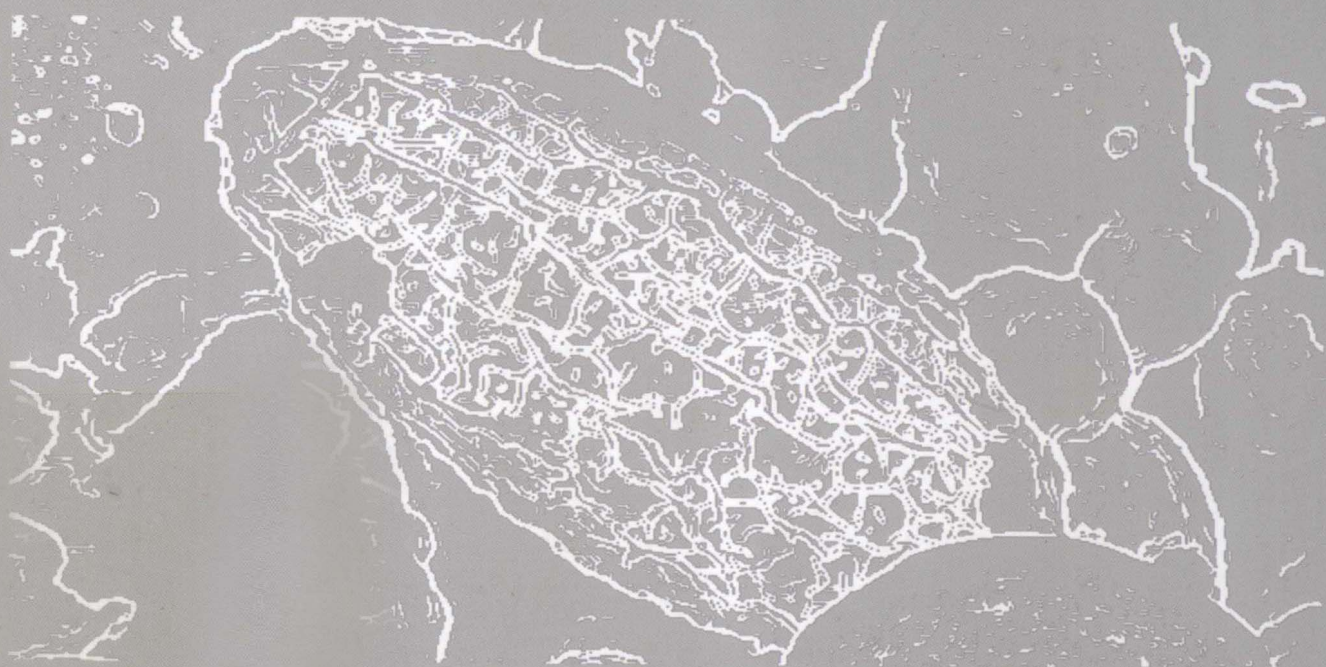


主编 乔 铁 张阳德

胆囊结石及胆囊结石中 华支睾吸虫卵微观结构

图谱

Map of Microstructure of Gallbladder stones and
Clonorchis sinensis eggs in the gallbladder stones



军事医学科学出版社

胆管结石及胆管结石中
华支睾吸虫卵的病理结构

图 谱

Abstract

Abstract

胆囊结石及胆囊结石 中华支睾吸虫卵微观结构图谱

主 编 乔 铁 张阳德

军事医学科学出版社

· 北 京 ·

内容提要

胆囊结石是一种常见病、多发病,近年来发生率逐年上升,目前尚无有效的预防方法,因此耗费了大量的医疗资源。胆囊结石的形成是一种人体内的病理性矿化过程,属于广义的生物矿化范畴,即在疾病的状态下,由生物体参与的、有机基质在分子水平上对矿物的成核、生长、微组装进行调控,并使其按照一定规律沉积,从而形成结石的过程,在结石形成过程中,胆囊结石的结构和成分记录着结石形成过程中的各种信息。本书将近年来积累的华支睾吸虫卵阳性结石的微观结构和物质成分研究的众多珍贵图片集结成册,以期对胆结石特别是华支睾吸虫卵与胆囊结石的形成机制提供理论依据,并对进一步寻找科学的预防措施、选择合理的治疗方案提供帮助。本书所介绍的内容均为目前国际上在该领域的最新研究成果,是高级临床医生、研究生、基础研究者的重要参考教材。

图书在版编目(CIP)数据

胆囊结石及胆囊结石中华支睾吸虫卵微观结构图谱/乔铁,张阳德主编.

