

中 國 醫 藥 大 學  
基 礎 醫 學 研 究 所

碩士學位論文

以膽道結紮誘導肝臟傷害引致大白鼠腦神經凋  
亡特性

**Characterization of Cerebral Apoptosis in Rats  
receiving Bile Duct Ligation of Liver**



指導教授： 許朝添 教授

研究生： 羅貽琛

中華民國九十六年五月一日

# 目 錄

	頁數
中文摘要	p05
英文摘要	p07
第一章 前言	p08
第二章 文獻探討	
第一節 肝臟結構及生理功能	p11
第二節 膽道結紮引致肝損害之動物模式	p13
第三節 肝腦病變	p15
第四節 高血氨對大鼠腦神經細胞影響	p17
第三章 材料與方法	
第一節 實驗材料	p19
第二節 實驗方法	p21
第四章 實驗結果	
第一節 實驗動物反應觀察	p24
第二節 實驗動物血清測定值	p25
第三節 動物肝硬化之觀察	p27
第四節 腦神經細胞呈現凋亡情況	p29
第五章 討論	p31

第六章 結論

p34

附錄圖表

p35

參考文獻

p38



## 附錄圖表

表一 實驗動物生化數值結果	p35
圖一 大腦皮質區域之凋亡細胞出現統計表	<b>p36</b>
圖二 海馬迴區域之凋亡細胞出現統計表	p36
圖三 不同組別海馬迴區域之凋亡細胞出現情況.	p37



## 中文摘要

肝腦病變屬於神經性精神病變，其真正致病機轉迄今仍未完全了解。 本篇研究是利用大白鼠經膽道結紮引致肝硬化損害，導致高血氨症持續，去探討時間改變是否與腦神經凋亡關連性。

利用雄性 Wistar 大白鼠經膽道結紮後，分別經過一週、二週、或三週時間再去研究其腦部變化。 更利用免疫化學染色 TUNEL 方式證明細胞凋亡現象。 再根據不同腦部區域如大腦皮質、海馬迴 Hippocampus、及基底核，去統計其凋亡細胞發現率。

大白鼠 20 隻隨機分配為四組。 第一組對照組有剖腹探查膽道但並無結紮處置、第二組膽道結紮為時一週後犧牲、第三組膽道結紮為時兩週後犧牲、第四組膽道結紮為時三週後犧牲。

結果血清中血氨症持續增高，發現神經細胞凋亡增加。 此外發現神經細胞凋亡隨膽道結紮時間延長而改變。 第一週為 3.2%，第二週 8.9%，第三週之數量反而下降 7.9%，可見凋亡情況會隨時間延長而增加， 而腦部各區域發現神經細胞凋亡率亦各有 同。

這項實驗目的透過膽結紮引起肝硬化而續發腦病變傷害之探討。隨著時間之增加，高血氨素之影響，我們發現實驗動物腦細胞出現明顯凋亡情形，進而影響實驗動物之活動力及反射動作之能力。臨床上肝腦病變慢性期中治療對象常出現精神、智力、退化及注意力集中困難情況，也許可以解釋病史雖經治療或血氨素控制仍然陸續出現精神症狀之原因。



## 英文摘要 Abstract

Hepatic encephalopathy is a neuropsychiatric disorder and its pathogenesis is still not understood. The purpose of this study is designed to evaluate the time change of cerebral apoptosis by hyperammonemia in rats using the bile duct ligation model.

The male Wistar rats receiving bile duct ligation or not were studied in 1, 2, 3 weeks, respectively.

The terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated deoxyuridine triphosphate-biotin nick-end labeling (TUNEL) method was used to identify the formation of apoptotic cells. The apoptotic ratio was calculated and the distribution of apoptosis was inspected in the pyriform cortex, basal ganglia and hippocampus territory . The rats were divided into four groups including Group I : the control group with bile duct manipulation , Group II : bile duct ligation for one week . Group III two weeks after bile duct ligation. Group IV three weeks after bile duct ligation.

Results of this study, the proportion of apoptosis increased with the duration of bile duct ligation and reached a maximum after about two weeks . The mean values of the apoptotic ratio in hippocampus were zero in group I, 3.2 % in group II , 8.9 % in group III and 7.9 % in groupIV. The distribution of apoptosis differed in the pyriform cortex, basal ganglia and hippocampus according to the duration of time of the hyperammonemia..

In the bile duct ligation model of rats, apoptosis observed in the brain is increased the time of hyperammonemia, reaching the peak at 2 weeks. The maximum formation of apoptosis is distributed at hippocampus than other parts of brain.



## 第一章 前言

肝源性腦病變 Hepatic Encephalopathy，主要是因為肝臟損害失去排除或代謝毒素的功能。令動物體內積壓大量毒素而致身體其它器官引起繼發性病變。這種由肝併發到腦之傷害會造成意識障礙及思考能力受損。

肝臟病變的原因除腫瘤，外傷或中毒外，常見於台灣病患為慢性發炎病毒感染所致。

病理上可見膽管或肝管發炎造成膽管內膽汁積聚呈現阻塞現象稱為膽栓。但大量膽栓出現會令肝細胞型態上呈空泡狀態，且會導致肝臟失能而毒素代謝停止而且造成大量積聚。

從組織學觀察，我們發現隨著膽道結紮時間越長，所發現膽管增生，肝細胞羽毛樣變化，發炎細胞浸潤或肝組織成壞死變化區域增加等現象有越趨嚴重，肝臟纖維化越見明顯。

臨床上病人會因為肝硬化而做成慢性高血氨症。雖然有藥物控制及血清檢測，但病人的腦功能仍一再受損害，而迄今真正之病理機轉仍無定論。參照放射學家進行之腦掃描追蹤可發現腦本質呈退化樣改變 encephalomalacia.<sup>33,34</sup>



臨床患者因為肝硬化無法代謝身體內毒素，例如 Ammonia, manganese, phenol, 或短鏈脂肪酸 Short chain fatty acid 等。

