

# 腹腔间隔室综合征动物模型的构建特点\*

畅庚云<sup>1</sup>, 梅铭惠<sup>2</sup>

## Establishment of an abdominal compartment syndrome animal model

Chang Geng-yun<sup>1</sup>, Mei Ming-hui<sup>2</sup>

### Abstract

**BACKGROUND:** The mechanism of organ functional lesion cause by abdominal compartment syndrome (ACS) is unclear. The appropriate animal models should be established for the in-depth study of the pathogenesis and pathophysiology.

**OBJECTIVE:** To investigate the related issues you might encounter during the process, including the model preparation standard, method, animal selection and monitoring of abdominal pressure.

**METHODS:** The PubMed database and CNKI database from 1990 to 2011 were used to search the articles on ACS, abdominal high pressure and related animal model.

**RESULTS AND CONCLUSION:** A successful animal model of ACS should have to maintain the stability of intra-abdominal pressure, and can persist for some time. Meanwhile it should impact on the experimental results as little as possible. Therefore, the key is the measurement of the intra-abdominal pressure in intraperitoneal infusion of liquid of gas model as well as the maintenance of a stable pressure. Dynamic monitor of the abdominal pressure can not be performed on the intraperitoneal infusion of liquid model, and the pressure fluctuations is significant; To compare with intraperitoneal infusion of liquid model, it is convenient to measure the intra-abdominal pressure on intraperitoneal infusion of gas model, and the utilization of electronic supply system to dynamic monitor the intra-abdominal pressure is desirable. The establishment of physical model is forward-looking experiment, but the existing physical models are needed to be improved.

Chang GY, Mei MH. Establishment of an abdominal compartment syndrome animal model. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(5): 931-934. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 腹腔间隔室综合征导致多器官功能损害的具体机制尚不十分清楚, 为深入研究其发病机制及病理生理过程, 需要合适的动物模型。

**目的:** 就腹腔间隔室综合征动物模型的制备过程中可能遇到的相关问题进行讨论, 包括制备模型的标准、方法、动物的选择及监测腹压的方式。

**方法:** 由第一作者检索 PubMed 数据及 CNKI 数据库 1990/2011 有关腹腔间隔室综合征及腹腔高压及相关动物模型方面的文献。

**结果与结论:** 一个成功的腹腔间隔室综合征动物模型最好能保持腹腔压力的稳定, 并能持续一定的时间, 同时尽可能少的影响实验结果。所以无论选择腹腔灌注气体还是灌注液体模型的测量腹腔内压并维持压力的稳定是关键。腹腔灌注液体模型无法动态监测腹压, 且压力波动较大, 与之相比腹腔灌注气体模型测压较为方便, 若使用电子供气系统动态监测则更为理想。生理模型是前瞻性的实验, 但现有的生理模型有待改进。

**关键词:** 腹腔间隔室综合征; 腹内高压; 动物模型; 腹腔间隙综合征; 腹腔筋膜室综合征; 腹腔高压

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.05.040

畅庚云, 梅铭惠. 腹腔间隔室综合征动物模型的构建特点[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(5): 931-934. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

<sup>1</sup>Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China;

<sup>2</sup>Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China

Chang Geng-yun★, Studying for master's degree, Physician, Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China cgyfs@163.com

Correspondence to: Mei Ming-hui, Professor, Master's supervisor, Chief physician, Affiliated Hospital of Guilin Medical College, Guilin 541001, Guangxi Zhuang Autonomous Region, China mhmei616@yahoo.com.cn

Received: 2011-10-22  
Accepted: 2011-12-09

## 0 引言

腹腔间隔室综合征(abdominal compartment syndrome, ACS)是各种原因造成的腹腔内压力急剧升高, 影响腹腔内、外组织器官的血液循环, 进而引起一系列病理生理改变的综合征<sup>[1]</sup>。ACS由Kron1986年首次提出, 在2006年国际专家会议讨论有关腹腔内高压IAH(intra-abdominal hypertension)和ACS, ACS是腹腔压力出现稳定升高并且>2.66 kPa(伴或不伴有腹腔灌注压≤7.98 kPa), 同时合并有新的器官功能障碍和衰竭<sup>[2]</sup>。ACS在外科危重患者中并非少见, 严重创伤后ACS发生率为

