



研究报告

小鼠慢性肝损伤周期性病变研究

孟霞 李梦 翟亚南 卢静

(首都医科大学实验动物部,北京 100069)

摘要:目的 研究四氯化碳(CCl_4)诱导的小鼠慢性肝病模型肝损伤变化特征,并探讨其在医学研究中的应用。
方法 正常 BALB/c 小鼠常规饲养 1 周后,腹腔注射 0.5% CCl_4 溶液($10 \mu\text{L/g}$, 1 次/3 天,持续 10 周)。注射第 2、4、6、8、10 周后,取小鼠血清检测 ALT、AST,同时取肝脏固定后进行 HE、Masson 染色,观察小鼠肝脏损伤变化。
结果 CCl_4 溶液注射 2 周时,肝细胞损伤以变性为主,出现大量炎性细胞浸润和少量胶原蛋白沉积,ALT、AST 轻度升高;4 周时,肝细胞损伤以坏死为主($P<0.01$),肝细胞数目($P<0.01$)和炎性细胞浸润均减少($P<0.01$),胶原蛋白沉积发展为条索状胶原纤维沉积,ALT、AST 升高极显著($P<0.01$);6 周时,肝细胞坏死明显减少($P<0.01$),肝细胞数目相对增多($P<0.01$),炎性细胞浸润亦减少($P<0.01$),胶原纤维沉积向胶原蛋白沉积转化($P<0.05$),ALT、AST 基本正常;8 周时,肝细胞变性再次增多,伴随大量炎性细胞浸润($P<0.01$),ALT、AST 轻度升高;10 周时,肝细胞损伤再次以坏死为主($P<0.01$),肝细胞数目($P<0.01$)及炎性细胞浸润减少($P<0.05$),胶原蛋白沉积发展为条索状胶原纤维沉积,ALT、AST 极显著升高($P<0.01$)。
结论 低剂量 CCl_4 诱导小鼠慢性肝损伤存在明显、规律性肝损伤周期变化,在同一周期内,“损伤、坏死—再生、修复”顺序交替主导肝组织病理变化;针对不同的研究方向,应选取相应的“窗口期”进行肝脏损伤或修复的机制研究和药效评价。

关键词:慢性肝损伤;BALB/c 小鼠;周期性病变**中图分类号:** R-332 **文献标识码:** A **文章编号:** 1006-6179(2019)05-0054-06**DOI:** 10.3969/j.issn.1006-6179.2019.05.010

CCl_4 是经典的实验性肝损伤外源性化合物,低剂量反复刺激可诱导慢性肝损伤^[1-2]。目前关于 CCl_4 慢性肝损伤模型的机制研究很多^[3-6],但是对于成模后肝损伤变化规律的研究很少,是持续性损害加深还是阶段性的损害与修复交替变化,对于 CCl_4 慢性肝损伤模型的实际应用至关重要,直接关系到相关机制研究和药性评价的可靠性。通常情况下 CCl_4 慢性肝损伤模型的研究多参考 CCl_4 急性肝损伤模型的研究方法,慢性染毒一段时间后,当血清、组织学等发生病变时即确定造模成功,继而研究相关机制及药效评价^[7]。但是这种方法忽略了慢性染毒本身的特点:一方面, CCl_4 慢性肝损伤模型注射的 CCl_4 浓度、剂量小,造成的肝损伤程度小,病程长;另一方面,肝脏是人体最大的解毒器官,具有很强的自愈再生能力。因此,在慢性染毒造模的几

周内,肝损伤所致的血清、病理学改变是持续性稳定增长,还是出现时而病变严重时而自愈缓解式的波动性变化就显得至关重要。如果肝损伤是波动性变化,那么 CCl_4 慢性肝损伤模型所反映出的将是一个明显的“损伤—修复”交替主导的复合模型,与 CCl_4 急性肝损伤模型所反映的以损伤为主导的单一模型将有很大区别。在损伤期内,病理变化以炎性细胞浸润和肝细胞变性坏死为主,病理机制以损伤为主导,适合进行与炎性反应、细胞损伤坏死有关机制研究;在修复期内,病理变化以肝细胞再生为主,病理机制以细胞增殖再生为主导,适合进行与肝细胞增殖再生有关机制研究。这就导致在选用该模型进行研究肝脏损伤或者修复机制研究、药物筛选过程中,必须选取相应的病理变化主导期进行评价,才能确保实验结论的真实有效性。基于以上思考,开展相

