

组织化学

ZUZHIHUA XUE

人民卫生出版社

組 織 化 学

(增訂第二版)

〔英〕A. G. E. 皮尔斯 著

馬仲魁 郑仁风 赵宗誠 王 炎 譯
文历东 郭声华 郭連魁

李肇特 史少頤 楊亨利
赵宗誠 文历东 李元敏 校
刘雪桐 张守仁 馬文华
馬立人 朱 启 洪松芳

人 民 生 活 出 版 社

一九六五年·北京

內 容 提 要

本书为 A. G. E. 皮尔斯著 Histochemistry Theoretical and Applied, 1960 年第二版的譯本, 也是本书中文譯本(1959 年)的第二版。自原书第一版在 1953 年間世以来, 在組織化学方面有极大的发展, 新的技术和理論日有增加, 而且使用范围也日广。这一版与第一版比較, 除各章都有更新和扩充外, 有些内容如硬蛋白和淀粉样蛋白均有专章介紹; 酶化学有显著的扩大与更新; 免疫組織化学和电子組織化学也立了专章; 在新技术方面有几章专门介紹螢光显微术和放射自显影术等; 所附具体操作技术内容也增加不少。因而在形式方面, 自然也由原来的 17 章增至 29 章; 插图和彩图分别由 108 幅和 4 面增至 245 幅和 10 面; 附录由 17 个增至 27 个。实不愧为理論与实践并重的好书。

本书主要对象是組織学、細胞学、病理学和生物化学工作者, 尤其适宜于教学研究人員参考之用。

HISTOCHEMISTRY Theoretical and Applied

by

A. G. Everson Pearse
Second (Enlarged) Edition

London

J. & A. CHURCHILL, LTD.

1960

組 織 化 学

开本: 787×1092/16 印张: 49 插頁: 44 字数: 1097 千字

馬仲魁 郑仁凤 等 譯

人 民 卫 生 出 版 社 出 版

(北京书刊出版业营业許可证出字第〇四六号)

· 北京崇文区校子胡同三十六号 ·

北 京 新 华 印 刷 厂 印 刷

新华书店北京发行所发行 · 各地新华书店經售

統一书号: 14048·1727

定价: (科八) 9.50 元

1959 年 4 月第 1 版—第 1 次印刷

1965 年 3 月第 2 版修訂。

1965 年 3 月第 2 版—第 3 次印刷

印 数: 4,501 - 9,300

原著者序

自从本书第一版进行准备,并在 1953 年出版以来,组织化学的技术领域已显著扩大了。这就是我扩充本书篇幅的理由。已过的六年中,组织化学在生物学、细胞学、组织学、病理学和动物学等形态科学中的应用也同样增加了,因此对于个人而言,现时要跟上组织化学范围广阔的文献是困难的。

本书再次试图概括应用于组织切片上的全部组织化学内容,而且我也曾尽可能地试验了各个方面现有的全部方法,并否定和改进确有缺欠的方法。事情是这样作了,但其中有些方法则未经我实验室试验过,所有这些事实,也已分别在文内说明。我对每个方法都给予了详尽的理论说明和充分的评论,以澄清它的主要目的和有效范围。正文中随处都叙述了组织化学在各学科中最近应用的详细情况,并有专门的章节论述硬蛋白和淀粉状蛋白。

书中有关酶组织化学的章节已加充实,以与这方面的迅速发展一致,至于免疫组织学方法现在则专占一章。

对每章的方法本身提供的技术操作附录,得到了普遍的赞许,因而也继续保持下来。虽然附录可自成一个完整的而且是独立的单位,不过也必须预告读者,不时参阅正文可有助于他们避免因使用不适当的方法而耗费无谓的劳动。

同本书第一版的序言中一样,我无须对正文中的化学和生物化学内容加以解释了。组织化学是建立在这些科学的基础之上,只有得到这些科学的帮助,它才能不断进步。

组织化学扩展到所有可适用的领域中是必要的。它确可使形态科学转变为动态的同时是功能性的科学,这在已往几年中已逐渐表现出来了。已逐渐认识到,在已运用组织化学方法的科学中,组织化学在扩展这些科学的境界上的作用,这样的认识无疑会促使它在应用组织化学中的使用范围更加广大。如果我这本书的第二版对今后的发展能有所推动和帮助,就算我如愿以偿了。

A. G. E. 皮尔斯

(楊亨利譯)

目 录

第一章	组织化学的历史	1
第二章	冷刀及冷切片机方法	10
第三章	冷冻干燥及冷冻替代法	17
✓第四章	固定作用的化学	36
第五章	蛋白质和氨基酸	51
✓第六章	荧光抗体方法	99
第七章	一些重要单纯蛋白质的组织化学	111
第八章	核酸和核蛋白	135
第九章	碳水化合物	168
第十章	粘蛋白的应用组织化学(淀粉状蛋白)	205
第十一章	类脂、脂蛋白和蛋白脂	211
第十二章	醛和酮	245
第十三章	水解酶组织化学的原理	267
第十四章	硷性磷酸酶	281
第十五章	酸性磷酸酶	315
第十六章	羧酸酯酶	333
第十七章	糖甙酶与葡糖基转移酶	359
✓第十八章	氧化酶与过氧化物酶	372
第十九章	脱氢酶的组织化学原理	391
第二十章	黄递酶及去氢酶	413
第二十一章	肽酶及其他酶类	428
第二十二章	作为组织化学试剂的酶	438
第二十三章	色素	460
第二十四章	无机成份	494
✓第二十五章	外源性物质和各种内源性物质	521
第二十六章	荧光显微镜检查法	526
第二十七章	放射自显影术及其应用	539
第二十八章	其它物理学方法	550
第二十九章	电子组织化学	558
附录 1		563
附录 2		571
附录 3		573
附录 4		574

