

研究简报

鳗鲡淋巴细胞表面存在不同表型的免疫球蛋白 EEL LYMPHOCYTES DIFFERENCE IN THE EXPRESSION OF SURFACE IMMUNOGLOBULIN

夏 春

(中国农业大学动物医学院, 北京 100094)

Xia Chun

(College of Animal Medicine, China Agricultural University, Beijing 100094)

川合研兒 楠田理一

(日本高知大学农学部, 日本 783)

Kenji Kawai and Riichi Kusuda

(Faculty of Agriculture, Kochi University, Japan 783)

关键词 鳗鲡, 淋巴细胞, 单克隆抗体, 表面免疫球蛋白

KEYWORDS Eel, Lymphocyte, Monoclonal antibody, Surface immunoglobulin

脊椎动物的免疫系统主要由淋巴细胞和特异性抗体构成, 然而如此复杂的网络系统的进化引起了许多学者的兴趣。至今, 高等脊椎动物的免疫系统已经研究得相当清楚; 而低等脊椎动物免疫系统的研究较少, 但构成这一系统的部分因子却与高等脊椎动物相同, 另一部分则按自身的进化形成了现有的构造。

鱼类经数亿年的进化演变, 现存约 2 万多种, 占脊椎动物总数的一半以上, 是具备细胞性和体液性免疫系统的最低等脊椎动物。其抗体仅有 IgM 类, 补体存在 1~9 成分, 存在 MHC I, MHC II 基因和 CD 8 受体[山村雄一, 1992], 从半抗原-载体效应、抗体产生细胞研究的结果分析, 鱼类存在 T, B 样淋巴细胞[Ruben, 1977; Smith, 1967]。但是, 是否还存在 T、B 细胞表面的相应标志仍在研究之中[Deluca, 1983; Secombes, 1983]。鳗鲡 (*Anguilla japonica*) 为洄游性鱼类并有很高的食用价值。为了阐明其免疫系统, 我们曾对鳗鲡淋巴细胞表面的羊红细胞受体 (SRBC), 抗体 IgM_{Fc} 受体, 补体 (C) 受体, 淋巴细胞增殖因子进行过研究[Xia 等, 1994a; Xia 等, 1994b; Kusuda 等, 1992]。本研究进一步制作了鼠抗鳗鲡 IgM 单克隆抗体和兔抗鳗鲡 IgM 多克隆抗体, 并通过间接荧光抗体法对鳗鲡淋巴细胞进行染色, 再使用细胞荧光仪对其淋巴细胞表面 IgM 的存在表型进行了测定。结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

鳎鲷,购于日本高知县养殖场,体重 120~180 克。BALB/c 鼠、兔均购于日本日进公司。

1.2 鼠抗鳎 IgM 单克隆抗体的制作

按 Kohler 和 Milstein[1975]的方法以鳎鲷 IgM 为抗原免疫 BALB/c 鼠后,取其脾细胞与 P3x63-Ag8.653 瘤细胞融合。然后,以 ELISA 法检测各孔培养上 Ig 的阳性率。即以 0.5 M pH 9.0 的碳酸缓冲液调至鳎 IgM 使其最终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$,再以每孔 100 μL 的量加于 96 孔 ELISA 板,室温孵育 2 小时,PBS 洗板 3 次,用 5% FCS-PBS 封闭,PBS 再洗板 3 次后,加 200 μL 融合细胞的培养上清,室温孵育 2 小时,洗板 3 次。然后,每孔加 100 μL 适当浓度的兔抗鳎 IgM 的 IgG[Xia, 1994a],室温孵育 2 小时,再 PBS 洗板 3 次,然后每孔加 100 μL 碱性磷酸酶标记的羊抗鼠 Ig(G+M+A)(美国 TAGO 公司),按常法显色,测 OD 值。再采用有限稀释法克隆和亚克隆阳性孔细胞。最后,将杂交瘤细胞扩大培养,取其培养上清 10 倍浓缩后,采用鼠单抗分类试剂盒(英国 Birmingham Research Park, lot T8359)检测其重链类型。

1.3 兔抗鳎 IgM 多克隆抗体的制作

按 Xia 等的方法[1993]制作。即以 200mg/0.5mL 鳎 IgM 和 0.5mL 佛氏完全佐剂(DIFCO 公司)混合后注射入兔背部皮下,每间隔 15 天,以同样剂量 IgM 加 0.5mL 佛氏不完全佐剂(DIFCO 公司)进行注射;连续 2 次注射后,按常法收集兔血清。采用 Protein A affigel(BIO-RAD 公司)亲活层析提纯兔 IgG。

