

CPB管道等)的制备中,研究者把肝素结合在这些人工材料的表面,证实肝素可以在局部缓慢持久地释放从而发挥其抗凝活性,对于其长时间内皮化过程中的抗血栓有重要的作用^[9]。

本实验采用 Conklin 等^[10]报道的 EDC 交联法,将肝素分子以共价键结合到脱细胞后的血管支架的表面胶原上,进行抗凝修饰,减少胶原蛋白的直接暴露。EDC 是一种双功能的交联剂,它既可与胶原中的氨基酸残基交联,又可以将含有碳酸根的有机材料活化,介导其与交联后胶原支架中的游离氨基酸残基的肽键结合,从而将有机材料结合到胶原支架上。采用甲苯胺蓝染色结果显示肝素结合于支架材料全层;体外凝血试验显示经肝素结合后的支架材料有良好的抗血栓形成的能力。并经机械性能测试结果显示,脱细胞和经肝素结合的脱细胞血管支架的力学特性与正常的血管相比几乎没有明显的变化。

本实验证实,利用去污剂-酶消化联合肝素结合法可以制备犬颈总动脉的血管支架材料。所制备的血管支架材料中完全去除了血管的细胞成分,能够完整地保留血管的细胞外基质成分,使支架材料具有与正常血管类似的三维空间结构;经脱细胞及肝素结合后的支架材料的形态、内径没有明显的改变,其力学特性与正常的血管相比几乎没有明显的变化;并且经肝素结合的血管支架材料具有良好的抗血栓形成能力,能够提高远期的通畅率。因此,本实验制备血管支架材料的方法可以作为制备小口径异种移植血管的新方法,能够为后期的动物移植实验提供所需的移植材料。

参考文献:

[1] Campbell GR, Campbell JH. Development of tissue engineered vascular grafts[J]. Curr Pharm Biotechnol, 2007, 8(1): 43-50.

[2] Nerem RM, Seliktar D. Vascular tissue engineering[J]. Bioengineering, 2001(3): 225 - 243.

[3] Cho SW, Park HJ, Ryu JH, *et al.* Vascular patches tissue-engineered with autologous bone marrow-derived cells and decellularized tissue matrices[J]. Biomaterials, 2005, 26(14): 1915.

[4] 杨岷, 陈长志, 成少飞, 等. 牛心包组织工程心脏瓣膜支架脱细胞方法的比较[J]. 中华胸心血管外科杂志, 2005, 21(6): 349-351.

[5] Samouillan V, Dandurand-Lods J, Lamure A, *et al.* Thermal analysis characterization of aortic tissues for cardiac valve prostheses[J]. J Biomed Mater Res, 1999, 46(4): 531-538.

[6] 池一凡, 林明山, 孙龙, 等. 猪脱细胞血管基质的制备及其生物学性状检测[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2008, 32: 6292-6295.

[7] 熊猛, 鲁开化, 商庆新, 等. 血管组织工程基质材料及管形支架的制备[J]. 西北国防医学杂志, 2004, 25(1): 3.

[8] Ishii Y, Sakamoto S, Kronengold RT, *et al.* A novel bioengineered small-caliber vascular graft incorporating heparin and sirolimus: Excellent 6-month patency[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2008, 135(6): 1237-1245.

[9] Heyligers JM, Verhagen HJ. Heparin immobilization reduces thrombogenicity of small-caliber expanded polytetrafluoroethylene grafts[J]. J Vasc Surg, 2006, 43(3): 587-591.

[10] Conklin BS, Richter ER, Kreutziger KL, *et al.* Development and evaluation of a novel decellularized vascular xenograft[J]. Med Eng Phys, 2002, 24(3): 173-183.

