

doi:10.3969/j.issn.2095-4344.2012.53.014 [http://www.crter.org/crter-2012-qikanquanwen.html]

纪勇, 陈静瑜, 郑明峰, 叶书高, 吴小波, 吴波, 刘峰. 无心跳供体肺移植大鼠模型的建立[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(53): 9951-9954.

## 无心跳供体肺移植大鼠模型的建立\*☆

纪勇, 陈静瑜, 郑明峰, 叶书高, 吴小波, 吴波, 刘峰

**文章亮点:** 成功建立了大鼠无心跳供体肺移植模型, 无心跳供体缺血 30 min 是肺移植的安全有效时间段, 超过此段时间会影响肺移植的成功率, 造成肺结构和功能的损害。

**关键词:** 肺移植; 缺血再灌注; 无心跳供体; 大鼠; 动物模型

### 摘要

**背景:** 大量实验表明, 供肺组织及肺血管功能在适当条件下可以保存, 当供体心跳停止后, 肺的气体交换系统可耐受缺血 60 min。

**目的:** 建立一种简单有效的无心跳供体肺移植大鼠模型。

**方法:** 60 只 SD 大鼠随机分为有心跳供体组、无心跳供体-缺血 30 min 组和无心跳供体-缺血 60 min 组, 每组 20 只。有心跳供体组供体大鼠取供肺保存在 4 °C 低钾右旋糖苷液中 4 h; 无心跳供体-缺血 30 min 组供体放血处死后, 维持通气 30 min, 使供肺在热缺血 30 min 后冷保存; 无心跳供体-缺血 60 min 组方法同无心跳供体-缺血 30 min 组, 不同之处在于供肺热缺血 60 min。各组大鼠循环回路连接后, 于 1, 15, 30, 45, 60 min 测出气道峰压和肺静脉血氧分压。灌注结束后检测供肺湿质量干质量比和丙二醛水平。

**结果与结论:** 有心跳供体组和无心跳供体-缺血 30 min 组所有指标比较差异均无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。各组气道峰压随时间的延长逐渐升高, 但无心跳供体-缺血 60 min 组升高程度高于有心跳供体组和无心跳供体-缺血 30 min 组 ( $P < 0.05$ )。各组供肺血氧分压均随着时间的延长而降低, 无心跳供体-缺血 60 min 组供肺血氧分压低于有心跳供体组和无心跳供体-缺血 30 min 组 ( $P < 0.05$ )。无心跳供体-缺血 60 min 组供肺湿质量干质量比和丙二醛水平较有心跳供体组和无心跳供体-缺血 30 min 组高 ( $P < 0.05$ )。结果提示大鼠无心跳供体肺移植灌注模型是一种安全有效的肺移植方法。

南京医科大学附属无锡人民医院, 江苏省无锡市 214023

纪勇☆, 男, 1981 年生, 江苏省连云港市人, 南京医科大学在读博士, 主要从事肺移植基础和临床研究。  
jiyong\_1981@163.com

中图分类号: R617  
文献标识码: A  
文章编号: 2095-4344  
(2012)53-09951-04

收稿日期: 2012-02-01  
修回日期: 2012-04-05  
(20120201003/M-C)

## Establishment of a rat lung transplantation model with non-heart beating donor

Ji Yong, Chen Jing-yu, Zheng Ming-feng, Ye Shu-gao, Wu Xiao-bo, Wu Bo, Liu Feng

### Abstract

**BACKGROUND:** A large number of experiments have shown that the donor lung tissue and pulmonary vascular function can be stored under appropriate conditions. When the donor heart beating stops, the pulmonary gas exchange system can be tolerant to the warm ischemia for 60 minutes.

