

大鼠原位肝移植模型的技术改进

施晓敏,史永照,傅志仁*,李先兴,丁国善,傅宏
(第二军医大学长征医院全军器官移植研究所,上海 200003)

[摘要] 目的:探讨大鼠原位肝移植模型的技术改进。方法:选取体质量相近的 SD 大鼠作为供受体,分别用 Kamada“二袖套法”和改良“二袖套法”(改良的方法包括:提高肝上下腔静脉的吻合质量、改进门静脉和肝下下腔静脉套管的吻合及胆总管的重建等)建立大鼠原位肝移植模型,比较两组在总的手术时间、无肝期时间、受体手术时间以及手术成功率上的差异。结果:两组手术成功率分别是 78.9%(71/90)和 91.7%(55/60)($P < 0.05$),而两组在总的手术时间、无肝期时间、受体手术时间上无统计学差异。结论:改良的大鼠原位肝移植模型是一种简单、易行、稳定的肝移植研究模型。

[关键词] 肝移植;模型;动物;大鼠;Sprague-Dawley

[中图分类号] R 657.3 [文献标识码] A [文章编号] 0258-879X(2006)10-1056-03

Modification of technique for orthotopic liver transplantation model in rats

SHI Xiao-min, SHI Yong-zhao, FU Zhi-ren*, LI Xian-xing, DING Guo-shan, FU Hong (Organ Transplantation Institute of PLA, Changzheng Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200003, China)

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate the modification of the technique for establishing rat model of orthotopic liver transplantation. **Methods:** Male Sprague-Dawley rats with similar body weights were selected as the donors and recipients. Two protocols were used for establishing orthotopic liver transplantation model in rats: one was Kamada's two-cuff method and the other was modified two-cuff method. The major modifications included the improvement of the anastomosis of superior and inferior vena cava, improvement of anastomosis between the portal vein and hepatic inferior vena cava, and the improvement of total bile duct reconstruction. The successful rate of operation, total operation time, anhepatic time, and the recipient operative time were recorded and compared in 2 groups. **Results:** The successful rates of the original and modified methods were 78.9% (71/90) and 91.7% (55/60), respectively ($P < 0.05$). No differences were found between the 2 groups in the total operative time, anhepatic time, and the recipient operative time. **Conclusion:** The modified model is simple and easy to be made, and can serve as a stable model for the study of liver transplantation.

[KEY WORDS] liver transplantation; models, animal; rats, Sprague-Dawley

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27(10): 1056-1058]

大鼠原位肝移植 (rat orthotopic liver transplantation, ROL T) 模型被广泛应用于肝移植实验研究。本文分别用 Kamada“二袖套法”^[1,2]和改良“二袖套法”(以下简称为改良法)建立 ROL T 模型,并对两组结果进行比较,以提供一个稳定和成功率高的 ROL T 模型的建立方法。

1 材料和方法

1.1 材料 两组均选用健康雄性 Sprague Dawley 大鼠(第二军医大学实验动物中心提供),体质量 200~250 g,供、受体体质量差 10%,受体略大于供体。自制袖套及内支撑管:门静脉(portal vein, PV)袖套采用 6F 动脉导管外鞘;肝下下腔静脉(infrahepatic vena cava, IVC)袖套为外径 2.8 mm、内径 2.6 mm 的聚乙烯管;胆总管(common bile duct, CBD)内支撑管为麻醉用硬膜外导管所制。灌注保

存液均采用 4 HCA-液(第 2 代高渗枸橼酸盐腺嘌呤溶液,本院研制)。

1.2 实验分组 (1)组:用 Kamada“二袖套法”完成 90 次 ROL T 模型的建立,并记录相应的总的手术时间、无肝期时间、受体手术时间和手术成功率。(2)组:采用改良法完成 60 次 ROL T 模型的建立,观察项目同 组。

1.3 手术操作

1.3.1 Kamada“二袖套法”操作 具体方法参见文献^[1,2]。

[基金项目] 全军“十五”重点课题(01Z061)。Supported by Key Project of the “Tenth five-Year Plan” of PLA(01Z061)。

[作者简介] 施晓敏,博士生,讲师、主治医师。

E-mail: sxmmail@citiz.net

* Corresponding author. E-mail: zhirenf@sh163.net

1.3.2 改良法手术操作 大鼠术前禁食 12~15 h。供体采用氯胺酮 100 mg/kg 肌内注射麻醉。受体术前 30 min 肌内注射阿托品 0.1 mg/kg, 术中扣戴面罩乙醚吸入麻醉。