作者简介: 郭晓亮, 现工作于山西省心血管病医院(邮编: 030024); 王学宁、张顺业(通讯作者)、高进、马晓华, 工作于山西省心血管病医院(邮编: 030024)。

(收稿日期: 2009-10-22)
(本文编辑 郭怀印)

L-Arg 在心肺联合移植中对心肺保护作用的实验研究

梁智星, 杨志刚, 郭建军, 张 勇, 王志斌, 李志英

摘要:目的 研究 L-Arg 在心肺联合移植中对心肺的保护作用及可能机制。方法 将健康成年犬 20 只随机分为两组, 对照组以 4℃LPD 液灌注及保存供肺, 实验组以 4℃含 L-Arg(500mg/kg)的 LPD 液灌注及保存供肺。心脏灌注液采用 4℃St.thomas 液, 实验组中加入 L-Arg 300 mg/500 mL。分别监测受体麻醉后和心肺移植后主动脉开放 5 min 和主动脉开放 30 min 的血气分析, 测定心肌和肺组织中一氧化氮(NO)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)的含量及肺组织的湿/干重比(W/D), 并观察移植肺组织的超微结构变化。**结果** 实验组血氧分压(PaO₂)高于对照组, 二氧化碳分压(PaCO₂)明显低于对照组。实验组心肌和肺组织中的 NO 及 SOD 的含量较对照组增高($P<0.01$), 而 MDA 的含量较对照组降低($P<0.05$)。实验组较对照组的 W/D 低($P<0.05$)。电镜检查实验组的肺组织损伤轻于对照组。**结论** L-Arg 可增强保存液对心脏的保护作用, 改善移植肺的肺功能, 能减轻供肺损伤, 增加心肺联合移植的成功率。

关键词: L-Arg; 心肺联合移植; 心肺保护; 氧自由基

中图分类号: R654.2 R655.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-1349(2010)04-0456-03

近 20 年来, 心肺联合移植(combined heart-lung transplantation, CHLT)已被证实是治疗终末期心肺衰竭的一种有效治疗方法。供体在获取、保存和移植过程中发生的心肺缺血-再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是导致移植后早期肺功能障碍甚至移植失败的主要原因, 如何做好供体心肺的获取和保存, 减轻 IRI, 是当前肺移植和心肺联合移植研究的热点

机制进行了初步的研究, 期望为 L-Arg 的临床新用途提供实验和理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 健康成年犬 20 只, 体重(16.2±1.5)kg, 雌雄不拘, 由山西医科大学动物实验中心提供。

1.2 实验仪器和试剂 体外循环机: STOKERT-SHILEY 循

ESTAT, 电镜: JEM-100CX 电镜, 恒温干燥箱: 上海跃进仪器厂, L-Arg: 上海生物化学工程技术研究所, NO、丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)检测试剂盒: 南京建成生物工程研究所, LPD 液、St. thomas 液: 山西医科大学第一医院心脏外科。

1.3 实验方法

1.3.1 实验动物分组 随机分为实验组和对照组, 每组各 10 只, 每次实验使用供体犬和受体犬各 1 只。每组受体犬体重大于供体犬体重的 18% ~ 20%^[1]。心肺灌注与保存分别使用 4℃ 的 LPD 液和 St. thomas 液。对照组仅用 4℃ 的 St. thomas 液及 LPD 液灌注心肺并保存, 实验组于 St. thomas 液及 LPD 液中分别加入 L-Arg 500 mg/kg 及 300 mg/500 mL, 所有动物实验前需要禁食 12 h。

1.3.2 异体原位 CHLT 模型的建立 供体犬: 肌注氯胺酮(20 mg/kg)和安定(0.5 mg/kg)麻醉后, 固定于手术台上, 气管插管, 呼吸机控制呼吸, 全身肝素(3 mg/kg)化。正中开胸, 打开心包, 缝主动脉与肺动脉荷包线, 置入灌注导管并固定, 阻断升主动脉, 经主动脉根部灌注 4℃ St. thomas 液或实验组含加入 L-Arg 的 St. thomas 液(20 mL/kg, 压力 100 mmHg), 同时经主肺动脉灌注 4℃ LPD 液或实验组含加入 L-Arg 的 LPD 液(60 mL/kg ~ 80 mL/kg, 压力 15 cmH₂O ~ 20 cmH₂O, 5 min 内灌注完), 灌注的同时切开左心耳使灌注液流出, 直至灌注液无色透明, 肺呈现白色。中度膨肺(70% ~ 80%), 钳夹气管, 切断升主动脉、上下腔静脉、气管、食管和肺韧带, 整块切除心肺并修剪。供心肺放入 4℃ 的 LPD 液保存 1.5 h ~ 2 h。

