

草鱼、中华鳖 T 淋巴细胞表面抗原的研究

郭 琼 林

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

摘要: 以草鱼脑组织、中华鳖脑组织和胸腺细胞为抗原制备兔抗草鱼脑血清(RACBS)、兔抗中华鳖脑血清(RATBS)和兔抗中华鳖胸腺细胞血清(RATTS)。补体依赖性细胞毒试验和不同组织对 RATBS、RATTS 的吸收试验结果表明: 中华鳖胸腺细胞和脑组织均存在 Thy1 抗原(亦称脑组织抗原或胸腺-脑组织 T 细胞抗原); 草鱼脑组织缺乏 Thy1 抗原。应用间接酶标免疫组化染色技术显示: Thy1 抗原阳性反应物沉淀于中华鳖胸腺细胞和外周一部分淋巴细胞表面。进一步用抗人白细胞分化抗原 CD₄、CD₈ 单克隆抗体进行免疫组化交叉反应提示中华鳖淋巴细胞膜上含有与人类 T 淋巴细胞表面抗原 CD₄、CD₈ 类似结构的物质。本文讨论了 Thy1 抗原、CD 抗原的出现及其意义, 探讨了淋巴细胞异质性及 RATBS、RATTS 的特异性和作用。

关键词: 草鱼; 中华鳖; Thy1 抗原; 白细胞分化抗原(CD); T 淋巴细胞表面抗原; 发育和比较免疫学

中图分类号: S948 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2001)05-0455-07

Thy1 抗原是小鼠 T 淋巴细胞表面的特异性标志^[1], 可用抗 Thy1 抗体加以检测。Pater 等证实小鼠胸腺细胞、脑、皮肤和部分外周血淋巴细胞膜上均存在 Thy1 抗原^[2], 抗鼠脑血清(RAMBS)能与小鼠淋巴细胞表面 Thy1 抗原起反应, 利用这种抗血清, 通过间接免疫荧光技术或补体依赖性细胞毒试验等可鉴定小鼠 T 淋巴细胞^[2, 3]。Binz 等发现人类、鼠类及其他多种动物的 T 淋巴细胞及脑组织中也有相当于 Thy1 抗原的特异成分, 其中大、小鼠的 Thy1 成分还具有交叉反应^[4]。Pitchappan 等实验提示了在爬行动物的杂色树蜥(*Calotes versicolor*)胸腺-脑 T 细胞抗原的存在, 以此他们推测在较低生理水平动物也存在这种胸腺-脑 T 细胞抗原的关系^[5]。人类白细胞分化抗原 CD 中的许多成分都属于 T 淋巴细胞表面抗原, Leclerc、Legac 和 De Guise 等用抗人 CD 单克隆抗体已检测出海洋无脊椎动物红海星(*Asterias rubens*)和海洋哺乳动物白鲸(*Delphinapterus leucas*)的淋巴细胞具有某些 CD 成分^[6-8]。而在多数水生动物, 特别是在国内, 这方面的资料还很欠缺。因此, 作者开展此研究旨在进一步探讨草鱼(*Ctenopharyngodon idellus* Cuvier et Valenciennes)、中华鳖(*Trionyx sinensis* Wiegmann)淋巴细胞异质性, 探讨水生动物 T 淋巴细胞表面 Thy1 抗原、某些 CD 抗原的出现、特征及其意义。

收稿日期: 2000-02-28; 修订日期: 2001-05-11

基金项目: 国家自然科学基金(No. 39470555; No. 30070588)资助项目; 湖北省自然科学基金, 中国科学院所长择优基金资助项目

作者简介: 郭琼林(1957-), 山西晋城人; 硕士, 副研究员; 研究方向: 水生动物病理学与免疫学

1 材料与方法

1.1 材料与试剂来源 中华鳖体重 80—400g, 草鱼体重 0.75—1.5kg。福氏完全佐剂 (FCA) 系美国 Sigma 公司产品。过氧化物酶 (HRP) 标记的羊抗兔 IgG 以及实验所用 BSA, DAB 均购自华美生物公司。实验兔为日本大白耳兔, 由湖北省卫生防疫站动物实验室提供。实验豚鼠由湖北医科大学动物实验室提供, 补体取自豚鼠血清。抗人 CD₄ 和 CD₈ 单克隆抗体购自卫生部武汉生物制品研究所。

