

常用实验动物不同组织部位肥大细胞异质性的 组织学特点比较

陈颖, 朱萍妹, 刘巧玲, 潘华, 周光兴

(复旦大学实验动物科学部, 上海 200032)

【摘要】 **目的** 探讨并比较六种常用实验动物不同部位肥大细胞异质性的形态学特点。**方法** 应用麻醉后处死的方法,取小鼠、大鼠、豚鼠、兔、犬和猴的皮肤、肺脏、乙状结肠和脾脏组织,经4%中性缓冲甲醛溶液或 Bouin's 液固定后,制作常规组织切片,分别作 HE、甲苯胺蓝、阿尔新蓝-藏红和 P 物质免疫组织化学染色,镜下观察并应用彩色病理图像分析软件进行形态学分析;另取皮肤组织固定于磷酸缓冲戊二醛溶液,制作常规超薄切片,透射电镜下观察肥大细胞超微结构。**结果** 六种动物不同组织中肥大细胞各有其分布特点,且在形态大小、异染性及染色特性等方面表现各异,肥大细胞密度和形态学参数差异有显著性($P < 0.05$);豚鼠、犬和猴皮肤肥大细胞颗粒具有特殊亚微结构;小鼠皮肤组织内可见 P 物质免疫阳性肥大细胞和神经纤维,犬脾脏内可见 P 物质免疫阳性肥大细胞。**结论** 在六种实验动物的同一组织中以及同一种动物不同组织中,肥大细胞具有明显的异质性,此异质性对采用实验动物开展与肥大细胞功能相关的动物实验研究具有重要参考价值。

【关键词】 肥大细胞;异质性;实验动物;比较组织学

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 06-0075-06

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.06.013

Comparison of the morphological heterogeneity of mast cells in different tissues of 6 types of common laboratory animals

CHEN Ying, ZHU Ping-mei, LIU Qiao-ling, PAN Hua, ZHOU Guang-xing

(Department of Laboratory Animal Science, Fudan University, Shanghai 200032, China)

【Abstract】 **Objective** To compare and explore the morphological characteristics of mast cells in different tissues of 6 types of common laboratory animals. **Methods** Ten healthy adult SPF Kunming mice, 10 SD rats, 10 Hartley guinea pigs, 10 New Zealand rabbits, 6 beagle dogs and 6 *Macaca mulata* (male:female = 1:1, for all) were used in this study. The animals were sacrificed by euthanasia, samples of the skin, lung, spleen and sigmoid colon were taken from mouse, rat, guinea pig, rabbit, dog and monkey, and fixed in formalin and Bouin's solution. Paraffin sections were stained with toluidine blue and Alcian blue-safranin O, respectively. The mouse skin and dog spleen were immunohistochemically stained for substance P. A color pathological image analysis system was used to conduct the analysis of morphometric parameters of mast cells. Samples of the skin of these animals were also fixed in glutaraldehyde for the electron microscopic observation and comparison of the mast cells. **Results** Mast cells in different types of animals were distinctive in distribution, morphology, size, metachromasia and staining properties. Density and morphometric parameters of the mast cells had significant differences among the 6 types of animals ($P < 0.05$). Characteristic granules were contained in the skin mast cells of guinea pig, dog and monkey. Mast cells in the mouse skin, dog spleen and nerves in the mouse skin showed immunoreactive substance P. **Conclusions** Mast cells in the 6 types of laboratory animals showed histochemical and morphological heterogeneity, which have important reference values in animal experimental research on mast cell function.

[基金项目]上海市科技发展基金项目(编号:11140900700)。

[作者简介]陈颖(1990-),女,硕士研究生,专业:实验动物病理及模型。Email:chenying900815@126.com。

[通讯作者]周光兴(1956-),男,研究员,研究方向:实验病理与比较医学。Email:gxzhou@shmu.edu.cn。

【Key words】 Mast cell; Heterogeneity; Laboratory animal; Comparative histology; Mouse; Rat; Guinea pig; Rabbit; Dog; Monkey; Skin; Lung; Colon; Spleen

