·实验研究论著·

脑死亡供体肺脏病理改变及临床移植应用前景探讨

农江¹, 孙煦勇¹, 董建辉¹, 秦科¹, 赖彦华¹, 聂峰¹, 蔡文娥¹, 文海涛¹, 李壮江¹, 杨建均², 何昌桓² (1.中国人民解放军第三0三医院移植医学研究院,广西南宁530021;2.中国人民解放军第三0三医院病理科,广西南宁530021)

摘要:目的 观察脑死亡供体肺病理改变,探讨临床移植应用的可行性。方法 对 23 例脑死亡供体肺进行了病理活检,HE 染色、网状纤维染色及 PASM 染色观察肺脏组织变化,电镜观察超微结构变化。结果 气管、支气管及肺泡结构尚完整,仅见局灶肺泡上皮细胞及支气管纤毛上皮细胞脱落,未见肺透明膜形成;肺泡间隔未见明显增宽、血管充血易见,血管内皮细胞未见明显改变,未见纤维化表现。电镜下肺泡 型上皮细胞胞质轻微水肿,但结构尚完整;内质网扩张,基底膜未见明显改变。结论 严格限定纳入标准,脑死亡供肺可以实施移植。

关键词: 脑死亡: 肺移植: 肺泡: 肺间隔

中图分类号: R655.3 文献标识码: A 文章编号: 1672-3619(2012)09-1065-03

Evaluation of the lung pathology in donor with brain-death and the feasibility using the lung for transplantation

NONG Jiang¹, SUN Xu-yong¹, DONG Jian-hui¹, QIN Ke¹, LAI Yan-hua¹, NIE Feng¹, CAI Wen-e¹, WEN Hai-tao¹, LI Zhuang-jiang¹, YANG Jian-jun², HE Chang-huan²

(1. Institute of Transplant Medicine, 303 Hospital of PLA, Guangxi, Nanning 530021; 2. Department of Pathology, 303 Hospital of PLA, Guangxi, Nanning 530021, China)

Abstract: Objective To evaluate the feasibility of using the lung from donor with brain-death for transplantation. Methods Histopathologic biopsies were obtained from 23 pulmonary donors with brain death. Pathological examination was performed after staining of the lung tissues with HE, reticular fiber and PASM stain. The microstructure of lung tissues was observed under an electron microscope (EM). Results Microscopic examination revealed that the tracheal, bronchial and alveolar structures were intact, with some alveolar endothelial cell and bronchial ciliary cell loss. Hyaline-membrane formation, thickening of the alveolar septum, changes of endothelial cell and fibrosis were not observed, but the congestion in blood vessel was seen. EM micrographs showed that type-II epithelia of alveolus had slightly edematous, but the structure was complete. Dilation of rough endoplasmic reticulum was seen and changes of basal membrane were not obvious. Conclusion Brain death donor is suitable for pulmonary transplantation.

Key words: brain dead; lung transplantation; alveolar; lung interval

肺移植是肺气肿、肺纤维化和肺动脉高压和各种原因导致的终末期肺疾病患者生存的唯一希望,但供肺匮乏成为开展肺移植的瓶颈。我院对脑死亡供体肺组织进行了光镜及电镜病理检查,进行了脑死亡供体肺综合评价,以探讨其临床移植应用的可行性。

1 材料与方法

1.1 脑死亡供体一般临床情况 我院器官移植中

自 处, 中 持均起

基金项目:广西自然科学基金(0991288)

作者简介:农江(1964-),男,本科,副主任医师,研究方向:军事病 理、肿瘤及移植病理

通讯作者:孙煦勇(1970-),男,博士,教授,主任医师,E-mail:sxywn

心 2007 年 1 月至 2008 年 12 月施行的脑死亡案例

中的23例病历(本实验组选取的供体均经供者家

属同意,并签署器官捐献同意书后进行实验),年龄

pressure, PEEP)=5 cm H_2O ; ③肺 X 线片正常无阴影; ④经和供者家属沟通, 确认患者无长期吸烟史(<10 年); ⑤供者胸部无外伤、胸膜无增厚, 供肺肉眼观无肺脓肿、肺气肿及支气管肺隔离症等, 无胸外手术史; ⑥痰涂片革兰染色阴性; ⑦取材之前支气管镜下检查正常且无分泌物。

