

小肠移植动物实验研究进展

张喜平, 封光华

张喜平, 杭州市第一人民医院普外科 浙江省杭州市 310006
封光华, 杭州市第一人民医院普外科 浙江省杭州市 310006
杭州市医药卫生科技计划资助项目, NO. 2004BZ005
通讯作者: 封光华, 310006, 浙江省杭州市浣纱路 261 号, 杭州市第一人民医院普外科.
电话: 0571-87065701-11381
收稿日期: 2005-01-06 接受日期: 2005-02-26

摘要

小肠移植是治疗永久性肠功能衰竭的理想方法. 但由于小肠具有高免疫性且含有大量的淋巴细胞和大量肠道菌, 肠腔细菌易位和感染等都较其他器官移植明显, 小肠移植后肠功能恢复困难, 因此手术难度较大, 成功率也极低. 直到环孢霉素 A(CsA)、他克莫司(FK506)等一些强力免疫抑制剂的问世, 才使得小肠移植逐渐走向成熟. 本文针对小肠移植在临床药物、排斥反应、小肠保存、实用模型这几方面的动物实验研究进展作一综述.

张喜平, 封光华. 小肠移植动物实验研究进展. 世界华人消化杂志 2005;13(7):891-893
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/891.asp>

0 引言

小肠移植(intestinal transplantation)现在已成为小肠衰竭及由全肠道外营养引起并发症患者的标准治疗方法. 但由于小肠是体内最大的淋巴库和细菌库, 术后不可避免地产生强烈的免疫应答, 加上免疫抑制疗法又会引起较大的副反应, 从而严重制约了临床小肠移植的发展, 也使小肠移植成为最具挑战性的腹腔脏器移植. 1902 年 Carrel 首先报道了小肠移植技术, 但 Margreiter 经调查指出这是错误的引用. 到 1959 年 Lillehei 在美国开展的犬自体小肠移植才真正是小肠移植实验研究的开始. 自 1964 年 Deterling 率先为婴儿施行小肠移植手术, 到 1988 年 Grant *et al* 进行了 1 例肝肠联合移植, 才让小肠移植真正走入临床, 尤其是 80 年代初环孢素 A(CsA) 及 1990 年代初他克莫司(FK506)的临床使用, 大大减少了术后排斥反应的发生率和致死率. 此外, 供肠保存、手术技巧、术后并发症处理等一系列重要环节上的技术也不断被革新, 使小肠移植的存活率不断提高. 据 IITR(International Intestinal Transplant Register, 国际小肠移植登记处)统计, 仅 1985-2001 年 5 月全球共施行小肠移植手术 651 人 696 例次, 至统计时共有 335 人存活, 最长的已存活超过 13 a, 存活者中 82% 以上已完全或部分恢复肠道功能, 68% 的患者完全脱离 TPN 而改成经口进食.

纵观小肠移植的发展历史, 动物实验研究对小肠移植的发展可谓居功致伟. 本文对小肠移植在药物研究、排斥反应、小肠保存、实用模型这几方面的动物实验研究进展作一综述.

