**独 创 声 明**

本人声明所呈交的学位论文是本人在导师指导下进行的研究工作及取 得的研究成果。据我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文 中不包含其他人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含未获得（注：如 没有其他需要特别声明的，本栏可空或其他教育机构的学位或证书使用过 的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了 明确的说明并表示谢意。

学位论文作者签名： 签字日期： 年 月 日

-------------------------------------------------------------------------------------------------

学位论文版权使用授权书

本学位论文作者完全了解桂林医学院有关保留、使用学位论文的规定， 有权保留并向国家有关部门或机构送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅。本人授权桂林医学院可以将学位论文的全部或部分内容编入有关数据库进行检索，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同时授权中国学术期刊（光盘版）电子杂志社、中国科学技术信息研究所将本学位论文收录到《中国优秀博硕士学位论文全文数据库》、

《中国学位论文全文数据库》，并通过网络向社会公众提供信息服务。（保 密的学位论文在解密后适用本授权书）

学位论文作者签名： 导师签字：

签字日期： 年 月 日 签字日期： 年 月 日

目 录

**[FTY720](#_Toc686761173)**[对小鼠脑死亡供体心脏移植物的影响](#_Toc686761173) 2

[中文摘要](#_Toc686761174) 2

**[Abstract](#_Toc686761175)** 2

[英汉缩略词对照表](#_Toc686761176) 3

[前言](#_Toc686761177) 3

[正文](#_Toc686761178) 4

[１ 材料与方法](#_Toc686761179) 4

[1.1 主要材料与仪器](#_Toc686761180) 4

[1.2 主要实验试剂](#_Toc686761181) 5

[1.3 主要的手术器械及仪器](#_Toc686761182) 6

[1.4 实验方法](#_Toc686761183) 6

[1.5 统计学方法](#_Toc686761184) 8

**[2](#_Toc686761185)** [结果](#_Toc686761185) 8

[2.1 FTY720对小鼠脑死亡供体心脏移植物Th存的影响（图2）。](#_Toc686761186) 8

[2.2 FTY720对小鼠脑死亡供体心脏移植后心肌酶表达的影响(图3)。](#_Toc686761187) 10

[2.3 FTY720对小鼠脑死亡供体心脏异位移植物中Caspase-3表达的影响(图4)。](#_Toc686761188) 10

[2.4 FTY720对小鼠脑死亡供体心脏病理改变的影响(图5)。](#_Toc686761189) 10

[3 讨论](#_Toc686761190) 11

[3.1 关于小鼠心脏异位移植模型的讨论](#_Toc686761191) 11

[3.2 关于脑死亡的讨论](#_Toc686761192) 12

[3.3 关于FTY20的讨论](#_Toc686761193) 12

[4 结论](#_Toc686761194) 13

[参考文献](#_Toc686761195) 13

[参考文献](#_Toc686761196) 19

[攻读学位期间发表的学术论文目录](#_Toc686761197) 21

II

# **FTY720**对小鼠脑死亡供体心脏移植物的影响

中文摘要

**目的：**探讨FTY720对小鼠脑死亡供体心脏异位移植物的影响及其机制。**方法：**实验采用小鼠腹部异位心脏移植模型，分为六组：A.同种异基因移植对照组；B.假脑死亡同种异基因移植组；C.同系移植对照组；D.同种异基因移植FTY720处理组（术前4d开始剂量0.5mg/kg/d直至排斥或观察终点）；E.脑死亡供心组；F.脑死亡供心移植FTY720处理组（术前4d开始剂量0.5mg/kg/d直至排斥或观察终点）。观察各组移植心脏的存活时间；术后第二天全自动生化分析仪测定心肌酶谱(CK-MB)；采用Western blot方法检测心肌中Caspase-3的表达；术后第5天HE染色观察心肌组织病理学改变。**结果：**同A 组

（12.75±0.50）天，B组（12.50±0.57）天相比较E组心脏移植物平均生存时间（7.75±0.50）天，显著缩短，*P*0.05；D、F、C组存活均超过35天（观察终点）；术后第二天，同A、B组比较E组CK-MB值和Caspase-3的表达明显升高，*P*0.05，D、F组同C组之间没有明显的差异；术后第5天A、B两组心肌组织呈2R级病理改变，E组呈3R级病理改变，D、F组呈1R级病理改变，C组呈0R/1R级病理改变。**结论：**脑死亡可以加重心脏异位移植的损伤且减短移植物的生存期；FTY720可以减轻脑死亡带来的对心脏异位移植的损伤。

**关键词：**脑死亡； FTY720； 缺血再灌注损伤； 心脏移植

1

**Role of FTY720 in murine of donor brain death cardiac heterotopic transplantation**

**Abstract**

**Objection:** To explore the role of FTY720 in murine of donor brain death cardiac heterotopic transplantation. **Methods:** All abdominal heterotopic heart transplantation models were randomly divided into six groups as follows, A. allograft control group, B. sham BD donor group, C. isograft control group, D. allograft and FTY720 treatment group (a dose of 0.5 mg/kg/d was started on day 4 before surgery and administered throughout the duration of the experiment), E. BD donor group, F. BD donor with FTY720 treated group. In each group, mean survival times (MST) of transplanted hearts recorded at respective rejection point or observation termination. Two days after operation, the levels of creatine kinase MB (CK-MB) and the expression of Caspase-3 in myocardium was detected by full automatic biochemical analyzer and Western blot. After five days, the pathological changes in myocardium of murine were examined by HE staining. **Results:** Group E, in which the MST is

2

(7.75±0.50) days, is significantly shorter than group A(12.75±0.50) days and group B(12.50±0.57) days. Allografts in group C, D, F survive more than 35 days. After two days operation, the levels of CK-MB and

The express of Caspase-3 in group E is significantly higher than group A and group B. Differences between group C, group D and group F were not significantly. After five days operation, transplanted hearts in group A and group B with a Grade 2R pathologic histological change, group E is Grade 3R, group D and group F is 1R and group C is Grade 0R/1R. **Conclusions:** BD exacerbates posttransplantation cardiac injury and decreases survival of mouse allografts. Furthermore, FTY720 can ameliorates BD-exacerbated induce injury.

**Key words:** Brain; Death; FTY720; Ischemia reperfusion injury; Heart transplantation

3

# 英汉缩略词对照表

|  |  |  |
| --- | --- | --- |
| 英文缩写 | 英文全称 | 中文全称 |

DCD Donors of cardiac death心脏死亡供体

BDD Brain death donor脑死亡供体

BD Brain death 脑死亡BDI Brain death-induced injury 脑死亡引起的损伤PNF Primary no function 原发性无功能IRI Ischemia reperfusion injury 缺血/再灌注损伤SPF Specific pathogen free 无特定病原体

ICP Intracranial pressure 颅内压ICAM-1 Intracellular adhesion molecules-1 细胞间黏附分子-1 WB Western blot 蛋白质印迹法Caspase Cysteine aspartic acid specific protease半胱天冬氨酸蛋白酶CK-MB Creatin kinase MB 肌酸激酶同功酶PAGE Polyacrylamide gel electrophoresis 聚丙烯酰胺凝胶电泳PVDF Polyvinylidene difluoride 聚偏二氟乙烯SDS Sodium dodecyl sulfate 十二烷基磺酸钠

HE Hematoxylin eosin苏木素伊红

S1P Sphingosine 1-phosphate 1-磷酸鞘氨醇TNF-αTumor necrosis factor-α肿瘤坏死因子IL Interleukin 白介素

MHC Major histocompatibility complex主要组织相容性复合物

4

前**言**

目前器官移植是临床治疗器官终末期衰竭的重要手段。但临床上面临着两大问题：一是供体的短缺；二是免疫排斥反应。

当今，主要有心脏死亡供体（donors of cardiac death, DCD）、脑死亡供体（brain death donor, BDD）和活体供体三种途径提供器官。为了应对供体的短缺，国家卫生部启动了心脏死亡后器官捐献，以此来缓解供体严重紧缺的局面[1]。但是就目前来看脑死亡供体的合法合理使用是解决我国供体来源奇缺最有前景的方案之一。临床和实 验研究表明：与活体供体移植比较，脑死亡供体质量明显降低，免疫原性增加，移植后早期移植器官功能不全（early allograft

dysfunction）甚至原发性无功能（primary no function, PNF）的发生率显著增高，使得肾、心、肺和肝移植的效果大大降低[2,3]，这主要归因于脑死亡引起的损伤（Brain death-induced injury, BDI）,脑死亡激起潜在的库欣反应，导致血液动力学的波动，全身器官缺血， 低体温，凝血障碍，激素的消耗和电解质的紊乱[4-6]。不仅如此，脑死亡还对随后的移植过程中不可避免的缺血/再灌注损伤（ischemia reperfusion injury, IRI）造成级联放大作用，协同造成移植物严重损伤。

FTY720是在冬虫夏草（Isaria sinclairii）子囊菌中的嗜热菌杀酵母素的烃链上引入了苯环和羟烷基而成的衍生物，是由日本

Fujita教授（Taito公司）和Yoshitomi制药有限公司共同研制开发，

5

故称其FTY，其化学名为：２-氯基-[2(4-辛基苯基)乙基] -1，3-丙二醇盐酸盐[7]。FTY作用机制独特，归纳为主要下面两方面的因素：一方面是加快淋巴细胞归巢并抑制淋巴组织内的淋巴细胞游出；另一方面是诱导淋巴细胞凋亡，抑制体内免疫排斥反应发生的同时不破坏机体对病毒的免疫应答及免疫记忆能力，它不良反应少，生物可利用度高。FTY720在预防免疫排斥反应有良好的效果且与其他免疫抑制剂西罗莫司（雷帕霉素，RAD）、环孢素A(CsA)、他克莫司（FK506）共同使用，有良好的协同增效作用，目前国外在治疗治疗肾移植和多发性硬化症进入Ⅲ期临床试验阶段[8-12]. FTY720为鞘氨醇-1-磷酸盐

（S1P）受体阻滞剂，S1P通过G蛋白偶联的级联信号转导系统起作用。

FTY720在体内主要经过鞘氨醇酶-2作用转化成单磷酸酯化合物(FTY720-P)发挥作用[13]。

因此，本实验借助小鼠脑死亡联合小鼠异位心脏移植模型研究

FTY720对小鼠异位移植物心脏的影响并且对其机制进行探讨，从而为进一步指导临床合理用药提供参考依据，更为重要的是为临床增加 供体来源提供理论依据。

6

# 正文

# １ 材料与方法

## 1.1 主要材料与仪器

### 1.1.1 实验动物及分组

封闭群KM（昆明）小鼠购于桂林医学院动物房；雌雄不限SPF(specific pathogen free)级近交系C57BL/6、BALB/C小鼠购于中国科学院湖南技术转移中心实验动物事业部湖南斯莱克景达实验动物有限公司，体重20-30克，周龄8-12周，饲养于桂林医学院SPF

级动物实验中心，给予足够的饲料和水喂养，严格控制光线，提供12小时的亮暗间隔，保持环境温度在20-22℃，动物饲养通风良好，湿度保持在45%-65%。正式实验前用KM小鼠进行腹部异位心脏移植和脑死亡模型的练习。正式实验用近交系C57BL/6、BALB/C小鼠做实验，实验分为六组：A组、同种异基因组（C57BL/6→BALB/C）；B组、假脑死亡组（C57BL/6→BALB/C）；C组、同种同基因对照组（C57BL/6

→C57BL/6）；D组、FTY720处理组（C57BL/6→BALB/C）；E组、脑死亡组（C57BL/6→BALB/C）；F组、FTY720处理脑死亡组（C57BL/6→BALB/C）。FTY720处理组为术前4天以0.5mg/kg/天剂量至术后观察期灌胃。其余组都用生理盐水灌胃来对照。灌胃的剂量不超过10ul/g。以35天为观察期，n=20。所有动物实验操作符合桂林医学院动物关怀伦理委员会条例。

7

### 1.1.2 主要仪器

(1) -20℃冰箱，型号BCD-206，青岛海尔，青岛市.