1.2 肺灌注方法 供体脑死亡患者平卧,胸正中切 口,切开心包及两侧纵膈胸膜,以 6-0 无损伤缝合 线于肺动脉起始部 1.5 cm 处作荷包缝合;肺动脉根 部注入前列腺素 E1 1 000 µg 及甲基强的松龙 500 mg,迅速将肺动脉灌注管插入肺动脉,收紧荷包线, 开始灌注肺保护液-改良低钾右旋糖酐液(lowpotassium dextran, LPD)。冰屑置入双侧胸腔;探查 肺组织的状况,同时与受体手术组联系开始受体肺 切除手术。切开左心耳引流灌注液,肺表面迅速由粉 红色-粉白色-白色。此期间呼吸机持续支持。灌注 约5000 ml 后,心包外切断上、下腔静脉、主动脉,注 意保护勿损伤食管,以减少胸腔内污染。切断气管前 过度通气并略退出气管插管, 在胸顶部以大直角钳 钳夹气管并切断,取出整体心肺块。在充满 LPD 溶 液的容器中,用事先充满气囊的 Foley 导尿管插入 左心房的肺静脉开口,分别低流量灌注 LPD 溶液共 约 500 ml,直至肺动脉流出的灌注液完全清澈透明。 将膨胀状态下的整体心肺块置入 4℃ LPD 液的 3 层 器官专用塑料袋中,每层之间均以 LPD 溶液充满; 再将塑料袋置入充满冰屑的器官保存箱中迅速转运 抵达受体手术室。供肺修整:心肺块浸在 4℃ LPD 液中,解剖切除左肺及心脏,保留右肺上下肺静脉处 的左心房袖 0.5 cm 及左肺动脉全长; 距隆突两个气 管环处切断右主支气管,尽量保留支气管周围的结 缔组织,以使支气管动脉不受损伤。供肺采取手术时 间(25±3.4) min,冷缺血时间(160±23.7) min;肺动 脉顺行灌注时间(12±2.4)min,5 000 ml;逆行灌注时 \mathbf{i} **i** (2±0.6) min,500 ml_o

1.3 肺脏病理观察 在肺离体后、移植前对供肺穿刺或部分肺叶切取,中性甲醛及戊二醛固定,分别进行超声波快速石蜡切片(HE 染色、网状纤维染色及PASM 染色)及部分标本的电镜检查。

2 结 果

2.1 病理改变

2.1.1 光镜改变 气管、支气管、细支气管及肺泡结构尚完整(图 1),局灶见肺泡上皮细胞轻度水肿,偶见脱屑,未见包涵体;肺泡间隔轻度水肿但未见明显增宽,间质血管充血易见,有少量的出血,局部有散

明膜的形成。PASM 及网状纤维染色显示血管内皮细胞未见明显改变,肺间质纤维存在但无明显增生,提示未见纤维化(图 2)。

图 1~2 见封底。

2.1.2 电镜改变 肺泡细胞胞质轻微水肿, 肺泡型上皮细胞表面糖原减少, 线粒体轻微肿胀、嵴存在,粗面内质网轻度扩张,但结构尚完整,基底膜未见明显改变。

3 讨论

在大器官移植中,肺脏移植的实验研究及临床移植进展均落后于其它器官。1963 年 Hardy 进行了人肺移植(lung transplantation, LT)的首次尝试,但患者仅生存了 18 d^[2]。1981 年 Reitz 第一次成功进行了心肺联合移植^[3]。1983 年多伦多小组为 1 例肺纤维化患者进行了肺移植手术,获得长期生存^[4]。此后肺移植快速发展,已成为治疗终末期肺部疾患的有效手段。但供体的缺乏、移植后排斥反应、闭塞性细支气管炎等并发症的发生仍然是影响肺移植数量及移植后患者长期生存的主要问题。增加器官供体的途径之一就是从脑死亡捐献者当中选择合适供体,扩大供体的入选标准,并通过提高移植的成功率。

