

## 乙醇对胎鼠肝细胞超微结构的影响及体视学分析

余耀南 徐邦生 王晓冬 蔡云平

南通医学院组胚教研室 南通 226001

**摘要** BALB/c 妊娠小鼠用 20%乙醇作为饮水, 平均每 d 每 kg 体重摄入乙醇 15g。与对照组相比, 乙醇组胎鼠肝细胞胞质溶解, 部分线粒体肿胀, 嵴排列紊乱、溶解破坏, 外膜破裂。部分线粒体小、基质电子密度高。有些粗面内质网池扩张、脱颗粒。胞质溶解区域见较多脂肪空泡和溶酶体。毛细胆管普遍扩张, 微绒毛短小。经体视学测量, 乙醇组线粒体、粗面内质网体积密度与对照组相比有显著下降, 具统计学意义。线粒体截面数密度和数密度均下降。结果表明乙醇能导致胎鼠肝细胞超微结构的损害。

**关键词** 乙醇; 肝超微结构; 体视学分析; 胎鼠

## EFFECT OF ALCOHOL ON ULTRASTRUCTURES OF HEPATOCYTES IN FETAL MICE AND STEREOLOGICAL ANALYSIS

*Yu Yaonan, Xu Bangsheng, Wang Xiaodong, Cai Yunping*

Department of Histology and Embryology, Nantong Medical College,  
Nantong 226001

**Abstract** During gestation BALB/c mice were given water, which contained 20% alcohol. The average doses of alcohol were 15g/kg weight daily. In comparison with control hepatocytes of fetal mice in ethanol group appeared degeneration and plasmolysis in focal area of cytoplasm. Partial mitochondria exhibited distention and distortion, disorientation of cristae and destruction of membrane. Some mitochondria showed small and electron-dense material in the matrix. The cisternae of rough endoplasmic reticulum(RER) were distention and RER showed degranulation. There were many lysosome and large fat droplets in region of plasmolysis. The bile canaliculi were distention and microvilli were short. In the hepatocytes of fetal mice volume density of mitochondria and RER from the ethanol showed significant decrease in comparison to that from the control group. Mitochondrial numerical density on area and numerical density showed a significant de-

crease too. The results showed that ethanol can cause ultrastructural abnormalities of hepatocytes in fetal mice.

**Key words** alcohol; ultrastructure of hepatocytes; stereological analysis; fetal mice

胎儿酒精综合征是由于出生前母亲饮酒而造成的具有下述特征性异常的综合征,表现为出生前后的生长迟缓,伴有智力迟钝、特异面貌及心脏等器官畸形。国外统计临床发病率占新生儿的 1~2%<sup>(1)</sup>。Uphoff 等报道小鼠於妊娠第 8d 至分娩,在液体食物中加入乙醇,每 d 摄入量为  $12.6 \pm 1.2\text{g/kg}$ ,其结果证实对心肌发育有明显影响<sup>(2)</sup>。Petersen 1977 年报道在人体和动物中慢性酒精中毒造成肝细胞超微结构的变化,主要为线粒体大小、形状、嵴和基质的变化<sup>(3)</sup>。本实验在小鼠整个妊娠期,用 20%乙醇作饮水,对乙醇导致胎鼠肝细胞超微结构损伤进行形态学观察的同时对线粒体、粗面内质网及胞质灶性溶解区进行体视学分析。

#### 材料和方法

1. 实验动物 为 BALB/c 成年小鼠,体重 20~25g,交配后妊娠小鼠白天 8h 以 20%乙醇作饮水,每 d 记录 8h 饮水量,测得平均每 d 摄入乙醇 15g/kg 体重。对照组饮自来水。2 组均喂以含蛋白质 11.7%的饲料。妊娠第 18d 处死母鼠,每窝随机取 1 只胎鼠作试验用。

2. 乙醇组共取 10 只胎鼠,对照组取 8 只,打开腹腔,取  $1\text{mm}^3$  肝组织块,经 4%戊二醛和 1%锇酸双固定,按常规脱水,环氧树脂 618 包埋, LKB-V 型超薄切片机切 50nm 薄片,醋酸铀、枸橼酸铅双染色。JEM-100S 型透射电镜观察。

3. 在 4000x 电子显微镜下摄片,随机拍摄较为完整的肝细胞,每 1 组织块摄片 10 张,共得底片 180 张,将底片放大成 8000x 照片,进行各项结构的计量。

4. 形态测量均在按 Weibel 原则制作的测量格上进行<sup>(2)</sup>,系用方网格试验系统,测量格边长 5mm,实际长度为  $0.625\mu\text{m}$ 。用以测肝细胞的线粒体,粗面内质网及胞质灶性溶解区的体积密度  $V_v$ ,线粒体的截面数密度  $N_A$  和数密度  $N_v$ ,以上均以肝细胞质为包容空间,并进行统计学分析。