0.5%~36.0%<sup>[3]</sup>。ACS可以引起器官功能衰竭直至死亡。有报道称如果得不到及时治疗, 患者病死率高达70%<sup>[4]</sup>。但ACS导致多器官的功能损害的具体机制尚不十分清楚, 为深入的研究ACS的发病机制及其病理生理过程, 需要合适的动物模型, 本文就动物模型的制备做一综述。

## 1 资料和方法

**1.1 资料来源** 由第一作者检索1990/2011年PubMed数据及CNKI数据库有关ACS与腹腔高压及相关动物模型方面的文献。

### 1.2 纳入与排除标准

纳入标准: ①文章所述内容需与腹腔间隔室

<sup>1</sup> 桂林医学院, 广西壮族自治区桂林市 541004;  
<sup>2</sup> 桂林医学院附属医院, 广西壮族自治区桂林市 541001

畅庚云★, 男, 1984年生, 山西省太原市人, 汉族, 桂林医学院在读硕士, 医师, 主要从事腹腔间隔室综合症方面的研究。  
cgyls@163.com

通讯作者: 梅铭惠, 教授, 硕士生导师, 主任医师, 桂林医学院附属医院肝胆外科, 广西壮族自治区桂林市 541004  
mhmei616@yahoo.com.cn

中图分类号: R318  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225 (2012)05-00931-04

收稿日期: 2011-10-22  
修回日期: 2011-12-09  
(20110917010/GW-C)

动物模型研究密切相关。②同一领域选择近期发表或在权威杂志上发表的文章。

排除标准: 重复性研究。

1.3 数据提取 计算机初检得到 54 篇文献, 阅读标题和摘要进行初筛, 排除因研究目的与本文无关及内容重复的研究 33 篇, 共保留其中的 21 篇归纳总结。

1.4 质量评价 符合纳入标准的 21 篇文献中, 文献[1-5]探讨了 ACS 的研究现状, 文献[5-21]介绍了目前最新的制作 ACS 动物模型的方法。

## 2 结果

2.1 ACS 动物模型的标准 目前由于不同动物在 ACS 中的差异性研究尚不明确, 所以很难有统一的动物模型标准, 但根据 ACS 的定义, 动物模型要求腹腔压力持续大于 2.66 kPa(伴或不伴或腹腔灌注压小于 7.98 kPa), 在 15 min~18 h 内实验动物出现多器官功能障碍, 而且不经治疗实验动物最终将死于多器官功能衰竭<sup>[5]</sup>。

2.2 动物模型的制备方法 目前用于 ACS 动物模型的制备方法主要包括以下几种:

2.2.1 腹腔灌注液体模型 腹腔灌注液体模型是最早使用制备 ACS 模型的方法, 该方法以增加腹水的量来升高腹腔内压。但由于液体很难被压缩, 且随着液体的增加, 腹腔内压力达到一定水平后会呈指数升高, 所以其压力很容易受到影响。

腹腔内灌注生理盐水模型: 即向腹腔内灌注生理盐水来升高腹内压力的模型。Hsu 等<sup>[6]</sup>在研究 ACS 对失血性休克的影响时使用套管针刺入腹腔, 并向腹腔灌注生理盐水的方法来制作 ACS 模型。随后 Moore-Olufemi 等<sup>[7]</sup>在相关研究中也使用生理盐水灌注腹腔的方法升高腹内压力。

以上动物模型均需要不定时测量腹腔内压力, 并随时补充盐水维持腹压, 不仅在实际操作中较为繁琐, 而且腹内压受腹壁压力及呼吸作用的影响较大, 同时由于腹腔液体增加时腹腔内容物是悬浮在腹腔内的, 所以直接法测量腹压容易受到肠管或网膜组织的干扰, 生理盐水可能参与组织液及淋巴回流进而对机体产生血流动力学影响。虽然腹腔内灌注无菌生理盐水存在压力不稳定等缺点, 但由于其模拟了临床腹水增加的情况, 所以国内外还是有很多动物模型采用此种方法<sup>[8-9]</sup>。

