

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2021.17.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210419.1854.002.html\(2021-04-20\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20210419.1854.002.html(2021-04-20))

脂多糖构建大鼠肝内胆管炎症动物模型的浓度研究^{*}

黄丽芳¹, 许彦¹, 唐乾利², 曾鸿孟³, 毛康任³, 王兵^{3△}

(1. 广西中医药大学, 南宁 530001; 2. 右江民族医学院, 广西百色 533000; 3. 广西中医药大学
第一附属医院, 南宁 530001)

[摘要] **目的** 研究脂多糖(LPS)构建大鼠肝内胆管炎症动物模型的最佳浓度。**方法** 80 只大鼠分为空白对照组、模型组 A、B 和 C, 每组各 20 只。空白对照组按 5 mL/kg 在肝内胆管一次性注射生理盐水, 模型组 A、B、C 分别按 5.00、2.50、1.25 mg/kg 3 种不同浓度在肝内胆管一次性注射 LPS 构建大鼠肝内胆管炎症动物模型, 观察大鼠存活时间共 7 d。分别于造模后 2、4、6、8 h 和 7 d 采取各组大鼠血液进行血常规、生化检测, 观察大鼠血常规中白细胞计数(WBC)、中性粒细胞百分比(N%)、丙氨酸氨基转移酶(ALT)和天门冬氨酸氨基转移酶(AST)炎症指标; 同时采取各组大鼠肝脏组织, 进行苏木素-伊红染色观察大鼠肝脏组织病理特征。根据造模结果分析 LPS 构建大鼠肝内胆管炎症动物模型的最佳浓度。**结果** 在造模后 2、4、6、8 h 及造模后 7 d, 模型组 C 的 WBC、N%、ALT 及 AST 水平较其他 3 组明显升高($P<0.05$)。模型组肝脏病理均有不同程度改变, 其中模型组 C 肝脏病理组织炎性改变及肝损伤改变最为明显。**结论** 在肝内胆管注射 1.25 mg/kg LPS 是构建大鼠肝内胆管炎症动物模型的最佳浓度。

[关键词] 脂多糖; 肝内胆管炎; 动物模型; 方法

[中图分类号] R657.4+5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2021)17-2889-05

Study on the concentration of lipopolysaccharide in constructing rat model of intrahepatic cholangitis^{*}

HUANG Lifang¹, XU Yan¹, TANG Qianli², ZENG Hongmeng³, MAO Kangren³, WANG Bing^{3△}

(1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530001, China; 2. Youjiang Medical University for Nationalities, Baise, Guangxi 533000, China; 3. The First Affiliated Hospital of Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning, Guangxi 530001, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the optimal concentration of lipopolysaccharide (LPS) in constructing rat model of intrahepatic cholangitis. **Methods** A total of 80 rats were divided into the blank control group, the model group A, the model group B and the model group C with 20 rats in each group. In the blank control group, 5 mL/kg sodium chloride injection was injected into intrahepatic bile duct at one time. The model group A, B, C was injected with LPS at 5.00, 2.50 and 1.25 mg/kg, respectively, to establish the rat model of intrahepatic cholangitis. The survival time of the rats was observed for 7 days. Blood samples of the four groups were taken at 2, 4, 6, 8 h and 7 d after modeling, respectively, and the blood routine and biochemical tests were performed to observe white blood cell count (WBC), percentage of neutrophils (N%), alanine aminotransferase (ALT) and aspartate transaminase (AST) inflammatory indexes. At the same time, liver tissue of rats in each group was stained with hematoxylin-eosin to observe the pathological characteristics of liver tissue. According to the modeling results, the optimal concentration of LPS to construct the rat model of intrahepatic cholangitis were evaluated. **Results** In the mold after 2, 4, 6, 8 h and 7 d after building, compared with the other three groups, WBC, N%, ALT and AST levels in the model group C significantly elevated ($P<0.05$). Liver pathology in the model group was changed to varying degrees, among which the changes of inflammatory

^{*} 基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目(81804099); 广西壮族自治区自然科学基金项目(2020JJB140118); 广西壮族自治区科技计划项目(桂科 AD17129025); 2017 年广西科学研究与技术开发计划项目/重点研发计划(桂科 AB17195071); 广西壮族自治区教育厅中青年教师基础能力提升项目(J17098); 广西中医药大学校级青年基金项目(2018QN019); 广西中医药大学研究生教育创新计划资助项目(YCSY2020100)。

作者简介: 黄丽芳(1994—), 在读硕士研究生, 主要从事普外及中医外治法研究。△ 通信作者, E-mail: 980028770@qq.com。

tissue and liver injury in the model group C were the most obvious. **Conclusion** Intrahepatic bile duct injection of 1.25 mg/kg LPS is the best concentration for the establishment of rat model of intrahepatic cholangitis.

