

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.02.002

不可控型心脏死亡大鼠供肾移植中的安全热缺血时限

邓新军, 胡建敏, 刘永光, 陈传宝, 黄金球, 何敏毅, 李 民, 陈 桦, 郭 颖, 范礼佩, 赵 明

(南方医科大学珠江医院器官移植科, 广州 510282)

【摘要】目的:探讨不可控心脏死亡(cardiac death, CD)后的大鼠供肾耐受热缺血的安全时限。**方法:**140 只 SD 大鼠随机按热缺血时间长短分成 7 组, 每组 20 只, 供、受者各 10 只, 分别于供鼠心跳停止 0、10、20、30、40、50、60 min 后进行原位肾移植术, 并结扎受鼠的右肾血管, 术后观察各组受鼠的生存情况、移植肾功能恢复情况及其纤维化程度。**结果:**各组冷缺血时间相同($P > 0.05$), 当供肾热缺血时间在 30 min 以内时, 血肌酐均于术后 1~2 周恢复正常, 各组受鼠存活率及移植肾纤维化程度与 0 min 组比较无显著差异($P > 0.05$); 当热缺血时间延长至 40 min 时, 受鼠存活率和移植肾纤维化程度与 0 min 组比较亦均无显著差异($P > 0.05$), 血肌酐于 2 周后稳定, 但明显高于 0 min 组($P < 0.05$); 当热缺血时间超过 40 min 时, 受鼠均于 1 周内死亡。**结论:**不可控型 CD 大鼠供肾移植中, 供肾热缺血时间应限制在 40 min 以内, 但热缺血时间介于 30~40 min 的供肾需谨慎使用。

【关键词】肾移植; 大鼠; 心脏死亡; 热缺血时间**【中国图书分类法分类号】**R617**【文献标志码】**A**【收稿日期】**2012-08-16

Safe limit of warm ischemic time for rat kidney graft from an uncontrollable cardiac death donor

DENG Xinjun, HU Jianmin, LIU Yongguang, CHEN Chuanbao, HUANG Jinjiu, HE Minyi, LI Min, CHEN Hua, GUO Ying, FAN Lipei, ZHAO Ming

(Department of Organ Transplantation, Zhujiang Hospital, Southern Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the safe limit of warm ischemia time (WIT) for kidney graft after uncontrollable cardiac death (CD) in rat. **Methods:** Totally 140 SD rats were randomly divided into 7 groups according to the WIT (CD0, CD10, CD20, CD30, CD40, CD50, CD60 groups). Each group had 20 rats, 10 as donors and 10 as recipients. The left kidneys were harvested from the donor rats at 0, 10, 20, 30, 40, 50, 60 min after CD and the harvested left kidneys were transplanted into the left nephrectomized recipient rats whose right renal pedicles were ligated. The survival of recipient rats, recovery of renal function and degree of fibrosis were observed and checked. **Results:** Cold ischemic time was similar in all groups ($P > 0.05$). The survival rate, serum creatinine level and allograft fibrosis in CD10, CD20, CD30 groups were all equivalent to those of CD0 group ($P > 0.05$) and the same results were acquired in CD40 group except that the serum creatinine level was higher than that of CD0 group ($P < 0.01$). All rats implanted with grafts for more than 40 min after CD (CD50 and CD60 groups) died within 7 d. **Conclusions:** WIT of the donor kidneys should be limited to less than 40 min for rat kidney graft from an uncontrollable CD donor; kidneys with WIT lasting for 30~40 min should be seriously considered for transplant.

