



四氯化碳复合法诱导家兔肝纤维化模型的建立

郭秋任克

(中国医科大学附属第一医院放射科, 沈阳 110001)

【摘要】 目的 建立一组家兔肝纤维化动物模型,并总结建模过程中所得到的经验。方法 选用30只普通级家兔,随机选取2~4只家兔作为实验组,5只为对照组。饲养适应1周后,四氯化碳色拉油溶液以5%的起始浓度经腹腔注射法注入实验组家兔体内,对照组给予相同剂量的生理盐水。于造模4W、7W、10W、13W、16W末分别处死24只实验组及1只对照组家兔,以观察肝纤维化的发展程度。结果 造模期间实验组家兔死亡7只,对照组家兔无死亡。家兔肝脏纤维化程度随着造模时间延长而逐渐加重。结论 此方法成功地建立了一种兔肝纤维化动物模型。

【关键词】 肝纤维化;家兔;模型

【中图分类号】R-33 R332 **【文献标识码】**A **【文章编号】**1671-7856(2011)03-0036-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.03.009

Establishment of Hepatic Fibrosis in Rabbit Model by Injecting Carbon Tetrachloride and Drinking Ethanol Water

GUO Qiu, REN Ke

(Department of Radiology, First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

【Abstract】 Objective To establish a set of rabbit model of hepatic fibrosis, and summarize the experiences from the modeling process. **Method** 30 normal level rabbits were divided into two groups, 25 rabbits as the experimental group were given carbon tetrachloride and oil mixture by intraperitoneal injection; five rabbits of the control group were given the same dose of saline. At 4th, 7th, 10th, 13th, 16th Week, 2~4 rabbits from the experimental group and 1 from the control group were sacrificed to observe the degree of hepatic fibrosis. **Result** During the modeling, seven rabbits of the experimental group were dead; the entire control group was survived. The degree of hepatic fibrosis was aggravated gradually with modeling extended. **Conclusion** The method successfully established a set of rabbit model of hepatic fibrosis.

【Key words】 Hepatic Fibrosis; Rabbit; Model

肝纤维化进一步发展则为肝硬化,肝纤维化可以治疗后逆转,发展为肝硬化时则难以逆转。因此,为深入研究肝纤维化的病因与发病机制,实现早期诊断,筛选防治肝纤维化的有效药物,建立肝纤维化动物模型是十分必要的。利用 CCl_4 法建立肝纤维化模型最关键的问题是药物浓度以及给药剂量较难掌握,本实验成功的建立一组家兔肝纤维

化模型,并在建模基础上总结了一些经验。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取5月龄普通级家兔30只(由中国医科大学动物实验中心提供[SCXK(辽)2008-0005]),体重在2.5~3.0 kg,雌雄不限。将其随机分为两组:实

[作者简介] 郭秋(1983-),研究方向:腹部影像诊断学/磁共振功能成像在肝纤维化疾病诊断中的应用。

[通讯作者] 任克,研究方向:腹部影像诊断学与分子影像学。

验组 25 只,对照组 5 只,分笼饲养,每笼一只家兔,颗粒料喂食,实验组家兔给予 10% 乙醇水溶液为唯一饮用水,对照组家兔饮用自来水。室内通风良好,温度、湿度适宜。

1.2 动物模型建立

动物饲养适应一周后进行模型建立。实验组:将四氯化碳(沈阳市新化试剂厂,纯度 99%)溶于无菌色拉油中摇匀,注射药物的起始浓度为 5%,按 0.1 mL/kg 剂量,采用腹腔注射的方式进行给药,注意回抽注射器,以防止误刺入血管及脏器内致动物死亡。前两周每周注射一次,第三周开始每隔三天注射一次。从第三周开始药物浓度每两次提高 2%,注射剂量维持在(0.1~0.2 mL/kg)根据动物体重变化及饮食情况调整。对照组给予相同剂量生理盐水。

1.3 病理组织学检查

于造模 4W、7W、10W、13W、16W 末时,经耳缘静脉注入空气栓塞法分别处死 2~4 只实验组家兔和 1 只对照组家兔,取出新鲜肝脏用福尔马林溶液固定 48 h 后,分别于肝左外叶及肝右前叶切取组织块,经石蜡包埋,常规切片及 HE 染色。镜下观察肝脏汇管区、肝窦壁及中央静脉等处的胶原纤维增生情况。肝纤维化程度评判采用 Scheuer 制定的肝纤维化分期评估方案^[1](S0~S4):S0 期为无纤维化;S1 期为汇管区纤维化扩大,局限于窦周和小叶内纤维化;S2 期为汇管区周围纤维化,纤维间隔形成,小叶结构保留;S3 期为纤维间隔形成伴小叶结构紊乱,无肝硬化;S4 期为早期肝硬化。

