

血小板对体外培养的猪 PBMC 增殖反应和 IL-2 分泌的影响

宋长绪·肖俊杰

(西北农业大学兽医系, 陕西杨陵, 712100)

摘要 本实验通过采取 10 头猪的血液, 经 30 次实验探讨了自体 and 异体血小板 (PL) 对体外培养的猪外周血单个核细胞 (PBMC) 增殖反应和 IL-2 分泌的影响。证明了 PL 对猪 PBMC 的增殖反应和 IL-2 分泌均有增强作用。同时也比较了 PL 和红细胞 (RBC) 对淋巴细胞的活化作用。并初步探讨了 PL 对淋巴细胞激活作用的机制。

关键词 血小板 (PL); LFA-3; CD₂; IL-2; 细胞增殖反应

中图分类号 S852.4

LFA-3 又称 E-受体配体、CD₃₈, 是 CD₂ 的天然配基。CD₂ 又称为 LFA-2、T₁₁、Leu-5、E 受体, 两者均广泛存在于多种细胞表面 (肖俊杰等, 1993; 肖俊杰等, 1992)。

CD₂ 与 LFA-3 的相互作用在淋巴细胞功能方面的作用的研究, 有许多人作了报道 (杨怀志等, 1987; 石镜等, 1985; 黄盛东等, 1991; 欧阳笑梅等, 1991)。最近肖俊杰等 (1993; 1992), 提出了“淋巴细胞激活中游离 CD₂ 调控途径”的假说。Vivier 等 (1990) 首次证明了血小板激活因子可通过 CD₂ 和 CD₃ 两条途径, 调节 PBMC 的功能。但完整 PL 的类似免疫功能则未见报道。

本试验的目的在于阐明 PL 对体外培养的 PBMC 的增殖反应和 IL-2 的影响, 并为肖俊杰提出的假说提供一定的资料和证据。

1 材料和方法

1.1 猪 1~3 月龄健康杂种猪 10 头。

1.2 C57BL/6 小鼠 16~20 g, 购自第四军医大学实验动物研究中心。

1.3 猪 RBC、PBMC 采肝素抗凝血以常规方法制备。

1.4 猪 PL 无菌采肝素抗凝血 10 mL, 500 r/min, 8 min 离心, 小心吸取上层液, 500 r/min, 5 min 离心, 取上清 3500 r/min, 30 min 离心, 向沉淀中加入红白细胞分离液 (尿素 10.0 g, 枸橼酸钠 0.5 g, 蒸馏水 100 mL, 10 磅 15 min 灭菌) 3 mL, 吹打均匀, 以含 10% Fcs 的无钙镁 Hanks' 液洗 3 次, 再以完全 RPMI1640 洗 1 次并重悬。

1.5 猪游离 CD₂ 按黄湄等 (1989) 介绍的方法制备。

1.6 C57BL/6 小鼠脾细胞 按杨贵贞等 (1991) 介绍的方法制备, 用于检测细胞培养上清液中 IL-2 的水平。

1993-11-27 收稿

*现为华南农业大学禽病学博士研究生

1.7 PL 及 RBC 对 PBMC 增殖反应的测定 在 96 孔细胞培养板中的按实验设计分别加入不同浓度的 PL, PBMC, 2%PHA-P (华美公司出品), RBC, 37℃, 5%CO₂ 中培养 68 h, 向各孔加入 MTT 应用液 (Serva 产品, 1 g/L, pH7.2 ~ 7.4) 各 50 μL, 继续培养 4 h, 以酸性异丙醇 (0.124%, HCL, W/V) 溶解, 用 510 酶标比色计在最适波长 550 nm 测 O.D 值, 并按下面公式计算刺激指数 (S.I)。S.I= 试验孔 O.D 值/ 阴性对照孔 O.D 值。

1.8 PL 及 RBC 对猪 PBMC IL-2 产生的影响的测定 取 24 孔细胞培养板按 1.7 的方法分别加入 PL,RBC,PHA-P, PBMC, 37℃, 5% CO₂ 中培养 12 h, 吸取上清液即为待测 IL-2 样品。将此待测样品各 50 μL 分别加入 96 孔培养板中, 再加入 1.6 中制备的 C57BL/6 小鼠脾细胞 100 μL 及 50 μL 完全 RPMI 1640, 37℃, 5% CO₂ 中培养 20 h, 加入 MTT 再培养 4 h, 测 O.D 值, 计算 S.I 值。