-北京:军事医学科学出版社,2012.6

ISBN 978-7-80245-979-3

I. ①胆… II. ①乔… ②张… III. ①胆囊疾病-结石(病理)-图谱
②华支睾吸虫病-图谱 IV. ①R575.6-64 ②R532.23-64

中国版本图书馆CIP数据核字(2012)第111249号

策划编辑:李 玫 责任编辑:李 玫 责任印制:丁爱军

出版人:孙 宇

出版:军事医学科学出版社

地址:北京市海淀区太平路27号

邮编:100850

联系电话:发行部:(010) 66931051, 66931049, 63827166

编辑部:(010) 66931039, 66931127, 66931038

传真:(010) 63801284

网址:<http://www.mmsp.cn>

印装:中煤涿州制图印刷厂北京分厂

发行:新华书店

开本:889mm×1194mm 1/16

印张:13

字数:379千字

版次:2012年7月第1版

印次:2012年7月第1次

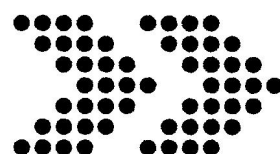
定价:139.00元

本社图书凡缺、损、倒、脱页者,本社发行部负责调换

第一章 CHAPTER ONE

胆囊结石成因研究现状及进展

The research and development of the formation of gallstones



胆囊结石是临床上的常见病、多发病。随着人口老龄化、人们生活节奏的加快及生活水平的提高,其发病率呈上升趋势。现在中国成年人胆囊结石的发病率为 10%, 中年妇女甚至高达 15%。胆囊结石的主要成分为胆固醇或胆色素, 还有少量的钙盐和无机离子、黏液或糖蛋白等。据此, 常见的胆囊结石分为胆固醇结石、胆色素结石和混合性结石三大类, 其中胆色素结石还可再分为棕色色素结石和黑色色素结石。此外, 还有一些少见的结石类型, 比如以脂肪酸盐为主要成分的脂肪酸盐结石、以蛋白质为主要成分的蛋白结石、胱氨酸结石、碳酸钙结石等。国外报道胆囊结石多数为胆固醇类结石, 但国内尚缺乏权威的统计报道。胆囊结石是一种多因素疾病, 其确切的病因和发病机制尚不十分清楚。以下着重介绍胆固醇类结石和胆色素类结石的发病机制及研究进展。

第一节 胆固醇结石的发病机制

许多研究明确指出, 胆囊胆固醇结石的形成包含三个连续性步骤: ①胆汁中胆固醇过饱和; ②胆固醇结晶析出; ③在促核形成因素作用下聚集并逐渐形成结石。胆汁中胆固醇、胆汁酸盐和卵磷脂三者的关系和比例变化会影响胆固醇的溶解, 进而导致胆囊结石的发生。而其他因素, 如胆囊功能、细菌、基因等能直接或间接参与、影响胆固醇结石的形成。

一、胆囊功能与胆固醇结石形成的关系

许多学者认为, 胆囊运动减弱是胆石发生的重要因素之一, 而胆囊收缩素 (CCK) 受体的缺乏可能是胆囊运动功能受损的一个重要原因。CCK 受体分为 CCK-A 受体和 CCK-B 受体两型。CCK-A 受体主要分布于胰腺、胆囊等外周组织, 在中枢及外周神经系统某些区域亦有发现。CCK-B 受体主要存在于中枢神经系统。CCK 通过与胆囊壁特定膜受体结合, 经细胞内第二信使传递系统引起胆囊收缩。有动物实验表明 CCK 受体基因缺陷的小鼠容易出现胆泥和胆石形成。而胆囊 CCK-A 受体表达下调是高胆固醇实验豚鼠早期胆囊收缩功能障碍的主要原因。与动物实验结果相似, 部分临床试验也显示, 胆囊结石病人的 CCK-A 受体 mRNA 表达较正常人减少; 同时, 在胆囊结石病人中, 收缩功能减弱者 CCK-A 受体 mRNA 表达又明显低于收缩“正常”者, 且 CCK-A 受体基因表达的变化与胆囊排空明显正相关。这些结果有力地支持了 CCK-A 受体在胆石病胆囊运动功能损害中的重要作用。

二、细菌与胆固醇结石形成的关系

近年来, 国内外很多学者都通过实验验证了细菌在胆固醇结石中的存在及其作用。国内学者对胆固醇结石进行电镜观察, 在结石表层结构内和结石核心中均发现有细菌样结构物质存在。还有人报道在胆固醇类混合结石的核心部分检测到螺杆菌 DNA。而日本学者也从 57% 的纯胆固醇结石 (胆固醇含量为 100%) 中检测到细菌 DNA。细菌发挥作用的机制可能为: 细菌产生的 β -葡萄糖醛酸苷酶、磷脂酶和胆汁酸水解酶可催化胆汁类脂成分水解, 为形成钙沉淀提供原料。而且细菌代谢产物本身是胆固醇形成结晶并聚积生长的良好基质。此外, 细菌感染能激发人体免疫或代谢状态的改变, 导致胆囊黏膜分泌紊乱, 胆囊运动功能障碍, 胆汁淤积。因此, 部分学者提出细菌源性物质可能直接参与胆固醇结石的形成, 并且与非细菌致石机制有交叉作用, 通过影响或改变人体免疫代谢产物间接促进胆固醇结石的形成。有研究发现, 在胆囊结石病人的胆囊黏膜中, 细菌 DNA 阳性和阴性的病人间黏膜 IgA、IgG 含量差异有统计学意义, 而非结石病人两组未见差异, 推测细菌可能引起胆囊黏膜免疫球蛋白的分泌, 间接参与细菌结石形成。需要注意的是, 细菌不但可参与胆固醇结石的形成, 更是与胆色素结石密切相关, 其准确的发病机制还有待进一步去研究阐明。

三、基因表达与胆固醇结石的关系

流行病学研究显示, 胆囊结石病符合多基因病遗传模式。国外研究者在小鼠基因中发现 2 号染色体

含核受体基因 Retinoid X receptor α (NR2B1), 该基因可调控胆固醇分解, 在胆固醇结石形成中起重要作用。而在人体中也存在类似作用的基因。研究发现 ABCB11 基因纯合子缺陷可以导致胆汁酸盐分泌的完全终止和严重的胆囊结石。国内学者在 3 号和 9 号染色体的连锁位点 D3S1266 和 D9S168 上发现胆石病致病基因连锁位点。也报道了胆囊胆固醇结石病人的肝脏 ABCG5 和 ABCG8 的表达增高, 尤以 ABCG8 的差异有统计学意义, 该基因表达增高可限制胆囊上皮对胆汁胆固醇的重吸收, 导致胆汁胆固醇过饱和。此外, 有研究提示低密度脂蛋白受体 (LDLR) 基因可能属于结石基因族成员之一。

