

自发性肝硬化比格犬肝脏病理形态学研究

胡建廷, 邱波, 英永, 屈卉锦, 王凤乾, 张鑫

(山东省药学院、山东省化学药物重点实验室, 济南 250101)

【摘要】 目的 研究自发性肝硬化比格犬肝脏的病理形态学改变和血清生化改变,以建立适用于GLP的实验动物背景资料。方法 下肢静脉采血制备血清,全自动生化分析仪测ALT、AST、TP、ALB、ALP、TBIL、TC、TG、GGT等肝功能指标,比较患病动物与同期空白对照组动物上述指标的差异;对比格犬肝脏进行组织病理学检查,光学显微镜下描述其病理形态学特点。结果 与同期空白对照组动物相比,患病动物ALT、AST、ALP、TBIL、GGT显著升高,ALB显著降低;与正常组织相比,肝硬化的肝细胞呈结节状再生、排列紊乱,形成数量不等的假小叶,假小叶周围被增生的胶原纤维所包裹。结论 需加强比格犬自发病变的病理监测,为药物安全性评价提供实验动物的背景资料。

【关键词】 比格犬;肝硬化;病理形态学

【中图分类号】 R-332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2016)12-0055-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2016.12.011

Study on pathomorphological changes of the liver in Beagle Dog with spontaneous hepatocirrhosis

HU Jian-ting, QIU Bo, YING Yong, QU Hui-jin, WANG Feng-qian, ZHANG Xin

(Shandong Pharmaceutical Academy, Shandong Provincial Key Laboratory Of Chemical Drug, Shandong Jinan 250101, China)

【Abstract】 Objective To study the liver pathomorphological and serum biochemical changes in Beagle dog with spontaneous hepatocirrhosis and establish the background information of experimental animals for GLP. Methods The ALT, AST, TP, ALB, ALP, TBIL, TC, TG and GGT were detected using an automatic biochemical analyzer, and compared the differences of above index between blank control and diseased animal. The histological changes of the liver were observed by optical microscopy. Results Compared with the blank control, the ALT, AST, ALP, TBIL and GGT of diseased dogs were increased significantly, and the ALB decreased significantly. Compared with normal dogs, the liver cells had nodular regeneration, arranged irregularly and pseudolobule formation. The pseudolobules were packaged with collagen fibers. Conclusion It is suggested that spontaneous lesions in Beagle dogs should be monitored so as to provide appropriate experimental animal histopathological background information for drug safety evaluation.

【Key words】 Beagle dog; Hepatocirrhosis; Pathomorphology

在重复给药毒性试验研究中,比格犬是常用的非啮齿类实验动物。关于比格犬的自发性病变,此前国内外学者也进行了相关研究了^[1-3],但未见有

比格犬自发性肝硬化的文献报道。本文以药物非临床安全性评价研究中空白对照组出现的一例肝硬化比格犬为研究对象,探讨其肝脏生化指标的改

[基金项目] 2014年省自主创新及成果转化专项计划(2014ZZCX02104)。

[通讯作者] 胡建廷(1979-),男,副主任药师,研究方向:毒性病理, E-mail: jiantinghu@163.com。

变和肝脏病理形态学改变,以期为药物非临床安全性评价提供重要的病理学背景资料。

1 材料和方法

1.1 实验动物与饲养环境

普通级比格犬,购自北京玛斯生物技术有限公司【SCXK(京)2011-0003】。动物饲养于本中心屏障环境(普通级)动物房【SYXK(鲁)2010-0004】。

试验开始时所有动物体重、摄食量及生化指标均无明显差异。解剖前 35 d,患病动物开始出现消瘦、体重减轻、皮肤粘膜轻度黄染等体征。患病动物为雌性,解剖时体重 10 kg,24 月龄。

1.2 仪器与试剂

日立 7180 全自动生化分析仪,由日立公司生产;樱花 VIP6 全自动脱水机、全自动染色封片机等病理设备均由樱花医疗株式会社生产。

肝功能生化检测试剂盒均由宁波瑞源生物科技有限公司生产;Masson 三色染色试剂盒由 Sigma 公司生产,产品批号:SLBK9565V;网状纤维染色试剂盒由北京索莱宝科技有限公司生产,产品批号:20160512。

1.3 方法

1.3.1 血清制备及肝生化指标检测:下肢静脉采血 2~3 mL 置促凝管中静置 30 min,3500 r/min 离心 10 min 制备血清。全自动生化分析仪测定 ALT、AST、TP、ALB、ALP、TBIL、TC、TG、GGT 等肝功能指标,比较患病动物与同期空白对照组动物上述指标的差异。

