

王文晓, 柏娟, 刘树立. 左支结扎制备SD大鼠门脉高压动物模型的实验研究[J]. 中国实验动物学报, 2020, 28(5): 675-679.
Wang WX, Bai J, Liu SL. Experimental study on the impact of ligation of left portal vein on portal vein pressure in SD rats [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2020, 28(5): 675-679.
Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2020.05.013

左支结扎制备SD大鼠门脉高压动物模型的实验研究

王文晓¹, 柏娟^{2*}, 刘树立³

(1. 烟台毓璜顶医院儿科, 山东 烟台 264000; 2. 烟台业达医院儿科, 山东 烟台 264006; 3. 首都儿科研究所附属儿童医院普外科, 北京 100020)

【摘要】 目的 探索单纯门静脉左支结扎能否形成稳定的门静脉高压及一氧化氮在其中是否发挥相应的作用。方法 36只SPF级雄性8周龄SD大鼠,随机分为左支结扎组(分别用直径0.6、0.7、0.8 mm针结扎),主干结扎组(直径0.9 mm针结扎),左外叶切除组,假手术组共6组。所有大鼠均于术前,术后即刻,术后15 d,术后30 d测量其门脉压力。所有大鼠于术后30 d处死,收集门静脉血液及肝左、右叶组织测量其一氧化氮(NO, nitric oxide)含量。结果 左支结扎组SD大鼠术后即刻、15 d、30 d门静脉压力较术前及对照组均明显升高;术后30 d左支0.6 mm组门静脉压力与主干0.9 mm组差异不具有显著性;六组SD大鼠肝左、右叶组织及血液NO含量分别比较均未发现统计学差异。结论 单纯门脉左支结扎能形成稳定的门脉高压,直径0.6 mm针能取得较好的结果;NO在肝前型门脉高压中未发挥作用。

【关键词】 门脉高压;左支结扎;大鼠;一氧化氮

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2020)05-0675-05

Experimental study on the impact of ligation of left portal vein on portal vein pressure in SD rats

WANG Wenxiao¹, BAI Juan^{2*}, LIU Shuli³

(1. Department of Pediatrics, Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264000, China. 2. Department of Pediatrics, Yantai Yeda Hospital, Yantai 264006. 3. Department of Pediatric Surgery, Capital Institute of Pediatrics, Beijing 100020)
Corresponding author: BAI Juan. E-mail: 289006219@qq.com

【Abstract】 Objective The aim of the study was to evaluate the relationship between portal hypertension and ligation of left portal vein (LLPV), together with the possible role of NO in prehepatic portal hypertension (PHT). **Methods** Thirty-six 8-week-old SD rats were divided into six groups: LLPV with needles of 0.6, 0.7, or 0.8 mm in diameter; ligation of the main portal vein (LMPV) with a needle of 0.9 mm in diameter; left lateral lobe of liver ligated and removed (LLLR); and sham operation. The portal vein pressure (PVP) was measured in all rats before the operation, immediately after the operation, and 15 and 30 days after the operation. All rats were sacrificed 30 days after the operation. The portal vein blood, and left and right lobes of liver tissues were saved to measure the concentration of NO. **Results** For rats in the LLPV group, the PVP levels immediately, 15 days, and 30 days after the operation were all significantly higher than the preoperative PVP and PVP of the sham operation group at the same time. No statistically significant difference of PVP was found between the LLPV group with a needle of 0.6 mm in diameter and the LMPV group 30 days after the operation. There were also no significant differences of the NO concentration in left and right lobes of liver tissue and blood

[作者简介] 王文晓(1984—)男,硕士研究生,主治医师,研究方向:儿科学。Email: wangwenxiao021@126.com

[通信作者] 柏娟(1985—)女,硕士研究生,主治医师,研究方向:儿科学。Email: 289006219@qq.com

in all groups. **Conclusions** LLPV can also form stable PHT. A needle of 0.6 mm in diameter can acquire good result. NO does not play a role in prehepatic PHT.

