

慢性肝损伤兔胆石症动物模型的构建^①

王兵^{1,2}, 秦军^{3②}, 俞渊⁴, 吕震^{1,2}, 李辉^{1,2}, 金萌^{1,2}, 王宇², 唐乾利²

(1. 广西中医药大学, 广西 南宁 530001;

2. 右江民族医学院, 广西 百色 533000;

3. 右江民族医学院附属玉林医院, 广西玉林市红十字会医院, 广西 玉林 537000;

4. 广西中医药大学第一附属医院, 广西 南宁 530023)

摘要: **目的** 构建稳定、可行、可重复的兔慢性肝损伤胆石症模型。**方法** 将 90 只新西兰大白兔随机分为空白对照组、肝纤维化组、肝纤维化胆石症组、肝硬化组和肝硬化胆石症组, 空白对照组 10 只, 其余各组各 20 只。空白对照组正常饮食, 肝纤维化组、肝纤维化胆石症组予 20% 的 CCl₄-橄榄油溶液 0.2 ml/kg 腹腔注射, 肝硬化组、肝硬化胆石症组予 25% 的 CCl₄-橄榄油溶液 0.3 ml/kg 腹腔注射, 每 4 d 1 次, 连续 12 周, 进行肝组织病理学检查及 Masson 染色, 计算结石形成率。**结果** 肝纤维化组、肝硬化组、肝纤维化胆石症组和肝硬化胆石症组结石形成率分别为 5%、10%、70%、70%, 空白对照组、肝纤维化组与肝纤维化胆石症组成石率的三组间比较差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 25.476, P < 0.001$), 两两比较结果显示, 空白对照组、肝纤维化组与肝纤维化胆石症组的比较差异均具有统计学意义 ($P_1 < 0.001; P_2 < 0.001$); 空白对照组、肝硬化组与肝硬化胆石症组成石率的三组间比较差异具有统计学意义 ($\chi^2 = 22.426, P < 0.001$), 两两比较结果显示, 空白对照组、肝硬化组与肝硬化胆石症组的比较差异均具有统计学意义 ($P_1 < 0.001; P_2 < 0.001$)。结石主要为胆固醇结石, HE 染色光镜下可见肝小叶结构遭到破坏, 肝细胞肿大; Masson 染色见纤维组织增多并变为蓝色, 尤其在肝小叶汇管区较为明显, 可见假小叶。**结论** 通过用 CCl₄ 和高胆固醇、高热量致石饲料, 能成功构建稳定、可行的兔慢性肝损伤胆石症模型, 为慢性肝损伤兔胆石症实验动物模型的构建提供一定的借鉴和指导意义。

关键词: 肝损伤, 慢性; 胆结石; 模型, 动物; 致石饲料

中图分类号: R-332

文献标识码: A

文章编号: 1001-5817(2015)02-0171-04

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2015.02.001

Establishment of rabbit cholelithiasis models caused by chronic liver injures

Wang Bing^{1,2}, Qin Jun³, Yu Yuan⁴, Lv Zhen^{1,2}, Li Hui^{1,2},

Jin Meng^{1,2}, Wang Yu², Tang Qianli²

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530001, Guangxi, China;

2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China;

3. Yulin Red Cross Hospital, the Affiliated Yulin Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Yulin 537000, Guangxi, China; 4. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, Guangxi, China)

