

# 吲哚菁绿显影小鼠胆管并益于左外叶门静脉的结扎

姚娜<sup>1</sup> 闫加艳<sup>2</sup> 高东梅<sup>1</sup> 李卡<sup>3</sup> 周俭<sup>2\*</sup> 罗楚彬<sup>2\*</sup>

1. 复旦大学附属中山医院肝癌研究所实验室 上海 200030

2. 复旦大学附属中山医院肝胆肿瘤和肝移植外科 上海 200030

3. 复旦大学附属中山医院实验动物中心 上海 200030

**摘要:** 啮齿类动物是构建动物模型时最常使用的实验工具, 然而目前并没有啮齿类动物胆道系统结构的详细报道。本文通过静脉注射吲哚菁绿溶液, 并同时结扎胆总管, 数分钟后可使小鼠 (*Mus musculus*) 肝外胆道系统呈翠绿色, 可见各肝叶胆管常于近胆囊处汇入胆总管。吲哚菁绿肝外胆管造影后, 利用 25 × 显微镜观察小鼠左外叶肝脏脉管系统, 将小鼠左外叶肝脏分为隐藏型、显露差型、显露一般型和显露完全型。选择显露一般型和显露完全型, 用 10-0 带线缝合针于左外叶脏面, 包绕左外叶门静脉进针和出针, 外科结结扎。手术后 3 天观察, 左外叶肝脏鲜活, 未结扎叶肝脏 Ki67 阳性细胞核占比提高, 肝叶重量明显增加, 成功诱导了肝脏再生。

**关键词:** 吲哚菁绿; 胆管; 门静脉结扎; 肝再生

啮齿动物是动物模型构建中最常用的实验工具, 作为研究肝脏疾病如胆汁淤积、肝纤维化、肝硬化、原发性肝癌、肝内胆管癌等和肝切除、门静脉结扎及门静脉结扎联合肝脏劈离的两步法肝切除 (portal vein ligation associating liver partition for staged hepatectomy, ALPPS) 后肝再生的模式生物。同其他哺乳动物一样, 啮齿类动物肝脏多也是多叶结构 (Zanchet et al. 2002), 每一个肝脏分叶都以支持它的门静脉分支命名 (Lorente et al. 1995)。先前的研究描述了大鼠肝脏的解剖结构, 包括肝脏分叶结构, 动脉、门静脉、静脉和胆管走向, 其中墨水注入胆管以显示胆管结构的方法, 使研究人员发现大鼠胆管有许多解剖学变异 (Martins et al. 2007)。

吲哚菁绿 (indocyanine green, ICG) 是一种二磺化的七甲基吲哚菁, 化学式为  $C_{43}H_{47}N_2NaO_6S_2$ , 核心骨架由吲哚环和菁环通过共轭键连接而成, 这种共轭结构使吲哚菁绿具有良好的光学性质。分子中含有两个带负电荷磺酸酯基团, 既增加了吲哚菁绿的水溶性, 又增强了其与蛋白质的亲和性, 使其在体内有较长的循环寿命。吲哚菁绿经血管注射后, 其可迅速与血浆白蛋白和脂蛋白结合, 形成的染色大分子, 经 785 nm 近红外线区电磁波照射后, 可发射约 805 nm 的电磁波, 这是其可被荧光成像系统捕捉的基础 (Baker 1966, Gioux et al. 2010)。吲哚菁绿随血浆白蛋白和脂蛋白在血液循环中流动, 经过肝脏时可被迅速吸收提取, 随后被分泌到胆

汁, 随小肠内容物排出体外 (Mitsunashi et al. 2008)。

肝胆手术的主要并发症之一是胆管和血管损伤, 高杨等人使用动态近红外荧光吲哚菁绿胆管造影技术, 用于急性胆管穿孔检测和胆管动力学的测量, 为肝移植后胆管吻合不良导致的胆汁外泄提供技术支持 (Gao et al. 2017)。石泽等开发的腹腔镜荧光成像技术, 吲哚菁绿胆道造影后, 通过可见光和荧光图像之间的交换, 实时示踪胆道解剖结构, 为腹腔镜和机器人胆囊切除术提供更安全、便捷和快速的造影手段 (Ishizawa et al. 2010)。然而迄今为止, 未有小鼠肝外胆管的明确位置的报道, 且要观察肝外胆管都需要借助红外设备, 方法复杂。

