

灵长类淋巴细胞亚群的研究

II. 猕猴外周血淋巴细胞的非特异性酯酶活性

宋宝云 贲昆龙 戴伟 邹如金

(中国科学院昆明动物研究所)

摘 要

以酸性 α ——醋酸萘酯酶(ANAE)染色表明,恒河猴外周血涂片和淋巴细胞悬液片的ANAE阳性率分别为 $82.9 \pm 5.9\%$ 和 $84.6 \pm 4.2\%$ 。猕猴、豚尾猴和红面猴也均在85%左右。用 E_{AET} (AET处理过的绵羊红细胞)、ZYC(酵母多糖补体复合物)分别与ANAE一起进行双标记,或三者混合标记,发现T细胞、B细胞和裸细胞中分别有 $95.5 \pm 1.8\%$ 、 $52.8 \pm 13.0\%$ 和 $78.7 \pm 9.2\%$ 为ANAE阳性。提示ANAE染色并不能作为这些动物的特异性的T细胞鉴定方法。

用非特异性酯酶染色研究淋巴细胞亚群,在近些年才发展起来。1975年Mueller首先发现酸性 α ——醋酸萘酯酶(Acid α ——naphthyl acetate esterase,简称ANAE)阳性的淋巴细胞与T细胞分布的区域一致(南京铁道医学院组织胚胎学教研室,1980)。1976年Ranki等人曾用ANAE染色来鉴别鼠的T和B淋巴细胞(Ranki A, et al., 1976)。接着Kulenkampff等人采用该法标记人的T淋巴细胞(Kulenkampff J, et al., 1977)。从此,用ANAE活性研究免疫细胞的报导越来越多(林台城,1981)。随着研究工作的不断深入,近来有些人提出ANAE活性并非为T细胞所特有(Yang T. J. et al., 1979; 孙国贤等, 1981)。由于猕猴属的几种动物是常用的医学生物学研究对象,为了弄清这些动物的淋巴细胞亚群,我们以ANAE染色法研究了它们的外周血淋巴细胞的ANAE活性,并以氨基异硫脲(AET)处理的绵羊红细胞(E_{AET})(T细胞标记)和酵母多糖补体复合物(ZYC)(B细胞标记)与ANAE进行双标记或三者混合标记,以探讨ANAE活性在淋巴细胞亚群鉴定方面的作用。

材料与方 法

一、动物

被检各种动物均在实验室检疫后,饲养数月以上,其中有成年健康的恒河猴(*Macaca mulatta*) (♂22, ♀25), 熊猴(*Macaca assamensis*) (♂4), 豚尾猴(*Macaca nemestrina*) (♂2, ♀1) 和红面猴(*Macaca speciosa*) (♂1)。

二、制片

1.血涂片:采动物趾端血于载玻片一端推成均匀的血膜,以血细胞平摊不堆积为宜。血膜太薄会使读数费时。

2.悬液片(贾昆龙等,1982):(1)淋巴细胞悬液片:经聚蔗糖-泛影钠分离液分离的淋巴细胞悬液,洗涤后,以细胞离心机(Shandon)离心制片。

(2)E_{AET}玫瑰花结形成细胞悬液片:分离的淋巴细胞悬液按一定比例与经AET处理的绵羊红细胞混合,以200g离心5分钟,置4℃冰箱2小时,戊二醛固定20分钟,细胞离心机制片。

(3)ZYC玫瑰花结形成细胞悬液片:分离的淋巴细胞悬液与ZYC混合后置37℃水浴中5分钟,然后200g离心5分钟,弃上清液,戊二醛固定,细胞离心机制片。

(4)E_{AET}, ZYC混合玫瑰花结形成细胞悬液片:将E_{AET}, ZYC按比例先后加到同一份淋巴细胞悬液内,200g离心5分钟,置4℃冰箱1—2小时,戊二醛固定后,同上法制片。

