

• 论 著 • doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.33.001

# 动态灌注与静态保存对犬离体肺组织中 AQP1 表达的影响<sup>\*</sup>

孙相华<sup>1</sup>, 洪文娟<sup>2</sup>, 洪志鹏<sup>2△</sup>, 祝艳翠<sup>3</sup>, 周 菊<sup>4</sup>, 王亚丽<sup>1</sup>

(昆明医科大学第一附属医院:1. 干部医疗科;2. 胸外科;3. ICU;4. 感染疾病科,昆明 650032)

**摘要:**目的 通过比较体外循环机持续灌注、间断压力灌注、单存低温保存离体肺的水通道蛋白 1(AQP1)表达变化,探索离体肺保存的最佳保存方法。**方法** 将 30 只 Mongrel 犬分成体外循环组、压力灌注组、低温保存组,每组 10 只。在保持机械通气的条件下,完整摘取双肺。进行体外循环机灌注、间断压力灌注、单存灌注离体肺循环后低温浸泡保存,并按时间点留取标本;HE 染色法观察犬离体肺组织形态学改变,免疫组织化学法、蛋白免疫印迹法(Western blot)检测犬离体肺组织 AQP1 的表达。**结果** HE 染色发现,随着离体时间的延长,肺泡组织结构逐渐塌陷,炎性细胞及渗出物增多,肺泡间隔也逐渐增宽,肺泡腔内可见渗出物;在同一时间点,体外循环组的组织结构损伤变化比压力灌注组和低温保存组轻。在各实验组随着时间推移 AQP1 的表达量呈现下降趋势;在每个时间点上,体外循环组 AQP1 的表达量高于压力灌注组,压力灌注组又高于低温保存组。**结论** 体外循环机械灌注对离体肺的保护作用显著优于间断压力灌注和单存低温保存。

**关键词:**水通道蛋白 1;离体肺;动态灌注;静态保存

中图分类号:R655.3

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)33-4417-05

## Effect of dynamic perfusion and static preservation on expression of AQP1 in vitro dog lung tissue<sup>\*</sup>

Sun Xianghua<sup>1</sup>, Hong Wenjuan<sup>2</sup>, Hong Zhipeng<sup>2△</sup>, Zhu Yancui<sup>3</sup>, Zhou Ju<sup>4</sup>, Wang Yali<sup>1</sup>

(1. Department of Cadre Medical Treatment; 2. Department of Thoracic Surgery; 3. Intensive Care Unit;

4. Department of Infectious Disease, the First Affiliated Hospital of Kunming

Medical University, Kunming, Yunnan 650032, China)

**Abstract:** **Objective** By comparing the change of expression of AQP1 in vitro lung preserved by the continuous infusion of a heart-lung machine, continuous pressure perfusion and single low temperature, to explore the best method of vitro lung preservation. **Methods** Thirty Mongrel dogs were randomly divided into 3 groups, and both lungs were completely resected under the condition of keeping mechanical ventilation. The vitro lungs were preserved by the way of the continuous infusion of a heart-lung machine, continuous pressure perfusion and single low temperature, and collecting specimens according to the time point. HE staining was used to observe the morphological changes of vitro lung tissue. Immunohistochemistry and Western blot were used to detect the expression of AQP1 in vitro lung. **Results** HE staining found that as the time went by alveolar structure gradually collapsed, inflammatory cells increased, alveolar interval also gradually broadened and exudation could be seen in the alveolar cavity; at the same time point, organization structure of extracorporeal circulation group changed lighter than pressure perfusion group and low-temperature preservation group. In each experimental group, the expression of AQP1 showed a trend of decline; at each time point, the expression of AQP1 in extracorporeal circulation group was higher than pressure perfusion group, and pressure infusion group was higher than that of low-temperature preservation group. **Conclusion** The protective effect of the continuous infusion of a heart-lung machine on vitro lung was better than continuous pressure perfusion and single low temperature.

