

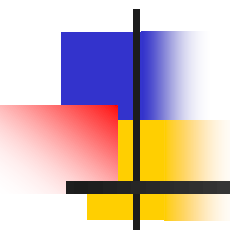
形态学综合性实验

---

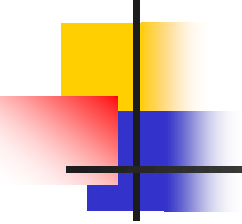
# 肝脏生物学

安徽医科大学病理学教研室

# 肝细胞损伤的形态学观察实验



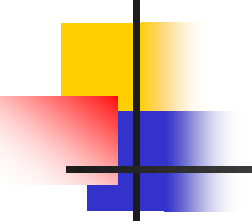
---



# 一、目的和要求

---

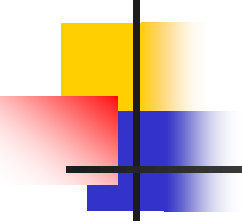
- **1.熟悉四氯化碳复制肝细胞中毒的实验方法及操作技巧。**
- **2.掌握肝细胞肿胀（气球样变）时大体和微细结构形态学变化。**



## 二、实验原理

---

- 四氯化碳为一种化学药物，进入人体后，经由肝脏滑面内质网细胞色素**P<sub>450</sub>**混合功能氧化酶的作用下形成有强毒性的三氯甲基自由基**CCl<sub>3</sub>**（ $\text{CCl}_4 + e \rightarrow \text{CCl}_3 + \text{Cl}^-$ ），破坏细胞膜结构，导致膜通透性增加，钠-钾泵功能障碍，细胞内钠离子增多，水分增加，出现肝细胞肿胀（气球样变）病变。



## 三、实验材料

---

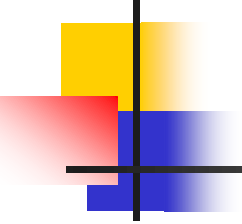
- **1. 动物：** 小鼠或大鼠。
- **2. 器材：** 鼠笼、普通天平、**1ml**注射器、**5ml**注射器、手术刀、手术剪、解剖镊以及制作切片的系列仪器和设备。
- **3. 试剂：** **5%**四氯化碳油液、生理盐水。



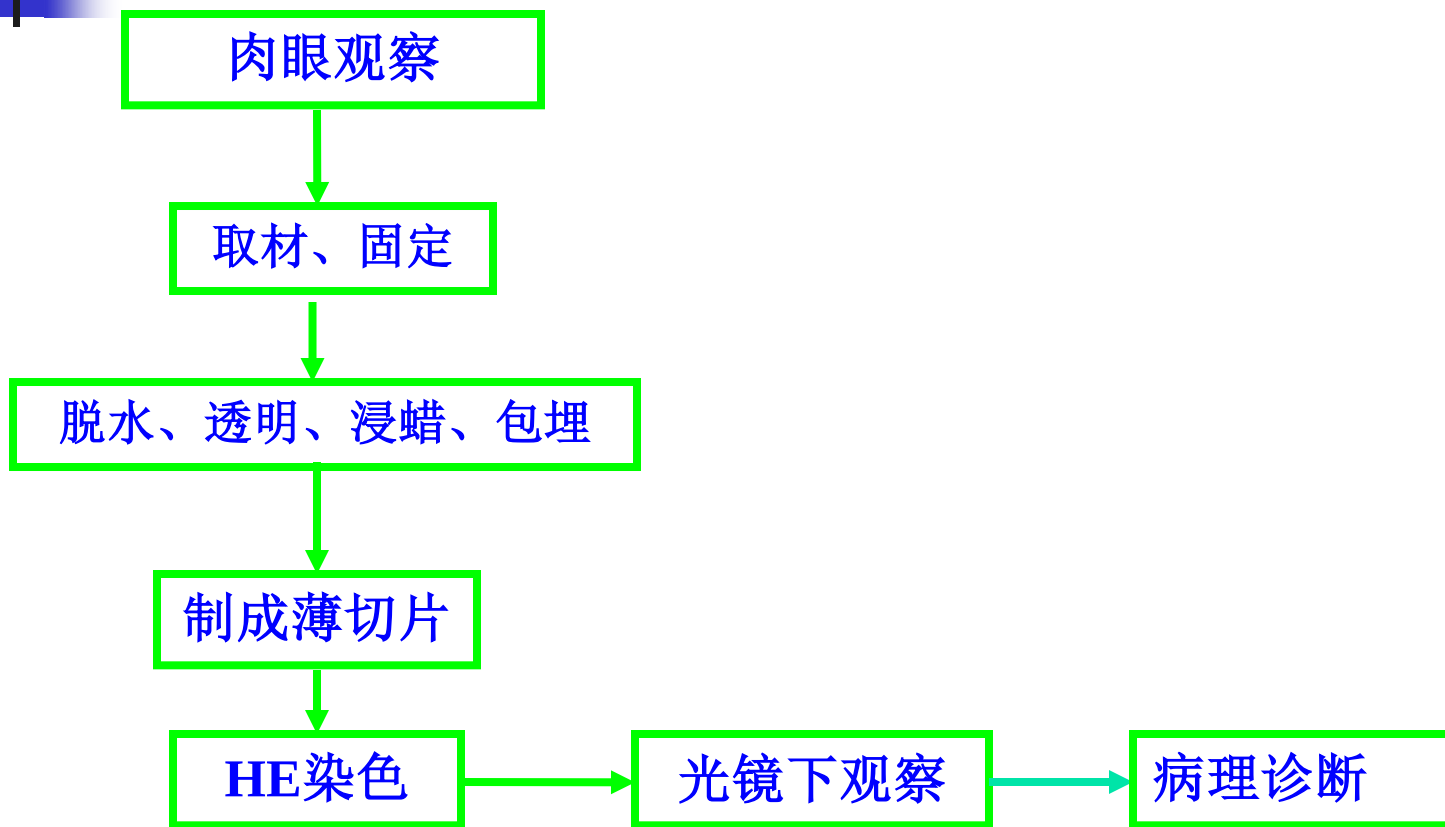
## 四、实验操作步骤

---

- **1.** 每组取**1**只小鼠为实验组，皮下注射**5%**四氯化碳油溶液**0.1ml/10g**体重；另**1**只为对照组，皮下注射等量生理盐水。
- **2.** **48**小时后，剖开腹腔，进行大体观察，肝脏体积增大，肝被膜紧张，肝脏边缘变的圆滑；切开后切面隆起，似切开的豆腐，边缘外翻，颜色苍白，混浊无光泽，似开水烫过，称之为水样变性；

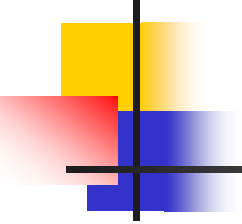
- 
- 
- **3.** 取肝脏组织，固定于10%中性福尔马林；
  - **4.** 常规石蜡包埋和切片，HE染色；
  - **5.** 镜下观察实验组和对照组肝脏形态学变化

# 病理检查程序









# 组织固定

---

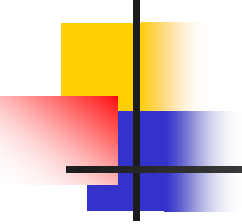
- ❑ 为防止组织自溶与腐败，影响观察及诊断，病理标本应及时固定。
- ❑ 常规标本固定液一般用10%中性福尔马林。
- ❑ 固定时间一般几个小时或过夜，不宜超过12小时以上。

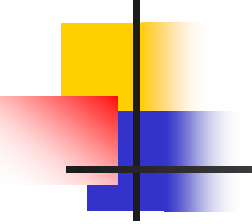


# 组织脱水

---

- 组织经固定和洗涤后含大量水分，因此在浸蜡和包埋前必须采用适当方法将组织中的水分彻底清除，此过程称为脱水。
- 脱水剂必须是与水在任何比例均能混合的液体。最常用的脱水剂为乙醇，其他有丙酮、异丙醇、正丁醇和环氧己环等。

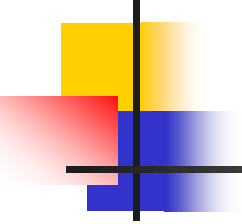
- 
- 乙醇脱水一般从70%开始，经80%、90%、95%至无水乙醇，即由低浓度逐步到高浓度。
  - 脱水时间与组织大小、厚薄有关，组织大且厚，脱水时间要长些。
  - 组织脱水时间在低浓度乙醇中可长些，而在高浓度乙醇中要短些，尤其在无水乙醇中放置时间不宜过长，以免组织过度硬化造成切片困难。



# 组织透明

---

- 为了使石蜡能浸入组织块，组织脱水后必须经过一种既能与乙醇相混合，又能溶解石蜡的溶剂，通过这种溶剂的媒介作用，达到石蜡浸入组织的目的。
- 在上述过程中，因组织块中的水分被溶剂（常用二甲苯）取代，其折射指数接近组织蛋白的折射指数，组织显示半透明状态，故称为透明。



---

- 常用的透明剂有二甲苯、苯、甲苯、氯仿等，其中以二甲苯最常用。它对组织的收缩性强，易使组织变硬变脆，因此组织块在二甲苯中透明时间不宜过长。

- 透明时间也可用肉眼观察来控制，一般见组织呈棕黄色或暗红色透明状即可。



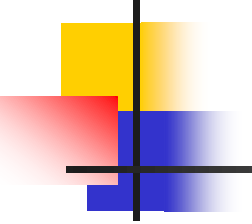
# 浸 蜡

---

- 组织经透明后，在熔化的石蜡内浸渍，使石蜡分子浸透入组织中的过程称浸蜡或浸透。
- 为使石蜡充分浸入组织块中；常需经过2~3次石蜡浸渍才能完成，通常需4~24小时，浸蜡时间过短，蜡没有完全浸入组织中，组织过软，切片困难；浸蜡时间过长，造成组织硬脆，切片也很困难。

# 自动脱水机

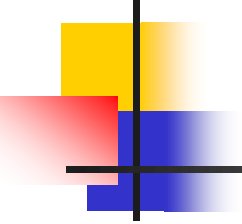




# 脱水、透明、浸蜡的程序及时间

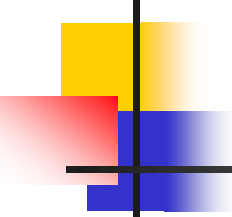
## 人体组织（自动脱水机）

- (1)**70%乙醇1~1.5h**
- (2)**80%乙醇1~1.5h**
- (3)**90%乙醇1~1.5h**
- (4)**95%乙醇1h**
- (5)**95%乙醇1h**
- (6)**无水乙醇1h**
- (7)**无水乙醇1h**
- (8)**二甲苯40min**
- (9)**二甲苯40~60min**
- (10)**石蜡1h**
- (11)**石蜡1h**
- (12)**石蜡 2 h**



## 人体组织（手动脱水）

- (1)**70%乙醇2h**      (2)**80%乙醇1.5~2h**
- (3)**95%乙醇过午**      (4)**无水乙醇1h**
- (5)**无水乙醇30min**      (6)**二甲苯30min**
- (7)**二甲苯约30min**（肉眼看透明）
- (8)**石蜡30~60min**      (9)**石蜡过夜**



