技术与方法

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2011.10.020

改进大鼠胰十二指肠移植模型的建立

赵雪云，张　力，刘胜春
（重庆医科大学附属第一医院内分泌外科，重庆　400016）

【摘　要】目的：提高大鼠胰十二指肠移植模型（Pancreaticoduodenal transplantation，PDT）的制作效率，为胰腺移植的临床和基础研究奠定模型基础。方法：以 SD 大鼠作为供体，Wistar 大鼠作为受体，共行 40 例大鼠胰腺移植。采用自制套管吻合供体门静脉和受体左肾静脉、供体腹主动脉和受体左肾动脉，术中不需阻断下腔静脉和腹主动脉。结果：40 例手术中，供体平均手术时间为（68 ± 4）min，受体平均手术时间（55 ± 4）min，静脉袖套吻合时间（6 ± 1）min，动脉套管吻合时间（5 ± 1）min，术后 24 h 移植物恢复功能，有轻度组织病理学改变，移植成功率达 90%。结论：该方法简化了血管吻合的步骤，减少了术后大出血的并发症，大大提高了造模效率。

【关键词】胰十二指肠移植；动物模型；大鼠
【中国图书分类法分类号】R657.5　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2011-05-31

Improvement of establishing the animal model of pancreaticoduodenal transplantation in the rat

ZHAO Xue-yun, ZHANG Li, LIU Sheng-chun
(*Department of Endocrine Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To improve the efficiency of establishing the animal model of pancreaticoduodenal transplantation (PDT) in the rat, so as to lay the foundation for the basic and clinical research of pancreas transplantation. *Methods*: Pancreatic allograft from SD rats was transplanted to Wistar recipients, which was performed in 40 rats. The recipients were operated without clamping inferior vena cava or aorta ventralis. The portal vein of the graft was anastomosed with the recipient's left renal vein by cuff technique while the aorta ventralis of the graft was anastomosed with the recipient's left renal artery by the same technique. *Results*: In the 40 models, the average time of donor operation was (68 ± 4) minutes while recipient operation was (55 ± 4) minutes. The anastomosis time of vein with cuff technique was (6 ± 1) minutes while the time of artery was (5 ± 1) minutes. There were minor histological changes; the function of the graft recovered after operation, and the operative successful rate was 90%. *Conclusion*: This technique improves the efficiency of the model establishment by simplifying the procedures of vascular anastomosis and reducing the complication of massive hemorrhage after operation.

【Key words】pancreaticoduodenal transplantation; animal model; rat

大鼠胰十二指肠移植（Pancreaticoduodenal transplantation，PDT）动物模型是研究胰腺移植最常用的模型之一[1-3]，目前常用的造模方法都需要暂时阻断腹主动脉和肠系膜上静脉或门静脉，改变了受体的血流动力学，容易导致器官的缺血-再灌注损伤，另外，动静脉吻合口出血等并发症对成功造模构成了障碍。因此，我们在国内彭勇等[4]报道的用袖套法吻合供受体静脉系统的基础上，用自制玻璃导管吻合动脉系统，实验证实，此法可以进一步缩短受体手术时间，避免了阻断体循环和门静脉系统带来的缺血-再灌注损伤和因吻合口漏造成的术后大出血，简化了动脉的吻合过程，手术成功率达 90%，建立了一种更简便、可靠的大鼠胰十二指肠移植模型。

作者介绍：赵雪云（1985- ），男，硕士，研究方向：器官移植。
通信作者：刘胜春，男，教授，Email：liushengchun1968@163.com。
基金项目：国家自然科学基金资助项目（编号：30871295）；国家人事部出国留学人员科研启动基金资助项目（编号：人发[2001]33）；重庆市科委科研资助项目（编号：CSTC，2009BB5065）。

1　材料和方法

1.1　实验动物及主要器材

1.1.1　实验动物　40 只清洁级健康封闭群 SD 大鼠（重庆医科大学实验动物中心提供），雄性，体重 200~230 g。40 只清洁级健康封闭群 wistar 大鼠（第三军医大学大坪动物中心提供），雄性，体重 330~350 g。

1.1.2　主要器械　显微手术器械（上海医疗器械厂）；双目手术显微镜；血糖仪及试纸（美国强生公司）；门静脉套管（用聚乙烯导管自制而成，内径 1.5 mm，外径 2 mm，管体长 3 mm，

管耳长 2 mm)；动脉导管(用定制玻璃导管处理而成，肾动脉端内径 0.3 mm，外径 0.6mm，腹主动脉端内径 1 mm，外径 1.5 mm，管长 7 mm)。

