

欧洲鳗鲡淋巴细胞转化试验条件的建立

郭松林^{1,2,3}, 关瑞章^{1,2}, 冯建军^{1,2,3}

(1. 集美大学 水产学院, 福建 厦门 361021; 2. 中国科学院 水生生物研究所, 湖北 武汉 430072; 3. 中国科学院 研究生院, 北京 100039)

摘要:通过对培养时间、培养温度、刀豆蛋白 A(ConA)质量浓度和鳗鲡血清质量分数 4 个参数的测定,确定欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)外周血淋巴细胞转化试验四甲基偶氮唑(MTT)法的实验条件。结果表明,在培养时间为 42~90 h,培养温度分别为 15.0℃、20.0℃、25.0℃和 30.0℃时,细胞培养液中 ConA 质量浓度分别为 0、10 μg/mL、20 μg/mL 和 30 μg/mL,鳗鲡血清质量分数分别为 0.5%、10%和 15%时,淋巴细胞于 20.0℃、含 10 μg/mL ConA,10%鳗鲡血清的 RPMI1640 细胞培养液中培养 66 h 后可获得最好的淋巴细胞转化效果。方差分析结果显示,4 个因素中仅鳗鲡血清水平对淋巴细胞转化试验 OD 值具有极显著影响($P < 0.01$),而温度、时间和 ConA 对其影响均不显著($P > 0.05$)。本研究建立的鳗鲡外周血淋巴细胞转化试验条件为鳗鲡的细胞免疫建立了研究方法。[中国水产科学,2007,14(3):403-411]

关键词:欧洲鳗鲡;淋巴细胞转化试验;MTT 法;ConA;培养温度;培养时间;鳗鲡血清

中图分类号:Q 959.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1005-8737-(2007)03-0403-09

鱼类的特异性免疫包括体液免疫和细胞免疫两个方面,分别由 B 淋巴细胞和 T 淋巴细胞介导。淋巴细胞转化试验是检测动物细胞免疫水平的常见方法之一。然而,鱼类细胞免疫方面的研究较少,很少被用作评价免疫效果的指标,一般对鱼类特异性免疫水平的检测仅限于体液免疫的抗体水平测定^[1]。淋巴细胞转化试验是利用淋巴细胞与丝裂原在体外共同培养,此时,淋巴细胞的代谢和形态发生一系列变化,并进一步转化为淋巴母细胞这一特性来反映机体免疫状态的一种试验,可作为细胞免疫水平的一个测定指标^[2]。其常用测定方法有形态学法、同位素掺入法(³H-TdR 掺入法)、四甲基偶氮唑(MTT)法。MTT 法是根据转化的淋巴母细胞线粒体脱氢酶能切断 MTT 的四唑环生成深蓝色的甲臜(Blue formazan crystals),该产物溶解于有机溶剂(SDS,DMSO 等)后能在波长为 550 nm 时被最大吸收,生成甲臜的量与淋巴细胞转化率呈正相关^[3],从而换算出淋巴细胞密度。该法既克服了形态学方法主观误差大的缺点,又能消除同位素掺入法的放射性污染,是目前最为常用的细胞免疫检测方法之

一。近年来,许多学者分别用植物凝血素(PHA)和刀豆蛋白 A(ConA)与从鸡、火鸡、鸭^[4-6]分离到的外周血淋巴细胞进行培养研究。结果表明,培养温度、时间、血清和 ConA 浓度对体外培养的淋巴细胞转化影响较大。水产动物在此方面的研究较少,Daly 等^[7]研究了不同丝裂原(ConA,PHA,LPS)对鲑(*Salvelinus fontinalis*)外周血淋巴细胞转化试验的影响。结果表明,10 μg/mL 的 ConA 能有效刺激 T 淋巴细胞转化。Marial 等^[8]的研究表明,鱼类淋巴细胞的培养温度应略高于其养殖的环境温度。另有研究表明,鱼类淋巴细胞的培养液中加入一定量的灭活同源血清有利于其转化^[9-10]。本实验分离欧洲鳗鲡(*Anguilla anguilla*)外周血淋巴细胞,在温度为 15.0~30.0℃、含 0%~15%的鳗鲡血清和 0~30 μg/mL ConA 范围内的 RPMI 细胞培养液中于不同时间培养,以探讨鳗鲡外周血淋巴细胞转化试验的条件,从而为鳗鲡以及其他鱼类外周血淋巴细胞转化试验提供有效方法,为鱼类细胞免疫水平的研究提供重要参考依据。

收稿日期:2006-07-20; **修订日期:**2006-10-18.

基金项目:福建省科技重大专题子课题项目(2004N203-2);福建省自然科学基金项目(B0410021);福建省教育厅项目(2002N024);厦门市科技局项目(3502Z2001);集美大学科研基金项目(F03015).

