

文章编号:1005-6947(2006)07-0500-04

· 肝移植专题研究 ·

供肝快速切取法大鼠原位肝移植模型的建立

李军, 窦科峰, 张洪涛, 张福琴, 孔亚林, 赵青川

(第四军医大学西京医院 肝胆外科, 陕西 西安 710032)

摘要: **目的** 采用供肝快速切取法建立大鼠原位肝移植模型, 研究其稳定性及成功率。 **方法** 健康雄性 SD 大鼠 200 只, 随机分为两组。实验组采取供肝快速切取法原位肝移植, 对照组采用传统肝移植方法。比较两组的手术时间, 供肝冷、热缺血时间, 术后受体肝功能变化及手术成功率。 **结果** 对照组供体手术时间 (33.8 ± 4.2) min, 供肝热缺血时间 (3.5 ± 1.2) min, 冷缺血时间 (62.0 ± 4.2) min, 手术成功率 80%。实验组供肝切取时间为 (13.1 ± 2.2) min, 供肝热缺血时间 0 min, 冷缺血时间 (38.0 ± 3.1) min, 术后肝功能恢复快, 手术成功率 94% ($P < 0.05$)。 **结论** 新的建模方法可明显缩短手术时间, 改善供肝质量, 提高手术成功率。该法为肝移植研究提供了更为科学的模型。

关键词: 肝移植; 模型, 动物; 肝快速切取法

中图分类号: R657.3; R318 **文献标识码:** A

The model of rapid-harvesting donor liver in rat orthotopic liver transplantation

LI Jun, DOU Ke-feng, ZHANG Hong-tao, ZHANG Fu-qin, KONG Ya-lin, ZHAO Qing-chuan

(Department of Hepatobiliary Surgery, Xijin Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710032, China)

Abstract: Objective To develop a rapid donor liver harvesting method in orthotopic liver transplantation in rats, and to study the stability and the success rate of the model. **Methods** A total of 200 healthy adult male SD rats were randomly divided into two groups: the experimental group (rapid donor liver harvesting transplant group), and the control group (conventional liver transplant group). The operation time, cold ischemic time and warm ischemic time of the donor liver, recipient post-transplantation liver function and the success rate of the operation between the 2 groups were compared. **Results** In the control group, the operation time of donor harvesting was (33.8 ± 4.2) min, warm ischemic time and cold ischemic time of donor liver was (3.5 ± 1.2) min and (62.0 ± 4.2) min, with a 80% rate of success. The new method reduced the time for donor surgery to (13.1 ± 2.2) min, and reduced the warm ischemic time and cold ischemic time of donor liver to 0 min and (38.0 ± 3.1) min respectively, and with a 94% rate of success (all $P < 0.05$). In addition, recipient liver function recovered more quickly in the experimental group.

Conclusions The novel model of rapid donor liver harvesting in rat orthotopic liver transplantation reduces the operation time, improves the quality of the donor liver, and enhances the success rate of operation, and provides a more scientific model for relevant researches.

Key words: Liver Transplantation; Models, Animal; Rapid Harvesting Donor

CLC number: R657.3; R318 **Document code:** A

随着临床肝移植的发展, 大鼠原位肝移植模型

被更多地应用于器官保存、移植排斥反应机制及免疫耐受等研究领域, 但因手术操作精细复杂, 使其普及应用受到限制。笔者在传统“二套管法”基础上, 采用供肝快速切取法建立大鼠原位肝移植模型, 以期能为肝移植研究提供一个较为理想的实验方法。

基金项目: 国家自然科学基金资助(30271281; 30170923)。

收稿日期: 2006-01-11; **修订日期:** 2006-04-21。

作者简介: 李军, 男, 陕西大荔人, 第四军医大学西京医院硕士研究生, 主要从事肝脏移植和肝脏外科的基础与临床方面的研究。

通讯作者: 赵青川 电话: 029-84775259; E-mail: zhaoqc@fmmu.edu.cn。

1 材料与方 法

1.1 材料及动物分组

清洁级雄性 SD 大鼠 200 只,体重 180 ~ 220 g (第四军医大学实验动物中心提供);受体体重略大于供体(30 g 左右)。聚乙烯袖套包括:门静脉袖套内径 1.8 ~ 2.0 mm,肝下下腔静脉袖套内径 2.5 ~ 3.0 mm。胆管插管由硬膜外麻醉管制成,长度 0.4 ~ 0.5 mm。双极电凝器 1 台,上海手术器械厂显微外科手术器械包,乙醚麻醉筒等。大鼠随机分为实验组和对照组。实验组采取供肝快速切取法原位肝移植,对照组采用传统“二套管”法。每组各 100 只,组内又随机分为供、受体各 50 只。

