

淋巴样细胞中酸性醋酸萘酯酶活性的比较细胞化学研究

查士隽 裘愉愉* 江希明

(杭州大学生物系)

酸性醋酸萘酯酶(Acid α -Naphthyl Acetate Esterase, ANAE) 活性被认为是人和其它哺乳类动物成熟的 T 淋巴细胞的细胞化学标志^[1,2,3,4]。据 Garavini 等(1981)^[5]报道, 在两栖类动物(蟾蜍)的胸腺和脾脏的淋巴细胞中, 有一群具有 ANAE 活性的细胞, 并判定它们也是 T 淋巴细胞。至于在鱼类或更低等的无脊椎动物中, 是否存在有 ANAE 活性的淋巴样细胞, 迄今未见报道。

我们应用 ANAE 标记法, 检测并比较了处于系统发生不同阶段的几种代表性动物的淋巴样细胞中的 ANAE 活性, 反应产物的染色形式特征。讨论了酸性醋酸萘酯酶活性的出现与淋巴细胞亚群分化的可能关系。

材 料 与 方 法

1. 实验动物

环节动物(蚯蚓), 鱼类(鲫鱼、泥鳅), 两栖类(蛙、蟾蜍), 哺乳类(小鼠、人)。

2. 淋巴样细胞来源

均取自血细胞。蚯蚓、鱼和两栖动物由心脏取血。小鼠由尾静脉取血。人血细胞取自健康人指尖或耳垂末梢血。均作全血涂片。

3. ANAE 染色

参照 Mueller(1975)和 Horwitz(1977)方法略加修改。简述如下: 血涂片经预冷(4℃)的丙酮—甲醛固定液固定 5 分钟后, 用水充分冲洗。然后置于温育液中温育。温育液系由下列试剂配制而成: 在 40 毫升 0.067M 磷酸缓冲液(pH5.0)中加入 2.4 毫升的偶氮副品红(hexazotized pararosanilin)溶液, 混匀后, 再加入 0.4 毫升的 2.5%醋酸萘酯。用于蚯蚓、鱼及两栖动物血涂片的温育液, pH 调节至 6.2, 在 5—6℃温育 21 小时。用于小鼠和人的血涂片的温育液, pH 分别调节至 6.4 和 5.8, 在 37℃温育 2 小时。

温育结束后, 取出涂片, 以水冲洗, 晾干, 再以 1% 甲基绿醋酸缓冲液(pH 4.2)复染 10 分钟, 水洗, 晾干。

4. 镜检计数

染色后的涂片置于油镜下观察。计数 100 个淋巴细胞(蚯蚓则计数 100 个白细胞)。凡胞浆中有深红色反应物的作为 ANAE 阳性细胞。没有反应产物的为 ANAE 阴性细胞。ANAE 阳性率以百分数表示。

结 果

1. 鱼及两栖类动物血细胞中具有 ANAE 活性的细胞包括一部分淋巴细胞, 血小板细胞和单核细胞。ANAE 阴性细胞包括一部分淋巴细胞, 多形核粒细胞及红细胞。

2. 鱼类的淋巴细胞中的 ANAE 反应产物较集中, 呈大斑块状, 未见有分散形式的反应产物(图 1)。两栖类动物淋巴细胞中的 ANAE 反应产物, 则既有斑块状的, 也有分散颗粒形式的(图 2)。出现在蚯蚓白细胞中的 ANAE 反应产物, 类似于鱼的 ANAE 阳性淋巴细胞, 以斑块状为主(图 3)。就 ANAE 反应产物的染色特性和形式特征而言, 蚯蚓、鱼及两栖动物的 ANAE 阳性细胞, 均与哺乳动物 ANAE 阳性淋巴细胞中所见相似, 只是反应产物在胞



