DOI:10.16016/j.1000-5404.1990.02.002

实验性阻塞性黄疸时枯否氏细胞吞噬功能及病理学变化的研究

李 锐* 钟光汉 左声鹤 （病理学教研室）

提 要 本实验应用胶性碳活体染色、内源性过氧化物酶细胞化学、定量组织学和电镜立体计量等方法，重点研究了大鼠胆总管结扎后不同时相点（3、7、14、21及28天）枯否氏细胞数量和超微结构的动态变化，同时测定了枯否氏细胞吞噬功能和血浆纤维联结蛋白调理活性。结果表明，大鼠胆总管结扎后枯否氏细胞形态和功能变化是一致的，二者均表现为一动态过程。枯否氏细胞吞噬功能变化主要是由于枯否氏细胞数量和细胞活性改变所致。

关键词 胆管阻塞，肝外；kupffer细胞；过氧化物酶；吞噬作用；纤维联结素类

枯否氏细胞（Kupffer cell，KC）占整个单核吞噬系统吞噬活性的80～90%，是吞噬和清除内毒素、细菌、活化的凝血因子、血小板聚合物、坏死细胞碎片及循环免疫复合物的主要场所。因其位置特殊，KC也是阻止内毒素和病原菌由门脉系统进入体循环的关键屏障。阻塞性黄疸常并发肠源性内毒素血症[1]、化脓性胆管炎、胆管源性或/和肠源性败血症，导致感染性休克和多器官衰竭[2]。因此，研究阻塞性黄疸时KC的吞噬功能和病理改变，对于阐明上述严重并发症的发生机制具有重要意义。这方面的研究国外仅有少量文献提及[2][3]，国内尚未见报道。本实验旨在研究大鼠阻塞性黄疸时KC吞噬功能和病理变化，探讨KC吞噬功能变化规律及其病理学基础。

1 材料与方法

1.1 动物分组及时相点设置

选用健康雄性Wistar大鼠144只，体重250±40g，随机分为胆总管结扎(Bile duct Ligation，BDL)组80只和假手术（Sham operation，SO）组64只，以假手术组作为对照。两组均设术后3、7、14、21和28天5个时相点。

1.2 观察指标与方法

1.2.1 KC形态结构变化

1.2.1.1肝脏组织学改变及KC计数 将已用于测定KC吞噬功能的动物肝脏取材固定，常规石蜡包埋切片（厚2.5μ），HE染色，Olympus显微镜下连续计数10个600倍视野中的KC数。

1.2.1.2电镜观察

①透射电镜 电镜组化及常规电镜 为准确辨认KC，参考Bouwens[4]等人方法，将肝组织灌注固定后以DAB法显示KC内有特殊定位的内源性过氧化物酶，环氧树脂618定向包埋，半薄切片定位后切超薄切片，醋酸铀、柠檬酸铅双染色，日产H—300透射电镜观察。

立体计量 按系统随机原则，使每个时相点均获32张等倍放大（10000×）的不同KC照片。采用点测试法，计算KC胞浆内吞噬结构体密度（V_{VPC}）。

②扫描电镜 活体肝组织灌注固定后按扫描电镜常规制样，JEOL－300扫描电镜观察。

1.2.2 KC吞噬功能测定 采用John M等人的非血流量依赖剂量胶性碳清除法[2]。结果以较正吞噬指数α表示，α越大，表示KC吞噬功能越强。

* 现在西南医院肝胆实验室工作

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

1.2.3 血浆纤维联结蛋白（Fn）调理活性测定 采用黄文华等报道的凝集法[5]。全部血浆标本均在取材后10小时内测定。

1.2.4 数据处理 在Robbin型计算机上对上述各项指标的数据进行单因素方差分析，FLST和Neuman Keul检验。

2 结果

2.1 肝脏组织学改变及KC计数

BDL组肝脏组织学改变主要为：①小胆管和纤维组织显著增生；②肝细胞小灶性坏死；③在增生的小胆管周围，扩张的汇管区和肝细胞坏死灶内有多少不一的中性白细胞、单核细胞及淋巴细胞浸润；④KC的变化。术后3～7天，KC显著增生，细胞体积胀大，胞浆丰富，其中充满吞噬的碳粒(图1)。术后14天时KC增生现象已不明显，21天KC数量减少，28天KC减少更加显著，仅在被增生的小胆管和成纤维细胞包绕的肝细胞团内残留少许KC（图2）。KC计数结果如图3所示。

