

不同性别小鼠化学性肝损伤后的肝再生能力比较*☆

刘玉荣, 熊喜峰, 徐丽萍, 冯世军, 孙文翰

Comparison of hepatic regenerative capacity between male and female mice after chemical hepatic injuries

Liu Yu-rong, Xiong Xi-feng, Xu Li-ping, Feng Shi-jun, Sun Wen-han

Department of
Histology and
Embryology,
Guangzhou Medical
College, Guangzhou
510182, Guangdong
Province, China

Liu Yu-rong☆,
Doctor, Lecturer,
Department of
Histology and
Embryology,
Guangzhou Medical
College, Guangzhou
510182, Guangdong
Province, China
578136404@qq.com

Corresponding
author: Liu Yu-rong,
Doctor, Lecturer,
Department of
Histology and
Embryology,
Guangzhou Medical
College, Guangzhou
510182, Guangdong
Province, China
578136404@qq.com

Supported by: the
Doctoral Start-up
Foundation of
Guangzhou Medical
College,
No.0706053*

doi:10.3969/j.issn.
2095-4344.2012.31.
023

Received: 2011-12-07
Accepted: 2012-01-24

广州医学院组胚
教研室, 广东省广
州市 510182

刘玉荣☆, 女,
1976年生, 吉林
省长春市人, 汉
族, 2007年吉林
大学毕业, 博士,
讲师, 主要从事组
织学与胚胎学专
业、肝癌及相关疾
病方面的研究。
578136404@
qq.com

中图分类号:R318
文献标识码:B
文章编号:2095-4344
(2012)31-05804-06

收稿日期: 2011-12-07
修回日期: 2012-01-24
(20111107027/D·C)

文章亮点:

以小鼠为研究对象, 采用四氯化碳皮下注射方法模拟肝脏急性损伤过程, 通过对肝脏损伤程度的病理分析, 肝质量/体质量比, 免疫组织化学方法对肝细胞增殖情况的观察及糖原染色方法观察肝脏功能的变化情况, 评估雌性和雄性小鼠之间是否存在差异。

Abstract

BACKGROUND: Many factors can influence the regeneration ability of liver. However, whether the effect of gender is one of the important factors during the liver repairing is uncertain.

OBJECTIVE: To compare the hepatic regenerative capacity between male and female mice after chemical injuries.

METHODS: Mouse models of acute chemical liver injury were established by carbon tetrachloride subcutaneous injection. 120 mice were divided into two groups: glycogen staining group and 5-bromodeoxyuridine group, 60 mice in each group, half male and half female. The intact liver was removed to be weighed on 1, 3, 5, 7 and 10 days. The mice were weighed before operation.

RESULTS AND CONCLUSION: The liver/body mass ratio in female mice was recovered at 7 days, but the ratio of the male mice was decreased. There was no distinct difference in the liver/body mass ratio between different genders at different time points ($P > 0.05$). The main injured sites of the liver induced by carbon tetrachloride was portal area and board area around the hepatic lobule, the liver cells presented with fatty degeneration, and the spotty necrosis was seen in the liver tissue. The female mice glycogen staining was darker than male group at 1, 5 and 7 days ($P < 0.05$). The liver 5-bromodeoxyuridine labeling index of female mice was higher than that of male mice at 3 days after liver injury ($P < 0.05$). There was no difference at 1, 5 and 7 days ($P > 0.05$). As a result, the recover ability after liver injury of female mice is more obvious than that of male mice, especially at 7 days, so different gender mice has different recover ability after liver injury.

Liu YR, Xiong XF, Xu LP, Feng SJ, Sun WH. Comparison of hepatic regenerative capacity between male and female mice after chemical hepatic injuries. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(31): 5804-5809.
[http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 肝脏再生能力受多重因素的影响, 而性别是否是再生修复过程的一个重要因素尚无定论。

目的: 比较不同性别小鼠化学性肝损伤后肝脏再生能力是否有差异。

方法: 采用四氯化碳小鼠皮下注射方法建立急性化学性肝损伤模型。120只昆明小鼠随机均分为糖原染色组和5-溴脱氧尿嘧啶核苷组, 各组再按照性别均分为雌雄两组, 于造模后第1, 3, 5, 7, 10天完整取下小鼠肝脏并称质量, 取材前称量小鼠体质量。

