

大鼠肝细胞凋亡和坏死动物模型的建立及评价

黄丙仓, 詹松华, 邱书珺, 张蕾

【摘要】 目的:通过大鼠肝右叶血供干预分别建立肝细胞凋亡和坏死动物模型,为进一步的磁共振成像实验奠定基础。**方法:**选取体重为250~300克的SD大鼠90只,随机分为A、B、C三组,每组30只,分别行肝右叶门静脉和肝动脉结扎术、门静脉结扎术及假手术,各组在术后3h及1、3、7和14d分别处死6只大鼠,取肝脏标本送病理及电镜检查。**结果:**A组30只大鼠肝右叶发生凝固性坏死,光镜及电镜下均呈典型的坏死改变,TUNEL染色呈阴性;B组30只大鼠肝右叶发生小灶性凋亡,光镜下可见肝细胞核固缩改变,电镜下见肝组织核边集和凋亡小体,TUNEL染色呈阳性改变。术后3h即可见凋亡细胞,24h时凋亡细胞数最多,7d后肝组织开始发生小灶性坏死;C组30只大鼠肝右叶未发生凋亡和坏死的病理改变。**结论:**大鼠肝右叶门静脉和肝动脉双结扎可建立胆脏凝固性坏死模型,单纯肝右叶门静脉结扎能构建肝细胞小灶性凋亡模型。

【关键词】 模型,动物;坏死;凋亡;肝动脉;门静脉

【中图分类号】 R364.1; R657.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1000-0313(2006)01-0017-04

Establishment and Evaluation of the Animal Models of Hepatic Apoptosis and Necrosis in Rats HUANG Bing-cang, ZHAN Song-hua, QIU Shu-jun, et al. Department of Radiology, Shanghai Traditional and Western Integrated Hospital, Shanghai 200082, P. R. China

【Abstract】 Objective: To establish rat models of hepatic cell apoptosis and necrosis by intervention of blood supply of the right hepatic lobe. **Methods:** 90 SD rats with body weight 250~300g were randomly divided into three groups, with 30 rats in each group. Group A had ligation of both the right hepatic artery and portal vein for the aim of necrosis. Group B had ligation of the right portal vein for apoptosis. Group C had no intervention of blood supply for control and comparison. Six rats from each group were sacrificed at 3h, 1d, 3d, 7d and 14d after operation, and the right hepatic lobes were sampled and examined using light microscopy and electronic microscopy. **Results:** All of the rats from group A had typical coagulative necrosis in right hepatic lobe under light microscopy and electron microscopy, and were negative on TUNEL staining. In group B rats, focal apoptosis in right hepatic lobe could be revealed. There were pyknosis under light microscope; karyon bound gathering and apoptosis small body under electron microscopy. Results of TUNEL staining were positive. In the right lobe, apoptosis could be seen at 3h, with a peak at 24h; focal necrosis accompanied apoptosis could be revealed at 7d after surgery. All thirty rats from group C showed no signs of necrosis and apoptosis in the right hepatic lobe. **Conclusion:** Right hepatic lobe coagulative necrosis can be obtained in rat models by ligation of right portal vein and hepatic artery, focal apoptosis can be obtained simply by right portal vein ligation in rat models.

【Key words】 Models, animal; Necrosis; Apoptosis; Hepatic artery; Portal vein

细胞因严重损伤累及细胞核时,呈代谢停止、结构破坏和功能丧失等一系列不可逆性变化,此即细胞死亡,包括坏死和凋亡。坏死是活体内范围不等的局部细胞死亡,死亡细胞的质膜崩解、结构自溶并引发急性炎症反应。坏死可迅速发生,也可由可逆性损伤发展而来。凋亡是活体内单个细胞或小团细胞的死亡,死亡细胞的质膜不破裂,不引发死亡细胞的自溶,也不引起急性炎症反应^[1]。凋亡和坏死动物模型的建立可通

