

❖ 实验研究

Portal venous velocity ratios in different degrees of portal vein stenosis following 70% partial hepatectomy of rats

MA Lin¹, YANG Lulu¹, CHEN Kefei², WANG Hong¹, LU Qiang¹,
LING Wenwu¹, LUO Yan^{1*}

(1. Department of Ultrasound, 2. Department of Hepatovascular Surgery, West China Hospital,
Sichuan University, Chengdu 610041, China)

[Abstract] **Objective** To analyze the changes of portal venous velocity (PVV) ratio (PVVR) in different degrees of portal vein stenosis (PVS) following 70% partial hepatectomy (PH) in rats. **Methods** According to different surgical methods, 102 SD rats were randomly subjected into sham operation rats group ($n=6$), non-PVS group, mild, moderate and severe PVS group (each group $n=24$). Models of 70% PH without PV ligation were established in non-PVS group, while in PVS groups were produced with partially ligating PV in different degrees following 70% PH. PVV was measured 1, 3, 7 and 14 days after operation, and PVVR was calculated in PVS groups. Combined with mitotic index (MI) 3 days after operation and liver regeneration degree (LRD) 7 days after operation, the changes of PVVR in different groups were analyzed. **Results** MI of non-PVS and moderate PVS groups were significantly higher than that of mild PVS group (both $P<0.05$), while of severe PVS group was significantly lower than that of moderate PVS group ($P<0.05$). LRD of severe PVS group was significantly lower than that of non-PVS and moderate PVS groups (both $P<0.05$). In non-PVS group, PVV decelerated to the lowest 3 days after operation, and recovered 7 and 14 days. In PVS groups, PVVR decelerated to the lowest 7 days after operation, and recovered until 14 days. PVVR of severe PVS group was significantly higher than that of mild and moderate PVS groups 1 and 3 days after operation (all $P<0.05$), while there was no statistical differences among PVS groups 7 and 14 days after operation (all $P>0.05$). **Conclusion** Ultrasound can well demonstrate blood flow changes of PVS following 70% PH in rats. Changes of PVVR may relate to pathological changes in hepatocytes, the nuclear division and the volume of regenerated liver in rats.

[Key words] Rats; Liver; Hepatectomy; Portal vein; Ultrasonography; Blood flow velocity

DOI:10.13929/j.1003-3289.201707095

大鼠 70% 肝切除后不同程度门静脉狭窄 门静脉流速比值

马琳¹, 杨璐璐¹, 陈克霏², 王红¹, 卢强¹,
凌文武¹, 罗燕^{1*}

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

[摘要] **目的** 观察大鼠 70% 肝切除后不同程度门静脉狭窄(PVS)模型门静脉血流速度(PVV)比值(PVVR)变化。
方法 根据手术方法将 102 只大鼠随机分为对照组($n=6$)、无 PVS 组及轻、中、重度 PVS 组(每组各 24 只)。对无 PVS

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81071163, 81371556)。

[第一作者] 马琳(1986—), 女(回族), 甘肃天水人, 硕士, 主治医师。研究方向: 腹部疾病的超声诊断。E-mail: malin2010US@163.com

