Bcl-2在人胎肠系膜淋巴结发育中的表达

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

[摘 要] **目的** 探讨Bcl-2免疫反应阳性细胞在肠系膜淋巴结组织发生过程中的分布及表达情况。**方法** 收集因故终止妊娠人胎回肠33例,采用免疫组织化学SABC法染色显示Bcl-2免疫反应阳性细胞,用BioMiaspro图像分析软件对免疫反应阳性细胞进行计数,有关数据做统计学分析。**结果** 9周胎龄人胎肠系膜淋巴结原基内开始出现极少的免疫反应阳性细胞,随胎龄的增长Bcl-2免疫反应阳性细胞数量随淋巴细胞数量增加而增加,尤以21~28周数量最多($P<0.05$)。Bcl-2阳性细胞早期散在分布,21周以后逐渐在淋巴小结聚集成团,在副皮质区呈集落样分布。随胎龄增长,Bcl-2免疫反应阳性强度略增加,13~20周Bcl-2免疫反应阳性强度最强($P<0.05$)。**结论** Bcl-2在人胎肠系膜淋巴结的组织发生过程中起重要的调节作用。

[关键词] Bcl-2;肠系膜淋巴结;人胎;发育

[中图分类号] R329.1;R714.51 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2010)03-0163-03

Expression of Bcl-2 in human fetal mesenteric lymph nodes during development

SU Min, LI Hong, HU Rong, HUANG Yue, XU Ting-liang, JIANG Feng-rong (Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical College, Guiyang Guizhou 550004, China)

Abstract: Objective To study the distribution and expression of Bcl-2-positive immunoreaction cells during the development of human fetal mesenteric lymph nodes. **Methods** 33 samples of human fetal mesenteric lymph nodes from the 9th to 28th gestational week (g. w) were collected. Bcl-2-positive cells were displayed by immunohistochemical SABC method. The immunoreactive positive-cells were counted with BioMiaspro photographs analysis software and analysised with statistics software. **Results** In the 9th g. w, there were rare Bcl-2-positive cells distributed in the anlage of human fetal mesenteric lymph nodes, Bcl-2-positive-cells were increasing gradually with multiplication of lymphocytes ($P<0.05$), especially the 9th to 28th g. w ($P<0.05$). Bcl-2-positive-cells were diffused distribution in the earlier period, and gradually gathered conglobation in the lymphoid nodule after 21th g. w, while formed colony in the para-cortical area. The immune reaction strength of Bcl-2-positive-cells were a little increased, especially 13th to 20th g. w were the most obviously ($P<0.05$). **Conclusion** Bcl-2 plays an imporntant adjusting role during the histogenesis of human fetal mesenteric lymph nodes.

Keyword: Bcl-2; mesenteric lymph nodes; human fetus; development

肠系膜淋巴结是肠相关淋巴组织(gut-associated lymphoid tissue, GALT)的重要组成部分,在肠道免疫功能调节过程中起重要作用[1]。胚胎淋巴结发育是一个特殊的生理过程,既存在着细胞的不断增殖,又存在着细胞的不断凋亡。在胚胎发育中两者的关系受各种生长因子或相关基因的调节与控制,研究胚胎发育中的细胞增殖与凋亡变化、相互关系及其相关蛋白的表达,对探讨胚胎正常发育过程的相关机理及预防胚胎发育过程中畸形事件的发生均具有重要意义[2]。目前,对凋亡基因或蛋白在免疫系统疾病中的分布及作用机制研究较多[3-4],但关于凋亡蛋白在人胎淋巴结发育过程中的表达、分布规律及作用机制的报道甚少[5]。本文通过研究Bcl-2蛋白在人胎肠系膜淋巴结中的表达以及其生长发育过程产生的变化趋势,探讨其在肠系膜淋巴结生长发育过程中的作用及意义,旨在更深入地认识其形态发生、发育的调控机制,并为肠相关淋巴组织的研究提供形态结构基础和理论依据。

1 材料与方法

1.1 胚胎收集与分组

收集因意外中止妊娠的人胎33例,标本来源于贵阳市各医院,每例标本均经孕妇本人同意。各例均测量顶臀长(crown-rump length, CRL),按Patten[6]标准确定胎龄(表1)。

表1 胎龄、顶臀长及例数分布

胎龄	n	顶臀长(mm)
9~12周	9	39.0~79.0
13~20周	13	91.0~185.0
21~28周	11	197.0~270.0

[基金项目] 贵州省教育厅基金资助项目(2002116)

