

• 基础研究 •

建立一种快速有效的大鼠腹腔心脏移植模型

王丽平, 刘越, 孟佳, 尹新华, 于卫刚, 贾智博

【摘要】 目的 探讨一种快速而有效地建立大鼠腹腔异位心脏移植模型的方法。方法 采用 Ono 术式并加以改良。供心摘取时,于心脏完全停跳后,在主动脉和肺动脉下过 1/0 丝线,一并结扎上、下腔静脉和肺静脉,提起丝线,同时剪断心脏各血管。实验组(Wistar-SD)和对照组(Wistar-Wistar)每组供、受体各 20 只。术后受体和移植心脏均存活 72h 视为手术成功,术后第 4 天两组供心组织行病理学观察。结果 手术成功率为 90%,供心摘取时间为(3.2±0.6) min。实验组移植心脏心肌组织呈急性排斥反应表现;对照组无急性排斥反应表现。结论 该方法与目前应用较广泛的大鼠改进的 Ono 术式比较,取心时间明显缩短;实验组非同系(Wistar-SD)异位心脏移植复制出的大鼠供心排斥反应模型,可用于相关实验研究。

【关键词】 心脏移植;大鼠;模型;动物

【中图分类号】 R318

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-5403(2010)04-04

Establishment of heterotopic abdominal heart transplantation model in rats

WANG Liping, LIU Yue, MENG Jia, et al

Department of Geriatrics, the Second Affiliated Hospital, Harbin Medical University, Harbin 150086, China

【Abstract】 **Objective** To explore a quick and efficient surgical technique for establishing heterotopic abdominal heart transplantation model in rats. **Methods** Heterotopic abdominal heart transplantation of rats was performed by using Ono's method with modification. When donor heart stopped beating completely, the superior vena cava, inferior vena cava and pulmonary vein were ligated respectively with a 1/0 silk through aorta and pulmonary artery. After raising the silk and cutting all blood vessels, the donor heart was harvested. There were 20 donors and 20 recipients in experimental group (Wistar to SD rats) and control group (Wistar to Wistar rats) respectively. Over 72 hour-survival of the animal after operation was considered a successful operation. On day 4, the transplanted hearts were observed histopathologically. **Results** The success rate of the operation was 90%. The donor heart harvesting time was(3.2±0.6) min. Acute rejection was observed in experiment group, and not in control group. **Conclusion** In this technique, the donor heart harvesting time is reduced significantly compared with the current widely used Ono's method. Wistar to SD rat heterotopic heart transplantation can establish the experimental animal model of immune rejection.

【Key words】 heart transplantation; rats; model; animal

目前,对于老年终末期心脏疾病如扩张型心肌病、缺血型心肌病等,心脏移植是一种有效的治疗手段。但是,心脏移植后的并发症仍然是阻碍移植心脏长期存活的主要因素^[1]。为了研究心脏移植基因治疗方面的相关实验,我们复制了大鼠腹腔异位心脏移植模型,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 健康雄性 Wistar 大鼠 60 只,

SD 大鼠 20 只,10 周龄左右,体质量 200~250 g,哈尔滨医科大学附属第二医院动物实验中心提供。实验组分别以 Wistar 和 SD 大鼠为供、受体;对照组以 Wistar 大鼠作为供、受体。每组供、受体各 20 只。

1.2 器械与药物 手术显微镜(上海医用光学仪器厂),显微外科手术器械(上海医疗器械有限公司),9/0 非吸收性外科缝线(杭州华威医疗用品有

基金项目:哈医大二院博士科研基金项目(BS2008-25)

作者单位:150086 哈尔滨市,哈尔滨医科大学附属第二医院老年病科(王丽平,孟佳,于卫刚);心外科(贾智博);附属第一医院心内科(刘越,尹新华)

通讯作者:贾智博, Tel:0451-86605248, E-mail: Doctor_jiazhibo@yahoo.com.cn

万方数据

限公司);10%水合氯醛(哈尔滨医科大学附属第二医院制药厂生产),心脏停搏液(由哈尔滨医科大学附属第二医院心外科提供配方:10%KCl 5 ml,25% MgSO₄ 2 ml,50%葡萄糖 30 ml,2%普鲁卡因 25 ml,5% NaHCO₃ 10 ml,地塞米松 5 mg,加林格液至 400 ml)。

