DOI:10.16016/j.1000-5404.2004.22.029
第26卷第22期 第三军医大学学报 Vol. 26, No. 22
2054 2004年11月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Nov. 2004

论著

文章编号:1000-5404(2004)22-2054-03

肝移植大鼠肠外营养模型的建立与评价

马正伟[1],刘利东[2],李 昆[1],张玉君[1],陈利均[1],董家鸿[1] ([1]第三军医大学西南医院全军肝胆外科研究所,重庆 400038;[2]解放军第141医院外二科,青岛 266100)

提 要:目的 建立稳定的肝移植大鼠全肠外营养(TPN)模型。方法 以二袖套法进行大鼠原位肝移植,并采用改制的代谢笼及输液保护架,术后6 h从右颈外静脉给予含中长链脂肪乳剂的TPN,观察其大体情况及7 d存活率、肝功能、移植肝组织学改变。结果 30例肝移植大鼠TPN支持后7 d存活率86.7%(26/30),光镜检查肝细胞无坏死,电镜检查线粒体结构完整。结论 本实验所建立的大鼠肝移植TPN模型稳定、重复性好、易于操作。

关键词:肝脏移植;大鼠;肠外营养;动物模型
中图法分类号:R332;R459.3;R657.3 文献标识码:A

Establishment and assessment of TPN model in rats with liver transplantation

MA Zheng-wei[1], LIU Li-dong[2], LI Kun[1], ZHANG Yu-jun[1], Chen Li-jun[1], DONG Jia-hong[1] ([1]Institute of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038; [2]Department of General Surgery, No. 141 Hospital of PLA, Qingdao 266100, Shandong province, China)

Abstract: Objective To establish a stable model of total parenteral nutrition (TPN) in rats with liver transplantation. Methods Orthotopic liver transplantation was performed and the portal vein and hepatic inferior vena cava were reconstructed by the cuff technique in rats. TPN was given with modified tube and retainer at 6 h after operation. The 7-day survival rate, liver function, and pathological changes of the liver were observed. Results The animal survival rate was 86.7% (26/30). Light microscopy and electron microscopy showed that the morphology of hepatocytes and mitochondrion was normal after TPN for 7 d. Conclusion The model of TPN in rats with liver transplantation established in this study is stable, reproducible, and easy to operate.

Key words: liver transplantation; rat; total parenteral nutrition; animal model

肝脏移植已成为治疗终末期肝病的惟一有效手段,针对此类病人的合理营养支持十分必要。但是,由于缺乏相关的系统研究,目前尚没有标准的营养支持方案,而建立合适的动物模型是进行实验研究的必要前提条件。因此,本研究的目的是建立稳定的大鼠肝移植TPN模型,为进一步深入进行肝移植后的营养支持研究奠定基础。

基金项目:国家杰出青年科学基金海外青年学者合作研究基金资助项目(30228030),第三军医大学青年科研基金资助项目(2002)
Supported by the National Science Fund for Young Distinguished Scholars (30228030) and the Scientific Research Fund for Young Scholars of Third Military Medical University (2002)
作者简介:马正伟(1972-),女,山西省山阴县人,博士研究生,助理研究员,主要从事生物化学和营养方面的研究 电话:(023)68765308
通信作者:董家鸿,电话:(023)68754168,E-mail:jhdong@hbsky.com.cn
收稿日期:2004-04-13;修回日期:2004-10-05

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

封闭群雄性SD大鼠78只,购自上海西普尔-必凯实验动物有限公司,体质量220~240 g,1周后进行实验。采用随机数字表法,取6只大鼠作为正常对照(NC)组,余随机配对行肝移植手术,选体重较小者为供体,体重较大者为受体。术后6 h,随机选取6只肝移植大鼠作为肝移植后对照(TC)组;另30只肝移植大鼠行TPN支持(TPN组)。NC及TC组大鼠于术后6 h处死。

1.2 主要仪器设备及试剂

1.2.1 仪器及试剂 XTS-4A型双人双目手术显微镜(镇江光学仪器厂);SSW-3型显微外科手术器械包(上海手术器械厂);YBWZ-12型微量注射泵(上海三峰爱德华电气公司);20%力能中长链脂肪乳(250 ml),水乐维他,安达美,维他利匹特(华瑞制药公司);10%18-F复合氨基酸(250 ml)(天津天安药业)。

