

水砷暴露大鼠肝损伤和肝纤维化模型的建立

闫超, 吴君, 刘芙蓉, 张莉莎

■背景资料

长期水砷暴露可以导致肝损伤及肝纤维化甚至肝癌,但其发生机制目前尚未明确,导致目前防治上的困难。目前还没有良好的实验模型制作方面的报道。

闫超, 吴君, 刘芙蓉, 张莉莎, 贵阳医学院附属医院感染科 贵州省贵阳市 550004

闫超, 在读硕士, 主要从事肝脏疾病的研究。

国家自然科学基金资助项目, No. 30471592

中国肝炎防治基金会“王宝恩肝纤维化研究基金”资助项目, No. 20070013

作者贡献分布: 此课题总设计、经费、分析工具、实验指导由吴君提供; 闫超负责本子课题设计; 研究过程由闫超与刘芙蓉完成; 数据分析由闫超完成; 张莉莎对实验过程给予指导性支持; 本论文写作由闫超完成。

通讯作者: 吴君, 550004, 贵州省贵阳市, 贵阳医学院附属医院感染科。wuwuj@21cn.com

电话: 0851-6774146 传真: 0851-6750569

收稿日期: 2009-01-07 修回日期: 2009-02-01

接受日期: 2009-02-09 在线出版日期: 2009-03-28

Model establishment of liver injury and fibrosis in rats exposed to oral arsenic solution

Chao Yan, Jun Wu, Fu-Rong Liu, Li-Sha Zhang

Chao Yan, Jun Wu, Fu-Rong Liu, Li-Sha Zhang, Department of Infectious Diseases, the Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China

Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 30471592; and China Foundation of Hepatitis Prevention and Cure, Liver Fibrosis Foundation of Wang Baoen, No. 20070013

Correspondence to: Jun Wu, Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Guiyang Medical College, Guiyang 550004, Guizhou Province, China. wuwuj@21cn.com

Received: 2009-01-07 Revised: 2009-02-01

Accepted: 2009-02-09 Published online: 2009-03-28

Abstract

AIM: To establish a liver injury and fibrosis model in oral arsenic solution exposed rats and to provide a comparatively ideal animal research model for mechanism-study, prevention and cure of liver injury and fibrosis induced by oral arsenic solution exposure.

METHODS: Eighty rats were divided into control group and model group at random. Rats in control group were fed with common animal feeds and tap water while model group were fed with common animal feeds and 100 mg/L iAs³⁺ water. Ten rats were executed in each group after 1, 2, 3 and 4 months' arsenic-exposure for detection of liver function. Hepatic tissues were

observed with optical microscope and transmission electron microscope in order to find out the pathological changes. Masson dyeing was also performed in order to run semi-quantitative analysis with image analysis system.

RESULTS: After 1 month's arsenic-exposure, hydropic, fatty and ballooning degeneration cells in hepatic lobule, hyperplastic inflammatory cells and some necrotic cells in portal area were observed, but the hepatic lobule remained intact. After 3 and 4 months' arsenic-exposure, the pathological injury of rats' hepatic tissue became more and more severe, fibrous tissues were hyperplastic and trabs were growing in portal area which showed the tendency of liver fibrosis. With transmission electron microscope, shape-change of the cell nucleus, expansion of nuclear membrane and tumid mitochondrion whose pole was disappearing and border blurry was observed. The serum ALT and AST were higher in model group than in control group, the serum ALT had statistical significance between 3, 4 months' model groups and control group (69.36 ± 15.70 U/L, 104.49 ± 16.86 U/L vs 50.68 ± 4.31 U/L, both $P < 0.05$). The size of fibrosis was significantly increased in model group. There was statistical significance in 2, 3, 4 months' model groups compared with control group (0.48 ± 0.15 , 0.57 ± 0.11 , 1.07 ± 0.22 vs 0.21 ± 0.13 , both $P < 0.05$) and so it was in 1, 2, 3 months' model groups compared with 4 months' model group ($P < 0.05$).

CONCLUSION: The liver injury and fibrosis model in oral arsenic solution exposed rats were successfully established which provides a comparatively ideal animal research model for the research of arsenic liver injury and fibrosis.