附录 5	577
附录 6	594
附录 7	597
附录 8	603
附录 9	611
附录 10	623
附录 11	624
附录 12	640
附录 14	645
附录 15	657
附录 16	661
附录 17	669
附录 18	674
附录 20	680
附录 21	684
附录 22	687
附录 23	689
附录 24	700
附录 25	714
附录 26	717
附录 27	720
分子量及出产商表	723
索引	733

第一章 組織化学的历史

按照 Lison 氏的看法,组织化学是“一门和组织学同样古老的科学”,一般对这个看法没有什么异议。但是,在考虑新组织化学是否继承着旧组织化学的时候,意见则有分歧。一方面我们有这样的意见,也是 Lison 在他的第一版书的前言中所提到的,认为现代组织化学与一百年前的组织化学根本不同。他说:“现代的组织化学可以说是重新建立起来的、和以前截然不同的一门崭新科学”。另一方面的意见,也是我自己所赞成的,认为组织化学的发展是一直继续下来的,其目的和原理直到今天实质上仍然和过去相同。这并不是说组织化学在发展过程中不曾有过各种各样的变更和改进。但是,组织化学的发展无论如何也不能比化学和生物化学这两门姊妹科学更快,因为组织化学要靠这两门科学的启示和指导。

这里所谈的组织化学历史概观,曾在—篇组织化学现代方法的评论文章 (Pearse, 1951) 中有过简短的叙述,意图是对于生物科学中这一门最年轻同时也是最古老的科学的沿革,提供一个真实的概貌。作为绪论,下面列出一个历史简表,当然此表是很不完全的,但它可作为一个线索,把以后举出的互无联系的个别参考文献连贯起来。

- 1800—29 有些研究组织标本中化学结构的零星报告,同形态学的研究相对应。组织化学尚未成为—门独立科学。
- 1830—55 这是组织化学作为—门科学问世的年代,其发端起源于植物学;这几十年间,组织化学的运用实际上是集中在植物学家们的手中。这个时期在这方面出版了几种著作: Raspail 著 “Essai de Chimie Microscopique Appliquée à La Physiologie”, 1830 和 “Nouveau Système de Chimie Organique”, 1833; Lehmann 著 “Lehrbuch der physiologischen Chemie”, 1842; Raspail 著 “New Systeme of Organic Chemistry”, 1834(译本)。
- 1856—71 动物方面的组织化学同植物组织的相反,在这个时期中主要为生物化学,大多数方法对组织都有破坏性。具有这样面貌的组织化学教科书开始出现了,其中有一些是翻译早期的著作: Lehmann 著 “Physiological Chemistry”, 1851(译本); Robin 和 Verdeil 著 “Traité de Chimie Anatomique”, 1853; Schlosberger 著 “Chemie der Gewebe des gesammten Thierreichs”, 1856; Sachs 著 “Handbuch der Experimental Physidogie der Pflanzen”, 1865; Frey 著 “Handbuch der Histologie und Histochemie des Menschen”, 1867。
- 1872—98 在这个阶段,组织化学分成两部分,一部分脱离了组织学,归并于生理学;另一部分仍为生物化学。在这个时期出版的论著有: Miescher 著 “Ein Beitrag zur Histochemie”, 1874; Frey 著 “Histology and Histochemistry of Man”, 1874(译本); Lehmann 著 “Traité de Chimie Physiologique”, 1883(译本); Bunge 著 “Lehrbuch der physiologischen und pathologischen Chemie”, 1887。

- 1899—1929 在这个期间,苯胺染料在组织学上的应用普遍推广开来。苯胺染料的应用是1862年 Bencke 最先记述的。二十世纪的前二十五年中,叙述组织病理学有了迅速发展。组织学家们对新的染料和染色技术越来越感兴趣,而对组织结构的化学就比较冷淡。尽管有许多新的颜色反应在诊断上已经具有重要意义,但并没有人打算把它们建立在物理学和化学的基础上。形态学的研究超过组织化学的研究, Mann (1902) 曾轻率地声言:哺乳动物显微解剖学的研究,到1900年,已经“几近于完成”。这个时期有三部记述显微化学和显微生理学的著作: Mann 著 “Physiological Histology” (1902); Ehrlich 著 “Encyclopädie der mikroskopischen Technik” (1903); 还有 Macallum 著 “Methoden und Ergebnisse der Mikrochemie” (1908)。这些都是经典著作。Prenant (1910) 在一篇有价值的论文中评述过组织化学的一般状况; Molisch 著 “Mikrochemie der Pflanzen” (1913) 中记述了不少组织化学和细胞化学的材料。在这个时期末出版的、说明组织化学发展的其它著作有: Parat 著 “Review of Recent Developments in Histochemistry” 1927; Patzelt 著 “Animale Histochemie” 1928; Klein 著 “Practicum der Histochemie” 1929; Hertwig 著 “Histochemische Methoden” 1929。
- 1930—44 这是组织化学复兴和组织化学一部分回到组织学领域中来的阶段。这个时期最重要的著作是 Lison 著的 “Histochemie Animale” 1936, 作者在书中宣布了不使组织破坏的新组织化学的诞生。这本书对组织化学的发展和运用所发生的影响,是无法估量的,直到1953年其第二版在广大地区出版时仍是基础科学所有领域中组织化学家们所公认的权威著作。其它虽较次要、但属优秀的著作有: Chamot 和 Mason 合著的 “Handbook of Chemical Microscopy” 1930; Romeis 著 “Histochemische Methoden” 1932; Policard 和 Okkels 合著的 “Die Mikroveraschung als histochemische Hilfsmethode” 1932; Lindström-Lang 著 “Problems in Histochemistry” 1936。
- 1945—56 这个时期的第一部著作是 Glick 著 “Techniques of Histo- and Cyto-chemistry” 1949。这本书简要地说明了与组织学家们有关的组织化学理论和方法。书中从生理学、物理学和组织学的角度评述了组织化学的全貌,其中也有许多专门的技术方面的知识。其后不久,出版了四部著作,其中大部分或全部都是属于组织化学的。按照出版的先后顺序计有: Gomori 著 “Microscopic Histochemistry” 1952; Danielli 著 “Cytochemistry” 1953; 本书的第一版1953和 Lison 著的 “Histochimie et Cytochimie Animales” 第二版, 1953。Bourne 著 “Functional Histology” 1953 一书,虽然不是一本组织化学的书,但是大部分内容是有关组织化学技术的应用的,而 Lillie 的第二版,用了新的书名 “Histopathologic Technic and Practical Histochemistry” 1954,虽然只有一部分内容涉及到组织化学,但也是一本重要的组织化学著作。Vialli 在他的著作 “Introduzione alla Ricerca in Istochimica” 1955 中,对现代组织化学作

