

# 天府肉鸭胸腺发育中 Fas、FasL 和 P53 蛋白表达的动态研究

蒋 敏 方 静\* 陈正礼 唐 丽

四川农业大学动物医学院 成都 611130

**摘要:** 凋亡相关因子 (Fas)、凋亡相关因子配体 (FasL) 和磷蛋白 53 (P53) 是细胞发生凋亡的重要调控因素。本文研究了天府肉鸭 (*Anas platyrhynchos domestica*) 胸腺发育过程中 Fas、FasL 和 P53 蛋白的动态表达, 旨在更深入地认识胸腺细胞自然凋亡的调控机制。将 65 羽天府肉鸭分为 13 组, 即 22、24、26 天胚龄, 胚后 0 (新生雏)、3、5、8、14、17、20、26、29、32 周龄。分别采取各组鸭的胸腺组织, 4% 多聚甲醛固定, 常规石蜡切片, Fas、FasL 及 P53 蛋白免疫组织化学染色, 镜检并进行阳性细胞计量分析。结果显示, Fas 阳性反应见于胸腺淋巴细胞, 其阳性率在 22 ~ 26 天胚龄无明显变化; 新生雏显著升高, 随后趋于恒定, 直到 17 周龄, 20 周龄以后呈上升趋势。FasL 阳性反应见于胸腺淋巴细胞及上皮细胞, 在胚胎及胚后发育过程中, 其淋巴细胞阳性率无明显变化。P53 阳性反应见于胸腺皮质淋巴细胞和胸腺上皮细胞, 其淋巴细胞阳性率在各组中无显著性差异。结果说明 Fas, FasL 和 P53 蛋白在天府肉鸭胸腺发育中呈现出不同表达规律。

**关键词:** 天府肉鸭; 胸腺; 凋亡相关因子 (Fas); 凋亡相关因子配体 (FasL); 磷蛋白 53 (P53); 免疫组化

中图分类号: S834.89, S852 文献标识码: A 文章编号: 0250-3263 (2016) 04-599-07

## The Expression Patterns of Fas, FasL and P53 Protines During Thymus Development of the Tianfu Duck

JIANG Min FANG Jing\* CHEN Zheng-Li TANG Li

College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China

**Abstract:** Factor associated suicide (Fas), Fas ligand (FasL) and phosphorus protein 53 (P53) are important modulators in cell apoptosis. The expression patterns of Fas, FasL and P53 proteins in thymus during embryonic and post-embryonic development of Tianfu Duck (*Anas platyrhynchos domestica*) were studied in order to deeply understand the regulatory mechanism of natural apoptosis of thymocytes. A total of 65 ducks were divided into 13 groups as follows: 22, 24 and 26 days embryonic stage, and 0 (neonatal stage), 3, 5, 8,

**基金项目** 教育部长江学者创新团队发展计划项目 (No. 0848);

\* 通讯作者, E-mail: fangjing4109@163.com;

**第一作者介绍** 蒋敏, 男, 硕士研究生; 研究方向: 动物组织学; E-mail: minjiangchn@hotmail.com。

收稿日期: 2015-04-14, 修回日期: 2015-12-23 DOI: 10.13859/j.cjz.201604011

14, 17, 20, 26, 29 and 32 weeks after hatching. Thymic tissue from each group was collected, and immediately fixed in 4% paraformaldehyde. After fixation for 24 h, tissues were dehydrated, paraffin-embedded, sectioned at 5  $\mu\text{m}$ , and stained for immunohistochemistry. Sections were observed under light microscope and microscopic analyses were performed. Results showed that Fas protein was distributed in the thymic lymphocytes (Fig. 1a - d). The Fas-positive lymphocyte ratios showed no significant changes during the embryonic stage ( $P > 0.05$ ). However, the values increased at the neonatal stage ( $P < 0.05$ ) and kept stable until 17 weeks after hatching ( $P > 0.05$ ), and then showed an increased tendency from 20 to 32 weeks (Table 1). The FasL protein was observed in the thymic lymphocytes and epithelial cells (Fig. 1e - g). The FasL positive lymphocyte ratios had no significant changes during the embryonic and post-embryonic development ( $P > 0.05$ ) (Table 1). The P53 protein was expressed in the thymic lymphocytes of cortex and the epithelial cells (Fig. 1h - k). The P53-positive lymphocyte ratios showed no significant variations among groups ( $P > 0.05$ ) (Table 1). This study indicates that Fas, FasL and P53 proteins show different expression patterns during the development of thymus in Tianfu Ducks.

