

、 說 明

- (一) “肝片吸虫血紅蛋白的研究——1. 輔基和蛋白質部分的分裂”、“肝片吸虫吸取宿主血液作为食料的化学研究”和“人紅血球触酶与血紅蛋白的紙上电泳分离”三文曾載“中国人民解放军医学科学院院刊”1957年第一期。
- (二) “医用异种血清的初步研究”一文曾載“中国人民解放军医学科学院院刊”1957年第二期。
- (三) 其余文章均在文后注明曾刊載的刊名和刊期。

肝片吸蟲 (*Fasciola hepatica*) 血紅蛋白的 研究—I. 輔基和蛋白質部份的分裂

程伊洪 林國鎬

我們知道有些寄生蟲體具有呼吸色素，這種色素的性質和脊椎動物血紅蛋白的性質很相近似，但是去氧作用的進行是比較不容易。1946—1949年，王應睐⁽¹⁾、Keiling 和 Davenport⁽²⁾ 等先後於胃蠅幼蟲和蛔蟲等蟲體發現蟲體血紅蛋白。

我們知道血紅蛋白都有可逆氧合作用的共同性質，這種性質和它分子中的蛋白質部份很有關係，因為當蛋白質部份變性後，就會失掉這些性質。雖然血紅素類蛋白質的色素和某些酵素有着相類似或相同的輔基，但是它們的化學性質和生理性能

却有很大的差別。這種專一性指出在這些色素蛋白質中含有某些具有專一性的蛋白質部份。因此，這方面的研究頗為重要。

1926年，Hill 和 Holden⁽³⁾ 已經成功地將血紅蛋白可逆地分裂為輔基和蛋白質兩部份，這種方法使我們得到了研究血紅素輔基和蛋白質之間連接鍵的新途徑。

本研究專注意於利用鹽酸丙酮分裂肝片吸蟲的血紅蛋白成為輔基和蛋白質兩部份，並將它的輔基和牛珠蛋白重新綜合，又對蟲血紅蛋白在體內的可逆氧合作用進行了初步觀察。

一 實驗和方法

(1) 肝片吸蟲血紅蛋白的提取⁽⁴⁾

自新鮮牛肝將肝片吸蟲取出，用清水洗滌，用針刺出蟲體食道內的東西，最後用蒸餾水徹底洗滌乾淨。洗淨的蟲體用砂磨碎，得到暗紅色混濁的液體。冷卻後，放入十分之一體積的鹼性醋酸鉛，調節至 pH7，行離心分離沉澱。吸出上層紅色液體，再加入十分之一體積的鹼性醋酸鉛，並滴入 1N 的氫氧化鈉溶液，攪拌至粘厚狀態。冷卻後，行離心分離沉澱，吸出鮮紅液體，放入少許固體磷酸氫鈉，去掉溶液中過量的鉛離子。冷卻後，行離心分離沉澱，最後得到鮮紅清澈的液體，調節至 pH7。

(2) 牛珠蛋白的製備⁽⁵⁾

牛的紅血球用 0.9% 食鹽水洗滌四次，然後加入等體積的氫氧化鋁乳液和四分之一體積的甲苯，震搖之，放入冰箱過夜。次日離心後，吸出血紅蛋白的清液，並過濾之。

下面步驟都在低溫下進行。於血紅蛋白溶液中慢慢加入十倍體積，預先冷至 0°C，又含有 1% 鹽酸的丙酮，放置三分鐘後過濾。用丙酮洗淨珠蛋白沉澱，在空氣中吹乾。乾燥後和水放在研鉢中攪磨，使溶解。然後用 0.2N 氫氧化鈉溶液緩慢且小心地滴定，至發生沉澱。放置十五分鐘後，再滴定至得到最大變性蛋白質沉澱。放置一小時後過濾，得到天然珠蛋白溶液。

(3) 氯化血紅素的製備

利用飽和食鹽的鹽酸處理方法，得到結晶氯化血紅素⁽⁵⁾。

二 結

(1) 肝片吸蟲血紅蛋白的分裂⁽²⁾和蟲色素的提取

用一半體積的丙酮加入純粹的蟲血紅蛋白溶液中，若有沉澱發生，則濾去之；再加入一半體積丙酮，使蟲血紅蛋白沉澱，過濾之。將所得沉澱，用 1:90 鹽酸丙酮處理，攪拌，放置一刻鐘，行離心分離沉澱。

吸出溶液，加入 2N 醋酸鈉溶液，至產生沉澱。放置半小時後離心，先用鹽酸丙酮洗濯沉澱，次用丙酮和蒸餾水洗淨。將所得蟲色素溶於 0.1N NaOH 溶液中備用。以次亞硫酸鈉 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$) 試驗溶液不產生血色原吸收光譜。

(2) 肝片吸蟲色素和牛珠蛋白的綜

合^(6,7,8,9)

將牛珠蛋白溶液調節至 pH7，小心地將蟲色素滴入，並加入少許次亞硫酸鈉，用分光鏡觀察，即可看到含氧血紅蛋白的特性吸收光譜。如加入過量還原劑，便可看到去氧血紅蛋白的吸收光譜。但在空氣中

表一 肝片吸蟲血紅蛋白和牛血紅蛋白的吸收光譜最高點(mμ)

化 學 處 理	蟲血紅蛋白 (HbO ₂)	牛血紅蛋白 (HbO ₂)
蒸 餾 水	578	576
	542	541
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$	554	556
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4 + \text{CO}$	571	568
	541	538

三 討

肝片吸蟲血紅蛋白和牛血紅蛋白的吸收光譜很相近似，並且蟲色素和牛珠蛋白

(4) 吸收光譜的測定

利用石英光譜分析儀 (Beckman Model DU) 測定吸收光譜。

果

震搖後，又復顯現含氧血紅蛋白的吸收光譜。由此可見新的締合物顯然像一般的血紅蛋白，具有攜氧分子的能力。

測定所得蟲色素和牛珠蛋白的締合物的吸收光譜，並比較蟲血紅蛋白，天然牛血紅蛋白、重新綜合的牛血紅蛋白和它們受不同化學試劑處理後的衍生物之吸收光譜。結果見表一和表二。

表二 肝片吸蟲血紅素和牛珠蛋白的締合物之吸收光譜最高點(mμ)

型 式	蟲色素和牛珠 蛋白的締合物	重新綜合的 牛血紅蛋白	天然牛血 紅 蛋 白
HbO_2	576	576	576
	540	541	541
Hb	553	554	556