了鼓励和批评性的评论,讨论了组织化学许多方面的优点和缺点。Mellor 著的“Analytical Cytology”, 1955, 是许多学者合著的、关于各种类型的显微镜及其使用的一本著作,给现代组织化学发展前途提供了依据。还有 Eränkő 著“Quantitative Methods in Histology and Microscopic Histochemistry”, 1955。这两部著作特别着重于组织化学的定量方面,将来的发展同这个方面的进展有密切的关系。组织化学的发展虽快,但直到 1950 年止,还没有专门属于这方面的杂志或期刊,而现在已有不下于七种。如果把登载许多组织化学和细胞化学论文的刊物也计算在内,则数目还要更多。组织化学和细胞化学的主要杂志按发刊年代可以举出以下几种: Experimental Cell Research 1950; Journal of Histochemistry and Cytochemistry 1953; Acta Histochemica 1954; Journal of Biophysical and Biochemical Cytology 1955; Rivista di Istochimica 1955; Annales d'Histochimie 1956; Histochemie 1958。

在总题为“显微化学发展史”的许多论文中, Harms(1931~1932)详细说明了法国药学家、植物学家兼显微镜学家 François-Vincent Raspail (1794~1878) 在组织化学方面的工作。他得出的结论是:应该认为 Raspail 是显微化学这门科学的创始人,这也得到其他有权威的评论者的支持。Baker(1943, 1945) 在 Quekett Microscopical Club 出版的一本专论中和在他的细胞学技术一书的第一版中有进一步的看法。他还认为 Raspail 是组织化学的真正创始人。他提出的这一称号,我认为是无可争辩的。最先对显微组织化学这门科学提出明确的评论的,无疑是出自 Raspail 之手(1825a 和 b, 1829)。这位学者陈述了他自己的四个原理(Harms 曾全部引证, 1931; Baker 也部分引证, 1943)后,就专心研究一种植物名叫 Graminaeae 的花和果的受精过程。在这个研究中,他所用的最重要反应就是碘淀粉反应,这是 1814 年 Colin 和 de Claubry 及 Stromeyer(1815)最初提出的, Caventou 1826 年曾用于淀粉的显微研究中。Raspail 和 Caventou 两位究竟是谁先在组织化学上使用了碘溶液,还不能肯定,然而这一点并不是最重要的问题,因为 Caventou 以后未曾继续作过更多的组织化学研究。与此相反, Raspail 却发现并应用了许多其它组织化学反应,直到今天还是很重要的。1829 年,他使用过蛋白黄色反应显示蛋白质、盐酸(糠醛)反应显示碳水化合物,后一反应即一般熟知的 Liebermann 反应(1887);在动物组织化学中现在已不使用了。他用硫酸在植物组织中显示蛋白质的存在,其实他所用的就是鉴定色氨酸的醛法,这个方法在他以后经过许多研究者修改,就是目前仍用于组织化学中的 Voisenet-Fürth 反应。根据 Reichl(1889)的材料, Mikosch 曾用过这种苯亚甲基缩合反应,用苯甲醛、硫酸和硫酸铁的混合物来证明植物组织中的蛋白质。现在一般都把烧灰显微法的发明归功于 Raspail (在 1829 年,根据 Baker)。他也是使用指示剂染料测定原生质 pH 的第一个人,他用从地中海地区出产的一种植物(甘遂)中取得的石蕊为指示剂。这个染料平时为蓝色,在酸性溶液中变成粉红色。

与 Raspail 的这些发现几近同时,还有另外几位植物学家发表了真正组织化学反应的论文。其中有 Mohl(1831)对碘反应的研究和 Schleiden(1838)对碘-硫酸反应的研究。但是,除了植物学上的研究以外,组织化学的发展是很慢的,甚至从最广泛的意义来说,到

1860年以前,能够称作组织化学的研究也极为有限。在一些最古老的方法中,应该提到铁的显示法,这些方法多是由 Vogel(1845, 1847)的工作中脱胎而来,他用氨的黄色硫化物把组织中的铁变成黑色硫化铁。1867年 Perls 介绍了他的普鲁士蓝检查铁的方法,这个方法直到如今还在使用。继 Peals 之后,Quinke 在 1868 年应用了 Vogel 的硫化物法,这个方法一直保留到目前而无改变。1844 年 Millon 叙述了他的蛋白质反应,但是 1853 年 Hoffmann 指出,这个反应实际上是一个测定酪氨酸的方法。虽然 Payen (1843) 已用硝酸亚汞显示植物组织中的含氮物质,但是 Millon 反应在 1888 年以前并未用于组织化学中(1888 年,Leitgeb 使用)。叶绿体中淀粉的定位,最先载于 Sachs(1887)著“植物生理学”的专论中。

