

## · 实验研究 ·

# 硫代乙酰胺诱导的门静脉高压大鼠 肝脏超微结构观察

许浩 施宝民 杨镇 王秀艳 马宏岩 穆庆岭 吴泰璜

**【摘要】** 目的 该研究以硫代乙酰胺复制门脉高压大鼠模型,对成模后的大鼠肝脏超微结构进行观察,探讨门脉高压大鼠肝脏超微结构的变化。方法 50 只大鼠分为造模组(40 只)和正常对照组(10 只)。造模组采取前 5 周使用 0.03% 的硫代乙酰胺,后 5 周使用 0.04% 硫代乙酰胺作为其饮用水,共诱导 10 周成模。对成模大鼠测定肠系膜上静脉压力,取硬化后肝脏标本,对收集后标本行 HE 染色,同时行电子显微镜观察肝脏超微结构变化。结果 模型组内皮细胞窗孔数量明显少于对照组,同时,门静脉压力明显高于对照组。结论 肝窦毛细血管化在硫代乙酰胺诱导的肝硬化门脉高压发生中起重要作用,肝窦内皮细胞窗孔减少并减小,内皮细胞下基底膜形成使肝细胞与外界物质交换减少,导致细胞缺氧、代谢产物聚集,肝细胞坏死,最终导致门脉高压的发生。

**【关键词】** 肝硬化; 门静脉高压; 内皮细胞窗孔; 肝窦; 电镜

**Ultrastructural changes in TAA induced hepatic cirrhosis in rats** XU Hao\*, SHI Bao-min, YANG Zheng, et al. \* Department of Hepatobiliary & Pancreatic Surgery, Shandong Provincial Hospital, Jinan 250021, P. R. China

**【Abstract】** Objective To observe the ultrastructural changes in liver after portal hypertension in rats. Methods A total of 50 rats were divided into the model groups (40) and control groups (10). The rats in the model group accepted 0.03% TAA administration. Five weeks later, the concentration of TAA was changed to 0.04% for induction for 10 weeks to establish the model of portal hypertension. The pressure of superior mesenteric vein was determined and cirrhotic liver samples obtained. The ultrastructural changes of were observed under electron microscope. Results The fenestra quantity of endothelial cells was significantly lower in the model group ( $P < 0.01$ ). The portal vein pressure was markedly higher in the control group ( $P < 0.01$ ). Conclusion Hepatic sinusoid capillarization plays an important role in occurrence of portal hypertension. The fenestra of endothelial cells in hepatic sinusoid reduces and the diameter of fenestra decreases. The formation of basement membrane impairs the substance exchange between blood and hepatic cells, which results in oxygen deficiency, metabolic product accumulation and cell necrosis.

**【Key words】** Liver cirrhosis; Portal hypertension; Fenestra; Endothelial cell; Electron microscope

门脉高压的发生与门脉后阻力增高密切相关,而后者可因肝细胞大片坏死网状支架塌陷所致,也可由缩血管物质的释放使肝微血管和肝窦收缩所致<sup>[1]</sup>。肝窦内皮细胞窗口最早在 1970 年由 Wisse 和 btaet 等<sup>[2,3]</sup>以透射电镜发现,当时被定义为相邻内皮细胞间的直径约 110 nm 的孔隙。该窗孔正常形态的维持对于肝细胞与肝窦间的物质交换及肝细胞的代谢密切相关<sup>[3,4]</sup>。该研究对硫代乙酰胺诱导

的门脉高压大鼠肝脏进行了超微结构观察,对门脉高压时肝脏内皮细胞窗孔的变化进行了探讨。

## 材料与方 法

1. 模型制作及门脉压力测定:大鼠 50 只(Wistar 雄性大鼠,体重 250~300 g)随机分为:肝硬化诱导组 40 只(A 组):前 5 周使用 0.03% 的硫代乙酰胺 TAA(购自国药集团上海化学试剂公司),后 5 周使用 0.04% 硫代乙酰胺作为其饮用水,共诱导 10 周成模 29 只。对照组 10 只(B 组):正常饮水,正常饮食。造模成功后氯胺酮肌注麻醉后取肝脏标本。采用标尺法测定门静脉压力。4.5 号头皮针穿刺肠系膜上静脉根部成功后外接输液器,少量输液后

资助项目:国家自然科学基金面上项目(30300341),山东省自然科学基金(Y2004Z12)

