维普资讯 http://www.cqvip.com

文章编号:0253-3626(2006)04-0486-03

近交系大鼠心脏移植模型建立的实验研究

兰 纲,杨 康,吴 蔚,李 军,熊 刚

(第三军医大学西南医院胸心外科,重庆 400038)

【摘 要】目的:建立近交系大鼠同种异位腹腔心脏移植动物模型。方法:采用改良的 ono 术式建立 Brown Norway 到 Lewis 大鼠的腹部异位心脏移植,将供心升主动脉、主肺动脉分别与受体腹主动脉、下腔静脉进行端侧吻合。采用分别结扎右上腔和下腔静脉后一次性集束结扎法取心,行端侧血管吻合连续缝合法。结果:共进行了 48 例大鼠心脏异位移植,经过预实验 16 只的技术总结,正式实验 32 只手术成功率为 96.88%,供心冷、热缺血时间和心脏复跳时间明显缩短,手术时间减少至 60min。结论:加强供心的综合保护和围手术期的处理,是移植模型建立的关键因素。

【关键词】近交系大鼠;异位心脏移植

【中国图书分类法分类号】R322;R654.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2006-03-20

Construction of heart heterotopic transplantation model in inbred strain rat

LAN Gang, et al

(Department of Cardiothoracic Surgery,Southwest Hospital,the Third Military Medical University)

【Abstract】*Objective*: To establish the model of inbred strain rat heart heterotopic transplantation. *Methods:*Male Lewis rats were used as recipients and Brown-Norway rats as donors, and the heterotopic transplants were done using ono's method with some modifications. The ascending aorta and pulmonary artery of donor were anastomosed end-to-side to the recipient abdominal aorta and inferior vena cava respectively. *Results:*48 heart transplantations were performed. We summarized surgical technique after sixteen rats of preliminary experiment. The successful rate was improved to 96.88% in 32 rats of formal transplantation.Time of cold ischemia,hot ischemia and rebeat were shorten significantly and operational time reduced to 60 min.*Conclusion:*To strengthen the protection of donor heart and perioperative treatment is the key point in the heart heterotopic transplantation in inbred strain rat.

【Key words】Inbred strain rat;Heart heterotopic transplantation

同种心脏移植术后急性排斥反应的发生及其造成的移植物急性或慢性失供是目前移植免疫学要解决的关键问题之一,大鼠腹腔异位心脏移植模型的建立可以提供一个良好的研究平台。我们的前期实验采用封闭群大鼠(Wistar,SD)作为供受体用以研究移植排斥的机理,因为遗传背景的差异性影响了对实验结果的正确评价,因此建立近交系大鼠异位心脏移植模型变得非常必要,我们的体会是通过加强供心的综合保护和围手术期的处理,减少并发症的发生是移植模型成功的关键。

1 材料与方法

作者介绍:兰 纲(1977-),男,硕士研究生,住院医师,主要研究方向:心脏移植的基础研究。

基金项目:国家自然科学基金(编号:30271246)。

1.1 实验动物和器械

供者为健康近交系雄性 Brown Norway 大鼠,体重为 230~280g,受者为健康近交系雄性 Lewis 大鼠,体重为 250~300g,由第三军医大学实验动物中心提供。显微外科器械(上海手术器械厂),改良 St.Thomas 心脏停跳液(第三军医大学西南医院),XTS-4A 手术显微镜(江苏镇江医疗器械厂),9-0 双针无损伤缝线(上海医用缝合线厂)。

1.2 手术方法

供者、受者均以 1%戊巴比妥钠按 40mg/kg 体重腹腔注射麻醉。手术区除毛,清洁手术。为缩短移植心脏冷缺血时间,我们采用先准备受者至暴露出吻合段血管后再获取供者心脏。

1.2.1 供心摘取

选择供体 Brown Norway 大鼠,取腹部正中切口,经下腔静脉缓慢注入冷肝素盐水(125U/ml) 2ml。2min 待全身肝素化后,切断下腔及腹主动脉完全放血,U 型向上剪开两侧胸壁至锁骨,剪开膈肌并打开心包,胸腔内立即置冰屑,见心脏跳

维普资讯 http://www.cqvip.com

动明显变缓，用自制回型针通过主动脉弓穿刺缓慢注入混合肝素的冷晶体停跳液（改良 St.Thmos 液）使心脏完全停搏至变白为止，整个灌注过程确保心脏不膨胀，3-0 丝线分别结扎并切断右上腔静脉和下腔静脉。分离并暴露主动脉和肺动脉，在无名动脉近端剪断升主动脉，在肺动脉分支近端剪断肺动脉。集束结扎左上腔静脉及所有肺静脉连同部分左房壁，并在其远端切断，心脏置于 0～4℃平衡液中修剪并短期保存（＜5min）准备移植。

