

[文章编号] 1674-8115(2011)03-0279-05

· 论著 ·

改良三袖套吻合法建立大鼠左肺原位移植模型及其鉴定

朱宏伟，吴镜湘，徐美英

(上海交通大学附属胸科医院麻醉科，上海 200030)

[摘要] 对三袖套吻合法建立的大鼠肺移植模型进行改进,建立操作简便和稳定有效的大鼠左肺原位移植模型。方法在预实验的基础上,对三袖套吻合法建立的大鼠肺移植模型进行以下改进:供体采用胸骨正中切口,经肺动脉圆锥处进行低压肺灌注;制作“袖套”时用无损伤血管夹固定套管尾部;套入“袖套”时用无创显微心耳钳夹住左肺门,在不离断“病肺”的情况下完成吻合;完善呼吸道管理流程。以手术成功率、手术时间、移植肺功能、肺组织病理学改变等对模型进行评估。结果完成大鼠左肺原位移植 10 例,手术成功率 80%。供肺灌洗到获取时间为 (12 ± 2) min, 体外套管时间为 (18 ± 3) min, 吻合时间为 (31 ± 3) min。移植肺再灌注 15 min 的氧合指数显著高于单肺通气 30 min ($P < 0.05$)。移植肺再灌注 2 h 后的病理学改变符合典型的缺血-再灌注损伤特征。结论成功改进了大鼠左肺原位移植模型,该模型稳定有效且操作简便。

[关键词] 大鼠;肺移植;袖套技术

[DOI] 10.3969/j.issn.1674-8115.2011.03.007

[中国分类号] R617;R-332

[文献标志码] A

Improvement of rat model of orthotopic left lung transplantation

ZHU Hong-wei, WU Jing-xiang, XU Mei-ying

(Department of Anesthesiology, Shanghai Chest Hospital, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 200030, China)

[Abstract] **Objective** To improve the cuff-like vessel anastomosis technique-based rat model of lung transplantation, and establish a simple and stable rat model of orthotopic left lung transplantation. **Methods** Based on preliminary experiments, improvement was made from cuff-like vessel anastomosis technique-based rat model of lung transplantation on the following aspects: lungs were extracted from donors through median sternotomy, and were perfused through cut at the cone of the pulmonary artery with low pressure; blood vessel clamps were used to fix the rear part of pipe; micro left auricular clamps were used to clamp lung hilum instead of removing “sick lung” to complete tallies; respiratory tract management was enhanced. The new model was evaluated by successful rate of operation, time of operation, transplanted lung function and pathological changes. **Results** Ten consecutive rat models of orthotopic left lung transplantation were completed, with the successful rate of 80%. The time of donor lung perfusion-harvest, donor lung vessel anastomosis and recipient vessel anastomosis was (12 ± 2) min, (18 ± 3) min and (31 ± 3) min, respectively. The oxygenation index 15 min after reperfusion was significantly higher than that 30 min after single lung ventilation ($P < 0.05$). The typical pathological changes of ischemia-reperfusion injury were confirmed by pathological examinations 2 h after reperfusion. **Conclusion** The improved rat model of orthotopic left lung transplantation has been successfully established, which is simple and effective.

[Key words] rat; lung transplantation; cuff technique

肺移植是对某些终末期呼吸系统疾病的的有效治疗手段。为提高移植成功率,供肺的保存、持续缺血过程和缺血-再灌注损伤等领域仍有待研究。许多不同的实验模型迄今仍在使用,Mizuta 等^[1]采用“袖套法”建立大鼠肺移植模型,逐渐为肺移植研究者所接受。本研究在“三袖套吻合法”的基础上对大鼠肺移植模型进行改进,为进一步开展肺移植后缺血-

再灌注损伤等领域的研究提供更为简便、稳定的动物模型。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 动物 清洁级健康雄性 SD 大鼠购自中国科学院上海实验动物中心,体质量 250~350 g,供、受者

[基金项目] 上海市卫生局青年基金资助项目(2007Y28)(Shanghai Municipal Health Bureau Foundation, 2007Y28)。

