

心脏不停跳法猪供心保存模型的建立

林 辉, 莫安胜, 温昭科, 黄爱兰, 贺榜福, 梁胜景,
周一凡, 卢昌超, 胡艳燕, 顾超琼

基金项目: 广西壮族自治区自然科学基金资助项目(编号:0235024-1)

作者单位: 530021 南宁, 广西壮族自治区人民医院胸心外科(林 辉, 莫安胜, 温昭科, 贺榜福, 梁胜景, 周一凡, 卢昌超), 麻醉科手术室(黄爱兰, 胡艳燕, 顾超琼)

作者简介: 林 辉(1957-), 男, 医学博士, 主任医师, 博士/硕士研究生导师, 研究方向: 心脏不停跳心内直视手术, 心脏移植。E-mail: linhui33622@sina.com

[摘要] **目的** 研究心脏不停跳法猪供心保存模型的建立, 评述其意义及价值。**方法** 选用 25 ~ 30 kg 的广西巴马猪 12 头, 6 头只用于采血, 6 头取心脏作为供心模型。全麻下, 胸部正中切口, 全身肝素化(4 mg/kg), 从上腔静脉放血 500 ml; 阻断并切断头臂干插灌注管, 切断上腔静脉和右上肺静脉回收血液, 灌注心脏停跳液使心脏停跳。切断降主动脉起始部和两大分支, 取下的心脏经肺静脉和二尖瓣口置入左心室引流管。用自行组装的灌注装置连续灌注氧合温血液, 维持心脏空跳 8 h。**结果** 6 只供心都完好地保存了 8 h, 保存期间除了 1 例出现短暂的心房传导阻滞(2:1)外, 其余无发生心律失常。红细胞压积从灌注 1 h(T_1)到 5 h(T_5)逐渐升高, 从 T_7 到 T_8 逐渐降低; 游离钙离子和钾离子有逐渐升高的趋势; pH 和 BE 有逐渐降低的趋势。心脏不停跳保存灌注压变化从 T_1 到 T_4 灌注压力呈逐渐下降, 以后就处于一个相对稳定的数值。冠状静脉血氧分压(56.62 ± 6.93) mmHg。心脏表面无干燥或水肿现象。**结论** “广西巴马小型猪”是进行心血管系统疾病研究理想的实验动物, 离体猪心不停跳模型的建立对移植供心保存的研究有更重要的意义和价值。

[关键词] 心脏移植; 心脏不停跳; 供体心脏保存; 动物实验模型

[中图分类号] R 654.1 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1674-3806(2010)11-1039-04

doi:10.3969/j.issn.1674-3806.2010.11.01

Beating heart model of pig for heart preservation LIN Hui, MO An-sheng, WEN Zhao-ke, et al. Department of Cardiothoracic Surgery, the People's Hospital of Guangxi Zhuang Autonomous Region, Nanning 530021, China

[Abstract] **Objective** To study the porcine beating heart model for heart preservation, review the meaning and value. **Methods** Twelve Bama pigs weighted 25 ~ 30 kg were chosen, 6 pigs were only used for sampling blood, hearts of another 6 pigs were used for donor heart models. Pigs underwent chest incision under anesthesia and general heparinization(4 mg/kg). Then 500 ml blood were removed from the superior vena cava. Blocked and cut off the brachiocephalic arteries, inserted perfusion tube and cut off the superior vena cava and right superior pulmonary, then vein blood cardioplegic solution infusion was performed for cardiac arrest. Cut off the beginning part of the descending aorta and the two branches, the left ventricular drainage tube was inserted into removed heart via the pulmonary vein and opening of mitral valve. A device with continuous perfusion with oxygenated warm perfusion of blood was used for maintaining empty heart jump 8 h. **Results** Six hearts were well preserved for 8 hours. In addition to 1 case of atrial conduction block (2:1) in a brief period, the others didn't be found arrhythmia. Hematocrit from the perfusion 1 hour (T_1) to 5 hours (T_5) increased gradually, gradually decreased from T_7 to T_8 ; free calcium and potassium ions are gradually increasing trend; pH and BE have gradually decreased. Save beating heart perfusion pressure from T_1 to T_4 decreased perfusion pressure, then went in a relatively stable value. Coronary venous oxygen tension was (56.62 ± 6.93) mmHg. Heart surface had been found without drying or edema. **Conclusion** “Bama miniature pig” is ideal for cardiovascular disease research laboratory animal, in vitro porcine model of heart beating donor heart preservation for transplantation research has more important meaning and value.

