

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2016.25.004

肝缺血再灌注诱导大鼠肝纤维化动物模型的建立*

刘俊平¹, 刘仁贵², 崔学斌², 苏娟¹, 秦燕^{1△}

(1. 大理大学基础医学院生理与病理生理学教研室, 云南大理 671000;

2. 大理大学附属医院普外科, 云南大理 671000)

[摘要] **目的** 建立肝缺血再灌注诱导大鼠肝纤维化动物模型。**方法** 将 16 只 SD 雄性大鼠分为假手术组(Sham 组)及肝纤维化模型组(HF 组), 每组 8 只。HF 组用无创动脉夹夹闭大鼠肝左叶和中叶的肝动脉、门静脉, 造成 70% 的肝脏缺血, 夹闭 90 min 后, 开夹, 继续饲养 4 周。Sham 组仅行肝蒂部骚扰。4 周后处死动物, 检测血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)、放射免疫法测定血清透明质酸(HA)及层粘连蛋白(LN)水平; 测定肝组织羟脯氨酸(Hyp)水平; Western blot 检测 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)的表达量; 苏木素-伊红(HE)染色观察肝纤维化的程度。**结果** 与 Sham 组比较, HF 组血清 ALT、AST、HA 及 LN 水平明显升高($P < 0.05$), 肝组织 Hyp 水平升高($P < 0.05$)。Western blot 结果显示, HF 组 α -SMA 蛋白的表达量明显高于 Sham 组($P < 0.05$)。光镜下 HF 组肝细胞变性和坏死程度较 Sham 组明显加重, 炎性细胞浸润明显, 部分有纤维隔的形成。**结论** 肝缺血再灌注操作可以成功诱导大鼠肝纤维化动物模型。

[关键词] 肝硬化; 模型, 动物; 肝缺血再灌注**[中图分类号]** R575.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2016)25-3469-03

The establishment of hepatic fibrosis model in rats induced by hepatic ischemia-reperfusion operation*

Liu Junping¹, Liu Rengui², Cui Xuebin², Su Juan¹, Qin Yan^{1△}

(1. Department of Physiology and Pathophysiology, School of Basic Medicine, Dali University, Dali, Yunnan 671000, China; 2. Department of General Surgery, Affiliated Hospital of Dali University, Dali, Yunnan 671000, China)

[Abstract] **Objective** To establish the model of hepatic ischemia-reperfusion induced hepatic fibrosis. **Methods** Totally 16 male Sprague-Dawley rats were divided into two groups: sham group (sham, $n=8$), hepatic fibrosis group (HF, $n=8$). The animal model of hepatic fibrosis was subjected to 90 minutes of ischemia in the left/middle liver lobe to induce partial hepatic ischemia (70%) in HF group, followed by reperfusion, and continued raising for 4 weeks. The rats in sham group were only harassed the hepatic pedicle. The rats were killed at the end of 4 weeks. ALT, AST and HA, LN levels were used to assess the degree of the liver damage and hepatic fibrosis. Liver tissues were employed to measured Hyp. The expression of α -SMA was detected by Western blot. The histological changes of the liver were determined by HE staining. **Results** Compared with the sham group, the serum ALT and AST markedly increased in the HF group, so did the level of HA and LN ($P < 0.05$); the content of Hyp in liver tissue increased in the HF group ($P < 0.05$); the expression of α -SMA protein in the HF group was markedly higher than it in the sham group ($P < 0.05$). The degrees of degeneration and necrosis of hepatocyte in the HF group were significantly more aggravated and infiltration of inflammatory cell were more obvious by the optical microscope, partially formed the fibrous septum compared with the Sham group. **Conclusion** Liver fibrosis model of rats can be successfully induced by hepatic ischemia-reperfusion operation.

