

无心跳供体肺移植中部分液体通气对肺保护的病理学评估**

闫宇博, 崔 健, 张 凯, 曹守强, 刘 成, 辛衍忠, 赵桂彬, 韩敬泉, 董 庆, 张翔宇, 李吉尧

Pathological assessment of part liquid ventilation in the protection of non-heart-beating donor lung

Yan Yu-bo, Cui Jian, Zhang Kai, Cao Shou-qiang, Liu Cheng, Xin Yan-zhong, Zhao Gui-bin, Han Jing-quan, Dong Qing, Zhang Xiang-yu, Li Ji-yao

文章亮点:

从病理学角度验证了氟化碳部分液体对无心跳供体肺起到了极佳的保护作用, 可通过降低缺血再灌注损伤, 进一步降低原发性移植物失功能的发生率。

Abstract

BACKGROUND: How to protect the non-heart-beating donor lung in the warm ischemia period in order to reduce the primary graft dysfunction after transplantation is the most important issue to all the researchers and clinicians.

OBJECTIVE: To assess the effect of part liquid ventilation in the protection of non-heart-beating donor lung from pathology.

METHODS: Thirty-six health SD rats were randomly divided into three groups. Homemade 16G deep vein needle lien was used for endotracheal intubation and connected to a respirator machine with mechanical ventilation. The KACL solution was injected into the jugular and lead to the rat sudden death, the multi-channel physiological detector was used to continuous record the blood pressure, the model was successful when the blood pressure was 0 mmHg. After the models were established, the models in the normal mechanical ventilation group were preformed with mechanical ventilation for 2 hours; the models in the saline group and the perfluoro carbon group were given oxygen ventilation for 5 minutes, then injected with the equivalent of the functional residual capacity of the oxygen salt and high oxygen perfluoro carbons (10 mL/kg) by endotracheal intubation, and mechanical ventilation for 2 hours.

RESULTS AND CONCLUSION: General observation showed that the lung of saline group was swelling, the sheet surface of lung tissue was bleeding, the lung was dark red, airway edema with bloody fluid; the lung of oxygen group was less swelling and less bleeding points of lung surface; in the perfluoro carbon group, the lung tissue inflammatory cell infiltration and edema was reduced. Light microscope observation of saline group and oxygen group showed that there was diffuse alveolar and interstitial hyperemia and edema, a large number of inflammatory cell infiltration could be seen in the bronchial wall and capillaries surrounding, the alveolar was over-expansion and the alveolar wall was ruptured; the lung tissue structure in the perfluoro carbon group was more complete and no significant damage. The results show that partial liquid ventilation can play a very good role in the protection of the non-heart-beating donor lungs.

Department of Thoracic Surgery, Fourth Affiliated School of Clinical Medicine, Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China

Yan Yu-bo★, Master, Physician, Department of Thoracic Surgery, Fourth Affiliated School of Clinical Medicine, Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China
yanyubo11@163.com

Corresponding author: Cui Jian, Doctor, Chief physician, Department of Thoracic Surgery, Fourth Affiliated School of Clinical Medicine, Harbin Medical University, Harbin 150000, Heilongjiang Province, China

Yan YB, Cui J, Zhang K, Cao SQ, Liu C, Xin YZ, Zhao GB, Han JQ, Dong Q, Zhang XY, Li JY. Pathological assessment of part liquid ventilation in the protection of non-heart-beating donor lung. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(31): 5783-5787. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

Supported by: "Harbin Excellent Academic Leaders" Foundation, No.2011RFXYS077*

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.31.019

Received:2011-12-01
Accepted:2012-01-29

摘要

背景:如何在热缺血期给予无心跳供体肺提供保护进而降低移植后原发性移植物失功能是所有研究者和临床医生面前的首要问题。

目的:从病理学角度评价部分液体通气在无心跳供体肺移植中对供体肺的保护作用。

方法:将 36 只清洁级 SD 大鼠随机均分为 3 组, 应用自制 16G 深静脉留置针作气管插管, 行气管切开并连接至呼吸机机械通气。经颈静脉注入 KACL 溶液猝死大鼠, 用多导生理检测仪连续记录血压, 在血压变为 0 mm Hg 时, 认为造模成功, 模型建立后氧气组大鼠继续给予机械通气 2 h; 盐水组和氟化碳组先给予盐水和氟化碳 5 min 的纯氧通气, 后从气管插管中注入相当于功能残气量的高氧盐水和高氧氟化碳(10 mL/kg), 并给予机械通气 2 h。