[Key words] Heart transplantation; Beating donor; Heart preservation; Experimental animal model

低温心脏停跳法是目前供心保存的常用方法,因为存在缺血-再灌注损伤,公认的安全时限为4~6 h。连续灌注心脏停跳保存虽然解决了缺血问题,但是严重的心肌水肿影响心脏功能。本文探讨心脏不停跳法保存供心模型建立的相关问题,报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验材料与动物 实验动物为体重25~30 kg的广西巴马小型猪12头;实验材料有:电子秤(无锡计量器械厂)、去白细胞滤器(长春泰尔茂医用器具有限公司)、采血袋(长春泰尔茂医用器具有限公司)、动物呼吸机(上海奥尔科特生物科技有限公司)、麻醉机(北京航天长峰医疗器械有限责任公司)、体外循环管道(广东东莞科威公司)、血气分析仪(i-STAT Co. USA)、离体心脏灌注装置(自行研制)、恒温浴(成都泰盟科技有限公司)、BL-420F生理记录仪(成都泰盟科技有限公司)、保定兰格恒流泵、LEAD-2(保定兰格有限公司)等。

1.2 实验方法

1.2.1 心脏不停跳保存模型建立 12头巴马小型猪随机分为两组,6头只用于采血,6头取心脏作为供心模型。用氯胺酮麻醉(30 mg/kg),气管插管(5号),呼吸机控制呼吸(10 ml/kg)。麻醉成功后取胸部正中切口,开始全身肝素化(4 mg/kg),从上腔静脉放血500 ml。不切开心包,阻断头臂干动脉插入灌注针头,切断右上肺静脉、上腔静脉和下腔静脉并用手协助排空心脏后阻断降主动脉近端和左锁骨下动脉,然后开始灌注心脏停跳液使心脏停跳。切断降主动脉起始部和两大分支,最后离断心包后面的组织。取下的心脏经肺静脉和二尖瓣口置入左心室

引流管。把灌注管连接到灌注装置,连续灌注氧合温血液,维持心脏空跳8 h。维持灌注血液的红细胞压积>15%,温度为34~36℃,灌注流量为60~80 ml/min,灌注压力保持30~60 mmHg,用95%的氧气和5%的二氧化碳氧合血液。

1.2.2 灌注液配制 从供血猪采取肝素化全血装入采血袋中,经白细胞滤器去除白细胞和血小板后装入心脏灌注装置。灌注液中加入红细胞保存液、赫斯、甲基强的松龙、成人型复合维生素、胰岛素、肾上腺素、二磷酸果糖、10%葡萄糖、10%葡萄糖酸钙、5%碳酸氢钠、10%氯化钾和25%硫酸镁配置成。灌注液的量为(675±93.54) ml。灌注液动脉血气、电解质和其他成分的基础值见表1。

1.2.3 监测指标 连续监测灌注压、红细胞压积、游离钙离子、钾离子、pH值及BE变化。

1.3 统计学方法 所得的数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,灌注压、红细胞压积、游离钙离子、钾离子、pH值及BE变化,采用SPSS15统计软件进行制图。

2 结果

6只供心都完好地保存了8 h,保存期间除了1例出现短暂的心房传导阻滞(2:1)外,其余无发生心律失常。灌注液红细胞压积、游离钙离子、钾离子、pH及BE变化见表1。红细胞压积从T₁到T₅逐渐升高,从T₇到T₈逐渐降低;游离钙离子和钾离子有逐渐升高的趋势;pH和BE有逐渐降低的趋势。心脏不停跳保存灌注压变化见图1。从T₁到T₄灌注压力有逐渐下降,以后就处于一个相对稳定的数值。心脏表面无干燥或水肿现象。

