

文章编号: 1674-5566(2010)02-0167-05

鲫鱼淋巴细胞转化 PHA 刺激剂量及 流式细胞仪检测参数探讨

王文娟, 蔡春芳, 叶元土, 施陈江, 夏燕美

(苏州大学基础医学与生物科学学院, 江苏 苏州 215123)

摘 要: 从异育银鲫外周血中分离淋巴细胞, 利用 RPMI-1640 培养基培养 48 h 后, 采用流式细胞仪分析方法研究不同浓度的植物凝集素 (phytohemagglutinin, PHA) ($0 \mu\text{g/mL}$, $80 \mu\text{g/mL}$, $200 \mu\text{g/mL}$, $400 \mu\text{g/mL}$, $600 \mu\text{g/mL}$, $800 \mu\text{g/mL}$, $1\ 000 \mu\text{g/mL}$, $1\ 200 \mu\text{g/mL}$) 对外周血淋巴细胞转化率的影响, 旨在探索异育银鲫外周血淋巴细胞体外转化最适刺激剂量。结果表明: (1) 在 PHA 浓度 $0 \sim 400 \mu\text{g/mL}$ 的范围内, 随着 PHA 浓度的增加, 淋巴细胞转化率也增加, 呈浓度依赖的关系, 但当 PHA 的浓度增加到 $1\ 200 \mu\text{g/mL}$ 淋巴细胞转化率明显下降。其中 PHA 浓度为 $400 \mu\text{g/mL}$ 时, 淋巴细胞转化率最高, 显著高于低浓度组 ($80 \mu\text{g/mL}$) 和高浓度组 ($1\ 000 \mu\text{g/mL}$, $1\ 200 \mu\text{g/mL}$) ($P < 0.05$), 略高于中浓度组 ($200 \mu\text{g/mL}$, $600 \mu\text{g/mL}$, $800 \mu\text{g/mL}$), 差异不显著 ($P > 0.05$)。由此可见, 在本试验条件下, PHA 体外刺激异育银鲫淋巴细胞转化的最适剂量为 $400 \mu\text{g/mL}$ 。(2) 用流式细胞仪检测细胞内 DNA 合成情况, Multicycle AV 软件进行细胞周期分析, 通过 DNA 增殖指数测定淋巴细胞转化率是一种简单、可靠的方法。需要注意的是, 采用流式细胞仪测定鲫鱼淋巴细胞转化率时, FS/SS 参数设置为 FS: Volts 62-gain 100; SS: Volts 1000-gain 500 能够获得清晰的图像。

关键词: 异育银鲫; 淋巴细胞转化; 流式细胞仪; DNA 增殖指数

中图分类号: S 917 **文献标识码:** A

The studies of the optimum PHA concentration to the transformation of lymphocytes of crucian carp (*Carassius auratus gibelio*) and the parameter of flow cytometry on fish

WANG Wen-juan, CAI Chun-fang, YE Yuan-tu, SHI Chen-jiang, XIA Yan-mei

(College of Basic Medical Science and Biology Science, Soochow University, Suzhou 215123, China)

Abstract: Lymphocytes were separated from peripheral blood of allogynogenetic crucian carp (*Carassius auratus gibelio*), and incubated in RPMI-1640 medium for 48 h. The effect of different concentration of PHA ($0 \mu\text{g/mL}$, $80 \mu\text{g/mL}$, $200 \mu\text{g/mL}$, $400 \mu\text{g/mL}$, $600 \mu\text{g/mL}$, $800 \mu\text{g/mL}$, $1\ 000 \mu\text{g/mL}$, $1\ 200 \mu\text{g/mL}$) on the lymphocyte transformation ratio was determined by flow cytometry (FCM). The result showed: (1) When the concentration of PHA was below $400 \mu\text{g/mL}$, there was a positive correlation between the concentration of PHA and the lymphocyte transformation ratio; When the concentration of PHA was $400 \mu\text{g/mL}$, the lymphocyte transformation ratio reached a peak and it was significantly higher than that of low

收稿日期: 2009-07-18

基金项目: 江苏省社会发展项目 (BS2006021, BS2007140)

