

DOI: 10.19296/j.cnki.1008-2409.2024-06-004

· 论 著 ·

· ORIGINAL ARTICLE ·

ANIT 诱导胆汁淤积模型病变与恢复研究

高雅, 唐子轩, 郭凯, 曹后康, 张可锋

(桂林医学院广西高校高发病防治药理学重点实验室, 桂林 541199)

摘要 **目的** 本研究旨在建立一种模拟胆汁淤积及其自然恢复周期的动物模型, 并探究胆汁淤积的病理机制, 为临床防治该疾病提供科学依据。**方法** 选用 6~8 周龄的昆明雄性小鼠, 体质量为 18~22 g, 造模后按照恢复时间节点(0、2、4 周)分为 3 组。每组分为 3 个子组, 分别接受不同剂量(10、20、30 mg/kg)的 α -萘异硫氰酸酯 (ANIT) 灌胃处理, 持续诱导 4 周, 建立胆汁淤积性肝损伤 (CLI) 模型。在第 4 周后停止 ANIT 处理, 分别收集第 4、6、8 周的肝脏和血清样本, 观察肝组织病理变化, 检测血清生化指标和组织炎症因子。**结果** 病理学结果显示, 随着 ANIT 剂量的增加, 炎性细胞浸润、胆管上皮细胞增生加剧; 肝药酶等生化指标和炎症因子水平随 ANIT 剂量增加而升高, 但在停止造模后, 随着恢复期的延长, 部分检测指标逐渐恢复。**结论** 使用剂量不大于 20 mg/kg 的 ANIT 诱导 4 周的胆汁淤积模型小鼠, 其肝损伤具有自然恢复性。

关键词: 胆汁淤积; α -萘异硫氰酸酯; 恢复时间

中图分类号: R575.6

文献标志码: A

文章编号: 1008-2409(2024)06-0025-08

ANIT-induced cholestasis model in different periods of pathology and its natural recovery

GAO Ya, TANG Zixuan, GUO Kai, CAO Houkang, ZHANG Kefeng

(Key Laboratory of Pharmacology for Prevention and Treatment of High Incidence Diseases in
Guangxi Higher Education Institutions, Guilin Medical University, Guilin 541199, China)

Abstract **Objective** The aim of this study was to establish an animal model simulating cholestasis and its natural recovery cycle, and to investigate the pathological mechanism of cholestasis, to provide a scientific basis for the clinical prevention and treatment of this disease. **Methods** KM male mice aged 6~8 weeks with a body mass of 18~22 g were selected and divided into 3 groups according to the recovery time nodes (0, 2, 4 w) after modeling. Each group was divided into 3 subgroups, which received different doses (10, 20, 30 mg/kg) of α -naphthyl isothiocyanate (ANIT) by gavage treatment for 4 weeks to establish cholestatic liver injury (CLI) model. ANIT

基金项目: 国家自然科学基金项目 (82160811); 广西自然科学基金项目 (2023GXNSFAA026220); 广西高校中青年教师科研基础能力提升项目 (2023KY0529)。

第一作者: 高雅, 博士, 副教授, 研究方向为肝脏药理和病理学研究。

通信作者: 曹后康, zyxhckhk@163.com; 张可锋, xueshengcailiao@163.com。

treatment was stopped after the 4th week. Liver and serum samples were collected at the 4th, 6th, and 8th week, respectively, to observe the pathologic changes of liver histology and to detect serum biochemical indexes and tissue inflammatory factors. **Results** Pathology showed that inflammatory cell infiltration and bile duct epithelial cell proliferation intensified with the increase of ANIT dose. Biochemical indexes such as hepatic drug enzymes and inflammatory factor levels increased with the increase of ANIT dose, but some of the detected indexes were gradually recovered with the prolongation of the recovery period after cessation of modeling. **Conclusion** The cholestasis model mice induced by ANIT at a dose no greater than 20 mg/kg for 4 weeks had natural recovery.

