

天府肉鸭胸腺淋巴细胞增殖与凋亡的增龄变化

方 静, 崔恒敏*, 陈正礼, 唐 丽

(四川农业大学动物医学院, 雅安 625014)

摘 要: 将 65 只天府肉鸭分为 13 个组, 即 22、24、26 天胚龄, 胚后 0(新生雏)、3、5、8、14、17、20、26、29、32 周龄; 采用增殖细胞核抗原(PCNA)和半胱天冬酶-3(Caspase-3)免疫组织化学方法及光镜和电镜技术研究其胸腺胚胎及胚后发育期淋巴细胞增殖与凋亡的增龄变化规律。结果可见, 各组胸腺中均可见 PCNA 和 Caspase-3 阳性反应淋巴细胞。胸腺小叶皮质和髓质淋巴细胞增殖率在 22~26 天胚龄逐渐下降, 在胚后 0~3、8~17、26~32 周龄无明显变化, 在 5、8、20 和 26 周龄显著下降; 各组皮质淋巴细胞增殖率均明显高于髓质。胸腺小叶皮质和髓质淋巴细胞凋亡率在 22~26 天胚龄无明显变化, 0~8 周龄逐渐升高, 8~17 周龄恒定, 20~32 周龄呈上升趋势; 各组皮质淋巴细胞凋亡率均明显高于髓质。凋亡淋巴细胞核呈多种形态, 线粒体肿胀, 嵴断裂; 可见巨噬细胞吞噬凋亡小体的现象。淋巴细胞增殖与凋亡在天府肉鸭胸腺胚胎及胚后发育过程中普遍存在, 具有明显增龄变化特性, 协同参与胸腺发育和退化过程。

关键词: 天府肉鸭; 胸腺; 细胞凋亡; 细胞增殖; 增龄变化

中图分类号: S852.1

文献标志码: A

文章编号: 0366-6964(2014)02-0305-08

Age-related Changes in the Lymphocyte Proliferation and Apoptosis of the Tianfu Duck Thymus

FANG Jing, CUI Heng-min*, CHEN Zheng-li, TANG Li

(College of Animal Veterinary, Sichuan Agricultural University, Ya'an 625014, China)

Abstract: This experiment was conducted to study the age-related changes in the lymphocyte proliferation and apoptosis during the embryonic and post embryonic development of the Tianfu duck thymus. Sixty five Tianfu ducks were divided into 13 groups as follows: 22, 24 and 26 days embryonic stage, and 0 (neonatal stage), 3, 5, 8, 14, 17, 20, 26, 29 and 32 weeks after hatching. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Caspase-3 immunohistochemistry and light, electron microscopy techniques were used in this study. The results showed that PCNA and Caspase-3 positive lymphocytes were distributed in the thymus. The proliferative rates of thymic lymphocytes in the cortex and medulla decreased significantly from 22-26 days embryonic stage, and kept stable from 0-3, 8-17 and 26-32 weeks after hatching, but markedly decreased on 5, 8, 20 and 26 weeks after hatching. In the same age group, the proliferative rate of lymphocyte in the cortex was higher than that in the medulla. The apoptosis rates of thymic lymphocytes in the cortex and medulla kept unchanged from 22-26 days embryonic stage, then increased from 0-8 weeks after hatching, and kept stable from 8-17 weeks, but rose continually from 20-32 weeks. In the same age group, the apoptosis rate of lymphocytes in the cortex was higher than that in the medulla. The nuclei of apoptotic lymphocytes with swollen mitochondria and broken cristae mitochondriales presented different features. The apoptotic bodies were phagocytized by the macrophages. The proliferation

收稿日期: 2013-05-17

基金项目: 教育部长江学者和创新团队发展计划(0848)

作者简介: 方 静(1963-), 女, 四川昭觉县人, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事比较组织学研究, Tel: 0835-2885754, E-mail: fangjing4109@163.com

* 通信作者: 崔恒敏, E-mail: cuihengmin2008@sina.com

and apoptosis of lymphocytes exist universally during the normal embryonic and post embryonic development of the Tianfu duck thymus which undergoes obvious age-related changes, and then supervises and controls the development and regression of this organ cooperatively.

Key words: Tianfu duck; thymus; cell apoptosis; cell proliferation; age-related changes

胸腺是培育 T 淋巴细胞的重要场所,具有维持机体的正常免疫功能,并向周围淋巴器官输送淋巴细胞,同时决定周围淋巴器官的发育。胸腺在不同发育阶段其大小、组织结构和功能有很大的变化,而这种变化往往与淋巴细胞的选择性发育密切相关^[1]。研究胸腺发育过程中淋巴细胞增殖与凋亡变化的规律及相互关系对探讨胸腺发育和退化过程的相关机理,调节免疫器官发育,制定合理的免疫程序具有重要意义。目前有关禽类胸腺淋巴细胞正常凋亡和增殖已有一些报道,但主要集中在鸡,且集中在胸腺发育的某一特定时期^[1-6]。而鸭胸腺胚胎及胚后发育期淋巴细胞增殖和凋亡的动态研究还未见报道。