1.3 供体手术 供体大鼠10%水合氯醛(3 ml/kg)腹腔内注射麻醉。将麻醉大鼠仰卧固定于手术台上,胸腹部备皮,碘酊消毒。腹正中切口开腹,显露下腔静脉,穿刺注入肝素生理盐水(125 U/ml)1 ml进行全身肝素化。剪断腹主动脉和下腔静脉放血,迅速沿双侧腋前线开胸至锁骨,向上翻起胸前壁,用冰屑包埋心脏局部降温,摘除胸腺,阻断主动脉远端,立即向主动脉根部缓慢注入冷停搏液(4℃)2~3 ml,至心脏完全停跳,在主动脉和肺动脉下过1/0丝线,一并结扎上、下腔静脉和肺静脉,提起丝线,尽可能远地剪断心脏各血管,将心脏立即放在4℃生理盐水中,用无菌冷生理盐水反复冲洗,冲出心脏及冠脉中的血液,注意勿将空气注入冠脉中。剪去多余脂肪组织,修剪主动脉与肺动脉。

1.4 受体手术 术前禁食8~10 h,麻醉固定同前,术中应用电热毯保温。腹部备皮和消毒后,取正中切口,开腹后将肠袢移出腹腔,温生理盐水包裹,用自制拉钩牵引两侧腹壁切口,暴露腹主动脉和下腔静脉,剪断并结扎腰动、静脉,肾血管平面下游离腹主动脉和下腔静脉,5/0丝线结扎背部分支。用无创血管夹在肾血管水平下阻断腹主动脉及下腔静脉近心端和远心端血流。在腹主动脉、下腔静脉上用显微剪刀分别做一直切口,与供心主动脉、肺动脉直径相当,用肝素生理盐水冲去积血。

1.5 供心移植至受体腹部术 供心用纱布包绕,纱布上持续缓慢滴注0~4℃生理盐水。在10倍手术显微镜下用9/0非吸收性外科缝线进行端侧血管吻合,先吻合供心主动脉与受体腹主动脉,将供心主动脉和受体腹主动脉切口对角缝合两针,一层连续缝合,针距与边距为0.5~1 mm,每侧缝合6~8针;同样方法缝合供心肺动脉与受体下腔静脉。缝合最后两针前,用钝性弯针头向吻合腔内注入生理盐水,排除残留空气,以防气栓形成。吻合完毕,去掉纱布,先试放远心端血管夹,随后松开近心端血管夹,检查吻合口漏血情况,压迫止血。见冠状动脉充血,心脏复跳,无出血及渗血,心脏由初始的室颤转为强有力的跳动,即可关腹,用4号丝线分两层连续缝合关腹。缝合完皮肤后,大鼠基本清醒,活动自如,并可饮水,保温30 min。

术后分笼正常喂养,不用抗生素,每天触诊腹部,了解移植心脏搏动情况。受体和移植心均存活

72h视为手术成功,统计每只供鼠的供心摘取时间、修剪时间,受体准备、动静脉吻合时间。移植术后第4天两组大鼠麻醉后做心电图检查,记录移植心脏心室率,开腹横向切取供心组织,30 s后大鼠因失血而死亡,供心组织生理盐水冲洗后用4%中性甲醛溶液固定,石蜡包埋,切片,常规HE染色,光镜下观察有无排斥反应表现。

1.6 统计学处理 应用SPSS13.0统计软件进行统计学处理,实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

2 结果

2.1 一般情况 大鼠异位(腹部)心脏移植模型成功建立。平均供心摘取时间为(3.2±0.6) min,供心修剪时间为(9.5±1.2) min,受体准备时间为(20.4±2.0) min,动脉吻合时间为(11.7±0.8) min,静脉吻合时间为(9.2±1.3) min。打开血管阻断夹后,供心经过短暂室颤后在1~2 min内复跳。共施行大鼠心脏移植术40例,至术后第4天处死大鼠前,有4例死亡(实验组和对照组各2例),手术成功率为90%。失败原因:1例吻合口出血、渗血死亡,1例在吻合血管时呼吸、心跳停止死亡,1例心脏不复跳,1例术后24 h不明原因死亡。存活大鼠均自由活动,一般状况可,3 d内无死亡。术后第4天移植心脏均维持跳动,节律规整,心率180~320次/min(图1)。

2.2 组织学观察 实验组和对照组各18只,术后第4天切取移植心脏行组织学观察。实验组HE染色组织切片,心肌组织内可见大量淋巴细胞和单核细胞浸润,呈急性排斥反应表现;对照组无急性排斥反应表现(图2)。

3 讨论

1969年,由Ono等^[2]创立的大鼠腹腔异位心脏移植模型,由于具有制作简单、成本低、有明显的成败标志(心跳)且术后观察容易等优点,迅速被国内外研究者采用^[3],并且在研究过程中,这种模型被不断改进和完善^[4]。目前基于Ono术式为基础的大鼠异位心脏移植模型已广泛应用于移植器官免疫、移植病理、器官保护和免疫抑制药物试验的研究中^[5]。本研究在现有方法的基础上,加以改良,使该模型更简便快捷。