**Key words:** Tianfu Duck; Thymus; Factor associated suicide (Fas); Fas ligand (FasL); Phosphorus protein 53 (P53); Immunohistochemistry

胸腺是动物的中枢免疫器官, 是培育 T 淋巴细胞的场所 (Hale 2004)。在胸腺发育过程中, 凋亡机制参与 T 淋巴细胞选择的全过程 (郑琳等 2008), 其中凋亡相关因子 (factor associated suicide, Fas)、凋亡相关因子配体 (Fas ligand, FasL) 及磷蛋白 53 (phosphorus protein, P53) 等凋亡蛋白发挥着重要的作用 (姜杨等 2010)。

凋亡相关因子 (Fas) 是一种跨膜糖蛋白分子, 对细胞凋亡有促进作用, 凋亡相关因子配体 (FasL) 为 Fas 的天然配体 (任含平等 2004), 磷蛋白 53 (P53) 是细胞发生凋亡的重要调控因素 (孙廷哲等 2008)。前人研究了 *Fas*、*FasL* 基因及其蛋白在牦牛 (*Bos grunniens*) (樊江峰等 2015)、大鼠 (*Rattus norvegicus*) (周瑞祥等 2006, 姜杨等 2010) 和人 (*Homo sapiens*) (Moulian et al. 1999, Bai et al. 2013) 胸腺中的自然表达。Linkova 等 (2011) 报道了 P53 蛋白在老年人胸腺中的动态表达; 李奎等 (2007, 2008) 揭示了 Fas、FasL 和 P53 蛋白在固始鸡 (*Gallus domesticus*) 胚后 1、4、8、12、16、20 周龄胸腺中的表达特点。可见有关 Fas、FasL 尤其是 P53 在动物胸腺中正常表达

的报道较少, 在禽类, 有关这方面的研究也主要集中在鸡, 且集中在胸腺胚后发育的某些特定时期。

作者前期工作显示, 天府肉鸭 (*Anas platyrhynchos domestica*) 胸腺在胚胎及胚后发育过程中均存在细胞凋亡现象 (方静等 2014), 在此基础上应用免疫组织化学方法对天府肉鸭胸腺胚胎及胚后发育过程中 (包括退化期) Fas、FasL 及 P53 蛋白进行定性和定量的动态观察, 以揭示这些凋亡蛋白的表达时序、相互作用关系, 旨在更深入地认识鸭胸腺细胞自然凋亡的调控机制。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

选用四川农业大学种鸭场同批孵化和饲养的天府肉鸭, 胚胎期分为 3 组, 即 22、24、26 天胚龄; 胚后期分为 10 组, 即 0 (新生雏)、3、5、8、14、17、20、26、29、32 周龄。每组实验动物数为 5 (胚胎期不分性别, 胚后期均为雄性)。

### 1.2 光镜标本制作

分别采取各组鸭的胸腺组织, 4% 多聚甲醛

固定，常规石蜡包埋，5  $\mu\text{m}$  连续切片。

### 1.3 主要试剂

一抗（兔抗 Fas 和 FasL 多克隆抗体、小鼠抗人 P53 单克隆抗体），链霉亲和素-生物素复合物（streptavidin-biotin complex, SABC）免疫组化试剂盒、二氨基联苯氨（diaminobenzidine, DAB）显色试剂盒，均购自武汉博士德生物工程有限公司。

### 1.4 免疫组织化学染色

Fas、FasL 和 P53 免疫组化染色方法按试剂盒说明书进行，具体操作步骤按照参考文献（方静等 2014）进行，一抗稀释浓度为 1 : 100，用磷酸缓冲液（phosphate buffered saline, PBS）代替一抗作为阴性对照，免疫阳性反应物呈棕黄色。

### 1.5 定量分析和统计学处理

每个胸腺标本间隔 200  $\mu\text{m}$  取一张切片，共取 3 张切片，每张切片随机选取胸腺小叶各 10 个，用江苏捷达 801 形态分析软件进行阳性细胞计数。淋巴细胞 Fas、FasL 和 P53 阳性率为单位面积内 Fas、FasL 和 P53 阳性淋巴细胞总数占单位面积内淋巴细胞总数的百分比。单位面积为 0.001  $\text{mm}^2$ ，相当于 1 000 倍下的视野范围。实验数据均用平均值  $\pm$  标准差表示，采用单因素方差分析  $F$  检验和组间  $t$  检验。数据处理用 SPSS 11.5 软件， $P < 0.05$  有统计学意义。