(3) 肝片吸蟲體內蟲血紅蛋白的可逆氧合作用^(10,11,12,13)

把一只新鮮肝片吸蟲放在顯微鏡玻片上，再用另一片蓋上，直接用分光鏡觀察，可清楚地看到含氧血紅蛋白的吸收光譜。如在兩片周圍間隙中用液體石臘填塞，隔離空氣後，在分光鏡中觀察，便可看到含氧血紅蛋白的二條吸收光帶逐漸地熔合變成一條去氧血紅蛋白的吸收光帶。

再將玻片揭開，讓蟲體暴露在空氣中，於是血紅蛋白又得到氧，復出現含氧血紅蛋白的二條吸收光帶。因此、肝片吸蟲血紅蛋白在蟲體內的氧化代謝系統中，可能是一個攜氧者，供給氧分子。

論

的締合物、牛血紅蛋白的重新締合物和它們的衍生物之吸收光譜最高點也都很接

近;因此、肝片吸蟲血紅蛋白的輔基可能和牛血紅蛋白的輔基是相同的,即是這兩種血紅蛋白可能具有相同的血紅素輔基,但有不同的蛋白質部份。但是天然血紅蛋白、重新綜合的血紅蛋白和它們去氧時的衍生物四者之間的吸收光譜的最高點尚有1至2m μ 的差別,此種差別是否由於輔基和珠朊間的連接鍵的變化,或由於輔基和珠朊本身變化所引起,或由於其他原因,尙待確定。

四 摘 要

本研究中利用了鹼性醋酸鉛提取肝片吸蟲的血紅蛋白。並且用鹽酸丙酮分裂肝片吸蟲的血紅蛋白,使肝片吸蟲色素和牛珠蛋白重新綜合。

比較了牛血紅蛋白、重新綜合的牛血紅蛋白,肝片吸蟲色素和牛珠蛋白的結合

實驗指出蟲體內蟲血紅蛋白在無氧環境中時處在去氧狀態,而當暴露於空氣中時,蟲血紅蛋白又獲得氧氣,這明顯地說明它能得到氧是賴於氧氣的分壓。蟲血紅蛋白可能從寄主的血紅蛋白和它生活周圍環境中的介質裏取得氧,而後把氧轉送給蟲體的代謝系統。

本報告對於肝吸蟲血紅蛋白的研究僅是初步探討,進一步的確定和物理化學性質的研究尙待日後進行。

物及它們的衍生物的吸收光譜;顯見肝片吸蟲色素和牛珠蛋白的締合物與天然牛血紅蛋白的吸收光譜很相近似(最高點各為576 m μ 、540 m μ 及576 m μ 、541 m μ)。並且初步觀察了肝吸蟲體血紅蛋白的可逆氧合作用。

主要參考文獻

- (1) Davenport, H. E., *Proc. Roy. Soc., B*, **136**, 281 (1949).
- (2) Keiling, D. & Wang, Y. L., *Biochem. J.*, **40**, 855 (1946).
- (3) Hill, R. & Holden, H. F., *Biochem. J.*, **20**, 1326 (1926).
- (4) Theorell, A. H. T., *Biochem. Z.*, **252**, 1 (1932).
- (5) Anson, M. L. & Mirsky, J., *Gen. Physiol.*, **13**, 469 (1926-1930).
- (6) Nenoki, M. E., *Physiol. Chem.*, **30**, 384 (1900).
- (7) Drabkin, D. L. & Austin, J. H., *J. Biol. Chem.*, **158**, 72 (1945).
- (8) Drabkin, D. L., *J. Biol. Chem.*, **112**, 89 (1935-36).
- (9) Rimington, C. & Fulton, J. D., *Biochem. J.*, **41**, 619 (1947).
- (10) von Brand, T., *J. Parasitology*, **23**, 316 (1938).
- (11) Keiling, D., *Proc. Roy. Soc., B*, **98**, 312 (1925).
- (12) von Brand, T., *J. Parasitology*, **23**, 225 (1937).

肝片吸蟲 (*Fasciola hepatica*) 吸取宿主血液作為食料的化學研究

黃如衡

肝片吸蟲 (*Fasciola hepatica*) 又名肝蛭，是寄生於人體，牛，羊等胆管中的一種吸蟲。在五分之一肝片吸蟲中，其食道內有棕黑色的東西；關於這棕黑色物質的來源和性質，文獻報告甚少，且從來沒有人做過化學分析，所以尚無肯定的結論。

1880 年，Sommer 氏⁽²⁾從組織學上觀察，發現蟲體食道中有紅血球與胆管上皮細胞，可是他認為肝片吸蟲是以胆汁為其食物的。1882 年，Mace 氏⁽³⁾用組織學研究法得出結論，說肝片吸蟲的主要食料是胆汁；同時，他用分光鏡分析，給予棕黑色物質以不正確的名字，叫做“胆血紅素” (Bilihemine)。1886—1901 年，Kuchen Mester 氏⁽⁴⁾也認為肝片吸蟲以胆汁為其主要食料，但他不能從肝片吸蟲食道中找出胆汁來。1890 年，Railliet 氏⁽⁵⁾用染料與石膏 (plaster) 注入受感染的牛、羊動脈中，再檢查牛、羊胆管與蟲體食道時，發現蟲食道內有染料而無石膏；Railliet 氏實驗證明染料是直接從血液中被吸入蟲體的。然而 Muller 氏却認為染料是經肝組織進入蟲體的。雖然 Muller 氏⁽⁵⁾也從組織學上觀察發現蟲食道的棕黑色物質中有胆管上皮細胞、紅血球、白血球等，可是他仍舊說此

棕黑色物質來自胆汁。1926 年，Flury 與 Leeb 二氏⁽⁶⁾將肝吸蟲放在生理鹽水中，經一小時後，用分光鏡分析，發現有氧合血紅蛋白與還原血紅蛋白。同年，Weinland 與 von Brand 二氏⁽⁷⁾以血餵蟲，發現血液在蟲食道中會凝固起來，證明肝片吸蟲能以血液作食料。1938 年，Hsu 氏⁽⁸⁾也發現在蟲體食道中有紅血球，白血球與少量胆汁。1948 年，Stephensen 氏⁽⁹⁾再作組織學上的觀察，用血液培養蟲，並用分光鏡分析，證明肝吸蟲是以血液為其主要食料的。

