



胆汁淤积性肝硬化大鼠模型的改良

宣 佶^{1,2}, 田耀洲^{1,3,4,5}, 曹 鹏^{3,4,5}, 胡春萍^{3,4,5}, 蔡雪婷^{3,4,5}, 张 伟^{3,4,5}

(1. 南京中医药大学, 江苏 南京 210046; 2. 解放军 81 医院, 江苏 南京 210002;
3. 江苏省中医药研究院, 江苏 南京 210002; 4. 南京中医药大学附属中西医结合医院, 江苏 南京 210002;
5. 中国中医科学院江苏分院, 江苏 南京 210002)

【摘要】 目的 构建肝纤维化大鼠模型, 并对经典结扎胆总管(BDL)复制模型方法进行适当改进。**方法** 80 只 SD 雄性成熟大鼠, 按随机数字表法分为 A 组 40 只、B 组 40 只, 分别运用胆总管结扎法和肝门部肝总管缝扎法先后两次造模, 各取其中 10 只为假手术组进行对照, 术后 1 周眼眶取血采用酶联免疫吸附法检测血清谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)、白蛋白/球蛋白(A/G), 术后 4 周 HE 染色观察大鼠肝组织病理学变化, 采用免疫组化染色分析肝脏组织 α -SMA 和 CK-19 表达水平。**结果** 两种方法均表现出明显肝功能损害; 标本胆小管增生明显, 肝脏假小叶形成, 达到早期肝硬化, 肝脏 α -SMA 和 CK-19 表达水平明显升高, 胆总管结扎组死亡率为 66.7%, 肝门部肝总管缝扎组死亡率为 26.7%。**结论** 肝门缝扎法可成功建立胆汁淤积性肝硬化大鼠模型, 能够明显降低模型动物死亡率, 提高模型质量及实验效率。

【关键词】 胆总管结扎; 肝门部肝总管缝扎; 胆汁淤积性肝硬化; 模型; 大鼠

【中图分类号】 R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 04-0057-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.004.013

Improvement in the rat model of liver fibrosis induced by bile duct ligation

XUAN Ji^{1,2}, TIAN Yao-zhou^{1,3,4,5}, HU Chun-ping^{3,4,5}, CAO Peng^{3,4,5}, CAI Xue-ting^{3,4,5}, ZHANG Wei^{3,4,5}

(1. Nanjing University of Chinese Medicine; 2. 81 Hospital of PLA; 3. Jiangsu Province Academy of Traditional Chinese Medicine; 4. Jiangsu Province Hospital of Integration of Chinese and Western Medicine;
5. Jiangsu Branch of China Academy of Chinese Medical Sciences, Nanjing 210002)

【Abstract】 Objective To establish a rat model of liver fibrosis induced by bile duct ligation (BDL), and to improve the classical BDL method. **Methods** Eighty adult healthy male Sprague-Dawley rats were randomly divided into groups A and B, 40 rats each. The two groups of rats were modeling by classical BDL method and modified hepatic duct ligation method, respectively. Sham operation was performed in 10 rats of each group and were taken as control sham group. Hepatic biochemical indicators AST, ALT, ALP, TBIL, DBIL, GGT, and A/G in the rat serum at one week after operation were detected with an automatic biochemistry analyzer. Pathological changes of the rat liver at 4 weeks after operation were observed with HE staining. Cell proliferation-related markers α -SMA and CK-19 in the liver were detected by immunohistochemistry. **Results** Both two rat models of obstructive cholestasis were successfully established. Serum biochemical and liver pathological changes indicated impaired liver function in the bile duct ligated rats. After cholestasis caused by bile duct ligation, mitotic figures of hepatocytes and the expression of α -SMA and CK-19 in hepatocytes and

【基金项目】 国家自然科学基金(No. 81060255); “江苏省六大人才”高峰项目(2013 - WS - 048); 江苏省科技厅技术基础设施建设计划项目(BM2008152)。

