



四氯化碳、酒精与四氯化碳联合、胆管结扎致 SD 大鼠肝纤维化病理学比较

孙 侠, 黄小琼, 钟海潮, 饶子亮, 钟志勇, 王 刚

(广东省医学实验动物中心, 佛山 528248)

【摘要】 目的 研究四氯化碳、酒精与四氯化碳联合、胆管结扎致 SD 大鼠肝纤维化模型肝脏的病理学改变, 初步探讨肝纤维化发病机制。**方法** 四氯化碳组 SD 大鼠以 3 mg/kg 的剂量(首次剂量加倍)皮下注射 50% 四氯化碳(四氯化碳: 橄榄油 = 1:1), 每周 2 次, 连续注射 6 周; 酒精与四氯化碳联合组 SD 大鼠每日按照 10 mL/kg 剂量灌服酒精混合物(酒精: 吡唑: 玉米油 = 10 mL: 25 mg: 2 mL), 同时每周 2 次按 0.3 mL/kg 剂量给予腹腔注射四氯化碳: 橄榄油(1:3), 连续造模 60 d; 胆管结扎组大鼠按 10 mg/kg 体重腹腔注射 3% 戊巴比妥钠麻醉, 腹部皮肤消毒, 无菌操作沿腹部正中线剪开腹腔, 分离出胆管, 在胆管近端和远端 2 处结扎胆管, 28 d 后结束实验。试验结束后麻醉动物, 解剖取动物肝脏组织, 用 10% 福尔马林固定, 进行病理学检查。**结果** 四氯化碳致 SD 大鼠肝纤维化模型表现为弥漫性脂肪肝、肝炎、肝纤维化; 酒精与四氯化碳联合致 SD 大鼠肝纤维化模型表现为酒精性脂肪肝、肝炎、肝纤维化; 胆管结扎致 SD 大鼠肝纤维化模型表现为胆管增生、肝炎、肝纤维化。**结论** 这 3 种方法都可以引起大鼠肝脏发生纤维化, 其中胆管结扎致 SD 大鼠肝纤维化造模方法适合于临床胆汁淤积所致肝纤维化的模型建立, 其它两种方法适合于化学性、病毒性肝炎引起的肝纤维化模型的建立, 可根据不同的实验目的选择不同的方法构建相应的动物模型。

【关键词】 肝纤维化; 四氯化碳; 酒精; 胆管结扎; 病理学

【中图分类号】 R36; R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)03-0036-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.003.008

Pathology Comparison of Hepatic Fibrosis SD Rat Caused by Carbon Tetrachloride, Alcohol and Carbon Tetrachloride Combination and Bile Duct Ligation

SUN Xia, HUANG Xiao-qiong, ZHONG Hai-chao, RAO Zi-liang, ZHONG Zhi-yong, WANG Gang
(Guangdong Medical Laboratory Animal Center, Foshan 528248, China)

【Abstract】 Objective To study the hepatic pathological changes in SD rat hepatic fibrosis model caused by carbon tetrachloride (CTC), alcohol combined with CTC, bile duct ligation, and discuss the pathogenesis of hepatic fibrosis preliminarily. **Methods** SD rats in carbon tetrachloromethane group were injected 50% carbon tetrachloromethane (CTC: Olive oil = 1:1) hypodermically with dosage of 3 mg/kg (first dose doubled), 2 times every week, for 6 weeks continuously. SD rats in alcohol combined with CTC group were drenched daily by alcohol mixture (alcohol: pyrazole: corn oil = 10 mL: 25 mg: 2 mL) with dosage of 10 mL/kg, at the same time, intraperitoneal injected with dosage of 3 mg/kg

