

文章编号:1005-6947(2005)01-0032-04

· 实验研究 ·

95%肝切除与药物诱导大鼠急性肝衰竭模型的比较

陈钟^{1,2}, 黄华², 吴振宇², 祝文彩², 李根喜¹

(1 南京大学生命科学院 医药生物技术国家重点实验室, 江苏 南京 210093; 2 南通大学附属医院 肝胆外科, 江苏 南通 226001)

摘要:目的 探讨一种理想的大鼠急性肝衰竭(AHF)模型建立方法。方法 SD大鼠36只随机分为3组:(1)改良手术诱导组,切除约95%肝脏组织,术中经中叶肝静脉注入5%葡萄糖氯化钠溶液10ml/kg体重;(2)传统手术诱导组,术中不行中叶肝静脉穿刺注射5%葡萄糖氯化钠溶液,其余手术方法同改良手术组;(3)药物诱导组,给予D-氨基半乳糖(D-gal)1.2g/kg腹腔注射。观察手术死亡率、建模后24h大鼠存活率、血谷丙转氨酶(ALT)、血氨(NH₃)、总胆红素(TB)和血糖(BG)。结果 传统手术诱导组手术死亡率高于改良手术组死亡率(33.3%:0%),改良手术诱导组、传统手术诱导组、药物诱导组大鼠建模成功后24h存活率分别为0%,0%,25%,改良手术诱导组ALT和NH₃水平显著高于药物诱导组($P < 0.05$),TB和BG水平低于药物诱导组,但差异无显著性($P > 0.05$)。结论 通过改进的95%肝切除术可建立较理想的大鼠AHF模型,术中经中叶肝静脉注入5%葡萄糖氯化钠溶液可减少手术死亡率。

关键词:肝功能衰竭/化学诱导;肝切除术;氨基半乳糖/副作用;疾病模型,动物

中图分类号:R575.3;R363

文献标识码:A

Comparison of rat acute hepatic failure model induced by 95% hepatectomy and drug injection

CHEN Zhong^{1,2}, HUANG Hua², WU Zheng-yu², ZHU Wen-cai², Li Gen-xi¹

(1. School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China; 2. Department of Hepatobiliary Surgery, Affiliated Hospital, Nantong University, Nantong 226001, Chian)

Abstract: **Objective** To explore an ideal method of establishing a rat acute hepatic failure (AHF) model. **Methods** 36 Sprague-Dawley rats were randomly divided into three groups. In modified operation induction group, rat AHF model was established by modified 95% hepatectomy. In the operation, 10ml 5% glucose saline solution per kilogram of body weight was injected into the median lobe hepatic vein of the rat. In traditional operation induction group, 95% liver was resected, but no glucose saline solution was injected. In drug induction group, AHF model was established by injecting 1.2g D-gal per kilogram of body weight intraperitoneally. Operative mortality and 24h survival rate after establishment of models were observed. ALT, total bilirubin (TB), NH₃ and blood sugar (BG) were monitored. **Results** The operation mortality in traditional operation induction group was higher than that in modified operation induction group (33.3% vs 0%). Survival rate was 0%, 0% and 25% in modified operation induction group, traditional operation induction group and D-gal group 24h later, respectively. ALT and NH₃ in the modified operation induction group were significantly higher than those of D-gal group ($P < 0.05$). TBIL and BG levels in the modified operation group were lower than those in the D-gal group, but the difference was not significant ($P > 0.05$). **Conclusions** The AHF model established by modified 95% hepatectomy is an ideal one. Injection of 5% glucose saline solution through median lobe hepatic vein at operation can reduce operative mortality.

Key words: HEPATIC FAILURE/chem ind; HEPATECTOMY; D-GAL/adv eff; DISEASE MODELS, ANIMAL

