论著

文章编号:1000-5404(2005)02-0150-04

# 小型猪原位肝移植的外科技巧及术中管理

郑树国,冯晓彬,董家鸿,冷建军,程建保,卿德科,马正伟,郑 平,熊 燕,张玉君 (第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038)

**提 要:目的** 总结小型猪原位肝移植的外科技术要点及术中监护管理经验。**方法** 在非体外静脉转流条件下行小型猪同种异体原位肝移植术,观察外科技术及术中监护处理对手术成功率及术后存活率的影响。**结果** 20次原位肝移植的平均手术时间为(181±25.8) min,平均无肝期(28.4±3.2) min;无肝期血流动力学及生化代谢虽发生急剧改变,但在严密监护处理条件下可逐渐恢复正常;动物1周存活率90%,15例动物长期存活,长期存活动物的血管和胆道并发症发生率低。**结论** 精细而熟练的外科技术及严密的术中监护处理是确保小型猪原位肝移植成功的关键。

**关键词**:肝脏移植;外科技术;术中管理;小型猪

**中图法分类号**:R-332; R617; R657.3 **文献标识码**:A

# Surgical technique and operative management for orthotopic liver transplantation in miniature pigs

ZHENG Shu-guo, FENG Xiao-bin, DONG Jia-hong, LENG Jian-jun, CHENG Jian-bao, QING De-ke, MA Zheng-wei, ZHENG Ping, XIONG Yan, ZHANG Yu-jun (Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

**Abstract: Objective** To investigate the surgical technique and operative management for orthotopic liver transplantations (OLTs) in miniature pigs. **Methods** OLTs were performed without veno-venous bypass in Bama miniature pigs. Effects of the surgical technique and operative management on the survival rates were investigated. **Results** A total of 20 OLTs were performed between pairs of miniature pigs. The mean operative time and anhepatic phase were (181±25.8) and (28.4±3.2) min, respectively. During the anhepatic phase, dramatic hemodynamic and metabolism changes were identified. With the enhancement of monitoring and management, the disorders of hemodynamics and metabolism were recovered gradually. The 1-week survival rate was 90%. A total of 15 animals survived more than 1 month. The incidence of vascular and biliary complications was lower in pigs with longer survival time. **Conclusions** Skillful surgical technique with the enhancement of operative monitoring and management is crucial for successful operation of OLTs in miniature pigs.

**Key words**: liver transplantation; surgical technique; operative management; miniature pig

猪同种异体原位肝移植是临床肝移植队伍的训练及相关研究中的常用手术模型,但有关小型猪原位肝移植外科技巧及术中管理经验的报道较少。本实验所选用的中国广西巴马小型猪[1]为小体积猪,手术耐受力差,出入肝血管及胆管较细,管壁薄,移植过程需要精细熟练的外科技术和严密监护处理。2002年7-9月我们在经过充分的技术和相关准备后先后行小型猪同种异体原位肝移植20次,取得了满意的结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物和手术器材

健康广西巴马小型猪(第三军医大学实验动物中心提供)40头,3~6月龄,体质量8~10 kg,雌雄兼用,按照随机数字表随机将动物分为供体组和受体组,每组20头,共行原位肝移植术20次。

手术器材:手术操作所用的高频手术电刀、肝移植专用手术器械及显微外科器械均为德国Martin产品;Keeler手术放大

基金项目:全军医学科学技术研究"十五"计划基金(01Z077),重庆市自然基金重点课题(CSTC2004BA5013)
Supported by the Key Program of the National "Tenth Five-year Plan" of PLA (01Z077) and the Key Program of Natural Science Foundation of Chongqing (CSTC 2004 BA5013)

作者简介:郑树国(1965-),男,河南省信阳市人,博士,副主任医师,副教授,主要从事肝脏移植及胰腺外科方面的研究,发表论文30余篇。电话:(023)68765310
通讯作者:董家鸿,电话:(023)68754168

