

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.31.009

[http://www.crter.org]

强光亮, 鲍彤, 温焕舜, 肖飞, 梁朝阳. 大鼠肺移植模型的改良[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(31): 5633-5638.

大鼠肺移植模型的改良*☆

强光亮, 鲍彤, 温焕舜, 肖飞, 梁朝阳(中日友好医院胸外科, 北京市 100029)

文章亮点:

- 1 实验对于供体大鼠采用气管切开插管法, 该方法优点是不需要特殊体位或设备, 快速简便, 操作容易, 成功率高, 单人即能完成操作。缺点是对动物机体创伤较大。
- 2 实验模型建立中, 取大鼠供肺时, 经胸骨正中切开, 较快且暴露好, 避免了经左侧胸腔入路暴露较差或者经两侧胸壁 U 字型切口至胸锁关节的繁琐, 避免损伤到胸廓内血管引起大出血。
- 3 实验采用的经肺动脉干灌注的方法简便实用, 与临床上取供体肺的方法更加接近, 尤其适合单人操作。
- 4 套管制作的方法与以往文献报道制作体部和尾部的的方法不同, 实验中直接从套管针上剪取 1.5 mm 的一段作为套管, 不需专门制作尾端, 用显微镊子夹住套管, 同样可将血管或支气管全周反折于套管。这样可以减少实验时间, 缩短套管长度。尽可能减少受体内异物, 从而减轻异物反应和纤维化, 同时可避免组织损伤, 这对要求较长时间存活的移植实验尤为重要。
- 5 实验在供肺静脉剪取时, 附带了少许心房壁并保证断端整齐, 增加了供肺静脉的长度。吻合时在受体肺静脉前壁剪开 1/3 管径的小口, 套管时只需牵拉血管前壁, 降低了撕裂血管的风险, 也更方便套管置入后的固定。加上暂不切断受体左肺, 可进行牵拉, 使肺门略为固定和上提, 血管壁保持一定的张力, 克服肺门深在的不利因素, 使血管暴露更好, 使套管更为方便。由于血管和支气管之间的相对位置固定, 也避免了管壁的旋转成角。

6 整个肺移植过程, 供肺均置于切口上方, 增加了胸腔的有效操作空间, 同时也减轻了对纵隔和对侧肺的压迫。

关键词:

器官移植; 心肺移植; 原位; 动物模型; 大鼠; 改良; 免疫; 排斥; 其他基金

摘要

背景: 建立大鼠原位肺移植模型是研究肺移植后慢性排斥反应的关键, 但因其需要精细外科技术, 难度较大, 限制了这一模型的应用。

目的: 改良麻醉和肺移植过程, 建立快速、安全、具有可重复性的大鼠肺移植模型。

方法: 共完成 42 只大鼠动物实验, 供体受体各 21 只。采用胸骨正中切口解剖供体左肺并置入套管(用静脉留置针套管剪取 1.5 mm 长制成)获取大鼠供肺。大鼠受体经左侧开胸, 利用套管技术吻合完成供肺植入。记录并计算手术时间及移植成功率。

结果与结论: 移植后大鼠均存活, 大鼠供肺获取时间平均为(35.3±5.1) min; 供肺套管时间平均为(12.5±4.6) min; 大鼠受体肺移植时间平均为(50.2±3.3) min; 吻合时间平均为(27.7±6.2) min。开放肺动、静脉血流后, 全肺迅速变红, 血流灌注充分, 静脉回流通畅; 恢复机械通气后, 所有移植肺膨胀良好。结果证实, 改良后的麻醉和肺移植技术可为大鼠肺移植的免疫与排斥研究提供稳定、可靠、可重复的动物模型。

Improvement of a rat lung transplantation model

Qiang Guang-liang, Bao Tong, Wen Huan-shun, Xiao Fei, Liang Chao-yang (Department of Thoracic Surgery, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China)

Abstract

BACKGROUND: Orthotopic lung transplantation model in a rat is the key to investigate the chronic rejection after lung transplantation. However, the precise surgical technique and difficult operation limit the application of the model.

OBJECTIVE: To improve the process of anesthesia and lung transplantation, and to establish a rapid, safe and reversible rat lung transplantation model.

METHODS: A total of 42 rats were used to establish the model, including 21 donor models and 21 receptor models. The donor lung was excised by median sternotomy with dissection of the left lung and implantation of cuffs (intravenous catheters cut into 1.5 mm sections). The left lung was implanted in the recipient by lateral thoracotomy using the cuffs for anastomoses. The duration of surgery and success rate of transplantation were recorded and calculated.

