

大鼠肾移植慢性排斥反应模型的建立

贾其磊¹, 尚攀峰², 侯子珍², 郝新生², 岳中瑾²

(1. 攀枝花市第二人民医院泌尿外科, 攀枝花 617068; 2. 兰州大学第二医院泌尿外科, 兰州 730030)

【摘要】 目的 建立一种稳定的大鼠原位肾移植慢性排斥反应模型。方法 供体为近交系 F344 大鼠, 受体为 Lewis 大鼠, 供肾采用左肾, 在体修整, 原位灌注。肾静脉用硬膜外导管做为临时内支架管端-端、六针法吻合, 腹主动脉端-侧连续缝合, 输尿管带膀胱瓣与膀胱吻合。受体术前 3 d 开始环孢素 A 灌胃至术后 30 d (5 mg/kg·d), 以预防急性排斥反应。结果 手术时间 120 ~ 180 min; 手术成功率 90.9% (40P44); 受体均存活 60 d。并发症有吻合口出血、静脉血栓形成、急性排斥反应等。结论 供肾原位灌注, 在体修整是简单可靠的方法。静脉内支架管端端吻合, 腹主动脉端侧吻合能够达到稳定的成功率, 值得推广。熟练的外科操作技能和血管吻合技术是手术成功的关键。

【关键词】 肾移植; 大鼠; 模型; 动物; 慢性排斥反应

【中图分类号】 R699.2 R332 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2011)03-0018-04

doi: 10.3969/j.issn.1671.7856.2011.03.005

Establishment of Rat Chronic Renal Transplantation Allograft Rejection Model

JIA Qi-lei¹, SHANG Pan-feng², HOU Zi-zhen², XI Xin-sheng²; YUE Zhong-jin²

(1. Department of Urology, Second Hospital of Panzhihua, Panzhihua 617068, China;

2. Department of Urology, Second Hospital of Lanzhou University, Lanzhou 730030, China)

【Abstract】 Objective To explore establishment a stable model of rat chronic renal allograft rejection. **Methods** Inbred F344 and Lewis rats were used as the donors and the recipients. Used the left kidney as a donor kidney, dressing for the kidney in vivo and in situ perfusion. Epidural catheter within the renal vein as a temporary stent tube, end-to-end of the six acupuncture anastomosis. Artery end-to-side continuous suture; ureter and bladder with the bladder flap anastomosis, Used cyclosporine A 5 mg/kg·d to 30 days after operation to prevent acute rejection from three days before operation. **Results** The total time of operation about 120 ~ 180 min, success rate about 90.9% (40P44); receptors can survive up to 60 d. the complications include anastomotic bleeding, venous thrombosis and acute rejection etc. **Conclusion** Dressing for kidney in vivo and in situ from renal perfusion is a simple and reliable method. Stent vein of end-to-end anastomosis, abdominal aortic end-to-side anastomosis can be achieved stable rate of success is worth promoting. Skilled surgical and vascular anastomosis operation is the key to success.

【Key words】 Renal transplantation; Rats; Model, animal; Chronic rejection

1 材料和方法

1.1 材料

普通级健康雄性近交系 F344 和 Lewis 大鼠作

为供体和受体, 购于兰州军区总医院实验动物中心 [SYXK(军 2002 ~ 026)], 12 ~ 16 周龄, 体重 250 ~ 300 g。显微外科手术器械。HC ~ A 离体肾保存液 (上海长征医院)、0.8% 硫喷妥钠、肝素钠 (天津生

[作者简介] 贾其磊 (1976 -), 男, 硕士, 主治医师, 四川省攀枝花市第二人民医院泌尿外科。

[通讯作者] 岳中瑾, 主任医师、教授、博士生导师, 研究方向: 肾移植。E-mail: yuezhongjin@sina.com。

物化学制药厂)、等渗盐水、青霉素钠(华北制药厂)。

1.2 方法

1.2.1 术前准备和麻醉:供、受体术前 6 h 禁食,不禁水,受体术前 3 d 和术晨用环孢素 A 5 mg/kg 灌胃。0.8% 硫喷妥钠 1.25 mL/100 g 腹腔注射麻醉。麻醉成功后取仰卧位,术野备皮,碘伏消毒局部皮肤,铺无菌巾单。

