



猪同种异体原位左肺移植模型的建立

曹浩¹, 周文勇², 康乐², 占贞贞², 王竹林², 汪波², 丁海燕¹, 范慧敏^{1,2*}, 刘中民^{1,2*}

(1. 同济大学附属东方医院心胸外科, 上海 200123; 2. 同济大学附属东方医院转化医学中心, 上海 200120)

【摘要】目的 建立接近于人的猪同种异体左肺原位移植动物模型。**方法** 环江香猪 12 只作为供体, 巴马香猪 12 只作为受体, 左侧第 4 肋间开胸, 完成左肺原位移植。术后 1、2、4、6、12 h 开胸测左、右肺动脉的压力, 同时取左、右肺静脉血进行血气分析, 取左、右肺组织, 观察含水量及病理学改变。**结果** 动物术后均存活, 随着术后时间延长, 供肺静脉血氧合指数 ($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$) 下降和肺动脉压 (PAP) 上升, 与受体正常肺比较, 差异有显著性 ($P < 0.05$)。随着时间的推移, 移植肺组织出现水肿、炎性细胞浸润、红细胞渗出, 肺泡壁增厚明显, 部分肺泡腔完全闭塞, 部分肺组织实变等变化, 与受体肺组织比较, 含水量增加显著 ($P < 0.05$)。**结论** 为研究肺移植缺血再灌注损伤及免疫排斥反应研究机制提供了理想的动物模型。

【关键词】 肺移植; 猪; 动物模型

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2015) 02-0111-04

Doi: 10.3969/j.issn.1005-4847.2015.02.001

A porcine model of orthotopic left lung transplantation

CAO Hao¹, ZHOU Wen-yong², KANG Le², ZHAN Zhen-zhen², WANG Zhu-lin²,
WANG Bo², DING Hai-yan¹, FAN Hui-min^{1,2}, LIU Zhong-min^{1,2}

(1. Department of Cardiothoracic Surgery, East Hospital, Tongji University School of Medicine, Shanghai 200123, China.

2. Research Center for Translational Medicine, East Hospital, Tongji University School of Medicine; Shanghai 200120)

【Abstract】Objective To establish a porcine allogeneic left lung orthotopic transplantation model to closely simulate human lung transplantation. **Methods** Twelve Huanjiang mini-pigs were used as donors and 12 Bama mini-pigs as recipients. The left lung orthotopic transplantation was completed by the left fourth intercostal thoracotomy. At 1 h, 2 h, 4 h, 6 h, 12 h after transplantation, the left and right pulmonary artery pressure were measured, the left and right pulmonary vein blood gas was analyzed, and samples of the left and right lung tissues were taken to determine the water content and for pathological examination. **Results** All animals survived, and the transplanted pulmonary vein blood $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ and PAP were raised along with the prolonged postoperative time, compared with those of the recipient normal lung showing a significant difference ($P < 0.05$). With the pass of time, there were increasing edema, inflammatory cell infiltration, RBC ooze, thickening of alveolar wall in the transplanted lung tissue, and some alveolar lumen occlusion and lung tissue consolidation. The water content of the transplanted lung tissue was increased significantly compared with that in the recipient lung tissue ($P < 0.05$). **Conclusions** The established method in this study provides an ideal animal model for research on lung transplantation ischemia-reperfusion injury and immune rejection mechanism.

【Key words】 Lung transplantation; Porcine model; Animal model

【基金项目】浦东新区卫生系统领先人才培养(PWR12011-01);上海市重点专科心脏外科(ZK2012A27);上海市浦东新区卫生系统重点学科群(Grant No. PWZxq2014-01);教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20130072120062);上海市浦东新区卫生、计生科技项目(PW2013A-2);上海市青年科技启明星计划(13QA1403100);同济大学青年优秀人才培养计划(2012KJ043);上海市东方医院启航计划(DFQH-M4)。

【作者简介】曹浩(1973-),男,主治医师,博士,研究方向:移植免疫;Email: caohaotj@163.com

【通讯作者】范慧敏,教授、主任医师, E-mail: frankfan@ tongji. edu. cn; 刘中民,教授、主任医师, E-mail: liu. zhngmin@ tongji. edu. cn.

