

文章编号:1005-6947(2005)07-0486-03

· 肝移植专题研究 ·

“二袖套法”大鼠原位肝移植的技术改进

李涛¹, 唐华美², 孙星¹, 彭志海¹

(上海市第一人民医院 1. 普外科 2. 病理科, 上海 200080)

摘要:目的 探讨大鼠原位肝移植(OLT)模型的技术改进方法,并观察移植后的排斥反应。方法 将“二袖套法”大鼠肝移植技术进行了改进;并行SD→SD, SD→Wistar大鼠肝移植各30例,观察术后排斥情况。结果 全组肝移植手术无肝期约为15 min。大鼠无手术死亡。SD→SD大鼠肝移植后3周内存活率为97%;SD→Wistar大鼠肝移植后8~15 d死亡,组织病理学证实存在不同程度的排斥反应。结论 采用该改良大鼠肝移植方法可明显缩短手术时间,降低术后并发症,提高移植大鼠的术后生存率。SD→Wistar大鼠的肝移植可作为较理想的研究肝移植排斥反应的动物模型。

关键词:肝移植;移植物排斥;疾病模型,动物

中图分类号:R657.1;R363 **文献标识码:**A

Technical improvement of “two-cuff method” of orthotopic liver transplantation in rats

LI Tao¹, TANG Hua-mei², SUN Xing¹, PENG Zhi-hai¹

(1. Department of General Surgery 2. Department of Pathology, Shanghai First People's Hospital, Shanghai 200080, China)

Abstract: **Objective** To investigate an improved technique of orthotopic liver transplantation with the “two-cuff method” in rats, and to observe allograft rejection after transplantation. **Methods** 30 Wistar rats were grafted with livers of SD rats and 30 SD rats were grafted with livers of SD rats by using a modified “two-cuff technique” and examined for postoperative rejection. **Results** The anhepatic period was about 15 minutes. The 24-hour survival rate was 100%. The Wistar rats grafted with SD livers died 8 to 15 days after liver transplantation, and the histopathologic examination showed various degrees of allograft rejection. The SD rats grafted with livers of SD rats had a survival rate of 97% at 3 weeks postoperatively. **Conclusions** The modified “two-cuff technique” can effectively reduce operative time, decrease postoperative complications and increase the survival rate of orthotopic liver transplantation in rats. The transplantation model of Wistar rats grafted with livers of SD rats can be used to study allograft rejection.

Key words: Liver Transplantation; Graft Rejection; Disease Models, Animal

CLC number: R657.1; R363 **Document code:** A

目前常用的大鼠肝移植方法为“二袖套法”^[1],即肝下下腔静脉(infrahepatic vena cava, IVC)与门静脉(portal vein, PV)分别用套管吻合,胆管用支架管吻合,肝上下腔静脉(suprahepatic vena cava, SVC)直接吻合的方法。笔者从2004年4月~2004年9月

对该法进行了技术改进,并对同系和同种大鼠肝移植的免疫排斥反应进行了观察,旨在建立稳定可靠的高排斥反应组合的大鼠肝移植模型。

1 材料和方法

1.1 材料

清洁级雄性SD大鼠及Wistar大鼠各60只,体重210~280g,由上海第一人民医院实验动物中心提供。供体体重低于受体10~20g。术前12h禁食,不禁水。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30400417)。

收稿日期:2005-01-11; **修订日期:**2005-05-24。

作者简介:李涛(1974-),男,山东莱芜人,上海市第一人民医院博士研究生,主要从事生物人工肝、肝细胞移植及肝移植方面的研究。

通讯作者:李涛 电话:021-63240090-4312; E-mail:transplant@126.com。

IVC及PV套管采用自制7~5F血管介入穿刺导管,长约3mm,带柄,上面划刻痕以利固定。胆总管支架管采用硬膜外导管,直径约0.8mm,长约4mm。常规显微器械,双目手术显微镜SXP-1C购自上海精密仪器仪表有限公司。无损伤血管缝线购自上海医用缝合线厂。乙醚购自上海马陆制药厂。