1850 年 Claude Bernard 完成了一项有名的实验,不过在 1859 年以前并未发表过。他给狗注射乳酸铁和亚铁氰化钾,检查有酸存在时反应产物-普鲁士蓝的定位不仅在胃腺中,而且在胃粘膜表面也有。这种体内实验的方法确属生理学的范围,不过这个特例也应算是组织化学之内的。同在 1850 年, Schulze 首先发表了他测定纤维素的氯-锌-碘法。现时仍在使用的这个方法,是 Fürnrohr(1850)记述的。

使用酶消化组织的方法,最初是 1861 年 Beale 报导的,他用胃液从他所研究的神经纤维中除掉不需要的组织。这个方法本身其实是显微解剖学的方法,但是到十九世纪的末期已发展成为一种公认的技术,即酶析法(Kossel 和 Mathews, 1898)。

证明组织中酶的存在是从 Klebs(1868)和 Struve(1872)的工作开始的,他们都指出愈创木酯的酒精制剂(tincture of guaiac)同胺作用时能生成蓝色,这是确定组织中有过氧化物酶存在的第一次记录,现在普遍承认白血球的颗粒中有此酶存在。Brandenburg (1900)首先证明白血球颗粒中过氧化物酶的反应。细胞色素氧化酶是 Ehrlich(1885)第一个显示出来的,不过当时并不叫这个名字。他在活体内完成了“纳笛”反应(“Nadi” reaction)(373 页),把 α -萘酚(α -naphthol)和对苯二胺(p -phenylenediamine)注入动物体内,在有“纳笛氧化酶”存在的部位观察靛酚蓝(indophenol blue)的生成。

除了上述若干方法外,在 1856~98 年期间,还提出了许多其它组织化学方法。1868 年 Heidenhain 指出,动质——分布于分泌腺细胞底部的一种强嗜硷性物质——中含有一种可被醋酸沉淀的物质。这种物质就是现在已知的核糖核酸。1870 年,他发现肾上腺髓质的某些细胞用铬酸处理时呈现棕色,这种现象现在叫做嗜铬反应。按照 Lison 的意见,这个反应是 Henle 在 1865 年发现的。在这个时期,利用酶消化组织的有: Miescher(1871)用胃蛋白酶从细胞浆中分离核; Stirling(1875)用胃液的消化作用分离弹性纤维。从现代的观点上来看,这两个工作已很难认为是组织化学的方法,但是它们足以说明,当时的许多组织化学研究工作中具有的破坏性。这也正是促使 Lison 把新的非破坏性的组织化学与旧组织化学分开的理由。

1873 年, Miescher 利用核染色质对甲基绿的选择性亲和力,分出了核染色质;而在 1878~79 年, Ehrlich 观察到热凝结作用可使血红蛋白对硝基染料的亲和力增加。Ehrlich 的工作得到现代的响应,研究变性对于染料或组织化学试剂同组织蛋白中特殊基因的结合发生的影响。在这同一时期(1856~98),从 Benke(1862)把苯胺染料用于组织学

上以后,苯胺染料在一般组织学上广泛应用开来。这是组织学方法上的一个革命,但也给组织化学的发展带来了障碍。因为,每位学者只从组织学的观点上出发,各种染料大多用来证明颜色和结构的相互关系,而未曾把这些染料的反应和可被染色的组织成分的化学性质联系起来。尽管如此,仍有几位学者为了找出各种染料如何同组织结合的真相,进行了相当多的研究。物理学的染色理论是 Witt (1890~91) 提出的,特别得到了 Fischer (1899) 的有力支持,后者根据吸附现象说明了所有染色过程。Miescher 和 Ehrlich, 还有 Knecht (1888) 都认为染色是一个化学过程。Mann (1902) 在所有这些问题上的见解是很重要的,他说:“染色的目的,第一是为了断定形态学的事实,第二是为了从微量化学上来确定我们从常量化学上已知的那些物质的存在和分布。他又说:“我们不能只满足于使用酸性或硷性染料并测定组织的硷性或酸性,或利用具有氧化或还原性的染色基,我们必须尽力找出那些染色反应,它们不只可证明如铁或磷等某些元素的存在,而且还能证明如碳水化合物、核素(nuclein)和精蛋白等有机化合物的存在”。这些话至少证明, Mann 已经发觉了这个问题,但是,组织学家们一般却很少从实际上加以解决。

有些使用苯胺染料的反应实际上就是组织化学反应,但是这些反应的意义常常是未能解释的或甚至是错误解释了的。大多数反应的意义现在仍未完全了解。例如, Cornil (1875) 最先记述的,甲基紫同淀粉状蛋白发生的异染性,就属此类。Heschl (1875) 和 Jürgens (1875) 几乎同时都研究了异染性的一般问题。Ehrlich 用含 8% 醋酸的天竺牡丹(dahlia)的饱和酒精溶液显示肥大细胞的反应,同现代使用噻嗪染料的方法甚为相似,也可以认为是一个组织化学反应。其它机理不明的一些反应有 Weigert (1884) 和 Marchi (1892) 的髓鞘染色法及 Gram (1884) 的苯胺紫法。Mathews (1898) 的清蛋白(albumin)和胨(albumose)的实验研究,以及 Saint-Hilaire (1898) 所进行的在核组蛋白(nucleohistone)方面的重要研究,都有力地支持了化学染色理论。Saint-Hilaire 在研究一个检定组织中尿酸的方法时,注意到核有时也被染色。他认为核的反应是由于有组蛋白存在的缘故。Saint-Hilaire 还指出,组织中被醋酸沉淀的核组蛋白可用稀盐酸溶液溶解开来,使组蛋白留在原位不动。这个方法的变法目前应用很广。

