

肢体保存技术的研究现状及进展

李雨虹 赵闻雨 曾力

【摘要】 肢体再植和移植是挽救创伤性肢体离断的首选治疗方法，而安全有效的肢体保存是肢体再植和移植成功的关键。静态低温保存技术是目前肢体保存的金标准，但保存时间较短，已无法满足临床的需要。随着近年来器官保存领域的快速发展，一些新的保存技术如深低温冷冻保存、过冷保存和机械灌注保存等相继出现，但目前这些技术多应用于实体器官的保存，而在包括肢体在内的带血管的复合组织移植移植保存方面的研究较少。本文就静态低温保存及机械灌注保存在肢体保存中的研究现状及进展进行综述，以期能为肢体保存技术的临床应用提供参考，促进肢体再植和移植的发展。

【关键词】 肢体再植；肢体移植；肢体保存；带血管的复合组织移植；静态冷保存；深低温冷冻保存；过冷保存；机械灌注

【中图分类号】 R617, R323.7 **【文献标志码】** A **【文章编号】** 1674-7445 (2023) 02-0017-05

Research status and progress on limb preservation technology Li Yuhong, Zhao Wenyu, Zeng Li. Department of Organ Transplantation, the First Affiliated Hospital, Naval Medical University, Shanghai 200433, China

Corresponding author: Zeng Li, Email: Zengli111109@aliyun.com

【Abstract】 Limb replantation and transplantation is the optimal treatment for traumatic limb amputation. Safe and effective limb preservation is the key factor to determine the success of limb replantation and transplantation. Currently, static cold storage is the gold standard of limb preservation. However, the preservation time is short, which may no longer meet clinical requirements. With rapid development of organ preservation in recent years, novel preservation technologies, such as ultra-low temperature preservation, supercooling preservation and mechanical perfusion preservation, have successively emerged. However, at present, these techniques are primarily applied to the preservation of solid organs rather than composite tissue allografts with blood vessels including limbs. In this article, research status and progress on the application of static cold storage and mechanical perfusion preservation in limb preservation were reviewed, aiming to provide reference for clinical application of limb preservation technology and promote the development of limb replantation and transplantation.

【Key words】 Limb replantation; Limb transplantation; Limb preservation; Vascularized composite tissue allotransplantation; Static cold storage; Ultra-low temperature preservation; Supercooling preservation; Mechanical perfusion

随着现代交通运输和工业生产的快速发展，各种事故所导致的创伤性肢体离断的发生率也逐年升高^[1]。目前肢体再植（limb replantation）是挽救创伤

性肢体离断的首选治疗方法，对于部分由于肢体严重毁损而无法再植的患者，目前常规的处理方法是佩戴假肢，然而假肢往往无法很好地满足日常生活

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023.02.017

基金项目：国家自然科学基金面上项目（81770744）

作者单位：200433 上海，海军军医大学第一附属医院器官移植科

作者简介：李雨虹，住院医师，研究方向为肾移植术后供者来源性感染，Email: liyuhongd163@163.com

通信作者：曾力，主任医师，研究方向为器官保存和临床肾移植相关研究，Email: zengli111109@aliyun.com

与工作的需要^[2]。近年来,同种异体肢体移植(limb transplantation)已成为肢体缺失功能重建的一种新的治疗选择。虽然肢体移植作为一种带血管的复合组织移植(vascularized composite tissue allotransplantation, VCA),其临床应用尚不及实体器官移植广泛,但自1998年9月23日Dubernard等^[3]在法国里昂成功实施了世界上首例异体上肢移植以来,全球已报道了超过150例肢体移植,随访研究表明其具有良好的中、长期预后^[4]。目前肢体移植已成为了一个全新的移植医学领域,显示出广阔的应用前景。

与实体器官移植类似,安全有效的肢体保存是肢体再植和移植成功的关键。在肢体再植中,患者往往合并多种危及生命的损伤,早期实施的抢救治疗往往会导致肢体再植的延迟;而对于肢体移植来说,受者的选择与组织配型、移植肢体的转运和移植手术的实施等都需要一定的时间,这就要求离体肢体在再植或移植前能保存其活力,并于血运重建后迅速恢复功能。随着近年来器官保存领域的快速发展,一些新的保存技术也已应用于肢体保存,现针对离体肢体保存领域的现状及研究进展做一综述。

