基础研究 文章编号:0253-3626(2009)02-0194-03

大鼠慢性移植肾肾病模型的建立

唐亚雄,唐 伟,梁思敏,李家兵,李 杰
(重庆医科大学附属第一医院泌尿外科,重庆 400016)

【摘 要】目的:建立一种简易、实用的大鼠肾移植慢性移植肾肾病(Chronic allograft nephropathy,CAN)模型,为研究肾移植术后慢性排斥反应的发病机理、治疗和预防提供平台。方法:F344 近交系大鼠和 Lewis 近交系大鼠作为供、受体,取供体的左肾作为供肾,在裸眼直视下行供体的下腔静脉与受体肾静脉的端端吻合,供体腹主动脉与受体腹主动脉行端侧吻合,进行原位异体肾移植。术后 10 mg/(kg·d)×10 d 环孢素口服液灌胃,于 4 周后分别观察各受体移植肾组织病理变化情况。结果:手术于 2.5 h 内完成,成功率达 97.50%。移植术后 4 周开始出现移植肾 CAN 的病理改变,12 周可见典型慢性排斥反应病变。结论:该方法手术操作简单、直观,简化了显微外科技术的设备要求,建立了大鼠慢性移植肾肾病模型。

【关键词】肾移植;大鼠;慢性排斥反应;模型
【中国图书分类法分类号】R617 【文献标识码】A 【收稿日期】2008-07-17

Establishment of the rat model of chronic allograft nephropathy

TANG Ya-xiong, et al
(*Department of Urology, the First Affliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To study the pathology, therapy and prevention of the chronic rejection after rat renal transplantation by establishing a simple and feasible allograft nephropathy model. *Methods*: We used Fisher rats as donors and Lewis rats as recipients. After the left kidney of the donors was removed, the inferiorvena of the donor was anastomosed end-to-end with the left renal vein of the recipient, and the donor's abdominal aorta was anastomosed end-to-side with that of the recipient with the unaided eyes to carry out renal allograft in prime position. The recipients were given ciclosporin oral solution10 mg/ (kg·d) by gavage for 10 days after transplantation, and the pathological changes of the recipient's transplant kidney would be respectively observed after 4 weeks. *Results*: The renal allograft in prime position were finished within 2.5 hours, and the achievement ratio was 97.5%. The pathological changes of the transplanted kidney began to appear 4 weeks after transplantation then the chronic rejection could be seen after 12 weeks. *Conclusion*: This method was simple and direct-viewing, and reduced microsurgery equipment, which successfully established rat renal transplantation model of chronic allograft nephropathy.

【Key words】 Kidney transplantation; Rat; Chronic rejection; Model

肾移植慢性移植肾肾病(Chronic allograft nephropathy,CAN) 被认为是影响移植肾长期存活的重要原因,约占移植肾丢失者的 40%[1,2],其具体发病机制尚未阐明,大鼠慢性移植肾肾病模型的建立为研究 CAN 提供了平台。在 20 世纪 60 年代 FISHER 等就有关于大鼠肾移植模型的报道[3],国内在 20 世纪 80 年代初期建立了大鼠肾移植模型。我们在既往研究的基础上,设计了一种在不借助外科显微镜下较为稳定的大鼠肾移植慢性移植肾肾病模型。

作者介绍:唐亚雄(1982-),男,硕士,
研究方向:肾移植。
通讯作者:梁思敏,男,副主任医师,E-mail:lsmgj@163.com。
基金项目:重庆市卫生局科研项目(07-02-042)。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 以 F344 近交系大鼠和 Lewis 近交系大鼠作为供、受体,体重约 180~200 g,饲养于SPF 动物房。

