

# 大鼠 70%肝切除后门静脉血流动力学变化及其与肝再生关系初探\*

杨璐璐<sup>1</sup>, 马琳<sup>1</sup>, 王红<sup>1</sup>, 陈克霏<sup>2</sup>, 卢强<sup>2</sup>, 凌文武<sup>1</sup>, 罗燕<sup>1△</sup>

1. 四川大学华西医院 超声科(成都 610041); 2. 四川大学华西医院 肝脏及血管外科(成都 610041)

**【摘要】** 目的 初步探究大鼠 70%肝切除(PH)后门静脉血流动力学变化及其与肝再生的关系。方法 将大鼠随机分为假手术组和 70%PH 组,于术前及术后第 1、3、7、14 天采用 5.0~12.0 MHz 高频超声探头测量门静脉主干管径(PVD)及最大血流速度(PVV);并观察肝组织形态学变化及细胞增殖核抗原(PCNA)表达,计算肝脏再生率(LRR)。结果 大鼠 70%PH 术后第 1 天,PCNA 开始升高,肝细胞以空泡样变为主,肝窦受压变窄,PVD 增粗, PVV 减慢;第 3 天,肝细胞达核分裂高峰期,PCNA 达峰值,肝窦结构紊乱,PVD 达峰值而 PVV 降至最低;术后第 14 天,肝细胞形态和肝小叶结构逐渐恢复,PCNA 恢复至假手术组水平,LRR 增至 90%以上,同时,PVD、PVV 均恢复至假手术组水平( $P>0.05$ )。结论 大鼠 PH 后血流动力学参数 PVD、PVV 与肝细胞的病理改变、核分裂状态、再生肝脏体积等因素有关,为超声应用于临床监测肝细胞再生的深入研究提供了基础依据。

**【关键词】** 大鼠肝脏 部分肝切除 血流动力学 肝脏再生 高频超声

**A Preliminary Study on Portal Vein Hemodynamic Changes and Liver Regeneration in Rats after 70% Partial Hepatectomy** YANG Lu-lu<sup>1</sup>, MA Lin<sup>1</sup>, WANG Hong<sup>1</sup>, CHEN Ke-fei<sup>2</sup>, LU Qiang<sup>1</sup>, LING Wen-wu<sup>1</sup>, LUO Yan<sup>1△</sup>. 1. Department of Ultrasound, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China; 2. Department of Hepatovascular Surgery, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China  
△ Corresponding author, E-mail: luoyan77@vip.sina.com

**【Abstract】** **Objective** To explore portal vein hemodynamic changes and liver regeneration in rats after 70% partial hepatectomy (PH). **Methods** Rats were randomly subjected into sham operation group and 70%PH group. A 5-12 MHz high-frequency linear transducer was applied to measure the portal vein diameter (PVD) and the maximum portal vein velocity (PVV) before and after operation on day 1, 3, 7, 14. On the corresponding time, liver tissue morphological changes were observed, and the expression level of PCNA was measured, and the liver regeneration rate (LRR) was calculated. **Results** On day 1 after PH, PCNA began to increase, and hepatocyte vacuolated obviously which squeezed and narrowed the hepatic sinusoid. Meanwhile, PVD started to dilate and PVV decelerated. On day 3 after operation, PCNA peaked and active mitosis resulted in the disorders of hepatic structure. PVD peaked and PVV decelerated to the lowest. Until the 14 d after operation, the cell morphology, lobular structure and PCNA recovered gradually accompany by LRR above 90%. PVD and PVV also almost recovered to levels closed to sham group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** The hemodynamic parameters PVD, PVV correlated with hepatic pathology changes, mitosis status and regenerated liver volume after PH, which state the potential possibility for ultrasound image study in liver regeneration surveillance.

