

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2013.05.015 [http://www.crter.org]

李川, 戚峰, 刘彤, 李富新, 王鹏志. 颈部袖套法建立小鼠-大鼠异种心脏移植模型[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(5): 859-865.

颈部袖套法建立小鼠-大鼠异种心脏移植模型*☆

李川, 戚峰, 刘彤, 李富新, 王鹏志

天津医科大学总院普通外科, 天津市 300052

文章亮点:

- 1 在传统袖套法的基础上, 作者对小鼠-大鼠颈部异种心脏移植模型进行了改进。
- 2 模型供体和受体均采用小动物麻醉机进行异氟烷吸入性麻醉, 起效及恢复期快, 对呼吸及心血管抑制作用较小, 术中麻醉效果维持良好, 术后数分钟内即可恢复自主活动。
- 3 重视低体温对模型手术成功率的影响。整个手术过程中供、受体动物均置于加热手术垫上, 使其体温保持在 37-40 °C, 可有效避免麻醉后低体温对实验对象造成的心肌缺血、凝血功能障碍等并发症, 并明显缩短麻醉后恢复自主期的时间。
- 4 摘取供心时, 实验中改进为分别单独结扎左、右上腔静脉, 其余进出心脏的血管集束结扎, 这样既可以缩短逐一结扎每根血管的手术时间, 又可以有效缓解整束结扎所有进出心脏的血管后产生的结扎张力对左、右心耳复跳带来的不良影响, 从而更利于整个供心复跳。

关键词:

器官移植; 心肺移植; 异种心脏移植; 小鼠; 大鼠; 动物模型; 异位; 袖套法; 排斥反应; 国家自然科学基金; 器官移植图片文章

摘要

背景: 小动物心脏移植模型是器官移植基础与临床研究的常用模型和重要手段, 移植部位多为颈部和腹部。其中颈部异位移植最大的优点在于移植心位于颈部皮下, 有利于对供心搏动情况进行直接观察, 进而早期预判排斥反应的发生。

目的: 对小鼠-大鼠颈部异种心脏移植模型的麻醉方式、手术操作、围手术期处理等方面进行改进, 以期建立更加稳定的动物模型。

方法: 采用改良袖套法建立异位异种心脏移植模型, 将小鼠供心移植到受体大鼠的右侧颈部, 主要改进了摘取供心的方法, 并使用小动物麻醉机进行异氟烷吸入性麻醉。模型建立分为练习、稳定和定型 3 个阶段。取部分实验标本做组织病理学检查。

结果与结论: 模型建立练习阶段、稳定阶段和定型阶段手术成功率分别为 53.33%, 85.71% 和 96.15%, 稳定及定型阶段手术成功率明显高于练习阶段 ($P < 0.05$); 稳定和定型阶段手术总操作时间明显短于练习阶段 ($P < 0.05$)。组织病理学结果显示, 异种心脏移植后出现供心血管内皮损伤、血栓形成、心肌实质损伤、间质出血和炎症细胞浸润等现象, 较正常心脏和同系移植均有明显改变, 并且有随移植术后时间延长而逐渐加重的趋势, 证实了模型的可靠性。提示小鼠-大鼠颈部异种心脏移植模型操作简便、稳定可靠, 短时间内即可熟练掌握, 成功率高, 是研究异种移植排斥反应的理想动物模型。

李川☆, 男, 1980年生, 天津市人, 汉族, 天津医科大学在读博士, 主治医师, 主要从事器官移植方面的研究。
lichuan1980@gmail.com

通讯作者: 戚峰, 博士, 教授, 天津医科大学总院普通外科, 天津市 300052
qf@medmail.com.cn

中图分类号: R318

文献标识码: A

文章编号: 2095-4344

(2013)05-00859-07

收稿日期: 2012-08-22

修回日期: 2012-09-16

(20120710006/G · C)

Establishment of a mouse-rat cervical cardiac xenotransplantation model by cuff technique

Li Chuan, Qi Feng, Liu Tong, Li Fu-xin, Wang Peng-zhi

Department of General Surgery, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China

Li Chuan☆, Studying for doctorate, Attending physician, Department of General Surgery, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China
lichuan1980@gmail.com

Corresponding author: Qi Feng, Doctor, Professor, Department of General Surgery, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China
qf@medmail.com.cn

Supported by: the National Natural Science Foundation of China, No.30940066*

Received: 2012-08-22
Accepted: 2012-09-16

Abstract

BACKGROUND: Small animal heart transplantation model is a common model and an important mean for basic and clinical research of organ transplantation, and the transplant part is often the neck and abdomen. The biggest advantage of cervical heterotopic transplantation is that the transplanted heart will located in the neck subcutaneous, which is conducive to the direct observation of the beating of donor heart, thus early anticipating the rejection.

