

体外可调式胆汁淤积性肝纤维化动物模型的建立

冯雪姣, 陈震, 秦鸣放

■背景资料

胆管梗阻、胆汁淤积是比较常见的病理环境, 较长时间的梗阻会使肝损害加重, 形成肝纤维化及胆汁性肝硬化, 而肝纤维化是一个极其复杂的动态过程, 具有可逆性。因此, 早期预防和阻断肝进行性纤维化是治疗的关键。

冯雪姣, 天津市南开医院内镜诊疗中心 天津市 300100
陈震, 秦鸣放, 天津市南开医院微创中心 天津市 300100
冯雪姣, 住院医师, 主要从事内镜诊疗的工作。

天津市中医药管理局基金资助项目, No. 11013

作者贡献分布: 此课题由陈震设计; 秦鸣放负责理论指导; 动物模型制作和相关实验数据检测分析由冯雪姣与陈震操作完成; 论文写作由冯雪姣完成。

通讯作者: 陈震, 主任医师, 300100, 天津市南开区三纬路122号, 天津市南开医院微创中心. chenchen75@gmail.com
电话: 022-27435219

收稿日期: 2014-03-18 修回日期: 2014-06-15

接受日期: 2014-06-19 在线出版日期: 2014-08-08

Establishment of an *in vitro* adjustable cholestatic liver fibrosis animal model

Xue-Jiao Feng, Zhen Chen, Ming-Fang Qin

Xue-Jiao Feng, Endoscopic Center, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China

Zhen Chen, Ming-Fang Qin, Minimally Invasive Center, Tianjin Nankai Hospital, Tianjin 300100, China

Supported by: the Program of TCM Administration for Tianjin, No. 11013

Correspondence to: Zhen Chen, Chief Physician, Minimally Invasive Center, Tianjin Nankai Hospital, 122 Sanwei Road, Nankai District, Tianjin 300100, China. chenchen75@gmail.com

Received: 2014-03-18 Revised: 2014-06-15

Accepted: 2014-06-19 Published online: 2014-08-08

Abstract

AIM: To establish and evaluate an adjustable cholestatic liver fibrosis animal model induced by bile duct ligation *in vitro*.

METHODS: Thirty male Wistar rats were randomly divided into three groups, namely, a sham operation group (A, $n = 5$), an *in vivo* bile duct ligation group (B, $n = 5$) and an *in vitro* adjustable bile duct ligation group (C, $n = 5$). Rats in each group were sacrificed 7 and 10 days after successful modelling, respectively. The gross morphology and morphological changes of the liver were observed.

RESULTS: The relative expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) mRNA in groups B and C significantly increased compared with group A

on days 7 and 10 after modelling (group B: 5.95 ± 1.21 vs 8.55 ± 1.34 , 5.01 ± 0.27 vs 8.06 ± 0.21 , $P < 0.05$; group C: 6.62 ± 1.25 vs 8.55 ± 1.34 , 5.14 ± 0.90 vs 8.06 ± 0.21 , $P < 0.05$), although there were no significant differences between groups B and C (6.62 ± 1.25 vs 5.95 ± 1.21 , 5.14 ± 0.90 vs 5.01 ± 0.27 , $P > 0.05$). The expression of COL1 and α -SMA genes showed similar trends to α -SMA mRNA expression.

CONCLUSION: The animal model of cholestatic liver fibrosis induced by adjustable bile duct ligation *in vitro* is a stable and reliable model, with advantages of simplicity, short processing cycle, and easy for intervention.

© 2014 Baishideng Publishing Group Inc. All rights reserved.

Key Words: Liver fibrosis; Animal model; Cholestasis; Bile duct ligation

Feng XJ, Chen Z, Qin MF. Establishment of an *in vitro* adjustable cholestatic liver fibrosis animal model. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2014; 22(22): 3270-3273 URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3270.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wjcd.v22.i22.3270>

摘要

目的: 通过体外胆总管结扎法建立胆汁淤积性肝纤维化动物模型, 观察其与传统体内胆总管结扎法的区别并对该动物模型进行探讨与评价。

方法: δ Wistar大鼠30只随机分为3组, 即A假手术对照组、B体内胆总管结扎组和C体外可调式胆总管结扎组。分别于造模成功后第7天和第10天处死大鼠, 每组每时相点保证大鼠5只, 留取标本, 观察大鼠肝脏的大体形态学以及病理形态学变化。