1.3.2 动物剖检:剖检前动物隔夜禁食不禁水。戊巴比妥钠麻醉,颈动脉放血处死。打开腹腔,观察

患病动物腹腔内有无腹水、腹水的颜色和腹水量;肉眼观察肝脏形态学改变。肝脏经粗切后放入中性甲醛溶液中固定。

1.3.3 组织病理学检查:对肝组织进行常规取材、脱水、包埋、石蜡切片,根据说明书步骤进行 HE 染色、网状纤维染色^[4]和 Masson 染色^[5],光学显微镜下观察患病动物肝脏病理形态学改变。

2 结果

2.1 生化指标的改变

与同期空白对照组动物相比,患病动物 ALT、AST、ALP、TBIL、GGT 显著升高,ALB 显著降低,升高或降低幅度为同期空白对照组 2~5 倍不等;与同期空白对照组动物相比,患病动物 TP、TC、TG 未见明显变化(表 1)。

2.2 肉眼形态学观察

患病动物腹腔内可见淡黄色腹水,腹水量约 50 mL;患病动物肝脏形状不规则、质地变硬,表面可见大小不一的颗粒状结节和黄色坏死灶突出于肝脏表面(图 1)。

2.3 组织病理学检查

HE 染色显示患病动物肝脏肝细胞呈弥漫性变性、坏死伴结节状再生;再生的肝细胞排列紊乱,形成数量不等的假小叶,假小叶内中央静脉缺如或偏位;肝内胆汁淤积(图 2、图 3)。

Masson 染色显示形成的假小叶被蓝染的增生的胶原纤维分割、包裹;肝脏汇管区胶原纤维增生(图 4、图 5)。

网状纤维染色显示肝细胞坏死区域和假小叶周围未见黑色网状纤维塌陷或沉积,仅见棕黄色胶原纤维增生(图 6)。

表 1 比格犬血清生化值改变

Tab.1 Changes of serum biochemistry values in the Beagle dogs

项目 Items	单位 Unit	血清生化值 Serum biochemistry values	
		患病动物生化值 Biochemistry values of diseased animal	同期对照生化值 Biochemistry values of concurrent control animals
丙氨酸氨基转移酶(ALT)	U/L	153.25	26.79 ± 5.21
天门冬氨酸氨基转移酶(AST)	U/L	105.20	30.62 ± 3.40
碱性磷酸酶(ALP)	U/L	351.37	104.23 ± 39.09
总蛋白(TP)	g/L	49.25	55.91 ± 3.30
白蛋白(ALB)	g/L	15.10	27.50 ± 1.49
γ-谷氨酰氨基转移酶(GGT)	U/L	9.33	3.55 ± 1.32
总胆红素(TBIL)	μmol/L	2.62	0.88 ± 0.28
甘油三酯(TG)	mmol/L	0.61	0.60 ± 0.11
总胆固醇(TC)	mmol/L	3.82	3.76 ± 0.62

