

鱼类外周血淋巴细胞的分离技术

陈全震

(国家海洋局第二海洋研究所, 杭州 310012)

李亚南 邵健忠 毛树坚

(浙江大学生命科学院, 杭州 310012)

摘 要 通过对分离草鱼(*Ctenopharyngodon idella*)外周血淋巴细胞技术的探索,发现用相对体积质量为1.080~1.085的Ficoll-Urografin分层液可将草鱼外周血中淋巴细胞100%地分离出来,这对进一步研究鱼类淋巴细胞的结构、功能具有重要意义。同时测得草鱼各类血细胞的相对体积质量:淋巴细胞为 1.077 ± 0.002 ,粒细胞为 1.096 ± 0.003 ,红细胞为 1.111 ± 0.002 。

关键词 鱼类, 外周血, 淋巴细胞, 分离技术

淋巴细胞能为抗原所激活,产生相应的各种抗体和免疫因子,因此对淋巴细胞的研究是免疫学研究的中心。关于鱼类免疫学的研究已作过综述^[1],本文报道了分离鱼类外周血淋巴细胞的方法,以期建立一种可靠方便的鱼类免疫学研究技术。这对鱼类细胞免疫的机理、功能^[2,3]研究具有一定的实际意义。该项技术国外在80年代曾有过类似的报道^[4,5],而国内未曾见报道。

1 材料和方法

1.1 草鱼

体重500~1 000 g, 10尾,捕于杭州市郊池塘。

1.2 Ficoll-Urografin 分层液的制备

1.2.1 试剂 聚蔗糖溶液(polysucrose solution, 商品名Ficoll),浓度为40%;泛影葡胺(meglumine diatrizoate, 商品名Urografin),浓度为75%。抗凝剂为0.8%生理盐水配制的500 μ g/ml肝素溶液。

1.2.2 分层液 先用双蒸水将40%的Ficoll稀释成6%,用生理盐水将75%Urografin稀释至34%,然后将Ficoll液与Urografin液分别混合成相对体积质量为1.050,1.070,1.077,1.080,1.085,1.090,

1.100的分层液。

1.3 分离外周血中淋巴细胞

(1)准备有抗凝剂的试管,从草鱼尾动脉或心脏取血,用pH 7.2的Hank氏液将抗凝血稀释1倍。

(2)每一相对体积质量的Ficoll-Urografin分层液各取2 ml,分别置于15 ml尖头玻璃离心管中,用可调加液器取稀释血液,在分层液面上约1 cm处沿离心管壁缓缓加入,使稀释血液重叠于分层液面。稀释血液与分层液的体积比例为2:1。

(3)用水平离心转头离心(4 000 r/min) 30~60 min。

(4)选择能将血液中血浆及各类细胞分层清晰的样品,用可调加液器(精度1 μ l)小心吸出各层内容物(血浆和各类细胞),同时用电子天平(精度1 mg)进行精确称量,然后计算出各层的相对体积质量。

2 结果

2.1 分层液相对体积质量选择

相对体积质量为1.050,1.070,1.077,1.090和1.100的分层液不能将草鱼血液中的各类细胞分离开,而相对体积质量为1.080~1.085的分层液能非常有效地分离出淋巴细胞。淋巴细胞悬浮于血浆与

收稿日期:1998-03-23

分层液之间的界面层,呈白膜状(见图1)。

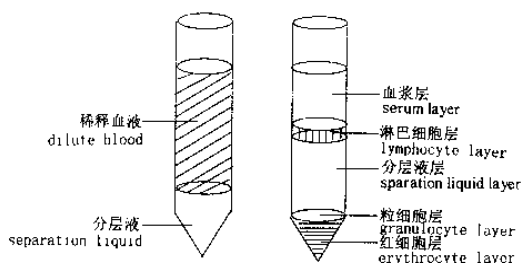


图1 用分层液分离淋巴细胞示意图

Fig.1 A sketch map showing separation of lymphocyte subpopulations with separation liquid

