

·实验研究 Experimental research·

应用介入技术建立猪肝硬化门脉高压模型的
实验研究

王 磊, 刘福全, 岳振东, 赵洪伟

【摘要】 目的 构建肝硬化动物模型并分析其病理学改变,探讨介入技术建立肝硬化模型的可行性与科学性。**方法** 将 30 头健康雄性贵州香猪分为实验组 A 10 头和实验组 B 10 头,分别采用四氯化碳腹腔注射法和肝动脉乙醇注入法构建肝硬化门脉高压症动物模型,另外 10 头作为对照组。**结果** 实验组 A 和实验组 B 成模平均时间分别为 12 周和 6 周,成模率分别为 80%和 100%。动物模型的门脉压力,对照组为 (8.2 ± 2.3) cm 水柱,实验组 A 为 (12.4 ± 2.2) cm 水柱,实验组 B 为 (12.6 ± 2.1) cm 水柱,实验组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。**结论** 采用介入技术向肝动脉内灌注乙醇优于腹腔注射四氯化碳造模法,具有造模创伤小,全身损害轻、可重复性强、操作简单、病理表现及分期明显的优点,可以建立较为理想的肝硬化动物模型。

【关键词】 肝硬化;介入;门静脉高压;动物模型

中图分类号:R575.2 文献标志码:B 文章编号:1008-794X(2012)-09-0756-04

The establishment of liver cirrhosis along with portal hypertension model in experimental pigs by using interventional technique WANG Lei, LIU Fu-quan, YUE Zhen-dong, ZHAO Hong-wei. Department of Interventional Radiology, Affiliated Beijing Shijitan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100038, China

Corresponding author: LIU Fu-quan, E-mail: lfuquan@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To establish the liver cirrhosis along with portal hypertension model in experimental pigs by using interventional technique, to analyze its pathological changes, and to discuss the feasibility and rationality of this technique. **Methods** A total of 30 healthy Guizhou male pigs were divided into three groups: study group A ($n = 10$), study group B ($n = 10$) and control group ($n = 10$). Pigs in study group A received intraperitoneal injection of CCL_4 and pigs in study group B received hepatic artery injection of alcohol in order to establish the models of liver cirrhosis complicated by portal hypertension. **Results** The average time for the establishment of model was 12 weeks in group A and 6 weeks in group B, and the model success rate was 80% and 100% respectively. The portal pressure of animal models in the control group was (8.2 ± 2.3) cm H_2O , which was (12.4 ± 2.2) cm H_2O in study group A and was (12.6 ± 2.1) cm H_2O in study group B. Statistically significant difference in portal pressure existed between the control group and both study groups ($P < 0.05$). **Conclusion** For the establishment of liver cirrhosis along with portal hypertension model, hepatic arterial injection of alcohol is superior to intraperitoneal injection of CCL_4 . The technique of hepatic arterial injection of alcohol is minimally-invasive, easily manipulated and highly repeatable with less damage to the body. Besides, the models demonstrate clear pathologic features and staging. (J Intervent Radiol, 2012, 21: 756-759)

【Key words】 cirrhosis; intervention; portal hypertension; animal model

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2012.09.013

作者单位:100038 北京 首都医科大学附属北京世纪坛医院
介入治疗科

通信作者:刘福全 E-mail: lfuquan@yahoo.com.cn

各种原因引起的肝硬化门静脉高压症是威胁人类健康的重要疾病之一。目前对此类疾病的研究及相关药学实验主要建立在肝硬化动物模型基础上,因此,构建一种稳定、可复制、便捷和仿真性强

的肝硬化动物模型是研究的必要条件。本实验采用肝动脉乙醇注射及四氯化碳(CCl_4)腹腔注射两种方法构建肝硬化门脉高压症动物模型,实验结果满意,报道如下。

1 材料和方法

1.1 一般资料

实验动物采用 30 头健康雄性贵州香猪,将动物分为对照组 10 头,实验组 20 头。实验组再分为 A 亚组 10 头和 B 亚组 10 头,分别采用 CCl_4 腹腔注射法和肝动脉乙醇注入法构建肝硬化门脉高压症动物模型。

1.2 方法

1.2.1 构建肝硬化门脉高压症动物模型成模标准

以对照组各项数据和指标为本实验的正常数据和指标;当实验动物门脉压力显著高于对照组时为造模成功标准;采用增强 CT 观察实验组出现的肝硬化迹象;根据 Madden 分级法^[1],动物模型肝组织活检病理学达到Ⅲ度和Ⅳ度时为造模成功标准。