Abstract: **Objective** To establish a stable, feasible and repetitive rabbit cholelithiasis model induced by chronic liver injury. **Methods** Ninety New Zealand white rabbits were randomly divided into 5 groups: a blank control group ($n = 10$), a liver fibrosis group ($n = 20$), liver fibrosis cholelithiasis group ($n = 20$), a liver cirrhosis group ($n = 20$) and a liver cirrhosis cholelithiasis group ($n = 20$). Among these groups, the rabbits in the blank control group was fed with normal diet, however, the rabbits of the liver fibrosis group and the liver fibrosis cholelithiasis group received 20% CCl₄-olive oil solution by intraperitoneal injection of 0.2 ml/kg, and the rabbits of the liver cirrhosis group and the liver cirrhosis cholelithiasis group received 25% CCl₄-olive oil solution by intraperitoneal injection of 0.3 ml/kg, once every 4 days for 12 weeks consecutively; then the formation rate of stone was calculated and the liver tissue histopathology examination and Masson staining were performed. **Results** The stone formation rates of the liver fibrosis group, of the liver cirrhosis group, of the liver fibrosis cholelithiasis group, and the liver cirrhosis cholelithiasis group was 5%, 10%, 70% and

① 基金项目: 2014 年广西科学研究与技术开发计划项目(桂科能 14123006-3)

② 通讯作者, E-mail: 13877587717@163.com

70%, respectively. Tri-group comparison of stone formation rate among the blank control group, the liver fibrosis group and the liver fibrosis cholelithiasis group yielded statistically difference ($\chi^2 = 25.476, P < 0.001$). Group-paired comparison of stone formation rate among the blank control group, the liver fibrosis group and the liver fibrosis cholelithiasis group yielded statistically difference ($P_1 < 0.001, P_2 < 0.001$); tri-group comparison of stone formation rate among the blank control group, the liver cirrhosis group and the liver cirrhosis cholelithiasis group yielded statistically difference ($\chi^2 = 22.426, P < 0.001$), group-paired comparison of stone formation rate among the blank control group, the liver cirrhosis group and the liver cirrhosis cholelithiasis group yielded statistically difference ($P_1 < 0.001, P_2 < 0.001$). The results mainly presented as cholesterol stones, the structure of visible hepatic lobule by HE staining was destroyed, swelling liver cell; Masson staining showed that fibrous tissues increased and became blue, especially in the liver portal area, and the visible false lobule. **Conclusion** Use of CCl_4 combined the high cholesterol and lithogenic diet with high quantity of heat can build a stable, feasible, repetitive cholelithiasis rabbit model caused by chronic liver injury, which will provide reference and guidance for constructing experimental animal cholelithiasis models in rabbits with chronic liver injury.

Key words: liver injury, chronic; cholelithiasis; models, animal; lithogenic diet

胆石症(cholelithiasis)是指发生在胆囊和胆道系统的结石,常与胆道感染并存,互为因果,是临床常见病、多发病,已严重影响人们的生活、工作^[1]。近年来在我国慢性肝病、肝硬化患者越来越多,成为胆囊疾病的好发因素之一,尤其是结石。目前已知胆石症的发生与饮食、环境、细菌感染、饮食等多种因素相关,但具体的发病机制至今尚未明确。利用动物模型进行胆石症的发病机制研究,已被证明是一种有效的研究方法。而关于慢性肝损伤性胆石症模型的研究国内外罕见,前期研究通过兔胆石症模型的构建,可以重建临床胆石症模型,进而进行相关发病机制研究,因而本次实验在前期研究基础上拟通过用 CCl_4 和高胆固醇、高热量致石饲料,建立慢性肝损伤兔胆石症模型,摸索出一条稳定、重复、可行的慢性肝损伤胆石症模型的构建方法。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组造模方法 选取雄性新西兰大白兔 90 只,4 月龄,体重为 2.5 kg 左右,单笼饲养,保持室内温度在 20~24 °C,湿度控制在 42%~60%,适应性喂养 7 d 后进行实验,按照随机对照原则,将 90 只新西兰大白兔随机分为 5 组:即空白对照组、肝纤维化组、肝纤维化胆石症组、肝硬化组和肝硬化胆石症组,空白对照组 10 只,其余各组各 20 只。各组间体重比较经方差分析,差异无统计学意义($P > 0.05$),组间可比性良好。

