

四氯化碳诱导大鼠肝性脑病模型的制备

刘 冀¹, 朱建忠¹, 隋月林¹, 刘 锋²

(1. 沧州医学高等专科学校解剖学和组织胚胎学教研室, 沧州 061000;
2. 河北医科大学解剖学和组织胚胎学教研室, 石家庄 050017)

【摘要】 目的 建立肝性脑病(HE)动物模型。**方法** 应用四氯化碳联合酒精自饮法制作慢性肝功能衰竭引起 HE 发生的模型,进行迷宫试验、脑电图、血液生化、形态学、行为活动观察等检测。**结果** 1. 肉眼可见模型组肝脏普遍肿大,表面较粗糙,有较粗的颗粒,暗红色;正常组肝脏未见异常。模型组肝内有大量纤维增生,肝细胞溶解,弥漫性大片坏死,残留肝细胞成片气球样变。2. 与对照组大鼠比较,造模组第九周水迷宫测试逃避潜伏期明显延长,以潜伏期延长超过正常 $\bar{x} + 2.5s$ 为标准,本实验有 14/20(55%) 只大鼠水迷宫潜伏期明显延长;3. HE 模型组血氨浓度明显高于正常对照组,组间比较差异有显著性 ($P < 0.01$); 4. 正常组脑电图以 α 波为主,无明显异常;模型组出现肝性脑病变化。**结论** 1. 建立了肝硬化合并肝性脑病较为理想的动物模型;2. 水迷宫测试联合检测更易检出 HE。

【关键词】 肝性脑病;肝硬化;大鼠;建立模型;水迷宫试验;病理学;脑电图

【中图分类号】 R373;R33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2012)02-0033-05

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2012.02.008

Establishment of a Rat Model of Hepatic Encephalopathy

LIU Ji¹, ZHU Jian-zhong¹, SUI Yue-lin¹, LIU Feng²

(1. Department of Anatomy and Embriology, Hebei Cangzhou Medical College, Cangzhou 061000, China;
2. Department of Anatomy and Embriology, Hebei Medical university, Shijiazhuang 050017)

【Abstract】 Objective To establish an animal model of hepatic encephalopathy (HE). **Methods** Using carbon tetrachloride-alcohol in drinking water to establish a rat model of chronic liver failure-caused hepatic encephalopathy. The behavior activities were observed by maze test, blood biochemistry was measured, and liver and brain morphology was examined by electron microscopy. **Results** 1) Under the naked eyes, the livers of model rats were enlarged in general, their surface was rough, with dark red coarse particles. In the normal group the livers were of normal appearance. There were lots of fibrosis, hepatocyte lysis, diffuse necrosis and widespread hepatocyte ballooning degeneration in the model group. 2) Compared with the control group, the model group showed that the escape latency was significantly longer in the Morris water maze test at the ninth week. Took the incubation period extended beyond the normal $\bar{x} + 2.5s$ as standard, there were 14/20 (55%) rats having a longer latency in Morris water maze test in this experiment. 3) In the HE model group, the blood ammonia concentration was significantly higher than that in the control group, with a significant difference between the two groups ($P < 0.01$). 4) In the normal group, the EEG was α -wave dominant and without distinct abnormalities, but changes of hepatic encephalopathy appeared in the model group. **Conclusions** A rather ideal rat model of liver cirrhosis accompanied with hepatic encephalopathy (HE) has been established. The HE changes can be more easily detected by Morris water maze test in the rats.

【Key words】 Hepatic encephalopathy; Liver cirrhosis; Model establishment; Rat; Neuron; Morris water maze

test; Histopathology; Electroencephalography

肝性脑病 (hepatic encephalopathy, HE) 是以各种严重肝脏疾病所致的代谢紊乱为基础的中枢神经系统 (CNS) 功能失调综合症, 以神经精神症状为主, 临床表现为意识障碍、记忆学习能力下降、行为异常、昏迷, 可有扑翼样震颤, 构音障碍, 出现病理反射, 血氨升高, 特征性脑电图异常 (高幅慢波)^[1]。HE 是肝脏解毒功能不全和衰竭表现, 发病机制尚未完全阐明。一般认为是肝细胞功能衰竭与门静脉因手术造成的或者是自然形成的侧支分流有关。主要来自肠道的多种毒性代谢产物, 未被肝脏解毒、消除, 经过侧支进入体循环, 透过血脑屏障而至脑部, 引起大脑功能紊乱。多认为是多种因素综合作用的结果, 目前存在多种致病学说, 其中氨中毒致 HE 学说已被广泛接受。在实验性肝性脑病的研究中, 肝性脑病动物模型复制的方法很多, 但多有其相对局限性。为此, 建立合适稳定的动物模型就非常重要。然而, 迄今为止尚无满意的慢性肝功能衰竭引起 HE 发生的模型, 通常的动物模型研究多以行为学观察为主, 缺乏可靠的定量指标和综合性分析。为此, 我们选择四氯化碳联合酒精自饮的方法制作慢性肝功能衰竭引起 HE 发生的模型, 并进行多项指标的检测和分析。

