

· 实验研究 ·

肢体隔离性灌注的兔实验模型研究

王永利 李麟荪 王杰 施海彬 冯耀良 李志欣 王卫东 彭晓静

【摘要】 目的 建立近似生理状态的肢体隔离灌注兔模型。方法 超声测算兔股动脉平均血流速度;以小型膜式氧合器及蠕动泵建立体外肢体隔离循环;观察不同氧流交换速度引起的灌注前、中及后的血气值的改变;不同的循环流速产生循环障碍的时间、发生概率;灌注的不同时间血糖值变化及补充血糖与未补充血糖的差异;灌注前后肢体围径的改变。结果 超声测量结果:左右股动脉各参数无差异,对于分组实验结果无影响,总平均流速为 (12.0 ± 1.8) ml/min。血气分析:无氧灌注 pH 值低于灌注前及生理值下降, PCO_2 值高于灌注前及生理上限值, PO_2 值低于灌注前及生理下降值;100ml/min 氧流组灌注前后 pH 值, PCO_2 值相接近, PO_2 值灌注后虽高于灌注前,但在生理范围值内;200ml/min 氧流组 pH 值及 PO_2 值明显高于灌注前,也超出生理正常值范围。第 30 分钟血糖值低于生理正常值,补充血糖后与灌注前血糖无差异,补充血糖组与未补充血糖组有差异。循环流速在 10~12ml/min 之间,循环障碍为零。灌注前后肢体围径无差异。结论 根据超声提供的流速参考,灌注中适当调整;100ml/min 氧流交换结合灌注中补充血糖,可以建立接近生理状态的肢体隔离灌注兔模型。

【关键词】 隔离灌注;兔;模型

The experimental research of isolated limb perfusion on rabbit model WANG Yongli, LI Linsun, WANG Jie, et al. Department of Radiotherapy, Zhengjiang First people's Hospital, Jiangsu 212002, China

【Abstract】 Objective To set up an isolated limb perfusion (ILP) model of rabbit approximately as in the physiological state. **Methods** Measuring and calculating the average speed of blood circulation in rabbit's femoral artery with ultrasound, building up an isolated limb of perfusion system with a mini-membrane-oxygenator and a mini pump. Observing the values of blood analyses (pH, PO_2 and PCO_2) at prior-, mid- and post-operation with differential exchanging speeds of oxygen, and probabilities of circulation failure with differential blood flow speeds, and the glucose change at several points of time and the difference between the groups with and without compensating glucose, and the dimensions of hind leg prior- and post-operation. **Results** Results of ultrasound showed that there was no difference in parameter between bilateral femoral arteries giving no effect on the results of differential groups. Total average flow speed was (12.0 ± 1.8) ml/min. Blood analysis: the perfusion without oxygen exchange showed pH was lower than preperfusion and physiological low threshold. PO_2 was below the normal standard, PCO_2 was higher than preperfusion and physiological upper threshold. 100ml/min of oxygen exchange showed pH, PO_2 and PCO_2 were nearly normal post-perfusion and 200ml/min group showed pH and PO_2 obviously higher than the normal physiological value. The glucose was lower than the normal at 30min after perfusion, but could be recovered under the compensation of glucose. There was significant difference between the groups processing with and without glucose. There was no circulation failure when the flow speed was in $10ml \leq V < 12ml$. No difference in dimension of hind legs appeared prior-and post-procedure. **Conclusions** According to the flow speed offered by ultrasound adhered with adjustment during perfusion. The selection of 100ml/min oxygen-exchange speed and compensation with glucose could set up an ILP model of rabbit, approximately as in the physiological state.

【Key words】 Isolated limb perfusion; Model; Rabbit

50 年代末 Creech 等^[1]首次采用隔离灌注(iso-

lated perfusion of limb, ILP)化疗治疗肢体恶性肿瘤。近 20 年来,国内外学者分别采用不同方式进行肢体动脉灌注和隔离灌注化疗,提高了肢体恶性肿瘤的疗效^[2-10]。本实验建立一个 ILP 兔模型,为肢体隔离灌注化疗提供进一步研究基础。

作者单位:212002 江苏省镇江市第一人民医院放疗科(王永利);南京医科大学一附院(李麟荪、王杰、施海彬、冯耀良、彭晓静);天津医科大学放射科(李志欣)

材料和方法

一、材料

(一) 健康青紫兰兔 12 只, 体重 2.4~3.5kg, 平均 (2.88 ± 0.31) kg。背式固定, 3% 巴比妥钠 (1 ml/kg) 经耳缘静脉推注全身麻醉, 配合腹股沟局部麻醉。测量双侧膝关节上 5cm 和 7cm 处肢体围径。肝素钠生理盐水 60U/kg 全身肝素化。切开暴露股动静脉, 22G (0.9mm × 19mm) 医用静脉留置针刺入血管, 建立肢体隔离灌注系统。切口以上绑扎止血带前后注射造影剂, 数字减影造影 (DSA) 并摄片。以小型膜式氧合器 (上海复旦大学延生生化公司提供) 提供气体及热交换场所; 以蠕动泵 (河北正定兰格公司制 BT01-100 驱头器, YZ1515 易装型) 提供灌注动力。模型如图 1。