[作者简介] 苏 敏(1971-),女,贵州省遵义市人,副教授,硕士,主要从事实验组织学和胚胎发生方面的研究。电话:(0851)6908567, E-mail:summ30@163.com

[收稿日期] 2010-04-08 [修回日期] 2010-04-30

1.2 方法

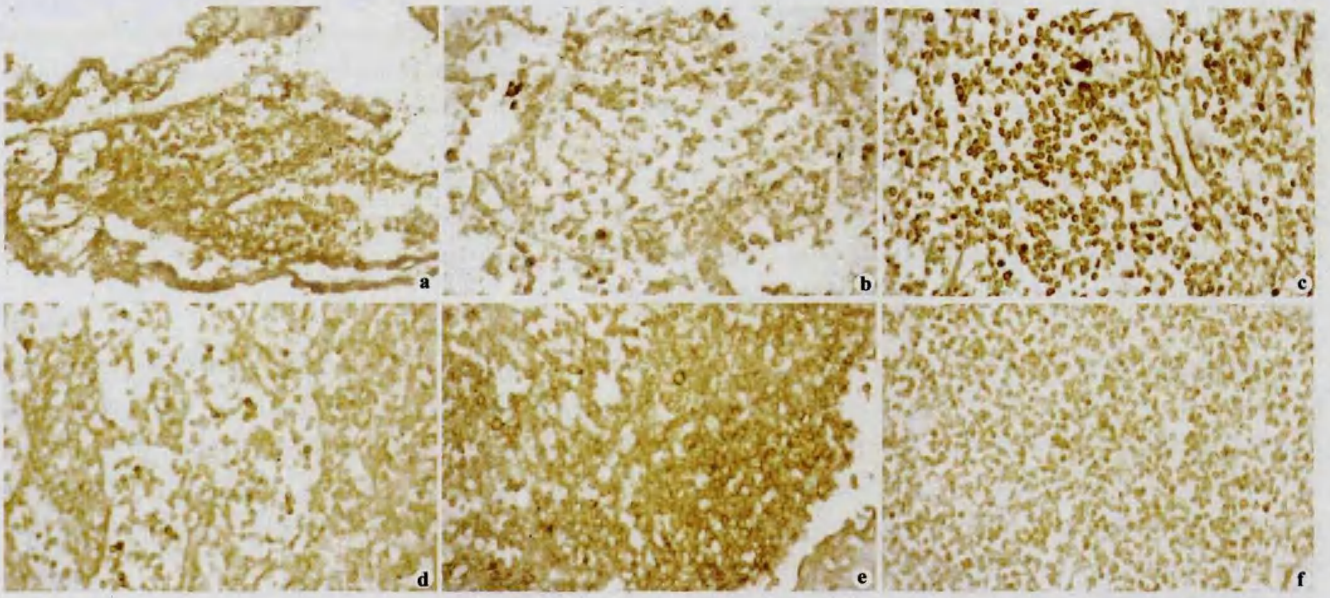
1.2.1 取材、制片和染色 从人胎腹腔内取出肠系膜淋巴结,4 ℃生理盐水洗净血液,10% Formalin 固定 24 h,流水冲洗 2 h,常规石蜡包埋。制成 4 μm 连续切片,免疫组织化学 SABC 法染色显示 Bcl-2 免疫反应阳性细胞,主要步骤:切片常规脱蜡入水,3% H_2O_2 室温 10 min,微波抗原修复,正常山羊抗小鼠血清封闭,滴加一抗(抗体浓度均为 1:200,Bcl-2 小鼠抗人单克隆抗体及其辅助试剂盒均购于武汉博士德生物制品有限公司),4 ℃过夜,生物素化山羊抗小鼠血清(1:100)37 ℃孵育 20 min,SABC(1:100)37 ℃孵育 20 min,DAB 显色(在以上各步之间均用 PBS 洗涤 5 min × 3),中性树胶封片,显微镜观察。阴性对照:均用 PBS 缓冲液代替特异性抗血清,其余步骤同前。

1.2.2 切片观察和统计学处理 每胎龄段标本随机取非连续切片 5 张,应用 BioMiaspro 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 Bcl-2 阳性细胞数;并测量各胎龄段灰度值。所有数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,并采用 SPSS11.5 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 Bcl-2 阳性细胞的分布和定位