#### 结果

##### 1. 肝细胞形态观察

对照组胎鼠肝细胞呈现正常的超微结构,线粒体呈卵圆形或杆状,嵴呈板层状伸入到颗粒状基质中,胞质内含发育良好的高尔基复合体和滑面内质网,偶见脂滴。乙醇组显示肝细胞有广泛的胞质灶性溶解坏死区(图 1~4,见封三),线粒体,内质网等细胞器多分布在核周围和胞膜附近。线粒体形态变化大,多数呈球形,见到少数呈囊状,中段狭窄的长线粒体。按 Uphoff 1984 年分类标准<sup>(2)</sup>,将不同程度退化的线粒体分成 3 期。初期线粒体变小,基质电子密度高,嵴模糊不清,中期线粒体变大,嵴完全溶解,膜破裂(图 1)。线粒体多数属于中期和初期的变化。部分粗面内质网扩张,脱颗粒现象,滑面内质网和糖原减少。在胞质溶解区见较多的溶酶体和髓样小体,溶酶体较小,边缘膜不清,见较多次级溶酶体,胞质中见有许多大脂肪空泡(图 2)。肝细胞核肿胀,核内见空泡(图 3)。毛细胆管扩张,微绒毛减少,脱落(图 4),周围紧密连接完好。

##### 2. 体视学分析

2 组各测量 400 个线粒体轴长,对照

组短轴平均  $0.63\mu\text{m}$ ，长轴  $1.09\mu\text{m}$ ，轴比值为 1.73，用平均面积法测得平均外径为  $0.802\mu\text{m}$ 。乙醇组短轴平均  $0.67\mu\text{m}$ ，长轴  $1.09\mu\text{m}$ ，轴比值为 1.62，平均外径长为  $0.847\mu\text{m}$ 。乙醇组线粒体与对照组相比显著增大 ( $P < 0.02$ )。

按 Weibel 体视学原理，将方网格试验系统测得的交点数，计算出线粒体、粗面内质网和胞质溶解区的体积密度，结果见附表。并按照 Cochran 公式<sup>(5)</sup>，计算标准误。结果表明乙醇组胎鼠肝细胞线粒体和

粗面内质网的体积密度显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )。

根据 Weibel 和 Gomez 方法<sup>(4,5)</sup>，按下列公式计算线粒体  $N_v$  值， $N_v = k / \beta \cdot (N_A)^{3/2} / V_v^{1/2}$ 。2 组先分别算出截面数密度  $N_A$ ，由上述轴比值从 Weibel 曲线中查得，乙醇组  $\beta$  值为 1.471，而对照组为 1.524。K 值近似取为 1，在每只胎鼠所摄的照片上算出  $N_A$  和  $N_v$  值。然后用统计方法求其均值和标准误，结果见表。

表 肝细胞病变结构体视学分析( $\bar{x} \pm s\bar{x}$ )

观察项目	单位	乙醇组	对照组	P 值
线粒体 $V_v$	$\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^3$	$0.117 \pm 0.048$	$0.201 \pm 0.092$	$< 0.01$
粗面内质网 $V_v$	$\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^3$	$0.089 \pm 0.038$	$0.188 \pm 0.091$	$< 0.01$
胞质溶解区 $V_v$	$\mu\text{m}^3 / \mu\text{m}^3$	$0.506 \pm 0.208$		
线粒体 $N_A$	个 / $\mu\text{m}^2$	$0.225 \pm 0.008$	$0.352 \pm 0.031$	$< 0.01$
线粒体 $N_v$	个 / $\mu\text{m}^3$	$0.214 \pm 0.013$	$0.283 \pm 0.028$	$< 0.01$

表中可见乙醇组线粒体截面数密度和数密度明显低于对照组 ( $P < 0.01$ )。

## 讨论

作者 1987 年报道妊娠小鼠摄入乙醇后，胎鼠生长迟缓，吸收胎和畸胎增加，胎鼠体重和脑重下降<sup>(6)</sup>。本实验妊娠母鼠，用 20% 乙醇作饮水，平均每 d 摄入乙醇  $15\text{g} / \text{kg}$ 。结果除出现上述类似变化外，胎鼠肝细胞的结构显示明显变化：肝细胞胞质溶解区所占体积密度很大；线粒体变形、嵴溶解、少数线粒体膜破裂，有些线粒体变小、基质电子密度高。Rømer 等 1983 年在食物中加入酒精喂养妊娠猪，胎猪肝细胞中也观察到上述线粒体变化，还见有纵向管状嵴的长线粒体，基质中有拟晶体结构<sup>(7)</sup>。这些变化在本实验胎鼠肝中未能见到，可能是动物种系不同所致。实验结果表明乙醇组线粒体比对照组有意义的增大，见乙醇中毒引起的肝细胞肿大，乙醇组线粒体  $N_v$ 、 $V_v$  明显低于对照