Key Words: Arsenic; Liver injury; Liver fibrosis; Model

Yan C, Wu J, Liu FR, Zhang LS. Model establishment of liver injury and fibrosis in rats exposed to oral arsenic solution. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2009; 17(9): 862-866

摘要

目的: 建立水砷暴露致大鼠肝损伤及肝纤维

■同行评议者

汪波, 副主任医师, 北京大学第一医院急诊科

化的动物模型, 为砷中毒致肝损伤及肝纤维化的机制研究和防治提供较好的实验平台。

方法: 80只大鼠被随机分成正常对照组和模型组, 对照组给予普通饲料和自来水, 模型组给予普通饲料和砷水(100 mg/L)。分别于第1、2、3、4月末各随机处死10只, 检测血清样本中谷丙转氨酶(ALT), 谷草转氨酶(AST)的含量; 取部分肝组织处理后于光镜和电镜观察, 了解肝组织病理改变; 并应用图像分析法进行Masson染色纤维化面积半定量分析。

结果: 砷暴露1 mo, 大鼠肝组织HE染色可见细胞水样变性、脂肪变性及气球样变性, 汇管区见炎症细胞浸润, 部分肝细胞坏死, 但肝小叶结构尚完整。砷暴露3、4 mo后大鼠肝组织损伤明显加重, 并可见汇管区纤维组织增生, 纤维条索形成, 肝纤维化趋势明显。电镜下可见砷暴露组大鼠肝脏组织细胞核形状改变, 核膜扩张并且不完整, 线粒体肿胀, 边界不清, 极消失。砷暴露大鼠血清ALT、AST的结果比正常对照组增高, ALT在3、4 mo后增高更明显(69.36 ± 15.70 U/L, 104.49 ± 16.86 U/L vs 50.68 ± 4.31 U/L, 均 $P < 0.05$)。模型组纤维化面积明显增大, 造模2、3、4 mo后肝组织纤维化面积与正常对照组比较差异有统计学意义(0.48 ± 0.15 , 0.57 ± 0.11 , 1.07 ± 0.22 vs 0.21 ± 0.13 , 均 $P < 0.05$); 造模4 mo后肝组织纤维化面积与造模1、2、3 mo后比较差异也有统计学意义($P < 0.05$)。

结论: 成功建立了水砷暴露致肝损伤、肝纤维化的动物模型, 为砷暴露致肝损伤、肝纤维化的研究提供了较理想的模型。

关键词: 砷; 肝损伤; 肝纤维化; 模型

闫超, 吴君, 刘芙蓉, 张莉莎. 水砷暴露大鼠肝损伤和肝纤维化模型的建立. 世界华人消化杂志 2009; 17(9): 862-866
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/17/862.asp>

0 引言

砷是一种可严重影响人类健康的环境毒物, 具有致癌性^[1-2]。砷可以引起不同程度的肝损伤、肝纤维化、肝硬化及肝癌^[3-6]。砷暴露致肝损伤、肝纤维化、肝硬化及肝癌的防治研究已逐渐成为国内外研究的热点^[7-11]。但是, 砷致肝损伤尤其是肝纤维化动物模型目前尚少见报道。本实验室模拟饮水砷暴露中毒病区患者饮用高浓度砷水导致砷中毒的方式, 已经成功建立了砷暴露小鼠肝纤维化模型^[12-13]。本实验尝试采用大

鼠自由饮用高浓度砷溶液造模, 建立较理想的砷暴露致肝损伤大鼠动物模型, 为砷中毒致肝损伤的机制研究提供较好的实验模型。

1 材料和方法

1.1 材料 健康清洁级SD大鼠, 体质量180-200 g, 购自贵阳医学院实验动物中心; 亚砷酸钠(NaAsO_2 美国Sigma chemical公司), 批号76H0240; AEROSET2000型全自动生化分析仪; OlympusCX21型光学显微镜; 日立H-7650透射电子显微镜; Biomias2001图象分析系统。

1.2 方法

1.2.1 模型复制药物浓度的确定: SD大鼠25只, 随机分成5组, 均给予普通饲料。正常组给予自来水(自由饮用); 其他四组分别给予不同浓度亚砷酸钠溶液(100、200、300、400 mg/L)自由饮用, 1 mo后杀鼠(各组大鼠耐受较好, 均无死亡), 根据大鼠肝脏组织HE染色切片显示的肝组织损伤情况确定模型复制的药物浓度。选定100 mg/L作为本实验模型复制的药物浓度。

