

## 猕猴脾脏中 IL-2 蛋白表达的性别差异

马文静<sup>1</sup>, 罗启慧<sup>1,2</sup>, 陈姗姗<sup>1</sup>, 陈正礼<sup>1,2\*</sup>

(1.四川农业大学动物医学院 动物疾病与人类健康中心四川省重点实验室,四川 雅安 625014; 2.四川农业大学预防兽医研究所,四川 成都 611130)

**摘 要:**观察白细胞介素 2(IL-2)在猕猴脾脏中的表达分布及性别差异。采用免疫组织化学 SP 法,对雌、雄猕猴脾脏内 IL-2 的分布与表达进行观察。雄性猕猴脾脏红髓区阳性细胞强染且多为胞浆着色,中等密度分布;白髓区有低密度分布的中等阳性细胞,且多数为胞浆着色;在边缘区有中等密度分布的中等阳性细胞。雌性猕猴脾脏中,红髓区脾索有高密度强阳性细胞,有部分胞核和部分胞浆着色;白髓区有低密度分布的胞核着色的中等阳性细胞;边缘区有中等密度分布的中等阳性细胞。雌性猕猴脾脏中 IL-2 阳性细胞数量及蛋白表达强度均显著高于雄性猕猴( $P<0.01$  或  $0.05$ )。IL-2 阳性产物主要表达于红髓中,表明 IL-2 对猕猴脾脏体液免疫功能的发挥起到了较强的作用,且性别差异明显。

**关 键 词:** 猕猴;脾脏;白细胞介素

中图分类号: S865.16

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2015)06-0651-04

## Difference of IL-2 expression in spleen of macaque between the male and female

Ma Wenjing<sup>1</sup>, Luo Qihui<sup>1,2</sup>, Chen Shanshan<sup>1</sup>, Chen Zhengli<sup>1,2\*</sup>

(1.Key Laboratory of Animal Disease and Human Health of Sichuan Province, College of Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Ya'an, Sichuan 625014, China; 2.Institute of Preventive Veterinary Medicine, Sichuan Agricultural University, Chengdu 611130, China)

**Abstract:** Interleukin-2 was observed via SABC, an immunohistochemical method, to investigate its expression and distribution in macaque's spleen and its difference with sex. Positive cells within red pulp area in spleen of male macaque were strongly stained with cytoplasm with a medium density distribution. The majority of middle positive cells with a low-density distribution in white pulp area were stained with cytoplasm. The middle-density middle positive cells were distributed in the marginal region. The high-density of strong positive cells were found in the red pulp area of splenic cord in the spleen of female macaque, some nuclei were stained, while, others were stained with cytoplasm. Middle positive cells with nuclei stained had low-density distribution in the white pulp area. The middle-density middle positive cells were distributed in the marginal region. In short, the interleukin-2 in spleen of female macaque was apparently higher than that in males both on the number of positive cells and protein expression intensity ( $P<0.01$  or  $0.05$ ). Higher expression of the interleukin-2 in red pulp area suggested that it played an important role in enhancing the humoral immune function, and this depended greatly on sex.

**Keywords:** macaque; spleen; interleukin-2

脾脏为猕猴机体重要的外周免疫器官,其实质 分为白髓、红髓和边缘区三部分。脾脏边缘区有较

多的巨噬细胞,是脾内捕获抗原、识别抗原和诱发免疫应答的重要部位<sup>[1-2]</sup>。脾脏是T、B淋巴细胞和免疫细胞因子等免疫细胞定居的场所<sup>[3]</sup>,既可以通过吞噬作用完成非特异性免疫,也可通过T细胞介导的细胞免疫和B细胞介导的体液免疫完成特异性免疫功能<sup>[4]</sup>。白细胞介素-2又称T细胞生长因子,是由活化T细胞产生,是动物体内一种重要的免疫活化因子<sup>[5]</sup>,在免疫系统内发挥调节效应,可刺激活化的T细胞克隆性生长,促进B细胞的增殖与分化,产生细胞因子,增强细胞毒性T细胞(Tc)、NK细胞和单核吞噬细胞的杀伤活性<sup>[6]</sup>。目前,关于IL-2与机体免疫调节的研究较多(主要集中在其抗肿瘤、抗微生物感染和自身免疫等方面<sup>[7-8]</sup>),但关于IL-2在脾脏中不同区域的表达和IL-2在不同性别动物免疫系统的差异性表达研究较少,尤其是关于灵长类动物的研究少见报道。笔者利用免疫组织化学SP法研究IL-2在猕猴脾脏中的表达及性别差异,旨在为猕猴的免疫研究提供参考资料。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