OBJECTIVE: To improve the anesthesia, surgical procedures and perioperative management of the mouse-rat cervical cardiac xenotransplantation model, in order to establish a more stable animal model.

METHODS: The mouse-rat heterotopic cardiac xenotransplantation models were established by modified cuff technique to transfer the donor heart of mouse to the right side of the neck of rat, the method to remove the donor heart was improved, and the models received inhalation anesthesia of isoflurane with small animal anesthesia machine. The experimental levels of establishing the models were divided into practicing, stable and skilled stages. Part samples were taken for the histopathological examination.

RESULTS AND CONCLUSION: In the three stages (practicing, stable, skilled) of establishing the models, the successful rates of surgery were 53.33%, 85.71%, and 96.15% respectively. The successful rate in stable and skilled stages was higher than that in the practicing stage ($P < 0.05$). The total operation time in the stable and skilled stages was significantly shorter than that in the practicing stage ($P < 0.05$). Histopathological examination results showed that the cardiovascular endothelial injury, thrombosis, myocardial parenchymal damage, interstitial hemorrhage and inflammatory cell infiltration after heterotopic cardiac xenotransplantation were more serious compared with normal heart transplantation and cardiac allograft, and showed a time-depend manner, which identify the reliability of the model. It suggests that the mouse-rat cervical cardiac xenotransplantation model is simple, reliable, easily operated in a short-time and has a high successful rate. It is an ideal animal model for studying xenotransplantation rejection.

Key Words: organ transplantation; heart-lung transplantation; cardiac xenotransplantation; mice; rats; animal models; ectopic; cuff method; rejection; the National Natural Science Foundation of China; photographs-containing paper of organ transplantation

Li C, Qi F, Liu T, Li FX, Wang PZ. Establishment of a mouse-rat cervical cardiac xenotransplantation model by cuff technique. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2013;17(5): 859-865.

0 引言

器官移植是终末期器官功能衰竭唯一有效的治疗方法, 等待移植者的日益增多和移植体相对不足的矛盾日益明显, 严重制约临床器官移植的应用。由于同种器官移植供体短缺, 异种器官移植越来越受到关注^[1-3]。但异种移植排斥反应迄今无法解决, 故其已成为异种器官移植在临床应用中的主要障碍^[4-5]。一般认为异种器官移植的临床应用至少要克服三大障碍, 即超急性排斥、急性血管性排斥和急性细胞性排斥。纵观与异种器官移植相关的排斥反应, 细胞性排斥反应的防治已在同种异体移植中获得了很好的经验, 通过清除天然抗体和/或补体可以有效防止超急性排斥反应^[6-7], 随之而来的急性血管性排斥反应是导致移植体丧失的关键。

小动物心脏移植模型是器官移植基础与临床研究的常用模型和重要手段^[8-10], 最常用的是大鼠与小鼠异位心脏移植模型, 移植部位多为颈部和腹部, 但后者将供心移植进受体腹腔, 对受体创伤大, 失血较多, 生理影响大, 手术时间相对较长, 术后粘连严重, 局部炎症反应较强, 污染概率较大, 移植心心跳不易触诊, 术后存活率不高, 从而影响了其作为移植排斥反应模型的实用性和准确性, 并且不同实验室用此模型进行实验有可能得出不同实验结果, 其原因可能是由于这种模型的炎症反应与排斥反应的互相干扰。由此可见, 颈部移植在实验研究方面具有一定优势。目前异种移植研究中, 心脏移植模型约占文献报道的90%以上^[11-13], 充分说明其对异种移植基础研究的重要性。因此, 实验对小鼠-大鼠颈部异种心脏移植模型的麻醉方式、手术操作、围手术期处理等方面进行改进, 以期建立更加稳定的动物模型, 从而为异种移植免疫排斥反应的体内研究提供可靠前提。