(2) -80℃冰箱，型号：902，公司：Thermo scientific. (3) Western Blot转膜仪，Jim-X scientific公司，型号：TE70XP/77XP (4) Western Blot电泳仪, Jim-X scientific公司，型号: PowerPac.

(5) PH测定仪，型号：FiveEasy plus, METTLER TOLEDO公司.

(6)超声破碎仪，型号：uibra cell，公司：sonics & Ma Terials. inc

（7）水平脱色摇床，型号：HH-W，金坛市恒丰仪器厂.

（8）电子天平，型号: ML204102, METTLER TOLEDO公司.

（9）电子秤，型号：ES-2，沈阳亮衡天平仪器有限公司.

（10）4℃离心机，型号：Centrifuge 5415R，德国Eppendorf.

（11）半自动病理切片机，型号：RM2035，德国LEICA公司.

（12）倒置光学显微镜，型号：CKX-31，日本奥林巴斯（Olympus）.

（13）移液枪，型号：genex，规格：eppendorf Research plus.

（14）3f Fogarty导管，美国Edwards Lifesciences,型号：85716.

（15）37℃孵箱，型号：BS-1E，金坛市科兴仪器厂.

（16）小鼠呼吸机，美国Kent Scientific(TOPO),型号：J11-042. (17)微量泵，美国 Stoelting,型号:60191.

（18）国产病理组织漂烘机，型号：PHY-III.

（19）制冰机：型号：SIM-F140,公司：SANYO.

## 1.2 主要实验试剂

8

### 1.2.1 主要试剂

戊巴比妥钠是由桂林医学院药学院惠赠，肝素钠注射液购于江苏万邦生化医药股份有限公司；FTY720购于Sigma公司；CK-MB购于南京建成生物工程研究所；在北京中杉金桥购于HE染色所需苏木素，在汕头西陇购于10%中性甲醛；Western blot所需试剂蛋白免疫印迹技术（Western Blot）所需原料Tris、Hcl、氢氧化钠、氯化钠、丽春红、脱脂奶粉、甲醇、甘氨酸、Tuwen20、TEMED、SDS、过硫酸铵(AP)、聚丙烯酰胺、N，N-甲叉双丙烯酰胺、乙酸、考马斯亮蓝)、彩虹蛋白Marker均购自Sigma公司。滤纸购自Whatman公司，PVDF膜（0.22µm和0.45µm）购自Invitrogen公司。小鼠兔抗Caspase-3单克隆抗体（一抗）购自美国CST公司，小鼠抗-actin单克隆抗体

（一抗）、辣根氧化酶标记的ft羊抗小鼠（二抗）、辣根氧化酶标记的

ft羊抗兔（二抗）均购自北京中杉金桥（Sigma分装）。ECL超敏发光液购自碧云天试剂，定影液和显影液粉剂购自Invitrogen公司，X光胶片、X光暗盒由柯达公司提供。

### 1.2.2 主要试剂配液

（1）戊巴比妥钠用生理盐水配制成1%的浓度避光4℃保存。

（2）肝素钠注射液配成125U/ml肝素化生理盐水避光4℃保存。

(3) FTY720用生理盐水配成2mg/ml避光4℃保存。

(4) 10％SDS: 取10g SDS,加水至100ml,溶解后室温保存。

(5) 1.0mol/L Tris·HCl浓缩缓冲液PH6.8:取11.96g Tris,加入三蒸水到100ml,溶解后用Hcl调PH至6.8，4℃保存。

9

(6) 1.5mol/L Tris·HCl分离胶缓冲液pH8.8:取18.15g Tris,加入三蒸水到100ml,溶解后用Hcl调PH至8.8，4℃保存。

(7) 10％过硫酸胺（AP）：0.1g过硫酸胺加1ml蒸馏水，可取0.1g AP置于EP管中保存，用时加水即可。（最好现用现配）

(8) 30％(w/v)丙烯酰胺溶液：丙烯酰胺29.2g,甲叉双丙烯酰胺

0.8g,加水到100ml,棕色瓶4℃保存。（该溶液有神经毒性，配置时应戴口罩，手套，在通风橱中配置，当其凝成胶刚无毒了。）(9) 0.5mol/L Tris·HCl（pH6.8）: 向500ml烧杯中加入Tris (MW121.14) 15.14g, 后加入约220 ml去离子水，溶解后使用浓

盐酸调节pH至6.8，用蒸馏水定容至250ml，高温灭菌后在室温下保存。

（10）20％Tween20:向100ml量筒里加入Tween20 20ml，后用去离子水定容到100ml，混匀后放置4℃保存。

(11) G250考马斯亮蓝溶液（蛋白定量专用）:考马斯亮蓝G250 100mg+ 95％乙醇50ml+85%（W/V）磷酸100ml,蒸馏水定容到1000ml，滤纸过滤，棕色瓶4℃保存。

(12)转移缓冲液：Tris 3.03g, 甘氨酸14.4g, 甲醇200lm,加三蒸水到1000ml充分溶解，4度保存。

（13）10\*丽春红染液：称丽春红s 2g加三氯乙酸30g加磺基水杨酸

30g最后加蒸馏水至100ml，4度保存。使用时将其稀释10倍。

（14）电泳液缓冲液：取14.49g甘氨酸，3.02g Tris,加10ml 10％SDS, 加三蒸水至1000ml, 4度保存。（可重复利用3次。）

10

（15）TBST缓冲液：1mol/L Tris-Hcl(PH8.0) 20ml, NaCl 8.8g,加Tween20 500ul, 用三蒸水定容到1000ml. ( 1mol/L Tris-Hcl

（PH8.0）:12.11g Tris,约4.2ml浓Hcl,定容到100ml.）

（16）封闭液（5%脱脂奶粉）：1g脱脂奶粉加20ml TBST，在摇床上使其溶解后即可使用，最是好现用现配。

（17）显影液：应避光保存，每次100ml水，先取小包0.42g,溶于50℃热水中，充分溶解后，再取大包4.83g加入到完全溶解，尽量避光，降到室温后使用。

（18）定影液：称取12.9g粉末到100ml 25℃温水中完全溶解，可重复使用，颜色不变黄即可应用。

## 1.3 主要的手术器械及仪器

SOM2000Dx手术显微镜购自苏州六六视觉科技股份有限公司；呼吸机购于美国Kent Scientific；微量泵购于美国Stoelting；3F气囊管购于美国Edwards Lifesciences；电钻由网上购买；显微手术器械购于苏州六六视觉科技股份有限公司，包括显微持针器、维纳斯剪两把一大一小、显微镊两把一直一弯、血管夹两个；其他的手术器 械由科室换药室提供包括持针器一把，剪刀一把，血管钳两把等一般 常规手术器械；11-0带线缝合针购于宁波医用缝针有限公司；5-0医用丝线购于上海浦东金环医疗用品股份有限公司；自制腹部牵引拉钩 两个、自制小鼠手术台一块；棉签、无菌纱布、1ml注射器由科室提供。

## 1.4 实验方法

11

### 1.4.1 小鼠腹部异位心脏移植手术方法[14]

1.4.1.1术前准备参考Ono法[15]并加以改良，手术过程为清洁级操作。供受体小鼠术前均不禁饮禁食，采用1%戊巴比妥钠(0.01mg/g)腹腔注射麻醉，麻醉满意后，小鼠仰卧位用橡皮筋固定四肢于自制手 术台上，剃去腹部鼠毛，用碘酒消毒皮肤切口。

1.4.1.2受体准备 取腹壁正中切口分两层进腹，切口上至剑突，下至尿道外口上缘约0.8cm，用自制拉勾拉开切口两侧，用湿棉签将腹腔内肠袢提出腹腔，推向小鼠腹部右上方，用温盐水纱布包裹，其 他的暴露地方也用温盐水覆盖，以防受体体液过度挥发。如果膀胱充 盈影响手术视野可以轻柔的挤压膀胱使其缩小，在肾静脉与髂静脉分 叉水平上0.5cm之间充分游离腹主动脉和下腔静脉周围的软组织和淋巴，腔静脉和腹主动脉不要强行分离以免引起大出血造成手术的失 败，不要误伤雄性小鼠睾丸动脉。用11-0丝线结扎下腔静脉的腰静脉分支。暴露的手术视野用温纱布覆盖等待供心的获取。

1.4.1.3供心获取术供体小鼠正中线开腹用眼睑撑开器撑开切口，把肠袢推向左侧暴露出下腔静脉和腹主动脉，不做过多的分离，从下腔静脉注射4℃肝素化生理盐水(125u/ml) 0.4ml约1分钟后使之全身肝素化剪断腹主动脉放血。剪开膈肌，迅速向胸腔内注入冰生理盐水， 然后沿双侧腋前线剪开胸廓至颈部，暴露胸腔剪开心包和上方的脂肪组织充分显露心脏，用冰生理盐水浸泡的纱布覆盖于心脏上，纱布上放置少许碎冰，心跳会减慢至停跳。靠近心脏分别结扎和离断下腔静脉和上腔静脉，游离主动脉弓及肺动脉，在肺动脉和主动脉弓分叉前

12

剪断肺动脉和主动脉，尽量保留肺动脉的长度。用5-0丝线集束结扎肺静脉及心脏后面的组织（注意不要伤及心耳），切断连接心脏的组织和血管取下心脏，立即放置于4℃肝素化生理盐水（12.5u/ml）中保存并用湿棉签轻轻挤压心脏排出里面的淤血。

1.4.1.4移植手术用血管夹夹近心端下腔静脉和腹主动脉，待下 腔静脉充盈后再夹住远心端血管，调整血管夹，使腹主动脉朝上。用

30G针头在腹主动脉上戳个小孔，用维纳斯剪纵行剪开腹主动脉，剪开的裂隙与供心升主动脉直径相仿，用少许肝素生理盐水（12.5u/ml）冲洗动脉管腔。将供心置于腹腔内右侧，在吻合口两端各作一牵引线，用11-0带线缝合针自尾侧一针连续缝合至头侧打结固定后，翻转心脏到左侧，行对侧连续缝合，与尾侧牵引线打结固定。每侧大概缝

5-6针，缝至倒数第二针时不要紧线以便给缝最后一针留下缝合空间，用肝素化生理盐水（10u/ml）冲洗管腔，以防术后形成冠状动脉血、气栓。调整血管夹使下腔静脉回到生理位置，用显微镊提起下腔静脉做一弧形切口，使切口直径与供心肺动脉直径基本一致，采用一针后壁先缝法[16]以期缩短血管吻合时间，缝至最后两针时，用肝素化生理盐水（10u/ml）冲洗血管腔排气。整个缝合期间供心表面覆盖冰纱布上面并放小许碎冰以减少对供心的损伤。血管吻合完成后，在腹主动脉和下腔静脉吻合口两侧用小棉球把肝素吸收后再放置小棉球以期压迫止血，先松开远端血管夹，后松下近端血管夹。可见供心冠脉立刻充血心肌变红，数秒内出现心脏纤颤，用温生理盐水滴注供心表面，供心出见不规则搏动随后心律恢复正常。将肠管小心还纳腹腔复位后，