四、免疫球蛋白与胆固醇结石的关系

免疫球蛋白属于促成核因子中的刀豆蛋白 A 结合蛋白一类。IgA、IgM 能与微泡中的磷脂相结合, 促使微泡聚集、融合, 从而促核形成。有研究者通过测定血清免疫球蛋白值发现胆囊胆固醇结石组的血清 IgA、IgM 较对照组明显增高, 而 IgG 在各组差异无统计学意义, 认为 IgA、IgM 作为促成核蛋白可能比 IgG 的作用更重要。

(罗小兵 冯禹阳)

第二节 胆色素结石的发病机制

胆色素结石可分为黑色色素结石和棕色色素结石, 前者多原发于胆囊, 而后者多原发于肝内外胆管。通常认为, 胆色素结石的本质是以胆红素与多种金属离子如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 形成的螯合形高聚物。胆红素与钙离子形成“胆红素钙”沉淀启动胆色素结石的形成, 该过程遵循溶解-沉淀平衡的溶度积原理, 即沉淀的形成取决于形成沉淀双方离子浓度的乘积, 称为离子浓度积 (IP), 当沉淀-溶解过程在特定条件下达到平衡时 IP 为一常数, 称条件溶度积常数 (K'_{sp})。若 $IP > K'_{sp}$, 则沉淀形成; 若 $IP < K'_{sp}$, 则部分沉淀趋于溶解, 直到达到新的平衡为止。某种因素若要能使非结合胆红素 (UCB) 和钙离子任一方增高, 都会使 IP 升高, 直接促进“胆红素钙”沉淀生成。但值得注意的是, “胆红素钙”形成的具体条件、机制以及形成过程仍然不清楚, 以及胆红素与钙离子或钙盐的相互作用机制需要进一步阐明。

一、糖蛋白的作用

许多研究证明, 糖蛋白作为基质与“胆红素钙”沉淀的微粒存在化学结合, 并将其凝集成为有形的结石。此外, 由于“胆红素钙”沉淀被糖蛋白紧紧包裹, 极难溶解, 因此在 $IP < K'_{sp}$ 时, “胆红素钙”沉淀的重新溶解受阻, 迫使平衡向沉淀生成的方向单向进行, 促进成石。有研究显示含结石时肝内胆管中黏蛋白 1 的表达增强, 特别是胆红素钙结石中黏蛋白 1 的表达阳性率较对照组显著性增高, 表明黏蛋白的高表达与肝内结石特别是胆红素钙结石的形成密切相关。

二、自由基的作用

胆汁中的自由基 (SOD) 促进成石的可能机制: ①自由基使“胆红素钙”的 IP 降低; ②自由基引发“胆红素钙”的聚合, 聚合后的沉淀难以再溶解, 迫使平衡向生成沉淀方向单向进行; ③自由基在组织培养液中能刺激胆管黏膜分泌更多的糖蛋白, 通过糖蛋白阻止“胆红素钙”重新溶解。有研究者发现胆色素结石幽门螺杆菌阳性 SOD 的活性表达明显高于阴性组, 推测 SOD 可通过对钙的沉淀-溶解平衡这一中心环节的影响而对胆色素结石的形成发挥其作用, 还可通过对糖蛋白的作用促进成石。

三、磷脂酶与棕色色素结石的关系

研究表明, 磷脂酶参与了棕色色素结石的形成过程, 而且磷脂酶 A1 的作用比磷脂酶 A2 更重要。棕



色色素结石的总脂肪酸含量和游离脂肪酸含量明显高于胆固醇结石和黑色色素结石。

四、细菌移位

细菌移位的三个基本因素是：肠道细菌过度繁殖、肠黏膜屏障损害和机体免疫防御功能低下。有研究证实胆石症病人血浆二胺氧化酶高于正常组，表明其肠黏膜屏障功能确实存在异常。这为细菌移位提供便利条件，从而增加胆道感染率。根据 Maki 学说，认为感染胆汁中的细菌所产生的 B-Gase 将能溶于水的胆红素葡萄糖醛酸苷（结合胆红素，CB）水解为游离胆红素（UCB）和葡萄糖醛酸，UCB 与胆汁中的钙离子结合成胆红素钙析出沉淀，感染胆汁中的糖蛋白再将胆红素钙沉淀颗粒凝聚在一起而形成胆色素结石。这一学说把 B-Gase、UCB、钙和糖蛋白四者与胆色素结石形成感染的关系联系在一起。然而，有相当比例的胆色素结石病人的胆汁中并不存在感染因素，事实上正常肝细胞、胆囊黏膜和胆管上皮也分泌 B-Gase，它可以直接水解 CB 为 UCB。研究表明，无论是在感染性胆汁还是非感染性胆汁中，内源性 B-Gase 在胆色素结石形成过程中可能起了关键性作用。

五、华支睾吸虫的作用

目前，关于感染华支睾吸虫是否是流行区胆囊结石症主要原因仍然存在争议。有文献报道华支睾吸虫感染者胆结石发生率为 4.2%，无虫对照组胆结石发生率为 0.3%，差异具有统计学意义。韩国学者总结在韩国华支睾吸虫流行区华支睾吸虫感染者中有 36% ~ 66% 患有胆石症，与我国研究结果相近。然而，韩国学者在对蔚山胆石症患者检查华支睾吸虫卵时发现 182 例胆石症患者中只有 48%（87 例）检出虫卵；韩国学者在全国 26 家医院研究疾病与华支睾吸虫感染的关系时，发现 148 例胆结石患者中华支睾吸虫阳性有 48 例。二者结果均表明华支睾吸虫感染与胆石症的发生没有统计学意义。我们对广州南部 183 例胆囊结石病人的胆囊结石进行了华支睾吸虫卵检查，采用结石磨碎镜检、扫描电镜观察、基因诊断以及傅里叶红外光谱分析，发现有 66.7% 的胆囊结石中检出虫卵，并且在华支睾吸虫卵阳性的 122 例结石中 97 例为胆色素类结石，占 79.5%，说明华支睾吸虫感染尤其是华支睾吸虫卵的存在与胆色素类结石形成密切相关，具体的作用机制我们正在进一步研究之中。