1.2.2 模型复制过程: SD大鼠80只, 雌雄各半, 在贵阳医学院动物实验中心清洁级实验动物饲养房(温度: 15-25℃, 湿度: 40%-70%)饲养, 饲料由贵阳医学院动物实验中心提供。适应饲养1 wk后, 随机分成正常对照组和模型组。正常对照组40只给予普通饲料和自来水(自由饮用); 模型组40只给予普通饲料和100 mg/L的亚砷酸钠溶液(自由饮用)。

1.2.3 标本采集: 模型组分别于造模第1、2、3、4月末各处死10只, 另外处死10只正常对照, 采集标本。股动脉放血后脱颈处死大鼠, 采集血清样本送检谷丙转氨酶(ALT), 谷草转氨酶(AST), 取适量肝组织放入100 g/L中性甲醛溶液固定, 石蜡包埋、切片、HE和Masson染色, 另取适量肝组织置于戊二醛溶液中固定, 处理后于透射电子显微镜下观察肝组织损伤情况。

1.2.4 血清肝功能指标检测: 由贵阳医学院附属医院生化实验室用美国Abbott公司AEROSET2000型全自动生化分析仪检测血清ALT、AST等肝功能项目。

1.2.5 肝组织病理观察: 处死的大鼠迅速剖开腹腔, 取出肝脏, 进行肉眼观察, 注意有无充血、脂肪变、肿大、萎缩、结节、囊肿等变化。切取部分肝组织(肝右叶)于中性甲醛中固定、石蜡包埋、切片、HE染色由贵阳医学院附属医院病理科完成。低、高倍镜下观察肝组织的病理改变。

■ 研发前沿

目前, 砷中毒致肝损伤及肝纤维化的研究已成为国内外研究热点, 研究主要集中在砷致肝损伤的氧化应激、细胞凋亡等方面, 但都未能明确阐明其机制。

■创新盘点

本实验较好的建立了砷中毒致肝损伤及肝纤维化的实验动物模型,与国内外其他研究相比,本实验造模时间更短,大鼠耐受性更好,暴露方式也更接近砷中毒地区的染毒方式。

1.2.6 肝组织Masson染色: 切取部分肝组织于中性甲醛中固定、石蜡包埋、切片。进行胶原三重染色(Masson染色),由贵阳医学院附属医院病理科完成。在400×倍光学显微镜下,通过SONY摄像头将实验动物肝组织马松染色切片图象采集并输入Biomias2001图象分析系统进行单位(视场)面积纤维组织面积测量。每张切片(每例动物标本)随机选取5个区域(视场),用HSV颜色分割法测量单位面积内纤维组织的面积,即每例切片共有5个数据,计算各剂量组小鼠肝内纤维组织面积的均值,反应肝组织纤维化的严重程度。

1.2.7 肝细胞超微结构检查: 按要求取材后置于戊二醛溶液,交由贵阳医学院电镜室完成,日立H-7600透射电子显微镜下观察肝组织损伤情况。

统计学处理 计量资料用mean±SD表示,采用SPSS11.5统计学软件处理数据,组间比较采用*t*检验, $P<0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 肉眼观 正常对照组大鼠生活状态良好,毛发光泽;模型组大鼠毛发粗糙,精神萎靡,动作迟钝,易激惹,进食、进水量明显减少,个别大鼠出现皮肤溃烂,造模结束时各组大鼠均无死亡。

正常对照组大鼠肝脏表面光滑、质软,无结节和囊肿,色泽粉红,未见淤血、脂肪变性,无明显肿大或萎缩。砷暴露组大鼠肝脏被膜光泽差,大鼠肝脏体积增大,质稍韧,少数局部有米粒大小的灰白色结节。

2.2 肝组织病理检查结果

2.2.1 肝组织HE染色: 可见正常对照组大鼠肝细胞以中央静脉为中心,呈放射状排列,无肝细胞变性、坏死及炎症细胞浸润,小叶结构完整(图1A)。砷暴露1、2 mo模型组大鼠肝脏细胞可见水样变性、脂肪变性及气球样变性,汇管区见炎症细胞浸润,部分肝细胞坏死,肝小叶结构尚完整。砷暴露3、4 mo模型组大鼠比1、2 mo模型组明显加重,除了以上改变加重外,尚可见汇管区纤维组织增生,纤维条索形成,肝纤维化趋势明显(图1B)。

