



D-氨基半乳糖联合脂多糖诱导小鼠慢性肝损伤模型的建立

翟亚南, 王晶晶, 李梦, 池亚菲, 孟霞, 彭博雅, 焦昆, 卢静

(首都医科大学, 北京 100069)

【摘要】 目的 研究 D-氨基半乳糖联合脂多糖诱导小鼠慢性肝损伤模型建立的方法。方法 30 mg/mL D-氨基半乳糖和 2 μg/mL 脂多糖混合溶液, 腹腔注射, 每 2 天 1 次, 连续 8 周。监测小鼠饮食和体重变化; 取血测定小鼠血清丙氨酸转氨酶 (ALT)、天冬氨酸转氨酶 (AST) 水平; 取肝组织, HE 和 Masson 染色, 观察小鼠肝组织结构、细胞形态及纤维化程度。结果 模型组 ALT 水平升高, 肝细胞变性、坏死等病变, 组织纤维化明显增生。结论 D-氨基半乳糖联合脂多糖可诱导小鼠的慢性肝损伤模型。

【关键词】 D-氨基半乳糖; 脂多糖; 肝损伤; 模型; 动物

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2014) 05-0062-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.005.013

Chronic hepatic injury modeling in mice induced by D - galactosamine and lipopolysaccharide combination

ZHAI Ya-nan, WANG Jing-jing, LI Meng, CHI Ya-fei, MENG Xia, ENG Bo-ya, JIAO Kun, LU Jing
(Capital Medical University, Beijing 100069, China)

【Abstract】 Objective To research the method of Chronic hepatic injury modeling in mice induced by D-galactosamine and lipopolysaccharide combination. **Methods** Injected D-galactosamine (30 mg/mL) and lipopolysaccharide (2 μg/mL) combination by intraperitoneal injection, two days at a time for 8 weeks. **Monitored** variation of diet and weight; detected serum level of alanine aminotransferase (ALT) and aspartate aminotransferase (AST), been put to death in mice and removed the liver tissue. strained hepatic tissue by the HE and Masoon dye to observe Liver tissue structure and cellular morphology and the degree of fibrosis. **Results** Lipopolysaccharide and D-galactosamine combination resulted in ALT rise, hepatocyte degeneration and necrosis, collagen fiber hyperplasia obviously. **Conclusion** D-galactosamine and Lipopolysaccharide combination could induce mice chronic hepatic injury modeling.

【Key words】 D-galactosamine; Lipopolysaccharide; Hepatic injury; Model, animal

肝脏疾病是人类最常见的疾病之一, 严重威胁着人类健康。为此, 研发抗肝脏疾病的有效药物显得尤为重要。动物实验是药物进入临床的必经之路, 在研发抗肝脏疾病药物过程中, 选择有科学性、实用性、

重现性的肝损伤动物模型的意义十分重要^[1]。目前, 有很多药物诱导肝损伤模型, 但是重复性和模拟性好, 药物毒性大, 或建模结果不够稳定。D-氨基半乳糖毒性小, 使用方便, 但用于诱导大鼠肝损伤模型, 有研

【基金项目】 2010 年度北京市属高等学校人才强教深化计划中青年骨干人才 (PHR201008390)。

【作者简介】 翟亚南 (1987 -), 女, 本科, 主要从事动物模型建立的研究。E-mail: zhaiyanan@ccmu.edu.cn。

【通讯作者】 卢静 (1969 -), 女, 博士, 副教授, 首都医科大学实验动物部主任。E-mail: lujing@ccmu.edu.cn。

究认为用于小鼠模型不稳定^[2]。为此,本实验就以 D-氨基半乳糖联合脂多糖(以下简称 D+L)致小鼠慢性肝损伤模型的制备进行探讨。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级健康雄性 BALB/c 小鼠 22 只,体重 18~22 g,购于北京维通利华实验动物科学技术有限公司【SCXK(京)2012-0001】。在首都医科大学实验动物部屏障环境开展实验【SYXK(京)2010-0020】。室温 20℃~25℃,相对湿度 40%~70%。小鼠分笼饲养,每笼饲养 3~4 只,给予自由进食和饮水,饲料和饮水均经灭菌处理。

