

鲤主要免疫器官 $CD4L$ 、 $CD8\alpha$ 和 $CD8\beta$ 表达细胞的分布特征

尚娜^{1,2} 肖占刚^{1,2} 郭琼林¹

(1. 中国科学院水生生物研究所, 武汉 430072; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

THE DISTRIBUTION OF $CD4L$, $CD8\alpha$ AND $CD8\beta$ EXPRESSION CELLS IN IMMUNO-ORGANS OF CARP

SHANG Na^{1,2}, XIAO Zhan-Gang^{1,2} and GUO Qiong-Lin¹

(1. Institute of Hydrobiology, Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430072, China; 2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

关键词: $CD4L$; $CD8\alpha$; $CD8\beta$; 原位杂交技术; 鲤

Key words: $CD4L$; $CD8\alpha$; $CD8\beta$; In situ hybridization; Common carp

中图分类号: Q344.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3207(2010)03-0673-05

自 1975 年在硬骨鱼类中发现 T 细胞存在的证据^[1]以来, 单克隆抗体技术、免疫组化和原位杂交等技术的应用, 使鱼类 T 细胞及其亚群和功能的研究成为可能。从 20 世纪 80 年代起, 人们开始尝试通过各种方法例如用胸腺细胞、多聚甲醛固定的胸腺细胞(DLT15)、胸腺细胞膜(WCL9)、肠白细胞膜(WCL38)免疫小鼠进而制备抗鱼类 T 细胞的单克隆抗体。其中 DLT15 对胸腺细胞和外周 T 细胞具有特异性, 能够同时识别活细胞和组织切片中的 T 细胞; WCL9 仅能与早期的胸腺细胞反应; WCL38 能与大约 60% 的肠白细胞和 5% 的胸腺细胞反应, 一度被作为肠道黏膜 T 细胞的标志用于免疫组化研究^[2]。但这些抗体都不能作为鱼类 T 细胞特别是 T 细胞亚群鉴定的特异性抗体。

近十年来, 随着分子生物学技术的发展, 在鱼类中已克隆到许多 T 细胞标志基因如 $CD3$ 、 $CD4$ 、 $CD8$ 、 TCR 等。 $CD4$ 分子是与 MHC II 类分子识别有关的单链跨膜糖蛋白, 主要表达于部分胸腺细胞和辅助性 T 细胞(Th 细胞)表面, 是 Th 细胞的标志。现已发现鱼类 $CD4L$ 基因包括两种, 分别命名为 $CD4L-1$ 和 $CD4L-2$ 。 $CD8$ 分子是与 MHC I 类分子识别有关的跨膜糖蛋白, 主要是由 α 和 β 链以二硫键连接的异二聚体(90%), 通过细胞介导的细胞毒作用杀伤病毒感染细胞和肿瘤细胞, 是部分胸腺细胞

和细胞毒性 T 细胞(Tc 细胞)的标志^[3]。原位杂交技术是根据已知基因的序列设计探针, 因此它具有直接、快速等特点, 现已成为鱼类 T 细胞标志基因在免疫器官中表达细胞分布研究的重要方法。目前该方面的报道包括东方鲀(*Takifugu rubripes*) $CD3\epsilon$ 、 $CD3\gamma/\delta$ 、 $TCR\alpha$ 、 $CD8\alpha$ 和 $CD8\beta$ 、尖吻鲈(*Dicentrarchus labrax*) $CD8\alpha$ 、 $TCR\beta$ 和大西洋庸鲈(*Hippoglossus hippoglossus*) $CD4L-1$ 、 $CD8\alpha$ 、 $CD8\beta$ mRNA 表达细胞的分布观察^[5-9]。我们已经报道了鲤(*Cyprinus carpio*) $CD4L-1$ 、 $CD8\beta$ 、 $CD3\gamma/\delta$ 和 $TCR\gamma$ 的 cDNA 分子结构和组织表达特征^[4,10]及 $CD3\gamma/\delta$ mRNA 表达细胞的分布^[10], 但迄今为止, 尚未发现鲤科鱼类 $CD4L-1$ 、 $CD8\alpha$ 和 $CD8\beta$ mRNA 表达细胞分布的报道。

