

·实验研究 Experimental research·

通过置入支架建立大鼠肝内门体分流模型

张 晗, 肖江强, 韩 浩, 乔香梅, 赵 思, 诸葛宇征

【摘要】 目的 通过置入支架建立大鼠肝内门体分流模型。**方法** 将 25 只雄性 SD 大鼠随机分为分流手术组 15 只,假手术组 10 只。分流手术组大鼠行腹部正中切口后暴露门静脉并穿刺,穿刺成功后经该途径肝内穿刺肝背段下腔静脉,并利用穿刺针引导,将自制支架置入肝内连接门静脉及下腔静脉,建立门体分流道。假手术组仅行开腹、关腹操作。术后通过门静脉内置管行直接门静脉造影,观察分流道通畅情况,并于术后 2 h 及 4 d 行腹部 B 超,监测支架内血流速度,术后第 3 天取大鼠外周血完成血常规、肝功能、血氨等检查。**结果** 分流手术组大鼠术后存活 14 只,术后即时直接门静脉造影,见大鼠门脉主干及肝上下腔静脉几乎同时显影,术后 2 h 超声结果提示,8 只手术成功。其中支架在位的 8 只大鼠中,6 只支架血流通畅,血流速度 22~68 cm/s,术后 4 d 超声结果提示支架均未移位,但术后 2 h 支架通畅的 6 只大鼠中仅有 1 只大鼠支架仍保持通畅,其余支架内均形成完全血栓。分流手术组与假手术组间术后 3 d 的 ALT、AST、总胆汁酸(TSA)、血红蛋白及血小板计数差异均无统计学意义(均 $P>0.05$),但白细胞及血氨水平分流手术组显著高于假手术组(均 $P<0.05$)。**结论** 通过开腹后直接穿刺大鼠门静脉置入肝内门体分流支架是安全可行的。

【关键词】 大鼠;肝内门体分流;动物模型

中图分类号:R657.3 文献标志码:A 文章编号:1008-794X(2023)-08-769-05

A rat model of intrahepatic portosystemic shunt established by stent implantation ZHANG Han, XIAO Jiangqiang, HAN Hao, QIAO Xiangmei, ZHAO Si, ZHUGE Yuzheng. Department of Gastroenterology, Affiliated Nanjing Drum Tower Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing, Jiangsu Province 210008, China

Corresponding author: ZHUGE Yuzheng, E-mail: yuzheng9111963@aliyun.com

【Abstract】 Objective To establish a rat model of intrahepatic portosystemic shunt by using stent implantation method. **Methods** A total of 25 male SD rats were randomly divided into portosystemic shunt group(group A, $n=15$) and sham operation group(group B, $n=10$). For the experimental rats of group A, the portal vein was exposed and punctured after a median abdominal incision was made, which was followed by the puncturing of the hepatic dorsal inferior vena cava, then under the guidance of the puncture needle a self-made stent was inserted into the liver to establish a portosystemic shunt. For the experimental rats of group B, only laparotomy and abdominal closure were carried out. Postoperative direct portal venography was performed to check the patency of the shunt channel. Abdominal ultrasonography was performed at 2 hours and 4 days after operation to determine the in-stent blood flow velocity. On the third day after operation, the peripheral blood sampling was made to complete the examinations of blood routine, liver function, blood ammonia, etc. **Results** In group A, the postoperative overall survival rate was 93.3% (14/15), and the direct portal angiography immediately after surgery showed that visualizations of the main portal vein and hepatic vena cava were almost simultaneously observed. Ultrasonography performed 2 hours after the operation showed that successful surgery was accomplished in 8 rats. Of the 8 rats in which the implanted stent was in right place, the stent blood flow was unobstructed in 6, and the blood flow velocity ranged from 22 cm/s to 68 cm/s. The

DOI:10.3969/j.issn.1008-794X.2023.08.009

基金项目:国家自然科学基金(8210032706)

作者单位:210008 江苏南京 南京大学医学院附属鼓楼医院消化内科(张 晗、肖江强、赵 思、诸葛宇征), 超声诊断科(韩 浩、乔香梅)

