

• 技术与方法 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2019.11.030

网络首发 <http://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.r.20190429.1648.018.html>(2019-05-05)

连续缝合端侧吻合技术建立大鼠腹腔异位心脏移植模型的研究*

肖宗宇¹, 汪 继^{2,3}

(1. 青海大学附属医院神经外科, 西宁 810001; 2. 南方医科大学研究生院, 广州 510000;

3. 解放军总医院第七医学中心, 北京 100700)

[摘要] **目的** 对经典 Ono 式异位心脏移植模型进行改良, 建立 SD-Wistar 大鼠腹腔异位心脏移植模型, 并探讨相关显微外科手术操作技巧。**方法** SPF 级雄性 SD 及 Wistar 大鼠各 50 只, 全身麻醉后取 SD 大鼠心脏作为供心, 在左锁骨下动脉以远 5 mm 处切断胸主动脉作为供血动脉, 将左肺动脉作为供心静脉。受体采用 Wistar 大鼠, 充分游离腹主动脉与下腔静脉, 选择左肾动脉远心端约 5 mm 附近的腹主动脉及下腔静脉作为吻合口部位, 将腹主动脉与下腔静脉的吻合口部位置于不同平面。采用连续缝合的方式分别将供心胸主动脉、左肺动脉与受体腹主动脉、下腔静脉进行端侧吻合。**结果** 通过该方法建立腹腔异位心脏模型, 每例 SD-Wistar 心脏移植模型总手术时间(60±10)min, 其中供心切取时间(10±3)min, 受体腹主动脉及下腔静脉游离时间(4±2)min, 血管吻合(12±5)min。实验动物术中及术后均无死亡, 术后所有供心全部复跳。2 例供心在术后第 3 天出现搏动减弱, 于第 5 天出现供心停跳。其余大鼠术后 1 周观察仍存在规律心跳。**结论** 经改良成功建立了 SD-Wistar 大鼠腹腔异位心脏移植模型。

[关键词] 心脏移植; 模型; 大鼠; 动物

[中图法分类号] R654.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-8348(2019)11-1916-03

Establishment of rat abdominal heterotopic heart transplantation model by end-to-side continuous suturing anastomosis*

XIAO Zongyu¹, WANG Ji^{2,3}

(1. Department of Neurosurgery, Affiliated Hospital of Qinghai University, Xining, Qinghai

810001, China; 2. Graduate School of Southern Medical University, Guangzhou, Guangdong

510000, China; 3. Affiliated Bayi Brain Hospital of The Aeventh Medical Center of PLA

General Hospital, Beijing 100700, China)

[Abstract] **Objective** To establish the SD-Wistar rat abdominal heterotopic heart transplantation model through modifying the classic Ono's heterotopic heart transplantation model, and to discuss the related micro-surgical operation skills. **Methods** Each 50 SPF class male SD and Wistar rats were selected in the study. After general anesthesia, the rat heart was taken as the donor heart. The thoracic aorta was cut off at 5mm distal to the left subclavian artery, which was used as the supplying artery, and the left pulmonary artery was used as the donor heart's venous system. Wistar rats were selected as recipients, the abdominal aorta and inferior vena cava were sufficiently dissected from each other. The distal end 5mm below the left renal artery was chosen as the site for end-to-side anastomosis, and the anastomotic site of the abdominal aorta and inferior vena cava are not on the same level. And the heart transplantation was performed by using continuous suturing anastomosis of donor's ascending aorta to recipient's abdominal aorta, and donor's left pulmonary artery to recipient's inferior vena cava. **Results** The abdominal heterotopic heart model was established by this method. The total operation time was (60±10)min for each case of SD-Wistar heart transplantation, in which the preparing time of donor's heart was (10±3)min, the dissection time of recipient's abdominal aorta and inferior vena cava was (4±2)min, the end-to-side vascular anastomosis time was (12±5)min. No death of experimental animals occurred during and after operation. All donors' hearts rebated after the circulation was recreated. In two cases, the transplanted hearts appeared the beat weakness on postoperative 3 d and stopped beating on 5 d. And regular heart beat could be found one week after the operation in the remaining 48 cases. **Conclusion** The SD-Wistar abdominal heterotopic heart transplantation model is successfully established by the modified Ono's technique.

