

· 专题交流 ·

TCDD 对 SD 大鼠肝脏超微结构的影响

刘云儒¹, 汤乃军^{1*}, 白景文², 杨海贤²

(1. 天津医科大学公共卫生学院, 天津 300070; 2. 天津医科大学电镜室, 天津 300070)

摘要: 采用一次性腹腔注射的方法对雌性 SD 大鼠进行 TCDD 染毒, 剂量为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, 用透射电镜观察其肝脏超微结构的变化。结果可见, 肝细胞部分线粒体溶解, 粗面内质网脱颗粒, 池崩解, 滑面内质网池扩张、融合, 侧重以核染色质溶解、部分凝固为特征, 肝细胞脂肪变, 枯否氏细胞核染色质凝聚, 细胞器轻度溶解。提示 TCDD 染毒 24 h 对大鼠肝脏损害广泛, 能使肝细胞和枯否氏细胞超微结构发生明显改变。

关键词: TCDD; SD 大鼠; 肝脏; 超微结构; 透射电镜

中图分类号: O625.21 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-221X(2004)06-0370-03

Effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on liver ultrastructure in SD ratsLIU Yun-ru¹, TANG Nai-jun¹, BAI Jing-wen², YANG Hai-xian²

(1. School of Public Health, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China; 2. Electron Microscopy Department, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

Abstract: **Objective** To study the effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on ultrastructure of the liver in rats. **Method** Female SD rats were injected intraperitoneally with TCDD ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$) only once. Ultrastructure of the liver in rats was observed by transmission electron microscopy. **Result** Mitochondrial dissolution, degranulation of rough endoplasmic reticulum (RER), dissolution of RER pool, and expansion and inosculation of smooth endoplasmic reticulum (SER) pool were observed in the liver of exposed rats, particularly dissolution and partial agglomeration of chromatin, fatty degeneration of liver cells, agglomeration of chromatin in Kupffer's cells and slight dissolution of organelles. **Conclusion** Exposure to TCDD in rats for 24 hours can cause extensive damage to the liver, leading to obvious changes in ultrastructure of liver cells and Kupffer's cells.

Key words: 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD); SD rats; Liver; Ultrastructure; Transmission electron microscopy

二噁英对于人和动物的皮肤、肝脏、生殖和发育及免疫系统、神经系统等都有危害^[1-8], TCDD 已被确定为人类一级致癌物^[9]。本实验通过研究 TCDD 对 SD 大鼠急性中毒其肝细胞超微结构的变化, 探索其对肝脏损害的形态学特性。

1 材料与方法

1.1 实验分组及染毒

清洁级 SD 雌性大鼠 8 只, 体重 (180 ± 20) g, 由天津市防病中心动物室提供, 随机分为 24 h 染毒组、72 h 染毒组、24 h 对照组、72 h 对照组, 每组 2 只。2, 3, 7, 8-TCDD (购自美国 Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) 溶于 DMSO 中, 质量浓度为 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$, 用腹腔注射的方法给动物染毒, 剂量为 $10 \mu\text{g}/\text{kg}$, 对照组给予 0.2 ml DMSO。

1.2 取材与观察

24 h 和 72 h 后, 把鼠处死, 迅速取肝脏, 切成约 1 mm 宽的小块, 用预冷的 2.5% 戊二醛+多聚甲醛固定, 1% 四氧化锇后固定, 乙醇逐级脱水, Epon812 环氧树脂包埋。瑞典 LKB-V 型超薄切片机半薄片 (1 μm) 定位后, 进行超薄切片 (厚度 50~70 nm), 醋酸铀、柠檬酸铅染色, 日本 JEOL-100CX 透射

电镜观察。

2 结果

2.1 对照组

肝细胞未见坏死和凋亡, 肝细胞核呈圆形或类圆形, 可见较大核仁, 未见染色质溶解, 粗面内质网池狭窄, 未见脱颗粒, 滑面内质网无增生, 未见明显扩张, 线粒体未见溶解, 中等均匀电子密度, 可见短嵴, 未见线粒体区域性集中, 未见增生, 几乎看不到髓磷体样结构, 未见糖原区, 滑面内质网少, 未见糖原颗粒, 枯否氏细胞未见显著改变, 肝细胞胞浆内可见中低度的多聚核糖体, 为正常肝脏的电镜表现。