**Key words:** aquaporin 1; vitro lung; dynamic perfusion; static preservation

肺移植是治疗晚期肺实质及肺血管疾病的惟一有效方法,随着外科技术、术后处理、免疫抑制剂的快速发展,肺移植患者存活率有了明显提高<sup>[1]</sup>。然而仍有 15%~20% 的肺移植患者在术后早期出现严重的移植肺功能障碍,其主要原因为离体肺保存方式欠佳以及缺血再灌注损伤<sup>[2-3]</sup>。供肺保存的质量对肺移植的成功与否起着决定作用,不同的保存方式对离体肺组织的结构和功能有着重要的影响。单存肺动脉灌注后低温保存法是目前应用最广泛的保存方式,该保存方式简单、易操作,但不符合肺循环的生理条件,易导致肺循环栓塞,影响供肺的保存质量和保存时间。随着肺移植技术的发展,对供肺保存的质

量和时间要求也越来越高。本研究通过比较体外循环机持续灌注、间断压力灌注、单存低温保存离体肺的水通道蛋白 1(AQP1)表达变化,探讨离体肺的损伤机制,阐明模拟肺循环和心脏机械灌注的优越性,为保证安全、有效、较长时间的离体肺保存创造了有利条件。

### 1 材料与方法

**1.1 材料** 选取健康成年 Mongrel 犬 30 只,犬龄 2~3 年,雌雄不限,体质量 15~18 kg(购自昆明医科大学动物实验中心)。实验前禁食 12 h,禁饮 6 h。分成 3 组:体外循环机动态灌注组(体外循环组)、间断压力灌注组(压力灌注组)和静态的单存肺

<sup>\*</sup> 基金项目:国家自然科学基金资助项目(81060010)。 作者简介:孙相华(1978—),住院医师,在读博士,主要从事胸外科疾病研究。 △

通讯作者, Tel:13808757261; E-mail: hzp\_doc@sina. cn。

动脉灌注后低温保存组(低温保存组),每组 10 只。

1.2 方法

1.2.1 仪器与试剂 手术相关器械、PHILIPS 有创动脉压监测仪、TKR-200C 小型动物呼吸机、体外循环机、离体肺保存液、AQP1 抗体等。

1.2.2 肺组织标本摘取 3%戊巴比妥钠犬前肢静脉注射,出现睫毛反射消失,肌力下降时立即进行四肢固定、气管插管、脱毛处理(取仰卧位,前胸脱毛);游离股动、静脉并插管,正中开胸,心包内游离上、下腔静脉和主动脉,全身肝素化(500 IU/kg),肺动脉接有创动脉监测仪,监测及记录实时肺动脉压,升主动脉插心脏麻痹液灌注管,肺动脉干插入肺灌注导管,依次阻断上、下腔静脉和升主动脉。灌洗心脏麻痹液,切断下腔静脉,排出心脏麻痹液。心脏停跳后,开始肺灌注,切除左心耳尖端,排出灌洗液,收集保存。在保持正常机械通气的条件下,完整摘取双肺。心脏停搏前同时从股动脉回收血液,采血瓶预存。摘取双肺后称取湿肺质量,经气管向肺内按潮气量 10 mL·kg<sup>-1</sup>·min<sup>-1</sup>进行通气,维持呼吸,FiO<sub>2</sub> 21%,进行持续体外循环机灌注、间断压力灌注、单存灌注离体肺循环后低温浸泡保存直至实验结束。

肺保存液成分:Na<sup>+</sup> 138.0 mmol/L,K<sup>+</sup> 6.0 mmol/L,Cl<sup>-</sup> 142.0 mmol/L,Mg<sup>2+</sup> 0.8 mmol/L,SO<sub>4</sub><sup>2-</sup> 0.8 mmol/L,PO<sub>4</sub><sup>3-</sup> 0.8 mmol/L,Ca<sup>2+</sup> 0.3 mmol/L,HCO<sub>3</sub><sup>-</sup> 1.0 mmol/L,右旋糖酐 40.0 g/L,葡萄糖 0.9 g/L。

离体肺组织标本留取方法:离体肺保存 0、60、120、180、240、300、360、420、480 min 取材;组织标本约 1.5 cm×1.0 cm×0.5 cm 备用,每次取材后缝合创面,防止漏气。

