

简报

人初乳巨噬细胞几种酶活性的研究

石慧文 沈淑瑾

(北京首都儿科研究所生化免疫室, 北京 100045)

关键词 巨噬细胞, 同工酶, 凝胶电泳, 组织化学

母乳中的免疫因子和细胞是新生儿获得抗感染能力的重要来源。人初乳中细胞总数约有 $1-3 \times 10^9$ 个/L, 其中巨噬细胞 (M ϕ) 居多, 占 30—85%, 多形核细胞 (PMN) 占 40—60% 以及少量淋巴细胞和初乳小体等^[1]。目前, 国内外对人初乳巨噬细胞 (CM ϕ) 形态和功能的研究并不很多, 有关 CM ϕ 的来源也还未完全肯定。本试验用组织化学和电泳技术定性分析了 CM ϕ 的过氧化物酶 (PO), 酸性磷酸酶 (ACP), α 醋酸萘酯酶 (ANAE) 三种酶活性, 并比较了 CM ϕ 与斑螫发泡后皮泡中 M ϕ (SM ϕ) 的等电聚焦同工酶谱。

1 材料和方法

CM ϕ 系用无菌技术采集健康初产妇产后一周内的初乳, 离心脱脂后用明胶/人血浆层贴壁分离, 用 ANAE 染色法鉴别纯度^[2]。本试验所选用 CM ϕ 纯度为 >90%。作组化测定时, 调节细胞浓度至 $6-8 \times 10^5$ /L, 以 2-盐酸联苯胺、 α 醋酸萘酯作为底物以及修饰 Gomori 铅法分别进行 CM ϕ 的 PO, ANAE 和 ACP 三种酶活性染色, 计数着色阳性细胞的百分数。作电泳分析的 CM ϕ 和 SM ϕ 细胞浓度分别为 $4-5 \times 10^{10}$ /L 及 $7-8 \times 10^{10}$ /L 作聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 和等电聚焦 (IEF) 测定。在 -25°C 和 37°C 之间反复冻融 6 次, 4°C 离心 10 min, 上清液冻存于 -25°C 待用, 不超过一周。

用 7.5% 的聚丙烯酰胺中性 (pH 7.5) 标准分离胶圆盘电泳定性分析 CM ϕ 的 ACP 和 ANAE 同工酶, 在恒温 4°C , 恒流 4mA/管的条件下电泳 2h。

制备薄层 (0.1 cm) 凝胶溶液中, pH 3—10 和 pH 5—7 的两性载体蛋白分别占 3.2% 和 0.28%, 两极电极液分别为 NaOH 和 H_2PO_4 。IEF 电泳约 3h, 泳毕凝胶柱和薄层分别作 ACP 和 ANAE 同工酶谱分析。

2 结果与讨论

2.1 CM ϕ 的组织化学分析

14 份标本中, CM ϕ 胞浆中 PO 特异性染蓝色颗

粒阳性细胞占 2—40% ($\bar{x} = 22.8 \pm 11.3$) 不等。12 份标本测定 ANAE 阳性细胞在 85% 以上, 平均为 90.5 ± 6.1 。ACP 阳性细胞占 46—91%, 平均为 70.3 ± 11.8 。

已知单核细胞在演变成组织 m ϕ 的过程中, 随着 m ϕ 的不断成熟, 其 PO 活性也逐渐减少^[3]。初乳中平均有 1/5 的 CM ϕ 有显微镜下 ($1000\times$) 可见的 PO 阳性反应, 变异系数几乎为 50%, 说明样品间有明显的均一性。其中形体大, 含脂肪多的初乳小体均为阴性, 它们是最成熟的 CM ϕ , 由于 CM ϕ 吞噬脂肪颗粒, 有的细胞核被挤压曲折, 形似 PMN, 有的 CM ϕ 直径较小类似淋巴细胞。用 Giemsa 或 Wright 常规染色时很难鉴别^[1], 因此本试验用 ANAE 组化染色法

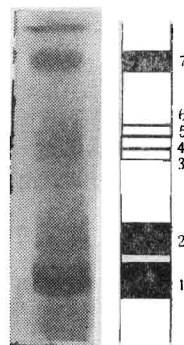


图 1 CM ϕ 的 ACP 同工酶 (圆盘电泳)

作为鉴别 CM ϕ 分离纯度的手段较为适宜。

2.2 CM ϕ 同工酶的 PAGE 分析

ACP 同工酶在中性胶上显示 7 条区带。酶活性以带 1, 2 和 7 最高 (图 1)。ANAE 同工酶呈现 8 条区带, 扫描显示区带 1, 6 和 7 的活性相对较强 (图 2)。

CM ϕ 和 SM ϕ 同工酶的 IEF 分析

CM ϕ 的 ACP 在 pH 3.6—6.15 间共显 8 条区带。带 1 和 2 活性较弱, pI 值为 3.6 和 4.2; 区带 3—6 的 pI 值分别为 4.5, 4.8, 5.0 和 5.3; 在 pH