1.2 造模方法 肝纤维化组、肝纤维化胆石症组予 20%的 CCl_4 -橄榄油溶液 0.2 ml/kg 腹腔注射,肝硬化组、肝硬化胆石症组予 25%的 CCl_4 -橄榄油溶液 0.3 ml/kg 腹腔注射,每 4 d 1 次,连续 12 周;同时肝纤维化胆石症组、肝硬化胆石症组投以高胆固醇、高热量致石饲料(普通饲料加入 1.2%胆固醇、0.1%胆酸、5%蔗糖、1 个鸡蛋及 3.5%鱼肝油),正常饮水。空白对照组正常饮食,不予任何处理。

1.3 模型成功标准 造模过程中死亡的实验兔立即

取肝脏行病理学检查。饲养 12 周后麻醉处死,解剖后取肝组织行病理学检查及 Masson 染色,同时摘除胆囊,寻找结石。计算各组实验兔的死亡率、结石率。计算公式为:死亡率=(原始例数-剩余例数)/原始例数 $\times 100\%$,结石率=成石例数/原始例数 $\times 100\%$ 。模型成功标准:病理学检查发现肝脏纤维间隔形成,结构紊乱,或假小叶形成,小叶内中央静脉缺如,细胞排列紊乱,部分细胞水肿,局部气球样变,小胆管增生,伴有淋巴细胞浸润;肝纤维化胆石症组、肝硬化胆石症组解剖后发现结石形成,主要为胆固醇结石,色黑、形状不规则,或是呈泥沙样散布在胆囊壁或底部;Masson 染色中蓝色代表纤维组织,肝纤维化或肝硬化时会明显增多。

1.4 统计学方法 采用 SPSS 18.0 统计软件进行数据分析,计数资料的两组间比较采用四格表 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,三组或三组以上的组间比较采用 $R \times C$ 表的 χ^2 检验或 Fisher 确切概率法,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义;多组间的两两比较采用 Bonferroni 法调整检验水准,三组间两两比较的检验水准调整为 0.0167。

2 实验结果

2.1 各组实验兔死亡率、结石率比较 各组的死亡率相比差异无统计学意义($P = 0.472 > 0.05$),空白对照组、肝纤维化组与肝纤维化胆石症组成石率的三组间比较差异具有统计学意义($\chi^2 = 25.476, P < 0.001$),两两比较结果显示,空白对照组与肝纤维化组的组间比较差异无统计学意义($P = 1.000$),空白对照组、肝纤维化组与肝纤维化胆石症组的比较差异均具有统计学意义($P_1 < 0.001; P_2 < 0.001$);空白对照组、肝硬化组与肝硬化胆石症组成石率的三组间比较差异具有统计学意义($\chi^2 = 22.426, P < 0.001$),两两比较结果显示,空白对照组与肝硬化组的组间比较差异无统计学意义($P = 1.000$),空白对照组、肝硬化组与肝硬化胆石症组的比较差异均具有统计学意义

($P_1 < 0.001$; $P_2 < 0.001$), 见表 1。提示肝纤维化胆结石模型、肝硬化胆结石模型造模成功。

表 1 各组死亡率、结石率

组别	n	存活例数	成石例数	死亡率 (%)	成石率 (%)
空白对照组	20	10	0	0	0
肝纤维化组	20	18	1	10.00	5.00
肝硬化组	20	17	2	15.00	10.00
肝纤维化胆结石组	20	16	14	20.00	70.00
肝硬化胆结石组	20	15	14	25.00	70.00

