

## · 基础研究 ·

## 氧合血停搏液连续灌注心脏保存模型的建立

张帆, 林辉, 莫安胜, 温昭科, 周一凡

**[摘要]:**目的 通过自行设计的离体心脏灌注装置,建立连续灌注大型动物心脏保存模型;评价连续灌注对供心保存的效果。方法 广西巴马小型猪 24 头,分别作为供、受体。单纯冷保存组( $n=6$ ):供心在 $4^{\circ}\text{C}$ 的 UW 液中冷保存 8 h 后移植到受体猪;连续灌注组( $n=6$ ):心脏停搏后连接灌注装置,连续灌注氧合血停搏液,体外保存供心 8 h 后移植到受体猪。观察两组移植心脏恢复情况,进行左室功能监测,包括左室收缩压(LVSP),左室舒张末压(LVEDP),左室内压最大上升/下降速率( $\pm dP/dt_{\max}$ ),并测定心肌组织氧摄取分数和心肌含水量。结果 主动脉开放后 3 min 内心脏自动复跳率连续灌注组优于冷保存组( $P=0.015$ );尽管连续灌注组心肌含水量在实验结束时高于冷保存组,但心肌功能测定不论是收缩功能的指标(LVSP、 $+dP/dt_{\max}$ ),还是舒张功能的指标(LVEDP、 $-dP/dt_{\max}$ ),连续灌注组均优于冷保存组( $P<0.0001$ )。结论 本自行设计的实验装置,可成功建立连续灌注保存大型动物(猪)心脏模型,与常规冷保存相比,减少缺血性损害,心脏自动复跳率高,功能恢复良好,能够延长供心保存时限。

**[关键词]:** 器官保存;心脏移植;连续灌注

**[中图分类号]:**R654.1 **[文献标识码]:**A **[文章编号]:**1672-1403(2012)02-0120-05

## Establishment of continuous perfusion preservation model of donor hearts

Zhang Fan, Lin Hui, Mo An-sheng, Wen Zhao-ke, Zhou Yi-fan

Department of Anesthesiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430061; Department of Cardiothoracic Surgery, Renmin Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

Corresponding author: Zhang Fan, Email: zfluck2002@163.com

**[Abstract]: Objective** To evaluate the preservative effect for donor hearts by establishing the continuous perfusion (CP) preservation model of large animal. **Methods** Twenty-four Bama miniature pigs were used as donors and recipients. Hearts were arrested with cardioplegic solution, then were either stored in cold UW solution for 8 hours at  $0-4^{\circ}\text{C}$  (CS group,  $n=6$ ) or continuously perfused with oxygenated blood cardioplegia for 8 hours (CP group,  $n=6$ ). After preservation, hearts were transplanted into recipients and reperfused for 3 hours. Left ventricular (LV) function and water content were measured. **Results** Most of CP hearts automatically reverted to normal sinus rhythm, whereas all hearts in CS group required DC shock and one of the hearts could not be successfully reverted. Although water content of CP hearts was higher than that of CS, LV contractility and diastolic function of CP hearts were superior to those of CS. **Conclusion** We have succeeded in establishing continuous perfusion preservation model of donor hearts with oxygenated blood cardioplegia. Donor hearts could be preserved longer using continuous perfusion and CP hearts performed better function than that of CS hearts.

**[Key words]:** Heart Transplantation; Organ Preservation; Continuous perfusion

阻止器官功能恶化,减轻时间依从性的缺血-再灌注损伤一直是供体心脏保存研究的重点。虽然心脏移植的发展经历了几十年,但临床供心保存的方法仅有很小的改变。如何延长离体心脏的保存期

限、提高保存质量以扩大供体选择范围成为突出问题。采用氧合的、富含代谢底物的液体连续灌注保存供心是一种更加适合的心脏保存方法。本研究通过自行设计的离体心脏灌注装置,采用氧合的血液停搏液连续灌注保存大型动物——猪的心脏,与单纯冷保存方法进行比较,评价连续灌注对供心保存的效果,建立连续灌注心脏保存模型。为今后发展供心保存系统奠定理论及技术基础。

