

专题介绍

小鼠动物实验方法系列专题(二)

小鼠是生命科学研究和医学研究的重要模式生物。随着小鼠基因组测序计划的完成,国际上明显加速了在这方面研究的投入和部署。从2005年起,美国、欧盟、加拿大等批准了一系列重大科学计划,开展基因工程小鼠的大规模研制,这些项目包括美国国立卫生院的小鼠基因剔除计划(KOMP, <http://www.nih.gov/science/models/mouse/knockout>)、欧盟第七框架的欧洲小鼠条件性剔除计划(EuCOMM, <http://www.eucomm.org>)和加拿大的北美小鼠条件性剔除计划(NorCOMM, <http://norcomm.phenogenomics.ca/index.htm>)等。中国也在2006年由科技部立项、上海南方模式生物研究中心牵头启动了中国的小鼠条件性基因敲除计划,该计划支持了国内几十个高校和研究所150种条件性基因敲除小鼠模型的建立。随着这些研究计划的快速进展,大量基因工程小鼠模型成为科学界的共同资源,这将对功能基因组和人类疾病治疗的机制以及新药的研发产生重大而深远的影响。为帮助读者能更好地利用这些小鼠资源开展研究,我们将从本期开始以专栏形式陆续刊登介绍小鼠动物实验技术的文章,也欢迎读者能够踊跃投稿,把自己手头正在做的小鼠动物实验技术方法和心得体会介绍给大家,一起来分享实验过程中的得失和快乐。

肝脏大部分切除实验在小鼠肝再生研究中的应用

马明 盛哲津 张梦杰 王维刚*

(同济大学生命科学与技术学院,上海200092)

摘要 小鼠肝大部分切除(partial hepatectomy, PH)实验是研究肝再生的一个重要的实验。本文以C57小鼠为例,对肝大部分切除实验做了较为详细的介绍。实验结果显示,在术后的1~8天,小鼠的肝脏体重比值逐渐增加,在术后的7~10天里可以达到原来肝重的90%以上,10天以后肝细胞停止分裂。正常情况下,实施肝大部分切除后,小鼠的存活率可以达到90%以上。该模型的建立为研究肝脏再生的细胞和分子生物学机制奠定了基础。

关键词 肝切除;肝再生;组织再生学;肝细胞;小鼠

哺乳动物的肝脏具有很强的再生能力,当小鼠受到急性肝损伤的时候,其肝脏细胞能够快速地进行增殖,修复肝脏损伤的部分。Higgins等^[1]最早在1931年对肝部分切除(partial hepatectomy, PH)实验模型进行了探讨,Grisham^[2]于1961年采用PH实验最早证明了在急性肝损伤中,肝脏的修复主要是通过肝实质细胞来完成的,继而有研究者证实,肝卵圆细胞也参与了肝脏的修复过程^[3]。在部分肝切除模型建立以后实验人员又对小鼠进行连续的部分肝切除手术(即在进行一次肝切除手术后,对于新生肝脏再进行切除),来研究肝细胞的分裂能力,发现肝细胞在进行2

轮分裂后肝重可达到原来的90%左右,10天后肝细胞基本停止分裂^[4,5]。研究人员通过肝移植的方法对肝细胞的再生能力进行了探索,证明了肝细胞强大的再生能力^[6]。进行肝大部分切除手术的实验对象不仅适用于小鼠,还可用于大鼠、兔子、猪、狗、猴子和大猩猩等哺乳动物^[7,8]。

