

DOI: 10.3969/j.issn.1005-8982.2021.12.009
文章编号: 1005-8982 (2021) 12-0046-05

综述

小鼠肝纤维化模型复制方法的研究进展*

王梓睿, 田飞鸿, 饶木艳, 姚继红, 李华, 王丽
(大连医科大学 药学院, 辽宁 大连 116044)

摘要: 肝纤维化是肝损伤后修复反应的失衡, 其发生机制尚未明确。复制与人类肝纤维化相似的动物模型是深入研究肝纤维化发病机制与药物治疗的重要基础。该文主要针对胆汁淤积、毒物诱导、代谢障碍、酒精损伤、免疫异常及血吸虫等致肝纤维化模型复制方法进行综述, 以供肝纤维化研究者选择参考。

关键词: 肝硬化; 模型; 动物; 小鼠

中图分类号: R657.31

文献标识码: A

Research progress of mice models for hepatic fibrosis*

Zi-ru Wang, Fei-hong Tian, Mu-yan Rao, Ji-hong Yao, Hua Li, Li Wang
(College of Pharmacy, Dalian Medical University, Dalian, Liaoning 116044, China)

Abstract: Hepatic fibrosis is a disturbance of repair responses after liver injury, but the underlying mechanism is not clear. To establish the animal models which mirror human liver fibrosis is an important basis for further study of the pathogenesis and drug treatment of liver fibrosis. Thus, this review briefly summarizes current methods of establishing hepatic fibrosis models in mice, including the paradigms induced via cholestasis, toxic substances, metabolic disorders, alcohol administration, immune abnormalities and schistosomiasis, which can serve as a reference for further researches on hepatic fibrosis.

Keywords: hepatic fibrosis; model, animal; mice

肝纤维化指由于多种病因导致肝细胞发生变性、炎症及坏死等, 进而刺激肝细胞外基质合成与降解失调, 造成肝脏内的纤维结缔组织异常增生、沉积而引起的一系列病理、生理过程^[1]。遗传、代谢、炎症、毒素、药物及寄生虫等各种刺激都可以引起肝脏纤维化^[2]。但无论何种病因引起的肝损伤, 其纤维化过程一致, 即以肝星状细胞的活化为主要特征。肝星状细胞活化后获得肌成纤维细胞表型, 并在肝脏分泌、沉积大量细胞外基质^[3-4]。当肝脏损伤持续时间较长, 慢性炎症刺激和细胞外基质的持续沉积会导致瘢痕组织替代

正常肝脏组织, 约30%肝纤维化患者逐渐发展为肝硬化甚至肝癌^[4]。

阐明肝脏纤维化的发病机制, 开发治疗药物, 预防、治疗甚至逆转肝纤维化, 一直是治疗慢性肝脏损伤的核心环节。目前肝纤维化动物模型以多种啮齿类动物为主^[5], 考虑实验动物成本和转基因动物多为小鼠, 因此越来越多肝纤维化研究用小鼠进行模型复制。根据引起肝纤维化的原因, 可将小鼠肝纤维化模型分为以下几种类型^[5], 并将其优缺点综述如下(见表1)。

收稿日期: 2020-12-17

* 基金项目: 国家自然科学基金(No: 81773799); 辽宁省博士科研启动基金项目(No: 20170520343)

