

• 基础与实验研究 •

Preparation of rat models of inferior vena cave-type Budd-Chiari syndrome

FANG Weirwei¹, CHENG Delei¹, LYU Weifu^{1*}, ZHU Nan²,
CHEN Xiaoming³, LIU Kaicai¹

(1. Department of Medical Imaging, the Affiliated Provincial Hospital, Anhui Medical University, Hefei 230001, China; 2. Department of Medical Imaging, Peoples Hospital of Wuhe County, Bengbu 233300, China; 3. Department of Gastroenterology, the Second Hospital of Anhui Medical University, Hefei 230601, China)

[Abstract] **Objective** To establish animal models of inferior vena cava (IVC) type Budd-Chiari syndrome (BCS) through partial ligation of the posterior IVC of rats. **Methods** Thirty-six healthy adult SD rats were equally divided into model group and sham operation group using random number method. Retrohepatic IVC in model group were ligated with 3F microcatheter, while only isolated in sham operation group. Liver function was tested with peripheral venous blood on the 28th day after operation. Abdominal ultrasound and DSA were performed to evaluate the degree of IVC obstruction and the collateral vein formation on the 84th day and 85th day. The rats were then sacrificed, and the liver and spleen were pathologically examined. **Results** The successful rate of model establishment was 83.33% (15/18). On the 28th day, alanine transaminase, aspartate aminotransferase, alkaline phosphatase, glutamyltransferase and total bilirubin in model group were higher than those in sham operation group (all $P < 0.05$). On the 84th day and 85th day, abdominal ultrasound and DSA showed IVC obstruction and the formation of hepatic and hepatic lateral branches in model group. Severe fatty degeneration of liver tissue, hepatic lobular central vein and surrounding hepatic sinusoid expansion and congestion, as well as mild fibrosis in the portal area were observed, while electron microscope showed decreased organelles, localized edema, accumulative lipid droplets in cytoplasm, expansive endoplasmic reticulum, reductive mitochondria and widening of nuclear membrane fissure in model group. **Conclusion** Rat models for IVC type BCS could be prepared through partial ligation of posterior IVC, therefore providing a platform for BCS researches.

[Key words] Budd-Chiari syndrome; Models, animal; Vena cava, inferior; Pathology

DOI:10.13929/j.1672-8475.201803046

大鼠下腔静脉型巴德-吉亚利综合征 动物模型的制备

方伟伟¹, 成德雷¹, 吕维富^{1*}, 朱楠², 陈晓明³, 刘开才¹

(1. 安徽医科大学附属省立医院影像科, 安徽 合肥 230001; 2. 安徽省五河县
人民医院影像科, 安徽 蚌埠 233300; 3. 安徽医科大学第二附属医院
消化科, 安徽 合肥 230601)

[摘要] **目的** 通过部分结扎大鼠肝后段下腔静脉(IVC)建立 IVC 阻塞型巴德-吉亚利综合征(BCS)模型。**方法** 采用随机数字法将 36 只健康成年 SD 大鼠分为模型组和对照组。对模型组大鼠以 3F 微导管部分结扎肝后段 IVC, 对照组

