

改良 Cuff 技术建立小鼠颈部异位心脏移植模型

程峰 顾晓冬 项建斌[△] 陈宗祐 蔡端

(复旦大学附属华山医院普外科 上海 200040)

【摘要】 目的 改进 Cuff 技术制作小鼠颈部异位心脏移植模型,以简化手术操作,提高手术成功率。方法 使用自制套管将供心肺动脉套接于受体右颈外静脉,将供心升主动脉套接于受体右颈总动脉。结果 正式实验 40 例,手术成功率 92.5%。手术时间约 60 min,供心冷缺血时间小于 30 min。结论 改良 Cuff 技术建立小鼠颈部异位心脏移植模型,无需显微外科操作,是一种经济实用、稳定可靠、易于复制的动物模型。

【关键词】 Cuff 技术; 心脏移植; 异位移植; 小鼠模型

【中图分类号】 R 654.2 **【文献标志码】** B

A model of cervical heterotopic heart transplantation in mice by modified Cuff technique

CHEN Feng, GU Xiao-dong, XIANG Jian-bin[△], CHEN Zong-you, CAI Duan

(Department of General Surgery, Huashan Hospital, Fudan University, Shanghai 200040, China)

【Abstract】 Objective To simplify surgical technique and increase postoperative survival rate by using improved Cuff technique in making the model of cervical heterotopic heart transplantation in mice.

Methods By using self-made cuffs, the donor pulmonary artery was anastomosed to the recipient right external jugular vein, the donor ascending aorta was anastomosed to the recipient right common carotid artery. **Results** Forty formal transplantsations were performed with a successful rate of 92.5%. The operative time was about 60 min, the cold ischemic time for donor heart was shorter than 30 min.

Conclusions The model of cervical heterotopic heart transplantation in mice by modified Cuff technique is an economical, practicable, reliable and high reproducible animal model, and can be operated by surgeons without professional microsurgery technique.

【Key words】 Cuff technique; heart transplantation; heterotopic transplantation; mouse model

目前心脏移植免疫研究不断深入,对供、受体间种系纯化程度要求日益提高,而小鼠具有品系较纯、分子生物学试剂来源多、免疫学检测方便、成本低等优点,因而在现代移植免疫学研究中具有其不可替代的地位。由于小鼠形体小,吻合小血管存在一定的技术难度,限制了小鼠心脏移植模型的广泛应用。Matsuura 等^[1]成功将 Cuff 技术运用到小鼠心脏移植模型上,大大降低了手术难度,但国内报道较少,可能受限于国内显微外科实验室的技术条件及专用套管难以获得。我们也采用该技术建立了小鼠颈部心脏移植模型,并加以简化和改进,同时采用 24G

和 22G 静脉留置针套管分别作为动脉和静脉套管,使得套管材料易于获得,血管翻套极为容易,有效减少供心缺血时间,且整个手术在单人操作下完成,无需显微外科吻合技术,手术成功率高,稳定易于复制,现报道如下。

材料和方法

实验动物 供受体均采用健康 C57(H-2^b)小鼠,7~9 周龄,重约 25 g,雌雄不限,受体体重要求大于供者体重,均购自中国科学院上海实验动物

国家自然科学基金项目(30772035),复旦大学上海医学院基础-临床医学交叉研究基金,上海高校优秀青年教师后备人选培养计划和复旦大学“世纪之星科研培养计划”项目

[△]Corresponding author E-mail: xjbzhw@yahoo.com.cn

中心。

实验设备 双人双目台式手术显微镜(WS2-286-82 上海医疗器械厂),显微外科手术器械(宁波成和器械厂),显微外科缝线(宁波医用缝针厂),自制血管套管:动脉套管长约 1.0 mm,外径约 0.7 mm,内径约 0.5 mm;静脉套管长约 1.0 mm,外径约 0.8 mm,内径约 0.6 mm。

手术方法 麻醉:采用 0.3%戊巴比妥钠腹腔麻醉(2.5 mL/100 g),麻醉成功后取仰卧位。四肢固定,备皮,消毒术区皮肤。

受体准备:自右侧下颌角至右锁骨中点作纵行切口,摘除右颌下腺,显露右颈外静脉,切断其属支。切断右胸锁乳突肌,游离右颈总动脉至颈内、外动脉分叉处,小血管夹夹闭颈总动脉近心端,结扎远心端分叉处,靠近结扎处剪断血管,肝素生理盐水(100 U/mL)冲洗管腔,血管游离缘缝合一针作为牵引线,牵引动脉穿过动脉套管,显微镊夹持颈总动脉游离缘两侧,使血管外翻包裹住套管,以 9-0 丝线环扎固定,剪去牵引线(图 1)。以相同方法制作颈外静脉套管。