1 材料和方法

设计: 动物模型、体外观察。

时间及地点: 实验于2010年2至5月在天津医科大学总医院普通外科研究所完成。

材料:

实验动物: 8-12周龄雄性BALB/c小鼠、8-12周龄雄性F344大鼠, 清洁级, 均购于解放军军事医学科学院实验动物中心, 许可证号: SCXK-(军)2007-004。

主要试剂、仪器及来源:

Main reagents, instruments and sources:

试剂、仪器	来源
双人双目手术显微镜	Opton, 德国
显微外科手术器械	Aesculap, 德国
小动物麻醉机	Matrx, 美国
无损伤缝线、结扎线	金环, 中国
加热手术垫	Cozee Cumfort, EEC
BD 留置针套管(18G, 24G)	BD, 美国
显微镜	OLYMPUS, 日本
异氟烷	力天, 中国

实验方法:

麻醉方法: 供体、受体均使用Matrx小动物麻醉机连接氧气管路进行吸入性麻醉, 麻醉药物为异氟烷。先于诱导箱中进行麻醉诱导, 氧气流量为1 L/min, 麻醉药物浓度为3%-5%; 当实验动物呼吸速度减慢, 全身肌肉松弛后改用呼吸面罩进行持续麻醉并开始手术, 氧气流量为0.5 L/min, 麻醉药物浓度为1%-3%。

受体准备: 仰卧固定于加热手术垫, 术区备皮消毒。于右颈前外侧纵行切开皮肤, 上至下颌基底部, 下至锁骨, 分离皮下脂肪组织, 解剖游离出颈外静脉。近心端以微血管夹夹闭后, 近颅侧结扎, 离断静脉远心端。以肝素复方氯化钠溶液(50 U/mL)冲去血管近心端游离段的血液及血凝块。于颈外静脉内侧离断部分颈前肌群, 寻找颈总动脉, 同法处理, 小心分离颈总动脉与颈总动脉鞘内其他组织, 避免损伤血管、神经。将静脉套入其套管中(18G), 无损伤血管钳夹住套管管柄及血管固定, 以显微镊帮助使静脉壁外翻套于套管上, 8-0丝线结扎固定。同法套入动脉套管(24G), 再次以肝素液冲洗血管游离段, 防止血凝块形成。受体颈部切口外敷湿盐水纱布, 等待植入供心^[14-15]。

供体手术: 仰卧位固定于加热手术垫, 消毒术区。沿腹正中切口进入腹腔, 自下腔静脉注入肝素复方氯化钠溶液(50 U/mL) 0.5 mL, 使全身血液肝素化, 然后继续自

下腔静脉缓慢推注肝素复方氯化钠溶液3 mL, 同时剪开腹主动脉放血, 待动脉血变清亮, 完成灌注。剪开胸廓向上翻起暴露心脏, 表面外敷4 °C冷盐水纱布, 使其迅速降温停跳。充分游离升主动脉和肺动脉, 紧靠无名动脉起始和肺动脉分叉处分别剪断主动脉和肺动脉。以8-0丝线分别结扎左、右上腔静脉和下腔静脉, 其余进出心脏的所有血管束束结扎, 迅速剪下心脏立即移植^[16-17]。

心脏移植: 供心放入受体颈部切口中, 以4 °C冷盐水纱布包裹。于供心肺动脉边缘缝一针牵引线, 将受体颈外静脉套管端插入供心肺动脉内, 以8/0丝线环扎固定。同法将颈总动脉套管插入供心主动脉内, 环扎固定。先松开静脉血管夹, 然后再松开动脉血管夹, 可见心脏立即充血、变红, 开始出现心肌纤颤, 并迅速转变为自主节律性跳动, 心率为160-200次/min。注意摆好供心位置, 防止动静脉打折, 术毕缝合皮肤^[18-19]。

主要观察指标: 术后保暖加温1 h, 并保持室温约28 °C。供心植入后, 于受体颈部可直接观察并触摸到供心搏动情况, 从供心复跳至完全停止跳动的的时间作为供心存活时间。小鼠-大鼠异种移植12 h后供心仍搏动良好者认为手术成功, 分别于移植后24 h和供心停跳即刻取下部分实验标本; 小鼠-小鼠心脏移植属同系移植, 无排斥反应发生, 72 h后仍搏动良好者认为手术成功并取下供心, 进行苏木精-伊红染色, 光镜观察组织病理改变。