## 2 结果

Fas、FasL 及 P53 蛋白免疫阳性反应呈棕黄色颗粒（图 1a ~ k）；在阴性对照组切片中，均为单一蓝色苏木素染色（图 1l）。

### 2.1 Fas

Fas 阳性反应见于胸腺淋巴细胞，呈强阳性反应，阳性物质定位于胞质和胞膜，阳性细胞多散在或簇状分布（图 1a ~ d）。在胚胎及胚后发育过程中，胸腺淋巴细胞 Fas 阳性反应强度变化不大，但阳性率却表现出明显变化趋势。胸腺小叶皮质和髓质淋巴细胞 Fas 阳性率在 22 ~ 26 天胚龄较低，且随胚胎发育无明显变

化（ $P > 0.05$ ）；新生雏显著升高（ $P < 0.05$ ），随后趋于恒定直到 17 周龄（ $P > 0.05$ ），20 周龄又明显升高（ $P < 0.05$ ），以后呈上升趋势，32 周龄达其峰值。各组皮质淋巴细胞 Fas 阳性率均明显高于髓质（ $P < 0.05$ ）（表 1）。

### 2.2 FasL

FasL 阳性反应见于胸腺淋巴细胞以及胸腺上皮细胞，呈强阳性反应，阳性反应物定位于胞质和胞膜（图 1e ~ g）。在胚胎及胚后发育过程中，皮质和髓质淋巴细胞 FasL 阳性反应强度和数量无明显变化（ $P > 0.05$ ）；各组皮质与髓质淋巴细胞 FasL 阳性率之间也无显著性差异（ $P > 0.05$ ）（表 1）。同时，在胚后期各组中，均可见较多胸腺上皮细胞呈 FasL 阳性反应，它们主要位于髓质和弥散胸腺小体中（图 1g）。

### 2.3 P53

P53 阳性反应见于 8 ~ 32 周龄胸腺皮质淋巴细胞，其阳性反应物定位于胞核或胞质和胞膜，呈强阳性反应（图 1h ~ k）；8 ~ 32 周龄各组淋巴细胞 P53 阳性率无显著性差异（ $P > 0.05$ ）（表 1）。同时，可见胸腺上皮细胞和弥散胸腺小体中多数上皮细胞呈 P53 阳性反应，前者呈强阳性反应（图 1i），后者为中等强度阳性反应（图 1j），阳性反应物质均定位于胞质、胞膜和核膜。

## 3 讨论

### 3.1 天府肉鸭胸腺发育与 Fas 和 FasL 蛋白的表达

Fas 分子在细胞膜胞质面有一长 60 ~ 70 个氨基酸序列的死亡结构域，它是凋亡期间的蛋白质停靠点和构象变化换能器，对 Fas 介导的凋亡起决定作用。FasL 为 Fas 的天然配体（Moulian et al. 1999, Kischkel et al. 2000, 任含平 2004）。Fas 与 FasL 或 Fas 抗体结合后，导致 Fas 发生寡聚反应，随之引起死亡诱导信号复合体的组装，该复合体激活起始 caspase-3，引起一系列酶的级联反应，最终导致 Fas 阳性

