

用Et花环法和酯酶染色法测定免疫前后猪血液中T淋巴细胞的比较试验*

欧阳琨 张 玲 赵晓初

(西北农学院兽医系)

摘 要

用总玫瑰花环(Et花环)法和酯酶染色法分别测定了同窝7头幼龄猪,在用猪瘟疫苗免疫前测定了7份血样的T淋巴细胞(TL),又在免疫后测定了35份,结果表明:平均绝对值分别为 6.06千/mm^3 和 5.48千/mm^3 ,平均百分率分别为37.33%和32.72%。Et花环法测定的TL平均绝对值和平均百分率均高于酯酶染色法。两种方法所测定的42份血样的TL绝对值配对统计有显著差异($P < 0.05$)。作相关性检验呈非常显著的正线性相关($r = 0.8323$, $P < 0.001$)。两种方法在免疫后测定的TL绝对值分别与免疫前测定的TL数配对统计,均有显著差异。这种差异在Et花环法维持到免疫后的第24天,在酯酶染色法维持到免疫后的第48天。TL绝对值的最高峰值均出现在免疫后的第8天。

前 言

动物的TL值是检查机体细胞免疫力的一项重要指标,检测TL可以评价家畜的细胞免疫水平,研究迟发型变态反应、免疫缺陷病及某些传染病。国内外兽医界已开始重视细胞免疫方面的研究。检测动物TL的方法主要有Ea花环、Et花环、EAC花环、酯酶染色法、荧光抗体法、酶标抗体法、SPA花环和荧光SPA花环等。本文用Et花环和酯酶染色法检测了7头猪在用猪瘟疫苗免疫前后42份血液样品的TL值,目的在于比较Et花环法和酯酶染色法,并评价猪瘟疫苗免疫前后的TL水平。

材 料 和 方 法

一、材料

血液样品: 自同窝7头当地土种猪(5月龄开始)前腔静脉采血(每头1 ml),加肝素抗凝。

1.5%绵羊红细胞: 自绵羊颈静脉采血,加肝素抗凝,用Hank's液洗涤3次(每次2000转/分洗10分钟),最后用Hank's液配制1.5%绵羊红细胞悬液,4℃保存。

* 本文收到日期:1985年1月26日。

细胞营养液: 国产1640粉1.04克溶于无离子水100毫升中,用适量5%NaHCO₃调至PH7.2,过滤除菌后加入20%灭活犊牛血清,分装于小瓶中冻存储用。亦可用含0.5%水解乳蛋白及20%灭活犊牛血清的Hank's液。

淋巴细胞分离液。

福尔马林—丙酮缓冲液: Na₂HPO₄·12H₂O 0.1克、KH₂PO₄ 0.5克溶于无离子水150毫升中,再加入丙酮225毫升,40%甲醛125毫升,混合过滤,4℃保存备用。

六偶氮副品红溶液: 副品红4克加入100毫升2NHC1中,水浴温热溶解。

2%α-醋酸萘酯溶液: α-醋酸萘酯2克溶于100毫升乙二醇单甲醚中,4℃避光保存。

应用染色液的配制:

(1) 取新配制的4%亚硝酸钠溶液,逐滴加入等量的副品红溶液中,边加边搅拌,颜色由红逐渐变棕黄,最后变为淡黄,再震荡约1分钟。

(2) 取2%α-醋酸萘酯溶液2.5毫升,逐滴加入PH7.6M/15磷酸缓冲液89毫升中,边加边搅拌,由无色逐渐变为乳白色。

将(1)液逐滴加入(2)液内,最后为琥珀色细粒沉淀的溶液,表面似有一薄层油脂,用滤纸过滤,并调节pH至5.6—5.8,4℃保存备用。

二、方法

1. Et花环法

取血液1毫升加等量Hank's液,混匀后,缓慢加于盛有2毫升淋巴细胞分离液上,使成两层,3000转/分离心30分钟。吸出中部呈云雾状的一薄层淋巴细胞,用Hank's液悬浮,以2500转/分离心洗涤三次,每次10分钟。最后一次洗涤后,吸去上清液,加细胞营养液2滴(约0.1ml),轻轻摇匀后,再加入1.5%绵羊红细胞2滴,轻轻混匀,于37℃水浴中作用5分钟,取出以500转/分离心5分钟,置4℃过夜。次日,取出加2.5%戊二醛溶液1滴,固定15分钟,随后轻轻摇匀,取1滴于载玻片上作成薄涂片,凉干,用美兰染色液或瑞特氏染色液染色,镜检200个淋巴细胞,凡结合三个以上绵羊红细胞者,判为玫瑰花形成细胞(T淋巴细胞)。计算出每份血样的TL百分率。按常规法计数每份血液样品的TL绝对值(千/mm³)。

