

大鼠自体原位肝移植胆道缺血再灌注损伤模型的建立

赵宏峰, 周杰* (南方医科大学南方医院肝胆外科, 广州 510515)

[摘要] **目的:**为降低手术难度,设计一个能客观反映大鼠肝移植胆道缺血再灌注损伤的模型。**方法:**采用 80 只 SD 大鼠建立此模型,并使用门静脉、腹主动脉双重恒压灌注,除血管吻合外,其余方法同大鼠原位肝移植。且门静脉、肝动脉再灌注由血管夹控制。**结果:**本模型手术成功率 95%(76/80),热、冷缺血和再灌注时间可精确控制,无肝期(16±2) min。双重恒压灌注效果好,光镜下胆道壁毛细血管未见红细胞。**结论:**本模型模拟了肝移植的全过程,手术简单、成功率高、可比性强。且排除了免疫因素对胆道损伤的影响,更好的反映了胆道缺血再灌注损伤的病理生理过程,为肝移植胆道损伤的基础研究提供了一种新的实验方法。

[关键词] 肝移植;胆道;再灌注损伤;模型;动物

[中图分类号] R 657.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2006)04-0429-02

Establishment of an orthotopic autologous liver transplantation model with bile ducts ischemia-reperfusion injury in rats

ZHAO Hong-feng, ZHOU Jie* (Department of Hepatobiliary Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To establish an orthotopic autologous liver transplantation model with bile duct ischemia-reperfusion injury in rats, so as to make it easy for the operation. **Methods:** Eighty SD rats were used to establish the models. The method used for this model was the same as the one for orthotopic liver transplantation, except for the blood vessel anastomosis and the constant pressure perfusion of portal vein and abdominal aorta. The portal vein and the hepatic artery reperfusion were controlled by artery clamp. **Results:** The successful rate of the operation for establishing the model was 95%(76/80) and the anhepatic phase was (16±2) min. The periods of hot and cold ischemia and reperfusion could be accurately controlled and the effect of double constant pressure perfusion was good. There was no erythrocyte in the capillary of bile ductal wall under the light microscope after the reperfusion. **Conclusion:** This technique, simulating the whole process of liver transplantation, is simple and has high successful rate. Besides, it rules out the influence of immune agent on bile ducts impairment, and better reflects the pathophysiological process of bile ducts ischemia and reperfusion injury, providing a novel approach for investigation of bile ducts injury during liver transplantation.

[KEY WORDS] liver transplantation; biliary tract reperfusion injury; models, animal

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(4): 429-430]

胆道并发症是肝移植术后的常见并发症,国外文献报道其发生率为 9%~30%^[1,2]。大鼠原位肝移植模型手术难度大、成功率低、重复性差^[3]。Kamada 等^[4]提出的“双袖套法”大鼠动物模型是目前国内外通用的方案,但此模型不吻合肝动脉,故用来作胆道损伤方面的研究显得不足,而吻合肝动脉的模型难度更大。以往的研究表明除手术技巧所致的胆道血供受损的原因外,免疫排斥和缺血再灌注损伤是肝移植术后胆道并发症的主要原因。所以建立手术方法简单、成功率高、重复性好的动物模型,用以研究胆道缺血再灌注损伤的病理生理过程很有必要。

1 材料和方法

1.1 材料 健康、成年、SPF 级纯系 SD 大鼠 80 只(购于南方医科大学实验动物中心),雌雄不限,体质量 280~300 g,术前禁食 8 h,不禁水。4 号静脉穿刺针、血管夹数个、显微外科器械一套,8-0 和 9-0 prolene 缝线。