# 包埋

---

- 组织块经过浸蜡再用包埋剂(石蜡)包起的过程称包埋。
- 包埋含组织的石蜡块简称蜡块，蜡块有一定硬度和韧度，便于在切片机上夹持切片。

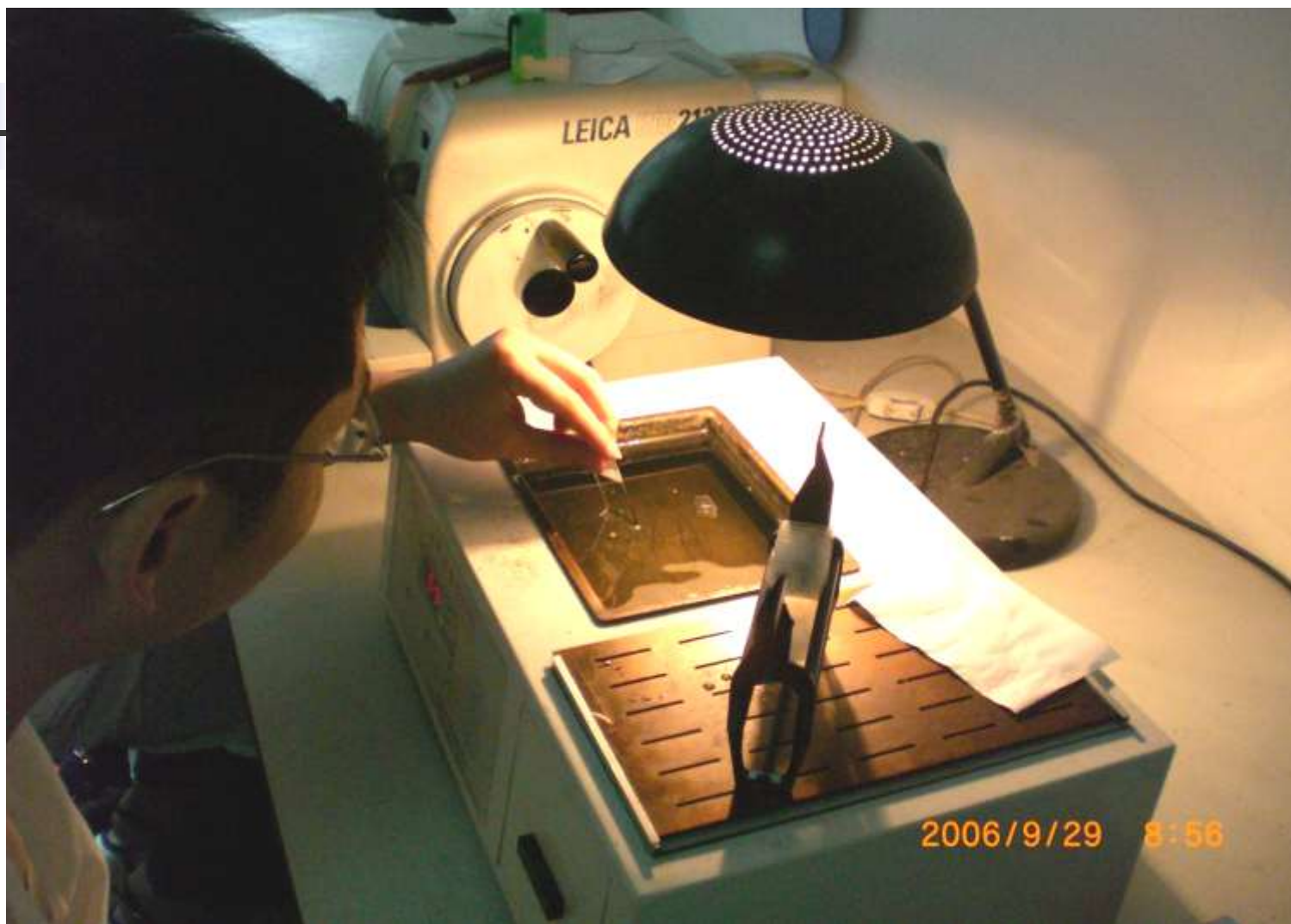




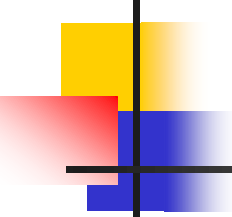




2006/9/29 8:54







2006

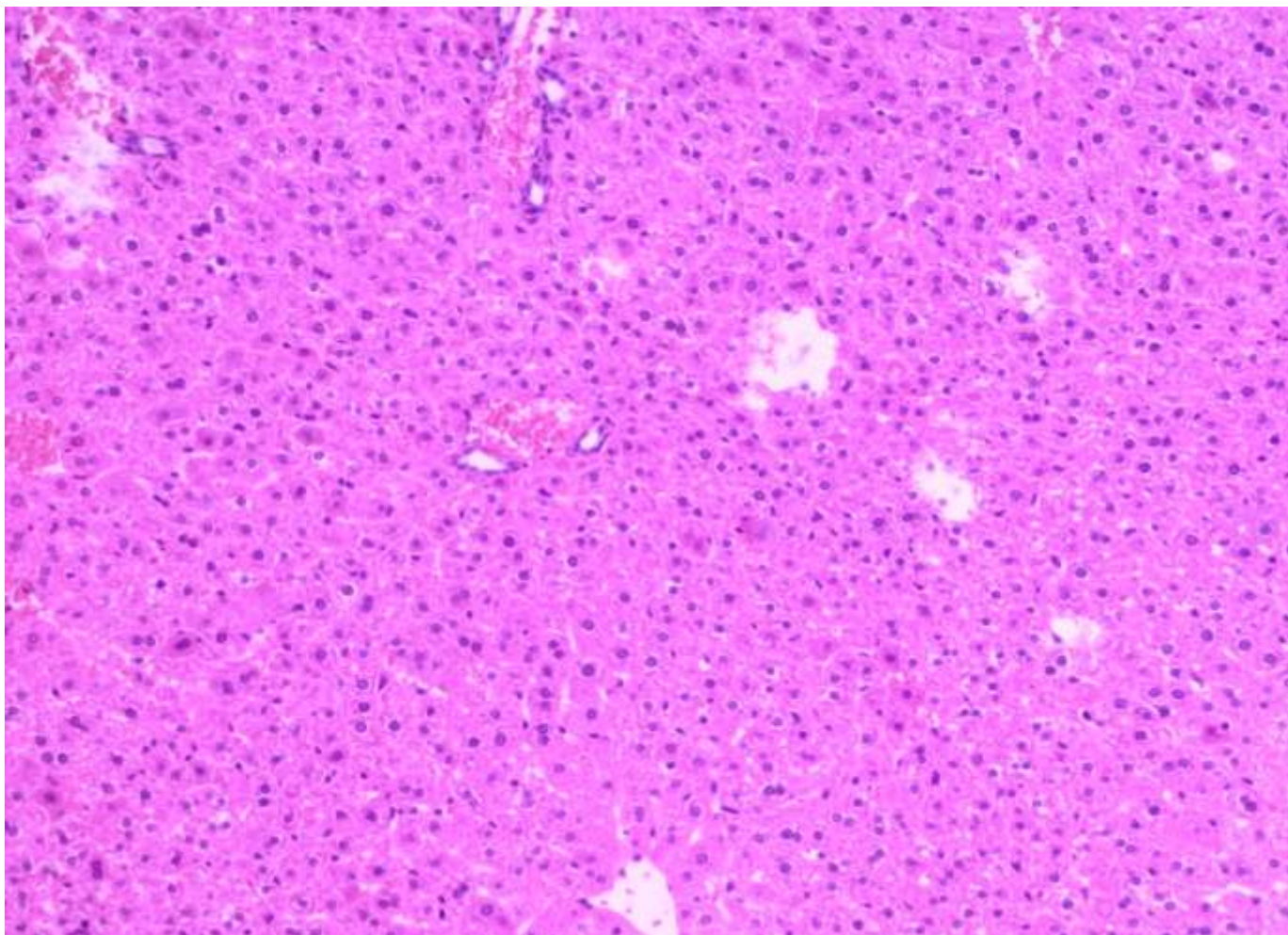


## 五、作业

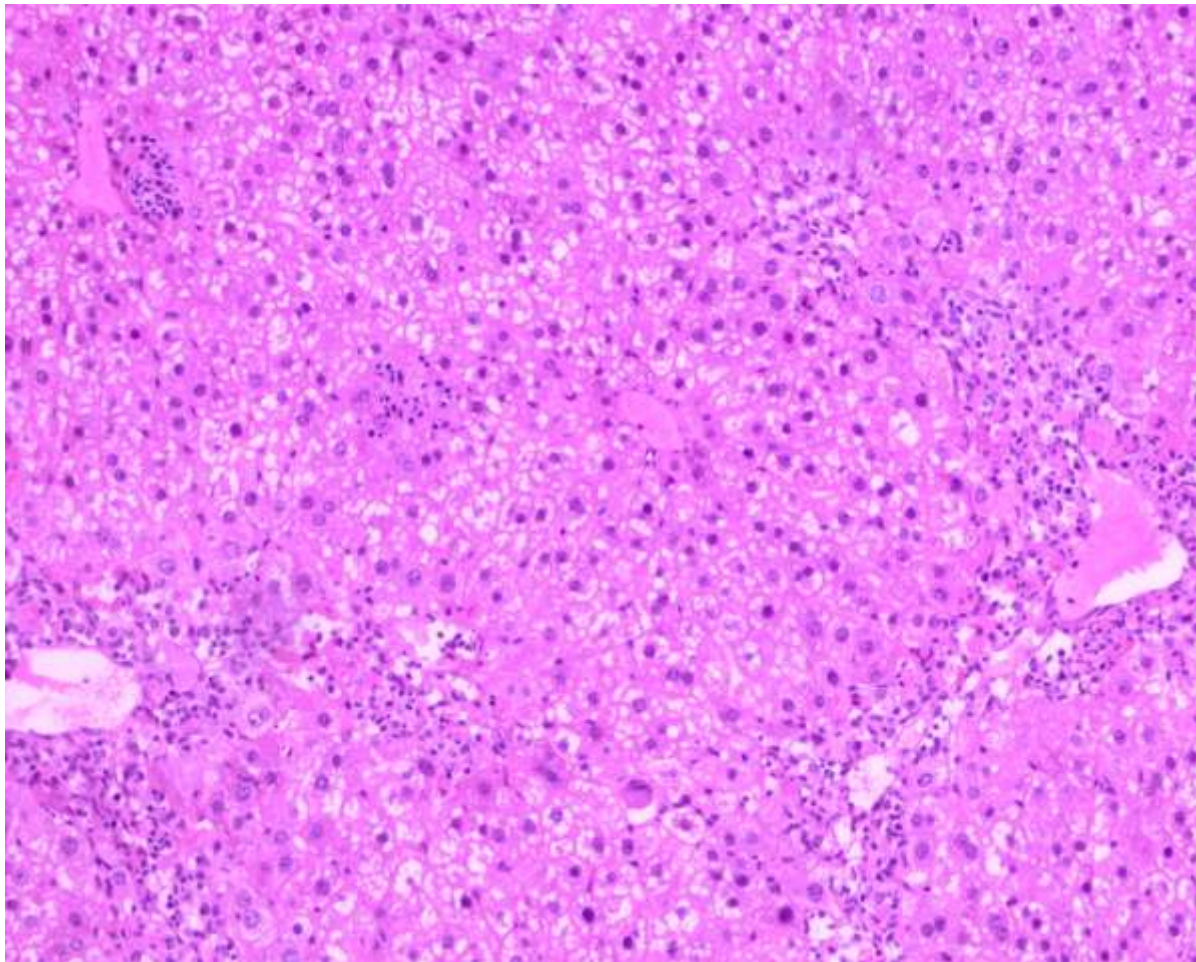
---

- **1.** 绘图比较正常肝细胞和肿胀肝细胞的结构。
- **2.** 描述肿胀肝细胞形态学特征。
- **3.** 简述肝细胞气球样变发生机理。

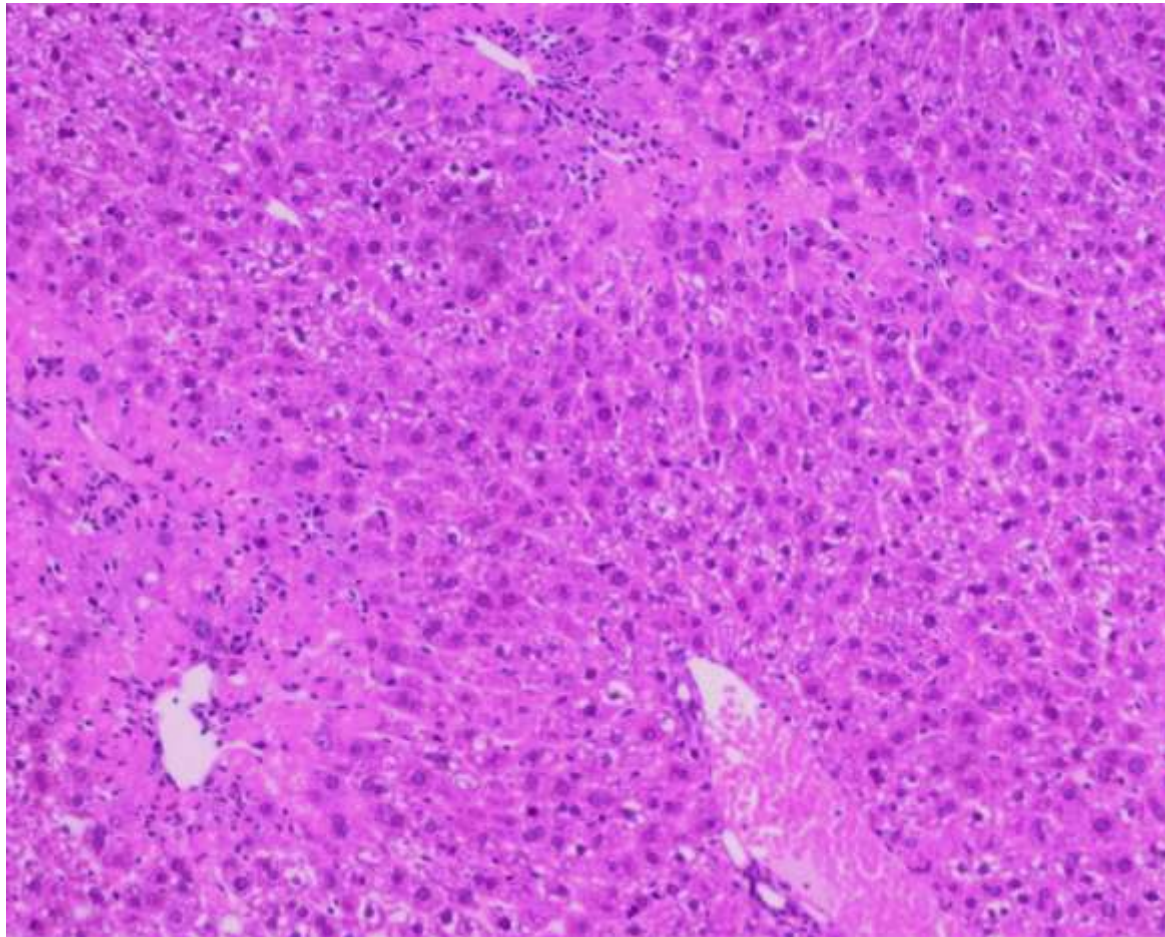
# 对照组



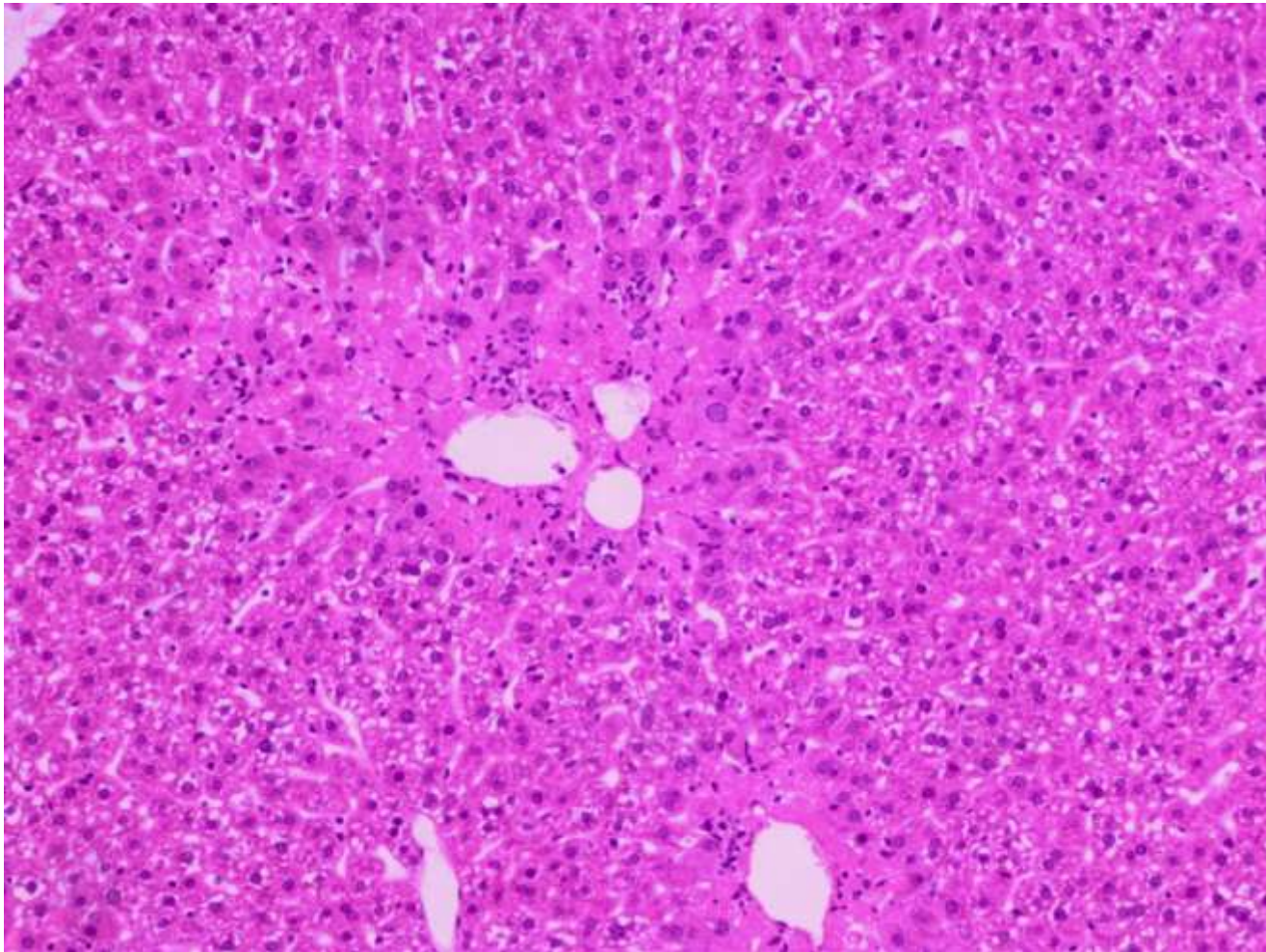
# 实验组



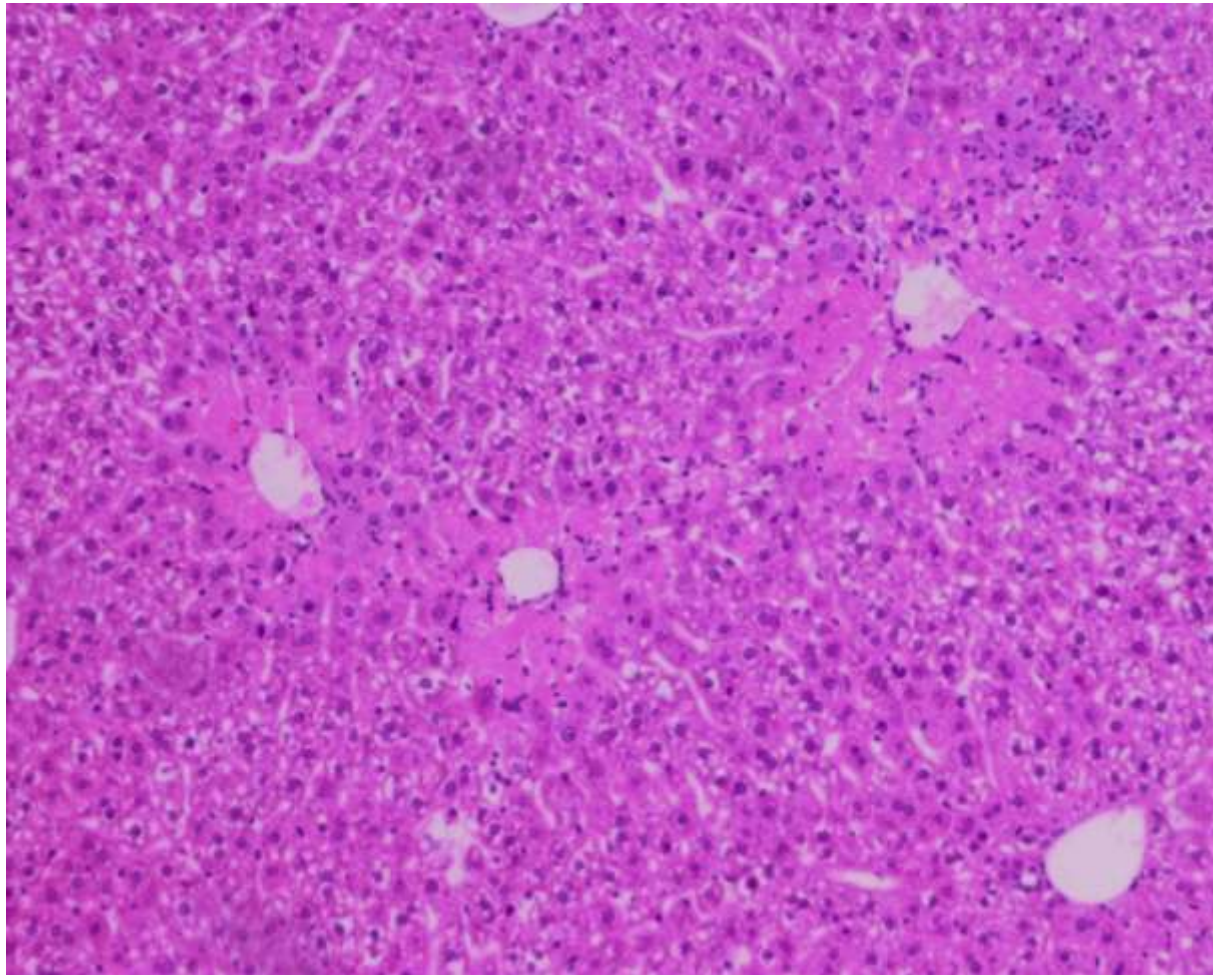
# 实验组



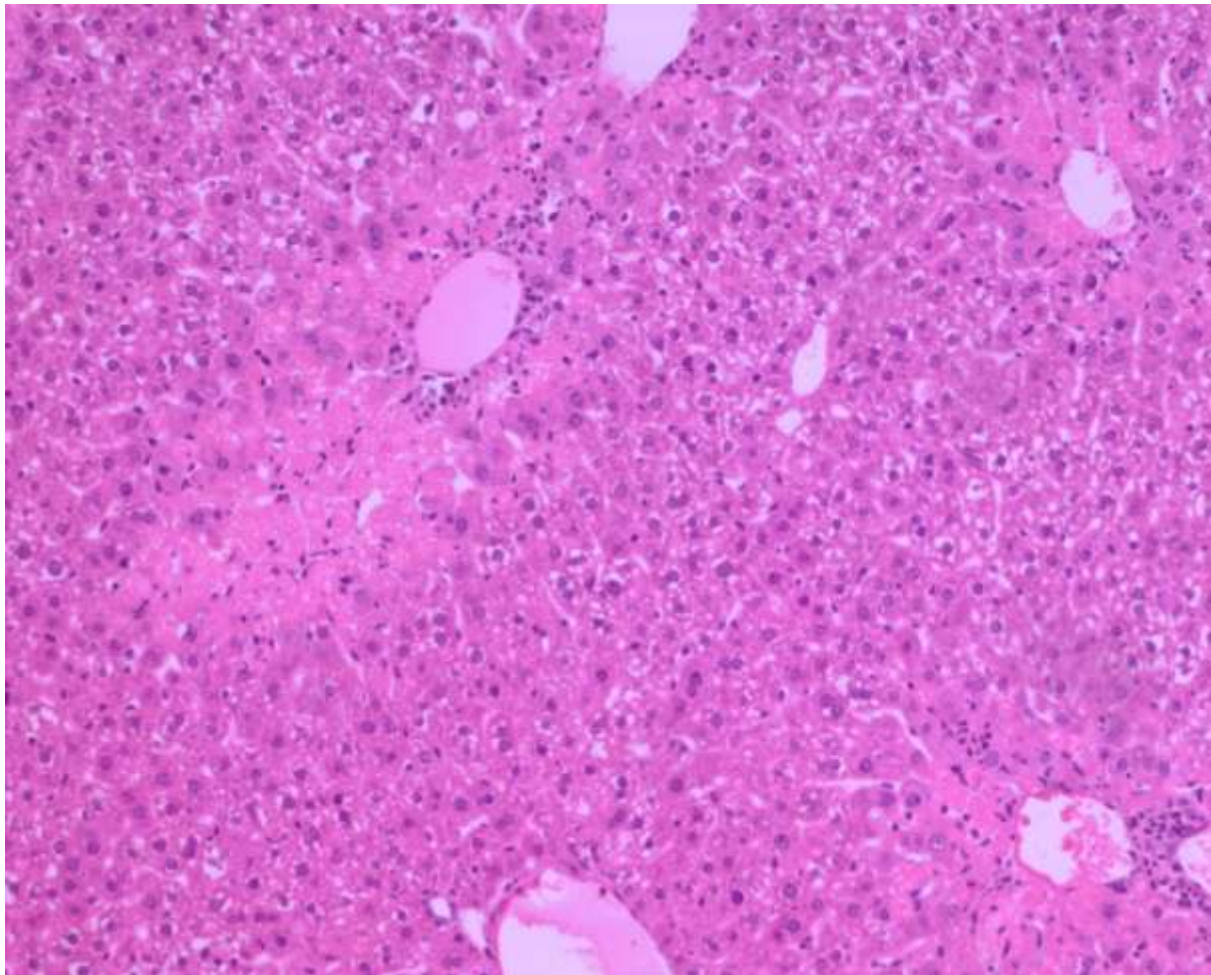
# 实验组



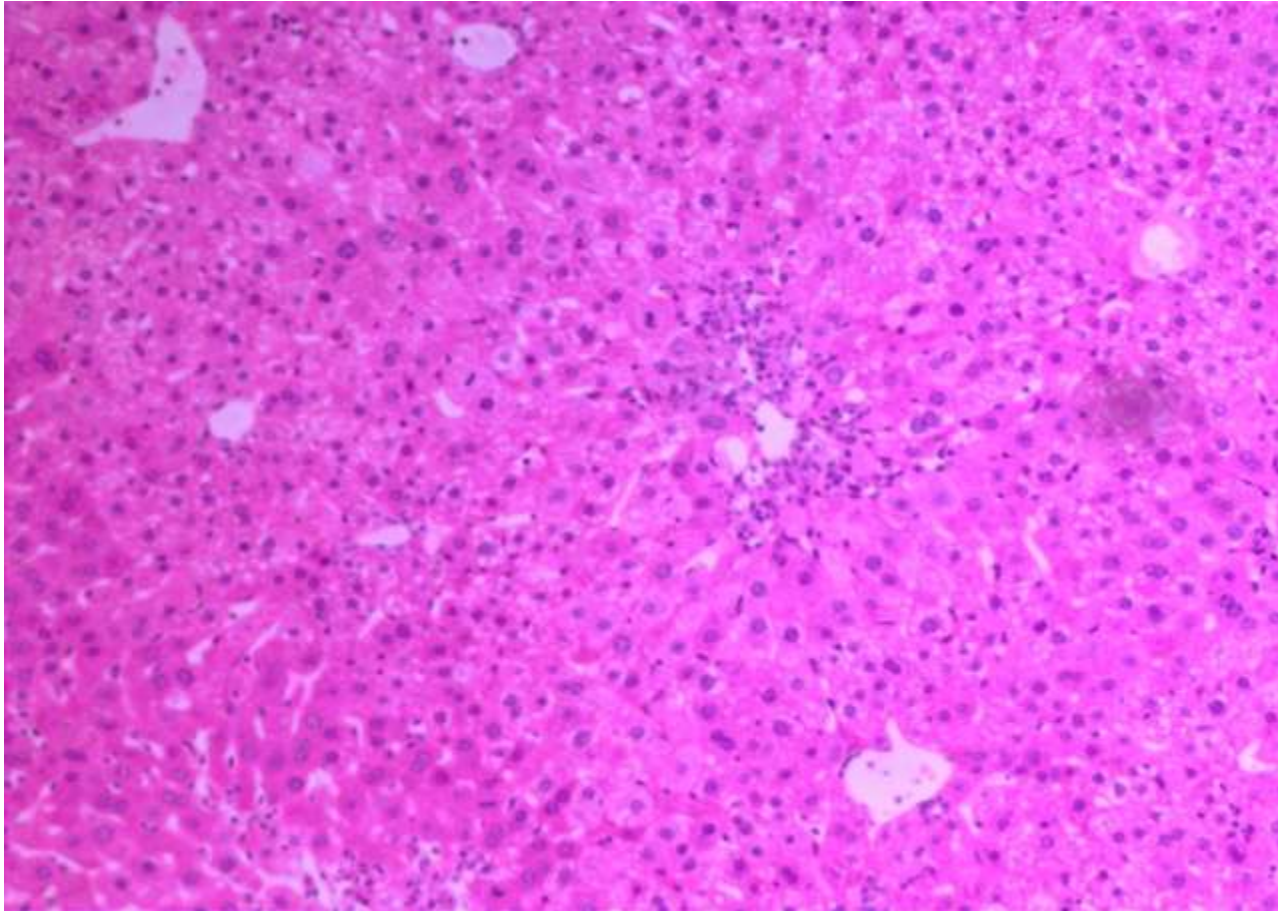
# 实验组



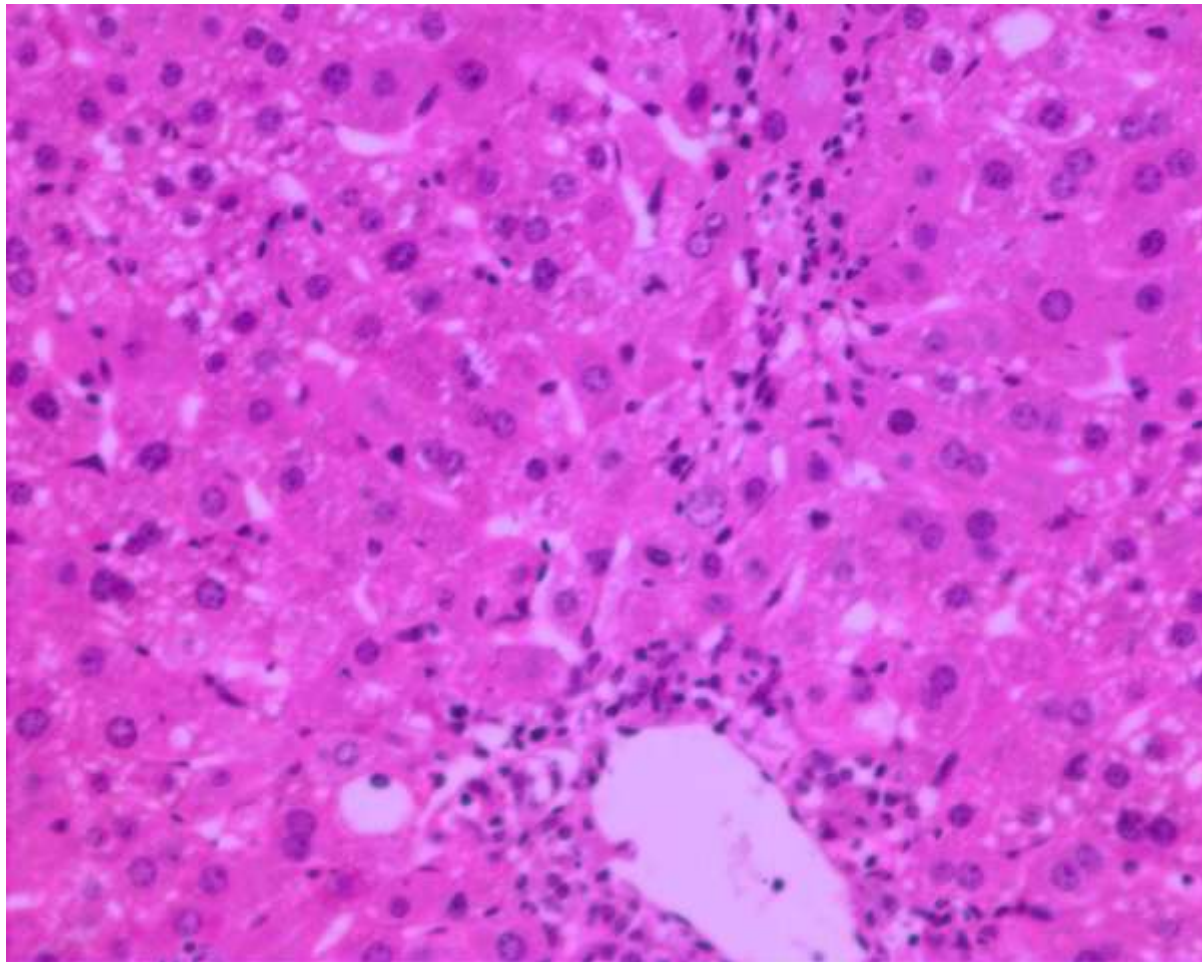
# 实验组



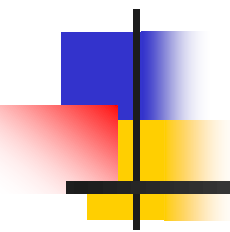
# 实验组



# 实验组







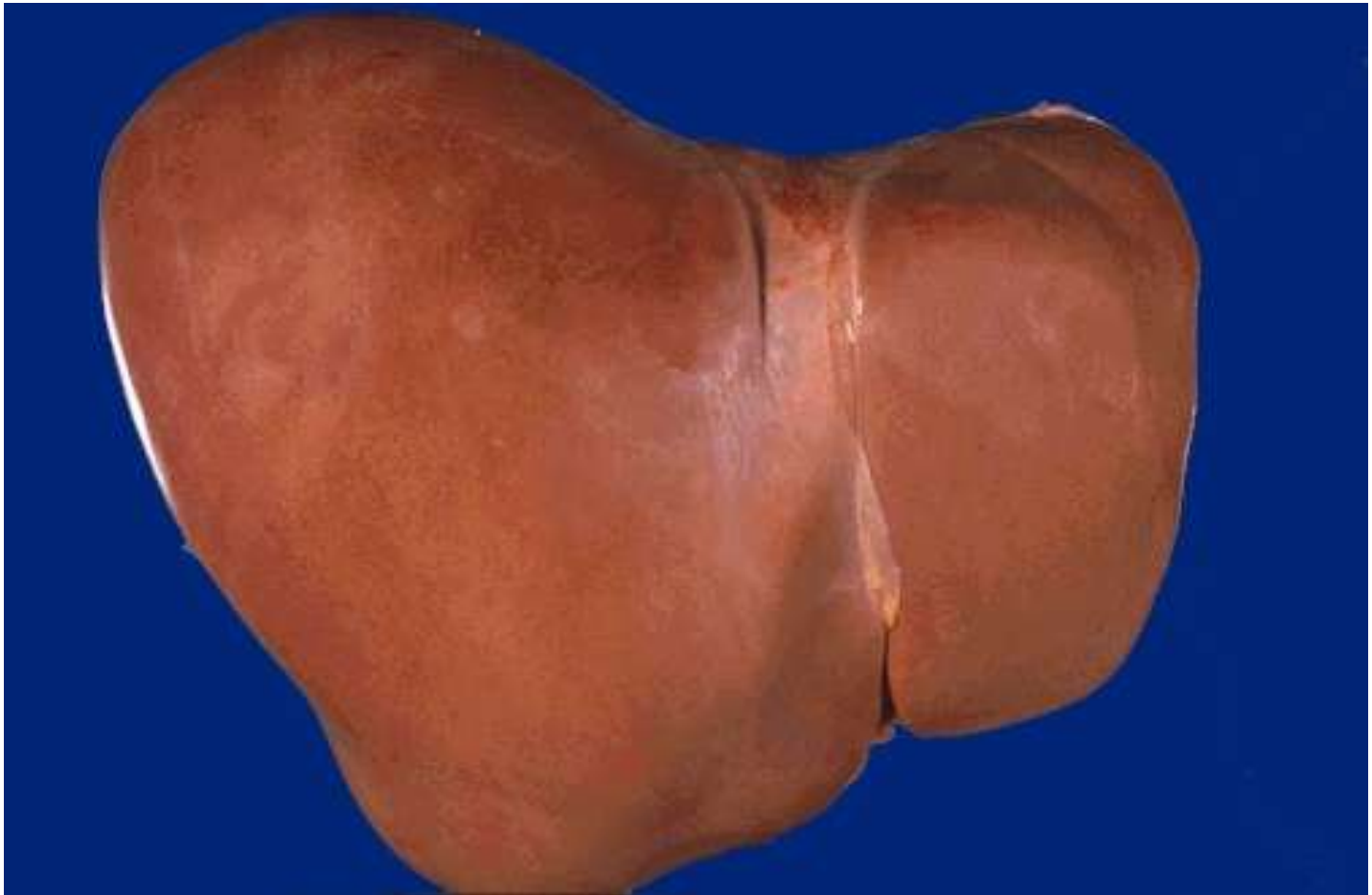
# 肝脏的正常结构及功能

---

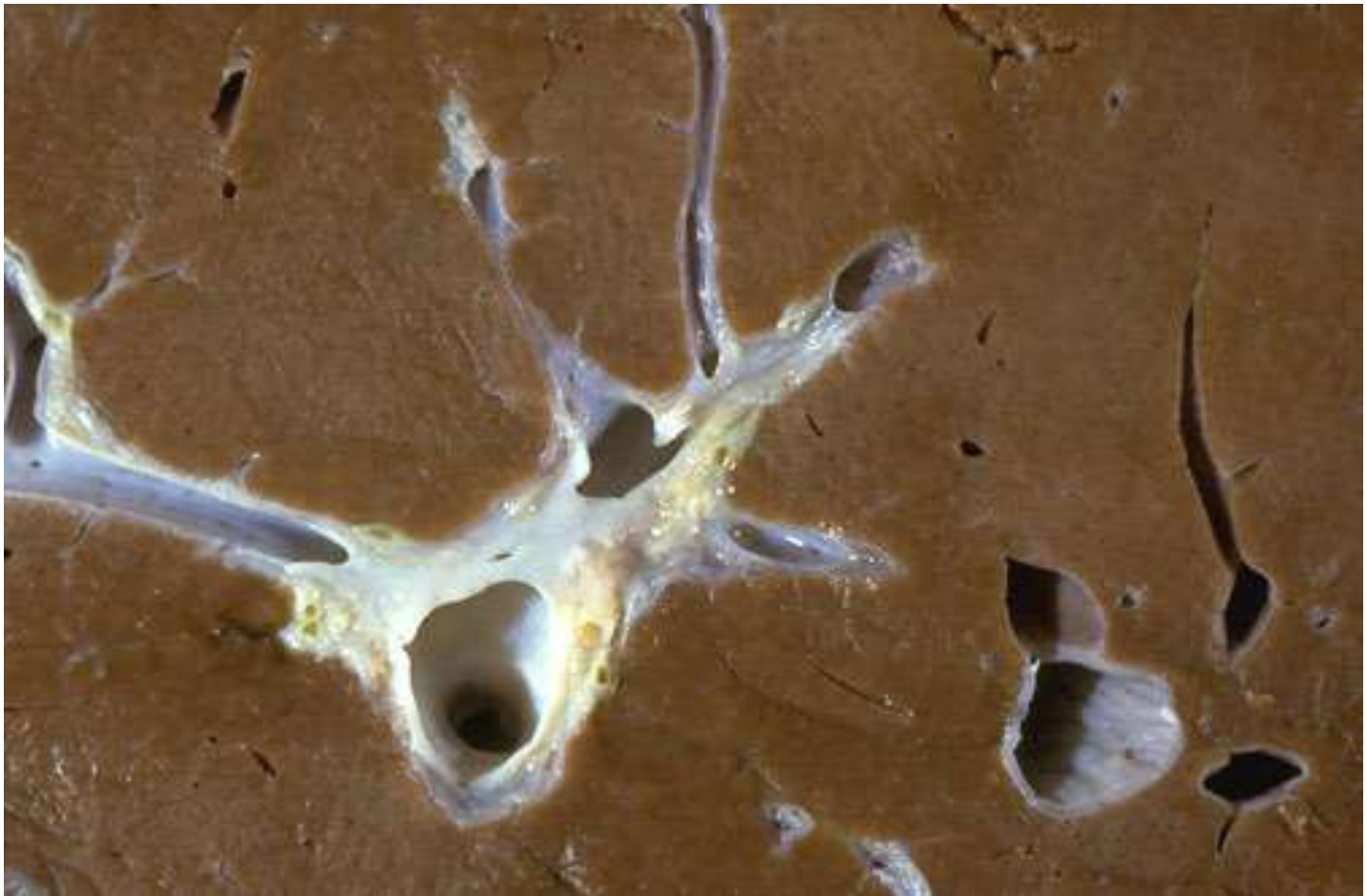
