

成年贵州小型猪脾脏的组织形态学观察及免疫组化研究

王 平¹, 田维毅¹, 王文佳¹, 巫 霞², 刘 霞³

(1. 贵阳中医学院 病原生物与免疫学教研室, 贵阳 550002; 2. 贵阳中医学院 形态实验室, 贵阳 550002; 3. 贵阳中医学院 组织胚胎学教研室, 贵阳 550002)

中图分类号: S828

文献标识码: A

文章编号: 1004-7034(2012)08-0008-03

关键词: 贵州小型猪; 脾脏; 免疫组化

摘 要: 为了给人类免疫相关疾病模型的建立提供参考, 试验分别取 24 头贵州小型猪脾脏组织进行组织形态观察, 用免疫组化 SP 法检测 CD₃、CD₄、CD₈ 及 CD₂₀ 阳性细胞的比例和分布。结果表明: 12 头雌性小型猪脾脏指数为 18.91 ± 1.59 , 12 头雄性小型猪脾脏指数为 17.26 ± 2.44 , 无显著差异 ($P > 0.05$)。CD₃⁺、CD₄⁺、CD₈⁺ 细胞主要分布在动脉周围淋巴鞘, CD₂₀⁺ 细胞主要分布在脾小体, 12 头雌性小型猪 CD₃⁺、CD₄⁺、CD₈⁺、CD₂₀⁺ 细胞比例 (46.67 ± 6.56 , 24.25 ± 5.04 , 25.33 ± 4.52 , 52.83 ± 6.60) 与雄性小型猪 (43.17 ± 7.58 , 23.33 ± 3.58 , 23.58 ± 5.91 , 54.42 ± 9.27) 比较无显著差异 ($P > 0.05$)。CD₄⁺/CD₈⁺ 比值在 0.7~1.5 之间波动; 雌性小型猪和雄性小型猪脾脏中 CD₂₀⁺ 细胞比例均较 CD₃⁺ 细胞多, 差异有显著性 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

Morphological observation and immunohistochemical study of spleen tissues in adult *Sus scrofa domestica* var. *mino Guizhounensis* Yu.

WANG Ping¹, TIAN Wei-yi¹, WANG Wen-jia¹, WU Xia², LIU Xia³

(1. Teaching and Research Section of Pathogenic organism and Immunology, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 2. Laboratory of Morphology, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China; 3. Teaching and Research Section of Histology and Embryology, Guiyang College of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China)

Key words: *Sus scrofa domestica* var. *mino Guizhounensis* Yu.; spleen; immunohistochemistry

Abstract: To observe the morphological and immunochemical features of the spleen of adult *Sus scrofa domestica* var. *mino Guizhounensis* Yu. and provide normal reference for the establishment of the human immune-related disease models. The spleen tissues taken from twenty-four *Sus scrofa domestica* var. *mino Guizhounensis* Yu. were fixed and sliced to observe the morphologic characteristics of the spleen using light microscopy with hematoxylin and eosin (H&E) staining. The proportion and distribution of the positive cells from CD₃, CD₄, CD₈ and CD₂₀ in the spleen were detected using immunohistochemical S-P method. The results showed that the spleen index of male and female *Sus scrofa domestica* var. *mino Guizhounensis* Yu. were 18.91 ± 1.59 and 17.26 ± 2.44 respectively, and the difference was not statistically significant ($P > 0.05$). The CD₃⁺, CD₄⁺ and CD₈⁺ positive cells were mainly distributed in the periarterial lymphatic sheath, and CD₂₀⁺ positive cells were mainly distributed in the splenic corpuscle. No significant differences were found between male and female *Sus scrofa domestica* var. *mino Guizhounensis* Yu. in the percentages of positive cells for CD₃, CD₄, CD₈ and CD₂₀ ($P > 0.05$). and the ratios of CD₄⁺ to CD₈⁺ fluctuated between 0.7 to 1.5. The CD₂₀⁺ positive cells from the spleen were more than the CD₃⁺ positive cells in the percentages of positive cells between male and female *Sus scrofa domestica* var. *mino Guizhounensis* Yu., and the difference had statistical significance ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

