

· 实验研究 ·

狗肝功能衰竭模型的制备*

何晓顺 褐文海 黄洁夫

(附属第一医院肝胆外科)

提 要 采用四氯化碳腹腔注射, 辅以营养控制的方法造成狗肝硬化, 然后在此基础上静脉滴注氨基半乳糖, 制备了肝功能衰竭的动物模型。该模型形成后的动物表现、实验室检查指标、组织学改变与临床常见的肝功能衰竭相似。并认为该方法制作的肝衰模型具有形成率高、形成时间短和无须手术的优点, 适宜于作肝移植研究用。

关键词 肝功能衰竭; 肝硬化; 四氯化碳; 氨基半乳糖

中图分类号 R575.3

肝功能衰竭是肝硬化病人常见的终末期表现, 目前尚无有效的内科治疗手段。近年来, 随着器官移植技术的进展, 原位肝移植已广泛地应用于治疗终末期肝病, 取得了良好的效果。但部分病人因全身情况太差, 不能耐受原位肝移植术。因此, 有学者建议用对这类病人采用创伤较小, 对机体干扰较少的辅助性部分肝移植治疗^[1,2]。为了探讨该种肝移植方法治疗肝功能衰竭的可行性, 有必要进行大动物实验。因此, 建立一个理想的符合肝移植条件的大动物肝功能衰竭的模型是一个亟待解决的问题。我们在使用四氯化碳辅以营养控制的方法造成动物肝硬化的基础上, 再用氨基半乳糖诱发犬肝功能衰竭, 取得了成功。现报道如下:

材 料 与 方 法

实验动物

本地杂种犬18只, 雄性, 体重10.5~13kg。实验前病理检查确定无肝硬化。血清丙氨酸转氨酶(ALT)、总胆红素(TBi)、白蛋白(A)、球蛋白(G)、血糖(SG)、凝血酶原时间(PT)均正常。

犬肝硬化的制备

用50%四氯化碳(CCL₄)花生油溶液,

0.24ml/kg腹腔注射, 每周2次, 同时辅以喂养含10%猪油的米饭, 15g/(kg·d), 加10%乙醇为饮料, 共8周。第8周末, 以肝穿刺活检结果, 确定肝硬化形成情况。

犬肝功能衰竭模型的建立

实验第8周末, 上述实验动物经病理检查证实有肝硬化者, 用氨基半乳糖(GaIN), 配制成10%溶液, 800mg/kg 静脉滴注, 诱发肝功能衰竭。肝功能衰竭诊断标准: (1)出现肝昏迷症状、体征。(2)出现进行性肝功能损害, 达到下列指标3个以上: ①ALT 700 IU/L以上; ②凝血酶原时间(PT)较对照组延长5s以上; ③TBi > 40μmol/L; ④肌酐(Cr) > 150μmol/L; ⑤血氨(NH₄) > 70μmol/L; ⑥血糖(SG) < 5.5 μmol/L; ⑦脑电图(EEG)出现异常改变。

观察指标

观察实验动物的一般状况, 实验前、第4周末、第8周末分别查ALT、TBi、PT、Cr、A/G。第4周末及第8周末肝组织穿刺活检; 滴注GaIN后24、48、72、96h分别查ALT、Cr、TBi、血糖。其中3例在滴注GaIN前及用药后72h作脑电图。动物死亡后常规作病理检查。

结 果

肝硬化形成阶段

1. 动物一般状况 注射CCL₄初期, 动物

* 国家教委博士点基金资助课题, 第一作者为博士研究生

表现为呕吐, 食欲下降, 以后逐渐出现体重减轻, 毛发脱落和失去光泽。后期活动减少。1例在第8周出现消化道出血。

2. 病理检查 注射 CCL₄第4周末, 肝细胞明显变性坏死, 可见大量炎性细胞浸润和纤维组织增生, 肝小叶结构尚完整; 第8周末之肝组织切片: 正常肝小叶结构破坏, 纤维组织增宽, 将肝细胞分隔成大小不等的假小叶, 部分肝细胞变性、坏死, 汇管区炎性细胞浸润。17例中, 肝硬化形成者共14例, 形成率82.3%。

