

文章编号: 1000- 0615(2000)04- 0349- 06

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

郭琼林

(中国科学院水生生物研究所, 湖北 武汉 430072)

摘要:草鱼淋巴细胞表面扫描电镜结构特征为有孔穴且较为光滑、具短小细锥状突起;中华鳖淋巴细胞、胸腺细胞表面扫描电镜结构特征为凹凸不平、较为光滑;它们均以表面凹凸不平特征的占大多数。E 花环试验的光镜和扫描电镜观察显示:草鱼淋巴细胞 E 花环形成不明显,而中华鳖淋巴细胞、胸腺细胞的成花率分别为 25%~34% 和 36%~47%,能形成花环的淋巴细胞、胸腺细胞以表面结构特征凹凸不平(类似哺乳动物 T 淋巴细胞)的为主。草鱼、中华鳖血液淋巴细胞和中华鳖胸腺细胞与抗人 CD₂ 单克隆抗体交叉反应的免疫组化检测显示中华鳖血液淋巴细胞和胸腺细胞的 CD₂ 阳性率分别为 24% 和 33%。草鱼血液淋巴细胞 CD₂ 阳性反应不明显。

关键词:草鱼;中华鳖;淋巴细胞异质性;E-花环试验;绵羊红细胞受体

中图分类号:Q336;S917 文献标识码:A

Observation of surface microstructure and investigation of SRBC receptor (CD₂) on lymphocyte of *Ctenopharyngodon idellus* and *Trionyx sinensis*

GUO Qiong-lin

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

Abstract: Under scanning electron microscope (SEM), the surface microstructure on lymphocytes of *Ctenopharyngodon idellus* is characterized with full of bumpiness and holes, or rather smooth or protruding with small cones, whereas the surface microstructure on lymphocytes and thymocytes of *Trionyx sinensis* is characterized with full of bumpiness and holes, or rather smooth. The lymphocytes and thymocytes filled with bumpiness and holes are evidently more than others. Under optic and scanning electron microscope, the rosette formation of lymphocyte of *C. idellus* with SRBC is not obvious, whereas rosette forming percents in lymphocytes and thymocytes of *T. sinensis* are respectively 25% - 34% and 36% - 47%. The lymphocytes and thymocytes which form rosettes with SRBC are predominantly ones filled with bumpiness and holes (similar to T lymphocyte of mammalian). The immunohistochemistry on the cross-reactivity by using monoclonal antibody against human CD₂ shows that the CD₂-positive percent of lymphocytes in peripheral blood and thymocytes of *T. sinensis* are respectively 24% and 33%, but no cross-reactivity is found on lymphocytes in peripheral blood of

收稿日期: 1999- 12- 08

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39470555 和 39670578); 湖北省自然科学基金以及中国科学院所长择优基金资助项目

作者简介: 郭琼林(1957-), 女, 山西省晋城人, 硕士, 副研究员, 主要从事水生动物病理与免疫学研究。Tel: 027- 87647721, E-mail:

mxiao@whhcc.edu.cn

C. idellus.

Key words: *Ctenopharyngodon idellus*; *Trionyx sinensis*; heterogeneity of lymphocyte; E- rosette test; SRBC receptor(CD₂)

八十年代以来,应用单克隆抗体技术进行了大量鱼类淋巴细胞分类、功能及其个体发育的研究^[1]。近几年来,有资料表明在斑点叉尾 (*Ictalurus punctatus*) T 细胞受体(TCR)的 α 和 β 基因结构与表达、鲢 (*Hypophthalmichthys molitrix*)的主要组织相容性复合体(MHC) I α 2 基因片段的克隆和序列分析等方面又取得了重大进展^[2,3]。与此同时,随着两栖类一种新的淋巴细胞受体(CTX)-Ig 超家族新成员 V 区 J 特征的证实、某些海洋哺乳动物鲸 (*Delphinaterus leucas*) 淋巴细胞表面抗原 CD_{45R}(一种人类白细胞分化抗原)同源物及其淋巴细胞与抗人 CD₂、CD₄ 等单克隆抗体交叉反应的发现^[4-6],作为构成水生动物机体免疫系统主要成分的淋巴细胞已得到愈来愈多科学家们的高度重视。比较而言,水生爬行动物免疫学的研究相对滞后,国内此方面的资料还相当欠缺。为配合我国淡水鱼类和特种水产中华鳖疾病的防治工作,阐明鱼类和爬行动物淋巴细胞及其与免疫反应、疾病发生的关系,作者试图对草鱼 (*Ctenopharyngodon idellus*)、中华鳖(*Trionyx sinensis*)淋巴细胞特别是 T 淋巴细胞进行系统的研究。本文主要报告草鱼、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)的检测结果并讨论其意义。