**【Key words】** Rat liver Partial hepatectomy Hemodynamics Liver regeneration High-frequency ultrasound

大量研究表明,正常生理状态下绝大部分肝细胞处于静息状态,但在受到感染、中毒或部分肝切除(partial hepatectomy, PH)后,肝细胞会迅速开始分裂,表现出强大的再生能力和功能代偿能力<sup>[1-3]</sup>, HIGGINS 等<sup>[4]</sup>在 1931 年提出的大鼠 70%PH 模型是研究肝再生的经典模型。近年来,国内外已有不少学者就大鼠大部肝切除后门静脉血流动力学变化

对肝脏再生的影响进行了相关研究<sup>[5-7]</sup>,但多采用门静脉压力值作为血流动力学评估指标,因门静脉压力测量方法较复杂、且大多有创,在临床上难以广泛开展。超声作为一种安全无创的影像学检查方法,能较准确反映肝脏组织声学变化并提供血流信息,可用于肝疾病模型建立的评估与疾病发展的观测和预后评价<sup>[8-9]</sup>,然而采用高频超声作为评估大鼠 PH 后门静脉血流动力学变化,并研究术后血流动力学改变与肝再生关系的研究几乎未见。本研究采用超声多普勒于术前及术后不同时间点测量大鼠

\* 国家自然科学基金面上项目(No. 81101060)资助

△ 通信作者, E-mail: luoyan77@vip.sina.com

门静脉管径及血流速度的变化,同时对肝再生状态进行相关形态学和生物化学观察,初步探究PH后大鼠门静脉血流动力学动态变化及其与肝脏再生状态的关系,考查以超声检测的血流动力学指标间接反映肝脏再生状态的可能,旨在为超声应用于临床监测肝细胞再生的深入研究提供基础依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验动物

健康成年 SPF 级雄性 SD (Sprague-Dawley) 大鼠 30 只,体质量 200~400 g,7~14 周龄,购自成都达硕生物科技有限公司,饲养于四川大学华西科技园动物实验中心,饲养间恒温(23~25 °C),12 h 明暗交替。所有动物自由进食、饮水,适应环境 1 周。

### 1.2 实验试剂

体积分数为 4% 的甲醛、75% 的乙醇、二甲苯、石蜡、苏木精、伊红、小鼠抗大鼠细胞增殖核抗原(PCNA)单克隆抗体(购于美国 BD 公司),Motic BA210 光学显微镜。

超声检测仪:Philips iU22 超声诊断仪(探头型号 L12-5;频率 5.0~12.0 MHz)。

### 1.3 动物分组与模型建立

将大鼠随机分为假手术组(SOR 组,6 只)和 70%PH 组(PH 组,24 只),并按大鼠处死时间(术后第 1、3、7、14 天)将 PH 组分为 4 个亚组,每组 6 只。

所有动物模型的建立由同一经验丰富的外科医生在无菌条件下完成,手术均于上午 9 时~12 时 30 分进行,乙醚麻醉大鼠后备皮。SOR 组开腹后腹腔给予 3.2 万 U 青霉素及 5 mL 0.9% NaCl 后关腹。PH 组参照 HIGGINS 等<sup>[4]</sup>介绍的手术方法,游离门静脉和肝周韧带后,切除肝中叶及左外叶,并用电子天平称量切除肝脏湿重。术后 1 h 皮下注射 50 U 的低分子肝素。术后大鼠自由饮水、进食。

### 1.4 超声观察

术前及术后第 1、3、7、14 天乙醚吸入麻醉大鼠后取仰卧位,用宠物电动推于右上腹检查区脱毛。采用二维灰阶超声高频探头(频率 5~12 MHz)于门静脉入肝前 0.5 cm 处测量主干前后径(portal vein diameter, PVD),频谱多普勒测定门静脉最大血流速度(portal vein velocity, PVV)。测量血流速度时根据血管走行方向和内径调节取样容积为 0.5 mm<sup>3</sup>,校正声束与血流之间夹角<60°,增益调至不产生噪声信号的最大灵敏度。以上检查均由同

一经验丰富的超声科医生完成,每项指标结果取 3 次测量平均值。

### 1.5 病理取材及检测

PH 组各亚组大鼠在超声检查后处死,SOR 组在术后第 14 天处死,立即取出肝脏并称重,根据大鼠体质量及手术切除肝脏质量计算肝脏再生率(liver regeneration rate, LRR)<sup>[10]</sup>。

取约 2.0 cm<sup>3</sup> 肝脏组织,以体积分数为 10% 的中性甲醛溶液固定,石蜡包埋,5 μm 厚度连续切片,行 HE 染色及免疫组化染色(免疫组化染色方法按照 SABC 试剂盒说明书进行)。光镜下观察 PH 后不同时间肝脏组织形态学变化及 PCNA 的表达,以肝细胞核呈棕黄色为阳性。