2.2 各组结石形成图片 形成的结石主要为胆固醇

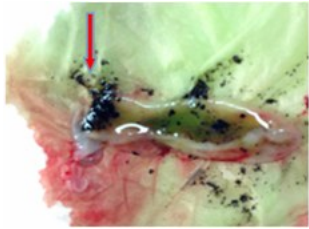


图 1 泥沙样结石

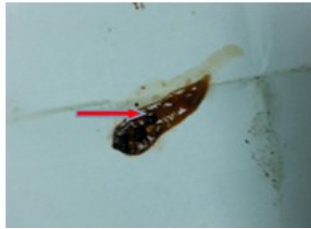


图 2 球形状结石

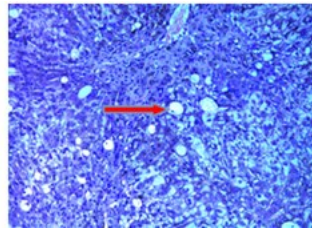


图 3 肝细胞气球样变形 100×

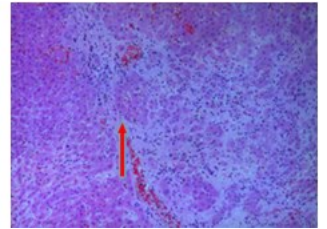


图 4 肝小叶纤维间隔 40×

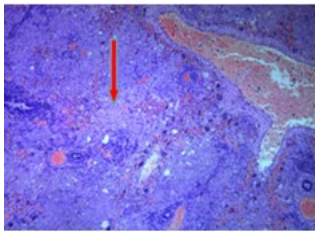


图 5 肝组织变性坏死 40×

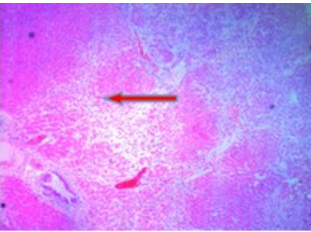


图 6 假小叶形成 40×

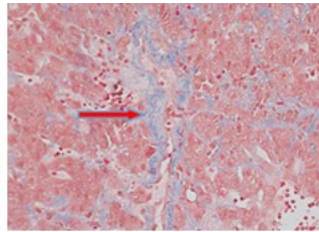


图 7 纤维明显增多 200×

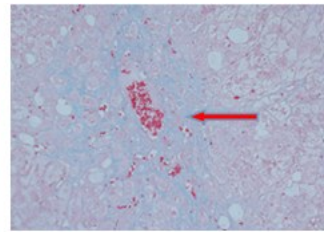


图 8 肝小叶汇管区 200×

3 讨论

3.1 慢性肝损伤兔胆结石模型造模方法的优势

3.1.1 操作简单, 成功率高 刘亚楠等^[2]采用的纳米细菌致石饲料造模操作较为复杂, 技术要求偏高, 大大增加实验的工作量, 成石率在 75% 左右; 也有研究通过将人胆囊结石或兔胆囊结石植入到正常实验兔胆囊内进行结石造模, 该方法受影响因素较多, 成石率及模型稳定性较低, 我们采用的高胆固醇、高热量致石饲料仅按配方将饲料搅拌均匀, 在腹腔注射橄榄油- CCl_4 的同时喂食实验动物即可, 无需其他特殊处理。一般进食高胆固醇后, 由于肝细胞受体活性下降, 经此途径摄取胆固醇以合成胆汁酸相应减少, 使胆汁中胆固醇呈过饱和, 易于结晶成石。

3.1.2 安全可行, 死亡率低 早期许多研究已经证实 CCl_4 可严重损伤或破坏肝结构及功能, 并广泛用于慢性肝损伤动物模型的构建。有些研究仅仅用 CCl_4 , 部分同时联合乙醇, 采用不同的剂量、浓度及注射方式, 张海燕等^[3]采用 20%~50% 不同浓度 CCl_4 溶液在 $1.5 \text{ ml} \cdot \text{kg}^{-1}$ 体重剂量下腹腔注射诱导典型的大鼠肝损

