

最新药物临床试验与非临床研究质量管理规范实施手册

主编 伊剑华

ZUIXIN YAOWULINCHUANGSHIYAN YU FEILINCHUANG
YANJIUZHILIANG GUANLIGUIFAN SHISHISHOUCE

宁夏大地音像出版社

第六章 临床试验的 新技术与新方法

第一节 抗炎和免疫抑制作用的实验方法

一、自身免疫性肝炎

自身免疫性肝炎是以异常的自身免疫反应为基础的疾病，需要予以长期的免疫抑制剂治疗，但其发病机制尚未被阐明。其特点包括：存在血清自身抗体， γ -球蛋白浓度增高，女性易患，常伴有肝外自身免疫综合征，具有免疫易感背景（HLA-DR3，HLA-DR4等），肝活检多见门静脉周围炎，碎屑样坏死伴大量淋巴细胞、浆细胞浸润且对免疫抑制剂反应良好等。这些临床特点都提示自身免疫性肝炎是由异常的自身免疫反应引起的。

（一）实验动物模型的建立

（1）实验对象 5周龄雄性 C57BL/6 小鼠，体重为 17~19g；生长环

境为 20~25℃, 通风良好, 无野鼠干扰。小鼠肝脏经肝组织病理学进行诊断, 诊断标准符合 2000 年修订的病毒性肝炎防治方案。

(2) 主要试剂 卡介苗, Freund 佐剂 (无水羊毛脂与液体石蜡按 3:17 比例混匀, 高压消毒后分装, 4℃保存)。

(3) 实验步骤

①LSP 制备。取同系 C57BL/6 小鼠, 脱颈致死, 取出肝脏, 将肝组织剪碎, 生理盐水反复冲洗除去血液, 与等量生理盐水进行匀浆, 34000r/min (10000g) 离心 25min, 取上清液即 S-100。将 S-100 用琼脂糖凝胶 6B 分离, 收集到的第 1 峰就是 LPS。将 LPS 用生理盐水稀释至 25g/L。

②免疫剂制备。每次免疫时将 25g/L 的 LPS 与 Freund 佐剂按 1:1 比例混匀, 充分研磨至乳白色, 滴加卡介苗 (5mg/ml) 继续研磨。

③免疫注射。将饲养 6 周的 C57BL/6 小鼠每周用新制备的免疫剂腹腔注射 1 次, 每次 0.2ml, 共 8 次。随着实验的进行, 模型小鼠变得不活跃, 常显萎靡状, 进食欠佳, 毛稀疏干燥、粗乱蓬松, 体重增加较慢。14 周时模型小鼠血清总蛋白升高明显, 白蛋白有所降低, A/G 倒置明显, 血清 Tbil、ALT、AST 随着免疫进程稳步上升。在免疫 2 次后, 模型小鼠可见肝细胞灶性坏死。免疫 4 次后, 灶性坏死增多, 肝细胞肿胀、汇管区炎症细胞浸润明显。免疫 6 次后, 肝细胞灶性坏死明显增多, 可见小叶中心性坏死, 肝细胞呈条索状植物细胞样改变, 汇管区较明显炎症细胞浸润, 肝窦内 Kupffer 细胞明显增多, 肝细胞变性、气球样变。免疫 8 次后, 肝细胞坏死明显、呈片状, 可见纤维组织增生, 肝窦增宽有淤血现象。浸润细胞多为淋巴细胞, 也可见单核细胞、中性粒细胞。肝组织免疫荧光检查, 模型小鼠在免疫 2 次后即可见到呈点状、线状特异性荧光。免疫 4 次后, 点状、线状特异性荧光增多, 可见大量颗粒状荧光团, 底色明亮。

(二) 观察指标

1 脏器质量

处死动物，并解剖取肝脏和脾脏，称重，计算每 10g 体重的脏器质量（肝指数和脾指数）。

2 组织学观察

①组织切片制备。动物处死后立即剖腹，取肝组织置于 10% 中性甲醛溶液中固定 24h，常规脱水、透明、浸蜡，包括 60% 乙醇、70% 乙醇、80% 乙醇、95% 乙醇各 2 次，每次 3h；100% 乙醇 2 次，每次 2h；二甲苯 3 次，前 2 次 30min，后 1 次 15min；55℃ 石蜡 2 次，每次 2h，然后石蜡包埋。组织块以石蜡切片机做连续切片 5 张。切片厚约 5 μ m，并将各种切片以一定方向粘至玻片的一端，稍作烘干后即置于 37℃ 的烘箱中 24h。

