

·实验研究·

胆总管结扎胆汁淤积性肝硬化
动物模型的建立与评价

全文二维码 OSID 码

肖程¹ 康权² 罗庆²

【摘要】 目的 探讨胆总管结扎手术致胆汁淤积性肝硬化小鼠模型的建立价值,并对模型进行评价。**方法** 将 84 只 balb/c 小鼠随机分为实验组(采用胆总管结扎术)和对照组(采用假手术),术后观察小鼠一般情况和肝胆大体结构;采用全自动生化分析仪检测术后 1 d、3 d、5 d、7 d、14 d、21 d、28 d 总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)、谷氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST);采用 H&E 染色评估肝脏组织形态学变化;采用 masson 染色和免疫组织化学检测术后 28 d 小鼠肝脏组织切片,评估两组胶原纤维增生和 a-SMA、CK-19 蛋白表达情况。**结果** 实验组与对照组小鼠相比,术后一般情况相对更差,胆汁淤积,胆囊、胆总管体积明显增大,各项血清生化指标明显增高($P < 0.05$);HE 染色可见肝小叶结构改变,胆管增生;术后 28 d 实验组小鼠 masson 染色可见胶原纤维形成,免疫组织化学染色提示 a-SMA、CK-19 表达量显著增多($P < 0.05$)。**结论** 经腹中线小切口行胆总管结扎手术可成功构建小鼠胆汁淤积性肝硬化模型。

【关键词】 胆总管; 结扎术; 肝硬化; 胆汁性; 模型; 动物

【中图分类号】 R726 R575.7 R575.2

Establishment and evaluations of cholestatic cirrhosis model induced by bile duct ligation. Xiao Cheng¹, Kang Quan², Luo Qing². 1. Second Affiliated Hospital, Army Military Medical University (Xinqiao Hospital) (Chongqing, 400037); 2. Children's Hospital Affiliated to Chongqing Medical University, Stem Cell Laboratory of Pediatric Research Institute, Key Research Laboratory of Pediatric Developmental Diseases of Ministry of Education, National Key International Laboratory of Children's Developmental Diseases, Chongqing Key Laboratory of Pediatrics (Chongqing 400014). Corresponding author: Kang Quan, Email: 564799351@qq.com

【Abstract】 Objective To explore the establishment and evaluations of cholestatic cirrhosis induced by bile duct ligation in mice. **Methods** A total of 84 balb/c mice were randomly divided into experimental group (bile duct ligation) and control group (sham operation). General status and hepaticobiliary structures were observed postoperatively. And serum levels of total bilirubin (TBIL), alanine transaminase (ALT), direct bilirubin (DBIL) and aspartate transaminase (AST) were detected by an automatic biochemistry analyzer at Day 1/3/5/7/14/21/28 post-operation. And the histological changes of hepatic tissue were assessed by hematoxylin & eosin (H&E) stain while the hepatic expressions of collagen fiber, a-SMA and CK-19 protein at Day 28 was assessed by Masson's stain and immunohistochemistry for evaluating the hepatic expressions of collagen fiber, a-SMA and CK-19 protein at 28 day post-operation. **Results** Compared with control group, mice in experimental group had worse general status, cholestasis, gallbladder & common bile duct expansion and cholestasis. Serum biochemical parameters significantly increased ($P < 0.05$). H&E stain showed changes in hepatic lobule and bile duct proliferation. Collagen fiber formation was observed by Masson stain in experimental group at Day 28

DOI:10.3969/j.issn.1671-6353.2020.01.015

基金项目: 1. 国家自然科学基金资助项目(编号: NSFC81172545);
2. 重庆市科委基础与前沿研究计划资助项目(编号: cstc2013jcyA10026)

作者单位: 1. 陆军军医大学第二附属医院(新桥医院)(重庆市, 400037); 2. 重庆医科大学附属儿童医院, 儿科研究所干细胞实验室, 儿童发育疾病研究教育部重点实验室, 儿童发育重大疾病国家国际科技合作基地, 儿科学重庆市重点实验室(重庆市, 400014)

通信作者: 康权, Email: 564799351@qq.com

day post-operation and immunohistochemical staining indicated that α -SMA and CK-19 increased markedly.

Conclusion A murine model of cholestatic cirrhosis is established successfully by bile duct ligation through small incision of abdominal midline.