综上所述，胆固醇类结石是在胆汁胆固醇过饱和的前提下和在促成核因子的作用下，胆固醇结晶析出、凝聚形成的。胆囊收缩素受体缺乏、细菌和免疫球蛋白通过不同的作用机制，直接或间接地影响胆固醇类结石的形成。基因在结石形成过程中也发挥重要作用。而胆色素类结石的本质是以胆红素与多种金属离子如 Ca^{2+} 、 Mg^{2+} 形成的螯合形的高聚物，其形成过程遵循溶解-沉淀平衡的溶度积原理。细菌和寄生虫的感染、糖蛋白和自由基等可促进结石的形成，胆汁酸盐则减少其形成。尽管现在对胆囊结石发病机制的研究已达分子水平，但仍有很多方面存在疑问，如胆囊结石形成与感染的先后关系以及胆囊在结石复发中的角色等。因此，进一步研究并阐明结石病因和发病机制，将为我们今后预防和治疗胆囊结石以及如何对待胆囊本身等问题上提供新的理论依据和崭新的技术方法。

（罗小兵 王兴强）

参考文献

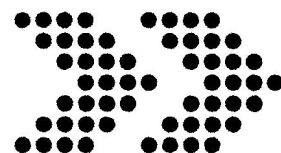
- [1] Zhu J, Han TQ, Chen S, *et al.* Gallbladder motor function, plasma cholecystokinin and cholecystokinin receptor of gallbladder in cholesterol stone patients [J]. *World J Gastroenterol*, 2005;11(11):1685-1689.
- [2] Sato N, Miyasaka K, Suzuki S, *et al.* Lack of cholecystokinin2A receptor enhanced gallstone formation: a study in CCK2A receptor gene knockout mice [J]. *Dig Dis Sci*, 2003;48(10):1944-1947.
- [3] 郑培永, 章学林, 朱培庭. 胆囊结石病肝气郁结证与 CCKAR 和 VIPR 基因表达的相关性研究[J]. 中国中西医结合外科杂志, 2004;10(5):346-348.
- [4] 杨玉龙, 刘小北, 谭文翔. 胆固醇结石中的细菌及其在成石机制中的作用[J]. 肝胆胰外科杂志, 2005;17(1):14-16.
- [5] 田志杰, 韩天权, 姜志宏, 等. 胆囊结石病胆道系统螺杆菌 DNA 的研究[J]. 中国实用外科杂志, 2004;24(2):84-87.
- [6] Kawai M, Iwahashi M, Uchiyama K, *et al.* Gram-positive cocci are associated with the formation of completely pure cholesterol stones[J]. *Am J Gastroenterol*, 2002;97(11):2922-2923.
- [7] Swidsinski A, Lee SP. The role of bacteria in gallstone pathogenesis [J]. *Front Biosci*, 2001;6(1):93-103.
- [8] 朱雷明, 蔡端, 吕元. 胆固醇结石病人与非胆石症人群胆道细菌感染状况及与免疫球蛋白相关性的对照研究[J]. 中华肝胆外科杂志, 2003;9(7):419-422.
- [9] Lammert F, Carey MC, Paigen B. Chromosomal organization of candidate genes involved in cholesterol gallstone formation: a murine gallstone map [J]. *Gastroenterology*, 2001;120(3):221-238.
- [10] Noe J, Kullak-Ublick GA, Jochum W, *et al.* Impaired expression and function of the bile salt export pump due to three novel ABCB11 mutations in intrahepatic cholestasis [J]. *J Hepatol*, 2005;43(3):536-543.
- [11] 秦俭, 韩天权, 袁文涛, 等. 胆囊结石病致病基因的定位研究[J]. 中华外科杂志, 2006;44(7):485-487.
- [12] 蒋兆彦, 韩天权, 所广军, 等. 胆固醇结石病人肝脏胆小管侧膜 ATP 基因表达差异的研究[J]. 外科理论与实践, 2005;10(1):61-65.
- [13] 刘嘉林, 肖路加, 林琦远. 低密度脂蛋白受体基因 Hinc II 多态性与胆囊结石病关系研究[J]. 中华医学遗传学杂志, 2001;18(2):155-157.
- [14] 黄晓峰, 何明鑫, 胡韵. 载脂蛋白 A1、免疫球蛋白与胆囊胆固醇结石形成的关系[J]. 贵州医药, 2003;27(2):102-104.
- [15] 杨小燕, 黄承斌, 吴泳泳. 免疫球蛋白与胆囊胆固醇结石形成的关系[J]. 赣南医学院学报, 2004;24(5):570-571.
- [16] 周孝思. 胆色素结石发病机理的平衡学说[J]. 外科理论与实践, 1999;4(1):7-9.
- [17] 汪开贵. MUC1 在含不同类型结石肝内胆管上皮组织中的表达及意义[J]. 安徽卫生职业技术学院学报, 2004;3(1):54.
- [18] 王建祥, 何鑫, 詹惟, 等. 幽门螺杆菌对胆囊结石形成的影响[J]. 临床外科杂志, 2008;16(4):271-272.
- [19] Wu SD, Uchiyama K, Fan Y. The role and mechanism of fatty acids in gallstones[J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2007;6(4):399-401.
- [20] Yang Su, Shuodong Wu, Junzhe Jin, *et al.* Role of intestinal barrier in pathogenesis of pigment gallstone in a guinea pig model [J]. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*, 2006;5(3):443-448.

