

文章编号: 1000-0615(2003)05-0486-05

·研究简报·

## 牙鲆的淋巴细胞表面抗原

乌日琴<sup>1,2</sup>, 张培军<sup>1</sup>, 徐 凡<sup>1,2</sup>, 李 军<sup>1</sup>, 徐永立<sup>1</sup>

(1. 中国科学院海洋研究所实验海洋生物学开放实验室, 山东 青岛 266071)

(2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

关键词: 牙鲆; 淋巴细胞; 表面抗原; 绵羊红细胞受体; NK 细胞; T 细胞

中图分类号: Q26, S917 文献标识码: A

### Study on surface antigen of lymphocyte of *Paralichthys oliveaceus*

WU Ri-qin<sup>1,2</sup>, ZHANG Pei-jun<sup>1</sup>, XU Peng<sup>1,2</sup>, LI Jun<sup>1</sup>, XU Yong-li<sup>1</sup>

(1. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Qingdao 266071, China)

(2. Institute of Postgraduate, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

**Abstract:** To observe the surface microstructure features by using scanning electron microscope, and study the surface antigen on lymphocytes of *Paralichthys oliveaceus* by form rosette with sheep red blood cells and the cross-reactivity by using monoclonal antibody against human CD. Under scanning microscope, there are two kinds of lymphocytes, type I lymphocytes is characterized with being full of bumpiness and holes, the surface of type II lymphocytes is rather smooth with tiny finger like tubercle. The rosette formation of lymphocytes with sheep red blood cells is obvious however the rosette forming percents of lymphocytes is rather low, lower than 2%. The cross reactivity of lymphocytes with monoclonal antibody against human CD showed that there are 5.25%+0.38% of NK cells in peripheral lymphocytes of *Paralichthys oliveaceus*, and the CD25<sup>+</sup> percentage of lymphocytes is 5.25%+0.38%. No cross-reactivity with T-cell antigen, B-cell antigen and other activity antigen is found on the lymphocytes surface of *Paralichthys oliveaceus*.

**Key words:** *Paralichthys oliveaceus*; lymphocytes; surface antigen; sheep red blood cells receptor; NK cell; T cell

关于鱼类淋巴细胞的异质性的研究开始于 20 世纪 70 年代, 80 年代以后才利用抗 IgM 单克隆抗体证明硬骨鱼具有 T/B 样淋巴细胞<sup>[1-3]</sup>。鱼类的 T 淋巴细胞具有和哺乳动物 T 细胞相似的功能, 如: 对同种移植产生的排斥反应和细胞增殖反应。虽然鱼类的 T 样淋巴细胞还没有象哺乳动物那样建立起以表面多肽的单克隆抗体进行分离鉴定的 CD 系统, 但在硬骨鱼中已发现了编码 TCR 分子和 MHC 分子的基因, 随着 DNA 测序技术的迅速发展, 美国、法国和日本等国家的几个实验室<sup>[6-10]</sup>在 20 世纪 90 年代开展了鱼类 TCR 基因多样性和组织相容性抗原(MHC)在脊椎动物系统发育中进化关系的研究, 近年来发展的分子生物学技术和流式细胞仪等新技术的应用<sup>[11]</sup>, 为淋巴细胞的辨别和分离提供了有效的

收稿日期: 2002-09-03

资助项目: 国家“973”项目资助(G1999012003, G1999012006)

作者简介: 乌日琴(1973-), 女, 内蒙古呼和浩特人, 助教, 中国科学院海洋研究所实验海洋生物技术开放实验室博士研究生, 从事海洋动物发育生物学和比较免疫学研究。

通讯作者: 张培军(1944-), 男, 主要从事发育生物学研究。E-mail: pjzhang@ms.qdio.ac.cn

手段。本文主要阐述牙鲆淋巴与绵羊红细胞 E 花环形成反应和与人淋巴细胞表面抗原单克隆抗体交叉反应结果。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

