DOI:10.16016/j.1000-5404.1993.01.002

急性胆道感染时肝腺泡酸性磷酸酶与细胞色素氧化酶活性的变化*

龚建平 韩本立 罗 丁 彭志明 王 卫 (第三军医大学西南医院肝胆外科中心) 630038

提 要 本文从肝腺泡角度出发,应用酶组化染色方法,结合图像分析技术,客观定量测定急性胆道感染时肝腺泡不同区带肝细胞 ACP、CO 活性变化。发现:胆道感染时,ACP 有一个先激活后抑制过程,其中以第 1 带肝细胞变化最显著;而 CO 在感染早期其活性已发生抑制,随病变发展进行性加重,主要以第 3 带肝细胞变化明显。表明肝腺泡不同区带肝细胞在胆道感染时对致病因素的反应不尽相同。

关键词 肝腺泡;胆管炎;酸性磷酸酶;细胞色素氧化酶;急性病

我们以往的研究表明,肝脏是严重胆道感染时受损最严重的器官[1,2]。近年来,随着对肝脏结构和功能认识的加深,经典肝小叶的概念受到挑战,肝腺泡的理论越来越为人们重视,这对解释肝脏的许多病理生理现象更具有实际意义。本实验通过复制大鼠急性胆道感染动物模型,应用图像分析技术,对大鼠肝腺泡不同区带酸性磷酸酶(ACP)、细胞色素氧化酶(CO)进行组化定量测定,为进一步探讨肝腺泡各区带肝细胞功能及胆道感染时肝细胞损害机制提供实验依据。

1 材料及方法

1.1 动物及动物模型的制作

选用健康 Wistar 大鼠 90 只,体重 180～220g,雌雄不限,随机分为 3 组(每组每时相各 10 只):(1)急性胆道感染组(AOC):1%戊巴比妥盐(25mg/kg)腹腔注射麻醉后,无菌条件下进入腹腔,双重结扎胆总管,同时注入大肠杆菌 $O_{111}B_4$ 0.2ml 于胆总管内(菌液浓度 5×10^9 cfu/ml);(2)胆总管结扎组(BDL):仅结扎胆总管,不注入细菌;(3)假手术组(SO):既不注入细菌,也不结扎胆总管。3 组动物其它条件保持相同。各组分别于术后 2、6 和 12 h 活杀。

1.2 取材及样品的制备

动物活杀时,取右前叶肝组织 27mm³,采用低温恒冷冰冻切片(厚度 0.4μm),按下列方法进行酶组化染色,所有切片孵育条件严格控制一致,对照切片酶反应均阴性。

1.2.1 ACP:采用 Valck[3]介绍的染色方法 。

1.2.2 CO:采用古德全[4]介绍的染色方法。

1.3 测定方法

本测定方法采用重庆大学光机系 MAS-1 自动定量图像分析仪测试。该仪器可分辨出 256 个灰度级,根据样本对光吸收后透光度不同,产生不同灰度来计算单位面积内酶反应的相对含量。主要过程:显像→摄像机→灰值图→二值图→定框→面积分数测试。按照 Cumucio 的方法,以门静脉终末支为轴心,各附近中央静脉为边界,确定肝腺泡,并根据血液供应不同将肝腺泡分为Ⅰ、Ⅱ、Ⅲ三个区带[5]。先测定各组动物肝脏切片总的 ACP、CO 相对含量,进一步测定 AOC 组动物肝腺泡 3 个区带内肝细胞 ACP 和 CO 相对含量。

1.4 统计学处理

所得数据采用方差分析,以 $P\leqslant0.05$ 为相差显著。

2 结果

2.1 各组动物肝组织总的 ACP 和 CO 含量变化(见表 1、2)

2.2 AOC 组肝腺泡不同区带肝细胞 ACP 和 CO 含量变化(见表 3、4)

* 国家自然科学基金资助项目

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 1 各组动物肝细胞总的 ACP 含量变化 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

