

人胚胎早中期肠壁黏膜层发育分化的研究

李永平¹, 蒋新华¹, 张文忻¹, 钟秀凤¹, 林健贤¹, 郑健梁¹, 刘琳², 周国民³

(1. 中山大学中山眼科中心病理室, 广东 广州 510060; 2. 广州陆军总医院, 广东 广州 510120;
3. 复旦大学上海医学院解剖与组织胚胎学系, 上海 200032)

摘要:【目的】研究人胚胎早中期肠壁黏膜层及黏膜上皮杯状细胞的发育。【方法】采用形态学、组化及联合组化和免疫组化等方法对 27 例 4-28 周胚胎空肠、回肠及结肠肠壁黏膜层的发育进行观察。【结果】黏膜上皮 PAS 阳性的杯状细胞在 10 周时已经出现, 爱茜蓝阳性的杯状细胞在 12 周出现, 空肠、回肠的黏膜肌层在 10 周时已开始形成, 起源于黏膜下层的肌肉干细胞, 此后, 随着胎龄的增加, 杯状细胞的数目增加, 黏膜肌层 -SMA 阳性的细胞逐渐增多。【结论】肠黏膜上皮杯状细胞在 10 周时开始发育, 可分为 4 类: 含中性黏多糖的杯状细胞; 含酸性黏多糖的杯状细胞; 既含中性黏多糖又含酸性黏多糖的杯状细胞; 既不含中性黏多糖也不含酸性黏多糖的杯状细胞。黏膜肌层起源于黏膜下层的肌肉干细胞。

关键词: 胚胎; 黏膜层; 干细胞; 杯状细胞; 空肠; 回肠; 结肠; 免疫组织化学

中图分类号: R322.451

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)02-0192-05

Investigation of Mucosa Development of Human Intestine in Early and Middle Embryo

LI Yong-ping¹, JIANG Xin-hua¹, ZHANG Wen-xin¹, ZHONG Xiu-feng¹, LIN Jian-xian¹, ZHENG Jian-liang¹,
LIU Lin², ZHOU Guo-min³

(1. Department of Pathology, Zhongshan Ophthalmic Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China;
2. Guangzhou Military Hospital, Guangzhou 510120, China; 3. Department of Anatomy, Histology and Embryology, Shanghai
Medical College of Fudan University, Shanghai 200032, China)

Abstract:【Objective】To investigate the development of the mucosa and the goblet cells in the intestine of human early and middle embryo.【Methods】The development of the mucosa of jejunum, ileum, and colon of 27 human embryo aged 4-28 weeks was investigated by morphology, histochemistry, combined histochemistry, and immunohistochemistry.【Results】The periodic acid schiffs (PAS) positive goblet cells appeared in the mucosa at week 10. The alcian blue (AB) positive goblet cells appeared at week 12. The muscularis mucosae was only discernible in jejunum and ileum at week 10, which derived from the muscle stem cells in the submucosa, then, the number of goblet cells and -SMA positive cells in the muscularis mucosae raised gradually with the increase of embryo age.【Conclusion】Goblet cells in the intestine epithelium start to develop at week 10, which can be classified into four types: goblet cells with neutral mucopolysaccharide; goblet cells with acid mucopolysaccharide; goblet cells with both neutral and acid mucopolysaccharide; goblet cells with non-neutral and non-acid mucopolysaccharide. The muscularis mucosae derived from the muscle stem cells in the submucosa.