3. 实验室检查 第4周末, ALT由用药前平均23.0 IU/L上升到320.5 IU/L, A/G由3.85/2.96改变为3.12/3.04, 其它指标无明显改变。第8周末, ALT平均为266.0 IU/L, A/G为2.05/3.42。其它指标无明显改变。

静脉滴注 GaIN 后

1. 一般情况 动物最初表现为狂躁, 随后出现嗜睡, 痛觉反应迟钝, 四肢肌张力改变, 少数出现抽搐与肌强直, 最后陷入昏迷, 对刺激无反应。2例出现黄疸, 5例出现消化道出血, 1例肾衰。除1例生存外, 其余13例死亡。死亡时间27~105h, 平均69.7h, 其中死亡于72~96h者占76.9%。肝功能衰竭形成率为92.9%。

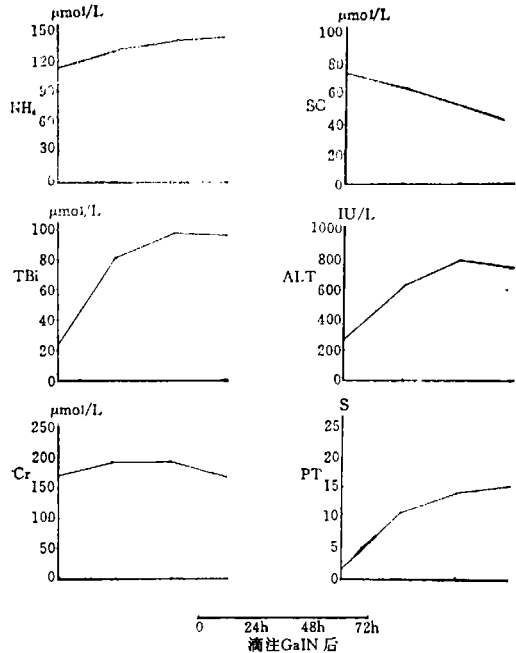
2. 病理检查 动物死亡后病检: 有腹水者3例, 脾中度增大者2例。肝外观呈暗红色, 部分表面可见细小小结节。肝脏大小无明显改变。镜下: 肝细胞呈大片状中央性坏死, 细胞核部分溶解, 汇管区大量炎性细胞浸润。

3. 实验室检查 滴注 GaIN 后, ALT、TBI、NH₄、随时间逐渐增高, 逐渐下降(P<0.01), PT 延长, Cr 无明显改变(P>0.05)(附图)。用药后72h EEG 表现为广泛慢波, 可见θ波, δ波。

讨 论

关于肝硬化模型的建立

肝硬化动物模型的研究已有几十年历史, 但多限于小动物, 且有模型形成时间长、形成率



附图 滴注 GaIN 后犬生化改变

NH₄, TBI, ALT 明显升高
PT 延长, SG 降低 (P 均 < 0.05)
Cr 变化不明显 (P > 0.05)

低、死亡率高等缺点^[3,4]。在染毒药物中, CCL₄ 因其价格低廉, 模型制作简便, 病变性质与程度可以控制被经常采用。然而, 单一的使用 CCL₄ 肝硬化形成的时间难以确定, 且形成率不高。考虑到营养水平对肝硬化形成的程度与速度有一定影响, 如蛋白质摄入能减轻肝组织纤维化程度, 而脂肪摄入能加速肝硬化的形成; 营养不良能促进肝硬化的形成, 而过度营养不良可能会出现实验动物在形成肝硬化前死亡。因此, 我们将实验动物的饮食予以适当控制, 以利肝硬化的形成。同时, 酒精可增加肝内脂肪含量, 并能直接损伤肝细胞, 我们在饮食调节的同时, 辅以酒精饲喂。这样, 在多个复合因素同时作用下, 实验动物在较短时间内(8周), 形成了不同程度的肝硬化, 形成率为87.2%, 形成的时间也比较一致。