1.2.3 HE 染色法观察犬离体肺组织形态学改变 肺组织采用 10%甲醛溶液固定,95%乙醇常规浓度梯度脱水,二甲苯透明 2 次,石蜡包埋,常规制备 5 μm 切片,HE 染色。

1.2.4 免疫组织化学法检测犬离体肺组织 AQP1 的表达 石蜡切片脱蜡和水化后,用磷酸盐缓冲液(PBS,pH 7.4)冲洗 3 次,对组织抗原进行相应的修复。每张切片加 1 滴 3%过氧化氢,室温下孵育,PBS 冲洗,加一抗,室温下孵育 60 min,PBS 冲洗,加二抗,室温下孵育 10 min,PBS 冲洗加新鲜配制的二氨基联苯胺(DAB)溶液,显微镜下观察 3~5 min,自来水冲洗,苏木素复染,分化,自来水冲洗,PBS 返蓝,切片经梯度乙醇脱水干燥,中性树胶封固。结果半定量的判定方法:在每个时间点抽取染色清楚的切片,每张切片于光镜下(×400)随机抽取

5 个视野,固定窗口面积,计数 AQP1,根据 AQP1 着色深度及阳性细胞数分别记分为 0~3 分,着色深度以多数 AQP1 呈色程度为准。如果肺泡周围出现明显黄色或棕黄色及棕褐色颗粒为阳性染色,不着色的为 0 分,呈黄色时为 1 分,棕黄色为 2 分,棕褐色为 3 分。整块切片中阳性染色占所有细胞中的比例小于或者等于 5%为 0 分,5%~25%为 1 分,26%~50%为 2 分,51%~75%为 3 分,大于 75%为 4 分。根据上述两项指标的积分相乘进行半定量分析。

1.2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测犬离体肺组织 AQP1 的表达 组织蛋白抽提,配制 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶,4%浓缩胶,取蛋白质样品上样电泳,采用硝酸纤维素膜湿转,AQP1 多克隆抗体和羊抗鼠 IgG 二抗稀释比例分别为 1:500 与 1:2 000,将 ECL 显色试剂滴加到膜上,曝光显影保存。采用相关分析软件分析,以每条蛋白电泳带与 β-actin 的灰度值比值表示 AQP1 蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理 采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用 *t* 检验,以 *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 犬离体肺组织病理改变 通过观察病理 HE 染色切片,发现体外循环组肺泡组织结构比压力灌注组及低温保存组完整,炎性细胞及渗出液少,肺泡间隔也小。组内对比可见,随着离体时间的延长,肺泡组织结构逐渐塌陷,炎性细胞及渗出物增多,肺泡间隔也逐渐增宽,肺泡腔内可见渗出物。综合比较,在同一时间点,体外循环组的组织结构损伤变化比压力灌注组和低温保存组轻。

2.2 免疫组织化学法检测结果 随着时间推移,各实验组 AQP1 的表达量呈现下降趋势;在每个时间点上,体外循环组 AQP1 的表达量高于压力灌注组,压力灌注组又高于低温保存组。体外循环组 3~8 h 各时间点两两比较,差异均有统计学意义(*P* < 0.05);在 1~2 h 各时间点,各组间两两比较,差异均无统计学意义(*P* > 0.05);在 3~8 h 各时间点,各组间两两比较,差异均有统计学意义(*P* < 0.05);低温保存组 3~8 h 各时间点两两比较,差异均有统计学意义(*P* < 0.05);压力灌注组 3~8 h 各时间点两两比较,差异均有统计学意义(*P* < 0.05);见图 1~3,表 1。

表 1 免疫组织化学检测离体犬肺组织 AQP1 的表达结果( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 0 h        | 1 h        | 2 h       | 3 h       | 4 h       | 5 h       | 6 h       | 7 h       | 8 h       |
|-------|------------|------------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 体外循环组 | 10.40±0.63 | 10.00±0.73 | 9.70±0.66 | 8.20±0.99 | 7.60±1.57 | 6.60±1.17 | 5.70±1.49 | 4.70±0.95 | 3.80±0.82 |
| 压力灌注组 | 10.40±0.63 | 10.10±0.74 | 9.80±0.82 | 7.50±1.47 | 6.50±1.26 | 5.40±1.51 | 4.30±1.31 | 3.10±0.74 | 2.10±0.71 |
| 低温保存组 | 10.40±0.63 | 10.10±1.03 | 9.60±0.67 | 7.00±1.24 | 5.70±1.72 | 4.10±0.99 | 3.40±0.84 | 2.40±0.70 | 1.20±0.42 |

