

# 大鼠喉移植改良模型的建立

李浩, 彭汉伟\*, 曾宗渊

(中山大学肿瘤防治中心华南肿瘤学国家重点实验室头颈科, 广州 510060)

**[摘要]** **目的:**改良大鼠喉移植模型,提高移植喉的存活率。**方法:**80只Ⅱ级近交系F344大白鼠,体质量250~350g,随机分为2组,每组40只,共20对。对照组采用Strome喉移植模型,实验组在切取供体喉时保留咽升动脉,将舌根、喉、喉咽作为复合移植体,供体大鼠双侧颈总动脉分别与受体大鼠颈总动脉、颈前静脉进行端端吻合重建移植喉血液循环,比较两组术后动脉通畅率及移植喉存活率。**结果:**Strome模型术后动脉、静脉通畅率和移植喉存活率分别为30%(6/20)、15%(3/20)、30%(6/20),实验组为75%(15/20)、65%(13/20)、80%(16/20),两组比较差异有显著性意义( $P<0.05$ )。**结论:**大鼠喉移植改良模型提高了受体大鼠和移植喉的存活率,优于Strome模型。

**[关键词]** 喉;器官移植;模型;动物

**[中图分类号]** R 739.65 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)03-0322-03

## Establishment of a modified rat laryngeal transplantation model

LI Hao, PENG Han-wei\*, ZENG Zong-yuan (State Key Laboratory of Oncology in Southern China, Department of Head and Neck, Cancer Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510060, China),

**[ABSTRACT]** **Objective:** To develop a modified rat laryngeal transplantation model to improve the survival rate of recipients. **Methods:** Eighty Class II isogenic F344 rats, weighing 250-350 g, were randomly divided into 2 groups ( $n=40$ ). The control group adopted the Strome model. The allograft used for the experimental group preserved ascending pharyngeal artery, which formed a complex allograft together with tongue base, larynx and pharyngolarynx. End-to-end anastomosis was performed between both allograft common carotid arteries and anterior neck veins. The patency rate and survival rate of the allograft of the 2 groups were compared. **Results:** The artery, vein patency rate and survival rate were 30%, 15%, and 30% in control group, and 75%, 65%, and 80% in experimental group, respectively ( $P<0.05$ ). **Conclusion:** The modified rat laryngeal transplantation model improves survival rate of allograft and vessels patency rate, compared with those of Strome model.

**[KEY WORDS]** larynx; organ transplantation; models, animal

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(3): 322-324]

近年来晚期喉癌发病率呈不断上升趋势,全喉切除术后患者由颈部造瘘口呼吸,不能发声言语,严重影响患者生存质量。Strome等<sup>[1]</sup>首先提出喉移植设想,由于喉作为一个非生命必需器官,其研究一直滞后于肾脏、肝脏等器官移植,直至Strome等<sup>[2]</sup>报道大鼠喉移植模型,使喉移植研究得以发展。本研究旨在改良Strome大鼠喉移植模型,提高移植喉的存活率。

### 1 材料和方法

1.1 实验动物 Ⅱ级近交系F344大白鼠,体质量250~350g,共80只,随机分为2组,每组40只,共20对,由中山大学动物实验中心提供。

1.2 实验分组 对照组采用Strome大鼠喉移植模式<sup>[2]</sup>;实验组动脉端与静脉端采用端端吻合模式,供体喉切取时保留咽升动脉,将舌根、喉、喉咽作为复合移植体。

#### 1.3 实验方法

1.3.1 对照组 (1) 供体大鼠:10%水合氯醛,1.2 mg/kg,腹腔内注射麻醉。仰卧位,颈前正中切口,上至下颌骨下缘,下达胸骨切迹。切开颈白线,在舌骨下缘切断颈前肌止点,向下分离至胸锁关节水平,暴露气管、鼠喉和颈动脉鞘。游

