

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.00524

利用分叶顺次肝切除术建立小鼠肝脏大部切除后再生模型

汤朝晖¹, 周露婷², 谢志芳³, 胡以平³, 杨甲梅^{1*}, 章卫平^{2*}, 吴孟超¹

1. 第二军医大学东方肝胆外科医院, 上海 200438
2. 第二军医大学基础部病理生理学教研室, 上海 200433
3. 第二军医大学基础部细胞生物学教研室, 上海 200433

[摘要] **目的:** 利用肝部分切除术, 建立可准确量化和易于操控的小鼠肝脏再生模型, 为研究肝脏再生的细胞和分子生物学机制及其病理学意义提供技术平台。 **方法:** 正常成年 C57BL/6 小鼠经心脏灌注固定后, 逐叶分离肝脏、称重, 计算各肝叶所占肝重的百分比; 麻醉状态下, 分叶顺次无菌切除小鼠肝脏的左外叶、左中叶和右中叶, 建立肝脏大部切除的再生模型; 利用 RT-PCR 方法动态检测术后肝脏甲胎蛋白基因的激活表达特征。 **结果:** 肝左外叶、左中叶和右中叶合计约占小鼠肝脏总重量的 68%, 分叶顺次切除上述 3 个肝叶, 术后动物恢复和存活状态良好, RT-PCR 结果证实甲胎蛋白基因在小鼠肝脏再生中的激活表达。 **结论:** 利用分叶顺次肝切除术, 成功建立了小鼠的肝大部切除后再生模型, 该方法可准确量化肝脏切除的程度, 具有可控性强、简便易行和成功率高等优点, 为小鼠肝再生的研究奠定了基础。

[关键词] 肝解剖; 肝部分切除术; 肝再生

[中图分类号] R 333.4 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)05-0524-03

Establishment of mouse liver regeneration model by consecutive partial hepatectomy

TANG Zhao-hui¹, ZHOU Lu-ting², XIE Zhi-fang³, HU Yi-ping³, YANG Jia-mei^{1*}, ZHANG Wei-ping^{2*}, WU Meng-chao¹

1. Eastern Hepatobiliary Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438
2. Department of Pathophysiology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433
3. Department of Cell Biology, College of Basic Medical Sciences, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To establish a quantifiable and easily manipulable mouse model of liver regeneration by partial hepatectomy, so as to provide a basis for investigating the underlying cellular and molecular mechanisms and pathophysiological significance of liver regeneration. **Methods:** Normal adult C57BL/6 mice were fixed by cardiac perfusion, the liver lobes were dissected and weighed, and the proportions of each lobe were calculated. Under anesthetic and sterile condition, partial hepatectomy was performed by removing the left lateral, left middle, and right middle liver lobes in turn to establish the regeneration model. The activation of alpha-fetoprotein (AFP) gene in the regenerating liver was dynamically monitored by real-time PCR analysis. **Results:** The left lateral, left middle, and right middle liver lobes together accounted for approximately 70% of the total liver weight. The animals survived and lived well after removal of the three lobes in turn. RT-PCR showed that AFP expression was activated in the regenerating livers. **Conclusion:** We have successfully established the mouse model of liver regeneration by consecutive partial hepatectomy. This method can quantify the hepatectomy and is easy to perform, which lays a foundation for studying liver regeneration in mice.

[KEY WORDS] liver anatomy; partial hepatectomy; liver regeneration

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(5): 524-526]

哺乳动物的肝脏具有很强的再生潜能, 相关的细胞和分子生物学机制及其病理生理学意义一直是人们感兴趣的课题。Higgins 和 Anderson 于 1931 年首次对大鼠施行肝部分切除, 建立了肝脏的再生模型^[1]。由于该技术操作简单, 部分切除后的肝再

生接近于正常的生理过程, 具有均一性好、重复性高和可控性强等优点, 已成为肝再生研究的经典动物模型。近年来, 随着转基因和基因打靶技术的发展, 建立一种可量化和易于操控的小鼠肝再生技术平台对肝再生的研究具有重要意义。目前小鼠肝脏切除

[收稿日期] 2008-12-29 **[接受日期]** 2009-04-10

[基金项目] 国家自然科学基金(90608026, 30772478). Supported by National Natural Science Foundation of China(90608026, 30772478).