作者单位:250021 济南,山东大学山东省立医院肝胆胰外科(许浩、施宝民、马宏岩、穆庆岭、吴泰璜),超声诊疗中心(王秀艳); 430030 武汉,华中科技大学附属同济医院外科(杨镇)

通讯作者:施宝民,电子信箱:baomins@tom.com  
万方数据

头皮针管内充满液体,拨开与输液器连通处,垂直提起头皮针管,观察液柱逐渐下移直到液柱稳定,测量该高度,以厘米水柱(cm H<sub>2</sub>O)记录为门静脉压力。

2. 电镜观察:取出肝硬化门脉高压大鼠肝脏标本,切成 0.3 cm×0.3 cm×0.1 cm 大小,取材后尽快浸入戊二醛固定液内再置于 4℃ 冰箱保存(最好在 1 min 内浸入戊二醛,以避免肝细胞器发生溶解,影响结果的观察)。所用设备及试剂:日本电子(JEOL)JEM-1200EX 透射电镜,戊二醛(日本),锇酸。

### 结 果

1. 门静脉压力测定结果:共有 11 只大鼠在造模前后成功测定了门静脉压力(表 1),行前后对照 *t* 检验(表 2)。查 *t* 界值表, $P < 0.05$ 。有显著统计学意义。可认为硫代乙酰胺诱导前后模型组静脉压力有显著变化,诱导后门脉压力显著大于诱导前。

2. 电镜结果:(1)肝硬化门脉高压肝组织超微结构:整体结构肝细胞比例减少,肝细胞凋亡,成纤

维细胞大量增加,枯否细胞增加,肝细胞大片坏死后网格状塌陷。主要病理变化为肝窦内皮细胞化,包括肝窦内皮细胞窗口消失、基底膜形成,星状细胞活化,狄氏间隙胶原沉积。①肝细胞:可见大量肝细胞凋亡,凋亡早期的肝细胞异染色质边集,线粒体水肿,细胞器溶解,细胞呈空泡样变,相邻肝细胞间的细胞连接消失,细胞边界不清,细胞连接消失,细胞内出现大量胆红素颗粒。凋亡细胞核深染,胞质浓缩。细胞内糖原颗粒消失。②肝细胞界面:窦状隙面肝细胞微绒毛消失,微绒毛基部的胞质中吞饮泡和含有致密无定形物质的小泡明显减少,细胞质混沌不清。毛细胆管形成面,毛细胆管管腔扩张,其内微绒毛消失。形成毛细胆管的相邻肝细胞的质膜连接处的紧密连接结构消失,胆汁渗入肝细胞胞浆内。③窦状隙:内皮细胞窗孔消失,形成完整基膜,细胞间连接消失,细胞内出现胆红素颗粒。肝窦管腔扩张,聚集,管腔相互沟通,肝窦内出现胆红素颗粒。④狄斯隙:间隙变窄,狄斯隙内肝细胞微绒毛消