[通信作者] 王丽, E-mail: wldl2007@126.com; Tel: 0411-86110412

表 1 不同小鼠肝纤维化模型的优缺点比较

模型	优点	缺点
胆管结扎	成模快,可重复性高	需手术操作
转基因小鼠		
<i>Mdr2</i> ^{-/-}	可重复性好	周期较长(3~6个月)
<i>dnTGFBβ II</i>	类似人类原发性胆管炎	暂无明显缺点
<i>NOD.c3e4</i>	类似人类原发性胆管炎	肝外胆管有损伤
<i>Il2α</i> ^{-/-}	类似人类原发性胆管炎	暂无明显缺点
<i>Ae2</i> _{a,b} ^{-/-}	类似人类原发性胆管炎	暂无明显缺点
DDC 饮食	类似人类原发性胆管炎	暂无明显缺点
ANIT 饮食	成模快	暂无明显缺点
CCl ₄	常用,可复制性高,成模快,类似人类纤维化特征	口服给药死亡率高
TAA	注射给药成模快	口服给药周期长
DMN	成模快	可诱导基因变异,致癌
高脂饮食	成模快,类似于胰岛素抵抗和代谢综合征的特点	暂无明显缺点
蛋氨酸-胆碱缺乏饮食	成模快,强脂肪性肝炎伴肿瘤坏死因子升高	可诱变,只能侧面反映人类非酒精性脂肪性肝炎,无胰岛素抵抗,体重减少,结果差异大
胆碱缺乏饮食	脂肪变性-炎症-纤维化	暂无明显缺点
胆碱缺乏-乙硫氨酸供给饮食	在非酒精性脂肪性肝炎方面比胆碱缺乏更有优势,激活肝前体细胞	暂无明显缺点
乙醇自由喂养	酒精性肝病相关研究	暂无明显缺点
Con A	免疫性肝纤维化	缺乏人类病毒感染持续复制阶段以及人类肝脏实质持续损伤的病理过程
血吸虫尾蚴	血吸虫病性肝纤维化及肝硬化	应用范围受限

注: *Mdr2*^{-/-}:多药耐药基因2; *dnTGFB β II*:显性负性突变转化生长因子 β II受体; *Il2 α* ^{-/-}:白细胞介素2R α ; *Ae2*_{a,b}^{-/-}:阴离子交换蛋白-2_{a,b}; *NOD.c3e4*:c3e4突变致非肥胖性糖尿病基因; DDC:3,5-二乙氧基羰基-1,=,4-二氢二吡啶; ANIT: α -萘异硫氰酸盐; CCl₄:四氯化碳; DMN:二甲基亚硝胺; TAA:硫代乙酰胺; Con A:刀豆蛋白A。

1 胆汁淤积致肝纤维化

1.1 胆总管结扎法

胆汁淤积是急慢性肝脏疾病引起肝脏纤维化及肝硬化的主要原因之一。胆总管结扎是复制胆道梗阻性胆汁淤积肝纤维化模型最常用的方法。将8~10周小鼠麻醉,开腹后游离胆总管进行双重结扎,并在两处结扎线间离断,以确保胆总管完全阻断,之后手术线缝合,关闭腹腔^[6-7]。胆总管结扎后小鼠进食量减少,皮毛散乱无光泽,行动变少且对外界刺激(如声、光等)的反应减弱,尿液颜色加深,深红带黄,似浓茶样改变。第15天时,肝脏开始明显改变,肝脏明显肿大,谷丙转氨酶、谷草转氨酶升至正常肝脏水平的10倍以上,经HE染色及天狼星红染色后,胆总管结扎小鼠肝组织可见明显

改变:肝脏汇管区及胆管周围肝细胞肿胀、破裂、空泡变性,炎症细胞浸润表现明显,门静脉周围及窦周纤维化明显^[8]。胆总管结扎法复制小鼠肝纤维化模型,操作简单,成模率高,肝脏纤维化明显,指标稳定,短期内纤维化不会自行逆转。实验过程中要严格无菌操作,避免后期感染,必要时可在术中或术后给予少量抗菌药物预防。胆总管结扎要熟练、扎实,以防手术线脱落,胆汁或肠内消化液流入腹腔,造成腹腔炎症引起实验动物死亡。

1.2 转基因动物法

近年来,随着转基因小鼠的研究不断成熟,转基因动物在慢性胆汁淤积致肝纤维化和自身免疫性肝纤维化方面的报道也逐渐增多。目前已发现的相关基因有 *Mdr2*、*Tgfb β 2*、*Il2 α* 、*Ae2*_{a,b}和 *NOD.c3e4* 等。*Mdr2* 编码胆小管磷脂的P-糖蛋白转