1.9 游离 CD₂ 对 PL 引起的 PBMC 增殖反应的封阻作用 在 96 孔培养板按实验设计分别加入 PL(3×10¹¹个/L) 和 PBMC(5×10⁹ 个/L), 和不同浓度的 CD₂(1X, 10X, 100X, 1 000X), 37℃, 5%CO₂ 中培养 68 h, 加入 MTT 培养 4 h, 测 O. D 值, 计算 S. I 值。

1.10 游离 CD₂ 对 PL 引起的 PBMC IL-2 产生的阻抑作用 试验分组同 1.9, 取 24 孔培养板加入各样品, 37℃, 5% CO₂ 条件下培养 12 h, 取上清即为待测 IL-2 样品, 按 1.8 后半部分介绍的方法测 IL-2 的水平, 以 S.I 值表示。

2 试验结果

2.1 自体 PL 及自体 RBC 对 PBMC 增殖反应的影响 结果见图 1。图 1 表明自体 PL 和 RBC (3×10⁹ ~ 3×10¹² 个/L) 均能协同 PHA-P 使 PBMC 的增殖反应极显著地增强 (P<0.01), 且与浓度有密切关系, PL 浓度为 3×10¹¹ 个/L 时反应达峰值。自体 PL 和自体 RBC (3×10¹⁰ ~ 3×10¹² 个/L) 单独作用于 PBMC 时, 也有极显著的促进作用 (P<0.01), 且在 3×10¹¹ 个/L 时达高峰。

2.2 自体 PL 和自体 RBC 对 PBMC IL-2 产生的影响 结果见图 2, 从图 2 可以看出, PL 和 RBC(3×10⁹ ~ 3×10¹¹ 个/L) 均能协同 PHA-P 使细胞培养上清液中 IL-2 极显著地增加 (P<0.01), 且在 3×10¹⁰ 个/L 浓度时达峰值。PL 和 RBC (3×10¹⁰ ~ 3×10¹² 个/L) 单独作

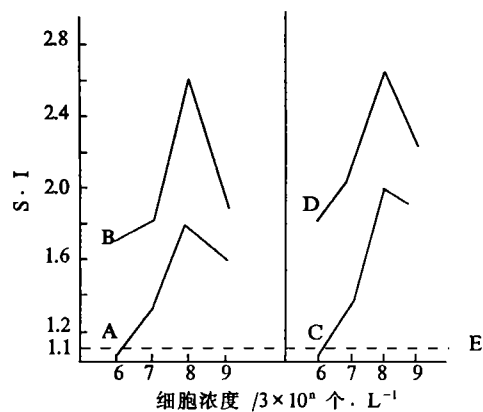


图 1 不同浓度自体 PL 及 RBC 对 PBMC 增殖反应的影响
A. PL+PBMC B. PL+PBMC+PHA-P
C. RBC+PBMC D. RBC+PBMC+PHA-P
E. PBMC+PHA-P

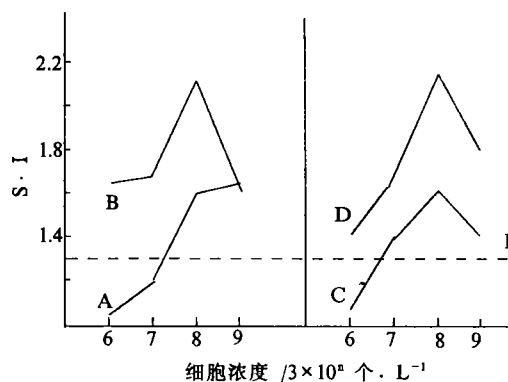


图 2 不同浓度自体 PL 及 RBC 对 PBMC IL-2 产生的影响
A. PL+PBMC B. PL+PBMC+PHA-P
C. RBC+PBMC D. RBC+PBMC+PHA-P
E. PBMC+PHA-P

用于 PBMC 时,也能极显著地增加 IL-2 的含量 ($P < 0.01$),且有浓度依赖性,在 3×10^{11} 个/L 时达高峰,以后则趋向平稳或稍降低。

2.3 异体 PL 对 PBMC 增殖反应和 IL-2 产生的影响 结果见图 3 图 4。从图 3 图 4 可以看出,异体 PL 能够协同 PHA-P 极显著地促进 PBMC 的增殖反应 ($3 \times 10^{11} \sim 3 \times 10^{12}$ 个/L) 和 IL-2 含量增加 ($3 \times 10^9 \sim 3 \times 10^{12}$ 个/L) ($P < 0.01$)。在 3×10^{11} 个/L 浓度达峰值。异体 PL ($3 \times 10^{10} \sim 3 \times 10^{12}$ 个/L) 单独作用也有上述作用 ($P < 0.01$)。从图 3 图 4 还可以看出相同浓度的 PL 和 RBC 无论是协同 PHA-P 还是单独作用时对 PBMC 增殖反应的增加作用和 IL-2 水平的增加均没有显著差异 ($P > 0.05$)。