1 材料和方法

1.1 动物

健康 Wistar 大鼠 50 只, 3~4 月龄, 体重 150~200 g (合格证编号 1003066)。

1.2 药品和试剂

四氯化碳 (CCl₄), 合肥工业大学化学试剂厂; 橄榄油, 上海化学试剂站分装厂 (将 CCl₄ 溶于橄榄油配制 40% CCl₄ 橄榄油溶液); 食用乙醇, 深圳市华昌化工有限公司; 戊巴比妥钠, 上海瑞齐生物科技有限公司

1.3 仪器

Morris 水迷宫, 自然基因科技有限公司产品; 自动生化检测仪 (Olympus, Au560); 全自动血氨检测仪 (日本 Ammonia-Checker II 型); HEL-LIGE 八道生理记录仪, 日本生产 (脑电图)。

1.4 试验方法

1.4.1 制作肝性脑病模型: 雄性 Wistar 大鼠 50 只购自河北医科大学河北省实验动物中心, 体重 150

~200 g, 大鼠随机分成 2 组即造模组和正常对照组。造模组 (n = 40) 给予 40% CCl₄、橄榄油混合溶液腹部皮下注射, (CCl₄: 橄榄油 = 1:2.5), 5% 乙醇自来水溶液自饮。首次给药每只鼠 0.5 mL/100 g, 以后每只 0.3 mL/100 g, 每周注射 2 次, 共 9 周; 对照组正常喂养, 普通饮水, 昼夜节律喂养, 每周腹下注射生理盐水 2 次, 9 周后成模。在造模过程中记录动物体重、外观指标、死亡率和死亡数, 同时观察行为活动状态, 特别是神经系统的功能状态, 死亡动物做完记录后予以剔除。

1.4.2 步骤: 实验开始前所有动物均进行 Morris 水迷宫测试, 建立水迷宫逃避潜伏期之后按完全随机的方法抽出 10 只大鼠作为正常对照组, 剩余 40 只进入造模组, 造模组大鼠按复合因素造成肝硬化的方法进行实验, 实验第九周 (肝硬化晚期) 将造模组和对照组大鼠进行水迷宫测试和脑电图 (EEG) 测试, 记录逃避潜伏期, 并观察脑电图 (EEG) 有无肝性脑病的典型高幅慢波。HE 的纳入标准: (1) 模组大鼠 Morris 水迷宫测试值大于对照组 $\bar{x} + 2.5s$; (2) EEG 测试有典型肝性脑病高幅慢波者; (3) 出现典型 HE 行为、情绪者。HE 模型建立。

1.4.3 Morris 水迷宫测试方法: 将水注入直径 130 cm、高 50 cm 的圆形不透明水箱中, 水深 25 cm、水温 (26 ± 1) °C。水中加适量奶粉使水保持不透明状态。测试前 1 d 将大鼠放入水箱中进行适应性训练。测试时, 将大鼠面朝池壁置于水箱中以测量其发现水下 1.5 cm 处平台 (8 cm × 8 cm) 的能力。连续测试 5 d, 每天训练两组次, 9:00 和 17:00 时各一组次, 每一组次训练 8 次。观察指标为发现并爬上平台时间 (逃避潜伏期), 取每一组次的平均值进行比较。如果大鼠在 120 s 内没有发现平台, 则将大鼠置于平台上, 60 s 后拿离迷宫, 其搜索平台的时间记为 120 s。

1.4.4 脑电图的测试方法: 大鼠在 1% 戊巴比妥钠 (45 mg/kg 体重) 腹腔麻醉下, 俯卧固定, 安置额枕骨间电极, 鼻根部及双耳分别接地线, 用 16 导脑电图机测定, 并用电脑描记脑电图, 时间常数 0.3, 高频滤波 100 Hz。固定、调试好仪器, 安装电极, 单极导联描记, 于安静状态下进行描记, 记录脑电图, 连续观察 10 min, 观察振幅与频率。振幅为波顶到波底间的垂直高度, 代表脑部电位活动的大小; 频率为同一周期的脑电波在 1 s 内重复出现的次数。

