

71-75

第20卷 第3期
1992年8月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol.20 No.3
Aug. 1992

天然 LFA-3 对于猪血清溶血作用和猪 PBMC E_t 花环的影响

肖俊杰 陈德坤[✓] 赵友琴

(西北农业大学动物病毒病研究室, 陕西杨陵·712100)

摘 要 根据解离、吸收猪血清能够阻止正常猪血清对 SRBC 的破坏作用和猪 PBMC E_t 花环的形成, 推断正常猪血清中存在天然的 LFA-3, 并从天然 LFA-3 与游离 CD₂ 和膜 CD₂ 的可能关系中提出了 T 淋巴细胞激活中游离 CD₂ 调控途径的设想。

关键词 猪, 游离 CD₂, LFA-3, 血清学, 溶血

中图分类号 S852.53

CD₂ 的配体(淋巴细胞功能相关抗原-3, LFA-3)除公认为绵羊红细胞(SRBC)表面糖肽外, 还发现自身红细胞(RBC)、淋巴细胞及上皮细胞等表面也有 LFA-3 存在^[1]。探索自身 LFA-3 与 CD₂ 结合后引起动物机体免疫反应的可能变化, 将是研究体内游离 CD₂ 生理功能的重要途径和方法。然而血液及其他体液中有无天然 LFA-3 存在, 迄今尚未得到实验证实。本研究在设想血液和其他体液中的 LFA-3 可能与其中的游离 CD₂ 相结合存在的基础上, 以解离和经 SRBC 吸收除去游离 CD₂ 的猪血清作为天然 LFA-3, 进行了正常猪血清溶血抑制试验和猪外周血单个核细胞(PBMC) E_t 花环抑制试验, 探索了猪血清中 LFA-3 的存在。

1 材料和方法

1.1 试验猪血清

采自屠宰前的成年健康猪, 血清分离后置 4℃ 保存, 供 5 d 内使用。

1.2 试验猪

为 2~3 月龄杂种仔猪, 测温、观察证明健康后, 供采集 PBMC。

1.3 SRBC 悬液的制备

颈静脉采集抗凝血, 以无菌生理盐水洗涤 3 次, 所得 SRBC 泥部分用于血清吸收, 部分以生理盐水和 Hanks 液分别配成 5% 和 1% 的悬液, 供溶血试验和 E_t 花环试验用。

1.4 经反复解离和 SRBC 吸收猪血清(下称天然 LFA-3)

正常猪血清经流水透析 4 h 后, 转入 4℃ 继续以生理盐水透析 44 h(中间换液 6~8 次), 然后加入 1/10 (v/v) 的 SRBC, 室温振荡吸收 15 min, 离心除去 SRBC 后, 于 37℃ 搅拌使血清内可能存在的游离 CD₂ 与 LFA-3 的结合物解离, 并即刻加入 SRBC, 室温振荡吸收 15 min, 经解离, 吸收 3 次后所得上清部分即为 LFA-3, 供当日使用。

文稿收到日期: 1991-09-13

1.5 RBC 振荡对照液(下称 RBC 对照液)

向生理盐水加入 1/10 (v/v) SRBC, 室温振荡 15 min, 离心弃去 RBC 后再加入 1/10 SRBC, 重复加入 SRBC 和室温振荡 3 次后所得上清部分即为 RBC 对照液, 供当日使用。

1.6 天然 LFA-3 抑制正常猪血清溶血作用的检测

正常猪血清中加入等量(v/v)的天然 LFA-3 后于室温振荡 5 min, 按照文献 [2] 介绍的溶血测定方法进行, 同时以生理盐水 2 倍稀释猪血清和加入等量 RBC 对照液猪血清对 SRBC 的溶解作用作为对照。

1.7 天然 LFA-3 抑制猪 PBMC Et 花环作用的检测

采集抗凝猪血 1 mL, 分离 PBMC, 并向其中加入 2 mL 天然 LFA-3, 室温振荡 15 min 后弃去上清部分, 向经反复振荡 3 次的 PBMC 中加入 0.4 mL 细胞营养液轻轻混匀, 按常规方法进行 Et 花环试验。以未经处理的同猪 PBMC 的 Et 花环率作为对照。