收稿日期:2004-09-02;修回日期:2004-11-17

镜系美国进口；Ethicon 5-0、6-0 、9-0 Prolene 缝合针线及 6-0 PDS 可吸收缝合针线分别用于吻合腔静脉、门静脉、肝动脉及胆总管；Teama HORUS 呼吸机（法国）、PROPAQcs 多功能生理监护仪（美国）及 Aisa 血气分析仪（美国）用于术中及术后生命征的支持和监测。

### 1.2　术前准备及麻醉

术前禁食 24 h，肌注氯氨酮诱导下行气管插管，静滴氯氨酮及琥珀酰胆碱维持麻醉，气管插管机控呼吸。受体猪麻醉后，左颈外静脉插管输液并监测中心静脉压，左颈内动脉插管监测动脉血压，全术程保温。

### 1.3　手术方法

1.3.1　供肝切取及修整　　腹部大“十”字切口进腹，游离肝周韧带，解剖出胆总管、肝动脉及门静脉。经脾静脉插入灌注管至门静脉主干，腹主动脉分叉处上方插入腹主动脉灌注管。全身肝素化，经门静脉及腹主动脉重力灌注 4 ℃乳酸林格液及 4 ℃ UW 液，灌注过程中肝脏表面不断覆冰屑以助肝脏降温，经胆总管断端插管冲洗胆道，至流出液清澈无血，肝脏冷却，表面呈均匀黄白色后，离断肝周血管，切取供肝，置 4 ℃UW 液中修整。修剪肝上及肝下下腔静脉，切除胆囊，清除门静脉及肝动脉周围结缔组织及淋巴结，胆总管不作过多游离，游离肝动脉至腹腔动脉开口处。各管道修整完毕后，注水法检查，漏液处妥善结扎或缝合修补。修整完毕后，将供肝置 4 ℃UW 液中保存。本组供肝均无热缺血，冷保存时间均控制为 4 h。

1.3.2　受体手术　　①受体肝切除：上腹反“L”形切口入腹，游离肝周韧带及血管，离断肝动脉，以静脉阻断钳分别阻断门静脉、肝上及肝下下腔静脉，紧贴肝脏离断门静脉、肝上及肝下下腔静脉，移除受体肝脏，妥善修整各血管断端。②新肝植入：将供肝置入受体动物腹腔，以 5-0 Prolene 针线连续缝合吻合肝上下腔静脉，6-0 Prolene 吻合门静脉，恢复肝脏血流。以 5-0 Prolene 连续缝合吻合肝下下腔静脉，开放下腔静脉血流。吻合肝上下腔静脉过程中经门静脉持续滴注 4 ℃乳酸林格液以避免供肝植入时升温并驱出供肝内富含高钾的 UW 液。采用供、受体肝总动脉对短吻合重建肝动脉。胆总管以 6-0 PDS 可吸收缝线间断对端吻合，清洗腹腔，关腹。

### 1.4　术中监护处理

1.4.1　无肝前期处理　　测血气及血生化，使之保持在正常范围。于无肝期之前适当加快输液速度，使 CVP 提高至正常上限水平 0.78～0.98 kPa（8～10 $cmH_2O$），一般需补充乳酸林格液约 200 ml。

1.4.2　无肝期处理　　严密监测门、腔静脉阻断后血流动力学变化，预防回心血量骤降所致的急剧低血压、心律失常及心跳骤停。依靠血管活性药物（持续静脉滴注多巴胺 10～15 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$，必要时静注小量肾上腺素），配合适量输液，将动脉收缩压维持在 6.66 kPa（50 mmHg）以上。

1.4.3　新肝期处理　　肝脏血流一开放即输入 5%碳酸氢钠 5 ml/kg 纠正酸中毒，静脉推注 10%葡萄糖酸钙 10 ml 对抗高钾，输少量（100 ml）新鲜全血补充失血，扩容，改善凝血功能，继续静脉点滴肾剂量多巴胺（2～5 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$），维持血压及有效循环，保护肾脏。

### 1.5　术后观察护理

术后持续监测心率、动脉血压及中心静脉压 24 h，静脉输液 80～100 $ml \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$，静脉滴注青霉素 $480 \times 10^4$ U/d，48 h 后开始进食，停止输液。

