

新生BALB/c小鼠肠道潘氏细胞的分布规律

王志峰 梁宏德 康静静 张蕊 杨玉荣*

(河南农业大学牧医工程学院, 郑州 450002)

摘要 观察BALB/c小鼠小肠潘氏细胞的分布规律。应用石蜡切片、H&E染色技术和Leica Qwin显微图像处理系统, 分别对2 d、4 d、6 d、8 d、10 d BALB/c小鼠小肠内潘氏细胞的形态发育、分布规律进行观察和分析。结果发现, 4日龄前的BALB/c小鼠各段小肠中肠腺发育尚不完整, 未见有潘氏细胞。6日龄后, 潘氏细胞开始出现, 数量随日龄增加呈递增趋势增长, 各日龄间差异显著($P<0.05$)。BALB/c小鼠肠道潘氏细胞存在于小肠, 十二指肠和空肠较少, 回肠较多, 各组(不同日龄/肠段)之间差异显著($P<0.05$)。

关键词 BALB/c小鼠; 小肠; 潘氏细胞; 分布

潘氏细胞(Paneth cells, PCs)位于肠腺底部, 细胞锥体形, 细胞核椭圆位于基底部, 其顶端含有嗜酸性颗粒, 是动物消化道中最具特征性的细胞之一^[1-2]。首先观察到这一细胞的是德国解剖学家Schwalbe, 此后, 德国医师Paneth在多种动物的肠腺中都发现了类似的细胞, 并对此加以详细描述^[3], 因此, 医学界习惯于将这种细胞称之为Paneth cell(潘氏细胞或帕内特氏细胞)。近年来对PCs的研究主要是对其所分泌防御素的研究。20世纪90年代初, 研究^[4-7]发现位于小肠肠腺底部的PCs能够合成和分泌具有宿主免疫功能的防御素(Defensins), 合成的防御素存在于PCs的分泌颗粒内, 并可将其防御素持续地分泌到肠腔中, 它有助于维护肠黏膜屏障功能的完整性, 从而使PCs防御素在肠道天然免疫中的作用受到密切关注。虽然PCs作为肠腺中的一种特殊细胞已被普遍接受, 对其来源和发育状况的研究已有一定基础, 但是对BALB/c小鼠小肠PCs分布规律的研究鲜有报道, 本研究旨在就PCs在BALB/c小鼠各段肠道的分布规律及形态发育状况进行探讨, 为深入探讨PCs在肠道免疫中的作用提供理论依据。

1 材料与方

1.1 实验材料

1.1.1 BALB/c小鼠 15只初生BALB/c小鼠, 清洁级, 母鼠购自中国科学院上海实验动物中心(SCXK(沪)2007-0005)。饲养间温度 20~25 °C, 相对湿度 40%~65%, 照明采用12 h/12 h明暗交替光照, 垫料(锯末)经高压灭菌。自由采食清洁级全营养颗粒饲料,

自由饮用高压灭菌水。

1.1.2 主要实验仪器 Leica RM2235显微图像处理系统, Leica DM2000显微镜, Leica RM2235石蜡切片机(德国Leica公司); BM-VII生物组织包埋机(孝感市宏业医用仪器有限公司); YD-A智能型生物组织摊片机(浙江省金华市益迪医疗设备厂)。

1.2 实验方法

1.2.1 实验取材 选取刚出生BALB/c小鼠, 分别于2、4、6、8、10日龄随机抽取3只, 采用麻醉法处死小鼠, 分别于幽门远端1~3厘米处取十二指肠1厘米、Treitz韧带远端2~4厘米处取空肠1厘米、回盲口近端1~3厘米处取回肠1厘米, 10%中性福尔马林固定。常规石蜡切片, 片厚5 μm , HE染色。

