

王娜,陆正峰,王明刚,等. 一种慢性肝衰竭大鼠动物模型的制备方法研究[J]. 中国实验动物学报, 2025, 33(6): 811-822.

WANG N, LU Z F, WANG M G, et al. Preparation of a rat model of chronic liver failure [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2025, 33(6): 811-822.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2025.06.004

一种慢性肝衰竭大鼠动物模型的制备方法研究

王娜¹, 陆正峰², 王明刚¹, 吴凤兰¹, 张日云³, 张荣臻¹,
冯雯倩³, 刘好³, 杜洋³, 舒发明¹, 蓝艳梅^{1*}, 毛德文^{1*}

(1. 广西中医药大学第一附属医院, 中医临床研究重点实验室, 南宁 530023; 2. 广西壮族自治区民族医院, 南宁 530001; 3. 广西中医药大学研究生院, 南宁 530299)

【摘要】 目的 制备稳定的慢性肝衰竭大鼠动物模型, 为开展相关基础研究提供造模方法。**方法** 取 66 只 SPF 级 SD 大鼠, 随机分为正常组 18 只, 造模组 48 只, 造模组以 50% CCl₄ 橄榄油混合溶液腹腔注射, 剂量为 1.5 mL/kg, 每周 2 次, 分别于第 8、16、24 周 B 超观察各组大鼠的肝形态、测量肝硬度值、门静脉直径、出现腹水症状后, 采集血清、血浆, 剖取肝, 肉眼观察各组大鼠肝组织变化, 检测大鼠肝功能、凝血功能, 苏木素-伊红(HE)染色观察各时间点大鼠肝组织损伤情况, Masson 染色观察肝组织纤维化程度, 水迷宫实验检测各组大鼠肝性脑病发生情况, 并统计不同时间点大鼠死亡情况。**结果** 与正常组对比, 造模组大鼠出现不同程度活动减少、食欲下降、尿液变黄、腹部变大等体征; 随着造模时间延长, 超声下可见大鼠肝实质回声逐渐增高、增粗, 继发出腹水, 门静脉直径变宽并门脉高压形成; 水迷宫及血氨检测发现造模组 24 周大鼠出现记忆力、定向力减退, 在重度肝损伤基础上发生肝性脑病; 肉眼观察造模组大鼠肝组织外观逐渐变粗糙、凹凸不平, 最终肝体积缩小; 肝组织 HE 染色见不同程度肝细胞肿胀、脂肪病变、坏死; Masson 染色见肝纤维化程度逐渐加重, 伴假小叶形成; 肝功能 AST、ALT、TBIL 水平在造模周期持续攀升, 凝血酶原时间延长, 国际标准比值升高, 血氨水平持续上升。**结论** 50% CCl₄ 橄榄油混合溶液大鼠腹腔注射 24 周(每周 1.5 mL/kg), 能较好地再现持续慢性肝损伤病理进程, 且能在肝硬化失代偿的基础上出现慢性肝衰竭的典型病理改变及并发症, 能较好地模拟人体从肝炎→肝纤维化→肝硬化代偿期→肝硬化失代偿期→慢性肝衰竭的病理演变过程, 可作为慢性肝衰竭基础研究的模型参考。

【基金项目】 广西重点研发计划项目(桂科 AB25069020), 广西自然科学基金(2023GXNSFAA026176, 2024GXNSFBA010218, 2021GXNSFAA220112), 国家中医药传承创新中心建设项目(发改办社会[2022]366号), 国家自然科学基金(82274434, 82360912, 82160881), 广西高校中青年教师科研基础能力提升项目(2024ky0123); 广西壮族自治区民族医院孵化项目(民科 FY202404), 广西中医药大学青年基金项目(2023QN007), 广西中医药大学第一附属医院青年基金项目(2022QN009)。

Funded by Guangxi Key Research and Development Program Project (Guike AB25069020), Guangxi Natural Science Foundation (2023GXNSFAA026176, 2024GXNSFBA010218, 2021GXNSFAA220112), Construction Project of the National Traditional Chinese Medicine Inheritance and Innovation Center (Document No. [2022]366 of the Office of the National National Development and Reform Commission in Social Affairs), National Natural Science Foundation of China (82274434, 82360912, 82160881), Guangxi University Young and Middle-Aged Teachers Research Basic Ability Improvement Project (2024ky0123), Guangxi Zhuang Autonomous Region Ethnic Hospital Incubation Project (MingkeFY202404), Guangxi University of Chinese Medicine Youth Fund Project (2023QN007), Youth Fund Project of the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine (2022QN009).

【作者简介】 王娜, 女, 学士, 副教授, 研究方向: 中医药防治肝病基础。Email: wangna0607@163.com

【通信作者】 蓝艳梅, 女, 硕士, 主治医师, 研究方向: 中医药防治肝衰竭基础。Email: lanyanmeixueshu@163.com;

毛德文, 男, 博士, 教授, 研究方向: 中医药防治疑难重症肝病。Email: mdwboshi2005@163.com。

* 共同通信作者

【关键词】 慢性肝衰竭;四氯化碳;动物模型;大鼠

【中图分类号】 Q95-33 【文献标志码】 A 【文章编号】 1005-4847 (2025) 06-0811-12

Preparation of a rat model of chronic liver failure

WANG Na¹, LU Zhengfeng², WANG Minggang¹, WU Fenglan¹, ZHANG Riyun³, ZHANG Rongzhen¹,
FENG Wenqian³, LIU Hao³, DU Yang³, SHU Faming¹, LAN Yanmei^{1*}, MAO Dewen^{1*}

(1. Key Laboratory of Chinese Medicine Clinical Research, the First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530023, China; 2. Guangxi Zhuang Autono Mous Region Ethnic Hospital, Nanning 530001, China; 3. Graduate School of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530299, China)

Corresponding author: LAN Yanmei. E-mail: lanyanmeixueshu@163.com;

MAO Dewen. E-mail: mdwboshi2005@163.com

【Abstract】 Objective To prepare a stable rat model of chronic liver failure to provide a tool for basic research. **Methods** Sixty-six SPF SD rats were divided into a normal group ($n = 18$) and a modeling group ($n = 48$). Rats in the modeling group received an intraperitoneal injection of 50% CCl₄ olive oil solution (1.5 mL/kg, twice a week). Multidimensional assessment was performed at 8, 16, and 24 weeks, respectively, including ultrasonic examination of liver morphology, hardness, portal vein diameter, and ascites, and collection of serum, plasma, and liver tissue to detect liver function, coagulation function, and blood ammonia levels. Liver tissue injury and fibrosis were observed by hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. Cognitive function was assessed using the water maze test. Survival were recorded simultaneously. **Results** Rats in the model group showed decreased activity and appetite, yellow urine, and increased abdominal circumference compared with the normal group. Ultrasound showed enhanced liver parenchyma echo in the model group that thickened with time, secondary ascites formation, portal vein dilation, and portal hypertension. Water maze and blood ammonia tests confirmed cognitive decline (memory and orientation loss) and hepatic encephalopathy in the model group. Gross observation showed that the liver in the model group was atrophied and appeared rough and uneven. HE staining showed hepatocyte swelling, steatosis, and necrosis, and Masson staining confirmed fibrosis progression with pseudolobule formation. The liver function indexes AST, ALT, TBIL and blood ammonia continued to increase, and coagulation dysfunction (prolonged PT and increased INR) gradually increased with the modeling process. **Conclusions** Intraperitoneal injection of 50% CCl₄ olive oil solution (1.5 mL/kg, every week) for 24 weeks can stably simulate persistent chronic liver injury in rats and lead to the typical pathological changes and complications of chronic liver failure, based on the decompensation stage of cirrhosis. This model replicates the pathological evolution of human hepatitis from liver fibrosis → liver cirrhosis compensation → decompensation → chronic liver failure, providing a reliable modeling reference for the study of the mechanism of chronic liver failure.