肝脏在受到急性损伤时,肝细胞会很快进入细胞

收稿日期:2010-12-21 接受日期:2011-01-05

国家重大科学研究计划(No.2010CB945500)资助项目

*通讯作者。Tel: 021-65986853, E-mail: weagonwong@gmail.com

周期进行分裂^[9], 肝脏的再生过程涉及细胞周期蛋白^[10]、细胞因子及多条信号通路, 如: 信号传感与转录触媒剂 3(STAT3)^[11,12] 等。参与肝脏再生的细胞因子有: 肿瘤坏死因子 α (TNF α)^[13-15]、白介素 6(IL-6)^[16]、肝细胞生长因子(HGF)^[17,18]、去甲肾上腺素^[19]; 而转化生长因子 β -1(TGF- β -1)参与了肝脏自身再生修复后的终止过程。因此, 肝脏的修复再生过程是一个精细复杂的过程, 对于肝脏是如何调控自身生长的大小^[20], 如何自发的终止再生过程现在还不是很清楚。

部分肝切除动物模型对于组织再生学尤其是对于肝脏再生机制的研究有着非常重要的意义。目前, 在肝脏的急性损伤研究中, 肝大部分切除实验已经成为一个较为广泛应用的模型。在本文中我们根据文献报道及自身实践经验, 介绍了如何建立小鼠的肝大部分切除动物模型, 为研究肝脏的再生提供了实用的动物实验方法。

1 材料与方法

1.1 实验方法简述

小鼠肝大部分切除(PH)模型手术操作主要包括四步: 腹腔开口; 血管、胆管结扎; 肝脏切除; 腹腔缝合。小鼠的肝脏一共有六叶(图 1), 分为左外叶、左中叶、右中叶、右上叶、右下叶和尾状叶, 其中的左中叶与右中叶相离较近, 又把它们合称为中叶。在对小鼠进行手术时, 具体对小鼠哪一叶肝脏进行结扎与切除有着不同的实验方案。小鼠的六叶肝脏中左外叶占其肝脏总重的 35%~41%, 中叶占其肝脏总重的 28%~32%, 因此这里我们切除左外叶和中叶, 即可达到理论上的 2/3 肝切除(图 1 虚线所示)。

小鼠在术后 1~8 天, 肝脏 / 体重比值逐渐增加; 术后 7~10 天, 其肝重可达到手术前肝重的 90% 左右。实验者可根据不同的实验需求, 在小鼠肝脏再生的不同时间点取小鼠的肝脏进行实验。一般情况下, 观察小鼠肝细胞增殖情况应取原来未被切除的肝叶作进行实验。

1.2 实验器材

戊巴比妥钠(Sigma 公司), 用生理盐水配制成 1% 的溶液; 生理盐水(丰原涂山制药有限公司); 4-0 丝质手术缝合线, 1/2 5x12 带线缝合圆针(尼龙线)(上海医菱医疗器械有限公司); 眼科镊, 眼科剪。

Trans-Blot SD 半干转印槽(BIO-BAD 公司); 一抗: 单克隆大鼠抗人增殖细胞核抗原(PCNA)1:1 000 稀释(基因科技公司), 可通用; 二抗: 辣根过氧化物酶标记山羊抗大鼠 IgG, 1:1 000 稀释(碧云天); Immobilon-P transfer membrane(Millipore 公司)。

1.3 试验动物

健康 C57 小鼠 15 只, 实验组 10 只, 对照假手术组 10 只, 均为雄性, 9 周龄, 体重 26 g~34 g。小鼠饲养在恒温(21℃~22℃)房间, 每隔 12 h 光暗循环。非实验期间小鼠自由进食标准鼠粮及饮水。小鼠在实验前一天未对其禁食。

1.4 手术操作方法

(1)按照 10 μ l/g 剂量腹腔注射 1% 戊巴比妥钠溶液麻醉小鼠, 麻醉后小鼠腹部剃毛(图 2A)。

(2)用手术剪刀, 沿小鼠腹部中线偏左的位置剪开一个 2.5 cm~3 cm 的切口, 上至剑突软骨的上方, 暴露剑突(图 2B), 下至距小鼠肛门处 3 cm 的位置。

将一条消毒的皮筋挂绕过剑突, 两端固定在手术板上。将一段细钢丝折叠后, 做成“ Π ”形拉钩, 其中一端弯成弧形, 用弧形拉钩拉开腹肌, 另一端固定在手术板上。两支拉钩撑开切口, 暴露肝脏(图 2C)。