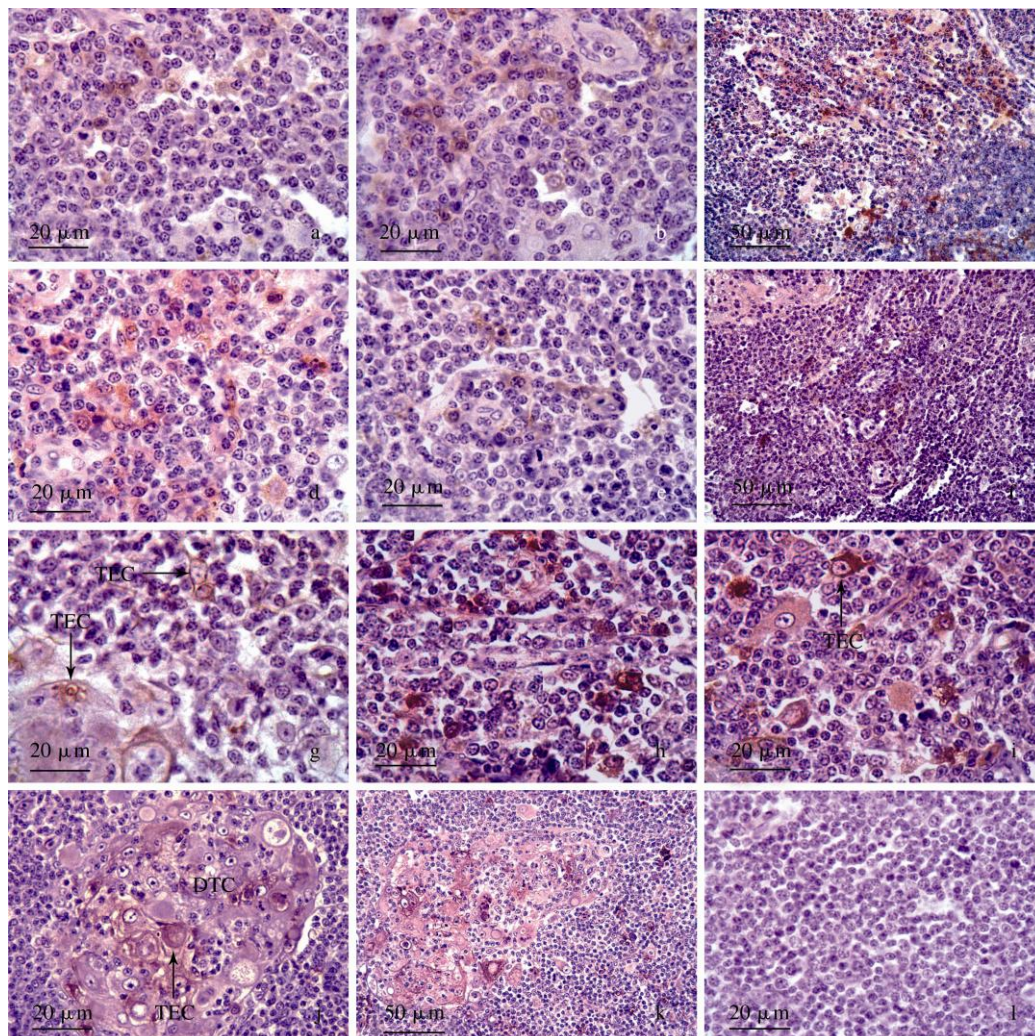


图 1 天府肉鸭胸腺 Fas、FasL 和 P53 蛋白免疫组织化学染色

**Fig. 1** The immunohistochemical staining of Fas, FasL and P53 proteins in the thymus of Tianfu Duck

a. 22 天胚龄胸腺小叶皮质淋巴细胞 Fas 阳性反应 (1 000 ×); b. 胚后 8 周龄胸腺小叶髓质淋巴细胞 Fas 阳性反应 (1 000 ×); c. 胚后 20 周龄胸腺小叶内 Fas 阳性反应 (400 ×); d. 胚后 29 周龄胸腺小叶髓质淋巴细胞 Fas 阳性反应 (1 000 ×); e. 22 天胚龄胸腺小叶皮质淋巴细胞 FasL 阳性反应 (1 000 ×); f. 胚后 20 周龄胸腺小叶内 FasL 阳性反应 (400 ×); g. 胚后 29 周龄胸腺小叶髓质胸腺上皮细胞 (TEC) 和弥散胸腺小体 (DTC) 中胸腺上皮细胞 (TEC) FasL 阳性反应 (1 000 ×); h. 胚后 26 周龄胸腺小叶皮质淋巴细胞 P53 阳性反应 (1 000 ×); i. 胚后 26 周龄胸腺小叶髓质胸腺上皮细胞 (TEC) P53 阳性反应 (1 000 ×); j. 胚后 5 周龄弥散胸腺小体 (DTC) 中胸腺上皮细胞 (TEC) P53 阳性反应 (1 000 ×); k. 胚后 20 周龄胸腺小叶内 P53 阳性反应 (400 ×); l. 胚后 3 周龄胸腺阴性对照 (1 000 ×)。

a. The Fas-positive reaction in the lymphocytes of the cortex in the thymic lobule at 22 days embryonic stage (1 000 ×); b. The Fas-positive reaction in the lymphocytes of the medulla in the thymic lobule 8 weeks after hatching (1 000 ×); c. The Fas-positive reaction in the thymic lobule 20 weeks after hatching (400 ×); d. The Fas-positive reaction in the lymphocytes of the medulla in the thymic lobule 29 weeks after hatching (1 000 ×); e. the FasL-positive reaction in the lymphocytes of the cortex in the thymic lobule at 22 days embryonic stage (1 000 ×); f. The FasL-positive reaction in the thymic lobule 20 weeks after hatching (400 ×); g. The FasL-positive reaction of the thymic epithelial cells (TEC) in the medulla and the thymic epithelial cells (TEC) in the diffuse thymic corpuscle (DTC) 29 weeks after hatching (1 000 ×); h. The (转下页)

