

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.31.005

大鼠腹腔异位心脏移植模型建立及改进*

王志远 张丽丽 顾金霞 李学奇[△]

(哈尔滨医科大学附属第四医院 黑龙江 哈尔滨 150001)

摘要 目的:建立一种快速有效的大鼠腹腔异位心脏移植模型。**方法:**采用 SD 大鼠作为受体, Wistar 大鼠作为供体, 行同种异位腹腔心脏移植, 术后给以 CsA5 mg/kg/d 灌服, 心脏移植手术方法采用改良的 Ono 术式, 观察改良的腹腔异位心脏移植各步骤所需时间、术后成功率及主要并发症发生率。**结果:**共建立 40 只大鼠异位心脏移植模型, 手术成功率 92.5%。动脉吻合时间 12.5 ± 2.3 min, 静脉吻合时间 12.3 ± 1.5 min, 供心缺血时间 37 ± 3.5 min, 受体血管阻断时间 34.2 ± 2.6 min, 总手术时间 90.2 ± 4.8 min, 出现的主要并发症为出血和供心复跳失败(各占 5%、2.5%)。**结论:**改进的大鼠腹部异位心脏移植技术是一种简便、快速、有效、成功率高的模型制作方法。

关键词:大鼠; 异位心脏移植; 动物模型; Ono 术式

中图分类号: Q95-3; R54 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2014)31-6019-03

The Establishment and Improvement of Heterotopic Heart Transplantation Model in Rats*

WANG Zhi-yuan, ZHANG Li-li, GU Jin-xia, LI Xue-qi[△]

(The Fourth Affiliated Hospital of Harbin Medical University, Harbin, Heilongjiang, 150001, China)

ABSTRACT Objective: To establish a rapid and effective heterotopic heart transplant model in rats. **Methods:** Allogeneic abdominal heterotopic heart transplantation was performed to make the SD rats as recipients and Wistar rats as the donors. After surgery, the rats were given the CsA5 mg/kg/d by gavage. The surgery of Ono style was further optimized based on the abdominal heterotopic heart transplantation, the time for each step, success rate and main complications after surgery. **Results:** 40 rats' heterotopic heart transplantation models were established with the success rate of 92.5%, and the aortic anastomosis time was 12.5 ± 2.3 min, the pulmonary artery anastomosis time was 12.3 ± 1.5 min, total donor heart ischemia time was 37 ± 3.5 min, vessel occlusion time was 34.2 ± 2.6 min, and total time surgery was 90.2 ± 4.8 min. The main complications were bleeding and/or resuscitation for heart failure which occurred to 5% and 2.5% of experimental rats, respectively. **Conclusion:** Improved abdominal heterotopic heart transplantation is a simple, rapid, effective and high success rate method of model establishment.

Key words: Rat; Heterotopic heart transplantation; Animal models; Ono surgical

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R54 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2014)31-6019-03

前言

心脏移植动物模型是进行器官移植免疫排斥反应及筛选免疫抑制剂等研究的经典模型, 至今仍被广泛应用。其中, 大鼠腹腔异位心脏移植动物模型具有操作简便、监测方便等优点, 可以满足对免疫排斥反应机理、免疫耐受机制、免疫排斥反应监测、免疫抑制药物筛选等临床及基础研究的需要。大鼠异位心脏移植的动物模型建立的历史由来已久。Ono 术式应用十分广泛, 但此模型操作难度大、安全性不高等缺点。因此, 我们将模型制作稍作改进, 旨在建立一种操作易于掌握、简便、时间较短、易于存活的腹部异位心脏移植模型。

1 材料和方法

1.1 实验动物

供体选用成年健康雄性 Wistar 大鼠 (体重 200~250 g), 受体选用健康雄性 SD 大鼠 (体重 250~300 g), 各 40 只, 由哈尔滨医科大学附属第二医院动物实验中心提供。

1.2 术前准备及麻醉

受术术前禁食 12 小时, 不禁水。均采用 10% 水合氯醛 (3 ml/kg) 腹腔注射麻醉。在移植过程中, 如动物有清醒迹象可适当追加 4% 的水合氯醛 1 mL, 如麻醉效果不佳, 可多次追加。

