

爬行动物胸腺胚胎发育和机能形态学研究*

李 玉 鹏

(烟台师范学院生物学系 烟台 264025)

王 平

(北京大学生命科学学院 北京 100871)

关键词 爬行动物 胸腺 胚胎发育 胸腺微环境 季节性变化

胸腺是免疫系统的中枢器官,是胸腺细胞发育分化和成熟的场所。成熟的胸腺细胞(T淋巴细胞)从其中迁居到其它免疫器官和组织,参与细胞免疫反应。对胸腺的真正认识则始于本世纪60年代 Miller 及 Good 的工作。此后,对胸腺和胸腺细胞分化的研究已发展成为现代免疫生物学的一个重要分支^[1-2]。近年来,胸腺微环境和神经内分泌因子在胸腺细胞发育分化中的调节作用又引起了人们的高度重

视^[1,3]。与此同时,从比较和进化的角度对胸腺也进行了大量研究,其中对鸡和蛙的研究最为突出^[4-5]。应用嵌合体和器官移植技术,在解决胸腺细胞的前体细胞(Progenitor cell,即定向干细胞)的起源问题上起到了重要作用。

* 国家自然科学基金资助项目,批文号 39170384;

第一作者介绍:李玉鹏,男,34岁,副教授,博士;

收稿日期:1997-04-16,修回日期:1997-06-15

随着发育和比较免疫学的发展,有关爬行动物免疫学的研究已积累了比较丰富的资料^[5]。根据我们实验室工作,结合国内外的已有报道,本文就爬行动物胸腺的有关研究进展进行综述,供国内同行参考。

1 胚胎发育

有关爬行动物胸腺的胚胎发育和组织发生的资料很少,仅有的结论主要见于对咽囊演化的研究。和其它非哺乳类脊椎动物一样,爬行动物的胸腺也起源于咽囊。胸腺原基为咽囊壁背突生长发育而成^[5]。

不同类群爬行动物胸腺起源于不同的咽囊。有鳞目蛇类的胸腺前叶和后叶分别起源于第4和第5对咽囊,而同一目的蜥蜴类则起源于第2和第3对咽囊。龟鳖目的胸腺主要起源于第3对咽囊,但第4对或第5对咽囊也参与某些龟鳖胸腺的器官形成。喙头目、鳄目和蚓蜥目(*Amphisbaenia* 或蚓蜥科)胸腺的胚胎发生尚未见有报道^[5-6]。

胸腺是爬行动物个体发育过程中最早出现的免疫器官。对变色树蜥(*Calotes versicolor*)和埃及蜥蜴(*Chalcides ocellatus*)胸腺的胚胎发育研究表明:胸腺原基由上皮细构成,为咽上皮外突形成,游离于间充质中。随着胚胎发育,未分化的细胞——成血细胞(hemoblast 或称定向干细胞、前淋巴细胞)和大淋巴细胞出现于胸腺原基上皮细胞之间。此后,大淋巴细胞包不断减少而中、小淋巴细胞逐渐增多。到孵化完成前,胸腺已可区分出皮质和髓质^[7-8]。对嗜龟(*Chelydra serpentina*)的研究亦表明在胚胎发育后期胸腺分化出皮质和髓质^[4,8]。虎斑颈槽蛇(*Rhabdophis tigrina*)胸腺淋巴干细胞和淋巴母细胞具有两种不同的超微结构类型,这点和B淋巴母细胞相似。胞腺微环境的发育主要以上皮细胞的分化为基础,而巨噬细胞和其它细胞出现较晚。在出生前(即第16期),皮质和髓质已形成。

虽然曾有人认为蜥蜴胸腺细胞起源于内胚层上皮细胞,但根据对哺乳动物和爬行动物胸

腺干细胞起源问题的研究,现在可以断定它们起源于胸腺以外的造血组织。通过对变色树蜥卵黄囊血岛、血液循环、间充质和胸腺原基中干细胞发生时序的组织学观察发现其胸腺细胞前体(Thymocyte precursor)来自血源性干细胞。对蜥蜴的研究亦支持这一观点^[7-8]。龟-鹌鹑嵌合体实验也证明水龟(*Emys orbicularis*)胸腺细胞前体来源于卵黄囊血岛和骨髓^[6,8]。

