

草鱼外周血淋巴细胞体外转化 诸因素的研究*

李亚南 陈全震 邵健忠 王冀平[†] 毛树坚

(杭州大学生命科学学院, 杭州 310012)

[†](浙江省测试技术研究所, 杭州 310012)

提要 于1993年3月—1993年11月, 采用³H-TdR 同位素掺入法, 分别测定草鱼外周血中淋巴细胞在经两种特异有丝分裂原植物凝集素(PHA)与金黄色葡萄球菌蛋白A(SPA)刺激后发生的T淋巴细胞与B淋巴细胞应答转化的平均刺激指数(SI)的值。经不同浓度的PHA与SPA刺激的T、B淋巴细胞转化实验表明, 两种有丝分裂原促T、B淋巴细胞应答转化的最适剂量, PHA为500 μ g/ml, SPA为0.05%; 用不同浓度的小牛血清培养试验表明, PHA组的最适浓度为10%, 而SPA组的为15%; 不同培养时间的试验显示, PHA最适刺激时间为1—2d, 而SPA为2—3d。因此在采用鱼类淋巴细胞体外转化实验来进行鱼类的免疫机理等方面的研究中, 必须考虑上述彼此相关的三个基本要素, 即淋转刺激剂的最适剂量、培养液中的小牛血清的最佳浓度以及淋巴细胞转化应答所需的最适时间。

关键词 草鱼 T、B淋巴细胞 植物凝集素与金黄色葡萄球菌 蛋白A 血清浓度 培养时间

为使鱼类免疫学研究的深入, 对鱼类免疫上的某些方法要素有必要进行探讨。如对体外培养的草鱼外周血淋巴细胞对PHA与SPA的免疫应答的研究, 国内外均未见报道; 用不同浓度的小牛血清来分析其对PHA与SPA刺激鱼外周血淋巴细胞的免疫应答转化的效应, 也未见专门的报道。本文报告草鱼外周血淋巴细胞在体外应答转化实验中的最佳条件, 以期建立一种较可靠的鱼类免疫学研究技术。这对鱼类免疫机理的研究以及鱼病的免疫学防治都具有一定的实际意义。

1 材料与方 法

1.1 实验鱼

于1993年3月—1993年11月, 采用本系农场鱼塘饲养草鱼(*Ctenopharyngoden idellus*), 体重在0.5—1kg, 在本实验室(20 \pm 1) $^{\circ}$ C水族箱中驯化两星期, 取健康草鱼30条备用。

1.2 试剂与仪器

³H-TdR系中国原子能研究院产品, 浓度为1mCi/ml, 比活性>5Ci/mmol, 使

* 国家自然科学基金资助项目, 39400100号; 浙江省自然科学基金资助项目, 395185号。李亚南, 男, 出生于1958年2月, 博士, 副教授。

收稿日期: 1995年1月3日, 接受日期: 1996年2月9日。

用时稀释至浓度 $20\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 比活性 $5\text{Ci}/\text{mmol}$ 。

脂溶性闪烁液, 取 1, 4 双[2'-(5' 苯基噁唑)] 苯(POPOP) 0.4g, 加少量二甲苯, 置 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 水浴, 待充分溶解后, 再加 2, 5- 二苯噁唑(PPO) 40g, 并用二甲苯补足至 1000 ml。

植物凝集素(PHA)液, 购自上海市医学化验所, 系四川云豆的提取物, 经低温冷冻干燥制成白色无菌粉末。每支 10mg, 用前加无血清 TC-199 培养液 2ml 溶解, 浓度为 $5\text{mg}/\text{ml}$ 。

金黄色葡萄球菌蛋白 A(SPA) 菌液, 由浙江省卫生防疫站惠赠。使用时打开安瓿, 加甲醛至终浓度为含甲醛 0.5% 的菌悬液体, 室温 3h, 再经 $80\text{ }^\circ\text{C}$ 加热 3min, 用无血清 TC-199 洗 3 次, 最后用 TC-199 液稀释成 1% 菌体悬液待用。

培养液, 在 TC-199 培养液中加入青霉素(终浓度为 $100\text{u}/\text{ml}$)、链霉素(终浓度 $100\mu\text{g}/\text{ml}$), 调 $\text{pH}=7.2-7.4$ 。

