论著

文章编号:1000-5404(2010)16-1766-04

人胎阑尾淋巴组织及T、B淋巴细胞的发育

李 红,苏 敏,杨 宇,胡 蓉,黄 悦,许庭良,姜俸蓉 (550004 贵阳,贵阳医学院组织学与胚胎学教研室)

【摘要】 **目的** 探讨人胎阑尾内淋巴组织的发生以及T、B细胞的发育。**方法** 经孕妇本人知情同意收集人胎阑尾26例,HE染色观察微细结构,免疫组织化学SABC法和S-P法染色显示T、B细胞,用BioMiaspro图像分析软件进行计数。**结果** HE染色9周胎儿阑尾管壁4层结构尚未分化形成,上皮为复层柱状,间充质内有单个淋巴细胞散在分布;11周上皮内偶见单个淋巴细胞浸润,间充质内淋巴细胞较前略多;13~15周上皮内淋巴细胞浸润明显,初级淋巴小结雏形形成;16~20周管壁内初级淋巴小结及弥散淋巴组织明显;21~28周淋巴小结初级数量增多,尤以28周明显。免疫组化染色9周间充质内出现少量IgM阳性细胞;11周出现CD3阳性细胞;15周IgM阳性反应细胞聚集开始形成淋巴小结,小结内CD3阳性反应细胞数量少;随胎龄增加,淋巴小结数量增多,IgM阳性反应细胞和CD3阳性反应细胞数量也逐渐增多($P<0.01$,$P<0.05$)。**结论** 人胎阑尾淋巴组织发生的过程中,9周即有B细胞迁入,而T细胞在11周迁入,B细胞的发育早于T细胞。随胎龄增加,T、B细胞数量逐渐增多。

【关键词】 人胎;阑尾;B细胞;T细胞
【中图法分类号】 R321.5;R322.45;R392.12 【文献标志码】 A

Histogenesis of lymphoid tissue and development of T and B lymphocytes in human fetal appendix

Li Hong, Su Min, Yang Yu, Hu Rong, Huang Yue, Xu Tingliang, Jiang Fengrong (Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical University, Guiyang, Guizhou Province, 550004, China)

【**Abstract**】 **Objective** To investigate the histogenesis of lymphoid tissue and the development of T and B lymphocytes in human fetal appendix. **Methods** Totally 26 samples of human fetal appendix from the fetus at the 9th to 28th gestational week were collected with informed consent signed by the fetus' parents. The morphology of the tissues was observed by hematoxylin and eosin (HE) staining. T and B lymphocytes were identified by immunohistochemistry using the streptavidin-peroxidase and SABC methods. The immunoreactive positive-cells were counted using BioMiaspro image analysis software. **Results** HE-staining showed that the 4 layers of the appendix were not formed at gestational week 9. The epithelium of the appendix was stratified columnar epithelium. There were rare and diffused lymphocytes among mesenchymal cells. At week 11, the lymphocytes were appeared in the epithelium. The amounts of lymphocytes were increasing slightly in the mesenchyme with the elapse of gestational time. The lymphocytes were obviously infiltrated into the epithelium from week 13 to 15. The primary nodules were consisted of a group of lymphocytes. From 16 to 20 week, the primary lymphoid nodules and diffuse lymphoid tissue were seen obviously. At gestational week 21 to 28, the number of primary nodules gradually increased with fetal age, reaching the peak at week 28. Immunohistochemistry indicated that there were few IgM-positive cells were observed in the mesenchyme. At gestational week 11, CD3-positive cells were seen. At week 15, the primary lymphoid nodule were appeared which were gathered by many IgM-positive cells and a small quantity of CD3-positive cells. From 17 to 28 gestational weeks, the amounts of the primary lymphoid nodules and the 2 types of positive-cells were increased gradually with fetal age ($P<0.01$, $P<0.05$). **Conclusion** B cells present at the gestational week 9 and prior to T cells by 2 weeks in the appendix. The number of 2 types of positive cells are gradually increased with fetal age.

