

近代的組織化学和細胞化学*

姚 鑫

(中国科学院实验生物研究所)

二十世紀是生物学从描述的科学轉向实验的科学时代。許多学科象实验細胞学、細胞生理学、实验胚胎学等等都是在近三、四十年內建立的。在这些学科中有着大大小小的各种理論和假設，例如細胞分裂時染色体运动和細胞質分割的理論，变形运动、纖毛运动和肌肉收缩的理論，原生質膜結構的各种学說，細胞分泌与粒綫体和高尔基体关系的臆說，以及胚胎分化的誘导理論等等。学者各自根据他們自己的观察和实验，对同一生物学现象往往提出不同的看法。为了要肯定一些看法或者否定另一些看法，生物学家不得不进一步去了解这些細胞生理现象的本質。但是当他們要这样做的时候，在很大程度上就受到了關於細胞或者組織本身的化学知識的缺乏的限制。当然，生物化学提供了很多这方面的資料，不过細胞学家和組織学家甚至細胞生理学家常常不能为一般的生化知識所滿足，他們希望直接了解各种物質在細胞和組織內各种形态結構中的分布，以便进而了解这些結構的功能。在这种要求的基础上，隨着一般生物科学、化学和物理科学的發展，細胞学家和組織学家才逐漸創造今天的組織化学和細胞化学。

虽然个别的組織化学反应，如淀粉的碘顏色反应等，远在十九世紀下半紀就被人提出，但一般都公認比国人 Lison 首先奠定近代的組織化学的基础。他在 1936 年出版的“動物組織化学”一書中詳細評述和分析了許多化学物質的染色反应，把它們放在可靠的科学基础上。細胞化学是从瑞典 Caspersson 的核酸紫外光吸收光谱分析和美国 Claude, Dounce 等關於

粒綫体、細胞核的分离研究發展開来的。这些工作都是在第二次世界大战前后發表的。在短短的一、二十年中，組織化学和細胞化学都进展得很快，目前其所应用的研究方法已大大超出了一般生物学工作者的訓練范围，而需要更多的化学家和物理学家的合作来进行工作了。

什么叫做組織化学和細胞化学

組織化学和細胞化学是組織学、細胞学 and 生物化学、分析化学及物理科学之間的邊緣科学，其目的在于运用这些科学的原理和技术，来研究各种各類的化学物質在細胞、組織中的分布和存在的量，为进一步理解細胞生理活動提供科学依据。譬如說，細胞核內的核仁，組織学家只能說明它对于酸性或鹼性染料的染色反应；生物化学家一般也不去注意这样的小东西，而且除了某些体积較大的卵細胞細胞核的核仁外，一般还没有办法收集大量的核仁做分析研究；因此核仁的化学成分是什么？細胞处于不同生理狀況下这些成分有没有变化？等等問題只有从細胞化学的工作中求得解答。又例如脊椎動物的腦垂体是能够分泌很多种激素的。生物化学家能够从大量的垂体提炼出各种生理性能不同的、具有蛋白質性質的激素。在另一方面，組織学家根据染色反应可以將垂体的細胞分为嗜鹼性、嗜酸性和中性的細胞。組織学家根据在不同生理情况下垂体細胞類型改变的情况，也可以猜測这些細胞与激素分泌的可能关系。但是究竟那种細胞分泌那种激素，最后的判断是應該由組織化学和細胞化学工作者来決定的。这两个例子多少說明細胞化学和組織化学是有它們自己的特殊任务的。因此，組織化学和細胞化学也有它們自己的一套

* 根据 1956 年 11 月 6 日在南京中国動物学会南京分会所作的報告写成。

研究方法和理論。

細胞化学和組織化学無論就其研究方法或分析对象來說多少是有些重复的，因为二者所用的方法，特別是以染色方法来鑒別各种化学物質的方法，可以說是相同的。同時許多細胞所呈現的組織化学反应也往往是不均匀的，这些反应也就常常以細胞为分析的对象，所以二者的清楚划分是比較困难的。目前的傾向是把細胞内各种細胞器(Cytoplasmic organoids)分离出来并研究它們的化学組成，或者应用光譜吸收分析法来研究物質在細胞結構内的量和分布的這類工作划入細胞化学的領域；而把許多用显微切片做的染色反应列入組織化学。器官的化学——專門研究物質在同一器官内各組織中的分布及其相互間之關係的學問——当然也包括在組織化学內的。

