

CD3和CD8免疫反应阳性细胞在人胎回肠的发育

苏敏, 胡蓉, 李红, 黄悦, 许庭良, 姜俸蓉

背景资料
有关人胎肠相关淋巴组织的研究较多, 针对肠道不同部位T淋巴细胞的发育均有报道, 但是对回肠内淋巴组织T细胞的发育报道较少。CD3是所有T细胞的共同标志, CD8⁺T淋巴细胞是免疫反应的效应细胞, 因而本文对CD3和CD8阳性T细胞的发育、分布和定位情况进行探讨。

苏敏, 胡蓉, 李红, 黄悦, 许庭良, 姜俸蓉, 贵阳医学院组织学与胚胎学教研室 贵州省贵阳市 550004
苏敏, 硕士, 副教授, 主要从事实验组织学和人体胚胎发生的研究。
贵州省教育厅基金资助项目, No. 2002116
作者贡献分布: 苏敏课题设计, 实验结果观察和总结, 起草文章, 提供研究经费; 胡蓉和李红收集标本, 直接参与实验, 统计分析; 黄悦对实验提供技术支持; 许庭良和姜俸蓉对文章内容作批评性审阅。
通讯作者: 苏敏, 副教授, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院组织学与胚胎学教研室. summ30@163.com
电话: 0851-6908567
收稿日期: 2009-09-25 修回日期: 2009-11-14
接受日期: 2009-11-23 在线出版日期: 2009-12-18

Development of CD3- and CD8-positive cells in human fetal ileum

Min Su, Rong Hu, Hong Li, Yue Huang, Ting-Liang Xu, Feng-Rong Jiang

Min Su, Rong Hu, Hong Li, Yue Huang, Ting-Liang Xu, Feng-Rong Jiang, Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by: the Foundation of the Department of Education of Guizhou Province, No. 2002116

Correspondence to: Min Su, Department of Histology and Embryology, Guiyang Medical University, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. summ30@163.com

Received: 2009-09-25 Revised: 2009-11-14

Accepted: 2009-11-23 Published online: 2009-12-18

Abstract

AIM: To investigate the distribution, location and growth of CD3- and CD8-positive cells in developing lymphoid tissue of human fetal ileum.

METHODS: Thirty samples of human fetal ileum between gestational weeks 9 and 32 were collected. CD3- and CD8-positive cells were identified by immunohistochemistry using the streptavidin-peroxidase method. The positive cells were counted using BioMias image analysis software, and the data were analyzed using the SPSS11.5 software package.

RESULTS: At gestational week 9, there were few CD3- and CD8-positive cells scattered in the connective tissue of the ileal wall. At week

11, these positive cells were distributed in small clusters. At week 17, CD3- and CD8-positive cells gathered together. The majority of positive cells were distributed in the connective tissue of mucosa, while few positive cells infiltrated into the ileal epithelium. At week 18, CD3- and CD8-positive cells were seen in the lymphoid nodules and participated in the organization of lymphoid nodules. After week 24, the number of the two types of positive cells gradually increased with fetal age, reaching the peak at week 28. The distribution of these positive cells were particularly prominent in aggregated lymphoid nodules. A significant positive correlation was noted between the number of CD3- and CD8-positive cells ($r = 0.831, P < 0.01$). The number of CD3-positive cells exceeded that of CD8-positive cells at all time points.

CONCLUSION: CD3- and CD8-positive T cells begin to appear at gestational week 9 when gut-associated lymphoid tissue is forming in human fetus. The development of CD3- and CD8-positive T cells is basically synchronous in human fetal ileum.

