

也各有所取。例如,有着重于形态学、酶学或激素^[10]等各方面。AFP是肝癌的一个带特征性的标志,所以建立能够反映AFP消长动态的细胞系,对于肝癌的病因发病机理和生物学特性研究,将是一个很好的实验材料。该系正常新生大鼠有功能的肝细胞的建立,在国内尚属首次报道,而从能反映AFP动态的细胞系来说,国外也很有限。

既然AFP是一个重要标志,那么有必要在培养细胞及其培养液中分别及时检测发现。为了比较客观地表达细胞的AFP状况,我们应用了以核酸原位杂交反映细胞内AFPmRNA的转录水平、以间接免疫荧光反映细胞内AFP的合成和以对流免疫电泳反映细胞AFP分泌状况等三方面的检测体系,力求综合分析,提高判断结果的科学性和准确性。从我们利用该系细胞在另一组实验研究的检测结果分析中,表明要比用单独任一项的结果评价更加客观,

具有一定意义,是一组有价值的检测方法。

参 考 文 献

- [1] Chen Ruiming et al., 1980, *Scientia Sinica*, 23(2):236.
- [2] Doi, I. et al., 1975, *Gann.*, 66 (4): 385.
- [3] 朱德厚等, 1980, *实验生物学报*, 13 (1): 113.
- [4] Brahic M. et al., 1978, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 75(12): 6125.
- [5] 葛曰萍、陈尊器等, 1986, *实验生物学报*, 19(2): 193-201.
- [6] Likely G. D. et al., 1952, *J. Nat. Canc. Inst.*, 13:177.
- [7] Chessebeuf M. et al., 1974, *Biochimie*, 56: 1365.
- [8] Williams G. M. et al., 1971, *Exp. Cell. Res.*, 69: 106.
- [9] Nissiey S. P. and P. A. Short, 1977, *Cell*, 11: 441.
- [10] Chessebeuf M. and P. Padieu, 1984, *In Vitro* 20(10):780.

人中性粒细胞 C₃ 受体 YC 玫瑰花结形成及其形态学观察

刘 友 华*

(中国医科大学细胞生物学研究室)

异物被吞噬细胞吞噬时通常需要经过细胞膜上受体的识别和粘附。大量实验证明,无论是中性粒细胞还是巨噬细胞,其细胞表面均存在有Fc受体和C₃补体受体,它们在吞噬细胞识别、结合、吞噬抗原颗粒及传递抗原信息中起着协同作用^[1,2]。体内外各种因子或微环境均能影响表面补体受体的活性^[3]。

本文根据酵母多糖可激活血清C₃旁路的原理,将酵母菌与人血清共同保温,形成YC复合物,它与表面具C₃受体的细胞结合形成YC玫瑰花结^[4]。我们用此技术检测了人正常中性粒细胞表面的C₃受体,应用光镜和扫描

电镜技术观察了人中性粒细胞所形成的YC玫瑰花结的形态学特征,并讨论了一些影响中性粒细胞YC玫瑰花结形成的因素。

材 料 和 方 法

一、人中性粒细胞的分离制备

人中性粒细胞的分离制备参照Ferrante等^[5]方法,稍加改进。其简要过程是,用20ml 76%泛影葡胺(上海信谊制药厂)加入90ml 9% Ficoll液(瑞典

本文承王芸庆教授审阅,谨此致谢。

* 现在工作单位: 中国医学科学院基础医学研究所。

Pharmacia 公司产品), 制备 Ficoll-泛影葡胺密度梯度液。在 10 ml 的离心管中, 底部加 3~4 ml Ficoll-泛影葡胺密度梯度液, 上层轻轻加 5~6 ml 肝素抗凝的健康成人的外周血液(中国医大附属一院血库提供)200 g, 离心 25 分钟。吸取中层的粒细胞层, 移到另一试管中, 用 RPMI-1640 培养液洗三次。这时(1)取部分细胞涂片, Wright-Giemsa 染色, 光镜下分类计数, 检查粒细胞的纯度, 所得的纯度约为 90%; (2)取部分细胞, 台盼蓝排斥法计算细胞活力, 其活力在 98% 左右, 并在血球计数板上计数, 计算细胞密度; (3)其余细胞用于 YC 玫瑰花结形成试验。

