

# 花粉提取物对带瘤小鼠胸腺 T 细胞 数量变动的的影响

虞研原 黄晓帆\*

(杭州大学生物系,杭州 310012)

**摘要** 本文报道用  $^3\text{H}$ -TdR 掺入法研究花粉提取物对带瘤小鼠胸腺 T 细胞在有丝分裂原作用下增殖反应的影响。并用酵母多糖混合玫瑰花形成试验,观察其胸腺细胞中 T、Tr 和  $\text{T}\mu$  细胞数量变动的的影响。实验结果表明:带瘤小鼠胸腺细胞的增殖反应均低于正常小鼠,经花粉提取物灌胃后,其胸腺细胞的增殖反应均有不同程度提高; T、Tr 及  $\text{T}\mu$  细胞数均比对照组升高。说明花粉提取物具有促进免疫细胞活性的作用。

胸腺是机体重要的中枢免疫器官,在细胞免疫系统的建立中具有重要作用。正常机体在不同生长发育时期胸腺细胞是发展变化的,当发生肿瘤时,原有的变化规律就会随之发生改

变。所以,机体免疫状态对肿瘤的发生发展有着密切的关系。带瘤机体的免疫功能随着瘤龄

---

\* 浙江中医学院分子医学研究所。

的增长而逐渐降低。胸腺是T淋巴细胞发育、特别是受体功能库及自我识别限制能力获得的主要场所<sup>[4,6]</sup>，研究T细胞分化的基本手段是分离出胸腺细胞亚群。国内外一些学者研究认为花粉具有抗肿瘤作用以及增强机体免疫力的功能。本文报道用<sup>3</sup>H-TdR掺入法研究花粉提取物对正常和带瘤小鼠胸腺T细胞增殖反应的影响，并用酵母多糖混合玫瑰花形成试验，观察其胸腺淋巴细胞中T<sub>r</sub>、T<sub>r</sub>和T<sub>μ</sub>细胞数量变动的的影响。

## 一、材料和方法

(一) 动物及肿瘤模型 BALB/C 纯系小鼠，4—7 周龄，体重 17±2 克，雄性个体。肿瘤模型为 Ehrlich 腹水癌 (EAC) 及实体肉瘤 (S<sub>180</sub>)。按常规接种。

(二) 花粉提取物的制备 取油菜花粉 100 克，置 -196℃ 液氮中冷冻 1 小时后，迅速投入 200 毫升 80—85℃ 热水中高速搅拌，冷却后置 4℃ 冰箱 24 小时取出抽滤。滤液经细菌漏斗过滤除菌后，分装于冰箱保存备用。经上述方法处理的花粉，涂片并在高倍镜下检查计数，结果花粉的破壁率达 90%。

(三) 培养液配制 采用 RPMI-1640 培养基 (Gibo)，补充 4mmol/L L-谷氨酰胺、25 mmol/L HEPES、5 × 10<sup>-3</sup> mol/L β-巯基乙醇，除菌后分装冻存。使用时加 10% 热灭活小牛血清，每毫升培养液加青霉素 100 单位、链霉素 100 微克；用 3.5% NaHCO<sub>3</sub> 调整 pH 至 7.2，即为基础培养液。

(四) 条件培养液 (CM) 制备 参照 Andersson 等<sup>[3]</sup>方法，用同系小鼠脾脏细胞制成 5 × 10<sup>6</sup>/毫升的细胞悬液，置于含 10% 小牛血清的基础培养液中，用 5 μg Con A (伴刀豆球蛋白)/毫升刺激，分装培养瓶后于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度下培养 48 小时，离心后收集上清，即为粗制条件培养液。经 0.22 μ 微孔滤膜过滤，置 -20℃ 冰箱冻存备用。条件培养液上清中含有一种使小鼠胸腺对 con A (concanavalin) 刺激发生增殖反应所必需的因子，这种因子不能

