·论 著·

内支架法在大鼠肾移植模型中的应用

余雪松,黄赤兵,张艮甫,孙 帧 (第三军医大学新桥医院泌尿外科,重庆 400037)

[摘 要] **目的** 建立一种稳定、操作简单的肾移植模型。**方法** 以 BN(RT1^n)大鼠为供体,Lewis(RT1^l)大鼠为受体,实验组静脉吻合用 3 号 prolene 线作内支架,对照组直接端端吻合肾动静脉,将输尿管带膀胱瓣吻合于膀胱。**结果** 实验组和对照组移植成功率分别为 90% 和 85%,两组准备供体耗时为(23.0 ± 2.4)min,供肾热缺血时间为(5.6 ± 1.3)s,实验组和对照组移植手术耗时分别为(40.6 ± 6.3)min 和(54.1 ± 4.2)min,冷缺血时间分别为(38.4 ± 5.7)min 和(49.7 ± 6.3)min,手术耗时和冷缺血时间比较,两组有显著差异($P < 0.05$)。**结论** 内支架法简单实用,明显缩短肾缺血时间。

[关键词] 肾移植;内支架;动物模型;大鼠
[中图分类号] R615;R617;R332 [文献标识码] A [文章编号] 1672-5042(2011)06-0595-03

Application of stent in rat model of kidney transplantation

YU Xue-song, HUANG Chi-bing, ZHANG Gen-fu, SUN Zhen (Department of Urinary Surgery, Xinqiao Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400037, China)

Abstract: Objective To establish a stable and feasible rat model of kidney transplantation. **Methods** BN(RT1^n) rats were used as donors and Lewis(RT1^l) rats as recipients. The renal vein of donors was anastomosed with the renal vein of recipients with the help of prolene in experimental group, meanwhile, the renal artery and vein were directly anastomosed end-to-end with the artery and vein of recipients in control group. Donor's ureter was anastomosed with that of recipients. **Results** The successful rate of kidney transplantation in experimental group and control group were 90% and 85% respectively. (23.0 ± 2.4) minutes were spent on preparing donors and (5.6 ± 1.3) seconds was on the warm ischemia in both groups. The time used for transplantation was (40.6 ± 6.3) minutes and (54.1 ± 4.2) minutes in experimental group and control group respectively. The cold ischemia time in experimental group and control group was (38.4 ± 5.7) minutes and (49.7 ± 6.3) minutes respectively, with significant differences between groups ($P < 0.05$). **Conclusion** The method of using prolene as stent is simple and practical, renal ischemic time can be shortened obviously.

Keywords: kidney transplantation; stent; animal model; rat

大鼠肾移植模型是常用实验动物模型之一,是开展免疫与肾移植基础研究的重要实验工具。20 世纪 60 年代 Lee 首先完成了模型制作[1],陈金芝等[2]于 1981 年在我国首次报道了大鼠肾移植模型的建立,之后人们对该模型的制作不断改进优化,建立了各种建模方法,包括静脉 Fabre 法吻合或 Cuff 管套扎法,动脉 Fabre 法或 Fisher 法等[3]。但目前大鼠肾移植术仍是精细复杂的显微手术,各种并发症尚有一定的发生率。本实验在黄赤兵等[4]大鼠肾移植改良技术基础上,改用简单的内支架法,采用原位肾移植,肾动静脉端端吻合,输尿管带膀胱瓣吻合于膀胱,建立一种简单可靠的大鼠肾移植模型,为后续研究奠定基础。

[基金项目] 国家自然基金资助项目(30872580)
[作者简介] 余雪松(1979 -),男,湖北省鄂州市人,主治医师,博士,主要从事肾脏移植免疫方面的研究。电话:(023)68774617
[通讯作者] 黄赤兵,E-mail:huangchibing@ medmail. com. cn
[收稿日期] 2011-06-15 [修回日期] 2011-07-12

1 材料与方法

1.1 材料

BN(RT1^n)大鼠为供体,Lewis(RT1^l)大鼠为受体(北京维通利华实验动物有限公司提供),雄性,约 200 g。手术显微镜 ×8 倍,11-0 显微缝合线,3 号 prolene 线,0.3% 戊巴比妥钠,显微外科手术器械(上海医疗器械有限公司),25 U/L 肝素钠生理盐水,乳酸林格氏液,青霉素钠注射液。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 BN(RT1^n)供体大鼠 40 只,Lewis(RT1^l)受体大鼠 40 只,40 对大鼠随机分成两组,实验组 20 对大鼠用内支架法行肾移植术,对照组 20 对大鼠用非支架法行肾移植术,采用原位低温灌洗,大鼠左侧行肾移植。

