

非套管法大鼠异体原位单肺 移植动物模型的建立

陈刚¹ 苗锋¹ 马勤运 陈佳 施梦 朱勇俊 陈志明[△]

(复旦大学附属华山医院胸外科 上海 200040)

【摘要】 目的 建立稳定的大鼠非套管法异体原位左肺移植模型。方法 使用 250~350 g Sprague Dawley (SD)大鼠进行实验,采用显微外科技术,分别连续缝合支气管和肺动、静脉,建立大鼠异体原位左肺移植模型。观察大鼠存活时间,移植肺脏血管、支气管吻合口通畅性。结果 10 只接受左肺移植的受体大鼠均成功脱离呼吸机,供肺冷缺血时间约 40 min,热缺血时间约 40 min,总手术时间约 130 min。解剖后检查各吻合口均通畅。结论 非套管法大鼠原位左肺移植模型具有稳定、可靠、接近临床肺移植的优点。

【关键词】 肺移植; 原位移植; 实验动物模型; SD 大鼠

【中图分类号】 R 655.3 **【文献标志码】** B

The experimental model of orthotopic left allograft lung transplantation in rats without using cuff

CHEN Gang, MIAO Feng, MA Qin-yun, CHEN Ji, SHI Meng, ZHU Yong-jun, CHEN Zhi-ming[△]

(Department of Thoracic Surgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 **Objective** To establish a stable model of rat orthotopic left lung transplantation using direct suture of vessels and bronchi. **Methods** Ten Sprague Dawley (SD) rats weighted 250 to 350 g were used as lung donors and recipients respectively. Airway and pulmonary vessels were reconstructed microsurgically using continuous running suture technique. Survival time were recorded and donor lungs were checked by autopsy. **Results** All 10 rats received left lung transplantation were weaned from ventilator successfully. Both of cold ischemia time and warm ischemia time were about 40 minutes. The total procedure took about 130 minutes. Autopsy was used to check the patency of anastomotic sites. No thrombosis or air leak was found. **Conclusions** Direct microsurgical suture can be used to establish an experimental model of orthotopic left allograft lung transplantation in rats. This method is proved to be stable, reliable and similar to clinical practices.

【Key words】 lung transplantation; orthotopic transplantation; experimental animal models; rats sprague-dawley

肺移植是治疗终末期肺部疾病的唯一方法,目前我国仅有少数医院能够开展临床肺移植,大多数单位有关肺移植的工作处在动物实验和离体研究阶段。动物实验相比离体研究更能够反映在体内复杂环境的影响下的效果和变化,因此建立稳定的肺移植动物模型是进行这些研究的首要条件。建立肺移植动物模型需要一定的设备条件,手术步骤较多,并且实验人员应具有一定的显微

手术操作技术,需进行一定时间的训练方可掌握。我们于 2008 年 11 月至 2009 年 3 月间进行该实验,成功建立了稳定的大鼠原位左肺移植动物模型,现将实验过程予以总结。

材料和方法

术前准备 准备手术台,调试手术显微镜和呼

¹共同第一作者

[△]Corresponding author E-mail:chenzhiminghs@yahoo.com.cn

吸机,准备灌洗液及器官保存液(本实验中均使用4℃肝素生理盐水溶液,12 500 IU/250 mL),准备手术器械,缝线(上海浦东金环医疗用品有限公司,标准号YY0166-2002 H1103)及药品。

供体操作过程

麻醉 SD大鼠(250~350 g)[复旦大学实验动物科学部SYXK(沪)2007-0002],称重后以戊巴比妥钠(1.5%,3 mL/kg)腹腔注射麻醉。仰卧位固定,气管插管,连接呼吸机(10~12 mL/kg,90次/min,I:E=1:2.5)。DHX-150动物呼吸机(成都仪器厂)。

供肺获取 沿正中线剪开胸腹部皮肤全长,腹部正中切口(剑突至耻骨上)打开腹腔,沿肋弓向两侧切开腹壁,切断肝脏三角韧带至肝静脉汇入下腔静脉处,沿膈肌肋骨附着处剪断膈肌,由剑突处向头侧纵行全长剪开胸骨。剪开双侧纵隔胸膜,切除双侧前胸壁。切除胸腺,显露肺动脉和主动脉。

经膈下下腔静脉注入肝素生理盐水溶液(250 IU/5 mL)进行全身肝素化。用镊子提起左心耳后剪去,剪断下腔静脉。用22 G静脉留置针刺右室流出道,拔出针芯,使针管进入肺动脉干。注入4℃肝素生理盐水溶液100 mL/kg,压力15~20 cmH₂O进行灌洗^[1]。灌洗后期可见清亮灌洗液从左心耳流出,心脏渐渐停止跳动,肺外观由粉红变为乳白色。

