

猕猴肝纤维化模型建立与评价

庞荣清, 刘建昆, 何占龙, 王惠萱, 张步振, 王鹤桦, 杨勇琴, 屈璐, 潘兴华

庞荣清, 刘建昆, 王惠萱, 张步振, 王鹤桦, 杨勇琴, 屈璐, 潘兴华, 成都军区昆明总医院医学实验科 云南省昆明市 650032

何占龙, 中国医学科学院协和医科大学昆明医学生物研究所
云南省昆明市 650032

庞荣清, 男, 1971-05-24 生, 云南省姚安县人, 汉族, 1998 年原解放军军需大学硕士研究生毕业, 现为成都军区昆明总医院主治医师, 主要从事成体干细胞的临床应用相关研究。

国家自然科学基金资助, No. 30270674

云南省自然科学基金重点资助项目, No. 2003C013Z

通讯作者: 潘兴华, 650032, 云南省昆明市大观路 212 号, 成都军区昆明总医院医学实验科。xinghuapan@yahoo.com.cn

电话: 0871-5413564 传真: 0871-4074773

收稿日期: 2005-05-23 接受日期: 2005-06-08

Establishment and evaluation of macaque liver fibrosis model

Rong-Qing Pang, Jian-Kun Liu, Zhan-Long He, Hui-Xuan Wang, Bu-Zhen Zhang, He-Hua Wang, Yong-Qin Yang, Lu Qu, Xing-Hua Pan

Rong-Qing Pang, Jian-Kun Liu, Hui-Xuan Wang, Bu-Zhen Zhang, He-Hua Wang, Yong-Qin Yang, Lu Qu, Xing-Hua Pan, Department of Laboratory, Kunming General Hospital, Chendu Military Area Command of Chinese PLA, Kunming 650032, Yunnan Province, China
Zhan-Long He, Animal Center, Kunming Institute of Medical Biology, Peking Union Medical College, Chinese Academy of Medical Sciences, Kunming 650081, Yunnan Province, China

Supported by National Natural Science Foundation of China, No. 30270674, and the Key Project of Yunnan Natural Science Foundation, No. 2003C013Z

Correspondence to: Xing-Hua Pan, Department of Laboratory, Kunming General Hospital, Chendu Military Area Command of Chinese PLA, Kunming 650032, Yunnan Province, China. xinghuapan@yahoo.com.cn

Received: 2005-05-23 Accepted: 2005-06-08

Abstract

AIM: To establish the macaque model of liver fibrosis.

METHODS: Ten macaques of 7-10 years old were randomly divided into the experiment and control group. The model of liver fibrosis was induced in the macaques of experiment group by intravenous injection of 400 mL/L CCl₄ (0.8 mL/kg) weekly for 10 weeks. Meanwhile, the macaques in experiment group were fed with high fat food. The liver function related proteins, enzymes and lipids in serum were detected by automatic biochemical analyzing equipment and the histological changes were investigated by pathological method.

RESULTS: The serum aspartate aminotransferase (AST), alanine aminotransferase (ALT), globulin (GLO), total cho-

lesterol (TCH), triglycerides (TG), low density lipoprotein (LDL), total bilirubin (TBIL), hyaluric acid (HA), type III procollagen (PCIII) and type IV collagen (IVC) contents in the macaques of experiment group were significantly increased as compared with those of the control group ($2\ 017.1 \pm 244.5$ nkat/L vs 550.1 ± 72.8 nkat/L, $1\ 978.6 \pm 237.0$ nkat/L vs 488.9 ± 55.2 nkat/L, 47.7 ± 5.4 g/L vs 41.5 ± 6.1 g/L, 4.2 ± 0.5 mmol/L vs 3.3 ± 0.4 mmol/L, 1.1 ± 0.2 mmol/L vs 0.5 ± 0.1 mmol/L, 1.9 ± 0.3 mmol/L vs 1.4 ± 0.2 mmol/L, 9.5 ± 1.2 μ mol/L vs 6.3 ± 0.8 μ mol/L, 419.3 ± 42.1 μ g/L vs 68.4 ± 8.2 μ g/L, 274.6 ± 32.2 μ g/L vs 39.4 ± 4.5 μ g/L, 269.7 ± 18.2 μ g/L vs 103.7 ± 12.3 μ g/L, all $P < 0.01$), while the serum total protein (TP) and albumin (ALB) contents was significantly reduced (74.3 ± 8.4 vs 84.3 ± 7.7 , 34.0 ± 4.3 vs 41.7 ± 4.8 , both $P < 0.01$). Pathological examination showed that the degeneration and necrosis of hepatocytes appeared, and the fibrotic tissues coagulated and proliferated.