【Key words】kidney graft; rats; cardiac death; warm ischemic time

肾移植是终末期肾病的最佳替代治疗方式。而供体器官短缺成为制约器官移植发展的主要因素^[1]。在第 2 届全国器官捐献与移植学术研讨会上陈忠华^[2]提出解决我国目前器官短缺压力的三大战略决策为“减少需求, 避免浪费, 扩展来源”。随着国

家政策^[3]的推行和公民意识的提高, 心死亡器官捐献(donation after cardiac death, DCD)成为“扩展来源”的重要途径。按照心跳停止前器官获取组织是否计划性的介入, 可将 DCD 分为可控型和不可控型两类, 其中不可控型 DCD 的器官热缺血时间常常是不可控的^[4]。对于这类供者, 其肾脏在心跳停止后多长时间内用于移植较安全成为值得探讨的课题。本研究以大鼠肾移植为模型, 在供鼠心死亡(cardiac death, CD)后不同时间点获取供肾并进行移植, 比

作者介绍: 邓新军, Email: dengxinjun30@163.com,

研究方向: 移植免疫学。

通信作者: 赵 明, Email: zhaoming02@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 81170696)。

较了移植肾在遭受不同时间热缺血损伤后的功能恢复情况,探讨不可控型 CD 大鼠供肾移植中的安全热缺血时限,为临床 DCD 相关研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物

以 SD 大鼠为供受者,体质量 200~250 g,均为雄性,共 80 只,购自南方医科大学实验动物中心。大鼠术前禁食 12 h,不禁水。

1.2 实验设计与分组

按照随机、双盲的原则,将 140 只 SD 大鼠分成 7 组,每组 20 只(10 只作为供者,10 只作为受者),CD0、CD10、CD20、CD30、CD40、CD50 组和 CD60 组分别于供鼠心跳停止后 0、10、20、30、40、50 min 和 60 min 获取其左肾作为供肾,并原位移植给受鼠,术后比较各组受者大鼠的生存情况和移植肾功能。

1.3 实验步骤

1.3.1 CD 大鼠供肾获取 供者 SD 大鼠以 5%异戊巴比妥钠 50 mg/kg 腹腔注射麻醉满意后,仰卧固定于手术台,术野备皮、消毒,取大十字切口进入腹腔,充分暴露左肾、左肾动静脉、腹主动脉和腔静脉。游离左肾及左肾动、静脉。游离左侧输尿管至离肾门约 1.5 cm 处剪断,适当保留其周围组织以保护血供。游离左肾蒂上下的腹主动脉和腔静脉各 1~1.5 cm,并于该处各备 1~0 丝线 1 根。经阴茎背动脉注入肝素钠 1 250 U,等待 8~10 min,使供鼠全身肝素化。剪开膈肌,用血管钳夹闭心脏基底部致使心脏停搏,阻断胸主动脉,确定心跳停止后,开始计算供肾的热缺血时间。在达到各组预定的热缺血时间(0、10、20、30、40、50 min 和 60 min)后,结扎各处备线,并以 0℃~4℃肝素水(25 IU/ml)低压匀速灌洗左肾,至左肾及所属血管苍白且肾静脉流出液清亮为止。灌洗完毕后迅速用冰屑覆盖左肾。于左肾动、静脉起始处剪断左肾动、静脉。将获取的供肾保存于 0℃~4℃肝素水中。

1.3.2 大鼠原位肾移植 受者 SD 大鼠以供鼠相同的方法麻醉、固定、备皮、消毒后,取正中切口入腹腔,肠管推向右侧并用盐水纱布包裹。适当游离左输尿管肾门处组织,剪断输尿管。游离左肾及左肾动、静脉,并于左肾动、静脉起始处各上一血管夹,于近肾门处剪断左肾动、静脉,切除左肾。以肝素水冲净被阻断血管内的残血。将供肾置于受者左侧肾窝内,吻合动、静脉过程中不断在肾周添加冰屑,以保持移植肾的低温状态。以 10~0 无损伤血管缝合线间断吻合供受者肾静脉 8~12 针,以 11~0 无损伤血管缝合线间断吻合供受者肾动脉 4~6 针,动、静脉吻合最后 1 针前均以生理盐水冲洗管腔以排出空气,避免发生气体栓塞。动、静脉吻合完毕后,移除肾动、静脉血管夹,可见移植肾迅速变红,观察输尿管蠕动及排尿情况。检查吻合口无异常后以 11~0 无损伤血管缝合线间断吻合供、受者输尿管 3~4 针。以 6~0 无损伤血管缝合线