1.2 兔抗草鱼脑血清 (RACBS)、兔抗中华鳖脑血清 (RATBS) 的制备 每兔每次免疫一只鳖 (100—150g) 全脑组织或两尾草鱼 (0.75kg/尾) 全脑组织, 剔除周围血管和血块, 用 PBS (pH 7.2, 0.15mol/L) 制成匀浆, 加 FCA 制成乳剂, 注射于日本大白耳兔背部多处皮内, 共免疫 3 次, 每次间隔 2 周, 末次免疫不加 FCA。7—10d 后放血, 分离血清, 56℃ 灭活 30min, 分别经 10% 体积的草鱼、中华鳖肝组织匀浆和红细胞吸收, -18℃ 以下保存、备用。

1.3 兔抗中华鳖胸腺细胞血清 (RATTS) 的制备 取健康幼鳖 (150—200g), 断头放血, 取两侧胸腺, 剔除表面结缔组织, 用 PBS (pH 7.2) 制备成胸腺细胞悬液, 在 Hank's 液内洗 2 次, 制备成 5×10^8 cells/mL 的胸腺细胞悬液, 每毫升含 100I.U. 肝素, 以 1% 台盼兰检查活率在 95% 以上。取健康日本大白耳兔, 耳缘静脉注射胸腺细胞悬液 1.5—2mL, 2 周后加强免疫 1 次。末次免疫 7d 后放血, 分离血清, 4000r/min 离心 20min, 取上清液, 56℃ 灭活 30min, 经 1/10 体积的红细胞吸收 (4℃ 共温 1h), -18℃ 以下保存、备用。

1.4 抗血清体外补体依赖性细胞毒试验 取草鱼头肾、脾脏和中华鳖胸腺、脾脏先分别制成浓度为 1×10^7 cells/mL 的细胞悬液, 要求细胞活率在 95% 以上, 无红细胞混杂。草鱼和中华鳖外周血淋巴细胞用淋巴细胞分离液分离所得。将草鱼头肾细胞悬液、脾脏细胞悬液、血液淋巴细胞悬液、肝和肾细胞悬液 (1×10^7 cells/mL) 分别与不同稀释度的 RACBS 及补体 (豚鼠血清, 1:8 稀释) 各 1 份相混合; 中华鳖胸腺细胞悬液、骨髓细胞悬液、脾脏细胞悬液和血液淋巴细胞悬液分别与不同稀释度的 RATBS 或 RATTS 和补体各 1 份相混合, 置 25℃ 共温 30min, 加等体积 1% 台盼兰染液, 取样镜检 200 个细胞, 并按下式计算细胞毒指数 (C.I.), 后者代表与抗血清相对应的细胞百分率。

$$C.I. = \frac{\text{实验管死细胞率} - \text{对照管死细胞率}}{100 - \text{对照管死细胞率}}$$

试验中对照管系灭活补体代替有活性补体

1.5 抗中华鳖胸腺细胞血清 (RATTS)、抗中华鳖脑血清 (RATBS) 的吸收试验 以 RATTS 作为标准血清 (1:8 稀释), 取 0.5mL, 分别加入 1/10 体积的中华鳖胸腺细胞和中华鳖、草鱼脑组织匀浆, 混匀后, 置 25℃ (室温) 0.5h 以上 (一般为 1—2h), 继放 4℃ 2h, 离心取上清液, 测定其对胸腺细胞的 C.I.。RATBS 的吸收试验方法同上。

