

胆总管内注射无水乙醇致胆道闭锁动物模型的建立

葛军涛, 李龙, 魏延栋, 王海斌, 乔国梁, 张震, 刘垚, 明安晓

(首都儿科研究所, 北京 100020)

【摘要】 目的 应用胆总管内注射无水乙醇建立SD大鼠胆道闭锁模型。方法 将SD雄性大鼠随机分为实验组和对照组,在实验组中经静脉留置针插入胆总管注入无水乙醇,对照组注入生理盐水。观察SD大鼠的生化及病理结果。结果 在实验组中SD大鼠根据病理及生化检测分为肝功能持续恶化组和肝功能修复组,肝功能持续恶化组在8周以后生化明显高于对照组及肝功能修复组。常规HE染色及SMA、Masson染色也出现明显变化。结论 胆总管无水乙醇注射诱导胆道闭锁模型是一种可靠的动物模型,此动物模型会帮助人们进一步研究胆道闭锁提供更多的研究手段。

【关键词】 胆道闭锁;肝硬化;无水乙醇;大鼠模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2014) 03-0050-03

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2014.03.010

Injection of ethanol into the common bile duct to establish a rat model of biliary atresia

GE Jun-tao, LI Long, WEI Yan-dong, WANG Hai-bin, QIAO Guo-liang, ZHANG Zhen, LIU Yao, MING An-xiao

(Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100021, China)

【Abstract】 Objective To establish a new rat model of biliary atresia by pure ethanol injection into the common bile duct. **Methods** A catheter was inserted and fixed in the common bile duct in male SD rats. Saline (8 rats) or pure ethanol (16 rats) was injected through the catheter, respectively, and the biochemical and pathological changes in the rats were examined. **Results** SD rats in the experimental group were divided into a persistent injury and a restoration of liver dysfunction groups according to pathological and biochemical detection. In the persistent injury group, biochemical impairments were significantly higher at 8 weeks after ethanol injection than those in the control group and restoration group. Distinct pathological changes in the liver were observed using HE, SMA, and Masson staining. **Conclusions** It is a reliable animal model of biliary atresia induced by injection of pure ethanol into the common bile duct in the rat. It will provide a useful tool in future studies of biliary atresia.

【Key words】 Biliary atresia; Liver cirrhosis; Pure ethanol; Rat, model

胆道闭锁 (biliary atresia, BA) 是以肝内外胆管闭锁和梗阻性黄疸为特点的小儿外科常见畸形,其病因和发病机制未明使得临床研究也受到极大限制。尽管胆道闭锁患儿成功的进行手术治疗伴随而来的还会有慢性肝脏疾病以至于大部分患儿必须接受肝移植。文献报道^[1] 葛西手术和肝移植的联合应用可以使患儿的十年生存达到 90%。但是 50 多

年来人们在探索胆道闭锁的动物模型中所获得的单一临床应用少之又少。1957 年开始, Symeonidis^[2] 就通过结扎成年大鼠的胆总管来建立动物胆道闭锁模型,后来 Dumont^[3] 通过胆总管注射福尔马林来诱导胆管炎,最近猕猴轮状病毒^[4-6] 致胆道闭锁的模型让研究者们收到极大鼓舞,成为最近普遍被接受的一种动物模型。但是种种动物模型并没有完

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目,先天性胆道畸形肝脏损伤及修复机制研究(81170335)。

[作者简介] 葛军涛(1986年-),男,在读硕士生。E-mail: gejuntao0620@163.com

[通讯作者] 李龙。E-mail: lilong23@126.com

全的模拟胆道闭锁临床上的表现,所以我们建立了 SD 大鼠胆总管内无水乙醇注射模型来模拟胆道闭锁并与胆道闭锁临床表现进行了对比。

1 材料与方法

1.1 材料

SPF 级 SD 雄性大鼠,24 只,体重 150 ~ 170 g,购自中国人民解放军军事医学科学院实验动物中心【SCXK(军)2009-0011】。其中 16 只作为实验组从胆总管注入无水乙醇,8 只作为对照组胆总管内注入生理盐水。所有大鼠饲养于北京大学医学部实验动物科学部【SYXK(京)2011-0039】,室温(22 ± 2)℃;湿度 50% ~ 70%,自由进食、饮水。术前当晚禁食。术后相同条件下饲养,明暗周期各 12 h。

