犬红细胞培养上清液对淋巴细胞增殖转化的影响

张佩君[1],白丽丽[2],乔 琦[2],陈德坤[2]
(1 陕西省教育学院 生物系,陕西 西安 710061;
2 西北农林科技大学 动物科技学院,陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 无菌采取犬血、肝素抗凝、分离出红细胞,制备不同浓度的红细胞悬液,接种 24 孔板中进行培养,在培养不同时间分别收集红细胞培养上清液,采用淋巴细胞增殖转化试验,检测其单独及协同不同丝裂原(PHA-P、ConA 和 LPS)对犬淋巴细胞增殖转化的影响,淋转结果用 MTT 法测定。结果显示,无论单独或是协同不同丝裂原(PHA-P、ConA 和 LPS),红细胞培养上清液对淋巴细胞均有明显的促增殖转化作用($P<0.05$);单独及协同丝裂原 PHA-P、ConA 和 LPS 刺激淋巴细胞时,红细胞浓度分别为 1×10^8,1×10^8,5.0×10^7 和 1×10^8 mL^{-1},培养时间分别为 56,72,56 和 72 h 的红细胞培养上清效果最佳。表明,犬红细胞培养上清液对犬淋巴细胞的增殖转化有明显的促进作用。

[关键词] 犬;红细胞培养上清液;淋巴细胞转化增殖试验;MTT 法
[中图分类号] R392.9 [文献标识码] A [文章编号] 1671-9387(2007)04-0051-04

Effects of canine erythrocyte cultural supernatants on promoting canine lymphocyte proliferation

ZHANG Pei-jun[1], BAI Li-li[2], QIAO Qi[2], CHEN De-kun[2]
(1 *Department of Biology, Shaanxi Educational College, xi'an, Shaanxi* 710061, *China*;
2 *College of Animal Science and Technology, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi* 712100, *China*)

Abstract: To understand the way of erythrocyte in regulation lymphocyte proliferation, different concentration canine erythrocytes were cultured and its supernatants were obtained in different cultural time. Then, these supernatants were added into canine lymphocyte cultural systems, and the lymphocyte proliferation was detected by MTT essay. The results show that canine erythrocyte supernatants can promote canine lymphocyte proliferation. For cultural supernatant of canine erythrocyte only and stimulating with different mitogens(PHA-P, ConA, LPS), the best level combinations to activate canine lymphocytes proliferation are 1×10^8, 1×10^8, 5.0×10^7 and 1×10^8 mL^{-1} canine erythrocyte separately, corresponding with canine erythrocyte culture time 56, 72, 56 and 72 h. The results indicate that the effects of canine erythrocyte cultural supernatants on promoting canine lymphocyte prolifeeration is significant.

Key words: canine; erythorcyte cultural supernatant of erythrocyte; lymphocyte proliferation test; MTT essay

自红细胞免疫的概念提出以来[1],国内外不少学者对红细胞参与淋巴细胞免疫活性调控的作用进

[收稿日期] 2006-10-24
[基金项目] 陕西省自然科学基金项目(99SM01);陕西省教育学院教师科研基金项目(06KJ023)
[作者简介] 张佩君(1964-),女,陕西西安人,讲师,主要从事动物免疫学研究。E-mail:zhangpeijun532123@163.com
[通讯作者] 陈德坤(1964-),男,陕西渭南人,教授,主要从事分子病原学与免疫学的研究。E-mail:chendekun163@163.com

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

行了探讨。有研究发现,红细胞具有刺激T、B细胞和NK细胞增殖,提高T细胞IL-2分泌量等免疫效应[2-4],证明了红细胞在免疫调控方面的作用。鉴于红细胞本身无核、无法合成和分泌细胞因子,因此其免疫效应的发挥应当与其表面的分子密切相关。但在生理状态下红细胞究竟是通过细胞间直接接触方式还是分泌/脱落可溶性膜分子方式参与淋巴细胞免疫调控,这一问题并没有得到阐明。为此,本研究以犬红细胞培养上清液为材料,探讨了红细胞培养上清液对淋巴细胞增殖的影响,以期为阐明上述问题奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 试 剂 RPMI-1640培养基,Hyclone公司出品;二巯基乙醇,北方同正生物公司出品;犊牛血清,中美合资兰州民海生物工程有限公司出品,-20 ℃保存;植物血凝素P(PHA-P),SIGMA公司出品,-20 ℃保存;刀豆蛋白A(ConA),SIGMA公司出品,-20 ℃保存;细菌脂多糖(LPS),SIGMA公司出品,-20 ℃保存;四甲基偶氮唑蓝(MTT),上海绿鸟科技发展公司进口分装;肝素,华美生物工程公司出品,-20 ℃保存;台盼蓝,上海公私合营新中化学厂出品;二甲亚砜(DMSO),aMResco公司出品,常温避光保存;淋巴细胞分离液,上海华精生物高科技有限公司提供,4 ℃避光保存。

