

# CD58 对猪 PBMC 转化的作用

靳亚平<sup>1</sup> 王爱华<sup>1</sup> 肖俊杰<sup>1</sup> 王文科<sup>2</sup>

(1 西北农业大学动物医学系, 陕西杨凌 712100; 2 陕西省畜牧兽医研究所, 陕西咸阳 712039)

**摘要** 应用 MTT 比色法, 测定了由 SRBC 膜及 PRBC 膜提取的 CD58 对猪 PBMC 转化的影响。结果证明, 两种 CD58 成分均能显著提高 PHA-P 对 PBMC 的激活作用 ( $P < 0.01$  或  $P < 0.05$ ), 单独应用也表现出对 PBMC 的活化效应, 且上述作用具有剂量依赖性。CD58 浓度达  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  时作用最强 ( $P < 0.05$ ), 超过该浓度则活化作用减弱, 其作用的规律与 RBC 一致。比较分析表明, 猪源 CD58 在最佳剂量时, 单独刺激作用或对 PHA-P 诱导的 PBMC 转化的协同作用均显著大于绵羊源 CD58 ( $P < 0.05$ ), PRBC 的协同刺激作用也大于 SRBC。

**关键词** 猪, 红细胞, CD58, 淋巴细胞, 转化

**中图分类号** S852.43

CD58 是 CD2 的天然配体, 广泛分布于红细胞 (RBC) 及其他多种组织细胞和血小板上<sup>[1]</sup>, 在动物及人的血液中尚存在游离的 CD58<sup>[2]</sup>。试验证明, 表达于绵羊红细胞 (SRBC) 及人 RBC 上的 CD58 具有重要的生物学功能, 它与 CD2 的相互作用是 E-玫瑰花环形成和淋巴细胞经旁路激活的分子基础之一<sup>[3,4]</sup>, 对 T 细胞 CD2 的表达有重要的调节作用, 同时伴有 T 细胞表面一系列其它受体的改变<sup>[5]</sup>。本文进一步研究了游离 CD58 对猪外周血单个核细胞 (PBMC) 活化的影响, 旨在为全面了解 T 细胞活化过程中红细胞的作用, 以及体液中游离 CD58 在免疫调节中的功能提供依据。

## 1 材料和方法

**动物** 绵羊由西北农业大学实验动物中心提供; 猪购自当地市场 1~3 月龄健康杂种猪 4 头。

**主要试剂与仪器** RPMI1640 (Gibco, 美国); PHA-P (华美公司); MTT (SERVA, 美国); 96 孔细胞培养板 (Gibco); 510 型酶标比色计 (上海第三分析仪器厂)。

**RBC 及 CD58 制备** 无菌采集静脉血, 肝素抗凝, 分装于灭菌试管静置 60 min 或 500 r/min 离心 5 min, 取沉淀 RBC 以 PBS 洗涤 3 次, 取部分以完全 RPMI1640 培养液 (CM, 含丙酮酸钠  $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , HEPES  $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 2-巯基乙醇  $0.05 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ , 犊牛血清  $100 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 配成  $250 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  的悬液。其余 RBC 按文献[8]所述方法制备 CD58, 经纯化后, 冷冻干燥,  $-20^\circ\text{C}$  保存。

**猪 PBMC 转化的测定** 从猪心脏或前腔静脉无菌采血, 肝素抗凝, 经常规密度梯度离心获 PBMC, 无  $\text{Ca}^{2+}$ 、 $\text{Mg}^{2+}$  Hank S 液洗涤 3 次, 以 CM 调整浓度至  $1 \sim 5 \times 10^6$  个/mL,