1.2 手术方法

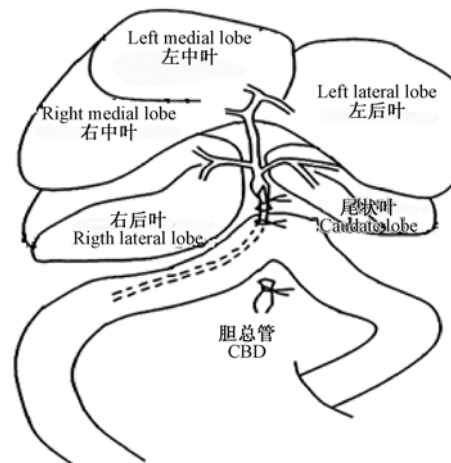
大鼠采用 1% 戊巴比妥钠(10 μL/g)腹腔麻醉后,取仰卧位,固定四肢后置于手术台,沿剑突及左右肋缘分层切开皮肤,找到肝十二指肠韧带,在显微镜下分离胆总管,用 2 条 6-0 手术线提起胆总管然后插入密闭式静脉留置针(留置针直径 0.7 mm,长度 19 mm)然后拔出针芯观察是否有胆汁流出,有胆汁流出证明在胆总管内,留置针头端达到尾状叶水平然后将手术线打结固定,通过微量调节注射器注入无水乙醇或生理盐水(无水乙醇的注射剂量:基于大鼠注入 0.18 mL 黑墨水于肝脏后,可以在肝脏表面看到黑色颗粒,故根据大鼠体重计算剂量为 1.2 μL/g。自实验起观察 8 周安乐死动物)。随后保持无水乙醇或生理盐水于肝内 5 min 后拔下微量调节注射器使液体自然流出。静脉留置管远端切断插入空肠(距离 Treitz 韧带 3 cm),并且用 11-0 尼龙线缝合固定(如图 1)。结扎胆总管远端并切断胆总管。实验完成后动物禁食一天后给予食物和水。

1.3 观察指标

分别在 0、2、4、6、8 周尾部取血,取血量为 1 mL。然后放入离心机 3500 r/min 离心 5 min,取上层血浆测总胆红素(TBIL)、谷丙转氨酶(ALT)谷草转氨酶(AST)。

1.4 病理

取肝脏同一叶(左后叶)组织放入 4% 甲醛中固定,然后石蜡包埋作连续切片并行 HE 染色、Masson 染色、SMA 染色。光学显微镜下观察并拍照。观察比较实验组与对照组肝脏外形以及肝脏组织常规切片,HE 染色在显微镜下观察肝内外胆管管腔有无狭窄、闭塞,胆管周围有无明显炎症反应,肝细胞有无变性坏死,肝细胞内有无淤胆,以及肝脏有无炎症



注:在胰胆管汇合点以上切开胆总管,用 2 条 6-0 手术线提起胆总管然后插入密闭式静脉留置针(0.7 mm × 19 mm),留置针头端达到尾状叶水平时双重结扎。胆总管远端结扎并切断,静脉留置针远端切断并放入空肠内固定。

图 1 手术方法

Note: To cut the common bile duct above the pancreatic duct confluence, with two 6-0 surgical thread to lift the duct, and then insert the closed intravenous catheter (0.7 mm × 19 mm). The end of the catheter needle is placed to the caudate lobe level with double ligation. The distal common bile duct is ligated and cut. The distal intravenous catheter is cut and fixed in the jejunum.

Fig. 1 Description of the surgical procedure

细胞浸润。Masson 染色观察纤维化以及 SMA 染色观察汇管区动、静脉及胆管平滑肌变化。

1.5 统计分析

所有结果用($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS 19.0 分析,计量资料采用秩和检验和 T 检验($P \leq 0.05$)。

2 结果

2.1 动物手术后表现

实验组中的 5 只大鼠(31.25%)和对照组中的 6 只大鼠(75%)存活到术后 8 周,通过解剖发现实验组中大鼠可能死于术后禁食时间过短,因为发现胃部有大量食物堆积而肠道内空虚。实验组中大鼠死亡原因除了死于禁食时间过短外,发现有严重的肝硬化腹水和营养不良。同时我们通过病理发现在实验组中同样存在两种病理变化。通过大鼠生化检测结果观察到实验组的生化结果也存在很大差异,有一类实验组大鼠总胆红素、谷丙转氨酶、谷草转氨酶呈进行性加重,我们暂且称之为持续损伤组(胆道闭锁模型);另一组大鼠总胆红素、谷丙转氨酶、谷草转氨酶在术后升高后又慢慢恢复到正常值范围,我们暂且称之为恢复组。

2.2 肝脏生化及病理染色

持续损伤组总胆红素、谷丙转氨酶及谷草转氨酶如图 2。持续损伤组相对应的病理变化如图 3。恢复组总胆红素、谷丙转氨酶及谷草转氨酶如图 4。恢复组相对应的病理变化如图 5(图 2、3 见彩插 7, 图 4、5 见彩插 8)。