Key words: embryo; mucosa; stem cells; goblet cells; jejunum; ileum; colon; immunohistochemistry

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(2):192-196]

黏膜肌与肠道的消化吸收功能密切相关, 有关胚胎肠壁黏膜肌的发育分化的研究以动物研究较多^[1,2], 而对人胚研究较少^[3]。目前对于黏膜肌层的起源知之甚少, Masumoto 等^[1]人的研究认为黏

膜肌层的发生和环行肌层密切相关。肠道杯状细胞分泌黏液, 促进营养物质的消化吸收, 而目前对于肠黏膜上皮杯状细胞的分类很模糊。刘怀如等^[4]的研究将南方鲇消化道的杯状细胞分为四类。周

收稿日期: 2005-04-15

基金项目: 广东省社会发展攻关基金资助项目(2003A3020302)

作者简介: 李永平(1961-)男, 湖南郴州人, 教授, 硕士生导师, 通讯作者。E-mail: zxc201@yahoo.com

国华等⁵的根据杯状细胞的形态将其分为两类。本文采用组织化学及免疫组织化学方法,研究人胚胎早中期肠壁黏膜层特别是杯状细胞的发育分化,结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

27 例胚胎,一部分为胚胎死亡,自愿终止妊娠病例,经人工流产或水囊引产获得,另一部分为子宫疾病合并妊娠病例,经剖腹手术获得,均经同意供科研用。根据月经龄计算,胎龄 4~28 周,中位胎龄为 12 周,由中山大学附属第一医院和附属第三医院提供,取胚胎空肠、回肠和结肠组织(10 周以前的胚胎,空肠、回肠和结肠还无法从形态上区分,我们主要根据其相对位置进行取材),常规福尔马林固定,酒精梯度脱水,石蜡包埋,连续切片 5 μm 厚,取数片进行常规 HE 染色。

1.2 试剂

鼠抗人 α -SMA(福州迈新,MAB-0003),鼠抗人 CD34(福州迈新,MAB-0034),三步法免疫组化试剂(福州迈新)。

1.3 组化及联合组织化学染色

进行过碘酸雪夫反应(PAS)、醛品红-爱茜蓝(AB)、爱茜蓝+PAS、Van Gieson's Stains(VG)、Masson 三色染色,进行爱茜蓝+PAS 联合染色时,为使两种染色方法不相互干扰,更清楚地显示出各类型的杯状细胞,省去染醛品红这一步。

1.4 免疫组织化学染色

石蜡切片常规脱蜡至水,用 30 mL/L H_2O_2 阻断内源性过氧化物酶 10 min, PBS 冲洗, 3 min \times 3 次;擦干后滴加一抗,室温孵育 1 h, PBS 冲洗, 3 min \times 3 次;滴加二抗 A 液,室温孵育 20 min, PBS 冲洗, 3 min \times 3 次;滴加二抗 B 液,室温孵育 30 min, PBS 冲洗, 3 min \times 3 次;DAB 显色(5 min,镜下观察),苏木精对比染色,常规脱水、透明、中性树胶封片。

2 结果

2.1 HE 染色

10 周时,空肠、回肠、结肠黏膜上皮均由 3~5 层细胞构成,肠腔不明显,呈裂隙状,略向肠腔隆起,无明显的指状绒毛突起,形态学上未见典型的

杯状细胞。12 周时空肠形成明显的指状绒毛突起,绒毛上段表面覆盖单层柱状上皮,近根部为复层柱状上皮,见一些杯状样、囊状和梨形的空泡细胞;回肠的绒毛与空肠相比较粗、较少,结肠则更短。13 周时空肠绒毛数目众多,绒毛表面覆盖单层柱状上皮,细胞呈柱形、圆形或卵圆形,已见肠隐窝形成;回肠及结肠均未见隐窝形成。15 周后空肠已见众多肠隐窝形成,固有层内的间质明显可见,为淋巴细胞、中央乳糜管、血管等结构;回肠及结肠均已形成肠隐窝。