1.2 手术方法

1.2.1 对照组供肝切取及修整 取腹部正中切口进腹。(1)游离肝脏:剪断肝镰状韧带、左冠状韧带,结扎切断膈肌静脉,剪断左三角韧带及肝胃韧带。结扎切断右肾上腺静脉。在右肾静脉上方分离肝下下腔静脉,切断右肾蒂。分离肝十二指肠韧带,结扎切断门静脉属支幽门静脉和脾静脉。于门静脉左侧结扎切断肝动脉。距肝门分叉约 0.5 cm 处游离肝外胆管,向其近端插入胆管插管,环扎固定,供肝分离完毕。(2)肝脏灌洗:穿刺阴茎背静脉,注入 2 mL 含肝素 50 U 的生理盐水全身肝素化。阻断肝下下腔静脉及肠系膜上静脉远端,在肠系膜上静脉近端穿刺门静脉,用含肝素 25 U/mL 的 4℃ 平衡盐溶液缓慢低压灌洗肝脏,约 10 mL。剪开下腔静脉远端及肝上下腔静脉(SVC)胸段,使灌注液流出,至肝脏变黄时,在靠近右肾静脉入口处剪断肝下下腔静脉,切断门静脉,围绕肝上下腔静脉环切膈肌。(3)供肝修整:供肝置于 0 ~ 4℃ 的生理盐水

中。剪去膈肌环内隔膜,扩大肝上下腔静脉开口,修剪多余的膈肌组织。将供肝门静脉断端剪齐,用门静脉袖套进行套管,即管耳方向向上,用一显微直镊穿过袖套并夹住门静脉断端,提起门静脉穿过袖套,血管夹夹住管耳固定,将血管壁外翻套在袖套的外壁,丝线环扎固定。同法制作肝下下腔静脉袖套。最后在肝上下腔静脉的两侧角用 8-0 带针线各缝吊 1 针。

1.2.2 实验组供肝切取及修整(供肝快速切取法) 上腹部大十字切口,上至剑突,下至耻骨联合,左右至腋后线。肝脏原位灌洗及游离:进腹后将肠管向左移出腹腔,暴露胆总管、门静脉、肝下下腔静脉。经下腔静脉远端穿刺行全身肝素化。简单游离胆总管后插胆道引流管。于肠系膜上静脉远端插入灌注管,立即用 0 ~ 4℃ 肝素生理盐水经输液器匀速灌注,液面高度距操作台 40 cm,灌注速度约 40 ~ 50 滴/min (< 3 mL/min)。剪开下腔静脉远端及肝上下腔静脉胸段,使灌注液流出,同时向肝脏淋撒 0 ~ 4℃ 生理盐水使其迅速降温。灌注同时电灼切断右肾上腺静脉、肝动脉,结扎切断幽门静脉。待肝脏变成土黄色后,连带周围组织剪断肝下下腔静脉及门静脉。以肝下下腔、门静脉为牵引点,由下向上锐性剪断肝周韧带。缝扎膈肌静脉,将肝脏轻轻下牵,用眼科剪紧贴膈肌“一剪法”剪下肝上下腔静脉(图 1),使其不带膈肌组织。修整供肝:供肝置于 0 ~ 4℃ 生理盐水中。肝下下腔静脉、门静脉分别上套管,肝上下腔静脉无需修整,在其左右两侧角各缝吊 8-0 缝线(图 2)。

实验组和对照组受体手术方法基本相同,参照马毅^[1]、李涛^[2]等的“二套管法”进行改进。

图 1 “一剪法”切取供肝

图 2 实验组供肝

1.3 生化指标检测

各组分别于术后1,3,5,7d取血1mL,3000r/min离心5min;取上层血清于离心管(Ependorf管)中,-20℃保存。用OlympusAV800全自动生化分析仪检测谷丙转氨酶(ALT)和总胆红素(TBIL)。

1.4 统计学处理

采用SPSS10.0统计软件分析数据。各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。均数间比较用 t 检验,存活率间比较用 χ^2 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