结果与结论: 造模后第7天雌性鼠恢复原肝质量/体质量比, 而雄性鼠则表现为下降趋势, 不同性别小鼠肝质量/体质量比在各时间点差异无显著性意义($P > 0.05$); 四氯化碳诱导的急性肝损伤主要部位为肝小叶周围的门管区及界板区, 损伤部位肝细胞出现脂肪变, 少数肝组织出现点状坏死; 损伤后1, 5, 7 d雌性小鼠糖原染色明显强于雄性组($P < 0.05$); 肝损伤后3 d雌性鼠肝脏5-溴脱氧尿嘧啶核苷标记指数高于雄性小鼠($P < 0.05$), 而第1, 5, 7, 10天则未见明显差异($P > 0.05$)。说明肝损伤后雌性鼠的再生修复比雄性鼠强, 于第7天完成修复。不同性别的昆明小鼠对四氯化碳诱导的急性肝损伤后恢复期中肝脏再生能力具有差异性。

关键词: 性别差异; 四氯化碳; 肝损伤; 肝再生; 糖原染色检测; 小鼠

刘玉荣, 熊喜峰, 徐丽萍, 冯世军, 孙文翰. 不同性别小鼠化学性肝损伤后的肝再生能力比较[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(31): 5804-5809.
[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

化学性肝损伤是由酒精、环境中的化学毒物及某些药物引起肝脏不同程度的损害,包括肝细胞的变性和坏死,是引发多种肝脏疾病的重要始动环节。长期反复的肝损伤则会引起肝纤维化、肝硬化乃至肝癌^[1]。国内外流行病学调查及临床资料统计结果显示男性肝硬化、肝癌发病率高于女性,比例为5~11:1^[2-3]。

肝脏有很强的再生修复能力,在各种病理条件下及肝脏术后恢复过程中均有肝的再生过程,但不同条件下肝再生的最终结局却相去甚远,尤其是不同性别之间^[4]。是什么原因导致肝脏在损伤和修复过程中的这种性别差异目前尚未明了。四氯化碳肝损伤动物模型是经典的化学性肝损伤模型,其条件要求低,技术易于掌握,可靠性强,重复性好,是其他任何肝损伤模型无法比拟的,故本实验采用四氯化碳皮下注射方法制备肝损伤动物模型,比较不同性别小鼠在四氯化碳诱导的肝损伤后肝细胞再生能力是否存在差别。

1 材料和方法

设计: 动物建模观察。

时间及地点: 于2010-01/2011-07在广州医学院组胚教研室完成。

材料: 健康成年昆明小鼠120只,2月龄,雌雄各半,体质量20~30 g, SPF级,由南方医科大学实验动物中心提供,实验动物许可证号: SCXK(粤): 2006-0015。将小鼠按性别配比随机均分为2组: 糖原染色(periodic acid schiff, PAS)组和5-溴脱氧尿嘧啶核苷(bromodeoxyuridine, BrdU)组,每组再均分雌性组和雄性组。实验过程中对动物的处置符合相关动物伦理学要求^[5-6]。

主要试剂与仪器:

试剂及仪器	来源
四氯化碳(CCl ₄), 粟米油	市售
兔抗 BrdU 多克隆抗体、鼠两步法检测试剂盒及 DAB 显色试剂盒	北京中杉金桥
PAS 试剂盒	珠海贝索生物技术有限公司
DK-8AX 型电热恒温水槽、DHG-9075A 型电热恒温鼓风干燥箱, DK-8AX 型电热恒温水槽	上海一恒科学仪器有限公司
BMJ-1 生物组织包埋机, QPJ-1B 生物病理切片机	天津天利航空机电有限公司
光学显微镜	OLMPUS

方法:

动物模型制备: 两组小鼠称质量、按性别随机分组后,按Hitoshi等^[7-10]的经典方法于皮下注射体积分数50%四氯化碳-粟米油溶液(四氯化碳与粟米油1:1混合), 6 mL/kg, 每3 d 1次,共注射2次。造模后PAS组和BrdU组各设5个时间点($n=6$), 1, 3, 5, 7, 10 d进行观察。PAS组在各个时间点取材后进行肝组织PAS染色分析; BrdU组小鼠分别于每个时间点前2 h腹腔下注射BrdU(50 mg/kg), 2 h后终止实验。称小鼠体质量,完整取下肝组织,称肝质量,计算小鼠肝质量/体质量的比;小鼠肝组织置体积分数10%中性甲醛固定,制做小鼠肝石蜡切片,切片行常规苏木精-伊红染色。