1 药物研究

药物治疗在小肠移植中必不可少, 从小肠移植的前期准备、到小肠移植的术后恢复, 每一步都离不开药物的帮助. 细菌易位(BT)被认为是在小肠移植术后一个高发性的并发症, NO 可以影响小肠移植中的细胞凋亡现象, Azuara *et al*^[1]将 NO 加入到威斯康新大学器官保存液(UW 液)中以观察其对大鼠小肠移植的影响. 结果显示, 在外加了 NO 之后, 通过组织学观察, 大鼠小肠 BT 现象明显被改善. 李可洲 *et al*^[2]研究肝细胞生长因子(HGF)对移植小肠吸收功能是否具有保护作用的实验中, 以近交系 Wistar(RT1k)大鼠为模型进行分组异位全小肠移植实验, 结果说明 HGF 能保护大鼠移植小肠对氨基酸的吸收功能及功能酶活性. 此外我国传统中药中华眼镜蛇毒因子, 对于延长异种小肠移植存活时间有很好的效果, 在蒋邦好 *et al*^[3]做的中华眼镜蛇毒因子与丹参对豚鼠至大鼠异种小肠移植存活作用的比较实验中, 中华眼镜蛇毒因子与丹参有明显效果, 能延长存活时间达 70 h 左右. 丹参也被报导能有效抑制低温保存小肠微循环通透性的增加, 减轻血管内皮细胞损伤^[4]. Mueller *et al*^[5]在大鼠实验中证明, 左旋-精氨酸(L-Arginine)对鼠小肠移植术后黏膜屏障功能和形态学完整性的保护有明显的作. 许多证据表明表皮生长因子可以增强小肠在移植手术后的适应性, 但其在生物学上的机制尚未清除, Nakao *et al*^[6]通过大鼠实验从生物学机制上阐述了这一问题, 他认为表皮生长因子(EGF)能增加二糖酶活性同时还能诱导二肽协同转运蛋白, 证实了 EGF 疗法的可行性. Nakai *et al*^[7]发现, 绿胆素保护同系基因型肠移植物的功能, 其机制是通过他的抗炎效应来实现对移植小肠的保护, 并对亚铁血红素加氧酶起到协同或增强的作用.

2 排斥反应

小肠移植的成功率大大低于其他器官移植, 大量淋巴细胞聚集于小肠而导致的强烈排斥反应是一个很大的原因. 作为小肠移植术后并发症的主要症状之一, 近年对于这方面的动物实验研究报道比较多, 施海 *et al*^[8]报道了小肠移植急性排斥反应中 Bcl-2 及 Bax 表达的意义, 实验选用了近交系 F344/N 和封闭群 Wistar/A 大鼠建立同种异基因小肠移植模型, 针对 Bcl-2 及 Bax 在移植小肠

组织中的表达做了研究. 结果显示移植小肠组织内Bcl-2表达水平可作为早期诊断急性排斥反应的一个有参考意义的指标. 调控T淋巴细胞也被认为是抗排斥反应一个很好的解决方法, 如T淋巴细胞疫苗接种能显著延长异品系大鼠小肠移植的存活期, 有明显的抗排斥反应作用^[9], 新型免疫制剂TLSF_{JM}(JM acut T ldukenia cell line derived suppressor factor)也能通过影响受体外周血及移植肠浸润T淋巴细胞对大鼠小肠移植发挥免疫抑制作用^[10]. 另外转化生长因子 β_1 (TGF- β_1)也被证实可抑制大鼠小肠移植急性排斥反应^[11].

3 小肠保存

小肠黏膜对缺血耐受性差, 小肠有效保存时间远短于肝、肾等器官. 到1937年Bickford和Winton采用低温方法延长组织存活时间取得成功. 此后数十年, 通过大量的实验研究, 得到许多高效保存技术, 主要分低温保存和生理温度保存, 并配置出相应的保存液. 但由于经历低温局部缺血期后的热灌流往往引起组织损坏, 移植后容易造成器官损伤, 诸如水肿、丧失屏障效应、急性毛细血管坏死、血管收缩和血管酸中毒等后果.

3.1 小肠保存液 现在最常用的小肠保存液主要有University of Wisconsin(UW)、乳酸林格(LR)液、Euro-Collins(EC)液、高渗枸橼酸盐嘌呤(HC-A)液和武汉医学院器官1号(MW0-1)液. Gundlach *et al*^[12]比较了LR液、EC液和UW液的保存效果, 大鼠小肠分别经LR液、EC液和UW液保存2 h后体外灌注, 结果证实LR液、EC液保存的小肠较UW液的小肠组织损伤重, 乳酸产生多. 李幼生 *et al*研究乳酸林格(LR)液、Euro-Collins(EC)液、高渗枸橼酸盐嘌呤(HC-A)液和武汉医学院器官1号(MW0-1)液保存猪小肠的效果, 表明保存猪小肠, EC液和MW0-1液优于LR液和HC-A液, 前者可以有效地保存猪小肠18 h, 而LR液和HC-A液只能保存10 h^[13]. Salehi *et al*^[14]使用了一种改进的UW液, 向原有的UW液中添加了组织氨基酸的缓冲液和碳水化合物的基底物质, 结果显示, 该保存液能使小肠在低温保存时也能产生足够的ATP, 显著提高其细胞能量. 为了提高临床上小肠低温保存的质量, Tsujimura *et al*^[15]结合了传统的两种保存方法, 将全氟碳(PFC)和一种新的富含氨基酸的苯巴比妥溶液联合使用, 获得良好效果.