肥大细胞(mast cell, MC)自报道以来,已被发现广泛存在于人和动物的多种组织器官内,在机体免疫反应、抗肿瘤、抗寄生虫感染反应及神经-体液-免疫调节通路中发挥着重要作用^[1]。这些功能的实现源于 MC 内富含的多种生物活性介质和细胞因子,MC 在外周组织发育成熟过程中,形成不同的细胞表型^[2],其形态、分布、所含介质种类和功能均存在明显的异质性(heterogeneity)。目前已有少量有关人及多种动物体内 MC 异质性的研究报道,但常用实验动物体内 MC 分布和功能的异质性至今未见系统报道,尤其对犬和猴 MC 的研究更为少见。本实验从 MC 分布、数量、形态、分型、超微结构及 P 物质免疫反应性等方面,对六种实验动物的皮肤、肺脏、乙状结肠和脾脏中的 MC 进行观察,首次对常用实验动物多种组织内 MC 进行了系统的比较组织学研究,以期探讨不同实验动物 MC 的功能及意义提供参考资料。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 KM 小鼠 10 只,体重 18 ~ 22 g,1.5 月龄;SPF 级 SD 大鼠 10 只,体重 150 ~ 250 g,2 月龄。均购于复旦大学实验动物科学部[SCXK(沪)2009-0019]。清洁级 Hartley 豚鼠 10 只,体重 800 ~ 1000 g,5 月龄;清洁级新西兰兔 10 只,体重 4 ~ 5 kg,6 月龄。均购于上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2012-0002]。普通级比格犬 6 只,体重 7 ~ 10 kg,2 岁;普通级食蟹猴 6 只,体重 4 ~ 7 kg,5 岁。均购于苏州西山中科实验动物有限公司[SCXK(苏)2012-0009]。以上动物均雌雄对半。小鼠、大鼠、豚鼠和兔的组织取材于复旦大学实验动物科学部动物实验设施内进行【SYXK(沪)2009-0082】,犬和猴的组织取材于苏州西山中科药物研究开发有限公司动物实验设施内进行【SYXK(苏)2011-0028】。常规麻醉后,取颈背部皮肤,立即打开胸腔、腹腔,取肺脏、脾脏和乙状结肠。组织固定后,作常规石蜡切片,行 HE 染色,部分动物作组化及免疫组化染色,光镜下观察。另取六种动物 1 mm × 1 mm × 3 mm 皮肤组织,作常规超薄切片,透射电镜观察。

1.1.2 主要试剂与仪器

甲苯胺蓝 O、阿尔新蓝-8GX、藏红 O 购于生物工程(上海)股份有限公司;P 物质(Substance P, SP)抗体购于美国 Millipore 公司;免疫组化试剂盒购于美国 Santa Cruz 公司;光学显微镜:Olympus-BX51;彩色病理图文分析系统:HPIAS-2000。

1.2 实验方法

1.2.1 组织化学染色

组织取材后固定于 Bouin's 固定液 24 ~ 48 h,常规石蜡切片,脱蜡至水,分别行甲苯胺蓝染色和阿尔新蓝-藏红染色。0.25% 甲苯胺蓝染色 1 min,稍水洗,0.5% 冰醋酸分化,显微镜下控制,直至颗粒明显、背景清晰,蒸馏水冲洗;0.5% 阿尔新蓝的 3% 冰醋酸溶液染色 40 min, PBS 冲洗后,0.25% 藏红的盐酸溶液复染 1 min, PBS 冲洗。酒精梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封固。

1.2.2 免疫组织化学染色

采用免疫组织化学 ABC 法进行染色。取皮肤、脾脏组织固定于 4% 中性缓冲甲醛溶液,常规石蜡切片,脱蜡至水,3% 甲醇-H₂O₂ 灭活内源性过氧化物酶, pH 6.0 枸橼酸盐缓冲液高压抗原修复(120℃, 5 min), 0.5% TritonX-100 细胞膜打孔, BSA 封闭 30 min, 1:100 稀释的 SP 抗体 4℃ 过夜, 0.5% 二抗、ABC 复合物各 37℃ 孵育 30 min, DAB 室温显色,镜下严格控制,阳性部位达到最强显色而背景无色时终止,苏木素复染后脱水、透明、封固,显微镜下观察并拍照。PBS 代替一抗作为阴性对照。