免疫组织化学方法: 小鼠肝组织切片依次经过60 °C烤箱熔蜡、二甲苯脱蜡、乙醇梯度水化、体积分数3%过氧化氢溶液封闭,枸橼酸缓冲液修复抗原、正常山羊血清封闭等步骤后,加一抗(抗BrdU多克隆抗体)4 °C冰箱过夜,室温孵育、PBS冲洗、加二抗(羊抗兔)再PBS冲洗、DAB显色,苏木精复染、脱水,透明,中性树胶固定封固。每张切片随机选取5个高倍视野,计数BrdU阳性标记的肝实质细胞和非实质细胞数。

PAS染色: 见表1。

表1 PAS 染色结果判定标准
Table 1 Resulting decision of PAS staining

Percentage of positive cells		Coloring points	
Percentage	Score	Strength	Score
0	0	No (Without coloring)	0
< 25	1	Weak (Light rose)	1
26-50	2	Moderate (Rose red)	2
51-75	3	Strong (Deep rose red)	3
> 75	4		

To sum the two points, if the results were 0, the cells were negative; 1-3 scores were weakly positive, 4-5 scores were moderately positive, 6-7 scores were strongly positive

按PAS糖原染色试剂盒说明书进行。肝组织切片脱蜡至水,高碘酸溶液,25 °C时pH值为1.7±0.5,氧化10 min,高碘酸是一种氧化剂,他能破坏多糖类结构的碳键,组织切片首先用高碘酸溶液氧化,使存在组织内多糖分子的乙二醇基或氨基的碳键打开,生成醛类化合物。其后,暴露出来的游离醛基与无色品红液作用,生成新的红至紫红色复合物而得到定位^[2]。然后充分蒸馏水洗,吸水纸吸干切片;雪夫试剂染色10~15 min;流动自来水洗10 min;Mayer苏木精染核1.0~2.0 min;体积分数95%乙醇、无水乙醇脱水、TO(二甲苯)透明,

最后中性树胶封固。染色结果糖原呈现红色, 细胞核呈现蓝色。评分标准: 染色结果采用综合记分法作半定量分析, 阳性细胞百分数为各时间点所有标本的阳性细胞平均数, 每例5个视野, 阳性强度以着色程度进行记分, 见表1, 计算各例分值求得平均数。根据正常对照雄性小鼠及雌性小鼠糖原染色分值计算各组小鼠糖原染色相对分值。

PAS 相对分值=实验组雄性(或雌性)小鼠 PAS 分值/正常对照雄性(或雌性)小鼠 PAS 分值

评估标准:

第1种为糖原染色的深浅程度, 分为4个级别:

- 0级: 细胞无染色
- 1级: 细胞糖原被染色, 并染成浅粉色
- 2级: 细胞糖原被染色, 并染成粉红色
- 3级: 细胞糖原被染色, 并染成紫红色

第2种为糖原染色分布程度, 分为4个级别:

- 1级: 糖原染色占细胞内液 0~25%
- 2级: 糖原染色占细胞内液 25%~50%
- 3级: 糖原染色占细胞内液 50%~75%
- 4级: 糖原染色占细胞内液 75%~100%

采用2套评分标准相加得出最终分数的方法。

主要观察指标: 通过观察各组小鼠实验前后肝质量/体质量比、造模后肝组织病理改变、BrdU阳性指数及PAS染色结果, 比较不同性别小鼠肝损伤后其再生能力是否存在差异。

统计学分析: 用ISD软件对数据进行统计学处理, 组间均数比较采用 t 检验, $P < 0.05$ 表示差异有显著性意义。

2 结果

2.1 纳入动物数量分析 造模成功率100%, 纳入动物数量120只, 全部进入结果分析, 无脱失。

2.2 不同性别小鼠肝质量与体质量比 见表2。

表2 不同性别小鼠肝质量/体质量比
Table 2 Liver/body bass ratio of different gender mice
($n=5$, %)

Time after modeling (d)	Female	Male	P	t
1 d	5.04	6.77	0.168 9	1.805
3 d	4.54	5.55	0.012 0	5.468
5 d	5.05	5.38	0.110 6	2.244
7 d	5.95	4.17	0.068 2	2.793
10 d	5.25	4.48	0.365 8	1.063