1 材料与方法

1.1 实验材料

实验中华鳖每只 300~400g,雌雄兼有,共 6 只。实验草鱼每尾 1.5~3kg,共 5 尾。淋巴细胞分离液系上海华精生物科技有限公司产品(密度:(1.077+0.02) g·mL⁻¹),抗人 CD₂ 单克隆抗体购自卫生部武汉生物制品研究所,羊抗鼠 IgG-HRP 购自华美生物试剂公司,绵羊血液由湖北省卫生防疫站动物实验室提供。无菌从绵羊颈静脉抽取血液,加入 2 倍以上无菌艾氏保存液,4℃保存。用时以无钙镁的 Hank's 液洗 3 遍,最后一次离心 2 000 r·min⁻¹, 10min,取压积红细胞配成 10mL·L⁻¹的 E 悬液。

1.2 实验方法

1.2.1 草鱼、中华鳖淋巴细胞的分离及胸腺细胞悬液的制备

草鱼心脏抽取血液,肝素抗凝(1 000U·mL⁻¹);中华鳖颈动脉放血,肝素抗凝(500U·mL⁻¹)。取 10mL 无菌离心管,加入待分离血液样品等量的淋巴细胞分离液 3mL,将肝素抗凝的新鲜草鱼、中华鳖血液各 1.5mL 用生理盐水稀释 1 倍后,小心分别叠加在分离液上,2 000r·min⁻¹,水平离心 20~30min,用毛细管小心吸取分离液与稀释血浆界面处的云雾状薄层白膜,此即所需单个核细胞层,用无钙镁 Hank's 液洗 3 遍并悬成 $2 \times 10^9 \sim 3 \times 10^9 \cdot \text{mL}^{-1}$ 的淋巴细胞悬液,活率在 95% 以上。涂片镜检,绝大部分为淋巴细胞,亦可见极少量的单核细胞和血栓细胞。摘取中华鳖两侧胸腺,剔除周围结缔组织,常规制备胸腺细胞悬液,用 Hank's 液洗 3 遍,活率在 95% 以上。

1.2.2 草鱼血液分离淋巴细胞扫描电镜样品的制备

将草鱼血液分离的淋巴细胞悬液离心,弃之 2/3 上清液,轻旋摇起细胞,加入等量 2.5% 戊二醛固定液,4℃保存 1h 以上。摊片,1% 锇酸固定后,用 pH 7.2 的 0.2mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液洗 3 遍,50%、70%、80%、95% 和 100% 乙醇系列脱水各 10min,醋酸异戊酯置换 20min,临界点干燥,粘台、喷金,日立 S-570 型扫描电子显微镜观察并照相。

1.2.3 草鱼、中华鳖淋巴细胞和中华鳖胸腺细胞 E 花环试验及扫描电镜样品的制备

草鱼、中华鳖淋巴细胞悬液和中华鳖胸腺细胞悬液分别与等量 10mL·L⁻¹ 的 E 悬液圆底小试管内混匀,置 37℃ 水浴 10~15min 后,室温低速(500 r·min⁻¹)离心 5min,置 4℃ 固定 2h 以上。取出试管,轻

旋摇匀细胞,加等量 2.5% 戊二醛固定液,轻旋混匀后,4℃固定 15min。三种受测细胞悬液各取一半分别滴在玻片上,平展,干燥,甲醇固定后,用稀释 8~10 倍的瑞氏染液染 3~5min,水洗、干燥、光学显微镜检查;另一半细胞悬液分别继续 4℃固定 1h 以上,轻旋摇匀细胞,摊片,1% 锇酸后固定,以下步骤同 1.2.2。