隨著血液循環而毒物積聚於腦部組織。主要原因是腦血管屏障 BBB 因水腫而失效，大分子的毒質自由進入腦細胞組織，令腦細胞水腫愈形惡化，慢慢影響腦細胞電位傳遞功能。

這些病理學上變化會做成組織局部或全腦傷害（Global sign）。只是時間差異所引到嚴重性而略有不同。

全腦症狀初期為神智不清，方向感不明或自律神經失調。更嚴重會出現病態性反射功能，如 Grasp reflex, Tremor 抖動，癲癇等。局部腦性病變包括視力模糊、失語、單肢感覺神經或活動神經失常。

而高血氨症 Hyperammonemia 為肝硬化最常見之毒素。此外在人類腦神經退化疾病研究,例如帕金森症、老年痴呆 Alzheimer Disease、舞蹈症 Huntington' s disease 均有大量神經凋亡現象 Apoptosis。從組織學病理特徵可在顯微鏡下發現細胞會呈現外膜皺縮，胞核濃縮或崩解。<sup>9,14</sup>

我們研究的目標是希望藉膽管結紮方式誘導大白鼠肝

臟傷害之動物實驗模式。 模擬膽汁淤積會引致肝臟細胞功能異常而後硬化。 藉慢性高血氨症而導致肝源性腦病變,去尋求腦神經持續病變之原因及其與持續時間性之關連。



## 第二章 文獻探討

### 第一節 肝臟結構及生理功能

肝臟屬人類身體中最重要的代謝器官，亦是最大型腺性細胞體，在組織結構上，由肝小葉（hepatic lobule），門脈區（portal trial）及竇間隙所合成。

肝臟細胞中超過 80%以上是由一種六角型式或多角型的肝細胞組成。主要功能為分泌膽汁及藥物毒物之代謝，與竇間隙排列呈索狀以中央靜脈為中心向四周呈放射狀排列。

28,29,30

此外在各肝小葉之間交界處有門脈區，它含有膽管（Bile duet），門靜脈（portal vein）及肝動脈（Hepatic antey）所組成，統稱 Portal trial。來自門靜脈（佔肝血流 75%高養分）及肝動脈（佔肝血流 25%高氧）之血流會流經竇間隙，經過濾或代謝再行注入中央靜脈。<sup>29,31</sup>

膽道結構由鄰近肝細胞毛細膽管匯聚，在肝小葉間合成小葉間膽管，經在多向聚集成肝總管 Hepatic dut，出肝後與膽囊合稱總膽管 Common bile duet，開口於十二指腸，負責分泌及排泄膽汁到腸道系統。<sup>32</sup>

總括肝臟有下列功能：

- (1) 營養物質之新陳代謝
- (2) 調節醣代謝之動態平衡
- (3) 合成脂質與分泌血漿蛋白
- (4) 調節膽固醇代謝
- (5) 合成尿素、血清蛋白、凝血因子，及其他蛋白  
外來物質、藥物、毒素分解及代謝.



## 第二節 膽道結紮引致肝損害之動物模式

膽汁淤積會導致肝臟細胞功能異常，甚至壞死。常見之臨床因素包括肝炎、先天性膽道閉鎖、膽結石，或膽道癌引致膽道阻塞，或敗血症發炎阻礙膽道功能，令膽汁積聚。<sup>34</sup>

在病理分析，由於膽汁積聚所做成肝損害主要在肝細胞。另毛細膽管之絨毛增粗、變鈍、稀少。因絨毛失去收縮力會令毛膽管擴張，反而膽汁流速緩慢，做成膽汁黏稠致膽栓。<sup>35 42</sup>

且疏水性膽汁酸大量積聚，對肝細胞做成毒害性，同時會損害 kupffer 細胞殺菌能力，從而做成膽道感染。組織學上可見肝細胞因膽鹽積滯呈現羽毛樣變性或泡沫狀，且四周有單核細胞浸潤，做成毛膽管附近纖維化。<sup>43</sup>

膽道結紮引致肝硬化之動物模式，雖然有很長久的歷史，但近年相關之動物實驗多以化學毒化方式進行肝硬化研究。兩者之間不同在於前者須耗費更長實驗時間觀察動物，而後者僅需很短時間之內就可做成肝臟損害目的。

比較各種動物實驗方式所導致肝硬化，膽道結紮之優點，是會引起動物黃疸及慢性均衡肝臟病變。隨時間之增加，肝組織硬化或肝門壓增高，肝血液分流 portal shunt 等肝

病變動能衰退症狀均明顯可見，比較符合臨床病患症狀。

目前最常使用之化學毒化動物肝損傷致硬化實驗模式。包括有藥源性 或毒化物 (ccl4) 等方式。由於藥物或毒物所引起肝臟損害區域及程度可能並不一致。故此利用總膽道切斷並結紮，有齊一性肝臟損害表現之優點，故能廣泛被利用。<sup>44,45,46</sup>

文獻報告以 Cameron et al 於 1932 年首先提倡以大白鼠剖腹總膽管結紮模式，觀察肝臟病變。其實驗方式是以氣體麻醉大鼠後，剖腹於腸道網膜找出呈綠色之膽管，於兩端結紮，剪斷，位置分離，做成肝外膽道阻塞到膽汁積聚肝內，損害另肝臟慢慢呈失能、硬化狀態。<sup>47</sup>

一般手術後照料如常，供應飲食，但一週後，組織學上即可發現肝損害，膽管擴張，膽道上皮增生。手術二週後，膽道四周呈現纖維化。三到四周後，組織呈現嚴重發炎反應，肝硬化逐步形成。<sup>45</sup>



### 第三節 肝腦病變

肝源性腦病變 **Hepatic Encephalopathy**，主要是影響動物及人類造成意識障礙及智力改變。源發性之肝臟疾病，例如肝炎、肝硬化及種種造成膽汁淤積的疾病，其造成肝功能失常，毒素於體內淤積，繼發成腦部病變。臨床上超過 70% 以上患者會有認知及腦功能障礙。經過腦掃描 (**Brain CT scan**) 或死亡後解剖可發現大腦皮質之變性，或腦組織萎縮現象。