肝切除术是原发性和继发性肝癌最常用的治疗手段, 手术可明显提高患者治愈率和生存时间, 然而由于肿瘤体积过大或数量过多等原因, 仅有一部分人达到肝切除手术指标 (Abdalla et al. 2006)。是否具有可切除性取决于肿瘤可清除效率, 及肝切除后残留肝脏的体积和功能状况 (Liu et al. 2009)。由于肝功能的稳定性对于维持身体稳态至关重要, 因此肝切除术的主要限制是缺乏足够的残余肝脏 (Michalopoulos et al. 2021)。通过门静脉结扎或门静脉栓塞术, 可以在较短时间内, 增加未来肝切除后的残余肝脏 (future liver remnant, FLR), 从而降低肝切除术后肝功能不足引发的肝衰竭风险 (Covey et al. 2008)。然而与肿瘤进展相比, 门

静脉结扎或门静脉栓塞诱导的未来残余肝脏的生长仍然相对较慢,甚至再生不足,等待数日仍不符合部分肝切除术的手术指征。2011 年,苏黎世医学院的桑替班尼和克莱文引入了 ALPPS,即联合肝脏离断及门脉结扎的分次肝切除术。它产生了非常快速的肝脏再生,从而减少了结扎离断后至实施肝切除术的间隔等待时间,进而降低了脏器粘连和肿瘤进展的严重影响 (de Santibañes et al. 2012)。

为了研究手术门静脉结扎、门静脉栓塞和联合肝脏离断及门脉结扎的分次肝切除术如何产生肝脏再生反应,人们开发了在相应的啮齿动物模型 (Vorobioff et al. 1983, Iwakiri et al. 2002, Almau Trenard et al. 2014)。虽然动物模型开发的目的不尽相同,但是确是后来人们研究肝再生常用的动物模型。如前文所述,啮齿类动物具有肝脏多叶结构 (Zanchet et al. 2002),每一个肝脏分叶都以支持它的门静脉分支命名 (Lorente et al. 1995)。同肝脏一样,每个肝叶均由两套血管系统供血,分别是门静脉和动脉,且门静脉为主要供血血管<sup>[17]</sup>。啮齿类肝脏分叶为左外叶 (left lateral lobe, LLL)、尾叶 (caudate lobe, CL)、右叶 (right lobe, RL)、右中叶 (right middle lobe, RML) 和左中叶 (left middle lobe, LML),相应的各个肝叶质量占比分别约为 30%、8%、22%、30% 和 10% (Martins et al. 2007)。在保留 10% 的未来残留肝脏肝切除术后,啮齿类动物往往面临肝功能衰竭 (Makino et al. 2005)。而肝叶在门静脉结扎或门静脉栓塞后,短期内虽有肝脏转氨酶的增高和白蛋白合成的降低,但其仍具有部分肝脏功能。因此在模仿人类未来术后残余肝脏功能达到容忍极限的啮齿类动物模型构建中,保留左中叶的所有血供,且同时结扎其他肝叶的门静脉 (约占门静脉血流的 90%),是非常准确可靠的模拟手段 (Dili et al. 2019)。

然而,与报道的一致,不管是肝叶还是门静脉结构,左外叶和左中叶享有共同的干系起源 (Rozga et al. 1986),甚至推测左中叶的胆管分支会穿过左外叶肝叶<sup>[3]</sup>,这使得两者结构更加紧密,难以完全区分开来。因此人们在研究门静脉结扎、门静脉栓塞和 ALPPS 时,通常保留右中叶的所有血流,同时结扎其他肝叶的门静脉 (约占门静脉血流的 70%) (Rozga et al. 1986, Martins et al. 2008b)。2014 年安德里亚团队用小鼠建立了阻断 90% 门静脉血流的联合肝脏离断及门脉结扎的分次肝切除术一期手术的动物模型 (Schlegel et al. 2014)。该模型保留左中叶的所有血流 (约占门静脉血

流的 10%),结扎了尾叶、右叶和右中叶的门静脉 (约占门静脉血流的 60%),并完全切除了左外叶肝叶 (Schlegel et al. 2014)。2018 年,亚历山德拉用大鼠在不引入肝切除术前提下,成功结扎了除左中叶外的所有门静脉分支,突破了无法结扎左外叶门静脉的极限 (Dili et al. 2019)。

然而结合前人文献和我们实际大鼠门静脉结扎经验,发现在大鼠中共用干系的左中叶和左外叶,两门静脉出现分支的位点,通常位于左外叶肝实质内。另左外叶门静脉在肝实质内部,仍可继续分成上部 and 下部两个独立的大分支 (Madrahimov et al. 2006),导致完全且准确的结扎左外叶门静脉非常苦难。结扎成功与否很大程度上依赖大鼠个体血管条件,且易于结扎左外叶门静脉的大鼠个体比例较低。另外,考虑到人和大鼠的免疫功能的较大差异 (Kruepunga et al. 2019),及转基因工具和抗体的相对缺乏,有必要开发 90% 门静脉结扎的小鼠模型。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

