

巨噬细胞溶酶体消化力的研究

II. 体外培养下小鼠腹腔巨噬细胞 溶酶体消化力的形态学检测

许 长 照

(南京中医学院病理教研室)

巨噬细胞具有吞噬异物和消化异物的能力,两个过程意义也不相同。如果只能吞噬异物(包括微生物),而不能或不适当消化和降解异物,必将有害于机体,引起甚至加重疾病^[1,2,8]。

临床和实验研究中有关人体和小鼠巨噬细胞的吞噬活动(吞噬率及其指数)作为免疫学指标已运用很多,但只有在检测吞噬指标的同时进行溶酶体消化力的观察,才可能全面认识巨噬细胞的功能。为此在体外培养下,我们将小鼠腹腔巨噬细胞溶酶体对鸡红细胞的消化力,进行活体和染色标本的形态学观察,并进一步在透射电镜下进行核对,证实是一致的,认为在临床检测时可以用光镜检查巨噬细胞的消化力。

方法和材料

1. 鸡红细胞的制备

在来亨鸡翅膀下无菌操作取1毫升血,放在5毫升阿氏(Alsever)液中混合,用0.9%无菌生理盐水洗涤鸡红细胞3次,最后制成5%悬液(相当于 $5-6 \times 10^6$ /毫升)备用。

2. 小鼠腹腔巨噬细胞悬液的制备

健康小鼠10只,体重20-25克,不分雌雄。用3%无菌淀粉溶液1.5毫升注入小鼠腹腔中,48小时后注入Hanks氏液1.5毫升,轻轻按摩腹腔,然后抽取腹腔液作为腹腔巨噬细胞悬液(也可离心沉淀,用Hanks氏液配成 2×10^6 /毫升悬液)。

3. 巨噬细胞培养

采用静止培养法,先将涂有鼠尾胶^[3]的玻璃条(8×24毫米)插入指管内,加入小鼠腹腔巨噬细胞悬液和培养液各0.5毫升。培养液成分为含10%小牛血清(经56℃灭活)的199培养液,青霉素100单位/毫升、链霉素100微克/毫升。一组同时加入鸡红细胞悬

液0.02-0.04毫升/毫升巨噬细胞悬液,在37℃温箱中培养30分钟至1小时,然后将玻条取出,移放在简易的培养小室^[4]。在相差显微镜下作活体观察并照相,最后用Wright-Giemsa染色。另一组巨噬细胞先经短期培养3天后,几乎全为仍具吞噬力的巨噬细胞,其它淋巴细胞等均死亡,然后按上述方法加入鸡红细胞,培养30分钟取出玻条,再进行观察。

4. 透射电镜标本的制备

将相差显微镜观察的巨噬细胞吞噬鸡红细胞活体标本取下,以pH7.2、0.1M二甲胍酸盐缓冲液稀释的2.5%戊二醛固定,用二甲胍酸盐缓冲液洗,再用1%锇酸固定,丙酮脱水,经醋酸铀染色,Epon 812包埋,包埋时以胶囊倒扣在细胞上^[4],用LKB-4800或LKB-2128IV型切片机制成超薄切片,再用枸橼酸铅复染,H-500型透射电镜下观察。

结 果

1. 活体观察

相差镜下见巨噬细胞吞噬鸡红细胞的全过程。它先向鸡红细胞游走,在游走时其运动方向的胞膜胞浆向前突出,外观透明,未见细胞器,仅见胞浆移动。巨噬细胞很快和鸡红细胞相接触,经粘附(图版图1)逐渐将其摄入胞浆,在胞浆内见到1-8个鸡红细胞。摄入胞浆的鸡红细胞次级溶酶体内隐约可见鸡红细胞核经消化后呈大小不等的形状(图版图2)。在巨噬细胞核周围可见许多杆状的线粒体及小圆形溶酶体在流动。吞噬较多鸡红细胞后巨噬细胞变球形,运动减慢,吞噬停止(图版图3)。

2. 染色结果

在Wright-Giemsa染色标本上可见巨噬细胞吞噬鸡红细胞,有的完整(鸡红细胞仍如原样,为6-8微米),有的已被消化。吞噬的鸡红细胞数为1-8个,巨噬细胞核可被推至一边。