研究細胞化学和組織化学 有那些方法

根据現阶段發展的情况，細胞化学和組織化学的研究方法大致可歸納为下面五个大類：

一、細胞化学和組織化学的染色方法

凡利用細胞及組織的显微切片对各种或各類的化学物質进行專一性的化学反应，并使反应产物能在显微镜下識別借以鑒定各种或各類物質的分布的方法統屬於此類。一般亦称为显微組織化学(Microscopic Histochemistry)。由于反应的产物是有顏色的或者是能轉化为有顏色的，我們暫時仍称之为染色反应。但是这些反应的原理和化学机制一般是比较明了的，而且大部分的反应也不利用酸性或鹼性染料来達到着色的目的，因此應該同一般的組織学染色法區別開来。在这里值得提到的是假使一个組織学染色方法的化学机制被了解以后，这个方法就可以成为一个組織化学的方法，如粘多糖類物質的異染色反应就是很好的例子。

這類方法中占主要的是高分子物質如核酸、蛋白質、酶、碳水化合物和脂類物質的染色反应，例如鑒定去氧核糖核酸的 Feulgen 反

应，鑒定高分子碳水化合物及其結合物的过碘酸——无色鹼性品紅反应(PAS反应)和鑒定鹼性磷酸酶的 Gomori 方法，都是最常用的細胞和組織化学染色方法。此外，应用作用專一的、極純淨的酶对显微切片做消化試驗，也可以幫助我們鑒定物質在細胞內的分布，象 Brachet 用法用核糖核酸解聚酶来鑒定核糖核酸的分布。

在細胞和組織內也存在着很多低分子物質，对于这些物質的組織化学鑒定，可靠的方法还不多。

对于任何一个細胞及組織化学染色方法應該从各方面去考查它的可靠性，例如研究对象的移位問題，反应产物的扩散和吸附問題，反应的專一性問題等等。用冰凍干燥方法代替一般組織学技术中的化学試剂固定方法的優點之一便是防止研究对象的移位。

一般的說，这些染色方法的最大優點是能够保存細胞和組織的形态結構，但是它們目前还停留于定性鑒別的阶段。如何把它們改变成为定量的方法將是今后这方面發展的主要方向之一。

二、分离分析法

屬於這一類的方法主要是应用显微解剖术、冰凍切片和离心等方法来分离細胞、組織和器官的各个部分，然后用化学分析方法研究这些部分的化学組成。今分为三項簡單介紹如下：

(1)細胞解剖和超微量分析：許多單細胞動物的細胞，无脊椎動物和脊椎動物的卵細胞，組織培养下的單個細胞都可以利用显微解剖操作分离細胞的内部結構，研究其化学組成。許多組成實質器官的細胞也可分別用机械的、缺鈣溶液的和酶的处理或者它們相結合的处理获得單個細胞进行同样的研究。配合這類工作，目前已有很多超微量分析的方法来測定極少量研究材料的体积和重量（一般用微微毫升 $\mu\mu\text{l}$ ，即 $1 \times 10^{-12}\text{l}$ 、微微克 $\mu\mu\text{gm}$ ，即 $1 \times 10^{-12}\text{gm}$ 来表示）并且进行化学的和生化的分析。例如应用一些特殊儀器和方法，可以从生

活細胞抽取 1—10 微微升細胞質，研究某些酶的活力；可以測定一個神經細胞內核糖核酸的含量，並進行其所含核苷酸的分析。利用紫外光進行顯微操作的儀器也正在被設計製造，將來對於了解核酸解聚酶在生活細胞內對核酸的作用等等會有幫助。

