

小鼠淋巴器官中 VV⁺ 细胞的检测及其在移植肿瘤后的量变*

查士隽 王建范 丁仁瑞

(杭州大学生物系)

近年的研究注意到, 在小鼠和人的淋巴器官及外周血中, 都分别存在一类对长柔毛野豌豆凝集素(Vicia villosa Lectin, VVL)有结合特异性的淋巴细胞(VVL受体阳性细胞, VV⁺细胞)。其中具有 Lyt 1⁺ 和 Lyt 2⁺(小鼠)或 CD 8⁺(人)亚群表型的 VV⁺ 细胞, 已发现是调节 T 细胞中一组新的功能亚群, 命名为反抑制 T 细胞(contrasuppressor T cells, Tcs)和/或抗抑制 T 细胞(Antisuppressor T cells, Tas)^[1-4]。有报道指出^[5], 抗抑制和反抑制是抑制反馈调节的两个连续过程, 是机体免疫系统赖以保持协调和自我稳定的机制之一。也有证据提示, Tcs 细胞的量变或功能异常, 和免疫缺陷病^[6], 自身免疫病^[7], 以及肿瘤的发生或消退^[8], 有密切的关系。因此, 识别和示踪 VV⁺ 细胞, 检测其变化规律, 是研究反抑制调节的基本技术之一。

本文报告, 应用荧光标记的 VVL(VVL-FITC)直接示踪法和 VVL 介导的花环形成示踪法, 检测了正常小鼠脾、肠系膜淋巴结和胸腺中 VV⁺ 细胞的相对数, 观察了小鼠在移植肿瘤后, 这类细胞水平的动态变化, 讨论了 VV⁺ 细胞的量变与肿瘤进展的可能相关问题。

材 料 和 方 法

1. 动物 NIH 小鼠, 6—8 周龄, 雌雄兼用。由浙江实验动物中心供应。

2. 试剂 VVL-FITC, Sigma 产品。N-乙酰半乳糖胺, B.D.H. 产品。VVL, 本实验室自制。Vicia villosa 种子由上海农科院畜牧所赠送。

3. 肿瘤 小鼠艾氏腹水癌(EAC), 腹腔移植, 2 × 10⁶ 个细胞/只。

4. VVL 的分离纯化 参照 Tollefsen(1983)^[9] 方法修改。简述如下: 100 克长柔毛野豌豆种子的粉末, 溶于 600 ml 的 PBS(pH 7.4) 中, 搅拌 12 小时。以 4 mol/L 的乙酸将提取液的 pH 调至 4.5, 离心沉降(20,000 × g, 20 分钟, 4℃)。上清液用 2 N 的 NaOH 将 pH 重调至 7.4。加入固体(NH₄)₂SO₄ 至 80% 饱和度, 离心沉降(3,000 × g, 20 分钟, 4℃), 沉淀物溶于 100 ml 的 PBS(pH 7.4) 中, 经充分透析后, 即得 VVL 的粗制品。纯化时, 将粗制的 VVL 通过 Sepharose 6 B 柱层析法, 收集对人的 A 型红细胞有高度凝集活性的组分, 合并冻干, 置 -20℃ 保存。临用前以 PBS 配制成适当浓度的溶液。

5. 小鼠脾、淋巴结和胸腺单细胞悬液制备 正常或带瘤小鼠断颈处死后, 摘取脾、肠系膜淋巴结和胸腺, 分别用挤压法梳理去除结缔组织, 以适量的 PBS(pH 7.2) 制成细胞悬液并使之滤过尼龙网(孔径 20 微米)。滤液经离心沉降后, 将压积细胞重悬浮于含 0.83% NH₄Cl 的缓冲溶液中(0.1 ml 压积细胞/ml 缓冲液), 溶去自身红细胞。细胞经充分洗涤后, 仍以 PBS 配制成一定浓度的单细胞悬液。通常, 细胞存活率为 95% 左右(台盼蓝拒染法判定)。

6. VV⁺ 细胞的直接荧光示踪 根据 Lang(1982)^[10] 的方法修改。在 1 ml 的小鼠脾、淋巴结或胸腺的单细胞悬液中(1 × 10⁷ 个细胞), 分别加入 0.1 mg 的 VVL-FITC, 置冰浴中作用 30 分钟。细胞经洗涤后, 恢复悬液至原浓度。吸取少量细胞悬液制成湿片, 通过荧光镜检(Olympus AH-1 型显微镜, 落射光 UV, 附加用于 FITC 的滤光片组), 计数 200 个细胞中被荧光染料标记的细胞数。VV⁺ 细胞以百分数(% ± SD) 表示。