**OBJECTIVE:** To establish a simple and effective rat lung transplantation model with non-heart beating donor.

**METHODS:** Sixty Sprague-Dawley rats were randomly divided into heart beating donor group, non-heart beating donor-ischemia 30 minutes group and non-heart beating donor-ischemia 60 minutes group, there were 20 rats in each group. The lungs of the donor rats in the heart beating donor group were obtained and stored in 4 °C low potassium dextran solution for 4 hours; rats in the non-heart beating donor-ischemia 30 minutes group were bloodletting sacrificed, and the lungs of the rats were maintained ventilation for 30 minutes, and then performed with cold preservation after hot ischemia for 30 minutes; the treatment method in the non-heart beating donor-ischemia 60 minutes group was similar to that in the heart beating donor-ischemia 30 minutes group, the difference was that the time of hot ischemia. The peak airway pressure and pulmonary venous blood oxygen partial pressure was measured at 1, 15, 30, 45 and 60 minutes after the connection of the circulation loop in each group. After perfusion, the wet weight and dry weight ratio and the malondialdehyde level were detected.

**RESULTS AND CONCLUSION:** There was no significant difference of all the indexes between heart beating donor group and non-heart beating donor-ischemia 30 minutes group ( $P > 0.05$ ). The peak airway pressure in each group was increased gradually along with the extension of time, but the peak airway pressure in non-heart beating donor-ischemia 60 minutes group was higher than that in the heart beating donor group and non-heart beating donor-ischemia 30 minutes group ( $P < 0.05$ ). The pulmonary blood oxygen partial pressure in each group was gradually decreased with the extension of time, and the pulmonary blood oxygen partial pressure non-heart beating donor-ischemia 60 minutes group

Affiliated Wuxi People's Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi 214023, Jiangsu Province, China

Ji Yong☆, Studying for doctorate, Affiliated Wuxi People's Hospital of Nanjing Medical University, Wuxi 214023, Jiangsu Province, China  
jiyong\_1981@163.com

Supported by: the National Science and Technology Support Program of China, No.2008BA160B05\*

Received: 2012-02-01  
Accepted: 2012-04-05

was lower than that in heart beating donor group and non-heart beating donor-ischemia 30 minutes group ( $P < 0.05$ ). The wet/dry weight ratio and the malondialdehyde level in non-heart beating donor-ischemia 60 minutes group were higher than those in heart beating donor group and non-heart beating donor-ischemia 30 minutes group ( $P < 0.05$ ). Non-heart beating donor-ischemia 30 minutes is a safe and effective method for lung transplantation.

Ji Y, Chen JY, Zheng MF, Ye SG, Wu XB, Wu B, Liu F. Establishment of a rat lung transplantation model with non-heart beating donor. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(53): 9951-9954.

## 0 引言

符合肺移植的肺疾病包括终末期的肺气肿、肺纤维化、支气管扩张症、矽肺、肺损毁、肺动脉高压等疾病<sup>[1]</sup>, 及时给予施行肺移植治疗, 可以使患者的肺功能得到明显的改善, 提高患者生活质量, 延长患者生存期。虽然肺移植的生存率仅有50%<sup>[2-3]</sup>, 然而真正制约肺移植发展的原因是供体短缺。近年来, 无心跳供体供肺的研究成为肺移植的重要课题, 大量实验表明, 供肺组织及肺血管功能在适当条件下可以保存<sup>[4-5]</sup>, 当供体心跳停止后, 肺的气体交换系统可耐受缺血60 min<sup>[6-7]</sup>。实验建立大鼠无心跳供体肺移植模型, 旨在提高供肺保存质量, 延长保存时间, 并探讨移植肺耐受缺血的安全时限。

## 1 材料和方法

**设计:** 动物模型设计。

**时间及地点:** 实验于2011年3至12月在无锡市人民医院肺移植重点实验室完成。

**材料:**

**实验动物:** 健康SD大鼠60只, 清洁级, 体质量250-350 g, 雌雄不拘, 由南京医科大学附属无锡市人民医院动物实验中心提供。

**主要仪器和试剂:**

仪器和试剂	来源
ALC-V9A型动物呼吸机	上海创萌生物科技有限公司
BT 00-300T型蠕动泵	保定兰格恒流泵有限公司
丙二醛试剂盒	上海研生生化试剂有限公司
低钾右旋糖苷液	瑞典Vitrolife公司
恒温水浴槽	上海江莱生物科技有限公司