1.2.2 术前处理 大鼠术前 12 h 禁食不禁水,术野备皮,0.3% 戊巴比妥钠(1 mL/kg)腹腔注射麻醉。麻醉成功后固定于手术台,用 2.5% 碘酒和 75% 酒精常规消毒,腹正中切口,上至剑突下至耻骨联合上,无菌手术。

1.2.3 供体手术 进入腹腔后,用自制 S 拉钩将腹壁拉开,将肠管推向右侧,并用盐水纱布覆盖,显露左肾,游离出腹主动

脉和后腔静脉,上达肠系膜上动脉分叉处,下至髂动脉分叉处,用 5-0 线结扎左精索静脉及左肾上腺静脉并剪断,去除肾脂肪囊,分离左输尿管至膀胱,连带膀胱离断,显微血管钳阻断后腔静脉和腹主动脉上、下端,在腹主动脉穿线处剪一约 2 mm 小口,插入硬膜外麻醉导管至肾动脉水平,结扎固定,再剪开后腔静脉,用 0 ~ 4 ℃的 25 U/mL 肝素林格氏液接导管灌注,灌注速度保持在 0.5 mL/s,至肾脏灰白,后腔静脉流出的灌注液清亮为止,一般灌注量为 5 ~ 7 mL。于近腹主动脉 1/3 处剪断肾动静脉,游离输尿管至膀胱,带膀胱壁取下肾脏。手术时间约 20 min,供肾热缺血时间约(5.6 ± 1.3)s。

1.2.4 供肾修整 置以上供体于冰水中,修剪肾静脉开口至平滑,并小心剔除多余的脂肪,以利吻合血管,修剪膀胱,保留输尿管开口周围约 3 mm 膀胱瓣,0 ~ 4 ℃素林格氏液保存。以上约需 5 min。

1.2.5 受体手术 Lewis(RT1[1])大鼠开腹后,将肠管推向右侧,湿盐水纱布覆盖腹腔脏器。游离左肾动脉及静脉,结扎左肾上腺动脉与静脉,左精索动脉与静脉一般不用结扎。结扎切断输尿管,包膜下分离左肾。用血管夹分别阻断游离出的左肾动脉与左肾静脉近端,远端切断切除左肾。用肝素盐水冲洗肾动静脉腔内的残血。肾动脉吻合用 11-0 无损伤缝合线间断缝合 8 针,先前后各缝合 1 针做固定牵引,再翻转分别缝合上下壁各 3 针[5]。实验组肾静脉吻合前,用 3 号 prolene 线尾端塞入供肾肾静脉约 1 cm,针头端进入受体肾静脉管腔内,从静脉管内壁距断端约 1 cm 处穿出,稍提拉出管壁针头,使断端间 prolene 线约平行于血管,防止线弯曲影响血管吻合操作(图 1a、b、c、d),固定好 prolene 线后,调整两静脉端间距,上下各缝合 1 针做固定牵引,再翻转分别缝合前后壁 4 针。对照组不用 prolene 线内支架,直接端端吻合肾静脉。动静脉吻合在收紧最后一针打结前,在血管内注入肝素生理盐水排出空气,检查吻合口是否漏水,同时避免开放前血管内血栓形成。端端间断吻合好肾静脉后,抽出 prolene 线。去除肾静脉血管夹及腹主动脉血管夹,可见移植肾迅速充盈,于 2 s 内迅速变红(图 1e),观察约 2 ~ 3 min,可见输尿管蠕动,并有尿液流出,用 10-0 线间断缝合膀胱瓣于膀胱。将供肾肾周少量脂肪于受体肾窝处固定 2 针以防止受体肾移位,造成肾血管的扭曲闭塞。腹腔补液 5 mL,加青霉素钠 8 万 U,3-0 线分两层连续缝合伤口。