应用兔抗成体和胚胎胸腺细胞抗血清对埃及蜥蜴的研究表明:(1):胸腺细胞除一部分具有和外周T淋巴细胞相同的抗原外,还有一部分具有另一类抗原——胸腺细胞分化抗原。(2):胚胎期胸腺细胞不仅具有以上二种抗原阳性细胞,而且还具有胚胎期胸腺细胞所特有的抗原——胚胎期胸腺细胞分化抗原。说明胸腺细胞在分化过程中表现出不同的抗原特征,胚胎期胸腺和成体胸腺也不同,胚胎期部分胸腺细胞具有其自身的分化特点。应用兔抗埃及蜥蜴脑组织 Thy-1(脑组织具有胸腺细胞膜蛋白-1 决定簇的一种糖蛋白)分子的抗血清以对埃及蜥蜴胸腺的个体发育研究进一步表明:在埃及蜥蜴胚胎发育过程中,当胸腺分化成淋巴样组织后即检测出 Thy-1+ 细胞;随后细胞数量不断增加并且在出生前达到成体水平。这点和前面应用兔抗成体胸腺细胞抗血清的实验结果相同,显示它们可能基本上结合到同一类特异性膜蛋白上;在胚胎发育结束时,成体胸腺细胞和 Thy-1+ 特异蛋白的同时表达可能还进一步说明:成熟T细胞的这二种蛋白的决定簇间有一定的联系^[8]。

El Deeb 等还以凝集素——on A(拌刀豆球蛋白)刺激埃及蜥蜴胚胎期胸腺细胞发生增殖反应,测定个体发育过程中胸腺细胞应答能力出现的时期和发育变化。当胸腺发育为淋巴器官时,胸腺细胞即具有增殖反应;其后,随着胚胎发育增殖反应水平逐渐增高。但是,胚胎发育完成以后,初生仔蜥的增殖水平有所降低。这一方面揭示埃及蜥蜴在胚胎发育期间胸腺细胞成熟程度不断增加,反映出识别特异性抗原和免疫应答能力的不断增大;另一方面还表明

初生仔蜥胸腺内对 Con A 起反应的胸腺细胞亚群的成熟程度和比例与胚胎期有所不同^[8]。一般认为爬行动物的免疫成熟过程迟缓^[4]，而 El Deeb 等的工作则说明埃及蜥蜴在出生时免疫功能已建立。

2 形态结构

胸腺的解剖位置、大体形态和叶数在爬行动物四个目中变化较大，Cooper 等曾对此有详细的综述^[6]。对胸腺组织结构已有不少研究，但超微结构方面研究却很少^[4,6,9]。胸腺外被一层结缔组织被膜，后者伸入胸腺实质形成小梁。血管和神经通过小梁进入胸腺实质。发育良好的胸腺均由明显的二个组织学区域——皮质和髓质构成；淋巴细胞和上皮细胞是胸腺实质的主要细胞成分；和哺乳动物一样，胸腺皮质主要由胸腺细胞和上皮细胞构成，而髓质则主要由非胸腺细胞成分尤其是上皮细胞构成，胸腺细胞较少。虽然有人认为爬行动物胸腺实质没有神经纤维分布，但 Terni 则观察到陆龟 (*Testudo graeca*) 和水龟胸腺实质中有许多神经纤维。一些是血管运动性的，另一些则分布于肌样细胞周围和胸腺上皮细胞之间^[9]。

3 细胞类型

胸腺实质除胸腺细胞和上皮细胞外，还含有肌样细胞、巨噬细胞和指状镶嵌细胞等。和哺乳动物不同的是爬行动物胸腺没有典型胸腺小体，只有一些由上皮细胞围成的胸腺小囊^[9]。近年来对哺乳动物胸腺的研究证明，胸腺内的细胞成分复杂，指状镶嵌细胞、哺育细胞 (nurse cell)、巨噬细胞和各种胸腺上皮细胞上胸腺的一定区域与发育分化中的胸腺细胞亚群形成特殊的微环境——胸腺微环境 (Thymic microenvironment)，在胸腺细胞的发育分化中起着重要的调控作用^[1-2]。

3.1 胸腺细胞 (Thymocyte) 即胸腺内发育分化的 T 淋巴细胞。爬行动物的胸腺细胞大小为 4~8 μm，与外周血中的中、小型淋巴细胞相似^[6]。细胞核质比大，电子密度高，尤其是小