35,36,37

據神經病理學研究，揭述不論急性或慢性肝腦病變對腦神經造成之損害程度、方式及位置均有所不同。

在急性期，肝臟及血液循環積有大量神經毒素，當經過被破壞腦血管屏障 (**Blood Brain Barrier, BBB**) 進入腦組織，引致腦神經細胞及組織性水腫，對腦部呈壓迫性損害，到最後會因水腫持續而致腦疝，甚而壓迫腦幹而死亡。

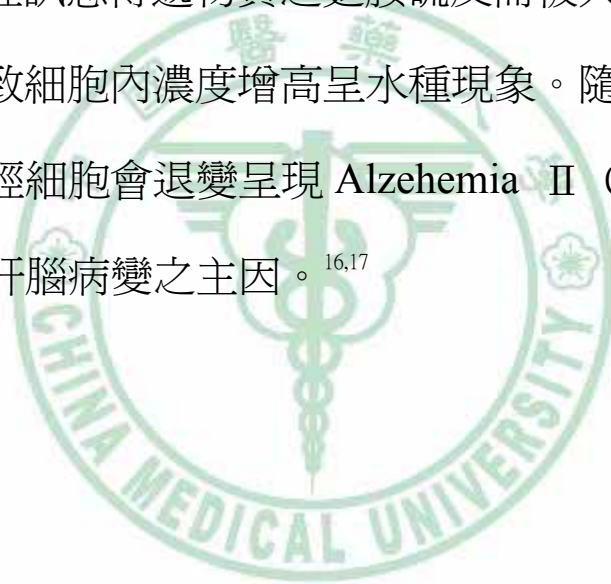
相反在慢性肝病變硬化而導致肝腦病變是位於星狀細胞內 (**Astrocyte**)。因為神經毒素改變其細胞酶合功能，例如高血氨影響 **Astrocytic glutamate** 之代謝令細胞澎漲水腫進而影響神經細胞功能。

在腦星狀細胞亦會出現退化性病變如 **Alzheimer II**



Cell，病理特徵為大量積聚細胞液 Cytoplasm，之中含有大顆灰白細胞核，且其中含明顯核質及斑狀染色質，且星狀細胞呈水種狀況。<sup>16</sup>

正常情況下，蛋白質於腸道吸收及分解後，產生大量氨素，會經肝吸收代謝成尿素，經腸道排出身體。從動物實驗得知高血氨會令腦星狀細胞 Astrocyte 中麩胺硫循環作用受損。作為神經訊息傳遞物質之麩胺硫反而被大量積聚於星狀細胞中，導致細胞內濃度增高呈水種現象。隨著時間愈久之血氨毒害神經細胞會退變呈現 Alzemia II Cell。所以血氨升高被視為肝腦病變之主因。<sup>16,17</sup>



#### 第四節 高血氨對大鼠腦神經細胞影響

曾經有研究針對肝腦病變患者進行腦部掃描，發現氨素主要積聚於特定位置。例如大腦皮質、海馬迴 Hippocampus、及基底核等區域。顯示正常之血腦屏障(Blood Brain barrier)因受到 Na-K-ATP 酵素影響而遭受破壞，令血氨於腦部通透性增加。<sup>15,39</sup> Camila et al 曾報告在門脈壓增高之老鼠中，發現血氨與血腦屏障之間有關聯。<sup>1,2,5</sup>

此外高血氨除了能夠阻止神經細胞後突(post synapse)之神經訊號傳遞(Neuro transmitter)。還會阻斷腦部能量(ATP)之正常供應。它是影響 TCA cycle 之中  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenate 最重要的 rate limit enzyme。而且會令神經系統之乳酸 Lactate 增加而做成更明顯意識障礙。<sup>18,40</sup>

在分子生物學研究，高血氨會改變基因調控蛋白的合成。Desjardins et al 報告受影響蛋白包括 Astrocytic glutamate transportor GLF-1 及星狀細胞之結構蛋白。<sup>20</sup>

在人類腦神經退化疾病研究，例如帕金森症、老年痴呆 Alzheimer Disease、舞蹈症 Huntington's disease 均有大量神經凋亡現象 Apoptosis。在顯微鏡下細胞會呈現外膜皺縮，胞核濃縮或崩解。<sup>3,6,9,14,25</sup>

在王宇明等實驗中，證明血氨可以令腦神經細胞大量凋亡呈正比例改變。<sup>7</sup> Lin et al 在多組血氨與大鼠神經實驗中，發現給予實驗組氨負荷之後有大量神經凋亡與對照組有明顯之差異。<sup>21</sup>

所以本篇實驗目的在於探討藉膽管結紮引到肝損壞硬化之動物模式。其中血氨增高情況下觀察神經細胞凋亡數量與時間之關係。



### 第三章 材料與方法

#### 第一節 實驗材料

實驗動物：

品種	Wistar 雄性大白鼠
來源	國家實驗動物繁殖及研究中心
週齡	6 ~ 7 週

飼養環境： 中國醫藥大學動物中心

飼養溫度  $22^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$

溼度  $55 \pm 5\%$

半日照環境

自由飯水供應（RO 過濾水源）

飼料（福壽牌，福壽實業股份有限公司）

化學藥品：

#### 1. Hematoxylin and Eosin stain

Xylene

Alcohol 100%, 95%, 70%.

Hematoxylin

Eosin

## 2. TUNEL assay

Terminal deoxynucleotide transferase-mediated

Dutp-biotin nick-end labelling

1% w/v paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS).

Tris-aminomethane-buffered saline (TBS).

0. 1% v/v hydrogen peroxide in TBS.