(3)使用眼科剪游离与肝脏相连的韧带, 充分暴露左外叶。以 4-0 缝合线, 自左外叶根部结扎, 结扎成功后左外叶由于缺血会变为暗红色(图 2D)。

(4)用镊子轻轻夹起, 使用眼科剪贴线结根部将左外叶切除(图 2E), 肝切面如有出血情况, 使用消毒的棉球轻轻擦拭即可。

(5)同(3)(4)法切除中叶(图 2F)。

(6)使用带线缝合针将小鼠腹肌、皮肤逐层缝合(图 2G)。碘酒、酒精消毒切口(图 2H)。

(7)将手术后的小鼠右侧卧位, 置于干燥柔软的手术巾上, 置 37℃ 的热板之上复温至小鼠苏醒。

(8)术后每隔 2 天取 2 只小鼠称量体重后颈椎脱臼处死, 观察肝脏再生情况并称量肝脏重量, 计算肝脏 / 体重比。

(8)假手术组小鼠的处理: 假手术组小鼠按照(2)所述方法开腹, 再使用眼科剪游离与肝脏相连的韧带后, 对小鼠进行切口缝合消毒。

2 结果

我们以 C57 野生型小鼠为例, 对其进行肝脏大部分切除手术, 术后观察小鼠的肝脏再生情况、测

定肝脏体重比值。

2.1 实验数据处理

本实验所得实验数据均采用OriginPro 7.5 软件进行数据处理。

2.2 实验结果

2.2.1 小鼠肝再生情况 在小鼠肝大部分切除手术后的20~28小时内,小鼠肝实质细胞的分裂达到了

最大值^[2]。图中显示,术后第4天可以明显地看到小鼠再生的肝叶(图3)。

2.2.2 小鼠肝再生过程中肝脏体重比(liver weight/body weight; LW/BW) 在术后,小鼠肝脏体重比随着时间逐渐增加(图4),到了第10天,术后小鼠肝重能达到原来的90%。通过Western blot检测增殖细胞核抗原(proliferating cell nuclear antigen, PCNA)

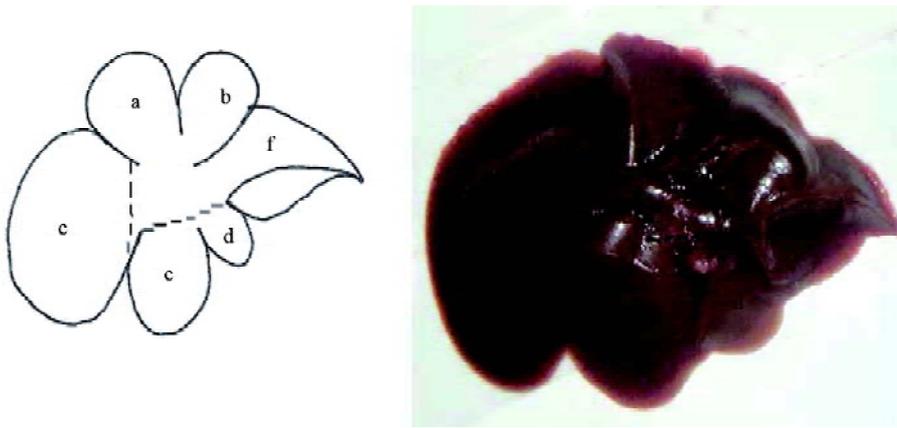


图1 小鼠肝模式图以及结扎位置示意图

图中虚线表示肝叶的结扎位置。a: 尾状叶; b: 右上叶; c: 左外叶; d: 左中叶; e: 右中叶; f: 右下叶; d,e: 中叶。

Fig.1 Schematic drawings of mouse liver anatomy and positioning of ligation

The dotted line presents the thread for knot of the ligation. a: caudate lobe; b: right upper lobe; c: left lateral lobe; d: left middle lobe; e: right middle lobe; f: right lower lobe; d, e: middle lobe.

