DOI:10.16016/j.1000-5404.2003.04.010
第25卷第4期 第三军医大学学报 Vol. 25, No. 4
2003年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2003

文章编号:1000-5404(2003)04-0301-04

论著

快速建立继发性脾功能亢进的犬动物模型

刘全达[1],马宽生[1],何振平[1], 丁钧[1],董家鸿[1],何长生[2] (第三军医大学附属西南医院:[1]全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院;[2]检验科,重庆 400038)

提 要:目的 介绍一种快速建立的继发性脾功能亢进的犬动物模型。方法 通过结扎犬的脾静脉主干和脾静脉属支引起淤血性脾肿大,观察动物外周血细胞变化,了解脾脏影像学变化以及组织病理学改变。结果 脾静脉结扎后1周外周血红细胞、血小板即下降,第3周以后二者下降明显($P<0.05$),红细胞和血小板减少、脾肿大可持续9周以上;术后第2周起,脾脏组织学改变符合脾淤血改变;脾切除术后红细胞和血小板逐渐恢复正常。脾静脉结扎后白细胞水平无显著改变。结论 脾静脉结扎建立继发性功能亢进方法简单、确切,可以作为脾功能亢进外科或介入治疗的较理想模型。

关键词:继发性脾功能亢进;脾静脉结扎;动物模型;脾切除术;犬
中图法分类号:R-332; R551.1 文献标识码:A

Rapid establishment of a canine model of secondary hypersplenism

LIU Quan-da, MA Kuan-sheng, HE Zhen-ping, DING Jun, DONG Jia-hong, HE Chang-sheng (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: Objective To introduce a method for the rapid establishment of a canine model of secondary hypersplenism. Methods Congestive splenomegaly was induced by ligation of splenic vein and its collateral branches in mongrel dogs. The blood cell counts for peripheral venous blood were determined weekly, the data of spleen size examined by radiological examinations and histopathological changes of spleen observed regularly. Results The erythrocyte and platelet counts decreased in the first postoperative week after splenic vein ligation, and were significantly lower at the end of 3rd week ($P<0.05$) and thereafter sustained. The splenomegaly, erythrocytopenia and thrombocytopenia remained over 9 weeks. Since the 2nd week after splenic vein ligation, the splenic histopathological changes conformed to the changes of congestive splenomagely. The low levels of erythrocyte and platelet counts were recovered gradually and approached similarly to the levels in the control group at two weeks after splenectomy. No significant changes of the leukocyte counts were observed after splenic vein ligation throughout the experiment. Conclusion The method of splenic vein ligation to induce experimental secondary hypersplenism is a simple, effective and relatively ideal model for surgical or interventional therapy in hypersplenism.

Key words: secondary hypersplenism; ligation of splenic vein; animal model; splenectomy; dog

继发性脾功能亢进(以下简称"脾亢")是肝硬化的最常见表现之一,主要表现为脾脏肿大、外周血中白细胞、红细胞和血小板一系或多系减少,其直接后果是凝血机制紊乱和机体免疫力下降。脾切除术是外科最常用的方法,且疗效确切。但随着对脾脏免疫功能认识的深入,尽可能地保留部分脾脏功能已经得到普通外科医师的公认[1]。而且临床也逐渐应用选择性脾动脉栓塞术[2]、脾内无水酒精注射[3]等微创方法治疗继发性脾亢。但在继发性脾亢的微创治疗的实验研究中,尚缺乏脾脏肿大的大动物模型[4,5]。我们在对脾脏射频消融治疗脾亢的实验研究中,建立了一种快速诱导的继发性脾亢的犬动物模型,现报告如下。

1 材料和方法

1.1 动物分组及动物处理

1.1.1 动物分组 健康成年杂种犬18只(第三军医大学实验动物中心提供),雌雄不拘,体重12~17 kg,随机分为3组:I组(对照组,$n=4$);II组(脾静脉结扎,$n=10$);III组(脾静脉结