(2) 顯微切片的化學分析：這是冰凍切片的組織學研究(包括一些定量組織學的方法)和微量分析相結合的方法，有人稱為 Correlative Histochemistry。丹麥 Linderstrøm-Lang 首先創立這類方法，用以研究器官的組織化學，特別是不同細胞和組織作分層排列的器官，如胃腸粘膜的酶的組織化學。腎上腺、腦組織等也可以用同樣的方法來研究。新鮮組織塊經冰凍後，用低溫切片設備切成連續薄片，分別作組織學(或組織化學)和生物化學分析之用。把生化分析的數據和組織學的分析，象不同類型細胞的計數，不同形態結構相對面積的計算等結合起來研究，可得出關於某些細胞或者形態結構的組織化學特點。例如胃蛋白酶是分布于胃壁的主細胞內的，十二指腸腺含有極豐富的碳水化合物和蛋白質分解酶的結論，就是這樣得到的。

(3) 細胞核及細胞器的分離研究：利用適當的溶媒研磨細胞和組織，所得懸液經不同時間、不同離心速力的處理，可以得到細胞核、粒綫體、微粒(Microsomes)、清液等部分作生化或其他分析之用。最近也有人把高爾基體、細胞分裂時的紡錘體、星綫作分離研究。這類方法的優點是能夠對分離的細胞核或者細胞器同時進行物質的定性和定量分析；但是它也有些缺點，特別是溶媒的非生理性和研磨處理都可能引起物質(尤其是低分子物質)分布的轉移。在最近七、八年中的這方面的研究進展得非常迅速，使我們對細胞質內許多形態結構的化學組成和生理功能有了很多的了解。

三、細胞光譜吸收法

所有化學物質都能吸收電磁輻射，並且由於組成物質的原子和電子的組合和排列不同，

各種物質往往對一定波長的輻射能有特殊的吸收。利用這種特性作物質的鑒別和定量分析是光譜分析的原理。一般組織學的染色反應同樣是利用不同染料對光綫的不同吸收來幫助我們鑒別各種形態結構的。把吸收光譜分析的原理應用到細胞學和組織學中去是一個比較新的研究方向。瑞典 Caspersson 在 1936 年首先利用核酸內所含嘧啶和嘌呤對 250 m μ 紫外光的吸收來分析細胞內核酸的分布。因為設備比較特殊，這類工作沒有得到推廣。近年，由於電子學、光學、X 光技術等方面的進步，細胞光譜吸收工作已擴展到用可見光及 X 射綫來做研究。很可能，可見光範圍的細胞光譜吸收分析將來用途最大，因為所有細胞及組織化學染色反應的產物都是有顏色的，都有可能利用這樣方法來做定量的分析。例如 Feulgen 反應的紫紅色產物在 550—570 m μ 間有特強的吸收，並已被用於測定個別細胞核去氧核糖核酸相對和絕對含量的研究。在可見光範圍進行這類工作需要的儀器包括一定的光源、單色光器、顯微鏡、記錄和照相系統四個部分。記錄系統主要包括極靈敏的倍增光電管和測定光電流強度的儀器。

細胞光譜吸收法的主要優點是能夠對個別細胞、細胞核，甚至個別的核心仁等進行分析研究，而分離分析法進行同樣的研究時一般只能得到統計的結果。這方面的研究工作目前只能算是剛剛開始，許多生物學問題有待用這類方法去研究，而方法的本身也還存在着很多問題需要去解決。

四、新的顯微鏡術的應用

第二次世界大戰以後，顯微鏡術(Microscopy)有非常迅速的進展。許多新型的顯微鏡已有商業產品。有的對細胞和組織化學的研究有直接的用途，有的只有間接的幫助。現在把有關的幾類顯微鏡簡單的提一下：