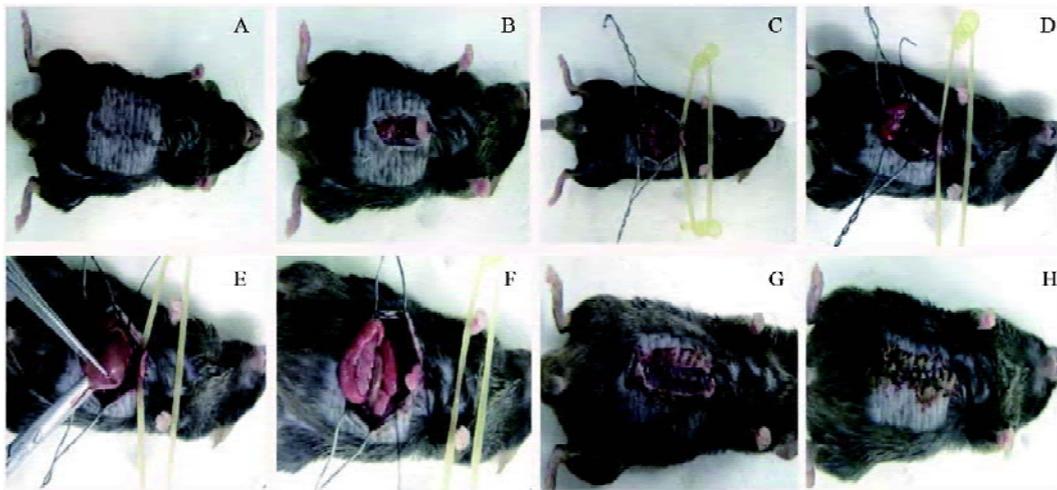


图2 肝大部分切除手术过程

A: 剪去小鼠腹部毛发; B: 打开腹腔,露出剑状软骨; C: 使用文中介绍的工具将腹腔切口撑大; D: 使用手术线结扎左外叶; E: 使用眼科剪剪掉左外叶; F: 使用手术线结扎中叶; G: 缝合小鼠腹肌; H: 缝合皮层,并用碘酒消毒。

Fig.2 The procedure of the partial hepatectomy

A: depilate the mouse abdomen; B: open the abdominal cavity, reveal the xiphoid; C: open the abdominal cavity widely; D: ligate left lateral lobe; E: cut the left lateral lobe; F: ligate the middle lobe; G: suture the abdominal cavity; H: suture the skin and disinfect with Iodine.