【Keywords】 portal hypertension; ligation of left portal vein; rat; NO

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

门脉高压是一种常见的肝疾病,并且其具有较高的死亡率^[1-2]。但其确切的发病机制至今尚未完全明确,有研究表明 NO 在维持门脉高压高动力循环中发挥重要作用^[3-5],但绝大多数研究是基于肝硬化导致的门脉高压。肝前型门脉高压中 NO 是否也发挥类似的作用,国内外研究较少。

上世纪 80 年代, Van Thiel 等^[6]首次报道门静脉主干部分结扎制作门脉高压动物模型,国内外众多研究者对这一模型进行复制、研究,取得了不错的结果^[7]。一例由于门静脉左支中断而形成的肝前型门脉高压引发思考,单纯行门静脉左支部分结扎是否也会形成稳定的门脉高压? NO 在其中是否发挥相应作用? 现通过动物实验报告如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8 周龄 SPF 级雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 36 只,体重 260 ~ 280 g,平均体重 268 g,北京华阜康生物科技股份有限公司提供【SCXK(京)2019-0008】。饲养于山东国际生物科技园发展有限公司【SYXK(鲁)2018-0030】。饲养期间各组大鼠自由饮水,饲喂普通维持饲料由青岛今墨堂生物技术有限公司【SCXK(鲁)2018-0009】提供。饲养环境:昼夜各半循环照明,湿度恒定,温度控制在 21 ~ 25℃。所有操作均符合首都儿科研究所实验伦理学要求(审批号:SEDDL-20190045)。

1.1.2 实验试剂与仪器

大鼠 NO 试剂盒(上海臻科生物科技有限公司提供),BL-420 生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司生产)。

1.2 方法

1.2.1 实验分组

36 只大鼠随机分为 6 组,每组 6 只。分别为直径 0.6、0.7、0.8 mm 针门静脉左支结扎组,直径 0.9 mm 针门静脉主干结扎组,肝左外叶切除组,假手术组。

1.2.2 实验方法

所有实验动物术前晚禁食,手术采用 3% 戊巴

比妥钠(60 mg/kg)腹腔注射麻醉。麻醉约 10 min 后开始手术,手术从剑突向下作 2 cm 腹部正中切口,暴露、游离门静脉主干至门脉左右支分叉,继续向上游离门静脉左支。左支结扎组分别用直径 0.6、0.7、0.8 mm 针,平行置于门静脉左支旁,用 4 号丝线将门静脉左支与直针一起结扎,缓慢旋转抽出直针;主干结扎组用直径 0.9 mm 针,平行置于门静脉主干旁,其余与前相同;左外叶切除组游离左外叶,并在左外叶根部结扎血管,切除左外叶;假手术组不作门静脉部分结扎,其余与左支结扎组相同,测压后关腹。

1.2.3 观察指标及方法

(1)观察大鼠术后是否苏醒及存活。

(2)门静脉测压:取回肠系膜较平直静脉,用充满肝素盐水的 24G 套管针穿刺,穿刺针置于肠系膜血管主干或一级属支内,通过压力传感器链接 BL-420 生物机能实验系统以读取各组大鼠门静脉压力。术后 15 d 及 30 d 所有实验大鼠均按上述相同方法测量门静脉压力。

(3)术后 30 d 处死所有大鼠,用真空采血管收集大鼠门静脉血液并剪取肝左、右叶部分组织,用 NO 试剂盒测量各组 NO 含量。

1.3 统计学分析

采用 SPSS 19.0 统计学软件进行统计分析,两组间比较采用独立样本 *t* 检验分析。计量资料采用平均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 实验动物存活情况

所有大鼠均于术后 24 h 内苏醒。术后第 2 天,门静脉主干结扎组因门静脉淤血死亡大鼠 1 只,余均顺利存活。术后 30 d,存活大鼠体重 282 ~ 302 g,平均体重 289 g。

2.2 各组大鼠不同时间点门静脉压力情况

(1)左支结扎三组大鼠术后即刻、术后 15 d、术后 30 d 门静脉压力较各自术前及同时间点假手术组均明显升高($P < 0.05$),且针直径越小,其术后压力越高。

(2) 主干 0.9 mm 组大鼠术后即刻、术后 15 d、术后 30 d 门静脉压力较各自术前及同时间点假手术组均明显升高 ($P < 0.05$); 左外叶切除组术后即刻、术后 15 d 门脉压力较术前及同时间点假手术组高 ($P < 0.05$), 但术后 30 d 二者无统计学差异; 假手术组大鼠门静脉压力随时间推移无明显变化。

