

· 基础研究 ·

SD 大鼠胆汁淤积性肝纤维化动物模型的建立与评价*

刘迎春, 顾小红[△]

(第三军医大学大坪医院野战外科研究所高干科, 重庆 400042)

摘要:目的 通过胆管结扎法建立胆汁淤积性肝纤维化动物模型,并对模型进行评价与探讨。方法 选用禁食 12 h、能自由饮水的 SD 雄性大鼠,腹腔麻醉后,分离胆管,以丝线两处剪断 1 cm 结扎胆管,分别于 0、2、4、6、8 周测定大鼠体质量、肝脏质量、肝功能、肝纤维化酶谱,镜下观察肝脏组织学及超微结构的改变,并设立假手术组和对照组。结果 4~6 周后,模型组大鼠体质量及肝脏质量较假手术组和对照组明显下降($P < 0.05$),肝脏湿质量明显下降($P < 0.05$),造模第 2 周即可见肝功能及肝纤维化酶谱较 0 周时明显升高($P < 0.05$),病理切片可见肝组织结构明显破坏,大量炎细胞浸润、胶原纤维增生及假小叶形成。结论 胆汁淤积性肝纤维化模型造模方法简单,形成周期短,是一种稳定且可靠的肝纤维化研究模型。

关键词:大鼠;肝硬化;动物模型;结扎胆管

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2012.05.016

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2012)05-0458-03

Establishment and evaluation of cholestatic liver fibrosis model induced by bile duct ligation in SD rat*

Liu Yingchun, Gu Xiaohong[△]

(Department of Geriatrics, Daping Hospital and Research Institute of Surgery, Third Military Medical University, Chongqing 400042, China)

Abstract: **Objective** To establish and evaluate the cholestatic liver fibrosis model induced by bile duct ligation in SD rat. **Methods** The bile ducts of the rats were occluded by ligation. Serum AST, ALT, TB, HA and LN were determined in 0, 2, 4, 6, 8 weeks separately, as well as body weight, liver weight and the changes of the liver histology and ultrastructure. A sham operation and normal group were used as control. **Results** After 2 weeks, serum AST, ALT, TB, HA and LN levels of the model group were much higher than those of the control group. After 4-6 weeks, body weight and liver weight were decreased significantly, amount of inflammatory cells infiltration in damage liver structure, collagen fiber hyperplasia and false flocculus were formed. **Conclusion** The model of liver cholestatic fibrosis induced by bile duct ligation is an ideal study model of liver fibrosis, because it is model-constructing method is simple, short for processing cycle, stable and harmless to human and environment.

Key words: rats; liver cirrhosis; animal model; bile duct ligation

肝纤维化是严重威胁人类健康的重要疾病之一,是多种慢性肝病发展至肝硬化的共同病理组织学基础,迄今没有理想的治疗方法。自从 1999 年 Friedman 等^[1]报道肝纤维化的可逆性后,研究肝纤维化发病机制和防治措施成为了攻克肝病的热点之一,为肝纤维化的有效治疗带来了新希望。本研究拟采用血流动力学改变、肝功能异常和肝脏病理学改变与人大小结节肝硬化基本一致的结扎胆管方法诱导胆汁淤积性肝纤维化动物模型,并对此模型进行深入的评价,为进一步在体研究肝纤维化发病机制和临床防治提供研究手段和方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物 清洁雄性 SD 大鼠(本院野战外科研究所动物中心提供),鼠龄 8~9 周,体质量 350~400 g,每次实验随机将大鼠分笼饲养(6 只/笼×16)于设定温度 25℃、定时光照(光照时间 08:00~20:00)房间,自由摄食和水,1 周后分组实验,实验均在 09:00~11:00 时开始,实验前禁食 12 h,自由饮水。

