

赭曲霉毒素 A 中毒鸡肝脏超微结构的观察

THE OBSERVATION OF MICROSTRUCTURE IN LIVER OF POISON CHICKEN WITH OCHRATOXIN A

郭延奎 牛钟相 孙蕙兰

(山东农业大学)

Guo Yankui Niu Zhongxiang Sun Huilan

(Shandong Agricultural University)

摘要 用 OA 中毒鸡肝脏进行超薄切片,然后电镜观察其超微结构,发现:肝细胞核膜增厚,线粒体肿胀溶解,内质网减少,胞浆内有大量异物及自吞噬泡,肝糖原积聚,肝细胞溶解。说明 OA 中毒能阻止蛋白质合成,抑制肝糖原的分解,它是一种肝脏毒。还发现,星状细胞毒害严重而溶解,其数量显著减少,证实了 OA 中毒首先毒害星状细胞。

关键词 赭曲霉毒素 A; 超微结构; 肝脏毒

Key words Ochratoxin A; Microstructure; Toxin for liver

赭曲霉毒素 A (Ochratoxin. A, 简称 OA) 是饲料中污染了赭曲霉菌,赭曲霉菌在饲料中繁殖生长产生的一种有毒代谢产物,动物食入含有 OA 污染的饲料会中毒发病。OA 中毒动物肝脏的超微结构,目前国内外还未见报道。为了更详细地探讨 OA 对动物的毒性及 OA 的致病机理,我们对 OA 中毒鸡肝脏的超微结构进行了观察。

1 材料和方法

1.1 材料和仪器

1.1.1 试验用鸡 30 日龄星波罗肉鸡,购自泰安市凤台肉鸡场

1.1.2 试验用毒素 山东农业大学提取

1.1.3 Reichert Histo STAT 冰冻切片机

1.1.4 JEM-1200EX 透射电子显微镜

1.2 方法

1.2.1 把试验用鸡随机分成两组饲喂,第一组饲喂含有 4.76 $\mu\text{g}/\text{kg}$ 赭曲霉毒素 A 的配合饲料,第二组饲喂正常的配合饲料作为对照。每只每天按 100 g 饲喂,十天后剖检第一组未死亡的中毒鸡,在肝脏的同一部位取组织两份,一份放入 4% 戊二醛中固定,另一份取鲜样进行荧光测定。剖检第二组健康鸡,同样取两份肝组织做为阴性对照。

1.2.2 鲜样使用冰冻切片机切片(厚 10~15 nm)。用荧光抗体技术对鸡肝脏进行赭曲霉毒素 A 残留检测,发现中毒鸡肝细胞浆内和肝脏组织间隙有黄绿色荧光。健康鸡肝脏组织中无荧光。荧光检测后再进行电镜制样。

1.2.3 取用戊二醛固定后的材料,再用 1% 锇酸后固定,乙醇脱水,Epont 812 树脂包埋,LKB 超薄切片机切片,醋酸双氧铀和柠檬酸铅双染色,透射电镜观察照像。

2 观察结果

2.1 中毒鸡肝脏超微结构的变化

肝小叶大小不一, 小叶间结缔组织增厚。肝细胞的核膜增厚。线粒体肿胀, 内部嵴不清晰, 有的嵴断裂溶解, 线粒体也发生溶解。内质网显著减少。胞浆内出现大量集结的糖原颗粒, 还有许多大小不等的异物, 此异物多为球型, 电子密度低, 周边有膜包围。肝细胞内大量自吞噬泡出现, 次级溶酶体增多, 有的肝细胞已被完全溶解, 见图版 1, 2, 3, 4。还发现肝窦内星状细胞显著减少, 有的星状细胞内有均质异物, 星状细胞中可见次级溶酶体出现, 大多数星状细胞染色变浅, 胞浆内细胞器消失, 细胞核溶解, 星状细胞溶解, 并见有星状细胞溶解后的残体, 见图版 5。又发现, 肝细胞与基底膜附近有白色小点和白色纤维状物质产生, 肝细胞紊乱。肝窦内有大量红细胞, 也可看到 B 淋巴细胞。有的 B 淋巴细胞中有明亮的小点。肝组织中, 内皮细胞显著增生, 填充于肝窦之中, 使肝窦空间变小, 肝细胞的微绒毛减少。肝细胞与肝细胞之间的间隙变小。

2.2 健康鸡肝脏超微结构

肝小叶大小相近, 小叶间结缔组织薄; 肝细胞整齐, 肝窦大, 肝细胞微绒毛伸向肝窦; 肝窦内有多量星状细胞, 星状细胞核大深染, 其内有溶酶体。肝细胞中, 核膜薄, 线粒体完整, 嵴清晰; 线粒体周围有内质网缠绕; 胞浆中有少量糖原颗粒, 见图版 6。

