

文章编号 1006-8147(2014)06-0433-04

论 著

## 诱导型狨猴肝纤维化模型的建立

李萌乾,王青松,郭正隆,尹海芳

(天津医科大学基础医学研究中心,天津医科大学细胞生物学系,天津 300070)

**摘要** 目的:建立诱导型狨猴肝纤维化模型。方法:手术切除普通狨猴部分肝脏,通过腹腔注射二乙基亚硝胺(DENA-2.5 mg/kg),并利用体质量和肝功能检测、病理分析、免疫组化、胶原染色和B超小动物活体成像等手段进行监测。结果:手术切除肝脏促使狨猴肝脏再生,并伴随肥大和炎症反应;DENA药物诱导会引发与人类类似的肝脏炎症,肝脏胶原聚集和血管增生,最终导致狨猴肝脏纤维化。结论:手术切肝联合DENA化学诱导可以成功获得狨猴肝纤维化模型。

**关键词** 肝纤维化;普通狨猴;二乙基亚硝胺;肝切除

中图分类号 R575.2

文献标志码 A

### Establishment of drug-induced common marmoset model for hepatic fibrosis

LI Meng-qian, WANG Qing-song, GUO Zheng-long, YIN Hai-fang

(Research Centre of Basic Medical Science, Department of Cell Biology, Tianjin Medical University, Tianjin 300070, China)

**Abstract** **Objective:** To establish the drug-induced common marmoset model for hepatic fibrosis. **Methods:** Hepatectomy and intraperitoneal injection of DENA at the dose of 2.5 mg/kg was used and various assays were performed to monitor the bodyweight, liver function, pathology, and collagen in common marmosets. Furthermore, non-invasive imaging systems were applied i.e. B ultrasound and live animal imaging. **Results:** The generation of newborn liver and inflammation was accelerated by hepatectomy. DENA was effective in inducing hepatitis, vascular proliferation, accumulation of collagen and fibrosis as observed in clinic. **Conclusion:** The common marmoset model for hepatic fibrosis has been successfully established with the combination of hepatectomy and DENA.

**Key words** hepatic fibrosis; common marmoset; diethylnitrosamine; hepatectomy

肝纤维化是严重危害人类健康的肝脏损伤性疾病<sup>[1]</sup>,临床上多指由各种致病因子所致肝内结缔组织异常增生,导致肝内弥漫性细胞外基质过度沉淀的病理过程,是肝癌形成过程中的生理屏障和重要前期阶段。其致病原因多样,多为药物性肝炎、过量饮酒和脂肪肝等长期异常的肝脏内微环境导致<sup>[2]</sup>,但是具体发病机制尚不明确,同时目前缺少有效的治疗手段。肝纤维化的发病机制研究、治疗药物筛选等均需要与人类肝纤维化复杂病理和生化特点相似的肝纤维化动物模型,目前多采用大小鼠肝纤维化模型<sup>[3]</sup>,但是由于啮齿类与人类亲缘关系较远,导致其难以满足需要。普通狨猴(common marmoset)是一种来自于南美洲的小型非人灵长类,多世代生活于亚马逊热带雨林环境,其独特的进食特点导致其对消化类疾病尤其是肝脏疾病异常敏感,非常适合作为人类相应疾病的实验动物应用于研究<sup>[4]</sup>。本实验利用哺乳动物肝脏术后再生特性,通过外科手术切除部分狨猴肝脏促使其长出生新肝脏后,施加以二乙基亚硝胺(diethylnitrosamine, DENA)

进行化学诱导,成功建立了狨猴肝纤维化模型。

### 1 材料与方法

1.1 实验动物 普通狨猴来自于天津医科大学实验动物科学部,2~6岁雌猴3只,4~7岁雄猴3只。所有狨猴均单独饲养于天津医科大学实验动物科学部,动物均得到了妥善保护和关怀,并且得到动物伦理委员会的许可(许可编号SYXK 2009-0001)。

1.2 设备 全自动生化分析仪(荷兰, KX-21, Ritalselectra-E,由天津市第三中心医院提供),超声诊断仪(意大利,百胜,天津-牛津基因治疗联合实验室提供),石蜡切片机,石蜡包埋机(德国, Lecia,天津医科大学基础研究中心提供)。

