

# 心脏死亡大鼠双肾移植模型的建立

邓妙文 金钟大

**摘要** **目的** 探讨心脏死亡大鼠双侧供肾左侧原位肾移植模型的手术方法。**方法** 供、受体均采用雄性近交系 Wistar 大鼠,分别于心脏死亡后 0、20 和 40min 取双侧供肾,行左侧原位肾移植术后摘除受体右肾,观察各组受鼠术后的移植肾的功能恢复情况及生存率。**结果** 0min 和 20min 组的大鼠移植肾功能良好、存活率高,40min 组的大鼠移植肾功能较差且均于 14 天后死亡。0min 组的左右供肾移植后的肾功能及存活率差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** 建立心脏死亡大鼠双侧供肾左侧原位肾移植模型稳定可靠,可有效减少供肾冷缺血时间及节约供体数量,可应用于心脏死亡供体肾移植实验研究。

**关键词** 心脏死亡 肾移植 大鼠 模型

**中图分类号** R617

**文献标识码** A

**DOI** 10.11969/j.issn.1673-548X.2022.01.008

**Establishment of a Model of Double Kidney Transplantation in Rats with Cardiac Death.** DENG Miaowen, JIN Zhongda. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangdong 510000, China

**Abstract** **Objective** To explore a surgical method of left orthotopic kidney transplantation model with bilateral donor kidneys in rats with cardiac death. **Methods** Both donor and recipient were male inbred Wistar rats. Donor kidneys were taken at 0min, 20min and 40min after cardiac death, and left orthotopic kidney transplantation was performed, and the recipient's right kidney was removed. The survival of the recipient mice in each group and the recovery of the transplanted kidney function were observed. **Results** Rats in group 0min and 20min had good kidney transplant function and high survival rate, while rats in group 40min had poor kidney transplant function and all died 14 days later. There was no statistical difference in the transplantation function and survival rate between the bilateral donors in the group 0min( $P > 0.05$ ). **Conclusion** The left orthotopic kidney transplantation model of bilateral donor kidney in rats with cardiac death is stable and reliable, which can effectively reduce the cold ischemia time of donor kidney and save the number of donors, and can be applied to the experimental study of cardiac death donor kidney transplantation.

**Key words** Cardiac death; Kidney transplantation; Rat; Model

目前治疗终末期肾脏病的最佳方案是行肾移植手术,供肾的短缺是制约其发展的一个重要因素,而心脏死亡器官捐献是扩展供肾来源的重要途径。为研究心脏死亡后移植肾的功能恢复情况,建立心脏死亡后肾移植动物模型具有现实意义。临床肾移植左、右肾都可以作为供肾,笔者在前期研究基础上采用内撑法间断吻合肾静脉及用改进的套袖法吻合肾动脉,现进一步探索心脏死亡后大鼠双侧供肾移植方法。

## 材料与方法

1. 实验动物:供、受体大鼠均为北京维通利华实验动物技术有限公司提供的雄性近交系 Wistar 大鼠,

体质量约为 200 ~ 250g,大鼠的饲养及肾移植手术均于广州中医药大学实验动物中心进行,动物实验方案经广州中医药大学动物伦理委员会批准(伦理审批号:TCM1087512)。大鼠术前禁食 8 ~ 10h,可自由饮水。

2. 实验设计与分组:将 120 只雄性近交系 Wistar 大鼠随机分为 4 组,每组 30 只(供体 10 只,受体 20 只),实验组分为 0min 组、20min 组和 40min 组,分别于供鼠心跳停止后 0、20 和 40min 获取其双肾作为供肾,肾移植时用内撑法间断吻合肾静脉,肾动脉的吻合采用改进原位套袖吻合法,对照组为供鼠心跳停止后 0min 后取双侧供肾,采用传统的端对端间断缝合技术进行吻合<sup>[1,2]</sup>。0min 组的左侧供肾为 1 组,右侧供肾为 2 组。行左侧原位肾移植完毕后,即刻切除受体右肾。观察各组受体大鼠术后移植肾的功能恢复情况和生存率。