1.6 酶标记免疫组化技术显示中华鳖淋巴细胞的 Thy1 抗原 取中华鳖颈动脉血, 制成血涂片, 另取胸腺细胞悬液制成细胞涂片, 10% 甲醛固定, PBS 充分洗, 1% BSA 处理 20min, 适当稀释 RATBS 与细胞反应 1h, PBS 洗, 羊抗兔 IgG-HRP (1:25) 反应 1h, DAB 和 H₂O₂ 显色 6—12min, PBS 洗, 自然干燥, 封存, 镜检。

1.7 免疫组化检测 草鱼、中华鳖血液淋巴细胞与抗人 CD₄、CD₈ 单克隆抗体交叉反应的检测方法同参考文献[9, 10]。

2 结果

2.1 RACBS 和 RATBS 对草鱼、中华鳖不同组织的细胞毒指数

RACBS 在 1: 4 和 1: 8 稀释时, 在补体参与下, 对草鱼头肾、脾脏与血液淋巴细胞的 C. I. 分别为 6%、4%、7% 以下。RATBS 对中华鳖胸腺细胞的 C. I. 明显高于脾脏、外周血淋巴细胞、骨髓细胞(图 1); 对肝、肾细胞的 C. I. 均在 5% 以下。

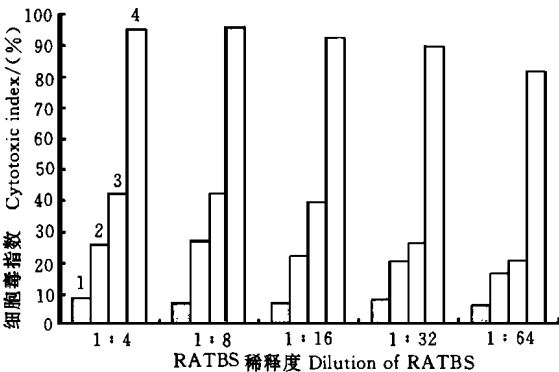


图 1 RATBS 对中华鳖不同组织的细胞毒作用

Fig.1 Cytotoxic effect of RATBS on different tissues of *T. sinensis*

1. 骨髓细胞 Myeloid cells; 2. 脾细胞 Splenocytes; 3. 血液淋巴细胞 Lymphocytes of blood; 4. 胸腺细胞 Thymocytes

2.2 不同组织对 RATTS 的吸收率

RATTS(1: 8) 用中华鳖胸腺细胞和中华鳖、草鱼脑组织吸收后, 根据其对中华鳖胸腺细胞的 C. I. 计算其吸收率(表 1)。

表 1 不同组织对 RATTS 的吸收率(%)

Tab. 1 Absorptive ratio of different tissues to RATTS

兔抗中华鳖胸腺细胞血清 RATTS	对胸腺细胞的细胞毒指数 Cytotoxic index to thymocyte of <i>T. sinensis</i>	吸收率 Absorptive ratio
标准 RATTS Standard RATTS	≥ 95	/
中华鳖脑组织吸收的 RATTS RATTS absorbed by brain tissue of <i>T. sinensis</i>	0—5	≥ 95
中华鳖胸腺细胞吸收的 RATTS RATTS absorbed by thymocyte of <i>T. sinensis</i>	0—5	≥ 95
草鱼脑组织吸收的 RATTS RATTS absorbed by brain tissue of <i>C. idellus</i>	≥ 95	/

2.3 不同组织对 RATBS 的吸收率

RATBS(1: 8) 用中华鳖脑组织、脑腺细胞和草鱼脑组织吸收后, 对中华鳖胸腺细胞的 C. I. 及其吸收率见表 2。

表 2 不同组织对 RATBS 的吸收率(%)

Tab. 2 Absorptive ratio of different tissues to RATBS

兔抗中华鳖脑血清 RATBS	对胸腺细胞的细胞毒指数 Cytotoxic index to thymocyte of <i>T. sinensis</i>	吸收率 Absorptive ratio
标准 RATBS Standard RATBS	≥ 95	/
中华鳖脑组织吸收的 RATBS RATBS absorbed by brain tissue of <i>T. sinensis</i>	0—5	≥ 95
中华鳖胸腺细胞吸收的 RATBS RATBS absorbed by thymocyte of <i>T. sinensis</i>	0—5	≥ 95
草鱼脑组织吸收的 RATBS RATBS absorbed by brain tissue of <i>C. idellus</i>	≥ 90	/

