

改良 EC 液低温灌注犬肺离体肺组织形态学变化的研究

孟 辉¹袁 高 玲²袁 申 洪³袁 钢¹袁 蔡瑞君¹袁 峰¹袁 赵 菲³袁 第一军医大学南方医院胸心外科袁 广州 510515 袁 解放军第 4 医院呼吸内科袁 青海 西宁 810014 袁 第一军医大学病理科教研室袁 广州 510515 袁

摘要 目的 观察犬肺移植中供体离体保存后肺组织随时间延长而产生的结构变化。方法 4 只健康成年杂种犬肺灌注结束后离体保存 30、60、120、180、240 min，取材制作组织标本观察不同时间点肺组织结构变化。灌注前作为对照组，结果 0 min 时肺组织结构清晰完整，肺泡上皮细胞线粒体轻微肿胀；0 min 时肺泡壁周围组织轻微水肿；0 min 时肺泡壁结构轻度破损，肺泡上皮细胞肿胀，线粒体肿胀较明显；20 min 时部分肺泡壁断裂，肺泡腔融合；80 min 时肺泡壁断裂，肺泡腔融合形成少量肺大泡；40 min 时肺泡壁断裂，肺泡腔融合形成多个肺大泡；肺泡上皮细胞泡浆空泡变，肺泡细胞板层小体模糊不清，空泡变明显，微绒毛已消失。结论 改进型 EC 液离体保存 4 h 内对离体保存肺组织细胞无明显损伤，4 h 后肺损伤较为严重。

关键词 低温肺 / 病理学 / 肺移植 / 器官保存 / 心麻痹液

中图分类号 R322.34;R332;R655.3 文献标识码 A 文章编号 1000-2588(2002)10-0898-04

Morphological changes in canine lungs perfused with modified Euro-Collins solution

MENGHui¹,GAOLing²,SHENHong³,CHENGang¹,CAIRui-jun¹,MUFeng¹,ZHAOFei³

¹Department of Cardiothoracic Surgery, Nanfang Hospital, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China; ²Department of Respiratory Medicine, the Fourth Hospital of PLA, 810014, China; ³Department of Pathology, First Military Medical University, Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the structural changes in canine lungs perfused with modified Euro-Collins solution (mECS), thus providing insight into the preservation of the donor lung tissue for transplantation. Methods Six dogs were anesthetized and pulmonary perfusion with mECS (4 ℥) was performed before the lungs were isolated thereafter and stored at 4 to 8 °C for 30, 60, 120, 180, 240 min respectively, after which tissue samples of the donor lung were taken for morphological observation with both light and transmission electron microscope. Results Immediately after reperfusion, the pulmonary tissues exhibited clear and intact structures, showing that mitochondria swelled slightly in the alveolar epithelial cells (AECs). Mild edema occurred in the alveolar wall and the tissues around the veins at 30 min after preservation, which exacerbated to dilapidation of the alveolar wall and obviousfaction of the mitochondrion in the AECs at 60 min. At 180 min, rupture of alveolar wall and emergence of the alveolus was observed at 120 min, and a few pulmonary bullae were reformed, the AECs (I) of which presented vacuolar changes in the cytoplasm and mitochondrion, with disappearance of the tiny villus of the AECs (II) at 240 min. Conclusion Within 4 h of preservation in mECS, the pulmonary tissues do not undergo obvious changes as signs of injury, which, however, may not be the case after longer preservation.

Key words: hypothermia;lung/pathology;lungtransplantation;organpreservation;cardioplegicsolutions

20 世纪 80 年代以来，随着免疫抑制剂环孢霉素 A 的应用以及手术和麻醉方法的改进，肺移植成为治疗晚期肺部疾病的有效治疗方法。为提高肺移植术的成功率，必须解决肺来源肺保存质量等问题。移植成功条件之一取决于肺缺血期保存方法的优劣及保存时间长短。这些因素对肺组织形态学结构乃至功能活性有重要影响。形态学结构的变化是肺保存质量的评价方法。本实验采用 4 益改进的 EC 液灌注犬肺，观察离体低温保存后不同时间点肺组织形态学变化。