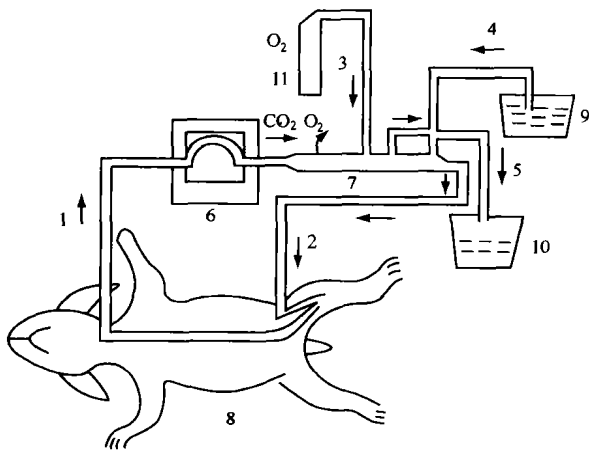


图 1 肢体隔离性灌注的兔实验模型示意图

1. 静脉引流管 2. 动脉输入管 3. O₂ 输入导管 4. 热水输入管 5. 热水输出管 6. 蠕动泵 7. 氧合器 9. 热水容器 10. 空容器 11. 医用氧气瓶

(二) 采用 ALT 公司 3000 型彩色多普勒声像仪, 10~538mm 变频探头, 纠角 60°, 多普勒超声分别测定膝关节上 5cm、6cm 及 7cm 处左右股动脉的血管内径 (D)、流量时间积分值 (VTI)、搏动次数 (HR), 比较双侧股动脉参数有无差异。计算平均血流速度: 平均血流速度 (V) 以公式 $V = 1/4 \cdot \pi D^2 \cdot VTI \cdot HR$ 。以平均血流速度 10~12ml/min 灌注。

二、方法

(一) 24 条后肢自然分成 2 组, 一组以 100ml/min 氧流进行气体交换灌注, 另一组以 200ml/min 氧流进行气体交换灌注。有氧灌注前每组各取 6 条后肢行无氧灌注 10min, 随后以各自组别的氧流量进行气体交换灌注, 总灌注时间为 60min。分别于灌注前、无氧灌注后 10min 及有氧灌注第 60min 测

定血气值。

(二) 瞬时血糖分析仪分别测定实验前, 实验中 10、20 及 30min 血糖值。6 条后肢在 30min 后按照灌注前后血糖平均下限值的差补充葡萄糖, 另 6 条以原条件继续灌注, 观察 40、50、60min 血糖值。作补充血糖组 40min 与灌注前血糖值比较, 补充血糖组与未补充血糖组各时相上 (40min 起) 血糖值的比较。

(三) 所有后肢进行上述实验期间分别以 10ml/min (平均血流下限), 12ml/min (平均血流速度), 17ml/min (大于平均血流速度 5ml/min) 及 22ml/min (大于平均血流速度 10ml/min) 流速灌注, 观察静脉引流不畅 (静脉端抽吸现象) 出现的时间及发生率。

实验前后测量双侧后肢膝关节上 5cm 和 7cm 处肢体围径。灌注结束后的测量时间定为术后 12~24 h 内。

上述数据统计学处理采用 Sigma Plot Windows 统计软件按 $\bar{x} \pm s$, 配对 *t* 检验及方差分析, χ^2 检验进行。

结 果

一、超声测量

左股动脉血管内径 (1.19 ± 0.10) mm, 右股动脉内径 (1.18 ± 0.06) mm; 左侧流量时间积分值 (4.7 ± 0.5) cm 与右侧 (4.8 ± 0.5) cm; 左侧搏动次数 (226 ± 17) 次/min, 右侧为 (228 ± 16) 次/min; 双侧平均血流速度左侧 (12.03 ± 1.68) ml/min, 右侧为 (11.97 ± 1.94) ml/min。上述左右股动脉各参数均无差异 ($P > 0.05$), 对于分组实验结果无影响, 总平均流速 (12.0 ± 1.8) ml/min 可作为灌注速度参考。

二、不同氧流速度血气分析值

(一) pH 值 无氧灌注前 (7.39 ± 0.09) 后 (7.29 ± 0.07) pH 值有显著差异 ($P < 0.05$); 100ml/min 氧流组灌注前 (7.39 ± 0.09) 后 (7.37 ± 0.04) pH 值无显著差异 ($P > 0.05$); 200ml/min 氧流组灌注前 (7.39 ± 0.09) 后 (7.54 ± 0.13) pH 值有显著差异 ($P < 0.01$)。