表 2 Western blot 检测离体犬肺组织 AQP1 的表达结果( $\bar{x} \pm s$ )

| 组别    | 0 h       | 1 h       | 2 h       | 3 h       | 4 h       | 5 h       | 6 h       | 7 h       | 8 h       |
|-------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|-----------|
| 低温保存组 | 1.11±0.06 | 1.07±0.04 | 1.06±0.03 | 1.06±0.04 | 0.95±0.05 | 0.87±0.05 | 0.80±0.09 | 0.72±0.05 | 0.63±0.04 |
| 压力灌注组 | 1.11±0.06 | 1.16±0.04 | 1.10±0.05 | 1.08±0.04 | 1.02±0.05 | 0.93±0.04 | 0.90±0.05 | 0.84±0.07 | 0.73±0.06 |
| 体外循环组 | 1.11±0.06 | 1.12±0.07 | 1.11±0.05 | 1.10±0.05 | 1.06±0.04 | 0.99±0.05 | 0.94±0.04 | 0.89±0.04 | 0.86±0.07 |

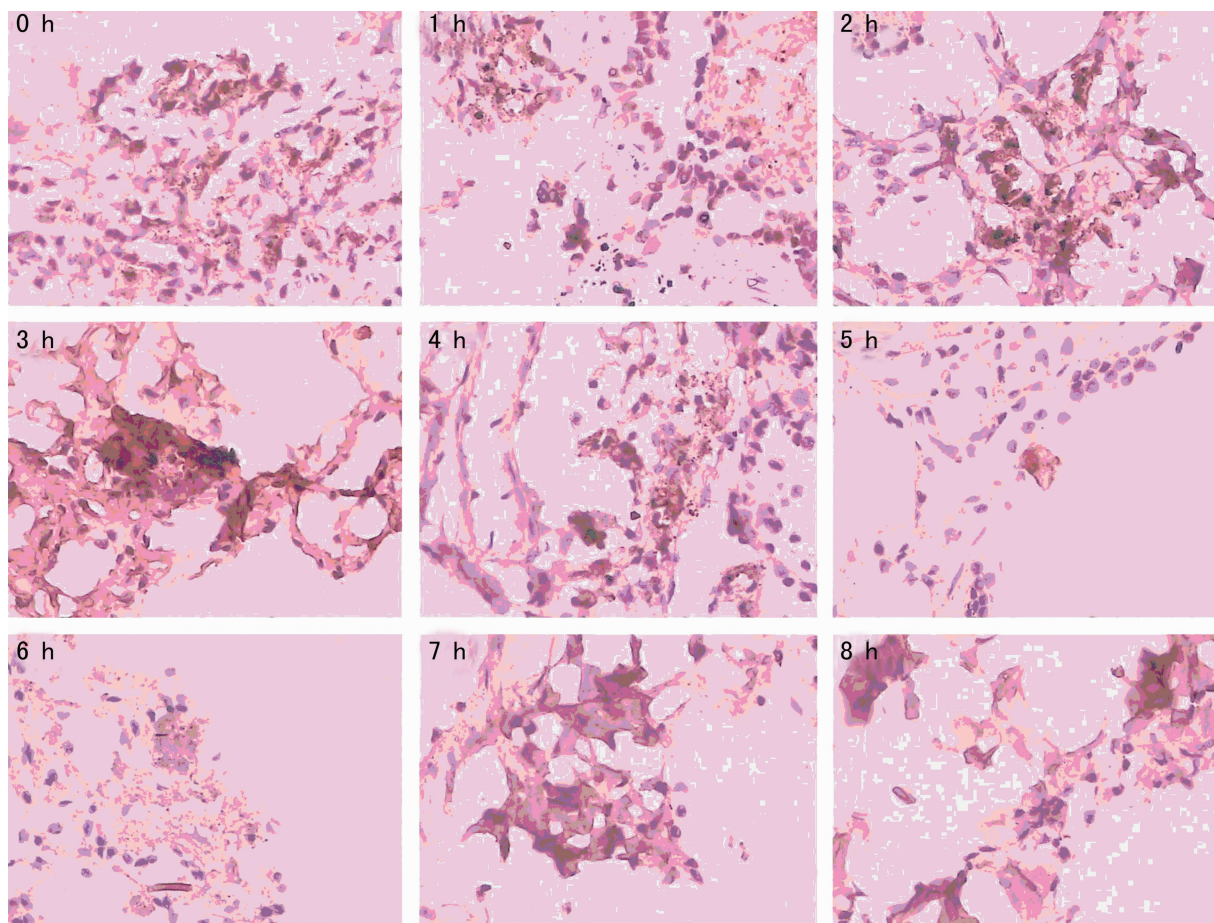


图 1 低温保存组离体犬肺组织 AQP1 免疫组织化学染色( $\times 400$ )