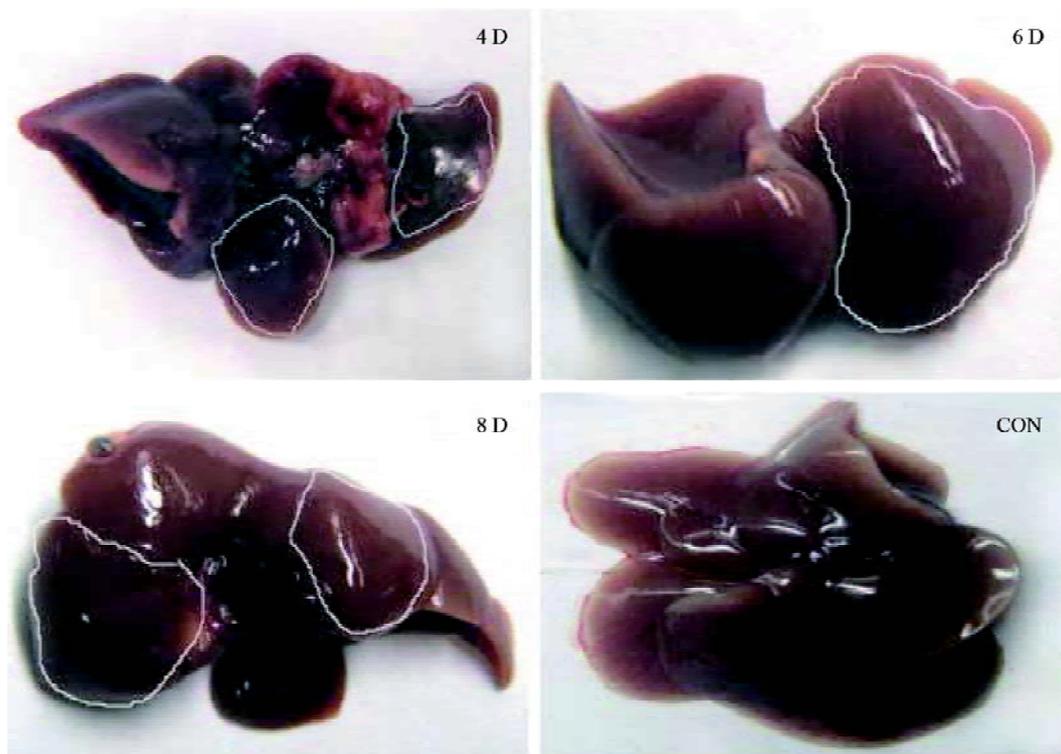


图3 肝脏PH后的再生情况

4D: 肝脏手术后4天的情形; 6D: 手术后6天的肝脏; 8D: 手术后8天的肝脏; CON: 假手术组的肝脏。白线所示区域表示新生肝脏。

Fig.3 The regeneration of the liver

4D: four days after PH; 6D: six days after PH; 8D: eight days after PH; CON: CON is the mouse's liver under the sham operation. The white line presents the renew liver.

的表达, 第6天已基本检测不到PCNA的表达, 第10天肝细胞已基本停止分裂(图5)。

3 讨论

小鼠肝大部分切除(PH)实验对于研究肝脏的再生以及组织再生学有重要意义。自该实验建立以来, 已经成为研究肝再生的重要手段之一, 通过该方法我们可以研究不同的信号通路对于肝脏再生过程的影响^[11-13], 此外人们还可以研究化学因子以及药物对于PH术后小鼠肝脏再生情况的影响^[15], 进而筛选出能够促进组织再生的药物。

小鼠作为广泛使用的常见模式生物, 在现今的科研工作中发挥着重要的作用。目前, 小鼠肝切除手术尚无一个统一的标准, 通常认为切除小鼠肝脏总重的70%即可达到肝脏大部分切除。以往的文献中^[1-4]涉及到的肝脏大部分切除实验大多是采用Higgins所介绍的切除方法, 但该方法所采用的实验对象是大鼠, 因为大鼠的体积相对小鼠较大, 肝切除实验操作相对

比较容易, 而此方法运用到小鼠上面是需要进行修改的。由于对于小鼠肝脏大部分切除尚无统一标准, 例如手术中具体的结扎位置, 切除哪几叶肝脏无统一标准, 从而会导致不同实验室在进行该实验时所得到的实验数据会存在差异。在一些文献中所介绍的小鼠肝切除手术实验对小鼠造成的身体损伤较大, 小鼠术后容易产生炎症, 不利于小鼠术后的恢复, 从而也会导致数据的差异。这里我们通过对C57小鼠品系的正常成年鼠进行肝脏解剖和分析, 发现小鼠的六叶肝脏中, 左外叶占肝脏总重的35%~41%, 中叶占28%~32%, 且左外叶和中叶位置容易暴露, 切除左外叶和中叶, 即可达到理论上的2/3肝切除即大部分肝切除(图1)。我们这种方法操作简单易行, 通常20分钟即可完成一只小鼠的肝脏大部分切除, 并且对小鼠自身所造成的生理损伤较小, 不易产生炎症, 有利于小鼠术后的恢复, 提高小鼠术后的成活率, 在我们的实验中小鼠术后的存活率可以达到90%以上。

