

单人建立大鼠原位肝移植模型的手术体会

许勇刚 翁明哲 张金彦 徐军明[△] 彭志海

(上海交通大学附属第一人民医院肝移植中心 上海 200080)

摘要 目的 探讨单人建立稳定大鼠原位肝移植模型手术中的难点及对策。方法 单人及双人裸视下采用改良二袖套法制备大鼠原位肝移植模型各 50 例。结果 单人及双人组供体手术时间、无肝期、受体手术手术时间分别为 (39.16 ± 2.89) min 和 (38.36 ± 3.04) min、 (19.92 ± 1.36) min 和 (19.70 ± 1.40) min、 (61.98 ± 3.46) min 和 (58.65 ± 3.94) min；单人及双人组手术成功率、1 周存活率、一月存活率分别为 94.0 % (47/50) 和 92.0 % (46/50)、86.0 % (43/50) 和 88.0 % (44/50)、86 % (43/50) 和 84 % (42/50)。结论 通过改进手术方法，简化操作，单人即可建立稳定的大鼠原位肝移植模型。

关键词 肝移植 大鼠 动物模型

中图分类号 Q95-3 R657.3 文献标识码 A 文章编号 1673-6273(2012)16-3026-03

Technique of Orthotopic Liver Transplantation in Rats Operated by One Person without Surgical Microscope

XU Yong-gang, WENG Ming-zhe, ZHANG Jin-yan, XU Jun-ming[△], PENG Zhi-hai

(Liver Transplantation Department, Affiliated First People's Hospital, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai, 200080, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the difficulties and countermeasures of the surgical technique in establishing a stable rat model of orthotopic liver transplantation. **Methods:** The model was established with improved two cuff technique. One hundred cases of rat orthotopic liver transplantation were performed by single person and double persons without surgical microscope. Fifty cases were operated in each group. **Results:** In single operator group and double operators group, donor operation time, anhepatic time and receptor operation time were (39.16 ± 2.89) min vs (38.36 ± 3.04) min, (19.92 ± 1.36) min vs (19.70 ± 1.40) min, (61.98 ± 3.46) min vs (58.65 ± 3.94) min; The successful operation rate, one week survival rate and one month survival rates in single operator group and double operators group were 94.0 % (47/50) vs 92.0 % (46/50), 86.0 % (43/50) vs 88.0 % (44/50), 86 % (43/50) vs 84 % (42/50) respectively. **Conclusion:** Through improving technique, it is successful to establish a stable model of rat orthotopic liver transplantation by single operator without surgical microscope.

Key words: Liver transplantation; Rat; Animal model

Chinese Library Classification: Q95-3, R657.3 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2012)16-3026-03

前言

大鼠原位肝脏移植是研究供肝缺血再灌注、受体免疫排斥反应及手术并发症的发生、进展机制的理想动物模型^[1-3]。自 1979 年 Kamada^[4]报道二袖套法后，许多研究者进行了各种改良^[5-7]，但多需在助手配合下完成，单人操作难度较大。笔者于 2011 年 3 月至 2011 年 9 月参照 Kamada 法并加以改进，单人及双人裸眼下行大鼠原位肝移植各 50 例，探讨单人建模手术技巧，现报道如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物与器械

健康清洁级雄性 SD 大鼠，体重 250~280 g，由上海交通大学附属第一人民医院动物实验中心提供，受体较供体略重。

显微器械购自上海医疗器械厂，手术缝线购自上海浦东金环医疗用品有限公司。门静脉套管及肝下腔静脉套管分别由 5F 至 7F 动脉导管鞘制成，胆总管支架采用硬膜外导管。自制吸入麻醉面罩一个，橡皮泥一块。

