

李 磊, 张英楠, 杨树宝, 等. 鸡嗦囊中淋巴细胞发育的研究[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(3): 24-29.

鸡嗦囊中淋巴细胞发育的研究

李 磊¹, 张英楠^{2,3}, 杨树宝¹, 冯小刚¹, 刘 莹¹, 董红艳¹, 马金萍¹, 栾维民^{1,4}

(1 吉林农业大学 动物科学技术学院, 吉林 长春 130118;
2 吉林农业大学 发展学院, 吉林 长春 130600; 3 吉林农业大学 生命科学学院, 吉林 长春 130118;
4 吉林农业大学 动物生产及产品质量安全教育部重点实验室, 吉林 长春 130118)

摘要:【目的】研究鸡出壳后不同日龄嗦囊中T淋巴细胞及其亚群和B淋巴细胞的定位分布及数量变化规律等一系列的发育过程.【方法】采用单克隆抗体,通过免疫组织化学方法,观察并统计各取材日龄相应细胞的分布和数量.【结果和结论】1日龄时,CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺细胞即已出现,Bu-1b⁺细胞于出壳后4日龄时出现.定位分布上,CD3⁺细胞主要分布于黏膜上皮基层及固有层中,7日龄首次出现以CD3⁺细胞为中心的淋巴聚集物;CD4⁺细胞主要分布于固有层中;CD8⁺细胞最初主要分布在黏膜固有层中,随日龄增长逐渐向上皮方向突入,最终形成含有CD8⁺细胞浸润的淋巴上皮;Bu-1b⁺细胞主要分布于黏膜固有层中,特别是在小血管周围.于35日龄观察到以Bu-1b⁺细胞为中心的生发中心.在数量变化上,CD3⁺、CD4⁺、CD8⁺细胞数量整体呈逐渐增加趋势,部分阳性细胞数量在14和21日龄时稍有下降,35~56日龄时阳性细胞数量缓慢增加,基本达到成熟水平.Bu-1b⁺细胞数量随着日龄的增加持续增多,且后期的增长速率大于T细胞的增长速率.结果表明,嗦囊作为鸡消化系统的一部分,具有由淋巴细胞和淋巴聚集物构成的免疫防线,为肠相关淋巴组织中的一个重要组成部分.

关键词:嗦囊; 发育; 定位分布; 肠相关淋巴组织
中图分类号:S852.1 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2014)03-0024-06

A study on development of lymphocytes in the chicken crop

LI Lei¹, ZHANG Yingnan^{2,3}, YANG Shubao¹, FENG Xiaogang¹, LIU Ying¹,
DONG Hongyan¹, MA Jinping¹, LUAN Weimin^{1,4}
(1 College of Animal Science and Technology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;
2 College of Development, Jilin Agricultural University, Changchun 130600, China;
3 College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China;
4 Key Laboratory of Animal Production & Product Quality and Security, Ministry of Education,
Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract:【Objective】To study the appearance, distribution and quantity variation of immunocytes—T lymphocytes and its subpopulations and B lymphocytes in different periods, analyzing the developmental process of immunocytes in the chicken crop. 【Method】The mono-antibodies and immunohistochemistry was used to observe the distribution and count the number of the relevant cell in every age. 【Result and conclusion】The results showed that CD3⁺, CD4⁺ and CD8⁺ cells appeared in the first day after post-

收稿日期:2013-09-11 优先出版时间:2014-03-31
优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/doi/10.7671/j.issn.1001-411X.2014.03.005.html>
作者简介:李 磊(1985—),女,硕士研究生,E-mail: lilei1225@hotmail.com;通信作者:栾维民(1957—),男,教授,博士,
E-mail: luanweimin@yahoo.com.cn
基金项目:国家自然科学基金(30901065);吉林省科技发展计划项目(201205059);“十二五”吉林省教育厅科学技术研究项目(2011431)