统计学分析: 采用SPSS 13.0统计软件包进行分析处理。计数资料用百分比(%)表示, 采用 χ^2 -test; 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两样本比较采用t-test。所有统计结果以 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义标准。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 模型建立分为练习、稳定和定型3个阶段。本实验共进行小鼠-大鼠异位心脏移植手术77例, 其中练习阶段手术30例, 稳定阶段手术21例, 定型阶段手术26例, 均无脱失。

2.2 小鼠-大鼠异种心脏移植模型手术成功率 练习阶段需逐步熟悉模型建立的操作步骤, 稳定阶段需熟练掌握模型建立的手术方法, 待成功率达到并稳定于85%以上时开始定型阶段手术。练习阶段手术30例, 手术成功率为53.33%; 稳定阶段手术21例, 成功率85.71%; 定型阶段手术26例, 成功率为96.15%。稳定及定型阶段手术成功率明显高于练习阶段, 见表1。

表1 小鼠-大鼠异种心脏移植模型手术成功率

Table 1 Successful rate of surgery for establishing the mouse-rat heterotopic cardiac xenotransplantation model

手术阶段	手术例数	成功例数	手术成功率(%)	χ^2	<i>P</i>
练习阶段	30	16	53.33		
稳定阶段	21	18	85.71 ^a	16.586	0.000
定型阶段	26	25	96.15 ^b		

注: χ^2 -test. 与练习阶段手术比较, ^a*P*=0.016, ^b*P*=0.000. 提示稳定及定型阶段手术成功率明显高于练习阶段

2.3 小鼠-大鼠异种心脏移植模型手术操作时间 模型稳定后, 单人操作完成小鼠-大鼠异位心脏移植手术需60 min左右, 移植物温缺血时间在10 min以内。稳定及定型手术的手术时间、摘取供心时间(开胸后至取下供心的时间)和供心温缺血时间(移植物脱离冷保存状态至恢复血运的时间)与练习手术比较, 差异均有显著性意义(*P*<0.05), 见表2。

表2 小鼠-大鼠异种心脏移植模型手术操作时间

Table 2 The total operation time for establishing the mouse-rat heterotopic cardiac xenotransplantation model ($\bar{x}\pm s$, min)

时间	练习阶段	稳定及定型阶段	<i>t</i>	<i>P</i>
总手术时间	100.620±7.289	66.250±5.825	10.421	0.000
摘取供心时间	12.000±2.070	2.425±0.535	11.840	0.000
供心温缺血时间	19.250±2.252	6.125±1.691	13.705	0.000

注: 稳定及定型手术的手术时间、摘取供心时间和供心温缺血时间均比练习手术短(*P*<0.05)

2.4 小鼠-大鼠异种心脏移植模型手术失败原因及供心存活时间 在全部实验过程中, 由于手术操作失误导致受体死亡或移植物无功能者共18例, 其中练习阶段14例, 稳定及定型阶段共4例, 出血(10/18)、血管栓塞(4/18)和套管失败(4/18)是主要原因。小鼠-大鼠异种异位心脏移植术后, 供心存活时间(40.17±3.76) h。

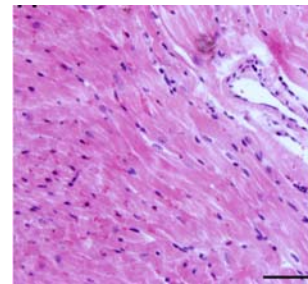
2.5 小鼠-大鼠异种心脏移植模型供心肉眼大体情况

①同系移植: 术后72 h剖开切口见供心颜色红润, 搏动有力, 与周围组织无粘连。取下供心见心脏体积无增大, 质地柔软, 心腔内无血凝块。②异种移植24 h: 术后24 h剖开切口见供心颜色红润, 与复跳时基本相同, 搏动良好, 但较复跳后有所减弱, 与周围组织有轻度粘连。

取下供心见心脏体积稍增大, 质地较韧。③异种移植停跳后: 供心停跳时剖开切口见供心呈暗紫色, 局部坏死发黑, 被周围组织包裹, 难以分离。取下供心见心脏体积增大, 质地坚硬, 心腔及大血管内充满大量血凝块。