胞腺细胞。异染色质分布于核周边，胸质中充满游离核糖体；其它细胞器则较少，只有少数线粒体和不发达的 Golgi (高尔基) 复合体。除上述细胞外，胞腺皮质还有一些淋巴母细胞，胞体较大，电子密度稍低，常处于有丝分裂状态^[6]。

3.2 胸腺上皮细胞 (Thymic Epithelial Cell, TEC) 这种细胞在胸腺内彼此以桥粒相互连接，构成贯穿胸腺皮质和髓质的网络结构。细胞的共同特点是胞质中含有中间纤维——细胞角蛋白性质的张力丝^[9-10]。皮质胸腺上皮细胞胞质中含有一些电子致密颗粒、淡染性内含物和致密小体^[10]。与皮质胸腺上皮细胞不同，髓质支持性上皮细胞 (Supporting epithelial cell) 电子密度低，张力丝和桥粒少；但却含有较多的线粒体、粗面内质网片段、发达的 Golgi 复合体和电子致密小颗粒，细胞具有一定的分泌能力。这类细胞常与胸腺髓质的胸腺小囊壁有关联^[10]。Saad 和 Zapata^[9]认为虽然缺乏对爬行动物胸腺激素的形态定位和功能研究，但上述细胞与其它脊椎动物胸腺合成分泌胸腺激素的细胞结构相似。

哺乳动物胸腺上皮细胞的异质性是近年来研究的焦点^[1-2]。虽然国外有学者在爬行动物中已注意到这一点，但尚无深入研究^[9]。本文对虎斑颈槽蛇胸腺的研究表明，胸腺上皮细胞是构成微环境最复杂和重要的细胞成分，在结构和功能上都表现出一定的异质性。其中一部分上皮细胞含有较小的分泌颗粒，具有明显的分泌功能；而另一部分细胞不含有分泌性颗粒，和其它基质细胞在胸腺不同区域共同构成局部微环境。不同区域的上皮细胞在角蛋白表达和超微结构上有各自的特点。胸腺上皮细胞形态结构的多样性反映了其对 T 淋巴细胞分化的相关性适应。

3.3 胸腺小囊 (Thymic cyst) 是非哺乳类脊椎动物胸腺实质中的一种特殊结构。因它主要由上皮细胞构成，一般认为是由上皮细胞发育或退化成的一种上皮性小囊 (Epithelial cyst)。根据构成小囊的细胞数量，分为单细胞小囊和多细胞小囊。在有些爬行动物，如盲蜥 (*Bianus*

cinereus)胸腺实质常出现真正的退化性胸腺上皮细胞^[9]。

多细胞胸腺小囊的壁由不同的胸腺上皮细胞和非胸腺上皮细胞构成。最常见的是具有短微绒毛或纤毛的淡染型胸腺上皮细胞或深染型的上皮细胞,它们被覆在小囊的腔面。小囊腔内常含有 PAS 和 Alcian 蓝阳性物质以及退化的细胞(如淋巴细胞和颗粒细胞)和细胞碎片。

胸腺小囊的发育和生理功能还不清楚。Saad 和 Zapata 认为过去所谓的胸腺小囊与分泌胸腺激素有关的看法已不再被认可,而赞同其与退化有关的观点^[9]。另一方面,对爬行动物胸腺有无胸腺小体样结构还有争议。Duda 和 Gupta 认为有类似的结构;而其他一些学者则持怀疑的态度,我们在虎斑颈槽蛇胸腺髓质中也未观察到胸腺小体。所谓的胸腺小体可能是胸腺上皮细胞团或变形的胸腺小囊^[9]。

3.4 巨噬细胞和指状镶嵌细胞 (Macrophage and Interdigitating Cell) 巨噬细胞是胸腺微环境中另一重要的基质细胞。其功能不仅能吞噬凋亡的胸腺细胞,还可分泌多种细胞因子,调节控制胸腺细胞的发育分化^[11]。爬行动物胸腺皮质和髓质分布有一定数量的巨噬细胞,胞质中含有发达的 Golgi 复合体、粗面内质网小片段以及许多处于不同退化状态的结构,如致密的多泡小体髓磷脂样结构^[9-10]。