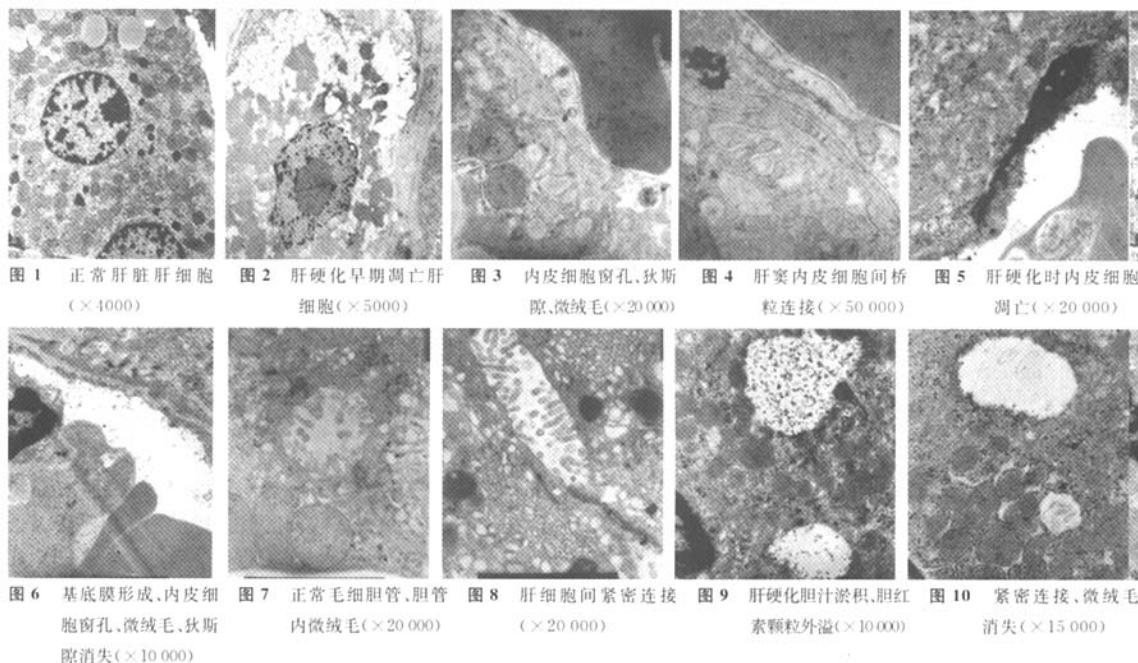


表 1 大鼠造模前后门静脉压力测定结果(cm H<sub>2</sub>O)

大鼠组别	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10	N11
A 组	18.5	18	18	18.5	18.5	18.5	17.5	18	15.5	17.5	18.6
B 组	9.0	10.2	10.3	8.6	9.2	9.5	10.2	7.8	8.2	9.5	10.0

表 2 经检验正态分布方差齐,采用配对 *t* 检验

组别	平均值	标准差	标准误	95%可信区间	<i>t</i> 值	df	显著性概率
A-B	8.6000	1.04403	0.31479	7.8986~9.3014	27.320	10	0.000

失,内皮细胞基膜出现。2. 正常、肝硬化门静脉高压、转基因后肝窦内皮细胞窗孔数量的改变:随机选取 10 个 20 000 倍下直径在 2~3 μm 的肝窦,计算其内皮细胞窗孔数(表 3),行方差分析多重比较 LSD(表 4)。硬化组与正常对照组比较(A-B): $P < 0.01$ ,故认为肝硬化时肝窦内皮细胞窗孔数量明显减少。

表 3 大鼠硬化组(A)和对照组(B)肝窦内皮细胞窗孔数量对照表

组别	N1	N2	N3	N4	N5	N6	N7	N8	N9	N10
A 组	2	1	3	2	4	1	1	2	4	3
B 组	8	7	9	10	6	7	5	9	8	5

表 4 硬化组与正常组肝窦内皮细胞窗孔数量比较 (SPSS 软件方差分析多重比较 LSD 法)

均差	标准误	Sig.	95%可信区间
-2.3000	0.64031	0.001	-3.5986~-1.0014

### 讨 论

肝窦状隙内皮细胞与肝细胞之间的间隙称狄斯隙,血浆通过内皮细胞的窗孔进入狄斯隙,狄斯隙间可见由肝细胞向间隙内凸起的微绒毛。窦状隙窦壁的大部分衬以内皮细胞。该细胞可见很多 100 nm 的小孔,称为窗孔,这些窗孔聚集成簇称为筛板,窗口占整个内皮细胞表面积的 6%~8%。借助于窗孔,血浆、白蛋白、脂蛋白可由肝窦内向狄斯隙移动,而血细胞、血小板、大的乳糜微粒则无法通过窗孔<sup>[5]</sup>。正常肝窦内皮细胞缺乏基底膜,窗孔的大小和数量受多种物质的调节,其中包括激素、细胞因子、肝窦内压力、神经递质、酒精、烟碱及内毒素等<sup>[6]</sup>。

肝细胞朝向肝窦状隙的界面称为窦状隙面。表面有许多微绒毛深入狄斯隙,微绒毛长而弯曲,可有分支。微绒毛基部的胞质中有许多吞饮泡和含有致密无定形物质的小泡,这是肝细胞吸收或释放大分子的一种形式。血液中的大分子可经窦状隙进入狄斯隙,被肝细胞的吞饮活动摄入小泡,吸收至细胞内。肝脏合成的蛋白质也通过分泌小泡分泌至狄斯隙。

二个或几个相邻肝细胞之间的间隙局部扩大,形成毛细胆管。相邻肝细胞质膜即为其管壁。肝细胞毛细胆管形成面有微绒毛深入管腔,微绒毛较窦状隙面的短小,形成毛细胆管的相邻肝细胞的质膜连接处有紧密连接结构。防止毛细胆管中的胆汁顺