【基金项目】 广东省科技计划项目(2010B060500020)。

【作者简介】 孙侠(1979-), 女, 助理研究员, 主要研究方向: 实验动物病理学。

【通讯作者】 王刚(1966-), 男, 高级兽医师, 从事动物实验和比较医学研究工作, E-mail: gdmlac@gmail.com。

CTC: Olive oil(1:3) 2 times every week, for 6 weeks continuously. SD rats in bile duct ligation group were anesthetized by 3% pentobarbital sodium intraperitoneal injection with dosage of 10mg/kg body weigh, disinfected abdominal skin, cutted along the abdomen to separate the bile duct and ligate bile duct at the proximal and distal bile duct with aseptic technique, 28 days later ended the experiment. After the test, we anesthetized SD rats, dissected liver tissues with 10% formalin fixed for pathological inspection. **Conclusions** SD rat hepatic fibrosis model induced by CTC characterized by diffuse fatty liver, hepatitis and hepatic fibrosis; SD rat hepatic fibrosis model induced by alcohol combined with CTC characterized by alcoholic fatty liver, hepatitis and hepatic fibrosis; SD rat hepatic fibrosis model induced by bile duct ligation characterized by bile duct hyperplasia, hepatitis and hepatic fibrosis. **Result** These three methods can cause hepatic fibrosis occurs, in which the method for SD rat hepatic fibrosis model caused by CTC is suitable for clinical cholestasis induced hepatic fibrosis model to establish, the other two methods are suitable for chemical, viral hepatitis induced hepatic fibrosis model to establish, we can choose different method to establish corresponding animal model according to different experiment purpose.

【Key words】 Hepatic fibrosis; Carbon tetrachloride; Alcohol; Bile duct ligation; Pathology

肝纤维化 (hepatic fibrosis) 是指肝脏内弥漫性细胞外基质 (特别是胶原) 过度沉积。它不是一个独立的疾病, 而是许多慢性肝病共同病理过程。几乎各种慢性肝脏疾病均可引起肝纤维化, 其病因大致可分为感染性 (慢性乙型、丙型和丁型病毒性肝炎, 血吸虫病等), 先天性代谢缺陷 (肝豆状核变性、血色病、 α 1-抗胰蛋白酶缺乏症等) 及化学毒性 (慢性酒精性肝病、慢性药物性肝病) 及自身免疫性肝炎、原发性胆汁性肝硬化和原发性硬化性胆管炎等。本实验采用 3 种^[1-3]不同方法分别建立四氯化碳、酒精与四氯化碳联合、胆管结扎致 SD 大鼠肝纤维化模型, 并对 3 种肝纤维化模型大鼠肝脏病理学改变进行比较, 初步探讨肝纤维化病变发生机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠, 34 只, 雄性, 4 周龄, 体重 180 ~ 220 g, 由广东省医学实验动物中心提供, 动物生产许可证粤监证字号: SCXK (粤) 2008-0002, 实验动物合格证号: 0056726。经过实验动物伦理委员会审查通过。

1.1.2 实验环境

SD 大鼠饲养在广东省医学实验动物中心 SPF 级实验动物室, 动物实验环境设施合格证号: 0028828, 室内温度 20 ~ 25℃, 相对湿度 40 ~ 70%, 换气量 10 ~ 12 次/h, 照明 12 h 明暗交替; 用标准大鼠箱饲养, 每箱 5 只, 水料充足, SPF 级饲料产自广东省医学实验动物中心。

1.1.3 主要试剂

四氯化碳: 广州市中南化学试剂有限公司, 批号: 060213; 橄榄油: 国药集团化学试剂有限公司, 批号: F20040614; 戊巴比妥钠: 北京化学试剂公司, 规

格: 25 g, 批号: 061222; 酒精: 北京红星股份有限公司, 规格: 2 L, 纯度: 60%; 吡啶: 上海晶纯试剂有限公司, 规格: 25 g, 纯度: 98%, 批号: 11169; 玉米油: 益海嘉里食品营销有限公司, 规格: 900 mL。病理检测试剂: 乙醇、二甲苯、甲醛、苏木素、伊红等。

1.1.4 主要仪器

YP3001N 电子天平: 上海精密科学仪器有限公司; PB203-N 电子分析天平: 梅特勒-托利多公司产品; 全自动生物组织脱水机, 湖北宏业医用仪器有限公司, 型号: TS-12N; 轮转切片机, 德国徕卡, 型号: RM2135; 全自动生物组织染色机, 湖北宏业医用仪器有限公司, 型号: RS-18 II; 荧光病理图像分析系统, 型号: OLYMPUS BX41。

1.2 方法

1.2.1 造模^[1-3]

SD 大鼠随机分为 4 组: 正常对照组 8 只, 四氯化碳组 8 只, 酒精与四氯化碳联合组 9 只, 胆管结扎组 9 只。四氯化碳组以 3 mg/kg 的剂量 (首次剂量加倍) 皮下注射 50% 四氯化碳 (四氯化碳: 橄榄油 = 1:1), 每周 2 次, 连续注射 6 周; 酒精与四氯化碳联合组每日按照 10 mL/kg 剂量灌服酒精混合物 (酒精: 吡啶: 玉米油 = 10 mL: 25 mg: 2 mL), 同时每周 2 次按 0.3 mL/kg 剂量给予腹腔注射四氯化碳: 橄榄油 (1:3), 连续造模 60 d; 胆管结扎组大鼠按 10 mg/kg 体重腹腔注射 3% 戊巴比妥钠麻醉, 腹部皮肤消毒, 无菌操作沿腹部正中中线剪开腹腔, 分离出胆管, 在胆管近端和远端 2 处结扎胆管, 28 d 后结束造模。