t -test at different time points of different gender mice

在动物模型的制作过程中, 化学性损伤后1, 3, 5, 7, 10 d不同性别小鼠肝质量/体质量比统计学分析结果显示, 差异无显著性意义。

2.3 肝组织结构病理学变化 见图1。

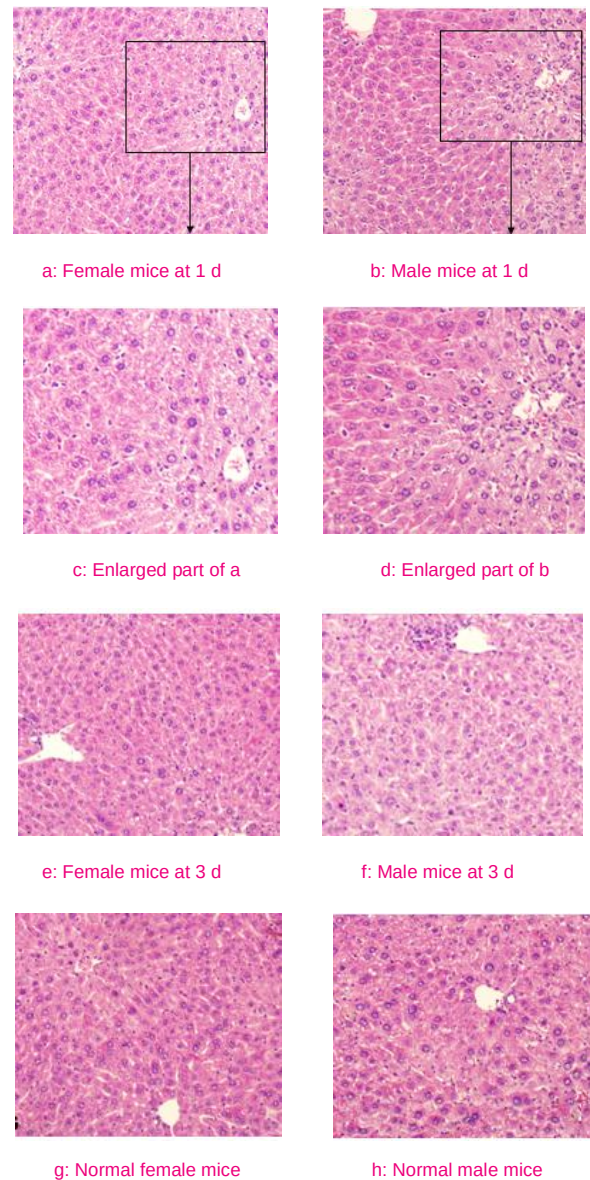


Figure 1 Pathological changes of liver tissue in different gender mice (Hematoxylin-eosin staining, $\times 20$)
图1 不同性别小鼠肝组织病理变化(苏木精-伊红染色, $\times 20$)

雌性及雄性小鼠肝四氯化碳急性损伤后1 d均可见肝小叶汇管区及中央静脉周围均可见炎细胞浸润, 肝细胞出现空泡(脂滴)即脂肪变性, 个别可见点状坏死, 见图1a~d, 肝损伤后第3天汇管区周围肝细胞内依然可见空泡(脂滴), 肝小叶结构尚完整, 汇管区血管旁炎性细胞聚集明显, 雄性鼠肝组织结构较松散, 炎性浸润雌性小鼠更为明显, 细胞内可见较多空泡(脂粒)。不同性别小鼠肝内均可见较多的双核细胞, 见图1e, f, 肝损伤

