

牙鲆淋巴细胞转化和细胞免疫

乌日琴^{1,2} 李 军¹ 张培军¹ 徐 1,2 徐永立¹

(1. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放实验室 青岛 266071;

2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘要: 利用淋巴转化实验测试了抗原和有丝分裂原对牙鲆 T 淋巴细胞的影响, 结果显示在适宜的生长温度范围内, 低温延缓或阻止牙鲆细胞免疫应答的发生, 导致淋转水平下降。外周血和脾淋巴细胞非特异性淋转水平较前肾高, 外周血和脾淋巴细胞的淋转水平没有显著差异。这可能和外周血、脾和前肾中 T 细胞占淋巴细胞的比例有关。外周血较脾和前肾特异性淋转水平高, 而前肾的淋巴细胞转化水平较脾高。注射引起牙鲆应激反应导致淋转水平升高。

关键词: 淋巴细胞转化; 细胞免疫; 牙鲆; T 淋巴细胞

中图分类号: Q954 **文献标识码:** A **文章编号:** 1009-3207(2003)02-0127-005

淋巴细胞转化实验(Lymphocyte Transplant Test)是利用淋巴细胞与抗原或有丝分裂原在体外共同培养,使淋巴细胞的代谢和形态发生一系列变化,进一步转化成为淋巴母细胞这一特性来反映机体免疫状态的一种实验。由于淋巴细胞转化实验简单易行,因而常用于人、哺乳动物和家禽的淋巴细胞功能的检测,随着鱼类细胞免疫研究的深入,T 淋巴细胞功能的研究也越来越受到重视。本研究拟利用淋巴细胞转化实验来检测牙鲆 T 淋巴细胞的动力学变化,并建立一些鱼类淋巴细胞转化实验的基础数据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 牙鲆(*Paralichthys olivaceus* Temmick et schlegel), 12—19 月龄, 体重 500—1000g, 健康, 饲养于本所水族楼。不同温度条件下转化实验选 10 尾鱼, 每尾分点肌肉注射 1.5mL 羊抗兔 IgG 加完全氟氏佐剂进行免疫。不同组织来源淋巴细胞转化比较实验选用 3 组鱼, 每组 15 尾, 第一组用羊抗兔 IgG 免疫, 第二组每尾注射鱼用生理盐水 1.5mL, 第三组不注射。每隔 10d 免疫 1 次, 共免疫 3 次。

1.2 试剂 PHA (Phytohemagglutinin, Sigma, 美国), 胎牛血清(青岛医学院免疫教研室制备), MIT(3,

[4, 5-dimethylthiazol-2-yl]-2, 5-diphenyltetrazolium bromide, Sigma, 美国), 淋巴细胞分层液(调节人淋巴细胞分层液, 比重为 1.083), 二甲基亚砜(和光纯药株式会社, 日本), 柠檬酸钠、柠檬酸(上海试剂总厂), Hank's 平衡液, 完全 1640 培养液(GIBCO, 美国)。

1.3 外周血单个核细胞悬液制备 每组随机取 3 尾牙鲆, 每尾经尾静脉无菌采血 2mL, 加等体积的阿氏抗凝剂抗凝。取淋巴细胞分层液 2mL 加入离心管, 上加抗凝血 3mL, 1000r/min, 离心 15min。离心后取单个核细胞层, 用 pH7.4 的 Hank's 平衡液洗涤数次, 弃上清, 加入含 15% 胎牛血清的完全 1640 培养液, 细胞计数, 调整细胞浓度为 3×10^5 个/mL。

1.4 脾淋巴细胞悬液制备 将上述取样的每组 3 尾牙鲆处死后, 酒精消毒, 由背部剪开腹腔外侧肌肉, 暴露腹腔, 在无菌条件下, 取出脾脏放在含 Hank's 液的一次性平皿, 剪碎, 过 200 目不锈钢网(可同时用 5mL 塑料针筒塞子磨碎), Hank's 液冲洗不锈钢网, 收集细胞悬液, 用 Hank's 液洗涤数次, 加入含 15% 胎牛血清的完全 1640 培养液, 细胞计数, 调整细胞浓度为 3×10^5 个/mL。如细胞计数过程中发现分离细胞不纯, 则可将细胞悬液加入淋巴细胞分层液分离淋巴细胞。上述取样的 9 尾牙鲆, 无菌取出