【作者简介】 宣佶(1982 -), 硕士生, 主治医师, E-mail: helio0009@126.com。

【通讯作者】 田耀洲, 博士, 主任医师, E-mail: tianyaozhou1960@126.com。

biliary epithelial cells was increased, and hyperplasia of bile canaliculi and hepatic pseudolobule formation were observed. These changes indicated early hepatic cirrhosis. The mortality rate of rats was 66.7% in the BDL group and 26.7% in the modified BDL group. **Conclusions** Liver fibrosis can be successfully induced by hepatic duct ligation in rats. In addition, this modified ligation method can reduce the mortality and improve the model quality and efficacy of experiment.

【Key words】 Bile duct ligation; Hepatic duct ligation; Cholestatic cirrhosis, Model, rat

肝纤维化是多种慢性肝病发展为肝硬化的必经阶段,阻断肝纤维化是慢性肝病治疗中的关键问题^[1]。为了更好地研究肝纤维化的发生机制以及药物对该病的疗效和治疗途径,需要建立稳定、高效、可靠的肝纤维化动物模型^[2,3]。国内文献对胆总管结扎模型建立的手术操作过程描述过于简单,不利于模型的复制,同时关于其造模成功率仅做了短期内的统计和评价,无法反映动物模型的远期可靠及稳定性^[3-5,7],为此,笔者在研究胆汁淤积性肝硬化的药物治疗中,曾先后两次建立胆汁淤积性肝硬化大鼠模型,本文拟报告造模过程,并探讨一种方法简便、成功率高、存活时间长、切实可行的造模方法。

1 胆总管结扎法

1.1 材料

清洁级 SD 大鼠 40 只由上海斯莱克实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(沪)2007-0005;使用证号 SYXK(苏)2011-0017,雄性,体重(180 ± 20)g,购于南京青龙山动物繁殖场。

1.2 方法

SD 雄性成熟大鼠 40 只,随机分为胆总管模型组($n=30$)和假手术组($n=10$),禁食禁水 24 h。进行称重,用 10% 的水合氯醛($0.3 \text{ mL}/100 \text{ g}$),腹腔注射麻醉,仰位固定于固定板上,消毒切口,沿腹部正中中线大鼠剑突以下约 $1.5 \sim 2 \text{ cm}$ 之间切口,打开腹腔,找到胃幽门部,翻转十二指肠,在十二指肠周围有淡粉色类似脂肪的就是胰腺;将胰腺展开后在胰腺中仔细寻找透明的管状物,该导管是从肝脏发出最后走行进入十二指肠,内有淡黄色液体,即为胆管。胆总管模型组暴露胆总管,于胆总管中段双重结扎,查腹腔内无活动性出血后,常规关腹(图 1)。假手术组仅暴露胆总管,不予结扎,常规关腹。术后连续 3 d 注射青霉素 40 万 U/只,禁水 12 h,禁食 24 h 后正常喂养。术后 1 周眼眶取血检测血清学指标谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、碱性磷酸酶(ALP)、总胆红素(TBIL)、直接胆红素(DBIL)、 γ -谷氨酰转肽酶(GGT)、白蛋白/球蛋白(A/G),术后 4 周取胆总管结扎和假手术小鼠肝组织块常规石蜡

切片,进行 HE 染色,光镜观察;取肝组织块经 SP 法免疫组织化学染色。石蜡切片经梯度乙醇脱水,甲醇过氧化氢封闭后,分别用抗 α -SMA mAb 和抗 CK-19 mAb 37℃ 孵育 1 h,辣根过氧化物酶偶联的抗小鼠的二抗,37℃ 孵育 0.5 h,二氨基联苯胺显色。用 PBS 代替一抗做为阴性对照。计算机扫描分析蛋白的阳性数目、灰度值和相对光密度。