Keywords: cholestasis; α -naphthyl isothiocyanate; recovery time

胆汁淤积性肝损伤(cholestatic liver injury, CLI)是一种复杂的肝脏病变,它可能引起肝内胆管狭窄、闭塞和胆汁酸分泌方式改变,从而导致肝细胞损伤、炎症和纤维化等一系列病理生理反应^[1-3]。胆汁淤积的危害广泛,不仅会导致肝功能异常,还可能引发黄疸、瘙痒、脂肪泻等临床症状,严重影响患者的生活质量。在严重的情况下,胆汁淤积可进展为肝硬化、肝衰竭,甚至增加患者肝癌的风险^[4]。因此,胆汁淤积的早期诊断和治疗对于改善患者预后至关重要。在临床治疗中,胆汁淤积常常需要针对其病因和病情严重程度采取不同的干预措施^[3]。胆汁淤积的发病原因较为复杂,包括遗传因素、药物毒性、感染、自身免疫疾病等,这些病因所导致的胆汁淤积往往呈现慢性进展的特点^[4]。此外,胆汁淤积的影响并不局限于肝脏,还可能波及其他器官,进而引发全身性的病理变化^[5]。

CLI 的诊断常依赖于一系列生化指标,这些指标反映了肝脏功能和胆汁流动状态的改变。胆汁酸是胆固醇在肝脏中代谢的产物,正常情况下以胆汁的形式通过胆管排入肠道,参与脂质的消化和吸收;当这一过程无法正常进行时,胆汁酸会进入血管^[6]。胆红素是红细胞分解产物,正常情况下由肝脏转化为胆汁酸后排出;当胆汁流动受阻时,胆红素在血液中积累,导致黄疸等症状^[7]。其中,总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)和总胆汁酸(total bile acid, TBA)的水平升高是胆汁淤积的重要标志,反映了胆红素代谢紊乱和胆汁排泄障碍^[8-9]。TBA 的水平升高则直接反映了胆汁淤积的程度,是评估胆汁流动受阻的关键指标^[10]。因此,胆汁酸水平的升高表示胆汁分泌或排泄功能受损^[11]。

本研究中通过监测小鼠血清中的谷丙转氨酶(glutamic-pyruvic transaminase, ALT)、谷草转氨酶(glutamic oxalacetic transaminase, AST)、碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)、TBA、TBIL 和 DBIL 水平,以及肝脏组织的病理学变化,来评估 ANIT 诱导的胆汁淤积模型建立程度。临床上胆汁淤积患者常常表现为 ALT、AST 和 ALP 水平的升高,以及 TBA、TBIL 和 DBIL 水平的显著升高,这与本研究模型小鼠的生化指标变化相似^[12]。此外,本研究中肝脏组织的病理学检查显示了与人类胆汁淤积相似的病变特征^[13],如胆管细胞增生和炎症细胞浸润,这进一步证实了模型动物的临床相关性。

尽管胆汁淤积的发病原因多样,但现有的动物研究模型多为急性胆汁淤积模型,这些模型往往采用较大剂量的 α -萘异硫氰酸酯(α -naphthyl isothiocyanate, ANIT)来诱导急性胆汁淤积^[14-15]。这种大剂量 ANIT 诱导的 CLI 模型虽然能够在短时间内再现胆汁淤积的病理特征,但其发病机制与人类胆汁淤积的常见病因存在显著差异^[16]。因此,这种造模方法并不能很好地反映人类疾病慢性发展的实际过程。

为了模拟更贴切临床胆汁淤积的实际情况,本研究旨在建立一种与临床更为接近的 CLI 模型,找出适宜的 ANIT 造模浓度和时间,探究胆汁淤积的发展过程及其自然恢复周期。

1 材料与方法

1.1 动物分组及处理

本研究使用了 72 只 6~8 周龄的昆明雄性小鼠[购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,生产许可证号 SCXK(湘)2019-0004],体质量 18~22 g。实验开始前,所有小鼠均在 20~24 °C 的温度、相对湿度

