

L-精氨酸对心肺移植缺血再灌注损伤的保护作用

黄克力 吴若彬 肖学钧 张锡彬 范瑞新

【摘要】 目的 探讨一氧化氮(NO)前体 L-精氨酸(L-Arg)在心肺移植中对心肺缺血再灌注损伤的保护作用。**方法** 将 30 条成年犬随机分为对照组、实验 A(L-Arg 100 mg/kg 体重)、B(L-Arg 500 mg/kg 体重) 3 组,每组 10 条,采用标准法行心肺移植,A、B 组心肺保护液中加入不同剂量 L-Arg,供心肺放入 4℃ EC 液保存 4~5 h。监测心率、平均动脉压(MAP)、肺动脉平均压(MPAP),股静脉血一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、心肌肌钙蛋白 I(cTnI)、乳酸脱氢酶同工酶(LDH)含量、股动脉血氧分压(PaO₂),测定肺干湿重比(W/DR)及观察心肺超微结构以评价心肺保护的效果。**结果** 主动脉开放 60 min, B 组 NO (82.76 ± 12.34) μmol/L、A、B 组 SOD (60.19 ± 12.42)、(100.38 ± 16.55) NU/ml 较对照组(29.43 ± 12.42) μmol/L、(26.65 ± 5.68) NU/ml 高(P < 0.05), B 组 cTnI (11.07 ± 2.62) mg/L、MDA (2.48 ± 0.51) nmol/ml、LDH (592.8 ± 51.92) U/L 较对照组(23.16 ± 2.76) mg/L、(4.48 ± 0.54) nmol/ml、(719.80 ± 292.16) U/L 低(P < 0.05), B 组 PaO₂ (207.60 ± 32.72) mm Hg(1 mm Hg = 0.133 kPa)高于对照组(130.20 ± 13.36) mm Hg (P < 0.05), A、B 组 W/DR (84.82 ± 1.14)%、83.84 ± 1.63)% 小于对照组(88.44 ± 1.42)% (P < 0.05),电镜检查 A、B 组心肺损伤轻于对照组。**结论** 供心肺可安全保存 4~5 h,在心肺移植实验中加入 L-Arg 可使 NO 含量增加,减轻心肺缺血再灌注损伤, B 组(500 mg/kg 体重)效果更好。

【关键词】 L-精氨酸; 心肺移植; 再灌注损伤

Effects of L-arginine on ischemia-reperfusion injury in heart-lung transplantation HUANG Ke-li, WU Ru-bin, XIAO Xue-jun, et al. Department of Cardiovascular Surgery, Guangdong Provincial People's Hospital, Guangzhou 510100, China

【Abstract】 Objective To investigate the protective effect of L-arginine on ischemia-reperfusion injury in heart-lung transplantation. **Methods** Thirty adult healthy dogs of both sexes were divided randomly into 3 groups: control group and treated groups A and B (each group having 10 dogs). The hearts were flushed with Stanford solution and the lungs with Euro-Collins solution. In treated groups, different doses of L-arginine (100 mg/kg, group A; L-Arg 500 mg/kg, group B) were added to cardioplegic and lung perfusion solution. After 4-5 h preservation in 4℃ EC solution, the donor hearts-lungs were implanted into the recipient dogs. Hemodynamic parameters including heart rate, mean artery pressure (MAP), mean pulmonary artery pressure (MPAP), were recorded. NO, cTnI, SOD, MDA and LDH were determined in venous blood, and oxygen partial pressure in arterial blood. Lung wet/dry weight ratio (W/DR) was measured and heart-lung ultrastructures were observed to evaluate the protective effects of heart-lung preservation. **Results** In 60 min after aorta opening, the concentrations of NO (82.76 ± 12.34) μmol/L in group B and SOD [(60.19 ± 12.42 NU/ml, (100.38 ± 16.55) NU/ml] in groups A and B were significantly higher than in the control group [(29.43 ± 12.42) μmol/L and (26.65 ± 5.68) NU/ml, P < 0.05], while those of cTnI (11.07 ± 2.62) mg/L, MDA (2.48 ± 0.51) nmol/ml and LDH (592.80 ± 51.92) U/L were significantly lower in group B than in the control group (23.16 ± 2.76) mg/L, (4.48 ± 0.54) nmol/ml, (719.80 ± 292.16) U/L respectively, P < 0.05]. PaO₂ was significantly higher in group B (207.60 ± 32.72) mm Hg (1 mm Hg = 0.133 kPa) than in the control group (130.20 ± 13.36) mm Hg, P < 0.05. The W/DR in group A (84.82 ± 1.14)% and group B (83.84 ± 1.63)% was less than in the control group (88.44 ± 1.42)% (P < 0.05). Electron microscopy revealed that the injury of heart and lung in groups A and B was milder than in the control group. **Conclusion** The donor heart-lung could be preserved up to 4-5 h safely. Addition of L-arginine to cardioplegic and lung perfusion solution could increase the release of NO, alleviate the ischemia-reperfusion injury of heart and lung. The effects in group B (500 mg/kg body weight) were more satisfactory.