目前肺移植已成为治疗终末期肺疾病的唯一有效方法,由于供体短缺,肺移植受到很大限制。肺移植术后移植肺缺血再灌注损伤、急慢性排斥反应等,可导致移植肺功能不全、甚至功能衰竭,移植失败。为进一步推动肺移植的研究,建立与人肺移植后更加接近的动物模型用于实验研究十分必要,为此,我们建立了猪同种异体原位左肺移植模型,现就动物模型的建立报告如下。

1 材料和方法

1.1 实验动物

普通级巴马香猪和环江香猪各 12 只,雌雄不拘,体重 20 ~ 25 kg,购于中国泰州试验用小型猪培育基地【SCXK(苏)2011-0002】。动物实验在同济大学实验动物中心【SYXK(沪)2009-0022】进行。

1.2 动物模型的建立

1.2.1 供体

猪于术前禁食 8 h,氯胺酮 10 ~ 20 mg/kg 肌注,之后耳缘静脉置留静脉针,肌松药推泵维持。猪仰卧固定,气管内插管,接呼吸机。通气频率 16 ~ 18 次/分,潮气量 10 ~ 12 mL/kg,氧浓度 100%,呼气末正压 5 cmH₂O。四肢连心电图,连续心电监测。正中劈胸骨入胸,剪开心包及双侧胸膜,暴露心脏及双侧肺。静推肝素每只 10,000 U,5 min 后结扎上、下腔静脉,升主动脉和肺动脉插入灌注管,肺动脉注射前列地尔(2 μg/kg),和甲强龙,剪开左、右心房,阻断升主动脉,经灌注管灌注心脏停跳液至心脏停跳,同时经肺动脉灌注管以 30 ~ 40 cmH₂O 压力灌注 4℃ Perfadex 肺保护液 2 L 至左心房流出清亮液体。在肺半膨胀状态下,夹闭主支气管,连同心肺一起取下,置入 4℃ Perfadex 肺保护液中修剪。分离出左主支气管、左肺动脉及左房袖,夹闭左主支气管,将左肺置于 4℃ Perfadex 肺保护液中备用。

1.2.2 受体

麻醉方法同供体,呼吸机参数同供体,动静脉置管,心电监护仪持续心电监护,左侧第 4 肋间切口入胸,1/3 量肝素静推,切断肺韧带,解剖肺门,切除左肺后潮气量减半。先间断 + 连续吻合左主支气管,用气管钳夹闭供肺左主气管,开放受体左主支气管,胸腔内注放温无菌生理盐水 1000 mL,检查支气管吻合口处有无漏气,若有,则予以修补。再连续吻合肺动脉,用小阻断钳阻断供肺左肺动脉,开放受体左肺动脉,检查有无漏血,若有,予以修补。最后以心耳

钳夹部分左心房,切开左心房,与供体左房袖吻合,打结前先开放左肺动脉排气,排气完毕,闭合左房吻合口,检查有无漏血,若有,予以修补。然后开放左主支气管,恢复正常潮气量,供肺膨胀。常规关胸,手术完毕。持续呼吸机辅助呼吸,分别于移植后 1、2、4、6、12 h,开胸取材,获取供体及受体肺组织及左、右肺静脉血液,用于进一步检测,同时测左、右肺动脉的压力。

1.3 检测指标

1.3.1 移植肺功能检测

呼吸机辅助呼吸,FiO₂ 为 1.0。相应时间点取移植肺之肺静脉血 2 mL,检测肺静脉血氧分压(PaO₂)、同时测定左、右肺动脉的压力。

1.3.2 肺含水量测定

相应时间点取供、受体移植肺组织样本,以生理盐水冲洗后用滤纸吸去表面水分,置于锡箔上用电子天平称其重量,除去锡箔的重量为湿重。再在 80℃ 烤箱内烘烤 72 h 后再称,除去锡箔的重量即为干重,计算肺含水量(%) = [1 - (干重 ÷ 湿重)] × 100%。

1.3.3 肺组织病理观察

相应时间点取供、受体移植肺组织约 1 cm × 1 cm × 1 cm 大小,用 4% 甲醛固定 24 h,石蜡包埋,苏木素-伊红(HE)染色。行光镜观察形态变化。

1.3.4 统计学方法

采用 SPSS 13.0 统计软件分析。数据以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。组间比较采用 *t* 检验。