培养半小时的玻片上,鸡红细胞胞浆及核已被消化成几种不同状态(分四级):原形核(3—4微米)、核固缩(2—3微米)、胞浆或核形隐约不清或呈墨绿色大小不一点状色素残余体(0.3—1.5微米,其中1微米较多)(图版图4,5)。

3. 透射电镜

观察超薄切片,可见巨噬细胞表面不规则,有伪足样结构和微绒毛。胞浆内见到较多的线粒体和粗面内质网,丰富的游离和多聚核糖体及明显的高尔基复合体。且可见大小不一、形态和密度不等的各级溶酶体,包括初、次级溶酶体和残余体(图版图8,9)。其中有的鸡红细胞核、浆依然完整,形成较大的异噬性溶酶体;有的鸡红细胞核已消化为固缩或碎裂的形态(与光镜所见的未消化形态,核固缩和点状色素残余体颗粒的大小,经测量相当)(图版图6,7);有的鸡红细胞核全被消化,留有胞浆密度稍低(与光镜见到鸡红细胞痕迹空泡同);有的胞浆消化多,形成多泡体样结构,其中有消化不全的核(图版图9)。有时可见空泡和脂肪滴(图版图8,9)。巨噬细胞核呈卵圆形、肾形、不规则形,有时有凹陷,见到核仁,在核膜及核仁上有稀疏分布的异染色质(图版图7)。

讨 论

巨噬细胞吞噬和消化鸡红细胞可分为四个阶段:

1. 趋化移动

在相差镜下能见到巨噬细胞向异物(鸡红细胞)移动。这是由于具有阳性趋化性物质作用引起的。这些趋化物质可能是鸡红细胞膜表面的脂多糖激活补体系统及致敏的淋巴细胞与鸡红细胞抗原接触而产生的趋化性淋巴因子等^[5,6]。

2. 识别粘附

辨认异己是巨噬细胞本能,在本实验鸡红细胞为巨噬细胞应清除的对象。在光镜、相差镜、电镜下都明显见到鸡红细胞紧紧粘附在巨噬细胞膜上。

3. 摄入

巨噬细胞与鸡红细胞相接触后,伸出伪足将它们包围并卷入胞浆内,形成由浆、膜包绕的异噬泡。随后巨噬细胞表面膜面积愈来愈少,直到变为球形,吞噬作用停止。这些在相差镜下最明显,电镜及光镜下也能见到摄入的固定形态。

4. 消化

指初级溶酶体进入异噬泡后将异物进行降解和消化、清除的过程。溶酶体含水解酶60多种^[7],当鸡红细胞作为异物吞入胞内形成异噬泡后,激活初级溶酶体,聚集在鸡红细胞周围并与其融合为较大的次级溶酶体。在相差镜下见线粒体的活动加强,电镜观察线粒体、核糖体、粗面内质网增多,高尔基复合体明显,均说明巨噬细胞内能量和物质代谢增强。然后溶酶体按消化需要,顺序地活化,释放不同成分的酶,将鸡红细胞核或浆分别消化,形成不同消化程度的各种次级溶酶体,包括多泡体及大小不一的残余体。我们在光镜下见到的消化状态与电镜对照完全一致,特别是光镜下易混淆的点状色素残余体(0.3—1.5微米),在电镜下得到了证实。

总之,由于巨噬细胞吞噬和消化异物(包括微生物)的能力并不一致,所以在检测巨噬细胞吞噬力时,必须更注意消化力的观察,这就是我们研究巨噬细胞溶酶体消化力形态的目的。

本工作承中国科学院上海生理研究所电镜室同志协助,谨致谢意。

参 考 文 献

- [1] 许长照, 1984, 解剖学通报, 7(1):32—34。
- [2] Jakab, G. J. et al., 1980. In *Macrophages and lymphocytes: Nature, Function and Interaction*(Escobar, M. R. & Friedman, H., ed.) pp 81—90, Plenum, New York.
- [3] Bornstein, M. B., 1958, *Lab. Invest.* 7: 134—137.
- [4] 鲍璋等, 1983. 实验生物学报, 16(1):81—91。
- [5] 上海第二医学院等, 1980. 免疫学讲义, 148—149。

(下转第63页)

EGF 受体激酶能使 src 多肽和 src 激酶的抗体磷酸化。在生长因子受体中或转化基因蛋白中出现的酪氨酸激酶活性与调节生长的机制的关系还不清楚。目前各种系统的许多方法,在确定那些直接成为 EGF 受体激酶或其它酪氨酸激酶底物的有生理意义的蛋白质还有困难。

