

自制低钾右旋糖苷改良液用于保存犬肺移植离体肺的最长时间★

梁朝阳, 张海涛, 王在永, 鲍彤, 张真榕, 刘德若

Modified self-confected low potassium dextran solution for preservation of isolated lung in canine lung transplantation: The longest preservation time

Liang Chao-yang, Zhang Hai-tao, Wang Zai-yong, Bao Tong, Zhang Zhen-rong, Liu De-ruo

Abstract

BACKGROUND: Clinical application of low potassium dextran (LPD) solution has better effectiveness, but effective period of donor lung preservation is still short and price is expensive.

OBJECTIVE: To observe changes of lung preservation after different periods preserved with modified self-confected LPD solution and to evaluate the storage term of lung in this solution.

METHODS: In total 32 healthy dogs were randomly divided into the control group and experimental group. Dogs in the control group were perfused with LPD solution; and those in the experimental group were perfused with modified self-confected LPD solution. Changes of myeloperoxidase, malonaldehyde, wet to dry weight ratio (W/D), pathological result and super-micro structural results from donor lung tissues were compared at pre-perfusion, after perfusion, and 4-, 8-, 12-, as well as 24-hours of preservation.

RESULTS AND CONCLUSION: For both groups: the values of myeloperoxidase, malonaldehyde and W/D were increasing as lung preservative period in vivo was prolonging; after 12-hour preservation, the value of myeloperoxidase was significant changed while the value of malonaldehyde and W/D were changed significantly after 8-hour preservation; the pathological and super-micro structural changes were reversible till lung preservative period reached 8-hour. Changes of lung preservation started to be significant after 8-hour preserved with modified self-confected LPD solution and irreversible historical changes appeared after 12-hour preservation.

Liang CY, Zhang HT, Wang ZY, Bao T, Zhang ZR, Liu DR. Modified self-confected low potassium dextran solution for preservation of isolated lung in canine lung transplantation: The longest preservation time. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu yu Linchuang Kangfu. 2010;14(53): 9881-9887. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 低钾右旋糖苷液用于肺移植, 灌注保存效果较好, 但有效供肺保存时间仍较短, 价格较昂贵。

目的: 观察改良自制低钾右旋糖苷液保存供肺不同时间供肺变化, 评价改良自制低钾右旋糖苷液的供肺保存期限。

方法: 成年家犬 32 只, 随机分成对照、实验两组。对照组采用低钾右旋糖苷液作为供肺灌注保存液, 实验组采用改良自制低钾右旋糖苷液。比较两组供肺组织灌注前、灌注后、保存 4, 8, 12, 24 h 的髓过氧化物酶、丙二醛、湿干比、病理光镜检查、透射电镜检查结果。

结果与结论: 两组离体肺组织的髓过氧化物酶、丙二醛和湿干比值随着保存时间的延长呈新增趋势, 髓过氧化物酶值在保存 12 h 以后与灌注前有显著差异, 丙二醛和湿干比值保存 8 h 后与灌注前有显著差异。保存 8 h 后, 实验组肺组织结构和超微结构的变化仍然可逆, 较对照组变轻, 但保存 4, 12, 及 24 h 两组变化基本相似。结果提示, 在实验条件下, 供肺在改良自制低钾右旋糖苷液中保存 8 h 后开始出现显著变化, 保存 12 h 后开始出现不可逆变化。

关键词: 低钾右旋糖苷液; 改良; 肺保存; 髓过氧化物酶; 丙二醛; 湿干比; 肺移植

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2010.53.001

梁朝阳, 张海涛, 王在永, 鲍彤, 张真榕, 刘德若. 自制低钾右旋糖苷改良液用于保存犬肺移植离体肺的最长时间[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2010, 14(53):9881-9887. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

虽然肺移植成为常规临床治疗手段已经超过 20 年, 但迄今为止, 作为评价器官保存方案及器官灌注保存液保存效果的指标之一, 公认可靠的供肺保存时间仍然只有 4~6 h, 远远短于其他如肾、肝、心等实质脏器的保存时间^[1]。因而良好的供肺灌注保存方案以延长肺保存时间始终是肺移植领域研究的热点^[2]。

低钾右旋糖苷液(low potassium dextran solution, LPD 液——本文中指 Perfadex 液, 瑞典 Vitrolife 公司)是惟一专门研究用于肺保存

的细胞外液型灌注保存液, 公认供肺灌注保存效果较好^[3]。

实验将中日友好医院配制的改良自制 LPD 液用于犬肺移植, 观察供肺离体保存的时间期限, 并与 LPD 液进行比较。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于 2007-04/11 在北京大学医学部附属北大医院动物实验室、卫生部中日友好医院临床研究所药理学(国家级重点实验室, 生物安全防护 BSL-3 级)、卫生部中日友

Department of Thoracic Surgery, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China

Liang Chao-yang★, Master, Associate chief physician, Department of Thoracic Surgery, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China chaoyangliang8@yahoo.com

Correspondence to: Liu De-ruo, Doctor, Chief physician, Department of Thoracic Surgery, China-Japan Friendship Hospital, Beijing 100029, China deruoliu@yahoo.com

Received:2010-06-29
Accepted:2010-08-12

中日友好医院胸外科, 北京市 100029

梁朝阳★, 男, 1969 年生, 北京市人, 汉族, 2005 年中国协和医科大学毕业, 硕士, 副主任医师, 主要从事胸部肿瘤的外科治疗及肺移植的基础研究和临床应用。chaoyangliang8@yahoo.com

通讯作者: 刘德若, 博士, 主任医师, 中日友好医院胸外科, 北京市 100029 deruoliu@yahoo.com

中图分类号:R617
文献标识码:A
文章编号:1673-8225 (2010)53-09881-07

收稿日期: 2010-06-29
修回日期: 2010-08-12
(20100329021/W-Z)