1.3 供心灌注及摘取

Wistar 大鼠称重, 麻醉, 固定, U 型剪开胸壁, 直至暴露升主动脉分叉处, 迅速将冰屑至于胸腔内, 去除胸腺打开心包暴露心脏, 下腔静脉 (the inferior vena cava IVC) 及上腔静脉 (the superior vena cava SVC) 过 6-0 缝合线, 用注射器抽取 10 mL (9 mL 乳酸格林氏液 + 1 mL 浓度为 100 U/ml 的肝素钠) 灌注液, 首先由 IVC 注入灌注液, 在 3~5 min 内注入, 注入 2 mL 后结扎

* 基金项目: 国家自然科学基金项目 (81102236/H1006); 黑龙江省博士后科研启动基金项目 (LRB03-129)

作者简介: 王志远 (1986-), 男, 硕士, 研究方向: 心脏移植免疫排斥反应, 电话: 18945086167, E-mail: wzhiyuan6666@163.com;

张丽丽 (1973-), 女, 博士后, 主任医师, 研究方向: 心脏移植免疫排斥反应, 电话: 0451-82576785, E-mail: drzhanglili@163.com

[△] 通讯作者: 李学奇, E-mail: lixueqi@medmail.com.cn

(收稿日期: 2014-03-30 接受日期: 2014-04-26)

SVC,然后继续注入剩余的灌注液并结扎 IVC,此时心脏基本停跳,冠脉呈白色,切断上下腔静脉。心脏灌注速度要缓慢,以免损伤心脏冠脉血管,横窦是辨认升主动脉和肺动脉的标志,经心脏横窦穿过 4-0 缝合线,集束结扎肺静脉,用剪刀倾斜 60° 距主动脉及肺动脉根部至少 3-4 mm 一起剪断主动脉及肺动脉,然后剪断肺静脉,此时心脏完全摘除,将其放入 4℃ 乳酸格林氏液中,并置于冰盒上,备用。

1.4 供体准备

取 SD 大鼠,麻醉、固定、剪毛、碘伏消毒,沿中线剪开腹壁直至剑突,充分暴露肠管,然后用温盐水纱布保护肠管,并将肠管拨至两侧而不牵拉出腹外。用自制拉钩拉开两侧腹壁,用一小块棉垫垫于大鼠腰部下面,使后腹壁及主动脉更加显露,剪开后腹膜,暴露下腔静脉及腹主动脉,选取左肾静脉到髂静脉之间的一段下腔静脉以及腹主动脉作为心脏移植血管吻合位点,显微镜下钝性去除此段血管周围脂肪组织,并分离阻断下腔静脉向背部的属支,主动脉及下腔静脉之间不做分离,哈巴狗无创血管夹夹闭左肾静脉到髂静脉之间的一段下腔静脉以及腹主动脉。用心脏外科冠脉刀,沿主动脉及下腔静脉做一纵行切口,切口长度与供心主动脉及肺动脉相吻合,并且主动脉切口略高于下腔静脉切口。

1.5 血管吻合

将供心用冰盐水浸过的纱布包裹置于腹主动脉侧(即大鼠左侧),并且肺动脉在上,主动脉在下,用 10-0 显微吻合线在外

科显微镜下进行血管端侧吻合,首先端侧吻合主动脉及腹主动脉,吻合一针,固定于腹主动脉切口一角,血管钳固定缝合线起始头暂不打结,先内翻连续缝合外侧壁,吻合至切口另一角时进而改变进针方向向外翻缝合主动脉内侧壁,连续吻合一圈后与起始线头结扎。同样方法吻合肺动脉及下腔静脉,吻合即将结束时用 1 mL 注射器抽取肝素生理盐水或乳酸格林氏液冲洗吻合口内的血栓。吻合过程中每隔 3 min 用 4℃ 生理盐水淋洒供心,吻合完毕,棉签轻压吻合口,缓慢开放血管夹。见供心充盈变红,半分钟内复跳,并很快由纤颤转为规律的跳动。用 1 号丝线连续缝合关腹。皮下注射 2 mL 生理盐水,以补充血容量,置温箱内保温、复苏,受体很快开始活动、进食。