### 1.6　观察指标和方法

1.6.1　手术基本情况　　包括动物存活率、无肝期、手术时间及术中失血量、输血量等。

1.6.2　术中血流动力学及血气、生化改变　　分别于无肝前期、无肝期、新肝期及关腹前抽取动脉血行血气分析，同时进行电介质及肾功能检测。

1.6.3　术后肝功能检测　　分别于术后第 1、2、3、7、14 天抽取静脉血标本，检测谷丙转氨酶（ALT）、谷草转氨酶（AST）、总胆红素（TBIL）、总蛋白（TP）、白蛋白（ALB）。

### 1.7　统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用 SPSS 11.0 统计程序进行 $t$ 检验和方差分析。

## 2　结果

### 2.1　小型猪原位肝移植手术的基本情况

20 次小型猪原位肝移植的平均手术时间（181 ± 25.8）min，平均无肝期（28.4 ± 3.2）min，术中平均失血量（90.4 ± 11.8）ml，输血量均为 100 ml，无术中死亡，术后 1 周内死亡 2 例，1 例于术后第 1 天死于肺栓塞，另 1 例于术后第 6 天因肝动脉栓塞死亡。其余 18 例均存活 1 周以上，1 周存活率为 90%。存活 1 周以上的 18 例小型猪中，有 1 例因肺部及腹腔感染于术后第 9 天死亡，另 1 例亦因肝动脉栓塞于术后 11 d 死亡，术后 15 d 因急性胃扩张胃壁坏死死亡 1 例，15 例长期存活（超过 1 个月），最长存活时间超过 180 d。长期存活的小型猪中 1 例出现胆管吻合口狭窄。远期死亡原因为肝功能不全、肝坏死、肝脓肿，胆道感染、胆泥、胆管铸型梗阻，粘连性肠梗阻，肺部感染，病理性骨折等。本组肝动脉栓塞及胆管吻合口狭窄均发生在前 10 例手术中，后 10 例未见此类可能与外科技术相关的并发症（表 1）。

**表 1　20 次小型猪原位肝移植的基本情况**

**Tab 1　General condition of 20 orthotopic liver transplantations in miniature pigs**

| Parameter | Result |
|---|---|
| Operative time ($t$/min) | 181.0 ± 25.8 |
| Anhepatic phase ($t$/min) | 28.4 ± 3.2 |
| Blood loss (ml) | 90.4 ± 11.8 |
| Blood transfusion (ml) | 100 |
| 1-week survival rate (%) | 90 |
| Long-term survival rate (%) | 75 |

### 2.2　术中血流动力学、血气、生化及体温改变

无肝期血流动力学和代谢发生急剧变化：MAP 从无肝前期的（14.59 ± 1.68）kPa 降低至（5.87 ± 0.91）kPa，CVP 从（0.66 ± 0.11）kPa 降至（0.27 ± 0.10）kPa，体温降至（34.29 ± 0.68）℃，pH、BE、$cHCO_3$ 均显著下降，血清钾显著升高。肝血流恢复后，MAP 立即上升至（8.64 ± 0.91）kPa，CVP 上升至（0.47 ± 0.09）kPa，体温继续下降至（33.66 ± 0.83）℃，pH、BE、$cHCO_3$ 逐渐升高，至关腹前以上指标均恢复至接近无肝前期水平（表 2）。

表2 20例次小型猪原位肝移植术中血流动力学、体温、血气及生化指标变化（$\bar{x} \pm s$）

Tab 2 Changes of hemodynamics, temperature, blood gas, and biochemical indexes in 20 orthotopic liver transplantations in miniature pigs ($\bar{x} \pm s$)