实验用小型猪是一种具有良好应用前景的中型实验动物, 在解剖、组织、生理、营养及代谢等方面均

与人类极其相似, 因此在生命科学研究领域中具有重要的实际应用价值^[1]。CD₃、CD₄、CD₈、CD₂₀ 是淋巴细胞表面重要的膜分子, 对于 T 淋巴细胞和 B 细胞的识别、黏附、分化具有重要作用。CD₃、CD₄、CD₈、CD₂₀ 细胞阳性率是基础免疫学和临床免疫学研究的重要指标^[2]。贵州小型猪 (*Sus scrofa domestica* var. *mino Guizhounensis* Yu.) 是贵阳中医学院培育的实验用小

收稿日期: 2011-11-09; 修回日期: 2012-06-12

基金项目: 贵州省科技基础条件平台项目 (黔科平台 [2009] 4008)

作者简介: 王 平 (1977-), 女, 讲师, 硕士, zyxywp@163.com.

通信作者: 田维毅 (1972-), 男, 教授, 硕士.

型猪, 体型微小、成熟早、耐受性强、品种特征稳定, 是国内最重要的几种实验用小型猪种群之一, 有关其实验动物化的研究已有近30年的历史, 在基础研究和动物模型应用方面积累了丰富的研究成果, 但有关贵州小型猪免疫器官的研究报道较少。为了加快贵州小型猪的开发应用, 试验对成年贵州小型猪重要的外周免疫器官——脾脏进行了形态学和免疫组化研究, 测定了 CD_3 、 CD_4 、 CD_8 、 CD_{20} 细胞数量, 并对不同性别动物的参数进行对比, 以期建立人类免疫相关疾病模型及组织器官移植相关研究提供一定参考依据。

1 材料

1.1 动物

成年贵州小型猪(12~18月龄)共24头, 雌雄各半, 按性别分成2组, 平均体重为 (30.6 ± 0.25) kg, 由贵阳中医学院动物所提供。

1.2 主要试剂

兔抗猪 CD_3 、 CD_4 、 CD_8 、 CD_{20} 单克隆抗体及相应SP免疫组化试剂盒, 购自上海晶天生物科技有限公司。

2 方法

2.1 脾脏指数的测定

动物称重后用速眠新麻醉, 腹主动脉放血致死, 立即取出脾脏, 剥离周围组织, 测量脾脏大小, 用电子天平称湿重, 以毫克为单位, 每10 g体重中脾脏所占重量(mg/10 g)表示脾脏指数。

2.2 常规石蜡切片的制备

分别在24头猪脾脏中部取一块组织($0.5\text{ cm} \times 0.5\text{ cm} \times 0.1\text{ cm}$), 用新配的4%多聚甲醛固定24 h, 梯度乙醇脱水, 石蜡包埋, 制作石蜡切片, 常规H.E.染色, 显示脾脏的组织结构, 显微镜下观察, 拍照。

2.3 免疫组化SP法

石蜡切片脱蜡至水后, 高温抗原修复, 用正常山羊血清封闭, 滴加一抗($1:100$), 4°C 过夜; 用 0.1 mol/L PBS洗3次(每次5 min); 滴加生物素化二抗(IgG), 37°C 作用20 min; 0.1 mol/L PBS洗3次(每次5 min); 滴加辣根酶标记链霉卵白素工作液(S-A/HRP), 37°C 作用20 min; 0.1 mol/L PBS洗3次(每次5 min); DAB显色; 苏木素复染细胞核, 中性树脂封片。阴性对照为用PBS缓冲液代替一抗, 其余步骤同前。每个标本每个指标随机取切片1张, 应用图像分析系统进行检测, 在高倍镜下每张切片随机取5个视野, 分别计数每个视野内的 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 、 CD_{20}^+ 细胞数。