固定移植肾上、下极。自受者左侧腰静脉补液约 3~5 ml。然后结扎受者的右肾血管。肠管回位,分 2 层关腹。一次性肌肉注射青霉素 40 万 IU 以预防感染。术后单笼饲养,自由进食、水。

1.4 观察指标

1.4.1 受鼠术中、术后情况 记录各组受鼠术中移植肾冷缺血时间,即从灌注到血流开放的时间;术后每日观察各组受鼠饮食、活动等,并记录各组受鼠存活率,当出现大鼠死亡时,立即对其进行解剖,明确有无动脉、静脉或输尿管吻合口出血或梗阻、腹腔感染等并发症。

1.4.2 血肌酐检测 术前及术后每 2 d 自受鼠尾静脉采集血标本,将血标本以 3 000 r/min 离心 10 min 获取上层血清,然后采用全自动生化分析仪检测血肌酐。

1.4.3 移植肾组织病理评估 术后 1 月,将各组存活的受鼠处死,获取移植肾标本,10%福尔马林固定,石蜡包埋,切成 2 μ m 厚的切片并进行 MASSON 染色。然后所有标本均采用既往研究^[9]中的评分方式(0-无纤维化、1-轻度、2-中度、3-重度)进行纤维化评分。

1.5 统计学分析

采用 SPSS 17.0 统计软件处理,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。生存曲线采用 Kaplan-Meier 法制作,组间生存率比较采用 Log-Rank 检验。血肌酐水平两两比较采用 Wilcoxon 检验,多组比较采用 Kruskal-Wallis 检验。冷缺血时间和移植肾纤维化评分采用单因素方差分析,两者关系采用线性回归分析。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧),以 $P \leq 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 受鼠存活率

本研究中,对术后 1 个月以内死亡的受鼠进行解剖,均未发现移植肾动脉、静脉及输尿管吻合口出血或梗阻以及腹腔感染等并发症。从图 1 可见,当供肾热缺血时间大于 40 min 时,受鼠均于 7 d 内死亡,当供肾热缺血时间小于 40 min 时,受鼠存活率随热缺血时间的延长逐渐降低。热缺血时间大于 40 min 的各组(CD50 组和 CD60 组)与热缺血时间小于 40 min 的各组(CD0、CD10、CD20、CD30 组和 CD40 组)比较差异均有统计学意义(Log-Rank 检验, P 均 < 0.05),而热缺血时间小于 40 min 的各组之间比较差异均无统计学意义(Log-Rank 检验, P 均 > 0.05)。

2.2 移植肾冷缺血时间

CD0、CD10、CD20、CD30、CD40、CD50 组和 CD60 组移植肾冷却血时间分别为(58.10 ± 6.97)、(59.80 ± 7.98)、(57.70 ± 9.62)、(61.10 ± 11.31)、(59.80 ± 9.53)、(55.60 ± 9.31) min 和 (54.30 ± 5.58) min,各组冷缺血时间比较差异无统计学意义($F=0.77$, $P=0.60$)。

2.3 术后受鼠血肌酐水平

比较各组中存活时间超过 1 月的受鼠血肌酐水平(图

2),发现各组血肌酐均于术后第 2~3 天达最高峰,之后缓慢下降;当供肾热缺血时间为 10~30 min 时,各组血肌酐均于术后第 12~14 天内恢复至正常水平(57.50 ± 5.04) $\mu\text{mol/L}$ 、(57.88 ± 6.15) $\mu\text{mol/L}$ 、(53.62 ± 14.01) $\mu\text{mol/L}$,且与 CD0 组(52.20 ± 17.78) $\mu\text{mol/L}$ 比较差异均无统计学意义($P>0.05$);而当供肾热缺血时间为 40 min 时,血肌酐于手术 12 d 后趋于稳定(133.00 ± 11.70) $\mu\text{mol/L}$,与 CD0 组比较差异有统计学意义($P<0.01$)。