后第5-7天肝细胞空泡(脂滴)逐渐减少, 第10天肝小叶结构趋于正常, 见图1 g, h。

2.4 各组小鼠肝组织BrdU阳性标记 见图2。

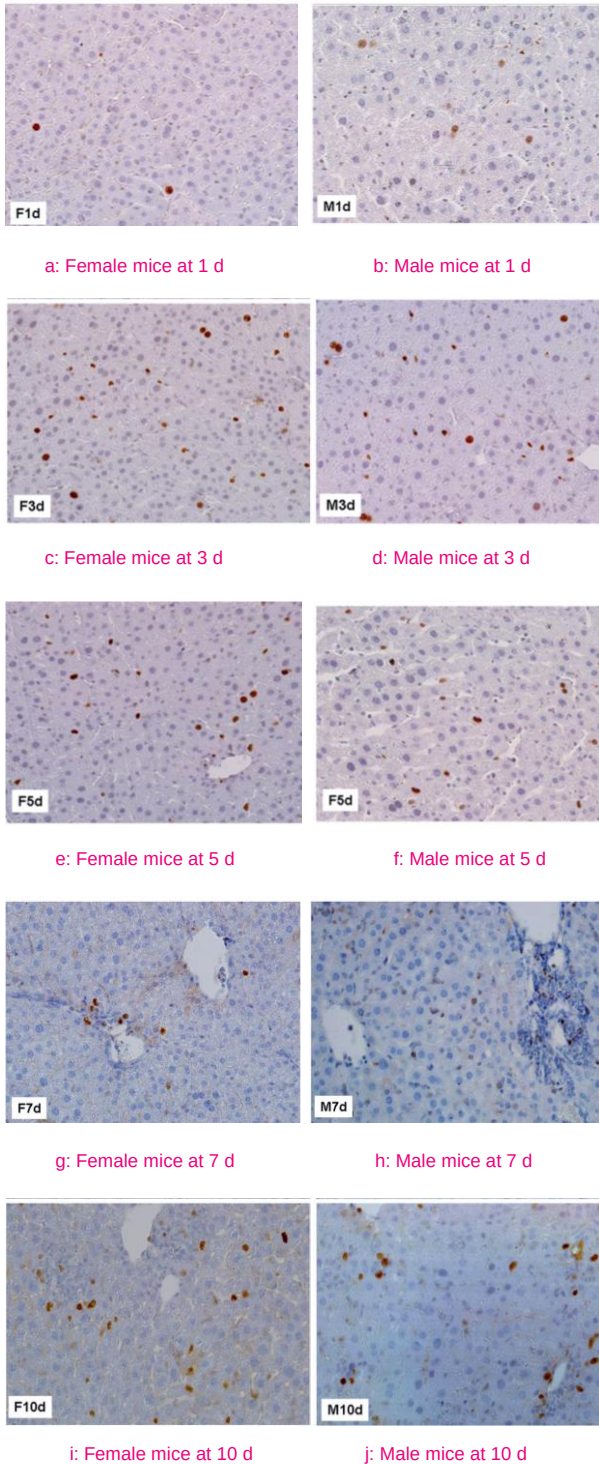


Figure 2 BrdU-positive parenchymal hepatic cells of different gender mice

图2 不同性别小鼠肝实质细胞 BrdU 阳性标记细胞

免疫组化显示各组肝组织均有BrdU阳性实质细胞和非实质细胞, 定位于细胞核。雄性 & 雌性小鼠肝细胞

的BrdU标记指数在化学损伤后第3天差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 而第1, 5, 7, 10天BrdU阳性数差异无显著性意义 ($P > 0.05$), 见表3, 4。

表3 不同性别小鼠肝实质细胞 BrdU 阳性标记标记指数
Table 3 Brdu labeling index of parenchymal hepatic cells of different gender mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Time after modeling (d)	Female	Male	t	P
1	1.32±0.540 4	1.10±0.461 3	0.351	0.748 7
3	1.72±0.363 3 ^a	1.05±0.443 5	6.789	0.006 5
5	1.72±0.641 9	1.12±0.178 9	2.176	0.095 1
7	0.68±0.228 0	0.90±0.115 5	1.414	0.252 2
10	1.04±0.296 6	0.76±0.1673	1.606	0.183 6

t-test of different gender mice at different time points, ^a $P < 0.01$

表4 不同性别小鼠的肝组织中非实质细胞 BrdU 阳性标记指数
Table 4 Brdu labeling index of nonparenchymal hepatic cells of different gender mice ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Time after modeling (d)	Female	Male	t	P
1	2.24±0.40	1.90±0.73	0.659	0.557 2
3	2.00±0.24 ^a	0.90±0.38	4.373	0.022 1
5	2.04±0.66	1.56±0.26	2.228	0.089 8
7	0.96±0.26	1.20±0.16	1.225	0.380 1
10	1.24±0.44	0.96±0.08	1.300	0.263 5

t-test of different gender mice at different time points, ^a $P < 0.05$

2.5 PAS染色结果 不同时间点小鼠糖原染色均有反应, 其中雌性组染色强度明显高于雄性组, 见图3, 分值见表5。统计学分析显示损伤后1, 5, 7 d雌性小鼠分值高于雄性小鼠, 差异有显著性意义 ($P < 0.05$), 3 d与10 d比较, 差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

表5 不同性别小鼠肝损伤后 PAS 染色比较
Table 5 Comparison of PAS staining results among different gender mice after liver injury ($\bar{x} \pm s, n=5$)