**基金项目:** 国家自然科学基金(基金编号 81060027)

**作者单位:** 430061 武汉,武汉大学人民医院麻醉科(张帆);530021 南宁,广西壮族自治区人民医院胸心血管外科(林辉、莫安胜、温昭科、周一凡)

**通讯作者:** 张帆, E-mail: zfluck2002@163.com

**注:** 林辉为共同第一作者

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物准备** 广西巴马小型猪(由广西大学动物学院实验动物中心提供)24 头,体重 25 ~ 30 kg。肌肉注射氯胺酮 20 mg/kg 麻醉后,气管插管,机械通气。通气频率 15 ~ 20 次/min,潮气量 10 ml/kg,维持动脉二氧化碳分压 35 ~ 40 mm Hg。麻醉维持给予吸入体积分数为 1% ~ 2% 异氟烷。开放耳缘静脉,以 50 ml/h 速率输注 5% 葡萄糖溶液。胸骨正中切开,分离大血管后注射肝素 300 U/kg 达到全身肝素化。

**1.2 实验分组** 24 头猪分为两组,分别作为供、受体。单纯冷保存组(冷保存组, n = 6 对):按目前常规方法灌注 4°C 的 St. Thomas 停搏液。心脏停搏后放入冰水清洗,紧接着灌注 4°C 的 UW 液(ViaSpan<sup>®</sup>, 万事安<sup>™</sup>, 百时美施贵宝公司,其中加入 40 U 正规胰岛素,16 mg 地塞米松,2 万 U 的青霉素 G)。摘取的心脏浸泡在盛有 UW 液的无菌袋中,4°C 保存 8 h 后移植到受体猪。连续灌注氧合血停搏液组(连续灌注组, n = 6 对):主动脉根部置入灌注管,灌注 4°C 的 St. Thomas 液停搏心脏后,立即切下供心,连接至灌注装置。在心脏离体后 5 min 内开始连续灌注氧合血停搏液,体外保存供心 8 h 后移植到受体猪。

**1.3 受体手术** 8 h 保存期结束后,与已切除心脏建立体外循环的受体猪行同种异体原位心脏移植。主动脉开放后,移植心脏在体外循环辅助下空跳 2 h,停机,再自主跳动 1 h、检测相关指标后结束实验。

**1.4 离体心脏连续灌注装置及灌注液** 此装置是一个小型的体外循环回路,包括:器官室,恒流泵(LEAD-2 型,保定兰格有限公司),变温水浴箱,膜肺(TERUMO<sup>®</sup>, BABY-RX, Terumo Co., Tokyo, Japan),储血罐,微栓过滤器及管道系统(广东东莞科威公司),BL-420F 生理记录仪系统(成都泰盟科技有限公司)。此装置以晶体液(林格氏液)预充排气,再以胶体液(万汶<sup>®</sup>, 北京费森尤斯公司)尽可能排掉晶体液。

**1.5 灌注液的配制** 供血猪麻醉后开胸,肝素化后以采血袋(生复<sup>®</sup> 血袋,长春泰尔茂医用器具有限公司)从中心静脉尽可能多的采集抗凝血,通过白细胞滤器(RF-II-400 型,南京赛尔金公司)滤过后输入到离体心脏灌注装置中与胶体混合,进行氧合变温。灌注液中添加红细胞保存液、KCl、MgSO<sub>4</sub>、三磷酸腺苷、二磷酸果糖、胰岛素、甲泼尼龙、复合维生素、抗生素等成为氧合血灌注液。灌注液动脉血