2 结 果

2.1 天然 LFA-3 对正常猪血清中游离 CD₂ 溶血作用的影响

每批以 2 份天然 LFA-3 分别与 7-9 份正常猪血清进行溶血抑制试验。先后共作 6 批试验, 结果如表 1。

表 1 天然 LFA-3 对正常猪血清溶解 SRBC 的阻抑作用

批次	组别	正 常 猪 血清份数	溶血指数(%)		显著性 (t 检验)
			$\bar{X} \pm S.D.$	范围	
1	A	8	75.72 ± 21.15	29.47~94.58	$P_{AB} > 0.05$
	B	8	52.15 ± 29.91	10.77~84.85	
	C ₁	8	8.62 ± 4.59	0~13.70	$P_{AC1} < 0.01$
	C ₂	8	14.35 ± 8.09	1.98~27.10	$P_{AC2} < 0.01$
2	A	7	44.69 ± 25.52	9.44~79.94	$P_{AB} > 0.05$
	B	7	44.34 ± 28.49	1.53~83.05	
	C ₃	7	13.92 ± 10.64	1.28~27.34	$P_{AC3} < 0.05$
	C ₄	7	11.95 ± 10.66	0.51~29.08	$P_{AC4} < 0.05$
3	A	9	65.88 ± 25.45	35.94~94.65	$P_{AB} > 0.05$
	B	9	68.83 ± 26.81	28.61~100	
	C ₅	9	4.43 ± 6.51	0~19.21	$P_{AC5} < 0.05$
	C ₆	9	8.28 ± 10.27	0~29.89	$P_{AC6} < 0.01$
4	A	8	85.86 ± 8.74	81.56~100	$P_{AB} > 0.05$
	B	8	89.37 ± 10.59	74.18~100	
	C ₇	8	31.30 ± 30.79	0.41~91.80	$P_{AC7} < 0.01$
	C ₈	8	5.88 ± 20.01	0~54.51	$P_{AC8} < 0.01$
5	A	7	72.54 ± 17.65	33.70~85.92	$P_{AB} > 0.05$
	B	7	67.00 ± 21.30	28.51~91.85	
	C ₉	7	9.99 ± 9.00	3.33~25.92	$P_{AC9} < 0.01$
	C ₁₀	7	5.88 ± 7.42	0~19.25	$P_{AC10} < 0.01$
6	A	9	75.81 ± 23.60	40.41~98.44	$P_{AB} > 0.05$
	B	9	77.23 ± 22.85	37.82~97.66	
	C ₁₁	9	20.54 ± 26.35	3.10~88.08	$P_{AC11} < 0.01$
	C ₁₂	9	20.05 ± 19.57	0~68.91	$P_{AC12} < 0.01$

注: A: 正常猪血清+盐水; B: 正常猪血清+RBC 对照液; C: 正常猪血清+不同编号天然 LFA-3。

由表 1 看出, 加入 RBC 对照液的正常猪血清对 SRBC 的溶血指数与加入生理盐水的正常猪血清无显著差异($P>0.05$), 6 批试验中除加入 3、4、5 号天然 LFA-3 的正常猪血清对 SRBC 的溶血指数显著低于加入生理盐水的正常猪血清($P<0.05$)外, 加入其余 9 份天然 LFA-3 的正常猪血清对 SRBC 的溶血指数均极显著低于加入生理盐水的正常猪血清($P<0.01$)。经解离和 SRBC 吸收过的猪血清对正常猪血清中游离 CD_2 溶解 SRBC 的作用具有明显的抑制作用。

2.2 天然 LFA-3 对猪 PBMC Et 花环形成的影响

每批以同猪的 4 份 PBMC 分别与 4 份天然 LFA-3 在室温下作用, 然后以此被天然 LFA-3 封闭了膜 CD_2 的 PBMC 进行 Et 花环试验, 并以未经处理的同猪 PBMC Et 花环率 4 个重复的均值作为对照, 先后共进行 6 批试验, 结果如表 2。

表 2 天然 LFA-3 对猪 PBMC Et 花环形成的阻抑作用

组别	n	Et 花环率(%) $\bar{x} \pm S.D.$					
		第 1 批	第 2 批	第 3 批	第 4 批	第 5 批	第 6 批
天然 LFA-3 处理组	4	21.71 $\pm$ 7.23*	25.52 $\pm$ 6.95*	25.56 $\pm$ 7.89*	19.56 $\pm$ 8.14*	27.81 $\pm$ 6.32*	10.50 $\pm$ 8.67*
未处理组	4	40.33 $\pm$ 6.51	40.33 $\pm$ 7.83	39.50 $\pm$ 1.09	28.00 $\pm$ 6.85	47.75 $\pm$ 4.53	36.75 $\pm$ 7.12

