DOI:10.16016/j.1000-5404.1985.02.004

生后1至90天大白鼠肝细胞溶酶体的年龄性改变

杨 恬

（组胚教研室）

指导者 王启民

提 要

本文从超微结构和形态计量两方面对生后1～90天的27只大鼠肝细胞溶酶体的变化进行了动态观察。结果表明，在这一发育阶段中，溶酶体的体积密度和数目密度有显著增加，位置由散在于胞浆中逐渐移向胆小管周围，同时，次级溶酶体的某些类型所占的比例也发生了明显变化，其中自噬泡的改变较为突出。本文就溶酶体数量、分布和类型等变化的意义进行了初步讨论。综合本文的观察结果，作者推测，生后5天左右可能是大鼠肝细胞溶酶体发育的一个重要转折时期。

溶酶体在机体发育、成熟和衰老过程中具有重要的作用[1]。关于溶酶体的年龄性改变及其与细胞分化、老化的关系，以往学者们已经进行了一些研究[2][3]。但是，这些工作偏重于老年期的变化，对出生至生后3月这一重要发育阶段则报告甚少。而且，已有的研究以纯描述性观察居多，缺乏定量分析，这就难于对溶酶体的年龄性改变及其在发育过程中的地位作出比较全面和准确的认识。本文作者从超微结构和形态计量两方面对生后1至90天大鼠肝细胞溶酶体的变化进行了动态观察，并结合其机能意义作了初步讨论。

材料与方法

选健康雌性大鼠27只，按其年龄分为6组（生后1天、5天、15天、30天、50天和90天），每组4～5只。

大鼠经断头术处死后立即在肝左侧叶上取材，迅速在3%戊二醛溶液中（pH7.4）修成约1mm³小块，然后置于4℃ 3%戊二醛溶液中固定5小时，经0.1M磷酸缓冲液漂洗数次，移入1%OsO_4中后固定2小时。再经丙酮逐级脱水和醋酸铀整块染色，最后包埋于618环氧树脂中。另外，根据改良的Essner氏法对部分大鼠肝作了电镜酸性磷酸酶（溶酶体标志酶）染色反应。

本文中应用了形态计量方法进行分析，为使所得样本尽量接近总体情况，在取材、标本制备、照相和测算等一系列步骤中按照形态计量的要求严格采用了多阶随机取样方法[4]。每一包埋块用LKB切片机先切出1μm厚的半薄切片，脱去树脂及锇酸，HE染色，供光镜计量；随后切出超薄切片（厚约400～600Å），两铅法染色，在DXA 4-10型电镜下进行超微结构观察，并按预定程序随机照相。整个研究过程中共得到随机光镜照片162张，随机电镜照片486张。光镜和电镜的放大倍数分别用Jena测微计和长春光学研究

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

所制造的光栅复型进行校正。在所得照片上进行形态计量分析（图1），获取数据的方法及计量公式均参照Weibel等的著述[4][5]。作者所用测试板为方格型，其测试点P_T分别为192和3834个，测试面积分别为59.4cm²和148.4cm²。根据立体学公式

$$V_{Vi} = \frac{P_i}{P_T}$$

$$N_{Vi} = \frac{1}{\beta} \cdot \frac{N_{Ai}^{\frac{3}{2}}}{V_{Vi}^{\frac{1}{2}}} \cdot K$$

在光镜照片上计算出肝细胞的有关结构参数和肝细胞平均体积，在电镜照片上计算出肝细胞溶酶体的数目密度和体积密度，并推算出初级溶酶体的直径。所有定量资料均经统计学处理。

结　果

1．超微结构观察

大鼠肝细胞结构保存良好，溶酶体能清楚分辨。对所做电镜酸性磷酸酶组化标本的观察证实作者所观察的确为肝细胞溶酶体。

在本文所研究的6个年龄组的大鼠肝细胞中均可见到初级溶酶体和次级溶酶体。

初级溶酶体形状较规则，多呈圆形或卵圆形，由一层单位膜包裹，内含均匀分布的电子致密物质，有的初级溶酶体的膜和基质之间可见一环状电子透明区（光晕）。初级溶酶体的大小比较接近，各组形态结构未见明显变化。