1 材料与方法

1.1 试验动物

选用四川农业大学种鸭场同批孵化和饲养的天府肉鸭,胚胎期分为 3 个组,即 22、24、26 天胚龄(d);胚后期分为 10 个组,即 0(新生雏)、3、5、8、14、17、20、26、29、32 周龄(w)。每组试验动物数为 5(胚胎期不分性别,胚后期均为雄鸭)。

1.2 光、电镜标本制作

分别采取鸭胚和雄鸭的胸腺,4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋,5 μm 连续切片,供光镜染色用。此外,在 22、26 天胚龄和胚后 3、5、8、14、32 周龄中分别再取胸腺组织 1~2 块,2.5%戊二醛固定,环氧树脂包埋,超薄切片,锇酸染色,用于透射电镜(H-600 型)下观察淋巴细胞凋亡的超微结构。

1.3 苏木素和伊红染色(HE)

石蜡切片脱蜡后,常规 HE 染色。

1.4 免疫组织化学染色

1.4.1 主要试剂 小鼠抗人增殖细胞核抗原(Proliferating cell nuclear antigen, PCNA)单克隆抗体(一抗)、兔抗半胱天冬酶-3(Caspase-3)多克隆抗体(一抗)、SABC 免疫组化染色试剂盒、DAB 显色试剂盒(购自武汉博士德生物工程有限公司)。

1.4.2 PCNA 免疫组化染色检测增殖细胞 免疫组化染色方法按试剂盒说明书进行,即石蜡切片脱蜡至水,3% H_2O_2 室温孵育,以消除内源性过氧化物

酶活性。pH 6.0 的枸橼酸缓冲液抗原热修复,加 5% BSA 封闭液后,加入 PCNA 单克隆抗体(1:100),4℃过夜。滴加生物素标记的二抗,37℃孵育 30 min,滴加 SABC 试剂,37℃孵育 30 min 后 DAB 显色。苏木素复染,常规脱水,透明,封片。以上各步骤均用 PBS 冲洗,同时另用 PBS 代替一抗作为阴性对照。PCNA 阳性反应物定位于细胞核,呈棕黄色。

1.4.3 Caspase-3 免疫组化染色检测凋亡细胞

免疫组化染色方法同 1.4.2,一抗稀释度为 1:100。免疫反应阳性物质呈棕黄色。

1.5 定量分析和统计学处理

每个胸腺标本间隔 200 μm 取 1 张切片,共取 3 张切片,每张切片随机选取胸腺小叶各 10 个进行阳性细胞计数(用江苏捷达 801 形态分析软件)。淋巴细胞增殖率或凋亡率 = 单位面积内 PCNA 或 Caspase-3 阳性淋巴细胞总数/单位面积内淋巴细胞总数 × 100%。单位面积为 0.001 mm²,相当于 1 000 倍下的视野范围。数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用单因素方差分析 *F* 检验和组间 *t* 检验。数据处理均用 SPSS11.5 软件,*P* < 0.05 有统计学意义。

2 结果

2.1 胸腺胚胎和胚后发育的组织结构

22 天胚龄,胸腺表面为一层结缔组织被膜,被膜向胸腺内部延伸,形成许多大小不等的胸腺小叶,其皮质和髓质已可分辨;髓质中可见弥散胸腺小体(diffuse Hassl's corpuscle, DHC)。这类胸腺小体大小差异极大,由数量不等的胸腺上皮细胞集聚形成。24 天胚龄,胸腺皮质部逐渐增大,细胞排列紧密;胸腺小叶中心区域的髓质相互融合贯通,髓质中分化出典型胸腺小体即哈氏小体(Hassl's corpuscle, HC),它由胸腺上皮细胞环抱而成,中央的胸腺上皮细胞明显角化,胞质强嗜酸性。26 天胚龄,胸腺组织结构发育趋于完善,皮质内细胞排列更为密集,小淋巴细胞数量增多;髓质内的淋巴细胞较少,主要为大、中淋巴细胞,排列较皮质疏松,胸腺上皮细胞清晰可见(图 1)。新生雏胸腺组织结构与 26 天胚龄相似,仅胸腺小叶皮质和髓质稍有增宽。胚

后 3~5 周龄,胸腺小叶显著增大,皮质部明显增宽,髓质部也迅速扩展变宽;DHC 和 HC 数量明显增多(图 2)。5~8 周龄胸腺小叶继续增大,但增大幅度较小。14~17 周龄,胸腺组织结构无明显变化,与 8 周龄相似(图 3)。20~32 周龄,胸腺小叶皮质和髓质进行性缩小,其中皮质缩小更为显著;DHC 体积明显增大,含较大的囊腔,其内可见大量强嗜酸性衰亡的细胞碎片(图 4)。可见,天府肉鸭胸腺胚后发育可分为继续发育期(0~8 周龄)、成熟持续期(14~17 周龄)、退化期(20~32 周龄),其中 3~5 周龄是胸腺发育的高峰期。