Key Words: CD3; CD8; Ileum; Human fetus

Su M, Hu R, Li H, Huang Y, Xu TL, Jiang FR. Development of CD3- and CD8-positive cells in human fetal ileum. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(35): 3606-3610

摘要

目的: 探讨CD3和CD8免疫反应阳性细胞在人胎回肠淋巴组织发生过程中的分布、定位及发育。

方法: 收集因故终止妊娠人胎回肠30例, 采用免疫组织化学SP法染色显示CD3和CD8免疫反应阳性细胞, 用BioMiaspro图象分析软件对免疫反应阳性细胞进行计数, 有关数据作统计学分析。

结果: 9 wk, 回肠内可见CD3和CD8阳性反应细胞, 主要定位于肠壁的结缔组织内, 数量较少, 散在分布; 11 wk可见CD3和CD8阳性细胞

同行评议者
许文燮, 教授, 上海交通大学医学院生理学教研室

三五成群分布; 17 wk, CD3和CD8阳性细胞聚集成群, 主要分布于绒毛中轴以及小肠腺之间固有结缔组织, 回肠黏膜上皮偶见阳性细胞浸润; 18 wk, CD3和CD8阳性反应细胞出现在淋巴小结处参与构成淋巴小结; 24 wk后, CD3和CD8阳性反应细胞数量增多, 尤以典型的集合淋巴小结处有较多分布, 其中, 在28 wk数量增加最为明显($P < 0.05$). CD8和CD3阳性细胞数量之间有较强的正相关关系($r = 0.831$, $P < 0.01$), CD3阳性细胞在整个发育过程中数量上均较CD8阳性细胞多.

结论: 人胎肠相关淋巴组织的形成过程中, 第9周即有T细胞发育. CD8和CD3阳性T细胞的发育时序基本同步.

关键词: CD3; CD8; 人胎; 回肠

苏敏, 胡蓉, 李红, 黄悦, 许庭良, 姜俸蓉. CD3和CD8免疫反应阳性细胞在人胎回肠的发育. 世界华人消化杂志 2009; 17(35): 3606-3610

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/3606.asp>

0 引言

回肠壁淋巴组织是肠相关淋巴组织(gut-associated lymphoid tissue, GALT)的重要组成部分, 参与构成机体抵抗外界入侵的第一道防线, 在肠道免疫功能的调节过程中起重要作用^[1-3]. CD3是所有T细胞的共同标志, CD3作为T细胞抗原受体, 为信号转导亚单位, 能将TCR接受的抗原刺激信号转导至细胞内, 使T细胞活化, 在T细胞免疫中起着必不可少的作用^[4-5]. CD8⁺ T淋巴细胞是免疫反应的效应细胞, 其数量的增多或减少可间接反映人体的免疫功能^[6-7]. 在人胎发育过程中, 肠道淋巴组织内T细胞逐渐表达CD3和CD8分子, 其发育过程也在一定程度上反映了胎儿免疫功能建立情况. 肠相关淋巴组织内T细胞的发育已经越来越受到学者们的关注, 如: 李红 *et al*^[8]报道人胎肠系膜淋巴结内11 wk出现T细胞; harr *et al*^[9]认为, 人胎13 wk时即有一些分散的淋巴细胞存在阑尾的固有层中; Noussios *et al*^[10]报道的人胎扁桃体14 wk观察到T细胞; Spencer *et al*^[11]认为, 人胎回肠11 wk出现T细胞; 朱清仙 *et al*^[12]认为, 人胎小肠10 wk出现T细胞, 但是对回肠内淋巴组织T细胞的发育报道较少. 因此, 为进一步了解人胎肠相关淋巴组织尤其是回肠内T细胞的发育情况, 本实验收集人胎回肠标本, 对CD3和CD8阳性T细胞的发育、分布和定位情况进行探讨, 以期提供更多的形态学

资料, 并为消化系免疫防御功能的研究提供形态学基础.

1 材料和方法

1.1 材料 人胎标本来源于贵阳市各医院因故中止妊娠的人胎30例(每例标本均征得孕妇本人同意). 兔抗人CD3 mAb(rabbit monoclonal antibody anti-human CD3)、鼠抗人CD8 mAb(mouse monoclonal antibody anti-human CD8)来源于福州迈新生物技术开发公司, SP免疫组织化学染色试剂盒由北京中杉金桥生物技术有限公司提供. SP免疫组织化学染色试剂盒内容: 内源性过氧化物酶阻断剂(endogenous peroxidase blocking solution), 正常非免疫动物血清(normal nonimmunone serum), 生物素标记的第二抗体(biotin-conjugated second antibody), 链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶(streptavidin-peroxidase).

