

器官移植前保存的理论研究与临床应用*

侯萍, 李剑平

Clinical application and theoretical study of organ preservation before transplantation

Hou Ping, Li Jian-ping

Abstract

BACKGROUND: Organ activity before organ transplantation is the key of functional recovery and is also a difficult medical problem of organ preservation.

OBJECTIVE: To review the organ preservation methods, preservation solution and current preservation situation at home and abroad in order to find the best preservation methods and preservation solution for providing the theory basis of organ preservation.

METHODS: Wanfang, VIP and PubMed databases were retrieved for articles related to the organ preservation before transplantation published from January 1998 to September 2011. Key words were "organ; transplantation; preservation" in Chinese and English. Articles which published recently or in the authoritative magazines were preferred in the same field. A total of 186 articles were obtained, and 20 articles were involved for summarization according to inclusion criteria.

RESULTS AND CONCLUSION: To understand the methods of organ preservation is beneficial for selecting appropriate preservation methods according to the current research situation. Organ preservation solution is the key to keep organ activity. Extant preservation solution is sufficient, so the effect of different preservation solutions on different organ preservations is different. To select the proper preservation solution is to achieve the best effect of transplanted organ preservation and to restore the best organ function after transplantation. To study the methods of organ preservation before transplantation, preservation solution and understand the different organs with the appropriate preservation method and preservation solution is beneficial for the further medical development of organ preservation.

Hou P, Li JP. Clinical application and theoretical study of organ preservation before transplantation. Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu. 2012;16(5): 895-898. [http://www.crter.cn http://en.zglckf.com]

摘要

背景: 器官移植前的活性是器官移植后功能恢复的关键,也是器官保存医学的难题之一。

目的: 综述了器官的保存方法、保存液以及各个器官国内外的保存现状,以便寻找不同器官的最佳保存方法和保存液,为器官保存提供理论依据。

方法: 应用计算机检索万方、维普数据库和 PubMed 数据库中 1998-01/2011-09 关于器官移植前保存的文章,在标题和摘要中以“器官;移植;保存”或“organ; transplant; preservation”为检索词进行检索。选择文章内容与器官移植前保存相关,同一领域文献则选择近期发表或发表在权威杂志文章。初检得到 186 篇文献,根据纳入标准选择 20 篇文章进行综述。

结果与结论: 对器官保存方法的了解,有利于根据研究现状选择合适的保存方法。器官保存液是器官活性保持的关键,现存保存液较多,不同保存液对不同的器官保存效果具有一定的差异,通过选择合适的保存液使需要移植的器官保存效果达到最佳,从而使移植后的器官功能恢复的最好。通过对器官移植前保存方法和保存液的研究,了解不同器官的合适的保存方法和保存液将有利于器官保存医学的进一步发展。

关键词: 保存液;器官;移植;保存;保存方法

doi:10.3969/j.issn.1673-8225.2012.05.031

侯萍, 李剑平. 器官移植前保存的理论研究与临床应用[J]. 中国组织工程研究, 2012, 16(5): 895-898. [http://www.crter.org http://cn.zglckf.com]

0 引言

器官移植是 20 世纪人类医学科学的重大进展,是治疗终末期器官衰竭唯一有效的根治手段。而器官保存是器官移植的三大支柱之一。器官保存的目的是最大限度减少缺血对离体器官造成的损伤,使器官保存一定的活力,以便使移植器官术后迅速恢复功能。器官移植虽然已经应用于临床,但其长期疗效还有待进一步考证,目前,国际上许多国家将组织器官库设立在本国的血液中心,因此本文主要从器官的保存方法、保

存液和保存现状等新进展作一综述。

1 资料和方法

1.1 资料来源 由第一作者在 2011-09 进行检索。检索数据库: PubMed 数据库,网址 <http://www.ncbi.nlm.gov/PubMed>; 万方数据库,网址 <http://www.wanfangdata.com.cn>; 维普数据库,网址 <http://www.vmis.net.cn/yixue/index.asp>。英文资料的检索时间范围为 1998-01/2011-09; 中文资料的检索时间范围为 1998-01/2011-09。英文检索词为“organ;

Institute of Transfusion Medicine, Liaoning Blood Center, Shenyang 110044, Liaoning Province, China

