

文章编号:1000-7423(2002)-04-0216-04

小鼠血吸虫病肝纤维化的超微结构动态观察

王雪莉¹ 张玲敏¹ 唐福星² 郭祖文² 吴春云¹ 熊钟瑾¹

【摘要】 目的 研究血吸虫病小鼠肝纤维化过程中几种相关细胞和肝组织超微结构动态变化,以探讨血吸虫病肝纤维化的可能机制。方法 日本血吸虫尾蚴经皮肤感染小鼠建立血吸虫病肝纤维化模型。常规方法制作肝组织透射电镜标本并观察。常规 HE 染色观察其病理变化。结果 HE 染色显示小鼠血吸虫病肝纤维化模型建立成功。电镜观察显示小鼠感染后 6 wk,急性肉芽肿周围的肝细胞发生坏死,肝窦内皮细胞窗孔减少,贮脂细胞(FSC)脂滴减少,枯否细胞胞浆出现大吞噬体和粗面内质网,8 wk 时部分肝细胞发生脂肪变性,少数肝细胞间隙增宽,间面出现微绒毛,肝窦周隙内充满大量胶原纤维,并形成肝窦毛细血管瘤。FSC 胞浆出现含胶原原纤维的分泌泡,周围见大量胶原纤维,枯否细胞粗面内质网增加,10 wk 时 FSC 转变为肌成纤维细胞,12 wk 时肌成纤维细胞减少,成纤维细胞和纤维细胞增加。结论 FSC 被激活转化为肌成纤维细胞是血吸虫病肝纤维化发生的关键环节,激活的枯否细胞、损伤的肝细胞和肝窦内皮细胞与 FSC 的活化密切相关,肝窦毛细血管瘤可能加速肝纤维化的发展。

【关键词】 血吸虫病;贮脂细胞;枯否细胞;肌成纤维细胞;纤维细胞;内皮细胞;肝纤维化;超微结构

中图分类号:R532.21

文献标识码:A

Ultrastructural Dynamic Observation on Murine Schistosomal Hepatic Fibrosis

WANG Xue-li¹, ZHANG Ling-min¹, TANG Fu-xing², GUO Zu-wen²,
WU Chun-yun¹, XIONG Zhong-jin¹

(1 Department of Parasitology, Medical College, Jinan University, Guangzhou 510632;
2 Laboratory of Electron Microscopy, Jinan University, Guangzhou 510632)

【Abstract】 Objective To explore possible mechanisms of hepatic fibrosis by investigating the ultrastructural dynamic changes of liver tissue, especially several kinds of cells related to hepatic fibrosis. **Methods** Murine schistosomal hepatic fibrosis model was established by infecting mice with *Schistosoma japonicum* cercariae. Routine transmission electron microscopy was used to observe the liver tissue. H. E. staining was used for examining the pathological changes. **Results** H. E. staining showed that the model was established successfully. Ultrastructural observation showed that at the 6th week after infection, the necrosis of hepatocytes around the acute granulomas occurred; the number of sinusoidal endothelial fenestrae and vitamin A droplets in fat-storing cells decreased; large phagosomes and rough endoplasmic reticulum could be seen in the cytoplasm of Kupffer's cells. At the 8th week, steatosis was found in some hepatocytes, some microvilli emerged on a few inter-hepatocytic surfaces and the inter-hepatocytic spaces were enlarged. Large collagen fibrillar bundles filled in the perisinusoidal spaces, and capillarization of hepatic sinusoids was observed. Secretory vesicles filled with collagen fibrils appeared in the cytoplasm of fat-storing cells with large amount of collagenous fiber bundles surround the cells. Rough endoplasmic reticulum increased in Kupffer's cells. At the 10th week, fat-storing cells were activated and transformed into myofibroblasts. At the 12th week, the number of myofibroblasts decreased but that of fibroblasts and fiber cells increased. **Conclusion** Activation of fat-storing cells and transformation from fat-storing cells into myofibroblasts are the critical link in the development of hepatic fibrogenesis following schistosome infection. Kupffer's cells, necrotic hepatocytes and sinusoidal endothelial cells may relate to the activation of fat-storing cells. Capillarization of hepatic sinusoids possibly accelerates the development of hepatic fibrosis.

【Key words】 schistosomiasis, fat-storing cell, Kupffer's cell, myofibroblast, fibroblast, endothelial cell, hepatic fibrosis, ultrastructure.