2.2 PAS 染色

10 周时, PAS 染色发现整个肠壁共 10~15 个细胞含有明显的 PAS 阳性物质,形似杯状细胞(图 1A)。12 周时, PAS 阳性的杯状细胞多位于绒毛根部;结肠 PAS 阳性的杯状细胞几乎全部位于绒毛根部,绒毛中部及上部未见 PAS 阳性的细胞。13 周时, PAS 阳性的杯状细胞散在分布于绒毛(图 1B);回肠肠腔中央有一团 PAS 阳性的物质(图 1C);结肠 PAS 阳性的杯状细胞多位于绒毛根部(图 1D)。15 周,空肠绒毛根部杯状细胞 PAS 阳性的程度比绒毛中部和上部弱,绒毛根部 PAS 阳性的杯状细胞胞浆中还可可见少量空泡形成;回肠见 PAS 阳性的物质存在于黏膜上皮细胞周围;结肠 PAS 阳性的部分细胞中央不着色,仅细胞边缘呈红色(图 1E)。18 周空肠、回肠及结肠杯状细胞阳性的程度有所减弱,且细胞中央均为阴性或弱阳性。

为了解 PAS 阳性的杯状细胞在人胚胎空肠、回肠及结肠发育过程中的数量变化规律,我们计数了 10, 12, 13, 15, 18, 19.5, 26, 28 周胚胎肠壁 1000 个黏膜上皮细胞中 PAS 阳性的杯状细胞数,每个胎龄计数了 2 例(共 16 例),计数后取平均值,并计算了 PAS 阳性的杯状细胞所占黏膜上皮细胞的比率,结果见图 2。

2.3 醛品红-爱茜蓝、爱茜蓝+PAS 染色

10 周时爱茜蓝染色为阴性。12 周时,已见少量爱茜蓝染成鲜蓝色的杯状细胞。13 周时,爱茜蓝阳性的杯状细胞则散在分布于绒毛,阳性细胞的数目比 PAS 阳性的细胞数目少(图 1F),爱茜蓝+PAS 染色显示:呈紫蓝色的杯状细胞占多数,仅少数杯状细胞呈红色,未见呈蓝色的杯状细胞(图 1G)。15 周,爱茜蓝+PAS 染色除见紫蓝色、红色的杯状细胞外,还见少数呈蓝色的杯状细胞(图 1H)。

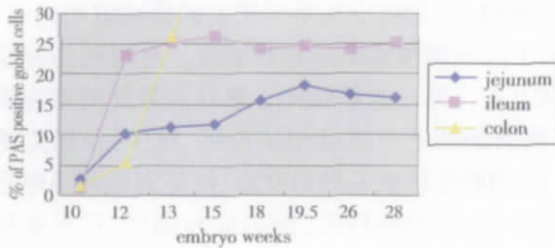


图 2 人胚胎肠 PAS 阳性杯状细胞占黏膜上皮细胞

Fig.2 The ratio of the PAS positive goblet cells of mucosal epithelium in human embryonic intestine

2.4 VG, Masson 染色

15 周时在靠近黏膜上皮处见薄层的 VG 染色呈黄色、Masson 染色呈红色的组织，黏膜肌层已形成。随着胎龄的增大，其厚度逐渐增加。

2.5 -SMA 免疫组织化学染色

早在 10 周时见一些阳性表达的细胞散在分布于靠近黏膜上皮处，细胞呈梭形或星形，为黏膜肌层刚开始形成的早期表现(图 1I)。12 周时在少数绒毛中轴见部分细胞 -SMA 呈阳性表达，绒毛中轴的肌肉组织已形成。13 周时空肠、回肠黏膜肌层已形成完整环形，由 1~2 层 -SMA 强阳性表达的细胞构成，并见其延伸至绒毛中轴上下(图 1J)。而结肠的黏膜肌层迟至 15 周时才形成完整环形。此后随着胎龄的增大，黏膜肌层逐渐增厚。