组别	术后 (h)		
($n=10$)	2	6	12
AOC	0.627±0.058*	0.443±0.039	0.209±0.062*
BDL	0.453±0.072	0.483±0.037	0.449±0.074
SO	0.439±0.067	0.472±0.062	0.457±0.058

* 与其它两组比较 $P<0.05$

表 2 各组动物肝组织总的 CO 含量变化 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

组别	术后 (h)		
($n=10$)	2	6	12
AOC	0.353±0.022*	0.263±0.016*	0.197±0.027*
BDL	0.527±0.031	0.519±0.023	0.509±0.039
SO	0.525±0.042	0.521±0.020	0.513±0.034

* 与其它两组比较 $P<0.05$

表 3 AOC 组肝腺泡不同区带 ACP 含量变化 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

区带	术后 (h)		
($n=10$)	2	6	12
1 带	0.732±0.051△	0.473±0.047	0.203±0.035△*
2 带	0.482±0.032	0.404±0.045	0.312±0.021*
3 带	0.473±0.037	0.462±0.038	0.326±0.027*

* 与 2 h 比较 $P<0.05$;

△ 与其它两带比较 $P<0.05$

表 4 AOC 组肝腺泡不同区带 CO 含量变化 ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

区带	术后 (h)		
($n=10$)	2	6	12
1 带	0.397±0.032	0.346±0.024	0.248±0.021*
2 带	0.371±0.024	0.328±0.021	0.204±0.019*
3 带	0.245±0.017△	0.162±0.031△*	0.132±0.061△*

* 与 2 h 比较 $P<0.05$;

△ 与其它两带比较 $P<0.05$

3 讨论

严重胆道感染所致脓毒血症是引起全身多个重要器官，特别是肝脏损害的重要原因。虽然众多学者对胆道感染引起肝脏损害进行了大量研究，但其细胞损伤的机制尚不完全清楚。近年来，随着肝脏结构和功能认识的深入，肝腺泡——作为肝脏微循环功能单位的概念已深受人们重视。本文从肝腺泡角度出发，利用酶组化染色方法，应用图像分析技术，测定肝腺泡各区带肝细胞内两个具有代表意义的酶 ACP、CO 含量变化，对阐明肝腺泡不同肝细胞群的功能及胆道感染时肝细胞的病理变化有一定意义。

3.1 肝脏 ACP、CO 活性变化及意义

肝脏为体内最大消化器官，是机体的代谢中枢。溶酶体是细胞内消化的主要细胞器，ACP 是溶酶体的标记酶，其活性变化在一定程度上反映了细胞消化机能的强弱；而 CO 作为线粒体特有的标记酶，在细胞的有氧呼吸中起重要作用，可以反映细胞氧化代谢的程度。因而这两种酶的组化定量研究有助于了解肝细胞的功能变化。

以往测定细胞酶活性，多用主观判断的定性或半定量法，准确性差。本实验用目前先进的图像分析技术，对胆道感染时肝组织 ACP、CO 进行了客观定量测定。结果发现，AOC 组术后 2 h ACP 有一个短暂升高，随后其活性受到明显抑制，提示胆道感染早期因细菌及毒素的刺激，提高了肝细胞的消化能力。但此能力是有限的，随着病程进展，细菌大量繁殖，肝细胞内溶酶体合成受损害，ACP 活性被抑制，最终可能导致溶酶体破裂并产生一系列病理损害。而 CO 含量从术后逐渐下降，表明肝细胞线粒体生物氧化过程的进行性损害。BDL 组 ACP、CO 活性无显著变化，可能与胆道梗阻时间尚短，其肝细胞损害尚未完全表现出来有关；这也间接说明胆道感染因伴有脓毒血症，肝脏损害比单纯胆道梗阻更为严重。