表1 八个时段红细胞压积、游离钙离子、钾离子、pH值及BE变化

时 点	红细胞压积(%)	游离钙离子(mmol/L)	钾离子(mmol/L)	pH值	BE
T ₁	18.00±2.83	0.53±0.06	3.92±0.57	7.50±0.11	0.00±2.10
T ₂	18.33±5.05	0.58±0.10	4.17±0.49	7.48±0.08	-2.33±1.21
T ₃	18.50±5.13	0.58±0.08	4.48±0.35	7.49±0.11	-2.50±1.87
T ₄	19.83±5.03	0.67±0.16	4.50±0.13	7.49±0.10	-3.67±1.21
T ₅	20.50±4.37 [△]	0.68±0.15	4.49±0.18	7.49±0.07	-2.83±1.47
T ₆	18.67±3.78	0.67±0.12	4.84±0.71	7.43±0.05	-3.67±0.82
T ₇	15.50±2.67	0.47±0.18	5.07±0.35	7.43±0.07	-3.50±1.05
T ₈	15.33±1.97	0.62±0.17	5.40±0.24 [▲]	7.40±0.06	-4.17±1.47

注:T₅与T₁比,[△]P≤0.05;T₈与T₁比,[▲]P≤0.05

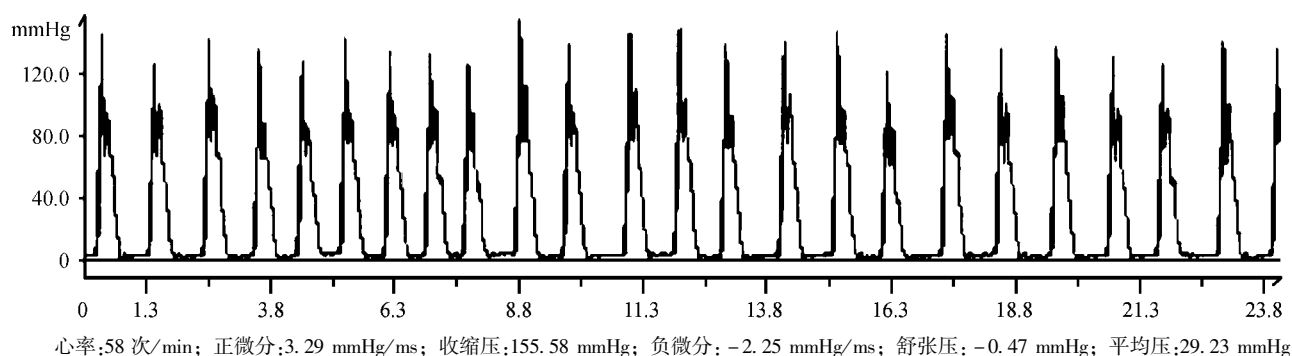


图 1 不停跳保存组供体植入后左心室空跳压力

3 讨论

3.1 用离体心脏(鼠心或兔心)Lungendorff灌注,心脏停跳或者不停跳,是一个经典的模型,已较广泛用于药效的评价,也用于心肌保护的研究^[1]。其主要优点是:(1)无神经支配;(2)不受各种体内激素、介质等物质的影响,容易观察和评价药物等干预因素的作用或效果;(3)心肌和心脏的兴奋性、传导性、自律性和收缩性等特性离体后的一段时间内并没有马上改变或消失;(4)心脏模型容易制作并且成本较低;(5)Lungendorff灌注系统比较简单,容易制作和操作;(6)Lungendorff灌注液不循环使用,无心肌的代谢废物堆积对心肌的不良影响;(7)节省人力、物力和经费。主要的缺点有:(1)解剖、大小、生理、病理生理与人类心脏差别太大;(2)所用仪器设备、药物计量与临床实际所用的相差甚远;(3)数据换算和统计学处理比较繁杂,有时甚至会影响学术价值。心脏不停跳法不阻断冠脉血流,用氧合血连续灌注(不管是顺行灌注或逆行灌注),大大地减轻缺血-再灌注损伤和心肌水肿,获得较好的心肌保护效果^[2,3]。然而,猪、羊和犬等大动物的离体心脏模型的研究报道罕见。“广西巴马小型猪”是通过国家认证的实验用小型猪^[4],其心血管系统解剖组织结构、生理代谢及病变特点与人极为相似,是进行心血管系统疾病研究最理想的实验动物,建立离体猪心不停跳模型有更重要的意义和价值。