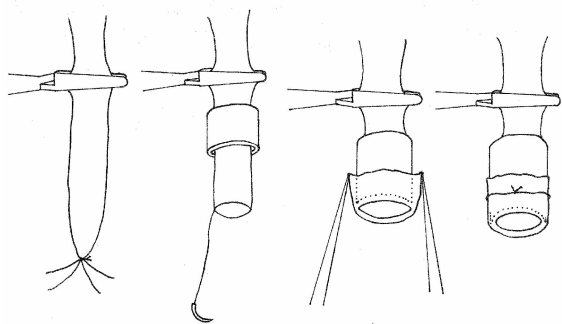


图 1 制作受体血管套管示意图

Fig 1 Schematic drawing of making recipient cuffs

供心切取:沿腹正中线切口进入腹腔,自下腔静脉注射肝素生理盐水 1 mL,沿双侧腋前线开胸至锁骨下缘,将整个胸前壁向上翻起,并立即向胸腔内置入冰屑,心脏迅速降温、停跳。钝性分离肺动脉及主动脉,保留少许肺动脉分叉处,从降主动脉逆行分离主动脉,在靠近无名动脉起始部分离出升主动脉,从心脏后方一次结扎除主动脉及肺动脉外的所有动静脉。注意勿结扎右心房,在结扎线远心端剪断,取下供心,置于 4℃生理盐水中保存。经升主动脉、肺动脉后壁的脂肪组织各预置一 9-0 丝线备用。

心脏移植:供心表面覆盖冰生理盐水棉球,置入受体右颈部切口处,颈总动脉套管插入供心升主动脉内,用预置好的丝线环扎(图 2)。使用 22G 静脉

留置针刺入供心肺动脉腔内,然后将颈外静脉套管经此孔插入,同法环扎。然后先开放颈外静脉血管夹,再缓慢开放颈总动脉血管夹,移植心表面覆以温生理盐水棉球迅速复温,可见到移植心的升主动脉、肺动脉及冠状动脉充盈,心脏由苍白转为红色,并逐渐变为红润。1 min 内自动复跳或由纤颤转为自主节律跳动。注意移植心位置的摆放,不要扭曲血管。缝合切口皮肤。

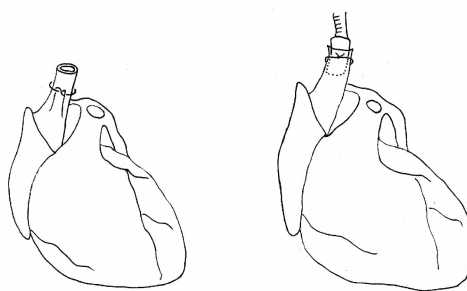


图 2 血管套管吻合血管示意图

Fig 2 Schematic drawing of vascular anastomosis with cuffs

术后处理与观察 术中出血小于 0.5 mL 不用特殊处理,出血稍多,可以皮下注入 1~2 mL 生理盐水。术后肌肉注射庆大霉素 50 U/10 g,灯泡照射保暖,单笼饲养。每天通过视诊和触诊观察移植心脏的搏动情况,移植心存活 72 h 以上视为手术成功。

结 果

正式实验 40 例,成功 37 例,手术成功率 92.5%。手术失败原因为麻醉意外 2 例,术中大出血 1 例。手术时间约 60 min,其中受体准备时间约 30 min,供心切取时间约 20 min,吻合时间约 5 min,供心热缺血时间控制在 1 min 内,供心冷缺血时间小于 30 min。

讨 论

Mann 等^[2]首次报道了狗腹腔内异位心脏移植,他们设计的冠状循环供血途径,为后来大鼠和小鼠心脏移植所沿用,其供心循环途径为:受体动脉→供心主动脉→冠状动脉→心肌→冠状静脉→右心房→右心室→肺动脉→受体静脉。左心不参与循环,无射血功能,可视为搏动的异物组织或无负荷异位心,又称为休眠心,广泛用于器官移植领域的研究。小鼠颈部异位心脏移植模型是移植免疫研究的较理想动物模型。小鼠品系多,遗传背景明确,转基因小

