

晚期逆行肺灌洗在无心跳供体肺移植中肺保护作用的病理学观察

陈其瑞 侯生才 李辉 胡滨 游宾

【摘要】 目的 从病理学角度评价晚期逆行肺灌洗在无心跳供体肺移植中的肺保护作用。方法 健康杂种雄性犬24只,随机分为A、B两组,每组供体、受体犬各6只。建立犬左肺原位移植模型。A组(对照组)行早期肺动脉灌洗联合早期逆行灌洗;B组(晚期逆行肺灌洗组)行早期肺动脉灌洗加早期逆行灌洗再联合晚期逆行灌洗。受体移植后维持机械通气观察6 h。观察移植前供体右肺和移植后6 h供体左肺肉眼观察、光镜及电镜下的不同病理特点。结果 晚期逆行灌洗使供肺灌洗更均匀,颜色更白;光镜下移植前和移植后6 h可见晚期逆行肺灌洗组肺血管内残留的血细胞和微血栓较少,炎症细胞浸润和组织水肿较轻;电镜下移植后6 h可见晚期逆行肺灌洗组肺组织细胞超微结构较为完整,破坏较轻。结论 晚期逆行灌洗可以更好地清除供肺内的微血栓、炎性细胞,减轻缺血及再灌注损伤。

【关键词】 肺移植; 病理学; 缺血; 再灌注损伤; 模型; 动物

肺移植早期肺动脉灌洗(pulmonary artery flush, PAF)联合早期逆行灌洗(retrograde flush, RF)是国际上使用较多的灌洗方案。我们在此基础上增加一次晚期RF观察供肺的病理学变化。

一、材料和方法

1. 实验动物及分组:健康杂种雄性犬24只,3~4岁,体重 (17.0 ± 2.0) kg,购自北京绿源伟业养殖场。将所有动物随机分为A、B两组,每组供、受体犬各6只,建立无心跳供体左肺原位移植模型。A组(对照组)采用的灌洗方案为早期PAF+早期RF;B组(晚期逆行肺灌洗组)为早期PAF+早期RF再联合晚期RF。

2. 麻醉:供、受体静脉注射丙泊酚注射液 5 mg/kg 、哌库溴铵 0.06 mg/kg 诱导麻醉,气管插管。术中丙泊酚注射液 $12 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,瑞芬太尼 $18 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 维持麻醉。受体术后丙泊酚注射液 $6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$,瑞芬太尼 $12 \mu\text{g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 维持麻醉。呼吸机控制通气,潮气量 20 ml/kg 呼吸频率15次/min,吸呼比1:2,吸入氧分数(F_{O_2})100%。

3. 供体手术:供体经第4或第5肋间行蛤壳状切口入胸,按 200 U/kg 体重静注肝素,主动脉取血 400 ml ,然后阻断腔静脉和升主动脉,记录热缺血时间,同时空气膨肺至中等膨胀状态(70%~80%),夹闭气管插管。然后主肺动脉根部插入灌注管并固定。热缺血 30 min 恢复机械通气,开放左心耳,开始用低钾右旋糖酐液(low potassium dextran solution, LPD)灌洗,灌注高度 $50 \text{ cm H}_2\text{O}$,灌注量 60 ml/kg 。顺灌结束后,再将灌注管置入左心耳,用LPD逆灌,灌注高度 $50 \text{ cm H}_2\text{O}$,灌注量 40 ml/kg 。灌洗结束,供肺于中等膨胀状态下取出,在 4°C 冰箱内LPD中保存6 h后修肺。B组在修肺前进行晚期RF,方法同早期RF。

4. 受体手术:受体麻醉后,右侧卧位,左侧第5肋间进胸行左全肺切除。静脉注射地塞米松 10 mg 按支气管-肺动脉-房袖顺序吻合,术中输血 400 ml 。术后观察受体6 h后开胸取标本。

