

小鼠异位肢体复合组织移植模型的建立

黄健兵, 徐高俊, 刘浩, 梅举, 丁芳宝*

(上海交通大学医学院附属新华医院心胸外科, 上海 200092)

【摘要】 目的 建立稳定的小鼠异位肢体复合组织移植模型。**方法** 选用25对C57BL/6小鼠行同品系异位肢体复合组织移植手术。取供体小鼠后肢,于腹股沟韧带下缘起沿股动脉、股静脉向上游离,电凝切断除股静脉、股动脉外所有分枝血管至髂外动脉、髂外静脉,断髂外动脉、髂外静脉后,横断股骨、股部肌肉。将供体髂外动脉、髂外静脉分别与受体小鼠右侧颈总动脉、颈外静脉行端侧吻合。连续缝合供体皮缘于受体皮肤切缘固定肢体。于供肢胫骨远端关节处切断,结扎残端。**结果** 手术成功率76%,总手术时间(87.1 ± 10.1) min,供体获取时间(23.8 ± 4.9) min,血管吻合时间(55.3 ± 9.6) min。**结论** 小鼠异位肢体复合组织移植成功率较高,稳定可靠,是一种新的研究移植免疫的理想动物模型。

【关键词】 小鼠;肢体;复合组织;移植;动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2016)03-0258-04

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2016.03.008

Establishment of a mouse model of limb heterotopic composite tissue allograft transplantation

HUANG Jian-bing, XU Gao-jun, LIU Hao, MEI Ju, DING Fang-bao*

(Department of Cardiothoracic Surgery, Xinhua Hospital, Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200092, China)

【Abstract】 Objective To establish a stable mouse model of limb heterotopic composite tissue allograft transplantation. **Methods** 25 pairs of C57BL/6 mice were used for this limb heterotopic allograft transplantation experiment. The hind legs were taken from the donor mice. A transverse incision was made at the level of inguinal ligament to expose and mobilize the femoral vessels up to the external iliac vessels. All branches to the external iliac artery and vein were cut off by electrocoagulation. To cut off the external iliac artery and external iliac vein, and to transect the femur, thigh muscles and skin. The donor external iliac artery-external iliac vein anastomosis was performed in end-to-side fashion with recipient mice's right common carotid artery and jugular vein, respectively. Continuously suture the donor skin to the recipient skin incisional margin to fix the limb. Cut off the donor limb's distal tibial joint, and ligate the stump. **Results** The success rate of the heterotopic limb transplantation operation was 76%. The total operation time was 87.1 ± 10.1 minutes, and the vessel anastomosis time was 55.3 ± 9.6 minutes. **Conclusions** This mouse model of limb heterotopic limb composite tissue allograft transplantation shows a high success rate of the surgical operation, and is stable and reliable. It is a new ideal model for studies on transplantation immunology.

【Key words】 Mice; Limb; Composite tissue; Transplantation; Animal model

Corresponding author: DING Fang-bao, Email: 40821247@qq.com

[基金项目] 上海市科委科技项目(15411952600)。

[作者简介] 黄健兵(1979-),男,博士研究生,主治医师,专业:心胸外科。Email: jb4480@163.com

[通讯作者] 丁芳宝(1969-),男,硕士生导师,主任医师,专业:心胸外科。Email: 40821247@qq.com

随着转基因技术的发展,转基因动物器官移植模型成为从分子水平研究移植免疫的新手段。小鼠的基因型相对容易控制,各种纯系小鼠的成功繁殖等有利因素,使小鼠模型在移植免疫方面占据不可替代的地位。随着移植免疫研究的进展,复合组织移植模型的运用逐步受到重视,但目前国内尚未有较成熟的复合组织移植的小鼠模型报道。因各型小鼠具有相似的解剖结构,在模型的建立上操作相同,为避免不同基因小鼠间组织移植的免疫排斥影响,我们选择基因型基本相同的近交系小鼠探索复合组织移植的可能性。笔者在参考国外文献的基础上,通过不断的摸索与练习,成功建立了小鼠异位肢体复合组织移植模型,简便易行,成功率高。

1 材料与方法

1.1 动物及分组

清洁级雌性 C57BL/6 (H2b) 小鼠 50 只,6~8 周龄,体重 16~22 g,购自上海交通大学医学院实验动物科学部[SCXK(沪)2013-0021],并在上海交通大学医学院附属新华医院动物实验室[SYXK(沪)2013-0106]完成实验。50 只小鼠随机分 25 对作异位肢体移植。实验过程按实验动物使用的 3R 原则给予人道关怀,并通过上海交通大学医学院附属新华医院医学伦理委员会的动物实验伦理审查(编号:XHEC-F-2016-004)。