基金项目:全军"十五"医学科研计划重点课题(02Z005)
作者简介:刘全达(1971-),男,江苏省宜兴市人,博士研究生,主要从事肝胆胰脾外科的临床和基础方面的研究,发表论文10篇。电话:(023)65398541
收稿日期:2002-09-10;修回日期:2002-11-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

扎+脾切除, $n=4$)。

1.1.2 动物处理 脾静脉结扎参照文献[5]加以改良。动物空腹过夜, 腹部备皮后, 以速眠新(长春市军需大学兽医研究所提供)肌肉注射(0.1 ml/kg)全身麻醉, 建立静脉通道, 术中快速输入平衡液500 ml, 无菌条件下手术: Ⅰ组剖腹术; Ⅱ组剖腹术+脾静脉结扎; Ⅲ组剖腹术+脾静脉结扎。为避免脾静脉侧支循环建立, 在脾静脉汇入门静脉处结扎脾静脉主干后20 min, 再在脾门处分别结扎扩张的脾静脉属支。术后归圈饲养, 温度(24±2)℃, 食水不限。术后第2周再手术, Ⅰ组: 剖腹术; Ⅱ、Ⅲ组: 剖腹术+脾静脉侧支血管结扎。术后第3周再次手术, Ⅰ、Ⅱ组: 剖腹术; Ⅲ组: 剖腹术+脾切除术。

1.1.3 脾脏影像学和组织学检查 动物术后每周行腹部CT或超声检查, 了解脾脏大小(脾脏厚度和长径)改变; 实验第2周起第Ⅱ组每周处死1只, 实验第9周动物全部处死, 切除脾脏均经10%福尔马林固定, 石蜡包埋, 连续5 μm切片, HE染色后镜检, 了解脾脏组织病理学改变。

1.1.4 外周血细胞计数 实验当天术前和术后每周采动物外周血行血细胞计数(白细胞、红细胞和血小板)。血标本立即送我院门诊检验科行自动血细胞计数仪Sysmex(K-4500)检测, 每个标本重复2次, 取其均值。

1.2 统计学处理

计量数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 均与对照Ⅰ组行 t 检验。

2 结果

2.1 外周血细胞在脾静脉结扎后、脾切除后的变化

与Ⅰ组(对照组)相比, Ⅱ、Ⅲ组动物在脾静脉结扎后第1周即出现红细胞和血小板下降, 在第3周末血小板[Ⅰ组(398±58)×10^9/L, Ⅱ组(230±86)×10^9/L, Ⅲ组(225±96)×10^9/L; $P<0.05$]; 红细胞[Ⅰ组(6.8±1.2)×10^{12}/L, Ⅱ组(5.1±0.7)×10^{12}/L, Ⅲ组(4.9±0.6)×10^{12}/L; $P<0.05$]显著降低; 第Ⅲ组脾切除术后红细胞和血小板逐渐恢复, 脾切术后2周基本恢复至正常。Ⅱ组到第9周实验结束血小板和红细胞一直保持在低水平。整个实验过程中3组白细胞水平变化均不显著($P>0.05$)。结果见图1~3。

