

大鼠腹腔内工作型心脏移植模型的改进

王竹林¹, 曹浩², 占贞贞¹, 范慧敏^{1,2*}

(1. 同济大学附属东方医院转化医学中心, 上海 200120; 2. 同济大学附属东方医院心外科, 上海 200120)

【摘要】 目的 构建大鼠腹腔内工作型心脏移植模型, 总结影响模型成功率的因素。方法 Brown Norway 到 Lewis 大鼠心脏移植 90 例, 其中预实验 50 例, 正式实验 40 例。采用肺动脉和左房吻合、主动脉和受体腹主动脉吻合的方法建立工作型心脏移植, 统计手术存活率和死亡原因, 分析确保成功率的关键因素。结果 术者通过练习, 手术成功率稳定 77.5%, 供心冷缺血时间为 (34 ± 5) min, 整个手术时间为 (71 ± 11) min。HE 染色显示移植后发生了免疫反应, 移植模型可靠。结论 决定手术成功率的影响因素众多, 其中主要因素有: 合格的实验动物、供体心脏的保护、快速有效的血管缝合和术后动物护理。

【关键词】 心脏移植; 工作型心脏; 动物模型; 免疫排斥; 大鼠

【中图分类号】 Q95-33, R617 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 02-0119-05

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.02.003

Experience and improvement in establishing an abdominal working heart transplantation model in rats

WANG Zhu-lin¹, CAO Hao², ZHAN Zhen-zhen¹, FAN Hui-min^{1,2}

(1. Research Center for Translational Medicine,

2. Department of Cardiac Surgery, East Hospital, Tongji University, Shanghai 200120, China)

【Abstract】 Objective To modify the techniques for establishment of an abdominal working heart transplantation model in rats and to sum up the key factors to success. **Methods** A total of 180 12-week old Brown Norway rats (donor) and Lewis rats (recipient) were used in this study; 50 BN rats and 50 Lewis rats for pilot experiment, and 40 BN rats and 50 Lewis rats for the formal experiment. The rat model of working heart heterotopic transplantation was adopted and established by Wiedemann's mode. We transplanted the heart from BN rats to Lewis rats and analyzed the survival rate, causes of death and histological changes of the heart (HE staining) in this experiment. **Results** After exercise and modification, the survival rate was increased to 77.5%, and the mean total duration of operation was 71 ± 11 min, and the mean ischemic time of the donor hearts was 34 ± 5 min. Histological examination (HE staining) of the cardiac allograft showed a mild inflammatory cell infiltration in the graft at 24 h after transplantation, indicating that the model was reliable. **Conclusions** A variety of factors may affect the final operation success rate in the establishment of this heart transplantation model. Among them, the major affecting factors include: healthy animals, donor heart protection, rapid and effective vascular suture, and postoperative animal management.

【Key words】 Working heart transplantation; Rat; Animal model; Surgery; Immunological rejection

【基金项目】 上海领军人才(2012-053); 上海市浦东新区卫生系统领先人才(Grant No. PWR12011-01); 上海市医学重点专科心脏外科(ZK2012A27); 上海市浦东新区卫生系统重点学科群(Grant No. PWZxq2014-01); 教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20130072120062); 上海市青年科技启明星计划(13QA1403100); 上海市浦东新区卫生、计生科技项目(PW2013A-2); 上海市东方医院启航计划(DFQH-M4)。

【作者简介】 王竹林(1988 -), 男, 硕士在读, 研究方向: 移植免疫; Email: easthospitalzhulin@163.com。

【通讯作者】 范慧敏(1964 -), 男, 教授、主任医师, 博士, 研究方向: 移植免疫、干细胞治疗; E-mail: frankfan@tongji.edu.cn

目前心脏移植的研究中,大鼠心脏移植模型被广泛应用。按照功能分为工作型和非工作型心脏移植,其中非工作型心脏已被广泛推广。但非工作型心脏长期处于无功能、无负荷的空搏状态,可导致心肌收缩蛋白合成减少,移植后发生心肌萎缩^[1]。相比之下,工作型心脏移植模型更接近于正常心脏的功能状态,具有良好的现实意义。然而,影响工作型心脏移植术成功的因素较多,手术难度较高。全面了解影响手术成功的因素对于初学者快速提高手术成功率具有重要作用。本研究在前人的基础上^[2,3],复制腹腔工作型心脏移植的制作流程,分析总结了在传统 Wiedemann 术式的手术要点,并在供体心脏血管的集束结扎操作和受体腹主动脉的暴露阻断操作等方面提出改进,以期对初学者提供更多经验。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级 Brown Norway 大鼠 90 只,12 周龄,体重 250 ~ 300 g; SPF 级 Lewis 大鼠 90 只,12 周龄,体重 300 ~ 350 g, 购于北京维通利华实验动物中心【SCXK(京)2012-0001】,雌雄不拘。其中预实验 50 例(Brown Norway 大鼠和 Lewis 大鼠各 50 只),正式实验 40 例(Brown Norway 大鼠和 Lewis 大鼠各 40 只)。动物饲养于同济大学实验动物中心屏障环境[SYXK(沪)2009-0022]。