1.2.2 供体手术:腹正中旁左侧 1.0 cm 纵行切口,长约 3.0 cm。切开皮肤和皮下组织,肌层和腹膜切开一小口,沿肌纤维方向钝性分离至切口大小。推开腹腔内容物显露左肾,切开后腹膜,于肾静脉下方向下游离并保护左输尿管。沿后腹膜下钝性分离显露左肾动、静脉近侧端;5/0 细丝线结扎肾上腺静脉。游离腹主动脉和下腔静脉至腰静脉起始处;除去血管周围脂肪和结缔组织,依次结扎(3/0 丝线)肠系膜上动脉、右肾动脉和腹腔干,分离、结扎下腔静脉及腹主动脉通向腰背部的血管。下腔静脉贴肝脏下缘处及腹主动脉和下腔静脉远侧端拟切断处各留置一根 0 号丝线,先结扎腹主动脉远侧端,在腹主动脉贴主动脉裂孔处结扎腹主动脉近侧端、下方剪断、立即从近心端插入一直径 1.0 mm 的硬膜外麻醉导管,注入 0~4℃、HC~A 液 2 mL 后肾脏变白,至肾静脉流出液清亮为止,停止灌注。腹主动脉远侧结扎处剪断,在肾静脉近端与下腔静脉汇合处切断肾静脉,游离肾脏。游离输尿管至膀胱,游离膀胱周围组织,尿道根部切断,整块将左侧肾脏及肾静脉和腹主动脉、输尿管、膀胱取下,放入带冰的器官保存液中。

1.2.3 供肾体外处理:横断膀胱,以左输尿管开口为中心,剪一直径 3 mm 大小的膀胱瓣;将一硬膜外麻醉导管长约 1.0 cm 插入左肾静脉,纱布包裹肾脏,肾血管原位保留,外置冰屑,冷存备用。

1.2.4 受体手术:腹左侧切口长约 3.0 cm,如前法游离左肾及其动、静脉至肾门处,离断左侧输尿管,结扎左肾动脉,断端双重结扎,血管外脂肪和结缔组织剔除干净;用 Lee 氏夹贴下腔静脉处夹住肾静脉,在肾门处切断,去除左肾并把供肾置原肾脏位置;经阴茎背静脉注入含肝素钠 50 U/mL 的生理盐水 3 mL。先吻合静脉,后吻合动脉。供肾静脉内置入硬膜外导管长约 1.0 cm 做为内支架管,内支架管另一头插入受体左肾静脉。肾上腺静脉残端做为标记对应整齐,防止扭曲;术者在 10 倍手术显微镜

下缝合,助手在直视下配合打结。用 10/0 无损伤缝合线在静脉两端各缝合 1 针作为牵引,先缝合后侧壁,然后前壁间断缝合各两针,共 6 针;最后一针打结前拔出内支架管。然后吻合动脉,在受鼠腹主动脉预留吻合口处上下各夹一动脉夹,动脉壁剪一小口约相当于动脉内径大小,肝素盐水冲洗管腔。采用连续缝合每侧 8~10 针,吻合完毕。只要缝针均匀,一般不会出血。用 8/0 无损伤缝合线缝扎供肾腹主动脉远端开口。去除肾脏周围的冰屑,开放肾血流,数秒内可见移植肾实质变鲜红、均匀、肾静脉充盈、吻合口饱满、肾动脉搏动有力,5 min 左右可见输尿管膀胱开口处有尿液流出。吻合口出血用棉球轻压片刻,一般均能停止。将肾脏置于原位妥善固定。输尿管膀胱瓣和受体膀胱端~侧吻合,用 6/0 无损伤缝合线连续全层缝合,输尿管防止扭曲。在腹腔内留置青霉素钠 5 万 U 和生理盐水 5 mL,逐层关腹。术后用灯箱保温约 30 min,麻醉清醒后饲以葡萄糖生理盐水,恢复行走后放回笼内正常饲养。术后 5 d 待大鼠一般状况恢复后,将其背部丝线拉紧打结替代肾切除,结扎后 3 d 剪断结扎线,使线端缩入体内。如为了观察移植后局部免疫病理变化,可不切除右肾。术后 5 mg/kg·d 灌胃直至术后 30 d,再饲养至术后 60 d 处死,取静脉血 2 mL 待用,切取移植肾做病检。