1.2 手术方法 (1)0.3%戊巴比妥 30 mg/kg 腹腔注射麻

醉。仰卧位固定。常规切口处碘酊、乙醇消毒,取倒“T”形切口,用组织钳牵开暴露。(2)进腹后先切断肝镰状韧带。然后沿食管分离,结扎并切断肝食管韧带内血管,以此为起点逆时针游离肝脏,切断左三角韧带,左膈血管结扎切断。向左翻转肝脏,游离肝上下腔静脉(SVC),并向下游离腔静脉至右肾静脉水平,期间如遇较大静脉支给予结扎切断。游离右肾上腺静脉给予结扎并切断。肝脏复位,游离肝下腔静脉(IVC),用显微镊轻轻提起 IVC 前壁鞘膜,用显微剪钝、锐性分离,至左肾静脉水平以上完全游离。解剖第一肝门,打开肝十二指肠韧带,从肠系膜下静脉和脾静脉汇合处游离门静脉(PV)至肝门部,并将 PV 壁鞘膜分离干净。因肝动脉和胆道关系紧密,将二者一同游离,在十二指肠上方预留一结扎线,近肝门处再预留一结扎线。最后用棉签钝性分离肝两片叶。至此除出入肝的管道外肝脏完全游离。(3)在肠系膜

[作者简介] 赵宏峰,硕士。E-mail: zhfengyn@163.com

* Corresponding author. E-mail: jacky@fimmu.com

上静脉及脾静脉汇合处上血管夹,轻轻向上向后提起血管夹,用4号针头刺入PV,并用血管夹固定穿刺针,推入肝素盐水(35 U/ml)3 ml,使肝素化,并使肝脏内的血液进入体循环。(4)在髂总动脉与左肾动脉之间用4号针头穿刺腹主动脉,用血管夹固定穿刺针,于腹腔干以上和穿刺点以下上血管夹阻断。冷灌前分别在SVC、IVC上血管夹,并在IVC血管夹稍上方静脉壁剪开约1 mm作流出道。然后以2.5 ml/min速度通过输液泵,同时分别经PV、腹主动脉穿刺处灌注4℃含肝素(12.5 U/ml)的乳酸林格液20 ml,在灌注的同时不断用4℃乳酸林格液浇注肝脏表面降温。在灌注期间注意保持肝脏正常解剖位置以防局部肝叶受压或扭曲而灌注不均匀。此时可见肝脏逐渐变成土黄色。(5)灌注完成后拔出穿刺针,用9-0 prolene缝线修补PV和腹主动脉穿刺点,用8-0 prolene缝线修补IVC流出道,并预松血管夹查看修补是否成功,成功后在肝动脉预留结扎线两处上血管夹,抽出预留线。然后分别松开PV、SVC、IVC、腹主动脉的血管夹使肝脏复流,结束无肝期。并同时用38℃生理盐水20 ml浇注肝脏表面以快速复温。(6)根据实验不同要求确定PV到肝动脉开放时间及肝动脉开放后到胆道取材时间。

1.3 观察方法 确定PV、肝动脉阻断开始时间及无肝期时间。观察PV、肝动脉复流后灌注情况。制作灌注前、结束后胆道起始部光镜标本,观察胆道壁毛细血管灌注情况和模型完成情况。

2 结果

以肝素化大鼠阻断PV时计时到PV开放为无肝期,时间(16±2) min。以阻断腹主动脉开始计算肝动脉阻断时间。且PV及肝动脉再灌注时间可精确控制。H-E染色放大100倍观察到灌注前连续5张切片胆道壁毛细血管内可见大量红细胞,灌注后未见红细胞残留。2005年8~11月共做预实验12例,定型术式80例,手术成功率95%(76/80)。因大鼠成功肝素化且灌注液中含有肝素,PV、肝动脉再灌注后未见血栓形成,血液复流良好。其中1例游离肝脏时损伤膈肌造成气胸,1例修补肝动脉时未成功,出血过多死亡。2例在无肝期时不能耐受而死亡。