13

关闭腹腔。

1.4.1.5围手术处理术后小鼠放置保温箱内给予小鼠复温，小鼠多在1小时左右苏醒。术后单独饲养，温度维持在26度左右，单独饲养1天后合群喂养，每日通过对腹壁触摸了解移植心脏跳动情况。移植后移植心脏持续搏动4天以上，心律齐、搏动有力视为手术成功标志否则视为手术失败[14]并设定35天为观察终点。

1.4.1.6获取标本和病理学检查

术后两天各组随机取供心，提蛋白检测；并心脏采血后收集血清检测CK-MB值。术后5天各组取供心，放在10%的甲醛中浸润48小时后，制成切片，采用苏木素-伊红染色后放在光学显微镜下观察。在观察终点或排斥终点肉眼观察心脏和脾脏的变化并记录心脏存活的时间。

### 1.4.2 脑死亡模型的建立(图1)[17,18]

小鼠麻醉满意后，小鼠仰卧在手术台上，小心分离出气管，气管切开后，插入小鼠呼吸机通气导管，调整呼吸频率为120次/分，潮气量12-16ul/g.之后小鼠成俯卧位，头皮、头盖的肌肉和骨膜分离出来暴露出颅骨，在矢状缝旁边4mm处用电钻钻一个2mm左右的小孔。3F气囊管沿钻口插入颅内，尖端指向脑干，以每5分钟注入20ul生理盐水，逐渐膨胀气囊，增加颅内压，通过压迫脑干使脑桥不可逆的缺血形成渐近性脑死亡模型（生理盐水总量为80ul±25ul）,在此期间会出现小鼠自主呼吸停止，后腿短暂性自发性收缩、背痉挛、尿失禁、瞳孔散大等一系列表现。脑死亡的诊断通过有无角膜反射及呼

14

吸停止试验来证实。整个脑死亡的过程3F气囊导管在小鼠颅内导管保持膨胀、呼吸机机械通气维持脑死亡3小时。

建立假脑死亡模型的方法步骤和脑死亡一样，区别在于假脑死亡只颅骨钻孔，3F气囊导管插入颅脑但不注入生理盐水使其膨胀。

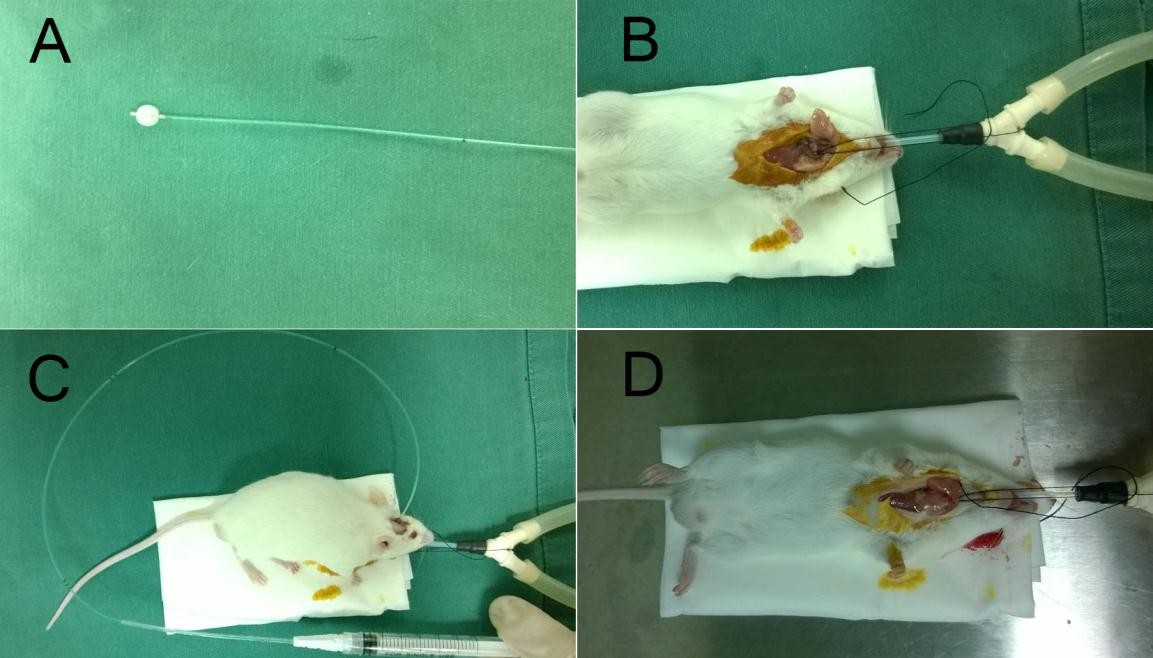


图 1 脑死亡的基本步骤

Figure 1 The basic steps of brain death

A. 膨胀的3F气囊导管B.呼吸机气囊导管插入小鼠的气管

C. 3F气囊导管插入小鼠颅内并膨胀D.持续的呼吸机维持通气

### 1.4.3 CK-MB的测量

样品（血清）10ul加试剂一（R1）200ul，混匀，37℃孵育5min之后再加试剂（R2）50ul，混匀37℃孵育2min，连续监测1-3分钟吸光度变化，计算△A/min。

CK-MB活力（U/L）=△A/min×F(8360)

反应总体积（ ）×2

样品体积（ ）毫摩尔消光系数

### 1.4.4 蛋白免疫印迹技术（Western Blot）

15

打开离心机4℃预冷，准备2.0ml的EP管中，加入1mlRIPA裂解液加入10ulPMSF吹打混匀；取组织，称重约0.1g，加入EP管中。

EP管在冰上超声破碎仪200J、30次进行破碎（因超声破碎仪使用过程中产热、应注意停顿）。超声破碎后静置2-3min中后12000 r/min

4℃离心15 min，取上清液100ul分装，-80℃保存，所有样品都经过考马斯亮蓝定量。进行实验所需的蛋白在上样前都加入33.3ul蛋白上样缓冲液混匀，再经过100℃水浴煮沸5 min变性后用微量加样器上样，通过计算取50µg总蛋白样品加入12% SDS-PAGE凝胶变性电泳；通过转膜仪转膜至PVDF膜（Caspase-3和-actin使用0.45um的PVDF膜）上，5%脱脂奶粉摇床室温封闭1-2 h, TBST洗涤3-5次，每次10min，分别加入一抗Caspase-3(1︰500)、-actin（1︰1000），

4℃孵育过夜。第二天TBST洗膜4-6次、每次12-15min后，分别加入含辣根氧化酶标记的ft羊抗兔IgG二抗（1︰2000）、入含辣根氧化酶标记的ft羊抗鼠IgG二抗（1︰5000）、37℃孵育75min, TBST洗膜4-6次、每次12-15 min，加适量ECL发光液（A、B液按照1: 1比例混合）发光1min左右，置于暗盒曝光，经显影液、定影液显色。曝光后的胶片在image J软件扫描获取灰度值，用相应目的蛋白条带与内参蛋白条带的灰度值相比来看蛋白的相对表达量。

### 1.4.5 HE染色

HE染色步骤：1、脱蜡至水：

（1）二甲苯Ⅰ脱蜡（脱蜡2-5分钟）；

16

（2）二甲苯Ⅱ（2-5分钟）；

（3）无水酒精Ⅰ（1-2分钟）；

（4）95％，85％，75％乙醇各浸泡1min，自来水洗2min,蒸馏水洗2min；

2、染色

(1)苏木精染色5-10min后自来水洗1min；

(2) 0.5％-1％盐酸酒精分化数秒至30分钟后自来水洗1min；

(3)用温水(50℃)蓝化5-15分钟后蒸馏水洗1min；

(4)伊红染色数秒-2分钟后蒸馏水洗1min；3、脱水、透明

（1）85％酒精脱水20s，95％酒精Ⅰ脱水1分钟，95％乙醇Ⅱ脱水

1min，无水酒精Ⅰ脱水1min；无水酒精Ⅱ脱水1min；（2）石炭酸-二甲苯(1: 3)透明1min；

（3）二甲苯Ⅰ脱水1-2min；二甲苯Ⅱ脱水1-2min；

4、封固：

（1）用中性树胶封片；

（2）附贴标签和书写病理编号。

## 1.5 统计学方法

实验数据采用均数±标准差(*x*±s)来表示，统计学用SPSS13.0软件处理。用Kaplan-Meier法来检验移植心脏存活率，采用*t*检验和单因素方差分析来检验组间差异，以*P*0.05有统计学差异。

17

# **2** 结果

## 2.1 FTY720对小鼠脑死亡供体心脏移植物Th存的影响（图2）。

在排斥的终点或观察的终点统计心脏存活的时间。A组同种异基因组（C57BL/6→BALB/C, n=8）心脏移植物平均生存时间 为

（12.75±0.50）天，B组假脑死亡供心组（C57BL/6→BALB/C, n=8）心脏移植物平均生存时间为（12.50±0.57）天，C组同种同基因对照组（C57BL/6→C57BL/6, n=8）心脏移植物平均生存时间均超过35天观察期，D组FTY720处理组（C57BL/6→BALB/C, n=8）除一组心脏生存期为32天其余组平均生存时间均超过35天观察期，E组脑死亡组

（C57BL/6→BALB/C, n=8）心脏移植物平均生存时间为（7.75±0.50）天，F组FTY720处理脑死亡组（C57BL/6→BALB/C, n=8）除一组心脏生存期为30天其余组平均生存时间均超过35天观察期。

18

**S u rviva l F u n c tio n s**

1.0 group

1.00

2.00

3.00

0.8

4.00

5.00

6.00

0.6 3.00-ce ns ore d

**C u m S u rviva l**

4.00-ce ns ore d

6.00-ce ns ore d

0.4

0.2

0.0

5.00 10.00

15.00

20.00

25.00

30.00

35.00

**Tim e (d a ys )**

图2 六组移植心脏存活时间

Figure 2 The survival time of transplant heart of six group

图中的group1,2,3,4,5,6分别代表着A组，B组，C组，D组，E组，F组. A，B两组没有统计学差异；与A组相比较E组脑死亡供体心脏平均生存时间明显缩短，差异性显著*P*0.01；与E组相比F组持续使用FTY720处理明显延长脑死亡供体心脏平均生存时间，差异性显著*P*0.01. n=8，观察期为35天。

## 2.2 FTY720对小鼠脑死亡供体心脏移植后心肌酶表达的影响(图3)。

术后第2天，心脏采血取血清测得各组CK-MB的值见下表。

19

表 1 六组CK-MB的值(*x*±s)

Table 1 The value of CK-MB of six group (x ± s )

| 分组 组 A 组 B 组 C 组 D 组 E 组 F |
| --- |
| CK-MB(U/L) 654.75±1.70 654.25±2.21 343.50±1.29 345.00±2.58 1200.75±2.21 352.25±2.58 |

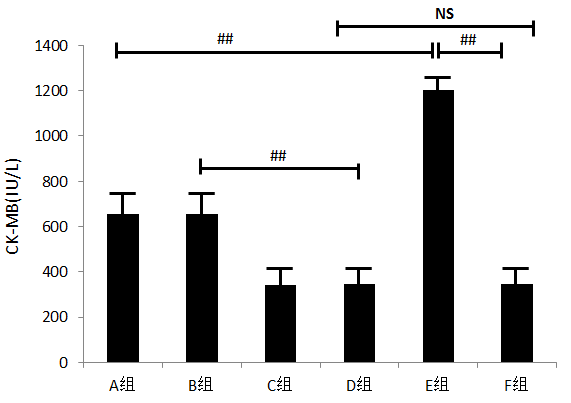


图 3 FTY720对各组CK-MB表达的影响

Figure 3 Effect of FTY720 on CK-MB expression

与A组相比，E组脑死亡供心组血清中的CK-MB明显升高，有统计学差异*P*0.01; F组脑死亡供心组用FTY720处理后相比E组血清中的CK-MB明显下降，有统计学差异*P*0.01；与B组相比较D组用FTY720处理后血清中的CK-MB明显下降有统计学差异*P*0.01; A，B两组相比没有统计学差异；C, D，F三组两两比较没有统计学差异。（NS=没统计学意义；##为

