

蛇胸腺中的 APUD 细胞

李丕鹏 王 平

(北京大学生命科学学院, 北京 100871)

摘 要

应用 Grimelius 嗜银法, 显示出虎斑颈槽蛇 (*Rhabdophis tigrina*) 胸腺中存在一些含嗜银颗粒的细胞, 主要分布于髓质。细胞单个或几个成团分布, 细胞多呈卵圆形、椭圆形或锥体形、长径约为 7—18 μm 。免疫组织化学研究表明大多数嗜银细胞呈 5-羟色胺阳性反应, 电子显微镜观察, 细胞的超微结构特点是: 游离核糖体较丰富, 粗面内质网片段和线粒体少。Golgi 复合体不发达。主要特点是细胞中含有许多致密的小分泌颗粒。颗粒圆形或椭圆形, 大小不等, 约 100—600nm。其中有些细胞的颗粒具有粒芯和晕轮。根据以上特性, 作者认为这些细胞应属于 APUD 系统。最后, 还讨论了这类细胞在神经内分泌免疫网络中的意义。

关键词 蛇、胸腺、APUD 细胞、内分泌学

1969 年, Pearse 根据人体一些内分泌细胞具有摄取胺前体和脱羧反应形成胺类物质的特性提出 APUD(Amine Precursor Uptake and Decarboxylation) 系统的概念^[1]。20 多年来, 对这一系统的研究进展迅速, 认识不断深入。不仅对其组成细胞由最初发现的 6 种增加到 40 多种, 而且也证明该系统广泛存在于脊椎动物。另外, 进一步的研究还发现 APUD 细胞与神经细胞在形态、生理生化等方面有极大的相似性。Pearse 等认为 APUD 系统和神经系统可能是一个整体, 共同构成散在的神经内分泌系统(Diffuse Neuroendocrine System-DNES)来完成调节和控制机体动态平衡的生理过程, 在调控机体的生命活动中起着重要的作用^[2]。

另一方面, 随着免疫生物学的发展, 自 1977 年 Besedevsky 提出神经内分泌免疫网络学说以来, 愈来愈多的实验证明神经内分泌和免疫系统之间存在双向调节作用^[3,4]。作为免疫中枢器官的胸腺在这一网络中占有的重要位置已引起人们的注意。已有研究证明人和哺乳类实验动物的胸腺可合成和分泌胸腺激素、催产素和加压素等激素, 但是免疫组织化学和原位杂交实验证明这些功能是由网状上皮细胞完成, 而未观察到有特定的内分泌细胞或 APUD 细胞参与^[5,6]。而且对正常人和一些哺乳类实验动物胸腺的大量超微结构的研究从形态上也未观察到类似于内分泌细胞或 APUD 细胞的细胞成分^[7,8]。但值得重视的是: 前人对一些非哺乳类脊椎动物胸腺电子显微镜研究中观察到一类含有小颗粒的细胞, 其超微结构和内分泌细

胞或 APUD 细胞相类似^[7-13]。但迄今没有证明它们归属于 APUD 系统或散在的神经内分泌系统(DNES)。

考虑到胸腺在神经内分泌免疫网络中的重要作用和胸腺微环境在胸腺细胞发生、分化和成熟过程中的调控作用,我们在对虎斑颈槽蛇(*Rhabdophis tigrina*)胸腺组织细胞发育研究的基础上,应用显示和鉴别 APUD 细胞的 3 种主要方法——银染法、免疫组织化学和电子显微镜技术对这类小颗粒细胞进行了研究,以期对其性质和类别进行鉴定,进一步确证低等脊椎动物——蛇胸腺存在一类特殊的内分泌细胞,并探讨它们在神经内分泌免疫网络中的意义。

1 材 料 和 方 法

1.1 材料

实验用性成熟虎斑颈槽蛇(*Rhabdophis tigrina*), 采集于北京郊区,共 10 条,雌雄兼有。体长 650—855 mm, 体重 65—145 g。动物经乙醚麻醉后,取出胸腺,放入 4℃ 预冷的固定液中。