2% v/v fetal bovine serum in TBS

TDT reaction buffer

TDT digoxigenin-dUTP mixture

Primary antibody solution

Secondary antibody solution

AEC solution

Haematoxylin solution

Crystal mount medium

PAP pen

## 第二節 實驗方法

### 方法：

#### (一) 實驗動物分組：

本實驗共使用 Wistar 大鼠依隨機辦法分為四組，共使用 20 隻，每組 5 隻。

##### 第一組：對照組 (Sham Group)

有剖腹探查膽道並經過腸道、膽道檢查但並無結紮處置

第二組：膽道結紮，正常餵食，為時一週後犧牲 BDL 1

第三組：膽道結紮，正常餵食，為時兩週後犧牲 BDL 2

第四組：膽道結紮，正常餵食，為時兩週後犧牲 BDL 3

#### (二) 動物膽道結紮處置：

動物經過膽道測量後施行麻醉，採用藥物腹腔內注射 (intraperitoneal injection)，藥品 Chlorhydrate (36 mg/cc，1ml，1cc/100gm rat body weight)。

把實驗動物麻醉後，仰臥方式進行剖腹手術，由肝臟檢查後再沿肝葉、肝管往下找尋總膽管。在十二指腸側端約 10-15mm 處結紮，利用 3 號絲線進行兩端結紮，切斷後再依反方向復



位。腹壁依解剖層縫合，在於腹內注射抗生素（Ancillin）預防感染。術後有觀察 2 小時再送回動物中心飼養。

### （三） 實驗手術過程：

動物依膽管結紮後 1 週，2 週，3 週進行犧牲以擷取樣本。比照組與 BDL 3 週組同時犧牲。以麻醉方式進行剖腹，採取下腔動脈抽血犧牲，取下肝臟及腦部進行研究。

### （四） 肝功能測定：

於手術中抽取動物下腔動脈血液，經過每分鐘 3000rpm 轉速進行離心 10 分鐘取上層血清液部分。分別以 Roche 重劃測定儀（COBAS, miraplu 及 COBAS Integra 400）測定 GOT、GPT、Ammonia 之生化值。

### （五） 肝臟組織學病理檢查：

利用 Hematoxylin and eosin Stain。

首先利用肉眼觀察肝臟，對於硬化結紮部位取小塊組織。Loy, 福馬林液作為組織固定，經過 24 小時再滲蠟機方式脫水。組織被石蠟包覆再以 4mm 厚度切片，肝臟切片至於



烘箱，設定 60°C，30 分鐘，作用為脫蠟，再以二甲苯 Xylere 清洗蠟質。漸次濃度酒精（100% ~ 95% ~ 75%）清洗，及 Hematoxylin 染一分鐘，以流動水分清洗過量之染料，再以漸濃酒精脫水，壓乾，封片，作觀察。

（六）腦細胞凋亡偵測 TUNEL 方式 (**Terminal deoxynucleotidyl transferase deoxy-UTP nick end labeling**)

- （1）組織切片脫蠟後，以濃度 20  $\mu$ g/ml proteinase k 在室溫下沖洗作用 30 分鐘
- （2）短暫加上平衡緩衝液(equilibration buffer)後加入作用溶液(含 dUTP-fluorescein 之 TdT 酵素) 於 37°C 下作用 60 分鐘。
- （3）各組組織切片則以標示溶液(label solution )取代作用溶液。之後以 PBS 沖洗三次以停止反應。抗 fluorescein 過氧化酶加入後於 37°C 下反應 30 分鐘。
- （4）加入剛配好的酶解物 (substrate) (0.05% 3,3' - diaminobenzidine tetrahydrochloride 和 0.03% 於 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 50mM Tris 緩衝液，pH7.6) 直至呈色。以 methyl green 染核後於光學顯微鏡下觀察。

## 第四章 結果：

### 第一節 實驗動物反應觀察

實驗動物經規則飼養，且分別於實驗期中第一週，第二週及第三週後出犧牲。實驗對照組與膽道結紮第三週組同時犧牲作觀察。

實驗期中，膽道結紮組共有三隻死亡，統計其生存率為實驗對照組 100%，膽道結紮一周為 100%，膽道結紮二週組為 80%，膽道結紮第三週為 60%

在動物體重觀察中，發現所有動物，不論各組均有依循時間增加而有體重增加現象。在膽道結紮組別動物重量增加與對照組觀察有增高 1.3 倍到 1.8 倍，在統計學上有差異。

實驗動物外型觀察發現，膽道結紮組毛色日益暗黑，有明顯脫毛及黃疸，活動有明顯遲緩，其中有三隻呈角膜反射消失，證明呈現腦性病變現象。對照組動物反而呈現毛色純白，觸感平順。

在肝臟器官觀察，實驗對照組動物肝臟顏色鮮紅，外觀無結節變化。膽道結紮動物有外觀纖維化狀況，纖維增生，有肝硬化形成。

## 第二節 實驗動物生化數值結果

在實驗動物犧牲前有抽血進行肝臟功能檢測。其中主要抽驗 GOT、GPT、及 Ammonemia 數值。分析 GOT 數值有發現隨膽道結紮時間增長，其數值愈有偏高情況。對照組(127.6 ± 35.1)，結紮一週組(154.1 ± 39.1)，結紮二週組(142.8 ± 75.5)，及結紮三週組(163.8 ± 64.9)。

而 GPT 的測驗結果顯示與結紮時間呈現正比例上升現象。對照組呈(152.3 ± 34.9)，而結紮一週組(415.6 ± 283.5)，結紮三週組(545.5 ± 198.5)，結紮三週組(788.2 ± 372.2)，統計上有明顯差異。

膽道結紮動物有呈現肝纖維化結節外觀，且抽驗其血清氨素 serum ammonia 含量會隨著結紮時間增長而增加。對照組(48.7 ± 5.8)，結紮一週組(104.4 ± 18.7)，結紮二週組(120.2 ± 32.3)，結紮三週組(128.5 ± 41.3)。

(詳見附錄圖表 表一 實驗動物生化數值結果)