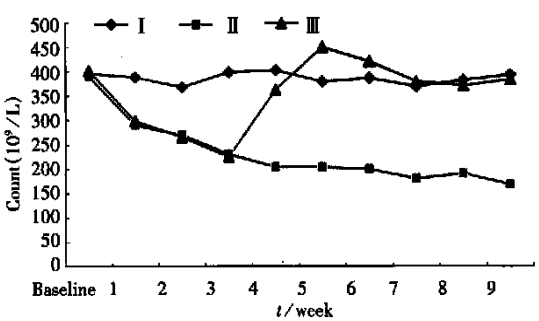


图1 血小板水平的时间动态变化

Fig 1 Temporal dynamic variation of the platelet levels

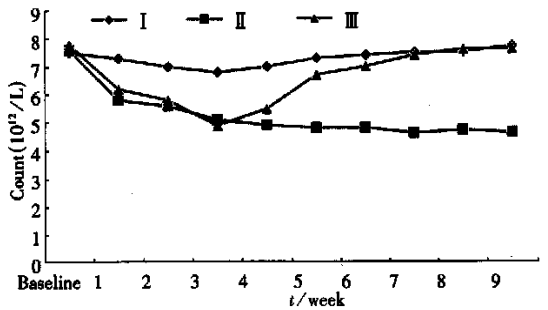


图2 红细胞水平的时间动态变化

Fig 2 Temporal dynamic variation of the erythrocyte levels

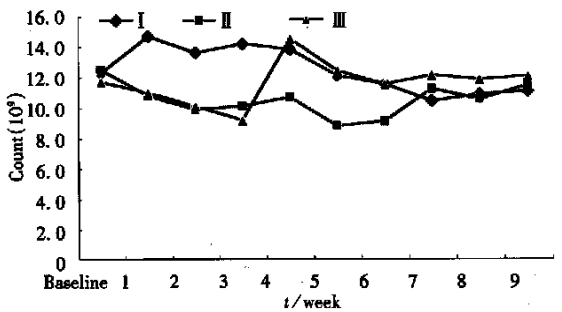


图3 白细胞水平的时间动态变化

Fig 3 Temporal dynamic variation of the leukocyte levels

2.2 脾脏影像学和组织病理学

CT等影像学检查显示脾脏结扎后体积明显增大, 见图4。第2周剖腹时发现脾脏略有缩小, 脾门周围又出现数支扩张的脾静脉属支; 予再次结扎后, 此后探查脾门仅见网状迂曲的小静脉网, 无明显扩张的粗大静脉。组织病理学检查提示, 与正常脾脏结构比较, 脾静脉结扎组第2周末脾脏明显充血, 脾窦扩张、充血, 可见大量红细胞破坏后形成的含铁血黄素巨噬细胞, 见图5A; 4~6周左右除脾窦扩张外, 还可见脾脏内纤维组织增生, 脾窦内有微血栓, 脾内白髓或淋巴小结明显减少, 脾小梁增粗, 脾被膜增厚, 见图5B。上述组织病理学表现符合慢性脾淤血改变。

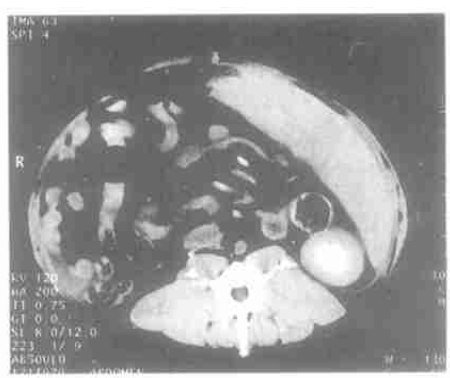


图4 腹部CT扫描显示脾静脉结扎第3周末的巨脾

Fig 4 Massive splenomegaly at the end of 3rd week after splenic vein ligation by CT scan

