

猕猴自然感染肝片吸虫诱发胆管结石的形成

廖国阳 卢明义 谢晋

(中国医学科学院,中国协和医科大学,医学生物学研究所 昆明 650107)

摘要 在研究肝片吸虫诱发猕猴自发性胆结石形成的病理学基础上,采用红外光谱分析、原子吸收光谱分析和组织化学染色对胆结石的成分及结构进行了测定,初步探讨了本病发生的机理。在一只9岁雌性猕猴肝总胆管内发现4条肝片吸虫(*Fasciola hepatica*),胆囊胆汁中检出大量肝片吸虫虫卵。左侧胆管内有一颗棕黑色结石,直径为1cm、长约2.5cm圆柱形。肝细胞灶性坏死伴有轻度结缔组织增生,胆管腺体重度增生,上皮细胞胞质内含有中性与酸性混合型粘多糖物质,上皮间有大量杯状细胞。胆石切面呈环状,环层间含有粘多糖物质。胆石经红外光谱分析出现胆固醇-胆色素混合型胆石和黑色物质特征性吸收峰,原子吸收光谱分析钙元素含量最高。

关键词 猕猴 肝片吸虫 胆结石 红外光谱 原子吸收光谱

中图分类号:R322 文献标识码:A 文章编号:10250-3263(2000)04-19-04

A Cholesterol-Bilirubinate Gallstone Induced by *Fasciola hepatica* Infection in *Macaca mulatta*

LIAO Guo-Yang LU Ming-Yi XIE Jin

(Institute of Medical Biology, Chinese Academy of Medical Science, Peking
union of Medical College Kunming 650107, China)

Abstract The present paper showed one case of cholesterol-bilirubinate gallstone in 9 years old female Rhesus Monkey. This monkey was infected by 4 pieces of *Fasciola hepatica* naturally in the ductus communis and a black-brown gallstone was formed in ductus hepaticus sinister. The liver cells was necrotic locally and the epithelia cell of bile ductules were deeply grown with a lot of AB/PAS positive materials in the cytoplasm. The infrared spectroscopy analysis of the gallstone showed it had characteric absorption bands of cholesterol-bilirubinate gallstone and a lot of black materal, $Q = 0.11$. The results of atomic absorption spectroscopy analysis showed the four metal contents in the gallstone as follow: Ca 36.6ppm, Fe 9.1ppm, Mg 3.4ppm and K 10.9ppm. A lot of substances with the positive to PAS and AB staining could be found outside the lane of gallstone.

第一作者介绍:廖国阳,男,38岁,助研,博士,研究方向:病原生物学;

收稿日期:1999-03-18,修回日期:2000-04-10

Key words :*Macaca mulatta* ; *Fasciola hepatica* ; Cholestrol-bilirubinate gallstone ; Infrared spectroscopy ; Atomic absorption spectroscopy

胆结石是人类的多发病,国内外学者对其结构成分进行了广泛研究,并在低等动物建立的胆石病模型上研究其发病机理^[1-3]。灵长类动物在进化上与人类最相近,许多生理生化指标类似于人,是研究人类疾病理想的动物模型。然而,自发性胆结石仅在猩猩、狒狒、夜猴和猕猴中有过一些报道^[4-6],胆固醇砂在灵长类中发现过 14 例,其中 11 例为猕猴,虽然是胆固醇类结石的前驱病变,但都没有伴发结石形成^[7]。由于对灵长类动物胆结石的成因知之甚微,用灵长类动物复制胆石病模型难于获得成功。

1 材料和方法

1.1 动物 猕猴(*Macaca mulatta*),雌性 9 岁,体重 3.5 kg。从野外捕来饲养于户外大猴笼已 5 年,饲料为颗粒料和水果。死前一年渐进性消瘦,最终倒地,股动脉放血处死。

1.2 病理解剖学检查 尸检时取各脏器,置于 10% 福尔马林液中固定,石蜡包埋,切片 5 μ m, HE、PAS、AB、AB/PAS、Kossas' 钙法和 Perl 氏铁法染色。肝片吸虫用生理盐水清洗后置于载玻片上,虫体两端各放一薄纸条,盖上一张载玻片,用细湿棉线缠绕固定,浸入 70% 酒精中 24 小时。胆汁直接镜检。病理解剖取出的胆石用蒸馏水洗净后,自然干燥至恒重。

1.3 红外光谱分析 胆石磨细后制成 KBr 压片,用 P-E 577 型红外分光光度计测出其吸收光谱图,与胆石标准光谱图进行比较^[8],并按公式 $Q = -\lg I_{1624}/I_{1645} / -\lg I_{1624}/I_{1900}$ 从胆石红外吸收峰强度计算 Q 值^[9]。