# 正常肝脏



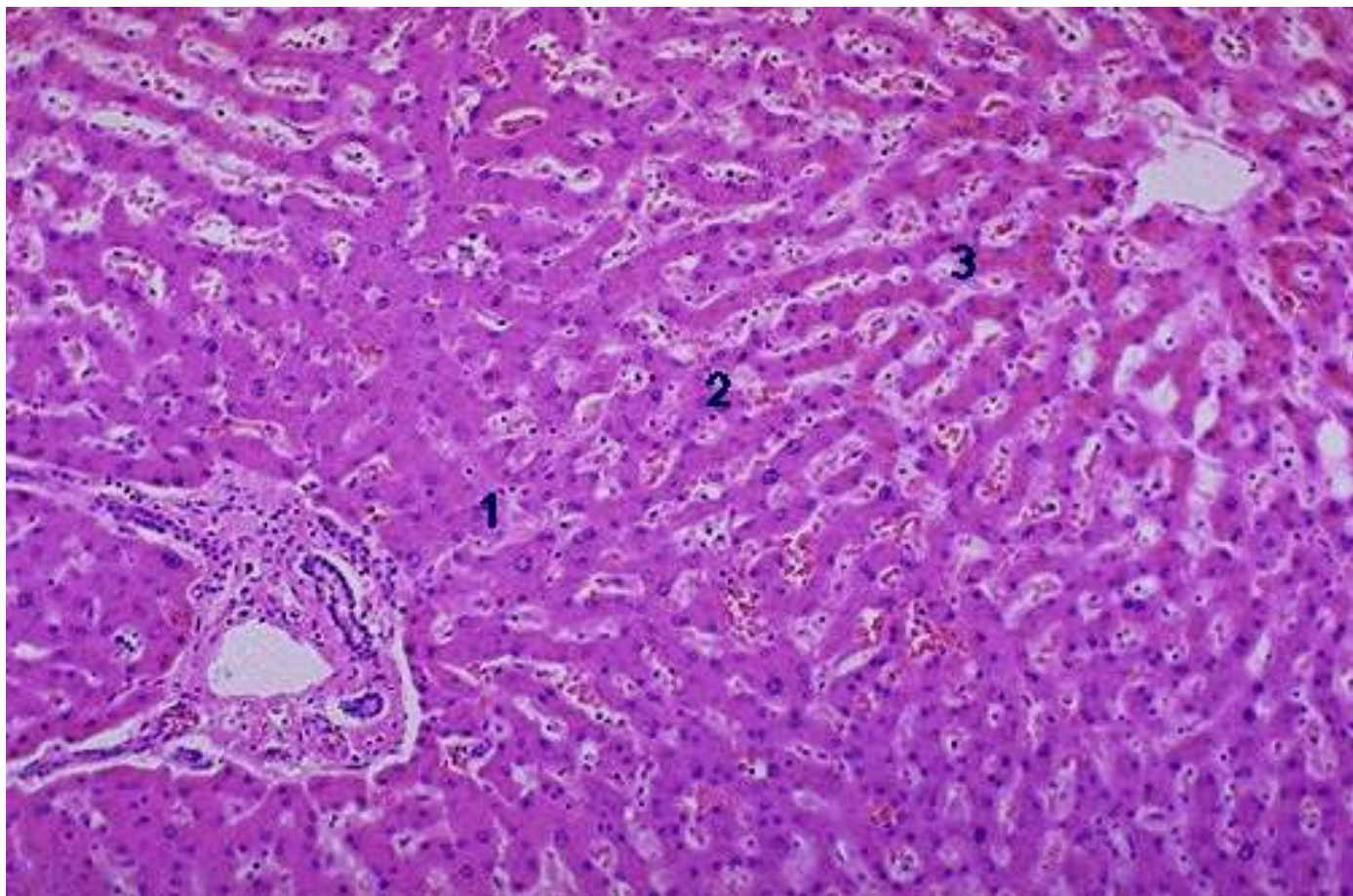
# 正常肝脏



# 正常肝脏

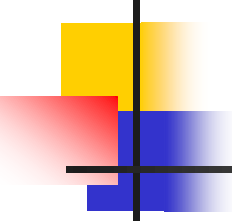


# 正常肝脏



# 肝小叶部分结构模式图

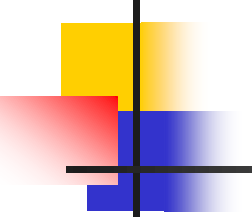


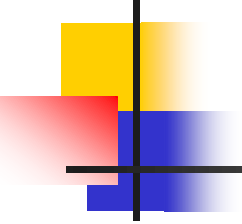


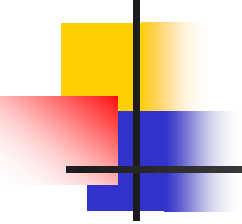
# 肝脏的功能

---

- ①分泌胆汁 胆汁能乳化脂肪，增加酶对脂肪分解作用的面积，促进脂肪的消化吸收；
- ②参与物质代谢
  - ❖ 肝脏对糖代谢的主要作用是维持血糖浓度的恒定；
  - ❖ 由消化道吸收的氨基酸通过肝脏时，其中80%的氨基酸在肝内进行蛋白质合成、脱氨和转氨基等作用；
  - ❖ 肝脏是脂肪运输的枢纽，还能利用糖和某些氨基酸合成脂肪、胆固醇和磷脂；

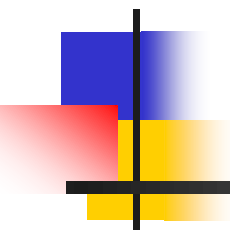
- 
- ③与红细胞生成和破坏有关 肝内可合成为红细胞发育成熟所必需的维生素B12，肝参与促红细胞生成素的合成。在胎儿时期，肝是红细胞发育的生成场所之一，婴儿出生后，肝成为破坏红细胞的重要场所，肝内的巨噬细胞能吞噬衰老、受损或形态异常的红细胞；
  - ④与血浆蛋白及多种凝血因子的合成有关 血浆蛋白中的全部白蛋白和80%的球蛋白在肝内合成；多种凝血因子如纤维蛋白原、凝血酶原等也在肝内合成。与凝血有关的维生素K及抗凝血的肝素也全部或部分地在肝内合成；

- 
- ⑤与血液循环有关 肝脏血管经常贮存相当分量的血液，是体内贮血库之一，当肝静脉出口受阻时，肝内会淤积大量血液，严重时会影响回心血量，造成血液循环功能困难；
  - ⑥与激素代谢有关 肝是多种内分泌腺所分泌的激素失活的主要器官，如肾上腺皮质激素和性腺激素等都在肝内失活；



