

门脉优先反向吻合快速建立肝移植大鼠模型

https://doi.org/10.12307/2022.537

张继翔¹, 闫宏宪², 轩娟娟¹, 白鸿太¹, 王耀权¹, 魏思东¹, 陈国勇¹

投稿日期: 2021-05-19

送审日期: 2021-05-20

采用日期: 2021-07-28

在线日期: 2021-11-22

中图分类号:

R459.9; R318; R617

文章编号:

2095-4344(2022)17-02696-06

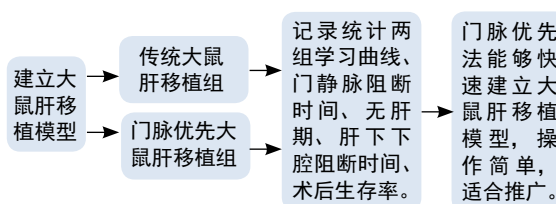
文献标识码: B

文章快速阅读:

文章特点一

△以传统“二袖套法”大鼠肝移植为基础, 采用门静脉先吻合, 吻合门静脉时受体肝脏未移除, 下腔静脉回流通畅, 称之为门脉优先法。门脉优先法缩短了无肝期, 缩短了大鼠下腔静脉阻断时间即学习曲线, 能够快速成功建立大鼠肝移植模型。

△门脉优先法采用供体肝脏解剖位置向下移动到腹部摆放方法, 反向吻合能够显露充分, 快速进行门静脉套管吻合。



主题释义:

门脉优先大鼠肝移植: 在传统“二袖套法”的大鼠移植模型建立的基础上, 先阻断门静脉, 离断门静脉后进行门静脉套管吻合, 不间断下腔静脉, 门静脉吻合完成后, 阻断肝下及肝上下腔静脉, 去除受体肝脏。

反向吻合: 供体肝脏解剖位置向下移动到腹部摆放, 供体门静脉从肝脏后方折返到肝上下腔静脉上方, 显露套管, 受体门静脉离断后拉向下方和供体套管吻合。

摘要

背景: 传统“二袖套法”大鼠肝移植模型的建立时间长, 训练难度大, 难以适应目前研究生的培养模式。

目的: 利用大鼠肝移植建立步骤多的特点, 合理组合每一步骤的时间及方法, 缩短学习时间, 降低操作难度, 快速地构建大鼠肝移植模型。

方法: 以“二袖套法”为基础, 在保留下腔静脉血流通畅的基础上门静脉优先套管吻合, 套管采用供肝放在大鼠下腹部的反向吻合法(门脉优先组), 建立大鼠肝移植模型, 与传统大鼠肝移植模型(传统移植组)予以对比, 统计分析两组学习曲线时间、门静脉阻断时间、无肝期时间、肝下下腔静脉阻断时间、受体手术时间及术后生存情况等。

结果与结论: ①对传统移植组32只和门脉优先组30只模型建立的学习曲线进行分析, 门脉优先组学习时间短于传统移植组; ②将存活时间超过2 d的传统移植组12只大鼠和门脉优先组20只大鼠手术中的各阶段时间进行统计, 采用参数检验分析显示, 门脉优先组门静脉阻断时间稍长于传统移植组但差异无显著性意义; 而门脉优先组肝上下腔阻断时间为(15.0±2.2) min, 明显短于传统移植组的(21.3±2.1) min($P < 0.05$); 门脉优先组肝下下腔阻断时间为(25.0±2.9) min, 明显短于传统移植组的(32.5±3.2) min($P < 0.05$); 两组供体灌注时间、供体手术时间、供体肝脏修整时间和受体手术时间相比差异无显著性意义; ③提示门脉优先肝移植大鼠模型能缩短学习周期, 降低操作难度, 为初学者迅速掌握大鼠肝移植模型建立提供了一种较为可靠的方法, 适合学习和推广。

关键词: 门脉优先; 肝移植; 反向吻合; 学习曲线; 无肝期

Rapid establishment of rat liver transplantation model by portal vein preferential reverse anastomosis

Zhang Jixiang¹, Yan Hongxian², Xuan Juanjuan¹, Bai Hongtai¹, Wang Yaoquan¹, Wei Sidong¹, Chen Guoyong¹

¹Henan University People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China; ²Luoyang Central Hospital, Zhengzhou University, Luoyang 471000, Henan Province, China

Zhang Jixiang, Master candidate, Henan University People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Corresponding author: Wei Sidong, Chief physician, Henan University People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Co-corresponding author: Chen Guoyong, Chief physician, Henan University People's Hospital, Zhengzhou 450003, Henan Province, China

Abstract

BACKGROUND: The traditional “two cuff” model of rat liver transplantation takes a long time to establish, which is difficult to grasp and adapt to the training of graduate students.

OBJECTIVE: As per the characteristics of multi-step establishment of liver transplantation model in rats, to rationally combine the time and method of each step so as to shorten the learning time and reduce the difficulty of operation, thereby rapidly establishing a rat model of liver transplantation.

METHODS: The portal vein was preferentially anastomosed using the two-cuff method when the blood flow of the inferior vena cava was unobstructed. The cuff was anastomosed reversely by placing the donor liver in the lower abdomen of rats (portal vein preferential anastomosis group). The rat liver transplantation model was established and compared with the traditional rat liver transplantation model (traditional transplantation group). The learning time curve, portal vein occlusion time, anhepatic phase time, inferior vena cava occlusion time, recipient operation time, and postoperative survival of the two groups were statistically analyzed.