1.3 结果

胆总管模型组大鼠术后尿黄,大便呈陶土色,但正常喂养后,胆总管模型组大鼠逐渐出现精神萎靡,腹胀腹水明显,术后 14 d 随机其中 5 只大鼠,抽取腹水以 AMS 酶法测定腹水淀粉酶,提示腹水淀粉酶明显升高(表 1),假手术组大鼠术后无精神萎靡,无腹水,毛发有光泽,进食进水正常,大小便正常,体重逐日增加。一周眼眶取血行血清学指标(AST、ALT、ALP、TBIL、DBIL、GGT)检测,对比假手术组模型组大鼠血清胆红素明显增高,肝功能异常(表 2),提示梗阻性黄疸模型成功,但是术后模型组相继出现死亡,1 月内累计死亡 20 只,死亡率达 66.7%,剖检尸体发现胰腺坏死,大量腹水,肠道胀气明显。术后 4 周进行组织形态学观察,胆总管模型组病理提示散在炎性细胞浸润,汇管区小胆管明显增生,纤维结缔组织增生将肝小叶分割成假小叶结构。免疫组化染色显示,模型组肝脏汇管区小胆管周围可见 CK-19 阳性的棕褐色细胞明显增生,肝组织 α -SMA 阳性的棕褐色细胞明显增多,成纤维细胞大量增生(图 2,见封三),胆总管模型组 CK-19、 α -SMA 蛋白的阳性数目、灰度值和相对光密度表达水平升高(表 3)。

2 肝门部肝总管缝扎法

2.1 材料

清洁级 SD 大鼠 40 只,雄性,体重(180 ± 20)g,由上海斯莱克实验动物有限公司提供,购于南京青龙山动物繁殖场,合格证号:SCXK(沪)2007-005;使用证号 SYXK(苏)2011-0017。

2.2 方法

SD 雄性成熟大鼠 40 只,随机分为肝总管模型

组($n=30$)和假手术组($n=10$),禁食禁水 24 h。进行称重,用 10% 的水合氯醛($0.3\text{ mL}/100\text{ g}$),腹腔注射麻醉,仰位固定于固定板上,消毒切口,沿腹部正中中线大鼠剑突以下约 $1.5\sim 2\text{ cm}$ 之间切口,打开腹腔,暴露胆总管,沿胆总管向上找到肝门部,见此处无胰腺组织,拉钩充分暴露术野,于肝总管近肝门部以 5-0 丝线单纯缝扎,查腹腔内无活动性出血后,常规关腹(图 1)。假手术组仅暴露肝总管,不予结扎,常规关腹。术后连续 3 d 注射青霉素 40 万 U/只,禁水 24 h,禁食 48 h 后正常喂水,少量喂食,1 周后正常喂养。术后 1 周眼眶取血行血清学指标(AST、ALT、ALP、TBIL、DBIL、GGT、A/G)检测,术后 4 周取胆总管结扎和假手术小鼠肝组织块常规石蜡切片,进行 HE 染色,光镜观察;取肝组织块经 SP 法免疫组织化学染色,方法同上。

2.3 结果

肝总管模型组大鼠术后尿黄,大便呈陶土色,正常喂养后,无精神萎靡,一般情况良好,近期并无腹水腹胀等情况,假手术组大鼠术后无精神萎靡,毛发有光泽,进食进水正常,大小便正常,体重逐日增加。术后一周眼眶取血行血清学指标(AST、

ALT、ALP、TBIL、DBIL、GGT)检测,对比假手术组模型组大鼠血清胆红素明显增高,肝功能异常,提示梗阻性黄疸模型成功,14 d 后部分大鼠出现少量腹水,查腹水淀粉酶未见异常(表 1),1 月内累计死亡 8 只,死亡率达 26.7%。术后 4 周进行组织形态学观察,肝总管模型组病理提示散在炎性细胞浸润,汇管区小胆管明显增生,纤维结缔组织增生将肝小叶分割成假小叶结构。免疫组化染色显示,模型组肝脏汇管区小胆管周围可见 CK-19 阳性的棕褐色细胞明显增生,肝组织 α -SMA 阳性的棕褐色细胞明显增多,成纤维细胞大量增生(图 2 见封三),肝总管模型组 CK-19、 α -SMA 蛋白的阳性数目、灰度值和相对光密度表达水平升高(表 3)。