(1) 對相顯微鏡：我們的眼睛象照相底片或者光電池一樣，只能對光綫強度的改變有敏感。當我們觀察一個生活細胞時，往往只是透

明的一团,无法辨認其中的結構,因为光綫在通过透明的細胞后,強度几乎沒有改变。但是由于細胞各部分的屈折率和厚度并不相同,光綫在細胞内进行的的速度却有了改变,因屈折率的大或者小而变得慢或者快了,这称为相差。对相显微鏡就是通过特殊装置把相差变为光綫強度的差別,使我們能更好地观察生活細胞的結構,研究物理的和化学的因素对于生活細胞的影响,鑒別生活的和受伤的細胞。例如細胞内高尔基体是否为組織固定的人为产物一直是爭論之點,运用对相显微鏡的观察,再結合电子显微鏡,組織化学染色等方法就帮助解决了这一類問題,証明高尔基体是确实存在于一些生活細胞中的。又如 Zollinger 利用对相显微鏡研究粒綫体,对它的結構、形成和它与細胞吸收分泌的關系有很多闡明。在組織化学方面,利用对相显微鏡研究許多化学固定剂对于生活細胞的作用將會有一定的意义。

(2)干涉顯微鏡:对相显微鏡只能把“相差”改变为光綫強度的差別,使屈折率不同的結構肉眼可以看見。干涉显微鏡可直接把“相差”的大小測量出来,由此便可求出細胞内除水以外其他物質的質量,即細胞的干量。例如人的紅血球用于干涉显微鏡測定每个含有31.5微微克的血紅蛋白,这數值与一般用直接分析法測定的數值完全符合。干涉显微鏡已開始被利用于酶活力在組織切片中的定量測定,因为有酶存在的區域,反应产物的沉积必然影响这个區域对光綫的屈折率,所以从相差的改变就可推求酶的分布及其活力的大小。此外,干涉显微鏡也可測定显微切片的实际厚度,是定量組織学研究中的新工具。

(3)电子顯微鏡:这种显微鏡的鑒別力很大,1~100 m μ 大小的結構都可以直接观察。它的主要貢獻是使我們更了解細胞和組織的显微結構,同時給我們提供關於超显微結構的資料。特別應該提到的是近年来电子显微鏡切片技术的进步,它使我們有可能去研究細胞功能改变和結構变化間的联系。电子显微鏡象偏光

显微鏡一样,对于細胞化学和組織化学只有簡接的帮助。

(4)螢光顯微鏡:物質的分子或原子經紫外光激動后,發射出波長較投射光为長的光波称为螢光。螢光的顏色和明度可以在螢光显微鏡下用肉眼來鑒別。它在組織化学中的应用并不很大。有些維生素有特殊的螢光,可以借此鑒定。組織切片經灰化后,可以根据其螢光的性質測定原素在切片中的分布。比較有希望的应用,可能是利用以螢光標記的抗体来研究抗原在組織切片中的分布。

五、放射自显影术

放射自显影术(Radioautography)是放射性同位素在細胞学、組織学上的应用。当含有放射性同位素的化合物的組織切片与照相底片相接觸時,射綫能还原底片上的銀鹽,攝出放射部分的印象,組織切片以后可以染色固封。切片和底片对照研究便可以确定放射性化合物存在的地方。这样,对于了解不同細胞之間或者同一細胞不同結構之間物質代謝的換轉率很有帮助。此外,这种方法对于确定一些在目前組織化学中还没有很好办法去鑒定的物質(如類固醇化合物,許多蛋白質激素和酶等)在細胞組織內的分布提供了希望。应用放射自显影术进行定量分析的方法正在被研究。

細胞化学、組織化学已有的貢獻

細胞化学和組織化学都是比較年輕的、正在發展的科学,因此目前它們的貢獻还不算很多,这里我們只能簡單的介紹几點比較重要的研究成果。

一、核酸的生物学功能

(1)核酸在細胞內的分布:核酸在細胞內的分布是了解核酸功能的必不可缺的資料。細胞和組織化学的染色研究說明去氧核糖核酸(DNA)主要存在于細胞核的染色質和分裂時的染色体中。核仁也有少量的DNA。核糖核酸(RNA)主要是分布于細胞質和細胞核的核仁內,細胞質的微粒內的含量特別多。染色体