1.2.2 代谢笼改制及输流保护架制备 参照文献[1],对管

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

道及保护装置加以改进。将代谢笼顶面中间两根铁丝用尖嘴钳弯成直径为 1.5 cm 的圆形。截取直径 2.7 cm 壁厚 0.1 cm 的铜管 2.0 cm, 两端扩为喇叭口状, 将铜管嵌于代谢笼顶的铁丝圆弧中。截取 25 cm 2 000 W 的电炉丝制作输液保护架, 将其一端 3~4 个螺纹修整为喇叭口状。消毒过的人体硅胶管一端与微量注射泵的注射器延长管相连, 另一端经保护架由喇叭口穿出, 胶布固定。

1.3　肝移植大鼠 TPN 模型制作

1.3.1　二袖套法肝移植　　供、受体大鼠术前均禁食 12 h, 不禁水, 术前称重。腹部以 8% Na_2S 脱毛, 术野碘伏消毒, 持续吸入乙醚麻醉。供体取上腹部横切口, 切取供肝, 于 4 ℃乳酸钠林格氏液中进行门静脉及肝下下腔静脉袖套安装。受体取腹部正中线切口, 记录肝移植各步的手术时间及无肝期。肝移植完成后, 用 4 ml 空针斜行刺入右肾静脉水平以下肝下下腔静脉, 缓慢推注 5% 碳酸氢钠和生理盐水混合液(1∶7) 1 ml, 拔针后以干棉签轻压 1~2 min, 关腹。保暖至苏醒, 禁食水。

1.3.2　TPN 输液管道的插入及固定　　肝移植术后 5.5 h, 将大鼠再次乙醚麻醉, 于背部平肩胛处脱毛消毒。仰卧固定四肢, 右颈部脱毛消毒。由下颌至锁骨上缘纵形切开右颈部, 分离右颈外静脉, 远端结扎。以硬膜外穿刺针引导硅胶管由右颈外侧皮下至背部脱毛处穿出, 排净输液管内气体。夹闭右颈外静脉近端, 切开后插入硅胶管约 4~5 mm 深结扎固定, 缝合右颈部皮下组织及皮肤。翻转大鼠, 以 7 号线将保护架喇叭口最远端的螺圈于大鼠后背皮肤上缝合固定。

1.3.3　术后处理　　大鼠放入代谢笼内, 保护架及输液管道由铜管内穿出, 在笼外保护架中上 1/3 处加 20 ml 注射器针头护套, 用胶布"十"字形固定。橡皮条悬吊保护架外连接于微量输液泵。术后 6 h 开始输液。术后保温 12 h, 实验期内禁食水, 肌注青霉素 1×10^5 U/d。大鼠观察室温度为 20~23 ℃, 光照时间 8:00~20:00。

1.4　TPN 液体配制方案

参照 TAO[2] 及李可洲[3] 大鼠 TPN 输液方案, 重新设计, 于无菌操作台上配制入 3 L 袋中, 置 4 ℃冰箱存放, 配方见表 1。术后 6 h 以 8.9 $ml\cdot kg^{-1}\cdot h^{-1}$ 速度输入, 此 TPN 液提供非蛋白热量为 741.8 $kJ\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$, 输入氮量 1.5 $g\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$, 非蛋白热量∶氮= 494.5 kJ∶1 g, 糖脂供能比 6∶4。

表 1　肝移植大鼠 TPN 液体配方 (ml)

Tab 1　Components of TPN solution for rats with liver transplantation (ml)

Components of TPN	Volume
20% Lipovenoes MCT	188
50 % glucose	266
10% amino acid(18-F)	536
10% Sodium chloride	35
10% Potassium chloride	15
10% Calcium gluconate	10
Soluvit N	10
Vitalipid N	2
Addamel N	10
Total	1 072

1.5　检测指标及方法

1.5.1　一般情况　　观察肝移植大鼠 TPN 期间精神、活跃程度、体毛变化。术后 7 d 存活率以及手术并发症、TPN 管道并发症。

1.5.2　肝功能　　7 d 存活大鼠 TPN 停止 2 h 后活杀收取血液标本, 检测血清 ALT、AST、TBIL。

1.5.3　肝脏组织学变化　　7 d 存活大鼠停止 TPN 2 h 后活杀收取肝脏标本, 一部分 10% 甲醛固定, 常规石蜡包埋切片, HE 染色, 光镜观察, 另一部分用经 2% 戊二醛预固定, 制作常规超薄切片, 行电镜观察。

