

ANIT 诱发大鼠肝内胆汁淤积的动态病理变化观察

朱平生^{1*}, 龙爱华², 王兵²

(1. 河南中医学院肝病研究所, 郑州 450008; 2. 上海中医药大学肝病研究所, 上海 201203)

[摘要] 目的: 观察 ANIT 诱发大鼠胆汁淤积模型肝组织病理动态变化特点。方法: 一次性给予 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ANIT 复制大鼠肝内胆汁淤积模型; 于造模后 24, 48, 72, 96 h 分 4 批杀鼠取材, 观测大鼠肝组织病理学变化。结果: 与赋形剂组比较, 24 h 模型组大鼠肝组织汇管区、小叶周边可见新生小胆管样上皮细胞, 少量炎性细胞浸润及脂肪变, 有少量胶原纤维沉积; 48 h 时胆管上皮细胞增生明显, 呈花环状, 可见少量肝细胞的坏死灶, 炎性细胞浸润增多, 汇管区扩大, 增生胆管周围胶原沉积增加; 72 h 时胆管上皮细胞增生范围增大, 细胞扁平形, 管腔宽大, 外周基底膜及胶原纤维层增厚; 96 h 脂肪变减少, 胶原纤维增生减少, 增生的小胆管样上皮细胞范围开始缩小。结论: 一次性给予 ANIT 诱发的肝内胆汁淤积大鼠模型病变表现为急性肝内胆汁淤积、肝细胞损伤及胶原纤维沉积, 随着时间的延长其病理变化呈现先加重后逐渐恢复的趋势。

[关键词] 胆汁淤积; ANIT; 大鼠; 病理组织学

[中图分类号] R285.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2011)03-0190-02

奈异硫氰酸脂 (α -naphthylisothiocyanate, ANIT) 常被用来诱发实验性肝内胆汁淤积^[1], 本文参考国外文献^[2], 建立大鼠肝内胆汁淤积模型, 对造模过程中肝脏病理组织学变化进行动态观察, 分析探讨其特点, 为进一步应用此模型开展药理学研究提供参考。

1 材料与方 法

1.1 动物 Wistar 雄性大鼠 55 只, 清洁级, 体重 (200 ± 20) g, 中国科学院上海实验动物中心, 合格证号 SCXK (沪) 2006-0012, 上海中医药大学实验动物中心饲养, 造模和观察。

1.2 试剂 天狼猩红-饱和苦味酸液, 购自北京海德创业生物公司, 批号 CAT#26357-02。

1.3 模型复制及动态观测 按数字表随机法将大鼠分为 2 组: 模型组 31 只, 赋形剂组 25 只。大鼠禁食 12 h 后, 一次性给予 $100 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ ANIT, 按照 $5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 兑入赋形剂 (橄榄油) 中 ig, 赋形剂组仅给予等量橄榄油。ANIT 模型分别在造模后 24, 48, 72

h 分 3 批随机取赋形剂组 3 只、模型组 5 只大鼠处死取材, 于 96 h 处死剩余大鼠, 记录大鼠体重、肝重、脾重等一般情况。

1.4 样品采集及处理 经 2% 戊巴比妥钠以 $2 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ip 麻醉后, 大鼠仰卧位固定, 打开腹腔, 观察大体情况, 肝、脾的色、质、形态、体积及腹水情况。经下腔静脉采血, 分离血清; 摘取肝、脾称重后, 选取肝右侧最厚一叶, 切取 $1.0 \text{ cm} \times 0.8 \text{ cm} \times 0.3 \text{ cm}$ 肝组织 2 块, 10% 中性福尔马林固定, 常规制片, 切片 $4 \mu\text{m}$ 厚, 用 HE 染色及胶原纤维染色 (天狼猩红染色), 观察组织的病理变化。

