

# 四氯化碳造模方法诱导下肝纤维化形成对大鼠结肠组织的影响

## Efficacy of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride modeling on colonic tissue in rats

刘 容 赵壮志 刘旭东\* 吕 萍 徐新杰 赵晓芳  
(广西中医药大学附属瑞康医院, 广西 南宁, 530000)

中图分类号: R656.9 文献标识码: A 文章编号: 1674-7860 (2020) 16-0006-04

**【摘 要】**目的: 探讨四氯化碳 (Carbon Tetrachloride, CCl<sub>4</sub>) 肝纤维化的造模方法对大鼠结肠组织的影响。方法: 采用清洁级雄性 Wistar 大鼠, 设立正常组和模型组, 采用 CCl<sub>4</sub> 花生油混合液皮下注射大鼠构建肝纤维化模型, 常规苏木精 - 伊红染色法 (Hematoxylin-eosin Staining, HE) 染色, 通过扫描电镜检测 CCl<sub>4</sub> 大鼠肝纤维化模型中结肠组织的病理变化。结果: 成功复制肝纤维化大鼠模型。肝纤维化模型组中结肠组织 HE 染色显示, 大鼠结肠组织中细胞结构较清晰, 肠黏膜绒毛结构较完整, 无明显肠绒毛脱落现象, 上皮细胞排列较为整齐, 杯状细胞能够较好保存完整, 细胞外壁能够保存完整, 组织间无明显充血、肿胀等表现, 与正常组相比, 结肠组织无明显变化; 扫描电镜显示, 肝纤维化模型组结肠组织上皮细胞未见破损, 也未见明显肿胀, 可见杯状细胞, 上皮细胞表面微绒毛排列整齐, 未见脱落, 细胞间隙未见增宽, 细胞也未见萎缩, 与正常组相比, 结肠组织无明显变化。结论: CCl<sub>4</sub> 造模方法诱导下大鼠肝纤维化形成可能对结肠组织无影响。

**【关键词】** 四氯化碳; 结肠组织; 肝纤维化造模方法; 动物模型

**【Abstract】** Objective: To investigate the effect of liver fibrosis modeling induced by CCl<sub>4</sub> on colonic tissue in rats. Methods: The clean-grade male Wistar rats were used to establish the normal group and the model group. The liver fibrosis model was constructed by subcutaneous injection of CCl<sub>4</sub> peanut oil mixture, and the hematoxylin-eosin staining was performed by scanning electron microscopy. Pathological changes of colon tissue in a rat model of liver fibrosis induced by carbon tetrachloride were examined. Results: Model rats of liver fibrosis were successfully molded. In the liver fibrosis model group, the colonic tissue was stained by HE staining. The cell structure in the colonic tissue of rats was clear, the villus structure of intestinal mucosa was relatively complete, and there was no obvious shedding of intestinal velvet, and the epithelial cells were arranged neatly. The goblet cells were well preserved, the outer walls of the cells were preserved intact, there were no obvious hyp-eremia and swelling between tissues, and there was no obvious change in colon tissue compared with the normal group. In the liver fibrosis model group, the colonic epithelial cells were not damaged or swollen, goblet cells were seen, the microvilli on the surface of the epithelial cells were arranged neatly, no shedding, no widening of the cell space, no atrophy of the cells. There was no significant change in colonic tissue compared with the normal group. Conclusion: The formation of liver fibrosis induced by CCl<sub>4</sub> modeling method may have no effect on colon tissue.