2 结果

2.1 术后左、右肺静脉血氧合指数(PaO₂/FiO₂)和肺动脉压(PAP)的变化

全部实验动物术后均存活至 12h 后。在 FiO₂ 为 1.0 条件下,相应时间点 PaO₂/FiO₂ 和 PAP 见表 1。术后 2h 开始,供体肺静脉血 PaO₂/FiO₂ 下降和 PAP 上升,与受体正常肺相比差异有显著性($P < 0.05$)(见表 1)。

2.2 术后左、右肺组织含水量的变化

随着术后时间的延长,供体肺及受体正常肺含水量有逐渐上升的趋势,但供体肺含水量增加显著(见表 2)。术后 1h 开始,同时间点肺组织含水量比较差异有显著性($P < 0.05$)。

2.3 病理学检查

受体肺组织可见肺泡腔内光滑,无渗出,仅见肺

泡壁少量炎细胞浸润;随着时间的推移,移植肺组织 明显,部分肺泡腔完全闭塞,部分肺组织实变等变化 出现水肿、炎性细胞浸润、红细胞渗出,肺泡壁增厚 (图 1)。

表 1 肺移植后左、右肺 PaO₂/FiO₂ 和 PAP 的变化(n = 12, $\bar{x} \pm s$, mmHg)

Tab. 1 The changes of PaO₂/ FiO₂ and PAP of the left and right lungs after transplantation

肺 Lung	单位 mmHg	术前 Normal	术后 1 h Postoperation 1h	术后 2 h Postoperation 2h	术后 4 h Postoperation 4h	术后 6 h Postoperation 6h	术后 12 h Postoperation 12h
左 Left	PaO ₂ /FiO ₂	326 ± 21	315 ± 19	306 ± 20 *	297 ± 17 *	266 ± 18 *	226 ± 15 *
	PAP	20 ± 1	22 ± 2	24 ± 1 #	26 ± 2 #	27 ± 2 #	30 ± 3 #
右 Right	PaO ₂ /FiO ₂	323 ± 18	319 ± 20	325 ± 16	334 ± 21	320 ± 15	319 ± 17
	PAP	21 ± 2	22 ± 1	22 ± 3	24 ± 2	23 ± 3	24 ± 2

注: * P < 0.05, 同时点肺静脉血 PaO₂/FiO₂ 比较; # P < 0.05, 同时点肺 PAP 比较。

Note. * P < 0.05 comparison of the PaO₂/FiO₂ between left and right pulmonary venous blood at the same time; # P < 0.05, Comparison of the PAP between left and right lungs at the same time.

表 2 左、右肺组织术后含水量比较(% , n = 12, $\bar{x} \pm s$)

Tab. 2 Comparison of water content in the left and right lung tissues after lung transplantation

肺 lung	术后 1 h Postoperation 1h	术后 2 h Postoperation 2h	术后 4 h Postoperation 4h	术后 6 h Postoperation 6h	术后 12 h Postoperation 12h
左 Left	86.0 ± 2.5 *	89.5 ± 2.7 *	90.4 ± 2.6 *	91.2 ± 3.5 *	93.5 ± 3.4 *
右 Right	78.3 ± 2.6	80.1 ± 2.2	82.4 ± 2.9	84.5 ± 3.0	84.7 ± 3.1

注: * P < 0.05, 同时点肺组织含水量比较。

Note. * P < 0.05 comparison of the water content in the left and right lung tissues at the same time.