本研究应用原位杂交技术观察了 $CD4L-1$ 、 $CD8\alpha$ 和 $CD8\beta$ mRNA 表达细胞在鲤胸腺、头肾、体肾和脾脏中的分布特征, 其结果对阐明鱼类免疫系统的基本结构、组成与进化及其 T 细胞亚群的发育、定位及其与功能关系具有重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

黄河鲤(*Cyprinus carpio* L.)(12 月龄或 1 龄)取自河南省河南水产研究所。将其胸腺、头肾、脾脏和体肾取出后,

收稿日期: 2009-04-09; 修订日期: 2009-10-16

基金项目: 国家自然科学基金项目(30671599, 30871912)资助

作者简介: 尚娜(1983—), 女, 山东泰安人; 硕士; 研究方向为水生动物病理学与免疫学; E-mail: shang0205.student@sina.com

通讯作者: 郭琼林, E-mail: qlguo@ihb.ac.cn

切成小块,迅速置于用 DEPC 水配制的 4%多聚甲醛溶液,4℃ 固定过夜,次日转移至 70%酒精。

1.2 鲤 *CD8α* 基因的克隆

利用同源克隆的方法,获得了鲤 *CD8α* 基因的一个 563 bp 的片段;通过 5'和 3'RACE 的 PCR 的方法,获得了鲤 *CD8α* 基因的全长 cDNA 序列;序列已提交 Genbank。

1.3 探针制备及原位杂交

根据 *CD4L-1*、*CD8α* 和 *CD8β* 的基因序列设计引物(表 1),PCR 扩增。其中 *CD4L-1* 的目的片段的长度为 204 bp, *CD8α* 的目的片段的长度为 254 bp, *CD8β* 的目的片段的长度为 216 bp。将 PCR 产物电泳,切取目的条带,用 Omega 胶回收试剂盒回收。

表 1 引物序列及其酶切位点
Tab. 1 Primers sequences and their enzyme digest sites

引物 Primer	序列 Sequence	酶切位点 Enzyme digest sites
CD4LYWL	5'-CTAGGTACCGCTGTGATG GCTGGTGACTC-3'	<i>Kpn</i>
CD4LYWR	5'-GACCTGCAGCATGTCCAT ACACCACTATGAC-3'	<i>Pst</i>
CD8AYWL	5'-CGAGGTACCGCAGCCATG AACAGCAATAA-3'	<i>Kpn</i>
CD8AYWR	5'-GAAGTGCAGTAATGGTGG GGACATCGTCT-3'	<i>Pst</i>
CD8BYWL	5'-ATCCTGCAGCCAAGACAC CCAAGAAGACC-3'	<i>Pst</i>
CD8BYWR	5'-ATCGGTACCTTCCACCTCA TCGCAACTG-3'	<i>Kpn</i>

将回收后的 *CD4L-1*、*CD8α* 和 *CD8β* 片段及 pSPT18 (Roche)载体用 *Pst* 和 *Kpn* 分别双酶切。将得到的目的片段连接入上述经双酶切的 pSPT18 载体,转化入大肠杆菌 HB101 感受态细胞,阳性克隆部分送英俊测序公司进行测序,部分加入甘油放-70℃ 保存以备提取质粒。质粒的提取参照 Omega 公司质粒大量提取说明书进行。将提取的质粒分别用 *Hind*III 和 *Eco*RV (TaKaRa)单酶切, Omega 胶回收试剂盒回收,用 10 μL DEPC 水溶解即得到转录用的线性 cDNA 模板。探针的标记依照 Roche 公司的 DIG RNA Labling Kit (SP6/T7)使用说明书进行。探针标记的步骤、组织切片的处理及原位杂交程序参考文献 [10, 11]进行。