1.5 观测指标与方法 肝纤维化程度评分标准 门管区纤维组织: 无增生“-”; 增生后面积占肝小叶 $1/3$ 以下为“+”; 占肝小叶 $1/3 \sim 2/3$ 为“++”; 占肝小叶 $2/3$ 以上为“+++”。小叶内纤维组织分布: 无增多为“-”; 比例增多但无搭桥现象为“+”; 出现少数搭桥为“++”; 弥漫搭桥为“+++”。形成假小叶的范围: 无假小叶为“-”; 假小叶的范围占切片 $1/3$ 以下为“+”; 占切片 $1/3 \sim 2/3$ 为“++”; 占切片 $2/3$ 以上为“+++”。小胆管增生程度: 无增生为“-”; 增生后面积占小叶 $1/3$ 以下为“+”; 占肝小叶 $1/3 \sim 2/3$ 为“++”; 占肝小叶 $2/3$ 以上为“+++”。每个“+”记 1 分, 每个标本记总分。

1.6 统计学方法 计量资料用统计分析软件 SPSS 13.0 中 ANOVA 程序进行单因素方差分析, 两两比较采用 q 检验。

[收稿日期] 2010-05-19

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目 (30500672); 河南省高校科技创新人才支持计划资助项目 (2009HASTII031); 河南中医学院博士科研基金资助项目

[通讯作者] * 朱平生, 博士, 副教授, 研究方向: 中医药防治肝胆病, Tel: 13783717957, E-mail: zhupingsheng@126.com

2 结果

2.1 肝脏病理组织学变化 HE 染色, 光镜下观察, 赋形剂组肝脏显示正常肝小叶结构, 结构清晰, 肝细胞索由中央静脉向四周呈放射状排列。24 h 模型组大鼠肝组织的汇管区、小叶周边可见到新生小胆管样上皮细胞, 少量炎性细胞浸润及脂肪变; 48 h 时胆

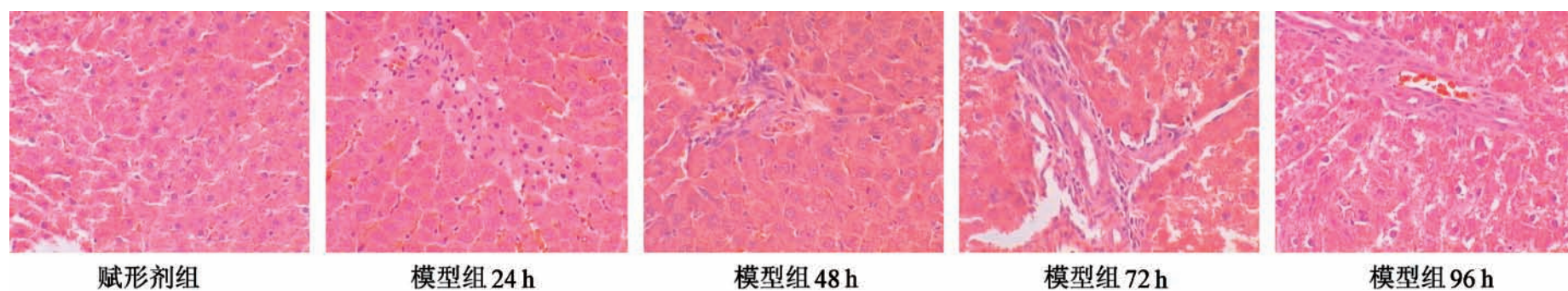


图 1 各时间点大鼠肝组织病理变化(HE, ×200)

2.2 肝组织胶原纤维增生程度的变化 天狼猩红染色, 光镜下观察, 赋形剂组仅在汇管区和中央静脉壁见少量胶原纤维, 24 h 模型组汇管区增生的胆管周围有少量胶原纤维沉积。48 h 后汇管区扩大, 增

