

# 肠造瘘式异基因型大鼠胰十二指肠移植模型的建立\*\*\*

张 力, 赵雪云, 刘胜春

## Establishment of allogeneic pancreaticoduodenal transplantation models in rats with duodenostomy

Zhang Li, Zhao Xue-yun, Liu Sheng-chun

### Abstract

**BACKGROUND:** At present, rat models of pancreatic transplantation are the major animal models for studying pathophysiology and transplantation immunology, but rat models of pancreas are characterized by difficult operation and low success rate. Rat pancreatic transplantation models using intestinal stoma method can simplify operation procedure and enhance success rate in model establishment.

**OBJECTIVE:** To improve the surgical techniques to establish a rat model of pancreaticoduodenal transplantation, which can be used for experimental research.

**METHODS:** Pancreaticoduodenal transplantation was performed between SD rats as donors and Wistar rats as recipients. End-to-side anastomosis was performed for arterial reconstruction between donors' abdominal aorta and recipients' abdominal aorta segments, while the donors' portal vein segment was anastomosed with the recipients' left renal vein by cuff technique. The proximal part of duodenum of the graft was ligated and a stoma was made on the distal end.

**RESULTS AND CONCLUSION:** Pancreaticoduodenal transplantation was performed in 40 rats. Out of 40 rats, 34 rats survived more than 3 days with normal blood glucose level. The success rate of transplantation was 84.4%. The average survival time of recipients was (8.97±2.05) days. The peak of death appeared on day 7-10 after transplantation, and the pathological changes of typical acute rejection were observed on day 7. The modified model is easily performed successfully, which provides a useful tool for experiment research on transplantation immunology.

Zhang L, Zhao XY, Liu SC. Establishment of allogeneic pancreaticoduodenal transplantation models in rats with duodenostomy. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2011;15(44): 8259-8262. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

### 摘要

**背景:** 大鼠胰腺移植模型是进行胰腺移植病理生理及移植免疫研究的主要动物模型, 但大鼠胰腺模型存在手术难度大、成功率低等缺点, 而采用肠造瘘的大鼠胰腺移植能简化操作过程、提高造模成功率。

**目的:** 通过显微外科技术建立一种简单、稳定的异基因大鼠胰腺移植模型。

**方法:** 将供、受体腹腔动脉端侧吻合, 供体门静脉与受体左肾静脉以自制导管行袖套吻合, 移植十二指肠近端结扎, 远端行腹壁造瘘, 建立 SD→Wistar 的糖尿病大鼠胰腺移植模型。

**结果与结论:** 共完成大鼠胰腺移植手术 40 例, 其中 34 只大鼠术后血糖正常且存活超过 3 d, 移植成功率为 85%。受体大鼠平均存活 (8.97±2.05) d, 移植后 7~10 d 为死亡高峰期, 移植体呈急性排斥反应病理改变。该模型操作相对简单、成功率高, 能够用于胰腺移植中诸如免疫排斥等方面的研究。

**关键词:** 胰十二指肠移植; 糖尿病; 动物模型; 大鼠; 肠造瘘

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2011.44.023

张力, 赵雪云, 刘胜春. 肠造瘘式异基因型大鼠胰十二指肠移植模型的建立[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(44): 8259-8262. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

Department of Breast Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China

Zhang Li★, Studying for master's degree, Department of Breast Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China  
Zhangli096@yahoo.cn

Correspondence to: Liu Sheng-chun, Professor, Department of Breast Surgery, First Affiliated Hospital of Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China  
liushengchun1968@163.com

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No. 30871295\*; Scientific Research Starting Foundation for Overseas Chinese Scholars, Ministry of Personnel, China, No. renfa[2001]333\*; Scientific Research Program of Ministry of Science and Technology of Chongqing, No. CSTC.2009BB5065\*