1.4 HE 染色

取正常鲤的胸腺、头肾、脾脏的组织块,固定于 Bouin's 液中,常规脱水、透明、石蜡包埋,切片厚度 6—7 μm,苏木精-伊红(HE)染色,光镜观察。

2 结果

2.1 鲤 *CD8α* 基因全长 cDNA 序列

鲤 *CD8α* 全长 cDNA 包括一个 33 bp 的 5'端非编码区, 660 bp 的开放阅读框和 606 bp 的含 polyA 结构的 3'端非

编码区(Genbank accession number: EU251078)。

2.2 *CD4L-1*、*CD8α*、*CD8β* 阳性细胞在胸腺、头肾、体肾和脾脏中的分布

图版 显示: *CD4L-1*、*CD8α* 和 *CD8β* 表达细胞广泛分布于胸腺、头肾、体肾和脾脏切片中。在胸腺中, *CD4L-1*、*CD8α* 和 *CD8β* 表达细胞在淋巴样外区呈点状密集分布,而在上皮样内区分布较少而分散(图版 -A、B、C)。在头肾中, *CD4L-1*、*CD8α* 和 *CD8β* 表达细胞主要成群分布在血管周围,其中 *CD8β* 表达细胞呈明显的成群或团簇状分布在血管周围且参与成群的细胞多而聚集;而在其他地方分布较少而分散(图版 -D、E、F)。在体肾中, *CD4L-1*、*CD8α* 和 *CD8β* 表达细胞主要呈分散分布,在血管周围可见有两三或三五个细胞聚集分布的现象(图版 -G、H、I),但与头肾比较,参与聚集的细胞数量相对较少;与 *CD4L-1* 和 *CD8α* 表达细胞分布比较,体肾中 *CD8β* 表达细胞相对稠密,成群聚集和分散分布均明显可见(图版 -I)。在脾脏中, *CD4L-1*、*CD8α* 和 *CD8β* 表达细胞主要呈分散分布,局部可见两三个细胞聚集在一起(图版 -J、K、L)。

2.3 HE 染色结果

HE 染色结果显示:在胸腺切片中,淋巴样外区、上皮样内区根据淋巴细胞的密度和网状结缔组织的相对量可明显区分,外区淋巴细胞分布密集且网状结缔组织相对较少,而在内区淋巴细胞量少而分散且网状结缔组织相对较多(图版 -A、B)。可见成群或成团的脂肪细胞或组织,表明 1 龄鲤胸腺已开始退化;在头肾中,淋巴细胞在血管周围呈环状密集分布,在其他地方分布较分散(图版 II -C、D);在脾脏中,淋巴细胞较多而分散分布,在血管周围也可见少许的成群分布(图版 -E、F)。

3 讨论

本研究应用原位杂交技术检测了 1 龄鲤胸腺、头肾、体肾和脾脏中 *CD4L-1*、*CD8α* 和 *CD8β* 表达细胞的表达与分布情况,实验中所设计的探针经过 Blast 比对分析显示与其他基因及这三个探针之间同源性很低,无交叉反应,说明检测到的表达细胞就是 *CD4L-1*、*CD8α* 和 *CD8β*T 细胞。

与东方鲈(*CD8α* 和 *CD8β*)、尖吻鲈(*CD8α*)和大西洋庸鲈(*CD4L-1*、*CD8α* 和 *CD8β*)胸腺原位杂交检测^[6-9]基本相似,研究结果显示:在 1 龄鲤胸腺中, *CD4L-1*、*CD8α* 和 *CD8β* 表达细胞在淋巴样外区(皮质)呈密集分布,而在上皮样内区(髓质)分布较少且分散。这与本次 HE 标本中胸腺细胞分布和胸腺结构吻合(另可见明显成群或成片的脂肪细胞或组织,表明 1 龄鲤胸腺已开始退化),也与作者曾报道的鲤(*CD3γ/δ*)原位杂交结果^[10]相吻合。鱼类胸腺是一个重要的免疫器官,承载着 T 细胞的发育、分化和成熟^[12],本研究对鲤 T 细胞的原位杂交结果提示:鱼类胸

腺细胞的组成和分布与哺乳动物胸腺基本相似, 表明 *CD4*、*CD8* 在 T 细胞成熟和 T 细胞及亚群细胞系鉴别中的保守作用, 反映了鱼类胸腺和哺乳动物胸腺功能上的相似性。