我们亦在Ono术式基础上进行改良,成功地建立了大鼠异位(腹部)心脏移植模型。供心摘取时,在主动脉和肺动脉下过1/0丝线,一并结扎上、下腔静脉和肺静脉,然后提起丝线,同时剪断心脏各血管,然后进行供心异位移植术。结果该取心方法所



图1 对照组大鼠术后第4天心电图表现(50 mm/s)
心率 420 次/min, 供心率 320 次/min

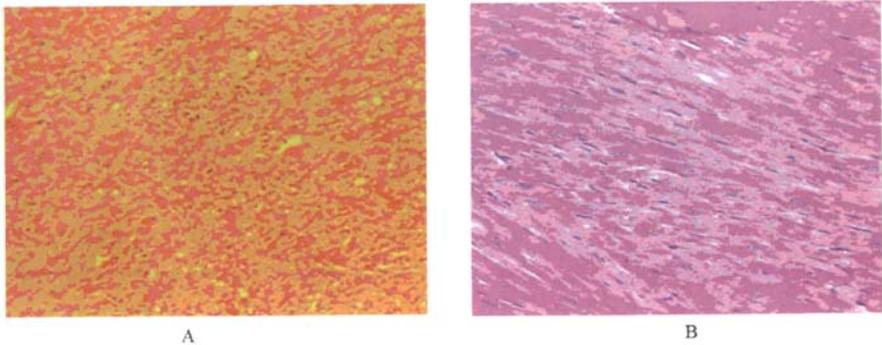


图2 术后4d两组大鼠移植心脏组织病理学观察(HE染色, ×100)
A:实验组;B:对照组

需时间仅为(3.2±0.6) min,与目前应用较广泛的改良 Ono 术式进行比较取心时间明显缩短。马毅等^[6]在进行 Lewis-DA 大鼠异位腹腔心脏移植实验中,于供心停跳后,用丝线分别结扎下腔静脉和上腔静脉,然后横断升主动脉和肺动脉,结扎其余血管,切下供心,结果取心时间为(7.2±0.8) min。翟光地等^[7]应用 SD 大鼠为受体,三色豚鼠为供者,复制了大鼠腹腔异位心脏移植模型,在取心时分别结扎、切断上、下腔静脉及主动脉弓部的三个分支,结果供心摘取时间为(4±1.5) min。范钦明等^[8]亦建立了 Wistar-SD 大鼠异位心脏移植模型,供心摘取时,分别结扎并切断上、下腔静脉,然后分别分离并断开升主动脉和肺动脉,最后再结扎和切断肺静脉,结果供心摘取时间为 5~8 min。我们克服了分别剪断主动脉与肺动脉血管并分别结扎和切断上腔静脉、下腔静脉及肺静脉费时的缺点,从而简化手术操作,缩短了供心热缺血时间。另外在心脏停搏液的选择上,本研究使用了能产生停搏作用的钾、镁溶液,与马毅等^[6]应用含肝素的林格液 5 ml 作为停搏液的实验相比,注射 2~3 ml 即可达到心脏完全停跳,提高了手术效率,停搏液中同时还含有普鲁卡因、地塞米松等成分,具有稳定细胞膜、防止细胞水肿的作用^[9]。

经过 40 例大鼠异位心脏移植模型制作,我们总结如下经验:(1)供体下腔静脉注射肝素盐水时应缓慢,太快会加重心脏负荷,引起心功能不全;(2)灌注心脏停搏液进行心肌保护时,灌注至心脏呈灰白色,完全停跳为止;(3)修剪供心应在显微镜下进行,清除多余脂肪组织,注意勿损伤主、肺动脉;(4)供心肺动脉与受体下腔静脉吻合时,因静脉口极易狭窄,应注意勿将缝合线拉得过紧;(5)行血管吻合时要注意供心局部降温;(6)术中及术后要给受体大鼠保温;(7)受体手术与供体手术宜同时进行,既可减少供心缺血时间,又可缩短受体手术时间,因此,该模型应该由两个或两个以上操作者配合完成。

通过实验组非同系(Wistar-SD)心脏移植模型,我们发现供心心肌组织呈急性排斥反应表现,对照组无急性排斥反应表现。说明采用非同系心脏移植可复制出心脏移植排斥反应模型,用于相关实验研究。大鼠异位心脏移植模型经多年的实践和探索,已有了很多改进和创新,但是,仍有继续改进的空间,需要我们不断地探索。

【参考文献】

- [1] Frances M. Outcome and complications after heart transplantation[J]. J Cardiovasc Nur, 2005, 20(55):

S31-S42.

[2] Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1969, 57(2): 225-229.

[3] David A, Chétritt J, Guillot C, et al. Interleukin-10 produced by recombinant adenovirus prolongs survival of cardiac allografts in rats[J]. Gene Ther, 2000, 7(6): 505-510.