1.2 试剂与仪器

D-氨基半乳糖(Nanjing Boyuan Pharmatech Co., Ltd, 20100521)、脂多糖(美国 Sigma 公司, L2880, 10 mg)、Masson 染色试剂盒(南京建成科技有限公司, 20100318) D+L 注射液:1800 mg D-氨基半乳糖加入 54 mL 生理盐水后,加入 6 mL 浓度为 20 μg/mL 脂多糖,配置成 30 mg/mL D-氨基半乳糖和 2 μg/mL 脂多糖的混合溶液、4% 甲醛固定液:10 mL 40% 甲醛溶液加入 90 mL 蒸馏水 10 倍稀释。石蜡包埋机(Leica EG1160)、旋转切片機(LEICA, RW2235)、烘片机(LEICA HI1220)、自动染色仪(LEICA, AUTOSTAINERXL)、电热恒温鼓风干燥箱(天津市泰斯特仪器有限公司, WG-7)、光学显微镜(Nikon)、Nikon 数字显微照相机(日本 Nikon 公司, Eclipse 80i)、图像采集分析系统(NIS-Elements Basic Research)、水浴锅(江苏省金坛市荣华仪器制造有限公司, HH-W600)、脱水机(Leica, ASP300S)。

1.3 实验方法

1.3.1 动物模型制备和实验组分组:22 只 BALB/c 小鼠随机分成三组,空白对照组 6 只, LPS 对照组 8 只, D+L 组 8 只, D+L 组 30 mg/mL D-氨基半乳糖为 +2 μg/mL 脂多糖(LPS)混合液,空白对照组同体重无菌生理盐水, LPS 对照组 2 μg/mL 脂多

糖(LPS)溶液,1 次/2 天,连续注射 8 周,给予途径均为腹腔。

1.3.2 取材:10% 水合氯醛麻醉后,用眼球动静脉采血法取血 1 mL,离心 3000 r/min 10 min,取上清 -80℃ 冻存待测。用脱颈椎方法使小鼠安乐死,解剖取肝脏,观察肝脏变化;取肝左叶于 4% 甲醛溶液固定,石蜡包埋,制备组织切片,其余肝组织放置 -80℃ 冰箱保存。

1.3.3 肝功能指标测定:采用日立 7180 全自动生化分析仪测定大鼠血清 ALT、AST 水平。

1.3.4 病理学及细胞凋亡变化:以石蜡包埋的肝组织标本制备 4 μm 切片,HE 染色,镜下观察病理组织变化,包括肝细胞的变性坏死、炎性细胞浸润、纤维间隔及假小叶的形成等病理变化。

1.3.5 肝组织切片水化脱蜡,使用 Masson 染色试剂盒染色,蓝紫色表达为胶原纤维。

1.3.6 统计学分析:用 SPSS13.0 统计软件进行分析;各组数据采用单因素方差分析,并作两两比较。取 $P < 0.05$ 有统计学意义,实验结果以均数加减标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 结果

2.1 一般情况

空白对照组小鼠毛发有光泽,活动正常,精神状态良好,饮食量正常;LPS 对照组小鼠毛发有光泽,活动较多,精神状态良好,饮食量正常;实验组小鼠毛发逐步凌乱无光泽,精神萎靡,活动渐少,饮食量少,对外界刺激反应迟钝。

2.2 肝功能指标

如表 1 示,第 8 周 D+L 慢性肝损伤 BALB/c 小鼠血清 ALT 水平与空白对照组、LPS 对照组比较, D+L 组极显著性增加($P < 0.01$); D+L 组 AST 水平与空白对照组、LPS 对照组比较,无明显变化($P > 0.05$); AST/ALT 比值,与空白对照组比较, D+L 组显著性降低($P < 0.05$), LPS 组显著性增加($P < 0.05$),与 LPS 对照组比较, D+L 组极显著性降低($P < 0.01$)。