从图版 中可以观察到, 与东方鲈^[6]*CD8 α* 和 *CD8 β* 表达细胞分布基本相似, 1 龄鲤 *CD8 α* 和 *CD8 β* 表达细胞也是广泛分布于头肾、体肾和脾脏中。在本研究中, 作者较详细地观察了这些表达细胞在外周淋巴器官的具体分布特征。在鲤头肾中, *CD8 α* 表达细胞主要成群分布在血管周围; 而 *CD8 β* 表达细胞更明显的团簇状地分布在血管周围, 且参与成群的细胞多而聚集; 在脾脏中 *CD8 α* 和 *CD8 β* 表达细胞主要呈分散分布; 这与在 HE 染色中观察到的结果是吻合的(图版)。鱼类肾脏是一个富含淋巴组织和造血组织的器官, 最近 Toda, *et al.* 应用单克隆抗体技术并通过磁式细胞术(MACS)从鲫肾脏(头肾和体肾)中分选出 *CD8 α* 、*CD4* 和 *sIgM* 阳性细胞, 表明肾脏是一个含各类淋巴细胞(T、B 细胞)的器官^[16]。Patel, *et al.* 在大西洋庸鲈头肾中观察到少量的 *CD8 β* 表达细胞, 未发现 *CD8 α* 细胞, 在脾脏中均未检测到 *CD8 α* 和 *CD8 β* 细胞^[9]。本研究表明: 在鲤这些外周淋巴器官中, *CD8 β* 表达细胞可能多于 *CD8 α* 表达细胞。基于 *CD8 β* 的结构域特征, 不能排除鱼类存在 *CD8 $\beta\beta$* 同源二聚体形式的可能性, 而人类 *CD8 β* 表达在细胞表面可以不需要 *CD8 α* 的共表达^[13]。现已发现硬骨鱼 *CD8 α* 和 *CD8 β* 有多个转录子, 如欧洲鲤[European common carp (*Cyprinus carpio* L.)] 和鲫(*Carassius auratus langsdorffii*)*CD8 α* 、*CD8 β* 都存在两种转录形式^[14,15]。尽管目前作者尚未发现黄河鲤存在多个 *CD8 α* 和 *CD8 β* 转录子, 或许欧洲鲤和鲫 *CD8* 分子的这些特征为部分解释鲤外周淋巴器官 *CD8 α* 和 *CD8 β* 表达细胞分布与数量的差异提供了依据。

迄今为止, 尚未发现 *CD4L-1* 表达细胞在鱼类体肾的分布报道, 最近 Patel, *et al.* 在大西洋庸鲈头肾和脾脏中也均未检测到 *CD4L-1* 表达细胞^[8]。因此, 通过对 1 龄鲤的检测, 作者首次观察到 *CD4L-1* 表达细胞在鱼类外周淋巴器官组织的分布特征: 在头肾中 *CD4L-1* 表达细胞呈分散分布, 在血管周围可见一些细胞成群的现象, 未见类似 *CD8 β* 表达细胞那样明显的团簇状分布现象; 在脾脏和体肾中, *CD4L-1* 表达细胞主要呈分散分布, 在血管周围可见两三个或三五个细胞集聚现象。*CD8 β* 、*CD8 α* 和 *CD4L-1* 表达细胞在外周淋巴器官(特别是头肾)血管周围成群或成团簇分布(包括在头肾 H-E 标本中观察到淋巴细胞在血管周围呈环状密集分布)可能与 T 细胞从胸腺迁移到外周免疫器官有关, 与免疫监视与作用有关, 也提示鱼类具有不甚明显的类似哺乳动物的 T 细胞依赖区或动脉周围淋巴细胞鞘(内含 Tc 和 Th 细胞)。在外周淋巴器官中分散分布的这三种细胞可能是组织中分散的 Tc 和 Th