【Key words】 L-arginine; Heart-lung transplantation; Reperfusion injury

心肺移植现已证实是治疗终末期心肺衰竭的一种有效手段^[1,2]。但它的发展较心脏移植明显缓慢。其主要原因是多方面的,而心肺保护的不完善所造成的心肺缺血再灌注损伤是造成心肺移植早期功能衰竭的主要原因,因此,对心肺缺血再灌注损伤的保护是提高心肺移植成功率的一个重要措施。现正进行多方面的实验药物研究,L-精氨酸(L-Arg)即其中之一,L-Arg 是一氧化氮(NO)生成的前体,通过 NO 产生作用,我们在心肺移植动物实验中使用 L-Arg,探讨研究 L-Arg 对心肺缺血再灌注损伤的保护作用。

材料与方法

1. 实验动物及分组:健康成年犬 30 条,体重(18.17 ± 1.97) kg,雌雄不拘,由广州南方动物实验中心提供。随机分为 3 组,每组各 10 条,每次实验使用受体、供体犬各 1 条,另准备 15 条供血犬。对照组心脏灌注 Stanford 液,肺灌注 Euro-Collins 液,A 组于 Euro-Collins 液、Stanford 液中分别加入 L-Arg 100 mg/kg 体重,受体犬主动脉开放前 5 min 加入 L-Arg 100 mg/kg 体重于机液中,B 组改 L-Arg 剂量为 500 mg/kg 体重。

2. 实验步骤及指标测定:供体犬以氯胺酮(2 mg/kg 体重)、安定(0.5 mg/kg 体重)和仙林(0.1 mg/kg 体重)麻醉,胸骨正中切口,股静脉注入肝素(3 mg/kg 体重)、甲基强的松龙(10 mg/kg 体重),肺动脉注入 PGE1(前列腺素 10 μ g/kg 体重)。经主动脉灌注 4℃ Stanford 液(30 ml/kg 体重,压力 100 mm Hg),同时经肺动脉灌注 4℃ Euro-Collins 液(100 ml/kg 体重,压力 30~40 cm H₂O),灌注中肺通气。灌注完后,中度膨胀肺(70%~80%),钳夹主支气管,整块切除心肺。供心再次灌注 4℃ Stanford 液,放入 4℃ Euro-Collins 液保存 4~5 h。受体犬麻醉,记录 ECG,留置股动、静脉通道,肝素化,预充液中加入甲基强的松龙(10 mg/kg 体重)。切除心肺。移植入供心肺,供心灌注 4:1 冷血(10℃)高钾停搏液(20 ml/kg 体重),分别行气管、右心房、主动脉吻合,气管吻合完备后,灌注 4:1 冷血(10℃)低钾停搏液 1 次(10 ml/kg 体重)。鼻咽温升至 32~33℃,开放主动脉。受体犬麻醉后、主动脉开放后 60 min 分别行股动脉血气分析(PaO₂),取股静脉血标本,测血流动力学指标,取左室心尖部心肌(1 mm×1 mm×1 mm)、右中肺组织(1 mm×1 mm×1 mm)2.5%戊二醛固定,4℃ 保存,作超薄切片行透射电子显微镜检查;取右上、下肺叶称重湿重后,在 90℃ 下干燥 2 周后称干重,以(湿重-干重)/湿重×100% 求干/湿重比(W/DR)。于股静脉血标本中加入抑肽酶 10 μ l/

ml 血,4℃ 离心(3 000 r/min)15 min,分离出上清液,置-70℃ 冰箱保存,待批量检测一氧化氮(NO)、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)(南京建成生物工程研究所提供试剂盒,NO 采用硝酸还原酶法,MDA 采用硫代巴比妥酸法,SOD 采用黄嘌呤氧化酶法)、肌钙蛋白 I(cTn-I)、乳酸脱氢酶同工酶(LDH)(使用美国 Beckman 公司 Access 微粒子化学发光免疫分析仪测定,使用 Beckman 公司配套试剂)。