1.2.3 电镜切片染色

取皮肤组织立即投入 2.5% 磷酸缓冲戊二醛溶液预固定,1% 锇酸溶液后固定,常规电镜脱水、包埋、固化,LKB-1 型超薄切片机制片 50 ~ 60 nm,3% 醋酸铀-枸橼酸铅双染色,Philips CM-120 透射电镜观察,拍片。

1.2.4 MC 计数及形态学参数分析

在甲苯胺蓝染色下对 MC 进行计数和形态学分析。对每只动物个体,连续随机计数 10 个高倍视野(×400)内 MC 数,取其平均值代表 MC 密度,对每种动物雌雄个体分别计数。使用彩色病理图像分析软件,分析 MC 面积、等效直径、核质比(细胞核在细胞中所占比例)和胞质灰度等参数。

1.2.5 统计分析

应用 Excel 2003 对结果进行数据处理并统计分

析, 计量数据以($\bar{x} \pm s$)表示, 不同种动物间差异性比较采用单因素方差分析, 双侧检验, 以 $P < 0.05$ 判定差异有显著意义, 同种动物雌雄个体间比较采用 t 检验。

2 结果

2.1 HE 染色

镜下观察结果显示, 六种实验动物皮肤、肺脏、乙状结肠和脾脏等 4 种组织的形态层次清晰, 结构完整, 均未观察到变性、炎症、增生及坏死等异常病理改变, 为正常组织, 可用于组织化学、免疫组化染色及电镜观察。

2.2 甲苯胺蓝染色

皮肤组织中, 六种动物 MC 分布于真皮层和皮下组织, 表皮层无分布, 多见于血管、淋巴管、毛囊、皮脂腺周围, 胞质内充满紫红色粗大的异染颗粒, 颗粒密集, 有时占据整个细胞。小鼠 MC 体积较大, 形态极不规则, 可见长的细胞突起, 且常可见脱颗粒形态的 MC 在真皮层及皮下组织中均匀分布。与小鼠相比, 大鼠 MC 体积较小, 形态较规则, 有较大的淡蓝染的细胞核及亮点样细胞核, 真皮层中分布较少, 皮下组织中较多。豚鼠 MC 有短的细胞突起, 在真皮层浅层较多, 散在或串珠样分布。兔 MC 多为圆形或卵圆形, 呈局部密集状分布, 其他区域密度低, 只见个别散在的 MC。犬和猴 MC 多聚集或散在分布于真皮层, 皮下组织中分布较少, 犬 MC 体积小而胞核大, 猴 MC 体积较大, 细胞边界不清(图 1, 彩插 8)。

肺组织中, 六种动物 MC 主要分布于小叶间支气管、终末细支气管以及血管、淋巴组织周边, 少量分布于肺间隔。六种动物的 MC 形态均可见圆形、椭圆形、梭形、三角形和不规则形态, 胞质被染成紫红色或蓝紫色, 胞核呈淡蓝色或不着色。小鼠 MC 形态最不规则, 个别细胞可见短棒状突起, 胞核较大, 似空泡状, 位于细胞中央。大鼠 MC 胞质着深染的紫红色, 胞核淡蓝染或亮点状位于细胞中央或偏于一侧。豚鼠与兔的 MC 胞质淡染, 部分 MC 着色偏蓝, 呈蓝紫色, 细胞边界不清, 豚鼠 MC 主要分布在气管、血管周围, 肺间隔中较少见到, 而兔 MC 在肺间隔中分布较多。犬与猴的 MC 在肺脏中广泛分布, 肺间隔中也较多见, 犬的 MC 中可见巨大的细胞核, 着淡蓝色, 猴的 MC 形态较规则, 胞核大小不一(图 2, 彩插 8)。

乙状结肠中, 六种动物 MC 主要见于黏膜固有层和黏膜下层, 个别动物尚可见于肌层, 犬和猴在浆膜层中亦可观察到 MC, MC 多沿血管、淋巴分布, 或簇集成群, 或排列成行, 或单个散在出现。小鼠 MC 多小而圆, 胞质为深染的蓝紫色, 在黏膜固有层分布较多, 黏膜下层分布不显著。大鼠 MC 胞质为深染的紫红色或蓝色, 固有层中较少分布, 多见于黏膜下层。豚鼠 MC 分布于固有层、黏膜下层, 胞质深蓝染。兔 MC 形态似小鼠, 胞质染蓝紫色, 着色淡, 在固有层中数量显著, 黏膜下层分布较少, 肌层偶见有分布。犬和猴的 MC 在黏膜固有层、黏膜下层、肌层和浆膜层均可见分布, 胞质着紫红色或深蓝色。猴 MC 还可见于浆膜下层(图 3, 彩插 9)。

