



# 一种新型大鼠动脉移植模型的建立

孙来龙<sup>1,2</sup>, 杜剑平<sup>1</sup>, 刘朝兵<sup>1,2</sup>, 张松林<sup>1,2\*</sup>

(1. 三峡大学第一临床医学院, 湖北 宜昌 443002; 2. 宜昌市中心人民医院胸心大血管外科, 三峡大学心血管病研究所, 湖北 宜昌 443002)

**【摘要】** 目的 移植物血管病(allograft vasculopathy, AV)限制着移植器官功能及远期存活,是器官移植领域最迫切需要解决的世界性难题。传统的血管缝合方式需要优秀的显微外科技术,开展困难。探索出更为简便、可行的动脉移植方法,可为临床研究 AV 提供思路。**方法** 采用静脉留置针管自制血管套管,取供体大鼠胸主动脉牵拉入套管并两端翻转、结扎固定为移植体,将该移植体植入受体大鼠腹主动脉并于造模后1周、4周、8周取移植段动脉行 HE 染色,观测移植血管形态、测量内膜厚度。**结果** 40 只受体大鼠中有 38 只健康存活达所需检测时间点,下肢及尾巴活动自如、大小便正常,且 HE 染色可见移植段血管内膜表现为与 AV 一致的同圆心样增厚。**结论** 此种大鼠动脉移植方法简便可行,较传统血管缝合方法可明显缩短腹主动脉阻断时间、减轻受体大鼠的手术创伤、造模成功率高,可复制性强。

**【关键词】** 移植物血管病;移植;模型

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2017) 05-0099-04

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2017.05.021

## A new model of rat artery transplantation

SUN Lai-long<sup>1,2</sup>, DU Jian-ping<sup>1</sup>, LIU Chao-bing<sup>1,2</sup>, ZHANG Song-lin<sup>1,2\*</sup>

(1. First clinical medical college of the Three Gorges University, Yichang 443002, China;  
2. Central People's Hospital of Yichang, Yichang 443002)

**【Abstract】 Objective** Allograft Vasculopathy (AV), which limits the function and long-term survival of transplanted organs, it is the most urgent problem need to be solved in the field of organ transplantation. Traditional vascular anastomosis requires excellent microsurgical techniques, it is difficult to carry out. To explore a simple and feasible AV model can provide ideas for clinical research. **Methods** We make vessel cannulas by using vein detained needles, pulling the thoracic aorta of donor rat in vessel cannula, both ends turned over and fixed, and then transplant it in recipient rat abdominal aorta. 1, 4 and 8 weeks after transplantation, we take out of the transplanted arteries, HE stain, to observe the histomorphology and measurement the vascular intimal thickness. **Results** 38 of the 40 recipient rats healthy survival to the detection time points, the legs and tail can move freely, defecating and urinating normally. It is found that transplanted arteries concentric circles thickening, its histomorphology just like the AV by using HE staining. **Conclusions**

The method of rats artery transplantation is simple and feasible, significantly shorten the time of abdominal aortic blocking, reduce surgical trauma, can improve the success rate and the reproducibility of operation.

**【Key words】** Allograft vasculopathy; Transplantation; Model

[作者简介] 孙来龙(1989-),男,硕士生,医师,研究方向:心肺移植的基础与临床研究。E-mail: 136284046@qq.com

[通讯作者] 张松林(1975-),男,博士生,副主任医师,研究方向:心肺移植的基础与临床研究。E-mail: zhangsonglin1101@sina.com

