DOI:10.16016/j.1000-5404.1986.02.002

生后1至90天内不同年龄大鼠肝细胞溶酶体酸性磷酸酶的观察

李兵仓 指导：王启民教授

（组胚教研室）

提 要 本文采用铅盐法，在光镜和电镜下对生后1～90天大鼠肝细胞溶酶体ACPase做了定性观察和半定量估计。

光镜显示：生后15天时，逐渐增加的酶反应颗粒由胞浆移到了胆小管旁。电镜显示：溶酶体系统是显示ACPase活性的主要细胞器，溶酶体的分布和数量随大鼠年龄增长的改变与光镜下酶反应颗粒的变化趋势基本一致。肝细胞内自噬泡的数量在生后早期较多，并可见许多性质不明的泡状结构。三种半定量方法均表明肝细胞溶酶体ACPase的活性随年龄增长而增强。

自噬泡参与了大鼠生后肝细胞胞质的重建。胆小管旁定位有利于溶酶体排出废物。溶酶体ACPase活性增强与大鼠生后肝机能日趋旺盛有关，主要表现为溶酶体数量的增加。

关键词 大鼠；肝细胞；溶酶体；酸性磷酸酶；不同年龄；光镜与电镜组化

溶酶体是富含多种水解酶的重要细胞器，其中酸性磷酸酶（ACPase）是溶酶体的主要水解酶(标志酶)。既往，很多学者在电镜下对成年大鼠肝细胞溶酶体ACPase曾做过定性研究[1][2]，但对大鼠肝细胞溶酶体ACPase从生后1天至90天内不同时间的研究尚未见有较全面的报导。Vorbradt('67)[3]对胚胎至生后28天的大鼠肝细胞溶酶体及其ACPase和成年正常肝细胞与肝细胞癌的肝细胞做了对比观察。Dvořák ('69)[4]在电镜下研究胚胎至生后40天的大鼠肝细胞溶酶体时，只在部份标本中采用显示ACPase的组化方法以鉴别溶酶体。Wood ('67)[5]曾提到电镜下观察过发育期大鼠肝细胞溶酶体ACPase。本文采用铅盐法，对生后1至90天大鼠肝细胞溶酶体ACPase做了定性观察和半定量估计，藉以探讨溶酶体ACPase在大鼠生后肝细胞发育和分化过程中的分布及其活性的改变。

材 料 与 方 法

取生后1、5、15、30、50和90天品系不明的雄性大鼠各5只，共30只。动物生后分专笼饲养，于上午9～10时取材，断头后取部份肝左叶组织，分别用Bancroft('77)和Essner等,('61)[1]改良的铅盐法做光镜和电镜组化处理。另取一只90天大鼠如前取材后做电镜常规技术观察，以做形态学对比。

一、组织化学方法 光镜组化：将10μm冰冻切片入4℃钙-福尔马林固定液固定20分钟，pH5.0的β-甘油磷酸钠孵育液37℃孵育50分钟。电镜组化：将约1 mm^3的肝组织小块入前述固定液固定约3小时，置于ACPase孵育液（含15%蔗糖）中37℃孵育80分钟，再经1%锇酸、饱和醋酸铀等处理后，Epon 618包埋，LKB超薄切片机切400～600Å切片，柠檬酸铅复染5分钟，用DXA 4～10型电镜观察。

二、半定量分析 1.积分法 根据肝细胞溶酶体ACPase反应颗粒的密集程度、颜色及在胞浆中所占面积将其分为（0）～(卌)级。每只动物连续计数100个ACPase反应强弱不同的肝细胞，按积分法记录。2.网格法 每只大鼠取12张切片，每张切片随机选择三个测量区，并以反应产物所占测量区内肝细胞总面积的平均百分比来表示酶活性的强弱。测量时，将绘有小方格的透明胶片装入15×目镜中，在油镜视野中央选用400个小方格来估计反应产物和肝细胞外成份（肝血窦、枯否氏细胞、造血细胞等）的面积。用400小方格减肝细胞外成

