

酸性与鹼性磷酸酶在正常及患腫瘤 雞体内之分佈組織化学与生物 化学对比的研究

袁 昌 國

(中央農業部獸生物藥品監察所)

磷酸酶爲一組能水解磷酸酯而產生無機磷酸鹽的酶。

1907年日本學者 Suzuki, Yoshimura 及 Takaishi 諸氏^[1]首次在穀類中發現一種磷酸酶,以後陸續在各種動植物中發現了各種不同的磷酸酶。

Edlbacher 与 Kutscher 氏^[2]報告,在雞、鼠與人的各種惡性腫瘤中有一種能使動植物的核酸脫磷酸的酶存在。此種酶也可在良性腫瘤中發現,但含量較少。Wienbeck^[3]与 Macfayden^[4]確証了這一發現,並指明在雞瘤抽提液中含有兩種酶,一爲核苷酸酶,另一爲磷酸酶。Morii 与 Takabatake^[5]報告,鹼性磷酸酶存在於人的淋巴結的轉移性子宮癌內,而不見於平滑肌瘤內。Hori^[6]報告,在照射過的癌瘤中,鹼性磷酸酶減少。以後許多作者繼續有所發見。最近 Носалевич 氏^[7]發現在正常乳腺組織中幾不見酸性磷酸酶的存在,但在乳腺癌組織中則經常可見酸性磷酸酶,其分佈主要在腫瘤周圍組織之小核、核及癌細胞漿內,腫瘤間質內常有少量或無之。鹼性磷酸酶經常大量存在於正常乳腺組織內,尤其在腺上皮內。結締組織內極少且僅限於血管壁、結締組織細胞核及腺腔周圍的細胞浸潤中。但在乳腺癌中則鹼性磷酸酶的分佈發生改變:上皮細胞中的含量減少,有時僅存在於小核及核內,而血管壁及結締組織(尤其腫瘤周圍者)中的含量則大增。這樣,在癌瘤存在時,酸性与鹼性磷酸酶同時存在於小核及核中。因此,他推論謂:“雖然小核的作用尚未完全明瞭,但其高度的活動性在新陳代謝方面已表示出來,由此可以說明在惡性瘤和非典型的破壞与增生的上皮細胞核的尖銳的形態變化以及惡性瘤細胞核与正常組織細胞核的一定的化学區別。顯然地,在同一細胞構造中磷酸酶的積聚僅是從正常組織變成癌瘤組織的複雜

过程中之一步驟。”

本項研究工作的目的，在於尋求在健康雞的各種組織中，酸性与鹼性磷酸酶分佈上的差別，確定健康雞組織與患腫瘤雞組織磷酸酶的分佈與含量有無顯著變化，並與前述發現作比較。

材 料

所有健康成年雞與六星期雛雞用於接種瘤腫者，均為愛丁堡家禽研究所的對瘤腫易感品種之棕色來克亨雞。

用於組織化學研究者計有：2 健康六星期雛雞（1 雄 1 雌），1 健康產卵雞，10 雛雞患 Rous 氏 1 號肉瘤，2 雛雞患傳染性 Campbell 氏纖維肉瘤（病毒所致），5 雛雞患双苯蔥所致的纖維肉瘤（GRCH/15），及患有其他偶發性瘤腫的雞數隻。

健康六星期雌雞曾靜脈注射銻胭脂紅（每日 5 毫升，連注 5 日），目的在藉以區別巨噬細胞及網狀內皮系。

健康產卵雞特用於生殖器官的研究，自卵巢及輸卵管的不同部位採取組織塊固定後備用。

Rous 氏 1 號肉瘤係用凍乾保存之瘤組織懸浮於生理鹽水中，注射入六星期雛雞肌肉中而引起。注射後 2—3 星期，注射部位（經常為雞之右腿及左胸）生成瘤腫，拉斷頸關節宰殺供用。

其中 5 雞係用 Rous 氏 1 號肉瘤的新鮮組織懸液靜脈注射所引起。全數均在肺中生成極多瘤腫，部分散佈於隨意肌、心肌、腦膜、胸腺、胰、腺胃、砂囊、十二指腸及空腸，其中一例在頸部生一大瘤造成潰瘍。從這些雞中採取患瘤臟器組織以供研究。

傳染性 Campbell 氏纖維肉瘤乃用乾燥保存之瘤組織引起瘤之生成，其方法與 Rous 氏瘤同，但其發生率遠低於 Rous 氏瘤，且無一有轉移。

双苯蔥引起的纖維肉瘤（GRCH/15）用肌肉內移植法直接由雞傳雞。將用活體解剖法採得的新鮮瘤組織，經皮下注射入六星期雛雞的胸肌內，通常於 2—3 星期內長成大瘤而將寄主消耗致死。此等病例常伴發肝硬化，此等現象後當述及。轉移常發生於肺、肝、胰及胃腺，轉移瘤均連同周圍組織採取以供研究。

一黑色 Minorca 母雞右翼下患一直徑 3 公分的良性纖維瘤者，由一農場獲得，經宰殺取材移植未成功。將原始瘤組織用於組織化學研究。

由農漁部家禽實驗室送來一份雞組織細胞肉瘤材料，試行移植未成功，可能由於

曾放置冰箱中过夜之故。

由家禽研究所一棕色來克亨雞中得一偶發性卵巢腺癌，生前腹部觸診即可探知一硬塊，宰殺後發現空腸之一部分因腸壁為腫瘤細胞浸潤而極度增厚。腸間膜及胰上有數個由腹腔內移植所造成的硬塊，從每處取一組織塊供研究。