脾脏内, MC 主要分布于边缘区、红髓、被膜下与小梁周围, 聚集呈簇, 红髓内可见围绕脾血窦分布的 MC, 动脉周围淋巴鞘中偶见有 MC 分布, 白髓淋巴小结中无 MC。小鼠和兔 MC 形态较规则, 呈圆形或椭圆形。小鼠 MC 胞质呈深染的紫红色, 体积大的细胞边界不清, 胞核淡蓝染或亮点状。兔 MC 胞质着蓝紫色, 胞核位于细胞中央。犬 MC 形态多样, 有的可见长短不一的突起, 主要分布在边缘区。猴 MC 胞质被染成较淡的蓝紫色, 胞核较大, 形态与分布同犬。在该甲苯胺蓝染色方法下, 未观察到大鼠和豚鼠的脾脏 MC(图 4, 彩插 9)。

2.3 阿尔新蓝-藏红 (Alcian blue-safranin O, AB-S) 染色

AB-S 染色显示 MC 在皮肤、肺脏、乙状结肠、脾脏中的分布位置与甲苯胺蓝染色结果相同。在小鼠、大鼠、豚鼠和兔的皮肤中可见蓝染、红染和红蓝间染的 MC, 犬、猴的皮肤中仅观察到蓝染的 MC。肺组织内, 小鼠、大鼠 MC 呈蓝染、红蓝间染、红染三种, 豚鼠、兔、犬、猴仅观察到到阿尔新蓝阳性的 MC。脾脏与乙状结肠内, 六种动物的 MC 均只见蓝染(图 5, 彩插 9)。

2.4 SP 免疫组化

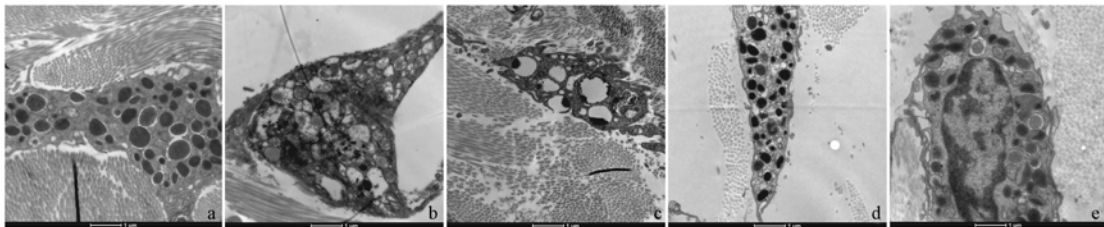
经免疫组化染色的组织中, 可见 MC 呈 SP 免疫反应性。细胞内阳性反应颗粒清晰, 呈棕褐色, 有时可见阳性颗粒充满整个细胞。其形态大小及分布特点与甲苯胺蓝染色基本一致。非 SP 阳性反应细胞为苏木素蓝染。小鼠皮肤中可见 SP 免疫反应阳性神经纤维, 行走于 MC 附近, 与 MC 邻接(图 6a)。而犬脾脏中未见 SP 免疫反应阳性神经纤维(图 6b)。对照组无阳性显色(见图 6, 彩插 10)。

2.5 皮肤 MC 电镜观察

透射电镜下,小鼠、豚鼠、兔、犬和猴的皮肤 MC 均呈现椭圆形、梭形、狭长的条形或不规则的多边形。细胞表面可见短的伪足样突起。胞核多为肾形,位于细胞中央或偏于一侧,核仁明显,均可见常染色质和异染色质,异染色质贴附于核膜内侧。胞质内含少量线粒体、粗面内质网、游离核糖体及丰富的细胞骨架成分,除此之外可见数量不等、形态不一的胞质颗粒,颗粒有单位膜包裹。