作者简介: 王文娟 (1986-), 女, 硕士研究生, 专业方向为水生生物制品安全性。E-mail: wangwenjuan1986118@163.com

通讯作者: 蔡春芳, E-mail: szcfa@yahoo.com.cn

concentration groups ($80 \mu\text{g}/\text{mL}$) and high concentration groups ($1\ 000 \mu\text{g}/\text{mL}$, $1\ 200 \mu\text{g}/\text{mL}$) ($P < 0.05$), and a little higher than that of moderate groups ($200 \mu\text{g}/\text{mL}$, $600 \mu\text{g}/\text{mL}$, $800 \mu\text{g}/\text{mL}$), no significant difference ($P > 0.05$). Under our conditions of experiment the optimum concentration of PHA was $400 \mu\text{g}/\text{mL}$. (2) Flow cytometry was applied to determine the state of intracellular DNA synthesis and cell cycle was analyzed by Multicycle AV software. The results indicated that it was a simple and reliable method to obtain the lymphocyte transformation ratio by determining the proliferation index of DNA. What calls for special attention was that only when the parameters of flow cytometry were FS: Volts $62 - \text{gain } 100$; SS: Volts $1000 - \text{gain } 500$, the scatter diagram was clear.

Key words: crucian carp; lymphocyte transformation; flow cytometry; DNA proliferation index

鱼类免疫学研究中,检测免疫活性细胞对不同抗原的反应性激活与增殖是评价细胞免疫功能的重要指标^[1]。淋巴细胞转化试验是淋巴细胞与特异性抗原或非特异性促分裂因子在体外共同培养时,细胞的代谢和形态发生一系列的变化,代谢旺盛,蛋白质和核酸的合成增加,细胞体积变大,进一步转化为能分裂的淋巴母细胞。由于这种转化与机体的免疫机能有关,因此,淋巴细胞转化率常被用作体外检测淋巴细胞功能、评价机体免疫机能的指标^[2]。国内外关于鱼类淋巴细胞转化最适刺激剂量的研究较少,结论也不完全一致^[3-6]。利用流式细胞仪分选技术研究人类和小鼠淋巴细胞转化已较为普遍^[7-10],而在鱼类淋巴细胞转化上未见报道。本研究通过比较异育银鲫外周血淋巴细胞对不同浓度 PHA 刺激的反应性增殖以确定最适刺激剂量,并探讨用流式细胞仪检测鲫鱼外周血淋巴细胞体外转化率的可行性,旨在建立一种可靠的鱼类淋巴细胞转化率测定方法。

1 材料与方法

1.1 试验鱼与饲养条件

试验用异育银鲫购自江苏常州某良种场,为当年池塘养殖鱼种。经 3% 食盐消毒后,选取 90 尾大小均匀、体格健壮,约为 25 g 左右的鱼种,随机分配到 6 个 $70 \text{ cm} \times 80 \text{ cm} \times 100 \text{ cm}$ 的玻璃钢水族箱中,每箱放 15 尾。试验饲料由 68% 鱼粉、12% 小麦粉、8% 谷朊粉、11.5% 鱼油和 0.5% 维生素矿物质预混料组成,经小型饲料膨化机挤压制粒而成。

饲养期间,每天投喂量为鱼体重的 2.0% ~ 3.0%,分 3 次投喂,时间分别为 8:00、12:30、17:00。所有水族箱在同一半开放式循环养殖系

统中,自然光周期,以充分曝气的自来水为水源,每天换水量为总水量的 $1/3$ 。养殖水经过滤、沉淀后流回蓄水池,经过增氧、控温后由水泵抽回各水族箱。饲养期间水质条件为:水温 (25 ± 2) $^{\circ}\text{C}$, $\text{DO} > 6.0 \text{ mg}/\text{L}$, $\text{pH } 7.5 \pm 0.2$, $\text{NH}_4^+ \text{ - N}$ (0.25 ± 0.05) mg/L , $\text{NO}_2^- \text{ - N}$ (0.04 ± 0.01) mg/L , 硫化物 $< 0.05 \text{ mg}/\text{L}$ 各项指标均符合养殖水体要求。共饲养 8 周,试验时鱼体重为 70~80 g。