**【Keywords】** CCl<sub>4</sub>; Colonic tissue; Liver fibrosis modeling; Animal models

doi:10.3969/j.issn.1674-7860.2020.16.002

肝硬化是较常见的慢性肝脏疾病之一, 亦是肝纤维化发展的终末阶段<sup>[1]</sup>。肝纤维化是由于各种理化因素 (如酒精、寄生虫、病毒等) 或炎症长期反复作用于肝脏, 引起肝细胞变性、坏死、增生和肝纤维结缔组织的增生和沉积<sup>[2]</sup>。有研究表明, 肝纤维化是可逆的<sup>[3-4]</sup>。如慢性乙肝患者的抗病毒治疗, 自身免疫性肝炎进行免疫抑制剂治疗等均可使原有的肝纤维化减轻。临床中肝纤维化产生主要机制为肠道菌群移位和肝脏内毒素清除能力差。自 1998 年 Marshall<sup>[5]</sup> 提出“肠-肝轴”学说以来, 研究者对肝脏病变与肠道功能的相关性的研究越来越重视。“肠-肝轴”学说明肝脏和肠道不仅在结构上存在联系, 而且在功能上更存在紧密关系, 当肝脏发生疾病时, 肠道黏膜屏障功能下降, 致使内毒素通过“细菌移位”, 穿过肠黏膜侵入肠道以外的部位, 内毒素血症形成, 引

起一系列病理反应<sup>[6]</sup>, 有研究<sup>[7]</sup>表明, 肝硬化患者出现肠道屏障功能障碍以及由其产生的肠道菌群和 / 或内毒素移位是促进自发性腹膜炎 (Spontaneous Peritonitis, SBP) 和肝性脑病发生而加重肝硬化的重要因素。肝硬化大鼠可引起肠道紧密连接间的距离增大甚至分离<sup>[8]</sup>。慢性肝病中, 肠黏膜结构发生相关改变, 如细胞间隙变宽、紧密连接受损等, 促使屏障功能丧失, 导致肠道细菌释放的内毒素进入肝脏<sup>[9]</sup>。因此, 长期慢性肝病中肝脏功能的长期损伤可能导致肠道结构变化, 但轻微肝纤维化的变化是否会导致肠道结构的变化暂未见实验报道。传统的四氯化碳造模方法是经典的、主要的动物肝纤维化造模方法。目前亦尚不明确四氯化碳造模方法是否对肠道黏膜结构有损害, 因此, 本研究拟通过四氯化碳建造肝纤维化实验动物模型, 观察肝纤维化形成过程中结肠组织的

情况, 初步探讨四氯化碳的造模方法对大鼠结肠组织的影响, 为后期研究提供实验基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组及处理

清洁级雄性 Wistar 大鼠 [购于第三军医大学实验动物中心, 动物合格证号 SCXK (军)-2012-0010], 体质量 250 ~ 300 g, 共 10 只。将大鼠按随机数字表法分为正常组与模型组, 每组 5 只。同时正常组和模型组予以同等体积生理盐水灌胃 (灌胃生理盐水 0.8 mL), 一天 1 次。

### 1.2 伦理审查

本研究符合广西中医药大学附属瑞康医院实验动物伦理委员会所制定的伦理学标准, 编号: CLS-EAW-2016-4-2。本研究符合国家法律关于实验室动物的管理与使用的准则。

### 1.3 主要试剂与仪器

苏木素染液 (南京建成); 伊红染液 (碧云天); 中性树脂 (国药集团); 2.5% 戊二醛溶液、0.2 mol/L PBS 溶液、醋酸异戊酯、梯度酒精; 水合氯醛 (国药集团, 中国);  $\text{CCl}_4$  溶液 (科龙化学仪器厂)。

### 1.4 构建肝纤维化动物模型

采用四氯化碳复合因素大鼠肝纤维化动物模型造模方法, 造模方法参照韩德五法<sup>[10]</sup>, 除正常组外, 模型组大鼠颈背部皮下注射 40%  $\text{CCl}_4$  花生油混悬液。首次注射 5 mL/kg 体质量, 后每隔 3 日皮下 3 mL/kg 体质量注射。第 4 周末正常组及模型组大鼠各随机处死 2 只, 取材常规 HE 染色证实肝纤维化形成。