3.2 小肠保存技术

3.2.1 氧自由基清除(抑制)剂 Lazaroid是重要的抗氧化剂, 能抑制脂质过氧化物生成, 用Lazaroid预处理供体, 能抑制小肠黏膜丙二醛(MDA)生成, 减轻组织损伤, 提高生存率^[16]. 丙酮酸也有较强的抗氧化作用, 并能抑制中性粒细胞的激活和浸润. 而21-氨基类固醇家族成员U74389G同样与Lazaroid一样具有较强的抗氧化作用, 但糖皮质激素和盐皮质激素的抗氧化作用较弱.

3.2.2 Ca^{2+} 拮抗剂 Ca^{2+} 拮抗剂能抑制缺血细胞的钙超载, 减轻再灌注的损伤. 大鼠小肠经EC液保存48 h不能存

活, 而再EC液中加入异搏定(25 mg/L)保存48 h, 术后生存率100%^[17].

3.2.3 辅酶Q10 辅酶Q10在线粒体呼吸链中起电子传递作用, 是细胞代谢和呼吸的激活剂, 大鼠小肠缺血前应用辅酶Q10能提高其生存率^[17].

3.2.4 谷氨酰氨 谷氨酰氨(Gln)是小肠黏膜细胞代谢的特殊营养物质, 大鼠小肠经UW液或等渗盐水保存18 h, 小肠转运葡萄糖的能力明显下降, 而在UW液或等渗盐水中加入Gln(1-2%)保存同样的时间, 小肠转运葡萄糖的能力达到正常小肠水平, 在UW液中加入Gln能抑制大鼠小肠黏膜谷氨酰氨酶活性降低, 减轻再灌注损伤^[17].

其他, 还有纳络酮抑制缺血损伤, NO供体抑制血小板聚集、中性粒细胞黏附、中和超氧阴离子和扩张血管, 细胞黏附分子减轻器官再灌注损伤等小肠保存方法.

4 实用动物模型

1971年Monchick *et al*^[18]报道成功建立大鼠小肠移植(small bowel transplantation, SBT)模型以来, 至今已有不少创新和发展, 并通过改进技术, 成功地建立了一些并发症少、存活率高、稳定实用的模型. Monchick建立的大鼠SBT模型是最早的经典小肠移植模型, 但由于其技术复杂, 死亡率高, 随着科技的发展, 有许多改进的方法如: (1)用供体的肠系膜上动、静脉分别与受体的腹主动脉, 下腔静脉进行吻合, 省去游离供体门静脉和结扎供体腹主动脉分支的步骤^[19], 简化了传统的手术方法; (2)显微外科技术在大鼠异位全小肠移植中的应用; (3)术前缩短禁食时间, 补充能量, 术中静脉输液, 减少对供肠的机械和缺血性损伤; (4)采用腹主动脉-腹主动脉吻合以及门静脉-左肾静脉套管法吻合, 使热缺血时间<40 min, 吻合口无血栓形成及狭窄, 接受小肠移植的大鼠的存活率提高到88.78%^[20]; (5)术中用微量输液泵经颈静脉插管, 输液4-10 mL/h预防低血容量休克的发生, 提高手术成功率. 此外, 一些学者在血管重组方式、低血容量休克预防和血管重建的时间等方面作相应的改进, 并建立好多简单、稳定、成功率高的模型.