2.4 免疫组化评分标准

细胞膜或细胞质出现棕黄色颗粒为阳性。每张切片选5个高倍视野, 每个视野计数100个细胞, 采用HIS评分^[3], 具体如下: 1) 阳性细胞数分级(记为A): $0 \sim <1\%$ 为0, $\geq 1\% \sim <10\%$ 为1, $\geq 10\% \sim$

$<50\%$ 为2, $\geq 50\% \sim <80\%$ 为3, $\geq 80\% \sim <100\%$ 为4。2) 阳性细胞显色强度分级(记为B): 0为阴性, 1为弱阳性, 2为阳性, 3为强阳性。3) $HIS = A \times B$: 0分为-, 1~4分为+, 5~8分为++, 9~12分为+++。

2.5 统计学分析

试验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 t 检验比较性别组间差异的显著性, 全部数据用SPSS17.0统计软件处理, 以 $P < 0.05$ 表示差异显著有统计学意义。

3 结果

3.1 大体形态学特点

脾脏形态呈镰刀形, 外缘凸, 呈锯齿状, 雌性小型猪脾脏长 (15.26 ± 1.98) cm, 宽 (3.28 ± 0.31) cm, 厚 (1.85 ± 0.22) cm; 雄性小型猪脾脏长 (14.83 ± 2.14) cm, 宽 (3.06 ± 0.23) cm, 厚 (1.82 ± 0.14) cm。各指标比较差异不显著。

3.2 脾脏指数

12头雌性小型猪的脾脏重量为 (57.14 ± 6.09) g, 脾脏指数为 18.91 ± 1.59 ; 12头雄性小型猪的脾脏重量为 (54.18 ± 4.45) g, 脾脏指数为 17.26 ± 2.44 , 两者比较差异不显著。

3.3 脾脏的组织结构

贵州小型猪脾脏由被膜和实质两部分组成(见174页彩图1), 被膜表面较光滑, 较厚而致密, 内含丰富的平滑肌和弹性纤维, 被膜伸入脾实质形成较粗大的脾小梁, 小梁内可见小梁动静脉。实质分为白髓和红髓。白髓分散在脾实质内, 由密集的淋巴细胞组成, 包括脾小体和动脉周围淋巴鞘, 可见中央动脉。脾小体典型而丰富, 多呈圆形, 脾小体内生发中心明显, 染色淡, 由大、中淋巴细胞构成。脾小体外围染色深, 细胞体积小, 分布密集。动脉周围淋巴鞘比较发达, 位于脾小体一侧或单独存在, 有时可见2个淋巴鞘分布在一起(见174页彩图2)。边缘区位于白髓和红髓间, 由较白髓稀疏的淋巴组织组成。红髓主要分布在被膜下和小梁的周围, 或填充于白髓之间, 由脾索和脾血窦组成, 其间填充大量的红细胞。脾索由淋巴细胞、红细胞和网状纤维相互连接成分支条索状, 条索状脾索再相互交织为网状。脾血窦分布于脾索中, 形状不一, 有的呈圆形, 有的呈索状。

3.4 免疫组化观察

3.4.1 脾脏中 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ T淋巴细胞的分布和比例 CD_3 、 CD_4 、 CD_8 细胞表达于T淋巴细胞表面, 细胞膜和细胞质呈浅黄到棕褐色着色为阳性。脾脏 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞主要分布在动脉周围淋巴鞘(见175页彩图2~4), 应用图像分析系统对 CD_3^+ 、 CD_4^+ 、 CD_8^+ 细胞比例及 CD_4^+/CD_8^+ 比值进行检测, 结果见表1, 并进行免疫组化评分, 结果见表2。结果显示雌性小型猪上述各项指标与雄性小型猪比

较差异不显著。

表1 阳性细胞比例($\bar{x} \pm s$ $n=12$)