特别在我们所讨论的这个时期的后半期,对于原生质的性质进行了很多工作,其中尤其是 Stöhr (1882), 他根据凝结过程的研究结果,断定在胃壁细胞中有某种蛋白存在。Flemming (1882)、Kossel (1882, 1886)、Altmann (1886, 1889)、Schwarz (1887) 和 Mann (1890) 等也进行了这方面的研究。Flemming (1876) 已经说明有一种粘合质把组成疏松结缔组织束的原纤维结合起来。他认为这种物质是粘蛋白性的。Altmann (在 1889 年) 创立了冷冻干燥的固定方法,这个方法后来在 Gersh 及其继承者的手中就成了现代组织化学的一种重要工具。其他学者们继续研究了染色过程的化学性质,其中的许多工作现在仍在应用。其中具有特别价值的是 Griesbach (1886) 的工作,他认为染料与组织形成的复合物应有不同于游离基的性质; Unna (1887) 也曾试图证明这一点; 还有 Lileinfeld (1893) 对粘蛋白染色的研究。Hoyer (1890) 证明噻嗪染料(thiazinedye)在唾腺粘液细胞中的异染性,继他的发现之后,粘蛋白异染法就十分普遍了。在 Hoyer 发表他的论文以前,粘蛋白多是利用它的强嗜硷性染色的。List (1885) 第一个使用俾斯麦棕(Bismarck brown)染

粘蛋白,而Hardy 和Wesbrook(1895)使用了俾斯麦棕的酒精溶液染水溶性的粘蛋白和粘多糖。同年,Heine(1895)对染色质的性质进行了若干重要的观察。他注意到染色质的一些片段可被米伦试剂(Millon's reagent)深染,使试图用甲基绿(methyl green)和玉红S(rubin S)的混合液区别核蛋白和核酸,但未成功。同在1895年,Macallum证实,经过硫酸处理后,核就可被显示组织铁的常用方法染色。从此以后,关于铁是否真正存在于核内,还是由它处吸附而来的问题,曾经过长期的讨论。

十九世纪末年应用的酶析法,在Mall(1891)的研究中有过记述。他研究了胶原蛋白在各种溶液中的膨胀过程及粗制胃蛋白酶和胰蛋白酶对胶原蛋白的作用。此时,现代的酶析作用概念还未建立起来。1896年Daddi首次用苏丹Ⅲ(Sudan Ⅲ)在体内进行脂肪染色,使动物食入染料后,借出现的红色证明组织中的脂肪。1901年Michaelis提出用苏丹Ⅳ(Sudan Ⅳ)作脂肪染色。这位学者指出,用苏丹染料染脂肪全属物理性的作用,是由于这种惰性染料溶于脂肪的结果。

在鉴定组织中的无机盐的方法中,应该提到Molisch(1893)的方法,这是把组织铁变成红色的硫氰酸铁;还有Lileinfeld和Monti(1892)提出的显示磷酸盐的钼酸铵法,这个方法曾经Pollacci(1900)修改,以后在二十世纪中再由其他学者加以修改。de Michele(1891)显示汞的方法,是用 H_2S 把汞变为硫化汞,这是显示组织中金属盐的若干类似方法的先驱。1901年Von Kóssa记述的显示组织中钙的方法,现在我们仍在使用;甚至在此以前由Schujeninooff(1897)叙述的、更特殊的“石膏(gypsum)”法,也保留至今。

上述有关组织化学历史的简短说明,未能给予读者一个这门科学是如何不断发展的真实概念。其中至少有一部分原因是由于确实缺乏这样的继续性。虽然如此,我仍然希望我能够表明,Raspail奠定的组织化学和这位伟大学者所阐述的一些原理,从1820年到本世纪为止一直未有大的间断,而得以继续下来。当十九世纪末,大多数组织学家都致力于收集由新染色技术的发展所带来的丰富成果,而很少有人从事组织化学的工作。因此,这门科学几乎处于停滞不前的状态,仅借少数几人的工作得以残存,直到廿世纪三十年代才复兴起来。由于Lison的大作“动物组织化学”的问世,使组织化学建立在现代的基础上,作为组织学的一个独立分支确立起来。从那时以来,组织化学发展和进步很快,如今在二十世纪的后半期,可以设想,大多数组织学家都愿意在他们所从事的工作中,用微量化学的方法来确定组织中的某些物质。

(郑仁风译 杨亨利校)

文 献

- Altman, R. (1886). "Studien über die Zelle." Leipzig.
 Altman, R. (1889). Arch. Anat. Physiol. Lpz. Physiol. Abt., p. 524.
 Baker, J. R. (1943). J. Quekett micr. Cl., 4 ser., 1, 256.
 Baker, J. R. (1945). "Cytological Technique." 2nd Ed. Methuen, London.
 Beale, L. S. (1861). Arch. Med. Lond., 2, 179.
 Bencke, A. (1862). Korrespbl. Ver. Gemeinsh. Arbeiten, 59, 980.