过组织部分和全部缺血形成。文献^[2-4]报道结扎大白鼠门静脉分支可诱发该分支供血的肝细胞早期发生坏死和后期发生凋亡。詹松华等^[5]的大白鼠实验研究也证实了单纯门静脉分支结扎将诱发局部肝细胞凋亡和肝脏萎缩改变。但是通过坏死和凋亡相对照进行的大样本实验目前尚未见报道。

材料与方法

1. 动物分组与手术操作

90只正常SD大白鼠,雌雄不限,年龄为3个月左右,体重250~300g,实验前、后按标准饲料统一喂养。将实验动物随机分成A、B、C三组,每组30只。其中

作者单位:200082 上海,上海市中西医结合医院放射科(黄丙仓); 200065 上海,同济大学附属同济医院(詹松华、邱书珺、张蕾)
作者简介:黄丙仓(1971-),男,上海人,主治医师,硕士研究生,主要从事腹部影像研究工作。
基金项目:上海市自然科学基金项目(02Z1314103)

A 组大鼠行肝动脉右支和门静脉右支双结扎, B 组行单纯门静脉右支结扎, C 组为对照组(打开大鼠腹腔但不结扎任何血管)。各组在手术后 3 h、24 h、3 d、7 d、14 d 共五个时间点分别处死 6 只实验大鼠, 取肝脏标本送病理学和电镜检查。

2. 电镜取材、固定和分析方法

在麻醉状态下剪开大鼠腹壁, 观察和记录肝脏形态和大小改变, 仔细分离并完整取出肝脏, 迅速切取肝脏右叶, 立即将肝右叶切开, 在无菌巾上切取 3~4 块大小约为 1.0 mm³ 的组织块, 并迅速置于生理盐水中漂洗后放入盛满缓冲固定液的青霉素瓶中, 在瓶上做好标记后立刻放于 4 ℃ 冰箱中保存。标本送至电镜室后按登记簿要求逐项认真填写, 并写明样本包埋要求, 然后择期进行半薄定位、电镜观察及取片, 将有明显细胞核固缩的观察野做好标记, 然后进行电镜观察、分析。

3. 病理染色技术和方法

在电镜取材完成后, 立即将取出的肝组织置于 10% 福尔马林溶液中固定 24 h 以上, 取肝右叶与左叶组织分切后常规石蜡包埋。将石蜡组织块进行 5 μm 连续切片, 随机抽取病理白切片分别做常规 HE 染色、末端脱氧核苷酸转移酶介导的缺口末端标记法 (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end-labelling, TUNEL) 检测细胞凋亡, 免疫组织化学 Envision 法检测增殖细胞核抗原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA)。TUNEL 染色采用德国 DAKO 公司生产的 ApopTag S7100 试剂盒, 按照试剂盒附带的操作步骤进行染色, 以细胞核呈深棕色伴核皱缩为细胞凋亡阳性细胞, 否则为阴性。PCNA 免疫试剂盒购自 DAKO 公司, 以细胞核内出现紫色颗粒为阳性细胞。

结 果

1. 手术后肝脏大体形态学改变

右侧门静脉或肝动脉和门静脉结扎手术操作成功后, 立即观察肝组织的颜色变化。两种结扎方法均可于短时间内导致肝右叶缺血改变, 表现为肝右叶颜色变暗, 由鲜红色变成暗紫色, 但以 A 组较明显。B 组因单独结扎门静脉右支, 结扎后肉眼观察肝右叶略变灰暗, 颜色变化相对较轻。在手术后不同时间, 两种血流阻断法引起肝右叶形态发生了不同变化。双重结扎后, 肝右叶逐渐发生凝固性坏死, 体积大小无明显变化, 但是颜色变为灰黄色, 质地变硬, 且随时间延长表现更加明显(图 1)。单独门静脉右支结扎的大鼠, 术