2 结果

在预试验基础上,正式实验共建立大鼠同种腹腔异位心脏移植手术 40 例,手术成功标准为术后供心存活 72 h 以上,供心存活标志是腹部可触及强有力的心脏搏动,频率约 180~250 次/min,手术成功 37 例,成功率 92.5%。3 例失败,1 例为静脉吻合口狭窄,术后供心淤血肿胀,不能复跳;1 例为供心冠状动脉受损,导致术后大量出血死亡,1 例因吻合时过度牵拉导致肺动脉破碎,修补失败导致吻合口出血无法止血,术后失血过多死亡。动脉吻合时间 12.5 ± 2.3 min,静脉吻合时间 12.3 ± 1.5 min,供心缺血时间 37 ± 3.5 min,供体血管阻断时间 34.2 ± 2.6 min,总手术时间 90.2 ± 4.8 min。见表 1 及表 2。

表 1 改良 Ono 术式各步骤所需时间($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Required time of the Ono improved surgical for each step($\bar{x} \pm s$)

Donor Organ Harvesting/min	Recipient setout/min	Aortic anastomosis/min	Pulmonary artery anastomosis/min	Vessel occlusion/min	Heart ischemia/min	Total time/min
5.8 ± 1.0	7.25 ± 1.5	12.5 ± 2.3	12.3 ± 1.5	34.2 ± 2.6	37 ± 3.5 min	90.2 ± 4.8

表 2 手术成功率及主要并发症

Table 2 Surgical success rate and major complications

Sample size (n=)	Survival rate (%)	Major complications			
		Anesthetic accident (%)	Bleeding (%)	No longer jump (%)	paraparesis (%)
40	92.5	0	5	2.5	0

3 讨论

大鼠腹腔异位心脏移植应用十分广泛,由 Abbott^[1]于 1964 年设计出第一种大鼠腹腔异位心脏移植动物模型,但这种模型的建立将受体腹主动脉、下腔静脉横断,与供心主动脉及肺动脉端端吻合,导致移植术后副作用及并发症较多。为避免较多的并发症,1969 年 Ono 和 Lindsey^[2]改进了 Abbott 的手术方式,不离断受体的主动脉及下腔静脉,而是改为与供心进行端侧吻合,克服了 Abbott 术式的不足之处,因此,得到了广泛的应用。近年来,不断有中外学者将 ono 术式进行改进,旨在使大鼠腹腔异位心脏移植模型的制作更加简便、有效,使手术成功率增加、时间缩短、血管缝合难度降低、并发症减少等。并且坚持训练,注重手术细节是成功的关键^[6]。

本实验主要改进之处及优点:(1)麻醉仍采用以往的 10% 水合氯醛(3 mL/kg)腹腔注射麻醉。但在实验移植过程,动物常用有清醒迹象,在实验中我们发现如果继续追加 10% 水合氯醛麻醉意外明显增加,并且药物剂量不易控制,所以我们采用每

次追加 4% 的水合氯醛 1 mL,如效果不佳可反复追加,这种麻醉策略安全性高,且可以达到手术麻醉需求,同时水合氯醛对呼吸及循环系统的抑制作用相对较小^[15,18],不至于因麻醉过量而死亡。(2)在供心灌注和摘取过程中,我们采用的 Ruzza A^[3]的灌注方法,该方法免去了开腹经下腔静脉预先将供体进行肝素化,而是直接采用开胸,迅速经胸腔内下腔静脉注入含有肝素的 4℃ 乳酸林格氏液,灌注时不剪断腹主动脉。此方式与传统方式相比因保留腹主动脉可维持主动脉压力,冠状动脉可获得良好的灌注。但向下腔静脉注射肝素水时,速度需慢,压力不宜过大(灌注压 60~70 mmHg),避免右心过度充盈,损伤心肌细胞,冰肝素生理盐水温度以 4℃ 为宜,温度过低,供心迅速停跳,冠状血管系统灌注不良。灌注以冠状血管内液体清亮为度。该方法可明显缩短供心摘取时间,减少心肌缺血时间,提高了移植心脏的存活率,充分的心肌灌注及缩短心肌缺血时间是手术成功的关键因素之一^[9]。(3)在受体准备时以往的报道^[9]是分别将主动脉及下腔静脉完全分离并分别阻断然后结扎其背部分支,虽然可以减少主动脉阻断时间,降低下肢截瘫的发

