

鸡胸腺微循环的初步研究

曾雪颜[†], 李维铨[†], 梁梓森, 剡海阔, 范小龙, 钟帆, 邓衔柏
(华南农业大学 兽医学院, 广东 广州 510642)

摘要:试验共选用(110±5)日龄健康湛江鸡10只,采用微循环观察仪对胸腺进行活体观察,通过做血管透明标本和组织切片的方法观察微血管总体走向、血管细微结构等.结果表明:胸腺的主要血液供应来自于迷走动脉,该动脉起自颈总动脉干的细小分支,其主干延伸至颈部内脏和颈中段的被皮,沿途再分支进入胸腺.该分支进入胸腺后,在接近腺体的中央部位发散形成血管树,经过实质形成毛细血管网.这些毛细血管垂直朝向胸腺表面,或加入浅表的毛细血管丛,或伴随这些毛细血管丛一段距离后返回髓质,形成毛细血管袢.微动脉分支组成不规则的毛细血管网,汇聚成毛细血管后微静脉加入到皮髓交界处的静脉中,汇入腺体表面的血管,进而在胸腺附近构成静脉树,汇集入胸腺静脉最后注入到颈浅静脉.

关键词:微循环; 胸腺; 鸡
中图分类号:S852.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2013)03-0416-06

A Preliminary Study of Thymus Microcirculation in Chicken

ZENG Xueyan[†], LI Weicheng[†], LIANG Zisen, YAN Haikuo, FAN Xiaolong, ZHONG Fan, DENG Xianbai
(College of Veterinary Medicine, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract:Ten healthy chickens were selected for the observation of chicken thymus by microcirculation microscope *in vivo*. Transparent vascular specimens and tissue sections were prepared to observe the overall trend of micro vascular and the fine structure of vascular. The results showed that the blood serving thymus was mainly from vagus artery starting from the small dried branch of common carotid artery and extending to the visceral of the neck and the being skin in middle of neck, then branching into the thymus along the way. The branch divergenced into the vascular tree in the central portion close to the glands, forming capillary network after essence. These capillaries went vertically toward the thymus surface, or they would join the superficial capillaries plexus, or with the capillary bundle a distance to return medulla, they formed the capillary loops. Metarterole was connecting extensive venous plexus composed of irregular meshes, whereas the post capillary venule joined the venues at the cortico-medullary boundary and finally into blood vessels at the surface of the glands, thus forming the thymus vein, which emptied into the external jugular vein.

Key words:microcirculation; thymus; broilers

胸腺是幼龄动物重要的中枢免疫器官,是T细胞发育、分化和成熟的场所.鸡没有典型的淋巴结,仅有分散的以淋巴小结为主的淋巴组织^[1],因此,胸腺的功能水平在鸡的免疫调节中起重要作用.鸟类和哺乳动物胚胎发育时期,T细胞的祖细胞起源于肝脏,并定居于胸腺^[2-3];出生以后,骨髓来源的前体细

收稿日期:2012-09-26 网络出版时间:2013-06-13
网络出版地址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.S.20130613.1422.017.html>
作者简介:曾雪颜(1987—),女,硕士研究生;李维铨(1987—),男,硕士研究生;†对本文贡献相同;通信作者:邓衔柏(1963—),男,副教授,E-mail: xbdeng@scau.edu.cn
基金项目:国家重点基础研究发展计划项目(2009CB118805)

胞伴随着少量的祖细胞逐日迁移到胸腺^[4]. 未分化的 T 淋巴细胞在进入胸腺之后,与不同类型的胸腺上皮细胞相互作用,从而达到分化成熟^[5].

微循环是指机体内微细血管与其周围组织细胞进行物质代谢的一系列结构和成分. 微循环在实际意义上,包括微血管管道的构筑成分以及组织细胞间隙中流动物质的理化特性、流速、管周情况等. 胸腺通过血液循环获得所需的营养,未分化 T 淋巴细胞通过血液循环进入胸腺,并经过胸腺的微血管网络成熟、分化、转运、参与细胞免疫. 可以看出胸腺的微循环状态直接影响到胸腺的免疫功能,因此有必要对鸡胸腺进行微循环研究.