CLC number: R575.3; R363

Document code: A

基金项目:江苏省卫生厅2002年重大资助项目(H200215);南通大学2003年创新基金。

收稿日期:2004-05-24; **修订日期:**2004-12-07。

作者简介:陈钟(1963-),男,江苏靖江人,南通大学附属医院教授,南京大学生命科学院博士后,主要从事肝细胞移植、生物人工肝及肝胆外科方面的研究。

通讯作者:陈钟 电话:0513-5052351(O),0513-5829806(手机); E-mail:zchen9999@sina.com。

AHF (acute hepatic failure, AHF) 的治疗非常困难,死亡率高达 80%^[1],是临床最为棘手的问题之一。肝脏具有很强的再生能力,如能及时提供肝功能替代治疗,如肝细胞移植及生物人工肝等,将有助于患者自身肝功能恢复,提高存活率。因此建立理想的动物 AHF 模型,将为 AHF 的研究提供有利的条件。目前大鼠 AHF 模型的建立通常采用外科手术及药物诱导两种方法。本研究通过改进的 95% 肝切除及 D-氨基半乳糖 (D-gal) 腹腔注射建立大鼠 AHF,比较两种方法的动物存活率及肝功能指标,旨在探讨一种较为理想的大鼠 AHF 模型建立方法。

1 材料与方 法

1.1 动物分组及模型制作

Sprague-Dawley (SD) 大鼠 36 只,体重 220 ~ 270 g,雌雄不限,由南通大学实验动物中心提供。普通块料喂养,随意饮水,室温 18 ~ 22℃,光照 12h,术前 12h 禁食,同时将饮用水改为 5% 葡萄糖水。实验动物随机分为 3 组:(1)改良手术诱导组 ($n = 12$)。采用改进的 95% 肝切除建立 AHF 模型。大鼠乙醚麻醉,仰卧固定,行腹正中纵切口,剪

开肝周韧带及各肝叶间菲薄的韧带连接。在肝中叶近肝门处预置丝线,打结但暂不收紧。在近肝门处寻得肝中叶的肝静脉,用皮试针穿刺注入 5% 葡萄糖氯化钠溶液 10 ml/kg 体重,迅速收紧预置结扎线,将结打在穿刺点近侧。依次用近肝门处结扎法切除肝左叶、右叶及尾叶前部。右上叶包绕下腔静脉,基底较广,先用电凝器将其上下缘烧灼,再行结扎切除。共切除 95% 肝组织。检查无出血后缝合腹壁切口。平均手术时间 25 ~ 30 min。(2)传统手术诱导组 ($n = 12$)。术中不行肝中静脉穿刺注射 5% 葡萄糖氯化钠溶液,其余手术方法同改良手术组。(3)药物诱导组 ($n = 12$)。采用腹腔注射 D-gal 1.2 g/kg 体重(购自重庆医科大学)诱导 AHF。3 组术后继续普通块料喂养,饮 5% 葡萄糖水,室温 18 ~ 22℃,光照 12h/d。

1.2 观察项目

1.2.1 观察一般情况 术后皮毛变化、活动、饮食及对外界的反应。手术组术后肝功能即显著恶化,建模成功时间从手术结束开始计算。D-gal 腹腔内注射,给药 48h 后肝功能损害严重(表 1),所以建模成功时间以注射后 48h 计算^[2]。

表 1 药物诱导组大鼠给药前、给药后 24,48,72h 生化指标变化 ($n = 8$)

生化指标	给药前	给药后 24h	给药后 48h	给药后 72h
ALT(U/L)	45.7 ± 11	636 ± 234	1253 ± 375.6	1322 ± 421
NH ₃ (μmol/L)	32.33 ± 2.8	171 ± 53.9	297 ± 49.1	386 ± 83
TB(μmol/L)	5.57 ± 0.36	35 ± 7.3	47 ± 16.1	46.2 ± 29.3
BG(mmol/L)	4.8 ± 0.5	4.2 ± 1.75	3.5 ± 1.95	3.3 ± 1.7

1.2.2 血清生化检查 传统手术组术中、术后死亡率较高,存活数少,不作生化指标检测。改良手术组动物于术后 12h,药物诱导组于注药后 60h 经尾静脉采血,在全自动生化仪(VITROS 250 强生公司生产)上作肝功能检测。同时取肝组织作病理学检查。

1.2.3 存活率 观察手术后 2,4,6,12,24h 大鼠存活率,给药后 24,48,72h 大鼠存活率。

1.3 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,统计学分析采用 Student *t* 检验。

