

· 综 述 ·

毛囊黑素干细胞研究进展*

郭海英¹, 王瑞敏², 周其超³, 杨珂¹综述, 杨恬^{1△}审校

(1. 第三军医大学基础部细胞生物学教研室, 重庆 400038; 2. 重庆医科大学细胞生物及遗传学教研室, 重庆 400016; 3. 太极集团西南药业股份有限公司, 重庆 400038)

关键词: 毛囊干细胞; 黑素; 细胞谱系; 维持; 分化

doi: 10.3969/j.issn.1671-8348.2013.24.036

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2013)24-2910-04

位于毛囊中的黑素干细胞在人和动物的皮肤附件系统中起着黑素细胞储存库的作用。在哺乳动物, 黑素干细胞负责向毛母质提供黑素细胞, 活化的黑素细胞向毛干的角质形成细胞提供黑素。在人类, 黑素干细胞一方面可为毛母质提供黑素细胞, 如生长期毛母质中的黑素细胞、斑秃毛发再生中毛母质的黑素细胞等; 另一方面可为脱色的表皮提供黑素细胞, 如白癜风复色、表皮烧伤或擦伤后的复色。所以, 对毛囊黑素干细胞的深入理解在研究色素变化和相关疾病方面具有重要的意义。

1 毛囊黑素干细胞概述

1.1 毛发黑素的生成与两类干细胞

毛囊(hair follicle)是具有周期性生长特性的一个亚器官, 在人和哺乳动物的整个生命期间, 按生长期(anagen)、退化期(catagen)和静止期(telogen)依序循环往复。完整的毛囊由多种细胞组成, 其结构由内向外依次为毛干、内根鞘和外根鞘, 毛囊下端膨大成毛球部, 容纳毛乳头(dermal papilla, DP)。

在毛囊上部, 外根鞘向外形成一个突起, 称为毛囊隆突(bulge)。现已证明, 毛囊隆突中栖息着 2 种干细胞, 其中, 毛囊干细胞首先被鉴定, 继而毛囊黑素干细胞被确认^[1]。这 2 类干细胞协同作用, 生成具有稳定色素的正常毛发, 并负责毛囊和毛发的维持与再生。

1.2 毛囊干细胞(hair follicle stem cells, HFSCs)

毛囊干细胞为外胚层上皮来源, 表现为标记滞留细胞(label retaining cell, LRC), 有多种分子标记物(K15/K19/ α 6/ β 1/CD34/DKK3/FZD1/Sox9 等)。目前, 对毛囊干细胞的研究已经有相当丰富的工作积累。毛囊干细胞具有 3 个方向的分化潜能: 向上迁移分化为皮脂腺及损伤修复中的表皮细胞; 向下迁移至毛球部, 分化为毛囊和毛发的各种上皮类型细胞, 其中部分细胞成为黑素接受细胞(melanin recipient keratinocytes), 它们适时地接受成熟黑素细胞产生的黑素, 进而生成含有黑素的毛干和毛发^[2]。

1.3 毛囊黑素干细胞(hair follicle melanocyte stem cells, HMcSCs)

毛囊黑素干细胞来源于神经嵴。在胚胎晚期, 神经嵴细胞分化为黑素母细胞(melanoblast, Mb), 后者穿过真皮向表皮迁移并进入正在发育中的毛囊。当黑素母细胞进入毛囊后, 一部分迁移到毛母质区域, 分化为成熟的黑素细胞(melanocyte, MC), 产生色素并传递给形成毛干的角质形成细胞; 另一部分定居于毛囊隆突, 成为黑素干细胞(melanocyte stem cell, MSC), 负责后续的黑素细胞谱系的再生。小鼠在胚胎发育的第 8.5 天(E8.5)黑素母细胞出现在神经嵴。之后黑素母细胞开始迁移, E10.5~12.5 进入真皮, E13.5 进入表皮, E