通信作者:诸葛宇征 E-mail: yuzheng9111963@aliyun.com

postoperative 4-day ultrasonography revealed that none of the stents were displaced, but of the 6 rats showing unobstructed stent at 2 hours after surgery only in one rat the stent remained unobstructed, and in all the other rats a complete thrombus was formed within the stents. No statistically significant differences in ALT, AST, total bile acids (TBA), hemoglobin and platelet count existed between group A and group B (all $P>0.05$), while the white blood cell count and blood ammonia level in group A were significantly higher than those in group B (both $P<0.05$). **Conclusion** It is safe and feasible to establish a rat model of intrahepatic portosystemic shunt by using stent implantation through direct puncture of portal vein after laparotomy. (J Intervent Radiol, 2023, 32: 769-773)

【Key words】 rat; intrahepatic portosystemic shunt; animal model

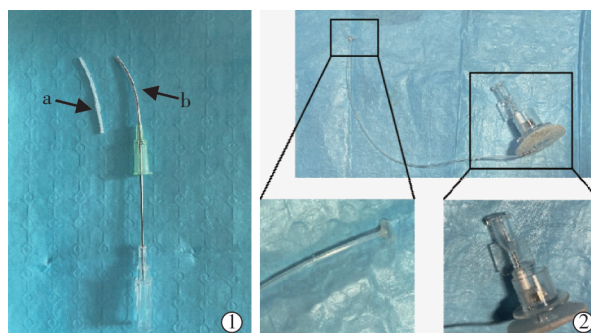
经颈静脉肝内门体分流术(transjugular intrahepatic portosystemic shunt, TIPS)已成为降低肝硬化或其他原因导致的门静脉高压的重要手段^[1-7]。随着门脉压力的降低,患者食管胃底静脉曲张出血的风险降低,同时肠道的功能也有明显改善^[8]。由于缺乏肝内门体分流在动物模型中的有效复制,手术诱导的具体病理生理改变仍不明确。常用的门腔分流模型端侧门腔静脉吻合术(portocaval anastomosis, PCA)主要用于诱导肝性脑病及肝脏损伤^[8-10]。然而,血管阻断时间长、分流血流不可控、手术要求高等因素阻碍了该术式的应用,且其具有与肝内门体分流不同的血流动力学特点。虽然已有在猪、狗等大型哺乳动物中 TIPS 手术成功的报道^[11-12],但大型动物的实验成本较高,且存在伦理方面的限制。本研究采用支架置入的方法建立大鼠肝内门体分流模型,并评估该模型的成功率及可行性。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料

雄性 SD 大鼠 25 只,购自北京维通利华实验动物技术有限公司。6~8 周龄,体质量 250~300 g,自由饮水及摄食,饲养温度为 $(24\pm3)^{\circ}\text{C}$ 、湿度为 $(50\pm10)\%$,保持昼夜节律。按照简单随机抽样法将大鼠分为 2 组,分流手术组 15 只,假手术组 10 只。本实验根据赫尔辛基宣言使用动物,对动物进行护理,已获南京大学医学院附属鼓楼医院伦理委员会批准。

自制大鼠门体分流手术支架穿刺套装(图 1①),支架 a 和推送套 b 覆盖在穿刺针表面,支架内径 0.8 mm,外径 1.27 mm,长度 1 cm,为增加支架的通畅性,支架前端管壁上有若干侧孔,门脉置管系统(图 1②)。BL-420 生物信号采集系统(泰盟软件有限公司,成都)、B 超(GE Healthcare LOGIQ E9,美国)、Philips FD20 DSA 系统。