收稿日期 2002-05-20

基金项目 广东省卫生厅高难高新医疗资助项目

作者简介 孟 辉，男，甘肃宁县人，第一军医大学在读博士研究生，主治医师，电话 20-616148227，E-mail: mhgl@263.net

变化为人形态学角度为实验犬供肺保存研究提供依据。

1 材料和方法

1.1 对象

6 只健康成年杂种犬由第一军医大学南方医院动物所提供，雄性，不拘年龄，体重 (20.69 ± 8.2) kg。实验前禁食 12 h。

1.2 分组

每只犬均采用自身前后对照的方法。灌注前为对照组，实验组分别为灌注后 30、60、120、180、240 min。

1.3 改进的 EC 液

EC 液由南方医院药物制剂室配制，成分组成：2.05 g/L KH₂PO₄，7.0 g/L K₂HPO₄，1.2 g/L KCl，8.4 g/L NaHCO₃，5.0 g/L MgSO₄，0.00 g/L 葡萄糖，0.00 g/L

甘露醇渗透压 576.00moSm/L pH 值 7.4 遥与传统 EC 液不同之处在于院深免甘露醇替代白蛋白深免 MgSO₄、K₂HPO₄ 葡萄糖含量增加深免添加血管扩张剂前列腺素 E₁ 深GE, 免深免使 pH 值进一步偏碱性遥。

1.4 供体肺的获得及低温保存

动物用 3% 的戊巴比妥钠深 0~40mg/kg b.w. 免静脉全麻后袁气管插管袁连接呼吸机深 MIE100i 型呼吸机袁辅助呼吸遥 手术操作过程深 实验犬呈正中仰卧位固定袁 取正中胸骨切口袁从劈胸骨袁行剪开心包牵向两侧遥 粗丝线结扎并切取右肺组织为正常对照样本袁 后分离出肺动脉主干及左右肺动脉袁 肺动脉灌注插头袁肺动脉主干内快速推注 PGE₁ 400~450 深 0 深/g b.w. 免后袁钳闭肺动脉主干袁远侧端灌注 4 益 mECS1500ml 深 灌注液按 60~100ml/kg b.w. 袁另加 PGE₁ 200 深 灌注压力控制在 3~4kPa 袁灌注时间深 67~73 免 min 遥 灌注同时切开左心耳使灌注液流出袁 E 压通气袁使肺膨胀袁 灌注结束时从左心耳流出的灌洗液呈无色透明袁 呈白色深 1 袁解剖分离肺的纵隔面袁 取重钳夹切断下腔袁 上腔静脉袁 主动脉及气管袁 完整取出心脏及两侧肺袁 分离出左袁 右主支气管袁 在充气膨胀状态下钳闭左袁 右主支气管并切断袁 将肺迅速分别置入冰屑的生理盐水液和 4 益冰箱内保存遥。



图 1 供肺灌注后支气管、肺动脉与肺静脉

Fig.1 The bronchus, pulmonary artery and vein of the donor lung perfused with mECS

1.5 标本留取方法

1.5.1 光镜标本取材及制作 每一时间点切取 1cm 伊 cm 伊 cm 肺组织标本 2 块袁 0% 福尔马林固定遥 按常规方法制作光镜标本遥 HE 染色袁 光镜下观察肺组织病理形态变化遥。

1.5.2 电镜标本取材及制作 低温保存 0 免 40min 后随机取材曰 益生理盐水漂洗袁 冲洗后用滤纸吸去表面水份袁 将标本切成 1mm 伊 mm 伊 mm 大小 8 块曰 2.5% 戊二醛固定 8 h 以上曰 0mmol/LPBS 深 H 7.4 免 洗 6 次伊 5min 曰 % 铬酸后固定 1.5 h 曰 0mmol/LPBS 深 H 7.4 免 洗 15 min 曰 用 75% 0% 丙酮

逐级脱水各 15min 曰 环氧树脂置换丙酮后用 SPURR 浸透袁 埋袁 0 益聚合 8 h 遥 行 50nm 超薄切片袁 并将超薄切片收集在 230 目铜网上袁 铂电子染色各 30 免 5min 袁 并注意隔绝二氧化碳遥 透射电镜观察遥。

2 结果

2.1 光镜下肺组织形态学变化

2.1.1 保存 0min 肺泡袁 肺泡腔结构清晰袁 肺泡壁结构完整深 2A 袁 细小支气管组织及上皮细胞结构完好袁 肺泡腔内偶见巨噬细胞袁 胸巴细胞和红细胞遥。

2.1.2 保存 30min 肺泡袁 肺泡腔结构清晰袁 肺泡壁结构尚完整袁 细小支气管组织及上皮细胞结构完好袁 肺泡腔内偶见单个散在的淋巴细胞袁 巨噬细胞及少量单个散在的红细胞袁 部分区域肺泡壁轻度肿胀袁 局部结构断裂袁 融合深 2B 袁 血管壁周围组织水肿袁 肺包膜亦有轻度水肿遥。