【Key words】 Common Bile Duct; Ligation; Liver Cirrhosis; Biliary; Model; Animal

胆汁淤积性肝病是人类死亡的重要原因之一,慢性胆石症、胆汁淤积性肝炎等均可发展为胆汁淤积性肝硬化。胆汁淤积性肝硬化是以胆管增生、肝细胞坏死、肝脏纤维化为特征的病理过程,目前其发生机制不完全清楚,且治疗方法有限^[1,2]。胆总管结扎术因与人类发生胆汁淤积性肝硬化的机制具有一定的相似性,故可被认为是一种相对稳定、有效的构建动物模型的经典方法,在研究其病因、发病机制、治疗手段中发挥重要作用^[3,4]。本文详述了 balb/c 小鼠经腹中线小切口行胆总管结扎手术诱导胆汁淤积性肝硬化的过程,并对该模型进行评价,发现该方法具有切口小、手术时间短、对胃肠道功能干扰小、存活率高、重复性强等诸多优点,是探索胆汁淤积性肝硬化病因、机制及治疗的理想模型。

材料与方法

一、主要材料

头戴式显微镜(德国 Leica), 6-0 可吸收缝线(上海金环), 戊巴比妥钠(北京 Notlas), 山羊血清(武汉博士德), 苏木素、伊红(北京索莱宝), Masson 三色染色试剂盒(北京 Leagene), α -SMA 多克隆抗体(北京博奥森), ck-19 单克隆抗体(美国 Abcam), 免疫组化检测试剂盒 PV-9002、DAB 染液(北京中杉金桥)。

二、实验动物

周龄 4~6 周, 体重 18~23 g 的健康雄性 balb/c 小鼠 84 只(购于重庆医科大学动物中心), 随机分为 7 笼, 每笼 12 只, 标准条件下(温度 18℃至 22℃/湿度 50%~60%)适应性喂养 1 周。本研究符合重庆医科大学医学研究委员会标准。

三、方法

(一) 动物模型的建立

每笼 balb/c 小鼠随机分为实验组(胆总管结扎组)和对照组(假手术组), 实验组 8 只, 对照组 4 只。术前禁食 8 h, 手术时间定于上午 9 时至 11 时, 在显微镜辅助下采用相对无菌操作。腹腔注射戊巴比妥钠(3 uL/10 g)麻醉后固定小鼠, 腹部备皮、消毒、铺巾。手术切口为剑突至剑突下约 1 cm 腹正

中线纵向切口(图 1A), 用眼科剪依次剪开皮肤、腹膜, 暴露腹腔, 选用弯头止血钳轻柔挑开肝脏, 同时用生理盐水润湿的棉签将肠道组织压向小鼠尾侧以充分显露肝门, 无须将肠道组织牵拉出腹腔, 以免造成术后胃肠功能紊乱或肠道组织粘连, 暴露过程需小心、轻柔, 避免伤及肝脏组织或拉破肠系膜造成大出血。此时可见一细小、透明的胆总管位于门静脉前方, 二者之间有疏松结缔组织相连。左手持眼科镊将胆总管下段提起, 右手持另一把眼科镊, 钝性分离结缔组织, 游离胆总管(图 1B)。牵拉胆总管时轻柔, 避免将其拉断或扯破门静脉。用 6-0 可吸收线于胆总管近心端结扎, 不剪断胆总管(图 1C), 随后间断缝合腹膜, 连续缝合皮肤。消毒手术切口, 小纱布包扎, 避免小鼠自行抓挠伤口。对照组不结扎胆总管, 其余手术步骤均相同。术后小鼠保暖, 密切观察, 待完全苏醒, 能自主活动后放回鼠笼。

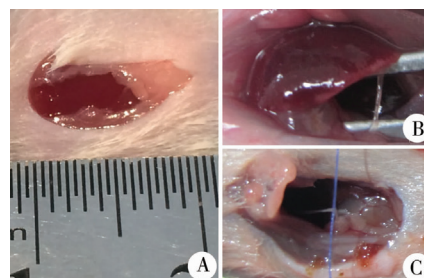


图 1 balb/c 小鼠胆总管结扎手术过程 A: 手术切口; B: 游离胆总管; C: 结扎胆总管

Fig. 1 Operative procedures of bile duct ligation in balb/c mice

(二) 术后小鼠一般情况及肝胆大体结构观察

记录术后小鼠体重变化, 观察皮毛色泽、活动情况、尿液颜色, 分别于术后 1 d、3 d、5 d、7 d、14 d、21 d、28 d 处死实验组小鼠 8 只, 对照组 4 只, 取材, 肉眼观察肝脏、胆囊、胆总管变化。实验过程中由逐渐增大的胆囊及血液检查结果判断, 未发现小鼠胆总管再通情况。