1.2 方法

1.2.1 Grimelius 嗜银染色法 Bouin 氏固定液中固定 24 h, 石蜡包埋,切片厚 5—6 μm。部分切片按 Grimelius 嗜银染色法。0.3% 硝酸银-醋酸盐缓冲液中染色 2.5 h(60℃), 对苯二酚-亚硫酸钠还原液中还原 1 h(45℃)。另一部分切片进行常规苏木精-伊红(H-E)染色,以确定胸腺的一般组织结构。

1.2.2 免疫组织化学染色 Bouin 氏固定液中固定 10 h(4℃), 石蜡包埋,切片厚 5—6 μm。按 Sternberger 方法进行过氧化物酶抗过氧化物酶(PAP)免疫组化染色。其中,染色前用 0.5% H₂O₂ 甲醇溶液处理切片 30 min; 以正常兔血清代替第一抗体或 PBS 代替二抗或 PAP 复合物进行对照实验。H-E 染色法复杂。

5-羟色胺抗血清系 DAKO 公司和中国第四军医大学产品。

1.2.3 电子显微镜样品制备 将蛇胸腺切成 1 mm² 的小长条,常规戊二醛-锇酸双重固定,梯度丙酮脱水,Epont 812 包埋,切片经醋酸铀-柠檬酸铅染色,TEM-100CX 电子显微镜观察。

对照实验:取虎斑颈槽蛇胃、胰脏和昆明系小白鼠(2♂, 2♀)胸腺固定于 Bouin 氏固定液中,方法同上两节。进行嗜银染色和 5-羟色胺免疫组化阳性和阴性对照实验。

2 结 果

2.1 胸腺的一般结构和嗜银反应

虎斑颈槽蛇胸腺的实质组织经常规 H-E 染色,可明显区分为皮质和髓质。和哺乳动物基本相似,皮质由大量密集的胸腺细胞组成,网状上皮细胞和巨噬细胞少,染色较深;髓质则胸腺细胞少,网状上皮细胞较多,染色较淡。在髓质中还分布有一些巨噬细胞、肌样细胞和胸腺小囊(thymic cyst)等组分。常规 H-E 染色,未能显色出和区分出含有小颗粒的细胞(图版 I-1)。

经 Grimelius 嗜银染色,蛇胸腺实质中可见一些呈阳性反应的细胞。胞质中充满黑褐色

的嗜银小颗粒。细胞轮廓清晰,形态多样,多呈卵圆形、椭圆形和锥体形,少数细胞形状不规则。有较长的突起,或呈长梭形或瓶状,细胞长径约为 7—18 μm 。多数细胞的胞核较大,呈卵圆形或圆形,位于细胞中央。细胞嗜银强度有差异,有些细胞嗜银性强,嗜银颗粒聚集在一起。有时覆盖于胞核上,使细胞呈黑褐色。另一些细胞嗜银性较弱,染色较浅,呈棕褐色。嗜银细胞除个别分布于胸腺皮质外,大多数分布于髓质。单个或数个成团散布于网状上皮细胞之间、网状上皮细胞和髓质胸腺细胞之间,有些还构成胸腺小囊壁的一部分(图版 I-2)。

胸腺的网状上皮细胞、胸腺细胞、巨噬细胞、肌样细胞和胸腺小囊细胞呈阴性反应,不具嗜银性。

对照实验结果表明:蛇胃粘膜内分泌细胞和胰脏的胰岛细胞呈阳性反应,具有较强的嗜银性。小鼠胸腺除结缔组织和实质组织中的肥大细胞略具嗜银性外,其它细胞和结构呈阴性反应,不具嗜银性。

2.2 免疫组织化学

应用免疫组织化学 PAP 法染色,在蛇胸腺显示出对 5-羟色胺抗血清呈阳性反应的细胞,阳性细胞的形态和分布特点与嗜银细胞相似,但数量略少。阳性反应物质多为细小的棕色颗粒。多数细胞阳性反应较强。胞质充满棕色小颗粒;少数细胞反应较弱(图版 I-3,4)。