术后动物存活超过48h计为移植成功。实验组供体手术时间及修肝时间均短于对照组,热缺血、

冷缺血时间亦短于对照组,而48h及1周存活率均大于对照组(均 $P < 0.05$)。两组术后ALT和TBIL均升高,随时间推移逐渐向正常恢复。实验组术后各时间点ALT及TBIL均低于对照组,而且恢复速度快(均 $P < 0.05$)(表1,2)(图3,4)。并发症:对照组48h内肝上下腔脉吻合口出血4例,门静脉袖套脱落出血2例,胆漏2例,肺栓塞1例,肺部感染1例。术后第3天肺部感染死亡2例,第5,7天胆管坏死、胆漏3例。实验组:48h内肝上下腔脉吻合口出血2例,门静脉血栓1例,术后第4天因肝下腔血栓死亡1例,第5,6天胆管坏死、胆漏2例。

表1 两组手术时间(min, $\bar{x} \pm s$)

分组	n	手术时间				
		供体	修肝	受体	SVC吻合	无肝期
对照	50	33.8±4.2	13.9±3.0	51.3±4.3	14.0±4.0	20.0±4.2
实验	50	13.1±2.2	7.4±2.5	50.2±3.0	12.0±3.5	17.0±3.0
P值		<0.05	<0.05	>0.05	>0.05	>0.05

表2 供肝冷热缺血时间及存活率

分组	n	冷缺血	热缺血	48h存活情况	1周存活情况
		(min, $\bar{x} \pm s$)	(min, $\bar{x} \pm s$)	例数(%)	例数(%)
对照	50	62.0±4.2	3.5±1.2	40(80)	35(70)
实验	50	38.0±3.1	0	47(94)	44(88)
P值		<0.05	<0.05	<0.05	<0.05

图3 术后ALT的变化

图4 术后总胆红素的变化

3 讨论

大鼠肝移植模型是肝移植基础研究方面的理想动物模型。Lee等^[3]首次报道大鼠原位肝移植,即肝上、肝下下腔静脉、门静脉以及肝动脉均采用缝合方法。该手术难度大,无肝期长,大鼠死亡率高。1979年,Kamada^[4]发明“双袖套法”吻合门静

脉,显著地缩短了无肝期,提高了移植成功率,使袖套技术被广泛认可。此后,许多改良方法相继出现^[5-8],使“双袖套法”不断完善。然而,迄今研究焦点仍主要集中在受体手术部分,而对于如何改进供体手术方法,以便更快、更好地获取高质量供肝所涉及报道较少。供肝的切取、修整及保存技术对于术后移植肝的存活、功能恢复及术

中术后并发症的发生有至关重要的影响^[9]。Schemmer^[10]认为:供肝游离过程中的手术操作本身,将会影响库普弗细胞(Kupffer)的状态,而该细胞在原发性移植物无功能中扮演着重要角色。临床研究发现,供肝质量是手术成功与否的先决条件,其中,供肝冷、热缺血时间是肝脏质量的重要因素。热缺血时间应尽量控制在5 min之内,过长与术后移植肝无功能及胆道系统损伤密切相关。Sanchez-Urdazpal^[11]研究人供肝保存时发现,供肝采用威斯康新大学器官保存液(UW液)保存<11.5 h,肝移植术后的胆道狭窄发生率仅2%,而>11.5 h,其发生率则高达35%,两者差异有统计学意义。大鼠原位肝移植也同样存在着因供体手术方式,冷、热缺血时间过长等原因造成的严重并发症,如胆漏、胆道狭窄等,从而明显影响模型的成功率及稳定性。为此,改进供肝切取方法,尽量缩短冷、热缺血时间至关重要。本研究实验组供体手术仅需(13.1±2.2) min,冷缺血(38.0±3.1) min,热缺血0 min,明显低于对照组及国内其他研究报道^[12-13]。笔者对手术方法作了如下改进:(1)取肝采用腹部大十字切口,上至剑突,下至耻骨联合,左右至腋后线。能充分暴露第一、第二肝门,无需腹部牵开器即可达到良好显露。(2)为缩短供肝冷、热缺血时间,改变了目前经常采用的先游离,后灌注的手术顺序。在开腹后立即行肝脏原位门静脉插管灌注,同时用冰盐水尽快降温,使肝脏在最短时间内进入冷缺血期。建立灌注通道后可同时游离肝脏,使游离与灌注两手术阶段重叠进行,明显缩短了手术时间。(3)供肝获取过程中的灌注不当包括灌注不足和灌注过量。灌注不足可导致热缺血时间长、微循环血栓形成等,这样的供肝移植术后容易发生严重并发症。为此本实验采取经输液器匀速灌注,灌注速度,灌注量及压力可通过调整液面高度及滴数来控制,避免了因灌注不足和灌注过量引起的损伤。(4)因大鼠肝脏质地娇嫩,过多翻动亦可引起损伤,致局部灌注不良。为避免损伤,许多学者采取由上向下顺时针的分离顺序,但仍不能避免触动肝脏。本实验改进为由下向上的切肝顺序,即先连带周围组织大块切取肝下下腔及门静脉,然后利用肝下下腔静脉远端和胆管结扎线作牵引点,以锐性剪取为主,由下向上直至肝上下腔静脉,做到切肝过程中基本不触动肝脏,明显减少了供肝损伤的机会。(5)传统的供肝切取均保留