气、电解质和其他成分的基础值,如表 2。在此灌注保存装置的器官室内连续灌注氧合血液,体外保存供心 8 h。离体心脏灌注系统示意图如图 1。

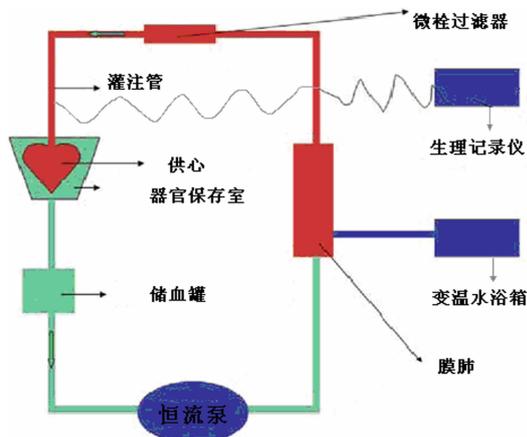


图 1 连续灌注保存装置构成图

**1.6 检测指标** 记录各组移植心脏吻合时间,心脏自动复跳率及成功停机数目。在主动脉开放 2 h 后,左室尖端置入测压管进行左室功能监测。所有数据以 BL-420F(成都泰盟科技有限公司)生理记录仪记录并测量。包括左室收缩压(LVSP),左室舒张末压(LVEDP),左室内压最大上升/下降速率( $\pm dP/dt_{max}$ )。在连续灌注保存的 0 h、4 h 和 8 h 三个时点抽动脉血及冠状静脉窦血检测血液灌注液的血气、血常规及电解质,并按公式计算心肌氧摄取百分数: $100 \times (PaO_2 - PvO_2) / PaO_2$ 。主动脉开放 2 h 后同时检测两组的这些指标。分别测定心肌干湿重,以计算心肌含水量。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS 13.0 统计软件进行分析。所得的数据计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,采用 *t* 检验和单因素方差分析,计数资料采用  $\chi^2$  检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 两组移植心脏恢复情况** 两组心脏吻合时间无明显差别。冷保存组 6 例均需除颤复跳,其中 1 例除颤 4 次仍未能复跳。连续灌注组除 1 例需除颤复跳外,其余 5 例均在 3 min 内自动复跳。连续灌注组 6 例全部成功停机,冷保存组仅 4 例成功停机。主动脉开放后 3 min 内心脏自动复跳率明显不同( $P < 0.05$ )。见表 1。

**2.2 血液学检查** 在经过了 8 h 灌注保存期及 2 h 的再灌注期后,血液灌注液各成分维持较好。在

表 1 移植心脏恢复情况比较( $\bar{x} \pm s$ )

项目	冷保存组 (n=6)	连续灌注组 (n=6)	P
除颤(例)	6	1	0.015
复跳(例)	5	6	1.000
停机(例)	4	6	0.121
心脏吻合时间(min)	61 ± 12	63 ± 16	0.784

表 2 血气、血常规及电解质变化( $\bar{x} \pm s$ )

