

肝纤维化发生发展过程中肝温度的变化规律

江涛, 吕少文, 张诗武, 李红, 庞奕辉, 何文彤

江涛, 吕少文, 李红, 庞奕辉, 何文彤, 武警医学院组胚教研室 天津市 300162
张诗武, 武警医学院病理学教研室 天津市 300162
江涛, 男, 1972-10-31 生, 安徽省和县人, 汉族, 2001 年北京中医药大学硕士
研究生毕业, 讲师, 主要从事肝纤维化的基础与临床研究。
中国人民武装警察部队科研基金资助项目, No. WKH 2002-2
项目负责人: 江涛, 300162, 天津市程林庄路, 天津武警医学院组胚教研室,
jt72@eyou.com
电话: 022-60578072
收稿日期: 2004-06-24 接受日期: 2004-07-22

Alterations of liver temperature during hepatic fibrosis

Tao Jiang, Shao-Wen Lv, Shi-Wu Zhang, Hong Li, Yi-Hui Pang, Wen-Tong He

Tao Jiang, Shao-Wen Lv, Hong Li, Yi-Hui Pang, Wen-Tong He, Department of Histology and Embryology, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China
Shi-Wu Zhang, Department of Pathology, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China
Supported by the Scientific Foundation of Chinese People's Armed Police Forces, No. WKH 2002-2
Correspondence to: Tao Jiang, Department of Histology and Embryology, Medical College of Chinese People's Armed Police Forces, Tianjin 300162, China. jt72@eyou.com
Received: 2004-06-24 Accepted: 2004-07-22

Abstract

AIM: To investigate the alterations of liver temperature during hepatic fibrosis in rats induced by CCl₄.

METHODS: Liver fibrosis was induced in rats after administration of CCl₄ twice a week for 8 weeks. The rat liver temperature in 2-, 4-, 6- and 8- wk models and control group rat was detected by computer-assisted infrared thermographic technology. To observe the histological change, the liver tissue microarray in every group of animals was stained by hematoxylin and eosin. Sirius red stain and polarization microscopy method was used for I and III collagen expression. Immunohistochemistry was used for detection of laminin to outline the formation of basement membrane on hepatic sinusoids.

RESULTS: The average infrared images temperature of hepatic fibrosis in rats induced by CCl₄ changed with the time of the model made. In 2-wk model group, the infrared image temperature of right liver lobe was 28.6±1.1 °C, compared with 2-wk control group ($P < 0.05$, $t = -2.518$). The temperature of 4-wk model group was 27.2±1.0 °C. In 6-wk model group, the temperature was 30.1±1.2 °C, compared with 6 wk control group ($P < 0.05$, $t = 3.773$). The temperature of 8-wk model group was 27.4±1.0 °C, compared with 8 wk control group ($P < 0.01$, $t = 4.998$). The histological changes of liver tissue were inflammation and hepatocytic degeneration and necrosis in 2-wk model group. There was a significant increase of extracellular

matrix among the necrotic hepatocytes in 4-wk model group. In 6-wk model group liver tissue showed the numbers of necrotic hepatocytes increased significantly and the septa formed around central vein and portal area. In 8 wk model group, there were wide septa expansions from the portal area to the central venous and pseudo-nodular formation. Sirius red and immunohistochemical stains showed collagen types I, III and laminin expression in liver tissues increased gradually in 2-, 4-, 6-, 8- wk model group. Collagen type III was the main collagen in 2- and 4-wk model groups. Collagen type I was the main collagen in 6- and 8-wk model groups.

CONCLUSION: The liver temperature changes regularly with hepatic tissue pathology in course of rat hepatic fibrosis induced by CCl₄.

