

# 大鼠供体喉保存的研究

李 浩, 彭汉伟, 曾宗渊, 伍国号

(华南肿瘤学国家重点实验室//中山大学肿瘤防治中心头颈科, 广东 广州 510060)

**摘 要:**【目的】研究大鼠喉移植供体喉的保存, 探讨喉体不同组织结构对缺血和坏死的耐受情况。【方法】40 只 Wister 大鼠, 采用 UW 液灌注, 低温保存供体鼠喉, 分别通过病理光学及透射电镜观察其形态学改变, 比较喉不同组织结构的缺血、坏死变化。【结果】供体喉保存 60 h 后, 病理 HE 染色才能镜检到喉体组织缺血改变, 电镜 24 h 即可发现组织细胞的缺血改变, 鼠喉各组织结构缺血耐受时间不同, 最先出现变化的是粘膜上皮, 接着是喉内肌、小涎腺、血管内皮、神经纤维, 最后改变的是软骨细胞。【结论】透射电镜检查能及时地反映喉体组织细胞缺血、坏死情况, UW 氏液保存供体喉不宜超过 26 h。

关键词: 喉移植; 供体保存; 电镜; 大鼠

中图分类号: R739

文献标识码: A

文章编号: 1672-3554(2006)03-0322-04

## Research of Laryngeal Allograft Preservation

LI Hao, PENG Han-wei, ZENG Zhong-yuan, WU Guo-hao

(State Key Laboratory of Oncology in Southern China//Cancer Center, SUN Yat-sen University, Guangzhou 510060, China)

**Abstract:** 【Objective】 To study preservation of rat donor larynx and discuss ischemic tolerance of different laryngeal tissue. 【Methods】 Forty Wister rats laryngeal allograft were perfused and preserved by cold UW s solution. Laryngeal morphological transform was observed under light microscopy and electron microscopy. Ischemic change or necrosis of donor rat larynx was compared. 【Results】 Ischemic ucosal was detected ischemic change at 24 hours under electron microscopy. Ischemic tolerance was difference among different part of rat larynx. Mucosal demonstrates ischemic change firstly, following by muscle, minor salivary gland, vessel, nerve and cartilage finally. 【Conclusion】 Electron microscopy can be used to detect change of laryngeal allograft early. UW solution was not suitable to preserve larynx more than 26 hours.

Key words: laryngeal transplantation; preservation; electron microscopy; rat

[J SUN Yat-sen Univ(Med Sci), 2006, 27(3):322- 325]

供体喉保存的目的在于使离体缺血的供喉保持最大活力, 并于血液供应恢复后迅速恢复功能, 以利于临床进行供体的血型鉴定与组织配型、供喉运输、实施喉移植术等<sup>[1]</sup>。由于喉作为一种复合组织器官包括粘膜、粘膜下组织、血管、神经、肌肉和软骨, 与肾脏、肝脏、心脏等实质、成分较单一的器官移植不同, 对体外保存的要求较高。本实验通过研究大鼠供体喉的保存, 探讨鼠喉各组织结构对缺血的耐受。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

由中山大学动物实验中心提供的清洁级、健康 Wister 大鼠 40 只, 体质量为 250~350 g, 雌雄不限。

### 1.2 保存液

UW 液(University of Wisconsin Solution), 由中山大学附属第三医院器官移植中心馈赠。

收稿日期: 2005-12-08

基金项目: 广东省自然科学基金项目(2005-5300797; 广州市科技计划项目(2003Z2-E4101)

作者简介: 李 浩(1971-), 男, 广东潮州人, 博士, 主治医师; 彭汉伟, 通讯作者。Email: ajax1998@163.com

### 1.3 实验方法

1.3.1 麻醉 用 100 mL/L 水合氯醛, 1.2 mg/kg, 腹腔内注射。

1.3.2 切口 颈部正中切口, 上至下颌骨下缘, 下达胸骨切迹上缘。

1.3.3 显露供体 喉正中切开颈白线, 在舌骨下缘分别切断两侧颈前肌, 充分暴露气管、甲状腺、鼠喉和颈动脉鞘。

1.3.4 游离供体血管蒂 切开一侧颈动脉鞘, 显露出颈总动脉、颈内动脉、颈外动脉, 结扎颈内动脉和枕动脉, 于甲状腺上动脉上 0.3 cm 处结扎颈外动脉。

1.3.5 切取供体喉 于第 7 气管环处横断气管, 沿气管食管间隙向上分离至食管入口处下方约 1 cm, 切断食管, 在舌骨下缘切断舌骨下肌群, 从会厌前间隙进入喉腔, 切开咽后壁, 直达椎前肌, 在椎前筋膜表面向下分离供喉, 与下方相连, 游离出整个喉体。