Hou Ping★, Master, Attending physician, Institute of Transfusion Medicine, Liaoning Blood Center, Shenyang 110044, Liaoning Province, china
houping77@163.com

Correspondence to: Li Jian-ping, Doctor, Chief physician, Institute of Transfusion Medicine, Liaoning Blood Center, Shenyang 110044, Liaoning Province, china
lj_p63@yahoo.com

Received: 2011-09-08
Accepted: 2011-11-15

辽宁省血液中心输血医学研究所,辽宁省沈阳市 110044

侯萍★,女,1977 年生,辽宁省沈阳市人,汉族,2005 年中国医科大学毕业,硕士,主治医师,主要从事干细胞相关方面的研究。
houping77@163.com

通讯作者:李剑平,博士,主任医师,辽宁省血液中心输血医学研究所,辽宁省沈阳市 110044
lj_p63@yahoo.com

中图分类号:R617
文献标识码:B
文章编号:1673-8225 (2012)05-00895-04

收稿日期:2011-09-08
修回日期:2011-11-15
(20110908018D·G)

transplant; preservation”; 中文检索词为“器官; 移植; 保存”。

1.2 入选标准

纳入标准: ①器官移植的研究。②器官保存方法的研究。③器官保存溶液的研究。

排除标准: ①与此文目的无关。②较陈旧的文献。③重复同类研究。

1.3 质量评估 基础研究和动物实验研究原著 154 篇, 综述 52 篇, 述评 2 篇, 临床研究 15 篇。

2 结果

2.1 纳入文献基本情况 初检得到 186 篇文献, 中文 105 篇, 英文 81 篇。阅读标题和摘要进行初筛, 排除因研究目的与此文无关 112 篇, 内容重复性的研究 54 篇, 共保存 20 篇中英文文献做进一步分析。文献[1-4]总结了器官保存液的研究现状, 文献[5-14]分析了器官短期保存现状, 文献[16-20]综述了器官的长期保存现状。

2.2 结果描述

2.2.1 器官保存法 器官保存法包括低温保存和灌注保存。在保存液中浸润状态下保存, 称为低温保存。一般情况下, 器官温度下降至 0~10 °C 时, 器官代谢率减至正常到 5%~10%, 故低温保存可抑制器官损伤。但是, 低温保存使器官由于缺血、缺氧导致细胞水肿, 组织糖酵解, 乳酸增多, 其产生的代谢产物不能排出, 蓄积于微环境中。另外, 随着供体器官选择标准的放宽, 低温保存法的保存极限也不断受到挑战, 器官保存时间仍以小时计算。近来灌注保存尤其是机器灌注保存越来越受到重视, 同单纯低温保存相比, 该法主要优点是能持续给脏器细胞提供维持其基本功能的底物, 所以使用机器灌注能更长时间的保存器官。另外灌注保存也在低温条件下进行。

2.2.2 器官保存液

UW 液: UW 液是由 Wisconsin 大学开发, 临床应用近 20 年, 能够有效保存肝脏、胰腺、肾脏 48 h, 是器官保存液的“金标准”。但有人证实仍有 10%~15% 的肝脏和 20%~30% 的肾脏在 UW 液灌注保存后发生移植物功能不全, 而且其对心、肺的保存效果仍无法令人满意。

IGL 液: IGL 保存液是法国 Georges Lopez 研究所研制的细胞外型多器官保存液。目前已用于肾脏保存。作为一种多器官保存液, 肝和胰腺保存效果与 UW 液接近, 肾脏保存效果优于 UW 液。

HTK 液: HTK 液是低钾、低钠、非体液性保存液, 最初作为一种心脏保存液应用于临床。HTK 液肝脏保存效果与 UW 液相当。另外有实验结果表明^[1], 当低温缺血时间(CIT)超过 24h 时, UW 液尸肾保存效果好于 HTK 液, 但在有心跳的供者肾脏保存效果, 两者没有差别。

由于临床上 CIT 多短于 24 h, 且 HTK 液灌注性好, 因此, 可以认为在肝、肾移植中 HTK 液与 UW 液等效。Fridell 等^[2]比较了 HTK 液和 UW 液在胰腺移植中的应用, 结果发现 CIT 在 24 h 内, HTK 液和 UW 液对胰腺保存效果相当, 而 CIT 在 24 h 外还需进一步研究。