1.2 手术方法

1.2.1 麻醉

腹腔注射 1.5% 戊巴比妥(40 mg/kg),注射后 5 ~ 8 min 就进入适宜麻醉状态(以肢体对疼痛无反射为标准)。稳定麻醉后,观察大鼠的呼吸平稳后,进行手术。

1.2.2 供心的取材

Brown Norway 大鼠麻醉后,脱毛、仰卧固定、消毒铺巾,沿腹正中线开腹,轻柔牵出肠袢,露出肝门静脉,注射 100 U 肝素(2 mL 肝素盐水),静置 2 min 待全身肝素化后,沿腋中线剪断肋骨开胸,向上翻开胸骨充分暴露胸腔。迅速钝性分离覆盖于主动脉上方的胸腺,暴露主动脉和主动脉弓。将准备好 0℃ 心脏保护液从心脏主动脉灌注心脏,直至心脏肌层血液冲净变白。此时心腔内可能依然存留一定量血液,但由于已经肝素化不会凝血。灌注后,如果心肌仍未完全停搏,将之前准备的生理盐水冰屑放在心

脏表面,低温停搏。停搏后,使用 3-0 丝线靠近近端结扎上下腔静脉,然后将 3-0 丝线穿行于结扎的上下腔静脉背侧和主动脉根部背侧,将剩余的包括肺动静脉、左上腔静脉全部尽量靠近远端结扎(如图 4),此时避免结扎或破坏左右心房。然后用眼科剪游离整个心脏,游离后将心脏迅速放入事先准备自制冰盒的湿冷纱布中低温保存。

1.2.3 供心的处理

清理结扎远端多余的组织和血管,剪开肺动脉以及左心房的近肺动脉侧边缘,左房切口可稍大于肺动脉断口,采用连续缝合法用 8-0 带针缝合线将二者吻合。缝合前需将肺动脉和左房吻合口修饰平整,并避免肺动脉扭曲打折影响再通。修饰主动脉,去除主动脉附近脂肪组织、胸腺残余以及心包膜等,预留主动脉约 2 mm,将断端修剪平整后,在主动脉断口两端,从外侧向内侧穿两根 8-0 带针缝合线与血管壁上,预留备用。以上操作均在冰盒内低温完成。准备好后,将供心用湿纱布盖好低温保存备用。

1.2.4 受体的准备

受体 Lewis 大鼠术前禁食不禁水过夜准备。麻醉后,腹部剃毛、仰卧固定、消毒后,沿腹正中线开腹。用 3-0 丝线左右牵引拉开腹壁,轻柔牵出肠袢,用温生理盐水纱布包裹后置于切口右上侧,充分暴露后腹壁。用显微镊钝性分离后壁腹膜和可能存在的脂肪组织,暴露腹主动脉从肾动脉到髂动脉分支(此段动脉侧支较少),小心钝性分离腹主动脉和伴行下腔静脉约 8 mm 即可。上下端各穿行 3-0 丝线,绕行 2 周后,用血管钳重力牵拉阻断上下血流(如图 3)。用 29G 注射针头于阻断动脉正上方扎一小口,然后用显微剪平行血管方向剪约 3mm 切口,应一剪完成,防止切口锯齿存在。用肝素生理盐水冲去血液残存,除净血管内和附近的血丝及其他可能组织杂物。至此受体准备完毕。

1.2.5 心脏移植和复跳

受体准备完毕后,将处理好的供体心脏,带湿冷纱布片共同放入受体腹腔,并带冰屑降温。对齐位置,并再次对受体腹主动脉切口长度进行修整,应保证在两端固定后不存在张力的前提下,扩大切口。供心的吻合采用两端固定双侧连续缝合法,边距 1 mm、针距 0.7 mm,90°端侧吻合供心主动脉和腹主动脉。一侧缝合完毕,反转心脏吻合另一侧前,先检查之前吻合质量,然后继续缝合,吻合到最后两针前,用肝素盐水排气后,缝合两端打结。缝合过程中