[Key words] liver cirrhosis; models, animal; hepatic ischemia-reperfusion

肝纤维化是肝组织受损后的一种损伤修复反应, 是慢性肝病发展为肝硬化必经的病理过程。由肝纤维化导致的肝硬化在全球呈现高发病率和死亡率高, 严重威胁着公众健康^[1-3]。目前的研究证实肝纤维化是可以逆转的, 但一旦进展至肝硬化则是不可逆性病变, 因此延缓、阻断乃至逆转肝纤维化是目前治疗各种慢性肝病的关键环节。肝纤维化动物模型是研究肝纤维化的前提之一, 但现有的肝纤维化动物模型与人类诸多因素形成的肝纤维化有很大差别, 迄今为止没有一种肝纤维化动物模型与人类疾病完全相似^[4-5]。因此, 有必要进一步探寻符合人类病因病理的肝纤维化动物模型。

肝缺血再灌注损伤 (hepatic ischemia-reperfusion injury,

HIRI) 在肝移植、休克复苏、严重肝外伤及肝叶切除等过程中均不可避免, 是影响治疗效果和预后的重要原因之一。多种细胞因子释放、枯否细胞活化、氧化应激与 HIRI 的发生、发展密切相关, 而这些因素都可以激活肝星状细胞 (hepatic satellite cell, HSC), 从而启动和促进肝纤维化^[6-8]。基于此, 本研究利用肝缺血再灌注操作, 诱导一种新型的大鼠肝纤维化动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SD 大鼠, 雄性, SPF 级, 体质量 210~250 g, 购自昆明医科大学实验动物中心 [SCXK(滇)2011-0004]。

* 基金项目: 云南省自然科学基金项目资助 (2011FZ164)。 作者简介: 刘俊平 (1991-), 在读硕士, 主要从事消化生理与病理研究。

△ 通讯作者, E-mail: lantingxun@126.com。

1.1.2 药物与试剂 血清透明质酸(HA)试剂盒及层粘连蛋白(LN)试剂盒(北京北方生物技术有限公司);考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒及羟脯氨酸(Hyp)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所);小鼠抗大鼠 α -平滑肌肌动蛋白(α -SMA)单克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司);HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(北京中杉生物技术有限公司);其他试剂均为分析纯。

1.1.3 主要仪器 7060 全自动生化分析仪(日本日立公司);自动放射免疫计数机(中国科学技术大学中佳公司);JY88-II 超声细胞粉碎机(宁波新芝科器研究所);T6 紫外分光光度计(北京普析);TGL-18R 高速冷冻离心机(珠海黑马);免疫印迹电泳系统(北京六一仪器厂)。

1.2 方法

1.2.1 分组与模型制备 16 只 SD 雄性大鼠分为假手术组(Sham 组)及肝纤维化模型组(HF 组),每组 8 只。HF 组行腹部正中切口,游离肝蒂部的胆管、门静脉及肝动脉,用无创动脉夹夹闭门静脉及肝动脉分支,以阻断入肝约 70% 的血流;夹闭 90 min,继续饲养 4 周。Sham 组行肝蒂部骚扰,90 min 后关腹。

1.2.2 Western blot 检测肝组织 α -SMA 表达 提取蛋白样品,用考马斯亮蓝法检测蛋白浓度,每泳道 50 μ g 蛋白进行十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶(SDS-PAGE)电泳,将聚偏二氟乙烯膜(PVDF 膜)平衡后湿转法转印 3 h(冰浴),之后 5% 脱脂奶粉封闭 1 h,小鼠抗大鼠 α -SMA 单克隆抗体(抗体浓度 1:300)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,3 次漂洗后以 HRP 标记的羊抗小鼠 IgG(抗体浓度 1:500)室温下震荡孵育 1 h,免疫印迹化学发光(ECL)显色,暗室曝光。