试剂: 吲哚菁绿、生理盐水、4% 水合氯醛、1% 戊巴比妥钠、庆大霉素。

材料: 10-0 带线缝合针 (金环)、5-0 蚕丝线 (强生)、4-0 小动物缝合针 (角针, 1/2, 宾雄)、1 ml 注射器、胰岛素注射针、1.5 ml 离心管。

器械: 显微操作器械 (金钟), 包括持针钳、显微剪、显微直平台镊、显微弯平台镊; 眼科剪; 平台镊; 腹腔撑开器。

实验对象与设施: C57BL6/J (北京维通利华), 饲养于无特定病原体饲养屏障系统。

仪器设备: 徕卡体视显微镜, Leica M400 E, 5 ~ 25 ×。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 术前麻醉

实验小鼠为 8 周龄左右的雄性 C57BL6/J (北京维通利华), 饲养在无特定病原体的屏障系统内。光周期为 12 小时光照 / 黑暗下, 自由采食饲料和灭菌水。所有实验操作, 均严格遵守了美国国家科学院和国立卫生研究院制定的实验动物的看护和使用指南 (NIH 出版物 86 ~ 23, 1985 年修订) 中的相关规定。4% 水合氯醛 (0.6 mL/20 g 体重) 和 1% 戊巴比妥钠 (0.6 mL/20 g 体重) 腹腔注射联合诱导麻醉。数分钟后指捏小鼠掌心而无疼痛反应, 即可沿中线造双层切口打开腹部, 切口从阴茎上 1 cm 至剑突。

### 1.2.2 吲哚菁绿使小鼠肝外胆道系统显色

将 10 mg 吲哚菁绿溶于 3 mL 注射用水, 吸取 0.05 mL 与同等体积的生理盐水混合。小鼠麻醉并沿中线开腹后, 拨开肠管和肝叶, 显露肝下腔静脉和右肾静脉。用直径 30 G 胰岛素针, 经右肾静脉向肝下腔静脉注射 0.1 mL 吲哚菁绿溶液, 同时用 5-0 蚕丝线近胰腺端结扎胆总管。随着时间的推移, 吲哚菁绿逐渐汇集在肝外胆管和胆囊, 约八分钟后, 自然光下可见肝外胆道系统显色呈翠绿色。

### 1.2.3 左外叶门静脉的观察、分型与结扎

小鼠麻醉开腹后, 用细棉棒掀起肝脏中叶和左外叶, 使脏面朝外。借助徕卡体式显微镜, 如前人所述可见小鼠左外叶和左中叶两门静脉分支共干 (Martins et al. 2007)。顺时针调动左外叶与左中叶肝实质的共干处, 结合吲哚菁绿胆道系统造影, 可整体观察左外叶的动脉、门静脉和胆管的分支结构。根据左外叶门静脉的显露程度, 可将小鼠分为四种类型: 隐藏型、显露差型、显露一般型和显露佳型。选择显露佳型和显露一般型进行左外叶门静脉结扎。在 25× 的显微镜视野下, 用 10-0 带线缝合针, 包绕左外叶门静脉进针和出针, 穿针的过程中, 利用组织的弹性, 规避除门静脉外的可见结构, 尽可能的将动脉、淋巴管和神经等排除在外, 并用外科结结扎。假手术组涉及开腹和翻转肝叶。最后, 使用 5-0 蚕丝线沿中线双层缝合腹部。手术后将小鼠置于加热垫, 直至恢复意识。

### 1.2.4 免疫组织化学染色 Ki67

免疫组织化学染色 (immunohistochemical staining, IHC) 步骤大体如下: 4% 多聚甲醛固定、乙醇梯度脱水、二甲苯替代组织内乙醇、浸蜡、石蜡包埋、3 μm 切片、一抗和二抗免疫染色、封片与拍照观察。通过对 10 个随机视野 (200×) 的手动计数, 确定 Ki67 阳性核和所有细胞核的数量。Ki67 阳性细胞核占比, 来评估肝脏增值情况。

### 1.2.5 统计分析

GraphPad Prism 软件 (美国加利福尼亚州圣地亚哥) 用于构建图形和数据统计。在图中, 我们标记了平均值 ± 标准误差 (mean ± standard error, SEM)。非配对的两尾 t 检验用于比较数据之间的差异。当 P 值小于 0.05 时认为有显著性差异。(\*,  $P \leq 0.05$ ; \*\*,  $P \leq 0.01$ ; \*\*\*,  $P \leq 0.001$ )。