hatching. Bu-1b⁺ cells were observed in the 4rh day. CD3⁺ cells mainly distributed in the epithelium and lamina propria, and the lymphoid aggregates covered by CD3⁺ cells were first observed in the 7th day after post-hatching. CD4⁺ cells were located in the lamina propria. At first, CD8⁺ cells mainly distributed in the lamina propria of the mucosa. With the age increasing, CD8⁺ cells slightly migrated and infiltrated to the epithelium of the mucosa, which were transformed to the lymphoepithelium. Bu-1b⁺ cells mainly distributed in the lamina propria, especially around the vessels. The germinal center which was covered by the Bu-1a⁺ cells was first observed in the 35th day after post-hatching. The amount of CD3⁺, CD4⁺, and CD8⁺ cells kept increasing with the age; the amount of parts of positive cells decreased in the 14th and 21th day; it slightly increased after this date and reached mature level around the 56th day. Bu-1b⁺ cells continuously kept increasing with age, its rising rate was higher than T lymphocytes during the later period. The research showed that as a part of the digest system in the chicken, the crop posses ses the mucosal immunity which consists of the lymphoid aggregates and the lymphocytes. The crop is an important part of gut-associated lymphoid tissue(GALT).

Key words:crop; development; location and distribution; gut-associated lymphoid tissue (GALT)

随着鸡黏膜免疫研究的深入,鸡黏膜免疫组织学内容亦趋完善.大量研究表明,禽类肠相关淋巴组织由肠道中集合的淋巴组织和散在的淋巴细胞一起构成.前者包括食管扁桃体、幽门扁桃体、盲肠扁桃体等,后者则为分布在各肠段中的散在的淋巴细胞,其主要分布于消化道、前胃、回肠和直肠等组织中^[1-3].嗦囊作为食物的最初储存场所,能使禽类摄取的食物保持适当的温度和湿度,并对其进行浸润与软化,利于胃肠道对食物进一步消化吸收.试验表明,切除嗦囊后鸡消化能力明显下降,并且更容易出现细菌感染等疾病,提示嗦囊对于食物中的微生物具有初步的抵御作用^[4-5].

冯小刚等^[6]于2013年通过免疫组织学方法发现鸡嗦囊中亦有大量的淋巴细胞分布,并将其归为肠相关淋巴组织中的重要组成部分.鉴于此,本试验

对鸡嗦囊的淋巴细胞做进一步研究.旨在观察鸡嗦囊中淋巴细胞的定位分布及数量变化情况,探索嗦囊免疫基础的建立过程,从而为肠相关淋巴组织的完善增添新的内容,同时也为疫苗的研发和嗦囊疾病的治疗提供理论依据.

1 材料与方法

1.1 试验样品

将100枚清洁级海蓝白种蛋进行孵化,鸡出壳后置于动物室中常规饲养.分别在出壳后1、4、7、14、21、27、35及56日取材.每次取7只鸡新鲜嗦囊的相同部位,置于蛋白包埋液(OCT)中包埋后进行低温切片,片厚5 μm. -80℃超低温冰箱保存备用.

1.2 抗体

试验所用单克隆抗体见表1.

表1 试验使用的单克隆抗体
Tab.1 Monoclonal antibodies used in this experiment

细胞	抗体特异性	抗体	抗体来源
B 淋巴细胞	Bu-1b antigen	Mouse Anti-Chicken Bu-1b-UNLB	Southern Biotech US
T 淋巴细胞	CD3 antigen	Mouse Anti-Chicken CD3-UNLB	Southern Biotech US
	CD4 antigen	Mouse Anti-Chicken CD4-UNLB	Southern Biotech US
	CD8 antigen	Mouse Anti-Chicken CD8-UNLB	Southern Biotech US

1.3 试剂和仪器

日本樱花蛋白包埋剂(OCT),AAF液,丙酮,伊红和3-氨丙基-3-乙氧基甲硅烷(APES)等. Lei-

ca CM1850 冰冻切片机, UltraSensitive™ SP 超敏试剂盒 kit-9710(福州迈新公司), Olympus CX41 显微镜, Image-pro Plus 5.1 图像分析软件(美国 Media

Cybernetics 公司),Pixera pro150ES 图像采集器.

1.4 试验方法

取嗦囊切片做以下处理:滴加过氧化物酶阻断溶液(试剂 A),室温下孵育 10 min,以阻断内源性过氧化物酶的活性;PBS 洗 3 次,各 3 min;滴加正常非免疫动物血清(试剂 B)封闭,室温下孵育 10 min;滴加相应稀释单抗工作液 50 μL,4 ℃ 条件过夜;PBS 洗 3 次,各 3 min;滴加生物素标记的第二抗体(试剂 C),室温孵育 10 min;PBS 洗 3 次,各 3 min;滴加链霉素抗生物素-过氧化物酶溶液(试剂 D),室温下孵育 10 min;PBS 洗 3 次,各 3 min;DAB 显色;苏木精复染;脱水;透明;镜检封片、照相.