[Key words] heart transplantation; model; rat; animal

随着显微外科技术的不断成熟,显微镜下血管、神经等吻合技术变得越来越成熟。早在 1969 年,Ono 建立了经典的大鼠腹腔异位心脏移植模型,该模型是将供心作为一个会搏动的器官,以观察其冠状动脉循环途径及免疫排斥反应而建立的显微外科手术模型^[1-2]。本研究对经典 Ono 术式进行改良,在 SD 大鼠左锁骨下动脉以远 5 mm 处切断胸主动脉,并分离左肺动脉,将 SD 大鼠的胸主动脉、左肺动脉分别与 Wistar 大鼠的腹主动脉、下腔静脉进行连续缝合端侧吻合,成功建立了 SD-Wistar 大鼠异位腹腔心脏移植模型,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 SPF 级 SD 及 Wistar 雄性大鼠各 50 只,体质量 200~250 g,购自北京华阜康生物科技股份有限公司。

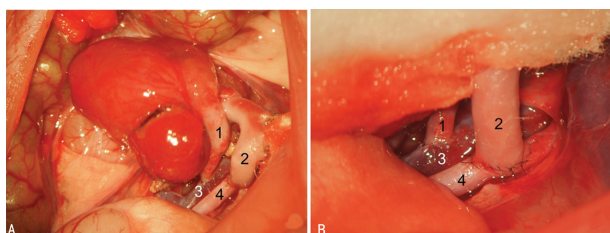
1.1.2 手术器械 Zeiss 手术显微镜一台(型号为 OPMI Pico),无损伤钝头冲洗针头一个(4#),无损伤血管夹 4 个,显微外科手术器械 1 套,常规手术器械若干,10-0 无损伤缝合线若干(上海医疗器械厂)。

1.2 方法 实验动物术前 12 h 禁食,但不禁水。采用 1%戊巴比妥钠,按 50 mg/kg 进行腹腔注射麻醉,麻醉起效后,胸腹部皮肤备皮,取仰卧位,用 2.5%的碘伏和 75%的乙醇消毒,取腹部正中切口。

1.2.1 供心的摘取 取供体 SD 大鼠,以湿的生理盐水纱布包裹肠管,并将其推向右侧,用 1 mL 注射器经下腔静脉缓慢注射 125 U/mL 肝素钠盐水 1 mL,进行全身肝素化后打开胸腔,并迅速向胸腔内放置大量冰屑促使心脏停跳,结扎并切断上下腔静脉、双侧肺静脉及主动脉弓的 3 个分支(头臂干、左颈总动脉及左锁骨下动脉),在左锁骨下动脉以远 5 mm 处切断胸主动脉;结扎右肺动脉,保留左肺动脉作为供心静脉系统。游离并取下供心,以 4℃肝素生理盐水对供心进行灌洗,直至供心质地变软,颜色变为灰白色,置 4℃冰盐水中保存备用。

1.2.2 受体手术 取受体 Wistar 大鼠,充分游离腹主动脉及下腔静脉,选择左肾动脉远心端约 5 mm 附近的腹主动脉及下腔静脉作为吻合口部位。首先进行供体主动脉与受体腹主动脉之间的端侧吻合,进行临时阻断后,用显微镊轻轻提起腹主动脉壁,用弯显微剪在受体腹主动脉前壁形成一与供心胸主动脉大小一致的椭圆形切口,采用 10-0 无损伤缝线先进行对角缝合、打结后并预留缝线,然后采用连续缝合的方式对前壁进行缝合,前壁缝合完毕后与尾侧预留缝线进行打结,随后将供心翻转,显露血管后壁,以同样的连续缝合方式进行缝合。然后再阻断受体下腔静脉,选择平齐于腹主动脉吻合口的稍远心端做端侧吻合部位,按上述方法进行供心左肺动脉与受体下腔静脉的吻合。腹主动脉与供心主动脉吻合的边距为血管