1.2.2 结果的观察 本实验使用显微图像处理系统测定, 每个样品选择染色良好, 结构清晰的肠管横切面, 对于开口于相邻绒毛之间, 由柱状细胞、杯状细胞等构成, 小肠粘膜上皮在绒毛根部下陷至固有层而形成的单管状腺, 即肠腺进行计数。对整个肠管横切面中肠腺的数量、含PCs的肠腺的数量、单个肠腺中PCs的数量、单个横断面PCs总数量、单个横断面所有肠腺中细胞的总数量(包括杯状细胞、柱状细胞、PCs和未分化细胞等)进行统计。并计算内含PCs的肠腺数量占肠腺总数量的比例, 以及单个横断面肠腺中PCs的数量占所有肠腺中细胞总数的比例。潘氏细胞内颗粒直径的测量: 每个切片选取

收稿日期: 2010-11-12 接受日期: 2011-03-16

国家自然科学基金(No.30800812)资助项目

*通讯作者。Tel: 0371-63554600, E-mail: yangyu7712@sina.com

3个不同的视野, 每个视野下测量10个数据, 取平均值。

1.2.3 数据的处理 运用SPSS13.0软件处理数据, 所有数据均用“平均值±标准差”表示。

2 结果

2.1 BALB/c小鼠十二指肠PCs的分布与发育

BALB/c小鼠随着日龄的增长, 十二指肠肠腺PCs见图1A、图1D, 数量见表1。2、4日龄BALB/c小鼠十二指肠未见肠腺, 6日龄出现明显的肠腺, 同时, 也出现了PCs, 数量较少, 细胞形态上窄下宽呈三角锥形, 胞核为蓝色卵圆形、大而圆、明亮, 位于细胞基底部, 胞质顶端的嗜酸性颗粒极小, 颗粒直径约(0.53±0.11) μm。8、10日龄肠腺及PCs数量明显有

所增长, 胞质顶端的嗜酸性颗粒有所增大, 10日龄颗粒直径约为(0.63±0.13) μm。6日龄和8日龄PCs总数、单个横断面肠腺中PCs总数所占比例均有极显著性差异($P<0.01$); 单个肠腺中PCs数、含有PCs的肠腺占肠腺总数的比例有显著性差异($P<0.05$)。8日龄和10日龄PCs数差异极显著($P<0.01$); 单个肠腺中PCs数有显著性差异($P<0.05$); 含有PCs的肠腺占肠腺总数的比例差异不显著($P>0.05$); 而单个横断面肠腺中PCs数所占比例则差异性极显著($P<0.01$)。

2.2 BALB/c小鼠空肠PCs的分布与发育

BALB/c小鼠随着日龄的增长, 空肠PCs见图1B、图1E, 数量见表2。2、4日龄BALB/c小鼠空肠未见发育较为完整的肠腺, 6日龄出现明显的肠腺, 同时, 也出现了PCs, 但数量较少, 细胞形态与十二指