后 3 h、24 h 肝脏右叶大小无明显变化, 但是颜色渐趋灰暗, 术后 3、7 和 14 d 结扎侧肝叶逐渐萎缩, 体积明显减小, 肝左叶体积代偿性增大, 上述变化均以术后 14 d 时最显著(图 2)。

2. 手术后肝脏标本的 HE 染色表现

对照组(C 组)大鼠标本镜下显示正常的肝脏结构, 细胞染色清晰, 排列规则呈放射状。

A 组实验大鼠肝右叶 HE 染色组织切片: 术后 3 h 镜下显示, 肝小叶中央静脉周围出现片状坏死, 并可见桥接坏死, 肝细胞肿胀、气球样变性, 胞核固缩, 部分核溶解、消失, 胞浆嗜酸性变, 肝窦内中性粒细胞聚集, 小叶周边可见排列及形态正常的肝细胞; 术后 24 h 镜下显示, 肝小叶内见大片坏死灶, 几乎不见正常肝细胞, 肝组织边缘可见炎性反应带, 中性粒细胞聚集; 术后 72 h 镜下显示, 肝索排列不规则, 肝细胞破坏, 呈均匀红染改变, 肝细胞核可见核固缩、核碎裂和核溶解(图 3); 7 d 后肝右叶坏死更加彻底, 细胞溶解、消失, 组织呈均质红染无结构区域, 边缘见炎性反应带, 肝左叶呈代偿性肥大改变。

B 组大鼠肝右叶 HE 染色组织切片: 术后 3 h 镜下显示, 细胞排列紧密, 胞核缩小; 术后 24 h 镜下显示, 肝叶变小, 肝小叶结构保持完整, 肝细胞排列更加紧密, 中央静脉周围出现点、片状坏死灶, 组织边缘未见炎性反应带; 术后 3 d、7 d 镜下显示肝右叶呈萎缩改变, 肝叶明显缩小, 坏死灶增多、扩大, 肝索排列规则, 可见散在呈细胞核固缩改变的凋亡肝细胞; 术后 14 d 镜下显示肝小叶萎缩, 部分肝索结构破坏, 可见细胞膜溶解破坏、细胞核碎裂、溶解消失, 胞浆红染, 部分区域呈坏死后改变, 周边未见炎性细胞。术后肝左叶呈代偿性肥大改变, 术后 3 h 就可见到明显的肝细胞增殖, 有较多核分裂相存在, 24 h 时达高峰, 并在以后较长时间内保持较高水平。

3. TUNEL 染色检测结果

对照组大鼠肝脏右叶及各实验组大鼠肝脏左叶组织切片内几乎看不到凋亡细胞, 而在行门静脉右支结扎的 B 组大鼠肝脏在各个时间点均可见细胞凋亡的病理变化过程。术后 3 h 即可见较明显的凋亡细胞, 表现为核浓缩呈均匀深棕色(TUNEL 染色阳性), 染色质团聚; 24 h 后, 凋亡细胞明显增多, 呈小灶性分布, 此时间点凋亡细胞最多(图 4); 72 h 后凋亡细胞数开始减少, 凋亡与坏死共存, 坏死组织呈片状灰黄色无结构区; 术后 14 d 凋亡细胞几乎不可见, 表现为肝小叶和肝细胞萎缩, 可见少量炎性反应及坏死的病理改变。行肝动脉右支和门静脉右支同时结扎的 A 组大鼠在