(接上页) P53-positive reaction in the lymphocytes of the cortex in the thymic lobule 26 weeks after hatching (1 000 ×); i. The P53-positive reaction in the thymic epithelial cells (TEC) of the medulla in the thymic lobule 26 weeks after hatching (1 000 ×); j. The P53-positive reaction of the thymic epithelial cells (TEC) in the diffuse thymic corpuscle (DTC) 5 weeks after hatching (1 000 ×); k. The P53-positive reaction in the thymic lobule 20 weeks after hatching (400 ×); l. The negative control of thymus 3 weeks after hatching (1 000 ×).

表 1 天府肉鸭胸腺淋巴细胞 Fas、FasL 和 P53 阳性率

Table 1 The Fas-, FasL- and P53-positive thymic lymphocyte ratios in the Tianfu Duck

组别 Groups	Fas 阳性率 Fas-positive ratios (%)		FasL 阳性率 FasL-positive ratios (%)		胸腺小叶皮质 P53 阳性率 (%) P53-positive ratios in cortex of thymic lobule
	胸腺小叶皮质 Cortex of thymic lobule	胸腺小叶髓质 Medulla of thymic lobule	胸腺小叶皮质 Cortex of thymic lobule	胸腺小叶髓质 Medulla of thymic lobule	
22 天胚龄 22 embryonic days	7.36 ± 1.04 <sup>a</sup>	4.76 ± 0.83 <sup>a</sup>	4.47 ± 0.98 <sup>a</sup>	4.44 ± 0.99 <sup>a</sup>	
24 天胚龄 24 embryonic days	8.00 ± 1.16 <sup>a</sup>	5.51 ± 0.73 <sup>a</sup>	4.95 ± 1.19 <sup>a</sup>	4.35 ± 1.02 <sup>a</sup>	
26 天胚龄 26 embryonic days	7.82 ± 2.02 <sup>a</sup>	5.39 ± 1.08 <sup>a</sup>	4.97 ± 0.73 <sup>a</sup>	4.84 ± 0.92 <sup>a</sup>	
0 周龄 0-week old	12.21 ± 2.17 <sup>b</sup>	9.61 ± 1.41 <sup>b</sup>	4.46 ± 0.82 <sup>a</sup>	4.98 ± 0.87 <sup>a</sup>	
3 周龄 3-week old	12.32 ± 2.52 <sup>b</sup>	9.80 ± 1.12 <sup>b</sup>	4.53 ± 0.47 <sup>a</sup>	4.97 ± 0.81 <sup>a</sup>	
5 周龄 5-week old	14.12 ± 3.94 <sup>b</sup>	11.41 ± 2.35 <sup>b</sup>	4.30 ± 1.55 <sup>a</sup>	5.01 ± 1.55 <sup>a</sup>	
8 周龄 8-week old	12.16 ± 3.75 <sup>b</sup>	9.55 ± 0.85 <sup>b</sup>	4.33 ± 0.38 <sup>a</sup>	4.29 ± 0.80 <sup>a</sup>	5.32 ± 0.56 <sup>a</sup>
14 周龄 14-week old	14.10 ± 3.74 <sup>b</sup>	10.17 ± 0.45 <sup>b</sup>	5.41 ± 0.76 <sup>a</sup>	4.61 ± 0.74 <sup>a</sup>	6.14 ± 0.36 <sup>a</sup>
17 周龄 17-week old	13.45 ± 3.58 <sup>b</sup>	10.71 ± 1.18 <sup>b</sup>	4.82 ± 0.91 <sup>a</sup>	4.38 ± 0.46 <sup>a</sup>	5.23 ± 0.62 <sup>a</sup>
20 周龄 20-week old	20.99 ± 5.23 <sup>c</sup>	15.26 ± 2.82 <sup>c</sup>	4.40 ± 0.61 <sup>a</sup>	4.44 ± 0.99 <sup>a</sup>	6.12 ± 1.11 <sup>a</sup>
26 周龄 26-week old	25.63 ± 5.30 <sup>d</sup>	21.63 ± 6.56 <sup>d</sup>	5.26 ± 0.48 <sup>a</sup>	5.14 ± 1.58 <sup>a</sup>	5.63 ± 1.25 <sup>a</sup>
29 周龄 29-week old	25.14 ± 5.02 <sup>d</sup>	19.88 ± 2.12 <sup>d</sup>	5.13 ± 0.72 <sup>a</sup>	5.47 ± 0.86 <sup>a</sup>	5.47 ± 0.98 <sup>a</sup>
32 周龄 32-week old	29.27 ± 5.44 <sup>e</sup>	24.80 ± 6.46 <sup>e</sup>	4.64 ± 1.01 <sup>a</sup>	4.82 ± 1.26 <sup>a</sup>	6.23 ± 0.47 <sup>a</sup>

