

猪 T 淋巴细胞两种检测方法的探讨

林秉诚 张守信 黄群山 尚文博

(西北农学院畜牧兽医系)

摘 要

本文通过 E—玫瑰花环试验和酸性酯酶染色法,对80头肥育猪进行了 T 淋巴细胞的检测,其结果玫瑰花环试验的百分率为 27.69 ± 7.857 ,绝对值 2188.99 ± 902.5 个/ mm^3 ;酯酶染色法 39.27 ± 8.79 ,绝对值 $3119.79 \pm 1249.65/\text{mm}^3$ 。它们均差异极显著 ($p < 0.01$)。对其中41头去势公猪及21头去势母猪用两种方法同时检查,结果无显著差异 ($P > 0.05$)。

免疫学的研究已经证实,淋巴组织具有免疫系统的功能活动,在淋巴组织中,按淋巴细胞表面标志和功能不同而分为 T 淋巴细胞和 B 淋巴细胞两大群。在细胞免疫中, T 淋巴细胞起着主要作用。因此,检测 T 淋巴细胞的数量和分布,有助于了解一些疾病的发病机理和免疫反应机理,为防治疾病提供依据。

1970年 Coombs 发现人的部分淋巴细胞在适当条件下能与绵羊红细胞形成玫瑰花环。1971年 Lay 等人鉴定出 T 淋巴细胞上存在着一种绵羊红细胞受体,即 E 受体。羊红细胞是通过 E 受体吸附到淋巴细胞膜上。由于 E 受体只存在于 T 细胞上,所以 E 受体是 T 细胞的特异表面标志。

1975年 Mueller, J 提出了一种改良的细胞酯酶染色法来识别 T 细胞。1978年 Ranki 等人相继通过细胞电泳、双标记等方法,进一步证实了 Mueller, J 的见解。认为在处于静止状态的成熟 T 细胞中酸性乙酸— α —萘酯,酯酶的话性较高,它能水解乙酸— α —萘酯,产生 α —萘酚和乙酸,然后 α —萘酚与付品红偶联形成棕红色产物,于是在酯酶存在部位呈现棕红色颗粒,是区别 T 细胞和 B 细胞简便而可靠的标志。并可用于某些疾病的诊断。

目前,国内外对于畜禽玫瑰花环形成试验和酸性酯酶染色法尚处于试验阶段。方法条件都不一致,因而测得的 T 淋巴细胞的数值也不完全相同。为此,我们用这两种方法检测屠宰肥育猪的 T 细胞,以进行比较,探讨体外检测猪 T 细胞的简便、可靠、快速的方法,同时为防治猪病提供依据。

材 料 和 方 法

一、试验动物

杨陵地区屠宰场收购的肥育杂种猪, 体重 95.7 ± 34.2 公斤, 均已阉割。取白细胞值在正常范围的80头猪进行正式试验。牧医系动物房饲养的健康公绵羊一只。

二、E—玫瑰花环试验(以下简称E花环试验)

1. 试剂

肝素	无钙镁汉克斯液
3%明胶溶液	2.5%戊二醛
红细胞保存液	细胞营养液

2. 试验方法

① 绵羊红细胞悬液的制备

自颈静脉采绵羊血, 每毫升血加入20单位肝素抗凝。将等量的红细胞保存液加入绵羊血中。置4℃冰箱保存, 可供两周内使用。临用前吸取保存液底部的红细胞, 用Hanks液离心洗涤三次。前两次各以1500转/分离心4分钟, 末次以2000转/分离心10分钟。弃去上清液, 将管底的红细胞压积用营养液配成0.4%的悬液, 约含有红细胞数为 $5 \times 10^7/\text{ml}$ 。

② 白细胞的采集

于屠宰猪时采血, 每毫升血加入20单位肝素抗凝, 取猪血2.0ml于10ml试管内, 加入3%明胶溶液1.0ml, 混匀后于37℃水浴中静置45分钟, 然后吸取上层血浆和白细胞的混合物于另一试管中, 以2000转/分离心10分钟, 弃去上层血浆, 向管内加入0.4ml细胞营养液, 配成约含白细胞数为 $10^5/\text{ml}$ 的悬液。

③ E花环形成试验

吸取白细胞悬液0.4ml, 加入等量的0.4%绵羊红细胞悬液, 混匀后于37℃水浴中静置10分钟, 再以500转/分离心5分钟, 随后置4℃冰箱两小时或过夜, 然后弃去上层液, 管底约留0.3ml, 轻摇混匀, 继则加入2.5%戊二醛0.1ml, 混匀后再置4℃冰箱中20分钟以上, 吸取一滴放载玻片上涂片, 干燥后用HE染色法染色。