高倍镜或扫描电镜分别各计数 200~300 个淋巴细胞,凡结合 3 个以上绵羊红细胞(SRBC)的,记为 E 花环形成细胞并计算成花率:

$$\text{成花率}(\%) = \frac{\text{成花的淋巴细胞}}{\text{计数的淋巴细胞}} \times 100$$

1.2.4 草鱼、中华鳖血液淋巴细胞和中华鳖胸腺细胞与抗人 CD₂ 单克隆抗体交叉反应的免疫组化检测

草鱼心脏、中华鳖颈动脉取血,制成血涂片,取新鲜中华鳖胸腺,制成印迹涂片,自然干燥后-18℃保存。染色前 PBS 洗 3 次,0.5%~3% H₂O₂ 预处理 20min, PBS 洗,小鼠腹水处理 10min,吸干水,滴加适当稀释的抗人 CD₂McAb,37℃ 60min, PBS 洗 3 次,羊抗鼠 IgG-HRP(免疫组化稀释 1:25) 孵育 60min, PBS 洗 3 次,0.04% DAB+0.03% H₂O₂ 显色 6~15min, PBS 洗,自然干燥,封存,镜检。

2 结果

2.1 草鱼淋巴细胞、中华鳖淋巴细胞和胸腺细胞的扫描电镜观察

草鱼淋巴细胞表面呈现程度不同的凹凸不平,可见极少数细胞表面有细锥状突起(图版-1),未见明显细而长的绒毛突起。中华鳖胸腺细胞表面亦呈现程度不同的凹凸不平,少数细胞表面较为平滑,凹凸起伏不明显(图版-2),未见明显的绒毛结构。中华鳖淋巴细胞表面结构基本同胸腺细胞,但以表面具凹凸不平的占大多数(图版-3,4)。

2.2 草鱼淋巴细胞和中华鳖淋巴细胞、胸腺细胞 E 花环形成的光镜和扫描电镜观察

草鱼淋巴细胞的 E 花环形成极少见,成花率为 3% 以下。中华鳖淋巴细胞、胸腺细胞在光镜下为圆形或卵圆形,核为类圆形或豆形,胞浆较少,绵羊红细胞圆形,较小,双凹圆盘状。光镜下可见明显的 SRBC 环绕淋巴细胞而与之结合形成花环。扫描电镜下计数易行,淋巴细胞成花率为 25%~34%,胸腺细胞成花率为 36%~47%,能成花的淋巴细胞以表面凹凸不平的为主(图版-3,4,5)。

2.3 草鱼、中华鳖血液淋巴细胞和中华鳖胸腺细胞与抗人 CD₂ 单克隆抗体交叉反应的免疫组化观察

CD₂ 阳性反应物为深褐色,位于细胞膜,大部分形成一褐色环状物或半环状物(图版-6),因粒细胞胞浆有较弱的非特异性染色,观察时应一一注意仔细辨认与比较。显微镜下,中华鳖血液涂片和胸腺印片各计数 200~300 个淋巴细胞和胸腺细胞的 CD₂ 阳性率分别为 24% 和 33%。草鱼血液淋巴细胞 CD₂ 阳性反应不明显。

3 讨论

就淋巴细胞的扫描电镜结构而言,Weiss^[7] 曾明确描述和图版显示哺乳动物淋巴细胞表面具有细长的微绒毛结构,中国医学科学院主编的图谱清楚表明哺乳动物 B 淋巴细胞表面的微绒毛多而细长,微绒毛基部与顶部直径一致;T 淋巴细胞表面凹凸不平^[8];图谱中所示 B 淋巴细胞的扫描电镜照片与 Weiss 组织学中的照片完全吻合。在鱼类,Blaxhall^[9] 已观察到鲢(*Salmo trutta*) 和鲤(*Cyprinus carpio*) 外周血淋巴细胞表面具绒毛样结构。此后,Blaxhall 和 Sheard^[10] 又进一步报道在分离液密度为 1.056g·mL⁻¹ 的实验条件下淋巴细胞表面平滑和具绒毛,然而密度为 1.07g·mL⁻¹ 时,淋巴细胞表面具较丰富的绒毛。但作者本次实验在分离液密度为 1.077g·mL⁻¹ 的条件下观察未发现淋巴细胞具有类似哺乳动物那样细而长的微绒毛结构;仅发现极少数淋巴细胞表面有短小的细锥状结构,类似 Blaxhall 观察到的绒毛样结