1.1.2 手术器械 显微手术器械,显微手术血管夹,电烙铁,硬膜外导管,医用无损伤缝合线 4-0、9-0 等。

1.1.3 药物 环孢素,水合氯醛,肝素钠,乳酸林格氏液,青霉素等。

1.2 手术方法

1.2.1 术前处理及麻醉 供受体于术前禁食12 h, 常规消毒手术器械。均以 50 g/L 水合氯醛(6 ml/kg)腹腔内注射麻醉。

1.2.2 切取供肾 取 F344 大鼠腹腔注射水合氯醛麻醉,仰卧位将大鼠固定于手术台上,消毒、铺巾,腹部正中大十字切

口入腹。充分暴露左肾、腹主动脉和下腔静脉。于左肾静脉下方寻及左侧输尿管，锐性游离左输尿管直至膀胱。电凝腹主动脉及下腔静脉分支；钝性分离腹主动脉和下腔静脉；以左肾蒂水平面为中心游离腹主动脉和下腔静脉，向上游离约 0.4 cm，向下游离约 1.5 cm，并在游离的下腔静脉和腹主动脉的两端（上、下端）分别放置 4-0 丝线备用。从尾静脉注入含肝素钠（100 μ/ml）生理盐水 2 ml 行全身肝素化。结扎备用线，迅速在下腔静脉剪一小口作为灌注液的流出道，同时在腹主动脉处于前壁剪一开口，插入接 5 ml 注射器的硬膜外麻醉导管，手压灌洗，灌洗液为 0℃～4℃含肝素钠乳酸林格氏液（25 μ/ml），速度约 0.1 ml/s 匀速灌注，直至左肾颜色变苍白及左肾静脉流出液变清晰为止，迅速用冰屑覆盖肾脏。下腔静脉流出道用 9-0 丝线缝 1 针作牵引，插入硬膜外麻醉导管 0.5 cm，支撑腔静脉。以上端结扎处和下端开口处离断腹主动脉及下腔静脉，切取完整的左侧肾、输尿管及膀胱，整体放入盛有 0℃～4℃乳酸林格氏液的自制肾袋内。结束供体手术。

1.2.3 修整供肾 供肾置于盛有 0℃～4℃乳酸林格氏液的自制肾袋内，腹主动脉保留离肾蒂水平约 0.4 cm 的长度，制备一以输尿管口为中心，直径约 0.3 cm 的膀胱瓣。于受者接受移植术前对该供肾进行强化冷缺血处理 1 h。

1.2.4 受体原位肾移植 Lewis 大鼠腹腔注射水合氯醛麻醉，上腹部左正中旁切口入腹。充分暴露左肾、腹主动脉和下腔静脉。电凝切断左输尿管。钝性分离腹主动脉和下腔静脉，长度约 0.5 cm。近肾门处 4-0 丝线结扎左肾动静脉，切除受体左肾。钝性分离左肾动脉和左肾静脉，于肾门下端 1/3 处 9-0 丝线结扎左肾动脉。充分剥离左肾静脉，以便血管吻合。用显微手术血管夹阻断左肾静脉血供，9-0 丝线于左肾静脉断端下悬吊 3 针，剪去残余静脉，找寻左肾静脉管腔，若不明显则用 4℃含肝素钠盐水冲注；同时将肾静脉内血液冲洗干净，9-0 丝线悬吊左肾静脉上、下、左、右 4 点。在裸眼直视下吻合血管。吻合静脉：采取端端吻合。移入供肾，周围放置冰屑降温。吻合供体下腔静脉和受体左肾静脉 4 点，勿打结；将供体下腔静脉内的支架管插入左肾静脉内，上下及右侧缝合线打结、牵引；吻合口右侧壁两结扎牵引线之间分别间断缝合两针，同样方法吻合左侧壁，缝合线不打结，放松缝合线，抽去支架管，再分别将吻合口左侧壁的吻合线打结。吻合动脉：采取端侧吻合。阻断腹主动脉，在腹主动脉偏左侧取一与供肾动脉口径相符的切口，9-0 丝线先固定腹主动脉上下两端，再固定左右两侧，于相邻两固定点间各缝合两针。吻合动静脉时于最后一针打结前用 4℃含肝素钠盐水灌注动、静脉。移除冰屑，将移植肾置入腹腔内；先后开放肾静脉、腹主动脉（先开放腹主动脉下端的动脉夹），观察吻合口有无渗血，如有渗血，可以用棉签在吻合口处轻压 1～2 min；可见移植肾迅速充盈变红，肾静脉充盈、肾动脉搏动明显，观察 2～4 min，输尿管开口即有尿液流出。重建尿路：在受体膀胱顶部做一直径与供肾膀胱瓣大小相当的切口，9-0 丝线两定点间断缝合吻合供体膀胱瓣和受体膀胱。4-0 丝线缝合切口。术毕，据出血情况行尾静脉注射温 5%糖盐水 1～3 ml，置于暖气旁待大鼠清醒。