【Keywords】 chronic liver failure; carbon tetrachloride; animal model; rat

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

肝衰竭(liver failure)以大面积肝细胞死亡为病理特征,该病救治难度大、病死率高,属内科危急重症之一^[1]。根据有无基础肝病、诱因与发病时间间隔以及临床表现,可分为急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)、亚急性肝衰竭(subacute liver failure, SALF)、慢加急性(亚急性)肝衰竭(acute(subacute)-on-chronic liver failure, ACLF 或

SACLF)和慢性肝衰竭(chronic liver failure, CLF) 4 类^[2]。全球数据统计发现^[3-4],全球肝病患者超过 4 亿,大部分由于病毒感染、酗酒和代谢性因素造成的慢性肝损伤,有 700 万肝病患者发展为肝硬化,最终每年有超过 40 万例发展为终末期肝病(肝衰竭和肝癌等)。在我国,早年间肝衰竭患者病死率高达 80%以上^[5],近年来随着人工肝支持

系统的开发和普及应用,内科综合治疗肝衰竭的水平较已大为提高^[6],但该病的死亡率仍维持在 50%以上^[7],其中 CLF 是在肝硬化基础上,缓慢出现肝功能进行性减退导致的以腹水、门静脉高压、凝血功能障碍和肝性脑病等为主要表现的慢性肝功能失代偿性疾病,其发病机制复杂,并发症多、病死率高,尚无针对性特效药物和手段。据统计,全世界约有 8.44 亿人患有慢性肝病,每年死于慢性肝病的患者有 200 万人^[8],其中就包含慢性肝衰竭在内。随着慢性肝病的长期进展,都有可能发展为慢性肝衰竭,因此对 CLF 发病机制的研究及治疗显得尤为重要,这对延缓慢性肝病的发展,提高终末期肝病患者的生活质量、延长生存时间具有重要意义。

当前,针对 CLF 大鼠动物模型制备方面的研究极少,造模药物、造模时间、判定标准等均缺乏一致意见。有鉴于此,本次研究致力于探索一种高效、稳定、便于操作的慢性肝衰竭大鼠动物模型,旨在为 CLF 相关基础研究提供动物模型借鉴。在本研究中,开发了一种 CLF 大鼠动物模型,通过长期低剂量给予四氯化碳(CCl_4)橄榄油腹腔注射产生慢性肝损伤逐步进展到 CLF,通过超声、水迷宫、生化等检测确认 CLF 模型的典型病理改变及并发症,为研究 CLF 的病理过程、发病机制及临床药效靶点提供动物模型参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 66 只,6 ~ 8 周龄,体重(200 ± 50) g,购自湖南长沙市天勤生物技术有限公司【SCXK(湘)2022-0011】,饲养于广西中医药大学科学实验中心【SYXK(桂)2019-0001】。饲养环境:室内温度控制在 20 ~ 25 °C,相对湿度控制在 50% ~ 60%,12 h 光照昼夜交替,自由进食,常规饲料饲养。本实验已获得广西中医药大学动物伦理委员会批准(DW20221017-221)。

1.1.2 主要仪器与试剂

CCl_4 (批号:20220421,购自广东光华科技股份有限公司)、橄榄油(批号:20221228,购自益海嘉里食品有限公司)、伊红(批号:C230804,购自珠海贝索生物技术有限公司)、苏木素(批号:

C23801,购自珠海贝索生物技术有限公司)、改良 Masson 三色染色试剂盒(批号:240004002,购自索莱宝生物科技有限公司)。全自动生化分析仪(中国,迈瑞,BS-240Vet)、全自动血细胞分析仪(中国,迈瑞,BC-5000)、全自动凝血分析仪(中国,赛科希德,SF-880C)、全自动脱水机(德国,徕卡,LEICA ASP300S)、组织包埋机(美国,赛默飞,Thermo HISTOSTAR)、切片机(美国,赛默飞,Thermo Shandon A788081)、展烤片机(日本,爱华,ZKPJ-1A)、封染一体机(中国,达科为,DP360 + CS500)、正置光学显微镜(日本,Olympus,BX63)、visutrack 高端行为学分析系统(中国,上海欣软,XR-VT)、彩色多普勒超声诊断仪,SL10-2 探头,探头频率 4 ~ 15 MHz,配备有剪切波弹性成像(SWE)功能等(Supersonic Imagine, Aixplorer)。

1.2 方法

1.2.1 模型构建方法、流程及分组

大鼠适应性喂养 1 周后进行实验。将 66 只大鼠分为正常组 18 只、造模组 48 只,各组自由饮食、进水。其中造模组给予 50% CCl_4 橄榄油混合溶液(CCl_4 :橄榄油 = 1:1)腹腔注射,剂量为 1.5 mL/kg,每周 2 次。正常组、造模组分别于 8、16、24 周各随机选取 6 只大鼠进行检测,并观察每个时间点正常组、造模组的大鼠死亡率等。(见图 1)。

1.2.2 标本采集

戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠,腹主动脉无菌无热源采血,3000 r/min 离心 10 min,提取血清、血浆以全自动生化分析仪、血氨及凝血分析仪检测;剖取肝,进行各组大鼠肝外观观察,剪取大鼠肝左叶 3 cm × 4 cm 放置 4%多聚甲醛于 4 °C 冰箱固定保存,用于 HE 及 Masson 染色。