14.5 开始从表皮基部向发育中的毛囊迁移, E15.5 进入毛芽, E18.5 到达毛囊隆突并永久居留于该区^[3-4]。有文献认为, 定居到毛囊隆突的黑素母细胞完全分化为黑素干细胞需要 3~4 d^[4-5]。当黑素母细胞在毛囊隆突分化为黑素干细胞后, 黑素干细胞可在毛囊隆突维持静息状态, 只在特定的时期(毛囊生长期早期)发生分裂, 其子代细胞中, 一部分补充空巢, 回到静息干细胞状态, 其他 TA(transient amplifying cells)细胞迁移到毛球, 分化为黑素细胞, 向形成毛发的角质形成细胞输出黑素^[1]。毛囊黑素干细胞在毛囊隆突巢中散在分布, 不与基膜相贴, 椭圆形, 无突起, 核质比大, 不含黑素, 动力学特点为慢周期原始细胞^[6]。黑素干细胞的分子标记物包括 Pax3、DCT^[7]和 KIT^[7-8]。

1.4 毛囊黑素细胞谱系(melanocyte lineage)

出生后的小鼠处于生长期的毛囊中, 黑素细胞可分为 3 类不同的亚型: 首先是位于毛囊隆突的黑素干细胞, 只表达酪氨酸相关蛋白-2(tyrosinase related protein 2, TRP2); 也称多巴异构酶(DCT), 不增殖; 其次是位于外根鞘的分化中的黑素细胞, 表达 TRP2 和酪氨酸相关蛋白-1(tyrosinase related protein 1, TRP1), 具有增殖活性; 第 3 类是位于 DP 上方毛基质中的黑素细胞(melanocytes), 表达 TRP2、TRP1、酪氨酸酶(tyrosinase), 在毛囊生长早期具有增殖活性, 可产生黑素^[7,9]。黑素干细胞和分化中的黑素细胞都缺乏有功能的 TYR, 所以仅含有未成熟的黑素小体, 不能产生黑素; 只有成熟的黑素细胞可产生黑素。

毛囊黑素细胞谱系的生物学活性与毛囊周期密切相关。当毛囊从静止期转入生长期(A2 期), 黑素干细胞活化, 产生 TA 细胞并迁移到毛球部, 分化为成熟的黑素细胞并产生黑素。在生长晚期, 黑素细胞开始退化, 部分分化的黑素细胞凋亡。在整个毛囊退化期和静止期, 黑素细胞不合成黑素。待下一个毛囊周期开始后, 毛囊黑素干细胞又重新开始新一轮的分化和迁移的循环^[10]。

2 黑素细胞谱系培养现状

对黑素细胞谱系的培养以对黑素母细胞和黑素细胞的培养为多, 且主要是通过培养神经嵴细胞^[11-12]或胚胎干细胞^[13]或多能干细胞(induced pluripotent stem cells, iPSCs)^[14]诱导而来。小鼠神经嵴细胞在体外诱导培养 4 d, 大约 1%~2% 细胞表达黑素母细胞的标记物, 并在 2 周后分化为黑素细胞^[15]。

对黑素干细胞的分离培养目前主要是通过流式分选或者利用带荧光标记的转基因小鼠分选。日本 Nishikawa 实验室通过流式分选的方法从转基因小鼠[CAG-CAT-EGFP mice ×

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81271770)。 作者简介: 郭海英(1980~), 讲师, 博士, 主要从事毛囊生物学、黑素生物学研究。

△ 通讯作者, Tel: 13508352905; E-mail: tianyi@163.net。

Det_{ml(Cre)Bee} mice], 黑素细胞谱系表达 EGFP) 的胚胎皮肤分离出黑素母细胞 (GFP⁺/PI⁻), 通过流式细胞仪检测纯度 (全部为 Kit⁺/CD45⁻)。在不同诱导条件下对分选出的细胞进行培养, 选择出黑素母细胞最佳的培养条件为: 以角质细胞 XB2 作饲养层, 并添加 SCF、FGF2, 体外培养 3 周能保持未分化状态。用毛发重建实验检测, 培养的未分化的黑素母细胞具备在毛囊中重建 MSC 系统的能力^[16]。Nishikawa 实验室还通过上述转基因小鼠, 从毛囊隆突中分离出黑素干细胞, 以角质细胞 XB2 作饲养层, 在 FGF2、SCF、EDN3、a-MSH 存在情况下体外培养, 可在毛囊重建实验中重建毛囊黑素细胞谱系^[17]。

Motohashi 等^[18]选用正常 C57/BL 小鼠, 用流式分选出黑素母细胞 (Kit⁺/CD45⁻)。分选出的细胞用 RT-PCR 检测黑素母细胞相关标记物 (Mitf、Sox10、Pax3、TRP-2), 证明分选出的 Kit⁺/CD45⁻ 细胞确实是黑素母细胞。