壁厚度的 1~2 倍,针距为边距的 2 倍,下腔静脉吻合时,边距可为血管壁的 3~4 倍,而针距仍为边距的 2 倍,平均 1 mm 缝合 3~5 针。在缝合最后一针打结前,向管腔内冲洗肝素生理盐水以排气。吻合完毕后,首先开放下腔静脉远心端血管夹,再开放近心端,然后开放受体远心端腹主动脉,最后开放腹主动脉近心端。随着供心的血流恢复,供心色泽变得红润,开始出现心肌颤动,恢复血流后 1~2 min 内供心可恢复规律心跳(图 1)。术毕,常规予以静脉及腹腔补液,通过鼠尾静脉注射的方式补充 0.9%生理盐水 2~3 mL,补液量一般不超过 2 mL/100 g,腹腔补液 5 mL^[3]。术后均连续 3 d 肌内注射青霉素 4 000 U/d。术后未予以抗免疫排斥药物,每日进行腹部触诊以观察供心搏动情况,并于术后 1 周开腹观察供心情况。



A:大鼠异位心脏移植,供体胸主动脉与受体腹主动脉吻合,供体肺动脉与受体下腔静脉吻合;B:局部吻合口放大观。1 为供体肺动脉,2 为供体主动脉,3 为受体下腔静脉,4 为受体腹主动脉

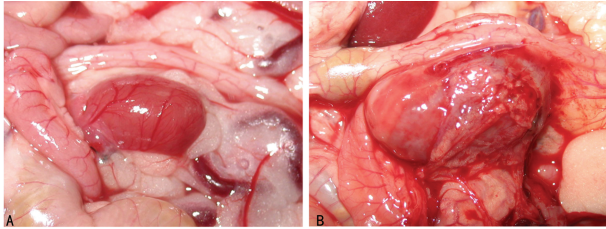
图 1 SD 大鼠腹腔异位心脏移植

2 结果

在本实验中,每例 SD-Wistar 心脏移植模型总手术时间(60±10)min,其中供心切取时间(10±3)min,受体腹主动脉及下腔静脉游离时间(4±2)min,血管吻合(12±5)min,供心主动脉与受体腹主动脉端侧吻合时间(5±2)min,供心肺动脉与受体下腔静脉吻合时间(7±4)min,供心的总缺血时间(30±5)min。腹主动脉平均缝合(15±4)针,下腔静脉平均缝合(12±3)针。在吻合口血流开放时,大部分大鼠均存在不同程度的吻合口渗血,下腔静脉渗血较少,多以腹主动脉吻合口失血为主,失血量约 0.2~0.5 mL,其中有 6 只大鼠发生出血较多,量约 1 mL,均经局部采用明胶海绵压迫后彻底止血。

本组共进行 SD-Wistar 腹腔异位心脏移植模型 50 例,术中及术后无大鼠死亡,大鼠术后 1~2 h 可苏醒,术后可恢复正常饮食,精神可,行走自如,无截瘫、肢体活动障碍、尿潴留等并发症。所有供心术中吻合血管通畅情况良好,均于术后即刻复跳,每日腹部触诊,移植心收缩有力,每日心率无显著变化,平均心率约每分钟(240±30)次。48 例供心均于术后 1 周仍存在规律心跳,心搏有力,冠状动脉清晰可见,吻合口通畅,局部无血栓及出血表现,供心与周围组织无明显粘连(图 2A)。另有 2 例供心在术后第 3 天出现搏动减弱,心率逐渐减慢,于第 5 天出现供心停跳,术后 1 周开腹观察,发现供心血管无扭转,但供心肿大明显,