②对切片进行 HE 染色。

③切片脱蜡至蒸馏水。

④切片浸入苏木素染液中染色 5min，结束后用流动自来水洗切片 5min。

⑤0.5% 盐酸乙醇溶液分化数秒钟，结束后用流动自来水洗切片 1~2min。

⑥0.5% 淡氨水蓝化切片 1~2min，结束后用流动自来水洗切片 5~10min。

⑦镜检满意后进入蒸馏水中清洗切片。

⑧切片进入 0.5% 伊红水溶液中 5min，结束后切片进入蒸馏水中洗一下。

⑨切片进入 80% 乙醇中 30s，结束后切片进入 95% 酒精中 30s。

⑩切片进入无水乙醇 I 中 30s，结束后切片进入无水酒精 II 5min。

⑪切片进入二甲苯 I 中 2min，结束后切片进入二甲苯中 II 2min。

⑫切片进入二甲苯中皿 10min，结束后用中性树胶封固。

⑬显微镜下观察，判断标准可以参考 1995 年《病毒性肝炎防治方案（试行）》为依据。—：肝组织无变化。+：肝组织轻度炎细胞浸润及灶性坏死。++：肝组织中度炎细胞浸润及肝细胞坏死。+++：肝组织严重炎细胞浸润及广泛肝细胞坏死。

⑭肝组织免疫荧光检查（以小鼠为例）。处死动物，取肝脏最大叶进行冰冻切片，滴加羊抗小鼠 IgG 荧光抗体与 1/5000 浓度的伊文氏蓝 1:10 稀释液，37℃ 保湿孵育 45min，PBS 冲洗 3 次，蒸馏水冲洗 1 次，烘干后用缓冲甘油封片，荧光显微镜下观察。荧光强度判断标准如下。—：底色均匀，无特异性荧光。+：有特异性点状、线状荧光。++：特异性点状、线状荧光多，有少量颗粒状荧光。+++：有大量颗粒状荧光团，底色明亮。

3 碱性磷酸酶（ALP）总活力测定

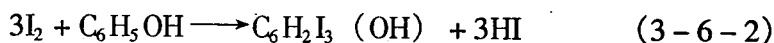
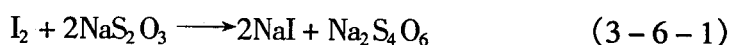
（1）磷酸苯二钠法 ALP 在碱性环境中作用于磷酸苯二钠，使之水解出酚和磷酸。酚在碱性溶液中与 4-氨基安替吡啉作用，经铁氰化钾氧化而成红色醌的衍生物，根据红色深浅确定 ALP 的活力。

①试剂

a. 碳酸盐缓冲液（pH10，0.1mol/L）。称取无水碳酸钠（AR）6.36g，碳酸氢钠（AR）3.36g，加少量蒸馏水溶于 1000ml 容量瓶中并稀释至刻度。加氯仿数滴防腐。

b. 磷酸苯二钠底物液（0.01mol/L。称取磷酸苯二钠（AR）2.18g 溶于 1000ml 蒸馏水中，此蒸馏水应迅速煮沸以消灭微生物，迅速冷却后加氯仿 4ml，放置冰箱内备用（此液久放，空白管吸光度增高，故一次不宜配制太多）。

c. 酚标准贮存液（1ml = 1mg）。结晶酚（AR）1g 溶于 0.1mol/L 盐酸溶液中使成 1000ml。再按下法标化：准确吸取酚标准贮存液 25ml，置于有玻璃塞的三角烧瓶中，加 0.1mol/L NaOH 50ml，加热至 65℃，再加入 0.05mol/L 碘液 25ml，加塞，置于室温 30min 后加浓盐酸 50ml，最后 1g/L 儿淀粉溶液为指示剂，用 0.05mol/L 硫代硫酸钠滴定之。滴定时的反应式如下：