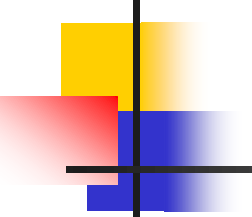
## ■ ⑦解毒作用

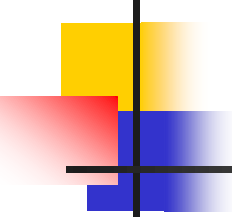
- ❖ 肝脏是人体主要的解毒器官。外来或体内代谢产生的有毒物质都要经肝脏处理，变成毒性较小或溶解度大的物质，随胆汁或尿液排出体外。
- ❖ 肝细胞内有许多与氨基酸代谢有关的酶，如谷丙转氨酶等，正常情况下，这些细胞内的酶很少进入血液，但当肝脏病变时，细胞的通透性增加或细胞遭破坏，这些酶就大量进入血液，使血液中GPT等的活性增高。



# 肝 脏 疾 病

---

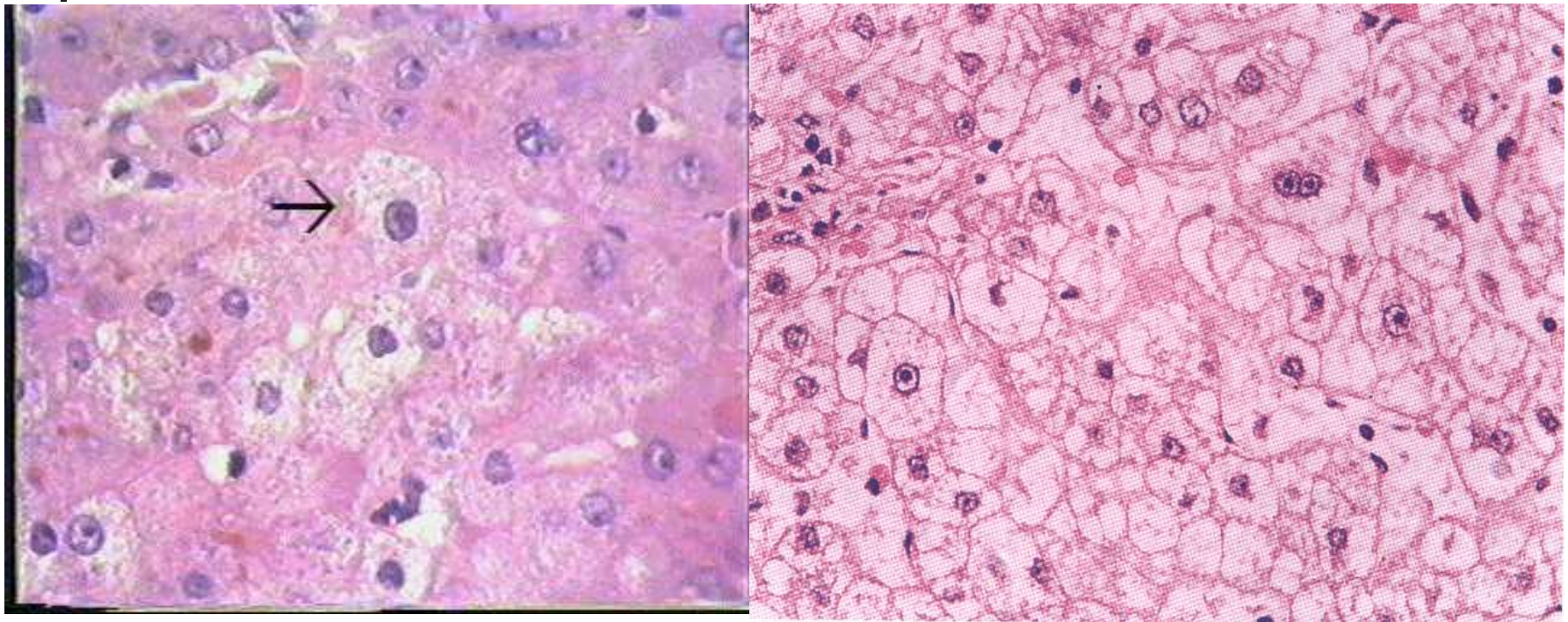
- 
- 肝脏是各种疾病常侵袭的器官。如代谢、中毒、微生物、循环障碍和肿瘤均可造成肝脏的损害。
  - 大多数情况下，是其他系统疾病继发累及肝脏，如心脏失代偿、癌症的广泛转移和肝外的感染等累及肝脏。
  - 肝脏的主要原发疾病为病毒性肝炎、酒精性肝病和肝细胞性肝癌。
  - 肝脏具有巨大的代偿能力，早期损伤临床表现常不明显。肝功损害明显时常可危及生命。。

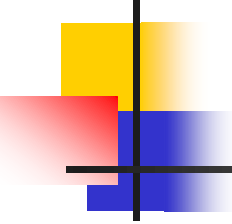


# 一、肝损伤的基本类型

- 1. 可逆性损伤(变性)和细胞内物质积聚 (degeneration and intracellular accumulation)
- 中毒和免疫性损伤可引起肝细胞肿胀，表现为细胞肿胀，胞质疏松呈网状。严重的肿胀可致肝细胞肿大呈球形，胞质几乎完全透明，称为气球样变。为肝细胞损伤后细胞内水分增多所致，故亦称水变性。
- 电镜下，内质网扩张、囊性变、核糖体脱失、线粒体肿胀。

# 肝细胞水肿变性



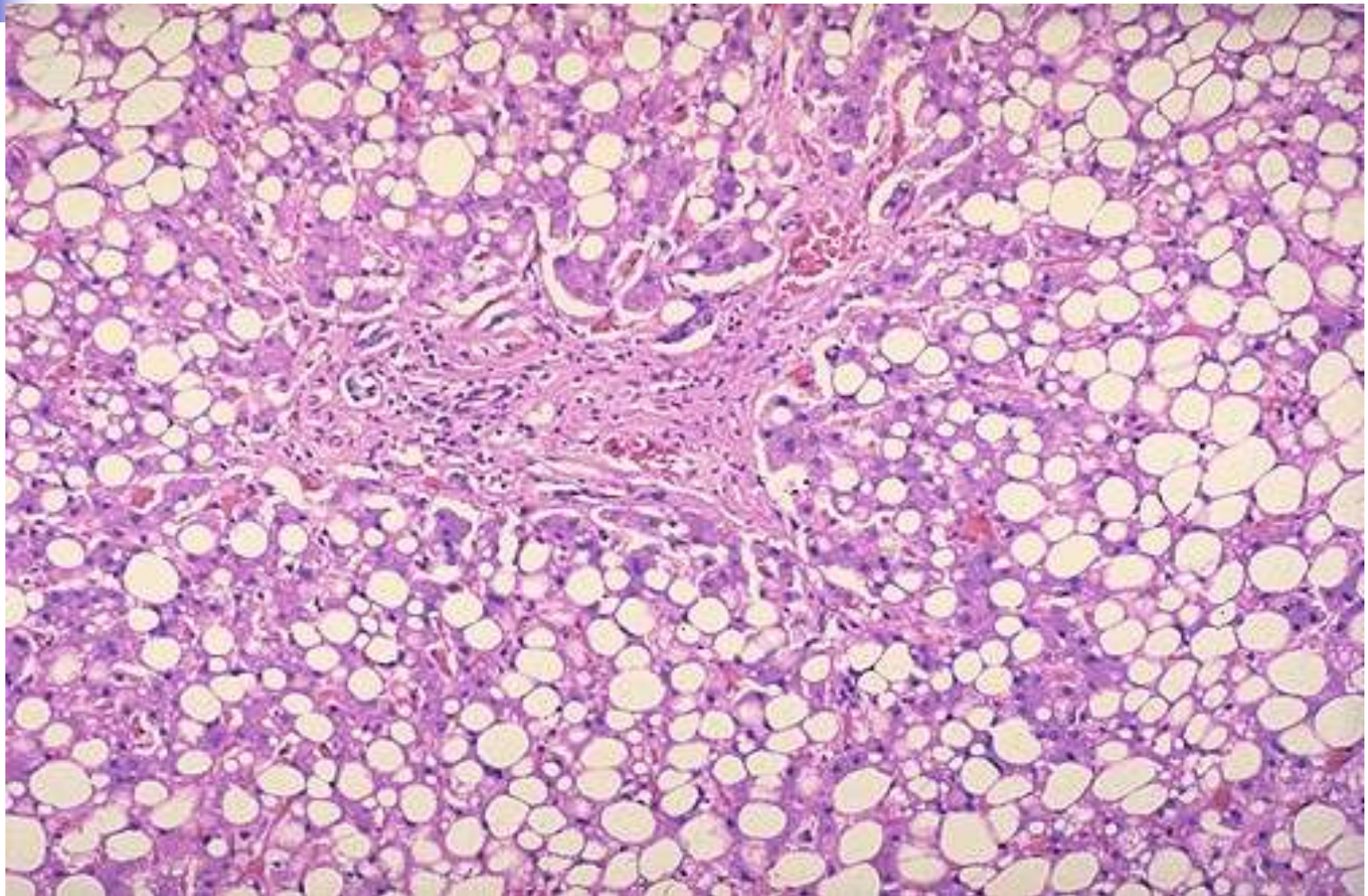
- 
- 肝细胞内可有一些物质的积聚，如铁、铜等。甘油三酯的积聚称为肝脂肪变。当胞质出现很多小脂滴，但尚未挤压细胞核时称小泡型脂肪变。当胞质内仅为一个大脂滴所占据，将细胞核挤压至一侧时称大泡型脂肪变。
  - 弥漫肝脂肪变可见于肥胖、糖尿病的病人。散在的脂肪变常见于丙型肝炎的肝脏。



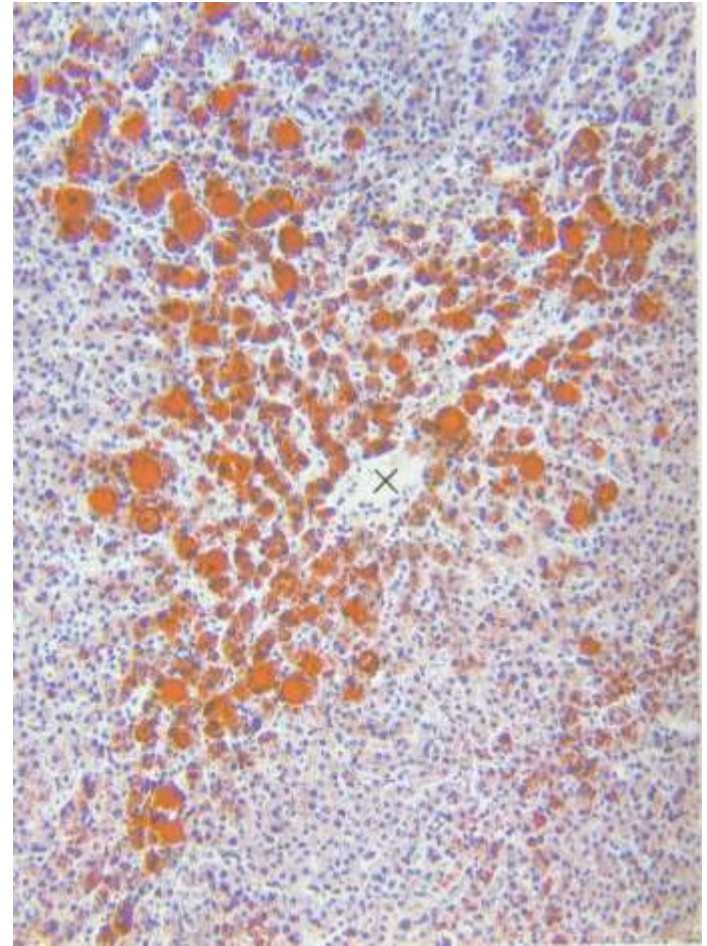
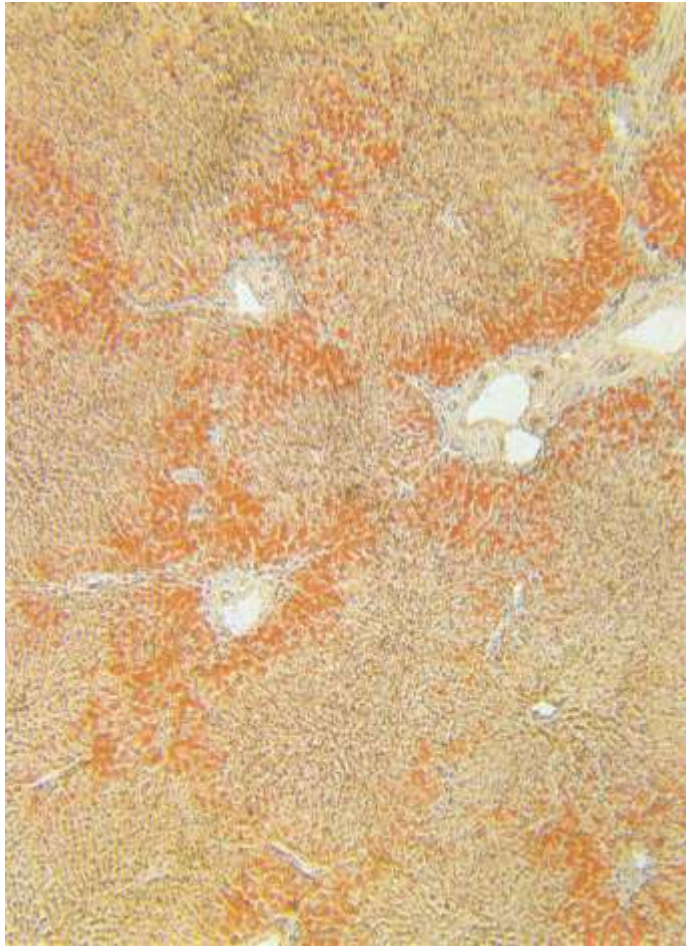
# 肝脂肪变性的机制

- **脂蛋白合成障碍** 由于合成脂蛋白的原料等物质缺乏，或由于化学毒物或其他毒素破坏内质网结构或抑制某些酶的活性，使脂蛋白及组成脂蛋白的磷脂、蛋白质等的合成发生障碍所致。
- **中性脂肪合成过多** 由于饥饿或某些疾病造成饥饿状态，或糖尿病患者对糖利用障碍，从脂库动员出大量脂肪，其中大部分以脂肪酸形式入肝，致肝合成脂肪增多，超过了肝将其氧化利用和合成脂蛋白输送出去的能力，导致脂肪在肝内蓄积。
- **脂肪酸的氧化障碍** 如白喉外毒素能干扰脂肪酸的氧化过程；而缺氧既影响脂蛋白的合成，又影响脂肪酸的氧化。

