



doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.010  
http://dx.doi.org/10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.010  
Chinese Journal of General Surgery, 2015, 24(7):970-974.

· 基础研究 ·

## 小体积肝移植大鼠模型的技术要点和改进

张斌, 韩正祥, 温泉, 李向农, 王人颢

(徐州医学院附属医院肝胆外科, 江苏徐州 221004)

### 摘要

**目的:** 建立稳定的大鼠 30% 小体积肝移植模型。

**方法:** 采用体质量相近雄性 SD 大鼠, 分别采用体内切除肝脏左叶、中叶, 保留尾状叶、右叶和三角叶获取小体积供肝, 采用“二袖套”法植入肝脏, 测定供肝占全肝湿重比率以及观察术后 2、7 d 生存率。

**结果:** 共完成 80 例大鼠小体积肝移植模型; 供肝重 ( $4.02 \pm 0.64$ ) g, 全肝重 ( $11.84 \pm 1.36$ ) g, 供肝占全肝湿重比率为 33.81%, 95% 可信区间为 33.22%~34.40%。受体 2、7 d 生存率分别为 84%、66%, 死亡原因主要为腹腔出血、胆汁漏、腹腔感染、慢性供肝失功能、肺部感染等。

**结论:** 采用切除肝脏左叶和中叶的方法可以尽可能地减少残存无功能肝脏, 保留的肝叶重量比率接近 30%, 可以稳定地建立小体积肝移植模型。

### 关键词

肝移植; 模型; 动物; 大鼠

中图分类号: R657.3

## Technical essentials and improvements for reduced-size liver transplantation model in rats

ZHANG Bin, HAN Zhengxiang, WEN Quan, LI Xiangnong, WANG Renhao

(Department of Hepatobiliary Surgery, the Affiliated Hospital, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221004, China)

### Abstract

**Objective:** To establish a stable 30% reduced-size liver transplantation model in rats.

**Methods:** Using male SD rats of similar weight, the reduced-size grafts were obtained by resecting the hepatic left and medial lobe in vivo, with preservation of the caudate, right and triangle lobe of the liver, and liver implantation was performed by two-cuff technique, respectively. The wet weight ratio of graft to the entire liver was determined, and the 2- and 7-d post-implantation survival rates were observed.

**Results:** A total of 80 reduced-size liver transplantation rat models were created. The wet weight of graft and entire liver was ( $4.02 \pm 0.64$ ) g and ( $11.84 \pm 1.36$ ) g respectively, and the wet weight ratio graft to entire liver was 33.81%, with the 95% confident interval of 33.22% to 34.40%. The 2- and 7-d post-implantation survival rate of the recipient was 84% and 66% respectively, and the main causes of death included abdominal hemorrhage, bile leakage, abdominal infection, chronic liver graft dysfunction, and pulmonary infection.

**Conclusion:** The method of resecting left and middle lobe can maximally reduce the non-functional remnant liver, with weight ratio of remnant liver to entire liver approximating to 30%, by which the stable reduced-size liver

基金项目: 江苏省卫生厅医学科技发展基金资助项目 [(2009) 15 号]。

收稿日期: 2015-03-26; 修订日期: 2015-06-02。

作者简介: 张斌, 徐州医学院附属医院主治医师, 主要从事普外科肝胆外科方面的研究。

通信作者: 王人颢, Email: drwangrenhao@163.com

transplantation model can be established.

**Key words** Liver Transplantation; Models, Animal; Rats

**CLC number:** R657.3

随着肝移植的迅猛发展,供肝短缺问题变得越来越突出,建立与临床上情况相似的小体积肝移植动物模型是开展相关实验研究的基础。大鼠小体积肝移植模型是目前实验研究中应用较多的动物模型,Kamada的“二袖套法”是大鼠肝移植领域使用非常广泛的技术<sup>[1]</sup>。本研究在对大鼠肝脏解剖深入研究的基础上,结合Kamada的“二袖套法”<sup>[2]</sup>,建立一种稳定可靠的大鼠30%小体积肝移植模型。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料与相关准备