收稿日期: 2019-06-03**作者简介:** 孟霞与李梦共同为第一作者

孟霞(1973—),女,主管技师,研究方向:实验动物管理与动物实验.E-mail: mengxia@ccmu.edu.cn

李梦(1981—),男,主管技师,研究方向:肝损伤.E-mail: lm_bshlm@126.com

通信作者: 卢静(1969—),女,副教授,研究方向:实验动物学.E-mail: lujing@ccmu.edu.cn

关实验,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF 级 BALB/c 小鼠 125 只,雄性,体质量 18~20 g,购于北京维通利华实验动物科学技术有限公司[SCXK(京)2012-0001],在首都医科大学实验动物部屏障环境[SYXK(京)2015-0012]饲养。所有实验操作程序均经过首都医科大学实验动物伦理委员会批准(批准号为 AEEI-2015-020)。

1.2 实验试剂

CCl₄ 溶液购自北京现代东方精细化学品有限公司。Masson 染色试剂盒购自南京建成科技有限公司,20100318。

1.3 模型制备

正常 BALB/c 小鼠常规饲养 1 周后,腹腔注射 0.5% CCl₄ 溶液(0.75mLCCl₄ 原液加入

149.25 mL 花生油),10 μL/g 体质量,1 次/3 天,持续 10 周。注射第 2、4、6、8、10 周后,随机抽取小鼠,取血检测血清 ALT、AST,取肝脏固定后 HE、Masson 染色,观察小鼠肝脏结构、细胞形态、纤维化程度。

1.4 样本处理

注射第 2、4、6、8、10 周后,随机抓取小鼠($n=25$)腹腔注射 1%戊巴比妥钠麻醉(40 mg/kg);麻醉后,眼眶静脉丛采血法采血;采血后,离心取血清(3000 g/min,10 min);采血后,颈椎脱臼安乐死并摘取肝脏;剪取肝脏最大叶,置于 4%多聚甲醛溶液中固定,常规方法脱水、透明、包埋后制成蜡块并切片备用。

1.5 AST、ALT 检测

日立 7180 全自动血生化仪检测 AST、ALT 血清浓度。

1.6 肝脏组织石蜡切片 HE 染色及 Masson 染色

将肝脏组织石蜡切片进行水化处理,分别使用常规法进行 HE 染色处理及 Masson 染色试剂盒进行 Masson 染色处理,中性树胶封片后使用 Nikon 数字显微照相机拍摄照片。

1.7 肝纤维化程度评判

Masson 染色半定量分析:Masson 染色切片,50 μm 倍光镜下,使用 Nikon 数字显微照相机进行吸光度(OD)测量,每组随机选取 10 个视野。

1.8 肝组织炎性细胞浸润、坏死肝细胞(玻璃样变)、正常肝细胞测定方法

HE 染色半定量分析:HE 染色切片,50 μm 倍下光镜拍照,使用 ip6.0 图像分析软件进行分析。

1.8.1 炎性细胞、正常肝细胞测定:炎性细胞与正常肝细胞细胞核在 HE 染色下均为深蓝染,但二者细胞核大小差异较大,选取蓝染区域后,限定选取区域像素为 0~600 可在点选蓝染范围内筛选出炎性细胞;限定选取区域像素为 800~3000 可在点选蓝染范围内筛选出正常肝细胞,然后计算点选区域细胞核总像素。

1.8.2 坏死肝细胞(玻璃样变)测定:玻璃样变为明显深红色均质染色,点选深红染色区域后,计算点选区域总像素。

1.9 统计方法

数据以平均值 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,实验结果用 SPSS 13.0 软件进行处理,各组数据采用单因素方差分析,并作两两比较, $P<0.05$ 有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 ALT、AST 变化

注射 CCl₄ 溶液 2 周后,小鼠 ALT、AST 轻度升高,提示肝细胞轻度损伤;注射 4 周后 ALT、AST 升高极为显著,提示肝细胞损伤严重;注射 6 周后 ALT、AST 基本恢复正常;注射 8 周后 ALT、AST 再次轻度升高,提示肝细胞轻度损伤;注射 10 周后 ALT、AST 再次极显著性升高,提示肝细胞损伤严重,见图 1。