AV 是由免疫因素和非免疫因素共同介导的移植血管内膜损伤和病理性过度修复,导致移植血管同心圆样增厚、管腔狭窄的一种移植后血管疾病。对 AV 发病机制及治疗的研究一直以来是器官移植领域研究的热点。传统的血管缝合需要优秀的外科团队及精细娴熟的显微外科操作技术,不利于 AV 研究的顺利开展及推广。我们在学习、尝试各种目前已有的 AV 造模,综合各种造模方式的利弊后总结出此种套管法大鼠胸主动脉腹腔移植模型,此法过程简便、可复制性强、受体大鼠手术创伤小,可为临床研究 AV 提供一个可行的思路。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级别雄性 Wistar 大鼠 20 只,体重 120 ~ 150 g, 5 ~ 6 周龄,购自北京华阜康生物科技股份有限公司 [SCXK(京)2014-0004]; SPF 级别雄性 SD 大鼠 40 只,体重 300 ~ 330 g, 8 ~ 9 周龄,购自三峡大学医学院实验动物中心 [SCXK(鄂)2011-0012]。实验操作完成于三峡大学第一临床医学院中心实验室 [SYXK(鄂)2011-0061]。并按实验动物使用的 3R 原则给予人道的关怀。

### 1.2 主要仪器及材料

XTL-165 双目外科显微镜(江西凤凰光学股份有限公司); 16 G、20 G 静脉留置针(BD 公司); P1 F6 输尿管导管(张家港沙工医疗器械公司); 8-0 及 9-0 显微带针缝合线(宁波医用缝针有限公司)。

### 1.3 实验方法

手术操作过程简便,除移植体植入受体大鼠腹主动脉过程时需一名助手外,其余操作过程一人即可顺利完成。1 只供体 Wistar 大鼠胸主动脉取出后可制作 2 个血管移植体移植给 2 只受体 SD 大鼠,节约动物资源。

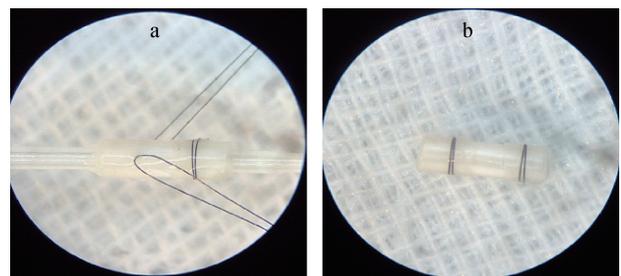
#### 1.3.1 供体手术

以 Wistar 大鼠为供体,术前禁食 12 h,自由饮水。以 10% 水合氯醛(35 mg/kg)腹腔注射麻醉,麻醉生效后将大鼠固定在垫有纱布的解剖台上。胸腹部备皮,碘伏消毒后铺无菌纱布于切口四周,取尿道口上 1 cm 处至剑突下切口入腹,用钝头无齿镊将胃管、肠管牵拉于腹腔左侧。剪开后腹膜暴露腹主动脉及下腔静脉,用剪刀剪断腹主动脉及下腔静脉快速放血,用纱布沾去血液,直到血液放尽。在

剑突下向两侧横形剪开腹壁和膈肌,分别于两侧腋中线处剪断肋骨,将胸壁上翻,暴露胸腔内脏器。小心分离出胸主动脉,显微镜下剥离动脉外层脂肪组织,剪断肋间动脉时保留断端约 1 mm 左右(断端血管弹性回缩,既可防止漏血,也保证了胸主动脉完整性)。切取全长胸主动脉,肝素生理盐水反复冲洗干净,手术刀切取中间两段约 7 mm 粗细均匀且较直的动脉以制作移植体。

#### 1.3.2 移植体制作

16 G 静脉留置针管(内径 1.5 mm,外径 1.7 mm)壁薄,材质坚韧,是自制血管套管的良好选择。10 支 16 G 静脉留置针可制作 40 个血管套管。以锋利的手术刀切取每段长度约 4 mm 的静脉留置针套管保证两个断端面光滑、平整。以 8-0 显微缝线缝于血管一端,牵引上述所取的移植血管通过套管。此时,将 20 G 静脉留置针管插入该段移植动脉以便于套管的固定及动脉的翻转。调节移植段血管于套管正中间。使用 8-0 显微缝线缝于血管一端两对称位置,反向牵拉血管使血管翻转于自制套管上,抽出用于牵拉的 8-0 显微缝线,将翻转血管打结固定。同样的方法翻转血管的另一侧并打结固定(见图 a),抽出 20 G 留置针管后(见图 b)将移植体保存于 4℃ 生理盐水中备用。在制作移植体的过程中应使用生理盐水保持血管湿润,避免血管损伤。经我们的大量造模实验证实供体 120 ~ 150 g Wistar 大鼠降主动脉外径与 16 G 留置针套管内径相当,且 16 G 留置针套管外径与 300 ~ 340 g SD 受体大鼠腹主动脉内径相当。



注:(a)反向牵拉,翻转血管;(b)制备完成的移植体。

图 1 移植体制作

Note. (a) Reverse pull and turn the artery; (b) Prepared graft.