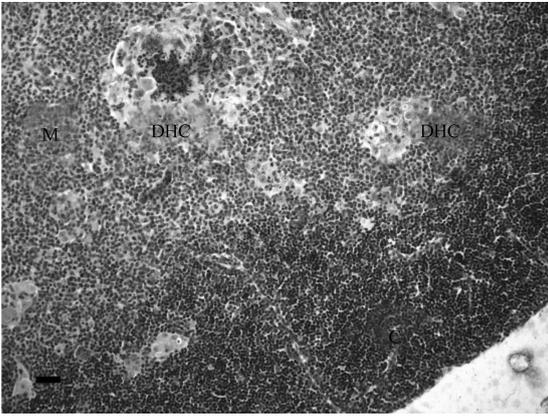


图 1 26 天胚龄胸腺,示胸腺小叶皮质(C)、髓质(M)和弥散胸腺小体(DHC);标尺=20 μm

Fig.1 The cortex (C), medulla (M) and diffuse Hassl's corpuscle (DHC) in the thymic lobule at 26 days embryonic stage; bar=20 μm

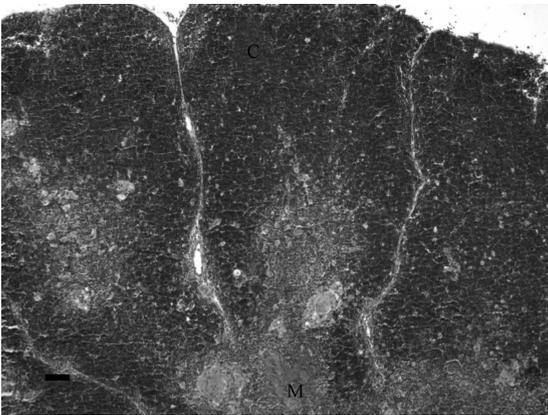


图 2 胚后 3 周龄胸腺,示胸腺小叶皮质(C)、髓质(M);标尺=40 μm

Fig.2 The thymic cortex (C) and medulla (M) at 3 weeks after hatching; bar=40 μm

2.2 PCNA 免疫组织化学

PCNA 免疫阳性反应定位于细胞核,呈棕黄色,阴性反应细胞核为蓝色;在阴性对照片中,所有

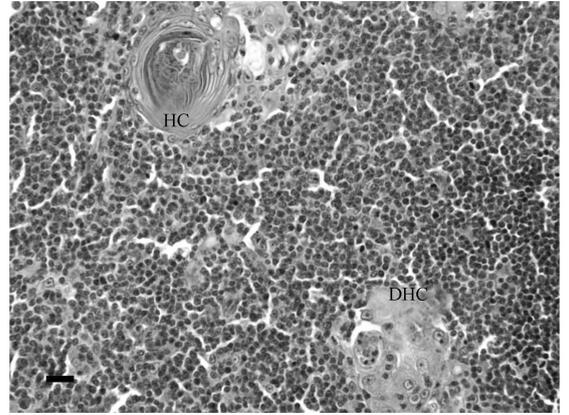


图 3 胚后 14 周龄胸腺,示胸腺小叶髓质及哈氏小体(HC)和弥散胸腺小体(DHC);标尺=10 μm

Fig.3 Hassl's corpuscle(HC) and diffuse Hassl's corpuscle (DHC) in the thymic medulla at 14 weeks after hatching; bar=10 μm

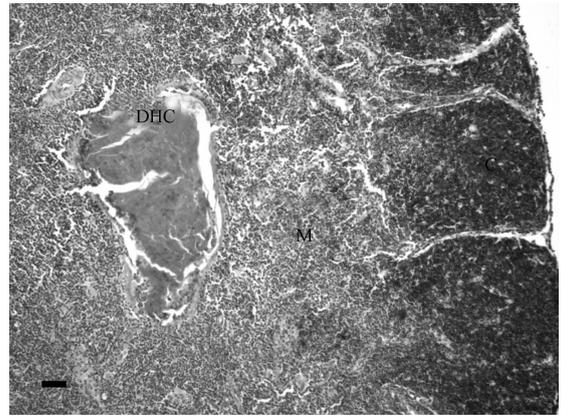


图 4 胚后 26 周龄胸腺,示胸腺小叶皮质(C)、髓质(M)和弥散胸腺小体(DHC);标尺=40 μm

Fig.4 The cortex (C), medulla (M) and diffuse Hassl's corpuscle (DHC) in the thymic lobule at 26 weeks after hatching; bar=40 μm

细胞核均为单一蓝色苏木素染色。各组胸腺中均可见 PCNA 阳性反应细胞,其中多为淋巴细胞,少数为胸腺上皮细胞(图 5~8)。由表 1 可见,22~26 天胚龄胸腺小叶皮质和髓质淋巴细胞增殖率逐渐下降($P<0.05$);与 26 天胚龄相比较,新生雏皮质淋巴细胞增殖率显著下降($P<0.05$),髓质淋巴细胞增殖率变化不大($P>0.05$)。皮质和髓质淋巴细胞增殖率在胚后 0~3、8~17 和 26~32 周龄无明显变化($P>0.05$),在 5、8、20、26 周龄显著下降($P<0.05$)。各组皮质淋巴细胞增殖率均明显高于髓质($P<0.05$),详情见表 1。构成 HC 的胸腺上皮细胞呈 PCNA 阴性反应;而组成 DHC 的外围胸腺上皮细胞偶见 PCNA 阳性反应(图 7)。

表 1 各组胸腺淋巴细胞增殖率和凋亡率

Table 1 The proliferative and apoptotic rates of the thymic lymphocytes in each group