[作者简介] 朱宏伟(1977—),男,主治医师,硕士生;电子信箱:zhuhongwei06@yahoo.com.cn。

[通信作者] 徐美英,电子信箱:myxu55@yahoo.com.cn。

体质量相近;动物生产许可证号为 SCXK(沪)2008-0016,动物使用许可证号为 SYXK(沪)2008-0043。

1.1.2 仪器和试剂 显微外科器械、啮齿类小动物胸撑开器、无损伤纤维血管夹(上海医疗器械集团有限公司手术器械厂),SXP-IB型双目外科显微镜(上海医疗器械股份有限公司),HX200 动物呼吸机(成都泰蒙科技有限公司),MPA2000 多道生理记录仪(上海奥尔科特生物科技有限公司),18G(直径 1.3 mm)、16G(直径 1.7 mm)、14G(直径 2.3 mm)、24G(直径 0.7 mm)静脉留置套管针(苏州碧迪医疗器械有限公司)。50 mg/mL 氯胺酮、肝素 12 500 U/2 mL、乳酸钠林格注射液。

1.2 方法

1.2.1 供体手术 大鼠称量体质量后,腹腔内注射阿托品 0.2 mg,全身麻醉后(腹腔内注射 100 mg/kg 氯胺酮)仰卧位固定于动物支架上,颈部气管切开,插入 14G 套管针外鞘管,固定后接呼吸机行机械通气,潮气量 10 mL/kg,呼吸频率 70 次/min,吸气与呼气比 1:2,吸入氧气浓度(fraction of inspired oxygen, FiO₂) 21%。取腹部正中切口,从下腔静脉注射肝素 1 000 U/kg,剪开膈肌,沿胸骨正中切口,两把科克钳撑开胸腔,切除胸腺后暴露心脏和肺,从肺动脉圆锥处剪一小口插入 18G 套管,连接自制的灌注器(50 mL 的注射器外套倒置悬挂于支架上),离心水平 20 cm,滴注入 4 ℃ 10 U/mL 肝素化林格氏液 20 mL(图 1)。剪开左心耳放出灌洗液,直至肺组织颜色变得完全苍白、流出的灌洗液清亮,于吸气末肺膨胀状态下夹闭气管,保持肺的膨胀状态。



图 1 供体手术中正中切口完成肺灌洗

Fig 1 Perfusion of lung through a median sternotomy during operation of donor

1.2.2 供肺套管处理 取出心肺组织,放入盛有 4 ℃ 肝素化林格氏液的平底玻璃培养皿中,底部和周边铺以冰屑,中间放一棉签棒,把总气管的牵引线与其捆绑,以隔离左右肺并固定方位、显露肺门(图 2)。于 10 倍显微镜辅助下先断离左上腔静脉,充分暴露

肺动脉近段,左肺静脉连着部分左心房离断,肺动脉连部分右肺动脉干离断,左肺支气管游离至隆突处用 3-0 丝线结扎后离断,继续保持膨胀状态。自制肺动脉、肺静脉和支气管套管,分别取材于 18G、16G、16G 静脉留置针外鞘管。套管由相连的体部和尾部组成,体部为空心管道,长 2.5 mm;尾部为手柄状,长 1 mm,便于握持。用砂轮摩擦套管表面,使其粗糙,以防套管时滑脱,再用刀背压两道凹槽,便于结扎。套管时,先用无损伤血管夹夹住套管尾部固定套管(图 3),然后使夹子水平固定,用显微镊子将供体血管从套管体中自尾端向头端牵出,将血管壁向外翻转在套管外表面上,使内膜外翻呈“袖套”状,5-0 丝线外科结固定于第一道凹槽上。同样方法,气管套管使黏膜外翻,5-0 丝线外科结固定于凹槽上。完成套管后,从肺静脉口注入少量保存液,观察肺动脉口有无液体溢出,检查套管通畅性。

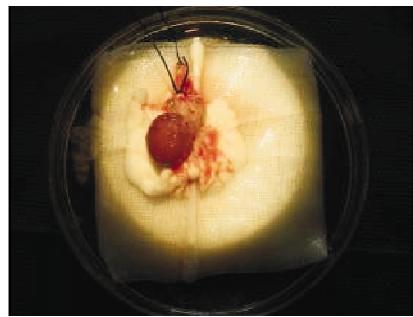


图 2 获取后的供体肺

Fig 2 Donor lung after harvest



图 3 无损伤血管夹固定套管尾部

Fig 3 Fixation of rear part of pipe by blood vessel clamp

1.2.3 受体手术 麻醉方法同供体,24G 套管针尾静脉穿刺置套管,妥善固定后接输液泵,以 10 mL·kg⁻¹·h⁻¹ 的速度静脉输注乳酸林格氏液。气管切开过程同供体,潮气量 10 mL/kg,呼吸频率 70 次/min,吸气与呼气比 1:2,FiO₂ 40%。右颈动脉游离后置入 24G 套管针外套管,连接换能器的管道,通过 MPA2000 多道生理记录仪连续显示和记录血压。右肩胸部下垫折叠的纱布卷,经第四肋间进胸。撑开