Fig. 1 Preparation of graft

#### 1.3.3 受体手术

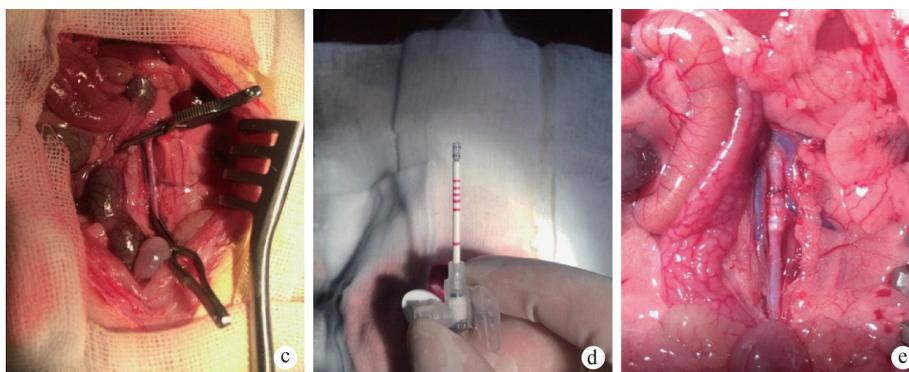
受体 SD 大鼠术前准备、麻醉、体位及固定、消毒铺巾、腹部切口同上述供体手术。开腹后用腹部撑开器暴露腹腔内容物,用钝头镊将胃管及少量肠

管轻轻牵拉于腹腔左侧的温盐水纱布上,另取一块温盐水纱布覆盖于牵拉至腹腔左侧的胃肠管。剪开后腹膜暴露腹主动脉及下腔静脉,在显微镜下小心游离肾动脉平面下方约 1~1.5 cm 腹主动脉,取一只动脉夹夹闭腹主动脉左、右髂总分叉处上约 3~4 mm 处,另取一只动脉夹夹闭上述游离段动脉最上缘(如图 c)。将一段较 20 G 静脉留置针软管约短 5 mm 的 P1 F6 输尿管导管套于 20 G 留置针管外,此时制备好的移植体可恰好置于其末端便于插入腹主动脉(如图 d)。于近心端动脉夹下约 4~5 mm 处剪开约 1/2 周径血管,远心端血管断端两角及正中间断缝三针 9-0 显微缝线起牵拉作用,分别向上、向左、向右三个方向牵拉三根缝线并将移植体向腹主动脉断端远心端完全插入。将三针用于牵拉的缝线缝合剪口(注意:三针均缝合后才能依次打结)。先开放远心端动脉夹,见无漏血后再开放近心端动脉夹(若有漏血应夹闭近心端动脉夹,在漏血处补缝一至两针)。观察到移植体远心端动脉充盈并搏动为移植体植入成功(见图 e)。温盐水冲洗腹腔 2~3 次后将胃管、肠管放回腹腔,关腹后送动物房。术后禁食 12 h,自由饮水。观察大鼠活