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

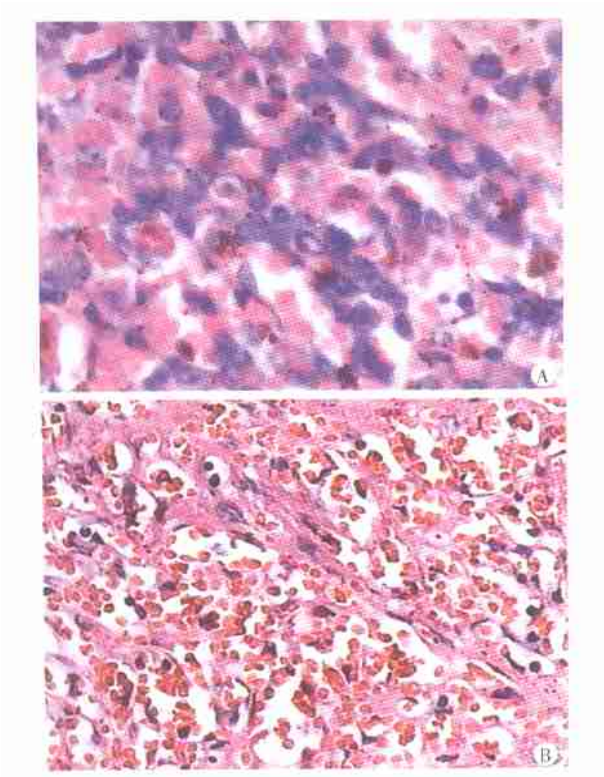


图 5　脾静脉结扎后脾脏组织病理学改变　A: 2 周末(HE×400); B: 6 周末(HE×200)

Fig 5　**Histopathological appearance of the spleen at end of after splenic vein ligation**　A: 2nd week(HE×400); B: 6th week(HE×200)

3　讨论

继发性脾亢最常见的原因是肝炎后肝硬化引起的门静脉高压症。尽管肝脏和骨髓造血因子在脾亢发生中的作用得到确认[6], 但由静脉回流阻力增加引起脾脏内血液淤滞——血液过分阻留作用仍认为是继发性脾亢相关的血细胞减少的主要机制[4,7]。正常情况下约 30%血小板阻留在脾脏, 当脾脏病理性肿大时, 约 80%以上血小板和 30%血细胞被脾脏阻留。肿大脾脏内的单核-巨噬细胞极度增生活跃, 在脾索内不但衰老红细胞被吞噬, 异常或不成熟的红细胞、血小板等均能为巨噬细胞所清除, 血细胞半衰期明显缩短, 导致外周血中红细胞、血小板减少从而引起血小板减少症、红细胞减少症或血细胞减少症。该原理与图 5 显示的红细胞破坏后脾脏内含铁血黄素巨噬细胞异常增多相吻合。

本实验采用脾静脉结扎成功建立继发性脾亢, 该方法类似于临床的脾静脉血栓形成引起区域性门静脉高压(Segmental portal hypertension), 但后者仅 50%左右病人出现脾脏肿大, 脾亢者更少[8,9]。其根本原因是脾静脉慢性闭塞过程中血流逐渐通过扩张的胃短静脉、胃网膜静脉等侧支血管代偿, 因而脾大、脾亢并不明显。为了防止上述侧支形成, Sahin 等[5] 采用在脾门处分别结扎脾静脉属支的方法, 但该方法建立的脾亢仅能维持 5 周左右。我们在实验中发现, 即使在脾门处结扎脾静脉, 术后 1 周探查时仍可见到代偿的粗大脾静脉属支, 脾脏缩小, 提示 1 次手术无法保证彻底的阻断脾静脉流出道。因此我们设计在结扎脾静脉主干基础上, 结合快速液体输入, 待脾静脉属支扩张后, 再在脾门处分别结扎扩张的脾静脉属支, 第 2 周再次结扎代偿的粗大脾静脉属支, 这就尽可能地完成脾静脉流出道的阻断。该方法极大地提高了脾亢动物模型的成功率。由于潜在侧支循环被阻断, 而高压的动脉血流仍持续向脾内灌注, 从而确保巨脾和脾亢能长时间维持。研究表明, 我们的脾亢模型持续时间达 9 周以上。

脾脏长时间淤血状态下, 除脾门周围出现细小网状血管网外, 脾脏组织学结构出现一些特征性改变, 即脾脏被膜增厚、脾窦淤血扩张、白髓萎缩、纤维化, 本实验脾静脉结扎后的组织病理学改变符合上述脾淤血改变。Ⅱ、Ⅲ组动物脾静脉结扎后红细胞和血小板计数在第 1 周即出现下降, 在第 3 周末与对照组相比下降显著, 而且脾静脉结扎引起的红细胞和血小板下降可以被脾切除术纠正。这些结果证实, 脾静脉结扎可以诱导红细胞减少和血小板减少。外周血细胞计数和脾脏组织学改变均提示, 动物脾静脉结扎可以成功建立继发性脾亢模型。