1.2.2 受者手术

选择受体 Lewis 大鼠，腹部正中切口，将肠袢推至左侧加以保护并覆盖温盐水纱布。打开后腹膜，在血管鞘外钝性分离暴露腹主动脉和下腔静脉，选择在左肾动脉与髂动脉分支之间为吻合血管，必要时结扎下腔静脉通向背侧的交通支，以避免术中出血、影响视野。在选定血管吻合部位上下偏远处钝性游离腹主动脉与下腔静脉，分别套 0 号丝线，两者相距约 1.0～1.5cm（见图 1）。先阻断下腔静脉，选择偏向下方部位其在前侧壁作一纵形切口，用 25U/ml 肝素生理盐水冲去积血，并用直剪刀扩大开口至稍小于肺动脉口，取供者心脏调整好位置，上下置冰棉片降温，用 9-0 锦纶丝线在下腔静脉壁近心端和供心肺动脉断端靠近主动脉一侧固定一针，先经右侧壁后经左侧壁连续缝合吻合口一圈与原线尾打结，针距 0.5mm，边距 0.5mm。之后结扎阻断腹主动脉，选择腹主动脉前壁略靠上方用尖刀作纵行小口，肝素生理盐水冲去积血后，扩大切口使其略小于供心主动脉直径。使动静脉一定程度上重叠（见图 2）。用 9-0 锦纶线同上述方法将供者心脏升主动脉与受者腹主动脉连续端侧缝合，针距 0.5mm，边距 0.5mm。动、静脉缝合关闭血管前向吻合口腔内注入肝素生理盐水，排除残留空气，吻合全过程每 5min 向冰纱布上滴加冰盐水降温，动脉吻合完毕后，去掉棉片，按先静脉后动脉，依次开放静脉的近心端、远心端，动脉的远心端、近心端，试松开结扎线时观察如有渗血可用棉球压迫，如有明显出血则可再次阻断补针。然后间断放松动脉近端阻断线，同时用棉球轻压心脏，防止心脏过度充盈，37℃盐水复温，1～3min 内，供心即可由细颤、粗颤转为复跳。观察 5min 无出血，将肠管复位，常规腹腔生理盐水冲洗，分 2 层关腹。按出血量皮下注射盐水。

1.3 术后的观察处理

术毕立即将大鼠置于自制 25～38℃恒温箱保温，清醒后自由饮水，并移入笼中单笼饲养，术后前两天加 5% 葡萄糖生理盐水＋维生素 C，之后正常喂食。记录每例供体的冷、热缺血时间，移植心复跳时间，围术期的并发症发生情况。术后每日 2 次视诊及触诊，观察移植心的搏动情况。供心再灌注后颜色鲜红，收缩有力，无心耳过度充盈，无吻合口渗血，供心存活时间超过 72h 视为手术成功[1]。

1.4 统计学处理

数据以均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，用 SPSS11.0 统计软件进行方差分析和 t 检验。

2 结 果

术后移植心收缩有力，搏动幅度较大，心率均慢于受体心率。预实验完成后，总结经验，再进行正式实验。经过加强围手术期的处理，正式实验组 32 只成功率为 96.88%。对比全组供心的冷、热缺血时间和心脏复跳时间显著减少（见表 1），腹主动脉阻断时间明显减少。

3 讨 论

国内研究心脏移植多应用远交系封闭群大鼠，我们建立的近交系大鼠同种异体异位心脏移植模

表 1 大鼠异位心脏移植模型冷、热缺血时间和心脏复跳时间（$\bar{x} \pm s$）

分组	实验数（只）	热缺血时间（min）	冷缺血时间（min）	腹主动脉阻断时间（min）
预实验组	16	2.14±0.38	66.69±5.92	25.00±3.16
实验组	32	1.23±0.29	48.94±5.90	15.63±2.16
		$P<0.01$	$P<0.01$	$P<0.01$

表 2 大鼠异位心脏移植模型手术并发症原因（$\bar{x} \pm s$）

分组	实验数（只）	麻醉意外（例）	吻合口狭窄（例）	供心不能复跳（例）	术后 1～3 天内死亡（例）	成功率（%）
预实验组	16	1	1.	2	2	62.50%
实验组	32	0	0	0	1	96.88%
						$P<0.05$