2.4 Thy1 抗原在中华鳖淋巴细胞的定位

血涂片中红细胞占绝大多数,核呈长椭圆形、淡黄绿色,细胞轮廓大致可见,淋巴细胞容易找到。淋巴细胞呈圆形或椭圆形,直径与红细胞横径相当或稍小,阳性标记的细胞有两种:一是棕色反应沉淀物呈环状位于淋巴细胞表面,可见明显胞核;另一种是沉淀物呈颗粒状或细丝状附着在细胞表面(图 2),胞核能辨认或不甚清晰。阳性淋巴细胞分散在其他血细胞之间,部分淋巴细胞呈阴性反应。血液淋巴细胞 Thy1 抗原阳性率为 46%,而在脾脏印片中占 24%。

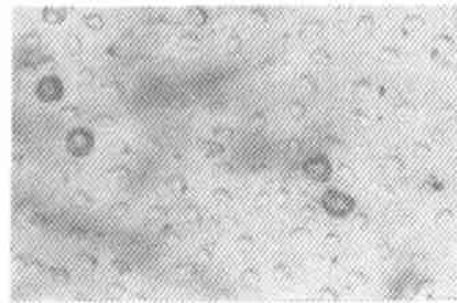


图 2 中华鳖 Thy1 阳性淋巴细胞 × 400

Fig. 2 Thy1 positive lymphocytes of *T. sinensis* × 400

胸腺细胞悬液涂片,胸腺细胞呈圆形,散在分布,胸腺细胞阳性标记率在 90% 以上。阳性反应沉淀物多呈环状位于细胞表面。

2.5 草鱼、中华鳖血液淋巴细胞与抗人 CD4、CD8 单克隆抗体交叉反应的免疫组化观察

CD4、CD8 阳性交叉反应为深褐色,位于细胞膜,大部分形成一褐色的半环状或环状物。显微镜下,阳性交叉反应与中华鳖淋巴细胞 CD₂ 和草鱼、中华鳖淋巴细胞 CD₂₅(IL-2R) 反应一致^[9, 10]。草鱼、中华鳖血液淋巴细胞与抗人 CD₂、CD₂₅(IL-2R)、CD₄ 和 CD₈ 单克隆抗体交叉反应阳性率的比较见表 3。

表 3 草鱼、中华鳖淋巴细胞与抗人 CD 单克隆抗体交叉反应阳性率(%)

Tab. 3 Positive ratio of cross reaction on lymphocyte in *C. idellus* and *T. sinensis* with mouse monoclonal antibody directed against Human CD

单克隆抗体 Monoclonal antibodies	草鱼淋巴细胞阳性率 Positive ratio of lymphocytes in <i>C. idellus</i>	中华鳖淋巴细胞阳性率 Positive ratio of lymphocytes in <i>T. sinensis</i>
CD ₂	/	24 ± 4.3
CD ₂₅ (IL-2R)	25 ± 4.7	34.6 ± 4.1
CD ₄	/	38.7 ± 5.8
CD ₈	/	41.2 ± 7.2