【**Key words**】 human fetus; appendix; T lymphocytes; B lymphocytes

Supported by the Natural Foundation of Department of Education of Guizhou Province(2002116). Corresponding author: Su Min, Tel: 86-851-6908567, E-mail: summ30@163.com

【基金项目】 贵州省教育厅自然科学研究项目(黔教科2002116)
【通信作者】 苏 敏,电话:(0851)6908567,E-mail:summ30@163.com

阑尾管壁内有着丰富的淋巴组织,在消化管免疫过程中起重要作用[1,2]。已有的研究中对人胎阑尾的结构、功能和组织发生以及对人胎时期淋巴细胞何时迁移进入阑尾及其在阑尾内的分布,对 T、B 细胞的发育时序,阑尾内是否存在产生 IgM 的细胞等问题学者们尚有不同认识,且报道也较少[3-5]。本研究用形态学方法对人胎阑尾淋巴组织的发生以及 IgM 阳性 B 细胞、CD3 阳性 T 细胞的迁入、分布及定位进行探讨,以期对上述问题有较多了解,为胃肠道免疫防御机制的研究提供一定的形态学基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

人胎标本来源于贵阳市各医院因故中止妊娠的人胎 26 例(每例标本均征得孕妇本人知情同意)。兔抗人 CD3 单克隆抗体来源于福州迈新生物技术开发公司,山羊抗人免疫球蛋白 M(IgM)来源于武汉博士德生物制药公司,S-P 免疫组织化学染色试剂盒由北京中杉金桥生物技术有限公司提供,其中试剂 A:内源性过氧化物酶阻断剂(endogenous peroxidase blocking solution),试剂 B:正常非免疫动物血清(normal nonimmunonen serum),试剂 C:生物素标记的第二抗体(bioton-conjugated second antibody),试剂 D:链酶菌抗生物素蛋白-过氧化酶(streptavidin-peroxidase),SABC 试剂盒由武汉博士德生物制药公司提供。

1.2 方法

1.2.1 人胎胎龄计算 所有人胎标本均测量顶臀长(crown-rump length,CRL),按 Patten 标准确定胎龄:9 ~ 12 周 4 例,CRL 为 39.0 ~ 79.0 mm(其中 9 周 +2 d 1 例,11 周 +3 d 2 例,12 周 +2 d 1 例);13 ~ 20 周 10 例,CRL 为 91.0 ~ 185.0 mm(13 周 1 例,14 周 +3 d 1 例,15 周 1 例,16 周 1 例,17 周 +1 d 1 例,17 周 +2 d 1 例,18 周 1 例,20 周 2 例,20 周 +2 d 1 例);21 ~ 28 周 12 例,CRL 为 197.0 ~ 270.0 mm(21 周 1 例,22 周 1 例,23 周 1 例,24 周 1 例,24 周 +5 d 1 例,25 周 +5 d 1 例,26 周 1 例,26 周 +6 d 1 例,27 周 +1 d 1 例,28 周 1 例)。

1.2.2 取材、制片和染色 各例均取阑尾,用 10% Formalin 固定,经乙醇梯度脱水,透明,石蜡包埋,4 μm 连续切片、贴片,染色。常规 HE 染色观察人胎不同时期阑尾的淋巴组织发生。免疫组织化学 SABC 法染色显示 IgM 阳性 B 细胞,主要步骤如下:切片脱蜡下行入水,入 3% H_2O_2 10 min,蒸水洗 2 min × 3 次,热抗原修复 10 min,正常兔血清(1∶10)室温下 20 min,一抗(IgM 1∶400)4 ℃过夜,PBS 洗 2 min × 3 次,生物素化兔抗山羊 IgG 37 ℃孵育 20 min,PBS 洗 2 min × 3 次,SABC 37 ℃孵育 20 min,PBS 5 min × 3 次,DAB-H_2O_2 液显色,中性树胶封片。免疫组织化学 S-P 染色显示 CD3 阳性 T 细胞,主要步骤如下:切片脱蜡下行入水,PBS 洗 3 min × 3 次,热抗原修复 10 min,试剂 A 室温 10 min,PBS 洗 3 min × 3 次,试剂 B 室温下 10 min,一抗(CD3 1∶50)4 ℃过夜,PBS 5 min × 3 次,试剂 C 室温 10 min,PBS 3 min × 3 次,试剂 D 室温下 10 min,PBS 洗 3 min × 3 次,DAB-H_2O_2 液显色,中性树胶封片。阴性对照:在免疫组织化学染色 SABC 法和 S-P 法中均用 PBS 缓冲液代替特异性抗血清,余步骤同前。