维普资讯 http://www.cqvip.com

型,可以避免大鼠基因背景不一致导致在一定程度上影响对实验结果的正确评价。应用在研究移植免疫排斥反应机理上有着非常重大的意义。Abbott[2]设计的大鼠腹部异位心脏移植术式,横断了腹主动脉和下腔静脉,易引起截瘫和尿潴留,Ono[3]将 Abbott 术氏的端端吻合改为端侧吻合,不横断大血管,得以广泛的应用。Heron[4]介绍一种不用缝合血管的 cuff 技术,心脏移植于受体颈部的皮下,但其位于皮下易受外力损伤,不宜用于需要长期存活观察的动物[5]。改良 Ono 方法的供心循环途径为:受体腹主动脉→供心升主动脉→冠状动脉→心肌→冠状静脉→右心房→右心室→肺动脉→受体下腔静脉。左心不参与血液循环,无射血功能。移植心处于半休息状态的无负荷异位休眠心,是研究心脏移植排斥的良好模型,实质上是搏动的受者体内异体组织,方便观察。本研究在 Ono 建立的大鼠异位心脏移植模型基础上改良建立的近交系同种异体异位心脏模型,实验的关键在于供心的综合保护和围手术期的处理,我们在实验模型的制备过程中总结了围手术期并发症发生的原因和预防要点,供心保护得到加强,受体动物的耐受性明显增强,使正式实验的手术成功率和稳定性较预实验有了明显的提高,供心平均存活 6.4 ~ 7.6 天。应用近交系大鼠心脏移植动物模型可以为研究移植免疫学及药物筛选的提供一个稳定的理想动物平台。可以在心脏移植实验中广泛推广。

选择健康近交系雄性 Brown Norway 和 Lewis 大鼠作为供者和受者,避免使用封闭群大鼠遗传背景不同影响对实验结果的正确评价。

稳定环境温度和麻醉效果:大鼠在麻醉后体温明显下降,手术应在恒温条件下进行,术中肠管用温盐水纱布保护以保温和减少体液丢失。同时在供心保护时不可避免的要在受体腹腔形成一个低温区,受体体温丢失明显,因此术中术后的温度控制疏忽极可能使受体死亡。手术结束后应将受者置于保温环境中,麻醉药的使用关系手术条件的稳定,戊巴比妥钠量大即可能造成呼吸抑制或骤停,我们使用过程中以 40mg/kg 腹腔注射可以提供满意的麻醉效果,维持至手术结束,并能够在术后 1 ~ 2h 内苏醒。

加强供心保护和吻合技术:良好的供心获取包括先准备好受体待吻合血管后再获取供心,明显的缩短供心冷缺血时间,供者全身肝素化后充分从下腔静脉及腹主动脉放血,开胸后迅速的供心降温、冷晶体停跳液经动脉灌注使心脏完全停搏至变白为止,确保供心停跳和心肌的保护,减少了供者心脏在无氧代谢下的能量消耗。采用分次结扎结合集束结扎,放弃左心耳,避免了术中影响视野且容易扎破导致大出血的可能,心耳损伤也是造成术中出血的原因,加之左房不参加循环,可以减少由此引起的受体血循环减少。吻合技术最大程度关系供心的存活,我们在吻合时做了如下改进:阻断前积压出血管腔内血液,由此可以减少无效血液丢失约 0.1ml,分别阻断下腔静脉与腹主动脉,先行静脉吻合,然后再阻断动脉进行吻合,全过程主动脉阻断时间平均为 15.63min,减少由此引起的截瘫,本实验均无 1 次截瘫出现可证明,间接的增加了受体的存活;连续不间断吻合技术可以提供满意的缝合效果,在两角分别打结固定,确保吻合的严密性。

减少手术时间和受体出血:良好的显微操作技术和应用连续吻合法极大的缩短了手术时间,减少对受体的影响。大鼠全身血液含量约占体重的 7.4%,250g 的大鼠,总血容量约 18ml,出血 1ml 不会有明显的生命危险,出血大于 2ml 面临即刻引起休克或死亡。我们使用的 0 号丝线结扎血管可以避免血管夹对空间的占用,方便操作[6],避免过多的分离受体组织,最大限度的减小受体的损伤,吻合口出血也是术中出血的原因之一。受者血管切口应比供者心脏血管口径稍小一点,可避免打结时因张力过大而撕扯管壁,移植时应用棉片保护供心并在吻合全过程做到对移植心的“不接触”,减少了人为损伤对结果的影响。

[通讯作者:杨康,联系电话:(023-68754183)]

参 考 文 献

[1] 陈振光,孙培吾,李树浓,等.大鼠移植心心电图改变与急性排斥相关分析[J].中山医科大学学报,2001;22(4):245-247.

[2] Abbott CP, Lindsey ES,Creech O,et al.A technique for heart transplantation in the rat[J].Cardiovasc Surg,1964;89:645.

[3] Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats[J].J Thorac Cardiovasc Surg,1969;57(2):225.

[4] Heron I. A technique for accessory cevical heart transplantation in rabbits and rats[J].Acto Pathol Microbiol Scand,1971;79(4):366-372.

[5] 杨光伦,罗诗樵,姚榛祥.改良袖套法建立异种心脏颈部移植模型[J].重庆医科大学学报,2004;29(1):64-65.

[6] 吴 蔚,杨 康,姜 恒.小鼠异位心脏移植模型的建立[J]. 重庆医学,2004;33(12):1777-1778.