1.3.6 供喉灌洗 在胸骨切迹水平结扎双侧颈总动脉近心端, 切断一侧颈总动脉作为静脉回流端, 另一侧则插入“4”号显微冲洗针头, 用 UW 液约 30 mL 行供喉原位灌洗, 用力均匀, 缓慢灌注, 直至喉体、气管、食管和甲状腺等组织呈均匀灰白色, 喉腔干净无分泌物残留, 静脉回流端流出液清彻为止; 切出供喉及血管蒂, 置于 0~4 °C UW 液中保存。

### 1.4 光镜及电镜标本制作

1.4.1 光镜标本制作 将切出的大鼠供体喉保存在 4 °C UW 保存液中, 分别保存至 1、10、20、30、40、50、60、70 h 后, 从保存液中取出鼠喉, 将喉体用 100 mL/L 福尔马林液固定, 石蜡包埋切片, HE 染色观察。

1.4.2 电镜标本制作 将切出的大鼠供体喉保存在 4 °C UW 氏保存液中, 分别保存至 1、6、10、14、18、20、22、24、26、28、30、32 h 后, 从保存液中取出鼠喉, 在鼠喉左右两侧杓会厌皱襞处切取 0.1 mm × 0.1 mm × 0.1 mm 标本 2 份, 迅速置于 4 °C 25 mL/L 戊二醛固定液中固定, 梯度酒精及丙酮脱水, 每次 15 min, 丙酮加环氧树脂 Epon812(1:1) 包埋 40 min, 纯环氧树脂 Epon812 在 60 °C 下聚合 48 h, 超薄切片 (50 nm), 醋酸铀和柠檬酸铅双重染色后在透射电镜下观察。

UW 液进行大鼠供体喉保存, 1~50 h 喉各个组织结构包括粘膜、小涎腺、肌肉、血管、神经和软骨均未见缺血性改变或坏死表现, 60 h 后, 黏膜层假复层纤毛柱状上皮开始脱落, 黏膜下和横纹肌组织水肿; 70 h 后, 喉结构缺血性及坏死改变明显, 黏膜层基本脱落, 基底层不完整, 黏膜下脂肪、结缔组织有肿胀、核固缩现象, 小涎腺腺上皮排列紊乱, 失去正常的腺泡结构, 腺管扩张, 肌层横纹肌肌组织水肿变性, 肌丝断裂, 血管内膜坏死、玻璃样变性, 神经轴索皱缩。

### 2.2 电镜下供体喉形态学的连续变化

UW 液进行大鼠供体喉保存, 1~22 h 喉各个组织成分均无明显缺血性改变或坏死表现, 24 h 后, 首先是黏膜上皮细胞出现细胞肿胀, 细胞超微结构发生改变, 部分细胞器出现缺血性变化, 线粒体呈圆形或椭圆形分布于胞浆内, 肿胀明显, 嵴大部分消失, 个别线粒体出现空泡状改变, 粗面内质网见核蛋白体脱落 (图 1); 26 h 后, 黏膜上皮、喉内肌



图 1 供体喉用 UW 液保存 24 h 后

Fig.1 Preservation by UW solution 24 h later ( $\times 5000$ )  
Microvillus of mucosal epithelial cell breakoff, cytoplasm swell, mitochondria vacuole, nucleus shrink and heterochromatin conglomeration



图 2 供体喉用 UW 液保存 26 h 后

Fig.2 Preservation by UW solution 26 h later ( $\times 5000$ )  
Myofibril of intrinsic muscle cell swell, some fascicle lysis or dissolution, mitochondria and endoplasmic reticulum dilation or vacuole, ellipse nucleus, chromatin marginate and pyknosis

