DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.24.035

技术方法

文章编号:1000-5404(2004)24-2264-02

改良的大鼠原位肾移植模型的建立

Improved *in situ* kidney transplantation in rats

冯嘉瑜[1],张艮甫[1],黄赤兵[1],张寅生[2],贺伟峰[3],吴 军[3] (第三军医大学:[1]新桥医院泌尿外科,全军肾脏病中心,重庆 400037,[3]西南医院全军烧伤研究所,重庆市器官移植基础研究所,重庆 400038;[2]西安交通大学第一附属医院肾移植中心,西安 710061)

提 要:目的 建立一种术式简单、初学者易于掌握、成功率高的大鼠肾脏移植模型。方法 采用原位肾脏移植术式,动脉采用Fabre方法吻合,静脉吻合使用带支架管的供肾腔静脉与受体肾静脉吻合,输尿管吻合采用输尿管-膀胱瓣与受体膀胱吻合,对侧肾脏切除采用术中留置结扎线,术后3 d结扎的方法。结果 采用新方法建立的大鼠肾脏移植模型,手术时间较经典术式明显缩短,手术成功率明显提高。结论 新方法建立大鼠肾移植模型使该移植模型比较稳定,成功率较高,易于掌握。

随着移植免疫的深入研究,近交系大鼠肾移植模型在动物模型中使用越来越广泛,以前大鼠肾移植术存在手术技巧要求高、血管吻合方法繁杂、模型成功率不高等缺点。本研究综合比较Fisher、Lee、Fabre、Kanada、Stillber等[1~5]大鼠肾移植模型建立,并总结国内一些学者的经验,建立了适应目前研究的大鼠肾移植模型。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 3月龄健康近交系大鼠60只,BN和LEW各30只(雌雄不限),体质量300~350 g。均购自北京维通利华实验动物种子中心(国家级实验动物种子中心)。5月龄Long Evens封闭群大鼠34只,体质量400~450 g,购自第三军医大学实验动物中心。

1.1.2 饲养 第三军医大学实验动物中心(持一级动物饲养合格证)。

1.1.3 手术器材 手术显微镜为江苏镇江中天光学仪器厂生产的XTS-6A手术显微镜;显微手术器械为浙江宁波医用缝针厂生产的外科显微手术器械III-2型,4套;显微手术血管夹10个;电动剃毛器;备皮刀;无损伤缝线9-0和11-0各30包。

1.1.4 药品 1%戊巴比妥钠、肝素、氨苄青霉素、0.9%生理盐水。

1.2 方法

采用改良的Fisher、Lee、Fabre、Kanada、Stillber大鼠肾移植方法。术前晚禁食、禁水、麻醉采用1%戊巴比妥钠(40 mg/kg)腹腔内注射,麻醉后将大鼠固定于手术台上,从阴茎背静脉注入含肝素100 U的生理盐水2 ml。供、受体(均为清洁手术)腹部先用剃毛器脱毛,然后用备皮刀充分剃除体毛,腹部(受者大鼠还需备右侧背部皮肤),腹部切口均采用2.5%碘酒和75%酒精消毒,供者采用腹部大"+"字切口,受者采用剑突至耻骨联合切口。

1.2.1 供肾切取 常规消毒、铺巾,腹部大"+"字切口进入腹腔。把肠管推向右侧,用温盐水纱布覆盖,打开左侧后腹膜,显露供肾及输尿管。仔细结扎肾上腺动静脉,生殖腺动静脉,充分游离肾动静脉和腹主动脉和腔静脉。以输尿管开口为中心切取大小适宜的膀胱瓣,贴近膀胱结扎供者的尿道,对侧输尿管因为有抗返流肌瓣可不用结扎。经腰静脉注入含有100 U肝素的生理盐水2 ml,以血管夹夹闭左肾动脉开口以上的腹主动脉(但是低于右肾动脉开口)并在下腔静脉上剪一小口作为灌注液留出道。用4 ℃含肝素的生理盐水(50 000 U/L)经腹主动脉插管灌注左肾,灌注压力为20~25 mmHg(0.8 ml·g^{-1}·min^{-1}),至左肾颜色变成淡黄色,静脉流出液变清晰为止,一般灌注液用量为10 ml[6]。从腔静脉远心端置入外径为1.5 mm的硬膜外导管,直至膈下的位置,并用0号丝线在腔静脉远端结扎固定该导管。然后用眼科剪剪断膈下的腔静脉和主动脉,供肾下方剪断腹主动脉和远端的腔静脉,将取下的供肾置入4 ℃的肝素生理盐水中备用。