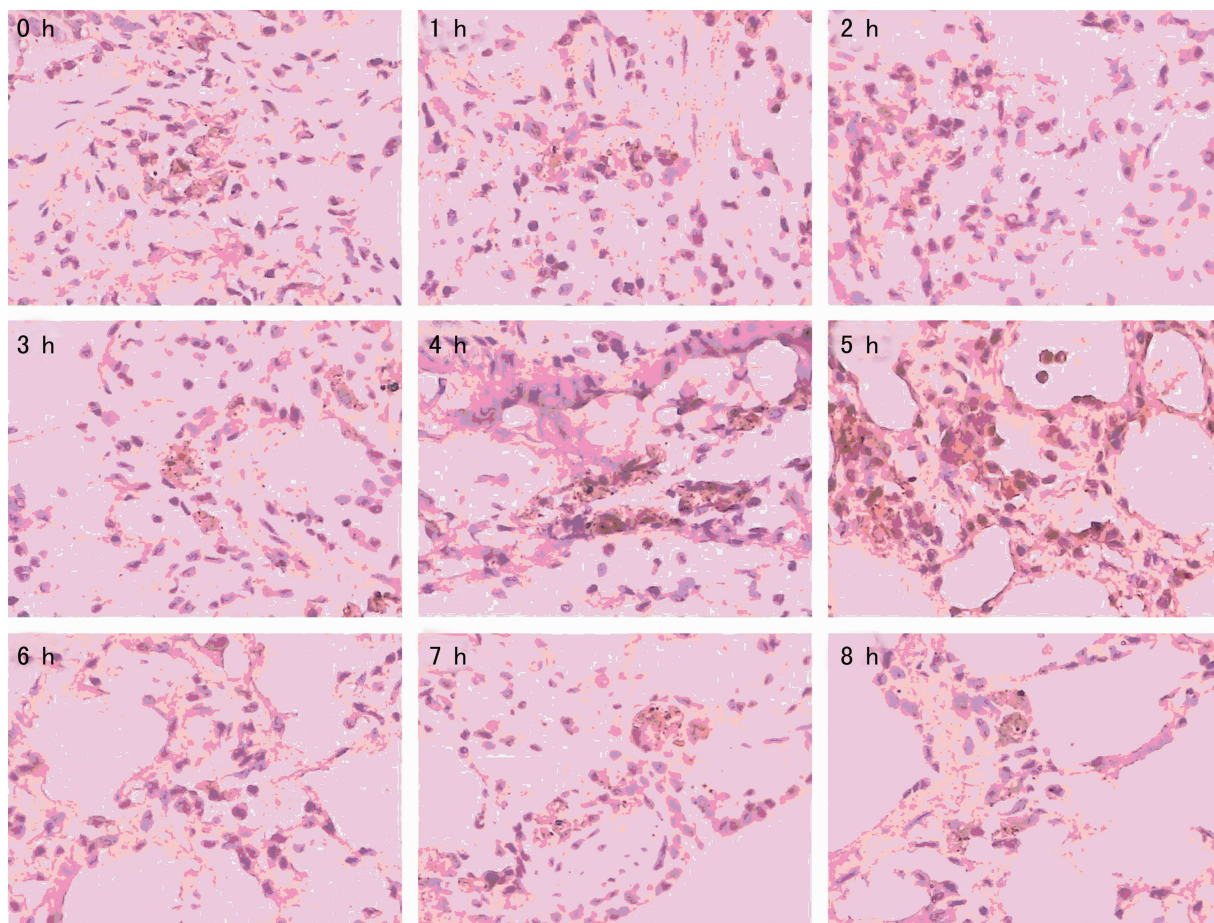


图 2 压力灌注组离体犬肺组织 AQP1 免疫组织化学染色( $\times 400$ )