[通信作者] 罗燕, 四川大学华西医院超声科, 610041。E-mail: luoyan77@vip.sina.com

[收稿日期] 2017-07-20 **[修回日期]** 2018-03-21

组大鼠仅行 70% 肝脏切除而不结扎门静脉, 轻、中、重度 PVS 组则在部分肝脏切除基础上不同程度结扎门静脉。于术后 1、3、7、14 天超声检测 PVV, PVS 组测量并计算 PVVR, 结合术后 3 天核分裂指数(MI)和 7 天肝再生度(LRD), 分析各组 PVVR 变化。结果 无 PVS 组及中度 PVS 组 MI 高于轻度 PVS 组(P 均 <0.05), 重度 PVS 组 MI 明显低于中度 PVS 组; 重度 PVS 组 LRD 明显低于无 PVS 组和中度 PVS 组(P 均 <0.05)。无 PVS 组术后 3 天 PVV 降至最小, 7、14 天回升。不同程度 PVS 组大鼠术后 7 天 PVVR 下降至最小, 14 天时有所回升, 且术后 1 天和 3 天重度组明显大于轻、中度组(P 均 <0.05), 术后 7 天和 14 天各组间 PVVR 差异均无统计学意义(P 均 >0.05)。结论 超声可准确观察大鼠部分肝脏切除术后 PVS 血流改变; 推测大鼠 PVVR 变化可能与肝细胞病理改变、核分裂状态、再生肝脏体积等因素有关。

[关键词] 大鼠; 肝; 肝切除术; 门静脉; 超声检查; 血流速度

[中图分类号] R543.6; R445.1 [文献标识码] A [文章编号] 1003-3289(2018)06-0812-05

门静脉狭窄(portal vein stenosis, PVS)是肝移植术后常见血管并发症之一。活体肝移植中, 供体与受体门静脉管径不匹配可发生 PVS, 严重时致门静脉血流量明显降低, 影响肝再生与功能, 甚至导致移植失败或受体死亡^[1-2]。超声是临床监测 PVS 的重要手段, 狭窄处与狭窄前门静脉血流速度(portal venous velocity, PVV)比值(PVV ratio, PVVR)是诊断 PVS 的重要指标之一, $PVVR \geq 4:1$ 时可考虑 PVS^[3]。目前少见对肝再生过程中 PVVR 变化的研究。本研究在大鼠 70% 肝切除模型基础上^[4], 采用门静脉部分结扎法建立不同程度 PVS 动物模型^[5-6], 分析肝脏部分切除后不同程度 PVS 时 PVVR 的变化。

1 材料与方法

1.1 实验动物 选取健康成年雄性 SD 大鼠 102 只(购自成都达硕生物科技有限公司), 无特定病原体(specific pathogen free, SPF)级, 7~14 周龄, 体质量 200~400 g; 实验前自由饮水及摄食, 于 23~25℃、12 h 光暗周期环境下适应性饲养 1 周。

将 SD 大鼠随机分为 5 组: ①对照组($n=6$), 仅行剖腹及肝脏游离, 不切除肝叶, 不结扎门静脉; ②无 PVS 组($n=24$), 切除 70% 肝脏, 不结扎门静脉; ③轻度 PVS 组($n=24$), 切除 70% 肝脏后部分结扎门静脉主干, 狭窄程度 0~50%; ④中度 PVS 组($n=24$), 切除 70% 肝脏后部分结扎门静脉主干, 狭窄程度 50%~65%; ⑤重度 PVS 组($n=24$), 切除 70% 肝脏后部分结扎门静脉主干, 狭窄程度 65%~99%。

1.2 动物模型制备

1.2.1 70% 肝切除模型制备 将大鼠麻醉后仰卧位保定于实验台, 参照文献^[4]方法, 切除肝中叶及左外叶(约占肝脏总体积 68%), 并称重。

1.2.2 肝切除后不同程度 PVS 模型制备 切除肝脏后游离门静脉主干, 于门静脉入肝分支以下、脾静脉与门静脉汇合处近心端约 2 mm 处, 以微血管测量尺测量预结扎部位门静脉管径, 根据拟制作 PVS 程度计算

狭窄处管径, 据此选取不同型号针头, 用丝线将门静脉与针头作为整体一同结扎, 之后快速旋转抽出针头, 此时门静脉管径即为针头外径, 从而建立不同程度 PVS。根据北美症状性颈动脉内膜切除术实验协作组(North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators, NASCET)标准^[7]计算门静脉狭窄率, 即门静脉狭窄率 = $(1 - \text{狭窄处血管直径} / \text{正常血管直径}) \times 100\%$ 。