1.2 主要试剂

链脲佐菌素(Streptozotocin，STZ，购于美国 Sigma 公司)；10%水合氯醛；25 U/L 肝素生理盐水。

1.3 受体大鼠糖尿病模型的建立

1.3.1 试剂配制 将 STZ 溶于 0.1 mol/L 的枸橼酸-枸橼酸钠缓冲液(pH4.5)中配置成 1%的 STZ 溶液，现配现用。

1.3.2 糖尿病模型建立 受体 Wistar 大鼠禁食 12 h 后，腹腔注射现配的 1%STZ 溶液(60 mg/kg)，在注射 STZ 溶液后 3 d 及 5 d，经尾静脉采血使用微量血糖仪测量随机血糖，连续两次测得血糖值>16.8 mmol/L，且稳定 1 周以上者判断为造模成功[5]，作为受体使用。

1.4 胰十二指肠移植模型的建立

1.4.1 术前准备及麻醉方式 术前供受体均禁食 24 h，期间给予 5%葡萄糖生理盐水自由饮用；采用 10%水合氯醛(0.3 ml/100 g)腹腔注射麻醉。仰卧位固定于手术台上，消毒、备皮，手术在显微镜下用清洁手术方式完成。

1.4.2 供体手术 沿腹正中线切开入腹(上至剑突，下至耻骨联合)，以下操作在显微镜下进行。①左上翻起胃，锐性离断胃脾韧带，结扎切断胃左动静脉及食管，结扎胰与脾之间的血管联系但不切断；分离大网膜与胰腺之间的联系，结扎切断胃网膜左右动静脉，在幽门环下方 5 mm 处用 6-0 丝线结扎，切除全胃；暴露肝门处，结扎切断胆总管、肝固有动脉，游离门静脉至分叉处。②将横结肠向下牵拉，锐性离断胰腺与横结肠之间的血管及筋膜联系，剪开屈氏韧带，依次结扎离断肠系膜上动静脉，在十二指肠和空肠之间出现的血运分界线处切断(注意保留十二指肠血管)，保留含胰管开口在内的十二指肠段约 3 cm。③在左肾动脉的下方 2 cm 处结扎，钝性分离覆盖于腹主动脉上的后腹膜，结扎离断左、右肾动脉，数对腰动脉，于腹腔干上方 1 cm 处预置 6-0 丝线，从左肾静脉推入肝素生理盐水(25 U/ml)2 ml，肝素化供体。④腹腔干上方 1 cm 处结扎腹主动脉，左肾动脉下经腹主动脉插管，4℃肝素生理盐水(12.5 U/ml)5 ml 灌注胰腺，同时剪断门静脉，直至流出澄清灌注液，移植物变苍白。⑤于肠系膜上动脉下方 5 mm 处结扎腹主动脉，在此结扎处和腹腔干上方结扎处以下切断腹主动脉。⑥完整取下移植物，放入 0℃~4℃肝素生理盐水(25 U/ml)中保存，在保存液中完成静脉袖套的制作。

1.4.3 受体手术 术前准备同供体，但手术切口只需约 5 cm，暴露左肾处及周围血管即可。①仔细分离左肾动静脉至肾门处，结扎离断左肾上腺静脉、精索内静脉，经左肾静脉注入 2 ml 肝素生理盐水(25 U/ml)肝素化受体。②结扎离断左输尿管，钝性剥离左肾外被膜和脂肪，贴近肾门处结扎肾蒂，切除左肾。③微血管夹分别阻断左肾动静脉根部，置入移植物，先动脉后静脉的顺序吻合血管，玻璃导管较细端插入左肾动脉，较粗端插入腹主动脉，门静脉袖套套入左肾静脉，6-0 丝线套扎固定，期间用带冰晶的纱布局部降温移植物，切除脾脏。④先放开静脉夹再放开动脉夹，可以看到胰腺和十二指肠由苍白迅速变红润，外引流用 6-0 丝线将十二指肠空肠行端侧吻合。⑤关腹前腹腔注射生理盐水 3 ml，术后经尾静脉注入肝素(50 U/L)生理盐水 2 ml，复温台复温至苏醒，自由饮用加入华法林的水，禁食 24 h 后正常饮食，单笼饲养。手术情况见图 1。