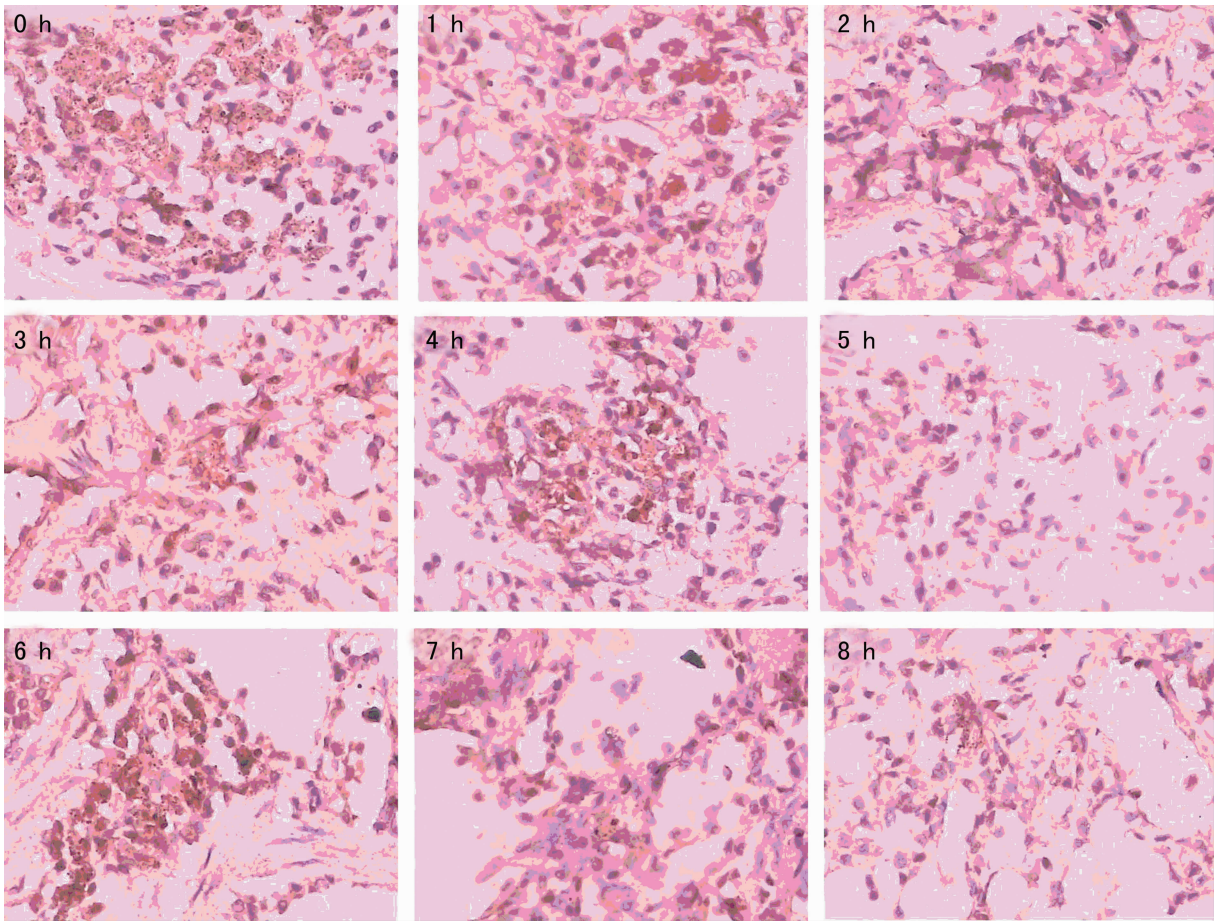


图 3 体外循环组离体犬肺组织 AQP1 免疫组织化学染色(×400)

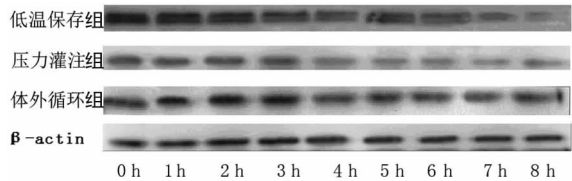
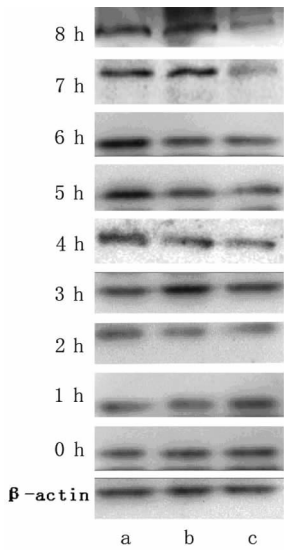


