

{ 研究简报 }

鳖、蛙及鲢免疫组织中两种不同淋巴细胞的分布

张奇亚 李正秋 罗晓春

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

DISTRIBUTION OF TWO DIFFERENT LYMPHOCYTES IN IMMUNE TISSUES FROM SOFT-SHELL TURTLE, PIG FROG AND SILVER CARP

Zhang Qiya Li Zhengqiu and Luo Xiaochun

(Institute of Hydrobiology, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072)

关键词 中华鳖, 美国青蛙, 鲢, 淋巴细胞, ANAE, PHA-荧光标记。

Key words Soft-shell turtle, Pig frog, Silver carp, Lymphocytes, α -naphthyl acid esterase, PHA-fluorescein isothiocyanate labeled.

分别以中华鳖 (*Trionyx sinesis Wiegmann*)、美国青蛙 (*Rana grylio stejneger*) 及鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix Cuvier et Valenciennes*) 为材料, 采用醋酸萘酯酶 (Acid α -Naphthyl Acetate Esterase, ANAE) 染色及植物凝集素荧光 (Fluorescein isothiocyanate-Phytohaemagglutinin, FITC-PHA) 受体标记的方法, 对被标记阳性淋巴细胞在上述水产动物不同免疫组织中的分布状况进行了分析和比较。

1 材料与方法

1.1 在4-5月份, 分别选择前一年繁育出的健康中华鳖、美国青蛙和鲢为供试材料。中华鳖购于武汉大东门集贸市场, 体重50—150g; 美国青蛙和鲢由本所关桥实验场提供, 体重分别为20—60g和50—100g。

1.2 涂片的制备 血液涂片由颈、尾动脉或心脏采血, 加肝素抗凝, 经初步分离血细胞后再制备。血细胞的初步分离有两种方法, (1)在室温下放置1—2h自然沉降, 取中间层涂片。(2)将血液加到装有白细胞分离介质 Histopaque-1077 (Sigma公司产品) 的离心管中, 以适当的速度和时间离心, 取中间带, 加入10ml 0.87% NH₄Cl溶解红细胞, 再用低速度离心, 将沉淀悬浮, 涂片。

胸腺、(头)肾、脾脏细胞的涂片是先取出胸腺、(头)肾、脾脏组织分别置于适量PBS或生理盐水中剪碎, 静置2—3min待组织碎块沉降后, 吸取细胞悬液, 涂片。

1.3 醋酸萘酯酶(ANAE)染色 (1)干燥的涂片用pH6.6的冷福尔马林-丙酮固定液固定, 用水冲洗后室温下自然干燥。(2)配制孵育液: 将3ml 4% NaNO₂水溶液缓慢地加入到3ml含4% 副品红的2mol/L HCl中, 使之生成偶氮副品红; 将6ml偶氮副品红逐滴加入89ml 0.67mol/L, pH7.6的磷酸缓冲液中; 再将

本研究得到国家“淡水生态和生物技术”重点实验室、湖北省自然科学基金和国家自然科学基金的资助

1998-09-18收到; 1999-07-16修回

2.5ml 2% 的 α -醋酸萘酯乙二醇甲醚溶液加入上述混合液，并将溶液的 pH 调至 6.2。(3)将已固定和干燥的涂片放入孵育液中，37℃，3h。(4)取出涂片立刻在自来水中冲洗。(5)用 2% 甲基绿染液将涂片复染 2min，再用自来水冲洗晾干，油镜下观察。ANAE 阳性细胞胞质内有红色斑点或斑块；阴性细胞呈绿色或浅绿色。至少观察 200 个免疫细胞，统计其百分比。

1.4 细胞表面丝裂原(PHA)受体的荧光标记 在固定好的涂片上滴加 FITC-PHA，并在室温下静置 30min 后，自来水冲洗 1min，晾干。在荧光显微镜下观察，发出绿色荧光的细胞为 PHA 受体阳性淋巴细胞，结合相差显微镜观察，并统计 200 个以上的免疫细胞，计算出 PHA 受体阳性淋巴细胞的百分比。