5. 肺组织学观察:供肺吻合前取供体右肺中叶外周段组织,移植6 h后取移植肺中叶外周段组织各1块,约 $1.5 \text{ cm} \times 1.5 \text{ cm} \times 1 \text{ cm}$,经10%甲醛溶液固定,乙醇脱水,石蜡包埋,切片厚 $4 \mu\text{m}$,常规HE染色后光镜下观察其病理变化。

6. 肺组织电镜观察:供肺吻合前取右肺中叶外周段组织,移植6 h后取移植肺中叶外周段组织各1块,约 $2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm} \times 2 \text{ mm}$ 。新鲜组织戊二醛固定后送北京天坛医院电镜室,缓冲液漂洗,锇酸固定,经脱水处理后包埋、聚合,切片后染色观察,照相分析。

二、结果

1. 两组大体标本移植前和肺移植后6 h比较:(1)移植前,A组(图1)早期灌洗后肺叶边缘仍有残留积血;B组(图2)晚期RF时可见灌洗液明显变红,有小血凝块被冲出,同时肺组织进一步变白,特别是早期灌洗效果较差的肺叶边缘部分变化明显。(2)移植后6 h A组(图3)肺组织红色较深,呈程度不等的肺水肿、肺出血表现,肺顺应性较差;B组(图4)肺组织红润,随呼吸运动肺的顺应性较好。

2. 两组光镜下病理结果在移植前和肺移植后6 h比较:(1)移植前,A组(图5)肺泡间隔增宽明显,中性粒细胞浸润较重,肺泡腔融合较多,微血栓的数量较多;B组(图6)肺泡结构较清楚,中性粒细胞浸润较轻,微血栓数量较少。(2)移植后6 h A组(图7)肺组织中有大量中性粒细胞浸润,间质充血水肿较重,肺泡间隔增宽,有较多的肺泡不张,伴有不同程度的肺泡结构紊乱、破坏,大量血细胞外渗,肺泡腔内水肿液积聚,肺出血明显;B组(图8):只有少量的中性粒细胞浸润和肺泡结构破坏,肺组织结构较完整。



图1 A组术前大体标本



图2 B组术前大体标本



图3 A组术后6h大体标本

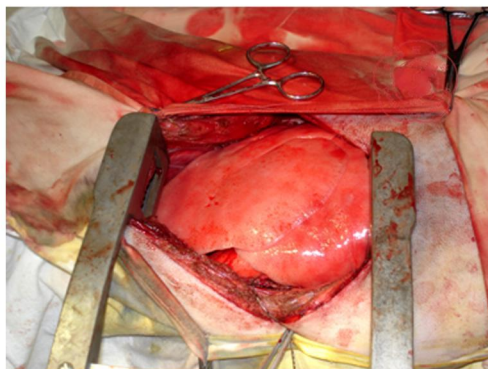


图4 B组术后6h大体标本

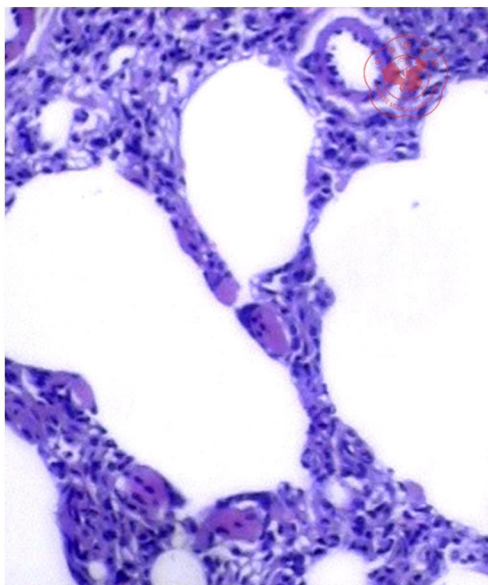


图5 A组术前肺组织光镜下特点(HE ×200)