实验用鱼共 10 尾, 体重 300~500 g。淋巴细胞分离液系上海华精生物科技有限公司产品, 密度为  $1.083\text{ g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。鼠抗人淋巴细胞表面抗原单克隆抗体为法国 Immunotech 产品, FITC 标记抗鼠 IgG 为法国 Immunotech 产品, 绵羊血液由青岛医学院动物实验室提供。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 绵羊红细胞(SRBC)悬液制备

无菌从绵羊颈静脉采血, 肝素抗凝,  $4^{\circ}\text{C}$  保存, 使用时用无钙、镁 Hank 氏液洗涤数次, 再用 Hank 氏液稀释为浓度为  $2 \times 10^8$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液。

#### 1.2.2 牙鲆淋巴细胞的分离及细胞悬液的制备

无菌采集牙鲆尾静脉血, 阿氏抗凝剂等体积稀释。抗凝血缓慢注入装有淋巴细胞分层液的试管中, 水平离心机(美国 Beckman 公司)离心,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $2000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ , 30min。吸取单个核细胞层细胞, 用无钙、镁 Hank 氏液洗涤数次, 再用 Hank 氏液稀释为  $2 \times 10^6$  个 $\cdot\text{mL}^{-1}$ 的细胞悬液。

#### 1.2.3 牙鲆血液淋巴细胞扫描电镜样品的制备

将上述制备细胞悬液离心, 加 2 倍体积的 2.5% 戊二醛固定,  $4^{\circ}\text{C}$  过夜, 1% 锇酸双固定, 酒精系列脱水, 醋酸异戊酯置换, 临界点干燥, 扫描电镜观察。

#### 1.2.4 牙鲆外周血淋巴细胞绵羊红细胞受体(CD2<sup>+</sup>表面抗原)检测

牙鲆淋巴细胞悬液 0.1mL 和体积 SRBC 悬液混匀, 加入 0.1mL 胎牛血清, 室温静置 15min, 低速离心( $500\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ ) 5min,  $4^{\circ}\text{C}$  放置 30min 测活性花环, 取出试管旋转摇匀细胞, 加等量 2.5% 戊二醛固定, 混匀,  $4^{\circ}\text{C}$  固定 15min。将固定的细胞悬液涂片, 干燥, 甲醇固定, 瑞氏染色, 水洗, 干燥, 光学显微镜油镜观察。另有部分试管  $4^{\circ}\text{C}$  过夜的, 测总花环, 方法同前。计数 200~300 个细胞, 凡结合 3 个以上绵羊红细胞(SRBC), 记为 E 花环形成细胞, 以下公式分别计算活性花环和总花环的成花率:

$$\text{成花率}(\%) = \text{成花淋巴细胞} / \text{计数淋巴细胞} \times 100$$

#### 1.2.5 牙鲆外周血淋巴细胞与鼠抗人淋巴细胞表面抗原单克隆抗体的交叉反应检测

无菌采集牙鲆外周血, 等体积阿氏抗凝抗凝, 分别检测以下细胞表型 T 细胞抗原: CD3、CD4、CD8、CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>-</sup>, B 细胞抗原: CD19, NK 细胞 CD3<sup>-</sup>/CD(16+56)<sup>+</sup>, 活化细胞表达抗原: CD3<sup>+</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>/CD25<sup>+</sup>、CD3<sup>-</sup>/HLA-DR<sup>+</sup>、CD3<sup>-</sup>/CD25<sup>+</sup>。每份待测样本, 100  $\mu\text{L}$  稀释血加 20  $\mu\text{L}$  经 FITC 标记的待测表面抗原的单抗, 旋转混匀 15min, 避光静置 1min, Coulter Q<sup>-</sup> prep 预处理机(美国)破碎红细胞, 35 个循环, 在 Coulter elite 型流式细胞仪(美国)上进行表面抗原分析, 以抗鼠 IgG1 作为阴性对照。