1.4 原子吸收光谱分析 取胆石 0.5 mg 经硝酸/过氯酸(9:1)混合酸于 245~250 $^{\circ}$ C 消化吸收 2 小时,再用日立 170-30 型原子吸收光谱仪来定量测定胆石中的钙、镁、铁和钾含量。

2 结果

2.1 病理解剖学检查 尸检发现,扩张的肝总胆管内有 4 条肝片吸虫,宽 1.4 cm、长 3.5 cm; 胆囊胆汁镜检发现大量肝片吸虫虫卵,经鉴定为 *Fasciola hepatica*(图版 I:1)。左侧胆管内有一颗棕黑色结石,直径为 1 cm、长 2.5 cm 圆柱形。肝脏病理组织切片观察,肝细胞灶性坏死伴有轻度结缔组织增生(图版 I:2)。胆管上皮腺瘤样增生突入管腔内(图版 I:3),增生的腺上皮细胞含有大量的粘多糖类物质(图版 I:4)。结石质地疏松,切面呈环层状,有如树木的年轮,环层间含有 PAS 染色阳性的中性粘多糖和 AB 染色阳性的酸性粘多糖物质(图版 I:5),钙染色阳性(图版 I:6),铁质染色阴性。

2.2 红外光谱分析 从胆石红外光谱图中可

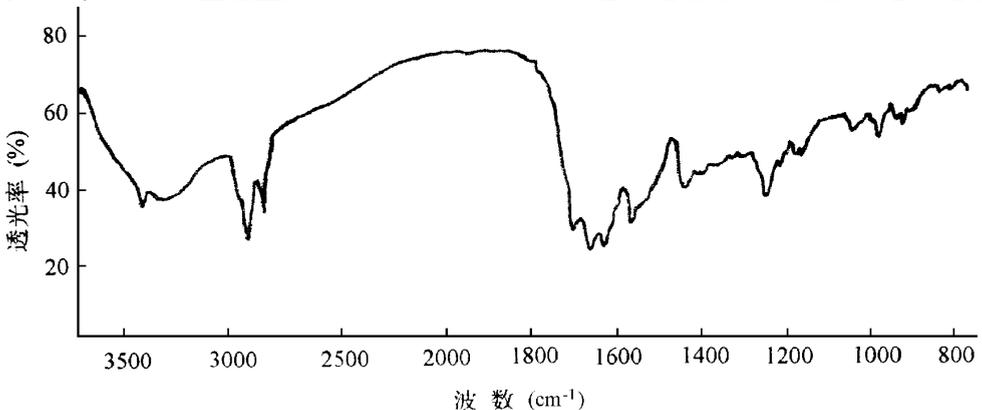


图 1 猕猴胆结石的红外光谱分析图

看出在波数 3395 cm^{-1} , 2920 cm^{-1} , 1698 cm^{-1} , 1650 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} , 1250 cm^{-1} , 1050 cm^{-1} 有吸收峰, 详见图 1。

2.3 原子吸收光谱分析 每千克胆石中金属元素含量分别为钙 36.6 mg, 铁 9.1 mg, 镁 3.4 mg 和钾 10.2 mg。

3 讨论

肝片吸虫造成胆管回流不畅在本病的发生上起了一定作用。胆管阻塞或胆汁回流不畅是诱发胆结石的重要因素, 已被临床及实验所证实^[1,3]。通过结扎兔和豚鼠等动物胆总管造成狭窄使肝外胆道压力增高, 导致胆色素结石的形成, 而改变肝外胆道动力学因素促进胆汁排空, 能有效地防止胆石形成^[2]。

目前通过组织化学研究及 X-射线衍射分析和电泳分析, 已确证胆石中含有的 PAS 阳性物质是一种粘多糖^[10,11]。这种粘多糖能与胆红素及其衍生物和金属离子粘聚, 从而在其外围沉积胆固醇, 此过程反复进行便形成了环层状结石^[1,12,13]。本病例猕猴肝胆管感染的肝片吸虫诱发了胆管上皮细胞的腺瘤样增生, 增生的腺上皮细胞胞质内 PAS、AB 染色增强, 上皮间有大量杯状细胞导致胆汁中糖蛋白量增高, 这对于胆石的形成起了重要的作用。

