

研究简报

## 抗胸腺细胞抗体对中华鳖免疫系统的影响

郭琼林 周秀霞 孙晓凤 贾伟章

(中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072)

### EFFECTS OF ANTI-THYMOCYTE SERUM ON IMMUNE SYSTEM OF *TRIONYX SINENSIS*

GUO Qiong-Lin, ZHOU Xiu-Xia, SUN Xiao-Feng and JIA Wei-Zhang

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

关键词: 抗胸腺细胞抗体; 免疫系统; 中华鳖

Key words: Anti-thymocyte serum; Immune system; *Trionyx sinensis*

中图分类号: S941.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-3207(2005)04-0462-03

造成免疫系统抑制的常用手段包括电离辐射和环磷酰胺、可的松等药物处理。这类处理常常伴有较为广泛而严重的副作用, 且对细胞免疫和体液免疫两者均有抑制效应。为专门研究 T 淋巴细胞及细胞免疫反应, 可采用早期人工手术摘除胸腺, 但这种处理特征是造成胸腺及细胞免疫活性彻底丧失且不可逆<sup>[1]</sup>。此外, 由于中华鳖 (*Trionyx sinensis*) 胸腺位于颈下部两侧, 紧邻胸腔, 与胸腔仅隔一薄膜<sup>[2]</sup>, 且身体被以较厚的背甲, 人工摘除存在一系列复杂的技术环节并极易造成气胸、血胸。因此, 通过制备抗中华鳖胸腺细胞血清, 试图建立一种在体内专一性并可逆性抑制 T 淋巴细胞及细胞免疫低下的中华鳖实验模型, 为实验病理学和免疫学研究奠定基础。

#### 1 材料与方法

**1.1 兔抗中华鳖胸腺细胞抗体 (Anti-thymocyte serum, 以下简称 ATS) 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) 制成胸腺细胞悬液, 在 Hank's 液内洗 2 次, 制备成  $5 \times 10^8$  cell/mL 的胸腺细胞悬液, 每毫升含 100IU 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, 末次免疫后放血, 分离血清, 4000r/min 离心 20min, 取上清液, 56℃ 灭活 30min, 经 10% 体积的中华鳖红细胞吸收 (4℃ 共温 1h), -18℃ 以下保存, 备用。实验用大白耳兔由湖北省卫生防疫站动物实验室提供,

免疫注射实验在湖北省卫生防疫站动物实验室完成。

**1.2 ATS 的体内注射方法** 取健康幼鳖 (150—200g) 12 只, 于夏季室内暂养 10d 后未发现异常。ATS 注射期间, 不投喂食料。实验第 1、4、7 天, 中华鳖腹腔注射 ATS (1.5—2mL/只)。另设 4 只对照中华鳖, 同期注射生理盐水。取最后 1 次注射 ATS 后第 3、15 天的中华鳖 (分别为实验 1 组和实验 2 组, 各 6 只) 和对照组中华鳖进行观察和检测。

**1.3 光学显微镜和电子显微镜标本的制备** 取中华鳖胸腺、脾脏组织, 于 Bouin's 液固定 6h, 常规脱水、透明, 石蜡包埋, 切片厚度 6—7 $\mu$ m, HE 染色, 光学显微镜观察。取中华鳖胸腺、脾脏组织, 切成 1mm<sup>3</sup>, 2.5% 戊二醛固定, 1% 锇酸后固定, 超薄切片, 醋酸铀和柠檬酸铅染色, H-600 型电子显微镜观察。

**1.4 淋巴细胞的分离及转化** 将肝素抗凝的新鲜血液用生理盐水稀释 1 倍后, 小心叠加在淋巴细胞分离液上, 2000r/min 离心 30min, 吸取分离液与稀释血浆界面处云雾状薄层白膜, 此为单个核细胞层。Hank's 液洗 2 次。用 RPMI1640 培养液 (0.2mL 胎牛血清、100 单位青霉素和 100 $\mu$ g 链霉素/mL) 悬成  $2 \sim 3 \times 10^6$  cell/L。取 1mL 单个核细胞悬液, 加入 0.2mL PHA 溶液 (50 单位/mL), 28℃ 培养 72h, 每天旋转摇匀 2 次。终止培养, 2000r/min 离心 10min, 取沉淀用 PBS 洗 2 次, 将沉淀细胞悬起、涂片, 自然干燥, 甲醇固定, Gemsa 染色 30min, 油镜下观察 200 个淋巴细胞并计算出转化率。淋巴细胞转化率 (%) = (母细胞 + 过渡型) / 200。判断标准参照

收稿日期: 2004-12-28; 修订日期: 2005-03-10

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 30070588; No. 30371091)

