

文章编号:1005-8737(2001)02-0028-04

鲫、草鱼外周血中淋巴细胞和单核细胞 对鲤血管内皮细胞的粘附

吴 康, 蔡春芳, 倪建国, 王永玲, 朱 国

(苏州大学 生命科学院水产系, 江苏 苏州 215151)

摘 要:借鉴哺乳动物内皮细胞体外培养技术,结合鱼类细胞自身特点,纯化培养鲤血管内皮细胞并传至3代,以此作为粘附材料。应用淋巴细胞分离液离心技术并结合玻璃粘附法分离纯化鲫、草鱼外周血中淋巴细胞、单核细胞,并与上述3代内皮细胞进行免疫粘附试验,同时进行免疫粘附动力学观察。结果显示,鲫、草鱼两类细胞对内皮细胞的粘附率分别为: 0.09 ± 0.013 , 0.20 ± 0.018 ; 0.11 ± 0.015 , 0.21 ± 0.023 。表明鲤科鱼类不同种的同类细胞粘附率差异不大,而同种不同类细胞则差异显著。动力学观察分析表明,淋巴细胞粘附较快,60 min 进入平台期;单核细胞粘附慢,120 min 进入平台期。初步证明鱼类内皮细胞具有免疫介导作用。

关键词:鲤;内皮细胞;体外培养;鲫;草鱼;淋巴细胞;单核细胞;粘附

中图分类号:Q959.468

文献标识码:A

内皮细胞(Endothelial cells, EC)是血液和组织之间的主要屏障,具有重要的生理和免疫功能,白细胞对内皮细胞的粘附在细胞免疫系统传入及传出途径中起着至关重要的作用^[1,2]。免疫介导的关键是免疫识别,而免疫粘附是免疫识别重要的指征。研究内皮细胞与免疫细胞的粘附对于进一步探索内皮细胞免疫功能具有重要的指导意义。国内在这方面作了许多工作,并在哺乳动物内皮细胞上发现了免疫因子受体^[2],而对于冷血动物的鱼类,有关血管内皮细胞免疫功能研究报道较少。本试验在鲤血管内皮细胞体外培养成功基础上^[3],采用淋巴细胞分离技术得到纯化的淋巴细胞、单核细胞,并与其进行免疫粘附试验,为探讨鱼类内皮细胞的免疫功能提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

收稿日期:2000-08-18

作者简介:吴 康(1965-)男,讲师,硕士,从事鱼病学基础研究。

2龄鲫、草鱼、鲤均购于苏州吴县养殖总场。成年雄性大白鼠购于苏州医学院动物房。50 ml 细胞培养瓶,24孔细胞培养板(Nunc产品)。淋巴细胞分离液购于中国科学院上海细胞研究所。WAG因子购自上海血液研究所。

1.2 方法

1.2.1 鲤血管内皮细胞的培养与传代 鲤血管内皮细胞的培养与传代按吴康等^[3]的方法进行。2代后,消化种植于鼠尾胶原^[4]包被24孔培养板中,3代培养至单层,后用于粘附试验。

1.2.2 鲫、草鱼外周血中淋巴细胞、单核细胞的制备 无菌取2龄鲫、草鱼外周抗凝血(含500 $\mu\text{g}/\text{ml}$ 肝素)2 ml, Hanks 1~2倍稀释,缓慢加至含1/2体积淋巴细胞分离液离心管中(不破坏分离液与血液界面),3 000 r/min 离心30 min。取二液界面的外周血单个核细胞 PMNC (Peripheral mononuclear cells),培养液悬浮 PMNC,少许计数,按 $1 \times 10^6 \text{ cm}^{-2}$ 种植于1%明胶(Sigma,不含内毒素)包被50 ml 培养瓶中,粘附2 h后,分离淋巴细胞和单核细

胞^[4], 将该两类细胞按一定浓度悬浮培养液中。

1.2.3 淋巴细胞与单核细胞对内皮细胞的粘附

纯化后的淋巴细胞、单核细胞, 按 5×10^5 /孔加至长满内皮细胞单层 24 孔培养板中, 28℃ 分别哺育 30、60、90、120、180 min 后, 以 Hanks 液浸洗 3 次单细胞单层, 除去未粘附的淋巴细胞、单核细胞。在余留细胞孔中各加 0.2 ml 0.25% 胰酶(1:250, H 产) - 0.02% EDTA(TE), 28℃ 消化, 并在倒置显微镜下观察其消化程度, 待绝大多数细胞收缩变圆后(消化 5~8 min), 加培养液(0.3 ml/孔)中和 5 min, 吹打分散成单细胞悬浮液。用 Wright - Giemsa 双染计数并计算其粘附率(染色后, 淋巴细胞大小不均一, 直径 5~8 μm , 为单核深染, 核球比为 1:1.1; 单核细胞大小均一, 直径 13~14 μm , 单偏核深染, 核球比为 1:2; 内皮细胞大小均一, 直径 21~22 μm , 少数单