组，表明肝细胞线粒体数减少。这些与在胞质溶解区见到的细胞器大量破坏是一致的。部分形态异常的病变线粒体，造成线粒体酶含量和活性下降。由于电子传递和氧化磷酸化的有关酶位于线粒体内膜上，因此胎鼠病变线粒体缺乏氧化代谢，同样的超微结构变化已经在成人或成年动物慢性酒精中毒的肝线粒体中观察到，并与电子传递成分的减少水平相关<sup>(8)</sup>。乙醇对胎鼠肝的毒性作用还表现为粗面内质网池扩张、脱颗粒、其体积密度显著低于对照组 ( $P < 0.01$ )，损伤的肝细胞合成蛋白质的功能受到影响。在胞质溶解区见较多的溶酶体、髓样小体、多泡体、与消化水解胞质内坏死产物和破坏的细胞器有关，溶酶体本身也显示结构异常。Dilts 1970 年指出乙醇通过胎盘转运无阻碍，母体和胎儿有同样的血浆乙醇浓度<sup>(7)</sup>。Kecanem 1975 年证实胎鼠能防止母鼠肝中乙醇代谢产生的乙醛进入胎血循环<sup>(7)</sup>。本实验妊娠小鼠饮

(下转第 19 页)

余耀南等：乙醇对胎鼠肝细胞超微结构的影响及体视学分析(见正文第20页)

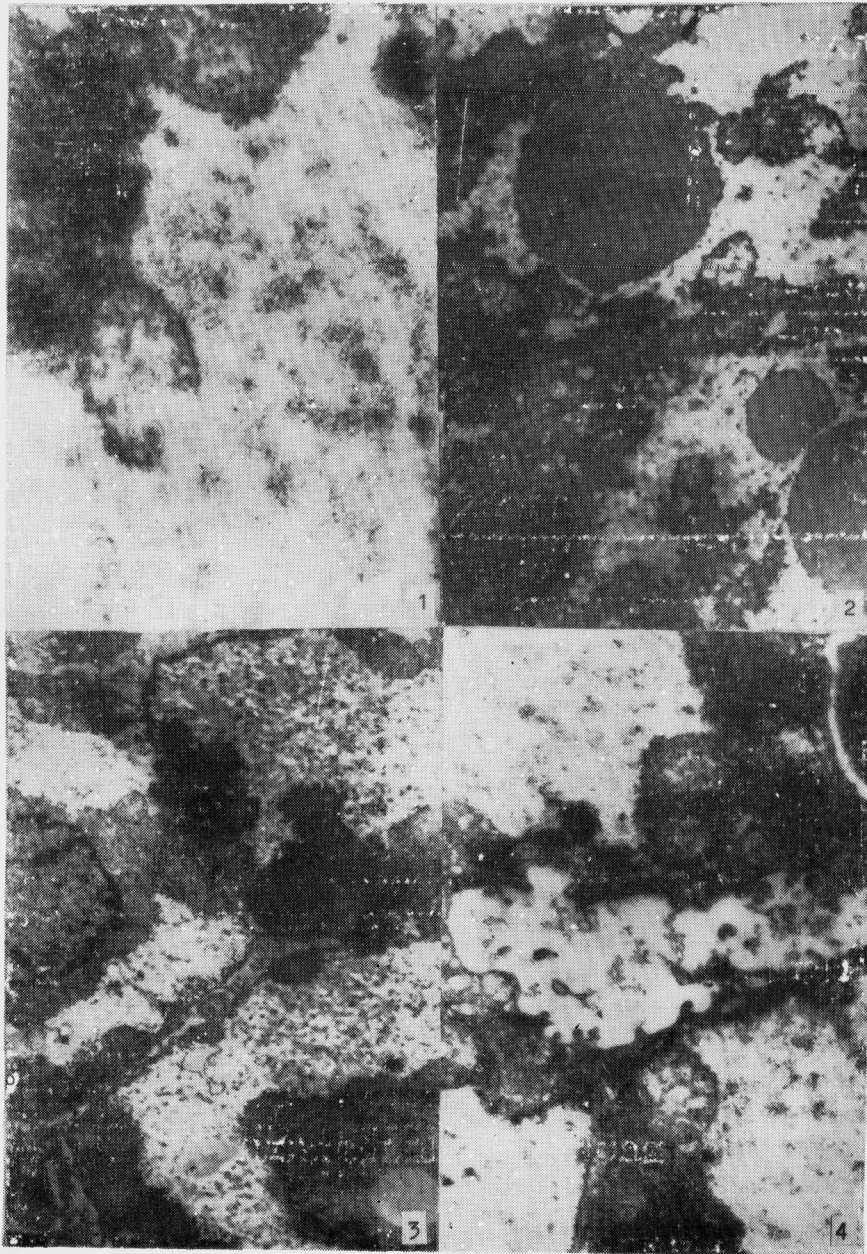


图1—4.均为乙醇组。1.肝细胞中见线粒体膜已破,嵴溶解,紊乱。20000x。2.肝细胞中见大脂肪泡,部分线粒体嵴溶解。8000x 3.肝细胞质大片溶解坏死,核内见空泡。8000x 4.毛细胆管扩张,微绒毛稀疏短小。12000x