1.1.2 试验动物 成年雌性健康牧羊犬,购自杨凌某养犬场。

1.2 方 法

1.2.1 犬红细胞培养上清液的制备 无菌采取犬血3 mL,肝素抗凝,与等体积的淋巴细胞分离液轻轻叠加,2000 r/min离心20 min。弃去红细胞层以上的全部液体,再用含5%FCS的无Ca^{2+}、Mg^{2+} Hanks液洗3次,每次1000 r/min、离心10 min。最后一次离心完毕后,弃上清,用完全RPMI-1640培养液重悬细胞。取0.1 mL犬红细胞悬液用台盼蓝染色,计数细胞,细胞活力在95%以上。用完全RPMI-1640培养液配制1.0×10^8,5.0×10^7,2.5×10^7和1.25×10^7 mL^{-1}的犬红细胞悬液,接种24孔板培养(每孔加红细胞悬液2 mL,培养条件为37 ℃,体积分数5%CO_2),每个浓度红细胞设9孔重复。分别于红细胞培养8,16,24,32,40,48,56,64和72 h时收集红细胞培养上清液吸出,-20 ℃保存备用。

1.2.2 犬淋巴细胞悬液的制备 无菌采取犬血3 mL,肝素抗凝,用含5% FCS的无Ca^{2+}、Mg^{2+} Hanks液稀释至4 mL,小心叠加于等体积的淋巴细胞分离液上,2000 r/min离心20 min,吸出上、中层之间白色云雾状的淋巴细胞,用含5% FCS的无Ca^{2+}、Mg^{2+} Hanks液洗涤3次(每次1 000 r/min离心10 min)。最后一次离心前将淋巴细胞悬液吸出0.1 mL,台盼蓝染色计数细胞,细胞活力在95%以上,用完全RPMI-1640将淋巴细胞调至5×10^6 mL^{-1}。

1.2.3 犬淋巴细胞的培养和测定 将96孔细胞培养板置于CO_2培养箱中,37 ℃、体积分数5% CO_2条件下培养68 h,吸出50 μL上清液,加入10 μL MTT,继续培养4 h后加入100 μL DMSO,吹打均匀,裂解细胞。然后作用15 min,用酶标仪在波长630 nm处测OD值(OD_{630})。

1.2.4 犬红细胞培养上清液促进淋巴细胞增殖转化试验(促淋转试验) 本研究探讨红细胞浓度和培养时间2个因子对淋巴细胞增殖转化的影响。参考前期预试验结果,试验淋巴细胞浓度为5×10^6 mL^{-1},培养液中PHA-P、ConA和LPS的质量浓度分别为12.5,10和80 μg/mL。试验设5个组,试验组为淋巴细胞+红细胞培养上清液+丝裂原和淋巴细胞+红细胞培养上清液2个组;对照组为淋巴细胞+丝裂原和淋巴细胞2个组;空白对照组为完全RPMI-1640。将淋巴细胞接种细胞培养板,其中试验组和对照组淋巴细胞接种量为100 μL,丝裂原和红细胞培养上清液加入量均为50 μL,每孔总量为200 μL,不足的用完全RPMI-1640补足。空白对照组为完全RPMI-1640 200 μL。每种红细胞培养上清夜均设3孔重复。培养68 h后测OD_{630}值,计算刺激指数(Stimulate Index,SI):

SI=(实验组OD_{630}-空白组OD_{630})/(对照组OD_{630}-空白组OD_{630})

1.2.5 数据处理 用Minitab软件处理数据,分析差异。试验结果以平均值±标准差($\bar{X}\pm S$)表示。

2 结果与分析

2.1 犬红细胞培养上清液的促淋转效果

表1表明,犬红细胞培养上清液单独刺激淋巴细胞时,有明显的促淋转效果,以红细胞浓度为1×10^8 mL^{-1}、培养56 h的处理促淋转效果最佳。

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1　犬红细胞培养上清液的促淋转试验结果

Table 1　Efficacy of erythrocyte cultural supernatant on activating canine lymphocytes proliferation