Time after modeling (d)	Female	Male	t	P
1	5.00±1.61 ^a	2.45±0.91	3.400	0.042 5
3	5.40±0.48	5.26±3.39	0.107	0.918 7
5	8.93±1.28 ^a	1.60±1.67	8.057	0.000 5
7	5.73±2.44 ^a	1.46±1.06	4.544	0.006 1
10	4.53±2.00	5.06±2.12	0.500	0.638 3

t-test of different gender mice at different time points, ^a $P < 0.05$

3 讨论

肝脏有很强的再生能力, 其再生是指各种原因所致的肝损伤后肝细胞的重新修复。正常状态下肝为相对静止的器官, 但在肝叶切除、病毒感染或其他原因所致的损伤后, 所有残余的肝实质细胞(成熟的肝细胞)及非实

质细胞(包括胆管上皮细胞, 窦状隙上皮细胞, 枯否细胞及Ito细胞)将先后进入增殖状态, 从而达到肝脏再生的目的^[11-13]。

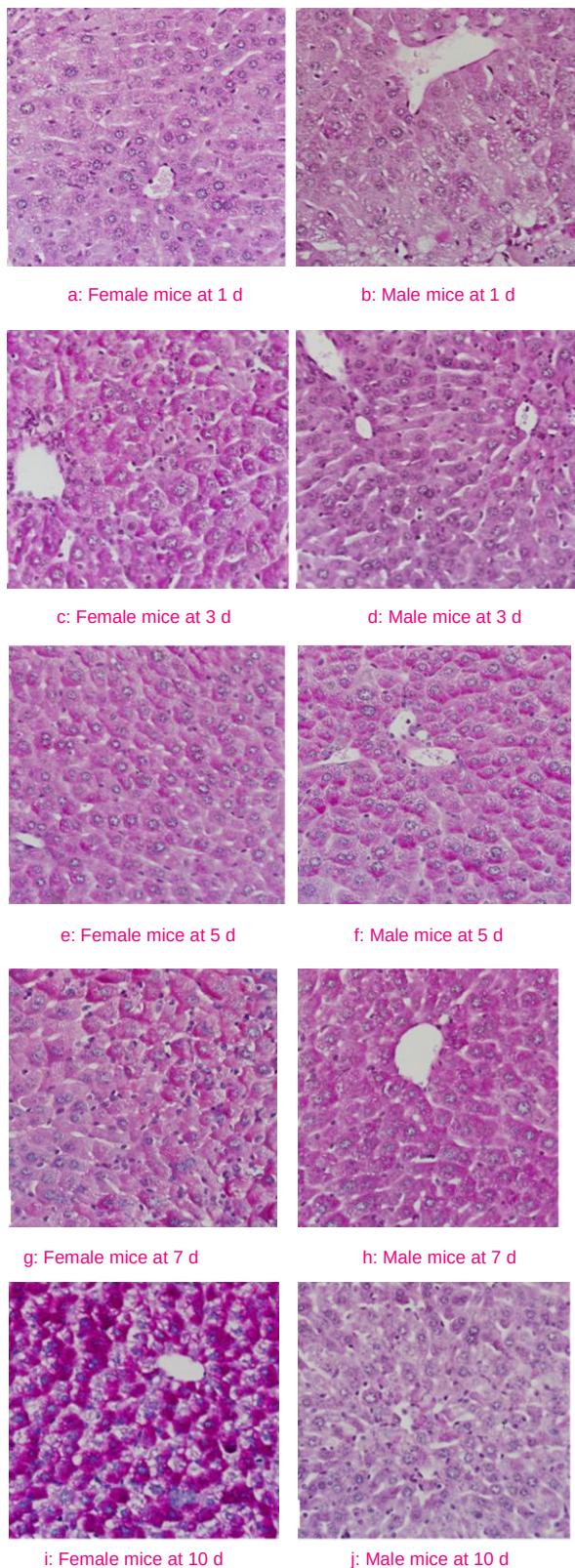


Figure 3 Comparison of PAS staining results between different gender mice after liver injury
图3 不同性别小鼠肝损伤后 PAS 染色比较

目前对肝再生的分子机制、形态学变化等方面已有较深入的研究和大量的文献积累。研究表明再生的启动是肝脏对各种病理生理条件下其有效细胞数量减少的直接反应, 通过肝实质细胞与非实质细胞间的相互作用, 以肝细胞生长因子、肿瘤坏死因子、转化生长因 α 、转化生长因 β 、表皮生长因子、白细胞介素1, 22等细胞因子为桥梁, 通过调控基因的表达及细胞的生理、生化及代谢过程而实现^[14-17]。尽管在各种病理生理条件下及肝脏术后恢复过程中均有肝的再生, 但肝再生的结局相差较远, 会有肝脏再生修复、肝纤维化或硬化、癌变等截然不同的转归, 这与各种致病因素所诱发的再生机制不同有关, 但也不能排除不同性别之间肝脏再生修复可能存在的差别, 因此值得深入探讨。

