



建立大鼠持续性肠内营养的输注模型 和淋巴液引流方法

周开国, 何桂珍, 董良广, 陈学峰, 张睿

(中国医学科学院, 北京协和医学院, 北京协和医院肠内肠外营养科, 北京 100730)

【摘要】 目的 建立大鼠持续性肠内营养的输注模型和淋巴液引流的方法。方法 大鼠行胃造口后游离硅胶管至背部, 通过 swivel 管连接到微量输液泵。5 d 持续匀速的输入肠内营养后开腹并游离肠淋巴干, 大鼠在肠道缺血 60 min 再灌注 120 min 同时潜行插入硅胶管收集淋巴液。结果 第一次胃造口术后大鼠持续肠内营养输注通畅, 未出现死亡或并发症。第二次手术时通过较简单的方法可以获取淋巴液, 成功率较高, 可达 90% 以上。结论 大鼠持续肠内营养输注模型的建立, 为研究营养物质的作用搭建了一个平台; 通过较简单的方法获取淋巴液可以为研究淋巴液的成分提供便利。

【关键词】 大鼠; 肠内营养; 淋巴引流

【中图分类号】 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-756(2011)03-0049-03

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.03.012

Model Establishment of Continuous Infusion of Enteral Nutrition and a Method for Obtaining Lymph in Rats

ZHOU Kai-guo, HE Gui-zhen, DONG Liang-guang, CHEN Xue-feng, ZHANG Rui

(Department of Enteral and Parenteral Nutrition, PUMC Hospital, CAMS and PUMC, Beijing 100730, China)

【Abstract】 Objective To establish model of continuous infusion of enteral nutrition and a method for obtaining lymph in rats. **Method** After rats received gastrotomy, the silicone tube, which freed to post back, was connected to the micro infusion pump through the swivel. After 5 days of continuous enteral nutrition the rats were opened the abdominal cavity and freed the intestinal lymph trunk, then the rats was subjected to intestinal ischemia for 60 minutes and reperfusion for 120 minutes, meanwhile, stealth inserted the silicon tube to collect lymph. **Result** After the first operation, the continuous infusion of enteral nutrition was smooth in rats and there were no death or complications symptoms. The lymph fluid was obtained by a simpler method, which success rate was higher than 90% in the second operation. **Conclusion** Model establishment of continuous infusion of enteral nutrition in rats could greatly facilitate to study the role of nutrients. The simple method to obtain the lymph provides greatly convenience for the study of lymph ingredients.

【Key words】 Rats; Enteral nutrition; Lymphatic drainage

肠内肠外营养从上世纪六十年代开展以来, 已经在国内外临床中得到广泛的应用。随着临床应用的普遍性, 研究各种营养物质作用的基础研究也不断深入。作为基础研究的一个重要部分—动物实验的肠内营养持续输注模型的建立具有重要的

作用。而大鼠淋巴液由于技术难度较高而难以获得。本课题组建立了大鼠持续性输入肠内营养的输注模型, 并在大鼠缺血再灌注同时建立较简单易行且成功率较高的肠淋巴液获取方法。

【基金项目】 国家自然科学基金资助项目(30940069)。

【作者简介】 周开国(1985-), 男, 研究生。

【通讯作者】 何桂珍, 教授, 研究生导师, 研究方向: 临床营养。E-mail: hgzpumc@163.com。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 SD 健康雄性大鼠 16 只, 封闭群, 体重 (306 ± 9.33) g 均购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [合格证号 SCXK(京)2007-0001]。所有大鼠均饲养于北京协和医院动物中心隔离屏障设施环境中, 温度 $18^{\circ}\text{C} \sim 29^{\circ}\text{C}$, 相对湿度 $40\% \sim 70\%$, 噪声 ≤ 60 dB, 人工照明 $150 \sim 300$ lx。全部大鼠均单笼饲养, 适应性饲养 5 d。

1.2 手术物品

剪刀、眼科剪、眼科镊、有齿镊、无齿镊、持针器、缝针、5-0 缝线、粗丝线、用于引流和输注营养液的硅胶导管(内径 ID0.8 mm, 外径 OD1.2 mm, 济南晨光医用导管厂)、收集淋巴液的 Nunc 冻存管(丹麦 Nunc 公司)、自制腹腔拉钩、输液用 Swivel 旋转轴装置(instech laboratories, inc. USA, 封底图 1), 无菌操作包内还应准备棉签、纱布、自制老鼠洞巾和固定拉钩的文具钉, 每次手术前所有物品均需灭菌处理。

