

细胞紧密连接索条数目的差别,说明它们的屏障能力有所不同,但是,是何种原因所致,是生态环境,还是别的什么原因,目前尚不清楚,有待研究。

中国科学院成都生物研究所两栖爬行动物研究室
鄂未远、李胜全提供中国林蛙标本,特此致谢。

参考文献

- [1] 岳奎元, 1984. 两栖爬行动物学报. 3(3): 19—21.
- [2] 岳奎元等, 1982. 植物生理学通讯. 4: 55—58.
- [3] Kawahara T. et al. 1982, *J. Electron Microscopy*, 31(2): 162—170.
- [4] 岳奎元等, 1983. 两栖爬行动物学报. 2(2): 23—28.

蚯蚓血液-体腔白细胞的E受体和ANAE活性研究

查士隽 章蓉萍* 江希明

(杭州大学 生物系)

脊椎动物的T淋巴细胞已知为细胞免疫的主要介导者,而无脊椎动物介导细胞免疫的细胞身份,至今尚未完全确定。近年的研究表明,许多无脊椎动物的白细胞有相似于脊椎动物T淋巴细胞的某些生物学特征。这些特征至少可以追溯到环节动物。据Cooper (1969)^[1]报道, *Lumbricus* 蚯蚓对异种或异体移植物有免疫排斥现象,并推测介导排斥反应的可能是体腔内的变形细胞 (amoebocytes)。Toupin 等 (1976)^[2]观察到, *Lumbricus* 蚯蚓的体腔细胞 (coelomocytes) 中,有某些细胞可与绵羊红细胞形成自然玫瑰花结 (E-rosettes)。Roch 等 (1977)^[3]发现, *Eisenia* 蚯蚓的体腔细胞,有的细胞上有刀豆素 A (Con A) 的受体,它们在体外能对 Con A 发生淋巴细胞样的转化增殖反应。Stein 等 (1977)^[4]证实, *Lumbricus* 蚯蚓的体腔细胞,除黄色细胞 (chloragogen cells) 外,都具有明显的吞噬功能。本文作者 (1983)^[5]曾报告, *Pheretima* 蚯蚓的血液白细胞多数具有酸性醋酸萘酯酶 (ANAE) 活性,其反应产物的染色特性及其分布形式 (patterns) 与脊椎动物淋巴细胞中所见相似。

本文报告,在 *Pheretima* 蚯蚓的血液-体腔白细胞中,有一类细胞群和脊椎动物的T淋巴细胞在异种红细胞受体 (E受体) 及 ANAE 活性方面有某些相似的特征。讨论了动物免疫活

性细胞进化的可能模式。

材料和方法

1. 蚯蚓

性成熟的环毛属蚯蚓 (*Pheretima*, 即 *Amyntas*), 采自三个自然生活区 (biotops)。

2. 蚯蚓白细胞的制备

血液白细胞取自蚯蚓的环状血管 (“心脏”), 经磷酸缓冲盐溶液 (PBS, pH 7.0) 洗涤后, 重悬浮于 PBS 中, 细胞悬液浓度调节至 2×10^6 /每毫升。体腔白细胞直接取自体腔液, 制备方法同上。在多数实验中, 蚯蚓白细胞系同时来源于血液和体腔液 (合并), 所得白细胞即称为血液-体腔白细胞。

3. 异种红细胞的制备

绵羊、小鼠、兔和鸡的红细胞分别取自静脉血。蛙红细胞则取自心血。异种红细胞均以 Alsever's 液保存 (4℃)。临用前, 以相应的生理盐溶液洗涤并配制成所需浓度的红细胞悬液。

4. E花结形成试验

按常规方法修改。蚯蚓白细胞与异种红细胞混合的数量比为 1:60。混合细胞分别置于三种温度域作花结形成试验。花结形成后以湿片法由高倍镜观察并计数。凡白细胞周围结合三个以上异种红细胞的, 即作为花结形成细胞 (ERFC)。花结形成率以百分数表示之。