受体犬: 麻醉同前, 经上下腔静脉及升主动脉建立体外循环(CPB), 切除心肺, 移植入供心、肺。开始吻合前, 供心灌注 4:1 冷血(10℃)高钾停搏液(20 mL/kg), (实验组加入 L-Arg 24 mmol/L), 分别行气管、主动脉、右心房吻合, 气管吻合完毕后, 灌注 4:1 冷血(10℃)低钾停搏液一次(20 mL/kg), (实验组加入 L-Arg 24 mmol/L), 开始主动脉吻合时, 复温。复温完毕后行右心房吻合, 右心房后壁吻合结束, 开放循环。继续并行 CPB 复温, 同时吻合右心房前壁, 心脏复跳有力, 待循环稳定, 鼻咽温升至 36℃ ~ 37℃, 停 CPB。

1.4 检测指标 在 CHLT 过程中, 分别测受体麻醉后、主动脉开放 5 min 和 30 min 3 个时间点的静脉血气分析。取心肺匀浆组织 4℃ 离心(3 000 r/min)10 min 后, 取上清液, 应用 NO 检测试剂盒, 采用硝酸还原酶法, 检测心肺匀浆组织中的 NO 的含量, 应用 MDA 检测试剂盒, 采用硫代巴比妥酸法, 测定心肺匀浆组织中 MDA 的含量, 按照 SOD 检测试剂盒说明, 采用黄嘌呤氧化酶法, 测定心肺匀浆组织中 SOD 的活性。

1.5 肺含水量测定 肺组织用生理盐水冲洗后, 立即称湿重量, 然后在 70℃ 的干燥箱下烘 72 h, 称其干重量, 计算肺组织的湿/干重比(W/D)。

1.6 肺组织超微结构的观察 切取供肺上叶组织(1 mm × 1 mm × 1 mm)用 2.5% 戊二醛固定, 4℃ 保存, 通过 JEM-100CX 透射电镜观察肺组织超微结构的变化。

1.7 统计学处理 实验数据采用 SPSS12.0 统计软件进行分析, 数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 采用 *t* 检验。P < 0.05 为

2.1 不同时间 PaO₂、PaCO₂ 检测结果(见表 1)

组别	PaO ₂		
	受体麻醉后	主动脉开放 5 min	主动脉开放 30 min
实验组	510.5 ± 18.40 ¹⁾	330.7 ± 48.70 ²⁾	121.5 ± 9.61 ¹⁾
对照组	478.7 ± 21.73	229.1 ± 40.12	106.9 ± 8.83

组别	PaCO ₂		
	受体麻醉后	主动脉开放 5 min	主动脉开放 30 min
实验组	23.10 ± 7.12	23.74 ± 4.51 ¹⁾	32.17 ± 5.82 ²⁾
对照组	26.85 ± 7.40	31.52 ± 4.60	45.65 ± 5.70

与对照组比较, 1) P < 0.05, 2) P < 0.01

2.2 移植心肌组织、肺组织 NO、SOD、MDA 的含量(见表 2、表 3)

组别	NO	SOD	MDA
	μmol/L	U/(mg · port)	nmol/(mg · port)
实验组	7.92 ± 2.07	55.52 ± 7.98	4.31 ± 0.65
对照组	2.46 ± 1.27	35.05 ± 6.31	5.43 ± 0.71
P	< 0.01	< 0.01	< 0.05

组别	NO	SOD	MDA
	μmol/L	U/(mg · port)	nmol/(mg · port)
实验组	5.62 ± 1.37	78.65 ± 5.63	6.56 ± 0.87
对照组	1.24 ± 0.32	21.38 ± 3.98	7.84 ± 1.13
P	< 0.01	< 0.01	< 0.05