3. 实验步骤:(1) 供肾的切取:手术在 10 倍显微

基金项目:国家自然科学基金资助项目(81373523)

作者单位:510000 广州中医药大学第二临床医学院(邓妙文);

510000 广州中医药大学第二附属医院(金钟大)

通信作者:金钟大,教授,硕士生导师,电子邮箱:tggyzydx@126.

com

镜下进行。供体大鼠腹腔麻醉固定,取腹部正中切口入腹腔并用拉钩尽可能大的暴露视野,游离靠近腹主动脉和下腔静脉的双侧肾动、静脉,将左肾动、静脉根部上下两侧的腹主动脉和下腔静脉各分离 10mm,以便从腹主动脉进行穿刺灌洗。左右输尿管中上段周围的脂肪组织和结缔组织进行锐性分离,并于离肾门 10mm 平肾下极处剪断双侧输尿管。完全游离双侧肾动、静脉及输尿管后分离左右肾,并进行肝素化。剪开膈肌,用血管钳夹闭心脏基底部致心脏停止搏动,并阻断胸主动脉,确定心脏停止搏动后按照各组热缺血时间进行计时。各组热缺血时间达到后,分别用血管夹阻断肾动、静脉水平上、下的腹主动脉和下腔静脉,剪断靠近下腔静脉处的左肾静脉根部,在腹主动脉阻断部分的远端用肝素生理盐水对双肾进行低压匀速灌洗直至双肾变成黄白色。在双肾周围放置冰块,在低温下灌洗 5min 后,靠近腹主动脉处剪断左右肾动脉根部,右肾静脉上部的下腔静脉结扎剪断,其下部的下腔静脉在长约 2mm 处剪断以备与受体肾静脉吻合。在 4℃ 0.9% 氯化钠溶液中保存取出的双侧供肾。(2)受体肾移植:左侧供肾与右侧供肾的移植由双人同时进行。受鼠麻醉固定后打开腹腔,以上述方法分离受者的左肾动、静脉,在靠近腹主动脉处阻断肾动脉血流,为便于肾动、静脉的吻合需保留较长的肾动、静脉。适当游离输尿管周围的组织后剪断输尿管,并在肾包膜下切除左肾。供肾用纱布包裹,将冰屑置于供肾周围保持低温。供体左肾行左侧原位肾移植,右肾翻转后移植到受体左侧,实验组肾静脉采用内撑间断吻合法,肾动脉的血管重建采用改进原位套袖法,对照组用传统的端对端间断缝合法<sup>[1,2]</sup>。血管重建完毕后,去掉包绕着供肾的纱块,在供肾肾门处阻断血流。依次开放肾静脉及肾动脉的血管夹,供肾血流开放后即见肾脏充血,移植肾颜色逐渐变为均匀粉红色,肾静脉充盈,肾动脉搏动明显。从阴茎静脉注射 3ml 0.9% 氯化钠注射液,

可见输尿管口流出清亮尿液。输尿管的吻合采用端端吻合法,用 10.0 缝线间断缝合 6 针,并固定移植肾的上下极。切除受体右肾并关腹。在受体恢复清醒后放入笼内正常饲养。

4. 观察指标:术中记录各组肾动、静脉的吻合时间,记录移植肾的冷缺血时间(从灌注到血流开放的时间)。观察各组受鼠肾移植术后的饮食、活动及并发症情况,并记录死亡时间。术后第 3、5 和 7 天从尾静脉采集血样,评估血清肌酐水平和血尿素氮水平。实验结束后,对所有动物实施颈椎脱臼安乐死。

5. 统计学方法:采用 SPSS 24.0 统计学软件对数据进行统计分析,计数资料用构成比(%)及频率( $n$ )表示,计量资料组间比较采用  $t$  检验,数据以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 结 果

实施移植手术 120 例(供体 40 只,受体 80 只)。术后各组大鼠手术时间及存活率如表 1 所示,0min 组、20min 组和 40min 组之间的肾动、静脉吻合时间及冷缺血时间比较,差异无统计学意义,而对照组较 0min 组长。40min 组的大鼠均于 14 天后死亡,其存活率与 0min 组及 20min 组之间比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );0min 组与对照组大鼠存活率比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