1.2 试剂与仪器

淋巴细胞分离液购自国药集团化学试剂有限公司; PHA 购自上海伊华医学科技有限公司; RPMI-1640 培养基为美国 GIBCO 公司产品,内含有小牛血清 15%, HEPES 10 mmol/L, 青霉素 100 U/mL, 链霉素 100 U/mL, 过滤除菌; 小牛血清和 RNA 酶购自上海蓝季科技发展有限公司; 碘化丙啶购自 sigma 公司; 流式细胞仪由美国 BECKMAN COULTER 公司制造。

1.3 外周血中淋巴细胞的分离

外周血中淋巴细胞的分离步骤^[11]如下。(1) 准备有抗凝剂的试管,从鲫鱼尾动脉取血,用 pH 7.2 的 Hank 氏液将抗凝血稀释 1 倍。(2) 将 2 mL 淋巴细胞分离液置于 10 mL 离心管中,在液面上约 1 cm 处沿离心管壁缓缓加入上述稀释血液,使其重叠于分层液面。稀释血液与分层液的体积比例为 2:1。(3) 用水平离心机以 2 000 r/min 离心 30 min。(4) 小心吸取淋巴细胞层移入另一试管中。(5) 加足量 5 倍以上体积 Hank 氏液小心混匀,1 500 r/min 离心 10 min 弃上清,如此重复洗涤两次。(6) 向沉淀中加入 1 mL 含 15% 小牛血清的 RPMI-1640 培养基重新混悬细胞。取一滴细胞悬液置血球计数板内计数,然后将细胞浓度调节至 $2 \times 10^6 /\text{mL}$ 。

1.4 PHA 刺激剂量设置

吸取上述细胞悬液接种于 24 孔细胞培养板,每孔 0.5 mL 加 0.1 mL 不同浓度的 PHA 致终浓度分别为 0 $\mu\text{g/mL}$ 、80 $\mu\text{g/mL}$ 、200 $\mu\text{g/mL}$ 、400 $\mu\text{g/mL}$ 、600 $\mu\text{g/mL}$ 、800 $\mu\text{g/mL}$ 、1 000 $\mu\text{g/mL}$ 、1 200 $\mu\text{g/mL}$ 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 在 5% CO_2 中培养 48 h。

1.5 流式细胞仪分析

1.5.1 流式细胞仪参数调整

由于鱼类的淋巴细胞体积较小,样品通过激光时产生的荧光信号较弱,因此必须通过调整流式细胞仪的 FS 和 SS 的 Volts、gain 参数改变脉冲的特征,以获得清晰的图像。

1.5.2 流式细胞仪检测淋巴细胞增殖功能的应用

在调整好的试验参数条件下,用流式细胞仪检测不同浓度的 PHA 对异育银鲫外周血淋巴细胞转化的影响,评价 PHA 浓度和淋巴细胞转化率的剂量-效应关系,从而建立可靠的异育银鲫外周血淋巴细胞转化率测定方法。具体操作方法如下。

培养 48 h 后收集细胞,离心 (1 500 r/min 10 min),用磷酸盐缓冲液 (PBS) 洗涤 2 次,离心,弃上清,70% 冷乙醇 (4 $^{\circ}\text{C}$) 固定^[8],隔夜。离心除去乙醇,PBS 洗涤 2 次,加 10 g/L RNA 酶 0.05 mL 0.1 g/L 碘化丙啶 0.1 mL 冷暗处 (4 $^{\circ}\text{C}$) 染色 30 min ^[12]。上机检测,Cell Quest 收集细胞 10 000 个, Multicycle AV 软件分析细胞周期。

2 结果

2.1 流式细胞仪参数设置对试验结果的影响

合理设置流式细胞仪参数对试验结果的准确性相当重要。如图 1 和 2 所示,当 FS: Volts 118—gain 2; SS: Volts 80—gain 10 时,细胞不能够清晰地分布在散点图中,而是集中在原点附近碎片区域,无法准确分析数据。而将参数调至 FS: Volts 62—gain 100; SS: Volts 1000—gain 500 时,细胞能够清晰地分布在散点图中,可以进行准确的细胞周期分析。