RESULTS AND CONCLUSION: The learning curves of 32 cases in the traditional transplantation group and 30 cases in the portal vein preferential anastomosis group were analyzed. The learning time of portal vein preferential anastomosis group was shorter than that of traditional transplantation group. The operation time of 12 rats in the traditional transplantation group and 20 rats in the portal vein preferential anastomosis group which survived over 2 days was statistically

¹ 河南大学人民医院, 河南省郑州市 450003; ² 郑州大学洛阳中心医院, 河南省洛阳市 471000

第一作者: 张继翔, 男, 1994年生, 河南省洛阳市人, 汉族, 河南大学在读硕士, 主要从事肝移植与排斥反应的研究。

通讯作者: 魏思东, 主任医师, 河南大学人民医院, 河南省郑州市 450003

通讯作者: 陈国勇, 主任医师, 河南大学人民医院, 河南省郑州市 450003

https://orcid.org/0000-0002-4278-8057 (张继翔)

基金资助: 国家自然科学基金资助项目(U2004124), 项目负责人: 陈国勇; 河南省医学科技攻关计划项目(SBGJ2018071), 项目

负责人: 陈国勇; 河南省医学科技攻关计划项目(SB201903020), 项目负责人: 魏思东

引用本文: 张继翔, 闫宏宪, 轩娟娟, 白鸿太, 王耀权, 魏思东, 陈国勇. 门脉优先反向吻合快速建立肝移植大鼠模型[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(17):2696-2701.



analyzed. Parameter test analysis showed that the portal vein occlusion time in the portal vein preferential anastomosis group was slightly longer than that in the traditional transplantation group, but there was no significant difference. However, the blocking time of the suprahepatic inferior vena cava in the portal vein preferential anastomosis group was (15.0±2.2) minutes, which was significantly shorter than (21.3±2.1) minutes in the traditional transplantation group ($P < 0.05$), and the time of infrahepatic inferior vena cava occlusion in the portal vein preferential anastomosis group was (25.0±2.9) minutes, which was significantly shorter than that [(32.5±3.2) minutes] in the traditional transplantation group ($P < 0.05$). There was no significant difference in donor perfusion time, donor operation time, donor liver repair time and recipient operation time between the two groups. Rat model of liver transplantation with portal vein preferential anastomosis can shorten the learning cycle, reduce the difficulty of operation, and provide a relatively reliable method for beginners to quickly master the establishment of rat liver transplantation model, which is suitable for learning and promotion.

Key words: portal vein preferential anastomosis; liver transplantation; reverse anastomosis; learning curve; anhepatic phase

Funding: the National Natural Science Foundation of China, No. U2004124 (to CGY); the Henan Provincial Medical Science and Technology Program, No. SBGJ2018071 (to CGY) and SB201903020 (to WSD)

How to cite this article: ZHANG JX, YAN HX, XUAN JJ, BAI HT, WANG YQ, WEI SD, CHEN GY. Rapid establishment of rat liver transplantation model by portal vein preferential reverse anastomosis. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2022;26(17):2696-2701.

0 引言 Introduction

大鼠原位肝移植动物模型是肝脏缺血再灌注损伤、移植免疫、器官保存等基础理论研究的理想模型^[1-4],通过大鼠原位肝移植模型的建立及其机制的研究^[5-7],对临床肝移植的发展产生了巨大的推动作用^[8]。自1955年WELTH首次报道实验性肝移植模型建立以来,1973年LEE首次建立大鼠原位肝移植,即“全缝合法”。1979年KAMADA等^[9]发明了“袖套法”吻合门静脉。1980年MIYATA采用“三袖套法”吻合肝上、肝下下腔静脉以及门静脉,移植模型建立方法迅速发展、改进。然而上述方法的手术操作较繁杂,操作要求高,需要大量反复训练,难度较大^[10],且模型的建立目前多为研究生完成,研究生在校时间短,三证合一后临床工作繁重,难以适应现代研究生的培养规划,因此如何能快速较好地构建大鼠肝移植模型十分重要。据此,作者先阻断门静脉,供体肝脏门静脉与受体门静脉套管完成后再阻断下腔静脉,称之为门脉优先法,能够快速建立肝移植模型,现报道如下。

1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 观察对比动物实验,对于符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异采用独立样本的t检验;计数资料以率表示,组间差异采用卡方检验;大鼠移植分阶层效果的分析采用秩和检验。

1.2 时间及地点 实验于2020年6月至2021年5月在河南省中医药研究院完成。

1.3 材料

1.3.1 实验动物与分组 选择健康雄性Sprague Dawley(SD)大鼠、Lewis大鼠、Brown Norway(BN)大鼠,其中SD大鼠来源于济南朋乐实验生物繁育公司,许可证号:SCXK(鲁)2019-0003;Lewis、BN大鼠来源于北京维通利华生物有限公司,许可证号:SCXK(京)2016-0006,体质量260-300g,实验过程中对动物的处置符合医学伦理学标准。

共纳入大鼠124只,其中SD大鼠40只,Lewis大鼠42只,BN大鼠42只(模型未稳定时采用预实验大鼠,即SD大鼠,稳定后采用正式实验大鼠,即Lewis、BN大鼠)。因手术方式、操作人员不同,将大鼠分为2组,其中传统移植组大鼠64只,门脉优先组60只,进行配对肝移植实验。

术前不禁食、不禁水,根据实验要求行供体和受体的不同组合移植,根据受体移植方式的不同分为传统移植组和门脉优先组,移植过程采用单人裸眼操作。

传统移植组采用方式为:阻断肝下下腔静脉,阻断门静

脉,阻断肝上下腔静脉,移除受体肝脏,植入供体肝脏,吻合肝上下腔静脉后行门静脉套管,套管完成后开放肝上下腔静脉和门静脉,肝下下腔静脉套管完成后开放肝下下腔静脉^[11]。

门脉优先组采用方式为:阻断和离断受体门静脉,行受体门静脉和供体门静脉套管吻合,套管完成后阻断肝下下腔静脉,阻断肝上下腔静脉,移除受体肝脏,吻合肝上下腔静脉后开放肝上下腔静脉和门静脉,肝下下腔静脉套管完成后开放肝下下腔静脉。

1.3.2 套管制备 肝下下腔静脉、门静脉套管及胆管支架管为蓝色铁氟龙管,肝下下腔静脉套管内径2.41mm,外径2.81mm,管长3mm,管尾翼长2mm,见图1A;门静脉套管内径1.68mm,外径2.08mm,管长3mm,管尾翼长2mm,套管在放大镜下用手术刀片刻5排鱼鳞纹,口向尾翼方向防滑脱,胆管支撑管内径0.46mm,外径0.76mm,长约7mm,两端剪为斜面,斜面朝向一致。

1.3.3 器械和药品 上海金钟显微外科手术器械一套(18cm弯镊1把,16cm弯镊1把,16cm直镊1把,16cm弯持针钳1把,16cm弯剪1把)、眼科12cm弯止血钳6把、18cm弯组织剪1把、朗米尼康14cm带剪持针钳1把、上海金钟10cm血管夹镊1把及动静脉血管夹若干;RZ1020润泽微量蠕动泵;8-0灵桥带尼龙线缝合圆锥,3-0涤纶线带圆锥,楚达桌夹式放大镜带灯,6-0真丝缝合线,大鼠动物固定手术台,2cm刀头的1mm小动物电动剃毛器等。硫酸阿托品(上海全宇生物科技动物药业有限公司)2mL:1mg,配制成0.1g/L,肝素钠封管液(山东省惠诺5mL:50单位)配制成25U/mL,左氧氟沙星(扬子江药业有限公司100mL:0.3g)。