清洁级雄性SD大鼠160只(上海斯莱克实验动物有限责任公司),体质量270~320 g,选取体质量相近的老鼠配对作为供体和受体(体质量误差 $\pm 10$  g),术前自由进食饮水。门静脉和肝下腔静脉袖套管分别采用型号为6 F和8 F的动脉穿刺套管的外鞘制成。套管体长3 mm,夹持柄长1.5 mm,管壁预先烙制槽纹以防结扎线滑脱。硬膜外导管制成胆管支架管(长5 mm,外径1 mm)。门静脉和下腔静脉结扎线用6-0普通丝线,其余结扎线为5-0普通丝线,肝上下腔静脉吻合用6-0带针缝合线,结扎肝脏组织用5-0锦纶线。手术为非显微镜下操作。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 供体手术** 戊巴比妥 45 mg/kg 腹腔注射麻醉,麻醉成功后供体取仰卧位,四肢以橡皮筋妥善固定,腹部备皮,碘伏消毒后,大十字切口进腹。将肠管推向左侧腹腔外,以温盐水纱布覆盖保护,充分显露腹腔手术野。游离并穿刺左腰背静脉,注入 4 ℃ 含 100 U 肝素的生理盐水 1 mL 后,结扎穿刺点,使供体肝素化。由镰状韧带开始按照顺时针方向游离肝脏。首先游离剪断镰状韧带至肝上下腔静脉水平,剪开部分左侧冠状韧带,分离出左膈下静脉,并以 6-0 带线缝合针缝合结扎。充分分离左侧冠状韧带后,将肝脏左叶轻推向右侧,暴露左肝食管支血管,以 5-0 丝线结扎后切断,游离左侧韧带至肝上下腔静脉。剪开肝胃韧带、左叶

和尾状叶之间韧带后,打开尾状叶后叶前面韧带,提起胃壁,剪开胃脾韧带,自胃后方剪断尾状叶后叶和胃壁之间韧带,这样可以最大限度地减少钳夹、挤压尾状叶后叶。游离出胆总管,肝动脉,门静脉,使肝十二指肠韧带“脉络化”。距胆管汇合开口 5 mm 处切口插入硬膜外导管作为支架管,导管插至距胆管汇合处约 1 mm,以 6-0 丝线双重结扎固定。游离幽门静脉,6-0 锦纶线自幽门静脉开口处结扎。以显微剪打开肝下腔静脉前腹膜,沿静脉壁锐性分离,使用显微镊将肝下腔静脉后壁分离,然后游离右肾静脉,使肾静脉和肾动脉分离。剪开肝脏右侧韧带至肝上下腔静脉后,6-0 丝线结扎右肾上腺血管,肝脏游离完成。在第一肝门以显微镊钝性分离并带线结扎阻断左叶、中叶肝蒂的入肝血流和胆管,此时可立即观察到左叶和中叶因缺血变为灰色(图 1A)。以 5-0 丝线自左叶肝蒂处结扎,并切除左叶。在肝中叶左、右肝静脉开口交叉点上方约 1 mm 处,以显微镊自肝膈面钝性分离穿刺,平行于肝中叶左右分叉处,自中叶脏面近第一肝门处穿出,以 2 根 5-0 锦纶线带线,首先结扎左中叶,分离右中叶附着于下腔静脉的肝脏组织至肝静脉开口处,结扎右中叶,然后切除中叶(图 1B),操作过程中应避免肝上下腔静脉扭曲、狭窄,切除的肝脏左叶和中叶一同称重。自腹主动脉插管固定后,迅速打开右侧胸腔,以血管钳阻断胸主动脉,然后于肝下腔静脉和左肾静脉汇合处剪开静脉壁放血,开始肝脏灌注(灌注液为 4 ℃ 含 12.5 U/mL 的乳酸林格氏液,控制滴速 45~50 滴/min,灌注总量约 20~25 mL)<sup>[3]</sup>;以 6-0 锦纶线自右肾静脉开口处结扎,沿肝上下腔静脉剪开膈肌,紧贴膈肌剪断上腔静脉。分别剪断肝下腔静脉放血处、右肾静脉和右肾上腺血管、幽门静脉,以 6-0 锦纶线结扎肝动脉后剪断。肝脏变为土黄生色后,自脾静脉开口处剪断门静脉,冲洗肝脏,肝脏称重后置于 0 ℃ 乳酸林格氏冰水混合液中,然后一起放入 4 ℃ 冰箱中保存待用。

**1.2.2 修肝** 修肝在 0 ℃ 冰水混合液中进行。摆正肝脏,以两把显微镊提起膈肌环两角拉平,沿膈肌环剪除多余上腔静脉和膈肌肌性部分。翻转肝

脏，剔除门静脉和肝下下腔血管壁附着的结缔组织，以免影响套管后血管腔内径。一把显微镊夹持预制好的 8 F 肝下下腔静脉套管柄，三把显微镊夹持血管口，使之成为等边三角形，右肾静脉结扎线对准三角叶下边缘，翻转并调整血管壁，使血管内