1.3 超声检查 采用 Philips iU22 超声诊断仪, 高频探头 L12-5, 频率 5~12 MHz, 对无 PVS 组和轻、中、重度 PVS 组大鼠于术后 1、3、7、14 天分别随机选取 6 只行肝脏及门静脉扫查, 采用频谱多普勒对各 PVS 组分别测量狭窄处和狭窄前 PVV, 并计算 PVVR: $PVVR = \text{狭窄处 PVV} / \text{狭窄前 PVV}$; 对无 PVS 组测量其 PPV。测量时根据血管走行方向和内径调节取样容积为 0.5 mm, 在不产生噪音信号前提下将增益调至最大, 矫正声束与血流之间夹角 $<60^\circ$ 。均由同一医师采用盲法进行扫查, 所有结果测量 3 次取平均值。

1.4 病理检查 完成超声检查后处死大鼠, 切除残余肝脏并称重, 计算肝再生度(liver regeneration degree, LRD): $LRD = [\text{处死时肝质量} - (\text{术前全肝质量} - \text{切除肝质量})] / \text{切除肝质量}$, 其中术前全肝质量 = $\text{切除肝质量} / 0.68$ ^[8-9]。

对术后 3 天处死的大鼠取体积约为 2.0 cm³ 肝组织, 行 HE 染色并于光镜下观察, 计算核分裂指数(mitotic index, MI)。每个切片分别选取中央区及周边区各 4 个高倍视野($\times 400$), 观察并记录处于核分裂象的细胞数, 计算 MI, MI 为 8 个高倍视野中核分裂细胞数。将对照组大鼠处死, 取肝组织, 于镜下观察有无核分裂。

1.5 统计学分析 采用 SPSS 16.0 和 Graphpad Prism 5 统计分析软件, 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析, 原始数据不服从正态分布时进行对数转换, 组间存在差异者以 LSD 法进行两两比较, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 手术建模及术后一般情况

本组成功建立大鼠 70% 肝脏切除无 PVS 及轻度、中度、重度 PVS 模型各 24 只, 后 3 组门静脉狭窄率分别为 $(44.80 \pm 5.23)\%$ 、 $(59.3 \pm 4.07)\%$ 和 $(69.50 \pm 2.17)\%$ 。各组大鼠术后 24 h 内活动、进食少。无 PVS 组和轻度 PVS 组大鼠术后 24~48 h 内进食和活动开始增多, 中度、重度 PVS 组大鼠术后 3~4 天进食和活动开始增多。术后 7 天, 除重度 PVS 组进食活动稍差外, 其余各组大鼠均恢复正常。

2.2 肝再生情况 无 PVS 组及轻度、中度、重度 PVS 组术后 3 天 MI 分别为 23.67 ± 10.86 及 11.67 ± 7.76 、 26.67 ± 9.79 、 13.67 ± 6.62 , 各组间总体差异有

统计学意义 ($F=4.096$, $P=0.020$)。无 PVS 组与中度 PVS 组 MI 均高于轻度 PVS 组 (P 均 <0.05), 重度 PVS 组 MI 明显低于中度 PVS 组 ($P<0.05$), 见图 1、2; 其余各组间两两比较差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。对照组大鼠肝脏未见核分裂象。

无 PVS 组及轻度、中度、重度 PVS 组术后 7 天 LRD 分别为 0.62 ± 0.24 及 0.48 ± 0.13 、 0.55 ± 0.29 、 0.26 ± 0.09 , 各组间总体差异有统计学意义 ($F=3.667$, $P=0.030$)。重度 PVS 组 LRD 低于无 PVS 组和中度 PVS 组 (P 均 <0.05 , 图 3), 其余各组间两两比较差异均无统计学意义 (P 均 >0.05)。

2.3 超声检查结果

2.3.1 无 PVS 组 常规超声均清晰显示大鼠残余肝脏及门静脉血流。无 PVS 组术后 1 天 PVV 较术前无明显变化, 3 天下降至最小, 与术前及术后 1 天 PVV 比较差异均有统计学意义 (P 均 <0.05), 术后 7、14 天