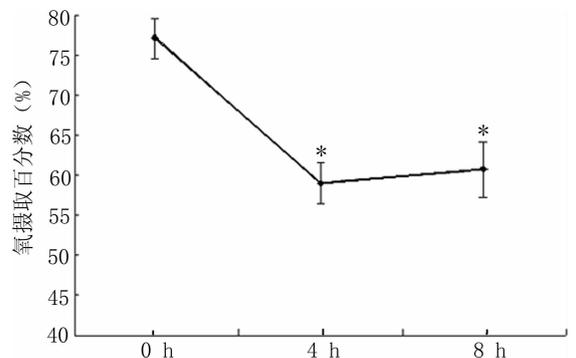
项目	生理值	连续灌注组 (n=6)				冷保存组再灌注期 (n=5)
		保存期 0 h	保存期 4 h	保存期 8 h	再灌注期	
WBC( × 10 <sup>9</sup> /L)	16.1 ± 4.0	0.5 ± 0.3	0.5 ± 0.4	0.8 ± 0.3	7.0 ± 1.7	6.3 ± 1.7
Hb(g/L)	109 ± 13	93 ± 11	86 ± 5	81 ± 7	97 ± 12	95 ± 1
Hct(L/L)	30 ± 3	21 ± 2	19 ± 1	18 ± 1	26 ± 3	26 ± 4
Plt( × 10 <sup>9</sup> /L)	336 ± 103	15 ± 6	36 ± 9	74 ± 17	122 ± 30	115 ± 32
pH	7.40 ± 0.04	7.38 ± 0.11	7.36 ± 0.06	7.37 ± 0.06	7.39 ± 0.02	7.41 ± 0.03
PaO <sub>2</sub> (mm Hg)	312 ± 52	154 ± 25	157 ± 17	159 ± 26	602 ± 31	585 ± 59
PvO <sub>2</sub> (mm Hg)	71 ± 5	—	64 ± 8	63 ± 10	65 ± 6	68 ± 3
PaCO <sub>2</sub> (mm Hg)	37 ± 5	41 ± 5	32 ± 4	42 ± 5	39 ± 4	37 ± 5
SO <sub>2</sub> (%)	100	99.7 ± 0.6	100	100	100	100
Na <sup>+</sup> (mmol/L)	144 ± 7	148 ± 7	150 ± 6	152 ± 5	145 ± 4	145 ± 3
K <sup>+</sup> (mmol/L)	4.1 ± 0.7	13.3 ± 2.9	14.4 ± 1.0	16.2 ± 1.1	5.1 ± 0.7	5.4 ± 0.9
Ca <sup>2+</sup> (mmol/L)	1.7 ± 0.4	0.7 ± 0.2	1.09 ± 0.2	1.01 ± 0.2	1.9 ± 0.3	2.2 ± 0.2
HCO <sub>3</sub> <sup>-</sup> (mmol/L)	23 ± 4	22 ± 3	21 ± 4	22 ± 3	23 ± 4	22 ± 2
BUN(mmol/L)	3 ± 1	2.3 ± 0.4	2.1 ± 0.3	2.2 ± 0.5	3.5 ± 0.5	3.5 ± 0.5
Crea(μmol/L)	66 ± 16	44 ± 7	42 ± 6	41 ± 7	60 ± 11	57 ± 9
Glu(mmol/L)	9.5 ± 2.3	12.8 ± 1.9	10.1 ± 1.6	8.3 ± 1.9	9.5 ± 2.2	9.3 ± 1.0

使用了白细胞过滤器后,连续灌注组的氧合血停搏液的白细胞和血小板计数在 0 h,4 h 和 8 h 三时点与基础值比较显著减少。两组再灌注期内血液学比较无明显差异 ( $P > 0.05$ ),见表 2。

**2.3 心肌氧摄取百分数与心肌含水量比较** 连续灌注组在连续灌注保存期间的 4 h,8 h 时点与基础值 0 h 比较有显著下降[(59 ± 3)%,(61 ± 4)% vs (77 ± 3)%, $P < 0.0001$ ],而两时点之间无明显差异。经过 11 h 后(8 h 保存期与 3 h 的再灌注),两组间心肌组织含水量有明显差别:冷保存组为(79.6 ± 0.9)%,连续灌注组为(81.5 ± 1.3)% ( $P = 0.003$ )。见图 2。

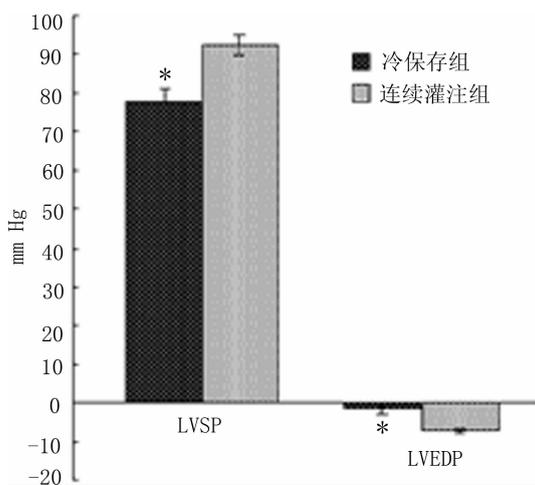
**2.4 左室心肌功能的测定** 不论是收缩功能的指标 LVSP、+dP/dt<sub>max</sub>,还是舒张功能的指标 LVEDP、-dP/dt<sub>max</sub>,连续灌注组均优于冷保存组,差异显著 ( $P < 0.0001$ )。冷保存组 vs 连续灌注组,见图 3、图 4。LVSP:(77.8 ± 3.3)mm Hg vs (92.5 ± 2.7)