### 1.5 取材

至第 4 周末, 禁食 12 h, 腹腔注射 7% 水合氯醛 (0.5 mL/100 g) 麻醉, 腹腔动脉采血后处死, 剖取肝脏, 取肝脏右叶相同部位组织, 1 块置入 10% 甲醛, 作常规石蜡切片, 取材后, 用 PBS 清洗, 4% 多聚甲醛固定。不同浓度乙醇脱水, 各 10 min。透明。透明处理过的组织浸泡于融化的石蜡中 3 h。包埋。切片。石蜡切片脱蜡复水, 双蒸水清洗 3 次  $\times$  2 min。进行苏木素染液 - 伊红染液染色, 冲洗, 脱水, 透明, 中性树脂封片。镜检 (细胞核成蓝色, 细胞质成红色或粉红色)。正常组与模型组大鼠证实肝纤维化形成后继续予生理盐水灌胃 (灌胃生理盐水 0.8 mL), 至第 6 周末, 禁食 12 h, 腹腔注射 7% 水合氯醛 (0.5 mL/100 g) 麻醉, 腹腔动脉采血后处死, 剖取肝脏, 取肝脏右叶相同部位组织, 同时取正常组与模型组相同部位的结肠组织, 分别作常规的肝组织与结肠组织的石蜡切片。

### 1.6 标本采集与检验方法

#### 1.6.1 大体标本观察

清洁级雄性 Wistar 大鼠处死后, 大体观察肝脏的颜色、质地、体积和表面变化后, 行组织病理切片检查。

#### 1.6.2 通过 HE 染色检测肝纤维化模型对结肠组织的影响

将已制备好的结肠组织切片用 PBS (0.01M) 浸洗 3 次, 每次 3 min; 4% 的多聚甲醛切片 15 min, PBS 浸洗玻片 3 次  $\times$  3 min; 苏木素染液染色 10 min; 冲洗约 5 min; 蒸馏水再洗涤一遍, 镜检, 伊红染液染色 2 min; 冲洗约 3 min; 再洗涤;

95% 乙醇脱水 2 min; 新鲜的 95% 乙醇再脱水 2 min; 二甲苯透明 5 min, 新鲜的二甲苯再透明 5 min; 中性树脂封片; 镜检。观察结肠组织的病理变化。

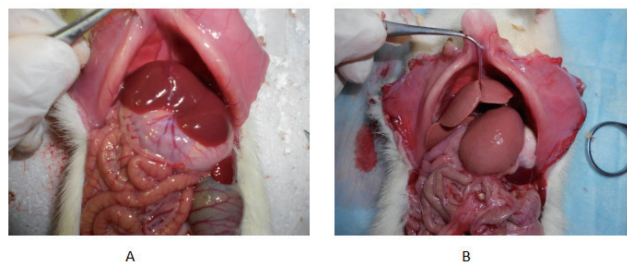
#### 1.6.3 通过扫描电镜检测肝纤维化模型对结肠组织的影响

取 1  $\text{cm}^3$  左右结肠组织切片, 加入 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的 3% 戊二醛, 4  $^{\circ}\text{C}$  过夜, 吸出固定剂, PBS 浸洗 2 次  $\times$  10 min, 4  $^{\circ}\text{C}$  预冷的 1% 锇酸。4  $^{\circ}\text{C}$  固定 1 h, PBS 浸洗 2 次  $\times$  10 min。系列梯度酒精脱水 (30%、50%、70%、80%、90%、95%、100%), 每种浓度酒精通过 2 次  $\times$  15 min。干燥, 切片干燥后, 待其温度升至室温时再放气, 取出切片。用真空喷镀法, 切片被安置在离蒸发源 10 ~ 15 cm 处的样品台上, 切片进行旋转活动, 先喷碳。后喷金, 喷镀应均匀, 完成后镜下观察。

