

经皮恒河猴肝纤维化模型超声引导下 肝脏穿刺介绍

王红¹, 马波², 盛琴², 周裕卿¹, 彭玉兰¹

(1. 四川大学华西医院超声科, 四川成都 610041; 2. 四川大学华西医院再生医学中心, 四川成都 610041)

摘要:目的: 观察超声引导下恒河猴肝穿刺活体组织检查技术在动物实验中的应用情况, 探讨超声引导下经皮恒河猴肝脏穿刺活检的价值和意义。方法: 采用 PHILIPS iU22 超声仪、9~3 MHz 探头、Bard 16G 活检枪及活检针对 22 只恒河猴肝纤维化疾病进行穿刺, 对穿刺组织进行病理检查。结果: 22 只恒河猴均穿刺成功, 病理学染色良好, 能够进行肝脏疾病的病理分析和诊断。结论: 在动物实验中, 超声引导下肝脏穿刺活检术是一项微创、安全、方便的取材方法, 能确定肝脏损害的病理性质, 对实验动物疾病模型诊断和治疗有重要的临床价值。

关键词: 超声引导; 肝脏; 穿刺; 恒河猴

中图分类号: TB559

文献标识码: A

文章编号: 1000-3630(2018)-01-0062-04

DOI 编码: 10.16300/j.cnki.1000-3630.2018.01.011

A analysis of ultrasound guided percutaneous rhesus monkey liver biopsy

WANG Hong¹, MA Bo², SHENG Qin², ZHOU Yu-qing¹, PENG Yu-lan¹

(1. Department of Ultrasound, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China;

2. Regenerative Medicine Research Center, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, Sichuan, China)

Abstract: Objective: To observe the application of ultrasound guided percutaneous biopsy of rhesus monkey liver in animal experiments and to explore the value and significance of this technology. Method: Using PHILIPS IU22 ultrasound diagnostic instrument with a 9~3 MHz probe and Bard 16 G biopsy gun and biopsy needle to perform liver biopsy for 22 rhesus monkeys with liver fibrosis disease, and then making pathological examination to these biopsy tissues. Results: All these punctures to the 22 rhesus monkeys are successful. Pathological dyeing is good, and the pathological changes of liver diseases can be analyzed and diagnosed. Conclusion: Ultrasound guided liver biopsy is a minimally invasive, safe and convenient examination method, which can determine the pathological nature of liver injury and has important clinical value in the diagnosis and treatment of experimental animal disease models.

Key words: ultrasound guided percutaneous biopsy; liver; puncture; Rhesus monkeys

0 引言

在动物实验中, 非人类灵长类动物由于其组织结构、生理和代谢功能同人类高度近似, 常被认为是研究人类疾病模型和疾病相关问题的理想动物模型。其中, 恒河猴(Macacamalatta, Rhesus Macaque)作为非常重要的拟人类实验动物, 目前已经有越来越多的学者和科研工作者认识到其在医学、药学等研究领域的重要性^[1-3]。而肝脏, 作为非常重要的消化系统脏器之一, 同时也是重要的造模器官和药物实验的

靶器官, 其结构及功能都较为复杂。目前对于恒河猴肝脏疾病模型的研究较多, 包括如恒河猴肝移植实验、恒河猴肝纤维化、恒河猴肝脏肿瘤等疾病模型^[4-8]。而这些疾病模型的评估需要经过对动物实验的检验。在对恒河猴肝脏疾病模型的研究中, 科研人员常需要对动物疾病模型进行长期的观察及跟踪研究。病理作为疾病诊断的“金标准”, 在动物实验的研究过程中也发挥着巨大的作用。在进行恒河猴肝脏疾病模型变化的长期动态实验观察中, 由于受到动物疾病模型与实验客观条件的限制, 在对这些疾病模型的病理分析和诊断时, 科研人员大多通过对肝脏组织进行盲穿或手术取材的方法得到肝组织, 进行病理等研究。而盲穿的方法受穿刺者经验及动物个体差异性的影响较大, 在实际运用中, 效果参差不齐。而手术取材的

收稿日期: 2017-04-21; 修回日期: 2017-06-16

作者简介: 王红(1986—), 女, 四川广安人, 医师, 研究方向为超声医学影像技术。

通讯作者: 彭玉兰, E-mail: ylphuaxi@163.com

方法,对实验动物创伤较大,术后护理及恢复较复杂,且易导致各类并发症,不利于疾病模型动物的长期观察。参考在临床上的实际运用情况,超声引导下经皮的肝脏活体组织穿刺技术由于其具有创伤小、术后恢复较好的特点,在临床中此项技术已较为成熟,并得到了广泛使用^[9]。而目前的现状是,由于国内实验室条件限制以及科研人员对经皮超声引导下肝脏穿刺技术的经验不足,在科研实验过程中,实时显像的超声技术在动物实验尤其是在实验动物活体组织穿刺取材上的运用较少。本文对本实验室近两年来共 22 只实验动物恒河猴肝脏疾病模型在超声引导下进行的经皮超声穿刺检查技术进行总结,并对其诊断价值进行评价,探讨超声引导下活体组织检查技术在恒河猴肝脏病变中的应用价值。