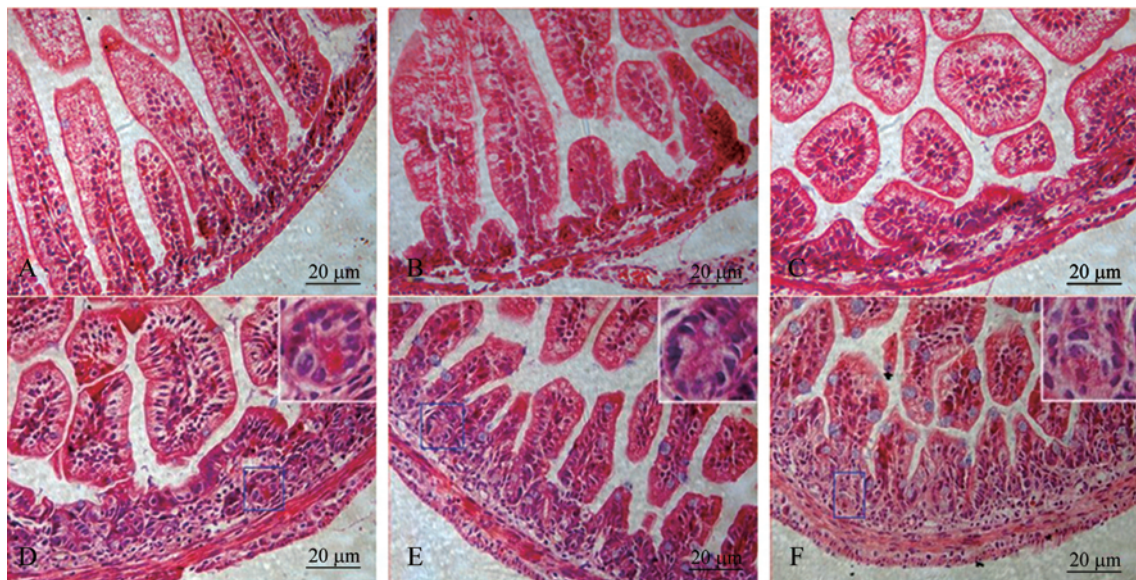
表1 不同日龄BALB/c小鼠十二指肠肠腺和PCs发育情况

Table 1 Development of intestinal gland and PCs in duodenum of BALB/c mice at different day ages

项目 Items	日龄/d Day ages				
	2	4	6	8	10
The number of PCs in single duodenum intestinal gland	0 ^{Cd}	0 ^{Cd}	0.40±0.08 ^{Bc}	0.50±0.03 ^{ABb}	0.59±0.05 ^{Aa}
The total number of PCs in the single cross section	0 ^{Dd}	0 ^{Dd}	5.67±1.53 ^{Cc}	28.67±2.52 ^{Bb}	58.00±3.61 ^{Aa}
The number of the intestinal gland containing PCs/the total of intestinal gland(%)	0 ^{Cc}	0 ^{Cc}	38.69±10.76 ^{Bb}	49.43±4.73 ^{ABa}	57.45±3.23 ^{Aa}
The number of PCs/the total of cells in duodenum intestinal gland(%)	0 ^{Dd}	0 ^{Dd}	4.96±0.95 ^{Cc}	9.86±0.18 ^{Bb}	12.27±0.52 ^{Aa}

注: 小写字母不同表示差异显著($P<0.05$), 大写字母不同表示差异极显著($P<0.01$), 字母相同表示差异不显著($P>0.05$)。下表同。

Note: the different small letters is $P<0.05$, the different capital letters is $P<0.01$, the same letters is $P>0.05$. The same as below.



A: 4日龄十二指肠PCs; B: 4日龄空肠PCs; C: 4日龄回肠PCs; D: 10日龄十二指肠PCs; E: 10日龄空肠PCs; F: 10日龄回肠PCs。

A: duodenum, 4 days; B: jejunum, 4 days; C: ileum, 4 days; D: duodenum, 10 days; E: jejunum, 10 days; F: ileum, 10 days.

图1 新生BALB/c小鼠肠道潘氏细胞

Fig.1 The Paneth cells in intestine of newborn BALB/c mice

肠PCs相似,胞质顶端的嗜酸性颗粒极小,颗粒直径约为 $(0.51\pm 0.09)\mu\text{m}$ 。8、10日龄空肠肠腺及PCs数明显有所增长,形态也趋于典型,嗜酸性颗粒有所增大,10日龄颗粒直径约为 $(0.65\pm 0.12)\mu\text{m}$ 。6日龄和8日龄PCs数、单个肠腺中PCs数、含有PCs的肠腺占肠腺总数的比例、单个横断面肠腺中PCs数所占比例均有极显著性差异($P<0.01$)。8日龄和10日龄含PCs的肠腺占肠腺总数的比例差异性显著($P<0.05$),但是其PCs数、单个肠腺中PCs数及单个横断面肠腺中PCs所占比例差异性不显著($P>0.05$)。