作者简介:郭松林(1976-),男,博士,讲师,从事鱼类病害与免疫防治研究. E-mail: gsl@jmu. edu. cn

通讯作者:关瑞章. 教授,博士生导师. Tel(Fax): 0592-6188973; E-mail: rzguan@jmu. edu. cn

1 材料与方法

1.1 实验动物

20 尾健康欧洲鳗鲡(体质量 150~200 g)由厦门同安养鳗场提供。

1.2 试剂及仪器

1.2.1 试剂 RPMI 1640(GIBCO)营养液:取 RPMI 1640 原粉 1 包(10 g),溶于 200 mL 超纯水,加 1 g NaHCO_3 、4 μL 2-巯基乙醇和 8.525 g Hepes,调 pH 值至 7.0~7.1,超纯水定容至 1 000 mL, φ 25 mm 孔径 0.22 μm 的微孔滤膜正压过滤,4 $^\circ\text{C}$ 保存备用,加入 10% 小牛血清(Hyclone)时称为 RPMI1640 完全营养液。ConA(Sigma)溶液:ConA 2.0 mg 溶于 20 mL RPMI1640 营养液, φ 25 mm 孔径 0.22 μm 滤膜除菌,-20 $^\circ\text{C}$ 保存。MTT(Biomol)溶液:MTT 1.0 g 溶于 50 mL 0.01 mol/L (pH7.4) 的 PBS, φ 25 mm 孔径 0.22 μm 滤膜除菌,4 $^\circ\text{C}$ 避光保存。0.1% 肝素溶液:肝素钠(上海化学试剂公司)0.1 g 溶于 100 mL 生理盐水, φ 25 mm 孔径 0.22 μm 滤膜除菌,-20 $^\circ\text{C}$ 保存。

1.2.2 仪器 细胞培养板(nunclon),酶标仪(CliniBio128C),离心机(Backman)。

1.3 鳗鲡外周血淋巴细胞悬液的制备

鳗鲡断尾采血 20 mL,加 0.1% 肝素钠 2 mL 抗凝,血液等分为 4 份,每份 5 mL。血样沿离心管管壁轻轻加于已装有 5 mL 淋巴细胞分离液(Ficoll, 1.077;上海试剂二厂)的玻璃离心管上层,2 500 r/min 水平离心 20 min,吸取上层的血清,灭活补体(65 $^\circ\text{C}$ 水浴 30 min)后备用,小心取出中层的白色淋巴细胞,移入另一无菌离心管,加 RPMI 1640 营养液 5 mL 吹散洗涤淋巴细胞,3 000 r/min 水平离心 10 min,淋巴细胞再用 RPMI 1640 完全营养液洗涤 2 遍。取洗涤后的淋巴细胞悬液 10 μL ,加 5 μL 0.6% 的台盼蓝拒染,活淋巴细胞计数,用 RPMI 1640 完全营养液调整细胞密度为 $2 \times 10^7/\text{mL}$ 。

1.4 淋巴细胞培养及检测

取 RPMI 1640 完全营养液(分别含 ConA 0 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、40 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、60 $\mu\text{g}/\text{mL}$,含鳗鲡血清 0%、10%、20%、30%,共 16 个组合)加入 96 孔细胞培养板,每孔 50 μL ;再加入密度为 $2 \times 10^7/\text{mL}$ 的淋巴细胞悬液 50 μL ,合计每孔 100 μL ,每个组合做 3

孔,以相应的无细胞培养液孔为对照调 OD 值为零。淋巴细胞分别于 15.0 $^\circ\text{C}$ 、20.0 $^\circ\text{C}$ 、25.0 $^\circ\text{C}$ 和 30.0 $^\circ\text{C}$ 培养。每个温度设 3 块细胞培养板,3 块板置于生化培养箱饱和湿度分别培养 42 h、66 h 和 90 h 后取出,每孔加 5 mg/mL MTT 15 μL ,继续培养 4 h 后每孔加 DMSO 200 μL ,边加边混匀,室温放置 10 min,用酶标仪检测 OD₅₅₀ 的光吸值。将上述实验重复 1 次。

1.5 数据及统计分析

不同条件培养下的淋巴细胞转化试验 OD 值采用平均值 \pm 标准差表示($\bar{X} \pm \text{SD}$),通过以下公式计算 ConA 对淋巴细胞的刺激指数(Stimulation Index, SI): $\text{SI} = (\text{加入某一浓度 ConA 后的 OD 值} / \text{不加 ConA 对照孔 OD 平均值}) - 1$ 。针对刺激指数,采用 SAS 统计学软件对培养温度、培养时间、鳗鲡血清浓度和 ConA 浓度 4 个参数进行四因素方差分析和多重比较(Duncan 法),以确定最佳的培养条件。

2 结果与分析

2.1 15.0 $^\circ\text{C}$ 培养淋巴细胞转化试验结果

15.0 $^\circ\text{C}$ 时淋巴细胞分别培养 42 h、66 h 和 90 h 后,随着培养液中鳗鲡血清浓度的增加,OD 值总体逐渐下降(表 1)。ConA 对淋巴细胞具有刺激作用,培养 42 h 后 SI 最大值(SI=0.200)出现在 ConA 为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组,鳗鲡血清质量分数为 15% 时;以无鳗鲡血清培养液培养 66 h 后,ConA 为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时对淋巴细胞的刺激效应最强(SI=0.249);培养 90 h 后 SI 最大值(SI=0.268)出现在 ConA 为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组和鳗鲡血清质量分数为 15% 时。当 ConA 阻止淋巴细胞的转化时,SI 出现负值。