2 结果

在经 4 个月 80 多次训练,我们较为熟练地掌握了大鼠肾移植显微外科技术;在试验阶段共实施移植手术 44 例(F344 大鼠 44 只,Lewis 大鼠 44 只),供体手术时间约 35~50 min,受体手术约 90~120 min,取肾和植肾总手术时间 120~180 min,热缺血时间 <15 s,冷缺血时间 20~40 min,静脉吻合时间 10~15 min,动脉吻合时间 15~25 min;再通血流后,肾脏立即充盈转为鲜红色,肾动脉可触及搏动。3 例吻合口漏血,2 例加针后出血停止,1 例动脉吻合口出血致术中死亡。手术后,受体大鼠 30 min 左右清醒,当天能进食。术后两个月成活 40 只,成活率 90.9% (40/44),术后存活均能达 60 d。术后 4 h 死亡 1 例和 20 h 死亡各 1 例,尸体解剖证实为动脉血栓形成,术后 3 d 死亡 1 例为静脉血栓形成。

60 d 切取移植肾做病检,移植肾体积较正常肾脏明显增大,质地变硬,表面有细颗粒状改变;镜下明显的移植肾间质单核细胞浸润显著,肾小球和血

管周边间质炎性反应和纤维化改变,肾小球基底膜增厚,并伴有肾小管的变性和坏死,血管内膜炎性增生(彩插 1 图 1)。依据 Banff 97 标准,符合慢性排斥反应改变。

3 讨论

建立稳定的动物肾移植模型是研究肾移植的基础,大鼠模型具有其它动物模型无法达到的动物品系的稳定性。我们在前人的基础上不断探索,在试验方法上进行了一些改进并取得了一些经验,总结如下:

3.1 动物选择

理想的慢性排斥反应模型理论上应该是仅存在慢性排斥反应而无急性排斥反应,F344 和 Lewis 大鼠在 MHC I 和 MHC II 分子方面完全相同。仅在非 MHC 分子方面有差别。因此,F344 和 Lewis 大鼠之间器官移植应该是诱导慢性排斥反应模型的理想动物,成为国际上公认的慢性排斥反应模型。在此基础上,本研究术前 3 d 给予 5 mg/kg 环孢素 A 灌胃直至术后第 30 天作为基础抗排斥治疗。实验表明,所有的受体均存活超过 60 d,所有受体可见慢性炎细胞,淋巴细胞和单核细胞浸润,肾小管变性、坏死等典型的慢性排斥反应改变,证明慢性排斥反应模型的建立是成功的。

3.2 手术方式

供肾手术采用在体修整,原位灌注的方法,热缺血时间明显较短,而且便于修整。热缺血时间 ≤ 15 s 相对于离体灌注具有明显优势;自从 Fisher^[1]提出了肾动脉与受体腹主动脉,腔静脉端-侧吻合,对受体虽有一定的生理干扰,但目前仍然是公认的标准方法。Grau^[2]等采用肾血管端-端吻合,不影响全身的血液循环,但血管吻合技术要求高,吻合难度大,要具备相当的显微外科设备和技术,而且,形成血栓或狭窄的机率很高。有学者提出袖套法吻合确实是一种较为简单的操作方法,但 Schumacher 等^[3]分析众多资料后认为:端-端或端-侧血管吻合效果优于袖套技术。我们在试验当中也发现袖套法的通畅率不如端-侧,而且,整个操作过程要在水中进行。否则,易形成空气栓塞。因此,我们仍然选择了静脉端-端吻合,动脉端-侧吻合的手术方式。双侧供肾的移植术节约了大鼠,但动脉必须要采用端-端吻合,增加了吻合难度,反而降低总成功率。静脉吻合我们使用内支架管,右肾静脉太短,不易