| Parameter | HR ($min^{-1}$) | MAP ($p$/kPa) | CVP ($p$/kPa) | T (℃) | pH | $HCO_3^-$ ($c_B$/mmol·$L^{-1}$) | BE ($c_B$/mmol·$L^{-1}$) | $K^+$ ($c_B$/mmol·$L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|---|---|---|
| Pre-anhepatic phase | 101.10±8.96 | 14.59±1.68 | 0.66±0.11 | 36.84±0.46 | 7.50±0.04 | 22.62±3.20 | 0.66±3.57 | 4.13±0.22 |
| Anhepatic phase | 167.80±13.53* | 5.87±0.91* | 0.27±0.10* | 34.29±0.68* | 7.17±0.05* | 13.58±4.83* | -17.40±2.91* | 6.22±0.96* |
| Postreperfusion | 141.05±6.59* | 8.64±0.91* | 0.47±0.09* | 33.66±0.83* | 7.33±0.03* | 19.50±4.96 | -5.34±4.55* | 4.65±0.53 |
| End of operation | 122.35±12.05* | 11.33±1.21* | 0.66±0.19 | 35.24±0.68* | 7.39±0.04* | 21.50±2.94 | -2.32±4.70 | 3.88±0.37 |

*：$P<0.05$，*vs* pre-anhepatic phase

### 2.3 术后肝功能改变

术后第1天ALT、AST明显升高并达到峰值，以AST为甚，第3天开始下降，第7天降至正常水平；TBIL术后第1、2、3天轻度升高，但仍在正常值范围之内，第7天恢复至麻醉后水平；TP及ALB变化不显著（表3）。

表3 术后肝功能改变（$\bar{x} \pm s$）

Tab 3 Changes of liver function after operation ($\bar{x} \pm s$)

| Parameter | ALT(IU/L) | AST(IU/L) | TBIL ($c_B$/μmol·$L^{-1}$) | TP ($\rho_B$/g·$L^{-1}$) | ALB ($\rho_B$/g·$L^{-1}$) |
|---|---|---|---|---|---|
| Postanaesthesia | 33.20±2.59 | 66.80±5.50 | 8.59±1.15 | 60.20±9.42 | 33.60±3.65 |
| 1 d | 132.60±17.04* | 1109.40±220.26* | 17.04±2.52* | 67.80±6.80 | 36.00±5.39 |
| 2 d | 90.80±11.10* | 799.60±105.44* | 15.40±2.52* | 61.80±6.18 | 34.00±3.87 |
| 3 d | 67.40±7.23* | 179.40±20.60* | 13.21±2.26* | 58.40±6.10 | 35.80±1.92 |
| 7 d | 44.40±5.68 | 82.00±6.96 | 9.65±2.20 | 56.80±5.45 | 32.60±2.07 |
| 14 d | 41.00±3.87 | 74.40±6.39 | 7.62±0.54 | 59.20±7.79 | 33.80±3.11 |

*：$P<0.05$，*vs* postanaesthesia

## 3 讨论

猪的肝胆系统的解剖生理与人类非常相似，是研究人类肝移植的理想实验动物。但目前国内大多数单位应用于肝移植研究的家猪基因纯合度及相似系数低，遗传稳定性差，不能作为标准实验动物。以往报道的猪原位肝移植手术过程复杂，创伤大、出血多、时间长、术后恢复慢，术中及术后早期并发症及死亡率高，长期生存者较少[2,3]；因长时间麻醉、手术及体外静脉转流等因素对实验结果影响较大，各实验对象之间可比性和重复性差；且所用猪体积较大，操作不便，动物生长迅速，肝脏体积、出入肝血管及胆管口径变化较快，不适于大样本含量的系列实验研究。针对以往猪原位肝移植中存在的诸多问题，我们在实验动物选择、手术步骤、技术方法及术中监护处理等方面作了一系列改进。首先选遗传背景稳定，基因纯合度及相似系数高的封闭群小型猪为实验动物，减少了动物间的个体差异，增加了标准化程度，同时，动物体积小、体重轻，方便操作；为了避免可能导致的凝血功能障碍、低温及出血等并发症，我们放弃了体外静脉转流，手术在非体外静脉转流条件下进行，简化了手术步骤，有效缩短了手术时间；我们还针对小型猪体重轻，对麻醉、手术创伤、失血耐受力差及出入肝血管和胆管口径较小、管壁薄、韧性差、吻合困难的特点，重点探讨创用了适合小型猪原位肝移植的外科技巧及术中监护管理措施。以上系列改进使本研究取得了满意的结果，与近期文献报道[4-6]的结果相比较，本研究原位肝移植的无肝期时间和手术时间显著缩短，术中失血量和输血量显著减少，而手术成功率和动物存活率则显著提高。我们体会到熟练的外科技术和严密的术中监护管理是取得满意结果的关键。