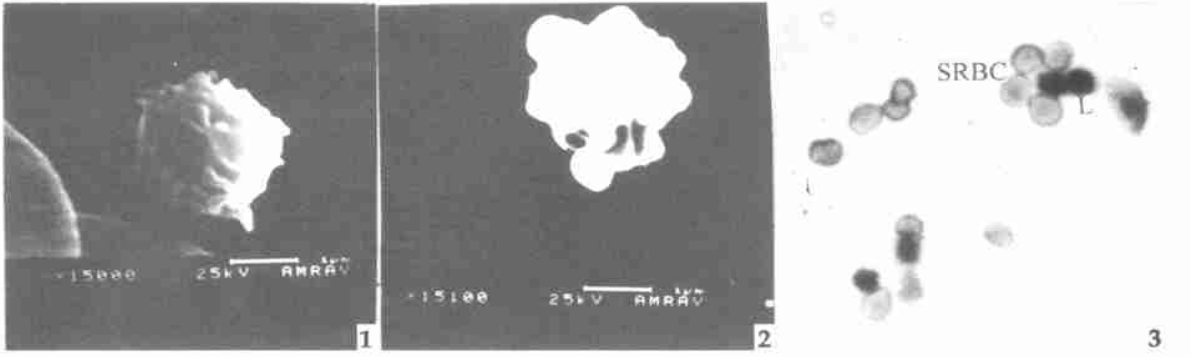
## 2 结果

### 2.1 牙鲆外周血淋巴细胞的扫描电镜观察

牙鲆的淋巴细胞是白细胞中较多的一类, 与其它鱼类的淋巴细胞相似, 牙鲆淋巴细胞略呈圆球形, 直径约为  $6.0\mu\text{m}$ , 核为圆形或肾形, 细胞质少。细胞表面有突起, 牙鲆淋巴细胞表面呈现程度不同的突起, 又可进一步分为 I 型细胞和 II 型细胞: I 型细胞表面有微绒毛, 多而且细长, 微绒毛基部与顶部直径一致(图版-1); II 型细胞突起排列杂乱, 表面凹凸不平(图版-2)。

### 2.2 牙鲆外周血淋巴细胞 E 花环形成的光镜观察

牙鲆外周血淋巴细胞总成花率低于 2%, 活性花环低于 1%, 虽然淋巴细胞的成环率较低, 但明显可见 SRBC 环绕淋巴细胞, 且常常有十几个 SRBC 围绕一个淋巴细胞形成花环的现象(图版-3)。



图版 Plate

1. 牙鲈 I 型淋巴细胞, B 样淋巴细胞; 2. 牙鲈 II 型淋巴细胞, T 样淋巴细胞; 3. 牙鲈淋巴细胞与绵羊红细胞的 E 花环反应。L: 牙鲈淋巴细胞 SRBC: 绵羊红细胞

1. Lymphocytes I of *Paralichthys olivaceus*, B-like lymphocytes; 2. Lymphocytes II of *Paralichthys olivaceus*, T-like lymphocytes; 3. The rosette formation of lymphocytes with sheep red blood cells. L: Lymphocytes of *Paralichthys olivaceus*; SRBC: Sheep red blood cell

## 2.3 牙鲈外周血淋巴细胞与鼠抗人淋巴细胞表面抗原单克隆抗体的交叉反应

牙鲈外周血淋巴细胞与鼠抗人淋巴细胞表面抗原单克隆抗体的交叉反应的检测结果见表 1。

表 1 牙鲈淋巴细胞与鼠抗人白细胞表面抗原交叉反应

Tab. 1 The cross reactivity of lymphocytes with monoclonal antibody against human CD

细胞表型 lymphocytes type	意义 represence	结果(%) results
T 细胞抗原 T <sup>+</sup> cell surface antigen	CD3	总 T 细胞(total T <sup>+</sup> cell)
	CD4	T 辅助/ 诱导细胞亚群(helper T <sup>+</sup> cell)
	CD8	T 抑制/ 细胞毒细胞亚群(cytotoxic T <sup>+</sup> cell)
	CD3 <sup>+</sup> /HLA <sup>-</sup> DR	静止 T 细胞(sleep T <sup>+</sup> cell)
B 细胞抗原 B <sup>+</sup> cell surface antigen	CD19	B 细胞 (B <sup>+</sup> cell)
	CD3 <sup>-</sup> /CD(16+56) <sup>+</sup>	自然杀伤细胞 (nature killer cell)
活化细胞表达抗原 activated lymphocytes surface antigen	CD3 <sup>+</sup> /HLA <sup>-</sup> DR <sup>+</sup> CD3 <sup>+</sup> /CD25 <sup>+</sup>	活化 T 细胞(activated T <sup>+</sup> cell)
	CD3 <sup>-</sup> /HLA <sup>-</sup> DR <sup>+</sup>	活化 B 细胞(activated B <sup>+</sup> cell)
	CD25 <sup>+</sup>	活化 T 细胞(activated T <sup>+</sup> cell)