放置支架管。因此,我们取供鼠左侧肾脏为供肾。国际上一般多采用左侧原位移植,因左侧血管条件好,操作方便,易于掌握,节省时间,并发症少^[4]。

3.3 切口选择

切口选择是我们的一个改进,以往的报导均作腹部正中或十字切口,上及剑突,下至耻骨联合。这种切口通常需将肠管裹至体外,而且暴露并不好,主要的血管吻合等操作均需深部进行。我们选择左侧旁正中切口,切开皮肤后,肌层切开一小口,沿肌纤维方向钝性分离肌层和腹膜。我们观察到;此切口明显较短,仅 3.0 cm,出血少,暴露好,损伤较小,减少体液丢失及肠管损伤,不必将腹壁和肠管翻出体外即可获得充分暴露。

3.4 血管吻合

血管吻合技术是建立模型成功的关键,需要至少一个月以上练习。六针法和硬膜外支架管内支撑法吻合静脉是我们的主要创新点。肾静脉和肾静脉端-端吻合,腹主动脉和腹主动脉端-侧吻合。静脉的缝合最常出现的并发症是狭窄,静脉壁很薄也给吻合增加了难度。容易扭曲或缝至对侧,或边距太大致吻合口狭窄。我们选用 10/0 无损伤缝合线,内置硬膜外导管作为临时支架管,克服了缝至对侧壁的可能。结扎肾上腺静脉均用 5/0 丝线,并以此作为对端之标记,以防止扭曲。只要边距适当,针距均匀,无张力下开通血流,一般无需加针。若有出血,一般用棉球轻压片刻即可。静脉吻合时间 10~15 min,动脉吻合时间 15~25 min;在吻合静脉时,并不阻断腔静脉的血流,因此下肢不会发生回流受阻现象,有利于大鼠的恢复,且不会引起血栓^[5]。血管吻合主要的难度是动脉,小动脉吻合是采用连续或间断缝合一直有争议^[6]。本实验中采用连续缝合,不容易狭窄或漏血,动脉吻合成功率 90.9% (41/44)。通过熟练练习以后,一般均能获得成功。本组 3 例吻合口漏血,2 例加针后出血停止,1 例动脉吻合口出血致术中死亡。要保护动脉内膜,术中禁止钳夹动脉内膜,吻合时尽可能使吻合口内膜化,从而降低动脉血栓形成机率^[7]。

3.5 动物选择原则

(1) 熟练的手术操作;需要具备有一定的外科操作技能,解剖清晰,以迅速流畅地完成手术。尽可能减少循环阻断时间和手术时间,以利于术后恢复^[6];(2) 术中要严防出血,最重要的是尽可能减少或避免受体血管游离及吻合过程中的失血。一些

对人看来很少的出血,对大鼠可能是致命的。(3)术中适当补液,可以在切除受鼠左肾之前从阴茎背静脉注入肝素生理盐水 2~3 mL 以补充血容量。(4)注意保持伤口的湿化,减少体液的丧失,以便使术后大鼠能够尽快恢复。切除受体左侧肾脏时,应先结扎肾动脉,稍后贴近肾脏结扎肾静脉,尽可能减少失血量;(5)在体修整和原位灌注缩短了热缺血时间,热缺血时间一般均 < 15 s,减少了缺血-再灌注损伤。(6)机体温度的保持和恢复、良好的麻醉,术中肾周冰块不断融化流入腹腔,使内脏温度骤然降低,造成低温。全身麻醉后,肌肉产热这一防御反应消失,虽然低温在心脏或脑缺氧状况下具有器官保护作用,但围手术期低温的不利影响不容忽视。刺激周围血管收缩,增加循环阻力,造成组织缺氧,还能显著影响凝血机制,导致凝血功能障碍。^[8]