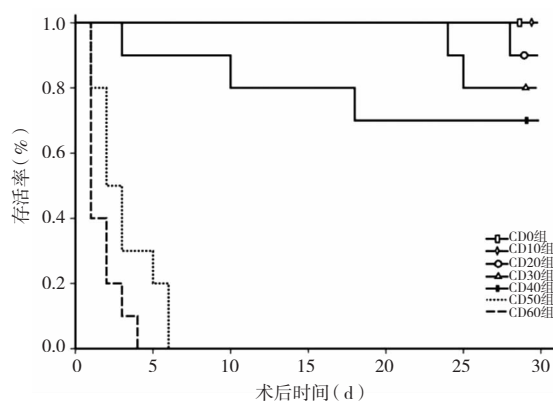


图 1 各组受鼠术后存活率

Fig.1 Post-transplantation survival rate of recipient rats in each group

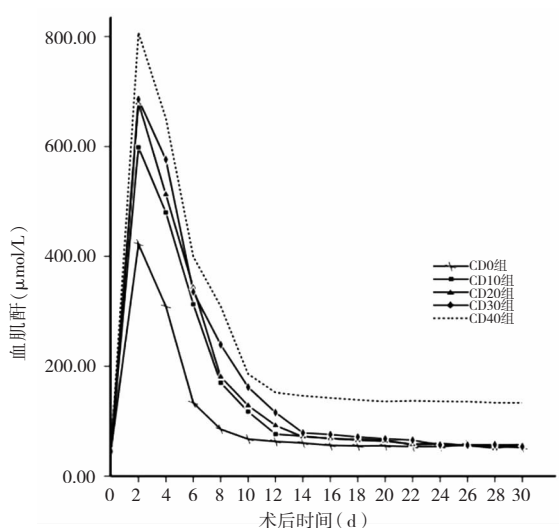


图 2 各组受鼠术后血肌酐水平

Fig.2 Post-transplantation serum creatinine level of recipient rats in each group

2.4 移植肾纤维化程度

术后 1 月,对各组存活的受鼠移植肾纤维化程度进行比较,发现各组移植肾均有不同程度的纤维化(图 3),CD0、CD10、CD20、CD30 组和 CD40 组纤维化评分分别为 0.90 ± 0.32 、 0.90 ± 0.57 、 1.11 ± 0.60 、 1.25 ± 0.46 和 1.43 ± 0.98 ,各组纤维化程度比较差异无统计学意义($F=1.22$, $P=0.32$)。但随着热缺血时间的延长,移植肾纤维化程度呈加重趋势($R^2=0.973$, $F=53.88$, $P=0.005$)。