## 2 结果

### 2.1 肝脏大体标本观察

正常组肝脏表面呈鲜红色, 表面光滑柔软, 无结节和颗粒, 肝缘锐利, 形态与大小均正常。肝纤维化模型组肝脏表明颜色较正常组织暗淡, 质地稍韧, 表面有颗粒改变, 肝缘较正常组变钝, 被膜肿胀。见图 1。

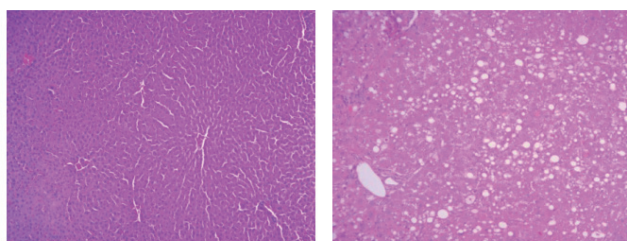


注: A: 正常组; B: 肝纤维化模型组。

图1 大鼠肝脏大体标本

### 2.2 HE 染色检测肝纤维化模型形成

正常组肝组织内肝细胞胞浆丰富、红染, 无明显脂肪变性等, 肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列。模型组肝细胞明显脂肪变性, 部分肝细胞水样变性, 小叶结构不清, 纤维组织明显增生, 形成纤维间隔, 分割肝小叶, 纤维间隔内有散在炎症细胞浸润。见图 2。



注: A: 正常组; B: 肝纤维化模型组。

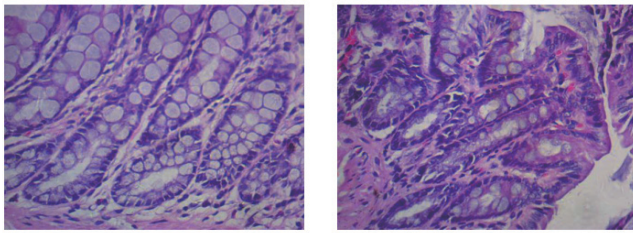
图2 肝纤维化病理切片 (HE $\times$ 100)

### 2.3 大鼠结肠 HE 染色结果

肝纤维化模型组大鼠结肠组织中细胞结构较清晰, 肠黏膜绒毛结构较完整, 无明显肠绒毛脱落现象, 上皮细胞排列较为整齐, 杯状细胞能够较好保存完整, 细胞外壁能够保存完



整,组织间无明显充血、肿胀等表现,亦未见炎症细胞浸润;与正常组相比,结肠组织结构无明显变化。见图3。

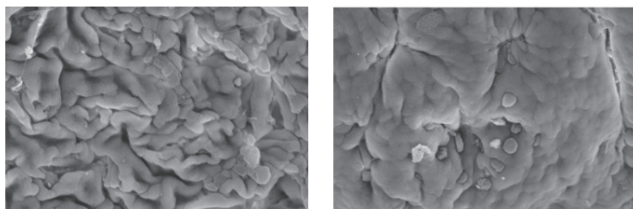


注: A: 正常组; B: 肝纤维化模型组。

图3 HE染色检测大鼠结肠组织的影响(×400)

### 2.4 大鼠结肠扫描电镜检测结果

肝纤维化模型组上皮细胞未见破损,大小基本一致,也未见明显肿胀,可见杯状细胞,上皮细胞表面微绒毛排列整齐,连接紧密,未见脱落,细胞间隙未见增宽,细胞也未见萎缩;与正常组相比,结肠组织结构无明显变化。见图4。



注: A: 正常组; B: 肝纤维化模型组。

图4 电镜扫描检测大鼠结肠组织的影响(×600)