Received:2011-06-07  
Accepted:2011-08-22

## 0 引言

胰腺移植是目前临床上1型糖尿病最有效的治疗方法,在最近30年取得了长足的发展<sup>[1]</sup>,但是由于胰腺具有毗邻解剖关系复杂、免疫原性强等特点,再加之供胰短缺等原因使得目前胰腺移植的受体、移植体存活率以及普及程度远不如肝、肾等实质器官的移植<sup>[2]</sup>,胰腺移植的相关基础研究也相对滞后。本实验旨在通过显微外科技术建立一种简单、稳定的异基因大鼠胰腺移植模型,模拟人异体胰腺移植病理生理过程,为胰腺移植的实验研究提供模型基础。

## 1 材料和方法

**设计:** 建立SD→Wistar的糖尿病大鼠胰腺移植模型,动物观察实验。

**时间及地点:** 于2010-10/2011-04在重庆医科大学附属第一医院动物实验中心完成。

### 材料:

**实验动物:** 清洁级健康封闭群SD大鼠,体重250~300 g,10周龄,由重庆医科大学动物中心提供;清洁级健康封闭群Wistar大鼠,体重300~350 g,10周龄,由解放军第三军医大学大坪医院动物中心提供。

重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科, 重庆市 400016

张力★, 男, 1983年生, 四川省广元市人, 重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科在读硕士, 主要从事胰腺移植基础研究。  
Zhangli096@yahoo.cn

通讯作者: 刘胜春, 教授, 重庆医科大学附属第一医院内分泌乳腺外科, 重庆市 400016  
Liushengchun1968@163.com

中图分类号: R617  
文献标识码: B  
文章编号: 1673-8225(2011)44-08259-04

收稿日期: 2011-06-07  
修回日期: 2011-08-22  
(20110607009/M·S)

### 实验试剂及器材:

实验试剂及器材	来源
链脲佐菌素	Sigma, 美国
血糖仪	强生公司, 美国
双人双目显微镜	上海医疗器械厂
门静脉袖套(介入外鞘管6F制成, 长度为3 mm, 管耳长2 mm)、小拉钩	自制

### 方法:

**糖尿病模型的建立:** Wistar大鼠在空腹状态下按60 mg/kg的剂量腹腔注入链脲佐菌素。注药3 d后测血糖, 以连续3 d血糖 $\geq 16.8$  mmol/L为建模成功<sup>[3]</sup>。

**大鼠胰十二指肠移植模型的建立:** 以SD大鼠作供体, 造模成功的Wistar大鼠作受体进行胰十二指肠移植手术, 按受体比供体重30~50 g进行随机配对。供、受体大鼠术前禁食12 h, 给予5%糖水自由饮用。10%水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉后, 将大鼠仰卧位固定于自制手术板上, 开腹前碘伏消毒皮肤, 采用清洁方式进行手术。

**供胰的切取与修复:** 采用上至剑突下至趾骨联合的腹部正中切口开腹, 以自制拉钩暴露腹腔, 以下操作在显微镜下完成。将胃向左上翻起, 锐性分离肝乳头叶上覆盖的脾胃间腹膜, 结扎切断脾胃韧带, 紧贴脾结扎胰脾之间的血管但不切断, 结扎切断胃左动、静脉和食管。分离胰腺与大网膜的联系, 结扎切断胃网膜左右动静脉, 在幽门环下方5 mm处用6-0丝线结扎十二指肠。向右下牵拉胃暴露第一肝门, 结扎切断胆总管和肝固有动脉, 游离门静脉至其分叉处。切断胃与十二指肠之间的联系, 弃去胃。向下牵拉横结肠, 沿无血管区锐性分离胰腺下缘与横结肠之间的联系, 结扎切断中、右结肠动静脉。将所有小肠翻向左侧, 暴露屈氏韧带, 紧贴胰腺下缘分别结扎切断肠系膜上动、静脉, 沿十二指肠游离胰腺, 保留含胰管开口在内的十二指肠段约3 cm。钝性分离腹主动脉上被覆的后腹膜, 结扎切断左、右肾动脉及腹主动脉背侧腰动脉, 完全游离腹腔干和肠系膜上动脉所在的腹主动脉段。在左肾动脉下2 cm处结扎腹主动脉, 于肠系膜上动脉分支水平远端处预置6-0丝线, 从左肾静脉注入肝素林格式液1 mL(25 U/mL)使供体肝素化, 然后在腹腔干上方约1 cm处用微血管夹阻断腹主动脉。在左肾动脉结扎处插入灌注针头, 预置丝线打结, 迅速于门静脉分叉处剪断, 4 ℃肝素生理盐水(25 U/mL)低流量低压灌注胰腺, 直至门静脉流出澄清灌注液。于血管夹下方剪腹主动脉, 肠系