5. ANAE活性的检测

蚯蚓白细胞的 ANAE 活性及阳性细胞的分型均按

* 现在工作单位: 建德严州中学。

** 李大林同志参加部分技术工作, 郁昭愈同志协助显微摄影, 谨致谢意。

作者(1983)^[5]报告的方法检测和区分。酯酶活性抑制试验所用的抑制剂为氟化钠(NaF, C.P.), 浓度为50 mM。

6. 花结形成与 ANAE 联合试验

取花结形成后的试管底部细胞涂片, 自然干燥后立即固定作 ANAE 染色。涂片的温育及镜检方法, 均如前述。

7. 吞噬试验

参照 Stein(1977)^[4]方法修改。吞噬用的炭颗粒系由中国墨汁充分洗涤后配制而成, 浓度为1% (V/V)。取上述墨汁炭颗粒悬液0.2毫升注入蚯蚓体腔。6小时后吸取白细胞并以 PBS 洗涤后镜检。有吞噬活性的细胞, 在胞浆中可见数量不等的黑色炭颗粒。

8. 硝基蓝四氮唑(NBT)还原试验

在0.2毫升的蚯蚓白细胞悬液中(内含白细胞约 0.5×10^6 个)加入等体积的含0.5%葡萄糖的1%NBT溶液。充分混匀后在室温(18—20℃)中反应2小时。然后取一滴细胞悬液镜检。凡胞浆中出现蓝黑色甲腈(formazan)沉淀者, 即作为 NBT 还原阳性细胞。

结 果

1. 无论来自蚯蚓血液或体腔液的白细胞, 都有相似数量的细胞在体外能与绵羊红细胞(SRBC)形成T细胞样的玫瑰花结(图1)。花结形成率为 $31.5 \pm 12.6\%$ (4—8℃)。温度变化对花结形成能力有明显的影响(表1)。

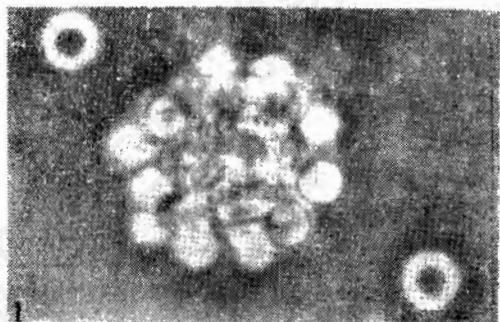


图1 蚯蚓白细胞与 SRBC 形成的花结, 相差显微摄影放大 $\times 1800$

2. 在蚯蚓白细胞中, 尚有某些细胞群可与小鼠红细胞(MRBC), 鸡红细胞(CRBC)和蛙红细胞(FRBC)形成玫瑰花结。花结形成率依次为 $14.0 \pm 2.2\%$, $25.0 \pm 3.0\%$ 和 $23.0 \pm 2.1\%$ (4—8℃)。然而, 不论在何种温度, 兔



图2 蚯蚓体腔黄色细胞, 相差显微摄影放大 $\times 1800$

红细胞(RRBC)却不能与蚯蚓白细胞形成花结。通常, RRBC一旦与蚯蚓白细胞相接触, 迅速被凝集而后溶解(表1)。

3. 体腔中的黄色细胞(图2)决不与上述任何一种异种红细胞形成花结。

4. 对由 SRBC 所形成的花结细胞(SRBC-RFC)的形态观察表明, SRBC-RFC 包括不同大小的(2.5—10.0微米)和不同形态特征的白细胞, 其中既有粒细胞(granulocyte)类型的, 也有无颗粒的透明细胞(hyalocyte)。多数 SRBC-RFC 有丝状或瓣状伪足。

5. 对蚯蚓白细胞的 ANAE 活性检测显示, 绝大多数(98%)细胞呈阳性反应。按反应产物的染色特性来区分, 近似T细胞型(T-type)的(图3), 约占80.5%, 近似单核细胞型的(M-type)(图4), 约17.5%。后者的酯酶活性可被 NaF(50 mM)完全抑制, 但氟化物对前者的酶活性的抑制效应较弱(表2)。体腔黄色细胞的 ANAE 反应呈阴性。

