维普资讯 http://www.cqvip.com

论 著 文章编号:0253-3626(2008)04-0390-04

小鼠胆总管结扎致肝纤维化模型的建立与评价

肖颜玉,胥 飚,崔 鲂,张莉萍

(重庆医科大学附属第一医院检验科,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立小鼠胆总管结扎致肝纤维化模型,并对其进行初步评价。方法:随机给予小鼠胆总管结扎和假手术,进行血清学指标(AST、ALT、ALP、TBIL、DBIL)检测;HE 染色和天狼猩红染色进行形态学观察;采用免疫组化染色分析 α-SMA 和 CK-19 表达;实时荧光定量 PCR 检测 α-SMA、Collagen-1 mRNA 的表达。结果:小鼠胆总管结扎后 2 周可见 CK-19 阳性的棕褐色细胞明显增生,模型组血清 AST、ALT、ALP、TBIL、DBIL 明显增高,α-SMA、Collagen-1 表达明显增强。结论:成功构建小鼠胆总管结扎致肝纤维化模型。

【关键词】胆总管结扎;肝纤维化;动物模型

【中国图书分类法分类号】R575.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2007-09-28

Establishment and evaluation of liver fibrosis model induced by bile duct ligation in mouse

XIAO Yan-yu, et al

(*Department of Laboratory Medicine, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To establish and evaluate liver fibrosis model induced by bile duct ligation in mouse. *Methods*: The bile ducts of the mice were occluded by ligation. Serum AST, ALT, ALP, TBIL and DBIL were determined; the morphological observation was done by HE staining and Sirius red staining, expressions of α-SMA and CK-19 were analyzed by immunohistochemistry staining; mRNA expression of α-SMA and Collagen-1 in liver tissues were assayed by real-time PCR. A sham-operation group was used as a control. *Results*: Chocolate brown cells with positive expression of CK-19 and α-SMA significantly proliferated 2 weeks after bile duct ligation. Serum AST, ALT, ALP, TBIL and DBIL levels of model group were much higher than those of control group; mRNA expression of α-SMA and Collagen-1 in liver tissue by real-time PCR were increased significantly in model group. *Conclusion*: The mouse liver fibrosis model can be established successfully by bile duct ligation.

【Key words】 Bile duct ligation; Liver fibrosis; Animal model

肝纤维化是多种慢性肝病发展为肝硬化的必经阶段,阻断肝纤维化是慢性肝病治疗中的关键问题[1]。为了更好地研究肝纤维化的发生机制以及药物对该病的疗效和治疗途径,需要建立稳定可靠的肝纤维化动物模型[2]。本研究目的是建立小鼠胆总管结扎致肝纤维化模型,并对其进行初步评价。

1 材料与方法

1.1 动物模型的建立

作者介绍:肖颜玉(1980-),女,硕士,
研究方向:肝细胞生物学及肝纤维化机理研究。
通讯作者:张莉萍,女,主任技师,E-mail:liuzhangcq@yahoo.com。

基金项目:国家自然科学基金(30670965),教育部重点课题(207099)。

选择健康 6~8 周龄大小的 C57BL/6 小鼠共 18 只,随机给予小鼠胆总管结扎(Bile duct Ligation)和假手术(Sham operation),假手术即打开腹腔,游离胆总管但不结扎,而后缝合。术后 5d 和 2 周打开腹腔,从下腔静脉取血,解剖摘取肝脏。

1.2 主要试剂

小鼠抗 α-SMA(平滑肌肌动蛋白)mAb、抗 CK-19(细胞角蛋白 19)mAb 分别购自美国 Sant Cruz 公司和 Dako 公司。生化试剂盒购自日本和光公司。

1.3 血清学生化指标检测

采用日立 7170 全自动生化分析仪按照试剂盒说明书测定血清 AST、ALT、ALP、TBIL、DBIL。

1.4 形态学观察

胆总管结扎和假手术小鼠肝组织块常规石腊切片,分别

维普资讯 http://www.cqvip.com

行 HE 染色和天狼猩红(SR)染色,光镜观察。

1.5 免疫组织化学染色

肝组织块经 SP 法免疫组织化学染色。石腊切片经梯度乙醇脱水,甲醇过氧化氢封闭后,分别用抗 α-SMA mAb 和抗 CK-19 mAb 37℃孵育 1h,辣根过氧化物酶偶联的抗小鼠的二抗,37℃孵育 0.5h,二氨基联苯胺显色。用 PBS 代替一抗做为阴性对照。