肝切除实验在实验过程中有很多因素会影响

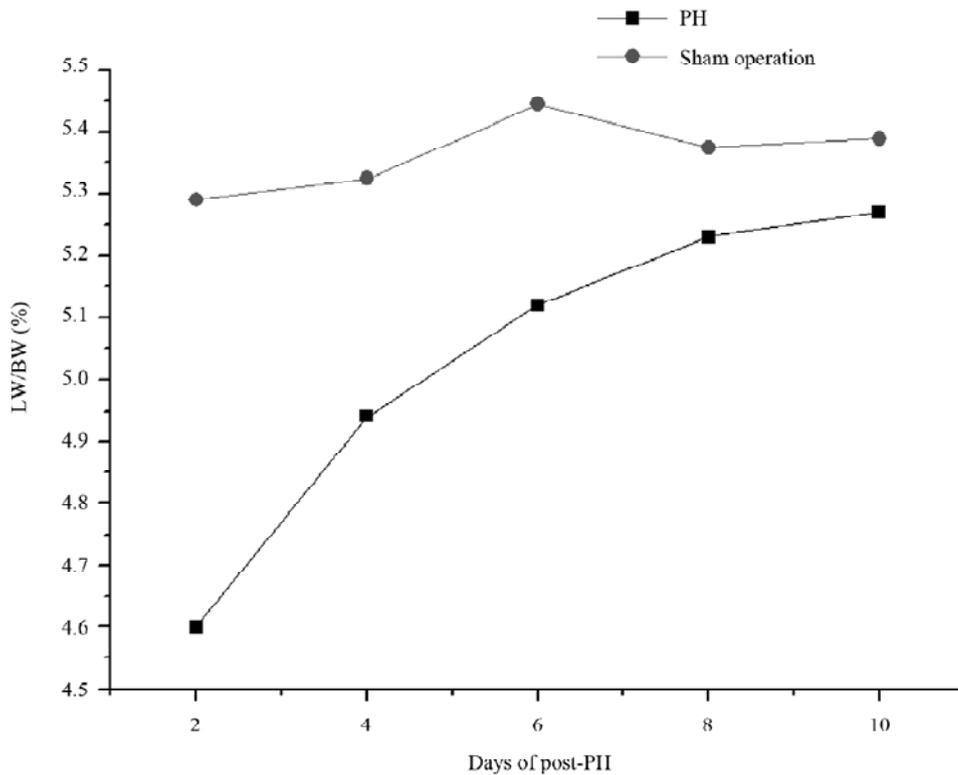


图4 肝大部分切除后肝脏体重比

从第2天到第10天小鼠的肝脏体重比逐渐增加($n=10$)。

Fig.4 The liver and body weight ratio after the partial hepatectomy.

The liver and body weight ratio gradually increased from the second day to tenth day post-PH. ($n=10$).

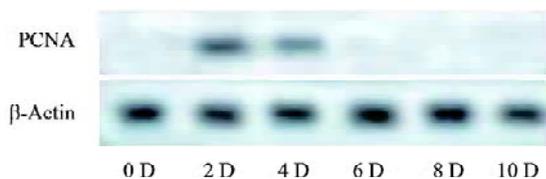


图5 肝部分切除后肝细胞内增殖细胞核抗原(PCNA)的表达
手术后0天、2天、4天、6天、8天、10天肝细胞内增殖细胞核抗原(PCNA)的表达(0D、2D、4D、6D、8D、10D)。手术后两天可以明显看到PCNA的表达,手术后10天已检测不到PCNA的表达($n=10$)。

Fig.5 The expression of the proliferating cell nuclear antigen(PCNA) of the liver after the partial hepatectomy

0D: the moment after the PH. 2D: two days after PH; 4D: four days after PH; 6D: six days after PH; 8D: eight days after PH; 10D: ten days after PH. After two days of PH the expression of the PCNA was obvious, and after ten day the PCNA was not be detected ($n=10$).