[4] 金钟大, 陈江华. 大鼠腹腔心脏移植技术的改良[J]. 局解手术学杂志, 2004, 13(3):162-164.

[5] Demirsoy E, Arbatli H, Korkut AK, et al. A new technique for abdominal heart transplantation in rats[J]. J Cardiovasc Surg, 2003, 44(6): 747-750.

[6] 马毅, 陈细桃, 朱晓峰, 等. 大鼠异位心脏移植模型的术式探讨[J]. 中华实验外科杂志, 2005, 22(10): 1238-1240.

[7] 翟光地, 沈振亚, 胡雁秋, 等. 创建大鼠腹腔异位心脏移植模型的技巧及体会[J]. 中华器官移植杂志, 2006, 27(6): 378.

[8] 范钦明, 廖崇先, 单忠贵, 等. 大鼠颈部和腹部心脏移植模型建立的体会和比较[J]. 滨州医学院学报, 2006, 29(3): 173-175.

[9] 朱晓东, 张宝仁. 心脏外科学[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2007. 250-251.

(收稿日期:2009-01-04;修回日期:2010-03-25)

(上接第 350 页)

表 2 住院期间功能障碍脏器的数目和病死率

脏器数目	发生率(n=645, %(n))	病死率
1	5.9(38)	31.6%(12/38)
2	27.0(174)	37.9%(66/174)
3	22.3(144)	56.3%(81/144)
4	18.1(117)	76.9%(90/117)
5	18.6(120)	78.3%(94/120)
6	6.7(43)	97.7%(42/43)
7	1.4(9)	100%(9/9)

3 讨论

尽管临床上采取积极的抗感染、液体复苏及相关脏器功能支持治疗,但脓毒症总死亡率仍居高不下。年龄是预测脓毒血症和严重脓毒血症发生及死亡最有效的危险因素之一,65岁以上人群和相对年轻人群相比,其脓毒血症的发生要高 13 倍,因脓毒血症致死的危险性高 2 至 3 倍。国外一项流行病学调查研究显示,所有脓毒症患者中老年脓毒症的死亡率大约是 30%~40%,而感染性休克患者的死亡率可高达 50%以上^[1,2]。本研究结果显示,老年重症脓毒症患者的抢救仍然是临床危重病抢救治疗中的难点之一。这与老年人大多伴有各重要脏器的基础疾病、免疫功能低下以及在感染、手术、外伤等打击下器官功能迅速恶化等有密切关系。

引起脓毒症的病原菌因年龄、性别、感染部位、基础疾病、院内或社区获得性感染、机体免疫力不同而不同。近年来病原菌不断变迁。引起脓毒症的病原体,大多数为 G⁻ 杆菌, G⁺ 球菌也不少见^[4]。本研究结果显示,本组患者的病原菌 G⁻ 菌感染占

全部感染的 72.7%,提示老年脓毒症患者的致病菌仍以 G⁻ 菌感染为主。

重症脓毒症患者多器官功能障碍发生率高,病死率随着脏器功能数目的增多而增高^[5]。本研究结果显示,各器官或系统功能障碍的发生率由高至低分别为呼吸、凝血、中枢神经、心、胃肠、肾、肝。其中,发生脑功能、呼吸功能、肾功能、凝血功能、心血管功能、胃肠功能障碍组的病死率显著高于无功能障碍组。各脏器功能障碍的病死率从高到低依次为肾、中枢神经、心血管、胃肠、凝血、呼吸、肝功能障碍。病死率随着脏器功能数目的增多而增高。以上结果提示,应当积极加强对老年重症脓毒症患者的脏器功能支持、保护的综治疗。

【参考文献】

[1] Martin GS, Mannino DM, Moss M. The effect of age on the development and outcome of adult sepsis[J]. J Crit Care Med, 2006, 34(1): 15-21.

[2] Zahorec R, Firment J, Strakova J, et al. Epidemiology of severe sepsis in intensive care units in the Slovak Republic[J]. J Infect, 2005, 33(2): 122-128.

[3] Levy MM, Fink MP, Marshall JC, et al. 2001 SCCM/ESICM/ACCP/ATS/ SIS International Sepsis Definitions Conference[J]. J Crit Care Med, 2003, 31(4): 1250-1256.

[4] 郭艳青, 郑爱民, 段美丽. 脓毒症的流行病学研究进展[J]. 中国现代医药杂志, 2008, 10(8): 133-135.

[5] 张淑文, 王超, 阴赓宏, 等. 1087 例多器官功能障碍综合征临床流行病学调查[J]. 中国危重病急救医学, 2007, 19: 2-6.

(收稿日期:2009-03-25;修回日期:2010-05-31)