

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 研究一氧化氮(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20只健康成年犬随机分为2组,每组各10只,每次实验使用受体犬和供体犬各1只,采用标准法行心肺移植。心脏灌注Stanford液,肺灌注Euro-Collins液,实验组于Euro-Collins液、Stanford液中分别加入L-Arg 500 mg/kg,受体犬主动脉开放前5 min加入L-Arg 500 mg/kg于机液中,供心肺放入4℃ Euro-Collins液保存4~6 h。监测心电图(ECG)、心率(HR)、平均动脉压(MAP)、肺动脉平均压(MPAP),测定股静脉血中一氧化氮(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),测定肺湿/干重比(W/DR)及观察心肺超微结构以评价心肺保护的效果。结果 开放后均为窦性心率,实验组PaO₂高于对照组($P < 0.01$),实验组NO、SOD含量较对照组高($P < 0.01$),实验组cTnI、MDA、CKMB、LDH含量较对照组低($P < 0.01$),实验组湿/干重比小于对照组($P < 0.05$),透视电镜检查实验组心肺损伤轻于对照组。结论 应用标准法可成功建立心肺移植动物模型,供心肺可安全保存4~6 h,在心肺移植实验中加入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。

【关键词】 L-精氨酸; 心肺移植; 缺血再灌注损伤

Effects of L-Arginine on Ischemie-reperfusion Injury in Heart-Lung Transplantation HUANG Keli, WU Rubin, XIAO Xuejun, et al. Department of Cardiovascular Surgery Guangdong Provincial Carvascular Institute, Guangzhou 510100

【Abstract】 Objective This study was to investigate the protective effect of L-arginine on ischemie-reperfusion injury in heart-lung transplantation. **Methods** 20 adult healthy dogs were randomly divided into two groups. The heart were flushed with Stanford solution, the lung were flushed with Euro-Collins solution, in treated group, administration of L-arginine to cardioplegic and lung perfusion solution (L-Arg 500 mg/kg). Hemodynamic parameters including heart rate (HR), mean artery pressure (MAP), mean pulmonary artery pressure (MPAP), plasma assayed included NO, cTnI, SOD, MDA, LDH, arterial blood for the assay were drawn, the ultrastructural studies of heart and lung. **Results** After artery untied, all cases

were SR, PaO₂ was significantly higher in the treated group than in the control group, the concentration of NO and SOD was signifieantly higher in the control group, the control group, the change of cTnI, MDA and LDH was adverse. Transmission electron microscopic examination showed the lesions in the treated group was milder than in the control group. **Conclusion** The heart-lung transplantation canine model had be finished successfully using standard method, we had used grafts preserved up to 4~6 hours successfully, administration of L-arginine to cardioplegic and lung perfusion solution increased the release of nitric oxide, can Improve protection of heart and lung in heart-lung transplantation.

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

心肺移植现已被证实是治疗终末期心肺衰竭的
种有效手段,但它的发育较心脏移植明显缓慢

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-Arg(L-精氨酸)即为其其中之一,L-Arg 是 NO(一氧化氮)生成的前体,通过 NO 产生作用,本实验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。

资料与方法

健康成年犬 20 只,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 2 组,每组各 10 只,每次实验使用受体犬和供体犬各 1 只,另外准备 10 只健康成年犬,每次实验使用 1 只作为供血犬。对照组心脏灌注 Stanford 液,肺灌注 Euro-Collins 液,实验组于 Euro-Collins 液、Stanford 液中分别加入 L-Arg 500 mg/kg,受体犬主动脉开放前 5 min 加入 L-Arg 500 mg/kg 于机液中,供心肺放入 4°C Euro-Collins 液保存 4~6 h。

供体犬以氯胺酮(2 mg/kg)和安定(0.5 mg/kg)肌注基础麻醉后,称重,仙林(0.1 mg/kg)、氯胺酮(2 mg/kg)静脉推注,气管插管,取胸骨正中切口,心脏和主动脉暴露直到无名动脉和左锁骨下动脉,游离上腔静脉和奇静脉,结扎切断奇静脉,游离下腔静脉,分离主动脉和肺动脉干,在上腔静脉和主动脉之间分离气管。股静脉注入肝素(3 mg/kg)、甲基强的松龙(30 mg/kg),肺动脉注入 PGE_1 (前列腺素 $10 \mu\text{g/kg}$)。阻断主动脉,经主动脉根部灌注 4°C Stanford 液(30 mL/kg,压力 100 mmHg),剪开下腔静脉;同时经肺动脉灌注 4°C Euro-Collins 液(100 mL/kg,压力 30~40 cmH₂O,10 min 内灌注完),剪开左心耳,灌注过程中肺继续通气。灌注完毕后,切断下腔静脉,高位切断主动脉,中度膨胀肺(70%~80%),双重钳夹主支气管,整块切除心肺。供心再次灌注 4°C Stanford 液(30 mL/kg,压力 100 mmHg),供心肺放入 4°C Euro-Collins 液保存 4~6 h。