好医院病理科、北京大学医学部病理系透射电镜室完成。

材料: 家犬 32 只, 雌性 6 只, 雄性 26 只, 完成供肺灌注保存实验, 随机分成两组, 每组 16 只, 其中对照组体质量(16.09±2.54) kg, 采用 LPD 液作为供肺灌注保存液; 实验组体质量(18.31±4.39) kg, 采用改良自制 LPD 液。实验动物均由北京大学医学院附属北大医院动物实验室提供。实验过程中对动物处置符合 2006 年科学技术部发布的《关于善待实验动物的指导性意见》^[4]。

主要药品及试剂:

主要药品及试剂	来源
前列腺素 E1(Prostaglandin E1)注射剂 (100 µg)	北京赛生药业有限公司
髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)试剂盒、丙二醛试剂盒、考马斯亮蓝试剂、蛋白标准物试剂	南京建成生物工程研究所
LPD 液(即 Perfadex 液)	瑞典 Vitrolife 公司
改良自制 LPD 液	中日友好医院药剂科

改良自制 LPD 液配制方法: ①取 50 g 低分子右旋糖苷 40 溶于 500 mL 80 °C 热蒸馏水中, 加热煮沸溶解。②加入 NaCl 7.92 g、KCl 0.448 g、MgSO₄ 0.22 g、Na₂HPO₄ 0.286 4 g、CaCl₂ 0.022 g、葡萄糖 0.9 g。③测溶液 pH 值, 渗透压。④加入蒸馏水使总液量达 1 000 mL 并加甘露醇 3.64 g 调整液体渗透压。⑤再次测定溶液 pH 值, 渗透压。⑥加入 NaHCO₃ 0.084 g 调整 pH 值。⑦过滤溶液。⑧最终测定溶液所有离子及有机成分浓度、pH 值及渗透压。⑨溶液加热至 100 °C 持续 30 min 灭菌后保存。⑩灌注保存使用前加入前列腺素 E1 125 µg/L 及硝酸甘油 100 µg/L。

改良自制 LPD 液成分及理化特性与 LPD 液对比^[5]:

成分及理化特性	LPD 液(LP solution)	改良自制 LPD 液(Self-confected LPD solution)
Na ⁺ (mmol/L)	138	136
K ⁺ (mmol/L)	6	6
Cl ⁻ (mmol/L)	142	141
Mg ²⁺ (mmol/L)	0.8	1.8
Ca ²⁺ (mmol/L)	0.3	0.2
HCO ₃ ⁻ (mmol/L)	0	1
PO ₄ ³⁻ (mmol/L)	0.8	0.8
SO ₄ ²⁻ (mmol/L)	0.8	1.8
右旋糖苷 40 (g/L)	50	50
葡萄糖 (mmol/L)	5	4.5
甘露醇 (mmol/L)	0	20
前列腺素 E1 (ug/L)	0	125
硝酸甘油(µg/L)	0	100
pH	7.4	7.1
渗透压 (kPa)	777.046	797.630

实验方法:

实验犬称质量, 鉴别性别。

麻醉: 实验犬静脉注射戊巴比妥钠(0.5 mg/kg)诱导麻醉, 气管插管, 简易呼吸器控制呼吸, 呼吸频率 16~20 次/min, 潮气量维持胸廓正常起伏, 吸入氧浓度以 7 L/min 流量的导管供氧维持约 50%。尽快手术。

手术: 实验犬取仰卧位。取第 4 肋间“壳”(Clam-Shell)式切口, 横断胸骨。于右肺下叶楔形切除直径 1.0~2.0 cm 的肺组织, 留作标本测定湿干比(wet/dry weight ratio, W/D)、丙二醛、MPO, 及行光镜, 透射电镜病理检查, 作为正常对照。切开心包, 右心耳注入肝素(1 000 U/kg), 肺动脉根部注入前列腺素 E1: 1 000 µg。游离上下腔静脉, 主动脉及气管。于肺动脉主干起始处缝合荷包, 插入灌注管, 荷包线结扎固定。夹闭上腔静脉, 剪开下腔静脉及左心耳, 夹闭主动脉。经肺动脉灌注管灌注灌注液。灌注液对照组采用 LPD 液, 实验组采用改良自制 LPD 液, 灌注压力以重力为动力, 保持 50 cm 灌注高度, 灌注量约为 60 mL/kg, 灌注液温度维持 23 °C 左右。持续灌注至肺成乳白色, 左心耳流出液清亮。灌注期间维持供肺通气并维持原有通气方式。灌注时间保持 10 min 内。灌注结束后, 在肺中度膨胀状态下(50%~60%)于隆突上 4 cm 夹闭气管。离断主动脉, 上下腔静脉, 于夹闭气管处上方, 剪断气管。将供体心肺同时取出, 置于相对应的 10 °C 保存液中, 右肺再次留取标本作为灌注后标本。恒温箱中 10 °C 保存浸泡于灌注保存液中右肺, 分别于保存 4, 8, 12, 24 h 获取标本。

标本制作: 每次获取标本楔形切取肺组织约 1.0 g,

标本分装: ①切取约 0.18 g 肺组织用于 MPO、丙二醛测量, 分装标本保存于-20 °C 冰箱。② 0.4~0.6 g 肺组织用于 W/D 测量, 分装标本保存于-20 °C 冰箱。③米粒大小肺组织保存于稀甲醛(体积分数 10%)用于病理光镜检测, 分装标本保存于 4 °C 冰箱。④2 mm 大小肺组织至于戊二醛(2.5%)缓冲液中用于透射电镜检测, 分装标本保存于 4 °C 冰箱。

标本处理及测量计算:

光镜标本: 送中日友好医院临床病理科检测。已固定标本经梯度乙醇脱水, 低温石蜡包埋, 切片(厚度 4 µm)后苏木精-伊红染色, 显微镜下观察并摄片。

电镜标本: 送北京大学医学部病理系检测。保存于戊二醛缓冲液的标本以磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤 2 次, 10 g/L 钨酸 4 °C 固定 2 h, 梯度丙酮脱水, EPON812 环氧树脂包埋, 超薄切片机切片, 每块标本置备超薄切片铜网两张, 醋酸铀和柠檬酸铅双重染色, 用日本电子公司 JEM-100CXR 型透射电镜观察并摄片。

W/D 测量: 用 1/10 000 分析天平测量前述分装标本②质量, 记录为湿质量值; 置于 60 °C 恒温箱烘干 24 h

后再次测量标本质量, 记录值为干质量值(记录值取 0.01), 湿质量值/干质量值即为 W/D(计算结果取 0.01)。

肺组织 MPO、丙二醛测量:

组织匀浆制备: 准确称取分装肺组织 0.18 g, 在冰浴下用眼科剪刀尽快减碎标本, 按 1:10 质量体积比加生理盐水在冰浴下制备成 10%组织匀浆, 待测。

MPO 测量: 所需试剂按南京建成公司提供试剂盒说明进行配置。取出 450 μ L 组织匀浆按 1:1 比例加入浓缩一倍试剂二溶液, 混匀; 加入 0.1 mL 试剂三, 充分混匀后 37 $^{\circ}$ C 水浴 10 min; 对照管和测定管分别分装 0.2 mL, 对照管依次加入蒸馏水 3 mL, 试剂四 0.2 mL, 测定管依次加入显色剂 3 mL, 试剂四 0.2 mL, 混匀, 37 $^{\circ}$ C 水浴 30 min; 各管加入试剂七 0.05 mL, 混匀, 60 $^{\circ}$ C 水浴 10 min, 取出后立即用紫外分光光度计(460 nm 处, 1 cm 光径, 蒸馏水调零)测各管吸光度(A)值。

MPO 计算公式:

$$\text{MPO(U/g)} = (\text{测量管 A 值} - \text{对照管 A 值}) / [11.3 \times \text{取样量}(0.18 \text{ g})]$$

丙二醛测量: 所需试剂按南京建成公司提供试剂盒说明进行配置。将已制备 1:10 组织匀浆置于离心机, 2 000 r/min 离心 10 min, 取出 50 μ L 上清留测蛋白含量, 余上清待测。①标准管制备: 依次加入 0.2 mL 标准品, 试剂一 0.2 mL。②标准空白管制备: 依次加入 0.2 mL 无水乙醇, 试剂一 0.2 mL。③测定管制备: 依次加入 0.2 mL 标本上清, 试剂一 0.2 mL。④混匀各管, 依次加入试剂二 3 mL, 试剂三 1 mL, 混匀, 试管口以保鲜膜扎紧, 用针头刺孔, 95 $^{\circ}$ C 水浴 40 min, 取出后流水冷却, 4 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 用紫外分光光度计(532 nm 处, 1 cm 光径, 蒸馏水调零)测各管吸光度值。

丙二醛计算公式:

$$\text{丙二醛}(\mu\text{mol/g}) = (\text{测量管吸光度值} - \text{标准空白管吸光度值}) / (\text{标准管吸光度值} - \text{标准空白管吸光度值}) \times \text{标准品浓度}(10 \mu\text{mol/L}) \div \text{蛋白含量(g/L)}$$

蛋白含量测定: 所需考马斯亮蓝试剂按南京建成公司提供试剂盒说明进行配置。将上述离心后取出待用的上清 50 μ L 用生理盐水按 1:9 稀释成 1%组织匀浆。①标准管: 依次加入标准液 0.05 mL, 已配置考马斯亮蓝试剂 3 mL。②测定管: 依次加入样品 0.05 mL, 已配置考马斯亮蓝试剂 3 mL。③空白管: 依次加入蒸馏水 0.05 mL, 已配置考马斯亮蓝试剂 3 mL。④混匀各管, 静置 10 min, 用紫外分光光度计(595 nm 处, 1 cm 光径, 蒸馏水调零)测各管 A 值。

蛋白含量计算公式:

$$\text{蛋白含量(g/L)} = (\text{测量管吸光度值} - \text{空白管吸光度值}) / (\text{标准管吸光度值} - \text{空白管吸光度值}) \times \text{标准管浓度(g/L)}$$

主要观察指标: 肺组织苏木精-伊红染色、透射电镜、湿干比、髓过氧化物酶、丙二醛结果。

设计、实施、评估者: 实验的设计及评估由第一作者和通讯作者共同完成, 实验的实施由第一至五作者和通讯作者共同完成。上述人员均接受过相应的动物实验培训。

统计学分析: 由第五作者采用 SPSS 11.5 数据统计软件进行统计分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用独立样本 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 选取实验动物 32 只, 分为 2 组, 无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 两组 MPO 值随保存时间变化 无论对照组、实验组, MPO 在灌注后均高于灌注前, 但差异无显著性意义; 离体保存过程中, 各时间点呈渐增趋势, 至保存 12 h 开始, 与灌注前相比, 差异有显著性意义; 但保存 24 h 与保存 12 h 相比差异无显著性意义, 见表 1。

表 1 两组 MPO 值随保存时间变化的比较
Table 1 Time variation of myeloperoxidase in two groups ($\bar{x} \pm s$, U/g)