*P*0.01有统计学意义；n=8）

## 2.3 FTY720对小鼠脑死亡供体心脏异位移植物中Caspase-3表达的影响(图4)。

术后两天收集心肌组织，提取蛋白，用Western blotting方法检测各组大鼠心肌Caspase-3蛋白表达情况。

20



图 4 a FTY720对Caspase-3的表达影响

Figure 4 a Effect of FTY720 on Caspase-3 expression



图 4 b Caspase-3/β-actin相对灰度值

Figure 4b Relative grey value of Caspase-3/β-actin

与A组相比，E组脑死亡供心组移植物中的Caspase-3明显升高，有统计学差异*P*0.01；

F组脑死亡供心组用FTY720处理后相比E组移植物中的Caspase-3明显下降，有统计学差异*P*0.01；与B组相比较D组用FTY720处理后移植物中的Caspase-3明显下降有统计学差异*P*0.01; A，B两组相比没有统计学差异；C, D，F三组两两比较没有统计学差异。（NS=没统计学意义；##为*P*0.01有统计学意义；n=8）

## 2.4 FTY720对小鼠脑死亡供体心脏病理改变的影响(图5)。

### 2.4.1 肉眼特征(图5a)

在排斥终点或观察终点取出心脏和脾脏肉观察变化。

21



图5 a心脏和脾脏的肉眼观察

Figure 5 a Naked eye observe of heart and spleen

A, B两组在术后12天左右移植心停止搏动，与C, D, F组相比移植心胀大变黑，脾脏也胀大部分变黑，A，B两组相比没有明显差异；E组脑死亡供心组相比A, B两组在术后7天左右移植心停止搏动，不仅移植心的存活时间缩短，且心脏和脾脏更加的肿胀发黑。不论是活体供心D组和脑死亡供心移植组F组用FTY720处理后与同系移植组C组没有显著性差异，心脏和脾脏未见明显肿大变黑，且在观察期终点35天仍移植心规律搏动n=8。

### 2.4.2 HE染色(图5b)

根据国际心脏移植学会（ISHLT）制定的标准进行排斥反应的病理学诊断和分级[19]。详见下表：

表 2 排斥反应的病理学诊断和分级

Table 2 Pathological diagnosis and classification of heart rejection

| 0R 级 | 心肌组织结构完好少量炎症性细胞浸润； |
| --- | --- |
| 1R 级 | 心肌组织坏死灶不超过 1 个，血管周围和（或）组织间隙内浸润； |
| 2R 级 | 伴有心肌组织破坏且 2 个以上的病灶状浸润； |
| 3R 级 | 浸润呈弥漫性且伴有多个心肌组织坏死灶。 |

22

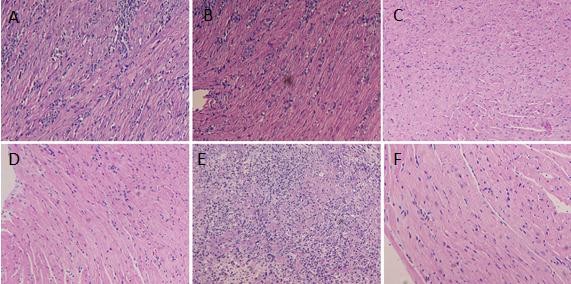


图 5 b术后第5天HE染色结果

Figure 5b The result of HE stain after 5 days

图中箭头示在血管周围及心肌组织间隙有大量炎症细胞聚集。×100

术后第5天，A组同种异基因移植组和B组假脑死亡供心组为急性排斥反应病理改变，心肌细胞出现变性坏死心肌轮廓尚清楚，单核细胞和淋巴细胞在心肌间浸润，为2R级病理分级；在E组脑死亡供心组有坏死的心肌细胞，心肌轮廓几乎不可见，单核细胞和淋巴细胞在心肌之间弥漫浸润，为3R病理分级，急性排斥反应属于重度；D组FTY720处理的同种异基因移植组和F组FTY720处理的脑死亡供心组移植物仅有少量单个核细胞浸润，心肌组织结构和轮廓完好，零星有点状坏死，为1R级病理分级；C组心肌组织结构完好，仅有少量炎症细胞浸润，介于0R和１R级之间的病理分级。n=4。

# 3 讨论

## 3.1 关于小鼠心脏异位移植模型的讨论

早在1933年，就有哺乳动物的异位心脏移植模型报道[20]其血流方向为从受体腹主动脉到移植心升主动脉再到冠状动脉到心肌到冠状静脉到右心房到右心室到肺动脉最后到受体下腔静脉，因此也阐明了移植心血液循环原理。我们采用的模型是小鼠异位移植的模型，血流方向为：受体腹主动脉→移植心脏主动脉→冠状动脉→心肌→冠状静脉→右心房→右心室→肺动脉→受体下腔静脉（图6）。虽然心脏

的左心没有参与血液循环且与正常的生理状态有所不一样，但存活没

有受影响，因而这种模型广泛应用于移植免疫学方面的研究。

23



图 6 小鼠腹部异位心脏移植的血液循环模式

Figure 6 The blood circulation pattern of heterotopic cardiac transplantation model in mice

动物移植模型一直是器官移植领域基础和临床研究的重要模型，其中最常用的是小鼠与大鼠的异位心脏移植模型。大鼠虽然体积大，且手术耐受好，成功率高；小鼠体积小手术需借用显微器械，手术难度大，可是小鼠也有其他动物没有的优点：目前有超过1300种转基因小鼠可以来利用；小鼠移植模型在移植免疫进程中已经取得了领先的地位；小鼠移植模型提供了一系列疾病生物研究的平台特别是在免疫系统疾病方面；还有在试剂用量上小鼠比其他动物会减少很多；更为重要的是小鼠H-2主要组织相溶性复合物和人类白细胞抗原主要组织相溶性复合物高度类似，提供了临床相关的内在机制。因此小鼠常常做为首选动物来研究移植免疫[21.22]。异位心脏移植模型主要分为两种：一种是腹部异位心脏移植[23.24]一种是颈部异位心脏移植[25]。与腹部异位心脏移植相比颈部空间明显小，不利于移植心术后的搏动，而颈动脉、颈静脉与下腔静脉和腹主动脉相比明显更加的难分离且细，不好进行血管吻合，且容易出现打结影响移植心的存活。而腹部空间

24

大，移植心脏有更多的空间搏动有更好的存活率，且腹主动脉和下腔静脉相对较大，这样就降低了血管缝合的难度，提高了心脏存活率，所以目前大多数还是采用小鼠腹部异位心脏移植的模型[26-30]。

小鼠心脏异位移植模型的建立难度较大，在经过大量显微训练和精心的围手术处理后模型才稳定建立。现将该模型的手术实践经验 讨论如下：

供心的保护：Ono法为先取供心，后再进行受体手术。我们在此基础上加以改进，一开始即进行受体准备，供体取心后直接就行移植 手术，这样就缩短了供体心脏冷缺血时间[31]。切取供心前充分肝素化避免术后供心血栓，供心缺血后应保持低温状态，吻合过程中供心 一直用冰纱布覆盖纱布上并加小碎冰。结扎右上腔静脉时应紧贴心脏 在分支下面结扎以免术后造成出血不止，分离主动脉弓和肺动脉时不 要强行分离，以免术后毛细血管出血不止。尽量缩短供心冷缺血和热 缺血时间对供心复跳很关键。

受体的处理：在对受体小鼠主动脉和下腔静脉的阻断中，采用血管夹阻断能够让腹主动脉完全朝上，减少了下腔静脉对缝合的干扰且血管夹对血管的损伤比丝线结扎血管要小。

血管的吻合：熟练的显微外科吻合技术是手术的成功关键。边距不宜过大，过大容易造成吻合段血管狭窄、不通，尤其是近心端，近心端如果边距过大造成的血管狭窄供心将没有血流通过将不会复跳，针距不宜过密，过密的话针孔较多术后易出血。边距和针距比约为

1: 1.5，动脉一般每侧5-7针，一边缝一边紧线，因动脉压力大以防术

25

后大出血。在缝合的过程要避免血管内皮的损伤以防术后动脉栓塞引起的下肢瘫痪。最后注意用肝素生理盐水冲洗以排出血管里的空气也防止血栓的形成。在缝合下腔静脉和肺动脉的时候，第一针特别重要以防渗血。缝合的针距相对较大，一侧3-4针，同时收线不宜太紧，因为静脉压不大，不会因为收线不紧而引起渗血。松开血管夹如果有渗血可以用事先准备好的小棉球压迫止血，效果较好。

围手术期处理：术后可向颈部皮下注射0.5ml生理盐水给术后小鼠补液。术中环境温度控制在25度与33度之间，当血管吻合完成后用温生理盐水冲洗腹腔，有利小鼠心脏复跳和体温恢复，术后把小 鼠放置在保温箱复温，有利于小鼠复苏。

## 3.2 关于脑死亡的讨论

### 3.2.1 关于小鼠脑死亡对器官的影响

众所周知，目前我国移植面临的最大的问题就是器官短缺。尽管国家卫生部近期启动了心脏死亡后器官捐献（Donate after cardiac death, DCD）工作，以此为突破口来缓解供体严重紧缺的尴尬局面

[1]. 不可置否，脑死亡供体（Brain death donor, BDD）的合法合理使用是解决我国供体来源奇缺最有前景的方案之一。然而，即使在西 方医学发达国家仍有约25％的潜在BDD在维护过程中丢失，而积极的维护措施有助于稳定BDD的生理状态、逆转不稳定器官功能使之适用于移植[32-38]。临床研究表明：与活体供体移植比较，BDD供体质量明显降低，免疫原性增加，移植后早期移植器官功能不全（early allograft dysfunction）甚至原发性无功能（primary no function ,

26

PNF）的发生率显著增高，这主要归因于脑死亡引起的损伤（Brain death-induced injury, BDI）[39-43]. BD可引起机体一系列严重复杂的病理生理改变，包括交感神经兴奋引起儿茶酚胺大量释放，产生强 烈的血管收缩，造成血管内皮细胞损伤，并导致血压、体温的混乱波 动，凝血机制异常、激素耗竭和电解质紊乱，并诱发各种炎症介质的高表达、隐蔽抗原的暴露等形成供体的“前炎症状态 ”

（pro-inflammatory state）以及血流动力学不稳定造成低灌注、缺血缺氧异常改变，组织细胞氧需/氧供失衡，从而出现不同程度的器官损伤。不仅如此，BD还对随后移植过程中不可避免的缺血/再灌注损伤（ischemia reperfusion injury, IRI）造成级联放大作用，协同造成移植物严重损伤[18, 32]。本实验拟探讨BDD移植背景下BDI→前炎症状态→I/R(IRI)→级联性损伤→FTY720的干预策略。通过实验我们看到脑死亡可以降低供体心脏在术后生存期，可以使术后血清中CK-MB上升，可以使促凋亡蛋白Caspase-3表达上调，可以使加重心肌的病理表现。