45%~65%的环境中适应性饲养1周,并保持每12 h明暗交替的光照条件,同时确保小鼠有充足的饲料和水源。小鼠适应性饲养后,按照恢复的时间点(0、2、4周)平均分为3组;而后,再将每组细分为3个不同剂量(10、20、30 mg/kg)的ANIT造模的子组;至此,总共形成了9个不同时间点或不同给药剂量的组别($n=8$)。所有小鼠接受对应剂量的ANIT灌胃,每日1次并持续4周,以建立胆汁淤积性肝损伤模型。0周组小鼠在造模4周后进行安乐死并收集小鼠血液和肝脏样本。从实验的第5周至第8周结

束,不再给予小鼠ANIT造模并给予充足的饲料和水饲养,使其自然恢复。2周组和4周组小鼠分别在造模第6周和第8周结束时进行安乐死并收集小鼠血液和肝脏样本,具体实验流程如图1所示。肝脏样本在4%多聚甲醛的溶液中保存。血液样本静置后,以5 000 r/min的速度离心15 min,分离出的血清在-20℃的条件下保存以待后续分析。本研究已经获得桂林医学院医学伦理委员会审核批准(GLMC-IACUC-2023018)。

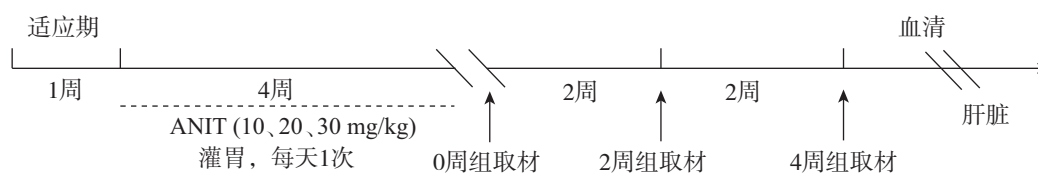


图1 实验流程图

1.2 主要实验试剂

ANIT(购自上海阿拉丁生化科技有限公司),检测ALT、AST、ALP、TBA、TBIL和DBIL等其他相关生化指标所需的试剂(均购自中国南京建成生物工程研究所),酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(购自中国武汉的酶免实业有限公司)。

1.3 仪器

Epoch全波长酶标仪(购自美国BioTek公司)、TGL-16K台式高速冷冻离心机(购自湖南湘仪离心机厂)、BS1105型电子天平(购自德国Sartorius公司)、Eppendorf移液器(购自德国Eppendorf公司)、KD-TS3A生物组织自动脱水机(购自浙江科迪仪器有限公司)、Tanon 4100型全自动化学发光图像分析系统(购自上海天能科技有限公司)。

1.4 组织病理学检测

首先,将肝脏组织固定在4%多聚甲醛中2 d;然后,进行脱水和石蜡包埋,将其切成厚度为4 μm 切片,并使用苏木精-伊红(HE)染色,进行组织学检查;最后,使用BX51光学显微镜拍摄图像并记录,以评估肝脏病理变化。

1.5 血清生化指标检测

按照试剂盒的说明对肝功能参数(ALT、AST、

ALP、TBA、TBIL和DBIL)进行检测。

1.6 ELISA检测

按照试剂盒的说明对肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)和白细胞介素(IL-1 β)进行检测,用于评价小鼠肝脏炎症水平。

1.7 统计学方法

使用SPSS 22统计软件进行数据分析,计量实验数据以($\bar{x}\pm s$)表示。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 组织病理学检测

如图2所示,在0周组中,相较于正常组,接受ANIT造模的不同剂量组(10、20、30 mg/kg)显示出不同程度的肝脏病变。主要病理改变包括以汇管区为中心的炎性细胞浸润和胆管细胞增生,且严重程度随ANIT剂量的增加而加重。在2周组和4周组中,肝脏的病理特征与0周组相似,而与2周组相比,4周组中ANIT10组和ANIT20组的肝脏病变程度显著减轻,主要表现为轻微的炎症反应和胆管细胞增生。