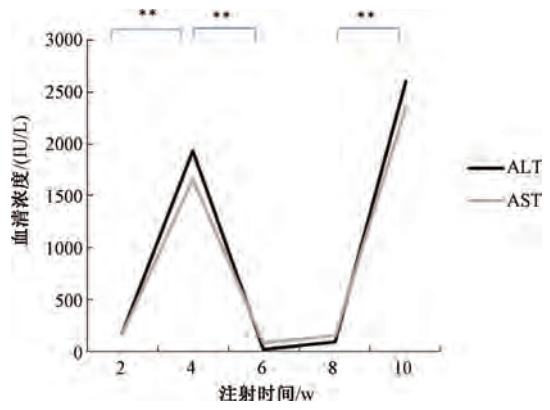


图 1 B/c 小鼠血清 ALT、AST 浓度(IU/L)

注:两组间比较,** $P<0.01$

Fig.1 B/c mouse serum levels of ALT and AST(IU/L)

Note:compared with two groups,** $P<0.01$

2.2 病理学观察

HE 染色显示在注射 CCl₄ 溶液 0~10 周的时间内,小鼠肝细胞出现明显周期性损害,分别依次出现肝细胞变性期、坏死期、缓解期、肝细胞变性期、坏死期。2 周时,肝细胞损害以变性为主,表现为肝细胞不典型空泡样变性和大量炎性细胞浸润;4 周时,肝细胞损害以坏死为主,表现为大量深红色玻璃样变

性及炎性细胞浸润减少;6 周时,肝细胞损害明显缓解,仅存少量玻璃样变性及炎性细胞浸润;8 周时,肝细胞损害再次以变性为主,表现为肝细胞大量空泡样变性和炎性细胞浸润;10 周时,肝细胞损害再次以坏死为主,表现为大量深红色玻璃样变性及炎性细胞浸润减少,见图 2~5。

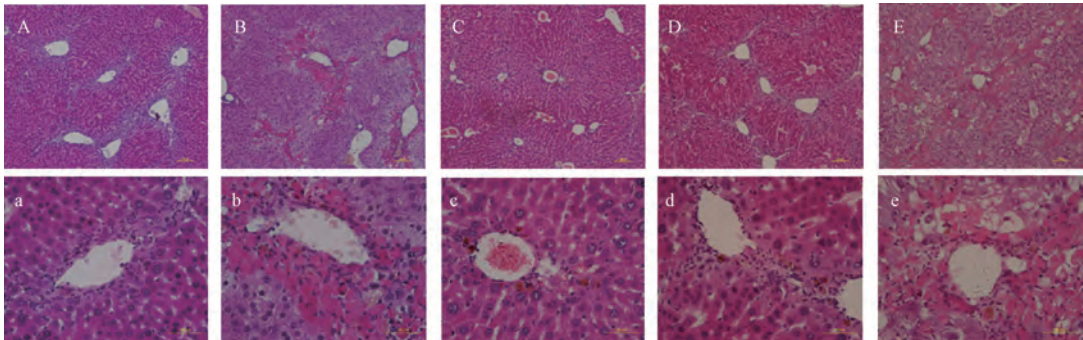


图 2 B/c 小鼠肝组织 HE 染色
注:(A、B、C、D、E 为 100 μm,a、b、c、d、e 为 50 μm),A、a 是 2 周,B、b 是 4 周,C、c 是 6 周,D、d 是 8 周,E、e 是 10 周)

Fig.2 Histology of the B/c mouse liver tissues. HE staining.

Note:(A, B, C, D,E;100 μm. a, b, c, d,e;50 μm). A, a;2 weeks. B, b; 4 weeks. C, c;6weeks. D, d;8weeks.E,e;10 weeks

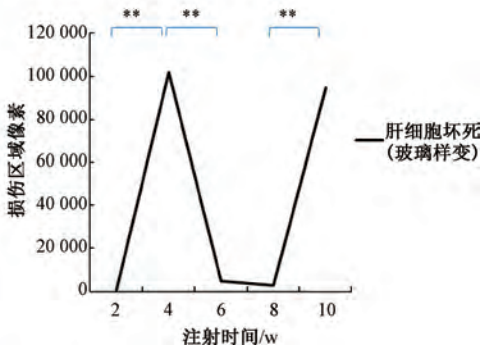
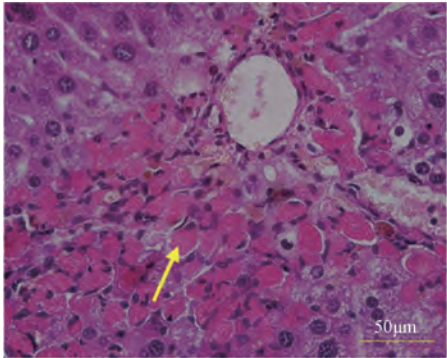