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

份所占格数的差去除反应产物所占格数，所得商再乘100即得反应产物所占肝细胞面积的百分比。3. 超薄切片中肝细胞ACPase反应的溶酶体计数　从每只大鼠的超薄切片中随机选取50个完整的肝细胞，在5000～10000倍的电镜下进行ACPase反应阳性的溶酶体计数，并求得每个肝细胞切面上的平均溶酶体数量以估计其ACPase的活性。

所有半定量资料均经统计学处理。

结　果

光镜观察　肝细胞排列和肝小叶轮廓在生后15天时才整齐明显。90天时，肝小叶和成年型相似。肝细胞溶酶体ACPase反应产物呈颗粒状，其堆积的密度、颜色及所占胞浆面积的大小在生后发育期内明显增强变大（图1、2.）。生后15天时，可见酶反应颗粒由胞浆移到了胆小管旁。

电镜观察　肝细胞溶酶体ACPase反应产物主要分布在溶酶体系统中。各组大鼠肝细胞的初级溶酶体和功能活跃的次级溶酶体都呈现了很强的酶反应。ACPase反应产物常在溶酶体内聚集成堆或显均质状。因反应产物的遮盖，溶酶体的单位膜多不能辨认（图3）。酶反应阳性溶酶体的数量和分布随大鼠年龄增长的改变与光镜下所见酶反应颗粒的变化趋势基本一致。生后15天时，数量逐渐增加的溶酶体也由胞浆移到了胆小管旁（图4）。90天时，溶酶体的分布呈年轻成年型，并可在胆小管和血窦中见到含有未消化物质的酶反应阴性残体。

酶反应阳性的自噬泡清楚可见。它们是由呈半月形弯曲的SER从一侧或双侧包绕线粒体等细胞器、糖元和细胞基质而形成（图5）。晚期自噬泡的内含结构被酶降解而不易辨认。自噬泡的数量在生后1天时较多。

自生后30天起始，指纹状的髓层小体（Myelin Figure）和多泡体容易看到。前者ACPase反应阴性，后者基质酶反应阳性，内含有很多小泡，其周围有很多有衣小泡，似有穿入多泡体的趋势（图6）。胆小管内可见髓层小体。

除酶反应阴性的脂滴外，在生后15天以前标本中的肝细胞内容易见到许多大小不一，形状各异的泡状结构。泡壁厚薄不等，具有相似于初级溶酶体酶反应产物的均质状物质。有些泡似以“发芽”方式伸出小泡，后者形似酶反应阳性的初级溶酶体（图7）。

在生后1～15天各年龄组的大鼠肝细胞中，可见1～2个酶反应阳性的溶酶体位于胞核内（图8）。

半定量估计　据积分法估计：肝细胞溶酶体ACPase反应的积分值随大鼠年龄增长而增大（如表所示）。由图9的坐标曲线可以看出：1～15天间和50～90天间积分值增大最为明显，表现为酶活性曲线较为陡直；15～50天间酶活性曲线较为平坦，说明积分值增大不明显。参照单位分析表明：5个年龄组和生后1天组的肝细胞溶酶体ACPase反应强度相比均相差显著；15与30、30与50及15与50天相比相差不显著；50与90天两组相差显著。据网格法估计：溶酶体ACPase反应颗粒所占肝细胞面积的百分比值随大鼠年龄增长而增大，曲线形状与积分法的基本相同（图10）。方差分析表明：各年龄组和生后1天组溶酶体ACPase反应颗粒所占肝细胞面积的百分比值相比均相差显著（1与5天，$P<0.05$；1与15、30、50和90天，$P<0.01$）；5与15天相差显著（$P<0.01$）；15与30、30与50天相差不显著（$P>0.05$）；但15与50天相差显著（$P<0.05$）；50与90天相差亦显著（$P<0.05$）。超薄切片中肝细胞ACPase反应的溶酶体计数由图11可以看出：表示酶反应阳性溶酶体数量的曲线由生后1天起始逐步上升，在1～30天间曲线较为陡直，30～50天间曲线较为平坦，50～90天间曲线再度变陡。方差分析表明：5个年龄组和生后1天组的平均肝细胞切面上酶反应阳性溶酶体数量相比均相差显著（1与5天，$P<0.05$；1与15、