3. 统计学方法:采用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析。

结 果

1. 血流动力学指标:本实验共完成 15 例心肺移植,均恢复窦性心率,其中对照组、A 组各有 1 例在主动脉开放后 60 min 内不能撤离 CPB,余 13 例顺利脱离 CPB。各组麻醉后股动脉平均压(MAP)、肺动脉平均压(MPAP)差异无统计学意义($P < 0.01$)。

2. 血液检测指标:LDH、MDA、SOD、NO、cTnI、PaO₂ 各组麻醉后差异无统计学意义($P < 0.01$);AO 开放 60 min,LDH、cTn-I 均升高,B 组升高幅度低于对照组、A 组;对照组、A 组 NO 降低,B 组升高,对照组 SOD 降低,A 组、B 组升高;对照组、A 组 MDA 升高,B 组降低,各组 PaO₂ 均较移植前降低,B 组降低幅度低于对照组、A 组。

3. 肺干湿重比(W/DR):对照组 W/DR 为(88.44 ± 1.42)%,A 组为(84.82 ± 1.14)%,B 组为(83.84 ± 1.63)%,A 组、B 组 W/DR 低于对照组,对照组-A 组、对照组-B 组组间比较差异有统计学意义($P < 0.01$),A 组、B 组组间比较差异无统计学意义($P > 0.05$)。

4. 心肌和肺超微结构:心肌超微结构显示对照组心肌细胞中度水肿,胞浆清亮、线粒体内出现空泡,实验组心肌细胞见轻度水肿,线粒体见轻度肿胀;肺超微结构显示对照组肺中-大量毛细血管内血栓形成,血管内皮细胞、肺泡上皮细胞少见,间质水肿、纤维化明显,A、B 组见大量通畅毛细血管,较多完整血管内皮细胞、肺泡上皮细胞,间质轻度水肿,少许纤维化。

讨 论

安全有效的器官保存是移植成功的先决条件,在心肺移植中对心肺器官进行良好的保存,减轻缺血再灌注损伤,是一项艰巨而复杂的工作,采取的措施是多方面的,而对灌注液药物成分的研究是其中一方面,这一研究贯穿心肺移植的始终,取得了较好的成绩,但距临床的要求仍有相当的差距,这就促使我们在心肺移植灌注

液及移植过程中药物使用方面进行进一步深入研究。

供应 NO 合成前体 L-Arg 促进内源性 NO 释放, 较外源性 NO 有更多的优点, 因为: (1) 内源性 NO 释放具有部位特异性(内皮与血浆交界面)和时间特异性(再灌注时释放多); (2) 内源性 NO 分布不依赖于有足够的冠脉血流量; (3) 内源性 NO 浓度有一定的自我调节机制, 可避免高浓度 NO 引发的细胞毒性反应^[3]。

缺血再灌注损伤使内皮细胞功能受损, 研究结果表明 NO 对内皮细胞有保护作用^[4,5], 而使用 L-Arg 使 NO 含量增加, 在主动脉开放 60 min 时段, 对照组、A 组 NO 含量降低, B 组升高, 说明心肺移植导致心肺缺血再灌注损伤, 内皮细胞功能受损, 使 NO 含量降低; 而当使用 L-Arg 达到一定剂量, NO 含量增加, 内皮细胞得到保护。

内皮细胞功能受损, 清除氧自由基能力下降, 可通过 SOD、MDA 两方面的测定予以证实, SOD 活力高低间接反映了机体清除氧自由基的能力, 而 MDA 的高低又间接反映了机体细胞受自由基攻击的严重程度。在主动脉开放 60 min 时段, A 组、B 组 SOD 含量较麻醉后升高, 对照组降低, 对照组、A 组 MDA 含量较麻醉后升高, B 组降低。表明缺血再灌注损伤使内皮细胞功能受损, 氧自由基生成增加, SOD 活力下降。使用 L-Arg 可保存 SOD 活性, 对细胞膜有直接保护作用, 增强机体清除氧自由基的能力, 使氧自由基生成减少^[6], 加大 L-Arg 用量, 可使氧自由基含量进一步减少。

cTnI、LDH 于主动脉开放 60 min 均升高, 有统计学差异, 表示有移植后心肌缺血再灌注损伤, B 组 cTnI、LDH 升高幅度低于对照组、A 组, 说明使用 L-Arg 可减轻心肌缺血再灌注损伤, 加大 L-Arg 剂量可增加心肌保护作用; 对照组在主动脉开放后 60 min 股动脉平均压均下降, B 组无差异, A 组、B 组与对照组比较