径最大化，6-0 丝线妥善结扎固定（图 1C）。以类似方法门静脉安置 6 F 套管，幽门静脉结扎线向三角叶相反方向对准。供肝置于 0 °C 乳酸林格氏冰水混合液，然后一起放入 4 °C 冰箱中保存待用。

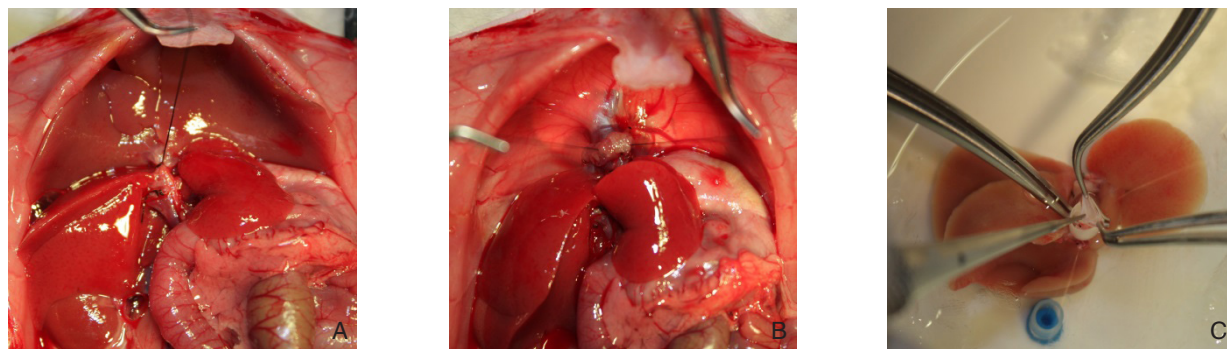


图 1 供体手术 A: 结扎左叶和中叶肝蒂; B: 切除左叶和中叶; C: 修整供肝

Figure 1 Donor operation A: Ligation of the hepatic pedicle of the left and middle lobe; B: Resection of the left and middle lobe; C: Liver graft trimming

1.2.3 受体手术 氯胺酮 80 mg/kg 腹腔注射麻醉。麻醉成功后受体取仰卧位，备皮，皮肤碘伏消毒，腹部正中切口进腹，两侧拉钩暴露手术视野。以 1 把血管钳钳夹剑突向大鼠头侧翻转，按照顺时针方向游离肝脏。剪断肝镰状韧带至肝上下腔静脉，以 6-0 带线缝合针缝扎左膈下静脉，游离左侧冠状韧带后，以 5-0 丝线结扎并切断左肝食管支血管。游离左侧韧带至肝上下腔静脉。剪开肝左叶和尾状叶间韧带，并游离出尾状叶后叶，以两块湿纱布分别遮盖肝脏脏面和肠管，充分暴露手术野。游离胆管汇合处，以 5-0 丝线结扎后切断胆总管，避免过多游离胆总管以免影响胆管血供。显微剪锐性分离肝下下腔静脉在右肾静脉平面以上部分，然后钝性充分游离出肝下下腔静脉后壁，以利钳夹阻断和套管。剪断肝脏右侧韧带后，以 5-0 丝线结扎右肾上腺血管。最后分离出肝动脉，以 6-0 丝线妥善结扎后切断。游离门静脉至幽门静脉水平，受体肝脏游离完毕。4 °C 冰箱中取出供肝，膈肌环两侧角分别以 6-0 带线缝合针缝合固定。以显微血管夹夹闭门静脉和肝下下腔静脉，无肝期从夹闭门静脉开始计时。含 25 U 肝素的乳酸林格液 2 mL 自门静脉穿刺注入驱除肝脏内血液后，棉签托起肝上下腔静脉后壁，Satinsky 钳钳夹阻断肝上下腔静脉，钳柄用橡皮泥固定。剪断肝上下腔静脉，

