

基于手术法所制造的大鼠肝内胆管结石模型的初步探索

常子越, 曹银彪, 唐浩文

中国人民解放军总医院第一医学中心, 北京市 100089

摘要: 目的: 初步探索大鼠肝胆管结石造模方法。方法: 12只SPF级SD大鼠采用手术法胆管逆行注射脂多糖后结扎造成胆管部分梗阻。术后在1, 2, 3, 4周时对大鼠进行二次手术取材并处死, 对血液、胆管及胆汁进行后续的实验分析。结果: 截止取材时, 共有6只大鼠死亡, 其中1周组及2周组中共有2只存活(66.7%), 3周与4周组中均仅有1只存活(33.3%)。外周血及胆汁涂片结果提示大鼠胆管结石造模成功。结论: 采用手术法进行大鼠胆管结石造模具备可行性, 但应进一步完善手术方案。

关键词: 肝内胆管结石病, 动物模型

Preliminary exploration of a rat model of intrahepatic biliary calculi created surgically

Ziyue Chang, Yinbiao Cao, Haowen Tang

First Medical Center, Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100089, China

Abstract: Objective: To explore the preliminary methods for creating a rat model of biliary calculi. Methods: Twelve SPF-grade SD rats underwent surgery to induce partial obstruction of the bile duct by ligating it after retrograde injection of lipopolysaccharide. Rats underwent secondary surgery and were euthanized at 1, 2, 3, and 4 weeks postoperatively. Blood, bile duct, and bile samples were collected for subsequent experimentation and analysis. Results: By the time of specimen collection, a total of 6 rats had died, with 2 surviving in the 1-week and 2-week groups (66.7%) and only 1 surviving in the 3-week and 4-week groups (33.3%). Peripheral blood and bile smear results indicated successful modeling of biliary calculi in rats. Conclusion: Surgical induction of biliary calculi in rats is feasible but requires further refinement of the surgical protocol.

Keywords: intrahepatic biliary calculi disease, animal model

1. 引言

肝内胆管结石是指左右肝管汇合处近端胆管中存在胆结石, 而与总胆管和/或胆囊中同时存在胆结石无关⁽¹⁾。目前肝内胆管结石的发病机制尚未明确, 可能与胆道细菌和寄生虫感染、胆管炎和胆汁淤积等其多种因素有关。其特征是肝内胆管在汇入肝总管之前出现色素结石, 结石主要由胆红素钙组成, 胆固醇含量较少, 主要病理生理机制包括胆管炎、胆汁感染和胆道狭窄, 从而形成一个自我维持的循环, 使疾病长期存在, 其特点是细菌感染经常反复发作, 被称为“复发性化脓性胆管炎”综合征。此外, 久治不愈的肝胆管炎也是肝内胆管癌的一个已知风险因素⁽²⁾。

一个已知风险因素⁽²⁾。

实验动物模型的产生为揭示胆道和胆汁淤积性损伤引发的多种病理生理机制以及验证其临床相关性提供了基本线索⁽³⁾。目前肝内胆管结石病的动物模型大都由兔等动物通过手术造模法制作⁽⁴⁻⁶⁾, 而大鼠等实验动物更加贴合人类的胆汁代谢, 因此, 我们探索了一种大鼠肝胆管结石造模方法, 并希望继续完善以成为一种较为标准的造模方案。

2. 材料及方法

2.1. 材料

2.1.1. 实验动物

无特殊病原体(SPF)级健康雄性大鼠12只, 体重250-300g, 由北京斯贝福生物技术有限公司提供, 实验动物许可证SCXK桂2011-0001。大鼠放置于饲养笼, 室内温度控制在23-25°C, 湿度保持在48-62%, 适应性饲养7d后进行实验。

收稿日期: 2024-6-25; 修回日期: 2024-8-2

基金项目: 青年人才托举工程: Young Elite Scientists Sponsorship Program by CAST. 第八届青托工程项目编号: 2022QNRC001