表 1 第 8 周 D+L 肝损伤 BALB/c 小鼠血清 ALT、AST 水平组间比较

Tab. 1 Comparison of serum levels of ALT, AST and AST/ALT in BALB/C mice at 8 th week

组别 Groups	N	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	AST/ALT 比值 AST/ALT ratio
空白对照组 Control group	5	28.20 ± 3.95	83.44 ± 15.88	2.96 ± 0.42
LPS 组 LPS group	8	23.35 ± 2.30	84.80 ± 11.46	3.66 ± 0.58 *
D+L 组 D+L group	7	68.04 ± 47.33 **▲▲	122.29 ± 82.70	2.05 ± 0.76 *▲▲

注:与空白对照组比较, * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; 与 LPS 组比较, ▲ $P < 0.05$; ▲▲ $P < 0.01$ 。

Note: compared with the control group: * $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; compared with the LPS group: ▲ $P < 0.05$; ▲▲ $P < 0.01$.

2.3 小鼠 D + L 慢性肝损伤过程中肝脏大体形态学、病理学变化

实验第 8 周时,空白对照组肝脏呈鲜红色,表面光滑、边缘整齐,病理切片显示肝细胞、汇管区、胆管上皮细胞等形态结构完整,未见变性、坏死等;LPS 对照组与空白对照组比较,小叶结构,细胞形态排列等,未见明显差异;D + L 组肝脏体积缩小,边缘变薄,HE 染色可见(封底图 1),肝小叶结构破坏,网状纤维等支架组织发生明显变化。10 倍镜下 D + L 组小鼠肝小叶结构紊乱,有结节性增生,40 倍镜下可见结节性增生区域,肝上皮细胞细胞核初相浓缩、溶解、坏死等现象,坏死灶密集分布,枯否氏细胞显著增多。Masson 染色(封底图 2),空白对照组肝组织 10 倍镜下可见均匀的淡蓝色细条索状染色,40 倍镜下可见蓝染部位为肝上皮细胞间质;LPS 组与正常对照组比较,染色性状与部位未见明显改变;D + L 组肝组织出现大量结节样蓝色深染,特别是在肝上皮细胞大量变性坏死区域,蓝色深染充斥整个区域,细碎偏淡的条状蓝染已经融合成粗大、深蓝的结节样改变。

3 讨论

慢性肝损伤是一种多因素介导的复杂生物学过程,损伤的结果是肝细胞发生凋亡和坏死,损伤的诱因是多方面的^[3]。ConA 诱导(免疫性损伤)、对氨基酚药物(药物性损伤)和 D-氨基半乳糖联合脂多糖诱导(炎症性损伤)等方法均可建立肝损伤动物模型^[4]。本实验采用 D-氨基半乳糖联合脂多糖诱导方法建立。D-氨基半乳糖诱发的动物肝损伤在形态学和功能上被认为与人的急性重症肝炎类似。外源性脂多糖可增加氨基半乳糖的肝毒性,同时氨基半乳糖也可导致脂多糖的感受性亢进。氨基半乳糖和脂多糖可导致广泛性肝坏死,较常用于肝炎药物的研发^[1]。但是两种药物联合诱导的慢性肝损伤动物模型,纵观目前国内外文献,较少,但是在临床上,慢性肝损伤远多于急性肝损伤病人。因此,慢性肝损伤动物模型的制备具有重要的研究意义。

脂多糖(LPS)是一种内毒素,可活化单核巨噬细胞,在体内主要通过脂多糖(LPS)结合蛋白、CD14 等介导,与单核巨噬细胞、内皮细胞等靶细胞上的跨膜受体 Toll 样受体 4 相结合,在淋巴细胞抗原 96 辅助下将信号转入胞内,通过胞内复杂的信号