对虎斑颈槽蛇胸腺的研究表明,巨噬细胞的结构和组化特性与哺乳类相似,但在蛇胸腺中具有两种分布形式——单个或群集。单个巨噬细胞所含溶酶体和吞噬物较少,高尔基复合体等细胞器较发达,表明具有较强的分泌功能;群集巨噬细胞所含溶酶体和吞噬物多,但高尔基复合体等较不发达,具有较强的吞噬能力。说明巨噬细胞在胸腺内与 T 淋巴细胞的发育分化和凋亡淘汰的局部微环境有密切关系。

指状镶嵌细胞,是一类抗原递呈细胞。Leceta 等^[11-12]发现拟水龟 (*Mauremys caspica*)胸腺髓质的淋巴细胞间分布有指状镶嵌细胞。细胞所含细胞器较少,主要是些杆状线粒体和个别电子致密颗粒。有时,指状镶嵌细胞

含有许多大的细胞碎片,表明其具有吞噬能力。Leceta 等认为它们属于单核细胞-指状镶嵌细胞系 (Monocyte-interdigitating cell lineage),并具有季节性变化^[10]。我们在虎斑颈槽蛇胸腺髓质也观察到类似的细胞类型,支持 Leceta 等的观点。有关指状镶嵌细胞在爬行动物胸腺中的功能和起源还不清楚。

3.5 肌样细胞 (Myoid Cell) 又称类肌细胞,爬行动物胸腺肌样细胞数量多,主要分布于胸腺髓质。光镜下,细胞核染色较淡,呈圆形、椭圆形或长形;胞质充满典型的具有横纹的肌原纤维束。肌原纤维以不同的走向环绕胞核,在同一切面上可看到纵向、横向和斜向的肌原纤维断面。爬行动物肌样细胞含有粗肌丝和细肌丝,肌节的排列和横纹肌相同。在肌原纤维之间,分布着游离核糖体、糖原颗粒、线粒体和肌质网;在 A 和 I 带交接处,有时可见到三联体。肌样细胞和胸腺上皮细胞之间以桥粒相连。除成熟的肌样细胞外,爬行动物胸腺中还有未成熟和退化的肌样细胞^[13]。

肌样细胞在爬行动物胸腺内处于发育分化和退化的变化过程中其与横纹肌不同。肌样细胞发育不仅受到环境因素的影响,而且在胸腺内还含有形成肌样细胞(即 Myogenesis)的能力。定量研究表明,随着虎斑颈槽蛇生长发育和年周变化肌样细胞数量发生相应的变化。

对肌样细胞的起源和功能尚有不同看法^[9]。有些学者认为肌样细胞起源于胸腺上皮细胞^[6,13];而另外一些学者则认为是由进入胸腺的干细胞或成肌细胞 (Myoblast) 分化而成^[9]。免疫组织化学研究证明肌样细胞和胸腺上皮细胞是完全不同的二个细胞系^[14]。

3.6 胸腺 APUD 细胞 (Thymic APUD Cell) 又称胸腺神经内分泌细胞 (Neuroendocrine cell),以前因细胞性质不明确曾称为内分泌样细胞 (Endocrine-like cell)^[9]或胸腺分泌细胞 (Thymic secretory cell)。细胞的特征是胞质中含有小而致密的分泌颗粒,颗粒形态和肾上腺素能神经末梢内的颗粒相似。另外,还有些细胞的颗粒较大,圆形或长椭圆形,电子密度中

等^[9]。Bockman 和 Winborn 认为这类细胞的结构和胰岛的 β 细胞相同, Zapata 等认为其与胸腺激素的分泌有关^[6]。本文对虎斑颈槽蛇胸腺进行了深入研究, 结果表明胸腺的这种细胞具有神经内分泌细胞的属性, 并应用多种鉴定方法确证它们是一类分布于胸腺实质中特殊的神经内分泌细胞, 命名为胸腺 APUD(胺前体摄取和脱羧)细胞或胸腺神经内分泌细胞^[1, 15]。

