

改良双袖套法大鼠原位肝移植500例

刘静, 陈福, 陈达丰, 刘旋, 杨爱国, 汪爽, 孙尔维

刘静, 陈达丰, 刘旋, 厦门大学附属东南医院; 中国人民解放军第一七五医院肿瘤治疗中心 福建省漳州市 363000
陈福, 厦门大学医学院动物中心 福建省厦门市 361000
杨爱国, 厦门大学附属东南医院; 中国人民解放军第一七五医院普外科 福建省漳州市 363000
汪爽, 孙尔维, 南方医科大学珠江医院器官移植科 广东省广州市 510282
国家自然科学基金资助项目, No. 39970705
福建省青年人才资助项目, No. 2004F3147
漳州市科技资助项目, No. 2006Z06076
作者贡献分布: 刘静与陈福对此文所作贡献均等; 此课题由刘静, 陈福, 汪爽及孙尔维设计; 研究过程由刘静, 陈福, 陈达丰, 刘旋, 杨爱国, 汪爽及孙尔维操作完成; 研究所用动物由刘静与孙尔维提供; 数据分析由刘静, 陈福与陈达丰完成; 本论文写作由刘静, 陈福, 陈达丰及刘旋完成.
通讯作者: 刘静, 363000, 福建漳州市漳华路, 厦门大学附属东南医院; 中国人民解放军第一七五医院肿瘤治疗中心.
ljdoctor@hotmail.com
电话: 0596-2936361-395839 传真: 0596-2975534
收稿日期: 2008-04-20 修回日期: 2008-07-05
接受日期: 2008-07-07 在线出版日期: 2008-08-08

Othotopic liver transplantation in 500 rats using a reformed two-cuff method

Jing Liu, Fu Chen, Da-Feng Chen, Xuan Liu,
Ai-Guo Yang, Shuang Wang, Er-Wei Sun

Jing Liu, Da-Feng Chen, Xuan Liu, Center of Tumor Therapy, the 175th Hospital of Chinese PLA; Southeast Hospital Affiliated to Xiamen University, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China
Fu Chen, Animal Center of Medical College, Xiamen University, Xiamen 361000, Fujian Province, China
Ai-Guo Yang, Department of General Surgery, the 175th Hospital of Chinese PLA; Southeast Hospital Affiliated to Xiamen University, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China
Shuang Wang, Er-Wei Sun, Department of Organ Transplantation, Zhujiang Hospital, Nanfang Medical University, Guangzhou 510282, Guangdong Province, China
Supported by: National Natural Science Foundation of China, No. 39970705; the Talented Youth Project of Fujian Province, No. 2004F3147; and the Science and Technology Project of Zhangzhou City, No. 2006Z06076
Correspondence to: Jing Liu, Center of Tumor Therapy, the 175 Hospital of Chinese PLA; Southeast Hospital Affiliated to Xiamen University, Zhangzhou 363000, Fujian Province, China. ljdoctor@hotmail.com
Received: 2008-04-20 Revised: 2008-07-05
Accepted: 2008-07-07 Published online: 2008-08-08

Abstract

AIM: To improve the method of rat othotopic liver transplantation using two cuffs and

shorten anhepatic phase, and to raise the success rate of operation.

METHODS: The animals used in formal trial were divided five groups: (1) liver transplantation on normal rats was carried out after infusing apoptotic splenocytes of donors 1 wk before transplantation (including 4 subgroups); (2) liver transplantation on normal rats was carried out with simultaneous injection of apoptotic splenocytes from donors (including); (3) apoptotic splenocytes of donors were infused after liver transplantation on normal rats was carried out (including 4 subgroups); (4) liver transplantation on cirrhotic rats was carried out after infusing apoptotic splenocytes of donors 1 wk before transplantation (including 4 subgroups); (5) liver transplantation on normal rats was carried out after infusing apoptotic lymphocytes of donors 1 wk before transplantation (including 3 subgroups). Each subgroup contained 10 rats. Operating time, 2-day and 1-week survival rate of rats were observed.

RESULTS: The operating time on donor rats, the warm ischemia time of donor livers, the time for cuff preparation, the operating time on recipient rats, the anhepatic phase and the cold ischemia time of donor livers were 30 ± 5 min, 2 ± 0.5 min, 10 ± 2 min, 51 ± 10 min, 16 ± 4 min and 61 ± 5 min, respectively, in formal trials. The 2-day and 1-week survival rates were 96.8% (184/190) and 95.3% (181/190), respectively.