1.5 图像分析及统计学处理

对各抗体阳性细胞进行分析,并选择放大倍数为 100 的图片,采用 Image-pro Plus 5.1 图像分析软件对单位视野内的免疫组织化学阳性细胞的面积进行测定. 对每个抗体对应的各个部位的切片随机选定 5 个视野,然后求平均值. 采用 SPSS19.0 单因素方差分析进行统计分析.

2 结果与分析

2.1 CD3⁺细胞的发育规律

出壳后 1 日龄时,可见少量 CD3⁺细胞分布于嗦囊黏膜固有层的小血管周围(图 1a);4 日龄时,CD3⁺细胞数量增多,散布于黏膜固有层与黏膜下层;7 日龄时,首次观察到以 T 细胞为中心的淋巴聚集物(图 1b),且有部分 CD3⁺细胞分布于沿黏膜上皮区域;27 日龄时,部分 CD3⁺细胞出现在腺体周围,并向腺体上皮突入;35 日龄时,CD3⁺细胞出现在黏膜上皮中,形成嵌有淋巴细胞的黏膜上皮,同时,腺体与上皮间固有层中出现弥散的淋巴聚集物(图 1c). 56 日龄时,血管周围阳性细胞较少,但淋巴聚集物增多,黏液腺上皮受淋巴细胞浸润明显,且部分腺体上皮和黏膜上皮转化为淋巴上皮(图 1d).

CD3⁺细胞于 1 日龄时即出现,随后于 4 日龄明显增多($P < 0.05$),其后逐渐增多,并于 21 日龄时再次明显增多($P < 0.05$),随后 CD3⁺细胞增加缓慢,呈较稳定水平(图 2).

2.2 CD4⁺细胞的发育规律

1 日龄时,少量的 CD4⁺细胞出现在嗦囊固有层的血管周围(图 1e);4 日龄时,固有层中的 CD4⁺细胞数量明显增多;7 日龄时,观察到 CD4⁺细胞出现在食管腺周围,并有向腺体内部突入趋势(同 CD3⁺

细胞一样,首次观察到含 CD4⁺细胞的淋巴聚集物);21 日龄时,CD4⁺细胞于滤泡间区域聚集,并发生明显浸润至腺体的现象;35 日龄时,分布于聚集物的 CD4⁺细胞,一部分位于滤泡外区域,而另一部分依然位于聚集物中心(图 1f、1g);56 日龄时,部分 CD4⁺细胞围绕在腺体周围,使部分腺体上皮转化为淋巴上皮(图 1h).

CD4⁺细胞于 1 日龄能够被观察到,4 日龄时增加明显($P < 0.05$),随后小幅上升,并于 21 日龄时再次显著升高($P < 0.05$),之后数量逐渐趋于稳定水平(图 2).

2.3 CD8⁺细胞的发育规律

1 日龄时,单个 CD8⁺细胞出现在嗦囊黏膜固有层和肌层中,偶在上皮基底层见单个阳性细胞分布;4 日龄时,多数散在的 CD8⁺细胞围绕在固有层的小血管周围(图 1i),上皮基底层可见单个阳性细胞浸润;14 日龄时,CD8⁺细胞逐渐向上皮内迁移(图 1j);27 日龄时,固有层中的阳性细胞多聚集在血管周围、腺体与上皮间区域;35 日龄时,浸润上皮基底层的阳性细胞增多(图 1k);56 日龄时,部分黏膜上皮和腺体上皮被 CD8⁺细胞浸润,使其转化为淋巴上皮. 在弥散淋巴组织中也有丰富的 CD8⁺细胞聚集,而固有层中的阳性细胞分布渐少(图 1l).