2.3 BALB/c小鼠回肠PCs的分布与发育

BALB/c小鼠随着日龄的增长,回肠PCs见图1C、

图1F,数量见表3。2、4日龄BALB/c小鼠回肠未见发育完整的肠腺,6日龄出现明显的肠腺,同时也出现较少的PCs,PCs形态与十二指肠、空肠近似,胞质顶端的嗜酸性颗粒较小,颗粒直径约为 $(0.57\pm 0.12)\mu\text{m}$ 。8、10日龄回肠肠腺及PCs数量明显有所增长,嗜酸性颗粒有所增大,10日龄颗粒直径约为 $(0.71\pm 0.16)\mu\text{m}$ 。6日龄和8日龄PCs数量、单个肠腺中PCs数、含有PCs的肠腺占肠腺总数的比例、单个横断面肠腺中PCs所占比例均有极显著性差异($P<0.01$)。8日龄和10日龄单个肠腺中PCs数及含PCs的肠腺比例差异性不显著($P>0.05$),但是其PCs数有极显著性差异($P<0.01$);单个横断面肠腺中PCs

表2 不同日龄Balb/c小鼠空肠肠腺和PCs发育情况

Table 2 Development of intestinal gland and PCs in jejunum of BALB/c mice at different day ages

项目 Items	日龄/d Day ages				
	2	4	6	8	10
The number of PCs in single jejunum ileum intestinal gland	0 ^{Cc}	0 ^{Cc}	0.58±0.08 ^{Bb}	0.71±0.02 ^{Aa}	0.77±0.04 ^{Aa}
The total number of PCs in the single cross section	0 ^{Cc}	0 ^{Cc}	7.67±2.08 ^{Cc}	38.33±7.09 ^{Bb}	67.67±8.96 ^{Aa}
The number of the intestinal gland containing PCs/the total of intestinal gland(%)	0 ^{Cd}	0 ^{Cd}	56.55±6.27 ^{Bc}	69.14±1.13 ^{Ab}	76.03±4.32 ^{Aa}
The number of PCs/the total of cells in jejunum intestinal gland(%)	0 ^{Cc}	0 ^{Cc}	6.85±1.11 ^{Bb}	12.35±3.02 ^{Aa}	14.11±0.72 ^{Aa}

表3 不同日龄Balb/c小鼠回肠肠腺和PCs发育情况

Table 3 Development of intestinal gland and PCs in ileum of BALB/c mice at different day ages

项目 Items	日龄/d Day ages				
	2	4	6	8	10
The number of PCs in single ileum intestinal gland	0 ^{Cc}	0 ^{Cc}	0.60±0.09 ^{Bb}	0.75±0.06 ^{Aa}	0.82±0.01 ^{Aa}
The total number of PCs in the single cross section	0 ^{Cd}	0 ^{Cd}	11±2.65 ^{Cc}	49.33±4.51 ^{Bb}	72.67±10.02 ^{Aa}
The number of the intestinal gland containing PCs/the total of intestinal gland(%)	0 ^{Cc}	0 ^{Cc}	59.72±8.67 ^{Bb}	74.24±7.26 ^{Aa}	80.70±2.12 ^{Aa}
The number of PCs/the total of cells in ileum intestinal gland(%)	0 ^{Cd}	0 ^{Cd}	10.38±1.68 ^{Bc}	17.18±1.27 ^{Ab}	20.12±1.52 ^{Aa}

所占比例有显著性差异($P<0.05$)。

3 讨论

PCs常见于人、鼠、猴、牛、马、羊、鸵鸟、鸡和兔等动物的肠道,一般不易见于猪、犬、猫,是肠道天然黏膜免疫中关键的细胞之一,在调节肠道菌群、阻止细菌移位、宿主肠道抵抗微生物的防御机制等方面起到重要的作用^[8]。本研究表明,BALB/c小鼠的十二指肠、空肠、回肠肠腺的底部分布有成簇状排列的PCs。一般情况下,健康BALB/c小鼠的小肠的PCs不出现于肠腺基底部以外的其它部位。但也有研究^[9]表明,*EphB3(-/-)*小鼠的PCs散在分布于整