在同列中, 相同小写字母标注无统计学差异 ( $P > 0.05$ ), 不同小写字母标注有统计学差异 ( $P < 0.05$ )。

In the same longitudinal list, the same lowercase letter indicates no significant difference ( $P > 0.05$ ), and different lowercase letters indicate significant difference ( $P < 0.05$ ).

细胞凋亡 (Gloire et al. 2008)。研究证实 Fas/FasL 介导的淋巴细胞凋亡在免疫系统的发育及免疫反应中发挥着重要作用 (任含平等 2004)。本试验观察到在胚胎及胚后发育过程中胸腺淋巴细胞均可表达 Fas 和 FasL。其中, 胸腺小叶皮质和髓质淋巴细胞 Fas 阳性率在 22 天胚龄较低, 且随胚胎发育, 无明显变化; 新生雏升高, 随后趋于恒定直到 17 周龄, 20 周龄以后呈上升趋势。方静等 (2014) 前期研究结

果显示, 天府肉鸭胸腺淋巴细胞凋亡率在 22 ~ 26 天胚龄恒定; 0 ~ 8 周龄上升, 8 ~ 17 周龄恒定, 20 ~ 32 周龄上升。比较鸭胸腺淋巴细胞 Fas 蛋白阳性率与其凋亡率的关系, 发现二者除 3 ~ 8 周龄无明显对应关系外, 其余各组变化趋势基本一致。同时, 本文结果显示, 在胚胎及胚后发育过程中, 胸腺皮质和髓质淋巴细胞 FasL 阳性率较低, 且不具有增龄变化特性, 与 Fas 表达规律完全不同。比较鸭胸腺淋巴细胞

FasL 蛋白阳性率与其凋亡率（方静等 2014）的关系，发现 FasL 蛋白阳性率在 22~26 天胚龄，以及 8~17 周龄当凋亡率趋于恒定时也维持恒定，其余各组则与凋亡率无明显对应关系。据报道胸腺上皮细胞是胸腺的主要基质细胞，具有多种合成和分泌功能，以调节胸腺细胞的发育、分化和成熟（Savino et al. 2000, Bai et al. 2013）。本研究中，胸腺上皮细胞呈 Fas 阴性反应，而在胚后期各组中较多胸腺上皮细胞呈 FasL 阳性反应，提示胸腺上皮细胞是胸腺中产生 FasL 的一个重要源泉。由于 Fas 与其配体 FasL 交联可诱导细胞凋亡，而 FasL 在胸腺淋巴细胞中的表达较低，且在胸腺淋巴细胞凋亡率呈上升态势时，其表达量也无明显变化。因此推测胸腺淋巴细胞中的 Fas 可能一方面通过与其自身产生的 FasL 结合，另一方面还通过与其自身产生的 FasL 相结合，从而诱导淋巴细胞的凋亡。此外，值得注意的是在胸腺退化期（20~32 周龄）（方静等 2014），淋巴细胞 Fas 阳性率显著升高，提示 Fas 与 FasL 诱导的细胞凋亡可能与天府肉鸭胸腺退化密切相关。已有研究显示，小鼠（*Mus musculus*）胸腺上皮细胞表达的 Fas 在胸腺增龄退化中发挥了重要作用（Yajima et al. 2004）。

前人研究结果显示，Fas 与 FasL 在不同动物胸腺中表达不一。在小鼠中，大多数胸腺细胞呈 Fas 阳性反应，胸腺上皮细胞呈阴性反应，胸腺上皮细胞和树突状细胞有 FasL 的高效表达（Moulian et al. 1999）。Fas 在大鼠胸腺中分布广泛，皮质和髓质无明显区别，胸腺细胞发育过程中无论双阴、双阳以及单阳性阶段均有显著表达，而 FasL 阳性染色细胞较少（周瑞祥等 2006）。人胸腺细胞和胸腺上皮细胞呈 Fas 强阳性反应，但原位检测不到 FasL 蛋白（Moulian et al. 1999）。另有研究结果显示，Fas 蛋白表达于人胸腺皮质和髓质上皮细胞，而 FasL 蛋白表达于髓质上皮细胞（Bai et al. 2013）。樊江峰等（2015）在牦牛胸腺仅检测到 Fas 和 FasL mRNA，未检测出两种蛋白。Fas