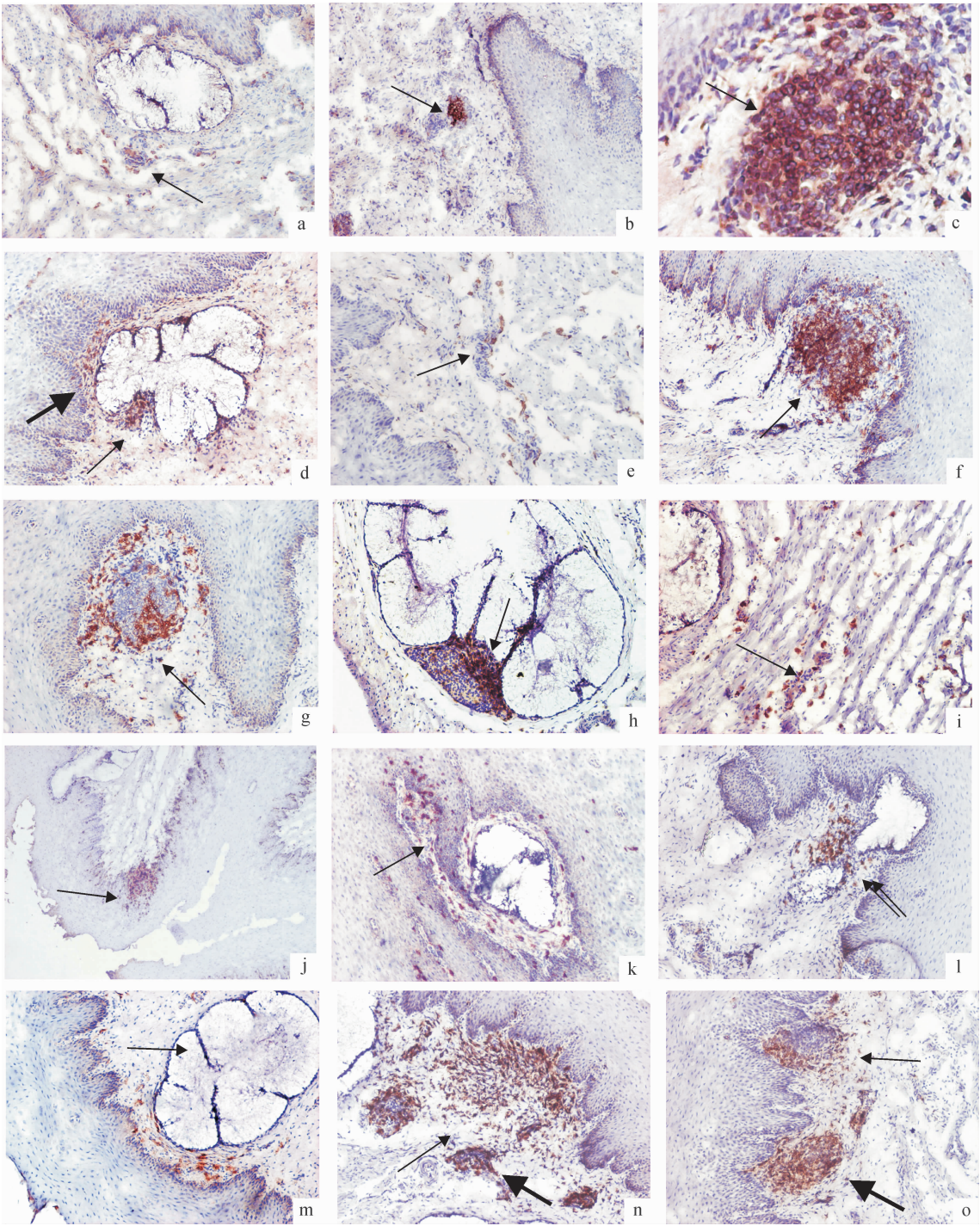
CD8⁺细胞数量在 4、14 日龄时显著增加($P < 0.05$);而在 21 日龄时有所减少,但不显著($P > 0.05$);27 日龄时,CD8⁺细胞数量显著增加($P < 0.05$);35 至 56 日龄,CD8⁺细胞数量逐步增加,但变化不显著($P > 0.05$)(图 2).