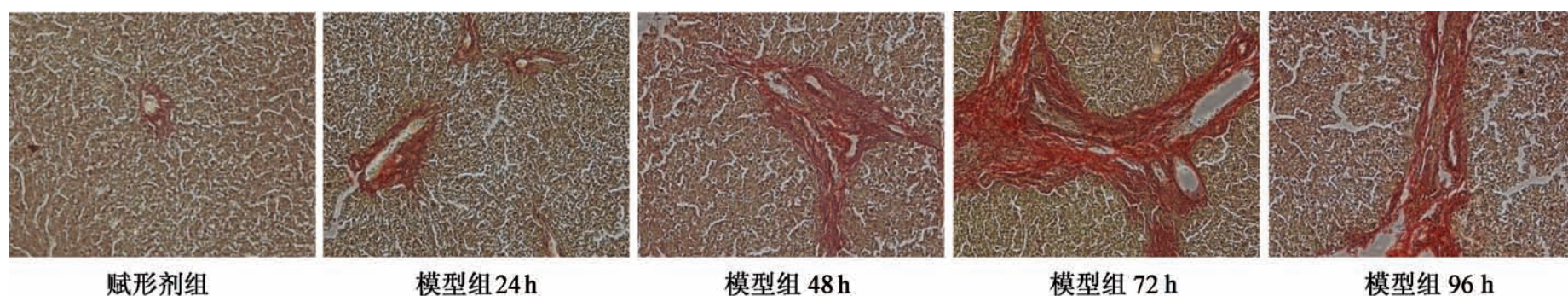


图 2 各时间点大鼠肝组织纤维化程度(天狼猩红染色, ×200)

表 1 胆汁淤积性纤维化程度评分结果(̄±s)

组别	n	肝纤维化积分
赋形剂	25	0 ²⁾
模型 24 h	5	2.80 ±0.84
48 h	5	3.60 ±0.89 ¹⁾
72 h	5	8.40 ±0.89 ²⁾
96 h	15	6.75 ±1.28 ²⁾

注: 与模型 24 h 比较¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$ 。

3 讨论

奈异硫氰酸脂不仅可造成实验动物肝内胆汁淤积, 也可引起肝细胞损伤, ANIT 对动物肝毒性的致病机制在病理生理学上的表现很像人类的药物性肝炎^[3], 在给药约 24 h 内, 会引起较重的胆汁淤积, 并伴随门静脉周围肝实质细胞损伤, 组织学检查可见肝小叶的门静脉周围区域有明显的炎性细胞浸润。有学者认为^[4-5] 炎性细胞浸润是 ANIT 造成肝实质细胞和胆管上皮细胞损伤的致病机制。

本实验结果显示, ANIT 诱发胆汁淤积大鼠肝组织的病理变化为胆管上皮细胞增生, 肝细胞坏死, 炎

管上皮细胞增生明显, 呈花环状, 可见少量肝细胞的坏死灶, 炎性细胞浸润增多; 72 h 时胆管上皮细胞增生范围增大, 细胞扁平形, 管腔宽大, 其外周基底膜及胶原纤维层增厚。96 h 脂肪变减少, 同时胶原纤维增生减少, 增生的小胆管样上皮细胞范围没有继续扩大, 反而开始缩小。见图 1。

生的胆管周围胶原沉积增加。72 h 后汇管区有明显的胆管增生及大量胶原纤维沉积。96 h 后胆管增生及胶原纤维沉积现象有所减轻。见图 2、表 1。

性细胞浸润及胶原纤维增生。病变程度随着时间的延长, 呈现先加重后逐渐恢复的趋势: 大鼠 ig ANIT 24 h 内就诱发了胆汁淤积, 同时引起肝细胞损伤及胶原纤维沉积, 从造模至 72 h, 其病变程度逐渐加重, 其后逐渐减轻, 至 96 h 已有较大程度的恢复。

[参考文献]

- [1] Krell H, Hoke H, Pfaff E. Development of intrahepatic cholestasis by alpha-naphthylisothiocyanate in rats [J]. *Gastroenterology*, 1982, 82: 507.
- [2] Jeffrey W Chisholm, Peter J Dolphin. Abnormal lipoproteins in the ANIT-treated rat: a transient and reversible animal model of intrahepatic cholestasis [J]. *J Lipid Research*, 1996, 37: 1086.
- [3] Mehendale H M, Roth R A, Jay Gandolfi A, et al. Novel mechanisms in chemically hepatotoxicity [J]. *FASEB J*, 1994, 8: 1286.
- [4] Hill D A, Roth R A. Alpha-naphthylisothiocyanate causes neutrophils to release factors that are cytotoxic to hepatocytes [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 1998, 148: 169.
- [5] Dahm L J, Schultze A E, Roth R A. An antibody to neutrophils attenuates alpha-naphthylisothiocyanate-induced liver injury [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1991, 256: 412.

[责任编辑 何伟]