從以上歷史，可見肝片吸蟲吸取宿主血液作為食料的問題，一直沒有得到直接的證明。僅從組織學上的觀察與分光鏡的分析來證明此棕黑色物質是血液或其衍生物，是不夠的。我們知道肝片吸蟲蟲體含有一種類血紅蛋白⁽¹⁰⁾；如將蟲放在蒸餾水中或生理鹽水中，這種類血紅蛋白也會逐漸滲散出來，所以直接用分光鏡觀察，結果不能完全可靠。單用組織學的方法與用血液來培養肝片吸蟲，更不能作出定論。本文報告用化學的方法分析，證明此棕黑色物質的化學性質與血液相似，而且發現此棕黑色物質含有一種活力甚高的蛋白酶，能將吸入的食料(宿主血液)分解為棕黑色物質。

實驗與結果

I. 材料

由宰牲場取來的肝片吸蟲 (牛胆管中

取出)，用自來水沖洗後，用蒸餾水洗滌三次。挑選蟲體食道中含有棕黑色食物的蟲

(在 1,230 條蟲中有 284 條蟲食道中含有棕黑色物質), 用尖針鑿破食道, 使棕黑色物質流出; 一般以不擠為原則, 以免與蟲體類血紅蛋白相混。每條蟲的食道中棕黑色物質的含量相差很大, 多的可達 0.05 毫升, 少的不能察見。

II. 血紅蛋白衍生物的證明

要證明此棕黑色物質是血液, 最直接而簡單的方法是測定在棕黑色物質中有無血紅蛋白或其衍生物, 因此、首先將此棕黑色物質作各種血紅蛋白的試驗。方法與結果如表一。

表一 肝片吸蟲棕黑色物質中血紅蛋白衍生物的測定

實驗	項 目	方 法	結 果
1	血紅素晶	Teichman 氏方法 ⁽¹⁾	有結晶
2	鹼性血紅素	棕黑色物質加鹼後, 加熱, 再在分光鏡下觀察	顯示鹼性血紅素吸收光譜
3	酸性血紅素	棕黑色物質加濃醋酸, 再加乙醚提取, 在分光鏡下觀察	顯示酸性血紅素吸收光譜
4	聯苯胺反應	棕黑色物質加聯苯胺與雙氧水	顯示藍色

上面實驗證明, 棕黑色物質可製成血紅素晶 (hemin), 顯示鹼性血紅素 (alkali hematin) 和酸性血紅素 (acid hematin) 的吸收光譜, 與陽性聯苯胺反應 (benzidine test)。因此、可以認為此棕黑色物質是血液的衍生物, 由於血紅蛋白的變性, 其顏色也就變成棕黑色 (當用水稀釋時, 呈棕黃色)。為了要證明這些反應並不是由於肝片吸蟲蟲體類血紅蛋白的作用, 我們直接用分光鏡觀察了棕黑色物質, 結果, 不能找到類血紅蛋白的吸收光譜, 僅有鹼性血紅素的吸收光譜。因此、我們可以想像此棕黑色物質不是蟲體的類血紅蛋白, 而是由於吸取宿主的血液變成的。

還有一個可能, 這種棕黑色物質是蟲

體色素的代謝產物, 而不是食料。這點理由可能性不大, 因為蟲體類血紅蛋白含量不多, 所以代謝不能產生這樣濃的顏色。我們並假定肝片吸蟲食道能分泌一種消化蛋白質的酶, 使血液變色, 而且此酶可能還存在於此棕黑色物質中; 因此、以棕黑色物質為酶原, 作血液消化試驗, 來檢定酶的存在。

III. 血液消化試驗

根據上面的假定, 棕黑色物質中含有一種能消化血液的酶系, 其中主要的又是蛋白酶, 故以食料 (棕黑色物質) 作為蛋白酶提液, 進行如下的試驗:

取小試管三支, 分別加等量的酶提液 (即棕黑色物質) 試管用甲、乙、丙標記之, 將甲管加熱煮沸, 使酶活力破壞, 然後每管各加等量磷酸緩衝劑 (pH7.2, M/15) 0.5 毫升, 甲、乙兩管各加入血液 0.1 毫升, 丙管加水 0.1 毫升作對照, 每管再加甲苯少許作防腐劑, 在 37°C 保溫, 三小時後觀察三管變化。其中乙管 (即實驗組) 顏色變成棕黑色, 與甲管顯著不同; 至十八小時後, 乙管與丙管相似, 呈棕黃色; 如再加熱, 僅生成細小的沉澱, 同時粘度亦大大減低, 而甲管則仍顯示紅色, 與開始時相同。加熱蛋白質即起凝固。這是因為酶已被破壞, 不再有消化作用的緣故。在分光鏡下觀察, 乙管與丙管顯示鹼性血紅素吸收光譜, 而甲管仍為氧合血紅蛋白的吸收光譜。所以證明乙管中的血紅蛋白已被肝片吸蟲食道中的蛋白酶消化, 祇剩血紅蛋白的衍生物了。

上面實驗說明平常所見的棕黑色物質, 實為經部分消化的血液, 棕黑的顏色是血紅蛋白的衍生物, 所以我們認為肝片吸蟲是吸取宿主血液作為其主要食料的。

IV. 蛋白酶活力的測定

我們既發現肝片吸蟲食料中含有消化血液的蛋白酶, 就進一步研究此酶的活力。

我們用 Mett 氏管法來測定蛋白酶活力⁽¹¹⁾；用稀釋十六倍的棕黑色物質，經十四次實驗的結果，Mett 氏管被消化的長度平均為 0.65mm，故其活力為：

$$(0.65)^2 \times 16 = 5.64 \text{ 單位。}$$

利用本法來研究蛋白酶活力的最適 pH，在不同 pH 的磷酸緩衝劑中測得 Mett 氏管被蛋白酶消化的長度如表二所示：

表二 肝片吸蟲食道中蛋白酶最適 pH 的測定
(表中數字表示 Mett 氏管被消化的長度毫米)

pH 實驗	5.4	6.4	6.8	7.0	7.2	7.4	7.8
1	0.1	0.3	0.65	0.72	0.7	0.65	0.4
2	0.2	0.3	0.5	0.5	0.5	0.6	0.3
3		0.1	0.1	0.2	0.2		0.1

從上表結果我們可見蛋白酶活動的最適範圍在 pH7 左右，但酶活動範圍甚大，且和蟲離宿主時間與食物進入食道的時間等有關。

V. 觸酶的測定⁽¹²⁾

上面的實驗結果都說明肝片吸蟲以宿主血液作為主要食料。我們知道血液中含有觸酶極多，因此，血液在未被完全消化前，在棕黑色食物中一定還有甚多觸酶殘餘。

表三 觸酶活力的測定

實驗	氧釋放 (μ l/4 分鐘)	棕黑物乾重 (mg)*	放氧商 QO ₂
1	90.5	0.5	2,700
2	92.0	0.5	2,740
3	28.8	0.32	1,200
4	29.2	0.32	1,220
5	91	0.6	2,270
6	105	0.61	2,600
7	61.1	0.23	3,190
8	46.6	0.2	3,500
9	53.3	0.21	3,900
10	56	0.21	4,200