1 材料与方法

1.1 试验动物与仪器

取健康湛江鸡 10 只,体质量(1.5 ± 0.2) kg,日龄(110 ± 5) d. 主要仪器为活体微循环观察显微镜(广州启跃光电仪器有限公司,增设底部投射光源).

1.2 方法

1.2.1 胸腺的血管观察 将鸡窒息处死,静置 1 h,待血液在体内凝固. 将颈部皮肤从腹侧正中划开,暴露胸腺,整体泡入体积分数为 20% 甲醛中固定 1 d 后,血液凝固呈黑色,解剖观察颈部血管走向及供应胸腺的血管.

1.2.2 活体观察胸腺微循环状态 试验动物称质量. 颈部、胸部去毛,消毒,保定,颈部中线切开皮肤,找到胸腺,将颈部皮肤固定在特制手术台上,涂以镜油,增设底部光源,在微循环观察仪下观察血管走向,血流状态等. 观察过程中用 37 ℃ 林格氏液保温保湿.

1.2.3 墨汁灌注透明标本制作 灌注液:质量浓度为 0.05 g/mL 的明胶墨汁(加入体积分数为 2% 的甲醛).

动静脉透明标本制作:活体观察结束后,在胸腔入口从颈总动脉和静脉灌入含抗凝剂的生理盐水冲洗血管,再灌入 10 mL 体积分数为 10% 的甲醛,随后立即将灌注液缓慢并保持一定压力地灌入. 灌注后结扎血管,取下胸腺,然后泡入体积分数为 10% 甲醛中固定 1~2 d.

胸腺微血管透明标本制作:固定后的胸腺用体积分数为 10% 的 H₂O₂ 漂白 1~2 d,光照催化,漂白后用流水洗净.

使用经典的冬青油透明法透明:梯度脱水方法参照解剖学试验技术,取出标本后切成约 150 μm 的透明厚片,浸泡在冬青油中用解剖显微镜观察.

1.2.4 苏木精-伊红染色切片制作 常规 HE 染色.

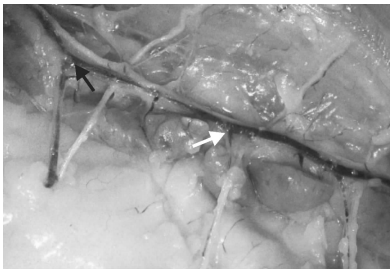
1.2.5 图像观察及处理 从每组制得的胸腺切片中随机抽取 10 张,在显微镜下于每张切片上随机选择 5 个视野,利用图像分析系统,测定小叶间动、静脉直径,各级毛细血管直径和微血管面积密度,前 3 者每个视野测定 4 个值,再取其平均值.

1.2.6 数据统计 分析统计结果均用 $\bar{x} \pm SD$ 表示,各统计结果均采用 SPSS 17.0 进行分析. 单因素方差分析采用 One-way ANOVA 模块,组间比较采用 LSD 法.

2 结果与分析

2.1 胸腺微循环观察

2.1.1 鸡胸腺血管供应 试验观察到鸡的胸腺位于颈部气管两侧皮下,与颈浅静脉、迷走神经、迷走动脉等包在同一个筋膜鞘内. 左右各 7 叶,共 14 叶,颜色粉红(甲醛固定后颜色呈灰白). 胸腺的主要血液供应来自于迷走动脉,这是一条起自颈总动脉干的细小分支,分布至颈部内脏和颈中段的被皮,沿途再分支为胸腺供应血液. 迷走动脉上升至颅底与枕动脉发出的降支吻合. 流出左右两侧胸腺的静脉分别汇入左右颈静脉,在胸腔入口处与锁骨下静脉汇合成左右前腔静脉. 流出胸腺的静脉,有的直接汇入颈浅静脉,有的则汇入到从皮肤收集静脉血液的分支中,再并入颈浅静脉(图 1).