(三) 小鼠血清生化指标

术后 1 d、3 d、5 d、7 d、14 d、21 d、28 d 分别取实验组和对照组小鼠血液, 离心机 5 000 r/min, 室温离心 15 min, 取上层血清按全自动生化分析仪标准程序检测总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)、谷氨酸转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)、天门冬氨酸氨基转移酶(as-

partate aminotransferase, AST)。

(四) 肝脏组织苏木素-伊红 (HE) 染色

分别取实验组与对照组术后 1 d、3 d、5 d、7 d、14 d、21 d、28 d 小鼠肝脏组织(约 1 cm³ 大小), 常规脱水、包埋、切片后行 HE 染色, 光学显微镜下观察。

(五) 肝脏组织 masson 染色

取实验组和对照组小鼠术后 28 d 肝脏组织切片, 按 masson 三色染色试剂盒标准步骤染色, 观察结果。

(六) 肝脏组织免疫组织化学染色

取实验组和对照组小鼠术后 28 d 肝脏组织, 常規石蜡切片, 免疫组织化学染色, 检测 a-SMA (a-平滑肌肌动蛋白)、CK-19 (细胞角蛋白-19) 表达情况。小鼠肝脏组织用 10% 福尔马林固定, 石蜡包埋, 4 μm 连续切片, 60℃ 烤片过夜。一抗选择 1:300 兔抗小鼠 a-SMA 多克隆抗体、1:600 兔抗小鼠 ck-19 单克隆抗体, 二抗为免疫组化检测试剂盒。具体步骤: 切片脱蜡、水化, 微波修复 15 min, 3% H₂O₂ 室温孵育 20 min, PBS 洗净, 山羊血清封闭 45 min, 孵育一抗, 避光、4℃ 过夜, 试剂 1 (聚合物辅助剂) 室温 20 min, 试剂 2 (PV-9001 辣根酶标记抗兔 IgG 聚合物) 20 min, DAB 染色, 苏木素复染, 梯度酒精脱水,

封片, 显微镜下观察。

四、统计学分析

应用 SPSS19.0 进行统计学分析, 试验数据中计量资料采用 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 因小鼠的体重、周龄等基线资料在分组前已经进行匹配, 且目前没有足够的证据表明存在本研究观察指标的独立影响因素, 因此在不考虑交互效应的前提下小鼠体重变化百分比及血清生化检测结果采用独立样本 *t* 检验进行对比, 检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

结 果

一、术后小鼠一般情况及肝胆大体结构观察

术后两组小鼠活动量均有所减少, 术后第 3 天对照组小鼠活动量基本恢复至术前水平, 其余无明显变化, 而实验组小鼠活动量基本未恢复, 皮毛粗糙、无光泽, 耳朵、四肢、尾巴部位出现明显黄疸, 尿液颜色加深至深黄色。两组小鼠体重在术后 1 d 均有所下降, 随后对照组小鼠体重逐渐增加, 而实验组小鼠体重呈下降趋势 (表 1)。通过取材可见, 随胆总管结扎时间的延长, 实验组小鼠出现腹膜黄染, 胆囊和胆总管因胆汁淤积逐渐增大, 肝脏质地变硬, 表面出现颗粒状结节 (图 2)。

表 1 两组小鼠手术后体重变化率比较 (% , $\bar{x} \pm s$)

Table 1 Postoperative changes of body weight in mouse (% , $\bar{x} \pm s$)

分组	术后 1 d	术后 3 d	术后 5 d	术后 7 d	术后 14 d	术后 21 d	术后 28 d
实验组 (n=8)	-7.343 ± 3.501	-8.854 ± 4.573	-12.750 ± 8.009	-8.366 ± 9.042	-16.350 ± 8.752	-23.285 ± 7.010	-16.529 ± 6.938
对照组 (n=4)	-4.073 ± 1.113	4.908 ± 6.612	5.110 ± 4.655	4.385 ± 2.289	18.605 ± 7.119	22.148 ± 5.239	20.300 ± 3.387
<i>t</i> 值	-1.785	-4.266	-4.068	-2.716	-6.881	-11.362	-9.869
<i>P</i> 值	0.105	<0.001	<0.001	0.001	<0.001	<0.001	<0.001