Group	Right lung pre-perfusion	Right lung after-perfusion	4-h preservation
Control	0.24 \pm 0.03	0.25 \pm 0.02	0.37 \pm 0.09
Experimental	0.23 \pm 0.07	0.25 \pm 0.08	0.36 \pm 0.09
Group	8-h preservation	12-h preservation	24-h preservation
Control	0.52 \pm 0.05	0.74 \pm 0.02 ^a	1.20 \pm 0.04 ^b
Experimental	0.45 \pm 0.05	0.76 \pm 0.07 ^a	1.06 \pm 0.05 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$, vs. right lung pre-perfusion

2.3 两组丙二醛值随保存时间变化 无论对照组、实验组, 丙二醛在灌注后均高于灌注前, 但差异无显著性意义; 离体保存过程中, 各时间点呈渐增趋势, 至保存 8 h 开始, 与灌注前相比差异有显著性意义; 保存 12 h 与保存 8 h 相比差异无显著意义, 但保存 24 h 与保存 8 h 相比, 差异也有显著性意义, 见表 2。

2.4 两组 W/D 值随保存时间变化 无论对照组、实验组, 肺组织 W/D 在灌注后均高于灌注前, 但差异无显著性意义; 离体保存过程中, 各时间点呈渐增趋势, 至保存 8 h 开始, 与灌注前相比, 差异均有显著性意义; 但是保存 12 h 及 24 h 与保存 8 h 相比, 差异无显著性意义, 见表 3。

表2 两组丙二醛值随保存时间变化的比较
Table 2 Time variation of malonaldehyde in two groups (x±s, μmol/g)

Group	Right lung pre-perfusion	Right lung after-perfusion	4-h preservation
Control	32.55±1.94	40.94±1.16	44.08±1.33
Experimental	29.09±0.89	37.38±1.90	42.56±1.72

Group	8-h preservation	12-h preservation	24-h preservation
Contro	49.61±1.57 ^a	64.81±1.75 ^b	78.94±1.43 ^{bc}
Experimental	48.17±2.12 ^a	59.86±1.52 ^b	73.34±1.22 ^{bc}

^aP < 0.05, ^bP < 0.01, vs. right lung pre-perfusion; ^cP < 0.05, vs. 8-h preservation

表3 两组W/D值随保存时间变化
Table 3 Time variation of wet to dry weight ratio (W/D) in two groups (x±s)

Group	Right lung pre-perfusion	Right lung after-perfusion	4-h preservation
Control	4.72±0.23	4.81±0.85	5.52±0.56
Experimental	5.01±0.43	5.72±0.75	6.17±0.33

Group	8-h preservation	12-h preservation	24-h preservation
Control	6.45±0.86 ^a	7.68±0.72 ^a	8.52±0.90 ^b
Experimental	6.43±0.26 ^a	7.24±0.68 ^a	8.27±0.71 ^b

^aP < 0.05, ^bP < 0.01, vs. right lung pre-perfusion

2.5 两组肺组织病理光镜观察结果 在灌注保存后, 两组肺组织均出现损伤表现。灌注后及保存 4 h 肺组织, 结构清晰完整, 肺泡间质及脉管周围组织无明显水肿, 肺泡腔内无明显积液。保存 8 h 肺组织, 肺泡腔可见轻度水肿, 部分有轻度淤血, 局灶可见少量巨噬细胞渗出; 肺泡壁增厚, 间隔增宽, 局灶水肿, 灶性中性粒细胞、淋巴细胞及单核细胞浸润渗出, 以中性粒细胞为主; 个别血管内可见血栓形成, 见图 1。保存 12 h 肺组织, 肺泡间质及脉管周围可见水肿, 部分肺泡上皮细胞脱落, 肺泡腔内水肿明显, 巨噬细胞渗出明显。保存 24 h 肺组织, 可见肺泡融合, 肺大泡形成, 肺泡上皮脱落, 红细胞外渗等。对照组与实验组比较, 后者的光镜病理变化在保存 8 h 略轻, 而灌注后, 保存 4, 12 及 24 h 两组光镜病理变化无明显区别。

2.6 两组肺组织透射电镜观察结果 两组供肺术前超微结构无明显差异, 灌注后肺组织超微结构与灌注前相似。保存 4 h 血管内皮, 肺泡上皮细胞结构尚完整, 但均已略肿胀, 上皮细胞内线粒体轻度肿胀。保存 8 h 超微结构变化明显, 血管内皮细胞内可见肥大细胞; I 型肺泡细胞内轻度细胞器空泡变性, 细胞间隔增宽; 部分 II 型肺泡上皮细胞存在排空现象, 线粒体肿胀或空泡变性, 可见板层小体, 细胞间脊消失, 初级、次级溶酶体形成, 见图 2。保存 12 h, 上皮细胞的线粒体嗜断裂、消失, 内质网扩张, 上皮细胞间连接松散, 肺泡壁毛细

血管损伤仍较轻, 气血屏障结构尚完整。保存 24 h 后, 肺泡已出现部分塌陷, 肺泡表面覆盖上皮大量脱落; 上皮细胞形状不规则, 其细胞器部分结构存在但明显肿胀, 部分已被破坏, 线粒体破坏明显; 血管内皮细胞增生、肿胀, 血管充血, 基膜有断裂; 气血屏障明显增宽, 肺泡壁增厚; 部分肺泡已经塌陷、融合。两组对比, 保存 8 h 后肺组织超微结构变化实验组较对照组变程度略轻; 但灌注后, 保存 4, 12 和 24 h 后, 两组变化基本相似。