2.1.3 保存 60min 肺泡袁 肺泡腔结构清晰袁 肺泡壁结构尚完整袁 细小支气管组织及上皮细胞结构完好袁 部分肺泡腔内可见少量散在的巨噬细胞和红细胞袁 单个散在的淋巴细胞遥 部分区域肺泡壁肿胀袁 肺泡壁轻度破损袁 局部区域有轻度淤血袁 血管周围组织水肿袁 肺包膜亦有轻度水肿深 2C 袁 遥。

2.1.4 保存 120min 肺泡袁 肺泡腔结构清晰袁 肺泡壁结构完整袁 细小支气管组织及上皮细胞结构完好袁 血管周围间质组织局限性水肿袁 肺泡腔内可见巨噬细胞袁 胸巴细胞袁 部分肺泡壁断裂袁 肺泡腔融合形成散在的肺大泡袁 部分区域肺泡壁轻度水肿袁 肺包膜有轻度水肿深 2D 袁 遥。

2.1.5 保存 180min 肺泡袁 肺泡腔结构清晰袁 肺泡壁结构完整袁 细小支气管组织及上皮细胞结构完好袁 肺泡腔内可见巨噬细胞袁 胸巴细胞袁 红细胞袁 部分肺泡壁断裂袁 肺泡腔融合形成少量肺大泡深 2E 袁 血管周围间质组织袁 肺包膜下有轻度水肿袁 部分区域肺间质中有轻度水肿袁 部分肺泡壁局部区域内轻度水肿遥。

2.1.6 保存 240min 部分肺泡壁断裂袁 肺泡腔融合形成肺大泡深 2F 袁 细小支气管组织及上皮细胞结构完好袁 部分肺泡腔内可见散在的淋巴细胞袁 巨噬细胞和红细胞遥 肺包膜下袁 部分区域肺间质袁 肺泡壁袁 血管壁周围间质及结缔组织均有不同程度水肿遥。

2.2 肺组织超微结构变化

2.2.1 保存 0 min 玉型及域型肺泡上皮细胞边界清楚袁 细胞及线粒体轻微肿胀袁 线粒体嵴欠完整袁 细胞膜完整遥 域型肺泡细胞的板层小体模糊不清袁 结构欠完整袁 部分已发生空泡变袁 缅毛排列尚整齐深 3A 袁 遥。

2.2.2 保存 60 min 玉型及域型肺泡上皮细胞均肿胀袁 细胞膜尚完整袁 核膜欠规则袁 电子密度减低袁 线粒

体明显肿胀袁变大袁已发生空泡变遜域型肺泡上皮细胞板层小体肿胀尧结构不完整,微绒毛明显减少^{图 3B}冤遜

2.3.3 保存 240 min 玉型及域型肺泡上皮细胞胞质

空泡变袁部分细胞膜可见破裂袁核膜不规则袁核染色质边集遜型肺泡细胞板层小体模糊不清袁明显空泡变袁微绒毛明显消失^{图 3C}冤遜

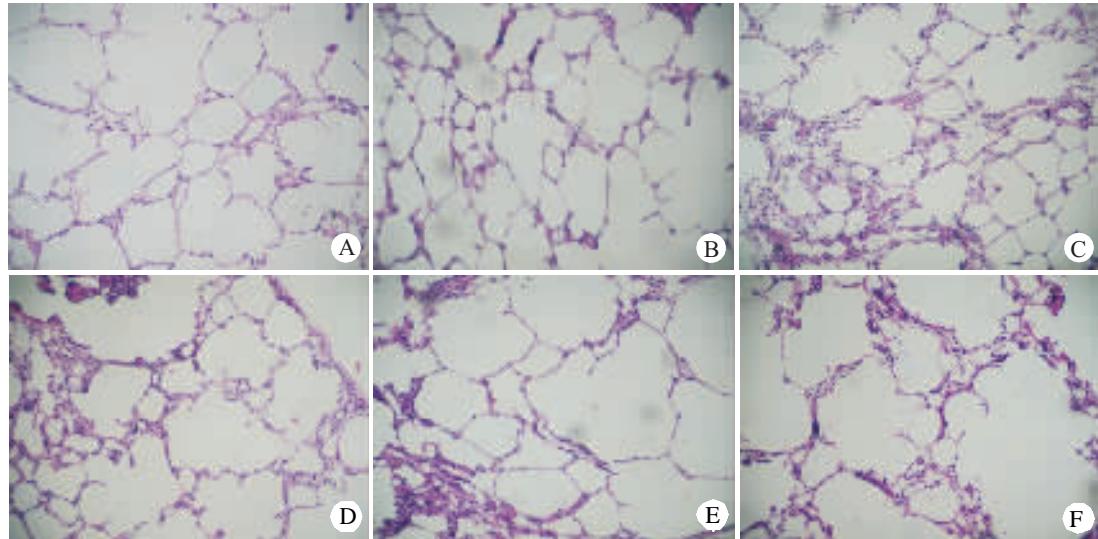


图 2 光镜下离体肺组织形态学变化^{HE, 伊400}冤

Fig.2 Morphological changes of isolated lung tissues observed under light microscope (HE, 伊400)