3.2.2关于小鼠脑死亡模型的建立

通过膨胀气囊管使小鼠颅内压增高造成的小鼠脑死亡实验动物模型用来做移植相关的研究。目前主要有渐进性(20ul/min)和暴发性

（40ul/min）脑死亡模型，他们之间的不同在于气囊注入生理盐水的速度。脑死亡必然会导致“交感神经风暴”或“儿茶酚胺风暴”，脑死亡必然带来交感神经的兴奋，在交感神经末梢和肾上腺髓质分泌大量的儿茶酚胺，远远超过生理量的水平在交感神经兴奋的共同刺激下，

27

心脏会过度兴奋，心跳加快带来心肌缺血缺氧，线粒体肿胀导致细胞 膜通透性改变，冠脉缺血，这可能是造成心肌毒性的机制[44]。在建立犬脑死亡过程中发现，心肌受损与颅内压上升的速度密切相关，在颅 内压迅速上升时，肾上腺素分泌量为正常的1000倍左右，心肌缺血缺氧肿胀坏死，体内循环丧失，脑死亡建立失败；在颅内压缓慢上升时，心肌功能相对完好，体内循环可以维持，脑死亡建立的成功率相 对高很多[45]。

在大量的动物实验中发现在颅内压增高时不可避免的压迫脑干使交感神经兴奋，儿茶酚胺分泌，虽然过多有心肌毒性作用，但是儿茶酚胺在维持心脏的兴奋性和维持血液循环有重要的作用。如果颅内压压迫脊髓会导致交感神经去活化，由于外周血管扩张最终导致血液循环丧失，建立脑死亡失败。有实验证实缓慢的增加颅内压会较好的避免压迫脊髓，特别是颈脊髓，这样建立脑死亡的模型成功率较高[45、

46]。

有研究证实建立小鼠渐进性脑死亡比暴发性脑死亡模型更加稳定[17]。所以我采用小鼠渐进性脑死亡来建立小鼠脑死亡模型，可重复和成功率高。

## 3.3 关于FTY20的讨论

20世纪以来，随着医学科学的发展，器官移植成为脏器功能衰竭终末期的常规、有效的治疗方式。免疫抑制剂在器官移植的过程中扮演着重要的角色，目前免疫抑制剂在按照作用机制主要为分为以下几种：①干预核酸的合成，如布列奎钠(BQR)、霉酚酸酯(MMF)、来氟米特

28

（LEF）、咪唑立宾(MZR)、硫唑嘌吟(Aza)等；②干预细胞因子到转录过程，如他莫西司(FK5O6)、环孢素(CsA)等；③对淋巴细胞的分化的影响，如152脱氧精胍菌素等。这些药虽然有良好的免疫抑制作用但是对整体的免疫系统也有抑制作用，使受者容易感染和肿瘤发生的概率增加。

FTY720是一种新型免疫抑制剂。FTY720由SphK（鞘氨醇激酶）磷酸化后成为磷酸化FTY720 (FTY72O-P)来起作用，其原因是鞘氨醇-1-磷酸酯(S1P)和磷酸化的FTY720有化学同源性，作为S1P的激动剂来发挥作用的，对体内的T淋巴细胞和B淋巴细胞的增殖和激活不受影响。有研究发现FTY720对体内的能量代谢没有影响，也没有传统免疫抑制剂的肾毒性和神经毒性[47]。

FTY720抑制免疫反应的机制目前没有一致看法，主要有归巢学说[48]和凋亡学说[49, 50]两种说法。有报道，在一定的范围（0.1-10mg/kg），

FTY720呈剂量依赖性[51]。有研究发现在以1mg/kg的剂量给小鼠灌胃后在6个小时后外周血中的CD4+、CD8+淋巴细胞数量会显著下降[52]。有研究证明在小鼠心脏异位移植的模型中持续小剂量FTY720

（0.3mg/kg/d）灌胃会明显延长移植物的生存期，外周血的淋巴细胞特别是CD4+、CD8+淋巴细胞数量显著下降，脾脏和肠系膜中的淋巴细胞数量显著上升[53]。大量研究证明，同种移植排斥反应是主要是由淋巴细胞特别是T淋巴细胞来介导的[54、55]。有体外实验（细胞实验）证实, FTY720能够促进细胞凋亡[56]且在用FTY720处理的大鼠心脏移植的模型中发现FTY720可以促进淋巴细胞的归巢和抑制淋巴细胞从

29

二级淋巴结中游离出来且减少移植物中的T淋巴细胞浸润[51]。所以我们认为小剂量FTY720可引起外周血液中的淋巴细胞的大大的减少且抑制了T淋巴细胞在移植物中的浸润，持续应用可以保证移植物的长期存活，因此我们采用术前4d开始以剂量0.5mg/kg/d直至排斥或观察终点，来做为FTY720处理组。

我们知道器官移植不可避免的引起缺血再灌注损 伤

（Ischemia-Reperfusion Injury, IRI）。最近有研究证明FTY720对肾脏和肝脏中缺血再灌注损伤有保护作用[57, 58]。然而先前的研究主要的把精力放在FTY720对淋巴细胞的影响。本文将从另一个角度即

FTY720对缺血再灌注的影响来进一步解释FTY720对器官移植的影响。心肌缺血再灌注损伤发病机制中的重要环节之一就是细胞凋亡，

细胞凋亡的与缺血再灌注损伤的程度密切相关。与细胞凋亡密切相关的是一种半胱天冬氨酸蛋白酶3（Cysteine aspartic acid specific protease3, Caspase-3）蛋白酶，可以引起心肌缺血再灌注损伤过程中心肌细胞凋亡，加重心肌损伤。目前有观点认为心肌细胞凋亡信号转导通路主要有为死亡受体/半胱天冬氨酸蛋白酶8(Caspase-8)和线粒体/半胱天冬氨酸蛋白酶9(Caspase-9)两条途径，Caspase-3是两条信号途径下游的共同通路。Caspase-9和Caspase-8是半胱天冬氨酸蛋白酶中参与凋亡启动的2个酶，Caspase-3在Caspase家族中属于效应子Caspase，处于凋亡通路的核心位置，称为“死亡蛋白酶”，可以对底物蛋白质进行酶解，一旦Caspase-3被激活，凋亡将不可避免发生[59, 60]。有研究证实在缺血再灌注中Caspase-3表达明显增加，

30

抑制Caspase-3的表达可以减轻IRI[61-64]. 有研究证实在体外实验经过FTY720处理后的细胞Caspase-3表达下调[65]，其机制可能促进Akt和ERK磷酸化，提高了Bcl-2的水平，抑制caspase-3表达[66, 67]。

虽然FTY720的作用机制尚没有完全阐明清楚且是否对移植物有免疫耐受的作用，但其独有的作用是肯定的。在本实验中我们可以看 到，经FTY720处理后的小鼠可以减轻脑死亡带来的对异位心脏移植的损伤比如延长术后移植物的生存时间，降低血清中的CK-MB值，降低心肌中的Caspase-3表达，改善心肌的病理结果和肉眼观察结果这些结果都接近同系移植组的效果。这就为FTY720为进一步指导临床用药提供了良好的理论依据。

# 4 结论

脑死亡可以加重心脏异位移植的损伤且缩短移植物的生存期；

FTY720可以减轻脑死亡带来的对心脏异位移植的损伤和延长移植物的生存时间。

31

参考文献

[1] Huang J, Millis JM, Mao Y, et al. [A pilot programme of organ donation after cardiac death in China.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22078722) Lancet, 2012, 379(9818): 862-866.

[2] Mehra MR, Uber PA, Ventura HO, et al. The impact of mode of donor brain death on cardiac allograft vasculopathy: an intravascular ultrasound study. Am Coll Cardiol, 2004, 43(5): 806-810.

[3] Szabo G, Buhmann V, Bahrle S, et al. Brain death impars coronary endothelial function. Transplantaion, 2002, 73(11): 1846-1848.

[4] Damman J, Seelen MA, Moers C, et al. Systemic complementactivation in deceased donors is associated with acute rejection after renal transplantation in the recipient. Transplantaion, 2011, 92(2): 163-169.

[5] Okamoto R, Yamamoto Y, Lin H, et al. Influence of dopamine on the liver assessed by changes in arterial ketone body ratio in brain-dead dogs. Surgery, 1990, 107(1): 36-42.

[6] Galinanes M, Hearse DJ. Brain-death-induced cardiac contractile dysfunction: studies of possible neurohormonal and blood-borne mediators. Mol Cell Cardiol, 1994, 26(4): 481-498.

[7] 高明明, 高向东, 顾觉奋. 新型免疫抑制剂FTY720的研究进展. 国外医药抗生素分册, 2007, 28(5): 215-218+224

[8] Brinkmann V, Cyster JG, Hla T. FTY720: sphingosine 1-phosphate receptor-1 in the control of lymphocyte egress and endothelial

32

Barrier function. Am J Transplant, 2004, 4(7): 1019-1025.

[9] LIXK, Tamura A, Fujinom, et al. Induction of lymphocyte apoptosis in rat liver allograft with ongoing rejection by FTY720. Clin Exp Immunol, 2001, 123(2): 331-339.

[10] Chiba K. FTY720, a new clas of immunomodulator, inhibits lymphocyte egress from secondary lymphoid tissues and thymus by agonistic activity at sphingosine 1-phosphate receptors. Pharmacol Ther, 2005, 108(3): 308-319.

[11] Leonard M BV, Nicolem VB, Wendy MM, et al. FTY720 treatment of kidney transplant patientss a differential effect on B cells, naive T cells, and NK cells. Transpl Immunol, 2006, 15(4): 281-288.

[12] Gardell SE, Dubn AE, Chun J. Emergin medicinal roles for lysophospholipid signaling. Trends Mol Med, 2006, 12(2): 65-75.

[13] Brinkmann V, Pinschewer D, Chiba K, et al. FTY720: a novel transplantation drug that modulates lymphocyte traffic rather than activation. Trends in Pharm Sciences, 2000, 21(2): 49-52.

[14] 朱鹏, 陈义发, 张宜江, 等. 建立小鼠腹部心腹移植模型的体会. 中国普通外科杂志, 2007, 16(2): 133-135.

[15] Ono k, Lindsey ES. Improved technique of heart transplantation in rats. J Thorac Cavdiovasc Surg, 1969, 57(2): 225-229.

[16] Shiguang Qian, John J. Fung, Anthony J. Demetris, et al. Orthotopic

33

Liver transplantation in the mouse. Transplantation,1991,52(3):562-564.

[17] Pomper G, Trescher K, Santer D, et al. Introducing a mouse model of brain death. J Neurosci Methods, 2010, 192(1): 70-73.

[18] Carl A, Bernhard F, Fei Q, et al. Donor brain death exacerbates complement-dependent ischemia/reperfusion injury in transplanted hearts. Circulation, 2013, 127(12): 1290-1299.

[19] Stewart S, Winters GL, Fishbein MC, et al. Revision of the 1990 working formulation for the standardization of nomenclature in the diagnosis of heart rejection. J Heart Lung Transplant, 2005, 24: 1710-1720.

[20] Mann FC. Transplantation of the intact mammalian heart. Arch Surg, 1933, 26: 219.

[21] Plenter RJ, Zamora MR, Grazia TJ. Four decades of vascularized heterotopiccardiac transplantation in the mouse. J Invest Surg, 2013, 26(4): 223-228.

[22] Gong W, Thomley T, Whitcher GH, et al. Introduction of modified cervical cardiac transplant model in mice. Exp Clin Transplant, 2012, 10(2): 158-162.

[23] Corry RJ, Winn HJ, Russell PS. Primarily vascularized allografts of heart in mice. Transplantation, 1973, 16: 343.