收稿日期: 2001-08-05; 修订日期: 2002-10-10

基金项目: 国家“973”项目资助(课题编号 G1999012003, G1999012006)

作者简介: 乌日琴(1973—), 女, 内蒙古呼和浩特市人; 助教; 研究方向: 海洋动物发育生物学和比较免疫学

通讯作者: 张培军, E-mail: pjzhang@ms.qdio.ac.cn

前肾后, 操作同前制备前肾淋巴细胞悬液。

1.5 不同温度条件下的淋巴细胞转化实验 分别在无菌的 48 孔培养板内, 按照下图的格式加入经羊

抗兔 IgG 免疫的牙鲈外周血的淋巴细胞悬液0. 5mL, 再分别加入 1ng/ mL PHA 10μL、100ng/ mL 羊抗兔 IgG 10μL 作为刺激原, 对照组加 Hank' s 液 10μL。

B1+ PHA	B2+ PHA	B3+ PHA	B4+ PHA	B5+ PHA	B6+ PHA	B7+ PHA	B8+ PHA
B1+ IgG	B2+ IgG	B3+ IgG	B4+ IgG	B5+ IgG	B6+ IgG	B7+ IgG	B8+ IgG
B1+ hank' s	B2+ hank' s	B3+ hank' s	B4+ hank' s	B5+ hank' s	B6+ hank' s	B7+ hank' s	B8+ hank' s
B9+ PHA	B10+ PHA	B11+ PHA	B12+ PHA	B13+ PHA	B14+ PHA	B15+ PHA	
B9+ IgG	B10+ IgG	B11+ IgG	B12+ IgG	B13+ IgG	B14+ IgG	B15+ IgG	
B9+ hank' s	B10+ hank' s	B11+ hank' s	B12+ hank' s	B13+ hank' s	B14+ hank' s	B15+ hank' s	

注: B1—15 代表从 15 尾牙鲈外周血分离制备的淋巴细胞悬液。

将上述 5 个 48 孔培养板分别置于 16℃、18℃、20℃、22℃和 24℃生化培养箱培养, 每 24h 吹打细胞一次, 培养 68h 后, 弃去上清液, 加入 MTT 溶液 (200μg/ mL) 200μL, 继续在生化培养箱中培养 4h, 然后加入二甲基亚砷 500μL, 在波长为 490 的酶联免疫检测仪测 OD 值。MTT 比色法是以活细胞代谢 MTT 形成甲瓖, 然后用酸化的 SDS 溶解沉淀, 在酶联免疫检测仪读取 OD 值。

1.6 牙鲈外周血、脾和前肾淋巴细胞转化实验 取无菌 48 孔培养板, 分别加入制备好的经外源蛋白羊抗兔 IgG 免疫(第一组)、生理盐水注射(第二组) 和未经注射(第三组) 的牙鲈外周血、脾和前肾的淋巴细胞悬液 0. 5mL, 分别加入 1mg/ mL PHA 10μL 作为有丝分裂刺激原检测牙鲈非特异性免疫, 羊抗兔 IgG 100ng/ mL 10μL 作为抗原检测牙鲈特异性免疫, 第三组作为对照, 将培养板置于 22℃生化培养箱培养, 每 24h 吹打细胞一次, 培养 68h 后, 分别取培养的经有丝分裂原刺激的牙鲈外周血, 脾和前肾淋巴细胞涂片, 瑞氏染色, 镜检观察、计数。弃去上清液, 加入 MTT 溶液(200μg/ mL) 200μL, 在生化培养箱中培养 4h, 然后加入二甲基亚砷 500μL, 用酶联免疫检测仪测波长为 490OD 值。

2 结果

2.1 牙鲈淋巴细胞转化观察

68h, 镜检观察一些淋巴细胞变大, 细胞核变松散, 细胞代谢旺盛, 可见细胞分裂相, 为淋巴母细胞(图 1)。通过形态变化, 分别计算外周血、脾和前肾来源淋巴细胞的转化百分率。淋巴细胞转化百分率(%) = 转化淋巴细胞/ 计数淋巴细胞× 100