1.2 手术器械及试剂

手术显微镜(上海医用光学仪器厂);血管夹(Accurate Surgical & Scientific Instruments 公司);显微持针器(Eriem Surgical 公司);显微剪刀和镊子(Fine Science Tools 公司);11/0 带针缝线(Crown-jun)和 4/0 医用丝线(上海金环医用缝线厂);戊巴比妥钠和肝素钠(上海医药集团公司)。手术操作均在 10~25 倍显微镜下完成。

1.3 手术方法

1.3.1 供体手术

麻醉采用腹腔注射 0.65% 戊巴比妥钠(0.01 mL/g)。剃除腹部、左后肢、左背部毛,小鼠取仰卧位固定四肢远端,术野消毒。沿左腹股沟韧带方向横行切开左后肢皮肤,垂直此切口斜向上切开腹腔,充分显露股动静脉、髂动静脉,自腹股沟韧带水平起逐步向腹腔游离、电凝切断除股静脉、股动脉外所有分枝血管,股动脉向上游离范围至髂外动脉下二分之一,股静脉向上游离至腹股沟韧带以上即可。游

离完成后,用显微血管夹阻断腹主动脉,在血管夹下方用 30G 针头斜行向下穿刺腹主动脉,灌注 4℃ 肝素生理盐水(10 U/mL) 1 mL。于髂外动脉下二分之一处断动脉,于腹股沟韧带水平上方断静脉,获取血管蒂。于股骨中段横断股骨,切断股部肌肉、背侧皮肤,获取后肢放入 4℃ 肝素生理盐水(10 U/mL)中备用。

1.3.2 受体手术

小鼠腹腔注射 0.65% 戊巴比妥钠(0.01 mL/g)麻醉后剃右侧颈、胸部毛,取仰卧位固定,头端朝向术者。术野消毒。作颈部偏右侧竖切口切开皮肤,游离右侧颈外静脉、颈总动脉。先使用显微弯血管夹侧方阻断颈外静脉(图 1),切开后与供体髂静脉行端侧吻合,吻合方法为:将供肢放于术野右侧,于吻合口上下两端各缝一针打结牵引固定血管,以上端缝线连续缝合右侧血管壁至下端后,绕过下端再连续向上缝合至上端与上端打结线,尾部打结完成静脉吻合。取另一显微弯血管夹侧方阻断颈总动脉(图 1),切开颈总动脉侧壁,与供体髂动脉行端侧吻合,吻合方法为:先于吻合口上端间断缝合一针,打结固定后,向下连续缝合右侧壁至下端后向上连续缝合左侧壁至上端与线尾打结。吻合完成后先开放静脉血管夹,后开放动脉血管夹,可见供体动脉搏动。将供肢皮缘与受体切口皮缘连续缝合固定供肢。于供肢胫骨远端关节处切断,结扎残端,使残端皮肤完全包埋骨性断端。

1.4 术后处理

术后,将小鼠置于 37℃ 暖箱内复温,自由活动后放回笼内,正常进食水。每天观察小鼠活动情况、移植肢体存活情况。

2 结果

供体手术时间为(23.8 ± 4.9) min,动、静脉吻合时间(55.3 ± 9.6) min,总手术时间为(87.1 ± 10.1) min。术后所有受体小鼠存活良好,活动无影响。四个移植肢体术后第 2 天出现干结、脱水表现,至第 5 天供肢干结、坏死明显,解剖提示动脉吻合口血栓形成。两个小鼠供肢出现明显肿胀,一周后出现坏死,解剖提示静脉吻合口血栓形成,血液回流不畅。其余小鼠供肢成活良好,供肢皮肤有毛生长(见图 2)。术后 3 周移植肢体存活率 76%。3 周后取成活供肢作病理检查(见图 3)证实肌肉存活良好。