小鼠术后的感染率以及死亡率。经作者多次预实验,发现需要注意以下事项:(1)以C57小鼠为例,实验小鼠一般采用8周龄左右的雄性小鼠为宜,鼠龄过

小,首先小鼠的免疫力低,手术后易感染;其次小鼠体型小,不容易进行手术。小鼠手术前无须禁食,手术前禁食易导致肝的脂肪变性,对于肝再生过程中的肝细胞增殖有一定的抑制作用。(2)我们采用1%戊巴比妥钠溶液,因为其麻醉效果较好,在使用戊巴比妥钠时,如果是新配的溶液,麻醉前最好进行预实验以确定药物的最佳剂量,否则小鼠会因麻醉剂量不当而死亡。(3)在对小鼠进行腹腔开口时,开口不宜过大,2.5cm~3cm即可。切口时应当在腹腔中线偏左的位置。伤口上方剪至剑突软骨暴露即可,不要向剑突软骨两边剪,因为其两侧有较大的血管,易造成出血。腹腔切口缝合时候注意两侧分层对齐及内脏复位,否则会影响小鼠脏器的功能,影响术后恢复。手术后使小鼠右侧卧位,注意保温(保温可以促进苏醒,减少麻醉药物的呼吸抑制作用),心脏向上,以免压迫心脏。(4)术后小鼠需要分笼独立饲养,不要共养,否则小鼠容易相互撕咬,会咬断手术缝合线,造成小鼠感染死亡。(5)手术操作时需注意无菌概

念, 防止感染, 由于 PH 手术为 I 类清洁切口, 术后无须使用抗生素, 这也避免了抗生素对肝脏再生的可能影响。

综上所述, 本文介绍了小鼠肝大部分切除(PH)实验方法。C57 野生型小鼠在手术后 7~10 天内其肝脏重量可达到手术前肝脏的 90% 左右, 在肝切除手术后通过检测增殖细胞核抗原(PCNA)的表达, 发现小鼠肝细胞在术后第 10 天已基本停止分裂。

参考文献(References)