根据反应式（3-6-2），3mol 碘（相对分子质量 254）与 1mol 酚（相

对分子质量 94) 起作用, 因此每毫升 0. 05mol/L 碘液 (含碘 12. 7mg) 相当于酚的毫克数为: $(12. 7 \times 94) / (3 \times 254) = 1. 567$ 。根据反应式 (3-6-1) 碘也与硫代硫酸钠溶液起反应。设滴定时用去硫代硫酸钠溶液为 Xml, 则实际与酚起反应的碘液为 $(25 - X)$ ml, 相当于酚量为: $1. 567\text{mg/ml} \times (25 - X) \text{ ml}$ 。此即为 25ml 酚贮存液中的实际含酚量。用来滴定酚溶液量为 25ml, 则此酚溶液的质量浓度为: $1. 567 \times (25 - X) / 25 = 0. 06268 \times (25 - X)$ 。

d. 酚标准应用液 (1ml = 1ing)。根据酚贮存标准液标定结果用蒸馏水加水稀释, 该液只能保存 2~3d。

e. 碱性溶液。取 0. 5mol/L 氢氧化钠溶液 8ml 及 0. 5mol/L 碳酸氢钠溶液 (称取碳酸氢钠 4. 2g 加蒸馏水 100ml) 12ml 混合。

f. 6g/L4-氨基安替吡啉。称取 4-氨基安替吡啉 0. 6g, 加蒸馏水 100ml, 放棕色瓶内置于冰箱保存。

g. 24g/L 铁氰化钾溶液 称取铁氰化钾 (AR) 2. 4g, 溶液蒸馏水中, 加至 100ml, 存放于棕色试剂瓶中。

②操作。按表 3-6-1 操作。

表 3-6-1 磷酸苯二钠法操作程序/ml

试 剂	测定管 u	对照管 c
血清	0.1	0.1
缓冲液 - 底物液 (临用前等量混合, 放 37℃ 水浴 3min)	2.0	—
37℃ 水浴 15min		
碱性溶液	2.0	2.0
缓冲液 - 底物液	—	2.0
6g/L4-氨基安替吡啉	1.0	1.0
24g/L 铁氰化钾溶液	1.0	1.0

充分混合后, 用 520nm 波长比色, 以对照管调零, 读数取测定管吸光度。查标准曲线, 求得 ALP 单位值。

③标准曲线绘制如表 3-6-2。

表 3-6-2 磷酸苯二钠法标准曲线绘制操作程序 ml

试 剂	管 号						
	空白	1	2	3	4	5	6
pH10 缓冲液	1. 1	1. 1	1. 1	1. 1	1. 1	1. 1	1. 1
酚标准应用液 (1 ml = 1mg)	0	0. 05	0. 10	0. 20	0. 30	0. 40	0. 50
蒸馏水	1. 0	0. 95	0. 90	0. 80	0. 70	0. 60	0. 50
37℃水浴 15min							
碱性溶液	2. 0	2. 0	2. 0	2. 0	2. 0	2. 0	2. 0
6g/L4-氨基安替吡啉	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0
24g/L 铁氰化钾溶液	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0	1. 0
相当于金氏单位	0	5	10	20	30	40	50

混合后用 520nm 波长比色, 以空白管调零, 读取各管吸光度, 以吸光度为纵坐标, 相应单位为横坐标, 绘制标准曲线。

④单位定义。每 100ml 血清在 37℃与底物作用 15min, 产生酚 1mg 为一个金氏单位。

⑤注意事项

a. 磷酸苯二钠保存过程中避免分解, 每次配制试剂的蒸馏水要煮沸消毒, 冷却后加氯仿, 冰箱保存, 临用前倒出所需量, 多余试剂不可倒回瓶中。可保存一个月。

b. 加试剂顺序不能颠倒。

c. 常用试剂空白管代替血清对照管, 试剂空白管可以检查底物是否分解, 当吸光度增高呈红色时, 底物就不应使用, 当血清严重溶血和黄疸时, 可做一血清对照。

(2) 对硝基酚法 血清中 ALP 能将对硝基苯磷酸二钠水解, 生成无机磷酸钠和对硝基酚, 对硝基酚在稀酸溶液中是无色的, 但在碱性溶液下转变为对硝基酚离子, 为一种黄色的醌式结构。酶作用所释放的对硝基酚的量可由标准曲线求得。

①试剂

a. 碱性缓冲液。称取 7. 50g 甘氨酸和 0. 095g 氯化镁 (无水) 或 0.