2.4 Bu-1b⁺细胞的发育规律

4 日龄时,极少数的 Bu-1b⁺细胞出现在嗦囊黏膜固有层中;7 日龄时,在固有层小血管周围、腺体与上皮间固有层中发现少数的 Bu-1b⁺细胞(图 1m),此时 Bu-1b⁺细胞在其他部位分布仍极少;14 日龄时,Bu-1b⁺细胞的分布较之前日龄分布更广,散在分布于固有层中;27 日龄时,Bu-1b⁺细胞初步形成聚集区,但上皮并未出现阳性细胞浸润;35 日龄时,出现了以 Bu-1b⁺细胞为中心的淋巴聚集物和大量散在的阳性淋巴细胞,上皮也出现少量 Bu-1b⁺细胞浸润(图 1n);56 日龄时,Bu-1b⁺细胞以散在的和聚集的形式大量分布于上皮下的固有层中,但上皮浸润依旧仅发生在聚集物和腺体上方的上皮基底层中(图 1o).

4~21 日龄,Bu-1b⁺细胞的数量呈增长趋势,但并

不显著($P>0.05$);27日龄时,Bu-1b⁺细胞数量急速增长($P<0.05$);35日龄时,Bu-1b⁺细胞的数量也显著增加($P<0.05$);与35日龄相比,56日龄时,Bu-1b⁺细胞的数量有所上升,但不显著($P>0.05$)(图2).



a:血管周围分布的CD3⁺细胞(1日龄),250×; b:首次出现CD3⁺细胞聚集物(7日龄,箭头),250×; c:腺体与上皮间固有层中的CD3⁺细胞(35日龄),1 000×; d:腺体周围分布的CD3⁺细胞,部分腺体上皮(细箭头)和黏膜上皮(粗箭头)转化为淋巴上皮(56日龄),250×; e:血管周围分布的CD4⁺细胞(1日龄),250×; f:弥漫淋巴组织中的CD4⁺细胞(35日龄),250×; g:滤泡外区域的CD4⁺细胞(35日龄),250×; h:CD4⁺细胞浸润至腺体内,部分腺体上皮转化为淋巴上皮(56日龄),250×; i:固有层中的CD8⁺细胞(4日龄),400×; j:浸润上皮内的CD8⁺细胞(14日龄),100×; k:上皮基层中的CD8⁺细胞(35日龄),250×; l:CD8⁺细胞(56日龄),250×; m:腺体与上皮间固有层中的Bu-1b⁺细胞(7日龄),250×; n:散在的(细箭头)与聚集的(粗箭头)Bu-1b⁺细胞(35日龄),250×; o:在生发中心的Bu-1b⁺细胞(粗箭头)和在滤泡间区域的Bu-1b⁺细胞(细箭头)(56日龄),250×.

图1 不同日龄时鸡嗉囊中T淋巴细胞亚群和B淋巴细胞的分布情况

Fig. 1 The distribution of T lymphocyte subpopulations and B lymphocytes in crop of different day-old chickens

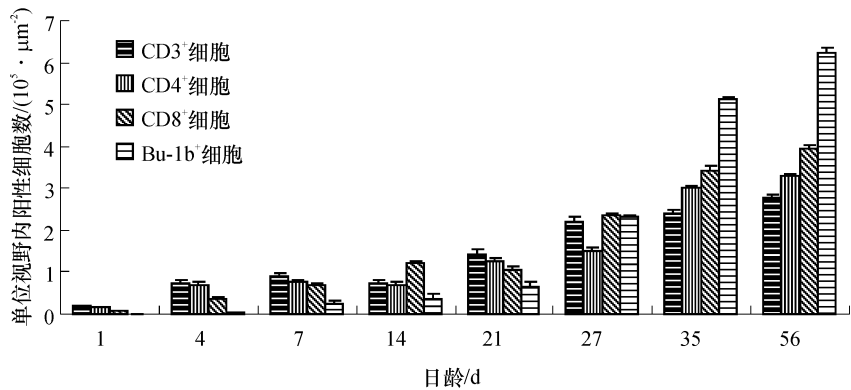


图 2 鸡嗦囊中 T 淋巴细胞及其亚群、B 淋巴细胞的发育变化

Fig. 2 Ontogenetic changes of T lymphocyte subsets and B lymphocytes in the chicken crop