腹腔内灌注乳酸林格液: 基本方法同腹腔灌注

生理盐水模型, 只是灌注液体改用乳酸林格液。O'Mara 等<sup>[10]</sup>在制作猪的 ACS 模型时使用乳酸林格液注入腹腔来升高腹腔内压力。该模型同腹腔高压生理盐水模型一样, 存在压力不稳定及测压较为困难的缺点, 但目前尚无证据表明乳酸林格液较生理盐水更适合制作 ACS 模型。

腹腔灌注琥珀酰明胶模型: 即通过腹腔灌注琥珀酰明胶来升高腹腔内压力。近期, Meier 等<sup>[11]</sup>在研究 ACS 同股静脉氧饱和度的关系时, 使用琥珀酰明胶注入大鼠腹腔, 并维持腹腔内压 2.66 kPa 持续 3 h。该模型腹腔灌注液选择了代血浆, 很好模拟了临床腹水增加致腹腔压力增高的情况, 但其缺点同腹腔灌注生理盐水模型。

2.2.2 腹腔灌注气体模型 气体具有能够在均匀充满一个密闭的空间, 而且容易被压缩, 不参与体液循环, 电解质交换及淋巴回流等优点。根据灌注气体的不同又可分为以下几种:

腹腔灌注空气模型: 使用空气升高实验动物的腹内压。Rezende-Neto 等<sup>[12]</sup>在做 SD 大鼠 ACS 模型的时候, 用套管针刺入腹腔, 且套管针连接三通管, 一端接压力计, 另一端用过滤过 CO<sub>2</sub> 的空气注入大鼠腹腔成功做出 ACS 模型。该模型可以注入空气的同时就检测腹腔内空气的压力, 而且腹腔内空气的压力等于腹腔内压, 所以测压时不用调节压力的基点。由于空气的弥散作用, 实验中需要通过向腹腔补充气体的方法维持腹腔内压力, 实际操作中稳定腹压较为繁琐。而且, 空气没有稳定的高压气源, 所以不能使用电子供气系统进行充气, 导致该方法主要应用于小动物 ACS 模型的制作。

腹腔灌注 CO<sub>2</sub> 模型: CO<sub>2</sub> 是腹腔镜气腹时使用的首选气体, 由于腹腔镜供气系统较成熟, 可以动态监测并维持腹内压力, 所以国内外很多模型都采这种方法。但是 CO<sub>2</sub> 的可溶性和腹腔可导致 CO<sub>2</sub> 吸收迅速增加, 可引起高碳酸血症和酸中毒。气腹时压力升高至 2.00 kPa 以上时膈肌上抬, 肺功能减退, 呼吸顺应性降低, CO<sub>2</sub> 的排出受阻进而影响机体的酸碱平衡<sup>[13]</sup>。近期 Otto 等<sup>[14]</sup>在构建猪的 ACS 模型中使用了 CO<sub>2</sub> 气腹, 利用腹腔镜的电子注气系统保持腹内压 3.99 kPa 的情况下并观察实验动物 6~12 h, 在此期间使用呼吸机辅助通气保证血 PaCO<sub>2</sub> 维持在 4.66~5.32 kPa。中国川北医学院的胡建华也在做家猪 ACS 模型时用选择家猪

并用呼吸机控制呼吸<sup>[15]</sup>。可见使用 CO<sub>2</sub> 制作 ACS 模型可以使用电子充气系统, 压力稳定且比较容易控制, 但是有相关研究表明应用 CO<sub>2</sub> 气腹可导致高碳酸血症, 所以在使用 CO<sub>2</sub> 气腹的同时需要使用呼吸机来维持机体的酸碱平衡。国外也有少数在制作鼠等小型动物 ACS 模型时使用 CO<sub>2</sub> 气腹的, 但是由于失去了呼吸机及电子供气系统的支持, 压力难以稳定, 而且存在高碳酸血症的干扰<sup>[16]</sup>, 所以 CO<sub>2</sub> 作为供气源制作模型时最好使用呼吸机增加通气量。