国际心肺移植协会 2006 年的统计, 肺移植术后 3 个月的存活率为 87%, 术后 30 d 内的主要死因中 手术技术占 8.4%,原发性移植肺失功占 28.4%,急性 排斥及感染分别占 5.1%及 21.2%, 术后 1、3、5 年 生存率分别为 78%、61%、49%[5]。美国器官获取和 移植中心统计数据显示,在所有器官供体中只有 15%的供肺可以实施移植區。有学者提出这些情况 可以通过移植前对供体肺的良好保护来逆转鬥。目 前临床上对脑死亡供体肺的保护主要是通过维持体 液平衡和机械通气两方面。在动物实验中早期吸入 沙丁醇胺可以有效地减少肺水肿的形成,但还未见临 床资料证实[8]。机械通气是保护肺的必要措施,低潮 气量可以改善病人移植术后急性肺损伤的发生⑨, 减少炎症反应[10];合适的呼吸末正压通气可以减 少肺膨胀不全,以保证肺循环血流量。保持灌注也 是维护肺功能的重要措施。有学者发现[11],在以高 流率(120 ml/min)灌注供肺前 10 min 先以低流率 (60 ml/min)灌注,与持续高流率灌注相比能显著降 低供肺的肺动脉压、吸气峰压,改善供肺的氧合能 力,防止肺水肿。供肺的储存保护也是手术成功的关 键环节,如在肺保护液中加入血小板活化因子拮抗 剂、粘附分子拮抗剂等能改善肺内皮细胞的生存能

程中由于供血中断以及通过血管吻合或恢复血液循环后血液再灌入器官后所形成的缺血再灌注损伤 (ischemia reperfusion injury, IRI)。严重的 IRI 可以造成广泛的肺泡损伤、肺泡间隔毛细血管血栓形成及局部肺泡透明膜的形成。但是,由于肺泡上皮细胞抵御损伤的能力强[12],并具有合成、分泌肺泡表面活性物质以及肺泡表面活性物质相关蛋白的作用,因而在本组资料中肺泡上皮细胞未见明显损伤。如果在术后给予刺激肺泡上皮细胞增生的药物可以使肺泡上皮细胞明显增生,产生丰富的肺表面活性物质,特别是 SPA 分泌增多[13-14],增强肺本身的免疫机能,可能可以用于防治肺移植后缺血再灌注损伤和并发的闭塞性细支气管炎,但目前均未见此类技术应用的文献报道。

脑死亡供体肺病理改变资料亦少见,且多限于 动物实验。文献[15-17]报道,在脑死亡过程中有很多因 素导致肺产生病理改变,首先大面积的脑损伤可以 使儿茶酚胺的水平升高,收缩血管,导致全身及肺循 环血管阻力增加,儿茶酚胺增多还可以引起内皮细 胞损伤并导致肺水肿的发生:其次,急性脑损伤诱导 肿瘤坏死因子和白细胞介素-6的产生,这些炎症因 子可以引发肺间质血管等发生炎症反应。本文结果 显示,在光镜下 HE、PASM 和网状纤维染色中观察到 脑死亡供体支气管、细支气管纤毛上皮大部分无显 著改变,肺泡结构大多完好,仅见局部肺泡上皮细胞 轻度水肿,偶见脱屑,肺泡间隔未见明显增宽,未见 肺透明膜的形成,PASM染色显示基底膜完整,提示 肺的血气交换屏障尚完好。电镜下肺泡细胞胞质轻 微水肿,肺泡 型上皮细胞表面糖原减少,线粒体 轻微肿胀、嵴存在,内质网扩张,但结构尚完整;基 底膜未见明显改变。这些改变与国内脑死亡动物实 验肺脏改变的结果有所不同。国内该类实验中肺脏 改变较重:光镜下见肺泡腔内渗出易见、局灶肺泡 萎缩,肺间质弥漫性水肿、增宽、充血,电镜下肺泡

委缩,肺间质弥漫性水肿、增宽、允皿,电镜下肺泡型上皮细胞线粒体肿胀明显、部分排列紊乱、嵴消失、部分膜溶解,毛细血管内皮细胞有吞饮小泡^[18]。而本组资料病理改变较轻,可能与维持较好的体液平衡、有机械通气支持及应用乌司他丁等抗炎性介质的药物有关。我们认为得到良好保护的脑死亡供肺是能够供移植使用的,这些肺脏发生的病理改变在移植后通过血液循环的重新建立、肺通气的重新开放及适当的治疗后是可以得到修复的。在本组脑死亡病例提供的部分肾脏中我们发现近曲小管部分上皮细胞坏死、脱落,对病变<50%者施行了移植,虽然个别病例出现了延迟性肾小管坏死、