三、染色

按南京铁道医学院组织胚胎学教研室的方法(南京铁道医学院组织胚胎学教研室,1980),付品红(北京化工厂产品)系该室赠送, α -醋酸萘酯酶为上海试剂厂产品。将血涂片及各种悬液片首先在福尔马林-丙酮固定液中固定1分钟,流水冲洗约3分钟(至无甲醛气味为止)。晾干,保温3小时。保温液必须新鲜配制:在44.5ml pH 7.2, M/15的PBS中依次加入六偶氮付品红3ml及2% α -醋酸萘酯1.25ml,混匀,用冰醋酸调至pH5.8,过滤后的上清液可染28张血涂片或悬液片。保温以后自来水冲去残留液,甲基绿复染1—2分钟,水洗,空气干燥后镜检。油镜下每片计数200个以上的淋巴细胞。

四、检查标准

1.淋巴细胞:(1)ANAE⁺⁺(斑块型)胞浆内可见1至多个明显的,深红色的斑块(图1)。

(2)ANAE⁺(微粒型)胞浆内可见细小散在的红色微粒(图2)。

(3)ANAE⁻胞浆内无着色颗粒,细胞呈浅绿色或棕黄色(图1)。

2.大单核细胞:胞质内有大小一致,分布均匀的椭圆形红色颗粒。

3.E_{AET}玫瑰花结形成细胞(R⁺):淋巴细胞表面紧紧结上3个或3个以上绵羊红细胞(图3)。

4.ZYC玫瑰花结形成细胞(Z⁺):淋巴细胞表面围满ZYC(图4)。

结 果

一、淋巴细胞的ANAE活性

36只恒河猴血涂片和20只恒河猴的淋巴细胞悬液片,淋巴细胞的ANAE阳性率分别为 $82.9 \pm 5.9\%$ 和 $184.6 \pm 4.2\%$ 。其中ANAE⁺⁺, ANAE⁺, ANAE⁻的百分率,在血涂片中分别为 55.3 ± 7.3 , 27.6 ± 6.6 和 17.1 ± 5.9 ;悬液片中分别为 55.3 ± 6.3 , 29.3 ± 5.1 和 15.4 ± 4.2 (表1)。大单核细胞不到1%,由于染色颗粒特殊,不会与淋巴细胞混淆。

表1 恒河猴血涂片和淋巴细胞悬液片中淋巴细胞ANAE阳性率(%)的比较
Table 1 Comparison of percentages of ANAE positive lymphocytes in blood smears and lymphocyte suspension cytocentrifuge preparations

	动物数 No. of animals	ANAE ⁺⁺	ANAE ⁺	ANAE ⁻
血涂片 blood smears	36	$55.3 \pm 7.3^*$	27.6 ± 6.6	17.1 ± 5.9
悬液片 suspension preparation	20	55.3 ± 6.3	29.3 ± 5.1	15.4 ± 4.2
t 测验 t test		无显著差异 No significant	无显著差异 No significant	无显著差异 No significant

* 本表与其他表格内均为 $M \pm SD$

其它猕猴属动物悬液片中淋巴细胞的ANAE活性见表2。

表2 熊猴、豚尾猴和红面猴淋巴细胞悬液片中淋巴细胞的ANAE阳性率(%)
Table 2 ANAE positive percentages of lymphocyte suspension cytocentrifuge preparations in three species of macaques

种类 species	动物数 No. of animals	ANAE ⁺⁺	ANAE ⁺	ANAE ⁻
熊猴 (<i>M. assamensis</i>)	4	47.5 ± 8.1	36.7 ± 6.7	15.8 ± 3.2
豚尾猴 (<i>M. nemestrina</i>)	3	50.0 ± 4.6	33.8 ± 5.1	16.2 ± 0.8
红面猴 (<i>M. speciosa</i>)	1	64.3	25.6	10.1

二、 E_{AET} 与ANAE, ZYC与ANAE双标记

12只恒河猴 E_{AET} 玫瑰花结形成细胞的百分率为 71.6 ± 5.1 。ZYC玫瑰花结形成细胞的百分率为 14.3 ± 3.3 。结花细胞均具有ANAE⁺⁺, ANAE⁺, ANAE⁻三种类型。由表3可见大部分T细胞($95.5 \pm 1.8\%$)为ANAE阳性细胞, 大约一半($52.8 \pm 13.0\%$)B细胞也为ANAE阳性细胞。

