

小鼠胸腺形态结构的增龄性变化★

刘仰斌,李启华

Age-related morphology and structure changes of mouse thymus

Liu Yang-bin, Li Qi-hua

Abstract

BACKGROUND: Dendritic cells are the most important antigen presenting cells *in vivo* and play a double role of immune response and immune tolerance. There are more dendritic cells in thymus. With the increasing age of mouse, structure of mouse thymus shows degradation tendency, and the role of antigen-presenting dendritic cells is also reduced.

OBJECTIVE: To explore the morphologic change of different growth period mouse thymus.

METHODS: The thymus structures of the 4-week-old, 20-week-old and 10-month-old mouse were observed; dendritic cells occupied area percentage in the thymus were observed and analyzed by S100 immunohistochemistry and the dendritic cells density was calculated.

RESULTS AND CONCLUSION: Following age increasing, thymic cortex became thinning and the limit between cortex and medulla were more distinct. The glandular substance of 10-month-old mouse were obviously decreased and substituted with interstitial substance to be full of adipocytes. S100⁺ dendritic cells area and dendritic cells density in 20-week-old mouse were significantly higher than in 4-week-old mouse, but were decreased obviously in 10-month-old mouse (P < 0.01). Simultaneously, there were more S100⁺ macrophage on juncture between cortex and medulla in 10-month-old mouse thymus. Results demonstrated that, with age increasing, structure of mouse thymus trends to degradation; lower of antigen presenting effect of dendritic cells in gerontism mouse were closely related to reduction of quantity of dendritic cells.

Liu YB, Li QH. Age-related morphology and structure changes of mouse thymus. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(31): 5805-5808. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Gannan Medical University, Ganzhou 341000, Jiangxi Province, China

Liu Yang-bin★,
Master, Associate
professor, Gannan
Medical University,
Ganzhou 341000,
Jiangxi Province,
Chinate September 1, 1975,

Received:2010-01-25 Accepted:2010-03-05

摘要

背景: 树突状细胞是体内最重要的抗原提呈细胞,在免疫调节中扮演着免疫应答和免疫耐受的双重角色,胸腺含有较多的树突状细胞。随着鼠龄增加,小鼠胸腺结构呈退化趋势,树突状细胞抗原提呈作用也在减弱。

目的:观察不同年龄时期小鼠胸腺形态结构的变化。

方法: 分别观察出生后 4 周龄、20 周龄及 10 月龄小鼠的胸腺结构;通过 S100 免疫组织化学标记,计算 S100[†]胸腺树突状细胞在参照物(胸腺)中所占面积百分比;计算胸腺树突状细胞密度。

结果与结论:随着年龄的增长,小鼠胸腺皮质变薄,皮髓质界限清楚。胸腺髓质由散在斑片状连成片。10 月龄小鼠胸腺实质部分明显减少,而被充满脂肪细胞的间质所取代。20 周龄小鼠的胸腺树突状细胞所占面积比和胸腺树突状细胞密度均比4 周龄的增加,然而10 月龄者则明显减少(P < 0.01)。10 月龄小鼠胸腺皮髓质交界处有较多 \$100*巨噬细胞。结果提示,随着鼠龄增加,小鼠胸腺结构呈退化趋势;老年鼠胸腺树突状细胞抗原提呈作用的减弱与胸腺树突状细胞数量的减少有密切关系。

关键词: 胸腺树突状细胞; 小鼠; 胸腺; 增龄; 形态学

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.31.026

刘仰斌,李启华.小鼠胸腺形态结构的增龄性变化[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(31):5805-5808. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

树突状细胞是机体抗原提呈细胞中最主要的和最有效的成分,是一种重要的免疫辅助细胞,对T细胞免疫反应的建立起至关重要的作用^[1]。胸腺作为中枢免疫器官,含有较多的胸腺树突状细胞(thymic dendritic cells,

TDCs)。TDCs通过递呈各种抗原来促进胸腺T淋巴细胞增殖、调控阴性选择及诱导自身免疫耐受,在调节细胞免疫和体液免疫中起重要的作用^[2-4],在肿瘤免疫移植免疫^[5]、疫苗制备等方面的作用也越来越大^[6-7]。本实验通过运用免