1 静态低温保存

一旦肢体离断后其血液供应停止,不可避免地会受到冷、热缺血和再灌注损伤,这些损伤可导致组织变性坏死,严重影响再植和移植预后。不同于肝脏、肾脏等实体器官,肢体是由来源于不同胚层的多种组织所构成的,而不同组织对于缺血的耐受性存在较大差异,如骨骼、肌腱、脂肪和皮肤可以耐受较长时间的缺血,但肌肉、血管和神经则对缺血的耐受性较差^[5]。因此对含有大量肌肉组织的高位离断肢体进行科学合理的保存以减少组织缺血-再灌注损伤,对于肢体再植或移植的成功和预后至关重要。

1.1 静态冷保存

静态冷保存(static cold storage, SCS)是目前肢体保存的标准方法,离断的肢体用纱布包裹后放入灭菌塑料袋中,密封后放入冰水中冷保存(4℃)。虽然SCS具有经济、简便的优势,但其保存肢体的时限仅4~6h^[6],而骨骼肌作为对缺血损伤最敏感的组织类型,其耐受缺血的时间仅4h,一旦保存时间超过这一时限,则会对肌肉组织造成不可逆的损伤,从而影响移植后肢体功能的恢复^[7]。据国际手移植登记处统计,同种异体手移植物的冷缺血时间从30min

到13.5h不等(平均5.5h),这可能是导致术后移植植物功能和长期存活差异的主要原因^[4]。SCS的保存时间过短是限制肢体再植和移植发展的重要因素。

1.2 深低温冷冻保存

虽然低温可以显著降低肢体的新陈代谢水平,但在0℃时仍存在低水平的代谢,因此肢体的SCS保存时间有限。而通过深低温(-196℃,液氮温度)冷冻保存(cryopreservation)则可使肢体的新陈代谢几乎完全停止,理论上可以无限期保存肢体^[8]。然而在冷冻过程中,细胞内冰晶的形成以及细胞内外渗透压的失衡会导致细胞损伤和死亡,目前一般通过使用冷冻保护剂(如甘油、二甲基亚砷等)和采用适当的冷冻方法(如玻璃化)来减轻损伤^[9]。既往冷冻保存在临床上仅应用于人体细胞、胚胎和卵巢组织的保存,而在2004年Wang等^[10]首次报道了2例断指分别冷冻保存5d和81d后再植获得成功,随访期内再植手指的外观和功能维持良好。深低温冷冻保存虽然是一种理想的保存方法,但对于体积较大的人类肢体来说,实际应用中还存在很多技术困难,目前尚无法应用于临床。

1.3 过冷保存

过冷保存(supercooling preservation)是一种新的静态低温保存方法,其利用过冷液体在0℃以下保存细胞、组织和器官,同时可以避免相变和随之而来的细胞冰晶介导的损伤^[11]。与冷冻保存相比,过冷保存的温度虽仅略低于0℃,却可显著延长保存时间。近期的一项研究发现,小鼠心脏在-8℃的过冷保存液中可保存96h,移植后仍能长期存活^[12]。目前已有学者尝试将过冷保存技术应用于VCA移植物的保存。然而过冷是一种热力学上不稳定的平衡状态,一旦平衡被打破,过冷液体就会迅速凝结,形成的冰晶会造成细胞损伤。虽然通过在保存液中添加低温保护剂(如3-O-甲基-D-葡萄糖)可预防冰晶形成,但对于保存肢体这种较大的VCA移植植物来说还存在较大难度。

2 机械灌注保存

机械灌注保存是指通过移植器官的固有血管系统给予持续动态灌注,从而为器官提供代谢所需的营养物质并清除代谢废物。与SCS相比,机械灌注保存可以显著延长器官保存时间,减少缺血-再灌注损伤,并可在保存过程中有效评估器官功能、改善器官质量。