个隐窝和绒毛。谢作焯等^[10]研究发现,在胃癌过程中,胃粘膜肠上皮化生出现PCs。因此,在不同的疾病状态下PCs的数目、位置和表达模式可能会发生改变。

在2、4日龄的BALB/c小鼠小肠中未发现发育的肠腺和PCs,在6日龄后的小肠中可以观察到发育的肠腺和PCs,说明PCs是在肠腺发育形成后的一段时间出现的。8、10日龄的小鼠肠道PCs的数量增多($P<0.05$ 或 $P<0.01$),说明小鼠在出生后,小肠在不断接触初乳、空气后,PCs迅速发育。这可能与外界的微生物有一定关系,这些微生物可在肠道定居,形成肠道的微生物菌群,这个过程中,PCs一经出现则迅速增殖发育,分泌防御素,提高肠道防御能力,调节肠

道菌群平衡。Fernandez等^[11]研究发现志贺氏菌不能引起1周龄以上的小鼠肠道炎症,这与小于1周龄的小鼠PCs还未分化成熟有关。同时,Recknagel等^[12]研究发现,PCs表面存在泌乳素受体,PCs的发育和成熟还受到乳汁中的泌乳素的影响。含PCs的肠腺数占肠腺总数的百分比随日龄的增加呈现上升趋势,且8日龄差异极显著,表明PCs的出现并非完全靠自身的分裂增殖,而是在肠腺发育过程中,由肠腺中的其他细胞分化而来,从侧面也反映了PCs由肠道干细胞分化而来。与Bjerknes等^[13]的研究相一致,他们研究发现小肠干细胞的增殖与分化是以对称及不对称的两种分裂方式进行,干细胞增殖分化后形成的定向祖细胞,将迅速分化为PCs、杯状细胞、M细胞、吸收细胞和内分泌细胞等,PCs向下迁移至肠腺底层,其余的4种细胞向肠腔方向迁移。Garabedian等^[14]和Stappenbeck等^[15]先后证实,人、大鼠和小鼠小肠的中间型细胞表达溶菌酶、隐窝素和磷脂酶A2,中间型细胞是PCs和杯状细胞共同的前体。所以即使在10日龄小鼠的小肠内,也并非所有肠腺均有PCs。肠腺中PCs数占肠腺细胞总数的百分比随日龄的增加呈现明显的上升趋势。

健康的BALB/c小鼠空肠和回肠上部的细菌很少,小肠肠道下段细菌逐渐增多。本研究结果表明分别在6、8、10日龄,从十二指肠、空肠到回肠,PCs的数量有显著增多的趋势,且各组之间存在显著性差异,该分布趋势与小肠各段细菌含量变化有一定相关性。此结果与杨斌等^[16]研究发现的人肠道PCs由十二指肠至空肠、回肠数量逐渐增多相一致。

小鼠肠道PCs在6日龄伴随着肠腺的出现而产生,健康BALB/c小鼠肠道PCs存在于小肠基底部,由十二指肠向下至空肠、回肠,细胞数量呈递增分布。进一步深入研究PCs在肠道的发育及分布有助于阐释PCs的来源及PCs分泌的防御素在肠道的功能,还可通过分子生物学及免疫组化等方法进一步深入探究胚胎期及新生小鼠PCs的来源、发育及分布。

参考文献(References)

