技术与方法 文章编号:0253-3626(2009)08-1054-03

重建肝动脉的大鼠肝移植模型改良的实验研究

黄德荣,吴忠均,朱 宇

(重庆医科大学附属第一医院肝胆外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:探讨稳定、高效地建立肝动脉重建的大鼠原位肝移植模型的手术方法。方法:参照"双袖套"法,在供肝的灌注、切取、肝上下腔静脉吻合等方面进行改良,供、受体肝总动脉间用改良的支架法吻合重建肝动脉血供。结果:共完成大鼠原位肝移植 80 例,供体手术时间:(40±3) min,受体手术时间:(50±5) min,无肝期时间:(16±2) min,肝上下腔静脉吻合时间:(6~9) min,肝动脉吻合时间:(2~3) min。术中无受体死亡,48 h 存活率为 96.3%,1 周存活率为 93.7%,1 月存活率为:87.5%。结论:该方法成活率高,稳定性好,是建立肝动脉重建的大鼠原位肝移植模型的理想方法。

【关键词】大鼠;肝移植;动物模型;肝动脉重建

【中国图书分类法分类号】R617 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-03-10

Modification of arterialized orthotopic liver transplantation in rats

HUANG De-rong, et al

(*Department of Hepatobiliary Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To improve the surgical technique to establish the arterialized orthotopic liver transplantion in rat. *Methods*: On the basis of two-cuff technique of Kamada, we improved the techniques of separaring, perfusing donor liver, the anastomosis of the suprahepatic inferior vena cava, and so on. And used the modified "stent" method to reestablish the hepatic artery. *Results*: 80 cases of operation were completed. The time of donor operation, recipient operation and anhepatic time were (40±3) min, (50±5) min, and (16±2) min, respectively. The time of reestablishing suprahepatic inferior vena cava and hepatic artery were (6~9) min, (2~3) min, respectively. The survival rate at 48 h, 1 week and 1 month were 96.3%, 93.7%, and 87.5%, respectively. *Conclusion*: The modified method can enhance the stability and survival rate, which is an ideal method for establishing the arterialized orthotopic liver transplantation model in rat.

【Key words】Liver transplantation; Rat; Animal model; Hepatic rearterialization

大鼠肝移植模型已经成为肝移植基础和临床研究的重要动物模型[1],而肝动脉化的大鼠肝移植模型因更接近生理状态,可更好地模拟人肝移植的病理生理过程而倍受关注,但其操作复杂,尤其是单人操作,任一环节处理不当均会影响受体存活,本研究在传统方法[2,3]上进行改进,简化了手术操作,缩短了手术时间,目的是更好的建立稳定、可靠、有效的大鼠肝移植模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物及分组 健康清洁级 SD 大鼠 160 只(由重庆医科大学动物中心提供),雌雄不论,体重 200~250 g,随机分为供、受体,其中受体体重等于或约大于供体,相差小于 20 g。供、受体术前禁食 12 h,不禁水。

1.1.2 实验器械 双人双目显微镜(上海医疗器械厂),显微外科器械一套、小型腔静脉钳、下腔静脉和门静脉袖套(分别用介入外鞘管 7F、5F 制成,长度为 3 mm)、胆管支架采用一次性硬膜外导管、肝动脉吻合支架采用 24 G 静脉留置针针头牵拉制成、9-0 带线缝合针、自制小拉钩(1.0 克氏针制成)。16 cm 止血钳,组织剪等。

1.2 方法

1.2.1 供肝切取与修整 开放式乙醚持续吸入麻醉,上腹部全横切口进腹,剑突上翻并配以腰桥暴露肝脏,游离肝周韧带,分离门静脉、肝下下腔静脉并顺次结扎幽门静脉、右肾上腺静脉丛。在胆总管靠近十二指肠处置入胆管支架(长约≤5 mm),结扎固定。由腹腔动脉开始分离并分别结扎切断胃左动脉、脾动脉,胃十二指肠动脉,仅保留肝总动脉。在腹腔干上方分离腹主动脉,后置 1 号线备用,向肝下下腔静脉内注入含肝素 500 U 生理盐水 4 ml,预置线在腹腔干上方打结,阻断上段腹主主动脉,迅速穿刺下段腹主动脉,微量泵以

作者介绍:黄德荣(1982-),男,硕士,
研究方向:肝移植基础研究。

通迅作者:吴忠均,男,主任医师,E-mail:zjingjing1011@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(No.30772055);重庆市卫生局科研项目(06-2-017)。

150~100 ml/h 的速度持续泵入 4℃乳酸钠林格氏液共计 20 ml，迅速剪开膈肌，剪断膈上下腔静脉，使灌注液流出，并不时以 4℃生理盐水浇洒肝脏，紧贴左肾静脉上方剪断下腔静脉，结扎并离断左肾静脉、左肾上腺静脉丛后，安装下腔静脉袖套，待肝脏灌注均匀地变为土黄色后，在脾静脉上方离断门静脉，再安装门静脉袖套，在肝总动脉起始处剪一斜口，置入肝动脉支架并结扎固定，在结扎线近端剪断肝总动脉，胆管支架下方离断胆总管，紧贴膈肌剪断肝上下腔静脉，取出供肝，置入 4℃乳酸钠林格氏液中，放入 4℃冰箱。