2.3 肺组织的湿/干重比 实验组为(5.32 ± 0.14), 对照组为(6.07 ± 0.32), 两组比较差异有统计学意义(P < 0.05)。

2.4 肺组织电镜超微结构观察 对照组肺泡 II 型细胞胞浆大小不等、空泡化, 板层小体结构融合, 线粒体嵴不清晰, 血管内皮细胞壁不完整, 肺泡上皮细胞少见。而实验组肺泡 II 型细胞的板层小体结构清晰, 线粒体嵴可见, 较多完整血管内皮细胞、肺泡上皮细胞。

3 讨论

随着各种治疗手段的进展, 心肺联合移植已成为一种治疗晚期心肺疾病的有效方法。尽管已有许多改进措施, 心肺移植术后缺血再灌注损伤仍是导致手术失败的主要原因之一, 也是移植后发生慢性排斥反应的重要危险因素^[2]。因此, 如何改进心肺保存方法, 提高心肺保存质量, 延长保存时间, 减轻心肺缺血再灌注损伤成为心肺联合移植基础和临床研究的热点。

L-Arg 是 NO 的生理性前体, 其生物学活性大部分是经过一氧化氮合成酶(NOS)作用生成 NO 而起作用的^[3,4]。NO 具有进入血管平滑肌激活鸟苷酸环化酶, 使细胞内 Ca²⁺ 浓度降低, 血管平滑肌松弛, 抑制纤维蛋白原与血小板结合, 减少毛细血管通透性、保持血管内皮的完整性等作用。目前多数学者认为血管内皮细胞是体内合成 NO 的最主要细胞, 移植肺在缺血再灌注这一病理生理过程中受到损伤, 病理状态下肺动脉内皮细胞 NOS 减少, 其产物 NO 也随之减少^[5]。肺毛细血管内皮细胞

肺,影响肺组织中的气体交换。肺组织的湿/干重比在一定程度上可以反映肺功能受损的严重程度^[6]。肺气体交换功能障碍被认为是评价肺缺血再灌注损伤程度及其保护效果最敏感的指标。本实验中实验组测定移植心肺 NO 的含量比对照组高, W/D 较对照组减轻, 实验组 PaO₂ 比对照组高, 而 PaCO₂ 比对照组低。其病理学研究亦发现实验组肺泡出血及间质水肿较对照组减轻, 表明 L-Arg 在肺灌注保存液中能减轻肺毛细血管的内皮损伤, 减少 CPB 中的体液积聚, 可减轻移植肺间质水肿^[7], 减轻肺缺血再灌注损伤。

目前研究表明氧自由基生成过多或清除障碍时会对机体造成损伤。它可引起细胞内毒性反应, 如细胞器破坏、细胞膜脂质过氧化、细胞内酶失活, 核酸破坏等导致细胞死亡^[8]。SOD 是机体内重要的抗氧化酶, 其活性的高低反映了机体清除氧自由基的能力, 而 MDA 作为判定氧自由基造成细胞膜脂质过氧化损伤的指标之一, 反映了机体细胞受自由基攻击的破坏程度^[9]。L-Arg 可通过促进 NO 的产生, 减少过氧亚硝酸阴离子(ONOO⁻)生成, 同时增加细胞内抗氧化物谷胱甘肽的水平, 还可直接中和氧自由基, 消除氧自由基对心肌及肺组织的损害。本研究实验组心肺组织 SOD 含量明显高于对照组, MDA 含量较对照组显著降低, 提示 L-Arg 可抑制缺血再灌注自由基产生和脂质过氧化, 增强内源性清除氧自由基的能力, 从而减轻心肺缺血再灌注损伤。

参考文献:

[1] 黄克力, 吴若彬, 肖学钧. 15 例犬心肺联合移植实验研究[J]. 国际

医药卫生导报, 2003, 9(7): 6-7.