目前机械灌注保存技术已广泛应用于临床肾脏、肝脏、肺脏等实体器官的保存^[13], 但其在肢体等 VCA 移植体保存中的应用尚处于临床前研究阶段。

离体机械灌注装置一般是由滚柱泵或离心泵、氧合系统、温控系统、过滤系统、监测传感系统和灌注管路等所组成的一个半封闭循环系统。除了灌注装置外, 灌注液(无细胞灌注液、血红蛋白溶液、红细胞悬液等)的选择和灌注参数(温度、压力、流量、氧合等)的设置对于机械灌注保存的效果也至关重要。目前有学者根据灌注温度的不同将机械灌注分为低温机械灌注(hypothermic machine perfusion, HMP)(0~12℃)、中温机械灌注(midthermic machine perfusion, MMP)(13~24℃)、亚常温机械灌注(subnormothermic machine perfusion, SNMP)(25~34℃)和常温机械灌注(normothermic machine perfusion, NMP)(35~38℃)^[14], 但对于何种机械灌注保存方法更适用于离体肢体的保存, 目前尚无定论。

2.1 低温机械灌注保存

由于肢体对缺血缺氧的耐受性较差, HMP 被认为是一种可替代 SCS 的理想肢体保存方法。在现有大动物模型研究中, 灌注温度一般维持在 8~10℃, 而对于灌注压力, 有研究显示在低温条件下低压灌注[30 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa)]比生理压力灌注(60 mmHg)后的组织结构完整性更好, 因此灌注压一般设定在 30 mmHg 左右, 氧合气体则多选择 95% O₂ 与 5% CO₂ 的混合气体^[15]。由于低温条件下肢体代谢的需氧量较低, 因此 HMP 系统的灌注液一般为不含载氧体的无细胞溶液, 如威斯康星大学保存液(University of Wisconsin solution, UW 液)、组氨酸-色氨酸-酮戊二酸盐液(histidine-tryptophan-ketoglutarate solution, HTK 液)、Perfadex 液和 Steen 液等, 此外灌注液中还添加了葡萄糖、胰岛素和甲泼尼龙等组份^[16]。与血液及含红细胞溶液相比, 无细胞灌注液具有制备、运输、储存方便, 无传播疾病和致敏风险等优点, 特别适用于创伤现场急救环境下的使用。

HMP 系统保存肢体的研究目前仍处于临床前阶段, 现有研究表明 HMP 系统可显著延长肢体的保存时间。美国哈佛大学医学院的 Kueckelhaus 等^[17]使用 Perfadex 液在 10℃ 下灌注猪前肢 12 h 并再植成功, 随后来自同一研究团队的 Krezdorn 等^[18]通过 Steen 液低温灌注将猪前肢的保存时间延长到 24 h。此外荷

兰拉德堡德大学的 Kruit 等^[19]也报道了应用 UW 液低温灌注猪前肢 18h, 再植后肌肉功能良好。在此基础上 Haug 等^[20]应用含 Steen 液的灌注系统保存人体上肢达 24 h, 使肢体离体保存时限延长 4~6 倍。但需要注意的是, 在上述研究中均发现灌注后肢体出现不同程度的重量增加, 如在 Kueckelhaus 等^[17]的研究中猪前肢的重量增加了 44%, Krezdorn 等^[18]则发现灌注后猪前肢的重量增加了 42%, 而 Kruit 等^[19]也报道了灌注后猪前肢重量增加 19%。有研究认为灌注后肢体重量的增加与肌肉组织的损伤和水肿密切相关, 而组织水肿会引起筋膜室压力升高, 进而导致骨筋膜室综合征的发生。但也有学者认为离体灌注期间的组织水肿并不会在肢体血运重建后引起骨筋膜室综合征, 亦不会影响再植后肢体功能的恢复^[21]。然而由于目前低温灌注保存后进行再植的相关数据较少, 尚需进一步的研究证实。

2.2 常温和亚常温机械灌注保存

虽然 HMP 可有效延长肢体的保存时间, 但低温不可避免地会引起移植物的损伤, 而 NMP 和 SNMP 则可使组织细胞在离体保存期间维持接近正常的生理代谢, 避免缺氧和低温的不利影响, 因此被认为是较 HMP 或 SCS 更为理想的肢体保存方式^[22]。