Yang 等^[14]通过诱导小鼠尾部成纤维细胞获得多能干细胞 (iPSCs), 并将其在含有 Wnt3a、SCF 以及 ET-3 的培养液中进行培养, 发现 iPSCs 可分化为产色素细胞。经检测这些色素细胞表达黑素细胞相关标记物 (Pax3、MITF、TYR、TYRP1、TYRP2、Sox10 等), 证明诱导 iPSCs 可以分化为黑素细胞。

本实验室用 SV40T 抗原转染新生小鼠背皮黑素细胞, 成功获得了不同分化程度的永生黑素细胞 (iMCs)。其中 iMC23 虽然表达黑素细胞早期标记物 c-kit, 但不表达黑素合成必须的标记物 tyrosinase, 且具有黑素生成的潜能, 经鉴定为早期黑素母细胞 (melanoblast progenitor); 而 iMC65 和 iMC37 则分别为分化晚期的黑素细胞 (late-stage melanocyte) 和分化中期的黑素母细胞 (intermediately differentiated melanoblast-like)^[19]。

3 调控黑素干细胞的维持和分化的信号途径

黑素干细胞的静息与分化受到严格的信号网络调控, 黑素干细胞通常维持在静息状态, 仅在毛囊生长早期短暂活化^[20-21]。已有研究结果表明, 黑素干细胞的静息与分化受到 Wnt、Notch、TGF- β 、SCF/KIT、Mitf、Sox10 等多种信号的调节, 而其中的一些信号又相互间起作用, 由此形成复杂的信号网络^[20-22-23]。

3.1 Notch 信号途径 Notch 信号途径是进化中高度保守的信号转导通路, 其调控细胞增殖、分化和凋亡的功能涉及几乎所有组织和器官。Notch 受体在邻近细胞产生的配体的活化作用下, 通过一系列分子间的相互作用, 精确地调控各谱系细胞的增殖分化。Notch 信号由 2 个邻近细胞的 Notch 受体与配体相互作用而激活。Notch 信号途径对黑素母细胞及黑素干细胞的维持具有关键作用, 条件性敲除黑素细胞谱系中的 Notch 信号, 小鼠的黑素母细胞和黑素干细胞都不能维持, 出生后第二周期的毛发变白^[22,24]。

3.2 Wnt 信号转导途径 Wnt 蛋白是一类脂质修饰的分泌型糖蛋白家族, 通过细胞表面受体介导的信号途径调控一系列的细胞行为, 包括细胞分化、增殖、迁移以及基因表达等。Wnt 信号途径对维持黑素干细胞的静息/分化具有关键作用。

研究表明, Pax3 (+)/Sox10 (-)/Mitf (-) 是黑素干细胞保持静息状态所需的条件^[24]。Pax3 影响神经嵴干细胞分化和黑素细胞发育, Sox10 通过维持黑素干细胞对生长因子的应答及生成不同细胞系来调节迁移中干细胞的多能性, Sox10 和 Pax3 相互作用激活 Mitf, 然后 Mitf 促进黑素干细胞的分化。Sox10/Mitf 共同以增效形式激活 DCT, 而 Pax3 抑制 Sox10/Mitf 介导的转录激活。而且, Mitf 同 Pax3 竞争 DCT 附着位点, 在 Mitf 较高浓度时, Mitf 将置换 DNA 上的 Pax3^[23,25]。

Wnt 缺乏时, Sox10/Mitf 低表达, Pax3 通过附着于 TCF/Lef 以及召回 DNA 上共抑制物 Groucho 抑制 DCT。Wnt 存在时, Wnt 信号的传入抑制 β -Catenin 降解, 使 β -Cat 在胞质内积聚并转运至核内; β -Catenin 置换出 DNA 上的 Grg4 (Groucho-related corepressor), 破坏 Pax3 介导的抑制, 同时, Mitf 置换 DNA 上的 Pax3, Sox10/Mitf 共同作用, 激活下游基因, 导致 DCT 等转录激活, 黑素干细胞转向初始分化^[26-27]。