- [21] Lim JH. Radiologic findings of clonorchiasis [J]. AJR Am J Roentgenol, 1990;155(5):1001-1008.
- [22] Joo KR, Bang SJ. A bile based study of Clonorchis sinensis infections in patients with biliary tract diseases inUlsan Korea[J]. Yonsei Med J, 2005;46(6): 794-798.
- [23] Kim HG, Han J, Kim MH, *et al.* Prevalence of clonorchiasis in patients with gastrointestinal disease: A Korean nationwide multicenter survey[J]. World J Gastroenterol, 2009;15(1): 86-94.
- [24] 谭宜将, 刘衍民. 胆囊结石发病原因研究现状与进展[J]. 中国实用外科杂志, 2009;29(7): 602-603.

第二章 CHAPTER TWO

胆囊结石的微观结构和物质成分的研究

**The research of the microstructure and composition of
gallstones**



第一节 概 论

胆结石是一种常见病、多发病。近年来其发生率逐年上升，目前尚无有效的预防方法，因此耗费了大量的医疗资源。胆结石的形成是一种人体内的病理性矿化过程，属于广义的生物矿化范畴，即在疾病的状态下，由生物体参与的，有机基质在分子水平上对矿物的成核、生长、微组装进行调控，并使其按照一定规律沉积，从而形成结石的过程。在结石形成过程中，胆结石的结构和成分记录着结石形成过程中的各种信息。通过研究胆结石的结构和成分，可以为胆结石形成机制提供理论依据，并对进一步寻找科学的预防措施、选择合理的治疗方案起到重要的帮助作用。

从 20 世纪 60 年代开始，许多学者对胆结石的结构和成分进行了各种研究。傅培彬通过对 168 例胆结石的化学成分分析，并在解剖镜下详细观察结石的剖面结构，发现了化学成分与剖面结构之间的规律，建立了“以化学成分及剖面结构为基础的胆石分类法”。孙峰等在光学显微镜及偏光镜下对结石内部结构、生长方式以及结晶形态等进行了观察和分类。发现结石内部结构可分为放射型、放射层状型、同心层状型、结晶集合体型、多核结晶集合体型和无定型；生长方式分为单核、双核、多核及无核生长；结晶形态有树枝状、竹节状、扇面状和绒球状等。吴杰等通过应用扫描电镜和 X 射线衍射仪对 35 例人体胆囊结石的剖面结构、晶体结构及组成物质进行了分析研究，发现尽管胆结石的外观和剖面的形态结构各不相同，但都以结晶物质为主，并分析其主要成分为胆固醇晶体。王爱勤等对采用不同溶剂溶解前后的胆色素型结石的结构进行了观察和红外光谱检测，发现胆红素和金属离子，尤其是钙和其他二价金属离子，形成了胆色素盐或配位络合物，并与糖蛋白等螯合成了大分子复合物是胆色素型结石难溶的主要原因。由于以往的研究工作大多是从某一学科的某一角度出发来进行分析研究，加上受到实验条件和技术方面限制的原因，对胆结石结构和成分的分析研究遇到了瓶颈难题。近年来，随着科学技术的发展，传统的研究方法得到了较大的改进，更加先进的实验仪器和设备被广泛应用于科学研究之中，如红外镜面反射光谱、X 射线荧光光谱、X 射线衍射法的广泛应用，以及出现了分辨率达到纳米级别的扫描电镜，为胆结石的实验分析提供了有力的支持。同时，随着人们观念的改变，越来越多的学科和概念互相交叉、渗透，为研究胆结石提供了良好的研究平台。

广州市番禺胆囊疾病研究所应用地质学、矿物学、晶体学、分子生物学等学科的一些现代的研究方法和检测手段，从交叉学科的角度对胆结石的微结构和物质成分进行了初步的分析，为研究胆结石形成的过程及机制提供了理论依据。

广州市番禺胆囊疾病研究所应用光学显微镜和纳米级高分辨率的扫描电镜对胆结石的微结构进行了观察；应用傅里叶红外光谱仪、X 射线能谱仪对胆结石主要的有机和无机物质成分进行了定位、定性、定量的测定并对胆结石中晶体物质的组成和成分进行了分析研究；应用荧光定量 PCR 仪对胆囊结石中的虫卵行基因鉴定。

一、光学显微镜、扫描电镜

各种类型结石的晶体组成存在明显不同。胆固醇型结石主体为晶态物质，主要晶体成分是胆固醇。胆色素型结石主体为非晶态物质，但也有碳酸钙晶体和少量胆固醇晶体，以胆红素和胆红素盐为其主要成分。混合型结石主体为晶态和非晶态物质混合而成，主要以胆固醇和胆红素为主要成分。多数胆固醇型结石中存在着一种周期性层状结构，这些结石大多是由一个形态各异的不规则晶体结构组成的核心和外围的层状结构所组成。这些层状结构主要由密集呈簇排列的胆固醇晶体组成，且胆固醇晶体的排列呈现出一定规律性，呈棒状、层状、条索状、板状、放射状、云母状、波浪状或无规律排列。胆色素型结石中未见这种层状结构，主要以呈团块状、大小不一的颗粒物质组成，这些颗粒或散在或聚集地分布于