各组术后肌酐(Scr)、尿素氮(BUN)检测结果如表 2 所示,所有组在肾移植后 3、5 和 7 天血肌酐和血尿素氮水平均升高,与 0min 组及 20min 组比较,40min 组明显升高。0min 组与对照组的血肌酐和血尿素氮水平比较,差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

0min 组中的左侧供肾为 1 组,右侧供肾为 2 组,双侧供肾为同时取肾,双人同时进行肾移植。1 组和 2 组大鼠的存活率及肾移植术后的血肌酐、血尿素氮水平比较,差异均无统计学意义( $P > 0.05$ ),详见表 3、表 4。

表 1 各组手术时间、术后并发症及存活率( $n = 20, \bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 肾动脉吻合<br>时间(min) | 肾静脉吻合<br>时间(min) | 冷缺血<br>时间(min)   | 静脉血栓<br>(%) | 输尿管狭窄<br>(%) | 7 天存活率<br>(%) | 14 天存活率<br>(%) |
|---------|------------------|------------------|------------------|-------------|--------------|---------------|----------------|
| 对照组     | 8.4 $\pm$ 0.6 *  | 11.5 $\pm$ 0.6 * | 27.8 $\pm$ 1.0 * | 5           | 5            | 95            | 90             |
| 0min 组  | 5.0 $\pm$ 0.5    | 10.0 $\pm$ 0.9   | 22.1 $\pm$ 2.4   | 0           | 5            | 100           | 95             |
| 20min 组 | 4.2 $\pm$ 0.4    | 9.3 $\pm$ 0.8    | 21.7 $\pm$ 3.2   | 5           | 10           | 95            | 85             |
| 40min 组 | 4.7 $\pm$ 0.4    | 9.7 $\pm$ 0.9    | 22.3 $\pm$ 1.8   | 85 *        | 15 *         | 40 *          | 0 *            |

与 0min 组比较, \*  $P < 0.05$

表 2 各组血肌酐及血尿素氮的检测结果 ( $n = 20, \bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 术前                           |                            | 3 天                          |                            | 5 天                          |                            | 7 天                          |                            |
|---------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
|         | Ser<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | BUN<br>( $\text{mmol/L}$ ) | Ser<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | BUN<br>( $\text{mmol/L}$ ) | Ser<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | BUN<br>( $\text{mmol/L}$ ) | Ser<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | BUN<br>( $\text{mmol/L}$ ) |
| 对照组     | 65.3 $\pm$ 2.8               | 8.7 $\pm$ 1.1              | 98.3 $\pm$ 6.0               | 14.6 $\pm$ 0.7             | 161.1 $\pm$ 9.0              | 16.8 $\pm$ 0.8             | 302.3 $\pm$ 15.8             | 21.2 $\pm$ 1.0             |
| 0min 组  | 65.2 $\pm$ 2.6               | 8.1 $\pm$ 1.0              | 102.4 $\pm$ 6.1              | 14.1 $\pm$ 0.8             | 159.6 $\pm$ 9.1              | 16.0 $\pm$ 0.9             | 297.2 $\pm$ 15.4             | 19.3 $\pm$ 1.4             |
| 20min 组 | 66.4 $\pm$ 3.0               | 8.8 $\pm$ 1.2              | 100.7 $\pm$ 5.4              | 15.2 $\pm$ 1.1             | 155.4 $\pm$ 7.0              | 16.8 $\pm$ 1.3             | 300.4 $\pm$ 12.0             | 19.3 $\pm$ 1.4             |
| 40min 组 | 65.1 $\pm$ 2.8 *             | 8.0 $\pm$ 0.9 *            | 110.5 $\pm$ 7.3 *            | 18.6 $\pm$ 1.4 *           | 178.9 $\pm$ 9.4 *            | 23.4 $\pm$ 0.8 *           | 361.8 $\pm$ 18.9 *           | 26.3 $\pm$ 1.1 *           |