2 结 果

2.1 一般观察

传统手术组大鼠术中死亡 4 例,死亡率 33.3% (4/12),死于术中失血,不计入统计。改良手术组大鼠术中无 1 例死亡,死亡率 0% (0/12)。两手术组术后 5 ~ 15 min 内即苏醒翻身,但 1 ~ 2h 后即出现肝衰竭表现。12h 后即相继出现肝昏迷,表现为精神萎靡,身体倦缩,鼠毛竖立,活动减少拒饮拒食,尿色发黄,腹壁手术切口渗血。药物诱导组大鼠给药后活动饮食及对外界的反应未立即出现明

显的变化;给药后24h出现反应迟钝、行动迟缓、饮食减少、尿色发黄;48h后出现明显的肝衰竭表现。

2.2 生化指标

术后12h改良手术组谷丙转氨酶(ALT)、血氨(NH₃)水平明显高于药物诱导组注药后60h的水平($P < 0.05$),总胆红素(TBIL)和血糖(BG)低于药物诱导组,但差异无统计学意义($P > 0.05$)(表2)。

表2 改良手术组术后12h和药物诱导组注射后60h肝功能结果

生化指标	手术组($n = 12$)	药物诱导组($n = 12$)	P
ALT(U/L)	1695.18 ± 216.74	1329.75 ± 146.31	< 0.05
NH ₃ ($\mu\text{mol/L}$)	555.18 ± 97.11	395 ± 139.5	< 0.05
TBIL($\mu\text{mol/L}$)	42.95 ± 1.39	45.95 ± 3.84	> 0.05
BG(mmL/L)	2.91 ± 0.085	3.17 ± 0.092	> 0.05

2.3 生存率

传统手术组术后2,4,6,12h及24h存活率分别为62.5%(5/8),37.5%(3/8),25%(2/8),12.5%(1/8)和0%(0/8);改良手术组大鼠术后2,4,6,12,24h存活率分别为91.67%(11/12),75%(9/12),58.33%(7/12),50%(6/12)和0%(0/12)。药物诱导组大鼠注药后24,48,72h存活率分别为100%(12/12),83.33%(10/12),25%(3/12)。

2.4 组织病理检查

改良手术组大鼠术后12h处死时见残余肝脏组织色泽暗红,包膜肿胀,表面渗血;镜下可见空泡变性和炎细胞浸润(图1)。药物诱导组大鼠注射后60h处死时见肝脏肿大,呈紫黑色,包膜紧张,表面呈颗粒状改变;镜下见肝小叶结构破坏,肝细胞大片变性坏死,胞质疏松,坏死区炎细胞浸润,肝窦扩张,呈网眼状,可见淤血及出血(图2)。

图1 改良手术组大鼠残肝组织病理(HE × 125)

图2 药物诱导组肝组织病理(HE × 125)

3 讨论

AHF导致肝脏的合成、代谢、解毒功能严重损害,临床上治疗十分棘手。肝移植是目前唯一有效的治疗手段,但诸多因素制约着肝移植的广泛开展^[3]。肝脏有较强的再生能力,通过及时的替代治疗如肝细胞移植,使患者度过难关,从而使其自身肝脏得以再生,为肝移植创造条件。甚至可使部分患者免于行肝移植。良好的AHF模型将为此类研究提供有利的条件。

理想的AHF模型应当满足以下条件^[4]:(1)实验动物死亡率高,模型建立后如不进行治疗实验动物几乎全部死亡;(2)实验方法对实验人员无损

害;(3)有一定的治疗窗,模型建立后实验动物能存活一定的时间,可以采取相应的治疗措施;(4)可重复性,有一致的临床表现和死亡率。大鼠AHF模型是研究AHF的常用工具。其制备方法大致分为外科手术型和药物诱导两种^[5]。药物诱导肝衰竭方法简单,但它在肝损害的同时常伴有身体其它脏器的非特异性损害。另外药物诱导肝衰竭还可影响治疗,干扰实验结果,特别在肝细胞移植时可对植入的肝细胞产生毒性损害。同时药物型肝衰竭不作治疗时实验动物的存活率仍然偏高,本研究注药后72h大鼠存活率为25%,且D-gal模型价格较高^[6],因此不甚理想。