Celsior 液(CS 液): CS 液结合了 UW 液和 HTK 液的优点, CS 液主要用于供心的保存。李涛等^[3]证实无心跳供者供肝经 CS 液灌注和保存, 可减少供肝的损伤, 因此认为 CS 液对热缺血 10 min 并冷保存 8 h 的大鼠供肝较 UW 液保存效果更好, 这可能与减少枯否细胞的激活有关。在肾移植中, Celsior 液适合保存供者年龄大、保存时间长的肾脏。在肝移植中, 它与 UW 液保存效果相当, 但由于价格低廉, Celsior 更适合肝脏的保存。有人研究了 Celsior 液和 UW 液在胰腺移植的保存效果, 证实当 CIT 在 12 h 内, 它们对胰腺的保存效果相当^[4]。

其他保存液: SMO 液即上海多器官保存液, 是中国研制的多器官保存液, 通过离体实验证实保存肝脏和肾脏效果优于 HTK 液, 与 UW 液相似。EC 液是高钾低钠型细胞内液型溶液, 曾被推荐作为临床肾脏移植的标准保存液, 在欧洲广泛使用。HC-A 液是高渗枸橼酸盐腺嘌呤液, 目前是中国器官移植的主要灌洗和低温保存液。

2.2.3 器官短期保存现状

心脏保存现状: 目前, 低温保存、冷保存液灌注是供体心脏保存最常用的方法。该法将 4 °C 的灌洗液以一定高度借助重力或压力快速灌入冠状动脉系统内, 使该器官的温度迅速而均匀的下降到 10 °C 以下, 然后浸入 0~4 °C 保存液中, 直到移植, 灌洗液与保存液可以相同也可不同。该方法适于短期保存心脏, 临床安全时限 4~6 h, 现在绝大多数临床医院采用此法。低温高压氧保存法是在低温保存基础上, 加用高压氧环境, 此法只在 20 世纪七八十年代有研究, 近期没有相关报道。而连续灌注保存法是将灌注液泵入冠脉系统, 供应代谢物和清除代谢废物^[5], 虽然研究证实该法优于低温保存, 但鉴于操作复杂, 影响因素较多, 还没有广泛应用临床。TransMedics 公司研制出一种常温器官保存装置, 可根据需要向血液内添加药品, 使供体心脏在运输途中不断跳动, 体外存活时间长达 12 h。目前该系统在欧洲和美国已经进入临床试验阶段并取得了良好的临床效果, 有望称为心脏保存的主要方法。但该技术研究较少, 技术也尚未统一, 缺乏远期研究资料^[6]。

目前心脏保存液有很多种, 如 Celsior 液、LYPS 液、STH-1 液、STH-2 液、UW 液、HTK 液等。二氮嗪强化 Celsior 强化的 Celsior 液可将冷保存鼠供心延长至 10 h 仍安全有效, 这为远距离获取供心提供了有力的保证^[6]。但这仅限于实验研究, 临床应用还需进一步证实。

肝脏保存现状: 低温缺血保存是目前国内普遍使用且效果良好的肝脏保存方法。通过降低缺血组织的温度抑制移植物新陈代谢, 可以有效提高存活能力。其方法为: 移植肝在离体状态下, 将冷灌注液(0~4℃)从 80~100 cm 的高度经门静脉及肝动脉灌入供肝, 使供肝迅速又均匀的降温到 10℃以下, 然后将供肝充分浸泡在 1~4℃冷保存液中直到移植。