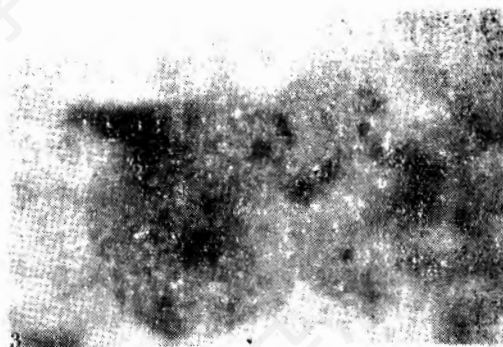


图3 蚯蚓白细胞(ANAE⁺, T型)显微摄影放大 $\times 3750$

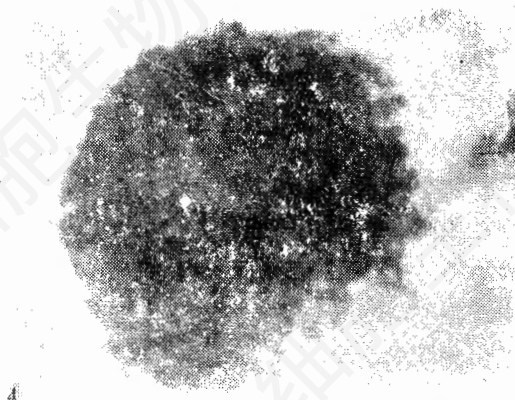


图4 蚯蚓白细胞(ANAE⁺, M型)显微摄影放大×3750

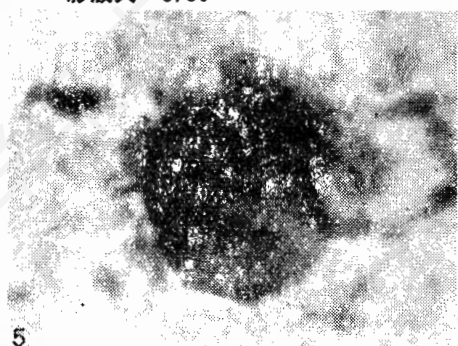


图5 蚯蚓白细胞与SRBC形成的花结, 并作ANAE染色(ANAE⁺), 显微摄影放大×3750

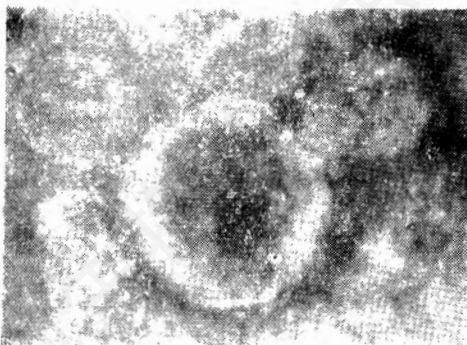


图6 蚯蚓白细胞与MRBC形成的花结, 并作ANAE染色(ANAE⁺), 显微摄影放大×3750

6. 花结形成与ANAE联合试验证实, 由SRBC形成的花结细胞(SRBC-FRC)和由MRBC形成的花结细胞(MRBC-RFC), 都是T型的而非M型的ANAE阳性细胞。唯在形式上, SRBC-RFC中的反应产物呈大斑块状

表1 Pheretima 蚯蚓白细胞与异种红细胞形成的E-花结

异种红细胞	形成次数	ERFC%±S.D.		
		4-8℃	15-20℃	25℃
绵羊红细胞	25	31.5±12.6	3.0±2.0	0
小鼠红细胞	8	14.0±2.2	7.0±0.8	0
鸡红细胞	5	25.0±3.0	未做	未做
蛙红细胞	5	23.0±2.1	未做	未做
兔红细胞	20	0	0	0

表2 Pheretima 蚯蚓白细胞的ANAE活性及其对NaF的抑制敏感性

检测次数	12	ANAE+%±S.D. 98.0±0.2	
		T-type	M-type
处 理	未	80.5±0.5	17.5±0.7
	NaF	73.0±1.6	0
反应产物染色特征		深红斑块或颗粒	红棕分散细小颗粒

NaF 浓度: 50mM. 温度: 4-8℃. pH: 6.0-6.2. 温育时间: 21 小时。

(图5), 而在MRBC-RFC中, 反应产物小而少(图6)。

7. 在蚯蚓白细胞中, 除特别小的(<2.5微米)透明细胞和黄色细胞外, 绝大多数白细胞都有吞噬炭颗粒的能力。它们在体外, 也有显著的对NBT的还原活性。

讨 论

高等脊椎动物的淋巴细胞能与异种红细胞(特别是SRBC)形成自然玫瑰花结的, 有的业已证实是T淋巴细胞(Coombs, 1970^[6]; 章翰和石镜, 1980^[7])。包括蚯蚓在内的许多无脊椎动物, 虽未发现胸腺样结构, 其白细胞甚至也可能还没有分化为淋巴细胞。然而, Toupin (1976)^[2]和我们一致地观察到, Lumbricus 和 Pheretima 蚯蚓的白细胞中确有细胞群可与SRBC形成T细胞样的玫瑰花结。尽管我们不清楚蚯蚓白细胞的SRBC受体和脊椎动物T淋巴细胞上的是否相同, 但红细胞受体(E受体)