1.2.2 受体手术 受体术前腹腔注射氯胺酮 5~6 mg，配合乙醚复合麻醉，肝脏游离与供体相似，游离肝下下腔静脉、门静脉分别至右肾静脉、幽门静脉水平，在左右肝管分叉处结扎胆总管和肝固有动脉，近肝脏侧离断，结扎并离断食管与肝的交通支，沿腹腔干分离肝总动脉。止血夹阻断肝下下腔静脉及门静脉血流，进入无肝期，在门静脉分叉处注入生理盐水 2~3 ml 驱出肝脏血液，紧贴膈环上方置入腔静脉钳阻断肝上下腔静脉，紧贴肝脏剪断肝上下腔静脉及肝下下腔静脉，门静脉分叉处离断门静脉，取出受体肝脏，原位置入供肝，自左角开始，连续外翻法缝合肝上下腔静脉，闭合前排尽血管内气泡。暴露第一肝门，袖套法吻合门静脉，松开门静脉止血夹及腔静脉钳，结束无肝期，见肝脏迅速变红。同法吻合肝下下腔静脉。将供体胆管支架置入受体胆总管内结扎固定。在受体肝总动脉近、远端置入动脉夹，在其远端靠近胃十二指肠动脉分叉处剪一斜口，将供肝肝动脉支架置入受体肝总动脉内，结扎固定。松开两端止血夹，见肝动脉迅速充盈，搏动有力，用大网膜覆盖吻合处。检查无活动性出血，胃肠道血运良好，分别用温生盐水、甲硝唑冲洗腹腔后 1 号线连续缝合关腹。手术情况见图 1~4。



图 1 供肝肝动脉的切取（图中所指为肝总动脉，×10）



图 2 供肝的切取与修整后



图 3 受体肝上下腔静脉吻合中



图 4 肝动脉重建后见肝动脉充盈好（图中所指为肝动脉，×10）

1.2.3 术后处理 术后 3 h 灯照保暖，自由进水进食，术后不用免疫抑制剂。

1.2.4 术中、术后观察 术中观察供、受体手术时间，无肝期时间，术后观察精神、饮食、睡眠、大小便、对外界反应等情况，记录 48 h、1 周、1 月死亡率，死后均进行尸体解剖了解死亡原因。

2 结 果

供肝热缺血时间 <30 s，冷保存时间为 40 min。共完成手术 80 例，供体手术时间：(40 ± 3) min，受体手术时间：(50 ± 5) min，无肝期时间：(16 ± 2) min，肝上下腔静脉吻合时间：(6~9) min，肝动脉吻合时间：(2~3) min。术中无死亡，48 h 存活率为 96.3%(77/80)，1 周存活率为 93.7%(75/80)，1 月存活率为：87.5%(70/80)。48 h 内死亡 3 例，死亡原因为：肝上下腔静脉漏血 1 例，肝动脉吻合处漏血 1 例，肝下下腔静脉血栓形成 1 例。1 周内死亡原因为腹腔感染 1 例，胆漏形成 1 例；1 周后死亡原因主要为腹腔感染，胆道并发症及不明原因死亡。

3 讨 论

大鼠肝移植模型是研究肝脏保存、缺血-再灌注损伤、血流动力学、药理学、移植免疫学方面的理想模型[4]。建立大鼠肝移植模型有着重要的意义。多年来，非肝动脉化的大鼠肝移植模型已被认为是标准的建模方式。但近年来的研究表明[5~7]：肝动脉重建可减少肝组织损伤、保护小胆管、甚至提高术后长期存活率。其重要性已被广泛认同，但肝动脉重建难度较大。本研究以“二袖套”法为基础上，并作出相关改良，稳定地建立了该模型，现将建模的技

巧及改良报道如下。

3.1 肝动脉重建

大鼠肝移植模型中重建大鼠肝动脉方法主要有套人式微血管吻合法、袖套法、支架法和缝合法，其中袖套法应用较多，其原理类似于门静脉吻合，但肝动脉细小，且壁厚腔小，不易翻转，对袖套要求高；缝合法即是将供体腹腔干作整段取出，与受体左肾动脉下腹主动脉进行端侧吻合，也有将受体右肾切除后，将供体腹腔干与受体右肾动脉吻合[8]的方法，手术时间长，技术要求高，可出现吻合口漏，血栓形成等并发症；套人式吻合法[9]是将供体肝固有动脉完整套入受体肝固有动脉，操作较缝合法有所简化，但套入后易发生套入处出血，血栓形成等并发症；支架法类似于胆道重建，手术时间短，但易导致血栓形成。一项以袖套法、缝合法、支架法重建肝动脉的比较研究中发现[10]：三种方法在减少胆道并发症方面无明显差异。本研究中在传统支架法[11]上作出改进，在供、受体肝总动脉间进行支架吻合，其优点有：(1)此处血管较粗，可减少血栓形成的发生率，又可减少组织过多分离、减少血管两端张力和减少对受体胃肠道血供的影响等。(2)改进的后的方法采用静脉留置针针头作支架，其壁薄腔大，可保证吻合后肝动脉血流通畅，且该支架质地软，对血管内膜损伤少，可进一步减少血栓形成率，保证肝动脉血供良好。