结石内部,排列没有一定的规律性,且颗粒之间有一定的空隙。混合型结石则同时具有胆固醇型结石的晶体结构与胆色素型结石的颗粒物质。黑色结石无明显核心区及外围层状结构,主要由密集分布于结石内部的细小颗粒组成。另外,碳酸钙晶体主要存在于胆色素型结石和混合型结石中,其形态多样,在光镜下有些呈圆球状,有些呈同心圆状或树年轮状排列,还有些呈柴捆状或呈梭形,溶于盐酸且有气泡产生;在电镜下,呈圆球形、椭圆球形、针状、杆状、团块状、柴捆状、苦瓜状,团块状者极为疏松,可见层叠孔隙、疏密相间现象,杆状晶体较致密,有的可见孔洞及空心。此外,在胆结石中发现了虫卵,光镜下可见虫卵形似芝麻粒,黄褐色,大小平均为 29 倍 17 μm ,卵前端有小盖,卵壳与盖相接处略厚,呈肩峰状,后端圆钝,并可见小突起,卵内含毛蚴。从形态学上初步判断为华支睾吸虫卵。虫卵黏附或包裹大量胆红素盐颗粒、碳酸钙结晶或黏液样物质,电镜下可见虫卵表面的网形物呈交织状排列,网形结构高低不平,虫卵表面黏附胆色素颗粒或黏液样物质。

二、傅立叶红外光谱仪

以胆石中主成分红外光谱与标准品红外光谱对照为依据将其分为胆固醇类结石、胆色素类结石、混合性结石及其他类结石。胆固醇类结石主要成分为胆固醇,含有少量胆红素或硬脂酸钙;胆色素类结石主要成分为胆红素及其盐,含有少量胆固醇、硬脂酸钙,常含有一定量的碳酸钙;混合性结石有胆红素-胆固醇混合性,碳酸钙-胆固醇混合性,碳酸钙-胆红素混合性等;其他类结石有碳酸钙类结石,主要成分为碳酸钙,脂肪酸类结石,主要成分为硬脂酸钙等。

三、X 射线能谱仪

人体必需的常量无机元素都能在胆结石中发现,人体必需的微量元素大多也存在于胆结石中。虽然各个元素间含量差异较大,但各结石中 Ca 含量最高,且 Ca 与 S, P, Mn 的含量之间呈正相关。Fe, Al, Mg, Si 的含量之间也呈一定的正相关性。

四、荧光定量 PCR 仪

对虫卵阳性结石行基因鉴定,结果显示华支睾吸虫成虫 DNA 及虫卵阳性胆囊结石 DNA 均出现 S 型阳性扩增曲线,而虫卵阴性胆囊结石 DNA 未出现扩增曲线(为一直线),证实胆囊结石中虫卵为华支睾吸虫卵。

(乔 铁 马瑞红)

第二节 胆囊结石的收集、处理及保存

一、胆囊结石的获取

喉罩全身麻醉,迷你腹腔镜直视右肋缘下小切口抓取胆囊,胆囊底部微小切口(<6 mm),用无菌脑室引流管引流胆汁至连接的无菌注射器中,用自主研发的 CHiAO(桥牌)系列胆囊镜(专利号:ZL200820188856.6)探查胆囊、取石,直径 ≥ 5 mm 的结石用套石网取出,直径<5 mm 的结石以及泥沙样结石用自主研发的 CHiAO(桥牌)胆囊小结石吸取箱(专利号:ZL200720049447.3)取出。

二、胆囊结石的处理

手术获得的胆囊结石经蒸馏水冲洗 2 次,放置于 60℃ 烘箱内 12 小时烘干。在电子表格中记录患者姓名、性别、年龄、住院号、结石类型、标本采集时间及收取时间,并给标本编号。



（一）结石光镜镜检

结石经手术刀片剖开，剖面层次结构清晰者，分层分别称取约 10 mg，无定形结构者研碎后直接称取约 10 mg，加 200 μ l 生理盐水，用研钵研磨结石标本，260 目尼龙纱过滤后，涂成薄片并标记好待镜检。每份标本涂片 2~3 张，光学显微镜下观察是否有虫卵。

（二）荧光定量 PCR 对结石中的虫卵行基因鉴定

称取 15 mg 虫卵阳性的胆囊结石置研钵中，加 200 μ l 超纯水，研磨至均匀。将结石研磨液离心取沉淀。向沉淀中加盐酸乙醇混合液抽提结石中胆红素。离心取沉淀，反复抽提 5 次。用 1 ml 超纯水洗涤沉淀 3 次，去除剩余乙醇。选用 Qiagen 公司 DNeasy Blood Tissue Kit 按说明步骤提取胆囊结石沉淀中 DNA。提取临床获取的华支睾吸虫成虫 DNA 作为阳性对照。运用 ABI7300 荧光定量 PCR 仪（美国），对胆囊结石 DNA 进行基因鉴定。

（三）胆囊结石涂片染色

对上述结石涂片按照试剂说明书分别进行 PAS 染色、Van Gieson 染色和钙盐染色。

（四）胆囊结石石蜡包埋切片

1. 将胆囊结石软化：根据结石大小、软硬度及性状，采用不同种类或不同浓度的软化剂（主要成分为硝酸、氯仿、乙醚等）浸泡结石，浸泡 2~24 小时不等需灵活掌握，达到去除硬质成分、软化结石的目的。

2. 结石的脱水及石蜡包埋：结石软化后取出，置于梯度酒精中脱水、固定，二甲苯透明和浸蜡后，石蜡包埋成蜡块。此过程用于脱水并固定软化结石中的各种有形成分，保持形态的稳定，同时制成蜡块便于下一步的精确切片。

3. 结石的石蜡切片：取包埋好结石的蜡块初步修整后，德国美康石蜡切片机切片。切片厚度设为 3 μ m，分别在蜡块前 1/3、中间 1/3 和后 1/3 区域做不同层面切片 3 张，对虫卵及其内部毛蚴进行全面观察。