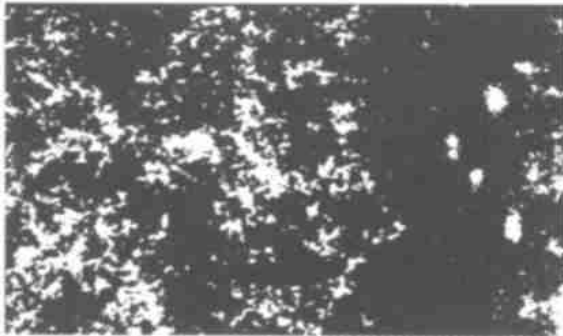
2.2 24 h 染毒组

可见部分肝细胞死亡, 主要表现为核溶解, 核染色质呈小片状或网状溶解, 主要波及常染色质, 但核中央部的异染色质也有少部分的溶解, 在边缘部的异染色质凝聚, 但胞膜及细胞器大部分保存 (见图 1); 可见肝细胞脂肪变, 脂滴一般较小, 呈圆形脂肪泡, 于脂肪泡内可见一个或数个髓磷体 (见图 2), 该脂肪变属于轻度变性; 可见肝细胞核变小, 少数细胞核变形, 呈不规则形, 异染色质沿核被膜凝聚, 粗面内质网池脱颗粒, 少数粗面内质网局部增生, 多数池密集呈平行排列; 滑面内质网池扩张, 相互融合, 局部融合成大池, 内含多数的糖原颗粒, 有的糖原池内含有髓磷体, 有的大池

收稿日期: 2003-07-03; 修回日期: 2004-06-22

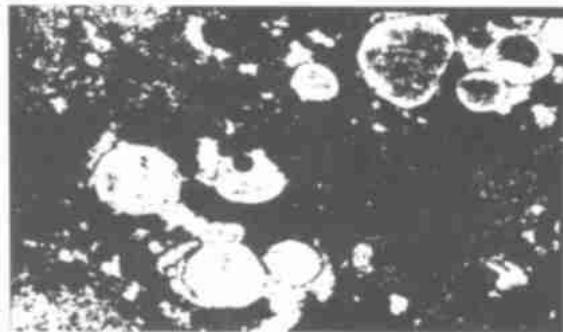
作者简介: 刘云儒 (1970-), 男, 内蒙古赤峰市人, 硕士研究生, 现工作单位为济宁医学院职业卫生与环境医学研究所。

内容物空虚, 呈透明状; 肝窦内枯否氏细胞核染色质凝聚, 胞浆浅染, 细胞器呈轻度溶解状 (见图 3); 肝细胞核仁较小, 窗孔减少, 但窗孔较大, 有的肝细胞核仁较大, 有多个窗孔, 并可见多个核仁协同染色质; 线粒体浅染, 内外膜清楚, 嵴结构不清楚, 基底电子密度较低, 线粒体基质呈轻度溶解; 有的肝细胞核孔减少。



肝部分核溶解, 但胞浆粗面内质网尚保存

图 1 TCDD 染毒 24 h ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 组) 肝脏超微结构
 $\times 19500$



肝多数脂肪变空泡, 内含髓磷体

图 2 TCDD 染毒 24 h ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 组) 肝脏超微结构
 $\times 7500$



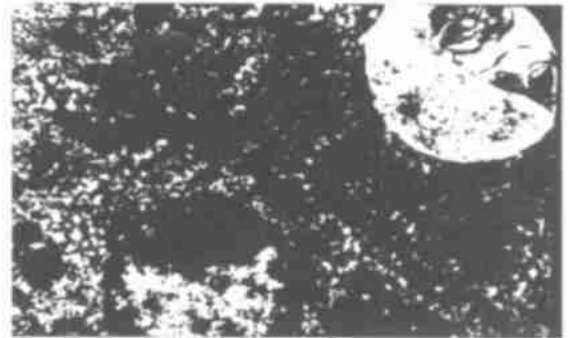
左下肝脂肪变空泡, 右上枯否氏细胞核高度凝聚

图 3 TCDD 染毒 24 h ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 组) 肝脏超微结构
 $\times 9900$