7. VVL 介导的花环形成法示踪 VV⁺ 细胞 按 Berrih(1981)^[11] 的原理和方法修改。小鼠淋巴组织的单细胞悬液, 溶去自身红细胞后, 在 1 ml 细胞悬液

* 国家自然科学基金资助课题(3870304)。

(1×10^6 个细胞)中,加入亚凝集剂量($25 \mu\text{g/ml}$)的VVL,置室温作用15分钟。细胞经充分洗涤后,重悬浮于1 ml的PBS中(内含0.1% NaN_3)。然后,加入等体积的人A型红细胞,1%RBC),混匀,低速离心(500 rpm, 5分钟)。吸取底层细胞悬液1滴并同时加入结晶紫(0.2%)溶液1滴,制成湿片,置于高倍镜下($\times 400$),观察并计数200个有核细胞中能与8—10个以上的A型RBC形成花环的细胞数。花环形成细胞(即 VV^+ 细胞)以百分数($\% \pm \text{SD}$)表示。

结 果

一、VVL-FITC 直接荧光示踪法检测正常小鼠淋巴器官中的 VV^+ 细胞

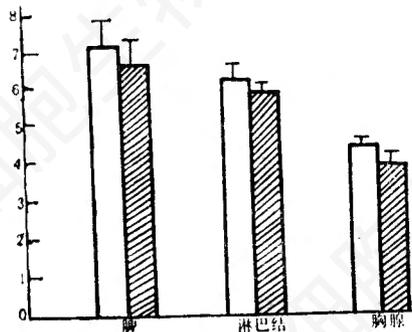
应用VVL-FITC直接荧光染色法显示,正常小鼠脾、肠系膜淋巴结和胸腺中 VV^+ 细胞的相对数,依次为 $6.7\% \pm 0.8$, $5.9\% \pm 0.5$ 和 $4.0\% \pm 0.6$ (图1)。

二、VVL 介导的花环形成法检测 VV^+ 细胞

应用VVL介导的花环形成法,检测正常小鼠上述3种淋巴器官中的 VV^+ 细胞相对数,比上法检测结果略高。脾中 VV^+ 细胞为 $7.2\% \pm 0.9$, 淋巴结为 $6.3\% \pm 0.4$, 胸腺为 $4.5\% \pm 0.4$ (图1)。非特异性自然花环形成率通常低于0.2%。检测个体数为20。

三、N-乙酰半乳糖胺对VVL介导的花环形成的阻断

小鼠脾、淋巴结和胸腺的单细胞经相同剂

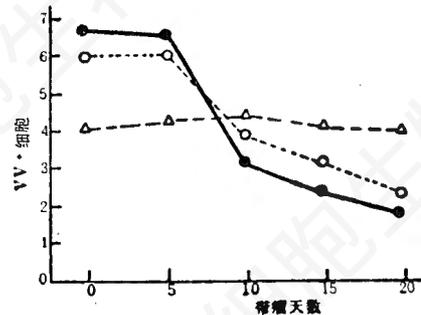


VV^+ 细胞%
图1 正常鼠脾、肠系膜淋巴结和胸腺中 VV^+ 细胞相对数
□ VVL介导花环形成法 ▨ 直接荧光法

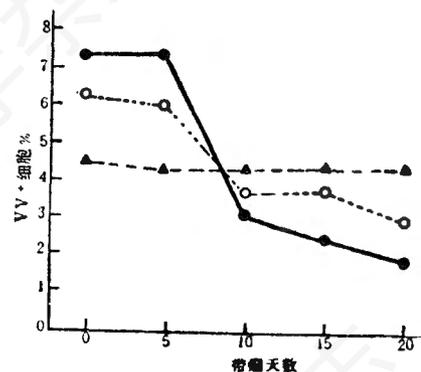
量($25 \mu\text{g/ml}$)的VVL和同样的方法处理后,如细胞悬液中预先有N-乙酰半乳糖胺(GalNAC, 1 mg/ml)存在时,则在加入指示红细胞(A型RBC)后,不再有特异性花环的形成(数据未列)。

四、小鼠移植肿瘤后 VV^+ 细胞水平的动态变化

在小鼠移植EAC后的不同时期,应用上述两种示踪方法同时检测3种淋巴器官中 VV^+ 细胞水平发现,在带瘤早期(5天以内),脾、肠系膜淋巴结和胸腺中的 VV^+ 细胞数和正常鼠(带瘤0天),没有明显的差别。及至带瘤10天,脾及淋巴结的 VV^+ 细胞数急剧减少。带瘤晚期(20天),脾及淋巴结的 VV^+ 细胞水平降