* 乾重的計算方法：先測定 0.1 毫升棕黑色物質的乾重，然後計算 0.5 毫升棕黑色物質稀釋液的乾重。
QO₂ 為每毫克乾重棕黑物一小時內放出的氧。

以雙氧水直接加入棕黑色物質中，結果、有大量氣泡發生，確證有觸酶存在。再用華白氏儀測定觸酶活力，以棕黑色物質 0.1 毫升稀釋到 10 毫升，再取 0.5 毫升，放在華白氏瓶中，側管中加入 3% 雙氧水 0.2 毫升，在 37°C 測定氧的釋放，結果如表三所示：

從上面實驗結果，我們發現每毫克棕黑色物質(乾重)在一小時內可放出 1,000—4,000 微升(μ l)的氧，可見在此棕黑色物質中含有觸酶極多。而蟲體本身則觸酶含量極少⁽¹²⁾，可略去不計，但與血液比較，却要少十倍左右。此棕黑色物質的觸酶含量差別很大；這是由於觸酶被蛋白酶分解的緣故。血液被消化的程度不同，則觸酶活力也就不同。這裏又一次證明此棕黑色物質為血液的衍生物。

VI. 棕黑色物質的一般化學性質

一、反應 棕黑色物質的 pH 在 7 左右，近於中性。

二、蛋白質試驗 棕黑色物質加熱時，即有細小的沉澱生成，振搖時又可重新分碎溶解，雙縮脲反應與 Millon 氏反應均為陽性，且粘度比血液低，可見血液蛋白質已被分解成多肽。

三、鐵量的測定 按照蟲食道中含棕黑色物質的多寡，把蟲分成多、中、少三類，分別儘量取出棕黑色物質，並用水洗滌蟲體，併合後、在烤箱中濃縮，再用 Wong 氏⁽¹³⁾法測定鐵的含量，從鐵的含量再計算血紅蛋白與每條蟲的平均吸血量。結果如表四所示：

上面實驗的結果是：每條肝片吸蟲棕黑色物質中血紅蛋白含量多的可達 0.0045 克，少的則祇有 0.0001 克，變化很大；這是由於每次分類，蟲體含棕黑色物質多寡的不能完全一致，棕黑色物質取出是否完全，

表四 肝片吸蟲棕黑色物質中鐵含量的測定

實驗	每次實驗用蟲量 (條)	鐵含量 (毫克)	每條蟲含血 紅蛋白(克)*
1	多	45	0.615
	中	81	0.227
	少	83	0.033
2	多	8	0.098
	中	32	0.095
	少	70	0.005
3	多	20	0.255
	中	80	0.195
	少	106	0.050
4	多	11	0.232
	中	70	0.25
	少	164	0.122

* 每條蟲的血紅蛋白含量的計算是以每克血紅蛋白含有 3.4 毫克鐵，計算出血紅蛋白量後，再除以蟲數而得。也不一致，而宿主本身血紅蛋白的多寡，與

穿刺程度，洗濯次數加多時蟲體色素的洗下等均能影響結果。如再以每百毫升血液含十四克血紅蛋白計算每條蟲吸血量，則含棕黑色物質多的每條蟲含有 0.03 毫升血液，棕黑色物質含量中等的蟲每條含有 0.007 毫升血液，棕黑色物質含量少的蟲每條含有 0.0007 毫升血液。雖然棕黑色物質含量少的蟲含血極少，幾不能察見，由於患者往往有蟲甚多，所以也可能解釋患者之所以貧血。

四、還原糖的測定 以肝片吸蟲的棕黑色物質用錳酸鈉去蛋白質後，用Folin-Rose氏⁽¹⁴⁾法測定其還原糖含量；四次實驗結果平均每毫升棕色物質含有 1.3 毫克，與血液中還原糖量相似。所以還原糖含量又是證明棕黑色物質為血液的另一證據。

討

肝片吸蟲吸取宿主血液作為食料的問題，在最近十年來，雖已從組織學觀察、體外培養、與分光鏡等分析得到證明，但是還不够明確；因為食道中紅血球、白血球的發現可能是在殺牛時混入，分光鏡的分析又因蟲體本身含有類血紅蛋白，所以也不可靠，而且棕黑色食料中血紅蛋白已經變性，我們不能發現有氧合血紅蛋白吸收光譜；

總

肝片吸蟲食道中棕黑色食料的化學分析得出如下的結論：

1. 用肝片吸蟲的棕黑色食料可以製備血紅素品，顯示酸性血紅素和鹼性血紅素的吸收光譜、與聯苯胺反應。

2. 在棕黑色食料中，我們發現有一種能使血液消化的蛋白酶，其最適活力在 pH7 左右。

3. 在棕黑色食料中還有很強的觸酶活力，每毫克棕黑色物質（乾重）在一小時內

論

用血液培養肝片吸蟲，也不能說明在宿主體內肝片吸蟲是吸血的。本文報告用化學的方法分析，證明棕黑色物質無論在化學性質上，分光鏡分析上，均與血液相似，可是蛋白質已部分分解；同時，此棕黑色物質中的蛋白酶的發現對宿主血液被分解為棕黑色物質提供了有力的證據。但是是否還有其他酶系存在，有待再作深入的研究。

結

可放出 1,000 至 4,000 微升的氧。

4. 棕黑色食料的 pH 在 7 左右，每條蟲多的含有 0.03 毫升的血液；食料中還原糖、每毫升達 1.33 毫克，與血糖含量相似。

上述結論均證實肝片吸蟲食道中的棕黑色物質為血液的衍生物，所以與我們的假定——肝片吸蟲吸取宿主血液作為食料——不相抵觸；因而我們已能用化學方法來證實前人用組織學等方法所獲得的結果。