取约 100 mg 肝组织样本,置于冻存管内,液氮保存,行 Western blot 半定量分析肝组织 PCNA 的表达。以 β-actin 为内参。

### 1.6 统计学方法

所有计量资料结果用  $\bar{x} \pm s$  表示。采用最小显著差异法(least significant difference, LSD)对术后不同时间超声观测指标、肝脏再生率、病理结果进行两两比较,对于方差不齐的资料采用 Dunnett-*t*3 检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 手术建模情况

24 只 PH 组大鼠均成功建立大鼠 70%PH 模型,术后大鼠活动少,术后 24 h 后,大鼠开始正常活动、进食。

**2.1.1 70%PH 后门静脉形态的改变** 二维灰阶声像图上大鼠门静脉均能清楚显示,门静脉从尾端向头端走行清晰可见。术后不同时间 PVD 变化如图 1 所示,PVD 从术后第 1 天开始增粗,至第 3 天达到高峰,随后开始下降,术后第 3 天 PVD 高于假

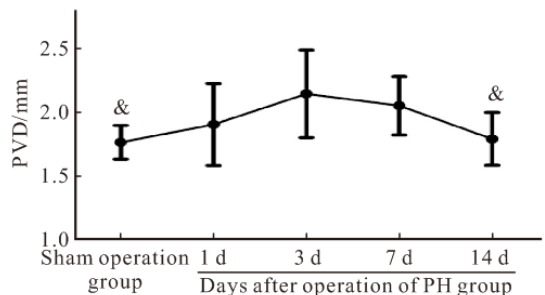


图 1 假手术组和 PH 组术后不同时间门静脉主干管径  
Fig 1 Portal vein diameters (PVD) after operation at different times  
&.  $P < 0.05$ , vs. 3 d

手术组及术后第 14 天( $P < 0.05$ ),而术后第 14 天与假手术组 PVD 差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.1.2 70%PH 后门静脉血流速度的改变** 彩色多普勒图像上门静脉表现为向肝血流,测得的 PVV 随时间变化如图 2 所示,PVV 术后第 1 天较假手术组稍减慢,第 3 天降至最低,流速低于术前( $P < 0.05$ );第 7、14 天流速逐渐回升,但至第 7 天流速仍低于假手术组( $P < 0.05$ ),术后第 14 天与假手术组差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