Jiang T, Lv SW, Zhang SW, Li H, Pang YH, He WT. Alterations of liver temperature during hepatic fibrosis. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2004; 12(9):2111-2114

摘要

目的: 研究肝纤维化发生、发展过程中肝温度变化的规律。

方法: 采用医用红外热像技术检测造模 2, 4, 6, 8 wk CCl₄ 肝纤维化大鼠模型及对照组大鼠肝脏温度, 肝组织芯片行苏木素-伊红、天狼猩红及免疫组织化学染色, 观察肝组织病理变化, I, III 型胶原及层粘蛋白的表达。

结果: 正常大鼠肝右叶 2, 4, 6, 8 wk 平均温度为 28.1±1.0 °C, 27.2±0.8 °C, 30.7±1.0 °C, 29.1±0.7 °C。肝纤维化大鼠模型组 2 wk 肝平均温度较对照组明显升高 ($P < 0.05$, $t = -2.518$); 模型组 4 wk 与对照组肝无明显差异, 模型组 6, 8 wk 肝平均温度较对照组明显降低 ($P < 0.05$ $t = 3.773$, $P < 0.01$ $t = 4.998$); 模型组 2 wk 病理变化以炎症及肝细胞变性为主, 模型组 4 wk 间质成分增生明显, 纤维化逐渐形成, 模型组 6 wk 肝细胞大量坏死, 中央静脉及汇管区纤维隔形成, 模型组 8 wk 肝组织形成完整的假小叶; 模型组 2, 4, 6, 8 wk 大鼠肝组织 I, III 型胶原及层粘蛋白表达逐渐增多, 2, 4 wk 以 III 型胶原增加为主, 4, 8 wk 以 I 型胶原增加为主。

结论: 肝纤维化发生、发展的不同阶段, 肝温度呈规律性变化。

江涛, 吕少文, 张诗武, 李红, 庞奕辉, 何文彤. 肝纤维化发生发展过程中肝温度的变化规律. *世界华人消化杂志* 2004; 12(9):2111-2114
<http://www.wjnet.com/1009-3079/12/2111.asp>

0 引言

近年来,随着医学分子生物学技术的应用,国内外学者对肝纤维化、肝硬化发生的机制、预防及治疗进行了广泛的探讨^[1-15],但关于肝纤维化发生、发展过程中肝温度变化的研究,尚未见报道.我们采用医用红外热像(infrared thermography, IRT)、组织芯片及免疫组织化学技术,研究肝纤维化中肝细胞坏死、炎症刺激、胶原蛋白增生及肝窦毛细血管化等病理变化对肝温度的影响,探讨肝纤维化中肝温度变化的规律.

1 材料和方法

1.1 材料 Wistar ♂大鼠64只,体质量180-220 g,自由饮水、进食,随机分为2, 4, 6, 8 wk对照组和模型组,每组8只.用橄榄油将CCL₄液体稀释6倍,0.2 mL, ip, 3次/wk,对照组注射相同剂量的橄榄油.

1.2 方法 分别于2, 4, 6, 8 wk后用100 mL/L水合氯醛麻醉,剖腹后采用国产DW-9100医用红外热像仪采集大鼠腹腔红外热像图,并测量肝右叶温度(分辨率为0.025 °C).取各组大鼠肝右叶下缘新鲜组织, Bouin液固定,石蜡包埋,制成目标蜡块,在受体石蜡模块上构建2组8×8共128点阵列蜡块,常规切片,HE染色,光镜下观察各组大鼠肝组织病理学变化.将肝组织芯片脱蜡后用饱和苦味酸天狼猩红液(天狼猩红0.1 g溶于100 mL饱和苦味酸)浸染1 h,用盐酸水(盐酸5 mL溶于纯水100 mL)浸染后,苏木素复染,偏振光显微镜下观察I, III型胶原在各组肝组织中表达,用HMIAS-2000图文分析系统采集图像并进行定量分析.肝组织芯片脱蜡后用胰酶进行抗原修复,10 mL/L% H₂O₂封闭10 min, PBS洗3次,每次5 min, 100 mL/L羊血清孵育30 min,滴加大鼠抗-LN抗体(1:30稀释)后4 °C孵育过夜, PBS洗3次,每次5 min,生物素化羊抗鼠IgM, 37 °C孵育45 min, PBS洗3次,每次5 min,辣根酶标记链亲合素(streptavidin/HRP)30 min, DAB显色,以小牛血清代替一抗作阴性对照,用HMIAS-2000图文分析系统采集图像并进行定量分析.

统计学处理 用SPSS11.5统计软件进行数据分析,以均数±标准差(mean±SD)表示,行*t*检验.