每胎龄段标本随机取非连续切片 5 张,应用 BioMias 29 图像分析系统进行检测,在高倍镜下(物镜 40 倍)每张切片随机取 3 个视野,分别计数每个视野内的 CD3 阳性细胞及 IgM 阳性细胞数。

1.3 统计学处理

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 11.5 统计软件进行单因素方差分析,组间两两比较用 q 检验。

2 结果

2.1 HE 染色

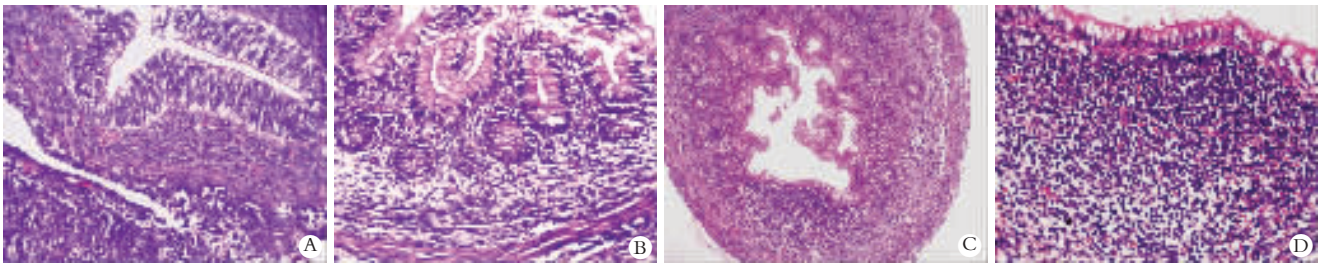
9 周阑尾已呈管状,腔小,腔面为复层柱状上皮,细胞排列紧密,呈高柱状,细胞核较大,杆状,染色深,胞质少。上皮外由间充质构成,细胞形状不规则,核椭圆形,着色淡。间充质细胞间有单个淋巴细胞散在分布。11 周阑尾腔狭小,几乎被上皮细胞所填充,腔面可见短小绒毛,复层柱状上皮局部脱落逐渐演变为单层柱状,杯状细胞开始出现,上皮间偶见单个淋巴细胞浸润。间充质内淋巴细胞单个散布于固有层内,数量较前略多;靠外层部位出现环形肌层,将间充质分隔成两部分,内侧为黏膜和黏膜下层,外侧为浆膜(图 1A)。13 ~ 15 周阑尾黏膜层明显,可见明显的绒毛和肠腺,上皮已经完全演变成为单层柱状,浆膜结构清楚。散在分布的淋巴细胞增多,上皮内淋巴细胞浸润明显,15 周淋巴小结雏形形成,纵行肌层开始出现(图 1B)。16 ~ 20 周黏膜下淋巴细胞较前增多,上皮内淋巴细胞浸润较前减少,在淋巴细胞之间可见高内皮微静脉。绒毛开始融合,黏膜可见体积较小的球团状淋巴小结。黏膜肌层明显,黏膜下层中淋巴细胞聚集形成弥散淋巴组织。21 ~ 28 周胎儿阑尾腔逐渐变大,绒毛短,逐渐消失,固有层和黏膜下层内有明显的淋巴小结,体积较前增大,未见生发中心,为初级淋巴小结,小结附近腺体较少(图 1C、D)。

2.2 免疫组织化学染色 SABC 法和 S-P 法染色

IgM 和 CD3 分别为 B 细胞和 T 细胞的特异性标志物,IgM 和 CD3 阳性细胞棕褐色的阳性反应物均表达在胞质内或胞膜上,细胞核内不表达。9 周人胎阑尾间充质内出现 IgM 阳性细胞,数量少,单个分布,棕褐色的阳性反应产物出现在胞膜上和胞质中(图 2A)。随胎龄增加,细胞数量逐渐增多。15 周可见 IgM 阳性反应细胞聚集成团(图 2B),17 周细胞数量明显增多,主要分布在固有层和黏膜下层内,23 周细胞聚集呈明显小结状或弥散分布(图 2C)。随着胎龄增长,小结数量增多。11 周人胎阑尾中出现了 CD3 阳性细胞,单个分布(图 2D),13 ~ 20 周,CD3 阳性细胞增多,散在分布,反应增强(图 2E),23 周可见 CD3 阳性细胞分布在小结处,数量较 IgM 阳性细胞少(图 2F)。26 周以后,CD3 阳性反应细胞增多明显。