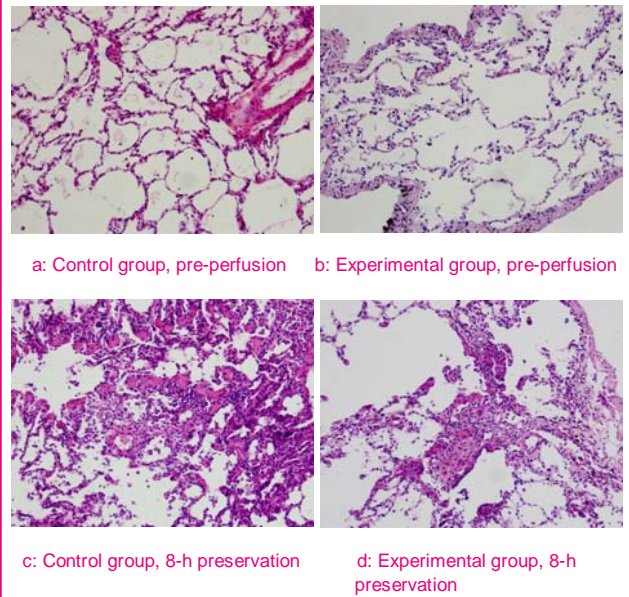


Figure 1 Pathological observation of lung tissues in two groups (Hematoxylin-eosin staining, x20)
图1 两组肺组织病理光镜观察(苏木精-伊红染色, x20)

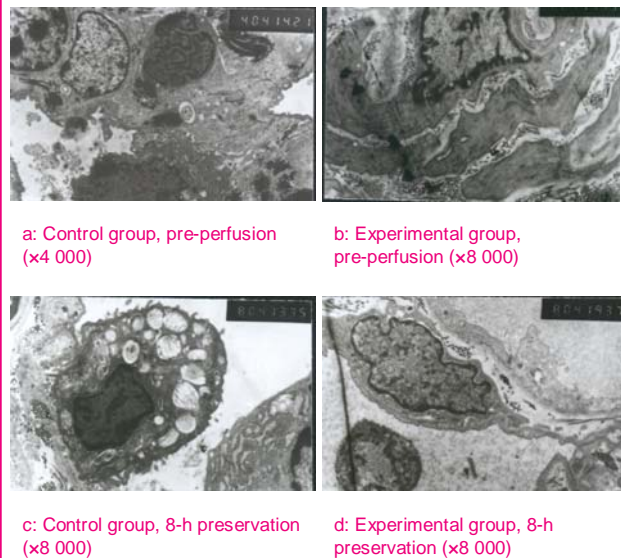


Figure 2 Observation of lung tissues under a transmission electron microscope
图2 两组肺组织透射电镜观察

3 讨论

3.1 改良自制LPD液的特点 LPD液模拟细胞外液成分配制而成, 含有低浓度 K^+ 和高浓度 Na^+ , 同时含有低分子右旋糖苷40。低钾能够避免高钾对内皮细胞的损伤, 从而减少内皮细胞生成和释放炎症递质^[6]; 而右旋糖苷40作为高渗基质的作用包括: ①提高胶体渗透压。②改善微循环, 保护内皮-上皮屏障, 阻止无复流现象发生。③减少供肺脂质过氧化物的发生, 保护肺表面活性物质的活力。④可能作为氧自由基清除剂。⑤促进肺成纤维细胞的蛋白合成等^[3]。

3.2 不同灌注保存液比较 供肺灌注保存液主要分为细胞内液型和细胞外液型。总体上, 认为无论在移植肺功能, 炎症反应, 肺损伤, 肺水肿以及减少原发性移植失功等方面, 细胞外液型灌注保存液供肺保存效果明显好于细胞内液型灌注保存液的学者占多数^[7-8]; 而在细胞外液型灌注保存液中, 又以LPD液的灌注保存效果较好^[5, 7]。

进一步改善LPD液灌注保存效果的改良研究已经开展^[9]。所谓改良目前包括: LPD液添加葡萄糖以降低低温保存肺中的有氧代谢^[10], 以及添加一氧化氮供体如三硝酸盐等^[11]。国外动物实验添加新型弹性蛋白酶抑制剂^[12]、国内临床尝试使用添加棉子糖的改良LPD液^[13], 也取得较好的效果。

3.3 LPD液的配制 正是基于前述国际上对于LPD液供肺灌注保存效果的多数认可, 以及因不满足LPD液目前灌注保存效果而进行进一步改良的趋势, 作者选用LPD液作为配制及改良肺移植灌注保存液研究的原型及对照标准。

实验结合LPD液的配方, 经过反复试验, 自行配置了LPD液。初期配制时在渗透压及pH值方面与LPD液差距较大, 通过调整配方内含 Na^+ 成分的剂量, 并以添加碳酸氢钠的方式在基本维持电解质浓度的情况下, 使pH值接近LPD液水平。同样为了接近LPD液的渗透压, 本实验增加了原配方没有的甘露醇, 而其他研究也证实, 甘露醇不仅可调节渗透压, 也可以减轻细胞间隙水肿, 具有抗缺血再灌注损伤作用^[14]。

最终配制结果虽然成分和理化特性与LPD液仍有一定差距, 但已经非常接近, 成为进一步研究的基础。

3.4 自制LPD液的改良 为了完善自制LPD液肺保存效果, 依据肺移植肺损伤的机制及肺损伤保护原则, 本实验进一步提出自制LPD液的改良方案。

肺灌注保存及再灌注损伤的机制和肺保护原则: 普遍认为再灌注后氧自由基的生成、钙超载、内皮功能不良与激活的中性粒细胞之间的相互作用参与了缺血再灌注损伤^[15-16]。

初期移植肺功能障碍的主要原因是缺血再灌注损伤, 而供体肺灌注保存期间的低温、缺血、缺氧激活残留的中性粒细胞、淋巴细胞、巨噬细胞产生炎症细胞因子、氧自由基等有害物质, 还引起三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)耗竭、乳酸增加, 细胞内钙超载^[17-18]。因而肺灌注保存直接导致的肺损伤同样不容忽视。