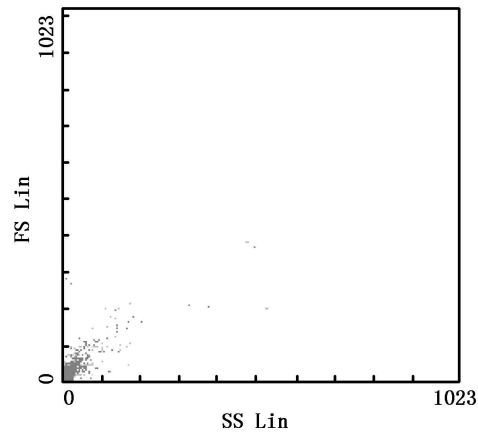


图 1 PHA 刺激淋巴细胞转化的 FS/SS 散点图

Fig 1 FS/SS scatter diagram of lymphocyte transformation stimulated by PHA

FS: Volts 118—gain 2; SS: Volts 80—gain 10

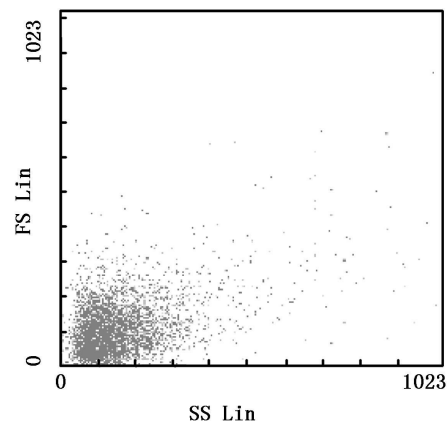


图 2 PHA 刺激淋巴细胞转化的 FS/SS 散点图

Fig 2 FS/SS scatter diagram of lymphocyte transformation stimulated by PHA

FS: Volts 62—gain 100; SS: Volts 1000—gain 500

2.2 不同浓度的 PHA 对异育银鲫外周血淋巴细胞体外转化的影响

流式细胞仪的观察指标为增殖指数 (proliferation index PI), 增殖指数反映处于增殖期的细胞占全部细胞的百分数。实验结果如表 1 所示, 不同的 PHA 浓度对异育银鲫外周血淋巴细胞的体外转化有不同的效应。在 PHA 浓度为 0~400 $\mu\text{g/mL}$ 的范围内, 随着 PHA 浓度的增加, 淋巴细胞转化率也增加, 呈浓度依赖的关系, 但

当 PHA 的浓度继续增加一直达到 1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 淋巴细胞转化率明显下降。其中 PHA 浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,淋巴细胞转化率最高,显著高于低浓度组 (80 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 和高浓度组 (1 000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、1 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) ($P < 0.05$), 但与中浓度组 (200

$\mu\text{g}/\text{mL}$ 、600 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、800 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 差异并不显著 ($P > 0.05$)。上述结果表明,在本试验条件下,PHA 体外刺激异育银鲫淋巴细胞转化的最适剂量为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

表 1 不同浓度的 PHA 对异育银鲫外周血淋巴细胞体外转化的影响

Tab 1 Effect of different concentrations of PHA on transformation of lymphocytes in peripheral blood from allogynogenetic crucian carp

PHA 浓度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	G ₀ G ₁ (%)	S (%)	G ₂ M (%)	DNA 增殖指数 PI (%)
0	65.66 ± 3.80 ^e	33.07 ± 3.52 ^a	1.27 ± 1.09 ^a	34.34 ± 3.80 ^a
80	46.08 ± 7.08 ^e	45.60 ± 4.28 ^b	8.33 ± 4.05 ^e	53.93 ± 7.08 ^e
200	36.14 ± 6.25 ^{ab}	55.33 ± 4.61 ^{cd}	8.53 ± 1.99 ^e	63.86 ± 6.25 ^{de}
400	31.90 ± 3.53 ^a	59.98 ± 2.32 ^d	8.11 ± 1.58 ^{bc}	68.10 ± 3.53 ^e
600	34.63 ± 2.70 ^a	56.12 ± 1.71 ^{cd}	9.25 ± 2.27 ^e	65.37 ± 2.70 ^e
800	39.66 ± 2.08 ^{abc}	51.92 ± 1.12 ^c	8.42 ± 0.96 ^e	60.34 ± 2.08 ^{de}
1 000	43.15 ± 3.96 ^{bc}	50.86 ± 2.56 ^c	5.99 ± 1.77 ^{bc}	56.85 ± 3.96 ^{cd}
1 200	54.30 ± 1.01 ^d	41.28 ± 0.60 ^b	4.43 ± 1.24 ^{ab}	45.70 ± 1.01 ^b

