

肝硬化门脉高压症大鼠模型制作方法的探讨

董琦¹ 聂晚频² 王康¹

(1 海南省人民医院 海南 海口 570000 2 中南大学湘雅三医院普外科 湖南 长沙 410013)

摘要 目的:建立稳定可靠的肝硬化门脉高压大鼠动物模型。材料与方法:50 只雄性 SD 大鼠,随机分为 3 组。正常对照组 10 只,行假手术,给予正常饮食。肝硬化 A 组 20 只,先行左肾上腺静脉结扎,然后给予初始浓度为 0.03% 的硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)溶液作为饮用水并根据大鼠体重变化调节给药浓度。肝硬化 B 组 20 只,行假手术,给予固定浓度为 0.03% TAA 溶液。给药时间为 14 周。结果:肝硬化 A 组大鼠死亡率为 0,肝硬化形成率达到 100%。肝硬化 B 组大鼠死亡率 15%,肝硬化形成率 75%。肝硬化 A 组大鼠的门静脉压力明显高于肝硬化 B 组和对照组。结论:采用左肾上腺静脉结扎并根据体重变化调节 TAA 给药浓度可建立稳定可靠的肝硬化门脉高压大鼠动物模型。

关键词:肝硬化;门脉高压;大鼠;模型

中图分类号:R575.2 **文献标识码:**A

Investigation of modeling portal hypertension rats with cirrhosis

DONG Qi¹, NIE Wan-pin², WANG Kang¹

(1 Department of Pediatric Surgery, The People's Hospital of Hainan Province, Haikou 570000, Hainan, China

2 Department of General Surgery, Third Hospital of the Central-south University, Changsha, 410013, Hunan, China)

ABSTRACT Objective: To establish a reliable portal hypertension rat model with cirrhosis. **Materials and methods:** Fifty male SD rats were randomly divided into three groups: group A, B and control group. The left adrenal vein of group A (n=20) was ligated before receiving continuous administration of thioacetamide (TAA) in the drinking water. And the concentration of TAA was adjusted according to weekly weight changes of the rats, with the initial concentration 0.03%. Group B (n=20) was given sham operation with the fixed concentration of TAA 0.03%. The control group (n=10) was accepted sham operation and was supplied with normal water. **Results:** The mortality in group B was 15% and the rate of cirrhosis formed was only 75%. In contrast, there was no death and cirrhosis formed was 100% of the rats in group A. The portal venous pressure of the rats in group A was higher than that of group B and the control group. **Conclusions:** The method of combining ligation of the left adrenal vein with adjustment of concentration of TAA in the drinking water according to weight changes of the rats can establish a reliable rat model of portal hypertension with cirrhosis.

Key words: Cirrhosis of liver; Portal hypertension; Rats; Model

我国的门脉高压症患者的病因以乙型肝炎后肝硬化为主。建立符合临床的稳定的肝硬化门脉高压症动物模型,是对肝硬化门脉高压症进行基础性研究的前提。本研究通过手术阻断大鼠门静脉中的经左肾上腺下静脉与左肾静脉之间的分流,再给予一定浓度的硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)水溶液代替饮用水,并根据大鼠每周体重变化调节给药浓度,成功建立了大鼠模型。此模型同时具备肝硬化和门脉高压两方面的病理特征,与临床常见的肝炎后肝硬化相符合,并降低了造模过程中大鼠的死亡率,提高了成模率。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物: 50 只雄性 Sprague-Dawley 鼠(简称 SD 大鼠),体重 200~220 克,购于中南大学湘雅医学院实验动物中心。喂饲标准颗粒饲料,自然光照周期,分笼饲养。温度 20~25℃,湿度 50~60%。

1.1.2 分组: 随机分为 3 组,正常对照组 10 只、肝硬化 A 组 20 只、肝硬化 B 组 20 只,分别采用龙胆紫、红汞溶液进行单个标记编号,组内每只大鼠均可单独区分。