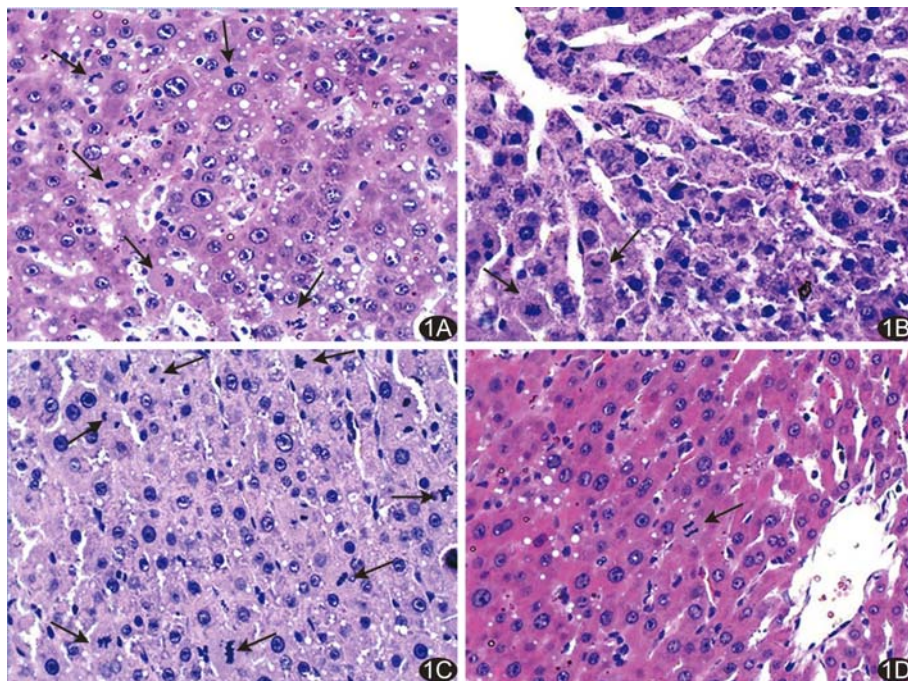


图 1 病理图(HE, $\times 400$) 切除 70% 肝脏后无 PVS 大鼠(A)及轻(B)、中(C)、重度(D)PVS 大鼠中央区核分裂情况 (箭示处于核分裂的细胞)

逐渐回升, 14 天时 PVV 明显高于 3 天时 ($P<0.05$, 图 4)。

2.3.2 PVS 组 常规灰阶超声均可清晰显示 PVS, 多普勒超声见狭窄处血流紊乱, 流速明显增高, 狭窄前流速减慢(图 5)。

各 PVS 组术后 1、3、7、14 天 PVVR 总体差异均有统计学意义 (P 均 <0.05)。轻度 PVS 组术后 3 天 PVVR 与 1 天差异无统计学意义 ($P>0.05$), 7 天下降至最小, 14 天时有回升; 中度及重度 PVS 组术后 PVVR 持续下降, 至 7 天时降至最小, 14 天时有回升(表 1)。

术后 1 天和 3 天 3 组间 PVVR 总体差异有统计学意义 (P 均 <0.05), 其中重度 PVS 组 PVVR 明显高于轻度、中度 PVS 组 (P 均 <0.05), 轻度与中度 PVS 组间差异无统计学意义 (P 均 >0.05); 术后 7 天和 14 天各组间差异均无统计学意义 (P 均 >0.05 , 表 1)。