疫组织化学标记和光镜等方法,对小鼠胸腺指数、胸腺苏木精-伊红染色切片进行了观察,分析了不同年龄时期小鼠胸腺形态学变化,以期为TDCs研究提供良好的技术基础和形态学资料。

1 材料和方法

设计:对比观察动物实验。

时间及地点:实验于2008-12/2009-06在 赣南医学院解剖教研室完成。

材料: 昆明小鼠由本院实验动物中心提供(动物合格证号: JxA-2005025), 雌雄各半, 体

赣南医学院, 江西 省 赣 州 市 341000

刘仰斌★, 男, 1970 年生, 男, 省務州 2006 年生, 人, 4种技大学毕业, 主 村, 事细胞生生, 新教胞生物究。 8208303@sina.

中图分类号:R322 文献标识码:B 文章编号:1673-8225 (2010)31-05805-04

com

收稿日期: 2010-01-25 修回日期: 2010-03-05 (20090925004/W·Z)



质量20~25 g,饲养于清洁环境。30只小鼠分3组,每组10只,雌雄各半。第1组为出生4周龄的小鼠,第2组为20周龄的小鼠,第3组为10月龄的小鼠。实验过程中对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部2006年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》标准^[8]。

试剂: 兔抗小鼠S100和SABC试剂盒,购自武汉博士德生物工程有限公司。DT2000图像分析软件V2.0。 DigiLab 2.0、Motic Images Plus 2.0 ML软件。

实验方法:

标本处理: 将小鼠用20 g/L戊巴比妥钠全麻后,左心内40 g/L多聚甲醛灌注固定,剥离胸腺组织,称质量后投入40 g/L多聚甲醛继续后固定24 h,胸腺低温石蜡包埋切片,厚4 μm,苏木精-伊红染色,Olympus显微镜观察组织结构。

免疫组织化学标记和观察:胸腺切片常规脱蜡至水,1 g/L胰蛋白酶消化30 min (37 ℃),一抗4 ℃过夜(S100工作浓度为1:150)。余按试剂盒作SABC免疫组织化学技术处理。DAB显色。不复染或1%甲基绿轻度复染,常规脱水透明封固。阴性对照样本以PBS代替一抗进行标记,其余步骤相同。

用DT2000图像分析软件V2.0计数单位面积胸腺切片中阳性颗粒的个数和面积,计算S100⁺细胞在参照物(胸腺)中所占面积百分比。使用DigiLab 2.0、Motic Images Plus 2.0 ML软件计算TDCs密度:每组随机选取50个高倍视野拍照(0.068 mm²),计数S100⁺细胞的个数。TDCs密度=50个高倍视野S100⁺细胞总和/3.4 mm²(阳性颗粒最小直径≥2 μm时认作一个细胞)。

胸腺指数的计算: 胸腺指数(mg/g)= 胸腺体质量(mg)/小鼠体质量(g)。

主要观察指标:①不同年龄时期小鼠胸腺指数的比较。②小鼠胸腺光镜观察。③免疫组织化学标记观察。

统计学分析: 用统计学软件包SPSS 14.0进行数据分析,结果用x±s表示。不同性别小鼠胸腺体质量和胸腺指数的比较,采用组间t 检验。其余数据各实验组之间的比较采用单因素方差分析。单因素多个样本均数比较的方差分析,组间差异的检测用snk多重比较法。

2 结果

- 2.1 不同年龄时期小鼠胸腺指数的比较 各组小鼠胸腺外观均分两叶,但10月龄小鼠胸腺较绵软,颜色较黄,形态不甚规则。各组小鼠胸腺体质量和胸腺指数的比较见表1和表2。
- 2.2 光镜观察 4周龄小鼠胸腺皮质较厚,结构较致密,胸腺细胞丰富,染色较深。在密集深染的小淋巴细胞之间,可见一些体积较大、核染色浅的多角形分支状树突状细胞,即为TDCs。髓质呈散在斑片状,结构较