2.2.2 肝组织Masson染色: 可见正常对照组大鼠肝组织肝小叶结构完整,未见有染成绿色的胶原纤维(图2A)。模型组大鼠肝组织可见明显的肝细胞坏死并被纤维增生来修复,增生的纤维形成细丝状或汇集成粗条索甚至片状,包绕汇管区并向肝小叶间及叶内、肝小叶中心延伸(图2B)。

表 1 大鼠肝功能检测结果 (mean ± SD, $n = 10$)

分组	ALT(U/L)	AST(U/L)
正常对照组	50.68 ± 4.31	194.50 ± 27.59
1 mo	62.68 ± 23.57	193.09 ± 55.79
2 mo	62.75 ± 14.40	190.38 ± 35.42
3 mo	69.36 ± 15.70 ^a	238.53 ± 86.30
4 mo	104.49 ± 16.86 ^{ac}	275.01 ± 74.21

^a $P<0.05$ vs 正常对照组; ^c $P<0.05$ vs 1、2、3 mo模型组。

2.2.3 肝细胞超微结构观察: 电镜下可见模型组大鼠肝组织细胞核形状改变,核膜扩张并且不完整,线粒体肿胀,边界不清,极消失(图3)。

2.3 大鼠血清中肝功能指标 模型组大鼠血清ALT、AST的结果比正常对照组增高,ALT在3、4 mo模型组与正常组组间比较有统计学意义($P<0.05$); 4 mo模型组与1、2、3 mo模型组比较均有统计学意义($P<0.05$)。各组AST差异无统计学意义($P>0.05$, 表1)。

2.4 大鼠Masson染色纤维化半定量数据 模型组纤维化面积明显增大,造模1 mo后纤维化面积为 0.24 ± 0.12 ,造模2、3、4 mo后肝组织纤维化面积与正常对照组比较差异有统计学意义(0.48 ± 0.15 , 0.57 ± 0.11 , 1.07 ± 0.22 vs 0.21 ± 0.13 , 均 $P<0.05$); 造模4 mo后肝组织纤维化面积与造模1、2、3 mo后比较差异也有统计学意义($P<0.05$)。

3 讨论

近年来,砷暴露致肝损伤、肝纤维化、肝硬化及肝癌的防治研究已逐渐成为国内外研究的热点。但目前多数为人群流行病学的调查研究,对其发生机制的研究较少,且尚缺乏成熟的砷中毒致肝损伤及肝纤维化动物模型。目前国内外研究所采用的砷致肝损伤动物模型多采用砷水灌胃造模,造模时间多较短,创伤大,肝损伤及纤维化尚未形成老鼠已多数不能耐受,且这种方式与慢性砷中毒患者肝损伤的砷暴露形式相去甚远。Santra *et al*^[3]用低浓度砷水给小鼠饮用,6 mo后发现肝细胞膜的损伤;12 mo后肝脏质量明显增加,15 mo可见纤维化。我实验室^[10-13]采用小鼠自由饮用高浓度砷水造模,6 mo时已见胶原纤维增生,10 mo后可见明显的肝纤维化形成,成功建立了砷暴露致小鼠肝纤维化的动物模型,并且初步探讨了一些细胞因子在砷暴露致肝损伤中的作用。

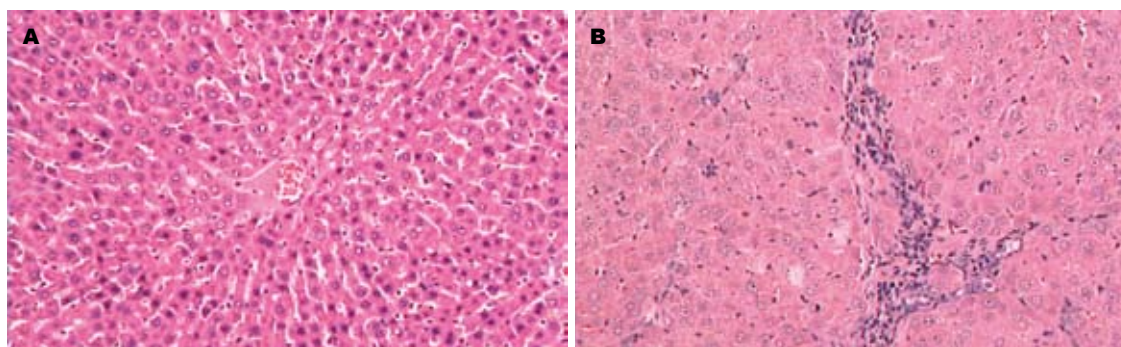


图 1 肝组织病理改变(HE染色). A: 正常对照组; B: 4 mo模型组.