运体,参与胆汁磷脂(磷脂酰胆碱)的排泄。当 *Mdr2*(*Abcb4*)被敲除,磷脂酰胆碱向胆汁内转运不足,诱发非脓性胆管炎伴门静脉炎,引起导管增生,管腔狭窄、阻塞。小鼠自出生起3~6个月,可出现硬化性胆管炎合并肝纤维化及肝细胞癌^[9]。原发性硬化性胆管炎系慢性胆汁淤积性肝病,以病理性免疫介导引起肝内小叶间胆管炎为特征,肝内、外胆管系统出现进行性炎症和纤维化。机体血清抗线粒体抗体阳性,肝内大胆管呈现节段性扩张与缩窄,导致局部胆管狭窄甚至闭塞,胆管出现多病灶狭窄,诱发肝纤维化,最终导致肝硬化^[10]。在肝星状细胞活化、细胞外基质增多等过程中,转化生长因子 β 发挥重要作用^[11]。显性负性突变转化生长因子 β II受体转基因小鼠,因CD4启动子处的转化生长因子 β II受体被抑制,其外周免疫耐受被破坏,诱发自体免疫反应,最终引起胆管炎症疾病。小鼠一般5~6周发病,表现出淋巴细胞性肝浸润伴门静脉周围炎,肝内胆小管渐进性损伤,与人原发性胆管炎的组织学改变相似^[12-13]。此外,*Il2ra*、*Ae2_{a,b}*敲除小鼠以及 *NOD.c3e4*小鼠也都能诱发自身免疫病,引起广泛的门静脉炎症反应,CD4⁺、CD8⁺等浸润增多,均能模仿人类原发性胆管炎变化^[14-16]。

1.3 免疫诱导法

胆管损伤也可以通过给予免疫诱导剂,引起小鼠自身免疫反应,诱发免疫性胆管损伤、阻塞,引起胆汁淤积。如2-辛酸偶联牛血清白蛋白磷酸盐溶液,加入含H37RA结核分枝杆菌全弗氏佐剂充分混合后,小鼠腹腔注射给药,8周后可出现明显改变^[17-18]。

1.4 改良饲料法

通过饲喂改良后的饲料或添加剂,也可以诱导小鼠引起胆汁淤积肝脏损伤模型。如3,5-二乙氧基羰基-1,4-二氢二氢吡啶(DDC)和 α -萘异硫氰酸盐(ANIT)。每日给予小鼠含0.1%DDC饲料,1周后在胆管上皮细胞中可见血管细胞黏附的表达分子、骨桥蛋白和肿瘤坏死因子- α 上调。持续8周导致胆卟啉增多,胆管周围肌成纤维细胞活化,引起胆道纤维化与人类硬化性胆管炎相似^[19]。每日给予小鼠0.025%ANIT,饲喂数天后,就可引起胆汁淤积性损伤,引起胆管上皮细胞损伤,胆管上皮扩张,轻度肝细胞损伤和门静脉周围炎症导致肝纤维化^[20]。

2 毒物诱导致肝纤维化

2.1 CCl₄

CCl₄法用于复制肝脏损伤模型的常用方法。CCl₄诱导小鼠肝脏损伤,进一步发展即可成为纤维化模型,是较为经典的早期肝纤维化模型复制方法。CCl₄模型复制方法成熟,成功率高达89.33%,简单易行、经济安全。一般从第2周开始,就可出现不同程度肝纤维化程度,平均4.9%,至第8周可达到平均9.2%的纤维化,能很好地模拟人类肝纤维化S0~S4期的病理特征,且与乙肝病毒感染所致肝纤维化的病理特征相似^[21-22]。该方法现已广泛应用于研究小鼠肝纤维化发生机制、筛选血清标志物以及开发抗纤维化药物等。但该方法由于CCl₄处理后的肝毒性剧烈,小鼠的死亡率较高,同时还有恢复的可能。总体来说,该方法在某种程度上基本可以满足实验需求,同时也需要改进来弥补缺点。

2.2 DMN

DMN具有肝毒性,能引起肝损伤并可导致肝纤维化,并具有致突变和致癌性^[23]。注射DMN 2周后,就可出现明显的肝纤维化(3.72%),第4周时,肝纤维化程度为3.73%^[24]。该方法操作简单,模型复制时间短,纤维化程度稳定。但由于DMN的毒性,该方法存在小鼠死亡率较高等弊端,同时,由于DMN的强挥发性,工作人员应注意防护。