注:数值为平均值 ± 标准差 (mean ± S.D. n=3); 同一列中具不同上标字母者表示差异显著 ($P < 0.05$); $PI = (S + G_2M) / (G_0G_1 + S + G_2M)$ 。

3 讨论

淋巴细胞体外转化试验是研究鱼体免疫能力及药物或毒物对鱼免疫力影响的重要手段。目前,广泛应用 PHA 在体外刺激淋巴细胞进行淋巴细胞转化试验,因此获得体外转化最佳条件是非常有意义的。在外周血淋巴细胞体外转化中,PHA 质量浓度、培养温度、小牛血清浓度是影响体外细胞转化的重要因素。除此之外,其它因素如 pH、培养时间、培养细胞的起始浓度等也都会影响培养细胞的转化情况,值得进一步深入研究。国内外学者对鱼类免疫细胞体外培养条件的研究中,最适温度和小牛血清浓度基本一致,分别为 28~30 °C、10%~15%,但对于 PHA 最适剂量的研究,不同学者的研究差距较大,Yamamoto 等^[3]培养肾脏细胞采用的 PHA 最终质量浓度为 60 mg/L;唐玫等^[4]研究草鱼头肾淋巴细胞体外转化的最适 PHA 浓度为 80 $\mu\text{g}/\text{mL}$;李亚南等^[5]在研究不同质量浓度 PHA 刺激草鱼外周血淋巴细胞体外转化时,认为最适剂量为 500 mg/L 而邵健忠等^[6]结果显示,质量浓度为 100 mg/L 的 PHA 对草鱼白细胞有较高的毒性,能使细胞在短时间内死亡。而本试验结果表明,当 PHA 浓度为 400 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时,异育银鲫外周血淋巴细胞转化率最高。这可能与不同种类、年龄的鱼

以及不同来源的淋巴细胞对 PHA 的敏感性不同或与不同厂家生产的 PHA 质量、纯度不同有关,具体原因还有待于进一步研究。

测定淋巴细胞转化的常用方法主要有:形态学方法、³H-TdR 掺入法和 MTT 比色法等。形态学方法虽然简单,但细胞涂片和镜检等均可引起误差,结果受主观差异性影响较大;³H-TdR 掺入法可通过检测激活细胞的 DNA 复制情况反映细胞增殖指数,但方法复杂、费时费力,且有放射性污染等缺点^[13]; MTT 比色法是一种用颜色反应来检测增殖后的活细胞数量,间接反映整体细胞增殖情况,结果受细胞数目影响较大^[14]。利用流式细胞仪细胞分选技术可以通过检测细胞内 DNA 合成情况,分析处于不同周期的细胞比例,以反映细胞对非特异性刺激物的反应性增殖。流式细胞术检测细胞周期的经典方法是碘化丙啶染色法,它是通过检测细胞内 DNA 含量的不同来检测细胞周期。Multicycle AV 软件是专门用于流式细胞术中进行细胞周期分析的软件。它通过对 DNA 含量直方图进行曲线拟合,能快速计算出各种细胞的 DNA 含量、细胞周期各时相细胞所占的比例等。用流式细胞仪检测细胞内 DNA 合成情况并进行细胞周期分析,通过 DNA 增殖指数即增殖期的细胞占全部细胞的百分数测定淋巴细胞转化率是近几年才开始使用的新方法,它通过对一定数量的细胞进行测量分