根据肺移植缺血再灌注损伤及供肺灌注保存肺损伤的机制, 肺移植肺损伤保护主要包括4个方面: ①抑制中性粒细胞聚集和激活。②清除氧自由基。③血管内皮细胞损伤的保护, 而内皮细胞的保护包括: 环磷酸腺苷的补给: 通过肺灌注液中添加前列腺素完成; 保护性一氧化氮的补充肺灌注液中添加硝酸甘油和硝酸盐阴离子(一氧化氮供体)增加保护性一氧化氮产生或添加L-精氨酸(一氧化氮前体)增加保护性一氧化氮合成。④肺上皮细胞损伤的保护, 主要通过给与外源性肺表面活性物质完成^[19]。

自制LPD液的进一步改良方案: 针对肺移植肺损伤的机制及保护原则, 特别是内皮细胞保护的重要性; 国内外在LPD液中加入前列腺素E1, 保护性一氧化氮供体或前体等以提高LPD液肺保存效果的成功改良方案以及国内临床使用的便捷性和经济性^[20], 作者对自行配置的LPD液提出进一步改良方案: 增加原LPD液配方中没有的前列腺素E1和硝酸甘油。

这两种新添加剂的具体作用如下: ①前列腺素E1的作用: 前列腺素E1具有选择性扩张肺血管作用, 通过对抗低温引起的肺血管反射性收缩和气道痉挛达到迅速降温和充分灌洗供肺的目的; 同时前列腺素E1具有抗炎特性, 能抑制中性粒细胞黏附, 血小板聚集及溶酶体酶的释放, 改善血管通透性; 另外, 前列腺素E1还可有效地抑制 K^+ 介导的血管收缩^[15]。本组试验中, 自制LPD液添加前列腺素E1后, 在灌注液成分仍有差距的前提下, 供肺保存效果能与LPD液基本相似, 前列腺素E1的供肺保护作用得到进一步证实。②一氧化氮的作用: 通过系统研究, 保护性一氧化氮减轻肺缺血再灌注损伤的机制包括^[21]: 一氧化氮能对抗内皮素、儿茶酚胺以及缺氧等引起的肺血管收缩, 降低PVR; 调节血管张力和维持通气/血流平衡, 既舒张肺血管, 也舒张支气管平滑肌; 抑制血细胞与内皮细胞黏附, 减少氧自由基的产生; 具有保持血管内皮通透性的特性; 具有非特异性广谱抗微生物活性。

增加保护性一氧化氮的方法主要集中在两个方面: 一是一氧化氮直接吸入, 其作用仅局限于肺, 对体循环无影响^[22], 但是临床使用不便, 需要特殊设计机械呼吸装置并可监测气体浓度, 导致临床上难以推广^[23]。另一方面是在灌注保存液中增加一氧化氮的供体或前体, 但是受到一氧化氮合酶的限制, 效果难以持久, 且对体循

环有一定影响^[24]。虽然有上述问题, 但是一氧化氮的供体或前体如硝酸甘油、L-精氨酸加入灌注保存液改善保存效果仍得到证实^[25]。特别是由于吸入一氧化氮在目前国内供体获取时开展可能性很小, 为了研究的实用性, 作者选择临床上较常使用的硝酸甘油作为一氧化氮供体加入自制LPD液进行改良。

在本组研究中, 自制LPD液中加入硝酸甘油用于供肺灌注保存, 通过增加保护性一氧化氮生成使得改良自制LPD液肺保护效果与LPD液无明显差异, 保护性一氧化氮的肺保护作用得到进一步证实。

3.5 改良自制LPD液离体肺保存时间的观察及与LPD液比较 供肺保存时间是评价肺保存方案乃至灌注保存液保存效果的重要指标之一^[1]。目前临床应用的肺保存技术所提供的保存期限为4~6h^[26], 短于其他实质脏器的保存时间, 也成为肺移植发展的制约因素^[27]。针对延长有效肺保存时间以改善肺保存效果的研究很多, 如在LPD液中添加维生素E、维生素C和尿激酶进行改良, 在双肺移植实验中, 供肺保存达到18h后移植仍功能良好^[28]; 也有在LPD液中加入氨基乙酸及经氨基乙酸静脉预处理, 供肺保存24h后移植功能良好的报道^[29]。最近, 国内研究证实, 在LPD液中加入棉子糖, 不但能明显减轻缺血末期组织损伤和保持细胞完整性, 提高再灌注后移植肺功能, 而且可以将肺保存时间明显延长至12h^[30], 其结果也得到了临床验证^[13]。

实验观察了两组离体肺保存不同时间的参数变化。无论对照组还是实验组, MPO、丙二醛和W/D等指标均随着保存时间的延长呈渐增趋势, 但是在灌注后及保存4h和灌注前相比, 差异无显著性意义($P > 0.05$)。保存8h后, 两组的丙二醛和W/D出现显著变化($P < 0.05$), 而MPO在保存12h后出现显著变化($P < 0.05$)。两组肺组织结构和超微结构的改变随着保存时间的延长, 也有逐步加重的趋势: 在保存4h后变化仍不明显; 到保存8h后已经出现明显改变, 但仍未出现严重不可逆的改变; 而保存12h后肺泡结构出现一些不可逆的组织学改变, 如肺泡上皮脱落、线粒体嵴断裂等; 保存24h后不可逆改变已经非常明显: 肺泡融合、红细胞外渗、气血屏障破坏等, 此时肺组织肯定不能再用于移植。虽然目前国内外研究尚无关于供肺出现严重不可逆损伤而无法移植的MPO、丙二醛及W/D确切值的报道, 但是作者认为测定值与灌注前相应值对照出现显著差异, 可说明此时供肺损伤已达到一定程度, 可能影响移植后受体肺功能和生存, 故应尽量避免应用保存时间过长而某参数已出现显著变化的供肺进行移植。作为评价供肺功能重要指标的供肺结构及超微结构的改变, 存在上述公认的不可逆改变表现^[30], 而在供肺保存时间上则应尽量短于不可逆改变出现的时限。