(3) 左支结扎三组大鼠术后即刻、术后 15 d 门静脉压力低于主干 0.9 mm 组; 至术后 30 d 左支

0.7、0.8 mm 组门静脉压力低于主干 0.9 mm 组, 但左支 0.6 mm 组门静脉压力与主干 0.9 mm 组差异无显著性表达 [$(16.82 \pm 2.16) \text{ cm H}_2\text{O}$ vs $(18.74 \pm 3.20) \text{ cm H}_2\text{O}$, $P > 0.05$]。

2.3 组织及血液 NO 含量

对六组 SD 大鼠肝左、右叶组织及血液中 NO 含量进行比较, 各组间均无显著性差异 ($P > 0.05$) (见表 2)。

表 1 各组大鼠不同时间点门脉压力 (cm H₂O)

Table 1 Portal vein pressure of SD rats at different time of six groups (cm H₂O)

组别 Groups	术前 Preoperative	术后即刻 Postoperative immediately	术后 15 d Postoperative 15 d	术后 30 d Postoperative 30 d
左支 0.6 mm 组 LLPV 0.6 mm group	10.20 ± 0.54	19.66 ± 4.06	16.79 ± 2.06	16.82 ± 2.16
左支 0.7 mm 组 LLPV 0.7 mm group	10.33 ± 0.40	18.37 ± 4.46	15.29 ± 2.16	14.92 ± 2.09
左支 0.8 mm 组 LLPV 0.8 mm group	10.54 ± 1.26	17.39 ± 2.52	16.34 ± 2.20	15.08 ± 1.73
主干 0.9 mm 组 LMPV 0.9 mm group	10.75 ± 0.70	25.21 ± 6.67	21.41 ± 2.38	18.74 ± 3.20
左外叶切除组 LLLR group	10.05 ± 0.19	15.46 ± 1.19	13.60 ± 1.77	11.88 ± 1.54
假手术组 Sham operation group	10.37 ± 0.48	10.37 ± 0.40	10.37 ± 0.63	10.34 ± 0.61

注: 术后即刻、术后 15 d、术后 30 d, 左支结扎三组门静脉压力均明显高于术前及对照组 ($P < 0.05$)。术后 30 d, 左支 0.6 mm 组门静脉压力与主干 0.9 mm 组差异不具有显著性 ($P > 0.05$)。

Note: For rats in LLPV groups, the PVP at the moment, 15 days and 30 days postoperation were all statistically higher than preoperation and sham operation group at the same time. No statistical difference of PVP was found between LLPV group with diameter of 0.6 mm needle and LMPV group 30 days postoperation.

表 2 SD 大鼠肝左右叶及血液 NO 含量 (μmol/L)

Table 2 NO concentration of SD rats in blood, left and right lobes of liver tissue (μmol/L)

组别 Groups	血液 NO 含量 NO concentration in blood	肝左叶 NO 含量 NO concentration in left lobe	肝右叶 NO 含量 NO concentration in right lobe
左支 0.6 mm 组 LLPV 0.6 mm group	17.54	58.06	61.14
左支 0.7 mm 组 LLPV 0.7 mm group	16.85	64.22	58.57
左支 0.8 mm 组 LLPV 0.8 mm group	16.12	77.71	61.58
主干 0.9 mm 组 LMPV 0.9 mm group	20.62	62.61	64.79
左外叶切除组 LLLR group	17.03	87.12	90.98
假手术组 Sham operation group	18.74	57.09	68.75

3 讨论

虽然门静脉主干结扎法制备大鼠门脉高压动物模型目前在国内外已得到广泛应用, 但其术后死亡率仍然较高, 可达到 20% 甚至更高^[8]。本研究亦有一只大鼠死亡。分析原因, 主要为门静脉血液回

流不畅, 胃肠道及脾大量淤血, 肠管紫绀坏死, 且易出现大量腹水, 容易导致大鼠死亡。而单纯门脉左支结扎大鼠并不会出现以上情况, 因为单纯门脉左支结扎, 门静脉右支保持畅通, 胃肠道及脾静脉无严重淤血, 肠管不会缺氧坏死, 故其术后死亡率低。SD 大鼠肝分为左外叶、左中叶、右叶、尾状叶和二乳