**2.2 肝脏再生率**

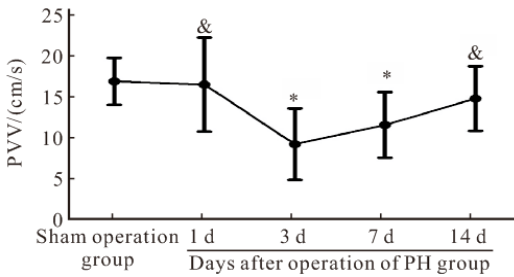


图 2 假手术组和 PH 组术后不同时间门静脉血流速度

Fig 2 Portal vein velocity (PVV) after operation at different times

\*  $P < 0.05$ , vs. sham operation group; &  $P < 0.05$ , vs. 3 d

图 3 示术后第 1、3、7、14 天肝脏再生率呈递增趋势,至术后第 14 天,每单位体质量肝脏质量基本恢复到假手术组水平(LRR > 90%)。

**2.3 肝脏再生病理观察**

**2.3.1 HE 染色光镜下肝组织形态学观察** 正常肝细胞为多角形,核大而圆,有一至数个核仁,以中央静脉为中心呈放射状向四周单层排列,形成肝细胞索,其间有肝血窦(图 4A)。术后第 1 天,肝细胞

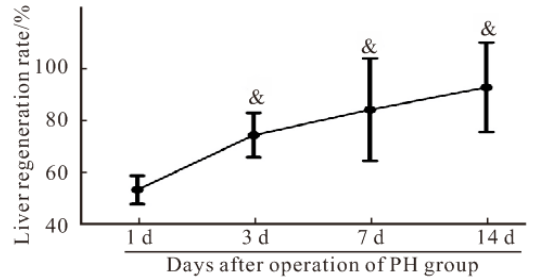


图 3 大鼠术后不同时间肝脏再生率

Fig 3 Liver regeneration rate (LRR) after operation at different times

&  $P < 0.05$ , vs. 1 d

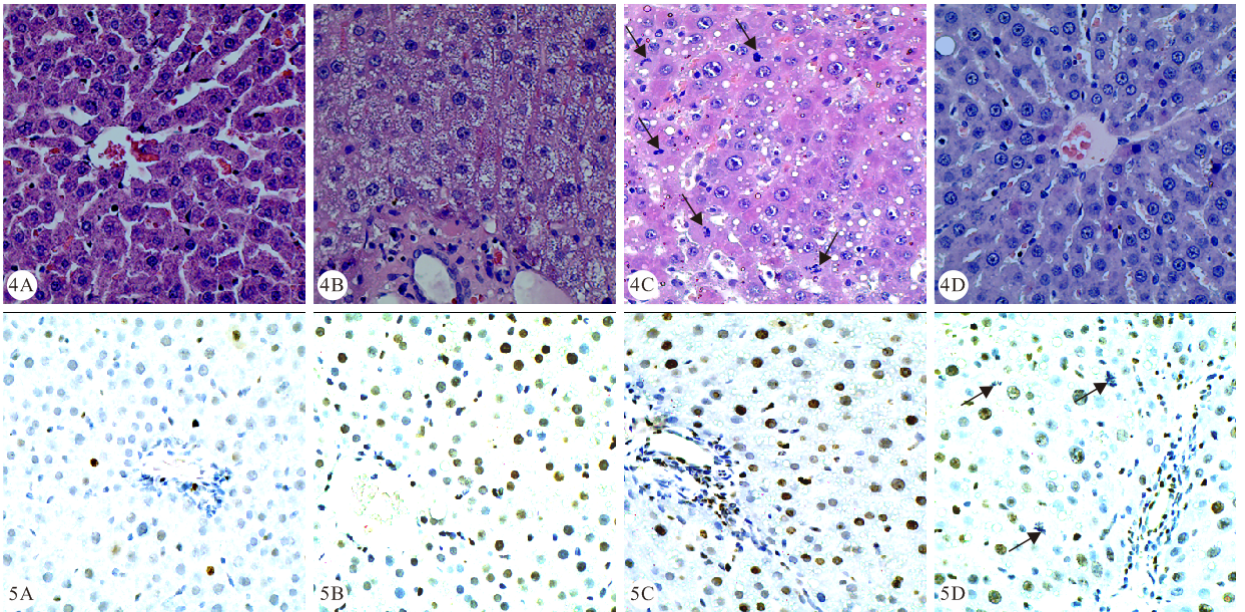


图 4 假手术组和 PH 组大鼠术后不同时间肝组织形态学变化。HE  $\times 400$  结果。SABC  $\times 400$

Fig 4 Morphologic changes of rat liver tissue at different times. HE  $\times 400$  SABC  $\times 400$

图 5 假手术组和 PH 组大鼠肝细胞 PCNA 免疫组化染色结果

Fig 5 Immunohistochemical results of hepatic PCNA in rats.

4A, 5A: Sham operation group; 4B, 4C, 4D: 1 d, 3 d, 14 d after operation of PH group (the arrows showed the mitotic figures of hepatic lobule in 4C); 5B: Central area of hepatic lobule at 1 d after operation of PH group; 5C: Portal area of hepatic lobule at 1 d after operation of PH group; 5D: Portal area of hepatic lobule at 3 d after operation of PH group, the arrows showed the mitotic figures which presented negative reaction after PCNA staining

体积增大,胞浆内充满大小不等、周界清楚的微型空泡,肝窦受压变窄,以周边汇管区明显(图4B),肝小叶周边区可见多少不一的核分裂象。术后第3天,肝小叶周边及中央区可见核分裂象明显增多,以汇管区突出,肝细胞仍有不同程度的空泡样变,细胞聚集呈团,排列紊乱,正常肝板结构显示不清,肝窦仍狭窄,可见较多巨核及双核细胞(图4C)。术后第7、14天,肝细胞脂肪变性及玻璃样变性程度逐渐减轻,细胞形态及肝窦结构恢复(图4D)。

**2.3.2 免疫组织化学染色结果** 正常大鼠仅见少数胞核着棕色的PCNA阳性细胞(图5A)。肝部分切除术后第1天,PCNA阳性细胞数量开始增多,主要集中于肝小叶周边汇管区(图5B、5C)。术后第3天,PCNA阳性细胞仍较多,而中央区处于核分裂状态的细胞呈阴性反应(图5D)。7d以后,PCNA阳性细胞明显减少,至第14天其表达与正常肝组织相近。