Table 1 The percentage of positive cells($\bar{x} \pm s$ $n=12$)				
组别	CD ₃ ⁺ /%	CD ₄ ⁺ /%	CD ₈ ⁺ /%	CD ₄ ⁺ /CD ₈ ⁺
雌性	46.67 ± 6.56	24.25 ± 5.04	25.33 ± 4.52	0.98 ± 0.26
雄性	43.17 ± 7.58	23.33 ± 3.58	23.58 ± 5.91	1.13 ± 0.39

表2 贵州小型猪免疫组化评分($\bar{x} \pm s$ $n=12$)

Table 2 The immunohistochemical score of <i>Sus scrofa domestica</i> var. <i>mino Guizhouensis</i> Yu. ($\bar{x} \pm s$ $n=12$) 分			
组别	CD ₃ ⁺	CD ₄ ⁺	CD ₈ ⁺
雌性	5.17 ± 3.07	3.17 ± 1.58	3.92 ± 2.19
雄性	4.83 ± 2.48	3.67 ± 1.87	3.33 ± 2.14

3.4.2 脾脏中 CD₂₀⁺ B 淋巴细胞的分布和比例
CD₂₀是人类 B 淋巴细胞表面特有的标识,它高表达于所有正常 B 淋巴细胞。试验证实 CD₂₀⁺细胞主要分布于脾小结(见 175 页彩图 5)脾小结尤其在脾小结内生发中心中见到大量 CD₂₀⁺细胞,体积较大,染色较浅。脾小结外围染色深,细胞体积小,分布密集,为 CD₂₀⁻细胞。12 头雌性猪 CD₂₀⁺细胞比例为 52.83% ± 6.60%,雄性猪为 54.42% ± 9.27%,差异不显著($P > 0.05$),见表 3。

表3 阳性细胞比例($\bar{x} \pm s$ $n=12$)

Table 3 The percentage of positive cells($\bar{x} \pm s$ $n=12$) %		
组别	CD ₂₀ ⁺	CD ₃ ⁺
雌性	52.83 ^a ± 6.60	46.67 ^{a△} ± 6.56
雄性	54.42 ^a ± 9.27	43.17 ^{a△△} ± 7.58

注:同列数据肩标小写字母相同表示差异不显著($P > 0.05$);与 CD₂₀⁺比较,数据肩标△表示差异显著($P < 0.05$),△△表示差异极显著($P < 0.01$)。

3.4.3 脾脏中 CD₂₀⁺ B 淋巴细胞和 CD₃⁺ T 淋巴细胞百分率比较
CD₂₀细胞高表达于所有成熟 B 淋巴细胞表面,代表成熟 B 淋巴细胞总数。CD₃细胞高表达于所有成熟 T 淋巴细胞表面,代表成熟 T 淋巴细胞总数。雌、雄小型猪 CD₂₀⁺细胞和 CD₃⁺细胞百分率见表 3 结果显示,雌、雄小型猪脾脏中 CD₂₀⁺细胞比例均显著或极显著高于同组 CD₃⁺细胞。

4 讨论

脾脏是机体重要的免疫器官,含有大量的免疫细胞,是 T、B 淋巴细胞居留增殖以及淋巴细胞接受抗原刺激、发生特异性免疫应答的场所。脾脏指数是一项与免疫功能相关的指标,本试验结果显示正常成年贵州小型猪脾脏指数为 18.44 ± 1.63,无性别差异。CD₃是 T 淋巴细胞的表面标志,表达于所有成熟 T 淋