受体犬麻醉后,气管插管,机械通气(18 次/min),四肢连接监护仪心电图标准肢体导联电极,记录 ECG,留置股动、静脉通道,股动脉置测压管连接监护仪,温度探头深入鼻腔探鼻咽温。胸骨正中切口,股静脉注入肝素(3 mg/kg),高位升主动脉插管,上、下腔静脉插管,建立体外循环(CPB),CPB 预充液中

温,鼻咽温 $32 \sim 34^{\circ}\text{C}$ 时阻断升主动脉,鼻咽温继续降至 $26 \sim 28^{\circ}\text{C}$ 。心脏和肺分别切除。移植入供心肺,开始吻合前,供心灌注 4:1 冷血(10°C)高钾停搏液(20 mL/kg),分别行气管、右心房、主动脉吻合,气管吻合完备后(高钾停搏液灌注后约 25~30 min),灌注 4:1 冷血(10°C)低钾停搏液 1 次(10 mL/kg),开始主动脉吻合时,行血液复温;鼻咽温升至 $32 \sim 33^{\circ}\text{C}$,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(PaO_2),取股静脉血标本,测血流动力学指标,取左室心尖部心肌($1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$)、右中肺组织($1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm} \times 1 \text{ mm}$)2.5%戊二醛固定, 4°C 保存,作超薄切片行透射电子显微镜检查;取右上、下肺叶称重后,在 90°C 下干燥 2 周后称干重,以(湿重-干重)/湿重 $\times 100\%$ 求湿/干重比(W/DR)。

于股静脉血标本中加入抑肽酶 $10 \mu\text{L}/1 \text{ mL}$ 血, 4°C 离心(3 000 r/min)15 min,分离出上清液,置 -70°C 冰箱保存,待批量检测 NO、MDA、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)、cTn-I、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)。

本实验结果均采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 SPSS for windows 11.0 社会科学统计软件包处理数据,采用单因素方差分析进行组间比较。 P 值代表统计学意义,以 $P > 0.05$ 、 $P < 0.05$ 、 $P < 0.01$ 表示,以 $P < 0.05$ 为有统计学意义的标准。

结 果

本实验共完成 10 例心肺移植,均能成功恢复窦性心率,对照组 1 例在主动脉开放后 60 min 内不能撤离 CPB,余 9 例顺利脱离 CPB。

肺湿/干重比(W/DR)($\bar{x} \pm s$)实验组为 $(83.84 \pm 1.63)\%$,对照组为 $(88.44 \pm 1.42)\%$,统计学比较有显著性差异($P < 0.01$)。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,间质水肿明显,实验组见大量通畅毛细血管,较多完整血管

表 1 基础指标结果(非实验研究指标)2组比较

项目组别	供心肺缺血 时间(min)	CPB 时间 (min)	EC 液灌注 时间(min)	供犬体重 (kg)	受犬体重 (kg)
对照组(<i>n</i> = 5)	252.4 ± 14.48	174.4 ± 9.92	4.4 ± 0.88	16.7 ± 2.24	17.8 ± 2.08
实验组(<i>n</i> = 5)	259.4 ± 19.92	169.6 ± 12.04	4.0 ± 0.8	16.9 ± 0.92	18.5 ± 0.8
<i>P</i>	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05	> 0.05

表 2 MAP、MPAP 变化($\bar{x} \pm s$)

分组	MAP (mmHg)		MPAP (mmHg)	
	麻醉后	主动脉开 放 60 min	麻醉后	主动脉开 放 60 min
对照组(<i>n</i> = 5)	126.4 ± 17.68 *	86.25 ± 16.25 * #	15.2 ± 1.44 *	19.25 ± 5.38 * #
实验组(<i>n</i> = 5)	138 ± 22.4	139 ± 18.8 #	15.2 ± 1.44	13.6 ± 0.48 #

注: * 组内比较有显著性差异($P < 0.01$); # 组间比较有显著性差异($P < 0.01$)。

表 3 LDH、cTn-I 变化($\bar{x} \pm s$)