核, 多数多核, 核较小, 根据形态大小区分 3 类细胞)。

2 结果

2.1 内皮细胞、淋巴细胞、单核细胞

内皮细胞经原代及传代后, 各代次细胞增殖数见表 1。2 代细胞经血凝 VⅢ RAG 因子鉴定内皮细胞纯度达 90%, 转接 24 孔板后生长旺盛, 并呈鹅卵石样, 见图版 I - 1, 符合粘附试验标准。在处理鲤、草鱼外周血中(各 5 份), 分离的单个核细胞经形态观察发现, 红细胞及多核细胞混入率低于 1%, 符合试验要求。草鱼 PMNC 在细胞瓶中分布见图版 I - 2, 粘附于细胞瓶壁上单核细胞见图版 I - 3。两种鱼的淋巴细胞、单核细胞平均数见表 2。

表 1 不同代次内皮细胞平均增值数

Table 1 Average growth numbers of endothelial cells in each generation		$\times 10^4 \text{ cm}^{-2}$						
代次 Generation	瓶数 Bottle nos.	培养天数/d Cultured days						
		0	1	2	3	4	5	6
原代 Primary culture	2	2.52	2.63	2.83	3.11	5.32	10.43	16.17
1 代 1st generation	4	4.21	7.32	20.11	36.43	47.32	50.23	-
2 代 2nd generation	5	6.35	13.25	1.24	43.53	51.24	54.32	-

表 2 鲤、草鱼的淋巴细胞、单核细胞平均数

Table 2 Average numbers of lymphocytes and mononuclear cells in the gold fish and grass carp				$\bar{X} \pm \text{SD}$
试验鱼 Species	血样份数 Blood samples	淋巴细胞数/ mm^{-3} Lymphocytes nos.	单核细胞数/ mm^{-3} Mononuclear cells	
鲤 Gold fish	5	11 280 $\pm$ 661	3 582 $\pm$ 71	
草鱼 Grass carp	5	9 422 $\pm$ 79	3 357 $\pm$ 44	

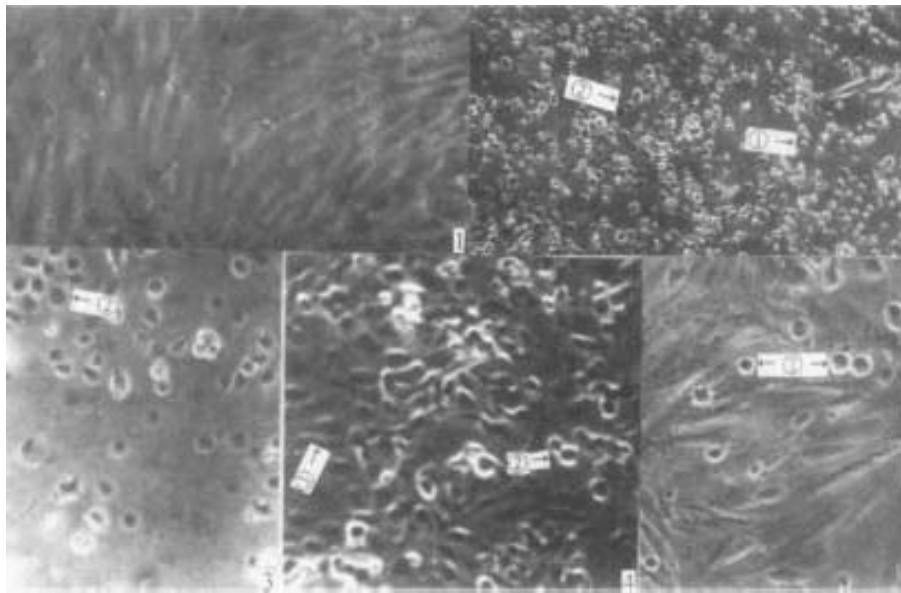
2.2 淋巴细胞与单核细胞对内皮细胞的粘附

在已经长满 3 代内皮细胞的 24 孔板中, 按每排

孔粘附 1 种鱼的 1 种细胞, 每种细胞重复 6 孔, 共处理 5 块板, 处理后, 按 30、60、90、120 和 180 min 各取 1 块计算粘附率, 草鱼两类细胞粘附见图版 I - 4, 5, 各类细胞在不同时间粘附率见表 3, t 检验分析, 两种鱼的淋巴细胞、单核细胞差异不显著, 鲤、草鱼的两类细胞在平台期(180 min; 120 min)差异极显著 $P < 0.01$ (t 分别为: 11.87, 10.21; 7.87, 8.43)。表明两种鱼中同类细胞粘附率差异不大, 而同种不同类细胞差异显著。两类细胞中, 淋巴细胞粘附速度较快, 60 min 进入平台期, 单核细胞速度慢, 120 min 进入平台期。

