

实验性肝损伤模型的建立和评价

李艳辉 综述 肖恩华 审核

【中图分类号】R-332; R657.3 【文献标识码】A 【文章编号】1000-0313(2006)10-1075-03

实验性肝损伤模型是实验和临床假说的基础, 它的建立为探知肝脏疾病的病因、病理生理、治疗等方面提供了有用的工具。

药物中毒性肝损伤模型的建立

1 四氯化碳(CCl₄)

CCl₄ 是最早、最广泛应用于实验性肝损伤动物模型的选择性肝毒性物质, 机制为^[1]: CCl₄ 的活性代谢产物三氯甲基根(-CCl₃) 刺激产生活性中间产物(ROI), 造成脂质过氧化, 引起细胞损害, 结缔组织产生过多。诱导微粒体细胞色素 P450 同工酶活性的物质可增加 CCl₄ 产物的肝毒性, 因此在制模过程中加入戊巴比妥或乙醇代替饮水是加速肝损伤进程的常用方法。

急性肝功能衰竭模型: SD 大鼠(体重 250~320 g)4 ml/kg, CCl₄ 灌胃^[2]; 肝纤维化模型有单纯法和复合法。单纯法: 采用 Wistar 大鼠(体重 85~95 g), 腹腔注射 CCl₄ 0.025 ml(以花生油 1:6 稀释), 每周 3 次, 共 4 周^[3]; 采用 Wistar 大鼠, 40% CCl₄ 石蜡油溶液第 1 天皮下注射 0.5 ml/100 kg 体重, 以后每隔 4d 皮下注射 0.3 ml/100 kg 体重, 共 10 次^[4]; SD 大鼠(体重 230~260 g), 轮替四肢皮下注射 50% 植物油 CCl₄ 溶液 0.3 ml/100 kg 体重, 每周 2 次, 共 8 周^[5]。

复合法: Mclean^[6] 在饮水中加入苯巴比妥(350 ml/l), CCl₄ 蒸气吸入; Proctor^[7] 让大鼠饮用含苯巴比妥(350 ml/l)的水 2 周肝极度肿大后, 以 CCl₄ 灌胃 0.2 ml/kg 体重, 5d 1 次, 8~10 周成模; 韩德五^[8] 以高脂蛋白食物(玉米面)为大鼠饲料, 加 0.5% 胆固醇, 实验第 1、2 周加 20% 猪油, 以 30% 酒精为唯一饮料, 皮下注射 CCl₄ (第一次用 0.5 ml/100 kg 体重, 以后每隔 3d 皮下注射 40% 油剂 CCl₄ 0.3 ml/100 kg 体重, 共 6 周); 孙敬方^[9] 向 Wistar 或 SD 大鼠皮下注射 45%~50% 油溶液, 0.3 ml/100 kg 体重, 每周 2 次, 第 2 周开始, 隔日以 20%~30% 乙醇 1 ml 灌胃, 饲以混有 0.5% 胆固醇低胆碱饲料, 共 8 周。

以上所述为几种经典、具有代表性的方法, 其它很多方法都是在此基础上的改良, 如腹腔内注射 CCl₄ 加饮用苯巴比妥钠和食用酒精等^[10]。目前多选用鼠造模, 因鼠繁殖力强, 生命力旺盛, 价格低廉, 也有选用兔, 因兔血容量大, 肝脏大小适中, 其肝损伤易于生化及影像学观察, 选用大动物模型如犬亦有成功报道^[11]。给药途径有多种, 如皮下注射、腹腔注射、灌胃、蒸气吸入或拌于食物中快速口服等, 优劣各家说法不一。灌胃法 CCl₄ 经过门静脉系统吸收, 直接进入肝脏, 模型制备理想, 但操作复杂, 肠道反应大; 腹腔内注射门静脉浓度高, 肝损伤形成时

间短, 但病死率较高(20%~35%); 皮下注射较腹腔注射具有如下缺点, 造模周期长, 动物病死率高, 相应增加了实验经费, 因操作不当可以发生皮下渗漏, 但操作简便; 蒸气吸入需快速吸入, 呼吸道刺激大, 动物不耐受, 中枢毒性大, 易污染环境和伤害实验人员; 溶于少许食物快速口服, 少吃多餐, 挥发减少, 浓度低胃肠刺激减小, 但受动物食欲影响, 剂量难以掌握, 实验终点不明确, 周期长。