分析肝臟受損程度，實驗動物常以其血清中 GOT，GPT 數值來鑑定其損害情況。數值愈高，損害度愈強。尤其 GOT 僅只來源於肝臟，故其專一性指標更為明顯。

血氨素值亦有隨膽道阻塞、肝纖維化等現象而增高。顯示肝臟損害後動物體內毒素代謝功能障礙。



### 第三節 動物肝硬化病理之觀察

肝臟首先利用肉眼觀察，對於硬化結紮部位取小塊組織。組織切成薄片，經 Formalin 固定、脫水、石蠟包埋後切片，以 Haematoxylin and Eosin (H&E) 方法染色進行病理觀察。對照組病理標本外觀色澤圓均，低倍顯微鏡下，組織細胞排列序正常。肝細胞與竇間隙索狀排列呈標準外向放射狀排列，且亦無發炎性單核細胞或肝細胞水腫變形現象。肝小葉間的膽管、門靜脈、肝動脈排列正常，並無膽汁積聚或中性單核白血球大量積聚，膽管亦無明顯性增生現象。

比較肝臟病變之結紮組動物，分別呈現初期到嚴重性肝臟組織變化，外觀上染色不均。低倍下觀察，肝細胞有水腫發炎，故此排列方向失序。傳統肝細胞與竇門隙索狀放射性排列表現凌亂。膽管及門脈區域有膽汁積聚，且膽管內毛細組織如絨毛增粗、變鈍、稀小。因絨毛失去收縮能力會令膽管擴張，反而造成膽汁積聚而膽管栓塞。

門靜脈鄰近之肝細胞因膽鹽積聚而呈羽毛樣式泡沫狀且四周圍有大量單核發炎細胞呈現組織發炎現象。在膽道結紮組之肝臟門脈區域有肝細胞及膽管增生相互增生圍繞發現，是肝纖維化病變特徵出現。隨著結紮時間增加，肝細胞

及膽管增生有增加趨勢。

(詳見附錄圖表 圖四 膽道結紮引致實驗動物肝損害)





#### 第四節 實驗動物腦神經細胞凋亡情況

實驗動物經麻醉後，經剖腹後抽取下腔動脈血液犧牲，分別取下肝臟及頸椎以上截斷取下腦部。

腦組織利用 TUNNEL 方法檢驗。先把全腦沉入多聚甲醛固定過夜（24 小時），再用石蠟處理。在低度室溫下（21 ~ 23 °C）進行縱向切片。承載玻片有先用多聚賴氨酸泡浸及風乾，切片經過脫蠟處理。在低度室溫下（21 ~ 23°C）進行縱向切片，經處理後，封片進行顯微鏡觀察。

(詳見附錄圖表 圖三 不同組別凋亡細胞出現情況).

凋亡細胞呈現深咖啡色色澤且有核質凝聚染色質濃密表現，有部分細胞可見細胞核部分分解及崩裂現象。在腦部各部位有不同程度之細胞凋亡表現。其中較明顯集中於腦海馬迴體部分 Hippocampus，及大腦皮質區，在基底核 basal ganglion 區域只有少數凋亡細胞並不具有統計學上意義。

而海馬迴區域之凋亡細胞以 CA2 及 CA3 位置為最多。數量統計，以膽道結紮兩週知凋亡細胞量最多，結紮三週之數量比結紮一週多，對照有凋亡細胞但數量不多且不明顯。

(詳見附錄圖表圖二)



大腦皮質出現凋亡細胞數量明顯比海馬迴區域更爲少量。數量以結紮兩週動物及結紮三週者爲多，結紮一週僅有少量檢測，對照組則有零星凋亡細胞存在。

(詳見附錄圖表 圖一)



## 第五章 討論

慢性肝病變是台灣人口主要死亡原因之一。因為肝臟為人體內主要排毒器官，不論是外源毒素或內源毒素，必須經過肝臟代謝才能排出體外，所以一旦肝臟病變而不能代謝排出人體必定造成毒素儲存，醫學研究常歸類為肝腦病變的形成原因。臨床上不同程度的人體毒化會影響睡眠清醒循環，進而改變人類的智力，行為個性思考能力，嚴重的更會影響神經肌肉的協調而致昏迷或死亡。<sup>11,12,14</sup>

血清高血氨素往往是為導致肝腦病變的主要人體內毒素，不論急性期或慢性期毒性均會有不同程度或方式改變腦細胞的功能。例如急性期的高血氨素，會導致腦細胞呈現水腫狀況，一旦持續到嚴重腦疝甚致會引起死亡，相同的慢性血氨中毒，會令腦神經細胞退化，呈現出病理學上亞默氏退化(Alzheimer II) II 型細胞，外型像一個發脹水腫，色澤呈灰暗色氣球。<sup>10,13,19</sup> 據研究中指出高血氨素影響在於改變腦細胞製作蛋白基因的程序，導致酶 glutamine synthetase 或腦纖維蛋白或酶 benzodiazepine receptor 製作蛋白均失去原有功能，進而降低腦細胞排毒或是作為腦訊息傳送的功能又或排泄血氨素能力。<sup>21,22</sup>

細胞凋亡變化其實是與外在環境有密切關係，典型細胞凋亡與細胞壞死之區別在於前者有遲發性細胞外型纏縮現象，在腦細胞的凋亡則常發現有胞內酵素或蛋白活性改變。更且高血氨素會影響腦細胞膜上的接受器功能，Buianska et al<sup>41</sup> 更指出高血氨引起腦細胞凋亡必須有三個訊號分子出現，No, protein kinase C 及 NF kappa B. 即如阻止 NO Synthase 作用會減小細胞凋亡的數量。<sup>4,8,10</sup>