病例移植成功,提示脑死亡导致的不严重的近曲小管损伤在移植后功能得到恢复,对肺移植可能有所启示[19]。

本组病理检查中用快速超声波石蜡切片代替了冰冻切片。因为冰冻切片很容易导致细胞肿胀,使得观察时导致判断错误,而且快速超声波石蜡切片可以做冰冻切片无法进行的 PASM 染色和网状纤维染色,此两种染色对观察肺泡结构是否完整、有无透明膜的形成、肺血管有无损伤等很有帮助。

传统的肺移植供体选择标准如下[20]:①年龄 ≤55 岁;②ABO 血型相配;③肺 X 线片正常无阴 影;④PaO₂≥300 mmHg,PEEP=5 cm H₂O;⑤吸烟史 ≤20年;⑥无胸外伤;⑦无肺脓肿;⑧无胸外手术 史; ⑨痰涂片革兰染色阴性; ⑩支气管镜下检查正常 且无分泌物。国内脑死亡供体肺移植开展较晚,数量 不多[21],对脑死亡供体肺移植应用的标准尚无太多 资料,我们认为可参考以下条件:①病理活检,a:支 气管、细支气管肺泡结构完整,微绒毛存在;b:未见 肺水肿、肺透明膜的形成; c: 肺泡间隔未见明显增 宽、炎症细胞少见:②结合临床情况,a:吸烟史≤20 年,无胸外伤、肺脓肿、胸外手术史及结核、播散性肿 瘤病史,肺 X 线无阴影;b:年龄<55 岁;c:捐献器官 前 PaO₂≥300 mmHg,PEEP=5 cm H₂O;d:HIV、HCV 病毒阴性;e:移植前得到较好的体液平衡维护及机 械通气支持。

本组病例样本量较少,计划进一步做更大样本、 多中心的研究,以全面了解脑死亡患者的肺脏病理 改变,完善供肺移植应用标准的建立。

参考文献

- [1] 卫生部脑死亡判定标准起草小组. 脑死亡判定标准(成人)和脑死亡判定技术规范(征求意见稿)[J]. 中华医学杂志,2003,83(3):262.
- [2] Blumenstock DA. The first transplantation of the lung in a human revisited [J]. Ann Thorac Surg, 1993, 56(6):14-23.
- [3] 万晓华. 器官移植及其伦理学问题的思考[J]. 中华医学研究 杂志,2007,7(12):1090-1092.
- [4] Dark JH. Lung transplantation [J]. Transplant Proc, 1994, 26(3): 1708–1709.
- 5] Aurora P, Edwards LB, Kucheryavaya AY, et al. The Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: thirteenth official pediatric lung and heart-lung transplantation report-2010 [J]. J Heart Lung Transplant, 2010, 29 (10):1129 – 1141.
- [6] Chang AC, Orens JB. Are there more lungs available than currently meet the eye[J]? Am Respir Crit Care Med, 2006,174(6):624– 625.
- [7] Fitzgerald RD. Management of the brain-dead organ donor [J]. Saudi

2012年9月第12卷第9期 J Trop Med, Sep. 2012, Vol.12, No.9

虽然贝氏柯克斯体基因组含有军团菌增强入侵

蛋白(enhanced entry protein)基因 enhA(CBU1122 和 CBU1138)、enhB(CBU1137 和 CBU0053),以及 enhC

(CBU1136)[13]。但是它们之间同源基因的相似度小于 51%,所以贝氏柯克斯体毒力相关芯片上的 enhA、

enhB、enhC 基因与军团菌基因组杂交的结果呈阴性。 根据相关基因信息,九里株(RSA493)基因组具

有 11 个锚定蛋白基因,而 Henzerling 株(RSA331)有 14个锚定蛋白基因。用 BLASTN 进行基因对比发现这 两个菌株中有10个翻译锚定蛋白的基因是相同的,基

因芯片的分析结果也显示 Henzerling 的 10 个锚定蛋 白基因杂交呈阳性。然而,九里株的另一锚定蛋白基 因(CBU1213)与 Henzerling 株基因组杂交为阴性。基 因序列对比分析发现,九里株 CBU1213 锚定蛋白基因