## 2 结果

### 2.1 吲哚菁绿使肝外胆管显影

尽管大鼠和小鼠的肝叶解剖结构非常相似, 但是小鼠体型精致小巧, 体型仅为大鼠的十分之一, 因此小鼠的肝脏解剖学结构并不像大鼠结构那样描述的细致入微 (Schlegel et al. 2014)。本实验将吲哚菁绿溶液经肝下腔静脉注射 5 分钟后, 肝外胆管系统逐渐显现。由于肝外近胰腺侧胆总管的结扎, 吲哚菁绿的浓度逐渐提高, 肝外胆道系统显影, 并呈现翠绿色 (图 1), 此时可得到小鼠肝外胆管系统全局观。

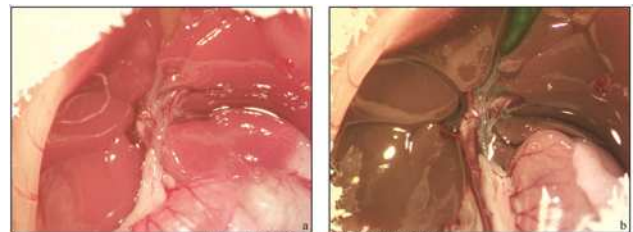


图 1 吲哚菁绿使肝外胆道系统显影

### 2.2 小鼠各肝叶肝外胆道系统变异较大

左外叶肝外胆管可见一条或两条。其中一条最为常见, 其自左外叶, 就近汇入胆总管 (图 2a)。偶见额外一条自肝脏冠状面后侧行走, 推测汇入胆总管 (图 2b)。右中叶可见一条肝外胆管, 该胆管可直接汇入胆总管 (图 2c), 也可汇入左外叶胆管 (图 2d)。前文提到马丁等推测左中叶的胆管分支可能会穿过左外叶肝叶 (Martins et al. 2007), 吲哚菁绿染色确实观察到, 左中叶的胆道分支既可为一支汇入左外叶胆管 (图 2e); 又可出现额外一支, 直接汇入左外叶 (图 2f 右侧箭头)。右叶的肝外胆管位置出乎我们的意料, 只有极少数右叶肝外胆管就近汇入胆总管 (图 2g); 绝大部分右叶的肝外胆管向远处延伸, 汇入胆囊附近胆总管 (图 2h); 另有少部分右叶, 其下叶和上叶出现各自的肝外胆管分支, 随后合二为一, 共同汇入胆囊附近胆总管 (图 2i 左右箭头)。同右叶一样, 极少数的尾叶肝外胆管就近汇入胆总管 (图 2j); 绝大部分肝外胆管汇入胆囊附近胆总管 (图 2k); 另有极少部分尾叶, 其前叶和后的肝外胆管分支可汇入不同方向, 前叶肝外胆管汇入右叶肝外胆管 (图 2l 左侧箭头), 后叶肝外胆管汇入胆囊附近胆总管 (图 2l 右侧箭头)。



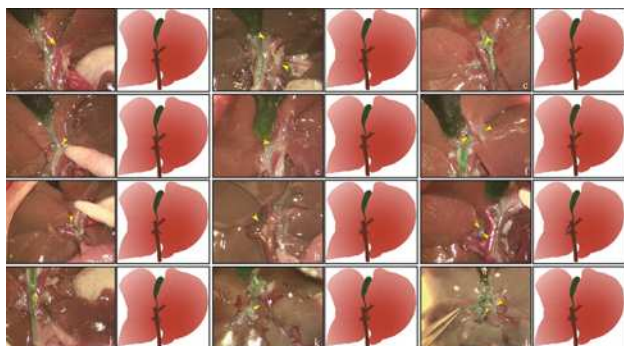


图 2 小鼠各肝叶肝外胆道系统变异较大

b 左外叶肝外胆管分支。c, d 右中叶肝外胆管分支。e, f 左中叶肝外胆管分支。g, h, i 右叶肝外胆管分支。j, k, l 尾叶肝外胆管分支。黄色箭头指各自肝叶的肝外胆管分支。每图右侧配以动画，绿色代表胆囊和胆总管及所要指示的胆管分支。

### 2.3 左外叶门静脉分支的分型

在实验过程中，我们发现了一中罕见的巨型动脉自然变异（图 3a）。在该变异类型中，门静脉入各个肝叶前是正常的，但是每个肝叶的门静脉分支异常狭窄，取而代之的是肝动脉（白色箭头所示）直径明显增大，肝叶颜色更近鲜红而非正常的暗红色。推测该突变体的门静脉和动脉的供血比例发生改变，导致肝小叶间血窦中混入更大比例动脉血，从而使肝脏呈现鲜红色。该自然突变体比例较低，因此正式实验中，我们予以排除。

