

- [13] 鲍瑞, 陈惠卿, 1962, 实验生物学报, 8: 117.
- [14] Snodgrass, S. R. et al., 1980, *Brain Research*, 190: 123
- [15] Ahmed, Z. et al., 1983, *J. Neurosci.*, 3 (12): 2448
- [16] Louis, J. C. et al., 1983, *Neurosci. Lett.*, 41: 313

局部异种移植物抗宿主反应在判定小鼠 细胞免疫功能上的应用研究

查士隽 胡汛* 郑小群** 江希明 丁仁瑞

(杭州大学生物研究所)

局部异种移植物抗宿主反应 (Local Xeno-genic Graft-vs-Host Reaction, LxGvHR) 是在正常淋巴细胞转移 (NLT) 反应基础上发展起来的可用于判定人的细胞免疫水平的生物鉴定法之一^[1,2]。后经 Shohat (1976)^[3] 和 Mavligit (1979)^[4] 等人的改进, 这一技术已被实验免疫学和肿瘤免疫学研究所采纳^[5-8]。近几年, LxGvHR 试验常用于检测肿瘤患者的细胞免疫功能^[8,9], 并研究人的调节性 T 淋巴细胞的功能特性^[4-6]。这一检测方法, 尚未见推广应用于实验动物 (如小鼠)。本文报告, 依照同一原理和相似的技术, 将小鼠淋巴细胞移植于免疫抑制的豚鼠皮内, 可获得类似的效果, 达到相同的目的, 并讨论了小鼠与豚鼠之间发生的 LxGvHR 的免疫学特征, 以及这一检测系统的有效性问题的。

材料和方 法

(1) 动物

BALB/c 和 C₅₇BL 小鼠 (纯系)、大鼠和豚鼠 (杂种), 均由本所动物室供应。带瘤鼠为腹腔移植艾氏腹水癌 (EAC, 2 × 10⁷/只) 的 BALB/c 成年雄性小鼠。

(2) 局部异种移植物抗宿主反应的诱发

参照 Shohat (1976)^[3] 及 Mavligit (1979)^[4] 方法修改。简述如下, 将正常 (或带瘤) 小鼠的脾、肠系膜淋巴结或胸腺制备成单细胞悬液, 以 ACK 缓冲液 (内含 0.83% NH₄Cl) 溶去残存的红细胞, 经 Hank's 平衡

盐液洗涤后, 细胞重新悬浮于 RPMI-1640 培液中 (1.5 × 10⁸/毫升)。取 0.2 毫升 (3 × 10⁷ 个细胞, 或指定数) 注入 24 小时前经环磷酰胺 (CY, 100 毫克/公斤体重) 免疫抑制处理 (或未处理) 的豚鼠 (或大鼠) 腹部 (毛剃净) 皮内。48 小时后, 以乙醚将豚鼠 (或大鼠) 麻醉至死, 剪下并翻转腹部皮肤, 剥离肌肉, 即可见移植局部皮内有红肿样特征的 GvH 反应块。以游标卡尺量取其平均直径 (mm)。反应强度均以反应块平均面积 (mm² ± S.D.) 表示之。

同种异系小鼠之间的移植及 GvHR 观测方法同上。

(3) 异种移植物及其处理方法

1. 异种红细胞 (RBC): 小鼠血经抗凝处理, 洗涤后以培养液配制成 RBC 悬液 (1.5 × 10⁸/毫升)。

2. 热灭活的小鼠淋巴细胞: 将小鼠脾及淋巴结 (合并) 的单细胞悬液 (1.5 × 10⁸/毫升) 置于 56°C 水浴中加温 45 分钟, 以台盼蓝 (0.4%) 拒染法, 镜检确证 95% 以上为死细胞后备用。

3. 抗 Thy-1 血清预处理小鼠淋巴细胞: 以 1 毫升脾及淋巴结混合的单细胞悬液 (1.5 × 10⁸/毫升) 和等体积的抗 Thy-1 血清 (兔抗 C₃H 鼠脑血清, 上海生物制品所产品) 加等体积的血清补体 (豚鼠冻干血清, 上海生物制品所产品, 按 1:20 稀释), 充分混合, 置于 37°C 温育 30 分钟。然后, 以 Hank's 液洗涤三次, 重新悬浮于 1 毫升的培液中。