次级溶酶体形态多变，大小不等，包括多种类型：自噬泡一般较大，具有单层膜或双层膜，内含处于不同消化阶段的多种胞质成份，常见的是线粒体、内质网和糖元（α型和β型）（图2），以及微体和胞浆基质，有的成份已分辨不清。生后第一天含糖元的自噬泡明显较多；消化泡由一层单位膜包裹，含有电子致密的基质和1至数个亮泡；各年龄组均可见少数多泡体；残体见于生后各组动物，其内部主要为板层状排列的髓膜样结构，高倍下有时可见板层间夹有团状的均质或非均质成份。残体一般单个存在，亦常见于胆小管中（图3）。

电镜观察见到，随动物年龄增加，次级溶酶体形态变化很少，但其某些类型的组成比例发生了显著改变。作者对全部随机电镜照片的分析表明，生后第一天自噬泡是次级溶酶体的主要类型，占其总数的23%，5天时所占比例明显下降（8%），而消化泡等其他类型的次级溶酶体的比例则相应上升，以后各年龄组自噬泡均较少（4～11%）。

溶酶体的分布呈现显著变化。刚出生时，溶酶体散在分布于胞浆中，生后5天时明显移向胆小管周围，15天时与90天时相似，绝大多数溶酶体围绕胆小管排列（图4）。

肝细胞血窦面附近可见成群吞饮小泡，有时可见小泡与血窦通连。吞饮小泡在初生时较少，生后5天时明显增多，以后随年龄增长其数目逐渐增加。

2．形态计量分析

从光镜照片上计算出各年龄组动物肝细胞的有关结构参数（表1），在电镜照片上计算出单位体积肝组织中肝细胞溶酶体的体积密度和数目密度（表略），再把上述资料换算成单位体积肝细胞胞浆中溶酶体的体积密度和数目密度（表2），这样能更直接反映肝细胞溶酶体的变化，同时也便于和生化的定量分析资料相比较。从表2可以看出，单位体积肝细胞胞浆中溶酶体的体积和数目在生后1至90天期间有显著变化，溶酶体的体积密度从3.21‰增至5.91‰，数目从1cm³胞浆中3.83×10^{10}个增至9.48×10^{10}个，两项指标均有非常显著的差异（$P<0.01$），其中主要变化发生于生后1至5天之间，以后各组则无显著变化（$P>0.05$）（图5）。

根据形态计量方法，作者进一步计算出平均每个肝细胞内溶酶体的数值和初级溶酶

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

表1 各年龄组大鼠肝细胞的有关结构参数

组别	肝细胞体积密度 Vvh(%)	核体积密度 Vvn(%)	胞浆体积密度 Vvcy(%)	核数目密度 Nvn(×10⁸个/cm³)	平均每个肝细胞体积 Vh(μm³)
1	66.5±2.3	5.9±0.4	60.6±1.9	195±13.2	3449±162
2	74.6±2.4	6.2±0.2	68.4±2.4	210±12.7	3489±199
3	78.0±4.1	8.1±0.6	69.9±3.9	289±13.2	2708±133
4	79.7±1.4	6.1±0.5	73.7±1.8	250±15.8	3241±275
5	82.4±1.1	5.7±0.3	76.7±1.3	140± 5.5	5900±248
6	81.2±1.9	5.6±0.3	75.6±1.7	142± 7.0	5757±227

注：各数值表示均数±标准误。

表2 肝细胞胞浆中溶酶体的体积密度和数目密度

组别	溶酶体体积密度 Vvly(‰)	溶酶体数目密度 Nvly(×10¹⁰个/cm³)
1	3.21±0.28⁺⁺	3.83±0.66⁺⁺
2	5.16±0.39**	7.98±0.73**
3	4.89±0.45	6.90±0.59⁺
4	5.30±0.43	6.99±0.90
5	5.52±0.41	8.22±0.74
6	5.91±0.50	9.48±0.88

注：1.各数值表示均数±标准误； 2.**表示与第1组之间差异非常显著（P<0.01）；
3.⁺⁺、⁺分别表示与第6组之间差异非常显著（P<0.01）和差异显著（P<0.05）。

体的直径，结果如表3。从表3可知，随年龄增长，平均每个肝细胞内溶酶体的数目和总体积基本上呈现逐渐增加的趋势，生后一天，平均每个肝细胞内溶酶体总体积为10.1μm³，数目为118个；90天时总体积为31.6μm³，数目为505个，分别增加了2.1倍和3.3倍。