2 结果

2.1 红外热像图及肝右叶温度 正常大鼠2, 4, 6, 8 wk肝脏红外热像图基本相同,显示肝外缘轮廓清

晰,不同色码温区分布规则,肝叶中心温度较低,呈明显的低温色码区,肝叶边缘温度较高,呈明显的高温色码区,其余部分温度介于二者之间,呈中等温区(图1A).肝右叶平均温度为28.1±1.0 °C, 27.2±0.7 °C, 30.7±1.0 °C和29.1±0.7 °C.模型组2 wk肝脏红外热像图表现与正常大鼠基本相似,不同色码温区分布较规则,肝右叶平均温度为28.6±1.1 °C,较对照组明显升高($P<0.05$, $t=-2.518$);模型组4 wk红外热像图表现为肝叶外缘轮廓不清,温区分布不规则,常出现局部低温区或温区界限不清,肝右叶平均温度为27.2±1.0 °C,与对照组相比无明显差异(图1B);模型组6 wk与4 wk红外热像图表现基本相似,肝右叶红外热像平均温度为30.1±1.2 °C,较对照组明显降低($P<0.05$, $t=3.773$);模型组8 wk肝叶红外热像图低温区明显增大,占据肝叶大部分面积,在低温区中可出现超低温区,肝右叶平均温度为27.4±1.0 °C,较对照组明显降低($P<0.01$, $t=4.998$).

2.2 大鼠肝组织病理变化 对照组2, 4, 6, 8 wk肝组织形态特点基本相似,肝细胞以中央静脉为中心向周围呈放射状排列,肝细胞索排列整齐,相邻肝细胞索之间为肝血窦;模型组2 wk肝间质有轻微纤维组织增生,肝细胞脂肪变性并有少量肝细胞坏死,可见炎细胞浸润(图2A);模型组4 wk肝细胞索排列紊乱,肝细胞脂肪变,坏死,肝间质增生并见纤维化形成;模型组6 wk肝细胞索排列紊乱,可见大量脂肪变及坏死肝细胞,中央静脉及汇管区纤维化隔形成,并有早期肝硬化表现;模型组8 wk肝内纤维组织广泛增生,肝细胞变性、坏死,假小叶形成,有典型的肝硬化表现(图2B).

2.3 肝组织I, III型胶原表达 经苦味酸天狼猩红染色,在偏振光显微镜下I型胶原呈红色或黄色的粗纤维,III型胶原呈绿色的细纤维.对照组2, 4, 6, 8 wk I型胶原多分布在门管区及各级静脉周围,III型胶原纤维,位于门管区及肝血窦;模型组2 wk中央静脉周围、门管区、肝血窦及坏死肝细胞周围I, III型胶原有所增加,以III型胶原增加为主,与对照组2 wk相比, $P<0.01$, $t=-4.270$;模型组4 wk与2 wk表现相似,但坏死肝细胞周围I, III型胶原较2 wk明显增加,并逐渐形成纤维隔(图3A, $P<0.01$, $t=-3.516$);模型组6 wk以I型胶原为主形成较为明显的纤维隔,胶原含量较4 wk明显增加(图3B, $P<0.01$, $t=-8.499$);模型组8 wk I型胶原广泛增生,假小叶形成(表1).

表1 大鼠肝组织I, III型胶原及LN表达图像分析(mean±SD, A%)

指标	2 wk		4 wk		6 wk		8 wk	
	对照组	模型组	对照组	模型组	对照组	模型组	对照组	模型组
I, III型胶原	0.051±0.025	0.169±0.069 ^b	0.060±0.019	0.309±0.093 ^d	0.065±0.021	0.755±0.188 ^f	0.062±0.185	1.001±0.189
LN	0.006±0.005	0.019±0.009 ^b	0.008±0.008	0.039±0.019 ^e	0.007±0.009	0.072±0.021 ^f	0.010±0.008	0.086±0.034

^b $P<0.01$ vs 对照组2 wk; ^d $P<0.01$, ^e $P<0.05$ vs 模型组2 wk; ^f $P<0.01$ vs 模型组4 wk.