通讯作者/Corresponding author: 唐浩文/Haowen Tang, E-mail: haowen_tang@163.com

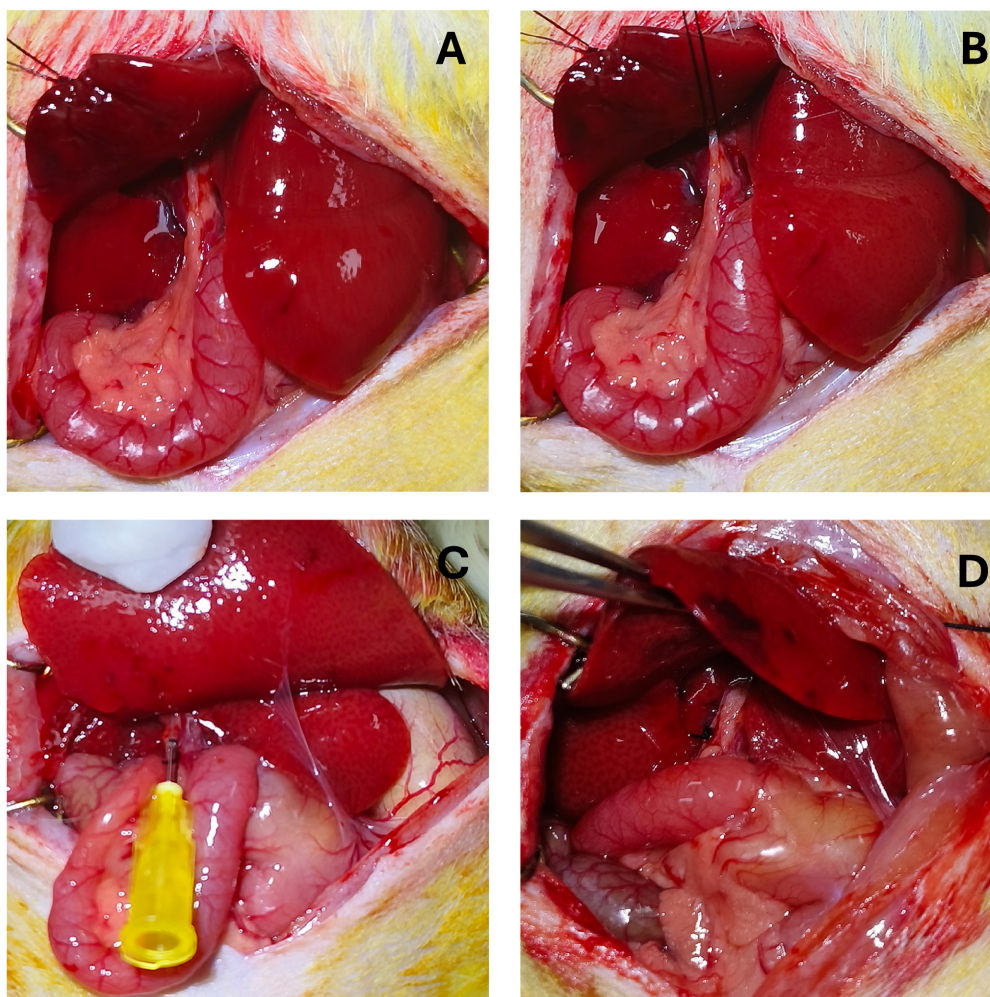


图1. 大鼠胆管结石造模术中图片。A: 沿腹腔正中切口入腹; B: 找到并游离部分胆总管; C: 32G针头逆行穿刺胆管, 注射LPS溶液; D: 撤出注射针, 观察无明显胆汁渗漏后关腹。

2.2. 方法

2.2.1. 实验动物分组及模型建立

将12只SPF级SD大鼠依照动物实验后不同的取材时间点随机分为1周、2周、3周和4周组。术前12小时禁食, 6小时禁水。以异氟烷吸入的方式麻醉大鼠, 将其四肢固定, 剃去腹部区域毛发, 沿腹正中切口入腹。沿十二指肠系膜找到胆管, 以32G针头逆行穿刺入胆管, 胆管外套扎5-0线固定穿刺针头并造成部分胆管梗阻, 循针头按大鼠体重0.5mg/kg逆行注射LPS溶液(0.25mg/mL)后拔出穿刺针头, 按压胆管至无明显渗出后关腹。

2.2.2. 标本采集

依据分组, 分别于术后饲养至1周、2周、3周和4周时进行二次手术, 循原切口入腹, 经下腔静脉取血液标本进行肝功能检测, 包括血清谷丙转氨酶(ALT)及血清总胆红素水平, 经胆道取胆汁标本, 室温下12000转每分钟高速离心后, 取沉淀进行涂片检查, 以镜下观察到黄色晶体或结石形成作为成功构建依据⁽⁷⁾。沿胆管两侧剪开肠系膜, 向上游离至大鼠肝门, 围肝门剪除部分肝实质