## 3 讨论

肝纤维化动物模型的研究,对于开展慢性肝脏疾病的预防和治疗具有重要意义。目前国内外在诱导肝纤维化模型形成的方法中,采用的主要包括化学中毒性肝纤维化(CCl<sub>4</sub><sup>[10]</sup>、二甲基硝铵<sup>[11]</sup>、二氧化硅<sup>[12]</sup>等)、乙醇法<sup>[13]</sup>、免疫法、胆管阻塞法<sup>[14]</sup>等方法,但最经典、最常用的方法是应用CCl<sub>4</sub>诱导下建立肝纤维化动物模型。CCl<sub>4</sub>是一种肝脏毒性药物<sup>[15]</sup>,机理是肝细胞吸收CCl<sub>4</sub>后,经细胞色素P450代谢氧化成CCl<sub>3</sub>自由基<sup>[16]</sup>,导致肝细胞膜物质脂质过氧化,引起肝细胞膜物质的损害,进而形成肝纤维化。长期给予CCl<sub>4</sub>可持续刺激成纤维细胞I型胶原基因大量表达,从而使I型胶原基因的合成增多,导致肝纤维化的形成<sup>[17]</sup>。有研究指出CCl<sub>4</sub>可诱导实验动物严重肝脏疾病如非酒精性脂肪性肝病、慢性肝炎及肝硬化,因此,CCl<sub>4</sub>诱导肝硬化动物模型是一个比较常用方法,可以通过消化道、腹腔注射或皮下注射等方式制作肝硬化动物模型<sup>[18]</sup>。因此本实验采用经典的CCl<sub>4</sub>诱导肝纤维化大鼠模型,每周一次将40%四氯化碳花生油混悬液颈部皮下注射至实验大鼠,造模时间为4周,造模结束后,通过HE染色可见肝纤维化模型组较正常组大鼠肝脏组织结构被破坏,小叶结构紊乱,肝索排列不规则,纤维组织明显增生,实验结果表明肝纤维化模型组大鼠存在肝纤维化的病理变化。

正常人的结肠和远端小肠存在着大量的细菌与内毒素,而内毒素存在于革兰氏阴性细菌菌体的细胞壁内,当细菌死

后细胞壁崩解时释出,活菌亦可以发疱形式将内毒素释出<sup>[19]</sup>。正常情况下,肠道屏障具有高选择性,因此具有防止肠道菌群移位,进而阻止内毒素释放入血,并且免疫监视及有效清除肠道内条件致病菌及外来病原体。肝脏是人体最大的“化学工厂”,对体内的内毒素及毒素具有清除及解毒作用,并由于肝脏具有免疫耐受特性,因此正常情况下病原体分子在肝脏中并不诱导系统性免疫反应。肠肝循环的存在,使肝脏不断暴露于肠道来源的内毒素,成为一个主要的滤过器官和第一道防线。当肝脏发生病变时,上述功能减退,从肠源性内毒素血症所致的肝纤维化中,其内毒素主要是来自肝脏受损,肝脏清除内毒素功能明显减弱,从而引起肝纤维化。Fouts等<sup>[20]</sup>在研究肝脏疾病早期细菌移位的动态和肠道微生物组的变化时,发现急性肝损伤与微生物组变化之前肠道通透性增加和细菌移位的早期发作有关。因此,在急性肝脏损伤或慢性肝脏损伤会致使肠道菌群异位,而慢性肝病在各种病理因素的长期损伤下,致使肠道通透性增加。

本实验研究结果表明,在肝纤维化模型组中HE染色结果提示大鼠结肠细胞结构较清晰,肠黏膜绒毛结构较完整,上皮细胞排列较为整齐,杯状细胞能够较好保存完整,细胞外壁能够保存完整,组织间无明显充血、肿胀等表现,与正常组相比,结肠组织结构无明显变化;扫描电镜结果提示大鼠结肠组织中上皮细胞未见破损,也未见明显肿胀,可见杯状细胞,上皮细胞表面微绒毛排列整齐,未见脱落,细胞间隙未见增宽,细胞也未见萎缩,与正常组相比,结肠组织结构无明显变化。其原因可能与造模时间短,肝脏急性损伤导致清除功能差有关。但有报道<sup>[21]</sup>发现在慢加急性肝衰竭时对结肠组织的肠黏膜损伤,影响肠黏膜通透性。该报道与本课题研究结果不一致,可能肝脏疾病的不同阶段对结肠组织的影响亦不相同。此外,考虑短期的急性肝损伤在早期肝纤维化阶段对结肠组织关系不大,可能与内毒素的数量、毒力、时间长久等相关因素引起,所以可能早期肝纤维化对大鼠结肠组织无影响。