1.2.2 供肾的体外修剪 在4 ℃灌注液中将供肾置入肾袋内,同时修剪多余的腹主动脉(仅保留肾动脉开口附近的腹主动脉3 mm左右),剪去靠近肾静脉开口的近心端多余的腔静脉,并小心剔除多余的脂肪,以利吻合血管[7]。

1.2.3 受体手术 常规消毒、铺巾、简单护皮。开腹后,结扎左肾动脉,近腔静脉处暂时夹闭左肾静脉,于肾门端1/3处结扎肾动脉,然后剪断肾蒂并摘除左肾。静脉吻合:将供体腔静脉近心端内支架管插入受体左肾静脉内,在手术显微镜下用9-0

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30200264),国家自然科学基金重点项目(39934302)
Supported by the National Natural Science Foundation of China (30200264) and the Key Program of the National Natural Science Foundation of China (39934302)
作者简介:冯嘉瑜(1974-),男,四川省南充市人,硕士,医师,主要从事器官移植耐受的基础研究和肾脏移植免疫耐受诱导策略的研究。电话:(023)68774924
通信作者:吴 军,电话:(023)68754006,E-mail:Junwupro@public.cta.cq.cn
收稿日期:2003-10-11;修回日期:2004-03-16

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

针线间断缝合供、受体肾静脉。先缝吻合口右侧壁, 然后调换两端缝线位置将吻合口扭转 180°, 再缝吻合口左侧壁, 每侧缝 5 ~6 针。缝合完毕后抽去支架管, 在供体左肾静脉下缘用 9-0 针线缝扎远端腔静脉。以 Fabre 法[4] 缝合供、受体腹主动脉。缝合完毕后去除肾袋, 再通肾血流。用 9-0 针线连续缝合供、受体膀胱。预置原肾肾血管体外结扎线: 用 1 根 4 号丝线置于右侧原肾肾血管腹侧, 用直针分别将丝线上下端紧贴肾血管上下缘从腰大肌外缘穿出背侧皮肤, 在丝线松弛状态下将两线端在体外打结, 以防线端缩入皮肤, 生理盐水冲洗腹腔后关腹。术毕, 立即给大鼠肌肉注射氨苄青霉素 0.2 g。

1.2.4　术后处理　　原肾肾血管体外延迟结扎: 肾移植术后 3 ~5 d, 在受体活动状态下固定其头尾部, 将其右侧背部结扎线拉紧并打结。结扎后第 3 天剪断结扎线, 剪除其体外部分, 使线端缩入体内。

术后第 3 天再次给予抗生素肌肉注射。术后受体大鼠每日给予环孢素 A(CsA) 6 mg/kg 口饲。

1.3　统计学方法

数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 t 检验和 χ^2 检验。

2　结果

移植手术总共 30 台, 除 1 只受者大鼠因血管夹意外脱落, 导致死亡, 2 只受者大鼠术后结扎右侧肾脏血管 3 d 内死亡, 其余大鼠均存活超过 20 d, 最长存活时间 63 d。手术成功率 86.7%。肾移植手术肾静脉吻合时间平均(9.0±0.50) min, 总手术时间平均(135±27) min。术后作病理检查: 静脉吻合口均无狭窄; 右侧原肾均呈广泛坏死, 移植肾结构正常(表 1)。