和 FasL 蛋白在固始鸡胸腺细胞内均有表达，但后者的表达量较前者少，阳性细胞主要分布于胸腺小叶髓质，二者的表达量随周龄增加呈波浪样动态变化（李奎等 2008）。本文结果显示，天府肉鸭胸腺淋巴细胞 Fas 阳性率在胚胎期表达较低，胚后期升高，达峰值时，也只有百分之二十几的淋巴细胞呈阳性反应；皮质淋巴细胞 Fas 阳性率明显高于髓质；胚胎及胚后发育期胸腺淋巴细胞 FasL 表达低，且不具有增龄变化特性；胸腺上皮细胞呈 Fas 阴性反应，却呈 FasL 阳性反应，说明鸭胸腺中 Fas 和 FasL 的表达量、表达细胞、表达部位以及表达变化规律均与人（Moulian et al. 1999, Bai et al. 2013）、大鼠（周瑞祥等 2006）、小鼠（Moulian et al. 1999）、牦牛（樊江峰等 2015）和鸡（李奎等 2008）有一定差异。这也提示了鸭胸腺中 Fas 和 FasL 介导凋亡的发生与其他动物胸腺并不完全相同。

### 3.2 天府肉鸭胸腺发育与 P53 蛋白的表达

野生型 P53 基因是一种抑癌基因，可诱导细胞凋亡和调节细胞周期等功能（Danilova et al. 2008）。P53 主要在细胞核内作为转录因子调控多种促凋亡靶基因和生长因子的表达，从而发挥其促凋亡功能。目前也有研究表明，P53 定位于细胞质，能直接在细胞质中发挥其促凋亡作用，并且该过程不依赖于其核内的转录活性（孙廷哲等 2008）。P53 是胸腺细胞凋亡的重要调控因子，调节 T 淋巴细胞的发育、分化和成熟（Rosenheimer-Goudsmid et al. 2000）。本研究结果显示，胸腺淋巴细胞在 8~32 周龄均可表达少量的 P53 蛋白，说明 P53 可能也参与了鸭胸腺淋巴细胞的凋亡调控。比较鸭胸腺淋巴细胞 P53 蛋白阳性率与其凋亡率（方静等 2014）的关系，发现在胸腺退化期（20~32 周龄）（方静等 2014），当淋巴细胞凋亡率呈上升趋势时，淋巴细胞 P53 阳性率却维持恒定，二者无对应关系，其原因可能是：（1）P53 蛋白仅仅是众多细胞应答调控网络中的一个中间环节，其对细胞凋亡的调控还与其调控网络中

各种上下游的调控因子及基因密切相关。(2) *P53* 基因可与多种癌基因协同调节细胞凋亡。如 *P53* 基因可与 *c-myc*、*bcl-2* 等相互作用共同参与肿瘤细胞凋亡; *P53* 基因可降低内源性 *bcl-2* 表达和抑制 *bcl-2* 的功能; *bax* 的启动子存在 *P53* 的结合位点, *P53* 能直接作用于 *bax* 基因促进其转录, 提高细胞内 Bax 蛋白表达, 使 Bcl-2/Bax 蛋白比例改变而促使细胞凋亡; *P53* 可增强 *fas* 和 *fasL* 的表达, 激活 Fas 途径 (Danilova et al. 2008)。(3) 本研究发现髓质中较多胸腺上皮细胞呈 *P53* 强阳性反应, 它们可能通过旁分泌 *P53* 的方式调节胸腺淋巴细胞的凋亡。

目前 *P53* 在胸腺中正常表达的研究报道较少。Linkova 等 (2011) 研究显示, *P53* 蛋白在老年人胸腺中有表达, 且表达量随年龄不同而不同。李奎等 (2007) 研究发现在固始鸡胸腺内, 仅 1 周龄和 12 周龄有少量 *P53* 表达阳性淋巴细胞, 它们主要分布于胸腺小叶皮质与髓质交界处, 其次是皮质内, 很少出现在髓质内。本研究结果显示, *P53* 蛋白仅表达于胚后 8~32 周龄的胸腺淋巴细胞和胸腺上皮细胞中, 前者主要分布于皮质, 后者主要位于髓质。胸腺内淋巴细胞 *P53* 阳性率随周龄增加无显著性差异。以上结果说明, 在天府肉鸭胸腺发育过程中, *P53* 的表达细胞以及表达时间与固始鸡不同, 但 *P53* 阳性淋巴细胞主要分布于胸腺小叶皮质, 又与固始鸡相似。