与 0min 组比较, \*  $P < 0.05$

表 3 1 组与 2 组手术时间、术后并发症及存活率 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 肾动脉吻合<br>时间 (min) | 肾静脉吻合<br>时间 (min) | 冷缺血时间<br>(min) | 静脉血栓<br>(%) | 输尿管狭窄<br>(%) | 7 天存活率<br>(%) | 14 天存活率<br>(%) |
|-----|-------------------|-------------------|----------------|-------------|--------------|---------------|----------------|
| 1 组 | 4.9 $\pm$ 0.4     | 10.2 $\pm$ 0.8    | 21.8 $\pm$ 2.7 | 0           | 10           | 100           | 90             |
| 2 组 | 5.0 $\pm$ 0.5     | 9.7 $\pm$ 1.0     | 22.4 $\pm$ 2.1 | 0           | 0            | 100           | 100            |

表 4 1 组与 2 组血肌酐及血尿素氮的检测结果 ( $n = 10, \bar{x} \pm s$ )

| 组别  | 术前                           |                            | 3 天                          |                            | 5 天                          |                            | 7 天                          |                            |
|-----|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|------------------------------|----------------------------|
|     | Ser<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | BUN<br>( $\text{mmol/L}$ ) | Ser<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | BUN<br>( $\text{mmol/L}$ ) | Ser<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | BUN<br>( $\text{mmol/L}$ ) | Ser<br>( $\mu\text{mol/L}$ ) | BUN<br>( $\text{mmol/L}$ ) |
| 1 组 | 64.7 $\pm$ 2.4               | 8.1 $\pm$ 1.2              | 103.8 $\pm$ 6.3              | 14.0 $\pm$ 0.9             | 161.1 $\pm$ 9.4              | 16.1 $\pm$ 1.1             | 300.5 $\pm$ 14.9             | 19.7 $\pm$ 1.4             |
| 2 组 | 65.7 $\pm$ 2.9               | 8.0 $\pm$ 1.2              | 101.0 $\pm$ 5.8              | 14.2 $\pm$ 0.8             | 158.1 $\pm$ 9.1              | 15.8 $\pm$ 0.8             | 294.0 $\pm$ 16.0             | 18.9 $\pm$ 1.3             |

讨 论

目前治疗终末期肾脏病的最佳方案是行肾移植手术,可有效提高患者的生活质量,延长患者的生存时间。现在等待肾源的患者逐渐增多,为缩小肾移植目前供需关系之间的差距,逐渐开发利用许多边缘供肾如心死亡或脑死亡的供肾。与活体或脑死亡供肾比较,移植肾无功能和移植肾功能延迟的情况因心死亡供肾遭受更严重的热缺血损伤而更广泛存在。心死亡所致的无氧葡萄糖代谢增加导致了乳酸形成,细胞内溶酶体酶的腔内释放显著增加,这是术后移植肾无功能或延迟恢复肾功能的主要原因,这也恰恰缩短了移植肾的存活时间<sup>[3]</sup>。肾脏病理的改变也随着缺血时间的增加而增加<sup>[4]</sup>,其中一个重要的病理改变与肾小管的损伤有关,热缺血时间的长短与肾小管损伤的预后呈正相关<sup>[5]</sup>。热缺血损伤的时间短,则肾小管呈现轻度水肿,仅有少量炎性细胞浸润,存活的肾小管上皮细胞通过细胞周期可以恢复细胞功能;而当热缺血时间延长时,肾小管上皮细胞的损伤、坏死超过了修复上限,则出现间质纤维增生<sup>[6,7]</sup>。另一原因可能与肾小管上皮细胞发生细胞凋亡有关,肾小管上皮凋亡细胞的数量随着缺血时间的延长而增加<sup>[8]</sup>。一般来讲,当供肾热缺血时间超过 40min 时,受鼠的移植肾纤维化程度高,受鼠的存活率低<sup>[9]</sup>。本研究发现移植肾热缺血时间为 40min 时受体大鼠