结果: B组第7天和第10天纤维化基因 α -平滑肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA) mRNA的相对表达量与A组各时相点相比均有升高(5.95 ± 1.21 vs 8.55 ± 1.34 , $5.01 \pm$

■同行评议者

黄缘, 教授, 南昌大学第二附属医院消化内科, 江西省分子医学重点实验室; 魏继福, 研究员, 江苏省人民医院

0.27 vs 8.06±0.21, $P<0.05$), C组在各时相点 α -SMA mRNA的相对表达量也有所升高(6.62±1.25 vs 8.55±1.34, 5.14±0.90 vs 8.06±0.21, $P<0.05$); 而C组 α -SMA mRNA的相对表达量和B组相比, 各时相点之间却不存在差异(6.62±1.25 vs 5.95±1.21, 5.14±0.90 vs 5.01±0.27, $P>0.05$). *COL1*基因和 α -SMA基因的表达变化趋势在各组中相似。

结论: 体外可调式胆汁淤积性肝纤维化动物模型造模方法简单, 形成周期短, 便于日后进行再通干预治疗, 是一种稳定、可靠的肝纤维化模型。

© 2014年版权归百世登出版集团有限公司所有。

关键词: 肝纤维化; 动物模型; 胆汁淤积; 结扎胆管

核心提示: 体外可调式胆汁淤积性肝纤维化动物模型是研究肝纤维化发病机制和寻找理想抗肝纤维化治疗药物研究的较理想模型。

冯雪姣, 陈震, 秦鸣放. 体外可调式胆汁淤积性肝纤维化动物模型的建立. 世界华人消化杂志 2014; 22(22): 3270-3273
URL: <http://www.wjgnet.com/1009-3079/22/3270.asp> DOI: <http://dx.doi.org/10.11569/wcjd.v22.i22.3270>

0 引言

在肝胆外科临床中, 胆管梗阻、胆汁淤积是比较常见的病理环境, 早期及时有效的引流, 大部分患者可取得满意的效果; 但是在我国有相当部分患者由于对疾病的认识不够或者经济的原因, 造成梗阻时间延长, 肝损害加重, 甚者形成肝纤维化及胆汁性肝硬化, 这部分患者后期即使接受了成功的引流, 但黄疸消退缓慢, 肝功能恢复不良, 术后并发症发生率高, 平均住院天数延长, 治疗费用增加, 心理负担加重等等, 严重危害了患者的生活质量及生存率^[1]. 而肝纤维化是由多种致病因子所致的肝内结缔组织异常增生, 是各种慢性肝病最终发展成肝硬化的必经病理阶段, 具有可逆性^[2]. 因此, 早期预防和阻断肝进行性纤维化是治疗的关键. 本实验研究就是通过体外胆总管结扎法诱导胆汁淤积性肝纤维化动物模型, 为进一步研究肝纤维化发病机制和临床防治提供一种方法和手段。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂ Wistar大鼠30只(中国人民解放军军事医学科学院卫生学环境医学研究所提供)。

11-13周龄, 体质量250-300 g. 标准条件下喂养, 并保持手术前至少1 wk的12 h白-黑周期的环境条件. 经检疫合格, 无疾病者入选。

1.2 方法

1.2.1 实验分组: 健康♂ Wistar大鼠30只, 采用随机数字表法分为3组: 即A组假手术对照、B组体内胆总管结扎和C组体外可调式胆总管结扎. 分别于造模成功后第7天和第10天处死大鼠, 每组每个时相点成功造模5只. 造模不成功的实验动物剔除补做。