小鼠 MC 胞质颗粒多呈圆形、椭圆形,少数呈短棒状或不规则形态。颗粒基质的电子密度均匀,未见特殊的亚微结构。根据颗粒电子密度的差异,小鼠皮肤 MC 可分为高电子密度、中等电子密度及低电子密度的均质状颗粒,低电子密度颗粒外的单位膜清晰可见(图 7a)。豚鼠 MC 胞质颗粒形态同小

鼠。颗粒基质呈绒毛状分布于颗粒内或呈斑状偏于颗粒一侧,也可见电子密度均匀的均质状颗粒,但个数极少(图 7b)。兔 MC 颗粒多呈圆形,少部分呈椭圆形,颗粒大小差别显著。观察到斑状颗粒、低电子密度的均质状颗粒、空泡状颗粒(图 7c)。犬 MC 颗粒呈现圆形、椭圆形,少数为不规则形态。颗粒基质呈现多种形态,除了有电子密度不等的均质状颗粒外,仍观察到多种特殊的颗粒亚微结构。如空泡状颗粒;同心圆状颗粒,其形态为高密度的圆形或椭圆形基质衬托在低密度均质中央;绒毛状颗粒;沙砾状颗粒以及斑状颗粒(图 7d)。猴 MC 的颗粒形态与犬类似,但颗粒的亚微结构不如犬的复杂。将猴皮肤 MC 的胞质颗粒分为 4 种类型:I 型为均质状颗粒,II 型为沙砾状颗粒,III 型为结晶状颗粒,IV 型为空泡状颗粒(图 7e)。



注:a、b、c、d、e 分别为小鼠、豚鼠、兔、犬和猴皮肤 MC 超微结构。

图 7 皮肤 MC 超微结构

Fig. 7 Ultrastructure of MCs in the skin of mouse (a), guinea pig (b), rabbit (c), dog (d) and monkey (e).

2.6 MC 计数比较

六种实验动物 MC 的数量在皮肤、肺脏及乙状结肠中差异均有显著性($P < 0.05$),皮肤中小鼠和大鼠 MC 数量较多,肺组织中犬和猴 MC 数量较多,乙状结肠中兔、犬和猴 MC 数量较多。小鼠、兔、犬和猴脾脏 MC 数量差异有显著性($P < 0.05$),犬 MC 数量较多。雌性犬皮肤 MC 数量多于雄性($P < 0.05$),而肺组织中雄性犬 MC 数量多于雌性($P <$

0.01),其余动物雌雄个体间差异无显著性($P > 0.05$)。

2.7 MC 形态学参数比较

六种动物之间,皮肤、肺脏和乙状结肠组织中 MC 的面积、等效直径、核质比和胞质灰度差异均有显著性($P < 0.05$),小鼠、兔、犬和猴的脾脏 MC 面积、核质比和胞质灰度差异均有显著性($P < 0.05$),等效直径则无差异(表 1~4)。

表 1 六种实验动物皮肤 MC 参数分析($\bar{x} \pm s$)

Tab. 1 Morphometric analysis of mast cells in the skin of 6 types of laboratory animals

动物 Animals	MC 面积/ $\mu\text{m} \times \mu\text{m}$ Area of MC	等效直径/ μm Equivalent diameter	核质比 Nuclear- cytoplasmic ratio	胞质灰度 Cytoplasmic grayscale
小鼠 Mouse	310.01 \pm 30.62 Δ	22.37 \pm 1.01 Δ	0.43 \pm 0.03 Δ	79.91 \pm 8.77 Δ
大鼠 Rat	261.63 \pm 33.08 Δ	20.28 \pm 1.26 Δ	0.32 \pm 0.03 Δ	71.92 \pm 5.20 Δ
豚鼠 Guinea pig	231.36 \pm 29.47 Δ	22.6 \pm 2.15 Δ	0.46 \pm 0.05 Δ	104.53 \pm 3.10 Δ
兔 Rabbit	180.64 \pm 51.4 Δ	19.49 \pm 3.53 Δ	0.40 \pm 0.11 Δ	98.75 \pm 7.50 Δ
犬 Dog	231.33 \pm 4.66 Δ	22.65 \pm 1.56 Δ	0.42 \pm 0.07 Δ	96.02 \pm 6.10 Δ
猴 Monkey	266.83 \pm 14.28 Δ	28.51 \pm 1.59 Δ	0.42 \pm 0.02 Δ	126.08 \pm 4.60 Δ

注:六种动物间比较, $\Delta P < 0.05$,视野数 50。

Note. $\Delta P < 0.05$, compared among the 6 types of laboratory animals. Observation of 50 visual fields.