关于肝功能衰竭模型的制备

国内外对肝功能衰竭的动物模型研究很多, 但制备的均为小动物暴发性肝衰模型。而临床上终末期肝功能衰竭是在肝硬化基础上,

因感染、出血、药物等诱因引起。两者无论在病理或临床表现上都有较大差别。为制备与临床终末期肝变相近的动物模型, 我们先采用 CCL₄ 造成犬肝的肝硬化因为动物。肝硬化形成后, 发展到肝功能衰竭常需 2 个月或更长的时间, 而且肝衰出现的时间也不一致, 这样给肝移植受体的手术时机选择带来了困难^[6]。因此, 我们使用 GaIN 作为诱发因素, 进一步导致肝细胞损害, 使已形成肝硬化的动物在相对固定的时间内发生肝功能衰竭。GaIN 是一种对肝具有高度选择性毒性的药物, 对其他脏器几无损害, 从而排除了其他因素引起动物死亡的可能性^[6]。本实验结果显示: 使用 GaIN 后, 92.9% 的动物发生肝功能衰竭, 死亡时间大多在 72~96 h, 实验终点非常明确, 适宜于作肝移植研究用。

本模型特点

1. 模型较理想 滴注 GaIN 后, 实验动物立即出现了进行性肝功能损害, 表现为 ALT 及胆红素的持续升高, 明显的凝血机制损害, 血糖降低, 部分动物出现消化道出血及肾功能损害; 动物表现为嗜睡, 肢体抽搐, 肌张力改变等, 并很快进入昏迷, 且伴有血氨升高,

脑电图改变, 酷似临床上肝性脑病表现, 病理改变亦与病毒性肝炎、药物性肝坏死相近。

2. 时间易控制 肝功能衰竭出现的时间较一致, 且肝衰出现时间与死亡时间有一定间隔, 满足模型作治疗研究用的要求。

3. 首用大动物 该模型采用大动物, 制备过程中无须开腹手术, 为作肝移植研究提供了良好的受体。

参 考 文 献

1. Terpstra OT, et al. The role of auxiliary liver transplantation. *Transplant Proc* 1987; 19:4370
2. Fortner JG, et al. Clinical liver heterotopic transplantation. *Surgery* 1973;74:739
3. 韩德五, 等. 肝硬化动物模型的研究. *山西医学杂志* 1979;(4):1
4. 周炯亮. 化学性肝损害. 北京:人民卫生出版社, 1989:12~14
5. Baddeley RM, et al. A Composite canine model of cirrhosis. *Ann Surg* 1969;169:603
6. 钮 振, 等. D-氨基半乳糖形成大白鼠急性肝功能衰竭初步报告. *中华医学杂志* 1981; 61:250

(1993-03-11 收稿 1993-09-30 修回)

THE EXPERIMENTAL STUDY OF THE CANINE MODEL OF DRUG-INDUCED HEPATIC FAILURE

He Xiaoshun Xuan Wenhai Huang Jiefu

(Hepatobiliary surgery, First Affiliated Hospital)

The canine liver cirrhosis was induced by the intraperitoneal administration of carbon tetra chloride (CCL₄) and the control of dietary intake. On the basis of the canine liver cirrhosis, a model of hepatic failure was established by injection of galactoramine intravenously. The presentation, laboratory and histological findings of the animal model were similar to those seen in the situation of the clinical hepatic failure. The model was constructed without the necessity of undergoing surgical procedure and established in a comparatively short time (only 8 weeks), 92.9% of animals could develop hepatic failure. Therefore, the model can be used as an ideal model of the recipient of the experimental liver transplantation.

Key words hepatic failure; liver cirrhosis; carbon tetra chloride; galactoramine