2 D-半乳糖胺(D-galactosamine, D-GalN)

半乳糖胺是一种肝细胞毒性药物, 可在短时间内引起严重肝损害, 其作用机制是: ①通过抑制肝细胞的 RNA 和浆膜蛋白合成造成肝细胞坏死^[12]; ②肝细胞坏死与细胞外 Ca²⁺ 大量进入细胞内有关^[13]; ③一些研究指出, 肠外因素, 包括胃肠通透性增加, 细菌的移位和内毒素等都增加了半乳糖胺的肝脏毒性^[14]。

急性肝功能衰竭模型: 大白猪颈外静脉置管注射半乳糖胺(0.75 g/kg 体重), 给药 18 h, 肝功能损害开始明显, 至 48 h 达高峰, 治疗肝功能衰竭的各种措施可在这段时间内进行试验, 该模型适合进行人工肝脏支持治疗的研究^[15]; 家猪经门静脉注射半乳糖胺 0.5 g/kg 和脂多糖 1 μg/kg^[16], 与单用半乳糖胺(1 g/kg)外周静脉注射诱导大动物急性肝功能衰竭模型相比, 半乳糖胺用量减少了一半, 联合应用脂多糖, 两药有明显协同作用。长期小剂量可导致肝纤维化和肝癌。半乳糖胺诱发的急性肝功能衰竭模型症状、生化、组织学表现接近人, 重复性好, 而且不造成环境污染及人体伤害等, 对肝衰竭、肝性脑病、人工肝支持系统的评价研究有重要价值, 缺点为半乳糖胺较昂贵。

3 甲基亚硝胺(dimethylnitrosamine, DMN)

DMN 是常见的致肝癌剂, 它通过微粒体代谢, 其中间产物与细胞核酸、蛋白质等结合致肝损伤, 同时产生一种活性甲基化产物使核酸、蛋白质甲基化导致肝坏死^[17]。急性肝损伤: 单剂后 12~18 h 出现肝细胞出血坏死周围细胞脂变, 24 h 广泛坏死, 嗜酸性变性, 脂肪沉着, 凋亡小体出现, 6 d 后坏死消失, 残留组织纤维增生, 静脉扭曲。

肝纤维化模型: SD 大鼠按 10 mg/kg 体重, 给予 1% DMN 生理盐水稀释液, 腹腔注射 10 次^[18]。DMN 诱发肝纤维化周期短, 动物病死率低, 肝纤维化形成相对稳定, 主要用于肝硬化形成和门脉高压机制的研究^[19], 还用于肝硬化向肝癌转化机制的研究。缺点为 DMN 毒性大, 易挥发, 排泄物在 24 h 内含毒物, 易污染环境和影响周围人群。

4 对乙酰氨基酚(acetaminophen, PAPA)

PAPA 是一种肝毒物, 是经生物转化后形成亲电子代谢物致肝损伤的样板, PAPA 常用于制作急性肝功能衰竭模型,

作者单位: 410011 长沙, 中南大学湘雅二医院放射科
作者简介: 李艳辉(1978-), 女, 湖南郴州人, 硕士研究生, 主要从事影像诊断工作。

P450 诱导剂加重肝损伤, 先予以 P450 诱导剂和 GSH 合成酶抑制剂, 再予 PAPA 复制的兔急性肝功能衰竭模型与人急性肝功能衰竭临床特点, 组织学表现相似, 是较理想的急性肝功能衰竭模型。

5 其它

硫代乙酰胺在实验性肝损伤动物中致肝癌, 肝细胞损伤反应好, 肝纤维化组织接近人类肝硬化表现, 诱发急性肝功能衰竭可表现肝性脑病, 常用于制作肝纤维化和急性肝功能衰竭模型^[20]。另外, 乙硫氨酸 (ethionine), 二甲基偶氮苯及黄曲霉素也可使肝细胞发生中毒性肝损伤。