通讯作者: 郭琼林, qlguo@ihb.ac.cn

文献[3]。

**1.5 直接脾细胞溶血空斑( $\alpha$ -PFC)检测** 将5%绵羊红细胞(SRBC,湖北省卫生防疫站动物实验室提供)经腹腔免疫雄性Balb/c小白鼠(20g/只),制备 $2\times 10^6/\text{mL}$ 脾细胞悬液。制备平皿底层:PBS配制的1.4%琼脂糖3mL加入平皿凝固后即成平坦的底层。取0.6%琼脂糖2mL,20%SRBC及脾细胞悬液各0.1mL混匀后加入含底层的平皿,凝固后置28 $^{\circ}\text{C}$ 孵育1.5h,加1:10(1:30)豚鼠(武汉大学医学院动物实验室提供)血清2mL,28 $^{\circ}\text{C}$ 继续孵育45min,弃补体,计数每 $10^6$ 脾细胞的空斑数。

**1.6 统计学分析** 结果以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,各实验组与对照组数据用 $t$ 检验进行统计分析, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果与讨论

对照组胸腺和脾脏组织结构与已报道相似<sup>[2,4]</sup>,无明显异常。ATS实验1组胸腺萎缩,皮质区变薄,胸腺细胞大面积溶解和固缩,胸腺细胞急剧减少(图1),以胸腺中段明显。髓质区毛细血管后微静脉空虚,网状细胞、肌样细胞相对增多。胸腺高度纤维化。一部分胸腺细胞胞膜不完整、断裂、胞膜呈碎末状(图2),尚有一部分胸腺细胞已死亡,可见明显增多的凋亡细胞;细胞膜内陷,核染色质固缩、聚集成块状、边集或片段化,胞浆也浓缩、结构破坏(图1)。脾脏的变化主要为椭圆体周围淋巴鞘(脾脏内的胸腺依赖区)明显变薄,淋巴细胞显著丢失,可见裸露状的椭圆体。胸腺依赖区内一部分残留的淋巴细胞核染色质固缩,形态变化类似胸腺

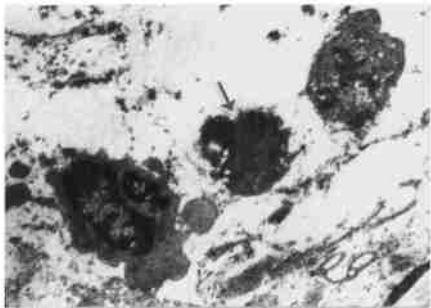


图1 胸腺细胞减少,箭头显示凋亡的细胞  $\times 20000$   
Fig.1 Thymocytes decrease, the arrow shows apoptoting thymocyte  $\times 20000$

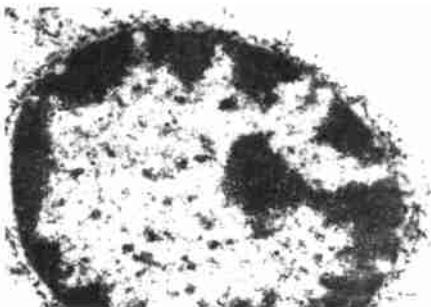


图2 照片显示胸腺细胞膜呈碎末状  $\times 20000$   
Fig.2 Photograph shows sawdust-like membrane of thymocyte  $\times 20000$

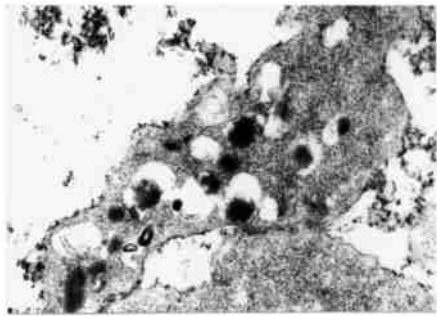


图3 照片显示网状细胞内溶酶体增多  $\times 20000$   
Fig.3 Photograph shows increasing lysosomes in reticular cell of spleen  $\times 20000$

细胞。此外,可见网状细胞内溶酶体增多(图3)。观察结果表明ATS能导致胸腺细胞及外周T淋巴细胞数量明显减少。实验2组变化较轻,淋巴细胞开始增多。

ATS对淋巴细胞转化率和 $\alpha$ -PFC数目的影响见表1。由表1可知:ATS实验1组和实验2组均可导致外周血淋巴细胞转化率和 $\alpha$ -PFC数目明显下降。但表1亦表明:实验2组的外周血淋巴细胞转化率和 $\alpha$ -PFC数目已开始回升。

表1 ATS对中华鳖血液淋巴细胞转化率及脾细胞 $\alpha$ -PFC的影响  
Tab.1 Effects of ATS on transformation ratio of blood lymphocyte and PFC level in *T. sinensis*