1.1.3 试剂: 硫代乙酰胺(分析纯),购于天津科密欧化学试剂开发中心。

1.2 方法

1.2.1 手术结扎肝硬化 A 组大鼠左肾上腺静脉: 将大鼠称重,25mg/kg 氯胺酮腹腔注射麻醉后,作左侧腹纵切口,显露左肾及左肾静脉,可见左肾静脉上方有一根小静脉汇入,为左肾上腺静脉,将其稍加游离后双重结扎,勿需切断,见图 1-1。然后分离左肾上极脂肪囊,如有小血管则予以结扎。

1.2.2 术后 将大鼠单独喂养 24 小时,待其恢复后放入组中饲养。

1.2.3 正常对照组和肝硬化 B 组 仅开腹暴露左肾上腺静脉,然后关腹。

1.2.4 给药: 术后 10 天,大鼠腹部伤口基本愈合,将大鼠称重,为初始体重。肝硬化 A 组给予初始浓度为 0.03% 的 TAA 溶液作为大鼠饮用水,每周称重一次,根据大鼠体重变化调节给药浓度。即大鼠在一周内体重增加超过 20g、或减少超过 10g,则将 TAA 浓度提高或降低 50%,以维持大鼠体重在 200~260g 之间,较初始体重增加量在 50g 以内。肝硬化 B 组给予

作者简介:董琦,(1977-),男,医师,外科学硕士。

(收稿日期:2006-07-17 接受日期:2006-08-23)

固定浓度为 0.03% 的 TAA 溶液为大鼠饮用水。正常对照组给予普通饮水。大鼠饮用 TAA 溶液均为当日新鲜配制。保证大鼠饮水和饲料充足,每周清晨称重并记录。给药 14 周后停药两周,肝硬化动物模型即制作完毕。

1.2.5 实验指标的检测和标本收集

1.2.5.1 测量门静脉压力:将大鼠麻醉,沿腹中线进腹(避开第一次手术后切口下的粘连),找到肠系膜前静脉与脾静脉汇合点上方,将一充满肝素钠生理盐水的 5# 静脉输液套管针逆行穿刺入门静脉,拔出针芯固定套管针不动,助手抬起套管针尾端软管,以大鼠右心房为“0”点测量门静脉压力值。然后结扎穿刺处血管。(此步骤需注意保温,否则门静脉及其属支将可能因受冷而痉挛收缩。)

1.2.5.2 制作肝脏组织标本:用 4% 多聚甲醛/0.1M PBS 溶液灌注固定后剪取肝脏组织,并放入该溶液中继续固定 4~6 小时。冰冻切片,HE 染色,片厚为 30 μ m。

1.2.6 结果判定:镜下观察肝脏病理组织变化,包括肝细胞的变性坏死情况,炎性细胞浸润,纤维间隔和假小叶的形成。以肉眼观察到肝硬化结节和镜下假小叶形成为肝硬化模型成功的判定标准。

1.2.7 统计学分析:使用 SSPS 11.0 统计软件分析,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,进行 t 检验, $P < 0.05$ 视为有统计学差异。

2 结果

2.1 一般情况

没有因手术造成大鼠死亡。肝硬化 A 组 20 只大鼠全部存活,存活率 100%,成模 20 只,成模率 100%。肝硬化 B 组 20 只大鼠存活 17 只,存活率 85%,成模 15 只,成模率 75%。

2.2 肝脏病理(图 1-2,1-3,1-4)

大体标本:成模大鼠可见明显门静脉压力增高,胃肠道淤血,肝脏表面粗糙,肝硬化结节形成等表现。镜下见肝内假小叶广泛形成,假小叶内可见纤维再分隔现象,小叶间隔增宽,同时伴有明显的肝细胞再生结节。所有大鼠未发现肝脏恶变。

2.3 各组大鼠体重及给药浓度变化情况(图 1-5)