- Bernard, C. (1859). "Leçons sur les Propriétés Physiologiques et les Altérations Pathologiques des Liquides de l'Organisme." Vol. 2. Paris.
- Bourne, G. H. (1953). "An Introduction to Functional Histology." Churchill, London.
- Brandenburg, K. (1900). *Munch. med. Wschr.*, 47, 183.
- Bunge, G. (1887). "Lehrbuch der physiologischen und pathologischen Chemie." F. C. W. Vogel, Leipzig.
- Caventou, J. B. (1826). *Ann. Chim. Phys.*, 31, 337.
- Chamot, E. M., and Mason, C. W. (1930). "Handbook of Chemical Microscopy." New York.
- Colin, J. J., and de Claubry, H. G. (1814). *Ann. Chim.*, 90, 87.
- Cornil, V. (1875). *C. R. Acad. Sci., Paris*, 80, 1288.
- Daddi, L. (1896). *Arch. ital. Biol.*, 26, 143.
- Danielli, J. F. (1953). "Cytochemistry." Wiley & Sons, New York; Chapman and Hall, London.
- Ehrlich, P. (1878~79). *Verh. physiol. Ges. Berlin*, 20.
- Ehrlich, P. (1885). "Das Sauerstoff-Bedürfniss des Organismus." Berlin.
- Ehrlich, P. (1903). "Encyclopädie der mikroskopischen Technik." Urban and Schwarzenberg, Berlin and Wien.
- Eränkő, O. (1955). "Quantitative Methods in Histology and Microscopic Histochemistry." Karger, Basel and New York.
- Fischer, A. (1899). "Fixierung, Färbung und Bau des Protoplasmas." Leipzig.
- Flemming, W. (1876). *Arch. mikr. Anat.*, 12, 434.
- Flemming, W. (1882). "Zellsubstanz, Kern und Zelltheilung." Leipzig.
- Frey, H. (1867). "Handbuch der Histologie und Histochemie des Menschen." Leipzig.
- Frey, H. (1874). "Histology and Histochemistry of Man." Trans. Baker, A. F. J. London.
- Furnrohr, R. (1850). *Flora*, 8, 641.
- Glick, D. (1949). "Techniques of Histo- and Cyto-chemistry." Interscience, New York.
- Gomori, G. (1952). "Microscopic Histochemistry." Chicago University Press.
- Gram, C. (1884). *Fortschr. med.*, 2, 185.
- Griesbach, H. (1886). *Z. wiss. Mikr.*, 3, 358.
- Hardy, W. B., and Westbrook, F. F. (1895). *J. Physiol.*, 18, 490.
- Harms, H. (1931). *Apotheker-Zeitung*, No. 90, p. 1454.
- Harms, H. (1932). *Ibid.*, Nos. 83, p. 1274; 84, p. 1293; 85, p. 1307; and 86, p. 1324.
- Heidenhain, R. (1868). *Stud. physiol. Inst., Breslau*, 4, 88.
- Heidenhain, R. (1870). *Arch. mikr. Anat.*, 6, 368.
- Heine, L. (1895~96). *Hoppe-Seyl. Z.*, 21, 494.
- Hertwig, G. (1929). "Histochemische Methoden." In von Möllendorff's "Handbuch der mikroskopischen Anatomie des Menschen." Berlin.
- Heschl, A. (1875). *Wiener med. Woch.*, 25, 714.
- Hoffmann, R. (1853). *Ann. Chem. Pharm.*, 87, 123.
- Hoyer, H. (1890). *Arch. mikr. Anat.*, 36, 310.

- Jurgens, R. (1875). *Virchows Arch.*, 65, 189.
- Klebs, E. (1868). *Z. med. Wiss.*, 6, 417.
- Klein, G. (1929). "Prakticum der Histochemie." Berlin.
- Knecht, E. (1888). *Ber. deutsch. chem. Ges.*, 21, 1556.
- Kóssa, J. von (1901). *Beitr. path. Anat.*, 29, 163.
- Kossel, A. (1882). *Hoppe-Seyl. Z.*, 7, 7.
- Kossel, A. (1886). *Ibid.*, 10, 248.
- Kossel, A., and Mathews, A. (1898). *Ibid.*, 25, 190.
- Lehmann, C. G. (1842). "Lehrbuch der physiologischen Chemie." Leipzig.
- Lehmann, C. G. (1851). "Physiological Chemistry" Trans. Day, G. E. London.
- Lehmann, C. G. (1883). "Traité de Chimie Physiologique." Paris.
- Leitgeb, H. (1888). *Mitt. bot. Inst., Graz*, p. 113.
- Liebermann, L. (1887). *Zbl. med. Wiss.*, 25, 321.
- Lilienfeld, L. (1893). *Arch. Anat. Physiol., Lpz. Physiol. Abt.*, p. 554.
- Lilienfeld, L., and Monti, A. (1892). *Z. wiss. Mikr.*, 9, 332.
- Lillie, R. D. (1954). "Histopathologie Technic and Practical Histochemistry." Blakiston Co., New York.
- Linderstrøm-Lang, K. (1936). *Arch. exp. Zellforsch.*, 19, 231.
- Lison, L. (1936). "Histochimie Animale." Gautier-Villars, Paris.
- Lison, L. (1953). "Histochimie et Cytochimie Animales." Gautier-Villars, Paris.
- List, J. H. (1885). *Z. wiss. Mikr.*, 2, 145.
- Macallum, A. B. (1895). *Quart. J. Micr. Sci.*, 38, 175.
- Macallum, A. B. (1908). *Ergebn. Physiol.*, 7, 552.
- Mall, F. (1891). *Abh. sächs. Ges. (Akad.) Wiss. Math-phys.*, 17, 299.
- Mann, G. (1890). *Trans bot. Soc., Edinb.*, 18, 429.
- Mann, G. (1902). "Physiological Histology." London.
- Marchi, V. (1892). *Arch. ital. Biol.*, 17, 191.
- Mathews, A. (1898). *Amer. J. Physiol.*, 1, 445.
- Mellors, R. C. (1955). "Analytical Cytology." McGraw Hill Book Co. New York.
- Michaelis, L. (1901). *Virchows Arch.*, 164, 263.
- de Michele, S. (1891). *La Riforma Medica*, p. 169.
- Miescher, F. (1871). *Hoppe-Seyl. med.-chem. Untersuch.*, p. 441.
- Miescher, F. (1873). *Verh. naturf. Ges., Basel*, 6, 138.
- Miescher, F. (1874). *Verh. naturf. Ges., Basel.*, 6, 138.
- Millon, A. N. E. (1844). *C. R. Acad. Sci., Paris*, 18, 1041.
- Mohl, H. (1831). *Flora*, 15, 417.
- Molisch, H. (1893). *Ber. deutsch. bot. Ges.*, 11, 73.
- Molisch, F. (1913). "Mikrochemie der Pflanzen." Fischer, Jena.
- Parat, M. (1927). *Biol. Rev.*, 2, 285.
- Patzelt, V. (1928). In "Fortschritte der Mikrochemie." Ed. Klein, G., and Strebing, R. Vienna.