2.6 正常心肌、同系心脏移植、异种心脏移植模型供体心肌组织切片苏木精-伊红染色结果比较

正常心肌: 心肌纤维排列规整, 血管内皮细胞无水肿, 血管内无血栓形成, 心肌间质无出血, 无炎症细胞浸润, 见图1。

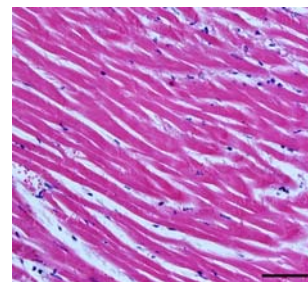


注: 心肌结构规整, 无炎细胞浸润

图1 小鼠正常心肌苏木精-伊红染色结果(×400, 标尺: 50 μm)

Figure 1 Hematoxylin-eosin staining of the mouse normal heart (×400, scale bar: 50 μm)

同系移植: 心肌纤维排列稍疏松, 心肌细胞无溶解, 血管无血栓形成, 间质无出血, 几乎无炎症细胞浸润, 见图2。

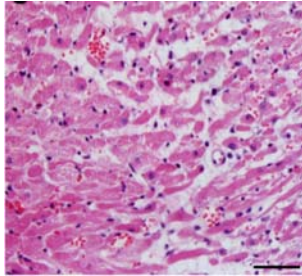


注: 心肌纤维排列稍疏松, 几乎无炎症细胞浸润

图2 小鼠-小鼠同系心脏移植模型供心苏木精-伊红染色结果(×400, 标尺: 50 μm)

Figure 2 Hematoxylin-eosin staining of donor heart of mouse-mouse fellow cardiac transplantation model (×400, scale bar: 50 μm)

异种移植24 h: 心肌纤维排列紊乱, 心肌细胞开始出现溶解, 间质可见水肿出血, 血管周围水肿伴内皮细胞肿胀, 有较多炎症细胞浸润, 包括单核细胞和嗜中性粒细胞, 见图3。

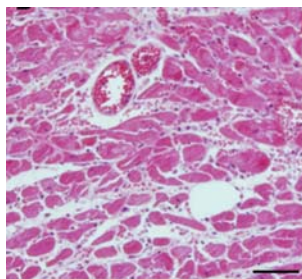


注: 异种移植 24 h, 轻度血管炎及间质水肿表现, 但未见血栓形成

图 3 小鼠-大鼠异种心脏移植模型供心苏木精-伊红染色结果($\times 400$, 标尺: 50 μm)

Figure 3 Hematoxylin-eosin staining of donor heart of mouse-rat heterotopic cardiac xenotransplantation model ($\times 400$, scale bar: 50 μm)

异种移植停跳后: 心肌纤维结构异常紊乱、部分肌丝断裂, 心肌细胞溶解坏死, 广泛间质出血, 血管结构崩解, 心肌血管内有血栓形成, 部分血管内膜破坏, 并有大量炎症细胞浸润, 见图4。



注: 出现血管炎、血栓形成及间质出血等典型的排斥反应特征

图 4 小鼠-大鼠异种心脏移植模型供心停跳后苏木精-伊红染色结果($\times 400$, 标尺: 50 μm)

Figure 4 Hematoxylin-eosin staining of donor heart of mouse-rat heterotopic cardiac xenotransplantation model after heart arrest ($\times 400$, scale bar: 50 μm)

疾病征程中一座屹立的丰碑。随着科学技术的进步, 同种异体器官移植愈来愈多地应用于临床, 使终末期器官功能衰竭患者的生命得以挽救。但目前器官移植还存在两大主要难题制约着器官移植的广泛临床应用, 其一是供移植用器官的来源困难, 二是移植排斥反应尚未完全满意得到解决。移植器官的短缺严重制约器官移植的发展, 异种动物器官将是解决这一矛盾的有力措施, 具有广阔的发展前景。但异种移植较同种异体器官移植具有更为复杂和强烈的免疫排斥反应, 且异种移植的排斥反应至今仍难以有效控制, 限制了其在临床上的应用, 使其仍处于实验研究阶段^[20-23]。因此, 建立可靠的动物模型是进行深入实验研究的重要前提。