巴细胞表面,代表成熟 T 淋巴细胞总数,成年贵州小型猪 CD₃⁺ T 淋巴细胞比例为 44.92 ± 7.16,无性别差异。T 淋巴细胞是机体重要的免疫调节细胞,为非均一的细胞群体,根据表面所表达的膜分子类型的不同,可将成熟 T 淋巴细胞分为 CD₄⁺和 CD₈⁺ T 淋巴细胞 2 个亚群,CD₄细胞主要分布于辅助性 T 淋巴细胞和诱导性 T 淋巴细胞,CD₈细胞主要分布于杀伤性 T 淋巴细胞和抑制性 T 淋巴细胞,正常免疫应答过程有赖于各 T 淋巴细胞亚群相互协作、相互制约,以形成适度的免疫应答,CD₄和 CD₈阳性细胞的数量及比值可以反应机体的免疫应答水平。本试验结果证实猪脾脏中 CD₄⁺和 CD₈⁺ T 淋巴细胞主要分布在动脉周围淋巴鞘,CD₄⁺/CD₈⁺在 0.7 ~ 1.5 之间波动,24 份标本中有 14 份 CD₄⁺细胞比例低于 CD₈⁺细胞,这与人们通常认为 CD₄⁺细胞较 CD₈⁺细胞多的说法有一定差异。CD₄与 CD₈细胞阳性率总和超过 CD₃,原因可能是小型猪脾脏中可能存在 CD₄、CD₈双阳性 T 淋巴细胞(DP 细胞)。F. A. Zuckermann 等^[4]已证实猪外周血、支气管、肠系膜淋巴结等组织中可见 DP 细胞,本试验提示在小型猪脾脏中也有可能存在 DP 细胞。此类 DP 细胞是否成熟,是否能作为一个独立的细胞亚群具备一定的免疫功能尚待进一步研究。CD₂₀细胞是人类 B 淋巴细胞表面特有的标识,它高表达于所有正常 B 淋巴细胞,CD₂₀⁺ B 淋巴细胞比例为 53.63 ± 7.91,主要分布在脾小体内,B 淋巴细胞在脾脏中的比例明显多于 T 淋巴细胞,差异有统计学意义。脾小体中除以 B 淋巴细胞为主外,也可见 CD₄⁺和 CD₈⁺ T 淋巴细胞。本试验进一步加深了人们对贵州小型猪外周免疫器官组织学基础的认识,为成年贵州小型猪正常免疫系统基本数据库的建立提供数据支持,为以贵州小型猪作为试验动物的免疫学相关研究提供参考依据。基于此试验基础,可以对贵州小型猪不同生长发育阶段免疫细胞及其亚群在脾脏中的发育过程作进一步研究,不断充实和完善贵州小型猪各年龄阶段的免疫学相关资料。

参考文献:

- [1] 袁进,顾有望.小型猪作为人类疾病动物模型在生物医学研究中的应用[J].动物医学进展,2011,32(2):108-111.
- [2] 金伯泉.细胞和分子免疫学[M].2版.北京:科学出版社,2001:29-33.
- [3] SOSLOW R A, DANNENBERG A J, RUSH D, et al. Cox-2 is expressed in human pulmonary, colonic, and mammary tumors[J]. Cancer, 2000, 89(12):2637-2645.
- [4] ZUCKERMANN F A, GASKINS H R. Distribution of porcine CD₄/CD₈ double-positive T lymphocytes in mucosa-associated lymphoid tissues[J]. Immunology, 1996, 87(3):493-499. (009)

细毛羊黑素皮质素受体 1(MC1R) 基因与毛色表型的研究

(作者陈 伟等,正文见第5~7页)

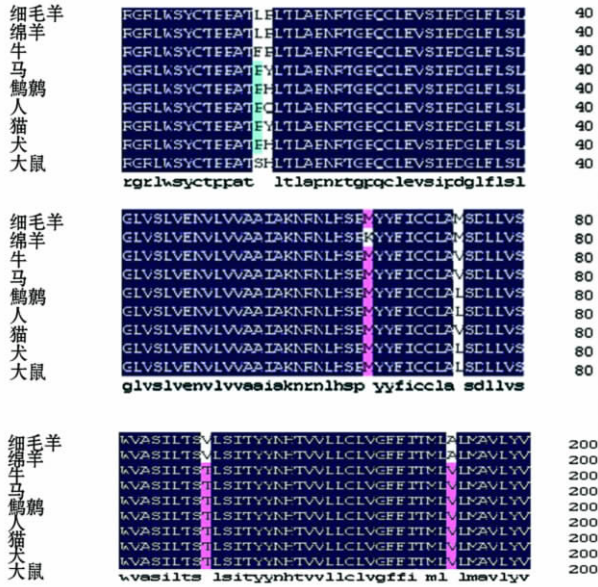


图2 细毛羊 MC1R 基因所编码的氨基酸与其他动物相应区段的相似性比较

Fig 2 Comparison of the similarity between the encoded amino acids of MC1R gene from fine wool sheep