- Higgins CC, Anderson RM. Experimental pathology of the liver; restoration of the liver of the white rat partial surgical removal. *Arch Pathol* 1931; 12: 186-202.
- Grisham JW. A morphologic study of deoxyribonucleic acid synthesis and cell proliferation in regenerating rat liver; autoradiography with thymidine-H3. *Cancer Res* 1962; 22: 842-9.
- Evarts RP, Hu Z, Omori N, Omori M, Marsden ER, Thorgeirsson SS. Precursor-product relationship between oval cells and hepatocytes: comparison between tritiated thymidine and bromodeoxyuridine as tracers. *Carcinogenesis* 1996; 17(10): 2143-51.
- Simpson GE, Finckh ES. The pattern of regeneration of rat liver after repeated partial hepatectomies. *J Pathol Bacteriol* 1963; 86: 361-70.
- Stocker E, Wullstein HK, Brau G. Capacity of regeneration in liver epithelia of juvenile, repeated partially hepatectomized rats. Autoradiographic studies after continuous infusion of 3H-thymidine (author's transl). *Virchows Arch B Cell Pathol* 1973; 14(2): 93-103.
- Rhim JA, Sandgren EP, Degen JL, Palmiter RD, Brinster RL. Replacement of diseased mouse liver by hepatic cell transplantation. *Science* 1994; 263(5150): 1149-52.
- Francavilla A, Ove P, Polimeno L, Coetzee M, Makowka L, Barone M, *et al.* Regulation of liver size and regeneration: importance in liver transplantation. *Transplant Proc* 1988; 20 (1 Suppl 1): 494-7.
- Kawasaki S, Makuuchi M, Ishizone S, Matsunami H, Terada M, Kawarazaki H. Liver regeneration in recipients and donors after transplantation. *Lancet* 1992; 339(8793): 580-1.
- Michalopoulos GK, DeFrances M. Liver regeneration. *Adv Biochem Eng Biotechnol* 2005; 93: 101-34.
- Nelsen CJ, Rickheim DG, Timchenko NA, Stanley MW, Albrecht JH. Transient expression of cyclin D1 is sufficient to promote hepatocyte replication and liver growth *in vivo*. *Cancer Res* 2001; 61(23): 8564-8.
- Lee J, Greenbaum L, Haber BA, Nagle D, Lee V, Miles V, *et al.* Structure and localization of the IGFBP-1 gene and its expression during liver regeneration. *Hepatology* 1994; 19(3): 656-65.
- Runge D, Runge DM, Drenning SD, Bowen WC Jr, Grandis JR, Michalopoulos GK. Growth and differentiation of rat hepatocytes: changes in transcription factors HNF-3, HNF-4, STAT-3, and STAT-5. *Biochem Biophys Res Commun* 1998; 250(3): 762-8.
- Akerman P, Cote P, Yang SQ, McClain C, Nelson S, Bagby GJ, *et al.* Antibodies to tumor necrosis factor-alpha inhibit liver regeneration after partial hepatectomy. *Am J Physiol* 1992; 263(4 Pt 1): G579-85.
- Fujita J, Marino MW, Wada H, Jungbluth AA, Mackrell PJ, Rivadeneira DE, *et al.* Effect of TNF gene depletion on liver regeneration after partial hepatectomy in mice. *Surgery* 2001; 129(1): 48-54.
- Huh CG, Factor VM, Sanchez A, Uchida K, Conner EA, Thorgeirsson SS. Hepatocyte growth factor/c-met signaling pathway is required for efficient liver regeneration and repair. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004; 101(13): 4477-82.
- Heinrich PC, Behrmann I, Haan S, Hermanns HM, Muller-Newen G, Schaper F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. *Biochem J* 2003; 374 (Pt 1): 1-20.
- Lindroos PM, Zarnegar R, Michalopoulos GK. Hepatocyte growth factor (hepatopoietin A) rapidly increases in plasma before DNA synthesis and liver regeneration stimulated by partial hepatectomy and carbon tetrachloride administration. *Hepatology* 1991; 13(4): 743-50.
- Schmidt C, Bladt F, Goedecke S, Brinkmann V, Zschiesche W, Sharpe M, *et al.* Scatter factor/hepatocyte growth factor is essential for liver development. *Nature* 1995; 373(6516): 699-702.
- Houck KA, Michalopoulos GK. Altered responses of regenerating hepatocytes to norepinephrine and transforming growth factor type beta. *J Cell Physiol* 1989; 141(3): 503-9.
- Taub R. Liver regeneration: from myth to mechanism. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004; 5(10): 836-47.

Partial Hepatectomy in the Study of Mouse Liver Regeneration

Ming Ma, Zhe-Jin Sheng, Meng-Jie Zhang, Wei-Gang Wang*

(School of Life Science and Technology, Tongji University, Shanghai 200092, China)

Abstract Partial hepatectomy (PH), a basic protocol, is widely used to study the liver regeneration and tissue regeneration. This article introduced the experimental method of 2/3 PH in detail, used the C57 mice as the subject. In our study, survival rate of the mice after the operation could be to 90%. After PH, the mice liver and body weight ratio gradually increased, and 7~10 days after PH the liver weight can be increased to 90% of the normal liver weight. The hepatocytes stopped dividing after 10 days. The found of 2/3 PH is for us to lay the foundation of the future to study the mechanism of the liver regeneration.

Key words partial hepatectomy; liver regeneration; tissue regeneration; hepatocyte; mouse

Received: December 21, 2010 Accepted: January 5, 2010

This work was supported by National Basic Research Program of China (973 Program) (No.2010CB945500)

*Corresponding author. Tel: 86-21-65986853, E-mail: weagonwong@gmail.com