细胞间隙外渗。

王新保等<sup>[7]</sup>报道肝硬化门静脉高压症病人门管区内皮细胞和肝窦壁内皮细胞凋亡和坏死明显增加。慢性肝病时肝窦内皮细胞化,在形态上可见窗孔数量减少并直径减小,内皮细胞下基底膜形成。窗孔变小、数量减少以及基底膜形成可使营养和气体交换发生障碍。肝脏微循环障碍,造成肝细胞缺血缺氧,进一步加重肝细胞损害和肝功能障碍<sup>[5]</sup>。Lu 等<sup>[8]</sup>认为,肝窦毛细血管瘤化是肝纤维化过程中的一个重要病理过程,其主要形态学改变表现为肝窦内皮失窗孔及内皮基底膜的形成。并认为门脉高压的发生与此有关:(1)肝窦毛细血管瘤化由于内皮失窗孔及内皮下基底膜的形成直接导致肝窦壁增厚,窦腔变窄。(2)肝窦毛细血管瘤化加剧肝细胞变性肿胀,从而压迫肝窦。据笔者实验观察,肝窦毛细血管瘤化是肝硬化门脉高压一个重要病理过程,其伴随着肝细胞大片坏死网格状塌陷,且毛细血管瘤化的肝窦排列紊乱,聚集在一起,仅以内皮细胞相隔,形成网格状结构,互相沟通。

在实验中笔者发现肝细胞表面微绒毛减少或消失,这表明肝细胞膜与外环境交换减少。且由于缺氧胆汁分泌功能受到影响,因此毛细胆管面微绒毛消失,肝细胞间的紧密连接消失。缺氧导致线粒体肿胀、嵴崩解、外膜破碎和基质外溢<sup>[9]</sup>。缺氧糖酵解增强使乳酸生成增多和脂肪氧化不全使酮体生成增加导致细胞酸中毒。pH 降低胞浆游离钙增加引起磷脂酶活性增强,溶酶体膜被分解,膜通透性增强,溶酶体肿胀,破裂、大量溶酶体酶释出。细胞器包括线粒体内质网溶解,肝细胞坏死<sup>[9,10]</sup>。枯否细胞是肝窦内的巨噬细胞,在试验中笔者可以看到大量的枯否细胞激活发生附壁现象。激活的枯否细胞可产生多种细胞因子,如 TNF-α、IL-1、IL-6、IL-10 等<sup>[11]</sup>。TNF 可以诱导肝细胞凋亡,TNF-α 以三聚体形式存在,与受体结合后,可诱导肝细胞凋亡<sup>[12]</sup>。

电镜照片发现,由于毛细胆管淤胆,肝细胞连接的消失,胆汁逆向流入肝细胞质中,并发毛细胆管的迂曲、增生。这与 Li 等<sup>[13]</sup>观察到的实验结果一致。肝细胞对胆红素的摄取、运载、酯化、排泄功能障碍。其中以排泄功能障碍为主,因此过程耗能最多,涉及的细胞器多而更易受损。其机制为:(1)肝细胞对酯形胆红素排泄障碍,排入胆汁的量少,入血增多;(2)相邻肝细胞受损使毛细胆管破裂,胆汁返流入血;(3)胆栓阻塞毛细胆管;肿大肝细胞压迫毛细胆管等使胆管阻塞,胆汁返流入血;(4)毛细胆管通透性增高,胆

汁经肝细胞入血。这些原因可使血中酯形胆红素增多。

因此肝窦毛细血管瘤在 TAA 诱导的肝硬化门脉高压发生中起重要作用,肝窦内皮细胞窗孔减少并减小,内皮细胞下基底膜形成使肝细胞与外界物质交换减少,导致细胞缺氧、代谢产物聚集,肝细胞坏死,胆汁淤积,是门脉高压发生过程中重要的病理生理改变。

参 考 文 献

[1] 刘立新,韩德五,许瑞龄,等. 实验性急性肝衰竭时门脉高压发生机制的研究. 中国病理生理杂志,1999,15:359-361.

[2] Wisse E. An electron microscopic study of the fenestrated endothelial lining of rat liver sinusoids. *J Ultrastruct Res*,1970, 31:125-150.

[3] Braet F, Fraser R, McCuskey RS. Thirty-five years of liver sinusoidal cells; Eddie Wisse in retirement. *Hepatology*,2003, 38:1056-1058.

[4] Braet F. How molecular microscopy revealed new insights into the dynamics of hepatic endothelial fenestrae in the past decade. *Liver Int*,2004,24:532-539.