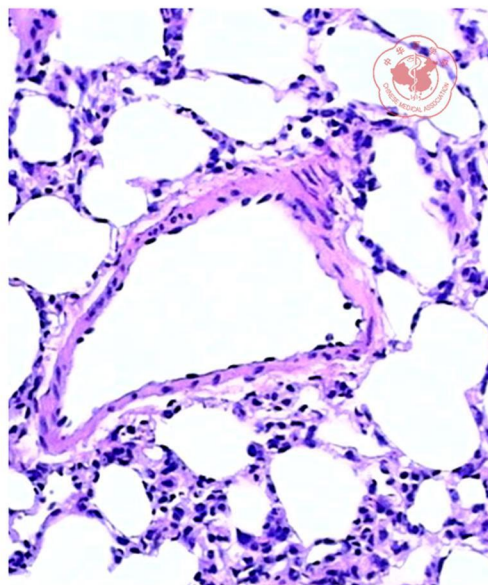


图6 B组术前肺组织光镜下特点(HE ×200)

3 两组移植术后6h电镜下肺组织超微结构变化: A组(图9-10)气血屏障连续性较差, 结构较模糊; 局部内皮基底膜断裂; 间质胶原蛋白渗出较重, 肺泡间隔不规则, 局部明显增厚, 可见肺泡上皮细胞缺损; 线粒体结构破坏成空泡状改变较多, 有较多板层小体排空现象。B组(图11-12)毛细血管壁肿胀较轻, 内皮细胞结构较完整; II型肺泡上皮微绒毛排列较整齐; 板层小体数量较多, 结构破坏较轻。

三、讨论

肺灌洗是肺保护的一个必要步骤, 目的是减轻缺血/再灌注损伤, 最大限度地保持供肺的活力。根据灌洗液流向的不同, 肺灌洗途径可分为顺行灌洗(antegrade flush, AF)和逆行灌洗(retrograde flush, RF)。根据灌洗时间的不同可分为摘取供肺时的早期灌洗、移植之前手术台

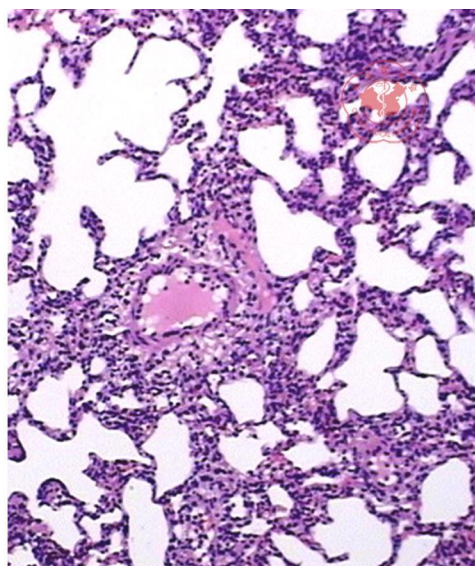


图7 A组术后6h肺组织光镜下特点(HE×100)

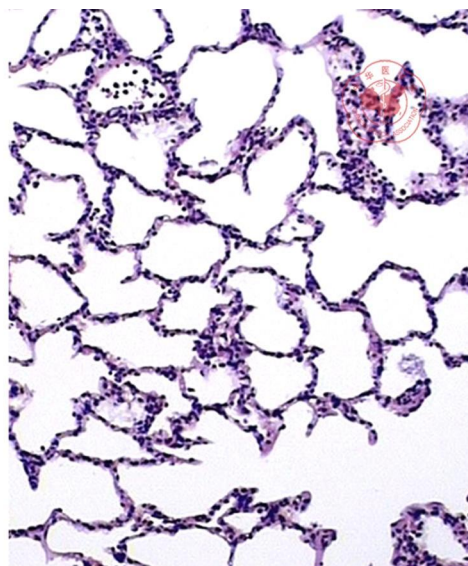


图8 B组术后6h肺组织光镜下特点(HE×100)