结果与结论:大体观察盐水组肺脏肿胀, 肺组织表面片状出血, 肺呈暗红色, 气道内有血性水肿液; 氧气组见肺脏肿胀较轻, 肺表面有少量出血点; 氟化碳组肺组织炎症细胞浸润和组织水肿明显减轻。光镜下盐水组和氧气组呈弥漫性肺泡和间质充血、水肿, 支气管壁及毛细血管周围有大量的炎性细胞浸润和肺泡过度膨胀, 肺泡壁断裂; 氟化碳组肺组织细胞结构较为完整, 无明显破坏。结果可见部分液体通气可以对无心跳供体肺起到很好的保护作用。

哈尔滨医科大学
附属第四临床医
学院胸外科, 黑龙
江省哈尔滨市
150000

闫宇博★, 男,
1984年生, 黑龙
江省齐齐哈尔市
人, 汉族, 2011
年哈尔滨医科大学
毕业, 硕士, 医
师, 主要从事无心
跳供体肺移植供
肺保护研究。
yanyubo11@
163.com

通讯作者: 崔健,
博士, 主任医师,
哈尔滨医科大学
附属第四临床医
学院胸外科, 黑龙
江省哈尔滨市
150000

中图分类号: R617
文献标识码: A
文章编号: 2095-4344
(2012)31-05783-05

收稿日期: 2011-12-01
修回日期: 2012-01-29
(20111201010/M·C)

关键词: 部分液体通气; 无心跳供体肺移植; 病理学; 热缺血; 氟化碳

闫宇博, 崔健, 张凯, 曹守强, 刘成, 辛衍忠, 赵桂彬, 韩敬泉, 董庆, 张翔宇, 李吉尧. 无心跳供体肺移植中部分液体通气对肺保护的病理学评估[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(31): 5783-5787.
[http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

肺移植是终末期肺部疾病惟一有效的治疗手段, 但肺移植供体的缺乏在肺移植中显得尤为突出^[1]。1991年在Egan等^[2]重新提出了无心跳供体肺移植的概念后, 肺移植研究者们又开始把研究方向转向了无心跳供体, 期望借此来缓解移植供体严重不足的问题。现在无心跳供体肺移植已经成功应用于临床^[3-5], 并且能够缓解中国供体严重缺乏的问题^[6]。与脑死亡供体相比无心跳供体要经历一段额外的热缺血期, 这会加重缺血再灌注损伤, 增加移植后早期原发性移植物失功能发生率和死亡率^[1]。原发性移植物失功能的病因仍不明确, 其主要临床表现和病理特征与同样由缺血再灌注诱导的急性呼吸窘迫综合征有诸多相似之处^[7]。过去的10余年中, 无论临床应用还是实验研究, 部分液体通气在由缺血再灌注损伤介导的急性呼吸窘迫综合征的临床及实验研究方面都受到极大的关注。

部分液体通气所应用的氟碳化合物是一种惰性、无色、高密度、低表面张力、不溶于水的液体, 其组织相容性好, 在体内基本不被吸收或代谢, 最为主要的是氟碳化合物能够溶解大量的气体, 尤其是氧气和二氧化碳^[8]。其独特的物理化学性质决定了氟碳化合物成为一种极佳的液体通气介质, 本实验从病理学角度评价氟碳化合物对无心跳供体肺的保护作用。

1 材料和方法

设计: 随机对照动物实验。

时间及地点: 实验于2010-10/2011-05在哈尔滨医科大学附属第二医院麻醉科实验室完成。

材料:

实验动物: 36只成年雄性清洁级SD大鼠, 体重250~300 g, 由中国医学科学院提供。

主要仪器、试剂:

试剂及仪器	来源
小动物呼吸机	Harvard Inspira, 美国
光学显微镜	Nikon 80i 全功能光学显微镜
多通道生理信号采集与处理系统	PowerLab/16SP, AD公司, 澳大利亚
体积分数为 99.95% 氧气	哈尔滨黎明气体公司
全氟环醚、氟化碳	ACROS ORGANICS 公司
生理盐水	石家庄四药