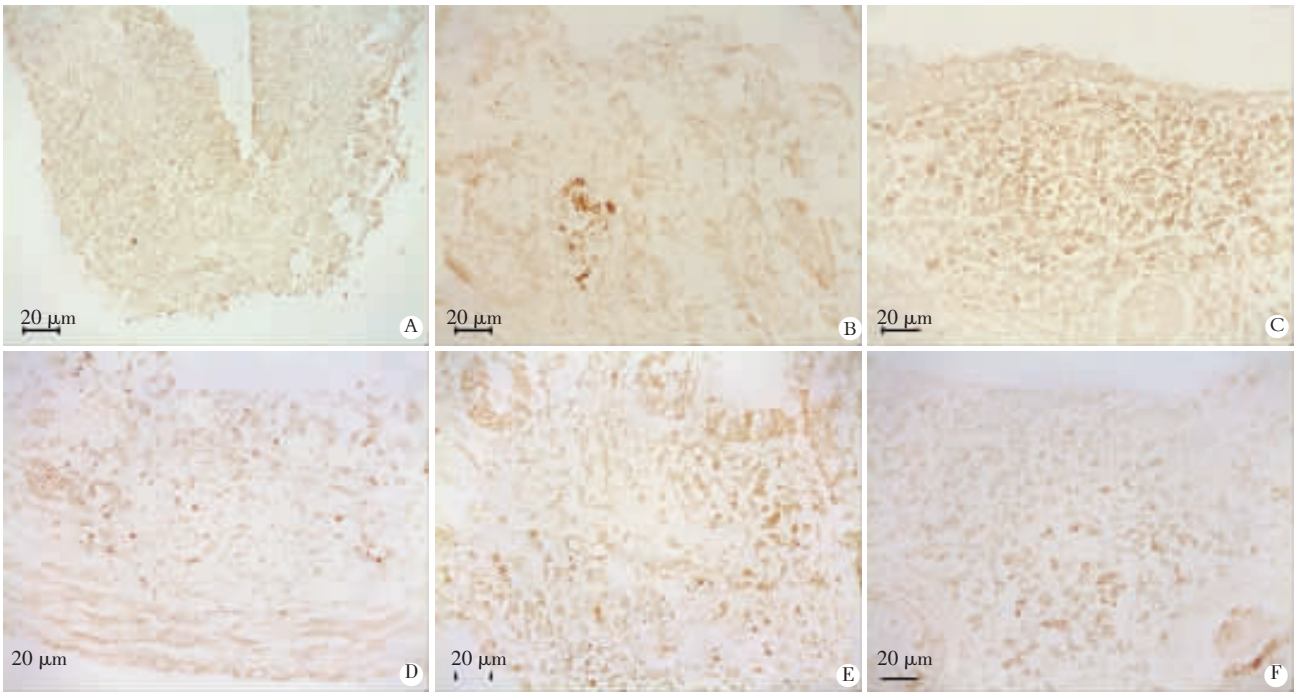
2.3 细胞计数

IgM 阳性反应细胞和 CD3 阳性反应细胞随胎龄的增长,数量逐渐增多,尤以 28 周明显,差异具有统计学意义($P < 0.01$,$P < 0.05$,表 1)。



A:11周,上皮为复层柱状,环形肌出现(×400);B:14周,绒毛和肠腺明显,出现较多淋巴细胞(×400);C:23周,示初级淋巴小结(×100);D:23周,示初级淋巴小结(×400)

图1 人胎发育不同阶段阑尾淋巴组织HE染色观察



A:9周,散在单个分布的IgM阳性细胞(SABC);B:15周,IgM阳性细胞聚集成群(SABC);C:23周,示IgM阳性细胞聚集形成的初级淋巴小结(SABC);D:11周,散在单个分布的CD3阳性细胞(S-P);E:15周,示CD3阳性细胞散在分布(S-P);F:23周,示CD3阳性细胞参与构成淋巴小结,数量较IgM阳性细胞少(S-P)