与Henzerling 株所有锚定蛋白基因的同源性小于 38%, 证明九里株和 Grita 株缺失该锚定蛋白基因,同时也 提示该基因不是贝氏柯克斯体致病所必须的基因。

参考文献

- 魏曦. 医用立克次体学[M]. 上海:科学技术出版社,1984.
- Seshadri R, Paulsen IT, Eisen JA, et al. Complete genome sequence of the Q-fever pathogen Coxiella burnetii [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100 (9): 5455-5460. Vogel JP, Andrews HL, Wong SK, et al. Conjugative transfer
- by the virulence system of Legionella pneumophila [J]. Science, 1998,279(5352):873-876. 俞树荣,陈香蕊,立克次体与立克次体病[M],北京:军事医学
- 科学出版社,1998.
- 俞树荣. () 热的病原与防治[M]. 重庆: 科学技术出版社重庆
- (上接第 1067 页) Follette DM, Rudich SM, Babcock ED. Improved oxygenation and increased lung donor recovery with high-dose steroid
- 17(4):423-429. The Acute Respiratory Distress Syndrome Network. Ventilation with lower tidal volumes as compared with traditional tidal volumes for acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome [J]. N Engl J Med, 2000, 342(18): 1301-1308.

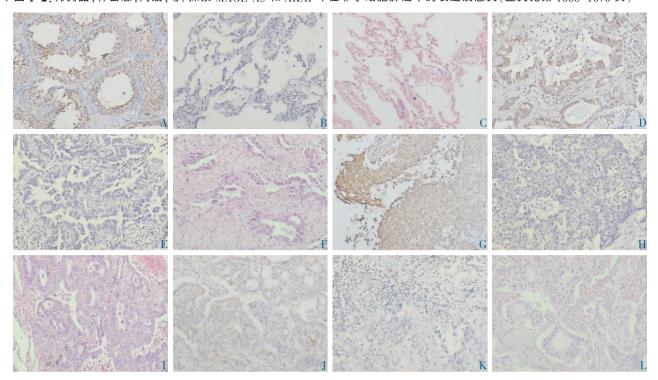
administration after brain death [J]. J Heart Lung Transplant, 1998,

- [10] Parsons PE, Eisner MD, Thompson BT, et al. Lower tidal volume ventilation and plasma cytokine markers of inflammation in patients with acute lung injury [J]. Crit Care Med, 2005, 33(1): 1-6.
- [11] Draenert A, Marquardt K, Inci I, et al. Ischaemia-reperfusion injury in orthotopic mouse lung transplants-a scanning electron microscopy study[J]. Int J Exp Pathol, 2011, 92(1):18-25.
- [12] Orens JB, Demissie E, Bellamy S, et al. Effect of single vs bilateral lung transplantation on plasma surfactant protein D levels in idiopathic pulmonary fibrosis [J]. Chest , 2011 , 140(2) : 489–496.
- [13] Schaller-Bals S, Bates SR, Notarfrancesco K, et al. Surfaceexpressed lamellar body membrane is recycled to lamellar bodies

分社,1990.