注: *, t 检验, $P<0.05$

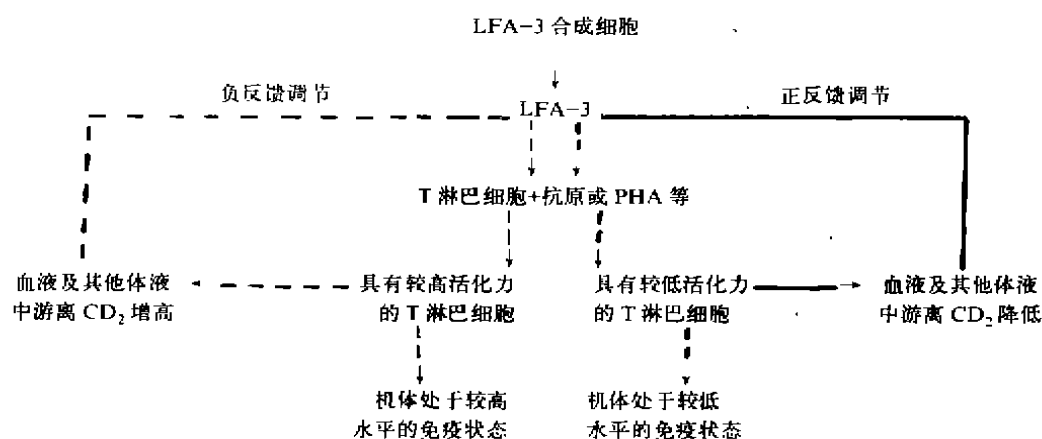
经天然 LFA-3 处理过的 PBMC 的 Et 花环率显著低于未经处理的同猪 PBMC Et 花环率($P<0.05$)。天然 LFA-3 对于猪 PBMC Et 花环的形成具有明显的抑制作用。

2 讨 论

作者曾以检测 SRBC 吸收猪血清、加入 SRBC LFA-3 猪血清及正常猪血清三者对 SRBC 的破坏作用, 证明了猪血清中游离 CD_2 具有溶解 SRBC 的作用^[2]。本试验又表明, 经处理作为天然 LFA-3 的猪血清具有抑制猪 PBMC 形成 Et 花环和阻止正常猪血清对 SRBC 的破坏作用。据此推测, 猪血清中可能存在天然 LFA-3, 并且认为, 血清中的 LFA-3 在正常情况下是以与游离 CD_2 结合的方式存在, 游离 CD_2 除结合状态外, 尚有相当部分为自由状态。

目前, 已经从淋巴细胞和非淋巴细胞表面找到了 LFA-3^[1]。这不仅说明体内游离的 LFA-3 的存在具有合理性, 同时提示它可能来自某些淋巴细胞和非淋巴细胞。此外, 本实验还表明, 血清中天然 LFA-3 具有与同种游离 CD_2 和膜 CD_2 结合的能力。Silv 等^[3]实验指出, T 细胞膜上的 CD_2 受到配体结合的刺激后, 可提高其免疫应答水平; 自身 RBC 参与 Y·干扰素、IL-2、IL-1、Ig 产生、NK、LAK 细胞及吞噬细胞免疫活性的控制^[4]。然而临床医学却发现, 体内游离 CD_2 存在量的增高, 常常伴随于某些细胞免疫功能受抑制的疾病^[5]。据此认为, 游离 CD_2 与 LFA-3、LFA-3 合成细胞及膜 CD_2 三者可能存在于下述关系, 即合成 LFA-3 的细胞将 LFA-3 分泌/脱落至血液或其他体液中, 其中大部分与游离 CD_2 相结合存在, 尚有少部分结合于 T 细胞膜 CD_2 上, 协助抗原刺激下的 T 细胞的活化作用。同时, 结合于 T 细胞膜 CD_2 上 LFA-3 的多少, 受其血液或其他体液中游离 CD_2 的控制; 当游离 CD_2 增高时, 则结