**腹腔灌注氮气模型:** 方法同上, 但灌注的气体为氮气。氮气同 CO<sub>2</sub> 一样是惰性气体, 不溶于水(常温常压下 1 体积水溶解 0.02 体积氮气), 且不参与气体的交换, 对内环境的影响较小, 理论上应该也是比较理想的升高腹腔灌注压的气体。最近 Gong 等<sup>[17]</sup>用 SD 大鼠, 在全麻下用 14 号套管针在腹正中中线刺入腹腔并行荷包缝合固定, 通过三通管联通压力计及氮气储气袋, 并维持腹腔内压力(2.660±0.133) kPa。该模型未使用了电子注气系统, 取而代之是氮气储气袋, 同时氮气对机体无害且不易吸收, 消除了气体本身的干扰因素, 与 CO<sub>2</sub> 气腹模型相比能更准确反映腹内高压情况下血气的变化。但有由于氮气不参与气体交换所以很难通过呼吸排出体外, 而且有报道称氮气可能增加气体栓塞的风险<sup>[18]</sup>。

**2.2.3 腹腔置入盐水袋模型** 2009 年 Benninger 等<sup>[19]</sup>在研究猪在腹腔高压情况下不同关腹方式对动物的影响时, 通过腹腔置入盐水袋的模型来制作腹腔高压。该模型实际操作较为繁琐, 且容易导致腹腔内压力不均匀, 腹压的测量较为困难。虽然有上述缺点, 但是该模型的创新之处在于他可以在开腹完成腹腔内操作后再造腹腔高压, 使得实验题材及内容明显增加。

**2.2.4 生理模型** 2007 年 Schachtrupp 等在总结 ACS 的动物模型之后发现当时的模型多是通过气体、液体及其他物质占据腹腔空间的方式来升高腹腔内压, 并提出下个阶段是使用生理方法制作动物模型, 即通过失血性休克后液体复苏导致腹腔漏出液增加的方式来升高腹腔内压力。

之后在 2010 年 Shah 等<sup>[20]</sup>在制作猪 ACS 模型时模拟失血性休克后发生腹腔高压的情况, 先通过放血使其平均动脉压保持 6.65 kPa 并维持 1 h, 再用 2 倍失血量的平衡盐溶液进行液体复苏, 同时给实验动物的肠系膜上静脉加压至 3.99 kPa, 测压方式为腹腔植入盐水袋, 袋内接压力计, 当腹内压力达到 2.66 kPa 后, 表示模型制作成功。该模型的关键是肠系膜高压, 如果失去肠系膜高压, 腹压则很难升高至 2.66 kPa。失血性休克后过量的平衡盐复苏一直被认为是 ACS 形成的原因之一<sup>[21]</sup>, Shah 是首个使用生理方式成功复制 ACS 模型, 而且很好模拟了失血性休克后过度复苏导致的腹腔高压, 该实验加深了人类对 ACS 的认识, 相信随着人类对

ACS 认识的深入, 腹腔高压生理模型会越来越成熟。

**2.3 实验动物的选择** 一个成功的模型需要选择合适的动物。目前被用于 ACS 模型的动物包括大鼠、兔、狗、猪等。

**大鼠:** 由于身体较小, 许多设备及器械难于应用。在制作动物模型的过程中最好选择尽可能简单的方式。目前涉及大鼠 ACS 模型制作方式, 多为腹腔刺入套管针外接三通管, 一端接压力计, 另一端灌注液器或气体, 其测压及稳压方式简单易行, 但是在实际操作中及时测压和稳定腹腔压力却成为实验的难点, 由于大鼠隶属小型动物, 难以使用间接测压法, 同时腹腔相对较小, 腹腔灌注物体在测压时的少量流失也会造成腹压波动明显。同时由于呼吸机等设备难以应用, 所以无法长时间观察动物, 再加上大鼠对各项手术操作的耐受性较差, 所以使用大鼠作为实验动物最终得出的实验结果可靠性稍差。

**兔、狗:** 两种动物皆为中型动物, 由于狗和人的食谱较接近, 消化器官功能同人类类似, 所以狗比兔更适合用于 ACS 的研究。中型动物可以使用实验的一般设备, 如呼吸机, 尿管, 深静脉导管等。所以具备进行 ACS 的一般研究的条件。同时由于有足够大的腹腔和足够厚的腹壁, 可以使用电子注气设备控制腹腔内压力, 就可以构成较为理想的动物模型。但上述动物由于体型、血容量等的限制, 难以耐受较大手术, 所以完成生理 ACS 模型较为困难。

