

## 小体积肝移植动物模型的建立

李来邦, 陈奕明, 张升宁, 高 杨, 任 刚, 张春平

(昆明医科大学附属甘美医院暨昆明市第一人民医院肝胆胰科, 云南 昆明 650031)

**[摘要]** **目的** 模拟建立大鼠 40% 小肝移植大鼠动物模型. **方法** 通过肝周骨骼化去神经效果解剖, 原位灌注和肝切除术建立大鼠原位 40% 小肝移植动物模型. **结果** 40% 小肝原位部分肝移植 1 d 生存率为 90.0% (18/20), 2 d 生存率为 85.5% (17/20), 4 d 生存率为 65.0% (13/20), 7 d 生存率为 60.0% (12/20). **结论** 通过技术改进, 提高了手术成功率及模型的稳定性, 成功建立小肝移植大鼠动物模型.

**[关键词]** 动物模型; 肝移植; 小肝综合征

**[中图分类号]** R617 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 2095-610X (2014) 11-0031-04

## Establishment of Small-for-size Liver Transplantation Animal Model

LI Lai-bang, CHEN Yi-ming, ZHANG Sheng-ning, GAO Yang, REN Gang, ZHANG Chun-ping  
(Dept. NO 1 Hepatobiliary Pancreatic Surgery, The Affiliated Calmette Hospital of Kunming Medical University & The First People's Hospital of Kunming City, Kunming Yunnan 650031, China)

**[Abstract]** **Objective** To establish 40% small-for-size liver transplantation animal model in rats. **Methods** Elaborate anatomical technique in peri-hepatic tissue, especially in hepatic artery and portal vein, orthotopic perfusion and partial liver resection were used to establish small-for-size liver transplantation animal model in rats. **Results** The postoperative survival rate of rats accepted small-for-size liver transplantation was 90% (18/20), 85.5% (17/20), 65% (13/20) and 60% (12/20) in day-1, -2, -4 and -7, respectively. **Conclusion** By technological improvement, the small-for-size liver transplantation model in rats had been established successfully, and the successful rate and model stability had been improved in our experiments.

**[Key words]** Liver transplantation; Animal model; Small-for-size syndrome

肝移植已成为临床上治疗终末期肝病的常规性手术, 然而, 随着临床上受体数量的不断增加, 供体短缺的问题越来越突出. 临床上活体肝移植的开展部分缓解了供肝短缺的状况, 但就成人-成人间移植而言, 经常遇到供肝体积过小的情况, 即小体积肝移植. 小体积肝移植术后有较高的并发症和死亡率. 为进一步研究小体积移植肝的病理生理特点, 以提高活体肝移植成功率, 我们成功建立了一种操作简便易于复制的大鼠小体积肝移植模型, 现报告如下.

### 1 材料与方法

#### 1.1 实验动物及主要材料

封闭群雄性 SD 大鼠 120 只, 体重 250 ~ 280 g, 购于昆明医科大学实验动物中心. 动物自由摄食饮水, 饲养温度 21 ~ 22℃, 湿度 40% ~ 60%, 光照 12 h (06:00 ~ 18:00)、黑暗 12 h (18:00 ~ 06:00). 随机选取 20 只为 NS 对照组 (A 组), 剩余 60 只大鼠按昆明市第一人民医院肝胆胰一科方法

**[基金项目]** 云南省科技厅-昆明医科大学联合专项基金资助项目 (2010CD213)

**[作者简介]** 李来邦 (1972~), 男, 哈尼族, 云南红河州人, 医学博士, 副主任医师, 主要从事肝胆胰及肝脏移植临床工作.

成功建立40%小体积肝移植动脉化模型,随机分为3组:(1)供体组(B组);(2)受体组(C组)。供、受体术前禁食6h,自由饮水,受体术前肌注阿托品0.03 mg,乙醚开放间断吸入麻醉。自制各种规格的袖套管及胆道支撑管若干,其中门静脉袖套管内径约2 mm,下腔静脉袖套管内径2.5~3.0 mm,门静脉、肝下腔静脉分别选用5~8 F的血管介入外鞘,管长约2 mm,手柄长约2~2.5 mm。胆道选用直径0.9 mm的硬膜外导管制成长约4~6 mm袖套,两侧修成斜面便于套入。袖套管及胆道支撑管表面以小刀刻小槽便于固定,防止结扎线脱落。

每组留5只检测门静脉压力,其余分别于术后1、4、7和10 d各组随机每个时间点处死5只取血标本和肝脏标本送检。移植术后将大鼠置于单笼饲养,恢复饮水和进食,饲养环境温度保持在20℃左右,观察大鼠皮毛、眼睛、饮食、活动和精神状态。