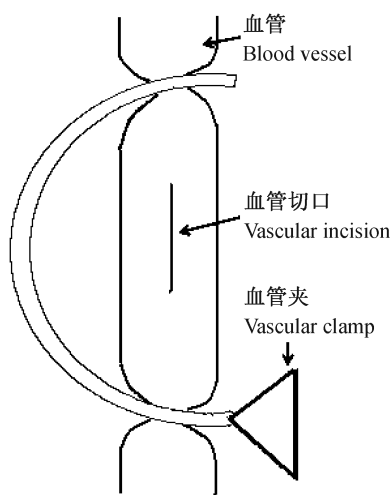


图 1 阻断血管方法示意图

Fig.1 Schematic diagram of the block method of the blood vessels

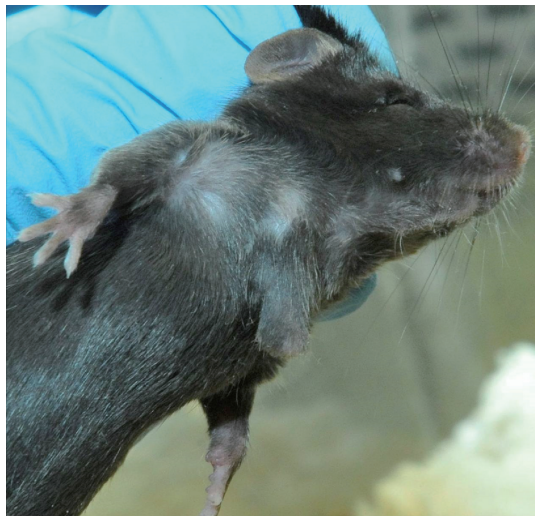


图 2 小鼠颈部肢体移植后 3 周

Fig.2 Gross appearance of limb allograft transplantation in the neck at 3 weeks after the operation.

3 讨论

随着机械化、工业化社会的形成,各种复合组织损伤时有发生,对复合组织的修复要求日趋受到重视,但复合组织移植的免疫排斥问题还需要更多的研究^[1]。皮肤、肌肉甚至骨骼复合组织的移植免疫研究尚未广泛开展,而缺乏稳定的复合组织移植模型可能是限制其研究的原因之一。因此,稳定的复合组织移植的动物模型的建立,对开展移植免疫研究至关重要。相对于大鼠及其他大动物而言,小鼠有其不可替代的优点:人们对小鼠基因组特征的认识比大鼠及其他任何大动物都清楚,转基因小鼠种

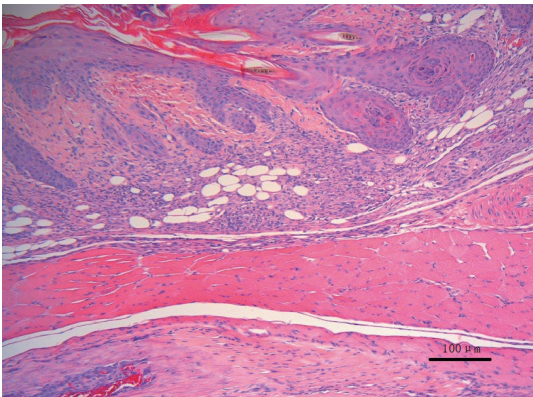


图 3 小鼠异位肢体移植后 3 周肌肉组织 HE 染色图片 (×100)

Fig.3 Histological appearance of the muscle tissue at 3 weeks after the limb allograft transplantation. (×100)

系较纯,已有大量的纯种小鼠及单抗可用,而有些蛋白成分如酶或趋化因子只能通过特定细菌或细胞分泌产生,产量非常少,无法批量用于大动物甚至大鼠。但由于小鼠体积和重量小,手术操作难度大,常见的小鼠移植模型多限于相对较大血管吻合的模型,如心脏移植、肾移植、肝移植等^[2-4]。1999 年 Zhang 等^[5]报道了原位小鼠肢体移植模型,但因为其较低的成功率,及受体小鼠创伤大、耐受性差限制了其发展。2001 年 Thomas 等^[6]报道了异位小鼠肢体移植模型,成功率有了明显的提高,小鼠的耐受也有改善,但其移植供体组织为较小的肢体皮片、肌肉或部分骨性组织,难以完整体现复合组织移植免疫过程。同时由于肢体血管细小,手术难度大,成功率低等,限制了小鼠肢体移植模型的发展,此后国外相继有少数几个较大的研究中心报道了涉及小鼠肢体复合组织移植模型的研究^[7-11],而国内尚未见相关报道。但国外已有的报道多使用较少的供体肢体组织,或行原位移植、腹部移植等,受体小鼠耐受较差,或受体小鼠易自行咬到供体组织影响实验。我们在参考国外相关文献的基础上,通过摸索与练习,成功建立了异位小鼠肢体复合组织移植模型。本模型设计的优点有:移植血管使用端侧吻合方法,不阻断受体小鼠原有的血供,避免对受体小鼠血流的影响。移植肢体位于受体小鼠颈部,不影响受体小鼠的正常活动,且无明显疼痛刺激,受体小鼠耐受性好。同时受体小鼠无法咬到位于颈部的供体组织,可较好的保护移植植物。