表 1 腹水淀粉酶测定($\bar{x}\pm s$)

Tab. 1 Determination of amylase in the ascites ($\bar{x}\pm s$)

组别 Group	数量 Number	腹水淀粉酶 Amylase of ascites
	N	IU /L
胆总管模型组 BDL group	5	1012.9 $\pm$ 107.9
肝总管模型组 BDL modified group	5	26.3 $\pm$ 9.6**

注:与肝总管模型组相比,** $P<0.001$

Note: * $P<0.001$ vs. BDL group



注: 1. 胆总管结扎组(结扎胆总管中段造模); 2. 肝总管模型组(缝扎肝总管上段造模)

图 1 两种造模方法操作图示

Note: 1. Bile duct ligation group(modeling by middle bile duct ligation); 2. Modified bile duct ligation group(modeling by hepatic duct ligation near the helium)

Fig. 1 Photographs of two types of modeling operation methods

表 2 肝功能生化指标

Tab. 2 Biochemical indices of liver function

组别 Group	谷丙转氨酶 (ALT) U /L	谷草转氨酶 (AST) U /L	总胆红素 (TBIL) umol/L	直接胆红素 (DBIL) umol/L	γ -谷氨酰 转肽酶 (GGT) U/L	碱性磷酸酶 (ALP) U/L	白蛋白/球蛋白 (A/G)
假手术组 Sham operated group	30.8 $\pm$ 11.5	59.4 $\pm$ 11.4	0.84 $\pm$ 0.29	0.25 $\pm$ 0.42	58.38 $\pm$ 1.87	47.67 $\pm$ 16.42	0.946 $\pm$ 0.021
胆总管模型组 BDL group	567.0 $\pm$ 238.8*	611.6 $\pm$ 283.4*	54.06 $\pm$ 9.70*	40.38 $\pm$ 4.90*	254.43 $\pm$ 23.37*	318.38 $\pm$ 198.90*	0.532 $\pm$ 0.024*
肝总管模型组 BDL modified group	527.0 $\pm$ 212.8**	571.4 $\pm$ 191.5**	65.65 $\pm$ 2.23**	49.45 $\pm$ 6.65**	249.24 $\pm$ 22.47**	298.98 $\pm$ 175.45**	0.434 $\pm$ 0.038**

注:与假手术组比,* $P<0.05$;与胆总管模型组相比,# $P>0.05$
Note: * $P<0.05$ vs. Sham operated group; # $P>0.05$ vs. BDL group

表 3 各组大鼠肝组织 CK-19、α-SMA 免疫组化染色的表达水平 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)
Tab. 3 Quantitative immunohistochemical analysis of the expressions of CK-19 and α-SMA ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

组别 Groups	CK-19			α-SMA		
	阳性数目 Number of positive cells	灰度值 Gray values	相对光密度 Relative optical density	阳性数目 Number of positive cells	灰度值 Gray values	相对光密度 Relative optical density
假手术组 Sham operated group	511 ± 273	189.89 ± 19.87	0.1174 ± 0.0284	463 ± 274	163.78 ± 18.65	0.1545 ± 0.0234
胆总管模型组 BDL group	1466 ± 476 *	225.04 ± 9.70 *	0.1534 ± 0.0156 *	1756 ± 457 *	203.76 ± 9.70 *	0.1734 ± 0.0156 *
肝总管模型组 BDL modified group	1495 ± 223 **	233.45 ± 9.87 **	0.1540 ± 0.0936 **	1796 ± 423 **	216.45 ± 13.87 **	0.1810 ± 0.0236 **

注:与假手术组组比, * $P < 0.05$;与胆总管模型组相比, # $P > 0.05$
Note: * $P < 0.05$ vs. Sham operated group; # $P > 0.05$ vs. BDL group