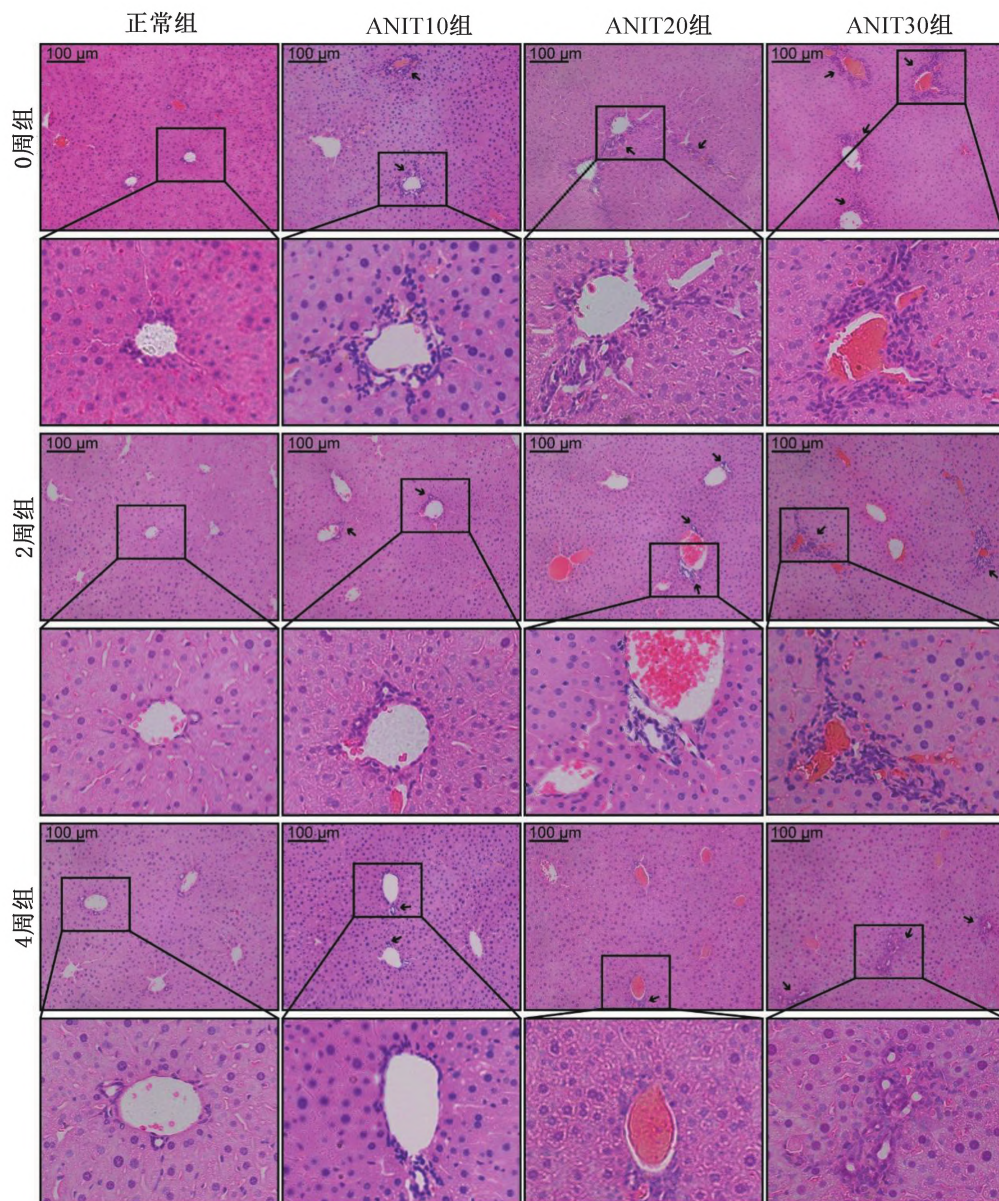