红细胞培养时间/h Culture time	不同浓度红细胞培养上清液的 SI 值 SI Value of different canine erythrocyte cultural supernatants			
	1×10^8 mL^{-1}	5×10^7 mL^{-1}	2.5×10^7 mL^{-1}	1.25×10^7 mL^{-1}
8	1.595±0.288	1.433±0.426	1.532±0.154	1.309±0.402
16	1.350±0.238	1.284±0.123	1.054±0.141	1.158±0.227
24	1.299±0.179	1.413±0.288	1.292±0.101	1.265±0.071
32	1.498±0.195	1.642±0.160	1.407±0.228	1.106±0.046
40	1.793±0.143	2.163±0.060	1.326±0.323	1.406±0.059
48	1.154±0.066	2.063±0.147	1.724±0.188	1.559±0.188
56	2.738±0.144	1.797±0.273	1.495±0.276	1.419±0.076
64	1.962±0.076	1.996±0.273	1.688±0.253	1.668±0.116
72	2.519±0.089	2.041±0.128	1.462±0.159	1.369±0.242

2.2　犬红细胞培养上清液协同 PHA-P 的促淋转效果

表 2 结果显示,随着红细胞培养时间的延长,各浓度红细胞培养上清液的促淋转作用均呈增强趋势,其中以犬红细胞浓度为 1×10^8 mL^{-1}、培养 72 h 的培养上清液协同 PHA-P 的促淋转效果最好。

表 2　犬红细胞培养上清液协同 PHA-P 的促淋转试验结果

Table 2　Efficacy of erythrocyte cultural supernatant cooperating with PHA-P on activating canine lymphocytes proliferation

红细胞培养时间/h Culture time	不同浓度红细胞培养上清液的 SI 值 SI Value of different canine erythrocyte cultural supernatants			
	1×10^8 mL^{-1}	5×10^7 mL^{-1}	2.5×10^7 mL^{-1}	1.25×10^7 mL^{-1}
8	1.129±0.027	1.137±0.170	1.235±0.040	1.073±0.179
16	1.015±0.193	0.850±0.027	1.144±0.028	1.180±0.151
24	1.217±0.213	1.109±0.070	0.961±0.042	0.979±0.114
32	1.180±0.093	1.427±0.025	1.180±0.099	0.861±0.112
40	1.360±0.175	1.333±0.173	0.962±0.042	1.286±0.184
48	1.463±0.056	1.443±0.204	1.287±0.120	0.867±0.079
56	1.892±0.066	1.627±0.023	1.319±0.278	1.305±0.065
64	1.788±0.098	1.409±0.126	1.417±0.084	1.422±0.097
72	1.916±0.169	1.780±0.035	1.535±0.099	1.553±0.033

2.3　犬红细胞培养上清液协同 ConA 的促淋转效果

表 3 结果表明,犬红细胞培养上清液具有协同丝裂原刺激 T 细胞增殖的效应,以红细胞浓度为 5×10^7 mL^{-1}、培养 56 h 培养上清液的促淋转效果最佳。

表 3　犬红细胞培养上清液协同 ConA 的促淋转试验结果

Table 3　Efficacy of erythrocyte cultural supernatant cooperating with ConA on activating canine lymphocytes proliferation

红细胞培养时间/h Culture time	不同浓度红细胞培养上清的 SI 值 SI Value of different canine erythrocyte cultural supernatants			
	1×10^8 mL^{-1}	5×10^7 mL^{-1}	2.5×10^7 mL^{-1}	1.25×10^7 mL^{-1}
8	1.143±0.218	1.037±0.303	1.243±0.081	1.626±0.018
16	0.802±0.041	1.042±0.156	1.728±0.254	1.315±0.169
24	0.866±0.079	1.432±0.177	1.601±0.199	1.388±0.055
32	1.524±0.024	1.326±0.111	1.467±0.093	1.465±0.173
40	1.368±0.048	1.169±0.098	1.514±0.290	1.454±0.068
48	1.588±0.131	1.048±0.046	1.517±0.187	1.358±0.126
56	1.407±0.061	1.909±0.318	1.465±0.466	1.451±0.240
64	1.516±0.050	1.095±0.049	1.250±0.038	0.980±0.096
72	1.860±0.088	1.452±0.171	1.063±0.124	1.027±0.116

2.4　犬红细胞培养上清液协同 LPS 的促淋转效果

表 4 表明,红细胞上清协同 LPS 刺激淋巴细胞时,对淋巴细胞的增殖有一定的促进作用,其中红细胞浓度为 1×10^8 mL^{-1}、培养 72 h 培养上清液的促