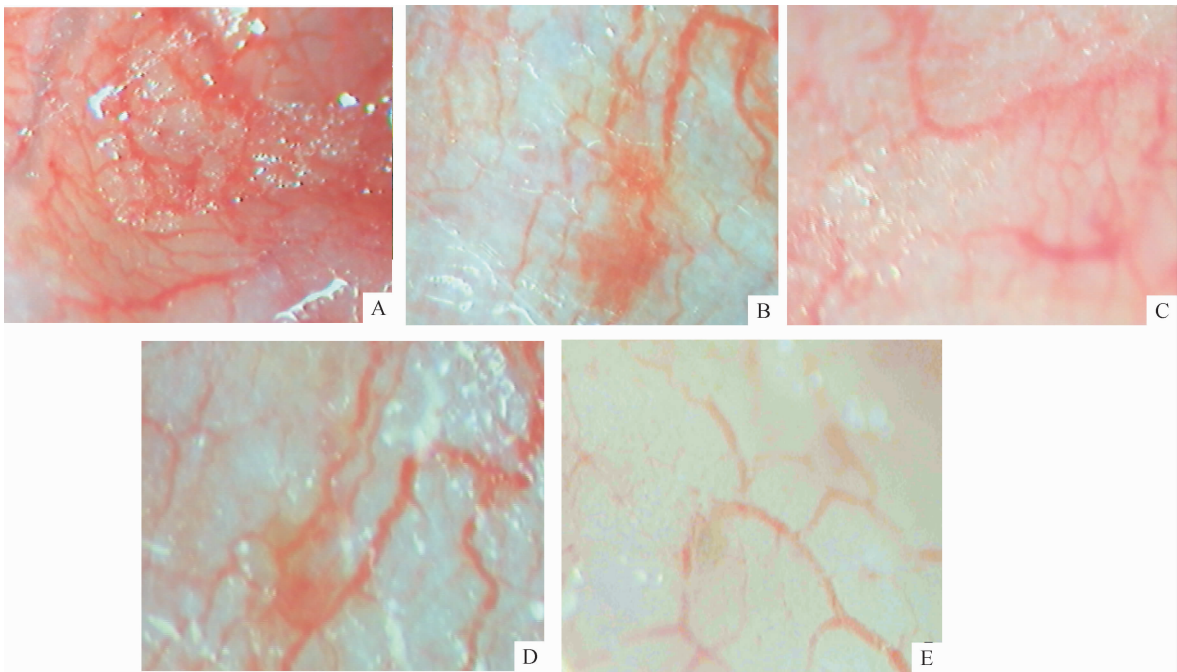
黑色箭头:汇入颈浅静脉,白色箭头:汇入到从皮肤收集静脉血液的分支中,再并入颈浅静脉.

图 1 鸡胸腺血管供应

Fig. 1 The blood vessels supplying to chicken thymus

2.1.2 微循环动态观察 本试验鸡的胸腺平均厚度为 2.6 mm,通过活体微循环显微镜观察到胸腺小动脉、分支毛细血管、网状毛细血管、小静脉等(图 2 A). 微血管管径粗细不一(图 2 B). 常能观察到血管的吻合支(图 2 C)及微血管的线流、粒流和线粒流(图 2 D). 细动脉分支形成毛细血管,管径细(约 4~6 μm),走行长而直,形状刚健,血流快. 分支毛细血管注入网状毛细血管,互相交联,走行弯曲,网状毛细

血管管径较分支毛细血管粗(约 5 ~8 μm),血流较慢, 12 μm),走行弯曲,外观柔软,途径长短不一,血流较 汇集入集合毛细血管.集合毛细血管管径较粗(约 8 ~ 网状毛细血管快,注入细静脉(图 2A,2B,2E).