疏松,淋巴细胞成分较少,可见少量树突状细胞及胸腺小体。20周龄小鼠胸腺皮质变薄,皮髓质界限清楚。有少数斑片状髓质连成片。胸腺细胞仍非常密集。髓质各种细胞成份丰富。10月龄小鼠胸腺实质部分明显减少,而被充满脂肪细胞的间质所取代。皮质很薄,淋巴细胞减少,核深染,可见核碎片。皮质内出现散在或几个聚集在一起的脂肪细胞。皮髓质界限不清,内含较多胞质嗜酸性、单核浅染的巨噬细胞。胸腺髓质已由斑点状连成一片,其间上皮性网状细胞较多,且胞质丰富。

表 1 不同年龄时期小鼠胸腺体质量和胸腺指数的比较 Table 1 Comparison of thymus weight and index of mouse at different growth periods (x±s, n=10)

Group	Thymus weight (mg)	Thymus index (mg/g)
4-wk-old	110.90±12.42	5.31±0.93
20-wk-old	128.30±19.54	4.54±0.84 ^a
10-mon-old	109.70±34.41	3.40±0.63 ^{bc}

 $^{a}P < 0.05$, $^{b}P < 0.01$, vs. 4-wk-old; $^{c}P < 0.01$, vs. 20-wk-old

表 2 不同性别小鼠胸腺体质量和胸腺指数的比较 Table 2 Comparison of thymus weight and index of mouse with different genders (x±s, n=10)

Group	Thymus weight (mg)		Thymus index (mg/g)	
	Male	Female	Male	Female
4-wk-old	110.00±11.14	111.80±10.50	5.31±0.99	5.31±0.99
20-wk-old	115.20±19.86	143.40±9.60 ^a	4.01±0.72	5.11±0.53 ^a
10-mon-old	95.00±32.33	120.40±34.53	2.93±0.50	3.47±0.67

2.3 免疫组织化学标记观察 对比观察免疫组织化学染色及苏木精-伊红染色切片,可见苏木精-伊红染中显示的TDCs多数能呈现S100 表达。S100标记示TDCs胞浆内有深棕色颗粒表达(部分TDCs细胞核也有表达)。20周龄小鼠胸腺可见大量S100阳性表达的TDCs,特别在皮质以及皮髓质交界处较多,髓质也有数量较少的TDCs;4周龄小鼠S100阳性表达的TDCs也较多,但体积较小,多突起,主要分布在皮质,髓质和皮髓质交界处较少;10月龄小鼠胸腺皮质有数量较少的小而多突起的TDCs,髓质几乎看不到TDCs。但在皮髓质交界处可见较多S100阳性表达的大细胞,这些细胞成堆存在,细胞体积较大,胞质泡沫状,与HE染色片比较,确认这是巨噬细胞。而在其他各组胸腺免疫组织化学标记切片中少见。结果见表3和图1~4。

表 3 各组小鼠 TDCs 所占面积比和 TDCs 密度的比较 Table 3 Comparison of thymic dendritic cells (TDCs) occupied area ratio and TDCs density of mouse in

Group TDCs occupied area ratio (%) TDCs density (number/mm²)
4-wk-old 5.473±0.834 25.100±1.898

 $^{a}P < 0.01$, vs. 4-wk-old; $^{b}P < 0.01$, vs. 20-wk-old

7.655±0.660°

3.782±0.895^{ab}

each group

20-wk-old

10-mon-old

 $(\bar{x}\pm s, n=10)$

35.200±4.124⁸

18.600±1.775^{ab}



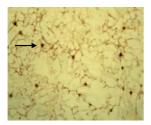


Figure 1 S100* thymic dendritic cells of 4-wk-old mouse (S100* immunohistochemistry, no counterstaining, × 400; arrow: dendritic cells)

图 1 4 周龄小鼠胸腺 S100*TDCs(S100*免疫组织化学显色,未复染,×400,箭头所指为树突状细胞)

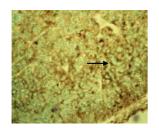


Figure 2 A large number of thymic dendritic cells presented at the junction of cortex and medulla of 20-wk-old mouse (S100* immunohistochemistry, methyl green-stained, ×400; arrow: dendritic cells at the junction of cortex and medulla)