2.2 20.0 $^\circ\text{C}$ 培养淋巴细胞转化试验结果

淋巴细胞于 20.0 $^\circ\text{C}$ 分别培养 42 h、66 h 和 90 h 后,随着淋巴细胞培养液中鳗鲡血清的含量增加,OD 值先增大后减小(表 2)。ConA 对淋巴细胞亦有刺激效应,但培养 42 h 时这种效应不明显,其 SI 最大值仅为 0.134。培养 66 h 后,SI 最大值(0.425)出现在 ConA 质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和鳗鲡血清质量分数为 15% 时;培养 90 h 后,SI 最大值(0.241)出现在 ConA 质量浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和鳗鲡血清质量分数为 15% 时。

表1 15℃不同培养时间、鳗鲡血清质量分数和 ConA 质量浓度的淋巴细胞
转化试验 OD 值和 ConA 对淋巴细胞转化的刺激指数(SI)

Tab.1 Effects of culture time, different dose of foetal bovine serum and ConA on optical density (OD) and
ConA stimulation index(SI) of lymphocyte proliferation at 15℃ $n = 6; \bar{X} \pm SD$

培养时间/h Cultured time	鳗鲡血清质量分数/% Eel serum concentration		ConA 质量浓度/($\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$) ConA concentration				
			0	10	20	30	
42	0	OD	1.369 ± 0.055	1.260 ± 0.160	1.136 ± 0.084	1.428 ± 0.078	
		SI		-0.080 ± 0.077	-0.170 ± 0.061	0.043 ± 0.057	
	5	OD	1.019 ± 0.028	0.992 ± 0.023	1.064 ± 0.017	1.106 ± 0.014	
		SI		-0.026 ± 0.022	0.044 ± 0.016	0.085 ± 0.013	
	10	OD	0.971 ± 0.057	1.005 ± 0.063	1.013 ± 0.063	1.058 ± 0.044	
		SI		0.035 ± 0.065	0.062 ± 0.065	0.090 ± 0.045	
	15	OD	0.775 ± 0.222	0.930 ± 0.053	0.853 ± 0.027	0.839 ± 0.082	
		SI		0.200 ± 0.068	0.101 ± 0.035	0.083 ± 0.106	
	66	0	OD	1.124 ± 0.055	1.124 ± 0.045	1.122 ± 0.037	1.404 ± 0.002
			SI		0 ± 0.040	-0.002 ± 0.033	0.249 ± 0.002
		5	OD	1.237 ± 0.061	1.201 ± 0.061	1.156 ± 0.079	1.244 ± 0.045
			SI		-0.029 ± 0.049	-0.065 ± 0.064	0.006 ± 0.036
10		OD	1.056 ± 0.021	0.720 ± 0.004	1.009 ± 0.079	1.083 ± 0.039	
		SI		-0.318 ± 0.004	-0.045 ± 0.075	0.026 ± 0.037	
15		OD	0.851 ± 0.157	0.950 ± 0.023	0.985 ± 0.030	0.956 ± 0.207	
		SI		0.116 ± 0.027	0.157 ± 0.035	0.123 ± 0.243	
90		0	OD	0.990 ± 0.141	1.054 ± 0.044	1.013 ± 0.078	0.991 ± 0.028
			SI		0.065 ± 0.044	0.023 ± 0.078	0.001 ± 0.028
		5	OD	1.117 ± 0.055	1.050 ± 0.101	0.983 ± 0.066	1.054 ± 0.058
			SI		-0.060 ± 0.090	-0.120 ± 0.059	-0.056 ± 0.052
	10	OD	0.756 ± 0.100	0.899 ± 0.054	0.824 ± 0.032	0.88 ± 0.000	
		SI		0.189 ± 0.071	0.090 ± 0.042	0.164 ± 0.000	
	15	OD	0.684 ± 0.045	0.749 ± 0.087	0.859 ± 0.188	0.867 ± 0.016	
		SI		0.095 ± 0.127	0.256 ± 0.275	0.268 ± 0.023	

注:黑体表示某一培养温度和培养时间的 SI 最大值。

Note: Overstriking number indicates the max SI of certain temperature and culture time.