肝纤维化是慢性肝病向肝硬化发展共有的病理变化。大量研究表明肝纤维化是可逆性病变,肝硬化则不可逆转。因此,能否将病变终止于肝纤维化或逆转至正常,是治疗各种慢性肝病的关键^[1]。血吸虫病肝硬化

及其并发症仍是血吸虫病患者致死的主要原因^[2]。因此,对其发生、发展机制已进行了大量研究。但对日本血吸虫病肝纤维化过程中几种肝纤维化相关细胞的超微结构动态变化尚未见报道。本研究建立了日本血吸虫感染小鼠肝纤维化动物模型,利用透射电镜观察其超微结构变化以期对揭示血吸虫病肝纤维化的发生、发展机制有所帮助。

作者单位: 1 暨南大学医学院寄生虫学教研室,广州 510632;
2 暨南大学电镜室,广州 510632

材料与方 法

1 小鼠血吸虫病肝纤维化模型的建立及取材

健康昆明小鼠, 体重约 25 g, 40 只, 雌雄各半(购自中山医科大学动物中心)。将其平均随机分为两组: ① 感染组: 每鼠经腹部皮肤人工感染日本血吸虫尾蚴(购自湖南血吸虫病防治研究所)约 25 条, 常规饲养。于感染后 6、8、10、12 wk 分别剖杀 5 只, 取肝脏。② 正常对照组: 不感染血吸虫尾蚴, 与感染组相同时间分别剖杀 5 只, 取肝脏作为对照。

取肝左叶切下 1 mm³左右的小块置于 2.5% 磷酸缓冲戊二醛固定液中固定, 留作透射电镜标本; 余下部分切成 (1×1×0.2) cm³左右的小块置于中性甲醛液固定, 留作常规石蜡切片(厚 4 μm)。

2 HE 染色

按常规方法, 用于肝组织病理学观察, 以确定模型是否成功。

3 透射电镜标本制作

依次将标本置于 2.5% 磷酸缓冲戊二醛固定液 2 h, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗 3 次(每次 10 min), 1% OsO₄ 1.5 h, 0.1 mol/L 磷酸缓冲液冲洗 3 次(每次 10 min), 50% 乙醇 15 min, 70% 乙醇 40 min, 90% 乙醇 15 min, 90% 丙酮/90% 乙醇(1:1) 15 min, 90% 丙酮 15 min, 100% 丙酮 3 次(每次 10 min), 100% 丙酮/包埋剂(1:1)过夜, 纯包埋剂 5 h, 低粘度 spurr 包埋剂包埋, 60 °C 过夜。Reichert Jung Ultracut E 型切片机制作切片。半薄切片经甲苯胺蓝染色定位后切超薄切片, 醋酸铀和硝酸铅染色后在 JOEL 100CX I 型透射电镜下观察。

结 果

1 肝组织病理学观察

正常对照组小鼠肝组织在实验各时期均未见任何病变。感染组小鼠 6 wk 时已形成急性虫卵肉芽肿病变, 虫卵周围聚集各种炎性细胞。可见典型的嗜酸性脓肿, 肝窦内枯否细胞增生; 感染后 8 wk, 慢性虫卵肉芽肿形成, 虫卵周围包绕梭形细胞和胶原纤维, 亦可见部分急性虫卵肉芽肿, 汇管区有大量炎性细胞浸润; 10 wk, 急性、慢性虫卵肉芽肿同时存在, 部分肉芽肿相互融合。小静脉周围有胶原纤维生成, 形成干线型纤维化; 12 wk, 肉芽肿和小静脉周围的胶原纤维束向肝小叶周围延伸。