经典术式 15 例, 存活 10 例。总手术时间(175±48) min。改良术式受体存活率 90%, 经典术式存活率 66.6%, 两者差异非常显著(χ^2= 19.64, P< 0.01)。

表 1　手术时间对比(min)

手术方法	例数	取肾时间	植肾时间	总共时间
改良术式	29	23±6 *	95±19 *	135±27 *
经典术式	15	25±5	145±24	175±48

t=37.71; 与经典术式比较, *: P< 0.01

3　讨论

自 1965 年 Fisher 等[3] 首次报道吻合血管的大鼠肾移植模型以来, 虽然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。前者因吻合口菲薄的静脉壁相互粘贴而使缝合难度大, 需时长, 易造成吻合口狭窄。后者虽简化了静脉吻合操作, 但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; 另外, 目前技术制作的 Cuff 管内外径相差大, 口径较大的供肾静脉穿过其内腔时很难避免人为狭窄。使用新方法进行血管吻合时, 静脉吻合时间大大缩短, 而且简便、可靠。特别是置入支架管后, 静脉壁被完全撑起, 没有缝合到对侧静脉壁的顾虑。动脉吻合采用 Fabre 连续缝合, 方法成熟, 但是应尽量减少阻断大动脉时间, 否则被阻断动脉的原侧易出现血栓形成, 另外适当的用肝素生理盐水冲洗可以有效的防止血栓的形成。

在使用比较昂贵的近交系大鼠手术前, 先使用了 15 只左右的 Long Evans 封闭群大鼠熟悉手术技巧, 改进手术方法。其中 3 只大鼠, 结扎其双侧肾脏后, 均在 72 h 内死亡。评价肾脏存活的期限一般为 3 d, 如果受体结扎右侧肾脏后存活时间超过 3 d, 证明新移植肾脏开始工作。以前的各种手术方法均是在移植手术当时或术后 5 ~7 d 结扎右侧原肾, 但是术中结扎右侧原肾, 要求移植肾脏必须立即工作, 否则大鼠将死亡。术后 5 ~7 d 进行 2 次手术切除原肾, 虽然避免了上述缺点, 但是受体难免短期内再次遭受手术打击, 也不利于大鼠术后存活。新方法克服了上述两种原肾切除方法的主要缺点, 其方法简便, 创伤很小, 可达到与肾切除同样的效果。我们观察到, 大鼠肾移植后需 3 ~5 d 可恢复正常饮食与活动, 此时结扎原肾肾血管可使对移植肾功能的观察尽早进行。

术后大鼠尸体解剖证实, 使用 CsA 后, 大鼠腹腔感染率大幅上升, 前 15 只受体中共有 6 例腹腔有明显的感染灶, 腹腔感染发生率达到 40%。后 15 只受者在术后第 7 天和第 10 天追加 2 剂抗生素后, 发生腹腔感染的仅为 2 例, 约 13%。使用抗生素可以明显的减低受体感染发生率, 有利于受体的存活, 使移植模型更加稳定。

关键词: 大鼠; 肾移植; 动物模型
中图法分类号: R-332; R699.2　　文献标识码: B

参考文献:

[1] Lee S. An improved technique of renal transplantation in the rat[J]. Surgery, 1967, 61(5): 771—773.
[2] Kamada N. A description of cuff techniques for renal transplantation in the rat. Use in studies of tolerance induction during combined liver grafting[J]. Transplantation, 1985, 39(1): 93—95.
[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] Fabre J, Lim S H, Morris P J. Renal transplantation in the rat: details of a technique[J]. Aust N Z J Surg, 1971, 41(1): 69—75.
[5] Silber S J, Crudop J. Kidney transplantation in inbred rats[J]. Am J Surg, 1973, 125(5): 551—553.
[6] 樊体武, 唐孝达. 大鼠原位肾移植实验动物模型的建立[J]. 长治医学院学报, 1998, 12(3): 161—162.
[7] 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.

(编辑　薛国文)

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net