按 0.1 mL/孔加入 96 孔细胞培养板, 再加入 PHA-P 应用液(含  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  PHA-P 的 CM), 同时, 以加入 CM 孔作为阴性对照, 各作 3 个重复孔, 每孔总量为 0.2 mL, 含 PHA-P 孔中 PHA-P 终浓度为  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 于  $37^\circ\text{C}$ ,  $50 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{CO}_2$ , 饱和湿度条件下培养 66 h, 取出; 各孔吸弃 0.05 mL 培养液, 加入 MTT 应用液(含  $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  MTT 和  $50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  葡萄糖的 PBS 液) 0.05 mL, 继续培养至 72 h, 终止培养, 分别吸出各孔细胞悬液, 离心, 弃上清, 继之分别加入 0.6 mL 含  $40 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 的异丙醇溶液, 充分吹打, 于 510 型酶标比色计上, 以 550 nm 作为检测波长, 660 nm 作为参考波长, 测定 OD 值。

CD58 及 RBC 对猪 PBMC 转化的影响之测定 按 1.2.2 的方法, 以单独加入 PHA-P 为阳性对照, 以 CM 作为阴性对照, 设 RBC 组; RBC+ PHA-P 组; CD58 组; CD58+ PHA-P 组为试验组。各组依 RBC 或 CD58 作 4 个浓度梯度, 每一浓度设 3 个重复孔, 含 PHA-P 各孔中 PHA-P 终浓度为  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ , 各孔总量为 0.2 mL。终止培养后, 测定 OD 值, 按下式计算刺激指数(SI):

$$SI = \frac{\text{试验孔 OD 值}}{\text{阴性对照孔 OD 值}}$$

## 2 结 果

### 2.1 源于 SRBC 的 CD58(sCD58) 和 SRBC 对猪 PBMC 转化的影响

sCD58 和 SRBC 在一定浓度范围内, 对 PHA-P 诱导的 PBMC 转化有协同作用, 两者单独加入, 表现出一定程度的诱导效应, 且其作用具有剂量依赖性, 同时表现出相似的作用趋势(图 1)。显著性检验表明, sCD58 和 SRBC 浓度分别为  $2.5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$  和  $0.625 \text{ mL} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 两者均对 PHA-P 诱导的 PBMC 转化有显著协同作用( $P < 0.05$ ), sCD58 单独应用的刺激效应与试验用量的 PHA-P 诱导的转化无显著差异( $P > 0.05$ )。值得注意的是, 当 SRBC 浓度达  $62.5 \text{ L} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 对 PHA-P 诱导的转化有显著的抑制作用( $P < 0.05$ )。

### 2.2 猪 CD58(pCD58) 及其 RBC(PRBC) 对猪 PBMC 转化的作用

测定不同浓度猪异体 CD58(apCD58) 和 RBC(apRBC) 对 PHA-P 诱导的 PBMC 转化的影响以及单独应用时, PBMC 活化的诱导效应与 SRBC 及 sCD58 的作用一致, 见图 2。

同样条件下, 猪自体 CD58(spCD58) 及其 RBC(spRBC) 对自身 PBMC 转化的影响, 与异体 CD58 及 RBC 的作用之间无显著差异( $P > 0.05$ ), 见表 1, 表 2。

表 1 自体(s)和异体(a)pCD58 引起 PBMC 转化的比较(SI)

组 别	试验次数 (n)	CD58 浓度 ( $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ )			
		0.625	1.25	2.5	5
PHA-P+ spLFA-3	4	$1.9 \pm 0.1$	$2.4 \pm 0.03$	$3.1 \pm 0.03$	$2.9 \pm 0.14$
PHA-P ± apLFA-3	4	$1.8 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.1$	$2.9 \pm 0.17$	$2.7 \pm 0.02$
spLFA-3	4	$1.5 \pm 0.1$	$1.9 \pm 0.0$	$2.2 \pm 0.1$	$2.1 \pm 0.01$
aLFA-3	4	$1.5 \pm 0.1$	$2.0 \pm 0.1$	$1.9 \pm 0.1$	$1.9 \pm 0.02$