203gMgCl₂·6H₂O，溶解在大约 750ml 蒸馏水中，加 1mol 儿氢氧化钠 85ml 并稀释到 1000ml，加几滴三氯甲烷防腐，调 pH 值至 10. 5。

b. 缓冲基质液。称取 0. 1g 对硝基酚磷酸溶解在装有大约 20ml 水的 50ml 容量瓶中，加 25ml 碱性缓冲液，用水稀释至 50ml，分装冰冻保存。

c. 标准液 (10mmol/L)。称取对硝基酚 0. 139g 加少量蒸馏水溶解，最后在容量瓶中稀释至 100ml。

d. 标准应用液 (0. 05mmol/L)。取 c 标准液 5ml 加 0. 2mol/L 氢氧化钠至 1000ml。

②操作。按表 3-6-3 操作

表 3-6-3 碱性磷酸酶总活力测定 (对硝基酚法) 操作程序/ml

试 剂	测定管 u	对照管 c
碱性缓冲液	1. 0	1. 0
保温 5min		
血清	0. 1	—
37℃水浴 30min		
血清	—	0. 1
氢氧化钠 (0. 02mol/L)	10. 0	10. 0

混匀，410nm 波长比色，以水调零，测定管读数减去对照管读数后查标准曲线来求其单位数。

③标准曲线绘制。按表 3-6-4 操作

表 3-6-4 对硝基酚法标准曲线绘制操作程序/ml

试剂	管 号					
	1	2	3	4	5	6
标准应用液	1. 0	2. 0	4. 0	6. 0	8. 0	10. 0
氢氧化钠 (0. 02mol/L)	10. 0	9. 0	7. 0	5. 0	3. 0	1. 0
相当于 ALP 单位	1	2	4	6	8	10

4 碱性磷酸酶同工酶测定

血清或组织提取液中 ALP 同工酶经醋酸纤维薄膜电泳分离后，以 β- 酚磷酸钠盐为底物，在 ALP 催化下释放出游离的 β- 萘酚，再与重氮化合

物反应产生不溶于水的偶氮色素而呈色，最后用光密度计扫描定量。

(1) 试剂

①Tris - 巴比妥缓冲液 (pH8. 8, 离子强度 0. 075) 作为电极缓冲液。

②硼酸缓冲液 (pH10. 0)。取 0. 2mol/L 硼酸 - 0. 3mol/L 氯化钾混合液 200ml 与 0. 2mol/L 氢氧化钠溶液 100ml, 混合。

③0. 1mol/L 氯化镁溶液。

④染色剂。称取 β - 萘酚磷酸钠盐 30mg, 固紫 B 盐 15mg, 用 pH10 硼酸缓冲液 7. 5ml 溶解, 加 0. 1mol/L 氯化镁 5 滴, 棉花过滤, 避光保存, 临用前 20min 配制。

⑤透明液。无水乙醇 72ml 与冰醋酸 28ml 混合。

⑥漂洗液。10% 乙酸溶液。

(2) 操作

①标本。新鲜血清或组织提取液 (提取组织 ALP 的全部操作应在 0 ~ 4℃条件下进行)。

②电泳膜处理。将乙酸纤维薄膜 (4cm × 12cm) 在 Tris - 巴比妥缓冲液浸泡 0. 5h 后取出, 用滤纸吸去多余缓冲液。

③点样。在无光泽面分左右两半, 各点样 1 μ l, 左右两次点样需要在同一直线上。

④电泳。电压 220V, 通电 30min, 温度保持在 20m℃左右。

⑤染色。电泳结束前 15min, 将另一条薄膜 (2cm × 6cm) 浸透染色剂。取出电泳薄膜, 从两端各剪去 3cm, 再从中间分左右剪开。左半部分做血清蛋白染色, 右半部分于浸染染色剂的薄膜在玻璃片上相对覆盖, 放入带盖搪瓷盘中置 37℃水浴 1h, 酶活性区为红色。

⑥漂洗。染色后, 将两条膜置漂洗液中漂洗 10min, 再用蒸馏水冲洗 2 ~ 3 次, 干燥、透明, 在 520nm 波长用吸光度扫描定量。

5 门冬氨酸氨基转换酶 (AST) 测定

总活力测定使用比色法。

(1) 原理 血清中 AST 作用于由门冬氨酸和 α -酮戊二酸组成的基质, 在一定的反应条件下, 产生一定量的草酰乙酸, 草酰乙酸在反应过程中脱羧成为丙酮酸, 在酶促反应达到规定时间时, 加入 2, 4-二硝基苯肼, 在酸性条件下形成苯腙。在碱性条件下, 苯腙呈红棕色, 根据颜色深浅即可确定 AST 的活力。

(2) 试剂

① 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液 (pH7.4)。称取磷酸氢二钠 11.928g, 磷酸二氢钾 2.176g, 加入少量蒸馏水溶解并稀释至 1000ml。