2.6 CD34 免疫组织化学染色

CD34 阳性的细胞在 10 周时散在分布于黏膜下层，细胞形态不规则(图 1K)。13 周时 CD34 阳性

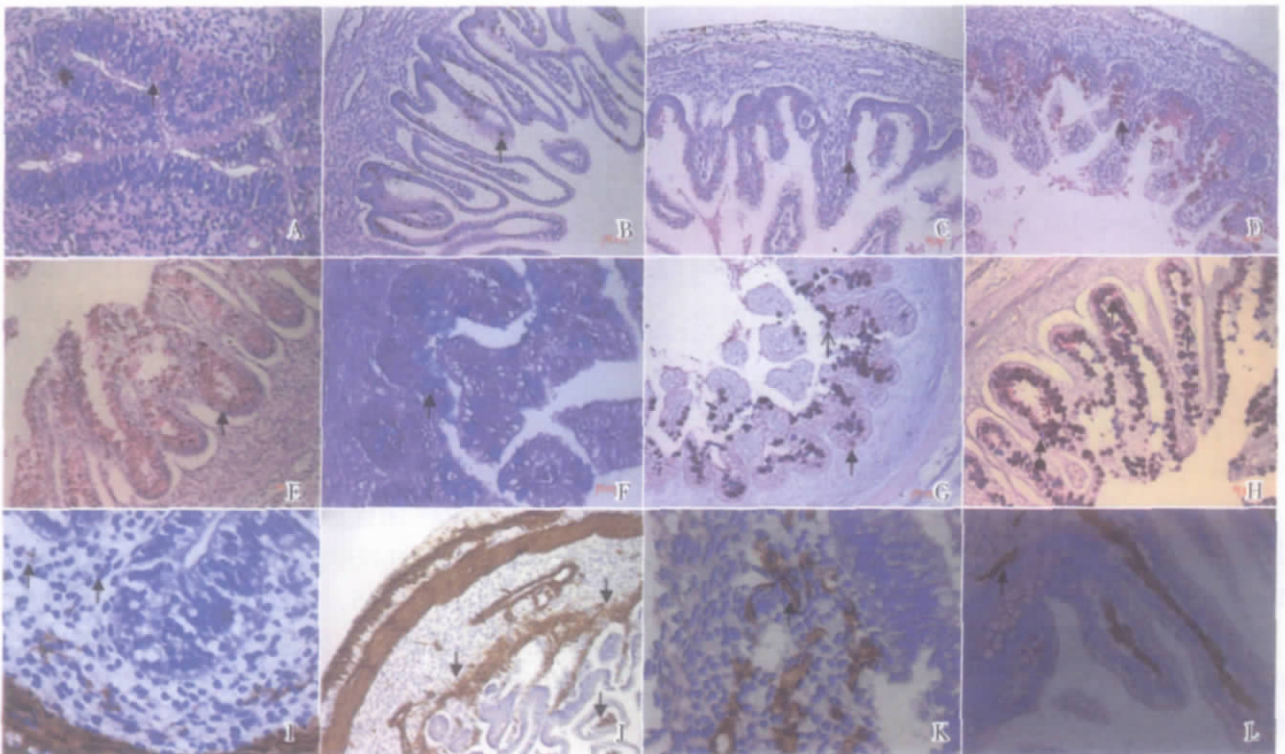


图 1 人胚胎肠壁染色

Fig.1 Staining of human embryonic intestine

A. Colon at week 10, about 10~15 PAS positive goblet cells (↔) were distributed in the mucosa, × 400; B. Jejunum at week 13, goblet cells for PAS positive (↔) were distributed in the mucosa, × 200; C. Ileum at week 13, goblet cells for PAS positive were distributed in the mucosa, × 200; D. Colon at week 13, goblet cells distributed in groups in the root of villus, × 200; E. Colon at week 15, goblet cells for PAS positive (↔) were distributed in the mucosa. × 200; F: Colon at week 13, goblet cells were stained blue by AB(↔), × 400; G. Colon at week 13, goblet cells were stained by AB+PAS indigo(↔) and red(↔), × 200; H. Colon at week 15, goblet cells were stained by AB+PAS indigo(↔), blue(↔) and red(↔), × 200; I: Colon at week 10, a few cells in the submucosa were immunostained for α-SMA(↔) besides longitudinal muscle layers and circular muscle layers, × 400; J. Jejunum at week 13, muscularis mucosa and smooth muscle cells in the lamina propria were strongly immunostained for α-SMA(↔), × 200; K. Colon at week 10, some cells in the submucosa near the mucosa were partly immunostained for CD34(↔), × 600; L. Jejunum at week 13, muscularis mucosa and smooth muscle cells in the lamina propria were strongly immunostained for CD34(↔), × 400