均于 14 天内死亡,40min 组术后肌酐和尿素氮水平较 0min 组及 20min 组明显升高,这表明供肾热缺血时间大于 40min 的供肾不宜使用。

为研究心死亡供肾的安全热缺血时限,建立稳定的、成功率高的大鼠肾移植模型十分必要。既往有许多文献运用了不同的方法建立心脏死亡大鼠模型,如安乐死、用过量的异氟烷或者打开胸腔通过心脏外部压迫(填塞)诱导心脏骤停等<sup>[10-12]</sup>。笔者团队游离左、右肾后,直接剪开膈肌打开胸腔,用血管钳夹闭心脏基底部致使心脏停搏,此法方便快捷,且更容易控制热缺血时间,保证双侧供肾同时缺血。

在以往的大鼠肾移植模型中用左侧或右侧单侧供肾研究较多,近年来双侧供肾移植因节省供体而多采用。Yin 等<sup>[13]</sup>采用双肾供体,供体下腔静脉和腹主动脉与受体下腔静脉和腹主动脉分别行端侧吻合。冯宁翰等<sup>[14]</sup>的供体肾动脉与受体腹主动脉行端侧吻合,供体肾静脉与受体肾静脉行端端吻合,尿道重建采用膀胱补片法。然而以上技术均不同程度阻断腹主动脉和下腔静脉血流,受体缺血再灌注后血流动力学变化较大,易形成血栓。供体膀胱瓣与受体膀胱吻合,腹部切口较大,影响术后恢复。

本研究中实验组大鼠肾动脉的吻合采用笔者前期研究的改进套袖法,将受者的肾动脉套入经显微镊少许扩张后的供肾动脉腔内,用显微镊帮助第 1 针穿

过外膜进入动脉内腔,然后从动脉末端取出针,较之更方便,易于操作<sup>[1]</sup>。虽然笔者的技术可能对供体动脉内膜造成损伤,但受损内膜与受体动脉的外膜接触,对肾血流量影响不大。实验组肾静脉采用以前使用的内撑法间断吻合,该方法具有两端对合好,针距易于控制,吻合整齐、内膜外翻,符合血流动力学的要求等优点,血管吻合后不易发生血栓形成及漏血和狭窄<sup>[2]</sup>。对照组肾动脉、肾静脉均采用传统的端端吻合法,与对照组比较,实验组的肾动、静脉吻合时间及冷缺血时间明显缩短。且本研究取双侧供肾后双人同时进行肾移植,0min 组中的左侧供肾(1 组)及右侧供肾(2 组)术后肌酐、尿素氮及存活率差异均无统计学意义,这表明此种方法两个移植肾术后肾功能无明显区别,可节省供体。

本研究的创新点在于描述了一种心脏死亡后大鼠双侧供肾移植的模型,采用心脏死亡后的大鼠双肾作为供肾,分别进行左侧原位肾移植,采用改进的套袖法进行肾动脉吻合,内撑法间断吻合肾静脉,手术时间短,可有效减少供肾的冷缺血时间,成功率高,无需其他特殊器械,且可以减少在建立心死亡大鼠肾移植模型中的供体消耗,有利于心脏死亡供体肾移植实验研究,为研究供肾热缺血安全时限提供实验基础。

### 参考文献

- Ju CH, Xue LN, Cheng HJ, *et al.* Optimized method to harvest both kidneys from one donor rat for transplantation [J]. BMC Surg, 2018, 18(1): 66–72
- Jin ZD, Xue LN, Peng LS. Orthotopic kidney transplantation in the rat with the use of a sleeve arterial anastomosis method and a modified stenting technique for renal veins [J]. Transpl Proc, 2017, 49(8): 1942–1946
- van den Eijnden MM, Leuvenink HG, Ottens PJ, *et al.* Effect of