(大小约1×1cm左右), 获得大鼠肝门部实质及胆管标本留待后续实验。手术后截至取材时间内死亡的大鼠解剖尸体明确死亡原因。

2.2.3. 统计学方法

采用SPSS 20.0软件进行数据分析, 计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 计数资料以频数或百分率表示。

3. 结果

3.1. 大鼠存活率

12只大鼠均成功进行造模手术(图1)。截止取材时, 共有6只大鼠死亡(造模死亡率50%), 其中1周组及2周组中有2只存活(66.7%), 3周与4周组中均仅有1只存活(33.3%)。对死亡大鼠剖验尸体, 发现其中5只(83.3%)死于胆漏, 1只未发现明确死亡原因。

3.2. 造模后大鼠肝功能的变化

1周、2周、3周和4周组大鼠血清总胆红素的平均水平

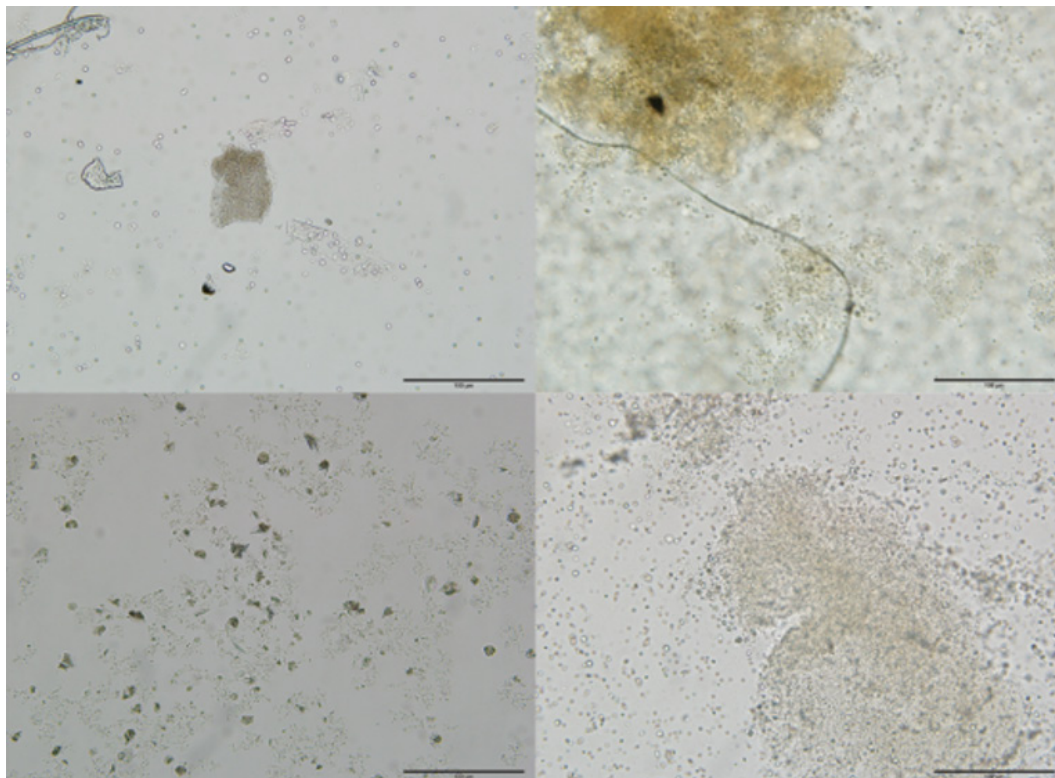


图2. 镜下观察胆汁沉淀涂片, 可见黄色晶体或者结石形成(20倍镜下视野, 分别为1, 2, 3, 4周取材组胆汁涂片)。

分别为20.05, 23.40, 50.44, 78.00 (umol/L), ALT分别为95.35, 95.88, 96.32, 92.45 (U/L)。

3.3. 造模后大鼠胆汁性状观察

取造模大鼠胆汁, 12000r/min离心10分钟后观察, 发现与正常大鼠胆汁相比, 造模后的大鼠胆汁沉淀明显变多, 颜色偏深, 质地更加浓稠。镜下观察可见造模大鼠胆汁内存在更多黄色晶体(图2)。

4. 讨论

本研究系初期探索性研究, 探讨大鼠手术法建立肝胆管结石模型的可行性。相较于其他动物, 大鼠为基础的胆管结石模型更加能够模拟人类的胆汁代谢。在本实验中, 结合大鼠取材样本的验证, 我们认为这种手术造模方法尽管尚不成熟, 但具备一定的有效性, 在大鼠的胆汁和血液样本的检测中均有体现。对于肝内胆管结石其他的炎性标记物等也有待进一步研究验证。