1 资料与方法

1.1 实验动物

22 只恒河猴(年龄为 4~6 岁,体重为 4.4~9.8 kg)由四川成都平安动物繁育研究基地提供。饲养条件,室内温度为(21±5)℃,湿度为(55±15)%。猴精饲料每日 2 次,水果或蔬菜每日 1 次,自由饮水。精神、食欲正常,健康状况良好。22 只雄性恒河猴肝纤维化疾病模型,其中 10 只动物为硫代乙酰胺(Thioacetamide, TAA)诱导的恒河猴肝纤维化疾病模型,造模方法参考文献[10]; 12 只动物为通过开腹手术形成胆汁淤积性肝纤维化模型,造模方法参考刘迎春等的研究文献^[11]。在硫代乙酰胺诱导的恒河猴肝纤维化疾病模型中,穿刺时间为注射药物 3 个月;在梗阻型肝纤维化模型中,穿刺时间为术后 2 个月,结合我们的前期研究认为,此时恒河猴肝脏发生病理改变。实验中所有动物相关操作均通过中国医学科学院实验动物研究所实验动物使用与管理委员会(Institutional Animal Care and Use Committee, IACUC)审查。

1.2 方法

超声引导下经皮恒河猴肝穿刺活检,在本实验中使用 PHILIPS iU22 超声仪、9~3 MHz 探头及固定导向穿刺架。穿刺枪为美国 Bard 公司生产的第 3 代连续可调式自动活检枪,射程为 1.5~2.2 cm,配以 Bard 16G 一次性穿刺针(长度为 160 mm,取样槽长度为 19 mm;取样针外径为 1.60 mm,内径为 1.19 mm)。对恒河猴用氯胺酮 5 mg/kg(ketamine)和 0.2 mg/kg 咪达唑仑诱导麻醉,麻醉后脱去肝区体毛。皮肤常规消毒、铺洞巾等常规术前准备。穿刺前先进行 B-Mode

超声检查,将仪器的增益、焦距、深度等各项参数调节至最佳位置,以获得最优分辨率的超声图像。结合穿刺者经验,在本实验中均选取恒河猴右肝肋间进行穿刺,多断面连续扫查,尽量避开肝内大血管及扩张的胆管、肿大的胆囊,确定穿刺安全路径,并做体表标记。这时将探头固定,使图像保持最佳状态。穿刺点先用手术刀做 2 mm 切口,取 16G 穿刺针沿固定导向穿刺架的针槽刺入,当穿刺针穿破肝包膜进入肝组织时,会有较为清晰的“落空感”。实时监测穿刺针进入肝脏情况,待穿破包膜刺入一段肝实质后(约 2 cm),启动穿刺针取长约 2 cm 的肝组织 1 条。按照免疫组化及病理需要,重复同样的方法反复穿刺取肝组织 2~3 条。穿刺完毕后纱布按压伤口 10~15 min,以防止出血。穿刺完成后超声检查肝周有无出血。所得肝组织均置于中性甲醛液中固定。4 h 后取出组织块,脱水、石蜡包埋、切片染色后在显微镜下进行观察。待动物苏醒后连续三天观察动物进食、行为等有无异常。穿刺过程中恒河猴肝周无明显出血;术后连续观察三天实验动物未发现饮食及其他行为异常;穿刺取材的组织病理染色清晰,可以用于疾病的诊断。满足上述三点认为穿刺成功。

2 结果

22 只恒河猴共进行 56 次肝脏穿刺,成功获得 55 条肝组织,1 例失败。失败的原因为胆汁淤积性肝纤维化模型中,恒河猴肝内胆管明显扩张,胆囊肿大,导致在肝脏穿刺的过程中未能成功完全避开梗阻扩张的肝内胆管,穿刺出的组织中发现有墨绿色的液体,考虑为胆汁,认为穿刺失败。超声引导下恒河猴肝脏肝组织检查如图 1 所示,成功率为 98%。采用右肝低位肋间进行超声活体组



图 1 超声引导下恒河猴肝脏穿刺图像
Fig.1 Ultrasound guided percutaneous biopsy image of rhesus monkey liver

织穿刺检查,能够较为完整地观察到穿刺针的走行与针尖的位置,以及针尖距肝包膜的距离,成功率为98%。术后超声观察发现仅3例肝周少量出血。病理结果显示,在苏木素(Hematoxylin)-伊红(Eosin)染色及天狼星红染色中,能够清晰显示肝细胞形态,观察炎性细胞浸润与胶原纤维情况及肝脏纤维化程度如图2所示。