- Chenoweth MR, Somerville GA, Krause DC, et al. Growth characteristics of Bartonella henselae in a novel liquid medium: primary isolation, growth-phase-dependent phage induction, and metabolic studies [J]. Appl Environ Microb, 2004, 70 (2):656
- [7] Wen B, Rikihisa Y, Mott J, et al. Ehrlichia muris sp. nov., identified on the basis of 16S rRNA base sequences and
- serological, morphological, and biological characteristics [J]. Int J
 - Syst Bacteriol, 1995, 45(2): 250-254. Wen B, Rikihisa Y, Fuerst PA, et al. Diversity of 16S rRNA genes of new Ehrlichia strains isolated from horses with clinical signs of Potomac horse fever [J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45(2): 315-318.
- Matsumoto G, Mori H, Ito K. Roles of SecG in ATP- and SecAdependent protein translocation [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1998,95(23):13567-13572.
- [10] Ogata H, Renesto P, Audic S, et al. The genome sequence of Rickettsia felis identifies the first putative conjugative plasmid in anobligate intracellular parasite [J]. PLoS Biol, 2005, 3(8): e248.
- [11] Roux V, Raoult D. Phylogenetic analysis of members of the genus Rickettsia using the gene encoding the outer-membrane protein rOmpB (ompB)[J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2000, 50 Pt 4: 1449-1455.
- [12] Tamura A, Ohashi N, Urakami H, et al. Classification of Rickettsia tsutsugamushi in a new genus, Orientia gen. nov., as Orientia tsutsugamushi comb. Nov [J]. Int J Syst Bacteriol, 1995, 45(3):589-591.
- [13] Cirillo SL, Lum J, Cirillo JD. Identification of novel loci involved in entry by Legionella pneumophila [J]. Microbiology, 2000, 146 (Pt6): 1345-1359.
 - 收稿日期:2011-08-19
- [14] Beers MF, Hamvas A, Moxley MA, et al. Pulmonary surfactant metabolism in infants lacking surfactant protein B[J]. Am J Respir
- Cell Mol Biol, 2000, 22(3): 380-391. [15] Ranasinghe AM, Bonser RS. Endocrine changes in brain death and transplantation [J]. Best Pract Res Clin Endocrinol Metab, 2011, 25(5):799-812.
- [16] Halejcio-Delophont P, Hoshiai K, Fukuyama N, et al. No evidence of NO-induced damage in potential donor organs after brain death [J]. J Heart Lung Transplant, 2001, 20(1):71-79.
- [17] Avlonitis VS, Fisher AJ, Kirby JA, et al. Pulmonary transplantation: the role of braindeath in donor lung injury [J]. Transplantation
- 2003,75(12):1928-1933. [18] 张水军,李建华,李震,等. 巴马小型猪脑死亡状态下肺脏形态
- 变化及其机制[J]. 中华器官移植杂志,2006,27(9):528-531. [19] 农江,孙煦勇,秦科,等,脑死亡供体肾脏病理改变及移植应用 标准评判的探讨[J]. 热带医学杂志,2011,11(3):303-305.
- [20] Botha P. Extended donor criteria in lung transplantation [J]. Curr Opin Organ Transplant, 2009, 14(2): 206-210.
- [21] 卫栋,陈静瑜,叶书高,等.国际标准化脑死亡供肺的临床应用 3 例报告[J]. 器官移植,2010,1(4):230-233.

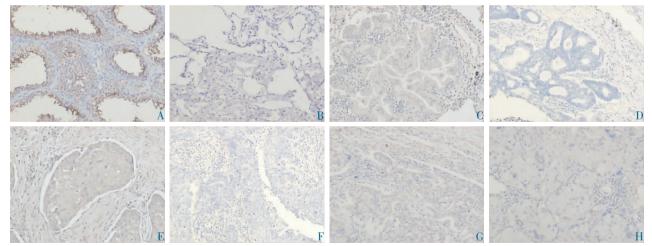
下图 **1~2 :**韩秀晶 ,林云恩 ,向波 ,等. 探索 MAGE-A3 和 AKAP-4 在非小细胞肺癌中的表达及意义(正文见第 1068~1070 页)



A:阳性对照,为正常睾丸组织;B:癌旁组织,阴性;C:癌旁组织的 HE 染色片;D:阳性肺腺癌;E:阴性肺腺癌;F:肺腺癌的 HE 染色片;G:阳性肺鳞癌;E:阳性腺鳞癌;E:阴性肺鳞癌;E:肿鳞癌的 E 染色片;E:阳性腺鳞癌;E:

图 1 AKAP-4 在非小细胞肺癌中的表达(10×10 倍)

Fig.1 The expression of AKAP-4 in NSCLC



A:阳性对照,为正常睾丸组织;B:癌旁组织,阴性;C:阳性肺腺癌;D:阳性肺腺癌;E:阳性肺鳞癌;F:阴性肺鳞癌;G:阳性腺鳞癌;H:阴性腺鳞癌。 图 **2** MAGE-A3 在非小细胞肺癌中的表达(10×10 倍)

Fig.2 The expression of MAGE-A3 in NSCLC

下图 1~2:农江,孙煦勇,董建辉,等. 脑死亡供体肺脏病理改变及临床移植应用前景探讨(正文见第 1065~1067 页)



图 1 肺泡壁结构(HE,×100)

Fig.1 Pathological changes of the lung tissue (HE,×100)

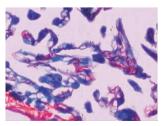


图 2 肺泡壁结构(网状纤维染色×100)

Fig.2 Pathological changes of the lung tissue (reticular fiber