1.2.2 病理学检查

实验结束后, 将大鼠用乙醚麻醉后处死, 解剖观察肝脏病变, 并采取肝脏组织用 10% 福尔马林固定 48 h, 按常规程序制作石蜡切片, 切片厚度 4 μ m,

HE 染色, masson 三色染色显微镜下观察并拍照。观察肝组织肝小叶结构是否紊乱, 小叶内肝细胞是否变性、坏死, 汇管区有无纤维组织增生、小胆管增生和炎细胞浸润等病理改变。

1.2.3 肝纤维化病变半定量、定量分析

肝纤维化分期半定量评估采用 Scheuer 评分系统^[4-5]: 0 分: 无纤维化; 1 分: 汇管区扩大; 2 分: 汇管区纤维化, 少量间隔形成; 3 分: 纤维间隔形成明显伴小叶结构紊乱; 4 分: 可能或肯定的肝硬化。肝纤维化病变定量分析: 每份标本在低倍视野 (10×10) 下依次选取左上、右上、左下、右下、中间 5 个视野 (共 1.5 mm^2), 采用 Image-Pro Plus 6.0 软件测定视野内肝纤维化病变总面积。

1.2.4 统计学分析

实验数据采用 SPSS16.0 统计软件, 组间比较采用 One-Way ANOVA 比较。

2 结果

2.1 各组大鼠肝脏外观比较

正常对照组大鼠肝脏表面暗红, 边沿锐利, 质地软; 四氯化碳组大鼠肝脏呈灰黄色, 饱满粗糙, 表面有大小不等的结节, 质硬, 韧性大; 胆管结扎组大鼠肝脏肿大, 呈黄绿色, 质地中等硬, 胆总管自结扎处以上明显扩张; 酒精与四氯化碳联合组大鼠肝脏较正常肝脏暗淡, 质地偏硬, 部分表面凹凸不平。

2.2 各组大鼠肝脏组织病理学改变

正常对照组大鼠肝脏肝小叶结构清晰, 小叶内肝细胞索排列较整齐, 肝细胞大小均匀, 无变性、坏死, 汇管区未见纤维组织增生和小胆管增生。四氯化碳组大鼠肝脏肝小叶结构不清甚至被破坏, 肝细胞弥漫脂肪变性, 汇管区及中央静脉周围见少量至中量炎性细胞浸润, 纤维组织增生较明显。酒精与四氯化碳联合组大鼠肝脏肝小叶结构不清甚至被破坏, 局灶至弥漫肝细胞水肿伴脂肪变性, 汇管区及中央静脉周围见少量至中量炎细胞浸润, 纤维组

织增生明显。胆管结扎组大鼠肝脏肝小叶结构不清甚至被破坏, 肝细胞未见变性, 小叶内及汇管区见少量至中量炎细胞浸润, 小胆管伴纤维组织增生明显。参见彩插 4 图 1。

2.3 各组大鼠肝纤维化病变半定量、定量比较

四氯化碳组、酒精与四氯化碳联合组、胆管结扎组大鼠肝纤维化程度与正常对照组比较显著增加 ($P < 0.01$)。结果提示四氯化碳、酒精与四氯化碳联合、胆管结扎致 SD 大鼠肝纤维化模型造模基本成功。胆管结扎组大鼠肝纤维化程度较四氯化碳组、酒精与四氯化碳联合组加重。参见表 1。

3 讨论

本实验分别采用多次皮下注射 50% 四氯化碳、胆管近端和远端 2 处结扎胆管、酒精混合液灌胃结合微量四氯化碳腹腔注射复合因素等方法成功建立肝纤维化大鼠模型。实验结果显示, 四氯化碳、酒精与四氯化碳联合、胆管结扎均可诱发 SD 大鼠肝纤维化的形成, 四氯化碳组大鼠可见肝细胞的弥漫性脂肪变性和炎细胞浸润, 酒精与四氯化碳联合组大鼠可见肝细胞的酒精性水肿伴脂肪变性和炎细胞浸润, 胆管结扎组大鼠可见小胆管的明显增生和炎细胞浸润。其中, 胆管结扎模型属于胆汁性肝硬化, 适合于模拟临床胆汁性肝硬化 (由胆管堵塞、胆道先 d 畸形、寄生虫等因素引起胆汁淤积所致肝硬化), 其病变以间质、胆管增生为主, 早期肝细胞正常, 晚期才出现肝细胞的变性、坏死。四氯化碳模型属于化学毒物性肝硬化, 适合于模拟临床化学药物性肝硬化 (由长期、慢性化学药物中毒引起), 其病变以肝细胞变性、坏死以及肝小叶改建为假小叶为主。酒精与四氯化碳联合模型属于酒精性肝硬化, 适合于模拟临床酒精性肝硬化 (由长期、慢性酒精中毒引起), 其病变与其它化学药物以及各种病毒性肝炎引起肝硬化的病变相类似, 均以肝细胞变性、坏死以及肝小叶改建为假小叶为主。