[Key words] lipopolysaccharide; intrahepatic cholangitis; animal model; method

胆石症是指胆道系统包括胆囊或胆管内外发生结石的疾病,是胆道系统中最常见的病变^[1],肝内胆管结石是胆结石的一种类型。我国胆石症的发病率呈逐年递增趋势^[2],其中肝内胆管结石的发病率在 2.0%~2.5%^[3],欧美地区的发病率相对较低^[4],其在韩国及日本均是常见疾病。目前肝内胆管结石的发病机制尚未明确,多认为它与胆道细菌和寄生虫感染、胆管炎和胆汁淤滞、遗传和环境、饮食与代谢等多种因素有关^[5-8],且各种因素可相互作用促进结石形成。因其易于复发并感染,能够引起肝左叶的萎缩、纤维化和功能减弱,故本病治疗难度较大,具有复发率高、残石率高、与肝内胆管癌关系密切等特点,在全世界范围内属于难治型胆道疾病^[9-11]。目前研究多倾向于利用动物模型构建炎症环境^[12-13],这已经被证实是一种有效的研究方法。因此,本课题组提出构建炎症动物模型,通过参照文献方法^[14],在肝内胆管注射脂多糖(LPS)构建大鼠肝内胆管炎症动物模型,探讨肝内胆管炎症参与结石形成的机制,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

无特殊病原体(SPF)级健康雄性大鼠 80 只,体重 200~250 g,由长沙天勤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 ℃,湿度保持在 48%~62%,适应性饲养 7 d 后进行实验。

1.1.2 试剂与仪器

熊去氧胆酸胶囊(意大利贝斯迪大药厂,国药准字 H20150398,0.25 克/粒,25 粒/盒)。LPS(北京索莱宝科技有限公司,国药准字 L8880,10 毫克/支)。全自动组织脱水机(Leica ASP300S)、展烤片机(ZK-PJ-1A 型)、Thermo Shandon 切片机(A78100101 型)、病理石蜡包埋机(TMA81010100)、全自动苏木素-伊红(HE)染色仪器(DAKEWE)、倒置显微镜(CKX41)、细胞自动计数器、超低温冰箱(EXF40086V)、台式高速冷冻离心机(Centrifuge 5810R)、超净工作台(SW-CJ-IFD)、日立 7180 自动生化分析仪(HITACHI)、希森美康 XT-1800i 全自动血液分析仪。

1.2 方法

1.2.1 腹腔内胆总管注射 LPS 诱导大鼠肝内胆管炎症形成

1.2.1.1 实验分组

将 80 只大鼠分为空白对照组、模型组 A、模型组 B 和模型组 C,每组各 20 只,放置于干净的饲养笼内正常喂食饲养,自来水饮食共 7 d。

1.2.1.2 模型构建

各组大鼠常规饲养 7 d 后,将 1 mg LPS 重悬于 1 mL 无菌平衡盐溶液或细胞培养基,轻轻旋涡振荡直至粉末完全溶解,变成模糊的淡黄色溶液,即得到 1 mg/mL 的储存液。用浓度为 10%的水合氯醛按 1 mL/200 g 通过左(右)下腹部采用腹腔注射大鼠进行麻醉,将大鼠麻醉后、腹部剃毛、腹部朝上、一次性橡皮筋固定四肢放置于木板上、聚维酮碘或乙醇消毒,在剑突下靠右作横行切口,直径 2~3 cm,切开皮肤、肌肉、腹膜、找到十二指肠,用眼科镊子提起十二指肠,再仔细观察十二指肠的肠系膜,找到淡黄色的韧性很好的小管,即肝内胆管(见图 1)。为研究不同浓度的 LPS 构建大鼠肝内胆管炎症动物模型,本次实验分为 4 组进行浓度研究对比,从中筛选出构建肝内胆管炎症动物模型的最佳造模方案,空白对照组按 5 mL/kg 在肝内胆管一次性注射 0.9%生理盐水,模型组 A、B、C 分别按 5.00、2.50、1.25 mg/kg 3 种不同浓度在肝内胆管一次性注射 LPS 构建大鼠肝内胆管炎症动物模型(见图 2)。均予常规饲料正常喂食,自来水饮食,放置于干净饲养笼内,观察大鼠存活时间,共 7 d。造模过程中对死亡的大鼠进行解剖,提取肝脏组织待后期进行病理检测。