[基金项目] 安徽省自然科学基金项目(1708085QH218)。

[第一作者] 方伟伟(1991—),男,安徽蒙城人,在读硕士。研究方向:介入放射学。E-mail: 1903692843@qq.com

[通信作者] 吕维富,安徽医科大学附属省立医院影像科,230001。E-mail: lwf99@126.com

[收稿日期] 2018-03-26 **[修回日期]** 2018-09-10

仅暴露肝后段 IVC,其余处理相同。术后第 28 天取外周静脉血行肝功能检查,术后第 84 天和第 85 天分别行腹部超声和 DSA,评价 IVC 阻塞程度及侧支静脉形成后处死大鼠,对肝脏、脾脏行病理学检查。**结果** 建模成功率 83.33%(15/18)。术后第 28 天,模型组大鼠静脉血谷丙转氨酶、谷草转氨酶、碱性磷酸酶、谷氨酰转氨酶和总胆红素均较对照组升高(P 均 <0.05);术后第 84 天和 85 天腹部超声及 DSA 检查均证实模型组大鼠存在 IVC 阻塞,肝内及肝外侧支静脉形成。光镜下模型组大鼠肝组织严重脂肪样变性,肝小叶中央静脉及其周围肝血窦扩张、淤血,汇管区纤维增生和轻度纤维化;电镜下可见肝细胞内细胞器减少,存在局限性水肿,胞质内大量脂滴堆积,粗面及细面内质网扩张,周围线粒体减少,肝细胞核膜裂隙增宽等改变。**结论** 部分结扎大鼠肝后段 IVC 可成功制备 IVC 阻塞型 BCS,为 BCS 研究提供平台。

[关键词] 巴德-吉亚利综合征;模型,动物;腔静脉,下;病理学

[中图分类号] R735.7; R-332 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-8475(2018)12-0743-05

巴德-吉亚利综合征(Budd-Chiari syndrome, BCS)是肝静脉(hepatic vein, HV)和/或其开口以上的下腔静脉(inferior vena cava, IVC)阻塞,导致门静脉(portal vein, PV)和/或 IVC 高压的临床症候群^[1],根据阻塞部位可分为 HV 阻塞型、IVC 阻塞型和混合型^[2],西方国家以 HV 阻塞型 BCS 较常见,而亚洲国家则以 IVC 阻塞型为主^[3-4]。目前有关 BCS 的相关基础研究及动物模型造模研究相对较少^[5-7]。本研究通过部分结扎大鼠肝后段 IVC 建立 IVC 阻塞型 BCS 模型,旨在为 BCS 研究提供实验基础。

1 材料与方法

1.1 实验对象 健康成年雄性 SD 大鼠 36 只[购于安徽省立医院实验动物中心,许可证号:SCXK(苏)2005-0001],体质量 185~235 g。普通饲料喂养。饲养环境:室温 15℃~25℃,湿度 50%~60%,保持饲养室良好通风及洁净。采用随机数字法将其均分为模型组和对照组,每组 18 只。本研究经安徽医科大学动物伦理委员会批准。

1.2 模型制备 术前实验鼠停饲 1 日(不停水)。以 10%水合氯醛(0.3 ml/100 g 体质量)腹腔注射麻醉动物,腹部备皮后保定于实验台,常规消毒、铺巾。取剑突下腹部正中切口,逐层进腹后分离镰状韧带,下压肝脏暴露肝后段 IVC,游离 IVC,将 3F 微导管(泰尔茂)平行紧贴 IVC,并以 0 号线环绕扎紧后抽出微导管,关腹前给予青霉素每只 20 U 腹腔灌洗,再逐层缝合,术后连续 5 天肌肉注射青霉素每只 20 U。对照组暴露而不结扎 IVC,其余步骤同模型组。术前和术后处死前每日称取大鼠体质量。

1.3 肝功能指标检测 于术后第 28 天以眼眶后静脉丛采血法取 1~2 ml 静脉血,检测肝功能指标,包括谷丙转氨酶(alanine transaminase, ALT)、谷草转氨酶(aspartate aminotransferase, AST)、谷氨酰转氨酶(glutamyltransferase, GGT)、白蛋白(albumin, ALB)、总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素

(direct bilirubin, DBIL)及碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP)。

1.4 影像学检查

1.4.1 超声检查 术后第 84 天,停饲 8 h 后对大鼠进行腹部超声检查,记录肝脏和脾脏大小、形态、内部回声,观察 HV、PV 和 IVC 是否通畅、有无狭窄、有无肝内和/或肝外侧支形成。