图 1 鲫鱼淋巴细胞(ANAE 阳性, 斑块型)
显微摄影放大 $\times 2880$

* 现在工作单位: 杭州护士学校。



图2 蟾蜍淋巴细胞 (ANAE 阳性, 斑点型)
显微摄影放大 $\times 2880$



图3 蚯蚓白细胞 (ANAE 阳性, 斑块型)
显微摄影放大 $\times 2880$

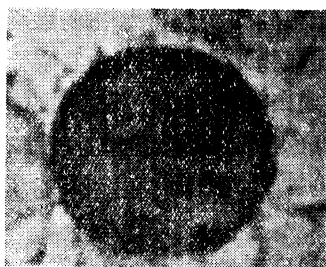


图4 小鼠淋巴细胞 (ANAE 阳性, 斑点型)
显微摄影放大 $\times 2880$



图5 人淋巴细胞 (ANAE 阳性, 斑点型)
显微摄影放大 $\times 2880$

浆中的边界, 后者比较清楚(图4, 5, 6)。

3. 鱼和两栖类动物的血小板细胞中也有



图6 人淋巴细胞 (ANAE 阳性, 分散颗粒型)
显微摄影放大 $\times 2880$



图7 蛙血小板细胞 (ANAE 阳性)
显微摄影放大 $\times 2880$

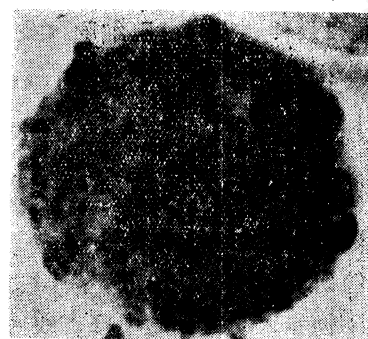


图8 蟾蜍单核细胞 (ANAE 阳性, 浓重染色的弥散型)
显微摄影放大 $\times 2880$

阳性反应产物, 但严格地局限于梭形细胞的两端(图7)。其单核细胞中的反应产物, 与哺乳动物单核-巨噬细胞 ANAE 反应相似, 呈棕色密集小颗粒状, 并弥散于整个胞浆(图8)。因此, 这两类细胞极易区别于 ANAE 阳性的淋巴细胞。

4. 恒温动物(哺乳类)淋巴细胞中 ANAE 反应的适宜温度, 可以有较大的变动范围, 一般在 $5-37^{\circ}\text{C}$ 反应均可进行, 但在低温 ($5-$

表 1 人和六种动物血液中 ANAE 阳性淋巴样细胞百分数, 反应条件及产物形式

动物类别		例数	ANAE ⁺ %±S.D.	ANAE 反应条件			ANAE 反应产物的形式
				pH	温度(℃)	时间(小时)	
环节类	蚯蚓	6	61.2±5.3	6.2	5—6	21	斑块状
鱼类	鲫鱼	8	66.5±9.1	6.2	5—6	21	斑块状
	泥鳅	6	68.3±14.3	6.2	5—6	21	斑块状
两栖类	蛙	6	70.0±9.4	6.2	5—6	21	斑点或颗粒状
	蟾蜍	9	64.4±12.5	6.2	5—6	21	斑点或颗粒状
哺乳类	小鼠	30	62.6±7.1	6.4	37	2	斑点或分散颗粒状
	人	34	67.0±13.0	5.8	37	2	斑点或分散颗粒状

6℃)条件下,需延长温育时间反应才能充分(约 20 小时左右)。而变温动物(蚯蚓、鱼及两栖类)的淋巴样细胞中 ANAE 反应只能在低温(5—6℃)发生。当温度高于 20℃ 时,酶即失活反应消失。其 ANAE 活性对温度的敏感性大于哺乳动物。

5. 人和六种动物的淋巴细胞(或白细胞)中 ANAE 阳性百分比及其反应条件,产物特征见表 1。

讨 论

1. 酸性酯酶的细胞特异性

早期的研究(Lake, 1971^[6]; Li, 1973^[7])表明,在动物和人的血细胞中都有酸性酯酶的存在,它们实际上是一组能水解脂肪族或芳香族酯类的同功酶。而催化醋酸萘酯水解为萘酚和醋酸的酸性酯酶(即 ANAE)则主要地存在于成熟期的 T 淋巴细胞。除 T 淋巴细胞外,某些其它类型的细胞(如单核细胞,巨噬细胞等),由于同时存在多种酯酶的同功酶,因而也显示出 ANAE 的活性。

近年,据 Radzun 等报道(1980)^[8],人的血细胞中溶酶体酸性酯酶在细胞化学反应上的差异,似与细胞特异的酸性酯酶同功酶的多态性有关。不同类型的血细胞各具有不同的酸性酯酶同功酶的组成成分,从而赋予它们细胞特

异性的细胞化学反应特性。因此,尽管同是 ANAE 反应阳性的淋巴细胞和单核细胞,其反应产物与重氮染料偶联所显示的染色特征,却有明显的差异。我们的实验结果支持了上述的看法。

由于在相同的条件下(在弱酸环境以醋酸萘酯为共同底物),我们在人和其它六种动物淋巴样细胞(或白细胞)中所观察到的 ANAE 反应产物的染色特征基本相似,使我们有理由相信,这些 ANAE 阳性细胞,可能属于同一类型的细胞群。