1.4 淋巴细胞表面 IgM 阳性率的测定

鳎淋巴细胞采用 Kusuda 等的方法[1992]分离。将淋巴细胞调至 2×10^6 细胞/mL 后,取 0.5mL 分别装于试管,加等量鼠抗鳎 IgM 单抗或兔抗鳎 IgM 多抗,室温孵育 1 小时,PBS 洗 3 次后,再加入 0.5mL 1000 倍稀释的荧光色素标记羊抗鼠 Ig 或荧光色素标记羊抗兔 Ig(日本和光纯药公司),4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 30 分,200g 离心 10 分钟收集细胞,悬浮于 PBS 中。然后使用细胞荧光仪(CoulterR EPICS-752 型)测定 10 000 个细胞的荧光强度,同时,以荧光显微镜观察淋巴细胞的染色相。

表 1 抗鳎 IgM 单克隆抗体类型
Table 1 Anti-eel immunoglobulin hybridoma clones

单抗号	抗鼠 Ig 重链琼扩结果					
	抗 IgG1	抗 IgG2a	抗 IgG2b	抗 IgG3	抗 IgA	抗 IgM
I1D4	-	-	-	-	-	+
I2F6	-	-	-	-	-	+
I2C1	-	-	-	-	-	+
I3E3	-	-	+	-	-	-

2 结果

经 ELISA 检测三次细胞融合的结果,获 I1D4、I2F6、I2C1 和 I3E3 四株分泌特异抗体的杂交瘤细胞。这四株单抗类型如表 1 所示,I1D4、I2F6 和 I2C1 为 IgM,I3E3 为 IgG。

用 I1D4、I2F6、I2C1 和 I3E3 四株单抗与鳎淋巴细胞反应的结果如表 2 所示。即 I1D4 阳性率在 11.17%~

13.16%, I2F6 在 1.81% ~ 2.82%, I2C1 在 62.19% ~ 82.16%, I3E3 在 33.16% ~ 48.23%。

表 2 鼠抗鳗 IgM 单克隆抗体染色鳗淋巴球结果(%)
Table 2 Percent surface immunofluorescences of eel lymphocytes
using mouse monoclonal antibodies to eel immunoglobulin

单抗号	实验鱼尾数		
	1	2	3
I1D4	11.17	13.16	12.56
I2F6	1.81	2.82	2.79
I2C1	73.72	62.19	82.16
I3D3	33.15	46.66	48.23

兔抗鳗 IgM 多克隆抗体染色的阳性率在 98.42% ~ 99.14% 之间。

淋巴细胞的荧光染色相如图 1 所示, 在各个反应中, 淋巴细胞均存在三种染色相。即细胞周围被染成圈形、帽形和点状形。

3 讨论

哺乳类、鸟类的淋巴细胞由于分化、成熟的场所不同, 可分为 T、B 两大类。其中 B 淋巴细胞表面带有免疫球蛋白(SIg), 抗体 IgGFeR 受体, 脂多糖(LPS)受体; T 淋巴细胞表面带有 SRBC、植物凝集素(PHA)受体; 近年来, 随着白细胞抗原体系(CD)的确立, B 淋巴细胞带有 CD2, T 淋巴细胞带有 CD4 抗原[山村雄一, 1992]。

鱼类存在 T 和 B 功能性淋巴细胞已被证明 [Ruben 等, 1977; Smith 等, 1967; Xia 等, 1993a], 至今, 许多学者都试探用细胞表面标志将这两类淋巴细胞分开。

Ellis 等[1975]和 Warr 等[1975]首先报道了鱼类淋巴细胞表面存在 sIg, 但是, 由于使用的是荧光标记的抗鱼 IgM 多克隆抗体媒染淋巴细胞, 结果是淋巴细胞的 sIg 阳性率极高, 因此, 认为 sIg 不能作为鱼类 B 样细胞的表面标志。Deluca 等[1983]和 Secompes 等[1983]也报道了鳗、鲤的淋巴细胞表面存在 sIg, 并且 sIg 阳性淋巴细胞在抗体产生过程的功能类似于哺乳类, 因此认为 sIg 可以作为鱼类淋巴细胞的分类标志。Egberts 等[1982]又报道了鳗淋巴细胞表面存在其胸腺抗原。Xia 等[1994a, 1994b]又进一步证实了鳗淋巴细胞上存在 IgMFc, SRBC, PHA, LPS 和补体受体, 这样使鱼类淋巴细胞表面标志的研究进一步多样化。

根据本文采用四株单抗与鳗淋巴细胞反应的结果, 表明鱼类淋巴细胞表面存在不同表型的 sIg。并且 sIg 还存在个体差异。这也充分证实了鳗存在两类淋巴细胞。即 sIg 阳性和 sIg 阴性淋巴细胞。各株单抗对不同鳗个体淋巴细胞染色结果不一样可能是因为鱼类 IgM 轻链存在多态性所致 [Lobb 等, 1984]。然而, 兔抗鳗 IgM 多克隆抗体染色鳗淋巴细胞的结果是几乎所有淋巴细胞表面 sIg 均为阳性, 我们认为这可能是非特异反应所引起。这种现象也类似于 Ellis 等[1975]和 Warr 等[1976]研究的结果。