也含有少量的 RNA。上述分布也为直接的生化分析所证实。这二种核酸都是高分子化合物,在細胞內和蛋白質結合为核蛋白質。分解这两种核酸的酶已經被提純和結晶出来,所以結合這類酶的使用,細胞化学能够可靠地去研究核酸在細胞內的分布。

(2)細胞核去氧核糖核酸含量的恆定性:細胞学的研究說明各种動植物机体細胞所含染色体數目是恆定的。体細胞一般为双倍体($2n$)。成熟性細胞为單倍体(n)。Boivin 和 Vendrely 在 1948 年提出細胞核去氧核糖核酸含量恆定的理論。他們用測定分离細胞核 DNA 的方法,說明在同一動物各种体組織每一細胞核的 DNA 含量是恆定的,而成熟性細胞核的含量恰为体細胞核的一半。这一結果以后为別的学者在許多其他物种上证实。最近用細胞光譜吸收法也证实了生化分析結果的正确性,并且还發現了高等動物細胞的多倍体现象。这种多倍体现象在不同的体組織并不相同,例如肝臟、胰臟細胞核 DNA 的含量有相当于 $2n$, $4n$ 和 $8n$ 的三類,而腎、腸細胞核只有 $2n$ 一類。同时,Feulgen 反应的光譜吸收法也証明当細胞进行有絲分裂時,在間期(interphase)的后期,細胞核的 DNA 含量增加一倍;以后在分裂的前期、中期、末期和后期 DNA 含量不再变化。細胞核去氧核糖核酸含量恆定的生物学意义是什么,这种恆定性与細胞的遺傳性有什么關係,都是需要进一步的研究才能闡明的問題。

(3)核酸和蛋白質綜合的关系:核酸,特别是 RNA 与蛋白質綜合有密切關联一點已經是公認的事实。这个理論最初是由 Brachet 从組織化学研究和 Caspersson 从紫外光吸收光譜分析的結果提出来的。他們都發現凡是生長旺盛的組織或者是大量綜合蛋白質的組織含 RNA 都比較丰富,前者如胚胎組織、再生組織和惡性瘤腫組織,后者如胰腺、唾液腺、淋巴球和漿細胞。这些細胞細胞核的核仁都非常显著,有的其數目也有增加。反之,不在生長

的或不大量綜合蛋白質的組織其 RNA 含量就很低。这个理論推動了很多研究。近来用分离的粒綫体和微粒做实验,說明这些細胞器在适当条件下能利用标记的氨基酸合成蛋白質。这些細胞器都含有 RNA 和很多的酶。但是究竟 RNA 在蛋白質合成中起什么作用,究竟蛋白質綜合的中心是在細胞質內还是在細胞核內,在整个过程中細胞核与細胞質又怎样交互作用等,都是沒有解決的問題。

(4)核酸与細胞分化:細胞分化的机制始終是实验胚胎学中的一个难题。一般的說,組織在分化过程中細胞質內的 RNA 含量是逐漸减少的,只有具有特殊生理功能的組織,象上面提到的腺体、淋巴球、神經原細胞等等,在分化完成后繼續擁有很多的 RNA。Gustafson、Hultin 等最近在海胆方面的研究說明粒綫体是在發育过程中逐漸形成的,沒有分化的細胞中微粒比較多,而已分化的細胞中粒綫体比較多。这些結果似乎是和組織分化过程中 RNA 含量的减少相符合的,因为細胞質中的 RNA 有一半以上是結合在微粒內的。

Moore 用 Feulgen 反应的光譜吸收法曾經研究兩棲類單倍体胚胎和双倍体胚胎的 DNA 含量。他發現在老的、已分化組織的每個細胞核的 DNA 含量的變動範圍比較狹,而在年輕的、未分化的或分化程度淺的組織內 DNA 的含量的變動範圍比較大。这些 DNA 含量的變動与細胞分裂沒有直接的關係,因此可能意味着 DNA 参与細胞分化的活動。