* 中国预防医学中心卫生研究所。

** 浙江农业大学牧医系。

结 果

(1) 同种异系及异种植物抗宿主反应强度比较

如表1所示,同种异系小鼠间的移植,只能诱发弱的局部GvH反应($<15\text{ mm}^2$)。反应

块通常在移植后15小时出现,24小时后消退。若以小鼠为供体,大鼠为受体的异种移植,反应出现时间相同,反应强度也较弱($<20\text{ mm}^2$),48小时后消退。而当小鼠淋巴细胞移植于豚鼠皮内,15小时后出现反应块,至48小时后反应强度达到峰值($55-58\text{ mm}^2$),此后,逐渐

表1 同种异系及异种植物抗宿主反应比较

移植供体	移植受体	GvHR(mm^2) \pm S.D.	消退时间(小时)
BALB/c 小鼠	C ₅₇ BL 小鼠	11.15 \pm 3.03	24
C ₅₇ BL 小鼠	BALB/c 小鼠	12.09 \pm 2.70	24
BALB/c 小鼠	大鼠	16.07 \pm 4.04	48
BALB/c 小鼠	豚鼠	58.91 \pm 4.23	120
C ₅₇ BL 小鼠	豚鼠	55.38 \pm 6.37	120

移植物:脾及淋巴结细胞($3 \times 10^7/0.2\text{ ml}$)

消退,120小时后完全消退。

(2) LxGvHR 强度与移植细胞数的关系

以小鼠脾及淋巴结混合细胞移植于免疫抑制的豚鼠皮内,如被移植的细胞太少($<10^5$),则GvH反应不显著($<10\text{ mm}^2$)。当增加移植细胞数时,反应强度也相应递增(图1)。