注: GI,  $\bar{X} \pm SD$ 。

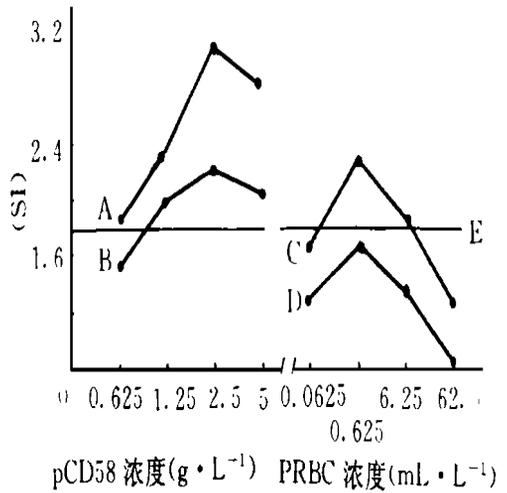
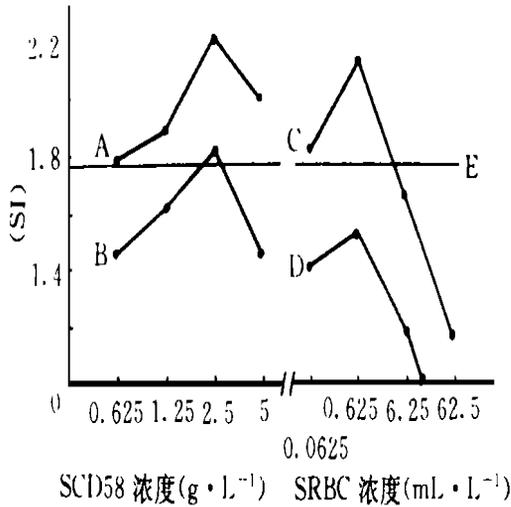


图 1 sCD58 及 SRBC 引起猪 PBMC 转化的作用

图 2 pCD58 及 PRBC 引起猪 PBMC 转化的作用

A. sCD58+ PHA-P; B. sCD58;

A. pCD58+ PHA-P; B. pCD58;

C. SRBC+ PHA-P; D. SRBC; E. PHA-P

C. PRBC+ PHA-P; D. PRBC; E. PHA-P

表 2 自体(s)和异体(a)PRBC 引起 PBMC 转化的比较(SI)

组 别	试验次数 (n)	RBC 浓度 ( $\times 10^{-1}$ mL $\cdot$ L $^{-1}$ )			
		0.625	6.25	62.5	625
PHA-P+ spRBC	4	1.64 $\pm$ 0.01	2.3 $\pm$ 0.01	1.9 $\pm$ 0.01	1.4 $\pm$ 0.01
PHA-P $\pm$ apRBC	4	1.7 $\pm$ 0.01	2.1 $\pm$ 0.02	1.7 $\pm$ 0.02	1.3 $\pm$ 0.02
spRBC	4	1.2 $\pm$ 0.1	1.6 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.02	0.3 $\pm$ 0.1
apRBC	4	1.3 $\pm$ 0.1	1.7 $\pm$ 0.1	1.3 $\pm$ 0.1	0.8 $\pm$ 0.1

注: GI,  $\bar{X} \pm SD$ .

### 2.3 sCD58 和 SRBC 与 pCD58 和 PRBC 作用的比较

在最佳剂量下, pCD58 单独刺激作用和对 PHA-P 诱导的 PBMC 转化的协同作用均显著大于 sCD58 ( $P < 0.05$ ), PRBC 对 PHA-P 诱导的 PBMC 转化的协同作用也大于 SRBC ( $P < 0.10$ ), 但二者单独应用则无显著差异 ( $P > 0.05$ )。

## 3 讨 论

许多研究表明<sup>[0,3]</sup>, SRBC 与人外周血淋巴细胞(PBL)结合,可使其对亚适剂量植物凝集素的增殖反应显著增强, Sigfussion 等<sup>[6]</sup>则进一步证实,自体 RBC 也具有类似作用。本试验证明,一定浓度的 SRBC 和 PRBC 加入猪 PBMC 培养系统后,均可显著提高 PHA-P 对 PBMC 诱导的转化作用;单独加入也具有引起 PBMC 转化的效应。这与上述研究结果相一致。同时,本试验证明,RBC 对 PBMC 的作用具有剂量依赖性,超过一定的剂量,反而抑制淋巴细胞的转化。