[作者简介] 汤朝晖, 博士生. E-mail: tzh1236@163.com

* 通讯作者 (Corresponding authors). Tel: 021-81875598, E-mail: jmyang@smmu.edu.cn; Tel: 021-81871020, E-mail: wzhang@smmu.edu.cn

后再生模型的建立主要是参考大鼠肝部分切除的方法,对于小鼠肝脏的解剖特点及肝切除的技术仅有零星报道^[2]。我们利用小鼠心脏灌注技术,对小鼠的肝脏解剖分叶特征进行了系统研究,通过分叶顺次肝切除建立了小鼠的肝脏大部切除后再生模型。

1 材料和方法

1.1 动物 C57BL/6 小鼠从美国 Jackson 实验室引进,于 SPF 级动物房中饲养。取 6~10 周龄小鼠,雌雄不限,体质量 20~30 g。

1.2 肝脏的分叶解剖 正常成年小鼠饥饿过夜,腹腔内注射 4% 水合氯醛(8 μ l/g),麻醉后行腹部十字切口,充分显露肝脏;剪开胸腔,显露心脏,剪开右心耳,将头皮针刺入左心室,用 20 ml 0.1 mol/L PBS (pH 7.4) 灌注去除血液后,再用 20 ml 4% 多聚甲醛灌注固定。游离肝脏周围韧带,完整切除肝脏,离体观察、称量;根据自然肝裂将肝脏进行解剖分叶并分别称量,计算各肝叶占肝质量的百分比。

1.3 肝大部切除术 正常成年小鼠饥饿过夜,腹腔内注射 4% 水合氯醛,麻醉后用安尔碘消毒,行腹正中切口,充分显露肝脏,剪开镰状韧带至下腔静脉前方。挤出小鼠肝脏,用棉签抬起左外叶,剪开肝脏脏面的肝胃韧带和部分肝左侧冠状韧带,此时肝左外叶基本游离。取 1 号丝线置于肝脏脏面,绕过左外叶,在肝脏膈面尽量靠近根部结扎,剪下肝左外叶。同时抬起肝左中叶和右中叶,从脏面绕过 1 号丝线,在肝脏膈面靠近根部处结扎,剪下这两叶。这样就达到了肝脏大部切除(近 70%)。用棉签清除腹腔内出血,查看无活动性出血后,用 0 号丝线分别缝合腹膜和腹壁。小鼠背部皮下注射 5 ml 无菌 5% 葡萄糖溶液,放入 37℃ 温箱待其复苏后正常饲养,观察小鼠的存活状态。

1.4 甲胎蛋白 mRNA 荧光定量 RT-PCR 检测 取

切除的肝脏组织,置液氮中速冻后于 -80℃ 保存。用 TRIzol(Invitrogen 公司)提取肝脏总 RNA,用 Super-Script-III 反转录试剂盒、Oligo(dT)(均为 Invitrogen 公司)为引物合成 cDNA 第一链;用 SYBR green 和甲胎蛋白(AFP)引物在荧光定量 PCR 仪(Mastercycler ep realplex, Eppendorf 公司)进行扩增,由荧光曲线上读出 Ct 值,36B4 作内参照,计算 AFP mRNA 表达相对量^[3]。以肝脏大部切除时切除的组织 AFP mRNA 水平为基数,计算切除术后 24、48 和 72 h 肝脏 AFP mRNA 表达水平的升高倍数。

1.5 统计学处理 所有数据均采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肝脏的解剖和分叶特征 小鼠肝脏位于横膈下,呈分叶状;各叶之间界限明确但相互重叠遮盖。根据人类肝脏解剖分叶的特点和命名习惯,我们把小鼠肝脏分为左外叶、左中叶、右中叶、右上叶、右下叶和尾状叶(图 1),其中尾状叶又分为尾状突、前尾状叶和后尾状叶,尾状突一般很少出现。各叶之间的叶间裂十分明确。左外叶最大,呈扁平梭状,遮盖着尾状叶、胃小弯,其左后方与食管紧密相连。左中叶外侧遮盖了左外叶内 1/4,右中叶遮盖了右上叶的左 1/2,右上叶位于右下叶正上方。右下叶与右肾相邻。尾状叶被胃与其他各叶分开,分为 3 个部分,尾状叶根据与下腔静脉的关系分为前、后尾状叶,形状如同圆盘。尾状突紧贴下腔静脉并和右下叶相连。根据对 20 只正常成年 C57BL/6 小鼠肝脏分叶的分析,各肝叶占总肝质量的百分比分别为:左外叶 37.12%,左中叶 9.46%,右中叶 19.40%,右上叶 13.46%,右下叶 11.48%,尾状叶 7.3%。据此,左外叶、左中叶和右中叶合计约占总肝质量的 68%。