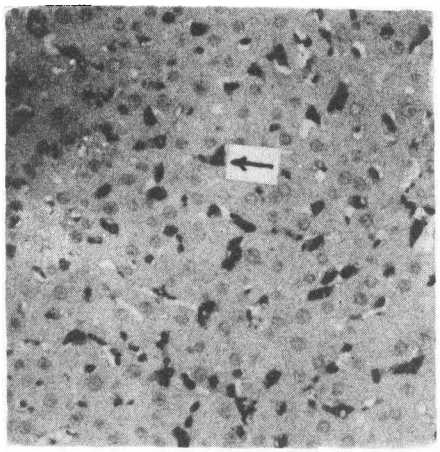


图1 BDL组术后3天，肝板排列稍乱，KC(→)显著增生，弥漫分布于肝窦中。HE×200

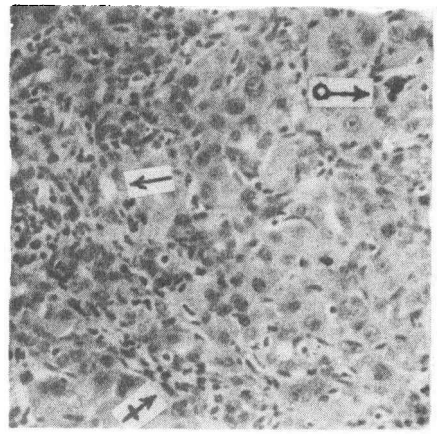


图2 BDL组术后28天，小胆管（→）和成纤维细胞（+→）显著增生，KC(○→)明显减少。HE×200

2.2 KC超微结构改变及立体计量

BDL组术后3～7天KC数量明显增多，体积大，表面皱折和突起增多，胞浆丰富，其中可见大量吞噬泡和电子致密吞噬体（图4），有的KC内可见吞入的红细胞、淋巴细胞或肝细胞碎片，蠕虫样结构

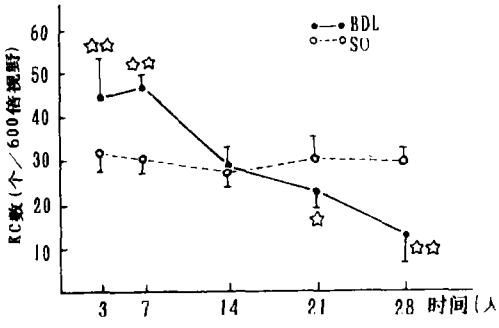


图3 吞噬碳粒的KC计数结果

☆：与SO组比较相差显著（P<0.05），☆☆：相差非常显著（P<0.01）

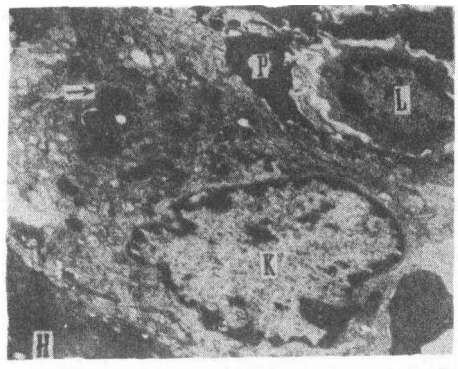


图4 BDL组术后3天，KC(K)胞浆内出现大量电子致密吞噬体（→），细胞体积增大，核浆比值降低。KC旁可见淋巴细胞(L)和血小板（P）。H表示肝细胞。TEM×5000

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

(Wormlike structure) 明显增多，迂回曲折成迷宫状。术后14天KC 内吞噬结构开始减少。术后21天多数KC体积缩小，表面突起和胞浆内吞噬结构较14天时少，线粒体嵴变短、排列紊乱、断裂。28天 KC 已很少见，KC体积明显缩小，核浆比值显著升高，细胞表面突起和胞浆内吞噬结构少见，其它细胞器亦有减少，若非特异性内源性氧化物酶标记，难以准确辨认。同时，KC 线粒体嵴断裂、基质空化、外膜破裂（图5），有的KC内可见内质网扩张，髓鞘样结构增多，胞膜破损等改变。