构;大部分细胞表面凹凸不平,其形态特征类似于哺乳动物的T淋巴细胞^[8],表面较平滑的也较少,特别是中华鳖。从扫描电镜照片来看,Blaxhall观察的鳟和鲤淋巴细胞表面的绒毛结构远不如哺乳动物明显^[7],因此他们也称之为绒毛样结构。实际上这种细胞从形态上似乎接近于哺乳动物的T淋巴细胞。作者认为:表面扫描电镜结构特征从形态学上反映了这些淋巴细胞分化程度、功能均低于哺乳动物。此外,即使不考虑种类繁多的鱼类种间的差异,也应注意绒毛结构在受到各种不同刺激(包括样品处理等因素)时,细胞表面绒毛的结构长度、直径大小、形态及分布特征都有可能发生改变。所以作者认为这种细胞表面绒毛的多少和形态特征不能作为鉴别鱼类和爬行动物T、B淋巴细胞的恒常标志。

在本研究中,作者完成了草鱼和中华鳖淋巴细胞花环形成的光镜和扫描电镜观察。在鱼类,除Xia和Kusuda^[11]已报道鳗鲡(*Anguilla japonica*)淋巴细胞膜上存在绵羊红细胞受体外,作者尚未发现其它有关鱼类和爬行动物此方面的资料。本次实验结果表明:草鱼淋巴细胞E花环形成不明显。由此分析:鱼类种类繁多,各实验手段不完全相同,种间差异可能都是导致结果不同的原因。中华鳖外周血淋巴细胞和胸腺细胞能与SRBC形成E花环,尽管其成花率低于人类的65%左右^[12],但E花环实验结果以及能形成E花环的淋巴细胞、胸腺细胞表面结构特征接近哺乳动物T淋巴细胞的事实提示爬行动物T淋巴细胞分化和功能高于鱼类并逐步接近哺乳动物。这些与中华鳖免疫器官的显微与亚显微结构的完善^[13,14]相吻合。根据此,同时基于尚未发现表面具明显细而长微绒毛的淋巴细胞,作者推测爬行动物的B淋巴细胞(亦包括鱼类)可能不如T淋巴细胞发育和分化完善。尽管到目前为止尚无更多免疫组化等方面的证据,但低等动物更多地依赖细胞免疫也许从本研究中得到一些诠释。

Du Guise等以抗牛、绵羊、小鼠和人类淋巴细胞表面CD₂、CD₄、MHC和TCR单克隆抗体,应用流式细胞测量术发现海洋哺乳动物鲸外周血淋巴细胞出现不同程度的阳性交叉反应^[6],Legac等用抗人类CD单克隆抗体以同样方法发现海洋无脊椎动物海星(*Asterias rubens*)的中轴器官(一种原始的淋巴器官)的淋巴细胞膜上有CD₂₅(IL-2R)阳性交叉反应,而CD₂、CD₄和CD₈均为阴性反应^[15]。本次实验显示的中华鳖淋巴细胞E-花环形成和与抗人CD₂单克隆抗体出现阳性交叉反应的事实均提示爬行动物可能具备CD₂抗原。E受体或CD₂的功能尚未完全清楚,但已有实验证实它参与T淋巴细胞的活化过程。作者分析草鱼未与抗人CD₂单克隆抗体发生交叉反应的原因可能有以下四个方面:①鱼类比两栖、爬行类动物和哺乳动物早出现1至3亿年,因此鱼类缺乏与人类CD₂足够长的相似的表现亲和交叉反应的结构片段;②鱼类CD₂样阳性交叉反应过低;③人类与鱼类CD₂结构特征差异较大;④CD₂抗原不存在于鱼类。

参考文献:

- [1] Scapigliati G, Romano N, Abelli L. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes [J]. *Aquac*, 1999, 172: 3-28.
- [2] Wilson M R, Zhou H, Bengten E, et al. T cell receptors in channel catfish: structure and expression of TCR alpha and beta genes [J]. *Mol Immunol*, 1998, 35(9): 545-557.
- [3] 夏春. 白鲢MHCII2基因克隆及序列分析[J]. *动物学报*, 1999, 45(3): 345-349.
- [4] Du Pasquier L, Chretien I. CTX, a new lymphocyte receptor in *Xenopus*, and the early evolution of Ig domains [J]. *Res Immunol*, 1996, 147(4): 218-226.
- [5] De Guise S, Erickson K, Blanchard M, et al. Characterization of a monoclonal antibody that recognizes a lymphocyte surface antigen for the cetacean homologue to CD45R [J]. *Immunology*, 1998, 94(2): 207-212.
- [6] De Guise S, Bemier J, Martineau D, et al. Phenotyping of beluga whale blood lymphocytes using monoclonal antibodies [J]. *Dev Comp Immunol*, 1997, 21(5): 425-433.
- [7] Weiss L. *Histology* (Fifth edition) [M]. New York: Elsevier Science Publishing Co Inc, 1983. 511-568.
- [8] 中国医学科学院(主编). *医学生物学电子显微镜图谱* [M]. 北京: 科学出版社, 1978. 146.
- [9] Blaxhall P C. Electron microscope studies of fish lymphocytes and thrombocytes [J]. *J Fish Biol*, 1983, 22: 223-229.
- [10] Blaxhall P C, Sheard P R. Preliminary investigation of the characteristics of fish lymphocytes separated on a percolation discontinuous gradient [J]. *J Fish Biol*, 1985, 26: 209-216.

