

用相差显微镜观察白血球 完全吞噬作用的研究

I. 正常人、兔、鸡白血球对枯草杆菌的 吞噬作用及其后果

李文简 沈惠仙

(齐齐哈尔医学院)

吞噬细胞在机体防御反应中是重要因素之一。过去往往用吞噬指数、调理指数作为客观的指标,这显然是不全面的。如果细胞仅能吞噬不能杀死细菌,就反而作了它的“海上保护伞”,这对机体来讲,非但无益反而有害。研究细菌在细胞内的命运,以及吞噬后细胞内的代谢、酶、杀菌物质等是一个非常有意义的问题,也是研究细胞免疫的新途径^[1]。目前研究完全吞噬尚没有完善的方法。Melly 等^[2]用相差显微镜研究“葡萄球菌在细胞内的命运”,证明葡萄球菌在细胞内繁殖,最后细胞破裂;这种方法是比較直接,简单适用。因此我们在此基础上用相差显微镜研究人、鸡、兔白血球对枯草杆菌的吞噬作用,企图了解:(1)吞噬细胞能否吞噬长链巨杆菌;(2)吞噬长链巨杆菌的方式;(3)细胞消化能力;(4)吞噬后果。此外改进试验条件也是我们研究目的之一。现将我们初步研究的结果报导如下。

材料及研究方法

菌液 将枯草杆菌培养在琼脂斜面上,8小时后用生理盐水洗下(无芽孢)。死菌是经8磅15分钟杀死的。

维持液 抽血时在注射器内加0.03毫升肝素(上海食品公司制药厂出品,每毫升含5,000国际单位)取血10毫升,离心后取出血浆放小试管中,盖上流动石蜡放冰箱中备用。

相差显微镜培养保温箱 本院修配所根据我们的要求制备,温度稳定。

盖玻片压滴标本的制备 取菌液一白金耳(直径约1毫米)于载片上(无菌无尘、无纤维并无其他离子),加血浆一滴(18号针头)与全血(人耳垂、兔耳尖、公鸡冠)一白金耳混合,再取此悬液与一滴血浆混合作压滴标本,迅速盖上盖玻片,周围用石蜡封固,放镜下用油镜观察。血量不宜过多,微现红色即可,否则往往使所跟踪的白血球被红血球盖住。细菌亦不宜过多,过多则细胞外细菌繁殖,增加细胞外的复杂性。为除去细胞外细菌繁殖的复杂性,可先将白血球与细菌在玻片上混合放温箱中15分钟(须防止血浆浓缩)进行吞噬,再取出一滴与含有链霉素及青霉素(10单位/毫升)之血浆混合,作压滴标本。如细菌用量适当,并按前者的操作方法,不加抗菌素亦可。

所用的血浆与血球的来源是同一个体。在我们的实验条件下白血球能活24小时,有达30余小时者。人、兔血球在37℃下观察,鸡是40℃。观察吞噬死菌之玻片标本中未加抗菌素,观察活菌在细胞内之命运时是先让白血球吞噬后,再移入含有抗菌素之血浆中。

实 驗 結 果

(一) **白血球的正常活动** 在相同的条件下,三种白血球以人的白血球最活跃,运动最迅速。人白血球在运动时仿足呈云雾状向前涌进,随之見原浆顆粒向前方迅速流动,細胞向前收縮。在前进时,后拖一尾状物,其末端为圓形,顏色較深,运动方向多半向前或左右,很少見到从尾状物处伸出伪足,作后退运动,有时見到細胞拉长成細条状曲折向后运动;此外还能見到細胞呈圓形,尾状物浸于深层液中成漏斗状。兔白血球运动状况与人白血球相似,也是伸出伪足,細胞拉长,顆粒向前流动,收縮前进,但尾状物較大,伪足常呈1—2尖刃状,向前伸出。鸡白血球运动慢,活动范围較小,沒有明显的尾状物,其伪足也没有人血球那样明显,伸出一个或数个触角样的小突起。我們认为尾状物的形成与运动的速度有关,运动的速度是否与伪足有关呢?这是生物学上一个有意义的問題。