1.2.2 动物模型构建过程 实验组 A 采用 50% CCl_4 花生油溶液(体积比 1:1)配制腹腔注射液, CCl_4 剂量为 0.25 ml/kg,于清晨空腹称完体重后腹腔注射,1 周 3 次,每天早、中、晚 3 餐给予普通猪饲料喂养。实验组 B 在全麻下经皮股动脉或髂外动脉穿刺插管,经导管向左右肝动脉主干内注射 55%乙醇 1 ml/kg(图 1),术后 10 d 行肝脏 CT 检查,CT 显示肝脏密度均匀,再次对该动物进行与第 1 次完全相同的肝动脉灌注乙醇,CT 显示肝脏密度不均匀,按预先设好的时间检查和处死动物。术后第 4、5、6、7、8、9、10、11、12 周所有实验组及对照组均行腹部超声检查,若发现肝硬化迹象即再行增强 CT 检查,然后全麻下开腹测量门静脉压力[测压装置由输液器及三通改造而成(图 2)],若门静脉压力差异显著,肝脏肉眼观察缩小、色黄,肝脏表面有小结节形成,质地较硬,即处死取肝脏组织行病理检查。与此同时处死比例相当的对照组猪,与实验组行同样的操作。

1.3 统计学方法

所有数据处理均采用 SPSS13.0 统计软件分析完成, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

在整个实验过程中,A 组有 2 头于实验开始后 2 周死亡,死亡原因为小肠痿所致的严重腹腔感染,

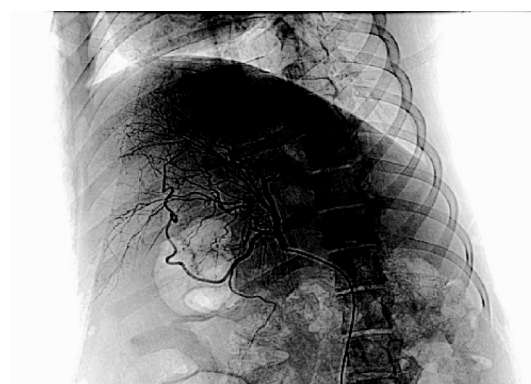


图 1 经肝动脉造影并灌注 55%乙醇



图 2 自设计门静脉测压装置三通一端接猪尾导管测压

未见肝硬化迹象。存活的 28 头列入统计。造模过程中 A 组因 CCl_4 毒副作用出现不同程度的厌食、呕吐、腹泻现象,B 组与对照组相比未见明显异常表现。

2.2 实验动物肝脏病理变化

2.2.1 大体病理 对照组肝脏质地柔软光滑,切面呈红褐色。门脉系统的肠系膜、网膜及胃周静脉细小,无曲张表现。实验组成模时的肝脏缩小、色黄,肝脏表面有少量脓泡及大量小结节(菠萝肝),质地硬(图 3)。肠系膜、胃周网膜等处、门脉系统等处静脉有不同程度明显曲张。

2.2.2 镜下病理 对照组肝脏汇管区清楚,肝窦轮辐状分布,肝细胞呈多面体形,核呈卵圆形,核膜清晰。实验组成模时肝脏肝窦明显扩张充血,肝细胞明显水肿,汇管区增宽,纤维细胞增生明显并有假小叶形成(图 4)。根据 Madden^[1]肝组织病理分级法,A 组成模时 8 头中有 3 头达到Ⅲ度,5 头达Ⅳ度;B 组 10 头中 2 头达Ⅲ度,8 头达Ⅳ度。