对肝的保存几乎都采用 UW 液。保存的时间可达 24 h, 移植后原发性无功能的概率因保存时间的延长而增加, 故应尽可能缩短至 12 h 以内。为了延长供肝保存时间, 提高供肝保存质量, 人们开始研制新型保存液和保存技术, 阿姆斯特丹大学开发了 Polysol 液, 用于常温机器灌注和低温保存, 该液富含氨基酸和抗氧化剂, 理论上具有广阔的应用前景, 但目前仍需实验和临床证明其保存效果^[9-10]。法国开发的 IGL-1 液, 虽然在猪的肝移植中取得了令人满意的效果, 但目前仍处于试验阶段^[11]。为了进一步提高器官的活力, 许多研究机构重提低温机器灌注的可能性, 低温机器灌注模拟动脉搏动进行循环灌注, 可随时向灌注液中加入各种所需的药物, 因此移植物功能延迟发生率显著降低。Vekemans 等^[12]进行的动物供肝低温机器灌注的研究表明, 经低温机器灌注保存的肝脏含有更多的 ATP, 肝脏损伤较低温保存显著减轻。Guarrera 等^[13]运用低温机器灌注技术进行为数不多的人肝移植的临床工作。虽然低温机器灌注还有很多需要改进的方面, 如庞大的设备, 灌注过程需要连续监测及复杂的, 但随着低温机器灌注系统的不断改进, 也许不久以后低温机器灌注系统会用于临床肝脏的保存。

肺脏保存现状: 肺保存的方法目前临床应用最广的是单存肺动脉灌注和低温浸泡相结合。肺灌注和保存的最佳温度现在仍然不很清楚, 有学者认为临床肺保存温度最好在 4~8℃, 而在此温度下肺的保存时间也仅限于 4~6 h。但临床上大多数移植中心仍采用 4℃进行灌注和保存。常用的灌注液有 Euro-Collins 液(EC 液)、UW 液和低钾右旋液, 由于高钾灌注液可引起血管收缩, 导致灌注压升高和灌注不均, 加重了缺血再灌注损伤, 因此目前多使用低钾右旋糖苷液灌注, 其在肺血管内有较好的分布, 逆行灌注和顺行灌注结合能更好的保护供体肺, 灌注液中加入氧自由基清除剂减轻了再灌注损伤。前列腺素 E 已被临床证实能扩肺血管、抗血小板聚集和白细胞黏附^[14]。近年研究较多的为低分子右旋糖酐液, 它是惟一研究专用于肺保存的液体, 低分子右旋糖酐液中含有低分子右旋糖苷, 无论在动物实验还是在临床研究中, 低分子右旋糖酐液保存肺脏的效果均优于 UW 和 EC 液。有报道使术后严重原发性肺功能衰竭下降了 50%^[15]。

2.2.4 组织器官的长期保存 目前, 深低温保存已经成

功用于皮肤、角膜、视网膜、静脉、动脉、软骨和心脏瓣膜。国内对组织器官玻璃化保存的研究主要以皮肤为主。Fujita 等^[16]研究将患者皮肤削薄, 在室温下浸于玻璃化冷冻液中 10 min, 立即放入液氮罐中保存 3 周, 玻璃化冷冻液由 40%乙二醇和含有 30%聚蔗糖的 PBS 液及 0.5 mol/L 蔗糖组成, 采用台盼蓝实验、MTT 比色试验及角化细胞培养试验进行评估, 发现玻璃化皮肤进行皮肤移植可促进伤口愈合, 该研究认为玻璃化皮肤保存技术简单而可靠。贾小明等^[17]研究了玻璃化对皮肤细胞膜和细胞骨架的影响, 在 DNA 水平上做了深入研究, 并逐步应用到烧伤临床, 通过将加有抗冻剂的离体皮肤放入-196℃液氮中可长期保持组织活性。角膜是应用最广的眼组织, 深低温技术促进了角膜长期保存的应用, 其降温冻存方法为: 将角膜片放入冷冻保护剂中, 4℃平衡, 然后以 1℃/min 的速率降温至-30℃, 再以 8~10℃/min 的速率降至-80℃以下, 放入液氮中保存。其复温方法为: 将角膜瓶放入水浴复温。复温后通过锥虫兰染色检测角膜活性, 当拒染率高于 70%, 可以用于临床移植。有数据显示角膜的保存年限可为 4~95 年。经深低温保存的角膜有 79.4%用于角膜移植, 其丢弃的原因多为污染、内皮破坏和血清反映异常。研究人员证实血管和心脏瓣膜的保存时间为 6 个月~3 年不等。对骨移植深低温保存的研究发现, 其保存时间在 1, 3, 5 年, 差异没有显著性意义, 均可安全用于移植^[18]。