表 2 20 ℃不同培养时间、鳗鲡血清质量分数和 ConA 质量浓度的淋巴细胞转化试验 OD 值和 ConA 对淋巴细胞转化的刺激指数(SI)

Tab.2 Effects of culture time, different dose of foetal bovine serum and ConA on the optical density(OD) and ConA stimulation index(SI) of lymphocyte proliferation at 20 ℃

$n = 6; \bar{X} \pm SD$

培养时间/h Cultured time	鳗鲡血清质量分数/% Eel serum concentration		ConA 质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ConA concentration			
			0	10	20	30
42	0	OD	1.437 ± 0.144	1.370 ± 0.176	1.367 ± 0.104	1.393 ± 0.078
		SI		-0.047 ± 0.122	-0.049 ± 0.072	-0.031 ± 0.054
	5	OD	1.262 ± 0.077	1.320 ± 0.053	1.373 ± 0.074	1.276 ± 0.272
		SI		0.046 ± 0.042	0.088 ± 0.059	0.011 ± 0.216
	10	OD	1.342 ± 0.141	1.362 ± 0.051	1.415 ± 0.033	1.274 ± 0.086
		SI		0.015 ± 0.038	0.054 ± 0.025	-0.051 ± 0.064
15	OD	1.107 ± 0.531	1.035 ± 0.404	1.255 ± 0.218	1.021 ± 0.128	
	SI		-0.065 ± 0.365	0.134 ± 0.197	-0.078 ± 0.116	
66	0	OD	1.332 ± 0.016	1.253 ± 0.062	1.225 ± 0.029	1.219 ± 0.074
		SI		-0.059 ± 0.047	-0.080 ± 0.022	-0.085 ± 0.056
	5	OD	1.626 ± 0.031	1.521 ± 0.042	1.065 ± 0.084	1.555 ± 0.085
		SI		-0.065 ± 0.026	-0.345 ± 0.052	-0.044 ± 0.052
	10	OD	1.311 ± 0.045	1.392 ± 0.136	1.490 ± 0.080	1.406 ± 0.043
		SI		0.062 ± 0.104	0.137 ± 0.061	0.072 ± 0.033
15	OD	0.997 ± 0.338	1.421 ± 0.015	1.385 ± 0.033	1.337 ± 0.088	
	SI		0.425 ± 0.015	0.389 ± 0.033	0.341 ± 0.088	
90	0	OD	1.066 ± 0.603	0.939 ± 0.038	0.891 ± 0.031	0.871 ± 0.076
		SI		-0.119 ± 0.036	-0.164 ± 0.029	-0.183 ± 0.071
	5	OD	1.137 ± 0.109	0.855 ± 0.151	1.075 ± 0.057	1.078 ± 0.073
		SI		-0.248 ± 0.133	-0.055 ± 0.050	-0.052 ± 0.064
	10	OD	0.932 ± 0.039	0.948 ± 0.051	0.916 ± 0.214	0.982 ± 0.026
		SI		0.017 ± 0.055	-0.017 ± 0.230	0.054 ± 0.028
15	OD	0.752 ± 0.016	0.740 ± 0.067	0.933 ± 0.291	0.900 ± 0.104	
	SI		-0.016 ± 0.089	0.241 ± 0.388	0.197 ± 0.138	

注:黑体表示某一培养温度和培养时间的 SI 最大值。

Note: Overstriking number indicates the max SI of certain temperature and culture time.

2.3 25.0 ℃培养淋巴细胞转化试验结果

淋巴细胞于 25.0 ℃培养时转化试验的 OD 值高于前 2 个温度组(15.0 ℃和 20.0 ℃)。表 3 显示,淋巴细胞培养 42 h 后的 SI 值总体高于培养 66 h 和 90 h 后的值。前者 SI 最大值(0.401)出现在 ConA

质量浓度为 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 而鱼血清质量分数为 15% 时;后两者 SI 最大值(分别为 0.382 和 0.261)均出现在鱼血清质量分数为 0%, 而 ConA 质量浓度分别为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时。该温度下培养 66 h 后 ConA 对淋巴细胞的转化未表现出负效应。

表 3 25 ℃ 不同培养时间、鳗鲡血清质量分数和 ConA 质量浓度的淋巴细胞转化试验 OD 值和 ConA 对淋巴细胞转化的刺激指数(SI)

Tab.3 Effects of culture time, different dose of foetal bovine serum and ConA on the optical density(OD) and ConA stimulation index(SI) of lymphocyte proliferation at 25 ℃