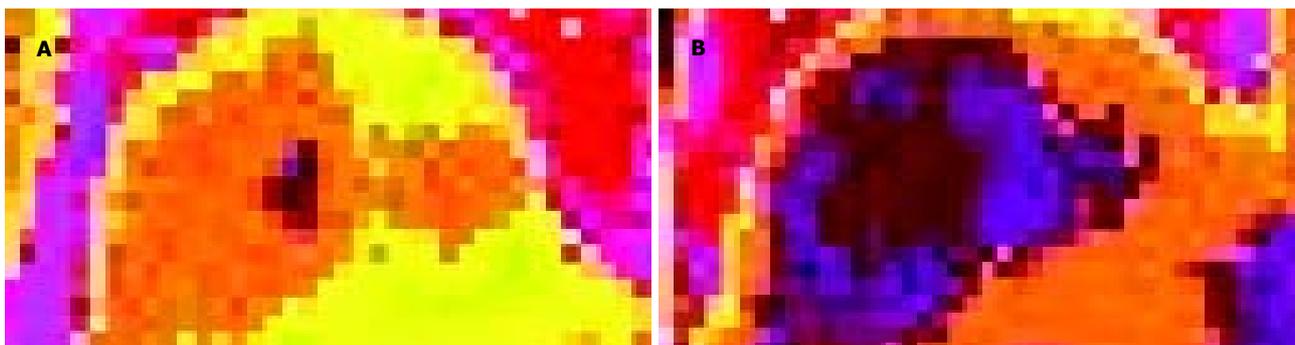


图1 大鼠4 wk 肝区红外热像图. A: 对照组; B: 模型组.

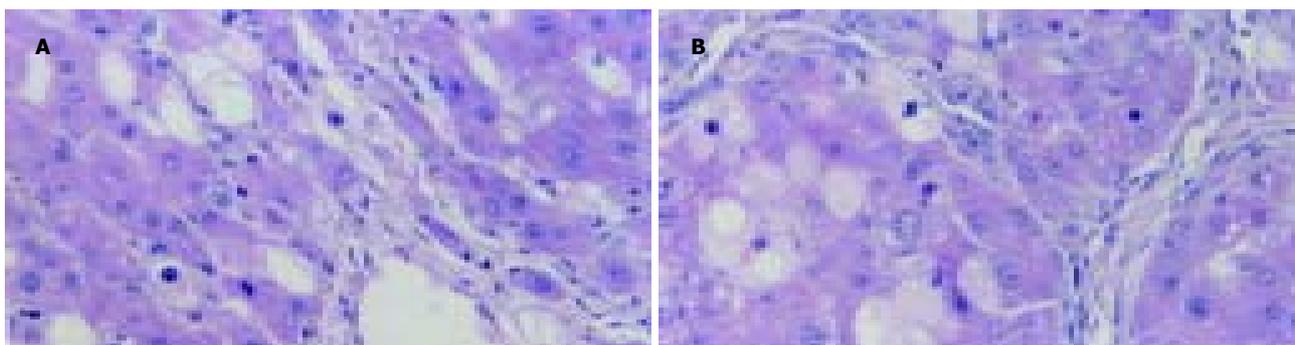


图2 模型组肝组织, HE $\times 200$. A: 2 wk 肝细胞变性、坏死及少量纤维组织增生; B: 8 wk 纤维组织广泛增生, 假小叶形成.