转化率结果见图 2, 外周血淋巴细胞较脾和肾淋巴细胞的转化率高, 脾和肾淋巴细胞转化率差异不大。

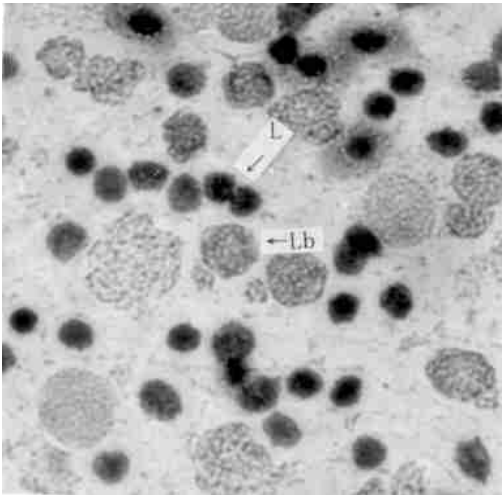


图 1 牙鲈淋巴细胞经有丝分裂原(PHA) 刺激后的形态变化
Fig. 1 Morphology of *P. olivaceus* lymphocytes after treated with PHA

L 淋巴细胞(Lymphocyte) Lb 淋巴母细胞(Lymphoblast)

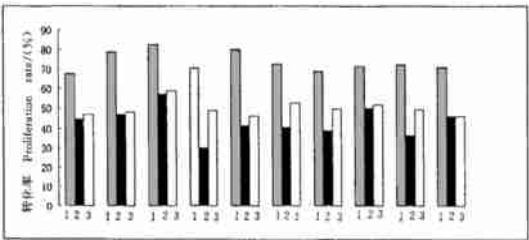


图 2 牙鲈外周血、脾和前肾淋巴细胞转化率的比较
1 外周血; 2 脾; 3 前肾

Fig. 2 The comparison of the proliferation rates of lymphocytes separated from peripheral blood, spleen and kidney of *P. olivaceus*
1 Peripheral Blood; 2 Spleen; 3 Head Kidney

2.2 温度与淋巴细胞转化水平的关系

如图 3 所示, 在 16—22℃, 对照组和 IgG 组牙鲆外周血淋巴细胞转化水平随着培养温度升高而升高, 24℃时淋转水平显著下降($p < 0.05$)。PHA 刺激外周血淋巴细胞转化水平在 16—20℃差异不显著($p > 0.05$), 22℃时淋巴细胞转化水平显著增加($p < 0.05$), 24℃时淋转水平显著下降($p < 0.05$)。

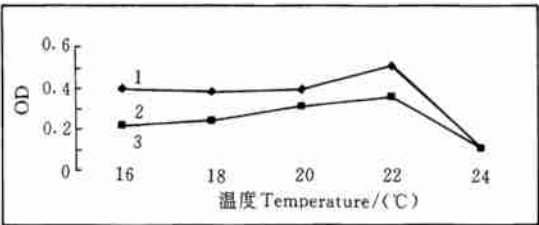


图 3 牙鲆外周血淋巴细胞在不同温度下淋转水平
1 PHA 2 IgG 3 C

Fig. 3 The proliferation of peripheral blood lymphocytes at different temperature of *P. olivaceus* 1 PHA 2 IgG 3 C