誌謝 本文是在林國鎬教授的指導下寫述的,特此致謝。

參 考 文 獻

- (1) Leuckart, R. (1886-1901) *Die Menschlichen Parasiten* 2nd ed., Leipzig.
- (2) Sommer, F.; *Z. wiss. Zool.* **34**, 559 (1880).
- (3) Mace, E. *Recherches anatomique sur la grande douve du foie.* Paris.
- (4) Railliet, A.; *Bull. Soc. Zool. Fr.* **15**, 88 (1890).
- (5) Muller, W.; *Zool. Anz.* **57**, 243 (1923).
- (6) Flury, F. and Leeb; *Klin. Wschr.* **5**, 2054 (1926).
- (7) Weinland, E. and Von brand F.; *Z. vergl. Physiol.* **4**, 212 (1926).
- (8) Hsu, H. F.; *Chin. Med. J.* **58**, 122 (1939).
- (9) Steephenson, W.; *Parasitology*, **33**, 120 (1939).
- (10) 林國鎬, 鮑忠祈; *生物化學*, **4**, (1) 6 (1951).
- (11) Hawk, H. B. Oser, B. L. and Summerson, W. H.; *Pract. Physiol. Chem.*, 12 th. ed. (1947).
- (12) 林國鎬, 黃如衡; *生物化學*, **4**, (1) 12 (1951).
Wong. *J. Biol. Chem.* **77**, 409 (1928).
- (13) Ponder.; *J. Biol. Chem.* **144**, 333 (1942).
- (14) Folin-Wu. *J. Biol. Chem.* **41**, 367 (1920).
Folin; *J. Biol. Chem.* **67**, 357 (1926).

人紅血球觸酶與血紅蛋白的紙上電泳分離

黃如衡 林國鎬

文獻報告⁽¹⁾所有含有高鐵血紅素(hematin)的物質均具有觸酶、過氧化酶的活力。最近日人 Mitsuo Suzuki⁽²⁾分離得結晶血紅蛋白,不具觸酶活力。在我們的

實驗室,余菊生等⁽³⁾用透析法亦證明血紅蛋白不具觸酶活力。本文報告用紙上電泳的方法來分離人紅血球中血紅蛋白與觸酶,進一步證實血紅蛋白不具觸酶活力。

實 驗

材料 將紅血球用生理鹽水洗滌三次,加入乙醚,或用交替冰凍和加溫法,使溶血。

儀器 and 試劑

電泳儀採用簡化紙上電泳儀⁽⁴⁾。電源採用B電瓶,每瓶100—110伏特,每次實驗用電流1—2微安培。電泳時用華德門1號濾紙。

電極用碳棒電極。電泳後陽極溶液變

色,但並不影響結果。

緩衝液 用pH不同的磷酸鹽,其離子強度為0.1。

染料 用1%溴酚藍酒精溶液。

洗液 0.5%醋酸。

0.2N雙氧水 以30%雙氧水稀釋後,用標準高錳酸鉀滴定。

0.1N高錳酸鉀 以純高錳酸鉀加水配製後、用草酸鉀滴定,應用時再稀釋十倍。

方 法

用毛細管吸取紅血球溶液,在華德門1號濾紙中間(長36厘米,闊10厘米)滴二滴,每滴相隔約5厘米,然後立即放在電泳儀上,濾紙二端浸入緩衝溶液中,並用滴管在距離頂點二邊約1厘米的地方,加緩衝劑,使濾紙全部濕潤,然後用大燒杯蓋上濾紙,接上電源,進行電泳。我們通常用100伏特電壓,電泳12—24小時。電泳結束後,取下濾紙,隨即用剪刀沿泳動方向剪開,一部分作觸酶活力分佈的測定;另一部份作蛋白質分佈測定。

甲、觸酶活力測定 用上述第一部份濾紙,自電泳起點開始,向左、右二端,每隔3

毫米、剪成狹長小紙條。每條小紙分別放在100毫升三角燒瓶中,瓶中預放磷酸緩衝劑(pH7.2, 0.1M)1毫升;再各加入0.2N過氧化氫1毫升,水5毫升,在室溫下作用30分鐘後,馬上依次加入濃硫酸0.2毫升,再以0.01N高錳酸鉀滴定殘餘過氧化氫⁽⁵⁾。從對照組滴定值(以無酶活力的與上同大紙條代替測得),減去實驗組滴定值,即得每3毫米闊紙上觸酶活力(以每30分鐘3毫米闊紙條所分解的0.01N過氧化氫的毫升數計算)。以被分解的過氧化氫量作縱座標,電泳起點距離作橫座標,作圖,即得電泳後觸酶的分佈圖。

乙、蛋白質測定 將上述第二部份濾紙先在 100°C 烘箱烘乾(約5—10分鐘),再浸入1% 溴酚藍溶液中5分鐘。染色後,用0.5%醋酸液洗滌四次;結果,祇有蛋白質部分被染色,其餘部份几乎無色。經烘乾後,將濾紙自電泳起點開始,向左、右二端每隔3毫米、剪成狹長小紙條。每條小紙分別

放入試管中,每管加0.2N 氫氧化鉀1毫升,水9毫升。不斷搖動半小時後,離心,除去纖維質,上清液用 $540\text{m}\mu$ 濾光板在光電比色計中比色。以比色計光密度讀數為縱座標,蛋白質泳動距離(毫米)為橫座標,作圖,即得蛋白質紙上電泳分佈圖。

結 果

用pH不同的磷酸鹽緩衝劑測定的結果,如下表與圖所示。

1. 在磷酸鹽緩衝劑 pH7.75, 離子強度為0.12, 電壓110伏特, 室溫 $27-30^{\circ}\text{C}$ 下

表 一

距 離 (毫 米)	21	18	15	12	9	6	3	0	-3	-6	-9
觸酶活力分佈 (毫升 0.01N過氧化氫分解)	0.45	0.4	0.3	0.45	0.4	0.45	0.6	2.2	3.07	1.9	0.6
蛋白質分佈(光密度)	0.05	0.25	0.5	0.75	0.85	0.85	0.55	0.45	0.25	0.05	