[5] Le Couteur DG, Fraser R, Hilmer S, et al. The hepatic sinusoid in aging and cirrhosis: effects on hepatic substrate disposition and

drug clearance. *Clin Pharmacokinet*, 2005,44:187-200.

[6] Braet F, Wisse E. Structural and functional aspects of liver sinusoidal endothelial cell fenestrae: a review. *BMC Compar Hepatol*,2002,1:1-17.

[7] 王新保,杨镇,李德旭,等. 门静脉高压症病人肝内血管内皮细胞凋亡的研究. 中华肝胆外科杂志,2002,8:28-30.

[8] Lu X, Liu P, Xu GF, et al. The role of hepatic sinusoid capillarization during the formation of portal hypertension in fibrotic rats induced by dimethylnitrosamine. *Chin J Hepatol*, 2003, 11:595-598.

[9] Rizzardini M, Mangolini A, Lupi M, et al. Low levels of ALS-linked Cu/Zn superoxide dismutase increase the production of reactive oxygen species and cause mitochondrial damage and death in motor neuron-like cells. *J Neurol Sci*,2005, 232:95-103.

[10] Britton RS. Metal-induced hepatotoxicity. *Semin Liver Dis*, 1996,16: 3-12.

[11] Canbay A, Feldstein AE, Higuchi H, et al. Kupffer cell engulfment of apoptotic bodies stimulates death ligand and cytokine expression. *Hepatology*,2003,38:1188-1198.

[12] Lin SY, Chen WY, Chiu YT, et al. Different tumor necrosis factor-alpha-associated leptin expression in rats with dimethylnitrosamine and bile duct ligation-induced liver cirrhosis. *Metabolism*, 2005, 54:445-452.

[13] Li MK, Crawford JM. The pathology of cholestasis. *Semin Liver Dis*,2004,24:21-42.

(收稿日期:2006-12-08 修回:2007-06-12)

(上接第 257 页)

为阴性。X线、CT、MRI 等影像学资料可帮助了解肿瘤与周围组织器官关系,对治疗有裨益。确诊需靠穿刺活检或手术病理。

内脏 MFH 的治疗关键在于早发现、早治疗。对于软组织肉瘤,肿瘤的大小是预后的重要因素,肿瘤<5 cm、5~10 cm、10~15 cm、>15 cm 病人的 5 年生存率分别为 84%、70%、50%和 33%<sup>[3]</sup>。目前主张以手术为主的综合治疗,即局部广泛切除加放疗和化疗,或是局部广泛切除加放疗,不能行广泛切除的,可辅以术中放疗。广泛局部切除包括肉瘤及周围浸润至少 3 cm 以上的正常组织。研究证实最有效的两个化疗药物是阿霉素和异环磷酰胺,并具有量效关系<sup>[4]</sup>。放疗方式是术后针对肿瘤行外照射。MFH 以血行转移为主,最常见部位是肺,其次为肝、骨、脑等,通常发生在术后 2~3 年内<sup>[5]</sup>。

该例经手术病理证实为胆囊炎型 MFH,而瘤体超过 10 cm 的胆囊 MFH 在文献中尚未见报道。因影像学征象无特异性,如果排除原发性胆囊癌时,我们应想到有恶性组织细胞瘤的可能。

参 考 文 献

[1] Coindre J M, Terrier P,Guillou L, et al. Predictive value of grade for metastasis development in the main histologic types of adult soft tissue sarcomas: a study of 1240 patients from the French Federation of Cancer Centers sarcoma Group. *J Cancer*,2001,91:1914-1926.

[2] F. ferrozzi. Bova. Hepatic malignant histiocytoma; CT findings. *Clin Radiol*,1998,53:699-701.

[3] Ramanathan RC, A'hern R, Fisher C, et al. Modified staging system for extremity soft tissues sarcomas. *Ann Surg Oncol*, 1999,6: 57-69.

[4] Bacci G, Ferrari S, Picci P. Neoadjuvant chemotherapy in malignant fibrous histiocytoma of the limbs;10 years of experience (1983-1992) at the Rizzoli Orthopedic Institute. *J Minerva Med*,1996,87:135-146.

[5] Putnam J B. Metastases from sarcoma. In: Pollock RE ed. American cancer society atlas of clinical oncology: soft tissue sarcomas. Hamilton, Ontario, BC Decker, Inc,2002. 266-278.

(收稿日期:2007-04-11)