細胞凋亡的檢驗方式。要證明細胞處於凋亡狀況必先證明其胞核分子處於分離情況，TUNEL 方法是利用 deoxy muclotidy tranferase (TdT)之 3-OH 鍵與胞核之 DNA 結合，結果染色在顯微鏡下呈現深棕色細胞或有胞核崩解現象，而證明凋亡情況，比較其它實驗方式，TUNEL 優點在於可利用內部直接觀察及記錄其分佈位置，故此我們引用此項實驗方式。<sup>23,24</sup>

根據上述實驗結果，證明肝腦病變的動物在腦部引起遲發病變位置，包括有海馬迴大腦皮質等，腦基底核及其它部位並無明顯凋亡細胞，而數量最多是位於海馬迴 CA2,CA3 部位。

根據凋亡細胞出現數量以海馬迴較大腦皮質為多，可能

原因為局部組織對血氨素的通透性不同，此外肝腦病變動物之血腦屏障亦含隨肝臟變化而增加對 Ammonia 之通透性。

Lock Wood et al 利用正子圖掃描(PET scanning)分析出肝硬化病體比較正常動物腦部對血氨素之通透性增高。<sup>25,1</sup>

本實驗中之對照組別並無明顯之凋亡細胞聚落，出現數量最多者為膽道結紮第二週 8.9%，第三週之數量反而下降 7.9%。第一週為 3.2%，可見凋亡情況會隨時間延長而增加，第三週之凋亡細胞下降情況可能為巨核細胞對退化細胞之清除作用產生。Lee et al 曾經在腦缺血實驗中證實退化細胞被清除之情況。<sup>26</sup> Magnus et al 亦證明 microglia 清除退化細胞有利於腦部防止發炎情況及退化情形之惡化。<sup>27</sup>

## 第六章 結論

這項實驗目的透過膽結紮引起肝硬化而續發腦病變傷害之探討，隨著時間之增加，高血氨素之影響，我們發現實驗動物腦細胞出現明顯凋亡情形，進而影響實驗動物之活動力及反射動作之能力，臨床上肝腦病變慢性期中治療對象常出現精神、智力、退化及注意力集中困難情況，也許可以解釋病史雖經治療或血氨素控制仍然陸續出現精神症狀之原因，分子生物學上及早發現可能是開創肝腦病變慢性期之治療契機。



## 附錄圖表

表一 實驗動物生化數值結果

Table 1 laboratory examination:

Group	<u>GOT (U/L)</u>	<u>GPT(U/L)</u>	<u>Ammonia</u>
Gr 1	127.6±35.1	152.3±34.9	48.7±5.8
Gr 2	154.1±39.1*	415.6±283.5	104.4±18.7**
Gr 3	142.8±75.5*	545.5±198.5**	120.2±32.3**
Gr 4	163.8±64.9*	788.2±372.2**	128.5±41.3**

數值以 ±標準差表示出，P< 0.05\*、P< 0.001\*\*

**Gr1 sham group vs Gr 2,3,4 BDL group.**

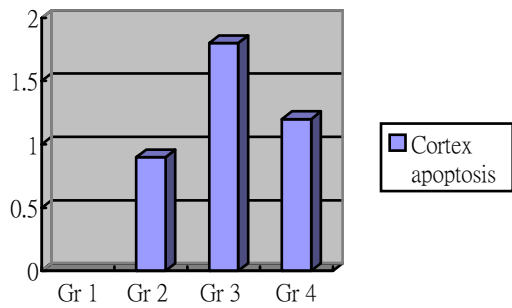


\*  
\*\*  
\*  
\*\*  
\*\*  
\*  
\*\*  
\*\*  
\*  
\*\*



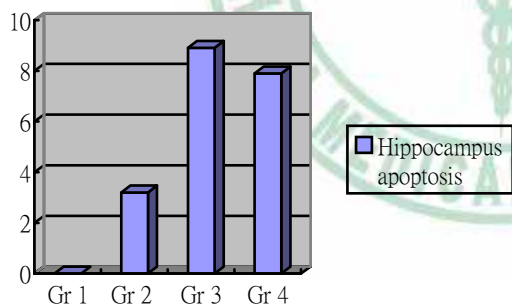
圖一 大腦皮質區域之凋亡細胞出現統計表

Fig 1 Apoptotic cells observed in the cortex of rat brain.



圖二 海馬迴區域之凋亡細胞出現統計表

Fig 2 Apoptotic cells observed in the hippocampus of rat brain

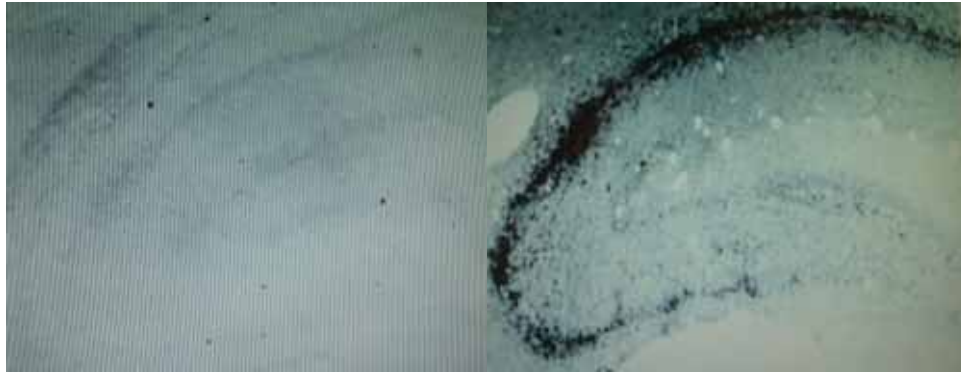


圖三 不同組別海馬迴區域之凋亡細胞出現情況.