(二) **白血球的吞噬方式** 白血球吞噬枯草杆菌的方式是非常有意思,它的吞噬能力是惊人的。它們能同时或先后吞噬二条5—6个人紅血球直径那样长(特别是对人及兔的白血球)的鏈杆菌,無論是对死菌或者是活菌都显示了同样的吞噬能力。在距离目标物远时是无定向运动,距离細胞約2个紅血球直径的距离时成直綫定向运动,并能排开前进方向的紅血球迅速奔向細菌。当5—6个紅血球直径那样长的鏈杆菌横位于吞噬細胞前面,白血球(人、兔)接近細菌时,細胞形状变成像翻口痰盂一样,原浆向細菌两端扩散,迅速將細菌包入原浆中。或細胞位于細菌上方,原浆向細菌两端扩展,將細菌包入(图1);有时原浆向两端扩展又收縮,細胞轉向細菌的一端,从一端將細菌进行吞噬(图2)。鸡白血球多半是采用后一种方式。接近細菌后完成5—6个紅血球直径长鏈状杆菌的吞噬是很迅速的,往往只需数秒鐘,从細菌的一端吞噬較慢,常需数分鐘到十余分鐘。吞噬的速度与細菌的长度、細胞活动能力也有关。吞噬以后,成鏈状的杆菌保持笔直杆状,因此細胞的形态因細菌在細胞內的位置及运动方向的关系常成梨形、长条形、橢圓形或棱形等(图3)。人、兔白血球經数次变形后能将笔直的鏈杆菌弯曲于細胞內,特别是死的枯草杆菌,鸡白血球就不易做到这一点,也可能与細胞运动能力有关。吞噬长鏈状杆菌后常將整个菌体或大部分菌体吐出于細胞外,此时仔細观察,細菌仍为原浆所包围,数分鐘后又將細菌收回于細胞中,这种現象在鸡白血球最为常見;有时也能見到細菌确实被吐出而不再吞噬,这只能发生于細胞活性不强的时候。此外,在我們对吞噬活菌的数十次观察过程中,从未見到細胞能吞噬运动非常活跃的細菌,所吞噬的都是运动減低的細菌。在标本中有些細菌运动迅速減低,或許血浆中存有一种作用迅速的制动因子,协助白血球吞噬。

(三) **吞噬后細胞內部的变化及两者的归宿** 三种白血球吞噬細菌后所引起細胞內部变化及两者(細菌与細胞)的最后結果大致相同,均有空泡形成。空泡形成一般在吞噬后数分鐘,并伴有原浆顆粒減少,細菌居于空泡之中。吞噬少量菌(1—2个)时,空泡多为圓形或卵圓形;吞噬4—5个或更多的长鏈杆菌所形成的空泡与細菌之形状一致。空泡之周围有較多之原浆顆粒,看起来好象构成空泡的壁一样,菌体上亦集聚有不少的原浆顆粒。大約吞噬后一小时原浆顆粒消失达最高峯,細胞涨大,最后原浆呈大小不等的圓球形向外脫出,浮于細胞周围,使細胞呈現明显的立体結構。有时細胞原浆全部脫出,有細胞阴影及粗顆粒密集圓形小体。吞噬死的枯草杆菌經7—9小时后,細胞內不易見到細菌,細胞最后

变为圓形,不能运动。細胞在消化活枯草杆菌的时候,細菌变短,寬度縮小,菌数增加一倍,形状呈細小短杆菌。細胞原漿脫出时,此短小鏈杆菌随原漿出現于細胞之外,不能运动(图3)。此种細菌可能是細菌分裂之初胚,被吞噬之前已分裂,因細胞壁被消化而暴露出来。