1.2.3 指标检测及模型鉴定

(1)大鼠一般状态观察:观察各组大鼠各个时间点的精神状态、毛发色泽、尿液、粪便、腹水等改变。

(2)大鼠生存时间分析:取材完毕,记录每周两组大鼠的死亡时间。

(3)水迷宫检测大鼠肝性脑病的变化:将各组大鼠在正式训练前 1 d 分别放入水迷宫水中自由游泳 2 min,并将其引导至平台区域,使其熟悉

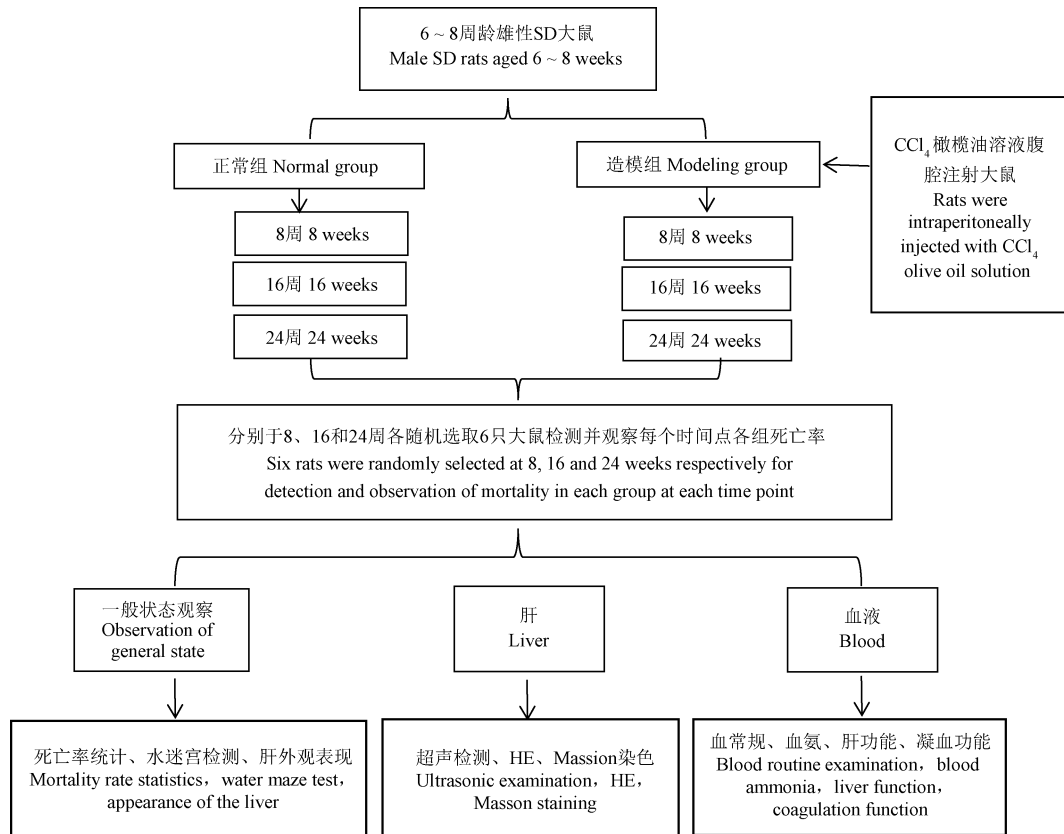


图 1 实验流程

Figure 1 Experimental procedure

环境。然后对各组大鼠正式进行 Morris 水迷宫测试。使用航行定位和空间探索实验对大鼠的学习能力和记忆能力进行测试。前 5 d 进行定位航行实验,将大鼠从标记的 4 个象限入水点依次朝向池壁轻轻放入水中,采集大鼠在 60 s 内寻找到并爬上平台所用的时间(平台在第 3 象限,平台低于水位 2 cm 左右),如果大鼠 60 s 内未找到平台,需将其牵引到平台,并停留 15 s。第 6 天进行空间探索实验,撤除平台,重复上述实验,记录大鼠在 60 s 在平台所放置的目标象限停留时间和穿越平台所在区域的次数。

(4) 超声仪观察大鼠肝形态变化、腹水、肝硬度值、门静脉直径:将大鼠麻醉后,剔除上腹部毛发,利用超声仪观察肝形态、腹水、测量肝硬度值及门静脉直径。

(5) 肉眼观察肝组织形态变化,HE 染色观察肝组织病理损伤:各时间点处死大鼠,剖取肝时,对每组大鼠肝进行拍照,肉眼观察肝的变化情况。肝组织经多聚甲醛 24 h 固定后,剪取 1 cm × 0.2 cm × 0.2 cm 大小肝组织置于组织包埋盒中,

流水冲洗,将包埋盒放入全自动脱水机进行梯度脱水,包埋成蜡块,全自动切片机切成 4 μm 厚切片,烤片机上烤 40 min 后放入封染一体机进行脱蜡、水洗、染色、脱水透明,封片机封片,采集图像。

(6) Masson 染色检测大鼠肝组织的纤维沉积及评分:包埋切片脱蜡至水后在恒温培养箱中媒染液浸染,水洗甩干天青石蓝染色液滴染,水洗 2 次后,苏木素染色并酸性分化液分化,水洗终止分化;丽春红品红染色液滴染,磷钼酸溶液处理,倾去上液直接滴加苯胺蓝染色液染色;弱酸溶液洗去苯胺蓝溶液后,继续滴加弱酸溶液覆盖切片,加以 95%、无水乙醇脱水,二甲苯透明 2 次,中性树胶封固,显微镜观察图像,进行肝纤维化 Ishark 评分。

(7) 全自动血细胞分析仪检测大鼠血清的白细胞、红细胞、血小板、血氨:将 EDTA 采血管收集的全血离心后置于全自动血细胞分析仪中检测。

(8) 全自动生化分析仪检测肝功能指标(丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、总

胆红素 (total bilirubin, TBil)、白蛋白 (albumin, ALB): 将真空采血管采集的全血离心后置于全自动生化分析仪中检测。

(9) 全自动凝血分析仪检测凝血功能的凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)、国际标准化比值 (international normalized ratio, INR): 将枸橼酸钠采血管收集的全血离心置于全自动凝血分析仪中检测凝血功能。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件进行实验数据分析, 计量资料数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多个样本间的比较采用单因素方差分析, 组间率的比较采用卡方检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有显著性。

2 结果

2.1 造模大鼠一般情况

正常组大鼠精神状态良好, 毛发光泽, 饮食情况良好, 体质量明显增长, 二便正常。与正常组比较, 造模组 8 周大鼠出现活动正常, 食欲稍有下降, 体质量增长, 二便正常; 16 周大鼠毛发缺乏光泽, 部分大鼠出现掉毛, 活动较前减少, 逐渐出现腹部胀大, 尿液变黄, 粪便稀烂等症状; 24 周大鼠毛发枯槁, 体型瘦长, 静默怠动, 精神萎靡, 腹部胀大如鼓, 尿液少且颜色深黄, 少部分出现便溏, 眼球发白等症状 (见图 2)。

2.2 不同造模时间点大鼠死亡情况分析

实验全程共有大鼠正常组 18 只, 造模组 48

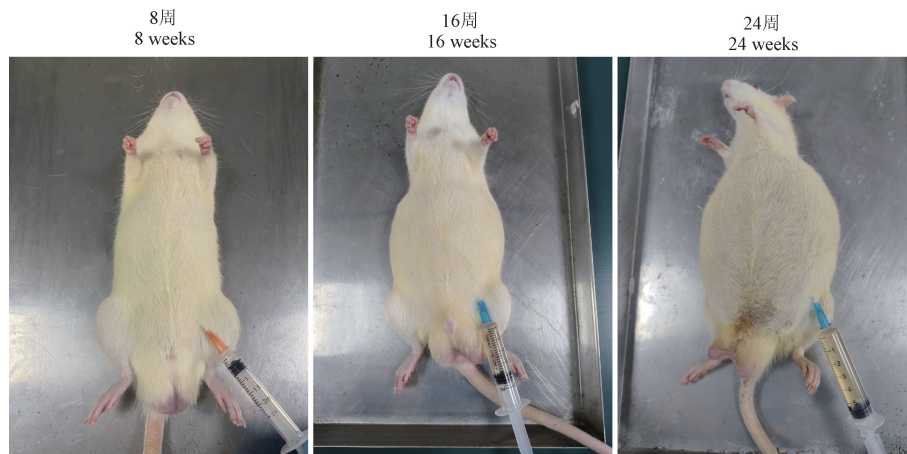


图 2 造模组不同时间点大鼠一般情况

Figure 2 General situation of rats at different time points of modeling group

只, 分别于不同时间点随机各选取 6 只取材检测, 统计不同时间点大鼠的死亡率及观察并绘制大鼠的生存曲线。随着造模时间延长, 造模组的死亡时间逐渐升高, 并且死亡率两两比较具有显著性差异 ($P < 0.05$)。造模至第 8 周结束大鼠共死亡 4 只, 至第 16、24 周结束大鼠死亡各 6 只, 说明造模时间达到 24 周时大鼠生存数显著下降 (见图 3, 表 1)。