1.4.5 血液生化检测:全部大鼠在灌注前,水合氯醛麻醉后剪开胸腔,用一次性注射器无菌心脏穿刺采血 5 mL。其中取 1 mL 置于无热原肝素管中迅速用全自动血氨分析仪测血氨 (BA);取 2 mL 全血,分离血浆后以全自动生化分析仪测定丙氨酸转氨酶 (ALT)、总胆红素 (TBil)、尿素氮 (BUN)。

1.4.6 病理检查:取大鼠肝脏同一叶肝组织一片,以 4% 中性甲醛溶液固定,常规脱水,石蜡包埋并且片,HE 染色后光镜观察。

1.5 检测指标

水迷宫逃避潜伏期;EEG;生化指标;切片;动物活动情绪行为观察。

1.6 统计学方法

应用 SPSS17.0 软件对水迷宫逃避潜伏期进行单因素方差分析;血液生化应用 *t* 检验进行分析。

2 结果

2.1 各组大鼠 Morris 水迷宫测试成绩

50 只正常大鼠中随机抽出 10 只作为对照组,与预行造模的造模组 (40 只) 比较两组逃避潜伏期无显著差别 ($P > 0.05$),具有可比性;第九周对照组潜伏期较造模前略延长,但无统计学意义,该组大鼠无一例潜伏期延长超过造模前建立的正常值 $\bar{x} + 2.5 s$;造模组中有 15 只潜伏期明显延长,超过正常 $\bar{x} + 2.5 s$,且 EEG 出现慢波,归入 HE 组,HE 组潜伏期与对照组比较潜伏期明显延长 ($P < 0.01$) (见表 1)。

2.2 各组大鼠脑电图的变化

除 1 只大鼠未出现典型肝性脑病的 EEG 特征

性外,其余实验组大鼠 EEG 均出现肝性脑病所特有的高幅慢波。(见图 1,2)

2.3 血液生化指标

结果显示,模型组大鼠 ALT(丙氨酸转氨酶)、TBil(总胆红素)、BUN(尿素氮)及 BA(血氨)水平平均比正常组明显升高,差异分别有非常显著性 ($P < 0.01$),说明模型组有严重的肝细胞损伤和氨中毒。(表 2)



图 1 正常大鼠脑电图

Fig. 1 The electroencephalograph (EEG) of a normal rat



图 2 HE 大鼠脑电图

Fig. 2 The electroencephalograph (EEG) of a hepatic encephalopathy rat

2.4 肝病理表现

肉眼下可见模型组大鼠肝脏普遍肿大,表面较粗糙,有较粗的颗粒,暗红色;正常组大鼠肝脏则未见异常。光镜下观察,正常组大鼠肝组织肝小叶结构完整,肝板条索状以中央静脉为中心呈放射状排列,肝细胞无变性、坏死;模型组大鼠肝组织经 HE 染色,见肝细胞溶解,弥漫性大片坏死,残留肝细胞成片气球样变。

2.5 行为学观察

模型组大鼠平均体重在造模过程中表现为先升高后降低 (4~5 周后开始下降),并逐步表现为精神不振、厌食、嗜睡、体形消瘦等。从第 6 周开始,部分大鼠先后表现为活动减少、嗜睡、捕捉反应、疼痛反应迟钝等,并且已开始出现死亡大鼠。第七周大鼠多数出现精神萎靡、呆滞、活动明显减少、步态蹒跚、自主性活动减少、捕捉反应更加明显、疼痛反应

表 1 Morris 水迷宫潜伏期变化 ($\bar{x} \pm s, s$)
Tab.1 The changes of escape latency of Morris water maze ($\bar{x} \pm s$) test. unit: second

动物组 Groups	造模前 Before modeling	造模后第九周 9 wks after modeling
正常组 Normal group (10)	13.02 $\pm$ 1.14	13.57 $\pm$ 1.36
模型组 Model group (14)	14.13 $\pm$ 1.28 [#]	30.23 $\pm$ 4.9 [*]

$P > 0.05$ * $P < 0.01$

表 2 肝性脑病模型组与对照组大鼠血液生化指标的比较 ($\bar{x} \pm s$)
Tab.2 Changes of serum biochemistry parameters of the 2 groups ($\bar{x} \pm s$)

组别 Groups	数量	ALT (IU/L)	TBiL (IU/L)	BUN (mmol/L)	BA (mg/L)
正常组 Normal	10	60 $\pm$ 12.3	9.7 $\pm$ 5.0	5.2 $\pm$ 1.1	1.0 $\pm$ 0.2
模型组 Model	14	1340.4 $\pm$ 299.7 [*]	74.8 $\pm$ 19.6 [*]	8.4 $\pm$ 3.1 [*]	4.5 $\pm$ 2.3 [*]