经免疫组织化学 SABC 法染色后,切片上可见 Bcl-2 免疫反应阳性产物主要表达在细胞质或细胞膜上,呈黄色或褐黄色颗粒,细胞核不着色。9 周人胎肠系膜淋巴结原基内出现极少的 Bcl-2 免疫反应阳性细胞(图 1a),14 周人胎肠系膜淋巴结内可见 Bcl-2 免疫反应阳性细胞数量随淋巴细胞数量增多而增多,散在分布,在少数巨噬细胞和间充质细胞内也可见免疫反应阳性产物存在(图 1b),17 周人胎肠系膜淋巴结内 Bcl-2 免疫反应阳性细胞数量明显增多,在淋巴结皮质淋巴窦、浅层皮质、副皮质区和髓质内均可见 Bcl-2 免疫反应阳性细胞,呈强阳性(图 1c、d)。23 周人胎肠系膜淋巴结内初级淋巴小结形成的部位可见 Bcl-2 免疫反应阳性细胞聚集成球团状,在其深面的副皮质区可见 Bcl-2 免疫反应阳性细胞呈集落样(图 1e)。随胎龄增大,25 周以后 Bcl-2 免疫反应阳性细胞阳性反应程度有所减弱(图 1f)。



a:9 周 Bcl-2 阳性表达;b:14 周 Bcl-2 阳性细胞数量增多,散在分布,可表达在巨噬细胞和间充质细胞;c:17 周早期皮质内 Bcl-2 阳性表达;d:20 周髓质内 Bcl-2 阳性表达;e:23 周浅层皮质初级淋巴小结和副皮质区内的 Bcl-2 阳性表达;f:28 周 Bcl-2 阳性表达

图 1 不同胎龄人胎肠系膜淋巴结 Bcl-2 免疫反应阳性细胞(SABC 法染色 ×400)

2.2 细胞计数和灰度值比较

随胎龄增长,Bcl-2 阳性反应细胞数量逐渐增加,尤以 21 ~ 28 周数量最多,与 9 ~ 12 周及 13 ~ 20 周相比,差异有显著统计学意义($P < 0.05$),与 9 ~ 12 周相比,13 ~ 20 周和 21 ~ 28 周 Bcl-2 免疫反应阳性强度差异有显著统计学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 Bcl-2 阳性细胞数和灰度值比较($\bar{x} \pm s$)

胎龄	Bcl-2 阳性细胞数(个)	灰度值
9 ~ 12 周	5.9210 ± 1.6053	174.2913 ± 5.9765
13 ~ 20 周	56.4815 ± 28.9026*	154.2053 ± 7.5290*
21 ~ 28 周	120.1750 ± 28.2312*#	168.3814 ± 5.3876*#

*:与 9 ~ 12 周比较,$P < 0.05$;#:与 13 ~ 20 周比较,$P < 0.05$

3 讨论

在胚胎发育中，器官的形成总是在细胞迁移、诱导、增殖及凋亡变化中完成，并处于动态的平衡[7]。尤其是细胞凋亡，它是致畸因素导致胚胎异常发育的重要形式[8]。消化系统不仅是消化、吸收营养物质的场所，而且具有重要的免疫屏障功能。消化系统的免疫学屏障主要由肠相关淋巴组织和肠道粘膜免疫相关细胞构成，肠系膜淋巴结作为肠道相关淋巴组织中的一个重要组分，是机体免疫系统与外来抗原以及微生物较早接触的免疫器官，同时也是较早发生免疫反应的器官[9-11]，其通过分泌 IL-2、IL-5、IFN-α 和 IFN-γ 等淋巴因子，诱导肠上皮细胞参与粘膜免疫应答。因此，肠系膜淋巴结内淋巴细胞的增殖与凋亡的数量以及分布可以反映局部粘膜免疫建立情况及其免疫防御功能的完善程度。