2.3 不同造模时间点大鼠肝形态变化、腹水、肝硬度值、门静脉直径、门静脉血流速度比较

超声下可见正常组大鼠肝密度均匀, 边缘光滑; 造模组 8 周大鼠肝密度稍欠均匀, 边缘尚且光滑; 造模组 16 周大鼠肝体积增大, 肝表面凹凸不平, 肝实质回声增高、增粗, 出现腹水, 与造模组

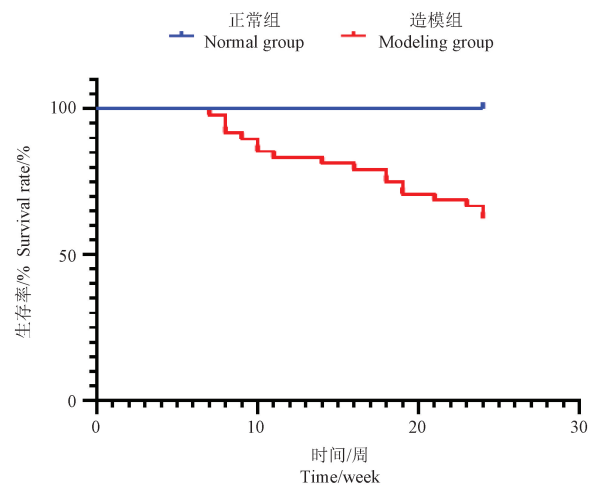


图 3 正常组与造模组生存曲线

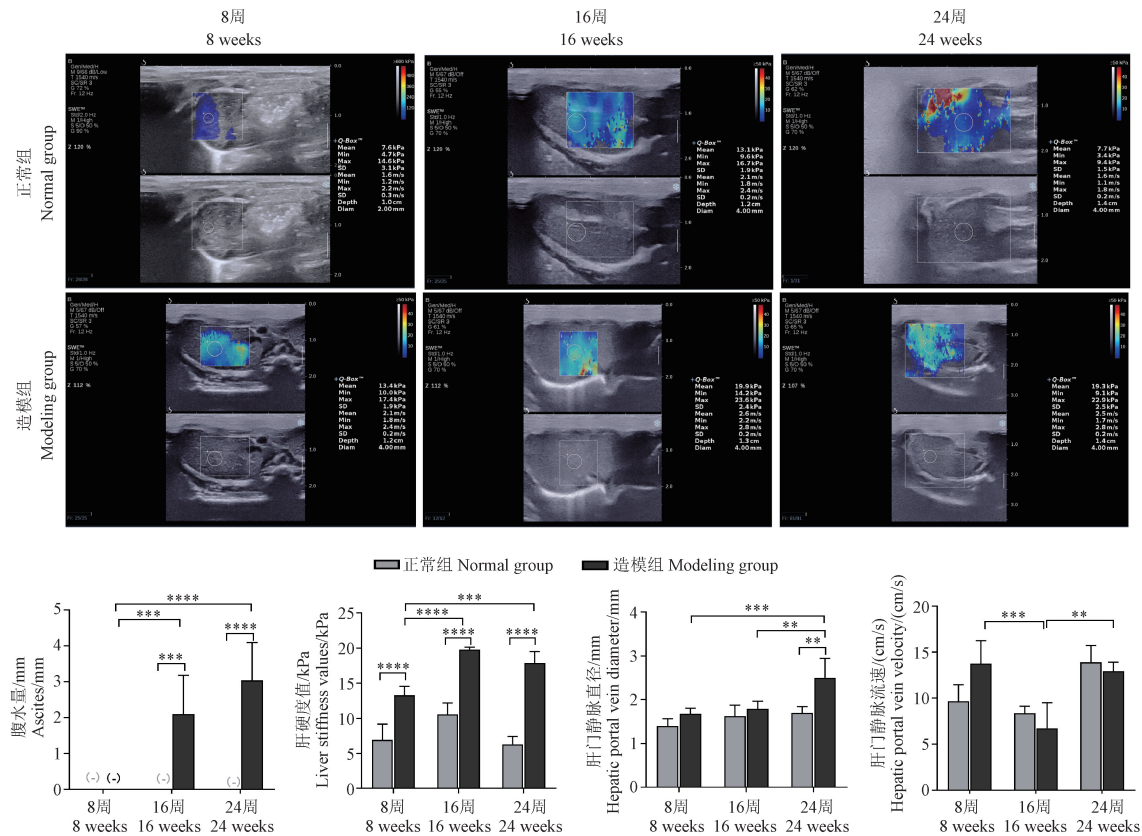
Figure 3 Survival curve of normal group and modeling group

表 1 不同时间点大鼠的死亡率
Table 1 Mortality of rats at different time points

组别 Groups	时间点 Time points	死亡只数/ <i>n</i> Death counts/ <i>n</i>	每个时间点剩余大鼠总数/ <i>n</i> Number of remaining rats at each time point/ <i>n</i>	死亡率/% Mortality/%
8 周 8 weeks	正常组 Normal group	0	18	0
	造模组 Modeling group	4	48	8.33 *
16 周 16 weeks	正常组 Normal group	0	12	0
	造模组 Modeling group	6	38	15.79 *
24 周 24 weeks	正常组 Normal group	0	6	0
	造模组 Modeling group	8	26	34.78 *

注:与正常组相比, **P* < 0.05。(下图同)
Note. Compared with normal group, **P* < 0.05. (The same in the following figures)

8 周比较,肝硬度值显著升高(*P* < 0.0001);造模组 24 周肝体积明显缩小,与正常组 24 周大鼠比较,肝硬度值增高(*P* < 0.0001),门静脉直径增宽(*P* < 0.01),出现大量的腹水(*P* < 0.0001)。与造模组 16 周大鼠相比较,造模组 24 周大鼠的肝门静脉血流速度升高(*P* < 0.01)(见图 4)。



注:与正常组相比, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001。(下图同)
图 4 不同时间点各组大鼠肝超声数值比较

Note. Compared with normal group, ***P* < 0.01, ****P* < 0.001, *****P* < 0.0001. (The same in the following figures)

Figure 4 Comparison of ultrasonic values of rats liver in each group at different time points

2.4 不同造模时间点大鼠肝性脑病并发情况

肝性脑病是慢性肝衰竭的代表性并发症,该病由严重肝病末期引起的、以代谢紊乱为基础的中枢神经系统功能失调的综合病征,其主要临床表现是意识障碍、行为失常和昏迷,水迷宫实验是检测肝性脑病的重要检测方法。造模组 8 周大鼠的血氨稍升高,与正常组 8 周大鼠比较无显著性差异($P > 0.05$),其水迷宫检测未见明显异常;