## 2 结果

### 2.1 病理光镜下供体喉形态学的连续变化

(图 2)、血管内皮细胞(图 3)等均出现缺血性或坏死变化,细胞内各种细胞器出现肿胀、崩解,核内染色质浓缩,聚集成团,核边集或核固缩;28 h 后,核染色质进一步浓缩,核膜破裂,部分核溶解或细胞凋亡;神经组织改变相对缓慢,仅表现为髓质松解,核固缩(图 4);软骨细胞(图 5)则保存 32 h 后才出现缺血改变。

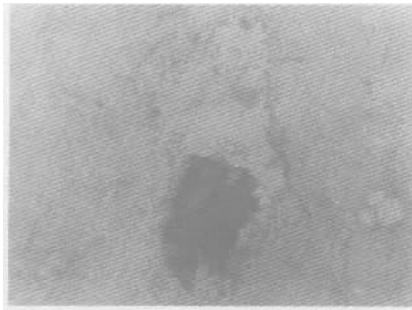


图 3 供体喉用 UW 液保存 26 h 后

Fig.3 Preservation by UW solution 26 h later ( $\times 5000$ )

Endothelial cell of capillary shrink, pinosome vesicle decrease, mitochondria swelling and ribosome breakoff from reticulum, nucleus membrane shrink like indentation, chromatin condense and pyknosis

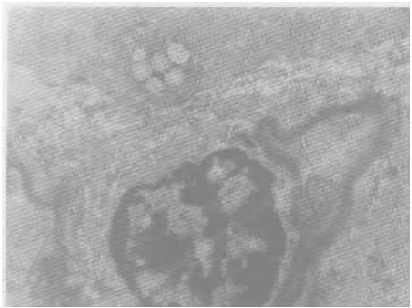


图 4 供体喉用 UW 液保存 28 h 后

Fig.4 Preservation by UW solution 28 h later ( $\times 5000$ )

Myelin sheath of nerve fiber degeneration, lamella split to form vacuoles or network form, neurofilament and microtubules lysis, chromatin conglomeration and pyknosis

### 3 讨 论

如何对保存后的供体喉进行准确评价,影响到对供体喉所采用的灌注、保存方法和保存液选择、保存期限判断,也直接影响到喉移植术后喉功能的恢复。由于对细胞损伤观察和所用方法的灵敏度和分辨能力有关,如肝缺血时,5 min 后即可从生化检查上证明其氧化磷酸化过程明显降低,但这些

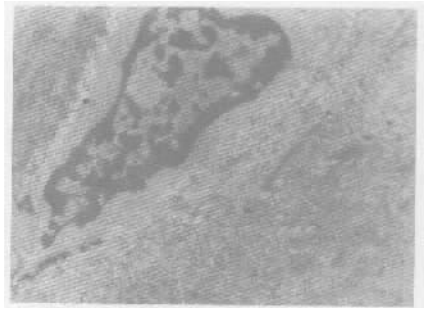


图 5 供体喉用 UW 液保存 32 h 后

Fig.5 Preservation by UW solution 32 h later ( $\times 5000$ )

Lot of collagen fibre surround cartilage cell, little prominences on the cell surface, inside enchylema there are little mitochondrion, nucleus like triangle shape, chromatin marginate at low grade

改变通常是可复性的,只要在 30 min 内能恢复血流灌注,则这些改变仍可恢复正常<sup>[2]</sup>;如果移植器官缺血持续,数小时后,细胞超微结构如内质网、线粒体、高尔基体、细胞膜、细胞核等亚细胞结构开始出现改变,如粗面内质网、线粒体肿胀和空泡变,细胞核染色质边集等,才表明细胞的损伤达到难以修复的程度,并趋于死亡;而细胞的核固缩、核碎裂、核溶解和核凋亡等的出现,则为细胞坏死的形态学标志<sup>[3]</sup>。因此,只有通过透射电镜才可以清楚地观察到这些组织细胞的超微结构改变,而此时在光学显微镜下,往往发现不了明显的改变,只有坏死达数十小时以上,组织细胞自溶性改变相当明显才能检见肯定的细胞损伤。