mm Hg;LVEDP:(-1.7 ± 1.4)mm Hg vs (-8.0 ± 0.6)mm Hg;+dP/dt:(806 ± 17)mm Hg/s vs (1616 ± 94)mm Hg/s;(-dP/dt:(-520 ± 23)mm Hg/s vs (-632 ± 33)mm Hg/s。



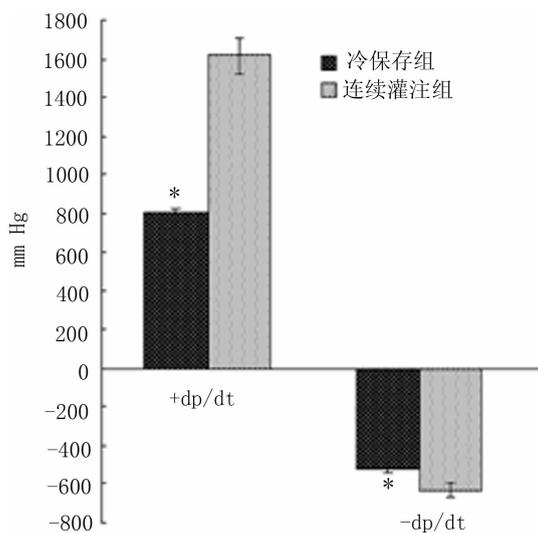
注:与 0 h 时比较 \*  $P < 0.0001$ 。

图 2 连续灌注组在各时点的心肌氧摄取百分数



注: 与连续灌注组比较 \* $P < 0.0001$ 。

图 3 再灌注 2 h 后两组 LVSP 和 LVEDP 比较



注: 与连续灌注组比较 \* $P < 0.0001$ 。

图 4 再灌注 2 h 后两组 +dp/dt 和 -dp/dt 比较

### 3 讨论

随着心脏移植的广泛开展和供心来源困难,对扩大供体库和扩大供体选择范围的要求越来越迫切。尽管很多研究者试图延长供心保存时间和提高供心质量,但在过去 20 年里,临床供心保存的方法仅有很小的改变。临床上广泛使用的传统保存方法是采用低温冷保存供心,保存时间局限在 4 ~ 6 h<sup>[1-5]</sup>,但它并不能提供完善的心肌保护。深低温所带来的细胞损伤,保存期间组织缺血缺氧,能量衰竭以及随后的严重再灌注损伤均成为导致移植早期功能衰竭的危险因素<sup>[6]</sup>。这是由于长时间的心肌代谢和离子平衡的紊乱所造成的。ATP 依赖的能量反

应受损,导致了膜稳定性、能量产生、酶的作用、需氧的葡萄糖代谢、ATP 的产生和利用、环磷酸腺苷的产生以及渗透压的平衡这些环节的功能受损<sup>[5,7-8]</sup>。导致临床心脏移植病例中有大约 3% 发生早期移植功能障碍,26% 的患者在术后 30 天内死亡<sup>[5-6]</sup>。