1.4.2 DSA 检查 术后第 85 天,暴露大鼠任意一侧下肢股静脉,置入 21G 留置针,行 DSA,观察 IVC 阻塞段及侧支静脉形成情况。

1.5 病理检查 DSA 后第 2 天,采用上述同样方法麻醉大鼠,开腹取大鼠肝脏、脾脏样本,采用游标卡尺测量脾脏长径、宽度及厚度,并用电子分析天平(Mettler Toledo PL403)称重。取肝左叶约 1 mm×1 mm×1 mm 组织块固定于 2.5%戊二酸磷酸盐缓冲液,以透射电镜(JEM-1230 型)观察肝细胞的细胞膜、细胞核、粗面内质网、光面内质网及线粒体等结构。取适量肝脏及脾脏固定于 4%甲醛溶液,经石蜡包埋、切片,行常规 HE 染色,光学显微镜(Nikon 80i)观察肝脏、脾脏形态学改变。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 19.0 统计分析软件。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用独立样本 t 检验或 t 检验比较 2 组大鼠体质量、脾脏质量,以及脾脏长径、宽度、厚度和肝功能指标;对 2 组组内术前和术后第 7 天、第 21 天大鼠体质量进行方差齐性检验,采用重复测量设计资料的方差分析进行比较。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 建模情况 模型组大鼠术中死亡 1 只,术后分别于第 7 天及第 11 天因感染死亡 2 只,余 15 只成功建模,建模成功率 83.33%(15/18)。模型组大鼠生长缓慢,毛色灰暗无光泽;术后第 3 天 9 只出现对疼痛反应减低;术后第 4 天均出现活动减少、食欲减退、对外界刺激反应迟缓;术后第 12~21 天均出现体质量增加,

腹部膨隆、腹壁紧张,于术后第 15 天随机抽取其中 6 只行腹腔穿刺,可抽出淡黄色液体;术后第 28 天开始大鼠腹部膨隆、腹壁紧张缓解,体质量降低。术后第 86 天处死时,大鼠腹腔内均可见淡黄色积液,3 只可见明显胃肠道淤血、胀气扩张,7 只可见腹壁浅静脉及腹腔侧壁静脉迂曲增粗。

对照组大鼠术中死亡 1 只,术后第 6 天死于感染 1 只,术后第 10 天不明原因死亡 1 只,余 15 只存活,死亡率 16.67% (3/18)。15 只大鼠术后前 3 天均对疼痛反应减低,后活动如常、饮食正常,反应机警,体质量呈逐渐增加趋势,未出现 BCS 相关症状。

2.2 体质量变化 2 组组内不同时间点大鼠体质量差异均无统计学意义(P 均 >0.05);2 组术前、术后第 7 天大鼠体质量差异无统计学意义,术后第 21 天模型组大鼠体质量高于对照组,处死时对照组大鼠体质量高于模型组,见表 1。

2.3 肝功能情况 术后第 28 天,模型组大鼠 ALT、AST、ALP、GGT、TBIL 较对照组升高(P 均 <0.05);而 DBIL 和 ALB 差异无统计学意义(P 均 >0.05),见表 2。

2.4 超声表现 模型组:肝、脾肿大,肝脏实质回声增粗,肝、脾周围和肠间隙可见明显液性暗区;肝内静脉淤血扩张并可见丰富肝内交通支;IVC 阻塞,远端管腔不同程度扩张;12 只结扎处 IVC 变窄,余 3 只结扎处 IVC 完全闭塞;IVC 内有高回声血栓形成,血流充盈缺损,严重者腔内未见血流充盈;IVC 周围可见新的侧支血管。对照组:肝、脾不大,内部回声均匀,腹腔未见液性暗区;肝内静脉无明显扩张、无交通支,IVC

表 1 模型组与对照组大鼠不同时间点的体质量比较(g, $\bar{x} \pm s, n=15$)

| 组别 | 术前 | 术后第 7 天 | 术后第 21 天 | 处死时 |
|-------|--------------|--------------|--------------|--------------|
| 模型组 | 206.56±15.56 | 207.73±15.54 | 226.93±15.79 | 290.40±28.88 |
| 对照组 | 209.11±11.49 | 212.27±12.71 | 215.93±13.30 | 333.13±14.61 |
| t 值 | 0.83 | 0.76 | 4.26 | 26.15 |
| P 值 | 0.58 | 0.39 | 0.048 | <0.01 |