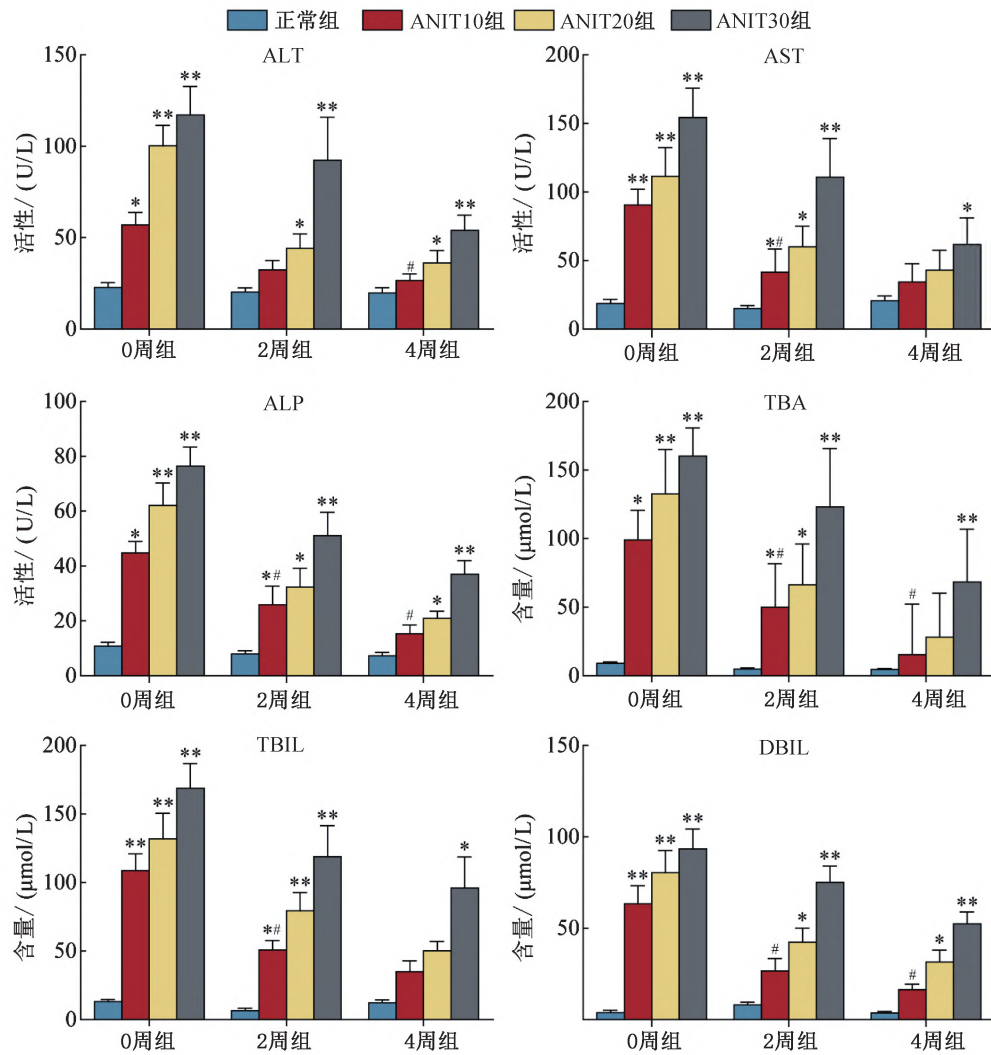