愛丁堡獸医学院禽病部送來一雜種母雞，其 Fabricius 囊患一偶發性淋巴細胞瘤，宰殺後立取新鮮瘤組織固定於冷醋酸中，腸間膜、空腸及腺胃壁中亦見瘤腫。

一偶發性纖維平滑肌瘤無意中發現於一供其他試驗用棕色來克亨產卵雞之卵巢腹側韌帶上，新鮮瘤組織立即採取固定，供組織化學研究。

實驗及結果

一. 組織化學的研究

以不超過 3 毫米厚的新鮮組織塊，用冷凍的醋酸固定，並放置 0°C 冰箱中 12—24 小時，然後在室溫中更換醋酸 2 次脫水，共歷時 12—24 小時，再放入苯中透明 2 次，每次各半小時，然後放入融點 56°C 石蜡在真空包埋器中放 2 小時後製成蜡塊，立即切成厚 5 微米的切片。取連續的切片 5 片供以下用途：一片供普通伊紅蘇木素染色，一片供酸性磷酸酶，一片供酸性磷酸酶對照，一片供鹼性磷酸酶，一片供鹼性磷酸酶對照。所有切片均漂浮在溫熱蒸餾水上展平，粘貼於塗有薄層蛋清的蓋玻片上。在室溫中乾燥 1—3 小時，通過二甲苯 2 次脫蜡，再通過醋酸及蒸餾水，然後使切片向上浸入盛有基質溶液之培養皿中。

基質溶液的配製法如下：

(1) 酸性磷酸酶用：

0.1 N 醋酸緩衝液 pH 5.0	12.5 毫升
5% 硝酸鉛溶液	5.0 毫升
蒸餾水	75.0 毫升
2% 乙位甘油磷酸鈣(B.D.H.)溶液	15.0 毫升

溶液按上列次序配成後，放置冰箱中 12—24 小時，用前濾過，切片在上述溶液中在 37°C 放置 18—20 小時，對照切片則放入以等量蒸餾水代替 2% 乙位甘油磷酸鈣溶液之同樣溶液中。

切片經孵育後用 1% 醋酸洗滌半分鐘，並迅速地通過蒸餾水 2 次，然後用硫化鉍（蒸餾水 100 毫升中加 6 滴），使磷酸鉛沉澱轉化為黑色的硫化鉛。經普通水洗滌 2 次

後用 1% 伊紅液或亮綠液作對比染色, 通過不同濃度的酒精脫水, 用二甲苯透明, 迅即用加拿大樹膠封固。

(2) 鹼性磷酸酶用:

2% 巴比士鈉溶液	20.0 毫升
2% 氯化鈣結晶溶液	10.0 毫升
2% 硫酸鎂溶液	10.0 毫升
2% 乙位甘油磷酸鈉(B.D.H.)溶液	20.0 毫升
蒸餾水	40.0 毫升

上列溶液配成後的最終 pH 為 9.4 左右。

對照切片所用溶液與上液的配製基本上相似, 僅用蒸餾水等量代替乙位甘油磷酸鈉溶液, 均在 37°C 溫箱中孵育 12—16 小時。

經孵育後, 切片放入 1% 氯化鈣溶液洗濯 10 分鐘, 移入 2% 硝酸鈷液中 10 分鐘, 然後在 1 分鐘內迅速地用蒸餾水洗濯 5 次, 用硫化銨 (100 毫升蒸餾水中加 6 滴) 溶液處理 5 分鐘, 用普通水洗濯, 用伊紅或亮綠作對比染色, 迅速地通過酒精及二甲苯脫水透明, 用加拿大樹膠封固。

用組織化學法觀察正常及腫瘤組織的結果稍加詳述, 文字的重複在所不免, 為參考方便計將結果列表附於本節之末。

組織化學法觀察的結果

(1) 酸性磷酸酶的分佈:

(i) 在正常雞組織中的分佈:

以下敘述中“染色”一詞係指在酶作用處形成的硫化鉛而言。

中樞神經系 一般說來, 腦與脊髓所有神經細胞與纖維均染色極深, 少樹突細胞染色最深, 小膠質細胞次之, 神經節細胞及星狀細胞又次之, Purkinje 氏細胞僅核內稍染色, 樹突及軸索因染色極深, 故可追蹤至相當距離。在較大之神經細胞內, 尤其在運動性神經節內, 亦可跟踪入細胞突起內 (圖 1)。室管膜細胞核染色深, 胞漿則淺, 軟腦膜及脈絡叢細胞呈中等度染色, 血管內皮細胞僅核染淺色。