1.6 实时荧光定量 PCR

肝组织总 RNA 的提取采用 Qiagen RNA-easy Mini 试剂盒,严格按照说明书进行操作;采用 RNA 6000 Nano LabChip对 RNA 质和量进行分析;制备 cDNA,采用 SYBR Green 荧光定量 PCR 试剂盒分别对 α-SMA、Collagen-1 进行定量检测。每个基因的表达水平用 TATA 结合蛋白 TBP (TATA-box binding protein)进行正常化比较。统计分析采用 t 检验。

2 结 果

2.1 胆总管结扎模型中的炎症反应

HE 染色可见假手术组肝小叶结构完整,肝板排列整齐。手术组小鼠胆总管结扎 5d 汇管区出现小胆管样上皮增生;2 周汇管区小胆管明显增生,小胆管周围纤维组织增生,大量胶原沉积在小胆管周围。见图 1~3。

2.2 胆总管结扎模型中胆总管增生和肝脏受损

抗 CK-19 mAb 免疫组织化学染色显示,小鼠胆总管结扎后 2 周可见 CK-19 阳性的棕褐色细胞明显增生,见图 5。

血清学指标检测显示,小鼠胆总管结扎后 5d 到 2 周,反映肝脏功能的主要指标明显增高,见表 1、2。

2.3 胆总管结扎模型中肝纤维化的形成

采用实时荧光定量 PCR 分析,结果显示,α-SMA、Collagen-1 mRNA 表达明显增高(见图 6a,图 6b)。

天狼猩红染色显示,小鼠胆总管结扎后 2 周,可见肝小叶中央静脉周围有大量的胶原纤维束,见图 8。

抗 α-SMA mAb 免疫组织化学染色显示,小鼠胆总管结扎后 2 周,可见 α-SMA 阳性的棕褐色细胞明显增多,成纤维细胞大量增生,见图 10。

3 讨 论

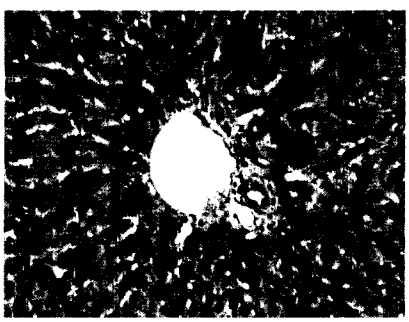


图 1 假手术组肝小叶汇管区的结构 (HE×20)

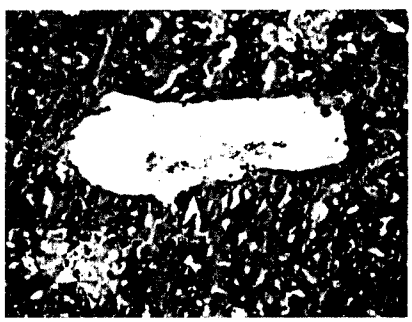


图 2 结扎术后 5d 肝组织结构 (HE×20)

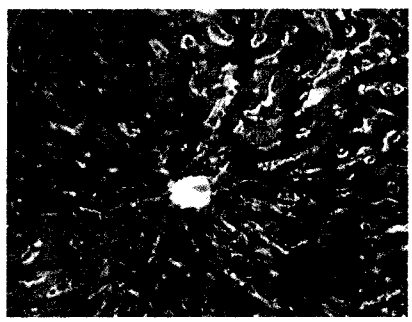


图 3 结扎术后 2 周肝小叶汇管区的结构 (HE×20)

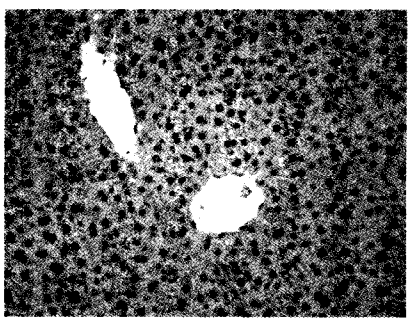


图 4 假手术组 CK-19 免疫组织化学染色 (20×)

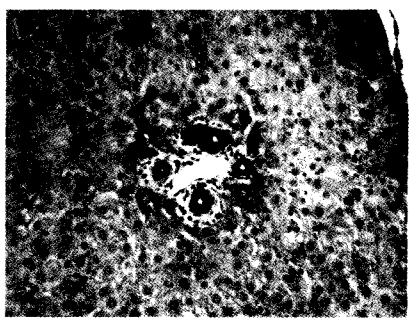


图 5 结扎术后 2 周免疫组织化学染色显示胆总管上皮细胞明显增生。可见大量 CK19 阳性的棕褐色胆总管上皮细胞(20×)