初级溶酶体的直径在这一发育期间无明显变化（0.38μm→0.38μm）。

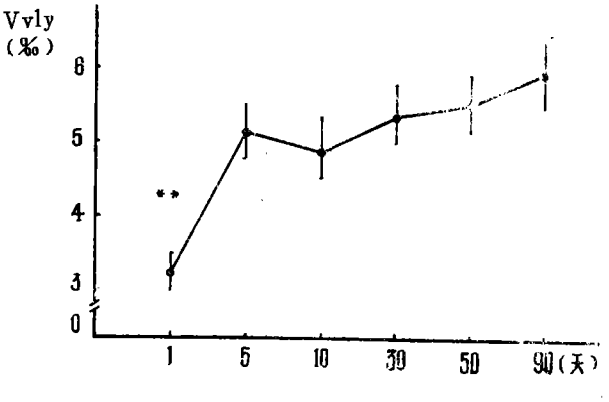


图5 各年龄组大鼠肝细胞胞浆中溶酶体的体积密度
**表示两组之间差异非常显著（P<0.01）；
I 表示均数标准误。

讨 论

1. 出生至生后3个月是大鼠发育的重要阶段，生后3月被称为年轻成年期[6]。对

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

表3 平均每个肝细胞内溶酶体的总体积、数目及初级溶酶体平均直径

组别	溶酶体总体积 Vly（μm^3）	溶酶体数目 Nly（个）	初级溶酶体直径 D（μm）
1	10.13±1.10^{++}	118±17^{++}	0.38±0.03
2	16.62±1.79^{**++}	253±22**	0.38±0.01
3	11.72±0.72^{*++}	167±16*	0.36±0.02
4	15.58±0.73^{**++}	204±13	0.39±0.03
5	30.58±3.38**	455±58**	0.33±0.01
6	31.55±2.60	505±42	0.38±0.02

注：1.各数值表示均数±标准误；

2.**、*分别表示与上一较年幼的年龄组之间差异非常显著（$P<0.01$）和差异显著（$P<0.05$）；

3.$^{++}$、$^{+}$分别表示与第6组之间差异非常显著（$P<0.01$）和差异显著（$P<0.05$）。

于这一时期内肝细胞溶酶体的数量变化仅有少数学者作过观察，其中除Rohr作了定量研究外[7]，其余学者均只有简略的定性描述。

本文的形态计量结果是：出生至生后90天内，肝细胞胞浆中溶酶体体积密度和数目密度的增加主要发生在生后1至5天之间（图5）。这一结果与Rohr的意见有某些不同，据他们对围产期大鼠（生前3天至生后8天）的研究报告，平均每个肝细胞内溶酶体的总体积在生后24小时最高，以后数天内迅速下降[7]。虽然Rohr也注意到生后第一天以自噬泡常见，与本文所见一致，但作者不能证实他们关于溶酶体在生后第一天即达到这样高的数量的结论。本文中平均每个肝细胞内溶酶体的数目随大鼠年龄增长而逐渐增加。这一结果为以往Dvorak等[3]从单纯定性观察中所得结论提供了定量的佐证。

2．电镜观察发现，在大鼠生后发育的过程中，溶酶体在肝细胞内的分布发生了显著变化，生后第一天，溶酶体不规则地散在分布于胞浆中，到生后5天时，多数溶酶体已移向胆小管附近，以后渐呈成体型分布。这种分布方式改变的意义目前还不完全明了；但有人提出与溶酶体参与胆汁形成有关[3]，另有学者发现大鼠胆小管内具有肝细胞溶酶体的全部酶型以及实验性研究中肝细胞吞噬的胶质二氧化钍颗粒[1]。作者在电镜下也观察到胆小管中有多种形态的残体存在。围胆小管分布可能有利于溶酶体把不能消化的物质排入胆小管内。虽然这一“清除”现象的确切机理仍需进一步研究，但似乎可以认为溶酶体的分布方式与其机能有关。