### 1.3 方法

1.3.1 动物分组及手术 (1)分组:狨猴6只(雌雄各3只),分为对照组2只(雌雄各1只),诱导组4只(雌雄各2只);(2)切肝手术:动物准备:狨猴术前1d隔离饲养;术前断食断水4h。麻醉:采用标准化异氟烷麻醉。消毒:备皮碘伏消毒,酒精脱碘;切出部分肝脏:标准化切除,结扎止血,切除后清扫关闭腹腔。补液:乳酸林格液皮下注射4~6 mL<sup>[5]</sup>。

1.3.2 诱导药物给药 参考文献[6]报道与预实验结果,对狨猴进行腹腔注射DENA 2.5 mg/kg,3次/周。

基金项目 国家973重大科学研究计划资助项目(2012CB9401305)

作者简介 李萌乾(1988-),男,硕士在读,研究方向:肝癌肝损伤模型;通信作者:尹海芳, E-mail: haifangyin@tmu.edu.cn。

1.3.3 体质量测量 所有狻猴均在早晨进食前称重3次,取平均值以减少误差。

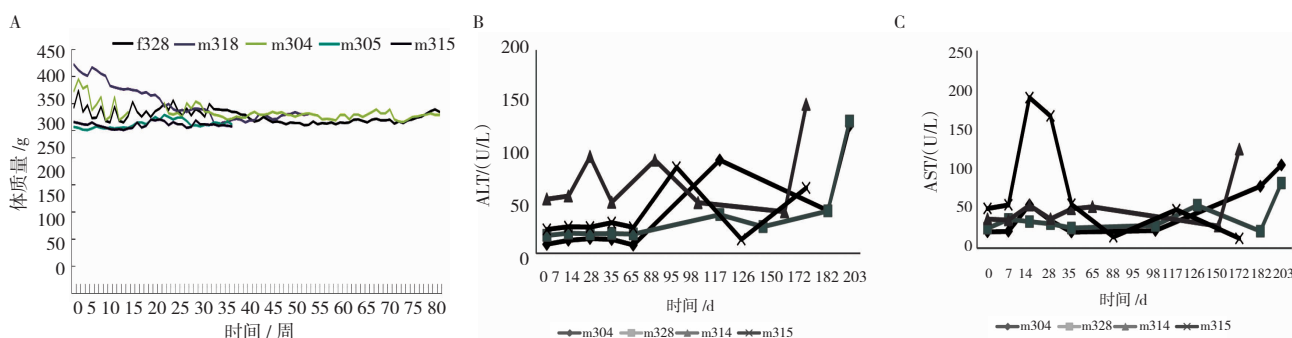
1.3.4 血生化检测 所有动物均在早晨进食前,经标准化手法固定和股静脉采血2 mL并转移至含促凝剂的2 mL真空分离胶采血管中,混匀、静止20 min后,常温离心(20 000 r/min, 20 min)。所有样品送天津市第三中心医院检验科进行生化及免疫检测<sup>[7]</sup>。

1.3.5 组织病理分析 (1)石蜡切片:采用标准化福尔马林组织固定、石蜡包埋和切片;(2)切片染色:苦味酸-天狼猩红染色,苏木精-伊红染色以及免疫组化染色均采用标准化临床病理染色技术;(3)超声诊断采用标准化诊断方法,操作与诊断标准参考临床标准<sup>[8-9]</sup>。

1.4 图片处理 应用软件 Photoshop、Adobe Illustrator CS。

## 2 结果

2.1 诱导肝纤维化全过程中生命体征的监控 在整个狻猴诱导过程中,体质量监测发现术后及诱导初期体质量下降明显,诱导60 d后体质量开始稳定而缓慢下降,直至肝纤维化阶段(图1A)。肝功能检测显示手术后初期约10 d,丙氨酸转氨酶(ALT)和天冬氨酸转氨酶(AST)开始显著升高,ALT最高值(平均为90 U/L)达到术前水平即正常水平(15 U/L)的6倍,AST的最高值(平均100 U/L)约为正常水平(35 U/L)的3倍;25 d左右开始下降,一般手术后35 d恢复到正常范围;在进行DENA给药后,狻猴的AST和ALT再次开始升高(超过术后恢复期峰值),但是较为缓慢且个体差异较大(图1B、1C),说明肝脏进入了慢性肝损伤状态。