3.2 要维持离体猪心保持空跳的状态必须用富含养分的氧合血液进行连续心脏灌注。而离体和非生理性的灌注会使心肌代谢发生改变,为了减轻或防止明显的病理生理的变化,必须采取适当的灌注液成分、温度、酸碱度、灌注压力和流量^[5,6]。要维持离体猪心的不停跳,需要一定量的灌注液来稀释心脏的代谢产物和调节酸碱平衡以维持代谢毒性物质在可以接受的浓度范围内。心脏保存的时间越长,产生的代谢产物就越多,所需要的灌注液就越多。

相应量的灌注液不仅有利于稀释心脏的代谢产物和酸碱平衡调节,而且还可以减轻心脏保存期间不必要的重量。本实验供体心脏保存了 8 h,灌注液的均值为(675 ± 93.54) ml。更换部分新鲜含血氧合灌注液,总量在(1 000 ~ 1 200) ml 效果也许更好些。灌注流量为 60 ~ 80 ml/min。温度在 32 ~ 34 °C 较适宜。

3.3 本实验是离体非工作跳动心脏模型,灌注压力是 35 ~ 62 mmHg,从 T_1 到 T_4 灌注压力逐渐下降,以后就处于一个相对稳定的数值。Aupperle 等^[7]认为 40 ~ 50 mmHg 的灌注压力比 80 ~ 90 mmHg 的灌注压力更加有利于心肌的保护。心脏离体以后血管阻力下降大约 50%,过高的灌注压力不仅容易导致心脏水肿,而且还容易引起主动脉瓣关闭不全。维持 40 ~ 60 mmHg 的低压灌注,必需保持良好的左心室减压和心脏的空跳才能使心脏各部分心肌得到均衡的血液供应和足够的氧及营养物质。经肺静脉和二尖瓣口置入一根导管,可有效把左室血液排出,保持低压状态。冠状静脉血氧分压和心律正常说明心肌的灌注是充分的。

3.4 随着保存时间的推移,代谢酸性物质越来越多,pH 和 BE 逐渐降低。细胞外酸性物质增多,氢离子向细胞内转移,换出细胞内的钾离子和钙离子,随着保存时间的延长,游离钙离子和钾离子有逐渐升高的趋势。钾离子的升高还与红细胞的破坏有关。因此,配置灌注液时尽可能的使 pH 和 BE 处于可以接受的高值,而钾离子和钙离子尽可能处于可以接受的低值。本实验的灌注液 pH 最高调到 7.61, BE 最高调到 2.10。钾离子最低浓度调到 3.2 mmol/L,游离钙离子最低浓度调到 0.45 mmol/L,并在灌注中每 30 min 检测 1 次,根据情况做调整。肝素是一种酸性物质,加入不足可能会形成微栓,但多了会使灌注液偏酸,维持 ACT 在 480 ~ 600 s 为好。

3.5 保护好红细胞,尽量减轻红细胞的损害以及减

少破碎,是维持微血管的通畅、保证微循环和心肌灌注良好的关键环节。因此,减低灌注压力和适当的灌注流量很重要。红细胞离体以后代谢仍然进行,需要在灌注液中加入一定比例的红细胞保存液以提供营养物质和稀释血液。使用甲强龙可保护细胞膜的稳定性。本实验心脏灌注 8 h,红细胞压积由 $(18.00 \pm 2.83)\%$ 仅下降到 $(15.33 \pm 1.97)\%$,提示红细胞保护良好。红细胞压积曲线在第 5 时点增高最明显,可能与灌注液水分丢失有关;以后的下降可能是红细胞的破坏所致。此外,保留离体心脏心包可以防止离体心脏心肌水分的丧失和防止心脏表面感染、避免了跳动产生的摩擦损伤、承载悬吊的心脏的重量、节制急性心脏扩大和整合四个心室各自相互依存的作用。

参考文献

1 林 辉,高尚志,李 欣,等. 逆行灌注心脏不停跳法的心肌保护

作用[J]. 中华实验外科杂志,2003,20(10):910-911.