要防止器械损害心房。吻合完成后,减小阻断血管的牵引线的张力,再通腹主动脉血流,检查吻合质量,如有少量渗血,用消毒棉压迫止血即可。如果有大量出血则重新牵拉阻断血流,补针缝合。一般血管阻断时间控制在 40 min 内不会引起大鼠术后下肢瘫痪。确定吻合可靠后,剪断取下牵引线,再通血流,供心会迅速充盈,并在 15 s ~ 1 min 内由室性心律失常复跳至窦性心率 (>120 次/min)。如果复跳不良,则应采用心脏按摩法,保证心脏内血液循环起来,一方面防止血凝,另一方面持续为供心心肌供血恢复心肌活力。在吻合良好的情况下,最多按摩 5 min 即可成功复跳。复跳后,温盐水冲洗肠袢并复位,并观察 3 min,如无供心心率减慢吻合口出血等情况,则可以关腹。

1.2.6 术后恢复和护理

良好的血管吻合是手术成功的重要因素,但良好的术后护理对大鼠的术后存活至关重要。关腹消毒后,根据出血量皮下补液 2 ~ 3 mL(羟乙基淀粉氯化钠注射液),伤口滴加 1 mL 利多卡因局部麻醉镇痛,将大鼠放在加热保温垫上,保温苏醒。注意体位,应保持侧卧位,不可采用俯卧姿势,防止体重压迫供心,使吻合口扭曲,以致供心缺血停跳。一般吻合口良好无渗漏血的情况下,2 h 即可完全苏醒,单鼠单笼,给予正常饮食。每日触诊腹部供心的搏动情况。一般在受体大鼠苏醒后 24 h,触诊供心心率每分钟大于 120 次,为移植成功。

1.3 统计分析

统计分析采用 SPSS 软件 20.0 版本进行(IBM, 美国)。所有计量资料结果都采用均值 \pm 标准差 (SEM \pm SD) 形式表示,独立样本的 *t* 检验比较不同两组之间计量资料的差别,*P* 值小于 0.05 ($P < 0.05$) 为有统计学差异。手术成功率和死因统计采用频数统计和比例的形式表示,差异检验采用单侧 *Z* 检验, $\alpha = 0.05$ 为显著性水平。

2 实验结果

2.1 手术质量评估

以上手术流程可实现单人操作,在预实验 50 例中,存活 6 例,存活率仅 12%,供心热缺血时间平均小于 30 s,冷缺血时间为 (56 \pm 8) min,整个手术流程时间为 (97 \pm 12) min。正式实验中,术者掌握手术过程中的各个环节后,后期的 40 例,存活 31 例,存活率提高到 77.5%,供心热缺血时间小于 30 s,

冷缺血时间为 (34 \pm 5) min,整个手术时间为 (71 \pm 11) min。经过系统的显微外科操作训练后,手术时间得到缩短 ($P < 0.05$) 和手术成功率大幅度提高。

2.2 死因统计

在整个建模过程,全部 90 例手术中,我们对大鼠死因进行统计,并对预实验和正式实验死因差别分别统计。预实验 50 例中,44 例失败,其中吻合后出血 19 例,吻合后不通 8 例,心脏复跳不良 5 例,术后不明死亡(低温或失水)5 例,下肢瘫痪 3 例;经过预实验训练和经验总结后,正式实验 40 例中,失败 9 例,其中吻合后出血 6 例、心脏复跳不良 1 例,术后不明死亡(低温或失水)2 例。在总计 10 例复跳不良中,损伤右心房 3 例,未肝素化 2 例,高钾导致复跳不良 2 例,低温保存缺失 2 例,保护液灌注不确切 1 例。

2.3 心脏移植术后 24 h 病理

同种异体心脏移植后 HE 染色发现,受体心脏心肌无异常表现,心肌细胞间无明显炎症浸润(如图 1);供体心脏心肌间可以发现少量细胞浸润,但炎症反应并不明显(如图 2)。可见此心脏移植模型,术后 24h 内并没有发生急性移植物排斥反应。