[24] Chen ZH. New technique of cervical heterotopic heart transplantation in mice. Transplantation, 1991, 52: 1099.

[25] Steinbruchel DA, Nielsen B, Salomon S, et al. A new model for heterotopic heart transplantation in rodents. Transplant Proc, 1994, 26: 1298-1299.

[26] Chen Y, Demir Y, Valujskikh A, et al. The male minor transplantation antigen

34

Preferentially activates recipient CD4+ T cells through the indirect presentation pathway in vivo. J Immunol,2003,171(12):6510-6518.

[27] Demir Y, Chen Y, Metz C, et al. Cardiac allograft rejection in the absence ofmacrophagemigrationinhibitoryfactor. Transplantation, 2003, 76(1): 244-247.

[28] Chen Y, Demir Y, Valujskikh A, et al. Antigen location contributes to the pathological features of a transplanted heart graft. Am J Pathol, 2004, 164(4): 1407-1415.

[29] Chen Y, Heeger PS, Valujskikh A. In vivo helper functions of alloreactive memory CD4+ T cells remain intact despite donor-specific transfusion and anti-CD40 ligand therapy[J]. J Immunol, 2004, 172(9): 5456-5466.

[30] Ensminger SM, Billing JS, Morris PJ, et al. Development of a combined cardiac and aortic transplant model to investigate the development of transplant arteriosclerosis in the mouse. J Heart Lung Transplant, 2000, 19: 1039-1046.

[31] 吴蔚, 杨康, 姜恒. 小鼠异位心脏移植模型的建立. 重庆医学, 2004, 33(12): 1777-1778

[32] J. F. Bugge. Brain death and its implications for management of the potential organ donor. Acta Anaesthesiol Scand, 2009, 53: 1239-1250

[33] Floerchinger B, Oberhuber R, Tullius SG[. Effects of brain death on organ quality and transplant outcome.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22459036) Transplant Proc. 2012, 44(8): 2260-2266.

[34] Dare AJ, Bartlett AS, Fraser JF. [Critical care of the potential organ donor.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22618126) Transplant Rev (Orlando). 2012, 26(2): 54-62.

[35] Westphal GA, Caldeira Filho M, Fiorelli A, et al[. Guidelines for maintenance of](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23026569)

35

[Adult patients with brain death and potential for multiple organ donations: the](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23026569) [task force of the brazilian association of intensive medicine the brazilian](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23026569) [association of organs transplantation, and the transplantation center of santa](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23026569) [catarina.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23026569) Curr Neurol Neurosci Rep. 2012,12(4):456-465.

[[36] Roels L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Roels%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23114533), [Smits J](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Smits%20J%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23114533), [Cohen B](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cohen%20B%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=23114533). Potential for Deceased Donation Not Optimally Exploited: Donor Action Data From Six Countries. [Transplantation.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23114533) 2012, 94(11): 1167-1171

[37] Goldstein MJ, Lubezky N, Yushkov Y, Bae C, Guarrera JV. [Innovations in organ donation.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22678859) Mt Sinai J Med, 2012, 79(3): 351-364.

[38] Rey JW, Ott T, Bösebeck D, Welschehold S, Galle PR, Werner C. [Organ](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22430555)protective intensive care treatment and simulation-based training. Anaesthesist. 2012, 61(3): 242-249.

[[39] Jassem W](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Jassem%20W%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12829901), [Koo DD](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Koo%20DD%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12829901), [Cerundolo L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Cerundolo%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=12829901), et al. Leukocyte infiltration and inflammatory antigen expression in cadaveric and living-donor livers before transplant. [Transplantation.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=W.%20Jassem%2C%20D.D.%20Koo%2C%20L.%20Cerundolo%20et%20al.%20%20Leukocyte%20infiltration%20and%20inflammatory%20antigen%20expression%20in%20cadaveric%20and%20living-donor%20livers%20before%20transplant.%20%20Transplantation%2C%2075%20%282003%20Jun%2027%29%2C%20pp.%202001%E2%80%932007) 2003, 75(12): 2001-2007.

[[40] Weiss S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Weiss%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17430397), [Kotsch K](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kotsch%20K%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17430397), [Francuski M](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Francuski%20M%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=17430397), et al. Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation. [Am J Transplant.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Brain%20death%20activates%20donor%20organs%20and%20is%20associated%20with%20a%20worse%20I%2FR%20injury%20after%20liver%20transplantation) 2007 Jun; 7(6): 1584-93.

[[41] Kuecuek O](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Kuecuek%20O%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15808654), [Mantouvalou L](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Mantouvalou%20L%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15808654), [Klemz R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Klemz%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=15808654), et al. Significant reduction of proinflammatory cytokines by treatment of the brain-dead donor. [Transplant Proc.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Significant%20reduction%20of%20proinflammatory%20cytokines%20by%20treatment%20of%20the%20brain-dead%20donor) 2005, 37(1): 387-8.

[[42] Van der Hoeven JA](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Van%20der%20Hoeven%20JA%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11726822), [Lindell S](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=Lindell%20S%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11726822), [van Schilfgaarde R](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed?term=van%20Schilfgaarde%20R%5BAuthor%5D&amp;cauthor=true&amp;cauthor_uid=11726822), et al. Donor brain death

36

Reduces survival after transplantation in rat livers preserved for 20 hr. [Transplantation.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11726822) 2001 Nov 27; 72(10):1632-6.

[43] Waki K. [UNOS Liver Registry: ten year survivals.](http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18368704) Clin Transpl, 2006: 29-39.

[44] HerijersP, LeunensV, DuydaT, et al. Changes in organ perfusion after brain death in the rat and its relation to circulation catecholamines. Transplantation, 1996, 62: 330.

[45] Shivalkar B, Van Loon J, Wieland W, et al. Varible effects of explosive or gradual increase of intracranial pressure on myocardial structure and function. Circulation, 1993, 1: 230-239.

[46] Sehrdaer H, Zwentow NN, Mekrid L: Regional cerebral blood flow and CSF Pressures during cushing response induced by a supratentorial expanding mass. Aeta Neurol Scand, 1985, 71: 453-463.

[47] Aki FT, Kahan BD. FTY720: A new kid on the block for transplant immunosuppression. Expert Opin Biol Ther, 2003, 3(4): 665-681.

[48] Tanaka T, Takahara S, Hatori M, et al. A novel immunosuppressive drug, FTY720, prevents the cancer progression induced by cyclosporine. Cancer, 2002, 181(2): 165-171.

[49] Suzuki S, Li XK, Enosawa S, et al. A new immunosuppressant FTY720 induces Bcl-2-associted apoptotic cell death in human lymphocytes. Immunology, 1996, 89: 518.

[50] Nagahara Y, Ikekita M, Shinomiya T. Immunosuppressant FTY720 induces apoptosis by direct induction of permeability transition and release of

37

Cytochrome from mitochondria[J]. J Immunol,2000,165:3250.

[51] Chiba K, Yanagawa Y, Masubuchi Y, et al. FTY720, a novel immunosuppressant, induces sequestration of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing in rats. I. FTY720 selectively decreases the number of circulating mature lymphocytes by acceleration of lymphocyte homing. J Immunol, 1998, 160(10): 5037-5044.

[52] Pabst O, Herbrand H, Willenzon S, et al. Enhanced FTY720-mediated lymphocyte homing requires Gαi signaling and depends onβ2 andβ7 integrin. J Immunol, 2006, 176(3): 1474-1480.

[53] Qi C, Dan L, Huifang L, et al. Effects of Long-term Administration of Low-dose FTY720 on Survival of Murine Cardiac Allograft. J Huazhong Univ Sci Technol, 2012, 32(2): 199-204.

[54] Andersen MH, Schrama D, Thor straten P, et al. Cytotoxic T cells [J]. J InvestDermato, 2006, 126: 32-41.

[55] Murphy KM, Reiner SL. The lineage decisions of helper T cells [J]. Nat Rev Immunol, 2002, 2: 933-944.

[56] Sugito K, Inoue M, Ikeda T, et al. Effect of FTY720 and ex vivo graft irradiation in rat small bowel transplantation: apoptosis of crypt cells and lymphocytes. Transplant Proc, 2007, 39(10): 3432-3435.

[57] Anselmo DM, Amersi FF, Shen XD et al. FTY720 pretreatment reduces warm

Hepatic ischemia reperfusion injury through inhibition of T-lymphocyte infiltration. Am J Transplant 2002; 2: 843–849.

38

[58] Troncoso P, Ortiz M, Martinez L, Kahan BD. FTY 720 prevents ischemic reperfusion damage in rat kidneys. Transplant Proc 2001, 33: 857–859.

[59] 曾海燕. PCSK9和Caspase3在大鼠心肌缺血再灌注损伤中的表达变化. 衡阳: 南华大学, 2011.

[60] 曹霞, 卢秀花, 崔新明, 等. 心肌缺血再灌注损伤中细胞凋亡及其信号转导通路的研究进展. 吉林大学学报(医学版), 2009, 35(5): 964-966.

[61] Vohra HA, Galiñanes M. Effect of the degree of ischaemic injury and reoxygenation time on the type of myocardial cell death in man: role of caspases[J]. BMC Physiol. 2005, 5: 14.

[62] Kovacs P, Bak I, Szendrei L, et al. Non-specific caspase inhibition reduces infarct size and improves post-ischaemic recovery in isolated ischaemic/reperfused rat hearts[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol. 2001, 364(6): 501-507.

[63] 张煜, 邱朝晖, 郭新贵, 等. Caspase-3 特异性抑制剂对缺血再灌注损伤诱导的大鼠心肌细胞凋亡的作用[J]. 中国临床医学, 2009, 16(1): 12-15.

[64] 陈建伟, 钟玲. 细胞色素C与caspase家族在缺血再灌注所致心肌细胞凋亡中的作用[J]. 医学综述, 2009, 15(2): 173-176.

[65] Kwan M, Kevin T. Ng, Terence K. Lee, et al. FTY720 Attenuates Hepatic Ischemia-Reperfusion Injury in Normal and Cirrhotic Livers [J]. Am J Transplant 2005, 5: 40-49.

[66] Hasegawa Y, Suzuk iH, Sozen T, et al. Activation of sphingosine-1-phosphate receptor-1 by FTY720 is neuroprotective after ischemic stroke in rats[J].

39

Stroke, 2010, 41(2): 368-374.

[67] OsindeM, Mullershasen F, Dev KK. Phosphorylated FTY720 stimulates ERK phosphorylation in astrocytes via S1P receptors [J]. Neu ropharm acology, 2007, 52 ( 5): 1210- 1218.