离供体血管蒂,在甲状腺上动脉上0.3 cm处结扎颈外动脉,注意保护好甲状腺上动脉和喉体之间的血管。横断气管,将气管和喉体向上牵拉,切开甲状舌骨膜,进入喉腔,直达椎前肌,在椎前筋膜表面分离供体喉,游离出整个喉体。此时,供体喉组织包含喉体、甲状腺、部分颈段食管、气管及保留双侧甲状腺上动脉的颈总动脉。用UW液行供体喉原位灌洗,直至喉体、气管、食管和甲状腺等组织呈均匀灰白色,喉腔干净无分泌物残留,静脉回流端流出液清彻为止,取出供喉,置于0~4℃UW液中保存。(2) 受体大鼠:手术切口如供体大鼠,切除左侧颌下腺,分离颈外静脉属支,在锁骨上窝游离出颈外静脉主干。分离并暴露左颈动脉鞘,在颈总动脉分叉处下方1 cm游离出一段颈总动脉,约1.0 cm。供体喉置于受体鼠左侧颈部,修剪血管蒂并将双侧颈总动脉断端剪成40~

**[基金项目]** 广东省自然科学基金(2005-5300797);广州市科技计划项目(2003Z2-E4101)。Supported by Natural Sciences Foundation of Guangdong Province(2005-5300797), and Project of Science and Technology of Guangzhou Municipal Government(2003Z2-E4101)。

**[作者简介]** 李浩,博士,主治医师。

\* Corresponding author. E-mail: ajax1998@163.com

50°斜面;供体喉左右侧颈总动脉分别与受体鼠左侧颈外静脉和左侧颈总动脉行端侧吻合(图1A)。

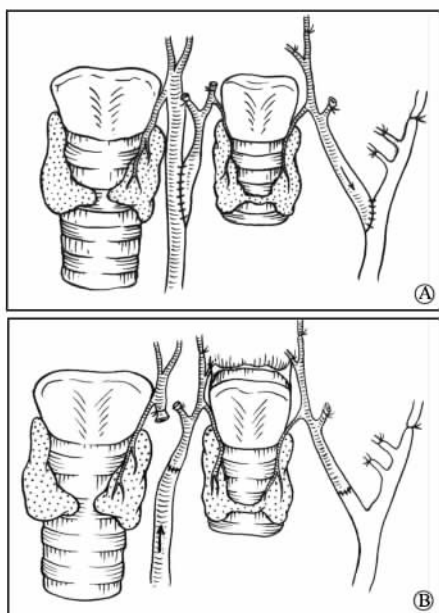


图1 对照组(A)和实验组(B)大鼠喉移植模型

Fig 1 Rat laryngeal transplantation model in control group(A) and experimental group(B)

1.3.2 实验组 (1) 供体大鼠:基本同对照组,作了2点改进:供喉切取时,在咽升动脉上方结扎颈外动脉终支,保留供体鼠双侧颈总动脉、颈外动脉主干及其分支——甲状腺上动脉和咽升动脉作为血管蒂;在舌骨上缘切断舌骨上肌群,进入下咽腔,保留部分舌根及下咽,保留下咽后壁,切取包含舌骨、舌根、下咽后壁、颈段气管、喉体在内的移植喉复合体。(2) 受体大鼠:在受体大鼠左侧锁骨上窝游离出颈外静脉主干及其两条主要分支——颈前静脉和颈外后静脉,将供体喉左侧颈总动脉与受体鼠颈前静脉行端端吻合;血管重建时,结扎受体鼠左侧颈总动脉的远心端,将供体大鼠双侧颈总动脉分别与受体大鼠颈总动脉和颈前静脉进行端端吻合

(图1B)。

1.4 移植喉存活评价 术后第14天进行,解剖受体鼠,在10倍显微放大镜下直接观察移植喉血管通畅情况,切取移植喉及动脉、静脉吻合口,用甲醛固定,石蜡包埋,连续切片,脱钙,H-E染色,观察移植喉的镜下结构改变。

1.5 统计学处理 采用SPSS 10.0统计软件包中的列联表 $\chi^2$ 检验。

## 2 结果

2.1 移植喉存活 受体大鼠全身状况良好,进食正常,精神佳;颈部切口愈合良好;移植喉组织轻度至中度水肿,与周围组织有纤维性粘连,血液循环良好,喉体表面颜色暗红或鲜红,质稍脆,用显微剪剪开部分组织后见新鲜血液渗出,喉腔内有炎性渗出物;病理镜下检查示喉基本结构正常,黏膜上皮为假复层柱状纤毛上皮,部分上皮坏死脱落,形成浅表溃疡,黏膜下层黏液样变,小涎腺腺泡黏液潴留,黏膜下层、肌层见散在的淋巴细胞和中性粒细胞浸润,血管、神经和软骨无明显病变。