2.4 手术改进

我们在原方法基础上主要做了三个改进:(1)在修剪供体心脏的时候就将带针缝合线预留在切口两端,节省了血管吻合时间,缩短受体大鼠腹主动脉血流阻断时间。(2)术中采用 3-0 丝线环绕两周后血管钳牵拉阻断腹主动脉血流,此法视野暴露清楚、再通操作简单、牵引抬高可以规避腹膜后脂肪的阻挡作用(如图 3)。(3)集束结扎供心血管时,结扎完上下腔静脉后,采用将丝线穿行于前后腔静脉以及主动脉背侧,然后集束结扎剩下全部血管,此法有上下腔静脉和主动脉牵引,就能很容易地避免结扎到左右心房(如图 4)。

3 讨论

工作型心脏移植模型能够很好地模拟移植后心脏的工作状态,对于研究心脏移植后发生的急慢性免疫排斥反应、心力衰竭和心肌纤维化等病理过程具有良好的价值^[4]。该模型的血液循环过程为:主动脉—冠状动脉—微血管—冠状静脉—右心房—右心室—肺动脉—左心房—左心室—主动脉。供体心脏移植到腹主动脉,感染机率小、再通成功率高,尽管不容易直接观察到移植心脏的存活搏动情况,但

依然可以通过触诊得知。我们以大鼠心脏移植 24 h 后,大鼠状态良好、能够自由取食、供心触诊心率每分钟大于 120 次为心脏移植成功标准。

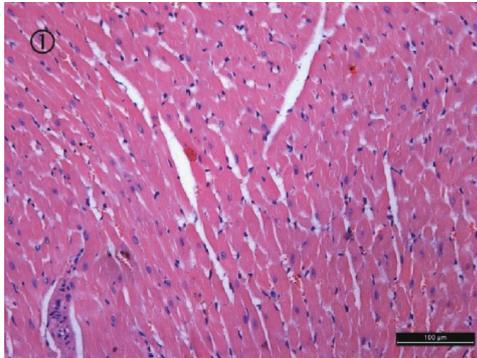


图 1 心脏移植 24 h 后受体 BN 大鼠心脏 (HE, 标尺 = 100 μm)

Fig. 1 The myocardial cells of a Brown Norway rat at 24 h after heterotopic working heart transplantation surgery (HE staining, Bar = 100 μm)

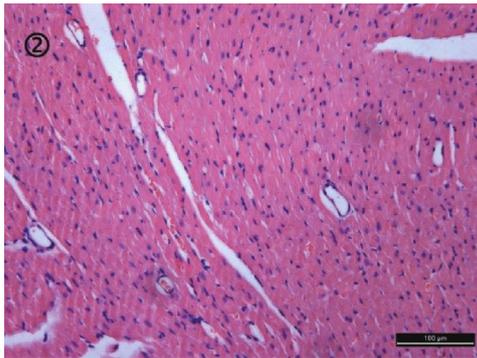


图 2 心脏移植 24 h 后供体 Lewis 大鼠心脏 (HE, 标尺 = 100 μm)

Fig. 2 Myocardial cells of a Lewis rat at 24 h after heterotopic working heart transplantation surgery. (HE staining, Bar = 100 μm)



图 3 阻断腹主动脉血流方法的改进

Fig. 3 The modified technique for blocking abdominal aorta



图 4 集束结扎心脏血管方法的改进

Fig. 4 The modified technique for cluster ligation of the heart arteries and veins

3.1 手术改进

我们在原方法基础上主要做了三个改进(1)在修剪供体心脏的时候就将带针缝合线预留在切口两端,节省了血管吻合时间,有效地缩短受体大鼠腹主动脉血流阻断时间和供体心脏热缺血时间。多数文章中采用动脉血管夹或者缝线结扎阻断腹主动脉血流^[2,5]。(2)采用 3-0 丝线环绕两周后血管钳牵拉阻断血流,不仅视野暴露清楚、再通操作简单,而且牵引抬高可以规避腹膜后脂肪的阻挡作用。(3)采用的穿线集束结扎肺动脉、肺静脉等血管有效地避免集束结扎操作容易结扎左右心房的问题。