**猪:** 实验动物中较大的种类, 和人体较为接近, 对各项手术操作的耐受性较强, 为较理想的实验动物。目前国外很多较复杂的实验, 比如生理腹腔高压模型多选择猪来做实验动物。与之前的实验动物相比, 它惟一的缺点也许是的实验成本较高, 限制了实验数据的统计学的处理。

**2.4 腹腔压力的测定** 成功的 ACS 模型需要合理的测量腹压及维持腹压的方式, 目前可以选择的测压方式主要分为直接测压法和间接测压法: 直接测压法是通过腹腔引流管或穿刺针连接压力计或传感器直接测定腹腔灌注压, 或通过腹腔镜检查术中的气腹机对腹腔压力进行自动连续监测; 间接测压法包括测量: 胃内压, 下腔静脉压力, 膀胱内压力, 腹腔植入气袋或盐水袋测压法。间接测量法由于创伤较小, 临床使用较多。但是作为 ACS 动物模型建立研究的测压方式主要是直接测压法, 因为大多数腹腔高压模型选择向腹腔内灌注气体或液体的方式来制作腹腔高压模型, 实验中只需套管针的尾端链接三通管即可将测压及稳压连为一体, 如果在实验中使用电子注气系统则测压及稳压的方式更为简便。如果要建立生理 ACS 模型则较为困难, 需要在开腹的情况下完成相关的手术操作, 这样就需要使用间接测压法或使用腹腔置入水袋或气袋的方式来间接测量腹腔内的压力。

### 3 讨论

一个成功的 ACS 动物模型最好能保持腹腔压力的稳定并能持续一定的时间, 同时尽可能少的影响实验结果。所以无论选择腹腔灌注气体还是灌注液体模型的测量腹腔内压并维持压力的稳定是关键。腹腔灌注液体模型无法动态监测腹压, 且压力波动较大, 与之相比腹腔灌注气体模型测压较为方便, 若使用电子供气系统动态监测则更为理想。生理模型是前瞻性的实验, 但现有的生理模型有待改进。