KC立体计量结果　Vvpc在BDL组术后 3～7 天显著高于SO 组，14天时与 SO 组无统计学差异，21天和28天显著低于SO组（图 6）。

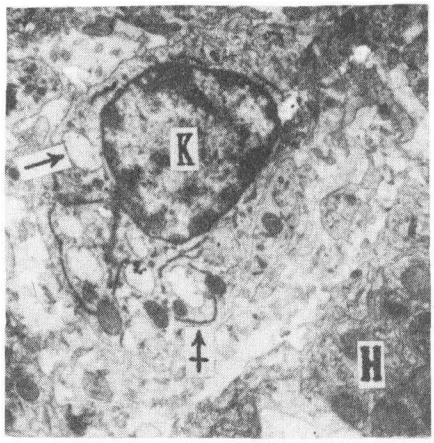


图 5　BDL组术后28天，KC体积缩小，表面突起显著减少，线粒体空化（→）。KC核膜和RER（+→）内源性过氧化物酶反应阳性。 TEM×10000

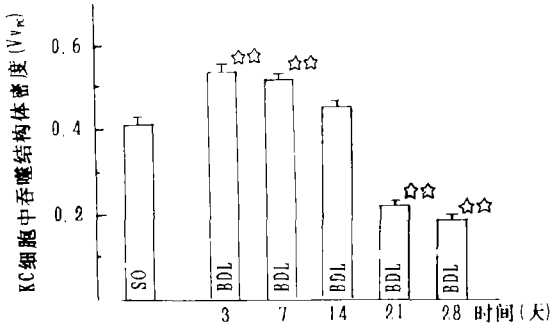


图6　KC胞浆中吞噬结构体密度变化
☆☆：与SO组比较相差非常显著（P＜0.01）

扫描电镜观察　BDL 组术后 3～7 天肝窦内 KC 增生，细胞体积巨大，常横跨整个窦腔（图 7），细胞表面皱折和突起增多。术后21天 KC 数量减少，胞体缩小，表面较光滑。术后28天 KC 很少见且难于确认。

2.3　kc吞噬功能变化

SO组各时相点间无显著差异。BDL组术后 3 天和 7 天α显著大于SO组，21天和28天α显著低于 SO 组（图 8）。

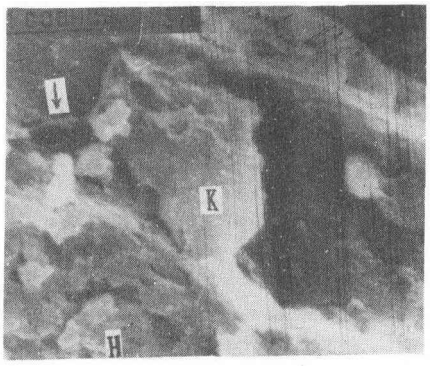


图 7　BDL组术后 3 天，KC肥大，几乎占据整个血窦腔，可见其丝状伪足（→）穿过内皮细胞的孔隙。SEM×2500

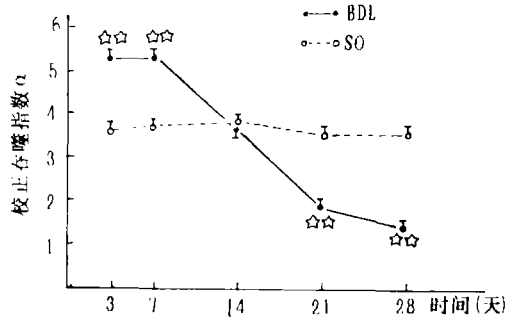


图 8　KC吞噬功能测定结果
☆☆：与SO组比较相差非常显著（P＜0.01）

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

2.4 血浆纤维联结蛋白调理活性测定结果如图9所示

将血浆稀释度（V）的倒数转化为以2为底的对数log 2（1/V）后进行统计学处理，结果表明BDL组与SO组在术后各时相点间均无显著差异（P>0.05）。

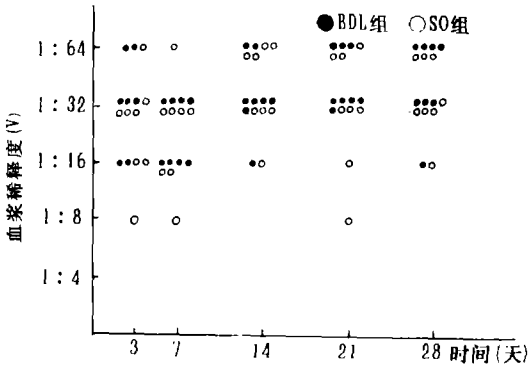


图9 术后血浆FN活性测定结果

3 讨论

既往研究证明，人和动物阻塞性黄疸时KC吞噬功能均受抑制[2][6]，但其机理不明。影响KC吞噬功能的因素是复杂的，如血浆调理素活性、肝脏灌流量、KC吞噬活性和KC数量等。研究表明阻塞性黄疸时肝灌流量并无减少[3]。本实验和James A Pain[3]的实验均表明阻塞性黄疸时血浆Fn活性并无降低，而Fn是KC非特异吞噬过程中最主要的调理素，因此有理由认为肝灌流量和血浆调理素变化不是导致KC吞噬功能抑制的主要因素。