表 1 各 PVS 组术后 PVVR 变化情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	术后 1 天	术后 3 天	术后 7 天	术后 14 天	F 值	P 值
轻度 PVS 组	4.21 ± 0.78	4.67 ± 1.42	$1.92 \pm 0.51^{* \&}$	$2.53 \pm 1.00^{\&}$	9.148	0.001
中度 PVS 组	7.62 ± 3.79	5.46 ± 2.12	$3.10 \pm 1.79^{* \&}$	$3.24 \pm 2.61^{* \&}$	4.547	0.014
重度 PVS 组	16.26 ± 9.29	9.65 ± 3.97	$2.31 \pm 1.11^{* \&}$	$4.81 \pm 1.81^{* \& \#}$	16.878	<0.001
F 值	10.039	4.408	2.295	1.864	—	—
P 值	0.002	0.031	0.119	0.179	—	—

注: * : 与同组术后 1 天比较, $P<0.05$; & : 与同组术后 3 天比较, $P<0.05$; # : 与同组术后 7 天比较, $P<0.05$

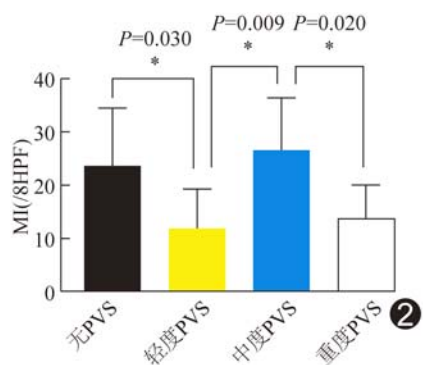


图2 切除70%肝脏后不同PVS模型大鼠术后3天MI柱状图

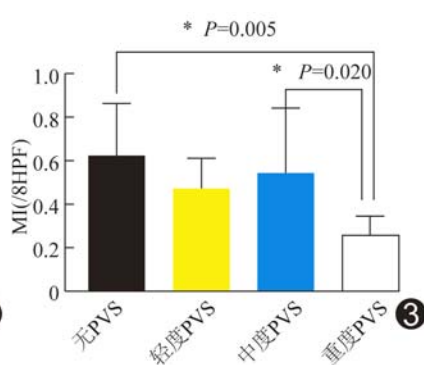


图3 切除70%肝脏后不同PVS模型大鼠术后7天LRD柱状图

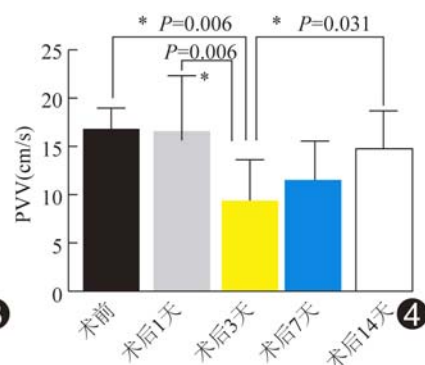


图4 切除70%肝脏后无PVS大鼠不同时间PVV变化柱状图

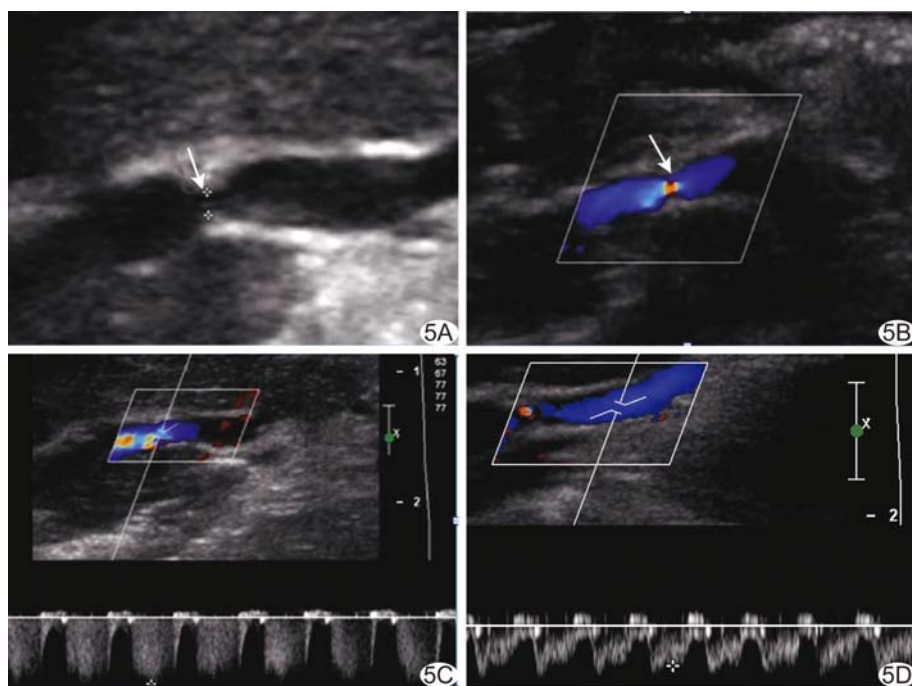


图5 切除70%肝脏后重度PVS大鼠术后3天超声图像 A. 灰阶超声显示PVS(箭); B. CDFI显示PVS处血流紊乱(箭); C. 频谱多普勒超声示狭窄处血流速度明显加快, PVV为77.3 cm/s; D. 频谱多普勒超声示狭窄前血流速度明显减慢, PVV为8.70 cm/s

3 讨论