- Payen, A. (1843). *Mem. Acad. Sci.*, Paris, p. 163.
- Pearse, A. G. E. (1951). *J. clin. Path.*, 4, 1.
- Perls, M. (1867). *Virchows Arch.*, 39, 42.
- Policard, A., and Okkels, H. (1932). "Die Mikroveraschung als histochemische Hilfsmethode." In Abderhalden's "Handbuch der biologischen Arbeitsmethoden." Berlin.
- Pollacci, G. (1900). *Att. Ist. bot. Univ. Pavia*, 2 ser., 6, 15.
- Prenant, A. (1910). *J. anat. Physiol.*, 46, 343.
- Quinke, H. I. (1868). Referred to in *Arch. exp. path. Pharmacol.*, Leipzig, 37, 183, 1895~96.
- Raspail, F. V. (1825a). *Ann. Sci. nat.*, 6, 224.
- Raspail, F. V. (1825b). *Ibid.*, 6, 384.
- Raspail, F. V. (1829). *Ann. Sci. Observation*, 1, 72.
- Raspail, F. V. (1830). "Essai de Chimie Microscopique Appliquée à la Physiologie." Paris.
- Raspail, F. V. (1833). "Nouveau Système de Chimie Organique." Paris.
- Raspail, F. V. (1834). "A New System of Organic Chemistry." Trans. Henderson, W. London.
- Reichl, C. (1889). *Monatschr. Chem.*, 10, 317.
- Robin, C., and Verdeil, F. (1853). "Traité de Chimie Anatomique." J. B. Baillière, Paris.
- Romeis, B. (1932). "Histochemische Methoden." In Boehm and Oppel's "Taschenbuch der mikroskopischen Technik." Munich.
- Sachs, J. (1865). "Handbuch der Experimental Physiologie der Pflanzen." Engelman, Leipzig.
- Sachs, J. (1887). "Lectures on the Physiology of Plants." Clarendon Press, Oxford.
- Saint-Hilaire, C. (1898). *Hoppe-Seyl. Z.*, 26, 102.
- Schleiden, M. J. (1838). *Ann. phys. Chem.*, 43, 391.
- Schlossberger, J. E. (1856). "Die Chemie der Gewebe des gesammten Thierreichs." Leipzig.
- Schujeninoff, S. (1897). *Z. Heilk.*, 18, 79.
- Schwarz, F. (1887). *Beitr. Biol. Pfl.*, 5, 1.
- Stirling, W. (1875). *J. Anat. Physiol.*, Leipzig, 10, 185.
- Stöhr, P. (1882). *Arch. mikr. Anat.*, 20, 221.
- Stromeyer, H. (1815). *Ann. Physiol.*, Leipzig, 19, 146.
- Struve, H. (1872). *Liebigs Ann. chem. Pharm.*, 163, 160.
- Unna, P. G. (1887). *Arch. mikr. Anat.*, 30, 39.
- Vialli, M. (1955). "Introduzione alla Ricerca in Istochimica." L.P.L. Milano.
- Vogel, J. (1845). "Pathologische Anatomie des menschlichen Körpers." Leipzig.
- Vogel, J. (1847). "Pathological Anatomy of the Human Body." Trans. Day, G. E. London, p. 346.
- Weigert, C. (1884). *Fortschr. Med.*, 2, 190.
- Witt, O. N. (1890~91). "Färberzeitung." Quoted by Mann, G., 1902.

第二章 冷刀及冷切片机 (Cryostat) 方法

随着显示酶的方法逐渐增多,对新鲜组织切片的需要也更加迫切。如用固定、有时还要包埋的方法来制做大量的切片,其中的困难是不可克服的。象冷冻干燥方法,就是明显的例证。这种方法现正在许多实验室中试用,也发现有几方面的缺点。这将在第三章中提到。切新鲜切片的方法可分为两大类,即冷刀法及冷切片机方法,但二者之间有时并不能截然分开。

冷刀法

装有 CO_2 喷射器使刀口冷却的冰冻切片机,是由 Schulze-Brauns(1931a 和 b, 1932) 用到组织学技术中的。多年来,已有商品出售,并由许多学者(如 Wachstein 和 Meisel, 1953)用来制作半连续的切片,以供组织化学之用。由于这样的切片机在实际工作中有许多困难,因而又促使人们寻求更好的方法以控制多数易变的因素,以便制做完善的新鲜切片,且其厚度又足以适合细致观察的需要。以下将详细讨论为此目的而发明的各种操作方法和仪器。