1.2 方法

供、受体均采用乙醚^[8]面罩吸入麻醉，遵循“深诱导，浅维持”原则。双人组手术方法参照文献^[9]，单人组手术方法参照文献^[4]，并加以改进。

1.2.1 供体手术 麻醉稳定后，仰位固定供体，胸腹部剃毛，碘伏消毒，剑突下 3 cm 取大横切口进腹，游离肝脏，处理左膈静脉及肝食管交通支，距肝门分叉约 1 cm 处剪开胆总管前壁，插入胆管支架管，6-0 丝线环扎固定，处理门静脉第一、二属支，结扎切断右肾动静脉，移除右肾，结扎右肾上腺静脉丛。经阴茎背静脉注入 2 ml 肝素盐水（含肝素 25 U/ml）完成肝素化。阻断门静脉后剪开前壁，缓慢灌注肝素生理盐水总量约 20 ml（含肝素 25 U/ml），左肾静脉水平离断肝下腔静脉，0~4℃冰盐水浇淋供肝表面，灌注完毕后，于脾静脉结扎线下方 2 mm 离断门静脉，离断肝上下腔静脉，取出供肝置于 0~4℃冰盐水中，水面以下修整供肝，肝上下腔静脉左右各置 1 根 7-0 带针线，供肝

作者简介 许勇刚(1985-) 男，硕士研究生，主要研究方向：肝脏移植术后急性免疫排斥的防治

△通讯作者 徐军明 电话 021-63240090-3136，E-mail: xjmsh@hotmail.com

(收稿日期 2011-11-01 接受日期 2011-11-26)

置于 4℃ 冰箱中保存。

1.2.2 受体手术 进腹同供体, 顺时针方向游离肝周围韧带 结扎左隔静脉 结扎切断肝食管交通支。于左右肝管汇合处用 6-0 丝线结扎离断胆总管, 处理肝固有动脉 结扎右肾上腺静脉丛, 肝上下腔静脉套橡皮筋一根备用。加深麻醉, 先后阻断肝下腔静脉和门静脉, 门静脉左右支带线, 于分叉处穿刺, 缓慢注入 2 ml 生理盐水自体输血, 阻断肝上下腔静脉, 靠近肝脏离断, 切断门静脉、肝下腔静脉, 移去肝脏。供肝置于受体肝床, 调整供肝位置便于吻合, 裸视下缝合肝上下腔静脉, 最后一针收紧前肝素生理盐水驱除气泡。迅速插入门静脉袖套固定后松开 Satinsky 钳, 结束无肝期, 同法吻合肝下腔静脉。此时肝脏呈鲜红色, 胆汁分泌旺盛, 肠系膜动脉搏动有力, 大鼠呼吸增快。于受体胆总管前壁作斜切口, 生理盐水冲洗供受体胆总管后将胆总管支架插入受体胆总管内, 6-0 丝线环扎固定。用一片血供良好的大网膜包绕胆道吻合口, 无痛碘及温生理盐水冲洗腹

腔, 逐层关腹。

1.3 统计学处理

实验所得数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 统计学处理用 SPSS14.0 软件完成。两组各项指标比较计数资料用 X^2 检验, 计量资料用 t 检验, $P < 0.05$ 差异有显著性。

2 结果

两组手术时间及存活率比较见表 1, 相应数据比较均无统计学差异。术后存活 48 h 视为手术成功, 单人组与双人组的成功率分别为 94.0 % (47/50) 和 92.0 % (46/50), $P > 0.05$ 。单人组因手术死亡 3 例, 其中肝上下腔静脉吻合口出血 1 例, 肝下腔静脉血栓 1 例, 门静脉袖套漏血 1 例。双人组因手术死亡 4 例, 原因为肝上下腔静脉吻合口漏血 1 例、门静脉袖套及胆道支架脱落各 1 例、气胸 1 例, 死因均经过尸体解剖证实。

表 1 两组手术时间及生存率

Table 1 Operation time and survival rate of two groups

Group	n	Doner operation time(min)	Anhepatic phase (min)	Recipient operation time (min)	One week survival rate	One month survival rate	Success rate of surgery
Single	50	39.16± 2.89	19.92± 1.36	61.98± 3.46	86.0%(43)	86%(43)	94.0%(47)
Double	50	38.36± 3.04	19.70± 1.40	58.65± 3.94	88.0%(44)	84%(42)	92.0%(46)
P	-	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05	>0.05