既往在以兔子为模型动物建立肝内胆管结石模型的研究中⁽⁸⁾, 常从十二指肠乳头逆行插管, 注射细菌后半结扎胆总管以达到胆道感染, 胆管狭窄, Oddis括约肌功能紊乱状态从而诱使结石发生。因此在大鼠为基础构建胆结石模型的过程中, 我们参考了黄丽芳⁽⁹⁾等制作大鼠胆管炎模型的造模方案, 取用最适宜引起大鼠胆管炎浓度的LPS直接经由胆管穿刺逆行注射后进行半梗阻操作, 通过胆管炎症结合胆道狭窄诱发胆管结石的发生⁽⁸⁾。术后肝功能化验结果提示大鼠出现了肝功能的损伤。胆汁的镜下观察结果亦提示结晶或镜下可见的结石形成, 提示初步验

证该方法具有可行性。而对于二次手术取材的肝门部肝实质, 胆管组织的进一步检测或将进一步佐证胆管的炎性改变。

结合术后死亡率及尸体剖验结果, 我们认为大部分大鼠死于术后胆漏。由于术中经胆管逆行注射了LPS, 因此造模大鼠的胆漏更易引发腹腔感染及脓毒血症。结合在兔等实验动物中进行肝内胆管结石的造模经验, 我们认为或可经十二指肠穿刺或者在胆管穿刺后缝合穿刺口避免胆漏。

本研究的创新性在于尝试构建了一种大鼠作为实验动物的肝内胆管结石模型, 不足之处为该造模方案目前仍处于探索阶段, 成模验证尚不完整, 手术方案仍需改善以降低术后死亡风险, 提高成模率。

利益冲突: 所有作者均声明不存在利益冲突。

致谢: 无。

作者贡献声明: 唐浩文: 实验设计、实验动物手术指导、文稿撰写与修改; 常子越: 实验动物手术、实验指标采集与记录、统计分析、文章撰写; 曹银彪: 实验动物饲养与手术辅助、统计分析、文章撰写。

参考文献

1. Sakpal SV, Babel N, Chamberlain RS. Surgical management of hepatolithiasis. *HPB (Oxford)*. 2009;11:194-202.
2. Motta RV, Saffioti F, Mavroeidis VK. Hepatolithiasis: Epidemiology, presentation, classification and management of a

- complex disease. *World J Gastroenterol.* 2024;30:1836-1850.
3. Mariotti V, Strazzabosco M, Fabris L, *et al.* Animal models of biliary injury and altered bile acid metabolism. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis.* 2018;1864:1254-1261.
 4. Yang Q, Wu Z, Liu F, *et al.* Effective treatment of chronic proliferative cholangitis by local gentamicin infusion in rabbits. *Biomed Res Int.* 2018;2018:6751952.
 5. 沈爱玲, 周家华, 胡亮, 等. 肝内胆管结石和胆管炎的兔模型. *海南医学.* 2010,21:31-34.
 6. 常伟华, 李智华, 陈飞. Oddi括约肌功能异常在兔肝内胆管结石形成中的作用. *中国普通外科杂志.* 2009,18:131-135.
 7. 张震. 白藜芦醇调控Nrf2表达及易位在胆色素结石形成中的作用机制研究. *中国医科大学.* 2023.DOI:10.27652/d.cnki.gzyku.2023.002120.
 8. 常伟华, 李智华, 陈飞. Oddi括约肌功能异常在兔肝内胆管结石形成中的作用. *中国普通外科杂志.* 2009,18:131-135.
 9. 黄丽芳, 许彦, 唐乾利, 等. 脂多糖构建大鼠肝内胆管炎症动物模型的浓度研究. *重庆医学.* 2021,50:2889-2893.
- 引用本文 / Article Citation:
- 常子越, 曹银彪, 唐浩文. 基于手术法所制造的大鼠肝内胆管结石模型的初步探索. *医学新视角.* 2024;1(4):199-202. doi:10.5582/npjm.2023.02016
- Ziyue Chang, Yinbiao Cao, Haowen Tang. Preliminary exploration of a rat model of intrahepatic biliary calculi created surgically. *The New Perspectives Journal of Medicine.* 2024;1(4):199-202. doi:10.5582/npjm.2023.02016