# 肝脂肪变性



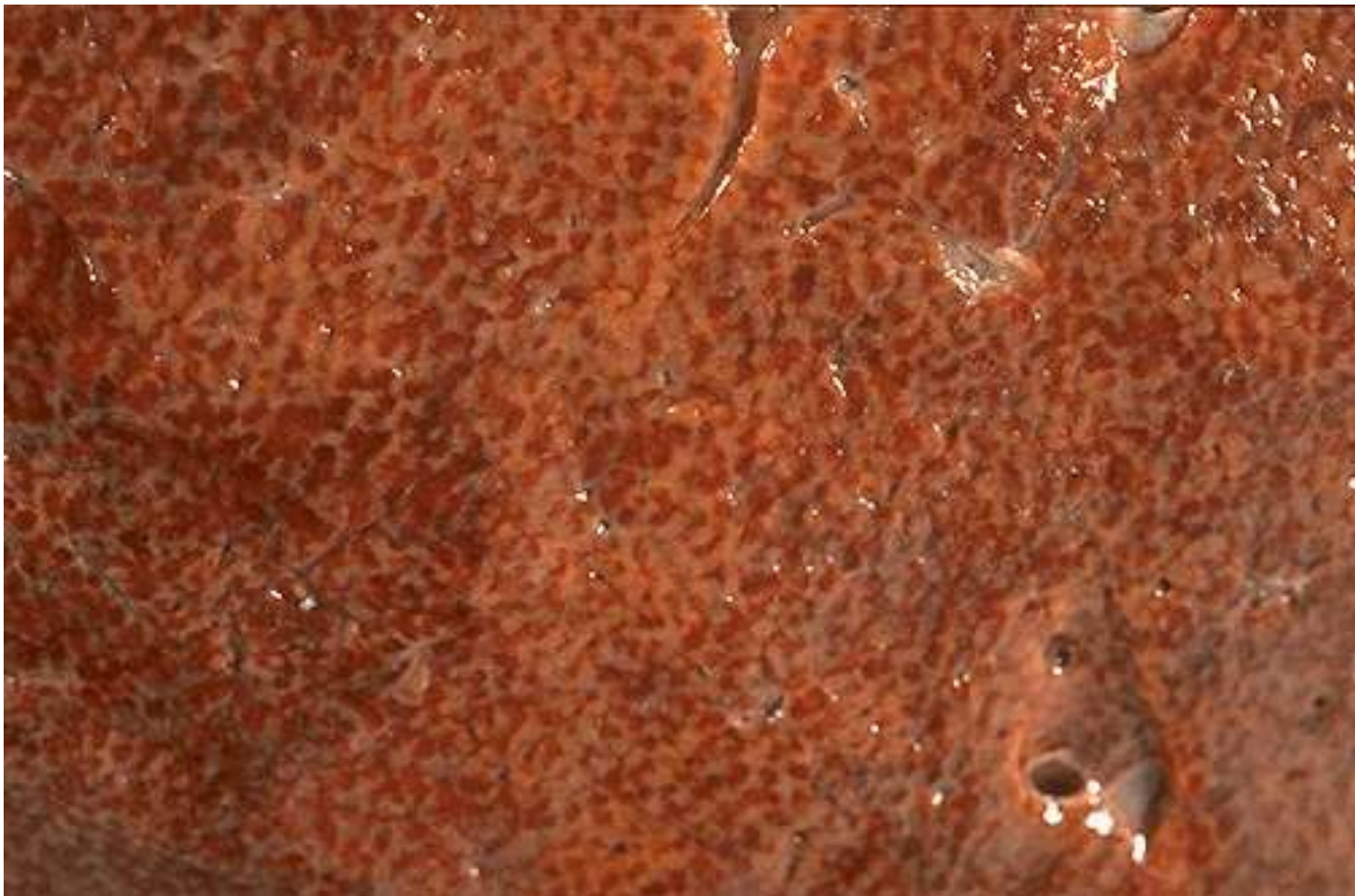
# 肝脂肪变性



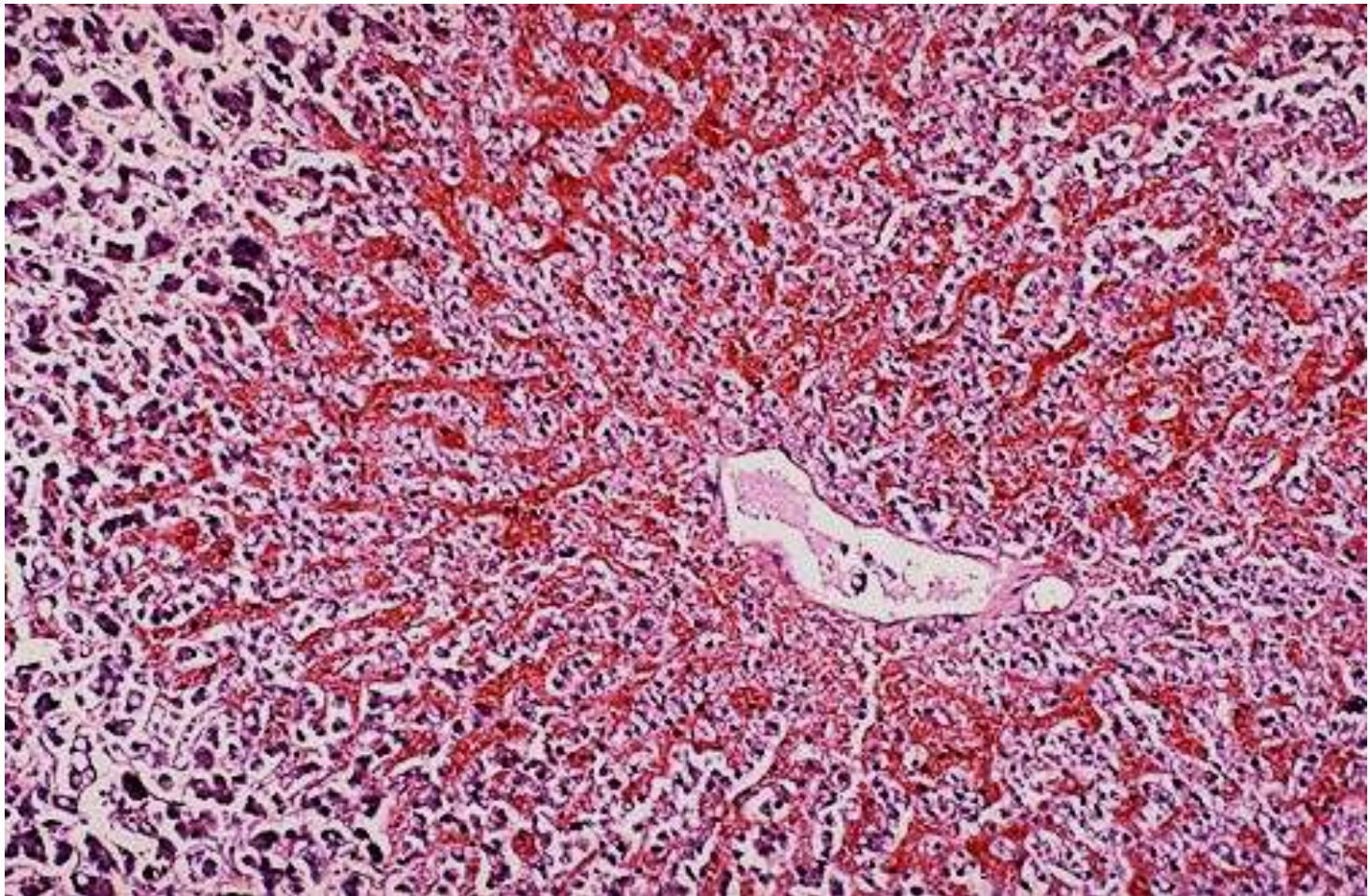
# 肝脂肪变性

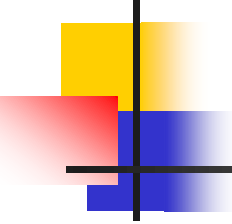


# 慢性肝淤血 (槟榔肝)



# 慢性肝淤血(槟榔肝)

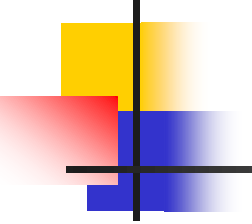




## 2. 坏死和凋亡(necrosis and apoptosis)

---

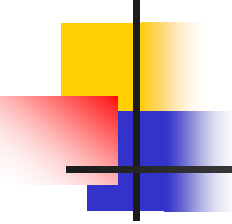
- 任何损伤因素，当足够强时均可引起肝细胞坏死。肝细胞可肿胀然后破裂、溶解消失（溶解性坏死）。溶解性坏死仅留下细胞碎屑。
- 肝细胞的凋亡表现为单个肝细胞的皱缩、胞质变红，核可碎成几块。肝细胞凋亡常见于病毒性肝炎。



### 3. 炎症 (inflammation)

---

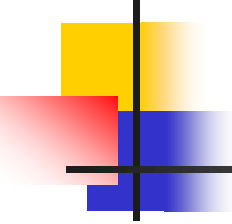
- 肝损伤出现急性或慢性炎细胞的浸润称为肝炎。中毒性或缺血性肝细胞坏死通常引起炎症反应。细胞毒性淋巴细胞可直接导致表达某些抗原的肝细胞的破坏。此种为肝细胞损伤的常见机制，尤其是病毒性肝炎时。
- 凋亡的肝细胞一般不引起炎症反应，但吞噬凋亡的细胞，如kupffer细胞和到达肝内的单核细胞可引来小团的炎症细胞。



## 4. 再生(regeneration)

---

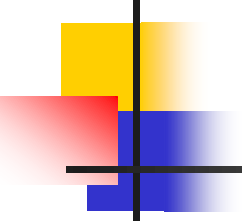
- 肝细胞寿命较长，在组织切除或细胞坏死后肝细胞均可增殖以修复受损的组织。肝细胞再生时核分裂增多、肝细胞索增厚，肝实质结构可呈现一定程度的不规则。
- 终末小胆管为严重肝实质损伤重建的储备成分，当其被激活后，可形成很多小胆管样结构，称为小胆管反应。在大胆管梗阻时也常见到小胆管反应。



## 5. 纤维化(fibrosis)

---

- 肝脏的炎症反应和中毒性损伤可引起纤维化。一般来说纤维化多为不可逆的。纤维化时胶原的沉积对肝脏血流和肝细胞灌注有明显的影响。早期纤维化可沿汇管区周围或中央静脉周围分布或胶原直接沉积在Disse腔内。随着纤维化的不断进展，肝脏逐渐被分割成由纤维包绕的结节，最终形成肝硬化。



## 二、病毒性肝炎

---

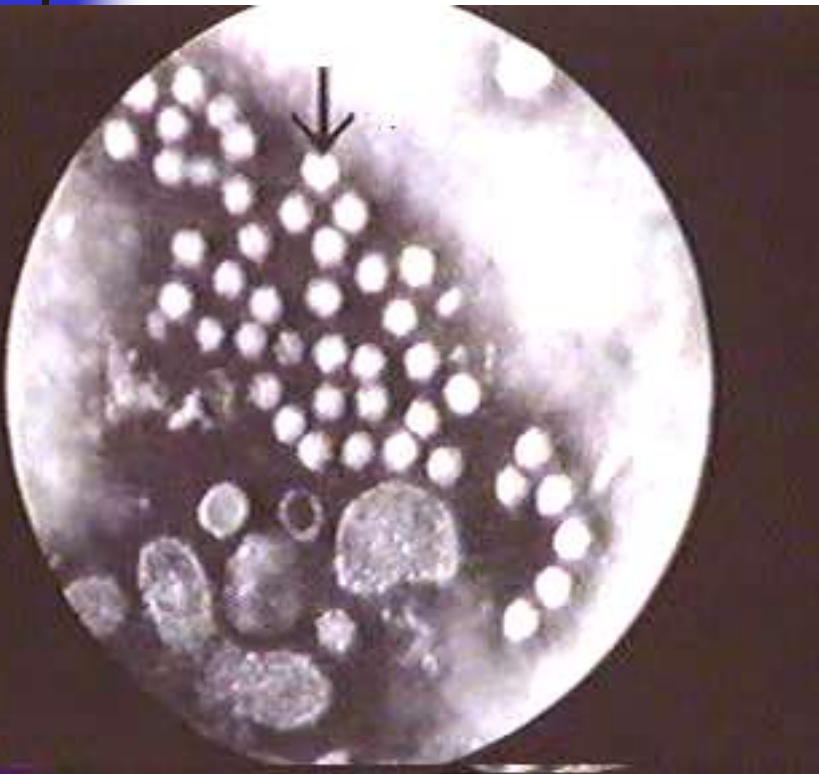
- **viral hepatitis:** 是一组由肝炎病毒引起的以肝实质细胞变性坏死为主要病变的传染病。
- 现有甲型、乙型、丙型、丁型、戊型及庚型**6**种。
- 其发病无性别差异，各种年龄均可罹患。



# 各型肝炎病毒的特点

| 肝炎病毒型      | 病毒大小、性质              | 传染途径      |
|------------|----------------------|-----------|
| <b>HAV</b> | <b>27nm,单链RNA</b>    | 肠道(易暴发流行) |
| <b>HBV</b> | <b>43nm,DNA</b>      | 密切接触、血道   |
| <b>HCV</b> | <b>30~60nm,单链RNA</b> | 同上        |
| <b>HDV</b> | <b>缺陷性RNA</b>        | 同上        |
| <b>HEV</b> | <b>32~34nm,单链RNA</b> | 肠道(易暴发流行) |
| <b>HGV</b> | <b>单链RNA</b>         | 血道        |

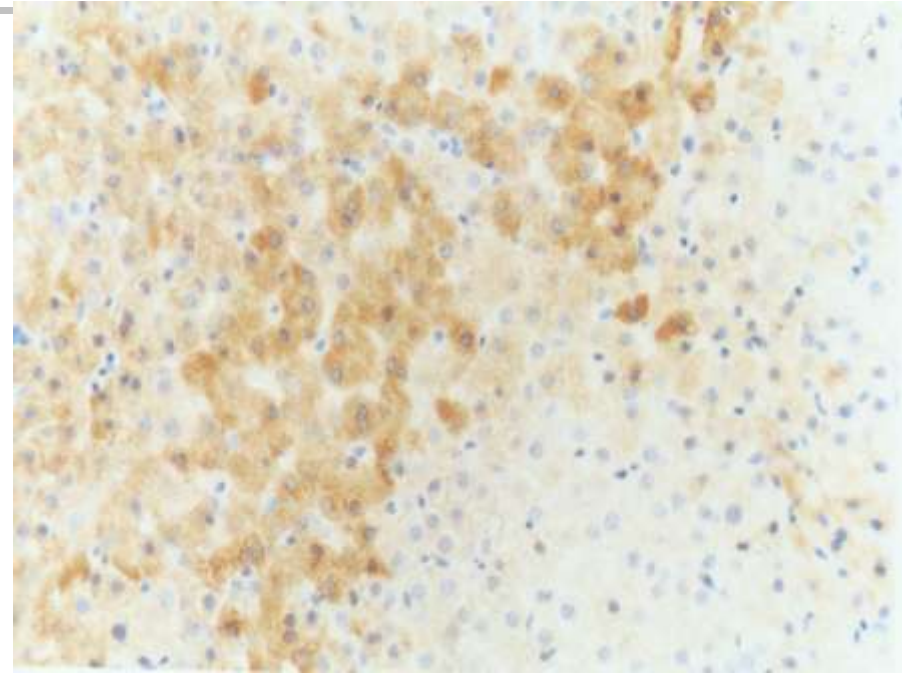
# HAV(left) & HBV(right)的电镜所见



# HBsAg的不同染色结果

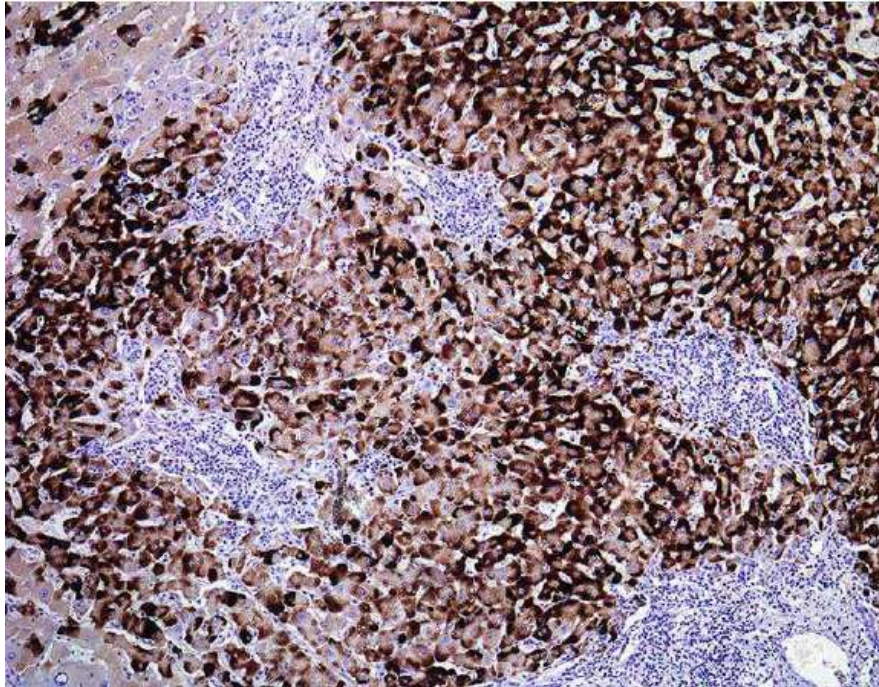


地衣红染色

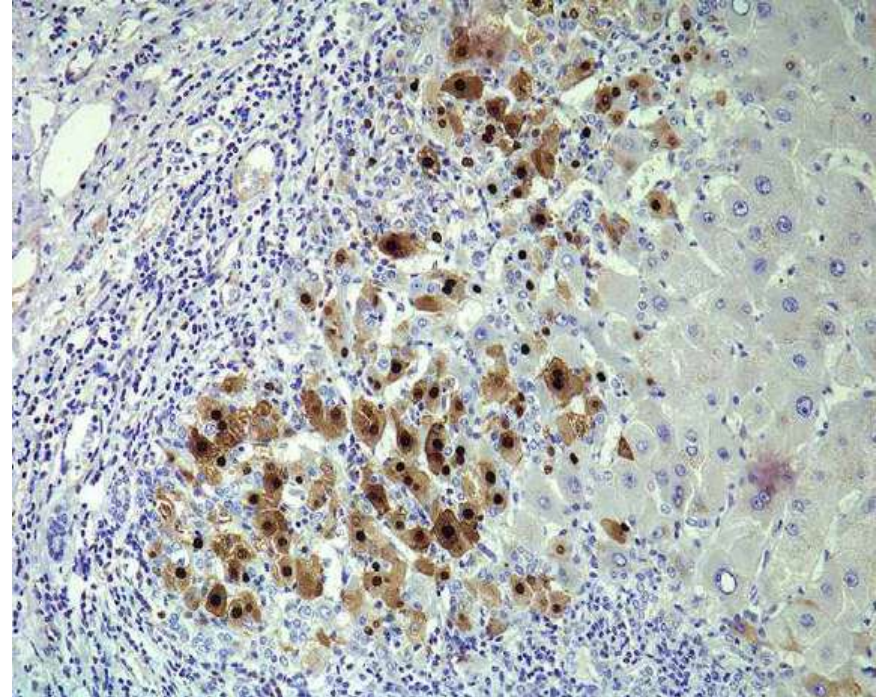


免疫组化染色

# 免疫组化染色

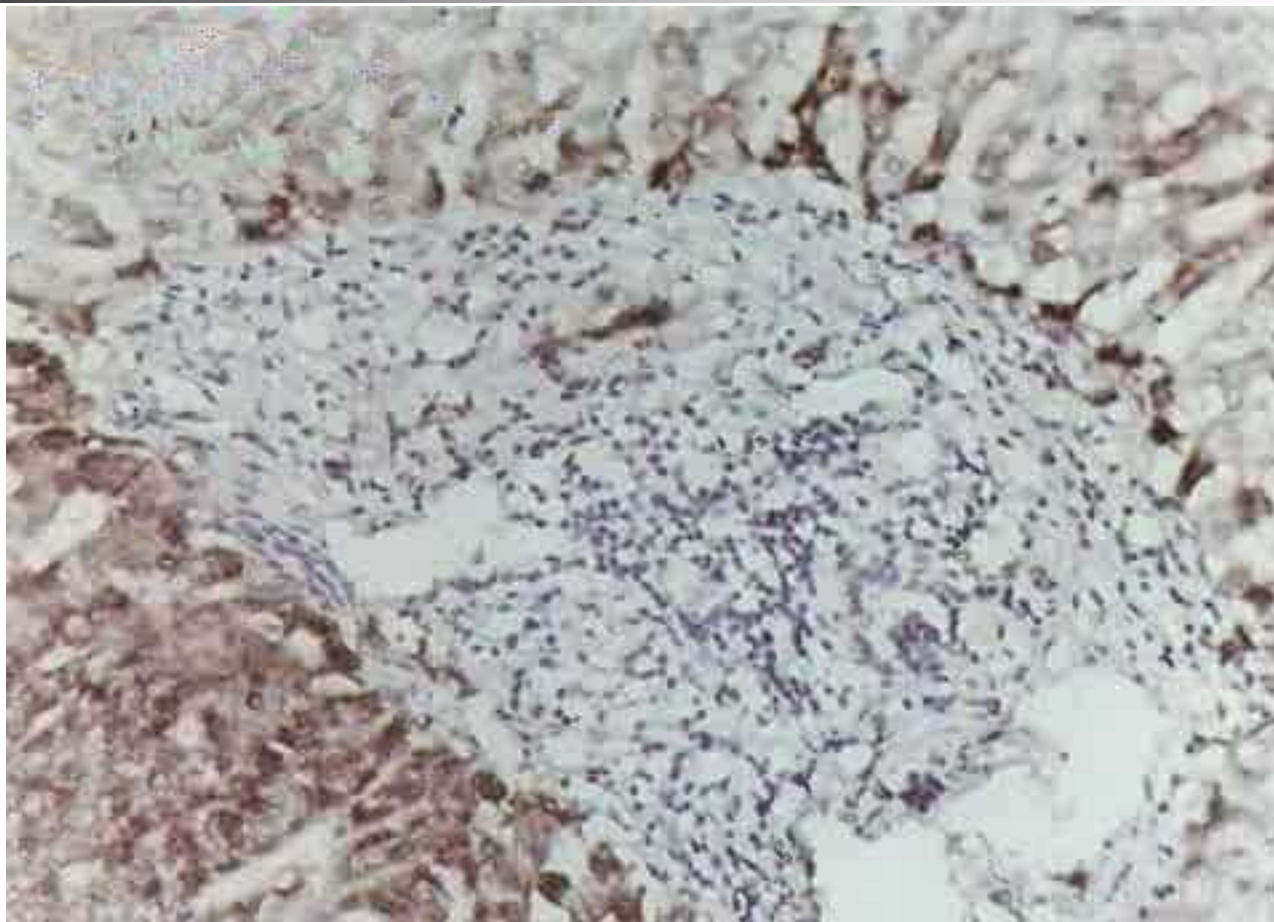


**HBsAg**



**HBeAg**

# HCV原位分子杂交



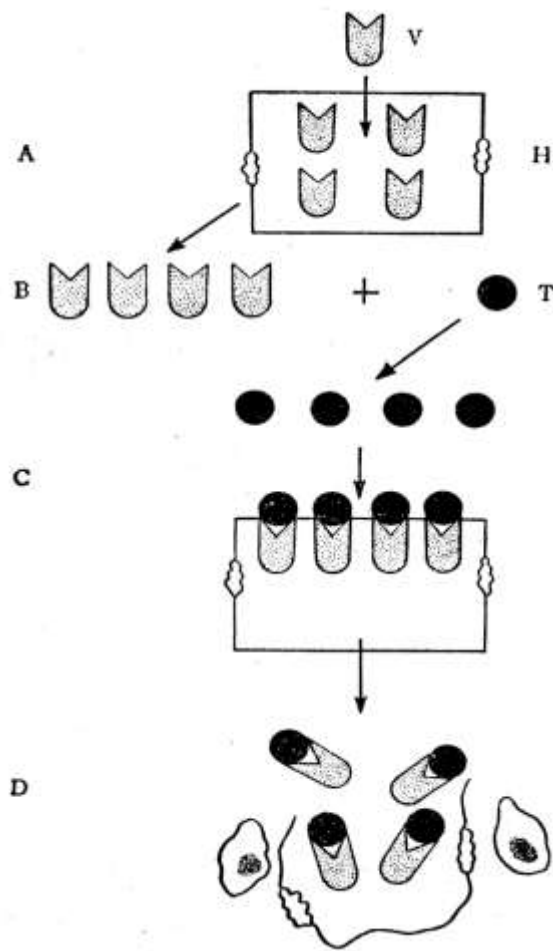


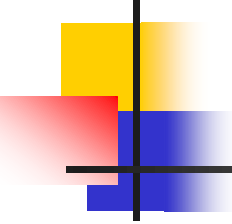
# 各型肝炎的临床特点

| 肝炎分型 | 潜伏期  | 转为慢性                        | 暴发性肝炎                           | 发生肝癌          |
|------|------|-----------------------------|---------------------------------|---------------|
| 甲型肝炎 | 2~6  | 无                           | 0.1 %~0.4%                      | 无             |
| 乙型肝炎 | 4~26 | 5%~10%                      | <1%                             | 有             |
| 丙型肝炎 | 2~26 | >50%                        | 极少                              | 有             |
| 丁型肝炎 | 4~7  | 共同感染<br><5%;<br>重叠感染<br>80% | 共同感染3%-<br>4%<br>重叠感染0.3-<br>3% | 有             |
| 戊型肝炎 | 2~8  | 无                           | 合并妊娠20%                         | 不详, 但可<br>能性小 |
| 庚型肝炎 | 不详   | 无                           | 无                               | 无             |