CONCLUSION: The macaque model of liver fibrosis can be established successfully by intravenously injecting 400 mL/L CCl₄ while giving high fat food for 10 weeks.

Key Words: Macaque; Liver fibrosis; Animal model

Pang RQ, Liu JK, He ZL, Wang HX, Zhang BZ, Wang HH, Yang YQ, Qu L, Pan XH. Establishment and evaluation of macaque liver fibrosis model. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(16):1956-1958

摘要

目的: 探讨灵长类动物肝纤维化模型制作方法, 建立与人类肝纤维化更接近的动物肝纤维化模型。

方法: 猕猴 10 只, 随机分为实验组和对照组, 实验组每周皮下注射 400 mL/L CCl₄ 0.8 mL/kg, 连续 10 wk, 同时辅以高脂饲料饲喂。注射 CCl₄ 后 11 wk, 检测肝功能相关的血清蛋白、血脂浓度及观察肝组织病理学变化。

结果: 实验组血清谷草转氨酶(AST)、谷丙转氨酶(ALT)、球蛋白(GLO)、血清总胆固醇酯(TCH)、三酰甘油(TG)、低密度脂蛋白(LDL)、血清胆红素(TBIL)、血清透明质酸(HA)、Ⅲ型前胶原(PC Ⅲ)、Ⅳ型胶原含量与对照组相比均显著升高($2\ 017.1 \pm 244.5$ nkat/L vs 550.1 ± 72.8 nkat/L, $1\ 978.6 \pm 237.0$ nkat/L vs 488.9 ± 55.2 nkat/L, 47.7 ± 5.4 g/L vs 41.5 ± 6.1 g/L, 4.2 ± 0.5 mmol/L vs 3.3 ± 0.4 mmol/L, 1.1 ± 0.2 mmol/L vs $0.5 \pm$

0.1 mmol/L, 1.9 ± 0.3 mmol/L vs 1.4 ± 0.2 mmol/L, 9.5 ± 1.2 μ mol/L vs 6.3 ± 0.8 μ mol/L, 419.3 ± 42.1 μ g/L vs 68.4 ± 8.2 μ g/L, 274.6 ± 32.2 μ g/L vs 39.4 ± 4.5 μ g/L, 269.7 ± 18.2 μ g/L vs 103.7 ± 12.3 μ g/L, $P < 0.01$), 而总蛋白(TP)和白蛋白含量降低与对照组相比显著降低(74.3 ± 8.4 g/L vs 84.3 ± 7.7 g/L, 34 ± 4.3 g/L vs 41.7 ± 4.8 g/L, $P < 0.01$).纤维化动物肝组织显示, 肝小叶间纤维增生, 部分纤维细胞向肝细胞间延伸.

结论: 成功复制猕猴肝纤维化模型.

关键词: 猕猴; 肝纤维化; 模型

庞荣清, 刘建昆, 何占龙, 王惠莹, 张步振, 王鹤桦, 杨勇琴, 屈璐, 潘兴华. 猕猴肝纤维化模型建立与评价. 世界华人消化杂志 2005;13(16):1956-1958 <http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/1956.asp>

0 引言

肝纤维化以纤维增生和细胞外基质增多为特征^[1-2], 对人类健康危害巨大, 目前尚无理想治疗措施, 建立符合标准的肝纤维化动物模型是进行相关研究的前提和基础. 目前已有大鼠、兔等实验动物肝纤维化模型^[3], 而与人类更为接近的灵长类动物肝纤维化模型研究的报道较少. 我们建立了灵长类动物肝纤维化模型如下.

1 材料和方法

1.1 材料 猕猴由昆明医学生物研究所动物中心提供, 雄性, 年龄7-10岁, 体质量8-10 kg, 经饲养观察30 d无异常, 经心、肝、肾生化指标检测未见异常. 将动物随机分为实验组(6只)和对照组(4只).