2.4 游离 CD₂ 对 PL 引起的 PBMC 增殖反应以及 IL-2 分泌增加作用的封阻 结果见图 5 图 6。从图 5 图 6 可见 CD₂ 能够封阻 PL 引起的 PBMC 增殖反应 ($P < 0.01$)。CD₂ 也能封阻 PL 协同 PHA-P 引起的 PBMC 的增殖反应 ($P < 0.01$)。从图 5 还可以看出 CD₂ 本身虽有降低增殖反应的作用,但这种作用不显著 ($P > 0.05$),说明 CD₂ 加入系统后引起的增殖反应降低显然不是游离 CD₂ 本身的直接作用所引起的。从图 6 可以看出加入游离 CD₂ 后不仅能阻抑 PL 单独引起的 PBMC 培养上清液中的 IL-2 含量增加作用 ($P < 0.01$),而且也能够阻抑 PL 协同 PHA-P 引起的 IL-2 含量增加作用 ($P < 0.01$)。上述结果说明 PL 引起的 PBMC 增殖反应和 IL-2 含量增加作用是通过 PL 上的 LFA-3 与 PBMC 上的 CD₂ 之

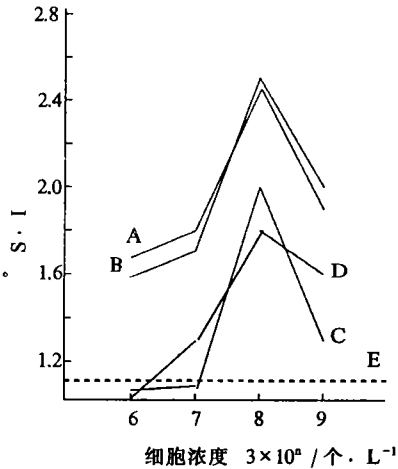


图3 自体与异体 PL 对 PBMC 增殖反应的影响

A. 自体 PL+PBMC+PHA-P B. 异体 PL+PBMC+PHA-P C. 自体 PL+PBMC D. 异体 PL+PBMC E. PBMC+PHA-P

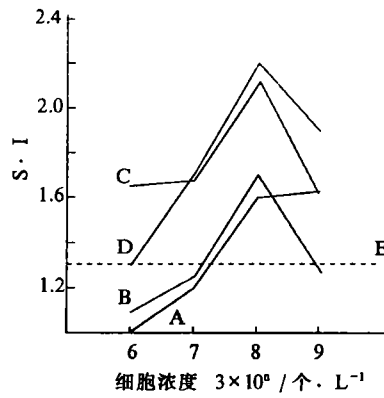


图4 自体与异体 PL 对 PBMC IL-2 产生的影响

A. 自体 PL+PBMC B. 异体 PL+PBMC C. 自体 PL+PBMC+PHA-P D. 异体 PL+PBMC+PHA-P E. PBMC+PHA-P

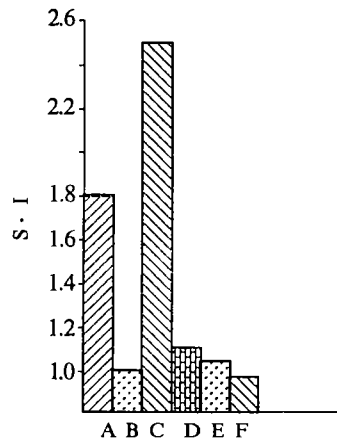


图5 游离 CD₂ 对 PL 引起的 PBMC 增殖反应的阻抑作用

A. PL+PBMC B. PL+PBMC+CD₂ C. PL+PBMC+PHA-P D. PL+PBMC+PHA-P+CD₂ E. PBMC+PHA-P F. PBMC+CD₂

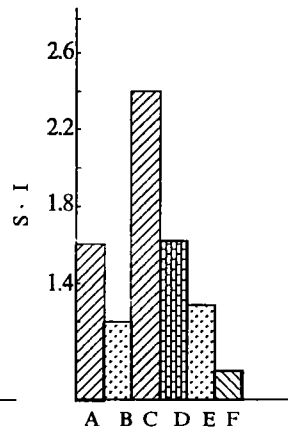


图6 游离 CD₂ 对 PL 引起的 PBMC IL-2 产生的阻抑作用

A. PL+PBMC B. PL+PBMC+CD₂ C. PL+PBMC+PHA-P D. PL+PBMC+PHA-P+CD₂ E. PBMC+PHA-P F. PBMC+CD₂

间的相互作用而介导的。

3 讨论

细胞免疫的调控一直是人们最为关注的问题,是近年研究的焦点。国内外学者在这方面作了许多工作,证明血液和体液中许多成分具有免疫调节作用。完整的 RBC 及 RBC 膜碎片(欧阳笑梅等,1991),从绵羊 RBC 和猪 RBC 表面提取的 LFA-3(王文科,1992;靳亚平,1992)等均有调节 PBMC 细胞增殖反应和 IL-2 分泌的作用。尚红生等(1987),Vivier 等(1990),Behrens 等(1990)证明血小板激活因子对细胞免疫也有一定的调控作用。但是完整 PL 细胞免疫的调控作用的研究则未见报道。本试验在这方面进行了初步的探讨,证明 PL 也有类似作用。PL 能够促使体外培养的 PBMC 的增殖反应增强和培养上清液中 IL-2 的水平增加,而且与 RBC 的作用具有同样重要的意义。同时也初步证明了 PL 对 PBMC 作用的机制是与 CD₂ 和 LFA-3 的相互作用有关的,即通过其相互结合而活化了 T-淋巴细胞。但是 PL 作用的更详细机制和过程,PL 与血小板激活因子的作用之间有没有统一性,即是否存在成分和结构方面的内在联系,PL 在活的机体内的作用等方面尚待进一步地探索和研究。

参 考 文 献