图 2 小鼠肝组织病理学检测

2.2 血清生化指标检测

本研究对小鼠的血清生化指标进行了检测,包括 ALT、AST、ALP、TBA、TBIL 和 DBIL。结果显示,与正常组小鼠相比,ANIT 造模小鼠的生化指标含量显著升高,且随着 ANIT 剂量的增加而升高。此外,

随着自然恢复时间延长,4 周组的 ANIT10 组和 ANIT20 组小鼠的 AST 和 TBIL 指标水平逐渐恢复至与正常组相比无统计学差异,具体变化趋势如图 3 所示。



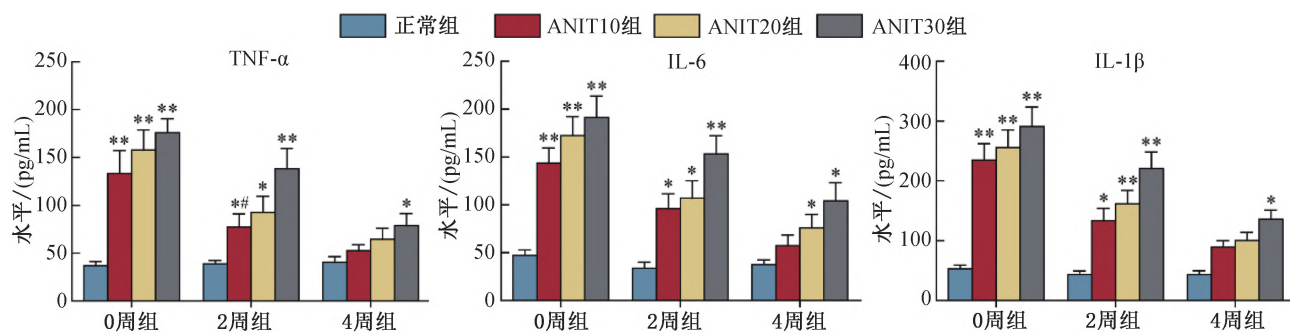
注:此图为血清 ALT、AST 和 ALP 活性检测与 TBA、TBIL 和 DBIL 含量检测。不同时间与其正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$;不同时间组与 ANIT30 组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

图 3 生化指标检测柱状图

2.3 ELISA 检测

为深入评估 ANIT 模型组小鼠肝脏的炎症状态,本研究采用 ELISA 对肝组织中的炎症因子进行定量分析,包括 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-6 和 IL-1 β 。如图 4、图 5 所示,检测结果表明,这些炎症因子的水平随 ANIT 造模剂量增大而升高。在大多数 ANIT 处理组中,这些炎症

因子的水平显著高于正常组。然而,随着恢复时间的延长,这些炎症因子的水平逐渐降低。尽管给予 ANIT 干预的组别在数值上仍然高于正常组,但在自然恢复 4 周之后,ANIT10 组和 ANIT20 组的 $\text{TNF-}\alpha$ 和 IL-1 β 与正常组相比无统计学差异。



注:此图为肝脏 TNF-α、IL-6 和 IL-1β 的水平检测。不同时间组与对应的正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$;不同时间组与 ANIT30 组比较,# $P<0.05$,## $P<0.01$ 。

图4 ELISA 检测柱状图

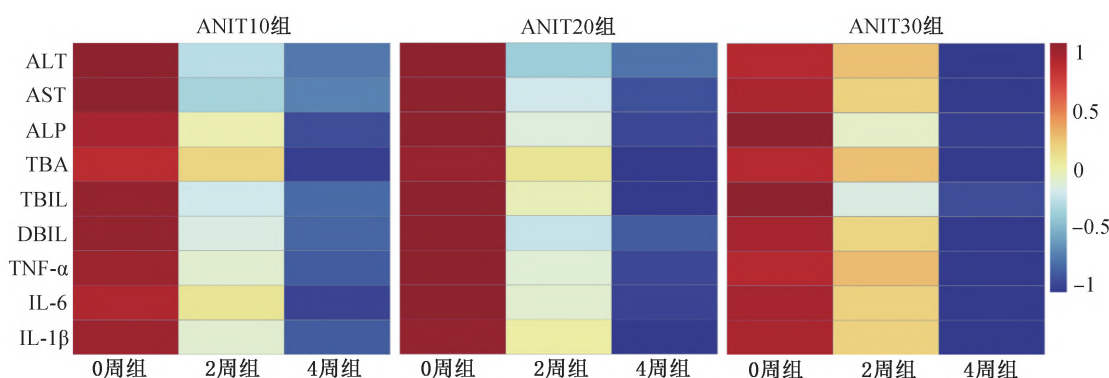


图5 生化指标和 ELISA 检测热图

3 讨论

从临床角度来看,CLI 的病因多种多样,包括遗传因素、药物反应、感染以及自身免疫疾病等^[17-19],这些因素通常会经历一个缓慢的病理发展过程。本研究旨在对 ANIT 诱导 CLI 的剂量和自然恢复时间进行研究,以更精确地反映临床 CLI 的发展过程及恢复情况。