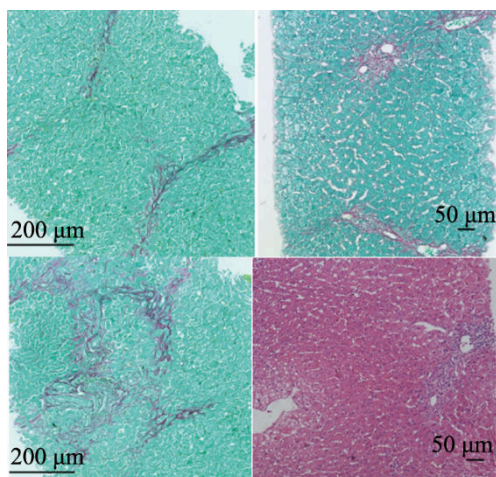


图2 恒河猴肝脏病理图片

Fig.2 The pathological images of rhesus monkey liver

3 讨论

肝脏是体内最重要也是最大的消化腺,作为理想实验动物类型的非人类灵长类动物恒河猴,其肝脏的正常组织学结构与人基本相似^[1,12]。在解剖结构上,恒河猴肝脏分为6叶,各叶之间较为独立,由肝小叶和肝门管区构成。与人相比,在肝脏外形上的主要区别在于肝叶的愈合程度不一。在肝内门静脉系统、胆道系统的分支上基本相似,但在分支的角度、粗细、长短及分布范围、分支数量上略有差别^[12]。恒河猴肝脏位置表浅,体积较大,在超声多断面连续扫查引导下能够避开较大的胆管及血管,穿刺操作安全、简便。这一点在本实验中12只通过手术造成恒河猴胆总管狭窄制备的胆汁淤积性肝纤维化模型中,其常规超声可见肝内呈“树枝”状扩张的肝内胆管,最大管径约7 mm,可见肿大的胆囊,肝脏体积长大,这些较为复杂的超声现象使得超声引导下肝脏取材的方法具有较大的意义。当然,准确的超声导向是保证穿刺安全性的前提。在实验中,动物虽然为麻醉状态,但由于恒河猴肝脏位置受呼吸、心脏运动影响较大,且恒河猴肝脏各叶较为独立,操作过程中需要严格控制穿刺方向、角度和深度。考虑到由于恒河猴左肝位置受胃及心脏运动、呼吸的影响较大,且动物在穿刺时不

能配合屏气动作,为了获得最大的取材成功率以减少实验动物穿刺针数,在超声引导下,基于能够较好地观察到穿刺针在肝内的走行,以及能够较好地观察到穿刺针针尖距肝包膜的距离,结合穿刺者经验,最终我们选取了右肝低位肋间进行超声活体组织穿刺检查,且成功获得了连续性较好的肝组织。在操作中也发现,恒河猴肝脏体积、形态存在一定的个体差异,且由于疾病模型造模方式的不同,不同体重、不同梗阻程度的恒河猴最佳穿刺点也会有所变化。这也提示我们在超声扫查时需进行多断面连续观察,结合实验动物疾病模型,尽量获得较好的穿刺点,确定安全的穿刺路径。且在穿刺完成后,需超声观察肝周有无出血,待苏醒后还需观察动物进食、行为等是否有异常。目前有关恒河猴肝纤维化疾病模型的研究较多,但并未建立较为经典的造模方法^[13-14]。在本实验中,病理结果进一步证实了硫代乙酰胺(Thioacetamide, TAA)诱导恒河猴肝纤维化疾病模型和通过手术造成实验动物胆总管狭窄制备的恒河猴胆汁性肝硬化模型的可行性。

超声引导下进行恒河猴肝组织活体穿刺检查具有明显的优点:(1)定位准确,实时显示,可动态显示活检针进针取材的全部过程,以及评估穿刺针与周围肝组织的位置关系,大大提高了穿刺的成功率。与盲穿相比,提高了取材成功率。(2)采用自动活检枪避免了穿刺过程中的不稳定性,所取组织标本具有较好的连续性、完整性,有利于后续病理检查和分型。(3)安全微创,可重复穿刺,术后恢复较好。且方便术后对穿刺可能导致的出血进行观察。粗针活检穿刺与手术活检相比,取材的组织方便进行进一步的病理学观察,且能较好地保证动物福利,善待动物,防止或减少动物的应激、伤害,有利于进行恒河猴动物疾病模型变化的长期动态观察与研究。