质地略硬,与周围组织粘连严重,供心表面未见明确冠状动脉(图 2B),剖开供心后发现内含大量血栓。本组共进行 50 例 SD-Wistar 大鼠心脏移植模型,术中血管吻合成功率达 100%,但术中 2 例发生心跳停止,本组模型成功率达 96.00%。



A: 供心存活良好,表面光滑,与周围组织无明显粘连,冠状动脉清晰可见;B: 供心停搏,体积明显增加,供心表面未见明确冠状动脉,与周围组织粘连严重

图 2 腹部异位心脏移植术后 1 周

3 讨论

大鼠心脏移植模型是将移植心作为一个可搏动的异体组织,以观察其冠状动脉循环途径及免疫排斥反应而进行的,供心循环途径为:受体供血动脉-供心升主动脉-冠状动脉-心肌-冠状静脉-右心房-右心室-供心肺动脉-受体静脉,左心不参与循环,无射血功能^[1,2,4]。最早由 ABBOTT 进行大鼠腹腔心脏移植模型的建立,他分别将供心的主动脉、肺动脉与受体的腹主动脉、下腔静脉进行端端吻合,成功建立了大鼠腹腔异位心脏移植模型,但由于该模型完全阻断了腹主动脉及下腔静脉,导致下半身血供障碍,容易发生下肢瘫痪和尿潴留等并发症,死亡率亦较高^[5]。1969 年,Ono 等对该术式进行改良,分别将供心主动脉、肺动脉与受体腹主动脉、下腔静脉进行端侧吻合,显著提高了心脏移植模型的成功率^[1,6]。

目前,颈部和腹部是应用较多的大鼠异位心脏移植部位^[7-8]。颈部异位心脏移植技术时,分别将供心主动脉、肺动脉与受体颈总动脉及颈外静脉进行吻合^[9]。但由于颈部抗感染能力差,局部容易形成积液;且颈部空间较狭小,可能对供心造成压迫,血管扭转、血栓形成概率均显著增加,从而导致供心血流障碍,模型失败^[10]。而腹腔异位心脏模型具备较多优点:(1)腹主动脉、下腔静脉管径较粗,显微吻合技术要求略低,且腹主动脉血流量较大,血栓形成概率相对较低,模型成功率高。(2)腹腔空间大,对供心不易造成压迫。(3)腹腔存在大网膜等组织,吸收能力及抗感染能力均较强。但腹腔模型仍存在一些缺点:(1)开腹手术,创伤较大,术中暴露肠管等腹腔脏器,体液丢失较颈部手术明显。(2)腹腔手术对胃肠功能有一定的影响。(3)术中需要充分游离腹主动脉及下腔静脉,可能发生血管意外损伤^[10-11]。但基于熟练的显微技巧及适量补液,可将上述风险降至最低,因此,本研究选用腹腔作为异位心脏移植模型部位。

在本模型中,笔者增加了供心的血管长度,采用

左锁骨下动脉以远 5 mm 的胸主动脉及左肺动脉作为供心动静脉系统,降低了血管吻合时的血管张力,增加了手术操作空间,降低了手术操作难度。在进行血管吻合口部位的设计时,若将两个腹主动脉与下腔静脉的端侧吻合口处于同一平面,那么在完成腹主动脉的吻合后,下腔静脉吻合口可能正好被供心升主动脉阻断,使得静脉吻合口难度增大,且可能对供心造成不必要的牵拉,使吻合口损伤的风险也相应增加。因此,笔者将两个端侧吻合口置于不同平面,下腔静脉的吻合口略低于腹主动脉的吻合口,从而可以在不牵拉供心的情况下,清楚观察到吻合口情况,并可进行相应操作。