3 讨论

大鼠的原位肝移植模型最先由美国的Lee等^[5]在1973年报道,20世纪80年代初Miyata等^[6]和Kamada等^[4]分别改用“三袖套法”和“双袖套法”吻合SVC、IVC、PV,显著缩短了无肝期。目前,Kamada等^[4]创建的“双袖套法”已成为经典的模型。但大鼠原位肝移植模型手术难度较大,高水平的显微外科技巧和长期的训练是建立模型的两个基本要求^[7]。90年代以来,国内学者马凯等^[8]建立自体肝移植模型,降低了手术难度,进行了一系列研究。但以上模型都不吻合肝动脉或未行肝动脉灌注,难以进行胆道损伤的研究。Li等^[9]发展完善了吻合肝动脉的模型认为吻合肝动脉更符合生理要求,能有效地降低胆道并发症的发生。但此模型难度更大,故本模型的建立具有一定的实际意义。

本模型模拟了原位肝移植的全过程,胆道经历了短暂的

热缺血(肝素化、腹主动脉穿刺阶段)2 min,冷灌注8 min,PV开放到肝动脉开放时间(相对热缺血),肝动脉开放时间(再灌注)。无肝期(16±2) min。手术确定了肝脏的游离顺序,在游离过程中基本避免了肝叶血管扭曲的发生及最小限度的翻动肝脏,减少了对肝内胆管的损伤。Tokunaga等^[10]认为,良好的灌注不在于灌注总量的多少,而在于缓慢均匀地灌注。本模型采用输液泵经PV、肝动脉双重恒压灌注的方法,灌注后胆道壁毛细血管内未见红细胞,说明灌注彻底。本模型与大鼠异体原位肝移植相比在于不切断出入肝的血管,避免了血管吻合,降低了手术难度。由于出入肝的血管都为血管夹阻断,可根据不同的实验要求精确控制缺血时间,提高了大鼠个体间及组间处理因素的可比性。且为自体移植,完全排除了免疫排斥方面的影响,能够更直接、更客观的观察冷缺血、相对热缺血及再灌注对胆道的损伤作用。此外还可用于PV、肝动脉开放次序的研究。综上所述本模型对肝移植胆道损伤的基础研究,提高肝移植的成功率,减少术后并发症等均具有重要的实用价值。

[参考文献]

- [1] Sherman S, Jamidar P, Shaked A, et al. Biliary tract complications after orthotopic liver transplantation. Endoscopic approach to diagnosis and therapy[J]. *Transplantation*, 1995, 60:467-470.
- [2] Icoz G, Kilic M, Zeytinlu M, et al. Biliary reconstructions and complications encountered in 50 consecutive right-lobe living donor liver transplantations[J]. *Liver Transpl*, 2003, 9: 575-580.
- [3] Kobayashi E, Kamada N, Goto S, et al. Protocol for the technique of orthotopic liver transplantation in the rat[J]. *Microsurgery*, 1993, 14: 541-546.
- [4] Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat[J]. *Surgery*, 1983, 93(1 Pt 1): 64-69.
- [5] Lee S, Charters AC, Chandler JG, et al. A technique for orthotopic liver transplantation in the rat[J]. *Transplantation*, 1973, 16:664-669.
- [6] Miyata M, Fischer H, Fuhs M, et al. A simple method for orthotopic liver transplantation in the rat; cuff technique for three vascular anastomosis[J]. *Transplantation*, 1980, 30:335-338.
- [7] Kashfi A, Mehrabi A, Pahlavan PS, et al. A review of various techniques of orthotopic liver transplantation in the rat[J]. *Transplant Proc*, 2005, 37:185-185.
- [8] 马凯,戴显伟,王仁平等. 下腔静脉内分流法大鼠自体原位肝移植模型的建立[J]. *中国医科大学学报*, 1998, 27:356-358.
- [9] Li J, Dahmen U, Dirsch O, et al. Modified sleeve anastomosis for reconstruction of the hepatic artery in rat liver transplantation[J]. *Microsurgery*, 2002, 22:62-68.
- [10] Tokunaga Y, Ozaki N, Wakashiro S, et al. Effects of perfusion pressure during flushing on the viability of the procured liver using noninvasive fluorometry [J]. *Transplantation*, 1988, 45:1031.

[收稿日期] 2006-01-04

[修回日期] 2006-03-10

[本文编辑] 李丹阳