停止机械通气。胸腔内置少量生理盐水冰屑,将心脏推向右侧,暴露左侧肺门。在手术显微镜下解剖肺门,可见左肺动脉、左主支气管、左肺静脉由头侧向尾侧排列。在肺动脉分岔处剪断左肺动脉,靠近左心房处剪断左肺静脉(图1)。左主支气管以3-0线套线,预置线结,开始机械通气,数个呼吸循环后于吸气末靠近隆突处收紧预置线结结扎,于结扎线近端剪断左主支气管。剪断背侧胸膜和附着的结缔组织,取出充气的左肺,浸泡在4℃肝素生理盐水溶液中(图2)。

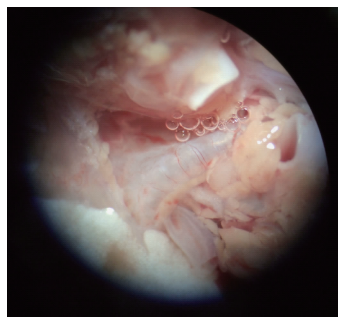


图1 供体肺门解剖

Fig 1 Hilar dissection of the donor

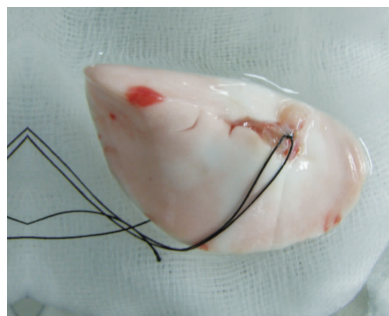


图2 供肺保存

Fig 2 Donor lung preservation

受体操作过程

麻醉 受体麻醉,气管插管,机械通气参数同供体。以照明灯供暖。

切除受体左肺 大鼠右侧卧位,行左侧后外侧切口,切断背阔肌和前锯肌,从第四肋间切开肋间肌进入胸膜腔,撑开切口(图3)。

游离左下肺韧带及纵隔胸膜,将左肺从切口牵出,使左肺门显露并保持一定张力。分离肺门周围胸膜,仔细游离左肺动脉、左主支气管和左肺静脉,分别以4-0线套线后,以细硅胶管靠近起始处收紧套线进行阻断后固定。靠近肺组织处切断左肺动脉、左主支气管和左肺静脉,取出左肺(图4)。

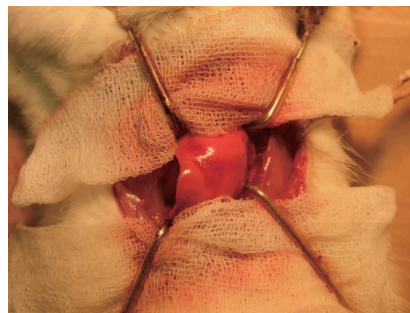


图3 受体开胸

Fig 3 Recipient thoracotomy

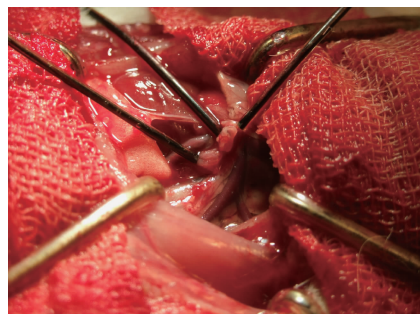


图4 切除左肺

Fig 4 Left lung resection

供肺植入 修剪供肺左肺动静脉及左主支气管断端后,将供肺放入受体胸腔。依次以9-0缝线吻合左主支气管,以11-0缝线吻合左肺动脉和左肺静

脉,均采用连续缝合法。吻合左主支气管时先缝合膜部,再缝合软骨环,吻合完毕后,吸净气管内分泌物打结。以4℃肝素生理盐水溶液冲洗血管断端,冲洗液不必吸去,保留在胸膜腔内可以起到局部降温、补充液体并保持血管断端湿润的作用。吻合左肺动脉和左肺静脉时先缝合后壁,再缝合前壁,动脉约缝合8~10针,静脉约缝合10~12针,注意防止血管扭转(图5)。吻合过程中置生理盐水冰屑于胸腔,减轻热缺血损伤,完成血管吻合前用肝素生理盐水冲洗管腔排气。