② 1mol/L 2, 4-二硝基苯肼溶液。称取 2, 4-二硝基苯肼 19.8mg, 用 10mol/L 盐酸 10ml 溶解后, 加蒸馏水至 100ml。保存于棕色瓶中备用, 此液可保存 3 个月。

③ 0.4mol/L 的氢氧化钠溶液。

④ 丙酮酸标准液 ($2\mu\text{mol}/\text{ml}$)。精确称取纯丙酮酸钠 22.0mg 于 100ml 容量瓶中, 加 0.1mol/L 的磷酸盐缓冲液至刻度。此液应新鲜配制。

⑤ AST 基质液 (DL-门冬氨酸 200mmol/L, α -酮戊二酸 2mmol/L)。称取 α -酮戊二酸 29.2mg 和 DL-门冬氨酸 2.66g 放置于一小烧杯中, 加入 1mol/L 氢氧化钠 20.5ml 使溶解。并校正 pH 值至 7.4, 然后将溶液移入 100ml 容量瓶中, 用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液稀释至刻度, 放置冰箱内保存。

(3) 操作 程序见表 3-6-5。

表 3-6-5 比色法操作程序/ml

试 剂	测定管 u	对照管 c
血清	0.1	0.1
AST 基质液	0.5	—
置 37℃ 水浴 30min		
2, 4-二硝基苯肼溶液	0.5	0.5
AST 基质液	—	0.5
置 37℃ 水浴 20min		
0.4mol/L 的氢氧化钠溶液	5.0	5.0

混匀 10min 后比色，波长 500nm，蒸馏水调零点。读取吸光度，用“u”管减去“c”管吸光度，查标准曲线求得 AST 的活力单位。

(4) 标准曲线绘制 绘制程序见表 3-6-6。

表 3-6-6 比色法标准曲线绘制/ml

试 剂	管 号				
	对照	1	2	3	4
0. 1mol/L 的磷酸盐缓冲液	0. 1	0. 1	0. 1	0. 1	0. 1
AST 基质液	0. 5	0. 45	0. 40	0. 35	0. 30
丙酮酸标准液	0	0. 05	0. 10	0. 15	0. 20
相当 AST 单位 (卡门氏单位)	0	24	61	114	190

置 37℃ 水浴 5min，各管加 2，4-二硝基苯肼溶液 0. 5ml，混匀，再置 37℃ 水浴 20min，各管加 0. 4mol/L 的氢氧化钠溶液 5ml，混匀，10min 后以蒸馏水调零，用 500nm 波长比色，读取各管吸光度，各管吸光度分别减去对照管吸光度。以各管对应的单位数为横坐标，以相应的吸光度值为纵坐标绘制成标准曲线。

附注：测定结果超过 200U 时，应将血清稀释后再进行测定，结果乘以稀释倍数。

6 淋巴细胞增殖反应实验

淋巴细胞受特异性抗原或丝裂原刺激后，在转化为淋巴母细胞的过程中，DNA 合成明显增加，且其转化程度与 DNA 的合成呈正相关。此时若将合成 DNA 的前体物质胸腺嘧啶核苷用放射性核素 (^3H -TdR) 标记，加入到培养体系中， ^3H -TdR 即被转化的淋巴细胞摄取而掺入 DNA 分子内。培养终止后，测定淋巴细胞内掺入的 ^3H -TdR 的放射量，就能判断淋巴细胞的转化程度。

(1) 试剂 丝裂原 (PHA、ConA、PWM 或其他丝裂原)； ^3H -TdR (100 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$)；5%三氯乙酸、无水乙醇；玻璃纤维滤膜及负压抽滤装置，闪烁液及 β 计数器。

(2) 操作步骤

①取肝素抗凝静脉血 5~10ml，用淋巴细胞分层液密度梯度离心法分

离外周血单个核细胞 (PBMC), 经无血清的 RPMI1640 洗 3 次, 每次 1000r/min 离心 10min。

②计数, 并用含 20%NCS 的 RPMI1640 完全培养液调整细胞浓度至 $1 \times 10^6/\text{ml}$ 。

③于 96 孔细胞培养板中各孔加入 20%NCS 的 RPMI1640 完全培养液 20 μl , 丝裂原或 NaCl 对照液 20 μl , 每种丝裂原各 4 孔。然后各孔加入上述细胞悬液 100 μl , 加盖, 置 37℃, 5%CO₂ 温箱中培养 3d。