RESULTS AND CONCLUSION: The survival rate of rats after lung transplantation was 100%. The time of left donor lung extraction was (35.3±5.1) minutes in average. The time of placing cuff in donor lung was (12.5±4.6) minutes in average. The surgical procedure time of recipient was (50.2±3.3) minutes. The time of arteriovenous

强光亮☆, 男, 1983 年生, 安徽省无为县人, 汉族, 2009 年北京大学医学部毕业, 博士, 主治医师, 主要从事胸部微创手术、肺移植研究。
pkudd@126.com

通讯作者: 梁朝阳, 硕士, 副主任医师, 中日友好医院胸外科, 北京市 100029
chaoyangliang8@yahoo.com

中图分类号: R318
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2013)31-05633-06

收稿日期: 2013-03-11
修回日期: 2013-03-13
(201303058W · C)

Qiang Guang-liang ☆, M.D.,
Attending physician,
Department of Thoracic
Surgery, China-Japan
Friendship Hospital, Beijing
100029, China
pkudd@126.com

Corresponding author: Liang
Chao-yang, Master, Associate
chief physician, Department of
Thoracic Surgery, China-Japan
Friendship Hospital, Beijing
100029, China
chaoyangliang8@yahoo.com

Supported by: Scientific
Research Projects of
China-Japan Friendship
Hospital, No. 2012-QN-12*

Received: 2013-03-11
Accepted: 2013-03-13

and bronchus casing anastomosis was (27.7±6.2) minutes. After pulmonary artery and vein blood flow was disrupted, the whole lung turned red rapidly, blood perfusion was sufficient, venous returned unimpeded; after mechanical ventilation resumed, all graft lungs expanded well. This improved anesthesia and lung transplantation technique in rats can provide a valid, reliable and reproducible animal model for studying immune responses and rejection in lung transplantation.

Key Words: organ transplantation; heart-lung transplantation; orthotopic; animal model; rats; improved; immune; other grants-supported paper

Qiang GL, Bao T, Wen HS, Xiao F, Liang CY. Improvement of a rat lung transplantation model. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2013;17(31): 5633-5638.

0 引言

目前肺移植已经成为终末期肺疾病的唯一有效的治疗方法。建立肺移植稳定的动物模型是研究肺移植的基础。应用大鼠肺移植模型进行同系或同种移植, 免疫差异性小, 移植后免疫排斥反应较轻, 可以进行肺保存和移植排斥的研究, 比较经济、易于管理。1989年Mizuta等^[1]应用套管法建立了经改进的显微外科技术完成的大鼠肺移植模型, 1995年Reis等^[2]报告了具有明显效果的经改进的套管技术。此后, 应用套管法或改良套管法建立大鼠肺移植模型得到了广泛应用。作者在三套管法肺移植模型的基础上加以改良建立大鼠肺移植模型。

1 材料和方法

设计: 大鼠肺移植技术改良。

时间及地点: 于2011年9月至2012年9月在中日友好医院动物实验室完成。

材料: 纯种Wistar大鼠42只, SPF级(Specific Pathogen Free, 无特定病原体)饲养, 雌雄不拘, 体质量250–350 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司。供、受大鼠间体质量基本匹配, 受体略大于供体。实验过程中对动物处置方法符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学要求。

实验方法:

大鼠供肺获取: 供体大鼠术前12 h禁食, 不禁水, 腹腔注射20 g/L戊巴比妥钠50 mg/kg体质量麻醉, 大鼠意识丧失、呼吸平稳、全身肌肉松弛, 视为麻醉成功。将大鼠仰卧位固定于手术台, 颈部气管切开, 顺气管走行插入静脉留置套管针后拔除针芯, 套管接动物呼吸机(DHX-150, 成都仪器厂), 见图1。呼吸机参数设置: 频率80次/min, 潮气量10 mL/kg, 吸呼比为1:2。消毒后取胸骨正中切口沿剑突下至颈部切开皮肤、肌层与胸骨, 将胸骨向两侧牵拉充分显露手术野, 切除胸腺与纵隔脂肪, 1 000 U/kg肝素经下腔静脉注入。离断下肺韧带, 解剖出肺动脉主干、肺静脉和左侧支气管, 游离肺动脉干和主动脉后方的间隙并预置3-0丝线, 同法将左肺静脉套线备用。将18G静脉留置针自右心室流出道插入