%

组别 Group	增殖率 Proliferative rate		凋亡率 Apoptotic rate	
	胸腺小叶皮质 Cortex of thymic lobe	胸腺小叶髓质 Medullar of thymic lobe	胸腺小叶皮质 Cortex of thymic lobe	胸腺小叶髓质 Medullar of thymic lobe
	22d	80.74±9.14 ^a	64.41±10.06 ^a	5.64±0.57 ^a
24d	75.01±8.22 ^b	53.77±8.36 ^b	5.86±0.55 ^a	4.13±0.97 ^a
26d	63.30±6.85 ^c	43.09±5.57 ^c	5.76±0.42 ^a	4.73±1.38 ^a
0w	53.80±5.78 ^d	43.43±5.09 ^c	8.74±0.68 ^b	7.61±1.44 ^b
3w	53.99±5.72 ^d	42.29±6.18 ^c	12.74±1.65 ^c	10.48±2.03 ^c
5w	45.14±4.66 ^e	37.12±8.97 ^d	18.69±2.49 ^d	14.57±3.55 ^d
8w	33.53±7.40 ^f	15.22±3.46 ^e	23.26±2.50 ^e	17.73±2.45 ^e
14w	32.85±5.72 ^f	17.31±5.85 ^e	22.49±2.74 ^e	18.71±2.99 ^e
17w	34.87±7.04 ^f	17.18±3.11 ^e	23.24±4.50 ^e	18.00±3.00 ^e
20w	14.26±2.77 ^g	9.76±1.73 ^f	27.56±6.99 ^f	21.34±3.13 ^f
26w	8.91±0.50 ^h	4.07±0.78 ^g	32.32±6.61 ^g	24.45±3.60 ^g
29w	9.10±0.57 ^h	3.99±0.33 ^g	33.17±7.23 ^g	26.19±4.64 ^g
32w	9.25±1.32 ^h	3.74±0.51 ^g	37.32±4.31 ^h	28.90±5.07 ^h

在同一测定项目中,相同小写字母标注差异不显著($P>0.05$),不同小写字母标注差异显著($P<0.05$)

In the same tested item, the values followed by the same small letters are not different ($P>0.05$), and those followed by the different small letters are different between two groups ($P<0.05$)

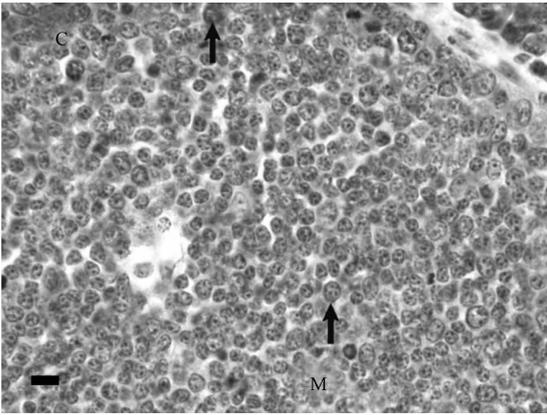


图 5 26 天胚龄胸腺小叶皮质(C)和髓质(M)淋巴细胞 PCNA 阳性反应(箭头); 标尺=5 μm

Fig. 5 PCNA positive reaction in the lymphocytes of thymic cortex(C) and medulla (M) at 26 days embryonic stage; bar=5 μm

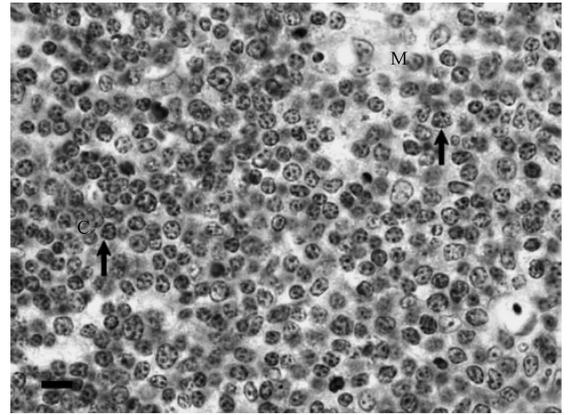


图 6 胚后 5 周龄胸腺小叶皮质(C)和髓质(M)淋巴细胞 PCNA 阳性反应(箭头); 标尺=5 μm

Fig. 6 PCNA positive reaction in the lymphocytes of thymic cortex(C) and medulla (M) at 5 weeks after hatching (arrow); bar=5 μm

2.3 Caspase-3 免疫组织化学

Caspase-3 免疫阳性反应呈棕黄色颗粒;在阴性对照片中,均为单一蓝色苏木素染色。各组胸腺中均可见 Caspase-3 阳性反应细胞,分布于胸腺小叶皮质和髓质,其中多为淋巴细胞,少数为胸腺上皮细胞;阳性反应物质定位于胞质和胞膜(图 9~12)。由表 1 可见,胸腺小叶皮质和髓质淋巴细胞凋亡率

在 22 d 较低,以后随胚胎发育无明显变化($P>0.05$);0 w 显著升高($P<0.05$),3~8 w 上升($P<0.05$),随后趋于恒定直到 17 w($P>0.05$),20 w 明显升高($P<0.05$),以后呈上升趋势,32 w 达其峰值。各组皮质淋巴细胞凋亡率均明显高于髓质($P<0.05$),详情见表 1。