健康的成年猕猴6只,年龄4.5~6.0岁,体质量3.5~4.5 kg,雌、雄各3只。在温湿度适宜、自由采食的环境中饲养。

### 1.2 主要仪器与试剂

主要仪器:恒温冷冻切片机(青海无线电一厂);日本OLYMPUS CHC型光学显微镜(日本OLYMPUS光学工业株式会社);Nikon50i-BF荧光生物数码显微镜(Nikon光学株式会社)。

主要试剂:抗兔链霉菌抗生物素蛋白-过氧化物酶免疫组化超敏SP试剂盒(北京中衫金桥生物技术有限公司);兔IL-2多克隆抗体(武汉博士德公司);葡萄糖氧化酶和四盐酸 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)。

### 1.3 试验方法

将猕猴用氯氨酮麻醉,经颈动脉放血处死后迅速取出脾脏,置于4%多聚甲醛磷酸缓冲液中固定36~48 h。

将取出的脾脏置于含20%蔗糖的缓冲液中24 h(环境温度4℃),待到组织块沉底后取出,在恒温

冷冻切片机上作冠状位切片,片厚30 μm。

猕猴的脾脏一部分用于免疫组化 IL-2 染色,另一部分用于阴性对照试验。切片经0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.4)漂洗3次,每次10 min;切片在室温下用过氧化物酶阻断液(试剂A)孵育30 min;用0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)漂洗3次,每次10 min;切片入非免疫动物血清(试剂B),室温下孵育30 min;入第一抗体(IL-2 多克隆抗体,工作浓度1:200),4℃冰箱孵育72 h。用0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)漂洗3次,每次10 min;加生物素标记的第二抗体(试剂C),室温下孵育1 h;用0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)漂洗3次,每次10 min;加链亲合素-过氧化物酶溶液(试剂D),室温下孵育1 h(所用A、B、C、D液为北京中衫金桥生物技术有限公司生产的SP试剂盒);0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)漂洗3次,每次10 min,入DAB显色液呈色(硫酸镍胺醋酸缓冲液50 mL,DAB 0.03 g,用双蒸水50 mL溶解过滤),两液混合,加入葡萄糖0.2 g,氯化铵0.04 g,最后加入葡萄糖氧化酶0.001 g。呈色时间不超过30 min,期间通过镜下观察来掌握呈色时间。用蒸馏水终止反应后洗2遍,用磷酸缓冲液洗2遍,每次15 s。贴片,晾干,乙醇脱水,乙醇透明,加拿大中性树胶封片。

阴性对照试验以0.01 mol/L 磷酸缓冲液(pH7.4)代替第一抗体,其他步骤同上。

### 1.4 图像的采集与分析

将制得的切片在Nikon数码光学显微镜下观察并拍照,每组动物随机选取5张切片,40倍物镜下观察10个视野内IL-2阳性细胞的数目及阳性产物的着色强度。测定每张切片的光密度值。

## 2 结果与分析

### 2.1 IL-2 在猕猴脾脏中的分布

用硫酸镍胺增强染色免疫组织化学SP法的结果表明:阳性显色结果为蓝黑色,阴性对照切片无蓝黑色阳性产物出现。在雌、雄猕猴脾脏的红髓区、白髓区和边缘区都分布着阳性细胞,但各区之间阳性产物的分布密度和着色强度有差异。