3.2 供肝的灌注

供肝灌注直接影响供肝的质量，而供肝质量的好坏并不取决于灌注液量的多少，而是灌注是否均匀、缓慢[12,13]。本研究采用微量泵通过腹主动脉进行灌注，一方面有利于控制和调整灌注压力，在灌注开始时，用 150 ml/h 的速度可迅速将肝脏内血液灌出，防止肝内微血栓形成，在灌注后期，用 100 ml/h 的速度作微量灌注，维持供肝一直处于低温、低氧耗状态，可保护肝细胞，提高供肝质量；另一方面，由于灌注前供体腹腔干上方腹主动脉已阻断，灌注液可经腹腔干通过肝动脉灌注，也可经肠系膜上动脉通过门静脉灌注，从而达到双重灌注的目的，与传统方法单一进行门静脉灌注法比较，可提高灌注效果，保证供肝质量。

3.3 受体肝上下腔静脉吻合

肝上下腔静脉吻合是建立大鼠肝移植的关键技术步骤之一，在本研究中采用连续外翻缝合法进行吻合，自左角开始向右缝合后壁至右角，锁边缝合法转至前壁，再沿前壁缝至左角，与第一针的留置线打结，与传统“两点”缝合法[14]，其优点有：(1)缩短缝合时间：可将缝合时间由传统的 12~16 min 缩短至 6~8 min，明显缩短无肝期时间，提高受体存活率；(2)减少并发症：外翻缝合法可保持吻合面光滑，减少血栓形成，但技术难度大，需较长时间的操作锻炼，缝合时需注意血管两端针距，边距对称，否则可导致吻合口狭窄，静脉撕裂等不良后果。

总之，肝动脉化的大鼠肝移植模型建立难度大，对实验者显微外科操作要求高，本研究在作出相关改进后，保证了该模型的稳定性，是一种建立大鼠肝动脉化肝移植模型的理想方法。

参 考 文 献

[1] 高良辉，郑树森.肝脏移植动物实验研究进展[J].国外医学外科学分册，2004，31(1)：39-40.

[2] Kamada N，Calne R Y. A surgical experience with five hundred thirty liver transplantation in the rat[J]. Surgery，1983，93(1)：64-69.

[3] Inoue S，Tahara K，Shimizu H，et al.Rat liver transplantation for total vascular reconstruction，using a suture method[J]. Microsurgery，2003，23(5)：470-475.

[4] 金晓音，楼 琦，萨晓婴，等.大鼠原位肝移植模型建立方法的若干问题探讨[J].中国比较医学杂志，2006，16(12)：760-762.

[5] Steffen R，Ferguson D M，Krom R A.A new method for rat liver transplantation with arterial cuff anastomosis to the recipient common hepatic artery[J]. Transplantation，1989，48：166-168.

[6] Gao W，Lemasters J J，Thurman R G.Development of a new method for hepatic rearterialization in rat orthotopic liver transplantation：Reduction of liver injury and improvement of surgical outcome by arterialization[J]. Transplantation，1993，56：19-24.

[7] Engemann R，Ulrichs K，Thiede A，et al.Value of physiological liver transplant model in rats：Induction of specific graft tolerance in a fully allogeneic strain combination[J]. Transplantation，1982，33：566-568.

[8] 黄新立，张 峰，王学浩，等.建立大鼠部分肝移植动脉化模型的实验研究[J].中国普外基础与临床杂志，2004，11(3)：224-227.

[9] 卢景宁，彭民浩，杨定华.直视下建立大鼠全血供原位肝移植模型[J].广西医科大学学报，2007，24(4)：548-549.

[10] Ma Y，Wang G D，Guo Z Y，et al.Surgical techniques of arterialized orthotopic liver transplantation in rats[J]. Chinese Medical Journal，2007，120(21)：1914-1917.

[11] Steffen R，Ferguson D M，Krom R A.A new method for orthotopic rat liver transplantation with arterial cuff anastomosis to the recipient common hepatic artery[J]. Transplantation，1989，48(1)：166-168.

[12] 陈志宇，张玉君，王曙光，等.小鼠原位肝移植模型建立[J].中华实验外科杂志，2006，23：1261-1262.

[13] 杨占宇，董家鸿，别 平，等.原位肝移植术中肝动脉重建临床研究[J].第三军医大学学报，2001，23(8)：972-973.

[14] 彭 勇，龚建平，刘明忠，等.改进的大鼠原位肝移植术与相关手术技巧[J].重庆医科大学学报，2003，28(6)：778-780.

(责任编辑：冉明会)