四氯化碳是医学基础研究中制作动物急性肝损伤及肝硬化最常用的化学物质^[18-19]。四氯化碳经肝细胞色素P450激活生成 CCl_3 , 引起脂质过氧化, 破坏线粒体、内质网等膜性结构, 抑制三羧酸循环及脂肪酸氧化而导致肝细胞广泛受损^[20-21]。因此本实验组织病理学检测可见不同性别小鼠肝组织出现明显的脂肪变性。BrdU即DNA前体胸腺嘧啶核苷的类似物, 能选择性的掺入到处于细胞周期S期(既DNA合成期)细胞的单链DNA核苷酸序列中, 故常用来做为反映细胞增殖状态的指标^[22]。本结果显示同样强度的化学性损伤刺激后, 不同性别的小鼠均出现肝的再生修复反应, 表现为BrdU阳性标记细胞数增加及肝组织结构的逐渐正常。统计结果表明损伤后第3天雌性小鼠处于S期的肝实质细胞及非实质细胞数均高于雄性小鼠, 其余时间点则未见明显差别, 提示在肝化学性损伤后的修复过程中, 不同性别小鼠肝的再生修复在个别时间点可有差别。从肝质量/体质量比结果看不同性别小鼠肝的再生修复有不同, 正常小鼠肝质量/体质量比为5.0%~5.5%^[23], 本实验发现四氯化碳诱导肝化学性损伤后雌性鼠表现为质量/体质量比先降低而后逐渐回升至正常水平, 雄性鼠则呈逐步下降趋势, 提示雌性鼠的修复比雄性鼠早, 根据不同性别小鼠肝组织结构病理改变的差别及肝质量/体质量比等指标, 可以认为四氯化碳对雄性鼠的肝损伤作用比雌性鼠要强, 因此在整个肝修复过程中表现为雌性鼠较早修复其正常结构, 然而也不能排除不同性别小鼠肝再生机制的差别, 如雌激素、雄激素的作用导致的细胞内不同信号分子的激活。