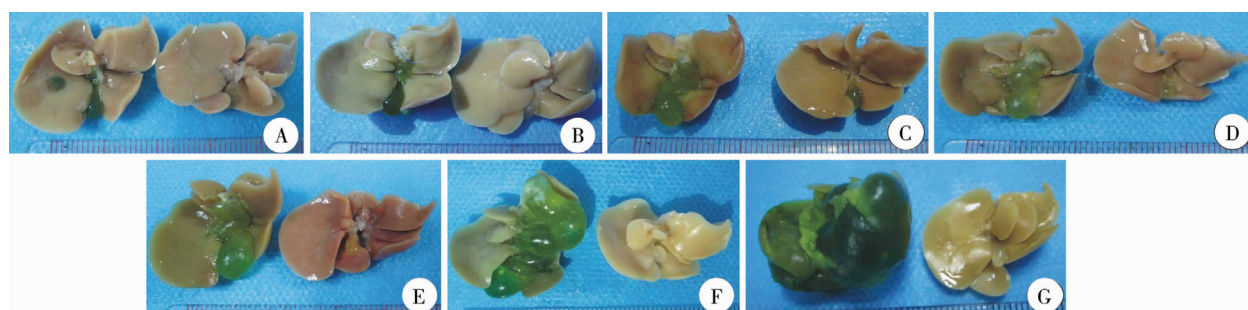


图 2 两组小鼠手术后不同时间点肝脏组织大体结构图 A: 术后 1 d; B: 术后 3 d; C: 术后 5 d; D: 术后 7 d; E: 术后 14 d; F: 术后 21 d; G: 术后 28 d; 实验组 (左) 与对照组 (右)

Fig. 2 Gross structures of murine liver tissue at different postoperative timepoints

二、小鼠生化检测结果

实验组小鼠随结扎时间延长, 血清 TBIL、DBIL 逐渐升高, 术后 14 d 达峰值, 随后下降直至总体趋于平稳; ALT、AST 于术后第 1 天达到高峰, 随后稍

有下降, 第 3 天至第 7 天再次缓慢升高, 随后逐步下降并趋于平稳。而对照组小鼠不同时间点血清 TBIL、DBIL、ALT、AST 值均无明显变化 (表 2、图 3)。

表 2 两组小鼠手术后不同时间点生化检测结果比较($\bar{x} \pm s$)Table 2 Serum biochemical profiles of mouse at different postoperative timepoints($\bar{x} \pm s$)

组别	时间	TBIL(umol/L)	DBIL(umol/L)	ALT(u/L)	AST(u/L)
实验组	术后 1 d	98.067 ± 29.967	84.267 ± 24.229	1441.983 ± 485.005	3415.383 ± 1822.435
对照组		0.350 ± 0.265	1.200 ± 0.231	51.250 ± 4.197	130.825 ± 32.478
t 值		7.987	8.397	7.023	4.414
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
实验组	术后 3 d	145.712 ± 73.304	126.867 ± 46.816	1137.333 ± 478.100	1317.950 ± 710.801
对照组		0.275 ± 0.236	1.200 ± 0.294	45.650 ± 10.895	145.050 ± 45.683
t 值		5.611	6.575	5.591	4.029
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
实验组	术后 5 d	168.817 ± 45.011	138.283 ± 32.836	1270.983 ± 404.397	1754.067 ± 370.680
对照组		0.375 ± 0.150	1.225 ± 0.150	41.200 ± 4.229	159.850 ± 13.452
t 值		9.166	10.224	7.448	10.524
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
实验组	术后 7 d	286.900 ± 26.605	201.017 ± 30.635	1453.967 ± 377.576	1780.500 ± 1015.980
对照组		0.367 ± 0.153	1.350 ± 0.265	46.450 ± 4.276	197.950 ± 40.543
t 值		26.380	15.964	9.130	3.811
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
实验组	术后 14 d	377.260 ± 126.88	240.283 ± 67.628	633.683 ± 133.679	644.417 ± 125.284
对照组		0.400 ± 0.183	1.150 ± 0.208	52.325 ± 8.739	174.525 ± 15.045
t 值		6.642	8.661	10.619	9.089
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
实验组	术后 21 d	255.100 ± 50.560	223.883 ± 39.363	409.283 ± 114.169	436.850 ± 118.617
对照组		0.3250 ± 0.1258	1.100 ± 0.1826	47.250 ± 4.5332	171.050 ± 19.3912
t 值		12.343	13.863	7.756	5.382
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001
实验组	术后 28 d	204.100 ± 57.9378	181.217 ± 59.8222	482.333 ± 118.4465	445.017 ± 113.6447
对照组		0.3250 ± 0.0957	1.175 ± 0.2986	49.500 ± 8.4526	173.200 ± 16.2158
t 值		8.615	7.372	8.917	5.771
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