析,所得到的数据信息量大,偏差小,而且操作简单。高山红等^[12]用流式细胞术法与³H-TdR 掺入法研究大鼠主动脉平滑肌细胞增殖,结果表明二者在观察细胞增殖的作用上有极为显著相关关系。这两种试验指标在用于研究细胞增殖作用时可以相互替代。李学义等^[7]用流式细胞仪测定人外周血 T 淋巴细胞增殖也表明流式细胞术测定细胞增殖具有快速、简便、客观和定量准确的优点,所得结果比较可靠、重复性好。它不仅可替代放射性同位素法用于体内外细胞的标记,对增殖细胞进行定性、定量检测,而且用免疫荧光抗体双标记法可分析不同类型细胞的增殖数量。而应用流式细胞术检测鱼类淋巴细胞转化率的相关研究未见报道,本研究结果也表明采用流式细胞仪对异育银鲫外周血淋巴细胞转化率的测定具有操作简便、客观、结果重复性好的特点,可在鱼类免疫指标测定以及免疫机制的研究中推广应用。然而,需要注意的是,由于鱼类的淋巴细胞体积较小,样品通过激光束时产生的荧光信号较弱,荧光检测器光电倍增管(PMT)产生的电压脉冲较小以至于细胞不能清晰地分散在坐标图中,此时需要反复调节流式细胞仪的参数,使细胞清晰地分散在坐标图中。本试验结果表明采用流式细胞仪测定鱼类淋巴细胞转化率时合适的参数设置为 FS: Volts 62—gain 100; SS: Volts 1000—gain 500。

参考文献:

- [1] Maino V C, Suni M A, Ruitenberg J J et al Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset activation[J]. *Cytometry*, 1995, 20: 127.
- [2] 肖克宇. 水产动物免疫与应用[M]. 北京: 科学出版社, 2007.
- [3] Yamamoto K, Ojima Y. A PHA⁻culture method for cells from the renal tissue of teleosts[J]. *Jpn J Genet* 1973, 48(3): 235—238.
- [4] 唐玫, 马广智. 草鱼头肾淋巴细胞体外转化培养影响因素的研究[J]. *华南师范大学学报*, 2001, (4): 5—8.
- [5] 李亚南, 陈全震, 邵健忠, 等. 草鱼外周血淋巴细胞体外转化诸因素的研究[J]. *海洋与湖沼*, 1996, 27(4): 380—385.
- [6] 邵健忠, 项黎新. PHA 体外诱导草鱼白细胞产生 γ 干扰素的研究[J]. *海洋与湖沼*, 2001, 32(2): 117.
- [7] 李学义, 朱平, 樊春梅, 等. 流式细胞术检测淋巴细胞增殖方法的建立[J]. *中国免疫学杂志*, 2003(19): 43—46.
- [8] 臧宁, 曾耀英, 黄秀艳, 等. 桑色素对小鼠 T 淋巴细胞体外活化、增殖和细胞周期的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2007, 23(3): 197—200.
- [9] 许文彬, 卢宏松, 徐丽慧, 等. 棉酚对小鼠淋巴细胞体外增殖和凋亡作用的影响[J]. *现代免疫学*, 2009, 29(2): 111—116.
- [10] 俞瑜, 曾耀英, 刘良, 等. 杨梅素对淋巴细胞活化及增殖的影响[J]. *中国药理学通报*, 2006, 22(1): 63—66.
- [11] 陈全震, 李亚南, 邵健忠, 等. 鱼类外周血淋巴细胞的分离技术[J]. *中国水产科学*, 1999, 6(4): 10—12.
- [12] 高山红, 王怀良, 王守英. 流式细胞术法与³H-TdR 掺入法观察细胞增殖的相关性研究[J]. *中国医科大学学报*, 2005, 34(1): 10—11.
- [13] 王敏, 张林杰, 何金生, 等. 流式细胞术检测 CFSE 标记人 T 细胞亚群增殖反应[J]. *免疫学杂志*, 2005, 21(5): 423—426.
- [14] 巴图德力根, 孔英, 高志红, 等. MTT 法与流式细胞术检测肺炎合剂促进 T 淋巴细胞转化的实验研究[J]. *中国免疫学杂志*, 2002, 18(4): 249—251.
- [1] Maino V C, Suni M A, Ruitenberg J J et al Rapid flow cytometric method for measuring lymphocyte subset