途径,导致 TNF- α 、IL-1、IL-6 等炎性细胞因子及肿瘤坏死因子的产生,从而引起肝细胞损伤^[5-6]。肝细胞内许多物质代谢过程与磷酸尿嘧啶核苷密切相关,足量的磷酸尿嘧啶核苷是维持肝细胞正常代谢及生物转化功能的必要物质,如果发生耗竭,可以引起肝细胞损伤甚至坏死。D-氨基半乳糖(D-GalN)是一种肝细胞磷酸尿嘧啶核苷干扰剂,通过竞争生成二磷酸尿苷半乳糖使磷酸尿苷耗竭,限制了细胞器的再生及酶的生成和补充,从而使细胞器受损,促使肝细胞的结构和功能均出现异常,导致物质代谢障碍,引起肝细胞变性、坏死^[7],并且 D-氨基半乳糖(D-GalN)还可能与脂多糖(LPS)协同作用,通过导致内毒素血症的途径造成肝细胞损伤,促使聚集在受损肝细胞周围的中性粒细胞产生暴发呼吸和脱颗粒,释放氧自由基和导致脂质过氧化,作用于肝脏实质细胞和血管内皮细胞,导致细胞严重损伤或死亡^[8]。因此,本实验选用这两种药物联合的方法诱导慢性肝损伤的发生。

肝损伤动物模型的建立是筛选保肝药物的关键步骤之一。由于小鼠价格便宜,目前较多的文献报道选用小鼠作为实验动物^[2]。有关慢性肝损伤模型的研究结果不尽相同,原因在于慢性损伤过程需较长的给药时间,动物个体差异大,在长时间给药过程中动物对药物的反应差异越来越大,导致实验系统的不稳定性。

根据预实验,在保证极低死亡率情况下,本实验采用 30 mg/mL D-氨基半乳糖联合 2 μ g/mL 脂多糖混合溶液,采用连续腹腔注射法造模,每 2 天 1 次。研究报道,慢性肝损伤标准至少要求肝损伤状态维持 6 周以上,并伴有肝组织学的结构病变,如肝纤维化和肝硬化结节等^[9];常用的肝纤维化动物模型复制方法中,介绍给药时间为 9 周^[10],综上及预实验结果,本实验采取连续 8 周给药的方法。

实验结果显示:在 8 周时,虽然 D + L 组与正常对照组比较,ALT、AST 水平均有明显的上升趋势,但 AST/ALT 显著性降低,依然提示此时虽然有明显的细胞膜和细胞器损伤,但该损伤以细胞膜变性改变为主(表 1、封底图 2)。

生理状态下 ALT 与 AST 主要分布在肝脏的肝上皮细胞内,血清含量极少。在肝细胞中,ALT 主要存在于非线粒体中。只要肝上皮细胞细胞膜稍有损坏,就可以使血清中 ALT 水平特异性升高。因此,ALT 被世界卫生组织推荐为肝功能损害最敏感

的检测指标。而大约 80% 的 AST 存在于线粒体内, 只有当肝上皮细胞坏死时, 血清中 AST 水平才会明显升高^[11]。

从组织形态学上, 该模型也呈现出肝损伤的特征, 坏死灶密集分布, 枯否氏细胞显著增多, 小叶分界颇不清晰, 结构紊乱, 结节状增多, 40 倍镜下可见结节性增生区域肝上皮细胞细胞核浓缩、溶解、坏死, 坏死细胞处出现枯否氏细胞聚集。而在相同部位 Masson 染色可见大量结节样蓝色深染, 特别是在肝上皮细胞大量变性坏死区域, 蓝色深染充斥整个区域, 细碎偏淡的条状蓝染已经融合成粗大、深蓝的结节样改变。

综上本实验建立的慢性肝损伤小鼠模型不仅具有较好的稳定性, 而且具有明显的生化、形态学、病理学特征。该模型的建立为研究慢性肝损伤的发病机制, 探索慢性肝损伤治疗新措施, 筛选治疗新药物提供了新的选择, 具有重要意义。