在缝合方式上,采用 10-0 尼龙丝线连续缝合的方式进行,首先进行对角缝合以固定吻合口的上下两端,然后再分别对血管前后壁进行连续缝合,然后再根据局部采用间断缝合进行补针。由于下腔静脉管壁较薄,且前后壁易贴在一起,使得肺动脉与下腔静脉的吻合成为本模型成功的难点之一,在术中可使用亚甲蓝染色以增强血管壁的显示,同时,通过肝素生理盐水反复冲洗亦增加血管壁的辨认,避免误将前后壁缝合在一起。值得注意的是,在血管吻合时,应将血管口周围血管外膜、脂肪组织等清除干净,避免将其带入血管腔成为异物,从而启动凝血机制,导致血栓形成^[4]。

本实验中,2 例供心在心脏移植后第 3 天出现心跳减弱,于第 5 天出现心跳停止,术后 1 周经解剖发现,供心血管无扭转,但心脏肿大明显,心腔内充填大量血栓,考虑停跳原因多系免疫排斥反应所致,但不能完全排除因吻合口血栓形成所导致心脏停跳。而余下 48 例大鼠,供心均可长时间规律跳动,证明移植心脏存活良好,模型成功率高。

综上所述,与经典 Ono 术式相比较,本研究增加了实验大鼠供心的血管吻合长度,并将腹主动脉与下腔静脉的吻合口位置不同平面,这样增大了血管吻合空间,降低了血管吻合的难度。同时,采用连续缝合的方式可以缩短手术时间,缩短受体腹主动脉、下腔静脉阻断时间及供心缺血时间,提高了手术成功率。因此,通过改良,本研究成功建立了 SD-Wistar 大鼠异位心脏移植模型。

参考文献

- [1] BENKE K, SAYOUR A A, MATYAS C, et al. Heterotopic abdominal rat heart transplantation as a model to investigate volume dependency of myocardial remodeling [J]. *Transplantation*, 2017, 101(3): 498-505.
- [2] SHIMADA S, DEL NIDO P J, FRIEHS I. Development of a vascularized heterotopic neonatal rat heart transplantation model [J]. *Eur Surg Res*, 2016, 57(3/4): 240-251.
- [3] 肖宗宇,陈晓娟,余鹏程,等. 端端吻合(下转第 1922 页)

CirA),其中 5 个涉及铁转运。FoxA 转运高铁氧胺铁载体;YncD 涉及转铁,但铁载体类型未知。IroN、FepA 和 CirA 主要涉及儿茶酚胺类铁载体,IroN 能转运 2,3-二羟苯甲酰基丝氨酸、肠菌素、沙门螯合素;FepA 能够转运 2,3-二羟苯甲酰基丝氨酸和肠菌素;而 CirA 只能转运 2,3-二羟苯甲酰基丝氨酸,三者在工作上具有一定互补性^[10-12]。本研究结果表明,当 3 个基因被敲除后导致细菌毒力显著下降,表明以这 3 个基因作为减毒的敲除靶基因是适合的。当然,后续还需要对减毒株的免疫保护效能及其免疫机制进行全面而系统的研究,才有可能将该减毒株纳入伤寒疫苗株的候选。