造模组 16 周大鼠出现血氨水平上升,造模组 24 周大鼠血氨水平显著上升,两者比较具有统计学意义($P < 0.0001$)。水迷宫数据可看出随着造模时间的延长,造模组 24 周大鼠逃避潜伏期延长,进入平台次数减少,在平台所在象限停留时间缩短,与正常组 24 周大鼠比较具有显著性差异(均有 $P < 0.05$),提示大鼠记忆力、定向力减退,出现肝性脑病(见图 5)。

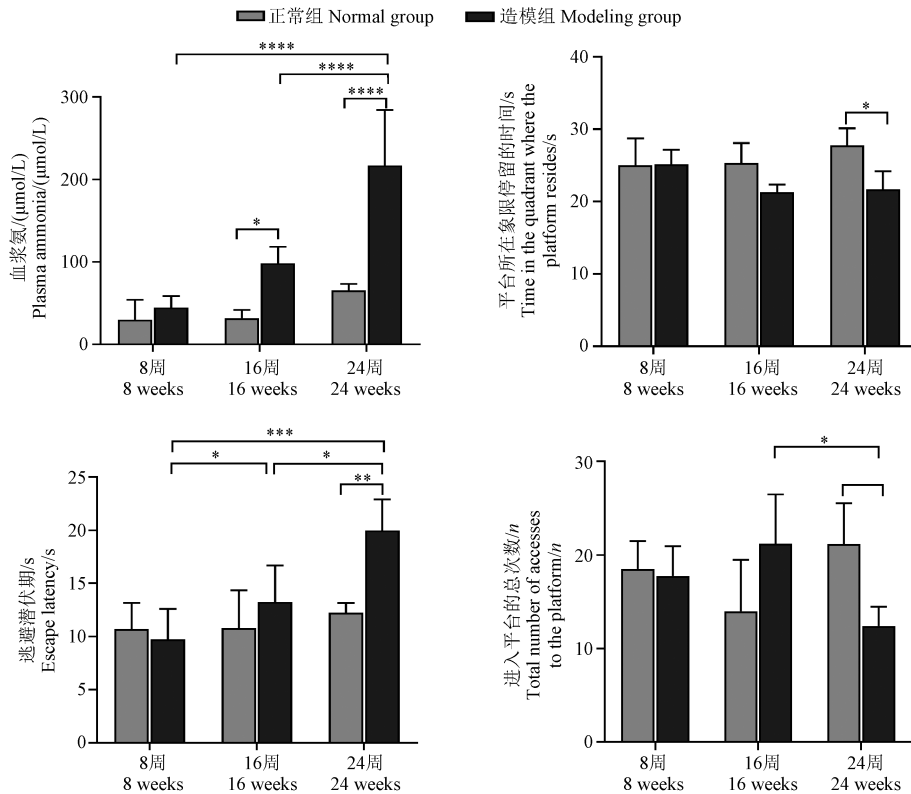


图 5 不同时间点各组大鼠血氨水平及水迷宫数据比较

Figure 5 Comparison of blood ammonia level and water maze data of rats in each group at different time points

2.5 不同造模时间点大鼠肝外观及 HE 染色情况

正常组大鼠在不同时期肝均呈鲜红色,表面光滑,质地柔软,肉眼观察未见明显异常病变。造模组 8 周大鼠肝呈鲜红色,表面稍粗糙,质地稍硬,造模组 16 周大鼠肝呈红黄色,表面凹凸不平,体积变大,质地变硬,造模组 24 周大鼠肝呈黄灰色,肝组织缩小,表面凹凸不平,质地坚硬(见图 6)。光镜下见正常组大鼠肝小叶结构清晰、完整,肝细胞及肝血窦呈放射状整齐排列,随着时间的延长,正常组 24 周大鼠肝细胞可见小泡性脂肪病变。造模组 8 周大鼠肝内可见肝小叶排列紊乱,肝血窦扩张,可见少许的炎症细胞浸润,肝细

胞相对排列整齐,肝细胞未见明显坏死;造模组 16 周大鼠肝内可见粗大纤维组织增生,纤维再分隔,假小叶形成,炎症细胞浸润,少部分肝细胞排列紊乱,肝细胞核消失,出现部分肝细胞坏死;造模组 24 周大鼠肝内出现纤维大量沉积并包绕广泛形成假小叶,假小叶内有点状、小片状肝细胞坏死增多,可见肝血窦扩张(见图 7)。

2.6 不同造模时间点大鼠肝组织 Masson 染色及 Ishark 评分

如图 8,图 9,正常组大鼠肝组织仅于汇管区和中央静脉周围有少许胶原纤维存在,细且短,各时期 Ishark 评分均为 0 分。造模组 8 周大鼠肝组织中胶原纤维形成,可相互连接形成纤维间