④每孔加入 20 μl ³H-TdR (相当于 1 μCi , 特异性比活性为 5Ci/mmol), 继续培养 4h, 用细胞收集器将细胞吸附在玻璃纤维滤膜纸片上, 用生理盐水充分洗涤, 洗去游离的³H-TdR。

⑤滴加 5%三氯乙酸 1~2ml 固定细胞, 滴加无水乙醇脱水、脱色。

⑥将滤纸片烘干后, 用镊子按其顺序分别放入盛有 4ml 闪烁液的塑料试管内。

⑦ β 计数器自动测定样品 1min, 将 4 份测定值中读数过高或过低者除去, 取其平均值。

(3) 结果计算 计算试验组 (加丝裂原) 及对照组 (加 NaCl) cpm 平均值; 刺激指数为丝裂原刺激管 cpm 平均值/NaCl 对照管 cpm 平均值。

7 抗肝特异性脂蛋白抗体测定

(1) 试剂

①LSP 抗原。将兔肝除去包膜, 剪成小块, 用自来水、生理盐水洗去血液, 直到肝组织颜色发白。称重, 加等量 0.25mol/L 蔗糖 (EDTA-Tris 缓冲液 1000ml, 含蔗糖 85.6g) 溶液, 于高速组织捣碎机中匀浆 5min, 3000r/min 离心 30min, 除去沉淀。上清液加硫酸铵使达 50%饱和度, 4℃静置 1h 后, 3000r/min 离心 20min, 弃上清液。沉淀溶于 EDTA-Tris 缓冲液, 过 SephadexG-100 凝胶柱, 用同一缓冲液洗脱, 收集第一蛋白峰。加硫酸铵使达 50%饱和度, 4℃静置 1h 后, 3000r/min 离心 20min, 收集沉淀溶于 EDTA-Tris 缓冲液中, 再过 Sepharose 6B 柱, 同一缓冲液洗脱, 收集第一蛋白峰, 即为 LSP。

②酶结合物。HRP 标记的羊抗人 IgG。

(2) 操作步骤 在聚苯乙烯板孔中加入 0.15ml LSP 溶液 (25ug/ml), 37℃ 静置 1h 后, 4℃ 过夜, 洗 3 次, 每次 3min (下同); 每孔加 1:50 稀释的待测血清 0.1ml, 静置 37℃ 1h, 洗 3 次, 加最适工作浓度的抗人 IgG 酶结合物 0.1ml, 37℃ 1h, 洗 3 次; 加底物溶液, 37℃ 20min 显色后, 用 2mol/L H₂SO₄ 终止反应; 在酶标仪测 492nm 波长测吸光度。每板均设阳性、阴性对照。

(3) 结果观察 P/N 值大于或等于 1.1 为阳性。 P/N 值算法如下:

$$P/N = P / (X_n + 2S)$$

式中, P 为待测血清吸光度值; X_n 为 50 ~ 100 例正常对照血清的吸光度均值。

二、实验性免疫性肝纤维化

(一) 实验性免疫性肝纤维化模型的建立

1 人血清白蛋白诱导

Wistar 大鼠, 雌性, 体重 120 ~ 150g。将人血清白蛋白用生理盐水稀释, 与等量的不完全弗氏佐剂乳化, 每只大鼠皮下多点注射, 每次注射 0.5ml, (内含白蛋白 4mg), 共 4 次。前后两次间隔 14d, 第 3, 4 次间隔 10d。末次免疫后 10d 取血测抗体, 取抗体阳性大鼠做实验, 尾静脉攻击注射白蛋白, 每周 2 次。

(1) 小剂量组 尾静脉攻击注射白蛋白, 每周 2 次。第 1 周 2.5mg/只, 以后每次攻击增加 0.5mg, 直至 4.5mg/只。维持此量, 至少 2 个月。

(2) 大剂量组 攻击注射白蛋白第 1、第 3 次为 8mg/次, 其余均 4mg/次, 共 9 次。

(3) 大剂量 + 前列腺素 E₁ 免疫和攻击注射量同大剂量组, 在攻击注

射前 1d 开始皮下注射 PGE_1 , $200\mu\text{g}/\text{次}$, 每日 2 次, 直至实验结束。

(4) 结果 肝纤维化形成率: 攻击后 60d 纤维化达到最大程度, 按小剂量组的攻击剂量死亡率为 5%, 大剂量组的死亡率为 56.4%, 说明大剂量组致死率高, 但给予前列腺素 E_1 ; 有明显保护大鼠免于休克致死的作用, 大剂量+前列腺素 E_1 组的死亡率为 5%。