参考文献

- [1] RADHAKRISHNAN A, ALS D, MINTZ E D, et al. Introductory article on global burden and epidemiology of typhoid fever[J]. *Am J Trop Med Hyg*, 2018, 99(3): 4-9.
- [2] 熊坤, 陈志瑾, 李建华, 等. 甲型副伤寒沙门菌减毒株的构建与鉴定[J]. *免疫学杂志*, 2015, 31(1): 27-31.
- [3] XIONG K, CHEN Z J, ZHU C Y, et al. Safety and immunogenicity of an attenuated *Salmonella enterica* serovar Paratyphi A vaccine candidate[J]. *Int J Med Microbiol*, 2015, 305(6): 563-571.
- [4] GUZMAN C A, BORSUTZKY S, GRIOT-WENK M, et al. Vaccines against typhoid fever[J]. *Vaccine*, 2006, 24(18): 3804-3811.
- [5] ROLAND K L, BRENNEMAN K E. *Salmonella* as a vaccine delivery vehicle[J]. *Expert Rev Vaccines*, 2013, 12(9): 1033-1045.
- [6] LIN I Y, VAN T T, SMOOKER P M. Live-attenuated bacterial vectors; tools for vaccine and therapeutic agent delivery[J]. *Vaccines (Basel)*, 2015, 3(4): 940-972.
- [7] ELLERMANN M, ARTHUR J C. Siderophore-mediated Iron acquisition and modulation of host-bacterial interactions[J]. *Free Radic Biol Med*, 2017, 105(1): 68-78.
- [8] LIU M, HUANG M, SHUI Y, et al. Roles of B739_1343 in Iron acquisition and pathogenesis in *Riemerella anatip-estifer* CH-1 and evaluation of the RA-CH-1ΔB739_1343 mutant as an attenuated vaccine[J]. *PLoS One*, 2018, 13(5): e0197310.
- [9] LI Y G, MA Q J. Iron acquisition strategies of *Vibrio anguillarum*[J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2017(7): 342.
- [10] B? UMLER A J, NORRIS T L, LASCO T, et al. IroN a novel outer membrane siderophore receptor characteristic of *Salmonella enteric* [J]. *J Bacteriol*, 1998(180): 1446-1453.
- [11] RABSCH W, VOIGT W, REISSBRODT R, et al. *Salmonella typhimurium* IroN and FepA proteins mediate uptake of enterobactin but differ in their specificity for other siderophores[J]. *J Bacteriol*, 1999(181): 3610-3612.
- [12] BEARSON B L, BEARSON S M, UTHE J J, et al. Iron regulated genes of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium in response to norepinephrine and the requirement of fepDGC for norepinephrine-enhanced growth[J]. *Microbes Infect*, 2008, 10(7): 807-816.

(收稿日期:2019-01-02 修回日期:2019-03-16)

(上接第 1918 页)

- 技术建立 SD-Wistar 大鼠肾移植模型[J]. *医学研究杂志*, 2016, 45(11): 133-135.
- [4] 王竹林, 曹浩, 占贞贞, 等. 大鼠腹腔内工作型心脏移植模型的改进[J]. *中国实验动物学报*, 2015, 23(2): 119-123.
 - [5] 胡定辉, 李鸿雁, 刘尊涛, 等. 大鼠腹腔异位心脏移植模型的建立与评价[J/CD]. *中西医结合心血管病(电子杂志)*, 2018, 6(2): 192-193.
 - [6] IBRAHIM M, NAVARATNARAJAH M, KUKADIA P, et al. Heterotopic abdominal heart transplantation in rats for functional studies of ventricular unloading[J]. *J Surg Res*, 2013, 179(1): 31-39.
 - [7] SCHAEFER A, SCHNEEBERGER Y, STENZIG J, et al. A new animal model for investigation of mechanical unloading in hypertrophic and failing hearts; combination of transverse aortic constriction and heterotopic heart transplantation[J]. *PLoS One*, 2016, 11(2): e0148259.
 - [8] 张金敏, 张松林, 魏蕾. Tail-Cuff 技术改良大鼠颈部异位心脏移植模型的效果观察[J]. *山东医药*, 2014, 54(28): 26-28.
 - [9] MA Y, WANG G D. Comparison of 2 heterotopic heart transplant techniques in rats: cervical and abdominal heart[J]. *Exp Clin Transp*, 2011, 9(2): 128-133.
 - [10] 周小兵, 蒋美芳, 徐三荣, 等. 大鼠心脏腹部和颈部移植模型的建立与比较[J]. *江苏大学学报(医学版)*, 2010, 20(1): 25-28.
 - [11] 余春俊, 王贤灿, 戴仕林, 等. 单术者制作大鼠腹腔异位心脏移植模型操作技巧[J]. *局解手术学杂志*, 2017, 26(9): 638-643.

(收稿日期:2018-11-20 修回日期:2019-02-02)