### 4 参考文献

- [1] Malbrain ML,Deeren D,De Potter TJ.Intra-abdominal hypertension in the critically ill: it is time to pay attention.Curr Opin Crit Care.2005;11(2): 156-171.
- [2] Malbrain ML,Cheatham ML,Kirkpatrick A,et al. Results from the International Conference of Experts on Intra-abdominal Hypertension and Abdominal Compartment Syndrome. I. Definitions.Int Care Med.2006;32(11):1722-1732.
- [3] Ball CG,Kirkpatrick AW,McBeth P.The secondary abdominal compartment syndrome: not just another posttraumatic complication.Can J Surg.2008; 51(5):399-405.
- [4] Kimball EJ,Rollins MD,Mone MC,et al.Survey of intensive care physicians on the recognition and management of intra-abdominal hypertension and abdominal compartment syndrome.Crit Care Med.2006;34:2340-2348.
- [5] Schachtrupp A,Wauters J,Wilmer A. What is the best animal model for ACS? Acta Clin Belg.2007;62:225-232.
- [6] Hsu YP,Chen RJ,Fang JF,et al.Increased susceptibility to oxidant injury in hepatocytes from rats with intra-abdominal hypertension. J Trauma. 2004;57(3):569-575.
- [7] Moore-Olufemi SD,Xue H,Allen SJ,et al.Effects of primary and secondary intra-abdominal hypertension on mesenteric lymph flow: implications for the abdominal compartment syndrome. Shock.2005;23(6):571-575.
- [8] Gudmundsson FF,Gislason HG,Dicko A,et al.Effects of prolonged increased intra-abdominal pressure on gastrointestinal blood flow in pigs.Surg Endosc.2001;15(8):854-860.
- [9] Doty JM,Oda J,Ivatury RR,et al.The effects of hemodynamically shock and increased intra-abdominal pressure on bacterial translocation. J Trauma.2002;52(1):13-17.
- [10] O'Mara MS,Papasavas PK,Newton ED,et al.Modified separation of parts as an intervention for intraabdominal hypertension and the abdominal compartment syndrome in a swine model. Plast Reconstr Surg.2003;114(7): 1842-1845.
- [11] Meier C,Contaldo C,Schramm R,et al.A new model for the study of the abdominal compartment syndrome in rats.J Surg Res.2007;139(2):209-216.
- [12] Rezende-Neto JB,Moore EE,Melo de Andrade MV,et al.Systemic inflammatory response secondary to abdominal compartment syndrome: stage for multiple organ failure. J Trauma.2002; 53(6): 1121-1127.
- [13] 钱淑清,何茵.腹腔压力监测在外科重症监护病房病情观察中的应用研究[J].护理研究,2005, 19(4):581-583.
- [14] Otto J,Afify M,Jautz U.Histomorphologic and ultrastructural lesions Of the pancreas in a porcine model of intra-abdominal hypertension. Shock.2010;33(6):639-645.
- [15] 胡建华,王大庆,涂发平.腹内高压对猪呼吸功能影响的实验研究[J].中国呼吸与重症监护杂志,2008,7(5):383-384.
- [16] Kheirabadi BS,Tuthill D,Pearson R.Metabolic and Hemodynamic Effects of CO2 Pneumoperitoneum in a Controlled Hemorrhage Model.J Trauma.2001;50(6):1031-1043.
- [17] Gong G,Wang P,Ding W,et al.A modified model of the abdominal compartment syndrome.J Trauma.2011;70(4):775-781.
- [18] Gupta A,Watson DI,Ellis T. Tumor implantation following laparoscopy using different insufflation gases. ANZ J Surg.2002; 72(4):254-257.
- [19] Benninger E,Laschke MW,Cardell M. et al.Intra-abdominal pressure development after different temporary abdominal closure techniques in a porcine model.J Trauma.2009;66(4): 1118-1124.
- [20] Shah SK,Jimenez F,Walker PA,et al. A novel physiologic model for the study of abdominal compartment syndrome (ACS).J Trauma. 2010;68(3):682-689.
- [21] Rezende-Neto JB,Moore EE,Masuno T.The abdominal compartment syndrome as a second insult during systemic neutrophil priming provokes multiple organ injury.Shock.2003; 20(4):303-308.

**作者贡献:** 第一作者和通讯作者构思并设计本综述, 分析并解析数据, 所有作者共同起草, 经通讯作者审核, 第一作者对本文负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 无涉及伦理冲突的内容。

**此问题的已知信息:** ACS 可以引起腹腔内脏器的缺氧改变, 同时也影响腹腔外脏器的功能, 其中对肺的影响及对血液循环的影响是导致患者死亡的主要原因。目前研究 ACS 所使用的动物模型的方法包括液体、气体致腹腔高压模型及生理腹腔高压模型。

**本综述增加的新信息:** 不仅总结了现有腹腔高压模型的制作, 同时提出不同动物对腹腔高压的耐受力也不尽相同。

**临床应用的意义:** 对积极早期腹腔减压, 有效减少腹腔高压带来的严重后果具有重要临床意义。

外国专家修饰的医学英语句型: “对照组光镜下 HE 染色大脑皮质微血管周间隙正常”

中文	修饰前的英文	修饰后的英文
对照组光镜下 HE 染色大脑皮质微血管周间隙正常, 管壁结构完整, 内皮细胞光滑。	In control group, hematoxylin-eosin staining exhibited normal pericapillary spaces of cerebral cortex, intact structure of vessel walls, and smooth vascular endothelial cells.	In the control group, hematoxylin-eosin staining revealed normal pericapillary spaces, intact vessel walls and smooth vascular endothelial cells within the cerebral cortex.
管腔内无血液成分; 神经细胞大小正常, 胞核居中, 核浆比无异常, 胞内结构清晰可见。	There was no erythrocyte in vascular lumina. Neurons presented with normal morphology, with clear round nuclei and proper nucleus to cytoplasm ratio.	No erythrocytes were observed within the vascular lumina. Neurons exhibited normal morphology, with clear round nuclei and a constant nucleus-cytoplasm ratio.