3 组大鼠给药前体重无明显差别。至第 14 周末,正常组大鼠体重持续上升,体重在 395~430g 之间为 409.00 ± 11.25 g。肝硬化 A 组大鼠体重相差不多,在 235~257.5g 之间 248.63 ± 6.66 g。肝硬化 B 组大鼠体重差距变大,在 245~310g 之间, 266.91 ± 18.61 g 其中有 3 只大鼠,体重持续下降,降至 160g 左右,分别于第 3、4、6 周死亡。

第 1 周末,肝硬化 A 组部分大鼠体重下降到 200g 以下,接受了 0.015% 浓度的 TAA 溶液后,体重回升;待体重恢复到 210g 以上后,再接受 0.03% 的 TAA 溶液。第 3 周末,肝硬化 B 组大鼠平均体重开始低于肝硬化 A 组, (199.34 ± 14.04 g Vs 209.15 ± 10.24 g, $P < 0.05$)。第 6 周开始,肝硬化 A 组部分大鼠体重超过了 260g 后接受了 0.045% 的 TAA 溶液。第 7 周末开始,两组大鼠平均体重持平, (235.00 ± 15.36 Vs 235.63 ± 12.95 g, $P > 0.05$)。从第 10 周末开始,肝硬化 B 组大鼠平均体重超过肝硬化 A 组 (256.18 ± 17.00 g Vs 245.50 ± 9.89 g, $P < 0.05$)。至造模结束,肝硬化 A 组有 2 只大鼠接受了 0.06% 的高

浓度 TAA 溶液。

2.4 门静脉测压结果

肝硬化 A 组和 B 组大鼠的门静脉压力明显高于正常对照组大鼠。肝硬化 A 组大鼠门静脉压力较 B 组大鼠明显增高。

附表 3 组大鼠门静脉测压结果

Attached table. Measuring values of portal vein pressure in the rats of the three groups

组别	例数	门静脉压力值(cmH ₂ O)
正常对照组	10	10.89 ± 1.42
肝硬化 A 组	20	$21.73 \pm 1.28^*$
肝硬化 B 组	15	$18.25 \pm 0.81^{**}$

注:与正常组比较 * $P < 0.01$,与肝硬化 A 组比较 * $P < 0.01$

Notes: Compared with normal group, * $P < 0.01$; Compared with cirrhosis group A, * $P < 0.01$.

3 讨论

3.1 肝硬化门脉高压症动物模型的一般制作方法

一种良好的疾病动物模型应尽可能模拟人类疾病的病理状态,且形成率高、死亡率低、造模方法简便易行。由于大多数人类门脉高压症患者同时存在肝硬化,所以门脉高压症动物模型也应复制肝硬化肝组织病理改变、肝功能损害的表现。目前门脉高压症的动物模型常用方法有:①药物作模型法:四氯化碳;硫代乙酰胺②手术作模型法:缩窄门静脉主干;门腔静脉吻合;缩窄胆总管;门静脉内注射血管阻塞物;门静脉内注射大肠杆菌。这些方法各有优缺点。肝毒性药物形成的肝硬化最稳定,且不能逆转,停药后 1~3 周,血浆中肝毒性药物即可基本代谢完全^[1,2],不影响随后的实验结果。但成模周期比较长,死亡率高,约为 30%,肝毒性药物可能对操作者造成危害并污染环境。而其他方法或与临床肝炎后肝硬化不符,或不能同时具备肝脏纤维化和门脉高压症两方面的病理特征,或成模率较低等种种缺点。