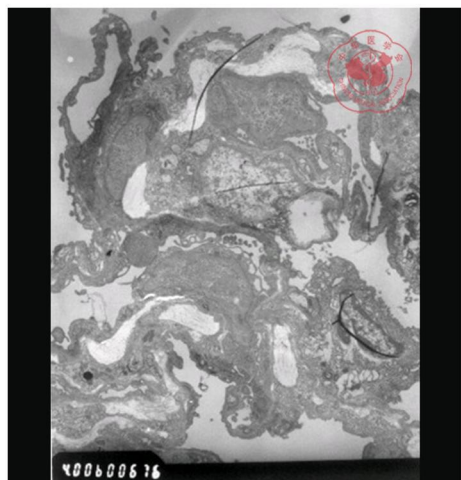


图9 A组术后6h肺组织电镜下特点
(铅铀双染色×4000)

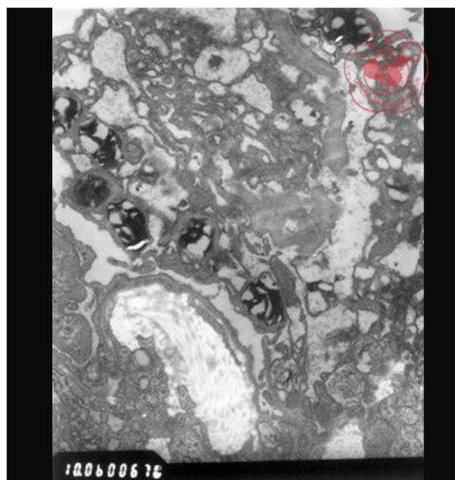


图10 A组术后6h肺组织电镜下特点
(铅铀双染色×10000)

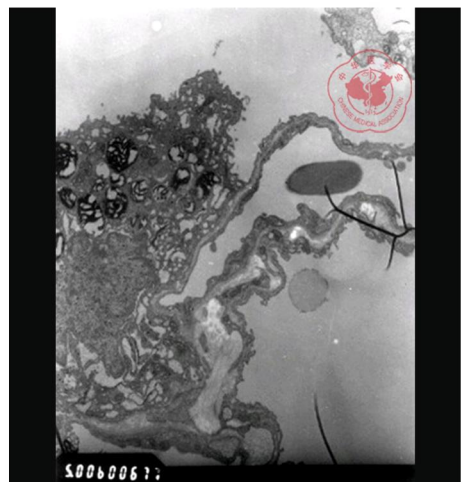


图11 B组术后6h肺组织电镜下特点
(铅铀双染色×5000)

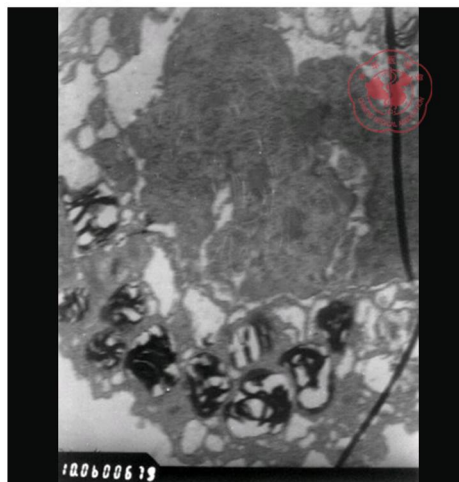


图12 B组术后6h肺组织电镜下特点
(铅铀双染色×10000)

液从左心耳或肺静脉灌入,逆生理流向进入肺循环,从肺动脉流出,使供肺快速降温。RF具有低血管阻力和高灌注容量的特点,灌注液分布快速、均匀,而且可以实现肺循环和支气管循环的同时灌注。单独 RF与 PAF相比可以明显减轻肺水肿,降低肺血管阻力,保护肺泡表面活性物质,提高肺的动态顺应性,改善供肺的氧合能力,减轻肺损伤^[2-3]。