1.2.2 胆汁淤积性肝纤维化动物模型的建立: 术前禁食15 h, 不禁水, 称量大鼠质量, 以10%水合氯醛0.3 mL/100 g腹腔内注射麻醉, 麻醉完全后, 将大鼠固定于手术台上, 取生理盐水湿润大鼠剑突下上腹部皮毛以利于备皮, 备皮范围3.5 cm×3 cm, 然后碘伏消毒, 铺自制洞巾, 于上腹正中切口2.5-3.0 cm入腹, 以胃幽门部为标志, 拇食指轻翻转十二指肠, 暴露胆总管后, 在肝右叶下缘与胆总管交点处分离胆总管上端, 然后由上向下游离到胆总管胰腺段以上. A: 假手术对照组: 只剖腹游离胆总管, 不做胆总管结扎. B: 体内胆总管结扎组: 以4-0丝线双结扎胆总管中上1/3处. C: 体外可调式胆总管结扎组: 应用眼科剪在游离的胆总管上下两处分别造口(不横断), 置入直径约1 mm长约25 cm硅胶管的两端, 以4-0丝线双固定此硅胶管于胆总管上下两端, 硅胶管的中段以4-0丝线缠绕固定, 以腹腔穿刺套管针沿大鼠腹部切口操作, 自皮下经过大鼠右侧颈背部建立皮下隧道, 经皮下顺着硅胶管中段丝线自大鼠颈后皮腹引出硅胶管, 固定硅胶管, 自颈部暴露出的硅胶管观察胆汁引流通畅后, 结扎体外硅胶管至完全梗阻. 各组大鼠术后均腹腔内滴入0.2 mL左氧氟沙星注射液, 关闭腹膜及皮肤层. 术后当天禁食水, 术后第2天给予普通饲料喂养, 自由摄取食物和水。

1.2.3 观察指标: (1)大体形态学观察: 解剖大鼠取材后用肉眼直接观察其肝脏形态及颜色变化; (2)HE染色观察肝脏组织病理学变化: 常规脱水、透明、石蜡包埋, 5 μ m厚度连续切片, 苏木精-伊红染色(HE), 在光学显微镜下观察肝组织病理形态学改变, IDA-2000高清晰度数码显微图像分析系统采集图像; (3)RT-PCR检测肝组织中 α -平滑肌动蛋白(α -smooth muscle actin, α -SMA)和COL1: 采用RT-PCR方法检测各组肝组织中 α -SMA、I型胶原蛋白(COL1)表达的动态变化。

■研究前沿

肝纤维化动物模型的造模方法很多, 但是每种方法都有各自的优缺点, 因此, 理想的造模方法一直是人们探讨的方向。

■创新盘点

体内胆总管结扎法虽然操作方法简单,纤维化形成周期短,稳定性好,但是在进行胆汁内引流时需要再次手术,不仅增加了手术难度,而且使动物耐受性降低,死亡率增加。而体外胆总管结扎法则避开了上述的局限性,具有优越性。

数据分析采用目的基因相对表达量 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。

统计学处理 采用SPSS16.0统计软件进行统计分析。多组比较采用多因素方差分析,两两比较采用 t 检验。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 大体形态学 A组:标本在相应时相点各肝叶均色泽红润,表面光滑。B组:第7天可见肝脏逐渐黄染并肿胀,部分质地变硬,肝脏淤血、水肿,40 g/L甲醛浸泡肝叶标本后,可见表面粗糙,颜色灰白等肝组织早期纤维化的表现,并且随着梗阻时间的延长肝纤维化逐渐加重。C组:与B组的形态学变化相似。

2.2 HE染色 A组:未见炎性细胞浸润、亦未见肝细胞变性、坏死等。B组:第7天可见炎性细胞浸润,肝细胞肿胀,少数出现变性坏死,重者见片状出血和坏死,肝组织汇管区可见胆管增生和纤维细胞增生性改变,第10天肝小叶结构受到破坏,肝细胞变性坏死,纤维化程度逐渐加重。C组:与B组的病理变化相似。

2.3 RT-PCR检测肝组织中 α -SMA和COL1 如表1所示,第7天B组 α -SMA mRNA的相对表达量和A组相比升高了6.13倍($P<0.05$),C组 α -SMA mRNA的相对表达量比A组升高了6.72倍($P<0.05$),而B组和C组相比,差异没有统计学意义($P>0.05$);B组第10天与A组相比 α -SMA mRNA的相对表达量明显增高到12.73倍($P<0.05$),C组 α -SMA mRNA表达升高了13.38倍,而B组和C组相比,差异也没有统计学意义($P>0.05$)。由表2可见第7天B组COL1 mRNA表达比A组升高了9.03倍($P<0.05$),第10天升高至9.87倍($P<0.05$),C组COL1 mRNA表达在第7天比A组升高了9.94倍($P<0.05$),第10天时进一步升高至10.71倍($P<0.05$),B组和C组各时相点相比,差异没有统计学意义($P>0.05$);可见, α -SMA和COL1基因表达随着胆管梗阻时间的延长表达量也逐渐升高;并且我们研究发现 α -SMA和COL1基因表达变化趋势在各组中具有一致性。