但是在整个实验过程中, 白细胞下降并不显著, 脾静脉结扎后引起的急性脾脏肿大是否能引起机体慢性反应, 刺激并动员全身炎症反应从而代偿白细胞下降? 本实验未进行相关研究。以往研究对病毒性肝炎引起的肝炎后肝硬化发现, 乙肝病毒和丙肝病毒能够抑制骨髓内造血祖细胞的活性[6], 因此提示脾静脉结扎不是脾亢性白细胞减少症的理想模型。

文献[4, 10] 也有腹腔内注射甲基纤维素(Methylcellulose)或明胶海绵诱导鼠的继发性脾大和脾亢模型的报道, 但诱导时间长[10], 一般需要 6～8 周, 而且小动物模型模拟临床研究时存在许多局限性。脾静脉结扎建立的脾亢模型优点是时间短、可以应用大动物成功复制。

随着脾脏免疫功能认识的深入, 尽可能地保留良性脾脏疾病的部分脾脏功能的认识已经被临床医师所接受。临床许多脾亢病人由于全身情况差、高龄或者伴有其他不适合手术的疾病, 如何处理脾亢相对棘手。目前有选择性脾动脉栓塞、脾脏酒精注射等微创措施[2,3], 但临床疗效均不太满意, 前者较多出现脾脓肿, 后者栓塞范围不易控制。我们在探索另一种微创治疗——射频消融治疗脾亢的同时, 深感准确评估射频消

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

融疗效需要一种理想的脾亢动物模型，在比较兔、猪后我们发现狗的脾脏大小相对理想，可以满足射频针展开直径2.0~3.5 cm的工作需要。初步实验结果也发现，与酒精注射不同，射频消融产生高温，可使节段性脾脏血窦内皮损伤，产生血栓、纤维化，脾脏缩小并达到治疗脾亢的目的。

总之，脾静脉结扎建立继发性脾亢方法简单、有效，脾静脉属支的彻底结扎是保证模型成功的关键。该模型可以作为脾功能亢进外科或介入治疗的较理想模型。

（致谢：感谢肝胆科进修医师梁天学、朱斌、马新、吴政谦等在本实验中提供的手术协助，以及放射科周代全副主任技师的鼎力帮助！）

参考文献：

[1] 杨新华，马宏敏，蔡志民. 脾大部切除术加断流术治疗肝硬变门静脉高压症的远期疗效[J]. 中国实用外科杂志，1999，19(12)：723－724

[2] Obatake M，Muraji T，Kanegawa K，*et al*. A new volumetric evaluation of partial splenic embolization for hypersplenism in biliary astresia[J]. J Pediatr Surg，2001，36(11)：1615－1616

[3] 安子元，张志利，徐大毅. 脾内注射酒精治疗脾功能亢进(附2例报告并动物实验研究)[J]. 中华消化杂志，1997，17(1)：56－57

[4] Manning K L，McDonald T P. C3H mice have larger spleens，lower platelet counts，and shorter platelet lifespans than C57BL mice：an animal model for the study of hypersplenism[J]. Exp Hematol，1997，25(10)：1019－1024.

[5] Sahin M，Tekin S，Aksoy F，*et al*. The effects of splenic artery ligation in an experimental model of secondary hypersplenism[J]. J R Coll Surg Edinb，45(3)：148－152

[6] Peck-Radosavljevic M. Hypersplenism[J]. Eur J Gastroenterol Hepatol，2001，13(4)：317－323.

[7] 周永宁，韩 彪，刘全达，等. 门静脉高压症：基础与临床[M]. 兰州：甘肃科学技术出版社，2002. 93－96

[8] Mullan F J，McKelvey S T D. Pancreatic carcinoma presenting as bleeding from segmental gastric varices：pitfalls in diagnosis[J]. Postgraduate Med J，1990，66(775)：401－403.