维普资讯 http://www.cqvip.com

表 1 术后 5d 小鼠胆总管结扎致肝纤维化模型血清学指标变化

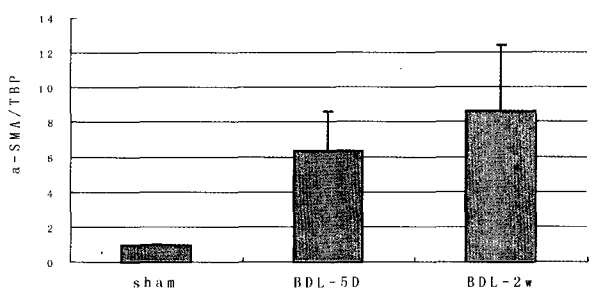
	n	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	ALP(IU/L)	TBIL(mmol/L)	DBIL(mmol/L)
对照组	4	40.7 ± 5.6	64 ± 4.9	62 ± 4.3	9.8 ± 0.9	4.7 ± 1.4
模型组	4	393.2 ± 47	466.7 ± 72.8*	603.5 ± 166.7*	19.8 ± 2.7*	9.6 ± 2.1

注:与对照组相比,*P<0.001

表 2 术后 2 周小鼠胆总管结扎致肝纤维化模型血清学指标变化

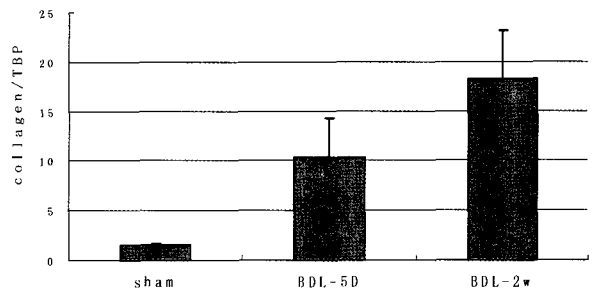
	n	ALT(IU/L)	AST(IU/L)	ALP(IU/L)	TBIL(mmol/L)	DBIL(mmol/L)
对照组	4	28.5 ± 1.9	49 ± 3.5	44.7 ± 3.4	12.7 ± 3.4	4.3 ± 1.1
模型组	4	656.8 ± 422*	985.6 ± 630*	2339 ± 564*	24.8 ± 3.8*	18.4 ± 3.8*

注:与对照组相比,*P<0.001



(模型组术后 5d 和 2 周, 其 α-SMA mRNA 表达明显高于对照组,P<0.01)

图 6a 实时荧光定量 PCR 分析 α-SMA 结果



(模型组术后 5d 和 2 周,其 Collagen-1 mRNA 表达明显高于对照组,P<0.01)

图 6b 实时荧光定量 PCR 分析 Collagen-1 结果



图 7 假手术组天狼猩红染色(20×)

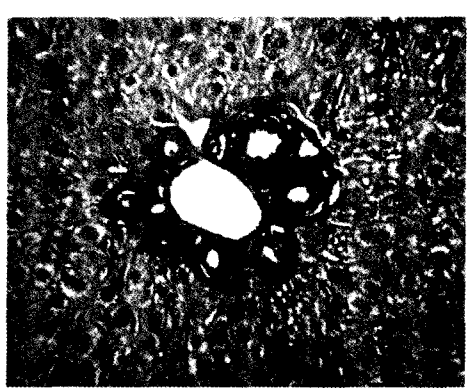


图 8 结扎术后 2 周天狼猩红染色显示中央静脉周围有大量的胶原纤维束(20×)

我国是慢性肝炎大国,肝纤维化是多种慢性肝病的共同反应,因此加强对肝纤维化基础与临床的研究具有重要的学术价值。其中模拟体内肝纤维化发生的动物模型的建立显得非常关键。可供选择的实验动物模型很多,可根据研究目的的不同而选择相应的动物模型[3]。本研究是采用小鼠胆总管结扎造成肝外胆道梗阻而引起肝纤维化。