1.2.5 择期切除受体右肾 受体术后第 10 d，由受体右腹部切口入腹，4-0 丝线结扎右肾动、静脉及右输尿管，切除右肾。术后腹腔内注射青霉素 20 万 U，4-0 丝线缝合腹壁切口。

1.3 术后处理 从受体肾移植术当天开始，腹腔每天注射青霉素 20 万 U 连续 3 d，环孢素口服液灌胃给药 10 mg/(kg·d)连续 10 d。4 周后观察各受体移植肾组织病理变化情况。

1.4 慢性移植肾肾病病理诊断标准：采用 Banff 97 分级诊断标准[4]。

2 结 果

手术训练和技术对照均采用同品系 SD 大鼠，进行 20 次。技术成熟后共进行 80 例手术，手术成功率 97.50%。手术总时间约 150 min，取肾约 20 min，进行移植约 70 min。切取右肾术后第 3 d 存活 77 只，死于移植肾无功能 1 只。于 4 周、6 周、8 周、10 周、12 周取受体移植肾进行病理学检查。术后 4 周移植肾与原肾相比外观、形态和大小均无明显的改变，可见轻度的间质纤维增殖，淋巴细胞和浆细胞的侵润；6～8 周可见明显的单核细胞浸润，血管内膜增厚，肾小球硬化；病变逐渐加重，12 周广泛的间质纤维增殖，肾小球基底膜增厚、硬化、闭塞，肾小管萎缩退化。符合慢性排斥反应病变。

3 讨 论

目前大鼠的肾移植模型动脉吻合法有 Fisher 法[3]或 Fabre 法[5]缝合；静脉吻合法有 Fabre 法[5]缝合、Kamada 套扎法[6]等；以上血管吻合方法对实验设备要求相对较高，操作复杂，而本实验最大的特点是在不借助外科显微镜裸眼直视下完成移植手术，简化了设备要求，训练时间短、操作简单、易于掌握。吻合动脉时虽需阻断腹主动脉，对受体有一定的生理干扰，但通过采取端侧吻合方法，先固定腹主动脉上下两端，再固定左右两侧，于相邻两固定点间各缝合两针，简化了手术操作，缩短了缺血时间，于 20 min 内完成吻合，术后并未出现相应的并发症；静脉吻合并不阻断腔静脉的血流，因此下肢不会发生回流受阻的现象，有利于大鼠的恢复，且不会引起血栓；与传统相比，极大的降低了手术风险；我们在黄赤兵[7]等的一种改良的静脉吻合技术上稍加改进，通过安放血管支架克服了因静脉管壁薄而难以寻找血管吻合口的难题和缝合到对侧静脉壁的顾虑，使操作简

便易行。大鼠肾移植尿路重建有 3 种较常见术式：受体输尿管端端吻合术、供体膀胱瓣和受体膀胱吻合、供体输尿管和受体膀胱浆肌层隧道术；我们采取了供体膀胱瓣和受体膀胱吻合，具有简便实用、省时、易掌握等优点，若采取端端吻合或供体输尿管和受体膀胱浆肌层隧道术则需要外科显微镜，我们简化了对设备的要求，术后仅出现输尿管梗阻 2 例，通过再次尿路重建后未出现梗阻现象。本实验术中移植肾强化冷缺血 1 h，有导致病变形成迅速和特异的优点，与文献[8]所报道的结果相符。术后，我们加强了对大鼠的护理工作。据术中失血情况予以补液，术毕置于暖气旁保暖，进一步提高了移植术后受体的存活率。