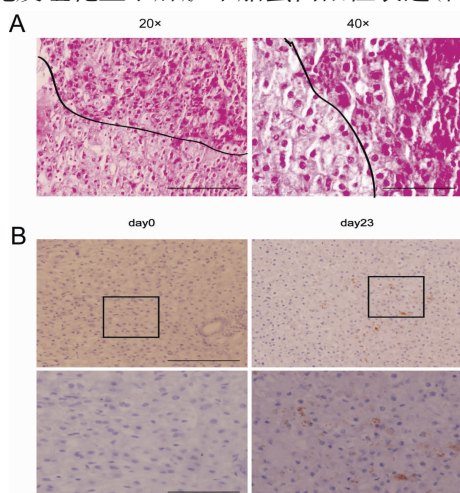


A: 诱导全身体质量变化;B: ALT变化趋势;C: AST变化趋势

图1 狻猴肝纤维化诱导过程中全程监测

Fig 1 Bodyweight and biochemical analysis

2.2 新生肝脏的产生 狻猴切肝手术后组织病理分析显示:在肝切除术23 d出现肝脏再生。与原有肝脏相比,新生肝脏细胞排列紧密,胞质伊红着色深(图2A);免疫组化显示肝脏甲胎蛋白阳性表达(图2B)。



A: 肝切除术后23 d新生肝脏,与原有肝脏具有明显细胞排列和着色不同,界限如图;B:免疫组化显示肝脏中甲胎蛋白表达阳性,而术前为阴性

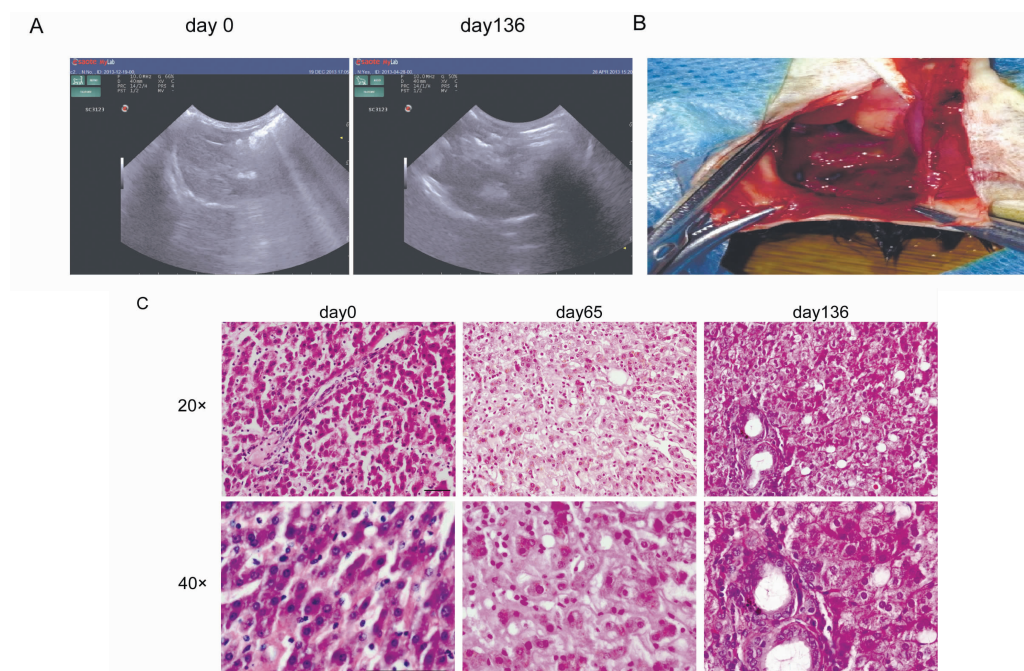
图2 术后新生肝脏检测

Fig 2 Detection of newborn liver after hepatectomy

2.3 肝炎期狻猴的生理特征变化 狻猴诱导后3周,超声检测显示与术前相比,肝脏表现为肥大、粘连,并伴有类似淋巴细胞聚集等现象(图3A)。二次手术时,发现肝切除手术时肝脏创面周围出现了粘连,脏器颜色暗沉(图3B),显示肝脏急性炎症状态。病理分析显示:随着药物诱导,狻猴肝脏逐渐出现组织损伤直至产生细胞水平变化的过程(图3C)。其中在诱导65 d后,可发现脂肪空泡的产生,而狻猴体质量未增加,推测为药物导致的肝脏脂肪代谢障碍。在诱导95 d发现在血管和胆管周围出现淋巴细胞的聚集。诱导136 d出现凋亡细胞,同时伴有淋巴细胞聚集,多核仁现象。