注:与正常组相比 * $P < 0.01$ 。Note: vs. normal group, * $P < 0.01$ 。

更加迟钝甚至消失,个别出现昏迷、死亡大鼠增多(最终死亡率为 50%:20/40)。而对照组大鼠体重持续上升,活动正常。

3 讨论

3.1 HE 大鼠模型建立的设计思路与依据

肝性脑病的发病机制至今仍不清楚,在多种学说中以氨中毒学说的研究为多,而其他可能的机制仍需要深入的、全面的研究。为此,建立合适稳定的动物模型就非常重要。肝性脑病动物模型的制作方法主要有三种:手术造模、药物造模、药物合并手术造模,其中手术造模用于制作急性肝衰性 HE 模型,而药物造模用于制作慢性肝功能衰竭引起 HE 发生的模型^[2]。目前,国内外尚无成熟的慢性肝功能衰竭引起 HE 发生的模型,通常的动物模型研究多以行为学观察为主,缺乏可靠的定量指标和综合性分析。为此,我们选择四氯化碳腹下注射联合酒精自饮方法制作慢性肝功能衰竭引起 HE 发生的模型,对动物 HE 模型的发生进行探索,并进行多项指标的检测和分析。一般将动物模型制作后的一段时间内出现萎靡、嗜睡、反应迟缓、自主性活动减少、共济失调、昏迷等症状之一,即可诊断为 HE。有时也可辅以检测动物脑电图、血氨水平,以及进行组织形态学检查(如病理或电镜检查)等^[3]。本实验通过对动物行为、肝病理表现、脑电图、水迷宫测试等项指标进行观察,结果表明 HE 造模成功。本实验模型的制作具有以下优点:(1) Morris 水迷宫测试是经典的反映动物学习、记忆、认知能力的行为学实验并且操作简单;(2) 脑电图测试是最重要的反映神经系统和大脑功能的方法^[4,5];(3) 复合因素造成实验性肝硬化大鼠模型是成熟的造模方法,更接近人类疾病模型。所以本实验关于 HE 模型的设计思路具有动物行为学和神经生理学依据,并与 HE 患者的诊断标准有较好的符合性,因而具有科学性。

3.2 Morris 水迷宫测试的意义

Morris 水迷宫(Morris water maze, MWM)是英国心理学家 Morris 于 1982 年设计的,最初是检测海马损害动物定位航行实验的重要工具,后来作为检验空间、学习、记忆的实验手段,成为行为神经科学常用的实验室工具之一^[6]。空间辨别性学习记忆是检测空间定向、反应时间,视知觉和结构应用等能力,从而评价其认知水平的一种行为模式,是一类

关于场景和事件的学习记忆。简单地说,需要动物把空间方位周围的物体作为参照物,经过反复识认,从而在其脑内将参照物同空间方位联系起来,借助参照物来获得辨别该空间方位的能力。建立空间辨别性学习记忆动物模型的方法较多,虽然装置各异,但基本原理多是让动物对利用空间信息作出正确的选择,其中大多装置以电击为刺激,使动物获知哪一方位是伤害源,从而避开,优点是简便易行,缺点是以电击为刺激因素,尽管其程度和时间是可控的,但毕竟是一种伤害,使动物产生应激反应,进而影响学习记忆活动。而水迷宫法是利用动物急于逃离水的本能反应为刺激,与电击相比对动物的影响要小得多,而且该行为模型是一种空间记忆的模型,与海马功能有关;另外, MWM 在学习记忆的神经化学原理方面比其他几种方法具有优势,特别是涉及区分记忆结构缺陷的感觉、运动、动机和再现过程等方面^[7]。海马、纹状体、基底前脑,大脑和小脑皮质等损害均可导致 MWM 成绩下降,且该成绩能反映不同脑区及不同神经递质相互作用、整合的情况以及神经系统能量代谢的状态。MWM 检测成为评估认知功能缺陷和神经认知功能处于何种状态的重要方法。所以本实验采用 MWM 训练大鼠,使其获得辨别空间方位的能力,并利用此模型来研究大鼠的学习记忆功能。本研究采用四氯化碳、酒精自饮复合因素造成的实验性肝硬化大鼠模型,结果显示:造模前对照组与造模组两组潜伏期比较无显著差别($P > 0.05$),具有可比性;第九周造模组中有 15 只(75%)逃避潜伏期延长超过正常 $\bar{x} + 2.5s$ 说明此时(肝硬化晚期)这部分大鼠学习、记忆、认知力出现障碍