$n = 6; \bar{X} \pm SD$

培养时间/h Cultured time	鳗鲡血清质量分数/% Eel serum concentration		ConA 质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$ ConA concentration			
			0	10	20	30
42	0	OD	1.771 ± 0.147	1.806 ± 0.076	1.884 ± 0.068	1.915 ± 0.034
		SI		0.020 ± 0.043	0.064 ± 0.038	0.081 ± 0.019
	5	OD	1.544 ± 0.090	1.793 ± 0.049	1.737 ± 0.051	1.737 ± 0.116
		SI		0.161 ± 0.032	0.125 ± 0.033	0.125 ± 0.075
	10	OD	1.637 ± 0.078	1.885 ± 0.063	2.018 ± 0.056	1.641 ± 0.200
		SI		0.151 ± 0.038	0.233 ± 0.034	0.002 ± 0.122
	15	OD	1.494 ± 0.433	2.093 ± 0.163	1.369 ± 0.315	1.157 ± 0.177
		SI		0.401 ± 0.109	-0.084 ± 0.211	-0.226 ± 0.118
66	0	OD	1.394 ± 0.099	1.472 ± 0.041	1.926 ± 0.047	1.498 ± 0.054
		SI		0.056 ± 0.029	0.382 ± 0.034	0.075 ± 0.039
	5	OD	1.648 ± 0.055	1.940 ± 0.061	1.766 ± 0.072	1.979 ± 0.032
		SI		0.177 ± 0.037	0.072 ± 0.044	0.201 ± 0.019
	10	OD	1.596 ± 0.124	1.723 ± 0.048	1.851 ± 0.020	1.705 ± 0.064
		SI		0.080 ± 0.030	0.160 ± 0.013	0.068 ± 0.040
	15	OD	1.454 ± 0.404	1.676 ± 0.070	1.678 ± 0.052	1.730 ± 0.032
		SI		0.153 ± 0.048	0.153 ± 0.031	0.190 ± 0.036
90	0	OD	1.071 ± 0.043	1.350 ± 0.045	1.271 ± 0.162	1.095 ± 0.019
		SI		0.261 ± 0.042	0.187 ± 0.151	0.022 ± 0.018
	5	OD	1.511 ± 0.068	1.317 ± 0.052	1.226 ± 0.023	1.211 ± 0.087
		SI		-0.128 ± 0.034	-0.189 ± 0.015	-0.199 ± 0.058
	10	OD	1.245 ± 0.070	1.258 ± 0.084	1.274 ± 0.315	1.175 ± 0.29
		SI		0.010 ± 0.067	0.023 ± 0.253	-0.056 ± 0.233
	15	OD	1.001 ± 0.283	1.046 ± 0.032	0.977 ± 0.244	1.001 ± 0.052
		SI		0.045 ± 0.032	-0.024 ± 0.244	0 ± 0.052

注:黑体表示某一培养温度和培养时间的 SI 最大值。

Note: Overstriking number indicates the max SI of certain temperature and culture time.

2.4 30.0 ℃ 培养淋巴细胞转化试验结果

淋巴细胞于 30.0 ℃ 培养时转化试验的 OD 值高于前 3 个温度组,随着淋巴细胞培养液中鳗鲡血清含量的增加,OD 值一般先增大后减小(表 4)。该温度下培养 42 h 和 90 h 后,无鳗鲡血清培养液培养

时 ConA 的刺激效应均最强,培养 42 h 和 90 h 时 SI 最大值(分别为 0.162 和 0.224)均出现在 ConA 质量浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时;66 h 培养时 SI 最大值(0.183)出现在 ConA 质量浓度为 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和鳗鲡血清质量分数为 10% 时。

表4 30℃不同培养时间、鳗鲡血清质量分数和 ConA 质量浓度的淋巴细胞转化试验 OD 值和 ConA 对淋巴细胞转化的刺激指数(SI)

Tab.4 Effects of culture time, different dose of foetal bovine serum and ConA on the optical density(OD) and ConA stimulation index(SI) of lymphocyte proliferation at 30℃ $n=6; \bar{X} \pm SD$

培养时间/h Cultured time	鳗鲡血清质量分数/% Eel serum concentration		ConA 质量浓度/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$) ConA concentration				
			0	10	20	30	
42	0	OD	1.845 ± 0.035	2.036 ± 0.036	2.142 ± 0.031	2.098 ± 0.165	
		SI		0.104 ± 0.020	0.162 ± 0.017	0.137 ± 0.089	
	5	OD	1.791 ± 0.283	1.779 ± 0.057	1.785 ± 0.071	1.930 ± 0.124	
		SI		-0.007 ± 0.032	-0.005 ± 0.040	0.078 ± 0.069	
	10	OD	1.685 ± 0.092	1.930 ± 0.094	1.710 ± 0.116	1.870 ± 0.272	
		SI		0.145 ± 0.056	0.015 ± 0.069	0.110 ± 0.161	
	15	OD	1.497 ± 0.000	1.522 ± 0.107	1.530 ± 0.011	1.540 ± 0.198	
		SI		0.037 ± 0.071	0.022 ± 0.007	0.029 ± 0.132	
	66	0	OD	1.759 ± 0.094	1.870 ± 0.030	1.974 ± 0.019	1.968 ± 0.047
			SI		0.063 ± 0.017	0.122 ± 0.011	0.119 ± 0.027
		5	OD	2.159 ± 0.050	2.097 ± 0.203	2.088 ± 0.181	2.104 ± 0.137
			SI		-0.029 ± 0.094	-0.033 ± 0.084	-0.025 ± 0.063
10		OD	1.723 ± 0.068	1.980 ± 0.053	2.026 ± 0.052	2.038 ± 0.077	
		SI		0.149 ± 0.031	0.176 ± 0.030	0.183 ± 0.045	
15		OD	1.939 ± 0.455	2.118 ± 0.063	2.140 ± 0.072	2.241 ± 0.219	
		SI		0.092 ± 0.032	0.104 ± 0.037	0.156 ± 0.113	
90		0	OD	1.026 ± 0.027	1.088 ± 0.066	1.256 ± 0.074	1.189 ± 0.084
			SI		0.060 ± 0.064	0.224 ± 0.072	0.159 ± 0.082
		5	OD	1.361 ± 0.025	1.324 ± 0.161	1.102 ± 0.168	1.111 ± 0.228
			SI		-0.027 ± 0.118	-0.190 ± 0.123	-0.183 ± 0.168
	10	OD	0.933 ± 0.134	1.005 ± 0.034	1.130 ± 0.146	0.930 ± 0.064	
		SI		0.077 ± 0.036	0.211 ± 0.156	-0.003 ± 0.069	
	15	OD	1.052 ± 0.000	1.046 ± 0.157	1.081 ± 0.211	0.757 ± 0.074	
		SI		-0.006 ± 0.149	0.028 ± 0.201	-0.280 ± 0.070	