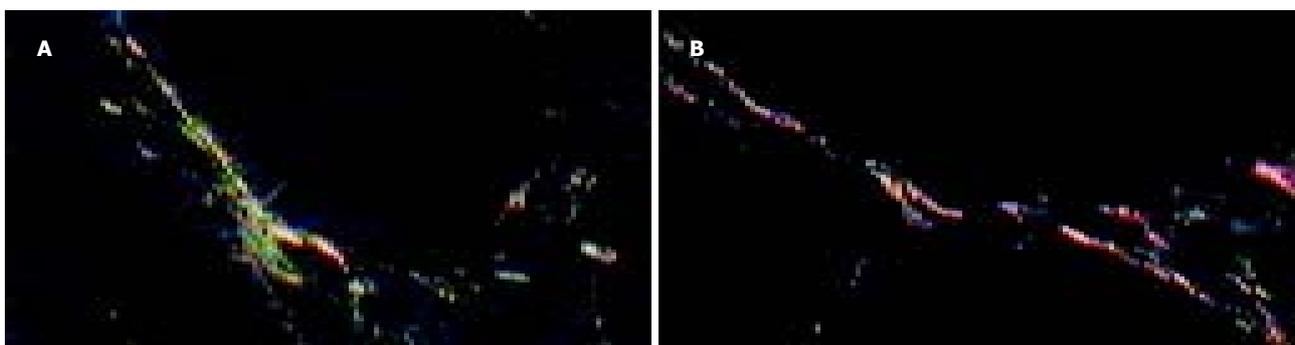


图3 模型组肝组织, 苦味酸天狼猩红染色, $\times 200$. A: 4 wk I, III 型胶原增生, 形成纤维隔; B: 6 wk I 型胶原增生为主, 纤维隔明显.

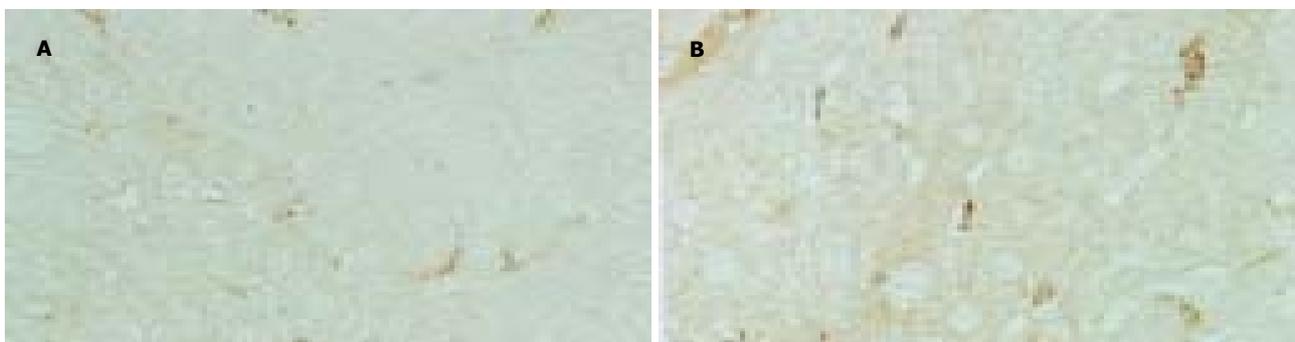


图4 模型组肝窦壁 LN 阳性, SP $\times 200$. A: 4 wk; B: 6 wk.

2.4 肝组织 LN 表达 对照组 2, 4, 6, 8 wk 大鼠肝窦壁 LN 表达不明显, 随着肝纤维化的形成, 模型组肝窦壁 LN 阳性着色逐渐增强; 模型组 4 wk 与 2 wk 相比, $P < 0.05$, $t = -2.587$ (图 4A); 模型组 6 wk 与 4 wk 相比 $P < 0.01$, $t = -3.703$, 模型组 6, 8 wk LN 在肝细胞坏死灶和纤维间隔附近的肝窦表达尤为明显 (图 4B, 表 1).

3 讨论

众所周知, 体温 (body temperature) 是衡量机体状态的重要指标, 如能采用适当的方法直接或间接测定生理、病理状态下某一器官温度 (organ temperature), 探讨器官温度变化与疾病发生、发展的规律, 对于通过脏器温度判断病情, 评价疗效和估计预后, 无疑具有重要意义. 肝