肺动脉干, 结扎肺动脉于套管上阻断自身肺灌注, 剪开左心耳放血, 同时以2.45 kPa的灌注压缓慢灌入的低钾右旋糖苷溶液25 mL, 此时, 灌注液经肺动脉→肺静脉→左心房、左心耳流出。继续灌注3–5 min直至左肺变为苍白色, 自左心耳流出透明液体后停止灌注。



注: 于大鼠气管前纵行切开并钝性分离颈前肌群, 向两侧牵拉, 顺气管方向插入套管后拔除针芯, 接呼吸机。

图1 大鼠肺移植改良模型建立供体大鼠气管切开插管

Figure 1 Improved rat lung transplantation model after tracheotomy intubation of donor

于肺动脉插管近心端剪断肺动脉和套管, 并留部分套管于远心端血管内作为标记, 见图2。



注: 于大鼠肺动脉插管近心端剪断肺动脉和套管, 并留部分套管于远心端血管内作为标记。

图2 大鼠肺移植改良模型建立供体大鼠左肺灌注后

Figure 2 Establishment of improved rat lung transplantation model after of donor left lung perfusion

附带部分左心房将左肺静脉于近心端切断, 尽量保留足够的长度并修剪整齐以利于套管。用显微血管夹在吸气相时将左侧支气管夹闭, 使肺处于半膨胀状态, 远端离断, 取出供肺。使用静脉留置针套管制作长度为1.5 mm的套管, 肺动脉和支气管套管分别采用16 G和14 G静脉留置针套管。将血管或支气管从套管体中自尾端向头端穿出, 把血管或支气管向尾端翻转, 以6-0丝线固定, 完成供肺的准备, 置于4 °C的低钾右旋糖苷液中保存。

受体大鼠肺移植: 麻醉方法同供体, 经口气管插管, 将光源照射于大鼠颈部皮肤, 左手将鼠舌向外向上牵拉, 见声门开口后。右手持气管插管(由14 G静脉留置针套管制成), 在声门张开的时候插入气管, 接呼吸机见大鼠胸廓起伏正常对称, 以确认插管位置。呼吸机参数设置同供体大鼠手术。

大鼠右侧卧位固定, 右侧胸部下垫一折叠的纱布块使大鼠体位呈折刀位, 以抬高左侧胸腔并展开肋间隙, 左侧胸壁备皮、消毒。手指由锁骨下方自上而下数肋骨定位第4肋间。组织剪剪开皮下组织后, 将前锯肌和背阔肌分别向前后牵开而不切断, 紧贴第5肋上缘剪开肋间外肌、肋间内肌, 经左侧第4肋间入胸, 以眼睑牵开器撑开切口充分暴露。由于个体差异, 第四肋间对于一些大鼠可能较低, 暴露肺动脉较困难, 这时则采取切断部分第四肋骨的方法暴露, 但需要注意断端的处理, 避免在受体左肺牵拉出胸腔时损伤肺血管, 造成大出血, 致使手术失败。

离断下肺韧带, 用棉签将左肺拨出胸腔并牵拉固定, 显露肺门, 游离左肺动静脉和支气管, 充分显露其管腔全长。先向后上方牵引左肺, 游离出肺静脉及分支; 随之将左肺向后下方牵引, 暴露肺门上方, 游离出左肺动脉干。以微血管夹分别夹闭肺动、静脉和支气管, 在血管夹的远心端分别预置5-0丝线绕外科结备用, 见图3。



注: 充分解剖肺门后, 预置5-0丝线于近心端, 微血管夹分别夹闭肺动脉、支气管、肺静脉。

图3 大鼠肺移植改良模型建立受体大鼠肺动脉、静脉、支气管游离完成。

Figure 3 Improved lung transplantation model with completion of the pulmonary artery, vein and bronchial free

将供肺置于受体胸腔上方, 紧贴受体左肺。于远心端将受体左肺静脉前壁剪开1/3管径长度小口, 显微镊拉开肺静脉壁, 将供肺静脉套管塞入受体左肺静脉内, 再将预置的5-0丝线外科结拉紧, 打结, 完成肺静脉的套管。同法完成肺动脉和支气管的套管。吻合支气管前, 需要将支气管内的分泌物清除干净。吻合完毕, 依次开放肺静脉、动脉及支气管, 移植肺逐渐变为粉红色。剪断受体左肺, 将移植肺置入胸腔, 完成移植, 见图4。