综上所述, 天府肉鸭胸腺淋巴细胞和胸腺上皮细胞可表达 Fas、FasL 和 *P53* 蛋白, 它们是鸭胸腺胚胎及胚后发育期淋巴细胞凋亡的重要调节蛋白。本研究将为调节鸭中枢免疫器官的发育和稳定, 制定合理的免疫程序提供理论依据。

## 参 考 文 献

Bai M, Doukas M, Papoudou-Bai A, et al. 2013. Immunohistological analysis of cell cycle and apoptosis regulators in thymus. *Annals of Anatomy-Anatomischer Anzeiger*, 195(2): 159-165.

- Danilova N, Sakamoto K M, Lin S. 2008. *P53* family in development. *Mechanisms of Development*, 125(11): 919-931.
- Gloire G, Charlier E, Piette J. 2008. Regulation of CD95/APO-1/Fas-induced apoptosis by protein phosphatases. *Biochemical Pharmacology*, 76(11): 1451-1458.
- Hale L P. 2004. Histologic and molecular assessment of human thymus. *Annals of Diagnostic Pathology*, 8(1): 50-60.
- Kischkel F C, Lawrence D A, Chuntharapai A, et al. 2000. Apo2L/TRAIL-dependent recruitment of endogenous FADD and caspase-8 to death receptors 4 and 5. *Immunity*, 12(6): 611-620.
- Linkova N S, Polyakova V O, Kvetnoy I M. 2011. Interrelation of cell apoptosis and proliferation in the thymus during its involution. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 151(4): 460-462.
- Moulian N, Renvoize C, Desodt C, et al. 1999. Functional Fas expression in human thymic epithelial cells. *Blood*, 93(8): 2660-2670.
- Rosenheimer-Goudsmid N, Haupt Y, Yefenof E, et al. 2000. *p53* and thymic 'death by neglect': thymic epithelial cell-induced apoptosis of CD4 + 8 + thymocytes is *p53*-independent. *Cell Death and Differentiation*, 7(3): 241-249.
- Savino W, Dardenne M. 2000. Neuroendocrine control of thymus physiology. *Endocrine Reviews*, 21(4): 412-443.
- Yajima N, Sakamaki K, Yonehara S. 2004. Age-related thymic involution is mediated by Fas on thymic epithelial cells. *International Immunology*, 16(7): 1027-1035.
- 樊江峰, 陈鹏, 崔燕, 等. 2015. 牦牛 Fas 和 FasL 基因克隆及其在主要组织器官中的表达. *畜牧兽医学报*, 46(2): 228-238.
- 方静, 崔恒敏, 陈正礼, 等. 2014. 天府肉鸭胸腺淋巴细胞增殖与凋亡的增龄变化. *畜牧兽医学报*, 45(2): 305-312.
- 姜杨, 王皓, 杨静, 等. 2010. FAS 和 FasL 基因在大鼠胸腺细胞凋亡时的表达及其意义. *解剖学研究*, 32(1): 35-38.
- 李奎, 康相涛, 刘英, 等. 2008. 固始鸡免疫器官内细胞凋亡基因 Fas 和 FasL 的动态表达. *中国农业科学*, 41(5): 1489-1496.
- 李奎, 李建华, 方丽云, 等. 2007. 细胞凋亡基因 *p53* 在固始鸡免疫器官内的表达及其生理意义. *中国农学通报*, 23(7): 1-5.
- 任含平, 施广霞. 2004. Fas 信号转导与其抑制机制. *国外医学: 生理病理科学与临床分册*, 24(4): 328-331.
- 孙廷哲, 陈春, 沈萍萍. 2008. 细胞凋亡中 *p53* 转录依赖与非依赖性调控. *细胞生物学杂志*, 30(3): 301-306.
- 郑琳, 周瑞祥. 2008. 胸腺细胞分化发育的凋亡调控. *解剖科学进展*, 14(1): 105-110.
- 周瑞祥, 黄云梅, 刘卉, 等. 2006. 胸腺细胞凋亡的死亡信号表达. *解剖学杂志*, 29(2): 171-173.