3. 直接对 DNA 的活性

最近, Mroczkowski 等证明高度纯化的 EGF 受体在 ATP 存在时,能使超螺旋的 DNA 产生缺口而成为松弛的形式。虽然在受体制备物中总有核酸酶污染的可能,但是 src 激酶制剂(来自两个实验室)和 A-431 细胞及一般小鼠肝纯化的 EGF 受体制备物都能催化同样的反应。

这种对 DNA 构象上的活性可用一些环状的,双链 DNA 分子(pBR 322, ϕ x 174, SV 40, PM2)来证明,其产物是有缺口的环状 DNA。这种松弛反应需要 ATP,不能被水解的 ATP 类似物不起作用。使 DNA 缺口的活性不受 EGF 的影响,而是保持在经加热而使酪氨酸激酶失活的受体制剂中,这提示在体外 DNA 松弛活性既不需要生长因子的结合也不需要酪氨酸激酶活性。有趣的是有时在这些反应中产生高分子量的 DNA。如果这代表已连环的 DNA 的话,那么,观察到的活性应该与 DNA 拓扑异构酶的打开缺口和连接的活性有关。

四、受体的生理学

重要的问题是受体的结构和功能如何提供介导 EGF 生物活性的机制。当 EGF 加到细胞上时,生长因子-受体复合物形成并被吞入。复合物的吞入最终导致 EGF 和受体降解。人的成纤维细胞在没有 EGF 存在时,其 EGF 受体的生理半衰期接近 10 小时。当加入 EGF 时,半衰期则很快降至 1 小时左右。那些营养性的或不是促分裂的大分子(如低密度脂蛋白,铁传递蛋白和无唾液酸糖蛋白)的受体具有高水平的再循环,与此相反,吞入了的 EGF 受体看来只有极少数进

入再循环。已有报道说配体加速吞入了的胰岛素受体降解。然而,认为受体降解与激素的吞入,特别与促分裂剂的吞入系统有联系还为时过早。不过,在受体分子内部和激素引起的受体迅速降解中或许存在着两个效应系统,这造成了一种可能性,即受体在细胞内加工后,触发了一个或两个效应系统,并被它们转移到细胞的其他部分,例如细胞核。如果证实受体具有使 DNA 产生缺口的活性,就能预言有这样的途径存在。至今,在检测受体中间体的加工方面还没有什么进展。在前面提到的 EGF 受体转化研究中,从代谢途径标记细胞,并在有 EGF 和没有 EGF 情况下进行追踪,免疫分离和定量测定残留的标记受体。然而,未检测到可能的降解产物,只测得标记的成熟受体(170,000 道尔登)的水平下降。以前有关 ^{125}I -标记的配体(EGF 或胰岛素)交联到受体的研究提示有中间降解产物的存在。由于深入地了解其性质面临着极大的技术困难,这些初步研究没有进一步做下去。

五、结 论

促细胞分裂剂激活了一个涉及许多不同生化过程的多效应反应。这些反应能被粗略地分成“早期”和“晚期”两个过程。前者一般涉及膜性质的变化,如营养物质的运输。后者包括需要核活动参加的大分子合成。在这两过程中如果受体都参加的话,则有理由认为由 EGF 激活的质膜上的酪氨酸激酶过程是致细胞分裂作用的“早期”反应。而 EGF 结合后受体吞入到内部所产生的与 DNA 相互作用是致细胞分裂作用的“晚期”反应。调节“早期”和“晚期”反应的不同机制在近十年前就有人提出过,并与一些报道相一致。这些报道指出,除了 EGF 结合外,其它因素(如抗体结合到受体上)引起受体成簇也足以诱导出细胞分裂的部分反应。

中国科学院上海细胞生物学研究所

蒋 倬译自 Cell, Vol.37,357-358,

June 1984

顾国彦 校审

(上接第 74 页)

[6] Nelson, D. S., 1976, *Immunobiology of the macrophage*, pp. 259-272, San Francisco London, New York.

[7] Allison, A. C., 1978, *Recent Advances in Histopathology* No. 10, (Anthony, P. P. &

Woolf, N., ed.), pp. 70-89, Churchill Livingstone, Edinburgh London & New York.

[8] Jean-Francois BACH, 1976, *Immunologie*, pp. 92-108,