**2.3.3 Western blot 半定量测定结果** 如图6所示,术后第1、3天PCNA升高,且大于假手术组( $P < 0.05$ ),随后逐渐下降,恢复至假手术组水平。

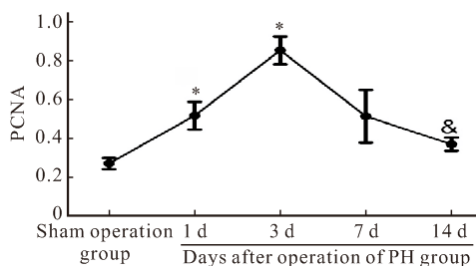


图6 假手术组和PH组术后不同时间大鼠PCNA表达

Fig 6 Expressions of PCNA after operation at different times

\*  $P < 0.05$ , vs. sham operation group; &  $P < 0.05$ , vs. 3 d

### 3 讨论

正常大鼠肝脏以多倍体肝细胞居多,四倍体占70%~80%,还有少量八倍体,但生理状况下处于有丝分裂的成熟肝细胞仅占约0.0012%~0.01%<sup>[3]</sup>。在受到肝切除后,损伤相关因子触发残留肝细胞开始迅速增殖,同时,肝脏血流动力学也会发生改变。超声不仅能较准确地测得门静脉管径,还能观测到血流方向及速度,能在一定程度上反映肝脏的血流动力学状态<sup>[8,11]</sup>。

当肝脏部分切除后,相关损伤因子触发残留肝细胞开始有序增殖,其中肝实质细胞最先进入细胞周期,于PH后10~12h开始DNA合成,且再生从

肝小叶周边汇管区开始,36~48h扩展到中央区<sup>[2-3]</sup>。PCNA是一种仅在增殖细胞中合成和表达的核蛋白,其在细胞分裂周期 $G_0 \sim G_1$ 期无明显表达, $G_1$ 晚期表达大幅增加,S期达峰值, $G_2 \sim M$ 期开始下降,其变化与DNA的合成是一致的,可作为评价细胞增殖状态的指标。本实验中,我们通过病理形态学资料观察到:肝细胞核分裂象首先出现在周边区,第3天中央区开始增多,且处于核分裂象的细胞PCNA染色呈阴性反应,这与文献报道的PCNA在细胞增殖周期M期不表达或呈低表达的特性是一致的<sup>[12]</sup>。然而,BACKES等<sup>[13]</sup>曾报道大鼠70%PH后,Ki-67表达高峰出现在术后48~72h,峰值集中在48h。而本实验因考虑到核分裂的高峰时间,即术后72h<sup>[14]</sup>是最有可能造成血流动力学改变的时间点,故选择术后72h而非48h作为研究观察点,而这并不影响本实验的研究结果。术后第3天,肝细胞分裂基本完成,再生的小的肝细胞围绕在毛细血管周围聚集成细胞团,随后肝星状细胞分泌层黏蛋白,将呈团状分布的肝细胞分隔成典型的肝板结构,毛细血管逐渐演化成肝窦,此过程可持续至术后2周。术后第14天,我们观察到光镜下肝小叶结构恢复到正常状态,而LRR升至 $(92.70 \pm 17.34)\%$ ,这与马明等<sup>[15]</sup>报道的小鼠PH后术后第10d,小鼠肝质量达原来的90%基本一致。

70%肝切除后,原来供应整个肝脏的门静脉血流灌注到仅剩余的30%体积的肝组织,肝窦血管床面积较术前明显减少,血管阻力增大,门静脉压力升高。本研究中,70%PH术后第1、3天PVD增粗,第3天达高峰,第7、14天下降。PVV则在术后第1天减慢,第3天达最低值,术后7、14天流速回升。这种变化趋势可能与PH后肝细胞增殖状态和肝窦血流阻力变化有关。有研究表明<sup>[16]</sup>,肝切除早期肝脏始终处于门静脉高压状态,而门静脉压力升高可以引起肝细胞空泡样变及肝窦内皮病变,本实验HE染色结果显示PH术后第1天,肝细胞肿大,胞质疏松,内出现大小不一、周界清楚的微型空泡,肝窦受压变窄,肝窦面积减小,与以往报道一致。术后第1天,肿大的肝细胞及受压变窄的肝窦使门脉血流入肝阻力增大,PVD增粗、PVV减慢;术后第3天肝细胞变性不如第1天明显,但结合HE染色结果我们发现此时的肝细胞处于有丝分裂高峰期,肝细胞呈团状聚集,排列紊乱,正常肝板结构尚在重建中,肝窦依然狭窄,肝窦面积仍低于术前,此时门静脉血流阻力进一步增大,PVD达最大值,而PVV值