图 1 暴露大鼠肝内胆管

1.2.2 标本采集

用浓度为 10%的水合氯醛按 1 mL/200 g 通过左(右)下腹部采用腹腔注射进行大鼠麻醉。分别于造模后 2、4、6、8 h 和 7 d 采集各组 3 只大鼠股动脉血液标本,每只 2 mL。同时于造模后 7 d 取各组 3 只大鼠肝脏组织,切除右肝脏边缘组织,大小为 0.3 cm×0.5

cm,放置于甲醛溶液中浸泡待后期行病理检测。取完标本后使用空气栓塞方法将大鼠处死。

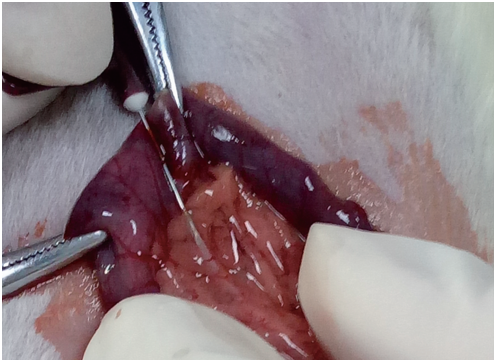


图 2 肝内胆管注射 LPS

1.2.3 血液标本血常规、生化指标检测

大鼠股动脉血液放入 4℃ 的冰箱 60 min,分别检测白细胞计数(white blood cell, WBC)、中性粒细胞百分比(percentage of neutrophils, N%)、丙氨酸氨基转移酶(alanine aminotransferase, ALT)及天门冬氨酸氨基转移酶(aspartate transaminase, AST)的水平变化。

1.2.4 HE 染色观察大鼠肝脏组织病理特征

通过肝脏组织标本固定、脱水透明、石蜡包埋,切片厚度在 4 μm,展片,捞片,烘片脱去溶化组织间隙的石蜡,将烤好的切片用弹簧夹夹好,放入全自动 HE 仪器中进行 HE 染色,取出吹干、封片,干燥后在显微镜下观察肝脏组织病理切片。

1.3 统计学处理

采用 SPSS20.0 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用方差分析;计数资料以频数或百分率表示,比较采用 χ^2 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组存活率比较

80 只大鼠共存活 45 只,存活率为 56%。术后 15 d 大鼠伤口基本愈合,4 组存活率比较,差异有统计学意义($\chi^2 = 16.406, P = 0.001$),见表 1。

表 1 各组存活率比较(n=20)

组别	存活数(n)	死亡数(n)	存活率
空白对照组	15	5	75%
模型组 A	5	15	25%
模型组 B	9	11	45%
模型组 C	16	4	80%

2.2 结果分析

2.2.1 不同时间段各组 WBC、N%、ALT 及 AST 水平比较

模型组 C 的 WBC、N%在造模 8 h,ALT、AST 在造模后 2、4、6、8 h 较其他 3 组明显升高,差异有统计

学意义($P < 0.05$),见表 2。

表 2 不同时间段各组 WBC、N%、ALT 及 AST 水平比较(n=3, $\bar{x} \pm s$)