- [11] Xia C, Kusuda R. Receptors for sheep red blood cells, Immunoglobulin M and complement detected on the lymphocyte of eel, *Anguilla japonica* [J]. *Suisanzoshoku*, 1994, 42: 47- 51.
- [12] 赵长春, 王庭桂, 杨春生(主编). 临床免疫检验学[M]. 天津: 天津科学技术出版社, 1990. 350.
- [13] 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.
- [14] 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.
- [15] 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.

欢迎订阅 2001 年《海洋与湖沼》

《海洋与湖沼》是由中国海洋湖沼学会主办、中国科学院海洋研究所承办的海洋湖沼科技领域的综合性学术刊物。主要刊载国家自然科学基金资助项目、国家重大攻关项目、各部委基金资助项目的研究成果, 论文内容涉及水圈范围内的物理学、化学、地质学、环境学、生物学等学科及其分支学科的研究报告、研究简报、高新技术、学术争鸣等栏目。

本刊为双月刊, 国内统一刊号: CN 37- 1149; 国际标准刊号: ISSN 0029- 814X。国内外公开发行, 国内邮发代号: 2- 421, 国外发行代号: BM69。16 开, 每期定价 12.00 元。读者可在当地邮局订阅, 也可直接汇款到编辑部订阅。编辑部地址: 青岛市南海路 7 号, 邮编: 266071。

联系电话: (0532) 2879062 转 2528, 传真: (0532) 2870882。E-mail: bsun@ms.qdio.ac.cn

欢迎订阅 2001 年《海洋渔业》

《海洋渔业》是中国水产学会和中国水产科学研究院东海水产研究所主办的中级水产科技期刊。主要刊登海洋渔业管理、资源开发与利用、繁殖保护、捕捞技术、鱼虾贝藻类增养殖、海洋环境保护、水产品加工利用、保鲜技术、渔业机械仪器等各类文章。

本刊为季刊, 逢季中月 25 日出版。国内外公开发行, 国内统一刊号: CN 31- 1341/S, 国际标准刊号: ISSN 1004- 2490, 16 开 48 页。每期定价 4.50 元, 全年 18.00 元, 全国各地由局(所)均可订阅, 邮发代号: 4- 630, 也可直接汇款到编辑部订阅。编辑部地址: 上海市军工路 300 号, 邮编: 200090。