在现有研究中, NMP 系统的灌注温度一般维持在 38~39℃, 而 SNMP 系统则为 30~33℃, 灌注压为肢体的生理动脉压。由于常温或亚常温条件下肢体代谢的需氧量显著增加, 因此要求灌注液具有良好的载氧能力, 目前常用的常温和亚常温灌注液有自体或异体血液(去除白细胞和血小板)、含红细胞溶液和血红蛋白溶液等。

2.2.1 常温机械灌注保存 NMP 是通过维持细胞生理代谢来延长肢体保存时间的一种方法。2018 年美国克利夫兰医学中心的 Duraes 等^[23]报道了应用含有红细胞的携氧胶体溶液在 39℃ 下灌注猪肢体 12 h, 肌肉收缩能力维持良好。2020 年该研究团队的 Fahradyan 等^[24]又将猪肢体的灌注保存时间延长到 25 h (24~44 h), 灌注后肢体重量仅增加 (7.28 ± 15.05)%。而在该团队近期进行的临床前研究中, 来自脑死亡器官捐献供者的上肢通过 NMP 系统在 38℃ 下灌注 (41.6 ± 9.4) h, 红外热成像和吲哚菁绿血管造影显示肢体灌注良好, 最终重量变化 (0.4 ± 12.2)%^[25]。近期该研究团队还报道了将原灌注液中的红细胞替换为基于聚合牛血红蛋白的人工载氧体 HBOC-201, 以避

免红细胞悬液运输储存困难、易传播疾病和溶血等缺点,结果表明含 HBOC-201 的灌注液可获得与含红细胞灌注液类似的保存效果,为 NMP 的研究提供了新的思路^[26]。

2.2.2 亚常温机械灌注保存 SNMP 通过适度降低灌注温度,在维持细胞正常生理代谢的同时,降低了其对营养物质和氧的需求。2011 年瑞士伯尔尼大学的 Constantinescu 等^[27]在 32℃ 下以自体血液灌注猪肢体 12 h,重量仅增加 1.32%,肌肉收缩功能和筋膜室压力均维持正常。2015 年美国芝加哥大学的 Ozer 等^[28]报道了使用稀释的红细胞悬液在 27~32℃ 下灌注猪前肢 12 h,随后该团队又将灌注时间成功延长至 24 h,灌注后的肢体均成功移植,移植后肌肉收缩功能正常。2017 年来自同一研究团队的 Werner 等^[29]首次报道了在 30~33℃ 下以稀释红细胞悬液灌注人体上肢 24 h,平均重量变化 -0.4%,组织病理显示无肌细胞损伤,肌肉收缩力正常。然而目前对 SNMP 的研究尚处于起步阶段,其保存效果尚需进一步研究证实。

2.3 中温机械灌注保存

目前应用机械灌注保存患者离断肢体的唯一病例报告来自于 MMP。2019 年德国雷根斯堡大学医院先后接收了 2 例创伤性肢体离断患者,2 例患者的一侧下肢自骨盆以下完全离断。由于病情危重,2 例患者均于重症监护室接受了抢救治疗,离断肢体则立即予肝素化林格氏液灌注,随后通过股动脉插管与体外膜氧合装置连接,予冷却至 20℃ 的肝素化 HTK 液、生理盐水或乳酸林格氏液持续机械灌注,氧合气体为纯氧。在机械灌注过程中,2 个离断肢体都接受了清创处理,并对所有筋膜室进行了筋膜切开,以避免骨筋膜室综合征。2 个离断肢体在分别灌注保存 15 h 49 min 和 12 h 27 min 后成功完成了再植,由于肢体损伤严重,患者 1 再植了大腿部分,而患者 2 再植了小腿部分。术后患者 1 恢复良好,术后 1 年可在没有辅助装置的情况下保持稳定的坐姿,并可使用拐杖进行活动。而患者 2 术后由于再植肢体静脉血栓形成而切除了肢体,后因创面感染死亡^[30]。表明离体机械灌注可应用于临床离断肢体的保存,能显著延长肢体的保存时间,但在临床应用中尚存在较多问题亟待解决,仍需要进一步深入研究。