4. 切片的染色及观察分析：石蜡切片按病理常规漂片、贴片、烘烤、干燥固定后备用。备用的切片在做染色等观察分析前，行脱蜡、脱二甲苯、水化，以提高组织、细胞对各种试剂如染液的通透性。做免疫分析时还需行抗原修复，以暴露相应的抗原决定簇，利于抗原抗体反应分析。取蜡块三个不同区域的连续切片各 3 张分别行苏木素伊红染色（HE 染色）、糖原染色（PAS 法）、胆红素染色（Van Gieson 法），用于显示细胞和组织形态结构、细胞与组织中及其周边糖蛋白、细胞与组织及其周边胆红素和胶原。染色完成后常规脱水、固定、透明、封片，然后用 OLYMPUS BX51 生物显微镜及其配套的 DP-26 摄影系统逐一观察记录拍摄每张切片，重点观察华支睾吸虫卵的卵壳、内部毛蚴、卵壳与毛蚴、虫卵与周边物质的染色形态与形态关系。观察分析胆囊结石内的华支睾吸虫卵及其内部毛蚴和它们与周边物质的空间形态关系，为华支睾虫卵与胆囊结石形成的关系提供重要依据。

（五）结石的定性分析

对于剖面层次结构清晰者，分层分别称取胆结石标本 2 mg，无定形结构胆囊结石经破碎后称取 2 mg，与 KBr 粉末按 1:150 mg 的比例混匀研磨，压片，采用傅立叶变换红外光谱仪测定胆囊结石主成分红外光谱。所得胆囊结石的红外光谱与标准样品的红外光谱进行比较，根据光谱特征峰分析并确定结石类型。

（六）结石的扫描电镜观察及 X 射线能谱分析

剖面层次结构清晰者分层分别取直径为 3 mm 左右的结石颗粒 1~2 颗，无定形结构者经破碎后直接取 1~2 颗直径为 3 mm 左右的结石颗粒，用导电双面胶固定于样品台上，鼓风干燥箱内 60℃ 过夜，经干燥后的标本采用离子溅射仪镀膜，扫描电镜观察结石，采用逐级放大的方法观察结石并扫描图片，加速电压为 20 kV，同时对感兴趣区行 X-射线能谱分析。

三、胆囊结石的保存

处理后的胆囊结石按标记顺序依次置于试管架上，并按结石标本顺序标记试管架，然后将试管架置

于通风干燥处（通风橱）保存。

（马瑞红 蔡洪英）

第三节 设备及步骤

一、扫描电镜

扫描电镜是用极细的电子束在样品表面扫描，将产生的二次电子用特制的探测器收集，形成电信号运送到显像管，在荧光屏上显示物体（图 2-1）。

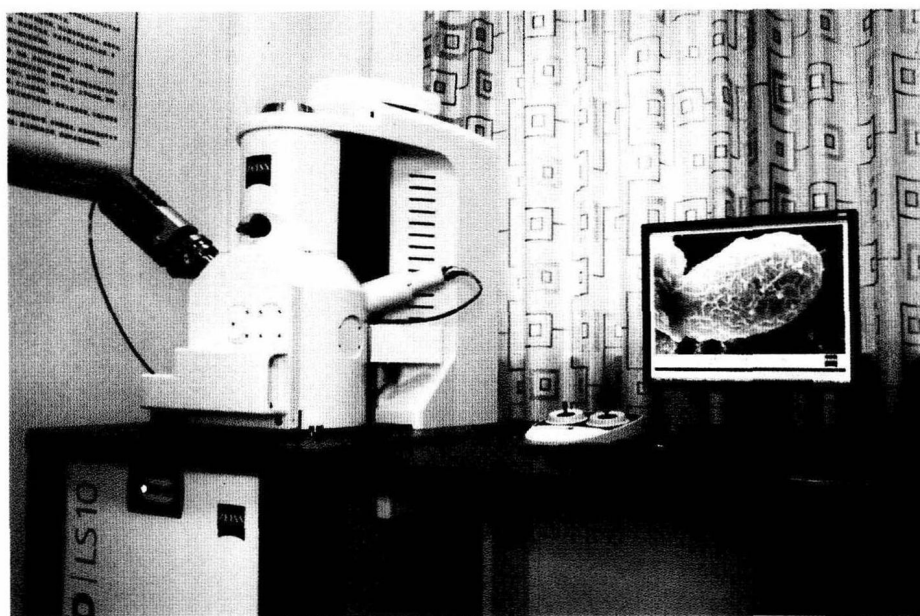


图 2-1 扫描电镜

（一）电镜结构

电镜由两大部分组成，一部分是镜筒和样品室，另一部分是成像和记录系统，两部分是由同步扫描发生器和信号探测器连接在一起的。镜筒：由电子枪、两个聚光镜和一个物镜组成，包括扫描线圈和消像散器。电子枪产生电子束，通过三个透镜把电子束聚焦在样品表面，利用“Optibeam”控制软件提供较大束流，而聚焦电子束斑直径可以小到几个纳米，在扫描线圈作用下，在样品表面做光栅扫描，与样品逐点发生相互作用，产生信号。样品室：样品放在样品台上，可以调整在 X、Y、Z 三个方向移动，也可以倾斜或自转，使样品的每个部位都可以移动到电子束下，将产生的信号送入探测器。探测器：装在样品室，通常有检测二次电子探测器（SED）和背散射电子探测器（BED），还有能谱探测器（SDD），接收 X 射线。成像和记录系统：在 19" 荧光屏上显示扫描图像，可以拍照或输出到计算机的存储器内，转存为电子文档。真空系统：镜筒和样品室都是处于高真空状态下工作，由涡轮分子泵抽高真空。

（二）工作原理

扫描电镜成像如同电视机一样，利用电子束扫描功能实现。同步扫描发生器同时控制镜筒中扫描线圈和显示器扫描线圈，使电子枪发出的电子束与显示器电子束分别在样品和荧光屏上同步扫描，两者逐