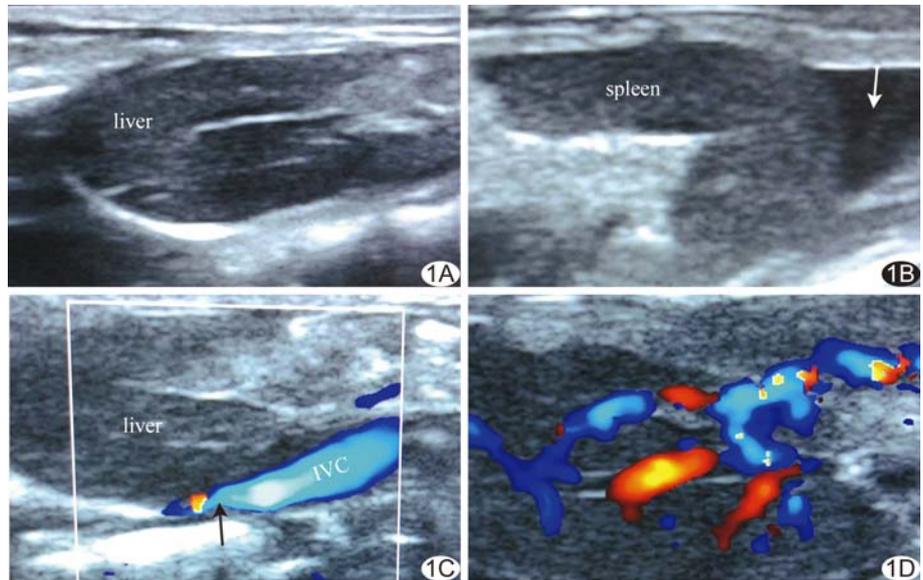


图 1 大鼠腹部超声 A. 对照组大鼠肝脏体积不大,肝内回声均匀,肝周未见液性暗区,IVC 未见明显狭窄; B. 模型组大鼠脾脏周围可见液性暗区(箭),脾脏肿大; C. 箭示狭窄端 IVC; D. 肝内静脉形成交通支,血流丰富 (liver: 肝脏; spleen: 脾脏; IVC: 下腔静脉)

未见狭窄或扩张,血流通畅。见图 1。

2.5 DSA 表现 模型组:IVC 结扎处管腔明显变窄,狭窄段管径均 <0.8 mm(狭窄率 $>80\%$),对比剂线性通过,其远端管腔扩张,并可见腰升静脉开放,IVC 血流通通过侧支循环汇入上腔静脉,同时胸腹腔内侧壁曲张静脉可显影。对照组:IVC 未见明显狭窄,回心血流通畅。见图 2。

2.6 病理学表现 大体病理:模型组大鼠肝脏呈暗紫色,以肝脏边缘较为明显,肝脏淤血肿大,被膜紧张,表面呈粟粒样改变,触之质韧,其中 6 只大鼠肝脏与膈肌粘连;对照组肝脏呈暗红色,表面光滑,质地柔软,其中 3 只大鼠肝脏与膈肌粘连。模型组和对照组脾脏长径分别为(36.80±2.90)mm 和(30.60±1.96)mm($t=5.61$,

表 2 模型组与对照组大鼠术后第 28 天时肝功能情况($\bar{x} \pm s, n=15$)

| 组别 | ALT(U/L) | AST(U/L) | GGT(U/L) | ALB(g/L) | TBIL(μ mol/L) | DBIL(μ mol/L) | ALP(U/L) |
|-------|--------------|--------------|-----------|------------|--------------------|--------------------|--------------|
| 模型组 | 112.58±14.96 | 287.00±34.36 | 1.80±0.47 | 34.48±3.51 | 2.45±0.35 | 1.59±0.63 | 234.83±64.76 |
| 对照组 | 41.47±5.49 | 130.40±19.09 | 1.25±0.40 | 33.15±2.02 | 1.17±0.52 | 1.25±0.71 | 63.93±18.00 |
| t 值 | 17.09 | 15.03 | 3.31 | 1.23 | 7.32 | 1.29 | 9.80 |
| P 值 | <0.01 | <0.01 | 0.03 | 0.23 | <0.01 | 0.21 | <0.01 |