注: 完成肺静脉、肺动脉和支气管套管吻合, 依次开放肺静脉、动脉及支气管, 移植肺逐渐变为粉红色。

图4 大鼠移植肺开放灌注后

Figure 4 Open perfusion of rat lung transplantation

检查吻合口无漏血、漏气, 放置胸腔引流管后逐层关胸。动物清醒呼吸频率 > 70次/min后, 经气管插管吸痰, 逐渐减少潮气量, 拔除气管插管、胸腔引流管。术毕腹腔补液1 mL后放回饲养笼中。术后注意保暖, 长时间的手术、麻醉、失血, 都会造成大鼠体温过低, 最适宜的室温为控制在25 °C左右。

肺移植模型吻合成功的标准: ①吻合口无漏血、漏气。②肺动、静脉均充盈。③肺颜色粉红, 均匀一致, 弹性良好。

主要观察指标: ①大鼠肺移植供肺获取时间、供肺套管时间。②受体肺移植时间、吻合时间。③移植肺循环及膨胀情况。

统计学分析: 统计学处理由第一作者完成, 所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 应用SPSS 11.5 for windows统计软件处理, 以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 进行大鼠左肺移植正式实验42只(21对), 移植后大鼠均存活, 全部进入结果分析。

2.2 大鼠左肺移植时间 大鼠供肺获取时间平均为(35.3±5.1) min; 供肺套管时间平均为(12.5±4.6) min; 受体左肺移植时间平均为(50.2±3.30) min; 吻合时间平均为(27.7±6.2) min。开放肺动、静脉血流后, 全肺迅速变红, 血流灌注充分, 静脉回流通畅; 恢复机械通气

后, 所有移植肺膨胀良好。

3 讨论

肺移植已经成为治疗许多终末期肺疾病(如肺气肿、肺间质纤维化、肺动脉高压等)唯一有效的治疗方法。从国内外经验来看, 肺移植需要经过长期的临床前期研究和准备工作。通过对动物模型的研究, 进而将结果应用于临床, 是移植学发展的一条重要途径。因此, 建立具有可操作性的肺移植动物模型对于发展临床肺移植起着不可替代的作用。迄今已报道多种肺移植的动物模型^[3-9], 大鼠肺移植模型可行同系或异系移植^[10-18], 具有可以研究移植后免疫性或非免疫性病理生理变化的优点, 动物来源丰富, 价格较低且便于管理^[19]。但对外科操作技术尤其是显微操作技术有一定要求。尽管在手术操作上比犬等大型动物困难, 但是从国内外实践来看, 经过一段时间的训练是完全可以掌握其手术技术的。另一方面, 该模型单人操作足以完成, 模型维护简便也是较大型动物模型的方便之处。1971年, Asimacopoulos等^[20]首先报道了大鼠原位异体移植, 在显微镜下分别吻合肺动脉、和肺静脉, 开创了同基因大鼠原位左肺移植模型。这种方法的优点是对气管和血管的长度无特别要求, 对肺门的游离少, 组织损伤小, 吻合口血供的保存较完整, 有利于吻合口的愈合。但是这种显微缝合技术对于实验者的显微外科手术技术要求很高, 手术时间长, 动物死亡率高, 模型既不稳定也不易普及推广。自1989年Mizuta等应用套管法建立大鼠肺移植模型后, 明显降低了手术的难度, 缩短了手术时间, 该模型被广泛用于各项研究中, 同时也在不断改进和完善。这次实验目的是建立起一个长期稳定有效的大鼠肺移植模型, 为研究移植肺功能和病理改变情况, 以及肺移植后自身免疫反应的发生机制与治疗学研究提供基础。

3.1 气管插管及气道管理 呼吸支持是建立大鼠肺移植模型的首要步骤。由于大鼠呼吸频率较快、口腔狭小、声门位置较高, 插管时声门暴露困难, 容易造成喉痉挛、喉水肿、气管穿孔、出血和分泌物过多阻塞气管导致窒息等并发症, 影响实验结果。

以往行大鼠气管插管, 由于是盲插法(在没有暴露声门的情况下直接插管), 成功率非常低, 要通过多次插管才能成功。套管对气管损伤大, 特别是一次插管不成功时, 反复刺激大鼠喉部, 使其喉部黏膜损伤, 分泌物增加, 声带水肿, 插管时易出现不同程度的缺氧窒息。另外, 还可致气管软骨断裂, 造成漏气与术后感染, 是大鼠术中与术后死亡的主要原因。而作者使用直视下进行大鼠气管插管, 成功率高, 是建立大鼠人工呼吸的较好方法。