A. 移植物取下修剪后，剪头所示为门静脉袖套制作完成后

B. 将供胰门静脉袖套套入受体左肾静脉后，如箭头所指

C. 将供胰腹主动脉和受体左肾动脉行套管吻合后，箭头所指处。此时尚未开放血液循环，可见胰腺颜色尚苍白

D. 开放血液循环后，供胰及十二指肠因血供恢复迅速变为粉红色

图 1 供受体手术过程

1.5 术后指标检测

1.5.1 移植物功能检测 术后 24 h 经尾静脉采血检测血糖，24 h 后每日检测非空腹血糖。以非空腹血糖<11.2 mmol/L 为移植物功能正常的标准。

1.5.2 手术时间的统计 统计供受体手术时间，动、静脉吻合时间

1.5.3 移植物组织病理学及大体形态观察 因超急性排斥反应在移植术后 24 h 即可发生，故于术后 24 h 开腹，肉眼观察移植物色泽、质地等，取移植物 10%甲醛固定，石蜡包埋，HE 染色，光镜下观察。

1.6 结果统计

手术时间及血糖水平用 $\bar{x}\pm s$ 表示，移植术前后血糖采用配对 t 检验比较，结果采用 SPSS17.0 软件分析，检验水准取 $\alpha=0.05$。

2 结 果

2.1 术后移植物功能

40 只受体糖尿病大鼠在接受胰十二指肠移植后 24 h 血糖均降至正常范围，有 36 只于术后存活超过 3 d(其余 4 只中，2 例因动脉套管内血栓形成导致移植物失功，1 例因静脉袖套脱落导致失血性休克死亡，1 例死亡原因不明)，尿糖转阴。术后 24 h 血糖(6.4 ± 1.3) mmol/L 和术前(25.5 ± 3.1) mmol/L 比较，差异有统计学意义($P<0.01$)。

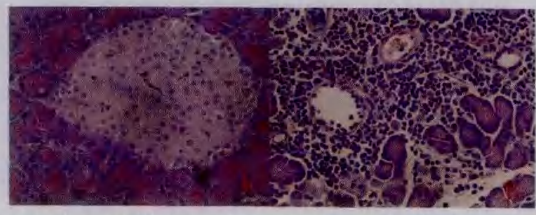
2.2 手术时间

统计 40 例移植手术时间：供体手术时间(68 ± 4) min，热缺血时间(阻断腹腔干上腹主动脉到插管开始灌注的时间)均控制在 1 min 内；受体手术时间(55 ± 4) min，静脉吻合时间(6 ± 1) min，动脉吻合时间(5 ± 1) min。

2.3 病理变化及大体形态

于术后 24 h 取移植胰腺，大体：色泽粉红，质软，有程度

不一的水肿，大量渗出物在胰周。镜下：胰腺小叶间质明显增宽，明显的水肿及渗出，毛细血管扩张充血明显，大量炎性细胞浸润，胰腺组织结构与正常胰腺有显著差异（图 2）。



A. 正常大鼠胰腺结构（HE×400）　B. 术后 24 h，移植胰腺组织（HE×400），可见胰腺小叶间隔增宽，间质水肿明显，间质血管明显扩张充血，大量淋巴细胞浸润，胰腺组织结构与正常胰腺有明显差异

图 2　术后 24 h 移植胰腺与正常胰腺组织结构对比

3　讨　论

3.1　移植模型建立

3.1.1　实验动物及器材的准备　①受体体重应比供体重 100 g 左右，这样受体肾动、静脉能更容易和供体动、静脉行套管吻合，肾动脉内径才能达到移植胰腺的供血所需。②封闭群大鼠在生活力、繁殖力上都强于近交群，个体之间的基因多态性与人类相似，不同品系大鼠在进行胰腺移植术后，能更好地观察移植物的炎症反应等各种变化。③静脉套管应在管外壁的中部划一段凹痕，以防止结滑脱；同样，动脉玻璃套管也应用磨砂轮在两侧靠近管口 2~3 mm 处磨出少许凹痕，以防止结滑落。④套管的选择要尽量管壁薄，管腔大，以保证血流通畅；在完成静脉袖套吻合后应剪去管耳，以防阻碍血流通畅。⑤由于采用玻璃导管将受体左肾动脉和供胰腹腔动脉吻合，若将导管两端口径制成一致（只能采用较细端的口径），虽可有效避免血栓的形成，但由于血管腔和玻璃管口径不一致，腹腔动脉端在结扎时会形成褶皱，容易导致血栓形成。因此，在保证两端管径符合两端血管口径的前提下尽量缩小导管两端口径差异，可以尽可能的避免形成血栓。