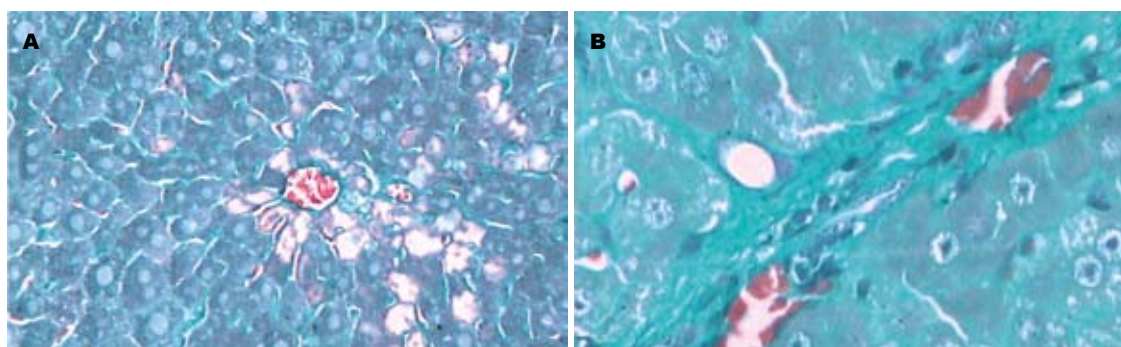


图 2 光镜下肝组织Masson染色观. A: 对照组; B: 模型组.

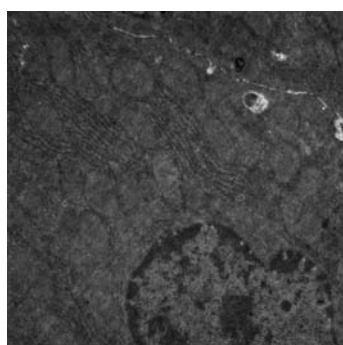


图 3 电镜下肝细胞器观.

本实验中, 大鼠砷暴露1、2 mo后肝细胞见大片水样变性及脂肪变性, 汇管区及肝小叶内见炎症细胞浸润, 但肝小叶结构完整. 随着造模时间的延长, 砷暴露3、4 mo后, 大鼠肝细胞损伤明显加重, 汇管区可见纤维组织增生, 并有少量纤维条索形成, 说明肝细胞损伤程度随砷暴露时间延长而加重, 并且高度趋向于纤维化. 造模1、2、3、4 mo后大鼠血清ALT、AST的含量较正常对照组升高, 表明砷可以导致肝细胞损伤, 而且随着造模时间延长, 肝损伤加重, 这可能与砷在肝脏中的蓄积有关. 动物实验表明, 砷可在大鼠肝组织中蓄积, 慢性砷暴露大鼠肝组织的砷含量与暴露浓度呈正相关. Xie *et al*^[14]发现大鼠暴露于亚砷酸钠0、10、20、40、80 ppm溶液10 wk后, 与对照组相比, 砷暴露各组肝组织含

砷浓度均高于对照组, 显微镜下观察可见肝细胞变性、炎症及点状坏死.

本实验成功建立了饮水型砷暴露致肝损伤、肝纤维化的大鼠模型. 与目前国内外所报道的模型相比, 本实验砷暴露方式更接近水砷病区砷中毒患者的暴露方式, 且造模时间更短, 出现肝损伤的时间更早; 与本室建立的砷暴露小鼠肝损伤、肝纤维化模型相比较, 大鼠模型出现肝损伤、肝纤维化的时间也更早, 且耐受性更好, 为进一步研究砷暴露致肝损伤的发生机制及防治提供了较理想的实验平台.