1.6　统计学处理

结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 采用 SPSS 10.0 进行单因素方差分析。

2　结果

2.1　肝移植大鼠 TPN 模型主要手术步骤时间

24 例大鼠原位肝移植手术供肝切取时间(16.8±1.1) min, 肝脏修整及双袖套置入时间(14.1±1.9) min, 无肝期为(13.0±1.6) min, 大鼠肝移植手术总时间为(70.7±5.8) min, TPN 管道置入时间(17.3±1.4) min。

2.2　术后 7 d 存活率以及手术并发症, TPN 管道并发症

共行肝移植大鼠 TPN 治疗 30 例, 死亡 4 例, TPN 模型 7 d 存活率为 87.5%。2 例因手术后出血死亡, 1 例因术后 TPN 致肺水肿于术后 3 d 死亡, 另 1 例于 4 d 时管道发生漏液至皮下水肿感染, 于术后 5 d 死亡。TPN 管道并发症 2 例, 均为右颈外静脉下段血管壁穿孔引发皮下漏液致皮下水肿, 其中 1 例死亡, 另 1 例 3 d 时皮下漏液, 发现后于左侧颈外静脉再次重新插管后存活至 7 d。未见 TPN 管道脱落、阻塞等其它管道并发症。

2.3　大体情况

肝移植大鼠术后即清醒、站立。TPN 插管麻醉清醒后大鼠可自由活动, 有撕咬保护架行为。1、2 d 时大鼠精神软, 耳、尾略显苍白, 活动减少, 皮毛略显杂乱, 3 d 后开始逐渐恢复, 活动量增加, 觅食要求明显, 均未见明显的黄疸。7 d 时大鼠精神好, 体毛整齐。

2.4　大鼠肝功能的变化

见表 2。

表 2　TPN 肝移植大鼠肝脏功能的变化 ($\bar{x}\pm s$)

Tab 2　Effects of TPN on hepatic function of rats with liver transplantation ($\bar{x}\pm s$)

Group	ALT(U)	AST(U)	T BIL(μmol/L)
NC	50.00± 11.21	436.33± 69.57	2.07±0.35
TC	1061.83±150.25 *	623.00±185.23 *	2.93±0.57 *
TPN	57.00± 8.22△	423.60± 38.55△	2.16±0.25△

*: $P<0.05$, *vs* NC; △: $P<0.05$, *vs* TC

2.5　肝移植大鼠 TPN 肝脏病理及超微结构改变

TPN 7 d 后大鼠肝脏无明显坏死, 肝小叶形态正常, 未见空泡变性及水样变, 汇管区胆管增生, 伴中度淋巴细胞浸润。TPN 7 d 后肝细胞内糖元较多, 线粒体发达, 结构完整。粗面内质网

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

发达，排列整齐；核膜完整，核无固缩。

3 讨论

本研究中30例肝移植大鼠术后TPN 7 d存活率为86.7%。以往研究报道肝移植后大鼠自由进食1周存活率为83%～88%[4～6]，与我们的实验结果较接近，表明与自由进食的大鼠相比，肝移植后行TPN对大鼠的短期存活没有明显差异。术后大鼠可自由活动，经TPN支持治疗后精神好，体毛整齐无脱落；仅2例发生了管道并发症。术后6 h肝功能指标显著升高，但经7 d TPN后恢复至正常；未见明显的免疫排斥反应及其它病理改变，表明此模型可用于肝移植后营养支持研究。

在模型建立中，快捷高质量完成移植手术是大鼠长期耐受TPN支持的第一步；代谢笼加工、保护架制备、TPN管道选择，插管及固定技巧也是TPN成功关键所在。

3.1 快速、高质量的大鼠原位肝移植

主要是术中双人配合操作技巧以及采用胆管支架吻合胆管。此外，我们对肝移植后的补液方式进行了改进。肝移植大鼠的补液多于关腹后由大鼠尾静脉或阴茎背静脉补液[7,8]，但我们发现肝移植术后尾静脉及阴茎背静脉穿刺成功率均不高。我们在术后关腹前，由肝下下腔静脉直接注射补液，成功率100%，无1只大鼠因此而出血死亡。

3.2 代谢笼的加工及保护架的制备

大鼠输液装置多经颈外静脉插管，因大鼠颈外静脉较粗[9]。插管由颈部经皮下隧道引至背部穿出连接输液泵。保护装置一般分为三个部分：①固定管道在大鼠背部引出部分；②由大鼠背部到代谢笼顶部的部分；③管道穿出代谢笼部分。