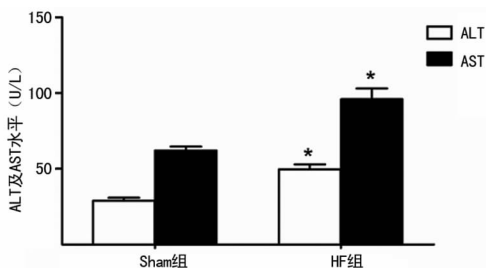
1.2.3 肝组织苏木素-伊红(HE)染色 固定好的肝组织标本经常规脱水、石蜡包埋组织制作切片(4 μ m),行 HE 染色观察肝组织病理学变化。

1.2.4 指标检测 全自动生化分析仪检测肝功能指标血清丙氨酸氨基转移酶(ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(AST)。放射免疫法测定血清 HA 及 LN 水平。制备 10% 的肝组织匀浆,严格按照试剂盒说明书提供的方法进行操作,采用 T6 紫外分光光度计检测 Hyp。

1.3 统计学处理 应用 SPSS17.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用完全随机设计两独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

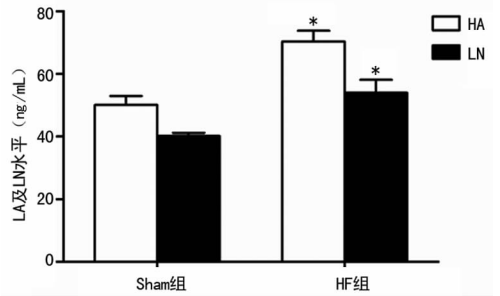
2.1 大鼠肝功能指标的变化 与 Sham 组比较,HF 组大鼠血清 ALT、AST 水平明显升高($P < 0.05$)。见图 1。



*: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较。

图 1 大鼠血清 ALT、AST 水平的变化

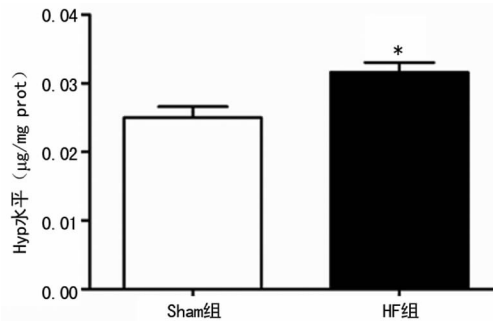
2.2 大鼠血清 HA 及 LN 水平的变化 与 Sham 组比较,HF 组大鼠血清 HA 及 LN 水平均明显升高($P < 0.05$)。见图 2。



*: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较。

图 2 大鼠血清 HA、LN 水平的变化

2.3 大鼠肝组织 Hyp 水平的变化 与 Sham 组比较,HF 组大鼠肝组织 Hyp 水平明显升高($P < 0.05$)。见图 3。



*: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较。

图 3 大鼠肝组织 Hyp 的水平变化

2.4 大鼠肝组织 α -SMA 蛋白表达水平 Sham 组肝组织 α -SMA 蛋白的表达量极低,而 HF 组 α -SMA 蛋白表达量明显高于 Sham 组($P < 0.05$)。见图 4、5。

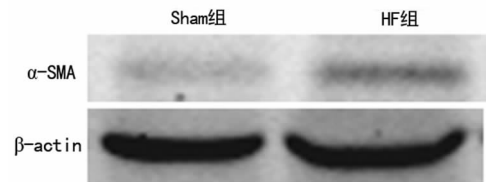
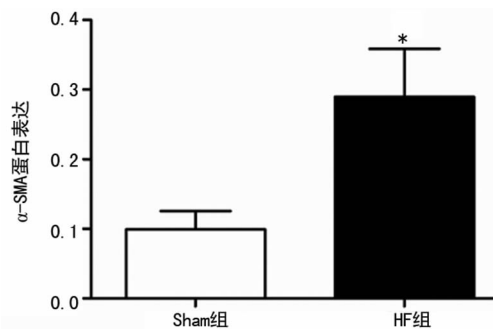