交感神經節 靠近腎上腺的交感神經節細胞胞漿染色極深, 核則極淺, 神經纖維中等度, 衛星細胞染色極深。

雞冠 角質層幾不染色, 上皮極度深染, 血管周圍淋巴細胞與纖維組織細胞均染色極深, 血管最深。

橫紋肌 肌纖維核中度染色, 肌漿較淺, 結締組織細胞核極深, 纖維淺。

血細胞 紅血球核染色深，胞漿中有極多細顆粒，白血球核中等度染色。

心臟 心肌細胞核中度染色，胞漿淺。心外膜及內膜核均深染，胞漿則淺。

氣管 上皮胞核極深，軟骨細胞核淺，而基質則深，軟骨環間韌帶胞核深，纖維淺。

肺 肺泡上皮胞核極深，胞漿淺，結締組織亦近似，肺膜僅核染淺色。肺血管各層細胞亦僅核染色。

食管 內面幾不着色，染色程度愈向外愈深，至上皮之生發層而達於極度。固有膜染色極淺，腺細胞及平滑肌染色淺，結締組織核極深，漿膜淺。

腺體胃 上皮細胞核染色深，結締組織中等度，腺體組織的基底膜染色清晰，其他細胞均淺。

砂囊 角質膜不均勻地輕度染色，腺組織與腱質均染色極深，結締組織與平滑肌僅胞核深染，漿膜中度染色。

小腸 絨毛中所有細胞核均深染，腺細胞及結締組織細胞核染中度，胞漿淺染，平滑肌淺染，漿膜細胞着色，深淺不一（圖3）。

盲腸 所有絨毛及淋巴組織的胞核深染，腺細胞與結締組織細胞核中度染色，胞漿則淺，漿膜染色淺。

大腸 所有粘膜及腺細胞核均深染，胞漿淺，其餘組織染色均淺。

肝 肝細胞核染色極深，胞漿則淺，網狀內皮染色淺。結締組織與淋巴細胞核染色深，胞漿色淺。

胰 腺細胞與胰島細胞核染色深，胞漿淺。胰島之兩種細胞無差異。結締組織核中等度。

松果體 室管膜染色淺。主質細胞中等度，軟腦膜染色深。

腦下垂體 纖維質囊胞核染色淺，胞漿幾無色。血管胞核中度染色，尤其在內皮及中層。胞漿不着色。

垂體遠側部 α 細胞核及顆粒均富於酸性磷酸酶， β 細胞中度染色。嫌色細胞染色極淺。

垂體神經部 室管膜細胞在竇周圍核中度染色，胞漿極淺，垂體細胞核中度染色。

甲狀腺 所有胞核中度染色，胞漿則淺，分泌物亦淺。

胸腺 胸腺細胞核中度染色，胞漿淺。Hassall 氏體及間質均中度染色。

腎上腺 皮質細胞核深染,胞漿淺。髓質細胞極淺,間質中等度。

脾 淋巴小結中心的淋巴母細胞較之周圍的淋巴細胞染色深,間質僅胞核中度染色,纖維幾不染色。

腎 絲球體及球囊胞核染色深,胞漿淺。腎小管各部除遠曲部外,胞核均深染,胞漿較淺,中間組織核中度染色。

Fabricius 氏囊 粘膜核內中度染色,胞漿極淺,腺細胞相近似。淋巴組織僅核染色,胞漿幾不染,平滑肌及漿膜幾不染。

睪丸 成年雄雞睪丸的纖維囊僅胞核中度染色,間質中度染色,絕大部分在胞核內,基底膜中度染色,所有原精子胞核深染,胞漿淺。精原細胞頭部深染,尾則淺。

卵巢 濾泡細胞核深染,胞漿稍次,基底膜中等度,卵黃淺染,中間組織亦淺。

輸卵管 (1) 漏斗:上皮胞核中度染色,胞漿淺,粘膜下組織及平滑肌胞核淺染,胞漿更淺,漿膜幾未染色。(2) 分泌蛋清部:上皮及淋巴組織核中度染色,胞漿較淺,腺細胞核深染,胞漿淺,平滑肌染色淺,漿膜染色極淺。(3) 形成蛋殼部:僅腺細胞中度染色,其餘組織染色均淺。

(ii) 腫瘤組織:

Rous 氏 1 号肉瘤 積極生長的瘤細胞核染色深,胞漿不染色,坏死中的瘤細胞僅核染淺色,間質核深染,胞漿則淺,此等瘤中核分裂者較少,所有均染色清晰。

GRCH/16 (双苯惹引起之纖維肉瘤) 瘤細胞核中度染色,胞漿極淺,有極多核分裂細胞染色清晰,間質細胞染色極淺。

Campbell 氏纖維肉瘤 瘤細胞核中度染色,胞漿則淺,間質染色淺。

偶發性纖維瘤 全部瘤組織幾不染色,僅偶見核中有散在的細顆粒。

偶發性組織細胞肉瘤 一致性染色極淺。

偶發性腺癌 瘤細胞核中度染色,胞漿則淺,間質幾不染色。

偶發性淋巴細胞瘤 瘤細胞核深染,胞漿淺,間質核中度染色,胞漿幾不染。

偶發性纖維平滑肌瘤(輸卵管韌帶之纖維肌瘤) 所有胞核深染,胞漿不染(圖

5)。

(2) 鹼性磷酸酶的分佈:

(i) 在正常雞組織中:

下列描述中“染色”一詞意指黑色硫化鈷沉澱而言,亦即是鹼性磷酸酶活動處。

中樞神經系 所有神經纖維均中度染色,小膠質細胞核染色最深,室管膜、脈絡

叢、少樹突細胞、Purkinje 氏細胞、神經節細胞、星狀細胞及軟腦膜次之。毛細血管染色極深。

交感神經節 在腎上腺節內，所有神經纖維均染色極深，神經節細胞核及漿均淺。

雞冠 角化層未染色，胞核染色的深度隨上皮向下而俱增，至生發層達頂點。胞漿染色極淺，毛細血管層及淋巴細胞核中度染色，胞漿較淺，結締組織核染色極深，纖維中等度，毛細血管染色極深。