各个时间点肝脏右叶均未见明显凋亡细胞(图3)。

4. 电镜分析结果

A组大鼠肝右叶标本的电镜表现:肝细胞排列紊乱,随时间延长细胞表现为从水肿到胞膜破裂,坏死区偶可见凋亡细胞,后期可见细胞结构消失(图5),7 d和14 d时肝右叶组织几乎完全坏死。B组大鼠肝右叶标本电镜表现:术后3 h可见少量散在的凋亡肝细胞,细胞核固缩、核边集、凋亡小体形成,胞膜及细胞器质膜均完整(图6)。凋亡细胞数量随时间而改变,术后3 h开始出现,24 h时凋亡肝细胞最多,可见细胞核固缩、边集及凋亡小体形成,7 d和14 d后电镜下呈典型凋亡改变的肝细胞开始减少。3 d和7 d时开始有不同程度的坏死改变,可见细胞膜和细胞器质膜破坏而不完整,并可见纤维组织增殖。从术后第3天开始正常细胞的数量减少,体积变小,呈萎缩改变。

讨论

1. 大鼠肝脏解剖和血供特点

吕毅等^[6]通过对150只成年SD大鼠肝脏及其附属管道的解剖学研究,将大鼠肝脏分为六叶,以肝门为中心逆时针方向依次为乳头叶、左外叶、左内叶、中叶、

右叶和尾状叶。笔者在实验过程中发现将大鼠肝脏分为左、右两部分较为合理,其中肝右叶又分为上、下两叶,肝左叶分左内叶、左外叶及乳头叶,其中乳头叶离开肝门分为腹、背两个叶。右下叶以凹陷切迹面与右肾相毗邻,并连以肝肾韧带,其内侧包绕下腔静脉,并有膜片状少许肝组织绕过Glisson系统背侧与乳头叶相连。两片乳头叶嵌于胃小弯,其中一叶位于贲门后方。左外叶遮盖了乳头叶、胃小弯和第一肝门。第一肝门为Glisson系统入肝处,肝动脉、门静脉和胆管及其分支全程相伴,在肝外极易分离和辨认。Glisson系统在肝门处分为三支,分别走向右、左和头方。右支进入右上叶前分支至右下叶,头支较粗大并分为2支,分别入左外叶和左内叶。

大鼠肝脏血液循环系统与人类相似,有两套供血系统,即肝动脉和门静脉,正常时分别占肝脏供血量的25%和75%。门静脉汇集肠道毛细血管循环后的血液,进入肝脏再分支进入肝血窦,将肠道吸收的营养物质提供给肝细胞进行代谢,这也是肝脏的主要功能。大鼠肝脏右叶的血供与其余肝叶分界清楚,因而容易分离,能够确保手术操作的成功率^[7,8]。