部分膈肌,待以后修整,延长了修肝时间。本实验切肝时采用眼科剪紧贴膈肌“一剪法”剪下肝上下腔静脉,使其不带膈肌组织。此法切肝后肝上下腔静脉可保留足够吻合长度,静脉残端整齐,不带膈肌环,可塑性强,且吻合口有足够大,无需进一步修整,明显缩短了修肝时间,也保证了其后高质量的吻合。

总之,供肝快速切取法大鼠原位肝移植模型简化了供体手术,术后存活率高,重复性好,便于推广普及。本方法为肝移植基础研究提供了稳定可靠的动物模型。

参考文献:

- [1] 马毅,何晓顺,陈规划. 大鼠原位肝移植模型的手术技巧及并发症的预防[J]. 中华显微外科杂志, 2003, 26(1): 45-47.
- [2] 李涛,唐华美,孙星,等. “两套袖法”大鼠原位肝移植的技术改进[J]. 中国普通外科杂志, 2005, 14(7): 486-488.
- [3] Lee S, Charters AC, Chandler JG, *et al.* A technique for orthotopic liver transplantation in the rat [J]. *Transplantation*, 1973, 16(6): 664-669.
- [4] Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat: techniques using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage [J]. *Transplantation*, 1979, 28(1): 47-50.
- [5] Miyata M, Fischer H, Fuhs M, *et al.* A simple method for orthotopic liver transplantation in the rat: cuff technique for three vascular anastomosis [J]. *Transplantation*, 1980, 30(5): 335-338.
- [6] Inoue S, Tahara K, Shimizu H, *et al.* Rat liver transplantation for total vascular reconstruction, using a suture method [J]. *Microsurgery*, 2003, 23(5): 470.
- [7] Li J, Dahmen U, Dirsch O, *et al.* Modified sleeve anastomosis for reconstruction of the hepatic artery in rat liver transplantation [J]. *Microsurgery*, 2002, 22(2): 62-68.
- [8] Aguirrezabalaga J, Arnal F, Marini M, *et al.* Auxiliary liver transplantation with portal arterialization in the rat: description of a new model [J]. *Microsurgery*, 2002, 22(1): 21-26.
- [9] 邱繁荣,李宁,高志刚. 原位肝移植供肝切取与修整技术的探讨[J]. 中华外科杂志, 2002, 40(6): 471-472.
- [10] Schemmer P, Schoonhoven R, Swenberg JA, *et al.* Gentle in situ liver manipulation during organ harvest decreases survival after rat liver transplantation [J]. *Transplantation*, 1998, 65(8): 1015-1020.
- [11] Sanchez-Urdazpal L, Gores GL, Ward EM, *et al.* Ischaemic type biliary complications after orthotopic liver transplantation [J]. *Hepatology*, 1992, 16(1): 49-53.
- [12] 刘金彪,郑树国,张玉君,等. 提高大鼠原位肝移植手术质量的技巧和注意事项[J]. 中华器官移植杂志, 2005, 26(8): 500-502.
- [13] 杜晓宏,王广义,孟伟,等. 改进的二袖套法大鼠原位肝移植术[J]. 中华器官移植杂志, 2003, 24(5): 316-317.