3 讨论

在胆胰肿瘤、胆管结石等外科胆道梗阻中,胆汁淤积是比较常见的病理因素。而这种病理因素若长期反复作用于肝脏,可产生肝细胞的变性坏死,继而肝细胞再生和纤维组织增生,导致肝纤维化,甚者引起肝硬化,成为世界上公认的复杂而棘手的问题。因此,早期及时有效的认识

表 1 第7与10天各组大鼠 α -SMA相对表达量($n=5$, mean \pm SD)

分组	第7天		第10天	
	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
A组	8.55 \pm 1.34	1.00	8.06 \pm 0.21	1.00
B组	5.95 \pm 1.21	6.13 ^a	5.01 \pm 0.27	12.73 ^a
C组	6.62 \pm 1.25	6.72 ^{ac}	5.14 \pm 0.90	13.38 ^{ac}

^a $P<0.05$ vs A组; ^c $P<0.05$ vs B组。

表 2 第7与10天各组大鼠COL1相对表达量($n=5$, mean \pm SD)

分组	第7天		第10天	
	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$	ΔCt	$2^{-\Delta\Delta Ct}$
A组	4.21 \pm 0.46	1.00	6.35 \pm 2.74	1.00
B组	3.04 \pm 0.87	9.03 ^a	4.33 \pm 0.86	9.87 ^a
C组	2.31 \pm 1.80	9.94 ^{ac}	4.74 \pm 0.94	10.71 ^{ac}

^a $P<0.05$ vs A组; ^c $P<0.05$ vs B组。

这种疾病是治疗的关键。肝纤维化是各种慢性肝病最终发展成肝硬化的必经病理阶段,具有可逆性。因此探讨和研究肝纤维化发生机制和治疗措施具有极其重要的临床意义。

胆汁淤积性肝纤维化动物模型的建立是研究肝纤维化发生机制以及药物对该病干预效果的基础。在实验动物的选择上,综合文献我们发现研究者造模使用的动物品种很多,有大型动物如兔、狗、猪等,小型动物有大鼠和小鼠^[3-11]。而在本研究中我们参照国外文献常用的动物品种,选择应用最广泛,数量最多的 δ Wistar大鼠,其性格温顺,进食量少,生长发育快(10周龄时雄鼠体重质量可达280-300 g),抗病力强,头部也较宽。文献中记载造模方法也有好多,但每种造模方法都有自己的优点和缺点。理想的肝纤维化动物模型应该与人类肝纤维化相似,病变发展具有动态性,纤维化过程稳定,并且造模方法简单,重复性好,形成率高,死亡率低等^[12,13]。在本研究中我们主要采用单纯胆总管结扎法(体内/体外)。传统的体内胆总管结扎法虽然操作方法简单,形成肝纤维化周期短,稳定性好,但是应用比较局限,在进行胆汁内引流时往往需要再次进行手术,不仅增加了手术的难度,而且使动物的耐受性降低,增加了动物的死亡率。而体外胆总管结扎法则避开了上述的局限性,并且拥有和传统体内胆总管结扎法相同的病理过程,具有优越性。

体外胆总管结扎法在进行手术操作时, 我们认为有几点需要注意的, 首先, 分离胆管时要谨慎, 避免损伤胆管周围的血管, 影响模型的成功率, 并能防止损伤过大。然后, 胆管的两处造口位置的选择也很重要, 近端如果太靠近肝门, 结扎困难, 增加操作难度; 远端太靠近十二指肠, 容易损伤胆管周围的胰腺组织, 出现胰腺炎、出血等并发症。我们在实验中造口近端选择在肝右叶下缘与胆总管交点处以下, 造口远端选择在胆管胰腺段以上。最后, 选择4-0丝线双固定硅胶管时, 力度要适中, 避免过紧导致胆道部分或者完全梗阻, 过松引起硅胶管脱落, 造模失败。

另外, 胆管梗阻时间与纤维化之间的关系, 国外文献指出, 胆管梗阻7-15 d可出现早期肝纤维化。秦冬梅等^[14]采用胆总管结扎建立肝纤维化模型, 通过病理组织学发现在第5天, 模型组大鼠全部都处于肝纤维化I和II期阶段; 在第10天, 模型组大鼠大部分已经处于肝纤维化III期阶段; 在第14天, 模型组大鼠大部分处于肝纤维化III期阶段, 一部分处于IV期阶段已形成肝硬化。一些研究认为肝纤维化发生在BDL术后第7天, 以后随着胆管梗阻时间的延长进一步发展。我们在实验前期的研究中^[15,16]也已经发现肝纤维化发展过程中, 第7天之后为持续的肝脏纤维化进程。并且在本研究中, 胆总管结扎第7天和第10天均出现了较显著的纤维增生样改变, 表明使用胆总管结扎法(体内/体外)诱导的肝纤维化动物模型复制成功。