**方法:**

**实验分组:** 将60只SD大鼠随机分为有心跳供体组20只、无心跳供体-缺血30 min组20只和无心跳供体-缺血60 min组20只。每组供体鼠10只, 受体鼠10只。

**供体肺移植模型的建立:** 术前6 h禁食, 自由饮水, 称

质量。1%戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射, 麻醉成功后仰卧固定于特制手术台上。经下肢周围静脉肝素化(1 000 U/kg), 颈部纵行切口, 气管切开, 以14G套管针行气管插管, 打结固定与呼吸机相连, 潮气量5 mL, 频率60-80次/min, 吸呼比1:2。剪开剑突, 正中剪开胸骨, 以自动撑开器撑开, 打开心包及双侧胸膜, 断开呼吸机, 自气管插管处分离气管和食道至后纵隔, 剪断主动脉弓及上腔静脉, 在膈肌水平横断降主动脉和下腔静脉, 取出心肺组织。即刻切开心脏右室流出道, 插入肺动脉插管至肺动脉主干, 并固定于灌注装置中, 剪开左心耳及左心室以备肺动脉灌洗的引流。将4 °C LPD保护液(组成成分: pH 7.6; Na<sup>+</sup> 141 mmol/L, K<sup>+</sup> 6.4 mmol/L, Cl<sup>-</sup> 119 mmol/L, HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 0 mmol/L, Mg<sup>2+</sup> 5 mmol/L, PO<sub>3</sub><sup>-</sup> 40 mmol/L, 葡萄糖10 g/L, 右旋糖苷10 g/L, 胰岛素20 U/L) 30 mL(100 mL/kg)以30 cm的高度落差, 经肺动脉灌注管灌洗大鼠肺, 灌洗时继续保持通气, 并检查有无肺损伤和漏气。在吸气末夹住气管, 保持肺膨胀状态。将取下的心肺组织, 浸没于装有4 °C LPD保护液的容器中, 外层加盖湿纱布, 塑料薄膜覆盖, 恒温冰箱4 °C保存4 h。整个过程应防止肺不张、损伤肺表面和压迫肺组织。从肺温缺血至心肺组织浸于低温保护液中, 时间应在10 min之内。

无心跳供肺组供体麻醉、插管和开胸方法均与有心跳供肺组的方法相同, 腹主动脉放血处死后, 维持通气30 min, 使供肺在热缺血30 min后冷保存, 肺动脉插管, 结扎并固定, LPD液灌注冷保存, 并向胸腔内滴注4 °C盐水, 加强供肺冷保护, 灌毕切肺。无心跳供体-缺血60 min组方法同无心跳供体-缺血30 min组, 不同之处在于供肺热缺血60 min供肺原位室温继续通气60 min。

**受体肺移植模型的建立:** 受体鼠麻醉, 气管切开, 以14G套管针行气管插管。左侧腹股沟纵行剪开皮肤, 暴露股动、静脉, 严密止血, 钝性游离股动、静脉。静脉推注肝素(1 000 U/kg)使转流鼠肝素化。股动脉下穿过1号丝线两根, 结扎股动脉远心端, 近心端丝线留置。股动脉以22G套管针穿刺, 将套管针送过腹股沟韧带, 以留置1号丝线结扎固定, 少量肝素盐水冲洗套管针。分离左侧颈内动脉, 主干下套过两根1号丝线留置备用,

以22G套管针穿刺, 将套管针送入, 以一根留置丝线结扎固定, 另一根留置丝线结扎颈内动脉穿刺点之远心端。同样方法游离并用16G套管针穿刺右侧颈静脉, 丝线固定。分别以4x12无创缝线将两根套管针与其下软组织缝扎固定, 缝合皮肤以保持体温。