橫紋肌 肌纖維核中度染色，胞漿淺，結締組織核染色深，胞漿則淺。

血細胞 紅血球核中度染色，胞漿淺，白血球核深染，胞漿亦淺。

心臟 心外膜及心肌核均深染，胞漿淺。心內膜則胞核胞漿均深染。

血管 內皮細胞核染色極深，胞漿則淺，中層及外層核均深染，胞漿中度，毛細血管胞核極深，胞漿中度。

氣管 纖維彈力層核中度染色，纖維淺，其他細胞核深染，胞漿淺。

肺 肺泡上皮與中間組織核均深染，胞漿淺，肺膜胞核染中度，胞漿淺。

食管 複層鱗狀上皮深層胞核深染，生發層達極度，固有膜胞核深染，胞漿則淺，粘液腺與平滑肌核染中度，胞漿較淺，結締組織核深染，纖維則淺，漿膜染中度。

腺體胃 上皮核染中度，胞漿極淺，腺細胞中度染色，基底膜極深，平滑肌染中度，漿膜染色淺。

砂囊 角質膜染色淺，腺組織深染，胞漿淺，結締組織核中度，胞漿淺。平滑肌淺染，腱質胞核深染，胞漿較淺，漿膜染色淺。

小腸 絨毛核深染，游離面亦然，腺細胞與結締組織核染中度，胞漿較淺，平滑肌淺染，漿膜中度(圖4)。

盲腸 粘膜及淋巴組織核染色深，胞漿極淺，腺細胞染中等度，平滑肌淺，結締組織與漿膜核染中度，胞漿較淺。

大腸 粘膜與腺細胞核染中度，胞漿極淺，平滑肌染色淺，結締組織核染色深，胞漿較淺，漿膜中度染色。

肝 網狀內皮染色極深，網質纖維極為清晰，其他細胞核染中等度，胞漿較淺。

胰 腺細胞核染中等度，胞漿淺，Langerhan 氏細胞及中間組織染色稍深。

松果體 室管膜染色特深，數種島細胞無明顯差別，主質中度染色，軟腦膜胞漿較深。

腦下垂体 纖維囊中度染色,核稍深,血管僅內皮与周圍蜂窩組織中度染色,神經纖維中度染色,結締組織核与纖維均染色極深。

垂体遠側部 所有三种不同的細胞核均染中度,胞漿淺。

垂体神經部 室管膜細胞与垂体細胞核及胞漿均染色淺。

甲狀腺 腺細胞核深染,胞漿則淺,分泌物亦淺,結締組織核染中度,纖維較淺。

胸腺 胸腺細胞及 Hassall 氏細胞核均染中等度,胞漿極淺,基質亦淺。

腎上腺 皮質細胞核深染,胞漿則淺,髓質細胞核染中度,胞漿淺,基質染中等度。

脾 白髓中心的淋巴母細胞較周圍染色較深,結締組織核染中度,胞漿較淺。

腎 近曲管細胞漿較之腎小管其他部分染色為深,尤其刷狀邊緣染色最深,結締組織纖維染色極深,所有其他細胞核均染中度,胞漿極淺。

Fabricius 氏囊 上皮与腺細胞核均染中度,胞漿較淺,淋巴組織与平滑肌淺染,漿膜染中度。

睪丸 纖維囊与基質均深染。Sertoli 氏細胞核染中度,胞漿淺,原精子核染色較深,精子头部染中度,尾極淺。

輸精管 上皮細胞核染中度,胞漿未着色,結締組織染中度。

卵巢 濾泡細胞核染中度,胞漿較淺。卵黃淺染,基底膜染色清晰,結締組織染中度。

輸卵管 (1) 漏斗: 刷狀邊緣染中度,上皮細胞核淺染,核仁染色清晰,胞漿深染,粘膜下組織幾不染,平滑肌核淺染,胞漿更淺,漿膜幾未染。(2) 蛋清分泌部分: 上皮細胞核淺染,胞漿更淺,腺細胞漿中的粗大分泌顆粒淺染,淋巴細胞核淺染,胞漿幾未染。平滑肌近於未染,漿膜淺染。(3) 蛋殼形成部分: 上皮細胞僅核仁淺染,腺細胞漿中的粗大分泌顆粒淺染,平滑肌及漿膜幾未染。

(ii) 瘤腫組織:

Rous 氏 1 号肉瘤 瘤細胞核自淺至深染色不等,胞漿幾未染,生長旺盛部分染色較深,壞死部分幾不染。酶在胞核中的部位主要在核仁及核膜,基質胞核深染,纖維極淺。

Campbell 氏纖維肉瘤 大部分細胞均未染色,少數主質細胞中度染色。

GRCH/15 (双苯萘誘致之纖維肉瘤) 此种瘤似不富含鹼性磷酸酶,瘤細胞核染中度,胞漿較淺,基質淺染。

偶發性纖維瘤 瘤細胞中僅核仁淺染，基質核亦淺染。

偶發性組織細胞肉瘤 僅瘤細胞小核淺染，胞漿幾不染，纖維囊深染，血管內皮細胞，中層胞核及靠近血管的淋巴細胞均深染。

偶發性腺癌 瘤細胞核深染，胞漿極淺，間質細胞核及纖維均深染。

偶發性淋巴細胞瘤 瘤細胞核染中度，胞漿較淺，間質僅胞核染中等度。

偶發性纖維平滑肌肉瘤 瘤細胞核淺染，胞漿更淺，間質胞核及纖維染中度（圖6）。

二. 生物化學的研究

本項研究中所用生物化學定量方法主要根據 Kay-Graham 二氏的測定牛乳中鹼性磷酸酶含量的“長時間法” (Elsdon 与 Walker, 1942)^[8]，及 Gutman 与 Gutman 氏 (1940)^[9] 測定血清中酸性磷酸酶的方法，反應液色澤濃度用 Hilger “Spekker” 吸收計 (absorptiometer) 測量，用 Ilford 606 號黃色濾光板及 Chance 氏 “Calorex” 吸熱濾板過濾光線。