2 结果和讨论

2.1 ANAE 阳性淋巴细胞及其在四种不同免疫组织中的分布 经醋酸萘酯酶染色呈绿色或灰绿色的是 ANAE 阴性淋巴细胞，而被染成红褐色的是 ANAE 阳性淋巴细胞，它们多具有较大的细胞核和狭窄的细胞质等典型淋巴细胞的形态特征。在油镜下看到同样形态和大小的淋巴细胞，有的呈 ANAE 阴性，也有的呈 ANAE 阳性。

经显微镜观察，对中华鳖、美国青蛙和鲤的血液、胸腺、脾脏和(头)肾细胞涂片的 ANAE 染色结果进行统计。它们胸腺细胞中 ANAE 阳性淋巴细胞的百分比均较大，中华鳖为 $66.5 \pm 3\%$ ，美国青蛙为 $79.3 \pm 2.6\%$ ，鲤为 $77.9 \pm 9.2\%$ ；在中华鳖和美国青蛙的血液与脾脏中 ANAE 阳性淋巴细胞的百分比居中，(头)肾细胞中

ANAE 阳性淋巴细胞的百分比较低，分别为 $5.7 \pm 0.25\%$ 和 $5 \pm 0.9\%$ ；但在鲤的头肾中 ANAE 阳性淋巴细胞的百分比仅低于胸腺，为 $59.6 \pm 8.5\%$ (图 1)。

2.2 PHA 受体阳性淋巴细胞及其在不同免疫组织中的分布 带有 PHA 受体的淋巴细胞可与 PHA 荧光

标记物相结合，通过荧光显微镜和相差显微镜对同一视野进行观察，就能鉴别出 PHA 受体阳性淋巴细胞。在相差镜下能观察到，但在荧光镜下不显示的那些淋巴细胞是 PHA 受体阴性淋巴细胞；在相差镜和荧光镜下都能看到的淋巴细胞为 PHA 受体阳性淋巴细胞。结果显示 PHA 受体阳性淋巴细胞的形态、大小及其在不同动物中的差别均与 ANAE 染色结果吻合(图 2)。在中华鳖、美国青蛙和鲤的胸腺中，PHA 阳性淋巴细胞的百分比差别不太大，分别为 $87.4 \pm 2.9\%$ ， $82.6 \pm 8\%$ ， $81.3 \pm 3.6\%$ ；但在中华鳖和美国青蛙的肾中，PHA 受体阳性淋巴细胞的百分比分别为 $5.2 \pm 1.6\%$ 和 $4.2 \pm 0.72\%$ ，明显低于鲤头肾中的百分比 $62.4 \pm 13.3\%$ 。

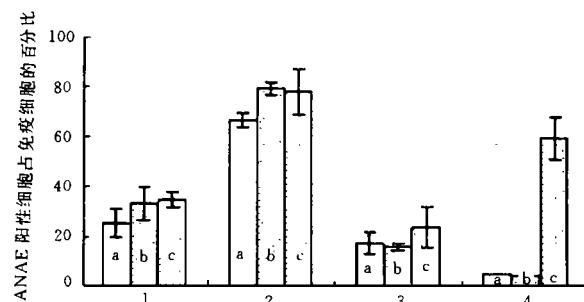


图 1 中华鳖(a)、美国青蛙(b)、鲤(c)的血液(1)、胸腺(2)、脾脏(3)、和(头)肾(4)组织中 ANAE 阳性淋巴细胞的分布

Fig. 1 Distribution of lymphocytes with ANAE activity in blood (1), thymus (2), spleen (3) and (head) kidney (4) from soft-shell turtle (a), pig frog (b) and silver carp (c)

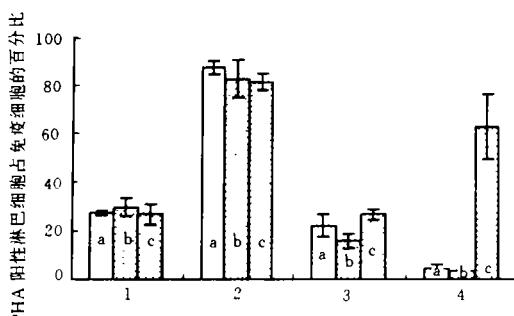


图 2 中华鳖(a)、美国青蛙(b)、鲤鱼(c)的血液(1)、胸腺(2)、脾脏(3)和(头)肾(4)组织中 PHA 受体阳性淋巴细胞的分布

Fig. 2 Distribution of lymphocytes with PHA receptors in blood (1), thymus (2), spleen (3) and (head) kidney (4) from soft-shell turtle (a), pig frog (b) and silver carp (c)