替代实验均为阴性。对照实验表明蛇胃粘膜内分泌细胞呈阳性反应而小鼠胸腺中没有 5-羟色胺阳性反应细胞。

2.3 超微结构

电子显微镜下。在网状上皮细胞、胸腺细胞和(或)胸腺小囊细胞之间,可见到一些明显与之不同的细胞,最显著的特点是胞质中含有许多小分泌颗粒。

细胞表面可见一些细小或较长的突起,它们和周围细胞具有广泛的联系(图版 I-5,6)。胞核圆形或卵圆形,轮廓不光滑,异染色质少,散布于核内。胞质内粗面内质网片段少,线粒体少,高尔基复合体不发达,游离核糖体丰富,并含有许多分泌颗粒。颗粒形态较一致,呈圆形或椭圆形;大小不等,直径从 100 nm 到 600 nm;内部结构也有差异。有些细胞的分泌颗粒较小,具有电子密度高的粒芯和晕轮,另一些细胞的分泌颗粒均质,电子密度略有差异,没有晕轮(图版 I-5,6,7)。

3 讨 论

APUD 系统由一些散在的内分泌细胞组成,具有一些基本的共同特征和鉴别方法^[2,14,15]。组织化学染色具有嗜银和(或)亲银性。生理生化上具有单胺类和(或)多肽类激素;可摄取胺前体并脱羧形成单胺类活性物质。而分泌颗粒则是超微结构水平上最显著的特点。Pearse 曾指出:分泌颗粒的大小、形状、粒芯的电子密度、晕轮的染色特点和宽度,既是电镜下鉴定 APUD 细胞的依据,也是区别 APUD 细胞类型的指征之一。

Grimelius 嗜银染色法作为染色反应范围宽广的银染法,广泛用于鉴定 APUD 细胞^[14,15]。本文用此方法显示出虎斑颈槽蛇(*Rhabdophis tigrina*)胸腺含有一些嗜银细胞。5-羟色胺等单胺类物质的存在是 APUD 细胞的另一个标志^[14],本文结果表明蛇胸腺也存在 5-羟色胺阳性细胞,并且细胞形态和分布特点和嗜银细胞基本一致,这说明蛇胸腺中含有一些既具有嗜银性又含有 5-羟色胺的内分泌细胞。这些细胞富含 5-羟色胺,也可以说明它们具有摄取 5-羟

色氨酸并脱羧形成 5-羟色胺贮存于细胞中的能力^[14]。电子显微镜观察进一步表明这些小颗粒细胞的超微结构特征完全符合 APUD 细胞的特点,尤其是分泌颗粒的大小、形态和内部结构,其中具有晕轮的小分泌颗粒和神经效应细胞与呼吸系统的神经内分泌细胞(如 K 细胞)相同,为神经内分泌型颗粒(neuroendocrine-type granule)^[14,15]。总之,本文结果从细胞的形态和分布特点,嗜银性和 5-羟色胺免疫组化反应,超微结构特征和分泌颗粒特点^[1,2,14,15]等方面均表明虎斑颈槽蛇胸腺中的小颗粒细胞是 APUD 细胞,应归属 APUD 系统(或称散在的神经内分泌系统——DNES)。

事实上,APUD 系统的细胞组成复杂,分布广泛^[2,14,15]。已知有 40 余种细胞,可分为中枢和周围两部分。中枢部分包括松果体(P)细胞、下丘脑大细胞和小细胞、腺垂体的生长激素细胞、催乳素细胞、嫌色细胞和促黑色素细胞、激素细胞等。周围部分的细胞分布广泛,大部分细胞分布于消化系统的胃肠道和胰脏,共同构成胃肠胰内分泌系统;此外,还分布于呼吸系统,泌尿生殖道、一些内分泌腺和神经节。至于免疫器官内有无 APUD 细胞的存在,迄今尚无定论^[6,7,10]。虽然前人曾在研究一些非哺乳脊椎动物胸腺的超微结构时见到一些含有小分泌颗粒的细胞,并从结构上推测为内分泌样细胞或 APUD 样细胞(APUD-like cell)^[7,11-13]。但缺乏其它方面的证据证明它们是 APUD 细胞。本文结果初次确定在蛇胸腺中含有 APUD 细胞;结合前人的工作,我们推测至少非哺乳类脊椎动物鸟、蛇和蛙等的胸腺中存在 APUD 细胞。

从我们观察到的蛇胸腺 APUD 细胞形态结构和反应特性的多样性分析,它们可能由多种细胞组成,也可能反应了细胞的不同生理状态。进一步的分型工作尚在进行中。我们设想,这将会拓宽对 APUD 系统细胞分布和种类的了解。