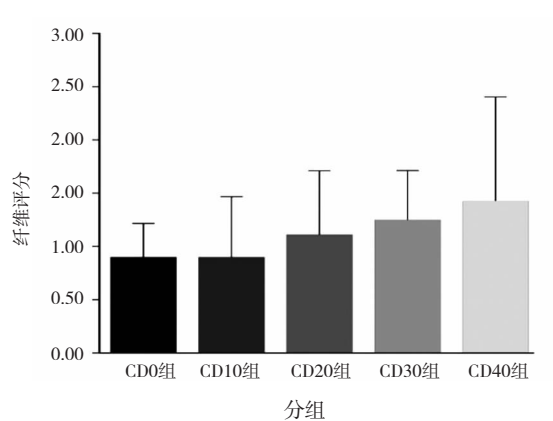


图 3 术后各组移植肾纤维化程度

Fig.3 Allograft fibrosis after kidney transplantation in each group

3 讨论

肾移植可有效延长终末期肾病患者的生存时间并提高其生活质量^[1],但由于供肾紧缺,仅极少数患者能等到移植器官。为缩小器官供需之间的巨大差距,许多边缘供肾逐渐被利用,如不可控型 DCD 供者捐献的肾脏等。与活体供肾或脑死亡供肾比较,此类边缘供肾通常遭受更严重的热缺血损伤,这大大增加了术后发生原发性移植肾无功能或移植肾功能延迟恢复的风险,缩短了移植肾的存活时间^[6]。因此,当 CD 供肾热缺血损伤无法避免时,其所能耐受的热缺血安全时限成为当前研究的热点。

当研究不同热缺血时间对肾脏影响时,最佳和最直接的方法是将其作为供肾,然后观察移植肾的存活情况及肾功能的恢复情况^[7]。本研究中切除受鼠自身左侧肾脏的同时结扎其右肾血管,术后仅移植肾发挥功能,当术中移植肾冷缺血时间无明显差别且术后 1 月内死亡的受鼠亦不存在动脉、静脉和输尿管吻合口出血或梗阻等外科并发症和感染等非外科并发症时,可认为受鼠的死亡系移植肾热缺血损伤所致。因此,观察术后受鼠的存活情况并检测其肾功能可直接反映不同热缺血时间对供肾的影响。

热缺血主要导致供肾小管尤其是近端小管的损伤且热缺血持续时间的长短直接影响肾小管损伤的预后^[8]。短时间热缺血,仅表现为肾小管水肿,少量炎症细胞浸润,这种损伤通常是可逆的,经过肾小管强大的增殖再修复能力,一般可在 1~2 周内自行恢复;当热缺血时间较长时,肾小管的损伤加重,表现为肾小管细胞极性改变,小管上皮基底

膜断裂,失去完整性,进而导致肾小管细胞损伤甚至坏死,当损伤超出其修复限度时,出现病理性修复即间质纤维增生^[9-10]。因此,评估移植肾的纤维化程度可间接反映经受不同时间热缺血后供肾的损伤程度。

本研究发现:随着热缺血时间的延长,移植肾存活率呈下降趋势,其纤维化程度则逐渐加重。当供肾热缺血时间在 30 min 以内时,其损伤程度较轻,通过自我修复能力,移植肾功能均于术后 1~2 周内恢复正常,受鼠存活时间均超过 1 月,表明 CD 大鼠的供肾耐受 30 min 以内热缺血较安全,这与国内外大部分研究结果相符^[11-12];当热缺血时间延长至 40 min 时,供肾损伤程度加重,其功能仅部分恢复,但移植肾存活率及其纤维化程度与热缺血时间 30 min 以内各组比较无统计学差异,表明 CD 大鼠的供肾经历 30~40 min 热缺血时,肾功能虽不能完全恢复,但足以维持受鼠存活相当长一段时间,而其远期效果仍待进一步研究;当供肾热缺血时间进一步延长,超过 40 min 时,供肾严重受损,术后移植肾几乎无功能,受鼠于 1 周内死亡,表明 CD 大鼠的供肾热缺血时间不能超过 40 min,这与毕旭东等^[13]提出的热缺血 40~60 min 是供肾可逆与不可逆损伤的分界值相一致。

综上所述,在不可控型 CD 大鼠供肾移植中,供肾热缺血时间在 30 min 以内较安全,热缺血时间介于 30~40 min 的供肾需谨慎使用,而热缺血时间超过 40 min 的肾脏不宜作为供肾。