2 透射电镜观察

正常对照组小鼠肝细胞无脂滴, 肝细胞间面除窦周隙向肝细胞延伸的部分有不规则的微绒毛外, 其余部分肝细胞紧密相邻, 表面基本平直, 无微绒毛。肝窦内皮细胞大部分以其扁平片状胞浆被覆于窦壁, 只有胞核区向窦腔突出。内皮细胞的窗孔极为丰富, 内皮细胞外侧无基底膜存在。内皮细胞的细胞器发育较差, 微丝和微管发达(图1A)。贮脂细胞(FSC)位于窦周隙内, 呈梭形或杆状。其最明显的特征是胞浆内有脂滴, 脂滴大小不等、数目不一, 切片上其总面积约占细胞面积的 1/3~2/3。由于脂滴挤压, 胞核常凹陷并位于细胞一侧, 胞质内细胞器较少。该细胞数量较少, 不易找到(图1B)。枯否细胞也被覆于窦壁, 有胞浆突起, 故形态不规则。细胞内溶酶体丰富, 常见吞噬体、吞噬泡, 缺乏粗面内质网。正常鼠肝脏内未见浆细胞。感染后 6 wk, 肉芽肿周围的肝细胞发生坏死, 胞核皱缩, 胞浆疏松, 细胞器崩解, 可见炎性细胞侵入坏死肝细胞并浸润于肝细胞之间。有的肝细胞发生嗜酸性坏死, 胞体缩小, 胞浆电子密度增加, 细胞器密集排列, 但轮廓尚清晰。部分肝细胞内出现小脂滴。肝窦内皮细胞窗孔减少, 有的内皮细胞肿胀, 胞浆内有大量饮泡(图2A)。FSC 数量增多, 胞浆内脂滴减少, 周围常伴有枯否细胞、白细胞等。枯否细胞增多, 吞噬活跃, 胞浆中出现大吞噬体(图2B)。肉芽肿内及周围出现大量浆细胞; 8 wk, 部分肝细胞内脂滴进一步增多增大, 核被挤向一侧, 发生脂肪变性。部分肝细胞间面出现微绒毛, 细胞间隙增宽(图3A)。肝窦周隙内充满大量胶原纤维束, 肝窦内皮细胞窗孔明显减少, 胞饮泡减少甚至消失, 细胞外侧有基底膜形成, 称为肝窦毛细血管化(图3B)。FSC 增生、肥大, 向肌成纤维细胞过渡, 脂滴进一步减少, 细胞器发育良好, 细胞周围充斥大量胶原纤维束。枯否细胞增生、肥大, 粗面内质网增加; 10 wk, FSC 已转变成肌成纤维细胞, 脂滴基本消失, 胞浆内含成束微丝和含胶原原纤维的分泌泡(图4)。这种细胞具有成纤维细胞和平滑肌细胞的共同特性, 故称之为肌成纤维细胞。肝细胞间面微绒毛增多; 12 wk, 肌成纤维细胞数量明显减少, 而成纤维细胞和纤维细胞明显增加(图5A、5B)。