改良自制LPD液在本实验条件下保存供肺4h供肺

组织结构及超微结构变化不明显, 保存供肺8h后出现明显改变但尚未出现不可逆改变, 保存12h后出现不可逆改变; MPO、丙二醛和W/D与灌注前相比的显著变化出现在保存8h甚至12h后。作者认为改良自制LPD液在本实验条件下保存供肺4h后移植应该是安全的, 而安全保存时间期限可能达到8h, 需要进一步实验, 特别是活体功能实验加以证实。

对于LPD液保存的供肺在保存8h后, 肺组织结构及超微结构也未出现不可逆改变, 且MPO、丙二醛及W/D的显著变化也出现在保存8h甚至12h后, 作者认为与本实验条件采用23℃灌注、10℃保存的灌注保存温度和供肺获取时50%的吸入氧浓度有关, 有研究证实与传统的4℃灌注保存和供肺获取时的空气吸入相比^[31-32], 前者供肺灌注保存效果更好。因而作者推测, LPD液在本实验条件下的安全肺保存期限可能超过传统的4~6h而达到8h, 当然进一步系统的比较研究是必需的。

4 参考文献

- [1] Hicks M, Hing A, Gao L, et al. Organ Preservation. *Methods Mol Biol.*2006; 333: 331-374.
- [2] Okada Y, Kondo T. Preservation solution for lung transplantation. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.*2009; 57(12): 635-639.
- [3] Van Raemdonck D. Thoracic organs: current preservation technology and future prospects; part 1: lung. *Curr Opin Organ Transplant.*2010;15(2):1550-1553.
- [4] The Ministry of Science and Technology of the People's Republic of China. Guidance Suggestions for the Care and Use of Laboratory Animals. 2006-09-30. 中华人民共和国科学技术部. 关于善待实验动物的指导性意见. 2006-09-30.
- [5] Zhao FR, Jiang YG, Li NB, et al. *Zhonghua Waikexue Zazhi.* 1997; 35(10): 611-619. 赵凤瑞, 蒋耀光, 李乃斌, 等. 肺移植的经验与教训(附3例报告)[J]. *中华外科杂志.* 1997, 35(10): 611-619.
- [6] Pu JT, Liu LX. *Zhongguo Xiongxin Xueguan Waikexue Zazhi.* 2007;14(3): 216-220. 蒲江涛, 刘伦旭. 肺移植手术中供肺保存液的研究现状[J]. *中国胸心血管外科杂志.* 2007, 14(3): 216-220.
- [7] Gao S, Wu QY, Hu SS, et al. *Zhongguo Xunhuan Zazhi.* 2007;22(3): 223-226. 高爽, 吴清玉, 胡盛寿, 等. 不同肺保护液对肺移植肺保护过程中肺损伤的保护作用[J]. *中国循环杂志.* 2007, 22(3): 223-226.
- [8] Bertolotti A, Gómez C, Lascano E, et al. Effect of preservation solution on graft viability in single-lung transplantation from heart-beating donors in pigs. *Transplant Proc.* 2007;39(2): 355-357.
- [9] Nikolaus P, Vitaly M, Konstantinos T, et al. PDE-5 inhibitor donor intravenous preconditioning is superior to supplementation in standard preservation solution in experimental lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2007; 32(1): 42-47.
- [10] Rega FR, Neyrinck AP, Verleden GM, et al. How long can we preserve the pulmonary graft inside the nonheart-beating donor. *Ann Thorac Surg.*2004; 77(2): 438-444.
- [11] Wittwer T, Albes JM, Fehrenbach A, et al. Experimental Lung preservation with Perfadex: effect of the NO-donor nitroglycerin on postischemic outcome. *J Thorac Cardiovasc Surg.*2003;125(6): 1208-1216.
- [12] Mori H, Nagahiro I, Osaragi T, et al. Addition of a neutrophil elastase inhibitor to the organ flushing solution decreases lung reperfusion injury in rat lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg.*2007; 32(5):791-795.
- [13] Chen JY, Hu CX, Zhu QK, et al. *Zhonghua Yixue Zazhi.* 2004; 84(17): 1416-1417. 陈静瑜, 胡春晓, 朱乾坤, 等. 改良低钾右旋糖苷液供肺灌注保存的临床观察[J]. *中华医学杂志.* 2004, 84(17): 1416-1417.