全部管腔吻合完毕后,依次松开左肺静脉、左肺动脉和左主支气管的阻断线,开始再灌注和通气。可见供肺动脉和肺静脉迅速充盈(图6),供肺由乳白色变为粉红色并且随呼吸机节律逐渐膨胀(图7)。肺膨胀不佳时可在吸净气道分泌物后适当加大通气压力,待其扩张后改为正常通气。

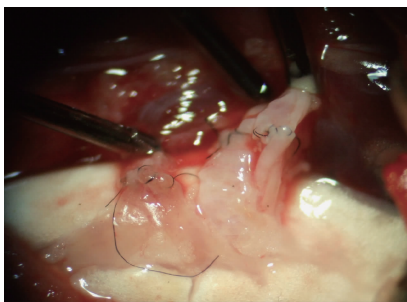


图5 肺动静脉吻合及支气管吻合

Fig 5 Anastomosis of pulmonary artery and bronchus

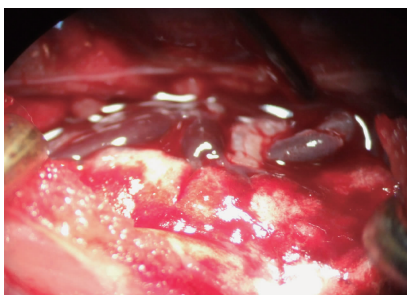


图6 各吻合口通畅

Fig 6 Patency of the anastomosis

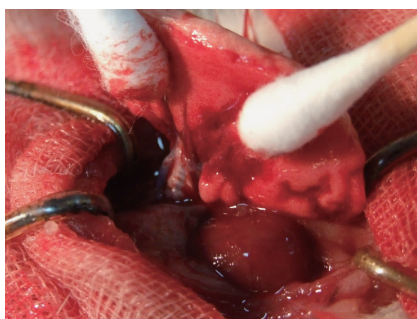


图7 供肺通气良好

Fig 7 Good ventilation of donor lung

关胸及复苏 以棉签吸净胸腔内液体,4-0线间断缝合肋间切口,分层缝合前锯肌、背阔肌及皮肤。机械通气支持大鼠呼吸,及时吸去气管内分泌物,至自主呼吸恢复并达到70~80次/分时可脱离呼吸机,拔去气管插管。将其放回饲养笼内,不限制饮食和饮水,注意保暖。

结 果

建立该模型共使用SD大鼠70只。前30只手术目的为熟悉大鼠解剖、确定手术步骤、摸索实验条件,熟练显微操作。自第31只大鼠起开始采用成对移植手术方案,前10对的受体因手术技术欠熟练(动脉吻合口漏血、狭窄、扭转,气管膜部漏气、气管环撕裂)或麻醉意外(气管插管脱出、堵塞)等原因未获成功,此后连续10对均顺利关胸脱机。

手术过程,供体操作约需30 min,供肺灌注结束至取出浸入保存液中约需10 min。受体开胸至左全肺解剖性切除约需30 min,供肺放入胸腔开始吻合至再灌注和再通气约需40 min。冷缺血时间(40±5)min,热缺血时间(40±5)min,全部手术时间(130±100)min。

10只成功接受左肺移植的大鼠结果如下:术后24 h内死亡1例;24~48 h死亡3例;6只存活48 h以上,于48 h后处死。解剖结果显示:各吻合口均通畅,肺组织均有不同程度的水肿。其中1例移植肺组织发黑、肿胀并伴肺不张;3例移植肺组织呈暗红色,部分实变伴肿胀;6例存活大鼠的移植肺组织与对侧肺组织比较略肿胀,顺应性良好,颜色无明显差异。

讨 论

建立大鼠肺移植动物模型的价值 20世纪初法国外科医生Alexis Carrel与Charles Guthrie即进行过心肺移植的动物实验研究,并且已经预见到器官移植终将成为一种可行的治疗措施^[2]。半个多世纪后James Hardy等进行了第1例人体肺移植,术后患者存活18 d。1983年起Joel Cooper等采用大网膜包裹气管吻合口并延缓术后激素开始应用的时间等技术进行了一系列动物实验取得良好效果并成功应用于临床肺移植。从国外经验来看,肺移植需要经过长期的临床前期研究和准备。通过对动物模型的研究,进而将其理论推用至人体,是临床医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发展临床肺移植具有重要意义。