CONCLUSION: The reformed two-method can simplify the operating procedure, reduce complication and raise the survival rates.

Key Words: Rat liver transplantation; Animal model; Two-cuff method

Liu J, Chen F, Chen DF, Liu X, Yang AG, Wang S, Sun EW. Othotopic liver transplantation in 500 rats using a reformed two-cuff method. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(22): 2521-2524

摘要

目的: 改进大鼠肝移植的方法, 缩短无肝期,

■背景资料

大鼠原位肝移植是常用肝移植动物模型。最初由 Lee *et al* 在1973年报道, 但手术难度较大, 技术要求较高。

■同行评议者

邱宝安, 主任医师, 中国人民解放军海军总医院肝胆外科

■应用要点

本研究改进显露方法及肝上下腔静脉吻合方法后,手术简化,同时并发症减少,生存率提高。

提高手术成功率,总结大鼠原位肝移植经验。

方法: 正式实验分组: (1)预输注供者凋亡的脾细胞正常大鼠肝移植研究组(分4小组); (2)同期输注供者凋亡的脾细胞对正常大鼠肝移植研究组(分4小组); (3)术后输注供者凋亡的脾细胞正常大鼠肝移植研究组(分4小组); (4)预输注供者凋亡的脾细胞对肝硬化大鼠肝移植研究组(分4小组); (5)预输注供者凋亡的血液淋巴细胞对正常大鼠肝移植研究组(分3小组), 每组各10只大鼠。观察手术时间以及大鼠肝移植2 d和1 wk存活率。

结果: 在正式实验大鼠肝移植中, 供体手术时间 30 ± 5 min, 供肝热缺血时间 2 ± 0.5 min, 袖套准备及肝脏修整时间 10 ± 2 min, 受体手术时间 51 ± 10 min; 无肝期 16 ± 4 min。冷缺血时间 61 ± 5 min。正式实验大鼠肝移植2 d存活率96.8%(184/190), 1 wk存活率95.3%(181/190)。

结论: 改进显露方法及肝上下腔静脉吻合方法后, 手术简化, 同时并发症减少, 生存率提高。

关键词: 大鼠肝移植; 动物模型; 双袖套法

刘静, 陈福, 陈达丰, 刘旋, 杨爱国, 汪爽, 孙尔维. 改良双袖套法大鼠原位肝移植500例. 世界华人消化杂志 2008; 16(22): 2521-2524

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/2521.asp>

0 引言

大鼠原位肝移植是常用肝移植动物模型。最初由Lee *et al*^[1]在1973年报道, 但由于手术难度较大, 技术要求较高。2000-03/2008-02, 我们在进行肝移植免疫耐受的诱导^[2-3]、肝缺血预处理和药物预处理对肝移植中供肝保护效应的信号转导等研究中, 把Kamada *et al*^[4]及孙君泓^[5]的双袖套法肝移植术加以部分改进, 使得操作更加简便, 成功率提高, 取得了满意的结果。

1 材料和方法

1.1 材料 供、受体均为清洁级SD、Wistar、F344/N大鼠, 体质量200-300 g(购自中山大学实验动物中心及南方医科大学实验动物中心)。供体体质量等于或略低于受体。术前禁食12 h, 术前15-30 min sc阿托品(0.03-0.04 mg/kg体质量)、禁水。显微器械手术包、中号哈巴狗钳: 上海医疗器械厂生产; Satinsky钳: 德国马丁公司生产; 7/0、8/0及9/0无损伤手术缝线: 上海医用缝合线

厂生产。套管: 用棉棒(中山市塑料制品厂)制成门静脉套管及肝下下腔静脉套管; 用一次性硬膜外麻醉导管(浙江嘉兴市苏嘉医疗器械厂)制成胆管支架管。乙醚溶液: 广东汕头西陇化工厂生产。

1.2 方法

1.2.1 套管的制作: 用壁薄有一定张力内径约为2.0、2.7 mm的棉棒切成管体长为3.5、4.5 mm, 管柄长2 mm, 用直血管钳在管体部钳夹一周使管体有槽, 并使管体内腔呈长圆柱型, 制成门静脉套管及肝下下腔静脉套管。徒手或在沸水中将硬膜外麻醉导管拉成内径为0.7 mm至0.9 mm, 剪成为端面与长轴成30-45度的斜面, 长约7 mm的胆道支架管。