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

30、50、90天，$P<0.01$）；相邻两组间的比较除30与50天相差不显著($P>0.05$)外，其余相差均显著（$P<0.01$）。

表　生后1至90天大鼠肝细胞溶酶体ACPase反应强度

年龄（天）	阴性细胞 %	阳性细胞 %				积分
		+	++	+++	++++	
A(1)	23.8	68.4	4.0	3.8	0.0	87.8
B(5)	20.0	5.0	71.0	4.0	0.0	159.0
C(15)	6.4	2.2	8.0	82.2	1.2	269.6
D(30)	0.0	5.0	5.0	86.8	3.2	288.2
E(50)	0.0	0	5.0	89.4	5.6	300.6
F(90)	0.0	2.0	3.0	4.8	90.2	383.2

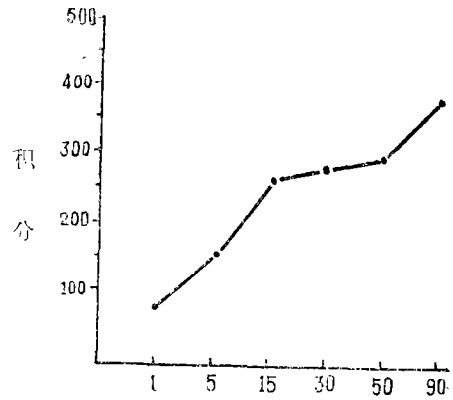


图9　生后1至90天大鼠肝细胞溶酶体ACPase反应强度

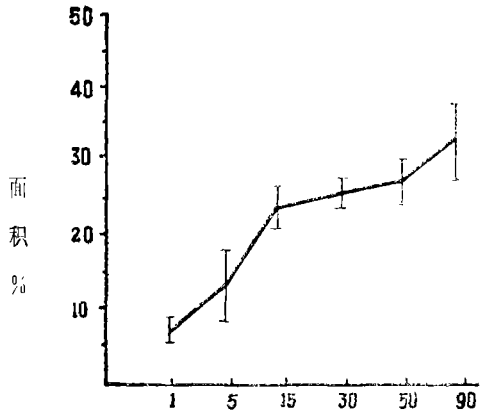


图10　生后1至90天大鼠肝细胞溶酶体ACPase反应面积

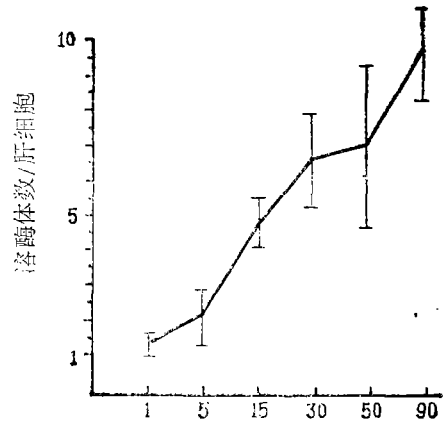


图11　生后1至90天大鼠肝细胞ACPase阳性溶酶体数量

讨　论

一、溶酶体及ACPase的分布与生后肝细胞发育　据光镜观察，辐射状的肝细胞索和肝小叶的轮廓在大鼠生后15天时才清楚可辨。肝细胞内逐渐增加的酶反应颗粒也在此时逐渐移到胆小管旁，呈极性排列。电镜观察，除部份残体、髓层小体及早期自噬泡外，初级溶酶体和其他次级溶酶体的消化泡、多泡体、晚期自噬泡等均呈酶阳性反应。作者观察结果表明：电镜下酶反应阳性溶酶体的分布及数量随大鼠年龄增长的改变与光镜下酶反应颗粒的变化趋势基本一致。在个体的发育和分化过程中，细胞的不断破坏和新生保证了组织器官的改建与形成。溶酶体不仅可以使细胞崩解，而且分解大分子物质，其中的部份代谢产物又可被细胞再利用。大鼠出生后，为了在新的代谢条件下发挥正常机能，肝细胞内的构筑成份必须进行新旧更替[6]，本文所见大鼠生后早期肝细胞内自噬泡较多，这说明自噬泡直接参与了胞质的重建[3][4]。新生时自噬泡的数量增多除与代谢