直接激活胸腺细胞，但能加强其对 con A 刺激的反应。

(五) 胸腺淋巴细胞增殖反应的测定 颈椎脱拉法处死小鼠，无菌取胸腺制成单细胞悬液，台盼蓝拒染法测活率，计算活细胞数，调整细胞浓度为 1 × 10<sup>6</sup>/毫升，加 con A 5 μg/毫升，于 37℃、5% CO<sub>2</sub> 饱和湿度下培养 54 小时，掺入 <sup>3</sup>H-TdR 1 μCi/孔 (比度为 14 居里/毫克分子)，继续培养 18 小时后，用半自动微量多头细胞收集器收集处理各小孔内已标记细胞于直径为 1.4 厘米 49 型国产玻璃纤维滤纸膜片上，取出膜片于 60℃ 烤干，冷却后置小玻璃管内，加闪烁液。在 YS-A 型内烁仪上计数 1 分钟。所有试验样品均作 4 个重复样本。每组实验重复 3 批。实验结果以每分钟脉冲数 (cpm) 的均数 (M) ± 标准差 (S.D) 表示。

(六) 混合玫瑰花结的形成 T 淋巴细胞表面具有绵羊红细胞的受体，能与绵羊红细胞结合形成 E-玫瑰花环。用酵母多糖 (Zymoscin) 制备抗酵母菌的免疫球蛋白分子 IgG、IgM 抗体然后制成酵母 IgG (Zy-IgG) 与酵母 IgM (Zy-IgM) 复合物。再与绵羊红细胞混合，分别与带有免疫球蛋白分子 IgG 的 FC 段结合的受体、SRBC (绵羊红细胞) 受体的 T<sub>r</sub> 细胞；带有免疫球蛋白分子 IgM 的 FC 段结合的受体、SRBC 受体的 T<sub>μ</sub> 细胞结合，分别形成 Zy-IgG-E 及 Zy-IgM-E 花环。计数花环生成率，便可测得带瘤小鼠 T 淋巴细胞及其亚群的变化。

每组样品分甲、乙两管，每管加胸腺细胞悬液 0.2 毫升、SRBC 0.2 毫升；甲管加 Zy-IgG，乙管加 Zy-IgM，各 0.2 毫升。混匀后离心，500 转/分、5 分钟，把乙管置水浴，甲管放入 4℃ 冰箱。1 小时后，在两管中均加 2.5% 戊二醛 2 滴，固定 20 分钟后涂片，自然干燥。再经甲醛固定，用苏木素伊红染色，油镜下计数。在涂片 Zy-IgG-E 中以淋巴细胞同时粘附 3 个以上 SRBC 和 3 个以上酵母细胞的为 T<sub>r</sub> 细胞 (见图 1)；在 Zy-IgM-E 中以淋巴细胞同时粘附 3 个以上 SRBC 及酵母细胞的为 T<sub>μ</sub> 细胞



图1 Zy-IgG-E (Tr 细胞), ×750



图2 Zy-IgM-E (Tμ 细胞), ×750

(见图2)。计数200个T淋巴细胞,计算百分率。

## 二、实验结果

**(一) 花粉提取物对带瘤(EAC及S<sub>180</sub>)小鼠胸腺T细胞增殖反应的影响** 正常及带瘤(瘤龄10天)小鼠经花粉提取物灌胃之后(1毫升/只,浓度0.5克/毫升,隔日一次,共5次)。取胸腺T细胞离体培养后,其增殖反应均显著增加( $P < 0.05$ ),尤以S<sub>180</sub>小鼠高于EAC小鼠(见图3),非常显著( $P < 0.01$ )。

**(二) 花粉提取物对正常及不同瘤龄小鼠胸腺T细胞及其亚群数量变动的影响** 经花粉提取物灌胃后的正常小鼠胸腺中T、T<sub>r</sub>及T<sub>μ</sub>细胞的数量均比对照组升高(见表1)。说明花粉提取物具有促进免疫细胞活性的作用。小鼠带瘤后,胸腺中T%、T<sub>r</sub>%及T<sub>μ</sub>%均下降,随着瘤龄的增长而逐渐降低。但经花粉提取物灌