3 小结与展望

随着目前肢体再植和移植临床研究的逐步开展,

传统的静态低温保存技术已无法满足临床肢体长时间保存的需要。随着近年来器官保存技术的不断进步,出现了一批以深低温冷冻保存、过冷保存和机械灌注保存为代表的新保存技术,但这些技术多应用于实体器官的保存,而在包括肢体在内的 VCA 移植物保存方面的研究较少,且大多处于动物模型研究阶段,尚缺乏临床应用研究,短期内无法在临床广泛开展。因此需进一步加强临床应用方面的研究,同时对相应的保存装置和保存方案进行改进和优化,以期进一步提高肢体保存的有效性和安全性,从而推动临床肢体再植和移植的发展。

参考文献:

- [1] STOVER G, PRAHLOW N. Residual limb pain: an evidence-based review[J]. *NeuroRehabilitation*, 2020,47(3):315-325. DOI: 10.3233/NRE-208005.
- [2] KURUCAN E, THIRUKUMARAN C, HAMMERT WC. Trends in the management of traumatic upper extremity amputations[J]. *J Hand Surg Am*, 2020,45(11):1086.e1-1086.e11. DOI: 10.1016/j.jhssa.2020.05.006.
- [3] DUBERNARD JM, OWEN E, HERZBERG G, et al. Human hand allograft: report on first 6 months[J]. *Lancet*, 1999,353(9161):1315-1320. DOI: 10.1016/S0140-6736(99)02062-0.
- [4] HAUTZ T, MESSNER F, WEISSENBACHER A, et al. Long-term outcome after hand and forearm transplantation - a retrospective study[J]. *Transpl Int*, 2020,33(12):1762-1778. DOI: 10.1111/tri.13752.
- [5] HE J, KHAN UZ, QING L, et al. Improving the ischemia-reperfusion injury in vascularized composite allotransplantation: clinical experience and experimental implications[J]. *Front Immunol*, 2022,13:998952. DOI: 10.3389/fimmu.2022.998952.
- [6] MESSNER F, HAUTZ T, BLUMER MJF, et al. Critical ischemia times and the effect of novel preservation solutions HTK-N and TiProtec on tissues of a vascularized tissue isograft[J]. *Transplantation*, 2017,101(9):e301-e310. DOI: 10.1097/TP.0000000000001845.
- [7] GOK E, KUBIAK CA, GUY E, et al. Effect of static cold storage on skeletal muscle after vascularized composite tissue allotransplantation[J]. *J Reconstr Microsurg*, 2020,36(1):9-15. DOI: 10.1055/s-0039-1693455.
- [8] SHANI N, FRIEDMAN O, ARAV A, et al. Cryopreservation and transplantation of vascularized composite transplants: unique challenges and opportunities[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2019,143(5):1074e-1080e. DOI: 10.1097/PRS.0000000000005541.