器官的长期保存一般采用特殊方法将器官冷却至深低温, 待需要时, 再将其按特殊方法复温, 以便获得活的生物体^[19]。将拟冻存的器官过渡到深低温环境中有两种方法: 一种为快速降温冷冻法, 又称玻璃化低温保存法, 玻璃化保存是指当溶液快速降温达到较低温度时, 形成的一种高黏度的介于液态和固态之间的玻璃状态, 该状态是一种可以减轻冷冻细胞和组织损伤, 长期保存细胞和组织的方法。把抗冻处理后器官加标密封后, 迅速投放到液氮中, 以 160℃/min 速度迅速降温至-196℃。另一种为“两步法”慢速降温冷冻法, 将器官慢速冷却至某一温度后将其直接置入液氮中。这两种方法均需加入抗冻剂和保存液以保持离体器官的活力。抗冻剂有 4 类: ①低相对分子质量可渗透性保护剂, 如 DMSO。②低分子不可渗透物质, 如蔗糖。③大分子保护剂, 如 PVP。④混合保护剂。目前对于混合抗冻剂的研究较多, 它能够较好的降低抗冻剂的细胞毒性, 同时发挥最佳的深低温保护作用, 提高复温后的存活率。深低温保存器官的复温研究较少, 多数学者认为, 如果冷却过程的速率较快, 相应的复温速率也要快, 这样可获得较好的效果。人们根据降温和控温的原理也研制了降温仪和低温生物显微镜, 可以对冷冻和复温程序进行监控和研究, 因而被看作是深低温保存领域的最重要的设备之一。

尽管深低温保存是活体组织或器官长期保存的一种有效方法,但冷冻和复苏都会对活体产生一定的不良影响。冷冻时产生的冰晶会对细胞造成机械性损伤和渗透性损伤。快速降温下,低温损伤源于致命的胞内冰。慢速冷冻过程中,细胞内外渗透压的不等,促使大量细胞的水分渗出,造成细胞的溶质性损伤^[20]。降温速率过高或过低与细胞类型有关,这导致不同细胞对应的最佳降温速率有所不同,因此,需要选择使损伤达到最低的降温速度。有学者认为小细胞对水渗透性强,适用于快冻,冷却速率达 103 °C/min,大细胞对水渗透性弱则适用于慢冻,最佳冷却速率只有(0.1~7.0) °C/min。同时也有研究证实,微波辐射和低温保护剂联合应用能控制细胞和组织在降温过程中的冰晶形成,此外,复温过程也会出现再结晶而加重细胞的损伤。

在器官移植的发展中,对于器官短期保存,只能保存数小时以内的器官,所以需要研制更好的保存液以延长器官的保存时间。对于器官的长期保存,长期的玻璃化保存仍具有很大难度,原因可能与组织器官的结构较为复杂,细胞之间的联系多种多样,不同的结构对降温速率可能会有不同的要求有关,另外对保护剂的种类和使用方法要求较高。器官玻璃化还有一个突出问题是复温,如何做到快速复温并去玻璃化也是很困难的。对于慢速降温冷冻法,对生物体的温度控制以及降温复温过程中组织器官损伤的研究也可能是需要攻克的难点。因此,如何确定更有效的方法,选择更好的保护剂、降温复温的温度控制以及兼顾所有细胞的冷冻效果,将是今后器官保存研究的重点。

3 参考文献

[1] de Boer J, De Meester J, Smits JM, et al. Eurotransplant randomized multicenter kidney graft preservation study comparing HTK with UW and Euro-Collins. *Transpl Int.* 1999; 12(6):447-453.

[2] Fridell JA, Agarwal A, Milgrom ML, et al. Comparison of histidine-tryptophan-ketoglutarate solution and University of Wisconsin solution for organ preservation in clinical pancreas transplantation. *Transplantation.* 2004;77(8):1304-1306.

[3] 李涛,唐华美,孙星,等. Celsior液与UW液对无心跳大鼠供肝保存效果的比较[J]. *中华器官移植杂志*, 2009,30(6):371-374.

[4] de Boer J, De Meester J, Smits JM, et al. Eurotransplant randomized multicenter kidney graft preservation study comparing HTK with UW and Euro-Collins. *Transpl Int.* 1999; 12(6): 447-453.