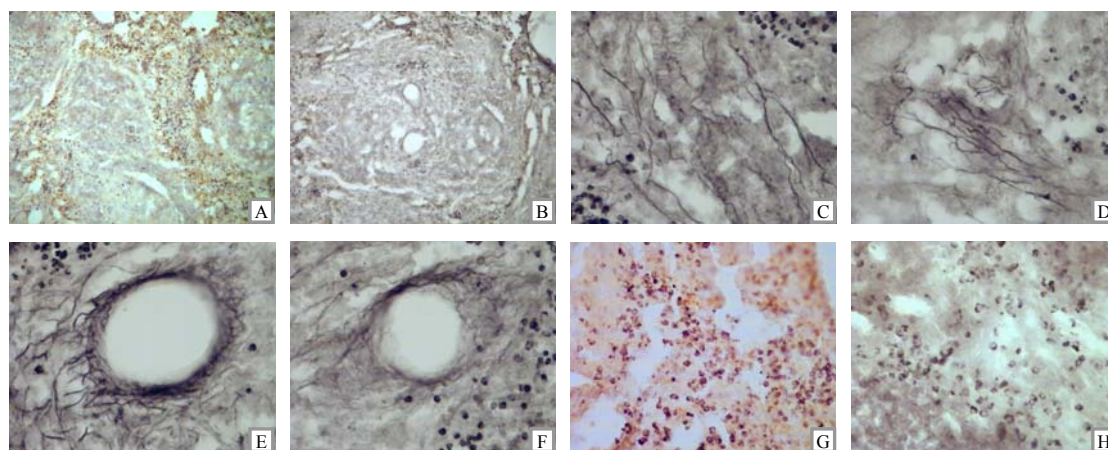
从整体上看,雌性IL-2阳性细胞的分布密度

明显高于雄性(图 1-A 和图 1-B), 雌性红髓区阳性纤维密度也高于雄性(图 1-C 和图 1-D), 雌性白髓区血管周围阳性纤维密度显著高于雄性(图 1-E 和图 1-F), 而红髓中的阳性细胞密度差异不明显(图 1-G 和图 1-H)。

在雄性猕猴脾脏红髓区脾索可见中等密度分布、胞浆着色的强阳性细胞, 细胞形态呈椭圆形或圆形, 细胞集中分布(图 1-B)。被膜有分布密度低、中等阳性的细胞, 为胞核着色。小梁上有分布密度低、着色深的强阳性细胞, 为胞浆着色, 呈椭圆形。白髓区有中空圆形着色较浅的中等阳性细胞(图 1-F), 脾小结周围也零星分布有着色较深的强阳性

细胞, 且基本为胞浆着色。动脉周围淋巴鞘可见低密度、中等阳性的细胞。从白髓和红髓的整体图片可以观察到红髓中阳性细胞的分布密度较白髓的高, 阳性的强度比白髓的强; 被膜上的分布密度低, 中等阳性; 边缘区的强度和分布密度为中等。

在雌性猕猴脾脏中, 红髓区为强阳性细胞, 且呈高密度分布(图 1-G), 大部分为着色较深的胞核着色, 呈不规则形状; 在白髓区, 阳性细胞分布密度低, 为胞核着色, 中等阳性细胞(图 1-E)。动脉周围淋巴鞘有胞浆着色的中等阳性细胞, 呈不规则形状, 分布密度低。被膜的阳性细胞呈低密度分布, 中等阳性(图 1-F)。



A 雌性 IL-2( $\times 100$ ); B 雄性 IL-2( $\times 100$ ); C 雌性红髓区阳性纤维 IL-2( $\times 400$ ); D 雄性红髓区阳性纤维 IL-2( $\times 400$ ); E 雌性白髓区血管周围阳性纤维 IL-2( $\times 400$ ); F 雄性白髓区血管周围阳性纤维 IL-2( $\times 400$ ); G 雌性红髓 IL-2; H 雄性红髓 IL-2( $\times 400$ )。