图2 免疫组化染色观察人胎发育不同阶段阑尾淋巴组织内IgM阳性B细胞和CD3阳性T细胞的发育

表1 人胎发育不同阶段阑尾淋巴组织中IgM和CD3阳性细胞计数比较($\bar{x} \pm s$)

细胞类型	9~12周	13~20周	21~28周
IgM阳性细胞	4.800 0±2.588 4	29.800 0±11.777 1[a]	74.400 0±16.501 5[b]
CD3阳性细胞	2.600 0±1.140 1	16.800 0±8.167 0[a]	58.600 0±13.427 5[b]

a:$P<0.01$,与9~12周比较;b:$P<0.05$,与13~20周比较

3 讨论

阑尾是大肠的一部分,其管壁内含有丰富的淋巴组织,是肠相关淋巴组织的重要组成部分,其结构及功能一直为研究者们所关注[6-8]。人胎阑尾淋巴组织的发生与胎儿免疫功能的建立有着密不可分的关系[9,10]。本实验观察到,人胎阑尾壁9周出现单个散在分布淋巴细胞,11周上皮内即有淋巴细胞浸润,13~15周淋巴小结雏形形成,均较梁文妹等[11]报道提前,提示人胎阑尾淋巴组织的发生在器官系统原基建立后即开始进行,发育时间较早,随着胎龄的增加,淋巴组织在形态上达到进一步的成熟。另外,本实验观察到16周以后,淋巴细胞上皮浸润现象逐渐不明显,推测可能由于上皮内淋巴细胞迁移进入了阑尾腔所致。

胎儿消化道免疫功能的完善,密切依赖于B细胞和T细胞的发育[12,13]。B细胞通过特异的克隆扩增,产生抗体发挥效应;T细胞分化为效应细胞,识别并直

接杀伤表达有特异抗原的靶细胞以实现免疫防御的功能[14-16]。本实验用免疫组织化学染色证明了 9 周人胎阑尾内就存在着 IgM 阳性细胞,数量少,分布在阑尾间充质细胞间。有研究表明,12 周胎儿血液中的 B 细胞已有 IgM 受体,发生宫内感染时,抗原与此受体结合后,B 细胞分裂形成分泌 IgM 的浆细胞,对付抗原[17]。而从我们的结果可以看出,9 周起,胎儿阑尾内已有 IgM 受体,可与抗原结合产生抗体发挥效应,到 11 周以后逐渐发生混合淋巴细胞反应,从而参与胎儿时期消化道免疫。

CD3 是 T 细胞的表面标志,表达于所有成熟 T 淋巴细胞表面,代表成熟 T 淋巴细胞总数[18,19]。T 细胞是很重要的免疫调节细胞[20],有研究证实,肠黏膜成熟 T 细胞数量减少,可导致肠黏膜免疫功能的降低[21]。因此,T 细胞的发育是消化道免疫功能建立不可缺少的部分。本研究发现 11 周后阑尾内才出现 CD3 阳性反应细胞,说明 B 细胞的发育早于 T 细胞,B 细胞要比 T 细胞定居于阑尾管壁的时间早,这可能与中枢淋巴器官的发育时序有关;同时阑尾免疫功能的建立,体液免疫早于细胞免疫。在 IgM 免疫组化染色中,15 周我们发现有多个阳性细胞聚集在一起,证实了淋巴小结的雏形是由 B 细胞为主聚集而成。16 周后经 IgM 和 CD3 免疫组化染色邻片对比发现,小结中主要是 IgM 阳性反应 B 细胞,而 CD3 阳性反应 T 细胞数量较少,这与淋巴结、脾等淋巴器官内 T、B 淋巴细胞的分布规律相一致[13,22]。阑尾所参与组成的肠道回盲部的淋巴组织密度在消化管中最大,是消化管最主要的免疫功能部位。有人曾预测未来的疫苗主要经肠道免疫,原因是肠壁为机体最大的免疫器官,黏膜产生的抗体远远多于体液中的抗体[23],本研究结果支持这一预测。

参考文献:

[1] 封彦青. 阑尾功能新认识对阑尾炎防治影响研究[J]. 当代医学:学术版, 2008, (13):19-21.