图 2 20 周齡小鼠胸腺皮质及皮髓质交界处大量 S100⁺TDCs(S100⁺免疫组织化学显色,甲基绿复染, ×400,箭头所指为皮髓质交界处树突状细胞)

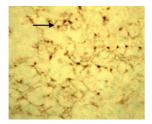


Figure 3 S100⁺ thymic dendritic cells of 20-wk-old mouse (S100⁺ immunohistochemistry, no counterstaining, × 400; arrow; dendritic cells)

图 3 20 周龄小鼠胸腺髓质的 \$100⁺TDCs (\$100⁺免疫组织化学显色,未复染,×400 发,箭头所指为树突状细胞)

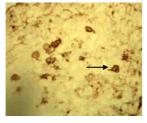


Figure 4 S100⁺ macrophage at the junction of cortex and medulla of 10-mon-old mouse (S100⁺ immunohistochemistry, no counterstaining, × 400; arrow: macrophage)

图 4 10 月龄小鼠胸腺皮髓质交界处 S100⁺大细胞(S100⁺ 免疫组织化学显色,未复染,**x400**,箭头所指为巨 噬细胞)

3 讨论

3.1 增龄对胸腺体质量的影响 胸腺是随增龄变化最 敏感的中枢免疫器官,它的体质量、形态及功能会随着 衰老而出现相应的变化。在幼年鼠,发生发育中的T细 胞数量多,而上皮性细胞比例则较少。青年鼠的髓质中 发现有更多的成熟T细胞,而且上皮性细胞及其它各类 的细胞也更为丰富[9-11]。本实验结果表明,胸腺指数随 着增龄而下降。至10月龄时小鼠胸腺实质部分明显减 少,而被充满脂肪细胞的间质所取代。小鼠胸腺细胞组 成比例的改变与上述报道相符。本实验在10月龄小鼠胸 腺切片上观察到较多S100标记表达阳性的巨噬细胞,且 主要分布在皮髓质交界处。巨噬细胞是胸腺基质细胞中 一员,但在小鼠胸腺的增龄变化中,它并不象其它胸腺 基质细胞那样减少,而是数量增多。这表明:巨噬细胞 随着增龄出现的抗原提呈功能的减退,出现了代偿性数 量增多,以加强吞噬作用,从而清除胸腺中随增龄出现 的更多的凋亡和坏死的各类细胞。有研究表明: 体内性 激素、生长激素等激素水平会对胸腺的重量、结构组成 产生影响[12-13]。从本实验看,雌鼠的胸腺体质量及胸腺 指数除幼年组外均高于雄鼠,与文献所述雌激素引起胸 腺体质量下降不太一致,此点尚需作进一步研究。

3.2 增龄对T细胞的影响 在增龄过程中,胸腺萎缩最显著的变化是胸腺皮质内胸腺细胞的大量死亡,但这并不改变胸腺细胞的分化顺序和亚群分布^[14]。胸腺细胞在胸腺内仍经历正常的从被膜下区、皮质区到髓质区的移行成熟过程,只是这一过程受到增龄对不同区域微环境的影响。微环境随增龄发生的改变导致对T细胞成熟过程所提供信号的改变,致使T细胞成熟过程受阻,成熟T细胞数量发生变化。另外,衰老还可以使骨髓中的原始T细胞迁移到胸腺的能力下降,这也是胸腺细胞减少和胸腺萎缩的原因之一。

树突状细胞是目前发现的功能最强的抗原提呈细胞,它几乎存在于所有哺乳类动物组织中^[15]。已有报道来自老年鼠的树突状细胞抗原提呈作用较来自青年鼠的要差^[16]。本实验各组小鼠TDCs数量表现出随增龄而发生着变化。20周龄小鼠的TDCs所占面积比和TDCs密度均比4周龄的增加,然而10月龄的则明显减少,经统计学分析,有显著性意义(P < 0.01)。这表明老年鼠TDCs抗原提呈作用的减弱与TDCs数量的减少有密切关系。