图 4 Western blot 检测大鼠肝组织 α -SMA 蛋白表达



*: $P < 0.05$, 与 Sham 组比较。

图 5 大鼠肝组织 α -SMA 蛋白表达相对灰度比值

表 1 大鼠肝脏肝纤维化病理学分级(n)

组别	n	0	I	II	III	IV
Sham 组	8	8	0	0	0	0
HF 组	8	0	2	4	2	0

2.5 肝组织病理形态学变化 Sham 组大鼠肝小叶结构完整,肝细胞索排列整齐,肝细胞大小均匀,无变性、坏死和纤维增生改变。HF 组肝小叶结构紊乱,肝索排列紊乱,肝细胞肿胀,胞质透亮,气球样变性、坏死,部分有炎细胞浸润,汇管区结缔组织有不同程度增生。见图 6、表 1。

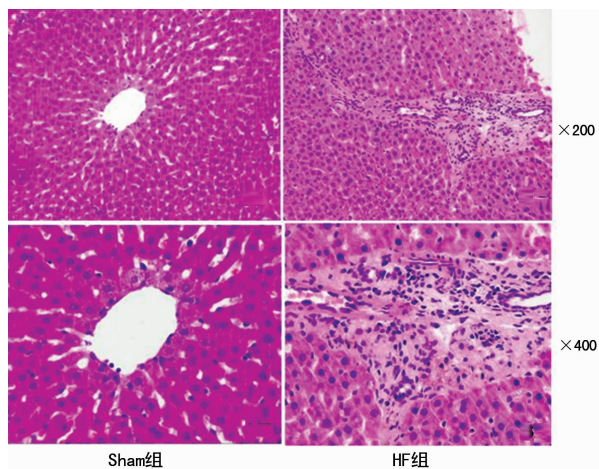


图 6 大鼠肝组织病理形态学变化

3 讨论

肝纤维化是各种慢性肝病最重要的病理特征,是发生肝硬化的病理基础,也是原发性肝癌发病的危险因素之一。因此延缓、阻断乃至逆转肝纤维化是目前治疗各种慢性肝病的关键环节。而建立肝纤维化动物模型是研究肝纤维化发生机制的一个重要基础。目前,复制肝纤维化动物模型的方法主要有以下几种:肝毒物诱导的肝纤维化、免疫性纤维化、乙醇诱导的纤维化及复合因素诱导的纤维化。但是没有一种肝纤维化的动物模型与人类肝纤维化的发病特征完全一致,因此有必要进一步探寻理想的肝纤维化动物模型,为肝纤维化的研究奠定基础。

肝纤维化是多种因素、多种机制共同作用的结果,肝组织损伤引起炎症相关因子、各种生长因子的释放,氧化应激,HSC 的激活等,这些因素相互影响、相互促进,形成一个复杂的动态网络,最终导致细胞外基质(extracellular matrix,ECM)的质和量发生变化,形成肝纤维化。其中 HSC 的活化被认为是肝纤维化发生的核心事件^[9-10]。HIRI 时,受损的肝组织也会释放大量的生长因子、炎症相关因子及发生氧化应激,这些因素均可导致 HSC 激活,启动和促进肝纤维化的形成。

实验结果显示, HF 组大鼠血清 ALT、AST 水平较 Sham 组明显升高。血清 ALT、AST 的水平在一定程度上反映肝细胞膜的稳定性,与细胞的受损情况有关。说明 HF 组大鼠肝脏经缺血再灌注操作处理后,肝细胞受到不同程度的损伤,因此血清 ALT、AST 水平明显升高。ECM 在肝内的异常和过度沉积是肝纤维化的主要特征^[10-11]。胶原蛋白是 ECM 中的主要成分,Hyp 则是胶原蛋白结构中特有的氨基酸,因此肝组织中 Hyp 水平可以直接反映肝纤维化的程度。HF 组大鼠肝组织 Hyp 的水平高于 Sham 组,说明肝组织内有大量的胶原增生和沉积。同时 HF 组大鼠血清中 HA 和 LN 水平也较 Sham 组升高,HA 和 LN 都是 ECM 的组成成分,在慢性肝损伤过程中血清 HA 水平与 HSC 合成、分泌增加及肝窦内皮细胞摄取、降解减弱有关,是判断慢性肝组织炎症坏死和肝纤维化程度的重要指标。LN 主要存在于基膜结构中,是基膜所特有的非胶原糖蛋白。血清 HA 及 LN 水平升高,说明肝组织中非胶原成分的