- [9] WHALEY D, DAMYAR K, WITEK RP, et al. Cryopreservation: an overview of principles and cell-specific considerations[J]. *Cell Transplant*, 2021,30:963689721999617. DOI: 10.1177/0963689721999617.
- [10] WANG J, LIN J, PEI Y, et al. Cryopreservation and transplantation of amputated finger[J]. *Cryobiology*, 2020,92:235-240. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2020.01.017.
- [11] WILLIAM N, ACKER JP. High sub-zero organ preservation: a paradigm of nature-inspired strategies[J]. *Cryobiology*, 2021,102:15-26. DOI: 10.1016/j.cryobiol.2021.04.002.
- [12] QUE W, HU X, FUJINO M, et al. Prolonged cold ischemia time in mouse heart transplantation using supercooling preservation[J]. *Transplantation*, 2020,104(9):1879-1889. DOI: 10.1097/TP.0000000000003089.
- [13] XU J, BUCHWALD JE, MARTINS PN. Review of current machine perfusion therapeutics for organ preservation[J]. *Transplantation*, 2020,104(9):1792-1803. DOI: 10.1097/TP.0000000000003295.
- [14] GAO J, HE K, XIA Q, et al. Research progress on hepatic machine perfusion[J]. *Int J Med Sci*, 2021,18(9):1953-1959. DOI: 10.7150/ijms.56139.
- [15] KUECKELHAUS M, FISCHER S, SISK G, et al. A mobile extracorporeal extremity salvage system for replantation and transplantation[J]. *Ann Plast Surg*, 2016,76(3):355-360. DOI: 10.1097/SAP.0000000000000681.
- [16] HAUG V, KOLLAR B, ENDO Y, et al. Comparison of acellular solutions for ex-situ perfusion of amputated limbs[J]. *Mil Med*, 2020,185(11/12):e2004-e2012. DOI: 10.1093/milmed/usaa160.
- [17] KUECKELHAUS M, DERMIETZEL A, ALHEFZI M, et al. Acellular hypothermic extracorporeal perfusion extends allowable ischemia time in a porcine whole limb replantation model[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2017,139(4):922e-932e. DOI: 10.1097/PRS.0000000000003208.
- [18] KREZDORN N, MACLEOD F, TASIGIORGOS S, et al. Twenty-four-hour ex vivo perfusion with acellular solution enables successful replantation of porcine forelimbs[J]. *Plast Reconstr Surg*, 2019,144(4):608e-618e. DOI: 10.1097/PRS.0000000000006084.
- [19] KRUIT AS, BROUWERS K, VAN MIDDEN D, et al. Successful 18-h acellular extracorporeal perfusion and replantation of porcine limbs - histology versus nerve stimulation[J]. *Transpl Int*, 2021,34(2):365-375. DOI: 10.1111/tri.13802.
- [20] HAUG V, KOLLAR B, TASIGIORGOS S, et al. Hypothermic ex situ perfusion of human limbs with acellular solution for 24 hours[J]. *Transplantation*, 2020,104(9):e260-e270. DOI: 10.1097/TP.0000000000003221.
- [21] MÜLLER S, CONSTANTINESCU MA, KIERMEIR DM, et al. Ischemia/reperfusion injury of porcine limbs after extracorporeal perfusion[J]. *J Surg Res*, 2013,181(1):170-182. DOI: 10.1016/j.jss.2012.05.088.
- [22] OZER K. Advances in limb preservation: from replantation to transplantation[J]. *J Hand Surg Am*, 2020,45(7):626-637. DOI: 10.1016/j.jhsa.2020.04.006.
- [23] DURAES EFR, MADAJKA M, FRAUTSCHI R, et al. Developing a protocol for normothermic ex-situ limb perfusion[J]. *Microsurgery*, 2018,38(2):185-194. DOI: 10.1002/micr.30252.
- [24] FAHRADYAN V, SAID SA, ORDENANA C, et al. Extended ex vivo normothermic perfusion for preservation of vascularized composite allografts[J]. *Artif Organs*, 2020,44(8):846-855. DOI: 10.1111/aor.13678.
- [25] ROHDE E, GOUDARZI M, MADAJKA M, et al. Metabolic profiling of skeletal muscle during ex-vivo normothermic limb perfusion[J]. *Mil Med*, 2021, 186(Suppl 1):358-363. DOI: 10.1093/milmed/usaa268.
- [26] FIGUEROA BA, SAID SA, ORDENANA C, et al. Ex vivo normothermic preservation of amputated limbs with a hemoglobin-based oxygen carrier perfusate[J]. *J Trauma Acute Care Surg*, 2022,92(2):388-397. DOI: 10.1097/TA.0000000000003395.
- [27] CONSTANTINESCU MA, KNALL E, XU X, et al. Preservation of amputated extremities by extracorporeal blood perfusion; a feasibility study in a porcine model[J]. *J Surg Res*, 2011,71(1):291-299. DOI: 10.1016/j.jss.2010.01.040.
- [28] OZER K, ROJAS-PENA A, MENDIAS CL, et al. Ex situ limb perfusion system to extend vascularized composite tissue allograft survival in swine[J]. *Transplantation*, 2015,99(10):2095-2101. DOI: 10.1097/TP.0000000000000756.
- [29] WERNER NL, ALGHANEM F, RAKESTRAW SL, et al. Ex situ perfusion of human limb allografts for 24 hours[J]. *Transplantation*, 2017,101(3):e68-e74. DOI: 10.1097/TP.0000000000001500.
- [30] TAEGER CD, LAMBY P, DOLDERER J, et al. Extracorporeal perfusion for salvage of major amputates[J]. *Ann Surg*, 2019,270(1):e5-e6. DOI: 10.1097/SLA.0000000000003226.

(收稿日期: 2022-09-26)

(本文编辑: 方引超 邬加佳)