4 结论

超声引导下经皮恒河猴肝脏活体组织穿刺检查技术,在取材成功率、安全性、术后护理等方面相比盲穿或手术取材具有显著的优势,且能够提供肝脏疾病较为完整全面的定性信息,包括肝脏损伤类型和程度。这些优点使得此项技术在对实验动物模型的观察、治疗及判断预后等方面均具有重要的意义,能够极大地提高实验结果的准确性和实验动物福利的完善。这也提示我们在动物

实验中开展这项技术的必要性。

参 考 文 献

- [1] 冉江华, 李铸, 刘静, 等. 二袖套法建立恒河猴原位肝移植的稳定模型[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(5): 762-768.
RAN Jianghua, LI Zhu, LIU Jing, et al. Construction of stable rhesus monkey orthotopic liver transplantation models using two-cuff technique[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2011, 15(5): 762-768.
- [2] LEE J I, SHIN J S, LEE J E, et al. Reference values of hematology, chemistry, electrolytes, blood gas, coagulation time, and urinalysis in the Chinese rhesus macaques(Macacumulatta)[J]. Xenotransplantation, 2012, 19(4): 244-248.
- [3] WANG Hong, HAN Pengfei, SUN Xiaorong, et al. Detection of hepatic hemodynamics in normal rhesus monkeys using high-frequency ultrasound[J]. Ultrasound in Med. & Biol., 2014, 40(4): 837-842.
- [4] WANG Hong, TAN Tao, WANG Junfeng, et al. Rhesus monkey model of liver disease reflecting clinical disease progression and hepatic geneexpression analysis[J]. Scientific RepoRts, 2015, 7(5): 15019-15024.
- [5] KIM J M, SHIN J S, MIN B H, et al. Induction, management, and complications of streptozotocin-induced diabetes mellitus in rhesus monkeys[J]. Xenotransplantation, 2016, 23(6): 472-478.
- [6] SCULL M A, SHI C, DE JONG Y P, et al. Hepatitis c virus infects rhesus macaque hepatocytes and simianized mice[J]. Hepatology, 2015, 62(1): 57-67.
- [7] 赵玺龙, 李学锋, 陈碉, 等. 不同年龄实验恒河猴自然死亡的肝脏病变谱分析[J]. 中国实验动物学报, 2011, 19(3): 228-232.
ZHAO Xilong, LI Xuefeng, CHEN Diao, et al. Analysis of liver pathology in captive rhesus monkeys at different ages[J]. Acta Laboratorum Animalis Scientia Sinica, 2011, 19(3): 228-232.
- [8] ZHOU P, XIA J, GUO G, et al. A macacumulatta model of fulminant hepatic failure[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(5): 435-444.
- [9] 张景山, 郑永. 超声引导下肝脏穿刺 107 例的临床分析[J]. 重庆医学, 2011, 40(7): 697-698.
ZHANG Jingshan, ZHENG Yong. Clinical analysis of 107 cases Ultrasound guided liver biopsy[J]. Chongqing Medicine, 2011, 40(7): 697-698.
- [10] 孟令平, 邹彪, 李杨, 等. 硫代乙酰胺诱导大鼠肝 硬化增生结节模型的评价[J], 中华临床医师杂志, 2012, 6(13): 171-172.
MENG Lingping, ZOU Biao, LI Yang, et al. Evaluation of thioacetamide induced rat liver cirrhosis hyperplastic nodule model[J]. Chinese Journal of Clinicians, 2012, 6(13): 171-172.
- [11] 刘迎春, 顾小红. SD 大鼠胆汁淤积性肝纤维化动物模型的建立与评价[J]. 重庆医学, 2012, 41(5): 458-460.
LIU Yingchun, GU Xiaohong. Establishment and evaluation of cholestatic liver fibrosis model induced by bile duct ligation in SD rat[J]. Chongqing Medicine, 2012, 41(5): 458-460.
- [12] 陈嘉绩. 哺乳动物肝内门管鞘系统的相似性和肝脏类型[J]. 江苏农业学报, 2002, 8(2): 122-125.
CHEN Jiayi. Similarity of glisson's system and classification of livers in mammals[J]. Jiangsu Journal of Agricultural Sciences, 2002, 8(2): 122-125.
- [13] 刘玲, 谭正怀. 胆总管结扎致肝纤维化动物模型研究现状[J]. 重庆医学, 2013, 42(23): 2793-2796.
LIU Ling, TAN Zhenghuai. Common bile duct ligation induced liver fibrosis animal model research status[J]. Chongqing Medicine, 2013, 42(23): 2793-2796.
- [14] 侯艳锋, 李晖, 梁颖丹, 等. 肝纤维化动物模型研究进展[J]. 武汉大学学报(医学版), 2015, 36(1): 155-158.
HOU Yanfeng, LI Hui, LIANG Yingdan, et al. Research progress of liver fibrosis of animal model[J]. Medical Journal of Wuhan University, 2015, 36(1): 155-158.