虽然附有冷刀附件的标准冰冻切片机也可归入冷刀方法一类,但现在一般所指的冷刀方法是 Adamstone 和 Taylor(1947, 1948)发明的方法。这两位学者用 Leitz 式滑动切片机,在刀的两面装有篱状附件,其中盛装干冰,使刀口持续冷却。用 Adamstone-Taylor 方法,也与先前用冷刀原理的其它方法一样,用细驼毛笔使切片在刀上慢慢展开,以免切片卷折。可用双底的金属勺,勺的下半部盛有干冰,将展平的切片由刀上移下,放到洁净的载玻片上。当开始融化而切片将在玻片上展开时,将切片和玻片浸入盛有固定剂或其它特殊试剂的染色缸中。Adamstone 和 Taylor 特别强调要避免切片在玻片上完全融化,以便保存细微结构;如果不注意此点,细胞则将发生碎裂和变形。因此,Adamstone 设计了一个自动装置,它能在正合适的时间内把切片浸入所用的固定剂中。象作者所说的,如为一个人操作时,这种装置是很必要的;如是两个人,则整个方法的操作效果更好。事实上,很少有实验室不能找到两个人的。

试剂(包括固定剂)作用于切片较快,脱水和包埋时间较比常用方法也有缩短,这都是 Adamstone-Taylor 方法的重要优点。其严重缺点是,如 Taft(1949)所指出的,此法与大气的条件不能分开。气温在 18°C (65°F) 以上,而湿度过大时,都会影响这个方法的顺利进行,因而当应用此法时应备有冷却装备或冷室。另外,曾有人告诉我,在切片和裱贴时,可用盛放粉状干冰的细孔的网悬在切片机和操作者的上方。如需强度冷却时,可牵绳使干冰缓缓落下;但一般由网下面放出的冷气已足够了。Taft 认为,Adamstone-Taylor 方法最好是用于试验性的实验室中,其实大多数实验室均可装置这种设备,以便进行某些有效的冷刀方法的工作。

事实上,Adamstone-Taylor 方法甚为人们乐于接受,目前已在全世界广泛采用。例如 White 和 Allen(1951)的报导中提出他们已将 Bausch 和 Lamb 式轮转冰冻切片机改装成功,可作冷刀切片之用。他们能切 6~8 微米厚的连续切片,几乎不断。他们本人对于

这种优良切片机的经验说明,这种仪器的性能是可以进行这样的工作的。Shimizu, Kubo 和 Morikawa(1956)曾进行过更有意义的改装,他们使用 Schanze 式滑动切片机,刀的两面用干冰块加以冷却。他们按照 Linderstrøm-Lang 和 Mogensen (1938) 提出的原理设计了一个附件(图 1),代替常用的驼毛笔,以防止切片卷曲。整个切片机放在一个自制的冰箱(5 立方呎)内,冰箱的前面为木门,门上有两个附有手套的孔,操作者的手和输入的 CO_2 可经此处进入。箱上装有内部照明设备和小的观察窗。最近 Thornburg 和 Mengers (1957)用 Spencer 式滑动切片机,进行了关于切新鲜冰冻切片的适宜条件的一些重要研究。他们把切片机放入一个加以改装的厨房用的冰箱内(见图 2 及 3)。上述的设备控制了外界条件,肯定能将 Adamstone-Taylor 方法的重要缺点,即对大气环境的敏感性,加以克服。

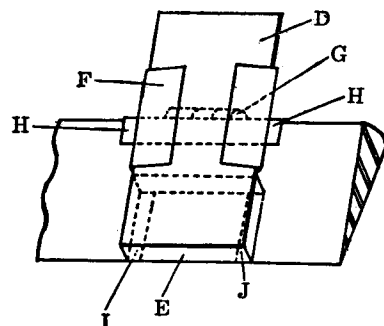


图 1

D. 玻片 E. 刀刃 F. 玻片夹 G. 铰链
H. 铰链夹 I. J. 组织块的边缘

至于冷刀切片的操作,则有不同的见解及做法。两个主要不同的意见是:(1)将切片放到已加处理或不加处理的载玻片上;(2)用一些冷或不冷的用具,将切片移起,再放到另外的地方去。如上面已经提到的,Adamstone 和 Taylor 竭力主张把固定剂或其它试剂直接加到依然冻结的切片上。相反,Wachstein 和 Meisel 发现,很难把仍在冻结的切片固定在玻片上,于是他们把融化时的切片移到所要用的孵育液或染液内。Shimizu 及其同事用分离针将切片移到玻片上,以后从冰箱中取出在室温中干燥。Thornburg 和 Mengers 喜用 Adamstone 的方法,使用自动的切片降落器,这个附件装在冰箱内,在切片机的旁边。许多学者,包括我自己在内,惯于用冷切片移举器或是驼毛笔,将冷刀切片直接移入孵育液内。切片的操作将留在冷切片机一段之后进一步讨论,因为所涉及的问题基本上是一样的。

冷切片机(Cryostats)法

我用冷切片机“Cold microtome”这一名词代替较常用的“Cryostat”一词,或并存,其原因有二:第一,本节与前一节所讲的方法的主要不同是,切片机、切片刀和组织块都在相同的温度下(-12° 到 -22°C)。第二,这个名词可与已被公认的冷刀和冷刀切片并列,而相应地命名为冷切片机和冷切片机切片。另外的名词,低温切片机(Cryostat)和低温切片(Cryostat Section),也是完全可用的。不过,Cryostat 就其词意本身而言,是指维持低温的设备,也就是冰箱,原本与制作切片无关。根据这样的定义,冷切片机与用冷环境保持的冷刀方法(Shimizu 等, Thornberg 和 Mengers)的不同,是切片时无需从外界来保持冷却;而且除非装上附录 2 所说明的附件,在刀与组织块间没有温度梯度。因此,从使用的目的而言,冷环境下的冷刀也可看作是一个冷切片机。

第一台低温切片机是丹麦 Linderstrøm-Lang 和 Mogensen(1938)创制的,用于定量的组织化学研究,将所得冰冻切片分别进行化学分析和组织学的观察。在原来的装置中,