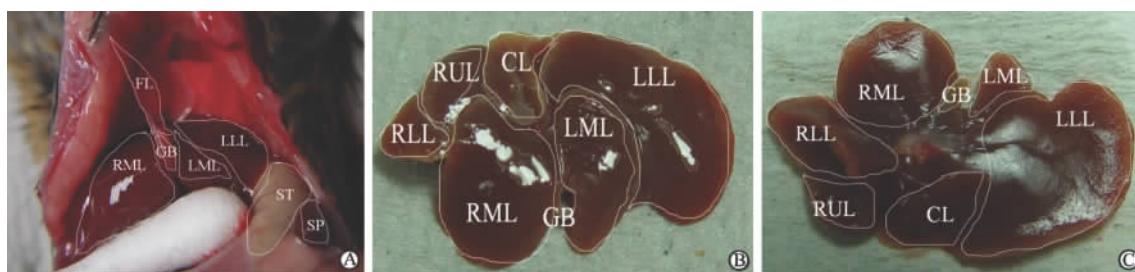


图 1 小鼠肝脏的在体解剖和离体解剖分叶观察

Fig 1 Observation of mouse liver anatomy *in vivo* and *in vitro*

A: *In vivo* inspection; B: Diaphragmatic view; C: Visceral view. LLL: Left lateral lobe; LML: Left middle lobe; RML: Right middle lobe; RUL: Right upper lobe; RLL: Right lower lobe; CL: Caudate lobe. FL: Falciform ligament; GB: Gallbladder; ST: Stomach; SP: Spleen

2.2 分叶顺次肝切除术建立小鼠的大部肝切除后再生模型 根据显露的深浅和手术操作的难易,采取先

左后右、先浅后深的顺序,分叶顺次切除小鼠肝脏的左外叶、左中叶和右中叶,达到肝大部分切除的目的。肝

左中叶和右中叶的肝蒂共干根部融合,故予同时结扎切除。术后补液和温控复苏。我们对20只小鼠进行了肝大部切除术,先期因手术操作尚未熟练导致2只术中死亡,其中1只因误将膈肌剪破、气胸而死,另1只因术中肝脏结扎线脱落、出血死亡。随着熟练度的提高,手术成功率和术后动物存活率达90%以上。

2.3 肝切除后再生肝组织 AFP 表达定量分析 AFP在成年肝脏中的表达水平很低,在肝细胞的再生过程中可被重新激活表达^[3]。我们对肝脏大部切除后的再生肝脏中的 AFP 表达进行了荧光定量 RT-PCR 分析,结果表明切除术后24 h 肝脏 AFP 的表达水平无明显改变,切除后48 h 可观察到其表达水平显著升高,切除后72 h 其表达水平升高8倍左右(图2);48 h 组和72 h 组 AFP 升高倍数与24 h 组相比较,差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。提示大部切除后的残留肝脏开始了有效的肝再生过程。

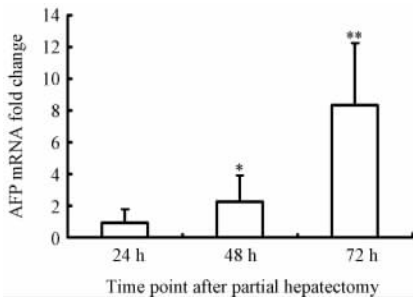


图2 小鼠大部肝切后肝脏 AFP mRNA 的激活表达
Fig 2 Activated expression of AFP mRNA in mouse liver after partial hepatectomy

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs 24 h group; $n = 4$, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