突叶,左肝约占全肝重量的 70%,而门静脉占肝大约 75% 血液供应,故单纯门静脉左支结扎即可严重影响肝血液供应。但目前国内外对单纯门静脉左支部分结扎能否制备门脉高压动物模型研究较少。

本研究显示,六组 SD 大鼠结扎前门静脉压力约为 10.37 cm,与文献中正常 SD 大鼠门静脉压力值大致相同^[9],单纯门静脉左支结扎的 SD 大鼠,其术后门静脉压力较术前及对照组均明显升高,且至术后 30 d 0.6 mm 针结扎门脉左支的大鼠与门脉主干部分结扎的大鼠其门静脉压力差异无显著性表达 $[(16.82 \pm 2.16) \text{ cm H}_2\text{O} \text{ vs } (18.74 \pm 3.20) \text{ cm H}_2\text{O}, P > 0.05]$,所以单纯门脉左支部分结扎也可取得较好的门脉高压模型。

国内外研究显示,对于体重 250 ~ 300 g 的雄性 SD 大鼠,结扎门静脉主干最合适的是 20G 直针(即相当于 9 号针,直径 0.9 mm)^[7,10],既能保证动物较低的死亡率,又能最大限度的提升门静脉的压力。但对于门脉左支部分结扎的合适口径,国内外并无报道。由于门静脉分为左右两支,因此在实验中我们分别应用更细的 0.6、0.7、0.8 mm 针对门静脉左支进行结扎,三组大鼠术后即刻、术后 15 d 及术后 30 d 门脉压力均较术前明显增高,其中利用直径 0.6 mm 针结扎左支 SD 大鼠其术后各时间点门静脉压力均为最高,且在术后 30 d 其与主干结扎大鼠门静脉压力无统计学差异,因此使用直径 0.6 mm 针对门静脉左支进行部分结扎即可取得较好效果。因为大鼠门静脉左支供应左外叶、左中叶,而这其中左外叶占据大部分,所以切除左外叶可有效减少门静脉左支的血液供应。而肝切除后是否伴随着门静脉压力的增高,仍存在着争议。本研究发现,肝左外叶切除后,门静脉压力立即上升,随着时间推移,肝左叶切除组门脉压力稳步下降,至术后 1 个月其与对照组已无统计学差异,这提示我们仅仅减少肝左叶血供并不能形成稳定门脉高压模型;而门脉左支部分结扎则能形成较为稳定的门脉高压模型,由此分析,有可能是门脉左支狭窄导致相关因子产生或增减,维持了门脉高压的状态,因此我们进一步研究了 NO 在其中是否起到相应作用。

之前有研究显示,蛋白 C、蛋白 S、抗凝血酶 III 降低与肝外型门脉高压相关^[11-12]。而在肝内型门脉高压,NO 与肝血管收缩、舒张功能失调及新生血管生成密切相关^[3,4,13]。肝硬化时肝内 NO 合成减少,导致肝内血管阻力增加,门脉压力升高;与此同

时,外周循环 NO 合成增多,使内脏血管扩张、血流量增多,进一步促使门静脉高压形成^[5,14]。

本研究发现,术后 30 d 各组 SD 大鼠肝内及血液内 NO 含量差异无统计学意义。这提示我们,肝外型门脉高压与肝内型门脉高压发生原理并不相同,在肝外型门脉高压中 NO 可能并没有起到关键作用。而最近有研究提示,对门脉结扎的 SD 大鼠使用促 NO 产生的生物制剂并不能有效降低门脉压力,而对肝硬化的 SD 大鼠使用促 NO 产生的生物制剂则能有效降低门脉压力^[15-16]。这与我们研究相符。

但限于本研究时间较短,对术后长期门脉压力及其影响因素研究较少。希望以后有更大样本、更长时间的类似研究。

参 考 文 献 (References)