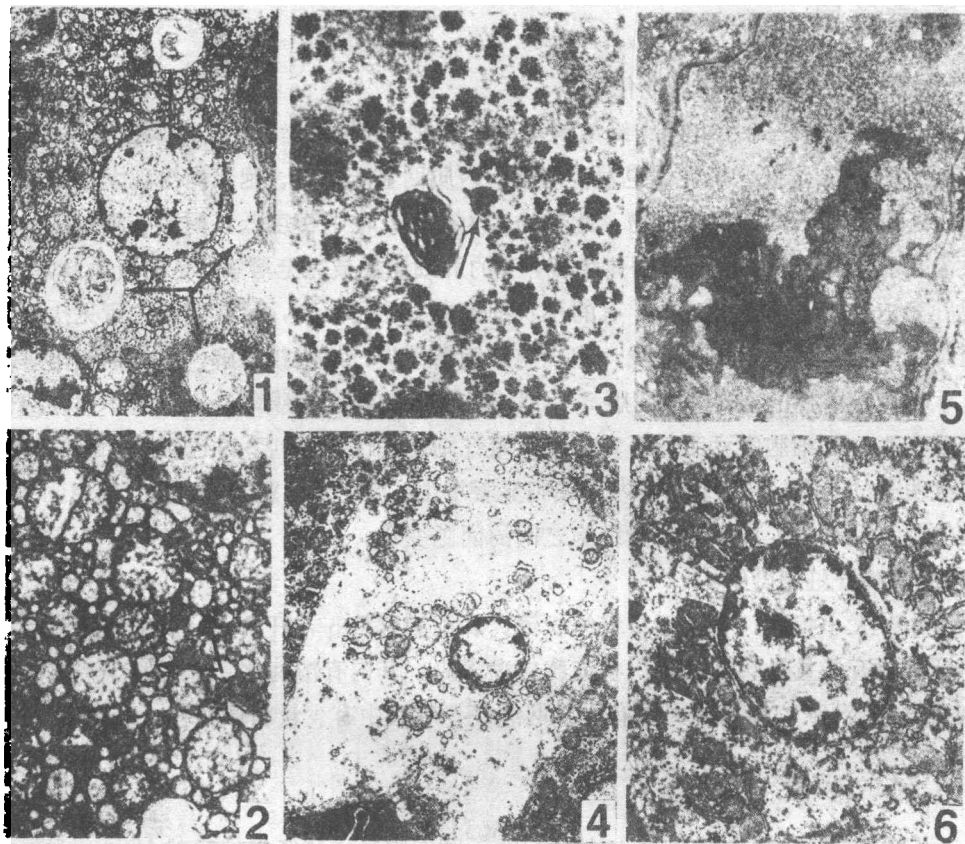
3 小结与讨论

3.1 荧光检测得知赭曲霉毒素 A 大量存在于肝细胞浆内和肝组织间隙内。OA 中毒鸡的肝细胞, 核膜增厚是肝细胞核与胞浆交换减少, 防止毒素进入细胞核有关, 这与荧光检测结果相一致。肝细胞中线粒体肿胀, 溶解, 内质网减少, 都说明蛋白质的合成受阻; 肝糖原积聚, 说明糖原代谢障碍。这一结果与前人报道的 OA 阻止蛋白质合成, 引起糖代谢异常相一致。肝细胞内异物由膜包围是肝细胞对有毒物质侵害的一种反应, 肝细胞把有毒物质控制在一定范围内尽量减少对细胞的毒害, 这与光镜观察的肝细胞发生水泡变性、脂肪变性相一致。肝细胞内次级溶酶体增多, 是肝细胞中初级溶酶体同异物发生反应而产生的, 同样对肝的解毒有一定的关系。

3.2 肝细胞内星状细胞明显减少, 未见前人报道, 这可能与 OA 侵害肝组织后, 星状细胞首先吞噬了有毒物质, 大量有毒物质在星状细胞内积聚, 造成星状细胞中毒, 星状细胞在降解毒素的过程中, 溶酶体的膜破裂, 而使星状细胞溶解。由此可见, OA 首先毒害星状细胞; 星状细胞在 OA 中毒过程中, 对肝脏起着积极的保护作用。

3.3 肝组织内皮细胞增生, 目的是取代坏死肝细胞的空间。内皮细胞填充于肝窦之中, 肝窦空间减少; 肝细胞与肝细胞之间的间隙减小; 肝细胞的微绒毛减少; 造成肝细胞与周围物质的交换减少, 这些现象的出现与 OA 毒素的毒害作用有直接关系, 当然还可能与肝组织中毒后自我保护有关。正是这一原因更加快了肝细胞发生变性溶解。电镜下还观察到肝窦内出现一些 B 淋巴细胞, 这一现象原因不详, 还待进一步研究。

综上所述, 证明 OA 不仅是一种肾脏毒, 也是一种肝脏毒。本研究对 OA 致病机理的探讨和分析提供了依据。



- 图版 1 OA中毒肝细胞中有许多自吞噬泡(箭头所示),放大2 500 $\times$ 。
- 2 OA中毒肝细胞中,线粒体嵴溶解消失,还可看到异物小泡(箭头所示),放大7 500 $\times$ 。
- 3 OA中毒肝细胞中有大量的肝糖原颗粒集结(箭头所示),放大20 000 $\times$ 。
- 4 OA中毒后已发生溶解的肝细胞,放大2 000 $\times$ 。
- 5 OA中毒后星状细胞溶解的残体,放大5 000 $\times$ 。
- 6 正常鸡肝细胞的超微结构,放大5 000 $\times$ 。