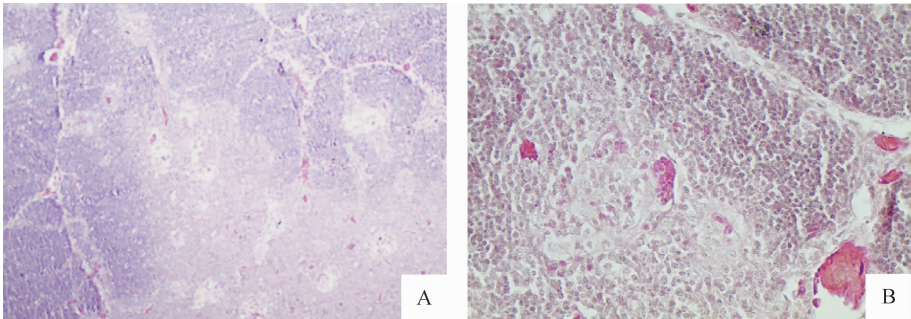
A:鸡胸腺微血管网络(10 $\times$); B:各类血管粗细不一,有的长而直,有的弯曲迂回(10 $\times$);C:血管的吻合支(10 $\times$);D:微血管的线流、粒流和线粒流(10 $\times$);E:鸡胸腺微血管活体循环动态(10 $\times$).

图 2 微循环显微镜活体观察结果

Fig. 2 The results observed by microcirculation microscope *in vivo*

2.1.3 鸡胸腺组织结构观察 HE 染色切片观察到 每叶胸腺的被膜结缔组织向腺体内发出许多膈,将 胸腺分隔成许多小叶,血管随其进入胸腺内.每个小 叶可分为皮质和髓质(图 3 A).皮质浓染而髓质淡 染,鸡胸腺中不易找到像哺乳动物那样典型的胸腺

小体. 试验鸡未经放血处理,胸腺中血管内仍留有红 细胞,易于观察血管大致位置.管径较大的血管主要 分布在小叶间和皮髓质交界处,在皮质中毛细血管 密度明显大于髓质中毛细血管密度(图 3 B).



A:胸腺切片(10 $\times$); B:小叶间较多管径较大的血管(10 $\times$).

图 3 胸腺组织结构显微观察

Fig. 3 Observation of the thymus structure

2.1.4 鸡胸腺的微血管分布 试验结果显示来自 颈总动脉分支的迷走动脉,与颈浅静脉、迷走神经和 胸腺链包裹在同一筋膜鞘中,沿途分支的主干供给 颈部皮肤上的血管,发出小分支到胸腺的中央部位, 进而分支成血管树穿透实质形成毛细血管网.每个 独立的胸腺小叶有 2 条动脉分布.逐渐分支的小动

脉沿着皮髓质交界处,注入到皮质和髓质的毛细血 管中.而另一类皮质动脉,进入胸腺后,其分支到皮 质的毛细血管中.也发现一些发卡状的小动脉,起源 于髓质动脉,并且供应皮质的毛细血管,在动脉和静 脉血管之间起到通路作用(图 4 A).