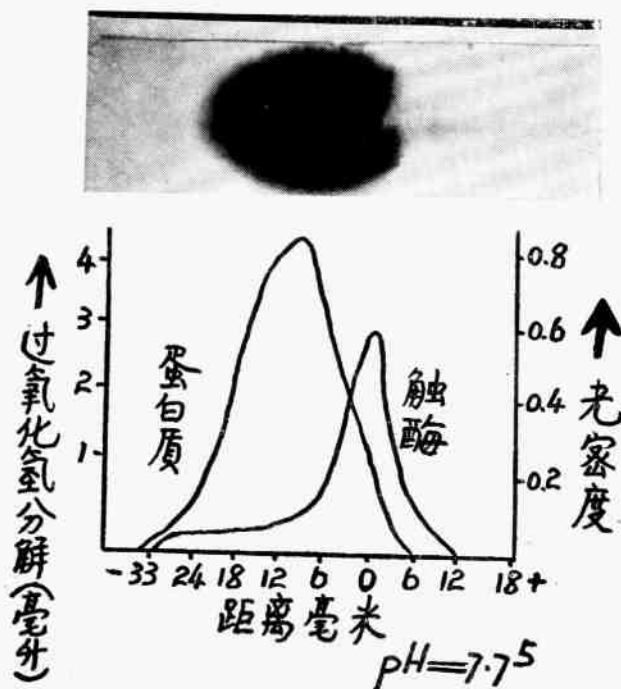


圖 一

圖一根據上表結果作成，圖上面為電泳後，經染色的濾紙。黑點表示血紅蛋白。

2. 用 $\text{pH}=7.4$ 的磷酸緩衝劑，電泳 17

小時後的結果如表二與圖二。從圖上可見觸酶仍無顯著變化，而血紅蛋白泳動增加，因此與觸酶的分離比較完全。

表 二

距 離 (mm)	27	24	21	18	15	12	9	6	3	0	-3	-6	-9	-12
觸酶活力分佈 (毫升 0.01N 過氧化氫分解)				0	0.1	0	0.1	1.9	7.2	11.6	10.9	5.1	1.25	0.2
蛋白質分佈 (光密度)	0	0.15	0.3	0.55	0.65	0.6	0.35	0.23	0.15	0.2	0.2	0		

以上表結果作圖如圖二。

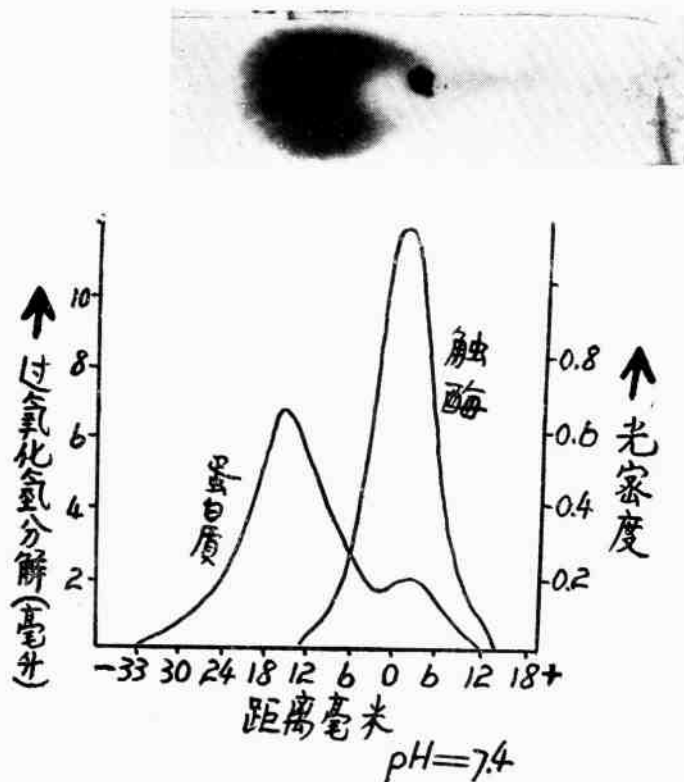


圖 二

3. 改用 $\text{pH}7.2$ 磷酸緩衝液，離子強度 0.1，電壓 100 伏特，電泳 17 小時後血紅蛋白向負極泳動增加，而觸酶却仍無顯著變

化；因此，兩者可以完全分開，結果如表三與圖四所示。

表 三

距 離 (mm)	28	27	24	21	18	15	12	9	6	3	0	-3	-6	-9
觸酶活力分佈 (毫升 0.01N過氧化氫分解)	0	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2	0	0.1	0.1	2.0	7.1	9.0	4.9	1.3
蛋白質分佈 (光密度)	0	0.04	0.05	0.62	0.48	0.15	0.1	0.05	0.0	0.0	0.01	0.0	0.0	

以表三結果作圖，如圖三：

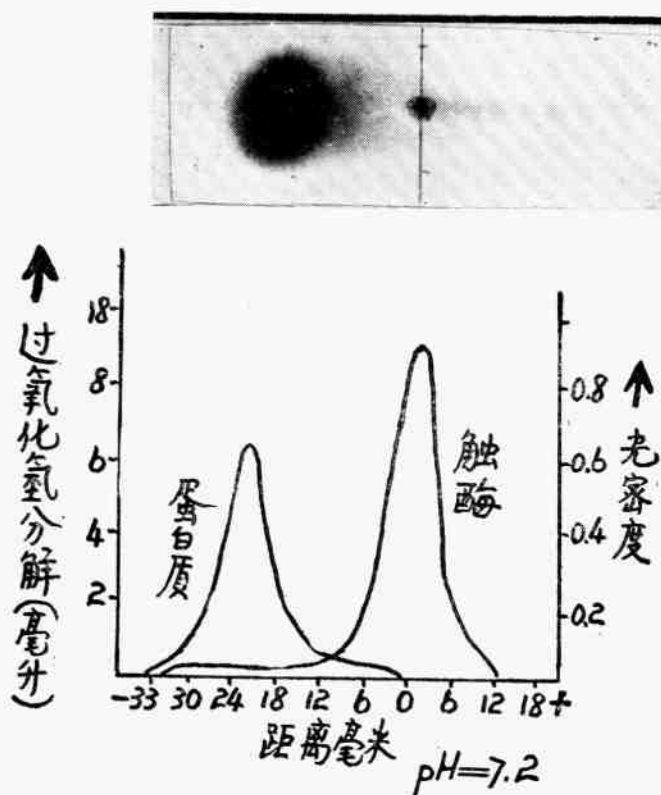


圖 三

討 論

根據我們的實驗，當磷酸鹽緩衝劑的 pH 改變時，觸酶仍停留在起點，幾不移動；而血紅蛋白的泳動則隨 pH 而改變。當緩衝劑之 pH 在 8.6 時，紅血蛋白向正極泳動；逐漸降低 pH 時，泳動即減少；在 pH 等於 8 時，泳動方向改變，向負極泳動；在 pH 7.2 時，血紅蛋白遠離起點，因此，觸酶與血

紅蛋白完全分開；所以我們能用紙上電泳的方法證明血紅蛋白不具觸酶活力。

用紙上電泳的方法來檢定酶的純度，研究酶的性質，所需設備簡單，操作簡便，而且樣品可以極少，所以對於研究、教學，都可適用。

總 結

用紙上電泳的方法，能將人紅血球觸酶與血紅蛋白不具觸酶活力。酶與血紅蛋白分開。因此，我們又一次證

考 參 文 獻

- (1) Sumner J. B. & Myrbäck K.: *The enzymes*. Vol. II. Part 1, 401 (1951).
- (2) Mitsuo Suzuki: *J. Biochem (Japan)* **41**, 401 (1954).
- (3) 余菊生、林國鏞、黃如衡：生理學會 1956 年上海分會年會報告。
- (4) 鮑忠所、陶義訓：人民軍醫 1954 年 1 月號 6 面。
- (5) Von Euler, H. & Josephson K: *Ann.* **452**, 158 (1927).