表 2 六种实验动物乙状结肠 MC 参数分析($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Morphometric analysis of mast cells in the colon of 6 types of laboratory animals

动物 Animals	MC 面积/ $\mu\text{m} \times \mu\text{m}$ Area of MC	等效直径/ μm Equivalent diameter	核质比 Nuclear- cytoplasmic ratio	胞质灰度 Cytoplasmic grayscale
小鼠 Mouse	99.33 ± 13.31 [△]	13.21 ± 1.42 [△]	0.51 ± 0.05 [△]	121.42 ± 6.71 [△]
大鼠 Rat	168.12 ± 37.52 [△]	20.38 ± 2.60 [△]	0.52 ± 0.04 [△]	114.65 ± 16.84 [△]
豚鼠 Guinea pig	129.58 ± 11.33 [△]	15.38 ± 0.72 [△]	0.51 ± 0.04 [△]	136.58 ± 4.96 [△]
兔 Rabbit	114.46 ± 13.44 [△]	15.56 ± 0.95 [△]	0.56 ± 0.01 [△]	126.94 ± 3.34 [△]
犬 Dog	193.19 ± 30.24 [△]	21.03 ± 1.27 [△]	0.53 ± 0.02 [△]	107.00 ± 3.30 [△]
猴 Monkey	216.44 ± 15.58 [△]	23.53 ± 1.87 [△]	0.46 ± 0.01 [△]	109.90 ± 3.21 [△]

注:六种动物间比较, $\Delta P < 0.05$, 视野数 50。

Note. $\Delta P < 0.05$, compared among 6 types of the laboratory animals. Observation of 50 visual fields.

表 3 六种实验动物肺脏 MC 参数分析($\bar{x} \pm s$)

Tab.3 Morphometric analysis of mast cells in the lung of 6 types of laboratory animals

动物 Animals	MC 面积/ $\mu\text{m} \times \mu\text{m}$ Area of MC	等效直径/ μm Equivalent diameter	核质比 Nuclear- cytoplasmic ratio	胞质灰度 Cytoplasmic grayscale
小鼠 Mouse	274.00 ± 43.05 [△]	24.37 ± 3.90 [△]	0.46 ± 0.04 [△]	86.68 ± 6.16 [△]
大鼠 Rat	208.65 ± 40.98 [△]	19.46 ± 1.02 [△]	0.38 ± 0.04 [△]	78.95 ± 5.11 [△]
豚鼠 Guinea pig	195.58 ± 21.60 [△]	17.46 ± 1.66 [△]	0.42 ± 0.04 [△]	93.63 ± 10.32 [△]
兔 Rabbit	123.46 ± 12.67 [△]	14.81 ± 2.17 [△]	0.48 ± 0.07 [△]	123.83 ± 8.08 [△]
犬 Dog	169.22 ± 15.97 [△]	18.07 ± 1.10 [△]	0.57 ± 0.08 [△]	90.01 ± 5.08 [△]
猴 Monkey	210.67 ± 56.83 [△]	19.98 ± 3.75 [△]	0.42 ± 0.08 [△]	84.89 ± 10.96 [△]

注:六种动物间比较, $\Delta P < 0.05$, 视野数 50。

Note. $\Delta P < 0.05$, compared among 6 types of the laboratory animals. Observation of 50 visual fields.