1.2 方法

1.2.1 人胎胎龄计算: 所有人胎标本均测量顶臀长(crown-rump length, CRL), 按Patten标准确定胎龄: 9-12 wk 5例, CRL为39.0-79.0 mm; 13-16 wk 7例, CRL为91.0-137.0 mm; 17-20 wk 6例, CRL为147.0-185.0 mm; 21-24 wk 6例, CRL为197.0-230.0 mm; 25-28 wk 6例, CRL为240.0-270.0 mm.

1.2.2 取材, 制片和染色: 各例均取回肠, 用40 g/L甲醛固定, 经乙醇梯度脱水, 透明, 石蜡包埋, 4 μ m连续切片、贴片, 邻片单染法每例观察切片两张以上, 切片间隔36 μ m.

免疫组织化学SP法染色显示CD3阳性和CD8阳性T细胞. 免疫组织化学SP法主要步骤: 切片脱蜡下行入水, 微波抗原修复15-20 min, 试剂A室温下10 min, PBS洗3 min \times 3次, 试剂B室温下10 min, 一抗(兔抗CD3 1:50, 鼠抗CD8 1:25)4 $^{\circ}$ C孵育过夜, PBS洗3 min \times 3次, 试剂C 37 $^{\circ}$ C孵育20 min, PBS洗3 min \times 3次, 试剂D 37 $^{\circ}$ C孵育20 min, PBS洗5 min \times 4次, DAB-H₂O₂液显色, 中性树胶封片. 阴性对照: 用PBS缓冲液代替一抗, 余步骤同前.

每胎龄段标本随机取非连续切片5张, 应用Biomias 29图像分析系统进行检测, 在高倍镜下(物镜40倍)每张切片随机取3个视野, 分别计数每个视野内的CD3阳性细胞及CD8阳性细胞数.

统计学处理 所有数据以mean \pm SD表示, 并采用统计软件SPSS11.5进行单因素的方差分析, 组间两两比较用 q 检验, 两变量间的关系用直线相关分析.

研究前沿
有关人胎肠相关淋巴组织的研究主要集中在各种淋巴细胞的发生时间、分布部位、亚型的发育分布、数量变化、淋巴小结各结构的形成以及淋巴细胞的迁移途径等.

相关报道
李红 *et al*报道人胎肠系膜淋巴结内11 wk出现T细胞, 15 wk形成早期髓质; 23 wk可辨认皮质和髓质; 至28 wk时, 小结仍为初级淋巴小结. 并将淋巴结的发生进行了详细研究. 朱清仙 *et al*对大小肠上皮内淋巴细胞的发生、亚型分布和数量变化等进行了比较. 认为大小肠上皮内淋巴细胞有基本相同的发育规律, 但发生时间和数量上有较大差异.

创新盘点

在人胎发育的第9周,回肠内可见少量CD3⁺和CD8⁺T淋巴细胞,主要定位于肠壁的结缔组织内。17 wk, CD3⁺和CD8⁺T淋巴细胞聚集成群,主要分布于绒毛中轴以及固有层结缔组织内。18 wk, CD3⁺和CD8⁺T淋巴细胞出现在淋巴小结处参与构成淋巴小结,尤以CD3⁺淋巴细胞数量最多。24 wk后, CD3⁺和CD8⁺T淋巴细胞在典型的集合淋巴小结处有较多分布。