二、补体包被的酵母菌(YC)的制备

用生理盐水冲洗斜面培养的小椭圆啤酒酵母菌(*Saccharomyces cerevisiae* Hansen Var., 中国科学院微生物研究所提供), 收集到离心管中, 然后煮沸致死(100℃, 煮沸 10 分钟)。加 2% 台盼蓝染色, 再用无 Ca^{++} 、 Mg^{++} 的 Dulbecco 磷酸缓冲液洗三次。血球计数板计数, 调整酵母菌浓度为 $10^8/ml$ 。离心弃上清, 加入新鲜人 AB 型血清, 25℃ 保温 20 分钟, 使酵母菌壁上的酵母多糖激活血清中的补体 C_3 包被在菌体表面。然后离心弃去血清, 用 RPMI-1640 液洗二次后恢复细胞原浓度, 每管分装 1 ml, -20℃ 保存。

三、YC 玫瑰花结形成试验

收集分离制备的人中性粒细胞, 按 1:40(细胞:酵母菌)加入补体 C_3 包被的酵母菌(YC)。37℃, 保温 30 分钟, 随即放在 4℃ 下停止反应。光镜下观察, 凡一个细胞表面或/和内部有三个或三个以上的酵母菌粘附和吞入者为 YC 玫瑰花结阳性, 否则为阴性。在血球计数板上随机计数 100 个细胞, 计算阳性率。为了解各种因素对中性粒细胞 YC 玫瑰花结形成的影响, 实验中设计了不同的实验条件(见实验结果)。

四、扫描电镜标本制备

收集 YC 玫瑰花结样品, 以 2.5% 戊二醛固定 2 小时, 0.1 M 二甲砷酸钠缓冲液漂洗, 1% 锇酸-2% 单宁酸-1% 锇酸处理, 中间均用双蒸水漂洗。样品经乙醇梯度脱水, 醋酸异戊酯置换乙醇, 这时将样品滴在预先覆有 Formvar 膜的小玻片上, CO_2 临界点干燥。真空喷金。在日立 S-450 扫描电镜下观察。

结 果

一、人正常中性粒细胞 YC 玫瑰花结形成

从六个不同个体的健康成人外周血液分离

到的中性粒细胞作六次平行实验, 结果(表 1)显示, 人正常中性粒细胞的 YC 玫瑰花结形成率为 74.8 ± 3.1 。

为检验方法的特异性, 实验中设计了几种不同条件处理酵母菌, 结果表明(见表 1), 菌体与正常新鲜血清保温后, 具有很强的粘附中性粒细胞的能力, 而在无血清或血清预先热灭活破坏补体后都不易与中性粒细胞结合, 用 EDTA 除去 Ca^{++} 、 Mg^{++} 离子时也不易发生结合。用一株其细胞表面只含有 Fc 受体而不含 C_3 受体的人早幼粒细胞白血病细胞(HL-60)与 YC 颗粒共同保温后, YC 与 HL-60 细胞亦不易结合形成 YC 玫瑰花结。

表 1 各种实验条件对 YC 玫瑰花结形成的影响

细胞	实验条件	YC 玫瑰花结阳性率(%)
中性粒细胞	(1) 新鲜血清	74.8*
	(2) 不含血清	2
	(3) 热灭活血清	4.5
	(4) 反应体系中无 Ca^{++} 、 Mg^{++}	3
HL-60 细胞	新鲜血清	1.8*

标“*”数据为六次实验结果的平均值, 其余数值为二次结果的平均值。

二、保温时间及细胞与 YC 颗粒比例对中性粒细胞 YC 玫瑰花结形成的影响

保温时间对中性粒细胞 YC 玫瑰花结形成率有着显著的影响。在保温 5 分钟时, YC 玫瑰花结形成率非常低。随着保温时间延长, 中性粒细胞的 YC 玫瑰花结形成率明显增高(图 1)。

粒细胞与 YC 颗粒的比例对中性粒细胞 YC 玫瑰花结形成也有一定影响(表 2)。然而, 当细胞与 YC 颗粒比例在 1:20 到 1:80 之间时, 上述两者比例对 YC 玫瑰花结形成率似乎影响不大。