然后在门静脉分叉处剪断门静脉，保留少许肝脏组织剪断肝下下腔静脉，移去受体肝脏（图 2A）。将供肝置于腹腔内，两定点法吻合肝上下腔静脉，需要注意的是，由于是保留膈肌环的血管吻合，后壁采用连续外翻缝合，缝合时血管两吻合端尽可能少缝组织，避免缝合距离过远撕裂菲薄的静脉壁；前壁采用单纯连续缝合，避免用力牵拉以免撕裂血管（图 2B）。吻合完毕打结前用含 12.5 U/mL 肝素的乳酸林格液冲洗管腔，排除空气泡。松开门静脉血管夹放血后，血管夹向后移至幽门静脉处，夹持供肝门静脉套管柄，拉开受体门静脉，以含 12.5 U/mL 肝素的乳酸林格液冲洗管腔，排除空气泡后，将受体门静脉和袖套管放入腹腔内的水中，迅速将供肝门静脉套管置入受体门静脉腔内，应使血管壁和套管平行不扭曲，5-0 丝线环扎固定。开放门静脉血管夹后，打开移去 Satinsky 钳，无肝期结束，可见肝脏颜色迅速变红，肠管淤血减轻；同样方法完成肝下下腔静脉套管，开放下腔静脉血管夹；受体胆管侧壁剪一小口，将供体胆管支架管插入，6-0 丝线环扎固定后与供体结扎线打结固定（图 2C）。检查无出血，以温生理盐水冲洗腹腔，分两层关闭腹腔。单笼饲养，自由进食水，不用免疫抑制剂及抗生素<sup>[4]</sup>。

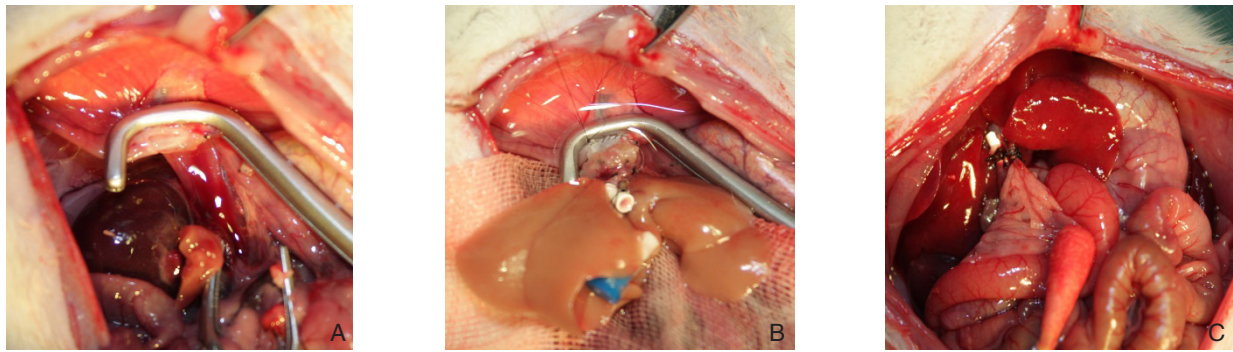


图2 受体手术 A: 切除受体肝脏; B: 肝上下腔静脉吻合; C: 血管胆管吻合完毕

**Figure 2 Recipient operation** A: Removal of the liver from the recipient; B: Anastomosis of the suprahepatic inferior vena cava; C: Completion of anastomosis of the vessels and bile ducts

### 1.3 统计学处理

供肝湿重和全肝湿重分别用均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 供肝占全肝湿重比率用点估计加95%可信区间 (CI) 表示, 数据采用SPSS 16.0统计软件进行分析。

## 2 结果

80例雄性SD大鼠小体积肝移植, 供肝重 ( $4.02 \pm 0.64$ ) g, 全肝重 ( $11.84 \pm 1.36$ ) g, 供肝占全肝湿重比率为33.81%; 95%可信区间为: 33.22%~34.40%。供体平均手术时间为 ( $35 \pm 3$ ) min, 修肝时间约10 min, 供肝冷缺血时间为 ( $60 \pm 5$ ) min, 无肝期为 ( $17 \pm 1.5$ ) min, 受体手术时间为 ( $50 \pm 5$ ) min。存活超过2 d者67例, 超过7 d者53例, 2 d和7 d存活率分别为84%和66%。死亡原因主要为腹腔出血、胆汁漏、腹腔感染、慢性供肝失功能、肺部感染等。

## 3 讨论

随着活体肝移植的广泛开展, 小体积肝移植成为解决成人肝移植供体短缺的一个新途径, 小体积肝移植的概念逐渐受到人们的重视<sup>[5-7]</sup>。大鼠肝移植模型是一种难度较大的动物模型<sup>[8]</sup>, 汪小辉等<sup>[9]</sup>根据二袖套法和体内切肝法, 建立30%大鼠肝移植模型, 另外, 有很多研究报道了不同类型的30%大鼠肝移植供肝切取方法和手术技术要点<sup>[10-13]</sup>。笔者在熟练掌握“二袖套”法原位肝移植的基础上开展大鼠30%小体积肝移植模型的研究, 建立了一种稳定、可靠、操作性强的移植模型,