DYQ-01 型多头细胞样品收集器(取样器), TRI-CARB 2050 CA 液体闪烁仪。

1.3 方法

1.3.1 草鱼外周血淋巴细胞对不同浓度的 PHA 与 SPA 的应答转化测定 鱼体外表作消毒处理后, 入无菌室。从草鱼尾动脉抽血, 移入准备有抗凝剂的无菌培养管中, 以 TC-199 培养液(含 20% 小牛血清) 0.5ml 为基础, 加抗凝剂 0.2ml 于培养管中。实验分别设二组: PHA 液组浓度分别为 0.0(对照), 62.5, 125, 250, 500, 1000, $1500\mu\text{g}/\text{ml}$, 以测定 T 淋巴细胞的应答转化效率; SPA 液组终浓度为 0.0%(对照), 0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.3%, 0.4% 与 0.5%, 以测定 B 淋巴细胞的转化效率。各组均设复管。各培养管至 $26\text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱培养 1—2d, 在培养终止前 16h, 加 $^3\text{H}-\text{TdR}2\mu\text{Ci}/\text{管}$ 。培养终止后, 用细胞样品收集器收集细胞, 纤维滤片法制备样品, 用液体闪烁仪分别测定每管中脉冲数(counts per minute, CPM)。实验结果以每管的平均刺激指数(stimulation index, SI)表示。各实验重复 6 次。

1.3.2 不同浓度小牛血清对 PHA 与 SPA 刺激草鱼外周淋巴细胞应答转化的测定 用同于 1.3.1 的方法培养草鱼外周血淋巴细胞。实验设二组: 各组均设复管, PHA 液组的终浓度均为 $500\mu\text{g}/\text{ml}$; SPA 液组的终浓度均为 0.05%; 小牛血清浓度分别为 0%(对照), 2%, 5%, 10%, 15%, 20%。各培养 2d 后, 加 $^3\text{H}-\text{TdR}$ 再温育 16h, 测 $^3\text{H}-\text{TdR}$ 的掺入量, 结果用 SI 表示。各实验重复 6 次。

1.3.3 不同培养时间的草鱼外周血淋巴细胞对 PHA 与 SPA 应答转化的测定 用同于 1.3.1 的方法培养草鱼外周血淋巴细胞, 实验设二组: 各组均设复管, PHA 与 SPA 组 8 个终浓度同 1.3.2; PHA 液组的小牛血清的 8 个浓度均为 10%, SPA 液组的 8 个均为 15%; 各组分别培养 0(对照), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7d, 分别加 $^3\text{H}-\text{TdR}$ 温育 16h, 用 SI 表示结果。实验重复 6 次。

2 结果与讨论

本文运用高等脊椎动物常用的放射免疫学方法中的 $^3\text{H}-\text{TdR}$ 标记化合物掺入实验, 来间接测定草鱼外周血淋巴细胞在体外培养条件下对 PHA 与 SPA 应答转化的效率, 发现: 引起 T, B 淋巴细胞应答刺激剂 PHA 与 SPA 的最适刺激剂量, 分别为 500

$\mu\text{g}/\text{ml}$ 与 0.05%；在体外培养过程中，小牛血清的浓度对淋巴细胞转化的最适浓度分别为 10% 与 15%；以及最适培养时间分别为 1—2d 与 2—3d。

2.1 草鱼外周血淋巴细胞对不同浓度的 PHA 与 SPA 应答转化的影响结果与分析

淋巴细胞体外培养所得的实验结果(表 1)表明，在草鱼外周血淋巴细胞的体外培养中，不同的 PHA 浓度对 T 淋巴细胞的应答转化有不同的效应。在 PHA 浓度 0—500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的范围内，淋巴细胞转化的效率(SI 表示)呈上升趋势，但这以后，一直到达 1000 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ，PHA 的淋转效应明显下降，表明浓度 500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 的 PHA 为草鱼体外淋转的最适剂量。这与林义浩等(1983)的草鱼体内注射 PHA(8 $\mu\text{g}/\text{g}$ 体重)可防治草鱼出血病，以及庄明炎¹⁾草鱼口服 PHA(1.5 $\mu\text{g}/\text{尾鱼}$)来预防草鱼出血病中的剂量相比，相差较大。但是，林义浩等(1980)在研究不同浓度的 PHA 刺激短期培养的草鱼成鱼的头肾细胞有丝分裂中发现，PHA 浓度在 600 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 时可获最高的有丝分裂指数，这是因为头肾细胞为鱼类的免疫器官之一，内含有许多可接受 PHA 应答的淋巴细胞。因此从一定意义上说，本文结果与林义浩的是一致的。同时表明 PHA 在体内与体外对 T 淋巴细胞的激活作用有较大差别。