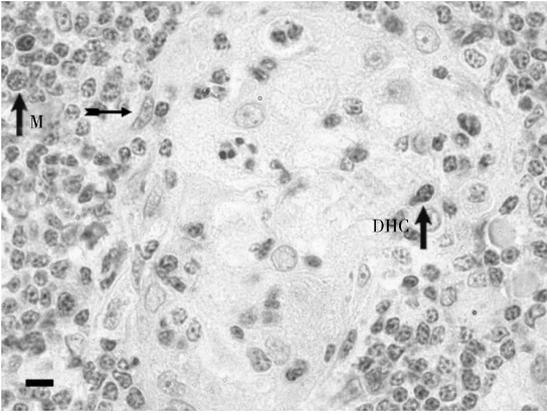


图 7 胚后 20 周龄胸腺小叶髓质淋巴细胞 (M)、DHC 中淋巴细胞 (箭头) 和胸腺上皮细胞 (有尾箭头) PCNA 阳性反应; 标尺 = 5 μ m

Fig. 7 PCNA reaction in the lymphocytes of the medulla (arrow) and DHC (arrow), and thymic epithelial cell (arrow with a tail) in DHC at 20 weeks after hatching; bar = 5 μ m

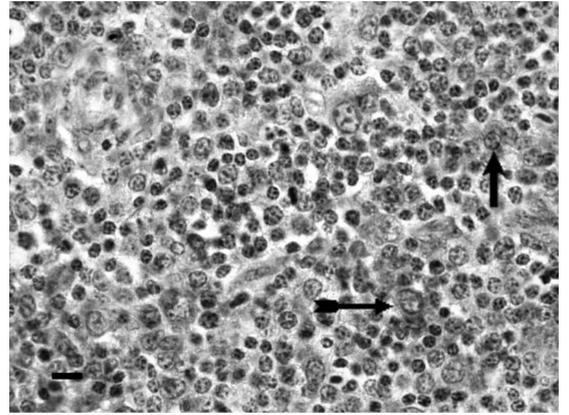


图 10 胚后 5 周龄胸腺, 示髓质中淋巴细胞 (箭头) 和胸腺上皮细胞 (有尾箭头) Caspase-3 阳性反应; 标尺 = 5 μ m

Fig. 10 The caspase-3 positive reaction of lymphocyte (arrow) and thymic epithelial cell (arrow with a tail) in the thymic medulla at 5 weeks after hatching; bar = 5 μ m

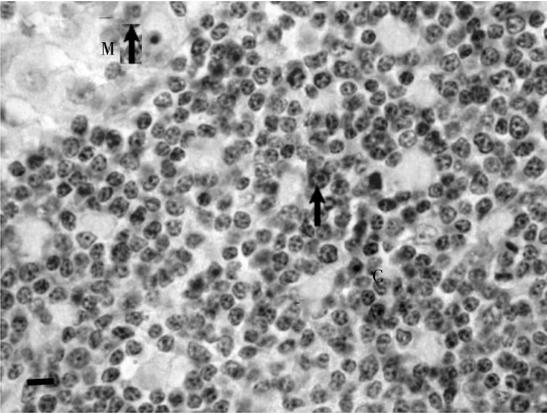


图 8 胚后 29 周龄胸腺小叶皮质 (C) 和髓质 (M) 淋巴细胞 PCNA 阳性反应 (箭头); 标尺 = 5 μ m

Fig. 8 PCNA positive reaction in the lymphocytes of thymic cortex (C) and medulla (M) at 29 weeks after hatching; bar = 5 μ m

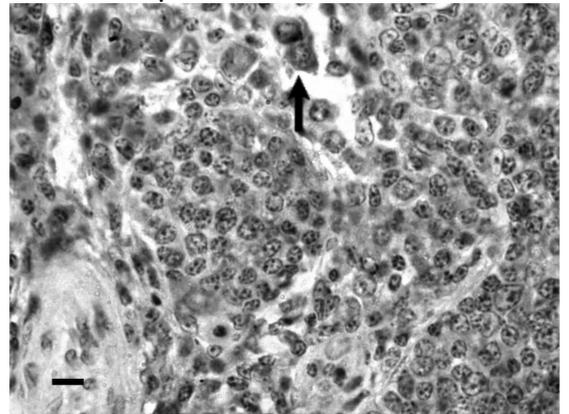


图 11 胚后 14 周龄胸腺, 示髓质中淋巴细胞 (箭头) Caspase-3 阳性反应; 标尺 = 5 μ m

Fig. 11 The caspase-3 positive reaction of lymphocyte (arrow) in the thymic medulla at 14 weeks after hatching; bar = 5 μ m