3. 镜检

凡淋巴细胞表面附有三个或三个以上的绵羊红细胞者, 记录为E花环试验阳性反应。在油镜下每张片子计数200个淋巴细胞, 计算出花环形成率。

三、非特异性酸性酯酶染色法(以下简称酯酶染色法)

1. 试剂

固定液: 甲醛—丙酮缓冲液

应用染色液: (临用时用下列试剂配制)

2%乙酸— α —萘酯溶液

4%付品红溶液

4%亚硝酸钠溶液(临用时配)

磷酸缓冲液(M/15. pH7.6)

1%甲基绿复染液

2. 试验方法。

取 E 花环试验中所采集的白细胞悬液一滴涂片。自然干燥后，立即浸入固定液中固定 30 秒至 1 分钟。取出用流水冲洗至无甲醛气味为止。干燥后浸入应用染色液中，37℃ 水浴箱中染色 1 小时，取出冲洗，待彻底干燥后用 1% 甲基绿复染 2—3 分钟。冲洗干燥。

3. 镜检

酯酶染色阳性的细胞浆内，多数为 1—2 个棕红色颗粒，有的为斑块状，还有弥散型。在油镜下每张片子计数 200 个淋巴细胞，计算出酯酶染色阳性率。

结 果

一、E 花环试验和酯酶染色法测定 80 头肥育猪 T 淋巴细胞，其结果见表 1。

表 1 肥育猪 T 淋巴细胞测定结果

项 目	E 花 环 试 验		酯 酶 染 色 法		P 值
	平 均 值	标 准 差	平 均 值	标 准 差	
检 出 率	27.69	7.86	39.27	8.79	<0.01
绝 对 置	2188.99	902.5	3119.79	1249.65	<0.01

注：表中 P 值用 t 检验（以下同）。

从表中可以看出，E 花环试验的检出率低于酯酶染色法，两者差异极显著（ $P < 0.01$ ）。E 花环试验检出的猪 T 细胞绝对值亦低于酯酶染色法，差异极显著（ $P < 0.01$ ）。两种方法检出率的分布情况见表 2，图 1 和图 2。

二两种方法检测阉割猪，结果在公、母猪之间差异不显著（ $P > 0.05$ ），见表 3。

表 2 80 头肥育猪 T 淋巴细胞检出率分布表

方 法	检 出 率 的 分 布									
	10—	15—	20—	25—	30—	35—	40—	45—	50—	55—
E 花环试验	2	12	19	18	13	11	5			
酯酶染色法			4	8	14	17	21	7	4	6