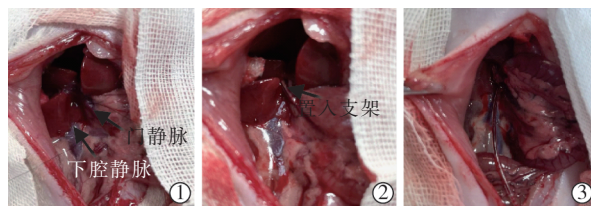


①自制大鼠门体分流手术带支架穿刺套装(a 为塑料支架,b 为推送套);②门脉造影导管

图 1 大鼠肝内门体分流术中所用自制支架及门脉造影导管

1.2 大鼠肝内门体分流模型的建立

大鼠禁食 12 h,腹腔内注射 1%戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉,去除腹部被毛,常规消毒手术区域。大鼠仰卧位固定,取上腹部正中切口,逐层进腹,将肠管用棉签推置于铺好的消毒纱布上,暴露并游离门静脉主干,以自制穿刺套装穿刺门静脉,根据下腔静脉走行,通过门静脉经肝实质盲穿肝背段下腔静脉,沿穿刺针芯送入支架,支架两端分别位于门静脉端及肝背段下腔静脉,血管夹夹闭门静脉远心端,缓慢拔出推送套及穿刺针,缝合穿刺点血管,缝合后血管基本无渗血及出血,打开夹闭门静脉的血管夹,手术过程如图 2 所示。假手术组大鼠,予以行腹部正中切口,并暴露、游离门静脉主干后关腹。



①做大鼠腹部正中切口,暴露门静脉及下腔静脉;②穿刺成功后沿穿刺针置入支架;③造影大鼠在置入支架后门脉放入造影导管

图 2 大鼠开腹肝内门体分流手术操作过程

1.3 术后处理

术后正常喂养,提供标准的实验室饲料和水。

术后直接门静脉造影:手术中置入支架为塑料支架,直接门静脉造影无法见支架显影,但可通过直接门静脉造影观察术后门脉血流动力学变化,术后分流手术组及假手术组各取 1 只大鼠,在缝合门静脉穿刺点前于门脉内置入造影导管,通过导管内注入造影剂在 X 线透视下进行直接门静脉造影,观察血流走向并摄片。

术后腹部超声检查:术后 2 h、4 d 行大鼠腹部超声检查,观察支架是否移位,支架内血流速度、有无血栓形成等。

1.4 血液标本检测

术后 3 d 抽取支架通畅大鼠血液标本,采用全自动分析仪检测血常规及 ALT、AST、总胆汁酸(TBA)和血氨水平。对 2 组大鼠术后的存活情况进行随访,随访时间为 2 周。

1.5 统计学分析

使用 SPSS 26.0 软件进行统计学分析。正态分布的计量资料以均数±标准差表示,两组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 手术并发症和生存情况

分流手术组中 1 只大鼠因支架置入过程中出血过多死亡,其余大鼠术中未出现明显并发症,术后 14 d 内,14 只大鼠均存活。假手术组 10 只大鼠均存活。

2.2 术后门静脉造影

术后门静脉造影可见分流手术组大鼠门脉主干及肝上下腔静脉同时显影,提示门脉血流通过支架直接进入下腔静脉中,假手术组注射造影剂后门脉及肝静脉逐渐显影,后期下腔及心脏显影(图 3)。

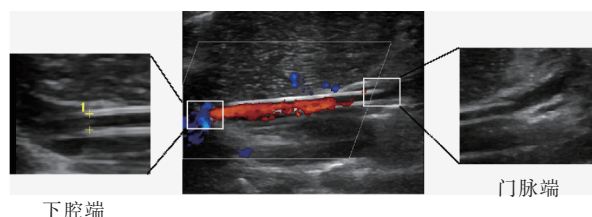
2.3 术后超声检查

术后 2 h 及 4 d 后行大鼠腹部超声检查确认支架位置并测定支架内血流速度。术后 2 h 腹部超声示,分流手术组 8 只大鼠支架在位,支架不在位的 6 只大鼠均未检测到支架内的血流信号,支架在位的 8 只大鼠中有 2 只支架内充满急性血栓,支架完全堵塞,未见血流信号,余 6 只可见门脉向下腔方向血流(图 4),血流速度如表 1 所示,但其中 4 只超声也可见支架内少量附壁血栓。术后 4 d,对血流通畅的 6 只大鼠再次行腹部 B 超检查,结果显示支架均未移位,仅 1 只大鼠支架内仍保持通畅血流,