**体外再灌注模型建立:** 以新鲜肝素化大鼠(1 000 U/kg)血液10 mL预充管道, 转机充分排气, 检查管路确保通畅并连接紧密。取出保存后的心肺组织, 悬置于有机玻璃恒温灌注箱内, 用热循环水保持箱内湿度和温度(37-39℃)。给供体肺通氧气, 设定潮气量5 mL, 频率60-80次/min。通过重力作用, 将转流大鼠颈静脉经管道流入入储血池, 管道加装调节阀控制引流速度。通过肺动脉灌注管, 将储血池中的静脉血经肺动脉插管泵入灌注供体肺。供体肺引流出的氧合血汇集于另一储血池, 用泵以同样的速度, 经股动脉回输给转流大鼠。依据大鼠颈动脉压可反映转流大鼠体液的出入量, 通过调节回输速度来维持平衡, 保持颈动脉压在10.64 kPa以上。灌注60 min后处死受体大鼠, 其间每隔15 min取供肺静脉血检测。

**主要观察指标:** 各组大鼠循环回路连接后, 于1, 15, 30, 45, 60 min测出气道峰压和肺静脉血氧分压。灌注结束后检测供肺湿质量干质量比和丙二醛水平。

**统计学分析:** 采用SPSS 12.0统计软件包进行分析, 所有数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果

**2.1 各组大鼠灌注不同时间气道峰压、肺静脉血氧分压的变化** 随着灌注时间的延长, 所有供肺气道峰压均逐渐升高, 而血氧分压逐渐降低。有心跳供体组与无心跳供体-缺血30 min组的气道峰压和血氧分压差异无显著性意义( $P > 0.05$ ), 无心跳供体-缺血60 min组与有心跳供体组和无心跳供体-缺血30 min组相比, 灌注后气道峰压升高更多( $P < 0.05$ ), 提示肺顺应性更差; 而氧气分压降低更多, 说明氧合能力更差( $P < 0.05$ ), 见表1和表2。

表1 各组大鼠灌注不同时间气道峰压的变化  
Table 1 Comparison of the pulmonary peak airway pressure after reperfusion for different times ( $\bar{x}\pm s$ , kPa,  $n=10$ )

Time	HBD group	NHBD-ischemia 30 min group	NHBD-ischemia 60 min group
1 min	1.150 4±0.039 9 <sup>a</sup>	1.169 1±0.030 6 <sup>a</sup>	1.214 3±0.027 9
15 min	1.210 3±0.090 4 <sup>a</sup>	1.205 0±0.055 9 <sup>a</sup>	1.254 2±0.038 6
30 min	1.231 6±0.091 8 <sup>a</sup>	1.243 5±0.061 2 <sup>a</sup>	1.408 5±0.086 4
45 min	1.271 5±0.098 4 <sup>a</sup>	1.279 5±0.058 5 <sup>a</sup>	1.847 4±0.075 8
60 min	1.294 1±0.113 0 <sup>a</sup>	1.310 0±0.089 1 <sup>a</sup>	2.307 5±0.211 5

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. NHBD-ischemia 60 min group; NHBD: non-heart beating donor

表2 各组大鼠灌注不同时间肺静脉血氧分压的变化  
Table 2 Comparison of the pulmonary venous blood oxygen partial repressure after perfusion for different times ( $\bar{x}\pm s$ , kPa,  $n=10$ )

Time	HBD group	NHBD-ischemia 30 min group	NHBD-ischemia 60 min group
1 min	17.347 2±2.456 8 <sup>a</sup>	17.570 6±2.682 6 <sup>a</sup>	16.123 6±2.142 6
15 min	15.337 6±2.600 1 <sup>a</sup>	15.183 3±2.586 8 <sup>a</sup>	13.821 4±1.377 9
30 min	13.726 9±1.460 3 <sup>a</sup>	13.088 5±1.854 0 <sup>a</sup>	11.227 9±1.214 3
45 min	12.303 8±1.800 8 <sup>a</sup>	11.672 1±1.969 7 <sup>a</sup>	9.278 1±1.022 8
60 min	10.695 9±1.783 5 <sup>a</sup>	9.869 9±1.653 2 <sup>a</sup>	7.223 2±0.706 2

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. NHBD-ischemia 60 min group; NHBD: non-heart beating donor

**2.2 各组大鼠灌注后供肺湿质量干质量比、丙二醛水平的变化** 有心跳供体组与无心跳供体-缺血30 min组的供肺湿质量干质量比和丙二醛水平比较, 差异无显著性意义( $P > 0.05$ )。无心跳供体-缺血60 min组供肺湿质量干质量比和丙二醛水平比有心跳供体组和无心跳供体-缺血30 min组高( $P < 0.01$ ), 见表3。