器撑开肋骨,用两根棉签轻轻拨出左肺,钳夹左肺至胸外固定,10倍显微镜下解剖游离肺门后,用无创显微心耳钳夹近心端(图4),将左肺动脉、静脉和支气管一并夹闭,将心耳钳柄嵌入橡皮泥固定。先吻合静脉,近心端左肺动脉后方绕以5-0丝线并预留外科结,在肺静脉远心端较粗的分支腹侧横行剪一小口,注意保留后壁,肝素盐水冲洗受体静脉残端,将供肺置于背部切口上方,用冰盐水棉纱包裹供肺,将供体肺静脉套管从受体肺静脉分支套入至共干,收紧预留的5-0丝线外科结固定套管。再套入一根5-0丝线,双道结扎加固。同样的方法在近心端支气管后方绕以5-0丝线并预留外科结,远心端支气管前壁剪一小口,用棉签轻轻擦净支气管分泌物,套入支气管套管,最后套入供体肺动脉套管。检查吻合口固定牢靠后,剪去“病肺”(受体左肺),松开心耳钳,移植肺因血液充盈由白色变为粉红色,并逐渐充气膨胀(图5)。调整呼气末正压,使其完全复张后纳入胸腔。留置胸腔引流管,检查无漏血、漏气后关闭胸腔。不拔出气管导管,维持呼吸机通气,维持补液,有苏醒现象则追加氯胺酮(20 mg/kg)。

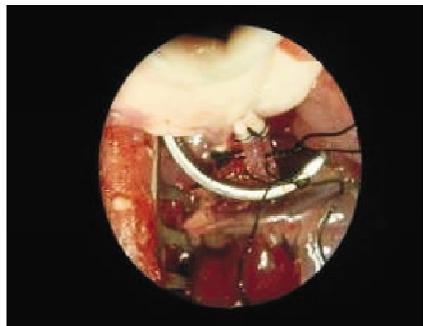


图4 左心耳钳夹受体肺门

Fig 4 Blockage of lung hilum by left auricular clamp



图5 吻合后再灌注的移植肺

Fig 5 Transplanted lung after anastomosis and reperfusion

1.2.4 标本采集和相关检测 分别于受体大鼠移植前、单肺通气30 min和移植肺再灌注15 min时点抽取右颈动脉血,行血气分析,计算氧合指数(氧合

指数=动脉血氧分压/FiO₂)。移植肺再灌注2 h后处死大鼠,将1/3肺组织以4%多聚甲醛固定2 d,HE染色,于光学显微镜下观察病理学改变。

1.3 统计学方法

采用SPSS 18.0软件进行统计学分析;计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,比较采用单因素方差分析; $P < 0.05$ 表明差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 预实验

预实验阶段实施大鼠左肺原位移植5例,供肺手术成功3例,移植手术成功2例。2例供肺手术失败原因分别为肺灌洗时灌注效果差引起肺水肿以及供肺血管套管后发生扭转。1例移植手术失败原因为受体大鼠切口选择位置不当,过度牵拉肺门导致血压过低,循环衰竭而死亡;另2例移植手术失败原因为套管吻合技术不熟练,导致肺静脉撕裂,受体鼠因急性失血死亡。移植成功的2只大鼠分别存活了36 h和48 h,术后24 h胸片显示移植肺状态良好(图6)。



图6 大鼠肺移植术后24 h胸片

Fig 6 X-ray of chest 24 h after lung transplantation in rat

2.2 正式实验

正式实验阶段实施大鼠左肺原位移植10例。供肺灌注到获取时间为(12±2)min,供肺完成分离时间为(25±4)min,体外套管时间为(18±3)min,吻合时间为(31±3)min。手术成功8例,成功率80%;失败2例,分别为肺静脉撕裂和肺动脉吻合口出血。移植前、单肺通气30 min和移植肺再灌注15 min右颈动脉血氧合指数分别为421±26、347±17和407±21,移植肺再灌注15 min与单肺通气30 min的血氧合指数比较差异有统计学意义($P < 0.05$)。移植肺再灌注2 h后,光学显微镜下观察可见移植肺组织及间质结构基本正常,肺泡壁轻度肿胀,肺泡腔内可见水肿液、炎性细胞(中性粒细胞和浆细胞为主)和红细胞渗出(图7),病理学改变符合典型的缺血-再灌注损伤特征。