·——·脾 ○·····○淋巴结 ▲——▲胸腺
图2 VVL-FITC直接荧光法检测小鼠移植EAC后 VV^+ 细胞动态变化



·——·脾 ○·····○淋巴结 △——△胸腺
图3 VVL介导的花环形成法检测小鼠移植EAC后 VV^+ 细胞动态变化

至2%左右。但是,在肿瘤进展过程中,胸腺中的 VV^+ 细胞数,未见有明显的改变。应用直接荧光示踪法和VVL介导的花环形成法检测结果表明,3种淋巴器官中 VV^+ 细胞水平的动态变化趋势基本一致。(图2,3)实验观测例数为15。

讨 论

我们应用VVL-FITC直接荧光示踪法和VVL介导的花环形成法检测到,在正常小鼠脾、肠系膜淋巴结和胸腺中,都分别存在一定数量的 VV^+ 细胞。虽然用不同方法所得检测结果略有差别,但相对数值比较接近。据Ptak(1986)^[12]报告,经三硝基酚(TNP)致敏小鼠的全脾细胞,应用VVL粘附法,可分离出25—30%的 VV^+ 细胞。这比我们所得数据显著较高。其原因一方面可能和使用的VVL制品和检测方法不同有关,另一方面,更可能和小鼠的免疫状态不同有关。我们的检测结果,反映了未经免疫小鼠淋巴器官中 VV^+ 细胞水平的正常值。

就上述两种 VV^+ 细胞检测方法的可信性而言,直接荧光法虽然可信性较高,但由于荧光易于淬灭,不利于观察,影响数据的准确性。VVL介导的特异花环形成法则比较简便,检测结果可信性的主要依据有:(1)指示细胞(A型RBC)已确知有VVL的受体^[13]。它们通过有多价结合部的VVL的介导和 VV^+ 的小鼠淋巴细胞联结形成的花环明显而且稳定,容易观察计数。(2)实验证明,A型RBC和小鼠 VV^+ 细胞形成的花环,可被对VVL有高度亲和力的GalNAC所阻断。从而证实,这种花环的形成是有VVL依赖特异性的。(3)A型RBC和小鼠淋巴样细胞极少有非特异性花环形成,不会影响数据的准确性。

小鼠在移植肿瘤后,随着肿瘤的进展,特别从带瘤10天起,除胸腺外,脾及淋巴结中的 VV^+ 细胞水平明显下降。这种下降趋势提示,肿瘤宿主免疫调节功能的异常和 VV^+ 细胞的

减少有关。有证据表明^[8,14],具有 VV^+ , $Lyt1^+$ 亚群表型的T淋巴细胞,包含一类可抵制或取消来自T抑制细胞(Ts)抑制活性的反抑制T细胞(Tcs)。它们在对肿瘤的免疫排斥中,据信发挥重要的作用。由此推测, VV^+ 的TCS细胞在外周淋巴器官中锐减,可能导致抑制和反抑制调节平衡的失常,以致使肿瘤宿主处于抑制优势的低免疫状态^[15]。当然,其确切原因,有待进一步的研究探明。关于小鼠 VV^+ 细胞的分离,表型和功能特性以及反抑制机理等,我们将有另文报道。

摘 要

应用FITC标记的长柔毛野豌豆凝集素(VVL)直接荧光示踪法和VVL介导的花环形成法,在正常小鼠脾、肠系膜淋巴结和胸腺中,分别检测到有一定数量的VVL受体阳性细胞(VV^+ 细胞)。小鼠在移植肿瘤(EAC)后,脾及淋巴结中 VV^+ 细胞明显地逐步减少。但胸腺中 VV^+ 细胞水平,未发现改变。有证据表明, VV^+ 细胞中包含一类反抑制T细胞(Tcs),它们在对肿瘤的免疫排斥中据信发挥重要作用。因此,在肿瘤进展中,外周淋巴器官中 VV^+ 细胞水平的降低,提示了抑制和反抑制调节平衡的失常。这可能是导致肿瘤宿主处于抑制优势的低免疫状态的原因之一。

参 考 文 献

- [1] Green, D. R. et al., 1986, *Immunol. Today*, 7:81.
- [2] Brines, R. et al., 1988, *Immunology*, 63: 247.
- [3] Paraskevas, F. et al., 1985, *Cell. Immunol.*, 92: 53.
- [4] Ernst, P. B. et al., 1989, *J. Immunol.*, 143: 1426.
- [5] Lee, S. T. et al., 1985, *Cell. Immunol.*, 92:64.
- [6] Amaro, R. G. et al., 1988, *Clin. Exp. Immunol.* 71: 399.
- [7] Fortune, F. et al., 1988, *Clin. Exp. Immunol.*, 74: 100.
- [8] Flood, P. M. et al., 1988, *Immunol. Res.* 7:12.