注:黑体表示某一培养温度和培养时间的 SI 最大值。

Note:Overstriking number indicates the max SI of certain temperature and culture time.

2.5 方差分析结果

方差分析结果表明,4个因素中仅鳗鲡血清质量分数对淋巴细胞转化试验 OD 值具有极显著影响($P < 0.01$),温度、时间和 ConA 质量浓度对淋巴细胞转化试验的影响均不显著($P > 0.05$)。多因素交互效应分析结果表明,培养温度、培养时间和血清浓

度3个因素的两两之间均存在显著的交互效应($P < 0.05$);同时,培养温度、培养时间和血清浓度3个因素间也有显著($P < 0.05$)的交互效应。4个鳗鲡血清水平对淋巴细胞转化试验影响程度由高到低依次为15%、10%、0%和5%;多重比较结果表明,15%与10%间差异不显著($P > 0.05$),10%与0%

间差异不显著($P>0.05$),其他浓度之间差异显著($P<0.05$)。

3 讨论

3.1 温度和培养时间对鳗鲡淋巴细胞转化的影响

由于淋巴细胞取自活体动物血液,因此,选择淋巴细胞体外培养的温度通常参照淋巴细胞来源动物的体温。一般哺乳动物和人类的淋巴细胞采用 37℃ 培养^[11],禽类则常在 39℃ 以上培养^[12-13]。因鱼类是变温动物,较难确定其淋巴细胞的最佳培养温度,Daly 等^[7]采用 18℃ 培养鲑外周血淋巴细胞。本实验结合鳗鲡在不同季节的体温于实验中设计了低(15℃)、中(20℃和 25℃)、高(30℃)4 个温度梯度。结果表明,温度适中时有利于淋巴细胞的转化,鳗鲡淋巴细胞转化试验的最大值出现在 20℃ 培养时(表 2,SI=0.425),次大值出现在 25℃ 培养时(表 3,SI=0.401),但 4 个温度对鳗鲡淋巴细胞转化的影响总体差异不显著($P<0.05$),原因可能由于各因素间显著的交互效应引起。

就培养时间而言,哺乳动物和禽类 T 细胞被 T 细胞受体(TCR)复合物(如 ConA)刺激后,其有丝分裂活性可在体外培养后 48~72 h 检测到^[14],因而国内外学者在用 MTT 法做哺乳动物和禽类的淋巴细胞转化试验时常用 48~72 h 培养^[4,12]。易道生^[15]探讨了鸡淋巴细胞 48 h 和 72 h 培养对 OD 值的影响并进行了比较,发现后者显著优于前者。郭松林^[6]对鸭淋巴细胞 56 h 和 66 h 培养后亦发现后者优于前者。本实验在上述研究基础上设计了 42 h、66 h 和 90 h 3 个培养时间,结果表明,淋巴细胞转化试验的培养时间受温度和鳗鲡血清交互作用的影响,温度较高时(25℃和 30℃)转化试验要求的培养时间较短,而较低时(15℃和 20℃)要求的时间较长。总体而言,培养 66 h 后的淋巴细胞转化水平优于培养 42 h,而培养 42 h 时又优于 90 h,但 3 个培养时间的差异均不显著($P>0.05$)。

3.2 ConA 浓度对鳗鲡淋巴细胞转化的影响

ConA 为 T 淋巴细胞丝裂原,可与 T 淋巴细胞膜表面的受体结合而活化细胞,促进其分裂增殖,但 ConA 过量可对细胞产生毒性效应而阻止细胞的增殖。使用 MTT 法检测鸡外周血淋巴细胞转化试验时,多数学者采用的浓度极不一致,李繁等^[14]采用 10 μg/mL, Khinakar 等^[5]采用 32 μg/mL,乔彦良