酒精性肝损伤动物模型的建立

酒精对肝损害的机制尚未完全阐明, 可能是炎症和免疫病理共同作用的结果, 蛋白质和各种营养物质缺乏会加重酒精的肝损害^[21]。高浓度的酒精引起急性肝损伤, 产生大量毒性代谢产物和乙醛, 并释放肾上腺素, 引起肝脏血管收缩, 肝窦内压升高和肝细胞缺氧, 导致空泡变性, 肝细胞溶解坏死^[22]。对酒精引起的慢性肝损伤研究较多。Liber DeCarli 液体食物模型^[23]: 按热量配置, 蛋白质占 18%, 脂肪 21%, 糖 61% (糖热量的 50% 由乙醇提供), 管饲狒狒实验 1~3 年, 1/3 狒狒发生肝硬化, 液体食物可完全控制食物与酒精的摄入量, 该模型与人类酒精性肝硬化极为相似, 但实验动物昂贵, 实验周期长, 推广困难。TsuKamoto-French 模型^[24]: 该模型采用大鼠, 饲液体食物, 采用植入人工胃管, 酒精占摄入总热量的 47%, 该模型可完全控制乙醇和营养物的摄入量, 符合进行性酒精性肝损伤, 从肝脂变、小叶中心坏死、炎症到肝细胞周围、静脉周围肝纤维化。河金福等^[25]在大鼠常规饲养同时灌入酒精 (56%)、橄榄油等的混合液, 4 周后电镜下可见肝细胞周围胶原纤维增生。陆伦根等^[26]用 60% 酒精按 1.5 ml/100 g 体重的剂量, 灌胃, 每日 2 次, 低脂饮食, 实验动物自由饮水, 6 个月后肝细胞周围脂肪变加重, 可见中央静脉周围和窦周纤维化, 高脂饮食可加重上述表现。丁霞等^[27]对 Wistar 大鼠每日清早灌胃白酒-玉米油-吡啶混合液, 间断给予高脂饲料, 其中酒精摄入量为每天 8~12 g/kg 随时间的延长而递增; 玉米油的摄入量为每天 2 g/kg, 吡啶的摄入量为 24 mg/kg 造模时间为 12 周, 经 Masson 三色染色证实肝组织中胶原纤维明显增生。乙醇与 CCl₄ 联合应用造模已有较多成功报道。吴孟超^[28]报道在小鼠使用该方法 60d 即可致肝硬化, 肝硬化稳定, 分期明显, 动物病死率低。此类模型可广泛用于酒精性肝病的研究, 依其处于不同时期可作酒精性脂肪肝及肝纤维化的研究。

免疫学方法诱发肝损伤模型

1 异种血清

异种动物血清诱导的肝损伤-肝纤维化模型产生机制, 被认为是白蛋白免疫复合物所致的 III 型变态反应^[29]。王宝恩等建立了良好的免疫性肝纤维化动物模型^[30], 采用人血清白蛋白给大鼠皮下注射, 抗体产生后, 尾静脉注射白蛋白。小剂量组 16 周 80% 动物形成肝纤维化乃至肝硬化, 病死率 20%~30%; 大

剂量组, 30d 可形成肝硬化, 但病死率高, 加入 PGE 可降低病死率至 5%。异种血清腹腔注射法^[31]: 可选用猪、牛、羊等血清, 其中以猪血清最为常用, SD 或 Wistar 大鼠, 猪血清 0.5 ml/次腹腔注射, 每周 2 次, 12 周后肝内广泛纤维组织增生, 假小叶形成, 有典型肝硬化表现。

2 刀豆蛋白 A (conA)

conA 是植物凝集素, 有促进有丝分裂的作用, 可以引起 T 细胞介导的肝损伤, 损伤有肝特异性和剂量依赖性。小鼠静脉注射 conA (20 mg/kg 体重) 后 6~8 h 可见肝细胞凋亡坏死和明显的淋巴细胞浸润, 肿瘤坏死因子- α 、干扰素- γ 等细胞因子血清水平升高^[32]。小鼠尾静脉注射 1 mol/l conA (12.5 mg/kg), 每周 1 次, 连续 6 周后, 常规病理切片 HE 染色发现肝小叶破坏, 结构紊乱, 肝坏死明显^[33]。另外, 细菌细胞壁产物, 如大鼠腹腔内注射由链球菌细胞壁提取物聚糖-多糖, 亦可引起 T 细胞介导的肝纤维化。

上述免疫性肝损伤模型与人类肝炎后肝纤维化的形成机制较一致, 但仍有较大差距, 因为它没有病毒复制和肝实质持续损伤的过程。此类模型有利于从免疫学角度探讨发病机制和评价药物治疗。