3 讨论

大鼠肝移植模型手术复杂、难度大, 尤其是单人操作, 须经过艰苦训练才能成功, 模型建立过程中有如下体会:

3.1 麻醉

乙醚吸入麻醉, 具有简便、易控制的优点, 但麻醉过深可导致大鼠呼吸抑制、分泌物过多而窒息。既往术前肌注阿托品可以减少呼吸道分泌物^[10]。我们采用低浓度乙醚深诱导(>4 min) 浅维持获得了满意效果。术中大鼠口中塞一棉签防止舌根后坠, 若呼吸道分泌物过多可用自制吸痰器(10 ml 注射器与输液皮条制成)吸出。术中注意大鼠呼吸频率及肝脏颜色, 一旦发现呼吸慢弱或肝脏转为暗红色应及时撤除麻醉, 必要时用 10 ml 注射器人工呼吸。若麻醉控制得当, 术毕大鼠即可自行翻身。

3.2 袖套相关问题

安装门静脉及肝下腔静脉袖套整个过程需在液面下进行, 安装完成后用肝素生理盐水冲洗管腔, 使血管复位, 避免袖套连接后发生扭转(图 1); 受体袖套连接前放出约 0.2 ml 高凝血, 肝素生理盐水冲洗管腔, 避免形成血栓。袖套经酒精浸泡 30 min 以减少腹腔感染。

3.3 供肝灌注

灌注良好的供肝是大鼠肝移植模型成功的基础。研究表明翻动肝脏可激活 Kupffer 细胞, 加重缺血再灌注损伤^[11]。取肝时应注意顺序, 动作轻柔, 避免过多翻动肝脏。Tokunaga 等^[12]认为缓慢均匀地灌注, 是获得高质量供肝的前提。我们采用重力法

(灌注液与大鼠垂直距离约 40 cm)经门静脉灌注, 获得了质地优良的供肝(图 2)。该方法的优点是灌注液的滴速易于控制, 灌注压相对稳定, 灌注均匀, 是一种理想的选择。灌注开始后应迅速剪开肝下腔静脉, 同时用 0~4℃ 生理盐水浇淋肝脏表面, 使供肝迅速降温, 减少肝细胞损伤。

3.4 肝上下腔静脉吻合

肝上下腔静脉的吻合是建模的难点, 快速、高质量的缝合是缩短无肝期及手术成功的关键。Kamada 等认为无肝期超过 26 min 大鼠则难以存活^[10]。既往显微镜下吻合肝上下腔静脉多见于文献报道, 笔者建模中发现大鼠肝上下腔静脉位置深、空间小, 单人使用显微镜操作不便, 遂裸眼下缝合, 体会如下: (1) 良好的暴露是缝合成功的前提, 术中采用横切口, 配以胸垫, 可充分暴露术野。(2) 大鼠肝上下腔静脉壁菲薄, 供肝保留少许肠肌环^[13], 以防止复流后血管壁撕脱。(3) 橡皮泥固定 Satinsky 钳使受体肝上下腔静脉略向上翘, 供肝右侧可垫一冰盐水棉球, 使供受体肝上下腔静脉处于同一水平。(4) 采用四点及八点牵引法缝合^[14], 此法使后壁短于前壁, 方便操作; 先缝后壁, 顺序从左至右, 缝合过程中应确保外翻, 针距约 0.6 mm, 边距约 0.8 mm, 缝合 2 至 3 针排线一次; 后壁及前壁最后一针缝过两侧各自相应的牵引线, 打结松紧适度, 防止边角处漏血及管腔狭窄; 前壁最后一针收紧前用肝素生理盐水驱除气泡, 防止空气栓塞(图 3)。总之, 肝上下腔静脉吻合技术需反复训练, 初学者可用失败的大鼠行血管吻合训练, 要有耐心及信心。