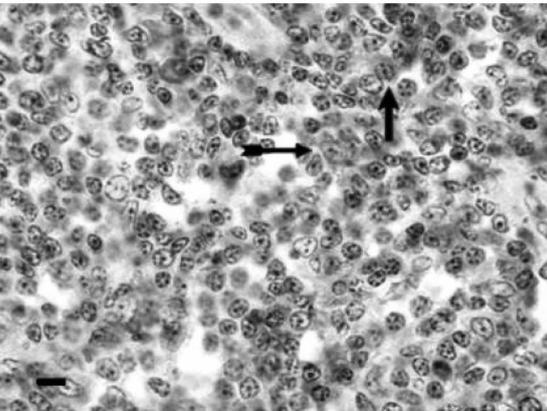


图 9 22 天胚龄胸腺, 示皮质中淋巴细胞 (箭头) 和胸腺上皮细胞 (有尾箭头) Caspase-3 阳性反应; 标尺 = 5 μ m

Fig. 9 The caspase-3 positive reaction of lymphocyte (arrow) and thymic epithelial cell (arrow with a tail) in the thymic cortex at 22 days embryonic stage; bar = 5 μ m

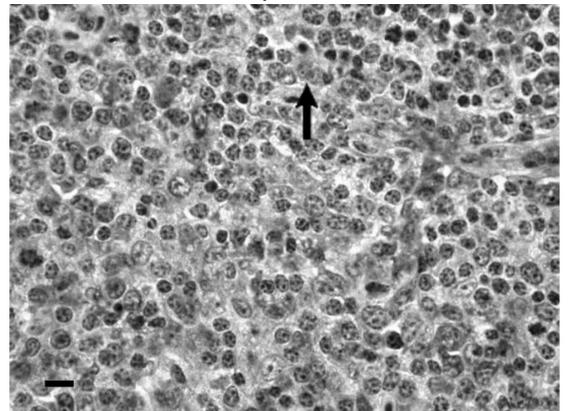


图 12 胚后 32 周龄胸腺, 示皮质中淋巴细胞 (箭头) Caspase-3 阳性反应; 标尺 = 5 μ m

Fig. 12 The caspase-3 positive reaction of lymphocyte (arrow) in the thymic medulla at 32 weeks after hatching; bar = 5 μ m

2.4 增殖率和凋亡率的关系

胸腺小叶皮质淋巴细胞增殖率在 22 d~17 w 远大于凋亡率($P<0.05$),在 20~32 w 则明显小于凋亡率($P<0.05$)。胸腺小叶髓质淋巴细胞增殖率与凋亡率的关系与皮质相似,但髓质淋巴细胞增殖率在 8 和 14 w 低于凋亡率($P<0.05$),在 17 w 与凋亡率无明显差异($P>0.05$),详情见表 1。

2.5 电镜观察

在胸腺各测定组中均观察到凋亡淋巴细胞,其中以 32 周龄中数量最多。凋亡淋巴细胞的形态学改变主要为核染色质固缩、边聚,呈新月形、圆斑状、C 形等高电子密度的浓缩核,线粒体肿胀,嵴断裂,最后凋亡细胞裂解为凋亡小体(图 13)。有时可见巨噬细胞吞噬凋亡小体或凋亡细胞的现象以及巨噬细胞中有大量已吞噬的,形态各异的凋亡小体(图 14)。

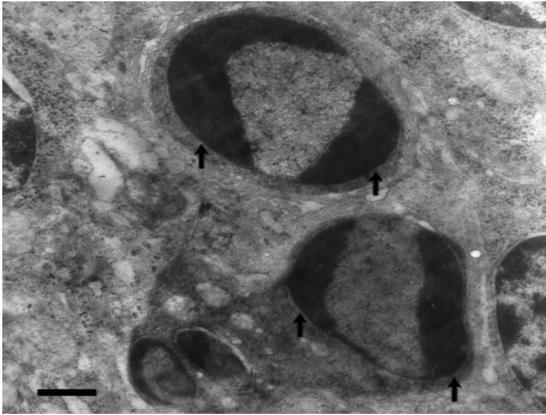


图 13 胚后 8 周龄胸腺,凋亡淋巴细胞核呈多个新月形(箭头);标尺=1 μm

Fig. 13 The apoptotic lymphocytes with crescent-shaped nuclei (arrows) in the thymus at 8 weeks after hatching; bar=1 μm

3 讨论

PCNA 是一种只出现在增殖状态细胞核中的蛋白质,是 DNA 聚合酶 δ 的蛋白辅助因子,是 36 ku 的多肽,其表达合成与细胞增殖周期相关,由 G_1 期开始,于 S 期达到高峰,至 G_2 期及 M 期则明显减少,PCNA 阳性细胞着色多少反映出细胞增殖的状态^[7]。因此本研究采用 PCNA 免疫组化染色来评价增殖细胞,通过 1.5 中所述方法获得增殖率。其结果显示在胸腺胚胎和胚后发育过程中均存在 PCNA 阳性淋巴细胞。22 天胚龄,胸腺皮质和髓质淋巴细胞增殖率最高,淋巴细胞增殖极为活跃,以后随