3.3 HE 大鼠动脉血氨浓度变化的意义

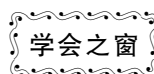
正常人体内氨的生成和清除保持着动态平衡,严重肝病时,由于氨的来源、生成、吸收增加以及清除不足,引起血氨增加^[8,9]。据 Norenberg 等报道,高血氨破坏了血脑屏障的完整性^[10]; McClung 等发现,氨灌注使血脑屏障的微孔由 7.3 nm 扩大到 8.5 nm; Lockwood 等^[11]发现肝衰竭时脑对氨的渗透表面积增加。因此,推断在外周血循环中血氨的增高可以累及脑组织,本实验结果显示大鼠血氨较正常组明显增多从而证实了血氨在 HE 时升高,说明血氨升高是 HE 发病机制之一。但也有一些研究对此提出异议,首先,血氨检测并未出现一致性升高,有个别大鼠血氨值表现为正常,其可能处于代偿期内。

另外也有个别样本血氨值甚至出现显著低于其正常值下限,提示 HE 发生时未必均伴有血氨升高,提示肝性脑病的发生机制可能相当复杂,氨中毒学说或许只是诸多机制中的一个方面,很有可能还存在其他的重要机制,例如是否存在氨、硫醇和短链脂肪酸的协同毒性作用、是否有假性神经递质的参与、是否存在氨基酸代谢的不平衡等机制,这一切都有待于进一步探讨,所以不能仅凭血氨水平来判断 HE 的发生。

参考文献:

- [1] 张光曙,商庆华,徐传镇,等. 肝性脑病的病因和防治探讨[J]. 临床肝胆病杂志, 2001, 17(4): 241-243.
- [2] 熊益群,周大桥,李航森,等. 实验性大鼠肝性脑病动物模型的研究[J]. 中国实验动物学杂志, 2002, 12(6): 340-342.
- [3] 郑超,张环环,汪丽娜,等. 肝性脑病动物模型的鉴定指标分析[J]. 皖南医学院学报, 2006, 25(4): 243-247.
- [4] 芮长玉,江净. 肝性脑病脑电图的临床应用[J]. 中国基层医药, 2003, 10(9): 909-910.
- [5] 闫威,杨玉洁,刘铁军,等. 毒消肝清颗粒对肝性脑病大鼠脑电图的影响[J]. 中国老年学杂志, 2010, 2: 249-250.
- [6] 胡凤玉,蒋娟,汪萌芽. 迷宫学习模型实验的时反应量效关系[J]. 皖南医学院学报, 2001, 20(3): 159-161.
- [7] 梅镇彤. 学习和记忆的神经生物学[M]. 上海科技教育出版社, 1997: 21-35.
- [8] 周镇先. 血氨水平与肝性脑病关系的再认识[J]. 江苏医药杂志, 200, 29(7): 560-561.
- [9] 蒋滢,蒋菊香,徐颖,等. 氨基酸代谢与肝性脑病[J]. 氨基酸和生物资源, 2002, 24(4): 53-58.
- [10] McClung JP, Beer ER, LaMorte WW, et al. Role of stasis and oxidative stress in ileal pouch inflammation[J]. Surg Res, 2000, 90(1): 67-75.
- [11] Lockwood AH. Blood ammonia levels and hepatic encephalopathy[J]. Metab Brain Dis, 2004, 19(3-4): 345-349.

[修回日期] 2011-09-15



2012 年中国实验动物学会科技奖奖项推荐启动

中国实验动物学会科技奖第二次推荐、评选和表彰活动将于 2012 年 2 月启动。2010 年首次学会科技奖评选共收到全国 24 个单位推荐的 31 项科研项目,经过形式审查,会议初审、终审、公示等程序,评选出了一等奖 1 项,二等奖 4 项,三等奖 11 个项目。该奖项 2008 年由科技部批准,为全国实验动物行业的最高科学技术奖。奖励面向全社会,凡在实验动物科学技术进步活动中做出突出贡献的单位、组织或个人均可申报。2012 年在基础研究类、技术发明类、应用研究类、国际科学技术合作类奖励基础上,增设了优秀青年人才类,奖励在实验动物科学研究、教育、普及、科技管理、成果推广转化等工作方面取出突出成绩,年龄 45 周岁以下的青年实验动物科技工作者。有关详细资料请登陆中国实验动物学会网站下载(<http://www.calas.org.cn>)。