1.3 肠内营养输注模型的建立

16 只大鼠术前均禁食 12 h, 可自由饮水。称重后腹腔注射 1% 戊巴比妥钠(50 mg/kg)。麻醉满意后大鼠固定在自制手术木板上, 腹部剑突下正中切口, 长约 2.5 cm。进腹找到胃, 在胃底用 5-0 缝线做一荷包缝合。造口后插入硅胶管, 硅胶管在插入前用粗丝线打一死结, 插入深度为 4~6 cm, 收紧荷包, 固定硅胶管。从管的另一端注入 1.5 mL 生理盐水测试硅胶管是否通畅。硅胶管从腹腔穿出, 皮下游离并从后背皮肤穿出, 关闭腹腔。硅胶管通过 Swivel 旋转轴装置连接到微量输液泵。把 Swivel 旋转轴装置固定在背部肌肉或脊柱上。术后约 2 h 大鼠苏醒后, 开始给予营养液(封底图 2)。营养液的配制为等氮(1.8 g/kg·d)、等热量(250 kcal/kg·d), 所有营养液在无菌操作的条件下配制。用微量注射泵 24 h 匀速输注, 输注速率为 2 mL/h, 第一天给与半量。每次更换营养液时用 1 mL 生理盐水冲洗管道。大鼠可以在代谢笼中自由活动, 记录术中和术后发生的不良反应以及是否出现死亡现象、老鼠精神状态和给予营养 5 d 前后的体重。

1.4 淋巴液引流

16 只大鼠持续在给予营养液 5 d 后行第二次手术。开腹前步骤和第一次手术相同, 切口选择偏下

方长度约 3 cm, 进入腹腔后, 用棉签把肠道轻柔的拨向大鼠左侧。在右肾动脉水平可以找到肠系膜上动脉。在其上方可以发现一根呈乳白色肠淋巴干。在近腹主动脉处小心分离浆膜, 钝性分离肠系膜上动脉及肠淋巴干。分离肠淋巴干后在近心端剪一小口, 将导管一端剪成 45° , 缓慢斜向下轻送进 3~5 mm, 然后用少量医用胶(北京福爱乐科技发展有限公司)涂抹在插入口、右肾旁浆膜处以及腹腔切口右侧固定导管, 以防脱出。导管另一端插入预先已在管盖钻一小孔的 Nunc 管(封底图 3)。缺血再灌注是课题研究需要, 因本课题组主要研究肠道缺血再灌注时淋巴液中生物活性物质的变化及对远隔组织的影响。所以建立淋巴引流的方法。在硅胶管插入淋巴干后用无创血管夹夹住肠系膜上动脉, 夹闭 60 min 后松开夹子复灌 120 min。为防止松夹时出现一过性低容量反应, 所有大鼠在缺血再灌注过程中均在腹腔开口处盖上用生理盐水湿润的无菌敷料(封底图 4), 间断给与生理盐水。记录术中术后发生的不良反应以及插管成功率和 3 h 引流量。

2 结果

2.1 动物观察

第一次胃造口手术后, 所有老鼠均未出现腹腔切口感染, 肠粘连, 出血等并发症, 未有死亡现象。给与营养后精神状态良好, 腹部后背体毛逐渐长出, 伤口愈合佳。持续 5 d 连续营养液输注后体重较前有不同程度上升。

2.2 淋巴液引流

在大鼠肠道缺血再灌注同时采用较简单易行的淋巴液获取方法。在熟练掌握获取方法后, 淋巴引流的成功率较高(15/16, 93.8%), 3 h 淋巴引流量为 0.6~1.0 mL。引流的淋巴液进一步测定其内毒素和炎性因子的浓度, 并与正常大鼠进行对照。

3 讨论

大鼠的肠道特征(解剖、代谢甚至生化)与人的相似^[1], 并且大鼠肠道对脂溶性物质的吸收也与人相似^[2]。所以大鼠是作为营养研究的理想动物。目前认为肠道是多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的发动机^[3], 其可能是独立的肠源性的因子经“肠-淋巴”途径到达系统循环导致系统性炎症反应综合征(systemic

inflammatory response syndrome, SIRS) 和远隔组织器官损伤而引起 MODS^[4], 因为淋巴是一个重要途径, 淋巴引流研究其成分是一个重要的研究手段。但以往的淋巴引流多集中在胸导管, 且操作复杂, 解剖难度大, 一些显微操作器械不是每个实验室都可以具备, 所以建立相对简单的肠道淋巴液引流方法对研究淋巴液中成分是必需的。