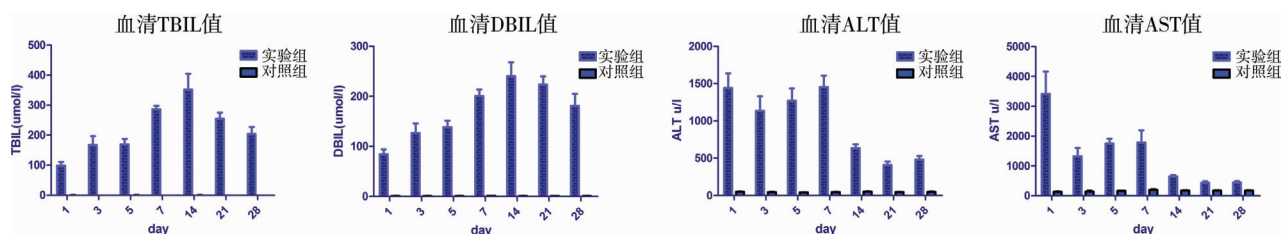


图 3 两组小鼠手术后不同时间点血清生化检测结果图

Fig. 3 Serum biochemical profiles of mice at different postoperative timepoints

三、肝脏组织 HE 染色结果

分别取两组小鼠术后 1 d、3 d、5 d、7 d、14 d、21 d、28 d 肝脏组织行 HE 染色,实验组小鼠术后第 3 天标本中可见较多炎性细胞,汇管区出现胆管上皮样细胞增生、胆管扩张以及胆管周围纤维组织增生。术后 28 d,实验组小鼠肝脏组织可见少量坏死肝细胞,大量增生的胆管上皮样细胞,增生胆管周围大量胶原纤维,肝小叶结构紊乱,岛屿状假小

叶结构形成。对照组小鼠肝脏组织未见炎症和坏死细胞,肝板排列整齐,肝小叶结构正常完整(图 4)。

四、肝脏组织 Masson 染色结果

选取两组小鼠手术后 28 d 肝脏组织行 Masson 染色,可见实验组肝脏组织结构紊乱,胶原纤维增生(病理切片图中蓝色部分);对照组小鼠肝脏组织结构正常,无胶原纤维形成(图 5)。

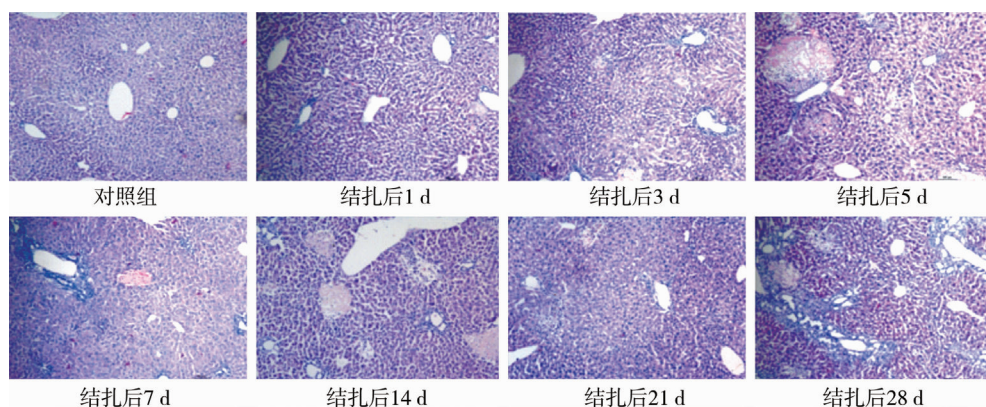


图4 两组小鼠手术后不同时间点肝脏组织形态图(HE染色, ×100)

Fig. 4 Liver tissue morphology of mice at different timepoints after operation (×100)

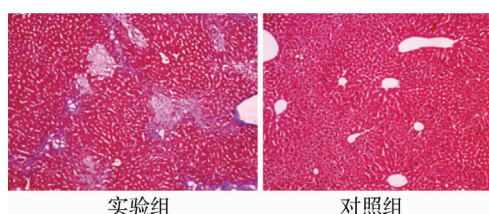


图5 两组小鼠手术后28 d 肝脏纤维组织形成情况(Masson染色, ×100)

Fig. 5 The formation of collagen fiber in liver at 28d post-operation(Masson stain, ×100)

(六) 肝脏组织免疫组织化学染色

选取两组小鼠术后28 d 肝脏组织行免疫组织化学染色,实验组可见 a-SMA 大量表达,提示肌成纤维细胞大量增生,而对照组无表达;CK-19 为胆管上皮细胞标志物,与对照组相比,实验组阳性细胞(病理切片图中标棕色部分)数量明显增高,呈花环状排列($t=6.150, P<0.001$),见图6。