- [1] Gjeorgjievski M, Cappell MS. Portal hypertensive gastropathy: a systematic review of the pathophysiology, clinical presentation, natural history and therapy[J]. World J Hepatol, 2016, 8(4): 231-262.
- [2] Berzigotti A. Advances and challenges in cirrhosis and portal hypertension[J]. BMC Med, 2017, 15(1): 200.
- [3] Leung TM, Fung ML, Liong EC, et al. Role of nitric oxide in the regulation of fibrogenic factors in experimental liver fibrosis in mice[J]. Histol Histopathol, 2011, 26(2): 201-211.
- [4] Hu LS, George J, Wang JH. Current concepts on the role of nitric oxide in portal hypertension[J]. World J Gastro-enterol, 2013, 19(11): 1707-1717.
- [5] Iwakiri Y, Kim MY. Nitric oxide in liver diseases[J]. Trends Pharmacol Sci, 2015, 36(8): 524-536.
- [6] Van Thiel DH, Gavalier JS, Slone FL, et al. Is feminization in alcoholic men due in part to portal hypertension: a rat model[J]. Gastroenterology, 1980, 78(1): 81-91.
- [7] 刘保荣, 李宗芳, 周蕊, 等. 门静脉主干缩窄法制备 SD 大鼠门静脉高压症模型时最佳口径的探讨[J]. 中华实验外科杂志, 2008, 25(9): 1135-1137.
Liu BR, Li ZF, Zhou R, et al. The best degree of partial portal vein ligation in making a rat model of pre-hepatic portal hypertension[J]. Chin J Exp Surg, 2008, 25(9): 1135-1137.
- [8] Wen Z, Zhang JZ, Xia HM, et al. Stability of a rat model of prehepatic portal hypertension caused by partial ligation of the portal vein[J]. World J Gastroenterol, 2009, 15(32): 4049-4054.
- [9] Polat D, Rizalar R, Tander B, et al. Effects of splenohepatopexy and omentopexy in experimentally induced infrahepatic portal hypertension in rats[J]. Pediatr Surg Int, 2004, 20: 434-438.
- [10] Fernandez M, Mejias M, Angermayr B, et al. Inhibition of VEGF receptor - 2 decreases the development of hyperdynamic splanchnic circulation and portal-systemic collateral vessels in

- portal hypertensive rats[J]. *J Hepatol*, 2005, 43(1): 98-103.
- [11] 张金山, 李龙, 李颀, 等. 蛋白 C、蛋白 S 和抗凝血酶Ⅲ与小儿肝外门静脉高压的关系研究[J]. *中华小儿外科杂志*, 2016, 37(11): 810-814.
- Zhang JS, Li L, Li Q, et al. Relationship between the deficiency of protein C, protein S and antithrombin III with extra-hepatic portal hypertension in children[J]. *Chin J Pediatr Surg*, 2016, 37(11): 810-814.
- [12] 张金山, 李龙, 陈震, 等. 肝外门静脉梗阻对抗凝血因子水平的影响[J]. *中华小儿外科杂志*, 2019, 40(2): 163-166.
- Zhang JS, Li L, Chen Z, et al. Effect of extra-hepatic portal venous obstruction upon the levels of anticoagulant factors in rabbits[J]. *Chin J Pediatr Surg*, 2019, 40(2): 163-166.
- [13] Hsu SJ, Tsai MH, Chang CC, et al. Extrahepatic angiogenesis hinders recovery of portal hypertension and collaterals in rats with cirrhosis resolution[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(6): 669-683.
- [14] Tung HC, Hsu SJ, Tsai MH, et al. Homocysteine deteriorates intrahepatic derangement and portal-systemic collaterals in cirrhotic rats[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2017, 131(1): 69-86.
- [15] Hu L, Su L, Dong Z, et al. AMPK agonist AICAR ameliorates portal hypertension and liver cirrhosis via NO pathway in the BDL rat model[J]. *J Mol Med*, 2019, 97(3): 423-434.
- [16] Tong X, Kono T, Evans-Molina C, et al. Nitric oxide stress and activation of AMP-activated protein kinase impair beta-cell sarcoendoplasmic reticulum calcium ATPase 2b activity and protein stability[J]. *Cell Death Dis*, 2015, 6(6): e1790.

[收稿日期] 2020-04-07