供体手术:备皮、消毒、十字切口进腹,将肠管移向下腹部并用生理盐水纱布保护覆盖,暴露上腹部。离断镰状韧带,近肝侧结扎左膈下静脉,离断左侧肝周韧带并靠近肝脏结扎肝食管血管交通支,将肝脏向左轻轻推开,离断右肝周韧带,紧贴下腔静脉分离结扎右侧肾上腺静脉丛和腰静脉,游离 IVC 至左右髂总静脉分叉处,分离出右肾动静脉,5-0 丝线结扎切断右侧肾动静脉。距肝门分叉约 0.5 cm 处 CBD 前壁剪一斜口,插入内支撑管,5-0 丝线结扎固定并预留一根结扎丝线不剪断。游离肝固有动脉和幽门静脉,分别带线暂不结扎,“骨骼化”PV 至脾静脉以下。穿刺右髂腰静脉,注入含 200 U 肝素的生理盐水 2 ml。5 min 后于左右髂总动脉分叉处向近心端穿刺腹主动脉并留置套管,经套管缓慢推注 4 HCA⁻液(内加 25 U/ml 肝素)30 ml,同时剪开膈肌,阻断胸主动脉,剪开胸侧下腔静脉和右侧髂总静脉,钳夹左侧肾蒂,碎冰外敷肝脏。肝脏灌注完毕后,游离乳头状突肝叶,结扎离断肝固有动脉和幽门静脉,在脾静脉以下切断 PV,在左右髂总静脉分叉处切断下腔静脉,沿肝上下腔静脉(suprahepatic vena cava, SVC)周围 0.5 cm 一圈剪下膈肌,取出肝脏置于 4 HCA⁻液内保存。供肝修整:剪去膈肌环内膜和多余膈肌组织,扩大 SVC 开口,保留完整的膈肌环。以镰状韧带和左膈下静脉为标记,在膈肌环开口两侧用 7-0 无损伤缝合线分别固定一针。将 PV 袖套套入 PV,注意袖套柄的朝向,PV 远端翻转覆盖袖套,用 5-0 丝线结扎固定。同法处理 IVC。移植肝置于 4 °C 冰箱内等待移植。

受体手术:正中切口进腹,自制小拉钩向两侧牵引肋弓,10-0 丝线结扎剑突,向头侧牵引,充分暴露手术野。受体肝脏游离基本同供体。注意远离肝脏结扎左膈下静脉、近肝侧结扎肝食管血管交通支,IVC 游离至右肾静脉并保留右肾动静脉。游离开口于 CBD 远肝端的两个肝管并用 5-0 丝线结扎,近肝侧剪断肝管,两侧结扎丝线各保留一根且一长一短,便于区分左右。游离结扎切断肝固有动脉。游离 PV 至幽门静脉。撤离乙醚麻醉,然后用血管夹阻断 PV,2 ml 生理盐水经 PV 左右分叉处注入驱赶肝内

血液。在右肾静脉处阻断 IVC。用小 Satinsky 钳连同部分膈肌一起钳夹,阻断 SVC 并切断下腔静脉,紧贴肝脏切断 PV,保留部分尾状叶切断 IVC。取供肝 SVC 左右预置缝合线分别缝合受体 SVC 左右角,左侧腔外打结,右侧暂不打结。用左角缝合线连续缝合后壁和前壁,暂不收紧,用 25 U/ml 肝素生理盐水冲洗血管腔排出气泡后,收紧缝线,在腔外与左角线尾打结。提起 PV 套管,经 PV 向肝内注入常温生理盐水 2 ml,排出供肝内含有代谢产物的冷保存液,用弯头微血管钳夹住受体左右 PV 分支开口向供肝 PV 靠近,紧贴微血管钳剪开受体 PV 前壁,松开受体 PV 动脉夹,放出少许高凝血,25 U/ml 肝素生理盐水冲洗 PV 管腔后,将供肝 PV 套管插入受体 PV 腔内结扎固定。开放 PV 血流,血管夹阻断供肝 IVC,去除 Satinsky 钳,结束无肝期,腹部灯照复温。用爱迪生镊提起受体 IVC 开口,放出少许高凝血,肝素生理盐水冲洗管腔后,将供肝下腔静脉套管插入受体下腔静脉腔内结扎固定,开放下腔静脉血流。用显微镊提起受体左右两个肝管预留线,在肝管会合处纵行剪开 CBD,显露 CBD 管腔,将供肝 CBD 内支撑管插入受体 CBD 管腔内并结扎固定,并将结扎线与供肝 CBD 预留的一根结扎线拉紧打结。随后 10 万单位青霉素置入腹腔,关腹。术后处理:术后灯照保温 2 h,自由进食饮水,单笼喂养。

1.4 统计学处理 使用 SPSS 10.0 进行 *t* 检验和 χ^2 检验分析。

2 结果

组 共完成 90 次 ROLT 模型的建立,组 共完成 90 次 ROLT 模型的建立,组 和组 总的手术时间分别是 (135.16 ± 12.05) min 和 (134.22 ± 11.73) min,无肝期分别是 (15.06 ± 3.15) min 和 (14.76 ± 2.97) min,受体手术时间分别是 (56.31 ± 9.05) min 和 (55.96 ± 8.82) min,以上数据经统计学分析差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。两组手术成功率(手术成功判定标准:据下一步实验的要求,以大鼠关腹去除固定后能自行翻身、精神好、主动进水、对刺激反应正常、存活 24 h 以上)分别是 78.9% (71/90) 和 91.7% (55/60),差异有统计学意义 ($P < 0.05$),显示改良法的手术成功率高于 Kamada“二袖套法”。