2. 右侧门静脉结扎后肝组织的病理改变

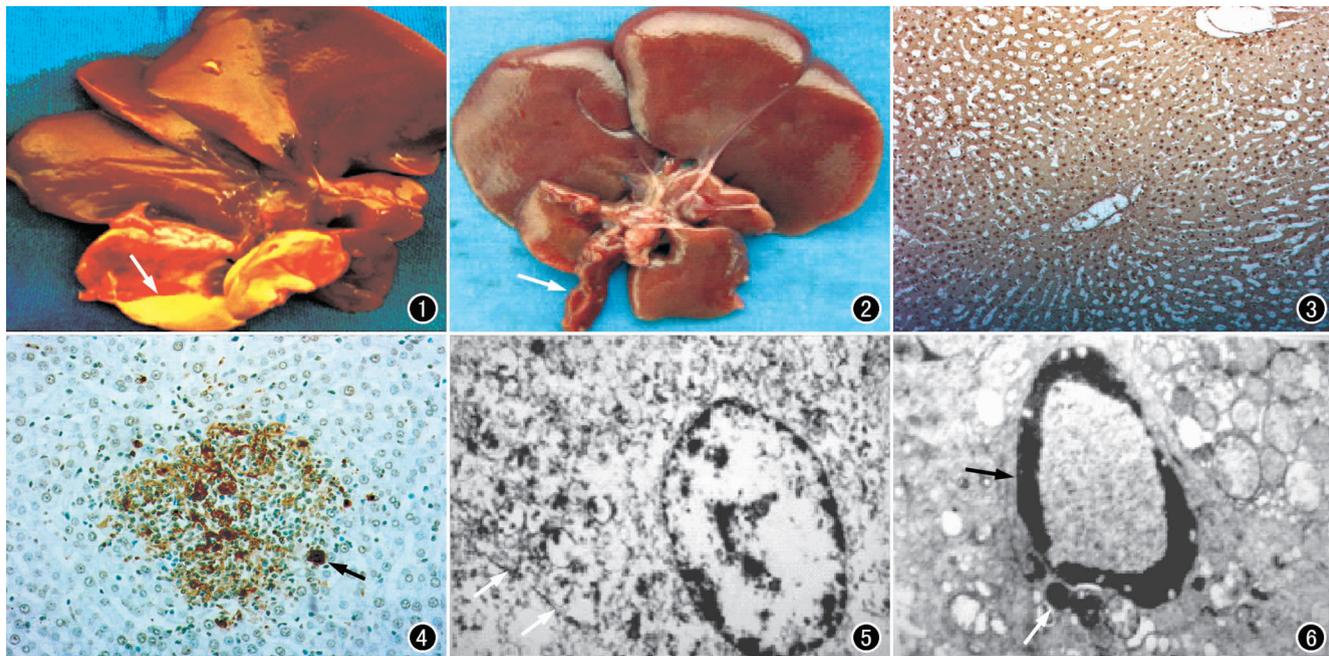


图1 大鼠门静脉及肝动脉右支双扎后大体病理标本显示肝右叶发生凝固性坏死(箭)。图2 大鼠门静脉右支单扎后大体病理标本显示肝右叶萎缩改变(箭)。图3 门静脉及肝动脉右支双结扎后72 h,光镜下显示肝右叶均匀灰黄染色,大量细胞死亡,未见凋亡细胞($\times 200$, TUNEL染色)。图4 单纯肝门静脉右支结扎后24 h光镜下显示染成棕黄色的凋亡细胞(箭)呈小灶状分布($\times 200$, TUNEL染色)。图5 肝门静脉及肝动脉右支双扎后1 d电镜下显示肝细胞质膜破坏(箭),线粒体变性,内质网肿胀($\times 6000$)。图6 肝门静脉单扎后7 d电镜下显示肝细胞核呈典型的核边集改变(黑箭),可见凋亡小体形成(白箭),质膜尚完整($\times 3500$)。

笔者发现在本次手术过程中,当行右侧门静脉结扎后,肝脏右叶颜色与肝脏左叶比较略变暗,但仍呈红色,术后 3 h、24 h 时肝右叶的颜色和大小与肝左叶比较只有轻微不同,术后 3 d、7 d 和 14 d 时可见肝右叶体积变小,而肝左叶体积增大,以术后 14 d 时最显著。门静脉右支结扎术后 3 h、24 h、3 d 和 7 d 时,光镜下显示肝脏右叶结构存在,肝索排列规则,在正常的肝组织细胞中依稀可见散在的细胞核固缩的凋亡肝细胞(TUNEL 染色细胞核被染成棕褐色)。肝右叶凋亡细胞数呈明显递增趋势,以术后 24 h 最为显著,至术后 14 d 凋亡细胞几乎不可见,同时可见炎症反应及坏死病理改变。

电镜检查的目的主要是从形态学上检测凋亡细胞和凋亡小体形成,是诊断凋亡存在最可靠的依据。凋亡细胞的电镜下典型表现是细胞核固缩、边集和凋亡小体形成。另外,凋亡发生时细胞膜及各种细胞器质膜均完整。笔者观察肝右叶门静脉结扎后各时间段电镜表现,发现术后 24 h 时可见典型的凋亡细胞,且数目较多,而术后 3 h 时未见明显的凋亡小体,术后 14 d 时可见到部分肝细胞的胞膜及各种细胞器质膜破坏改变。从上述的术后病理学、电镜及 TUNEL 染色表现,可得出结论:通过肝右叶门静脉结扎可成功制作肝细胞凋亡模型,以术后 24 h 时凋亡改变最显著^[9,10]。

