

绵羊、肉牛不同组织酶化学定位的研究*

丁伯良

(西北农业大学兽医系)

A. Newton R. M. Barlow

(英国伦敦大学皇家兽医学院)

摘 要 选用屠宰绵羊与肉牛各 10 头的新鲜回肠、肝、肾、肺、脾和淋巴结作 5 种酶在组织中的位置与活性的比较研究。结果表明：在回肠与肾脏，以碱性与酸性磷酸酶活性最强，主要分布于肠绒毛上皮细胞与肾皮质近曲及远曲小管；在肝脏，酶主要位于实质细胞内，其中酸性磷酸酶活性明显；在肺脏，细支气管呼吸上皮内非特异性酯酶的活性最强；脾脏的红、白髓处相应为酸性磷酸酶最强活性部位；在淋巴结，以碱性磷酸酶与琥珀酸脱氢酶最为活跃，主要集中于皮质部的淋巴滤泡内。

关键词 酶，活性，组织化学，绵羊，肉牛

中图分类号 S852.165, S858.230.2165, S858.260.2165

近年来在医学与兽医学领域对酶组织化学研究已日趋普遍。酶组织化学技术已广泛应用于人类和动物一些疾病的研究，其中包括一氧化碳中毒引起的肝和肾的损伤，脂肪肝、肝细胞瘤、Niemannpick 病、小鼠肝损伤、大鼠亚得里亚霉菌肾病、大鼠急性肾衰、牛白血病引起的淋巴结变化与犊牛腹泻引起的肠粘膜变化^[1,2]。然而，酶组织化学在反刍兽组织中的应用却鲜为研究，仅见报道的有绵羊和肉牛肝脏中一些水解酶与氧化酶的分布^[3,4]。本文旨在通过组织化学方法建立酶在绵羊与肉牛中的正常分布，为研究反刍兽不同组织的病理变化提供参考依据。

1 材料和方法

1.1 动物组织的选择

在英国 Bedford 屠宰场任意选取绵羊与肉牛各 10 头的新鲜组织——回肠、肝、肾、肺、脾和淋巴结。它们的胴体与器官经肉品卫生检验均属正常。

1.2 试剂

巴比妥钠、氯化钙、硫酸镁、 β -甘油磷酸钠、盐酸副萘胺、硝酸钠、二甲肿酸盐、萘酚 AS-BI、二甲替甲酰胺、羟甲基氨基甲烷缓冲液、 α -醋酸萘酯、亚硝酸钠、硝基-BT 液、琥珀酸钠、吩嗪甲硫酸、L-亮氨酸-4-甲氧基 β -萘酰胺、氰化钾、坚牢蓝盐等。以上试剂均购自英国 SIGMA 化学公司。

文稿收到日期：1990-05-17。

* 本研究在英国伦敦大学皇家兽医学院病理系完成。

1.3 组织样品的处理

将绵羊与肉牛中的新鲜回肠、肝、肾、肺、脾和淋巴结切成 3~4mm 厚度, 放入用液氮冷却的异戊烷 30s, 组织块在 -70℃ 低温冰箱内保存, 所有被检组织在 -18℃ 低温切片机内切成 10μm 薄片, 将新鲜未固定切片孵育以确定酶的活性。

1.4 酶组织化学方法

(1) 碱性磷酸酶 (ALPase) 选用磷酸钙法 (pH9.4) 以 β-甘油磷酸钠 (Sodium β-Glycerophosphate) 为基质, 37℃ 下孵育 2h^[5]。

(2) 酸性磷酸酶 (ACPase) 采用经改进的萘酚 ASBI 磷酸法^[6], 本试验用二甲胂缓冲液 (pH7.6) 在室温下孵育 1h^[6]。

(3) 非特异性酯酶 (NSE) 采用 α-萘酚醋酸酯 (α-Naphthyl acetate) 法, 37℃ 下孵育 10min^[6]。

(4) 琥珀酸脱氢酶 (SDH) 选用硝基-BT 液 (Nitro Blue Tetrazolium) 法^[6], 37℃ 下孵育 45min。

(5) 亮氨酸氨肽酶 (LAPase) 选用 L-白氨酸-4-甲氧基 β-萘胺 (L-Leucyl-4-Methoxy β-Naphthylamide) 法 (此方法仅应用于回肠组织), 37℃ 下孵育 30min^[6]。本试验在封固时用 DPX 取代甘油胶。