等^[13]采用 45 μg/mL。有研究^[16]认为,低剂量 ConA(2.5~10 μg/mL)可得到较好的转化效果,当 ConA 质量浓度达 20 μg/mL 以上时将出现负效应。对于鱼类,Fujiwara 等^[17]研究发现,在 ConA 质量浓度为 0、15 μg/mL 和 50 μg/mL 时,15 μg/mL 的 ConA 能够有效刺激虹鳟(*Onchorhynchus mykiss*)外周血淋巴细胞的转化。也有研究^[9]表明,不同鱼类外周血淋巴细胞转化试验对最佳的 ConA 浓度要求存在显著差异。本研究设计了 10 μg/mL、20 μg/mL 和 30 μg/mL 3 个浓度梯度进行研究。结果表明,ConA 对淋巴细胞的刺激受温度、培养时间和鳗鲡血清交互作用的显著($P<0.05$)影响,但 SI 最大值均出现在 ConA 质量浓度为 10 μg/mL 时(表 2、表 3)。

3.3 血清对鳗鲡淋巴细胞转化的影响

淋巴细胞培养时灭活补体的小牛血清因能促进淋巴细胞转化而被普遍采用,哺乳动物和禽类一般使用质量分数为 5%~10%^[6,13,15-16],而鱼类淋巴细胞培养时小牛血清质量分数通常为 10%^[7,10]。有报道^[18]认为,当培养液中含 10% 小牛血清时加入鱼类同源血清可数十倍地提高其淋巴细胞转化水平,故本研究在含 10% 的小牛血清培养液中添加了 0%、5%、10% 和 15% 的 4 个鳗鲡血清水平,以探讨鳗鲡血清对其淋巴细胞转化的影响。结果表明,细胞培养液中添加同源血清对鳗鲡淋巴细胞的转化有极显著($P<0.01$)影响,但尚未达到 DeKoning 等^[10,18]研究的数十倍效应,考虑到其试验是在虹鳟和鲑中进行的,故可能由种属差异引起。有人认为添加同源血清可为淋巴细胞的转化提供活性因子^[19],其机理尚有待进一步研究。

参考文献:

- [1] Toranzo A E, Devesa S, Romalde J L, et al. Efficacy of intraperitoneal and immersion vaccination against *Enterococcus* sp. infection in turbot[J]. *Aquaculture*, 1995, 134: 17-27.
- [2] Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays[J]. *J Immunol Methods*, 1983, 16: 55-63.
- [3] Bounous D I, Campagnoli R P, Brown J. Comparison of MTT colorimetric assay and tritiated thymidine uptake for lymphocyte proliferation assays using chicken splenocytes[J]. *Avian Dis*, 1992, 36 (4): 1022-1027.
- [4] Barta O, Barta V. Optimum conditions for the chicken lymphocyte transformation test[J]. *Avian Dis*, 1992, 36(2): 945-955.
- [5] Khinakar R G, Jones R C. Effect of storage of chicken and turkey

- blood on the lymphocyte responses to concanavalin A and pokeweed mitogen[J]. *Vet Immunol Immunop*, 1997, 56:353 - 362.
- [6] 郭松林, 谌南辉, 易道生. 鸭淋巴细胞转化试验(MTT法)最佳条件的研究[J]. *江西农业大学学报*, 2001, 23(1): 126 - 129.
- [7] Daly J G, Moore A R, Oliver G. A colorimetric assay for the quantification of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) lymphocyte mitogenesis[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1995, 5: 265 - 273.
- [8] Marial E, Collazos E R, Carmen B. Influence of the temperature upon the proliferative response of lymphocytes of tench (*Tinca tinca*) during winter and summer[J]. *Comp Immuno Microbiol Infect Dis*, 1995, 18 (3): 209 - 214.
- [9] Tillitt, D E, Giesy J P, Fromm P O. *In vitro* mitogenesis of peripheral blood lymphocytes from rainbow trout (*Salmo gairdneri*) [J]. *Comp Biochem Physiol*, 1988, 89: 25 - 35.
- [10] Dekoning J, Kaattari S L. An improved salmonid lymphocyte culture medium incorporating plasma for *in vitro* antibody production and mitogenesis[J]. *Fish Shellfish Immunol*, 1992, 2: 275 - 285.
- [11] 巴年德. 当代免疫学技术与应用[M]. 北京: 北京医科大学出版社, 1998: 47, 203 - 257.
- [12] 乔彦良, 杨汉春, 郭玉璞. 左旋咪唑对鸡细胞免疫和体液免疫功能的作用[J]. *畜牧与兽医*, 2000, 32(2): 1 - 4.
- [13] Michel Y. Why did infection with *Aeromonas hydrophila* occur when water contains so many other microorganisms? [J]. *Clin Infect Dis*, 1993, 16: 174.
- [14] 李繁, 谢明权, 林辉环, 等. 免疫增强剂促进鸡球虫细胞免疫的研究[J]. *中国预防兽医学报*, 2000, 22(3): 196 - 199.
- [15] 易道生. 海藻提取物对鸡免疫功能影响的研究[D]. 南昌: 江西农业大学, 2000.
- [16] 李祥瑞, 金红, 王秀丽, 等. 以 MTT 比色法检测鸡脾淋巴细胞转化效果[J]. *畜牧与兽医*, 1996, 28: 3 - 4.
- [17] Fujiwara A, Nishida-Umehara C, Sakamoto T, et al. Improved fish lymphocyte culture for chromosome preparation[J]. *Genetica*, 2001, 111: 77 - 89.
- [18] DeKoning J, Kaattari S. Mitogenesis of rainbow trout peripheral blood lymphocytes requires homologous plasma for optimal responsiveness[J]. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1991, 27: 381 - 386.
- [19] Loa C C, Lin T L, Wu C C. Factors affecting mitogenic response of turkey lymphocytes[J]. *Acta Vet Brno*, 2001, 70: 433 - 442.