3.2 我们将手术和药物结合在一起,并根据体重调节给药浓度,成功构建了肝硬化门脉高压大鼠模型。

3.2.1 阻断经左肾上腺静脉的自然分流途径。门脉高压食管静脉曲张的形成受门静脉压力高低及流经食管静脉血流量的影响。近年来对大鼠解剖结构的研究发现,大鼠左肾上腺上、下静脉粗大。门脉高压时,部分肠系膜前静脉血液分别可由此经膈下静脉和左肾静脉流入腔静脉^[3]。因此动物单纯给予肝毒性药物,肝硬化形成明显,但食道静脉曲张等并发症却不明显,需要附加手术操作切断该自然分流途径,使门静脉压力更加增高,经食道静脉的分流血量增加,从而使食道胃底区静脉高压状态更为明显。国内周丁华^[4]等证实,先行手术阻断该自然分流通路,再给予四氯化碳腹腔注射,可使 60% 的大鼠出现食道静脉曲张。我们的实验结果也证实,手术结扎左肾上腺下静脉组大鼠的门静脉压力明显高于单纯 TAA 给药组。

有作者认为须钝性游离左肾静脉及左肾周围脂肪囊,使之去血管化,以彻底切断门静脉与左肾静脉之间的交通枝^[4]。我们认为左肾动、静脉之间相贴紧密,不易分开,沿左肾静脉游离过多易损伤左肾动、静脉。同时对左肾周围组织做过多的操作,一是加重大鼠创伤、延长了麻醉时间,术后大鼠死亡

几率增加;二是术后大鼠左肾周围创伤修复形成新的增生血管,可成为新的侧枝循环。

3.2.2 给予肝毒性药物促使肝硬化形成:目前最常用的药物有四氯化碳、TAA、乙醇等。我们认为 TAA 口服给药是最适宜的方式。TAA 在体内代谢为硫氢化合物,影响蛋白合成及肝细胞中酶的代谢,引起肝细胞膜损害致肝细胞坏死。用饮用水稀释 TAA 诱导大鼠肝硬化模型的方法,简单可靠,无创伤,肝硬化形成率高,在组织学和生化代谢的变化上与各种病因引起的人类肝硬化改变很相似^[5]。我们的试验结果中,肝脏大体及病理切片都符合肝硬化的改变,亦证实 TAA 是制造肝硬化大鼠模型的理想药物。

3.2.3 根据大鼠体重调节给药浓度:大鼠给予肝毒性药物后肝细胞不断坏死、修复、增殖到形成纤维化,是一个长期的过程,分为变性坏死期、纤维增生期、假小叶形成期^[6]。过分的增大药物剂量试图缩短造模过程,势必会造成造模过程中大量动物死亡,且浓度过高,大鼠会拒饮。给药时间也不能无限期延长,TAA 是一种癌变诱导剂,文献报道持续给药 16 周可形成肝硬化模型,而 24 周则可形成肝癌模型^[7]。而且由于大鼠的个体差异,对 TAA 的耐受力不同,饮用 TAA 溶液后肝功能受损程度也不同,即使是近交系大鼠也不能避免^[8]。在给药过程中大鼠体重变化反映了大鼠肝功能状况和进食状态,我们参照 Li X 等^[9]的经验,对 TAA 的投放,采用了个体化的原则,根据体重变化调节 TAA 浓度,并将给药时间由 12 周增至 14 周,同样使造模过程中大鼠死亡率为 0,并将成模率由 90% 提高至 100%。

我们在实验中发现,多数大鼠在给药第 1~3 周体重会明显下降,至第 4~5 周体重才缓慢增加。肝硬化 A 组大鼠在第 1~3 周时部分大鼠需降低给药浓度,度过这段时间后,大鼠对 TAA 的耐受力提高,再根据体重变化提升 TAA 的给药浓度。造模后期,部分大鼠接受了高达 0.06% 浓度的 TAA 溶液。肝硬化 B 组大鼠,给药过程中体重差距逐步增大,造模后期部分大鼠体重持续增加,远超过同组其他大鼠。部分大鼠体重持续下降,降至 160g 左右死亡。这也初步反映了在造模过程中,肝脏由变性坏死到逐步修复代偿形成肝硬化门脉高压的进