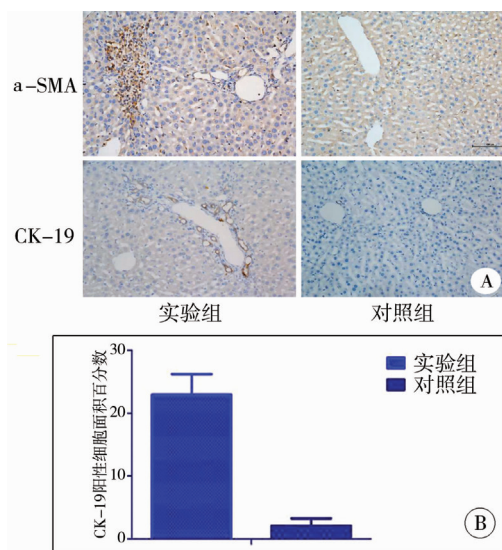


图6 两组小鼠手术后28 d 肝脏组织 a-SMA, CK-19 表达情况(×200) A:免疫组织化学结果; B:CK-19 阳性细胞面积百分比半定量分析结果

Fig. 6 The expression patterns of a-SMA and CK-19 in liver at

讨论

由于胆汁淤积及胆汁酸的毒性作用,肝细胞可出现进行性损伤,最终可发展为肝硬化甚至肝衰竭。因而,胆汁淤积性损伤是肝纤维化、肝硬化的重要危险因素^[5,6]。

胆总管手术动物模型自1872年首次应用以来,一直被推举为研究进行性肝损伤的经典模型。凭借简单、快速、有效等优点,广泛用于进行性肝病的多方面研究:如动态评估肝硬化形态学与生化指标,探索促纤维化信号通路,剖析不同细胞亚群、基因在肝纤维化进程中的作用,测试抗纤维化相关药物^[7,8]。近年来,国内外在构建该动物模型时多采用胆总管双重结扎以避免其发生再通;如需研究较少纤维化形成和进行性肝细胞增殖的关系时,可选择结扎部分胆总管,或部分胆总管结扎联合胆囊切除术,以此来预防胆汁淤积引起的急性胆囊炎^[9];更有学者熟练掌握了建立胆道吻合动物模型的先进显微技术^[10]。

本研究团队通过前期不断总结,选择 balb/c 小鼠行经腹中线小切口胆总管结扎术,致肝外胆管阻塞,成功构建了胆汁淤积性肝硬化动物模型。当然,也有部分研究者选择胆总管较粗的大鼠作为动物模型,便于寻找及结扎胆总管;同时大鼠术后耐受能力较好,存活率高。但大鼠无胆囊结构,可能干扰到肝硬化形成时间与动态改变。肖颜玉、罗丹^[11,12]的研究中早期将小鼠胆总管结扎至术后14 d,有文献指出,小鼠胆总管结扎术后14 d 处于早期纤维化水平,28 d 达中晚期肝硬化水平^[13]。因此,本研究将造模最长时间定为术后4周,以便研究

小鼠中晚期胆汁淤积性肝硬化的病理改变,其中小鼠术后 21 d 平均存活率 91.67%,术后 28 d 平均存活率为 75%。小鼠胆总管位于腹中线稍右方,由左右肝管汇合而成,采用腹中线竖切口,可减少损伤腹壁血管引起的出血,也便于找寻胆总管^[14]。长度 1 cm 的小切口可充分减轻手术损伤,同时暴露胆总管时无需翻动胃肠道,减少了肠系膜血管破裂、出血的风险,也降低术后发生腹腔粘连的可能性;显微镜的使用可进一步减轻门静脉损伤。为保证模型的重现性,所有小鼠结扎点均选在左右肝管汇合处稍下方。

胆总管结扎术后,随时间延长,实验组小鼠逐渐出现一系列与胆汁淤积性肝硬化患者相似的症状、体征。取材可见小鼠腹膜呈黄色,胆汁淤积至胆囊肿大、胆总管扩张,肝脏质地变硬;术后 21 d 肝脏表面可见颗粒状结节,以上为胆总管结扎手术成功的直接证据。TBIL、DBIL 为胆汁淤积的血清生化指标,与对照组相比,实验组小鼠 TBIL、DBIL 在术后 14 d 达到高峰,随后逐渐降低,直至 28 d 总体趋于平稳,证实胆总管结扎引起了进行性的肝脏损害^[7,15]。ALT、AST 是评估肝脏损伤的常用临床指标,术后 1 d,二者在实验组小鼠中均达高峰,分析原因可能是手术的急性损伤导致肝细胞应激;随后稍有下降,术后 7 d 再次升高,14 d 至 28 d 逐渐下降进入相对平稳状态,其原因可能是肝细胞经过自我调节和修复后仍不能代偿至正常水平。有学者对 SD 大鼠行胆总管结扎术,发现 ALT、AST 水平在术后第 3 天达高峰,其结果与本实验稍有差别,可能上述指标的定量结果受不同胆总管结扎部位影响,或大小鼠对手术的应激反应和耐受程度不同。术后不同时间点 HE 染色结果直接显示了小鼠肝脏组织结构的动态改变^[6],实验组小鼠可见肝细胞坏死、胆管样结构增生、假小叶形成,符合胆汁淤积性肝硬化患者肝脏组织 HE 染色结果;而对照组小鼠肝小叶结构完整,肝细胞由中央静脉向外周呈辐射状排列,由此也为该动物模型的成功构建提供了有力证据。本组前期实验发现,将患有胆汁淤积性肝硬化的患者肝脏组织切片进行 HE 染色,胆小管结构内可见黄棕色胆汁,而小鼠结扎胆总管模型中,术后 28 d 小鼠肝脏组织仍没有在增生的胆总管中发现胆汁,其原因可能是人和小鼠存在物种差异,或构建模型时间尚未达到形成胆汁所需的时间,具体原因有待进一步探索。Masson 染色中,实验组小鼠术后 28 d 肝脏组织可见正常结构遭到破坏,胶原纤维