Fig 3 Apoptotic cells of hippocampus

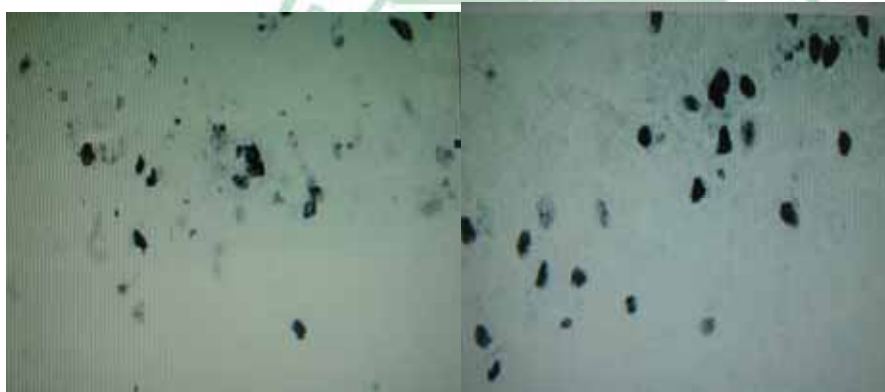
**Gr1 control group**

**Gr 3 BLD 2 weeks**



**Gr2 BLD 1 wk**

**Gr 3 BLD 2 wk**



**Gr 4 BLD 3 wk**



## Reference:

1. Camila Scorticati,  
Hyperammonemia, brain edema and blood-brain barrier alterations  
in prehepatic portal hypertensive rats and paracetamol intoxication  
World J Gastroenterol 2004;10(9):1321-1324
2. Rodrigo Jover,  
Brain Edema and Inflammatory Activation in Bile Duct Ligated Rats  
With Diet-Induced Hyperammonemia: A Model of Hepatic  
Encephalopathy in Cirrhosis  
Hepatology 2006;43:1257-1266.
3. Nikolaus Seiler  
Ammonia and Alzheimer's disease  
Neurochemistry Int. 41;(2001)189-207
4. Li Yang  
GABA C-receptor agonist suppressed ammonia-induced apoptosis in  
cultured rat hippocampal neurons by restoring phosphorylated BAD  
level.  
Journal of Neurochemistry 2003;87,791-800
5. Hong-Yan Liu  
Apoptosis of neurocytes induced by ammonia in rat liver cirrhosis  
World Chin J Digestol 2004 August;12(8):1865-1867
6. R. RODRIGO,  
Bile duct ligation plus Hyperammonemia in rats reproduces the  
alterations in the modulation of soluble guanylate cyclase.  
Neuroscience 130 (2005) 435-443
7. Agata Klejman  
Mechanisms of ammonia-induced cell death in rat cortical neurons:  
Neurochemistry International 47 (2005) 51-57
8. Pilar Monfort,  
Molecular mechanism of acute ammonia toxicity: role of NMDA  
receptors  
Neurochemistry International 41 (2002) 95-102
9. Lawrence S. Honig,  
Apoptosis and neurologic disease.  
AmJ Med. 2000;108:317-330.
10. Vicente Felipo  
Neurobiology of ammonia

- Progress in Neurobiology 67 (2002) 259–279
11. Cheol-Sik Shin,  
The Time Evolution of Cerebral Apoptosis in the Permanent Middle  
Cerebral Artery Occlusion Model in Rats  
J Korean Neurosurg Soc.; 37 January 2005, 55-59
  12. Klaus Kunze  
Metabolic Encephalopathies  
J Neurol.; 249 (2002) 1150-1159
  - 13 Norenberg  
Mechanisms of Ammonia-Induced Astrocyte Swelling  
Meta Brain Dis.; 20,(4) 2005
  14. M. LEWIS  
The neurology of liver failure.  
Q J Med.; 96 (2003), 623-633
  15. ALAN H. LOCKWOOD,  
The Dynamics of Ammonia Metabolism in Man  
J. Clin. Invest.; 63 March 1979 449-460
  - 16 Claude bachmann, Olivier braissant,  
Ammonia toxicity to the brain and creatine  
Molecular Genetics & metabolism 81.2004,s52—s57
  - 17 Rajiv Jalan\*, Debbie Shawcross, Nathan Davies  
The molecular pathogenesis of hepatic encephalopathy  
The International Journal of Biochemistry & Cell Biology 35 (2003)  
1175–1181
  - 18 Lai, J.C.K., Cooper, A.J.L.,  
Brain  $\alpha$ -ketoglutarate dehydrogenase complex: kinetic properties,  
regional distribution and effects of inhibitors.  
J. Neurochem. 1986 47, 1376–1386.
  19. Ratnakumari, L., Qureshi, I.A., Butterworth, R.F.,  
Effects of congenital hyperammonemia on the cerebral and hepatic  
levels of the intermediates of energy metabolism in *spf* mice.  
Biochem. Biophys Res. Commun. 1992., 184, 746–751.
  - 20 Desjardins, P., Michalak, A., Therrien, G., Chatauret, N.,  
Butterworth, R.F.,  
Increased expression of the astrocytic/endothelial cell glucose  
transporter (and water channel) protein GLUT-1 in relation to  
brain glucose metabolism and edema in acute liver failure.