胆总管结扎致肝纤维化的动物模型具有造模过程中炎性反应轻、胆总管增生明显、肝纤维化形成快等特点[4,5]。本实验中 HE 染色结果显示小鼠胆总管结扎后 2 周肝小叶汇管区范围明显增大,中央静脉周围有炎性细胞侵润,胆小管明显增生;同时我们选用胆总管上皮细胞特异性标志—细胞角蛋白 19(CK-19),免疫组织化学染色显示,小鼠胆总

维普资讯 http://www.cqvip.com

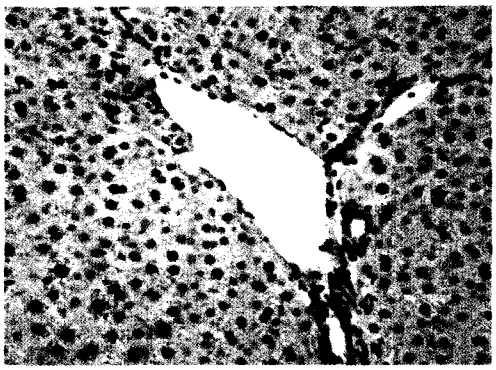


图 9 假手术组 α-SMA 免疫组化染色（20×）

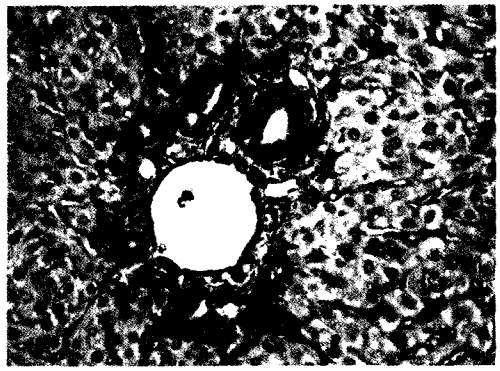


图 10 结扎术后 2 周免疫组化染色可见 α-SMA 阳性的棕褐色细胞明显增多（20×）

管结扎后 2 周出现明显的胆总管上皮细胞增生，而且反应肝脏功能的主要生化指标血清 ALT、AST、ALP、TBIL 以及 DBIL 在胆总管结扎后 5d 和 2 周明显增高，提示胆总管结扎后已经引起小鼠肝性炎性反应、胆总管细胞明显增生、肝脏受损等病理表现。在本实验过程中胆总管结扎组共有 2 只小鼠死亡（共 18 只），死亡率约为 11.1%。

肝纤维化的形成主要是由于肝星型细胞的活化并表达Ⅰ型胶原（Collagen Ⅰ）和 α－平滑肌肌动蛋白（α－ SMA）等细胞外基质[6]。实时荧光定量 PCR 分析显示胆总管结扎后 5d 和 2 周肝组织的 Collagen Ⅰ和 α－ SMA mRNA 表达明显增强；天狼猩红染色显示，小鼠胆总管结扎后 2 周，肝小叶中央静脉周围纤维化，可见大量的胶原纤维束；同时抗 α-SMA mAb 免疫组织化学染色显示，小鼠胆总管结扎后 2 周，可见 α-SMA 阳性细胞明显增多，提示成纤维细胞大量增生。

本研究从血清学、形态学以及组织病理学的角度证实，我们采用小鼠胆总管结扎造成肝外胆道梗阻，成功构建了肝纤维化模型，该模型简便易行，操作者容易掌握，实验指标稳定，是一个较为理想的肝纤维化模型，为今后深入研究肝纤维化的发生机制奠定了关键的实验基础。

参 考 文 献

[1] Iredale JP. Models of liver fibrosis:exploring the dynamic nature of inflammation and repair in a solid organ[J]. J Clin Invest,2007;117(3):539-548.

[2] Weiler-Normann C,herkel J,Lohse AW. Mouse models of liver fibrosis[J]. Z Gastroenterol,2007;45(1):43-50.

[3] Gutierrez-Ruiz MC,Gomez-Quiroz LE.Liver fibrosis:searching for cell model answers[J]. Liver Int,2007;27(4):434-439.

[4] Rodriguez-Garay EA. Cholestasis:human disease and experimental animal models[J]. Ann Hepatol,2003;2(4):150-158.

[5] Kinnman N,Housset C. Peribiliary myofibroblasts in biliary type liver fibrosis[J]. Front Biosci,2002;7(2):d496-503.

[6] Ali C, Maria EG,Hajime H,et al. Cathepsin B inactivation attenuates hepatic injury and fibrosis during cholestasis[J]. J Clin Invest,2003;112(2):152-159.

（责任编辑：冉明会）