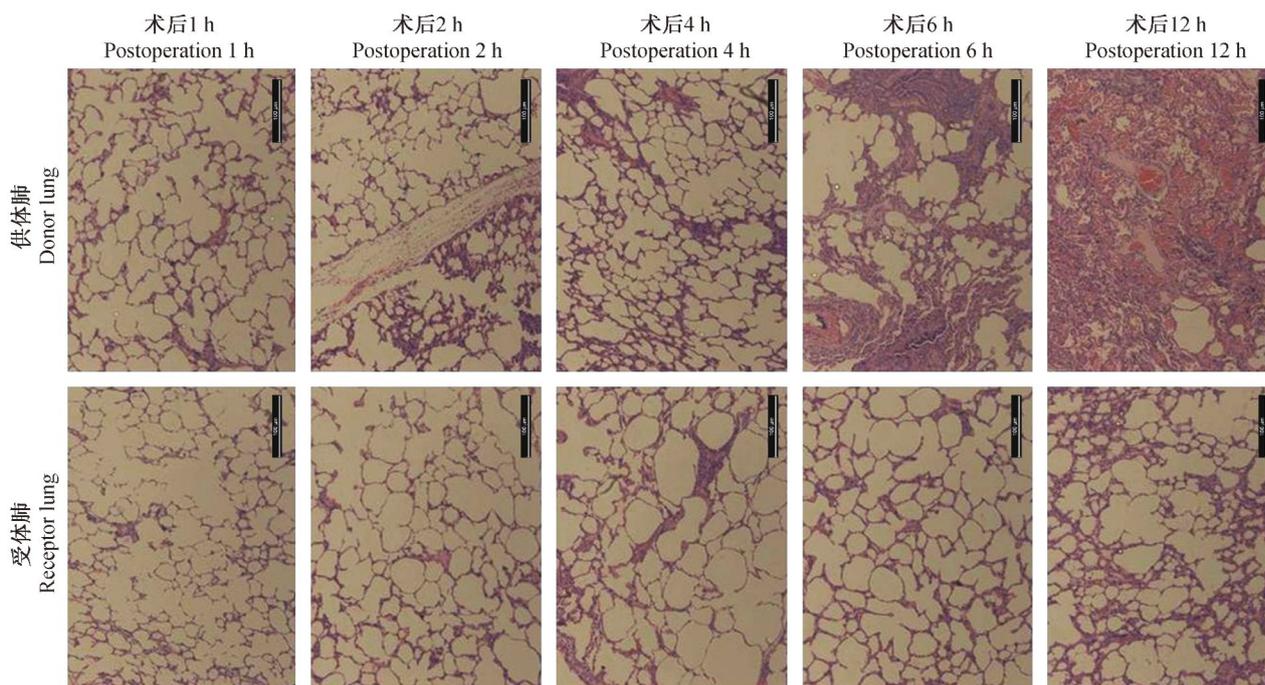


图 1 肺移植术后供、受体肺组织病理变化(HE 染色, ×100)

Fig. 1 Histological appearance of the donor and receptor lung tissues after lung transplantation(HE staining, ×100)

3 讨论

肺移植是治疗终末期肺病的有效治疗手段,但肺移植后面临缺血再灌注损伤、原发移植物失功、感染以及慢性排斥反应导致的闭塞性细支气管炎等众多问题,严重影响肺移植术的临床应用。建立更接近于人的同种异体左肺原位移植动物模型,将为肺

移植临床应用研究提供理想的平台。猪肺移植是一种常用的动物模型,可用于缺血再灌注损伤^[1]、供体肺保护^[2]及异种移植^[3]的研究。国内有少量文献报道建立猪肺移植(肺叶移植)用于供肺保护的研究^[4,5]。

肺移植方法很多,有文献报道,用单一阻断钳阻断肺门,先吻合肺静脉,然后是左支气管和肺动脉,

完成原位肺移植^[6]。也有研究者分别结扎左肺静脉、左支气管和左肺动脉,切除左全肺;接着吻合左支气管、左肺动脉和左心房袖,完成肺移植^[7]。我们的移植方法采用后一种。移植肺功能的评估是肺移植成功的一个重要部分。通常采用动脉血氧合能力($\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$)、肺动脉压力和血管阻力、动态和静态肺顺应性监测移植肺再灌注后肺功能变化^[8]。评估肺功能有三种方法,第一,在右肺循环和通气条件下评估^[9]。第二,在移植肺再灌注后不久,结扎右肺动脉,以便评估移植肺的功能^[10];但这种条件下,动物耐受时间不长,右肺动脉结扎时间不能超过 1~2 h,结扎后会有大量血液分流入供体肺,导致已经历冷缺血期间内皮损伤移植肺出现水肿、血氧不足和死亡^[8]。第三,在保持双肺灌注和通气的情况下,抽取左肺静脉的血样进行血气分析评估移植肺的功能^[11]。这种方法不受肺动脉结扎时间的影响,可以观察更长时间肺灌注后的肺功能变化。但这种方法应避免取左右肺动脉混合的血液。实验中我们采用第三种方法评价肺功能,开胸条件下获取左、右肺静脉血液,同时将测压管置于左、右肺动脉,测定左、右肺动脉的压力。实验中我们发现:随着时间的推移,移植肺组织出现水肿、炎性细胞浸润、红细胞渗出,肺泡壁增厚明显,部分肺泡腔完全闭塞,部分肺组织实变等变化,而受体肺组织无明显病理改变;随着术后时间的延长,移植肺静脉血 $\text{PaO}_2/\text{FiO}_2$ 下降和 PAP 上升,肺含水量增加显著,与受体正常肺相比。