三、人中性粒细胞 C_3 受体 YC 玫瑰花结形态学观察

光镜下观察, YC 粘附在人中性粒细胞表

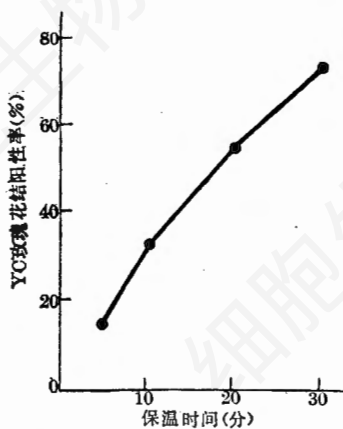


图1 保温时间对人中性粒细胞YC玫瑰花结形成的影响

图中数字为三次实验结果的平均值

表2 细胞与YC颗粒比例对YC玫瑰花结形成的影响

比例*	1:10	1:20	1:40	1:80
YC阳性率(%)	52	76	78	79

* 中性粒细胞与C₃致敏的酵母菌(YC)之比例。

面所形成的玫瑰花结较稳定,当细胞在溶液中浮动时,其上附着的酵母菌也随之而动。随保温时间延长,吞噬YC的细胞增多,甚至可见一个细胞吞噬3—5个酵母菌。吞菌后的细胞胞体稍为增大。

扫描电镜下,人中性粒细胞的形态具多样性,其表面多具皱襞,有数量不等的指状或横向的嵴状突起。中性粒细胞与YC颗粒形成玫瑰花结的形态多样,多数通过细胞膜与YC颗粒大面积接触(图版I图2);有些则借各种突起与菌体疏松相连(图版I图1);有的胞膜作套筒状包绕菌体。人中性粒细胞C₃受体YC玫瑰花结的形成常伴随粒细胞的吞噬作用,随着粒细胞与YC颗粒接触时间的延长,粘附于粒细胞表面的YC颗粒,常被粒细胞包绕,进而粒细胞膜内陷,将YC颗粒吞入胞内。实验中均能见到这些吞噬过程不同阶段的形态特征。粒细胞在吞噬酵母菌后,细胞多处出现钝形隆

起,细胞表面变得较为平滑,丰富的表面突起和皱襞趋于消失(图版I图3、4)。另外,在有些细胞表面可见直径为0.2~0.5μm的小圆孔(图版I图4),这可能是粒细胞吞噬YC颗粒后的形态表现。

讨 论

YC玫瑰花结的形成是因为酵母菌表面的酵母多糖激活了血清中的补体C₃,使其包被于酵母菌表面而形成YC复合物。以此作为指示颗粒,可与人中性粒细胞表面C₃受体结合而成YC玫瑰花结,为检测细胞表面C₃受体提供了一个简便的实验方法。补体C₃粘附于酵母菌表面而形成的YC颗粒,由于多糖分子对C₃提供了保护性的微环境,避免了血清中β1H和C₃灭活因子对C₃的进一步裂解,故指示颗粒表面的C₃较为稳定^[6],容易与中性粒细胞表面的C₃受体结合而形成YC玫瑰花结。Rivero^[4]和朱云凤等^[7]的实验都证明,血清因素是YC玫瑰花结形成的关键,不存在血清或血清预先热灭活处理破坏补体,基本上不能形成YC玫瑰花结,用EDTA除去反应体系中的Ca⁺⁺、Mg⁺⁺二价金属离子也几乎不能形成YC玫瑰花结。我们在本实验中也观察到同上述作者类似的实验结果(表1)。上述实验结果不仅符合补体受体的生物学特性,即C₃受体与配体结合时必须要有Ca⁺⁺、Mg⁺⁺的存在,而且也可以与Fc受体相区别,因Fc受体与配体结合时不需Ca⁺⁺、Mg⁺⁺的存在^[8]。在实验中,我们选择了一株其表面只具Fc受体而没有C₃受体的人早幼粒细胞白血病细胞(HL-60)^[9],与YC颗粒共温,结果基本上不能形成YC玫瑰花结,从而为进一步确证本实验方法对C₃受体具有高度特异性提供了有力的佐证。