2.3 术后解剖所见

持续组肝脏损伤表面可见明显的结节,腹腔内可见明显的大量腹水以及明显的曲张静脉丛,说明持续损伤组大鼠发生明显的肝硬化及门脉高压。如图 6(彩插 8)。

3 讨论

胆道闭锁临床表现为阻塞性黄疸,陶土样大便和肝脾肿大三联症,基本的病理变化为肝内外胆管进行性炎症和肝纤维化,这种疾病无论是对于病人及其家庭、就诊医生、社会来讲都是一种悲剧^[7],尽管患儿成功的进行葛西手术,但大部分患儿最后不得不进行肝移植手术以及面对肝移植后的器官排斥和其他继发病。几种动物模型前面已经介绍过,胆总管切除模型会导致近端的胆总管明显扩张,导致动物在术后 4 周死亡。相反,胆总管结扎模型会导致胆管的再通,肝脏的功能和形态可以恢复正常。在胆总管内注射甲醛诱导硬化性胆管炎的动物模型中,肝脏的组织学检查显示胆管周围有炎症细胞浸润以及小胆管的纤维性胆管炎和增生,但是汇管区周围的肝细胞是正常的。在猕猴轮状病毒感染小鼠模拟胆道闭锁的模型中,小鼠肝脏颜色淡黄至深黄,部分肝缘呈鲜黄色坏死样,肝包膜紧张,表面颗粒状,质韧,胆囊萎缩或膨大,肝外胆道呈条索状狭窄和闭锁。HE 染色显示肝内汇管区大量炎症细胞浸润,淤胆明显,部分肝缘组织出现点灶样或大块坏死;肝外胆管连续切片见胆管狭窄和闭锁,胆管壁增厚,胆管内皮细胞不规则增生,伴有大量炎症细胞浸润,有时候会发现肝外胆道闭锁近端的膨大。但是肝内胆管变化比较轻微,更深层次的研究发现动物模型中的小鼠并没有像人一样出现严重的肝脏纤维化和门脉高压。小鼠的病毒模型至少是对病毒学说的一种支持,因为注射病毒的新生小鼠发生了胆道的梗阻。但 Coots 等^[8]在最近的研究中发现人类的胆管上皮和小鼠的胆管上皮一样对猕猴轮状病毒敏感,这种发现表明在人类的胆道闭锁疾病病因中猕猴轮状病毒或许起着很大的潜在性作用。

在目前的酒精模型中,持续损伤组中的大鼠发生了肝脏的损伤并且导致硬化性的胆管炎。在这些

动物中虽然肝外胆道在显微镜下并没有闭锁但是肝内胆道病理变化特点和胆道闭锁非常类似。Kyokane 等^[9]在 2001 年做过选择性的肝叶(大约肝重 70%)注射无水乙醇,剂量约为 0.6 $\mu\text{L/g}$ 。结果显示术后第 14 天注射部分肝叶重量减少到整个肝重的 50%,而未注射部分肝叶重量增加 1.6 倍,胆汁流量和胆汁酸明显增加。组织结构上注射无水乙醇肝叶部分肝内胆管被破坏并且发生纤维化及炎症细胞浸润,最终导致肝内胆管闭锁但不坏死。血清转氨酶在术后第 14 天时回到正常范围。所以在目前的无水乙醇模型中,我们认为恢复组有可能由于无水乙醇的量不足引起的,换句话说在无水乙醇注射过程中可能发生了酒精的泄漏。即使无水乙醇的量充足,但是大鼠间先天性的胆管直径以及注射速度和对无水乙醇的反应也存在差异。

我们认为此动物模型基于无水乙醇胆总管注射引起胆管上皮损伤,导致硬化性胆管炎及其他继发反应,继发反应通过引起胆管的破坏和纤维组织的替代发生肝内胆管的堵塞同时伴随胆管的增生。总之,此大鼠的酒精模型与临床上胆道闭锁模型非常类似,所以,此模型对于研究胆道闭锁有进一步的帮助。

(本文图 2~6 见彩插 7,8)。

参 考 文 献

- [1] Hartley JL, Davenport M, Kelly DA. Biliary atresia [J]. *Lancet*, 2009. 374(9702):1704-1713.
- [2] Symeonidis A, Trams EG. Morphologic and functional changes in the livers of rats after ligation or excision of the common bile duct [J]. *Am J Pathol*, 1957. 33(1):13-27.
- [3] Dumont M, D'Hont C, Moreau A, et al. Retrograde injections of formaldehyde into the biliary tree induce alterations of biliary epithelial function in rats [J]. *Hepatology*, 1996. 24(5):1217-1223.
- [4] Petersen C, Biermanns D, Kuske M, et al. New aspects in a murine model for extrahepatic biliary atresia [J]. *J Pediatr Surg*, 1997. 32(8):1190-1195.
- [5] Petersen C, Kuske M, Bruns E, et al. Progress in developing animal models for biliary atresia [J]. *Eur J Pediatr Surg*, 1998. 8(3):137-141.
- [6] Allen SR, Jafri M, Donnelly B, et al. Effect of rotavirus strain on the murine model of biliary atresia [J]. *J Virol*, 2007. 81(4):1671-1679.
- [7] Petersen C. Biliary atresia: the animal models [J]. *Semin Pediatr Surg*, 2012. 21(3):185-191.
- [8] Coots A, Donnelly B, Mohanty SK, et al. Rotavirus infection of human cholangiocytes parallels the murine model of biliary atresia [J]. *J Surg Res*, 2012. 177(2):275-281.
- [9] Kyokane T, Nagino M, Oda K, et al. An experimental study of selective intrahepatic biliary ablation with ethanol [J]. *J Surg Res*, 2001. 96(2):188-196.

[收稿日期] 2014-03-13