增生明显,纤维化逐步形成。同时通过免疫组织化学染色检测了术后 28 d 两组小鼠肝脏组织中 α -SMA 和 CK-19 的表达情况, α -SMA 为肌成纤维细胞特异性标志物,其在肝脏组织中表达量增加提示存在肝星状细胞活化^[6,7,16-18]。活化的肝星状细胞可导致细胞因子增多,细胞外基质合成增加,逐渐发展为肝硬化。本研究实验组可见 α -SMA 表达量明显增加,且主要集中于汇管区,说明汇管区可能是肝硬化形成的起始部位。CK-19 为胆管上皮细胞特异性标志物^[7,19],可形成胆管结构,选用表皮生成素可选择性诱导 CK-19 表达上调^[20]。与对照组相比,实验组汇管区 CK-19 表达量明显增多且具有统计学意义,证明经胆总管结扎术的小鼠肝脏组织有明显的胆管上皮细胞增生,胆小管形成,符合胆汁淤积性肝硬化患者肝脏组织结构。通过对比实验组和对照组小鼠的一般情况、血清学变化、组织学改变,证实了腹中线小切口胆总管结扎术是一种简单、重复性强的胆汁淤积性肝硬化动物模型。

虽然本研究基本达到了预期的研究目的,但我们的实验仍存在一些不足,如暂未检测到术后小鼠血清 GGT 的改变;小鼠胆总管结扎后更长时间引起的肝脏病理改变也有待于进一步研究。当然,在所有肝病研究中,采用胆总管结扎的方式进行建模仍然存在一定局限性,虽然其可模拟肝外胆道梗阻引起的胆汁淤积性肝硬化,但不能模拟胆道感染或自身免疫性肝炎等导致的肝内外胆道病变。

参考文献

- 1 Galicia-Moreno M, Favari L, Muriel P. Trolox mitigates fibrosis in a bile duct ligation model [J]. *Fundam Clin Pharmacol*, 2013, 27 (3): 308-318. DOI: 10.1111/j.1472-8206.2011.01020.x.
- 2 Bai H, Zhang N, Xu Y, et al. Yes-associated protein regulates the hepatic response after bile duct ligation [J]. *Hepatology*, 2012, 56 (3): 1097-1107. DOI: 10.1002/hep.25769.
- 3 Meng F, Wang K, Aoyama T, et al. Interleukin-17 signaling in inflammatory, Kupffer cells, and hepatic stellate cells exacerbates liver fibrosis in mice [J]. *Gastroenterology*, 2012, 143 (3): 765-776. e3. DOI: 10.1053/j.gastro.2012.05.049.
- 4 Goncalves JO, Tannuri AC, Coelho MC, et al. Dynamic expression of desmin, α -SMA and TGF- β 1 during hepatic fibrogenesis induced by selective bile duct ligation in young rats [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2014, 47 (10): 850-857. DOI: 10.1590/1414-431x20143679.