实验中对超 200 例小鼠的观察，发现与报道的一致 (Martins et al. 2007)，除巨型动脉突变体外，小鼠的每个肝叶外均可见三套脉管系统支持：门静脉、动脉和胆管。其中胆管（图 3 黄色箭头）呈透明状，延肝叶边缘汇入胆总管；动脉（图 3 白色箭头）呈鲜红色，直径纤细，附着于门静脉进入肝叶；门静脉（图 3 黑色箭头）成暗红色，直径较粗，延根部进入各肝叶。经常可看到左中叶门静脉分支可再生出侧支，支持左外叶部分肝叶，如图 3d 黑色三角所示。

如前所述，结构上左中叶和左外叶有共同的干系起源 (Martins et al. 2008b)。可根据左中叶和左外叶门静脉分支的起源点所在位置，将小鼠分为两种主要的类型：隐藏型和显露型。隐藏型中（图 3b, c），两门静脉分支的起源点深入左外叶肝叶内部，只有共同的干系门静脉肉眼可见；显露型中，两门静脉分支的起源点位于左外叶肝叶外部。根据两门静脉分支的起源点‘深入’和两门静脉分支显露程度的不

同，可将显露型进一步分为显露差型、显露一般型和显露完全型。显露差型中（图 3d, e, f），只有在挑动左外叶肝叶一角后，才可在脏面侧见两门静脉分支。显露一般型中，两门静脉分支在左外叶膈面侧不可见，但脏面侧清晰可见（图 3g, h, i）。在显露完全型中，两门静脉分支在左外叶膈面和脏面均清晰可见（图 3j, k, l）。

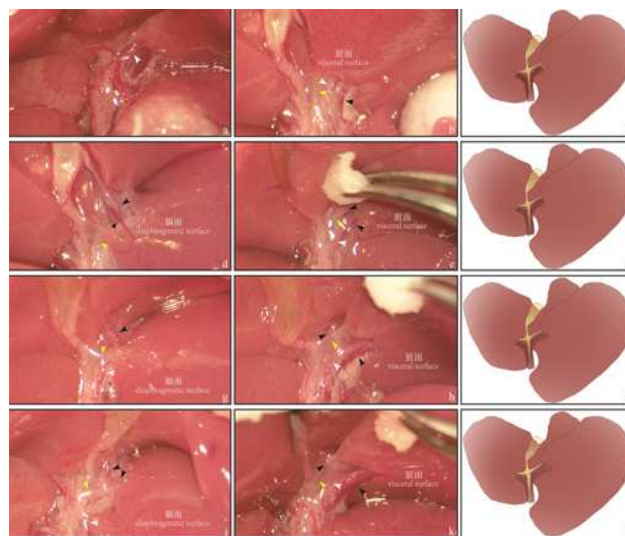


图 3 左外叶门静脉的分型

巨型动脉自然变异。b, 左外叶门静脉分支隐藏型。d, e, f 左外叶门静脉分支显露差型。g, h, i 左外叶门静脉分支显露一般型。j, k, l 左外叶门静脉分支显露完全型。黄色箭头：肝外胆管。白色箭头：动脉。黑色箭头：门静脉。黑色三角：门静脉侧支。

### 2.4 左外叶门静脉分支的结扎

为了成功结扎左外叶门静脉，实验者首先应掌握显微操作技术 (Martins et al. 2008a)。由于小鼠肝脏的动脉、门静脉、肝静脉和胆管分支极其细弱，同时又紧密附着，器械分离各组份极易造成损伤，故应避免。因此实施左外叶门静脉结扎术时，应排除左外叶门静脉隐藏型。而显露差型中，左外叶和左中叶两门静脉分支以一个棘手的角度出现，操作者很难准确界定两门静脉分支界限，因此结扎失败率极高。幸运的是，这两种类型只占总体的一小部分，约 1/12，实施左外叶门静脉结扎术时，可将两者用作假手术组。

选择左外叶门静脉一般和完全暴露型的小鼠实施左外叶门静脉结扎术。具体操作如图 4。惯用手持显微持针钳夹持 10-0 单根尼龙丝线带线缝合针，经左外叶肝叶脏面根部，从矢状面左侧避开可见管状结构进针（图 4a，为保证

进针过程清晰,未演示避开管状结构过程),非惯用手辅助错开胆道和动脉,使缝合针紧贴门静脉出针(图4b),外科结结扎门静脉。如遇左外叶门静脉侧支,依同样的方法另起针结扎。结扎完全成后,可见左外叶肝叶颜色变暗(图4c)。