### 3.1 外科技巧

非体外静脉转流条件下原位肝移植手术的特点是无肝期血流动力学及生化代谢发生急剧改变[7]。必须在有限时间和较紧急的病理生理状态下快速、高质量完成肝上下腔静脉及门静脉的吻合，以尽早结束无肝期。小型猪的肝上下腔静脉虽然口径较大，但管壁较薄，易被缝线割伤，为了增加血管壁的强度，我们在修剪肝上下腔静脉时保留1～2 mm的膈肌袖套，吻合时每一针均要带住膈肌袖套，或采用供受体肝上下腔静脉外翻折叠后双层缝合。小型猪的门静脉壁菲薄，缝合时要注意操作的稳、准、轻、巧，缝合无需太密，但要求每一针都确切到位，刺点准确，无反复刺针，边距、针距和跨距均匀一致，连续对端缝合完毕打结时预留约8 mm“生长因子”以保证血流开放后吻合口充分扩张，并要确保吻合口无漏血，无狭窄及扭曲，无冗长及张力过高。

肝动脉及胆管吻合是小型猪原位肝移植过程中的技术难点。由于所选实验动物的肝动脉口径不足2 mm，胆总管口径不足4 mm，需在手术放大镜下实施精细的显微吻合方能保证吻合口质量。我们对肝动脉和胆管的吻合均采用二定点端端缝合法[8]。首先在吻合口的9点钟及3点钟处各缝1针打结作牵引，在第1针和第2中点缝第3针，再在第1、第3针中点和第2、第3针中点缝第4、第5针，前壁缝合好后翻转，同样再缝合后壁的第6、7、8针，打结时用力恰当，无过紧或过松。本组选供、受体肝总动脉对端吻合，当口径不相匹配时，应用受体或供体肝固有动脉与胃十二指肠动脉建立血管瓣方式扩大吻合口。胆道重建采用供受体胆总管对端吻合。我们认为，预防肝动脉栓塞及胆管吻合口狭窄的关键在于游离整形时防止损伤动脉内膜及胆管血供，操作耐心仔细，实现良好的内膜对内膜的精

密对端吻合。

3.2 术中管理

非体外静脉转流的条件下原位肝移植术中血流动力学及内环境变化剧烈，实验动物体质量轻、体积小，对上述变化的代偿能力差。无肝期门静脉、下腔静脉同时阻断，大量血液瘀滞在胃肠道、双下肢及肾脏，有效循环血量锐减，引起严重低血压、酸中毒、高钾血症，甚至受体死亡，能否迅速恢复血流动力学和内环境的稳定是术中管理的关键所在[9, 10]。为了克服血流动力学和内环境的急剧变化，我们采取了以下措施：①无肝前期适当加快输液速度，切除受体肝时，门静脉置管快速输注平衡液 200 ml，将肝内血液驱入体循环以扩容，并使 CVP 达正常值上限；②无肝期一开始即使用血管活性药物，配合适量快速输液，迅速恢复循环稳定；③无肝期循环稳定后适当控制输液量；④肝脏血流一开放即输入碳酸氢钠纠正酸中毒，静推葡萄糖酸钙对抗高钾，继续静脉点滴肾剂量多巴胺（2 ~ 5 $\mu g \cdot kg^{-1} \cdot min^{-1}$），维持血压及有效循环，保护肾脏。由于动物对液体负荷及血管活性药物作用的耐受力差，故术中要严格控制输液量，禁止滥用血管活性药物。当术中出现异常情况时，要仔细寻找原因，及时对因处理，勿盲目对症给药，避免输液、用药的随意性。我们的经验是术中总输液量控制在 1 000 ml 以内，无肝期输液量 300 ml 左右，除了应用多巴胺和小剂量肾上腺素外，尽可能不用其它血管活性药物。此外，手术过程中，尤其是无肝期和新肝期易出现低温，应对动物实施全术程保温，防止低温所致的不良反应。