项目	空白对照组	模型组 A	模型组 B	模型组 C
WBC($\times 10^9/L$)				
2 h	4.2±2.3	4.1±1.2	5.5±1.4	5.7±1.2
4 h	3.5±1.8	4.5±1.7	6.3±1.5	5.2±1.3
6 h	3.6±2.1	4.8±1.3	5.9±2.1	7.1±2.3
8 h	3.9±2.5	5.2±1.3	6.8±1.3	8.3±1.4 ^{ab}
N%(%)				
2 h	5.3±2.2	6.9±2.7	7.6±3.1	9.2±3.4
4 h	5.5±2.1	7.1±2.3	8.2±3.2	9.7±2.6
6 h	6.1±2.3	7.3±2.6	7.8±2.5	10.2±3.5
8 h	6.4±2.5	7.6±2.3	7.6±2.4	10.2±2.7 ^{ab}
ALT(U/L)				
2 h	20±14	40±15	51±16 ^a	81±15 ^{ab}
4 h	22±17	42±16	57±13 ^a	92±17 ^{ab}
6 h	24±12	45±11	55±18 ^a	102±13 ^{ab}
8 h	25±13	47±18 ^a	60±14 ^a	97±13 ^{ab}
AST(U/L)				
2 h	13±7	51±15	61±23 ^a	112±31 ^{ab}
4 h	17±9	55±13	65±18 ^a	120±18 ^{ab}
6 h	21±11	53±11	71±15 ^a	125±26 ^{ab}
8 h	23±12	57±14 ^a	75±22 ^a	131±15 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与空白对照组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组 A、B 比较。

2.2.2 造模后 7 d 各组 WBC、N%、ALT 及 AST 水平比较

模型组 C 的 WBC、N%、ALT 及 AST 水平较其他 3 组明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),见表 3。

表 3 造模后 7 d 各组 WBC、N%、ALT、AST 水平比较(n=3, $\bar{x} \pm s$)

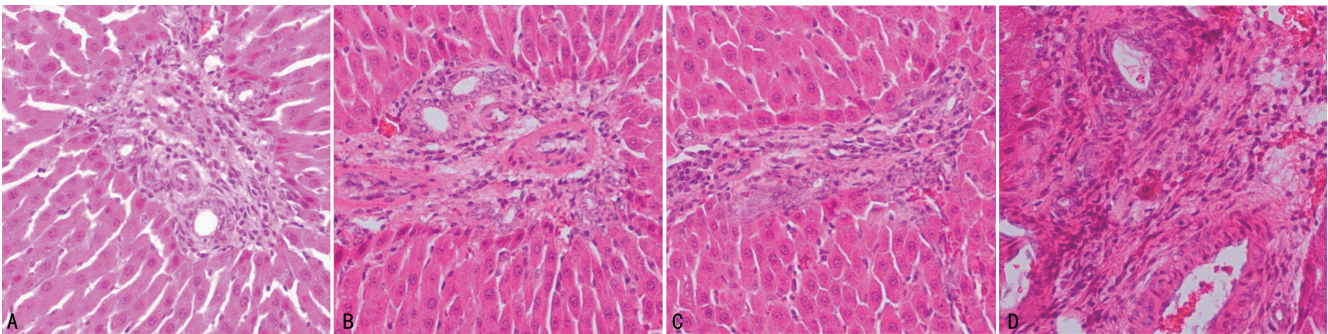
组别	WBC ($\times 10^9/L$)	N% (%)	ALT (U/L)	AST (U/L)
空白对照组	5.0±3.7	5.1±3.5	21±16	18±15
模型组 A	8.2±3.0 ^a	7.5±5.5 ^a	43±18 ^a	55±24 ^a
模型组 B	8.5±2.5 ^a	10.5±3.1 ^a	62±23 ^a	72±34 ^a
模型组 C	12.9±3.3 ^{ab}	13.5±3.2 ^{ab}	112±32 ^{ab}	123±40 ^{ab}

^a: $P < 0.05$,与空白对照组比较;^b: $P < 0.05$,与模型组 A、B 比较。

2.2.3 造模后 7 d 各组肝脏组织病理结果

使用 LPS 造模 7 d 后,通过 HE 染色,空白对照组可见完整的正常肝细胞形成,未见炎性细胞浸润;模型组 A 肝血窦间隙增大,炎性细胞呈向心性浸润;模型组 B 炎性细胞浸润程度较模型组 A 轻;模型组 C 可见肝内胆管排列紊乱,大量炎性细胞浸润肝内胆

管,见图 3。



A:空白对照组;B:模型组 A;C:模型组 B;D:模型组 C。
图 3 肝脏病理结果(HE,×40)

