

· 论 著 ·

不同剂量 CCl₄ 急性肝损伤模型的评价*梁道明¹, 胡智兴², 罗敏³, 张毅¹, 陈嘉勇¹

(1. 昆明医科大学第二附属医院普通外科, 昆明 650101; 2. 昆明医科大学药理学教研室, 昆明 650031;

3 昆明医科大学云南省天然药物药理重点实验室, 昆明 600031)

摘要:目的 建立一种简单易行和系统稳定的 CCl₄ 诱导的急性肝损伤模型, 以便于对肝细胞移植效果进行观察。方法 选用 20% 和 50% 浓度的 CCl₄ 植物油溶液 2 mL/kg 腹腔注射小鼠, 分别于在不同时间点取材。检测小鼠的存活率、肝功能中的血丙氨酸转氨酶(ALT)和天门冬氨酸转氨酶(AST)以及肝脏病理变化。结果 20% CCl₄ 腹腔注射小鼠的生存率高于 50%。实验组的动物血 ALT 和 AST 均明显升高, 显著高于对照组($P < 0.01$), 但两实验组之间差异无统计学意义($P > 0.05$), 病理切片显示 20% CCl₄ 腹腔注射小鼠肝细胞出现典型的胞浆疏松化、气球样变, 可见散在的点状、碎片状坏死及炎性细胞浸润; 50% CCl₄ 除上述病变明显加重外, 还伴有明显的纤维化改变。结论 应用 20%~50% CCl₄ 在 2 mL/kg 剂量下腹腔注射可诱导出不同程度的较为稳定的肝损伤, 其浓度的高低决定肝损伤的程度; 20%~50% CCl₄ 所致急性肝损伤是肝细胞移植治疗实验较为理想的模型。

关键词: 肝细胞移植; 急性肝损伤; 四氯化碳

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.01.006

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2014)01-0018-03

Evaluation of acute liver injury in mice model with different does of CCl₄*Liang Daoming¹, Hu Zhixing², Luo Min³, Zhang Yi¹, Chen Jiayong¹

(1. Department of General Surgery, the Second Affiliated Hospital of Kunming Medical University,

Kunming, Yunnan 650101, China; 2. Department of Pharmacology, Kunming Medical University,

Kunming, Yunnan 650031, China; 3. Yunnan Key Laboratory of Pharmacology for Natural

Products, Kunming Medical University, Kunming, Yunnan 650031, China)

Abstract: Objective To establish a simple, stable acute liver injury model induced by CCl₄ to observe effects of hepatocyte transplantation. Methods CCl₄ plant oil with different concentration of 20% and 50% was used in mice by intraperitoneal injection, of which the dose was 2 mL/kg, and then materials were taken at different time points respectively. Mice survival rate, alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and the pathological changes of the liver were detected. Results Mice survival rate in 20% CCl₄ intraperitoneal injection was significantly higher than that of 50%. ALT and AST in experiment group were significantly higher than that of control group, but there was no significant difference between two experimental groups. Pathological examination showed that mice liver cells showed typical cytoplasmic, ballooning, scattered punctate, piecemeal necrosis and inflammatory cell infiltration in 20% CCl₄ intraperitoneal injection; while in 50% CCl₄, there was obvious fibrosis, in addition to the mentioned heavier lesions. Conclusion 20%–50% CCl₄ intraperitoneal injection in 2 mL/kg dose can induce different degrees of relatively stable liver injury, and its concentration determines the degree of liver injury. Acute liver injury induced by 20%–50% CCl₄ was an ideal model for hepatocyte transplantation experiment.