2.2 分层观察

分别观察血浆层、淋巴细胞层、粒细胞层、红细胞层及分层液所作的涂片:(1)血浆中仅有少量的破碎了的红细胞;(2)粒细胞层较薄,取样较难,易将红细胞吸入,所以在涂片中观察到颗粒细胞的同时,也能观察到不少的红细胞;(3)分层液中无任何细胞;(4)淋巴细胞层有淋巴细胞和少部分单核细胞,淋巴细胞与单核细胞的数量经观察统计,淋巴细胞占80%~95%,单核细胞占5%~20%。在每次分离细胞并计数淋巴细胞与单核细胞的同时,都用同批的外周血做血涂片观察作对照,统计外周血中的淋巴细胞与单核细胞的数量比例,结果都一致(表1)。各分离层液相对体积质量见表2。

表1 淋巴细胞层中淋巴细胞与单核细胞的数量比例

Table 1 Number ratio of lymphocytes to monocytes in the lymphocytes layer

实验序号 No.	统计淋巴细胞层200个细胞 statistics of 200 cells in lymphocytes layer		统计外周血中 200个核细胞 statistics of 200 leucocytes in blood
	淋巴细胞量/% lymphocyte	单核细胞量/% monocyte	淋巴细胞/单核细胞 lymphocyte/monocyte
1	85	15	85/15
2	95	5	95/5
3	80	20	80/20
4	89	11	89/11
5	85	15	85/15

表2 各分离层血液中血浆及各类细胞的相对体积质量

Table 2 The gravities of serum and other cells in the blood of all separation layers g/cm³

实验序号 No.	血浆层 serum layer	淋巴细胞层 lymphocyte layer	粒细胞层 granulocyte layer	红细胞层 erthrocyte layer
1	1.070	1.075	1.090	1.109
2	1.070	1.075	1.090	1.109
3	1.069	1.079	*	1.114
4	1.070	1.079	*	1.109
5	1.070	1.079	1.100	1.113
6	1.070	1.075	*	1.113
7	1.068	1.080	*	1.109
8	1.069	1.075	1.100	1.115
9	1.072	1.075	1.100	1.109
10	1.070	1.080	*	1.109
平均值 mean	1.070	1.077	1.096	1.111
标准差 S.D	±0.001	±0.002	±0.003	±0.002

* 由于粒细胞层太薄,取样困难而未测。Unmeasured because the granulocyte layer is too thin to be sampled

3 讨论

(1) 为了研究淋巴细胞的异质性及功能的需要,国外在80年代就有人从事鱼类外周血的淋巴细胞分离工作。Sakai^[4]用18% Ficoll液分离鳙、金鱼的淋巴细胞,得到98%的淋巴细胞。Blaxhall^[5]用Ficoll-paque或Percoll梯度离心法分离鲑、鲤外周血中淋巴细胞,同时^[6]对用Percoll连续梯度离心分离出来的鱼外周血淋巴细胞层进行酸性脂酶及酸性磷酸酶的细胞化学研究,证明有70%的反应为阳性,与哺乳类动物中的T淋巴细胞酶化学相似。分离淋巴细胞技术的要点,主要是所得细胞的纯度与得率,其次是使用技术的操作是否简便。前人所有的方法各有优缺点。本文用Ficoll-Urografin为分离介质,经过各种不同相对体积质量的试验,在相对体积质量1.080~1.085的分离液中,可以看到血液中各类组成被清晰的分层。血浆层相对体积质量最小,在血浆层与分离液之间是淋巴细胞层,在分离液之下才是粒细胞层和红细胞层。血液层与分离液层中经检测,无淋巴细胞。因此可以认为淋巴层集中了血液中的全部淋巴细胞。但与哺乳动物外周血淋巴细胞分离有所不同,对哺乳动物只需用相对体积质量为1.077的Ficoll-Urografin就能将其外周血中淋巴细胞分离出来^[7]。