2 结果

2.1 一般情况

造模期间实验组家兔死亡 7 只,对照组无死亡,共 23 只家兔完成实验,实验组病死率为 28%。实验组家兔随给药时间延长,体重无明显增加,甚至部分家兔体重略减轻,对照组家兔体重明显增加。实验组家兔在每次注射药物后的前两天内精神萎靡,活动明显减少,第 3 天状态略恢复。对照组家兔无不良反应。

2.2 病理学检查结果分析

大体观察,见对照组家兔肝脏颜色鲜红,表面光滑,质地柔软。实验组家兔肝脏随着注射药物次数的增多,肝纤维化的程度逐渐加重,肝脏颜色略呈灰白色改变,表面凹凸不平,肝脏边缘变顿,质地

较硬(图 1)。镜下观察,分别于 40、100 倍显微镜下观察,HE 染色结果显示实验组随给药时间延长,肝内胶原纤维和网状纤维数量增多、范围扩大,肝细胞变性、坏死及炎细胞浸润逐渐加重(图 2)。还发现同一时期行病理学检查的家兔肝纤维化程度并不完全相同,且同一家兔不同肝叶所形成肝纤维化程度也不完全相同(表 1)。

表 1 各次病理学检查结果分期情况
Tab.1 The results of various pathological conditions in phases

肝纤维化分期 (The stages of hepatic fibrosis)	肝左外叶 (The left lateral lobe of the liver)					肝右前叶 (The left lateral lobe of the liver)					总计 (Total)
	4w	7w	10w	13w	16w	4w	7w	10w	13w	16w	
	S0	1	1	1	1	1	1	1	1	1	
S1	3	2	1	0	0	3	2	1	1	0	13
S2	1	1	2	2	0	1	2	1	1	1	12
S3	0	1	1	2	0	0	0	1	1	1	7
S4	0	0	0	0	2	0	0	1	1	0	4

3 讨论

本实验选用家兔造模,一方面家兔性情温和便于操作,另外家兔肝脏体积大小满足于一般的实验要求,例如进行 CT 或磁共振扫描等。且血容量相对较多,可以满足一般化验需要。CCL₄ 造模法在形态学、病理生理学某些方面与人类肝纤维化相似,且该方法造模途径多样、简便、费用低廉、病理特征稳定可靠、复制时间短,广泛应用于研究肝纤维化发生细胞、分子机制、血清学标志物与组织病理的相关性及抗纤维化物质的药效评价^[2],目前作为科研中肝纤维化造模的主要方法。

3.1 CCL₄ + 乙醇复合法致肝纤维化的机制

CCL₄ 进入动物体内后,在肝细胞内质网中通过肝微粒体细胞色素 P450 氧化酶激活后,产生三氯甲基自由基(CCL₃·),CCL₃·与肝细胞内大分子发生共价结合,破坏肝细胞功能。此外,CCL₃·还可攻击膜不饱和脂质,引发活性氧自由基的产生和脂质过氧化,损伤肝细胞。CCL₄ 进入体内 15 min 即可引起肝细胞损害,至 48 h 达到高峰,随后进入修复阶段。间隔 3~4 d 给药 1 次,即在肝损害后的修复期再次给药,重复损害-修复-损害的过程,诱导肝纤维化形成^[3-5]。

乙醇本身即为肝硬化的重要病因,成人日摄入量多于 30 g/d 可诱发肝硬化^[6,7],乙醇可刺激肝细胞脂肪合成,并诱导 P450 活性,从而增加 CCL₄ 的肝毒性,加速肝细胞坏死^[8-10],乙醇与 CCL₄ 联合应用

造模已有较多成功报道,两者合用可以使造模时间缩短,且可减少两者剂量以降低药物副作用与动物的不耐受现象。

3.2 CCL₄ 经腹腔注射法的优势

将 CCL₄ 引入动物体内的方法多种,如腹腔注射法、口服法、皮下注射或肌肉注射法、空气吸入法^[11]等,本实验采用腹腔注射法的原因有:①避免因口服给药受动物食欲影响而致剂量较难掌握,实验终点不够明确;②避免因肌肉注射或皮下注射而易发生浸润性脓肿;③由于 CCL₄ 具有高挥发性,避免因空气吸入法造成的环境污染。