应用鉴定神经内分泌细胞的特殊组织化学、免疫组织化学和电镜技术, 对虎斑颈槽蛇胸腺的研究表明, 主要在胸腺髓质分布着一些含有小分泌颗粒的细胞。颗粒具有嗜银性和(或)亲银性、Pb-苏木精染色阳性等特点。免疫组织化学染色, 颗粒呈 5-HT、CCK、SOM 和 Gas 等多种神经递质和神经内分泌激素免疫反应阳性。电镜观察, 细胞具有胃肠胰内分泌细胞和呼吸道神经内分泌细胞的超微结构特点^[1, 15]。依据神经内分泌细胞的分类指征, 初步将其分为三类^[1]。

虽然对这类细胞的起源和功能还不清楚, 但根据我们的研究结果和近年来对神经内分泌免疫网络的研究进展, 可认为爬行动物胸腺神经内分泌细胞可能与胸腺激素的合成分泌无关, 而是作为一类具有分泌神经内分泌激素和因子的细胞, 调节控制着胸腺微环境的生理功能和胸腺细胞的发育分化。

4 胸腺季节性变化和皮质类固醇作用

虽然爬行动物胸腺的季节性变化和年龄变化很早已为人们所注意, 但一直到 70 年代末才被重视^[6, 10]。El Ridi 实验室先后对埃及蜥蜴、石龙子 (*Scincus scincus*) 和邵氏花条蛇 (*Psammophis schokari*) 等的免疫系统的季节变化进行了观察^[16]。结果表明: 蜥蜴胸腺从春末到夏末皮质和髓质分化明显, 胸腺细胞增多, 而胸腺小囊较少。从秋季开始到冬季结束, 胸腺不断退化, 胸腺体积缩小, 胸腺细胞逐渐减少; 而胸腺小囊数量则相对增多。到来年春初, 胸腺又开始复壮。有趣的是花条蛇与上述蜥蜴有所不同, 胸腺不仅在冬季退化, 而且还在夏季发

生退化, 我们对虎斑颈槽蛇的研究与此相同。从免疫应答和混合白细胞反应等方面也证明胸腺具有类似的季节性变化^[15, 17]。Zapata 实验室对拟水龟的研究表明其胸腺的季节性变化特点和蜥蜴相似, 而和蛇不同^[18]。

从以上研究可以看出, 胸腺退化, 胸腺细胞减少, 胸腺小囊增多, 细胞免疫功能的显著减少是胸腺退化的特征。但是, 退化后的胸腺是否还具有其它功能, 在爬行动物中尚不清楚。Plytycz 和 Bigaj 对欧洲林蛙 (*Rana temporaria*) 胸腺的研究表明冬眠期的胸腺是一个内分泌器官, 其功能是促进 T 淋巴细胞在外周免疫器官中的最终成熟^[19]。

关于引起胸腺季节性变化的原因, 尚有争论。Kendall 认为冬眠与胸腺的季节性变化有关^[10], 但也有实验结果不支持这一观点, 如夏季低温处理鱼和林蛙, 未发生类似冬眠引起的退化。另一方面, 胸腺的季节性变化可能与神经内分泌系统中起免疫抑制作用的激素有关^[10]。埃及蜥蜴是一种无冬眠现象的蜥蜴, Saad 的研究表明其内源性皮质类固醇浓度和胸腺发育程度呈负相关^[20]。从初春到初秋, 高度发达的胸腺和较强的免疫应答能力与血液中低浓度的皮质类固醇含量是一致的; 而从秋季中期开始到冬季结束, 皮质类固醇浓度逐渐增加, 这与胸腺的退化程度相吻合。Leceta 等对成体雄拟水龟的研究也证明胸腺等免疫器官的季节性变化和皮质类固醇的浓度有关。说明胸腺的季节性变化至少和神经内分泌系统产生的某些激素有一定的关系。为了深入探讨类固醇类激素与免疫系统的关系, Saad 等又研究了外源性类固醇——氢化可的松对埃及蜥蜴免疫系统的影响。发现胸腺重量与氢化可的松浓度直接相关, 在注射后 3~7 天影响最严重, 使胸腺细胞减少 85%, 剩余的为 T 淋巴细胞分化抗原阴性细胞。体外淋巴细胞培养实验结果表明胸腺细胞比其它淋巴细胞对氢化可的松更敏感, 氢化可的松处理后, 与 T 淋巴细胞相关的免疫反应受到影响, 同种异体皮肤移植排斥反应延迟, MLR 中对异体抗原的增殖能力降低, 抗大鼠红