伤模型, 且随剂量的增加肝损伤程度加重。该法病变稳定, 操作简便, 但是死亡率偏高。翟亚南等^[4]采用 30 mg/ml D-氨基半乳糖和 $2 \mu\text{g/ml}$ 脂多糖混合溶液, 腹腔注射, 每 2 d 1 次, 连续 8 周, 进行小鼠肝损伤造模。本方法安全可靠, 且 D-氨基半乳糖毒性小, 使用方便, 对兔效果欠佳。另外, 通过 10% CCl_4 -花生油 $0.1 \text{ ml}/10 \text{ g}$ 灌胃建立小鼠慢性肝损伤模型, 实验动物存活率高, 模型稳定性较低。慢性肝损伤在结石形成中具有重要作用, 且成石率及结石性质与慢性肝损伤的严重程度和性质有关^[5-6]。我们在建模的时候严格控制橄榄油- CCl_4 的浓度, 最高不超过 25%, 每隔 3 d 1 次, 连续用药 12 周, 这样可有效减少实验动物的死亡率, 提高模型成功率。

2.3 病理 HE 染色及 Mosson 染色结果 除空白对照组外, 其余各组实验兔都存在不同程度肝损伤, HE 染色后光镜下可见肝小叶结构遭到破坏, 细胞排列稍紊乱, 肝血窦间隙增大, 肝细胞肿大并出现气球样变, 炎性细胞浸润及纤维组织增多, 部分见假小叶形成, 部分区域呈点状、片状坏死, 少许形成桥接坏死(见图 3~6)。Mosson 染色后见纤维组织增多并变为蓝色, 尤其在肝小叶汇管区较为明显, 个别可见到假小叶, 提示造模成功(见图 7~8)。

3.1.3 配方合理, 重复性高 任何结石的形成都会经历“致石性胆汁”的生成、结晶体析出、沉淀等三个不同阶段, 并贯穿整个过程的始终。也就是说, 胆道系统结石形成的根本原因在于致石性胆汁的合成分泌。高胆固醇膳食可增加实验动物的血清、胆固醇及甘油三酯水平, 促使胆汁中胆固醇增加、成石性胆汁形成。仅仅高胆固醇致石饲料造模操作较本法简单方便, 然造模

成功率偏低、重复性欠佳。我们通过前期造模实验,配方在高胆固醇的基础上增加了胆酸,促进胆固醇吸收,同时又辅以蔗糖、鸡蛋等增加热能量,鱼肝油刺激肝脏胆囊,促进胆汁成分改变,形成致石性胆汁,从而导致结石。

3.1.4 干扰较小,结果可靠 王成友等^[7]研究中发现胆囊结石患者中存在雌激素与脂类代谢紊乱,分别给予不同性激素注射,结果雌二醇 E2 组 90% 成石;绒毛膜促性腺激素组雌性兔 100% 成石,雄性兔无结石形成。通过它相应的受体增加提高胆囊胆固醇结石的易感性,增加胆囊结石发病率。该方法受性别影响偏大,成石率较高,方法简单。因此,我们在基础研究中采用雄性大白兔作为实验动物,减少了雌激素的干扰,增加了结果的客观性、可靠性。

3.2 基于慢性肝损伤兔胆石症模型造模方法的实验技巧及经验

3.2.1 动物选择原则 建立实验动物模型的目的是通过外因干预复制出与该疾病相同或相似的病或症的动物模型,为保证实验结果的科学性及重复性,必须选择标准化并与实验目的相适应的实验动物^[8]。动物模型的选择原则如下:第一,能够正确复制研究所需要的损伤或病变;第二,实验重复性好,可被他人重复;第三,可多次或者使用多种方式进行实验;第四,实验中可获取数量较多的活检标本;第五,操作简单,并与动物实验设备相适应;第六,实验观察时间充裕。而本实验在胆石病模型的构建中选择了新西兰大白兔,主要由于雄性大白兔生命力和适应性能力较强,也可以减少雌性激素造成的影响,能够客观、真实地反映与评价实验结果;且大鼠的解剖特点缺少胆囊,小鼠的胆囊过小,无法进行胆囊结石动物模型的构建及研究。