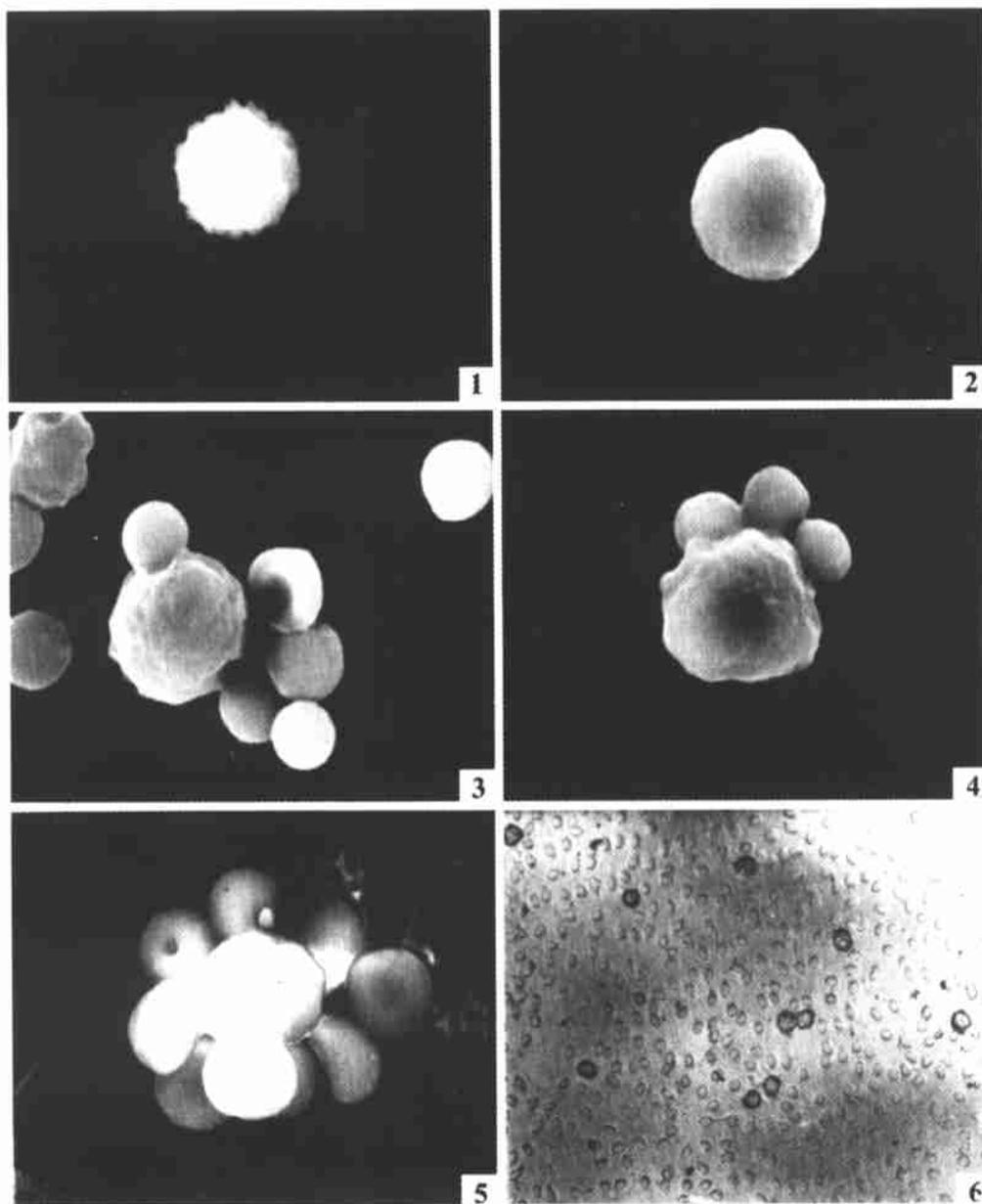
电话: 021- 65684690- 8048。

欢迎订阅 2001 年《渔业致富指南》

《渔业致富指南》杂志系目前我国水产行业出版周期最短、传递信息最快的水产科技期刊, 读者遍及全国 30 个省、市、自治区, 深受广大读者欢迎。本刊主要辟有渔业信息、水产养殖实用技术、名特优水产品养殖、鱼类病害防治技术、养殖技术专题讲座、科研园地、读者信箱、水产商情等栏目。

本刊为半月刊, 彩封, 大 32 开, 国内统一刊号: CN42- 1270/F, 邮发代号: 38- 320。每期 56 页, 每月定价 3.00 元, 全年 36.00 元。全国各地邮局均可办理订阅手续, 如当地邮局不能办理订阅手续, 也可直接汇款至本编辑部, 本刊常年办理订阅和补订手续(免收邮资费)。编辑部地址: 湖北武汉市武昌东湖路 96 号, 邮编: 430071。

联系人: 黄凯勤, 电话: 027- 87311934。



1. SEM 观察的草鱼淋巴细胞, 表面具细锥状突起, $\times 5\ 000$; 2. SEM 观察的中华鳖胸腺细胞, 表面凸凹不平不明显, $\times 5\ 000$; 3- 4. SEM 观察的中华鳖淋巴细胞(表面凸凹不平)及其 E 花环 $\times 5\ 000$; 5. SEM 观察的中华鳖胸腺细胞(表面凸凹不平)及其 E 花环, $\times 5\ 000$; 6. 光学显微镜观察的中华鳖血液 CD₂ 阳性交叉反应的淋巴细胞, $\times 200$.