①假手术组大鼠直接门静脉造影见肝脏内血管显影后,下腔静脉及心脏逐渐显影;②分流手术组大鼠支架植入后直接门静脉造影见门脉显影后肝背段下腔静脉几乎同时显影,提示支架在位,门脉内血流通过支架直接进入肝背段下腔静脉

图 3 术后直接门静脉造影示意图



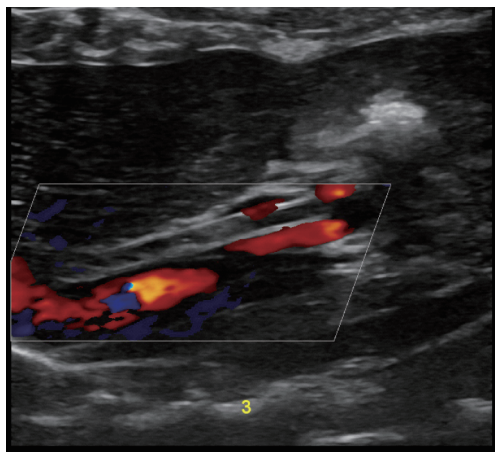
分流手术组大鼠术后 2 h 行腹部超声检查提示支架在位,支架一端位于门静脉中,另一端位于肝背段下腔静脉,血流通畅,流速约为 68 cm/s

图 4 大鼠术后 2 h 腹部超声图像

表 1 分流手术组大鼠术后存活及支架通畅情况

| 大鼠 | 术后是否存活 | 支架是否在位 | 支架内血流 (术后 2 h) | 支架内血栓 (术后 2 h) | 支架内血栓 (术后 4 d) |
|----|--------|--------|----------------|----------------|----------------|
| 1 | 存活 | 不在位 | 无血流 | / | / |
| 2 | 存活 | 不在位 | 无血流 | / | / |
| 3 | 存活 | 在位 | 无血流 | 完全血栓 | / |
| 4 | 存活 | 不在位 | 无血流 | / | / |
| 5 | 存活 | 在位 | 52.7 cm/s | 未见血栓 | 少量附壁血栓,血流较畅 |
| 6 | 存活 | 在位 | 44 cm/s | 可见小血栓 | 可见血栓,无血流 |
| 7 | 死亡 | / | / | / | / |
| 8 | 存活 | 不在位 | 无血流 | / | / |
| 9 | 存活 | 在位 | 无血流 | 急性血栓 | / |
| 10 | 存活 | 在位 | 22 cm/s | 急性血栓 | 完全血栓,未见血流 |
| 11 | 存活 | 不在位 | 无血流 | / | / |
| 12 | 存活 | 在位 | 68 cm/s | 未见血栓 | 血栓,少量血流 |
| 13 | 存活 | 不在位 | 无血流 | / | / |
| 14 | 存活 | 在位 | 24 cm/s | 轻度血栓 | 完全血栓 |
| 15 | 存活 | 在位 | 40 cm/s | 轻度血栓 | 血栓,少量血流 |

其余 5 只支架内均为大量血栓,基本无血流通过(图 5)。



分流手术组大鼠术后 4 d 行腹部超声检查提示支架附壁长满血栓, 支架内基本无血流通过

图 5 大鼠术后 4 d 腹部超声图像

2.4 术后血常规、肝功能及血氨水平变化

术后 3 d, 分流手术组大鼠白细胞计数为 $(14.6 \pm 3.8) \times 10^9/L$, 高于对照组的 $(5.6 \pm 0.3) \times 10^9/L$, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 提示术后大鼠存在炎症反应。分流手术组大鼠血红蛋白为 $(103.0 \pm 3.2) g/L$, 血小板计数为 $(939.8 \pm 122.5) \times 10^9/L$; 对照组血红蛋白为 $(117.0 \pm 23.5) g/L$, 血小板计数为 $(648.5 \pm 154.5) \times 10^9/L$, 差异无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。