3.3 增龄对胸腺形态的影响 随着增龄,胸腺微环境中的细胞组成也会发生比例上的改变。在这过程中,胸腺发生退化最显著的改变是胸腺内胸腺细胞数量的减少,并伴有上皮细胞损伤、网状结构消失,以及它们所分泌的可溶性因子的减少。目前对微环境中另一重要成



份巨噬细胞在胸腺增龄过程中的变化有一些不同的观 点[17]。本实验通过光、电镜全面观察表明巨噬细胞的数 量是随年龄增加而增加的。由此可见,不是所有的基质 细胞都表现为破坏和数量减少,巨噬细胞除在增龄的过 程中对T、B细胞的辅助协同作用无明显变化,识别和提 呈抗原的能力有所下降以外, 主要表现还是细胞数量的 增多、吞噬和分泌功能的活跃[18-19],这可能是一种代偿 性反应[20]。该细胞通过数量的增多,功能的活跃来清除 大量的凋亡和坏死的胸腺细胞和胸腺基质细胞。以上情 况表明随着年龄增长胸腺微环境中的基质细胞组成会 发生一定改变,也许这正是细胞因子表达改变的关键因 素所在。关于增龄过程中胸腺微环境的改变与衰老的关 系还有待进一步研究。

参考文献

- Adema GJ. Dendritic cell from bench to bedside and back. [1] Immunol Lett. 2009;122(2):128-130.
- Rescigno M, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P, et a1. Dendritic [2] cells at the end of the millennium. Immunology and cell biology. 1999;77(5):404-412.
- Steinman RM. Dendritic cells and the control of immunity: [3] enhancing the efficiency of antigen presentation. Mt Sinai J Med.2001;68(3):106-113.
- Chen HY.Beijing: People's Medical Publishing House. 2008: [4] 68-73.
- 陈海英. 组织学与胚胎学. 北京: 人民卫生出版社, 2008: 68-73. Wang H, Ge W, Arp J, et al. Free bone graft attenuates acute [5] rejection and in combination with cyclosporin a leads to indefinite
- cardiac allograft survival. J Immunol.2009;182(10):5970-5981. Wu J, Hou JB, Zhang MM,et al. Protosappanin a, an [6] immunosuppressive constituent from a Chinese herb, prolongs graft survival and attenuates acute rejection in rat heart allograft. Transplant Proc.2008;40(10):3719-3722.

- Gong Q, Deng D, Ding J, et al. Trichosanthin, an extract of [7] Trichosanthes kirilowii, effectively prevents acute rejection of major histocompatibility complex-mismatched mouse skin allograft.Transplant Proc.2008;40(10):3714-3718.
- The ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部.关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- Petrie HT. Role of thymic organ structure and stromal composition in steady-state postnatal T-cell production. Immunol Rev. 2002:189:8-19
- Wei L, Liu L, Xu YD, et al. Zhongguo Laonianxue Zazhi. 2007;27(9): 832-835.
- 进展, 2008,14(1):24-27.
- Fenaux JB, Gogal RM Jr, Ahmed SA. Diethylstilbestrol exposure during fetal development affects thymus: studies in fourteen-month-old mice. J Reprod Immunol.2004;64(1-2): 75-90.
- Endo T, Kanayama K. Changes in the weight of the thymus after birth and in pregnancy in mice. Res Commun Mol Pathol Pharmacol.1998;101(3):307-310.
 Chen HY, Chen JM, Zheng JS. Changzhi Yixueyuan Xuebao.
- 2009;23(2):95-98. 陈海英, 陈建明, 郑建盛.胸腺细胞渐进性凋亡对大鼠脾脏淋巴细胞 增殖功能的影响[J].长治医学院学报, 2009;23(2):95-98.
- Bodey B, Siegel SE, Kaiser HE. Antigen presentation by dendritic cells and their significance in antineoplastic immunotherapy. In Vivo.2004;18(1):81-100.
- Grolleau-Julius A, Harning EK, Abernathy LM, et al. Impaired dendritic cell function in aging leads to defective antitumor
- immunity. Cancer Res. 2008; 68(15):6341-6349. Zhao TP,Xu YD,Zhong SQ,et al.Zhongguo Zuzhi Huaxue yu Xibao Huaxue Zazhi. 2008;17(5):475-479. 赵太平,徐玉东,钟淑琦,等. 小鼠胸腺巨噬细胞的免疫组织化学研究[J]. 中国组织化学与细胞化学杂志,2008,17(5):475-479.
- Lai AY, Kondo M. Identification of a bone marrow precursor of the earliest thymocytes in adult mouse. ProcNatl Acad Sci USA.2007;104 (15): 6311-6316.
- Seiz HM, Camenisch TD, Lemke G, et al. Macrophages and dendritic cells use different Axl / Mertk / Tyro3 receptors in clearance of apoptotic cells. J Immunol.2007;178(9):5635-5642.
- Perez-Pinera P, Garcia-suarez O, Prieto JG, et al. Thymocyte depletion affects neurotrophin receptor expression in thymic stromal cells. J Anat.2006;208(2): 231-238.