表 3 每种细胞在不同时间粘附率

Table 3 Adhesive rate of cells in different adhesion time		$\bar{X} \pm \text{SD}$				
粘附细胞 Adhesive cell	重复孔数 Hole replicates	粘附时间/min Adhesion time				
		30	60	90	120	180
草鱼淋巴细胞 Lym. of grass carp	6	0.06 $\pm$ 0.011	0.11 $\pm$ 0.015	0.11 $\pm$ 0.013	0.11 $\pm$ 0.021	0.10 $\pm$ 0.019
草鱼单核细胞 Mono. of grass carp	6	0.04 $\pm$ 0.008	0.10 $\pm$ 0.021	0.13 $\pm$ 0.018	0.21 $\pm$ 0.023	0.20 $\pm$ 0.022
鲤淋巴细胞 Lym. of gold carp	6	0.05 $\pm$ 0.010	0.09 $\pm$ 0.013	0.09 $\pm$ 0.015	0.08 $\pm$ 0.017	0.08 $\pm$ 0.016
鲤单核细胞 Mono. of gold carp	6	0.05 $\pm$ 0.007	0.08 $\pm$ 0.006	0.14 $\pm$ 0.016	0.20 $\pm$ 0.018	0.19 $\pm$ 0.021



图版 I Plate I

1. 3 代鲤内皮细胞, $\times 300$ 。Endothelial cells of 3rd generation common carp.
 2. 草鱼外周血单个核细胞, $\times 100$ 。Peripheral blood mononuclear cells of grass carp.
 3. 贴壁的草鱼单核细胞, $\times 250$ 。The mononuclear cells of grass carp adhering to the bottle.
 4. 草鱼单核细胞粘附内皮细胞, $\times 250$ 。The mononuclear cells of grass carp adhering the endothelial cells of grass carp.
 5. 草鱼淋巴细胞粘附内皮细胞, $\times 450$ 。The lymphocytes cells of grass carp adhering to the endothelial cells of grass carp.
- ①草鱼淋巴细胞 Lymphocytes of grass carp; ②草鱼单核细胞 Mononuclear cells of grass carp; ③内皮细胞 Endothelial cells.

3 讨论

(1) Jaffe^[5]的研究证明,培养的人静脉内皮细胞表面具有表达白细胞抗原特性,使得内皮细胞具有主动参与器官移植排异反应和抗原信号传递以及免疫辅助细胞作用。吴金莺等^[2]报道了内皮细胞表面有 CD4 和 CD8 淋巴细胞分化抗原表达。这些研究提示,内皮细胞不再是一种被动的血管壁上的覆盖物,它在体内免疫系统中通过与免疫作用细胞之间的相互联系而参与机体内的平衡、炎症反应和免疫应答等作用,特别通过移植免疫排斥反应的研究揭示血管内皮细胞表面 HLA 抗原表达。张晓峰^[6]通过人的 PMNC 不同亚群对 PAEC 粘附,认为内皮细胞是活体延缓性异种排斥反应中单核细胞—自然杀伤细胞(简称 NK)的靶细胞,而鱼类的内皮细胞体外活体模型尚未建立。内皮细胞是否存在主动参与器官移植排异反应和抗原提呈以及免疫辅助细胞的作用未见正式报道,因而作者通过同科异种的内皮细胞与免疫细胞粘附得出了与哺乳动物内皮细胞相似的结果,为今后开展鱼类内皮细胞免疫功能的研究