讨 论

近年来, 对病毒性肝炎后肝纤维化^[3]和四氯化碳等化学物质引起的肝纤维化^[4]的大量研究表明, FSC 的激活、增殖是肝纤维化发生的中心环节。

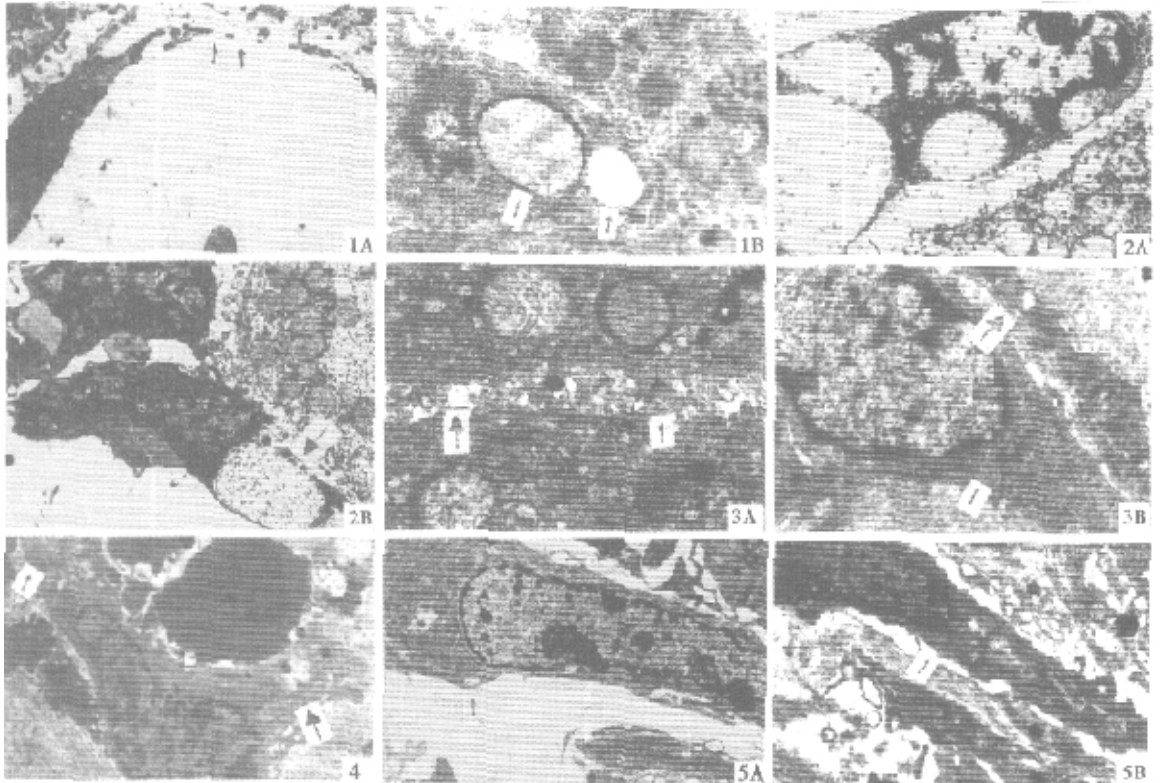


图 1 正常对照组小鼠肝脏超微结构 A 肝窦内皮细胞的窗孔丰富, 外侧无基底膜($\times 8\ 000$) B 贮脂细胞含有大小不等的脂滴($\times 10\ 000$) **图 2 感染后 6 wk 超微结构变化** A 肝窦内皮细胞含大胞饮泡($\times 5\ 300$) B 贮脂细胞脂滴减少, 枯否细胞含大吞噬体($\times 4\ 200$) **图 3 感染后 8 wk 超微结构变化** A 肝细胞间面出现微绒毛, 细胞间隙增宽($\times 10\ 000$) B 肝窦周隙内充满大量胶原纤维束, 肝窦内皮细胞外侧出现基底膜($\times 10\ 000$) **图 4 感染后 10 wk** 贮脂细胞转化为肌成纤维细胞, 胞浆内含成束微丝和含胶原原纤维的分泌泡($\times 4\ 200$) **图 5 感染后 12 wk** 成纤维细胞(A, $\times 4\ 000$)和纤维细胞(B, $\times 5\ 300$)增加

Fig. 1 Hepatic ultrastructure in control mice A Sinusoidal endothelial fenestrae were rich, without basement membrane outside of sinusoidal endothelial cells. $\times 8\ 000$ B Big and small lipid droplets in fat-storing cells. $\times 10\ 000$ **Fig. 2 Hepatic ultrastructure of the mice at the 6 th week after infection.** A Macropinocytotic vesicles in cytoplasm of sinusoidal endothelial cells. $\times 5\ 300$ B Decreased number of vitamin A droplets in fat-storing cells. Large phagosomes in the cytoplasm of Kupffer's cells. $\times 4\ 200$ **Fig. 3 Hepatic ultrastructure of the mice at the 8 th week after infection.** A Some microvilli emerged on inter-hepatocytic surfaces and the inter-hepatocytic spaces were enlarged. $\times 10\ 000$ B Large collagen fibrillar bundles filled in the perisinusoidal spaces. Basement membrane seen outside of the sinusoidal endothelial cells. $\times 10\ 000$ **Fig. 4 Fat-storing cells transformed into myofibroblasts at the 10 th week.** Microfilament bundles and secretory vesicles filled with collagen fibrils in the cytoplasm. $\times 4\ 200$ **Fig. 5 Increased number of fibroblasts (A, $\times 4\ 000$) and fiber cells at the 12 th week (B, $\times 5\ 300$).**

而血吸虫病肝纤维化有其独特的病理改变——先形成虫卵肉芽肿, 继而形成肝纤维化, 其发生、发展机制是否与上述相同, 有待进一步研究。

近年来 FSC 被认为是肝纤维化时产生结缔组织的主要细胞^[7]。这一特性与 FSC 的激活过程紧密相连, 即从静止的“储存”型变为高增殖性的“肌成纤维细胞”型^[6]。FSC 的激活态包括: 增生, 维生素 A 脂滴丢失, 产生胶原纤维, 趋化性, 释放细胞因子和吸引白细胞, 原有基质降解造成基质重建及收缩性。在本研究中除了“释放细胞因子”和“收缩性”不能观察到, 其余特点均可观察到。正常小鼠肝脏由于 FSC 数量少、形体小, 且存在于窦周隙内, 故不易找到, 而日本血吸虫感染后 6 wk 时可发现 FSC 数量有所增加, 脂滴减少, 周围出现少量胶原原纤维并且多出现于坏死肝细胞周围。至 8 wk 时 FSC 明显增生且聚集在纤维化的