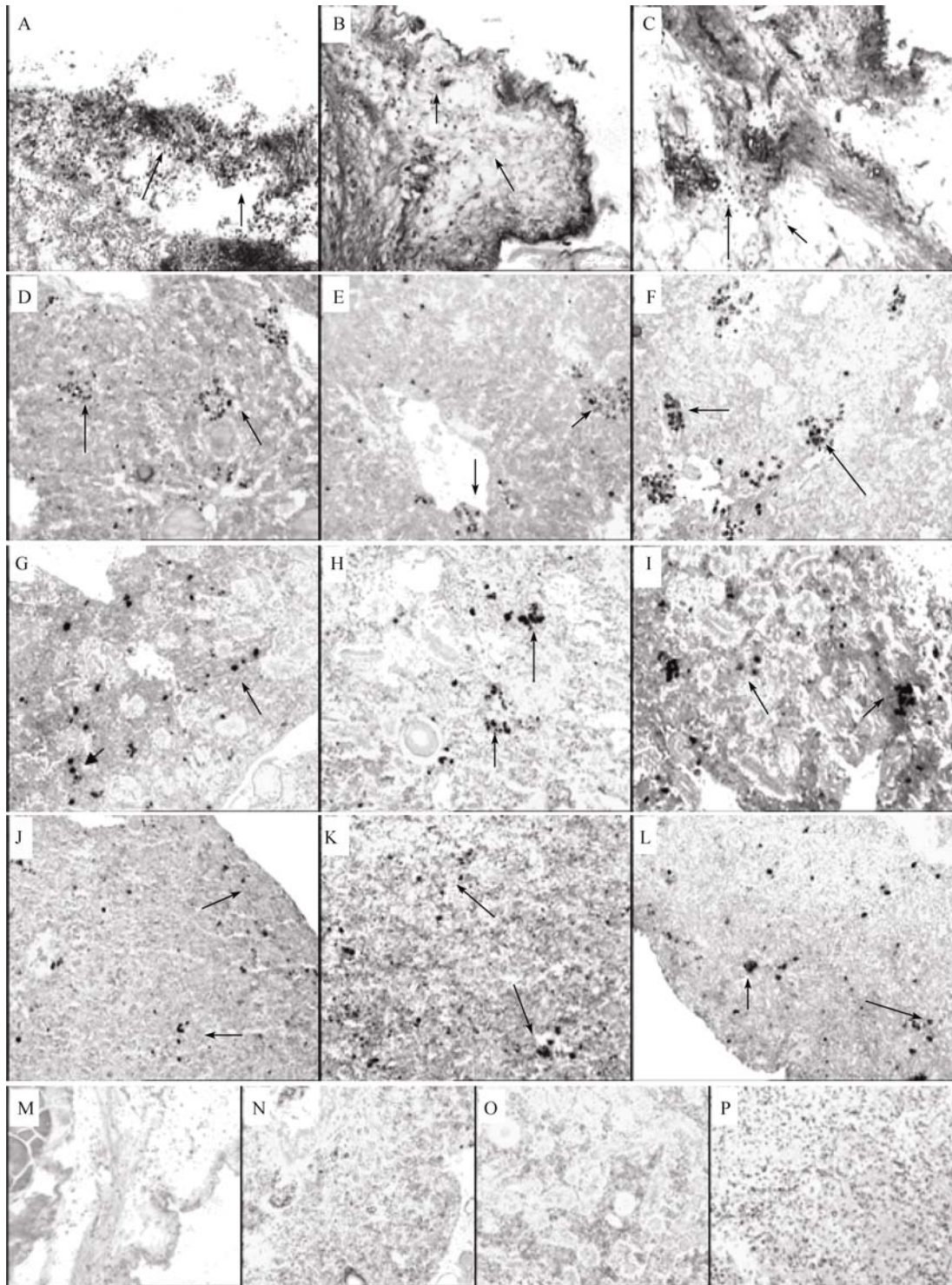
细胞, 尚包括血流中的 Tc 和 Th 细胞。本研究提示: 这些 T 细胞依赖区或动脉周围淋巴细胞鞘样结构中 *CD8* 表达细胞可能多于 *CD4* 表达细胞。此外, 大西洋庸鲈头肾中未检测到 *CD4L-1*、*CD8 α* 表达细胞和脾脏中未检测到 *CD4L-1*、*CD8 α* 、*CD8 β* 表达细胞^[8,9], 除了该作者分析的原因之外, 我们分析其原因可能包括受检大西洋庸鲈规格偏小(70—150 g)、胸腺尚未明显退化(标本图片无明显脂肪组织)^[8,9], 这个时期的 *CD4L-1*、*CD8 α* 和 *CD8 β* 表达细胞尚未大量进入外周; 而东方鲈检测结果^[6]则表明受检鱼已达到 900 g, *CD8 α* 和 *CD8 β* 表达细胞已明显进入外周淋巴器官。在哺乳动物, 成熟的 *CD4* 和 *CD8* 细胞大量进入外周淋巴器官和组织并能在抗原刺激下发生增殖时胸腺便开始了退化。因此, 本研究结果进一步提示鱼类胸腺内 T 细胞的发育、迁移和在外周的分布及其与胸腺退化的关系与哺乳动物可能是一致的。