3.6 围手术期的处理

成功的手术还需要良好的围手术期处理;注意大鼠整体机能的恢复,术后应迅速用灯箱尽快复温。严格意义上急性排斥反应得到很好的控制以后出现的排斥现象才是慢性排斥反应。术前三 d 开始至术后 30 d 用环孢素 A 灌胃较好的抑制了急性排斥反应,使大鼠的存活时间达到了试验的要求。我们在预试验过程中,部分受体大鼠虽然血管吻合成功,但大鼠最终死于围手术期,分析可能是手术时间过长,体液、体温的急剧变化超出大鼠的耐受能力所致。反过来,顺利度过围手术期的大鼠,一般均能存活超过 60 d。后来,通过加快手术速度,术中术后注意保温及补液等措施后,死亡率明显下降。丹麦学者 kehlet^[8]提出 fast track surgery,即采

用一系列措施减少围手术期的应激反应,减少创伤,促进康复也是很重要的。我们将这一原则应用于大鼠,效果明显。

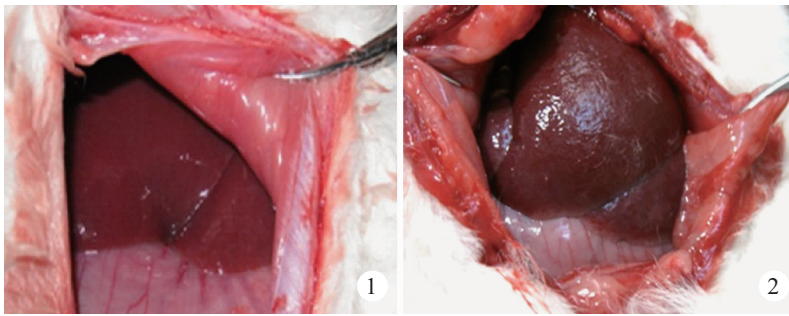
4 结论

供肾在体修整,原位灌注取肾是可靠的方法。熟练的外科操作技能和血管吻合技术是手术成功的关键。静脉内支架管端端吻合,腹主动脉端侧吻合能够达到试验要求,值得推广。

参考文献:

- [1] Fisher B, Lee S, Kutz K, et al. Microvascular surgical technique in research with special reference to renal transplantation in the rat [J]. *Surgery*, 1965, 58:9041.
- [2] Grau V, Steiniger B. Transplantation of both kidneys from one donor rat [J]. *Lab Anim* 2003, 37:162-165.
- [3] Schumacher M, Van Vliet BN, Ferrari P. Kidney transplantation in rats: an appraisal of surgical techniques and outcome [J]. *Microsurgery* 2003, 23:387-3941.
- [4] Huang H, Deng M, Wagner B. The effect of FK778 on the progression of chronic allograft nephropathy in a rat model [J]. *Transplantation*, 2007, 83:741-746.
- [5] 王康,戴勇,李德萍,等. 大鼠原位肾移植模型肾静脉吻合方法的改良[J]. *中华器官移植杂志* 2006, 27:54-56.
- [6] 刘小友,于立新,付绍杰,等. 大鼠肾移植急性排斥反应模型的建立[J]. *中华泌尿外科杂志* 2005, 26:730-732.
- [7] 朱佳庚,张炜,钱立新,等. 一种大鼠肾移植模型的建立[J]. *中华实验外科杂志* 2004, 21:103-1041.
- [8] Schwenk W. Fast track rehabilitation in visceral surgery [J]. *Chirurg* 2009 Aug, 80(8):690-701.