討 論

目前有不少学者从事細胞吞噬能力及細菌在細胞內命运的研究^[3], Elberg^[4]应用 Mackaness^[5]的特制玻片,能观察活細胞的形态,并将片子进行染色計数,同时用 Carred 氏小瓶进行培养,后用离心法洗去細胞外的細菌,然后用皂素破坏单核細胞,接种琼脂平板,計数細胞內生存的細菌。Holland 及 Prickett^[6]用单层細胞培养法, Cohn 及 Morse^[7]用多核細胞与細菌在試管中进行培养,然后用离心及平板培养,分別計算細菌总量,上清液及細胞內細菌的数量。根据文献資料及我們实验結果推論,这些方法得出来的数字是值得考虑的。第一,細胞內有很多的杀菌物質^[6,8,9],在細胞內被杀死的細菌数是培养不出来的;第二,因吞噬細菌而引起原漿脫出的細胞能粘着很多的細菌,形成的白血球-細菌凝团因离心作用而下沉。因此,这些方法很难得出細胞吞噬細菌的准确数字,更难判定細菌在細胞內的状况。此外,还有很多比較直接的方法如 Бермен^[10], Житва^[11]用琼脂培养压印法研究完全吞噬, Kaprad^[12]等用特制組織培养室来研究葡萄球菌在細胞內的生存, Melly 等^[2]用相差顯微鏡及顯微鏡培养台来研究葡萄球菌在人类白血球中的命运。Melly 的方法,能直接看到吞噬后細胞內部的变化,細菌能否在細胞中繁殖是研究完全吞噬很有前途的方法, Wilson^[13]在 1957 年曾采用这种方法来研究无毒的 A 族鏈球菌在人及鼠单核細胞中的命运問題。当然 Melly 所用的試驗条件有的还需要进一步研究,使之更加完善,如白血球的保持液为含有 0.05% 肝素的 Todd-Hewitt 肉湯与等量菌液混合。可以想象,在此試驗条件下細胞能保持它的生理功能不会太长。原因是(1) 0.05% 肝素 Todd-Hewitt 肉湯不是太理想的維持液;(2)細胞在吞噬及消化細菌的过程中,細胞外細菌不断繁殖,細胞受到內外敌人的夹攻;(3)白血球吞噬能力是很強大的,在一定的時間內它能連續吞噬周围的細菌,这样就很难判定細胞內細菌繁殖的状况。Melly 观察最长的時間是 90 分鐘,同时也沒有說明在它的試驗条件下,細胞究竟能活多少小时。我們认为維持液的成分,加入細菌的数量及控制細胞外的細菌的繁殖对研究完全吞噬都是很重要的。我們用同一个体的肝素血浆作为白血球維持液,比較接近正常血液情况,細胞能活 24 小时,甚至有达 30 余小时,这样长的時間对观察細菌在細胞中的命运提供了有利条件。为了控制細胞外細菌的繁殖,我們把細菌与白血球先在沒有抗菌素血浆中进行吞噬,再移入含有抗菌素的血浆中进行观察,这样就可以減少細胞外細菌繁殖的复杂因素,这种措施亦曾有人^[6,12]应用于試管吞噬实验中。

我們之所以采用血浆作为維持液,是因为考虑到,在机体中白血球的吞噬作用并不是孤立地进行,而是与血清中的某些物質特别是調理数发生协同作用^[4,7]。同时血浆与正常体液环境相接近。我們也注意到吞噬的枯草杆菌,并不是已經经过血浆中杀菌物質杀死的細菌,因为在玻片上細胞发生吞噬是非常快,同时在观察过程中,能見到活的細菌。

一个細胞能吞噬十余个这样大的巨杆菌,可見細胞的吞噬能力和細胞壁的弹性都是

很大的,而吞噬的方式也是多种多样的。吞噬后所见的空泡形成,原浆颗粒的消失在防御上有积极的意义,因原浆颗粒可能含有吞噬素(phagocytin),溶菌酶等。吞噬过程中发生颗粒溶解的现象及其意义,最近三四年已有详细的研究^[3,15,16]。在我们实验中也观察到原浆颗粒发生明显的溶解。Hirsch^[16]认为白血球是高度分化的细胞,不可能发生颗粒的再生,但我们看到细胞原浆的密度及微小颗粒在24小时内有轻度恢复,并且在后期看到为数不多的像宝石样的亮绿色颗粒。这样亮绿色颗粒是否为细胞核中所释放出的颗粒呢,我们不敢肯定,因为显微镜下不能看到活细胞的细胞核。