Higgins等^[4]建立的大鼠70%肝切除模型是目前研究肝再生的经典模型,操作简单,成模时间短,模型稳定,大鼠生存率较高,且便于动态监测血流动力学改变^[10]。门静脉部分结扎法是制作肝前性门静脉高压模型的常用方法^[5-6]。本研究在大鼠70%肝切除基础上结合门静脉部分结扎法,建立不同程度PVS模型。

切除70%肝脏后,大鼠迅速进入肝再生过程,肝再生包括肝实质细胞再生和肝组织结构重建。正常情况下,肝实质细胞分裂指数极低(约1/100 000),肝脏部分切除后即被激活进入细胞分裂周期,术后1天

DNA合成达高峰,3天细胞分裂达高峰,7天时经历1~2次细胞周期,肝脏体积恢复至原有水平^[11]。肝组织结构重建主要由以肝血窦内皮细胞为主的非实质细胞分裂增殖完成,血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)对内皮细胞生长增殖有促进作用。张文学等^[12]发现VEGF表达在肝切除后12 h逐渐增多,3天达高峰后逐渐下降。本研究无PVS组大鼠肝脏部分切除术后3天PVV降至最低,7、14天逐渐回升,可能与肝脏部分切除术后肝细胞增殖状态和肝窦血流阻力变化有关。肝部分切除后肝窦血管床面积减少,血流阻力增加,肝脏处于门静脉高压状态^[13];术后3天,细胞分裂和肝血窦重建逐渐达到高峰,血流阻力进一步增大,

PVV降至最小;术后7天随着肝细胞分裂的完成、肝血窦重建和再生肝脏体积恢复,门静脉高压逐渐缓解, PVV逐渐恢复。

不同程度PVS大鼠术后14天内PVVR变化趋势有所差异,且在术后1天和3天重度PVS组PVVR明显高于轻、中度组,而术后7天和14天不同程度PVS组间PVVR无明显差异,其可能影响因素如下:①PVS程度直接影响PVV和PVVR;②不同程度PVS对肝再生的影响不同,使肝细胞分裂及血窦重建水平和速度出现不同程度增高或降低,从而对血流阻

力产生相应影响。本研究术后 3 天中度 PVS 组 MI 明显高于轻度和重度 PVS 组,提示中度 PVS 时,门静脉血流量减少对肝脏造成的损伤在一定范围内与肝再生状态呈负相关^[14],使得肝再生较轻度 PVS 更为活跃,肝细胞分裂及血窦重建水平更高,血流阻力增大可能更加明显;而术后 7 天重度 PVS LRD 明显减低,提示入肝血流量明显减少抑制了肝再生进展,使得血流阻力受到相应影响;③肝再生过程中不同程度 PVS 门静脉血流量变化对流速及比值也有一定影响。