量是增多的。由此可见, HF 组大鼠肝组织中胶原成分及非胶原成分的量都是明显增加的,说明了经 HIRI 处理的大鼠发生了肝纤维化。

HSC 的活化是肝纤维化发生的关键, α -SMA 是 HSC 活化的特异性标志物^[11-12]。Western blot 结果显示 HF 组 α -SMA 的蛋白表达水平较 Sham 组明显升高。说明肝组织中有大量的 HSC 被活化,活化的 HSC 可以合成和分泌大量的 ECM,这与上述所获得的结果相一致。肝脏病理学的结果也显示, HF 组大鼠肝组织肝小叶结构紊乱,肝细胞肿胀、胞质透亮,气球样变性及坏死,汇管区结缔组织有不同程度增生,呈现出典型的肝纤维化的病理学特点。

综上所述,经肝缺血再灌注操作处理可以成功诱导大鼠肝纤维化模型,利用该方法建立的动物模型更加符合疾病的发生和发展规律,符合临床实际,为肝纤维化机制及其他方面的研究提供了一个理想的动物模型。

参考文献

- [1] Hernandez-Gea V, Friedman SL. Pathogenesis of liver fibrosis[J]. Annu Rev Pathol, 2011, 6(5): 425-456.
- [2] Chirapongsathorn S, Talwalkar JA, Kamath PS. Readmission in cirrhosis: a growing problem[J]. Curr Treat Options Gastroenterol, 2016, 14(2): 236-246.
- [3] Elpek G. Cellular and molecular mechanisms in the pathogenesis of liver fibrosis: an update [J]. World J Gastroenterol, 2014, 20(23): 7260-7276.
- [4] 侯艳峰, 李晖, 梁颖丹, 等. 肝纤维化动物模型研究进展[J]. 武汉大学学报(医学版), 2015, 36(1): 155-158.
- [5] 薛改, 刘建芳, 闫成, 等. 硫代乙酰胺诱导大鼠持久性肝纤维化模型的制备[J]. 世界华人消化杂志, 2015, 23(12): 1937-1942.
- [6] Nastos C, Kalimeris K, Papoutsidakis N, et al. Global consequences of liver ischemia/reperfusion injury [J]. Oxid Med Cell Longev, 2014, 2014: 906965.
- [7] Prosser CC, Yen RD, Wu J. Molecular therapy for hepatic injury and fibrosis: where are we? [J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(4): 509-515.
- [8] Lu HW, Chen YB, Li YM, et al. Role of hepatic arterial ischaemia in biliary fibrosis following liver transplantation [J]. Chin Med J, 2010, 123(7): 907-911.
- [9] 杨新疆, 齐翠花, 郑勇, 等. SB203580 对肝纤维化大鼠肝脏 I、III 型胶原蛋白表达的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2014, 22(3): 310-318.
- [10] Toosi AE. Liver fibrosis: causes and methods of assessment, a review [J]. Rom J Intern Med, 2015, 53(4): 304-314.
- [11] 叶立红, 王翀奎, 陈秀丽, 等. 利莫那班对肝纤维化 C57 小鼠肝组织大麻素受体 1 及 α -SMA 表达的影响[J]. 天津医药, 2014, 42(5): 440-442.
- [12] Cheng F, Li Y, Feng L, et al. Hepatic stellate cell activation and hepatic fibrosis induced by ischemia/reperfusion injury[J]. Tran Proc, 2008, 40(22): 2167-2170.