其它猕猴属动物T和B细胞的ANAE阳性率见表4。

表3 12只恒河猴T和B细胞的ANAE活性

Table 3 ANAE activity of T and B cell in twelve *M. mulatta*

双标记 Double marker	在淋巴细胞中的百分率 Percentages in lymphocytes	在结花或非结花细胞中的百分率 Percentages in rosetting or non-rosetting lymphocytes
R ⁺ ANAE(+++)*	68.5 ± 4.8	95.5 ± 1.8
R ⁺ ANAE ⁻	3.2 ± 1.4	4.5 ± 1.8
R ⁻ ANAE(+++)	16.6 ± 4.9	57.4 ± 8.9
R ⁻ ANAE ⁻	11.7 ± 2.2	42.6 ± 8.9
Z ⁺ ANAE(+++)	7.6 ± 2.7	52.8 ± 13.0
Z ⁺ ANAE ⁻	6.7 ± 9.2	47.2 ± 13.0
Z ⁻ ANAE(+++)	76.5 ± 5.8	89.3 ± 6.3
Z ⁻ ANAE ⁻	9.2 ± 5.6	10.7 ± 5.3

* ANAE(+++), 包括ANAE⁺⁺和ANAE⁺。

表4 熊猴、豚尾猴、红面猴T和B细胞的ANAE阳性率(%)

Table 4 ANAE positive percentages of T and B cells in three species of macaques

动物(只) species (No.)	ANAE活性 ANAE activity	R ⁺	R ⁻	Z ⁺	Z ⁻
熊猴(4) (<i>Macaca assamensis</i>)	ANAE(+++)	62.8 ± 1.5 (94.1 ± 4.1%)*	22.7 ± 4.7 (67.9 ± 11.1%)*	6.0 ± 2.3 (47.4 ± 8.3%)*	77.1 ± 5.8 (88.3 ± 2.4%)*
	ANAE ⁻	4.1 ± 2.9 (5.9 ± 4.1%)*	10.5 ± 3.3 (32.1 ± 11.1%)*	6.6 ± 3.0 (52.6 ± 8.3%)*	10.2 ± 1.8 (11.8 ± 2.4%)*
豚尾猴(3) (<i>Macaca nemestrina</i>)	ANAE(+++)	62.1 ± 6.8 (94.0 ± 1.5%)*	22.9 ± 5.5 (66.4 ± 4.1%)*	11.8 ± 1.9 (68.2 ± 2.6%)*	77.8 ± 3.5 (89.2 ± 1.0%)*
	ANAE ⁻	3.9 ± 0.5 (6.0 ± 1.5%)*	11.2 ± 1.0 (33.6 ± 4.1%)*	5.5 ± 1.2 (31.8 ± 2.6%)*	8.9 ± 0.5 (10.8 ± 1.0%)*
红面猴(1) (<i>Macaca speciosa</i>)	ANAE(+++)	75.6 (93.4%)	14.7 (76.2%)	8.1 (50.6%)	77.7 (92.5%)
	ANAE ⁻	5.3 (6.6%)	4.6 (23.8%)	7.9 (49.4%)	6.3 (7.5%)

* 括号内为结花或未结花细胞的百分比。

三、裸细胞 (Null cell) 的 ANAE 阳性率

9只恒河猴 E_{AET} , ZYC 混合玫瑰花结形成细胞悬液中的裸细胞 (未标记上 E_{AET} 和 ZYC 的细胞) 也具有 ANAE⁺⁺, ANAE⁺, ANAE⁻ 三种类型, 其 ANAE 阳性率为 $78.7 \pm 9.2\%$ 。

讨 论

非特异性酯酶染色是一种简便的细胞化学检查法。近几年来, 很多学者应用该法测定了人类外周血和淋巴组织的细胞亚群。恒河猴外周血和淋巴细胞悬液片的 ANAE 阳性率分别为 $82.9 \pm 5.9\%$, $84.6 \pm 4.2\%$ 。这与孙国贤等人测得的正常人外周血淋巴细胞 ANAE 阳性率 ($89.4 \pm 5.5\%$) 接近 (孙国贤等, 1981)。其它猕猴属动物的 ANAE 阳性率也在 85% 左右。