近些年来有许多学者报道了一些高效可行的移植模型, 如全身静脉引流术制造大鼠小肠移植模型, Balaz *et al*^[21]将全身静脉引流术这一显微外科技术应用到了小肠移植模型的制作上, 由此制备出了一个重现性很好的模型. 该模型对于研究小肠移植的很多方面, 如肠保存、排斥反应等, 不失为一个好模型. 王曙逢 *et al*^[22]通过改进技术也建立了一种简便稳定存活率高的大鼠异位节段小肠移植模型, 平均存活(8.93±2.59)d, 最长存活时间为14 d. 他们认为良好的血管吻合和充分补充液体是手术成功、移植肠具有良好活力的关键因素. 王一芳 *et al*^[23]研究建立了大鼠同种异体在体异位节段小肠移植的模型, 成活率为85.71%, 该模型制作成功率较高, 适合小肠移植排斥研究.

总之, 动物实验的重要性在各个方面体现无疑, 正是由于他的快速发展才促进了小肠移植在临床上的巨大进

步. 但由于小肠移植本身原因, 难度依然较其他器官移植大, 成功率也较其他器官移植低, 所以还需进一步的研究, 动物实验作为研究的最佳载体将会显示出更大的作用.

5 参考文献

- 1 Azuara D, Sola A, Hotter G, Calatayud L, Jaurrieta E, de Oca J. Administration of nitric oxide with caspase inhibitors minimizes bacterial translocation in experimental intestinal transplantation. *Transplantation* 2004;77:177-183
- 2 李可洲, 伍晓汀, 李宁, 黎介寿. 肝细胞生长因子对大鼠移植小肠黏膜结构的保护作用. *中国普外基础与临床杂志* 2003;10:236-239
- 3 蒋邦好, 吴印爱, 刘献棠, 王志伟, 谢尚奎, 刘军, 李朝龙, 沈新明. 中华眼镜蛇毒因子与丹参对豚鼠至大鼠异种小肠移植存活作用的比较. *广东医学* 2003;24:244-245
- 4 李幼生, 黎介寿, 李宁, 江志伟. 丹参对移植小肠微循环的保护作用. *新消化病学杂志* 1997;5:554-555
- 5 Mueller AR, Platz KP, Schirmeier A, Nussler NC, Seehofer D, Schmitz V, Nussler AK, Radke C, Neuhaus P. L-arginine application improves graft morphology and mucosal barrier function after small bowel transplantation. *Transplant Proc* 2000;32:1275-1277
- 6 Nakao A, Otterbein LE, Overhaus M, Sarady JK, Tsung A, Kimizuka K, Nalesnik MA, Kaizu T, Uchiyama T, Liu F, Murase N, Bauer AJ, Bach FH. Biliverdin protects the functional integrity of a transplanted syngeneic small bowel. *Gastroenterology* 2004;127:595-606
- 7 Nakai K, Hamada Y, Kato Y, Kitagawa K, Hioki K, Ito S, Okumura T. Further evidence that epidermal growth factor enhances the intestinal adaptation following small bowel transplantation. *Life Sci* 2004;75:2091-2102
- 8 施海, 王为忠, 王海凤, 李纪鹏, 管文贤. 小肠移植急性排斥反应中 bcl-2 及 bax 表达的意义. *中华胃肠外科杂志* 2003;6:263-266
- 9 岳树强, 窦科峰, 李开宗, 李纪鹏, 杨雁灵, 帝振宇. T 淋巴细胞疫苗抗大鼠小肠移植排斥反应的实验研究. *医学研究生学报* 2003;16:251-252
- 10 董光龙, 李开宗, 王为忠, 陈丽华, 杨琨, 金伯泉. TLSF_{TM} 对小肠移植大鼠外周血及移植肠浸润 T 细胞的影响. *免疫学杂志* 2003;19:36-40
- 11 赵峰, 丁印鲁, 史朝辉, 吕丽红, 李兆亭. 转化生长因子 β_1 与大鼠小肠同种异体移植急性排斥反应的关系. *消化外科* 2003;2:280-282
- 12 Gundlach M, Pohland CC, Toennies SE, Knoefel WT, Rogiers X, Broelsch CE. Small bowel preservation: evaluation of different solutions. *Transplant Proc* 1996;28:2622-2623
- 13 李幼生, 黎介寿, 李宁, 江志伟, 赵允召, 李南云, 刘放南. 不同保存液保存小肠的效果评估. *中华器官移植杂志* 1999;20:100-102
- 14 Salehi P, Spratlin J, Chong TF, Churchill TA. Beneficial effects of supplemental buffer and substrate on energy metabolism during small bowel storage. *Cryobiology* 2004;48:245-253
- 15 Tsujimura T, Salehi P, Walker J, Avila J, Madsen K, Lakey J, Kuroda Y, Churchill TA. Ameliorating small bowel injury using a cavitary two-layer preservation method with perfluorocarbon and a nutrient-rich solution. *Am J Transplant* 2004;4:1421-1428
- 16 Hamada N, Zhang S, Nomoto M, Zhu Y, Nemoto A, Kawashima Y, Starzl TE, Todo S. Lazaroid U74006F for canine small bowel preservation. *Transplant Proc* 1996;28:2607-2608
- 17 李幼生, 黎介寿. 小肠保存的研究现状. *新消化病学杂志* 1997;5:673-674
- 18 Monchick GJ, Russel PS. Transplantation of small bowel in the rat: Technical and immunological considerations. *Surgery* 1971;70:693-702
- 19 Harmel RP Jr. A simplified technique of small intestinal transplantation in the rat. *J Pediatr Surg* 1984;19:400-403
- 20 伍晓汀, 黎介寿. 改进技术的大鼠全小肠移植术. *中华显微外科杂志* 1999;22:48-50
- 21 Balaz P, Kudla M, Matia I, Fronek J, Ryska M. Model of small bowel transplantation with systemic venous drainage in rats. *Ann Transplant* 2003;8:36-38
- 22 王曙逢, 李国威. 大鼠小肠移植模型的改进. *中国普通外科杂志* 2003;12:279-282
- 23 王一芳, 许爱刚, 吴继明, 江立红, 吴文溪. 大鼠同种异体在体异位节段小肠移植模型的建立. *南京医科大学学报* 2003;23:219-220