2.3 TAA

300 mg/kg腹腔注射TAA,2次/周,共8周^[25],或者将TAA按200 mg/L加入小鼠饮用水中,日常饮用^[26]。即可见中心小叶坏死,转氨酶活性升高,肝纤维化加重。该模型成功率高且稳定,药物中断后肝纤维化不易恢复,但TAA是一种弱致癌物,毒性大易挥发,使用过程中应注意。

3 代谢性肝纤维化

长期高脂饮食或以特殊饲料喂养小鼠,可引起肝脏脂肪样变,引起肝脏纤维化甚至肝硬化。如小鼠以蛋氨酸-胆碱缺乏饲料喂养8周后,可见明显大泡性肝细胞脂肪变、小叶内炎细胞浸润、肝细胞呈点灶状坏死以及窦周区纤维化等^[27],产生非酒精性脂肪肝,引起肝纤维化。此外胆碱缺乏、胆碱缺乏乙硫氨酸供给等也可引起非酒精性脂肪肝导致肝纤维化。

4 酒精性肝纤维化

肝脏是乙醇代谢的主要器官, 在乙醇代谢过程中, 肝脏 NADH/NAD⁺ 比率的变化、脂肪积蓄以及脂质过氧化物堆积, 均能引起肝细胞损伤。小鼠用 56% 乙醇自由喂养 4~7 周, 结果显示小鼠肝细胞出现明显脂肪变性, 肝脏形成纤维化^[28]。该模型一般较多运用于酒精性肝病相关研究。

5 免疫性肝纤维化

免疫性肝纤维化通过注射抗原, 激发小鼠自身免疫过程, 形成免疫复合物, 沉降于汇管区, 刺激肝星状细胞活化, 生成肌成纤维细胞, 分泌大量胶原沉积致纤维化。该模型是基于免疫反应引起纤维化, 故主要用于评估与分析药物在免疫性肝纤维化中的作用与机制^[8]。Con A 常用于诱导免疫性肝纤维化, 通过激活 T 细胞分泌大量细胞因子, 引发特异性肝损伤, 肝实质可见大量淋巴细胞 (CD4⁺T 淋巴细胞为主) 浸润^[29], 肝损伤进一步发展, 形成肝纤维化。Con A 诱导肝纤维化特征与人类病毒感染致肝纤维化病理特征更接近^[30]。

此类模型是一种免疫性损伤, 模型复制方法较稳定、成功率高、对动物其他器官损伤较轻且纤维化持续时间长。但此类动物免疫性肝损伤模型缺乏人类病毒感染持续复制阶段以及人类肝脏实质持续损伤的病理过程。

6 血吸虫致肝纤维化

血吸虫尾蚴可用来制备肝纤维化模型^[31]。血吸虫尾蚴可在肠系膜静脉系统发育为成虫, 雌虫释放虫卵进入肝脏后, 分泌可溶性虫卵抗原, 诱发宿主体病理免疫应答, 继发肝纤维化过程。感染 4 周后肝脏肉芽肿增生、肿大, 自第 6 周开始即可见中心静脉变性坏死, 门脉区结缔组织增生、扩大, 肝小叶内被增生的结缔组织间隔成肝细胞团, 逐渐形成肝纤维化。此模型一般仅用于血吸虫病性肝纤维化及肝硬化的药物治疗研究, 不适用于肝纤维化的一般研究。

7 总结

理想的肝纤维化模型应与人类疾病的发生、发展特征相似, 且在动物实验过程应符合 3R 原则,

这就要求动物实验应该实验方法稳定、成模率高、重现性好。迄今为止, 利用实验动物复制肝纤维化模型的方法较多, 但都各有利弊。目前, 尚无某一模型复制方法能完全模拟人类发病过程, 这与人和动物种属差异大、肝纤维化致病原因复杂有关。CCl₄ 与 DMN 这两种化学药剂由于材料容易得到, 模型复制周期短, 并且无需做大量生物学上的准备工作, 更容易被接受。但与此同时, 化学药剂引发的肝脏反应, 并不是人类实际的发病原因。免疫模型复制方法相比于其他方法更加接近临床情况, 与人类肝纤维化情况类似, 但由于诱发因子的抗原性温和, 纤维化程度都不高, 动物也没有人类病毒感染过程中病毒持续复制以及肝脏实质持续受损的过程。此外, 我国临床中肝纤维化的诱因仍以慢性病毒感染引起为主, 但多数实验动物对肝炎病毒易感性低, 不易成模。故未来肝脏纤维化动物模型应着眼于模拟人类因肝炎病毒长期感染, 以期对此类患者发病机制及治疗药物的筛选提供更多支持。