3. 肝动脉和门静脉结扎后肝组织的病理改变

肝脏入肝血供中门静脉供血占 75%,肝动脉占 25%,当入肝血供全部阻断后,肝右叶因急性缺血发生凝固性坏死。在手术过程中发现当门静脉及肝动脉双结扎后,肝右叶颜色立即由鲜红色变为暗红色。3 h 大体标本见肝右叶呈黄色改变,质变硬,边界清晰,体积变化不明显。随着时间的延长,肝组织体积稍缩小,周边见炎症反应。光镜下呈典型的坏死后改变,可见肝细胞核碎裂、核溶解及核膜破裂等改变,细胞及组织结构显示不清。电镜下可见肝细胞质膜及核膜破裂改变。随着时间的推移,上述改变趋于加重。本组采用肝右叶门静脉和肝动脉双结扎法构建肝组织凝固性坏

死模型是为了和肝细胞凋亡模型进行对照研究,有助于更深层次的理解肝细胞凋亡模型的建立。

总而言之,大鼠肝脏各叶及肝血管的解剖学特点便于肝血管结扎手术的操作,肝右叶门静脉及肝动脉双结扎和门静脉单结扎后分别使肝右叶发生坏死和凋亡的病理改变。因此,通过肝血供干预构建正常肝细胞的坏死和凋亡动物模型是切实可行的,从而为临床和科研的进一步研究打下了坚实的基础。

参考文献:

- [1] 杨光华. 病理学(第 5 版)[M]. 北京:人民卫生出版社,2001. 18-24.
- [2] Bilodeau M, Aubry MC, Houle R, et al. Evaluation of Hepatocyte Injury Following Partial Ligation of the Left Portal Vein[J]. J Hepatol, 1999, 30(1): 29-37.
- [3] Ikeda K, Kinoshita H, Hirohashi K, et al. The Ultrastructure, Kinetics and Intralobular Distribution of Apoptotic Hepatocytes after Portal Branch Ligation with Special Reference to Their Relationship to Necrotic Hepatocytes[J]. Arch Histol Cytol, 1995, 58(2): 171-184.
- [4] Lambotte L, Li B, Leclercq I, et al. The Compensatory Hyperplasia (Liver Regeneration) Following Ligation of a Portal Branch is Initiated before the Atrophy of the Deprived Lobes[J]. J Hepatol, 2000, 32(6): 940-945.
- [5] 詹松华, 韩洪杰, 王国良, 等. 门静脉右支结扎和栓塞的对比研究[J]. 同济大学学报(医学版), 2001, 22(3): 4-6.
- [6] 吕毅, 潘承恩, 孟令忠, 等. SD 大鼠肝脏及附属管道的应用解剖[J]. 西安医科大学学报, 1998, 19(1): 70-73.
- [7] Hatakeyama Y, Asanuma Y, Sato T, et al. Regional and General Effects of Hepatic Lobes with Impaired Blood Flow after Hepatic Resection[J]. Hepatogastroenterology, 2002, 49(44): 487-491.
- [8] Picard C, Starkel P, Sempoux C, et al. Molecular Mechanisms of Apoptosis in the Liver of Rats after Portal Branch Ligation with and without Retrosine[J]. Lab Invest, 2004, 84(5): 618-628.
- [9] Zhao M, Beauregard DA, Loizou L, et al. Non-Invasive Detection of Apoptosis Using Magnetic Resonance Imaging and a Targeted Contrast Agent[J]. Nat Med, 2001, 7(11): 1241-1244.
- [10] Brauer M. In Vivo Monitoring of Apoptosis[J]. Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry, 2003, 27(2): 323-331.

(收稿日期:2005-06-30 修回日期:2005-09-12)