表3 各组大鼠灌注后供肺湿质量干质量比、丙二醛水平  
Table 3 Comparison of the wet weight and dry weight ratio and the malondialdehyde level after reperfusion ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Group	W/D	MDA (mmol/g)
HBD	6.23±0.65 <sup>a</sup>	10.42±1.86 <sup>a</sup>
NHBD-ischemia 30 min	6.15±0.72 <sup>a</sup>	10.98±1.67 <sup>a</sup>
NHBD-ischemia 60 min	7.31±0.84	15.36±2.93

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , vs. NHBD-ischemia 60 min group; NHBD: non-heart beating donor; W/D: wet weight and dry weight ratio; MDA: malondialdehyde

## 3 讨论

供体肺缺乏一直制约着肺移植研究的发展, 传统的研究认为, 死亡患者的肺不能用于肺移植。但由于人体肺组织的结构特性, 支撑肺功能不仅需要血液灌注, 更需要气体交换<sup>[8]</sup>。因此, 基于此理论的观点, 研究者将无心跳供体肺用于肺移植的模型研究中, 无心跳供体再次成为肺移植领域的研究热点, 有望成为肺移植的重要甚至主要供体来源。1952年, Harkins将气管内支架应用到肺模型的研究中, 也有国内外学者将袖套技术应用于大鼠的原位肺移植, 实验效果也很好<sup>[9-10]</sup>。寻找操作方法简单, 实用性好, 效果稳定的模型制作方法一直是肺移植的重点方向。

在肺移植模型中, 心肺联合移植、双肺移植、单肺移植模型由于操作复杂, 实验条件要求高使其应用受到一定的限制。小动物离体灌注模型具有简单、经济等优点, 被广泛用于低温保存后的供体肺功能评价。本实验设计中, 模拟临床实际情况, 将有心跳供体肺用KCI停

止心跳, 插管, 灌注4 °C的LPD液<sup>[11-12]</sup>, 取肺, 供肺灌注后冷保存, 建立供肺移植模型, 同时采用受体鼠颈静脉中引流出的静脉血灌注离体肺, 流出的氧合血再经股动脉输回受体鼠体内以解毒、去氧, 不会造成有毒代谢产物堆积, 不需要人工去氧设备, 最大程度地模仿正常生理状态。研究表明, 供肺静脉血气指数稳定, 接近正常生理状态下的静脉血, 有心跳供体组和无心跳供体-缺血30 min组所有指标比较均无明显差异( $P > 0.05$ )。各组气道峰压随时间的延长逐渐升高, 但无心跳供体-缺血60 min组升高程度高于有心跳供体组和无心跳供体-缺血30 min组( $P < 0.05$ ), 各组供肺血氧分压均随着时间的延长而降低, 无心跳供体-缺血60 min组供肺血氧分压低于有心跳供体组和无心跳供体-缺血30 min组( $P < 0.05$ ), 说明供体肺功能出现逐渐降低的趋势, 出现再灌注损伤, 肺功能恶化。

实验操作中有一些操作需要注意, 如造模时还应注意摘取供肺时要暂停机械通气, 使双侧肺萎缩, 待灌注时使其膨胀, 避免取肺时损伤, 在供体肺缺血期间, 要保持机械通气, 保证供肺质量。大鼠麻醉后用肝素钠1 000 U肝素化, 是为了防止肺实质水肿和血栓形成, 对肺有保护作用<sup>[13-14]</sup>。呼吸氧体积分数要在50%-70%, 氧体积分数过高容易使组织中自由基含量升高, 严重影响血管通透性受损。右心房插管时为防止循环时管负压吸引房侧壁, 造成引流不畅, 把插管剪成侧孔, 而且插管深度要适中, 过浅容易使插管脱落或管道进气, 过深容易使插管紧贴房壁影响引流, 循环过程中可随时调整右心房插管角度, 保证静脉引流顺畅。整个实验过程要保持室内温度无太大变化, 尽量使实验大鼠体温保持在37 °C, 引流血温度也要在37 °C左右, 保持供体肺湿度在95%-100%。