A:At0minofpreservation;B:At30minofpreservation;C:At60minofpreservation;D:At120minofpreservation;E:At180min
ofpreservation;F:At240minofpreservation



图 3 透射电镜下离体肺组织形态学变化^{原放大倍数院5000}冤

Fig.3 Morphological changes of isolated lung tissues observed under transmission electron microscope
(originalmagnification: 伊5000)

A:At0minofpreservation;B:At60minofpreservation;C:At240minofpreservation

3 讨论

较长时间高质量的肺保存是实现远距离异地运输供肺袁保持供肺组织活力的关键遜由于具有活力的离体肺组织能量代谢仍在进行袁但其能量代谢所必须的能量物质及氧供给均被阻断袁细胞不可避免地发生缺血性损伤袁长时间后将导致组织细胞的不可逆损伤袁发生缺血性坏死遜通过降低温度以降低组织细胞的能量代谢水平尧人工供给必须的代谢底物是通常采用的肺保存技术遜低温是防止组织器官缺血性损害的重要条件袁但它能阻止 ATP 依赖的 Na-K 泵功能袁从而阻止膜电位下降和钠离子内流袁防止细胞内水肿的发生遜ooper^等和 Konr^等认为最佳保存温度应在 4~8 益遜合适的灌注保存液对于减少或减慢器官保存过程中

的各种损伤袁延长器官保存时间及提高器官质量有着十分重要的意义遜成功的器官保存液应满足院减少因低温保存导致的细胞水肿袁防止细胞的酸化作用袁防止灌洗保存过程中细胞间隙的肿胀袁防止氧自由基的损伤袁提供再生高能磷酸化合物的底物遜

单纯灌洗虽是目前最广泛的临床保存方法袁但该技术也有缺点^如袁针对其缺陷袁我们在 mECS 中加入甘露醇尧GE₁袁灌注同时用 PGE₁袁加大葡萄糖尧MgSO₄尧HPO₄²⁻量来增加底物和渗透压遜低温条件下加入一定量的代谢底物可维持一定的新陈代谢活动袁从而加强肺保存作用^如袁有实验证明袁葡萄糖可作为底物提高供肺的保存效果^如袁甘露醇是一种高渗性

脱水剂起到高渗脱水作用减少水份流入细胞内维持细胞体积防止组织细胞和血管内皮细胞损伤从而改善微循环曰清除羟自由基以防止自由基对细胞的损伤同时也减少了脂质过氧化反应对组织的损伤曰抑制补体激活可明显减低移植术后移植物早期无功能的发生增加渗透压防止肺水肿蛋白主要以增加胶体渗透压为主通过PGE₁具有扩张血管尤其是肺血管的功能可以拮抗高钾和低温所致的肺血管收缩使肺灌注更加均匀充分可以使小血管充血扩张使灌洗阻力减低增强灌洗液对肺组织的保护作用曰PGE₁还通过cAMP系统抑制血小板凝集和血小板释放血栓素A₂达到保护细胞的作用通过保存液偏碱时可以降低肺血管阻力使保存液均匀分布而动脉冲洗彻底并能抑制溶酶体酸性蛋白酶活化通过外缺血期间肺组织尚处于低水平代谢因pH值偏碱而中和局部堆积的酸性代谢产物轻酸中毒引起的组织损伤

供肺保存期间由于缺氧嘌呤氧化酶不能产生超氧化基团或过氧化氢此时虽然由于Ca²⁺梯度的破坏及蛋白水解作用已产生了缺血性损害但在此阶段点的组织学检查尚未有明显的形态学破坏迹象只有在保存期间内源性抗氧化剂超氧化物歧化酶失活或耗尽使氧自由基不能及时清除时作用于细胞的重要成分氧化脂质蛋白质核酸糖类等才能对细胞造成广泛的结构损伤通过实验结果提示在4 h内离体肺组织与灌注前相比形态学变化不明显而在4 h后不可逆性损伤比率逐渐上升这与李刚等的研究结果基本相同李刚所用的灌注保存液是传统的EC液其成分无甘露醇PGE₁和低葡萄糖量MgSO₄及低渗我们以前的实验发现离体保存肺组织一氧化氮超氧化物歧化酶丙二醛及肺泡上皮细胞核/质体积密度表面积密度与体积比实验组与对照组无显著差异随着保存时间延长一氧化氮超氧化物歧化酶体积密度表面积密度均呈下降趋势而丙二醛表面积与体积比却呈上升趋势这些均说明应用mECS在4 h内肺组织内氧自由基未大量产生超氧化物歧化酶未明显消耗氧自由基终产物丙二醛并未明显增加肺组织活性尚好缺血预处理有助于抑制供体肺产生氧自由基肺泡上皮细胞核不变或变小而细胞质的体积表面积则轻度变大组织和细胞水肿变化不明显而在4 h后肺损伤明显加剧