综上所述,超声可准确监测大鼠部分肝切除后 PVS 血流改变;不同程度 PVS 大鼠 PVVR 在肝再生过程中的变化各不相同;随大鼠肝再生进展,PVVR 变化除受狭窄程度影响外,还可能与肝细胞病理改变、核分裂状态、再生肝脏体积等因素有关,尚需进一步研究。

[参考文献]

- [1] Mullan CP, Siewert B, Kane RA, et al. Can Doppler sonography discern between hemodynamically significant and insignificant portal vein stenosis after adult liver transplantation? *AJR Am J Roentgenol*, 2010,195:1438-1443.
- [2] Garcia-Valdecasas JC, Fuster J, Charco R, et al. Changes in portal vein flow after adult living-donor liver transplantation: Does it influence postoperative liver function? *Liver Transpl*, 2003,9(6):564-569.
- [3] Luo Y, Fan YT, Lu Q, et al. CEUS: A new imaging approach for postoperative vascular complications after right-lobe LDLT. *World J Gastroenterol*, 2009,15(29):3670-3675.
- [4] Higgins GM, Anderson RM. Experimental pathology of the liver. Restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal. *ARCH Pathol*, 1931,12:186-202.
- [5] Van Thiel DH, Gavalier JS, Slone FL, et al. Is feminization in alcoholic men due in part to portal hypertension: A rat model. *Gastroenterology*, 1980,78(1):81-91.
- [6] 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. *中华实验外科杂志*, 2008,25(9):1135-1137.
- [7] North American Symptomatic Carotid Endarterectomy Trial Collaborators, Barnett HJM, Taylor DW, et al. Beneficial effect of carotid endarterectomy in symptomatic patients with high grade carotid stenosis. *N Engl J Med*, 1991,325(7):445-453.
- [8] 王鹏飞,李崇辉,张爱群,等.不同入肝血流阻断方式对大鼠肝切除术后肝再生的影响. *中国医学科学院学报*, 2012,34(1):14-18.
- [9] 刘国华,张谷裕,林满洲,等.两种肝再生模型肝切除术后肝再生指数和肝再生度的实验研究. *岭南现代临床外科*, 2012,12(3):168-170.
- [10] Yang L, Luo Y, Ma L, et al. Establishment of a novel rat model of different degrees of portal vein stenosis following 70% partial hepatectomy. *Exp Anim*, 2016,65(2):165-173.
- [11] Nobuoka T, Mizuguchi T, Oshima H, et al. Portal blood flow regulates volume recovery of the rat liver after partial hepatectomy: Molecular evaluation. *Eur Surg Res*, 2006,38(6):522-532.
- [12] 张文学,赵良真,赵艳红,等.血管内皮生长因子在大鼠肝再生过程中的表达变化. *解剖学报*, 2006,37(4):402-406.
- [13] 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.
- [14] 陈栋,陈实,吴力群,等.大鼠肝切除术后肝损伤程度与肝再生状态的动态对比研究. *中华肝胆外科杂志*, 2002,8(6):354-357.

本刊可以直接使用的英文缩略语(二)

经胸超声心动图(transthoracic echocardiography, TTE)
经食管超声心动图(transesophageal echocardiography, TEE)
彩色多普勒血流显像(color Doppler flow imaging, CDFI)
彩色多普勒能量图(color Doppler energy, CDE)
组织速度成像(tissue velocity imaging, TVI)
应变率成像(strain rate imaging, SRI)
速度向量成像(velocity vector imaging, VVI)

脉冲多普勒(pulsed wave Doppler, PWD)
多普勒组织成像(Doppler tissue imaging, DTI)
彩色多普勒成像(color Doppler imaging, CDI)
超声造影(contrast enhanced ultrasound, CEUS)
斑点追踪成像(speckle tracking imaging, STI)
高强度聚焦超声(high intensity focused ultrasound, HIFU)
机械指数(mechanical index, MI)
阻力指数(resistance index, RI)