1.2.6 术后处理 大鼠术后灯照保温 1 h 后,置笼内正常饲养,鼠笼底垫白纸垫,起到保温作用,并可以观察大鼠排尿情况,即时自由饮水,24 h 后自由进食。

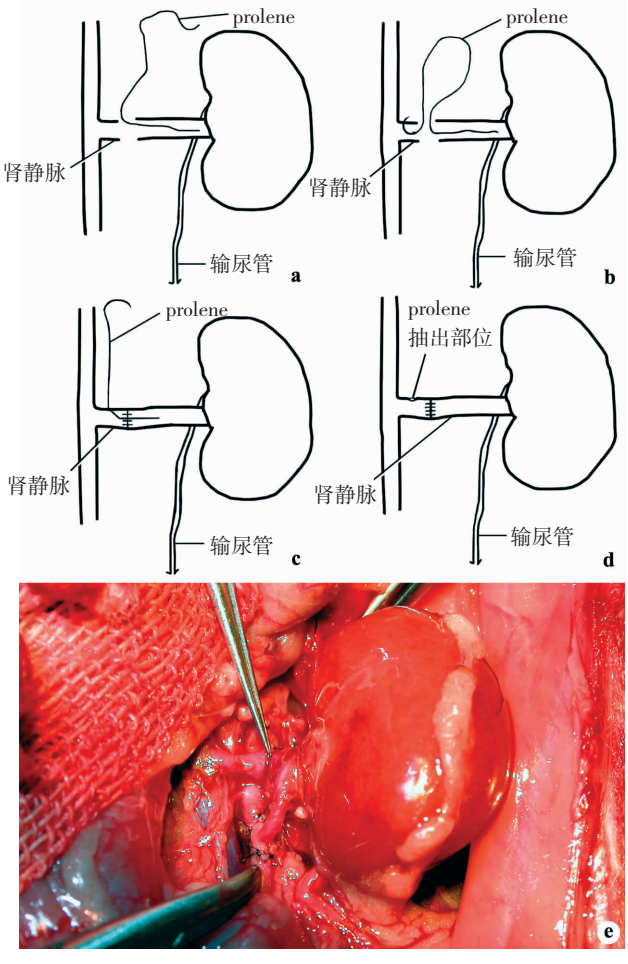
1.3 统计学分析

应用 SPSS 15.0 软件包进行统计学分析,计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,组间比较采用独立样本的 t 检验。$P < 0.05$ 表示有统计学差异。

2 结果

2.1 实验动物数量分析

手术后 Lewis(RT1[1])受体大鼠一般于 30 ~ 60 min 内清醒,当天能正常进食。实验组肾移植手术成功 18 例,死亡 2 例,成功率 90%,其中 1 例死于失血性休克,1 例死于膀胱输尿管吻合口漏尿导致的腹腔感染。对照组肾移植手术成功 17 例,死亡 3 例,成功率 85%,其中 2 例死于失血性休克,1 例出现动脉吻合处血栓导致死亡。



a:prolene 线尾端塞入供肾肾静脉;b:prolene 线针头在距受体肾静脉端断口约 1 cm 处,从静脉管内壁穿出;c:提拉 prolene 线,端端缝合肾静脉;d:静脉端端吻合好后,抽出 prolene 线;e:松开血管夹后,移植肾于 2 s 内迅速充盈变红

图 1 受体肾移植手术

2.2 手术时间

两组大鼠肾移植手术检测指标见表 1。两组移植手术耗时和冷缺血时间比较,$P < 0.05$,有统计学差异。

表 1 两组大鼠肾移植手术指标比较($\bar{x} \pm s$)

组别	准备供体耗时(min)	移植手术耗时(min)	热缺血时间(s)	冷缺血时间(min)
实验组	23.0 ± 2.4	40.6 ± 6.3	5.6 ± 1.3	38.4 ± 5.7
对照组	23.0 ± 2.4	54.1 ± 4.2*	5.6 ± 1.3	49.7 ± 6.3*

*:与对照组比较,$P < 0.05$

3 讨论

器官移植模型动物的选择较多,但是大鼠模型由于相对简单、经济、便于饲养等原因,仍然是进行排斥

反应等基础研究的首选[6]。1965 年 Fisher 等[3]首次报道了吻合血管的大鼠肾移植模型,人们对该模型进行了技术更新和改进,但一些技术仍较复杂,并发症多或不尽合理。目前大鼠肾移植模型中静脉吻合多采用 Fabre 法缝合或 Kamada 法套扎。Chen 等[7]报道了肾动静脉袖口式套叠方法吻合,但肾动脉不容易翻转、肾动脉套管容易形成血栓,且套管制作难度大。同时在吻合口处供体静脉突入受体静脉,不符合血流动力学要求,且容易形成血栓[8]。人工制作的 Cuff 管内外径相差大,口径较大的供肾静脉穿过其内腔时很容易形成人为狭窄,同时套扎时操作难度大[9]。