图 4 各组不同时间点离体肺组织 AQP1 的表达结果



a:体外循环组;b:压力灌注组;c:低温保存组。

图 5 各时间点下各组离体肺组织 AQP1 的表达结果

2.3 Western blot 检测结果 各种保存方式下,随着保存时

间的延长,条带灰度变浅,提示 AQP1 在离体肺组织中的表达随着时间的延长呈逐渐减少的趋势(图 4)。各时间点下,0~3 h 的各条带灰度基本均匀一致,但在 4~8 h 条带灰度逐渐变浅(图 5)。各实验组内 0~3 h 两两比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ );低温保存组内 4~8 h 在组内各时间点(除 5 h 与 6 h 外)两两比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );压力灌注组 4~8 h 在组内各时间点(除 3 h 与 4 h、5 h 与 6 h 外)两两比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );体外循环组 4~8 h 在组内各时间点两两比较,差异均有统计学意义( $P<0.05$ );在 1~3 h 各时间点,各组间两两比较,差异均无统计学意义( $P>0.05$ );在 4~8 h 各时间点,各组间两两比较(除 4 h 和 6 h 压力灌注组与体外循环组外),差异均有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 2。

3 讨 论

目前国际公认的离体肺保存时间最好在 4 h 以内,超过 4 h,发生移植肺功能障碍的概率明显增加<sup>[4]</sup>。最常用的保存方式为肺循环灌注后的单存低温保存,既往研究表明,离体肺保存过程中最容易出现细胞损伤,它是一个非常复杂的过程,主要包括炎性细胞因子的产生<sup>[5]</sup>、氧自由基的释放<sup>[6]</sup>、微小血管的损伤及其通透性的增加<sup>[7]</sup>。

水的跨膜转运对维持细胞正常代谢具重要作用。水通道蛋白是一组介导水的跨膜转运的通道蛋白,在肺内,其位于肺泡毛细血管内皮的血液侧,主要负责转运肺间质内的水分<sup>[8]</sup>。AQP1 不仅对各级支气管及肺组织内生理和病理状态下水的吸收和转运有重要调节作用,同时也协同钠通道和  $\text{Na}^+-\text{K}^+$ -

ATP 酶对胸腔内液体进行转运。在肺泡上皮细胞、气管支气管纤毛细胞质膜的顶端及浆液细胞、黏液细胞的基侧部存在的 AQP1 可能与肺水肿消除有关<sup>[9]</sup>。有研究表明,敲除 AQP1 后肺泡毛细血管水的通透性呈显著下降趋势,表明其具有转运或协同水转运的能力<sup>[10-11]</sup>。

本研究中,通过比较体外循环机持续灌注、间断压力灌注、单存低温保存这 3 种离体肺保存方式下,肺组织 AQP1 表达的变化来研究离体肺保存的最佳方法。本研究结果表明,在每种保存方式下,AQP1 在离体肺组织中的表达随着时间的延长呈逐渐降低的趋势,说明随着离体肺保存时间的延长,缺血缺氧等各种因素的影响,导致肺组织水肿越来越重。脱离机体后,肺组织仍然进行着有氧代谢,虽然低温可以有效限制有氧代谢的进程,但随着时间的延长,离体肺的缺血性损伤不可避免,主要表现在肺泡间质水肿,肺泡间隔增宽,影响了离体肺保存的质量,加重了肺移植后再灌注损伤<sup>[12]</sup>。既往研究证实,随缺血缺氧时间延长,肺血管内皮细胞结构损伤越重,血管的通透性增大,合成和释放多种细胞生长因子,导致水分及细胞毒性成分进入肺泡间质,使得呼吸膜厚度增加,水通透性明显降低<sup>[13]</sup>。