表 1 各组 SD 大鼠肝脏组织纤维化半定量、定量比较

Tab. 1 Semi-quantitative, quantitative comparison of SD rats liver fibrosis in each group

组别 Group	n	纤维化程度 Fibrosis degree					1.5 mm ² 视野内纤维化病变总面积 (mm ²) The total area of fibrosis in the 1.5 mm ² view area
		0	1	2	3	4	
正常对照组 Normal control	8	8	0	0	0	0	0
四氯化碳组 Carbon tetrachloride group	9	0	2	3	3	1	0.09 ± 0.02 ^{##}
酒精与四氯化碳联合组 Alcohol combined with CTC	9	0	0	3	4	2	0.41 ± 0.14 ^{##}
胆管结扎组 Bile duct ligation	8	0	0	2	1	5	0.88 ± 0.46 ^{##}

注: 与对照组比较, “#” $P < 0.05$, “##” $P < 0.01$

Note: Compared with the control group, “#” $P < 0.05$, “##” $P < 0.01$

肝纤维化的发病机制尚未完全清楚,多项研究表明,很多不同的因素(病毒性肝炎、慢性酒精中毒、营养不良、有毒物质的损伤作用等)均可引起肝细胞的损害,如长期作用,反复发作,可导致肝内广泛的胶原纤维增生,增多的胶原纤维来源有两种:其一为肝细胞坏死后,肝小叶内原有的网状支架塌陷、聚积、胶原化或由肝星状细胞转变为肌成纤维细胞样细胞产生胶原纤维;其二为汇管区的成纤维细胞增生并分泌产生,广泛增生的胶原纤维向肝小叶内延伸,分割肝小叶,严重时肝小叶内的胶原纤维连接成纤维间隔包绕原有的或再生的肝细胞团,形成假小叶,这些病变随着肝细胞不断坏死与再生而反复进行,最终形成弥漫全肝的假小叶,并导致肝内血液循环改建和肝功能障碍而形成肝硬化^[6]。四氯化碳、酒精、胆管结扎这三种因素可引起肝细胞变性、小胆管增生、肝炎等肝脏损伤,后经反复作用,从而进一步导致肝内广泛的胶原纤维增生。

目前,针对肝纤维化的治疗方法^[7]大致分为:①去除病因治疗;②抑制肝脏炎症;③抑制肝星状细胞(HSC)激活和增殖,促进 HSC 凋亡;④抑制细胞外基质(ECM)合成,促进 ECM 降解;⑤基因治

疗。其中,去除病因治疗是治疗肝纤维化最直接、有效的方法。在进行病理、药理、毒理等方面研究时可根据实际需要选择与病因相一致的肝纤维化实验动物模型进行研究。

参考文献:

- [1] 范明霞,周康荣,沈继章,等.大鼠 CC14 诱发的肝纤维化模型 Mn-DPDP MR 研究[J].临床放射学杂志,2004,23(8):722-726.
- [2] 王兵,朱平生.茵陈四苓散防治胆管结扎大鼠肝纤维化的实验研究[J].河南中医,2005,25(7):20-22.
- [3] 王磊,季光,郑培永,等.大鼠酒精性肝纤维化复合模型的建立[J].中西医结合学报,2006,4(3):281-284.
- [4] Scheuer PJ, Lefkowitz JH. Liver biopsy interpretation, 6th ed. London: Saunders, 2000:274.
- [5] Bedossa P, Paradis V. Liver extracellular matrix in health and disease[J]. J Pathol, 2003, 200:504-515.
- [6] 李玉林主编.第七版病理学.人民卫生出版社.2008, 181-182.
- [7] 陈潇潇,陆伦根.肝纤维化的临床研究进展[J].中国肝病杂志,2008,13(4):338-340.

[修回日期]2011-12-07