40

综述

脑死亡对外周器官影响的研究进展

目前器官移植发展的主要问题仍然是器官严重短缺。主要有活体、心死亡（donors of cardiac death, DCD）以及脑死亡（brain death，

BD）供体三种来源，纵观三种供体来源形式，当前移植领域的最佳来 源是脑死亡供体器官。但是由于脑死亡所引起的一系列严重复杂的病 理生理改变对供体器官质量有显著影响[1, 2]。现就脑死亡的病理生理改变、供体器官的处理等方面的最新研究进展综述如下。

1. 脑死亡的定义和判断标准

1968年，哈佛大学医学院将脑死亡定义为“包括脑干在内的全脑功能丧失的不可逆状态”[3]。脑死亡的判断标准可以归纳如下：A.昏迷；B。脑干反射阴性（包括角膜反射、咳嗽反射、冷热试验、咽反射、瞳孔对光反射、拱嘴反射和吸吮反射消失）；C.呼吸试验阴性：动脉二氧化碳分压（PaCO2）达到8.0kPa或高出平常基线水平2.67kPa时仍无呼吸；D.根据病人年龄决定的两次评估的间隔期：出生到2需要48h,2岁到1岁需要24h,1岁至18岁以上要6h；E.确诊性试验：年龄小于2小月需要2个确诊试验证实，2个月到1岁需要1个确诊试验证实，1岁以上确诊根据临床而定[4]。

2. 脑死亡的病理Th理改变

2.1血流动力学改变

脑死亡是由颅内压骤然增加引起，颅内压增加压迫脑桥引起的

41

“库欣反应”所致血压升高、心率减慢、脉压增大。之后随着大脑缺血和脑疝的形成，交感神经兴奋性增加，儿茶酚胺大量释放，出现“交感风暴”和“儿茶酚胺风暴”引起外周血管剧烈收缩，导致器官供血不足，微循环障碍，之后无氧代谢增加，血液中乳酸及自由脂肪酸水平迅速增加，从而出现酸中毒[5.6]。之后由于交感神经兴奋性降低，血压正常或下降，加之心脏出现心肌损伤、心肌缺血等结构性改变，引起心功能降低，最终导致外周组织和器官的供血和供氧不足[7.8]。总之，脑死亡的早期重要标志之一就是血流动力学紊乱。

2.2内分泌系统的改变

由于交感神经活性和血清中儿茶酚胺水平改变，脑死亡可能引起内分泌的改变。在脑死亡的动物模型中，我们可以看到三碘甲状腺氨酸（T3），皮质醇和胰岛素的急剧增加[9.10]。但是在脑死亡的病人中有一些不一样，在绝大多数病例中皮质醇和胰岛素的水平保持正常且 三碘甲状腺氨酸（T3）下降的水平不统一[11-13]。在60%-80%脑死亡的供体中，三碘甲状腺氨酸（T3）仅仅低于正常值，但中在仅仅15%的脑死亡供体中三碘甲状腺氨酸（T3）到达非常低的值且T3的值降低伴随着逆三碘甲腺原氨酸（reverse T3）值的上升。游离甲状腺素受的影响较小且只有30%-35%仅仅低于正常值。在脑死亡供体中垂体前

叶的功能似乎保存下来，因为促甲状腺激素（TSH）, 促肾上腺皮质激素（ACTH）和人类生长激素的值是正常的，表明垂体前叶的功能还是有保留的。甲状腺激素和TSH水平是判断“甲状腺机能正常的病态综合征”重要标准常伴随着严重的脑损伤，而不是TSH缺陷[11-13]。在

42

脑死亡引起的中枢神经系统损伤引的内分泌的变化报道说法不一、激 素对外周血流动力学影响方面也存在矛盾现象且在动物和病人中内分泌的变化也存在显著差异[14]。

3.3炎症和免疫方面的影响

脑死亡和严重的脑损伤后，血液中的肿瘤坏死因子α（TNF-α），白介素6(IL-6)，IL-8，IL-1和IL-2R的水平有所升高，这些因子在实体器官中也会表达上调[15-18]. TNF-α和IL-6的表达升高与供心的质量下降有关且可以预测在心脏移植后右心室的衰竭[19.20]。在肾移植，活体供体的比尸体供体在短期和长期效果都要好，且脑死亡供体增加的在血液中和肾脏中的细胞因子的水平反映了在活体和尸体供中不同的结果[21-23]。细胞因子对免疫系统有许多协同和拮抗的作用。脑死亡后他们可能触发炎症级联反应，快速的增加白细胞的数量和粘附分子比如：选择蛋白，细胞间粘附分子-1（ICAM-1）和单核趋化因子-1导致在移植中的器官细胞浸润[24,25]。粘附的白细胞释放促炎症淋巴因子比如：TNF-α和干扰素-γ上调在移植物细胞中的主要组织相容性复合物（MHC）Ⅰ和Ⅱ。MHC可能通过T细胞介导过程增加移植物的免疫原性[26]。有研究证实，在脑死亡猪中发现肾，心和肺存在促炎症分子的器官特异性调节[17]。在这些细胞因子和相关的分子测量，IL-1和IL-6在所有器官中有所增加，然而TNF-α仅仅在肺组织中增加。ICAM-1 mRNA也仅仅在肺组织中增加。这些不同可能会解释器官免疫原性的不同和不同的移植结果[17]。

“交感风暴”和之后出现的儿茶酚胺不稳定可能导致在许多器官

43

低灌注和缺血，从而激活细胞因子系统。在脑部受损后，在脑组织和 脑脊液发现许多细胞因子他们通过有缺陷的血脑屏障，到达血液循环 刺激血液中的靶性细胞[27]。

总之，脑死亡与促炎症物质的释放有关，且促炎症反应在移植的器官中可以检测的到，导致在移植前可以激活免疫原性，最终导致与活体供心比脑死亡供心组织损害，功能降低，更低的存活时间[26,28-32]。

3脑死亡供体器官的保护

遭受颅内出血或脑部损伤后病人的治疗主要是针对脑部的治疗，这些治疗通常包括大量的镇静剂和高渗性生理盐水输液，以减轻颅内压和提高大脑的血液动力学[33, 34]。大量的镇静剂影响儿茶酚胺对心脏的输出作用从而损伤器官的灌注。当潜在的脑死亡病人发展成脑死亡， 下面对脑死亡器官供体的质量和管理就显和尤为重要。

3.1血液动力学管理

保持供体循环的稳定有一定的挑战性，从脑死亡到器官获取之间的时间要尽可能的短[35]。我们希望保持足够的血液循环量、适当的心输出量和再灌注压来保证氧气传送到组织。由于血液动力学不稳定，供体需要液体复苏，正性肌力剂支持，血管加压药和激素替代物治疗。 在多达80%的供体中会发生血压过低[36]，持续的血压过低会损伤移植物的功能[37, 38]。由于血容量减少很普遍，所以体液复苏是最早的纠正低血压。目前没有统一哪种液体最适合来补液，通常为晶体液和胶体液，大多数他们联合来用。

即使足够的体液复苏不足以保证恢复血压和心输出量，大概

44

80-90%的供体需要血管活性药的支持[39]。大剂量的儿茶酚胺使用到实验动物身上引起的心肌的损伤与脑死亡过程中“交感神经风暴”引起的损伤类似[40-42]。有研究在使用高剂量的多巴胺和去甲肾上腺素处理后心脏移植有好的效果，其原因是重建了脑死亡后失去的交感神经对心功能的必要作用[43]。获取足够的冠状动脉灌注压可能比避免高剂量儿茶酚胺更加的重要[44]。传统的认为多巴胺做为第一选择血管活性药来使用，儿茶酚胺有免疫调节效果可能减弱增加的器官免疫原性来提高移植后的器官存活期，多巴胺还会诱导血红素氧合酶-1来减少器官受到缺血再灌注和炎症的损伤[45-48]。

在一些病例中，体液复苏和使用多巴胺有时不足以恢复心脏后负荷，需要加入血管加压药。去甲肾上腺素和血管加压药的同时使用会 带来好的移植效果，血管加压药可以有效的对抗尿崩症[49-51]。

如果血流动力还没有控制好，可以使用激素替代治疗，传统的联合使用甲状腺激素，类固醇，抗利尿激素和胰岛素[52]。如今胰岛素治疗和血糖的控制重病特别护理中使用，且大部分供体器官接受胰岛素 的治疗在脑死亡之前[53-55]。具体的机制还有待进一步阐明。

3.2免疫抑制策略

用甲基泼尼松龙处理的脑死亡供体可以提高移植器官的短期和长期效果，有研究证实在脑死亡后甲基泼尼松龙可以减少免疫活性，发现在血清和移植器官甲基泼尼松龙可以降低细胞因子的表达，且在人的肝移植中提高移植器官功能，降低缺血再灌注损伤和降低急性排斥的概率。脑死亡后立即用甲基泼尼松龙处理供体细胞因子的水平可

45

以接近活体供体后的水平。但是甲基泼尼松龙处理需要的量不统一

[56,57]。

4展望

脑死亡供体已经为当前器官移植领域主要来源之一。但是由于在我国脑死亡尚未被大家所接受加之脑死亡之后极为复杂的病理生理改变，其机制也没有得到很确定的证明，这使得在我国脑死亡供体尚未完全的开展起来。因此我们需要不断的对脑死亡的病理生理机制进行研究，对脑死亡供体采取更合理的保护措施来提高移植患者的预后， 从而建立一个合理的完善的脑死亡规范化治疗方案。

46

参考文献

[1] Feng S, Goodrich NP, Bragg-Gresham JL, et al. Characteristics associated with liver graft failure: the concept of a donor risk index. Am J Transplant, 2006, 6(4): 783-90.

[2] Golling M, Mehrabi A, Blum K, et al. Effects of hemodynamic instability on brain death-induced preservation liver damage. Transplantation, 2003, 75(8): 1154-9.

[3] 郭明晓, 李幼生. 脑死亡供体器官研究进展. 中国普外基础与临床杂志, 2013, 20(10): 1183-1187.

[4] 罗超军, 张传汉. 脑死亡的研究进展. 国外医学·麻醉学与复苏分册, 2003, 24(3): 143-145

[5] Herinjgers P, Leunens V, Dudya T, et al. Changes in organ perfusion after brain death in the rat and its relation to circulating catecholamines. Transplantation, 62(3): 330-335.

[6] Bugge JF. Brain death and its implications for management of the potential organ donor. Acta Anaesthesiol Scand, 2009, 53(10): 1239-1250.

[7] Lundgren A, Wilton J, Molne J, et al. Impaired hepatic circulation despite normotension in brain-dead rats. Transplant proc, 2003, 2: 773-776.

[8] Ogawa K, Ito Y, Takahashi T, et al. Effects of cortisol administration on hepatic circulation during brain death in rabbits. Surgery, 2002,

47

4:450-455.

[9] Novitzky D, Cooper DK, Human PA, et al. Triiodothyronine therapy for heart donor and recipient[J]. Heart Transplant, 1988, 7: 370–375.

[10] Novitzky D, Cooper DK, Morrell D, et al. Brain death, triiodothyronine depletion, and inhibition of oxidative phosphorylation: relevance to management of organ donors. Transplant Proc, 1987, 19: 4110–4111.

[11] Masson F, Thicoipe M, Latapie MJ, et al. Thyroid function in brain-dead donors. Transplant Int, 1990, 3: 226-33.

[12] Gramm HJ, Meinhold H, Bickel U, et al. Acute endocrine failure after brain death[J] Transplantation, 1992, 54: 851–7.

[13] Howlett TA, Keogh AM, Perry L, et al. Anterior and posterior pituitary function in brain-stem-dead donors. A possible role for hormonal replacement therapy. Transplantation, 1989, 47: 828–34.

[14] Novitzky D, Cooper DKC, Reichart B, et al. Hemodynamic and metabolic response to hormonal therapy in brain-dead potential organ donors. Transplantation, 1987, 43(6): 852-854

[15] Stangl M, Zerkaulen T, Theodorakis J, et al. Influence of brain death on cytokine release in organ donors and renal transplants. Transplant Proc 2001, 33: 1284–5.

[16] Feuerstein GZ, Wang X, Barone FC. Inflammatory gene expression in cerebral ischemia and trauma. Potential new therapeutic targets.

48

Ann NY Acad Sci, 1997, 825: 179–93.

[17] Skrabal CA, Thompson LO, Potapov EV, et al. Organ-specific regulation of pro-inflammatory molecules in heart, lung, and kidney following brain death. J Surg Res, 2005, 123: 118–25.