中华鳖病毒病原和美国青蛙病毒病原的诊断和鉴定^[1,2]揭示出药物对防治其流行病存在局限性的本质原因。通过探讨低等脊椎动物的免疫机能及免疫应答规律,以增进水产动物的健康养殖是水产动物比较免疫学的重要任务之一。迄今尚未见中华鳖免疫细胞标记的文献报道,美国青蛙免疫细胞学研究的有关资料也很少。相比而言,鱼类免疫学研究开展得较早并积累了一些经验,前些年已有学者采用了ANAE染色的方法对鱼类T淋巴细胞进行了初步研究^[3]。本项工作借鉴鱼类和医学免疫学的方法开展水产动物比较免疫学研究,将为防病治病和低等脊椎动物的系统进化研究提供有价值的资料。

不同的淋巴细胞对某种丝裂原的敏感性有所不同,其表面的酶活性也有差异,人们认为这是由于淋巴细胞存在异质性(Heterogeneity)的缘故^[4]。用PHA受体荧光标记或用ANAE方法染色的结果都表明,鳖、蛙及鲤的淋巴细胞中总是存在阳性和阴性两类,因此可认为淋巴细胞的异质性普遍存在于不同水产动物中。对鳖、蛙及鲤进行比较,表明无论是阳性淋巴细胞占总淋巴细胞的比例,还是阳性淋巴细胞在特定免疫组织中的分布都有明显相似性,提示鳖、蛙及鲤的进化地位虽不同,但它们的免疫系统,尤其是免疫细胞的类群分布、应答功能等均存在进化保守性。结果还显示,两种方法测定的阳性细胞比例都是在胸腺组织中为最高,超过了70%,这与鱼类胸腺中有78%的小淋巴细胞,而且是T淋巴细胞增殖和分化的场所等观点吻合^[5,6]。

在中华鳖和美国青蛙的肾脏中阳性淋巴细胞百分比显著低于鲢头肾中的百分比。这是因为与爬行动物和两栖动物相比,硬骨鱼肾的分化程度要低,除了司代谢、维持渗透压平衡之功能外,淋巴样组织也位于其中^[7]。另外,ANAE阳性淋巴细胞有的呈现红色颗粒或斑块状,有的红色斑块还会融合成片状,这可能与胞质中酯酶的含量、活性及存在方式有关。偶尔还可见表现为ANAE染色或PHA受体荧光标记阳性淋巴细胞在形态大小上存在某些差异,推测这些阳性淋巴细胞属T淋巴细胞的不同亚群或不同分化阶段,当然对此还需作深入研究。

参 考 文 献

- [1] 张奇亚 李正秋 江育林等 中华鳖病毒病病原的发现. 科学通报, 1996a, 41(21): 1988—1990
- [2] 张奇亚 李正秋 江育林等, 沼泽绿牛蛙病毒的分离及其细胞感染的初步研究. 水生生物学报, 1996, 20(4): 390—392.
- [3] Blaxhall P C, Doggett T, Esterases and Phosphatases in the leucocytes of rainbow trout, *Salmo gairdneri* Richardson. J. Fish Biol. 1987, 30: 35—40
- [4] Sizemore R C, Miller N M, Cuchens M A, et al, Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: The cellular requirements for in vitro mitogenic responses of channel catfish leukocytes. J. Immunol., 1984 133: 2920—2924
- [5] Manning M J, Fishes. In: Immunology: A Comparative Approach Turner R. J. Eds. John Wiley & Sons Ltd 1994 p69—100
- [6] 卢全章 草鱼胸腺组织学的研究. 水生生物学报, 1991, 15(4): 327—332
- [7] 钟明超 黄渐鲇淋巴样器官的发育. 水产学报, 1995, 19(3): 258—262