图 3 B/c 小鼠肝脏肝细胞坏死

注: 两组间比较, ** $P < 0.01$; 箭头指示为肝细胞玻璃样变性

Fig.3 B/c mouse hepatocyte necrosis

Note:compared with two groups, ** $P < 0.01$;the arrow indicates hyaline degeneration of hepatocytes

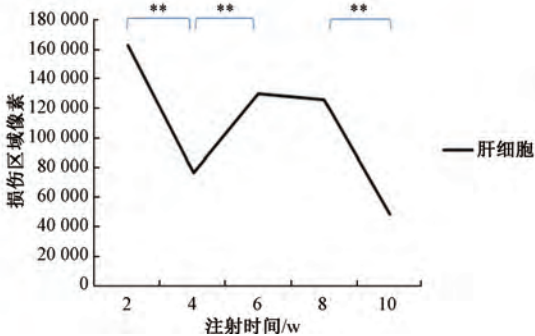
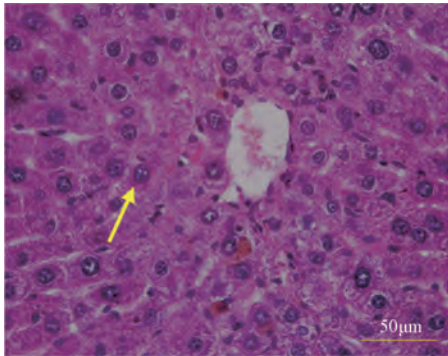


图 4 B/c 小鼠肝脏肝细胞

注: 两组间比较, ** $P < 0.01$; 箭头指示为正常肝细胞

Fig.4 B/c mouse hepatocyte

Note:compared with two groups, ** $P < 0.01$;the arrow indicates normal hepatocytes

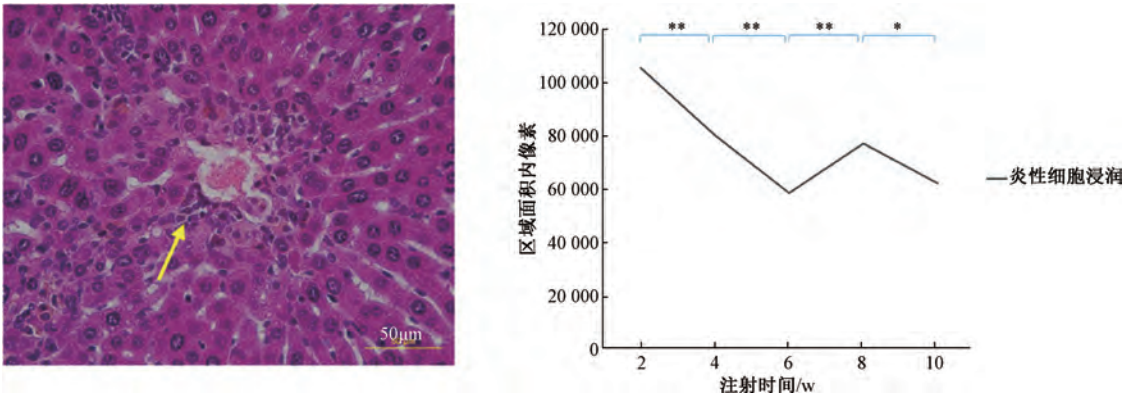


图 5 B/c 小鼠肝脏炎性细胞浸润

注：两组间比较，** $P < 0.01$ ，* $P < 0.05$ ；箭头指示为炎性细胞浸润

Fig.5 B/c mouse inflammatory cell infiltration of the liver

Note:compared with two groups, ** $P < 0.01$, * $P < 0.05$;the arrow indicates inflammatory cell infiltration

Masson 染色显示在注射 CCl_4 溶液 0~10 周的时间内,小鼠肝组织内胶原蛋白、纤维沉积随肝细胞损害出现明显周期性变化。2 周时,当肝细胞损害以空泡变性为主时,损伤区域出现淡蓝染胶原蛋白沉积;4 周时,当肝细胞损害以坏死为主时,损伤区域淡蓝染胶原蛋白沉积逐步积聚为深蓝染条索状胶