大鼠的后腔静脉在腹主动脉的右侧,手术时体位靠近脊柱侧两者有部分重叠,两者结合相当紧密,若术者以显微血管镊直接自上而下分离,很容易损伤后腔静脉,造成出血,延误手术时间[10]。大鼠肾动静脉管径小,肾静脉壁薄,在显微镜下操作,对精细要求程度高,血管吻合难度大。由于肾静脉壁薄,在切断后,因无血液充盈而塌陷,前后壁相互粘贴,吻合时难以寻找到供肾静脉的断端的开口,而使缝合难度增大,缝合时间长,易造成吻合口狭窄和管壁破损。本实验模型制作过程中,我们用简单的内支架法,即吻合血管内穿入光滑的 prolene 线,可以较好地固定两端血管,减少寻找断端开口而浪费时间,同时穿入滑线后静脉壁被撑起,可以避免缝到对侧静脉壁,简化了静脉吻合操作,可以有效地避免吻合失误等对静脉管壁的损伤,且支架取出简单、容易,通过牵拉管壁外的线头即可。同时,我们建立内支架是从受体肾静脉出针,而不从供肾静脉出针的原因是因为供体肾静脉相对受体肾静脉残端长,内支架置入管腔内长度更长,同时不在供肾静脉端穿针出管壁,能保护供肾血管,避免供肾静脉进一步损伤。如果出口有渗血等情况,可以通过简单按压或补缝 1 针。选择光滑和伸展性能良好的 prolene 线为支架可以避免吻合线针头扎入线内,且肾静脉不会因内支架硬度过大而受损。阻断体循环采用肾动静脉和腹主动脉及后腔静脉吻合,也是被很多人采用的吻合方法,但后来发现手术中大鼠的下半身一直处于缺血状态,开放血流以后严重的缺血再灌注损伤不可避免[11],这也使移植后大鼠的生存率有所下降。改进为肾血管端端吻合后弥补了它的不足,提高了术后生存率,受体大鼠下肢不会发生回流受阻现象,不易出现静脉血栓等并发症,这也是我们采用端端吻合法的原因。在取输尿管时,解剖膀胱后,直视下以输尿管膀胱开口为中心,附带切取直径约 3.0 mm 的膀胱瓣,极大地保护了下段输尿管的血液循环。术后解剖未见明显移植肾、输尿管积水及吻合口缺血坏死。

大鼠肾移植模型是十分有用的实验模型,推动了我们对移植免疫及肾移植机制等重要生命现象的理解与认知[12]。用内支架法吻合大鼠肾静脉,显著提高了手术的可操作性,减少肾缺血时间,简单实用。

[参考文献]

[1] Lee S. An improved technique of renal transplantation in the rat[J]. Surgery, 1967, 61(5): 771 - 773.

[2] 陈金芝,夏穗生. 大白鼠异体肾移植术[J]. 中华器官移植杂志, 1981, 2(2): 73 - 76.

[3] Fisher B, Lee S. Microvascular surgical techniques in research with special reference to renal transplantation in the rat[J]. Surgery, 1965, 58: 904.

[4] 黄赤兵,方玉华,吴 军,等. 应用新技术建立大鼠肾移植模型[J]. 中华器官移植杂志, 2001, 22(2): 114.

[5] 冯嘉瑜,张艮甫,黄赤兵,等. 改良的大鼠原位肾移植模型的建立[J]. 第三军医大学学报, 2004, 26(24): 2264 - 2265.

[6] Tanaka T, Kitamura H, Sahara H, et al. Effects of a new immunosuppressive agent, beta-SQAG9, in swine kidney transplantation[J]. Transpl Immunol, 2007, 18(1): 67 - 71.

[7] Chen B, Kapturczak MH, Joseph R, et al. Adeno-associated viral vector-mediated interleukin-10 prolongs allograft survival in a rat kidney transplantation model[J]. Am J Transplant, 2007, 7(5): 1112 - 1120.

[8] Pahlavan PS, Smallegange C, Adams MA, et al. Kidney transplantation procedures in rats: assessments, complications, and management[J]. Microsurgery, 2006, 26(5): 404 - 411.

[9] Iwai S, Endo K, Kobayashi E. Training protocol for feline renal transplantation, using rat vascular anastomosis[J]. Microsurgery, 2006, 26(1): 8 - 12.

[10] Karatzas T, Santiago S, Xanthos T, et al. An easy and safe model of kidney transplantation in rats[J]. Microsurgery, 2007, 27(8): 668 - 672.

[11] Neri F, Puviani L, Tsivian M, et al. Protective effect of an inhibitor of interleukin-8 (meraxin) from ischemia and reperfusion injury in a rat model of kidney transplantation[J]. Transplant Proc, 2007, 39(6): 1771 - 1772.

[12] 丁 瑞,谢院生,陈香美. 大鼠肾脏移植模型成功建立的要点[J]. 中国中西医结合肾病杂志, 2008, 9(4): 365 - 366.

(编辑:余汇洋)