本研究在制作试验切片时, 均同时制作对照切片, 以排除假阴性或假阳性结果。此外, 每个组织切片还分别作苏木精-伊红常规染色, 以确定一般形态学特征。

1.5 酶活性强度的表示法

酶组织化学反应应用以下标准显示: “0”表示无反应; “1+”表示弱反应, 在细胞内仅有少量反应产物的分散颗粒; “2+”表示中等程度反应, 反应产物散布于细胞质内; “3+”表示强反应, 细胞内有大量反应产物; “4+”表示剧烈反应, 细胞内反应产物密集沉淀。

2 结 果

绵羊与肉牛不同组织的酶组织化学活性见表 1。

表 1 绵羊与肉牛不同组织的酶活性

酶	绵 羊						肉 牛					
	回肠	肝	肾	肺	脾	淋巴结	回肠	肝	肾	肺	脾	淋巴结
ALPase	4+	1+	4+	2+	3+	4+	4+	1+	4+	1+	3+	3+
ACPase	4+	2+	3+	3+	2+	3+	4+	3+	4+	3+	3+	3+
NSE	3+	2+	4+	3+	3+	3+	3+	2+	4+	2+	2+	2+
SDH	2+	2+	2+	2+	3+	3+	3+	3+	2+	1+	3+	3+
LAPase	3+						3+					

2.1 回肠的酶活性

ALPase 活性主要位于绵羊与肉牛的绒毛上皮细胞的顶端部 (图 1), 单个淋巴小结

边缘呈中等程度阳性反应。ACPase 活性集中于绒毛上皮细胞和肠腺的周边 (图 2), 在肉牛的许多单个淋巴小结也有强烈反应。NSE 分布在上皮细胞的细胞质内, 从绒毛至腺管的活性逐渐减弱。SDH 活性在牛的回肠较强, 主要密集在绒毛上皮, 而在腺管上皮的活性则较弱。LAPase 在肉牛绒毛上皮细胞内有强烈反应 (图 3), 但在腺管上皮几乎无反应, 尽管延长孵育时间。

2.2 肝脏的酶活性

ALPase 仅在绵羊与肉牛的窦状隙内有较弱反应。ACPase 在肉牛的肝细胞质与汇管区内有明显反应, 但在星状细胞内反应较弱。在绵羊的肝实质细胞内有中等程度反应。NSE 分布于整个肝实质细胞 (图 4), 而内皮及结缔组织未见有此酶染色。SDH 活性集中在汇管区周围。在肝实质细胞的细胞质内活性较低, 其中牛肝脏内该酶活性强于绵羊。

2.3 肾脏的酶活性

ALPase 集中于肾脏的近曲小管与远曲小管, 其中绵羊肾脏的 ALPase 活性明显比肉牛肾脏 ALPase 强烈。ACPase 活性局限分布于肾皮质, 其中在远曲小管与近曲小管的 ACPase 活性较强。一般来说, 牛肾近曲小管活性强于绵羊。NSE 活性明显分布在近曲小管与远曲小管 (图 5), 偶而在集合管内存有少量 NSE。SDH 集中于一些近曲小管、远曲小管、上皮细胞和集合管的细胞质内, 其中肉牛肾内 SDH 活性强于绵羊。

2.4 肺脏的酶活性

ALPase 活性分布于绵羊的一些肺泡壁内, 偶而见于细支气管的呼吸上皮。在肉牛, 上述部位的 ALPase 活性明显减弱。ACPase 在肺泡壁和细支气管呼吸上皮内的活性较强, 在肉牛肺组织内, 它的活性更为明显。NSE 活性集中于细支气管 (图 6), 偶而在肺泡壁见有少量 NSE, 其中绵羊细支气管内 NSE 活性强于肉牛。SDH 染色均集中于肉牛和绵羊所有细支气管的呼吸上皮内。

2.5 脾脏的酶活性

ALPase 活性在骨髓较强烈, 其活性颗粒集中在骨髓边缘 (图 7)。此酶在绵羊与肉牛脾脏内的分布几乎相同。ACPase 活性在红髓较强烈, 而在骨髓较弱。牛脾内 ACPase 活性强于绵羊。NSE 存在于红髓与骨髓, 但红髓内 NSE 颗粒明显多于骨髓, 绵羊脾内 NSE 活性强于牛脾。SDH 活性在本研究所有肉牛的脾脏内均呈中等程度反应。在一些红髓内见有部分 SDH 活性颗粒, 而骨髓内反应较弱。