## 1.2 手术方法

### 1.2.1 供体手术

(1) 供体大鼠用乙醚气体麻醉,待大鼠昏倒后迅速取出。然后采用自制麻醉面罩置于大鼠面部,并根据大鼠的呼吸频率、深度等随时调整面罩与手术鼠口鼻间的距离,以维持一定的麻醉深度。取大鼠仰卧位并以橡皮筋固定四肢,胸腹部脱毛剂脱毛,碘伏消毒,取腹部正中“十”字切口,依次切开腹壁各层进腹,以湿盐水纱布覆盖肠管并推向左侧腹腔外。穿刺肝下腔静脉远端,注入含50 U/mL肝素的生理盐水2 mL,完成供肝肝素化。游离腹主动脉至左右髂总动脉分叉处,8号输液针头于左右髂总动脉分叉处向近心端穿刺腹主动脉进行灌注,采用0~4℃ HTK (Histidine-Tryptophan-Ketoglutarate Solution) 液20~30 mL并以3~5 mL/min的速度开始灌注,随即在右肾静脉下之1 cm处切断肝下腔静脉;同时于右侧剪开部分膈肌,于右心耳处离断肝上腔静脉,以开放流出道。灌注前剪开部分膈肌并以小血管钳阻断胸主动脉,以保证肝脏的有效灌注和通畅。灌注同时以0~4℃的冷生理盐水或冰屑不时浇注供肝表面。待肝脏灌注充分,颜色黄白、质地均匀后开始游离肝周组织和韧带。顺时针方向切断肝镰状韧带、肝左三角韧带、肝后韧带、肝胃韧带。然后套线结扎左膈下静脉、肝食管交通支。分离出胆总管,于胆总管前壁距肝管汇合部4 mm处作一小切口,向肝侧插入胆道支架管,7-0丝线环扎固定。分离肝动脉后结扎切断,解剖出门静脉,用7-0丝线结扎离断幽门前静脉,在脾静脉汇入

处切断门静脉壁,游离门静脉应尽量使门静脉壁光滑。剪开肝下腔静脉表面腹膜,游离腔静脉向下至髂总静脉,切断结扎右肾静脉,切断结扎右肾上腺静脉,结扎汇入下腔静脉的腰静脉分支。游离腔静脉时应尽量剔净静脉壁之附壁组织,使得静脉外壁光滑。将供肝略下拉,肝上下腔静脉紧靠近膈肌环离断,避免带有膈肌环组织,取出肝脏置于0~4℃ UW (University of Wisconsin Solution) 液冰浴保存。(2) 供肝修整及处理:在0~4℃ UW液中修整供肝的门静脉、肝上、下腔静脉,剔除残留脂肪组织、结缔组织。分别置套管:套管由人体血管介入用5~8F血管介入外鞘,包含2 mm之套管体及2 mm之套管柄,套管体上作数道刻痕。门静脉套管安置:血管镊穿过套管钳夹住供肝门静脉末端,将套管套在门静脉上,用血管镊将门静脉壁外翻套在套管上,注意幽门前静脉线结要靠左边,以免血管扭曲。调整好位置以7-0丝线于划痕处结扎固定。套入时注意套管尾翼的方向,以备供肝植入时能顺利准确操作。另外要尽量使幽门前静脉结扎处牵出套在管腔外,以免管腔狭窄,影响血流。肝下腔静脉套管安置:同门静脉套管。另外要尽量使右肾静脉结扎处牵出套在管腔外,注意右肾上腺静脉线结要靠右边,以免血管扭曲使管腔狭窄,影响血流。调整好位置以7-0丝线于划痕处结扎固定。肝上腔静脉两侧角分别吊一根8-0显微外科缝线。供肝经上述处理完毕后,将供肝保存在0~4℃ UW液中待用,或将供肝置于冰箱中保存。

### 1.2.2 受体手术

(1) 受体术前禁食6h,但不禁水,乙醚麻醉前15 min经肌肉注射阿托品0.03 mg,以减少麻醉过程中呼吸道分泌物的分泌。麻醉后,胸腹部用生理盐水淋湿后剪毛,碘伏消毒皮肤,自剑突至耻骨上1 cm处行腹部正中切口打开腹腔,自制橡皮筋拉钩牵开腹腔并固定,湿纱布推开肠管于左下腹部。然后游离肝周组织和韧带,切断肝镰状韧带、肝胃韧带、肝左三角韧带、肝后韧带。结扎切断食管静脉,仔细分离左膈下静脉,远离肝上下腔静脉带线结扎切断,将肝脏向头侧翻起,于第一肝门分离出胆总管,在胆总管于左、右肝管分叉处切断胆总管,分离出肝固有动脉7-0缝线结扎切断,分离出门静脉直至门静脉之左右支分叉处暂不切断。剪开肝下腔静脉表面腹膜,游离右肾静脉水平以上的肝下腔静脉,结扎右肾上腺静脉丛和下腔静脉后交通支,游离腔静脉向下至右肾静脉,向上游离下腔静脉至膈肌环。然后用血管夹分别于右肾静脉上方阻断肝下腔静脉、幽门前静脉上方阻断门静脉,移开乙醚面罩,停止乙