1.4 方法

1.4.1 肝移植模型供体手术 供体按10mL/kg给予2%的戊巴比妥钠进行腹腔注射麻醉^[12];取前腹部“十”型切口,进腹后,将肠管推向左下腹,显露胆总管,在肝胆管汇合部远端7mm处剪开胆总管前壁,置入胆管插管,6-0丝线结扎固定,留线5mm,便于寻找和牵拉,见图1B;结扎右侧肾动脉,游离肝下下腔静脉,8-0线缝扎右肾静脉,见图1C;6-0丝线结扎右肾上腺静脉,显露左膈下静脉,8-0线缝扎,见图1D;经肝下下腔静脉远端汇合处注入25U/mL肝素2mL,见图1E;使供体血液肝素化,显露腹主动脉,穿刺针置入腹主动脉血管夹固定,见图1F;剪开胸壁,钳夹胸主动脉,剪断胸段下腔静脉,见图1G;0-4℃生理盐水灌注肝脏,流速6mL/min,待肝脏变黄后改为流速3mL/min维持^[13-14],6-0

丝线结扎离断肝食管静脉, 见图 1H; 游离门静脉, 8-0 线结扎并切断幽门静脉和脾静脉, 肝动脉结扎离断, 见图 1I, J; 平左肾静脉开口剪断肝下下腔静脉, 离断右肾静脉及右侧肾上腺静脉, 见图 1K; 脾静脉远端离断门静脉, 见图 1L; 膈肌环与静脉壁汇合处离断肝上下腔静脉, 取出供肝, 置入 0-4 °C 生理盐水中。

1.4.2 供肝修整 血管镊穿过自制套管管腔, 注意尾翼置于正前方, 眼科血管钳固定套管尾翼与血管, 夹住门静脉端后外翻于套管壁, 见图 1M; 6-0 丝线套管外双重结扎, 注射器于门静脉内注入生理盐水, 观察门静脉液体流入, 确保置管顺利; 同法处理肝下下腔静脉, 见图 1N; 尾翼置入正后方, 静脉夹夹闭肝下下腔静脉及套管尾翼, 防治血液倒流和血管扭转, 见图 1O; 在肝上下腔静脉侧方用 8-0 的带针线缝合一针打结固定便于提拉肝脏, 然后再由外至内缝合一针便于和受体静脉缝合, 见图 1P。

1.4.3 肝移植模型受体手术

(1) 麻醉与肝脏游离: 受体大鼠术前以浓度为 0.1 g/L 阿托品 0.3 mL 肌肉注射以减少呼吸道腺体分泌, 15 min 后按 10 mL/kg 给予 2% 的戊巴比妥腹腔注射麻醉。供体肝脏游离步骤: 取前腹部正中切口, 进腹后, 两端拉钩牵拉, 充分显露术野, 5 mL 37 °C 生理盐水皮下注射补水, 将肠管推向左侧腹部, 显露肝动脉及胆总管, 8-0 缝线缝扎肝动脉, 见图 2A, 于肝总管左右汇合处 6-0 丝线结扎后离断, 见图 2B, 翻向下方; 8-0 带针缝线于门静脉至肝内左右分支汇合处两侧留悬吊牵拉线以减少套管时间, 见图 2C, 分离肝下下腔静脉, 6-0 缝线结扎右侧肾上腺静脉, 见图 2D; 游离肝周韧带, 显露左膈下静脉, 8-0 缝线缝扎, 见图 2E, 近远端 6-0 丝线结扎肝食管血管离断, 见图 2F; 于肝后方置入 6 cm 左右橡皮筋, 牵拉至肝上下腔静脉处, 8-0 带针缝线于肝下下腔静脉两侧留悬吊牵拉线以减少套管时间。

(2) 传统移植的受体肝脏去除、肝上下腔静脉吻合、受体门脉套管: 血管夹夹闭受体肝下下腔静脉, 见图 2G, 幽门静脉分叉以上阻断门静脉, 见图 2H; 门静脉注入 3 mL 37 °C 生理盐水, 将肝内血冲入体循环, 眼科弯血管钳阻断肝上下腔静脉, 紧贴肝脏离断肝上下腔静脉, 翻起受体肝脏, 肝门处离断门静脉, 直视下离断肝下下腔静脉, 见图 2I, 保留右侧肾上腺静脉入肝下下腔静脉段, 移除受体肝脏。植入供体肝脏, 调转手术台, 使大鼠头侧对应术者, 供体肝上下腔静脉左右侧预置的 8-0 尼龙缝线与受体肝上下腔静脉左右侧两侧缝合, 自受体左向右连续缝合肝上下腔静脉后壁, 见图 2J, 至右侧与留置线打结后连续缝合肝上下腔静脉前壁, 见图 2K, 生理盐水冲出血管腔内气泡, 与左侧线尾打结, 完成肝上下腔静脉缝合。调正手术台, 大鼠尾侧对应术者, 用纱布把肝脏翻向上方, 显露肝门, 受体门静脉两侧血管钳夹住预置线以作牵引; 弯头显微镊于血管夹上方夹住门静脉, 并下移门静脉止血夹, 同时松开显微镊, 排出门脉血管内残余血液, 生理盐水冲洗管腔, 调整血管位置避免扭曲, 18 cm 显微镊夹住套管尾翼, 弯头显微镊牵开受体门静脉, 将供体门静脉袖套插入受体门静脉管腔, 见图 2L, 血管夹固定后 6-0 丝线结扎固定 2 道, 见图 2M, 移除肝上下腔静脉阻断钳、门静脉血管夹,