大鼠慢性移植肾肾病模型的建立首先要考虑的问题就是大鼠肾移植术后能产生排斥反应，同时为更好的建立大鼠慢性移植肾肾病模型应尽量减轻受体急性排斥反应。为此我们选择了 F344 近交系大鼠和 Lewis 近交系大鼠作为供、受体。MHC 编码的抗原即白细胞抗原(Human leukocyte antigen，HLA)作为移植反应的主要抗原是引发急、慢性排斥反应的根本原因，但 MHC 分子在诱导器官急性排斥方面起的作用更明显[9]，F344 大鼠和 Lewis 大鼠在 MHC Ⅰ类分子和 MHC Ⅱ类分子的基因型上完全相同[10]，进行肾脏移植术后主要产生由非 MHC 分子介导的免疫排斥及非免疫因素所致的移植物损伤反应；此外，根据大鼠的传代其不同品系的抗原系统不同，Lewis 大鼠和 Fisher 大鼠为直属亲属品系，它们的 RT1 3 个位点均为 1，RT2 也均为 a，而 Fisher RT3 为 b，Lewis 为 a，Fisher 大鼠的肾移植于 Lewis 大鼠仅有轻微的急性排斥反应，于 8~12 周后可出现慢性排斥反应[11]，故是目前世界公认研究器官慢性排斥的最佳模型之一。如若进行同系大鼠间的肾移植，主要产生非免疫因素所致的移植物排斥反应，文献报道[12]同系大鼠间肾移植开始出现慢性排斥反应的时间为 24 周，所需时间更长。既往研究发现[13]：在 DA 和 Lewis 大鼠间进行肾脏移植，术后使用环孢素 1 周即可诱导移植物的存活，故我们从受体肾移植术当天开始，环孢素口服液灌胃给药 10 mg/(kg·d)连续 10 d，以抑制早期急性排斥反应的发生；10 d 后在移植肾能够代偿的前提下切取右肾，进一步提高了大鼠的存活率。通过监测受体大鼠移植肾组织病理学改变，移植术后 4 周开始出现移植肾 CAN 的病理改变，12 周可见典型慢性排斥反应病变，证实了此模型符合慢性移植肾肾病病理变化。

该手术模型可以在一般的实验室条件下开展，简单、易行，手术成功率高，是建立大鼠肾移植慢性移植肾肾病模型的理想模型之一。

参 考 文 献

[1] Womer KL, Vella J P, Sayegh MH. Chronic allograft dysfunction; mechanisms and new approaches[J]. Semin Nephrol, 2000, 20(20): 126-147.

[2] Pekka Hayry, Serdar, Joannis Vamvakopolos, et al. Pathology and pathophysiology of chronic rejection[J]. Current Opinion in Organ Transplantion, 2006, 11(3): 296-303.

[3] Fisher B, Lee S Microvascular surgical technique in research, with special reference to renal transplantation in the rat [J]. Surgery, 1965, 58(5): 904-914.

[4] Lorraine C, Racusen, Solez K, et al. The Banff 97 working classificat-ion of renal allograft pathology[J]. Kidney International, 1999, 55(3): 713.

[5] Fabre J, Lin SH, Morris P. Renal transplantation in the rat. Detail of the techniques[J]. Aust N ZJ Surg, 1971, 41(1): 69-75.

[6] Kamada N. A description of cuff technique for renal transplantation in therat. Use in studies of tolerance induction during combined liver grafting[J]. Transplantation, 1985, 39(1): 93-95.

[7] 黄赤兵，吴 军，罗高兴，等. 一种改良的静脉吻合技术用于大鼠肾移植模型的建立[J]. 重庆医学，2002，31(8)：666-667.

[8] Yiping Lu, Weiguo Chen, Youping Li, et al. A new rat model of transplant arteriosclerosis accelerated by I/R injury[J]. Transplant Proc, 2003, 35(1): 184.

[9] Wu GD, Tuan TL, Jin YS, et al. Donor tissue responses to chronic rejection: evidence for persistent antibody injury, endothelial cell activation and difere-ntial expression of extracellular matrix remodel ing enzymes in heart allografts[J]. Transplantation, 2000, 69(4): S348.

[10] Klempnauer J, Steiniger B, Luck R, et al. Genetic control of rat heart allograft rejection: effect of different MHC and non-MHC incompatibilities[J]. Immunogenetics, 1989, 30(2): 81-88.

[11] Tobias C A, Shumsky J S, Shibata M, et al. Delayed grafting of BDNF and NT-3 producing fibroblasts into the injured spinal cord stimulates sprouting, partially Rescues automized red nucleus neurons from loss and atrophy, and provides limited regeneration[J]. Exp Neurol, 2003, 184(1): 97-113.

[12] 严 群，唐迎春，张 鹏，等. 大鼠同系与同种肾移植的慢性排斥反应机制的研究[J]. 中华器官移植杂志，2003，24(2)：100-101.

[13] McGrath JS, Shehafa M. The effect of differing immunosuppres sive regimes on The functional and morphologic changes in a rat venal allograft model of chronicRejection[J]. Transplant Proc, 2001, 33 (8): 2191.

（责任编辑：关蕴良）