选择猪作为实验动物,因为其解剖结构及免疫排斥过程与人相似,能更好地模拟人的肺移植的过程。猪右主支气管和右肺动、静脉,分支较多,左侧较单一,操作较简单,故选择行左肺移植。实验中我们先灌停心脏,再行肺灌注,可减少跳动心脏影响操作,利于肺灌注保护液。供体器官获取时可以保留较长的左主支气管、左肺动脉,适当修剪左房袖;受体的左肺切除时可以保留较长的左肺动脉利于吻合。肺静脉的吻合,夹闭部分左房壁,切开后切口与供体左房袖大小相仿,因左右下肺静脉距离很近,可夹闭左房壁部分较小,要进行充分解剖分离,吻合时要避免扭转。采用左房袖与受体左心耳进行吻合,无肺静脉回流不畅之优点。

我们的实验只观察了肺移植后 12 h 过程中肺

功能的变化,今后的工作将观察移植动物的长期存活情况,并进行相关研究。总之,该模型在手术操作上是可行的,具有较好的稳定性和可复制性。为研究肺移植缺血再灌注损伤及急慢性免疫排斥反应机制提供了更接近临床的动物模型。

参 考 文 献

- [1] Simón Adiego C, González-Casaurrún G, Azcárate Perea L, et al. Experimental swine lung autotransplant model to study lung ischemia-reperfusion injury [J]. Arch Bronconeumol. 2011, 47 (6): 283 - 289.
- [2] Meers CM, De Wever W, Verbeken E, et al. A porcine model to study ex vivo reconditioning of injured donor lungs [J]. J Surg Res. 2011, 166(2): e175 - 85.
- [3] Gaca JG, Leshner A, Aksoy O, et al. Disseminated intravascular coagulation in association with pig-to-primate pulmonary xenotransplantation [J]. Transplantation. 2002, 73(11): 1717 - 1723.
- [4] 龙小毛, 林辉, 李香伟, 等. 体外温血持续灌注对猪供肺的保护作用 [J]. 中华实验外科杂志, 2012, 29 (12): 2522 - 2524.
- [5] 任斌辉, 冯冬杰, 胡江文, 等. 常温肝素灌注液对自体移植肺损伤的影响 [J]. 中华实验外科杂志, 2010, 27(7): 940 - 942.
- [6] Karimi A, Cobb JA, Staples ED, et al. Technical pearls for swine lung transplantation [J]. J Surg Res, 2011, 171(1): e107 - 111.
- [7] Pizanis N, Milekhin V, Tsagakis K, et al. PDE-5 inhibitor donor intravenous preconditioning is superior to supplementation in standard preservation solution in experimental lung transplantation [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2007, 32(1): 42 - 47.
- [8] Korom S, Hillinger S, Cardell M, et al. Sildenafil extends survival and graft function in a large animal lung transplantation model [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2006, 29(3): 288 - 293.
- [9] Gomez CB, del Valle HF, Bertolotti A, et al. Effects of short-term inhaled nitric oxide on interleukin-8 release after single-lung transplantation in pigs [J]. J Heart Lung Transplant, 2005, 24 (6): 714 - 722.
- [10] Pizanis N, Milekhin V, Tsagakis K, et al. PDE-5 inhibitor donor intravenous preconditioning is superior to supplementation in standard preservation solution in experimental lung transplantation [J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2007, 32(1): 42 - 47.
- [11] Cypel M, Yeung JC, Hirayama S, et al. Technique for prolonged normothermic ex vivo lung perfusion [J]. J Heart Lung Transplant, 2008, 27(12): 1319 - 1325.

[收稿日期] 2015-01-16