按照移植解剖部位的不同, 心脏移植分为原位移植和异位移植。原位移植手术操作复杂, 需要特殊器材, 主要用于大动物模型, 故一般实验室难以开展。异位移植则是将供心移植于受体腹腔、腹股沟和颈部, 主要用于小动物模型。供、受体血流重建的方法包括Ono直接血管吻合法和Heron袖套式血管连接法。前者将供心移植于受体腹腔内, 供心主动脉和肺动脉分别与受体的腹主动脉和下腔静脉行端侧吻合; 后者应用套管技术在受体的颈部植入供心, 通过血管套管将供心的主动脉和肺动脉分别与受体的颈总动脉和颈外静脉相连接。本模型主要参照改良Cuff技术建立小鼠-大鼠颈部异位心脏移植模型^[24], 实验结果表明本模型操作简便, 经短期训练即可熟练掌握, 成功率高, 无需进行长期专业的显微血管吻合技术训练, 并且供体心肌缺血时间短, 受体出血量少, 明显缩短了手术时间; 组织病理学表现说明移植后供心血管内皮损伤、血栓形成、心肌实质损伤、间质出血和炎症细胞浸润等特征, 较正常心脏和同系移植都有明显改变, 并且有随移植术后时间延长而逐渐加重的趋势, 到完全排斥时部分心肌凝固性坏死溶解、广泛间质出血、血管结构崩解、广泛血管内血栓形成及大量炎症细胞浸润, 证实了模型本身的可靠性, 为后续实验提供保障。

颈部异位移植最大的优点在于移植心位于颈部皮下, 有利于对供心搏动情况进行直接观察, 进而早期预判排斥反应的发生。此外, 由于手术操作不进入腹腔, 无受体肠蠕动等对供心的影响, 受体创伤小、遭受干扰少、有利于术后恢复。本模型建立后, 供心血液循环途径为受体颈总动脉-供心主动脉-冠状动脉-心肌-冠状静脉-右心房-右心室-肺动脉-受体颈外静脉, 与所有类

3 讨论

回眸20世纪医学发展史, 器官移植无疑是人类攻克

似血管吻合的模型一样存在缺点,即由于血液动力学改变,供心左心室和左心房不参与血液循环,易发生左心室血栓形成和内膜下缺血引起梗塞,供心长期存活将发生左侧心肌萎缩和右心室容量负荷增加,但异种心脏移植的动物模型所要求的供心存活时间不长,可回避上述不足,颈部心脏移植也可避免腹腔内移植所造成的截瘫、尿潴留、吻合口狭窄等并发症^[25]。因此,颈部心脏移植更适合于异种心脏移植免疫排斥反应的研究,但应注意在标本取材时应尽量选取右心部分,以减少血液动力学改变引起的实验误差。

在传统袖套法的基础上,作者对本实验动物模型进行了以下改进:①既往建立模型多采用水合氯醛、戊巴比妥等注入性麻醉和乙醚吸入麻醉,这些药物对呼吸、心血管抑制作用严重,肝肾毒性高,一旦过量,极易死亡,麻醉效果不易维持,且注射性麻醉剂注入体内后不易控制其深度,须于体内代谢完全排泄后作用才能逐渐消失,对后续实验数据的准确性有一定影响。本模型供体和受体均采用小动物麻醉机进行异氟烷吸入性麻醉,起效及恢复期快,对呼吸及心血管抑制作用较小,术中麻醉效果维持良好,术后数分钟内即可恢复自主活动,无动物死于麻醉意外,有效减小麻醉对实验动物的影响,显著提高了实验的准确性。②重视低体温对模型手术成功率的影响。整个手术过程中供、受体动物均置于加热手术垫上,使其体温保持在37-40℃,可有效避免麻醉后低体温对实验对象造成的心肌缺血、凝血功能障碍等并发症,并明显缩短麻醉后恢复自主期的时间,对实验动物安全复苏有实际意义^[26]。③摘取供心时,既往手术方法多为整束结扎所有进出心脏的血管,而本实验中改进为分别单独结扎左、右上腔静脉,其余进出心脏的血管束集结扎,这样既可以缩短逐一结扎每根血管的手术时间,又可以有效缓解整束结扎所有进出心脏的血管后产生的结扎张力对左、右心耳复跳带来的不良影响,从而更利于整个供心复跳,此外,还应重视以下两点:**a.**先进行受体手术,包括术区解剖、颈总动脉及颈外静脉的游离和导管连接,准备充分后再取供心,取下供心后立即进行移植,可不将其置于器官保存液,显著缩短供心冷缺血时间。有研究表明供心在4℃保存液中仅可保存4 h左右,冷缺血时间过长亦会对移植供心造成不可逆损伤,从而导致手术失败^[27-28]; **b.**打开供体腹腔后经下腔静脉注入肝素,使心脏肝素化,受体行心脏移植前也要进行全身肝素化,可有效防止血栓形成,而血栓形成是未行肝素化致手术失败的主要原因之