表 4 六种实验动物脾脏 MC 参数分析($\bar{x} \pm s$)

Tab.4 Morphometric analysis of mast cells in the spleen of 6 types of laboratory animals

动物 Animals	MC 面积/ $\mu\text{m} \times \mu\text{m}$ Area of MC	等效直径/ μm Equivalent diameter	核质比 Nuclear- cytoplasmic ratio	胞质灰度 Cytoplasmic grayscale
小鼠 Mouse	147.90 ± 8.10 [△]	15.73 ± 0.40 [*]	0.34 ± 0.05 [△]	67.10 ± 9.98 [△]
兔 Rabbit	118.13 ± 26.67 [△]	14.19 ± 2.49 [*]	0.53 ± 0.10 [△]	91.75 ± 11.32 [△]
犬 Dog	186.29 ± 41.97 [△]	17.01 ± 3.05 [*]	0.53 ± 0.10 [△]	85.11 ± 9.31 [△]
猴 Monkey	141.79 ± 5.12 [△]	15.46 ± 0.68 [*]	0.52 ± 0.02 [△]	110.87 ± 7.73 [△]

注:4 种动物间比较, $\Delta P < 0.05$, $* P > 0.05$, 视野数 50。

Note: $\Delta P < 0.05$, $* P > 0.05$, compared among 4 types of the laboratory animals. Observation of 50 visual fields.

3 讨论

MC 胞质颗粒富含多种生物活性介质和细胞因子^[3]。颗粒内的组胺、肝素对碱性染料甲苯胺蓝具有异染性,可被染成蓝紫色,从而与周围细胞、组织区分。本实验甲苯胺蓝染色结果显示,MC 在各种动物的每种组织中均存在形态学差异,但未观察到大鼠和豚鼠的脾脏 MC,使用改良甲苯胺蓝染色法,或可增加 MC 的染出率。目前国内尚未有关于甲苯胺蓝染色效果差异性的报道,本实验发现六种动物乙状结肠中均可见数量不等的胞质呈深蓝染的 MC,与其他部位胞质着紫红色的 MC 不同,表明甲苯胺蓝对于不同部位 MC 的着色有差别。不同动物

的 MC 密度差别显著,同种动物雌雄个体间无差别,仅在犬的皮肤和肺脏中发现雌雄差异,由于统计个体较少,对此差异故暂不能下定论。本实验对象均为成年动物,年龄差异对 MC 的异质性是否有影响,仍需进一步实验研究。

根据颗粒介质种类的不同,动物 MC 分为结缔组织 MC(CTMC)和黏膜 MC(MMC)^[2]。使用 AB-S 染色法能够区分含有不同颗粒种类的 MC,藏红阳性者(红染)为颗粒内酸性黏多糖含硫量较高、以分泌肝素为主的成熟 MC, Alcian 蓝阳性者(蓝染)则为分泌组胺为主的未成熟的 MC^[4]。本实验在小鼠、大鼠、豚鼠和兔的皮肤 MC,小鼠和大鼠的肺脏 MC 中观察到红染和红蓝间染的 MC,表明在这些组

织中存在以分泌肝素为主的 MC, 其他组织中则仅见以分泌组胺为主的阿尔新蓝阳性 MC。虽然目前对 AB-S 染色技术在组织化学评价方面尚有争议, 但本实验中相同条件下不同组织 MC 呈现着色差异, 亦可在一定程度上说明 MC 颗粒介质的种类是存在差异的。有研究发现, 病理状态下 MC 的着色性发生改变: 小鼠急性缺氧致肺损伤的模型中, 随着缺氧时间的延长, 肺组织内红染、红蓝混染颗粒逐渐减少, 蓝染颗粒逐渐增多^[5]。

透射电镜观察显示豚鼠、犬和猴的皮肤 MC 颗粒均有特殊亚微结构。结果证实不同动物皮肤 MC 颗粒介质种类的确存在差异, 但每种结构所表示的介质性质及意义, 则仍需进一步研究。人 MC 胞质颗粒有旋涡状、颗粒状和结晶状特殊结构^[6], 本实验在猴 MC 胞质颗粒内发现了和人相似的结晶状结构, 提示猴与人 MC 在介质种类及功能上可能存在相似性。