2. ANAE 活性与淋巴细胞亚群分化

高等脊椎动物的淋巴细胞主要分为两大亚群,即胸腺来源的 T 细胞和囊(bursa)或骨髓来源的 B 细胞。从淋巴细胞的个体发生来看, T 淋巴细胞的分化成熟和细胞内 ANAE 活性的出现,似乎都是胸腺依赖的^[9]。比较免疫学的研究表明,从真骨鱼开始,方有胸腺的形成。然而,显然不存在胸腺而且也未证实有淋巴细胞分化的蚯蚓,其白细胞中出现 ANAE 活性这一事实提示了,在系统发生上,白细胞中 ANAE 活性的出现,早于有结构的胸腺,两者没有必然的依赖关系。据 Roch 等(1977)报告^[10],蚯蚓白细胞对有丝分裂原(mitogens)的反应不同而证实有异源性。因此,据推测,具有 ANAE 活性细胞群存在的

普遍性,可能是淋巴样细胞的一种趋同进化(convergent evolution)现象。至于蚯蚓的 ANAE 阳性细胞是否是原始型的 T 样细胞,尚待研究确定。

参 考 文 献

- [1] Mueller, J. et al., 1975, Eur. J. Immunol., 5:270-274.
- [2] Horwitz, D. A. et al., 1977, Clin. Exp. Immunol., 30:289-298.
- [3] Kulenkampff, J. et al., 1977, Brit. J. Hematol., 36:231.
- [4] Ferrari, F. A. et al., 1980, Clin. Exp. Immunol., 41:358-362.
- [5] Garavini, C., 1981, Experientia, 37: 516-517.
- [6] Lake, B. D., 1971, J. Clin. Pathol., 74: 617-620.
- [7] Li, C. Y. et al., 1973, J. Histochem. Cytochem, 21:1-12.
- [8] Radzun, H. J. et al., 1980, Blood, 55: 891-897.
- [9] Leino, A. et al., 1977, Developmental Immunobiology, Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam. p. 147-p. 154.
- [10] Roch, P. et al., 1977, Developmental Immunobiology, Elsevier, North Holland Biomedical Press, Amsterdam. p. 41-p. 49.

敌枯双、敌枯唑对体外培养细胞 SCE 的影响及其机制

傅中滇 徐维光 王瑞淑 彭恕生

(四川医学院卫生系)

自从 BUdR/Giemsa 技术用于检查 SCE 以来,已经用 SCE 分析法测试了许多化学物质的诱变性和致癌性,大多数促使 SCE 频率升高的化学物质都是诱变性致癌剂。因此,在遗传毒理学中已把 SCE 分析法作为诱变剂致癌剂的一种快速敏感的短期筛选方法。但是,也发现有些能使体外培养细胞 SCE 频率升高的化学物质,尚无证据认为是诱变剂,如维生素 C、A 等^[1]。本文报道了敌枯双、敌枯唑促使体外培养的中国地鼠卵巢成纤维细胞 (CHO-K1) SCE 频率升高,而且受到尼克酰胺和 NAD⁺ 的拮抗,与以前报道的,在人淋巴细胞中的结果对比^[9],提出敌枯双、敌枯唑的作用点可能在 DNA 以外的部位,它们的诱变性和致癌性值得进一步研究。

材 料 和 方 法

全部采用 RPMI 1640 培养基,加 15—20% 小牛血清,卡那霉素 100 单位/毫升, pH 调到 7.2—7.4。本实验中采用的 CHO-K1 细胞株是次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核糖转移酶 (HGPRT) 遗传缺陷型。在瓶底面积为

10 平方厘米的培养瓶中,接种约 3×10^5 个细胞,培养液总量为 3 毫升。用胶塞塞紧后,放置在普通恒温培养箱中,在 37℃ 生长 24 小时,然后加入受试物和 BUdR (最终浓度为 10 μ M), 再在完全黑暗的温箱中继续培养 26 小时。结束培养前 2 小时,加入秋水仙素 (最终浓度为 0.2 微克/毫升)。敌枯双和敌枯唑在临用前用二甲亚砜 (DMSO) 溶解,配制各种浓度的准备液,使之加入培养液后能获得所需要的最终浓度,每份标本加受试物溶液 15 μ l, 对照组只加 15 μ l DMSO, 因此 DMSO 在培养液中的浓度均为 0.5% (V/V)。尼克酰胺和 NAD⁺ 用生理盐水配制, 每份标本也加 15 μ l。细胞收集和制片按常规进行,并照 Korenberg 建议的方法作色差染色^[2]。SCE 计数采用盲片法,统计学处理全部用双侧 t 检验。

结 果

一、敌枯双、敌枯唑对 CHO-K1 细胞 SCE 的作用

如表 1 所示,在所选的有效剂量组中,这

本文承复旦大学遗传研究所项维教授、上海第一医学院顾学箕教授提供宝贵意见,特此致谢。