2.2.3 成模时间和成模率及门静脉压力变化 A、B 组成模平均时间分别为 6 周和 12 周,成模率分别为 80%和 100%。动物模型的门脉压力在对照组为

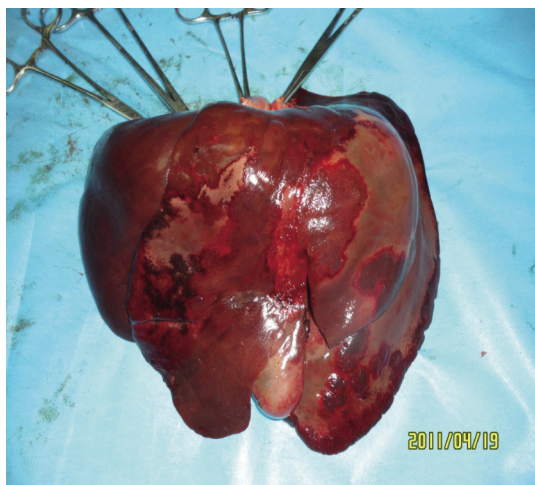


图3 成模后肝脏大体病理表现

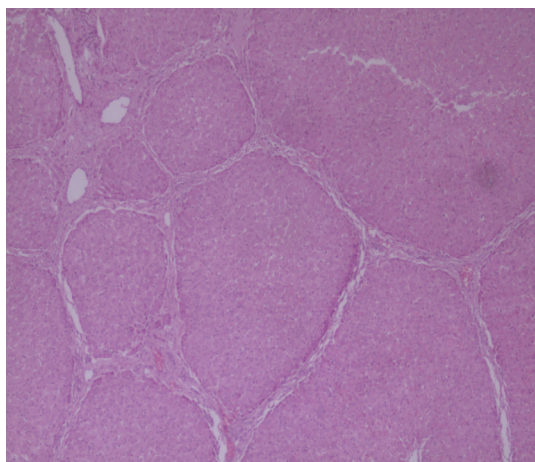


图4 成模后镜下见假小叶形成(HE, × 100)

(8.2 ± 2.3) cm 水柱, A 组为 (12.4 ± 2.2) cm 水柱, B 组为 (12.6 ± 2.1) cm 水柱, 实验组与对照组比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 造模方法的选择

理想的肝硬化动物模型应具备如下条件: ①最大程度的模拟人类肝硬化的发病过程, 且其病理进展分期明显; ②造模方法简单, 可重复性高; ③造模率高, 动物死亡少; ④尽可能的减少对动物的损伤; ⑤对人体及环境无危害, 环境污染少; ⑥便于外科、介入、微创手术操作, 以利用模型进一步研究^[2]。肝硬化最主要的病因为肝炎病毒感染, 而我国绝大部分肝病患者为乙型肝炎(乙肝)病毒感染, 因此人乙肝病毒感染的动物模型, 毫无疑问是最理想的肝硬化动物模型。然而, 由于人乙肝病毒只能感染人和少数灵长类动物, 所以长期以来缺乏实际可用的动物模型, 目前国内外大多以化学和复合等因

素制备肝硬化模型。构建肝硬化模型的方法很多, 主要可分为单因素造模和多因素造模。单因素造模方法有 CCl_4 、乙醇性、胆总管结扎致胆汁性等^[3]。多因素造模即将以上某两种或两种以上因素联合应用^[4], 其中以 CCl_4 的造模方法最为常用^[5]。本研究通过对比研究两种不同的造模方法, 以得到更为理想的造模手段。

3.2 造模方法的作用机制

在制作 CCl_4 诱导性肝硬化模型时, 最常见的给药方式是口服法和腹腔内注射法。自 Cameron 和 Karunaratne^[6]首次报道应用 CCl_4 制作肝硬化动物模型后, CCl_4 法被广泛地用于制作动物模型。其作用机制是: CCl_4 通过肝微粒体细胞色素 P450 氧化酶激活后, 产生自由基- CCl_3 - CCl_3 与肝细胞内大分子发生共价结合, 破坏肝细胞功能。此外, 由于内质网受损可导致脂蛋白合成障碍, 使三酰甘油和脂肪酸在肝细胞内蓄积, 形成脂肪变性。由此, 长时间的给药促使肝脏慢性损伤, 最终导致肝硬化形成^[7], 但由于 CCl_4 的毒副作用较大容易造成并发症的产生而影响成模率, 并且 CCl_4 对于实验者存在一定的潜在风险, 腹腔注射 CCl_4 法一般成模时间为 12 ~ 15 周, 时间相对较长。肝脏是乙醇在机体内代谢的主要场所, 通常慢性乙醇中毒可引起肝脏的 4 种序贯性损伤, 即脂肪肝、酒精性肝炎、酒精性肝纤维化和酒精性肝硬化。研究发现乙醇在肝内代谢过程中, 肝细胞内 NADH/NAD^+ 比率增高、自由基大量产生、活性氧簇系统高度活化、脂质过氧化及脂肪积蓄, 这些生化改变可引起肝细胞的脂肪变性、坏死等, 最终导致纤维组织大量增生以及肝硬化^[8]。采用介入技术肝动脉分支灌注乙醇的方法通过实验证明具有明显的优势: ①微创技术, 对动物的损伤小, 可重复操作; ②全身毒副反应轻; ③成模时间短; ④无环境污染; ⑤实验动物死亡率低等。Avritscher 等^[9]在猪的肝动脉内单次注射碘化油和乙醇比例为 3 : 1 的栓塞剂, 研究者发现栓塞后 2 周肝体积变大, 栓塞后 6 ~ 8 周肝静脉压力梯度较术前明显增加, 组织病理学显示纤维间隔和假小叶再生结节。