肉芽肿内, 周围常伴有枯否细胞、白细胞等。常见几个 FSC 排列在一起, 脂滴进一步减少, 细胞周围出现大量胶原纤维。窦周隙内原有的低密度基质被胶原纤维取代。由上述可见, 在日本血吸虫病肝纤维化过程中 FSC 也经历了从静止态到激活态的转变过程, 与已有报道相似^[7]。

传统理论认为血吸虫病肝纤维化时胶原增加主要是由于肉芽肿内的巨噬细胞吞噬异物后变为类上皮细胞, 后者又变为成纤维细胞并分泌大量胶原, 同时从虫卵渗出可溶性虫卵抗原激活巨噬细胞产生 IL-1, 激活 T 细胞产生成纤维细胞刺激因子等均可促使成纤维细胞增生, 肝内胶原合成增加导致血吸虫病肝纤维化。然而许多研究提示 FSC 也应是该病的细胞外基质 (ECM) 来源细胞之一, 并且可能是主要来源。许多资料表明 FSC 和肌成纤维细胞间关系密切。在一定条件

下两者可以相互转化,故常被认为是肝内同一结缔组织细胞的两种不同表现形式。如在慢性酒精中毒及酒精性肝硬化模型中,FSC数量明显减少,而肌成纤维细胞数量明显增加,形态上可见FSC向肌成纤维细胞移行的渐进性过程。在慢性VitA过多症以及用胰岛素等处理CC₄诱导的肝纤维化模型时,可见肌成纤维细胞向FSC转变,FSC数量明显增加,肝内胶原含量明显减少^[8]。一旦FSC转变成肌成纤维细胞后,胶原的分泌即明显增加,总的效应使胶原的合成超过细胞内降解,故肌成纤维细胞对肝纤维化过程中胶原的大量合成及沉积起主要作用^[9]。

FSC的激活是由一系列的细胞事件引起的,该过程分为起始阶段和持续阶段。启动FSC激活的刺激物来自损伤的肝细胞、毗邻的内皮细胞和枯否细胞,另外还有ECM成分迅速的、微妙的改变。损伤的肝细胞、枯否细胞和窦内皮细胞还能分泌多种生长因子、炎症介质等生物活性物质激活FSC。此外,T淋巴细胞、血小板分泌的活性物质和血浆中的某些物质均能促进其活化^[10]。FSC激活态的维持是由于细胞因子旁分泌和自分泌作用的增强和ECM的重建^[11]。ECM重建是指ECM成分发生改变,低密度的内皮下基质进行性地被胶原纤维取代。这种ECM成分的转换会对肝细胞、窦内皮细胞和FSC的行为产生影响^[12]。本实验观察到小鼠感染日本血吸虫8 wk时,窦内皮下的窦周隙中充满了胶原纤维。

以往的报道认为活化的FSC的转归有两种可能:一是回复静止状态^[13],二是凋亡^[14]。而本研究观察到小鼠感染日本血吸虫10 wk时肌成纤维细胞有所减少,而成纤维细胞似有增加;12 wk时这两种变化都更加明显。推测肌成纤维细胞有可能变为成纤维细胞,这可能与此时尚处于肝纤维化进展期有关。

枯否细胞(KC)通过分泌多种细胞因子发挥调控肝组织和基质修复、肝细胞和FSC的增殖及合成ECM的作用,从而参与肝纤维化的形成。因此,有人认为KC所产生的细胞因子是FSC“激活”的启动点,KC是肝纤维化的始动细胞。本实验观察到KC在血吸虫病肝纤维化过程中发生了一系列超微结构变化。感染后6 wk时,其胞浆内出现大吞噬体说明其吞噬活动增强;8 wk时,粗面内质网增加说明其合成蛋白质等物质的能力增强。这些均提示KC在血吸虫病肝纤维化过程中也发挥了始动作用。

血吸虫感染后6 wk时,肉芽肿附近肝窦内皮细胞肿胀,窗孔减少,胞浆内含大胞饮泡(提示吞噬功能亢进);8 wk时,肝窦内皮细胞窗孔和胞饮泡减少甚至消失(提示吞噬功能耗竭),细胞外侧有基底膜形成,发生肝窦毛细血管化。后者可能通过以下几种途径促进肝