3.5 胆道吻合

移植术后的胆道并发症与受体长期存活密切相关。制作胆道支架时两端可剪成钝斜形，直径以插入胆道后稍紧为宜，吻合前生理盐水冲洗胆道，吻合时应注意防止扭曲，避免术后胆

道狭窄、阻塞。由于模型未重建肝动脉，胆道周围保留少许脂肪组织并用一片血供良好的大网膜覆盖吻合口，结扎松紧适度，防止胆道缺血坏死(图 4)。采用上述方法，两组无一例受体死于胆道狭窄、阻塞。

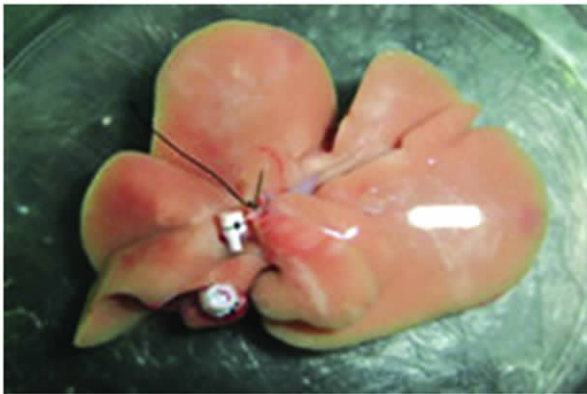


图 1 袖套安装完毕
Fig. 1 Two cuff installed

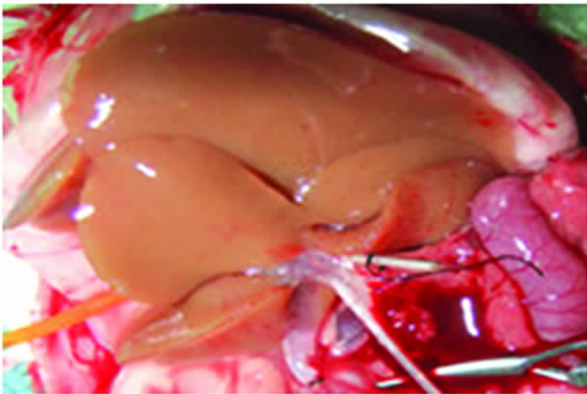


图 2 肝脏灌注
Fig. 2 Liver perfusion

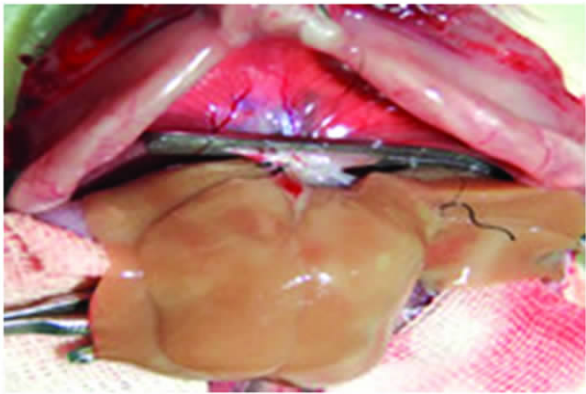


图 3 肝上下腔缝合完毕
Fig. 3 Anastomosis of suprahepatic inferior vena

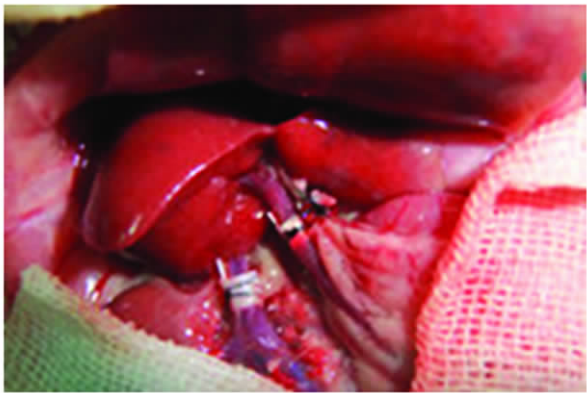


图 4 胆管吻合完毕
Fig. 4 Anastomosis of bile duct

3.6 围手术期的管理

良好的围手术期管理对促进大鼠术后恢复，保证存活率至关重要。受体术前禁食 8h 左右为佳，过短则胃部充盈，不利操作，过长则影响受体耐受力，不利术后恢复。开腹后可先经阴茎背静脉补 5 %GNS0.6 ml，术毕腹腔注射 5 %GNS2 ml，补充术中丢失液体量，术中应严格控制出血，出血量超过 2 ml^[15]则大鼠多于 48 h 内死亡。关腹前用无痛碘及温生理盐水冲洗腹腔，既利于大鼠心肺肾等脏器功能的恢复，又可预防腹腔感染，术后 1-2 天可酌情肌注青霉素 2 万 U/天。术后大鼠灯照复温 30 min，单笼饲养，自由进糖盐水，第二天起正常饲养，注意应勤换垫料，以减少感染的发生。

总之，通过改进肝上下腔缝合方法，简化操作，单人裸眼即可建立稳定的大鼠肝移植模型，较双人操作相比，更为经济、实用。

参考文献(References)

[1] Nan Wang, Jian G. Lu, Xian L. He, et al. Effects of ischemic postconditioning on reperfusion injury in rat liver grafts after orthotopic liver transplantation[J]. Hepatology Research, 2009, 39(4): 382-390