1.2 方法

1.2.1 肝纤维化动物模型的建立 随机将实验动物分为模型组、假手术组和对照组。(1)模型组:1%戊巴比妥钠 40 mg/kg 腹腔内注射麻醉,解剖分离出胆管,丝线两处剪断 1 cm 结扎胆管;(2)假手术组:剪开腹腔后随即关腹;(3)对照组:未给予任

何手术处理;各组大鼠术后均给予普通饲料喂养,自由摄取食物和水,环境温度 25℃,定时光照(光照时间 08:00~20:00)。取 0、2、4、6、8 周作为不同时相点进行实验。

1.2.2 观测指标 (1)一般情况:大鼠的皮毛色泽、食欲、活动、黄疸的变化以及死亡情况;(2)体质量和肝脏湿重:大鼠称质量后,腹腔注射麻醉,剪开腹腔,取出肝脏,称质量,计算肝脏指数(肝脏湿质量/体质量);(3)血清中肝功和肝纤维化酶谱:大鼠门静脉采血,分离血清,采用全自动生化分析仪检测;(4)肝脏大体标本及病理学检测:大鼠腹腔注射麻醉,3%戊二醛灌注 30 min,取肝组织 4℃固定,超薄切片,铀铅染色,透射电镜检查。另取部分肝右叶组织,4%多聚甲醛固定,石蜡包埋,切片,HE/Masson 染色,光镜观察。

1.3 统计学处理 采用 SPSS13.0 统计软件处理数据,多组比较采用多因素方差分析,两两比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 动物的体质量与一般情况 2~3 周前各组大鼠在整个实验过程中皮毛色泽、活动度、食欲基本一致。3 周后模型组大鼠皮毛光亮度逐渐变差,毛发较干燥,活动度减少,食欲较假手术组和对照组差,逐渐出现皮肤和毛发黄染,体质量

* 基金项目:重庆市自然科学基金资助项目(CSTC2010BB5165);中国人民解放军第三军医大学中青年科学基金资助项目(XG200543)。

[△] 通讯作者, E-mail: Guxiaohong@dpyytjzx.com。

表 1 各组大鼠体重质量变化 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	时间(周)				
	0	2	4	6	8
对照组	280.4±14.9	304.0±19.0	334.0±19.0	374.0±19.0	385.4±21.87
假手术组	274.4±20.9	294.0±19.0	333.4±17.7	357.2±26.7	334.6±17.39
模型组	281.2±15.9	291.2±14.8	267.0±9.7*	234.4±10.8#	224.0±18.10#

: $P < 0.05$, * : $P < 0.01$, 与对照组比较。

增加不明显(表 1), 随后大鼠一般情况逐渐变差, 体质量减少, 黄疸加深, 在分批实验的 3、4、5、6 周过程中均发生大鼠死亡, 死亡率 45%。而假手术组和对照组大鼠皮毛色泽、活动度、食欲基本一致, 体质量逐渐增加, 无大鼠死亡发生。4 周后模型组大鼠肝脏湿质量明显下降 ($P < 0.05$), 而假手术组和对照组肝脏湿质量无明显变化, 见表 1、2。

2.2 生化检测结果 第 2 周, 模型组血清中总胆红素的水平与 0 周时相比差异有统计学意义 ($P < 0.01$), 见表 3。第 4 周与 0 周比较模型组血清中各项生化指标均升高 ($P < 0.05$)。

表 2 各组大鼠肝脏湿质量的变化 ($\bar{x} \pm s, n=5$)

组别	时间(周)				
	0	2	4	6	8
对照组	6.7±1.0	7.6±1.4	8.0±1.4	8.4±1.4	8.6±1.3
假手术组	6.8±1.0	7.5±1.5	7.9±2.1	8.3±1.7	8.5±1.5
模型组	6.7±0.8	7.6±1.0	8.1±0.8#	10.3±0.9#	10.8±1.1#