**参考文献：**

[1] 吴丰春，魏 泓，甘世祥，等. 巴马小型猪与贵州小型香猪遗传多样性的 RAPD 分析[J]. 实验生物学报，2001，34(2)：115 - 119.
[2] 王孟龙，徐冠南，丁国善，等. 猪原位肝移植中肝动脉重建方式的探讨[J]. 中华器官移植杂志，2000，21(1)：57.
[3] 何春水，何延政，钟 武，等. 猪解剖生理学特点对猪原位肝移植的影响[J]. 中国普通外科杂志，2002，11(1)：41 - 44.
[4] 刘蔚东，张阳德，龚连生，等. 40 例猪原位肝移植的手术分析[J]. 中国现代医学杂志，2002，12(8)：13 - 16.
[5] 祝哲诚，彭志海. 9 例次猪原位肝移植体会[J]. 复旦学报(医学版)2002，29(3)：228 - 229.
[6] 何春水，何延政，田根东，等. 猪原位肝移植术中体外静脉转流途径的实验研究[J]. 中国普外基础与临床杂志，2003，10(2)：125 - 127.
[7] Oike F, Uryuhara K, Otsuka M, *et al*. Simplified technique of orthotopic liver transplantation in pigs[J]. Transplantation, 2001, 71(2): 328 - 331.
[8] 叶 晟，韩本立，董家鸿. 大鼠原位肝移植的显微外科技巧[J]. 中华显微外科杂志，2003，26(1)：49 - 50.
[9] Rossi G, Langer M, Maggi U, *et al*. Veno-venous bypass versus no bypass in orthotopic liver transplantation: hemodynamic, metabolic, and renal data [J]. Transplantat Proc, 1998, 30(5): 1871 - 1873.
[10] Zheng S, Huang D, Wu J, *et al*. Orthotopic liver transplantation with no veno-venous bypass[J]. Zhonghua Wai Ke Za Zhi, 2002, 40(5): 326 - 328.

（编辑 刘洪娥）

文章编号：1000-5404(2005)02-0153-01

## 个案与短篇

# 凝血酶增强内皮细胞蛋白 C 受体表达及释放

# Thrombin enhances the expression and release of endothelial protein C receptor

李招权，蒲晓允 （第三军医大学医学检验系临床血液学教研室，重庆 400038）

1994 年 Fukudome 分离出内皮细胞蛋白 C 受体（endothelial protein C receptor，EPCR）。EPCR 有两种存在形式：①结合型 EPCR，主要表达于大血管内皮细胞表面，具有增强 PC/APC 的抗凝活性[1]；②血浆中的游离型 EPCR（soluble endothelial protein C receptor，sEPCR），能显著抑制 PC/APC 的活性[2]。我们通过实验发现，在体外细胞培养中，凝血酶能增强内皮细胞 EPCR 的表达和释放，并且这种作用能被水蛭素抑制。

作者简介：李招权（1972 - ），男，重庆市永川市人，硕士，讲师，主要从事血液凝固检验与血栓方面的研究，发表论文 6 篇。电话：023-68752311

收稿日期：2003-12-02；修回日期：2004-07-15

## 1 方法

人脐静脉内皮细胞培养：用含 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液以 $1 \times 10^5$/ml 将细胞接种于 96 孔板内，于 5% $CO_2$，37 ℃条件下培养。倒置显微镜观察待细胞融合单层后备用。实验分组：①凝血酶处理组（TTG）：在培养孔内加入 100 μl 凝血酶溶液（0.1 U/μl）；②水蛭素抑制组（HIG）：在培养孔内加入 100 μl 凝血酶及水蛭素混合溶液（凝血酶及水蛭素分别为 0.1 U/μl 和 0.1 U/μl）；③对照组（CG）：在培养孔内加入 100 μl 培养液，继续培养，分别于 3、6、12、24 h 取培养上清。

采用 ELISA 法检测培养上清 sEPCR 含量，$t$ 检验评价差异显著性。

（下转 163 页）