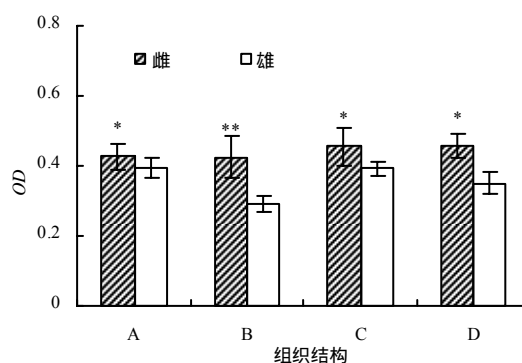
图 1 白细胞介素 2 在猕猴脾脏中的分布情况

Fig.1 Distribution of interleukin-2 in spleen of macaques

不管是雄性还是雌性猕猴脾脏, 其红髓中的阳性细胞密度均比白髓中的高; 雄性阳性细胞多数为圆形或椭圆形, 而雌性阳性细胞多数为不规则形状。整体上, 阳性细胞雌性的分布密度比雄性的低。

## 2.2 猕猴脾脏中 IL-2 阳性的表达强度

光密度测定结果显示, 脾脏中 IL-2 的表达总体上呈现出雌性猕猴均显著高于雄性猕猴。由图 2 结果可见, 猕猴脾脏白髓区血管周围 IL-2 阳性纤维的表达强于雄性, 差异显著( $P < 0.05$ ); 红髓区 IL-2 阳性纤维的表达雌性强于雄性, 差异极显著( $P < 0.01$ ); 红髓 IL-2 的表达雌性强于雄性, 差异显著( $P < 0.05$ ); 中央动脉区 IL-2 的表达雌性强于雄性, 差异显著( $P < 0.05$ )。



A 白髓区血管周围阳性纤维 IL-2; B 红髓区阳性纤维 IL-2; C 红髓 IL-2; D 中央动脉区 IL-2; “\*”代表与雄性组比较差异显著( $P < 0.05$ ), “\*\*”代表差异极显著( $P < 0.01$ )。

图 2 猕猴脾脏中 IL-2 阳性表达的光密度值

Fig.2 Values of optical density from the positive expression of interleukin-2 in spleen of macaques

### 3 结论与讨论

根据脾脏血窦发达程度,哺乳动物脾脏可分为防御性脾脏和储存性脾脏<sup>[9]</sup>。猕猴脾脏富含血窦和血管,为防御性脾,且其免疫功能强大,因此对其免疫相关因子的研究有重要意义。众多的生物学效应使IL-2在免疫系统中成为一种起中心作用的细胞因子<sup>[10]</sup>。本研究中发现,雌性、雄性猕猴脾脏IL-2都是在红髓区表达最强且高密度分布,白髓区次之,边缘区最弱,整体上雌性猕猴脾脏阳性细胞分布密度高于雄性。已有研究<sup>[11-12]</sup>表明,雌激素和免疫系统有密切的关系,雌激素可影响免疫系统的发育并调节其功能。结合本试验结果,推测雌雄之间阳性细胞分布密度的差异可能是由雌雄之间的性激素差异所致。雌激素在IL-2调控脾脏免疫中发挥的作用强于雄性激素。雌性大鼠老化过程中脾细胞雌激素受体含量与血液中雌激素水平呈正相关,而且IL-2的含量与雌激素受体的含量也呈正相关,表明雌激素及雌激素受体在一定程度上对脾脏的免疫有增强作用<sup>[13]</sup>。研究表明IL-2可参与B淋巴细胞和T淋巴细胞的增殖与分化<sup>[14]</sup>,而本研究结果发现IL-2阳性细胞主要是红髓的表达有显著差异,而红髓主要是由B淋巴细胞组成,因此,推测IL-2在调控脾脏B淋巴细胞的体液免疫过程中,雌激素发挥了重要的协同作用。