3 讨论与结论

肠相关淋巴组织同呼吸道相关淋巴组织、生殖道相关淋巴组织一起构成了禽类体内共同黏膜免疫的防御系统。根据 Castelyn 等^[7]报道,鸡肠相关淋巴组织由食管扁桃体、幽门扁桃体、回肠派氏结及盲肠扁桃体等肠道集合淋巴组织以及散在于食管、腺胃、十二指肠、回肠及泄殖腔等组织中的淋巴细胞共同组成。然而,嗦囊作为鸡食管的一个重要组成部分,时刻受到夹杂于食物中大量的物理性、生物病原体的侵扰。冯小刚等^[6]发现鸡嗦囊中亦有大量淋巴细胞分布,并将其划归为肠相关淋巴组织中的一个不可缺少的部分。基于此,本研究结合禽类免疫学与发育学,通过免疫组织化学方法观察鸡嗦囊免疫活性细胞发育的日龄相关性变化,阐述 B 淋巴细胞、T 淋巴细胞及其亚群的分布,迁移定位和数量变化情况。

本研究发现,1 日龄时,CD3⁺、CD4⁺和 CD8⁺细胞即已出现,Bu-1b⁺淋巴细胞于出壳后 4 日龄时出现。定位分布上,CD3⁺细胞主要分布于黏膜上皮基层及固有层中,以 CD3⁺细胞为中心的淋巴聚集物首次出现在 7 日龄;CD4⁺细胞主要分布于固有层中;CD8⁺细胞最初主要分布在黏膜固有层中,随日龄增长逐渐向上皮方向突入,最终形成淋巴上皮;Bu-1b⁺细胞主要分布于黏膜固有层中,特别是在小血管周围。35 日龄时,观察到以 Bu-1b⁺细胞为中心的生发中心。并且 CD3⁺、CD4⁺细胞数量于 4 日龄开始显著持续增加,这与 Friedman 等^[8]报道的法氏囊与胸腺 T 淋巴细胞在 4 日龄时发生第 2 次迁移至肠道的结果相一致,表明此时 T 淋巴细胞已经发育成熟。而在 14 日龄(CD3⁺和 CD4⁺细胞)和 21 日龄(CD8⁺细胞)时阳性细胞数量略有下降,这与栾维民等^[9-10]及杨树宝等^[11]对食管扁桃体、盲肠扁桃体等发育研究结果基本一致。此外本研究还发现,在嗦囊

中存在由淋巴细胞浸润而转化成的淋巴上皮,主要包括部分黏膜淋巴上皮和腺上皮,分析其可能与嗦囊特有的腔状结构有关。嗦囊为鸡饱腹后的储食场所,时刻受到来自食物中的大量病原体的侵扰,所以要求其在润湿食物的基础上同时能够抵御食源性抗原的不利影响。由 CD3⁺、CD8⁺细胞浸润转化而成的黏膜淋巴上皮能够抵御来自腔内的部分细菌及病原体的侵扰,逃过此屏障进一步浸入黏膜的微生物则会遭遇腺上皮转化而来的淋巴上皮的再次抵制,诱发局部黏膜免疫。

本试验中虽未见大量淋巴生发中心的出现,但的确有较多的淋巴聚集物存在,同时 Bu-1b⁺细胞的数量随着日龄增长呈上升趋势,这与之前的报道有所差异^[12]。试验证明,生发中心的出现与病原体侵染相关,表现为黏膜受到外界刺激时,黏膜内 B 淋巴细胞受到刺激后,局部代谢增强,细胞快速增殖,形成生发中心,进而引起免疫应答。本研究中,可能由于饲养环境单一,试验鸡未接触大量流行病原体,故不能引起大量的生发中心产生。同时,也可能与消化道免疫的基础有关。有研究报道,鸡消化道中免疫系统早期以 T 淋巴细胞免疫反应为主,其细胞数量增长趋势远大于 B 淋巴细胞。而到 6 周龄后,B 淋巴细胞的数量显著增加并大于 T 淋巴细胞数量,表现为以 B 淋巴细胞免疫为主,这亦可能是早期未见大量生发中心,而 Bu-1b⁺细胞却一直增加的原因^[12-14]。有趣的是,本试验在鸡出壳后 7~56 日龄间均能观察到以 T 淋巴细胞为中心,而 B 淋巴细胞围绕在周围的独特淋巴聚集物。通过对比前人的研究结果,在肠道中仅有腺胃和法氏囊中出现了此种情况^[15-16],而本试验的研究对象嗦囊,同前胃一样为消化道中仅有的拥有较大直径的空腔状器官,这可能是出现共同结果的一个原因,但具体分布原因尚需进一步深入研究。