方法:

实验分组: 36只成年雄性清洁级SD大鼠, 随机分为3组: 正常对照组(氧气组), 无心跳供体盐水保护组(盐水组), 无心跳供体部分液体通气保护组(氟化碳组), 每组12只。

动物模型制备: 3%戊巴比妥钠60 mg/kg腹腔内注射麻醉, 左臀部肌肉注射阿托品0.2 mg。供体颈部和前胸腹部备皮, 取仰卧位, 四肢固定于自制鼠板上, 手术台铺设高压灭菌手术单。自制16G深静脉留置针作气管插管行气管切开, 接容量控制啮齿类动物呼吸机大鼠连接至小动物呼吸机, 行机械通气, 基本参数: 呼吸频率60次/min, 潮气量10 mL/kg, 吸入氧体积分数100%, 呼气末正压为0 kPa。经颈静脉注入KACL溶液猝死大鼠, 用多导生理检测仪连续记录血压, 血压变为0 mm Hg (1 mm Hg=0.133 kPa)时, 认为无心跳供体肺模型建立成功。模型建立后氧气组大鼠继续给予机械通气2 h; 盐水组和氟化碳组先给予盐水和氟化碳5 min的纯氧通气, 后从气管插管中注入相当于功能残气量的高氧盐水和高氧氟化碳(10 mL/kg), 并给予机械通气2 h。

标本的处理: 将右肺下叶组织取出, 置于甲醛溶液中固定, 乙醛脱水, 石蜡包埋, 切片厚4 μm。将大鼠左肺肺尖到肺底的中间部位的横切面进行苏木精-伊红染色。

肺损伤评分: 标本经苏木精-伊红染色后行显微镜下观察。根据肺泡上皮细胞破坏、毛细血管阻塞、肺间质水肿、肺泡内水肿、出血、

单核细胞浸润、多型核细胞浸润、肺泡间质水肿、透明膜形成、间质胶原降解判断肺损伤情况。肺损伤分4个级别：0分：肺血管、肺泡、间质及支气管均正常；1分：间质少量中性白细胞，间质及肺泡腔出血、水肿范围<25%；2分：间质及部分肺泡腔有较多白细胞，间质增宽，毛细血管淤血，肺泡腔出血及水肿的范围在25%~50%之间；3分：大部分细胞和间质有白细胞聚集成团，间质明显增宽，肺泡腔出血及水肿的范围在50%~75%之间。

主要观察指标：各组肺组织病理学改变以及病理组织评分。

统计学分析：实验数据结果计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示，组间比较采用单因素或多因素方差分析，运用SAS 9.1统计软件分析， $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

2 结果

2.1 实验动物数量分析 36只成年雄性清洁级SD大鼠，随机分为3组，每组12只，均建模成功并通气2 h后切取右肺下叶并行苏木精-伊红染色后行显微镜下观察。

2.2 大体观察 盐水组肺脏肿胀，肺组织表面片状出血，肺呈暗红色，气道内有血性水肿液；氧气组见肺脏肿胀较轻，肺表面有少量出血点；相对于盐水组及氧气组，氟化碳组改变很轻。

2.3 光镜观察 盐水组和氧气组呈弥漫性肺泡和间质充血、水肿，支气管壁及毛细血管周围有大量的炎性细胞浸润，肺泡过度膨胀，肺泡壁断裂，其中以盐水组更为明显，见图1和图2。

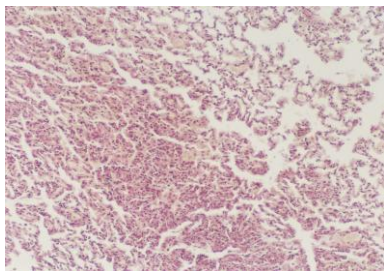


Figure 1 Light microscope observation of the lung tissue in the saline group showed the diffuse alveolar and interstitial hyperemia and edema, the bronchial wall and capillaries were surrounded by a large number of inflammatory cells, the alveolar was over-expansion and the alveolar wall was ruptured (Hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)

图1 盐水组肺组织光镜下可见呈弥漫性肺泡和间质充血、水肿，支气管壁及毛细血管周围有大量的炎性细胞浸润，肺泡过度膨胀，肺泡壁断裂(苏木精-伊红染色， $\times 100$)