致谢本研究得到了南方医院胸心外科刘亚湘和毛向辉药物制剂室谭亚非麻醉科刘高望动物所王元占主任和刘秋菊的帮助在此深表感谢

参考文献院

- 1 咨孟辉,陈钢.肺移植研究进展[J].第一军医大学学报,2001,21(3):224-7.
2 MengH,ChengG.Lungtransplantation[J].FirstMilMedUniv,2001,21(3):224-7.
- 3 咨CooperGD,PersonFG,PattersonGA.Techniqueofsuccessfullungtransplantationinhumans[J].ThoracCardiovascSurg,1987,93(2):173-81.
- 4 咨KonND,HinesMH,HarrCD,et al.Improvedlungpreservationwithcoldairstorage[J].AnnThoracSurg,1991,51(4):557-61.
- 5 咨孟辉,陈钢,谭军,等.改良EC液低温灌注犬肺离体组织中一氧化氮与氧自由基变化的研究[J].第一军医大学学报,2001,21(7):498-500.
6 MengH,ChengG,TanJ,et al.Changesofnitricoxideandoxygen-free radical in canine lung perfused with improved Euro-Collins solution[J].JFirstMilMedUniv,2001,21(7):498-500.
- 7 咨HopkinsonDN,BhabraMS,HooperTL,et al.Pulmonarygraftpreservation:a worldwisesurveyofcurrentclinicalpractice[J].HeartLungTransplant,1998,17(5):525-8.
- 8 咨ChiangCH,WuK,YuCP,et al.Hypothermiaandprostaglandin(E1)produce synergisticteutuationofischemiareperfusionlunginjury[J].AmJRespirCritCareMed,1999,160(4):1319-23.
- 9 咨BakerCJ,LongoriaJ,GadePV,et al.Additionofawatersolublealpha-tocopherol analogue to University of Wisconsin solution improvesendothelialviabilityanddecreaseslungreperfusioninjury[J].SurgRes,1999,86(1):145-9.
- 10 咨FukuseT,JojoH,TanW,et al.Influenceofdeflatedandanaerobicconditionduringcoldstorageonratlungs[J].AmRespirCritCareMed,1999,160(2):621-7.
- 11 咨陈建常,王乐农,史振满,等.肢体缺血再灌注致肺损伤及甘露醇对其的保护作用[J].中国危重病急救医学,2000,12(6):359-61.
ChenJC,WangLN,ShiZM,et al.Protectiveeffectofmannitolonlunginjuryafterlowerlimb ischemic-reperfusion[J].ChinCritCareMed,2000,12(6):359-61.
- 12 咨GrinoJM,MiravitlesR,CastellarAM,et al.Flushsolutionwithmannitol in the prevention of post-transplant renal failure[J].TransplantProc,1987,19(5):4140-2.
- 13 咨NovickRJ,ReidKR,DenningL,et al.Prolongedpreservationofcanine lungallografts:theroleofprostaglandins[J].Ann ThoracSurg,1991,51(5):853-9.
- 14 咨FeatherstoneRL,ChambrsDJ,KellyFJ,et al.Ischemicpreconditioningenhance recovery of isolated rat lungs after hypothermic preservation[J].AnnThoracSurg,2000,69(1):237-42.
- 15 咨李刚,张临友,谭佩林.低温灌洗UW液和Euro-Collins液保存离体鼠肺效果的形态学比较研究[J].哈尔滨医科大学学报,2000,34(2):501-4.
LiG,ZhangLY,TanPL.HistomorphologicalcomparisononpulmonarypreservationwithcoldUWandEuro-Collinsflushingsolutionsinrat[J].HarbinMedUniv,2000,34(2):105-8.
- 16 咨孟辉,申洪,陈钢.犬肺移植中供体肺泡上皮细胞核超微结构变化及形态计量学研究[J].第9届中国体视学与图像分析学术会议论文集,北京,2001.133-4.