	淋巴细胞转化率 Transformation ratio of lymphocyte ( $\bar{x}\pm s$ )	PFC数目 PFC level ( $\bar{x}\pm s$ )
实验1组(6只)	13.33 $\pm$ 3.01 **	49.17 $\pm$ 8.23 **
实验2组(6只)	27.17 $\pm$ 5.81 **	94.83 $\pm$ 15.66 **
对照组(4只)	45.00 $\pm$ 5.00	161.25 $\pm$ 9.53

\*\* :与对照组相比具有显著性差异,  $P<0.05$

爬行动物在免疫系统的进化过程中占据着关键地位,具备T、B淋巴细胞分型和细胞、体液介导的免疫应答<sup>[5]</sup>,并能产生17S的5聚体抗体(IgM)和单体的5.7S和7.5S抗体<sup>[6]</sup>。研究表明:兔抗杂色树蜥(*Calotes versicolor*)胸腺细胞血清在体外能更有效地选择性杀伤胸腺细胞,鳄龟(*Chelydra serpentina*)和蛇(*Spalerosophis diadema*)的实验结果也相似<sup>[5]</sup>。作者曾报道ATS在体外能选择性杀伤中华鳖胸腺细胞、外周血液和淋巴组织的一部分淋巴细胞<sup>[7]</sup>。本次实验进一步证实:除了导致胸腺细胞及外周T淋巴细胞数量明显减少外,体内注射ATS能导致外周血淋巴细胞对PHA转化率和脾细胞 $\alpha$ -PFC下降。电镜观察结果提示胸腺细胞膜严重受损和凋亡细胞增多可能是ATS杀伤胸腺细胞和细胞减少的原因。爬行类T淋巴细胞在丝裂原PHA刺激下可转化为淋巴母细胞<sup>[5]</sup>,B淋巴细胞对细菌和异源性红细胞等大分子抗原均产生抗体反应,且抗体反应似乎都属于T淋巴细胞依赖性<sup>[8]</sup>。因此实验结果显示的淋巴细胞转化率下降反映了体内T淋巴细胞数量减少及功能低下,而T淋巴细胞数量减少及功能

低下也可能导致与抗体生成有关的  $\alpha$ -PFC 下降。实验结果尚表明:ATS 的免疫抑制作用具有可逆性,最后一次注射后第 15 天已开始恢复,此与小鼠结果基本相似<sup>[1]</sup>。

实验结果初步证实:借助抗胸腺细胞抗体可以建立 T 淋巴细胞减少、细胞免疫受抑的免疫缺损实验动物模型。这种动物模型可被用来作为免疫功能重建与恢复或其他目的的研究手段。基于这一考虑,作者已经开展了中华鳖 T 淋巴细胞与疾病发生关系的实验病理学研究,并将继续报道此方面的研究结果。

#### 参考文献:

- [ 1 ] Bach J F. The mode of action of immunosuppressive agents[M]. Amsterdam:North Holland,1975
- [ 2 ] Guo Q L. The microstructure,ultrastructure of thymus in *Trionyx sinensis* and its significance in evolution[J]. *Acta Zoological Sin.* 1999,22:26—32[郭琼林. 中华鳖胸腺的显微与亚显微结构及其在进化上的意义. 动物学报,1999,22:26—32]
- [ 3 ] Guo Q L. Preliminary study of effects on immune organs and immune cells in grass carp induced by hydrocortisone (HCT) [J]. *Transactions of researches on fish diseases.* 1993, No. 1:46—51[郭琼林. 氢化可的松对草鱼免疫器官及免疫细胞影响的初步研究. 鱼病学研究论文集,第一辑. 北京:海洋出版社,1993,46—51]
- [ 4 ] Guo Q L. The microstructure,ultrastructure and the function of spleen in Chinese soft-shelled turtle *Trionyx sinensis* [J]. *Acta Hydrobiol. Sin.* 1998,22(Suppl):26—32[郭琼林. 中华鳖脾脏的显微和亚显微结构及其功能. 水生生物学报,1998,22(增刊):26—32]
- [ 5 ] Jurd R D. Reptiles and Birds. In:Turner R J ed. *Immunology:A Comparative Approach* [M]. John Wiley & Sons Ltd. 1994,137—148
- [ 6 ] Turchin A, Hsu E. The generation of antibody diversity in the turtle [J]. *J Immunology.* 1996,156:3797—3805
- [ 7 ] Guo Q L. Studies on surface antigens of T lymphocyte in grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* and Chinese soft-shelled turtle, *Trionyx sinensis* [J]. *Acta Hydrobiol Sin.* 2001,25:455—461[郭琼林. 草鱼、中华鳖 T 淋巴细胞表面抗原的研究. 水生生物学报,2001,25:455—461]
- [ 8 ] El Ridi R, Zada S, Afifi A, et al. Cyclic changes in the differentiation of lymphoid cells in reptiles[J]. *Cell Different*, 1988,24:1—8