3.1.2　供体手术　①在整个供胰获取过程中，要尽量避免胰腺热缺血时间。因此在阻断腹主动脉后应尽快插管用 0℃~4℃肝素生理盐水灌洗。灌注时，应控制好速度，缓慢均匀灌注，以免压力过大损伤胰腺。②整个手术过程中应尽量避免接触胰腺，结扎胰脾之间的联系后不切断，脾可以作为牵拉物而避免直接接触胰腺。③结扎离断肠系膜上动脉后等看到肠管变苍白后再结扎切断肠系膜上静脉，这样可以使肠道的血液回流，避免过多的失血。④结扎肠系膜上动脉时，近端不能太高以免误扎胰十二指肠下动脉，在分离结扎肝固有动脉时，应特别注意误损伤胰十二指肠上动脉，因为此动脉是胰腺的主要血供。⑤门静脉袖套的的制作应在 0℃~4℃肝素生理盐水中完成。

3.1.3　受体手术　①受体手术中，肾动静脉粘连较紧密，且周围脂肪结缔组织较多，加之静脉壁很薄，在分离时一定要仔细轻柔，对可疑的小血管必须仔细结扎。②行套管吻合时，注意勿使血管扭曲，否则术后易形成血栓而导致移植物失功。由于肾动脉很细，故可以在肾动脉套管前局部给予少量盐酸罂粟碱以扩张局部血管，有助于肾动脉套管。③行套管吻合动静脉时，应用带冰晶的纱布覆盖胰腺，尽量减少其热缺血的时间。④因糖尿病大鼠抵抗力低，血液也较粘稠，术后应向腹腔注射 5 ml 温生理盐水并在复温台复温，阴茎背静脉注射肝素生理盐水（50 U/L）2 ml 肝素化受体。⑤由于肾动脉套管口径细，容易形成血栓，因此术后饲养时在其饮用水中加入华法林有助于防止血栓形成。

3.2　该模型的优缺点

①以 Lee 等[6]为代表的传统胰十二指肠移植模型中，不可避免的要暂时阻断腹主动脉，另外动脉吻合技术较难，术后吻合口漏血、吻合口血栓形成等导致了模型成功率较低。由于胰腺是低灌注器官，经过比较，受体比供体重 100 g 的情况下，受体左肾动脉的内径（0.45 ± 0.05）mm 与供体腹主动脉上的腹腔干（胰腺血供的主要血管）内径（0.6 ± 0.05）mm 差别不大，能满足胰腺血供所需。因此，我们在借鉴国内彭勇等[4,7,8]用袖套法吻合供受体静脉系统的基础上，用自制玻璃导管吻合动脉系统，避免了阻断受体腹主动脉，省去了端侧吻合动脉的步骤，大大提高了受体手术时间，提高了建模效率。②因不需要阻断受体自身的血流，也避免了受体自身器官缺血-再灌注损伤的发生。③但是，此法在动脉吻合上采用自制玻璃导管吻合肾动脉和腹腔动脉，两端口径悬殊较大，容易形成涡流、层流等改变，此处容易形成血栓。我们发现尽可能的缩短玻璃导管长度，保证充足的血容量以及术后肝素化受体并给予口服华法林等措施，能够有效的避免此并发症。④40 例手术中，术后平均存活时间（4 ± 1）d，实验证实，此法建立的胰十二指肠移植模型，简单可靠，能满足胰腺移植基础和临床研究所需，是一种理想的建模方法。

参　考　文　献

[1] Linder G, Carlsson P O, Hansell P, et al. Hemodynamic effect of iopromide in pancreas-duodenum transplanted rats[J]. Official Journal of The Foundation Acta Radiologica, 2007, 48(10): 1125-1130.

[2] Yu J B, Xu Z K, Han S G, et al. Studies of CTLA4Ig in acute rejection of pancreas transplantation in rats[J]. Journal of Nangjing Medical University, 2006, 20(5): 263-265.

[3] Drognit O, Michel P, Koczan D, et al. Characterization of ischemia/reperfusion-induced gene expression in experimental pancreas transplantation[J]. Transplantation, 2006, 81(10): 1428-1434.

[4] 彭　勇，龚建平，甘　霖，等. 袖套法制作大鼠胰腺移植模型[J]. 肝胆胰外科杂志，2004，16(1)：7-9.

[5] Park S H, Marso S P, Zhou Z, et al. Neointimal byperplasia after arterial injury is increased in a rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus[J]. Circulation, 2001, 104(7): 815-819.

[6] Lee S, Tung K S, Koopmans H, et al. Pancreaticoduodenal transplantation in the rat[J]. Transplantation, 1972, 13(4): 421-425.

[7] 魏晓平，刁　畅，李　立，等. 异基因大鼠胰十二指肠移植模型建立的手术技巧[J]. 中国普外基础与临床杂志，2009，16(2)：111-118.

[8] Jiga L P, Nita G, Dornean V, et al. Experimental model of pancreas transplantation with portal or systemic drainage in the laboratory rat[J]. Chirurgia(Bucur), 2007, 102(5): 563-570.

（责任编辑：冉明会）