Key words: hepatocyte transplantation; acute liver injury; carbon tetrachloride

肝细胞移植被认为是治疗各种肝损伤和肝衰竭的有效的方法之一^[1]。对其有效性的评价是建立在广泛的实验动物研究基础上, 在实验动物中, 肝细胞移植(包括重复多次移植)不存在肝细胞缺乏的优点, 因而动物肝细胞移植技术研究较多, 发展也较快^[2]。目前, 动物肝损伤模型可分为急性和慢性两种。四氯化碳(CCl₄)为目前最为常用的诱导急性肝损伤的药物, 但在 CCl₄ 诱导的急性肝损伤模型中, 缺乏对给药剂量、途径和时间间隔等方面统一的标准。本实验拟建立一种简单易行和系统稳定的 CCl₄ 诱导的急性肝损伤模型的方法, 以期对肝细胞移植建立良好的实验平台。

1 材料与与方法

1.1 材料 健康昆明小鼠 56 只, 体质量 18~22 g, 购自昆明医科大学动物科, 许可证号: (滇)SYXK2005-0003, 实验过程中对动物处置符合动物伦理标准。CCl₄ (北京化学试剂公司), 鼠

丙氨酸转氨酶(ALT)试剂盒、鼠天门冬氨酸转氨酶(AST)试剂盒(上海劲马生物科技有限公司), 酶联免疫仪(美国 M262154)。

1.2 动物模型的制备和实验分组 取健康昆明小鼠 56 只随机分为实验 I 组、实验 II 组(每组各 24 只)和对照组(8 只)。在预试验中确定 CCl₄ 的注射剂量和间隔时间: 在实验 I 组, 给予新鲜配制的 20% CCl₄ 植物油溶液 2 mL/kg 腹腔注射; 在实验 II 组, 给予新鲜配制的 50% CCl₄ 植物油溶液 2 mL/kg 腹腔注射; 给予对照组动物注射同等剂量的植物油。

1.3 主要检测指标 根据小鼠病死率、肝脏病理及肝功能损伤程度选择小鼠急性肝功能衰竭(acute liver failure, ALF)的最适诱导剂量, 建立小鼠急性肝功能衰竭模型。每组每次随机解剖 8 只, 并观察肝脏大体形态变化。取材时, 应用 0.6% 戊巴比妥钠麻醉大鼠, 采集大鼠下腔静脉血 3 mL, 3 000 g 离心

10 min, 留取血清, 采用全自动生化分析仪测定 ALT 和 AST 水平。剪取大鼠肝左叶相同部位肝组织, 置于 4% 甲醛溶液中固定, 石蜡包埋, 制备 4 μm 切片, HE 染色, 在光学显微镜下观察肝组织的损伤情况。

1.4 统计学处理 采用 SPSS11.5 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 独立样本用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 动物存活率 小鼠在 CCl₄ 诱导后 6 h, 部分小鼠精神萎靡, 身体蜷缩, 12 h 后部分小鼠开始进入昏迷状态, 且死亡时间大多集中在 12 h~3 d。在 3, 7 d, 实验 I 组存活率明显高于实验 II 组 ($P < 0.05$), 见表 1。

表 1 CCl₄ 诱导 ALF 过程中各组小鼠的存活率 (%)

时间(d)\不同处理组	1 d	3 d	7 d
对照组	100	100	100
实验 I 组	75.0	50.0	40.0
实验 II 组	50.0	37.5	12.5

2.2 肝功能指标 实验组的动物血 ALT 和 AST 均明显升高, 显著高于对照组 ($P < 0.01$), 但两实验组之间差异无统计学意义 ($P > 0.05$), 见图 1。

2.3 肝脏病理学变化 正常小鼠肝脏呈鲜红色, 表面光滑、边

缘锐利。实验 I 组的肝脏观察到肝细胞的气球样变、脂肪变性及炎性细胞浸润等逐渐加重, 伴有肝细胞再生等。在实验 II 组, 上述病变进一步加重。实验 I 组动物肝脏体积进一步缩小, 边缘较钝, 质韧, 颜色稍黯淡, 表面可见多量的渗出液, 但未见周围粘连; 实验 II 组肝脏体积明显缩小, 颜色黯淡, 边缘钝, 质硬, 表面有大量纤维渗出物, 与周围组织粘连 (图 2C); 病理切片显示实验 I 组动物肝细胞出现典型的胞浆疏松化、气球样变, 可见散在的点状、碎片状坏死及炎性细胞浸润; 实验 II 组除上述病变明显加重外, 还伴有明显的纤维化改变 (图 2C、D 和 E); 正常肝组织肝小叶形态结构正常, 汇管区形态完整, 未见变性和坏死 (图 2A、B)。