鼠易获得,可用于研究的单克隆抗体大多源于小鼠,而且小鼠用药量小、实验成本低。颈部心脏模型供心位置表浅,搏动可见,易触诊,便于进行功能评价,并且创伤小,污染小,手术对小鼠全身状况影响小,缝合线不易被小鼠破坏。随着移植免疫耐受研究的进展,颈部心脏模型也可用于建立二次移植模型。

Chen 等^[3]于 1991 年创建了小鼠颈部心脏移植模型,但操作复杂,对术者有较高显微外科要求,同时缝合会带来吻合口出血及血栓形成等问题。Matsuura 等^[1]将 Cuff 技术应用到小鼠颈部心脏移植模型中,无需专门的血管缝合技术,但制作套管时血管需缝 3 根牵引线,小鼠颈总动脉直径为 0.3~0.5 mm,要缝 3 根牵引线也很不易。Tomita 等^[4]使用了特制的带固定臂的套管,虽不需缝牵引线,但比较难获得此种套管。Wang 等^[5]使用肺动脉外翻制作套管,肺动脉和主动脉间隔不易分离,肺动脉壁薄易撕破,且肺动脉干短时无法制作套管。冯剑锸等^[6]使用套管和内芯以便于外翻血管,但内芯插入容易损伤到血管内膜。为此,我们将 Cuff 技术进行了改进与简化。

供受体手术同步交替进行,先做受体颈部血管准备,再取供心做移植,减少供心冷缺血时间。Cuff 技术方便、可靠,勿需专门显微血管吻合技术,减少了吻合口出血、梗阻、狭窄等并发症,但国内鲜有报道,可能是因为难以获得这种细小的套管。我们采用 24G 和 22G 静脉留置针套管分别作为动脉和静脉套管,材料易于获得。Cuff 技术的难点在于血管外翻包裹住套管,我们在颈外静脉及颈总动脉分叉处剪开可扩大开口,翻套极为容易,这些血管也容易充分分离,更重要是避免了在供心上制作套管,从而减少供心缺血时间。操作动作要轻柔,本实验 1 例因术中损伤血管大出血死亡。升主动脉和肺动脉易撕破,在供心停搏的状态下很难发现这些破口,等到供心移植后复跳时,才发现有出血点,常导致手术失败。我们不去分离升主动脉与肺动脉起始部,从降

主动脉逆行分离,在靠近无名动脉起始部分离出升主动脉,22G 静脉留置针在肺动脉前壁做一个小孔,便于颈外静脉套管由此孔插入肺动脉。经升主动脉、肺动脉后壁的脂肪组织各预置丝线,以便血管吻合。在打开胸腔后应立即向供心表面置入冰屑,使心脏尽快停跳以缩短热缺血时间。同时在吻合血管期间供心表面要覆盖冰生理盐水棉球。吻合完毕,血管完全开放后,应立即在供心表面覆盖温生理盐水棉球,以促进心脏复温复跳,避免心脏膨胀,造成心肌损害。手术完毕时应仔细放好移植心脏位置,避免血管扭曲。术后注意保暖,结合术中液体损失,可予适当补液。另外,术中麻醉剂量要适合,首次剂量要足够,如不足,反复给药不易掌握麻醉效果,本实验 2 例因麻醉药过量抑制呼吸而死亡。经过改进的手术只需在 10 倍显微镜下进行,简单实用,值得推广。

参 考 文 献

- [1] Matsuura A, Abe T, Yasuura K. Simplified mouse cervical heart transplantation using a cuff technique [J]. *Transplantation*, 1991, 51(4): 896 - 898.
- [2] Mann FC, Priestly JT, Markowitz J, et al. Transplantation of the intact mammalian heart [J]. *Arch Surg*, 1933, 26: 219 - 221.
- [3] Chen ZH. A technique of cervical heterotopic heart transplantation in mice [J]. *Transplantation*, 1991, 52(6): 1 099 - 1 101.
- [4] Tomita Y, Zhang QW, Yoshikawa M, et al. Improved technique of heterotopic cervical heart transplantation in mice [J]. *Transplantation*, 1997, 64(11): 1 598 - 1 601.
- [5] Wang Q, Liu Y, Li XK. Simplified technique for heterotopic vascularized cervical heart transplantation in mice [J]. *Microsurgery*, 2005, 25(1): 76 - 79.
- [6] 冯剑锸,孙宗全.应用 Cuff 技术建立小鼠异位心脏移植模型 [J]. *中华实验外科杂志*, 2005, 22(12): 1 576 - 1 577.

(收稿日期:2007-11-23;编辑:王蔚)