在人、狒狒和松鼠猴中, 雌性较雄性易发生胆结石^[4], 而本病例猕猴和已报道的 2 例猕猴自发性胆石也都为雌性^[7,15], 似乎猕猴对胆石形成的敏感性也表现出与上述几种动物相似的性别差异。这种性别差异现象可能与 Oscar^[16] 报道的雌激素能够促使猕猴产生被胆固醇饱和的胆汁有一定的关系, 有待于进一步试验验证。

红外光谱似化合物的指纹, 可以不改变混合物体系组成就能分析。根据吸收峰的位置、强度和形状与已知标准物的红外吸收谱比较, 就可以判断胆石的主要成分。此法简便、快速、结果准确, 已被广泛用于胆石分类上。刘振华^[13]和宋惠芳^[8]将胆石按红外光谱吸收峰的特征及位置分为 6 类: 胆色素型、胆固醇型、胆色素-胆固醇混合型、碳酸盐型、硝酸盐型和脂

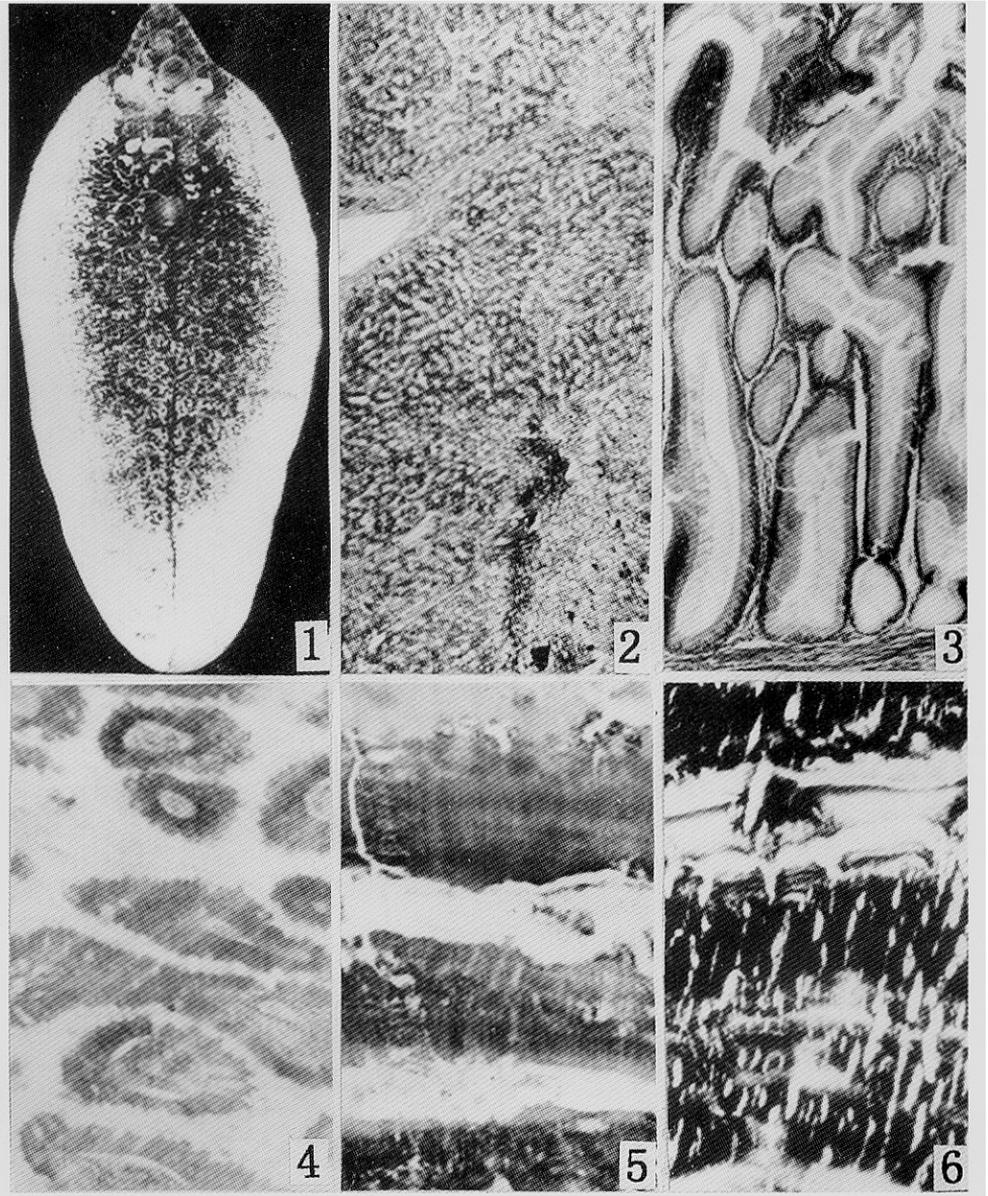
肪型。本例猴胆石不仅在胆红素吸收峰位置 3395 cm^{-1} , 1698 cm^{-1} 和 1250 cm^{-1} 有吸收峰, 而且在胆固醇吸收峰位置 2920 cm^{-1} , 1450 cm^{-1} 和 1250 cm^{-1} 也有吸收峰, 应为胆红素与胆固醇混合型胆石。