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

改变有关外[4],Dvořák('69)和Bal('79)[7]还认为大鼠出生时的缺氧和生后胰岛素水平的下降也促进了自噬泡的形成。溶酶体既然参与大鼠肝脏的解毒功能[2]和胆色素代谢[1],那么随着肝机能的日趋旺盛,溶酶体的数量必然逐渐增加,并且向它们便于排泄废物的有利位置—胆小管旁移动。

不少学者对幼年和成年的大鼠肝细胞ACPase进行了亚细胞定位研究[1][2][5],均认为溶酶体是显示ACPase活性的主要结构。Vorbradt('67)[3]曾报导:出生时大鼠肝细胞中自噬泡的数量最多,在生后28天内,随着溶酶体向胆小管旁移动,自噬泡的数量逐渐减少,而其他溶酶体的数量逐渐增加。Dvořák('69)[4]和Phillips('67)[8]也分别在生后40天和生后12小时以内的大鼠肝细胞中做出了类似的结果。Dvořák特别指出:生后10～14天时肝脏的组织发生和肝细胞的分化才逐渐完成。这些作者的报导和本文的观察结果一致。

残体和髓层小体都是含有未消化物质的后期溶酶体[6],其内部的水解酶多消耗完毕,因而ACPase活性不会显示出来。当自噬泡内的膜性细胞器消化不全时,可形成指纹状的髓层小体。据作者电镜观察,胆小管和血窦中也有残体和髓层小体,说明在生理条件下,残体和髓层小体与溶酶体内废物一样,也可排到细胞外。这些现象已有人在大鼠肝中有所报导[2][3]。

二、发育期肝细胞溶酶体ACPase活性与溶酶体数量的变化　光镜下,用积分法和网格法分别估计了生后1～90天大鼠肝细胞内溶酶体ACPase的反应强度及反应颗粒所占肝细胞面积的百分比值。电镜下,作者用肝细胞切面上平均酶反应阳性溶酶体数量的估计值来表示溶酶体ACPase的活性。上述三种半定量方法所得结果虽有一些出入(可能由取样误差和统计方法不同等所致),但都表明在生后1～90天大鼠发育期内,肝细胞溶酶体ACPase活性逐渐增强。

通常认为酶蛋白的合成增强或降解减少[9][10]、溶酶体膜的通透性增强[7]及溶酶体的数量增加[2][10][11]是溶酶体ACPase活性增强的直接因素。本文仅做了光镜和电镜ACPase的观察,所得结果只能表明随着大鼠生后年龄的增长,溶酶体数量的增加使其ACPase的活性增强。

Wachstein('65)[11]光镜观察说明大鼠肾近曲小管上皮细胞中ACPase活性随年龄增长而增强。Klamer('63)[12]在培养的四膜虫细胞中也作了同样报导。电镜下,Dvořák等证明生后大鼠肝细胞溶酶体的数量随年龄增长而增加[3][4]。本文测定结果和其他作者所得结果相符。

生化学者对生后大鼠、小鼠和人肝匀浆中的溶酶体ACPase及其他水解酶做了一些定量研究,所得结果很不一致。Stevens等的工作认为酶活性随年龄增长而增加[7][13];Franklin等的工作却说明酶活性随年龄增长而下降[14];而Messina('79)[15]则报导酶活性与年龄增长无关。本文所得溶酶体ACPase组化计数结果支持Stevens等的结论。

三、关于泡状结构问题　在所观察的肝细胞内见到的形状各异的泡状结构,其性质如何难以确定。在所见文献报导中,尚未见到生后1～90天大鼠肝细胞内象我们所观察的泡状结构,只有Millington('67)[16]和Ono('81)[17]先后在出生至30天左右的大鼠小肠上皮细胞中报导了从形态上、酶反应上及数量的变化上都有些和我们的泡状结构相似的空泡系统。他们认为空泡系统可以代替溶酶体的功能,并可以演变成溶酶体。至于本文所见的泡状结构有待进一步的研究。