2.3 72 h 染色组

肝细胞溶解性坏死明显, 严重程度超过 24 h 染毒组, 表

现侧重为核染色质显著溶解, 严重者核染色质大部分溶解, 为 24 h 染毒组所未见, 但胞浆中的细胞器及胞膜大部分保存; 有少数肝细胞的部分核染色质凝聚于一侧, 几乎形成半月形, 其余染色质溶解严重 (见图 4), 少数肝细胞核变小, 变形, 核异染色质高度凝集, 核孔开大; 肝细胞可见脂肪变, 为小脂滴, 滴内可含有髓磷体样结构; 粗面内质网池崩解, 明显脱颗粒; 滑面内质网池扩张, 相互融合 (见图 5), 但其扩张程度较轻, 不含糖原颗粒; 线粒体出现集中, 聚拢在一起, 着色变浅, 有的线粒体呈高电子密度, 嵴结构部分存留, 部分已消失, 有的线粒体严重溶解, 超过 24 h 染毒组; 肝细胞核核仁变小, 且不规则, 窗孔极小且数目减少, 有的核仁凝聚, 已看不到窗孔; 枯否氏细胞核染色质凝聚。



右下可见肝细胞核变小, 染色质溶解, 异染色质凝聚, 呈半月形, 但大部分胞浆细胞器尚保存, 左上脂变空泡内含髓磷体

图 4 TCDD 染毒 72 h ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 组) 肝脏超微结构
 $\times 9900$



局灶核溶解, 广泛滑面内质网池扩张, 粗面内质网保存

图 5 TCDD 染毒 72 h ($10 \mu\text{g}/\text{kg}$ 组) 肝脏超微结构
 $\times 24000$

3 讨论

在二噁英对人和动物的毒作用的研究中, 有关电镜方面的报道不多。Dong^[10]等的研究发现, TCDD 能引起斑鱼胚胎的背侧中脑的细胞凋亡, 表现为染色质的固缩和断裂, 认为芳香烃受体 (AHR) 的激活能诱导发育阶段的中枢神经系统的细胞凋亡。还有文献报道 TCDD 引起大鼠肝细胞滑面内质网 (SER) 的增加, 同时伴随着粗面内质网 (RER) 的减少; 雄性

大鼠肝细胞中SER增加,胞浆中出现脂滴;鲇鱼肝细胞明显变大,核皱缩且不规则,多核,异染色质分散,核仁变大,核变性,线粒体数目减少,嵴变形,髓磷体样变和溶酶体数目增加,有时细胞器和细胞质完全消失,变化的严重程度与染毒剂量和染毒时间呈正相关^[11~13]。

本次研究表明,72 h染毒组超微结构的改变明显比24 h染毒组严重,TCDD主要形态学攻击的靶为核染色质(主要由DNA和组蛋白组成),对核仁(RNA)也有一定影响(可能影响到转录);对于RER,除24 h染毒组有少部分代偿性增生外,大部分均表现为数目减少,并有严重脱颗粒现象,粗面内质网的主要功能是进行分泌蛋白质的合成、修饰加工、分选和转运。分泌性蛋白,如抗体、酶、多肽激素和细胞外基质蛋白,其他一些蛋白,如膜蛋白、内质网池可溶性驻留蛋白、溶酶体等都在粗面内质网内合成,粗面内质网的异常会使这些蛋白的合成减少;SER主要表现为池扩张、融合,24 h染毒组可见糖原积蓄,72 h染毒组糖原消失,滑面内质网增生;滑面内质网的功能主要是固醇激素的合成和脂类代谢,糖原的合成和分解。解毒作用,肝脏的解毒作用主要是由肝细胞内的滑面内质网完成的,其内含有参与解毒的各种酶系,如细胞色素P450、NADH-细胞色素C还原酶、NADH-细胞色素B5还原酶、NADPH-细胞色素P450还原酶等,给动物染毒后,一般会引起滑面内质网增生,与解毒有关的酶的含量增加,本次实验发现,在染毒24 h后,SER增加,但72 h后就减少,说明TCDD对SER的毒害作用是很迅速的;线粒体的功能主要是细胞呼吸和能量转换,细胞生命活动所需能量的80%是由线粒体提供的,线粒体的形态结构、数量分布以及代谢反应很容易受到细胞内、外环境的影响而发生改变,因此它是细胞病变及损伤时最敏感的指标之一。当细胞处于异常状态时,线粒体会发生改变,如正常的心肌细胞、骨骼肌细胞功能亢进时,可以见到线粒体增生;在有害物质渗入时,线粒体会发生肿胀甚至破裂,肿胀后的体积有时比正常体积大3~4倍。本次研究发现,24 h染毒组可见线粒体浅染,嵴结构不清,基质呈轻度溶解,72 h染毒组可见部分嵴结构已消失,有的线粒体呈严重溶解,严重程度明显超过24 h染毒组。本次研究还发现,TCDD不仅对肝细胞有影响,而且还影响枯否氏细胞,表现为核染色质凝聚,胞浆浅染,细胞器呈轻度溶解状。