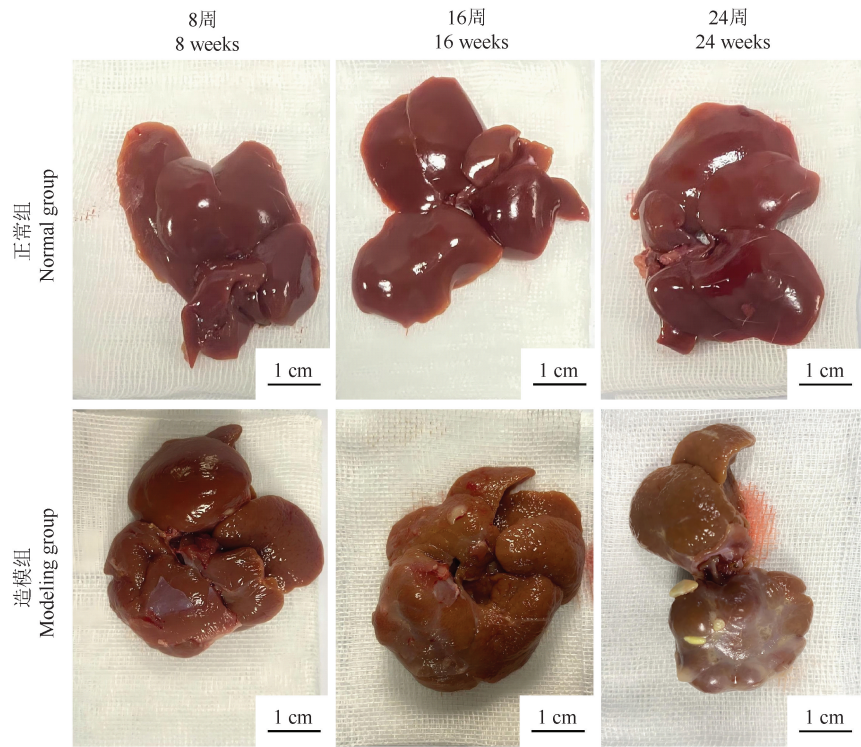


图 6 不同时间点各组大鼠肝外观

Figure 6 Liver appearance of rats in each group at different time points

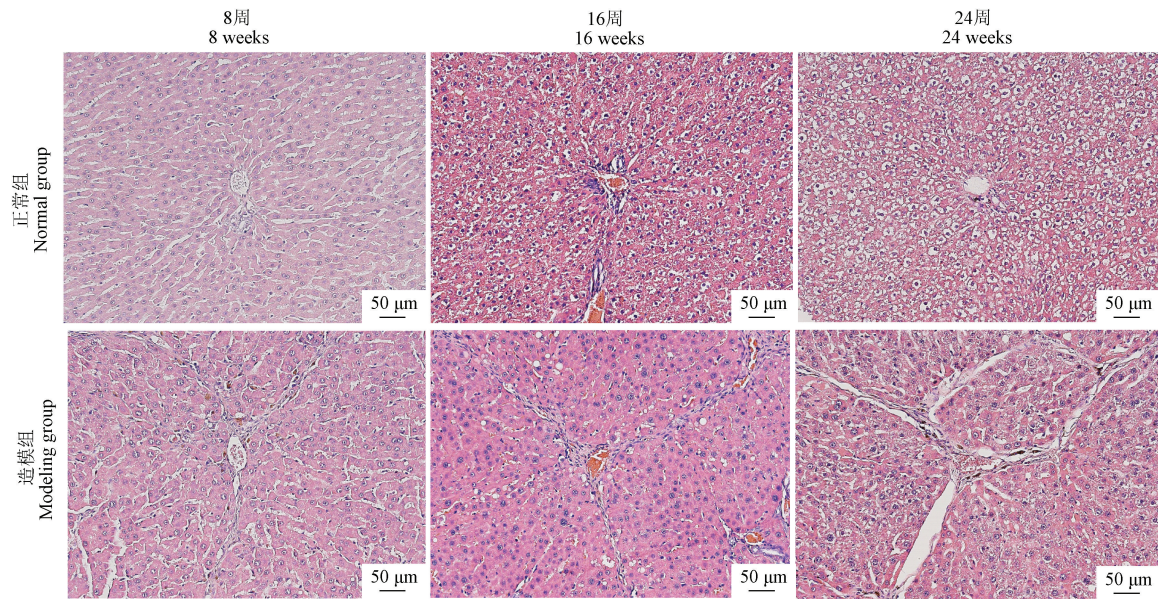


图 7 不同时间 HE 染色

Figure 7 HE staining at different times

隔,Ishark 评分为(2.64 ± 0.84)分;造模组 16 周大鼠肝组织中胶原纤维明显增多,部分已经形成假小叶,Ishark 评分为(4.0 ± 0.65)分;造模组 24 周大鼠肝组织胶原纤维变粗,假小叶广泛形成,Ishark 评分为(5.61 ± 0.5)分,组间比较均有显著性差异($P < 0.0001$)。

2.7 不同造模时间点大鼠血常规比较

与正常组比较,造模组 8、16 周大鼠的白细胞、红细胞、中性粒细胞百分比、血小板差异不大($P > 0.05$);造模组 8 周与造模组 16 周大鼠的白细胞、中性粒细胞百分比、血小板比较无显著性差异($P > 0.05$),但血小板数值有所下降;造模组

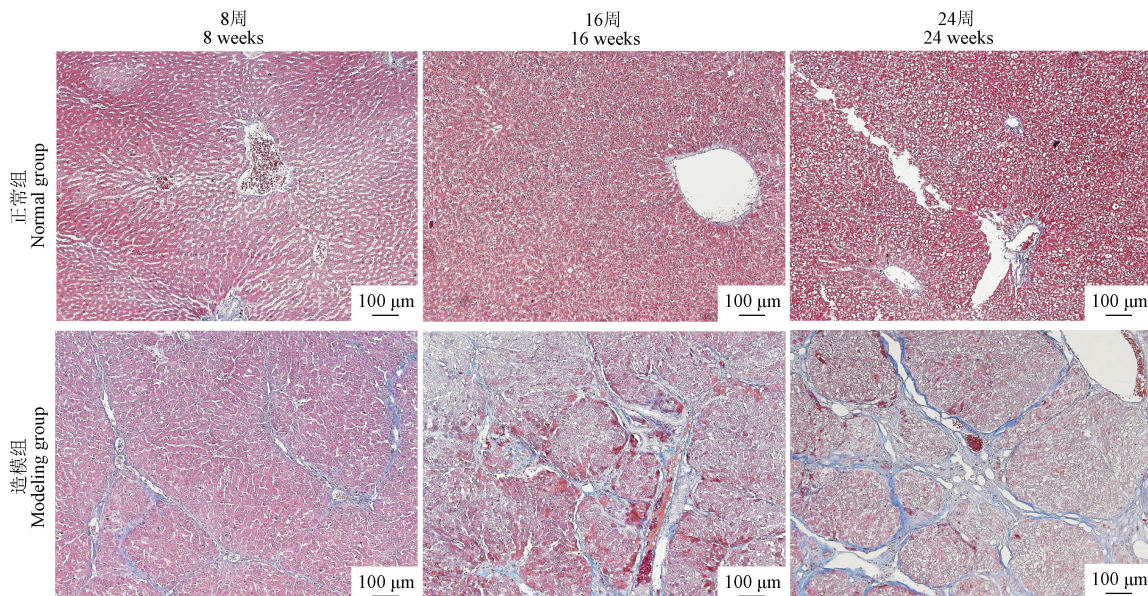


图 8 不同时间点各组大鼠 Masson 染色

Figure 8 Masson staining of rats in each group at different time points

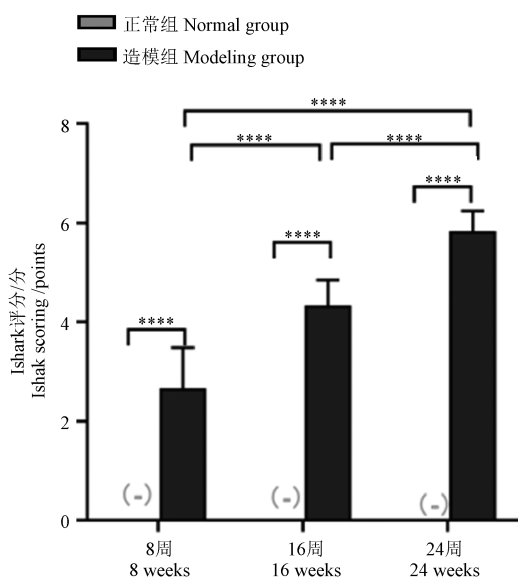


图 9 各组大鼠 Ishak 评分

Figure 9 Ishak scoring of rats in each group

16 周大鼠与造模组 24 周大鼠比较,造模组 24 周大鼠的白细胞、中性粒细胞百分比显著升高,血小板明显下降,红细胞轻度下降,说明可能存在感染;与正常组比较,随着造模时间延长,造模组的小血小板逐渐明显下降(见图 10)。

2.8 不同造模时间点大鼠肝功能变化情况

与正常组比较,造模组 8 周大鼠的转氨酶升高, TBIL 轻度升高, AST/ALT 比值、白蛋白水平无显著性差异;造模组 8 周大鼠与造模组 16 周大

鼠相比较,造模组 16 周大鼠的 AST、ALT、TBIL 显著升高 ($P < 0.001$, $P < 0.0001$, $P < 0.05$), AST/ALT 比值比较无差异 ($P > 0.05$), 白蛋白水平略有下降;造模组 16 周大鼠与造模组 24 周大鼠相比较,造模组 24 周大鼠的转氨酶升高幅度较造模组 16 周大鼠低, TBIL 仍显著升高(高于正常组约 5 倍), AST/ALT 比值下降明显并且更接近于 1, 说明肝细胞线粒体遭到大量破坏, AST 从线粒体和胞浆内释出;造模组 24 周大鼠白蛋白水平明显下降,与造模组 16 周大鼠比较均有显著性差异 ($P < 0.05$) (见图 11)。