综上所述, 本研究根据本实验室已获得的鲤 *CD4L-1*、*CD8 α* 和 *CD8 β* 基因序列分别设计探针, 应用原位杂交技术检测并观察了鲤胸腺、头肾、体肾和脾脏等淋巴器官中 *CD4L-1*、*CD8 α* 和 *CD8 β* 表达细胞的分布特征, 加深了对鱼类免疫系统特别是 T 细胞及细胞亚群组成、分布及其与免疫功能关系的认识, 为后续研究奠定了基础。

参考文献:

- [1] Stolen S, Makela O. Carrier preimmunisation in the antihapten response of a marine fish [J]. *Nature*, 1975, 254: 718—719
- [2] Scapigliati G, Romano N, Abelli L. Monoclonal antibodies in fish immunology: identification, ontogeny and activity of T- and B-lymphocytes [J]. *Aquaculture*, 1999, 172: 3—28
- [3] Randelli E, Buonocore F, Scapigliati G. Cell markers and determinants in fish immunology [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, 25: 326—340
- [4] Sun XF, Shang N, Hu W, *et al.* Molecular cloning and characterization of carp (*Cyprinus carpio* L.) *CD8 β* and *CD4*-like genes [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23: 1242—1255
- [5] Araki K, Suetake H, Kikuchi K, *et al.* Characterization and expression analysis of *CD3 ϵ* and *CD3 γ/δ* in fugu, *Takifugu rubripes* [J]. *Immunogenetics*, 2005, 57: 158—163
- [6] Suetake H, Araki K, Akatsu K, *et al.* Genomic organization and expression of *CD8 α* and *CD8 β* genes in fugu *Takifugu rubripes* [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2007, 23: 1107—1118
- [7] Picchietti S, Guerra L, Salleri L, *et al.* Compartmentalisation of T cells expressing *CD8 α* and *TCR β* in developing thymus of sea bass *Dicentrarchus labrax* (L.) [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2008, 32: 92—99
- [8] Patel S, Overgård A C, Nerland A H. A *CD4* homologue in Atlantic halibut (*Hippoglossus hippoglossus*): Molecular

- cloning and characterisation [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2009, **26**: 377—384
- [9] Patel S, Overgård A C, Nerland A H. CD8 α and CD8 β in Atlantic halibut, *Hippoglossus hippoglossus*: cloning, characterization and gene expression during viral and bacterial infection [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, **25**: 570—580
- [10] Shang N, Sun X F, Hu W, *et al.* Molecular cloning and characterization of carp (*Cyprinus carpio* L.) TCR γ and CD3 γ/δ chains [J]. *Fish & Shellfish Immunology*, 2008, **24**: 412—425
- [11] Yin J, Zhou L, Liu J, *et al.* Temporal and spatial expression pattern of gibel carp *pou2* gene during embryogenesis [J]. *Acta Hydrobiologica Sinica*, 2007, **31**(5): 629—636 [尹隽, 周莉, 刘军, 等. 银鲫 *pou2* 基因在胚胎发育过程中的时空表达图式. 水生生物学报, 2007, **31**(5): 629—636]
- [12] Hansen J D, Zapata A G. Lymphocyte development in fish and amphibians [J]. *Immunological Reviews*, 1998, **166**: 199—220
- [13] Devine L, Kieffer L J, Aitken V, *et al.* Human CD8 beta, but not mouse CD8 beta, can be expressed in the absence of CD8 alpha as a beta beta homodimer [J]. *Journal of Immunology*, 2000, **164**: 833—838
- [14] Forlenza M, de Carvalho Dias J D, Veselý T, *et al.* Transcription of signal-3 cytokines, IL-12 and IFN alpha beta, coincides with the timing of CD8 alpha beta up-regulation during viral infection of common carp (*Cyprinus carpio* L.) [J]. *Molecular Immunology*, 2008, **45**: 1531—1547
- [15] Somamoto T, Yoshiura Y, Nakanishi T, *et al.* Molecular cloning and characterization of two types of CD8alpha from gibel carp, *Carassius auratus langsdorfii* [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2005, **29**: 693—702
- [16] Toda H, Shibasaki Y, Koike T, *et al.* Alloantigen-specific killing is mediated by CD8-positive T cells in fish [J]. *Developmental & Comparative Immunology*, 2009, **33**: 646—652