2.3 牙鲆外周血、脾和前肾淋巴细胞转化水平的比较

牙鲆不同组织来源淋巴细胞转化的 MTT 比色法监测表明, 经外源蛋白羊抗兔 IgG 免疫(第一组)、生理盐水注射(第二组)和未经注射(第三组)的实验

牙鲆外周血、脾和前肾淋巴细胞经 PHA 和 IgG 刺激都能引起明显的淋巴细胞增殖反应(表 1)。牙鲆外周血淋巴细胞经 PHA 和 IgG 刺激均可引起明显的 T 细胞增殖反应, 用 PHA 作为刺激原, 外源蛋白羊抗兔 IgG 免疫组与生理盐水注射组和未经注射组的外周血淋巴细胞转化水平相比差异较大($p < 0.05$), 生理盐水注射组和未经注射组的外周血淋巴细胞转化水平相比也有显著差异($p < 0.05$)。特异性抗原 IgG 刺激的淋巴细胞转化水平较有丝分裂原 PHA 低。脾淋巴细胞经 PHA 和 IgG 刺激均可以引起明显的 T 细胞增殖反应, 用 PHA 作为刺激原, 外源蛋白羊抗兔 IgG 免疫组与生理盐水注射组和未经注射组的外周血淋巴细胞转化水平相比差异较大($p < 0.01$), 生理盐水注射组和未经注射组的外周血淋巴细胞转化水平相比没有显著差异。前肾淋巴细胞经 PHA 和 IgG 刺激均可以引起明显的 T 细胞增殖反应, 用 PHA 作为刺激原, 外源蛋白羊抗兔 IgG 免疫组与生理盐水注射组和未经注射组的外周血淋巴细胞转化水平相比差异较大($p < 0.05$), 生理盐水注射组和未经注射组前肾淋巴细胞转化水平相比没有显著差异($p > 0.05$)。

表 1 MTT 法检测牙鲆外周血、脾和前肾淋巴细胞增殖反应

Tab 1 The proliferation of lymphocytes separated peripheral blood, spleen and head kidney of *P. olivaceus* determined with MTT

淋巴细胞 转化水平 (OD)	外周血			脾			前肾		
	第一组	第二组	第三组	第一组	第二组	第三组	第一组	第二组	第三组
PHA	0.503±0.036	0.398±0.087	0.231±0.075	0.491±0.035	0.341±0.046	0.155±0.089	0.351±0.095	0.230±0.039	0.202±0.065
IgG	0.399±0.065	0.236±0.069	0.197±0.043	0.302±0.052	0.287±0.043	0.197±0.056	0.369±0.034	0.219±0.069	0.178±0.076
C	0.298±0.059	0.229±0.043	0.207±0.067	0.272±0.091	0.272±0.091	0.221±0.079	0.251±0.065	0.196±0.052	0.163±0.069

比较外周血、脾和前肾三者, 外周血和脾淋巴细胞非特异性转化水平较前肾高($p < 0.05$), 二者之间非特异性淋转水平没有显著差异, 外周血特异性淋巴细胞转化水平显著高于脾和前肾($p < 0.05$), 前肾的淋转水平则显著高于脾($p < 0.05$)。

3 讨论

哺乳动物的 T 细胞表面具有植物血凝集素受体(PHA-R)、伴刀豆球蛋白 A 受体(ConA-R)和与 B 淋巴细胞共有的美洲商陆丝裂原受体(PWM-R), 可以接受相应有丝分裂原刺激, 发生有丝分裂, 转化为淋巴母细胞。常用的测定淋巴细胞转化实验的方法有形态学观察计数、放射性核苷酸掺入法、NAG 试验、

MTT 法和 XTT 法。MTT 法能较准确地反映淋巴细胞在体外的状态, 省时省力, 且不污染环境。鱼类 T 细胞的研究中最早是通过在体外培养细胞中加入有丝分裂原来证实硬骨鱼类中 T 样淋巴细胞的存在, 70 年代以来, 研究学者通过大量的实验, 证明鱼类存在对 PHA、ConA 和 PWM 产生应答的 T 淋巴细胞, 因而简单易行的淋巴细胞转化实验逐渐应用于鱼类细胞免疫功能的研究。该实验的基础是分离得到较纯的淋巴细胞群。自制的牙鲆淋巴细胞分层液效果较好, 可以分离得到较纯的单个核细胞层。牙鲆外周血、脾和前肾淋巴细胞转化率的差异可能是由于 T 样淋巴细胞在各个器官中分布的差异造成的, 从其他鱼类抗 sIg 的单抗的研究结果来看, 硬骨鱼类