图4 左外叶门静脉的结扎

左外叶门静脉矢状面左侧进针。b,左外叶门静脉矢状面右侧出针。c,结扎后左外叶肝叶颜色转暗。

### 2.5 门静脉结扎后肝脏再生的评估

左外叶门静脉结扎术后3天(3 days post-operation, 3 POD),我们评估了结扎水平和肝脏再生情况。术中和围手术期死亡率为0(图中未显示)。小鼠麻醉并开腹后,外观可见整个肝叶鲜活(图5a, b),左中叶无坏死或硬化,并可见明显增大;偶见左外叶根部少许坏死。肝脏灌注后,对除左外叶以外的非结扎叶称重,并计算非结扎叶肝重与体重比。对结扎的左中叶,多聚甲醛固定后进行免疫组化实验。假手术组做同样处理。

从结果可以看出,与假手术组(0 POD)相比,肝细胞有丝分裂标志物 Ki67 阳性细胞核比例明显提高(图5c, d, e),除左外叶外的整体肝脏重量与体重比明显增强(图5f)。这些结果表明,左外叶门静脉的结扎准确完整,且确实诱导了肝脏再生。

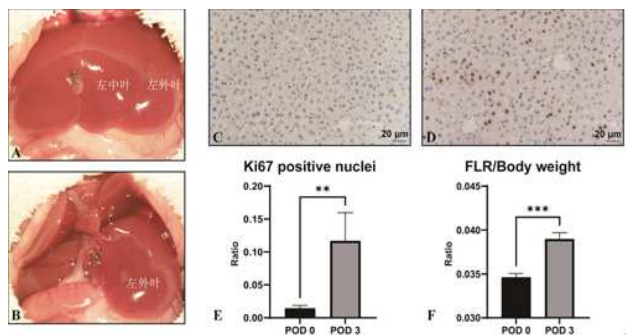


图5 左外叶门静脉结扎的术后评估

开腹后肝叶整体膈面观。b,左中叶脏面和左外叶膈面观。c,假手术组术后三天 Ki67 染色。d,手术组术后三天 Ki67 染色。e, Ki67 阳性细胞核在所有细胞核的占比。f,未结扎肝叶重量与体重比。h, Ki67 阳性细胞核于术后0天(未

手术组)和3天的统计,均值分别为0.01429和0.1167,  $n = 10$ ,  $P = 0.0023 < 0.01$ 。i,非结扎叶重量与体重比于术后0天(未手术组)和3天的统计,均值分别为0.03461和0.03897,  $n = 6$ ,  $P = 0.0003 < 0.001$ 。

### 3 讨论

研究人员通过向胆管注入墨汁并解剖胆管树的方式,来观察胆道系统,发现大鼠的胆道系统变异较多(Martins et al. 2007)。随着荧光成像技术的发展,吲哚菁绿胆管造影技术的应用越来越广泛,荧光成像系统显影吲哚菁绿胆管造影技术可实时显示胆道系统,可应用于肝脏部分切除术(Aoki et al. 2008)、腹腔镜胆囊切除术(Ishizawa et al. 2010, Kaneko et al. 2012)和肝移植(Dai et al. 2022)等。本实验将吲哚菁绿用于小鼠肝外胆道系统造影,填补了啮齿类动物肝外胆道系统结构研究的空白。通过提高吲哚菁绿浓度及近胰腺端胆总管的结扎,我们成功开发了自然光照下肉眼可见的胆道造影技术。对于啮齿类动物肝纤维化模型建立与改良及相关研究奠定良好基础(谢雨虹等 2022, 邹永康等 2023, 屠海烨等 2024)。

对近50例小鼠的肝外胆管造影观察,同大鼠类似,小鼠肝外胆管存在相当丰富的变异。令我们意外的是,常见类型并不像文章所述,各肝叶的胆管分支就近汇入胆总管(Martins et al. 2007)。与此相反,各肝叶的胆管分支似乎更倾向于‘就远’汇入胆囊近处胆总管,这在距离胆囊较远的右叶和尾叶中表现的更加明显。

我们在门静脉结扎和门静脉结扎联合肝脏劈离的两步法肝切除诱导肝脏再生的机制研究时,最初使用大鼠 Lewis 作为研究工具,随着显微操作技术的精进和手术技术的提高,研究工具逐渐替换为小鼠 C57BL/6J。所以我们对大鼠和小鼠的肝脏解剖结构都具有清晰准确的认知,如前人所述(Lorente et al. 1995),除胆囊的有无外,大鼠和小鼠的肝脏结构相似。但随着我们实践的积累,发现两者肝脏解剖结构的细微差异,即小鼠各肝叶的门静脉主干,更易暴露于肝实质外;而大鼠的肝实质对各肝叶门静脉的覆盖度更高。这一发现为我们实现技术的突破奠定了坚实的结构基础。另外我们开发的吲哚菁绿肝外胆道系统造影技术,使肝脏脉管支持系统显示强烈的颜色对比,自然光照下,胆管为翠绿色,动脉为鲜红色,门静脉为暗红色,使我们对肝叶细微结构的认识更加准确。对结扎左外叶而言,相比于动脉,胆管距离门静