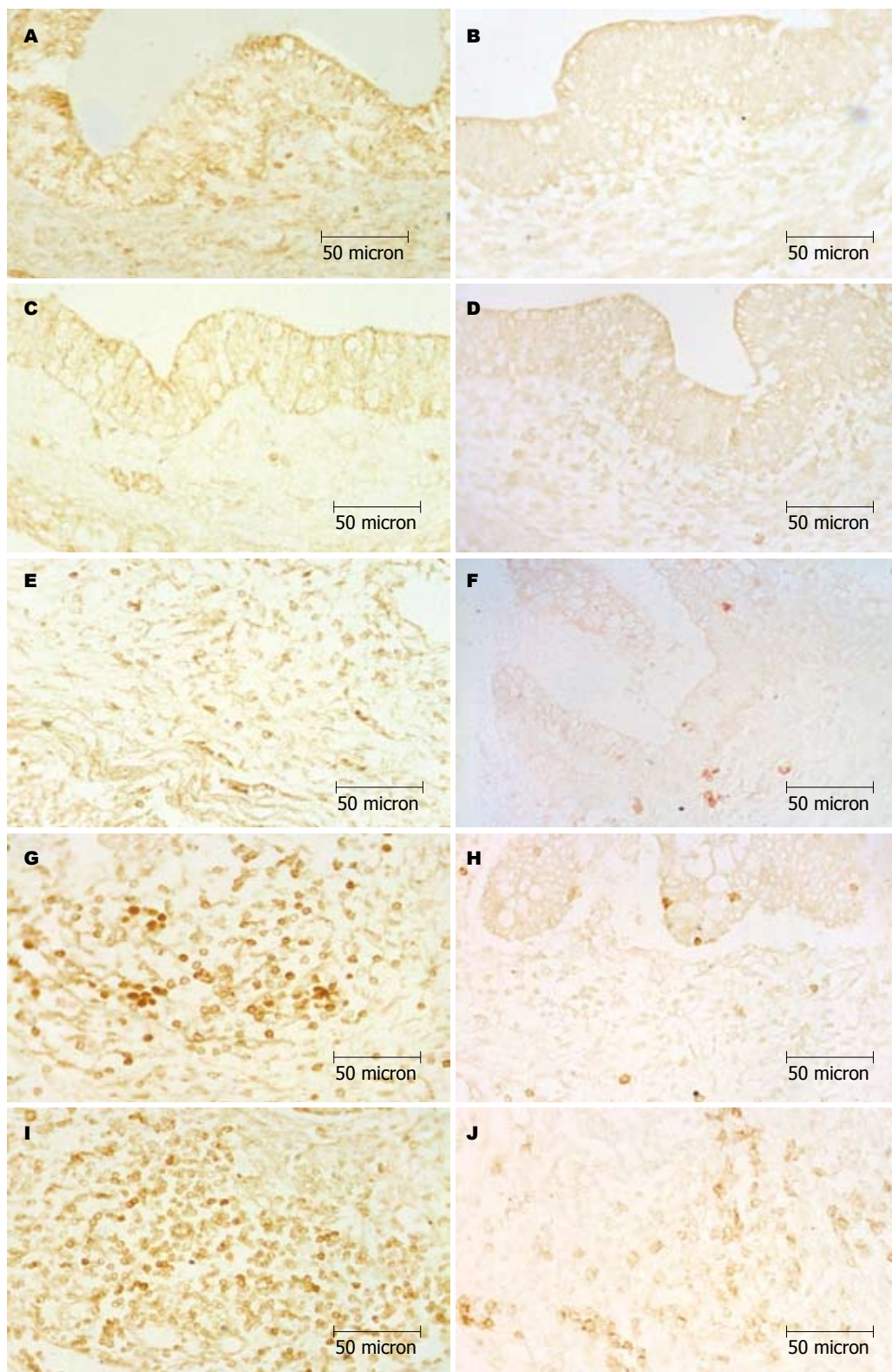


图1 人胎发育不同时期回肠CD3和CD8阳性细胞的发育(免疫组织化学染色, $\times 400$)。A: 9 wk CD3阳性表达; B: 9 wk CD8阳性表达; C: 11 wk CD3阳性表达; D: 11 wk CD8阳性表达; E: 17 wk CD3阳性细胞数量增多, 散在分布; F: 17 wk CD8阳性表达; G: 18 wk CD3阳性表达; H: 18 wk CD8阳性表达, 上皮内阳性细胞浸润明显; I: 24 wk集合淋巴小结处CD3阳性细胞; J: 24 wk CD8阳性细胞, 数量明显增多。

2 结果

2.1 CD3和CD8阳性细胞的分布和定位 9 wk, 回肠内可见少量CD3阳性反应细胞和CD8阳性反

应细胞, 棕褐色的阳性反应产物表达在胞膜上, 反应弱, 染色较浅, 主要定位于肠壁的结缔组织内, 散在分布(图1A-B)。11 wk可见CD3阳性和

表 1 不同胎龄CD3阳性细胞和CD8阳性细胞计数 (mean \pm SD)