3 讨论

3.1 Thy1 抗原的出现及其意义

Thy1 抗原作为鉴定 T 淋巴细胞的标志(因其也存在于脑组织、上皮组织、故亦称之为脑组织抗原)出现于哺乳动物已是不争的事实。Pitchanppan 等用不同重量的脑、肝、肾组织对兔抗杂色树蜥胸腺细胞血清(ATS)进行吸收,发现脑组织吸收后的 ATS 对胸腺细胞的细胞毒指数明显下降,他们认为胸腺-脑组织之间的抗原具有较密切的相关性^[5]。在本实验中,作者除已验证 Pitchanppan 等的结果外,尚从另一个方面展开了工作,即通过直接制备 RATBS 进行:1)对胸腺细胞的 C. I.; 2)以胸腺细胞吸收后的 RATBS 对胸腺细胞的 C. I.; 3)间接酶标免疫组化技术显示阳性细胞。结果表明:RATBS 在胸腺细胞吸收前 C. I. 达 95% 以上,胸腺细胞吸收后,其 C. I. 降至 5% 以下。实验充分说明中华鳖具有 Thy1 抗原,组化技术也明确这种 Thy1 抗原位于胸腺细胞和外周一部分淋巴细胞表面。实验结果亦反映中华鳖脑和胸腺组织能特异性地分别吸收 RATTs 和 RATBS。作者的前期研究工作已经表明:中华鳖胸腺结构较为发达,脾脏中椭圆体周围淋巴鞘明显出现,其一部分淋巴细胞能与 SRBC 形成 E 花环^[9, 11, 12],本研究进一步发现中华鳖胸腺细胞和外周一部分淋巴细胞具有与脑组织相关的 Thy1 抗原。而草鱼脑组织缺乏 Thy1 抗原。这些研究反映中华鳖的 T 淋巴细胞形态特征较之鱼类有了显著的发展。

3.2 Thy1 抗原在中华鳖淋巴细胞中的定位及其在各淋巴器官中的分布与比例

间接酶标组化技术染色结果显示 Thy1 抗原位于中华鳖胸腺细胞和一部分淋巴细胞表面。尽管在哺乳动物利用组化技术进行抗原定位的工作不少,但在爬行动物,迄今为止尚未发现此方面的报道。Pater 等将抗鼠脑血清分离纯化得到 IgG 并与 FITC 结合,用直接荧光抗体染色技术显示 Thy1 抗原位于淋巴细胞膜上^[2],相对来说,间接酶标技术更简便且标本容易保存。就其检测 Thy1 阳性细胞在淋巴器官中的比例而言,细胞毒试验实用性较强,如能与组织化学联合并用,则可提高实验结果的可靠性。实验结果表明胸腺细胞 Thy1 阳性率在 90% 以上,血液淋巴细胞 Thy1 阳性率为 46%,而脾细胞阳性率为 24% 左右。作者另一实验已说明中华鳖一部分淋巴细胞能与 SRBC 形成 E 花环^[9]。因此,中华鳖 T、B 淋巴细胞的分类及淋巴细胞异质性已毋庸置疑。

3.3 草鱼、中华鳖淋巴细胞与抗人 CD 单克隆抗体阳性反应的意义

作者曾以抗人 CD₂ 单克隆抗体进行免疫组化检测观察到中华鳖淋巴细胞膜出现阳性交叉反应;以抗人 CD₂₅ 单克隆抗体观察到草鱼、中华鳖淋巴细胞膜上出现阳性交叉反应^[9, 12]。本研究应用抗人 CD₄、CD₈ 单克隆抗体,以同样方法检测出中华鳖淋巴细胞膜上出现阳性交叉反应,而草鱼则无明显交叉反应。在此之前,Leclerc、Legac 等应用抗人 CD 单克隆抗体,通过流式细胞术检测出海洋无脊椎动物海星(*Asterias forbesi* and *Asterias rubens*)中轴器官(一种原始的淋巴器官)的淋巴细胞膜上含有 CD₇、CD₂₅(IL-2R)、CD₁₂₁(IL-1R)等抗原;用同样方法未检测出 CD₂、CD₃、CD₄、CD₈、CD₁₆和 CD₂₈^[6, 7]等抗原。De Guise 等分别以抗牛、绵羊、小鼠和人类淋巴细胞表面的 CD₂、CD₄、MHC 和 TcR 单克隆抗体,应用流式细胞术发现海洋哺乳动物白鲸的外周血淋巴细胞不同程度地出现阳性交叉反应^[8]。这种现象说明了水生动物淋巴细胞膜上含有与人类某些白细胞分化抗原 CD 类