本研究证实了鳗淋巴细胞表面存在不同表型的免疫球蛋白。因此, sIg 作为鳗 B 细胞的表面标志是可能的。这也进一步支持了 Egberts 等[1982]的研究。即 sIg 可作为鱼类 B 样淋巴细胞标志。作为低等脊椎动物的鱼类, 不仅种类多, 系统分类地位间隔也大, 并且 IgM 也存在种间差异。因此, 是否所有的鱼类淋巴细胞表

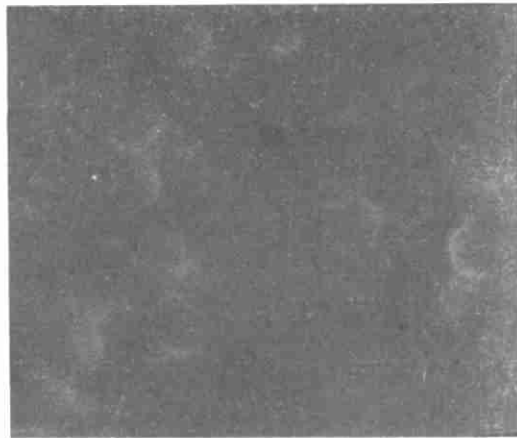


图 1 鼠抗鳗 IgM 单克隆抗体染色鳗淋巴球的荧光相(×1 000)

Fig. 1 Immunofluorescence micrograph of eel lymphocytes after incubation with MoAc and SAM/Ig-FITC(×1 000)

面都存在不同表型的 sIg 还有待全面证明。

本研究承蒙国家教委留学回国人员启动金部分资助。

参 考 文 献

- [1] 山村雄一,1992. 现代免疫学,457~468. 东京医学书院出版.
- [2] Secombes, C. *et al.*,1983. Ontogeny of the immune system in Carp. The appearance of antigenic determinants on lymphoid cells detected by mouse anti-carp thymocyte monoclonal antibodies. *Dev. Comp. Immunol.*,7:455~464.
- [3] Deluca, D. *et al.*,1983. Lymphocyte heterogeneity in the trout, *Salmo gairdneri*, defined with monoclonal antibodies to IgM. *Eur. J. Immunol.*,13:546~551.
- [4] Egbert, E. *et al.*,1982. The immune system of cyprinid fish. Monoclonal antibodies directed against carp thymocytes. *Dev. Comp. Immunol.*,2:217~222.
- [5] Ellis, E. *et al.*,1975. Surface immunoglobulins on the lymphocytes of the skate *reja naevua*. *Eur. J. Immunol.*,5:726~728.
- [6] Lobb, C. J. *et al.*,1984. Fish lymphocytes differ in the expression of surface immunoglobulin. *Dev. Comp. Immunol.*,6:473~496.
- [7] Kohler, G. and C. Milstein,1975. Continuous cultures of fused cells secreting antibody of predefined specificity. *Nature*,256:495~496.
- [8] Kusuda, R. and Xia, C.,1992. Lymphocyte growth-promoting factor(s) produced by the leucocytes of eel, *Anguilla japonica*. *Nippon Suisan Gakkaishi*,58:1667~1671.
- [9] Ruben, L. N. *et al.*,1977. Phylogenetic origins of immune recognition; lymphoid heterogeneity and the hapten/carrier effect in the goldfish, *Carassius auratus*. *Cell. Immunol.*,31,166~283.
- [10] Secombes, C. J. *et al.*,1983. Separation of lymphocyte subpopulation in carp (*Cyprinus carpio* L.) by monoclonal antibodies-immunohistochemical studies. *Immunol.*,48:165~175.
- [11] Smith, A. M. *et al.*,1967. Antibody-forming cells in the pronephros of the teleost *Iepomis macrochirus*. *J. Immunol.*,99:876~882.
- [12] Xia, C. *et al.*,1993. Studies on the heterogeneity of lymphocyte population in eel, *Anguilla japonica*. *Suisanzoshoku*,41:119~123.
- [13] Xia, C. *et al.*,1994a. Receptors for sheep red blood cells, immunoglobulin M and complement detected on the lymphocyte of eel, *Anguilla japonica*. *Suisanzoshoku*,42:47~51.
- [14] Xia, C. *et al.*,1994b. Presence of mitogen receptors on the lymphocyte of eel, *Anguilla japonica*. *Suisanzoshoku*,42:53~56.
- [15] Warr, G. W. *et al.*,1976. Phylogenetic origins of immune recognition; Lymphocyte surface immunoglobulin the goldfish, *Carassius auratus*. *Proc. Natn Acad. Sci.*,73:2476~2480.