# 发病机制

- 尚不清楚。多种肝炎发病机制可能不同。
- **HBV**主要通过细胞免疫引起病变：
  - **HBV**在肝细胞表面表达部分抗原，致敏**T**细胞与肝细胞表面的抗原结合，发挥细胞毒作用，杀伤靶细胞，清除病毒，同时也损害了肝细胞。
- 甲、丁型肝炎病毒可能直接损害肝细胞。

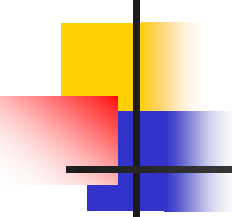




# 细胞免疫反应与**HBV**肝炎的关系

---

- 免疫反应正常→急性轻型（普通型）肝炎
- 免疫反应过强→重型肝炎
- 免疫功能低下→炎症慢性化
- 免疫功能缺陷/免疫耐受→病毒携带者



## (二) 基本病变

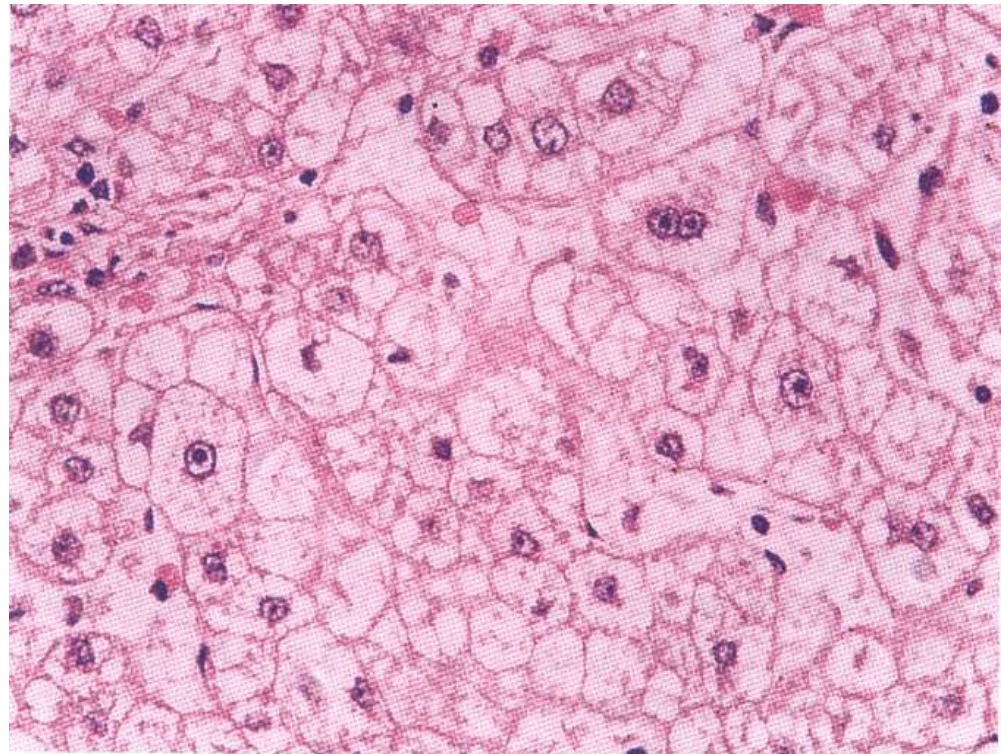
---

- 各型肝炎病变基本相同，都是以肝细胞的变性、坏死为主。
- 同时伴有不同程度的炎性细胞浸润、肝细胞再生和纤维组织增生。

# 1. 肝细胞变性

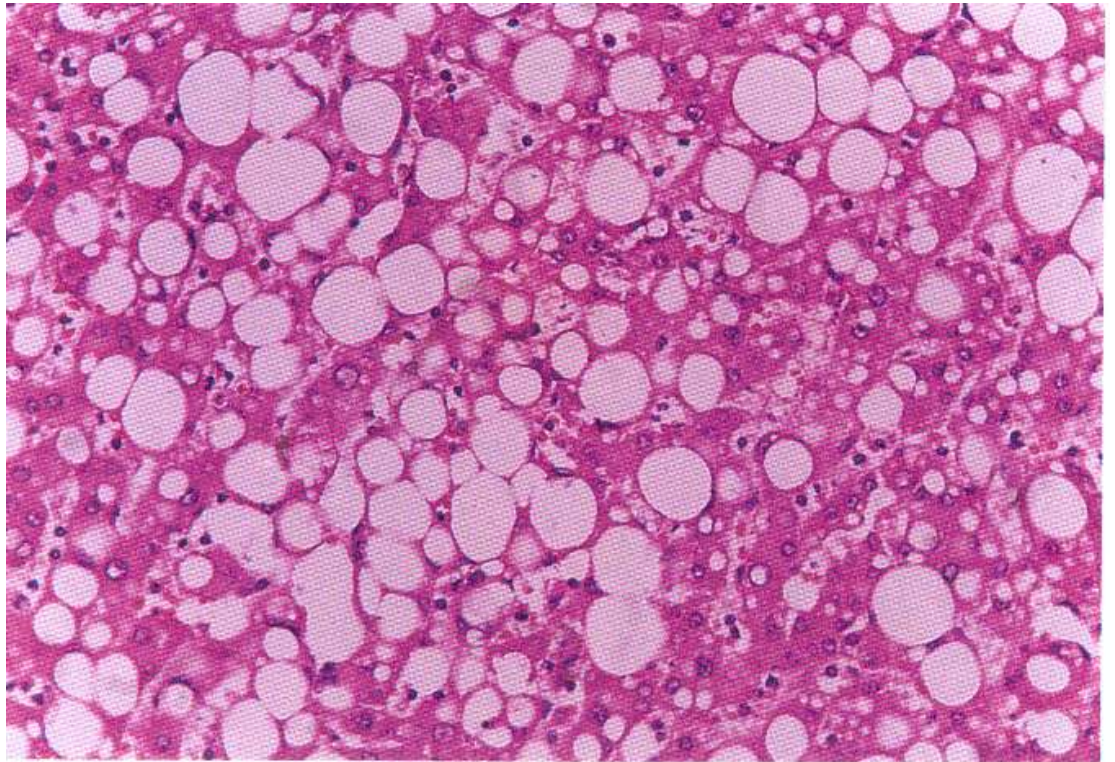
## (1) 胞浆疏松化、气球样变:

- 肝细胞受损，细胞水分增多。
- 肝细胞肿大，胞浆疏松呈网状、半透明，称**胞浆疏松化**。
- 进一步发展，肝细胞胀大呈球形，胞浆几完全透明，称为**气球样变** (ballooning degeneration)

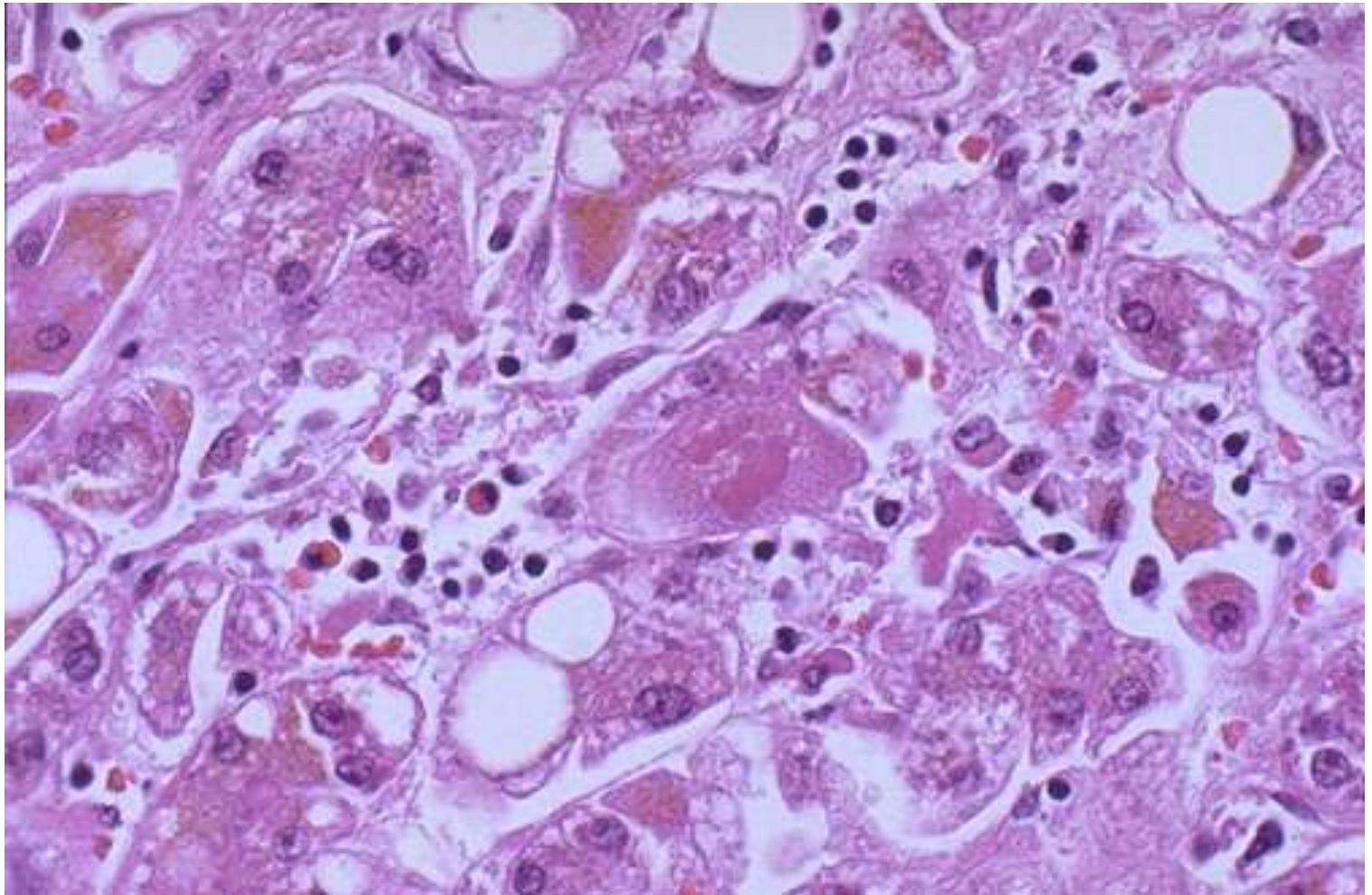


## (2) 脂肪变

- 常见于丙型肝炎，
- 可呈小泡性脂肪变性，也可能是大泡性脂肪变性

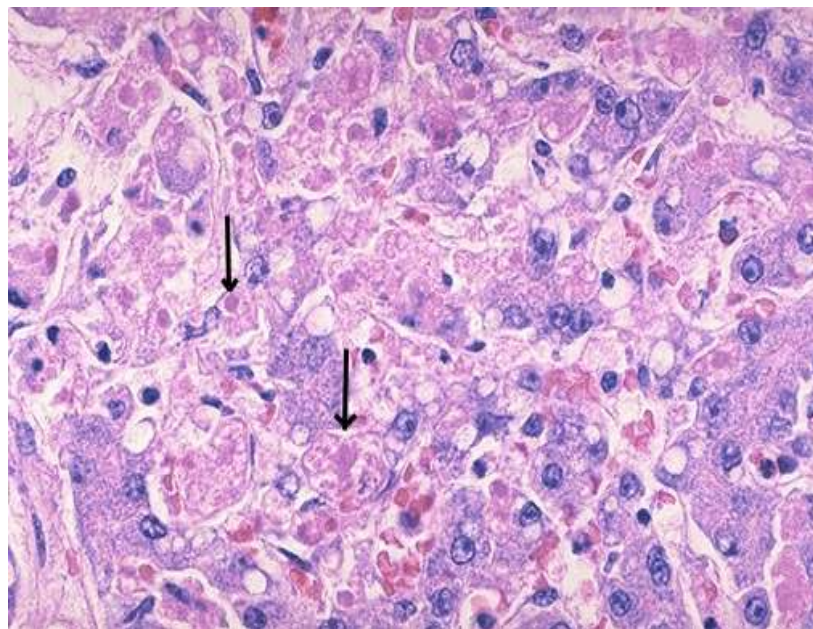
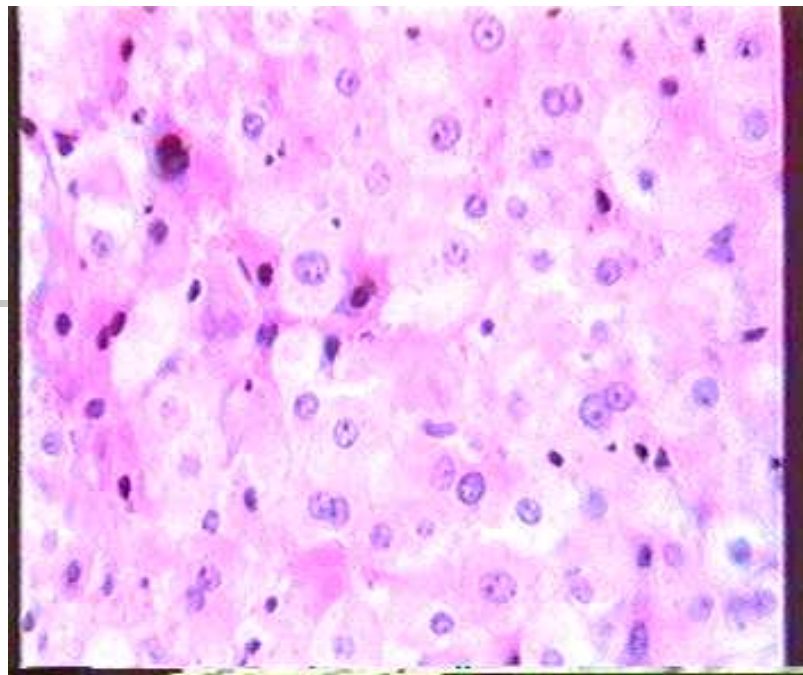


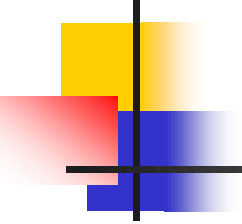
# 丙型肝炎



### (3) 嗜酸性变

- 嗜酸性变多累及单个或几个肝细胞，散在于小叶内。
- 肝细胞胞浆水分脱失浓缩，嗜酸性染色增强，胞浆颗粒性消失。
- 是细胞死亡的前期病变。



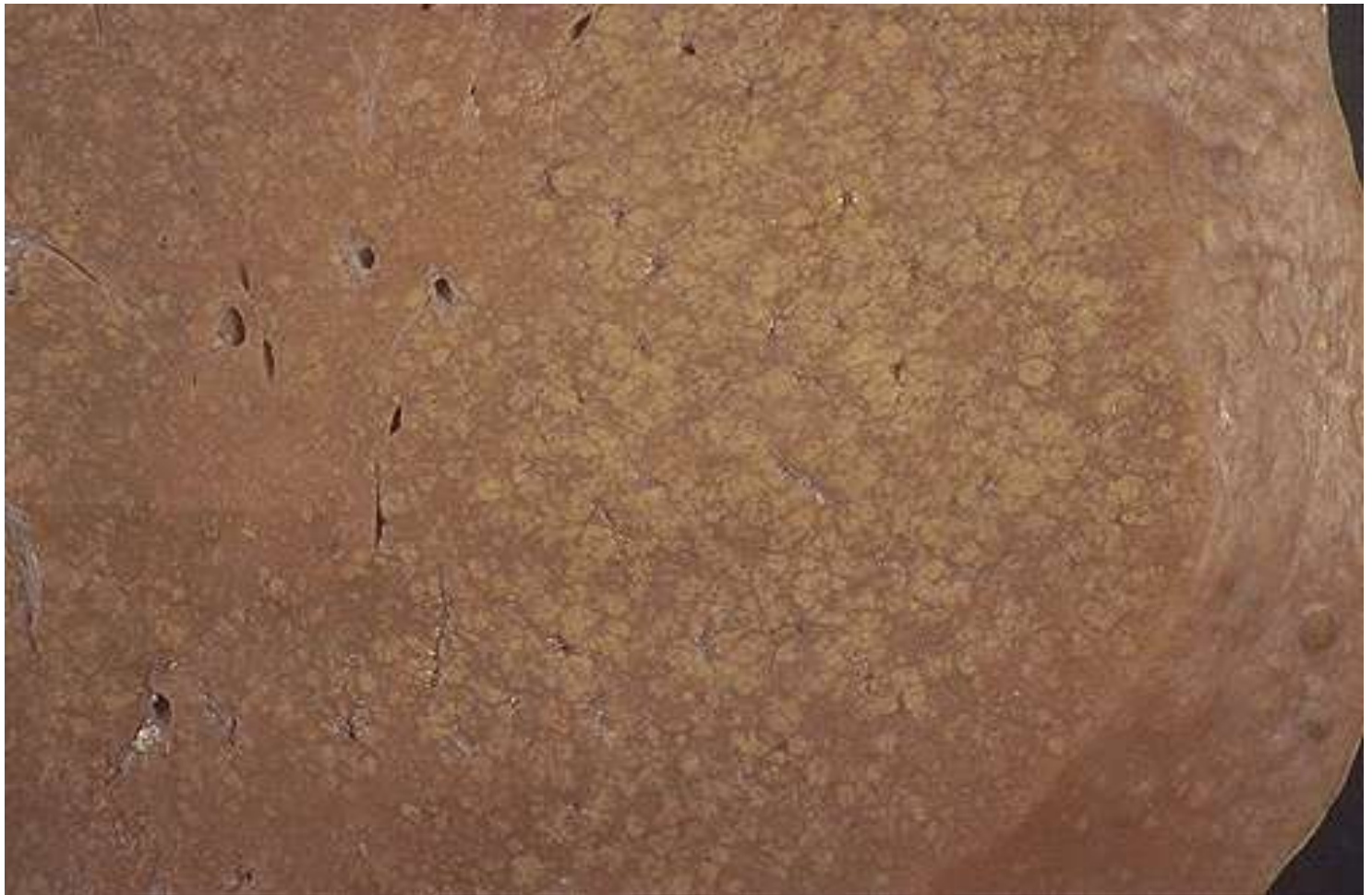


## 2. 肝细胞死亡

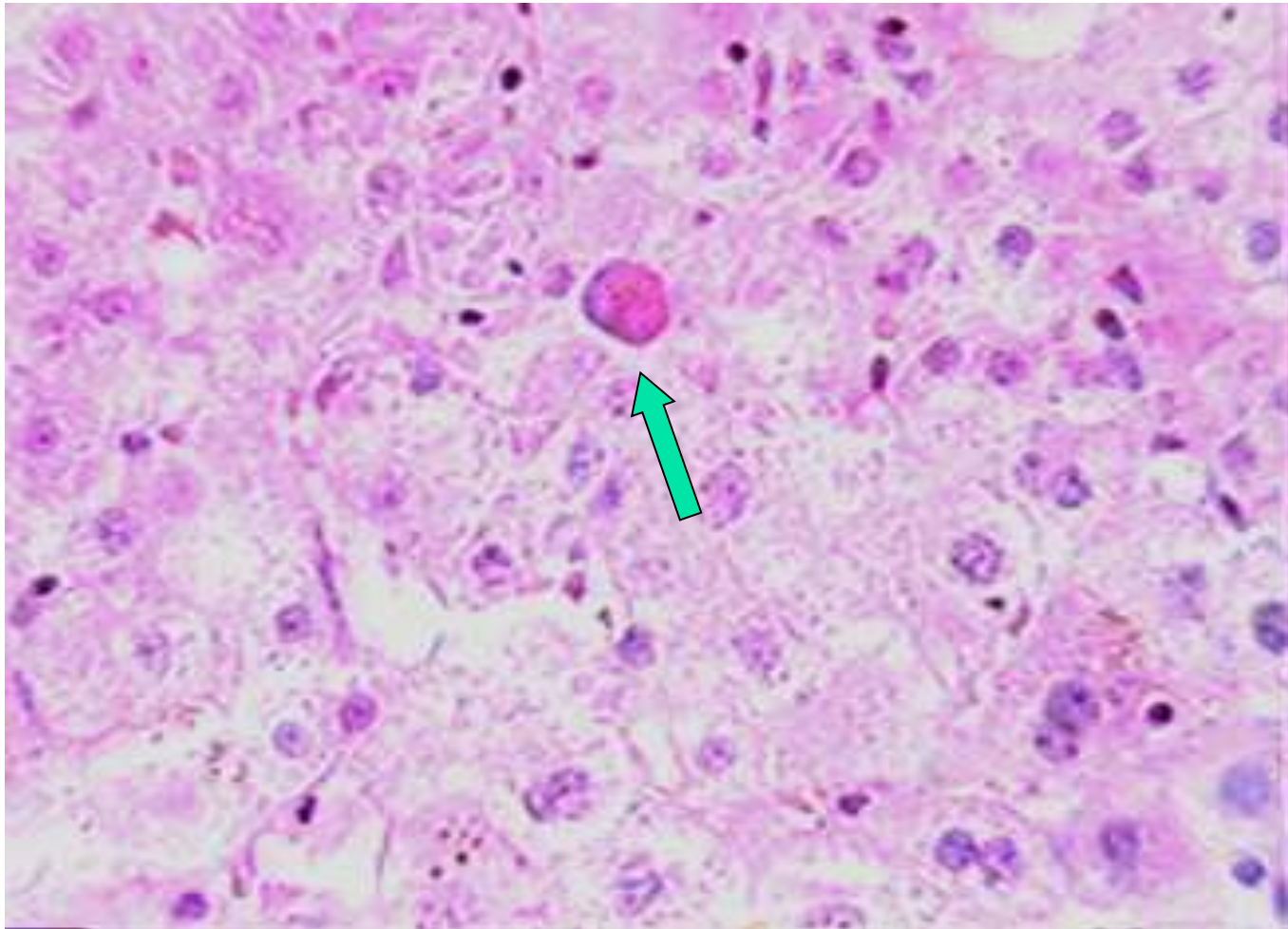
- 按死亡性质可分为两大类：
- **1) 溶解坏死 (lytic necrosis) :**
  - 最多见，常由高度气球样变发展而来；
  - 此时胞核固缩、溶解、消失，最后细胞解体。
- **2) 嗜酸性坏死 (acidophilic necrosis) :**