3．大量文献指出，新生期是肝细胞结构和功能发育的重要转折点，此时肝为了迅速适应子宫外环境的各种需求，细胞的能量代谢、物质转换、成份更新等活动急剧加强，肝细胞内发生着广泛而剧烈的组织分化和结构重建[8][9]。作者观察到此期内溶酶体的相应表现是包含多种胞质成份的自噬泡明显增多，细胞内自噬作用非常活跃。虽然自噬增加亦可见于饥饿、缺氧等多种应激状态[1]，但联系初生时肝细胞中发生的大量变化，生后第一天所见到的自噬作用增强似应理解为主要与组织分化和细胞内广泛的结构重建有关。同时自噬泡内含较多糖元颗粒提

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

示溶酶体参与了新生期糖元降解，而大量糖元降解可能为细胞内剧烈活动提供能量。

4. 超微结构观察和形态计量分析表明，生后5天时溶酶体发生了显著变化，总量明显增多，而自噬泡所占比例下降，同时其他类型的次级溶酶体增多，吞饮小泡的数目也明显增加。关于出生后溶酶体的上述变化，文献记载很少，仅Larsson(1975)在研究大鼠肾近曲小管细胞溶酶体时曾提及类似改变[10]。作者认为，这些现象可能反映了新生期肝细胞向成体发育过渡时溶酶体变化的一些方面。生后5天自噬泡明显减少而其他一些次级溶酶体和吞饮小泡增多可能表明此时大鼠肝细胞新生期的结构重建工作已趋基本结束。溶酶体除仍参与自噬活动，以保证发育过程中细胞成份的更新外，开始更多地参与外来物质的降解。

综合考虑本文的观察结果，在大鼠生后1至90天的发育过程中，溶酶体的数量、分布和类型都发生了一些变化。生后1至5天溶酶体数目密度和体积密度上升明显，5天时已接近年轻成体水平；同一时间自噬泡减少而吞饮小泡增多；再结合溶酶体分布也在5天时开始渐具规律性，作者推测：生后5天左右可能是大鼠肝细胞溶酶体发育的一个重要转折时期。

（此项工作得到本室孙　榆同志及电镜室有关同志大力支持，特此志谢。）

参考文献

1. De Duve C, et al: Functions of lysosomes. Ann Rev Physiol 1966; 28:435—492

2. Schmucker DL, et al: Stereological analysis of hepatic fine structure in the Fischer 344 rat. Influence of sublobular location and animal age. J Cell Biol 1978; 78:319—337

3. Dvorak M, et al: Occurence of lysosomes and differentiation of rat liver cells. Z Zellforsch 1969; 99:277—285

4. Weibel ER, et al: Correlated morphometric and biochemical studies on the liver cell. I. Morphometric model, stereologic methods, and normal morphometric data for rat liver. J Cell Biol 1969; 42:68—91

5. Elias H, et al: An elementary introduction to stereology (Quantitative microscopy). Am J Anat 1980; 159:412—446

6. Knook DL, et al: Lysosomal enzyme activities in parenchymal liver cells isolated from young, adult and old rats. Mech Ageing Dev 1976; 5:389—397

7. Rohr HP, et al: Morphometric analysis of the rat liver cell in the perinatal period. Lab Invest 1971; 24:128—139

8. Phillips MJ, et al: Glycogen depletion in the newborn rat liver. An electron microscopic and electron histochmical study. J Ultrastruct Res 1967; 18:142—165

9. Chandra RK: The liver and biliary system in infants and children. Churchill Livingstone, Edinburgh 1979, pp 1—17

10. Larsson L, et al: Differentiation of the vacuolar apparatus in cells of the developing proximal tubule in the rat kidney. J Ultrastruct Res 1975; 53:254—270

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

Changes of Lysosomes of Hepatocytes in Rats Aged One to Ninety Days

Yang Tian

Tutor: Wang Qimin

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

The changes of lysosomes of the hepatocytes in 27 healthy female rats aged 1, 5, 15, 30, 50, and 90 days respectively were observed on morphometry and by studying the ultrastructures with electron microscope. The results are as following:

1. The volume density and numerical density of the lysosomes of rat hepatocytes are markedly increased as the age increases.

2. The lysosomes originally scattered in cytoplasm gradually migrate to the periphery of bile canaliculi.

3. The proportion among certain forms of secondary lysosome changes as the rats grow older and the alteration of autophagic vacuoles is more prominant than others.