可见肝脏血液迅速充盈, 见图 2N。

(3) 门脉优先的受体门脉反向套管、受体肝脏去除、肝上下腔静脉吻合: 肝脏游离完成后, 调转手术台, 使大鼠头端对应术者, 取出供体肝脏, 放在下腹部稍偏左侧的纱布上, 背侧在前, 肝上下腔静脉在下, 此时门静脉套管尾翼在后, 看清门静脉方向无扭转后牵拉门静脉套管至纱布边缘, 见图 3A, B。尾翼挂在纱布边缘防治回缩及扭转, 之后牵拉肝上下腔预置尼龙线, 使肝上下腔静脉翻向上方, 此时供体肝脏为正常解剖位置, 相当于水平下移到下腹部, 门静脉相当于折叠到肝上下腔静脉后方, 利于套管, 见图 3C, D。牵拉受体门静脉预置线, 移动纱布调整供体门静脉和受体门静脉位置以利于套管, 静脉夹夹闭受体门静脉近幽门静脉端, 经肝门注入 3 mL 37 °C 生理盐水, 观察肝脏局部发黄为宜。动脉夹夹闭肝门端门静脉, 紧贴肝门离断门静脉, 两端向前下牵拉预置线, 后壁 8-0 带针缝线缝扎, 三线悬吊, 此时受体门静脉反向, 开口朝向前下, 生理盐水注入受体门静脉内, 确保无气泡, 见图 3E, F; 置入供体门静脉套管, 移动牵引线尾端确保受体血管壁包绕套管, 血管夹夹闭尾翼、血管壁及牵引线固定, 6-0 丝线结扎套管两道, 见图 3G, H, 操作过程供体肝脏冰盐水纱布覆盖。血管夹夹闭受体肝下下腔静脉, 眼科弯血管钳阻断肝上下腔静脉, 注意夹闭约 3 mm 的膈肌防滑脱和压榨, 橡皮筋牵拉, 紧贴肝脏离断肝上下腔静脉, 翻起受体肝脏, 直视下离断肝下下腔静脉, 保留右侧肾上腺静脉入肝下下腔静脉段, 移除受体肝脏, 见图 3I; 牵拉供体肝脏植入原受体肝脏位置, 供体肝上下腔静脉左右侧预置的 8-0 尼龙缝线与受体肝上下腔静脉左右侧两侧缝合, 缝针内进外出, 在血管壁外打结, 牵拉缝合线不带针的尾端, 充分显露吻合血管, 自受体左向右连续缝合肝上下腔静脉后壁, 见图 3J; 至右侧与留置线打结后连续缝合肝上下腔静脉前壁, 见图 3K; 生理盐水冲洗血管腔内排出气泡, 见图 3L, 与左侧线尾打结, 完成肝上下腔静脉缝合。注意受体血管后壁缝合尽量在近膈肌处, 供体血管后壁缝合尽量在近肝脏处, 便于确认位置和折叠较多的血管以防漏血。移除肝上下腔静脉阻断钳、门静脉血管夹, 见图 3M, N, 可观察肝脏血液迅速充盈, 由黄变红, 见图 3O, 腹腔注入 37 °C 生理盐水, 复温, 见图 3P。注意肝上下腔静脉吻合时需要牵拉调整肝脏, 门静脉固定的动脉夹及静脉夹待肝上下腔静脉吻合完成后才能去除。

(4) 肝下下腔静脉套管、胆管重建与关腹: 受体肝下下腔静脉血管夹移至右侧肾静脉处取出血凝块, 生理盐水充盈血管, 置入供体肝下下腔静脉套管, 套管尾翼在后, 血管夹固定肝下下腔静脉壁和套管尾翼, 6-0 丝线结扎固定 2 道, 去除阻断静脉的动脉夹和静脉夹, 恢复肝下下腔静脉血流, 见图 2O。胆总管支架管插入受体胆总管管腔内, 6-0 丝线结扎固定, 受体胆管固定线与供体胆管固定线结扎加固, 见图 2P, 网膜覆盖肝门静脉处, 腹腔注入左氧氟沙星液 1 mL 抗菌, 3-0 丝线连续缝合关腹。手术结束, 皮下补充 37 °C 生理盐水 3 mL, 电热毯、暖灯复暖, 直至大鼠清醒, 一般需要 3 h 左右, 术后自由进水进食。

1.5 主要观察指标 统计分析两组学习曲线时间、门静脉阻断时间、无肝期时间、肝下下腔静脉阻断时间、受体手术时间及术后生存情况等。

| | |
|-------------------|--|
| 组织工程实验动物造模过程的相关问题 | |
| 造模目的 | 研究大鼠肝移植后排斥反应相关基因表达 |
| 选择动物的条件 | 体质量 260-300 g, 健康雄鼠 |
| 模型与所研究疾病的关系 | 大鼠肝移植模型是后续肝移植排斥反应中相关基因表达的研究基础 |
| 动物来源及品系 | SD 大鼠来源于济南朋乐实验生物繁育公司, Lewis、BN 大鼠来源于北京维通利华生物有限公司 |
| 造模技术描述 | 选取健康雄性大鼠, 取出供体大鼠肝脏, 置于 0-4 °C 生理盐水中进行“门静脉、肝下腔静脉”套管。传统手术组受体直接阻断肝上下腔静脉、门静脉, 将受体肝脏取出, 供体肝脏行门静脉套管、肝上下腔静脉吻合, 松开血管阻断, 后行肝下腔静脉套管、胆管套管, 关腹, 术毕; 门脉优先组在不取出受体肝脏情况下, 离断受体门静脉, 行门静脉套管, 后阻断肝上下腔静脉, 行肝上下腔静脉吻合, 松开血管阻断, 行肝下腔静脉套管、胆管套管, 关腹, 术毕 |
| 动物数量及分组方法 | 共纳入大鼠 124 只, 其中 SD 大鼠 40 只, Lewis 大鼠 42 只、BN 大鼠 42 只 (模型不稳定时采用预实验大鼠, 即 SD 大鼠, 稳定后采用正式实验大鼠, 即 Lewis、BN 大鼠)。因手术方式、操作人员不同, 将大鼠分为 2 组, 其中传统移植组大鼠 64 只, 门脉优先组 60 只 |
| 造模成功评价指标 | 大鼠肝移植术后 2 d 后正常进食水、精神状态稳定为造模成功 |
| 造模后观察指标 | 两组人员学习时间、供体手术时间、肝脏修整时间、门静脉阻断时间、无肝期时间、下腔静脉阻断时间、受体手术时间及术后生存情况 |
| 造模后动物处理 | 放入黄色垃圾袋中, 放置冷冻冰箱, 统一焚烧处理 |
| 伦理委员会批准 | 实验方案经郑州大学生命科学伦理审查委员会批准 |

两组成活大鼠肝脏和肠道缺血再灌注损伤的组织学观察: 将两组成活大鼠在移植后第 7 天获取的肝脏和空肠标本制作病理切片, 行苏木精-伊红染色^[15], 观察其组织学变化。