动,48 h 大鼠自由活动可视为手术成功。若术后,大鼠下肢瘫痪、大小便失禁、尾巴僵直、发凉变暗考虑为移植失败。

## 2 结果

经过造模预实验后,正式造模的 40 只 SD 大鼠中,有 38 只均能存活达实验观测时间点,且受体大鼠下肢、尾巴活动自如、大小便正常。有 1 只 SD 大鼠在向远心端插入移植体时感阻力极大,不幸撕裂腹主动脉而导致失败;有 1 只大鼠术后下肢活动障碍、尾巴僵硬,并于术后第三天死亡,考虑为移植体管腔或剪口缝合处狭窄导致远端供血不足。数据分析发现供体胸主动脉获取至剥离干净平均时间为(20±2)min;移植体制作平均时间为(6±1)min;受体移植手术总时间平均为 45±4 min,其中腹主动脉阻断时间平均约(7±2)min。由于总手术时间、腹主动脉阻断时间短,本实验中未使用肝素及抗生素,术后约 1 h 大鼠即可苏醒并逐渐恢复正常活动。移植后 1 周、4 周、8 周(n=12)取出移植段血管,用肝素生理盐水冲洗管腔置于 4% 多聚甲醛中固定以供后期行 HE 染色。

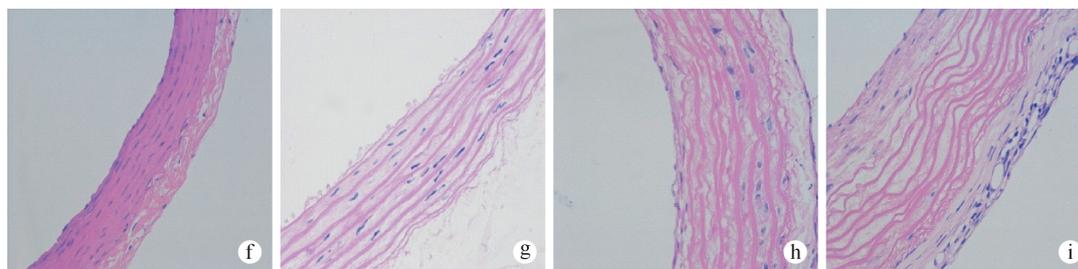


注:(c)阻断腹主动脉;(d)移植体的放置;(e)移植手术成功。

图 2 受体手术

Note. (c) Abdominal aorta occlusion; (d) Placement of graft; (e) Successful transplantation.

Fig. 2 Receptor surgery



注:(f)正常对照组;(g)移植术后 1 周;(h)移植术后 4 周;(i)移植术后 8 周。

图 3 移植动脉 HE 染色(×400)

Note. (f) Normal control group; (g) 1 week after transplantation; (h) 4 weeks after transplantation; (i) 8 weeks after transplantation.

Fig. 3 HE staining of graft artery

移植段动脉 HE 染色结果分析:正常对照组血管:内膜、中膜、外膜完整,中层弹力纤维排列整齐;移植 1 周:血管内皮明显剥脱,内膜附着少许炎细胞及血栓;血管壁明显水肿,少许炎细胞浸润;移植 4 周:血管内膜逐渐增厚,中层弹力纤维排列欠整齐,少许炎细胞浸润;移植 8 周:血管内膜明显同心圆样增厚,中层弹力纤维排列紊乱,偶见断裂,亦可见炎症细胞浸润。

HE 染色可见血管组织形态总体表现为 AV 一致的改变。下列表 1 示各时间点 12 只受体大鼠移植血管内膜平均厚度:

表 1 各时间点移植动脉内膜厚度( $\bar{x} \pm s, \mu\text{m}$ )

Tab. 1 Intimal thickness at each time point

组别 Group	内膜厚度 Intimal thickness
对照组 Control group	4.56 ± 0.08
1 周组 1 weeks group	4.72 ± 0.03
4 周组 4 weeks group	38.76 ± 3.62
8 周组 8 weeks group	87.45 ± 4.27