细胞抗体生成减少,而非 T 淋巴细胞依赖性抗原的体液免疫反应不受影响^[20]。说明免疫系统和内分泌系统之间有着重要的联系,且主要是通过中枢免疫器官——胸腺来实现的(见李丕鹏博士论文,北京大学研究生院,1994.1~199.)。

总之,虽然对爬行动物胸腺的研究已取得了一些有价值的结果,但进展尚不够深入和完善,有些方面还刚开始。随着对胸腺生物学深入研究,胸腺系统发育问题和比较生物学问题将更受到免疫学和动物学工作者的重视。对爬行动物胸腺微环境的构成、基质细胞异质性、胸腺激素和细胞因子、神经内分泌细胞及其激素,以及它们在胸腺细胞发育分化中的作用等方面的深入研究将成为今后的重点领域。

参 考 文 献

- Kendall, M. D. The functional anatomy of thymic microenvironment. *J. Anat.*, 1992, 177(1):1-29
- Ritter, R A., I. N. Cryspe, Thymus. London: Oxford Press, 1992
- Adre, R., D. L. Felton, N. Cohon. Sychoneuroimmunology (2nd ed). New York: Academic Press, 1991. 1-32
- Cohen, N., M. M. Sigel. The Reticuloendothelial System. 3: Phylogeny & Anatogeny New York: Plenum Press. 1985
- Zapata, A. G., E. L. Cooper. The Immune system: Comparative Histo-physiology. Michester: John Wiley & Sons, 1991
- Cooper, E. L., A. E. Klempau, AL. G. Zapata. Reptilian immunity. In: "Gans, C. et al eds. Biology of the Reptilia New York; Wiley Interscience. 1985, 15: 599-678"
- El Deeb, S., S. Zada, R. El Ridi. Ontogeny of hemopoitic and lymphopoitic tissues in the lizard, *Chalcides ocellatus*. *J. Morphol.*, 1985, 185(1): 241-253
- El Deeb, S., A-H. Saad. Ontogenic maturation of the immune system in reptiles. *Dev Comp Immunol.* 1990, 14(1):151-159
- Saad, A-H., A. Zapata. Reptilian thymus gland. *Thymus*, 1992, 20(2): 135-152
- Kendall, M. D. The Thymus Gland. London: Academic Press 1981
- Leceta, J., E. Garrido, H. Torroba, A. G. Zapata. Ultrastructural changes in the thymus of the turtle, *Mauremys caspica* in relation to the seasonal cycle. *Cell Tissue Res.*, 1989, 256(2): 213-219
- Leceta, J., A. Villena, B. Razquin, J. Fonfria, A. G. Zapata. Interdigitating cells in thymus of the turtle. *Mauremys caspica*. Possible relationship to macrophages. *Cell Tissue Res.*, 1984, 238(3): 381-385
- Raviola, E., G. Raviola. Striated muscle cells in the thymus of reptiles and birds: an electron microscopic study. *Am. J. Anat.*, 1967, 121(4): 623-646
- 李丕鹏,王平.蛇胸腺的 APUD 细胞.中国科学(B), 1994, 24(11):1178-1181
- Li Pipeng, Wang Ping. Ultrastructural study of the thymic APUD cells and their relationship to the adjacent cells in snake. *Dev Comp Immunol.* 1994, 17(SUP.) :73
- El Ridi, R., A. H. Saad, S. El Deeb. Cyclic changes in differentiation of lymphoid cells in reptiles. *Cell Different.* 1988, 24(1):1-8
- Farag, MA., R. El Ridi. Mixed leukocyte reaction in the snake, *Psmammophis sibilans*. *Immunol.* 1985, 55(1): 173-181
- Leceta, J., A. G. Zapata. Seasonal changes in the thymus and spleen of the turtle *Mauremys caspica*. A morphometrical, light microscopic study. *Dev Comp. Immunol.* 1985, 9(3): 653-668
- Plytycz, B., J. Bigal. Seasonal cycle changes in the thymus of adult frog *Rana temporaria*. *Thymus.* 1983, 5(2):327-335
- Saad, A-H. Corticosteroids and immune system of non-mammalian vertebrates: a review. *Dev Comp Immunol.* 1989, 12(1):120-132