膜下方结扎切断腹主动脉, 即获得移植物。迅速将带脾的胰十二指肠移植物放入4 ℃肝素生理盐水中保存。于显微镜下在保存液中修剪掉胰腺上的细小脂肪组织, 将门静脉穿过袖套内口, 并将其外翻套于管体上, 用6-0丝线环扎固定。

**受体手术:** 术前于尾静脉注入25 U/mL肝素林格式液1 mL行肝素化。腹腔暴露过程同供体, 将肠管推向右侧, 用盐水纱布覆盖。结扎切断左输尿管, 游离左肾动静脉, 然后剪开肾包膜游离左肾。在左肾动脉水平向下游离腹主动脉约0.8 cm, 靠近腹主动脉结扎切断左肾动脉, 靠近下腔静脉用微血管夹夹闭左肾静脉, 紧贴肾门切除左肾, 25 U/mL肝素林格式液冲洗左肾静脉。将移植物用含冰晶的湿纱布包裹, 置于左肾切除后的凹陷内, 调整方位以确保吻合血管不扭曲。先重建动脉, 先近端后远端用微血管夹夹闭受体腹主动脉, 在结扎段腹主动脉上左侧壁开一椭圆形窗口, 25 U/mL肝素林格式液冲洗, 用9-0缝线两定点法前后壁分别连续外翻缝合, 完成供、受体腹主动脉端侧吻合。再重建静脉, 将受体门静脉袖套入受体左肾静脉内断端, 6-0丝线环扎固定。按静脉近端-静脉远端-动脉远端-动脉近端的顺序开放血流, 用干明胶海绵轻压吻合口1.0~2.0 min。吻合成功后可见胰十二指肠迅速由苍白转为红润, 小动脉搏动有力。最后切除脾脏, 将移植物十二指肠腹壁造瘘, 然后分两层间断缝合腹壁。肠造瘘后约25 min后可见液体从瘘口流出。手术情况见图1~4。



Figure 1 Prepared pancreaticoduodenal tissue from the donor (x10)  
图1 供胰的切取与修复后(x10)

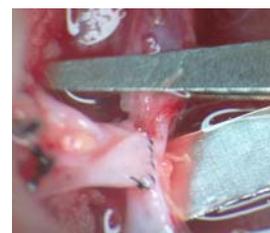


Figure 2 Reconstruction of the abdominal aorta (x10)  
图2 动脉重建后(x10)



Figure 3 Anastomosis of donor portal vein and the recipient left renal vein cuff (x10)  
图3 供体门静脉与受体左肾静脉袖套吻合后(x10)



Figure 4 Transplanted pancreas turned into red after reperfusion  
图4 开放血流后胰腺变红润(x10)

**术后处理:** 术后大鼠肌注 $80 \times 10^4$  U青霉素。将大鼠置于复温板上1 h, 待大鼠完全清醒后单笼饲养, 2 h后自由饮水, 24 h后恢复正常饮食。分别于术后第1, 3, 5, 7, 10天尾尖取血测每只大鼠随机血糖。