1.6 统计学分析 采用 SPSS 20.0 软件进行统计学分析。对于符合正态分布的计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间差异采用独立样本的 *t* 检验; 计数资料以率表示, 组间差异采用卡方检验; 大鼠移植分阶层效果的分析采用秩和检验, 统计学差异采用双边检验, $P < 0.05$ 时表示差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 共纳入受体大鼠 62 只, 分为传统移植组与门脉优先组, 其中传统移植组大鼠 32 只, 门脉优先组 30 只, 62 只全部进入分析。

对于供体大鼠, 因术中操作问题造成部分大鼠在手术未完成即结束手术, 时间数据缺失, 故将其中成活超过 2 d 的大鼠 (传统移植组 12 只和门脉优先组 20 只) 纳入供体手术时间、肝脏修整时间、门静脉阻断时间、无肝期时间、下腔静脉阻断时间分析。传统移植组剔除 20 只, 其中 4 只供体肝脏灌注不全, 大鼠术后未醒; 4 只因肝上下腔静脉吻合后出血; 3 只因肝下腔静脉血栓; 2 只因膈下静脉出血; 2 只因门静脉套管扭转; 2 只因门静脉套管脱落; 其他原因 3 只。门脉优先组剔除 10 只, 其中 3 只肝上下腔静脉吻合后出血, 2 只供肝灌注不全, 2 只肝下腔静脉血栓, 其他原因 3 只。其他指大鼠术后苏醒, 意识欠佳, 食欲减退, 1 d 后死亡, 可能因为肝脏急性排斥反应、术中缺氧时间过长、门静脉缺血再灌注损伤等, 具体原因不详。

2.2 大鼠移植成活原因分析 因为手术目的是研究术后 1 周大鼠排斥反应的作用和机制, 大部分大鼠在术后 1 周要取标本, 统计时间以术后 1 周为结点, 采用卡方检验显示大鼠肝移植后成活率门脉优先组高于传统移植组, 见表 1。

表 1 | 两组死亡率与生存率的关系 (n/%)
Table 1 | The relationship between mortality and survival rate in the two groups

| 组别 | n | 生存率 | 死亡率 |
|------------|----|-------|-------|
| 传统手术组 | 32 | 12/38 | 20/62 |
| 门脉优先组 | 30 | 20/67 | 10/33 |
| χ^2 值 | | 5.27 | |
| P 值 | | 0.02 | |

因为大鼠生存时间大于 2 d 而小于 7 d 表明手术操作没有问题, 但并不能达到实验的目的, 把大鼠分成 3 个阶层, 大鼠生存时间 <2 d 记 1 分, 2-7 d 记 2 分, >7 d 记 3 分, 见表 2。

表 2 | 两组按移植先后排序大鼠成活效果的分阶层结果 (分)
Table 2 | The stratification of the survival of rats in the two groups according to the order of transplantation

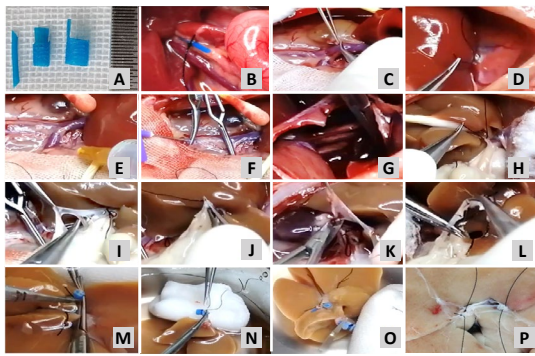
| 移植先后排序 | 传统移植组 | 门脉优先组 | 移植先后排序 | 传统移植组 | 门脉优先组 | 移植先后排序 | 传统移植组 | 门脉优先组 |
|--------|-------|-------|--------|-------|-------|--------|-------|-------|
| 1 | 1 | 1 | 12 | 1 | 2 | 23 | 2 | 3 |
| 2 | 1 | 1 | 13 | 3 | 3 | 24 | 1 | 3 |
| 3 | 1 | 1 | 14 | 1 | 2 | 25 | 3 | 3 |
| 4 | 1 | 1 | 15 | 1 | 3 | 26 | 3 | 2 |
| 5 | 1 | 1 | 16 | 1 | 3 | 27 | 3 | 3 |
| 6 | 1 | 1 | 17 | 1 | 3 | 28 | 1 | 3 |
| 7 | 1 | 3 | 18 | 3 | 3 | 29 | 3 | 3 |
| 8 | 1 | 1 | 19 | 1 | 3 | 30 | 3 | 3 |
| 9 | 1 | 3 | 20 | 3 | 3 | 31 | 1 | |
| 10 | 3 | 1 | 21 | 1 | 3 | 32 | 2 | |
| 11 | 1 | 1 | 22 | 3 | 1 | | | |

表注: 大鼠生存时间 <2 d 记 1 分, 2-7 d 记 2 分, >7 d 记 3 分

通过秩和检验显示大鼠肝移植的效果门脉优先组优于传统移植组, 为了显示手术效果与手术例数累积的关系, 依照移植的先后排序, 每 10 例成活效果分别比较。两组第 1 个 10 例、第 2 个 10 例、第 3 个 10 例生存分阶层成活情况的秩和检验显示, 门脉优先组第 2 个 10 例优于传统移植组 ($Z=78.000$, $P=0.041$), 其他 2 个 10 例两组之间差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。

2.3 两组成活大鼠手术各阶段时间比较 把成活时间超过 2 d 的传统移植组 12 例大鼠和门脉优先组 20 例大鼠手术中的各阶段时间进行统计分析, 采用参数检验分析显示, 门脉优先组门静脉阻断时间稍长于传统移植组, 但差异无显著性意义; 门脉优先组肝上下腔阻断时间为 (15.0±2.2) min, 明显短于传统移植组的 (21.3±2.1) min ($P < 0.05$); 门脉优先组肝下腔阻断时间为 (25.0±2.9) min, 明显短于传统移植组的 (32.5±3.2) min ($P < 0.05$); 两组供体灌注时间、供体手术时间、供体肝脏修整时间、受体手术时间和门脉阻断时间相比差异无显著性意义, 见图 4。