## 3 讨论

据扫描电镜图谱显示, 哺乳动物 B 细胞表面的微绒毛多而且细长, 微绒毛基部与顶部直径一致, 而 T 细胞则表面凹凸不平, 本实验前期对牙鲈外周血淋巴细胞的扫描电镜观察牙鲈的 I 和 II 型淋巴细胞分别与上述哺乳动物 B 和 T 淋巴细胞形态极为相似。郭琼林<sup>[2]</sup>对草鱼淋巴细胞进行扫描电镜观察时, 认为从草鱼的淋巴细胞表面形态结构不能区分 T、B 淋巴细胞, 其细胞都比较光滑, 有小的锥状突起。相比而言, 牙鲈淋巴细胞形态分化和发育已与哺乳动物十分相似。

哺乳动物淋巴细胞发育成熟的不同阶段, 其细胞表面表达不同种类、抗原性质各异的糖蛋白, 在 T/B 细胞的不同发育阶段、T/B 细胞成熟分化后的静止期和活化期这些糖蛋白分子存在明显的差异, 它们赋予 T/B 细胞对抗原识别的特异性、与细胞因子的结合和胞浆内信息传递等多种功能的特异标志, 是研究细胞行使免疫功能的基础, 因此对细胞表面抗原的研究是现代免疫学研究的热点之一。在鱼类目前还没有报道利用其特异性表面标记制作单克隆抗体分离鉴定 T 淋巴细胞, 一般利用 T 细胞的功能特点或者制作抗 B 细胞表面 sIg 的单克隆抗体, 检测得到的阴性细胞为 T 淋巴细胞。针对白细胞表面分子的单克隆抗体是分离不同类型的白细胞的重要工具, 同样鱼类的单克隆抗体也极大的方便鱼类免疫系统的研究。目前鲑鳟类、斑点叉尾鲟、鲟鱼、草鱼和鲇鱼都已有单克隆抗体分离 T/B 样淋巴细胞<sup>[1-5, 13, 14]</sup>。

E 花环检测结果表明牙鲈外周血淋巴细胞表面有绵羊红细胞受体, 但具有绵羊红细胞受体的细胞在淋巴细胞中比例极少, 在哺乳动物中绵羊红细胞曾作为 T 淋巴细胞的表面标记在检测和分离 T 淋巴细胞, 但在硬骨鱼绵羊红细胞受体

显然不能作为 T 淋巴细胞的检测依据, 一些酶化学实验和单克隆检测结果表明硬骨鱼中 T 淋巴细胞占外周血的 50% ~ 70%<sup>[12, 15-17]</sup>。牙鲆外周血淋巴细胞活性 E 花环的成花率和与抗人 CD3 的单克隆抗体的交叉反应比例非常相似。本文实验利用抗人淋巴细胞的表面抗原抗体来检测鱼类淋巴细胞的表面抗原, 结果显示牙鲆外周血淋巴细胞与鼠抗人 CD25 和 NK 细胞单克隆抗体的交叉反应为阳性, CD25, 即 IL-2Ra 是 Bonnard 等人在体外培养的 CTC (human cultured T cell) 发现的, 目前的研究表明 CD25 主要在人或哺乳动物的成熟的活化 T 细胞细胞表达, 通常作为 T 细胞的活化指标, Legac 等<sup>[11]</sup>发现海星 (*Asterias rubens*) 的中轴器官淋巴细胞膜上也有 CD25 阳性交叉反应, 郭琼林<sup>[13]</sup>利用间接酶标免疫技术检测草鱼淋巴细胞 CD25 (IL-2R) 阳性率为 25%, 比牙鲆的 7% 更高。