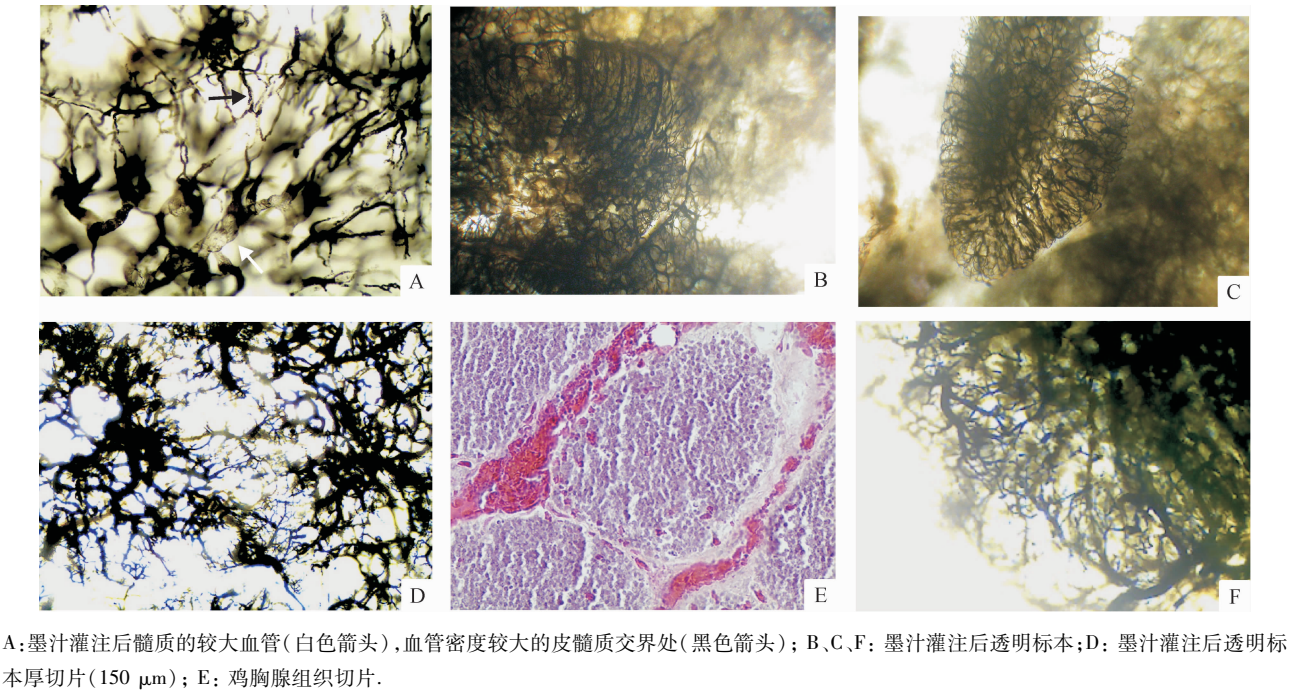
观察发现皮质中的毛细血管比髓质中的分布

更为稠密(图4 B). 皮质小动脉呈放射状从皮髓质交界处向外皮层延伸,并汇入到皮质边缘的小静脉中. 在外皮层,许多皮质小动脉呈现螺旋、弯曲状(图4 C),也流通到皮质表面的小静脉中. 但髓质小动脉则形成毛细血管网络,与静脉连通(图4 D).

胸腺中静脉系统:髓质比皮质中的分布更密(图4 D). 在胸腺髓质,尤其是皮髓质交界处,常常观察

到弯曲迂回的小静脉(图4 B). 这些小静脉起源于皮质或髓质,形成髓质静脉,并与小叶间静脉连接. 这些静脉的血管内皮表面,能够观察到淋巴细胞穿透内皮细胞层(图4 E).

在胸腺表面上,许多皮质的静脉收集了皮质中毛细血管的血流,并汇入到小叶间静脉(图4 F). 这些皮质静脉多数与穿过皮质隔或实质的髓质静脉汇合或吻合. 皮质的血管不存在血管周围间隙.



A: 墨汁灌注后髓质的较大血管(白色箭头),血管密度较大的皮髓质交界处(黑色箭头); B、C、F: 墨汁灌注后透明标本; D: 墨汁灌注后透明标本厚切片(150 μm); E: 鸡胸腺组织切片.

图4 鸡胸腺的微血管分布(10 $\times$)

Fig. 4 The distribution of microvascular in chicken thymus

3 讨论与结论

3.1 关于本试验所采用的微循环研究方法

本试验主要选用了组织切片和灌注墨汁的方法进行形态学研究,用活体微循环观察仪进行生理学研究. 镜下观察组织切片方法,可以了解微血管的断面形态、结构,能够观察微血管和其周围组织的关系. 但一般组织切片仅能反映约 5 μm 厚的断面结构,不能了解微血管立体分布、走行. 为了补救组织切片方法的缺陷,可以采用连续切片,逐片观察、描绘、复制的方法. 这种方法,除具有组织切片方法的优点外,又能描绘出微血管的立体分布、走行和相互关联. 早期的研究利用这种方法认识了一些脏器,如脾脏等的微血管的分布形态. 但也存在着工作量过大,缺少真实感等缺陷. 因而在本试验中,选用灌注墨汁后制作透明标本的方法弥补了组织切片观察的片面性.