是人体及其他高等动物代谢最旺盛的器官,也是机体主要的产热器官,但对于生理、病理状态下肝温度变化的研究尚不多见。Weidensteiner *et al*^[16]应用质子共振频(proton resonance frequency, PRF)的方法获得 MR 温度图,用以监测肝肿瘤热消融手术中肝脏温度的变化。Dewasmes *et al*^[17]采用电热调节器探针监测睡眠状态下大鼠肝脏温度的变化。医用红外热像技术是基于红外辐射原理,以机体为辐射源,采用先进的红外扫描技术,探测红外辐射,经过一系列信号处理,把不可见的实时温度(real-time temperature)转变为可视性、可定量的红外热图,从而实现了机能与结构多元信息的转换和表达,为人们探索机能信息和结构信息的内在联系开辟了新的途径并广泛用于医学基础与临床研究^[18-24]。因此,我们采用医用红外热像技术,结合组织芯片等方法探讨肝纤维化中肝温度的变化规律及影响因素。肝细胞变性、坏死与细胞外基质的过度增生和沉积是肝纤维化的主要特征,肝实质细胞的减少加之间质成分的增加,势必影响其代谢和产热功能;肝窦毛细血管化是肝纤维化过程中一个重要的病理改变^[8, 13],肝窦毛细血管化减弱了肝细胞和血液之间的氧和营养物质的交换,导致肝细胞萎缩和肝窦塌陷,肝细胞的损伤会促使 Disse 间隙细胞外基质进一步沉积,肝窦的塌陷则会使肝内血管网减少,而进一步造成影响肝温度的变化。随着肝纤维化的加重,肝小叶结构改建,假小叶及结节形成,肝内血管网减少,肝内血流受阻,门静脉内压力升高,造成入肝血流量的重新分配,也会造成肝内温度的变化。

红外热像的检测结果表明, CCl₄ 所致肝纤维化模型大鼠肝温度存在规律性变化。肝纤维化初期(造模 2 wk),肝组织温度较对照组明显升高($P < 0.05$)。随着肝纤维化病变的进展(造模 4 wk),模型组与对照组肝组织温度无明显差异,肝纤维化后期(造模 6 wk),肝组织温度较对照组明显降低($P < 0.05$)。当肝纤维化发展为肝硬化时(造模 8 wk),肝组织温度较对照组显著降低($P < 0.01$)。形态学的研究表明,模型组 2 wk 肝组织病理改变以炎细胞浸润,肝细胞变性、坏死为主,提示炎症反应是造成模型组肝平均温度增高的主要因素;模型组 4 wk 在肝细胞变性坏死的同时, I, III 型胶原较对照组及模型组 2 wk 明显增加,提示炎症反应造成的肝组织温度升高与 I, III 型胶原成分的增加,肝实质细胞的减少造成的肝脏温度降低处于动态平衡,因而使得肝模型组 4 wk 肝平均温度与对照组相比无明显变化;模型组 6, 8 wk 以 III 型胶原为主的 ECM 明显增加,并形成不完整的纤维间隔或假小叶, LN 在肝细胞坏死灶和纤维间隔附近的肝窦表达明显,提示肝纤维化后期肝实质细胞的减少,细胞外基质成分的增加,肝窦毛细血管化及肝组织结构的改建使得肝组织平均温度较对照组明显降低。