哺乳动物 NK 细胞来源于骨髓, 与细胞毒性 T 淋巴细胞不同, 它没有特异性抗原受体, 能非特异性杀伤肿瘤细胞和病毒感染靶细胞, 其杀伤作用不受 MHC 分子限制, CD56 是 NK 细胞表面特有的标志, NK 细胞还表达低亲和性 IgG Fc 受体 (CD16), 也能定向杀伤与 IgG 抗体结合的靶细胞, 目前硬骨鱼还没有存在 IgG 免疫球蛋白的报道, 也没有有关分离 NK 细胞的报道, NK 细胞在机体早期抗病毒感染免疫过程中起重要作用, 尤其是鱼类的免疫应答时间较长, NK 细胞不受 MHC 分子限制, 也无需抗体参加和抗原预先致敏, 在牙鲆早期非特异性杀伤的免疫监视中所起的作用和 IgG Fc 受体 (CD16) 受体在牙鲆体内存在的意义值得探讨。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与哺乳动物 TCR 和 MHC 相关的基因片段<sup>[6-10, 19, 20]</sup>, 但目前还不能确定鱼类是否有类似 Ts 细胞和 Th 细胞的存在<sup>[21-24]</sup>。在对鱼类 MHC 分子研究中发现, 哺乳动物结合 CD4 和 CD8 分子的相应位点在鱼类也高度保守<sup>[25, 26]</sup>, 提示鱼类中有 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> 细胞。但牙鲆外周血细胞与抗人 CD4 和 CD8 单抗的交叉反应均为阴性, 可能是因为牙鲆杀伤性 T 细胞和辅助性 T 细胞表面抗原与人 T 细胞表面抗原的同源性很小, 牙鲆 T 细胞的分化程度不高, 虽然具有 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞功能, 但并没有分化的表面抗原加以区分。鱼类在免疫系统结构、免疫应答方式和 T 细胞作用机制等方面都有其独自的特点, 硬骨鱼类的免疫学, 尤其是 T 细胞免疫目前仍然是一新兴领域, 有待深入研究。