4 黑素干细胞异位分化与毛发变白

以前认为, 黑色素生物合成时其氧化物质可能为细胞毒素, 积累的细胞毒素导致随着年龄的增长黑素细胞逐渐退化, 毛发变白。但最近研究发现事实并非如此, 头发变白是由于黑素干细胞丧失了自我维持能力, 在巢中异位分化, 下一个毛囊周期中没有黑素细胞来源, 从而毛发变白^[20-21]。而且, 不论是因为何种因素引起的黑素干细胞异位分化, 都具有以下共同的特征: 巢中的黑素干细胞形态学特征由体积小、两极突起变为树突状、体积大, 并且产生和聚积黑色素。

Nichmura 等制备了 2 类毛发变白的小鼠模型: Bcl2 突变鼠和 Mitf 突变鼠。Bcl2 -/- 小鼠出生后第 1 周期的毛发颜色正常, 第 2 周期毛发开始变白。通过对黑素干细胞进行检测, Bcl2 -/- 小鼠出生后 8.5 d 毛囊隆突中的黑素干细胞突然完全消失, 导致第二周期毛囊不能像正常小鼠那样重建黑素细胞谱系。与 Bcl2 -/- 突变鼠不同, Mitf^{fl/fl} 突变鼠毛囊隆突中的黑素干细胞是逐渐减少的。在毛发第 3 周期的生长中期, Mitf^{fl/fl} 鼠毛囊隆突中黑素干细胞消失, 且毛囊隆突中出现异位的黑素颗粒, 说明 Mitf 突变鼠的黑素干细胞在毛囊隆突巢中不能维持, 异位分化为黑素细胞。Nichmura 同时对正常小鼠和人的黑素干细胞进行了观察, 发现随着生理性衰老, 毛囊隆突中不产黑素的黑素干细胞逐渐消失, 取而代之的是产黑素的黑色素细胞的出现, 导致在下一个毛囊周期进程中毛囊隆突巢内缺失了黑素干细胞而不能重建黑素细胞谱系, 毛发变白^[21]。

电离辐射可引起的 DNA 不可修复性损伤, 也可导致小鼠黑素干细胞不能自我更新。值得注意的是, 这种 DNA 损伤并非引起黑素干细胞衰老或死亡, 而是触发了黑素干细胞在毛囊隆突巢中分化为成熟的黑素细胞, 导致黑素干细胞缺失, 毛发不可逆地变白^[8]。

而一些信号途径的缺失, 也会引起黑素干细胞不能维持而异位分化, 从而使得毛发变白, 比如 Notch 信号缺失、TGF- β 信号缺失^[20]。缺失 TGF- β 受体的小鼠在毛囊第 2 个生长中期即可发现异位分化的黑素干细胞, 并且毛发颜色变灰/白, 说明 TGF- β 信号在维持黑素干细胞未成熟状态起到重要作用。

Tanimura 等^[28]研究发现, COL17A1 -/- 突变鼠的毛发会变灰白且数量减少。该突变鼠在生后 5 周内毛囊隆突的黑素干细胞是正常的, 12 周时黑素干细胞发生树突状的形态学改变, 5 个月时, 毛囊隆突的黑素干细胞和毛母质的黑素细胞均消失。但是 COL17A1 并不表达于黑素干细胞, 而在毛囊干细胞中表达, 且 COL17A1 -/- 突变鼠的毛囊干细胞数量减少。由此可见, 毛囊干细胞不断更新参与了黑素干细胞巢的严密调控。

5 科学意义和应用前景

5.1 黑素干细胞是研究干细胞巢微环境的理想模型 脊椎动物团体内存在 2 类干细胞系统, 一个是构成型, 如在小肠上皮中发现的干细胞, 这些干细胞经历连续的自我更新。另一类是再生型, 这些干细胞进入静止期和再生期的循环。黑素干细胞就是一个典型的再生型干细胞, 其再生循环受到毛囊周期的同步调控。与其他成体干细胞比较, 黑素干细胞的另一个重要特

征是它们不需要与子代细胞接触,这与大多数成体干细胞与其子代细胞紧密联系的方式完全不同。例如,肠道上皮细胞的干细胞总是与两侧的 2 个其他上皮细胞相接触,在这种情形下,不能排除干细胞子代自身在干细胞巢的微环境中发挥作用的可能性,从而使干细胞巢中的细胞成分更复杂。相反,黑素干细胞中,角质细胞是惟一的临近细胞成分。所以,黑素干细胞是研究干细胞巢的一个理想模型。