2.9 不同造模时间点大鼠凝血功能比较

如图 12,与正常组相比,造模组 8 周大鼠凝血功能未见明显异常,随造模周期的延长,造模组 16 周大鼠 PT 出现延长 (16.5 ± 2.52) s, INR 比值增大 (1.34 ± 0.22) 小于 1.5;与造模组 16 周相比较,造模组 24 周大鼠的 PT 值显著延长 (21.88 ± 7.95) s, INR 比值显著增大 (1.80 ± 0.68) 且大于 1.5,提示凝血功能严重障碍甚至可能出血。

3 讨论

CLF 仍具有较高的发病率和死亡率,究其原因是对其发病机制及病理演变过程的研究不足,面对此类病患,如何提高其生存质量,减少并发

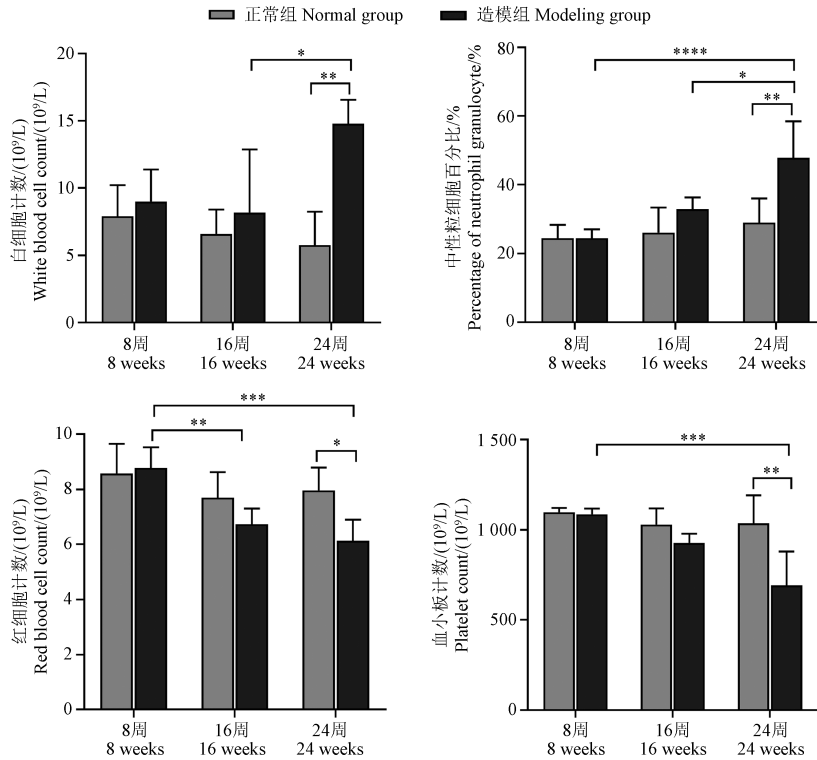


图 10 不同时间点各组大鼠白细胞、红细胞、中性粒细胞、血小板比较

Figure 10 Comparison of white blood cell, red blood cell, neutrophils and platelets of rats in each group at different time points

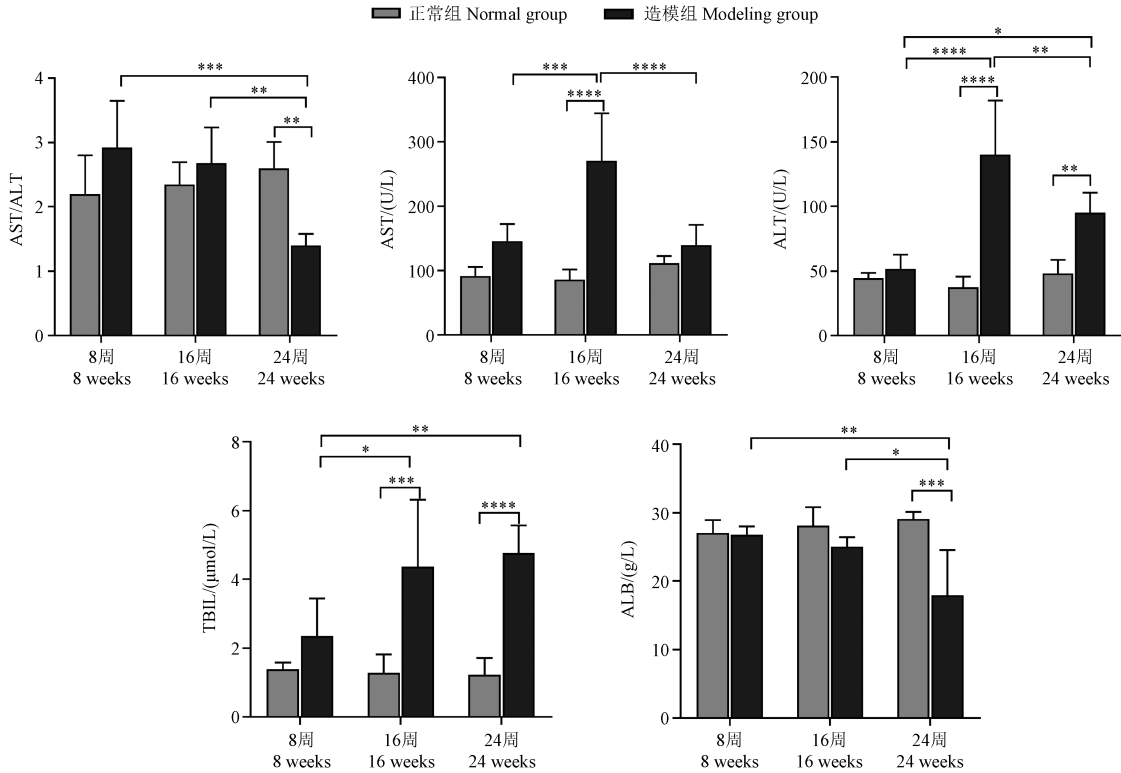


图 11 不同时间点各组大鼠肝功能对比

Figure 11 Comparison of liver function of rats at different time points

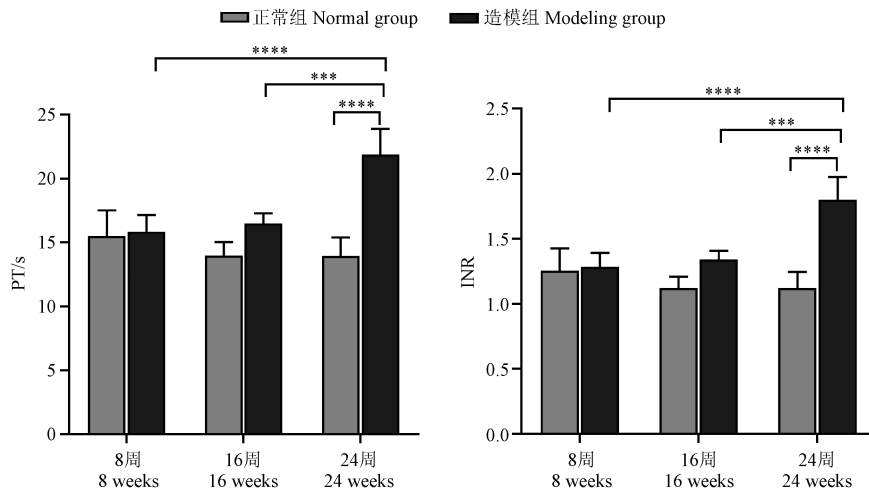


图 12 不同时间点各组大鼠凝血功能比较

Figure 12 Comparison of blood coagulation function in each group at different time points