**移植物病理学检查:** 分别于术后6 h和7 d, 取移植胰腺组织, 100 g/L多聚甲醛固定2 d, 4 mm切片, 行常规苏木精-伊红染色。

**统计学分析:** 血糖水平用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 移植前后血糖的比较采用配对t检验。采用SPSS 11.0软件进行统计学分析, 检验水准 $\alpha=0.05$ 。

## 2 结果

**2.1 手术相关时间统计** 共完成40对SD→Wistar的大鼠胰腺移植手术。以移植后受体血糖 $< 11.2$  mmol/L作为移植物有功能的指标, 血糖 $> 11.2$  mmol/L作为移植物失功的指标, 移植后3 d内移植物失功或受体死亡记作手术失败。由此统计手术成功34例, 失败6例, 手术成功率为85%。失败原因包括静脉扭曲致移植物淤血、肿胀、血栓形成2例, 动脉吻合口出血1例, 腹腔感染1例, 下肢缺血性瘫痪处死1例, 移植物失功1例。手术时间供体( $63.5 \pm 5.5$ ) min, 受体( $55.0 \pm 5.0$ ) min, 门静脉袖套准备时间2 min左右, 动脉吻合时间( $17.1 \pm 2.5$ ) min, 静脉套管时间( $3.35 \pm 0.69$ ) min, 移植物热缺血时间0 min, 冷缺血时间( $49.5 \pm 5.1$ ) min。

**2.2 移植前后血糖水平比较** 移植后第1天大鼠血糖水平为( $5.70 \pm 1.19$ ) mmol/L, 较移植前1 d ( $22.03 \pm$

$3.39$ ) mmol/L明显下降, 差异有显著性意义( $P < 0.05$ )。移植后第10天血糖水平为( $20.54 \pm 3.63$ ) mmol/L, 与移植前1 d接近, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。

**2.3 移植胰腺病理变化** 胰腺移植后6 h, 移植物形态大体正常, 胰岛、胰腺小叶结构正常, 小叶间基本无炎性细胞浸润, 见图5。移植后第7天, 移植胰腺发生中重度排斥反应, 光镜下可见腺泡大片融合、坏死; 大量炎性细胞、红细胞渗出; 胰岛结构模糊, 甚至消失; 并伴有动静脉内膜炎, 见图6。

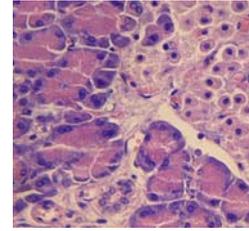


Figure 5 Pathological change of transplanted pancreas at 6 h after transplantation, the pancreas islet and gland alveolus were almost normal (Hematoxylin-eosin staining, x400)  
图5 移植后6 h, 胰腺之胰岛、胰腺小叶等结构基本正常(苏木精-伊红染色, x400)

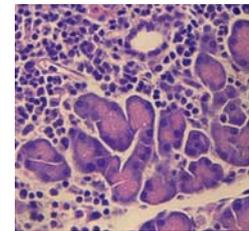


Figure 6 Pathological change of transplanted pancreas at 7 d after transplantation. Many gland alveolus in transplanted pancreas confluent and were necrotic; many inflammatory cells, blood cells infiltrated gland alveolus; the pancreas islet decreased or even vanished and there were endoangiitis in the artery (Hematoxylin-eosin staining, x400)  
图6 移植后7 d, 胰腺实质内大片腺泡融合、坏死, 腺泡周围有大量炎性细胞、红细胞渗出; 胰岛结构模糊、消失, 并伴有动脉炎(苏木精-伊红染色, x400)

**2.4 受体大鼠存活时间统计** 对手术成功的34只大鼠进行生存时间统计, 最短存活5 d, 最长存活13 d, 平均存活时间( $8.97 \pm 2.05$ ) d。移植后7~10 d死亡的大鼠血糖水平平均 $> 17.0$  mmol/L, 结合病理检查结果, 可以得出结论: 移植后7~10 d是排斥反应程度最重的时间段, 是大鼠死亡的高峰期。