表 1 药物的诱变作用和对 DNA 的 CD 谱影响的关系小结

药物(化合物)	致突变试验*	对 CNA 的 CD 谱影响	说明
顺铂	+	+	
10-羟基喜树碱	+	+	
碳铂	+	+	
放线菌素 D	+	+	
高三尖杉酯碱	+	+	
三尖杉酯碱	+	+	
博来霉素	+	+	
阿霉素	+	+	
长春碱	+	+	
阿糖胞苷	+	+	
环磷酰胺	+	-	需代谢活化
羟甲芬太尼	-	-	
石杉碱甲	-	-	
苗拉西坦	-	-	
吡乙酰胺	-	-	
牛膝多糖	-	-	
双酚氨酸	-	-	致畸作用
羧代赖氨酸	-	-	抑制 CHL 细胞有丝分裂
千金藤立定	-	-	

\* 致突变试验包括微核试验, 染色体试验和细菌回交试验

### 参 考 文 献

1. Maria T, et al. Lack of Z-DNA conformation in mitomycin-modified polynucleotides having inverted circular dichroism. Proc Natl Acad Sci USA 1983; 80(10): 2874.
2. Daigleish DG, et al. Circular dichroism studies of complexes of the antibiotics daunomycin, nogalamycin, chromomycin and mithramycin with DNA. Biopolymers 1974; 13(9):1757.
3. 屠曾宏, 王美瑛. 3种促智药, 石杉碱甲、苗拉西坦和吡乙酰胺的诱变作用和诱变协同作用. 新药与临床 1990;9(2):65.
4. 屠曾宏, 王美瑛, 肖伟琪等. 羟基喜树碱诱变中国仓鼠卵巢细胞染色体畸变在小鼠骨髓、胎肝血中形成微核的作用. 中国药理学报 1990;11(4):378.
5. Kastenbaum MA, et al. Tables for determining the statistical significance of mutation frequencies. Mutat Res. 1990;9(5):527.
6. Ishidate MJR, et al. Chromosome test with 134 compounds on chinese hamster cells *in vitro*—a screening for Chemical carcinogens. Mutat Res 1977;48 (3/4):337.
7. Sato Y, et al. Conformation change of DNA induced by 6-oxybenzo [x]pyrene radical. Gann 1982; 73(2):308.
8. 乐秀芳, 吴富根, 符彬. 羧代赖氨酸的抗癌及药理实验研究. 药理学报 1980; 15(7):391.

(上接第 22 页)

用乙醇, 在胎鼠中观察到的肝细胞超微结构的变化与人体酒精中毒见到的肝细胞损害相似。

图 1~4. 均为乙醇组。1. 肝细胞中见线粒体膜已破, 嵴溶解, 紊乱。20000× 2. 肝细胞中见大脂肪泡, 部分线粒体嵴溶解。8000× 3. 肝细胞质大片溶解坏死, 核内见空泡。8000× 4. 毛细胆管扩张, 微绒毛稀疏短小。12000×

### 参 考 文 献

1. Clarren SK, et al. The fetal alcohol syndrome. N Engl

- J Med 1978; 298(5): 1063.
2. Cynthia Uphoff, et al. Cardiac muscle development in mice exposed to ethanol in utero. Teratology 1984; 30(1):119
3. Petersen P, et al. Abnormal mitochondria in hepatocytes in human fatty liver. Acta Pathol Microbiol Scand. Sect A 1977;85(3):413.
4. Weibel ER, et al. Practical stereological methods for morphometric cytology. J Cell Biol 1966; 30(1):23.
5. 杨光等. 豚鼠肾上腺髓质嗜铬细胞超微结构的立体学研究. 解剖学报 1986; 17(2):216.
6. 余耀南等. 酒精和乙醛对小鼠的胚胎毒性和致畸效应. 解剖学杂志 1987; 10(3):200.
7. 引自 Rømer P, et al. Alcohol-induced injury of mitochondria in hepatocytes of mini-pig fetuses. Virchows Arch [Pathol Anat] 1983; 399(2):299.
8. Rubin E, et al. Effects of ethanol on the biogenesis of mitochondrial membranes and associated mitochondrial functions. Lab Invest 1970; 23(4):620.