首先需要选择与实验动物相匹配的直径大小与长

短合适的气管套管。气管套管应在能插入的前提下, 选内径较粗的。这样既可保证大鼠有较好的肺通气, 又可防止气管套管从气道中滑出; 套管长短合适有利于插管位于气管之中而不致过深进入一侧支气管。根据作者实验体会, 14 G套管针适合300 g以上大鼠, 16 G套管针适合300 g以下大鼠。实验对于供体采用气管切开插管法, 沿颈部中线纵行切开1 cm切口, 止血钳钝性分开筋膜后, 游离甲状腺并分开颈前肌, 暴露白色、有环形软骨的气管。游离0.5-0.6 cm长度的气管后套线, 将套管针沿气管方向插入气管后拔出针芯, 丝线结扎固定套管即完成操作。

该方法优点是不需要特殊体位或设备, 快速简便, 操作容易, 成功率高, 单人即能完成操作。缺点是对动物机体创伤较大, 在慢性实验研究中, 切口的大小、组织损伤的程度、手术时的无菌程度以及术后的感染都会影响术后大鼠的恢复, 增加了非实验因素对实验结果的影响。因此, 对于受体采用直视下气管插管法建立通气。将光源照射于大鼠颈部皮肤, 用组织钳小心地将大鼠舌头拉出口腔, 光线可透过大鼠下颌部皮肤和肌肉照亮大鼠喉部, 此时能清楚见到声门随着大鼠呼吸开闭, 在大鼠吸气时将气管套管插入气道。接呼吸机后可见大鼠胸廓随机械通气的频率有规律起伏, 并且双侧对称, 是插管成功的标志。大鼠对缺氧十分敏感, 一旦判断插管不成功即应迅速拔管重新插管, 避免大鼠发生严重的缺氧。由于套管壁较为光滑, 需要妥善固定气管插管, 防止套管脱出或过深进入一侧支气管。手术过程中如果发现肺膨胀不满意, 呼吸动度差, 或气道内产生哮鸣音或痰鸣音, 应及时检查气道, 吸净分泌物保持气道通畅, 必要时适当加大潮气量。小动物呼吸机一般是容量控制模式, 容量控制需要非常精准, 因为大鼠的潮气量很小, 过大过小都可能造成肺损伤或缺氧。

直视法大鼠气管插管, 气道口清晰可见, 只要把握好大鼠呼吸节奏、插管成功率高, 但初学时要掌握好暴露声门的技巧, 插入导管的力度要适当, 大鼠头部和颈部要保持同一水平, 插管方向正确, 套管置入受阻时应避免暴力否则可能损伤气道。需要注意可能误入食管的情况, 插管时要将套管略向上腭部方向轻挑, 以防插入食管(因食管在气管背侧), 通过接呼吸机后观察胸廓起伏来判断。操作熟练后过程比较简单, 所需器械少, 是一种简便、无创性的气管插管方法。

作者在预实验阶段发现有大鼠术后因为呼吸道及口腔分泌物堵塞气管而死亡, 所以在加强手术中气管腔内分泌物清除的同时, 作者认为在拔管前除需气管插管内吸痰外, 还需注意清除口腔内的分泌物。大鼠术后在一段时间内较为虚弱, 很难自主将其排出, 如不能将其清除, 易引起术后窒息。

3.2 供肺获取与处理 实验模型建立中, 取供肺时,

经胸骨正中切开, 较快且暴露好, 避免了经左侧胸腔入路暴露较差或者经两侧胸壁U字型切口至胸锁关节的繁琐, 避免损伤到胸腔内血管引起大出血。该开胸方法有利于心肺组织的暴露, 避免在操作过程中误伤肺组织, 也有利于从肺动脉干进行肺灌注。

进入胸腔后, 在供肺灌注和获取之前, 先充分游离肺门, 采用棉签结合血管钳钝性分离肺门的方法, 用一根棉签将左肺拨向背侧并保持一定的张力显露肺门, 用另一根棉签将左肺韧带牵出并剪开, 棉签钝性游离肺门前, 注意动作要轻柔、循序渐进, 直至游离到隆突为止。对于肺门区血管和支气管, 可用弯血管钳紧贴管壁游离, 打开表面胸膜和血管外鞘, 剔除周围脂肪组织。