SP 免疫组化结果显示, 在小鼠皮肤可见充满 SP 免疫阳性颗粒的 MC 及 SP 阳性免疫反应神经纤维, 两者在位置上构成关联, 位于真皮层浅层, 与以往报道相同^[7]。在犬 MC 内可见 SP 免疫阳性的 MC。神经纤维释放 SP, 以旁分泌的方式作用于与之相邻或形成突触连接的 MC, 引起 MC 脱颗粒, 释放组胺等炎性介质^[8], 使血管扩张、血浆溢出以及皮肤局部红肿、瘙痒, 而组胺反作用于感觉神经, 促使其形成 SP 经轴突反射由另一神经末梢释放^[9], SP 亦作为痛觉传入递质向中枢传入痛觉信息。与此同时 MC 释放 SP, 一方面作用于 MC 自身, 另一方面刺激淋巴细胞和抗体生成, 引起局部免疫反应^[10]。含 SP 的 MC、神经纤维以及两者的形态联系, 与增生性瘢痕^[11]、特应性皮炎^[12]、银屑病^[13]等皮肤性疾病的病理发展相关。脾脏是免疫系统重要的器官之一, 富含 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞, 与甲苯胺蓝染色相比, 犬脾脏内的 MC 大部分呈 SP 免疫反应阳性, SP(+) MC 受神经调控脱颗粒释放 SP, 促进周围组织中淋巴细胞生成, 对于免疫调节、维持宿主免疫防御和内环境稳态具有重要意义。

综上所述, 本实验通过组织学、免疫学、细胞生物学和形态参数分析等指标, 在国内首次系统比较了六种常用实验动物皮肤、肺脏、乙状结肠和脾脏中 MC 的组织形态学特点, 结果显示并证实了 MC 在不

同动物同一组织及同一种不同组织中存在明显的异质性。实验结果对于生命科学领域中开展人类动物模型的相关实验研究, 提供 MC 功能和组织学参考资料。

(本文图 1~6 见彩插 8,9,10)。

参 考 文 献

- [1] 庄玉, 呼格吉乐图, 赵风华, 等. 肥大细胞研究概述 [J]. 动物医学研究进展. 2011, 32(9): 109-112.
- [2] Heib V, Becker M, Taube C, et al. Advances in the understanding of mast cell function [J]. Br J Hematol, 2008, 142(5): 683-694.
- [3] Franceschini B, Ceva-Grimaldi G, Russo C, et al. The complex functions of mast cells in chronic human liver diseases [J]. Dig Dis Sci. 2006, 51: 2248-2256.
- [4] 呼格吉乐图, 苏布达, 王志, 等. 肥大细胞的组织化学与超微结构异质性 [J]. 细胞生物学杂志. 2007, 29: 840-844.
- [5] 于洪川, 魏智清, 张振汉, 等. 小鼠急性缺氧后肺内 MC 的变化 [J]. 宁夏大学学报(自然科学版). 2007, 28(3): 249-252.
- [6] 姚红艳, 李秀富, 李诗举, 等. 小鼠空肠肥大细胞组织化学及超微结构研究 [J]. 动物医学进展. 2010, 31(1): 41-43.
- [7] Li WW, Guo TZ, Liang DY, et al. Substance P signaling controls mast cell activation, degranulation, and nociceptive sensitization in a rat fracture model of complex regional pain syndrome [J]. Anesthesiology. 2012, 116(4): 882-895.
- [8] Buhner S, Schemann M. Mast cell-nerve axis with a focus on the human gut [J]. Biochim Biophys Acta. 2012, 1822: 85-92.
- [9] Harvima IT, Nilsson G. Stress, the neuroendocrine system and mast cells; current understanding of their role in psoriasis [J]. Expert Rev Clin Immunol. 2012, 8(3): 235-241.
- [10] Pongor É; Altdorfer K; Fehér E. Colocalization of substance P with tumor necrosis factor- α in the lymphocytes and mast cells in gastritis in experimental rats [J]. Inflamm Res. 2011, 60: 163-168.
- [11] 陈亮, 流沙, 李世荣, 等. P 物质对人增生性瘢痕组织块中组胺释放的影响 [J]. 中华烧伤杂志. 2006, 22(3): 192-194.
- [12] Choi JK, Kim SH. Inhibitory effect of galangin on atopic dermatitis-like skin lesions [J]. Food Chem Toxicol. 2014, 68: 135-141.
- [13] Theoharides TC, Zhang B, Kempuraj D, et al. IL-33 augments substance P-induced VEGF secretion from human mast cells and is increased in psoriatic skin [J]. Proc Natl Acad Sci U S A. 2010, 107(9): 4448-4453.

[收稿日期] 2014-07-02