通过动物实验,能够熟悉手术的过程,掌握技巧,使临床上不常见的移植手术在动物体内可以反复进行研究。此外,动物模型还提供了进行可比性研究和重复性研究的稳定平台。包括大鼠在内的小型啮齿类动物肺移植模型具有经济实惠和良好遗传学背景等特点,尽管在手术操作上比大型动物困难,但是从我们的实践来看,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,该模型可以单人操作完成,模型维护简便也是较大型哺乳动物模型的方便之处。在器官保护、再灌注损伤和排异反应等研究方面,该模型可以作为一个良好的平台。

本模型的特点 世界上首例大鼠肺移植模型的建立报道于1971年,当时采用缝合法进行吻合。此后,由于手术步骤复杂,未能广泛开展。1989年, Mizuta 等^[3]采用套管法进行吻合,降低了手术难度,此后的动物实验多采用该方法。但是有报道认为,套管法会引起吻合口的肉芽肿增生^[4],不利于进一步实验研究,且体内有异物存留,对于临床手术方式的指导意义有限。

我们对所有吻合口均采用缝合法,手术条件同套管法,需要使用显微镜和显微操作器械,不需要制作套管。大鼠供体灌注结束后,套管法至少要求两倍套管长度的游离段,以便外翻固定于套管上;缝合法对供肺的肺门结构无特殊要求,一般的残端长度即可满足吻合条件,供肺取出快速。套管法需要对供肺的血管和气管进行进一步的操作,使管壁外翻,并结扎固定;缝合法无此步骤。

大鼠受体开胸后,分离左肺门。相对于套管法,缝合法对气管和血管长度无特别要求,所以对肺门的分离操作较少,对肺门组织损伤小,时间短,吻合口血供的保存较完整,有利于吻合口的愈合。套管法使用血管夹阻断血管和气管,血管夹占去部分空间,并且血管夹容易滑脱,增加了手术的风险;缝合法中,我们使用套线加硅胶管阻断后,固定较稳定,并且可以对肺门起到一定的牵拉作用,有利暴露。套管法的吻合口大小由套管管径决定,固定后可能会拉脱;缝合法的管径由吻合口决定,缝合牢固,无脱落危险。套管法的吻合口光滑;缝合法血管采用外翻缝合,气管采用望远镜法,吻合口基本完全内皮化。缝合法吻合过程略长于套管法,热缺血时间约40 min,但未超过热缺血60 min的安全时限^[5]。通过训练,缝合法的吻合时间可达到(23.5 ± 4.6) min

左右^[6]。另有文献报道,使用脑死亡后90 min的供肺^[7],术后肺功能良好。具体比较见表1。

表1 肺移植两种吻合方法的比较
Tab 1 Comparison of two different anastomosis technique in lung transplantation

Compare Parameters	Suture	Cuff
Microsurgical maneuver	Need	Need
Foreign body	No	Yes
Kink of pulmonary vessels or bronchi	No	Yes
Connection of anastomosis	Secure	Weak
Bleeding or air leak	Minor or no	No
Stenosis	Minor	Depend on cuff size
Warm ischemia time	45 mins	30 mins
Epithelial continuity	Almost complete	Complete
Similar to clinical cases	Yes	No

我们使用缝合法建立的大鼠肺移植模型是一种稳定、可靠、接近临床肺移植的方法,为研究肺移植后的免疫、病理及临床治疗提供了良好的平台。

参 考 文 献

- [1] Featherstone RL, Chambers DJ, Kelly FJ, *et al.* Ischemic preconditioning enhances recovery of isolated rat lungs after hypothermic preservation [J]. *Am Thorac Surg*, 2000, 69: 237 - 242.
- [2] Sade RM. Transplantation at 100 years: alexis carrel, pioneer surgeon [J]. *Ann Thorac Surg*, 2005, 80: 2 415 - 2 418.
- [3] Mizuta T, Kawaguchi A, Nakahara K, *et al.* Simplified rat lung transplantation using a cuff technique [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1989, 97: 578.
- [4] Hirschburger M, Greschus S, Kuchenbuch T, *et al.* Lung transplantation in the Fischer 344 → Wistar Kyoto rat strain combination is not suitable to study bronchiolitis obliterans [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2007, 26: 390.
- [5] 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.
- [6] Zhang QC, Wang DJ, Yin N, *et al.* The orthotopic left lung transplantation in rats: a valuable experimental model without using cuff technique [J]. *Transplant International*, 2008, 21(11): 1 090 - 1 097.
- [7] Wittwer T, Franke UF, Fehreubach A, *et al.* Lung retrieval from non-heart-beating donors: first experience with all innovative preservation strategy in a pig lung transplantation model [J]. *Eur Surg Res*, 2004, 36: 1 - 7.

(收稿日期: 2009 - 05 - 12; 编辑: 王蔚)