3 讨论

肝纤维化动物模型在肝纤维化的发生机制以及药物研究中应用广泛,方法多样,胆总管结扎术是其中一种经典造模方法,该模型的原理与发生在人体的继发性胆源性肝硬化的机制相吻合,形成人为的肝外胆道梗阻,从而引起梗阻部位以上胆管扩张、胆汁淤积、胆道内压力增高,并可引发肝内胆小管扩张破裂^[5,6],国内文献报道该模型短期内存活率在 75% ~ 83.3% 之间^[3-5,7],但笔者发现该经典方法造模后模型动物 1 月内死亡率仍然偏高,很难满足实验药物疗效观察。

笔者第一次造模,采用经典的结扎胆总管法,死亡率较高,成本较大。观察发现模型大鼠术后当天一般情况可,并无死亡,术后第二天进食进水后,逐渐出现精神萎靡、腹部膨隆等情况,并且逐日加重,3 d 后陆续出现死亡,期间抽取腹水查淀粉酶提示明显增高,剖检死亡大鼠发现腹腔内大量腹水,胰腺液化坏死,肠道明显胀气。结合大鼠体征、血液及腹水生化及剖检结果,分析大鼠死亡原因考虑为急性胰腺炎可能性较大,进而导致腹水淀粉酶明显升高,剖检时发现肠道胀气也与胰腺炎引起的麻痹性肠梗阻有关。通过仔细研究大鼠胆道解剖及胰腺分布,发现大鼠胆总管于胰腺内走行,且管腔十分纤细,不易寻找和暴露,术中对胰腺中胆管的牵拉、分离解剖、结扎都不可避免的造成一定的胰腺损伤,加之术后过早喂食,促进胰腺分泌,进一步加重胰腺坏死,最终造成模型动物死亡。因此,笔者对第一次造模死亡率偏高主要原因总结为术中胰腺损伤和术后过早喂食刺激并加重胰腺坏死有关。

经过仔细研究大鼠解剖结构,笔者发现大鼠的

肝总管位于左右肝管汇合部远心端,位置固定,易于寻找及暴露,且无胰腺组织包裹,于此处结扎胆道既可以有效阻断胆道又可以减少损伤胰腺风险。因此第二次以肝门部肝总管缝扎法进行造模,以眼科针穿 5-0 丝线(尽量减少周围组织损伤)进行单纯缝扎,术中小心操作,最大限度的减少分离、结扎胆管造成的牵拉,避免损伤胰腺组织,造模后适当推迟给水喂食时间,推迟并减少胰腺分泌。术后发现肝总管模型组的大鼠给食后无精神萎靡,一般情况良好,1 周内并无腹部膨隆饱胀等情况,术后第二周部分大鼠出现少量腹水,查腹水淀粉酶未见异常,考虑与肝硬化后影响蛋白合成有关造成的腹水有关。

本实验中,各组大鼠血液生化提示两个模型组大鼠较假手术组胆红素、转氨酶等指标明显升高并伴有蛋白合成障碍;HE 染色结果显示散在炎性细胞浸润,汇管区小胆管明显增生,纤维结缔组织增生将肝小叶分割成假小叶结构,同时我们利用胆管上皮细胞特异性标志-细胞角蛋白 19 (CK-19)免疫组化染色提示,胆管上皮细胞明显增生。以上结果均反映出两组模型组大鼠肝脏功能受损、细胞炎性反应、小胆管细胞增生明显等一系列病理表现。另外,肝纤维化的显著特征是细胞外基质(extracellular matrix, ECM)的增加和成分的改变,而肝星状细胞(hepatic stellate cells, HSCs)的活化和增殖是其关键和中心环节^[8-10]。α-平滑肌肌动蛋白(α-SMA)是肝星状细胞活化的特征性标志物,免疫组化显示两组模型组大鼠肝脏 α-SMA 阳性细胞明显增加,提示成纤维细胞大量增生,进一步证实胆道结扎后大鼠肝脏纤维化的病理改变。