3 讨 论

肝内胆管结石是肝胆外科中最常见的疾病,给人们的健康带来严重影响。目前肝内胆管结石的发病机制尚未明确,大部分学者认为其形成与肝内胆管炎症密切相关。LPS 是革兰阴性菌致病的重要因素之一,它可以激活机体内皮细胞、平滑肌细胞、成纤维细胞及单核吞噬细胞,诱导炎症因子合成和释放^[15-16]。相关研究显示,LPS 可以诱导动物模型发生炎症反应,如急性肝损伤、急性肺损伤、急性肾损伤^[17-19]。本实验采用 LPS 构建大鼠肝内胆管炎症动物模型,通过血常规、生化检测及肝脏组织 HE 染色探求肝内胆管炎症参与结石形成的机制。在实验中严格控制 LPS 注射剂量,有效减少了实验动物造模过程中的死亡率,提高了造模成功率,其中模型组 C 的成活率较高;不同浓度 LPS 可致大鼠 WBC、N%、ALT、AST 水平升高,模型组 C 最明显;肝脏病理组织可见肝内胆管大量炎性细胞浸润。

在造模过程中发现以下几个问题:(1)LPS 溶液应储存于硅烷化容器内,在使用前需旋涡振荡至少 30 min,如果振荡时间不够,则很难看到溶液变淡黄色。LPS 储存液可进一步用无菌平衡盐或细胞培养基稀释至需要的浓度。该储存液(1 mg/mL)可放在 4 ℃ 保存,大约 1 个月稳定。(2)每次腹腔注射前及灌胃前大鼠需禁食,麻醉时,麻醉药需要根据大鼠体重计算精准,避免麻醉剂量过大导致大鼠死亡。(3)对于注射 LPS 的浓度,在造模过程中比较了 5.00、2.50、1.25 mg/kg 这 3 种浓度,最终通过造模致死率,总结出最佳的肝内胆管 LPS 注射浓度为 1.25 mg/kg。(4)所有实验大鼠造模后,每只大鼠需要放置单独的笼子里,避免双方互相斗殴致死。(5)造模术口应横切,较好找到胆总管,术口切口不宜超过 3 cm。如果切口过大会使造模后大鼠因体温下降甚至失血过多导致死亡。(6)室内温度低于 23 ℃ 会导致大鼠体温下降或切口感染,进而伤口难愈合最后导致死亡。因此,要保持室内温度控制在 23~25 ℃,湿度保持在

45%~65%,有利于大鼠生存及结石的形成,使造模更容易成功^[20]。

综上所述,肝内胆管注射 1.25 mg/kg 浓度的 LPS 是构建大鼠肝内胆管炎症动物模型的最佳浓度,本研究为肝内胆管炎症动物模型的构建奠定了理论基础,为相关临床与基础研究提供了新方法、新思路及指导作用。

参考文献

[1] TORRES O J M,LINHARES M M,RAMOS E J B,et al. Liver resection for non-oriental hepatolithiasis[J]. Arq Bras Cir Dig,2019,32(4): e1463.

[2] WONGJARUPONG N,ASSAVAPONGPAIBOON B,SUSANTITAPHONG P,et al. Non-alcoholic fatty liver disease as a risk factor for cholangiocarcinoma:a systematic review and meta-analysis[J]. BMC Gastroenterol,2017,17:149.

[3] LU H,YANG H,WU L,et al. A novel prognostic model for diagnosing a ttypical bile duct hyperplasia in patients with intrahepatic lithiasis[J]. Medicine (Baltimore),2019,98(17): e15364.

[4] PENG J X,WANG L Z,DIAO J F,et al. Major hepatectomy for primary hepatolithiasis;a comparative study of laparoscopic versus open treatment [J]. Surg Endosc,2018,32(10): 424271-414276.

[5] JIROUSKOVA M,NEPOMUCKA K,OYMA N-EYRILMEZ G,et al. Plectin controls biliary tree architecture and stability in cholestasis[J]. J Hepatol,2018,68(5):1006-1017.