用純酚水溶液作出相當於酸性及鹼性基質溶液色澤深度的圖表為二直線如曲線 1：

每一份欲測定的新鮮組織準確秤取 0.2 公分，加少量純石英砂 (No. 6089 A.L. Curtis Westmor Laboratory, Chatteris) 在玻璃研鉢中研磨，加 10 毫升蒸餾水混勻後，靜置半小時，然後用 Whatman 1 號濾紙濾過，取濾液 0.5 毫升 (1:50)

加 19.5 毫升蒸餾水稀釋成 1:2000，最後取 2 毫升稀釋液加入 10 毫升基質液中放入 37°C 溫箱孵育 22 小時，用剩的組織抽提液保存於 0°C 冰箱中留供次日加入對照管以做對比用。

酸性磷酸酶測定用基質液配製法如下：

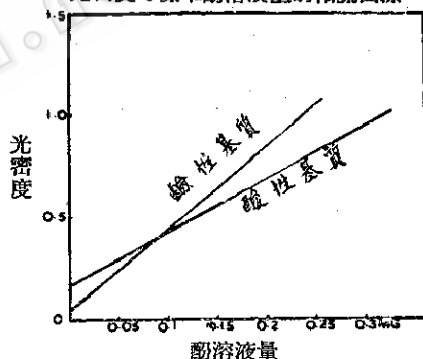
甲液 溶解 1.092 克磷酸酚二鈉於 500 毫升蒸餾水中 (0.005 M)。

乙液 溶 42.0 克結晶枸橼酸於蒸餾水中，加 376 毫升 1N 氫氧化鈉，加蒸餾水使總量成 1 公升，盛於密閉玻璃瓶中放入 0°C 冰箱備用。其 pH 用酚甲酚綠標準比色管比較為 5.0。

臨用時將甲、乙二液等量混和。

測定鹼性磷酸酶用的基質液配合法相同，但用巴比妥緩衝劑 (pH 9.4) 代替前述

光密度與標準酚溶液量的相關曲線



的 0.1M 枸橼酸緩衝劑 (pH 5.0)。法將 11.54 克巴比妥鈉溶於 500 毫升蒸餾水中, 盛於密閉玻璃瓶中放入 0°C 冰箱保存, 臨用時加入等量磷酸酐二鈉溶液。

測量磷酸酶的一般手續如下:

(1) 每 10 毫升基質液加氯仿 3 滴及 2 毫升組織抽提液 (1:2000), 与另一不加組織抽提液的基質液对照管同時放入 37°C 溫箱中孵育 22 小時。

(2) 孵育後, 將各試管同放冰箱中冷卻 20 分鐘, 然後每管加 4.5 毫升稀釋的 Folin-Ciocalteu 氏試劑 (用前用蒸餾水稀釋至 1:3)。

(3) 混和均勻後, 每管取 10 毫升, 各加 14% 無水碳酸鈉溶液 2 毫升。

(4) 立即將各試管放入沸水中 2 分鐘。

(5) 然後在流水中冷卻, 用蒸餾水對比在吸收計中讀出其色澤濃度。

(6) 由磷酸酐二鈉中因酶的作用而放出的酐量按標準圖計算出之。

例如: 0.1 毫克酐在酸性基質液中的色澤濃度為 0.256。2 毫升 1:2000 正常雞肝抽提液在酸性基質液中經 22 小時孵育後的色澤濃度為 0.708。則相當於 $\frac{0.1 \times 0.708}{0.256} = 0.2765$ 毫克酐。

因此, 每 1 克新鮮肝中酸性磷酸酶經孵育 22 小時後, 必可使基質分解出 276.5 毫克的酐。

各種正常與腫瘤組織的定量結果, 總結於表 1, 2, 3:

表 1. 正常 6 星期雛雞 18 種不同器官內酸性与鹼性磷酸酶的活動性

器 官	酸 性 磷 酸 酶				鹼 性 磷 酸 酶			
	每 1 克組織在 37°C 孵育 22 小時 所釋出酐的毫克數				每 1 克組織在 37°C 孵育 22 小時 所釋出酐的毫克數			
大 腦	80.5				19.37			
小 腦	138.6				15.3			
垂 體	170.2				191.2			
甲 狀 腺	120.3				12.2			
副 甲 狀 腺	47.96				44.96			
胸 腺	189.4	110.9				5.26		
胰 腺	207.8				8.1			
腎 上 腺	98.4				18.6			
心 臟	94.9				98.0			
肺	87.5	42.5	46.5	52.3	11.0	11.24	7.65	
脾	210.5	337.1	215.6	299.6		7.65	6.45	
骨 髓	109.7	100.0	111.3	90.2	20.8	7.4	11.8	7.6

腎	94.1	201.9	107.4	163.6		97.1	187.5	114.5	80.8
睪丸	125.7					68.9			
腺體	112.1					35.4			
十二指腸	257.8					92.1			
肝	276.5	273.8	185.9	317.9		102.2	126.07	45.4	66.7
肌肉	85.9		17.5	22.6		8.3			11.0

表 2. 患有 GRCH/15 腫瘤雞的各种組織中酸性与鹼性磷酸酶的活動性

組 織	酸 性 磷 酸 酶			鹼 性 磷 酸 酶		
	每 1 克組織在 37°C 孵育 22 小時 所釋出酚的毫克數			每 1 克組織在 37°C 孵育 22 小時 所釋出酚的毫克數		
腫 瘤	178.0	76.6	平均 127.3	14.2	15.8	平均 15.0
肌 肉	90.6	98.8	94.7	0.109	4.1	2.104
肝	198.0	228.9	213.4	9.8	24.4	17.1
肺	122.0	101.9	111.9	4.5	18.4	11.4
脾	383.2	310.5	341.8	3.5	5.5	4.5
腎	205.8			40.4		
骨 髓		121.1			3.5	