- 5 Weerachayaphorn J, Luo Y, Mennone A, et al. Deleterious effect of oltipraz on extrahepatic cholestasis in bile duct-ligated mice[J]. *J Hepatol*, 2014, 60(1): 160-166. DOI: 10.1016/j.jhep.2013.08.015.
 - 6 Tag CG, 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). DOI: 10.3791/52438.
 - 7 Tag CG, Weiskirchen S, Hittatiya K, et al. Induction of experimental obstructive cholestasis in mice[J]. *Lab Anim*, 2015, 49(1 Suppl): 70-80. DOI: 10.1177/0023677214567748.
 - 8 Zhang Y, Hong JY, Rockwell CE, et al. Effect of bile duct ligation on bile acid composition in mouse serum and liver[J]. *Liver Int*, 2012, 32(1): 58-69. DOI: 10.1111/j.1478-3231.2011.02662.x.
 - 9 Heinrich S, Georgiev P, Weber A, et al. Partial bile duct ligation in mice: a novel model of acute cholestasis[J]. *Surgery*, 2011, 149(3): 445-451. DOI: 10.1016/j.surg.2010.07.046.
 - 10 Kirkland JG, Godfrey CB, Garrett R, et al. Reversible surgical model of biliary inflammation and obstructive jaundice in mice[J]. *J Surg Res*, 2010, 164(2): 221-227. DOI: 10.1016/j.jss.2009.08.010.
 - 11 肖颜玉, 胥飏, 崔鲂, 等. 小鼠胆总管结扎致肝纤维化模型的建立与评价[J]. *重庆医科大学学报*, 2008, 33(4): 390-393. DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.2008.04.012.
Xiao YY, Xu B, Cui F, et al. Establishment and evaluation of liver fibrosis model induced by bile duct ligation in mouse[J]. *Journal of Chongqing Medical University*, 2008, 33(4): 390-393. DOI: 10.13406/j.cnki.cyx.2008.04.012.
 - 12 罗丹, 文阳安, 董玉芳, 等. 胆总管结扎引起胆汁淤积对小鼠肝脏细胞增殖的影响[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(2): 134-137. DOI: 10.3321/j.issn:1000-2790.2009.02.011.
Luo D, Wen YA, Dong YF, et al. Effect of bile duct ligation induced biliary cholestasis on hepatocytes proliferation[J]. *Journal of Fourth Military Medical University*, 2009, 30(2): 134-137. DOI: 10.3321/j.issn:1000-2790.2009.02.011.
 - 13 Huss S, Schmitz J, Goltz D, et al. Development and evaluation of an open source Delphi-based software for morphometric quantification of liver fibrosis[J]. *Fibrogenesis Tissue Repair*, 2010, 3(1): 10. DOI: 10.1186/1755-1536-3-10.
 - 14 宣佑, 田耀洲, 曹鹏, 等. 胆汁淤积性肝硬化大鼠模型的改良[J]. *中国比较医学杂志*, 2014, 24(4): 57-61. DOI: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.004.013.
Xuan J, Tian YZ, Cao P, et al. Improvement in the rat model of liver fibrosis induced by bile duct ligation[J]. *Chinese Journal of Comparative Medicine*, 2014, (4): 57-61. DOI: 10.3969/j.issn.1671.7856.2014.004.013.
 - 15 Yuan S, Jiang T, Zheng R, et al. Effect of bone marrow mesenchymal stem cell transplantation on acute hepatic failure in rats[J]. *Exp Ther Med*, 2014, 8(4): 1150-1158. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1007-3418.2018.10.004.
 - 16 Gonçalves JO, Tannuri AC, Coelho MC, et al. Dynamic expression of desmin, α -SMA and TGF- β 1 during hepatic fibrogenesis induced by selective bile duct ligation in young rats[J]. *Braz J Med Biol Res*, 2014, 47(10): 850-857. DOI: 10.1590/1414-431x20143679.
 - 17 Deng YH, Pu CL, Li YC, et al. Analysis of biliary epithelial-mesenchymal transition in portal tract fibrogenesis in biliary atresia[J]. *Dig Dis Sci*, 2011, 56(3): 731-740. DOI: 10.1007/s10620-010-1347-6.
 - 18 Gressner AM, Weiskirchen R. Modern pathogenetic concepts of liver fibrosis suggest stellate cells and TGF- β as major players and therapeutic targets[J]. *J Cell Mol Med*, 2006, 10(1): 76-99. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2006.tb00292.x.
 - 19 Liu WH, Ren LN, Chen T, et al. Stages based molecular mechanisms for generating cholangiocytes from liver stem/progenitor cells[J]. *World J Gastroenterol*, 2013, 19(41): 7032-7041. DOI: 10.3748/wjg.v19.i41.7032.
 - 20 Zhou J, Zhao L, Qin L, et al. Epimorphin regulates bile duct formation via effects on mitosis orientation in rat liver epithelial stem-like cells[J]. *PLoS One*, 2010, 5(3): e9732. DOI: 10.1371/journal.pone.0009732.
- (收稿日期: 2017-08-25)
- 本文引用格式:** 肖程, 康权, 罗庆. 胆总管结扎胆汁淤积性肝硬化动物模型的建立与评价[J]. *临床小儿外科杂志*, 2020, 19(1): 74-80. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2020.01.015.

Citing this article as: Xiao C, Kang Q, Luo Q. Establishment and evaluations of cholestatic cirrhosis model induced by bile duct ligation[J]. *J Clin Ped Sur*, 2020, 19(1): 74-80. DOI: 10.3969/j.issn.1671-6353.2020.01.015.