[2] Hitotsumatsu O, Hamada H, Naganuma M, *et al*. Identification and characterization of novel gut-associated lymphoid tissues in rat small intestine[J]. J Gastroenterol, 2005, 40(10):956-963.

[3] Pospisil R, Mage R G. B-cell superantigens may play a role in B-cell development and selection in the young rabbit appendix[J]. Cell Immunol, 1998, 185(2):93-100.

[4] Yamagiwa S, Sugahara S, Shimizu T, *et al*. The primary site of CD4-8- B220 + alphabeta T cells in lpr mice:the appendix in normal mice[J]. J Immunol, 1998, 160(6):2665-2674.

[5] Pospisil R, Mage R G. Rabbit appendix:a site of development and selection of the B cell repertoire[J]. Curr Top Microbiol Immunol, 1998, 229:59-70.

[6] 束弋, 王健伟. 肠道黏膜免疫系统的研究进展[J]. 微生物与感染, 2007, 2(1):59-62.

[7] Hamada H, Hiroi T, Nishiyama Y, *et al*. Identification of multiple isolated lymphoid follicles on the antimesenteric wall of the mouse small intestine[J]. J Immunol, 2002, 168(1):57-64.

[8] Sansonetti P J. War and peace at mucosal surfaces[J]. Nat Rev Immunol, 2004, 4(12):953-964.

[9] 梁文妹, 石爱荣, 何素云. 人胎阑尾 IAPP-、SS-及 5-HT 免疫反应性细胞的免疫组织化学研究[J]. 解剖学报, 1998, 29(4):438-440.

[10] 雷天晓, 刘江舟, 康照昌. 几种先天性畸形胎儿阑尾的解剖及组织学观察[J]. 湖北职业技术学院学报, 2007, 10(1):102-104.

[11] 梁文妹, 何素云. 人阑尾的组织发生[J]. 解剖学报, 1990, 21(2):210-214.

[12] 苏敏, 胡蓉, 李红, 等. CD3 和 CD8 免疫反应阳性细胞在人胎回肠的发育[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(35):3606-3610.

[13] 李红, 苏敏, 胡蓉, 等. 人胎肠系膜淋巴结组织发生及相关 T、B 细胞的发育[J]. 解剖学杂志, 2009, 32(2):183-186.

[14] 张有聪, 刘淑英. T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞的研究进展[J]. 畜牧与饲料科学, 2006, (5):75-78.

[15] 弓鸿飞, 殷国荣. 肠上皮内淋巴细胞抗弓形虫感染的免疫功能研究进展[J]. 国际医学寄生虫病杂志, 2006, 33(4):202-205.

[16] 张利利, 郑鹏远, 罗予, 等. 双歧杆菌对食物过敏小鼠肠道屏障功能及 Th1/Th2 细胞因子的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2009, 17(11):1091-1097.

[17] 杜涛, 方群. 胎儿淋巴细胞的发育和功能[J]. 国外医学:妇产科学分册, 2005, 32(2):94-97.

[18] Durandy A. Development of specific immunity in prenatal life[J]. Arch Pediatr, 2001, 8(9):979-985.

[19] 邓峰, 朱清仙, 黎静, 等. 人胎儿小肠上皮内淋巴细胞的发育[J]. 中国体视学与图像分析, 2000, 5(3):157-161.

[20] 王成秀, 符州, 谢琴, 等. 50 例危重新生儿 T 细胞亚群及免疫抗体的检测[J]. 第三军医大学学报, 2007, 29(24):2360, 2366.

[21] 任宏宇, 邹开芳. 炎症性肠病肠黏膜组织内淋巴细胞激活和效应应答[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16(28):3178-3180.

[22] 黄守雄, 周凡, 王若愚, 等. 人胎脾交错突细胞对 T, B 淋巴细胞发育影响的免疫组织化学研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志, 1997, 6(3):273-279.

[23] 王雯慧, 陈秋生, 陈怀涛, 等. 浆细胞在双峰驼消化管中的分布及形态特征[J]. 中国兽医科技, 2000, 30(10):12-14.

(收稿 2010-03-05 修回 2010-04-30)

(编辑 张 维)