4 参考文献

- 1 Brown KG, Ross GL. Arsenic, drinking water, and health: a position paper of the American Council on Science and Health. *Regul Toxicol Pharmacol* 2002; 36: 162-174
- 2 李达圣, 安冬, 曾正, 朱爱华, 张锐智. 贵州燃煤型砷中毒患者患恶性肿瘤死亡观察. *中国地方病学杂志* 2004; 23: 42-45
- 3 Santra A, Maiti A, Das S, Lahiri S, Chakraborty SK, Mazumder DN. Hepatic damage caused by chronic arsenic toxicity in experimental animals. *J Toxicol Clin Toxicol* 2000; 38: 395-405
- 4 Liu J, Liu Y, Goyer RA, Achanzar W, Waalkes MP. Metallothionein-I/II null mice are more sensitive than wild-type mice to the hepatotoxic and nephrotoxic effects of chronic oral or injected inorganic arsenicals. *Toxicol Sci* 2000; 55: 460-467
- 5 Waalkes MP, Keefer LK, Diwan BA. Induction of

■应用要点

本研究为砷中毒致肝损伤和肝纤维化的研究提供了很好的实验平台, 对研究其发生机制有重要的意义.

■同行评价

本研究思路清晰, 技术路线明确, 方法可靠, 为今后对砷中毒致肝细胞损伤的机制研究和进一步干预提供基础, 实际意义很大。

- proliferative lesions of the uterus, testes, and liver in swiss mice given repeated injections of sodium arsenate: possible estrogenic mode of action. *Toxicol Appl Pharmacol* 2000; 166: 24-35
- 6 黎平, 刘铭, 李达圣, 王述全. 燃煤污染型砷中毒临床症状体征分析. *中国地方病学杂志* 2000; 19: 139-141
- 7 吴君. 砷对肝脏毒性的研究进展. *中国药物与临床* 2005; 5: 645-647
- 8 勒翠红, 翟城, 戴国均. 饮高砷水致地方性砷中毒的现状调查及其对人血清巯基含量的影响. *工业卫生与职业病* 2002; 28: 80-82
- 9 苏丽琴, 金银龙. 现场流行病学研究对慢性砷中毒判定的意义. *卫生研究* 2005; 34: 636-639
- 10 蒋玲, 李玲, 吴君, 欧兵, 张韵, 李诚秀, 程明亮, 杨勤.

氧化应激致慢性水砷暴露小鼠肝损伤作用. *中国公共卫生* 2008; 24: 593-595

- 11 欧兵, 吴君, 李玲, 张韵, 蒋玲, 李诚秀, 程明亮, 杨勤. 促肝纤维化因子在水砷暴露小鼠肝组织中的表达. *中国公共卫生* 2008; 24: 254-256
- 12 欧兵, 张韵, 吴君. 砷与肝纤维化. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2330-2331
- 13 罗天永, 梁耀东, 吴君. 砷与肝损伤. *世界华人消化杂志* 2007; 15: 2328-2329
- 14 Xie Y, Trouba KJ, Liu J, Waalkes MP, Germolec DR. Biokinetics and subchronic toxic effects of oral arsenite, arsenate, monomethylarsonic acid, and dimethylarsinic acid in v-Ha-ras transgenic (Tg.AC) mice. *Environ Health Perspect* 2004; 112: 1255-1263

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2009年版权归世界华人消化杂志

• 消息 •

第二十一次全国中西医结合消化学术会议征文通知

本刊讯 中国中西医结合学会消化系统疾病专业委员会决定于2009-07-23/26在南宁市召开第二十一次全国中西医结合消化系统疾病学术会议, 并同时举办全国中西医结合消化疾病(重点为功能性胃肠病、炎症性肠病和消化内镜新技术临床应用演示)新技术新理论继续教育学习班。学习班招收对象: 中西医结合、中医或西医的消化专业医师、科研人员、研究生等。参加学习班者授予国家级1类继续教育学分; 大会论文报告者另授继续教育学分6分。

1 征稿内容

功能性胃肠病、炎症性肠病中西医结合基础与临床治疗研究; 幽门螺杆菌相关疾病的中西医结合基础与治疗研究; 脂肪肝、慢性肝炎与肝硬化等常见肝病的中西医结合基础与临床研究; 消化系肿瘤中西医结合诊疗; 脾胃学说及其临床应用; 其他消化系统疾病(包括食管、胃、肝、胆、胰腺等疾病)的基础研究、临床研究与实践等。

2 征稿要求

请注明作者姓名、单位、详细通讯地址、邮编。稿件请附800字论文摘要, 尽可能以电子信件的形式将稿件传送, 截稿日期: 2009-06-30。

3 联系方式

袁海锋, 朱永苹, 530011, 广西壮族自治区南宁市华东路10号广西中医学院瑞康医院, 电话: 0771-2188107; 13597004049; 13077766271, 传真: 0771-2411156, rkxhmk@sina.com或czs.xiaohua@163.com