的细胞除分布于黏膜下层外, 在绒毛中央也见 CD34 阳性的细胞(图 1L)。18 周后, CD34 阳性细胞数目开始减少, 表达 CD34 的程度也开始减弱, 但 CD34 阳性的细胞并未消失。

3 讨 论

哺乳动物肠黏膜上皮是机体代谢最为活跃的场所, 肠黏膜上皮细胞终生进行着不间断的自我更新, 位于肠道隐窝部位的肠黏膜上皮干细胞保持着旺盛的增殖分化能力, 凋亡脱落及受损坏死的细胞与干细胞增殖、分化之间保持着动态平衡, 由此可见肠黏膜上皮干细胞在维持肠道屏障结构和功能的完整以及损伤后的修复中扮演着重要角色^[6]。肠黏膜上皮干细胞位于肠隐窝, 而黏膜上皮的各细胞谱系均是由干细胞分化而来, 杯状细胞由干细胞产生后迁移至绒毛^[7]。位于隐窝基底部的肠黏膜上皮干细胞不断向隐窝顶部(肠腔方向)迁移, 整个迁移过程大约 3~5 d, 在迁移过程中干细胞分化形成不同的肠黏膜上皮细胞^[8]。根据顾岩^[9]等人的研究, 长期的肠外营养可导致肠黏膜的萎缩及肠黏膜上皮细胞凋亡。杯状细胞具有异质性, 表现为其分泌黏多糖的糖链组成成分不同, 用多种植物凝集素和免疫组化方法研究, 表明各处杯状细胞与 PAS 和爱茜蓝的反应性不同, 甚至在同一器官不同部位的杯状细胞的反应也有差别^[10]。这种异质性也能用组织化学的方法反映出来。PAS 主要使中性黏多糖着色, 爱茜蓝主要使酸性黏多糖着色。本研究显示: 13 周时空肠见少数肠隐窝形成, 而回肠及结肠迟至 15 周才形成肠隐窝, 说明回肠及结肠黏膜层的发育是慢于空肠的。10 周时已出现 PAS 染色为阳性的杯状细胞, 而爱茜蓝染色为阳性的杯状细胞在 12 周才开始出现, 此时爱茜蓝阳性的细胞与 PAS 阳性的细胞并不十分一致, 说明早期形成的杯状细胞只合成中性黏多糖, 胎龄稍大后才开始合成酸性黏多糖, 而有些杯状细胞既可合成中性黏多糖也可合成酸性黏多糖。杯状细胞经爱茜蓝+PAS 染色可呈现 3 种颜色, 即红色、蓝色和紫蓝色, 因此我们认为肠黏膜上皮内的杯状细胞可分为如下 4 类: 含中性黏多糖的杯状细胞; 含酸性黏多糖的杯状细胞; 既含中性黏多糖又含酸性黏多糖的杯状细胞; 既不含中性黏多糖也不含酸性黏多糖的杯状细

胞, 这类细胞可能是未成熟的杯状细胞也可能是黏多糖已排出而即将死亡的杯状细胞。12 周、13 周时 PAS 阳性的杯状细胞多数位于绒毛根部, 随着胎龄的增大, 绒毛中部及上部 PAS 阳性的杯状细胞才有所增多, 肠黏膜上皮干细胞不断分化产生杯状细胞, 待其产生的黏多糖足够多后, 才沿绒毛缓慢向上迁移至绒毛中部及顶部, 在 15 周及更大胎龄的人胚, 绒毛根部杯状细胞 PAS 阳性的程度比绒毛中部和上部弱, 并见其胞浆中有少量空泡存在, 提示绒毛根部的杯状细胞并未完全成熟, 杯状细胞在向上迁移至绒毛中部及上部的过程中逐渐发育成熟。而在肠隐窝形成之前, 肠壁处于发育的初级阶段, 干细胞位于肠壁各处, 此后随着胎龄的增大, 肠黏膜上皮干细胞集中于肠隐窝部, 参与黏膜上皮细胞的更新及黏膜上皮的损伤修复。