很多研究已证实采用氧合的、富含代谢底物的液体连续灌注保存供心是一种更加适合的保存方法<sup>[9-12]</sup>。连续灌注保存心脏比单纯低温心脏保存心肌的损伤更小已经得到广泛认可。连续灌注相比于冷保存主要有三个方面的优点:① 它避免了保存期间的心肌缺血缺氧,改善氧供,减少了再灌注损伤;② 连续灌注液中富含营养物质和代谢底物,含有自由基清除剂和缓冲对,保证了良好的胶体渗透压;③ 连续灌注及时冲洗去除组织内毒性代谢产物,控制酸中毒。基本避免了低温所带来的一系列问题<sup>[13]</sup>。

Poston 等制造出了轻便的器官保存装置<sup>[14]</sup>,国内没有发现类似装置以及实验的相关报道。我们根据体外循环机的构成原理自行组装了离体心脏连续灌注保存装置。这一小型的体外循环回路装置包括:自行改装的器官室,用于放置储存离体心脏;恒流蠕动泵为心脏的灌注提供动力,灌注流量在 20 ~ 300 ml/min 范围内可以调节;变温水浴箱,温度可以在 25 ~ 38℃ 之间调节,用于调节灌注液的温度;膜肺用于血液进行氧合和热交换;储血罐,微栓过滤器及管道系统;自行改装的灌注针头可以在头臂动脉插管对心脏进行灌注;BL-420F 生理记录仪系统用于监测离体心脏各项指标。用此装置,将供体心脏体外保存 8 h 并且进行了原位心脏移植。将氧合血灌注液连续灌注保存与单纯冷保存两种方法进行了对比,结果显示离体猪心在长时间(8 h)保存情况下,连续灌注保存的方法要优于传统的冷保存方法。

离体心脏连续灌注保存方法的关键是灌注液的配制、适当的灌注压力和流量,血液的保护与置换。灌注液采用的是经滤过去除白细胞和血小板的不凝血与胶体液混合后稀释的血液,灌注液中添加了红细胞保存液(含有葡萄糖、磷酸二氢钠、氯化钠、腺嘌呤、甘露醇、枸橼酸钠、枸橼酸)、三磷酸腺苷、二磷酸果糖、胰岛素、甲泼尼龙、复合维生素、抗生素等,成为氧合血灌注液;在此基础上再添加碳酸氢钠,氯化钾和硫酸镁配置成为氧合血灌注液。灌注液中富含营养物质和心肌代谢所需的能量底物,而且含有自由基清除剂和缓冲对,具有良好维持胶体渗透压的物质。实验结果标明此灌注液对于离体心脏连续灌注保存是合适的。Aupperle 等<sup>[15]</sup>报道采用低的灌注

压(40 ~ 50 mm Hg)连续灌注保存心脏,心肌超微结构改变优于高灌注压组。另有研究显示<sup>[13]</sup>,过低的冠状动脉灌注压(15 mm Hg)可能会导致心肌组织内不均匀的血液灌注以及氧输送。本实验的灌注流量为 30 ~ 40 ml/min,与之相适应的灌注压力在 35 ~ 45 mm Hg 左右。在灌注保存期间 4 h 和 8 h 两时点的氧摄取百分数没有明显变化,这意味着心肌氧供需和内环境的平衡,灌注流量是足够的。另外,在灌注保存的第 4 h 进行换血以提供足够的代谢底物,保证了灌注液中有足够的正常红细胞,改善了心肌氧的供应,并且减少了与机器相关的溶血和细胞碎片<sup>[16]</sup>。尽管连续灌注组心肌含水量高于冷保存组,但在测定的各项指标上(收缩性和舒张性),连续灌注组心肌功能都要好于冷保存组。对于连续灌注期间的水肿对心肌功能的影响现在还不是很清楚,且影响水肿的因素很多:灌注压力、灌注液胶体渗透压和灌注的方式等,理想的灌注液配方和灌注条件还没有定论,因此,还需要进一步深入的研究。

本研究通过自行设计的离体心脏连续灌注装置,成功建立连续灌注保存大型动物离体心脏模型——保存猪心脏 8 个小时并移植到受体猪。与常规冷保存心脏相比,心脏功能恢复良好。进一步提示了连续灌注氧合血这种方法能够延长供心保存时限,减少缺血性损害,为临床远距离获取供心、扩大供心选择范围提供有力的实验依据,为今后发展出完整的供心保存系统奠定理论及技术基础。