5.2 毛囊黑素干细胞可作为白癜风治疗的黑素细胞库 在临床治疗中,白癜风恢复时首先表现为在毛囊口产生色素点,然后逐渐向外扩大形成色素岛,最后色素岛相互融合,白斑色素恢复正常;而掌跖及黏膜等无毛囊的部位,白癜风很难恢复。这些现象说明毛囊在白癜风治疗恢复过程中起着重要作用,这种毛囊周围复色模式提示毛囊中存在黑素细胞库,是色素恢复的再生源,在表皮复色过程中移行出来参与表皮色素的重建。甲苯胺蓝复合染色显示白癜风白斑表皮无黑素细胞以及黑素干细胞,但毛囊外根鞘内黑素干细胞仍然存在,其分布和数量与正常相似;在治疗恢复区皮损中,毛囊外根鞘内黑素干细胞数量明显增多,并出现多巴阳性的有功能黑素细胞^[29]。由此可见,毛囊中静止的黑素干细胞可在治疗作用下重新活化、分裂增殖,由无功能状态转变为功能状态,成为白癜风治疗恢复时黑素细胞的来源。因此,了解和阐明如何激活毛囊中的黑素干细胞可能是治疗白癜风的关键。

参考文献:

- [1] Nishimura EK, Jordan SA, Oshima H, et al. Dominant role of the niche in melanocyte stem-cell fate determination [J]. *Nature*, 2002, 416: 854-860.
- [2] Tiede S, Kloepper JE, Bodò E, et al. Hair follicle stem cells: walking the maze [J]. *Eur J Cell Biol*, 2007, 86(7): 355-376.
- [3] Osawa M, Hasegawa K, Moriyama M, et al. Melanocyte stem cells: as an excellent model to study stem cell biology stem cells [M]. Wellington: Springer Netherlands Publisher, 2008: 129-144.
- [4] Mak SS, Moriyama M, Nishioka E, et al. Indispensable role of Bcl2 in the development of the melanocyte stem cell [J]. *Dev Biol*, 2006, 291(1): 144-153.
- [5] Nishikawa SI, Osawa M, Yonetani S, et al. Niche required for inducing quiescent stem cells [J]. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol*, 2008, 73(1): 67-71.
- [6] Buac K, Pavan WJ. Stem cells of the melanocyte lineage [J]. *Cancer Biomark*, 2007, 3(4-5): 203-209.
- [7] Osawa M, Egawa G, Mak SS, et al. Molecular characterization of melanocyte stem cells in their niche [J]. *Development*, 2005, 132(24): 5589-5599.
- [8] Inomata K, Aoto T, Binh NT, et al. Genotoxic stress abrogates renewal of melanocyte stem cells by triggering their differentiation [J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1088-1099.
- [9] Botchkareva NV, Botchkarev VA, Gilchrist BA. Fate of melanocytes during development of the hair follicle pigmentary unit [J]. *J Invest Dermatol Symp Proc*, 2003, 8(1): 76-79.
- [10] Nishimura EK. Melanocyte stem cells: a melanocyte reservoir in hair follicles for hair and skin pigmentation [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2011, 24(3): 401-410.
- [11] Kawa Y, Soma Y, Nakamura M, et al. Establishment of a kit-negative cell line of melanocyte precursors from mouse neural crest cells [J]. *Pigment Cell Res*, 2005, 18(3): 188-195.
- [12] Thomas AJ, Erickson CA. The making of a melanocyte: the specification of melanoblasts from the neural crest [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2008, 21(6): 598-610.
- [13] Motohashi T, Aoki H, Yoshimura N, et al. Induction of melanocytes from embryonic stem cells and their therapeutic potential [J]. *Pigment Cell Res*, 2006, 19(4): 284-289.
- [14] Yang R, Jiang M, Kumar SM, et al. Generation of melanocytes from induced pluripotent stem cells [J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(12): 2458-2466.
- [15] Dunn KJ, Brad YM, Ochsenbauer-Jambor C, et al. WNT1 and WNT3a promote expansion of melanocytes through distinct modes of action [J]. *Pigment Cell Res*, 2005, 18(3): 167-180.
- [16] Yonetani S, Moriyama M, Nishigori C, et al. In vitro expansion of immature melanoblasts and their ability to repopulate melanocyte stem cells in the hair follicle [J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(2): 408-420.
- [17] Nishikawa-Torikai S, Osawa M, Nishikawa S. Functional characterization of melanocyte stem cells in hair follicles [J]. *J Invest Dermatol*, 2011, 131(12): 2358-2367.
- [18] Motohashi T, Yamanaka K, Chiba K, et al. Unexpected multipotency of melanoblasts isolated from murine skin stem cells [J]. *Cell Molecular Biol*, 2009, 27(4): 888-897.
- [19] Yang K, Chen J, Jiang W, et al. Conditional immortalization establishes a repertoire of mouse melanocyte progenitors with distinct melanogenic differentiation potential [J]. *J Invest Dermatol*, 2012, 132(10): 2479-2483.
- [20] Nishimura EK, Suzuki M, Igras V, et al. Key roles for transforming growth factor beta in melanocyte stem cell maintenance [J]. *Cell Stem Cell*, 2010, 6(2): 130-140.
- [21] Nishimura EK, Granter SR, Fisher DE. Mechanisms of hair graying: incomplete melanocyte stem cell maintenance in the niche [J]. *Science*, 2005, 307(5710): 720-724.
- [22] Schouwey K, Beermann F. The notch pathway: hair graying and pigment cell homeostasis [J]. *Histol Histopathol*, 2008, 23(5): 609-619.
- [23] Steingrimsson E, Copeland NG, Jenkins NA. Melanocyte stem cell maintenance and hair graying [J]. *Cell*, 2005, 121(1): 9-12.
- [24] Osawa M, Fisher DE. Notch and melanocytes: diverse outcomes from a single signal [J]. *J Invest Dermatol*, 2008, 128(11): 2571-2574.
- [25] Nishikawa S, Osawa M. Generating quiescent stem cells [J]. *Pigment Cell Res*, 2007, 20(4): 263-270.
- [26] Sommer L. Check points of melanocyte stem cell development [J]. *Sci Stke*, 2005, 298(Pe42): 1-4.
- [27] Kubic JD, Young KP, Plummer RS, et al. Pigmentation Pax-ways: the role of Pax3 in melanogenesis, melanocyte stem cell maintenance, and disease [J]. *Pigment Cell Melanoma Res*, 2008, 21(6): 627-645.