小肠黏膜上皮杯状细胞开始分化于小肠隐窝部, 以后逐渐向上迁移至绒毛, 最后从绒毛顶端死亡脱落。杯状细胞从发生到死亡只有一个分泌周期, 黏液排空后从绒毛顶端死亡脱落^[10]。本研究表明: 结肠杯状细胞的数目随着胎龄的增大一直在增加, 而空肠、回肠的杯状细胞数目在增加的过程中有一个平台期, 至 18 周时才开始显著增加, 13 周以前, 结肠的杯状细胞数目比空肠、回肠少, 说明结肠黏膜上皮的发育是慢于空肠、回肠的。杯状细胞排出的黏多糖聚集于肠腔, 在 13 周回肠的肠腔中央形成了一团 PAS 阳性的物质, 而 PAS 阳性的杯状细胞将胞浆内的黏多糖部分排出, 则形成了 PAS 染色边缘为阳性而中央为阴性的杯状细胞, 此外, 各期人胚肠的黏膜层均见较多 PAS 染色及爱茜蓝均为阴性的空泡状细胞存在, 上述空泡状细胞我们猜想有以下 4 种可能: 为胞浆内黏多糖全部排出的杯状细胞; 为不成熟的杯状细胞, 其胞浆内的糖原物质还未形成; 为变性的杯状细胞; 其它细胞。Yunus 等^[11]的研究显示: 鼠肠感染后不久其杯状细胞的数目成倍增加, 杯状细胞分泌黏液的量也增加。Trefol factor 3 (TFF3) 是由肠杯状细胞表达和分泌的一种肽。Lin 等^[12]人应用免疫组化的方法显示: 表达 TFF3 的杯状细胞在 12 周人胚就已经出现。本研究表明非常典型的 PAS 阳性的杯状细胞已出现在 10 周时的肠黏膜上皮层, 说明杯状细胞在 10 周或更早期已经开始发育。

根据目前的研究,平滑肌细胞在发育的早期就开始表达 α -SMA,因此,我们用鼠抗人 α -SMA 来研究黏膜肌层的发育过程。关于肠壁黏膜肌层形成的初始时间 Fu 等^[3]最近应用免疫组化所做的研究表明黏膜肌层在 14 周时形成完整环形,何素云^[13]用组织学方法所做的研究表明十二指肠的分化早于空回肠,故小肠从头端往尾端方向分化,20 周后黏膜肌层才开始形成。Tamura 等^[14]以小鼠为材料,应用免疫荧光的方法研究表明:EGFP 阳性的细胞沿着小肠黏膜固有层的微血管分布,但与基底部平滑肌层的大血管无联系,EGFP 阳性的细胞分化为固有层的内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞。CD34 可识别肌肉卫星细胞即一种肌肉干细胞,也可识别血管内皮祖细胞^[15]。本研究显示:10 周时已有少数 α -SMA、CD34 同为阳性的细胞散在分布于黏膜下层,证明黏膜肌层已开始形成,其起源于黏膜下层的肌肉干细胞。12 周时黏膜下层及其靠近黏膜层处散在的 α -SMA 阳性细胞更多,证明黏膜肌层正在形成,此时用传统的 HE 片及组织化学法尚不能识别出。10 周时黏膜下层散在分布的 CD34 阳性的细胞随着肠壁的发育逐渐增殖分化为平滑肌细胞和血管内皮细胞,平滑肌细胞通过细胞间融合而形成完整的黏膜肌,从而行使其肠绒毛的摆动功能,促进营养物质的消化吸收,平滑肌细胞还形成血管壁结构,血管内皮细胞则形成黏膜下层的血管。固有层内见 CD34 阳性的细胞存在,说明 CD34 阳性的肌肉卫星细胞和内皮细胞也参与固有层内平滑肌及血管的形成。CD34 阳性的细胞一直都存在于肠壁黏膜层内,可能参与肠壁黏膜肌层及黏膜层血管的损伤修复过程,黏膜下 CD34 阳性细胞可视为黏膜肌干细胞的一个标记。13 周时黏膜肌层在空肠、回肠已形成完整环形,而结肠迟至 15 周才形成完整环形,进一步说明结肠的发育晚于空肠、回肠。10 周时肠绒毛刚开始形成,12 周时在绒毛中轴见少量 α -SMA 阳性的肌肉组织,说明黏膜肌在形成完整环行之前就已延伸至绒毛中央。我们的结果表明:黏膜肌层的形成比同类研究所得的结果要早,其发育是按空肠、回肠及结肠的顺序进行的。