在供体喉保存的研究中,我们发现通过电镜检查,可以在 24 h 后,观察到喉体的黏膜上皮细胞肿胀,亚细胞结构出现缺血性改变,如线粒体肿胀、畸形变短、消失,空泡变,粗面内质网核蛋白体脱落,细胞核有核边集现象;保存至 26~28 h 后,大部分喉体组织可出现细胞核内染色质浓缩,聚集成团,核固缩,进而核膜破裂,核溶解或核凋亡,提示细胞坏死,达到不可修复的状态。和光学显微镜检查比较,直到喉体保存 60 h 后才能观察到喉部分组织结构出现缺血、坏死表现,如黏膜层假复层纤毛柱状上皮脱落,黏膜下和横纹肌组织水肿;70 h 后,黏膜下脂肪组织坏死,核溶解、消失,小涎腺腺泡结构破坏,腺细胞核固缩,横纹肌核消失,结构不清,血管和神经发生缺血性坏死。因此,我们认为供体喉保存的评价需通过透射电镜检查,才能及时地反映各组织细胞的缺血、坏死情况,避免术后出现无功能

喉。

近几年来,部分学者<sup>[4,5]</sup>在肾脏和肝脏的移植中研究用磁共振波来评价保存器官和组织的活力,该项技术是通过分析原子核如<sup>31</sup>P、<sup>1</sup>H等在磁场的特征从而描记其化学位移波,定性及定量分析细胞及组织器官含磷物的浓度,在细胞内的滞留和减少以及变化的速率,测定细胞内无机磷,并估计细胞内pH值。Pegg等<sup>[6]</sup>认为磁共振液可以准确地反映器官组织低温保存后的细胞代谢功能状态,还可以及时连续监测,但价格昂贵,临床应用上受到一定的限制。

移植器官的复苏时间是指当缺血的器官恢复正常血供后,决定器官功能的多数细胞刚刚尚能存活的最长缺血时间,各器官组织缺血后的复苏时间不尽相同。普遍认为器官耐受缺血的程度取决于:

组织器官的种类,间叶性细胞大于实质性细胞;功能状态,静息细胞大于活动细胞;供体组织的年龄,年青供体者大于老年供体者;保存温度,低温保存大于常温保存。在移植喉的保存研究中,我们发现大鼠喉各个组成部分对缺血耐受能力不完全相同。黏膜上皮最先出现坏死,保存时间约24h,然后是肌肉、黏膜下组织如小涎腺等,保存时间约24~26h,接着是血管、成纤维细胞、神经纤维细胞,保存时间可延长至26h,而软骨细胞于32h才出现缺血变化。因为喉最主要生理功能是发音,正常发音是在中枢神经系统发出指令后,通过喉返

神经支配喉内、外肌肌肉收缩,使声带产生内收或外展运动,从而发出声音。因此,供体喉的神经和肌肉组织起着相当重要的作用,如果出现缺血性坏死,将意味着移植术后喉功能的恢复差。据此,我们认为供体喉的保存时间应限制在肌肉、神经组织坏死之前。

参考文献:

- [1] STROME S, SLOMAN-MOLL E, SAMONTE B, et al. Rat model for a vascularized laryngeal allograft[J]. *Ann Otol Rhinol Laryngol*, 1992, 101(11):950-956.
- [2] FURUKAWA H. Effect of cold ischemia time on early outcome of human hepatic allograft preserved with UW solution[J]. *Transplantation*, 1992, 51(10):1000-1008.
- [3] SANIPPO F, BENJAMIN MFIL. The detrimental effect of delayed graft function in cadaver donor renal transplantation[J]. *Transplantation*, 1984, 38(6):642-648.
- [4] TOLEDO, PEREIRA L H, RODRIGUEZ F J. Scientific basis and current status of organ preservation [J]. *Transplant Proc*, 1994, 26(1):309-311.
- [5] BETZER F O, SOUTHARD J H. Principles of solid organ preservation by cold storage [J]. *Transplantation*, 1988, 45(4):673-676.
- [6] PEGG D E. Viability assays for preserved cells, tissues, and organs[J]. *Cryobiology*, 1989,26(3):212-231.

(编辑 黄小延)