2. 酯酶染色法

固定: 加福尔马林—丙酮缓冲液于已干燥的血片上,固定1分钟,自来水冲洗3分钟,蒸馏水冲洗1分钟,吹干。

染色: 将固定后的血片浸于应用染色液中,37℃水浴2—3小时,自来水冲洗3分钟,蒸馏水冲洗1分钟,吹干。再用1%甲基绿复染2—3分钟,吹干。

镜检: 用油镜检查,细胞内有1—2个以上的黑红色颗粒,或有弥散的黑红色细点状者,判为T淋巴细胞。每份样品检查200个淋巴细胞,计算出TL的百分率。

按常规法计算每份血样的TL绝对值(千/mm³)。

3. 1983年9月10日给每头试验猪颈部皮下注射猪瘟兔化弱毒疫苗(2头份)。

结 果

7头猪不同时期（包括免疫前后）的42份血液样品用Et花环法测定的TL平均绝对值为6.064千/mm³，平均百分率为37.33；用酯酶染色法测定的TL平均绝对值为5.479千/mm³，平均百分率为32.73。Et花环法测定的数值均高于酯酶染色法。以42份样品两种方法测定的TL绝对值（千/mm³）按配对统计，两种方法有显著差异（ $P<0.05$ ）。但两种方法测定的TL绝对值作相关性检验，呈强正线性相关（ $r=0.8328, P<0.001$ ）（见图1）。

Et花环法和酯酶染色法在用猪瘟疫苗免疫前后所测得的TL绝对值（千/mm³）有

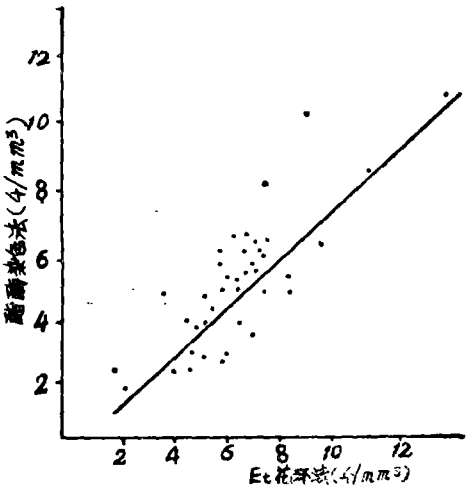


图1 两种方法TL值的相关性

两种方法测定猪免疫前后血液中的T淋巴细胞水平（千/mm³）

方法	免疫	测定时间	样品数	范 围*	均数±标准差*	P值**
Et花环法	前	9月8日	7	2.089-6.381	4.559±1.349	
	后	9月18日	7	5.169-12.764	6.293±2.759	$P<0.001$
		9月28日	7	5.732-8.623	6.690±1.012	$P<0.05$
		10月6日	7	5.660-6.670	6.180±0.400	$P<0.05$
		10月15日	7	3.564-5.474	4.769±0.640	$P<0.5$
		10月28日	7	1.736-7.349	4.738±2.012	$P>0.5$
酯酶染色法	前	9月8日	7	1.574-3.440	2.597±0.572	
	后	9月18日	7	5.778-13.388	9.158±2.884	$P<0.001$
		9月28日	7	5.322-6.835	6.182±0.589	$P<0.001$
		10月6日	7	4.778-8.528	5.918±1.355	$P<0.001$
		10月15日	7	3.654-6.116	4.504±1.348	$P<0.05$
		10月28日	7	2.467-6.660	4.488±1.285	$P<0.05$

* 为7头猪42次不同时期测定的统计数值。 ** 按配对实验以免疫前为对比统计的数值。

显著差异(见上表)。根据配对实验统计的数值,用Et花环法在免疫后各次测定的TL绝对值与免疫前相比,T淋巴细胞水平明显升高(9月18日: $P < 0.001$; 9月28日: $P < 0.05$; 10月6日: $P < 0.05$),并维持到10月6日(免疫后的第24天)。同样按配对实验统计,用酯酶染色法在免疫后测定的TL同免疫前的相比,TL水平差异非常显著(9月18日、9月28日和10月6日: $P < 0.001$; 10月15日和10月28日: $P < 0.05$),这种差异一直维持到免疫后的第48天(见上表)。