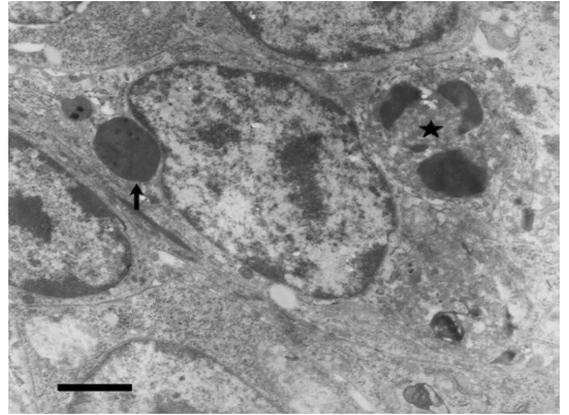


图 14 胚后 32 周龄胸腺,巨噬细胞正在吞噬凋亡小体(箭头),★示巨噬细胞中已吞噬的凋亡小体;标尺=1 μm

Fig. 14 The macrophage containing phagocytized apoptotic bodies (★) was phagocytizing an apoptotic body (arrow) in the thymus at 32 weeks after hatching; bar=1 μm

胚胎发育,胸腺组织结构的逐渐形成,增殖率呈下降趋势。新生雏胸腺已基本具有成熟的组织结构,增殖率显著降低;胚后 0~3 周龄增殖率变化不大,胸腺生长缓慢;胚后 3~5 周龄,增殖率下降,但下降幅度较小,仍维持较高水平,较多淋巴细胞处于增殖状态,胸腺生长十分迅速;8~17 周龄胸腺生长趋于稳定,增殖率在 8 周龄显著下降,并维持恒定直到 17 周龄;20~32 周龄胸腺逐渐退化,增殖率分别在 20 和 26 周龄再次出现下降高峰。以上结果说明,在胚胎及胚后发育过程中天府肉鸭胸腺淋巴细胞增殖具有明显增龄变化特性,与胸腺发育和退化密切相关。本研究还观察到各组皮质淋巴细胞增殖率均明显高于髓质,说明胸腺皮质在 T 淋巴细胞发育、分化中占有更为重要的地位,这符合 T 淋巴细胞在胸腺内的发育规律,即胸腺内分化发育的 T 淋巴细胞,90%位于皮质^[8]。

Caspase 是细胞凋亡的主要执行者,其导致的蛋白酶级联反应为选择性裂解底物天冬氨酸残基后,通过对蛋白激酶、核酸酶及细胞骨架的裂解,产生核皱缩、DNA 片段形成等凋亡现象,最终控制着凋亡的发生和发展^[9]。在 Caspase 家族的 14 个成员中,Caspase-3 是细胞凋亡中的关键酶。虽然在不同细胞或同一细胞受不同刺激诱发凋亡过程中,激活的 Caspase 不尽相同,但 Caspase-3 可能是凋亡信号传递的共同通路^[2,9]。因此本研究采用 Caspase-3 免疫组化染色来评价凋亡细胞,通过 1.5 中所述方

法获得凋亡率。其结果显示在胸腺胚胎和胚后发育过程中均存在 Caspase-3 阳性淋巴细胞。胚胎期胸腺小叶皮质和髓质淋巴细胞凋亡率变化不大;胚后 0~8 周龄胸腺继续生长,凋亡率逐渐升高;8~17 周龄胸腺已具备成熟的组织结构,生长趋于恒定,凋亡率无明显变化;20~32 周龄胸腺逐渐退化,凋亡率呈上升趋势。由此说明,天府肉鸭胸腺淋巴细胞凋亡在胚胎期不具有增龄变化特性,而在胚后期则表现出明显增龄变化规律,这一增龄变化规律与胸腺的胚后生长发育和退化密切相关。

本研究中观测到胚后期凋亡率较胚胎期高,说明胚后期胸腺淋巴细胞凋亡较胚胎期活跃,这一结论与固始鸡^[3]和来克亨 SPF 鸡^[1]相似。本试验发现在退化期(20~32 w)凋亡率呈上升趋势,并在 32 w 达到峰值,电镜观察结果也显示 32 周龄中凋亡淋巴细胞数量最多,表明鸭胸腺淋巴细胞凋亡在胸腺退化期最为活跃,这与 J. Gui 等^[10]的结论具有一致性,即与青年小鼠比较,老龄小鼠胸腺退化,胸腺细胞凋亡率明显增加。本研究还发现各组皮质淋巴细胞凋亡率均高于髓质,说明皮质淋巴细胞凋亡较髓质活跃;胸腺皮质在 T 淋巴细胞发育、分化中占有更为重要的地位。胸腺组织中,凋亡细胞多见于胸腺皮质,这可能与胸腺细胞分化的大部分阶段和分化细胞位于胸腺皮质,且胸腺细胞在发育过程中大部分通过凋亡的方式死亡有关。近年来大量研究证实不论是自然凋亡,还是诱导凋亡,胸腺细胞凋亡主要发生在胸腺皮质^[3,5,6,11],与本研究结论相似。但刘凯等^[12]的研究却显示人胚胎胸腺细胞凋亡主要发生在髓质。