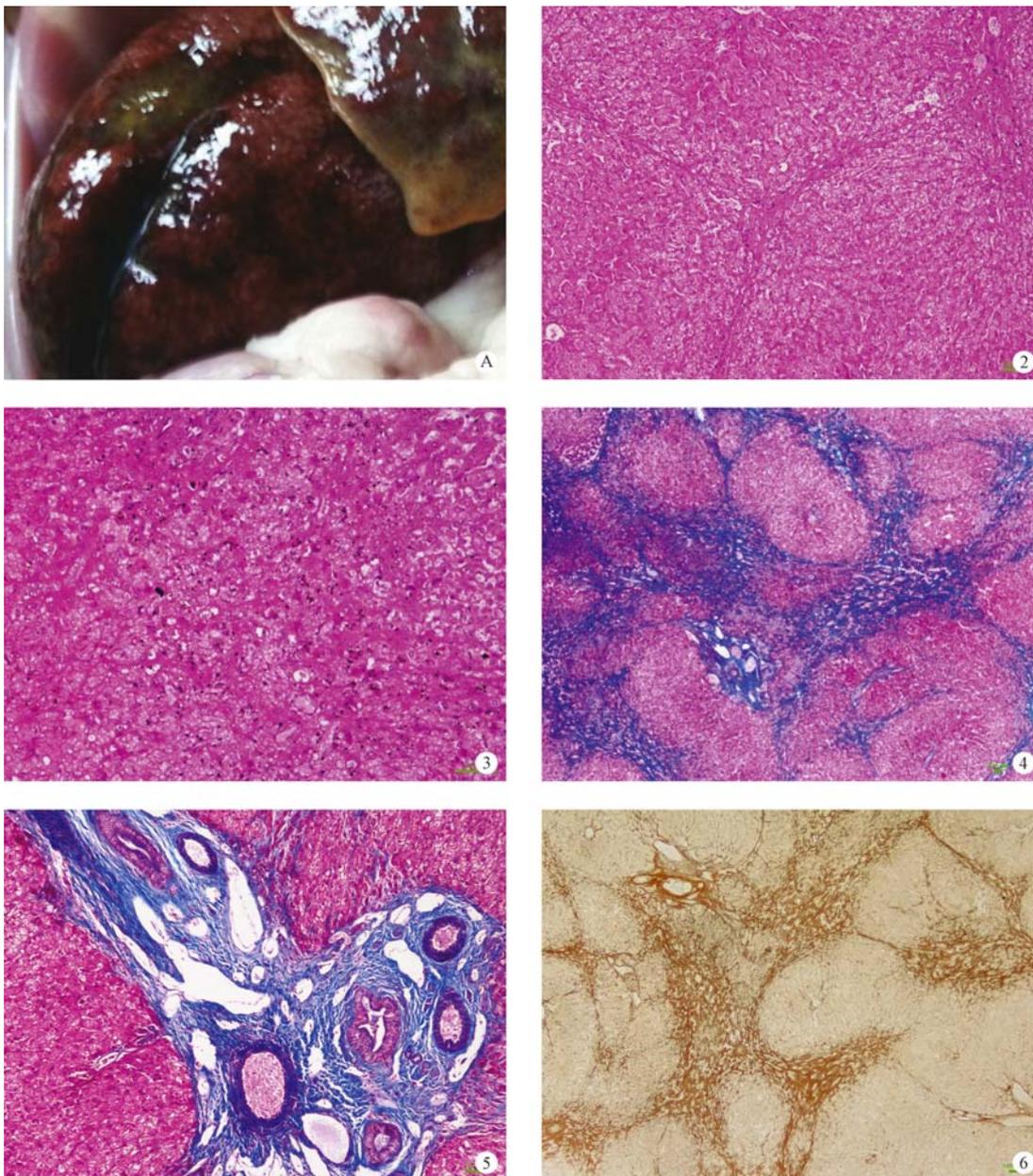


图 1 肝脏表面形状不规则、质地变硬,表面可见大小不一的颗粒状结节和黄色坏死灶。

图 2 肝细胞变性、坏死、结节状再生。再生肝细胞排列紊乱,形成假小叶。假小叶中央静脉缺如或偏位(HE,标尺 = 100μm, 100 ×)。

图 3 肝细胞广泛坏死、胆汁淤积(HE,标尺 = 100μm,200 ×)。

图 4 肝细胞结节状再生。再生肝细胞排列紊乱,形成假小叶,假小叶中央静脉缺如或偏位。假小叶被蓝染的胶原纤维分割、包裹 (Masson ,标尺 = 100μm,40 ×)。

图 5 汇管区胶原纤维增生(Masson ,标尺 = 100μm,100 ×)。

图 6 假小叶被棕黄色的胶原纤维分割、包裹;肝细胞坏死区和假小叶周围未见黑色网状纤维沉积(网状纤维染色,标尺 = 100μm,40 ×)。

Fig.1 The liver has irregular surface and hard constance, granular nodules and necrotic foci can be seen on the liver surface.

Fig.2 Liver cellsdegeneration,necrosis and nodular regeneration. Disarranged regenerative hepatocytes and pseudolobule formation. Central vein is absent in some pseudolobules. (HE, Bar = 100μm ,100 ×).

Fig.3 Necrosis of hepatocytes and cholestasis(HE, Bar = 100μm ,200 ×)

Fig.4 Disarranged regenerative hepatocytes and formation of hepatic pseudolobules. Extensive deposits of collagen fibers in the pseudonodules. The central vein is absent in some pseudolobules. (Masson, Bar = 100μm , 40 ×).