[5] Lin H, Mo A, Zhang F, et al. Donor heart preservation in an empty beating state under mild hypothermia. *Ann Thorac Surg.* 2010; 89(5):1518-1523.

[6] Jacobs S, Rega F, Meyns B. Current preservation technology and future prospects of thoracic organs. Part 2: heart. *Curr Opin Organ Transplant.* 2010;15(2):156-159.

[7] Monzen K, Hosoda T, Hayashi D, et al. The use of a supercooling refrigerator improves the preservation of organ grafts. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005;337(2):534-539.

[8] 严志焜,胡志斌,孟群,等. 二氮嗪强化Celsior液可安全延长供心低温保存时限[J]. *中华胸心血管外科杂志*, 2009,25(2):123-127.

[9] Hata K, Tolba RH, Wei L, et al. Impact of polysol, a newly developed preservation solution, on cold storage of steatotic rat livers. *Liver Transpl.* 2007;13(1):114-121.

[10] Masthuis MH, Ottens PJ, van Goor H, et al. Static cold storage preservation of ischemically damaged kidneys: a comparison between IGL-1 and UW solution. *Transpl Int.* 2008;21(5):473-482.

[11] Ben Mosbah I, Roselló-Catafau J, Franco-Gou R, et al. Preservation of steatotic livers in IGL-1 solution. *Liver Transpl.* 2006;12(8):1215-1223.

[12] Vekemans K, Liu Q, Heedfeld V, et al. Hypothermic liver machine perfusion with EKPS-1 solution vs aqix RS-1 solution: in vivo feasibility study in a pig transplantation model. *Transplant Proc.* 2009;41(2):617-621.

[13] Guarnera JV, Esteves J, Boykin J, et al. Hypothermic machine perfusion of liver grafts for transplantation: technical development in human discard and miniature swine models. *Transplant Proc.* 2005;37(1):323.

[14] Kelly RF, Murar J, Hong Z, et al. Low potassium dextran lung preservation solution reduces reactive oxygen species production. *Ann Thorac Surg.* 2003;75(6):1705-1710.

[15] Gámez P, Córdoba M, Millán I, et al. Improvements in lung preservation: 3 years' experience with a low-potassium dextran solution. *Arch Bronconeumol.* 2005;41(1):16-19.

[16] Fujita T, Takami Y, Ezoe K, et al. Successful preservation of human skin by vitrification. *J Burn Care Rehabil.* 2000;21(4): 304-309.

[17] 贾晓明,于瑜,李东杰. 两种低温保护剂对皮肤储存后 α -辅肌动蛋白表达及活力的影响[J]. *军医进修学院学报*, 2009,30(05):706-707.

[18] Salai M, Brosh T, Keller N, et al. The effects of prolonged cryopreservation on the biomechanical properties of bone allografts: a microbiological, histological and mechanical study. *Cell Tissue Bank.* 2000;1(1):69-73.

[19] 王增涛,王春霞,朱磊,等. 深低温保存81d断指再植1例[J]. *山东医药*, 2004,44(3):29.

[20] 罗晓中,杨志明. 组织工程化组织的低温冷冻保存研究[J]. *中国临床康复*, 2004,8(6):3227.

作者贡献: 第一和第二作者构思并设计本综述, 第一作者解析相关数据、起草并对本文负责。

利益冲突: 课题未涉及任何厂家及相关雇主或其他经济组织直接或间接的经济或利益的赞助。

伦理批准: 没有与相关伦理道德冲突的内容。

此问题的已知信息: 器官移植是 20 世纪人类医学的重大进展, 很多器官的移植如肝移植、肾移植、心脏移植等已经被广泛的应用临床, 并取得了很好的疗效。

本综述增加的新信息: 器官移植虽然已经应用临床, 但其长期疗效还有待进一步考证, 本文对近几年器官的保存液发展和各种器官的短期和长期保存现状作一综述, 较系统的分析了保存液的优缺点和各种器官保存尚待改进的方面。

临床应用意义: 器官保存是器官移植领域的关键之一, 对器官保存液和各种器官保存方法和现状的进一步探究和分析, 有助于为临床提供思路, 通过找到合适的保存液使器官保存活性达到最佳, 从而更好的提高移植后患者的生存质量, 同时也为冻存医学领域发展提供理论基础。