在血管中注入墨汁充盈微血管,再将组织透明,

便可以在解剖镜下清晰地观察到微血管的分布、形态以及微血管的相互关系. 理想的血管内灌注液应具备接近血液的黏稠度和较好的流动性. 试验采用质量浓度为 0.05 g/mL 明胶墨汁. 灌注后选用冬青油与苯甲酸甲酯混合液透明组织,透明效果好. 胸腺浸泡在透明液中,在解剖镜下能清晰、直观地观察到微血管的分布、走行、形态,以及细动脉、毛细血管、细静脉的相互关系等. 试验证明,这种传统的墨汁灌注透明法操作简单、所需的设备普通常见,不失为一种比较实用的微循环形态学研究方法.

试验采用活体微循环显微仪进行直接的活体微循环观测. 本试验在原有的显微镜落射光源的基础上,在底部添加透射能力强、亮度大的冷光源,能较为清晰地观察到血流动态,转动微调时,能观察到不同高低层次的微血管. 但动物不可能完全地安静,试验中,观测部位在鸡的颈部,鸡只的呼吸活动等会对活体观察造成影响,不容易得到清晰连贯的微循环录像,这也是本试验所欠缺的地方.

总的来说,本试验从宏观到微观,从静态到动态比较详细地观察了鸡胸腺微循环。

3.2 鸡胸腺的微循环特点

胸腺在性成熟之后会发生增龄性退化,可以说,不同日龄的动物的胸腺在体积上会有很大的不同。因此在试验动物的选择上,本次试验严格控制试验鸡的日龄在110 d左右。鸡胸腺的血管丰度随日龄增长呈递增趋势^[6],这可能是由于在增龄过程中鸡胸腺产生了大量死亡胸腺细胞^[7],胸腺血管要靠自身数量的增多才足以运输和清理这些死亡细胞。

啮齿动物类的胸腺是黄色的,鸡的胸腺是粉红色的,这种颜色的不同尚未能解释原因。啮齿动物的胸腺小叶呈现出一种“穿透的循环”,即毛细血管从内向外穿透内皮层,到达位于表面的静脉,这一点与肝小叶的微循环类似。外层皮质占有最大的微血管密度,且胸腺细胞的有丝分裂指数最高;血管密度最低的是胸腺髓质,特别是在胸腺小体。小动脉深入小叶髓质,在皮髓质交界处以下平行形成弓状分支。皮质毛细血管垂直进入内皮层,在胸腺中毛细血管密度最大的外皮质区形成毛细血管分支。皮质毛细血管直接连接到包膜下。有弯曲的血管从包膜底下穿行,加入到包膜静脉。可以观察到阻止血液逆流的毛细血管袢。一些毛细血管通向皮质的静脉,而其他的则环回到皮髓质交界处的静脉中^[8]。小叶表面的静脉,贯穿皮层,到皮髓质交界处的深处血管中。小叶表面上动脉和静脉之间偶尔存在动静脉吻合。髓质中一些静脉也很明显,血管分布模式有别于皮质,毛细血管密度也明显比皮质中少。在胸腺小体中,血管数量非常少。毛细血管穿透皮质的模式中,细胞和化学物质的交换以及滤过过程都会增多^[9]。

Henry等^[10]详细地描述过无尾两栖动物胸腺的微脉管系统。林蛙胸腺主要的动脉血管,来源于颞动脉或耳支,接近腺体的中央部位,分支成血管树穿透实质形成毛细血管网。血管铸型可观察到微动脉上有细胞核长轴平行于血管拉长的细胞核印迹,而微静脉中的细胞核印迹则是圆的、薄的并随机分布在微静脉内皮层里^[11]。此外,还有一些小口径的辅助动脉支加入到胸腺表面的毛细血管丛。小鼠也有类似的额外动脉^[12]。接近胸腺表面的胸腺血管分成几条主要的分支穿透胸腺实质。接着发出一些更细的弯曲的分支加入到浅层的不同直径的静脉和毛细血管中。禽类和小鼠也有这样类似的分支情况,这与本试验中观察到的一致。小动脉分支出的二级小动脉根部有一种括约肌样的结构,可以控制通过浅层毛细血管网的血量。这一结构能在电镜下的血管铸型上