表 1 不同浓度 PHA 和 SPA 对草鱼外周血淋巴细胞转化的影响结果

Tab. 1 Effect of different concentrations of PHA and SPA on transformation of lymphocytes in peripheral blood from grass carp (*Ctenopharyngoden idellus*)

组别	对照	—	二	三	四	五	六
PHA($\mu\text{g}/\text{ml}$)	0	62.5	125	250	500	1000	1500
刺激指数(SI)	1	1.22	1.48	2.07	2.95	1.95	1.82
SPA(%)	0	0.025	0.050	0.100	0.300	0.400	0.500
刺激指数(SI)	1	1.27	3.54	3.00	1.47	1.11	1.07

关于 SPA 的浓度对 B 淋巴细胞的转化效应，也表现出上升到 0.100% 的浓度后其 SI 呈现下降的趋势(表 1)，SPA 对草鱼外周血 B 淋巴细胞的体外应答转化的最佳浓度为 0.050%。Clem 等(1984)用不同剂量的 LPS(50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 与 250 $\mu\text{g}/\text{ml}$)来激活体外培养的 Channel fish 外周血 B 淋巴细胞转化等实验表明，LPS 对 B 淋巴细胞的应答效应的强弱同样表现在其剂量的差别上。从 SPA 与 LPS 同样能激活 B 淋巴细胞的免疫应答这个意义上讲，本文的实验结果与 Clem 有类似的一致性。

2.2 小牛血清浓度对 PHA 与 SPA 刺激草鱼外周血淋巴细胞应答转化的影响结果

本文在对 2%—20% 的 5 个不同浓度的小牛血清的比较实验中，发现 10% 的小牛血清对 PHA 刺激草鱼外周血 T 淋巴细胞转化效果最好，而 15% 的小牛血清对 SPA 的免疫应答效应最大(表 2)。类似的研究如 Bly (1991)在研究 Channel fish 的外周血淋巴细胞的体外免疫抑制时，采用了 10% 的人血清加 5% 的 Channel fish 血清来培养淋巴细胞的，测定其对 ConA(激活 T 细胞)与 LPS(激活 B 细胞)的免疫应答。此外本实验室常用 10% 的小牛血清来培养草鱼细胞(李亚南等，1990)。因此作者提出，10% 到 15% 的小牛血清对鱼类外周血淋巴细胞的体外淋转是比较合适的浓度。

1) 庄明炎等，1986，鱼病简讯，4: 2—5。

表 2 小牛血清浓度对 PHA 与 SPA 刺激草鱼外周血淋巴细胞转化的影响结果

Tab. 2 Effect of concentrations of calf serum on transformation of peripheral blood lymphocytes from grass carp (*Ctenopharyngoden idellus*) stimulated by PHA and SPA

小牛血清(%)		0	2	5	10	15	20
刺激指数	PHA	1	2.35	2.78	3.79	2.41	2.02
(SI)	SPA	1	2.05	2.07	2.53	3.98	2.96

2.3 不同培养时间的草鱼外周血淋巴细胞对 PHA 与 SPA 的应答转化的影响结果

本文的实验表明(表 3), 草鱼 T 淋巴细胞对 PHA 刺激作出应答的最适时间是在培养 1—2d 的时候, 这之后应答高峰逐渐下降, 到第 7 天的时候几乎已无 T 淋转反应。但对草鱼外周血 B 淋巴细胞来说, 其在接受特异的分裂原 SPA 刺激后作出的应答转化高峰是处于培养 2—3d 的时候, 在高峰期之前 B 淋巴细胞的转化率极低, 高峰期之后, 随着培养时间的延长, B 淋巴细胞对 SPA 的应答效应缓慢下降。Faulmann 等(1983), Clem 等(1984)曾指出, Catfish 的淋巴细胞对 ConA 的应答高峰出现在体外培养过程中, 对接受有丝分裂原刺激后发生转化的最大效应有个最适时间的选择问题, 本文的结果实际上正是这种最适时间选择的体现。

表 3 不同培养时间的草鱼外周血淋巴细胞对 PHA 与 SPA 的应答的影响结果

Tab. 3 Effect of different cultural time on response of peripheral blood lymphocytes from grass carp (*Ctenopharyngoden idellus*) stimulated to PHA and SPA