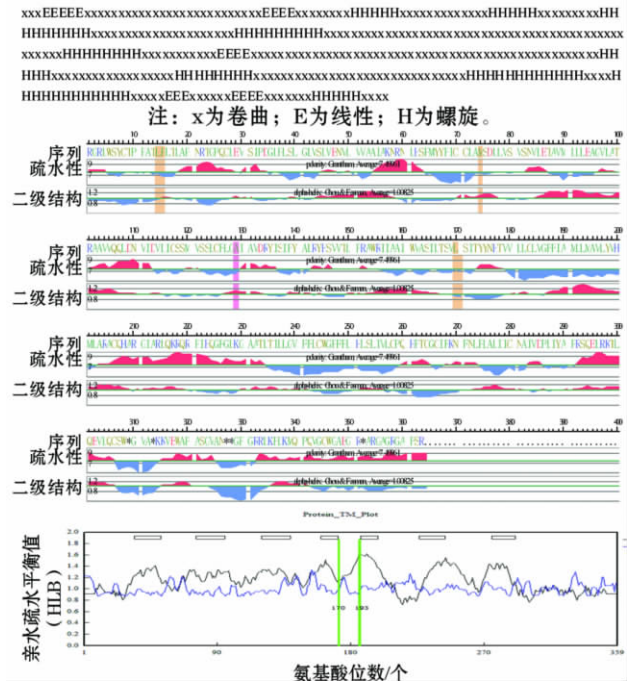
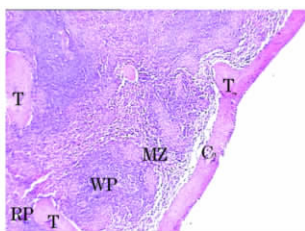


图4 细毛羊 MC1R 氨基酸疏水亲水性及二级结构和跨膜结构预测图

Fig 4 The hydrophobicity and hydrophilicity of the MC1R amino acid with the prediction of its secondary structure and transmembrane structure in fine wool sheep

成年贵州小型猪脾脏的组织形态学观察及免疫组化研究

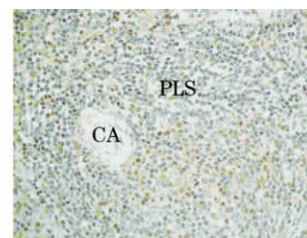
(作者王 平等,正文见第8~10页)



C. 示被膜; T. 小梁; WP. 白髓; RP. 红髓; MZ. 边缘区。

图1 成年贵州小型猪脾脏(H. E. ,×100)

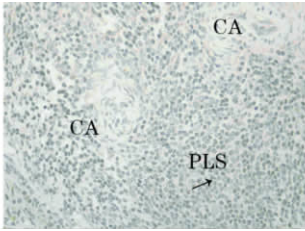
Fig 1 The spleen of an adult *Sus scrofa domestica* var. *mino Guizhounensis Yu.* (H. E. stained ,×100)



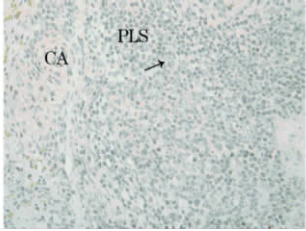
PLS. 动脉周围淋巴鞘; CA. 中央动脉。

图2 CD₃ 阳性细胞(SP 法 ,×400)

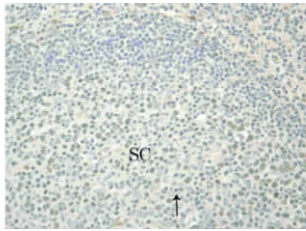
Fig 2 CD₃ positive cells (SP method ,×400)