原纤维沉积;6 周时,当肝细胞损害明显缓解时,深蓝染条索状胶原纤维逐渐向淡蓝染胶原蛋白转化;8 周时,当肝细胞损害再次以脂肪变性为主但未发生坏死时,胶原纤维继续向胶原蛋白弱化;10 周时,当肝细胞损害再次以坏死为主时,胶原蛋白开始逐步向胶原纤维沉积强化,见图 6~7。

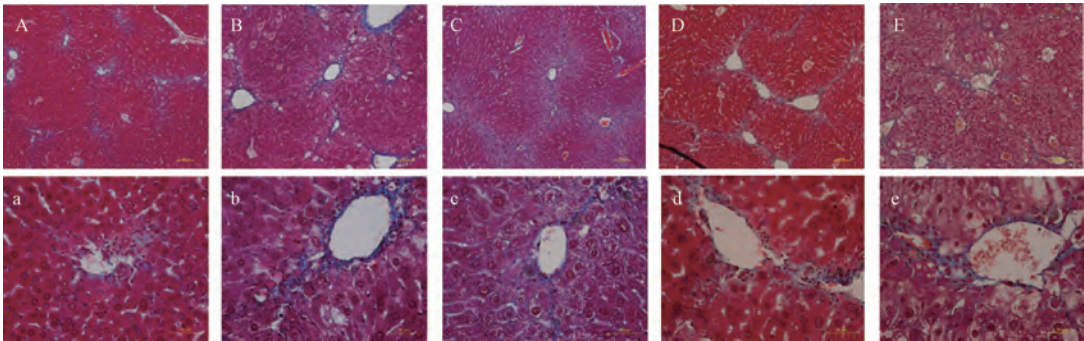


图 6 B/c 小鼠肝组织 Masson 染色

注:A、B、C、D、E 为 100 μm ,a、b、c、d、e 为 50 μm ,A、a 是 2 周,B、b 是 4 周,C、c 是 6 周,D、d 是 8 周,E、e 是 10 周

Fig.6 Histological changes of the B/c mouse liver tissues. Masson staining

Note:A, B, C, D,E:100 μm . a, b, c, d,e:50 μm . A, a:2 weeks. B, b: 4 weeks. C, c:6weeks. D, d:8weeks.E,e:10 weeks

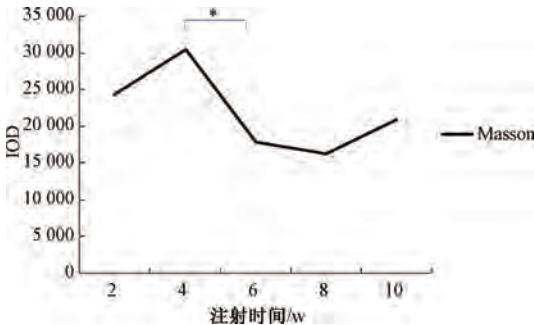


图 7 B/c 小鼠肝脏 Msson 染色

注：两组间比较，* $P < 0.05$

Fig.7 Histological changes of the B/c mouse liver tissues. Masson staining

Note:compared with two groups, * $P < 0.05$



3 讨论

本实验结果显示,在注射 CCl_4 溶液 0~10 周的时间内,小鼠肝细胞出现明显周期性损害,分别依次出现变性期、坏死期、缓解期。变性期以肝细胞变性为主,伴随大量炎性细胞浸润,此时肝细胞虽然受损但未发生坏死,因此 ALT、AST 仅轻度升高;随着肝细胞变性加重及炎性细胞作用,变性期过渡到坏死期,损伤的肝细胞出现大量坏死,表现为大量无结构的红色均染玻璃样变性,ALT、AST 急剧升高,肝细胞、炎性细胞浸润明显较少;当坏死的肝细胞残余被逐步吞噬吸收,坏死期开始向缓解期过度,炎性细胞浸润进一步减少,玻璃样变体大量消失,新生肝细胞增多,ALT、AST 基本恢复正常;之后继续按照此顺序发生周期性病变。本实验共观察到 1.5 个周期性损害变化。