观察到。这种类似括约肌的结构在哺乳动物的淋巴结血管上也能观察到^[11],但在哺乳动物的胸腺血管中并没有报道。

哺乳动物的主要胸腺微动脉和微静脉平行地走行在皮髓质交界处,在进入皮质和髓质时彼此分开^[11,13]。通过制作血管铸型,在扫描电镜下观察可见绵羊血管的铸型表面有大量的细胞压痕和印迹,这可能代表淋巴细胞渗透通过小静脉壁。大多数髓质的血管在血管壁与胸腺实质之间存在血管周围间隙(Perivascular space, PVS)。尽管在髓质深层,这些血管周围间隙的外形有点不清晰,但仍可见在这些间隙中通常包含一至多层淋巴细胞,偶见粒细胞、巨噬细胞和肥大细胞。

3.3 结论

鸡胸腺的主要血液供应来自于迷走动脉,该动脉起自颈总动脉干的细小分支,其主干延伸至颈部内脏和颈中段的被皮,沿途再分支进入胸腺。该分支进入胸腺后,在接近腺体的中央部位发散形成血管树,经过实质形成毛细血管网。这些毛细血管垂直朝向胸腺表面,或加入浅表的毛细血管丛,或伴随这些毛细血管丛一段距离后返回髓质,形成毛细血管袢。微动脉分支组成不规则的毛细血管网,汇聚成毛细血管后微静脉加入到皮髓交界处的静脉中汇入腺体表面的血管,进而在胸腺附近构成静脉树,汇集入胸腺静脉最后注入到颈浅静脉。

试验观察到鸡胸腺皮质与髓质中血管分布不同,这体现了微循环与器官功能的关系。皮质中毛细血管更为丰富,保证胸腺的血液和营养的供应;而髓质中静脉比较丰富,管壁较薄、管径较大,这更有利于T细胞的转移。另外,皮质中毛细血管有“血胸屏障”之称,髓质血管则无此结构。这种特殊结构与胸腺特有的免疫功能是相关的,它使得血液和胸腺间的物质交换有一定限制。既能保证完成胸腺功能、代谢所必须的物质交换,又能减少不必要的物质进入皮质,特别是血液中一些大分子抗原物质不易与胸腺淋巴细胞接触而引起免疫反应。

参考文献:

- [1] LAWN A M, ROSE M E. Presence of a complete endothelial barrier between lymph and lymphoid tissue in the lumbar lymph nodes of the duck (*Anas platyrhynchos*) [J]. Res Vet Sci, 1981, 30(3): 335-342.
- [2] COLTEY M, JOTEREAU F V, LE DOUARIN N M. Evidence for a cyclic renewal of lymphocyte precursor cells in the embryonic chick thymus [J]. Cell Differ, 1987, 22(1): 71-82.

[3] JOTEREAU F, HEUZE F, SALOMON-VIE V, et al. Cell kinetics in the fetal mouse thymus: Precursor cell input, proliferation, and emigration[J]. J Immunol, 1987,138 (4):1026-1030.

[4] SCOLLAY R, SMITH J, STAUFFER V. Dynamics of early T cells: Prothymocyte migration and proliferation in the adult mouse thymus[J]. Immunol Rev, 1986,91:129-157.

[5] VAN EWIJK W. T-cell differentiation is influenced by thymic microenvironments[J]. Annu Rev Immunol, 1991, 9:591-615.

[6] 王云. 鸡胸腺发育形态学研究[D]. 武汉:华中农业大学,2010.