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

参 考 文 献

1. Essner E and Novikoff AB. Localization of acid phosphatase activity in hepatic lysosomes by means of electron microscopy. J Biophys Biochem Cytol 1961; 9:773～784

2. Campbell RM, et al. Localization of acid phosphatase activity in the liver of pregnant rats. Histochem J 1977; 9:43～60

3. Vorbradt A. Cytochemical studies of some cytoplasmic structures in embryo and newborn rat liver and in hepatoma. Folia Histochem Cytochem 1967; 5:239～248

4. Dvořík M, et al. Occurence of lysosomes and the differentiation of rat liver cells. Z Zellforsch 1969; 99:277～285

5. Wood RL. Electron microscope localization of phosphatase activity in developing rat liver. J Cell Biol 1967; 35:146A

6. Pitt D. "Lysosome and Cell Function" edited by D Pitt, Longman. London and New York, 1975

7. Bal D and Vainllant R. Endocrin control of lysosomal alteration in rat liver during the perinatal period. Experientia 1979; 35:1531～1532

8. Phillips MJ, et al. Glycogen depletion in the newborn rat liver an electron microscopic and electron histochemical study. J Ultrastruc Res 1967; 18:142～165

9. Knook DL, et al. Change in lysosomes during ageing of parenchymal and non-parenchymal liver cells. In "Advances in Experimental Medicine and Biology" Vol 53, edited by VJ Cristofelo. Plenum Press. New York and London. 1975; pp155～169

10. Lake BD and Ellis RB. What are you thinking you are quantifing? An appraisal of histochemical method in the measurement of activities of lysosomal enzymes. Histochem J 1976; 8:357～366

11. Wachstein ME, et al. Histochemical localization of enzyme activity in the kidneys of three mammlian species during their postnatal development. J Histochem Cytochem 1965; 13:44～56

12. Klamer B, et al. Acid phosphatase activity during growth and synchronous division of Tetrahymena pyriformis. Exp Cell Res 1963; 29:166～175

13. Stevens L. A comparative study of enzymes in fetal, young and adult rat. Comp Biochem Physiol 1962; 6:129～135

14. Franklin TJ. The influence of age on the activities of some acid hydrolases in the rat liver and kidney. Biochem J 1962; 82:118～122

15. Messina M, et al. Lysosomal hydrolase activities in the developing rat liver. Boll Soc Ital Biol Sper 1980; 15:27～32

16. Millington PF, et al. Electron microscope studies of the distribution of phosphatase in rat intestinal epithelium from birth to the ten days after weaning. Histochemie 1967; 8:109～121

17. Ono K, et al. Ultrastructural localization of acid phosphatase activity in the small intestinal absorptive cells of postnatal rat. Histochemistry 1981; 71:501～512

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

Observations on Acid Phosphatase of Lysosomes of Hepatocytes in Rats Aged One to Ninety Days

Li Bingcang Tutor: Wang Qimin

(Department of Histology & Embryology, Third Military Medical College)

Acid phosphatase (ACPase) of the lysosomes of the hepatocytes in rats aged 1～90 days was studied qualitatively and semi-quantitatively with lead salt method under light and electron microscopes (LM, EM). Under LM, the reactive enzyme granules (REG) of the lysosomes were scarce in number and dicstributed irregularly in the cytoplasm of the hepatocytes on the first postnatal day. The number of REG increased with the age, and most of REG migrated to the periphery of the bile duct on the 15th day after birth. Under EM, the lysosome system was found to be the only organelle where the activity of ACPase could be observed. The results of the observations with LM and EM were quite consistent, that is, the number of REG and the activity of ACPase increased with the age of the rats, and the distribution of lysosomes varied with the age, too. In the early stage after birth, there were quite a number of autophagic vacuoles as well as many vacuolelike structures of unkown origin in the hepatocytes. Autophagic vacuoles contributed significantly to the reconstruction of the cytoplasm of the hepatocytes. The location of lysosomes at the periphery of the bile ducts was favorable to the excretion of waste products. It was also found that the activity of ACPase, which was mainly reflected by the increase of the number of lysosomes, was closely related to the function of the liver, which became more exuberant after birth.