: $P < 0.05$, 与对照组比较。

表 3 模型大鼠肝功能检查结果 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

指标	时间(周)				
	0	2	4	6	8
丙氨酸氨基转移酶	45.85±4.18	67.57±6.13	87.71±7.92#	181.33±16.31*	271.4±25.87*
天冬氨酸氨基转移酶	42.86±13.18	58.57±14.92	78.71±7.87#	171.0±33.57*	334.6±85.39*
总胆红素	1.21±0.22	36.71±4.39*	72.43±8.9*	152.67±20.47*	204.0±18.10*
透明质酸	88.00±7.18	115.14±7.43	384.43±34.28*	509.5±51.84*	184.33±53.58*
层黏蛋白	66.4±11.24	83.86±5.70	110.57±12.00#	511.6±72.97*	223.0±57.08*

: $P < 0.05$, * : $P < 0.01$, 与 0 周比较。

2.3 病理观察

2.3.1 肝脏大体标本及切面情况 肝纤维化组大鼠肝脏明显肿大, 肝包膜紧张, 边缘钝, 黄棕色, 质硬, 部分表面有细小结节, 切面可见岛屿状结节。假手术组和对照组大鼠肝脏体积正常, 包膜无紧张, 质软, 切面红润、油腻。

2.3.2 HE/Masson 染色 肝纤维化分级以 2000 年病毒性肝炎防治方案为标准, 将肝纤维化改变分为 S0~S4 级。第 2 周模型组大鼠肝组织损伤不明显, 仅有轻度的肝细胞肿胀, 汇管区可见纤维化, 部分有纤维间隔形成, 病理学分级多为 S1, 肝细胞空泡变性, 轻度脂肪变性; 第 4 周见大量胶原组织沉积, 纤维增生明显, 胶原纤维从汇管区及中央静脉周围向肝小叶内延伸, 病理学分级多为 S2~S3 级, 肝组织结构轻微破坏, 肝细胞肿胀明显, 空泡变性伴脂肪变性也加重, 伴有炎性细胞浸润。第 6~8 周肝组织结构破坏更严重, 肝细胞大片状变性、坏死及空泡变, 见大量炎细胞浸润, 大量胶原纤维从汇管区及中央静脉周围向肝小叶内延伸, 可见假小叶形成, 病理学分级为 S3~S4, 见封 3 图 1~4。

3 讨论

建立合适的肝纤维化动物模型是研究肝纤维化发生机制、筛选护肝药物的前提。尽管肝纤维化造模方法很多, 但不同物质诱导肝纤维化的机制不同, 并产生不同的病理和生化改变, 有各自的优、缺点。理想的肝纤维化模型应该具有: (1) 与人类疾病相似, 可复制人类肝纤维化的形态特征; (2) 病变有一定发

展过程, 病理改变呈阶段性, 即有明显分期; (3) 造模方法简单易行, 可重复; (4) 形成率高, 死亡率低; (6) 所用方法对人类无害或危害较小, 环境污染少。

3.1 四氯化碳(CCl₄)中毒性肝纤维化动物模型^[2-9] CCl₄ 进入人体后可直接进入肝细胞, 溶解肝细胞膜上的脂质成分, 也可通过影响肝细胞色素 P450 依赖性混合功能氧化酶的代谢, 生成三氯甲基自由基和氯甲基自由基, 启动脂质过氧化作用, 致肝细胞损伤、变性、坏死, 长期反复刺激可诱导肝纤维化形成。单因素 CCl₄ 攻击建立的肝纤维化模型, 具有简便、易行、廉价且耗时短(一般为 8 周)、肝纤维化过程稳定、病变典型的特点, 目前仍被广泛使用。但该模型死亡率较高, 停止造模后有一定自然恢复趋势。复合因素模型除了皮下注射 CCl₄ 外, 还在饲料中混以猪油、胆固醇, 并以 30% 的乙醇为饮料, 最短 42 d 造模即可成功。该模型成功率高, 与人的肝纤维化接近, 主要用于肝纤维化中糖、蛋白质、脂肪、色素等代谢障碍, 以及迅速出现的营养不良、脂肪变性、肝纤维化的形态学研究。但此模型中 CCl₄ 的肝毒性作用强且迅速, 剂量掌握不当时死亡率很高, 一定程度会增加实验经费, 且 CCl₄ 对人和动物均有毒性作用, 使得此模型具有一定局限性。