(5) 病理学观察 光镜观察在攻击注射早期 (15d), 肝组织结构大致正常。其后则见网状纤维及胶原纤维于汇管区增生, 且向外延伸。同时, 于中央静脉周围增生, 并沿肝窦散在分布, 互相联结, 纤维结缔组织包绕小叶, 以后假小叶形成, 呈典型肝硬化。汇管区及中央静脉周围有淋巴细胞、单核细胞及嗜酸性细胞浸润, 呈炎症反应。沿界板及其肝细胞核浓染溶解及小双核细胞, 表明肝细胞轻度损伤及增生, 大剂量组死于过敏性休克者可见灶性坏死。电镜观察早期可见贮脂细胞增生活跃, 后期见肌成纤维细胞形成, 分布于汇管区。其周围有大量胶原沉积, 沉积的胶原形成较宽松的分隔, 其中有功能静止的纤维细胞。

(6) 免疫荧光染色 肝窦、血管壁、结缔组织中以及肾小球荧光染色阳性, 提示肝肾组织免疫复合物沉着。

攻击注射后纤维化分级与肝脏胶原含量显著相关。

总之, 研究结果表明, 用人血清白蛋白免疫攻击可使大鼠形成典型的肝纤维化及肝硬化模型。四氯化碳中毒肝纤维化模型的纤维组织有自然再吸收的趋势。而本模型再吸收较四氯化碳为慢, 持续时间为长。另有实验表明将四氯化碳中毒和白蛋白免疫攻击同时给予同一组动物, 其纤维化程度并不比单独白蛋白攻击强, 反而弱些。本模型肝细胞损伤较轻, 无桥状坏死, 系免疫损伤模型, 有利于从免疫角度探讨发病机理和评价药物。本模型的形成过程中, 白蛋白攻击剂量影响模型形成的时间及死亡率。小剂量组用较小剂量攻击, 经 16 周受试动物约 80% 可形成程度不等的纤维化乃至肝硬化, 死亡率为 20% ~ 30%; 用 4 ~ 8mg 剂量相间攻击时, 30d 可形成肝硬化, 缩短了实验周期, 但动物死亡率高达 56%。于攻击前即给予前列腺素 E_1 皮下注射, 结果死亡率下降到 5%。 PGE_1 的

应用提高了受试动物的存活，但并未减少纤维化发生的频度和程度。

2. 牛血清白蛋白诱导

Wistar 大鼠，雌性，体重 130g 左右。

(1) 模型复制 以 9mg/ml 牛血清白蛋白 (BSA) 弗氏不完全佐剂混悬液每次每只 0.5ml，小剂量多部位皮下注射以致敏动物共 5 次，第 1、第 2 次间隔 2 周，其余间隔 1 周。末次致敏注射后 1 周，于球后静脉丛采血测大鼠血清中抗 BSA 抗体。取抗体阳性者尾静脉攻击注射，每周 2 次，由每只每次 2mg/0.4ml 递增至 3mg/0.4ml，第 12 次 3.4mg/0.4ml，以后每次增 0.2mg 至 4g/0.4ml，共 15 次。当攻击注射时，造模大鼠部分发生不同程度的过敏性休克反应，如呼吸急促、俯伏不起、侧倒等，经 30min 左右恢复，有的死亡，死亡率 31.6%。造模大鼠大多数肝脏表面呈不同程度淡黄色，少光泽，部分有灰白色细小颗粒，质稍韧，剪碎时有砂粒感。

(2) 大鼠血清抗 BSA 检测 模型大鼠各抗原浓度均出现沉淀线。

(3) 病理组织学观察 光镜下造模大鼠肝组织均可见界板区肝细胞变性坏死，炎性细胞浸润，肝小叶结构紊乱，汇管区及小叶间纤维组织增生，形成假小叶。电镜下模型大鼠多数肝细胞结构模糊，核固缩、线粒体肿胀或髓样变、嵴模糊不清，粗面内质网脱颗粒，贮脂细胞或成纤维细胞增生，肝细胞面之间有大量胶原纤维增生。