总之, 本研究所建立的体外可调试胆汁淤积性肝纤维化动物模型造模方法简单, 形成周期短, 形成的肝纤维化稳定可靠, 并且便于日后进行再通干预治疗, 因此是研究肝纤维化发病机制和寻找理想抗肝纤维化治疗药物研究的较理想模型。

4 参考文献

- 1 陈应果, 别平, 祝建勇. rhGH上调Mrp2表达及促胆红素转运的作用. 中华肝胆外科杂志 2006; 12: 260-263
- 2 Benyon RC, Arthur MJ. Extracellular matrix degradation and the role of hepatic stellate cells. *Semin Liver Dis* 2001; 21: 373-384 [PMID: 11586466]
- 3 Masuda Y. [Learning toxicology from carbon tetrachloride-induced hepatotoxicity]. *Yakugaku Zasshi* 2006; 126: 885-899 [PMID: 17016019]
- 4 陈钟, 戴向华, 明志祥, 朱李璐. 改良四氯化碳皮下注射法制备犬肝硬化门静脉高压症模型. 中国普通外科杂志 2009; 18: 63-67
- 5 郭若涵, 白彬. 大型动物实验性肝纤维化及肝硬化模型的研究进展. 世界华人消化杂志 2013; 21: 421-426
- 6 曹罡, 黎一鸣. 门脉置管四氯化碳注射法制备狗肝硬化模型. 中华肝胆外科杂志 2001; 7: 53-54
- 7 陆家海, 卢开柏, 杜立智, 杜宝昆, 曹建书, 员逢全, 杨建民, 张都民, 李新力. 犬肝硬化模型的建立. 中国兽医学报 1994; 14: 291-293
- 8 牛丽文, 杨镇, 郭剑利, 张爱龙, 李崇健, 肖亮, 王超. 瘦素蛋白在小鼠日本血吸虫病肝纤维化组织中的表达及意义. 江西医学院学报 2007; 47: 12-15
- 9 张俊晶, 孟兴凯, 岳根全, 钟海燕, 张瑞芳. 腹腔注射四氯化碳辅以饮食调控制猪肝硬化模型. 中国中西医结合消化杂志 2007; 15: 231-233
- 10 黄迪, 古维立, 胡志文, 张帅, 王成兴. 大鼠肝纤维化模型建立及肝纤维化的检测. 广州医药 2012; 43: 56-60
- 11 肖颜玉, 胥飏, 崔鲂, 张莉萍. 小鼠胆总管结扎致肝纤维化模型的建立与评价. 重庆医科大学学报 2008; 33: 390-393
- 12 Geng J, Peng W, Huang Y, Fan H, Li S. Ginsenoside-Rg1 from *Panax notoginseng* prevents hepatic fibrosis induced by thioacetamide in rats. *Eur J Pharmacol* 2010; 634: 162-169 [PMID: 20184879]
- 13 Liu H, Wei W, Sun WY, Li X. Protective effects of astragaloside IV on porcine-serum-induced hepatic fibrosis in rats and in vitro effects on hepatic stellate cells. *J Ethnopharmacol* 2009; 122: 502-508 [PMID: 19429320]
- 14 秦冬梅, 赵文惠, 胡利萍, 陈文. 胆总管结扎术造大鼠肝纤维化模型的研究. 时珍国医国药 2012; 23: 803-805
- 15 张辰. 肝脏卵圆细胞与相关细胞因子在大鼠胆管梗阻模型中的变化. 天津: 天津医科大学, 2011
- 16 元海成, 秦鸣放, 邹富胜, 李东华. 急性胆道梗阻肝脏损伤的实验研究. 中国普通外科杂志 2012; 21: 178-182

■同行评价

本文设计合理, 数据分析及统计学方法得当, 是研究肝纤维化发病机制和寻找理想抗肝纤维化治疗药物研究较理想的模型。

编辑 田滢 电编 闫晋利