- 王文科.1992.游离 LFA-3 对猪 PBMC 的增殖反应和诱生 IFN- γ 的作用:[学位论文].陕西杨陵:西北农业大学兽医系
- 石 镜,谢少文.1985. E 受体的研究近况——E 受体与淋巴细胞功能的关系.国外医学免疫学分册,9(3): 113
- 杨怀志,刘仕康,郑德先.1987.淋巴细胞受体的研究 VII:抗猪 T-淋巴细胞 E 受体的促细胞增殖反应.中国免疫学杂志,3(3): 130
- 杨贵贞.1991.免疫生物学工程纲要与技术.长春:吉林科学技术出版社,48
- 肖俊杰,胡秀珍.1993. CD₂ 分子.陕西杨陵:天则出版社,1~55
- 肖俊杰,陈德坤.1992.天然 LFA-3 对于猪血清溶血作用和猪 PBMC Et 花环的影响.西北农业大学学报,(3): 71
- 欧阳笑梅,张红毅,金伯泉,等.1991.红细胞在葡萄球菌肠毒素 B 刺激人 PBMC 增殖中的辅佐作用.中国免疫学杂志,7(4): 299~231
- 尚红生,丁桂凤.1987.血小板活化因子对小鼠巨噬细胞受体结合及产生 IL-1 的探讨.免疫学杂志,10(1):19
- 黄盛东,郭峰.1991.红细胞免疫调控研究新进展.国外医学免疫学分册,(4): 191
- 黄 湄,张 云,石 镜.1989.E-受体配体的提取与鉴定.中国免疫学杂志,5(3):186
- 靳亚平.1992.游离 LFA-3 对猪 PBMC 转化及诱生 IL-2 的作用:[学位论文].陕西杨陵:西北农业大学兽医系
- Vivier E, Deryckx S, Wang J L, et al. 1990. Immunoregulatory Function of Paf-acether. International Immunology, 2(6):546~553
- Behrens T W, Goodin J S. 1990. Control of Human T-cell Proliferation by Activating Factor of Platelet. Int J Immunopharmac, 12(2): 175~184

THE EFFECTS OF PLATELETS ON PIG PERIPHERAL BLOOD MONOCYTE PROLIFERTION AND IL-2 PRODUCTION IN VITRO

Song Changxu Xiao Junjie

(Dept. of Veterinary Medicine, Northwestern Agr. Univ., 712100, YangLing, Shanxi)

Abstract

By means of 30 experiments on 10 pigs, the effects of self and nonself platelets (PLs) on pig peripheral blood monocyte (PBMC) proliferation in vitro was stuided, and it was reveald that PLs have enhancement effects on the pig PBMC proliferation and inter-lukin-2 (IL-2) production. At the same time, the effects of PL and RBC on the lymphocyte activation was compared and the mechanism of the effects of PL on lymphocyte discussed preliminarilly.

Key words PL; LFA-3; CD₂; IL-2; Proliferation