## 3 讨论

胰腺移植是目前维持1型糖尿病患者长期血糖稳定和摆脱胰岛素依赖最有效的治疗方法。但是胰腺移植的发展受到外科并发症、同种异体免疫屏障、自身免疫性

糖尿病复发以及其他外科问题的限制<sup>[4]</sup>。因此建立理想的动物模型具有重要的意义。Lee等<sup>[5]</sup>的大鼠胰腺移植模型多年来一直是进行胰腺移植相关基础研究的经典模型, 但该模型手术难度大、成功率低(65%)。作者借鉴Sakamoto等<sup>[6]</sup>的袖套法制作大鼠原位肝移植的基础上, 对经典术式进行改进, 利用自制袖套完成静脉重建, 并采用肠造瘘引流胰液。该法的优点主要体现在: ①由于静脉阻断后管壁塌陷、吻合困难, 而采用袖套法重建静脉, 仅需2 min左右, 这极大简化了手术过程、明显缩短了受体冷缺血时间。②避免了阻断下腔静脉引起的血流动力学改变。③将供体的门静脉与受体的左肾静脉套管吻合, 避免了阻断受体肠系膜上静脉或门静脉。④作者采用供体胰十二指肠末端腹壁造瘘引流胰液, 与传统的膀胱引流或肠引流比较该术式避免了膀胱引流导致的尿路并发症, 以及肠引流可能引起的肠痿、腹腔感染等并发症<sup>[7]</sup>; 明显缩短了受体手术时间; 现有的研究发现胰十二指肠移植后, 胰腺和十二指肠黏膜排斥反应大都同时存在, 采用肠造瘘后可以通过瘘口收集胰液作相关生化检查, 以及取十二指肠黏膜及胰腺进行病理学检查<sup>[8-9]</sup>。

建立该模型除了要求具有扎实显微外科基本功和耐心细致的操作外, 还有如下一些要点需要注意: ①实验动物及器材: 因为胰腺是低血流器官, 尽量按受体比供体重30~50 g进行配对, 这样受体的左肾静脉较供体门静脉粗, 能够减少血栓形成的概率, 同时也能使静脉袖套的连接容易完成。门静脉袖套套管选材要求管壁薄、管腔大, 这有助于静脉通畅。②供体手术: 胰腺与其他实质器官相比, 具有易脆、易损伤的特点, 因此在分离胰腺时应遵循Lee等<sup>[5]</sup>的“零接触”原则, 尽量用湿纱条轻柔分离, 切忌挤压、过分牵拉, 钳夹、反复翻动胰腺, 这样可以避免术后创伤性胰腺炎、毛细血管内微血栓形成等并发症。保留供体脾脏至血管吻合后再切除, 将脾作牵拉之用, 也可有效避免直接接触胰腺。在结扎切断肝固有动脉时, 要保护好胰十二指肠动脉。结扎近端腹主动脉时立即往胰腺上不停地浇冰林格氏液对移植植物进行降温, 以保证胰腺处于冷缺血状态。灌注时要做到低压、匀速、缓慢, 以2 mL/min为宜, 灌注总量5 mL左右。③受体手术: 为了防止静脉血栓的形成, 受体术前必须肝素化。在进行血管重建时, 必须保证血管不扭曲, 以防止动脉不通或静脉血栓形成。在开放血流前必须用带冰晶的纱布进行供胰的降温, 防止热缺血损伤。修剪受体腹主动脉形成的“卵圆形”口径尽量与供体腹主动脉口径一致。动脉连续缝合的针距不宜过大, 且疏密均匀, 以每壁6~8针为宜。在开放血流前, 要仔细检查动脉吻合口是否有间隙, 如有漏缝或可疑间隙应补缝一两针, 这样比开放血供后补缝要轻松得多。开放血流后用干明胶海绵轻压吻合口1.0~2.0 min一般都能止住针眼渗血, 如果不能止血应重新阻断血流检查