术后 3 d, 分流手术组 (术后 2 h 超声提示支架通畅的 6 只大鼠) ALT 为 $(34.1 \pm 3.8) U/L$, AST 为 $(174.5 \pm 39.3) U/L$, TBA 为 $(19.8 \pm 5.3) \mu mol/L$; 对照组 ALT 为 $(38.4 \pm 0.3) U/L$, AST 为 $(104.5 \pm 12.5) U/L$, TBA 为 $(18.2 \pm 3.8) \mu mol/L$, 差异均无统计学意义 (均 $P > 0.05$)。分流手术组血氨为 $(318 \pm 62.9) \mu mol/L$, 对照组为 $(200 \pm 46.5) \mu mol/L$, 差异有统计学意义 ($P = 0.04$)。

3 讨论

大鼠肝脏为多叶结构 (6 个肝叶), 每叶均具有肝蒂, 与人的结构略有不同, 但其具有与人类似的 Glisson 系统和肝静脉系统。大鼠的肝左外叶与左内叶静脉汇合后形成肝左静脉, 中叶内含肝中静脉和肝右静脉, 肝左静脉、肝中静脉和肝右静脉开口位于肝背段下腔静脉, 构成大鼠第二肝门^[13]。虽然大鼠的肝静脉直径较细, 穿刺并置入支架难度大, 但肝背下腔静脉前壁与肝脏实质紧密相贴, 此处下腔静脉至门静脉分叉之间均穿行于肝实质中, 此种解剖结构特点为经门静脉穿刺下腔静脉提供了重要的解剖学基础。

相对于大型哺乳动物, 大鼠实现 TIPS 的难度明

显增加。大鼠的血管较细, 外周血管穿刺困难, 颈静脉入路很难实现, 有极高的穿刺技术要求并且需要设计专属的穿刺套装。为此本研究设计了开腹从门静脉入路穿刺下腔静脉的途径, 通过自行设计的门体分流术用带支架穿刺套装完成了穿刺, 同时进行支架置入的操作, 缩短了手术时间。由于支架为塑料支架, 无法在透射引导下进行穿刺, 故按照肝后段下腔静脉走行对下腔静脉肝背段进行盲穿, 手术的成功率相对较低, 但后续可在超声引导下进行穿刺以增加穿刺的成功率。本研究中术后支架内血栓形成率较高, 考虑与支架本身材料性质相关, 且支架内直径较小, 容易引起血液流速减慢, 进而形成血栓, 后续设计相应的金属覆膜支架可增加术后支架通畅率, 并可在术后适当予以抗凝治疗。大鼠门脉分支末端与下腔静脉肝背段解剖位置较为相近, 支架在肝实质内穿行距离相对较短, 且术后通过缝合穿刺点门脉血管壁, 减少了术后渗血。本研究中 15 只大鼠仅有 1 只在术中出现严重的肝脏血管破裂出血。后期实验如能在超声引导下选择合适的角度可更好地避免大血管及胆道的损伤, 增强手术的安全性。

TIPS 在大型哺乳动物中技术相对成熟, 手术中大多采用临床常用穿刺器械及覆膜支架。为缩短分流道两端静脉之间的距离, 减少肝脏损伤, 有研究提出改良式分流道建立的方法 (下腔静脉前壁直接穿刺门静脉)^[14], 该方法与本研究中的支架放置位置较为相似。在猪模型中, 改良 TIPS 术后 4 周的支架通畅率为 50%, 其与支架材料及手术的方式密切相关。在本研究中, 虽然支架保持通畅的时间较短, 但手术操作相对简单, 并可达到预期手术效果。在超声引导下操作, 并使用特制的金属覆膜支架后, 可提高手术的成功率并延长支架通畅时间。

有研究报道, 肝硬化患者经 TIPS 降低门脉压力后, 可显著改善肠道通透性, 减少内毒素进入门脉系统^[15], 但 TIPS 术后门脉压力变化对于肠道内皮细胞损伤及肠道内皮屏障完整性的影响鲜有研究。对于相关内容具体机制的研究涉及众多细胞成分、信号通路及基因表达的调节, 需要基因背景更清楚的动物模型。相对于大型哺乳动物, 大鼠的基因背景相对清晰, 且可实施的实验范围更加广泛, 因此, 建立简明易操作的大鼠肝内门体分流模型, 具有重要的科研价值。