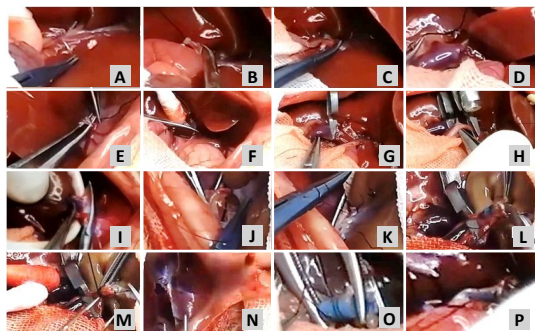
2.4 两组成活大鼠肝脏和肠道缺血再灌注损伤的组织学观察 两组成活大鼠在移植后第 7 天获取肝脏和空肠标本制作病理切片, 行苏木精-伊红染色, 进行缺血再灌注损伤组织学分析, 结果显示肝脏的炎症反应及细胞损伤改变两组无明显差异, 见图 5A, B; 空肠在缺血再灌注损伤后, 炎症反应程度两组无明显差异, 见图 5C, D。



图注：图 A 为套管；B 示胆管插入支撑管；C 示右肾静脉缝扎；D 示左膈下静脉结扎；E 示经左肾静脉肝素化；F 示腹主动脉穿刺灌注；G 示胸内腹主动脉夹闭，下腔静脉离断；H 示结扎离断肝食管静脉；I 示结扎离断幽门静脉；J 示结扎离断肝动脉；K 示离断右肾静脉；L 示离断门静脉；M 示门静脉袖套翻转；N 示肝下下腔套管结扎；O 示肝下下腔静脉及套管静脉夹夹闭；P 示肝上下腔预置尼龙线

图 1 | 供体手术及肝脏修整过程图

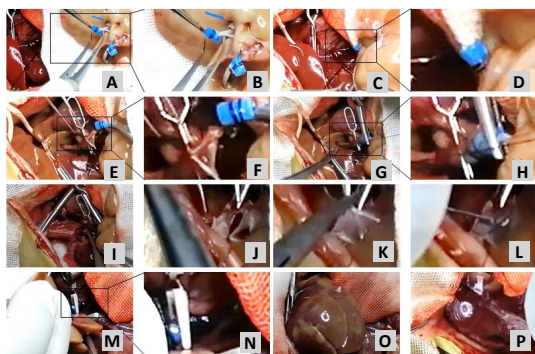
Figure 1 | Donor surgery and liver repair process



图注：图 A 示结扎肝动脉；B 示离断胆总管；C 示门静脉预置尼龙线悬吊线；D 示结扎右肾上腺静脉；E 示结扎左膈下静脉；F 示结扎离断肝食管静脉；G 示阻断肝下下腔静脉；H 示阻断门静脉；I 示离断肝上下腔静脉；J 示肝上下腔静脉后壁缝合；K 示肝上下腔静脉前壁缝合；L 示门静脉套管；M 示门静脉套管结扎；N 示恢复门静脉和肝上下腔静脉血流；O 示肝下下腔静脉套管；P 示胆管支架植入结扎

图 2 | 传统肝移植受体手术的步骤

Figure 2 | Procedures of traditional liver transplant recipient surgery



图注：图 A, B 示肝脏放在受体下腹部，提拉门脉套管，确认无扭转，可见套管的双重结扎线；C, D 示门脉经肝脏后面尾端拉向头端，前壁翻向后方，套管尾端卡在纱布边缘；E, F 示受体仅离断门静脉，提拉门静脉前壁在后下与供体门静脉套管；G, H 示套管受体端静脉夹，供体端动脉夹，固定后双重结扎；I 示阻断肝上下腔和肝下下腔去除受体肝脏；J 示肝上下腔后壁缝合；K 示肝上下腔前壁缝合；L 示缝合后驱除肝上下腔内气体；M, N 示去除门静脉动脉夹和静脉夹；O 示见肝脏部分血流充盈去除肝上下腔阻断钳；P 示肝脏温水复温

图 3 | 门脉优先法反向吻合门静脉后阻断下腔静脉受体肝移植的步骤

Figure 3 | Procedures of inferior vena cava recipient liver transplantation after reverse anastomosis of the portal vein by the portal vein preferential method

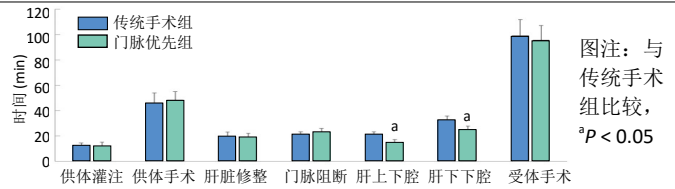
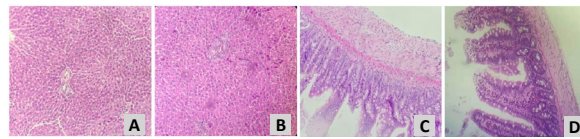


图 4 | 两种方法建立大鼠肝移植模型各阶段时间柱状图

Figure 4 | Histogram of establishing a rat liver transplantation model at different stages using two methods



图注：图 A, C 为传统手术组肝脏、肠道病理；图 B, D 为门脉优先组肝脏、肠道病理

图 5 | 大鼠移植后 7 d 肝脏、肠道苏木精 - 伊红染色图片 (×100)

Figure 5 | Hematoxylin-eosin staining of the liver and intestines in rats 7 days after transplantation (×100)