3.2 乙醇诱导肝纤维化动物模型^[3-5,10] 肝脏是乙醇代谢的主要场所, 乙醇及其代谢产物乙醛是高反应活性分子, 能与蛋白质结合形成乙醛-蛋白质复合物, 后者不但对肝细胞有直接损伤作用, 而且还可以作为新抗原诱导细胞及体液免疫反应,

导致肝细胞受免疫反应的攻击。目前多采用乙醇加高脂饮食诱导大鼠肝纤维化模型,60%乙醇,1.5 mL/100 g 大鼠体质量的剂量灌胃,每日 2 次,高脂饮食,实验动物自由饮水,6 个月后可见中央静脉和窦周肝纤维化。该模型复制方法简单,肝纤维化程度较高,稳定可靠,与人类饮酒而导致的肝纤维化较相似,可广泛用于酒精性肝病的研究,依据其发展处于不同时期可进行酒精性脂肪肝和肝纤维化的研究。但肝纤维化所需时间较长,操作技术要求较高,灌胃法操作不当可引起相关的并发症,如急性胃扩张、酒精误入气管均可引起大鼠死亡。

3.3 实验性免疫性肝纤维化模型^[3-6,11] 免疫性肝纤维化模型可能机制是由 I、III 型变态反应引起。异种动物血清(如猪、牛、马)或异体蛋白(如人血清清蛋白、猪血清清蛋白、牛血清清蛋白等)尾静脉注入大鼠机体后,刺激其产生相应的抗体,当抗原再次进入机体后,抗原抗体结合,形成抗原抗体复合物,激活补体。由于抗原的长期、反复刺激,过量的免疫复合物来不及被清除,沉积于肝脏的血管壁内外,引起血管炎或血管周围炎,造成肝损伤,长期反复,最终发展成肝纤维化和肝硬化。此模型与多数人类慢性肝炎所致的肝纤维化在发病机制上有一定的相似之处,有利于从免疫学角度探讨肝纤维化发病机制及评价药效。但无病毒持续复制和肝实质持续损伤的过程,且有自愈倾向,造模周期较长,大鼠死亡率较高。

3.4 血吸虫性肝纤维化模型^[3-5,8-9] 主要用于血吸虫病性肝硬化门脉高压发病机制、病情转归、外科手术改良以及药物筛选研究。但实验过程中有可能感染实验者及环境而造成污染,且造模时间长(60~90 d),死亡率高(40%~50%);二甲基亚硝胺致肝纤维化模型造模周期短,大鼠死亡率低,肝纤维化形成相对稳定,便于在药物抗肝纤维化研究中推广,缺点是容易掌握剂量。

综合文献^[10-15],本研究采用胆总管套扎法建立大鼠肝纤维化模型,形成人为的肝外胆道梗阻,进而肝细胞缺血和坏死,胶原组织大量沉积,向肝小叶内伸展,包围肝小叶并散布于肝细胞周围,最终形成肝硬化。此模型建立时间相对较短,6~8 周即可见肝脏体积缩小,表面有细小颗粒样结节,镜下可见肝细胞空泡样变性,大量纤维组织增生,病理学分级 S4 级的重度肝纤维化和假小叶形成。以往研究提示,胆汁性肝纤维化模型血流动力学改变、肝功能异常和肝脏病理学改变与人小胆管肝硬化基本一致,是进行门静脉高压症血流动力学研究、肝纤维化机制、筛选非创伤性肝纤维化血清学指标、寻找理想抗肝纤维化治疗药物研究的理想模型。其存在的问题是:有时结扎的胆管可再通使组织学逆转,胆汁过度淤积致死亡率高(30%~50%),因此,本实验在胆管结扎时结扎两处,并从中切断,从而避免再通。