胃之后,其胸腺T细胞及其亚群的数量均有增高。而不同带瘤鼠之间有显著差异(见表2)。

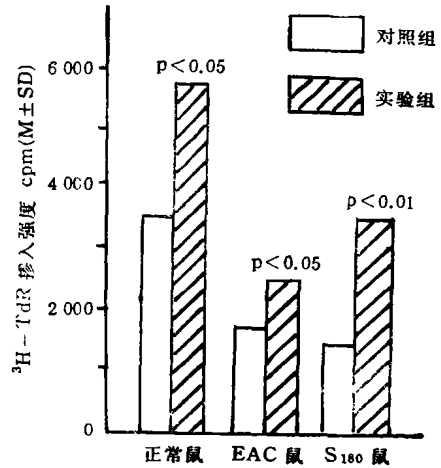


图3 花粉提取物对带瘤小鼠(瘤龄10天)胸腺T细胞增殖反应的影响

表1 花粉提取物对正常小鼠胸腺T细胞及其亚群数量变动的影响

组别	T	T <sub>r</sub>	T <sub>μ</sub>	T <sub>r</sub> /T <sub>μ</sub>
对照组	38.66 ± 0.10	7.57 ± 0.16	7.29 ± 0.16	1.03 ± 0.57
实验组	76.21 ± 0.10	14.29 ± 0.25	19.98 ± 0.40	0.71 ± 0.05

## 三、讨论

小鼠胸腺细胞主要为不成熟的T细胞,因此在体外培养时细胞成活率可随培养时间的延长而逐渐降低。Mosler<sup>[1]</sup>报道在培养的第3天仅有4%的存活率。虞研原等<sup>[2]</sup>报道将猪胸腺素加入培养系统中可提高其成活率。在培养至第3天,相对成活率可比对照组增加75%。若小鼠喂给花粉提取物后,其胸腺细胞在含条件培养液及Con A的培养系统中可提高细胞的成活率。如果将<sup>3</sup>H-TdR掺入到胸腺细胞中可判断其增殖反应的程度。

带瘤小鼠随肿瘤生长而出现胸腺进行性萎缩<sup>[1]</sup>,实验表明该胸腺细胞的增殖反应亦受到抑制。由于肿瘤代谢产物或某种抗原刺激导致胸腺细胞从胸腺向外周循环迁移,参与对肿瘤细胞的杀伤活动,使胸腺中淋巴细胞发生排空现象,同时,机体内肿瘤生长而导致宿主胸腺内

表2 花粉提取物对带瘤小鼠胸腺 T 细胞及其亚群数量变动的影响

鼠名	组别	瘤龄 5 天		瘤龄 10 天		瘤龄 15 天	
		对照组	实验组	对照组	实验组	对照组	实验组
EAC 小鼠	T	37.47±0.10	47.23±0.10	28.50±0.84	36.83±0.88	18.57±0.10	25.65±0.10
	Tr	11.35±0.17	28.44±0.67	8.24±0.12	9.25±0.56	7.59±0.16	18.03±0.19
	Tμ	10.55±0.17	24.92±0.53	10.38±0.28	12.40±0.28	7.29±0.28	21.04±0.21
	Tr/Tμ	1.07±0.08	1.14±0.12	0.79±0.42	0.74±0.23	1.04±0.57	0.86±0.90
S <sub>180</sub> 小鼠	T	46.29±0.10	75.43±0.10	29.00±0.14	54.99±0.10	22.86±0.13	31.29±0.58
	Tr	15.70±0.40	23.67±0.58	13.47±0.14	16.28±0.40	8.66±0.24	14.99±0.32
	Tμ	16.53±0.57	25.81±0.64	11.47±0.26	13.58±0.61	7.42±0.38	10.14±0.41
	Tr/Tμ	0.94±0.70	0.92±0.90	1.17±0.53	1.19±0.65	1.16±0.63	1.47±0.78