参 考 文 献

- [1] Wolfe R A, Ashby V B, Milford E L, et al. Comparison of mortality in all patients on dialysis, patients on dialysis awaiting transplantation, and recipients of a first cadaveric transplant[J]. *N Engl J Med*, 1999, 341(23): 1725-1730.
- [2] 中华医学会武汉市器官移植学会. 解决我国目前器官短缺压力的 3 大战略决策——减少需求, 避免浪费, 扩展来源[C]. // 陈忠华. 第二届全国器官捐献与移植学术研讨会论文集. 武汉: 中华医学会武汉市器官移植学会, 2009: 43-46.
- Wuhan Organ Transplantation Branch of Chinese Medical Association. Three decision strategies in solving the shortage of donor organs in China—reducing demand, avoiding waste and extending source[C]. // Chen Z

H. Proceedings of the 2nd national organ donation and transplantation workshop. Wuhan: Wuhan Organ Transplantation Branch of Chinese Medical Association, 2009: 43-46.

- [3] 中华人民共和国卫生部. 卫生部办公厅关于启动心脏死亡捐献器官移植试点工作的通知[J]. *中华移植杂志(电子版)*, 2011, 5(2): 173-174.
- Ministry of Health of the People's Republic of China. Notification published by general office of the ministry of health about beginning the pilot project of donation after cardiac death[J]. *Chinese Journal of Transplantation(Electronic Version)*, 2011, 5(2): 173-174.
- [4] 陈忠华. 25 年磨一剑(剑)——环球性器官短缺与移植危机中的中国新(心)路历程[J]. *中华移植杂志(电子版)*, 2010, 4(4): 1-8.
- Chen Z H. New sight after a quarter century—a long Chinese way to tackle the organ shortage in the era of worldwide organ crises[J]. *Chinese Journal of Transplantation(Electronic Version)*, 2010, 4(4): 1-8.
- [5] Kunter U, Rong S, Boor P, et al. Mesenchymal stem cells prevent progressive experimental renal failure but maldifferentiate into glomerular adipocytes[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2007, 18(6): 1754-1764.
- [6] Singh R P, Farney A C, Rogers J, et al. Kidney transplantation from donation after cardiac death donors: lack of impact of delayed graft function on post-transplant outcomes[J]. *Clin Transplant*, 2011, 25(2): 255-264.
- [7] 郑军华, 闵志廉, 李玉莉, 等. 长征-1 号多器官保存液效果的动物实验研究[J]. *中华泌尿外科杂志*, 1999, 20(12): 712-714.
- Zheng J H, Min Z L, Li Y L, et al. The efficacy of CZ-1 solution in flushing the donor renal transplant for prolonged cold storage[J]. *Chinese Journal of Urology*, 1999, 20(12): 712-714.
- [8] Kale S, Karihaloo A, Clark P R, et al. Bone marrow stem cells contribute to repair of the ischemically injured renal tubule[J]. *J Clin Invest*, 2003, 112(1): 42-49.
- [9] Finn W F, Chevalier R L. Recovery from postischemic acute renal failure in the rat[J]. *Kidney Int*, 1979, 16(2): 113-123.
- [10] Witzgall R, Brown D, Schwarz C, et al. Localization of proliferating cell nuclear antigen, vimentin, c-Fos, and clusterin in the postischemic kidney. evidence for a heterogenous genetic response among nephron segments, and a large pool of mitotically active and dedifferentiated cells[J]. *J Clin Invest*, 1994, 93(5): 2175-2188.
- [11] 毕旭东, 崔乃强, 赵 晶. 缺血时间对肾脏影响的实验研究[J]. *中国现代医学杂志*, 2003, 13(6): 20-23.
- Bi X D, Cui N Q, Zhao J. The effect of different warm ischemia time on rat kidney changes and transplanted kidney's function[J]. *China Journal of Modern Medicine*, 2003, 13(6): 20-23.
- [12] Pahlavan P S, Smallegange C, Adams M A, et al. Kidney transplantation procedures in rats: assessments, complications, and management[J]. *Microsurgery*, 2006, 26(5): 404-411.

(责任编辑: 关蕴良)