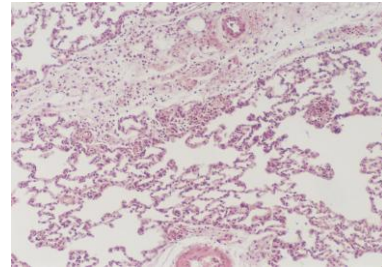


Figure 2 Light microscope observation of the lung tissue in the oxygen group showed the mild alveolar and interstitial hyperemia and edema, the bronchial wall and capillaries were surrounded by inflammatory cells, the alveolar was over-expansion and the alveolar wall was ruptured (Hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)

图2 氧气组肺组织光镜下可见轻度肺泡和间质充血、水肿，支气管壁及毛细血管周围有较多的炎性细胞浸润，肺泡壁断裂(苏木精-伊红染色， $\times 100$)

氟化碳组毛细血管扩张和间质肿胀不明显，有少量炎性细胞浸润，细胞壁保持完整，肺泡内未见透明膜，见图3。3组病理评分结果之间具有显著性意义($P < 0.05$)，见图4。

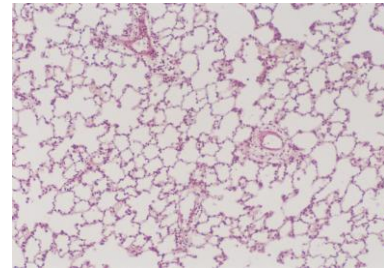
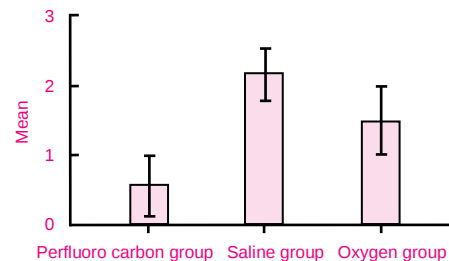


Figure 3 Light microscope observation of the lung tissue in the perfluoro carbon group showed the telangiectasia and stromal swelling was not obvious, a small amount of inflammatory cell infiltration and the cell wall was intact (Hematoxylin-eosin staining, $\times 100$)

图3 氟化碳组肺组织光镜下可见毛细血管扩张和间质肿胀不明显，有少量炎性细胞浸润，细胞壁保持完整(苏木精-伊红染色， $\times 100$)



The pathological scores have significant difference among the three groups ($P < 0.05$)

Figure 4 The lung pathological score
图4 各组肺组织病理评分

3 讨论

肺移植是终末期肺部疾病的有效治疗手段之一,由于供体的严重缺乏及心跳供体发生的“自主神经风暴”^[1,9],无心跳供体又重新回到人们的视线,成为肺移植新的研究及发展方向^[4,10]。对于无心跳供体肺移植,如何在热缺血期给予尸体肺提供保护进而降低术后原发性移植物失功能是摆在所有研究者和临床医生面前的首要问题^[11-13]。1968年Homatas等^[14]应用离体肺灌注模型证实停止循环后热缺血时间2 h内尸体肺通气功能基本正常,热缺血时间超过2 h后肺水肿明显增加。其他研究小组认为肺脏的热缺血耐受时间是1.0~2.0 h^[15-16]。因此本实验进行2 h的热缺血时间。低温是器官保护不可或缺的因素,即使肺脏能耐受一定时间的热缺血,但在细胞不可逆性损害发生之前低温降低代谢以维持ATP的水平并减少代谢废物的产生是肺脏保护最为重要的一步。现在最常用的降温技术为胸腔内表面降温和支气管降温^[17-19]。尽管采取了降温的方法,但是原发性移植物失功能的发生率仍较高,这就使得研究者思考寻找一种新的肺保护措施。缺血再灌注损伤作用机制很复杂,主要与自由基的作用、钙超载作用、中性粒细胞和黏附分子作用、细胞因子作用、内皮素作用相关。过去的10余年中,无论临床应用还是实验研究,部分液体通气在由缺血再灌注损伤介导的急性呼吸窘迫综合征的临床及实验研究方面都受到极大的关注^[20]。