当白血球吞噬死枯草杆菌时,也发生空泡,原浆颗粒溶解,最后细菌不易看到,白血球变圆不能活动,我们认为细胞处于衰竭状态,是否尚保持生命,在我们的实验中不能肯定。吞噬活的细菌,经过数小时到十余小时,能导致细胞原浆脱出或细胞破裂,在细胞内或释放出短小不活动的细菌(约正常菌的1/3—1/2)可能是细菌细胞壁被消化(因为看不到折光率较强的细胞壁),暴露出在吞噬前已形成的分裂初胚,如果是因为繁殖的关系,细菌不会那样短小,一定也具有折光率强的细胞壁,而且经过数小时、十余小时甚至30小时所看见之细菌数决不止增加两倍,所以我们认为细胞能杀死枯草杆菌并且能进行一定程度的消化,最后细胞因极度衰竭而崩溃,所未完成的使命将由另一新的细胞来完成。

结 论

1. 三种白血球(人、兔、鸡)吞噬枯草杆菌的能力是非常强的,都能吞噬十余个巨大的枯草杆菌。
2. 细胞壁的弹性很大而且很坚韧,吞噬很长的链状枯草杆菌不但细胞不破裂而且能将细菌曲折于细胞中。
3. 吞噬长链枯草杆菌的方式是多样的,可由细菌的一端进行吞噬也可由细菌中间将伪足向两端扩展,将细菌包入原浆中,而且吞噬的速度很快。
4. 白血球能杀死枯草杆菌并能进行一定程度的消化,最后能引起细胞极度衰竭而崩溃。
5. 多次实验中未见到细胞能吞噬运动活跃的枯草杆菌。

参 考 文 献

- [1] 谢少文:全国免疫训练班讲稿,1963年于长春吉林医科大学。
- [2] Melly, M. A. *et al.*: *J. Exp. Med.*, **112**: 1121, 1960.
- [3] 谢少文:免疫学进展,109,上海科学技术出版社,1962。
- [4] Elberg, S. S. *et al.*: *J. Exp. Med.*, **106**: 545, 1957.
- [5] Mackaness, G. B.: *J. Path. Bact.*, **64**: 429, 1952.
- [6] Holland, J. J. and Prickett, A. J.: *J. Exp. Med.*, **108**: 343, 1958.
- [7] Cohn, J. A. and Morse, S. J.: *J. Exp. Med.*, **110**: 419, 1959.
- [8] Cohn, J. A. and Hirsch, J. G.: *J. Exp. Med.*, **112**: 983, 1960.
- [9] Hirsch, S. G.: *Bact. Rev.*, **24**: 133, 1960.
- [10] Бермен, В. М. и Славская, Е. М.: *Ж. М. Э. И.*, **3**(8): 112, 1958.
- [11] Житва, Е. И. и Куброшева, П. И.: *Ж. М. Э. И.*, (8): 112, 1963.
- [12] Kaprad, F. A. and Shagegani, M. G.: *J. Exp. Med.*, **110**: 123, 1959.
- [13] Wilson, A. T., Wiley, G. G. and Buono, P.: *J. Exp. Med.*, **106**: 777, 1957.
- [14] Rogers, D. E. and Melly, M. A.: *J. Exp. Med.*, **111**: 533, 1960.
- [15] Cohn, Z. A. and Hirsch, J. G.: *J. Exp. Med.*, **112**: 1015, 1960.
- [16] Hirsch, J. G.: *J. Exp. Med.*, **116**: 827, 1962.