程。

综上所述,我们参照前人的研究成果,并加以改进。1.在给予肝毒性药物前,对大鼠左肾上腺静脉结扎,阻断了肝硬化形成后由此途径的门脉系统分流,使门静脉压力更加增高。同时,手术具有操作简单、创伤小的优点。2.对大鼠肝毒性药物 TAA 的投放,采用了个体化的原则。大鼠每日的饮水量是相对固定的,调整饮水 TAA 浓度,即可调节大鼠每日 TAA 摄入量。这就克服了由于动物对药物敏感度的个体差异造成的肝硬化形成率低和制模过程中动物因肝功能衰竭死亡的问题。实验结果满意,达到预期目的。

参考文献

- [1] Niederberger M, Gines P, Martin PY, et al. Comparison of vascular nitric oxide production and systemic hemodynamics in cirrhosis versus prehepatic portal hypertension in rats[J]. *Hepatology*, 1996, 24(4): 947 - 951
- [2] Kaibori M, Kwon AH, Nakagawa M, et al. Stimulation of liver regeneration and function after partial hepatectomy in cirrhotic rats by continuous infusion of recombinant human hepatocyte growth factor[J]. *J Hepatol*, 1997, 27: 381 - 390
- [3] 周丁华, 应大君, 朱楚洪, 等. 复制大鼠门脉高压食管静脉曲张模型的解剖基础[J]. *解剖学杂志*, 1999, 22(2): 109 - 111
- [4] 周丁华, 应大君, 肖凌云, 等. 大鼠肝硬化门脉高压症模型建立方法改进[J]. *中国普外基础与临床杂志*, 2000, 7(1): 22 - 24
- [5] Dashti H, Jeppsson B, Hagerstrand I, et al. Thioacetamide - and carbon tetrachloride - induced liver cirrhosis[J]. *Eur Surg Res*, 1989, 21(2): 83 - 91
- [6] 韩德五, 马学慧, 赵元昌. 肝硬化动物模型的研究[J]. *山西医药杂志*, 1979, 4(1): 1 - 6
- [7] Porter WR. TAA - induced hepatic necrosis[J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 1979, 208(1): 386
- [8] Proctor E, Chatamra K. High yield micronodular cirrhosis in the rat[J]. *Gastroenterology*, 1982, 83(6): 1183 - 1190
- [9] Li X, Benjamin IS, Alexander B. Reproducible production of thioacetamide - induced macronodular cirrhosis in the rat with no mortality [J]. *J Hepatol*. 2002, Apr; 36(4): 488 - 493

附图

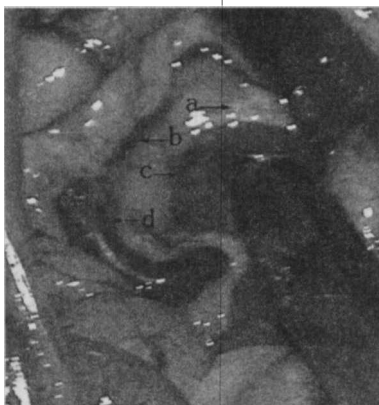


图 1-1 大鼠腹腔解剖: a 为左肾上腺, b 为左肾上腺静脉, c 为左肾, d 为左肾静脉

Fig 1-1 Abdominal cavity anatomy for rats: (a) Left adrenal gland; (b) Vein of left adrenal gland; (c) Left kidney; (d) Vein of left kidney.

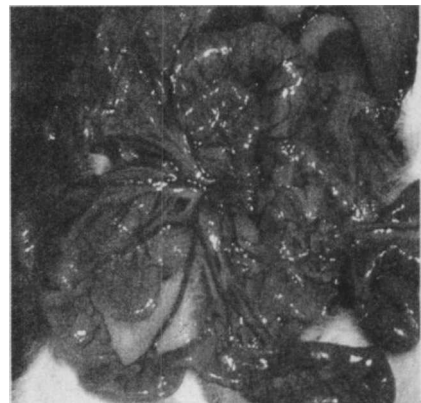


图 1-2 肝硬化大鼠肠系膜静脉充盈淤血

Fig 1-2 Filling passive congestion of intestinal mesentery veins in cirrhosis rats