症的发生,延长生命周期迫在眉睫^[9]。目前,该病的主要挑战之一是对潜在发病机制理解不充分,导致肝性脑病、感染和顽固性腹水等并发症的快速进展且难以挽回。现阶段,国际及国内尚未发现一种较好的 CLF 动物模型制备方法能完整地模拟人类 CLF 病理演变过程,以至于在深入理解发病机制并形成有效治疗策略方面难有创新性突破,迫切需要开发一种高效、稳定、便于操作的慢性肝衰竭大鼠动物模型,为开展相关基础研究提供关键技术支撑。

CLF 发病的前驱基础是慢性肝病/肝硬化,而肝硬化动物造模方法大多为 CCl_4 诱导法、总胆管结扎法、二甲基亚硝胺诱导法、乙醇诱导法等。目前,针对不同肝衰竭疾病动物模型构建方法有所不同,建立 ACLF 动物模型常用的方法有以下 4 种: CCl_4 联合 D-半乳糖胺/脂多糖法、肿瘤相关抗原联合脂多糖法、血清白蛋白法、胆管结扎术法。在大多数 ACLF 模型中,慢性损伤是由 CCl_4 、胆管结扎或猪血清诱导的,而急性损伤是由 D-半乳糖胺/脂多糖诱导的^[10]。相对而言,肝硬化、慢加急性肝衰竭的动物模型造模方法较多,而慢性肝衰竭的动物实验研究却止步不前,课题组致力于急性肝衰竭,慢加急性肝衰竭的基础和临床研究,在基础实验方面,经验丰富,配备有专业的科研人员,基于此,在本研究中从既往慢加急性肝衰竭及慢性肝衰竭造模实验中寻找了经验,借鉴临床 CLF 患者的病理变化特点,完整地构建了成模率高、重复性好的 CLF 大鼠动物模型。

在本研究中,设置了正常组、造模组,各组大鼠的饲养环境、饮食等情况相同,仅造模周期不同。在造模第 8 周大鼠出现转氨酶、胆红素升高,肝组织 HE、Masson 染色显示纤维形成,说明该阶段存在慢性肝炎过程;在造模第 16 周,转氨酶、胆红素显著升高,白蛋白下降,PT 延长,INR 增大,血小板减少,肝超声显示肝硬度值增加、门静脉直径变宽、门静脉流速下降及血流阻力增加,出现腹水,肉眼可见肝表面变粗,凹凸不平,Masson 染色可见纤维结缔组织增生假小叶形成,证明该阶段存在肝纤维化→肝硬化代偿期/失代偿期过程;在造模第 24 周除了上述指标出现更显著异常以外,存在低蛋白血症,合并感染,出现顽固性腹水,HE 染色显示有不同程度的肝细胞坏死,血氨升高显著,大鼠记忆力、定向力下降出现肝性脑病,这一系列表现符合肝衰竭诊治指南中慢性肝衰竭的诊断^[2],可表明大鼠慢性肝衰竭模型建立成功。

综上所述,本研究采取的低剂量 CCl_4 橄榄油腹腔注射长期诱导能较好模拟肝从肝炎→肝纤维化→肝硬化→慢性肝衰竭的疾病全程^[11],从血液学指标、病理学指标、超声检测等方面均较好地复制了慢性肝衰竭的疾病特征,且具有较高的成模率和较低的死亡率,操作简单,具有良好的稳定性,可作为慢性肝衰竭模型制备标准的参考。

参 考 文 献 (References)

- [1] LIN D, CHEN H, XIONG J, et al. Mesenchymal stem cells

- exosomal let-7a-5p improve autophagic flux and alleviate liver injury in acute-on-chronic liver failure by promoting nuclear expression of TFEB [J]. Cell Death Dis, 2022, 13 (10): 865.
- [2] 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊治指南 [J]. 中华肝脏病杂志, 2019, 27(1): 18-26.
- Liver Failure and Artificial Liver Group, Chinese Society of Infectious Diseases, Chinese Medical Association, Severe Liver Disease and Artificial Liver Group, Chinese Society of Hepatology, Chinese Medical Association. Guideline for diagnosis and treatment of liver failure [J]. Chin J Hepatol, 2019, 27(1): 18-26.
- [3] LOU T W, YANG R X, FAN J G. The global burden of fatty liver disease: the major impact of China [J]. Hepatobiliary Surg Nutr, 2024, 13(1): 119-123.
- [4] XIAO J, WANG F, WONG N K, et al. Global liver disease burdens and research trends: analysis from a Chinese perspective [J]. J Hepatol, 2019, 71(1): 212-221.
- [5] WLODZIMROW K A, ESLAMI S, ABU-HANNA A, et al. Systematic review: acute liver failure-one disease, more than 40 definitions [J]. Aliment Pharmacol Ther, 2012, 35 (11): 1245-1256.
- [6] LI N, GU H, ZHU Y, et al. Recent advances in the treatment of liver failure [J]. Med. Philos, 2018, 39 (8B): 50-54.
- [7] MEZZANO G, JUANOLA A, CARDENAS A, et al. Global burden of disease: acute-on-chronic liver failure, a systematic review and meta-analysis [J]. Gut, 2022, 71 (1): 148-155.
- [8] SINGANAYAGAM A, TRIANTAFYLLOU E. Macrophages in chronic liver failure: diversity, plasticity and therapeutic targeting [J]. Front Immunol, 2021, 12: 661182.
- [9] ARORA G, KEEFFE E B. Management of chronic liver failure until liver transplantation [J]. Med Clin North Am, 2008, 92(4): 839-860.
- [10] LI F, MIAO L, SUN H, et al. Establishment of a new acute-on-chronic liver failure model [J]. Acta Pharm Sin B, 2017, 7(3): 326-333.
- [11] ARROYO V, ANGELI P, MOREAU R, et al. The systemic inflammation hypothesis: towards a new paradigm of acute decompensation and multiorgan failure in cirrhosis [J]. J Hepatol, 2021, 74(3): 670-685.

[收稿日期] 2024-10-23

《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》

依据文献计量学的原理和方法,经研究人员对相关文献的检索、统计和分析,以及学科专家评审,《中国实验动物学报》再次入编《中文核心期刊要目总览》2023 年版(即第 10 版)动物学/人类学类的核心期刊!

《中文核心期刊要目总览》采用定量评价和定性评价的学术水平和学术影响进行综合评价,受到学术界的广泛认同。

目前,本刊为中国科学引文数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库来源期刊、中国学术期刊综合评价数据库(CAJCED)统计源期刊、《中国学术期刊文摘》来源期刊;被中国生物医学文献数据库、《中国核心期刊(遴选)数据库》、《中国科技论文统计源期刊》(中国科技核心期刊)、《中文核心期刊要目总览》等数据库收录。

感谢编委、专家们的帮助与支持,感谢广大作者和读者朋友们的厚爱与信任。本刊编辑部将始终坚守办刊宗旨,不忘初心,严谨办刊,开拓进取,不断创新,向世界一流期刊看齐。