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

淋转效果最佳。

表4 犬红细胞培养上清液协同LPS的促淋转效果

Table 4 Efficacy of erythrocyte cultural supernatant cooperating with LPS on activating canine lymphocytes proliferation

红细胞培养时间/h Culture time	不同红细胞浓度培养上清的SI值 SI Value of different canine erythrocyte cultural supernatants		红细胞培养时间/h Culture time	不同红细胞浓度培养上清的SI值 SI Value of different canine erythrocyte cultural supernatants	
	1×10^8 mL^{-1}	5×10^7 mL^{-1}		1×10^8 mL^{-1}	5×10^7 mL^{-1}
8	1.527±0.117	1.186±0.04548	48	1.768±0.037	1.042±0.061
16	1.044±0.100	1.101±0.04056	56	1.599±0.096	1.461±0.090
24	1.209±0.031	1.500±0.13964	64	1.748±0.080	1.117±0.039
32	1.727±0.145	1.268±0.05472	72	2.216±0.102	1.511±0.030
40	1.491±0.159	1.225±0.088			

3 讨 论

血液中红细胞的数量与其他各类血细胞相比占绝对优势,这与红细胞功能有关。红细胞免疫学研究发现,红细胞还具有清除血液循环中免疫复合物的作用,参与这一功能的红细胞表面分子是C_3b受体(CR_1)[5]。对红细胞免疫的进一步研究表明,红细胞表面还存在CD_2分子的配体(CD_{58},CD_{59})[6-7],红细胞胞内还含有NK细胞激活因子[8],这是红细胞在体外培养体系中能够刺激T细胞、NK细胞活化的分子基础[9]。但至今人们对红细胞以何种方式激活淋巴细胞并不清楚,也缺乏相关研究报道。陈德坤等[10]报道,绵羊红细胞培养上清具有单独和协同丝裂原促进猪淋巴细胞增殖的效应。本研究结果表明,在同一种内,红细胞培养上清具有刺激同种淋巴细胞增殖的免疫效应。结合以前的研究结果作者推测,通过释放免疫活性分子来调控淋巴细胞的活化,可能是红细胞参与机体免疫调控的途径之一。

血液循环系统与淋巴系统之间不仅在组织学上关系密切,在功能上也是相辅相成的。淋巴细胞在中枢淋巴器官发育成熟后,经血流迁移到外周淋巴器官发挥各种生物学功能,在迁移过程中淋巴细胞会与红细胞不断接触,与红细胞释放到外周血中的免疫活性分子相互作用,促进其增殖转化。脾脏既是机体最大的外周免疫器官又是机体的血库,其给淋巴细胞与红细胞之间的相互作用提供了有利的场所,但正常情况下由于红细胞数量巨大,而淋巴细胞相对较少(犬体内红细胞与淋巴细胞的比例大约为10 000∶1),所以作者推测,正常情况下淋巴细胞几乎被红细胞团团围住,由于红细胞释放的免疫活性分子浓度太大而抑制了淋巴细胞的增殖,从而维持外周血细胞间的相对稳定。但在病理环境下,由于炎症等因素的刺激,血液中淋巴细胞数量增多,使局部或整体红细胞与淋巴细胞的比例达到最佳,从而实现红细胞对淋巴细胞的免疫调控。

本试验中作者分别用了3种不同的丝裂原配合红细胞培养上清液刺激淋巴细胞增殖,结果发现红细胞培养上清液不仅能够协同T细胞丝裂原刺激T细胞增殖,还能够协同B细胞丝裂原(脂多糖)刺激B细胞增殖。红细胞培养上清液的后一种效应究竟属于直接还是间接作用有待进一步探讨,但这一试验结果无疑表明,红细胞培养上清液具有促进机体细胞免疫和体液免疫功能的效应。

红细胞免疫学研究属于血液免疫学研究的领域之一,目前国内红细胞免疫学研究主要集中在红细胞与免疫复合物的方面。作者认为,红细胞参与淋巴细胞免疫调控的研究同样应当受到足够的重视,其研究成果不仅对摸清红细胞全面的免疫学功能有重要意义,更重要的是对全面认识机体的免疫调控机理有重要的理论意义。

[参考文献]

[1] Siegel I, Liu TL, Gleicher N. The red cell immune system [J]. Lancet, 1981, 2: 8246: 556.

[2] Silva A, Lopez-Botet M, Alvarez J, et al. Enhancement of functional activities of human T cells after their interaction with SRBC[J]. J Immunol, 1981, 126: 393-397.