降至低谷;术后第 7、14 天,镜下可见肝小叶中央区及周边区肝细胞和肝窦形态基本恢复正常,随着肝细胞分裂的完成、肝血窦的重建和再生肝脏体积的恢复,门静脉高压得到缓解,血流阻力减小,PVD 及 PVV 也逐渐恢复。

本研究实现了对 70% PH 后肝再生病理基础的初步了解,并证明大鼠 PH 后超声血流动力学参数 PVD、PVV 与肝细胞的病理改变、核分裂状态、再生肝脏体积等多种因素有关,为进一步探索超声监测 PH 后肝细胞再生的深入研究提供了基础依据。

### 参 考 文 献

- [1] MICHALOPOULOS GK. Liver regeneration after partial hepatectomy: critical analysis of mechanistic dilemmas. *Am J Pathol*,2010,176(1):2-13.
- [2] KONIARIS LG, MCKILLOP IH, SCHWARTZ SI, *et al.* Liver regeneration. *J Am Coll Surg*,2003,197(4):634-659.
- [3] MICHALOPOULOS GK, DEFRANCES MC. Liver regeneration. *Science*,1997,276(5309):60-66.
- [4] HIGGINS GM, ANDERSON RM. Experimental pathology of the liver. 1 Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *ARCH Pathol*,1931,12: 186-202.
- [5] 张红军,王 义. 大鼠广泛肝切除术后门静脉高压所致肝衰竭模型的建立. *武警医学*,2010,21(4):296-299.
- [6] MARUBASHI S, SAKON M, NAGANO H, *et al.* Effect of portal hemodynamics on liver regeneration studied in a novel portohepatic shunt rat model. *Surgery*,2004,136(5):1028-1037.
- [7] FAHRNER R, PATSENKER E, DE GOTTARDI A, *et al.* Elevated liver regeneration in response to pharmacological reduction of elevated portal venous pressure by terlipressin after partial hepatectomy. *Transplantation*,2014,97(9):892-900.
- [8] HUANG TL, CHEN TY, TSANG LL, *et al.* Hemodynamics of portal venous stenosis before and after treatment in pediatric liver transplantation: evaluation with Doppler ultrasound. *Transplant Proc*,2012,44(2):481-483.
- [9] LUTZ HH, GASSLER N, TISCHENDORF FW, *et al.* Doppler ultrasound of hepatic blood flow for noninvasive evaluation of liver fibrosis compared with liver biopsy and transient elastography. *Dig Dis Sci*,2012,57(8):2222-2230.
- [10] KWON AH, UETSUJI S, YAMAMURA M, *et al.* Effect of administration of fibronectin or aprotinin on liver regeneration after experimental hepatectomy. *Ann Surg*, 1990,211(3):295-300.
- [11] LEE H, LIM CW, YOO SH, *et al.* The effect of Doppler ultrasound on early vascular interventions and clinical outcomes after liver transplantation. *World J Surg*,2014,38(12):3202-3209.
- [12] 韦 伟,龚建平,裘法祖. 大鼠肝再生期间两种检测细胞增殖与凋亡方法的比较. *中华实验外科杂志*,2002,19(6):603.
- [13] BACKES AN, TANNURI AC, BACKES FN, *et al.* Effects of tarolimus and insulin in a liver regeneration model in growing animals with portal vein stenosis: immunohistochemical and molecular studies. *Pediatr Surg Int*,2014,30(4):423-429.
- [14] HARKNESS RD. Changes in the liver of the rat after partial hepatectomy. *J Physiolm*,1952,117(3):267-277.
- [15] 马 明,盛哲津,张梦杰,等. 肝脏大部分切除实验在小鼠肝再生研究中的应用. *中国细胞生物学学报*,2011,33(2):112-118.
- [16] PANIS Y, MCMULLAN DM, Emond JC. Progressive necrosis after hepatectomy and the pathophysiology of liver failure after massive resection. *Surgery*,1997,121(2):142-149.

(2015-11-16 收稿,2016-02-20 修回)

编辑 汤 洁