Key words: Rat; Hepatocytes Lysosomes; ACPase; different age; Histochemistry of lightand electron microscopes

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

生后1至90天内不同年龄大鼠肝细胞溶酶体酸性磷酸酶的观察 （正文见第107页）

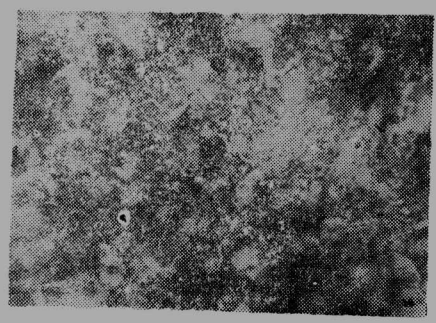


图1 生后1天大鼠。肝细胞内溶酶体ACPase反应颗粒较少，在胞浆内的分布也不规律。×1000

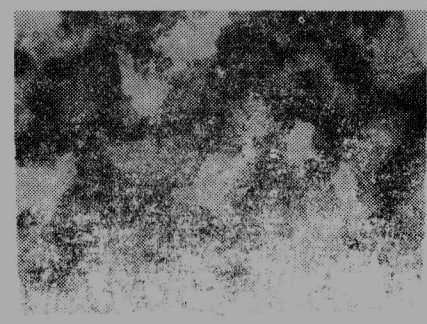


图2 生后90天大鼠。肝细胞内溶酶体ACPase反应颗粒呈致密的板块状堆积，且典型地围绕胆小管分布。×1000



图3 生后一天大鼠。肝细胞内ACPase反应阳性的溶酶体较少，分布也不规律。其单位膜多不能辨认。×23000

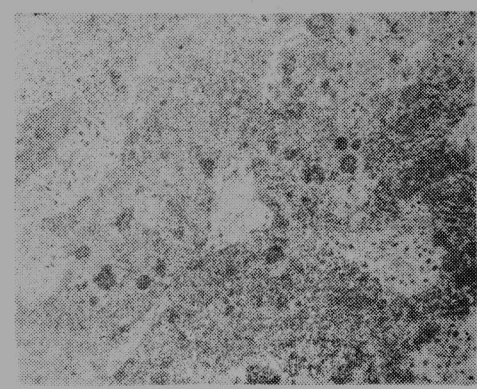


图4 生后15天大鼠。ACPase反应阳性的溶酶体由胞浆移到胆小管周围。×12000

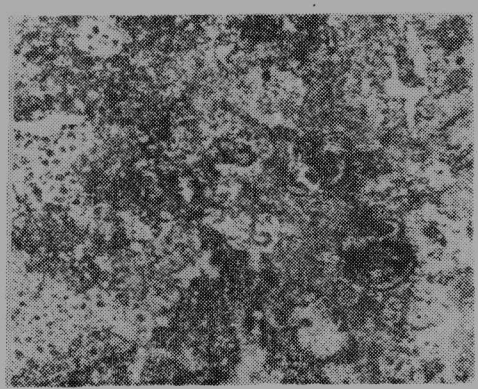


图5 生后15天大鼠。肝细胞内正在形成中的自噬泡（AV_1和AV_2）。×18900

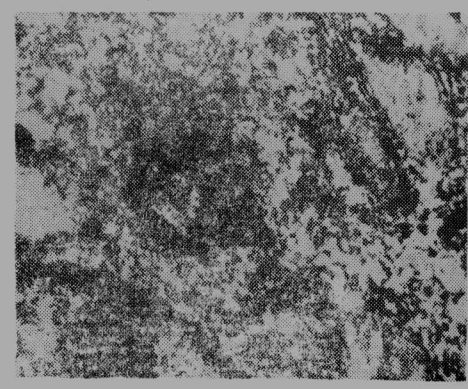