$P < 0.01$), 宽度分别为 (7.00 ± 0.76) mm 和 (6.47 ± 0.91) mm ($t = 1.74, P = 0.93$), 厚度分别为 (3.93 ± 0.70) mm 和 (3.73 ± 0.80) mm ($t = 0.73, P = 0.47$), 脾脏质量分别为 (0.68 ± 0.10) g 和 (0.37 ± 0.27) g ($t = 9.15, P < 0.01$)。

光镜下见模型组肝细胞索紊乱, 肝细胞肿胀、脂肪样变性; 较严重区域肝小叶结构消失, 肝细胞坏死, 炎性细胞浸润, 中央静脉及肝血窦扩张、淤血, 汇管区纤维增生和轻度纤维化, 尚无纤维间隔包绕形成假小叶(图 3); 脾脏见脾窦轻度扩张, 窦内皮细胞增生, 脾小体萎缩; 对照组肝细胞呈多面形, 细胞核大而圆, 核仁清晰; 胞质丰富、呈粉红色; 肝细胞相互连接成肝细胞索; 脾脏未见异常。

透射电镜见模型组肝细胞局限性水肿, 肝细胞内细胞器减少, 线粒体嵴断裂或空泡变性, 肝细胞胞质内大量脂滴堆积, 粗面及光面内质网扩张, 周围线粒体减少, 肝细胞核膜裂隙增宽; 对照组大鼠肝细胞形态正常, 内有丰富的线粒体、高尔基体, 核膜清晰。

3 讨论

IVC 阻塞型是亚洲国家最常见的 BCS 分型。既往汪海军等^[6]采用外科手术缩窄家兔 HV 主干制备 BCS 动物模型; 王春喜等^[8]利用介入技术制备 HV 阻塞型 BCS 动物模型, 对设备、技术要求高, 成本亦高, 不能高度模拟 IVC 阻塞型, 且选择性阻塞 HV 可导致相应肝叶缺血坏死、萎缩, 其余肝叶代偿性增大, 不能很好地模拟 BCS 的自然病程发展过程。

本研究借鉴 Akiyoshi 等^[9]的方法制备 IVC 阻塞型 BCS, 建模成功率 83.33%。术中选用 3F 微导管代替玻璃棒, 可避免完全结扎 IVC 造成的急性肝功能衰竭, 且微导管柔顺性较好, 还可避免术中造成气胸或肝脏损伤。此法制备 IVC 阻塞型 BCS 模型成本低, 所需器械、试剂及药品易于获得; 大鼠为常用实验动物, 易获得、造价低, 且易饲养, 管理方便; 其肝脏解剖结构与