[3] Virella G, Rugeles M T, Hyman B, et al. The interaction of CD2 with its LFA-3 ligand expressed by autologous erythrocytes results in enhancement of B cell responses[J]. Cell Immunol, 1988, 116: 308-319.

[4] Kalechman Y, Herman S, Gafter U, et al. Enhancing effects of autologous erythrocytes on human or mouse cytokine secretion and IL-2R expression[J]. Cell Immunol, 1983, 148: 114-129.

(下转第59页)

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

[参考文献]

[1] 王　飞. 新型的绿色饲料添加剂——溶菌酶[J]. 广东饲料, 2002,11(6):31-32.

[2] 冷　静,朱仁俊,马　黎. 抗生素对断奶仔猪免疫机能的影响[J]. 江苏农业科学,2004(2):63-64.

[3] 谢佚勋. 大鼠血清溶菌酶活性测定及在热暴露环境下临床应用的探讨[J]. 中国兽医科技,1995,25(12):32-33.

[4] 荣晓花,凌沛学. 溶菌酶的研究进展[J]. 中国生化药物杂志, 1999,20(6):319-320.

[5] 刘　莹,孙荣丹,杨翔华,等. 溶菌酶的应用现状[J]. 饲料工业, 2006,27(6):19-20.

[6] 孙怀昌,张　泉,施伟庆,等. 人溶菌酶 cDNA 的克隆及其在小鼠体内的表达[J]. 中国兽医学报,2004,24(2):157-159.

[7] 楼善贤,苗德林. 溶菌酶的研究进展[J]. 中国肿瘤临床,1994, 21(9):709-711.

[8] 王佃亮. 重组人溶菌酶研究进展[J]. 中国生物工程杂志,2003, 23(9):59-64.

[9] Tomohiro H,Ishido M,Izumi K,et al. Expression of a synthetic gene encoding canine milk lysozyme in Escherichia coli and characterization of the expressed protein[J]. Protein Engineering,1999,12,(5):429-435.

[10] 郑清梅,叶　星,白俊杰,等. 斑节对虾溶菌酶基因的原核表达与产物活性检测[J]. 水产学报,2005,29(1):19-24.

[11] Hdtmark D. Ixsect immw,purification and properties three inducible hacteticidal laroteixs from hemolymph of immmized pupae of fiyalophera cecropia[J]. Esc J liochem,1980,106:7-16.

[12] 邵春容,包承玉. 饲用溶菌酶制剂的提取、保存及对幼龄畜禽的保健作用[J]. 饲料研究,1996,1(8):2-4.

[13] 沈彦萍,陈宇光,潘宏涛,等. 溶菌酶可溶性粉剂防治仔猪腹泻的效果观察[J]. 饲料工业,2005,26(6):16-18.

[14] Marcano J G S,Tsotsis T T. Catalytic membranes and membrane reactors[M]. Wiley VCH Verlag GmbH: Weinheim Press,2002.

[15] 郑晓澜,万　琼,谢忆虹. 临床分离病原菌及耐药谱辩证分析[J]. 中华医院感染学杂志,2007,17(1):100-102.

[16] 贾向志,袁汉英,马文煜,等. 人溶菌酶基因的克隆及其在毕赤酵母中的表达[J]. 第四军医大学学报,2001,22(22):2068-2072.

(上接第 54 页)

[5] 王旭东,饶家荣. 红细胞免疫学新探(下卷)[M]. 南京:南京农业出版社,1998.

[6] Plunkett M L,Sanders M E. Selvaraj P. et al. Rosetting of activated human T lymphocytes with autologous erythrocytes,definition of the receptor and ligand molecules as CD_2 and lymphocyte function-associated antigen(LFA-3)[J]. J Exp Med,1987, 165:664-676.

[7] Deckert M,Ubar J K,Zoccola D,et al. CD_{59} molecule: a second ligand for CD_2 in T cell adhesion[J]. Eur J Immunol,1992,22: 2943-2947.

[8] Shau H,Gupta R K,Golub S H. Identification of a natural killer enhancing factor(NKEF) from human erythroid cells[J]. Cell Immunol,1993,147:1-11.

[9] Jyonouchi H,Kincade P W,Misra H P. Analysis of the effects of erythrocytes on mitogen-dependent clonal proliferation of murine B lymphocytes[J]. Cell Immunol,1984,83:189-198.

[10] 陈德坤,肖俊杰. 红细胞培养上清中 CD_2 配件的生物活性研究[C]//第三届全国畜牧兽医青年科技工作者学讨论会优秀论文集. 长春:长春出版社,1996.

© 1994-2010 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net