[2] 翁明哲,徐军明,张金彦,等. 吖啶胺 2,3- 双加氧酶在诊断肝移植急性排斥中的作用[J]. 中华实验外科杂志, 2011, 28(7): 1123-1126
Weng Ming-zhe, Xu Jun-ming, Zhang Jin-yan, et al. Role of indoleamine 2,3-dioxygenase in diagnosing rat's acute rejection after liver transplantation[J]. Chin J Exp Surg, 2011, 28(7): 1123-1126(In Chinese)
[3] Wang Jun, Du Zhi-yong, Zhang Wen, et al. Post liver transplantation acute kidney injury in a rat model of syngeneic orthotopic liver transplantation[J]. Laboratory Investigation, 2011, 91: 1158-1169
[4] Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat[J]. Transplantation, 1979, 28(1): 47-50
[5] Veeravorn Ariyakhagorn, Volker Schmitz, Peter Olschewski, et al. Improvement of Microsurgical Techniques in Orthotopic Rat Liver Transplantation [J]. Journal of Surgical Research, 2009, 153 (2): 332 -339
[6] T. Hori, S. uemoto, X. zhao, et al. Surgical guide including innovative techniques for orthotopic liver transplantation in the rat: Key techniques and pitfalls in whole and split liver grafts [J]. Annals of Gastroenterology, 2010, 23(3): 270-295

(下转第 3044 页)