## 参考文献:

- [1] Rosenbaum DH, Peltz M, DiMaio JM, *et al.* Perfusion preservation versus static preservation for cardiac transplantation: effects on myocardial function and metabolism [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2008, 27(1): 93 - 99.
- [2] Nelson SK, Bose S, Rizeq M, *et al.* Oxidative stress in organ preservation: a multifaceted approach to cardioplegia [J]. *Biomol Pharmacother*, 2005, 59(4): 149 - 157.
- [3] Rivard AL, Gallegos RP, Bianco RW, *et al.* The basic science aspect of donor heart preservation: a review [J]. *J Extra Corpor Technol*, 2004, 36(3): 269 - 274.
- [4] Dobson GP. Organ arrest, protection and preservation: natural hibernation to cardiac surgery [J]. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 2004, 139(3): 469 - 485.
- [5] Kur F, Beiras - Fernandez A, Meiser B, *et al.* Clinical heart transplantation with extended preservation time (> 5 hours): experience with University of Wisconsin solution [J]. *Transplant Proc*, 2009, 41(6): 2247 - 2249.
- [6] Taylor DO, Edwards LB, Boucek MM, *et al.* Registry of the International Society for Heart and Lung Transplantation: twenty - third official adult heart transplantation report - - 2006 [J]. *J Heart Lung Transplant*, 2006, 25(8): 869 - 879.
- [7] Rivard AL, Gallegos RP, Bianco RW, *et al.* The basic science aspect of donor heart preservation: a review [J]. *J Extra Corpor Technol*, 2004, 36(3): 269 - 274.
- [8] Yang L, Yu T. Prolonged donor heart preservation with pinacidil; the role of mitochondria and the mitochondrial adenosine triphosphate - sensitive potassium channel [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2010, 139(4): 1057 - 1063.
- [9] Rivard AL, Gallegos R, Ogden IM, *et al.* Perfusion preservation of the donor heart: basic science to pre - clinical [J]. *J Extra corpor technol*, 2009, 41(3): 140 - 148.
- [10] Peltz M, He T, Adams GA, *et al.* Perfusion preservation maintains myocardial ATP levels and reduces apoptosis in an ex vivo rat heart transplantation model [J]. *Surgery*, 2005, 138(4): 795 - 805.
- [11] Ozeki T, Kwon MH, Gu J, *et al.* Heart preservation using continuous ex vivo perfusion improves viability and functional recovery [J]. *Circ J*, 2007, 71(1): 153 - 159.
- [12] Jacobs S, Rega F, Meyns B. Current preservation technology and future prospects of thoracic organs. Part 2: heart [J]. *Curr opin organ transplant*, 2010, 15(2): 156 - 159.
- [13] Peltz M, Cobert ML, Rosenbaum DH, *et al.* Myocardial perfusion characteristics during machine perfusion for heart transplantation [J]. *Surgery*, 2008, 144(2): 225 - 232.
- [14] Collins MJ, Moainie SL, Griffith BP, *et al.* Preserving and evaluating hearts with ex vivo machine perfusion: an avenue to improve early graft performance and expand the donor pool [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2008, 34(2): 318 - 25.
- [15] Aupperle H, Garbade J, Ullmann C, *et al.* Comparing the ultrastructural effects of two different cardiac preparation - and perfusion - techniques in a porcine model of extracorporeal long - term preservation [J]. *Eur J Cardiothorac Surg*, 2007, 31(2): 214 - 221.
- [16] Hassanein WH, Zellos L, Tyrrell TA, *et al.* Continuous perfusion of donor hearts in the beating state extends preservation time and improves recovery of function [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 1998, 116(5): 821 - 830.

(收稿日期: 2011-10-08)

(修订日期: 2012-01-12)