总之,本实验所建立的胆汁淤积性肝纤维化模型具有造模方法简单,形成周期短,形成的肝纤维化稳定可靠,实验中均无对动物和人有毒物的物质接触。因此,此模型是研究肝纤维化发病机制和寻找理想抗肝纤维化治疗药物研究的理想模型。

参考文献:

[1] Friedman SL. Molecular mechanisms of hepatic fibrosis and principles of therapy[J]. *Gastroenterol*, 1997, 32(3): 424-430.

[2] Theodorakis NG, Wang YN, Wu JM et al. Role of endothelial nitric oxide synthase in the development of portal hypertension in the carbon tetrachloride-induced liver fibrosis model[J]. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*, 2009, 297(4): G792-799.

[3] 魏泓,孙敬方,李双良等. 医学实验动物学[M]. 成都:四川科学技术出版社,2001,239-429.

[4] Hessien MH, Sharkawi IM, Barbary AA, et al. Non-invasive index of liver fibrosis induced by alcohol, thioacetamide and Schistosomal infection in mice[J]. *BMC Gastroenterol*, 2010, 10(53): 1-11.

[5] 李志钢,杨晋翔,张伟,等. 肝纤维化实验动物模型的建立与评价[J]. *北京中医药大学学报:中医临床版*, 2009, 16(4): 43-46.

[6] Zellos A, Boitnott JK, Schwarz KB, et al. New-onset autoimmune hepatitis in young patients with preexisting liver disease[J]. *Dig Liver Dis*, 2010, 42(9): 657-660.

[7] Chávez E, Segovia J, Shibayama M, et al. Antifibrotic and fibrolytic properties of celecoxib in liver damage induced by carbon tetrachloride in the rat[J]. *Liver Int*, 2010, 30(7): 969-978.

[8] Hou G, Dick R, Brewer GJ. Improvement in dissolution of liver fibrosis in an animal model by tetrathiomolybdate[J]. *Exp Biol Med*, 2009, 234(6): 662-665.

[9] Xu XB, Leng XS, He ZP, et al. Observation on experimental liver fibrosis and hepatic carcinogenesis of HBV gene knock-in transgenic mice induced by CCl₄/ethanol[J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2010, 90(12): 822-825.

[10] Degos F, Lebrun L, Perez P, et al. Methods and interest of noninvasive assessment of liver fibrosis are still in debate[J]. *Hepatology*, 2011, 53(5): 1781-1783.

[11] Toda K, Kumagai N, Kaneko F, et al. Pentoxifylline prevents pig serum-induced rat liver fibrosis by inhibiting interleukin-6 production[J]. *J Gastroenterol Hepatol*, 2009, 24(5): 860-865.

[12] Onozuka I, Kakinuma S, Kamiya A, et al. Cholestatic liver fibrosis and toxin-induced fibrosis are exacerbated in matrix metalloproteinase-2 deficient mice[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 406(1): 134-140.

[13] Rosenberg P, Sjöström M, Söderberg C, et al. Attenuated liver fibrosis after bile duct ligation and defective hepatic stellate cell activation in neural cell adhesion molecule knockout mice[J]. *Liver Int*, 2011, 31(5): 630-641.

[14] Aube C, Moal F, Oberti F, Roux J, et al. Diagnosis and measurement of liver fibrosis by MRI in bile duct ligated rats[J]. *Dig Dis Sci*, 2007, 52(10): 2601-2609.

[15] Georgiev P, Jochum W, Heinrich S, et al. Characterization of time-related changes after experimental bile duct ligation[J]. *Br J Surg*, 2008, 95(5): 646-656.