综上所述,以上结果可能跟造模时间短,早期肝纤维化过程中对结肠组织的影响不大,在四氯化碳造模方法诱导下肝纤维化的形成对大鼠结肠组织可能无影响。因此本研究提示通过细菌脂多糖移位引起肝纤维化方面的研究中用这种模型可能值得进一步探讨。

### 参考文献:

[1]CHEN EQ, HUANG FH, HE LL, *et al.* Histological changes in chinese chronic hepatitis B patients with ALT lower than two times upper limits of normal[J]. Dig Dis Sci,2010,55(2):432-437.

[2]Friedman SL. Liver fibrosis from bench to bedside[J].Journal of Hepatology,2003,38(1):38-53.

[3]LI X,SHEN J,ZHONG Z,*et al.* Paeoniflorin: a monomer from traditional Chinese medical herb ameliorates Schistosoma japonicum egg induced hepatic fibrosis in mice[J]. J Parasitol,2009,95(6):1520-1524.

[4]CH Ho, RN Chien, PN Cheng, *et al.* Aberrant serum immunoglobulin G-glycosylation in chronic hepatitis B is associated with histological liver damage and reversible by antiviral therapy[J].Journal of Infectious

Diseases,2015,211(1):115-124.

[5]Marshall JC. The gut as a potential trigger of exercise-induced inflammatory responses[J]. Can J Physiol Pharmacol.1998.76(5):479-484.

[6]Guarner C, Soriano G. Bacterial translocation and its consequences in patients with cirrhosis[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol,2005,17(1):27-31.

[7]张丽静,段志军.肝硬化门脉高压的肠屏障损伤与保护[J/CD].中华临床医师杂志(电子版),2015,9(18):3322-3325.

[8]Cheadle GA, Costantini TW, Hageny A, et al. Enteric Glia Cells Attenuate Cytomix-Induced Intestinal Epithelial Barrier Breakdown[J]. Journal of Surgical Research,2013,8(2):202-203.

[9]韩德五,赵龙凤.肠源性内毒素血症在肝炎慢性化中的作用[J].基础医学与临床,1999,19(6):2-7.

[10]韩德五,马学惠,赵元昌.肝硬化动物模型的研究[J].山西医药,1979,8(4):1.

[11]Hyon M K, Kwon E, Choi H J, et al. Dimethylnitrosamine-induced liver fibrosis and recovery in NOD/SCID mice[J]. Journal of Veterinary Medical Science,2011,73(6):739-745.

[12]罗超元,姜海平,张海伟.二氧化硅诱导肝癌周围肝纤维化的实验研究进展[J].中国病理生理杂志,2009,25(5):1022-1025.

[13]Molleken C, Sitek B, Henkel C, et al. Detection of novel biomarkers of liver cirrhosis by proteomic analysis[J]. Hepatology,2009,49(4):1257-1266.

[14]JU Marquardt, D Seo, LE Gómez-Quiroz, et al. Loss of c-Met accelerates development of liver fibrosis in response to CCl<sub>4</sub> exposure through deregulation of multiple molecular pathways[J]. Biochim Biophys Acta,2012,1822(6):942-951.

[15]JIN X, CONG T, ZHAO L, et al. The protective effects of Masson pine pollen aqueous extract on CCl<sub>4</sub>-induced oxidative damage of human-hepatic cells[J]. International Journal of Clinical & Experimental Medicine. 2015,8(10):17773-17780.