2 林 辉,高尚志,李 欣,等. 逆行灌注心脏不停跳法对心肌的保护作用[J]. 中华实验外科杂志,2002,19(1):60-61.

3 Mo AS, Lin H, Wen ZK, et al. Efficacy and safety of on-pump beating heart surgery[J]. Ann Thorac Surg, 2008,86(6):1914-1918.

4 杨述林,任红艳,王 恒,等. 3 个中国实验用小型猪品种血液生化指标分析[J]. 中国畜牧兽医, 2007,34(4):75-78.

5 Peltz M, He TT, Adams GA 4th, 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.

6 Fitton TP, Wei C, Lin R, et al. Impact of 24 h continuous hypothermic perfusion on heart preservation by assessment of oxidative stress [J]. Clin Transplant, 2004,18(Suppl. 12):22-27.

7 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.

[收稿日期 2010-08-13][本文编辑 韦挥德 黄晓红]

课题研究·论著

胰岛素治疗方案与糖尿病家兔肾脏病变关系的实验研究

李 妮, 钟 玫, 陈 晖, 莫祥兰, 周微雅, 陈翠玲, 黄 莹

基金项目: 广西壮族自治区科技厅自然科学基金资助项目(编号:桂科基 0385005)

作者单位: 530021 南宁,广西壮族自治区人民医院内分泌科

作者简介: 李 妮(1955-),女,大学本科,主任医师,研究方向:糖尿病并发症。E-mail:Rjjq@tom.com

[摘要] 目的 以糖尿病家兔肾脏组织、细胞外基质的改变和炎症因子表达为判断标准,探讨模型胰岛素(Ins)用药治疗的适宜方案。方法 雄性家兔 40 只,随机分成对照组(N 组)、糖尿病模型组(D 组)、多次 Ins 治疗组(A 组)、50R 混合 Ins 治疗组(B 组)、30R 混合 Ins 治疗组(C 组)。治疗组用 Ins 治疗 30 d 后处死动物,同时处死其他组动物;观察各治疗组血糖达标时间及达标时 Ins 用量。比较各组血糖、糖化血红蛋白(HbA1c)、白天平均血糖水平(MBG)、血糖标准差平均值(MOS)、每只兔血糖绝对差值的平均值(MODD)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、细胞外基质成分(ECM)、NF- κ B 的表达情况。结果 A 组达标时间最短,C 组最长($P < 0.01$)。治疗各组血糖和 HbA1c 较 D 组下降($P < 0.05$)。A、D 两组较 C、N 两组 NF- κ B 灰度值明显降低,TNF- α 、ECM 明显升高($P < 0.05$)。A 组的 MOS、MODD 较 C 组和 N 组明显升高($P < 0.001$);HbA1c 与 MBG 呈正相关($P < 0.001$),与 MOS、MODD 无相关。D 组血糖及 NF- κ B 灰度值与 TNF- α 呈正相关(P 均 < 0.02)。肾脏组织病变受损严重程度及炎症因子表达明显度 D 组 $>$ A 组 $>$ B 组 $>$ C 组。结论 30R 预混胰岛素治疗方案最佳。提供一个较高的基础胰岛素浓度加少量餐时胰岛素峰值量治疗糖尿病,血糖平稳缓降,对糖尿病肾组织有治疗和保护作用。多次胰岛素 3 短加 1 中或长的强化治疗及太短时间达标的方法不主张首选。

[关键词] 糖尿病家兔模型; 肾组织病理; 核因子- κ B; 肿瘤坏死因子- α ; 细胞外基质