传统的外科型肝衰竭模型,常因术中失血,即使

丢失所切除肝叶内储存的血液,亦可使大鼠循环血容量锐减,而使手术失败。加之术后动物不能立即恢复饮水摄食,导致严重低血糖,很难通过给予含糖饮用水加以纠正,动物很快死亡,治疗窗窄。但改良手术组在切除肝中叶之前通过肝中叶静脉给予5%葡萄糖氯化钠溶液10mL/kg体重,明显降低了动物的术中死亡率,扩大了治疗窗^[7]。可能与注射5%葡萄糖氯化钠溶液既有效补充血容量又纠正了低血糖有关。本实验中传统手术方法建立外科型肝衰模型,动物术中死亡率达33.3%(4/12),而改良手术方法术中无1例死亡。本研究选择肝静脉补液而非门静脉补液^[8],因为门静脉补液虽然可以驱除肝内血液,但含糖液体停留在肝叶,未完全进入血循环,不能起到有效纠正低血糖的作用。本项研究表明:本手术制模方法具有以下优点:(1)AHF效果明显,血ALT和NH₃水平高于药物诱导组,TB和BG低于药物诱导组,但差异无统计学意义,这可能与两种建模方法的致肝衰竭机理不同有关。95%肝切除AHF模型系正常肝组织大量减少引发肝衰竭,D-gal诱导AHF模型系肝细胞大量坏死,肝小叶破坏所致。手术诱导组建模后如不作治疗实验动物24h内全部死亡;(2)肝衰竭发生后至死亡的时间有一定的间隔,有一定的治疗窗;(3)手术简单、易行,可以复制;(4)价格低廉,经济可行。其缺点是工作量较大,当样本量较大时尤其明显。综上所述,通过改进的95%大鼠肝切除建立大鼠AHF模型,方法可靠,稳定性、重复性好,肝

衰竭效果明显,可成为研究AHF的良好动物模型。

参考文献:

- [1] 陈钟,丁义涛,徐庆祥,等. 犬急性肝衰竭一种新模型的建立[J]. 中国普通外科杂志,2003,12(3):206-208.
- [2] 廖丹,谢青,周霞秋,等. 肝细胞移植对急性肝衰竭大鼠的治疗作用及移植细胞生物学特性的研究[J]. 肝脏,2000,5(2):66-69.
- [3] Watanabe FD, Mullon CJ-P, Hewitt WR, *et al.* Clinical experience with a bioartificial liver in the treatment of severe liver failure: A phase I clinical trial [J]. *Ann Surg*, 1997,225(5):484-494.
- [4] Terblanche J, Hickman R. Animal models of fulminant hepatic failure [J]. *Dig Dis Sci*, 1991,36(6):770-774.
- [5] 胡安斌,郑启昌. 微囊化异种肝细胞移植对大鼠爆发性肝衰竭治疗作用研究[J]. 中国普通外科杂志,2003,12(3):198-201.
- [6] Kalpana K, Ong HS, Soo KC, *et al.* An improved model of galactosamine-induced fulminant hepatic failure in the pig [J]. *J Surg Res*, 1999,82(2):121-130.
- [7] Palmes D, Diel KH, Drews G, *et al.* Auxiliary partial orthotopic liver transplantation: treatment of acute liver failure in a new rat model [J]. *Langenbecks Arch Surg*, 2002,386(7):534-541.
- [8] 郝迪斯,王毓利,汪文国. 切除大鼠85%肝诱导急性肝衰竭的实验研究[J]. 黑龙江医学,2002,26(4):249-250.

本刊为“万方数据——数字化期刊群”期刊

为了实现科技期刊编辑、出版发行工作的电子化,推进科技信息交流的网络化进程,本刊已入网“万方数据——数字化期刊群”,所以,向本刊投稿并录用的稿件文章,将一律由编辑部统一纳入万方数据资料系统(Chinainfo),进入因特网提供信息服务。凡有不同意见者,请另投它刊。本刊所付稿酬包含刊物内容上网服务报酬,不再另付。

万方数据——数字化期刊群是国家“九五”重点科技攻关项目(网址:<http://www.chinainfo.gov.cn/periodical>)。本刊全文内容按照统一格式制作编入万方数据资料系统(Chinainfo),读者可上因特网进入万方数据资料系统(Chinainfo)免费(一年后开始酌情收费)查询浏览本刊内容,也欢迎各界朋友通过万方数据资料系统(Chinainfo)向我刊提出宝贵意见、建议,或征订本刊。