该方法的优点是肺门游离迅速, 而且不容易出血, 不需要结扎。有学者提出将左肺或心肺组织块离体后, 运用显微镜进行血管、支气管游离^[21], 作者认为肺血管在灌注后呈苍白色、管壁塌陷不易辨认, 很难和周围结缔组织相区别, 处理难度大, 容易损伤导致实验失败。作者将血管骨骼化解剖后套线备用, 在灌洗结束后, 提起套线仍可以清楚地辨认出血管, 避免损伤。

供肺灌注的优劣直接决定了移植肺的质量, 有文献报道从下腔静脉插管灌注^[22], 作者在实验中发现, 下腔静脉插管的确能有效灌洗供肺, 但是该方法需要结扎大鼠上腔静脉, 同时需要准确的下腔静脉置管并妥善固定, 单人操作难度大。实验采用的经肺动脉干灌洗的方法: 在大鼠肝素化后, 轻轻将其心脏向下牵拉, 血管钳从升主动脉和主肺动脉根部的后方穿过, 将1根3-0丝线套过肺动脉根部。在右心室的流出道插管并在直视下可见其进入肺动脉主干, 控制其深度, 收紧缝线打结。左心耳剪开后, 灌注管就可以接灌洗液进行左肺灌洗。经肺动脉插管灌注结束后直接将套管前端剪断留置于肺动脉腔, 收紧线结固定套管, 为下一步将动脉壁翻转提供标志。该方法简便实用, 与临床上取供体肺的方法更加接近, 尤其适合单人操作。

供肺保护对灌注压的要求比较严格, 压力过高容易损伤血管内皮细胞, 对移植后肺功能有明显的损害, 压力过低则降温过慢, 增加供肺热血时间, 不能使肺血管床得到充分的灌洗, 从而导致灌注后肺功能减退和肺水肿的发生率增高。作者在灌注时采用低压(2.45 kPa)灌注低钾右旋糖苷液25 mL, 即能够保证肺血管床得到充分的灌洗(肺由粉红色变成白色), 又减少了灌注对内皮的损伤, 减少术后移植肺栓塞的发生。

套管制作的方法与以往文献报道制作体部和尾部的的方法不同^[23], 对于套管是否制作并保留尾部存在一定的争议, 一些学者认为狭长锐利的套管尾部易造成血管、支气管狭窄或损伤, 也增加了体内异物存量。且较长的尾部可能对血管内血流动力学造成影响, 影响移植物的功能^[24]。另外一部分学者认为套管尾部的影

响有限, 由于术野小、肺门较深, 吻合后去切除尾部, 难度较大且不易将边缘修剪光滑, 故一般不予处理套管尾部, 除非发现影响血流供给, 立即予以切除^[25]。对于套管尾部切除与否对移植肺功能产生的影响, 仍需进一步研究和探讨。在套管的异物反应方面, Reis等^[2]研究发现使用较好材料的套管, 6个月后移植肺仍能保持较好的通血及通气功能。也有学者建议将套管和生物蛋白胶联合使用, 减少异物反应的发生^[26]。在操作过程中有学者在吻合完成后剪掉所有套管尾部, 但仍存在过程繁琐的缺点^[27], 本实验中直接从套管针上剪取1.5 mm的一段作为套管, 不需专门制作尾端, 用显微镊子夹住套管, 同样可将血管或支气管全周反折于套管。这样可以减少实验时间, 缩短套管长度。尽可能减少受体体内异物, 从而减轻异物反应和纤维化, 同时可避免组织损伤, 这对要求较长时间存活的移植实验尤为重要。