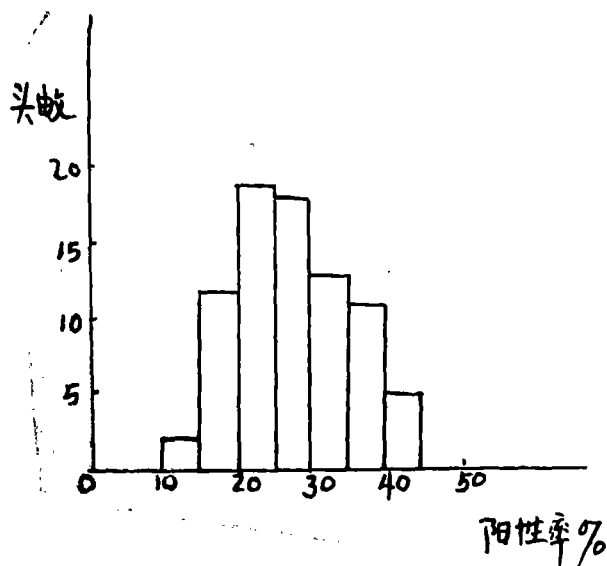


图1 E花环试验检出率分布图

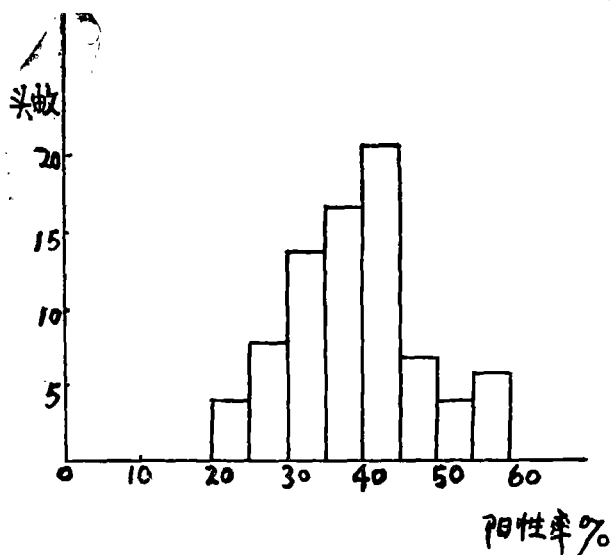


图2 酯酶染色法检出率分布图

表3 41头去势公猪和26头阉割母猪T细胞检出率

方 法	去 势 公 猪 组		阉 割 母 猪 组		P 值
	平 均 值	标 准 差	平 均 值	标 准 差	
E花环试验	29.63	6.75	26.50	9.32	>0.05
酯酶染色法	39.61	8.03	38.74	7.37	>0.05

小 结 与 讨 论

已经证明,红细胞受体为T淋巴细胞表面的特异标志。因此,E—玫瑰花环试验亦是测定T淋巴细胞的特异性方法之一。

酸性 α -萘酯酶,在静止的成熟淋巴细胞中的活性较高,但在单核细胞和各种淋巴细胞亚群中均可能有其活性,特别是处于激活状态的部分B细胞,也可能显示 α -萘酯酶活性,会干扰T细胞的测定。然而,B细胞的酯酶活性较弱,必须延长染色时间,才能呈现阳性反应。可见该法是一种非特异性的检测方法。但只要使实验条件标准化,检测结果基本上可以反映T淋巴细胞在体内的变化趋势。

猪T淋巴细胞E玫瑰花环检出率为 $27.69 \pm 7.86\%$,酯酶染色法为 $39.27 \pm 8.77\%$,两者差异极显著($P < 0.01$)。这种差异是因为试验方法不一导致结果不一致。另外我们从80头肥育猪中,查出两种方法测得值有相平行关系的为41头,占总数的51.25%。其余尚无规律性。

根据白细胞计数、白细胞分类计数和T细胞检出率,可以测定T细胞的绝对值。我们试验的结果,E玫瑰花环试验为 2188.99 ± 902.5 个/ mm^3 ,非特异性酸性酯酶染色法为 3119.79 ± 1249.65 个/ mm^3 ,两者差异极显著($P < 0.01$)。在某种情况下T淋巴细胞百分率增减是由于T细胞绝对值的增减还是由于其它细胞群的增减而引起的相对数的变化,是需要加以区别的。因此,用T细胞的绝对值和T细胞的检出率来反映机体的免疫状态,可能比只用T细胞的检出率更有意义。

我们比较了阉割公、母猪之间的T细胞检出率,结果表明,不论是E花环试验还是酯酶染色法,对阉割后的公母猪来说,T细胞的检出率无明显差异($P > 0.05$),说明阉割后公、母猪之间细胞免疫水平差异不显著。

E花环试验需要绵羊红细胞、操作繁杂,而且花环易受某些因素影响发生脱落,重复性差。但该试验特异性强,是测定T细胞的可靠方法之一,适合于实验室条件较好的单位使用。而酯酶染色法,不仅可染血涂片,而且可染组织切片;酯酶不致因涂片所破坏,酶促反应易完成、操作简单、结果稳定,是一种简便而快速的检测法。但应强调该实验条件的标准化,基层单位均可在临床上试用。

参 考 文 献

1. Brain P. et al: Rosette formation by peripheral lymphocytes. Clin. Exp. Immunol. 6: 681 1970.
2. Mueller J. et al: Nonspecific acid esterase activity: a criterion for differentiatin of T and B lymphocytes in mouse lymph nodes. Eur, J, Immunol. 5: 270, 1975.
3. Ranki A, et al: Identification of resting human T and B lymphocytes by acid α -naphthyl acetate esterase staining Combined with rosette

formation with *Staphylococcus aureus* strain cowan 1. *Scand. J.*

Immuno. 5 : 1129, 1976.

4. Ranki A, et al: Nonspecific esterase activity in human lymphocytes, histochemical Characterization and distribution among major lymphocyte Subclasses. *Chin Immunol Immunopathol* 10 : 47, 1978.
5. 汪美先: 《免疫学基础》, 第四军医大学, 1979, 12。
6. 林学颜: 免疫学基础, 1979年。
7. T淋巴细胞酯酶染色法在连续观察小鼠末梢血的应用, 《免疫学》, 1981年第一卷第四期。
8. 侯西庚等: 末梢血涂片T淋巴细胞非特异性酸性酯酶染色法对67例2—3月龄健康猪T淋巴细胞正常值的测定, 《西北农学院学报》2, 71—74, 1981。