1.2.2 麻醉: 开放式吸入麻醉。

1.2.3 手术方法: 为清洁手术。(1)供体手术: 麻醉后仰卧位橡皮筋固定四肢, 腰部垫高, 酒精消毒, 取腹部横切口, 由剑突到耻骨联合的中点向两侧延至腰大肌前。持针器钳夹剑突向头侧牵引固定, 自制弹性拉钩将季肋部向两侧牵拉, 游离左肾静脉水平以上的肝下下腔静脉(IVC), 结扎右肾动脉, 游离右肾静脉, 9/0丝线结扎切断。切断右三角韧带及肝后韧带, 5/0丝线结扎切断右肾上腺静脉。切断肝胃韧带, 结扎切断肝后食管段之间的血管支, 切断镰状韧带、左三角韧带。7/0丝线缝扎切断左膈静脉。在距肝门分叉约0.5 cm处胆总管前壁做一斜切口, 插入胆管支架管, 5/0丝线环扎固定。9/0丝线结扎幽门静脉, 5/0丝线结扎肝总动脉, 在十二指肠上缘结扎除门静脉(PV)外的肝十二指肠韧带内所有组织。游离PV至脾静脉汇合处。阴茎背静脉注射肝素生理盐水1 mL(125 kU/L)后, 在脾静脉汇合以下阻断肠系膜上静脉及脾静脉, 切开PV, 插管, 4℃肝素生理盐水(12.5 kU/L)灌注肝脏8-10 mL, 灌注开始后即剪开左肾静脉汇合以下的下腔静脉, 使灌注液顺利流出。冰盐水纱布覆盖肝脏。依次切断PV、IVC, 贴近膈肌剪断肝上下腔静脉(SVC)。取出供肝置4℃生理盐水中。(2)修整供肝: 在4℃生理盐水中进行。修整PV, 用显微血管镊穿过PV套管腔夹住PV断端拖出, 管柄向肝前缘侧, 用血管夹夹住管柄及PV协助固定, 将PV外翻于套管体上, 反折线在幽门静脉汇合以上, 5/0丝线固定。同法安装IVC套管, 反折线在右肾静脉汇合以上。经PV注入少量4℃肝素生理盐水(12.5 kU/L), 以冲出肝内残留血液及检查套后的血管

是否通畅.用一小血管夹夹闭IVC.修整SVC,用8/0缝线在左右两侧及前壁中点各缝一支持线.将各肝叶复位,置4℃生理盐水中,纱布覆盖.(3)受体手术:入腹腔及暴露方法同供体手术.湿纱布保护肠管.游离肝脏同前,自肝下缘分离IVC至右肾静脉上缘,结扎切断右肾上腺静脉、肝与食管段之间血管支和左膈静脉及韧带.结扎并切断肝固有动脉、胆总管上端.加深麻醉.用7/0缝线在受体PV左右支预缝置牵引线,左侧穿过残留的胆管系膜,右侧贯穿肝实质.

待麻醉处于第Ⅲ期第三级后,停止麻醉,在右肾静脉上方阻断IVC,于幽门静脉上方阻断PV.将肝脏向下牵拉,小Satinsky钳或哈巴狗钳阻断SVC,紧贴肝脏剪断SVC,于门静脉牵引线肝侧切断门静脉、动脉、胆管的分支,带少许肝组织切断IVC.移去受体肝,原位置入供肝.Satinsky钳或哈巴狗钳向头侧翻转固定在橡皮泥上.用供肝的SVC支持线在受体SVC断端两侧各缝合结扎固定一针,并向两侧牵引.用8/0缝合线将受体的SVC前壁中点缝合向头侧牵引,供肝相应缝线向尾侧牵引.先由左至右连续外翻缝合后壁,然后用8/0缝线将供、受体前壁中点缝合单结结扎后向头侧牵引,再由右向左连续缝合前壁.结束吻合前用4℃生理盐水冲洗血管腔排气、湿润供肝.肝叶复位,向外上方牵引PV左右支缝线,在PV分叉处V形切开,瞬间开放PV约0.5 s排除血凝块后再阻断PV,用自制接注射器的“小针钩”撑开PV管壁,同时冲洗供、受体管腔,将供体PV套入受体PV腔内,5/0丝线环扎固定,线结在供体套管固定线以下.恢复PV血供,去除SVC阻断钳.在受体IVC断端两侧用7/0缝线各吊一针牵引线,向外上方牵引,同法吻合IVC.距受体胆总管断端2 mm将受体胆总管前壁剪成V形口,将已入供体胆管支架管另一端经此口套入胆总管,5/0丝线固定,用大网膜覆盖胆管吻合处.棉球吸尽腹腔积液,肠管复位,腹腔留放含青霉素钠20万IU生理盐水1 mL.两层缝合腹壁.经阴茎背静脉注肝素生理盐水1 mL(12.5 kU/L).颈背部皮下注射生理盐水5-10 mL.