3.3 吻合技术 供受体各管道之间的吻合是模型成功建立的关键步骤。吻合的顺序常规为先吻合肺静脉, 再吻合肺动脉, 最后吻合支气管。血管尤其是肺静脉的吻合是手术中主要的难点之一, 肺静脉管壁薄, 长度短, 套管时难度很大, 如果按以往的手术方法^[28], 仅用肺静脉主干, 将肺静脉完全离断后, 牵拉血管壁, 肺静脉壁外翻时容易撕裂, 难以完成套管和吻合, 而且, 由于用力不均, 容易出现前后成角, 甚至可能漏扎部分血管壁, 引起严重的后果甚至导致手术失败。因此实验在供肺静脉剪取时, 附带了少许心房壁并保证断端整齐, 增加了供肺静脉的长度。吻合时在受体肺静脉前壁剪开1/3管径的小口, 保留血管后壁, 套管时只需牵拉血管前壁, 降低了撕裂血管的风险, 有利于套入的操作, 也更方便套管置入后的固定。加上暂不切断受体左肺, 可进行牵拉, 使肺门略为固定和上提, 血管壁保持一定的张力, 克服肺门深在的不利因素, 使血管暴露更好, 使套管更为方便。由于血管和支气管之间的相对位置固定, 也避免了管壁的旋转成角。此外, 整个手术过程, 供肺均置于切口上方, 增加了胸腔的有效操作空间, 同时也减轻了对纵隔和对侧肺的压迫。吻合后套管的固定也非常重要, 将预置的5-0丝线外科结打紧, 避免吻合完毕开放肺门后出现吻合口渗血, 也可以减少由于术后受体苏醒过程中出现挣扎而导致吻合口撕裂的发生。

根据作者体会, 大鼠肺移植模型建立的过程学习曲线比较明显。初期摸索阶段, 仅获取供体左肺就需时较长, 完成一例供体手术需要三四个小时, 前5例由于对大鼠解剖特点不熟悉常在供肺获取前就因损伤大血管引起严重出血而失败。对于初学的医师或者实验技术人员, 建议每天坚持做一例移植即可, 操作过程需耐心细致, 结束后及时总结经验教训, 不断完善和改进。初期坚持每天的训练是很必要的, 一般经过10次左右训练,

可顺利完成供体手术; 在此基础上, 可继续进行第二阶段的受体手术, 此阶段的关键技术在于套管和血管的吻合, 对显微技术的要求较高, 一般经过15-20次的训练, 受体基本可以达到稳定存活。

在此基础上, 还需要继续进行一段时间的加强巩固训练。在坚持每天进行移植模型的同时, 每天移植模型数量逐渐增加, 移植时间逐渐缩短, 达到每天基本可以完成三四例移植, 移植成功率达到75%以上。这段加强训练期一般1个月左右。经过大约2个月左右的训练, 大鼠肺移植模型的生存率一般可达到95%以上, 这样稳定高效的生存模型, 可满足实验的需要。

作者认为在手术操作中还有以下几点值得注意: ①操作轻柔, 手术全程用棉签和显微器械进行操作, 减少对肺组织和血管支气管的损伤。大鼠肺组织质地柔嫩, 术中不可避免需要翻动牵拉肺组织时, 可用棉签轻柔操作。操作时切忌用器械夹持, 即使器械稍用力碰触肺表面, 也可能导致局部的肺淤血或肺不张。②严格止血、尽量减少出血, 术野渗血经棉签压迫一般可止血, 小血管出血可采用结扎或缝扎止血; 若术中出血多, 可经腹腔注射生理盐水补液, 有利于加快术后恢复和提高存活率。③注意辨认并保护食管, 以免污染术区, 导致大鼠术后不能长期存活。④在套接套管以及吻合时, 要始终保持肺血管和支气管的原有方向, 以免扭曲后引起严重的移植功能障碍。特别是肺动脉, 这是手术的难点和成败的关键。

基金资助: 中日友好医院级科研课题(2012-QN-12)。

作者贡献: 设计、实施、评估均为文章作者, 均受过专业培训。否盲法评估。

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。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置符合2009年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