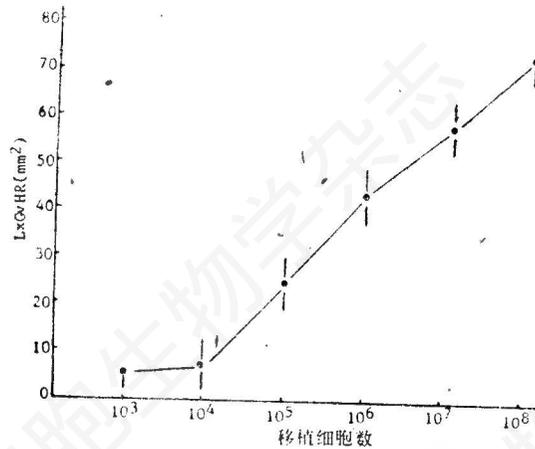


图1 局部异种移植物(小鼠淋巴细胞)抗宿主(豚鼠)反应强度与移植细胞数的关系

(3) 小鼠不同淋巴组织来源的细胞诱发GvH反应强度的差异

当以相同数量的小鼠脾、胸腺、肠系膜淋巴结细胞分别移植于同一免疫抑制的豚鼠皮内时,可见淋巴结细胞诱发的GvH反应强度最

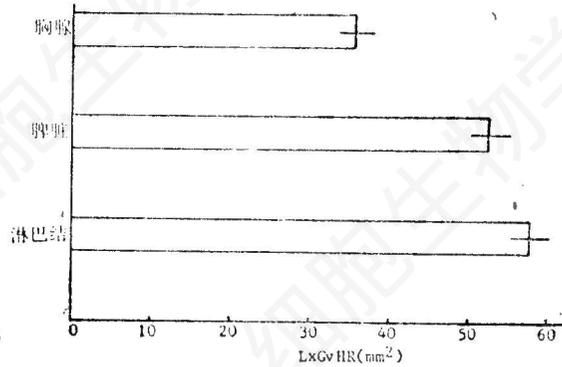


图2 小鼠不同淋巴组织来源的细胞诱发的移植物抗宿主(豚鼠)反应强度比较

大,脾细胞次之,胸腺细胞最小(图2)。

(4) 异种RBC移植结果

如以小鼠RBC($3 \times 10^7/0.2$ 毫升)代替淋巴细胞,以上述相同方式移植于豚鼠皮内,不论何时,移植局部都没有可见的反应块出现(表2)。

(5) 热灭活和经抗Thy-1血清预处理的小鼠淋巴细胞丧失诱发GvHR的能力

小鼠脾及淋巴结混合细胞如经 56°C 灭活或以抗Thy-1血清加补体处理后,以足够的细胞数移植于免疫抑制豚鼠皮内,移植局部无论何时均不出现任何反应(表2)。

表 2 小鼠 RBC 及经不同处理的淋巴细胞在豚鼠皮内诱发 GvHR 能力

移植物	移植物处理	宿主处理	GvHR	消退时间(小时)
RBC	未处理	CY 抑制	-	
淋巴细胞*	56°C 灭活	CY 抑制	-	
淋巴细胞*	抗 Thy-1 + C	CY 抑制	-	
淋巴细胞*	未处理	未处理	±	48
淋巴细胞*	未处理	CY 抑制	+	120

* 小鼠脾及淋巴结细胞(合并)。

(6) 未经免疫抑制剂处理的豚鼠接受异种淋巴细胞的移植

如以小鼠脾及淋巴结混合细胞 ($3 \times 10^7 / 0.2$ 毫升) 移植于未经环磷酰胺处理的豚鼠皮内, 偶然也可诱发弱的 GvH 反应 ($< 20 \text{ mm}^2$), 但不稳定, 并在 48 小时后完全消退(表 2)。

(7) 带瘤(EAC)小鼠淋巴细胞诱发 LxGv-HR 的动态变化

在小鼠接种肿瘤后的第 2 至第 4 天, 其脾及淋巴结细胞(合并)在免疫抑制的豚鼠皮内, 仍能诱发较强的 GvH 反应, 强度接近正常鼠。但是, 从第 6 天开始, 其淋巴细胞诱发 GvH 反应能力急剧下降。至第 12 天又略有回升。以后持续降低, 直至死亡前的第 18 天降至最低值 (15 mm^2) (图 3)。

讨 论

移植免疫反应可不同程度地发生于同种异体、异系或异种动物之间细胞、组织或器官的

移植。如移植物本身是淋巴细胞, 则当它们被植入免疫抑制的异种动物时, 由于供、受体之间种特异的抗原系统的不相容, 异种抗原可刺激移植物中淋巴细胞的活化和扩增, 并因淋巴因子的释放, 增强了宿主小血管的透性而导致局部水肿。同时, 又由于供体淋巴细胞对宿主细胞的攻击造成局部组织的损伤, 结果出现了以红肿块为特征的 LxGvHR^[4]。这一反应的强度通常取决于移植供、受体的非相容程度和移植物中淋巴细胞数、淋巴细胞亚群组成, 以及宿主的免疫状态。我们的实验结果充分显示, (1) 发生在异种动物(特别是小鼠-豚鼠)之间的 GvH 反应远比同种异系小鼠之间的要强烈。(2) 在正常情况下, LxGvHR 强度与被转移的淋巴细胞数呈正相关。(3) 只有活的而不是死的富含淋巴细胞的而不是红细胞的异种移植物, 才能在免疫抑制的宿主皮内诱发强而持久的 LxGvH 反应。(4) 以抗 Thy-1 血清加补体处理移植细胞, 以消除其中 T 细胞的影响, 这