2.6 淋巴结的酶活性

ALPase 在绵羊和肉牛的淋巴结内均有较强的活性, 其中在淋巴滤泡和皮质深部更为强烈 (图 8)。髓质部的活性也很强, 尤其在髓索处。本研究所有绵羊和肉牛淋巴结中的 ACPase 活性分布基本相同, 主要集中于髓索部, 髓索处也有中等程度活性。NSE 活性明显集中于髓索, 而在髓索和淋巴滤泡内的反应较弱, 绵羊淋巴结内 NSE 活性强于肉牛。大量 SDH 活性颗粒分布于整个淋巴滤泡, 绵羊和肉牛淋巴结内 SDH 活性强度大致相同。

3 讨 论

酶组织化学在实验动物(例如大鼠)的研究已有较多报道。然而,正常的反刍兽组织中酶组织化学方面的研究资料甚少。仅对绵羊与牦牛^[3,4]的肝脏作过一些酶组织化学的研究。在本试验之前尚未见有人对正常的绵羊和肉牛组织作酶组织化学的系统和比较研究。

本研究采用的组织化学技术均选用 Drury^[5]和 Bancroft^[6]法。唯一不同的是本试验在某些酶的酶组织化学实验中对孵育时间作了适当的改变。Brinn^[7]建议,酶孵育时间在室温下通常需 60min 或更长时间。但若改用微波炉孵育,将温度控制在 38℃,可大大缩短孵育时间,同样获得良好结果,这是值得借鉴的一种好方法。

绵羊和肉牛回肠的酶组织化学研究是本试验的重点。研究表明,几种酶的活性均集中在回肠上皮细胞内。这与其它种动物^[4,8,9]的回肠酶活性反应基本是一致的。据报道,黑猩猩、猴和人的小肠腺管中 SDH 活性强度几乎与肠绒毛内 SDH 活性相同。本试验反刍兽回肠的酶组织化学研究表明,绒毛上皮细胞内 ACPase 和 SDH 活性比腺管细胞更强。这与 Landsverk^[11]与 Stigimair^[12]等的报道是一致的。

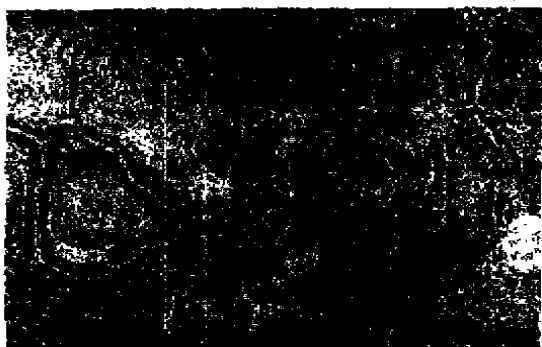
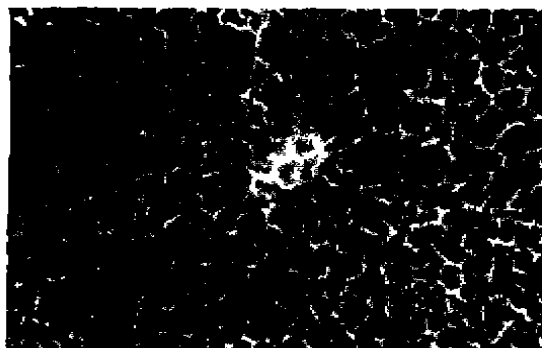
在绵羊、牦牛、大鼠、小鼠、狗、猫、牛和禽类的肝脏中,酶活性均较强^[3,4]。本研究对绵羊与肉牛肝脏的试验表明,ACPase, NSE 和 SDH 活性强烈,但 ALPase 活性却很弱,尽管延长了孵育时间。

有关绵羊与肉牛肾、肺、脾和淋巴结等组织中不同酶活性的正常分布方面的报道较少。Mcguire^[10]曾记载,ACPase 在啮齿动物肺泡巨噬细胞内的分布。本研究已发现,在绵羊和肉牛的肾脏中,上述几种酶对其均有明显活性,常集中在近曲小管与远曲小管内。在肺脏, NSE 和 SDH 活性主要集中在肺细支气管内,而 ACPase 和 ALPase 常分布于肺泡壁。绵羊肺脏的酶活性高于肉牛。在脾脏, ACPase, NSE 和 SDH 活性常集中于红髓,而 ALPase 分布在白髓。在淋巴结, ALPase 和 SDH 的明显反应密集于淋巴滤泡, ACPase 和 NSE 活性在髓索最强烈。