生,但是在实验中发现分离主动脉及下腔静脉时操作复杂、易损伤周围神经及下腔静脉,而且较费时,本实验只结扎阻断下腔静脉向背部的属支,不阻断腰静脉及睾丸静脉,不分离主动脉及下腔静脉^[13],并用血管夹一次性阻断腹主动脉及下腔静脉,可以减少血管及神经损伤^[45],使操作更加简便,缩短时间,同样可以降低下肢截瘫的发生率。(4)受体开腹后以往报道^[16]采用将肠管翻出,用温湿生理盐水将其包裹置于大鼠左或右侧,此种方法容易使大鼠大量液体丢失及体温散失,容易并发术后肠梗阻,体温降低可导致大鼠出现寒战,误认为麻醉不足,进而追加麻药导致麻醉过量,影响术后存活率,我们采用温盐水纱布保护肠管,并将肠管拨至腹腔两侧而不牵拉出腹外,此方法减低了大鼠体温及液体的丧失,减少术后肠梗阻并发症。并且采用软绵垫垫于大鼠腰部,可使腹主动脉及下腔静脉更为表浅,易于血管分离和吻合操作。(5)血管切开采用冠脉刀片反挑持刀法切开血管,可以保证血管切口边缘光滑,易于操作,血管吻合时我们采用10-0吻合线,尽管有很多研究^[6,8,14]采用8-0或9-0显微外科缝合线,但是更加精细的吻合可以减少吻合口血栓形成,吻合时我们采用上述吻合方式可以避免传统吻合方式^[7,9,10]中不断翻转心脏等繁琐的操作,减少吻合中不必要的损伤,减少吻合操作时间。同时采用只固定切口一角的方式,并行首尾线打结可以减少打结次数^[17],进而减少因打结导致吻合口狭窄及血栓发生率,但需要注意的是吻合过程中应避免过度牵拉而导致的吻合口狭窄。吻合过程中注意用4℃生理盐水淋洒供心,以保护心肌^[12],在操作各个环节都应该遵守无菌操作原则^[11,19],防止因感染而影响大鼠的手术成功率。

总之,大鼠腹腔异位心脏移植模型经众多学者多年的实践和摸索,已有很多改良创新,但仍需继续改进完善,使移植手术更加简便、快速、有效、成功率高的模型制作方法。

参考文献(References)