差异有统计学, 说明心肺移植后心脏舒缩功能受损, 使用 L-Arg 可使心脏舒缩功能改善。

两实验组肺干/湿比重(W/DR)均低于对照组, 说明实验组的肺间质水肿程度低于对照组, 在肺的电镜超微结构中显示, 对照组见间质水肿、纤维化明显, 实验组见间质水肿、纤维化轻微, 实验组与对照组的差异表明, 使用 L-Arg 可减少体外循环中的体液积聚, 可减轻移植肺间质水肿^[7,8]。

本实验结果表明供心肺可安全保存 4~5 h。在心肺移植器官保护液中加入 L-Arg 可使 NO 含量增加, 从而加强对心肺的保护作用, 减轻心肺缺血再灌注损伤, 在心肺移植中对心肺两器官同时使用 L-Arg, 使心肺缺血再灌注损伤均减轻, 无细胞毒性反应发生。不同剂量的 L-Arg 均可减轻心肺缺血再灌注损伤, B 组 (500 mg/kg 体重) 效果更好。

参 考 文 献

- 1 John HS, Bruce AR. Clinical heart-lung Transplantation. Surgery of the Chest, 2001, 2089-2103.
- 2 Vricella LA, Karamichalis JM, Ahmd S, et al. Lung and heart-lung transplantation in patients with end-stage cystic fibrosis: the Stanford experience. Ann Thorac Surg, 2002, 74: 17-18.
- 3 Desrois M, Sciaky M, Lan C, et al. L-arginine during long-term ischemia: effects on cardiac function, energetic metabolism and endothelial damage. J Heart lung Transplant, 2000, 19: 367-376.
- 4 安君, 谷春久, 师恩伟, 等. 内皮素-1 和一氧化氮对家犬肺移植早期缺血-再灌注肺动脉的影响. 中华实验外科杂志, 2001, 18: 231-232.
- 5 苟大明, 杜磊, 余志豪, 等. 左旋精氨酸对体外循环中内皮细胞及红细胞的保护作用. 中华实验外科杂志, 2001, 18: 477.
- 6 Fukahara K, Murakami A, Watanie G, et al. Inhaled nitric oxide after lung ischemia reperfusion hemodynamics and oxygen free radical scavenger system. Eur J Cardio Thorac Surg, 1997, 11: 343-349.
- 7 Schutte H, Witzel M, Mayer K, et al. The PDE inhibitor zaprinast enhances NO-mediated protection against vascular leakage in reperfused lungs. J Physiology Lung Cellular Molecular Physiology, 2000, 279: 496-502.
- 8 Yamagishi H, Yamashita C, Okada M. Preventive influence of inhaled nitric oxide on lung ischemia-reperfusion injury. Surgery-Today, 1999, 29: 897-901.

(收稿日期: 2005-11-22)

"2006 中国国际肝胆外科论坛——肝移植时代东西方肝胆疾病治疗策略演变"征文通知

由第三军医大学、解放军总医院主办, 解放军西南肝胆外科医院和《消化外科》编辑部承办的"2006 中国国际肝胆外科论坛——肝移植时代东西方肝胆疾病治疗策略的演变"学术会议将于 2006 年 8 月 12~13 日在北京(或重庆)召开。届时将邀请欧美、日本等国家及中国港台地区和大陆的知名肝脏移植及肝胆外科专家 30 余名作专题演讲, 并以肝移植时代的肝胆外科为主题展开广泛深入的学术交流研讨, 这将是我国外科学界的又一次盛会, 对促进我国肝脏移植和肝胆外科的技术创新和可持续发展具有重要意义。欢迎全国外科同仁踊跃投稿参会。优秀论文将在《消化外科》优先发表。参会者可获得国家级继续教育 I 类学分 8 分。

1. 征文内容: 有关肝细胞癌、肝硬化静脉高压症、肝移植胆道并发症、活体肝移植、劈离式肝移植、儿童肝移植及多脏器移植等领域的临床及基础研究。

2. 征文要求: (1) 请寄论文全文及 800 字左右的摘要, 注明会议征文, 同时附稿电子版 1 份(E-mail 或软盘); (2) 截稿日期 2006 年 7 月 15 日。

3. 投稿地址: 重庆市第三军医大学西南医院《消化外科》编辑部收 邮政编码: 400038 E-mail: digisurg@263.net 电话: 023-68754655 传真: 023-6531763 联系人: 郑树国 陈敏