分组	LDH (U/L)		cTn-I (μg/mL)	
	麻醉后	主动脉开 放 60 min	麻醉后	主动脉开 放 60 min
对照组(<i>n</i> = 5)	103.4 ± 37.12 *	719.8 ± 292.16 * #	0.038 ± 0.022 *	23.16 ± 2.76 * #
实验组(<i>n</i> = 5)	92.2 ± 33.44 *	592.8 ± 51.92 * #	0.032 ± 0.014 *	11.07 ± 2.62 * #

注: * 组内比较有显著性差异($P < 0.01$); # 组间比较有显著性差异($P < 0.01$)。

表 4 NO、SOD 变化($\bar{x} \pm s$)

分组	NO (μmol/L)		SOD (NU/mL)	
	麻醉后	主动脉开 放 60 min	麻醉后	主动脉开 放 60 min
对照组(<i>n</i> = 5)	71.71 ± 10.9 *	29.43 ± 12.42 * #	37.5 ± 14.86 *	26.65 ± 5.68 * #
实验组(<i>n</i> = 5)	70.57 ± 15.85 *	82.76 ± 12.34 * #	41.14 ± 14.57 *	100.38 ± 16.55 * #

注: * 组内比较有显著性差异($P < 0.01$); # 组间比较有显著性差异($P < 0.01$)。

表 5 PaO₂、MDA 变化($\bar{x} \pm s$)

分组	PaO ₂ (mmHg)		MDA (nmol/mL)	
	麻醉后	主动脉开 放 60 min	麻醉后	主动脉开 放 60 min
对照组(<i>n</i> = 5)	445.2 ± 81.84 *	30.2 ± 13.36 * #	2.89 ± 0.7 *	4.48 ± 0.54 * #
实验组(<i>n</i> = 5)	384.6 ± 64.88 *	107.6 ± 37.72 * #	2.26 ± 0.43	2.48 ± 0.51 #

注: * 组内比较有显著性差异($P < 0.01$); # 组间比较有显著性差异($P < 0.01$)。

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

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^[1, 2]。

分泌 NO 减少, 而使用 L-Arg 使 NO 含量增加, 本实验在主动脉开放 60 min 时段, 对照组 NO 含量降低, 实验组升高, 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, 使用 L-Arg 可保护内皮细胞功能。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。本实验在主动脉开放 60 min 时段, 实验组 SOD 含量较麻醉后升高, 对照组降低, 表明缺血再灌注损伤使内皮细胞功能受损, SOD 活力下降, 机体清除氧自由基的能力下降, 使用 L-Arg 可保存 SOD 活性, 以减少氧自由基, 保护膜磷脂, 维持细胞膜系统的完整性, 增强机体清除氧自由基的能力; 对照组 MDA 含量较麻醉后升高, 实验组降低, 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, 使用 L-Arg 对细胞膜有直接保护作用, 使氧自由基生成减少^[3, 4]。

本实验两组 cTnI、LDH 于主动脉开放 60 min 均升高, 时间段之间有统计学差异, 表示均有心肌移植后缺血再灌注损伤, 实验组 cTnI、LDH 升高幅度低于对照组, 说明使用 L-Arg 可减轻心肌缺血再灌注损伤; 对照组在主动脉开放后 60 min 股动脉平均压均下降, 实验组无差异, 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。

实验组肺湿/干比重(W/DR)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, 对照组见间质水肿明显, 实验组见间质水肿轻微, 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^[5, 6]。

本实验结果表明应用标准法可成功建立心肺移植动物模型, 供心肺可安全保存 4~6 h。在心肺移植实验中加入 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。

参 考 文 献

- 1 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(4): 367~376
- 2 Greenberg S, Chemin G, Shapira I, et al. Captopril and L-arginine have asynergistic cardioprotective effect in ischemic-reperfusion injury in the isolated rat heart. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2000 Oct, 5(4): 282~290
- 3 姜 桢, 徐德民, 叶磊. 左旋精氨酸在心脏围术期的应用. *中华麻醉学杂志*, 1998, 18: 150~152
- 4 Fukahara k, Murakami A, Watanie G, et al. Inhaled nitric oxide after lungischemia reperfusion hemodynamics and oxygen free radical scavenger system. *Eur J Cardio Thorac Surg*, 1997, 11(2): 343~349
- 5 Schutte H, Witzeurath 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(3): 496~502
- 6 Yamagishi H, Yamashita C, Okada M. Preventive influence of inhaled nitric oxide on lung ischemic-reperfusion injury. *Surgery-Today*, 1999, 29(9): 897~901