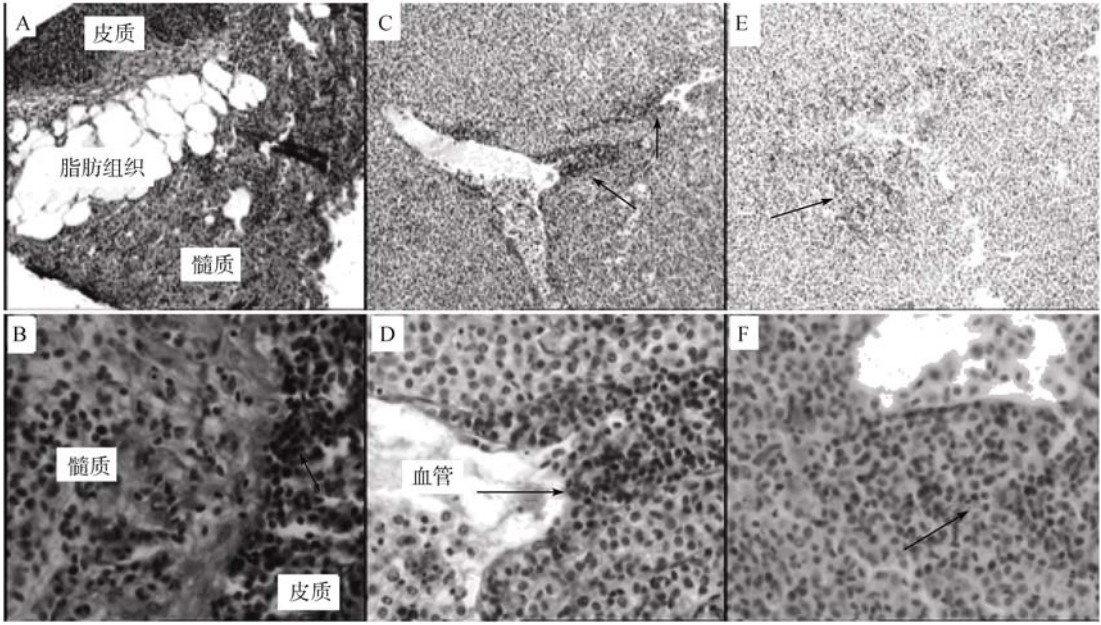


图版 原位杂交显示 *CD4L-1*、*CD8α* 和 *CD8β* 表达细胞在 1 龄鲤主要淋巴器官中的分布

Plate I *In situ* hybridization of *CD4L*, *CD8α* and *CD8β* in different tissues of 12-month carp

A-C. 胸腺(分别用 *CD4L*、*CD8α* 和 *CD8β* 反义探针); D-F. 头肾(分别用 *CD4L*、*CD8α* 和 *CD8β* 反义探针); G-I. 体肾(分别用 *CD4L*、*CD8α* 和 *CD8β* 反义探针); J-L. 脾脏(分别用 *CD4L*、*CD8α* 和 *CD8β* 反义探针); M-P. 胸腺、头肾、体肾和脾脏 (阴性对照); 黑色箭头指示表达细胞(100×)

A-C. thymus (with *CD4L*, *CD8α* and *CD8β* anti-sense probe respectively); D-F. head kidney (with *CD4L*, *CD8α* and *CD8β* anti-sense probe respectively); G-I. body kidney (with *CD4L*, *CD8α* and *CD8β* anti-sense probe respectively); J-L. spleen (with *CD4L*, *CD8α* and *CD8β* anti-sense probe respectively); M-P. thymus, head kidney, kidney and spleen (with sense probe, negative control); Arrows indicate the cells that reacted with DIG-labeled anti-sense RNA (100×)



图版 1 龄鲤主要淋巴器官 HE 染色标本

Plate II The photo of HE staining

A、B. 胸腺(100×; 400×); C、D. 头肾(100×; 400×); E、F. 脾脏(100×; 400×)
A, B. thymus (100×; 400×); C, D. head kidney (100×; 400×); E, F. spleen (100×; 400×)