[7] 冯仁田, 潘宏志, 何维, 等. Balb/C 小鼠免疫系统结构与功能的增龄性变化[J]. 中华老年医学杂志, 2000, 12(2): 223-225.

[8] OLSON I A, POSTE M E. The vascular supply of the thymus in the guinea-pig and pig[J]. Immunology, 1973,24 (2):253-257.

[9] CLARK S L, Jr. The thymus in mice of strain 129/J, studied with the electron microscope[J]. Am J Anat, 1963,112(1):1-33.

[10] HENRY M, CHARLEMAGNE J. Development of amphibian thymus: I: Morphological differentiation, multiplication, migration and lysis of thymocytes in the urodele *Pleurodeles waltlii* [J]. J Embryol Exp Morphol, 1980,57: 219-232.

[11] SALVADOR A C, PEREIRA A S, DE SÁ C M, et al. Blood vessel architecture in lymph nodes of the dog viewed by scanning electron microscopy[J]. J Submicrosc Cytol Pathol, 1992,24(1):97-102.

[12] IRINO S, TAKASUGI N, MURAKAMI T. Vascular architecture of thymus and lymph nodes, blood vessels, trans-mural passage of lymphocytes, and cell-interactions[J]. Scan Electron Microsc, 1981(Pt 3):89-98.

[13] KATO S, SCHOEFL G I. Microvasculature of normal and involuted mouse thymus: Light- and electron-microscopic study[J]. Acta Anat, 1989,135(1):1-11.

【责任编辑 柴 焰】

(上接第 398 页)

[13] 龚国春, 戴蕴平, 樊宝良, 等. 以不同类型的转基因细胞为核供体生产牛的转基因克隆胚胎[J]. 中国科学, 2003, 33(6): 532-538.

[14] LAI Liangxue, PARK K W, CHEONG H T, et al. Transgenic pig expressing the enhanced green fluorescent protein produced by nuclear transfer using colchicine-treated fibroblasts as donor cells[J]. Mol Reprod Dev,2002,62(3): 300-306.

[15] LEE G S, KIM H S, HYUN S H, et al. Production of transgenic cloned piglets from genetically transformed fetal fibroblasts selected by green fluorescent protein[J]. Theriogenology, 2005,63(4):973-991.

[16] EDWARD L J, DORADO C M, WILSON T J, et al. Development of cloned embryos reconstituted with serum fed or starved adult granulose cells[J]. Theriogenology,2001, 55:265.

[17] KUH HOLZER B, HAWLEY R J, LAI L X, et al. Clonal lines of transgenic fibroblast cells derived from the same fetus result in different development when used for nuclear transfer in pigs[J]. Biol Reprod, 2001, 64(6):1695-1698.

[18] FIORETTI A M, LANZA R. Preliminary palaeomagnetic results from the devono-carboniferous admiralty intrusives [J]. Terra Antarctica, 2000, 7(5):657-664.

[19] ONISHI A, IWAMOTO M, AKITA T, et al. Pig cloning by microinjection of fetal fibroblast nuclei[J]. Science, 2000, 289(5482):1188-1190.

[20] LEE G S, HYUN S H, KIM H S, et al. Improvement of a porcine somatic cell nuclear transfer techniques by optimizing donor cell and recipient oocyte preparations [J]. Theriogenology, 2003, 59(9):1949-1957.

[21] LIN T P, FLORENCE J. Cell fusion induced by a virus within the zona pellucida of mous eggs[J]. Nature, 1973, 242(5392):47-49.

[22] CZOŁOWSKA R, MODLINSKI J A, TARKOWSKI A K. Behaviour of thymocyte nuclei in non-activated and activated mouse oocytes[J]. Cell Sci, 1984, 69:19-34.

[23] SIMS M, FIRST N L. Production of calves by transfer of nuclei from cultured inner cell mass cells [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91(13):6143-6147.

[24] WILLADSEN S M. Nuclear transplantation in sheep embryos [J]. Nature, 1986, 320(6057):63-65.

【责任编辑 柴 焰】