图6 生后50天大鼠。多泡体基质ACPase反应阳性，内有许多小泡，在多泡体周围有很多有衣小泡。×28500

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

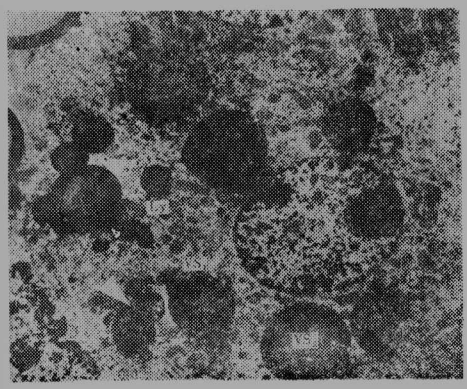


图7　生后5天大鼠。泡状结构的壁厚（VS_1）薄（VS_2）不等。△所指处似为泡状结构的“发芽”处。溶酶体（Ly）。×4200

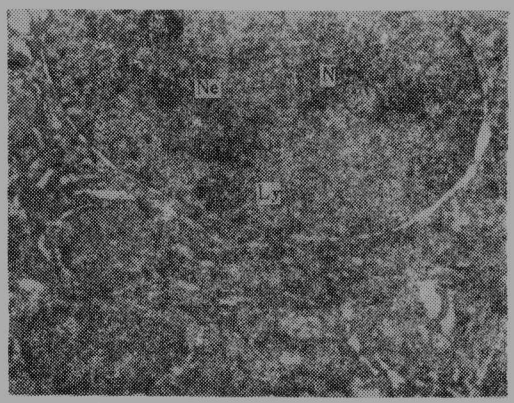


图8　生后1天大鼠。肝细胞核（N）内ACPase反应阳性的溶酶体(Ly)，核仁(Ne)。×14000

大鼠海马至顶叶、额叶、颞叶皮层的纤维投射 （正文见第134页）

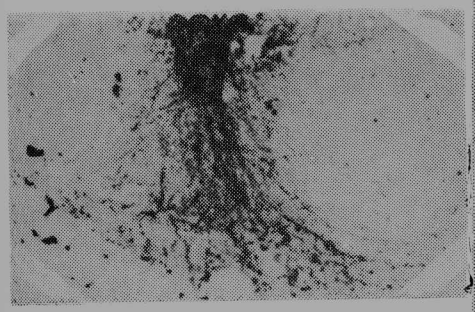


图2　HRP泳入顶叶皮层的3/7区。10×10

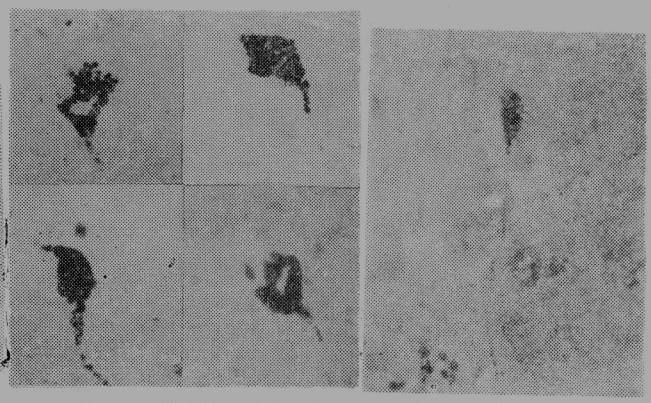


图3　顶叶注入HRP后，CA_1区的标记细胞10×40

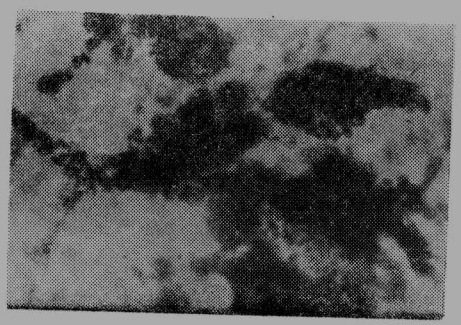


图4　额叶皮层注入HRP后，CA_1区的标记细胞　10×100



图5　颞叶皮层注入HRP后，CA_2区的标记细胞　10×40

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