- brain death and non – heart – beating kidney donation on renal function and injury: an assessment in the isolated perfused rat kidney [J]. Exp Clin Transpl, 2003, 1(2): 85–95
- 毕旭东, 崔乃强, 赵晶. 缺血时间对肾脏影响的实验研究[J]. 中国现代医学杂志, 2003, 13(6): 20–23
- Kale S, Karihaloo A, Clark PR, *et al.* Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule [J]. J Clin Invest, 2003, 112(1): 42–49
- Finn WF, Chevalier RL. Recovery from postischemic acute renal failure in the rat [J]. Kidney Int, 1979, 16(2): 113–123
- Witzgall R, Brown D, Schwarz C, *et al.* Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c – Fos, and clusterin in the postischemic kidney. evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells [J]. J Clin Invest, 1994, 93(5): 2175–2188
- 于新路, 王禾, 张波, 等. 大鼠实验性肾缺血/再灌注引起肾小管上皮细胞凋亡及其与 Bcl – 2, Fas/FasL 表达变化的关系 [J]. 第四军医大学学报, 2003, 24(8): 723–726
- 邓新军, 胡建敏, 刘永光, 等. 不可控型心脏死亡大鼠供肾移植中的安全热缺血时限 [J]. 重庆医科大学学报, 2013, 38(2): 117–120
- Iwai S, Kikuchi T, Kasahara N, *et al.* Impact of normothermic preservation with extracellular type solution containing trehalose on rat kidney grafting from a cardiac death donor [J]. PLoS One, 2012, 7(3): e33157
- Saat TC, Susa D, Kok NF, *et al.* Inflammatory genes in rat livers from cardiac – and brain death donors [J]. J Surg Res, 2015, 198(1): 217–227
- van den Eijnden MM, Leuvenink HG, Ottens PJ, *et al.* Effect of brain death and non – heart – beating kidney donation on renal function and injury: an assessment in the isolated perfused rat kidney [J]. Exp Clin Transplant, 2003, 1(2): 85–95
- Yin M, Booster MH, Vd Bogaard AE. A simple technique to harvest two kidneys from one donor rat for transplantation [J]. Lab Animals, 1994, 28(4): 387–390
- 冯宁翰, 钱立新, 华立新, 等. 一种双侧供肾大鼠肾移植模型的建立 [J]. 中华器官移植杂志, 2006, 5: 309–310

(收稿日期: 2021 – 06 – 09)

(修回日期: 2021 – 08 – 02)

(上接第 24 页)

- Kim J, Kundu M, Viollet B, *et al.* AMPK and mTOR regulate autophagy through direct phosphorylation of Ulk1 [J]. Nat Cell Biol, 2011, 13(2): 132–141
- Zhang L, Fu L, Zhang S, *et al.* Discovery of a small molecule targeting ULK1 – modulated cell death of triple negative breast cancer in vitro and in vivo [J]. Chem Sci, 2017, 8(4): 2687–2701
- Ma S, Yu Z, Feng S, *et al.* Corneal autophagy and ocular surface inflammation: a new perspective in dry eye [J]. Exp Eye Res, 2019, 184: 126–134
- Wang Y, Chen Q, Shi C, *et al.* Mechanism of glycyrrhizin on ferroptosis during acute liver failure by inhibiting oxidative stress [J]. Mol Med Rep, 2019, 20(5): 4081–4090
- Ahn JH, Seo H, Park W, *et al.* Enhanced succinic acid production by Mannheimia employing optimal malate dehydrogenase [J]. Nat

Commun, 2020, 11(1): 1970

- Halbrook CJ, Nwosu ZC, Lyssiotis CA. Fine – tuning mitochondrial dysfunction and reductive carboxylation [J]. Trends Endocrinol Metab, 2018, 29(9): 599–602
- Gu H, Chen C, Hao X, *et al.* MDH1 – mediated malate – aspartate NADH shuttle maintains the activity levels of fetal liver hematopoietic stem cells [J]. Blood, 2020, 136(5): 553–571
- Zhang B, Tormmalm J, Widengren J, *et al.* Characterization of the role of the malate dehydrogenases to lung tumor cell survival [J]. J Cancer, 2017, 8(11): 2088–2096
- Yu Z, Li J, Ren Z, *et al.* Switching from fatty acid oxidation to glycolysis improves the outcome of acute – on – chronic liver failure [J]. Adv Sci (Weinh), 2020, 7(7): 1902996

(收稿日期: 2021 – 07 – 07)

(修回日期: 2021 – 07 – 09)