本研究结果提示, 在大鼠开腹后, 通过穿刺门静脉置入肝内门体分流支架是一种安全、可行的方

法,这种方法相对颈静脉入路的门体分流手术,手术操作简单,动物死亡率低,同时可较好地构建肝内的门体分流通路。

[参 考 文 献]

- [1] Tripathi D, Stanley AJ, Hayes PC, et al. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt - shunt in the management of portal hypertension[J]. Gut, 2020, 69: 1173-1192.
- [2] Lv Y, Chen H, Luo B, et al. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt with or without gastro-oesophageal variceal embolisation for the prevention of variceal rebleeding: a randomised controlled trial[J]. Lancet Gastroenterol Hepatol, 2022, 7: 736-746.
- [3] Deltenre P, Zanetto A, Saltini D, et al. The role of transjugular intrahepatic portosystemic shunt in patients with cirrhosis and ascites: recent evolution and open questions[J]. Hepatology, 2023, 77: 640-658.
- [4] Walter A, Rudler M, Olivas P, et al. Combination of model for end-stage liver disease and lactate predicts death in patients treated with salvage transjugular intrahepatic portosystemic shunt for refractory variceal bleeding[J]. Hepatology, 2021, 74: 2085-2101.
- [5] Wang X, Luo X, Yang L. Achieving an effective pressure reduction after TIPS: the need for a new target[J]. J Hepatol, 2021, 75: 246-248.
- [6] 毕光荣, 张 勇, 陈旭昇. 经颈静脉肝内门体分流术联合胃冠状静脉栓塞术治疗门脉高压上消化道出血的临床疗效[J]. 介入放射学杂志, 2013, 22: 239-243.
- [7] Wang P, Qi X, Xu K. Progress, and prospects of research on transjugular intrahepatic portosystemic shunt applications [J]. J Interv Med, 2021, 4: 57-61.
- [8] Oria M, Chatauret N, Chavarria L, et al. Motor-evoked potentials in awake rats are a valid method of assessing hepatic encephalopathy and of studying its pathogenesis[J]. Hepatology, 2010, 52: 2077-2085.
- [9] Navarro-Gonzalez YD, Ventura-Juarez J, Munoz-Ortega MH, et al. Arginine vasopressin deficiency and conivaptan (a V1a-V2 receptor antagonist) treatment reverses liver damage and fibrosis in rats with chronic portocaval anastomosis[J]. Int J Exp Pathol, 2023: 25.
- [10] Kim D, Oh H, Ahn H, et al. Comparison of serum bile acid concentrations between maltese and other breeds of dogs with portosystemic shunt[J]. In Vivo, 2023, 37: 709-713.
- [11] Ma Y, Dong D, Gong Z, et al. Novel imaging-based approaches for predicting the hepatic venous pressure gradient in a porcine model of liver cirrhosis and portal hypertension[J]. Life Sci, 2021, 264: 118710.
- [12] Farsad K, Narasimhan E, Davies G, et al. Transjugular intrahepatic portosystemic shunt creation using a radiofrequency wire: acute feasibility study in swine[J]. J Vasc Interv Radiol, 2020, 31: 682-685.
- [13] 史冀华, 朱盛兴, 张水军. 大鼠肝部分切除术的应用解剖及实施[J]. 世界华人消化杂志, 2008, 16: 2516-2520.
- [14] 张曦彤, 徐 克, 姜 宏, 等. 经颈静脉肝内门体静脉内支架分流术术式改良的实验研究[J]. 中华放射学杂志, 2003, 37: 156-160.
- [15] Reiberger T, Ferlitsch A, Payer BA, et al. Non-selective betablocker therapy decreases intestinal permeability and serum levels of LBP and IL-6 in patients with cirrhosis [J]. J Hepatol, 2013, 58: 911-921.

(收稿日期: 2023-03-30)

(本文编辑: 新 宇)