手术肝损伤实验动物模型

主要用于急性肝功能衰竭模型研究肝移植、细胞移植和人工肝治疗效果, 根据实验动物的不同术式较多。Terblanche^[34]提出理想的暴发性肝衰竭模型应具有 6 个特征, 即可重复性、肝衰竭致死、有治疗窗、治疗后可逆、大动物模型和对实验人员危害小。部分肝切除、全肝切除术仅适合肝移植肝切除后到供肝行使功能期间的研究, 亦有采用门腔端-侧分流、胆总管结扎切断术建立了较理想的犬急性肝功能衰竭模型, 有望用于生物人工肝的研究^[35]。陈钟^[36]行 95% 肝切除, 术中经中叶肝静脉注入 5% 葡萄糖氯化钠溶液 (10 ml/kg 体重), 建立了较理想的大鼠急性肝功能衰竭模型, 并指出与传统手术方法相比, 经中叶肝静脉注入 5% 葡萄糖氯化钠降低了病死率, 药物诱导肝衰竭法在肝细胞移植时药物可对植入的肝细胞产生毒性损害, 可能影响治疗, 干扰实验结果, 单纯胆总管结扎、胆管内逆行性注入 N-丁基-2-氨基丙烯酸盐加胆管结扎^[37]均可建立胆管阻塞性肝纤维化模型, 且具有炎症反应轻、造模周期短、自发逆转低, 实验指标稳定等优点。 α -萘异硫氰酸盐溶于油中, 按 50~150 mg/kg 体重的剂量给大鼠灌胃可诱发胆汁性肝纤维化^[38]。

其它肝损伤动物实验模型的建立

营养和代谢性肝损伤模型、寄生虫性肝纤维化模型、感染性肝损伤模型 (病毒性肝炎、沙门菌、大肠杆菌等诱发) 亦有不少报道。国外还有转基因小鼠肝纤维化的研究^[39]。

综上所述, 实验性肝损伤制模方法较多, 由于人体肝脏功能的复杂性和肝损伤因素的多样性, 任何一种实验模型都不能全面、精确地反应特定肝损伤的本质满足所有科研需要, 制模的可重复性、可预测性、可比性、低费效比是制模成功的关键, 研究者应根据研究目的、技术熟练程度及经济条件选择建立适

当的动物模型。

参考文献:

- [1] Hernandez-Munoz R, Diaz-Munoz M, Chagoya de Sanchez V. Possible Role of Cell Redox State on Collagen Metabolism in Carbon Tetrachloride-induced Cirrhosis as Evidenced by Adenosine Administration to Rats[J]. Biochim Biophys Acta, 1994, 1200(1): 93-99.
- [2] 赖力英, 杨旭, 许向青, 等. 四氯化碳诱导大鼠急性肝功能衰竭动物模型的建立[J]. 中国现代医学杂志, 2005, 15(11): 1655-1657.
- [3] Hernandez-Munoz R, Diaz-Munoz M, Suarez J, et al. Adenosine Partially prevents Cirrhosis Induced by Carbon Tetrachloride in Rats[J]. Hepatology, 1990, 12(2): 242-248.
- [4] 汪谦. 现代医学实验方法[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1998. 941-942.
- [5] 彭小东, 王波, 王天才. 四氯化碳皮下注射构建大鼠肝纤维化模型的研究[J]. 江西医学院学报, 2005, 45(2): 5-6, 10.
- [6] McLean E, McLean AME, Sutton PM. Instant Cirrhosis, an Improved Method for Producing Cirrhosis of the Liver in Rats by Simultaneous Administration of Carbon Tetrachloride and Phenobarbitone[J]. Br J Exp Pathol, 1969, 50(4): 502.
- [7] Proctor E, Chatamra K. High Yield Micronodular Cirrhosis in the Rat[J]. Gastroenterology, 1982, 83(5): 1183-1190.
- [8] 韩德五, 马学惠, 赵元昌. 肝硬化动物模型的研究[J]. 山西医药杂志, 1979, 10(1): 4.
- [9] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2001. 474-475.
- [10] 叶春华, 刘浔阳. 四氯化碳综合法制备大鼠肝硬化模型[J]. 医学临床研究, 2005, 22(5): 619-622.
- [11] 吕明德, 黄洁夫. 腹腔注射四氯化碳配合营养控制制备犬肝硬化模型[J]. 中华实验外科杂志, 1993, 10(1): 58-59.
- [12] Mcmillan JM, Jollow DJ. Galactosamine: Hepatotoxicity Effect of Galactosamine on Glutathione Resynthesis in Rat Primary Hepatocyte Cultures[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 1992, 115(2): 234-240.
- [13] Schanne FAX, Pfau RG, Farber JL. Galactosamine-induced Cell Death in Primary Cultures of Rat Hepatocytes[J]. Am J Pathol, 1980, 100(1): 25-38.
- [14] Kasravi FB, Wang L, Wang XD, et al. Bacterial Translocation in Acute Liver Injury by Dgalactosamine[J]. Hepatology, 1996, 23(1): 97-103.
- [15] 陈影波, 何永源, 杜原赞, 等. 急性肝功能衰竭的猪动物模型[J]. 暨南大学学报(医学版). 2000, 21(6): 22-25.
- [16] 彭承宏, 肖卫东, 吴伟顶, 等. 门静脉注射 D-氨基半乳糖和脂多糖建立猪急性肝功能衰竭模型[J]. 中华医学杂志, 2005, 85(21): 1464-1467.
- [17] Ryhanen L, Ala Kokko L, Savolainen FR. The Effect of Malotilate on Type III and Type IV Collagen Lamina and Fibronectin Metabolism in the Rat[J]. J Hepatol, 1996, 24(3): 283-285.
- [18] Pietrangelo A, Gualdi R, Casagrandi G, et al. Molecular and Cellular Aspects of Iron-induced Hepatic Cirrhosis in Rodents[J]. J Clin Invest, 1995, 95(11): 1824-1831.
- [19] 王宪波, 刘平, 陆雄, 等. 二甲基亚硝胺大鼠肝纤维化形成中门脉压力的动态变化[J]. 世界华人消化杂志, 2002, 10(4): 401-405.
- [20] 宋正己, 杨晋辉. 实验性肝损伤模型的建立和研究进展[J]. 医学综述, 2004, 10(5): 278-280.
- [21] 叶任高, 陆再英, 等. 酒精性肝病[M]. 内科学, 437-439.
- [22] 周宁, 厉有明, 等. 大鼠酒精性肝纤维化模型的构建[J]. 东南大学学报(医学版), 2003, 22(2): 93-97.
- [23] Lieber CS, Jones DP, Dearli LM. Effects of Prolonged Ethanol Intake: Production of Fatty Liver Despite Adequate Diets[J]. J Clin Invest, 1965, 44(10): 1009.
- [24] Tsukamoto H, Reidelberger RD, French SW, et al. Longterm Cannulation Model for Blood Sampling and Intragastric Infusion in the Rat[J]. Am J Physiol, 1984, 247(6): R595.
- [25] 河福金, 黄长恩, 王德福. 小柴胡汤对大鼠酒精性肝损伤的防护作用[J]. 中西医结合肝病杂志, 1994, (4): 19-21.
- [26] 陆伦根, 曾民德, 范建高, 等. 实验性肝纤维化组织中细胞间粘附分子-1 表达的研究[J]. 中华内科杂志, 1999, 38(1): 37.
- [27] 丁霞, 蒙一纯, 黄长恩, 等. 酒精性肝纤维化动物模型的建立[J]. 中国中医基础医学杂志, 1999, 5(7): 47-48.
- [28] 吴孟超, 杨广顺. 大鼠肝硬化模型复制的研究[J]. 中华实验外科杂志, 1994, 1(4): 146-148.
- [29] 朱起贵, 方步武, 吴起贺, 等. 牛血清白蛋白致免疫损伤性肝纤维化动物模型的研究[J]. 中华病理学杂志, 1993, 22(2): 121.
- [30] 王宝恩, 王志富, 殷蔚莪, 等. 实验性免疫性肝纤维化模型的研究[J]. 中华医学杂志, 1989, 6(9): 503.
- [31] 程明亮, 杨长青. 肝纤维化的基础研究及临床[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2002. 366-367.
- [32] Dawei C, Robert J, Zeytun A, et al. CD44 deficient Mice Exhibit Enhanced Hepatitis after Concanavalin A Infection: Evidence for Involvement of CD44 in Activation-induced Cell Death[J]. J Immunol, 2001, 166(10): 5889-5897.
- [33] 李鸿立, 田聆, 魏于全, 等. 刀豆素蛋白 A 诱导小鼠肝纤维化模型的建立[J]. 免疫学杂志, 2004, 20(5): 390-392, 396.
- [34] Terblanche J, Hickman R. Animal Models of Fulminant Hepatic Failure[J]. Dig Dis Sci, 1991, 36(6): 770-774.
- [35] 陈钟, 丁义涛, 徐庆祥, 等. 犬急性肝衰竭一种新模型的建立[J]. 中国普通外科杂志, 2003, 12(3): 206-208.
- [36] 陈钟, 黄华, 吴振宇, 等. 95% 肝切除与药物诱导大鼠急性肝衰竭模型的比较[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(1): 32-35.
- [37] 阴赅宏, 马红, 刘乃慧, 等. 大鼠胆管阻塞性肝纤维化模型的建立[J]. 实验动物科学与管理, 2002, 19(2): 1-3.
- [38] 邹移海. 中医实验动物学[M]. 广州: 暨南大学出版社, 1999. 130.
- [39] Sanderson N, Factor V, Nagy, et al. Hepatic Expression of Mature Transforming Growth Factor- β 1, in Transgenic Mice Results in Multipletissue Lesions[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1995, 92(3): 2572-2576.

(收稿日期: 2005-12-28)