本次研究发现二英能引起核染色质部分溶解或大部分溶解为特征的细胞死亡,亦即溶解性细胞坏死,有些细胞器变性但胞浆皱缩和崩解不明显,为二英中毒引起的变化的特点。Sakamoto^[14]等用二英给非洲蟾蜍染毒后,曾发现过一种特殊的肝细胞死亡方式,既不同于细胞凋亡又不同于细胞坏死,除此以外在其他动物身上未见此类报道。因此,我们认为这种细胞死亡方式可能是TCDD导致肝细胞死亡的侧重核染色质的溶解性坏死。

根据本次实验的电镜结果可以得出如下结论:(1)TCDD对大鼠的肝细胞有较强的毒性,染毒24 h后就可发现肝细胞的明显改变,且随着时间的延伸毒作用加大;(2)TCDD主要

的形态学攻击的靶为核染色质,即染色质严重溶解,对核仁也有一定影响;(3)TCDD中毒损害广泛,既损伤肝细胞,又损伤枯否氏细胞。

参考文献:

- [1] Coenraads PJ, Brouwer A, Olie K, et al. Chloracne. Some recent issues [J]. *Dermatol-Clin*, 1994, 12 (3): 569-576.
- [2] 左厚声, 汤乃军, 曹树义, 等. 二英所致氯痤疮临床流行病学分析 [J]. *中华劳动卫生职业病杂志*, 1998, 16 (4): 230-231.
- [3] Murante RG, Gasiewicz TA. Hemopoietic progenitor cells are sensitive targets of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin in C57BL/6J mice [J]. *Toxicol Sci*, 2000, 54 (2): 374-383.
- [4] Rune GM, de-Souza P, Krowke R, et al. Morphological and histochemical effects of 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) on marmoset (*Callithrix jacchus*) testes [J]. *Arch Androl*, 1991, 26: 143-154.
- [5] Nohara K, Ushio H, Tsukumo S, et al. Alterations of thymocyte development, thymic emigrants and peripheral T cell population in rats exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin [J]. *Toxicology*, 2000, 145 (2-3): 227-235.
- [6] Hurst CH, Devito MJ, Setzer RW, et al. Acute administration of 2, 4, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) in pregnant Long Evans rats: association of measured tissue concentrations with developmental effects [J]. *Toxicol Sci*, 2000, 53 (2): 411-420.
- [7] Hamm JT, Sparrow BR, Wolf D, et al. In utero and lactational exposure to 2, 3, 7, 8-Tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin alters postnatal development of seminal vesicle epithelium [J]. *Toxicol Sci*, 2000, 54 (2): 424-430.
- [8] 曹树义, 汤乃军, 赵力军, 等. 职业接触二英对神经行为功能的影响 [J]. *中国公共卫生学报*, 1998, 17 (2): 122-123.
- [9] McGregor DB, Partensky C, Wilbourn J, et al. An IARC evaluation of polychlorinated dibenzo-dioxins and polychlorinated dibenzofurans as risk factors in human carcinogenesis [J]. *Environ Health Perspect*, 1998, 106 suppl. 2755-2760.
- [10] Dong W, Teraoka H, Kondo S, et al. 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin induces apoptosis in the dorsal midbrain of zebrafish embryos by activation of aryl hydrocarbon receptor [J]. *Neurosci Lett*, 2001, 303 (3): 169-172.
- [11] Connell BJ, Singh A, Chu I. Interaction of PCB congeners and 2, 3, 7, 8-TCDD in the rat liver: an electron microscope study [J]. *J Submicrosc Cytol Pathol*, 1998, 30 (1): 157-163.
- [12] Tofgaard R, Nilsen OG, Carlsstedt Duke J, et al. Polychlorinated terphenyls: alterations in liver morphology and induction of cytochrome P450 [J]. *Toxicology*, 1986, 41 (2): 131-144.
- [13] Wu WZ, Zhou BS, Xu Y, et al. Cytological and biochemical alterations in *Carassius auratus* hepatocytes from exposure to sediment containing dioxins and related compounds [J]. *Arch Environ Contam Toxicol*, 1999, 37 (3): 358-363.
- [14] Sakamoto MK, Mima S, Tanimura T, et al. A morphological study of liver lesions in *Xenopus* larvae exposed to 2, 3, 7, 8-tetrachlorodibenzo-*p*-dioxin (TCDD) with special reference to apoptosis of hepatocytes [J]. *J Environ Pathol Toxicol Oncol*, 1995, 14 (2): 69-82.