### 3 讨论

#### 3.1 经验及体会

在造模学习、尝试的整个过程中,我们经历过多次不同原因的失败。在不断改进、摸索中才总结出此种简便可行的套管法大鼠主动脉移植模型。现将造模过程中的体会分享如下:(1)制作套管时,用锋利刀片切割 16G 留置针管,确保长度一致、边缘修剪整齐以保证移植血管长度一致及减少对移植动脉的损伤;(2)制作移植体时,20G 静脉留置针的使用可以很好的固定套管,便于翻转血管及打结固定;(3)翻转移植动脉时用两把显微镊子或者缝合血管壁反向牵拉缝线均能较好地翻转动脉;(4)为防止移植体插入腹主动脉时移植体上动脉滑动,固定套管上移植动脉至少需要两股线,打结固定前应将血管两端牵平、理顺,保证移植动脉紧贴套管内壁;(5)实验过程中我们发现大鼠的腹主动脉的直径与大鼠体重、与大鼠平时活动量、大鼠手术前交感兴奋程度等多种因素有关,一般大鼠体重低于 300 g、平时活动量少或手术前大鼠交感过度兴奋导致心率极快及血管收缩时,移植体的插入将较困难;(6)受体大鼠麻醉前可先轻微牵拉其尾巴促进其排便,因为肛门上段肠管正位于腹主动脉及下腔静脉之上,阻挡手术视野;(7)分离腹主动脉和下腔静脉是手术关键点及难点,须十分小心,一旦分离出血,难以继续分离;(8)插入移植体前在腹主动脉远心端缝合三针时确保缝合到腹主动脉内膜、中膜、及外膜三层结构,可避免移植体插入到动脉夹层中。由

助手水平向右牵拉大鼠右侧缝线、垂直向上牵拉中间缝线,术者左手水平向左牵拉大鼠左侧缝线,右手持移植体插入腹主动脉剪口中。此过程是手术中另一极其关键的步骤;(9)缝合剪口时,待三针全部缝合后,再逐一打结,若先打结,缝合下一针时找进针点及出针点困难,甚至进针过深可能缝合到动脉后壁。

#### 3.2 AV 研究模型比较

AV 的研究模型以 Ono 和 Lindsey<sup>[1]</sup>开创的大鼠心脏移植最为经典,将供心移植至受体腹腔中,供心主动脉与受体腹主动脉行端侧吻合,供心肺动脉与受体下腔静脉行端侧吻合。在这种技术基础上,Heron 等<sup>[2]</sup>采用套管技术进行兔和大鼠颈部异位心脏移植。运用心脏移植模型来研究 AV 需要切开心脏来检测所有脉管<sup>[3]</sup>,操作困难且由于不同个体心脏冠脉系统常存在变异,难以形成平行对照。后来,主动脉移植模型来研究 AV 逐渐被国内外研究者所认同并采用<sup>[3-5]</sup>。由于血管端端吻合或者端侧吻合对显微缝合技术要求高,且易发生吻合口出血和(或)狭窄,即使同一术者每次缝合的差异性可能会很大。为进一步简化实验模型,孙文字等<sup>[4]</sup>使用 Teflon 管进行大鼠胸主动脉腹腔移植,该套管分为管体和延长部两部分,制作相对较复杂;李平等<sup>[5]</sup>也利用自制聚乙烯套管完成大鼠胸主动脉腹腔移植,较孙文字等的方法在套管设计上有些改进。我们尝试并总结前人经验的基础上发现我们的造模方式可能更加简便,在移植体插入腹主动脉后仅需要在肉眼下缝合 3~4 针即可,大大缩短了动脉阻断时间及整体手术时间,减轻了对大鼠的手术创伤,提高了手术成功率和模型稳定性,容易学习和推广。

#### 参考文献:

- [1] Ono K, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1969, 57(2): 225-229.
- [2] Heron I. A technique for accessory cervical heart transplantation in rabbits and rats[J]. Acta Pathol Microbiol Scand A, 1971, 79(4): 366-372.
- [3] Stubbendorff M, Deuse T, Hammel A, et al. Orthotopic aortic transplantation: a rat model to study the development of chronic vasculopathy [J]. J Vis Exp, 2010, (46).
- [4] 孙文字,刘蔚,孙军远,等.大鼠胸主动脉腹腔移植模型的技术改良[J].中国胸心血管外科临床杂志, 2000, 7(2): 141-142.
- [5] 李平,高思海,赵金平,等.大鼠胸主动脉腹腔移植模型的建立及改进[J].中国组织工程研究与临床康复, 2007, 11(51): 10226-10229.

[收稿日期]2016-09-07