3 讨论 Discussion

传统的“二袖套法”建立大鼠肝移植模型中，需要大量的实验动物反复练习，无肝期时间、排斥反应程度、失血等都是影响肝移植模型大鼠成活的关键因素^[16-18]，KAMADA 等^[9]提出无肝期的最长时间不能超过 26 min 的理论时间，否则大鼠就很难存活，该方法是去除受体肝脏，行肝上下腔静脉缝合吻合，再行门静脉套管吻合，吻合结束后开放门静脉和肝上下腔静脉，其无肝期时间为门静脉阻断时间或肝上下腔静脉阻断时间，需要在 26 min 内完成肝上下腔静脉吻合和门静脉套管。对于门静脉阻断时间，如去除肝脏，即使下腔静脉通畅，门静脉阻断 30 min 情况下仍有 30% 的死亡率^[19]，如不去除肝脏，阻断肝门，肠道耐受瘀血的时间为 35 min，如肠道瘀血超过 40 min，肠道出现不可逆损伤导致大鼠死亡^[20-21]，说明大鼠成活血流阻断时间的关键是肝上下腔静脉阻断时间不超过 26 min。由于传统的门静脉套管时间为 5-7 min，如果这个时间不去除肝脏，不断阻肝上下腔静脉，原理上在 26 min 内完成肝上下腔静脉吻合就可以了，加上门脉套管的时间仍能保证肠道不会出现不可逆损伤。据此作者在 Kamada “二袖套法”的基础上采用门脉优先的方法，即在不去除肝脏、保持下腔静脉的血流通畅情况下，行门静脉的套管吻合，缩短了肝上下腔静脉的阻断时间约 6 min，同时也缩短了肝下下腔静脉的阻断时间，对大鼠血流动力学影响小^[22]，保持了循环的稳定性，减轻了大鼠肾脏的缺血再灌注损伤。传统手术方法先去除受体肝脏，在肝上下腔静脉阻断时间内必须完成肝上下腔吻合和门静脉套管吻合，而门脉优先法在肝上下腔静脉阻断时间内只需完成肝上下腔吻合，降低了手术的难度，提高了缝合的质量。传统门静脉套管需要肝脏上翻显露肝门，供体门静脉和受体门静脉移动均受限，套管需要反复训练；门脉优先法供体门静脉游离，移动纱布调整位置更易于套管吻合，因为肠道耐受缺血时间较长，套管时门脉下腔静脉通畅，理论上套管吻合 10 min 内完成均可以，操作比较轻松，即使在操作失误的前提下，也有了充分的补救时间。从两组成活超过 2 d 的大鼠门脉阻断时间分析，虽然门静脉阻断时间两组没有显著性差异，数据显示门脉优先组门静脉阻断时间稍长于传统移植组，可能是相同时间内传统移植组大鼠没有成活所致；通过分阶层对比分析显示在第 2 个 10 例的手术效果

门脉优先法优于传统移植法,随着移植例数的增加,可以看到第3个10例两组效果差异不明显;但如按照成活率80%为模型稳定来看,门脉优先组只需20例可达到模型稳定的效果,而传统手术组30例尚不能达到模型稳定,通过肝脏及空肠的苏木精-伊红染色图片可以看出,门脉优先反向吻合建立的大鼠肝移植模型在增加成活率、提高移植效果的同时,并没有增加肝脏和空肠的缺血再灌注损伤^[23-25]。综合分析来看门脉优先的手术方式具有操作轻松、迅速建立稳定模型的优点。

文献报道三套管法时把受体肝脏稍翻向右下侧,供体肝脏原位套管,受体肝脏门静脉不剪断,以受体门脉为支撑进行门静脉套管^[26-27],作者也尝试了这种方法,由于供体肝脏游离,上翻显露供体肝门困难,供体肝脏门静脉套管后较短,如受体门静脉不离断,位置较深,供体门静脉和受体门静脉套管角度不好、张力大、操作困难。作者调转手术台,大鼠头端对应术者,把供体肝脏解剖位下移放在大鼠左下腹位置,把门静脉从肝脏后方折叠到肝脏上方,采用纱布边缘固定,受体门静脉离断后翻向下前方,称之为反向吻合法,视野清楚,套管角度好,受体门静脉冲洗后液体不易流出,避免套管后门静脉内气泡残留。

如门静脉供体套管脱落,再翻袖套结扎固定费时较长,大鼠很难成活^[28],作者在套管上刻5排鱼鳞样纹路解决结扎时需要寻找套管上刻痕的弊端(图1B),受体套管时移动或意外牵拉牵引线容易导致受体门静脉滑脱,采用动脉夹固定,同时延长套管的长度为3mm以便于双侧结扎,有效避免了供体套管脱落;肝上下腔静脉吻合完成后再次开放血管夹,可有效避免肝脏摆放牵拉引起的静脉滑脱,增加了套管的操作性。肝上下腔静脉吻合的质量和速度是肝移植大鼠成活的关键,作者在门脉优先法的基础上,通过乳胶手套缝合训练、采用肝上下腔静脉预置固定缝合线,缝线两端牵引显露、大鼠头端对应术者的良好术野显露有效地缩短了缝合时间,采用紧贴膈肌环的受体静脉后壁和紧贴肝脏的供体静脉后壁缝合、肝上下腔静脉左右两侧的前后壁重叠缝合提高了缝合质量,有效防止了血管漏血。由于研究生实验时间的不确定性,此次研究的大鼠均无禁食要求。门脉优先法的缺点是门静脉阻断期间无法观察血管内情况,无法冲出血管内可能的血栓,作者在移植成活大鼠术后7d取标本时没有发现门静脉血栓^[29-30],但较长时间存活的大鼠是否有血栓形成尚需进一步观察。

总之,从结果看,门脉优先反向吻合的大鼠肝移植模型解决了移植过程中肝上下腔静脉阻断时间过长导致的术后大鼠存活率较低、反复套管失败以及术野显露困难的问题,为初学者迅速掌握大鼠肝移植模型的建立提供了一种较为快速可靠的方法,适合学习和推广。

致谢:感谢河南省人民医院肝胆胰脾外科六病区为课题提供的帮助。

作者贡献:模型数据资料收集为第一、二作者共同完成,第一作者完成论文书写,稿件审核为通讯作者。

经费支持:该文章接受了“国家自然科学基金资助项目(U2004124)及河南省医学科技攻关计划项目(SBGJ2018071,SB201903020)”的资助。所有作者声明,经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

利益冲突:文章的全部作者声明,在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

机构伦理问题:实验方案经郑州大学生命科学伦理审查委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。

写作指南:该研究遵守国际医学期刊编辑委员会《学术研究实验与报告和医学期刊编辑与发表的推荐规范》。

文章查重:文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行3次查重。
文章外审:文章经小同行外审专家双盲外审,同行评议认为文章符合期刊发表宗旨。

生物统计学声明:文章统计学方法已经河南省人民医院生物统计学专家审核。
文章版权:文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

开放获取声明:这是一篇开放获取文章,根据《知识共享许可协议》(署名-非商业性使用-相同方式共享4.0)条款,在合理引用的情况下,允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展,同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献,并为之建立索引,用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