由此可见,在持续低剂量染毒过程中,同一周期内不同的表现期, CCl_4 慢性肝损伤的作用机制不同,变性期、坏死期以损伤机制为主导,缓解期以修复机制为主导,是一种近似“损伤—修复”交替出现的模型。在损伤机制主导期,反映出类似 CCl_4 急性肝损伤模型的病理变化,是研究 CCl_4 导致肝损伤诸多机制的最佳窗口期;而在修复机制主导期,则反映出 CCl_4 急性肝损伤模型不具备或者不显著的肝细胞再生表现,是研究肝损伤后机体诸多修复自愈机制的最佳窗口期。因此我们认为选择不同的窗口期,对于评价抑制肝细胞损伤或者促进肝细胞再生两大类药物的疗效至关重要。

肝纤维化是伴随肝损伤出现的胶原纤维沉积,一般认为是不可逆的过程。但是 Mohammad 等人研究发现,该过程或许存在逆转的可能,其逆转的关键就是肝细胞再生,肝纤维化的形成,需要肝星状细胞转变为肌成纤维细胞,表达 α -平滑肌动蛋白、合成细胞外基质,而肝星状细胞的转变需要激活其表面的 5-羟色胺 2B 受体 (5-HT_{2B}),进而激活转化生长因子 b1 (TGF-b1) 信号通路而完成,然而 TGF-b1 是肝细胞增殖强有力的抑制剂,当选择性拮抗 5-HT_{2B} 时能够有效抑制肝星状细胞 TGF-b1 表达,明显减少肝星状细胞转化,在降低急、慢性肝损伤模型小鼠肝纤维化程度的同时,大量促进肝细胞再生^[8]。本实验也发现类似趋势:在变性期时,肝细胞损害以脂肪变性为主,此时肝细胞虽然受损但未发生坏死,细胞结构

大致完整,因此仅在变性肝细胞周围沉积淡蓝染胶原蛋白;随着损伤加重,变性期过渡到坏死期,出现大量肝细胞坏死后形成的无细胞结构的玻璃样变体,因此该区域内胶原蛋白逐步积聚为深蓝染条索状胶原纤维沉积;到缓解期时,坏死肝细胞极显著减少,肝细胞大量增殖再生,不仅胶原蛋白的沉积数量显著减少,形态也从条索样积聚弱化为分泌样表现。这是 CCl_4 慢性肝损伤模型区别于 CCl_4 急性肝损伤模型的又一表现,要利用好 CCl_4 慢性肝损伤模型研究肝纤维化逆转机制、评价抗纤维化药物疗效,明确其周期性损伤变化、选择好优势窗口期势必至关重要。

值得注意的是,与建立 CCl_4 急性肝损伤模型不同,我部选用不同批次同一起来源种群的 B/c 小鼠建立 CCl_4 慢性肝损伤模型时,虽然“损伤—修复”这一典型肝损伤病理表现周期性交替出现,但是这一循环性病变出现的时间点以及强度 (ALT、AST) 却存在差异^[9]。国外研究也有过类似发现,同一起来源近交系小鼠会因装运、笼具、个体持续性差异导致检测结果出现显著差异^[10]。我们推测这与 CCl_4 慢性肝损伤模型的病理特点密切相关,正是由于在染毒过程中剂量小和肝脏自愈再生能力强两大特点,导致成模过程出现“损伤—修复”机制交替主导的复杂过程,为个体原本微小差异的持续性进展提供了可能。而这种近交系个体间固有的微小差异在 CCl_4 急性肝损伤模型造模中基本不会表现出显著差异,因为在急毒实验中,大剂量 CCl_4 根本不会给肝脏自愈任何机会,展现出完全的压制性肝损伤病理表现。因此,在应用 CCl_4 慢性肝损伤模型进行研究时,应着眼于对“损伤—修复”的周期性病变规律的影响,而不是对肝损伤出现的时间及强度的干预。

综上所述, CCl_4 慢性肝损伤模型的制备与研究源于 CCl_4 急性肝损伤模型,其肝组织损伤变化与急性模型相近而又有区别,具有明显的周期性损害变化,在损伤期内,病理变化以炎性细胞浸润和肝细胞变性坏死为主,病理机制以损伤为主导;在修复期内,病理变化以肝细胞再生为主,病理机制以细胞增殖再生为主导,是一种近似“损伤—修复”交替出现的模型,“损伤期”适合进行与炎症反应、细胞损伤坏死有关机制研究,“缓解期”适合进行与肝细胞增殖再生有关机制研究。因此在使用 CCl_4 慢性肝损伤模型进行肝损伤或修复机制研究或药效评价时,应重视该模型周期性的病变规律与特点,有针对性地

选择相应“窗口期”,从而得到更为客观有效的实验数据。

参 考 文 献

[1] 王宇,程微波,张银柱,等.10%四氯化碳致大鼠慢性肝损伤的研究[J].现代预防医学, 2006,**33**(5):701-703.