Bcl-2 家族是目前用来研究细胞凋亡常用的一类调控基因。Bcl-2 家族包括 Bax、Bcl-2、Bak、Bcl-xl 等 4 个家族分子，其中 Bcl-2 为抑制凋亡基因，又称生存蛋白，具有抑制细胞凋亡的作用[12-14]，同淋巴细胞的发育有着密切的关系[15]。本实验结果表明，人胎在第 9 周至第 28 周龄段的生长发育过程中，Bcl-2 蛋白阳性表达细胞在肠系膜淋巴结中分布具有一定的规律性。即肠系膜淋巴结中的 Bcl2 阳性细胞随着胎龄的增大，其分布密度由胎儿发育早期的散在分布到 23 周明显聚集初级淋巴小结形成部位和副皮质区（胸腺依赖区）区域，数量由少到多，免疫反应强度具有明显差异。结果提示，在胎儿发育的早期阶段，肠系膜淋巴结原基内的间充质细胞和随血循环迁移而来的淋巴细胞在各种细胞因子作用下逐渐分化演变为肠系膜淋巴结内的淋巴细胞和其他免疫细胞，肠系膜淋巴结内的淋巴细胞正处于旺盛的分化、增殖时期。此时 Bcl-2 蛋白在肠系膜淋巴结实质内随着胎龄的增加而逐渐增多，这与李威等[16]报道的在小鼠早期胚胎发育过程中 Bcl-2 基因表达随胚胎发育的进程逐渐增加相一致。Bcl-2 蛋白可以减轻肠系膜淋巴结在发育过程中各种不利因素对淋巴组织细胞的损伤程度，保证淋巴组织、细胞按照自然程序正常发育，引起抗原分泌，淋巴因子释放，延长成熟淋巴细胞的寿命[15]，防止组织细胞过度凋亡事件的发生。到 21 周以后，随着肠系膜淋巴结结构日趋完善，Bcl-2 蛋白的阳性表达强度也有所减弱。本文推测这可能与肠系膜淋巴结的发育过程中不同阶段的生理功能有关。肠系膜淋巴结作为肠相关淋巴组织的一个重要组成部分，在早期发育阶段，淋巴组织处于最旺盛的分裂、分化、增殖阶段，细胞因分化、发育而逐渐进入肠系膜淋巴结内相应的皮质和髓质部位而继续发育，淋巴结因此体积逐渐增大。随着胎龄的增加，肠系膜淋巴结基本发育成形，淋巴循环的建立使得淋巴细胞和其他免疫细胞进行信息和营养的传递，而淋巴细胞的增殖、分化作用将随胎龄的增长逐渐减弱。本实验观察到在肠系膜淋巴结内少数巨噬细胞和间充质细胞内也可见免疫反应阳性产物存在，至少可以认为肠系膜淋巴结内淋巴细胞之外的其他免疫细胞也参与了淋巴结组织发生的全过程。但对其具体过程及相关机制仍需进一步探讨。

[参考文献]

[1] 吴翰桂，朱 诚，丁仁瑞. 肠道粘膜免疫研究进展[J]. 免疫学杂志，2000，16(3)：235－238.

[2] 刘学红，张金萍. Bcl-2 和 Bax 蛋白在人胚胎早期脊髓发育中的表达及意义[J]. 神经解剖学杂志，2008，24(2)：181－184.

[3] 黄江海，许淑媛. 粘膜相关淋巴组织淋巴瘤和凋亡[J]. 国际病理科学与临床杂志，2007，27(2)：133－136.

[4] Isaacson PG. Update on MALT lymphomas[J]. Best Pract Res Clin Haematol, 2005, 18(1): 57－68.

[5] 王 彤，刘存志，刘玉珍，等. bcl-2\bax 基因调控机体细胞的凋亡的机制研究进展[J]. 中国老年学杂志，2008，28(16)：1658－1660.

[6] Patten BM. Human Embryology[M]. 2th ed. New York: Blakistion, 1953. 47.

[7] 王浩宇，安 峰，吴靖芳，等. Bcl-2 与 P53 在腭发育及腭裂形成中的作用[J]. 毒理学杂志，2009，23(4)：267－270.

[8] Sukhotnik I, Bernshteyn A, Moqilner JG. The basic biology of apoptosis and its implications for pediatric surgery[J]. Eur J Pediatr Surg, 2005, 15(4): 229－235.

[9] 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.

[10] 张 晗，王瑞玲，赵 琪，等. 仔猪小肠母源抗体 IgG 的摄取与肠道淋巴组织发育的组织学研究[J]. 中国兽医杂志，2006，42(1)：7－10.

[11] 顾宪红，张宏福，佘锐萍，等. 断奶日龄对仔猪肠粘膜形态的影响[J]. 畜牧兽医学报，2001，32(4)：306－313.

[12] Coopersmith CM, Chang KC, Swanson PE, et al. Overexpression of Bcl-2 in the intestinal epithelium improves survival in septic mice[J]. Crit Care Med, 2002, 30(1): 195－201.

[13] Jacob T, Ascher E, Hingorani A, et al. Glycine prevents the induction of apoptosis attributed to mesenteric ischemia/reperfusion injury in a rat model[J]. Surgery, 2003, 134(3): 457－466.

[14] Reed JC. Bcl-2 and the regulation of programmed cell death[J]. J Cell Biol, 1994, 124(1-2): 1－6.

[15] 吴自勋，赵 彤. Bcl-2 基因与淋巴细胞发育[J]. 国外医学输血及血液学分册，1998，22(3)：133－135.

[16] 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.

（编辑：余汇洋）