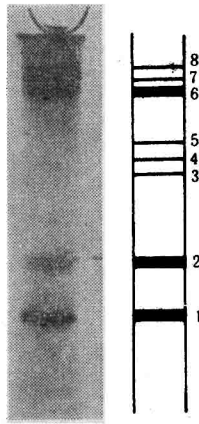


图 2 CMφ 的 ANAE 同工酶(圆盘电泳)

5.6~6.15 之间还有二条酶活性较弱的带。SMφ 亦显示 8 条区带, 各区带的 pI 值与相应的 CMφ 区带相同, 不同的是 SMφ 的区带 5 和 6 酶活性强度低于

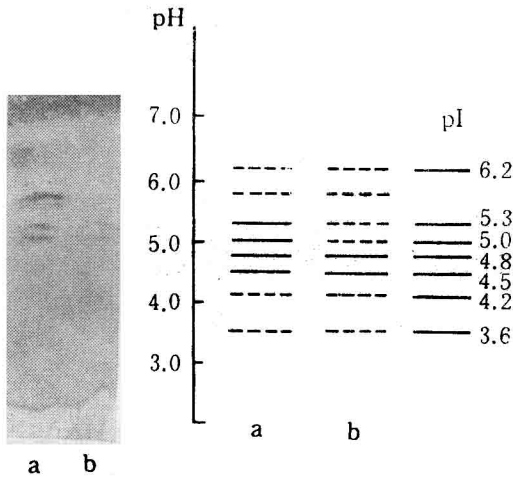


图 3 人 CMφ (a) 和 SMφ (b) 的 ACP 同工酶 (IEF)

CMφ 的相应区带(图 3)。

CMφ 的 ANAE 同工酶在 pH 3.6—7.2 范围间共显 13 条区带。在近阳极端的区带 1—5 活性较弱, 在 pH 3.6—4.9 之间; 区带 6—8 的 pI 值分别为 5.1, 5.6 和 5.9; 带 9 的 pI 为 6.1, 活性较强; 带 10 活性最强, pI 为 6.4。近阴极端的带 11—13 的 pI 为 6.57—7.2。CMφ 样品间相比较差别不明显, 人 SMφ 的同工酶带与 CMφ 的带型基本相似, 酶活性最

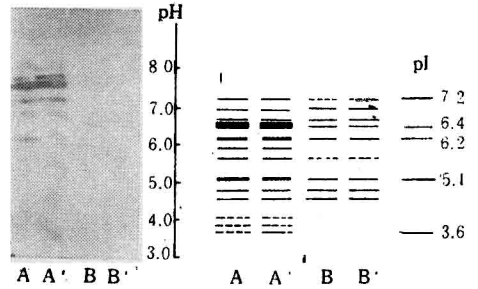


图 4 人 CMφ (样品 A, A') 和 SMφ (样品 B, B') 的 ANAE 同工酶谱 (IEF)

强的带亦位于 pI 6.4 和 5.1, 但缺乏与 CMφ 带 1—3 和 8 的相应区带。故共显 9 条区带, 其中带 4, 5 的活性低(图 4)。

以上分析说明 CMφ 和 SMφ 的 ACP 和 ANAE 的同工酶谱极为相似。

由于 CMφ 和 SMφ 是以同样的细胞浓度, 在同一块凝胶板上电泳, 消除了实验误差, 其分离结果是可比的。Parwaresch 等^[4]用 IEF 分析了血液单核细胞及腹腔和肺泡 Mφ 的 ACP 和 ANAE 同工酶谱后, 提出单核细胞和 Mφ 间同工酶相似, 并认为各组织中的 Mφ 是同源的。从本试验结果表明人初乳中含有成熟期早晚不同的 Mφ。CMφ 和 SMφ 可能同源, 但二者的活性未必等同。陈虹等^[5]利用初乳免疫细胞空斑形成技术观察到 35% 的空斑中心有 Mφ; 提出 CMP 也遵循肠道乳腺轴的运转规律, 即 Mφ 在肠道壁与多种抗原作用后再移居至乳腺。这种 CMφ 与 SMφ 一样, 具有高度的吞噬活性。如果用物理的或免疫学方法分离初乳中单核-巨噬细胞亚群。进一步观察各组细胞同工酶的活性, 将对人初乳 Mφ 的特性及其异质性有更多的了解。此外, 由于初乳中 Mφ 含量丰富, 取材较易, CMφ 可以考虑作为人 Mφ 来源应用于某些免疫学的研究。

参 考 文 献

- 1 王正森等. 中华儿科杂志, 1985; 3: 188
- 2 Yam L T, Li C Y. *Amer J Clin Path*, 1971; 55:283
- 3 Fishman M, Weinberg D S. *Cell Immunol*, 1979; 45: 437
- 4 Parwaresch M, Radzum H J. *Immunobiol*, 1982; 161: 309
- 5 陈虹, 沈淑瑾. 上海免疫学杂志, 1987; 7(3): 140