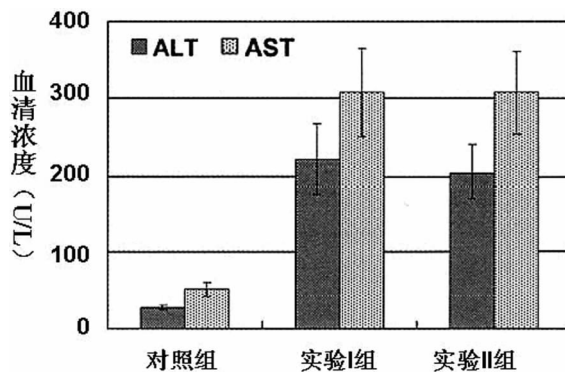


图 1 各组小鼠血清 ALT 和 AST 水平比较

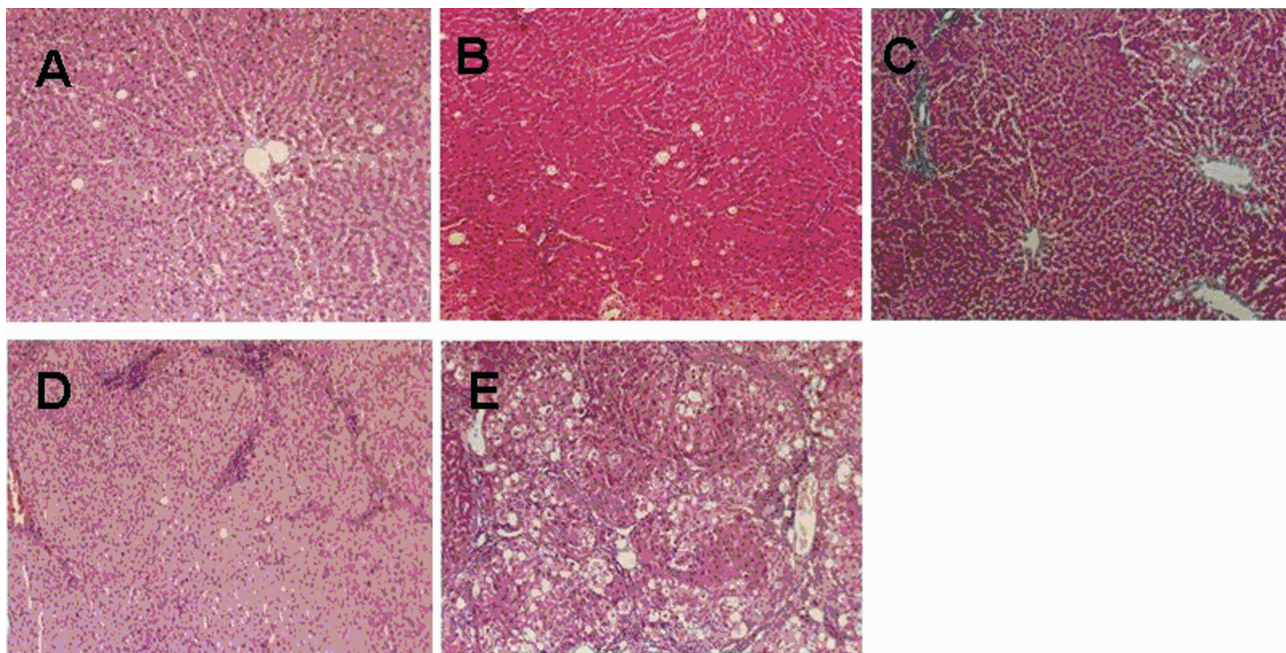


图 2 肝脏病理学变化

3 讨 论

ALF 是指健康者在 6 个月内由严重的肝功能紊乱发展而成的临床综合征, 由大面积的肝细胞坏死引起, 并伴有进展迅速的肝性脑病及严重的肝功能损害如凝血障碍、黄疸等, 是各种肝病特别是病毒性肝炎的主要死因之一^[3]。ALF 具有复杂的临床征状和较高的病死率。在实验研究中, 建立急性肝衰竭模型应该满足 Rahmann 与 Hodgson 制定的标准, 即动物模型应具有可逆性、重复性、ALF 能导致死亡和在诱导为 ALF 与模型死亡之间要有足够的治疗时间 4 个条件。然而, 迄今能简单、准确地重现人 ALF 的动物模型尚未见报道, 目前使用的模

型都有很大局限性^[4-7]。在此作者的目的是建立一个简单的与临床相关的 ALF 动物模型, 以便于对肝前体细胞移植效果进行观察。

肝细胞移植是近 10 年在广泛的实验动物研究基础上建立起来的, ALF 动物模型成为肝细胞移植的关键问题之一。在实验动物中, 多次移植不存在肝细胞缺乏的优点, 因而动物肝细胞移植技术研究较多, 发展也较快。在当前动物模型研究中, 依据移植的肝细胞来源不同, 可分为自体同源型、同基因型、同种异体和异种异体肝细胞移植类型, 许多学者已经证实了各种来源的肝细胞均可用于细胞移植, 并且取得了良好的治