合于 T 细胞膜 CD_2 上的 LFA-3 减少, 当游离 CD_2 减少时, 则结合于 T 细胞膜 CD_2 上的 LFA-3 增多。机体以此在正常情况下将免疫应答限制在一定水平上和在某种情况下适当提高其免疫应答水平(附图)。



附图 淋巴细胞激活中游离 CD_2 调控途径

——→: 表示免疫应答向高水平方向进行;

——→: 表示免疫应答向低水平方向进行

从附图看出, 游离 CD_2 虽来自 T 细胞表面, 并且同 T 细胞膜上 CD_2 同样具有与天然 LFA-3 相结合的特性, 但是游离 CD_2 与天然 LFA-3 结合后在体内所引起的免疫应答反应却与 T 细胞膜上 CD_2 和天然 LFA-3 结合后所引起的免疫应答反应相反, 前者具有降低其免疫应答的作用, 后者则具有增高免疫应答的作用, 这和某些学者的研究结果相一致^[3,5]。同时, 机体免疫应答不仅受 T 细胞合成、分泌/脱落游离 CD_2 的控制, 同时还受自身 RBC 等合成、分泌/脱落 LFA-3 细胞所制约, 这不仅反映了合成 LFA-3 细胞参与淋巴细胞免疫系统的途径和方式, 也说明了机体在免疫反应过程中所具有的协调性和统一性。

参 考 文 献

- 1 黄海波. 淋巴细胞亚群及其功能. 中国兽医科技, 1990, (7): 19
- 2 肖俊杰, 陈德坤. 猪血清中游离 CD_2 对红细胞的溶解作用. 西北农业大学学报, 1992, 20(2): 63~66
- 3 Silva A, Lopez-bötet M, Alvarez J *et al*. Enhancement of the functional activities of human T cells after their interaction with SRBC. *J Immunol*, 1981(126): 393
- 4 郭 峰. 红细胞调控细胞免疫的事实与意义. 上海免疫学杂志, 1991(11): 63
- 5 田濤生. 可溶性 E 受体与疾病的关系. 国外医学免疫学分册, 1986(4): 185

Natural LFA-3 on Hemolysis of Normal Pig Serum and the Et Rosette Forming of Pig PBMC

Xiao Junjie Chen Dekun Zhao Youqin

(Virus Disease Research Lab, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi, 712100)

Abstract Based on the fact that the re-dissociation and SRBC absorbed pig serum can prevent the destruction of normal pig serum on SRBC and the Et rosette-forming of pig PBMC, we deduced that the normal pig serum contains natural LFA-3, and further, we present a hypothesis of free-form CD_2 regulating mechanism in the process of activating of T lymphocyte in accordance with the likely relationships between the natural LFA-3 with Free-form CD_2 of cell membrane.

Key words pigs / free CD_2 , LFA-3, serology, hemolysis

我国首例奶山羊卵泡卵母细胞试管羔羊在我校诞生

我校家畜生殖内分泌研究室在 1992 年 4 月 1 日获得 4 只山羊卵泡母细胞的试管羔羊。这一重大科研成果是由该研究室硕士研究生刘灵在导师钱菊汾教授和张涌副教授的指导帮助下完成的,填补了国内外山羊胚胎工程研究中的一项空白。

1991 年秋季以来,该研究首次应用国产肝素诱导山羊新鲜和冷冻精子体外获能,使平均受精达 74.3% 和 75.9%。在新鲜精子体外受精试验中,将 12 枚受精卵(pb II 期)移植给 5 只同期发情的受体山羊,50 天后进行超声诊断,有 2 只受体妊娠。其中一只受体于移植后 52 天因意外事故死亡。经剖腹取得一只发育正常的试管胎羔,胎长 8.5 厘米。另一妊娠受体怀孕 149 天,顺利生下两只试管羔羊。在冷冻精子的体外受精试验中,将 24 枚受精卵(pb II 期)移植给 6 只受体山羊,60 天后诊断,有一只妊娠,怀孕 149 天后产下双羔,4 只羔羊均发育正常。

该项研究的成功,标志着我国山羊卵泡卵母细胞体外受精技术已达到世界领先水平,对充分挖掘优良种畜的繁殖潜力和加速良种家畜的工厂化繁殖进程具有重大的实践意义。

(刘佩芬)