- [2] Reynaud GM. Pathophysiology of obliterative bronchiolitis in lung transplant[J]. Rev Mal Respir, 2003, 20(2 Pt1): 224-232.
- [3] Liaudet L, Soriano FG, Szabo C. Biology of nitric oxide signaling[J]. Crit Care Med, 2000, 28(4 suppl): 37-52.
- [4] Aitchison JD, Orr HE, Flecknell PA, *et al*. Nitric oxide during perfusion improves post transplantation function of non-heart-beating donor lungs[J]. Transplantation, 2003, 75(12): 1960-1964.
- [5] Aguilo R, Serra E, Togores B, *et al*. Long-term(72hours) preservation of rat lung[J]. Thorac Cardiovasc Surg, 2003, 125(4): 907-912.
- [6] Kutschka I, Sommer SP, Hohlfeld JM, *et al*. Insitu topical cooling of lung grafts: Early graft function and surfactant analysis in a porcine single lung transplant model[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2003, 24(3): 411-419.
- [7] Schutte H, Witzeurath M, Mayer K, *et al*. The PDE inhibitor zaprinast enhances NO mediated protection against vascular leakage in reperfused lungs[J]. J Physiology Lung Cellular Molecular Physiology, 2000, 279(3): 496-502.
- [8] Liu CJ, Ueda M, Kosaka S, *et al*. A newly developed solution enhances thirty-hour preservation in a canine lung transplantation model[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1996, 112(3): 569-576.
- [9] Paik HC, Hoffmann SC, Egan TM. Pulmonary preservation studies: Effects on endothelial function and pulmonary adenine nucleotides[J]. Transplantation, 2003, 75(4): 439-444.

作者简介: 梁智星, 现工作于山西医科大学第一医院(邮编: 030001); 杨志刚(通讯作者), 工作于山西省儿童医院(邮编: 030013); 郭建军、张勇、王志斌、李志英, 工作于山西医科大学第一医院。

(收稿日期: 2009-12-04)

(本文编辑 郭怀印)

大鼠脑缺血再灌注损伤 Bcl-2、Bax、FADD 表达及对细胞凋亡的影响

潘妍婷, 崔万森

摘要:目的 观察大鼠脑缺血再灌注损伤后神经细胞凋亡及凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、FADD 表达对细胞凋亡的影响。方法 20 只 SD 大鼠随机分为假手术组($n=4$)、模型组($n=16$)。线栓法制备大鼠中动脉闭塞模型(MCAO), TUNEL 法检测神经细胞凋亡, 免疫组织化学法染色检测 Bcl-2、Bax、FADD 蛋白。结果 与假手术组比较, 模型组凋亡神经细胞计数随再灌注时间的延长显著增加, 再灌注后 24 h 表达达高峰, 差异有统计学意义($P<0.01$)。模型组 Bcl-2、Bax、FADD 蛋白表达随再灌注时间的延长, 表达逐渐增强。缺血再灌注 6 h 后 Bcl-2 蛋白表达达高峰; 缺血再灌注 24 h 后 Bax 蛋白表达达高峰; 缺血再灌注 72 h 后 FADD 蛋白表达达高峰, 均有统计学意义($P<0.01$)。结论 Bcl-2、Bax、FADD 表达在脑缺血半暗带区, 随再灌注时间延长, 表达逐渐增强, 与细胞凋亡表达规律一致。

关键词: 脑缺血; 再灌注损伤; 神经细胞凋亡

中图分类号: R743.34 R255.2

文献标识码: A

文章编号: 1672-1349(2010)04-0458-03

神经细胞凋亡是造成脑梗死后神经功能缺损的重要机制之一^[1], 脑缺血半暗带的细胞损伤主要通过细胞凋亡途径进行, 而神经细胞凋亡是一种受基因控制的自主性、程序性死亡过程。期间细胞凋亡蛋白 Bcl-2、Bax, 以及死亡结构域蛋白 FADD 蛋白在细胞凋亡中起着重要作用, 通过本组实验, 动态观察大鼠脑缺血再灌注损伤后细胞凋亡及凋亡相关蛋白的表达情况。

1 材料与方法

$g \sim 280 g$, 清洁级, 由北京大学医学部实验动物中心提供。应用线栓法经右侧颈总动脉插线建立右侧大脑中动脉阻塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)再灌注模型, 随机分为两组。模型组($n=16$): 即缺血 2 h 再灌注 6 h、12 h、24 h、72 h; 假手术组($n=4$): 除不插线外, 其余步骤同模型组。

1.2 标本的采集 模型组动物在规定的时间内取材。分别于缺血 2 h 再灌注 6 h、12 h、24 h、72 h 取材, 假手术组于手术后 1