试验证明,本研究采用的酶组织化学方法对绵羊和肉牛中正常组织——回肠、肝、肾、肺、脾和淋巴结的酶活性指示与一些细胞结构的标记是合适的。

图版 绵羊、肉牛不同组织酶活性的分布

1. 绵羊回肠: 碱性磷酸酶活性密集于绒毛上皮细胞(箭头), 少量位于基底部, 磷酸钙法, ×100;
2. 绵羊回肠: 酸性磷酸酶活性分布于绒毛上皮细胞的顶端细胞质内(箭头), 苯酚 ASBI 磷酸法, ×100;
3. 肉牛回肠: 白氨酸氨基肽酶活性在绒毛上皮细胞内呈强烈反应(箭头), 但在腺管上皮内无明显反应, L-白氨酸-4-甲氧基 β-萘胺法, ×100;
4. 肉牛肝脏: 非特异性酯酶分布于整个肝实质细胞, 但内皮及结缔组织内未见有此酶染色, α-萘酚醋酸酯酶法, ×100;
5. 肉牛肾脏: 非特异性酯酶活性分布在许多近曲小管与远曲小管内, α-萘酚醋酸酯酶法, ×100;
6. 绵羊肺脏: 非特异性酯酶活性集中于细支气管(箭头), 偶而在肺泡壁见有少量此酶染色, α-萘酚醋酸酯酶法, ×100;
7. 肉牛脾脏: 碱性磷酸酶活性在白髓较强烈, 主要集中在白髓边缘(箭头), 磷酸钙法, ×100;
8. 绵羊淋巴结: 碱性磷酸酶活性在淋巴滤泡(箭头)和皮质深部较强烈, 磷酸钙法, ×100



参 考 文 献

- 1 Landsverk T. An enzyme histochemical investigation of the intestinal mucosa in diarrheic calves. *Acta Vet Scand*, 1981, 22(3/4): 449~458
- 2 Stiglmeier H, Maria T, Pospischil A. A new method for the analysis of intestinal enzyme histochemistry: A comparison of healthy and diarrheic calves. *Zentralbl Veterinärmed Reihe A*, 1985, 32: 249~263
- 3 Gopinath C, Thorpe E. The comparative histochemistry of some hydrolytic and oxidative enzyme in the livers of several domestic and laboratory animals. *Res Vet sci*, 1968, 9: 435~442
- 4 Manns E, Mortimer P H. Liver enzyme histochemistry: A comparative study of sheep, calf and rat. *J Comp Path*, 1969, 79: 277~284
- 5 Drury R A B. Carleton's histological technique: Enzyme histochemistry. 4th ed. New York: Oxford Univ Press, 1967, 243~244
- 6 Bancroft J D. Histochemical techniques. 2nd ed. London: Butterworths, 1975, 246~247, 259~261, 279~281, 296~297
- 7 Brinn Nathan, Wayne Terrell. Selected enzyme histochemical techniques facilitated by the microwave oven. *J Histotechnol*, 1986, 9(4): 231~234
- 8 Fowler E H, Rohovsky M W. Enzyme histochemical activity in small intestine of the Germfree cat. *Am J Vet Res*, 1970, 30(8): 1423~1428
- 9 Saloniemi H, Rahko T. On the enzyme histochemistry in the ileum of the pig. *Nord Vet Med*, 1972, 24: 151~155
- 10 McGuire M C. Localization of acid phosphatase, esterase and lysozyme within alveolar macrophages of rodent lung. *J Histotechnol*, 1988, 11(2): 95~98

Studies on Localization of the Enzyme Histochemistry in Tissues of Sheep and Cattle

Ding Boliang

(Department of Veterinary Medicine, Northwestern Agricultural University)

A. Newton R. M. Barlow

(Department of Pathology, Royal Veterinary College, Hatfield, England)

Abstract T. ileum, liver, kidney, lung, spleen and lymph node tissues from ten freshly-slaughtered sheep and ten freshly-slaughtered cattle are selected to carry out the comparative study of the normal locations and activity of 5 enzymes in tissues. The results indicate that the enzyme activity of T. ileum and kidney in sheep and cattle was concentrated in the most apical portion of the villus epithelial cells and convoluted tubules; in livers, levels for different enzyme activity were strong in the hepatic cells; in the lung, these enzyme patterns were demonstrated in the respiratory epithelia of bronchiolus; in the spleen, ALPase was distributed in the white pulp, but ACPase was strong reaction in the red pulp; in the lymph node, ALPase and SDH activity was concentrated in the lymphonodulus, but ACPase and NSE activity was extremely strong in the medullary cord.

key words enzyme, activity, histochemistry, sheep, cattle