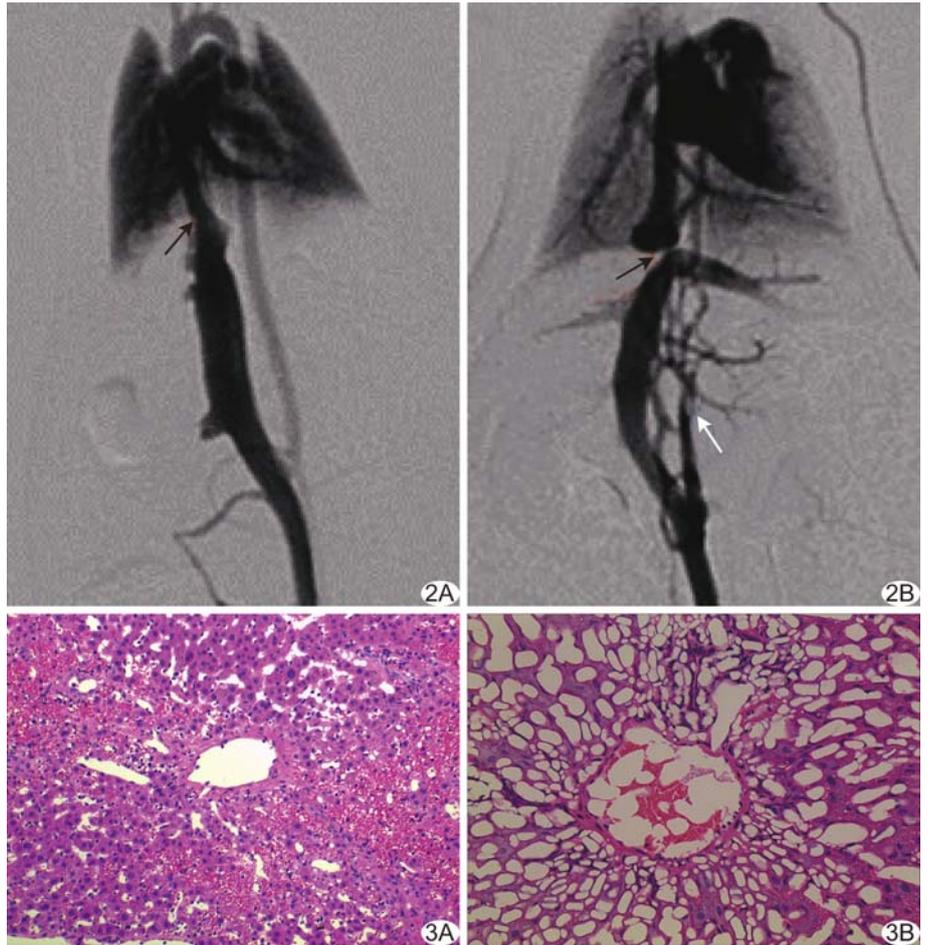


图 2 DSA 表现 A. 对照组, 箭示大鼠膈下 IVC, 管腔未见明显狭窄及扩张; B. 模型组, 黑箭示膈下 IVC 明显狭窄, 狭窄段管腔直径约 0.8 mm, 白箭示腰升静脉开放并汇入上腔静脉 图 3 模型组病理图 A. 肝细胞排列紊乱, 正常肝细胞索消失, 肝小叶中央静脉及其周围肝血窦扩张, 其内可见大量红细胞淤积(HE, $\times 200$); B. 肝小叶中央静脉周围肝细胞广泛脂肪样变性(HE, $\times 400$)

人类相似度较高, 动物模型模拟性强; 术中操作简单, 便于推广及大批量造模, 所获模型可高度模拟我国多发型 BCS 疾病类型。

建模后第 12 天始, 模型组大鼠体质量逐渐增加, 腹部穿刺抽出淡黄色液体, 提示腹腔积液形成; PV 压力升高时, 腹腔内脏血管床静水压升高, 组织液回收减少而漏入腹腔, 从而形成腹腔积液。建模后第 28 天始模型组大鼠腹腔积液逐渐减少, 与肝内交通支及周围侧支静脉形成有关; 腹部超声证实肝内静脉出现广泛交通支, 下腔静脉 DSA 发现腰升静脉开放, 病理见腹壁及腹腔内侧壁浅静脉纵行迂曲、扩张, 与 BCS 患者腹部静脉曲张形成原因类似, 均为 IVC 阻塞后导致 IVC 高压症候群。建模后模型组大鼠食欲减低, 与胃肠道血流回心受阻、胃肠道淤血有关。出现大量腹腔积液时, 上述症状加重, 导致模型组大鼠生长缓慢。

术后第 28 天,模型组大鼠 ALT、AST、ALP、GGT 及 TBIL 较对照组升高,提示长期肝脏淤血造成肝细胞损伤,肝、脾大体标本及电镜观察均可见相关表现。部分结扎 IVC 后,HV 回心血流受阻,淤血从肝小叶中心静脉开始一直扩展到肝血窦,长期肝脏血流回流不畅可致肝内 PV、HV 和肝动脉血液循环失衡,造成肝细胞缺氧和养料供给障碍,进而发生非炎性坏死,炎性细胞浸润,汇管区纤维增生并形成纤维分隔。