参考文献:

- [1] 王福根, 孙静霞. 肝损伤动物模型的建立和应用[J]. 中国药房, 2006, 17(9): 702 - 703.
- [2] 李梅, 谷淑玲, 马腾飞. D-氨基半乳糖致小鼠、大鼠肝损伤模型的实验性研究[J]. 徐州医学院学报, 2007, 27(2): 86 - 88.
- [3] 张海燕, 侯维. 大鼠慢加急性肝衰竭模型建立的方法探讨[J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2009, 18(4): 348 - 351.
- [4] 张锦雀, 黄丽英. 肝损伤动物模型研究进展[J]. 福建医科大学学报, 2009, 43(1): 86 - 88.
- [5] 陈恩强, 王丽春, 唐红, 等. 脂多糖联合 D-氨基半乳糖诱导急性重症肝炎小鼠模型的建立[J]. 华西医学, 2009, 24(1): 129 - 131.
- [6] 李劲, 张健, 刘光泽, 等. D-氨基半乳糖与脂多糖对小鼠肝脏损伤后再生修复的影响[J]. 南方医科大学学报, 2012, 32(1): 50 - 54.
- [7] Abou - Elella AM, Siendones E, Padillo J, et al. Tumour necrosis factor- α and nitric oxide mediate apoptosis by D-galactosamine in a primary culture of rat hepatocytes: exacerbation of cell death by cocultured Kupffer cells [J]. Can J Gastroenterol, 2002, 16(11): 791 - 799.
- [8] 潘庆军, 朱学芝, 刘渊. LPS /D-GalN 诱发 NF- κ B 转基因小鼠急性致死性肝损伤模型的建立[J]. 中国实验动物学报, 2013, 21(4): 1 - 5.
- [9] 张海燕, 温韬. 四氯化碳诱导大鼠慢性肝损伤模型方法的探讨[J]. 实用肝脏病杂志, 2009, 12(3): 161 - 163.
- [10] 周光兴, 高诚, 徐平, 等. 人类疾病动物模型复制方法学[M]. 上海科学技术文献出版社, 2008: 87 - 88.
- [11] 张丽杰. 血清转氨酶的测定及临床意义[J]. 中国医药指南, 2012, 10(9): 298 - 299.

[修回日期] 2014-04-16

(下接第 82 页)

析、能量分析、胰岛素钳夹技术分析以及组织学分析。感官的表型分析包括嗅觉、听见和视觉的分析。在此基础上利用 MRI 和 OCT 影响进行更加准确的综合分析。台湾的工作主要集中在免疫相关小鼠、老年病、神经退行性疾病及骨科疾病的模型小鼠的分析。该平台分两步对模型进行免疫学的表型分析。利用流式细胞术先对小鼠脾脏和血液中的免疫细胞进行分类, 在此基础上对免疫细胞的亚型分类并进行功能检测。澳大利亚在 ENU 突变小鼠中具有多年的工作经验。在小鼠基因组单核苷酸突变与小鼠表型的关系进行了大量研究, 特别是免疫系统的记忆性/效应性 T、B 淋巴细胞的分析。会议主办方日本也就平台的建设与发展进行

了报告, 日方的工作主要是利用对照数据对平台进行的表型分析数据的一致性研究及建立基于多参数的表型分析系统。

感想: 第 60 届日本实验动物年会内容涉及广泛, 仅涉及的动物物种就包括大小鼠、雪貂、兔、乌龟、比格犬、果蝇、线虫、mekada 鱼、金鱼、羊、狨猴、恒河猴等多个物种, 研究内容涉及了实验动物检测、实验动物技术、保种育种、动物基因组学、人类疾病动物模型制作、比较医学、人类疾病机制、实验动物伦理学等各个方面。在许多热点研究领域, 日本动物学界已进行了较深入的研究, 拥有了较高水平的研究, 值得我们学习与追赶。