细胞类型	9-12 wk	13-16 wk	17-20 wk	21-24 wk	25-28 wk
CD3阳性细胞	6.80 \pm 5.26	17.00 \pm 8.06	46.60 \pm 19.35 ^a	93.00 \pm 40.78 ^a	144.60 \pm 15.52 ^a
CD8阳性细胞	4.80 \pm 1.79	9.20 \pm 1.92	29.20 \pm 8.90 ^a	49.60 \pm 19.00 ^a	75.40 \pm 24.05 ^a

^a $P < 0.05$ vs 同类细胞13-16 wk.

CD8阳性细胞三五成群分布(图1C-D). 17 wk, CD3和CD8阳性细胞数量略增多, 反应明显增强, 细胞聚集成群, 主要分布于绒毛中轴以及固有层结缔组织内, 回肠黏膜上皮偶见阳性细胞浸润(图1E-F). 18 wk, CD3和CD8阳性反应细胞出现在淋巴小结处参与构成淋巴小结, 尤以CD3阳性反应细胞数量最多, 上皮内阳性细胞浸润明显(图1G-H). 24 wk后, CD3和CD8阳性反应细胞数量显著增多, 尤以典型的集合淋巴小结处有较多分布(图1I-J).

2.2 细胞计数 随胎龄增长, CD3阳性反应细胞和CD8阳性反应细胞数量逐渐增加, 尤以25-28 wk数量最多, 与21-24 wk相比, 差异有显著统计学意义($P = 0.001 < 0.01$), 且CD3阳性反应细胞较CD8阳性反应细胞多. 直线相关分析发现, 在人胎发育过程中, CD3和CD8阳性细胞的数量变化呈较强的正相关关系($r = 0.831$, 表1).

3 讨论

肠道不仅是消化、吸收营养物质的场所, 而且具有重要的免疫屏障功能^[1-3]. 肠道的免疫学屏障主要由肠相关淋巴组织和肠道黏膜免疫相关细胞构成, 回肠肠壁内淋巴细胞作为肠道相关淋巴组织中的一个特殊组分, 是机体免疫系统与外来抗原以及微生物较早接触的免疫细胞, 同时也是较早发生免疫反应的细胞^[13-19], 其通过分泌IL-2、IL-5、IFN- α 和IFN- γ 等淋巴因子, 诱导肠上皮细胞参与黏膜免疫应答. 因此, 回肠内淋巴细胞的类型、数量以及分布可以反映小肠局部黏膜免疫屏障的建立情况及其免疫防御功能的完善程度.

本研究发现, 在人胎肠相关淋巴组织的形成过程中, 9 wk回肠内即有CD3阳性反应T细胞和CD8阳性反应T细胞发育, 这一结论较Spencer *et al*^[11]、朱清仙*et al*^[12]报道T淋巴细胞出现的时间早. CD3是成熟T细胞的标志, CD8亚群T细胞是免疫反应的效应细胞, 提示在胚胎发育的较早的时期, 即有发育成熟的T淋巴细胞迁移进入消化管壁, 并分化出CD8阳性T细胞亚群, 参与

肠相关淋巴组织的形成. 已有的研究表明早在妊娠7.5 wk, 在胎儿肝脏就可检测到胎儿肝细胞发生混合淋巴细胞反应, 在胸腺则为妊娠11 wk, 脾为妊娠13 wk, 外周血为妊娠14.5 wk. 提示9 wk回肠T淋巴细胞在抗原的刺激下, 胎儿可能发生特异性免疫应答, 消化系的免疫功能也开始建立. 本实验还观察到11 wk可见CD3和CD8阳性细胞成群分布, 17 wk聚集成群并浸润上皮, 18 wk形成淋巴小结, 24 wk后, 在典型的集合淋巴小结处有较多分布, 阳性细胞的分布也从固有层散在的淋巴细胞到形成淋巴组织并且逐渐浸润到上皮内, 说明随着胎龄的增加, T淋巴细胞的数量逐渐增多, 回肠黏膜免疫屏障逐渐完善, 胎儿免疫防御功能逐渐增强. 本研究发现在人胎回肠发育过程中, CD3和CD8阳性细胞的数量变化呈较强的正相关关系($r = 0.831$)且二者的发育时序基本同步, 随着CD3阳性细胞的出现, 数量的增多, CD8也同步开始表达, 可以认为, CD3阳性细胞的发育在一定程度上也反映了CD8阳性细胞的变化.