部分液体通气所应用的氟碳化合物是一种惰性、无色、高密度、低表面张力、不溶于水的液体。其组织相容性好,在体内基本不被吸收或代谢,最为主要的是氟碳化合物能够溶解大量的气体,尤其是氧气和二氧化碳。正是因为氟碳化合物具有这些独特的物理化学性质,所以成为目前最理想的液态呼吸介质。肺脏是惟一不依赖灌注进行细胞呼吸代谢的器官,肺实质在循环停止后仍可能存活一段时间。氟碳化合物可以给无心跳供体肺提供氧气并带走局部组织产生的二氧化碳,部分液体通气的独特物理化学性质使其可以在无心跳供体肺移植中进行应用。

当发生缺血再灌注时,会激活炎症细胞,可以产生大量的炎症递质、氧自由基及蛋白水解酶等,进而直接和/或间接损伤血管内皮细胞和肺泡上皮细胞,而微血管损伤是再灌注失败的一个重要原因^[21]。在本实验中,氟碳化合物部分液体通气对肺组织的炎性反应有很好的控制作用。盐水组及氧气组病理变化为较重的组织充

血、水肿和炎性浸润。而氟化碳组组织充血、水肿和炎性浸润几乎未见。其原因是氟碳化合物对肺组织起到了很强的抗炎作用:①直接作用:氟碳化合物可以对巨噬细胞及其释放的白细胞介素1、白细胞介素2和肿瘤坏死因子 α 等细胞因子起到直接的抑制作用,从而发挥直接的抗炎作用^[22]。②间接作用:氟碳化合物作为肺灌洗的有效载体将肺泡内渗出物和炎症递质疏散、稀释,通过呼吸带出肺泡和外周小气道^[23],进而控制肺部炎症并改善通气。可见氟碳化合物部分液体通气可以降低缺血再灌注损伤,在理论上可以进一步的降低原发性移植物失功能的发生率。

正常肺功能的维持有赖于肺泡膜和微血管内皮细胞的完整性和正常的通透性。在肺移植过程中,肺泡的萎陷多发生在下垂的肺组织,而氟碳化合物密度较高,在重力的作用下下沉至下垂的肺组织,使萎陷的肺泡复张,使血流分布于通气更好的肺上部,进而提高了气体交换的效率。氟碳化合物具有高分布系数和低表面张力的特征,因此在注入肺脏后,可以均匀的分布于肺泡表面,从而使原来的液气界面被液液界面代替,减小肺表面张力,稳定肺泡结构,相当于外源性肺表面活性物质的作用。而且在氟碳化合物进入肺脏后可以稳定肺泡结构,进而对内源性肺表面活性物质起到保护作用。从本组实验的大体病理看,氟化碳部分液体通气可以保持热缺血期尸体肺肺泡膜及微血管内皮的完整性,并有效的降低肺组织水肿程度。这对于移植后肺功能的恢复及预防原发性移植物失功能有极其重要的作用。

致谢:感谢哈尔滨医科大学附属第二医院动物中心对实验的帮助。

4 参考文献

- [1] Bando T, Date H, Minami M, et al. First registry report: lung transplantation in Japan: The Japanese Society of Lung and Heart-Lung Transplantation. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;56(1):17-21.
- [2] Egan TM, Lambert CJ Jr, Reddick R, et al. A strategy to increase the donor pool: use of cadaver lungs for transplantation. *Ann Thorac Surg.* 1991;52(5):1113-1121.
- [3] de Antonio DG, Marcos R, Laporta R, et al. Results of clinical lung transplant from uncontrolled non-heart-beating donors. *J Heart Lung Transplant.* 2007;26(5):529-534.
- [4] Gomez-de-Antonio D, Varela A. Non-heart-beating donation in Spain. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2011;59(1):1-5.
- [5] de Antonio DG, de Ugarte AV. Present state of nonheart-beating lung donation. *Curr Opin Organ Transplant.* 2008;13(6):659-663.