关于胸腺细胞的凋亡有 2 种截然不同的观点:其一是胸腺内凋亡学说,即胸腺细胞是在胸腺内微环境条件下死亡,凋亡细胞被附近巨噬细胞原位吞噬^[13]。1980 年以来,一些学者用 TUNEL 方法提供了可靠的形态学证据,在胸腺原位发现存在死亡的细胞^[14]。李奎、李玉谷等^[3,5,6]用透射电镜观察了鸭、鹅、鸡胸腺内胸腺细胞自然凋亡的过程及巨噬细胞原位吞噬凋亡细胞的现象。C. D. Surh 等^[14]认为由于正常胸腺组织内凋亡细胞及凋亡小体被巨噬细胞迅速吞噬清除,所以,不易观察到凋亡细胞及凋亡小体。本研究透射电镜原位显示在胚胎及胚后发育过程中胸腺内均存在凋亡淋巴细胞,同时观察到巨噬细胞正在吞噬凋亡小体或凋亡细胞的现象,也可见巨噬细胞中有大量已吞噬的,形态各异的凋亡小

体,因此本试验支持上述观点。其二是胸腺外凋亡学说,即胸腺细胞是在胸腺内获得死亡信号,而在外周凋亡^[13]。还有的学者认为胸腺细胞同时存在胸腺内死亡和胸腺外死亡 2 种方式,其中一部分在胸腺原位死亡的,而另一部分是迁出胸腺后死亡溶解的^[13]。有关天府肉鸭胸腺中是否存在胸腺外凋亡,尚需进一步研究。

本研究结果显示,在 22~26 天胚龄胸腺小叶皮质和髓质淋巴细胞增殖率远大于凋亡率,说明淋巴细胞具有高分化潜力和增殖能力,有利于 T 淋巴细胞的增殖和最小死亡,以促进胸腺组织的胚胎发育。胚后 0~8 和 14~17 周龄分别是胸腺胚后继续发育和成熟持续期,增殖率也分别显著高于凋亡率(髓质在 8~17 w 除外),这表明淋巴细胞增殖也较活跃,有利于 T 淋巴细胞的增殖,促进胸腺胚后进一步发育和维持结构的稳定,这对出壳后以及成年鸭免疫调节和细胞免疫功能的发挥有极其重要的作用。20~32 周龄为胸腺退化期,凋亡率则显著高于增殖率,提示胸腺逐渐完成对 T 淋巴细胞的增殖,淋巴细胞以凋亡为主,有利于胸腺组织的退化。总之,细胞增殖与凋亡相互协调,及时调控淋巴细胞的增殖和分化,及时清除异常、衰老的淋巴细胞,在天府肉鸭胸腺发育和退化过程中发挥着重要的调控作用。

4 结 论

淋巴细胞增殖与凋亡在天府肉鸭胸腺胚胎及胚后发育过程中普遍存在,具有明显增龄变化特性,协同参与胸腺发育和退化过程。

参考文献:

- [1] 张书霞,陈万芳,于 勇,等. Bcl-2 基因在成年和胚胎鸡免疫器官中的表达及其与细胞凋亡的关系[J]. 南京农业大学学报,1999,22(4):65-68.
- [2] 张书霞,鲍恩东. 鸡免疫器官中半胱天冬酶-3、Bcl-2 的表达与细胞凋亡的关系[J]. 畜牧兽医学报,2002,33(6):619-622.
- [3] 李 奎,康相涛,刘 英,等. 固始鸡中枢免疫器官细胞和自然凋亡细胞超微结构研究[J]. 畜牧兽医学报,2007,38(1):89-95.
- [4] 李 奎,王永才,康相涛,等. 家禽免疫器官内细胞凋亡及其凋亡相关基因调控研究进展[J]. 动物医学进展,2008,29(6):76-79.
- [5] 李玉谷,辛朝安,李楚宣,等. 鸭胸腺细胞自然凋亡的

- 电镜观察[J]. 畜牧兽医学报, 2000, 31(6): 571-575.
- [6] 李玉谷, 辛朝安. 鹅胸腺细胞自然凋亡的电镜观察[J]. 中国兽医科技, 2001, 31(12): 35-37.
- [7] OGATA K, KURKI P, CELIS J E, et al. Monoclonal antibodies to a nuclear protein(PCNA/cyclin) associated with DNA replication[J]. *Exp Cell Res*, 1987, 168(2): 475-486.
- [8] 成令忠, 钟翠平, 莱文琴. 现代组织学[M]. 上海: 上海科学技术文献出版社, 2003.
- [9] 卢智勇, 卢智刚, 曾昭淳. Caspase-3 细胞定位信号的检测与分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2008, 24(6): 543-548.
- [10] GUI J, ZHU X, DOHKAN J, et al. The aged thymus shows normal recruitment of lymphohematopoietic progenitors but has defects in thymic epithelial cells[J]. *Int Immunol*, 2007, 19(10): 1201-1211.
- [11] 崔恒敏, 陈怀涛. 铜中毒对雏鸭免疫器官细胞凋亡影响的研究[J]. 畜牧兽医学报, 2005, 36(4): 370-375.
- [12] 刘 凯, 高英茂, 马金龙, 等. 人类胚胎胸腺细胞凋亡的定量研究[J]. 山东医科大学学报, 1997, 35(4): 296-299.
- [13] 冯继明, 吴江声. 胸腺细胞的胸腺外凋亡的形态学证据[J]. 解剖科学进展, 1997, 3(3): 217.
- [14] SURH C D, SPRENT J. T-cell apoptosis detected in situ during positive and negative selection in the thymus[J]. *Nature*, 1994, 372(6501): 100-103.

(编辑 白永平)