[28] Tanimura S, Tadokoro Y, Inomata K, et al. Hair follicle stem cells provide a functional niche for melanocyte stem cells[J]. Cell Stem Cell, 2011, 8(2):177-187.

dian J Dermatol, 2009, 54(4):313-318.

(收稿日期:2013-02-23 修回日期:2013-04-22)

[29] Falabella R. Vitiligo and the melanocyte reservoir[J]. In-

• 综 述 •

移植肺保护措施的研究新进展*

龚添庆 综述, 刘 斌[△] 审校

(四川大学华西医院麻醉科, 成都 610041)

关键词: 肺移植; 无心跳供体; 热缺血时间; 器官保存液; 离体肺灌注

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.24.037

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)24-2913-03

自 1963 年 Hardy 实施第 1 例人体肺移植术以来, 肺移植技术不断改进。1983 年以后肺移植例数迅速增加, 根据国际心肺移植协会的统计, 截止至 2011 年 6 月, 全世界共完成 39 835 例成人肺移植和 3 631 例成人心肺联合移植手术, 并以每年 2 000 多例的速度增长。肺移植已成为治疗终末期肺疾病的一种有效方法。然而, 供体肺来源不足和术后早期高病死率仍阻碍着肺移植的快速发展。由缺血再灌注损伤所引起的原发性移植肺功能不全(primary graft dysfunction, PGD)主要表现为非特异性肺泡损伤、肺水肿以及低氧血症, 常在术后 72 h 内发生, 是导致术后早期死亡的主要原因。因此, 减轻缺血再灌注损伤, 降低 PGD 发生率以及增加供肺来源成为肺移植研究重点。本文将从无心跳供体的发展、器官保存液的改进、离体肺灌注技术的应用等几个方面对近年来肺移植供体肺保护措施的研究进展进行综述。

1 无心跳供体

肺移植开展的初期, 供体肺主要来源于无心跳供体(non-heart-beating donor, NHBD), 后来由于脑死亡观念的接受, 脑死亡供体即有心跳供体(heart-beating-donor, HBD)成为供肺主要来源。随着肺移植需求量日益增加, 等待移植的患者数量远超过了有限的 HBD 数量, 特别是在中国等脑死亡概念还没被广泛接受的国家。因此, 研究者们又重新燃起对 NHBD 的希望, 以期能缓解供肺短缺问题。