应用 E_{AET} , ZYC 与 ANAE 双标记后的结果表明, ANAE 染色并不是特异性的 T 细胞鉴定方法。因为在恒河猴外周血内 T 细胞有 $95.5 \pm 1.8\%$ 为 ANAE 阳性, B 细胞有 $52.8 \pm 13.0\%$ 为 ANAE 阳性。熊猴、豚尾猴和红面猴的 B 细胞都有近一半或一半以上的 ANAE 阳性细胞。在 E_{AET} , ZYC 混合玫瑰花结形成细胞悬液中发现有 $78.7 \pm 9.2\%$ 的裸细胞显示 ANAE 活性。Yang 等也发现人的 B 细胞 ($44.1 \pm 2.6\%$) 和牛的 B 细胞 ($38.3 \pm 0.8\%$) 同样具有 ANAE 活性 (Yang T. J. et al. 1979)

此外, 有人认为 ANAE 微粒型 (ANAE⁺) 是裸细胞或抑制 T 细胞 (林台城, 1981)。但在我们的研究中发现 T 细胞, B 细胞以及裸细胞都具有 ANAE⁺⁺ (斑块型) 和 ANAE⁺ (微粒型) 两种类型细胞。由此看来, 微粒型既不是裸细胞的标记, 也不是抑制 T 细胞的标记。ANAE 活性的强弱是否表示淋巴细胞各亚群的成熟度, 有待进一步探讨。

参 考 文 献

- 孙国贤等 1981 淋巴细胞酸性 α -萘酚酯酶测定法及其应用的初步探讨。中华医学检验杂志, 4 (2): 76—78
- 林台城 1981 人白细胞非特异性酯酶染色。中华医学检验杂志, 4 (2): 121—125。
- 南京铁道医学院组织胚胎学教研室 1980 末梢血涂片酸性非特异性酯酶标记 T 淋巴细胞。中华医学检验杂志, 3 (1): 6—9。
- 贾昆龙等 1982 灵长类淋巴细胞亚群的研究 I 外周血和淋巴组织的 SRBC、SMRBC 和 ZYC 玫瑰花结形成细胞的测定。动物学研究, 3: 403—411。
- Kulenkampff J. et al., 1977. Acid esterase in human lymphoid cells and leukaemic blasts: a marker for T lymphocytes. Brit. Haemat 36 (2): 231—240
- Ranki A. et al., 1976. Identification of mouse T and B lymphocytes from cytocentrifuged cell smears. Clin. Exp. Immunol. 26(3): 632—640
- Yang T. J. et al., 1979 Acid α -naphthyl acetate esterase: presence of activity in bovine and human T and B lymphocytes. Immunol. 38(1): 85—93

STUDIES ON LYMPHOCYTE SUBPOPULATIONS IN PRIMATES

II. NONSPECIFIC ESTERASE ACTIVITY OF PERIPHERAL BLOOD LYMPHOCYTES OF MACAQUES

Song Baoyun Ben Kunlong Dai wei Zhou Rujin

(*Kunming Institute of Zoology, Academia Sinica*)

Acid α -naphthyl acetate esterase (ANAE) positive lymphocytes in peripheral blood smears and lymphocyte suspension cytocentrifuge preparations of *Macaca mulatta* were $82.9 \pm 5.9\%$ and $84.6 \pm 4.2\%$, respectively. Of *M. assamensis*, *M. nemestrina* and *W. spectosa* also were about 85%. By double marking with ANAE and E₄ET (AET-treated sheep red blood cells) or ZYC (zymosan-yeast-complement complex) and by triple marking with them simultaneously, ANAE positive cells in T, B and null cells of *M. mulatta* were $95.5 \pm 1.8\%$, $52.8 \pm 3.0\%$ and $78.7 \pm 9.2\%$, respectively. The results indicate that ANAE staining was not a specific method for marking of T cell in these monkeys.