缺血再灌注时,激活的炎症细胞可以产生大量的炎症介质、氧自由基和蛋白水解酶,直接或间接损伤血管内皮细胞和肺泡上皮细胞,而微血管损伤是再灌注失败的一个重要原因^[4],正常肺功能的维持有赖于肺泡膜和微血管内皮细胞的完整性和正常通透性。从大体标本看,晚期 RF可以进一步冲出肺血管内的有形成分。光镜下可见对照组有较多的微血栓形成,肺泡间隔增厚,水肿较重,炎症细胞浸润明显,术后肺出血明显,可见晚期 RF可以冲掉供肺内的部分残留微血栓,减少了缺血再灌注时炎症细胞浸润。

移植肺在术后肺表面活性物质的减少和成分的改变将降低其功能^[5],使肺的顺应性下降,肺泡萎陷, V/Q失调,出现肺水肿和氧合下降。从电镜病理结果来看,晚期逆行肺灌注组肺泡 II 型细胞结构较完整,微绒毛保持较规则,细胞内板层小体数量较多,而对照组板层小体排空更明显,可见晚期 RF对肺泡 II 型上皮细胞有保护作用,从而可以减轻肺泡塌陷和过度膨胀,减少肺间质和肺泡内组织液生成,防止肺水肿;降低吸气阻力,减少呼吸做功。

我们在实验中检测受体气道压、氧合指标及多种细胞因子水平,结果发现在早期 PAF+RF的基础上,增加晚期 RF可以减少供肺组织中炎症细胞浸润和炎症介质 $TNF-\alpha$ 及 $IL-8$ 的产生,减少氧自由基的产生,改善肺的顺应性,提高术后早期移植肺的氧合功能^[6]。以上发现和我们病理学方面的观察结果是一致的。

总之,在早期 PAF+RF的基础上增加晚期 RF的灌注方案,可以进一步冲出残存在供肺内的微血栓,减少供肺组织中炎症细胞浸润,减轻肺水肿,减轻移植后供肺的炎症反应,维持细胞的正常结构。可见晚期 RF对供肺有保护作用。

参 考 文 献

- [1] Sarsan MA, Yonan NA, Dejanjia AK, et al. Retrograde pulmonary perfusion for lung preservation in clinical transplantation: a new technique. *J Heart Lung Transplant* 1993; 12(3): 494-498.
- [2] Witwer T, Franke U, Fehrenbach A, et al. Impact of retrograde graft preservation in Perfadex based experimental lung transplantation. *J Surg Res* 2004; 117(2): 239-248.
- [3] Van DeWauwer C, Neyrinck AP, Geudens N, et al. Retrograde flush following warm ischemia in the non-heart-beating donor results in superior graft performance at reperfusion. *J Surg Res* 2009; 154(1): 118-125.
- [4] Sack FJ, Dollner R, Reidenbach B, et al. Intraoperative microscopy of pulmonary microcirculation after single lung transplantation in pigs. *Transplant Proc* 2006; 38(3): 737-740.
- [5] Majra G, Inchley K, Novick RJ, et al. Acute lung injury and lung transplantation influence in vitro subtype conversion of pulmonary surfactant. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol* 2002; 282(1): 167-74.
- [6] 陈其瑞, 侯生才, 李辉, 等. 肺移植晚期逆行肺灌注肺保护作用的实验研究. *中华外科杂志*, 2008; 46(12): 942-943.

(收稿日期: 2009-12-18)

(本文编辑: 吴莹)

陈其瑞, 侯生才, 李辉, 等. 晚期逆行肺灌注在无心跳供体肺移植中肺保护作用的病理学观察 [J/CD]. *中华临床医师杂志: 电子版*, 2010; 4(4): 477-480.