3.3 造模动物的选择

肝硬化动物模型的选择有很多种, 对于不同的研究目的, 可以选择不同的动物模型, 大鼠、小鼠由于血样少, 不宜同时做多项指标测定, 更不利于外科、介入、微创手术的操作, 最重要的是与人体解剖、生理生化正常值、疾病的发展过程等相差甚远^[10]。也有学者用犬、猴子等大动物建立肝硬化门脉高压模

型,但人与犬的门体间侧支循环有很大差别,如犬的经颈静脉肝内门体分流道连接的是下腔静脉和门静脉。而猴子作为灵长类动物,较少用于动物实验研究。目前,小型猪肝硬化动物模型的研究少见报道,与鼠、兔及犬等其他动物相比,小型猪具有以下 6 项优点:① 解剖结构及疾病的发展、转归更接近人类;② 饲养简单;③ 血容量大,便于多次采集多项指标;④ 肝脏大小适中,便于取材;⑤ 对实验耐受性强;⑥ 解剖结构清晰易于操作。综上所述,应用血管内微创技术模拟肝炎肝硬化病理学改变建立猪的肝硬化模型不仅可以推动肝硬化门静脉高压症病理生理学和血流动力学等基础研究的进展,同时也可能为门静脉高压症内科、外科治疗术及经颈静脉肝内门体分流术后支架再狭窄、肝性脑病的研究提供更好的研究平台,很有必要在国内率先开展有关应用血管内微创技术模拟肝炎肝硬化病理学改变建立猪肝硬化模型的研究。

[参考文献]

- [1] Madden JW, Gertman PM, Peacock EE Jr. Dimethylnitrosamine-induced hepatic cirrhosis: a new canine model of an ancient human disease[J]. Surgery, 1970, 68: 260 - 267.
- [2] Lin D, Wu X, Ji X, et al. A novel canine model of portal vein stenosis plus thioacetamide administration-induced cirrhotic portal hypertension with hypersplenism [J]. Cell Biochem Biophys, 2012, 62: 245 - 255.
- [3] Popov Y, Sverdlov DY, Bhaskar KR, et al. Macrophage - mediated phagocytosis of apoptotic cholangiocytes contributes to reversal of experimental biliary fibrosis [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2010, 298: G323 - 334.
- [4] Wang L, Potter JJ, Rennie - Tankersley L, et al. Effects of retinoic acid on the development of liver fibrosis produced by Carbon tetrachloride in mice [J]. Biochim Biophys Acta, 2007, 1772: 66 - 71.
- [5] Domenicali M, Caraceni P, Giannone F, et al. A novel model of CCl₄-induced cirrhosis with ascites in the mouse [J]. J Hepatol, 2009, 51: 991 - 999.
- [6] Cameron CR, Karunaratne WAE. Carbon tetrachloride cirrhosis in relation to liver regeneration [J]. Path Bact, 1936, 42: 1 - 21.
- [7] Abiralde JG, Albillos A, Bañares R, et al. Simvastatin lowers portal pressure in patients with cirrhosis and portal hypertension: a randomized controlled trial [J]. Gastroenterology, 2009, 136: 1651 - 1658.
- [8] Weber SN, Wasmuth HE. Liver fibrosis: from animal models to mapping of human risk variants [J]. Best Pract Res Clin Gastroenterol, 2010, 24: 635 - 646.
- [9] Avritscher R, Wright KC, Javadi S, et al. Development of a large animal model of cirrhosis and portal hypertension using hepatic transarterial embolization: a study in swine [J]. J Vasc Interv Radiol, 2011, 22: 1329 - 1334.
- [10] Geerts AM, Vanheule E, Praet M, et al. Comparison of three research models of portal hypertension in mice: macroscopic, histological and portal pressure evaluation [J]. Int J Exp Pathol, 2008, 89: 251 - 263.

(收稿日期:2012-01-10)

(本文编辑:侯虹鲁)