3.3 给药方法的总结

CCL₄ 法建立肝纤维化模型的缺点是动物个体差异较大,CCL₄ 肝毒作用迅速剧烈,剂量掌握不当时动物死亡率高,停止造模给药后,有自然恢复的趋势。本实验过程中,实验组家兔共死亡 7 只。其中,造模前 5 周内,实验组家兔死亡 5 只,表现多伴有口鼻血色或白色泡沫溢出,其中可见一只家兔全身皮肤紫黑色,经过尸检后可见肝脏肿大、紫黑色,肝表面可见点状白色膜状物,考虑多由急性 CCL₄ 中毒引起肝坏死,释放出凝血活酶样物质,引起血管内皮损害,导致严重出血有关^[12]。7 周时死亡 1 只,死亡原因为自发性肝脏转移瘤形成,家兔恶病质而死。9 周时死亡 1 只,死亡原因为家兔双侧后爪感染面积较大,未能治愈影响全身状态而死。

从第 3 周起的前两周内,每周注射药物两次,且每次药物浓度较前一次提高 2%,如此注射药物持续两周,实验组家兔死亡 4 只,考虑药物浓度提高速度较快,家兔难以耐受,因此,于第五周开始,每周两次注射药物浓度保持不变,即每注射两次药物浓度提高 2%,使其产生耐受过程,按此方法后实验组家兔死亡率明显降低。因此,给药浓度与给药时间间隔的变化对降低动物的死亡率至关重要。

3.4 本实验病理结果分析

病理检查结果显示,肝左外侧叶与肝右前叶所取部位的肝纤维化程度不尽相同,但并不能依此推断出哪个肝叶纤维化程度更重,且两肝叶纤维化程度相差并不十分显著,多为一个分期间隔,考虑其原因可能为:①家兔肝脏各叶供血及回流血管分布不同,毒性药物主要经门静脉吸收到流入血,因而可能造成一定差异;②样本数量有限,未能充分体现出不同肝叶纤维化程度之间的差异;③取材范围

有限,且肝纤维化多为不均匀性分布。同一时期处死家兔肝脏病理检查结果提示,其肝纤维化形成的程度并不完全相同,考虑可能由于家兔个体差异所致。

家兔肝纤维化模型建立方法相对较复杂,研究要以寻求 CCL₄ 使用的最佳途径、剂量、复合因素的搭配及降低死亡率为重点。本研究采用初始低浓度、低剂量,逐渐递增法建立兔肝纤维化动物模型,实验结果表明这种方法值得在今后的应用中推广。

参考文献:

- [1] 中华医学会肝病学会肝纤维化学组. 肝纤维化诊断及疗效评估共识[J]. 中华肝脏病杂志, 2002, 10:327-328.
- [2] Luckey SW, Petern DR. Activation of kupffer cell during the course of carbon tetrachloride induced liver injury and fibrosis in rats[J]. Exp Mol Pathol 2001, 71(3):226-240.
- [3] Kreft B, Block W, Dombrowski F, et al. Diagnostic value of a super paramagnetic iron oxide in MR imaging of chronic liver disease in an animal model[J]. 1998, 170:661-668.
- [4] Ohishi T, Saito H, Tsusaka K, et al. Anti-fibrogenic effect of an angiotensin converting enzyme inhibitor on chronic carbon tetrachloride-induced hepatic fibrosis in rats[J]. Hepatol Res, 2001, 21(2):147-158.
- [5] Sato R, Maesawa C, Fujisawa K, Wada K, et al. Prevention of critical telomere shortening by oestradiol in human normal hepatic cultured cells and carbon tetrachloride induced rat liver fibrosis[J]. Gut 2004, 53: 1001-1009.
- [6] 郭美姿,李孝生,沈鼎明,等. 大黄酸对大鼠肝纤维化形成的影响[J]. 中华肝脏病杂志, 2003, 11(1):26-29.
- [7] 蔡瑜,沈锡中,王吉耀. 用 cDNA 微矩阵研究肝纤维化基因表达的变化[J]. 肝脏, 2003, 8(1):18-20.
- [8] Muriel P, Femgmdz Martinez E, Alvarez V, et al. Thalidomide ameliorates carbon tetrachloride induced cirrhosis in the rat[J]. Eur J Gastroenteml Hepatol 2003, 15(9):951-957.
- [9] Nanji AA, Jokelainen K, Lau GK, et al. Arginine reverses ethanol-induced inflammatory and fibrotic changes in liver despite continued ethanol administration[J]. Pharmacol Exp Ther 2001; 299: 832-839.
- [10] Feerman DE, Melinkov Z, Nanji AA. Induction of CYP3A by ethanol in multiple in vitro and in vivo models[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2003; 27: 981-988.
- [11] Ugazio G, Bosia S, Cornaglia E. Experimental model of cirrhosis in rabbits exposed to carbon tetrachloride by inhalation[J]. Res Commun Mol Pathol Pharmacol 1995; 88(1):63-77.
- [12] 毛一雷,张涛,桑新亭,等. 家兔肝纤维化肝癌模型的研究[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(1):99-101.

(修回日期)2010-08-48