本模型建立的几点体会:取供体时,关键需要保护供体血管无损伤,且要注意处理分支时可靠电凝,

防止移植后分支血管出血。供体血管切断的位置在腹股沟韧带以上,其血管径明显较腹股沟韧带下方股动脉、股静脉粗,便于后期血管吻合。在吻合血管时,受体血管切口略大于供体血管开口径。因静脉壁很薄,有张力牵拉时很难分辨前后血管壁,在开始缝合时先在上下两端各缝一针作牵引,缝合过程中血管端间断冲生理盐水使血管腔鼓起后便于分辨血管壁,连续缝合完打结前,轻拉吻合口,使吻合口充分展开,缝线自然舒展,打结时线结靠上即可,防止用力拉线导致吻合口狭窄。动脉吻合时,注意修剪干净吻合口附近血管外膜,缝合时防止外膜组织入吻合口,导致术后血栓形成,缝合完打结时勿过于用力致吻合口狭窄。

缝合完供体皮肤后,于供肢胫骨远端关节处切断,如果血管吻合良好,可见残端出血。结扎残端时,注意使皮肤完整包埋骨性断端,否则后期胫骨由残端穿出,致局部组织坏死。切除供体远端肢体可较好的减少对受体小鼠活动的影响,同时不影响供肢复合组织的免疫学研究。

总之,小鼠异位肢体复合组织移植模型有一定的技术难度,对实验室条件、实验者显微外科技术要求较高,但通过适当的练习,可以建立稳定的复合组织移植模型,有助于对移植免疫机制进行更深的研究。

参 考 文 献

[1] Lin CH, Zhang W, Ng TW, et al. Vascularized osteomyocutaneous allografts are permissive to tolerance by induction-based immunomodulatory therapy [J]. Am J Transplant, 2013, 13: 2161

- 2168.
[2] 鲍春荣, 梅举, 丁芳宝, 等. 小鼠腹腔异位心脏移植模型制作方法的改进 [J]. 上海交通大学学报医学版, 2014, 34: 1100 - 1103.
[3] 傅宇阳, 何晓顺, 陈剑琳, 等. 小鼠肾移植模型的建立 [J]. 中华显微外科杂志, 2003, 26: 213 - 214.
[4] 黄德荣, 吴忠均, 郑树森, 等. 小鼠原位肝移植模型建立方法的改良研究 [J]. 解放军医学杂志, 2009, 34: 1070 - 1072.
[5] Zhang F, Shi DY, Kryger Z, et al. Development of a mouse limb transplantation model [J]. Microsurgery, 1999, 19: 209 - 213
[6] Tung THH, Mohanakumar T, Mackinnon SE. Development of a mouse model for heterotopic limb and composite-tissue transplantation [J]. J Reconstr Microsurg, 2001, 17: 267 - 273.
[7] Foster RD, Liu T. Orthotopic hindlimb transplantation in the mouse [J]. J Reconstr Microsurg, 2003, 19: 49 - 54.
[8] Tung TH, Mackinnon S, Mohanakumar T. Long-term limb allograft survival using anti-CD40L antibody in a murine model [J]. Transplantation, 2003, 75: 644 - 650.
[9] Tung TH, Mackinnon S, Mohanakumar T. Prolonged limb allograft survival with CD40 costimulation blockade, T-cell depletion, and megadose donor bone-marrow transfusion [J]. Microsurgery, 2005, 25: 624 - 631.
[10] Sucher R, Lin CH, Zanoun R, et al. Mouse hind limb transplantation: a new composite tissue allotransplantation model using nonsuture supermicrosurgery [J]. Transplantation, 2010, 90: 1374 - 1380.
[11] Yan Y, Johnson PJ, Glaus SW, et al. A novel model for evaluating nerve regeneration in the composite tissue transplant: the murine heterotopic limb transplant [J]. Hand, 2011, 6: 304 - 312.

[收稿日期] 2015-10-27