The significance of the lysosome changes mentioned above was discussed. The author, considering from all the results, suggests that the time around five days after the birth of the rats is a critical period for the development of the lysosomes of rat hepatocytes.

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

生后1至90天大白鼠肝细胞溶酶体的年龄性改变 （正文见127页）

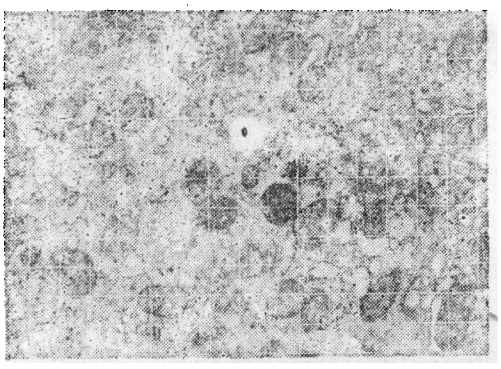


图 1 复以测试板的电镜照片，交叉点作测试点。×16800

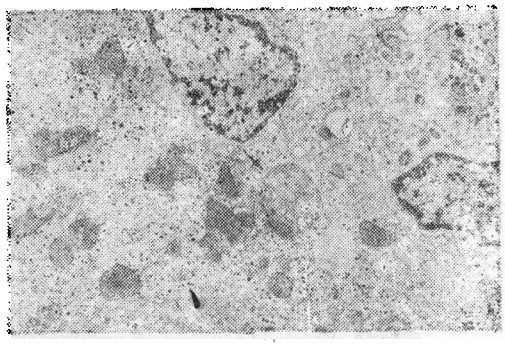


图 2 生后一天大鼠肝细胞，自噬泡（箭头）内可见线粒体和内质网等胞质成份。×7200

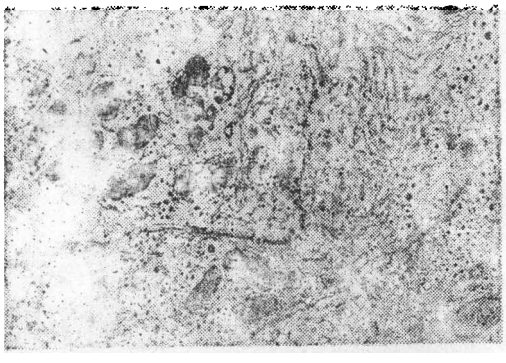


图 3 生后五天大鼠肝细胞，残体（箭头）位于胆小管内。×9800

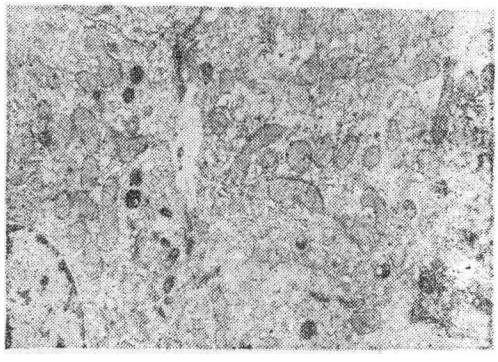


图 4 生后15天，肝细胞的初级溶酶体和多种形态的次级溶酶体。×6700

不同投射物水中弹后空腔的特点 （正文见163页）

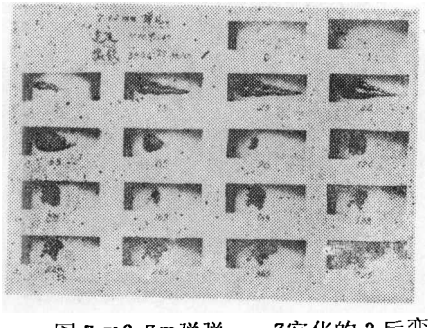
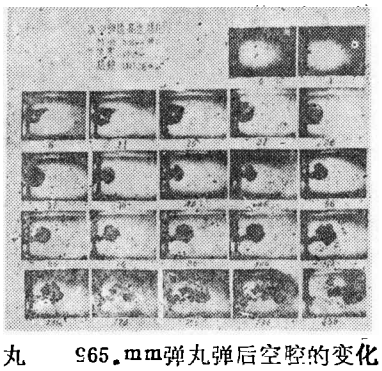


图 2 m6.7m弹弹 2空化的 3 后变腔图



丸 965.mm弹丸弹后空腔的变化

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