是否有漏针, 然后补缝。静脉袖套吻合后要剪掉管耳, 以免阻碍静脉通畅。

通过以上手术操作方面的不断改进, 移植成功的34只大鼠移植后1 d的血糖均将降至正常范围内, 说明供体胰腺已恢复活力, 替代受体胰腺内分泌功能, 使糖尿病大鼠血糖下降, 这正是胰腺移植的最终目的。实验观察到移植后7~10 d是大鼠死亡的高峰期, 结合病理切片结果可以得知此时间段排斥反应程度最重。当然此模型采用肠造瘘引流胰液, 大鼠有可能因碱性液体的丢失而造成酸碱失衡, 应予以重视。总之此模型操作过程被简化, 手术成功率高, 能够用于胰腺移植相关的基础研究, 尤其适用于移植免疫相关方向的研究。

#### 4 参考文献

- [1] Dean PG, Kudva YC, Stegall MD. Long-term benefits of pancreas transplantation. *Curr Opin Organ Transplant*. 2008;13(1):85-90.
- [2] Ming C, Gong N, Chen X. The current state of pancreas-kidney transplantation in China: the indications, surgical techniques and outcome. *J Huazhong Univ Sci Technolog Med Sci*. 2009;29(3):269-272.
- [3] Park SH, Marso SP, Zhou Z, et al. Neointimal hyperplasia after arterial injury is increased in a rat model of non-insulin-dependent diabetes mellitus. *Circulation*. 2001;104(7):815-819.
- [4] Liu XY, Xue L, Zheng X, et al. Pancreas transplantation in the mouse. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2010;9(3):254-258.
- [5] Lee S, Tung KS, Koopmans H, et al. Pancreaticoduodenal transplantation in the rat. *Transplantation*. 1972;13(4):421-425.
- [6] Sakamoto I, Takahashi T, Kakita A, et al. Experimental study on hepatic reinnervation after orthotopic liver transplantation in rats. *J Hepatol*. 2002;37(6):814-823.
- [7] Monroy-Cuadros M, Salazar A, Yilmaz S, et al. Bladder vs enteric drainage in simultaneous pancreas-kidney transplantation. *Nephrol Dial Transplant*. 2006;21(2):483-487.
- [8] Liu Z, Guan FL, Shen ZY, et al. *Zhongguo Putong Waikexue Zazhi*. 2002;11(3):165-167.
- [9] 刘忠, 关凤林, 沈忠义, 等. 异基因大鼠全胰十二指肠移植急性排斥反应的病理变化[J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(3):165-167.
- [9] Wang ZW, Fan XJ, Zhu MY, et al. *Zhongguo Putong Waikexue Zazhi*. 2004;13(10):754-757.
- 王志伟, 范向军, 朱铭岩, 等. PFC, TNF- $\alpha$ , NO在猪胰腺移植急性排斥反应中的意义[J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(10):754-757.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 课题受国家自然科学基金项目(30871295), 国家人事部出国留学人员科研启动基金项目(人发[2001]33), 重庆市科委科研项目(CSTC, 2009BB5065)资助。

**作者贡献:** 实验设计为第一作者, 实验实施为第一、二作者, 实验评估为全部作者共同进行, 第一作者收集资料并撰写论文, 第三作者审核, 第一作者对文章负责。

**利益冲突:** 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

**伦理批准:** 实验过程中对动物处置符合动物伦理学标准。

**本文创新性:** 以“胰腺移植、肠造瘘、异基因型”为关键词, 检索万方数据库, 未发现同类性质的文章, 证明该实验具有先进性。实验采用内分泌体静脉回流, 外分泌肠造瘘的方式建立异基因型大鼠胰腺移植模型, 简化了操作过程, 提高了造模成功率, 为胰腺移植的基础研究提供了模型基础。