4 参考文献 References

- [1] SUN Z, LI T, WEN H, et al. Immunological effect induced by mesenchymal stem cells in a rat liver transplantation model. *Exp Ther Med*. 2015;10(2):401-406.
- [2] CHENG Y, LAN H, CHEN Y, et al. Protective Effect of Retrograde Reperfusion Against Hepatic Autophagy Impairment in Rat Liver Transplantation. *Transplant Proc*. 2021;53(1):443-449.
- [3] BRUINSM BG, BERENDSEN TA, IZAMIS ML, et al. Supercooling preservation and transplantation of the rat liver. *Nat Protoc*. 2015;10(3):484-494.
- [4] LI M, LU C, ZHU H, et al. Cenicriviroc ameliorates the severity of graft-versus-host disease through inhibition of CCR5 in a rat model of liver transplantation. *Am J Transl Res*. 2019;11(6):3438-3449.
- [5] WESTERKAMP AC, FUJIYOSHI M, OTTRNS PJ, et al. Metformin Preconditioning Improves Hepatobiliary Function and Reduces Injury in a Rat Model of Normothermic Machine Perfusion and Orthotopic Transplantation. 2020;104(9):e271-e280.
- [6] CHEN X, WANG L, DENG Y, et al. Inhibition of Autophagy Prolongs Recipient Survival Through Promoting CD8+ T Cell Apoptosis in a Rat Liver Transplantation Model. *Front Immunol*. 2019;10:1356.
- [7] 赵英鹏, 李立, 陈刚. 减体积肝移植在大鼠脂肪肝供肝移植模型中的应用[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(4):582-586.
- [8] CHONG AS, ALEGRE ML, MILLER ML, et al. Lessons and limits of mouse models. *Cold Spring Harb Perspect Med*. 2013;3(12):a015495.
- [9] KAMADA N, CALNE RY. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage. *Transplantation*. 1979;28(1):47-50.
- [10] KAKIZAKI Y, MIYAGI S, SHIMIZU K, et al. The Effects of Short-term Subnormothermic Perfusion After Cold Preservation on Liver Grafts From Donors After Circulatory Death: An Ex Vivo Rat Model. *Transplantation*. 2018;102(4):e147-e154.
- [11] 李蕾, 李善宝, 汪涛. 单人直视下大鼠肝移植模型供肝获取不同灌注方式比较[J]. *器官移植*, 2020, 11(3):356-361.
- [12] 陈辉, 姜骥, 王雁. 三种不同麻醉药对SD大鼠肝移植手术麻醉效果的比较和应用[J]. *实验动物科学*, 2009, 26(4):57-59+62.
- [13] JIA JJ, LI JH, YU H, et al. Machine perfusion for liver transplantation: A concise review of clinical trials. *Hepatobiliary Pancreat Dis Int*. 2018;17(5):387-391.
- [14] GASSNER JMGV, NOSSER M, MOOSBURNER S, et al. Improvement of Normothermic Ex Vivo Machine Perfusion of Rat Liver Grafts by Dialysis and Kupffer Cell Inhibition With Glycine. *Liver Transpl*. 2019;25(2):275-287.
- [15] JIA L, YU W, YU H, et al. Electroacupuncture Pretreatment Attenuates Intestinal Injury after Autogenous Orthotopic Liver Transplantation in Rats via the JAK/STAT Pathway. *Oxid Med Cell Longev*. 2020;2020:9187406.
- [16] QU B, YU F, SHENG GN, et al. Protective Effect of a Novel Technique for Liver Transplantation in the Rat. *Transplant Proc*. 2018;50(1):267-273.
- [17] XIONG L, WANG D, LIN S, et al. Soluble CD83 inhibits acute rejection by up regulating TGF- β and IDO secretion in rat liver transplantation. *Transpl Immunol*. 2021;64:101351.
- [18] ZHAO Z, PAN G, TTANG C, et al. IL-34 Inhibits Acute Rejection of Rat Liver Transplantation by Inducing Kupffer Cell M2 Polarization. *Transplantation*. 2018;102(6):e265-e274.
- [19] 骆助林, 汪涛, 田伏洲. 大鼠无肝期耐受门静脉血流阻断的安全时限研究[J]. *山东医药*, 2012, 52(43):11-13.
- [20] 周京安, 李宁. 肠道耐受淤血-再灌注损伤的安全时限观察[J]. *临床与实验病理学杂志*, 2010, 26(3):339-344.
- [21] WANG J, YU S, LI J, et al. Protective role of N-acetyl-L-tryptophan against hepatic ischemia-reperfusion injury via the RIP2/caspase-1/IL-1 β signaling pathway. *Pharm Biol*. 2019;57(1):385-391.
- [22] YUAN Y, CHEN MH, HUANG J, et al. Organ Ischemia-Reperfusion Injury by Simulating Hemodynamic Changes in Rat Liver Transplant Model. *J Vis Exp*. 2021; (169). doi: 10.3791/61779.
- [23] LI X, WANG L, YANG X, et al. Metformin Attenuates Ischemia-reperfusion Injury of Fatty Liver in Rats Through Inhibition of the TLR4/NF- κ B Axis. *Balkan Med J*. 2020;37(4):196-202.
- [24] BEJAOU M, ZAOUALI MA, SAKLE R, et al. Olprinone protects the liver from ischemia-reperfusion injury through oxidative stress prevention and protein kinase Akt activation. *Can J Physiol Pharmacol*. 2018;96(3):227-231.
- [25] ZAZUETA C, BUELNA-CHONTAL M, MACIAS-LOPEZ A, et al. Cytidine-5'-Diphosphocholine Protects the Liver From Ischemia/Reperfusion Injury Preserving Mitochondrial Function and Reducing Oxidative Stress. *Liver Transpl*. 2018;24(8):1070-1083.
- [26] 唐丹, 袁泉, 王志超. 冠状动脉支架在弯曲血管中的血流动力学分析[J]. *中国组织工程研究*, 2018, 22(22):3563-3568.
- [27] 刘洪涛, 李永国. 受体肝分步切除三袖套法大鼠原位肝移植术的改进[J]. *中国现代手术学杂志*, 2006, 10(2):106-108.
- [28] 何宇涛, 周焘, 李晓凯. 大鼠肝移植中 veno-lined 支架技术的改良研究[J]. *中华器官移植杂志*, 2020, 41(11):687-691.
- [29] PECORA RA, CANEDO BF, ANDRAUS W, et al. Portal vein thrombosis in liver transplantation. *Arq Bras Cir Dig*. 2012;25(4):273-278.
- [30] ONDA S, FURUKAWA K, SHIRAI Y, et al. New classification-oriented treatment strategy for portal vein thrombosis after hepatectomy. *Ann Gastroenterol Surg*. 2020;4(6):701-709.

(责任编辑: GD, ZN, SX)