似结构的物质,也从发育和比较免疫学上反映了 CD 抗原的出现与表达尚有差异。CD₂₅ (IL-2R) 的检出证实了 IL-2 物质及其细胞免疫功能广泛存在于水生无脊椎动物、鱼类、爬行类以及哺乳动物。在人类已证实 CD₄、CD₈ 存在于成熟胸腺细胞和外周血 T 淋巴细胞表面。作为 T 淋巴细胞亚群的标记,它们不仅是 T 淋巴细胞分化抗原,还参与 T 淋巴细胞与其他细胞间的相互作用。有报告表明 CD₂、CD₄ 和 CD₈ 可能存在于两栖类淋巴细胞表面^[13]。因此,从两栖类、爬行类动物开始,T 淋巴细胞的发育和分化进一步成熟。

3.4 两种抗血清的特异性及作用

RATTS 在体外能选择性杀伤胸腺细胞、外周血和淋巴组织一部分淋巴细胞(胸腺细胞起源的),RATBS 体外杀伤淋巴细胞的作用也相同。Manickasundari 等实验显示杂色树蜥 100% 胸腺细胞、50% 外周血淋巴细胞、30% 脾脏细胞和 20% 骨髓细胞对抗蜥蜴胸腺细胞血清(ATS)敏感,进一步的分析证实非粘附的脾细胞对 ATS 敏感,而粘附的脾细胞富于 sIg⁺ 淋巴细胞且对 ATS 不敏感^[14]。Ei Deeb 等应用抗蜥蜴(*Chalcides ocellatus*)胸腺细胞血清(ATS)初步进行了蜥蜴 T 淋巴细胞的个体发育的研究^[15]。本实验制备的两种中华鳖抗血清(RATTS, RATBS)除了用于鉴别 T、B 淋巴细胞外,RATTS 在体内、外的应用也为今后淋巴细胞的研究提供了手段即利用其选择性杀伤胸腺和胸腺起源的淋巴细胞研究其 T 淋巴细胞的功能,并可以藉以了解与机体抗体产生及与疾病发生发展的关系等。作者在对中华鳖胸腺的研究中发现:中华鳖胸腺位于颈部两侧较深的位置,与胸腔仅隔一薄膜^[11],作者认为手术去胸腺的确存在一系列复杂的技术问题。而 Saad 等报告可的松对蜥蜴的混合淋巴细胞反应,皮肤移植排斥反应和抗体产生均有影响^[16]。因此借鉴抗中华鳖胸腺细胞血清对胸腺及胸腺起源的 T 淋巴细胞特异性作用原理可建立中华鳖体内、外细胞免疫低下实验模型,作者将在已发现 RATTS 有明显的抑制中华鳖胸腺细胞增殖作用^[10]的基础上继续展开这一方面的研究。

参考文献:

- [1] Raff M C. Theta isoantigen as a marker of thymus derived lymphocytes in mice[J]. *Nature*, 1969, **224**: 378—379
- [2] Pater H H, Clagett J, Feldman J D, et al. Rabbit antiserum to brain associated thymus antigens of mouse and rat. I. Demonstration of antibodies cross reacting to T cells of both species[J]. *J Immunol*, 1973, **110**: 1077—1084
- [3] 李绍康,章谷生. 鼠类淋巴细胞表面抗原的异种抗血清制备、鉴定和应用[J]. 上海免疫学杂志, 1983, **3**(2): 114—118
- [4] Binz H, Lindenmann J, Wigzell H. Cell bound receptors for alloantigens on normal lymphocytes. I. Characterization of receptor carrying cells by the use of antibodies to all antibodies[J]. *J Exp Med*, 1974, **139**: 877—887
- [5] Pitchappan R M, Muthukkaruppan V R. *In vitro* properties of heterologous anti lizard thymocyte serum[J]. *Proc Indian Acad Sci*, 1977, **85**(1): 1—12
- [6] Leclerc M, Ameodo V, Legac E et al. Identification of T-like and B-like lymphocyte subsets in sea star *Asterias rubens* by monoclonal antibodies to human leucocytes[J]. *Thymus*, 1993, **21**: 133—139
- [7] Legac E, Vaugier G L, Bousquet F et al. Primitive cytokines and cytokine receptors in invertebrates: The sea star *Asterias rubens* as a model of study[J]. *Scand J Immunol*, 1996, **44**(4): 375—380
- [8] De Guise S, Bernier J, Martineau D, et al. Phenotyping of beluga whale blood lymphocytes using monoclonal antibodies[J]. *Dev Comp Immunol*, 1997, **21**(4): 425—433
- [9] 郭琼林. 草鱼、中华鳖淋巴细胞扫描电镜结构特征及其绵羊红细胞受体(CD₂)的检测[J]. 水产学报, 2000, **24**