CD8阳性反应细胞是整个肠黏膜免疫系统与肠腔抗原最接近的免疫细胞, 对细菌、病毒感染有免疫监视作用, 能特异性直接杀伤靶细胞^[20-23]. 同时CD8阳性反应细胞和上皮细胞毗邻, 与肠上皮细胞间存在着双向的免疫生理调节. 由于CD8阳性反应细胞与外周T淋巴细胞在表型和回归方面存在很大差异^[24], 因此对CD8阳性反应细胞的来源仍然不明确. 多数研究者所公认CD8阳性反应细胞前体细胞在小肠中发育成熟, 不受胸腺因子的影响, 是一条独立的胸腺外途径^[1]. 一般认为在一个黏膜部位致敏的免疫细胞, 经胸导管入血液循环, 逐步分化成熟, 在特异回归受体介导下, 多数免疫细胞归巢到致敏部位黏膜固有层^[25]. 本实验观察到在基底膜上有CD3和CD8阳性反应细胞, 可能其游走于固有层和上皮之间, 我们至少可以认为黏膜固有层的淋巴细胞可以通过基底膜迁至上皮, 但其具体过程及上皮内淋巴细胞来源仍需进一步探讨.

应用要点

本文为一基础研究, 明确了CD3⁺和CD8⁺T淋巴细胞出现的时间点、分布部位、数量变化, 参与构成淋巴小结的时间等, 为消化系统免疫防御功能的研究提供形态学基础.