1.2 方法 分析纯CCl₄, 用橄榄油配制成400 mL/L, 0.8 mL/kg, iv. 每周1次, 同时辅以饲喂高脂饲料, 连续处理10 wk. 在末次注射CCl₄后1 wk采集外周血, 采血前1 d晚22:00开始禁食, 次日上午09:00采集外周血5 mL, 于常温下放置6 h, 吸取上清液送本院检验科取样送入自动生化分析仪(日本岛津CT-7200)进行肝功能相关生化分析. 另采用放射免疫测定法检测血清透明质酸(HA)、III型前胶原(PC III)和IV型胶原(IV C)原含量. 采用海军医学研究所、重庆肿瘤研究所生产的HA, PC III, IV C放射免疫测定试剂盒, 按操作说明书进行. 在美国产Au4型彩超机引导下, 用16G活检针采取肝组织长度为1.5-2 cm, 经40 g/L甲醛固定24 h后, 采用常规石蜡包埋、切片和HE染色, 然后在普通光学显微镜观察并照相.

统计学处理 采用 t 检验分析法.

2 结果

2.1 血清学变化(表1) 血清谷草转氨酶(AST)和谷丙

转氨酶(ALT)均显著升高($P < 0.01$). 血清总蛋白(TP)和白蛋白含量降低($P < 0.05$), 球蛋白(GLO)含量升高($P < 0.05$). 血清总胆固醇酯、甘油三酯和低密度脂蛋白含量升高($P < 0.05$), 高密度脂蛋白含量下降($P < 0.05$), 总胆红素、直接胆红素和间接胆红素升高($P < 0.01$), 血清透明质酸(HA)、III型前胶原(PC III)、IV型胶原含量均显著高于健康对照组($P < 0.01$).

表1 猕猴CCl₄所致肝纤维化血清学变化(mean \pm SD)

指标	实验组($n = 6$)	对照组($n = 4$)
AST(nkat/L)	$2\,017.1 \pm 244.5^a$	550.1 ± 72.8
ALT(nkat/L)	$1\,978.6 \pm 237.0^a$	488.9 ± 55.2
TP(g/L)	74.3 ± 8.4^b	84.3 ± 7.7
ALB(g/L)	34.0 ± 4.3^b	41.7 ± 4.8
GLO(g/L)	47.7 ± 5.4^b	41.5 ± 6.1
TCH(mmol/L)	4.2 ± 0.5^b	3.3 ± 0.4
TG(mmol/L)	1.1 ± 0.2^b	0.5 ± 0.1
HDL-C(mmol/L)	1.5 ± 0.2^b	1.8 ± 0.1
LDL-C(mmol/L)	1.9 ± 0.3^b	1.4 ± 0.2
TBIL(μ mol/L)	9.5 ± 1.2^a	6.3 ± 0.8
DBIL(μ mol/L)	3.2 ± 0.4^a	1.7 ± 0.2
IBIL(μ mol/L)	4.7 ± 0.5^a	2.5 ± 0.3
HA(μ g/L)	419.3 ± 42.1^a	68.4 ± 8.2
PC III (μ g/L)	274.6 ± 32.2^a	39.4 ± 4.5
IVC(μ g/L)	269.7 ± 18.2^a	103.7 ± 12.3

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组.

2.2 病理组织学变化 正常肝组织结构清楚, 肝细胞排列整齐, 肝小叶完整, 肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列. 纤维化动物肝组织显示点状或灶状肝细胞坏死和免疫细胞浸润, 肝小叶间纤维增生, 部分纤维细胞向肝细胞间延伸(图1).

3 讨论

我们采用注射CCl₄造成肝细胞变性坏死, 同时辅以高脂饲料增加肝脏负荷, 诱发肝组织纤维增生. 肝纤维化的发生机制复杂, 涉及一系列病理组织学及生化功能变化^[4]. 依据肝脏的生物功能及肝纤维化时可能出现的血清学变化, 系统观察了谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)、白蛋白(ALB)、胆红素(BIL)、血清总胆固醇酯(TCH)、甘油三酯(TG)、血清透明质酸(HA)、III型前胶原(PC III)、IV型胶原(IV C)等与肝脏功能密切相关的血清学指标变化及病理组织学改变. 结果发现, ALT、AST、球蛋白(GLO)、TCH、TG和低密度脂蛋白(LDL)、BIL、HA、PC III、IV C含量均显著升高, 而总蛋白(TP)和白蛋白含量降低. 其中,