3.2.2 造模过程中需要注意的问题 在造模过程中,我们发现以下几个问题需要注意:①橄榄油与 CCl₄ 混合浓度不宜过高(建议 20%~40%),过高易致动物出现急性中毒性肝损伤死亡,影响实验进程及统计分析,过低则会导致造模失败;②每次腹腔注射橄榄油—CCl₄ 前需禁食,注射时采取头低臀高位,使腹腔脏器向上移动,减少刺破肠管的概率及死亡率;③大白兔选择中需要排除病理改变存在的可能性,如果条件允许,实验兔尽量选择雄性大白兔,避免雌激素在造模过程中的影响;④所有实验兔最好单笼饲养,以避免妊娠或斗殴致死;⑤定期补充维生素(青菜叶或新鲜胡萝卜),减少实验兔的死亡率;⑥高胆固醇、高热量致石饲料配方中胆酸气味偏重,在具体操作过程中可酌情调整剂量;⑦实验兔在光照充足,温度适宜的环境下较为温顺,进食量较大,易形成结石,且极少出现螨虫或发生褪毛、

嗜睡、出血等不良现象,螨虫具有传染性,应注意预防;⑧保持室内温度在 20~24℃,湿度控制在 42%~60%,这样的环境湿度有利于结石的形成^[9]。

目前国内外研究慢性肝损伤与胆石症的较多,但大都以鼠类为主,主要考虑鼠的生命力顽强,操作简单,然生理解剖使得其很难完好地复制慢性肝损伤胆石症模型,不能满足临床研究的需要。前期研究发现高胆固醇、高热量致石饲料对兔胆石症模型的构建有独特的优势,具有操作简单、切实可行、重复性好、成石率高、死亡率低等特点^[10-11],我们在此基础上构建稳定、可行、重复的慢性肝损伤兔胆石症模型,丰富了实验动物模型构建的理论,为临床慢性肝损伤与胆石病相关发病机制的研究奠定基础,并对胆石症动物模型的构建提供借鉴意义和发挥一定的指导作用。

参考文献:

- [1] Coban G, Yildirim E, Gokturk S, et al. Body mass index, cholecystitis, cholelithiasis, pancreatitis and imaging of common bile duct stones [J]. Am J Med Sci, 2014, 347 (5): 364-369.
- [2] 刘亚楠, 张国彬, 马立人. 纳米细菌致兔胆囊结石的研究 [J]. 华北煤炭医学院学报, 2011, 13(4): 461-463.
- [3] 张海燕, 温韬, 卢静, 等. 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, 224.
- [4] 翟亚南, 王晶晶, 李梦, 等. 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 [J]. 中国比较医学杂志, 2014, 24(5): 62-65.
- [5] Migita M, Kumasa S, Matsumoto T, et al. Cholelithiasis in a patient with type 2 Gaucher disease [J]. J Nippon Med Sch, 2014, 81(1): 40-42.
- [6] 俞渊, 唐乾利, 赫军, 等. 慢性肝损伤家兔胆石症模型制作及成石因素研究 [J]. 中国医药导报, 2007, 4(34): 106-108, 161.
- [7] 王成友, 张敏杰, 倪勇. 性激素诱发兔胆囊结石的实验研究 [J]. 华中医杂志, 2000, 24(1): 23-24.
- [8] 刘志刚, 柴程芝, 黄煌, 等. 病证结合方证动物模型构建思路的探索 [J]. 中华中医药杂志, 2012, 27(8): 2123-2125.
- [9] 唐乾利, 黄欣, 俞渊, 等. 环境湿度对兔胆石症模型建造的影响 [J]. 右江民族医学院学报, 2013, 35(6): 749-751.
- [10] 俞渊, 唐乾利, 黄欣, 等. 大黄灵仙胶囊防治兔胆石病的代谢组学超微病理研究 [J]. 中华中医药杂志, 2013, 28 (11): 3359-3362.
- [11] 唐乾利, 俞渊, 黄名威, 等. 大黄灵仙胶囊对慢性肝损伤后胆结石形成的干预作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2009, 20(11): 2661-2664.

收稿日期: 2015-04-22