1.2 分组及手术方法

1.2.1 分组 本实验行SD→SD及SD→Wistar大鼠OLT各30对。

1.2.2 供体手术 供体采用自制面罩持续开放式乙醚吸入麻醉。腹部去毛消毒,阴茎背静脉注射肝素液1mL(50U/mL),十字切口入腹。游离IVC,结扎右肾上腺静脉。顺时针方向游离肝周韧带。游离第一肝门,近PV干结扎切断胃幽门静脉。于髂血管近端游离部分腹主动脉,插入穿刺针并血管夹固定。迅速打开胸腔,阻断胸主动脉,同时剪断SVC,用重力法(约40cm高度)持续滴注4℃乳酸林格液(内含肝素25U/mL)。肝脏表面置一小棉垫,间断滴注4℃冰水降温。灌注的同时,在左肾静脉上缘切断IVC,助手向头端提起IVC,暴露右肾静脉后方的肾动脉并从静脉壁上游离下来,结扎右肾静脉,于结扎线外侧剪断右肾静脉及右肾上腺静脉,用Satinsky钳钳夹SVC及部分膈肌,沿钳边缘离断SVC。在胆总管分叉下方1cm左右切断胆总管,剪断肝固有动脉,脾静脉上缘切断PV,取下肝脏放入4℃乳酸林格液中保存备用。

1.2.3 供肝修剪及套管安装 紧靠SVC静脉壁缝扎左右膈下静脉。助手垂直方向提起SVC残端,术者紧贴膈肌环剪去膈肌水平以上SVC及膈肌组织,仅保留膈肌环。SVC左右两侧7-0无损伤缝线各缝1针。修整IVC及PV,并分别安装袖套管,方法参照Kamada法^[1]。胆总管插入支架管并固定。

1.2.4 受体手术 受体术前30min肌注阿托品0.03mg,麻醉同供体。正中切口入腹,用回形针自制拉钩牵开腹壁,将肝下腔隙内肠管推向左下方,以湿纱布保护。在右肾静脉上方游离IVC,于其后方套线结扎右肾上腺静脉,顺时针方向游离肝周韧带,缝扎左右膈下静脉。结扎切断肝食管交通支。游离胆总管,并于分叉下方切断;游离结扎切断肝

固有动脉,在幽门静脉水平上方游离PV。微血管夹依次阻断IVC及PV,在PV分叉处穿刺,注入常温生理盐水2mL驱血后剪断PV。用Satinsky钳阻断SVC,迅速于近肝上方切断SVC,于右肾上腺结扎线上方切断IVC,移去原肝。取出供肝,原位放入受体肝床;肝表面置棉片间断滴加4℃冰水降温。供肝SVC左右侧缝线分别与受体SVC左右侧缝合,然后左侧缝线连续缝合腔静脉后壁与右侧缝线线尾打结,再用右侧缝线连续缝合腔静脉前壁与左侧缝线线尾打结,缝合最后2针前生理盐水冲洗血管腔排气,完成SVC的吻合。经PV袖套管注入常温生理盐水2mL,排出供肝内冷灌注液,微血管夹阻断供体SVC,然后迅速插入供体PV袖套管,并用5-0丝线结扎固定。移去PV血管夹,迅速移去SVC上的Satinsky钳。至此供肝恢复血流,结束无肝期。此时停止吸入麻醉。同法迅速吻合IVC后开放恢复血流。观察胆总管有黄色胆汁流出后,将胆总管支架管插入受体胆总管管腔内,用5-0丝线结扎固定,留1根线尾,大网膜覆盖后,与供体胆总管结扎线打结。最后再将胆总管支架管固定在PV袖套管上。检查供肝颜色鲜红,无活动性出血,关腹。术后经阴茎背静脉补液2mL。灯烤复温,禁饮4h后自由进糖水,术后1d自由进食。术后均未用抗生素及免疫抑制剂。

1.3 观察项目

观察术后大鼠一般情况及生存率,大鼠死亡后立即取肝组织标本行常规病理检查。

2 结果

2.1 手术时间

供体热缺血时间接近于0。供体手术时间约20min,肝脏修剪及安装袖套管时间约10min。SVC吻合时间约8min,PV吻合约2min,无肝期约15min。IVC吻合时间约2min。供肝冷缺血时间约40min。

2.2 术后经过及结果

大鼠术后24h内无死亡。SD→Wistar移植组大鼠术后萎靡,活动明显减少,并迅速出现黄疸、腹水而死,死亡时间为8~15d;解剖见腹腔内大量腹水,肝脾肿大,PV区广泛侧支循环形成;HE染色显