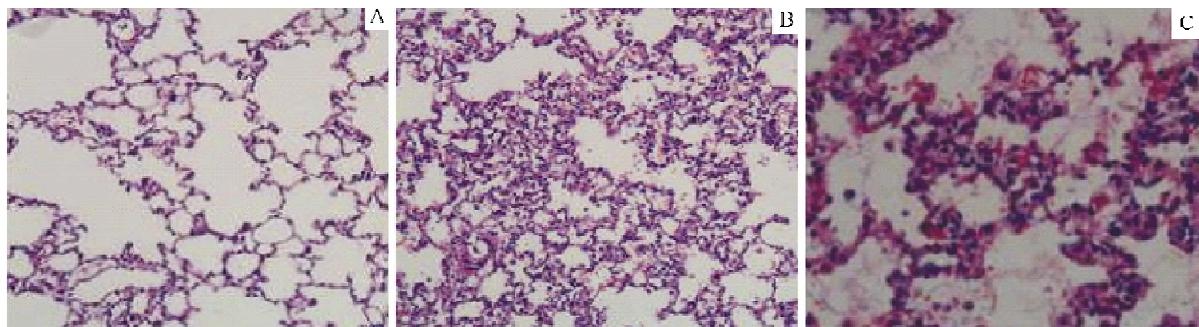
A. 正常肺组织 $\times 200$; B. 移植肺组织 $\times 200$; C. 移植肺组织 $\times 400$ 。

图 7 光学显微镜下肺组织形态学观察 HE 染色

Fig 7 Morphological observations of lung tissues under light microscopy HE staining

3 讨 论

在肺移植实验的早期阶段,犬是首选的实验动物^[2],但研究者因伦理和经济问题被迫寻求其他动物模型。大鼠是广泛使用的实验动物,其体型小、耐腐蚀、并易于保存和喂养。但研究者在尝试大鼠肺移植初期就碰到了技术复杂的显微外科血管和支气管缝合问题^[3],而且由于手术时间长和术后死亡率高,其较少受到青睐。但 Reis 等^[4]在袖套法的基础上提出了重大改进的手术技术,使大鼠的肺移植模型得到了进一步发展。由于该手术技术复杂,研究者面临着长期的学习过程。而对于手术者来说,则必须熟悉大鼠的解剖特点和显微外科操作。

在本实验的套管制备过程中,我们对肺静脉采用 16G(直径 1.7 mm)套管,肺动脉采用 18G(直径 1.3 mm)套管,以尽量减少肺门部结构撕裂的风险,而且已证明使用中有足够的通畅性^[5]。与其他研究者^[6]不同,我们通过正中切口从供体大鼠提取肺,发现使用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,也有利于从肺动脉圆锥处进行肺灌注。为避免灌注后的肺水肿,我们采用自制的灌注器,可以控制灌注压力和灌注的液体总量。另外我们采用开腹手术进入隔膜下腔静脉,而不必再通过建立额外血管通路使用肝素进行管理,可以减少提取时间。

本实验对三袖套吻合法的关键步骤进行了改良。在制作“袖套”过程中采用无损伤血管夹夹住套管尾部,再使血管夹水平放置,这种固定方法稳定性好,更易于单人操作;在受体手术时,采用一把无创显微心耳钳夹闭左肺门近心端,在不离断“病肺”的情况下游离左肺动脉、静脉和支气管,在吻合时保留血管和支气管后壁,有利于套入“袖套”的操作。这

种套入方法与以前采用的三针悬吊法^[7]或四针牵引法^[8]相比,不易撕裂血管壁,更加容易操作;吻合后套管的固定非常重要,我们采用双道结扎线,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者苏醒过程中出现挣扎而导致吻合口撕裂的情况。

实验中我们体会到术前禁食时间对于预防移植肺术中和术后的呼吸道并发症非常关键。我们发现禁食时间不充分的受体大鼠在插管及手术过程中分泌物增多,易引起误吸,阻塞气道,引起缺氧,增加死亡率。因此术前禁食 12 h,给予阿托品有预防作用。术中呼吸机的管理也很重要,要密切关注气道压力,气道压力过高可能导致肺气压伤,除了通过调整潮气量到适当水平,还要在术中和术后及时清理呼吸道的分泌物^[9]。由于气管套管细小,我们采用了 18G 套管针芯伸入气管套管内用针筒回抽的方法。应注意吸痰的时间不宜太久,以避免大鼠缺氧。