↑. CD₄ 阳性细胞; PLS. 动脉
周围淋巴鞘; CA. 中央动脉。
图3 CD₄ 阳性细胞 (SP 法, ×400)
Fig 3 CD₄ positive cells
(SP method, ×400)



↑. CD₈ 阳性细胞; PLS. 动脉
周围淋巴鞘; CA. 中央动脉。
图4 CD₈ 阳性细胞 (SP 法, ×400)
Fig 4 CD₈ positive cells
(SP method, ×400)



↑. CD₂₀ 阳性细胞;
SC. 脾小体。
图5 CD₂₀ 阳性细胞 (SP 法, ×400)
Fig 5 CD₂₀ positive cells
(SP method, ×400)

地方风味猪肉香肠中细菌的分离鉴定和环境因素对细菌繁殖的影响
(作者舒黛廉等 正文见第 65 ~ 66 83 页)

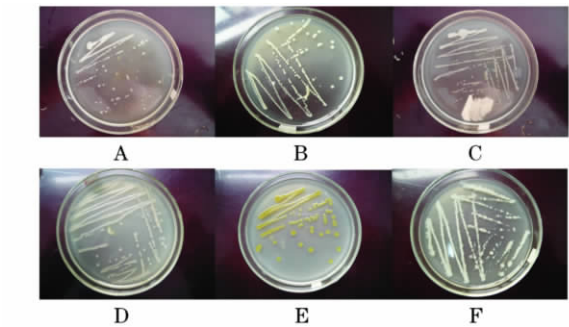


图1 6种分离菌的菌落特征

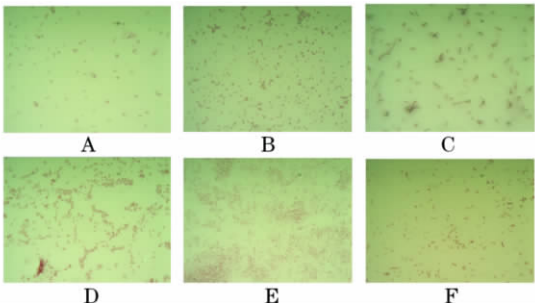


图2 6种分离菌的形态与染色特征

高能混合粒子场处理龙牧 803 紫花苜蓿的诱变效果研究
(作者尚晨等 正文见第 75 ~ 77 页)

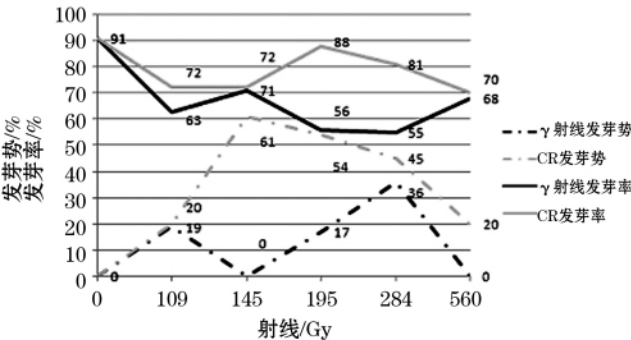


图1 利用高能混合粒子场和 γ 射线处理对紫花苜蓿发芽势和发芽率的影响

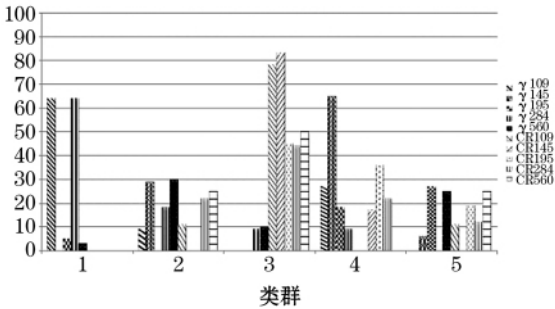


图3 分子检测类群结构柱形图