本研究证明,游离态的 CD58 同样具有对 PHA-P 诱导的 PBMC 转化的协同作用,其本身也表现出对 PBMC 的刺激效应,且其作用的规律与 RBC 一致,表明 CD58 是 RBC 促进 PBMC 转化的分子基础之一,其作用的发挥不依赖 RBC 膜的完整性。同时表明,CD58

与 CD2 类似, 在生物进化上具有很大的保守性。而 sCD58 及 pCD58 对猪 PBM C 刺激强度上的差异又部分反映了不同动物间 CD58 在功能或与 CD2 亲和力上的差异。

对于 CD2 生物学研究表明<sup>[7]</sup>, 该分子作为一种体液因子与膜 CD2 的作用不尽相同, 膜 CD2 通过与 SRBC、自身 RBC 或针对几种 CD2 表位的单抗共同作用, 传递激活信号, 而体液中游离态 CD2 则表现出对淋巴细胞活化的抑制活性。本试验表明, CD58 无论存在于 RBC 膜或呈游离态, 均表现出活化 T 细胞的活性, 提示 CD58 可能作为一种免疫正调节因子和 CD2 共同作用, 发挥着调节免疫平衡的重要作用, 这一点, 与本研究同期和以前的研究结果<sup>[2,8]</sup>一致。

本试验同时证明, CD58 可在无特异抗原的存在下, 直接引起 PBM C 转化, 即这种活化作用不具有 MHC 的限制性。推测 CD58 在生理条件下可能参与胸腺细胞的早期发育, 以及目前对其活化机制尚不清楚的  $\gamma\delta$ T 细胞的活化。关于这一点, 正在进行进一步研究。

### 参 考 文 献

- 1 Krensky Alan M, Sanchez-Madrid Francisco, Robbins Elizabeth, *et al.* The Functional significance, distribution, and structure of LFA-1, LFA-2 and LFA-3. *J Immunol*, 1983, 131(3): 611
- 2 肖俊杰, 陈得坤. 猪血清中天然 LFA-3 存在的探讨. *畜牧兽医学报*, 1994, 25(2): 180
- 3 Meuer S C, Hussey R E, Fabbi M, *et al.* An alternative pathway of T-cell activation. *Cell*, 1984, 36: 897
- 4 金伯泉主编. 细胞与分子免疫学. 西安: 世界图书出版公司, 1995
- 5 Lin J. 抗-CD2 单克隆抗体诱导受体变化——CD2 和 CD3 的相互作用. *国外医学——免疫学分册*, 1997, 20(4): 224
- 6 Gabriel. The interaction of CD2 with its ligand expressed by antologous erythrocytes results in enhancement of B cell responses. *Cellular Immunol*, 1988, 116: 308
- 7 郭 波. CD2 基因结构与功能. *国外医学——免疫学分册*, 1992(5): 240
- 8 王爱华, 靳亚平, 孙联辉等. LFA-3 在新城疫免疫中的促进作用. *中国兽医科技*, 1997(2): 28

## Activation of Pig PBM C Induced by CD58

Jin Yaping<sup>1</sup> Wang Aihua<sup>1</sup> Xiao Junjie<sup>1</sup> Wang Wenke<sup>2</sup>

(1 Department of Veterinary Science, Northwest Agriculture University, Yangling, Shaanxi 712100)

(2 Shaanxi Institute of Veterinary and Animal Sciences, Xianyang, Shaanxi 712039)

**Abstract** The effects of CD58 from SRBC (sCD58) and pig RBC (PRBC) on proliferation response of pig PBM C are determined by using MTT colorimetric assay. The results show that the CD58 from different animals and in different forms has the most significant or significant coordinating effects on the PHA-P inducing proliferation response of pig PBM C ( $P < 0.01$  or  $P < 0.05$ ) and can also induce the PBM C proliferation response independently. The effect is similar to SRBC and PRBC, and has dose dependence as well, the best density of CD58 being 2.5 mg/mL. The results also indicate that the coordinating effect of pig CD58 and PRBC on the PHA-P inducing pig PBM C proliferation response is higher than that of sheep CD58 and SRBC ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ).

**Key words** pig, erythrocyte, CD58, PBM C, proliferation