胸腺细胞的有丝分裂指数和 DNA 合成急骤下降, 宿主呈现一种 T 细胞部分耗竭状态, 进一步导致机体免疫功能降低。当将花粉提取物给带瘤小鼠灌胃之后, 胸腺细胞在体外培养系统中可显著提高其增殖反应。说明花粉提取物能增强小鼠胸腺细胞对 Con A 的刺激反应。能将不成熟型胸腺细胞转变为成熟型。极大地促进了不成熟型细胞 DNA 合成, 这对 T 细胞发育分化和功能调节具有一定的作用。

参加特异性细胞免疫反应的 T 细胞是机体内的免疫活性细胞。根据其表面受体的不同, 可分为带有 IgG 受体的 Tr 细胞和带有 IgM 受体的 Tμ 细胞。T 细胞的两个亚群在调节免疫反应方面起着不同的作用, Tr 细胞具有抑制和杀伤效应, 抑制细胞反应和阻止 B 淋巴细胞特异性抗体的产生。Tμ 细胞有辅助功能, 协助 B 细胞产生抗体, 辅助特异性的体液免疫反应, Tr 细胞和 Tμ 细胞在细胞免疫和体液免疫反应中相互联系、相互制约、对稳定和调节整个机体免疫系统生理功能及免疫应答的强度起着重要作用。体内免疫反应可视为 Tμ 和 Tr 细胞相对活性之总和。Tr 及 Tμ 细胞不仅在抗体产生上起着调节作用, 而且在肿瘤的发生发展中也起着重要作用。这群细胞的数量

或比例发生变化后, 将直接影响机体的免疫功能, 导致各种与免疫有关的疾病发生和发展。小鼠带瘤后, 胸腺中 T、Tr 及 Tμ 细胞数量减少、Tr/Tμ 值降低, 导致机体免疫功能降低。实验证明花粉提取物具有促进 T 细胞成熟分化的作用, 进而调节机体免疫功能具有一定作用, 可能通过增强特异性淋巴细胞免疫功能有助于恢复胸腺功能低下机体的免疫平衡。因此, 掌握 T 细胞及其亚群数量变动的规律可作为评价机体对不同抗原免疫反应性的指标, 在临床诊断上有一定意义。

### 参 考 文 献

- [1] 姜世勃 1984 Ehrlich 腹水癌小鼠对胸腺依赖性抗原的反应 上海免疫学杂志 4: 5。
- [2] 虞研原等 1990 猪胸腺素对带瘤小鼠胸腺细胞及其富含 PNA<sup>-</sup> 和 PNA<sup>+</sup> 细胞淋转反应的研究 杭州大学学报 17: 1。
- [3] Andersson J. et al. 1979 Studies on T Lymphocyte Activation I. Requirements for the Mitogen Dependent production of T cell Growth Factors *Eur. J. Immunol.* 9:581.
- [4] Huning T. 1983 T cell function and specificity in a athymic mice. *Immunology Today*. 4:84-87.
- [5] Mosler DE. et al. 1972 Functional maturation of thymic Lymphocyte population in vitro. *J. Exp. Med.* 136:1481.
- [6] Miller J.F.A.P. 1979 Experimental thymology has come of age. *Thymus*. 1:3-25.

责任编辑: 刘兰英 刘素霞 陈瑞田

## INFLUENCE OF POLLEN WATER-SOLUBILITY EXTRACTION ON THE QUANTITIES OF THYMUS T LYMPHOCYTE OF TUMOR-BEARING MICE

YU Yanyuan      HUANG Xiaofan

*(Department of Biology, Hangzhou University Hangzhou 310012)*

**ABSTRACT** Influence of pollen water-solubility extraction on quantities of thymus T lymphocyte marked by  $^3\text{H-TdR}$  of tumor-bearing mice was studied using Zymosan mixed rosette-forming test. The results indicated the percent of T lymphocyte,  $T_r$  and  $T_u$  in thymus of tumor-bearing mice were lower than that in the normal mice and were gradually reducing with the growth of tumor age. But the quantities of T cells would be increased if the tumor-bearing mice was treated with extracts of pollen. This suggests that the pollen water-solubility extraction can enhance the activity of thymus T lymphocyte and it can be used to increase the immunity of body against different antigens.