—^[29-30]。改良袖套法建立小鼠-大鼠颈部异位异种心脏移植模型手术操作简便、稳定可靠、易于掌握,且供、受体遗传背景清楚,易于进行基因操作,是研究异种移植排斥反应发生机制及其防治措施、筛选免疫抑制药物的理想动物模型。

基金资助: 国家自然科学基金资助项目(30940066)。

致谢: 感谢天津医科大学总医院普通外科研究所邱宇杰、赵娜、梁晖老师对实验实施和统计学处理给予的帮助。

作者贡献: 戚峰、刘彤、李川进行实验设计,实验实施及统计学处理者为李川、李富新,实验评估者为王鹏志、刘彤,资料收集者为李富新,李川成文,戚峰审校,李川对文章负责。

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。

伦理要求: 实验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。

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] Zhou S, Peng LK, Xie XB, et al. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(44):8283-8287. 周松,彭龙开,谢续标,等. 异种器官移植的研究进展[J]. 中国组织工程研究与临床康复,2010,14(44):8283-8287.
- [2] Dou KF, Li X, Li JJ, et al. Zhonghua Qiguan Yizhi Zazhi. 2012;33(3):184-188. 窦科峰,李霄,李俊杰,等. 异种器官移植研究的主要问题与对策[J]. 中华器官移植杂志,2012,33(3):184-188.
- [3] Chu J, Yu YB, Zhang SH, et al. Shandong Yiyao. 2011;51(44):112-113. 储建,禹亚彬,章世海,等. 异种器官移植的研究进展[J]. 山东医药,2011,51(44):112-113.
- [4] Mendicino M, Liu M, Ghanekar A, et al. Targeted deletion of Fgl-2/fibroleukin in the donor modulates immunologic response and acute vascular rejection in cardiac xenografts. Circulation. 2005;112(2):248-256.
- [5] Hosiawa KA, Wang H, Devries ME, et al. CD80/CD86 costimulation regulates acute vascular rejection. J Immunol. 2005;175(9):6197-6204.
- [6] Won JY, Ahn KS, Sorrell AM, et al. Cytolytic assessment of hyperacute rejection and production of nuclear transfer embryos using hCD46-transgenic porcine embryonic germ cells. Zygote. 2009;17(2):101-108.
- [7] Liu B, Cheng C, Wu Y, et al. Transgenic mice designed to express human alpha-1,2-fucosyltransferase in combination of human DAF and CD59 to avoid xenograft rejection. Sci China C Life Sci. 2008;51(3):199-204.
- [8] Su S. Zhonghua Qiguan Yizhi Zazhi. 2007;28(4):251-252. 苏松. 小鼠器官移植模型的现状和展望[J]. 中华器官移植杂志,2007,28(4):251-252.