[2] 卫生部.保健食品功能学评价程序及检验方法规范[S]. 2003 版, 133-135.

[3] 杨淑贤,赵青舟,单宇,等.牛樟芝对四氯化碳致大鼠慢性肝损伤的保护作用[J].现代食品科技, 2018,**34**(2): 1-5.

[4] 王建青.内质网应激在四氯化碳诱导小鼠急性慢性肝损伤中的作用及部分机制[D].合肥,安徽医科大学,2012.

[5] 王东辉.激活素 A 在四氯化碳诱导的小鼠急性慢性肝损伤中的作用[D].长春,吉林大学, 2013.

[6] Lavallard V J,Gual P. Autophagy and non – alcoholic fatty liver disease[J].Bio-med Res Int,2014,2014: 120179.

[7] 刘甦苏,霍桂桃,王辰飞,等.四氯化碳诱导近交系 C57BL/6 小鼠建立肝纤维化模型[J].实验动物科学,2019,**36**(4):28-30+34.

[8] Ebrahimkhani M R, Oakley F, Murphy L B, *et al.* Stimulating healthy tissue regeneration by targeting the 5-HT_{2B} receptor in chronic liver disease [J]. nature medicine, 2011, **17** (12): 1668-1673.

[9] 李梦,翟亚南,王晶晶,等.制备低剂量四氯化碳诱导小鼠慢性肝损伤模型的探讨[J]. 中国实验动物学报,2014,**22**(4): 52-55.

[10] Hoy Y E, Bik E M, Lawley T D, *et al.* RelmanVariation in Taxonomic Composition of the Fecal Microbiota in an Inbred Mouse Strain across Individuals and Time[J]. PLoS One, 2015, **10**(11):e0142825.

Study on Periodic Lesions in Mice with Chronic Liver Injury

MENG Xia, LI Meng, ZHAI Yanan, LU Jing

(Laboratory Animal Department, Capital Medical University, Beijing 100069, China)

Abstract: Objective To observe changes in liver damage induced by carbon tetrachloride (CCl₄) induced chronic liver disease in mice. **Method** One week after normal feeding in normal BALB/c mice, 0.5% CCl₄ solution (10 μL/g, one time every three days for 10 weeks, lasting 10 weeks) was intraperitoneally injected. After 2, 4, 6, 8, and 10 weeks of injection, the serum ALT and AST were detected, HE and Masson staining after liver fixation, observation of liver structure, cell morphology and fibrosis degree in mice. **Result** When CCl₄ solution was injected for 2 weeks, the liver cell damage was mainly denatured with a large number of inflammatory cells infiltration and a small amount of collagen deposition, and ALT and AST were slightly elevated; At 4 weeks, hepatocyte injury was mainly necrosis (*P*<0.01), and the number of hepatocytes (*P*<0.01) and inflammatory cell infiltration decreased (*P*<0.01). Collagen deposition developed into stripe collagen fiber deposition, and ALT and AST increased significantly(*P*<0.01); At 6 weeks, necrotic hepatocytes were significantly reduced (*P*<0.01), the number of hepatocytes increased (*P*<0.01), the infiltration of inflammatory cells was further reduced (*P*<0.01), collagen fiber deposition was transformed to collagen deposition (*P*<0.05), ALT and AST were basically normal(*P*<0.01)); At 8 weeks, the degeneration of hepatocyte was increased again, with a large number of inflammatory cell infiltration (*P*<0.01), and a slight increase in ALT and AST; At 10 weeks, hepatocyte injury was mainly necrosis (*P*<0.01). The number of hepatocytes (*P*<0.01) and inflammatory cell infiltration decreased (*P*<0.05). Collagen deposition developed into stripe collagen fiber deposition, and ALT and AST increased significantly (*P*<0.01). **Conclusion** The chronic liver injury model of mice induced by 0.5%CCl₄ solution has obvious and regular liver injury cycle changes, and the degeneration stage, necrotic stage and remission stage of hepatocyte appear in turn.

Key words:Chronic liver injury; BALB/c mice; periodic lesions