化学性肝损伤后不同性别小鼠肝脏的自我修复能力有明显的差别, 雌性鼠比雄性更为耐受四氯化碳损伤, 早于雄性鼠完成肝脏的修复。

致谢: 感谢组胚教研室马宁芳教授对本实验的指导。

4 参考文献

- [1] Montalto G, Cervello M, Giannitrapani L, et al. Epidemiology, risk factors, and natural history of hepatocellular carcinoma. *Ann N Y Acad Sci.* 2002;963:13-20.
- [2] Johnson PJ, Krasner N, Portmann B, et al. Hepatocellular carcinoma in Great Britain: influence of age, sex, HbsAg status and aetiology of underlying cirrhosis. *Gut* 1978;19(11):1022-1026.
- [3] Wu MC, Chen H, Shen F. *Zhonghua Waike Zazhi.* 2001;39(1):25-28.
吴孟超, 陈汉, 沈锋. 原发性肝癌的外科治疗—附5524例报告[J]. *中华外科杂志* 2001, 39(1):25-28.
- [4] Shimizu I, Kohno N, Tamaki K, et al. Female hepatology: favorable role of estrogen in chronic liver disease with hepatitis B virus infection. *World J Gastroenterol.* 2007;13(32):4295-4305.
- [5] Yang GB. *Zhongguo Yixue Lunlun.* 2010;23(3):10-13.
杨国斌. 生物医学研究中实验动物伦理学问题的思考[J]. *中国医学伦理学*, 2010, 23(3):10-13.
- [6] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance suggestion of caring laboratory animals. 2006-09-30.
中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [7] Ikeda H, Watanabe N, Ishii I, et al. Sphingosine 1-phosphate regulates regeneration and fibrosis after liver injury via sphingosine 1-phosphate receptor 2. *J Lipid Res.* 2009;50(3):556-564.
- [8] Zhu RZ, Xiang D, Xie C, et al. Protective effect of recombinant human IL-1Ra on CCl₄-induced acute liver injury in mice. *World J Gastroenterol.* 2010;16(22):2771-2779.
- [9] Ren X, Zhang Y, Snyder J, et al. Forkhead box M1 transcription factor is required for macrophage recruitment during liver repair. *Mol Cell Biol.* 2010;30(22):5381-5393.
- [10] Horiguchi N, Lafdil F, Miller AM, et al. Dissociation between liver inflammation and hepatocellular damage induced by carbon tetrachloride in myeloid cell-specific signal transducer and activator of transcription 3 gene knockout mice. *Hepatology.* 2010;51(5):1724-1734.
- [11] Xie C, Gao J, Zhu RZ, et al. Protein-protein interaction map is a key gateway into liver regeneration. *World J Gastroenterol.* 2010;16(28):3491-3498.
- [12] Vassiliou I, Lolis E, Nastos C, et al. The combined effect of erythropoietin and granulocyte macrophage colony stimulating factor on liver regeneration after major hepatectomy in rats. *World J Surg Oncol.* 2010 Jul 7;8:57.
- [13] Michalopoulos GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol.* 2010;176(1):2-13.
- [14] Michalopoulos GK. Liver regeneration: alternative epithelial pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2011;43(2):173-179.
- [15] Natarajan A, Wagner B, Sibilia M. The EGF receptor is required for efficient liver regeneration. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2007;104(43):17081-17086.
- [16] Zhang HY, Radulescu A, Chen CL, et al. Mice overexpressing the gene for heparin-binding epidermal growth factor-like growth factor (HB-EGF) have increased resistance to hemorrhagic shock and resuscitation. *Surgery.* 2011;149(2):276-283.
- [17] Ren X, Hu B, Colletti LM. IL-22 is involved in liver regeneration after hepatectomy. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;298(1):G74-80.
- [18] Park O, Jeong WI, Wang L, et al. Diverse roles of invariant natural killer T cells in liver injury and fibrosis induced by carbon tetrachloride. *Hepatology.* 2009;49(5):1683-1694.
- [19] Fujii T, Fuchs BC, Yamada S, et al. Mouse model of carbon tetrachloride induced liver fibrosis: Histopathological changes and expression of CD133 and epidermal growth factor. *BMC Gastroenterol.* 2010 Jul 9;10:79.
- [20] Xie XM, Liu ZW, Lin SB, et al. *Jiepouxue Yanjiu.* 2007;29(6):417-419.
谢湘媚, 刘志伟, 林少宾, 等. 四氯化碳致小鼠急性肝损伤的性别差异与雄激素受体表达的关系[J]. *解剖学研究*, 2007, 29(6):417-419.
- [21] Zhou ZX, Wang J. *Shanghai Shiyan Kexue.* 2002;22(4):245-248.
周忠信, 王捷. 肝硬化动物模型研究进展[J]. *上海实验科学*, 2002, 22(4):245-248.
- [22] Levkoff LH, Marshall GP 2nd, Ross HH, et al. Bromodeoxyuridine inhibits cancer cell proliferation in vitro and in vivo. *Neoplasia.* 2008;10(8):804-816.
- [23] Vanheule E, Geerts AM, Van Huisse J, et al. An intravital microscopic study of the hepatic microcirculation in cirrhotic mice models: relationship between fibrosis and angiogenesis. *Int J Exp Pathol.* 2008;89(6):419-432.
- [24] Simpson RU, Hershey SH, Nibbelink KA. Characterization of heart size and blood pressure in the vitamin D receptor knockout mouse. *J Steroid Biochem Mol Biol.* 2007;103(3-5):521-524.

来自本文课题的更多信息——

基金声明: 广州医学医学院博士启动基金课题项目 (0706053)。

作者贡献: 设计、评估、成文、审校由第一作者完成, 资料收集、实验实施由全部作者完成, 第一作者对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其它经济组织、科研团体直接或间接的经济及利益冲突。

伦理要求: 实验为基础性研究, 对动物的处置符合中华人民共和国科学技术部 2006 年颁发的《关于善待实验动物的指导性意见》。

本文摘要及创新性: 国内外流行病学调查及临床资料统计结果都显示, 男性肝病患者的人数明显高于女性, 肝脏疾病发病率的这种性别差异是否是必然, 是什么原因导致这种差异的, 目前尚无定论。本实验采用四氯化碳皮下注射方法制备肝损伤动物模型, 通过对肝脏损伤程度的病理分析, 肝质量/体质量比, 免疫组织化学方法对肝细胞增殖情况的观察及糖原染色方法观察肝脏功能的变化情况, 评估雌性和雄性小鼠之间是否存在差异。实验无抄袭并具有一定的创新性, 结果为探讨肝病的性别差异机理奠定一定的基础, 为临床研究提供相关依据。