现就相关技术要点和改进总结如下:

### 3.1 30%小体积肝移植物的肝叶切取方法

本实验采用切除大鼠肝左叶和中叶, 保留尾状叶、右叶和三角叶的方法, 是基于大鼠肝脏的解剖结构和各肝叶所占全肝的重量比率做出的选择<sup>[14-19]</sup>。本方法的优点为: (1) 保留的肝叶和全肝重量比率接近30%, 符合实验要求。(2) 切除了中叶, 吻合肝上下腔静脉操作时获得了足够大的术野, 暴露充分利于操作。(3) 避免了切除三角叶和右叶的手术操作: 三角叶和右叶肝脏组织紧密包裹肝下下腔静脉, 如切除这两个肝叶, 为防止结扎肝组织时引起肝下下腔静脉扭曲、狭窄等, 一般需离开肝下下腔静脉一定距离进行结扎操作, 残留于下腔静脉周围的无功能肝脏组织较多, 为术后的腹腔感染、出血、胆漏等留下隐患。(4) 采用体内原位切肝, 可以及时观察到出血及有无副损伤等, 避免体外切肝复流以后出现出血等无法补救的被动局面。梁廷波等比较了两种供肝切取方法, 认为体内法便于操作, 术后并发症低, 存活率大大提高, 明显优于体外法<sup>[20]</sup>。

### 3.2 供体手术操作要点

(1) 肝脏左叶和中叶入肝血流的阻断: 钝性分离左叶、中叶肝蒂时, 应由左侧近尾状叶处的间隙进入, 显微镊尖端由门静脉和下腔静脉之间的肝脏组织穿出, 带线结扎, 可以避免损伤上述两个血管。(2) 肝脏左叶和中叶出肝血流的阻断: 左中叶和右中叶有各自的肝静脉, 由于中叶呈扇形包裹肝上下腔静脉近一半的外周径, 如一次性结扎势必引起肝上下腔静脉管腔狭窄, 故只能分次结扎切除; 需要指出的是, 在显微镊进入肝实质以后, 应耐心钝性分离, 遇到阻力时不可强行

前进, 应退出, 偏离阻力点少许再次进入钝性分离, 以免强行分离撕裂肝静脉, 造成难以补救的出血。由于左中叶偏离肝上下腔静脉, 可以首先结扎; 右中叶紧靠肝上下腔静脉, 部分肝组织包绕肝上下腔静脉, 故在结扎肝静脉前, 应先分离附着于下腔静脉的肝脏组织至肝静脉开口处, 再行结扎, 防止下腔静脉扭曲狭窄。

### 3.3 保留膈肌环修剪供肝肝上下腔静脉

肝上下腔静脉壁菲薄, 后壁较短, 直接吻合容易牵拉撕裂静脉壁导致受体出血死亡。保留膈肌环, 采用两定点法吻合时, 由于两端缝合于较坚韧的膈肌上, 形成抗张力较强的支撑点, 连续缝合不容易撕裂静脉壁; 同时可以进行血管后壁连续外翻缝合, 最大限度保证吻合口血管壁的光滑, 防止血栓的形成。

### 3.4 受体肝上下腔静脉的吻合

高质量迅速完成肝上下腔静脉、门静脉和肝下腔静脉的吻合是手术成功的关键; 最大限度地缩短无肝期, 可以提高存活率, 减少并发症的发生<sup>[21-22]</sup>。本实验采用两定点法连续缝合血管, 切实做到每针层次清晰。顺着缝合针弧度出针, 避免反复退针, 引起不必要的出血。吻合完毕准备打结前数针由于视野较小, 是引起吻合口出血的常见部位。本实验采用最后2~3针先按层次缝合血管, 不收紧, 冲洗肝上下腔静脉管腔排除气泡后, 再依次收紧缝合线, 这样可以避免出现最后几针层次不清的被动局面。

总之, 大鼠小体积肝移植是一项精细、复杂的外科操作。本实验经过改进切肝方法, 建立了稳定的大鼠30%小体积肝移植模型。该模型是研究小肝移植肝再生的理想平台, 并且在小肝移植免疫、缺血再灌注损伤等研究领域有广泛用途。

### 参考文献

- [1] Kashfi A, Mehrabi A, Pahlavan PS, et al. A review of various techniques of orthotopic liver transplantation in the rat[J]. *Transplant Proc*, 2005, 37(1):185-188.
- [2] Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplantations in the rat[J]. *Surgery*, 1983, 93(1 pt 1):64-69.
- [3] 陈志宇, 张玉君, 王槐志, 等. 改良法重建肝动脉血供的大鼠原位肝移植模型[J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(8):1016-1017.
- [4] 陈耿, 张玉君, 杨程, 等. 重建肝动脉血液供应和胆道外引流的大鼠原位肝移植模型的建立[J]. *中华器官移植杂志*, 2006, 27(1):40-43.