编辑 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005 年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

世界华人消化杂志 2005 年由月刊改为半月刊

本刊讯 中国科技期刊引证报告(2003 年版): 2002 年度世界华人消化杂志总被引频次 4151, 影响因子 1.926, 即年指标 0.424, 他引总引比 0.45, 引用刊数 173, 扩散因子 4.2, 被引半衰期 2.99, 地区分布数 26, 机构数 138, 国际论文比 0.03, 基金论文比 0.27. 2002 年度各学科影响因子较高的 3 种期刊排名: 世界华人消化杂志影响因子 1.926, 临床医学排名第 2 位. 2002 年度总被引频次较高的 20 种期刊排名: 世界华人消化杂志总被引频次 4151, 排名第 1 位. 世界华人消化杂志被评为中国科技核心期刊, 《中文核心期刊要目总览》2004 年版内科学类的核心期刊, 中国科技论文统计源期刊, 2001 年度第一届中国百种杰出学术期刊, 2003 年度中国百种杰出学术期刊. 世界华人消化杂志的英文摘要被美国《化学文摘》, 荷兰《医学文摘库/医学文摘》, 俄罗斯《文摘杂志》收录. 为适应我国消化病学专业基础与临床研究的快速发展, 从 2005 年开始, 世界华人消化杂志将由月刊改为半月刊, 大 16 开, 160 页, 每月 1, 15 日出版, 24 元/期, 全年 24 期, 邮发代号 82-262, 北京报刊发行局发行. (世界胃肠病学杂志 2004-06-15)