本试验结果表明,嗦囊不仅是鸡储存食物的第一场所,亦具有肠黏膜免疫的基础——即由淋巴细胞和淋巴聚集物构成的免疫防线.同时,嗦囊淋巴细胞的迁移规律和分布情况,同其他肠组织淋巴细胞迁移和定位情况相一致,进一步验证了嗦囊可能是肠相关淋巴组织中的一个重要组成部分.同时,本试验描述了嗦囊淋巴细胞的发育情况,分析了嗦囊免疫系统的建立和发生,为治疗嗦囊病以及鸡疫苗的研发,进行实时性免疫提供理论依据.

参考文献:

[1] NAGY N, OLÁH I. Pyloric tonsil as a novel gut-associated lymphoepithelial organ of the chicken[J]. J Anat, 2007,211(3):407-411.

[2] GÓMEZ DEL MORAL M, FONFRÍA J, VARAS A, et al. Appearance and development of lymphoid cells in the chicken (*Gallus gallus*) caecal tonsil[J]. Anat Rec, 1998,250(2):182-189.

[3] BAR-SHIRA E, FRIEDMAN A. Development and adaptations of innate immunity in the gastrointestinal tract of the newly hatched chick[J]. Dev Comp Immunol,2006,30(10):930-941.

[4] 付金香,刘荣稳. 鸡常见的几种嗦囊疾病[J]. 中国禽业导刊, 2007,24(20):28.

[5] IMAMURA K, YASRDA M, RIWAR B, et al. Characteristic cellular composition of germinal centers[J]. Comp Immunol, Microbiol Infect Dis,2009,32(5):419-428.

[6] 冯小刚,杨树宝,李磊,等. 鸡嗦囊组织结构及其淋巴组织分布的观察[J]. 中国家禽,2013,35(1):17-19.

[7] CASTELYN C, DOOM M, LAMBRECHTS E, et al. Locations of gut-associated lymphoid tissue in the 3-month-old chicken; A review[J]. Avian Pathol, 2010, 39(3):

143-150.

[8] FRIEDMAN A, BAR-SHIRA E, SKLAN D. Ontogeny of gut associated immune competence in the chick[J]. World's Poul Sci J, 2003,59(2):209-219.

[9] 栾维民,杨树宝,张英楠,等. 鸡食管扁桃体中 T、B 淋巴细胞的发育及其定位分布[J]. 中国预防兽医学报, 2011,33(3):223-226.

[10] 栾维民, 杨树宝, 顾玉宝,等. 鸡肠相关性淋巴组织中 IFN- γ 和 IL-2 mRNA 表达的动态变化[J]. 中国兽医科学, 2011, 41(3):292-297.

[11] 杨树宝, 张英楠, 高晶晶,等. 鸡盲肠扁桃体中 B 淋巴细胞的发育[J]. 中国兽医科学, 2009,39(11):999-1002.

[12] MASTELLER E L, PHARR G T, FUNK P E, et al. Avian B cell development[J]. Int Rev Immunol, 1997, 15(3/4):185-206.

[13] PENHA FILHO R A, MOURA B S, ALMEIDA A M, et al. Humoral and cellular immune response generated by different vaccine programs before and after *Salmonella enteritidis* challenge in chickens [J]. Vaccine, 2012, 30(52):7637-7643.

[14] VERVELDE L, JEURISSEN S H M. Postnatal development of intra-epithelial leukocytes in the chicken digestive tract: Phenotypical characterization in situ[J]. Cell Tissue Res, 1993, 274(2):295-301.

[15] MATSUMOTO R, HASHIMOTO Y. Distribution and development change of lymphoid tissue in the chicken proventriculus[J]. J Vet Med Sci, 2000, 62(2):161-167.

[16] MASLAK D M, REYNOLDS D L. B cells and T-lymphocyte subsets of the head-associated lymphoid tissues of the chicken[J]. Avian Dis, 1995; 39(4):736-742.

【责任编辑 柴 焰】