- [6] Oto T. Lung transplantation from donation after cardiac death (non-heart-beating) donors. *Gen Thorac Cardiovasc Surg.* 2008;56(11):533-538.
- [7] Buchanan SA, Mauney MC, Parekh VI, et al. Intratracheal surfactant administration preserves airway compliance during lung reperfusion. *Ann Thorac Surg.* 1996;62(6):1617-1621.
- [8] Mitsuno T, Ohyanagi H, Yokoyama K. Development of a perfluorochemical emulsion as a blood gas carrier. *Artif Organs.* 1984;8(1):25-33.
- [9] Herijgers P, Leunens V, Tjandra-Maga TB, et al. Changes in organ perfusion after brain death in the rat and its relation to circulating catecholamines. *Transplantation.* 1996;62(3):330-335.
- [10] Gámez P, Córdoba M, Ussetti P, et al. Lung transplantation from out-of-hospital non-heart-beating lung donors. one-year experience and results. *J Heart Lung Transplant.* 2005;24(8):1098-1102.
- [11] Christie JD, Bavaria JE, Palevsky HI, et al. Primary graft failure following lung transplantation. *Chest.* 1998;114(1):51-60.
- [12] Wittwer T, Franke UF, Fehrenbach A, et al. Innovative pulmonary preservation of non-heart-beating donor grafts in experimental lung transplantation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2004;26(1):144-150.
- [13] Ahmad S, Shlobin OA, Nathan SD. Pulmonary complications of lung transplantation. *Chest.* 2011;139(2):402-411.
- [14] Homatas J, Bryant L, Eiseman B. Time limits of cadaver lung viability. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 1968;56(1):132-140.
- [15] Loehe F, Mueller C, Annecke T, et al. Pulmonary graft function after long-term preservation of non-heart-beating donor lungs. *Ann Thorac Surg.* 2000;69(5):1556-1562.
- [16] Aitchison JD, Orr HE, Flecknell PA, et al. Functional assessment of non-heart-beating donor lungs: prediction of post-transplant function. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2001;20(1):187-194.
- [17] Steen S, Sjoberg T, Pierre L, et al. Transplantation of lungs from a non-heart-beating donor. *Lancet.* 2001;357(9259):825-829.
- [18] Steen S, Liao Q, Wierup PN, et al. Transplantation of lungs from non-heart-beating donors after functional assessment ex vivo. *Ann Thorac Surg.* 2003;76(1):244-252.
- [19] Oto T, Calderone A, Pepe S, et al. High-flow endobronchial cooled humidified air protects non-heart-beating donor rat lungs against warm ischemia. *J Thorac Cardiovasc Surg.* 2006;132(2):413-419.
- [20] Kacmarek RM, Wiedemann HP, Lavin PT, et al. Partial liquid ventilation in adult patients with acute respiratory distress syndrome. *Am J Respir Crit Care Med.* 2006;173(8):882-889.
- [21] Sack FU, Dollner R, Reidenbach B, et al. Intravital microscopy of pulmonary microcirculation after single lung transplantation in pigs. *Transplant Proc.* 2006;38(3):737-740.
- [22] Riter HG, Brooks LA, Pretorius AM, et al. Intra-arrest hypothermia: both cold liquid ventilation with perfluorocarbons and cold intravenous saline rapidly achieve hypothermia, but only cold liquid ventilation improves resumption of spontaneous circulation. *Resuscitation.* 2009;80(5):561-566.
- [23] Uchida T, Makita K, Nakazawa K, et al. Relationship between airway pressure and the distribution of gas-liquid interface during partial liquid ventilation in the oleic acid lung injury model: fluorine-19 magnetic resonance imaging study. *Crit Care Med.* 2000;28(8):2904-2908.

来自本文课题的更多信息——

基金声明: “哈尔滨市优秀学科带头人”基金资助 (2011RFXYS077), 项目名称: 无心跳供体肺移植中肺泡Ⅱ型上皮细胞凋亡的研究。

作者贡献: 实验设计为崔键、闫宇博; 实验实施为闫宇博; 实验评估为崔键、闫宇博、董庆、韩敬泉、曹守强; 资料收集为闫宇博、董庆、韩敬泉、张凯、曹守强。闫宇博成文, 崔键审校, 闫宇博、崔键对文章负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理要求: 实验过程中对动物的处置应符合 2009 年《Ethical issues in animal experimentation》相关动物伦理学标准的条例。

研究的创新之处: 氟化碳部分液体通气在给予肺提供氧的同时还稳定了细胞机构, 进而对尸体肺起到了很好的保护作用。