2.4 狻猴肝纤维化模型确立及生理特征 诱导狻猴血清的分析显示:与对照组比较,抗胰蛋白酶(A-TRYP)、5'-核苷酸酶(5'-Nucleotidase, 5'-NT)和总胆汁酸(TBA)显著性升高(分别由0.95 g/L升高至1.21 g/L,由2.8 U/L到7.1 U/L,由0.6  $\mu$ mol/L到8.1  $\mu$ mol/L),显示狻猴经过诱导开始出现肝纤维化。总蛋白(TP)、白蛋白(ALB)、球蛋白(GLO)、白蛋白/球





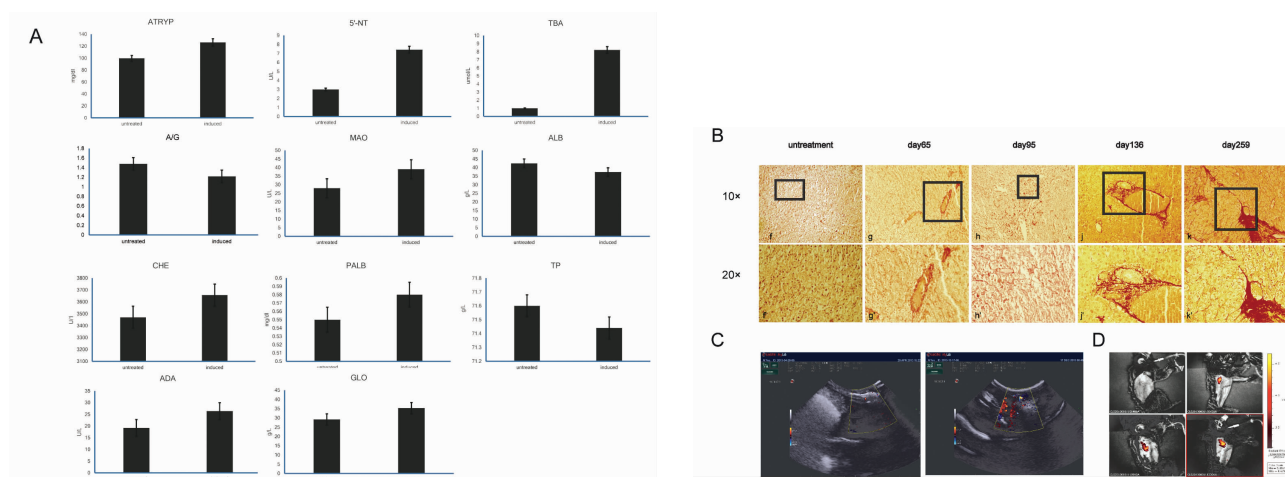
A: B 超检测显示肝切除手术+DENA 诱导后 136 d 影像; B: 诱导狨猴肝脏出现粘连、组织液泡等炎症特征; C: 病理分析(苏木精-伊红染色, HE 染色)显示肝脏在诱导各阶段的特征。

图 3 狨猴的肝炎期组织特点

Fig 3 Histopathological and image analysis for early induction in common marmoset

蛋白(A/G)、胆碱酯酶(CHE)、前白蛋白(PALB)、腺苷脱氨酶(ADA)、单胺氧化酶(MAO)等与对照比较,均无显著性差异,但个体间差异明显(图 4A)。组织苦味酸-天狼猩红染色结果显示(图 4B): 诱导 96 d 没有明显的胶原增加,但是诱导 136 d 后开始出现网状纤维,在诱导 259 d 出现片状纤维聚集。说明诱导狨猴进入了肝纤维化阶段,诱导型狨猴肝纤维化模型得以确立。