提供基础资料。

(2) 要获得满意试验效果,必须有高纯度,性能稳定的内皮细胞单层培养物,内皮细胞与鱼类其他细胞培养条件基本相似,但有其特点:①必须用细胞选择性强胶原酶消化血管^[8]。这样处理,混入成纤维细胞少,生长旺盛,利于克隆。②须用基底膜支持,才能良好的贴壁生长。用 2% 鼠尾胶原可获得满意效果。③内皮细胞生长须内皮细胞生长因子(ECGF)支持。我们参照张惕等^[9]方法,用鲤下丘脑提取液代替 ECGF 获得了满意效果。此外,获得纯度高、活力强的淋巴细胞、单核细胞也是试验成功的关键。淋巴细胞分离液作离心垫离心,将红细胞、多核细胞(体积质量均大于 1.077 g/ml)和 PMNC 分开。进而通过其粘附性,可将 PMNC 中单核细胞和淋巴细胞分离,玻璃瓶壁包被 1% 明胶,可大大缩短单核细胞 TE 洗脱时间,提高其活力。鱼类 PMNC 不同亚群分离纯化鉴定工作是水生动物免疫学基础研究的重要组成部分,其基础相对薄弱,有待于作进一步的探索。该试验中也发现,粘附于内皮细胞上的淋巴细胞大多数可能为小淋巴细胞,是否是医学

界提到 NK 细胞也有待于作进一步的证实。

(3) 凝血酶和纤溶酶通路对于保持循环系统内环境恒定有重要的作用。血管内血栓的病理性形成和溶解是与一定数量的致命性急性炎症相伴随的,血管内皮是这两种相互作用通路的焦点。内皮细胞能分泌凝集蛋白酶和纤维溶解蛋白酶,这些酶与它们的底物在内皮细胞表面发生作用。内皮细胞的体外培养成功使体内的凝血纤维蛋白溶解系统以及相互作用物质的研究前进了一步,因而鱼类血管内皮细胞体外模型的建立和免疫功能研究,也为今后深入开展鱼类急性传染病出血机制的研究提供了广阔的前景。

致谢:本文得到沈颂东博士,潘新法高级实验师的指导及刘长贵、李明老师的图片制作协助,在此表示谢意。

参考文献:

[1] 盛民立. 血管内皮细胞与疾病[M]. 上海:上海医科大学出版

社,1993.

- [2] 吴金莺, 盛民立. 人脐静脉内皮细胞表面血型 ABO 抗原, HLA 抗原, CD 抗原表达特性[J]. 细胞生物学杂志, 1992, 14(3): 122-124.
- [3] 吴 康, 薛明强, 吴海琴, 等. 鲤血管内皮细胞分离培养及初步鉴定[J]. 水生生物学报, 2001, 25(2): 174-178.
- [4] 郭 征. 组织培养技术[M]. 第 2 版. 北京: 人民卫生出版社, 1983. 63-64.
- [5] 巴德年. 当代免疫学技术与应用[M]. 北京: 北京医科大学中国协和医科大学联合出版社, 1998. 157-159.
- [6] Jaffe E A. IFN- γ and IFN- α induce the expression and synthesis of leu13 antigen by cultured human endothelial cell[J]. Journal of Immunology, 1989, 143: 3 961.
- [7] 张晓峰, 冯志民, 丰美福, 等. 人外周血单核细胞不同亚群对猪内皮细胞的粘附作用[J]. 科学通报, 1999, 44(22): 2 419-2 422.
- [8] 王 毅, 朱佩芳, 王正国. 内皮细胞培养中清除成纤维细胞的新方法[J]. 细胞生物学杂志, 1991, 13(2): 46-49.
- [9] 张 惕, 金慰芳, 朱涵能, 等. 人血管内皮细胞生长因子的提取及活性测定[J]. 细胞学杂志, 1992, 14(2): 75-78.

Adhesion of lymphocytes and mononuclear cells of peripheral blood in grass carp and gold fish to artery endothelial cells in common carp

WU Kang, CAI Chun-fang, NI Jian-guo, WANG Yong-ling, ZHU Guo

(Department of Aquaculture, Life Sciences College, Suzhou University, Suzhou 215151, China)

Abstract: Using the technique of endothelial cell (EC) culture in vitro in mammal, the artery endothelial cells were cultured and subcultured to the 3rd generation and this 3rd-generation artery EC was used as an adhesive material. The lymphocytes and mononuclear cells were isolated from the blood of grass carp and gold fish with the techniques of lymphocytes separation solution and glass adhesion. The endothelial cell adhesion was tested and a kinetic analysis was conducted. The results showed that the adhesive rate of lymphocytes and mononuclear cells in grass carp and gold fish were 0.11 ± 0.015 , 0.21 ± 0.023 and 0.09 ± 0.013 , 0.20 ± 0.018 , respectively. There were apparent differences between the 2 different cells in adhesive rates, but no evident differences between the 2 fishes. Adhesion of lymphocytes(60 min) was faster than that of mononuclear cells(120 min). Also, the immunity reaction of artery endothelial cells was primarily testified.

Key words: common carp; endothelial cells; culture in vitro; gold fish; grass carp; lymphocytes, mononuclear cells; adhesion