- Dellmann HD, Brown EM. 兽医组织学. 秦鹏春, 聂其灼, 译. 北京: 农业出版社, 1989: 214-20.
- Porter EM, Bevins CL, Ghosh D, Ganz T. The multifaceted Paneth cell. *Cell Mol Life Sci* 2002; 59(1): 156-70.
- Bevins CL. The Paneth cell and the innate immune response. *Curr Opin Gastroenterol* 2004; 20(6): 572-80.
- Bevins CL. Paneth cell defensins: Key effector molecules of innate immunity. *Biochem Soc Trans* 2006; 34(2): 263-6.
- Ouellette AJ. Mucosal immunity and inflammation IV. Paneth cell antimicrobial peptides and the biology of the mucosal barrier. *Am J Physiol* 1999; 277(2Pt1): 257-61.
- Ganz T. Defensins: Antimicrobial peptides of innate immunity. *Nat Rev Immunol* 2003; 3(9): 710-20.
- Salzman NH, Ghosh D, Huttner KM, Paterson Y, Bevins CL. Protection against enteric salmonellosis in transgenic mice expressing a human intestinal defensin. *Nature* 2003; 422(6931): 522-6.
- 王永胜, 吕茂, 王思花. 小肠潘氏细胞防御素. 内蒙古农业大学学报 2007; 28(4): 221-4.
- Battle E, Henderson JT, Beghtel H, Vandenborn MM, Sancho E, Hüls G, *et al.* Beta-catenin and TCF mediate cell positioning in the intestinal epithelium by controlling the expression of EphB/ephrinB. *Cell* 2002; 111(2): 251-63.
- 谢作焯, 廖剑辉, 郑佩娥. 胃瘤中的内分泌细胞和潘氏细胞的免疫组织化学及电镜研究. 中华病理学杂志 1992; 21(4): 221-3.
- Fernandez M, Regnault B, Mulet C, Tanguy M, Jay P, Sansonetti PJ, *et al.* Maturation of paneth cells induces the refractory state of newborn mice to Shigella infection. *J Immunol* 2008; 180(7): 4924-30.
- Recknagel I, Geyer G, Jalbhuber KJ. Development of Paneth cells in the mouse small intestine during exclusive milk feeding. *Anat Anz* 1972; 132(5): 523-9.
- Bjerknes ML, Cheng H. Clonal analysis of mouse intestinal epithelial progenitors. *Gastroenterology* 1999; 116(1): 7-14.
- Garabedian EM, Roberts LJ, McNevin MS, Gordon JI. Examining the role of Paneth cells in the small intestine by lineage ablation in transgenic mice. *J Biol Chem* 1997; 272(38): 23729-40.
- Stappenbeck TS, Gordon JI. Rac1 mutations produce aberrant epithelial differentiation in the developing and adult mouse small intestine. *Development* 2000; 127(12): 2629-42.
- 杨斌, 陈双, 常見星, 周泰成, 章立, 陈国星. 人小肠黏膜潘氏细胞的形态学和机能. 中山大学学报 2008; 29(2): 177-80.

The Pattern of Distribution of Paneth Cells in Intestine of Newborn BALB/c Mice

Wang Zhifeng, Liang Hongde, Kang Jingjing, Zhang Rui, Yang Yurong*

(College of Animal Science and Veterinary Medicine, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

Abstract To observe the regularity of distribution of Paneth cells in normal BALB/c mice, 2 d, 4 d, 6 d, 8 d, and 10 d BALB/c mice were selected respectively ($n=3$ in each group). The distribution and morphology development of Paneth cells in different segments of the small intestines and different time were analyzed by paraffin section, HE staining and Leica microscopic image processing system. Result show that Paneth cells exist only in small intestine of the BALB/c mice, which is less in the duodenum and jejunum, and more in the ileum. The difference among the different segments of the small intestines were statistically significant ($P<0.05$). 4 days before, the development of small intestine gland is not imperfect, and no Paneth cells were observed in it. After 6 days of birth, Paneth cells were found in small intestine gland. The difference among different ages and were statistically significant ($P<0.05$).

Key words BALB/c mice; small intestine; Paneth cell; distribution

Received: November 12, 2010 Accepted: March 16, 2011

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (No.30800812)

*Corresponding author. Tel: 86-371-63554600, E-mail: yangyu7712@sina.com

作者致歉声明

作者曾在《中国细胞生物学学报》2011年第33卷第2期发表研究论文“靶向TTF-1转录因子诱导肺腺癌干细胞表型分化”，由于我们工作上的疏忽，上述论著在发表过程中遗漏了作者段友容。

段友容教授作为上述论著第一作者的硕士研究生招生导师，实际参与了本研究计划的制定并对研究工作给予了热情指导，因而也是论著的实际贡献者。结果发表时遗漏该作者是我们的过失，谨此声明予以增补并向段友容教授表示歉意。

作者：李焱、董强刚

2011年6月3日