3.2 经验总结和影响因素分析

影响大鼠腹主动脉工作型心脏移植手术结果的主要因素可以概括为三方面:血管吻合、心肌保护和围手术期管理。

3.2.1 血管吻合

血管吻合导致死亡的表现吻合后出血、吻合后堵塞和吻合后主动脉扭曲等。吻合前,一方面主动脉修剪时预留短(约 2~3mm),能够有效地预防吻合后血管扭折的发生;另一方面受体腹主动脉切口应预切短一点,待供心缝合时再调整,防止切口预切过大而需要额外缝合腹主动脉。在吻合过程中,采用两端固定双侧连续缝合法,边距 1 mm、针距 0.7 mm,每针均需适当拉紧能有效地防止出血渗血的发生。有报道认为心脏端侧吻合采用一定角度能够增大了吻合口截面,增加再通血流^[6],术者在实践中认为直角缝合较适合,可以满足一定的前后负荷和有效的心肌供血。总之,不同精准的显微外科技术是保证血管吻合成功的关键,稳定持续的显微外科练习能够有效地提高血管吻合水平。

3.2.2 供体心脏保护

供体心脏移植后能否成功复跳,一方面取决于缝合质量,能不能有效供血;另一方面则决定于心肌的保护。心肌的保护主要涉及四个方面:低温湿润、保护液、肝素化和避免机械损伤。笔者在建模中使用自制冰盒和湿纱布覆盖保持供心低温湿润,在吻合过程中也使用湿冷纱布覆盖心肌,供心灌注的保护液也预先处理到 4℃ 低温。另外心肌保护液要灌注充分,本研究使用的心肌保护液是自配的,值得讨论的是保护液中钾离子的浓度,高钾停跳液主要是促使心脏停跳,缩短热缺血的时间,但术者在手术中发现在移植后心脏复跳中,高浓度钾离子灌注过的心脏恢复自主跳动的的时间延长,需要长时间心脏按摩来辅助,增加了手术时间。我们使用钾离子浓度为 6 mmol/L 的保护液,既能保证心脏钾离子平衡为心脏提供 1h 以上的有效保护,又能保证血流再通后及时复跳,降低心脏按摩对心脏的影响。此外,供体取材前的全身肝素化对心脏的保护也具有重要意义,术者在实验中就有 2 例因为取材前忘记进行全身肝素化处理,导致移植后供体心脏微循环堵塞,再通后复跳不良。因此良好的肝素化处理是对保护心脏微循环的重要步骤。最后,在心脏复跳时,如果发现心率一直较慢(约 40 ~ 50 次/min),应检查是否在集束结扎时破坏了右心房导致的室性心律。

3.2.3 动物围手术期管理

手术的成功很大程度决定于血管吻合质量,良好的血管吻合和较短的手术时间都可以大大地提高术后动物的生存率。但围手术期动物管理是稳定成功率的前提保障。严格按照 3R 原则管理饲养,保证实验大鼠健康、对麻醉和手术创伤耐受良好等。

术后关键的问题就是保温和补液,一般来讲,双侧术腋窝皮下补液 2 mL 的 5% 碳酸氢钠水比术后补液效果好,但如果术中出血量较大,则需要术后补充 1 ~ 2 mL 羟乙基淀粉溶液,以保证胶体渗透压。将大鼠放置在保温垫上保温,应采用侧卧位,一方面防止俯卧位压迫供心主动脉发生弯折,一方面防止仰卧位气管分泌物窒息。

总之,工作型心脏移植是个系统的工程,需要术者具备良好的显微外科技能的基础上,全面掌握影响手术的各个方面,从而有效地提高和保证模型构建的稳定性和可靠性。

参 考 文 献

- [1] Klein I, Hong C, Schreiber SS. Cardiac atrophy in the heterotopically transplanted rat heart: in vitro protein synthesis [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1990, 22(4): 461 - 468.
- [2] 曹浩, 范慧敏, 张治国, 等. 大鼠工作型异位心脏移植模型的建立 [J]. *同济大学学报*, 2010, 31(6): 1 - 4.
- [3] Klima U, Guerrero JL, Levine RA, et al. A new biventricular working heterotopic heart transplant model: anatomic and physiologic considerations [J]. *Transplantation*, 1997, 64(2): 215 - 222.
- [4] Wiedemann D, Boesch F, Schneeberger S, et al. Graft function after heterotopic rat heart transplant with an isolated reperfused working heart: a methodic consideration [J]. *Exp Clin Transplant*, 2012, 10(2): 154 - 157.
- [5] 陈浩, 梅运清, Michael A Solomon. 大鼠腹腔内心脏移植模型的构建和体会 [J]. *中华医学杂志*, 2012, 92(24): 1715 - 1718.
- [6] 夏春秋, 景华, 程晓峰, 等. 工作型大鼠异位心脏移植模型的建立 [J]. *医学研究生学报*, 2005, 18(4): 330 - 333.

[收稿日期] 2015-01-16