醫用異種血清的初步研究

華復一 陶義訓 馬立人 林國鎬 程伊洪
朱壬葆 劉雪桐 張思民

前言

文獻綜述

各項實驗

I. 醫用異種血清的製備

II. 生化分析

III. 毒性、血漿除去試驗和熱原檢定

IV. 免疫學性質

V. 對動物出血性休克的防治

VI. 維持動物血量的性能

VII. 動物受注後的組織形態學觀察

VIII. 注入後在血液內停留時間的檢定

綜合討論

總結

參考文獻

前 言

輸血是近代外科能够獲得巨大成就的重要保證之一。爲了輸血工作的順利開展和彌補血來源的困難，醫學界在下列三方面曾有了初步研究：(一)延長儲藏血液的保存期限，(二)應用乾血漿、白蛋白等血液製品，(三)製備血漿代用品。

十餘年來、血漿代用品的研究雖有較多的進展，右旋醣酐 (dextran)、白明膠 (gelatin) 和它的衍生物以及多乙基吡咯酮 (polyvinylpyrrolidone) 都曾廣泛被採用，但還或多或少，存在着不同的缺點。尋找理想的血漿代用品的工作、還‘方興未艾’。

動物血清的利用已有較久的歷史，並

日益引起注意。雖目前還在實驗階段，文獻中未有定論，但國外已有不少商業製品。蘇聯有幾處血液學和輸血研究機構進行這項工作，並且已經獲得了一定的成就。

大型動物牛、馬、豬、羊等的血清，來源充裕，生理性能和人血清頗多相近之點，如能在加工處理後、應用於輸血，將有莫大意義。所以這項研究即使在目前還不够完善，也仍可繼續深入，探求改進。我們鑒於國防需要，從 1953 年起，開始做了這項工作。現在把工作以來第一階段的實驗材料整理作一初步報告。切盼國內醫學工作者予以幫助和指正，以便更好的進一步展開有關的研究！

文 獻 綜 述

血液是人體維持生命不可缺少的部份。“足受血而能步，掌受血而能握”，我國祖先在血液生理上早有光輝創見。醫學古著內經素問中就已有“諸血皆屬於心”，“經脈流行不止，環周不休”等有關血液循環的論述；比 Harvey 氏幾乎早 2,000 年。

輸血研究開端於血液循環學說確立以後不久的時代。當初就是從採用異種動物血液開始。

爲了使異種動物血液在醫學上得到應用，科學家們已經努力了三百年⁽¹⁻³⁾(圖1)。1667年，Denis 氏首先把異種動物血液注入人體。那時好些醫師會進行過類似的試驗，但都因血液凝固和注射後的有反應而被迫停止。19 世紀時，發現除去纖維蛋白、可以防止血液凝固，也必須這樣，才有可能

作較大量的輸血，但因異種動物間輸血而引起的各種反應，仍不能避免。那時醫學家們已經注意到輸入的動物血球將被溶化而引起腎小管梗塞

和腎功能衰竭，由於紅血球溶化而產生的血鉀過多症可以促成迅速死亡。

此後，研究方向就集中於動物血清和血漿的



圖 1 三百年來的努力，動物血清在醫學上已有了初步的應用⁽⁴⁾⁽⁵⁾



採用。Wangensteen 等氏⁽⁶⁾的實驗更改變了前人⁽⁷⁾的看法，證明牛血清輸入人體後，具有和人血清同樣的營養價值。但在多例注射中⁽⁸⁾，牛血清注入後，反應率高達 66.6%；如果草率的把動物血清直接用來補償失血，是極端危險的。

廿世紀免疫知識的發展，發現了動物血清中含有對人體血球的凝集素和溶血素。由是而產生的血球凝集和溶血現象是引起輸入反應的原因之一。這些物質並不能用白陶土等把它吸除。人血球的吸附處理也只對溶血素呈較大效果，對凝集素只能吸除一半左右⁽⁸⁾。經這樣處理後的動物血清注入後，仍將引起較多的反應。

如將牛血漿和它的球蛋白、白蛋白部份分別作皮內試驗；球蛋白部份和全血漿相似，引起較多的陽性皮內反應，而白蛋白部份產生的陽性率極低⁽⁹⁾。有人認為牛血清的毒性只和它的球蛋白部份有關。Davis 同 Eaton⁽¹⁰⁾ 二氏把牛血清球蛋白注入家犬後，產生和注入全血清類似的反應，而注入白蛋白的家犬，都良好如常。牛血清白蛋白注入人體時，反應率也很低⁽¹¹⁻¹³⁾。根據 Taylor 等氏⁽¹²⁾電泳分析結果，不論藉硫酸銨或甲醇分離的牛血清白蛋白，都含 5—7% 泳動速較慢的球蛋白成分，認為必須把該球蛋白部份徹底除去

後，才有可能作為安全的血漿代用品。

Cohn 氏按乙醇分離法，精製出純粹牛血清白蛋白結晶⁽¹⁴⁾。它的分子形狀、大小和電荷跟人血清白蛋白相同，以致二者的混合液在電泳和超速離心時，跟各該蛋白的單純溶液並無差別⁽¹⁴⁾。雖則在動物過敏試驗中，仍然具有抗原性^(14,15)，但在人體皮內試驗中，陽性率較一般粗製白蛋白更有顯著的低減⁽¹⁶⁾。動物試驗和病理檢查都沒有發現毒性⁽¹⁷⁾。跟同濃度人血清白蛋白溶液具有相同的滲透壓和維持血量的生理性能⁽¹⁸⁾。在將近 100 例的初步人體試驗中，都沒有明顯的即時的或延遲的反應；但在試用較大量工業製品時，反應率却達 $\frac{1}{3}$ ^(16,19)。前後不同的結果究是因在工業生產時混入部份變性蛋白，還是因滲入若干重金屬等其他原因而起，一直沒有獲得圓滿的結論^(16,20)。從 1945 年以來，未曾有更深入的研究。