关于阻塞性黄疸时KC的病理变化少有文献提及[3][7]，缺乏与KC吞噬功能测定相对应的形态学动态观察资料，亦未见形态学定量研究报道。本实验在测定大鼠胆总管结扎后不同时相点KC吞噬功能变化的同时，首次对KC的病理变化进行了动态的定量研究。结果表明，KC的形态学改变同吞噬功能测定结果相吻合，二者均表现为一动态变化过程，大致可分为3期：①功能亢进期（术后3～7天），表现为吞噬指数α升高，KC计数明显增多，细胞肥大，胞浆内吞噬结构体密度显著升高；②过渡期（术后14天），与功能亢进期比较，吞噬功能开始减退，但尚未出现抑制，可视为介于吞噬功能亢进与抑制之间的一个过渡阶段；③功能抑制期（术后21～28天），吞噬指数α显著降低，核浆比值明显升高，胞浆内吞噬结构体密度显著降低，细胞器减少，并出现线粒体空化、破裂、内质网扩张，髓鞘样结构增多，细胞膜破裂等细胞损伤表现。根据本实验结果，我们认为阻塞性黄疸的早期KC吞噬功能一度增强，随着阻塞性黄疸的迁延，KC吞噬功能逐渐减退直至出现明显抑制，而KC活性降低和KC数量减少是阻塞性黄疸时KC吞噬功能抑制的主要原因。

阻塞性黄疸时肠道菌大量增殖，肠源性内毒素吸收增加[1][8]，也常并发化脓性胆管炎，大量内毒素和病原菌进入门脉系统，而此时KC吞噬功能明显抑制，使内毒素和细菌得以溢出（Spill over）而进入体循环，发生内毒素血症和/或败血症，导致感染性休克和多器官衰竭。这可能是阻塞性黄疸并发感染发展快，临床表现复杂，多器官衰竭发生率高的重要原因之一。

参考文献

1. Cashill CJ, et al. Prevention of post-operation renal failure in patients with obstructive jaundice—the role of bile salts. Br J Surg 1983; 70:590～595
2. John M, et al. Biliary obstruction and host defense failure. J Surg Res 1982; 32:206～213
3. James A Pain, et al. The Kupffer cell in experimental extrahepatic cholestasis in the rat—

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

Immunohistochemical and electron microscopy study. J Hepatology 1986; 150:187～194
4. Luc Bouwens. Tissue localization and kinetics of pit cells or large granular lymphcytes in the liver of rats treated with biological response modifiers. Hepatology 1988; 8(1):146～152
5. 黄文华，等。血清纤维联结蛋白的测定并初步试用于临床病例的观察。第三军医大学学报 1984；6(3):225～229
6. George Drivas, et al. Study of reticuloendothelial phagocytic capacity in patients with cholestasis. Br Med J 1976; 1:1568～1569
7. Carpino F, et al. A scanning and transmission electron microscopic study of experimental extrahepatic cholestasis in the rat. J Submicrosc Cytol 1981; 13(4):581～589
8. Ingoldby CJH, et al. The significance of preoperative endotoxaemia in obstructive jaundice. Br J Surg 1983; 70:300

(收稿：1989.09.18；修回：1989.11.20)

A Study of Kupffer Cell Phagocytic Function and Its Pathological Changes in the Rat with Experimental Obstructive Jaundice

Li Rui, et al (Department of Pathology, Third Military Medical College)

Pathological changes of Kupffer cells in number and ultrastructure were studied by means of colloidal carbon uptake, endogenous peroxidase cytochemistry, quantitative histology and ultrastructural stereologic morphometry at various time intervals (3,7,14,21,and 28 d) after common bile duct ligation. Kupffer cell phagocytic function and serum fibronectin opsonic activity were measured. The results show the morphological changes of Kupffer cells coinciding with their functional alterations. Alteration of Kupffer cell phagocytic function is mainly due to the changes of number and cellular activity of Kupffer cells.

Key words: bile duct obstruction, extrahepatic; Kupffer cells/UL; peroxidase; phagocytosis; fibronectins

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