关于肺移植后移植肺功能的评价,有研究^[10]认为在保留对侧肺并正常工作的情况下,即使供肺缺血-再灌注损伤非常严重,受体也可能继续生存,因此无法通过检测体循环动脉血气来准确评估移植肺的肺功能。采用阻断对侧肺通气血流的方法或切除对侧肺虽然可以单纯评估移植肺的功能,但是由于手术创伤大,围手术期动物死亡率高^[11]。本实验检测大鼠受体移植前、单肺通气 30 min、移植肺再灌注 15 min 采集的右颈动脉血气分析数值,将再灌注后右颈动脉血的氧合指数与移植前、单肺通气时右颈动脉血氧合指数比较可以大致反映移植肺的氧合情况。再灌注 15 min 后氧合指数比单肺通气后得到改善,说明移植肺起到了氧合作用。

综上所述,本实验在三袖套吻合法的基础上,综合国内外大鼠肺移植模型的特点,根据研究需要进

行了适当的改进,成功建立了大鼠左肺原位移植模型。该方法操作简便、成功率高、可复制性强,值得借鉴和推广。

[参考文献]

- [1] Mizuta T, Kawaguchi A, Nakahara K, et al. Simplified rat lung transplantation using a cuff technique [J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1989, 97(4): 578–581.
- [2] Blumenstock DA, Otte HP, Grosjean OV, et al. Lung allografts in dogs treated with methotrexate and antilymphocyte serum[J]. Ann Thorac Surg, 1968, 6(1): 33–39.
- [3] Marek KW, Wildevuur CR. Lung transplantation in the rat: I. Technique and survival[J]. Ann Thorac Surg, 1982, 34(1): 74–80.
- [4] Reis A, Giaid A, Serrick C, et al. Improved outcome of rat lung transplantation with modification of the nonsuture external cuff technique[J]. J Heart Lung Transplant, 1995, 14(2): 274–279.
- [5] Sánchez PG, Martins LK, Martins FK, et al. Technical modification of unilateral lung transplantation in rats [J]. J Bras Pneumol, 2007, 33(4): 448–453.
- [6] 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.
- [7] 张翀,倪一鸣,徐鹤云.大鼠同种异体左肺原位移植模型的方法改进[J].中华实验外科杂志,2003,20(9):854–855.
- [8] 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.
- [9] Li B, Hartwig MG, Appel JZ, et al. Chronic aspiration of gastric fluid induces the development of obliterative bronchiolitis in rat lung transplants[J]. Am J Transplant, 2008, 8(8): 1614–1621.
- [10] Keshavjee SH, Yamazaki F, Cardoso PF, et al. A method for safe twelve-hour pulmonary preservation[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1989, 98(4): 529–534.
- [11] 徐松涛,郭卫刚,谭黎杰,等.无心跳供体大鼠同种异体左肺原位移植模型的热缺血时限[J].复旦学报:医学版,2008,35(5):742–746.

[收稿日期] 2010-10-15

[本文编辑] 刘晓华

上海交通大学学报(医学版)

关于启用《“中国知网”学术期刊优先数字出版平台》的通知

《上海交通大学学报(医学版)》与《中国学术期刊(光盘版)电子杂志》合作开办的《“中国知网”学术期刊优先数字出版平台》于2011年1月开始运行。该平台将先于印刷期刊发表作者的数字版论文,缩短出版周期,解决学术论文发表时滞过长的问题。快速实现期刊论文按篇即时在线出版,切实提高学术期刊文献出版的时效性和影响力,争取科研成果的首发权。

本刊拟在作者知情授权后选择以下优质稿件实行优先数字出版:1)国家“973”“863”等重大科研项目的研究成果;2)国家自然科学基金项目等国家级项目的研究成果;3)海外联合基金资助的研究成果;4)其他具有创新性和显著理论意义和应用价值的研究成果。

申请纳入优先数字出版的稿件请作者在留言栏内注明,如符合优先数字出版的条件,稿件将得到优先处理,优先数字出版的稿件在印刷期刊组版时优先刊用。如有不明事项,请致电或通过电子邮件与本编辑部联系。

自数字出版之日起,在中国知网(CNKI)全文数据库可全文检索和下载优先出版的稿件。

上海交通大学学报(医学版)编辑部

2011年1月