通过对小鼠进行不同剂量的 ANIT 灌胃处理,来模拟人类胆汁淤积的病理状态,即在一个长时间的周期内持续给予较小剂量 ANIT 对小鼠进行胆汁淤积造模。在急性胆汁淤积性肝损伤中,由于大剂量的 ANIT 导致胆管细胞大量损伤,从而使胆汁无法顺利从肝脏排出,胆汁酸转运发生障碍,导致肝细胞发生坏死^[20-22]。严重的情况下,受损区域的细胞形态可能会完全丧失^[23-24],这种剧烈的病理变化虽然在某些情况下可以为研究提供参考,但这无法代表大多数临床上 CLI 的渐进性特征。相比于常见的急性

ANIT 诱导模型,本研究采用的 ANIT 诱导模型更具有优势,因为本研究采用的小剂量长时间给药策略所建立的模型,主要表现为慢性炎症和胆管细胞增生,这种病变过程更贴近于原发性硬化性胆管炎的临床特征^[25-26],而且这种模型能够更好地模拟人类胆汁淤积患者经历的缓慢病理进展。与此同时,本研究中的小鼠模型通过模拟这种小剂量 ANIT 所导致的渐进性损伤,为研究胆汁淤积的长期影响和恢复机制提供了一个更为真实的参照结果。本研究通过这种方法,能够更细致地观察不同剂量 ANIT 对肝脏损伤和恢复过程的影响。

本研究通过检测 CLI 小鼠的生化指标,揭示了 ANIT 剂量增加与小鼠血清中 ALT、AST、ALP、TBA、TBIL 和 DBIL 的水平升高之间的直接关联。这些生化标志物的升高与肝脏损伤和胆汁淤积的严重性紧密相连,为评估肝功能提供了重要指标。在 ANIT10 组和 ANIT20 组中,生化指标和 ELISA 数值在实验的

第6周和第8周与ANIT30组相比,呈现出明显的差异。这一研究结果表明,在较低剂量的ANIT造模下,肝脏展现出较强的抵抗损伤能力和自我修复能力。

本研究通过对ANIT30组的数据和病理切片分析发现,虽然ANIT30组恢复程度较好,但是与其他剂量组相比,其恢复速度有所减缓。这暗示了肝脏的自我修复能力在面对较高剂量ANIT(30 mg/kg)造成的损伤时存在局限性,而且短期内难以完全恢复。此外,在较低剂量ANIT(10、20 mg/kg)处理的组别中,小鼠在造模第4周到第6周的时间段内表现出较为显著的自然恢复迹象;与低剂量组相比,较高剂量ANIT(30 mg/kg)的组别则在造模第6周到第8周的时间段内才显现出恢复的趋势。这一研究结果表明,较大剂量的ANIT可能延长了小鼠肝脏的自我修复过程,从而影响了小鼠恢复的起始时间点和持续时间。

综上所述,本研究为建立与临床更为相近的CLI模型提供了动物模型的参考,该动物模型能够模拟胆汁淤积的缓慢发展及其自然恢复过程,这为未来CLI的机制研究和临床治疗策略的制定提供了科学依据。

4 结论

通过研究发现,昆明小鼠在20 mg/kg以下的ANIT剂量下表现出良好的自然恢复能力,适当剂量的ANIT诱导胆汁淤积模型在停止给药后,昆明小鼠肝脏的自我修复机制能够逐步逆转由胆汁淤积引起的损伤。