保温0.5-1 h,单笼喂养.术后3 d内除给予饲料、水外,另给予100 g/L葡萄糖水喂养.

1.2.4 实验分组:正式实验中分组如下:(1)预输注供者凋亡的脾细胞诱导大鼠肝移植免疫耐受的研究分四组(对照组,单纯供体地塞米松处理组,单纯输供者脾细胞组,地塞米松诱导供者凋

亡脾细胞输注组,每组各10只Wistar、SD大鼠);(2)同期输注供者凋亡的脾细胞对大鼠肝移植免疫影响的研究分四组(对照组,单纯供体地塞米松处理组,单纯输供者脾细胞组和地塞米松诱导供者凋亡脾细胞输注组.每组各10只Wistar、SD大鼠);(3)术后输注供者凋亡的脾细胞对大鼠肝移植免疫影响的研究分四组(对照组,单纯供体地塞米松处理组,单纯输供者脾细胞组和地塞米松诱导供者凋亡脾细胞输注组.每组各10只Wistar、SD大鼠);(4)预输注供者凋亡的脾细胞对肝硬化大鼠肝移植免疫影响的研究分四组(对照组,单纯供体地塞米松处理组,单纯输供者脾细胞组,地塞米松诱导供者凋亡脾细胞输注组,每组各10只Wistar、SD大鼠);(5)预输注供者凋亡的血液淋巴细胞对大鼠肝移植免疫影响的研究分三组(对照组,单纯供体淋巴细胞处理组,已诱导供者凋亡淋巴细胞输注组,每组各10只Wistar、SD大鼠).共计190对大鼠.

2 结果

310例预试验中,易出现的意外为SVC漏血、SVC成角狭窄、SVC撕裂、肝挫伤出血、气胸、空气栓塞、吻合口血栓、PV、IVC的套管扭转成角、胆漏、肝功能衰竭、麻醉死亡、分离PV、右肾上腺静脉、左膈静脉时相应的静脉破裂出血、腹腔及肺部感染.

按改进的二袖套法进行的190例正式实验中,供体手术时间 30 ± 5 min,供肝热缺血时间 2 ± 0.5 min,袖套准备及肝脏修整时间 10 ± 2 min,受体手术时间 51 ± 10 min;无肝期: 16 ± 4 min.冷缺血时间: 61 ± 5 min.正式实验2 d存活率96.8%(184/190),SVC漏血死亡3例,SVC狭窄死亡2例,PV左分支破裂漏血1例;1 wk存活率95.3%(181/190),死亡原因为肝脏坏死.1 wk后死亡的受体原因全部为胆道并发症,最长生存时间超过1.5年.

3 讨论

经过前期的预实验,我们在传统的双袖套法肝移植术的基础上,对腹部横切口的选择、弹性拉钩牵开季肋部、供者右肾上腺动脉的结扎、分离PV的改进、受体PV缝扎牵引线的提前预置、使用橡皮泥固定钳夹SVC的器械、供、受体SVC前壁牵开、SVC的“三定点”吻合、自制“小针钩”的气泡驱除等方面进行了改进.改进后的手术方式可单人直视下操作,不需要

■同行评价

本研究把kamada及孙君泓的双袖套法肝移植术加以部分改进,使得操作更加简单,成功率较高,具有一定的实用性.