近年来,对哺乳动物的大量研究表明,免疫系统和神经、内分泌系统之间存在着复杂而密切的关系,共同构成调节和维持机体正常生命活动的一个网络体系^[3,4]。胸腺作为中枢免疫器官,在这一网络中起着重要的作用。已有实验证明胸腺的内分泌功能在神经内分泌免疫网络中起着重要的中介作用。但哺乳动物胸腺的内分泌功能是由网状上皮细胞来完成的^[5,6,10]。一方面,神经和内分泌因子通过分布于网状上皮细胞上的乙酰胆碱受体、肾上腺皮质激素受体和性激素受体等,调节其生理活动,尤其是合成和分泌胸腺素、催产素、加压素和其它因子,从而影响胸腺的发育和 T 淋巴细胞(胸腺细胞)的分化和成熟。另一方面,成熟的 T 淋巴细胞可分泌一些淋巴因子(或免疫递质和免疫激素),既可作用于神经细胞相应的受体上,影响其功能;也可作用于下丘脑或直接分泌 ACTH 和生长抑素等来影响内分泌系统的活动,而 T 淋巴细胞的成熟和进入循环状态则又是在胸腺的内分泌功能和微环境的调节下完成的^[4]。由此可知,胸腺的内分泌功能在神经内分泌免疫网络中起着重要的作用。非哺乳动物——蛇胸腺的 APUD 细胞,作为特异的神经内分泌细胞,所合成和分泌的激素无疑会对 T 淋巴细胞的分化和成熟,也可能对神经内分泌和免疫系统的双向调节起着重要的作用。

本文结果还为神经内分泌免疫网络学说提供了直接的形态学路径和证据,对从进化角度认识胸腺的免疫和内分泌功能以及神经内分泌免疫网络的演化规律和特点具有重要的意义。

4 结 论

根据以上分析和讨论,可得出以下几点结论:(1)根据鉴定 APUD 细胞的特征,证明虎斑颈槽蛇胸腺存在 APUD 细胞。(2)将对 APUD 系统分布的认识拓宽到免疫系统。(3)为神

经内分泌免疫网络学说提供了直接的证据。为研究这一网络的进化提供了基础。

参 考 文 献

- [1] Pearse, A. G. E., *J. Histochem. Cytochem.* 1969, **17** (2): 303—313.
- [2] 何泽涌主编, 组织学与胚胎学进展, 第一版, 人民卫生出版社, 北京, 1987, 130—151.
- [3] Besedovsky, H., Sorkin, E., *Clin. Exp. Immunol.*, 1977, **27**(1): 1—7.
- [4] 朱长庚, 解剖学报, 1993, **24**(2): 216—221.
- [5] Geenen, V., Legros, J. J., Franchimont, P. *et al.*, *Science*, 1986, **232** (3): 508—511.
- [6] Geenen, V., Legros, J. J., Franchimont, P. *et al.*, *New York Acad. Sci.*, 1987, **496** (1): 56—66.
- [7] Kendall, M. D., *The Thymus Gland*, 1st ed., Academic Press, London, 1981, 72—73.
- [8] Henry, K., Symmers, W. S. C., *Thymus, Lymph Nodes, Spleen and Lymphatics*, Churchill Livingstone, Longman Group UK Limited, 1992, 47.
- [9] Zapata, A. G., Cooper, E. L., *The Immune System: Comparative Histophysiology*, John Wiley & Sons, Chichester, 1990, 104—149.
- [10] Nabarra, B., Andrianarison, I., *Thymus*, 1991, **17**(1): 39—61.
- [11] Bockman, D. E., Winborn, W. B., *J. Morphol.* 1967, **121** (2): 277—294.
- [12] Curtis, S. K., Cowden, R. R., Nagel, J. W., *J. Morphol.*, 1979, **160** (2): 241—274.
- [13] Bigal, J., Plytycz, B., *Fol. Histochem. Cytochem.*, 1988, **26**(1): 70—79.
- [14] Adriaensen, D., Scheuermann, D. W., *Anat. Rec.* 1993, **236**(1): 70—79.
- [15] Park, I. S., Bendayan, M., *Anat. Rec.* 1992, **232**(2): 247—256.
- [16] Alta, M., Amantea, A., *Thymus*, 1991, **17**(2): 155—165.