Fig.5 Hyperplasia of collagen fibers in the pirtal area. (Masson, Bar = 100μm ,10 ×)

Fig.6 The pseudolobules were surrounded and separated by bundles of brown colored collagen fibers. No black colored reticular fibers were seen. (Reticular fiber Bar = 100μm ,40 ×)

3 讨论

重复给药毒性试验中,肝脏是常见的毒性靶器官。为了对药物相关性肝病和自发性病变进行正确鉴别,需加强对实验动物自发性肝脏病变的研究。因此,本试验系统描述了自发性肝硬化比格犬肝脏肉眼形态学、组织病理学变化特征以及血清生化指标改变。

肉眼形态学观察结果显示患病动物腹腔内出现约 50 mL 淡黄色腹水;病变肝脏形状不规则、质地变硬,表面可见大小不一的颗粒状结节突出于肝脏表面。组织病理学检查结果显示患病肝脏肝细胞呈弥漫性变性、坏死伴结节状再生,再生的肝细胞排列紊乱,形成数量不等的假小叶,假小叶被增生的胶原纤维所分割、包裹,假小叶内中央静脉缺如或偏位。肝脏汇管区胶原纤维增生,肝内胆汁淤积。上述结果提示,患病动物出现的肝脏病变为结节性肝硬化。结节性肝硬化可通过网状纤维染色与亚急性肝衰竭进行鉴别诊断,亚急性肝衰竭时肝细胞坏死区域和假小叶周围可见网状纤维塌陷或沉积^[6]。

生化检测结果显示肝硬化动物 ALT、AST、ALP、TBIL、GGT 显著升高,ALB 显著降低。试验中指标升高的意义与病理学检查结果相一致,如 ALT、AST 显著升高提示了肝细胞存在广泛的变性、坏死。生化检测结果同时也解释了肝硬化动物出现的一些特殊体征,如动物出现明显腹水是由于肝脏合成蛋白能力下降^[7],血中 ALB 显著降低引起低蛋白血症所致;动物出现皮肤粘膜黄染是由于胆红素代谢障碍、肝内胆汁淤积,血中 TBIL 显著升高所致。

肝硬化是一种慢性进行性疾病,病毒性肝炎、化学药物、营养不良、中毒等因素均可导致肝硬化的发生。研究表明,肝硬化病理过程起始于肝内星状细胞活化^[8]。肝星状细胞是存在于肝脏的一类

特殊的间质细胞,主要位于肝血窦内皮与肝细胞之间的窦周隙内。活化后的肝星状细胞可转变为成纤维细胞,进而使肝脏细胞外基质及胶原纤维合成增多,引起细胞外基质发生重构形成纤维间隔^[9-10],导致肝脏假小叶被分割、包裹,最终形成肝硬化。

参考文献:

- [1] Michael J, Goedken, RoyL, *et al.* Spontaneous and age-related testicular findings in beagle dogs [J]. *Toxicologic Pathology*, 2008, 36(3):465-471.
- [2] MorishimaH, NonoyamaT, SasakiT, *et al.* Spontaneous lesions in beagle dogs used in toxicity studies [J]. *Exp Anim*, 1990, 39(2):239-241.
- [3] 胡建廷,英永,王韶艳,等. 比格犬垂体囊肿的组织病理学研究 [J]. *中国比较医学杂志*, 2011, 21(8):61-62.
- [4] 王晓燕,高俊岩,王艳霞. 网状纤维染色在临床病理诊断中的应用及技术 [J]. *中国医药导报*, 2016, 13(9):72-75.
- [5] 李敏,姚梅宏,曾玲,等. PASM-Masson 染色法在肾穿刺活检特殊染色中的应用与体会 [J]. *临床与实验病理学杂志*, 2014, 30(6):693.
- [6] 雷扬,陶艳艳,刘成海. 痰热清注射液对急性肝衰竭小鼠的保护作用研究 [J]. *上海中医药大学学报*, 2015, 29(4):51-56.
- [7] 秦克芝,周华实. 肝病诊断中八项生化指标的意义及临床评价 [J]. *中国现代医药*, 2010, 17(11):66.
- [8] MallatA, LotersztainS. Cellular mechanisms of tissue fibrosis novel insights intoliver fibrosis [J]. *Am J Physiol Cell Physiology*, 2013, 305(8):789-799.
- [9] Hegazy SK, El-BedewyM, YagiA. Antifibrotic effect of aloe vera in viral infection-induced hepatic periportal fibrosis [J]. *World J Gastroenterol*, 2012, 18(3):2026-2034.
- [10] Sousa AM, LiuT, GuevaraO, *e et al.* Smooth muscle alpha-actin expression and myofibroblast differentiation by TGF beta are dependent upon MK2 [J]. *Cell Biochem*, 2007, 100(8):1581-1592.

[修回日期]2016-07-12