酸鹼處理可使蛋白質的抗原性改變或減弱⁽²¹⁻²⁷⁾。Davis 和 Eaton 二氏⁽²⁸⁾用鹼處理的牛血清白蛋白進行人體注射時，沒有發現不良反應。Lewis 氏⁽²⁹⁾說：牛血漿經 0.5N 氫氧化鈉 37°C 處理一小時後，它的抗原性已消失，而無毒性。但一般認為^(27,30)牛血清經強鹼長時間處理

後，即使在抗原性還沒有消失時，已經呈嚴重的毒性。這毒性或是同變性蛋白分子本身有關⁽³⁷⁾，或是由蛋白質的破裂產物而致⁽³⁸⁾。事實上，即使只經較短時間的鹼處理而認為還沒有產生毒性的製品，它的安全耐受量也沒有超過每公斤體重注入蛋白一克⁽³⁷⁾的。如以 50 公斤體重計算，每人的安全注射量為 5% 溶液 1,000 毫升，還難滿足臨床要求。並且蛋白質經強鹼處理後，分子量減小很多，在體內停留時間太短，若干作者⁽³¹⁾認為蛋白質業已分解成脲（proteose）。

江崎治夫等氏⁽³²⁾曾將抗原性已經消除的長時間鹼處理產物作進一步的解毒處理，它的產品既無抗原性，又無毒性，但因排泄較快，未作深入的臨床試用。此外，加鹼高熱處理⁽³³⁾，鹼和葡萄糖的混合處理等方法⁽³⁴⁾也曾經有人試用，怎樣利用鹼處理原則、把動物血清製成適用的血漿代用品，目前還沒有獲得妥善解決。

酸也能引起蛋白變性。據稱：動物血清在小於 pH4 的酸性狀態下，可以耐受煮沸，而不凝固⁽³⁵⁾。在我們的初步試驗中，未經沖淡的動物血清加入少量酸後，加熱時反較原來的血清凝固得更快。即使在 pH 小於 4 時，也仍須把血清沖淡一倍以上，才能使它經受煮沸。列寧格勒輸血研究所⁽³⁶⁾用 3% 枸橼酸 100 毫升和 4% 葡萄糖 300 毫升加入 100 毫升血清中，據說在加熱後可以應用，有防治失血的療效。但它的血清蛋白已經沖淡五倍，療效顯然受到限制。

葡萄糖在臨床上一一直被認為有解毒的作用。蛋白和葡萄糖的作用近年來逐漸引起注意，並且有較深入的研究^(34,35)。Зильбер 氏⁽³⁷⁾在 1933 年就指出蛋白質加入葡萄糖後，可以耐受加熱。Lenggenhager 氏⁽³⁸⁾把葡萄糖加熱方法應用在血漿代用品的製備上：每 100 毫升動物血清中，加入 7.7 克葡萄糖，經乾燥後，它的溶液雖受煮沸，而不凝固。經這樣處理後的動物血清，據稱能用作人體注射。我國魯大氏⁽³⁹⁾按照了這原則，進行過一些初步試驗。Филатов 氏⁽⁴⁰⁾在進行類似試驗時，曾強調提出乾燥過程的必要性。在我們的試探性實驗中，無論牛或豬的血清，假如蛋白濃度未經稀釋，那末葡萄糖含量雖達 20% 時，仍難耐受 80°C 以上的加熱處理。增加冰凍乾燥的手續後，也仍須把蛋白濃度沖淡到 4% 以下，才能經受

煮沸。同時，它的粘度增加很多。若干作者^(38,39)認為經過加入葡萄糖煮沸處理後的動物血清，對豚鼠仍能引起典型的過敏反應，而其滲透壓已只剩原有的 1/10，缺乏實際應用價值。

甲醛的解毒作用曾被應用在類毒素的製備上。當採用異種動物血清研究在其他單位還沒有進入採用異種血清階段以前，Ramon 氏⁽⁴¹⁾在 1915 年，就已經在動物血清甲醛加熱處理後、用作血漿代用品的問題上，獲得了很大成就。第二次大戰前後，甲醛處理方法曾引起廣泛的注意⁽⁴¹⁻⁴³⁾。Edwards 氏⁽⁴⁰⁾報告：如在牛血清中加入甲醛和氨，加熱到 72°C 後，球蛋白部份就起變化，而白蛋白部份的變化較少。該作者認為製品具有同人體血漿相近的滲透壓，把它注入 200 例人體時，都沒有發現明顯的反應。Massons 氏⁽⁴⁷⁾用類似方法加熱到 100°C，據稱製品仍具有血漿的生理性能，而無毒性和抗原性。

上述結果雖曾獲得若干作者的支持^(43,48)。但一般認為處理後、血清的抗原性仍然存在，並且滲透壓也已降低到不及原有的 $\frac{1}{2}$ ⁽⁴⁶⁻⁴⁸⁾。個別作者⁽⁴⁴⁾在動物實驗中，還認為它的毒性也還沒有完全消除。但近十年來，用甲醛處理動物血清，數以萬計的人體注射，具有一定臨床效果⁽⁴⁵⁻⁴⁶⁾。

有關動物試驗材料，只供臨床醫師在採用時應加多謹慎考慮⁽⁴⁴⁾。目前很多國家已有按照甲醛加熱原則製造出來的醫藥商品：Isoplasma（西班牙）、Heteroplasma（葡萄牙）、Anaplasma（意大利）、Haemiplasma（法國）、Adaequan（德國）⁽⁴⁵⁻⁴⁶⁾等都已積累較多的臨床和實驗室材料。Massons 氏到 1951 年，已進行了 60,000 次以上的注射⁽⁴⁹⁾；Adaequan 到 1953 年，使用量已超過 15,000 瓶⁽⁵⁰⁾。若干統計報告認為反應率同輸用人血的反應相近⁽⁴⁴⁾。病人可以耐受多次注射：個別病例在連續 28 次注射中，總量達 10,250 毫升，而沒有呈反應⁽⁴⁴⁾。

河石等氏^(72,74)認為無論牛、豬、馬等動物血漿在加入甲醛、氫氧化鈉，和經過 65°C 加熱處理後，都可供臨床採用。有關他的製品 Plasmonal 的材料，已有豐富的文獻報道^(82,72-79)。處理血清的毒性已經消失。抗原性方面產生一種在通常蛋白質少見的現象：對家兔抗血清的沉澱素價雖仍極高，而對豚鼠的致敏性却有明顯的減弱。臨