- [5] Lee HH, Joh JW, Lee KW, et al. Small-for-size graft in adult living-donor liver transplantation[J]. *Transplant Proc*, 2004, 36(8):2274-2276.
- [6] Moon DB, Lee SG. Adult-to-adult living donor liver transplantation at the Asan Medical Center[J]. *Yonsei Med J*, 2004, 45(6):1162-1168.
- [7] Shimada M, Ijichi H, Yonemura Y, et al. Is graft size a major risk factor in living-donor adult liver transplantation?[J]. *Transpl Int*, 2004, 17(6):310-316.
- [8] 江翰, 王子豪, 李永盛, 等. 乌司他丁对大鼠原位肝脏移植供肝的保护作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2014, 23(1):53-57.
- [9] 汪小辉, 沈柏用, 王以巧, 等. 大鼠30%小体积肝移植模型手术技巧[J]. *中华实验外科杂志*, 2011, 28(7):1179-1181.
- [10] 姚爱华, 浦立勇, 李相成, 等. 大鼠30%小体积肝移植模型三种切肝方法的比较[J]. *世界华人消化杂志*, 2007, 15(33):3479-3483.
- [11] 李江, 刘斌, 刘静. 三种小体积肝移植大鼠模型的比较[J]. *中华器官移植杂志*, 2011, 32(3):182-185.
- [12] 严信祺, 张明钧, 杜志勇, 等. 大鼠部分肝移植模型建立的技术要点[J]. *肝胆外科杂志*, 2010, 18(3):217-219.
- [13] 钱建民, 汤黎明, 胡建平, 等. 大鼠肝移植小移植模型的研究[J]. *中华实验外科杂志*, 2003, 20(3):275-277.
- [14] 吕毅, 潘承恩, 孟令忠, 等. SD大鼠肝脏及附属管道的应用解剖[J]. *西安医科大学学报*, 1998, 19(1):70-73.
- [15] Martins PN, Neuhaus P. Surgical anatomy of the liver, hepatic vasculature and bile ducts in the rat[J]. *Liver Int*, 2007, 27(3):384-392.
- [16] Madrahimov N, Dirsch O, Broelsch C, et al. Marginal hepatectomy in the rat: from anatomy to surgery[J]. *Ann Surg*, 2006, 244(1): 89-98.
- [17] Martins PN, Theruvath TP, Neuhaus P. Rodent models of partial hepatectomies[J]. *Liver Int*, 2008, 28(1):3-11.
- [18] 史冀华, 朱盛兴, 张水军. 大鼠肝部分切除术的应用解剖及实施[J]. *世界华人消化杂志*, 2008, 16(22):2516-2520.
- [19] Palmes D, Spiegel HU. Animal models of liver regeneration[J]. *Biomaterials*, 2004, 25(9):1601-1611.
- [20] 梁廷波, 郑树森, 徐骁, 等. 两种不同方法的大鼠小体积肝移植模型建立的比较[J]. *中华肝胆外科杂志*, 2004, 10(5):320-322.
- [21] Urata K, Nguyen B, Brauh A, et al. Decreased survival in rat liver transplantation with extended cold preservation: role of portal vein clamping time[J]. *Hepatology*, 1998, 28(2):366-373.
- [22] 范洪凯, 蔡秋程, 熊日晖, 等. 大鼠脂肪变供肝肝移植模型的建立[J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(12):2881.

( 本文编辑 宋涛 )

本文引用格式: 张斌, 韩正祥, 温泉, 等. 小体积肝移植大鼠模型的技术要点和改进[J]. *中国普通外科杂志*, 2015, 24(7):970-974. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.010

Cite this article as: ZHANG B, HAN ZX, WEN Q, et al. Technical essentials and improvements for reduced-size liver transplantation model in rats[J]. *Chin J Gen Surg*, 2015, 24(7):970-974. doi:10.3978/j.issn.1005-6947.2015.07.010