参 考 文 献 :

- [1] 王建枝, 钱睿哲. 病理生理学[M]. 第 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2015: 352
- [2] WIRKOWSKA A, PACZEK L. Liver fibrosis and cirrhosis-causes. Part I[J]. Przegl Lek, 2011, 68(4): 222-227.
- [3] FRIEDMAN S L. Hepatic stellate cells: protean, multifunctional, and enigmatic cells of the liver[J]. Physiol Rev, 2008, 88(1): 125-172.
- [4] DING B S, CAO, Z W, LIS R, et al. Divergent angiocrine signals from vascular niche balance regeneration and fibrosis[J]. Nature, 2014, 505(7481): 97-102.
- [5] LIETKE C, LUEDDE T, SAUERBRUCH T, et al. Experimental liver fibrosis research: update on animal models, legal issues and translational aspects[J]. Fibrogenesis Tissue Repair, 2013, 6(1): 19.
- [6] CUBERO F J, PENG J, LIAO L, et al. Inactivation of Caspase 8 in liver parenchymal cells confers protection against murine obstructive cholestasis [J]. J Hepatol, 2018, 69(6): 1326-1334.
- [7] KONG R, WANG N, LUO H, et al. Hesperetin mitigates bile duct ligation-induced liver fibrosis by inhibiting extracellular matrix and cell apoptosis via the TGF- β_1 /Smad pathway[J]. Curr Mol Med, 2018, 18(1): 15-24.
- [8] TAG C G, SAUER-LEHNEN S, WEISKIRCHEN S, et al. Bile duct ligation in mice: induction of inflammatory liver injury and fibrosis by obstructive cholestasis[J]. J Vis Exp, 2015, 96: e52438.
- [9] MENG F, KENNEDY L, HARGROVE L, et al. Ursodeoxycholate inhibits mast cell activation and reverses biliary injury and fibrosis in Mdr2^{-/-} mice and human primary sclerosing