[9] Sakorafas G H，Tsiotou A G. Splenic-vein thrombosis complicating chronic pancreatitis[J]. Scand J Gastroenterol，1999，34(12)：1171－1177.

[10] 刘经权，陈希炜，陈维佩，等. 脾肿大形态结构与吞噬功能关系的实验研究[J]. 肝胆外科杂志，1994，2(1)：9－12

（编辑 陈聪连）

（上接300页）

者均属于预后良好组织型。

3 讨论

该病是一类罕见的恶性实体瘤，术前确诊困难，误诊率高，本组仅1例术前确诊。发病年龄较轻，多数病史较长，本组1例年龄23岁，病程达6年[1]。肿瘤恶性程度高且生长迅速。最常见的临床表现是无痛性全程肉眼血尿。腰腹部包块及腰腹痛亦为常见症状。青年人出现血尿及腰腹部生长迅速的巨大包块，应警惕本病可能。

光镜检查均可见未分化的间叶组织，具有一定分化的间叶组织和上皮细胞组织三种成分。有的肿瘤组织尚含有软骨、骨、移行上皮细胞、内分泌细胞等，称为畸胎性Wilm瘤[2]。肾母细胞瘤的原始胚基含圆形或卵圆形细胞成分，肾小球或肾小管呈胚胎性发育不全，这是与肾癌鉴别的主要病理依据。按组织分化程度可分为预后组织良好型(FH)和预后不良组织型(UH)。UH患者发病年龄较轻，发病时病变多为晚期，预后明显较差。

本组10例行CT检查，多显示密度不均的巨大肿块，密度普遍低于周围正常组织，增强扫描后稍有强化；3例在低密度区中出现不规则钙化，这应该与瘤体中含有软骨或骨组织有关，可归属为畸胎性Wilm瘤，提示患者预后不良。成人肾母细胞瘤CT表现与肾癌类似，需血管造影才能确诊。82%的成人肾母细胞瘤有特征性动脉造影表现[3]，即“波浪状”肿瘤血管。本组1例行肾动脉造影，肿瘤表现为少血性，供养血管纤细，排列较整齐，并伴有“波浪状”的新生血管进入肿瘤，由此确诊为肾母细胞瘤。我们认为应将动脉造影作为巨大恶性肾肿瘤的常规检查，以降低误诊率。

本组采取手术、化疗和/或放疗相结合的综合治疗。目前已开始采用自体骨髓移植下大剂量化疗[4]以提高疗效和耐受性。FH患者生存期明显长于经相同治疗的UH患者，提示肿瘤组织分化类型更能预示患者的预后。本组II期3例，III期3例患者预后较差，可能与肿瘤浸润范围广，组织分化差，转移危险性更大有关。我们认为，对成人肾母细胞瘤应结合临床分期及组织学类型指导治疗，且组织学类型意义更大。对于各期及各组织类型的成人肾母细胞瘤均应采取手术、化疗、放疗相结合的综合治疗。化疗药物至少3种联用，疗程超过6个月；放疗剂量可采用NWTs推荐的总量4 500 cGy和180 cGy/天的照射剂量[5]。

关键词：肾肿瘤；肾母细胞瘤；成人

中图法分类号：R737.11 文献标识码：B

参考文献：

[1] 叶 锦，靳风烁，江 军，等. 成人肾母细胞瘤1例[J]. 临床泌尿外科杂志，2002，17(4)：168.

[2] 刘彤华. 诊断病理学[M]. 北京：人民卫生出版社，1994. 429.

[3] Kioumehr F，Cochran S T，Layfield L，*et al*. Wilms tumor (nephroblastoma) in the adult patient：clinical and radiologic manifestations[J]. AJR，1989，152(2)：299－302.

[4] Hupperets P S，Havewith M G，Blijham G H. Recurrent adult nephroblastoma[J]. Cancer，1992，69(12)：2990

[5] Roth D R，Wright J，Cawgood C D，*et al*. Nephroblastoma in adults[J]. J Urol，1984，132(1)：108－113

（编辑 陈聪连）

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net