狨猴诱导 400 余天时 B 超多普勒检查显示肝脏中血流明显增多,可能为血管增生;而在 200 余天时尚无此种异常现象(图 4C)。小动物成像结果显示: 诱导 400 d 后狨猴肝脏部位出现纳米分子卟啉(特异性吸附血管)所标记 cy5.5 的荧光聚集,而对照组无荧光,说明诱导狨猴肝脏出现血管增生情况(图 4D)。



A: 肝纤维化常见血清学指标检测; B: 肝组织石蜡切片纤维化染色(苦味酸-天狼猩红染色, 红色为胶原, 黄色为其他组织); C: 肝脏 B 超检查显示狨猴在诱导 456 d 时, 肝脏内血管增生明显(红色、蓝色区域显示为血流, 其中红色为对流血, 蓝色为返流血); D: 小动物活体成像显示诱导狨猴肝脏血管增生; 红色部位为增生血管部位

图 4 狨猴肝纤维化的建立

Fig 4 The establishment of common marmoset model for hepatic fibrosis

### 3 讨论

普通狨猴因为其与人类较近的亲缘关系、较高的生育速率以及适合笼养的较小体型,使其越来越广泛地应用于医学研究。近年研究发现,狨猴因为独特的生理特点非常适合应用于消化和代谢系统的研究,尤其是对肝脏疾病具有高度的灵敏性。本研究利用天津医科大学特色实验动物普通狨猴,通过对狨猴手术进行肝脏部分切除后,刺激新生肝的产生,采用国际通用的肝损伤化学诱导药物二乙基亚硝胺进行诱导。在实验中发现,狨猴经过手术后肝功能恢复期、手术引起的炎症期和药物诱导引起的肝炎期,最后进入肝纤维化期,最终建立了能模拟人类肝纤维化发病特点的诱导型狨猴肝纤维化模型。

DENA 是医学研究中常用于诱导哺乳动物肝损伤模型的化学药物<sup>[10]</sup>,如原发性肝癌,药物性肝炎等。在诱导肝纤维化的实验中,与传统诱导药物四氯化碳和 DDT 等药比较,DENA 致死率较低但是有诱导周期较长,高剂量则可能引起肝黄化等缺点<sup>[11]</sup>。本实验中通过手术切除部分肝脏促使动物产生新生肝,大幅度提高了肝脏对诱导药物的敏感性,降低诱导药物使用剂量,在较短的时间内成功地建立了狨猴的肝纤维化模型,且克服了高剂量药物引起的动物死亡等问题,证明了该建模方法的可靠性和可行性。

通过与对照组比较,发现切肝手术会引起狨猴肝脏在新肝生长过程中出现增生、肥大,而手术导致的肝脏部位炎症和粘连等肝损伤也可能加快肝脏纤维化的进程。对照组动物在未进行切肝手术情况下只是单纯注射同等剂量 DENA 进行诱导,虽然出现了轻度的肝炎但是未出现肝纤维化症状,证明手术切肝对于诱导狨猴产生肝纤维化有促进、加速作用。同时发现只进行切肝手术的对照组在 60 d 后生化和病理参数恢复术前水平,除了肝损伤期的急性炎症外并未出现其他肝脏明显的损伤(结果中未提及)。

在本实验中,狨猴肝纤维化的诱导形成过程与临床病人发病过程高度类似<sup>[12]</sup>,均是经过肝损伤、肝炎、肝纤维化;在肝损伤阶段,动物出现消瘦等虚弱症状;肝炎期,组织病理分析发现炎症细胞聚集和组织形态的改变,如细胞排列疏松;肝纤维化期,出现胶原的聚集、片状连接<sup>[13]</sup>,同时肝脏中也出现了血管的增生。除了表征和组织病理的类似性,如狨猴在肝炎期出现肝功能酶(ALT、AST)升高,肝纤维期血清中纤维化标志物表达出现明显异常,如 TBA, 5'-NT 等显著升高,与肝纤维化病人情况一致<sup>[14]</sup>外,在涉及到具体肝纤维化分型的血生化标志物其个体