## 参考文献:

- [1] Lobb C J, Clem L W. Fish lymphocytes differ in the express of surface immunoglobulin [J]. Dev Comp Immunol, 1982, 6: 473-479.
- [2] Sizemore R G, Miller N W, Cuchens M A, et al. Phylogeny of lymphocyte heterogeneity: the cellular requirements for *in vitro* mitogenic responses of channel catfish leukocytes [J]. J Immunol, 1984, 133: 2920-2924.
- [3] Thuvander A, Fossum C, Lorenzen N. Monoclonal antibodies to salmonid immunoglobulin, characterization and applicability in immunoassays [J]. Dev Comp Immunol, 1990, 14: 415-423.
- [4] Secombes C J, van Groningen J J M, Egberts E. Separation of lymphocyte subpopulation in carp, *Cyprinus auratus* L. by monoclonal antibodies. immunohistochemical studies [J]. Immunology, 1983, 48: 165-175.
- [5] Navarro V, Quesada J A, Abad M E, et al. Immunocytochemical characterization of monoclonal antibodies to gilthead seabream *Sparus aurata* immunoglobulin [J]. Fish Shellfish Immunol, 1993, 3: 167-177.
- [6] Hordvik I, Jacob A L J, Charlemagne J, et al. Cloning of T-cell antigen receptor beta chain cDNAs from Atlantic salmon (*Salmo salar*) [J]. Immunogenetics, 1996, 45: 9-14.
- [7] Partula S, de Guerra A, Fellah J S, et al. Identification of cDNA clones encoding the T-cell receptor  $\beta$ -chain in the rainbow trout *Oncorhynchus mykiss* [J]. C R Acad Sci Paris Life Sci, 1994, 317: 765-770.
- [8] Partula S, de Guerra A, Fellah J S, et al. Structure and diversity of the T-cell antigen receptor  $\beta$ -chain in a teleost fish [J]. J Immunol, 1995a, 155: 699-706.
- [9] Partula S, de Guerra A, Fellah J S, et al. Identification and analysis of genes encoding TCR  $\alpha$ -chain in the rainbow trout [J]. The Nordic Symposium on Fish Immunology, Reykjavik, Iceland, 1995b, 153: 53-62.
- [10] 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.
- [11] Legac E, Vaugier G L, Bousquet F, et al. Primitive cytokines and cytokine in invertebrates: the sea star *Asterias rubens* as a model of study [J]. Scand J Immunol, 1996, 44(4): 375-380.
- [12] Guo Q L. Scanning electron microscope observation and sheep red blood cells receptor (CD2) analysis on grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* and Chinese soft-shelled turtle *Trionyx sinensis* [J]. J Fish China, 2000, 24(4): 349-353. [郭琼林, 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 [J]. 水产学报, 2000, 24(4): 349-353.]
- [13] Partula S. MAbs against rainbow trout immunoglobulins that were present on B cells were described in many teleostes surface markers of fish T-cells [J]. Fish Shellfish Immunol, 1999, 4: 241-257.
- [14] 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.
- [15] Albelli L, Picchiatti S, Romano N, et al. Immunohistochemistry of gut-associated lymphoid tissue of the sea bass *Dicentrarchus labrax* L[ J ]. Fish Shellfish Immunol, 1996, 6: 235-245.
- [16] Clem L W, et al. Evolution of lymphocyte subpopulations, their interactions and temperature sensitivities. In: Warr G W, Cohen N. ed. Phylogenesis of Immune Functions[M]. Boca Raton, Florida: CRC Press, 191-214.
- [17] Fournier-Betz V, Quentel C, Lamour F, et al. Immunocytochemical detection of Ig-positive cells in blood, lymphoid organs and the gut associated lymphoid tissue of the turbot (*Scophthalmus maximus*) [ J ]. Fish Shellfish Immunol, 2000, 10: 187-202.
- [18] Guo Q L. Identification of an interleukin-2 substance in splenocyte culture supernatant of grass carp, *Ctenopharyngodon idellus* and Chinese soft-shelled turtle *Trionyx sinensis* [ J ]. Acta Hydrobiol Sin, 2001, 25(1): 22-27. [ 郭琼林. 草鱼、中华鳖脾细胞培养上清液IL-2物质的检测 [ J ]. 水生生物学报, 2001, 25(1): 22-27. ]
- [19] Rast J P, Haire R N, Litman R T, et al. Identification and characterization of T-cell antigen receptor-related genes in phylogenetically diverse vertebrate species [ J ]. Immunogenetics, 1995, 42(3): 204-221.
- [20] Rast J P, Litman G W. T-cell receptor gene homologues are present in the most primitive jawed vertebrates [ J ]. Proc Acad Sci USA, 1994, 91: 9248-9252.
- [21] Miller N W, Ryczyn M A, Stude T B, et al. *In vitro* culture approaches for studying immune cell functions in ectothermic vertebrates. Dev Comp Immunol, 1994, 18(Suppl): S132.
- [22] Nakanishi T. Ontogenetic development of the immune response in the marine teleost *Sebastes marmoratus* [ J ]. Bull Jan Soc Sci Fish, 1986, 52: 473-477.
- [23] Nakanishi T. Effects of  $\alpha$ -irradiation and thymectomy on the immune response of the marine teleost *Sebastes marmoratus* [ J ]. Dev Comp Immunol, 1986, 10: 519-527.
- [24] Tatner F, Funderly C. Lymphocytes migration and localization patterns in rainbow trout *Onchorhynchus mykiss*, studies using the tracer sample method [ J ]. Fish Shellfish Immunol, 1991, 1: 107-117.
- [25] Hashimoto K, Nakanishi T, Kurosawa Y. Isolation of carp genes encoding major histocompatibility complex antigens [ J ]. Pro Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 6863-6867.
- [26] Hashimoto K, Nakanishi T, Kurosawa Y. Identification of a shark sequence resembling the major histocompatibility complex class I $\alpha$ 3 domain [ J ]. Pro Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 2209-2212.