- [14] Liu XY, Song HM, Bi YW, et al. Zhonghua Qiguan Yizhi Zazhi. 2002; 23(6):333-335.
刘相燕, 宋惠民, 毕研文, 等. 自制SDMC-2液对离体大鼠心脏低温保存的实验研究[J]. 中华器官移植杂志, 2002, 23(6): 333-335.
- [15] Liu DR, Zhao FR, Zhonghua Xiongxin Xueguan Waikexue Zazhi. 2000; 16(3): 186-188.
刘德若, 赵凤瑞. 肺保存过程中损伤机制的研究进展[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2000, 16(3): 186-188.
- [16] Gong SG, Liu JM. Jixu Yixue Jiaoyu. 2007; 21(11): 24-27.
宫素岗, 刘锦铭. 肺移植缺血再灌注损伤肺保护的研究进展[J]. 继续医学教育, 2007, 21(11): 24-27.
- [17] Kuntz CL, Hadjilias D, Ahya VN, et al. Risk factors for early primary graft dysfunction after lung transplantation: a registry study. Clin Transplant. 2009; 23(6): 819-830.
- [18] Silva C, Carvalho RS, Cagido VR, et al. Influence of lung mechanical properties and alveolar architecture on the pathogenesis of ischemia-reperfusion injury. Interact Cardiovasc Thorac Surg. 2010. [Epub ahead of print]
- [19] Zhang WW, Xue YL. Zhongguo Tiwai Xunhuan Zazhi. 2005; 3(4): 254-256.
张玮玮, 薛玉良. 肺移植术中缺血再灌注损伤的保护[J]. 中国体外循环杂志, 2005, 3(4): 254-256.
- [20] Marc P, Shaf K. Lung preservation. Curr Opin Organ Transplant. 2001; 6(1): 223-230.
- [21] Xu ZB, Li Y, Li N, et al. Zhonghua Qiguan Yizhi Zazhi. 2005; 26(4): 226-228.
许崇武, 李野, 李楠, 等. 硝普钠在预防肺缺血再灌注损伤中的作用及机制[J]. 中华器官移植杂志, 2005, 26(4): 226-228.
- [22] Liao DS, Li ZQ, Yu Y. Fujian Yike Daxue Xuebao. 2008; 42(2): 109-112.
廖东山, 李增祺, 余毅. 吸入一氧化氮对大鼠无心跳供体肺缺血再灌注损伤的影响[J]. 福建医科大学学报, 2008, 42(2): 109-112.
- [23] Dong BM, Abano JB, Egan TM. Nitric oxide ventilation of rat lungs from non-heart-beating donors improves posttransplant function. Am J Transplant. 2009; 9(12): 2707-2715.
- [24] Vainikka T, Heikkilä L, Kukkonen S, et al. L-Arginine in lung graft preservation and reperfusion. J Heart Lung Transplant. 2001; 20(5): 559-567.
- [25] Minamoto K, Pinsky DJ, Fujita T, et al. Timing of inhaled nitric oxide supplementation determines endothelial regulation and quality of lung preservation for transplantation. Am J Respir Cell Mol Biol. 2002; 26(1): 14-21.
- [26] Trulock EP, Edwards LB, Taylor DO, et al. The Registry of the International Society of Heart and Lung Transplantation: twenty-first official adult lung and heart-lung transplant report-2004. J Heart Lung Transplant. 2004; 23(7): 804-815.
- [27] Yeung JC, Cypel M, Waddell TK, et al. Update on donor assessment, resuscitation, and acceptance criteria, including novel techniques--non-heart-beating donor lung retrieval and ex vivo donor lung perfusion. Thorac Surg Clin. 2009; 19(2): 261-274.
- [28] Nishi H, Date H, Aoe M, et al. Canine bilateral lung transplantation after 18-hour preservation using non-heart-beating donors. J Heart Lung Transplant. 2007; 26(6): 610-616.
- [29] Gohrbandt B, Fischer S, Warnecke G, et al. Glycine intravenous donor preconditioning is superior to glycine supplementation to low-potassium dextran flush preservation and improves graft function in a large animal lung transplantation model after 24 hours of cold ischemia. J Thorac Cardiovasc Surg. 2006; 131(3): 724-729.
- [30] Yang GY, Chen JY, Xiao YH, et al. Linchuang yu Shiyan Binglixue Zazhi. 2007; 23(2): 210-212.
杨国仪, 陈静瑜, 夏钰弘, 等. 棉子糖低钾右旋糖苷液供体肺灌注保存的临床病理学研究[J]. 临床与实验病理学杂志, 2007, 23(2): 210-212.
- [31] Zhang ZR, Liu DR. Beijing: Beijing Daxue Yixuebu. 2008
张真榕, 刘德若. 温度对肺保存效果的影响[D]. 北京: 北京大学医学部, 2008.
- [32] Yang XB, Wu QY, Liu XY, et al. Zhonghua Qiguan Yizhi Zazhi. 2001; 22(5): 264-265.
杨秀滨, 吴清玉, 刘小燕, 等. 肺泡内不同氧浓度对供肺保存效果的影响[J]. 中华器官移植杂志, 2001, 22(5): 264-265.

来自本文课题的更多信息一

利益冲突: 本课题研究经费来源于卫生部中日友好医院课题经费, 未接受任何其他赞助, 不存在利益冲突。

课题的意义: 肺移植已经成为治疗终末期肺病的重要方法, 低钾右旋糖苷液是灌注保存效果较好的肺灌注保存液, 但是在保存效果及保存时间上仍有提高的空间, 特别是价格昂贵, 成为制约肺移植应用的一个因素。本课题作为卫生部中日友好医院胸外科改良自制低钾右旋糖苷液系列研究的一部分, 通过自行配制低钾右旋糖苷液并改良, 在动物实验中获得与 Perfadex 液相近的灌注保存效果, 而自制低钾右旋糖苷液的价格较 Perfadex 明显低廉, 如果最终能应用于临床, 可明显降低患者费用, 对临床肺移植的开展、治疗更多的终末期肺病患者具有一定意义。

课题评估的“金标准”: 本课题主要结果指标如肺组织过氧化氢酶、丙二醛、W/D、光镜下表现及透射电镜下表现是评价肺质量及功能的常用指标, 目前尚无公认的“金标准”。

设计或课题的偏倚与不足: 仅将改良自制低钾右旋糖苷液与低钾右旋糖苷液比较, 缺少与生理盐水作为灌注保存液的阴性对照; 缺乏供肺移植后活体肺功能的指标且样本数较少。作为系列研究, 上述缺陷部分正在其他相关研究中进行补充。

提供临床借鉴的价值: 通过一系列研究, 目前改良自制低钾右旋糖苷液的配制方法已趋于稳定成熟, 完成了初步动物实验及毒理和药物代谢研究, 拟进一步完善后逐步开展临床研究, 因而应用于临床的可行性存在, 前景较好。