点、逐行、逐帧对应，见图 2-2。电子束激发样品每个点的信号被探测器接收，经过放大送到显示器，调制荧光屏对应扫描点的亮度，如果样品每个点发出的信号强度不同，荧光屏上对应点的亮度就有差异，这就是扫描图像。

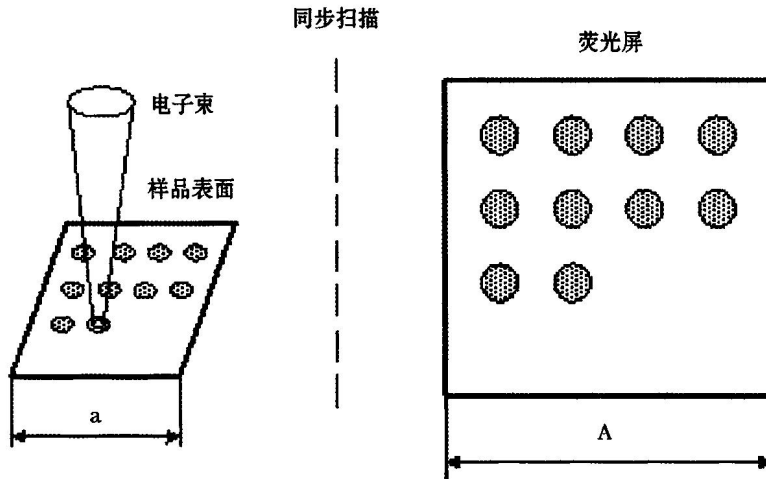


图 2-2 成像原理

(三) 操作步骤

1. 开机 在电镜基座的前面板上有绿 (ON)、黄 (STANDBY)、红 (OFF) 三个按钮，见图 2-3。接通电源后，按红钮，电镜通电；按黄钮，真空系统工作，整机处于待机状态；几分钟后按绿钮，开计算机，系统操作程序，SmartSEM 工作；注册和登录。

2. 键盘点击 Ctrl + G，打开扫描电镜控制窗口 (SEM Control) 该窗口包括多个控制版面：电子枪 (Gun)、探测器 (Detector)、光阑 (Aperture)、真空 (Vaccum)。操作时每个版面均有多种选择。

3. 放置样品 样品室通入氮气打开舱门，放入样品，抽真空：等待真空度 $< 5 \text{ mba}$ ，真空状态许可出现 (Vaccum State = Ready)。

4. 选择加速电压 (EHT) 和开电子枪，荧光屏上出现图像 可将亮度 (Brightness) 固定在 50%，调节衬度 (Contrast) 使图像亮暗合适。在低倍率下聚焦图像。

检查灯丝饱和与电子枪合轴：选择样品感兴趣部位，将图像放大到 $5000 \times$ 以上调焦，如果需要，进行物镜光阑合轴，并消像散。调整图像亮度和衬度。

5. 记录图像 选择较慢扫描速度，图像扫完一帧后将冻结 (Freeze) 在存储器中，以数字文档形式转存或打印；图像最终扫描时可以选用不同的降噪方式，提高图像信噪比。在冻结图像上可以输入文本或对特征物测量。

6. 关机 关电子枪 (Shutdown)，样品室放气取出样品，再抽真空；按提示关闭所有窗口与计算机，按黄钮，稍候再关红钮，电镜断电。

二、X-射线能谱仪

微区分析技术是检测从样品射出的特征性 X 射线的波长或能量。利用晶体衍射分光检测感兴趣的特

征 X 射线波长，称为波长色散谱仪（Wavelength Dispersive Spectroscopy, WDS，简称波谱仪）；检测特征 X 射线能量，称为能量色散谱仪（Energy Dispersive Spectroscopy, EDS，简称能谱仪）。本章节重点介绍能谱分析技术。EDS 可以与 EPMA，SEM，TEM 等组合，其中 SEM-EDS 组合是应用最广的显微分析仪器，EDS 的发展，几乎成为 SEM 的标配。是微区成分分析的主要手段之一。

能谱仪的结构：X-射线能谱仪主要由探测器、放大器、脉冲处理器、显示系统和计算机构成（图 2-4）。图 2-5 为能谱仪外观。

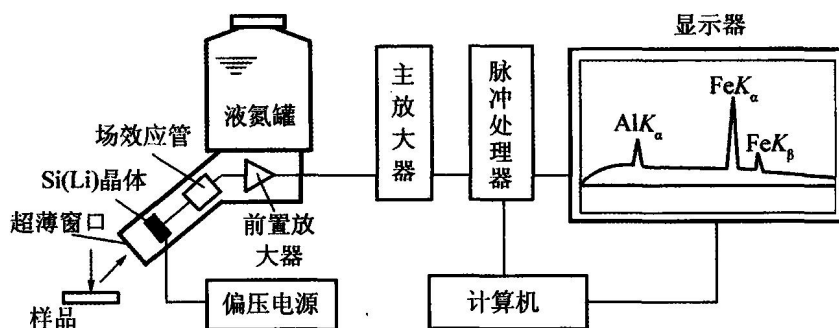


图 2-4 硅锂探测器能谱仪结构示意图



图 2-5 能谱仪外观

（一）能谱的特点

1. 能快速、同时对各种试样的微区内 Be-U 的所有元素进行定性、定量分析，几分钟即可完成。
2. 对试样与探测器的几何位置要求低：对 W、D 的要求不是很严格；可以在低倍率下获得 X 射线扫描、面分布结果。
3. 能谱所需探针电流小：对电子束照射后易损伤的试样，例如生物试样、快离子导体试样、玻璃等损伤小。