同时在 3 种保存方式间比较研究发现,体外循环灌注组离体肺组织中 AQP1 的表达明显高于压力灌注组,压力灌注组又高于低温保存组,表明体外循环机械灌注对离体肺的保护作用明显优于间断压力灌注和单存低温保存。体外循环灌注肺动脉恢复了肺循环,使保存液在肺内更加均匀分布,能更好地清除微小血管内红细胞和血栓,并且可有效除去氧自由基、激活的炎性介质和补体等细胞毒性成分,改善细胞有氧代谢,减轻肺表面活性物质的损伤,保护上皮细胞的功能,减轻离体肺缺血性损伤。体外循环灌注克服了肺微循环栓塞、肺冷却不均匀、灌洗液分布不均匀、灌注压不易控制、灌洗温度难以调节、灌注量或多或少、容易受到人主观因素的影响等低温保存不能解决的困难。

综上所述,本研究中离体肺在通气过程中以体外循环机械灌注肺循环,模拟了肺循环和心脏灌注的特点,确保恒温、灌注标准化、灌注充分均匀,更接近于肺循环的生理状态,从而有效地延长了肺保存的时限,为安全、有效、较长时间的离体肺保存创造了有利条件,为肺移植提供更好的肺源,也为肺保存方法提供了更好的研究方向。

#### 参考文献:

- [1] Liu CC, Hsu PK, Huang WC, et al. Two-layer method (UW solution/perfluorochemical plus O<sub>2</sub>) for lung preservation in rat lung transplantation[J]. Transplant Proc, 2007,39(10):3019-3023.
- [2] Chen F, Fujinaga T, Shoji T, et al. Outcomes and pulmo-

nary function in living lobar lung transplant donors[J]. Transpl Int, 2012,25(2):153-157.

- [3] Lehmann S, Barten MJ, Topf C, et al. Donor type impact on ischemia-reperfusion after lung transplantation[J]. Ann Thorac Surg, 2012,93(3):913-920.
- [4] Fischer S, Hopkinson D, Liu M, et al. Raffinose improves 24-hour lung preservation in low potassium dextran glucose solution; a histologic and ultrastructural analysis[J]. Ann Thorac Surg, 2001,71(4):1140-1145.
- [5] Fehrenbach H, Schepelmann D, Albes JM, et al. Pulmonary ischemia/reperfusion injury: a quantitative study of structure and function in isolated heart-lungs of the rat[J]. Anat Rec, 1999,255(1):84-89.
- [6] Moore TM, Khimenko PL, Taylor AE. Restoration of normal pH triggers ischemia-reperfusion injury in lung by Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> exchange activation[J]. Am J Physiol, 1995,269(4Pt2):1501-1505.
- [7] Pizanis N, Gillner S, Kamler M, et al. Cold-induced injury to lung epithelial cells can be inhibited by iron chelators - implications for lung preservation[J]. Eur J Cardiothorac Surg, 2011,40(4):948-955.
- [8] Jin Y, Yu G, Peng P, et al. Down-regulated expression of AQP5 on lung in rat DIC model induced by LPS and its effect on the development of pulmonary edema[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2013,26(5):661-665.
- [9] Verkman AS, Matthay MA, Song Y. Aquaporin water channels and lung physiology[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2000,278(5):867-879.
- [10] Verkman AS. Role of aquaporins in lung liquid physiology[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2007,159(3):324-330.
- [11] Li J, Xu M, Fan Q, et al. Tanshinone II A ameliorates seawater exposure-induced lung injury by inhibiting aquaporins (AQP) 1 and AQP5 expression in lung[J]. Respir Physiol Neurobiol, 2011,176(1/2):39-49.
- [12] Leggett K, Maylor J, Undem C, et al. Hypoxia-induced migration in pulmonary arterial smooth muscle cells requires calcium-dependent upregulation of aquaporin 1[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2012,303(4):343-353.
- [13] 陆德琴, 陈莹, 李涛, 等. 大鼠整体低氧预处理对在体肺缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 重庆医学, 2010,39(15):1960-1962.

(收稿日期:2014-07-08 修回日期:2014-08-12)

## 《重庆医学》开通微信公众平台

《重庆医学》已开通微信公众平台(微信号:ChongqingMedicine),《重庆医学》将以微信平台渠道向广大读者发送终审会动态报道、各期杂志目录、主编推荐文章、学术会议、《重庆医学》最新资讯等消息。欢迎广大读者免费订阅。读者可以点击手机微信右上角的“+”,在“添加朋友”中输入微信号“ChongqingMedicine”,或在“添加朋友”中的“查找公众号”一栏输入“重庆医学”,添加关注。