Suzuki^[9]和王训颖^[11]认为, 色素胆结石中的黑色物质主要是胆红素及其衍生物的多聚物或胆红素与钙、铁、镁和铜等金属离子的高分子螯合物。Suzuki^[9]将黑色物质含量用 Q 值来定量描述, Q 值愈大, 含胆红素钙愈多、含黑色物质愈少, 反之亦然。一般纯黑色素胆石 $Q < 0.30$, 胆红素钙结石 $Q > 0.30$ 。本例 Q 值为 0.11, 表明胆红素钙含量低, 黑色物质含量高。

参 考 文 献

- [1] 凌小峰, 邓绍庆, 徐智. 胆道狭窄致胆色素结石时胆汁酸成分的变化. 中华实验外科学杂志, 1998, 15(2):99~101.
- [2] 石景森, 任斌, 马庆久. 利胆溶石胶囊防止胆石形成的实验研究. 华人消化杂志, 1998, 1(7):564~566.
- [3] 张继红, 陈国忠, 杨可桢等. 肝外胆道动力学因素对胆囊结石形成的影响. 肝胆胰外科杂志, 1997, 9(3):112~113.
- [4] Anver M.R. Cholesterol gallstones in *Aotus trivirgatus*. *J. Med. Primatol.*, 1972, 1:241~246.
- [5] Glenn, F. The baboon and experimental cholelithiasis. *Arch. Sur.*, 1970, 100:105~108.
- [6] Mesherry, J. Cholesterol gallstones and the chemical composition of bile in baboons. *Ann. Surg.*, 1971, 173:569~577.
- [7] Kessler, M. Calcium bilirubinate gallstones in an aged rhesus monkey. *Am. J. Primatol.*, 1982, 2:291~294.
- [8] 宋惠芳, 林明, 张莎等. 红外光谱分型与胆石化学组成的初步研究. 北京医学院学报, 1985, 13(3):183~186.
- [9] Suzuki. Infrared absorption spectroscopy of pure pigment gallstones. *Tohoku. J. Exp. Med.*, 1975, 116:253~258.
- [10] 周孝思, 张挽华, 王守忍等. 胆石的化学分析和组织化学研究. 北京医学院学报, 1980, 12(2):111~113.
- [11] 王训颖, 石云明, 胡鑫尧等. 黑色胆结石结构、成分及发生机理的研究. 中华外科学杂志, 1985, 23(9):522~524.
- [12] 惠建斌, 刘会洲, 吴瑾光. 人体胆结石中的周期性环状

- 结构及其形成机理研究. 生物物理学报, 1997, 13(4): 647~652.
- [13] 刘振华, 陈俭镒, 张继森. 红外光谱法比较研究胆石核心, 成环部分及周边的成分. 北京大学学报, 1998, 34(4): 415~423.
- [14] Gurleyik, E. Does chemical composition have an influence on the fate of intraperitoneal gallstone in rat? *Surg La-*
parose Endosc., 1998, 18(2): 113--116.
- [15] Martin, F. Naturally occurring cholelithiasis in a rhesus monkey and its effects on plasma and biliary lipid concentrations. *Am. J. Vet. Res.*, 1973, 34: 971~974.
- [16] Oscar, W. Portman. Role of Diet in Normal Biliary Physiology. *Primates in Nutritional Research*. New York: Hayes, 1979. 153--155.



1. 肝片吸虫(*Fasciola hepatica*)HE×2

2. 肝脏切片肝细胞灶性坏死, 结缔组织增生(focal necrosis of liver cell and a few of connective tissue)HE×60

3. 肝胆管上皮切片, 胆管上皮腺瘤样增生, 上皮间含有大量杯状细胞(epithelia cells of bile ductules were deeply grown)HE×40

4. 肝胆小管切片, 胆管上皮细胞含有紫蓝色中性及酸性混合型粘多糖(section of bile ductules, AB/PAS staining)×400

5. 胆石切片, 环层不含粘多糖, 环层间含有中性及酸性粘多糖(section of gallstone, AB/PAS staining)×120

6. 胆石切片, 环层间钙染色强阳性(section of gallstone, Kossas' staining)×120