动物手术时要严格遵守无菌操作的步骤。肠内营养输注模型建立中应该注意: ①实验动物应安全麻醉, 术后能及时清醒。②胃造口时硅胶管插入前用粗丝线打的结不能太紧也不能太松, 太紧则输注营养液困难, 太松则不能起到增大摩擦的作用, 插管容易从造口中滑出。③管插入深度原则上是宁长勿短, 短容易滑出造口。④因为大鼠皮肤比较松弛, 要保证大鼠能在代谢笼中自由活动, 所以 Swivel 旋转轴装置应该固定在肌肉或脊柱上。⑤每次更换营养液时应用注射器输注 1 mL 生理盐水做通管用以防堵塞。⑥输注营养液出现堵塞现象时可以用 10 mL 注射器高压通管。

淋巴液引流时应该注意: ①钝性分离肠系膜上动脉及肠淋巴干浆膜时必须操作仔细, 不需要完全分离肠系膜上动脉及肠淋巴干。有研究报道完全分离与不完全分离对插管成功率没有差别^[5]。②肠系膜淋巴管位置相对表浅, 管壁特别薄, 仅由多层上皮细胞组成, 很容易撕裂。游离一小段即可。③剪口尽量选择在近心端, 因为如果近心端插入失败, 还有远心端可以选择。④肠淋巴管的位置多与肠系膜上动脉平行在其上侧, 但是骑跨的情况并不少见, 甚至还可以在肠系膜上动脉后方, 与彭等的报道一致^[6]。⑤插入的硅胶管应与淋巴管成平行, 所以固定硅胶管时应有此概念。

本实验插管成功率较以往报道稍高, 可能由于插管难度不一, 以致影响插管质量而导致的差异, 也有大鼠之间个体差异的原因。本方法所需器材相对简单, 实验室容易添置。所需人力要求不高, 一人足以完成。这是此方法优势所在。

饮食对淋巴液的流量有明显影响, 禁食超过 4 h 时会影响淋巴的量, 而本实验因完全按照临床手术规范行事, 禁食时间较长, 这影响淋巴液的引流量。相比国内外报道的淋巴引流量偏少。国外 Boyd^[7]报道的淋巴液引流量较大, 可能与其术前 1 h 应用 1.5 ~ 2 mL 橄榄油, 术中输液有关。还与其是从胸导管引流淋巴液有关, 因为胸导管的淋巴量占全身的 50% ~ 70%, 而本实验采用的是肠淋巴干引流。

目前随着医学基础研究的范围越来越广, 研究深度也在不断加深。持续肠内营养输注模型的建立和淋巴液获取方法的简便化可以为研究疾病与营养物质的作用机制提供一个良好的技术平台。

参考文献:

- [1] Desesso JM, Jacobson CF. Anatomical and physiological parameters affecting gastrointestinal absorption in humans and rats [J]. Food Chem Toxicol, 2001, 39(3): 209 - 228.
- [2] Pahl MV, Oveisai F, Khamiseh G, et al. Intestinal absorption and biliary secretion of cholesterol in rats with nephritic syndrome [J]. Nephrol Dial Transplant, 1998, 13(6): 1446 - 1451.
- [3] Clark JA, Coopersmith CM. Intestinal crosstalk: a new paradigm for understanding the gut as the "motor" of critical illness [J]. Shock, 2007, 28: 384 - 393.
- [4] Fanous MY, Phillips AJ, Windsor JA. Mesenteric lymph: the bridge to future management of critical illness [J]. JOP, 2007, 8: 374 - 399.
- [5] 顾葆春, 刘正军, 李萍, 等. 获取大鼠肠淋巴液的技术改进 [J]. 第三军医大学学报, 2005, 27(19): 1988 - 1989.
- [6] 彭毅志, 肖光夏, 马利, 等. 大鼠肠淋巴管的制作 [J]. 第三军医大学学报, 1995, 17(5): 420.
- [7] Boyd M, Risovic V, Jull P, et al. A stepwise surgical procedure to investigate the lymphatic transport of lipid-based oral drug formulations: Cannulation of the mesenteric and thoracic lymph ducts within the rat [J]. Pharmacol Toxicol Method, 2004, 49(2): 115 - 120.

修回日期) 2010-06-22