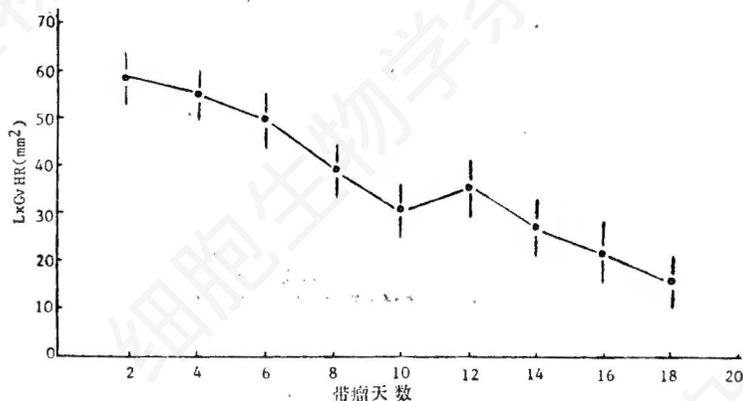


图 3 在肿瘤发展过程中, 小鼠脾及淋巴结混合细胞在豚鼠皮内诱发的 LxGvHR 动态变化

样的移植物不再有诱发 LxGvHR 的能力。根据以上事实,我们推定,小鼠淋巴细胞在免疫抑制的豚鼠皮内诱发的局部红肿反应是 LxGvHR,而不是宿主抗移植物反应(HvGR),或其它形式的迟发超敏反应(DTH)。因此,应用 LxGvHR 试验判定供体的细胞免疫功能是合理和可信的。

至于小鼠不同淋巴组织来源的细胞,其诱发 LxGvHR 强度的差异,一方面可能和该淋巴组织中所含分化成熟的 T 淋巴细胞数的不同有关,另一方面,也可能和淋巴细胞的亚群组成和 T 细胞亚类的组成不同有关^[6]。

在 LxGvHR 试验的实际应用中,我们以带瘤小鼠作为检测对象,发现随着肿瘤的发展,其脾及淋巴结细胞诱发 LxGvHR 的能力逐步降低。这种动态变化趋势提示了肿瘤诱导的抑制细胞(Ts 细胞和/或抑制性巨噬细胞)的出现,可能是肿瘤宿主免疫调节障碍的原因之一^[10-12]。

LxGvHR 检测系统用于判定小鼠的细胞免疫功能水平,有其独特的优点。首先,从这一试验结果反映出来的,不仅是供体 T 淋巴细胞的数量变化,而且也是 T 细胞功能亚群的免疫活性。其次,同一受体动物可同时接受多种不同来源或经过不同方式处理的供体淋巴细胞的移植,实验结果易于对比。第三,便于在体内或体外检测并估价某种药物或免疫调节成分(细胞或分子)对供体 T 细胞功能的影响。第四,此法操作简便,材料节省,重复性及灵敏度均较高。

摘 要

以一定数量小鼠活的淋巴细胞移植于免疫抑制的豚鼠皮内,在移植局部可诱发以红肿为特征的局部异种移植物抗宿主反应(LxGv-HR)。这一反应的强度及持久性,似与种间的非相容性和被转移的淋巴细胞数及其亚群组成等因素有关。供体 T 细胞在介导 LxGvHR 中,可能起主导作用。因此,根据 LxGvHR 的强度,可大体上判定供体小鼠的细胞免疫功能。通过对带瘤小鼠淋巴细胞的异种移植试验表明,LxGvHR 检测系统作为小鼠细胞免疫功能的鉴定法是有效的。这一检测方法操作简便,可重复性及灵敏度均较高。

参 考 文 献

- [1] Brent, L. & Medawar, P., 1964; *Nature.*, 204: 90.
- [2] Brent, L. & Medawar, P., 1966; *Proc. R. Soc. Lond. B.*, 165: 281.
- [3] Shohat, B. et al., 1976; *Clin. Exp. Immunol.*, 24: 534.
- [4] Mavligit, G. et al., 1979; *J. Immunol.*, 123: 2185.
- [5] Mavligit, G. et al., 1982; *Cancer.*, 49: 2029.
- [6] Shohat, B. et al., 1982; *Thymus* 4: 323.
- [7] Talpaz, M. et al., 1983; *J. Immunol. Meth.*, 61: 133.
- [8] Sun, Y. et al., 1983; *Cancer* 52: 70.
- [9] Mavligit, G. et al., 1980; *J. Natl. Cancer Inst.*, 65: 317.
- [10] 胡汛, 查士雋, 江希明, 1986, 中国免疫学杂志, 2: 77.
- [11] 张宗梁等, 1979, 实验生物学报, 12: 13.
- [12] Naor, D., 1979; *Adv. Cancer Res.*, 29: 45.

出 版 消 息

由厦门大学生物系汪德耀教授主编的《普通细胞生物学》一书将于明年出版,需购书者可向当地新华书店或上海科学技术出版社农科编辑室订购(截止时间 1988 年 1 月中旬)。