似在系统发生早期动物的免疫活性细胞上就已出现。此外, 蚯蚓白细胞的其它异种红细胞受体, 究竟是同一类群的细胞所共有, 还是分别存在于不同的细胞群, 尚有待查明。

就已检测的五种异种红细胞而言, 唯有兔红细胞(RRBC)不能与蚯蚓白细胞形成花结。当RRBC与蚯蚓白细胞接触时, 常导致RRBC的凝集和溶解。这可能由于存在于Pheretima蚯蚓血液或体腔液中的某些凝集素或/和白细胞的自然细胞毒作用的结果(Cushing, 1967^[8]; Boiledieu, 1977^[9])。值得注意的是, 凡能形成花结的那些异种红细胞, 即使和蚯蚓白细胞较长时间的(24小时以上)接触, 始终能保持完整, 既不被凝集, 亦不被溶解。由此可见, 不同的异种红细胞和蚯蚓白细胞之间在免疫学上的关系, 显然也有所不同。

脊椎动物淋巴细胞中的ANAE活性, 被认为是成熟的T淋巴细胞的标志之一(Mueller, 1975^[10], 及以后其他人), 已受到广泛注意。近年, 应用抗T细胞的单克隆抗体标记技术, 证明了人外周血中ANAE阳性淋巴细胞确系T细胞(Bergroth, 1983^[11])。另外, 从蚯蚓白细胞ANAE活性的抑制试验结果来看, 只有单核细胞型的ANAE阳性细胞中的酯酶活性可被NaF强烈地抑制, 而NaF对T细胞型的阳性反应的抑制不甚显著。这一点也同人的单核细胞和T淋巴细胞中非特异性酯酶同工酶组成的细胞特异性及其对氟化物的抑制敏感性的差异相一致(Radzun, 1980^[12]; Yourno, 1981^[13])。因此, 蚯蚓白细胞中T型的ANAE阳性的SRBC-RFC, 可能更接近于T样细胞的进化原型。

在Pheretima蚯蚓白细胞中, 除特小的可能是未成熟的白细胞外, 几乎所有的白细胞都表现吞噬作用和对NBT的还原活性。这似乎表明, 从蚯蚓白细胞的总体来说, 它们实质上是同脊椎动物的吞噬系细胞同源的。

根据Cooper(1977)^[14]的见解, 动物细胞免疫的进化起始于非特异性的吞噬作用。负有介导特异性细胞免疫使命的T淋巴细胞, 可能是由吞噬型细胞进一步分化和特化产生的。我们所提供的证据, 支持了他的这一假说。因为上述结果提示, 蚯蚓白细胞虽然都是吞噬型细胞, 但同时它们又出现了分化上的异质性, 而其中在E受体和ANAE活性方面和T淋巴细胞有相似特征的细胞群, 似是与T细胞同功的进化先驱者。

参 考 文 献

- [1] Cooper, E. L., 1969. *Science*, 166:1414—1415.
- [2] Toupin, J. et al., 1976. *Cell. Immunol.* 26: 127—132.
- [3] Roch, P. et al., 1977. *Develop. Immunobiol. Elsevier, North-Holland Biomedical Press.* pp. 41—49.
- [4] Stein, E. et al., 1977. *J. Morph.* 153:467—473.
- [5] 查士隼等, 1983. *细胞生物学杂志*, 5(2): 30—33.
- [6] Coombs, R. R. et al., 1970. *Int. Arch. Allergy appl. Immunol.* 39:655—660.
- [7] 章翰和石镜, 1980. *实验细胞免疫学进展*, I. T细胞E玫瑰花试验, 中国医学科学院情报所, 豫北医专合编 pp. 119—135.
- [8] Cushing, J. E., 1967. *Fed. Proc.* 26:1666—1670.
- [9] Boiledieu, D. et al., 1977. *Develop. Immunobiol. Elsevier, North-Holland Biomedical Press.* pp. 51—57.
- [10] Mueller, J. et al., 1975. *Eur. J. Immunol.* 5:270—274.
- [11] Bergroth, V. et al., 1983. *J. Histochem. Cytochem.* 31:837—839.
- [12] Radzun, H. J. et al., 1980. *Blood.* 55:891—897.
- [13] Yourno, J. et al., 1981. *Blood.* 58:939—946.
- [14] Cooper, E. L., 1977. *Develop. Immunobiol. Elsevier, North-Holland Biomedical Press.* pp. 99—105.