- 定[J].中华实验外科杂志,2008,25(10):1309-1310
- Yu Zhen-hua, Zhu Shun-ye, Zhang Long-juan. Primary culture and identification of rat tibial growth plate chondrocytes [J]. Chin J Exp Surg, 2008, 25(10):1309-1310
- [6] 胡志俊,胡波,唐德志,等.兔膝关节软骨细胞的分离培养及形态学特征[J].中国组织工程研究与临床康复,2010,14(46):8555-8558
- Hu Zhi-jun, Hu Bo, Tang De-zhi, et al. Isolation, culture and morphological characteristics of rabbit articular cartilage cells [J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research, 2010, 14 (46): 8555-8558
- [7] 司徒镇强,吴军正.细胞培养[M].西安:世界图书出版公司,2006:157-159
- Si Tu-zheng-qiang, Wu Jun-zheng. Cell Culture [M]. Xi'an: World Publishing Corporation, 2006:157-159
- [8] 秦俊,陈廖斌,汪晖,等.人膝关节软骨细胞的体外培养[J].武汉大学学报(医学版),2007,28(2):129-133
- Qin Jun, Chen Liao-bin, Wang Hui, et al. Culture in Vitro of Human Osteoarthritis Chondrocytes[J]. Medical Journal of Wuhan University, 2007, 28(2):129-133
- [9] Lin Z, Willers C, Xu J, et al. The chondrocyte: biology and clinical application[J]. Tissue Eng, 2006, 12(7):1971-1984
- [10] Isogai N, Kusuhara H, Ikada Y, et al. Comparison of different chondrocytes for use in tissue engineering of cartilage model structures[J]. Tissue Eng, 2006,12(4):691-703
- [11] Manning WK, Bonner WM Jr. Isolation and culture of chondrocytes from human adult articular cartilage[J]. Arthritis Rheum, 1967,10(3):235-239
- [12] Green WT Jr. Behavior of articular chondrocytes in cell culture[J]. Clin Orthop Relat Res,1971,75:248-260
- [13] Klagsbrun M. Large-scale preparation of chondrocytes [J]. Methods Enzymol, 1979,58(8):560-564
- [14] 俞永林,任志伟,乔健,等.兔关节软骨细胞的分离培养及生物学特征[J].复旦学报(医学版),2006,33(6):753-756
- Yu Yong-lin, Ren Zhi-wei, Qiao Jian, et al. Isolation, culture and biological characteristics of rabbit articular chondrocytes [J]. Fudan University Journal of Medical Sciences, 2006, 33(6):753-756
- [15] Kartsogiannis V, Ng KW. Cell lines and primary cell cultures in the study of bone cell biology[J]. Mol Cell Endocrinol, 2004, 228(1-2):79
-
- (上接第 3028 页)
- [7] 樊斌,李德卫,冯渊,等.大鼠肝移植急性排斥反应模型的建立[J].中国组织工程研究与临床康复,2011,15(5):774-777
- Fan Bin, Li De-wei, Feng Yuan, et al. Establishment of an acute rejection model of rat orthotopic liver transplantation[J]. Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research,2011,15 (5):774-777 (In Chinese)
- [8] 彭勇,龚建平,刘长安,等.大鼠原位肝移植模型制作过程中麻醉方法的选择[J].中国普通外科杂志,2003,12(9):673-676
- Peng Yong, Gong Jian-ping, Liu Chang-an, et al. Selection of anesthetic method in setting up the animal model of orthotopic liver transplantation in rats [J]. Chinese Journal of General Surgery,2003,12(9):673-676(In Chinese)
- [9] 王振猛,唐乙,宋少华,等.大鼠原位肝移植模型的手术技巧[J].临床军医杂志,2008,36(4):638-640
- Wang Zhen-meng, Tang Yi, Song Shao-hua, et al. Operation skills for Orthotopic Liver Transplantation in Rats [J]. Clin J Med Offic, 2008, 36(4): 638-640(In Chinese)
- [10] Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplantation in the rat[J]. Surgery, 1983, 93(1): 64-69
- [11] Schemmer P, Enomoto N, Bradford BU, et al. Activated Kupffer cells cause a hypermetabolic state after gentle in situ manipulation of liver in rats[J]. Physiol Gastrointest Liver Physiol,2001,280(6):1076-1082
- [12] 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, 1998, 45(6):1031-1035
- [13] 王轩,杨甲梅,严以群,等.大鼠原位肝移植不同术式的探讨[J].中华器官移植杂志,1998,19(2):76-78
- Wang Xuan, Yang Jia-mei, Yan Yi-qun, et al. Studies on the ways of orthotopic liver transplantation in rats [J]. Chin J Organ Transplant, 1998,19(2):76-78(In Chinese)
- [14] 彭承宏.血管4点和8点牵引吻合技巧[J].中国实用外科杂志,2006,26(3):225
- Peng Cheng-hong. 4 and 8 point traction technique in vascular anastomosis [J]. Chinese Journal of Practical Surgery, 2006, 26 (3): 225 (In Chinese)
- [15] Kashtl A, Mehmbi A, Pahlavan PS, et al. A review of various techniques of orthotopic liver transplantation in the rat[J]. Transplant Proc, 2005, 37(1):185-188