3 讨论

大鼠原位肝移植因手术要求精细,加之一旦出现并发症大多难以补救,因此建立一个稳定的肝移植模型并非易事,往往需要较长时间的手术训练^[3,4]。我们对 ROLT 术中 SVC 的吻合方法以及 PV、IVC 和 CBD 的重建进行了相应的改进,保证了手术操作的稳定性,提高了成功率。

3.1 提高 SVC 的吻合质量 良好的暴露是吻合确切的前提。在 SVC 的吻合过程中,我们把受体腰部垫高,用自制小拉钩向两侧牵引肋弓,10-0 丝线向头侧牵引剑突,从而获得良好的手术野。阻断 SVC 时,在向下牵引肝脏的同时,用小 Satinsky 钳避开肺组织向头侧连同部分膈肌一起钳夹,保留部分肝组织切断下腔静脉,这既使得肝上下腔留有足够的长度,又可以通过提夹肝组织暴露吻合口,防止因镊子直接接触血管内膜而造成损伤。SVC 吻合时,在确认血管位置正确无扭曲后,用供肝 SVC 左右预置缝合线分别缝合受体 SVC 左右角,左角腔外打结,右角暂不打结,便于暴露血管后壁。吻合时将左角缝合线由受体 SVC 腔外缝入腔内,采取供肝腔静脉内膜进内膜出,受体腔静脉外膜进内膜出的方法连续缝合后壁,至右角时由受体腔静脉缝出腔外,同一缝合线,采取供肝腔静脉内膜进内膜出,受体腔静脉内膜进内膜出的方法连续缝合前壁,至左角时在腔外与左角线尾打结,同时右角缝合线腔外打结。SVC 缝合结束以后,不必再次检查吻合口,以防吻合口撕裂。

3.2 PV 和 IVC 套管吻合的改进 通常在行 PV 重建时,术者大都用显微镊向供肝侧提拉受体 PV 壁进行套管吻合,由于 PV 壁非常薄,显微镊又较尖,很容易造成管壁撕裂。我们发现,用弯头微血管钳水平夹住受体 PV 左右分支,将其固定在供肝 PV 下方,距止血钳 2 mm 处剪开 PV 前壁,再将供肝 PV 套管插入受体 PV 腔内,该方法简单易操作,基本上避免了血管的扭曲,又防止了管壁的撕裂。IVC 套管吻合前需要注意将受体下腔静脉连同部分尾状叶组织保留下来,保证足够的静脉长度,用爱迪

生镊夹住肝组织和血管壁进行套管,操作就相对简单了。

3.3 CBD 的重建 胆管吻合时,因为受体 CBD 在插管前已切断,管腔细、管壁薄,不利于寻找和夹持,因此,我们切断受体 CBD 前,先游离开口于 CBD 远肝端的两个肝管并用 5-0 丝线结扎,两侧结扎丝线各保留一根且一长一短,便于区分左右,再剪断肝管,受体 CBD 重建时,提起肝管结扎线,将受体 CBD 固定在供体 CBD 旁,并在分叉处纵行剪开一小口,将供体 CBD 内支撑管插入的即可。

3.4 术中补液 通常来讲,大鼠经历无肝期后,往往会伴随高钾、酸中毒的出现,这对大鼠全身各系统尤其是呼吸循环的恢复有不利的影响,因此在 IVC 开放后,立即经阴茎背静脉或尾静脉缓慢输液,通过观察大鼠呼吸的深浅和频率以及肠系膜动脉的搏动决定补液的多少,通常补液量在 2~3 ml^[5~7]。但在实验中,我们发现,如果操作者手术娴熟,手术顺利且时间短,大鼠出血少,可以不补液,或者经腹腔少量补液,大鼠术后恢复也很快,无不良影响。术后适当给予 5%葡萄糖液灌胃即可。

[参考文献]

- [1] 孙君泓,吴孟超,曾琪华. 300 次大鼠原位肝移植[J]. 中华器官移植杂志,1990,11:19-21.
- [2] Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat: technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage[J]. Transplantation, 1979, 28:47-50.
- [3] Delriviere L, Gibbs P, Kobayashi E, et al. New technique of complete thymectomy in adult rats without tracheal intubation [J]. Microsurgery, 1998, 18:6-8.
- [4] Zhang XY, Wheatley AM. Application of a new sleeve anastomosis technique to graft rearterialization in rat liver transplantation[J]. Microsurgery, 1996, 17:472-476.
- [5] 彭方兴,郑本波,刘立新,等. 大鼠原位肝移植动物模型制作要点[J]. 中华普外基础与临床杂志,2005,12:117-119.
- [6] 孙星,李涛,徐军民,等. 快速法切取供肝及改良袖套技术在大鼠肝移植中的应用[J]. 复旦学报(医学版),2005,32:617-619.
- [7] 李宗狂,马毅,许赤,等. 大鼠原位肝移植模型的建立及术式改进[J]. 中国修复重建外科杂志,2004,18:34-36.

[收稿日期] 2006-02-23

[修回日期] 2006-09-30

[本文编辑] 邓晓群