根据两种方法在免疫前后不同时期测定的TL均数所作的折线图(见图2)可以明显地看出,用猪瘟疫苗免疫后TL水平的最高峰值在9月18日(免疫后的第8天),随后逐渐下降。

讨 论

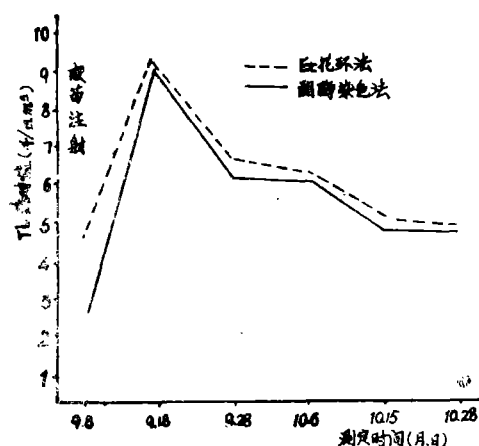


图2 Et花环法和酯酶染色法各时期测定的T淋巴细胞均值比较

由于实验条件和方法不尽相同,两种方法测定的TL值或者是用同一种方法不同实验室测定的TL值有高低,这是允许的,各实验室可以根据自己的试验条件制定相应的标准。Kapnytb (1982) 等认为Et花环法是测定猪T淋巴细胞较好的方法,朱凤麟根据自己临床检验经验觉得酯酶染色法优于Et花环。我们的实验结果虽然两种方法测定的数值有显著差异,但用相关显著性检验证明,两种方法均可以正确地反映机体内的T淋巴细胞水平。酯酶染色法用量很少,操作简便,易行,适于临床普遍应用。

我们尚未见到在猪用猪瘟疫苗免疫前后血液中T淋巴细胞水平变化的报道。Chauhan等(1983)用火鸡疱疹疫苗等免疫雏鸡,发现在免疫后的雏鸡的T淋巴细胞值与对照组相比明显升高。我们认为,研究动物体内的T淋巴细胞水平和细胞免疫反应,对进一步了解某些疾病的免疫和发病机理以及诊断和治疗问题、以及评价疫苗的免疫效果,无疑是有重要意义的。

参 考 文 献

- [1] 汪美先等:《免疫学基础》,1981,256—259。
- [2] 林学颜:《免疫学基础》,1979,170—173。
- [3] 林秉诚等:《西北农学院学报》,1982, No. 1, 43—48。
- [4] 侯西庚等:《西北农学院学报》,1981, No. 2, 71—74。
- [5] 周玉英等:《中国兽医杂志》,1981, Vol. 7, No. 8, 27—28。

- [6] 朱凤麟:《上海免疫学杂志》, 1983, Vol. 3, No. 2, 77.
- [7] KapnyTb, H.M., BeTePIHapИЯ, 1982, No.12, 29—31.
- [8] Shimizu, L.C.Pan, et al., Am.J.Vet.Res, 1976, Vol.37, No. 3, 309-315.
- [9] Chauhan, H.V.S., et al., Br.Vet.J., 1983, Vol.139, No.1, 6—14.
- [10] Remond, M., et al., Vet.Bull., 1982, Vol.52, No. 9, 721.

The Comnarative ExPeriment of the Determination of T Lymh Cells in Swine Blood After and Before the Immunization by Means of Et Method and Esterase

Staining Method

CuYang kun Zhang Lin Zhao Xiaochu

(The Veterinary Department, Northwestern College of Agriculture)

Abstract

T lymph cells (TL) of 7 blood samples of 7 piglets of the same litter immunized before hog cholera vaccine and those of 35 blood samples of the same piglets immunized after hog cholera vaccine were determined by means of Et method and the esterase staining method. Results obtained from the experiment showed that the average absolute value was 6.06 thousand/mm³ and 5.48 thousand/mm³ respectively, and the average percentage was 37.33% and 32.72% respectively. TL average absolute value determined by Et method was higher than that determined by the esterase staining method. TL absolute value of 42 blood samples determined by the two methods was the pairing statistics with their difference of ($P < 0.05$). The corretation test appeared to be very obvious positive linear correlation ($R = 0.8323$, $P < 0.001$). TL absolute value determined by the two methods after immunization was TL numbers in pairing statistics determined before immunization with the obvious difference. This difference remained to the 24th day after immunization with Et method and to the 48th day after immunization with the esterase staining method. However, the highest peak value of TL absolute value appeared in the 8th day after immunization.