醚吸入, 必要时吸氧. 于门静脉分叉处穿刺快速注入常温生理盐水约 2 mL, 肝脏即刻变白或黄, 随即于膈肌环上方, 用无损伤血管钳连带约 2~4 mm 膈肌阻断肝上下腔静脉. 切断门静脉、肝下腔静脉时应尽可能贴近肝脏, 其中肝下腔静脉切断时可保留少许肝组织以增加受体肝下腔静脉残端长度, 同时残留的肝还可起到支撑血管壁的作用, 使管壁自然张开, 有利于套管吻合. 移出受体肝脏后, 检查后腹膜有无出血点, 有则妥善止血. 将供肝原位置于腹腔内, 供肝表面冷湿棉片覆盖予以低温保护, 先行肝上下腔静脉重建. 供肝肝上下腔静脉两侧角的预置线与受体相应位置缝合后打结, 再按先后壁后前壁的顺序进行吻合, 同时用肝素生理盐水冲尽血管腔内气泡及血凝块, 缝线打结时注意松紧度合适. 经门静脉套管注入常温生理盐水约 1~2 mL, 排出供肝内冷灌注液. 将阻断受体门静脉的微血管夹下移至幽门静脉水平, 排出门静脉内血液及血块, 冲洗血管腔, 迅速插入供体门静脉袖套管, 在袖套管凹槽内以 7-0 丝线环扎固定. 然后立即放开门静脉血管夹, 可见肝脏迅速恢复血灌注颜色, 待供肝肝下腔静脉有血液流出时 (可少量放血), 再迅速夹毕, 然后直视下缓慢放开肝上下腔静脉阻断钳, 结束无肝期. 扩开受体肝下腔静脉, 注入生理盐水, 和门静脉同法端端吻合肝下腔静脉, 缓慢放开肝下腔静脉血管夹. 此时大鼠开始苏醒, 可见供肝色泽更鲜红, 胆汁不断流出, 肠系膜动脉搏动有力. 吻合胆总管, 于受体胆总管前壁作一小切口, 以生理盐水冲洗胆总管腔后, 将供肝胆总管支架管插入受体胆总管内, 7-0 丝线环扎固定, 将供受体胆总管结扎线拉拢打结. 根据情况选择一片血供良好的大网膜组织覆盖于胆道吻合口. 查无出血, 以温生理盐水冲洗腹腔, 腹腔内给予氨苄青霉素 0.1 g, 经阴茎背静脉缓慢补入常温的生理盐水或等渗  $\text{NaHCO}_3$  溶液 1~2 mL, 1 号丝线连续缝合腹壁切口. 移植成功的大鼠术毕即醒, 能翻身, 角膜反射灵敏, 迅速复温. (2) 术后处理: 术后大鼠置于鼠笼中, 以红外灯或空调加热, 以便尽快复温, 直至活动自如. 单笼饲养 3 d, 术后 3 h 恢复进水, 12 h 后自由进食. 饲养环境温度 22℃ 左右. 观察活动情况, 进食饮水情况及对刺激的反应, 死亡大鼠应解剖, 无特殊情况不应用抗生素.

## 2 结果

3 只大鼠因动脉吻合口出血, 2 只因肝上下腔

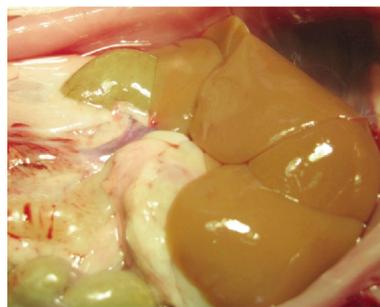


图 1 肝脏原位灌注后呈土黄色

Fig. 1 The liver turned yellow after perfusion



图 2 袖套放置

Fig. 2 Cuff placement

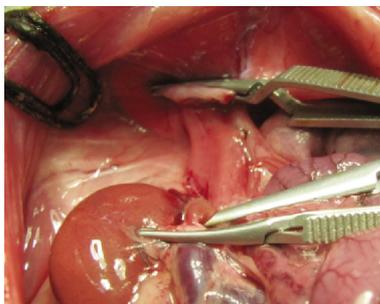


图 3 切除受体的肝脏

Fig. 3 Receptors in the liver resection



图 4 肝上下腔静脉后壁吻合完毕

Fig. 4 Hepatic inferior vena cava posterior wall of the anastomosis is accomplished