多由嗜酸性变进一步发展而来，胞浆更加浓缩之外，胞核也浓缩以至消失。最后剩下深红色均一浓染的圆形小体，即所谓**嗜酸性小体 (acidophilic body或Councilman body)**。为单个细胞死亡（细胞凋亡）。

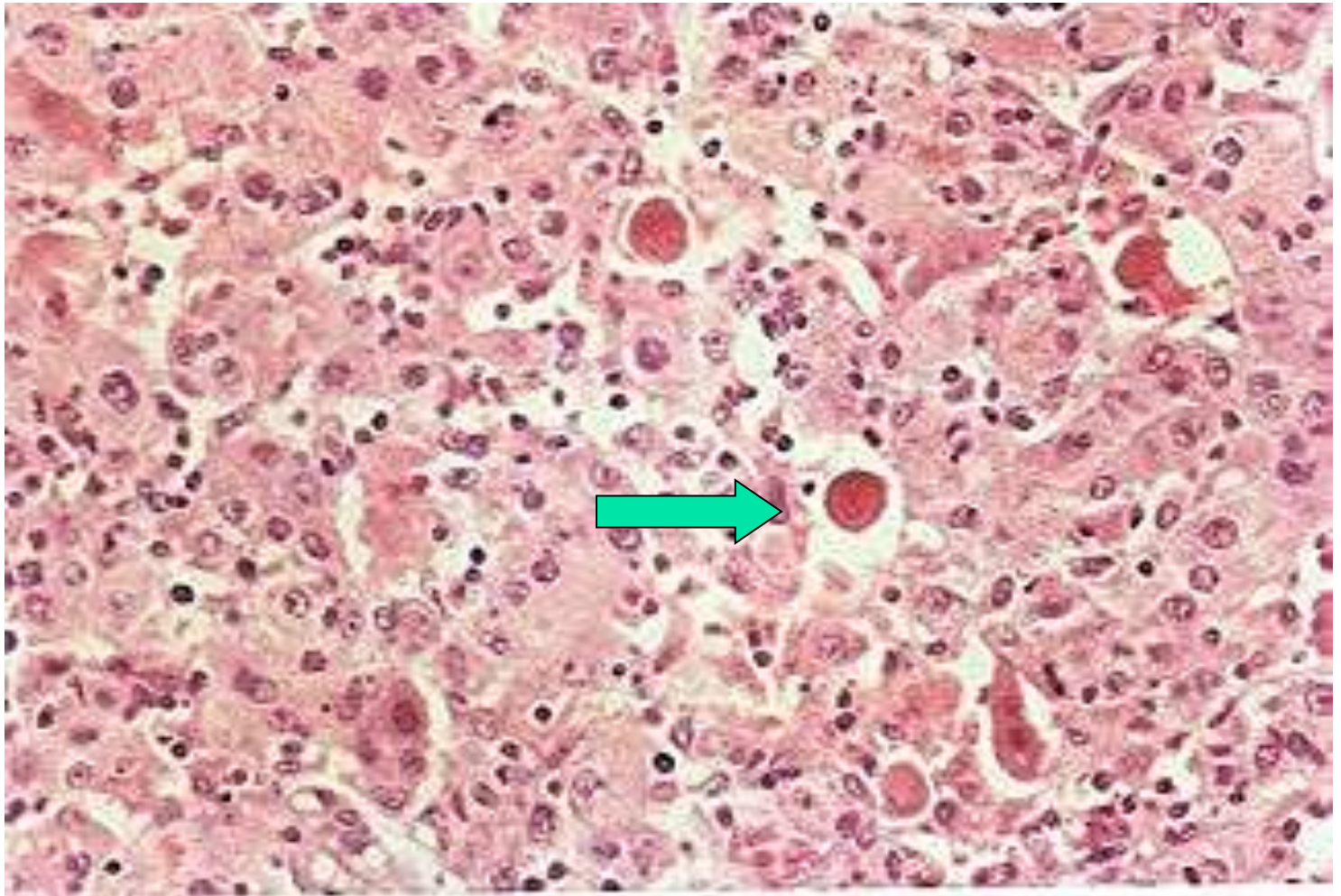
# 肝细胞坏死

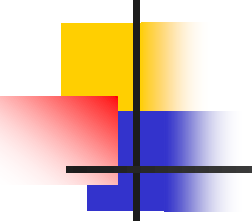


# 嗜酸性小体



# 嗜酸性小体

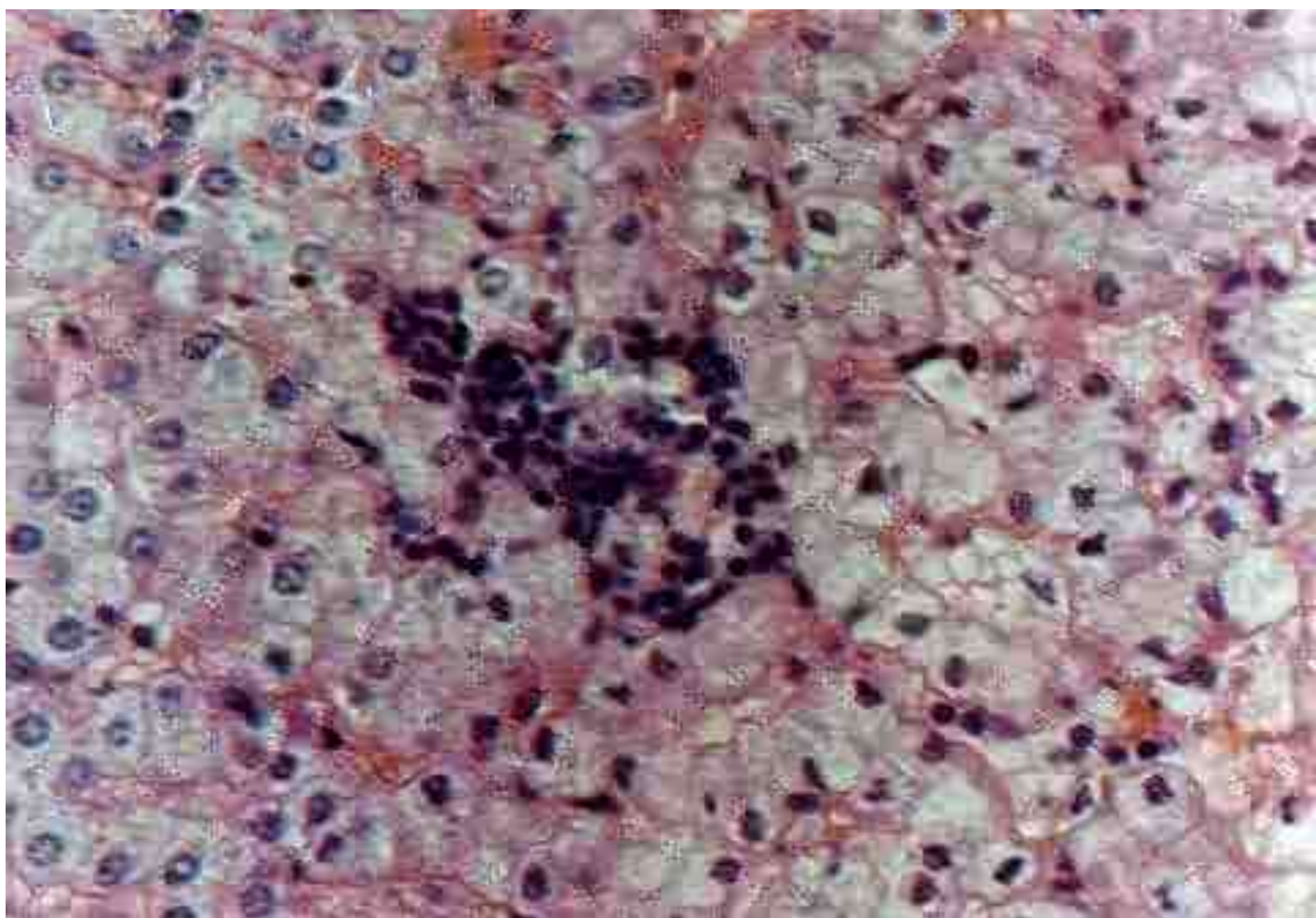




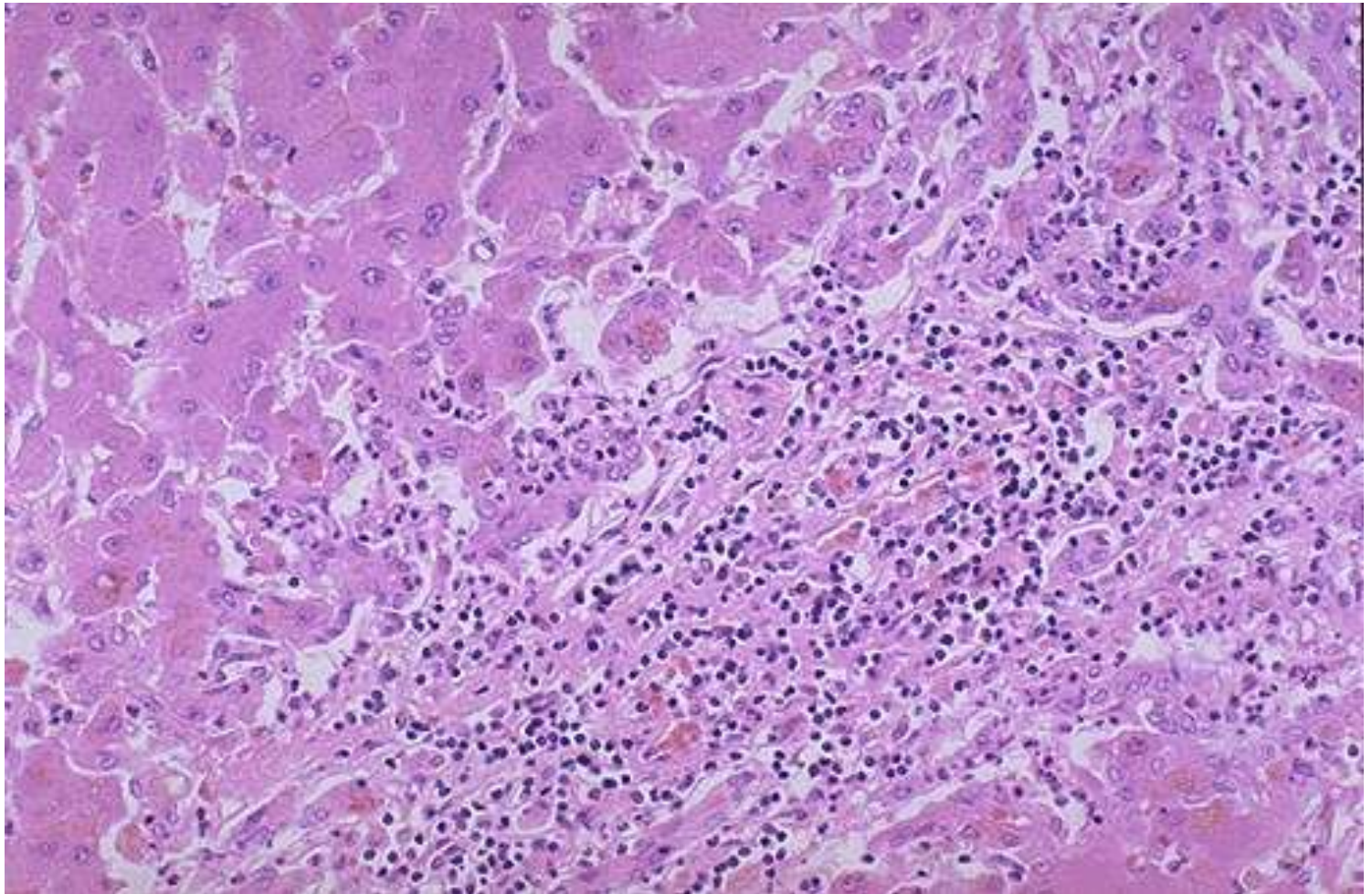
## 按细胞死亡的部位和范围可分为：

- **1) 点状坏死** 肝小叶内散在灶状肝细胞溶解坏死。每个坏死灶仅累及**1**至几个肝细胞。同时该处伴以炎性细胞浸润。
- **2) 碎片状坏死** 小叶周边肝细胞界板受到破坏，界板肝细胞呈灶状溶解坏死、崩解，呈虫蚀状，伴有炎性细胞浸润。
- **3) 桥接坏死** 小叶中央静脉与汇管区之间或两个中央静脉之间出现肝细胞溶解坏死带。
- **4) 亚大块坏死** 累及几个肝小叶的大部分或全部的融合性溶解坏死。
- **5) 大块坏死** 大部分肝脏的大片融合性溶解坏死。