- [1] Abbott CP, Lindsey ES, Creech JR, et al. A technique for heart transplantation in the rat [J]. Arch Surg, 1964, 89: 645-652
- [2] Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats [J]. J Thoracic Cardiovasc Surg, 1969, 57(2): 225-229
- [3] Ruzza A, Vespignani R, Czer L S, et al. Heterotopic heart transplantation in rats: improved anesthetic and surgical technique [A]. Transplantation proceedings [J]. Elsevier, 2010: 3828-3832
- [4] Wang D, Opelz G, Terness P. A simplified technique for heart transplantation in rats: Abdominal vessel branch-sparing and modified venotomy [J]. Microsurgery, 2006, 26(6): 470-472
- [5] Demirsoy E, Arbatli H, Korkut AK, et al. A new technique for abdominal heart transplantation in rats [J]. J Cardiovasc Surg, 2003, 44(6): 747-775
- [6] 郭晓秋, 刘振红, 朱继巧, 等. 大鼠心脏移植模型实验体会 [J]. 中国病案, 2012, 13(5): 61-62
Guo Xiao-qiu, Liu Zhen-hong, Zhu Ji-qiao, et al. Experience heart transplantation experiments in rats [J]. Chinese Medical Record, 2012, 13(5): 61-62
- [7] 郭宇, 叶小鸣, 张彤, 等. 大鼠腹腔同种异体异位心脏移植模型的建立与改进 [J]. 器官移植, 2011, 2(1): 18-22+45
Guo Yu, Ye Xiao-ming, Zhang Tong, et al. The establishment and improvement of allogeneic rat peritoneal model of heterotopic heart transplantation [J]. Organ Transplantation, 2011, 2(1): 18-22+45
- [8] 余晓伟, 沈振亚, 于曙东, 等. 大鼠腹腔异位心脏移植模型的制作 [J]. 南京医科大学学报: 自然科学版, 2010, (4): 458-459
Yu Xiao-wei, Shen Zhen-ya, Yu Shu-dong, et al. Rat heterotopic heart transplantation model [J]. Acta Universitatis Medicinalis Nanjing (Natural Science), 2010(4): 458-459
- [9] 陶明, 袁国红, 张志鹏, 等. 大鼠腹部异位心脏移植模型的建立及改进 [J]. 实验动物科学, 2011(6): 16-19
Tao Ming, Yuan Guo-hong, Zhang Zhi-peng, et al. The establishment and improvement of abdominal heterotopic heart transplantation model in rats [J]. Laboratory Animal Science, 2011(6): 16-19
- [10] 林星, 车成日, 金虎日, 等. 大鼠腹腔异位心脏移植模型的制作及改进 [J]. 吉林医学, 2010, 31(032): 5701-5704
Lin Xing, Che Cheng-ri, Jin Hu-ri, et al. Production and improvement of abdominal heterotopic heart transplantation model in rats [J]. Jilin Medical Journal, 2010, 31(032): 5701-5704
- [11] 王约青, 沈承澜, 金庆元. 大鼠腹腔内心脏移植模型制作成功关键因素 [J]. 临床和实验医学杂志, 2009, 8(2): 3-5
Wang Yue-qing, Shen Cheng-lan, Jin Qing-yuan. Critical success factors in rat peritoneal heart transplantation model making [J]. Journal of Clinical and Experimental Medicine, 2009, 8(2): 3-5
- [12] 余思, 何晓顺, 马毅. 改良大鼠腹部心脏移植模型的制作 [J]. 北京大学学报(医学版), 2008, 40: 327-329
Yu Si, He Xiao-shun, Ma Yi. Improved abdominal heart transplantation model in rats produced [J]. Journal of Peking University(Health Sciences), 2008, 40: 327-329
- [13] 谭向龙, 李基业, 王世斌, 等. 大鼠腹腔内异位心脏移植模型的复制及改进 [J]. 感染. 炎症. 修复, 2008, 9(3): 168-170
Tan Xiang-long, Li Ji-ye, Wang Shi-bin, et al. Copy and improvement of heterotopic heart transplantation model in the rat [J]. Infection Inflammation Repair, 2008, 9(3): 168-170
- [14] 王晓亮, 彭志海. 大鼠腹部心脏移植模型的改进 [J]. 实验动物与比较医学, 2008, 28(3): 183-185
Wang Xiao-liang, Peng Zhi-hai. Improved abdominal heart transplantation model in rats [J]. Laboratory Animal and Comparative Medicine, 2008, 28(3): 183-185
- [15] 周昆, 屈彩芹. 动物实验常用麻醉剂的比较与选择 [J]. 实验动物科学, 2008, 25(2): 41-43
Zhou Kun, Qu Cai-qin. Animal experiments commonly used anesthetic Comparison and Selection [J]. Laboratory Animal Science, 2008, 25(2): 41-43
- [16] 梁宏亮, 郑奇军, 易定华. 改良大鼠腹腔异位心脏移植模型的建立 [J]. 第四军医大学学报, 2007, 28(18): 1646-1648
Liang Hong-liang, Zheng Qi-jun, Yi Ding-hua. Establishment of modified rat heterotopic heart transplantation model [J]. Journal of the Fourth Military Medical University, 2007, 28(18): 1646-1648
- [17] 王昊飞, 高旭辉, 王武军, 等. 改进的 Ono 大鼠异位心脏移植模型 [J]. 中华实验外科杂志, 2004, 21(4): 402
Wang Hao-fei, Gao Xu-hui, Wang Wu-jun, et al. Improved Ono rat heterotopic heart transplantation model [J]. Chinese Journal of Experimental Surgery, 2004, 21(4): 402
- [18] 郑国强, 艾洪滨. 三种麻醉剂对蟾蜍离体心脏生理特性的影响 [J]. 山东师范大学学报: 自然科学版, 2006, 20(4): 84-86
Zheng Guo-qiang, Ai Hong-bin. Three Anesthetics on physiological characteristics of toad heart [J]. Journal of Shandong Normal University(Natural Science), 2006, 20(4): 84-86
- [19] 陈阳天, 孟旭, 孙凌波, 等. 大鼠腹部异位心脏移植围手术期并发症的防治 [J]. 心肺血管病杂志, 2007, 26(2): 121-122
Chen Yang-tian, Meng Xu, Sun Ling-bo, et al. Abdominal circumference prevention of heterotopic rat heart transplant operative complications [J]. Journal of Cardiovascular and Pulmonary Diseases, 2007, 26(2): 121-122