同行评价

本研究从发育学的角度去了解人胚胎发育过程中免疫系统的发育情况,具有一定的理论和潜在的临床意义。

4 参考文献

- 1 吴翰桂,朱诚,丁仁瑞. 肠道粘膜免疫研究进展. 免疫学杂志 2000; 16: 235-237
- 2 储昭新,秦环龙. 炎症性肠病肠道淋巴细胞归巢研究进展. 世界华人消化杂志 2009; 17: 687-693
- 3 任宏宇,邹开芳. 炎症性肠病肠黏膜组织内淋巴细胞激活和效应应答. 世界华人消化杂志 2008; 16: 3178-3180
- 4 张有聪,刘淑英. T淋巴细胞和B淋巴细胞的研究进展. 畜牧与饲料科学 2006; 27: 75-78
- 5 李付广,李沛,靳静,董子明. 外周血T淋巴细胞的培养、纯化及鉴定. 郑州大学学报(医学版) 2006; 41: 605-607
- 6 张卫国,童强,王强,王小虎,李胜保. T淋巴细胞亚群和DNA倍体检测在腹水鉴别诊断中的价值. 世界华人消化杂志 2007; 15: 1972-1975
- 7 戴建宜,梁晓萍,文锦丽,李彩银. T淋巴细胞亚群及炎症细胞因子与慢性浅表性胃炎合并十二指肠球部溃疡的关系. 世界华人消化杂志 2004; 12: 1254-1256
- 8 李红,苏敏,胡蓉,姜俸蓉,许庭良. 人胎肠系膜淋巴组织发生及相关T、B细胞的发育. 解剖学杂志 2009; 32: 183-186
- 9 Haar JL. Epithelium and associated lymphocytes of developing human fetal appendix. Electron microscopic study. *Biol Neonate* 1977; 31: 94-102
- 10 Noussios G, Xanthopoulos J, Zaraboukas T, Vital V, Konstantinidis I. Morphological study of development and functional activity of palatine tonsils in embryonic age. *Acta Otorhinolaryngol Ital* 2003; 23: 98-101
- 11 Spencer J, Dillon SB, Isaacson PG, MacDonald TT. T cell subclasses in fetal human ileum. *Clin Exp Immunol* 1986; 65: 553-558
- 12 朱清仙,邓锋,江鹏飞,曾慧红,邹江洪. 人胎大肠和小肠上皮内淋巴细胞的比较分析. 中国体视学与图像分析 2004; 9: 84-87
- 13 Willems F, Vollstedt S, Suter M. Phenotype and function of neonatal DC. *Eur J Immunol* 2009; 39: 26-35
- 14 王茜,杨琨,白海,吴涛,路继红. 人脐血间充质干细胞抑制异体T淋巴细胞反应的实验及临床意义. 第四军医大学学报 2007; 28: 1649-1651
- 15 邓峰,朱清仙,黎静,高摄渊. 人胎儿小肠上皮内淋巴细胞分布及其计数. 江西医药 2003; 38: 320-322
- 16 Law HK, Tu W, Liu E, Lau YL. Insulin-like growth factor I promotes cord blood T cell maturation through monocytes and inhibits their apoptosis in part through interleukin-6. *BMC Immunol* 2008; 9: 74
- 17 李洁,李扬秋,杨力建,陈少华,余卫. 接触苯及苯中毒工人外周血T细胞中CD3 ζ 基因的表达与分析. 细胞与分子免疫学杂志 2007; 23: 447-449
- 18 陈少华,李扬秋,杨力建,陈思,林锦绒. CD3 ζ 链基因在脐带血T细胞及其CD4+和CD8+T细胞亚群中的表达特点. 免疫学杂志 2008; 24: 452-455
- 19 孙少川,郑春宁,刘国勤,谭伟,姜永胜. 重组人生长激素对大鼠肠道缺血再灌注后肠壁组织T淋巴细胞亚群和浆细胞凋亡的影响. 中华实验外科杂志 2006; 23: 605-606
- 20 Mansoor N, Abel B, Scriba TJ, Hughes J, de Kock M, Tameris M, Mlenjeni S, Denation L, Little F, Gelderbloem S, Hawkridge A, Boom WH, Kaplan G, Hussey GD, Hanekom WA. Significantly skewed memory CD8+ T cell subsets in HIV-1 infected infants during the first year of life. *Clin Immunol* 2009; 130: 280-289
- 21 金波,张纪元,张政,王慧芬,王福生. PD-1表达对急性乙型肝炎患者HBV特异性CD8+ T细胞功能的影响. 肝脏 2008; 13: 310-314
- 22 金波,王慧芬,王福生,李捍卫. 慢性丙型肝炎患者型树突状细胞、淋巴细胞亚群的特点及临床意义. 传染病信息 2008; 21: 115-118
- 23 高娟,李芳兰,周一珺,杨花梅,陈同辛,何振娟. 不同发育时期大鼠小肠粘膜及派氏结T淋巴细胞发育活化的研究. 中国免疫学杂志 2009; 25: 678-683
- 24 杨辉,唐承薇. 肠血管活性多肽或生长抑素抑制大鼠肠CD8 $^{+}$ 淋巴细胞归巢. 上海免疫学杂志 2002; 22: 182-185
- 25 熊建美,李贞,李务荣,李敏,高慧英. 人小肠各段粘膜上皮及固有层淋巴细胞分布规律的研究. 泰山医学院学报 2006; 27: 532-533

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

《世界华人消化杂志》标点符号用法

本刊讯 遵照国家标准GB/T 15834-1995标点符号用法的要求,本刊论文中的句号都采用黑圆点;数字间的起止号采用“-”字线,并列的汉语词间用顿号分开,而并列的外文词、阿拉伯数字、外文缩略词及汉语拼音字母拼写词间改用逗号分开,参考文献中作者间一律用逗号分开;表示终了的标点符号,如句号、逗号、顿号、分号、括号及书名号的后一半,通常不用于一行之首;而表示开头的标点符号,如括号及书名号的前一半,不宜用于一行之末.标点符号通常占一格,如顿号、逗号、分号、句号等;破折号应占两格;英文连字符只占一个英文字符的宽度,不宜过长,如5-FU. 外文字符下划一横线表示用斜体,两横线表示用小写,三横线表示用大写,波纹线表示用黑体.(科学编辑:李军亮 2009-12-18)