[16]Rusu MA, Tamas M, Puica C, et al. The hepatoprotective action of

ten herbal extracts in CCl<sub>4</sub> intoxicated liver[J]. Phytotherapy Research, 2005,19(9):744-749.

[17]Muriel P, Fernández-Martínez E, Pérez-Alvarez V, et al. Thalidomide ameliorates carbon tetrachloride induced cirrhosis in the rat[J]. European Journal of Gastroenterology & Hepatology,2003,15(9):951-957.

[18]Hafez MM, Al-Harbi NO, Al-Hoshani AR, et al. Hepato-protective effect of rutin via IL-6/STAT3 pathway in CCl<sub>4</sub>-induced hepatotoxicity in rats[J]. Biological Research,2015,48(1):30.

[19]M. Grąt, K.M. Wronka, M. Krasnodębski, et al. Profile of gut microbiota associated with the presence of hepatocellular cancer in patients with liver cirrhosis[J]. Transplant Proc,2016,48(5):1687-1691.

[20]Fouts DE, Torralba M, Nelson KE, et al. Bacterial translocation and changes in the intestinal microbiome in mouse models of liver disease[J]. J Hepatol,2012,56(6):1283-1292.

[21]孙欢娜,张向磊,石建美,等.护肠消毒微丸对慢加急性肝衰竭大鼠肝脏及结肠病理变化的影响[J].山东中医药大学学报,2018,42(2):170-174.

#### 基金项目:

国家自然科学基金(No. 81473532); 广西一流学科建设重点课题(No.2018XK084); 广西中医药管理局课题(GZLC14-10); 广西自然科学基金青年基金项目(No.2018GXNSFBA050041); 广西卫计委自筹课题(Z2016205)。

#### 作者简介:

刘容(1983—),女,硕士,主治医师,主要研究领域为中西医结合防治肝纤维化研究。

刘旭东(1976—),通讯作者,博士,主任医师,主要研究领域为中西医结合防治肝纤维化研究。

编辑:张怀锦 编号:EC-6190722195(修回:2020-06-02)

## 胃下垂的常见中医分型与胃肠动力学指标的相关性研究

### A study on correlation between common TCM typing of gastroptosis and gastrointestinal dynamics indexes

彭薇洪<sup>1</sup> 尚文璠<sup>2</sup> 陈其城<sup>2</sup> 蒋志<sup>2</sup>

(1.广州市白云区人民医院,广东 广州,510000; 2.广东省中医院,广东 广州,510000)

中图分类号: R322.4<sup>+</sup> 文献标识码: A 文章编号: 1674-7860(2020)16-0009-04

**【摘要】**目的:探讨胃下垂的常见中医分型与胃肠动力学指标的相关性。方法:选取2012年1月—2016年6月我院收治的胃下垂患者54例为研究对象,根据中医证型分为肝胃不和组30例和脾虚饮停组24例。选取同期25例健康志愿者为正常对照组。均进行胃十二指肠同步测压,比较三组的消化间期移行性复合运动(Migrating Motor Complex, MMC)周期的时程和振幅指数、消化期的远端胃振幅指数(Amplitude Meal Index, AMI),胃肠收缩类型以及病史资料。结果:肝胃不和组胃痛、便秘的症状发生率高于脾虚饮停组( $P < 0.05$ )。脾虚饮停组胃内振水音、餐后腹胀的症状发生率高于肝胃不和组( $P < 0.05$ )。消化间期,肝胃不和组、脾虚饮停组的MMC周期III相时程均小于正常对照组( $P < 0.05$ ),且脾虚饮停组的MMC周期III相时程小于肝胃不和组( $P < 0.05$ )。脾虚饮停组的十二指肠通道、空肠通道III相振幅指数均小于正常对照组和肝胃不和组( $P < 0.05$ )。消化期,