示汇管区不同程度淋巴细胞浸润,血管内皮炎和胆管损伤,部分可见肝细胞坏死,证实死亡原因为急性排斥反应。SD→SD组除1只鼠第7天死于胆漏外,均健康存活超过3周;解剖见肝脏色红润,略肿大,脾脏不大;HE染色显示汇管区少量单核细胞浸润,无血管内皮及肝细胞坏死。

3 讨论

“二袖套法”是最常用的大鼠肝移植方法。笔者在此基础上对供肝的灌注、切取及吻合等方面进行了改良,缩短了手术时间,提高了术后生存率,本组无手术死亡。本组主要对以下步骤进行了改进:

(1) 供肝灌注 本组采用腹主动脉插管持续灌注,部分灌注液经肝动脉入肝,部分通过腹腔脏器回流后经门静脉入肝,收到肝动脉及PV双重灌注的效果。此法不仅使肝脏的热缺血时间降至最低,减少了热缺血损伤,而且不会发生灌注压力过高,避免了对肝脏微血管的损伤。持续灌注直至PV离断,保证了肝脏在切取过程中始终保持一个低温环境,减轻了肝脏热缺血损伤。

(2) 右肾静脉的处理 供肝切取中如按常法将右肾静脉在灌注前处理,常因肾动脉紧贴其后方难以分离而一起结扎,造成结扎处组织过多,影响套接,甚至强行分离造成不必要的大出血。本组采用在切下供肝时结扎右肾静脉,暴露清楚,可以很容易地将肾动脉从其后方分离下来。

(3) 右肾上腺静脉的处理 右肾上腺静脉在肝三角叶后方,不易暴露。本组处理方法是充分游离IVC段后,直接从肝后用弯钳套线附带脂肪结缔组织结扎右肾上腺静脉,供体在下肝时于结扎线外侧剪断,受体只扎不断,作为IVC后壁的一个固定点,方便套管,同时避免了套管时IVC的扭曲。

(4) 膈下静脉的处理 有文献^[2,3]报道未处理右膈下静脉,笔者却认为这可能是造成大鼠术后出血死亡的一个主要原因。大鼠膈下静脉解剖位置固定,本组修肝时常规于左右膈下静脉血管根部分

别缝扎,受体在游离肝脏时于膈下静脉根部分别缝扎,方法简单可靠。

(5) SVC的处理 本组采用2针固定前后壁分别连续外翻缝合的方法,可以有效避免SVC的扭曲,缝合时使SVC后壁更容易暴露,使吻合迅速可靠,缩短了手术时间和无肝期。

(6) 受体无肝期 文献^[4]报道,大鼠无肝期最长不能超过26min。熟练的显微外科操作是缩短无肝期的关键。本组无肝期控制在15min左右,无一例手术死亡。

(7) 胆管处理 胆管并发症是影响大鼠肝移植术后存活的主要因素之一。笔者参照Tanaka的方法^[5],将胆总管支架管用大网膜覆盖后再固定在PV袖套管上,避免了术后由于胆总管滑脱或扭曲成角造成的梗阻及胆漏,降低了术后胆道并发症的发生,提高了移植大鼠的术后存活率。

SD→Wistar大鼠的肝移植,术后未进行抗排斥治疗,均在8~15d内死亡,病理显示免疫排斥反应。说明SD→Wistar大鼠的肝移植可作为肝移植排斥反应的研究模型。

参考文献:

- [1] Kamada N, Calne RY. Orthotopic liver transplantation in the rat [J]. *Transplantation*, 1979, 28(1): 47-50.
- [2] 李宗狂, 马毅, 许赤, 等. 大鼠原位肝移植模型的建立及术式改进 [J]. *Chinese J Reparative and Reconstructive Surgery*, 2004, 18(1): 34-36.
- [3] 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.
- [4] Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat [J]. *Surgery*, 1983, 93(1): 64-69.
- [5] Tanaka H, Hashizume K, Enosawa S, *et al.* Successful transplantation of a 20% partial liver graft in rats: a technical innovation [J]. *J Surg Res*, 2003, 110(2): 409-412.