() 2762 ISSN 1673-8225 CN 21-1539/R 2010 年版权归《中国组织工程研究与临床康复》杂志社所有

肝、肾移植领域免疫抑制剂的应用: 本刊中文部③

6 单剂赛尼哌联合小剂量抗胸腺免疫球蛋白 在肾移植免疫诱导中的应用

罗道升,米其武,潘光辉(东莞市人民医院泌尿 外科)

2009年31期6027页

推荐理由: 赛尼哌是器官移植领域第一个 人源性的单克隆抗体,属于抑制性抗体,能有 效阻断白细胞介素2受体,特异性抑制活化T淋 巴细胞表面的白细胞介素2受体, 阻断T淋巴细 胞的活化过程, 从而阻断了排斥反应的中间链, 有效地抑制了排斥反应。实验应用单剂赛尼哌 联合小剂量抗胸腺免疫球蛋白进行免疫诱导, 旨在评估该方法的有效性和安全性。

实验纳入肾移植患者556例, 121例在应用 三联免疫抑制方案同时,应用赛尼哌联合抗胸 腺免疫球蛋白免疫诱导,其中89例属高危人群。 435例应用常规三联免疫抑制方案。提示单剂赛 尼哌联合短疗程抗胸腺免疫球蛋白在肾移植免 疫诱导中的应用是安全有效的,尤其对高危人 群具有更重要的临床价值。

7 氯沙坦及氨氯地平对肾移植患者24 h尿蛋 白及血、尿转化生长因子β1的影响 陈统清, 黄英伟, 孔耀中, 林敏娃, 吴碧红, 练桂英(佛山市第一人民医院肾内科)

2009年53期10541页

推荐理由:环孢素A的使用可引起血管紧张 素Ⅱ的过度表达和刺激肾小球旁器细胞分泌转 化生长因子β1,增加转化生长因子β1的合成, 而转化生长因子β1是慢性移植肾肾病过程中 参与纤维化进程的主要细胞因子。血管紧张素 Ⅱ受体拮抗剂氯沙坦及钙离子拮抗剂氨氯地平 是高血压患者的常用降压药,可以有效控制血

本文观察肾移植患者使用氯沙坦及氨氯地 平降血压治疗对24 h尿蛋白,血、尿转化生长 因子β1的影响,发现氯沙坦和氨氯地平可以获 得等同的降压效果,移植肾功能也无明显差别,

但氯沙坦同时可以显著降低24 h尿蛋白水平, 并使血清转化生长因子β1浓度下降大约50%。 而氨氯地平对于蛋白尿和转化生长因子β1无 影响。提示肾移植患者使用氯沙坦在改善患者 血压的同时, 还能改善蛋白尿和降低转化生长 因子β1的水平,该措施可能对慢性移植肾病的 预防及治疗具有重要价值。

8 蛋白A免疫吸附防治高致敏肾移植受者急性

沈蓓莉, 徐兆平(郑州人民医院器官移植科)

9 五酯胶囊对肾移植受者他克莫司全血浓度

胡建敏,陈桦,李民,赵明(南方医科大学珠江 医院器官移植科)

全文详见: http://www.crter.org/Html/2010_07_ 13/2_64027_2010_07_13_122208.html