目前已分离的受体分子的化学本质均为蛋白质,多数为结合蛋白,主要是糖蛋白和脂蛋白。根据存在部位,受体可分为细胞质膜受体和细胞内受体,而细胞膜IL-2受体的表达水平与机体免疫状况和机体清除病毒、细菌的能力密切相关。IL受体(ILR)分布广泛,存在于受其作用的多种细胞,具有不同的亲和力<sup>[15]</sup>。本试验观察到IL-2阳性产物主要定位于细胞浆或细胞膜,表明IL-2可能是通过膜受体介导细胞内一系列第二信使而进行非基因机制调控的。

本研究中观察到IL-2在脾脏中分布广泛,且分布不均,主要分布于红髓区,同时发现雌性猕猴在脾脏各部位的表达均强于雄性,说明体内IL-2在猕猴脾脏体液免疫的调控中有较强的作用,且存在明显的性别差异。

### 参考文献:

- [1] Chadburn A. The spleen: Anatomy and anatomical function [J]. *Semin Hematol*, 2000, 37(Suppl 1): 13-21.
- [2] Groom AC. Microcirculation of spleen: New concepts, new challenges [J]. *Microvasc Res*, 1987, 34(3): 269-289.
- [3] 郑国强, 刘安军, 滕安国, 等. 雌雄小鼠胸腺和脾脏的免疫比较 [J]. *安徽农业科学*, 2011, 39(16): 9743-9745.
- [4] 周成玥, 冯利杰, 沈玉君, 等. 大鼠出生后不同时期脾脏结构发育和浆细胞分化 [J]. *安徽医科大学学报*, 2012, 47(7): 797-798.
- [5] 黄其春, 杨小燕, 林淑慧, 等. 银杏叶提取物对肉仔鸡脾脏淋巴细胞增殖及IL-2分泌影响的血清药理学研究 [J]. *中国畜牧杂志*, 2012, 48(15): 54.
- [6] 李鹏华, 畅灵丽, 黄玉青, 等. 青蒿琥酯治疗对斯氏狸殖吸虫感染大鼠血清IL-2和IL-4含量的影响 [J]. *国际医学寄生虫杂志*, 2012, 39(4): 210.
- [7] 梁玉杰, 段永强, 成映霞, 等. 衰老进程中机体免疫器官和免疫细胞因子变化及健脾补肾中药的干预研究 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2012, 19(3): 43.
- [8] 常嵩华, 程天印, 董振生. 山莓叶三萜对大鼠免疫功能的影响 [J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2012, 38(1): 83-85.
- [9] 谭雪芬, 王雯慧, 关飞, 等. 牦牛脾脏的解剖学和组织学研究 [J]. *甘肃农业大学学报*, 2014, 49(2): 4.
- [10] 葛艳玲, 朱启镛. 白细胞介素2基因多态性研究 [J]. *中华实用儿科临床杂志*, 2006, 3(2): 174-176.
- [11] Roberson C N, Roberson K M, Padilla G M, et al. Induction of apoptosis by diethylstilbestrol in hormone-insensitive prostate cancer cells [J]. *Natl Cancer Inst*, 1996, 88: 908-910.
- [12] 袁文丹, 陈金荣, 石增立. 雌激素对免疫系统调节作用的研究进展 [J]. *医学综述*, 2005, 11(5): 422-424.
- [13] 祝春梅, 陈正礼, 曾文, 等. 猕猴脾脏中雌激素受体的表达及其性别差异 [J]. *中国兽医学报*, 2008, 28(10): 1239-1242.
- [14] Srivastava P K, Menotet A, Basu S, et al. Heat shock proteins come of age: Primitive functions acquire new roles in an adaptive world [J]. *Immunity*, 1998, 8(6): 657-665.
- [15] 王健, 王瑜, 叶松. 白细胞介素2受体及其功能研究进展 [J]. *中国现代医学杂志*, 2006, 16(2): 55-58.

责任编辑: 王赛群

英文编辑: 王 库