3.2 肝腺泡各区带肝细胞功能及其损害

由于不同部位肝细胞其局部的血流动力学和氧及营养供给不同，各带肝细胞在细胞结构、代谢等方面有明显差异，在不同病理条件下对致病因素的反应也不同[5]。本实验发现，胆道感染后 ACP 的变化以第 1 带肝细胞最显著，有一个先激活后抑制过程，这可能与该带肝细胞与细菌及毒素的密切接触有关，因为肝腺泡第 1 带肝细胞群，其肝窦内血流氧分压最高，血供最丰富，对缺血耐受性最强，但易遭受毒性物质的损害。而 CO 的变化则以第 3 带肝

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

细胞最明显，在胆道感染早期其活性就受到明显抑制，表明其线粒体氧化代谢功能已遭受严重损害。早期第 3 带肝细胞 CO 活性抑制显然不能用细菌及毒素的直接作用来解释，可能原因是肝脏微循环障碍所致。Fry 和 Asher[6,7] 认为，感染引起的器官衰竭首先是由于器官有效血流量减少，而并非毒素对细胞的直接毒性作用。Machiedo[8] 的实验表明：全身感染后 2 h，肝血流量即可明显减少，而此时肝细胞尚没有明显的损伤，直至感染发生 6 h，肝细胞才有受损表现。我们的研究也表明[9]，胆道感染 2 h，肝血流量已明显下降。我们认为第 3 带肝细胞 CO 活性早期受抑制的原因，是因肝细胞群血供特点所决定。该细胞群距门管终末支轴线最远，血供最差，对缺血缺氧的耐受性也最弱。因此，随肝血流量减少，CO 活性降低，线粒体功能遭受损害。本实验结果提示，肝腺泡不同区带肝细胞在胆道感染时的病理损害变化不尽相同，缺血对胆道感染引起的肝细胞损害可能具有某种起动作用，这方面的研究值得深入进行。

参考文献

1. 龚建平 韩本立 段恒春，等。急性胆道感染时多脏器损伤病理学观察。第三军医大学学报，1992；14(2)：107～111
2. Luo Ding，Han Benli，Gong Jianping，et al. An experimental study on hepatocyte mitochondrion damage during acute biliary sepsis. J Med Coll PLA，1991；6(4)：319～323
3. Valck VD，Geerts A，Schllinck P，et al. Localization of four phosphatases in rat liver sinusodial cells. Histochemistry，1988；89：357～363
4. 古德全。显示细胞色素氧化酶的组织化学方法及其应用。临床与实验病理学杂志，1988；4(4)：239～240
5. Gumucio JJ，Miller DL. Functional implications of liver cell heterogeneity. Gastroenterology，1981；3(2)：393～403
6. Fry DE. Multiple system organ failure. Surg Clin North Am，1988；68：107
7. Asher EF. Experimental bacteremia and hepatic nutrient blood flow. Circ Shock，1986；20：43
8. Machiedo GW，Eurd T，Rush BF，et al. Temporal relationship of hepatocellular dysfunction and ischemia in sepsis. Arch Surg，1988；123(4)：424～427
9. 孙文兵 韩本立 段恒春，等。胆道梗阻感染和胆道梗阻时有效肝脏血流量的测定。第三军医大学学报，1992；14(2)：176～178

（收稿：1992-05-06；修回：1992-10-23）

Changes of acid phosphatase and cytochrome oxidase in hepatic acini during acute obstructive cholangitis in rats

Gong Jianping，Han Benli，Luo Ding，et al（Department of Hepatobiliary Surgery，Southwest Hospital，Third Military Medical College，Chongqing，630038）

Abstract The changes of acid phosphatase (ACP) and cytochrome oxidase (CO) in the hepatic acini were investigated with image analysis in 90 Wistar rats after acute obstructive cholangitis was inflicted. It was found that the activity of ACP was significantly increased in the 2nd hour after surgery and markedly decreased in the 12th hour and these changes were predominantly located in acinur zone 1 of the hepatocytes. The activity of CO was decreased progressively after surgery，and these changes were quite marked in the acinur zone 3 of the hepatocytes. These findings indicate that the reactions towards acute obstructive cholangitis are different in the different acinur zones of the hepatocytes.

Key words hepatic acinus；cholangitis；acid phosphatase；cytochrome oxidase；actue disease

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net