显微镜或助手协助,使操作更加简单、确切,手术成功率达到96.8%,长期存活率为95.3%,较孙君泓 *et al*^[5]法报道的手术成功率(92.5%)与长期存活率(89%)为高。笔者总结出“开放灌注四牵三缝二横一拉”法大鼠原位肝移植的无肝期,手术时间缩短,7 d生存率提高^[6]。本方法又以下优点:(1)管道的制作:用止血钳钳夹管壁一圈形成刻痕,制作方法简单。(2)横切口选择:既往文献报道由于顾忌出血多及创伤大,受体均采用腹部直切口^[1,4-5,7-9]。实际上直切口暴露较差,而腹部横切口可充分暴露,操作视野广阔,更好地显露SVC,提高吻合成功率,并可减少对肝脏的翻动及损伤,降低了手术的难度;术中可以更直观地观察肝脏颜色及呼吸动度来监测麻醉深浅。可棉球局部压迫腹壁进行止血,效果好。(3)供肝的灌注:供体全身肝素化后,向PV边插管边排管中的气泡。低压灌注肝脏,在灌注的同时剪开下腔静脉放血。灌注速度控制在2-3 mL/min,以PV无扩张、肝不肿胀为宜。可确保供肝灌注彻底、均匀、低压,防止肝脏水肿、花斑。并用冰盐水纱布覆盖肝脏,使局部持续低温。(4)PV缝扎牵引线预置:在无肝期前,用8/0缝线在受体PV左右分支预置牵引线,避免分离PV左右支时的可能出血,以免阻断PV后行PV置牵引线,缩短了无肝期。(5)供、受体SVC吻合 SVC吻合是受体手术的难点。用横切口把受体腰部垫高,用自制弹性拉钩将季肋部向两侧牵拉,并用Satinsky钳或哈巴狗钳夹受体SVC后向头侧翻转固定,使受体SVC与供体SVC在一个平面上,既解决了吻合口的张力问题,又把吻合口变浅,避免了在狭小、深在的空间操作,视野清晰,无需显微镜即可操作。为防止吻合口狭窄或成角,应

作SVC间的血管端端吻合,而不是如某些文献^[7-8]作膈肌环间的吻合。采用“三定点”缝合法,即缝合完后壁后,将前壁中点吊起,可确保吻合口均匀、整齐、光滑,避免血管膜内翻及前后壁缝闭,后期的实验发现:连续缝合3针再一起收线不仅缝合均匀、对合良好而且加快吻合速度,提高手术成功率。(6)气泡驱除:可将注射器针头针尖弯成钩,制成“小针钩”,钩住少许血管断端前壁向前提拉以撑开血管壁作牵引,在推注生理盐水排气泡同时插入套管完成吻合。操作简单、确切、迅速,无需助手协助。

4 参考文献

- 1 Lee S, Charters AC, Chandler JG, Orloff MJ. A technique for orthotopic liver transplantation in the rat. *Transplantation* 1973; 16: 664-669
- 2 刘静, 汪爽, 高毅, 孙尔维. 细胞凋亡与肝移植免疫耐受. *世界华人消化杂志* 2004; 12: 446-447
- 3 Liu J, Gao Y, Wang S, Sun EW, Wang Y, Zhang Z, Shan YQ, Zhong SZ. Effect of operation-synchronizing transfusion of apoptotic spleen cells from donor rats on acute rejection of recipient rats after liver transplantation. *World J Gastroenterol* 2005; 11: 1161-1166
- 4 Kamada N, Calne RY. A surgical experience with five hundred thirty liver transplants in the rat. *Surgery* 1983; 93: 64-69
- 5 孙君泓, 吴孟超, 曾琪华. 300次大鼠原位肝移植. *中华器官移植杂志* 1990; 11: 19-20
- 6 刘静, 孙尔维, 汪爽, 李冉冉, 聂凯, 杨爱国, 高毅, 钟世镇. “开放灌注四牵三缝二横一拉”法行大鼠原位肝移植. *中华器官移植杂志* 2005; 26: 695-696
- 7 田超睿, 姜汉英, 夏穗生. 受体肝分步切除的三袖套法大鼠原位肝移植术. *中华器官移植杂志* 1999; 20: 152-153
- 8 王轩, 杨甲梅, 严以群, 姚晓平, 吴孟超. 大鼠原位肝移植不同术式的探讨. *中华器官移植杂志* 1998; 19: 76-78
- 9 康俊升, 吴孟超. 大鼠原位肝移植的手术技巧初探. *实验动物科学与管理* 1999; 16: 47-48

编辑 李军亮 电编 郭海丽