因此本研究表明对于以上两种造模方法均可以有效制造胆汁淤积性肝硬化动物模型,但是前者

死亡率较高,因此往往需要多次补做模型,时间和经费成本相对较大,而肝门部肝总管缝扎法,具有解剖位置固定、易于寻找和暴露、术后并发胰腺炎可能性小、成模率高、存活时间长等优点,是一种切实、方便、可行的造模方法。笔者通过实验成功建立了胆汁淤积性肝硬化大鼠模型,对经典的胆总管结扎造模方法进行适当改进,降低了造模的死亡率,提高了肝纤维化模型质量和实验效率。

参考文献:

- [1] Iredale JP. Models of liver fibrosis:exploirng the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ [J]. J Clin Invest, 2007, 117(3):539-548.
- [2] Weiler-Normann C,herkel J,Lohse AW. Mouse models of liver fibrosis [J]. Z Gastroenterol, 2007, 45(1):43-50.
- [3] 秦冬梅,赵文惠,胡利萍,等. 胆总管结扎术造大鼠肝纤维化模型的研究 [J]. 时珍国医国药, 2012, (04):27-29.
- [4] 邵文武,张辉. 胆总管结扎术诱导大鼠肝纤维化模型的建立 [J]. 黑龙江医药科学. 2010, 33(4):102.
- [5] 林冬静,金政. 常用肝纤维化动物模型的研究及评价 [J]. 时珍国医国药, 2006, (03):189-190.
- [6] Marques TG, Chaib E, Fonseca JH, et al. Review of experimental models for inducing hepatic cirrhosis by bile duct ligation and carbon tetrachloride injection [J]. Acta Cir Bras, 2012, 27(8):589-594.
- [7] 元海成,秦鸣放,邹富胜,等. 大鼠胆总管结扎后不同时间点的生化指标变化 [J]. 中国中西医结合外科杂志, 2011, 17(6):583-585.
- [8] Lee UE, Scott L, Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2011, 25(2):195-206.
- [9] Kisseleva T, Brenner DA. Mechanisms of fibrogenesis [J]. Exp Biol Med, 2008, 233(2):109-22.
- [10] Henderson NC, Iredale JP. Liver fibrosis: cellular mechanisms of progression and resolution [J]. Clin Sci, 2007, 112:265-80.

[修回日期] 2014-02-12

《中国比较医学杂志》约稿 欢迎踊跃投稿

《中国比较医学杂志》是中国实验动物学会和中国医学科学院医学实验动物研究所共同主办的全国性学术刊物(月刊),主要刊载实验动物与动物实验等生命科学各分支学科,比较医学成果和进展。本刊开设研究报告,综述与专论,研究快报,技术方法,经验交流,管理科学,国外研究进展,学术信息,简讯等。

1. 文稿内容要具有创新性、科学性和实用性,论点明确,资料可靠,文字通顺精练,标点符号准确,用词规范,图表清晰。
2. 来稿须附第一作者主管单位正式介绍信,作者单位应对稿件内容的真实性负责,声明无署名纠纷,无一稿两投或多投。
3. 请登录(<http://zggydw.alljournal.ac.cn/zgbjyxzz/ch/index.aspx>)注册后按照提示投稿。作者也可通过登陆中国实验动物学会网站(www.calas.org.cn)链接进入投稿系统。
4. 两刊采用论文授权书形式替代单位介绍信,请在投稿系统网站下载中心下载后填写盖章,扫描件或照片以附件形式随文章一同投稿上传。

本刊已入万方数据网络和中国学术期刊(光盘版)电子杂志、中文生物医学期刊文献数据库、中国实验动物信息网和中国实验动物学会网站等网络文献数据库,如不同意自己论文入网,请在来稿中声明。

地址:北京朝阳区潘家园南里5号《中国比较医学杂志》编辑部,邮编:100021

电话:010-67779337 传真:010-67781534 E-mail: b67761337@126.com