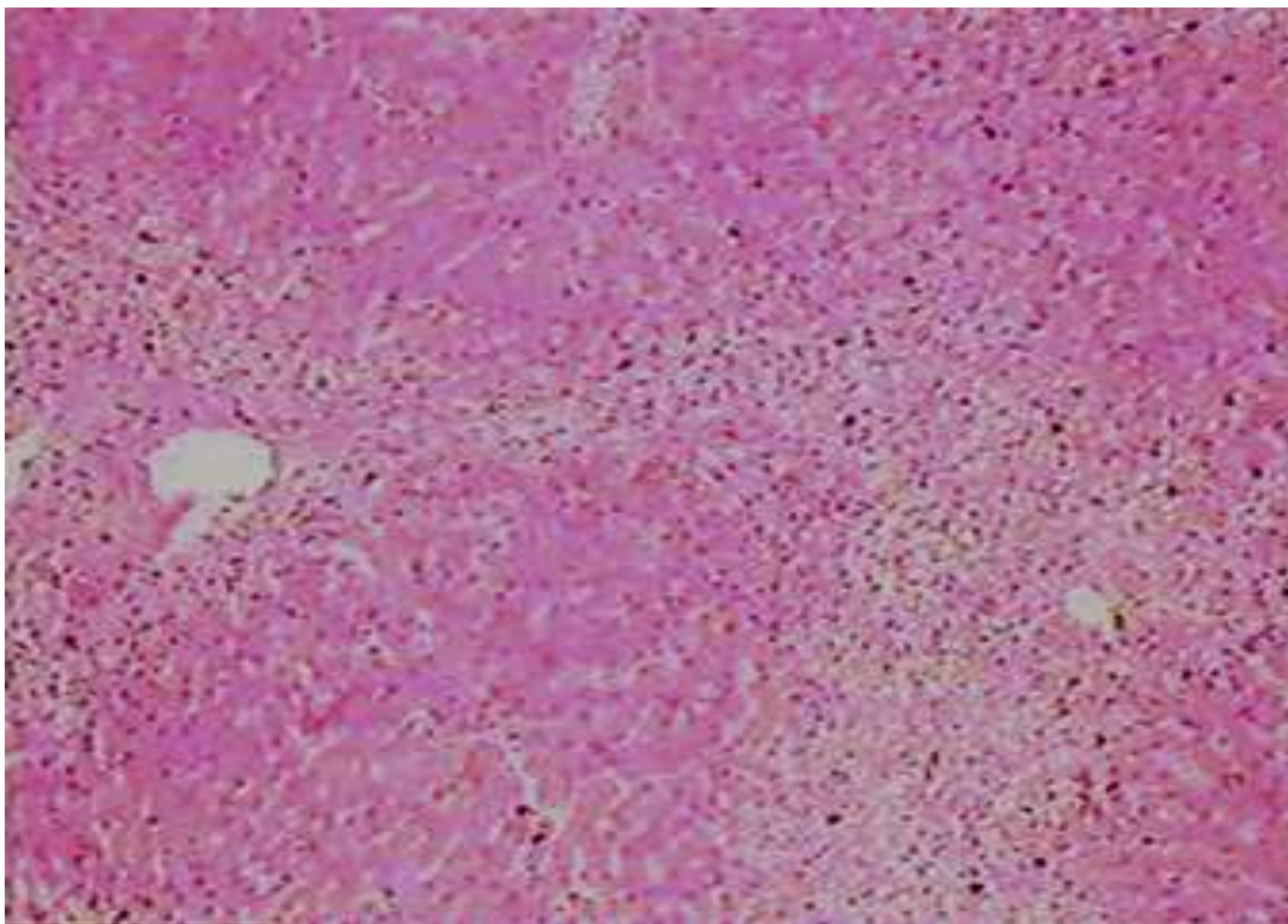
# 点状坏死



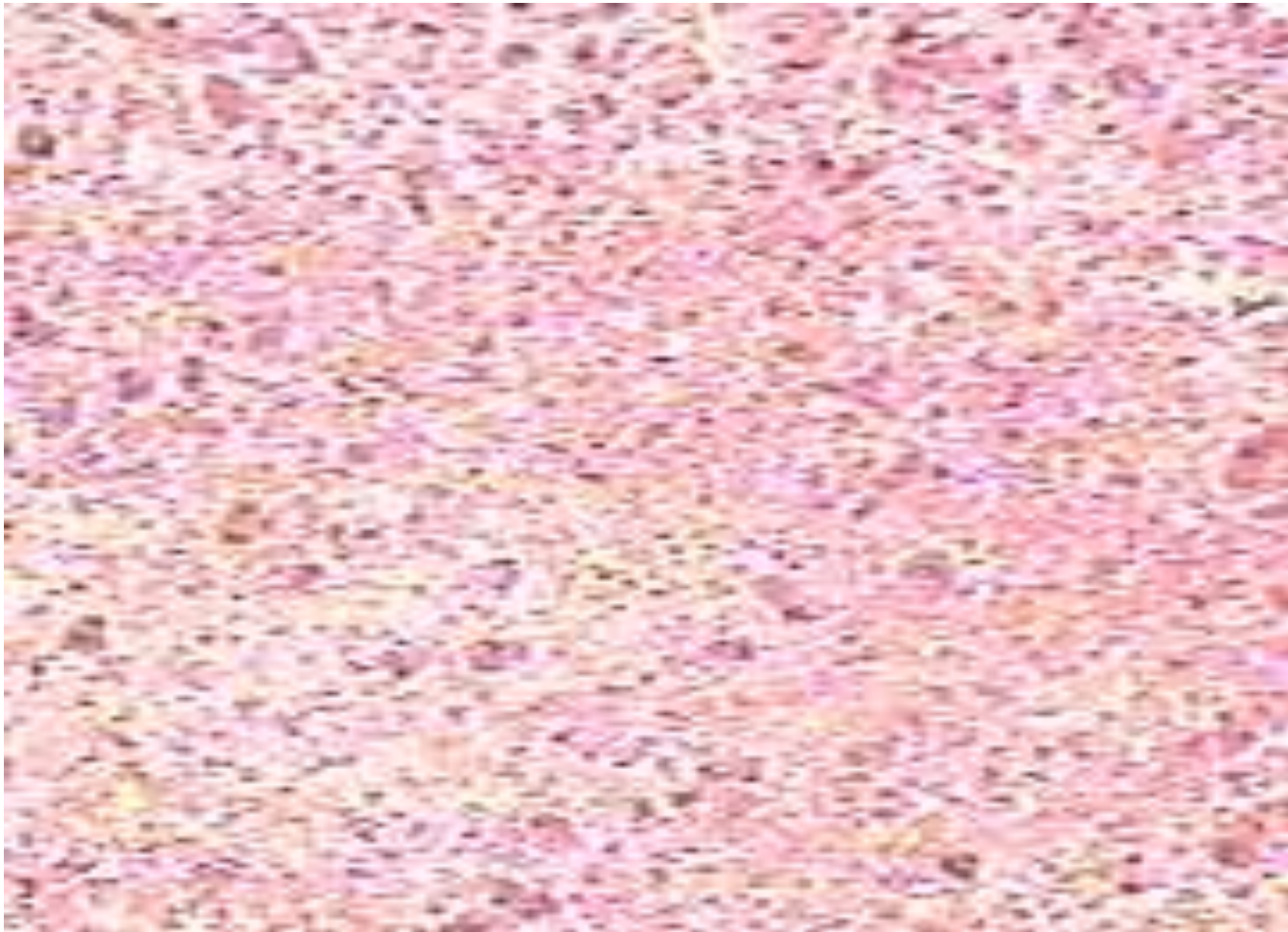
# 碎片状坏死

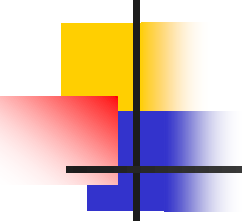


# 桥接坏死



# 大块坏死

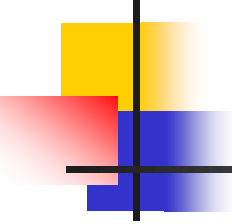




### 3. 炎细胞浸润

---

- 肝炎时在汇管区或肝小叶内常有程度不等的炎性细胞浸润。
- 浸润的炎细胞主要是：
  - 淋巴细胞
  - 单核细胞
  - 有时也见少量浆细胞及中性粒细胞等。



## 4. 间质反应性增生及肝细胞再生

- **Kupffer细胞增生肥大**

是肝内单核吞噬细胞系统的炎症反应。增生的细胞呈梭形或多角形，胞浆丰富，突出于窦壁或自壁上脱入窦内成为游走的吞噬细胞。

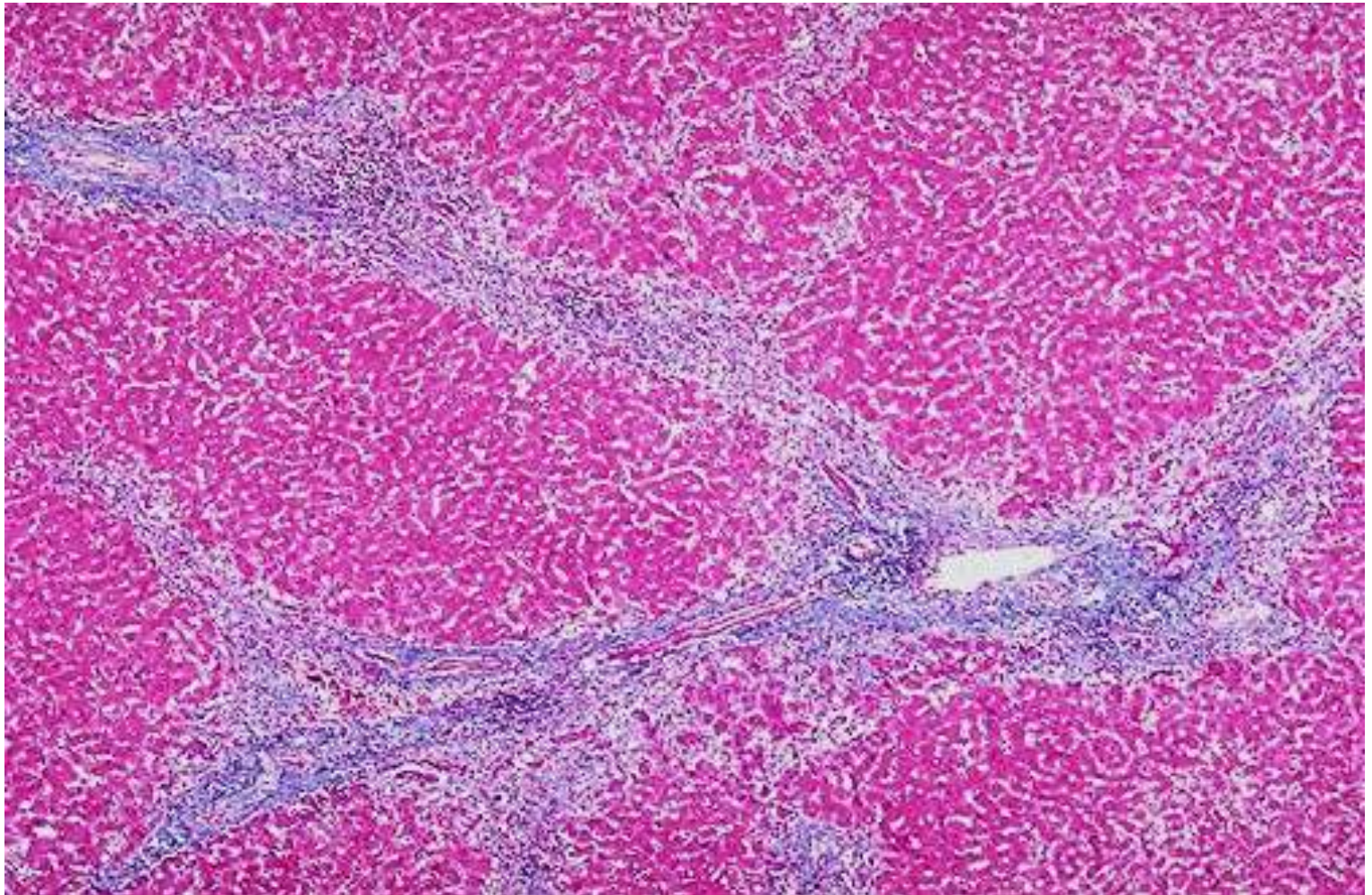
- **肝星状细胞 (*hepatic stellate cell, Ito cell*) 增生**

为间叶细胞来源，散在于**Disse**腔内，肝炎时可演化为成肌纤维细胞样细胞，合成胶原，长期大量纤维组织增生可发展成肝纤维化及肝硬化。

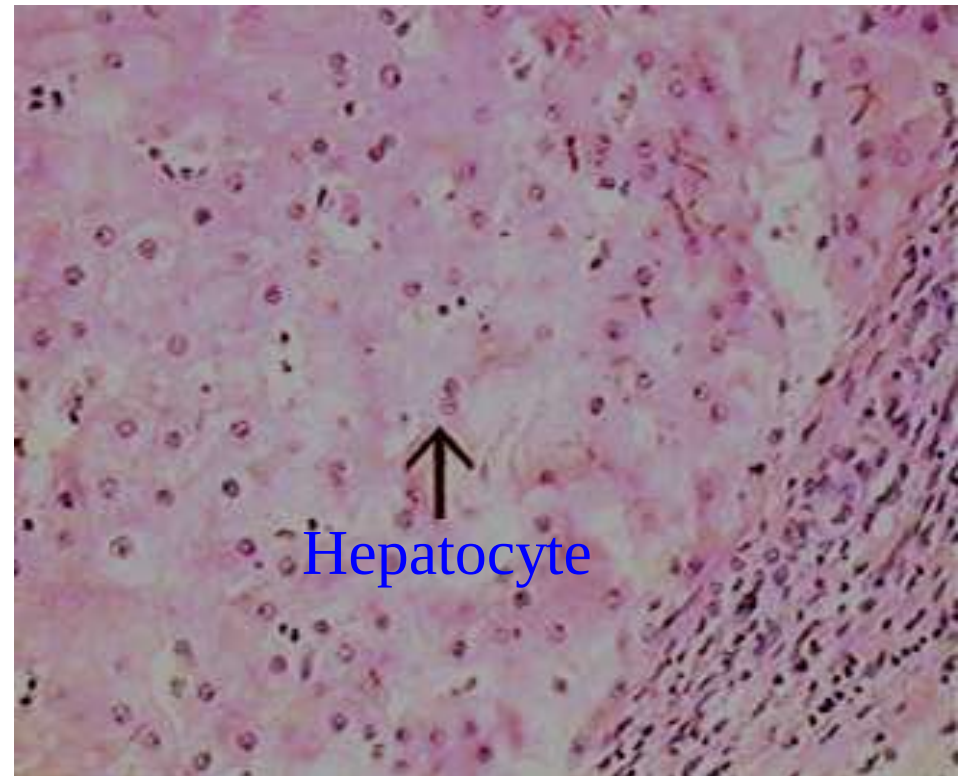
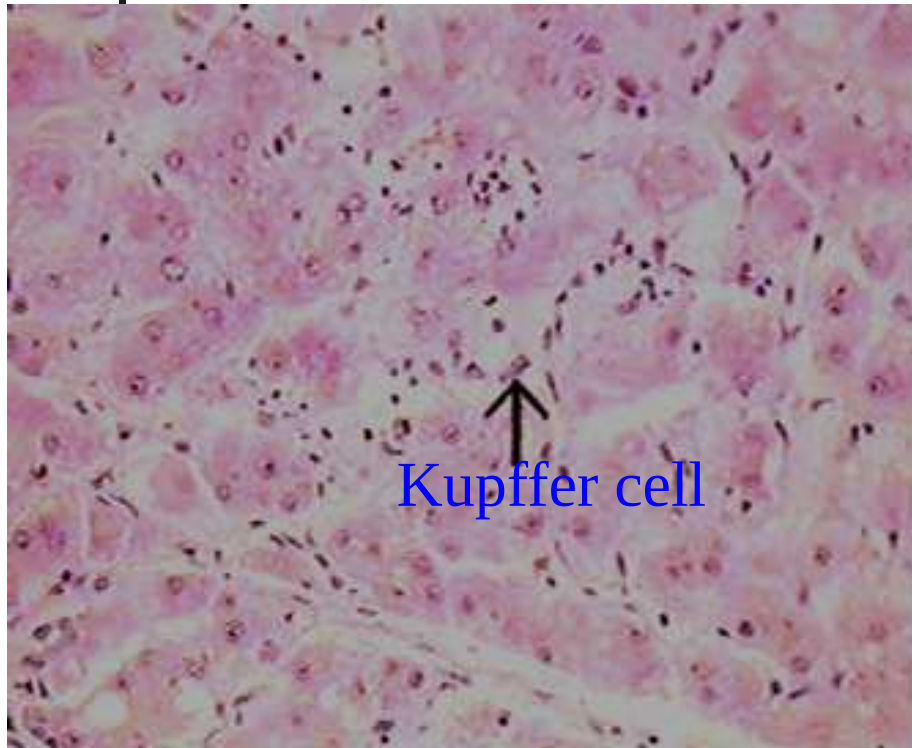
- **肝细胞再生**

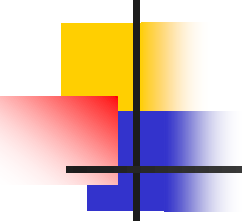
肝细胞坏死时，邻近的肝细胞可通过直接或间接分裂而再生修复。在肝炎恢复期或慢性阶段则更为明显。再生的肝细胞体积较大，核大而染色较深，有的可有双核。慢性病例在汇管区尚可见细小胆管的增生。

# 肝纤维化



# 细胞增生与再生

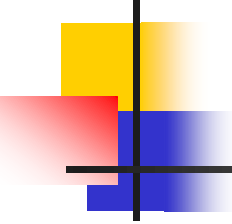




## （三）临床病理类型

---

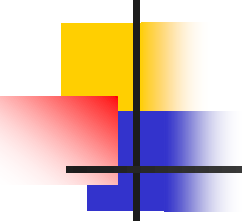
- 各型肝炎病毒引起的肝炎其临床表现和病理变化基本相同。
- 现在常用的分类是，在甲、乙、丙、丁、戊、庚**6**型病毒病因分类之外，把病毒性肝炎从临床病理角度分为**普通型**及**重型**两大类。
- 在**普通型**中分为**急性**及**慢性**两类。
- **急性**有急性无黄疸型及黄疸型；
- **慢性**有轻、中、重三类。
- **重型**中又分为**急性**及**亚急性**两种。



# 1. 急性（普通型）肝炎

---

- 最常见。
- 临床上又分为**黄疸型**和**无黄疸型**二种。
  - 我国以无黄疸型肝炎居多，其中多为乙型肝炎。
  - 黄疸型肝炎的病变略重，病程较短，多见于甲型、丁型、戊型肝炎。
  - 两者病变基本相同。

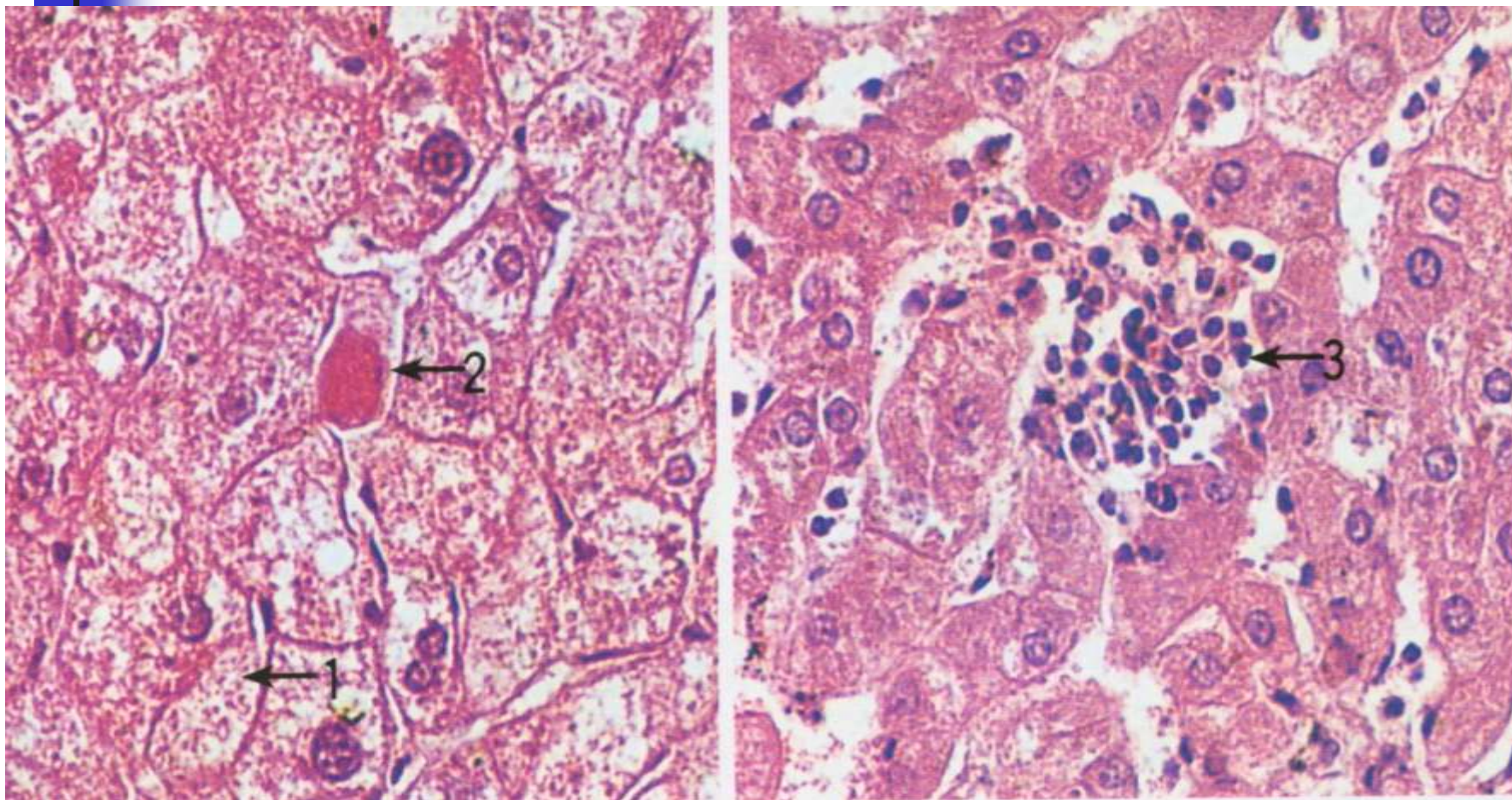


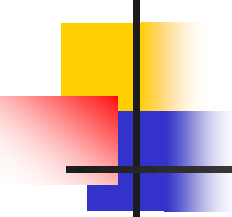
# 病理变化

---

- 广泛的肝细胞变性，以胞浆疏松化和气球样变最为普遍。
- 坏死轻微，肝小叶内可有散在的点状坏死。嗜酸性小体的出现并非经常。
- 由于点状坏死灶内的肝细胞索网状纤维支架保持完整而不塌陷，所以该处通过再生的肝细胞可完全恢复原来的结构和功能。
- 汇管区及肝小叶内也有轻度的炎性细胞浸润。
- 黄疸型者坏死灶稍多、稍重，毛细胆管管腔中有胆栓形成。

# 急性（普通型）肝炎





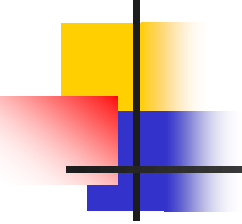
# 临床病理联系

---

- **肝大、肝区疼痛或压痛：**肝细胞弥漫地变性肿胀，使肝体积增大，被膜紧张所致。
- **血清谷丙转氨酶（SGPT）等升高：**肝细胞坏死，释出细胞内的酶类入血。同时还可引起多种肝功能异常。
- **黄疸：**肝细胞坏死较多时，胆红质的摄取、结合和分泌发生障碍，加之毛细胆管受压或有胆栓形成等则可引起黄疸。

# 黄疸





# 结局

---

- 急性肝炎大多在半年内可逐渐恢复。
- 点状坏死的肝细胞可完全再生修复。
- 一部分病例（多为乙型、丙型肝炎）恢复较慢，需半年到一年，
- 少数病例可发展为慢性（乙型肝炎**5-10%**、丙型肝炎**50%**）。
- 极少数可恶化为重型肝炎。