参考文献:

- [1] MASUMOTO K, NADA O, SUITA S, et al. The formation of the chick ileal muscle layers as revealed by α -smooth muscle actin immunohistochemistry [J]. *Anat Embryol*, 2000, 201(2):121-129.
- [2] 高金岗,王士平,邢绥光. 小白鼠十二指肠发育分化的组织学和组织化学观察[J]. *解剖学报*, 1995, 26(4): 425-430.
- [3] FU M, TAM P K, SHAM M H, et al. Embryonic development of the ganglion plexuses and the concentric layer structure of human gut: a topographical study[J]. *Anat Embryol*, 2004, 208(1): 33-41.
- [4] 刘怀如,张耀光. 南方鲇消化道杯状细胞的分布及类型探讨[J]. *四川动物*, 2002, 21(1): 6-8.
- [5] 周国华,张熙纯. 回肠末端的杯状细胞超微结构变化及其意义探讨[J]. *中国内镜杂志*, 1999, 5(4): 30-38.
- [6] 赵京禹,付小兵,陈伟,等. 肠道干细胞的研究进展[J]. *中国临床康复*, 2004, 8(11): 2098-2099.
- [7] STEWART S. *Stem cells handbook*[M]. Clifton: Humana press, 2004: 317-328.
- [8] 姜佳丽,王虹,展玉涛. 肠道干细胞[J]. *世界华人消化杂志*, 2003, 11(11):1730-1732.
- [9] 顾岩,谢建新,吴肇汉. 肠外营养促进短肠大鼠小肠粘膜上皮细胞凋亡[J]. *中山医科大学学报*, 2000, 21(4S):120-122.
- [10] 史玉兰,段相林. 杯状细胞的研究进展[J]. *解剖科学进展*, 2001, 7(4):358-362.
- [11] YUNUS M, HORII Y, MAKIMURA S, et al. Murine goblet cell hypoplasia during *Eimeria pragensis* infection is ameliorated by clindamycin treatment[J]. *J Vet Med Sci*, 2005, 67(3): 311-315.
- [12] LIN J, NADROO A M, CHEN W, et al. Ontogeny and prenatal expression of trefoil factor 3/ITF in the human intestine[J]. *Early Hum Dev*, 2003, 71(2):103-109.
- [13] 何素云. 人胎小肠的组织发生[J]. *贵阳医学院学报*, 1988, 13(4):436-439.
- [14] TAMURA H, OKAMOTO S, LWATSUKI K, et al. In vivo differentiation of stem cells in the aorta-gonad-mesonephros region of mouse embryo and adult bone marrow[J]. *Exp Hematol*, 2002, 8(30): 957-966.
- [15] 张静波,宗书东,马文丽. 干细胞[M]. 北京:中国协和医科大学出版社, 2003: 331-335.

(编辑 刘清海)