学术术语: 同系移植-也叫同基因移植, 遗传背景完全相同的个体间进行的细胞、组织或器官移植。如同卵双生子或同类系动物不同个体间的移植, 移植后不发生排斥反应。

作者声明: 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。

4 参考文献

- [1] Mizuta T, Kawaguchi A, Nakahara K, et al. Simplified rat lung transplantation using a cuff technique. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1989;97(4):578-581.
- [2] Reis A, Gaid A, Serrick C, et al. Improved outcome of rat lung transplantation with modification of the nonsuture external cuff technique. *J Heart Lung Transplant.* 1995;14(2):274-279.
- [3] 张新, 陈如坤, 高颖欣, 等. 一种新的大鼠肺移植模型的建立[J]. *中华器官移植杂志*, 2005, 26(3): 178-179.
- [4] 纪勇, 陈静瑜, 郑明峰, 等. 无心跳供体肺移植大鼠模型的建立[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(53):
- [5] 杨天宝, 黄国忠, 谢金标. 改良三袖套法建立大鼠左肺原位移植动物模型[J]. *海峡药学*, 2012, 24(11): 39-41.
- [6] 胡庆华, 陈胜喜, 罗凡砚, 等. 缺血后处理对大鼠无心跳供体肺移植的保护作用[J]. *中南大学学报: 医学版*, 2012, 37(4): 384-389.
- [7] 林江波, 康明强, 陈道中, 等. 血红素加氧酶-1高表达对大鼠同种异体肺移植缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *福建医科大学学报*, 2012, 46(1): 15-19.
- [8] 刘国华, 梁岳培. 缺血预处理联合缺血后处理对肺移植中缺血再灌注肺损伤的影响[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(5): 839-842.
- [9] 朴铁花, 谷月, 蔡鸿彦, 等. 雷公藤多苷对同系大鼠肺移植排斥反应的影响[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2011, 15(53): 9969-9972.
- [10] 王守宝, 张睿智, 刘菲, 等. 同种异体肺和复合组织序贯移植大鼠模型研究[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2011, 31(12): 1719-1723.
- [11] 朱宏伟, 吴镜湘, 徐美英. 改良三袖套吻合合法建立大鼠左肺原位移植模型及其鉴定[J]. *上海交通大学学报: 医学版*, 2011, 31(3): 279.
- [12] 吴镜湘, 朱宏伟, 徐美英. 诱生型一氧化氮合酶在肺移植大鼠肺血管功能改变中的作用[J]. *上海医学*, 2011, 34(4): 264-270.
- [13] 林江波, 陈道中, 康明强, 等. 袖套法建立大鼠肺移植模型的手术技巧[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(44): 8186-8190.
- [14] 范凯, 王建军, 翟伟, 等. 改良三套管法建立大鼠左肺原位移植模型[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(44): 8183-8185.
- [15] 张俊, 王胜, 王建军, 等. 大鼠左肺原位移植模型手术技术改进[J]. *华中科技大学学报: 医学版*, 2010, (3): 381-382, 386.
- [16] 陈刚, 苗锋, 马勤运, 等. 非套管法大鼠异体原位单肺移植动物模型的建立[J]. *复旦学报: 医学版*, 2009, 36(6): 727-730.
- [17] 丁建勇, 徐松涛, 郭卫刚, 等. 同种异体大鼠左肺原位移植模型的建立和改良[J]. *中国临床医学*, 2009, 16(4): 524-527.
- [18] 许建新, 康明强, 林江波, 等. 大鼠左肺原位移植模型的改进[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2009, 16(3): 223-225.
- [19] Sugimoto R, Nakao A, Nagahiro I, et al. Experimental orthotopic lung transplantation model in rats with cold storage. *Surg Today.* 2009;39(7):641-645.
- [20] Asimacopoulos PJ, Molokhia FA, Pegg CA, et al. Lung transplantation in the rat. *Transplant Proc.* 1972;3(1):583-585.
- [21] 姚飞, 徐建康, 邵永丰, 等. 大鼠单肺原位移植模型的建立及改良[J]. *南京医科大学学报: 自然科学版*, 2010, 30(7): 962-965.
- [22] 江科, 王建军, 陈军, 等. 改良的大鼠左肺原位移植模型[J]. *中国胸心血管外科临床杂志*, 2006, 13(5): 335-337.
- [23] 潘铁文, 吕随峰, 孙耀昌. 三袖套管法大鼠肺移植[J]. *中华器官移植杂志*, 1998, 19(2): 84-86.
- [24] Nakao A, Ogino Y, Tahara K, et al. Orthotopic intestinal transplantation using the cuff method in rats: a histopathological evaluation of the anastomosis. *Microsurgery.* 2001;21(1):12-15.
- [25] Santana Rodríguez N, Martín Barrasa JL, López García A, et al. Lung transplantation in rats: a viable experimental model. *Arch Bronconeumol.* 2004;40(10):438-442.
- [26] Galvao FH, Bacchella T, Machado MC. Cuff-glue sutureless microanastomosis. *Microsurgery.* 2007;27(4):271-276.
- [27] 翟伟, 葛晶, İlhan İnci, 等. 大鼠原位左肺移植模型的改进[J]. *山东医药*, 2007, 47(29): 24-25.
- [28] 蒋雷, 周逸鸣, 张鹏, 等. 大鼠同种异体左肺移植模型建立的实验研究[J]. *中华外科杂志*, 2008, 46(20): 1587-1588.