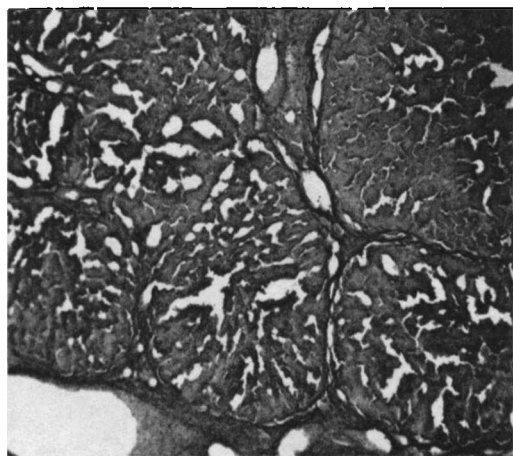


图 1-3 大鼠肝硬化肝脏 HE 染色 ×400 倍

Fig 1-3 HE staining (×400) for rats with cirrhosis of liver

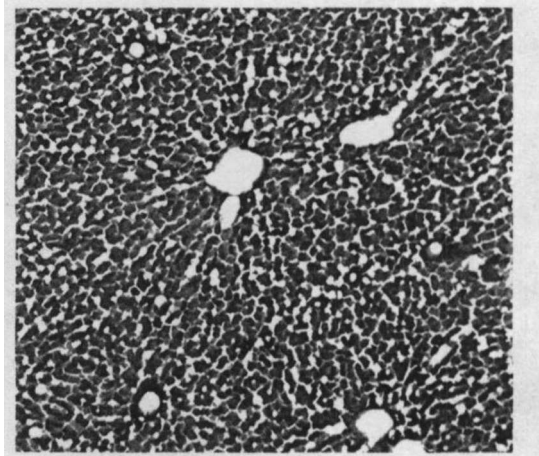


图 1-4 大鼠正常肝脏 HE 染色 ×400 倍

Fig 1-4 Liver HE staining (×400) for healthy rats

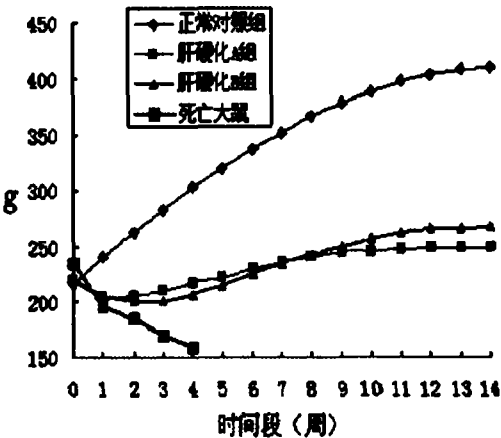


图 1-5 3 组大鼠体重变化曲线

Fig 1-5 Weight changes curve for the three groups of rats

(上接第 47 页)

参 考 文 献

[1] 中国科学院植物志编辑委员会.中国植物志[M]:第 20 卷第 1 分册.北京:科学出版社,1998:1-10

[2] 湖北省植物研究所.湖北植物志[M]:第 1 卷.武汉:湖北人民出版社,1958:229-230

[3] 中国科学院华南植物研究所.海南植物志[M]:第 1 卷.北京:科学出版社,1964:385-394

[4] 巩忠福,杨国林,严作廷,谢家声.蓼属植物的化学成分与药理学活性研究进展[J].中草药,2002,33(1):82-84

[5] 任光友,常凤岗.石菖蒲的药理研究[J].中国中药杂志,1995,20(2):107-109

[6] 何文胜.紫外分光光度法测定脑灵胶囊中银杏黄酮的含量[J].海峡药学,2002,14(2):37-38

[7] 毛丽珍,徐世芳.蜂胶口服液中黄酮类化合物的测定[J].中草药,1998,29(4):231-232

[8] 缪珊,施新猷.辣蓼的抑菌抗炎实验研究[J].中国新医药,2004,3(2):29-31