表 3. 患有 Rous 氏 1 号肉瘤雞的各种組織中酸性与鹼性磷酸酶的活動性

組 織	酸 性 磷 酸 酶			鹼 性 磷 酸 酶		
	每 1 克組織在 37°C 孵育 22 小時 所釋出酚的毫克數			每 1 克組織在 37°C 孵育 22 小時 所釋出酚的毫克數		
腫 瘤	9.75	24.6		1.55	0	
肌 肉	27.5	41.4		6.3	3.3	1.91
肝	293.6	332.4	116.4	96.5	83.7	10.47
肺	59.5	72.6		22.6	2.8	
腎	128.8	178.1	139.8	79.3	123.6	105.02
骨 髓	65.0	159.3	46.8	15.4	21.3	4.06

討 論

在任何有關酶的組織化学工作中均应考慮到人為結果的問題。过去文献中对此問題曾有極詳盡的討論,且曾舉出不少避免酶的瀰散的方法 (Danielli)^[10], 在 Gomori 氏法中因蛋白質一開始即被固定於組織中的一部分故不應有瀰散作用的發生。

Ruyter 与 Neumann 二氏^[11]曾建議切片不必脫蜡,逕直放入基質液中孵育,以免在脫蜡及孵育过程中引起可溶性酶的瀰散。但作者試用其法,結果不佳。因如不脫蜡,組織中的酶極難与基質液接觸,極不利於水解作用的進行,所以直至目前一般均

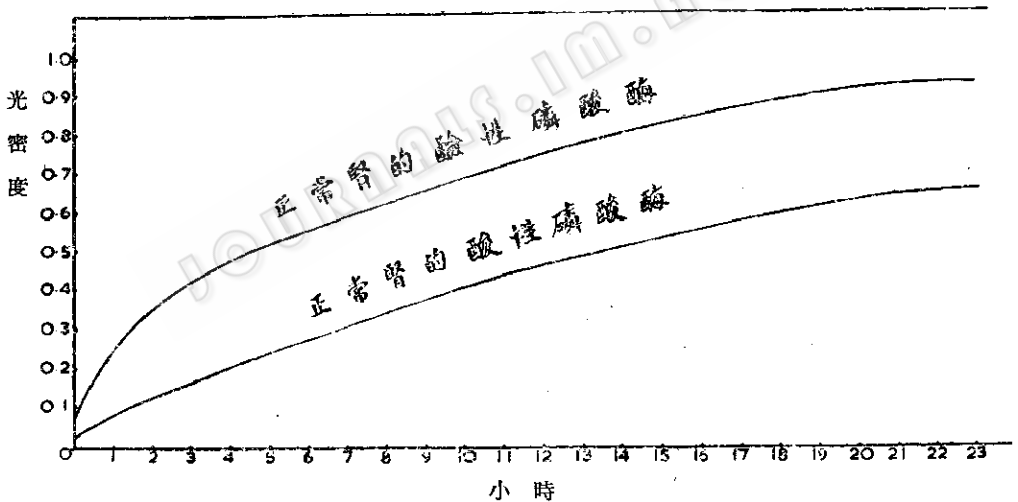
承認 Gomori 氏方法可靠，由組織切片中酶分佈界線的清晰一點觀之即可証明。

如將組織切片垂直浸入基質液孵育，常可發現酶的活動最旺盛的部位常為靠近基質液表面之處。據推想氧的分子壓可能與酶的作用速度有關，因此改將切片粘附於蓋玻片上，水平浸入基質液果然使結果大有改進。

其次考慮到酸性与鹼性磷酸酶的穩定性。一般言之，此二種酶較多種其他的酶為穩定，酸性磷酸酶在水溶液中較鹼性磷酸酶為穩定，據推想後者之所以較不穩定可能由於輔酶與蛋白質分離之故。據作者經驗在無菌狀態下將組織抽提液放置 0°C 冰箱中兩星期之久，其 pH 亦不變更。本項工作中酶的定量均儘可能應用最新鮮的組織抽提液，且在標準情況下操作，故可不必顧慮到酶的分解。

為了測驗基質液的濃度與孵育時間長短的相互關係，將 24 管相同的試驗液同時放入 37°C 溫箱，然後每隔 1 小時取出 1 份測定。用腎磷酸酶測出的作用曲線見曲線 2。一般言之，孵育 22 小時以後，無論酸性或鹼性磷酸酶的濃度均趨於定值。

光密度與孵育時間的相關曲線



吾人對磷酸單酯酶的作用所知極少，此一類酶可水解磷酸的單酯，而鹼性磷酸酶即一般所說的血或骨磷酸酶與核苷酸酶類似，可從核苷酸中分解出磷酸鹽。本文引言中曾舉出不少討論此類酶作用的假說，事實上磷酸單酯酶的生理作用尚亟待進一步研究，任何組織化學的或生物化學的發現均有其一定的價值。

在此一系列的工作中，組織化學的觀察儘可能地用定量方法作為對比，並未發現任何大的差異。不少事實証明酸性与鹼性磷酸酶確與生長及分化有關，所有細胞積極分生之處，如皮膚的生發層，食道上皮的基底層，腸粘膜等處均富含酶。原始的卵巢

濾泡中酸性磷酸酶的活動微弱，但漸近成熟時則酶活動大量增加（圖 2）。但鹼性磷酸酶分佈則無此等差異。值得注意的是，在急速增生的瘤腫內，分裂中的染色體含有大量酸性磷酸酶，此種現象亦見於腸粘膜。