2.2 移植喉坏死 全身情况较差,精神不振、萎靡,毛发失去原有光泽、灰暗,进食量减少,排稀烂样大便;颈部切口红肿,见脓性分泌物渗出,部分切口裂开、不愈,瘻道形成,有恶臭味;移植喉体被周围纤维结缔组织包裹,喉体变黑,质脆、糜烂,喉腔炎性渗出物增多,部分结构已被溶解,形成一个被纤维结缔组织包裹的脓性囊肿;镜下检查示喉基本结构消失,黏膜层完全坏死、脱落,各层组织间见大量炎性细胞浸润,横纹肌、神经、血管及软骨均出现坏死。

2.3 2组受体鼠存活率、移植喉动脉、静脉通畅率及移植喉存活状况 对照组术后死亡4只,2只死于术后第2天,另外2只分别死于术后第1天和第4天,术后7d动脉和静脉通畅率分别为30%、15%,移植喉存活率为30%;实验组术后移植大鼠仅有1只死亡,死于术后第2天,动脉和静脉的通畅率高,分别为75%和65%,移植喉的存活率达80%(表1)。经统计学分析,术后受体鼠存活率差异无显著性意义;动脉通畅率、静脉通畅率和移植喉存活率2组比较,差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。

表1 2组受体鼠存活、血管通畅和移植喉存活情况

Tab 1 Survival of recipients, vessel patency, and survival of allografts in 2 groups

[N=20, %(n/N)]

Group	Survival of recipients	Artery patency	Vein patency	Allograft vitality
Control	80(16/20)	30(6/20)	15(3/20)	30(6/20)
Experimental	95(19/20)	75(15/20)	65(13/20)	80(16/20)
	$P=0.505^*$	$P=0.01, \chi^2=9.263$	$P=0.003, \chi^2=11.618$	$P=0.003, \chi^2=11.807$

\*: Fisher's exact test(2-tail)

## 3 讨论

喉癌在我国发病率近年呈上升趋势<sup>[3]</sup>,部分晚期喉癌患者必须行全喉切除术,术后丧失言语发音、经鼻呼吸和协助吞咽等功能。语言功能是我们日常生活、工作和学习中交流

的桥梁,语言的丧失必然影响到患者的生活质量和自尊,如何恢复无喉者的发音功能是目前比较棘手的课题,而喉移植的研究将为解决上述问题开辟一条新的途径。20世纪60年代初 Boles、Silver等<sup>[4,5]</sup>开始进行犬喉移植实验研究,探索喉移植血管重建、神经再支配、术后免疫排斥等,但当时免疫药

物毒副作用如骨髓抑制、肝肾功能损害等太大,喉移植成功率不高,大部分实验动物死于败血症,Silver等<sup>[5]</sup>报道12只移植犬,2只存活8d以上,术后成活率仅有12.5%。1992年Strome等<sup>[2]</sup>建立大鼠喉移植模型,该模型保留受体鼠喉,同时将供体喉并行植入受体大鼠颈部,主要目的是研究喉移植血管重建、术后免疫排斥反应及抗免疫药物的筛选,术后移植喉是无功能的。1998年Strome在此研究基础上成功完成了人类历史上第1例喉移植<sup>[1]</sup>,患者术后发音良好。由于Strome报道大鼠喉移植模型术后血管通畅率较低<sup>[2,6]</sup>,移植喉存活率不理想,本研究目的在于对此模型进行改良,提高移植喉存活率。

通过大鼠应用解剖学研究,我们发现大鼠喉的血液供应与人类不同,除甲状腺上动脉外,咽升动脉发出交通支与甲状腺上动脉共同滋养喉部<sup>[7]</sup>。因此,在改良模型设计中,选择保留咽升动脉,在其上方进行颈外动脉结扎。实验结果表明,术后移植喉血流灌注量的增加,减少微循环栓塞机会,同未保留咽升动脉对照组相比,提高了移植喉的存活率。