脉较远，结扎时不易被连累。

结扎左外叶门静脉时，请于该肝叶脏面操作，脏面可使肝脏脉管支持系统最大程度显现，请勿试图翻转左外叶。准确而完整的结扎可维持左外叶肝脏活性，保留其部分肝脏功能，并激活非结扎叶的细胞有丝分裂，增加非结扎叶的肝脏重量和功能。如何确保结扎的准确和完整性，参考下列要点。当带线缝合针穿过左外叶肝脏边缘时，无或少量出血，说明缝合针并未造成静脉或稍大动脉穿孔。如果有大量且无法控制的出血，提示门静脉被缝合针贯穿，为避免持续出血，应立即拽出缝线，并重新结扎；否则即使门静脉暂停出血，结扎后部分血管功能仍然被保留。如果少量出血且颜色为鲜红色，则提示缝合针刺穿动脉，棉球按压止血即可。准确结扎后，左外叶肝脏变为暗红色，如结扎后变为苍白色，则提示结扎连累了动脉，建议调整缝合针走针位置，重新结扎，否则肝叶极易坏死。

我们选择术后 3 天作为实验处理终点，是因为先前的实验发现，小鼠门静脉结扎后的 1~2 天，肝脏水肿明显，影响肝脏重量称量。另肝脏内除肝实质细胞外，窦状内皮细胞、枯否细胞和星状细胞等，再生反应延迟 1~2 天发生，因此当用 Ki67 检测再生肝细胞时，可在 3 天时检测所有类型的肝细胞再生。

啮齿类动物动脉细微，对肝脏的供血量较少，肝脏移植时甚至可以忽略动脉重建。实验中我们发现一种巨型动脉变异突变体，该突变体门静脉主干外观正常，但汇入各肝叶的门静脉分支极细，推测该突变体为天然的门静脉高压案例。对该突变体行部分干切除术，发现肝脏再生明显减弱，符合门静脉高压病人的临床特征，值得进一步研究。

#### 参考文献：

[1] Abdalla E K, Adam R, Bilchik A J, et al. 2006. Improving resectability of hepatic colorectal metastases: expert consensus statement. *Annals of Surgical Oncology*, 13(10): 1271–1280.

[2] Almau Trenard H M, Moulin L E, Pad í n J M, et al. 2014. Development of an experimental model of portal vein ligation associated with parenchymal transection (ALPPS) in rats. *Cirug í a Española*, 92(10): 676–681.

[3] Aoki T, Yasuda D, Shimizu Y, et al. 2008. Image-guided liver mapping using fluorescence navigation system with indocyanine green for anatomical hepatic resection. *World Journal*

*of Surgical Oncology*, 32(8): 1763–1767.

[4] Baker K J. 1966. Binding of sulfobromophthalein (BSP) sodium and indocyanine green (ICG) by plasma alpha-1 lipoproteins. *Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine*, 122(4): 957–963.

[5] Covey A M, Brown K T, Jarnagin W R, et al. 2008. Combined portal vein embolization and neoadjuvant chemotherapy as a treatment strategy for resectable hepatic colorectal metastases. *Annals of Surgery*, 247(3): 451–455.

[6] Dai B, Guissi N E I, Sulyok L F, et al. 2022. Advantages of using indocyanine green in liver transplantation: a narrative review. *Annals of Translational Medicine*, 10(2): 110.

[7] de Santibañes E and Clavien P A. 2012. Playing Play-Doh to prevent postoperative liver failure: the “ALPPS” approach. *Annals of Surgery*, 255(3): 415–417.

[8] Dili A, Lebrun V, Bertrand C, et al. 2019. Associating liver partition and portal vein ligation for staged hepatectomy: establishment of an animal model with insufficient liver remnant. *Laboratory Investigation*, 99(5): 698–707.

[9] Gao Y, Li M, Song Z F, et al. 2017. Mechanism of dynamic near-infrared fluorescence cholangiography of extrahepatic bile ducts and applications in detecting bile duct injuries using indocyanine green in animal models. *Journal of Huazhong University of Science and Technology*, 37(1): 44–50.

[10] Gioux S, Choi H S and Frangioni J V. 2010. Image-guided surgery using invisible near-infrared light: fundamentals of clinical translation. *Molecular Imaging*, 9(5): 237–255.

[11] Ishizawa T, Bandai Y, Ijichi M, et al. 2010. Fluorescent cholangiography illuminating the biliary tree during laparoscopic cholecystectomy. *British Journal of Surgery*, 97(9): 1369–1377.