差异明显,显示狨猴正罹患不同类型的肝纤维化。这些典型、复杂的肝纤维化病理、生化特点在先前的啮齿类模型中均未见报道<sup>[15]</sup>。

通过比较可知,本实验所建立的诱导型狨猴肝纤维化模型可以模拟人类肝纤维化发病的病理和生化特点,具有明显的阶段性特点<sup>[16]</sup>,是适合进行肝纤维化研究的优良模型。

#### 参考文献:

- [1] Smyth R, Munday M R, York M J, et al. Comprehensive characterization of serum clinical chemistry parameters and the identification of urinary superoxide dismutase in a Carbon tetrachloride-induced model of hepatic fibrosis in the female Hanover Wistar rat[J]. *Int J Exp Pathol*, 2007, 88(5): 361
- [2] Zhao J, Zhou G, Li M, et al. A novel non-alcoholic steatohepatitis animal model featured with insulin resistance, hepatic inflammation and fibrosis[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2010, 45(11): 1360
- [3] Yermakoff J K, Fuller G C, Rodil J V. An experimental model of hepatic fibrosis induced by the administration of dibutyltin dichloride[J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1979, 49(1): 31
- [4] Kishi N, Sato K, Sasaki E, et al. Common marmoset as a new model animal for neuroscience research and genome editing technology[J]. *Dev Growth Differ*, 2014, 56(1): 53
- [5] Ludlage E, Mansfield K. Clinical care and diseases of the common marmoset (*Callithrix jacchus*)[J]. *Comp Med*, 2003, 53(4): 369
- [6] Kovalszky I, Szeberenyi S, Zalutnai A, et al. Modification of DENA-induced hepatocarcinogenesis by CCl<sub>4</sub> cirrhosis. Comparison of the marker enzyme patterns[J]. *Carcinogenesis*, 1992, 13(5): 773
- [7] Aboul-Ela L M, Shaaban S. A lab-clinical study of reinforced acrylic resin dentures. Composite dentures. Part II [J]. *Alex Dent J*, 1977, 2(2): 73
- [8] Dufour D R, Kost G J. Critical values launch interpretive Lab medicine and clinical pathology. Interview by Carren Bersch and Kristin N. Hale[J]. *MLO Med Lab Obs*, 2009, 41(3): 18
- [9] Villiers E. Applications of clinical pathology: from the practice Lab to the research bench[J]. *J Small Anim Pract*, 2007, 48(10): 543
- [10] Gäbele E, Dostert K, Dorn C, et al. A new model of interactive effects of alcohol and high-fat diet on hepatic fibrosis[J]. *Alcohol Clin Exp Res*, 2011, 35(7): 1361
- [11] Goo M J, Ki M R, Lee H R, et al. *Helicobacter pylori* promotes hepatic fibrosis in the animal model[J]. *Lab Invest*, 2009, 89(11): 1291
- [12] Chae H B, Jang L C, Park S M, et al. An experimental model of hepatic fibrosis induced by alcohol and CCl<sub>4</sub>: can the lipopolysaccharide prevent liver injury induced by alcohol and CCl<sub>4</sub>[J]. *Taehan Kan Hakhoe Chi*, 2002, 8(2): 173
- [13] Müller V, Brummer D, Erhardt W, et al. Arterialisation of the portal vein as a model for the induction of hepatic fibrosis: description of microsurgical models in the rat[J]. *Transpl Int*, 2005, 17(12): 822
- [14] Gonnert F A, Kunisch E, Gajda M, et al. Hepatic fibrosis in a long-term murine model of sepsis[J]. *Shock*, 2012, 37(4): 399
- [15] Wang B E, Jia J D, Zhang W S. Progress in non-invasive diagnostic model of hepatic fibrosis[J]. *Zhongguo Zhong Xi Yi Jie He Za Zhi*, 2006, 26(1): 5
- [16] Jung S A, Chung Y H, Park N H, et al. Experimental model of hepatic fibrosis following repeated periportal necrosis induced by allyl alcohol[J]. *Scand J Gastroenterol*, 2000, 35(9): 969

(2014-05-30 收稿)