外周血的 T 淋巴细胞大概占总淋巴细胞 50% — 70% 左右, 和本次实验的结果相吻合。

3.1 温度对牙鲆淋巴细胞转化的影响

牙鲆是温水性鱼类, 进行体外培养过程中细胞可以在较大范围的温度存活, 同时温度对体外培养的淋巴细胞转化水平也产生很大的影响。前文所述, 在一定的温度范围内, 随着温度的升高, 淋转水平也升高, 但到一定温度 (24℃), 淋转水平突然下降。温度影响体液免疫同时也影响细胞免疫, T 协助细胞的成熟和释放对温度敏感。Reitan 等^[1]认为低温导致的鱼类免疫抑制是由于 T 细胞受抑制所致, 鱼类 T 细胞功能受温度影响较大, 低温条件下受有丝分裂原和异源细胞刺激后不增生, 同时低温还抑制 T 细胞的辅助作用^[2], 但本文所述的淋巴细胞转化水平降低可能是因为 24℃超过了牙鲆的适宜生长温度, 在适宜的生长温度范围内, 低温延缓或阻止细胞免疫应答的发生, 导致淋转水平下降。和哺乳动物相比鱼类抗体形成期较长, 而冷水鱼则更长。有文献^[3, 4]表明鱼类抵御异源性侵害是主要依赖细胞免疫, 可见虽然牙鲆的细胞免疫应答较哺乳动物晚, 但牙鲆机体动员细胞免疫系统发挥抗感染功能仍然十分有效。

3.2 外周血、脾和前肾淋巴细胞转化水平

比较外周血、脾和前肾三者, 外周血和脾非特异性淋巴细胞转化水平较前肾高, 脾和外周血的非特异性淋转水平没有显著差异。而特异性淋转水平三者则是外周血高于前肾, 前肾高于脾。上述实验结果可能与外周血、脾和前肾中 T 细胞占淋巴细胞的比例有关, 健康成年的牙鲆外周血 T 细胞为 70% — 80%, 而脾和前肾的 T 细胞占淋巴细胞的比例不超过 40%, 由于所有的 T 细胞表面都存在有丝分裂原受体, 当有丝分裂原刺激时, 所有的 T 细胞都发生增殖, 因此非特异性淋转水平可能和 T 淋巴细胞的分布有关, 而特异性细胞转化水平则与某一 T 淋巴细胞的亚群的分布有关。鱼类的 T 淋巴细胞具有哺乳动物 T 细胞相似的功能, 如: 对同种移殖产生的排斥反应和细胞增生反应。哺乳动物 T 细胞通过其表面抗原受体 (TCR) 对抗原的识别来发挥免疫功能, 在此过程中还需要组织相容性复合物 (MHC) 分子的协助。最近, 从多种鱼类的免疫组织分离到了与哺乳动物 TCR 和 MHC 相关的基因序列^[5, 6], 表明鱼类可能具有哺乳动物相似的细胞免疫机制。

有意思的是注射生理盐水的对照组牙鲆外周血和脾非特异性淋转水平都较未注射组高, 前肾的差

异不大, 可能是注射使牙鲆产生应激反应。Faissal^[8]通过惊吓所引起的免疫抑制实验, 发现不受 LPS 的影响, 说明和 B 细胞无关; Maule^[9, 10]则认为惊吓导致胸腺的某一类白细胞亚群数量增加 (Ts 细胞), 从而导致整个鱼体的免疫受抑制。因此, 虽然经过注射生理盐水, 机体处于应激反应, 但是特异性和非特异性发防御能力被抑制, 对疾病的敏感性增加。淋转水平升高可能是因为引起免疫抑制的一类 T 细胞的增殖所致, 因此在进行牙鲆疫苗免疫时应选择适当的免疫方式, 以免引起免疫抑制。

鱼类免疫体系与哺乳动物有显著差异, 鱼类免疫应答方式也有其特殊性。鱼类的细胞免疫尤其是 T 细胞免疫研究是一新的课题, 其中大多数研究还处于实验阶段, 未能形成系统的成熟理论。本研究通过牙鲆鱼几种不同组织来源的淋巴细胞转化实验, 获得了牙鲆淋巴细胞功能检测的基础数据, 对鱼类细胞免疫体系研究进行了初步的探索, 但有待于深入的研究。

参考文献:

- [1] Reitan L J, Thuvander A. In vitro stimulation of salmonid leucocytes with mitogens and with *Aeromonas salmonicida* [J]. *Fish Shellfish Immunol.* 1991, **1**, 297—307
- [2] Bly J E, Clem L W. Temperature and teleost immune functions. *Fish Shellfish Immunol.* 1992, **2**, 159—171
- [3] Houghton G. Immunosuppression in juvenile carp, *Cyprinus carpio* L.: the effects of the corticosteroids triamcinolone acetonide and hydrocortisone 21-hemisuccinate (cortisol) on acquired immunity and the humoral antibody response to *Idiophthirus multifiliis* Fouquet [J]. *Journal of Fish Dis.* 1990, **13**: 269—280
- [4] Scapigliati F, Ramano N, Abelli L, et al. Immunopurification of T cells from sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) [J]. *Fish Shellfish Immunol.* 2000, **10**(4): 329—341
- [5] Rast J P, Litman G W. T_H cell receptor gene homologues are present in the most primitive jawed vertebrates [J]. *Proc. Acad. Sci. USA.* 1994, **91**: 9248—9252
- [6] Ristow S S, Grabowski L D, Thompson S M, et al. Coding sequence of the MHC II beta chain of homozygotic rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) [J]. *Dev. Comp. Immunol.* 1999, **23**(1): 51—60
- [7] Grinwis G C, Vethaak A D, Wester P W, Vos J G. Toxicology of environmental chemicals in the flounder *Paratichthys flesus* with emphasis on the immune system field, semi field (mesocosm) and laboratory studies [J]. *Toxicol. Lett.* 2000, **112-113**: 289—301
- [8] Faissal M. Social confrontation "stress" in aggressive fish is associated with an endogenous opioid-mediated suppression of proliferation response to mitogens and nonspecific cytotoxicity [J]. *Brain Behav. Immunol.* 1996, **3**(3): 223—233
- [9] Maule A G. Changes in numbers of leukocytes in immune organs of juvenile coho salmon after acute stress or cortisol treatment [J]. *Aquat. Anim. Health.* 1990, **2**(4): 298—304

THE LYMPHOCYTES TRANSPLANT TEST AND CELL-MEDIATED IMMUNE OF *PARALICHTHYS OLIVACEUS*

WU RiQin^{1,2}, LI Jun¹, ZHANG Pei Jun¹, XU Peng^{1,2} and XU Yong Li¹

(1 Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071;

2 Institute of Postgraduate, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039)

Abstract: To determine the effect of foreign antigen and mitogen on immune function of lymphocytes of *Paralichthys olivaceus*, lymphocytes proliferation induced by haemagglutinin (PHA) and IgG at 16 °C, 18 °C, 20 °C, 22 °C and 24 °C were detected. The proliferation rate of lymphocytes from different flounder lymphoid were analyzed. Lymphocytes obtained from peripheral blood, spleen and head kidney were collected for PHA-stimulated and IgG stimulated proliferation assay and their proliferation was determined with MTT. Morphology of *P. olivaceus* lymphocytes after treated with PHA were observe by microscope, we found lymphocytes, lymphoblasts and mitogenesis in the culture system. The results showed that the proliferation of lymphocytes were decreased sharply at 24 °C, within the suitable cultural temperature, from 16 °C to 22 °C in our experiment, at the comparable low temperature the proliferation of cultured cells were decreased. As compared with those of spleen and head kidney, the proliferation rate of peripheral blood lymphocytes is very high. The rates show no difference between spleen and head kidney. Both PHA and IgG can induce the proliferation of lymphocytes. The nonspecific lymphocytes proliferation (Induced by PHA) of peripheral blood and spleen was significantly higher than that of the lymphocyte from head kidney ($p < 0.05$), there is no difference between those of blood and spleen ($p > 0.05$). The specific lymphocytes (Induced by IgG) proliferation of peripheral blood were higher than those of head kidney and spleen ($p < 0.05$), and the head kidney lymphocyte proliferation was higher than spleen's ($p < 0.05$). Injection increased the proliferation of lymphocytes of *P. olivaceus*.

Key words: Lymphocytes Transplant; Test cell-mediated immunology; *Paralichthys olivaceus*; T cell