疗效果^[8-10]。依据细胞代谢障碍类型的不同,动物模型可以分为 Crigler-Najjar I、酪氨酸血症 I 型模型(FAH 小鼠模型)、Wilson's 疾病大鼠模型、进展性家族性肝内胆胆汁淤积 III 型、mdr2 小鼠甲酰酶(ornithine transcarbamylase, OTC)缺陷模型、spf-ash 胆固醇血症模型(Watanabe 可遗传的高脂血症家兔模型)和 lmatian 狗模型。除此之外,也有许多其他途径可以制备出小鼠急性肝坏死模型,包括醋酐、二甲基亚硝胺、D-半乳糖、感染和外科肝次全切除术制备的急性肝衰竭模型;目前还采 CCl₄ 在大鼠建立起代偿失调性肝硬化模型^[11-14]。

CCl₄ 是诱导动物肝损伤模型的最常用的化学物质^[15],它在肝滑面内质网代谢,分解成为 ·CCl₃ 和 Cl,具有自由基的 ·CCl₃ 可通过共用电子对和 P450 磷脂部分发生反应,继而与膜脂质和蛋白质大分子进行共价结合,使蛋白质代谢障碍,引起膜结构和功能完整性的破坏。另外,·CCl₃ 可抑制细胞膜和微粒体膜上钙泵的活性,使内流增加。两种途径最终导致肝细胞浆中可溶性溶酶体酶渗出入血,引起一系列生化指标改变。

作者选用了两种不同剂量的 CCl₄ 分别腹腔注射诱导出不同程度的肝损伤,实验中采用的两种剂量的 CCl₄ 均能够引起典型的肝细胞损伤,且大剂量诱导的病变程度比较重。给予 50% CCl₄ 后 12~24 h,血清 ALT 活性即显著升高,24~72 h 后中央静脉周围出现广泛坏死;7d 后,肝组织即仍有部分坏死。应用 20%~50% CCl₄ 在 2 mL/kg 剂量下腹腔注射可诱导出不同程度的较为稳定的肝损伤,并且其浓度的高低决定肝损伤的程度。由于 CCl₄ 所致的肝衰竭模型损伤较重、模型肝功能受损持续时间长,有利于观察移植细胞情况。因此 20%~50% CCl₄ 所致急性肝损伤是肝细胞移植治疗实验较为理想的模型。

参考文献:

- [1] Strom S, Fisher R. Hepatocyte transplantation; new possibilities for therapy[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(2): 568-571.
- [2] Wege H, Le HT, Chui MS. Telomerase reconstitution immortalizes human fetal hepatocytes without disrupting their differentiation potential[J]. *Gastroenterology*, 2003, 124(2): 432-444.
- [3] O'Grady J. Acute liver failure[J]. *Postgrad Med J*. 2005, 81(953): 148-154.
- [4] Newsome PN, Plevis JN, Nelsone LJ, et al. Animal models of fulminant hepatic failure: a critical evaluation[J]. *Liver Transpl*, 2000, 6(1): 21-31.
- [5] Rahman TM, Hodgson HJ. Animal model of acute hepatic failure[J]. *Int J Exp Pathol*, 2000, 81(2): 145-157.
- [6] Belanger M, Butterworth RF. Acute liver failure: a critical appraisal of available animal models[J]. *Metab Brain Dis*, 2005, 20(4): 409-423.
- [7] van de Kerkhove MP, Hoekstra R, van Gulik TM, et al. Large animal model of fulminant hepatic failure in artificial and bioartificial liver support research[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(9): 1613-1625.
- [8] Akhter J, Johnson LA, Gunasegaram A, et al. Hepatocyte transplantation: a review of laboratory techniques and clinical experiences[J]. *Surgeon*, 2007, 5(3): 155-64.
- [9] Hughes RD, Mitry RR, Dhawan A. Hepatocyte transplantation in the treatment of liver diseases-future seems bright after all[J]. *Pediatric Transplantation*, 2008, 12(1): 4-5.
- [10] Cho CH, Parashurama N, Park EY, et al. Homogeneous differentiation of hepatocyte-like cells from embryonic stem cells; applications for the treatment of liver failure[J]. *FASEB J*, 2008, 22(3): 898-909.
- [11] Patzer JF, Mazoriegos GV, Lopez R. Preclinical evaluation of the Excorp Medical Inc, Bioartificial Liver Support System[J]. *Jam Coll Surg*, 2002, 195(3): 299-310.
- [12] Ishizawa Y, Totsuka E, Umehara M, et al. Efficacy of double-filtration plasmapheretic cross-circulation with a high-permeability membrane using canine harvested liver in porcine fulminant hepatic failure model[J]. *Transpl Proceed*, 2004, 36(8): 2344-2348.
- [13] San-Miguel B, Alvarez M, Culebras JM, et al. N-acetylcysteine protects liver from apoptotic death in an animal model of fulminant hepatic failure[J]. *Apoptosis*, 2006, 11(11): 1945-1957.
- [14] Nardo B, Tsivian M, Neri F, et al. Extracorporeal portal vein oxygenation improves outcome of acute liver failure in swine[J]. *Transpl Proceed*, 2008, 40(6): 2046-2048.
- [15] Yasuda M, Okabe T, Itoh J, et al. Differentiation of necrotic cell death with or without lysosomal activation; application of acute liver injury models induced by carbon tetrachloride (CCl₄) and dimethylnitrosamine (DMN) [J]. *J Histochem Cytochem*, 2000, 48(10): 1331-1339.

(收稿日期: 2013-08-13 修回日期: 2013-09-22)

(上接第 17 页)

- [1] Nitric oxide-induced regulatory T cells inhibit Th17 but not Th1 cell differentiation and function[J]. *J Immunol*, 2013, 191(1): 164-170.
- [2] Zhang X, Koldzic DN, Izikson L, et al. IL-10 is involved in the suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD25⁺ CD4⁺ regulatory T cells[J]. *Int Immunol*, 2004, 16(2): 249-256.
- [3] Brenu EW, Staines DR, Tajouri L, et al. Heat shock proteins and regulatory T cells[J]. *Autoimmune Dis*, 2013

(2013), 813256.

- [4] Mendoza L, Pardo F. A robust model to describe the differentiation of T-helper cells[J]. *Theory Biosci*, 2010, 129(4): 283-293.
- [5] Ni CN, MacConmara M, Zang Y, et al. Enhanced regulatory T cell activity is an element of the host response to injury[J]. *J Immunol*, 2006, 176(1): 225-36.

(收稿日期: 2013-09-08 修回日期: 2013-10-22)