图 5 关腹

Fig. 5 Abdominal closure



图 6 大鼠麻醉清醒、活动自如

Fig. 6 Anesthetized rats awake, freedom of movement

静脉吻合口出血，均于术后 2~16 h 内死亡（术后 24 h 内死亡为手术死亡），死亡原因均经尸检证实，手术成功率为 93.3%（56/60），95%CI 为 83.80%~98.15%。术后 1 d 生存率为 90.0%（18/20），2 d 生存率为 85.5%（17/20），4 d 生存率为 65.0%（13/20），7 d 生存率为 60.0%（12/20），95%CI 为 36.05%~80.88%。通过技术改进，昆明市第一人民医院肝胆胰科一提高了手术成功率及模型的稳定性，成功建立小肝移植大鼠动物模型。

### 3 讨论

从 Welch 提出肝移植假设以来，在肝移植模型中重建肝动脉的重要性已获广泛认同。动脉化模型更接近生理状态，从理论上讲，比静脉化模型更能克服缺血再灌注损伤及免疫反应，可加速移植肝再生口，有利于移植肝长期存活。本实验选用的供鼠周龄比受鼠小 1~2 周，体重约轻（ $30 \pm 5$ ）g，切除左叶、双尾叶及乳头叶后残肝重约相当于受鼠全肝重的 40%，较符合预期设想，GV/SLV 平均约为 42%。本实验参照 Kamada 等所介绍的二袖套法，在以下方面做了技术改进。

对于供体手术：通过以上的技术改进，化繁为简，化难为易，缩短了手术时间，提高了手术成功率及模型的稳定性，为我室在肝移植领域的研究提供了坚实的模型基础。

#### [参考文献]

- [1] BOILLOT O, DELAFOSSE B, MCHET I, et al. Small-for-size partial liver graft in an adult recipient; a new transplant technique [J]. *Lancet*, 2002, 359 (9 304): 406-407.
- [2] TROISI R, PRAET M, DE HEMPTINNE B. Small-for-size syndrome: what is the problem [J]. *Liver Transpl*, 2003, 9 (9):S1.
- [3] GRUTTADAURIA S, PAGANO D, LUCA A, et al. Small-for-size syndrome in adult-to-adult living-related liver transplantation [J]. *World J Gastroenterol*, 2010, 16:5 011-5 015.
- [4] RECTOR R S, THYFAULT J P, WEI Y, et al. Non-alcoholic fatty liver disease and the metabolic syndrome: an update [J]. *World J Gastroenterol*, 2008, 14(2):185-192.
- [5] KAMADA N, CALNE R Y. Orthotopic liver transplantation in the rat. Technique using cuff for portal vein anastomosis and biliary drainage [J]. *Transplantation*, 1979, 28 (1):47-50.
- [6] 梅建民, Billiar T R, 吕民生. 早期反应基因-1 (Egr1) 在缺血再灌注肝组织中的表达 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2005, 11(11):772-775.
- [7] 王学浩, 李国强. 活体肝移植的历史和现状 [J]. *实用临床医药杂志*, 2003, 7(1):72-78.
- [8] CM LO, ST FAN, CL LIU, et al. Minimum graft size for successful living donor liver transplantation [J]. *Transplantation*, 1999, 68(8):1 112-6.
- [9] YAMADA T, TANAKA K, URYUHARA K, et al. Selective hemiportal caval shunt based on portal vein pressure for small-for-size graft in adult living donor liver transplantation [J]. *Am J Transplant*, 2008, 8:847-853.
- [10] GORALCZYK A D, OBED A, BEHAM A, et al. Posterior cavoplasty: a new approach to avoid venous outflow obstruction and symptoms for small-for-size syndrome in right lobe living donor liver transplantation [J]. *Langen-becks Arch Surg*, 2011, 396:389-395.
- [11] ITO T, KIUCHI T, YAMAMOTO H, et al. Changes in portal venous pressure in the early phase after living donor liver transplantation: pathogenesis and clinical implications [J]. *Transplantation*, 2003, 75(8):1 313-1 317.
- [12] MAN K, LO CM, NG I O, et al. Liver transplantation in rats using small-for-size grafts: a study of hemodynamic and morphological changes [J]. *Arch Surg*, 2001, 136 (3): 280-285.
- [13] NAKAJIMA A, UEDA K, TAKAOKA M, et al. Effects of pre and posts ischemic treatments with FK409, a nitric oxide donor, on ischemia/reperfusion-induced renal injury and endothelin-1 production in rats [J]. *Biol Pharm Bull*, 2006, 29(3):577-9.
- [14] 游伟, 李相成. 一氧化氮促释放剂在保护大鼠减体积肝移植后缺血再灌注损伤中的作用 [J]. *南京医科大学学报(自然科学版)*, 2006, 7 (26):5526-529.

(2014-09-08 收稿)