总之,在肝纤维化发生、发展的不同阶段,肝脏温度随肝组织病理变化呈规律性变化。炎症刺激,肝实

质细胞变性、坏死,细胞外基质(主要为胶原蛋白)的过度增生和沉积,肝窦毛细血管化及肝组织结构的改建等可能是影响肝脏温度变化的主要因素。

4 参考文献

- 1 Kershenobich Stalnikowitz D, Weissbrod AB. Liver fibrosis and inflammation. *Ann Hepatol* 2003;2:159-163
- 2 Canbay A, Friedman S, Gores GJ. Apoptosis: the nexus of liver injury and fibrosis. *Hepatology* 2004;39:273-278
- 3 Song Z, Joshi-Barve S, Barve S, McClain CJ. Advances in alcoholic liver disease. *Curr Gastroenterol Rep* 2004;6:71-76
- 4 Hui AY, Friedman SL. Molecular basis of hepatic fibrosis. *Expert Rev Mol Med* 2003;2003:1-23
- 5 Selmi C, Invernizzi P, Keefe EB, Coppel RL, Podda M, Rossaro L, Ansari AA, Gershwin ME. Epidemiology and pathogenesis of primary biliary cirrhosis. *J Clin Gastroenterol* 2004;38:264-271
- 6 Hsu YC, Chiu YT, Lee CY, Lin YL, Huang YT. Increases in fibrosis-related gene transcripts in livers of dimethylnitrosamine-intoxicated rats. *J Biomed Sci* 2004;11:408-417
- 7 Dang SS, Jia XL, Cheng YA, Chen YR, Liu EQ, Li ZF. Inhibitory effect of Huangqi Zhechong decoction on liver fibrosis in rat. *World J Gastroenterol* 2004;10:2295-2298
- 8 Xu GF, Wang XY, Ge GL, Li PT, Jia X, Tian DL, Jiang LD, Yang JX. Dynamic changes of capillarization and peri-sinusoid fibrosis in alcoholic liver diseases. *World J Gastroenterol* 2004;10:238-243
- 9 季光, 王育群, 曹承楼, 姜鲁峰, 张玮, 邢练军, 王奕. 清肝活血方治疗酒精性肝病的临床研究. *中国中西医结合杂志* 2004;24:13-16
- 10 杨妙芳, 谢渭芬, 张新, 强晖, 孙田美, 朱梁. 核糖体 S6 蛋白激酶在大鼠肝纤维化组织中的表达. *第二军医大学学报* 2004;25:153-156
- 11 王卫卫, 杨希山, 李旭, 王捷, 田野, 杨传红, 赖晃文. 血管紧张素 II 1 型受体在肝纤维化形成过程中表达变化的研究. *中华消化杂志* 2004;24:131-134
- 12 李旭, 孟莹, 杨希山, 张振书, 吴平生, 邹峻岭. 培哚普利抗实验性大鼠肝纤维化的实验研究. *中华肝脏病杂志* 2004;12:32-34
- 13 陆雄, 刘成海, 徐光福, 陈文慧, 刘平. 大鼠肝纤维化形成中肝窦壁层粘连蛋白及 IV 型胶原蛋白的变化. *世界华人消化杂志* 2001;9:260-262
- 14 陆伦根, 曾民德, 茅益民, 李继强, 邱德凯, 杨文卓, 贾一韬, 曹爱平. 氧化苦参碱对四氯化碳诱导的大鼠肝纤维化 I, III, IV 型胶原表达的影响. *世界华人消化杂志* 2003;11:1488-1491
- 15 徐光福, 葛桂玲, 李澎涛, 田德禄, 姜良铎, 杨晋祥. 铁剂诱发大鼠肝纤维化的组织学变化. *世界华人消化杂志* 2004;12:714-718
- 16 Weidensteiner C, Kerioui N, Quesson B, de Senneville BD, Trillaud H, Moonen CT. Stability of real-time MR temperature mapping in healthy and diseased human liver. *J Magn Reson Imaging* 2004;19:438-446
- 17 Dewasmes G, Loos N, Delanaud S, Ramadan W, Dewasmes D. Liver temperature during sleep. *Sleep* 2003;26:948-950
- 18 Rich PB, Dulabon GR, Douillet CD, Listwa TM, Robinson WP, Zarza BL, Pearlstein R, Katz LM. Infrared thermography: a rapid, portable, and accurate technique to detect experimental pneumothorax. *J Surg Res* 2004;120:163-170
- 19 Ng EY, Sudharsan NM. Computer simulation in conjunction with medical thermography as an adjunct tool for early detection of breast cancer. *BMC Cancer* 2004;4:17
- 20 Huygen FJ, Niehof S, Klein J, Zijlstra FJ. Computer-assisted skin videothermography is a highly sensitive quality tool in the diagnosis and monitoring of complex regional pain syndrome type I. *Eur J Appl Physiol* 2004;91:516-524
- 21 Xie W, McCahon P, Jakobsen K, Parish C. Evaluation of the ability of digital infrared imaging to detect vascular changes in experimental animal tumours. *Int J Cancer* 2004;108:790-794
- 22 乔锋利, 周余来, 常淑芳, 侯立中, 颜伟群, 杨同书. 红外热像扫描技术在组织工程皮肤移植修复中的应用. *中国实验诊断学* 2004;8:40-42
- 23 马春红, 谭连红, 赵湘杰, 王淑友, 马惠敏, 张栋. 家兔循环组织温度变化与降钙素基因相关肽和血管紧张素 II 含量的关系. *针刺研究* 2002;27:149-151
- 24 洪毅, 缪鹏程, 张仲宁, 张淑仪, 孙利, 水修基, 季晓勇, 张志炳. 超声红外热像技术及其在无损伤检测中的应用. *南京大学学报·自然科学* 2003;39:547-552