我国多数 BCS 患者主要以腹腔积液、胸腹壁静脉曲张和肝脾肿大等症候群^[10]。本研究所制动物模型均存在腹腔积液、胸腹壁静脉曲张和肝脾肿大等 PV 及 IVC 高压症候群,与 BCS 临床表现相似;影像学检查显示大鼠 IVC 及 HV 血液回流受阻,IVC 管径狭窄甚至闭塞,同时见侧支循环开放,与临床 IVC 阻塞型 BCS 相类^[11]。

综上所述,部分结扎大鼠肝后段 IVC 所建立的 IVC 阻塞型 BCS 动物模型可较好地模拟 IVC 阻塞型 BCS 患者的临床表现及病理生理改变。

[参考文献]

[1] 中华医学会放射学分会介入学组. 布加综合征介入诊疗规范的专

家共识. 中华放射学杂志, 2010, 44(4): 345-349.

- [2] 中国医师协会腔内血管学专业委员会腔静脉阻塞专家委员会. 布-加综合征亚型分型的专家共识. 介入放射学杂志, 2017, 26(3): 195-201.
- [3] Qi X, Guo X, Fan D. Difference in Budd-Chiari syndrome between the West and China. *Hepatology*, 2015, 62(2): 656.
- [4] 王伯, 张辉, 郭成浩, 等. 下腔静脉隔膜阻塞型布-加综合征的病理学及病因学研究. 介入放射学杂志, 2008, 17(7): 500-503.
- [5] Cheng D, Xu H, Lu ZJ, et al. Clinical features and etiology of Budd-Chiari syndrome in Chinese patients: A single-center study. *J Gastroenterol Hepatol*, 2013, 28(6): 1061-1067.
- [6] 汪海军, 吴猛, 牛坚, 等. 肝静脉主干狭窄法制备家兔布加综合征模型. 大家健康(下旬版), 2013, 7(2): 18-19.
- [7] Janssen HL, Garcia-Pagan JC, Elias E, et al. Budd-Chiari syndrome: A review by an expert panel. *J Hepatol*, 2003, 38(3): 364-371.
- [8] 王春喜, 梁发启, 韩丽娜, 等. 肝静脉阻塞型布加氏综合征动物模型的制作. 中华实验外科杂志, 2005, 22(4): 494-495.
- [9] Akiyoshi H, Terada T. Centrilobular and perisinusoidal fibrosis in experimental congestive liver in the rat. *J Hepatol*, 1999, 30(3): 433-439.
- [10] 王霞, 周秀彦, 高超, 等. 山西省布加综合征 169 例临床分析. 山西医科大学学报, 2014, 45(6): 481-483.
- [11] 徐慧婷, 代岳, 刘小华, 等. 利用磁共振肝脏加速容积采集技术研究布加综合征患者不同侧支循环类型与分型. 中华肝胆外科杂志, 2016, 22(8): 526-529.

三线表的规范格式

▲表序和表题:表序即表格的序号,一篇论文中如只有 1 个表格,则表序编为表 1,表题即表格的名称,应准确得体并能确切反映表格的特定内容且简短精练。

▲项目栏:指表格顶线与栏目线之间的部分,栏目是该栏的名称,反映了表身中该栏信息的特征或属性。

▲表身:三线表内底线以上,栏目线以下的部分叫做表身,是表格的主体表身内的数字一般不带单位,百分数也不带百分号,均归并在栏目中表身中不应有空项,如确系无数字的栏,应区别情况对待,在表注中简要说明,不能轻易写“0”或画“—”线等填空,因“—”可代表阴性反应,“0”代表实测结果为零。

▲表注:必要时,应将表中的符号标记代码,以及需要说明的事项,以最简练的文字,横排于表题下作为表注也可附注于表下。