(2) 镜检淋巴细胞层中的细胞,淋巴细胞占80%~95%,另有5%~20%是单核细胞。这个比例与外周血液涂片镜检的结果相一致,因此也进一

步证明使用相对体积质量 1.080~1.085 的 Ficoll - Urografin 分离介质所得到的淋巴细胞总数基本没有损失,得率达到 100%。但是淋巴细胞与单核细胞的比例,随着每次实验草鱼的状态不同有所差别,说明鱼体随着环境或免疫状态的不同而外周血中各种免疫细胞的数量有所差别^[8~12]。

(3)在实际操作时,分离效果的好坏还与环境温度有关。当环境温度高于 20℃ 时,由于红细胞易破碎,加上离心力的作用,分离时会有大量的红细胞碎片进入各分离层中,导致淋巴细胞层不清晰。因此,在夏季操作时,应在室温低于 20℃ 的环境下进行分离操作。

参 考 文 献

- 1 李亚南,陈全震,等. 鱼类免疫学研究进展. 动物学研究, 1995, 16 (1):83~94
- 2 李亚南,陈全震,等. 草鱼外周血淋巴细胞体外转化诸因素的研究. 海洋与湖泊, 1996, 27(4):380~385
- 3 Verlhac V, Sage M, Deschaux P. Cytotoxicity of carp (*Cyprinus carpio*) leucocytes induced against TNT - modified autologous spleen cells and influence of acclimatization temperature. Comp Immunol, 1990, 14(4):475~480
- 4 Sakai D K. Separation of lymphocytes from the peripheral blood of rainbow trout, goldfish. Bull Jap Sci Fish, 1981, 47(10):1,281~1,288
- 5 Blaxhall P C. The separation and cultivation of fish lymphocytes. Fish Immunology, 1985a. Symposium on Fish Immunology, Plymouth, UK, 11~13 Jul 1983, 245~260
- 6 Blaxhall P C, Hood K. Cytochemical enzyme staining of fish lymphocytes separated on a percoll gradient. J Fish Biol 1985b, 27(6):749~755
- 7 陶义训,章谷生. 临床免疫学检验, 上海:上海科学技术出版社, 1983
- 8 朱心玲,贾丽珠,张明英. 草鱼血液学的研究 I, 九项血常规数的周年变化. 水生生物学报, 1985, 9(3):245~257
- 9 Peters G, Schwarzer R. Changes in hemopoietic tissue of rainbow trout under influence of stress. Dis Aquat Org. 1985, 1(1):1~10
- 10 Ellsaesser C F, Clem L W. Haematological and Immunological changes in channel catfish stressed by handling and transport. J Fish Biol. 1986, 28(3):511~521
- 11 Maule A G, Schreck C B. Changes in numbers of leukocytes in immune organs of juvenile coho salmon after acute stress cortisol treatment. J Aquat Anim Health. 1990, 2(4):298~304
- 12 江育林,李 燕,于 平. 草鱼免疫应答的初步研究. 水生生物学报, 1991, 15(4):321~326

The separation of lymphocyte from peripheral blood of fish

Chen Quanzhen

(Second Institute of Oceanography, SOA, Hangzhou 310012)

Li Yanan Shao Jianzhong Mao Shujian

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

Abstract The separation of lymphocytes from peripheral blood of grass carp was performed with the mixture of Ficoll - Urografin solution. The results showed that about 100 percent of the lymphocytes was isolated with the mixture at density from 1.080 to 1.085. The mixture was made from 6% Ficoll and 34% Urografin. The observation of serum layer, lymphocyte layer, granulocyte layer, erythrocyte layer and layering solution layer showed that (1)there were only a few broken erythrocytes in the serum; (2) the granulocyte layer was too thin to be sampled; (3) there was no cell in the layering solution layer; (4)in the lymphocyte layer the lymphocytes made up 80%~91%, and the monocytes made up 5%~20%. The densities of some kinds of cells in the blood of all separation layers were: lymphocyte 1.077 ± 0.002 , granulocyte 1.096 ± 0.003 , erythrocyte 1.111 ± 0.002 and serum 1.070 ± 0.001 . This separating technique can be used to study the structure and function of fish lymphocytes.

Key words fish, peripheral blood, lymphocyte, technique of separation