[18] Amado JA, Lopez-Espadas F, Vazquez-Barquero A, et al. Blood levels of cytokines in brain-dead patients: relationship with circulating hormones and acute-phase reactants. Metabolism, 1995, 44: 812–6.

[19] Birks EJ, Burton PB, Owen V, et al. Elevated tumor necrosis factor-alpha and interleukin-6 in myocardium and serum of malfunctioning donor hearts. Circulation, 2000, 102: 352–8.

[20] Birks EJ, Owen VJ, Burton PB, et al. Tumor necrosis factor-alpha is expressed in donor heart and predicts right ventricular failure after human heart transplantation [J]. Circulation, 2000, 102: 326–31.

[21] Bugge JF, Hartmann A, Osnes S, et al. Immediate and early renal function after living donor transplantation. Nephrol Dial Transplant, 1999, 14: 389–93.

[22] Hariharan S, Johnson CP, Bresnahan BA, et al. Improved graft survival after renal transplantation in the United States, 1988 to 1996. N Eng J Med 2000, 342: 605–12.

[23] Terasaki PI, Cecka JM, Gjertson DW, et al. High survival rates of kidney transplants from spousal and living unrelated donors. N Eng

49

J Med 1995, 333: 333–6.

[24] Kusaka M, Pratschke J, Wilhelm MJ, et al. Early and late inflammatory changes occurring in rat renal isografts from brain dead donors. Transplant Proc, 2001, 33: 867–8.

[25] Koo DD, Welsh KI, McLaren AJ, et al. Cadaver versus living donor kidneys: impact of donor factors on antigen induction before transplantation [J]. Kidney Int, 1999, 56: 1551–9.

[26] Pratschke J, Neuhaus P, Tullius SG. What can be learned from brain-death modelsTransplInt, 2005, 18: 15–21.

[27] Ott L, McClain CJ, Gillespie M, et al. Cytokines and metabolic dysfunction after severe head injury. J Neurotrauma, 1994, 11: 447–72.

[28] Pratschke J, Wilhelm MJ, Laskowski I, et al. Influence of donor brain death on chronic rejection of renal transplants in rats. J Am Soc Nephrol, 2001, 12: 2474–81.

[29] Weiss S, Kotsch K, Francuski M, et al. Brain death activates donor organs and is associated with a worse I/R injury after liver transplantation. Am J Transplant, 2007, 7: 1584–93.

[30] Wilhelm MJ, Pratschke J, Beato F, et al. Activation of proinflammatory mediators in heart transplants from brain-dead donors: evidence from a model of chronic rat cardiac allograft rejection. Transplant Proc, 2002; 34: 2359–60.50

[31] van der Hoeven JA, Lindell S, Van SR, et al. Donor brain death reduces survival after transplantation in rat livers preserved for 20 hr. Transplantation, 2001, 72: 1632–6.

[32] Nijboer WN, Schuurs TA, van der Hoeven JAB, et al. Effects of brain death on stress and inflammatory response in the human donor kidney. Transplant Proc, 2005, 37: 367–9.

[33] Bentsen G, Breivik H, Lundar T, et al. Hypertonic saline (7.2%) in 6% hydroxyethyl starch reduces intracranial pressure and improves hemodynamics in a placebocontrolled study involving stable patients with subarachnoid hemorrhage. Crit Care Med, 2006, 34: 2912–7.

[34] Bentsen G, Breivik H, Lundar T, et al. Predictable reduction of intracranial hypertension with hypertonic saline hydroxyethyl starch: a prospective clinical trial in critically ill patients with subarachnoid haemorrhage. Acta Anaesthesiol Scand, 2004, 48: 1089–95.

[35] Cittanova ML, Leblanc I, Legendre C, et al. Effect of hydroxyethylstarch in brain-dead kidney donors on renal function in kidney-transplant recipients. Lancet, 1996, 348: 1620–2.

[36] Nygaard CE, Townsend RN, Diamond DL. Organ donor management and organ outcome: a 6-year review from a Level I trauma center. J Trauma, 1990, 30: 728–32.

[37] Lucas BA, Vaughn WK, Spees EK, et al. Identification of donor factors predisposing to high discard rates of cadaver kidneys and

51

Increased graft loss within one year posttransplantation–SEOPF 1977–1982. South-Eastern Organ Procurement Foundation. Transplantation, 1987, 43: 253–8.

[38] BusuttilRW, GoldsteinLI, DanovitchGM, etal. Liver transplantation today. Ann Intern Med, 1986, 104: 377–89.

[39] Wood KE, Coursin DB. Intensivists and organ donor management[J]. Curr Opin Anaesthesiol, 2007, 20: 97–9.

[40] Rona G. Catecholamine cardiotoxicity. J Mol Cell Cardiol, 1985, 17: 291–306.

[41] Novitzky D, Wicomb WN, Cooper DK, et al. Prevention of myocardial injury during brain death by total cardiac sympathectomy in the Chacma baboon. Ann Thorac Surg, 1986, 41: 520–4.

[42] Novitzky D, Rose AG, Cooper DK. Injury of myocardial conduction tissue and coronary artery smooth muscle following brain death in the baboon. Transplantation, 1988, 45: 964–6.

[43] Chamorro C, Silva JA, Romera MA. Cardiac donor management: another point of view. Transplant Proc, 2003, 35: 1935–7.

[44] Chamorro C, Silva JA, Segovia J, Romera MA. Use of catecholamines in cardiac donors: what is the real limitJHeartLungTransplant, 2004, 23: 916–7.

[45] Schnuelle P, Yard BA, Braun C, et al. Impact of donor dopamine on

52

Immediate graft function after kidney transplantation. Am J Transplant, 2004, 4:419–26.

[46] Hoeger S, Gottmann U, Liu Z, et al. Dopamine treatment in brain-dead rats mediates anti-inflammatory effects: the role of hemodynamic stabilization and D-receptor stimulation. Transpl Int, 2007, 20: 790–9.

[47] van der Woude FJ, Schnuelle P, Yard BA. Preconditioning strategies to limit graft immunogenicity and cold ischemic organ injury. J Investig Med, 2004, 52: 323–9.

[48] Beck GC, Brinkkoetter P, Hanusch C, et al. Clinical review: immunomodulatory effects of dopamine in general inflammation. Crit Care, 2004, 8: 485–91.

[49] Pennefather SH, Bullock RE, Mantle D, et al. Use of low dose arginine vasopressin to support brain-dead organ donors. Transplantation, 1995, 59: 58–62.

[50] Chen JM, Cullinane S, Spanier TB, et al. Vasopressin deficiency and pressor hypersensitivity in hemodynamically unstable organ donors. Circulation, 1999, 100 (Suppl 2): 244.

[51] de Perrot M, Weder W, Patterson GA, et al. Strategies to increase limited donor resources. Eur Respir J, 2004, 23: 477–82.

[52] Wheeldon DR, Potter CD, Oduro A, et al. Transforming the '‘unacceptable'’donor: outcomes from the adoption of a standardized

53

Donor management technique. J Heart Lung Transplant, 1995, 14: 734–42.

[53] Van den Berghe G, Wouters P, Weekers F, et al. Intensive insulin therapy in the critically ill patients. N Eng J Med, 2001, 345: 1359–67.

[54] Derde S, Vanhorebeek I, Van den Berghe G. Insulin treatment in intensive care patients. Horm Res, 2009, 71: 2–11.

[55] Van den Berghe G. Insulin therapy in the intensive care unit should be targeted to maintain blood glucose between 4.4 mmol/l and 6.1 mmol/l. Diabetologia, 2008, 51: 911–5.

[56] Kuecuek O, Mantouvalou L, Klemz R, et al. Significant reduction of proinflammatory cytokines by treatment of the brain-dead donor. Transplant Proc, 2005, 37: 387–8.

[57] Kotsch K, Ulrich F, Reutzel-Selke A, et al. Methylprednisolone therapy in deceased donors reduces inflammation in the donor liver and improves outcome after liver transplantation: a prospective randomized controlled trial. Ann Surg, 2008, 248: 1042–50.

54

# 攻读学位期间发表的学术论文目录

1. **雷彪，**何松青. 建立小鼠异位心脏移植模型的心得. 国际外科学杂志，2014,41(12)：834-836

2. Jiangfa Li, **Biao Lei**（并列第一）, Xingju Nie, Linku Lin, Syed Abdul Tahir, Wuxiang Shi, Junfei Jin, Songqing He. A comprehensive

Method for predicting fatal liver failure of patients with liver cancer resection. Medicine, 2015,94(17).

3. Qi Cheng, Songqing He, **Biao Lei**, Xin Long, Huifang Liang, Peng Zhu, Junfei Jin, Bo Tang, Stephen Tomlinson, Zhiying Wu, Xiaoping Chen. Early application of auxiliary partial orthotopic liver transplantation in Wilson's disease murine model and its clinical

strategy. Transplantation, 已接收.

4. Liao W, Zhang J, Zhu Q, Qin L, Yao W, **Lei B**, Shi W, Yuan S, Tahir SA, Jin J, He S. Preoperative Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio as a New Prognostic Marker in Hepatocellular Carcinoma after Curative Resection. Transl Oncol, 2014,7(2):248-55.

5. Bo Tang, Guangying Qi, Fang Tang, Shengguan Yuan, Zhenran Wang, Xingsi Liang, Bo Li, Shuiping Yu, Jie Liu, Qi Huang, Yangchao Wei, Run Zhai, **Biao Lei**, Hongping Yu, Xingyuan Jiao and Songqing He. JARID1B promotes metastasis and epithelial-mesenchymal transition via PTEN/AKT signaling in hepatocellular carcinoma cells.

Oncotarget,2015，已接收.

55

致谢

岁月如梭，转眼间，三年的研究生求学生活即将结束。值此[毕业论文](http://biyelunwen.yjbys.com/)完成之际，我谨向所有关心、爱护、帮助我的人们表示最诚挚的感谢与最美好的祝愿。

本论文是在导师何松青教授的悉心指导之下完成的。三年来，何教授渊博的专业知识，高超的医学水平，严谨的治学态度，精益求 精的工作作风，诲人不倦的高尚师德，朴实无华、平易近人的人格魅 力对我影响深远。本论文从选题到完成，几易其稿，每一步都是在导 师的指导下完成的，倾注了导师大量的心血，在此向我的导师何松青 教授表示深切的谢意与祝福！

衷心的感谢桂林医学院肝脏疾病研究室的金俊飞教授，唐博副教授，廖维甲老师、覃理灵老师、姚文敏老师对我实验的帮助。

衷心的感谢桂林医学院肝胆外科袁晟光教授，陈谦教授，杨景红教授，唐博、刘杰、喻亚群、余水平副教授对我临床的帮助。

衷心的感谢华中科技大学同济医学院肝脏外科的张必翔教授，梁慧芳老师，程琪博士，刘旭博士和宋嘉师弟对我实验动物移植方面 的指导。

衷心的感谢林联库，李铂，李江发师兄，同门胡志高，师弟翟润，甘信利，龚建华，余继东对我实验和生活的帮助。

衷心的感谢桂林医学院研究生科的全体老师和关心我的同学，感谢你们对我学习和生活给我的帮助。

56

特别的要感谢从小到大一直为我操劳的父亲和母亲，不管在精神上还是在物质上你们给了我莫大的支持，特别的感谢一直陪伴我的 妻子沙丁冉，谢谢你对我这几年学习上的理解和支持。

最后，向各位评审专家表示衷心地感谢！谢谢你们在百忙之中抽出时间对本论文进行评审并提出宝贵意见。

57