Optimum conditions of lymphocyte proliferation of European eel

GUO Song-lin^{1,2,3}, GUAN Rui-zhang^{1,2}, FENG Jian-jun^{1,2,3}

(1. Aquaculture College of Jimei University, Xiamen 361021, China; 2. Institute of Hydrobiology Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 3. Graduate school of Chinese Academy of sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: One of experiments to indicate the immune status of the fish is the *in vitro* culture of lymphocytes and mitogen which will cause series changes of metabolizability and morphology of the lymphocytes and then induce the lymphocytes transforming to the lymphoblasts. This experiment of lymphocyte proliferation can be used as an index of cell immunology level and has been used for determining T cells mediated immunology. Many researches on mammal and avian indicated that culture temperature, culture time, concentration of animal serum and ConA had significant effects on lymphocyte proliferation *in vitro* culture, but few studies on the suitable condition for the fish lymphocyte proliferation were reported. To study the optimum condition of the lymphocyte proliferation, we isolated the peripheral blood lymphocyte of European eel (*Anguilla anguilla*) and incubated it in the RPMI 1640 medium (containing 10% fetal bovine serum, FBS) under the different temperature, cultured time, eel serum and ConA concentrations. We expect the results of this study would provide an effective method for peripheral blood lymphocyte proliferation of eel and other fish, and an important reference for the further studies on the cell-mediated immunology of fish. In the experiment, European eel (150 - 200 g) obtained from Tongan Farm of Xiamen in China were cultured in aquaria supplied with aerated water in dark environment at room temperature. The fish were fed with commercial pellete feed twice a day. Prior to the experiments the fish were acclimatized at 25 °C for a minimum of four weeks. When preparing blood lymphocyte, 5 mL blood aseptically released from eel caudal sinus with a syringe containing 0.5 mL heparin sodium. The blood samples were diluted with 5 mL RPMI-1640 medium containing 10% FBS, adding isometric lymphocytes separation medium (Ficoll 1.077, The Second

Reagent Factory of Shanghai), then, isolated by leucocytes for 20 min at centrifugation of 3 000 g. Collecting the interface of the centrifuged medium which consisted of over 90% lymphocytes, then washing twice with RPMI1640. The viability of the cells was determined by the trypan blue exclusion test and quantified by a haemocytometer. The cell suspension was then adjusted to 1×10^7 cells \cdot mL⁻¹. To culturing lymphocytes, the temperature was from 15 °C to 30 °C, and the incubation time was from 42 h to 90 h; the eel serum concentration was from 5% to 15%, and the ConA concentration was from 0 μ g/mL to 30 μ g/mL. At the four incubation temperatures (15 °C, 20 °C, 25 °C, 30 °C), each was designed with three incubation periods (42 h, 66 h, and 90 h), four eel serum concentrations (0%, 5%, 10%, 15%) and four ConA concentrations (0 μ g/mL, 10 μ g/mL, 20 μ g/mL, 30 μ g/mL). Then 48 culture mediums with different combinations of incubation time, eel serum and ConA concentration were made. The results of anova analysis of four factors indicated that only eel serum concentration had significant ($P < 0.01$) influence on the lymphocyte proliferation rate. Simultaneously, there were significant ($P < 0.05$) interaction effects between the three factors of incubation temperature, incubation time and eel serum concentration. Some researchers found out 10% serum of brook trout (*Salvelinus fontinalis*) could increase 30 to 100 times of OD value in lymphocyte proliferation, but the OD value can never doubled when eel serum concentration was increased from 5% to 15%. In general, the temperature of lymphocyte proliferation of mammals is 37 °C, and avian lymphocytes cultured in vitro is over 39 °C. Optimum temperature of fish lymphocytes cultured in vitro was hard to ascertain because fish are allotherms. The results of our study found out the best temperature for lymphocyte proliferation was 20 °C. In addition, effect of ConA concentration was significantly influenced by other three factors, but 10 μ g/mL was the best. To sum up, the optimum stimulation index of the experiment can be acquired after 90 h under the condition of 20.0 °C, RPMI 1640 medium containing 10 μ g/mL ConA and 10% eel serum. The results in this experiment acquired optimum conditions for cell-mediated immunity study of European eel (*Anguilla anguilla*) and provided an important reference for the further studies on the cell-mediated immunology of fish. [Journal of Fishery Sciences of China, 2007, 14(3): 403 - 411]

Key words: European eel; proliferation of lymphocyte; MTT Assay; ConA; culture temperature; culture time; eel serum

Corresponding author: GUAN Rui-zhang. E-mail: rzguan@jmu.edu.cn