本实验成功的建立大鼠无心跳供体肺移植模型, 实验方法安全有效, 且操作简单, 重复性好。无心跳供体缺血30 min是肺移植的安全有效的时间段, 超过此段时间会影响肺移植的成功率, 造成肺结构和功能的损害。

#### 4 参考文献

[1] Sade RM. Transplantation at 100 years: Alexis Carrel, pioneer surgeon. *Ann Thorac Surg.* 2005;80(6):2415-2418.  
 [2] Dutly AE, Andrade CF, Verkaik R, et al. A novel model for post-transplant obliterative airway disease reveals angiogenesis from the pulmonary circulation. *Am J Transplant.* 2005;5(2):248-254.  
 [3] Qu N, de Vos P, Schellhorst M, et al. Integrity of airway epithelium is essential against obliterative airway disease in transplanted rat tracheas. *J Heart Lung Transplant.* 2005; 24(7):882-890.

[4] Okamoto T, Chen F, Zhang J, et al. Establishment of an ex vivo lung perfusion model using non-heart-beating large pigs. *Transplant Proc.* 2010;42(5):1598-1601.  
 [5] Okamoto T, Chen F, Zhang J, et al. Comparison of extracellular-type-Kyoto solution and Perfadex as a preservation solution in a pig ex vivo lung perfusion model: impact of potassium level. *Transplant Proc.* 2011;43(5): 1525-1528.  
 [6] 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):1113-1120.  
 [7] Van Raemdonck DE, Jannis NC, De Leyn PR, et al. Warm ischemic tolerance in collapsed pulmonary grafts is limited to 1 hour. *Ann Surg.* 1998;228(6):788-796.  
 [8] Wood D. Airway stenting. *Chest Surg Clin N Am.* 2003;13(2): 211-229.  
 [9] Verbrugge SJ, Lachmann B, Kesecioglu J. Lung protective ventilatory strategies in acute lung injury and acute respiratory distress syndrome: from experimental findings to clinical application. *Clin Physiol Funct Imaging.* 2007;27(2): 67-90.  
 [10] Kermeen FD, McNeil KD, Fraser JF, et al. Resolution of severe ischemia-reperfusion injury post-lung transplantation after administration of endobronchial surfactant. *J Heart Lung Transplant.* 2007;26(8):850-856.  
 [11] Nakajima D, Chen F, Yamada T, et al. Hypothermic machine perfusion ameliorates ischemia-reperfusion injury in rat lungs from non-heart-beating donors. *Transplantation.* 2011;92(8): 858-863.  
 [12] Stammberger U, Kubisa B, Gugger M, et al. Strong additive effect of 1,25-dihydroxycholecalciferol and cyclosporine A but not tacrolimus in rat lung allotransplantation. *Eur J Cardiothorac Surg.* 2003;24(2):196-200.  
 [13] Dreyer N, Mühlfeld C, Fehrenbach A, et al. Exogenous surfactant application in a rat lung ischemia reperfusion injury model: effects on edema formation and alveolar type II cells. *Respir Res.* 2008;9:5.  
 [14] Ding JY, Shi Y, Guo WG, et al. *Zhonghua Shiyian Waikexue*. 2008;25(12):1678.  
 丁建勇, 时雨, 郭卫刚, 等. 大鼠原位左肺移植模型的改进[J]. *中华实验外科杂志*, 2008, 25(12):1678.

#### 来自本文课题的更多信息--

**基金资助:** 国家科技支撑计划项目“心、肺移植关键技术研究(2008BA160B05)”。

**作者贡献:** 实验设计为纪勇, 实验实施为纪勇, 实验评估为陈静瑜, 资料收集为叶书高。纪勇成文, 陈静瑜审核, 纪勇对文章负责。

**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。

**作者声明:** 文章为原创作品, 数据准确, 内容不涉及泄密, 无一稿两投, 无抄袭, 无内容剽窃, 无作者署名争议, 无与他人课题以及专利技术的争执, 内容真实, 文责自负。