随着转基因和基因敲除小鼠的广泛应用,小鼠作为动物模型的主体越来越受到重视。目前小鼠大部肝切除后再生的研究,基本上借用了大鼠的相关资料。研究发现,小鼠与大鼠的肝脏解剖存在较多差异,如大鼠没有胆囊,大鼠肝脏的分叶、比例与小鼠也不尽相同。我们对实验室最常用的 C57BL/6 小鼠品系的正常成年肝脏的解剖和分叶特征进行了系统分析,并据此分叶顺次切除肝脏的左外叶、左中叶和右中叶,接近于肝脏再生中经典的70%部分肝切除^[4-5],成功建立了小鼠的大部肝切除后再生模型,而 RT-PCR 动态检测结果也证实了 AFP 在肝脏再生过程中的激活表达。剩余肝脏的右上叶和右下叶以及前、后尾状叶都有相对独立的肝蒂,可在此基础上施行更高比例的大部肝切除,以满足不同实验的需要。比如,针对在急性肝衰竭中常用的90%、95%和97%部分肝切除^[6],我们可切除肝脏左外叶、左中叶、右中叶、右上叶和右下叶,仅剩下尾状叶,这样就

切除了小鼠肝脏的90%^[7];如果再切除尾状叶的前叶,可达95%;如果连后叶一起切除,则肝切除的比例可达97%。我们施行的肝分叶顺次切除术与传统的大块结扎术相比,具有可准确量化和控制肝脏切除比例等优点,避免了大块结扎易出现的结扎脱落和出血等并发症,提高了手术成功率。与显微镜下肝切除术相比^[8],我们采取的直视下切除具有操作简便、易于开展等优点。

为提高手术成功率,我们的主要体会是:(1)肝切除前彻底游离肝脏、完整显露肝蒂,以利结扎肝叶。分离、剪开需要切除肝叶的相应韧带;用蚊式钳夹住小鼠剑突,置于小鼠头部附近,以此牵引、上提膈肌,便于显露肝蒂及下腔静脉。(2)用棉签作为牵引、显露、止血等工具,避免损伤肝脏和引起不必要的出血。(3)肝叶结扎时,避免过于靠近下腔静脉引起狭窄,影响回流。根据实验设计,分别用丝线结扎相应肝叶的肝蒂后(左、右肝中叶肝蒂共干只能一起结扎),剪除肝叶。由于切除的是完整肝叶,结扎线处没有过多的组织残留,不易感染和出现胆漏,炎症反应较轻。(4)肝叶结扎、切除时遵循先易后难、先表浅后深部的顺次切除法。(5)术后进行补液和温控复苏。据报道,给术后小鼠饮用20%葡萄糖水,可提高90%以上的极限量肝切除小鼠的存活率^[9]。

【参考文献】

- [1] Higgins G M, Anderson R M. Experimental pathology of the liver: restoration of the liver of the white rat following partial surgical removal[J]. Arch Pathol, 1931, 12: 186-202.
- [2] Martins P N, Theruvath T P, Neuhaus P. Rodent models of partial hepatectomies[J]. Liver Int, 2008, 28: 3-11.
- [3] Xie Z, Zhang H, Tsai W, Zhang Y, Du Y, Zhong J, et al. Zinc finger protein ZBTB20 is a key repressor of alpha-fetoprotein gene transcription in liver[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 10859-10864.
- [4] Rodríguez G, Lorente L, Durán H J, Aller M A, Arias J. A 70% hepatectomy in the rat using a microsurgical technique[J]. Int Surg, 1999, 84: 135-138.
- [5] Fausto N, Riehle K J. Mechanisms of liver regeneration and their clinical implications[J]. J Hepatobiliary Pancreat Surg, 2005, 12: 181-189.
- [6] Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, Dahmen U. Marginal hepatectomy in the rat; from anatomy to surgery[J]. Ann Surg, 2006, 244: 89-98.
- [7] Emond J, Capron-Laudereau M, Meriqqi F, Bernuau J, Reynes M, Houssin D. Extent of hepatectomy in the rat. Evaluation of basal conditions and effect of therapy[J]. Eur Surg Res, 1989, 21: 251-259.
- [8] Martins P N, Neuhaus P. Hepatic lobectomy and segmentectomy models using microsurgical techniques[J]. Microsurgery, 2008, 28: 187-191.
- [9] Nikfarjam M, Malcontenti-Wilson C, Fanartzis M, Daruwalla J, Christophi C. A model of partial hepatectomy in mice[J]. J Invest Surg, 2004, 17: 291-294.

【本文编辑】 商素芳, 邓晓群