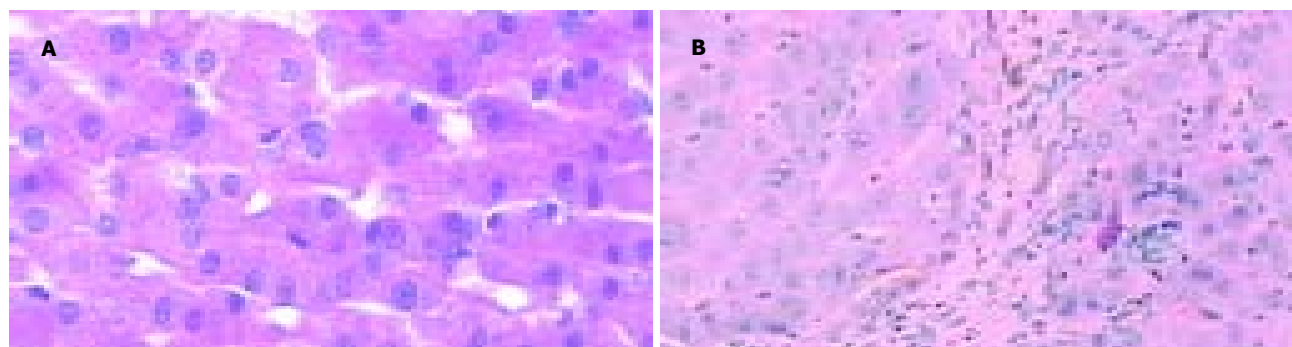


图1 肝病组织学变化(H&E × 400). A: 正常; B: 纤维化.

ALT、AST 升高, CCl_4 进入肝脏后引起肝小叶内中央肝静脉周围细胞坏死, 引起纤维增生, 而纤维增生以小叶内窦间隙为主^[5], 本结果表明持续给予 CCl_4 后, 肝细胞变性、坏死, 转氨酶释放增多, GLO、TCH、TG 和 LDL、BIL 增加, 说明肝细胞受损, 肝脏的代谢功能障碍, 而血清 TP、ALB 含量降低, 提示肝脏蛋白合成能力下降. HA、PC III、IV C 含量变化已被认为是肝纤维化的特征性血清学改变^[6-8], 其浓度增加水平与肝纤维化程度成正相关, 本实验结果表明肝组织发生了纤维化改变. 进一步通过病理组织学观察证实, 肝小叶间有纤维组织增生, 肝组织有点状和灶状肝细胞坏死, 同时有炎性细胞浸润, 部分肝组织纤维成分向肝细胞间延伸. 综合分析所得实验结果, 血液生化指标及病理组织学符合肝纤维化标准, 表明成功建立了猕猴肝纤维化模型.

肝纤维化是许多肝脏疾病的一个中间发展环节, 而肝脏纤维化改变后若得不到有效控制, 可能会发展为肝硬化, 甚至导致患者死亡, 因而治疗肝纤维化是肝病治疗的一个重要环节. 为了探讨有效的治疗肝纤维化措施, 建立一个与人类疾病相似的动物模型极为重要. 总体上, 肝纤维化模型的要求是模型能与人的

肝纤维化有形态学、血液动力学及生化方面相似的特点, 但到目前为止仍还没有与人肝纤维化完全相似的模型, 这可能与人和动物种属间的差异有关, 但可依据不同的实验目的来选择相应的实验动物模型. 由于国内外关于灵长类肝纤维化模型建立的研究报道甚少, 本研究为建立高级灵长动物肝纤维化动物模型奠定了基础.

4 参考文献

- 1 刘平, 高云华. 肝纤维化动物模型的建立. 世界华人消化杂志 2002; 10:693-695
- 2 孙玉凤, 崔东来, 姚希贤. 中西医结合抗肝纤维化的研究现状与进展. 中国中西医结合脾胃杂志 2000;8:254-256
- 3 展玉涛, 魏玉山, 王志荣, 黄新, 徐芹芳, 李定国, 陆汉明. 大黄素抗肝纤维化作用的实验研究. 中华肝胆病杂志 2001;9:235-236
- 4 何云, 王建宾, 王宇明. 慢性肝炎肝纤维化程度诊断方法的进展. 世界华人消化杂志 2001;9:1305-1309
- 5 Krahenbuhl S, Weber FL Jr, Brass EP. Decreased hepatic glycogen content and accelerated response to starvation in rats with carbon tetrachloride-induced cirrhosis. *Hepatology* 1991;14:1189-1195
- 6 崔东来, 姚希贤. 肝纤维化的血清学检测. 世界华人消化杂志 2000; 8:683-684
- 7 Tsutsumi M, Urashima S, Matsuda Y, Takase S, Takada A. Changes in type IV collagen content in livers of patients with alcoholic liver disease. *Hepatology* 1993;17:820-827
- 8 胡乃中, 刘功传. 不同类型肝病中血清IV型胶原与层粘连蛋白和透明质酸的比较及诊断价值. 临床消化病杂志 1998;10:100-101

编辑 潘伯荣 审读 张海宁