[12] Iwakiri Y, Cadelina G, Sessa W C, et al. 2002. Mice with targeted deletion of eNOS develop hyperdynamic circulation associated with portal hypertension. *American Journal of Physiology–Gastrointestinal and Liver Physiology*, 283(5): G1074–1081.

[13] Kaneko J, Ishizawa T, Masuda K, et al. 2012. Indocyanine green reinjection technique for use in fluorescent angiography concomitant with cholangiography during



laparoscopic cholecystectomy. *Surgical Laparoscopy Endoscopy & Percutaneous Techniques*, 22(4): 341–344.

[14]Kruepunga N, Hakvoort T B M, Hikspoors J, et al. 2019. Anatomy of rodent and human livers: What are the differences? *Biochimica et Biophysica Acta—Molecular Basis of Disease*, 1865(5): 869–878.

[15]Liu H and Zhu S. 2009. Present status and future perspectives of preoperative portal vein embolization. *American Journal of Surgery*, 197(5): 686–690.

[16]Lorente L, Aller M A, Rodriguez I, et al. 1995. Surgical Anatomy of the Liver in Wistar Rats. *Surgical Research Communications*, 17, PP. 113–121.

[17]Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, et al. 2006. Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery. *Annals of Surgery*, 244(1): 89–98.

[18]Makino H, Togo S, Kubota T, et al. 2005. A good model of hepatic failure after excessive hepatectomy in mice. *The Journal of Surgical Research*, 127(2): 171–176.

[19]Martins P N and Neuhaus P. 2007. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat. *Liver International*, 27(3): 384–392.

[20]Martins P N and Neuhaus P. 2008a. Hepatic lobectomy and segmentectomy models using microsurgical techniques. *Microsurgery*, 28(3): 187–191.

[21]Martins P N, Theruvath T P and Neuhaus P. 2008b. Rodent models of partial hepatectomies. *Liver International*, 28(1): 3–11.

Michalopoulos G K and Bhushan B. 2021. Liver regeneration: biological and pathological mechanisms and implications. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 18(1): 40–55.

[22]Mitsuhashi N, Kimura F, Shimizu H, et al. 2008. Usefulness of intraoperative fluorescence imaging to evaluate local anatomy in hepatobiliary surgery. *Hepatobiliary and Pancreatic Surgery*, 15(5): 508–514.

[23]Rozga J, Jeppsson B and Bengmark S. 1986. Portal

branch ligation in the rat. Reevaluation of a model. *The American Journal of Pathology*, 125(2): 300–308.

[24]Schlegel A, Lesurtel M, Melloul E, et al. 2014. ALPPS: from human to mice highlighting accelerated and novel mechanisms of liver regeneration. *Annals of Surgery*, 260(5): 839–846; discussion 846–837.

[25]Vorobioff J, Bredfeldt J E and Groszmann R J. 1983. Hyperdynamic circulation in portal–hypertensive rat model: a primary factor for maintenance of chronic portal hypertension. *The American Journal of Physiology–Endocrinology and Metabolism*, 244(1): G52–57.

[26]Zanchet D J and Montero E F S. 2002. Pig liver sectorization and segmentation and virtual reality depiction. *ACTA Cir ú rgica Brasileira*, 17 (6) 2002–381.

[27]屠海焯, 包方奇, 张利棕, 等. 2024. 部分胆管结扎致胆汁淤积小鼠模型的构建方法学研究 [J]. *中国实验动物学报*, 32(5): 620–629.

[28]谢雨虹, 唐波, 范崇熙, 等. 2022.  $\alpha$ -酮戊二酸对小鼠胆汁淤积性肝损伤的缓解作用 [J]. *陆军军医大学学报*, 44(13):1322–1329.

[29]邹永康, 岳朋朋, 曹撼坤, 等. 2023. 一种新型改良式可逆性梗阻性黄疸大鼠模型的建立 [J]. *浙江大学学报 (生物医学与生物技术)*, 24(4): 345–351.

**作者简介:** 姚娜 (1989 年 12 月), 女, 籍贯为河北省唐山市, 汉族, 博士学历, 研究方向为肝再生。

**通讯作者:** 罗楚彬 (1990 年 9 月), 男, 籍贯为广东省清远市, 汉族, 博士学历, 研究方向为肝脏肿瘤微环境。

声明

本研究已经获得复旦大学附属中山医院伦理委员会伦理审查批准, 批准书编号 2019–185。

致谢

感谢复旦大学附属中山医院院长周俭教授经费和仪器设备的支持, 及实验大方向的积极引导。感谢复旦大学附属中山医院老年医学中心陈霏雨博士在小鼠左外叶肝脏门静脉结扎手术的共同探索。