其他含有大量酶的器官為輸卵管，尤其分泌蛋殼部分鹼性磷酸酶極為活躍，腎小管的刷狀邊緣也富含鹼性磷酸酶。腦的運動神經節細胞含有大量活動的酸性磷酸酶（圖 1），但鄰近的神經節細胞則含量極少，吾人知所有神經節細胞並非同時興奮，此種現象可說明酸性磷酸酶與神經細胞的活動性有關。

本工作中有若干發現與前人發現不甚一致之處，列舉如下：

據姚鑫氏 (Yao)^[12]：“在果蠅胚胎發育期間酸性磷酸酶至少在細胞化學上未見活動性的變化；至於鹼性磷酸酶則在胚帶收縮後始開始出現，活動性逐漸加強，後又復降低。”據 Moog 氏^[13,14]：在雞胚胎發生期間情形稍有差異，在早期酸性磷酸酶遠較鹼性磷酸酶為強，但在 2 至 12 天的雞胚，酸性磷酸酶活動性的變化卻遠不及鹼性磷酸酶在同一時期內之顯著。又據 Lindeman 氏^[15]，雞胚視網膜中酸性磷酸酶的活動性自孵育第 12 天起直至孵化後 100 天遠較鹼性磷酸酶者為穩定。此種發現顯然與本項工作中觀察所得者不同，但可能由於胚胎發生中酶的作用與卵的成熟期中者不同，需要進一步定量的研究。

Wolf, Kabat 與 Newman^[15]三氏報告，脾小體中的酸性磷酸酶較之紅髓中為少，而食道的複層鱗狀上皮中幾不含酸性磷酸酶，但在本項工作中未見脾小體與紅髓中之酸性磷酸酶含量有顯著差異，而食道上皮的生發層含酸性磷酸酶相當豐富。此點可能由於哺乳類與鳥類此等細胞在化學上有基本的差異之故。

據 Kabat 與 Furth^[16]：“某些哺乳動物與雞的大腸上皮細胞未見鹼性磷酸酶反應，僅靠近腸腔的少數細胞有之。”但據本人觀察則雞的大腸上皮含有相當豐富的鹼性磷酸酶。

在同上文獻中又云：“膽管與肝細胞不含磷酸酶或極少，雖然偶見若干細胞顆粒散在切片中但並不在某種細胞中。”但作者在雞的膽管與肝細胞中確見有中等量的鹼性磷酸酶。

在同一文獻中又云：“一年青成年人的甲狀腺上皮不含磷酸酶”。但在雞甲狀腺上皮細胞核中鹼性磷酸酶相當豐富，胞漿中較少。

一般說來，鹼性磷酸酶出現於結締組織間質中或器官的基底膜中，而酸性磷酸酶則主要在胞核中，所可異者在患有 GRCH/15 肉瘤的雞肝中雖然常併發彌散性的小

葉間硬化(圖 9), 而其鹼性磷酸酶含量則顯然較正常雞肝為少(正常雞肝平均含 85.0 單位, 而患 GRCH/15 肉瘤的雞肝僅含 17.1 單位)。

當胸部患有迅速生長的大腫瘤時, 如有壞死組織則其有毒產物可能引起肝臟的損傷, 但事實上 GRCH/15 肉瘤並不似 Rous 氏 1 号肉瘤之易於發生出血及壞死, 但後者寄主的肝臟卻並不見硬化病變的發生。GRCH/15 肉瘤為一種化學物質(雙苯蒽)所引起, 但自從 1935 年由 Peacock 博士初次引起生成之後, 曾在雞體傳代多次似不可能因原用化學物質而使肝受損。

Rous 氏 1 号肉瘤為傳染性病毒所引起, 可能在代謝過程中與 GRCH/15 根本不同, 雖然常有出血及壞死, 但其壞死組織所產生的毒素並不損傷肝臟, 因此推想 GRCH/15 肉瘤必有一種特殊的代謝產物生成。

多種不同的肝臟障害均可使血清中的鹼性磷酸酶增多。在大鼠的肝瘤中酶的含量增加 (Greenstein, 1947, 219 頁)^[7], 此一現象曾被解釋為鹼性磷酸酶通常由造骨細胞生成, 通過胆汁排泄。肝機能的障害使排泄受阻, 因之血清中酶的濃度增加。假使這種觀點正確, 則極難解釋患 GRCH/15 肉瘤雞肝硬化者, 鹼性磷酸酶含量減少的理由。遺憾者為血清中磷酸酶的含量未經測定, 但由患 GRCH/15 肉瘤雞、骨髓、脾等造血器官中酶含量反較正常略為減少一點觀之, 血清中酶含量當必不至升高。

正常雞肝常為暗棕色, 軟而脆弱, 肝細胞索間結締組織極少。患 GRCH/15 肉瘤雞肝青紫, 堅硬腫大, 結締組織含量增多, 將肝細胞分成多數小堆(圖 9), 在高倍鏡下觀察, 可見這些肝硬化的肝細胞核仁體積大小懸殊, 極多新生膽管出現於增生的結締組織中, 所有中央靜脈及血竇均充血, 常伴有黃色漿液性腹水。在具有轉移性 GRCH/15 肉瘤的肝切片中常見鹼性磷酸酶局限於少數肝小葉的中央靜脈周圍(圖 8), 在正常肝臟, 酶均勻地散佈於整個器官中。