(修回日期) 2010-07-20

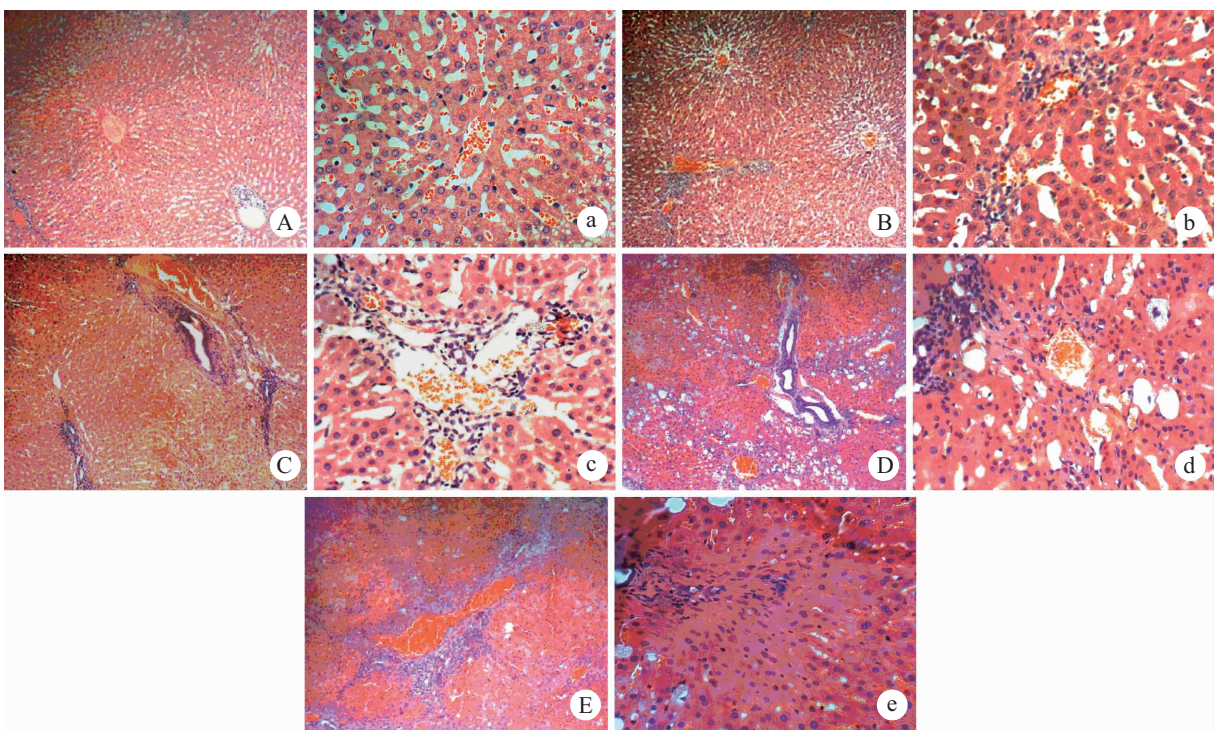


注:①为 S0 期兔肝脏,见肝脏颜色鲜红,表面光滑,边缘锐利,质地较软。②为 S4 期兔肝脏,见肝脏颜色略发灰,表面不光滑呈小结节状,边缘变顿,质地变硬。

Note:①Rabbit's liver of Stage 0, the liver is red, smooth, and has sharp edge, soft texture. ② Rabbit's liver of Stage 4, Liver slightly change to gray, the surface has small nodules, the marginal change to blunt and has hard texture.

图 1 S0 期与 S4 期家兔肝脏大体病理改变

Fig. 1 The pathological changes of rabbits' liver in S0 and S4



注:A、B、C、D、E 为 HE× 40 A、a S0 期 肝小叶结构完整,肝细胞围绕中央静脉呈放射状排列;B、b S1 期 汇管区周围纤维组织轻度增生;C、c S2 期 汇管区周围纤维化,纤维间隔形成,小叶结构保留;D、d S3 期 纤维间隔形成伴小叶结构紊乱;E、e S4 期 可见假小叶形成

Note: a、b、c、d、e 为 HE×100

A、a Stage 0, the structure of hepatic lobule is integrity, hepatic cells radially arranged around the central vein.

B、b Stage 1, mild hyperplasia of fibrous tissue around the portal areas

C、c Stage 2, Fibrosis around the portal area, fiber septa formed, lobular structure retained

D、d Stage 3, fibrous septa formed, and the lobule structure disordered

E、e Stage 4, Show the pseudolobulas

图 2 对照组兔肝脏组织与不同时期肝纤维化组织病理切片(HE)

Fig. 2 The histopathology of the control group and the different stages of fibrous rabbit liver (HE)