- Hepatology 2001. 34 (237A), 253-.
21. Hong-Yan Liu, Jing-Yan Wang, Wei Lei, Ying Wen, Pei Liu  
Apoptosis of neurocytes induced by ammonia in rat liver cirrhosis  
World Chin J Digestol 2004 August;12(8):1865-1867
  22. Bélanger, M., Desjardins, P., Chatauret, N., Butterworth, R.F.,  
Loss of expression of glial fibrillary acidic protein in acute  
hyperammonemia.  
Neurochem. Int. 2002. 41 (2-3), 155-160.
  23. Li Y, Chopp M, Jiang N, Yao F, Zaloga C :  
Temporal profile of in situ DNA fragmentation after transient  
middle cerebral artery occlusion in the rat.  
J Cereb Blood Flow Metab 15 : 389-397, 1995
  24. Linnik MD, Miller JA, Cavallo JS, Spinkle-Cavallo J, Mason PJ,  
Thompson FY, et al :  
Apoptotic DNA fragmentation in the rat cerebral cortex induced by  
permanent middle cerebral artery occlusion.  
Mol Brain Res 32 : 116-124, 1995
  25. Lock wood AH,  
Blood ammonia levels and hepatic encephalopathy  
Metab Brain Dis 2004,Dec,19,P345-349
  26. Lee SH, Kim M, Kim YA, Kim YJ, Chi JG, Roh JK, et al :  
Ischemic intensity influences the distribution of delayed infarction  
and apoptotic cell death following transient focal cerebral ischemia  
in rats.  
Brain Res 956 :14-23, 2002
  27. Magnus T, Chan A, Grauer O, Toyka KV, Gold R :  
Microglial phagocytosis of apoptotic inflammatory T cell leads to  
down- regulation of microglial immune activation.  
J. Immunol 167, 2001 : 5004-5010
  28. Elferink RP.  
Understanding and controlling hepatobiliary function.  
Best Pract Res Clin Gastroenterol.2002; 16(6) 1025-34
  29. Nakanuma Y, Hosono M, Sanzen T, Sasaki M.  
Microstructure and development of the normal and pathologic biliary  
tract in humans, including blood supply.  
Microsc. Res Tech 1997 Sep 15;38(6):552-70.
  30. Ho CW, Shioda K, Shirasaki K, Takahashi S,  
The pathogenesis of biliary atresia: a morphological study of the



- hepatobiliary system and the hepatic artery.  
J Pediatr Gastroenterol Nut. 1993; Jan 16(1) 53-60
31. LaRusso NF.  
Morphology, physiology, and biochemistry of biliary epithelia  
Toxicol Pathol 19<sup>96</sup> Jan-Feb;24(1):84-9.
32. Handler JA, Kossor DC, Goldstein RS.  
Assessment of hepatobiliary function in vivo and ex vivo in the rat  
J Pharmacol Toxicol Methods. 1994 Feb;31(1):11-9
33. Cohen L, Sandbank U, Roseinfeld JB  
Silent acute pancreatitis with encephalomalacia mimicking hepatic  
coma  
Am. J Gastroenterol 1975 Jan 63(1) 75-78
34. Y Chan, S W Huang, T F Wang  
Lack of detrimental effect of nitric oxide inhibition in bile duct  
ligated rat with hepatic encephalopathy.  
European J of Clinical Investigation; 34 (2004) 122-128
35. Binesh N, Huda A, Thomas MA, Wyckoff N, Bugbee M  
Hepatic encephalopathy: a neurochemical, neuroanatomical, and  
neuropsychological study.  
J Appl Clin Med Phys. 2006 Winter 7(1) 86-96
36. Nakagawa Y, Matsumura K, Iwasa M, Kaito M, Adachi Y, Takeda K.  
Single photon emission computed tomography and statistical  
parametric mapping analysis in cirrhotic patients with and without  
minimal hepatic encephalopathy  
Ann Nucl Med. 2004 Apr;18(2):123-9.
37. Tarasow E, Panasiuk A, Siergieczyk I, Orzechowska B A  
MR and 1H MR spectroscopy of the brain in patients with liver  
cirrhosis and early stages of hepatic encephalopathy.  
Hepatogastroenterology. 2003 Nov-Dec;50(54):2149-53.
38. Roger F. Butterworth  
Hepatic Encephalopathy A Serious Complication of Alcoholic Liver  
Disease  
Alcohol Research & Health 2003 Vol. 27, No. 2, 143-145
39. Agata Klejman a,1, Michał Wegrzynowicz b,1, Erzsebet M. Szatmari  
Mechanisms of ammonia-induced cell death in rat cortical neurons:  
Roles of NMDA receptors and glutathione  
Neurochemistry International 47 (2005) 51–57
40. Chatauret, N., Rose, C., Therrien, G., Butterworth, R.F.,  
Mild hypothermia prevents cerebral edema and CSF lactate



- accumulation in acute liver failure.  
Metab. Brain Dis.2001 16, 95–102.
- 41.Buzanska L, Zablocka B, Dybel A, Domanska-Janik K, Albrecht J  
Delayed induction of apoptosis by ammonia in C6 glioma cells.  
Neurochem Int 2000. 37:287–297.
- 42.Rodriguez Garay E.  
Cholestasis : human idsease and experimental animal model.  
Ann Hepatol 2003; 2, 150-158
- 43.Patel T, Roberts LR, Jones B.  
Dysregulation of apoptosis as a mechanism of liver disease:  
overview  
Semin Liver Dis 1998;18:105-114
- 44.Kountouras J, Billing B, Scheuer P  
Prolonged bile duct obstruction: a new experimental model for  
cirrhosis in the rat.  
Br J Pathol 1984; 65:305-311
- 45.Jaspreet S. Gujral, Anwar F, M L Bajt.  
Neutrophils aggravate acute liver injury during obstructive  
cholestasis in bile duct ligation.  
Hepatology 2003;38:355-363
- 46.Jaspreet S. Gujral, J Liu, A Farhood.  
Reduced oncotic necrosis in Fas receptor-De cient C57BL/6J-lpr  
mice after bile duct ligation.  
Hepatology 2004;40:998-1004
- 47.Cameron GR, Oakley CL  
Ligation of the common bile duct.  
J Pathol Bact. 1932;35: 769-798.
- 48.洪靜宜,許朝添  
The expression of bone morphogenetic proteins in bile duct ligation  
induced liver injury in rats.  
中國醫藥大學 基礎醫學研究所 碩士論文
- 49.葉靜華,許朝添  
The regulation of cholinergic nerve on cytokines during rat liver  
damaged tissue repairing.  
中國醫藥大學 基礎醫學研究所 碩士論文

---

9,14  
28,29,30  
29,31  
32  
34  
35  
42  
43  
44,45,46  
47  
45  
35,36,37  
16  
16,17  
15,39  
1  
2,5  
18,40  
20  
3,6,7,9,25  
14  
7  
21  
11,12,14  
10,13,19  
21,22  
41  
4,8,10  
23,24  
25,1  
26  
27