培养时间(d)		0	1	2	3	4	5	6	7
刺激指数	PHA	1	1.66	0.96	0.71	0.58	0.24	0.07	0.11
(SI)	SPA	1	3.77	51.77	39.64	17.82	23.47	23.66	6.55

3 结语

从以上的实验结果分析, 作者建议研究者在采用鱼类淋巴细胞体外转化实验来进行鱼类的免疫机理等方面的探讨时, 应首先把握实验中彼此相关的三个基本要素, 即淋转刺激剂的最适剂量、培养中的小牛血清的最佳浓度以及淋转应答所需的最适时间。本文得出的结果, 即 PHA 与 SPA 的最适剂量分别为 $500\mu\text{g}/\text{ml}$ 与 0.05%, 最佳小牛血清浓度为 10%—15%, 而把 1—2d 与 2—3d 的刺激(培养)时间分别作为 PHA 与 SPA 的最适应答时间, 至少是对 20℃ 水温中驯化的草鱼外周血淋巴细胞来说是合适的。对于草鱼外周血淋巴细胞为何在上述三个最适条件下对刺激的应答呈最高峰的有关机理问题, 尚待进一步探讨研究。

参 考 文 献

- 李亚南等, 1990, 水产学报, 14 (2): 89—94.
 林义浩等, 1980, 淡水渔业, 6: 1—3.
 林义浩等, 1983, 淡水渔业, 5: 25—32.
 Bly, J. E., 1991, Vet. Immunol. Immunopathol., 28(3): 356—377.

Clem, L. W. et al., 1984, *Dev. Comp. Immunol.*, 8(2): 313—332.

Faulmann, E. et al., 1983, *Trans. Am. Fish. Soc.*, 112: 673.

STUDIES ON SOME ELEMENTS OF TRANSFORMATION OF LYMPHOCYTES IN PERIPHERAL BLOOD FROM GRASS CARP (*CTENOPHARYNGODEN IDELLUS*)

Li Yanan, Chen Quanzhen, Shao Jianzhong, Wang Jiping[†], Mao Shujian

(College of Life Science, Hangzhou University, Hangzhou 310012)

[†](Institute of Testing Technology, Zhejiang Province, Hangzhou 310012)

Abstract The mean stimulation index (SI) values of response transformation of T and B lymphocytes stimulated respectively by special mitogens, PHA and SPA in the Grass Carp (*Ctenopharyngoden idellus*)'s peripheral blood were detected with incorporation of ³H-TdR from March to November, 1993. The fish were bled (by syringe) from the tail aorta. Blood was collected into heparinized tubes to which had been added TC-199 medium solution containing 0.5ml of 20% calf serum on base.

(1) The tests of effect on different concentrations of PHA and SPA were divided into two groups: final concentrations of PHA group were 0.0 (control), 62.5, 125, 250, 500, 1000 and 1500 μ g /ml, to detect T lymphocyte transformation; concentrations for the SPA group were 0.0% (control), 0.025%, 0.05%, 0.1%, 0.3%, 0.4% and 0.5%, to detect B lymphocyte transformation. All the tubes were incubated in 20 $^{\circ}$ C for 1—2 days. Sixteen hours before completion of culture, 2 μ Ci /tube of ³H-TdR were put into the tubes. Finally, counts per minute (CPM) of all samples were detected in a TRI-CARB 2050 CA liquid scintillation counter.

(2) The tests of effect on concentrations of calf serum were in two groups: the final concentration of PHA group was 500 μ g /ml, SPA group was 0.05%; concentrations of calf serum were 0% (control), 2%, 5%, 10%, 15%, 20% respectively. The processes were the same as those in (1).

(3) The tests of effect on different cultural time were also in two groups: the final concentrations of PHA and SPA were the same as those in (2); concentrations of calf serum of the PHA group was 10%, of the SPA group was 15%; the cultural time was 0 (control), 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 days respectively. Other processes were also the same as those in (1).

Every test was repeated 6 times and all numerical data were analyzed statistically. Tests of different concentrations of PHA and SPA for stimulating T and B lymphocytes transformation of response showed that the best concentration was

500 μ g for PHA and 0.05% for SPA. Culture tests of different concentrations of calf serum showed that the best concentration for PHA stimulation was 10%, for SPA was 15%, and that the best stimulation time was 1—2days for PHA and 2—3days for SPA.

Key words Grass carp (*Ctenopharyngoden idellus*) T, B lymphocytes Concentration of PHA, SPA Calf serum concentration Culture time