在正常肝細胞的每一核中均可見中等量的酸性磷酸酶, 在患有 GRCH/15 肉瘤的硬化肝中, 轉移瘤周圍受壓縮的區域中, 酸性磷酸酶的活動性減弱(圖 7)。

因鹼性磷酸酶在磷化作用中極為重要, 而肝又為起這些作用的重要器官, 在硬化的肝, 這些作用必受嚴重影響。

在患有 Rous 氏 1 号肉瘤的雞肝組織構造基本正常, 而鹼性磷酸酶含量亦與正常雞肝近似。

總 結

1. 正常 6 星期雛雞的 18 種不同的組織與患腫瘤雞的各種組織均經用組織化學及生物化學方法研究其酸性與鹼性磷酸酶的分佈情形及其含量。
2. 用改良的 Gomori 氏法，將組織切片粘附於蓋玻片上平浸於容有基質液的 Petri 氏皿內，對研究酸性與鹼性磷酸酶的組織化學分佈狀況可得較佳結果。
3. 經多次試驗得知對酸性磷酸酶的組織化學研究，以孵育 18—20 小時為最佳，而對鹼性磷酸酶 12—16 小時為最佳。
4. 酸性磷酸酶出現於幾乎所有細胞核中，鹼性磷酸酶的分佈無如此之廣，主要在器官的結締組織間質中。
5. 酸性及鹼性磷酸酶的濃度與孵育時間的相關曲線均經繪出。
6. 瘤腫的惡化程度與酸性及鹼性磷酸酶的含量無明顯關係。
7. GRCH/15 肉瘤的鹼性磷酸酶活動性較之宿主除肝及腎以外其他器官的酶活動性為高。Rous 氏肉瘤的酸性磷酸酶活動性較之宿主其他器官者為低。
8. 患 GRCH/15 肉瘤（雙苯蒽所引起）雞常併發肝硬化，此等肝的鹼性磷酸酶含量減少極多，其理由曾加以討論。
9. 對磷酸單酯酶的生理功能，由本項組織化學研究對前人學說更加以証實。
10. 本項工作中所發現事實與前人發現不一致之點，曾列舉並簡單討論。

參 考 文 獻

- [1] Suzuki, Yoshimura and Takaishi, *Tokyo Imp. Univ. Coll. Agric. Bull.*, 7:503. 1907.
- [2] Edlbacher, S. and Kutscher, W. *Zisch. f. physiol. chem.*, 199:200. 1931.
- [3] Wienbeck, Hoppe-Seylers *Z. Physiol. chem.*, 219:164. 1933.
- [4] Macfayden, *J. Exp. Med.*, 60:361. 1934.
- [5] Morii and Takabatake. *Arb. 3. Abst. anat. Inst. Kyoto*, No. 3, 46. 1932.
- [6] Horii, *Arb. 3. Abst. anat. Inst. Kyoto C. No. 4*, 10. 1933.
- [7] Носалевич, О. М. *Архив Цитологии*, 3:75. 1954.
- [8] Elsdon, G. D. and Walker, G. H. *Richmond's Dairy Chemistry*. 4th ed. Charles Griffin & Co., London. p. 327. 1942.
- [9] Gutman, F. B. and Gutman, A. B. *J. Biol. Chem.*, 136:201. 1940.
- [10] Danielli, J. F. *Cytochemistry*. John Wiley & Sons. N. Y. p. 28. 1953.
- [11] Ruyter, J. H. and Newmann, H. *Biochem. Biophys. Acta.*, 3:125. 1949.
- [12] Yao, T. *Quart. J. Microscop. Sc.*, 91:89. 1950.
- [13] Moog, F. *Biol. Bull.*, 86:51. 1944.

- [14] Moog, F. J., *Cell. Comp. Physiol.* 27-28:197, 1946.
- [15] Lindeman, V. F., *Proc. Soc. Exp. Biol.* N.Y., 71:435, 1949.
- [16] Kabat, E. A. and Furth, J., *Amer. J. Path.*, 17:303, 1941.
- [17] Greenstein, J. P. *Biochemistry of Cancer*. p. 343. Academic Press., N. Y. 1947.

PHOSPHATASES IN NORMAL AND TUMOUR-BEARING CHICKENS

YUAN, C. K.

Institute of Veterinary Biologics, Peking, China

1. 18 different tissues from normal 6-week-old chickens and various tissues from tumour-bearing chickens were studied both histochemically and biochemically for the distribution and content of the acid and alkaline phosphatases.
2. A modification of the original methods of Gomori consisting of mounting the tissue sections on cover glasses and incubating them lying flat in the substrate solutions contained in Petri dishes, gave better results for the histochemical study of both acid and alkaline phosphatases.
3. It was found by trial and error that 18-20 hours' incubation for acid phosphatase and 12-16 hours' incubation for alkaline phosphatase are the most suitable time of incubation for the histochemical study of these enzymes in chicken tissues.
4. It was found that acid phosphatase is present in nearly all nuclei. Alkaline phosphatase has not such a wide-spread distribution, occurring mainly in the connective tissue stroma of organs.
5. A correlation curve between the density and the time of incubation of acid and alkaline phosphatases of the normal chicken kidney has been plotted.
6. There is no apparent correlation between the degree of malignancy and the content of acid or alkaline phosphatase.
7. The alkaline phosphatase activity of Rthe GRCH/15 sarcoma is fairly high as compared with the activity of the host's organs with the exception of liver and kidney. The acid phosphatase activity of Rous sarcoma is low as compared with other tissues of the host.
8. The GRCH/15 (dibenzanthracene induced) tumour-bearing birds were usually found to be affected with liver cirrhosis, and the alkaline phosphatase content of the organ was greatly reduced. The reason for this is discussed.
9. Some of the suggested physiological functions of the phosphomonoesterases received further confirmation in the present histochemical study.
10. Discrepancies between the present findings and those recorded by previous workers have been mentioned and discussed briefly.