- [9] Tao R, Wang L, Han R, et al. Differential effects of B and T lymphocyte attenuator and programmed death-1 on acceptance of partially versus fully MHC-mismatched cardiac allografts. *J Immunol.* 2005;175(9):5774-5782.
- [10] Tomita Y, Zhang QW, Matsuzaki G, et al. Absent mRNA accumulation of Th1 or Th2 cytokines in heart allografts with chimerism-based drug-induced tolerance. *Surg Today.* 2005; 35(5):364-370.
- [11] Qi F, Zhu LW, He XH, et al. *Tianjin Yike Daxue Xuebao.* 2010; 16(4):559-562.
戚峰,朱理玮,何向辉,等. 多靶点联合用药抑制小鼠到大鼠异种心脏移植排斥反应[J]. *天津医科大学学报*,2010,16(4):559-562.
- [12] Cooper DK, Teuteberg JJ. Pig heart xenotransplantation as a bridge to allotransplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2010; 29(8):838-840.
- [13] Manji RA, Menkis AH, Cooper DK. Cardiac xenotransplantation technology provides materials for improved bioprosthetic heart valves. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;142(1):238-239, 239.
- [14] Huang XS, Liu X, Chen DZ, et al. *Zhongguo XiuFu Chongjian Waike Zazhi.* 2005;19(7):583-586.
黄雪珊,刘璇,陈道中,等. 改良Heron法建立异种异位心脏移植模型[J]. *中国修复重建外科杂志*,2005,19(7):583-586.
- [15] Tang H, Yao ZX, Liu SC, et al. *Zhongguo Xiandai Yixue Zazhi.* 2008;18(1):21-24.
唐华,姚榛祥,刘盛春,等. 鼠异种异位心脏移植模型建立与病理特征观察[J]. *中国现代医学杂志*,2008,18(1):21-24.
- [16] Wei L, Wang M, Qu X, et al. Differential expression of microRNAs during allograft rejection. *Am J Transplant.* 2012; 12(5):1113-1123.
- [17] Chen WW, Yang YR, Xia P, et al. *Wenzhou Yixueyuan Xuebao.* 2011;41(3):252-254.
陈文伟,杨亦荣,夏鹏,等. 小鼠颈部异位心脏移植手术的改良[J]. *温州医学院学报*,2011,41(3):252-254.
- [18] Wang JX, Huang SD, Xu ZY, et al. *Tongji Daxue Xuebao.* 2008; 29(1):106-108.
王建雄,黄盛东,徐志云,等. 改良移植技术建立豚鼠至大鼠异位心脏移植模型[J]. *同济大学学报: 医学版*, 2008,29(1):106-108.
- [19] Zhang SL, Sun ZQ. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu.* 2010;14(31):5883-5886.
张松林,孙宗全. 应用Tail-cuff技术改良小鼠颈部异位心脏移植模型[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010,14(31): 5883-5886.
- [20] Postrach J, Bauer A, Schmoeckel M, et al. Heart xenotransplantation in primate models. *Methods Mol Biol.* 2012;885:155-168.
- [21] Choi HJ, Kim MK, Lee HJ, et al. Effect of alphaGal on corneal xenotransplantation in a mouse model. *Xenotransplantation.* 2011;18(3):176-182.
- [22] Hawthorne WJ, Simond DM, Stokes R, et al. Pre-clinical model of composite foetal pig pancreas fragment/renal xenotransplantation to treat renal failure and diabetes. *Xenotransplantation.* 2011;18(6):390-399.
- [23] Luca G, Calvitti M, Mancuso F, et al. Reversal of experimental Laron Syndrome by xenotransplantation of microencapsulated porcine Sertoli cells. *J Control Release.* 2012.
- [24] Li C, Luo L, Lu J, et al. A modified splint tubing technique for heterotopic heart transplantation in mouse. *Transpl Immunol.* 2011;25(1):82-87.
- [25] Jiang XF, Zhu L, Cui ZM, et al. *Zhongguo Puwai Jichu yu Linchuang Zazhi.* 2010;17(9):914-916.
姜晓峰,朱磊,崔哲铭,等. 一种改良的吻合合法小鼠腹腔异位心脏移植模型[J]. *中国普外基础与临床杂志*,2010,17(9):914-916.
- [26] Yan GF, Zhang J, Zhou Y, et al. *Shiyan Dongwu yu Bijiao Yixue.* 2008;28(5):341-342.
严国锋,张健,周勇,等. 保温措施对小鼠麻醉效果的影响[J]. *实验动物与比较医学*,2008,28(5):341-342.
- [27] Hansen TN, Haworth RA, Southard JH. Warm and cold ischemia result in different mechanisms of injury to the coronary vasculature during reperfusion of rat hearts. *Transplant Proc.* 2000;32(1):15-18.
- [28] Li S, Guan Q, Chen Z, et al. Reduction of cold ischemia-reperfusion injury by graft-expressing clusterin in heart transplantation. *J Heart Lung Transplant.* 2011;30(7): 819-826.
- [29] Brenner P, Keller M, Beiras-Fernandez A, et al. Prevention of hyperacute xenograft rejection through direct thrombin inhibition with hirudin. *Ann Transplant.* 2010;15(4):30-37.
- [30] Schumacher M, Van Vliet BN, Ferrari P. Kidney transplantation in rats: an appraisal of surgical techniques and outcome. *Microsurgery.* 2003;23(4):387-394.