二、細胞化学、組織化学对于比較生理学的貢獻

動物的各种器官都有它一定的生理功能。賦有相同生理功能的器官,在不同的高等和低等動物,其形态結構可以相似,也可以很不相同。根据功能和形态相統一的概念,比較生理学的任务,就是要研究同功器官間的異同性,来闡明生理功能演化的規律。組織化学在这方面能够起一定的作用。例如用 Gomori 的鹼性磷酸酶組織化学鑒定法,可以証明這類酶是广

泛分布于哺乳類、鳥類、爬虫類、兩棲類和魚類的腸膜表皮細胞的紋狀緣上面；很多无脊椎動物的腸膜也有類似的分布。同样，哺乳類腎臟的后曲管細胞的刷狀緣也有非常丰富的鹼性磷酸酶；在低等脊椎動物的腎臟和无脊椎動物的排泄器官（如昆虫的馬尔基氏管）中也有這類酶的存在。然鹼性磷酸酶的生理功能还不完全了解，以前認為这种酶只有水解的作用，現在証明它也有轉換磷酸根的作用。但是上述广泛的和相類似的分布至少說明鹼性磷酸酶與細胞的吸收和分泌功能有很大的關係。可惜用电子显微鏡来比較这些同功器官的显微和超显微結構的工作还非常少見。我們認為运用組織化学的方法，結合电子显微鏡和生物化学的方法去研究一些比較生理学方面的問題，是有很大意义的。

这里應該附帶說明細胞及組織化学不但对于比較生理学，就是对于正常生理学和病理学也可以有貢獻。近年来用這類方法去研究結構复杂的器官（如腎臟）的生理功能和病理过程（如腫瘤形成）的工作非常多，并且也取得了一定的成就。

三、細胞的生化組成与形态結構間的關联

自从 Claude 在 1943 年应用离心方法来分离細胞質的顆粒以后，粒綫体与微粒的分离研究立刻就成为生物化学家和細胞学家的共同兴趣。随着提取方法的改善，同位素和电子显微鏡技术的应用，这方面的研究进展得很快，已經成为細胞化学研究中一个最活躍的領域。它使我們更了解物質在細胞內的分布，更了解細胞質中一些顆粒的生理功能。

就从動物肝臟提取的粒綫体來說，它主要是由蛋白質和磷脂類物質組成，外此含有极少

量的 RNA 和一些低分子物質。粒綫体的外表包被着有選擇性滲透作用的膜，內部有复杂的橫隔結構，膜和橫隔都是由脂蛋白組成的。在粒綫体内部的液相存在許多酶、輔酶和酶的作用物等物質。根据許多作者的研究，粒綫体是細胞呼吸的中心，它含有細胞絕大部分的氧化碳水化合物、脂肪或蛋白質分解物所必需的全套酶系（三羧循环酶系）。从氧化过程产生的能，又可經另一些酶的作用而轉至一些含高能磷鍵的有机磷化物，最后轉至腺三磷。這類能的轉換反应直接参与許多綜合过程，因此粒綫体也是細胞各种活動所需能的供应站。氧化和一些磷酸化酶系集中在有結構的粒綫体里面不是一件偶然的事，这些酶也不是隨便混在一起的，而是有着一定的空間組合關係。这种關係，我們目前还不完全了解，但是有一點似乎是肯定的，就是只有把这些酶系集中在这類細胞器里面，并且保持一定的空間關係，細胞才有可能在氧化、能的轉換和綜合等反应的相互配合方面，获得最大的功率。

各种細胞的粒綫体，甚至各种動物的粒綫体，其基本的結構、化学組成及生理功能是极相似的，这是形态与功能相联系的一个很好的例子；但是最近的研究也表明不同器官的粒綫体，可以持有一些与所屬器官相适应的代謝特點。

上面我們只是簡單的介紹了一些細胞化学和組織化学的方法和成就，可能是不够全面的。我們認為把這類研究方法运用到各种生物学問題上去，特別是用各种不同的方法来研究同一个問題，是可以获得很多有价值的資料的。