NHBD 被分为 4 类即 Maastricht 分类: I 类, 到院时已死亡; II 类, 心肺复苏失败后死亡; III 类, 撤退生命支持等待心脏停搏; IV 类, 脑死亡患者心脏停搏。其中, I 类和 II 类称为不受控的 NHBD, III 类和 IV 类称为受控的 NHBD。

近年来, 随着 NHBD 肺移植例数增加, 许多临床研究将 HBD 与 NHBD 肺移植进行了比较。Van 等^[1]将 35 例来源于 III 类 NHBD 的肺移植与 77 例来源于 HBD 的肺移植进行队列研究, 结果为两组术后生存率、PGD 发生率、急性排斥反应发生率比较差异无统计学意义, 且 NHBD 组支气管闭塞综合征发生率更低, FEV₁ 值更高。Erasmus 等^[2]回顾性比较了来源于 HBD 的肺移植与来源于 III 类 NHBD 的肺移植, 两组术后肺功能比较差异无统计学意义, 且术后 2 年生存率 NHBD 组更高。威斯康星大学^[3]将 1993~2009 年进行的 18 例 NHBD 肺移植与 HBD 肺移植进行队列研究, 结果为两组患者远期生存率相当。Mason 等^[4]总结了全美 20 年来完成的 36 例来源于

NHBD 肺移植, 在排除双肺移植、较低器官评分的偏倚后, 存活率仍高于同期完成的来源于 HBD 肺移植。这些研究都证明了来源于 NHBD 的肺组织能安全用于肺移植。随着大量临床研究的深入以及 NHBD 肺保存技术的发展, NHBD 有望成为供肺的主要来源。

2 热缺血时限

目前, 对热缺血时间并没有一个明确的定义。Oto 等^[5]将热缺血开始定义为: 氧饱和度小于 85%, 收缩压小于 50 mm Hg, 心跳停搏或确认死亡; 热缺血结束为: 开始通 100% 氧气, 原位表面冷却或者肺动脉灌注开始; 对于受控的 NHBD 主要是指心跳停搏到肺动脉开始灌注这段时间。Levey 等^[6]在分析 13 例临床病例后认为对于受控的 NHBD, 用收缩压低于 50 mm Hg 至开始冷灌注肺动脉来定义热缺血, 更简单、广泛且包含了热缺血的重要因素。

供体肺都会经历一段时间热缺血, 特别是来源于 NHBD 的供肺, 征得家属同意和供肺评估都会延长热缺血时间。然而肺组织代谢率较低, 肺泡内充满氧气, 细胞呼吸并不依赖于血液灌注, 而是通过气体界面直接进行气体交换来维持细胞活力, 与其他实质器官相比能耐受更长时间的热缺血, 但其具体时长各研究不尽相同。

Gamez 等^[7]进行的 5 例非受控 NHBD 肺移植术, 热缺血时间平均为 120 min, 术后早中期肺功能良好且全部存活。在马德里进行的 17 例非受控 NHBD 肺移植中, 热缺血时间平均为 118 min, 最长达到 192 min, 术后 3 个月、1 年、3 年生存率分别为 82%、69%、58%^[8]。这是目前临床报道的最长的热缺血时间。

在动物实验中, 由于选择的动物不同, 结论也各不相同。Inci 等^[9]结果为猪肺热缺血 2 h 以后, 支气管肺泡灌洗标本中蛋白质含量、表面张力、气道峰压值、肺血管阻力明显增加, 氧合指数明显降低; Wittwer 等采用逆行肺静脉灌注的方法能使热缺血耐受时间达到 5 h。有通气的兔肺可耐受 4 h 热缺血。给予通气的鼠肺在热缺血 4 h 后有超过 80% 的实质细胞存活。因此, 目前大部分研究都支持肺在通气、肝素化等条件下能耐受热缺血时间为 4 h, 但多数仍采用热缺血 2 h 以内的供肺进行移植以提高术后肺功能, 降低 PGD 发生率。

3 器官保存液

最早的器官保存是通过体外循环机自体灌注、表面冷却等

* 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30972862)。 作者简介: 龚添庆(1987~), 硕士研究生, 主要从事围术期血液与器官保护研究。

[△] 通讯作者, Tel: (028)85423035; E-mail: benbinliu@hotmail.com。