3. 猪血清腹腔注射诱导

Wistar 大鼠，雌性，体重约 100g，饲以普通饲料和清水，腹腔注射猪血清每次 0.5ml/只，每周两次，10 周后停止注射。结果猪血清注射 8 周后均形成肝纤维化，实验期间无 1 例死亡。肉眼检查第 3 周末肝脏表面与正常相似，质地柔软，第 8 周末肝表面出现弥散均匀的细小颗粒，外观质地较硬，直到停止注射后 5 周、10 周的肝脏大体观仍同第 8 周，质地较前更硬。肝纤维化过程中除肝星状细胞 (HSC，原称 Ito 细胞) 增多外，尚发现原始间叶细胞 (PMC) 增多、活化，实验早期汇管区及间隔内 Eos 和肥大细胞增多，IgG 和 C₃ 阳性，停止注射后逐渐减弱。本模型虽然

在3周有个体差异，但在连续注射8周后全部发展为纤维化，无1例死亡，且整个病变过程中肝细胞受损伤轻、肝脏组织形态清晰，有利于各种原位研究，不似CCl₄模型中因肝细胞大量脂肪变及坏死导致肝组织结构严重扭曲变形，因而本模型具有制作简单、经济、成功率高和病变单纯等优点，作为一种无明显肝细胞损伤性纤维模型比较理想。

(1) 实验指标观察

1 病理学观察

(二) HE 染色 HE 染色的方法同免疫性肝炎部分。肝纤维化的程度可参考以下分级标准。0级：肝组织正常，无胶原纤维增生。I级：胶原纤维从汇管区或中央静脉周围轻度向外延伸。II级：胶原纤维延伸明显，但尚未互相连结包绕整个肝小叶。III级：胶原纤维延伸明显，互相连结，包绕整个肝小叶。IV级：胶原纤维包绕分割肝小叶，以致正常肝小叶结构破坏，假小叶形成，但以大方形假小叶为主。V级：肝小叶结构完全破坏，假小叶形成；大方形假小叶与小圆形假小叶各占50%。VI级：肝内满布小圆形假小叶，假小叶内有粗大增生的胶原纤维。或者参考以下标准。-：汇管区无明显纤维组织增生。+：汇管区有较多纤维组织增生，局限性。++：汇管区有大量纤维组织增生，呈窄带状，并向肝小叶周围伸展。+++：汇管区有大量纤维组织增生，呈宽带状，并伸展包绕肝小叶，且可见中央静脉偏位。

(2) VG 染色

①试剂配制

a. Weigert 铁苏木素液

A液：苏木素	1g	B液：0%三氯化铁	4ml
无水乙醇	100ml	蒸馏水	100ml
		纯盐酸	1ml

A液、B液需分瓶盛放，临用前A液B液等量混合，配好后染液为紫黑色。

b. Van Gieson 染液

A 液：1% 酸性品红水溶液 B 液：苦味酸饱和水溶液（约 1.22%）
临用前取 A 液 1 份 B 液 9 份混合后使用。

②操作方法。切片脱蜡至蒸馏水，用 Weigert 铁苏木素液染 20min，流水稍冲洗，1% 盐酸乙醇迅速分化，流水冲洗后蒸馏水冲洗，用 Van Gieson 液染 5min，去染液，直接用 95% 乙醇分化和脱水，无水乙醇脱水，二甲苯透明，中性树胶封固。根据汇管区血管周围绿染区厚度判断如下。
-：< 5 μ m。 +：5 ~ 10 μ m。 ++：10 ~ 15 μ m。 +++：> 15 μ m。

2 谷草转氨酶测定

血清中谷草转氨酶在一定的反应条件下，作用于门冬氨酸及 α -酮戊二酸生成一定量的草酰乙酸。草酰乙酸在反应过程中又自行脱羧成为丙酮酸。在酶反应到达规定时间内，加入 2, 4-二硝基苯肼，终止了酶反应。2, 4-二硝基苯肼能与反应产生的丙酮酸及剩余基质中的 α -酮戊二酸生成相应的 2, 4-二硝基苯腙，在碱性的条件下呈棕色。以相同物质的量浓度计算，丙酮酸所形成的苯腙在 505nm 波长下的 OD 值为 α -酮戊二酸的 3 倍，根据此特点可计算出谷草转氨酶作用下所生成的丙酮酸的量，从而推算出酶的活力。

(1) 试剂

基质液；

氢氧化钠溶液（4mol/L），使用前用蒸馏水稀释 10 倍成 0.4mol/L 氢氧化钠溶液；

二硝基苯肼溶液（1mmol/L）；

丙酮酸标准液（2mmol/L）。

(2) 实验标本 实验药物作用于动物模型后的血清，保持新鲜或低温贮藏。

(3) 标准曲线绘制

①按表 3-6-7 各管中加入相应试剂。