参考文献

- [1] 王雪芳,陈丽红,黄丽云,等.Lenta 胆管炎 12 例临床病理分析[J].临床与实验病理学杂志,2024,40(6):627-631.
- [2] 范松松,曹学峰,赵荣楠,等.胆汁淤积性肝病纤维化机制研究进展[J].中国现代医生,2023,61(1):125-128.
- [3] 汪佩文,董育玮.胆汁淤积的定义、病因及分类[J].内科理论与实践,2022,17(1):15-23.
- [4] CHALIFOUX S L, KONYN P G, CHOI G, et al. Extrahepatic manifestations of primary biliary cholangitis[J]. Gut Liver,2017,11(6):771-780.
- [5] HILSCHER M B, KAMATH P S, EATON J E. Cholestatic liver diseases: a primer for generalists and subspecialists[J]. Mayo Clin Proc,2020,95(10):2263-2279.
- [6] 湛洁,章述军.胆汁淤积发生机制的研究进展[J].重庆医学,2024,53(7):1074-1079.
- [7] 树成森,魏宁,杨晶,等.胆道粒子支架植入联合 TAI 序贯治疗不可切除肝门部胆管癌的临床疗效差异[J].医学影像学杂志,2023,33(9):1613-1618.
- [8] 洪国平,崔安琪,何志敏,等.一例疑似犬钩端螺旋体感染引发肾衰竭的血液透析治疗[J].宜春学院学报,2023,45(9):95-99.
- [9] 李宁,杨贞振.MRCP 在梗阻性黄疸性疾病中的应用价值及进展[J].医学影像学杂志,2008,18(1):87-90.
- [10] 罗欣,成鹏,陆茵,等.丁香酸调控胆汁酸代谢和肠道屏障改善胆汁淤积肝病的研究[J].南京中医药大学学报,2024,40(4):350-358.
- [11] 张灵雁,于东升,李晓萍.基于“肠道菌群-胆汁酸代谢”探讨茵陈黄颗粒对胆汁淤积症小鼠的改善作用及其机制[J].现代药物与临床,2023,38(11):2660-2671.
- [12] 中华医学会肝病学分会.胆汁淤积性肝病管理指南(2021)[J].临床肝胆病杂志,2022,38(1):62-69.
- [13] 张继平.胆汁淤积性肝病的病理学诊断[J].临床肝胆病杂志,2024,40(6):1093-1099.
- [14] 许伟,苗明三.基于数据挖掘的胆汁淤积动物模型应用分析[J].中药药理与临床,2023,39(7):91-95.
- [15] 张清清,曲颖,蔡晓波,等.胆汁淤积性肝病动物模型构建的研究进展[J].临床肝胆病杂志,2023,39(7):1754-1760.
- [16] 湛洁,章述军.胆汁淤积发生机制的研究进展[J].重庆医学,2024,53(7):1074-1079.
- [17] GUAN G Q, CAO H K, TANG Z X, et al. Mechanistic studies on the alleviation of ANIT-induced cholestatic liver injury by Polygala fallax Hemsl. polysaccharides[J]. J Ethnopharmacol,2024,328:118108.
- [18] 李华,李光明,胡坚方,等.急性胆汁淤积诱导大鼠肝细胞损伤的机制研究[J].实用医学杂志,2009,25(5):700-702.
- [19] 蒲诗云,任常瑜.核受体 FXR 在肝星状细胞及肝纤维化中的作用[J].生理科学进展,2022,53(1):19-23.
- [20] 邓昕雨,马骁.肝损伤发生机制及其治疗研究进展[J].中药与临床,2022,13(5):118-123.
- [21] 曹丹,陈祺,陈小橹,等.基于 Nrf2/HO-1 信号通路探讨四逆散对胆汁淤积性肝炎大鼠氧化应激反应的影响[J].

- 中国实验方剂学杂志,2024,30(12):1-7.
- [22] 谭张奎,陈利锋,卢绮萍.消黄去疸汤对胆汁淤积性肝损伤大鼠肠物理屏障及 Th17/Treg 平衡的影响[J].中成药,2024,46(4):1327-1331.
- [23] 袁腾腾,王雷,唐亚楠,等.芍药苷保肝药理作用及新剂型的研究进展[J].药学研究,2022,41(12):808-814.
- [24] 苑翠星.早产儿胆汁淤积症的危险因素分析[D].石家庄:河北医科大学,2021.
- [25] 陈小青,王迎春.肝内胆汁淤积性肝病的病因与治疗[J].实用肝脏病杂志,2018,21(2):163-165.
- [26] 姚光弼.肝脏对胆汁形成和分泌的作用[J].肝脏,2004,9(2):106-109.
- [收稿日期:2024-09-12]
- [责任编辑:郭海婷 英文编辑:李佳睿]