宋宝云等：灵长类淋巴细胞亚群的研究 II 猕猴外周血淋巴细胞的
非特异性酯酶活性

Song Baoyun et al.: Studies on Lymphocyte Subpopulations in
Primates II. Nonspecific Esterase Activity of Peripheral
Blood Lymphocytes of Macaques

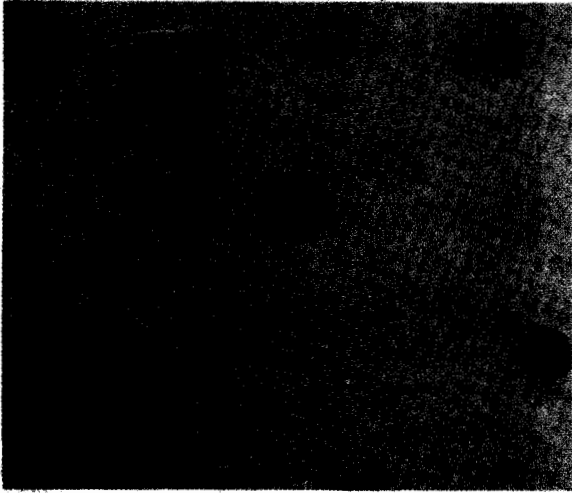


图1.血涂片中的淋巴细胞：正中为
 $ANAE^-$ ；余者为 $ANAE^{++}$ 。

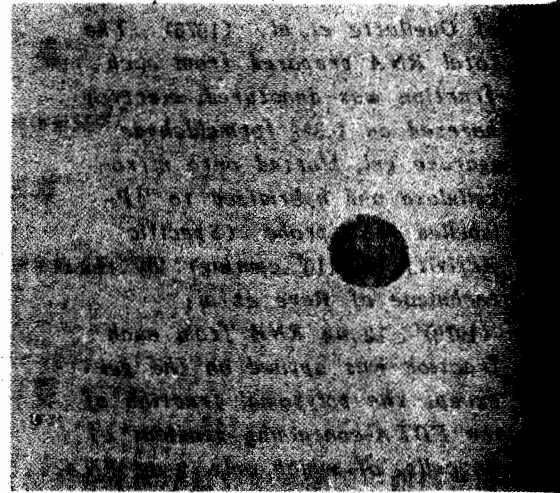


图2.血涂片中的 $ANAE^+$ 淋巴细胞。

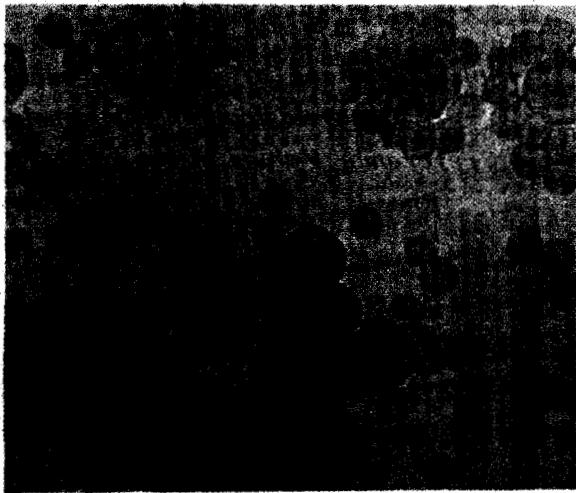


图3. E_{AET} 与 $ANAE$ 双标记的淋巴细胞：
结花细胞均为T细胞。

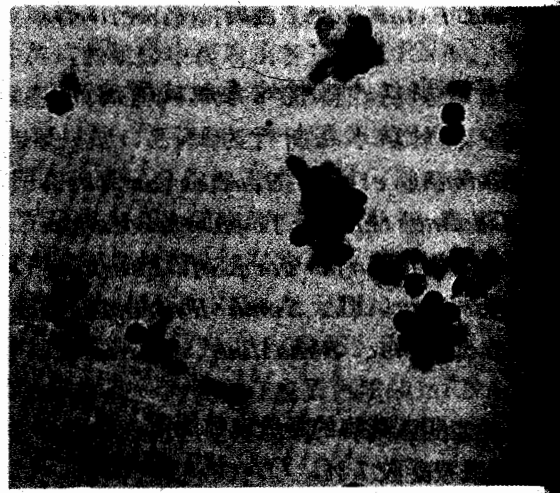


图4. E_{AET} 、 ZYC 与 $ANAE$ 混合标
正中为B细胞。