[6] WANG N,TANG B,HAO Y,et al. Acute shock caused by clonorchis sinensis infection;a case re-

- port[J]. BMC Infect Dis,2019,19:1014.
 - [7] KASPRZAK A,ADAMEK A. Mucins;the old, the new and the promising factors in hepatobiliary carcinogenesis[J]. Int J Mol Sci,2019, 20(6):1288.
 - [8] ALMANDIL N B,TAHA M,GOLLAPALLI M, et al. Indole bearing thiadiazole analogs: synthesis, β -glucuronidase inhibition and molecular docking study[J]. BMC Chem,2019,13(1):14.
 - [9] 翟润. 1 743 例胆石病流行病学调查及危险因素分析[J]. 中国卫生产业,2017,14(32):153-154.
 - [10] 虞名旭,林型城,徐定银,等. 规则性肝段/肝叶切除术对复杂性肝内胆管结石患者结石清除率、并发症及复发率的影响[J]. 数理医药学杂志,2020,33(6):791-793.
 - [11] LU H,YANG H,WU L, et al. A novel prognostic model for diagnosing atypical bile duct hyperplasia in patients with intrahepatic lithiasis[J]. Medicine (Baltimore),2019,98(17): e15364.
 - [12] 周朦静,陈兰英,胡宏辉,等. 白头翁皂苷 B4 对脂多糖诱导的急性肺损伤的保护作用研究[J]. 中药新药与临床药理,2019,30(6):664-670.
 - [13] YI G,LI H,LIU M, et al. Soybean protein-derived peptides inhibit inflammation in LPS-induced RAW264. 7 macrophages via the suppression of TLR4-mediated MAPK-JNK and NF-kappa B activation[J]. J Food Biochem,2020,44(8):e13289.
 - [14] ZHAO L,YANG R,CHENG L, et al. Epithelial-mesenchymal transitions so bile duct epithelial cells in primary hepatolithiasis[J]. J Korean Med Sci,2010,25(7):1066-1077.
 - [15] TIAN W,PIAO X M,YIN C R, et al. Adventitious root cultures of *Oplopanax elatus* inhibit LPS-induced inflammation via suppressing MAPK and NF-B signaling pathways[J]. In Vitro Cell Dev Biol Anim,2019,55(9):766-775.
 - [16] DLOUHA D,PROCHAZKOVA I,ERETOVA Z, et al. Influence of lipoprotein apheresis on circulating plasma levels of miRNAs in patients with high Lp(a)[J]. Atheroscler Suppl,2019,40:12-16.
 - [17] 陈赛男,谭迎,肖筱婵,等. TLR4 基因敲除对脓毒症小鼠急性肝损伤的影响[J]. 实用医学杂志,2020,36(11):1425-1428.
 - [18] SOCHA B M,ŁADA P,SZCZEPANSKA A A, et al. The influence of experimentally induced endometritis on the PPAR expression profile in the bovine endometrium[J]. Theriogenology,2018,122:74-83.
 - [19] 程笑,杨滢霖,李伟瀚,等. 秦皮甲素减轻脂多糖刺激小鼠急性肾损伤和炎性反应的作用及其机制[J]. 中国药学(英文版),2020,29(5):322-332.
 - [20] 唐乾利,黄欣,俞渊,等. 环境湿度对兔胆石症模型建造的影响[J]. 右江民族医学院学报,2013,35(6):749-751.
- (收稿日期:2020-12-18 修回日期:2021-05-13)
-
- (上接第 2888 页)
- [12] ZUO H L,ZHANG Q R,CHEN C, et al. Molecular evidence of herbal formula:a network-based analysis of Si-Wu decoction[J]. Phytochem Anal,2021,32(2):198-205.
 - [13] 刘霞,李凡,宋屿璠,等. 四物汤药理及临床研究进展[J]. 中西医结合研究,2020,12(6):392-395.
 - [14] 安磊,王珂,孙雨辰,等. 雪莲果中菊淀粉型低聚果糖的神经保护作用[J]. 中国食品学报,2019,19(10):34-39.
 - [15] 张晶,李昊,师建辉,等. 果糖与代谢性疾病[J]. 中国病理生理杂志,2020,36(4):735-740.
 - [16] 杨蕾,凌玲,郁多男. 红细胞抗氧化机制的研究进展[J]. 医学研究杂志,2020,49(8):13-16.
- (收稿日期:2020-12-24 修回日期:2021-04-12)