纤维化:①使肝窦变窄,血流供应减少;窗孔减少,影响肝细胞与血液之间的物质交换,从而诱发或加重肝细胞损伤。②受损或肿胀的内皮细胞容易被淋巴细胞、血小板或KC粘附,并释放各种蛋白分子,加重肝脏微循环障碍或激活FSC合成ECM成分等物质。③影响肝细胞摄取外源性脂质和维生素A,FSC内的维生素A减少易转化为肌成纤维细胞,基膜和胶原生成增加,有可能导致肝纤维增生^[15,16]。

本研究观察到虽然在光镜下血吸虫病肝纤维化和非血吸虫病肝纤维化的病理表现有很大的不同,但电镜下的细胞超微结构的变化却基本相同,提示两者的发生、发展机制也有许多相似之处,结合已有报道^[17]推测FSC的激活同样是血吸虫病肝纤维化的中心环节,枯否细胞、坏死肝细胞和肝窦内皮细胞可能与FSC的活化有关;肝窦毛细血管化和基质重建可加速肝纤维化。

参 考 文 献

- [1] 孔宪涛,高峰. 肝纤维化的实验与临床研究[J]. 第二军医大学学报,1996,17:1-5.
- [2] 程灼朴,钱国希,朱海昌,等. 173例晚期血吸虫病病人死因分析[J]. 上海预防医学杂志,1994,6(2):29-30.
- [3] Clouston AD, Jonsson JR, Purdie DM, et al. Steatosis and chronic hepatitis C: analysis of fibrosis and stellate cell activation[J]. J Hepatol, 2001,34:314-320.
- [4] Zhang LP, Takahara T, Yata Y, et al. Increased expression of plasminogen activator and plasminogen activator inhibitor during liver fibrogenesis of rats: role of stellate cells[J]. J Hepatol, 1999,31(4):703-711.
- [5] Pinzani M. Hepatic stellate (Ito) cells: expanding roles for a liver-specific pericyte[J]. J Hepatol, 1995,22(6):700-706.
- [6] Maher JJ, McGuire RF. Extracellular matrix gene expression increases preferentially in rat lipocytes and sinusoidal endothelial cells during hepatic fibrosis *in vivo*[J]. J Clin Invest, 1990,86:1641-1648.
- [7] Tanaka Y, Mak KM, Lieber CS. Immunohistochemical detection of proliferating lipocytes in regenerating liver[J]. J Pathol, 1990,160:129-134.
- [8] 彭雁忠,张贤华,熊敏芳,等. RNA和马来替酯治疗兔血吸虫病肝纤维化后肝组织超微结构比较[J]. 中国血吸虫病防治杂志,1999,11:336-339.
- [9] 杜卫东,张月娥. Ito细胞在肝纤维化过程中的作用[J]. 临床与实验病理学杂志,1995,11(2):155-158.
- [10] Pinheiro-Margis M, Margis R, Borojevic R. Collagen synthesis in an established liver connective tissue cell line (GRX) during induction of the fat-storing phenotype[J]. Exp Mol Pathol, 1992,56:108-118.
- [11] Friedman SL. Cytokines and fibrogenesis[J]. Semin Liver Dis, 1999,19(2):129-140.
- [12] Pinzani M, Marra F, Carloni V. Signal transduction in hepatic stellate cells[J]. Liver, 1998,18(1):2-13.
- [13] Wang SC, Ohata M, Schrum L, et al. Expression of interleukin-10 by *in vitro* and *in vivo* activated hepatic stellate cells[J]. J Biol Chem, 1998,273:302-308.
- [14] Iredale JP. Hepatic stellate cell behavior during resolution of liver injury[J]. Semin Liver Dis, 2001,21:427-436.
- [15] 刘丽群,朱继红,成令忠. 肝窦内皮细胞研究进展[J]. 解剖科学进展,1999,5:102-106.
- [16] 程明亮,陆影,梁跃东. 肝纤维化发生机制的研究进展[J]. 科技导报,1999,5(1):22-24.
- [17] 杨艳宏,蔡卫民,金国梁,等. 日本血吸虫感染兔肝肌成纤维细胞的动态变化及其意义[J]. 中华医学杂志,1999,79:870-873.

(收稿日期:2002-01-10 编辑:富秀兰)