目前虽然有几种方法可检测细胞表面C₃受体,但YC玫瑰花结法的特异性强、重复性好、操作简便,尤适于一般实验室应用。Rivero(1979年)^[4]首先成功地用YC玫瑰花结方

法检测了人淋巴细胞表面的 C_3 受体, 朱云凤等^[7]报道了小鼠腹腔巨噬细胞 YC 玫瑰花结形成。最近, 我们用 YC 玫瑰花结方法检测了人早幼粒细胞白血病细胞(HL-60)在维生素 A 酸等诱导剂作用后细胞表面 C_3 受体的变化。其结果表明, HL-60 细胞在维生素 A 酸处理 6 天后, YC 玫瑰花结阳性率近 60%^[10], 说明经诱导分化的 HL-60 细胞其表面 C_3 受体已接近人正常中性粒细胞的水平。

人中性粒细胞表面 C_3 受体 YC 玫瑰花结大多为吞噬玫瑰花, 其形态特征明显不同于人淋巴细胞形成的玫瑰花结。一般认为, 淋巴细胞所形成的玫瑰花结主要是通过其表面的微绒毛与外界呈点状接触^[11]。而中性粒细胞 C_3 受体 YC 玫瑰花结, 除部分细胞借突起与菌体相连外, 大部分粒细胞是通过胞体与菌体的大面积接触。显然这种形态学差异是与中性粒细胞的吞噬功能密切相关。扫描电镜下可观察到 C_3 致敏的酵母颗粒接触、粘附粒细胞, 继而粒细胞表面内陷、YC 颗粒被吞噬的各个阶段的形态特征(图版 I 图 1—4)。中性粒细胞在吞菌后其表面形态变得较为平滑, 丰富的表面突起趋于消失。粒细胞这种表面形态的变化可能有利于细胞作更大限度的膨胀, 以适应吞菌后细胞体积增大的需要。附着于菌体表面的补体 C_3

与具有相应 C_3 受体的吞噬细胞相结合, 从而充当了中性粒细胞与其“靶子”之间的桥梁, 同时吞噬细胞表面玫瑰花结的形成表明吞噬细胞所能“见到”的酵母菌颗粒浓度大为增加。因此, 补体 C_3 与吞噬细胞膜上其相应 C_3 受体结合为吞噬作用发生提供了重要的条件。

参 考 文 献

- [1] 近藤元治(陈仁译), 1982, 补体学入门, 人民卫生出版社, pp 51—54.
- [2] Ehlenberger, A. G. et al., 1977, *J. Exp. Med.* 145: 357—371.
- [3] Schreiber, A. D. et al., 1975, *J. Clin. Invest.* 56: 1189—1197.
- [4] Rivero, I. et al., 1979, *Scand. J. Immunol.* 9: 9—14.
- [5] Ferrante, A. et al., 1978, *J. Immunol. Methods.* 24: 389—393.
- [6] Fearron, D. T. et al., 1977, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74: 1683—1687.
- [7] 朱云凤、郭寿延, 1983, 上海免疫学杂志, 3: 262—265.
- [8] Griffin, F. M. et al., 1975, *J. Exp. Med.* 141: 1269—1277.
- [9] Breitman, T. R. et al., 1981, *Blood Cells* 7: 78—89.
- [10] 宋争平, 刘友华, 韩锐, 1984, 药学学报, 19: 576—581.
- [11] Lin, P. S. et al., 1973, *N. Engl. J. Med.* 289: 548—551.

简 讯

细胞生物学会超微结构专业组举办超微结构酶细胞 化学技术学习班

为了推广超微结构细胞化学技术, 使其更好地为科研和教学服务, 细胞生物学会委托上海第二医科大学举办了超微结构酶细胞化学学习班。学习内容包括细胞化学的基本原理、具体方法和技术关键等, 学习方法以实际操作为主, 每位学员从动物灌注取材到标本制备、自己动手做了葡萄糖-6-磷酸酶、胞嘧啶单核苷酸酶、焦磷酸硫酸酶和髓过氧化物酶四种超微结构细胞化学实验。从 1985 年 11 月至 12 月共举办了三期学习班, 来自全国 22 省市 120 人参加了学习班。

(张蕙心)