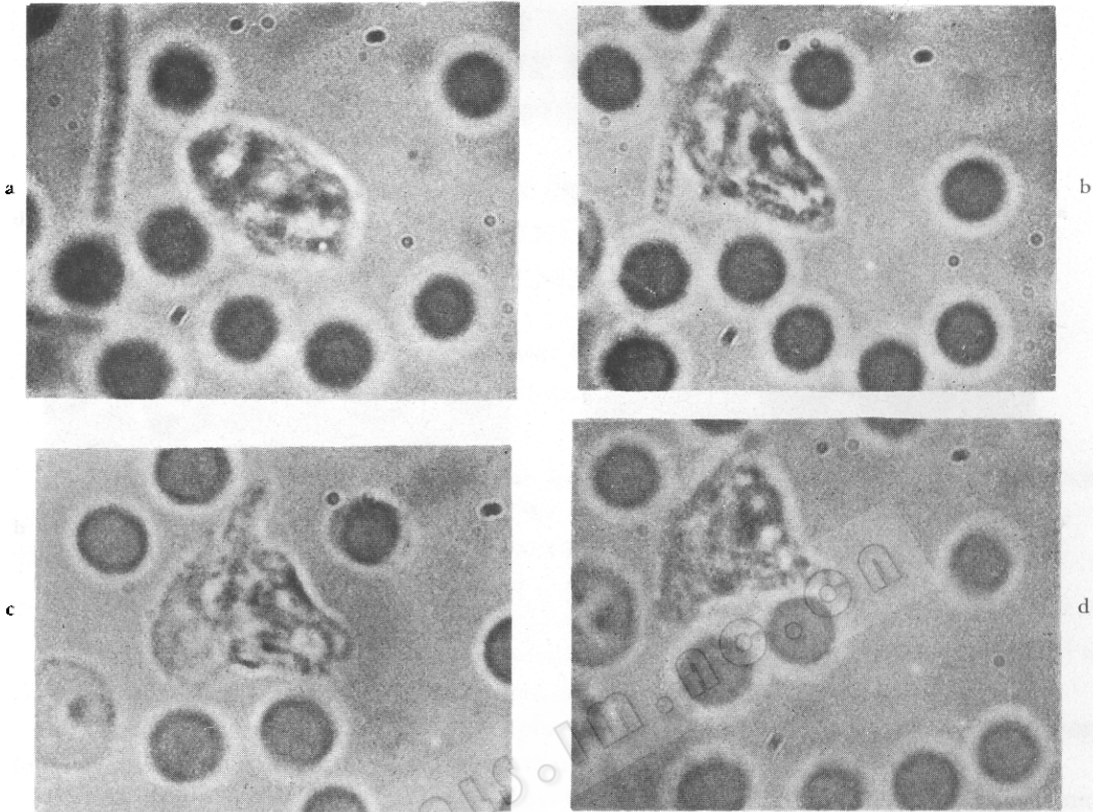


图 1 白血球横吞枯草杆菌(活菌)。

a. 白血球向细菌成直线运动； b. 白血球排开前进方向中之红血球横吞细菌； c. 白血球原浆向细菌两端扩展； d. 白血球将细菌横吞入细胞原浆中。

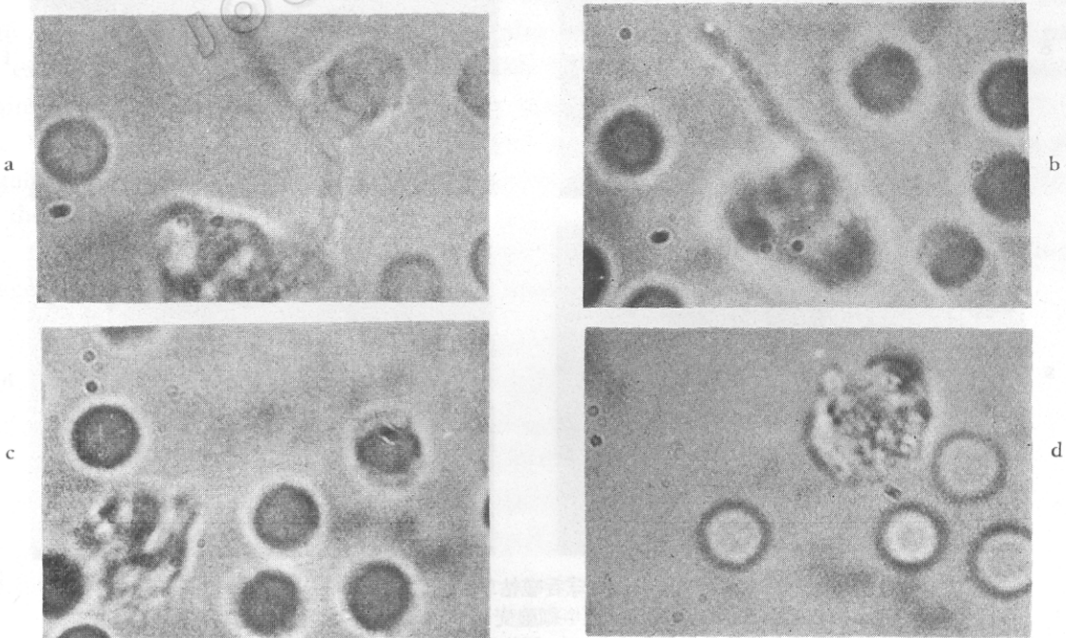


图 2 白血球纵吞枯草杆菌。

a. 从细菌(13个枯草杆菌)一端进行吞噬； b. 3分钟后,半数细菌被吞噬； c. 细菌曲折于细胞中,原浆颗粒减少,同时出现空泡； d. 白血球变圆,不能运动,处于衰竭状态(观察9小时)。