(4): 349—353

- [10] 郭琼林. 草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液 IL-2 物质的证实[J]. 水生生物学报, 2001, 25(1): 21—27
- [11] 郭琼林. 中华鳖胸腺显微和亚显微结构及其在进化上的意义[J]. 动物学报, 1999, 45(2): 207—231
- [12] 郭琼林. 中华鳖脾脏的显微和亚显微结构及其功能意义[J]. 水生生物学报, 1998, 22(增刊): 26—32
- [13] Horton J D. Amphibians. In *Immunology: A Comparative Approach*[M]. Turner R J(ed). John Wiley & Sons Ltd, 1994, 101—136
- [14] Manickasundari M, Pitchappan R M, Characteristics of heterologous anti lizard (*Calotes versicolor*) thymocyte serum which identify the function of thymus derived cell lineage[J]. *Dev Comp Immunol*, 1987, 11: 605—612
- [15] Ei Deeb S, Ei Ridi R, Zada S. The development of lymphocytes with T or B membrane determinant in the lizard embryo[J]. *Dev Comp Immunol*, 1986, 10: 353—364
- [16] Saad A H, Ei Ridi, Ei Deeb S, et al. Effect of hydrocortisone on immune system of the lizard, *Chalcides ocellatus*. III. Effect on cellular and humoral immune responses[J]. *Dev Comp Immunol*. 1986, 10: 235—246

STUDIES ON SURFACE ANTIGENS OF T LYMPHOCYTE IN GRASS CARP, *CTENOPHARYNGODON IDELLUS* AND CHINESE SOFT SHELLED TURTLE, *TRIONYX SINENSIS*

GUO Qionglin

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

Abstract: Rabbit anti-grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*) brain serum (RACBS), rabbit anti-Chinese soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) brain serum (RATBS) and rabbit anti-Chinese soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*) thymocyte serum (RATTS) were obtained. By complement-dependent cytotoxicity assay and respective absorption assay of RATBS, RATTS with thymocyte, brain tissue of Chinese soft-shelled turtle and grass carp, it is shown that there are Thy1 antigens (a brain associated thymus antigen or thymus-brain antigen) on thymocytes and brain of Chinese soft-shelled turtle, but absent in brain of grass carp. By indirect immunoperoxidase histochemistry staining, it is shown that the Thy1 antigens appear on the membrane of thymocytes and a parts of peripheral lymphocytes. Further, with indirect immunohistochemistry technique, CD₄, CD₈ cross reactions have been identified on lymphocyte membrane of Chinese soft-shelled turtle using mouse monoclonal antibody directed against Human Leucocyte Differentiation Antigen CD₄, CD₈. In this paper, the presence and the significance of Thy1 antigen and CD, the specificity and the action of RACBS and RATTS, the heterogeneity of lymphocytes have been discussed.

Key words: Grass carp (*Ctenopharyngodon idellus*); Chinese soft-shelled turtle (*Trionyx sinensis*); Thy1 antigen; Human Leucocyte Differentiation Antigen (CD); T lymphocyte surface antigen; Developmental and comparative immunology