大鼠喉静脉回流主要通过甲状腺上静脉和喉与气管食管及咽部之间的交通支,为避免损伤这些静脉回流途径,在供体喉切取时,我们主张将舌骨、部分舌骨上、下肌群和部分舌根、下咽作为喉的复合移植体一起保留。术后受体鼠即处死,实验中未考虑受体鼠舌功能。

良好的动脉供血和静脉回流是移植喉存活的关键,Strome模型采用一侧甲状腺上动脉为供血动脉,另一侧甲状腺上动脉作为回流静脉。实验中,对照组采用Strome模型,术后对移植喉观察,发现喉体的微循环栓塞明显,喉存活率只有30%,我们认为可能有以下原因:(1)动脉和静脉吻合均采用端侧吻合,术后由于血流动力学发生改变,易出现湍流;(2)血流的冲击作用,易造成吻合口处的内膜内皮细胞损伤;(3)血管吻合中通常由于管壁剪去过多,形成缺口太深或呈“V”形,术后容易造成管腔狭窄,血栓形成,继而导致移植喉

的缺血坏死。

改良模型中,结扎受体大鼠远端颈总动脉,将近端颈总动脉与供体大鼠的颈总动脉直接进行端端吻合,增加了吻合口处的动脉压力,同时也增加移植喉血流灌注量,使吻合口处血栓形成机会明显减少。回流静脉选择汇入颈外静脉主干的属支,如颈前静脉或颈外后静脉,这些静脉的管径与供体大鼠颈总动脉管径相近,吻合后不易引起湍流,提高了术后静脉通畅率。我们认为改良大鼠喉移植模型,术后移植喉存活率提高到80%,优于Strome模型,有利于喉移植的进一步研究。

[参考文献]

[1] Strome M, Stein J, Esclamado R, et al. Laryngeal transplantation and 40-month follow-up[J]. *N Engl J Med*, 2001, 344: 1676-1679.

[2] Strome S, Sloman-Moll E, Samonte BR, et al. Rat model for vascularized laryngeal allograft[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1992, 101: 950-953.

[3] 张克, 费声重, 陈哲, 等. 辽宁省工业城市大气污染与喉癌发病的关系[J]. *中华耳鼻咽喉科杂志*, 1990, 25: 240-242.

[4] Boles R. Surgical replantation of the larynx in dogs: a progress report[J]. *Laryngoscope*, 1966, 76: 1057-1064.

[5] Silver CE, Rosen RG. Function of transplanted and denervated larynx[J]. *Arch Otolaryngol*, 1974, 99: 100-101.

[6] Lorenz RR, Dan O, Fritz MA, et al. Rat laryngeal transplant model: technical advancements and a redefined rejection grading system[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 2002, 111: 1120-1127.

[7] 李浩, 曾宗渊, 彭汉伟, 等. 大鼠喉移植的应用解剖学研究[J]. *肿瘤防治杂志*, 2004, 11: 467-469.

[收稿日期] 2005-09-20 [修回日期] 2005-12-30  
[本文编辑] 贾向春

**Glutamate receptors within the nucleus of solitary tract contribute to pancreatic secretion stimulated by intraduodenal hypertonic saline**

Peng J, Fan G, Hong Z, Chai Y, Wu Y (Shanghai Key Laboratory for Pharmaceutical Metabolite Research, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

[ABSTRACT] High-speed counter-current chromatography (HSCCC) with a solvent system composed of ethyl acetate-n-butanol-water (2 : 1 : 3, V/V/V) was used to isolate and separate two C-glycosylflavones from *Patrinia villosa* Juss, a traditional Chinese medicine. The separation produced 42.9 mg isovitexin and 20.1 mg isoorientin with purities of 99.3% and 98.5%, respectively as determined by high-performance liquid chromatography (HPLC) in one step elution from 250 mg crude extract, and identification was performed by MS, <sup>1</sup>H NMR and <sup>13</sup>C NMR. It is the first report of discovering isovitexin and isoorientin from the plant of *Patrinia* genus.

[J Chromatogr A, 2005, 1074: 111-115]