- cholangitis[J]. *Lab Invest*, 2018, 98(11): 1465-1477.
- [10] KYRITSIS K, FRANCIS H, ZHOU T, et al. Downregulation of p16 decreases biliary damage and liver fibrosis in the *Mdr2*^{-/-} mouse model of primary sclerosing cholangitis[J]. *Gene Expr*, 2020, 20(2): 89-103.
- [11] FABREGAT I, MORENO-CÁCERES J, SÁNCHEZ A, et al. TGF- β signalling and liver disease[J]. *FEBS J*, 2016, 283(12): 2219-2232.
- [12] YANG G X, LIAN Z X, CHUANG Y H, et al. Adoptive transfer of CD8(+) T cells from transforming growth factor beta receptor type II (dominant negative form) induces autoimmune cholangitis in mice[J]. *Hepatology*, 2008, 47(6): 1974-1982.
- [13] KAWATA K, YANG G X, ANDO Y, et al. Clonality, activated antigen-specific CD8(+) T cells, and development of autoimmune cholangitis in dnTGF β RII mice[J]. *Hepatology*, 2013, 58(3): 1094-1104.
- [14] WAKABAYASHI K, LIAN Z X, MORITOKI Y, et al. IL-2 receptor alpha^{-/-} mice and the development of primary biliary cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2006, 44(5): 1240-1249.
- [15] CONCEPCION A R, SALAS J T, SÁEZ E, et al. CD8⁺ T cells undergo activation and programmed death-1 repression in the liver of aged *Ae2_{a,b}*^{-/-} mice favoring autoimmune cholangitis[J]. *Oncotarget*. 2015, 6(30): 28588-28606.
- [16] HUANG W, RAINBOW D B, WU Y, et al. A novel *Pkhd1* mutation interacts with the nonobese diabetic genetic background to cause autoimmune cholangitis[J]. *J Immunol*, 2018, 200(1): 147-162.
- [17] REUVENI D, GORE Y, LEUNG P S C, et al. The critical role of chemokine (C-C Motif) receptor 2-positive monocytes in autoimmune cholangitis[J]. *Front Immunol*, 2018, 9: 1852.
- [18] JIANG X, LIAN M, LI Y M, et al. The immunobiology of mucosal-associated invariant T cell (MAIT) function in primary biliary cholangitis: Regulation by cholic acid-induced Interleukin-7[J]. *J Autoimmun*, 2018, 90: 64-75.
- [19] ADDANTE A, RONCERO C, ALMALÉ L, et al. Bone morphogenetic protein 9 as a key regulator of liver progenitor cells in DDC-induced cholestatic liver injury[J]. *Liver Int*, 2018, 38(9): 1664-1675.
- [20] LI T T, XU L J, ZHENG R Y, et al. Picoside II protects against cholestatic liver injury possibly through activation of farnesoid X receptor[J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153153.
- [21] MARTÍ-RODRIGO A, ALEGRE F, MORAGREGA Á B, et al. Rilpivirine attenuates liver fibrosis through selective STAT1-mediated apoptosis in hepatic stellate cells[J]. *Gut*, 2020, 69(5): 920-932.
- [22] WU H, CHEN G Y, WANG J Y, et al. TIM-4 interference in kupffer cells against CCL₄-induced liver fibrosis by mediating Akt1/Mitophagy signalling pathway[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(1): e12731.
- [23] WANG P W, WU T H, LIN T Y, et al. Characterization of the roles of vimentin in regulating the proliferation and migration of HSCs during hepatic fibrogenesis[J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1184.
- [24] 金玉兰, 周全, 田澄, 等. 肥大细胞在二甲基亚硝胺诱导大鼠肝纤维化胶原纤维降解中的作用机制[J]. *中华病理学杂志*, 2012, 41(4): 260-264.
- [25] LIM B J, LEE W K, LEE H W, et al. Selective deletion of hepatocyte platelet-derived growth factor receptor α and development of liver fibrosis in mice[J]. *Cell Commun Signal*, 2018, 16(1): 93.
- [26] HEMPEL F, RODERFELD M, SAVAI R, et al. Depletion of bone marrow-derived fibrocytes attenuates TAA-induced liver fibrosis in mice[J]. *Cells*, 2019, 8(10): 1210.
- [27] LUO X J, LI H G, MAL Q, et al. Expression of STING Is increased in liver tissues from patients with NAFLD and promotes macrophage-mediated hepatic inflammation and fibrosis in mice[J]. *Gastroenterology*, 2018, 155(6): 1971-1984.
- [28] WANG Y C, GUAN M, ZHAO X, et al. Effects of garlic polysaccharide on alcoholic liver fibrosis and intestinal microflora in mice[J]. *Pharm Biol*, 2018, 56(1): 325-332.
- [29] SALAH M M, ASHOUR A A, ABDELGHANY T M, et al. Pirfenidone alleviates concanavalin A-induced liver fibrosis in mice[J]. *Life Sci*, 2019, 239: 116982.
- [30] MOUNIEB F, RAMADAN L, AKOOL E S, et al. Propolis alleviates concanavalin A-induced hepatitis by modulating cytokine secretion and inhibition of reactive oxygen species[J]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2017, 390(11): 1105-1115.
- [31] WAN C P, JIN F, DU Y Q, et al. Genistein improves schistosomiasis liver granuloma and fibrosis via dampening NF- κ B signaling in mice[J]. *Parasitology Research*, 2017, 116(4): 1165-1174.

(李科 编辑)

本文引用格式: 王梓睿, 田飞鸿, 饶木艳, 等. 小鼠肝纤维化模型复制方法的研究进展[J]. *中国现代医学杂志*, 2021, 31(12): 46-50.

Cite this article as: WANG Z R, TIAN F H, RAO M Y, et al. Research progress of mice models for hepatic fibrosis[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2021, 31(12): 46-50.