大鼠背部管道的固定问题得到了较好的解决[10,11]，但代谢笼顶至大鼠背部的管道部分仍得不到良好的保护；用电炉丝制作保护架[1]，笼内管道及保护架经代谢笼顶部轴承空出，有较好的保护作用，但仍有不足。我们改良后的代谢笼及保护架具以下优点：①在牢固固定管道的同时，可以全程有效保护笼内的管道部分。②代谢笼顶端嵌入口径较大的铜管，保护架可在其中自如滑动，大鼠在代谢笼周边活动也不会受束缚。③于笼外保护架中外1/3处加横挡，大鼠不能将代谢笼外管道拖入笼中，保护了笼外管道部分。④保护架外管道以橡皮条悬吊，可防止扭曲或脱入笼内被咬断；在减轻保护架对大鼠背部压力的同时，也使保护架始终位于中间位置，便于大鼠在笼内活动，有效解决了TPN支持后期大鼠习性暴躁将保护架拖入代谢笼中撕咬的问题。

保护架的制作需注意以下几点：取弹性较佳的2 000 W电炉丝截取25 cm长度，不再拉伸以防失去弹性并使大鼠不能于螺纹间咬到管道；远端只将断端整齐即可，近端3～4螺纹拉成喇叭口状，一可使力距延长，固定于大鼠背部后不易扭动；二可使4条固定线间距增加，不至滑在一起而失去固定作用。

铜管加工的要点是：①两端扩为喇叭口状，可使其嵌入固定于代谢笼顶部的两弧形铁丝间。②口径大利于大鼠在笼周边活动，口径过小会造成大鼠在笼周围活动时，保护架滑动不畅。

3.3 TPN管道处理及插管、固定技巧

大鼠TPN插管不宜太粗或太细，过细易脱落，过粗易穿破血管前端。TPN插管断面应为横断，不应为斜面，用1 000目细砂纸打磨光滑，避免出现毛刺；插管时右颈外静脉不宜分离太干净，因血管周围组织过少结扎线固定时易滑脱；插入深度以5～7 mm为佳。

综上所述，本实验所建立的肝移植大鼠TPN模型是一种稳定、经济、重复性好的肝移植后营养支持研究的小型动物模型。

参考文献：

[1] 彭 曦，汪仕良，谭银铃，等. 大鼠静脉输液装置的设计和制作[J]. 第三军医大学学报，1999，21(7)：532－533.

[2] Tao R C，Yoshimura N N，Chinn I B，*et al*. Determination of intravenous non-protein energy and nitrogen requirements in growing rats[J]. J Nutr，1979，109(5)：904－915.

[3] 李可洲，李 宁，黎介寿，等. 短链脂肪酸对大鼠移植小肠作用的研究. 肠外与肠内营养[J]. 2000，7(3)：159－161.

[4] 胡 浩，陈易人，李 纲，等. 100例大鼠原位肝移植[J]. 肝胆外科杂志，1999，7(3)：225－226.

[5] 王 轩，杨甲梅，严以群，等. 大鼠原位肝移植不同术式的探讨[J]. 中华器官移植杂志，1998，19(2)：76－78.

[6] 谢学羿，陈规划，黄洁夫，等. 二袖套法建立大鼠原位肝移植模型的初步体会[J]. 肝胆外科杂志，1999，7(6)：468－469.

[7] 曾琪华，孙君泓，吴孟超，等. 三袖套法原位肝移植[J]. 中华器官移植杂志，1989，10(4)：159－161.

[8] 刁同进，姚晓平，季 兵，等. 三袖套法金黄地鼠至大鼠肝移植模型术式改进及并发症预防措施[J]. 肝胆胰外科杂志，1998，10(2)：100－103.

[9] 陈国钧. 常用实验动物的解剖及生物学特性[A]. 陈国钧主编. 实验外科学[M]. 合肥：安徽科学技术出版社，1991：37.

[10] Cox C E，Beazley R M. Chronic venous catheterization：a technique for implanting and maintaining venous catheters in rats[J]. J Surg Res，1975，18(6)：607－610.

[11] 花天放，蔡祝辉，周嘉良，等. 大鼠长期静脉喂养的输液技术[J]. 上海医学，1984，7(2)：116.

（编辑 薛国文）

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