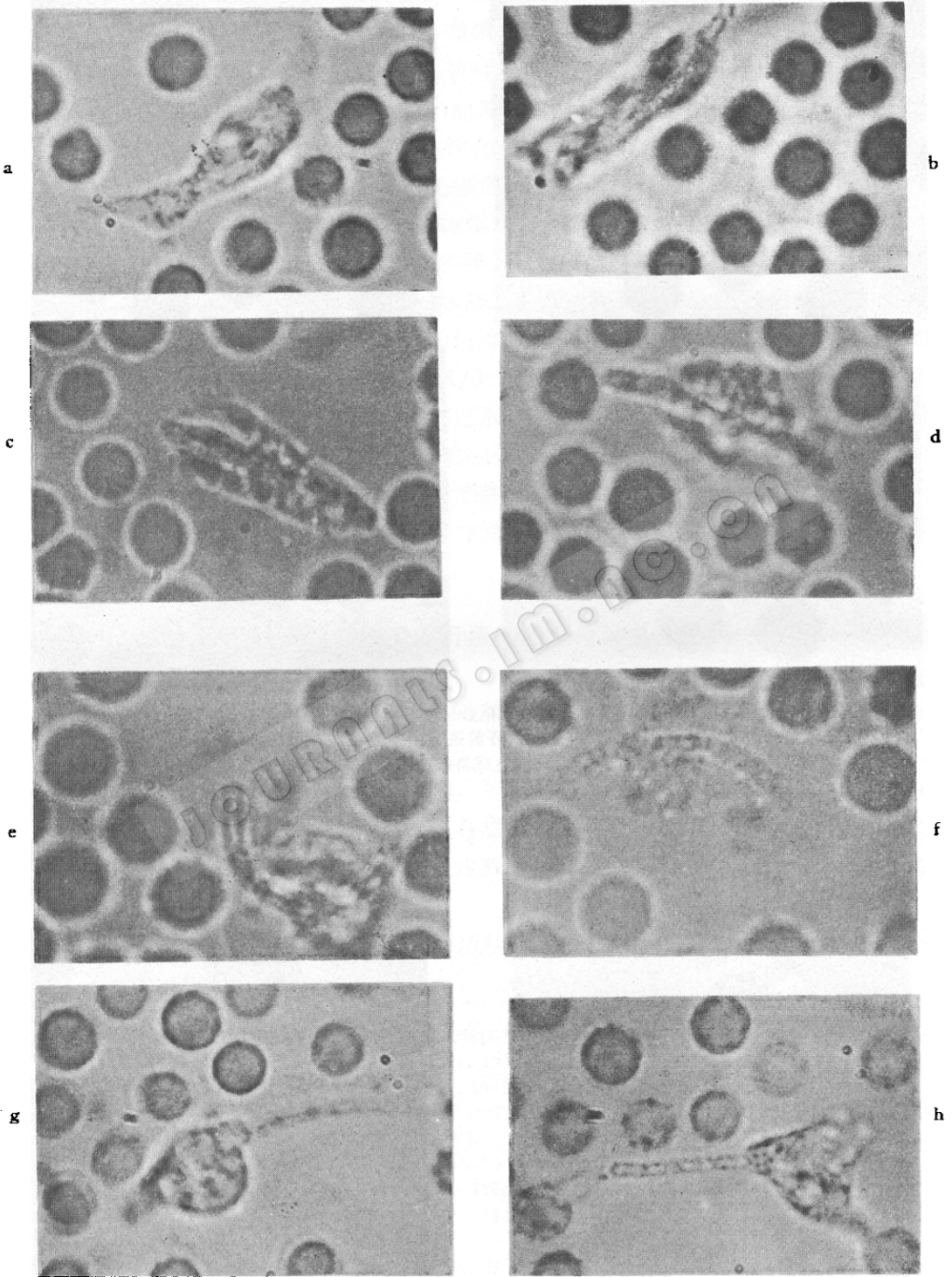


图3 兔白血球吞噬枯草杆菌之结果。

a. b. 白血球已将一长链枯草杆菌吞入原浆中细胞变长； c. d. 形成空泡，菌体及空泡周围有较多之原浆颗粒； e. 细菌曲折于细胞中； f. 细胞涨大，颗粒完全消失； g. 细胞原浆脱出，短小杆菌突出于细胞外； h. 原浆全部脱出，留有圆形球体，中有少数大颗粒(观察 16 小时)。

THE STUDY OF COMPLETE PHAGOCYTTIC ACTION OF LEUCOCYTES BY PHASE MICROSCOPY

I. THE PHAGOCYTTIC ACTION OF NORMAL HUMAN, CHICKEN AND RABBIT LEUCOCYTES ON *BACILLUS SUBTILIS* AND ITS END RESULTS

LI WEN-CHIEN AND SHEN HUAI-SHIEN
(Chichihar Medical Institute)

The phagocytic phenomena of *Bacillus subtilis* by human, chicken and rabbit leucocytes was studied with phase microscopy. We intend to clarify the following points.

1. The capability of these phagocytes to engulf long chain large bacilli,
2. The mode of phagocytic action on long chain large bacilli,
3. The digestive ability of these phagocytes,
4. The end results of such phagocytosis.

Our preliminary results are summarized as follows.

1. The phagocytic activity of these phagocytes (human, chicken and rabbit) is very strong, as each cell can phagocytise more than ten individual bacilli of large size.
2. The cell membrane of leucocytes is so strong, that after having engulfed long chain bacilli, not only the cell membrane did not rupture, but the bacilli may coil up within the cell.
3. The mode of these phagocytes to engulf long chain *B. subtilis* is varied. They may engulf the bacilli from its one extremity, or may attack them from its central part by extending long pseudopodia toward both its extremities, so as to take in the whole chain of bacilli into the cytoplasm. The speed of phagocytosis is also quite high.
4. Leucocytes can kill *B. subtilis* and are able to digest it to some extent, but the engulfment of living bacilli may finally cause extreme exhaustion of the cells and lead to their disintegration.
5. Even in repeated observations, we have not been able to observe that these phagocytes that engulf *B. subtilis* showed active movement.