(二) PCO₂ 值 无氧组灌注前 $[(32.16 \pm 9.45)$ mmHg] 后 $[(43.86 \pm 8.46)$ mmHg] PCO₂ 有显著差异 $P < 0.01$; 100ml/min 氧流组灌注前 $[(32.16 \pm 9.45)$ mmHg] 后 $[(35.03 \pm 2.87)$ mmHg] PCO₂ 值无显著差异 ($P > 0.05$); 200ml/min 氧流组灌注前

[(32.16 ± 9.45)mmHg]后[(19.57 ± 8.43)mmHg] PCO₂ 值有显著差异($P < 0.01$)。

(三) PO₂ 值 无氧灌注前后 PCO₂ 值[(67.08 ± 6.07)mmHg]和[(41.78 ± 9.46)mmHg]的差异有显著性; 100ml/min 氧流组灌注前后 PCO₂ [(67.08 ± 0.07)mmHg]和[(79.7 ± 3.65)mmHg]有显著差异($P < 0.01$); 200ml/min 氧流组灌注前后 PCO₂ [(67.08 ± 6.07)mmHg]和[(294.4 ± 96.04)mmHg]有非常显著差异($P < 0.001$)。

上述结果说明,无氧灌注 pH 值低于灌注前及生理值下限; PCO₂ 值高于灌注前及生理上限值; PO₂ 值低于灌注前及生理下限值; 处于缺氧酸中毒状态。100ml/min 氧流组灌注前后 pH 值及 PCO₂ 值相接近; PO₂ 灌注后虽高于灌注前,但在生理范围内,既未出现酸碱失衡,亦未见缺氧。200ml/min 氧流组 pH 值及 PO₂ 值明显高于灌注前,也超出生理正常值范围,PCO₂ 明显低于正常值和灌注前,虽无缺氧状态,但是出现了碱中毒的 pH 值改变。

三、血糖观察

灌注后血糖值 10min[(7.13 ± 0.46)mmol/L]、20min[(6.31 ± 0.31)mmol/L]及 30min[(5.38 ± 0.41)mmol/L]均低于灌注前,差异均有显著性($P < 0.01$),而且第 30min 血糖值低于生理正常值。补充血糖组第 40min 血糖值为[(7.95 ± 0.39)mmol/L],与灌注前的[(7.84 ± 0.54)mmol/L]无显著差异($P > 0.05$); 补充血糖组血糖值第 40、50[(7.03 ± 0.50)mmol/L]及 60min[(6.27 ± 0.54)mmol/L]与未补充血糖组血糖值第 40[(4.55 ± 0.40)mmol/L]、第 50[(4.05 ± 0.44)mmol/L]及 60min[(3.60 ± 0.50)mmol/L]分别比较均有显著差异($P < 0.01$)。

四、不同灌注速度静脉引流不畅结果

全部 24 条后肢初始以 10ml/min 灌注,未见静脉引流不畅; 12ml/min 流速灌注 10min 内(5~7min)有 2 只兔双侧后肢均出现静脉引流不畅,发生率 16.7%(4/24), 17ml/min 灌注 5min 内静脉引流不畅发生率 75%(18/24); 22ml/min 灌注 3min 内引流不畅发生率 100%(24/24)。后两者与前两者经方差分析, χ^2 检验有非常显著差异($P < 0.001$)。

五、灌注前后 200ml/min 氧流组与 100ml/min 氧流组肢体围径均无显著差异($P > 0.05$)。

讨 论

在肢体隔离灌注中首先需要解决的是灌注流速问题。当灌注速度明显低于或高于生理流速时,产

生肢体并发症程度将增高^[8],表现为组织缺血缺氧或筋膜间隙压力增高,肢体充血肿胀。国内外文献所报道的肢体灌注速度相差悬殊,没有相对的标准范围,亦未提供采用上述灌注速度的客观依据。对于 ILP 常见的肢体肿胀,我们也认为与灌注流量有关。

本实验证明,大于平均流速的灌注可导致动脉充血,动脉输入端血压上升; 静脉端引流不畅,连接管瘪陷,后者表现更为直观,且灌注速度愈快出现概率愈大,时间愈早。徐世伟等^[9]亦有报道。

超声测定血流速度的方法,临床上广泛应用。Borel 等^[11]在肝脏灌注中测定肝动脉及门静脉血流速度。我们受此启发,假设采用多普勒超声测定血液生理流速,可以作为选择 ILP 流速的客观参照。

实验结果提示 Doppler 超声测算提供的平均血流速度 10~12ml/min 更接近生理血流速度,可以作为调节灌注速度的依据。当流速在 17 或 22ml/min 时,肢体静脉引流不畅发生率甚高,分别为 75% 和 100%, 在 12ml/min 流速时发生率仅为 16.7%, 根据超声调整在 10~12ml/min 时静脉引流不畅发生率为 0。根据实验结果可以认为:参照超声平均血流速度,灌注中适当调整的方法是唯一可行的客观标准,可以保证灌注的正常进行。相信这一方法在今后人体的肢体隔离灌注化疗中也有应用价值。

模型建立中另一关键因素是氧流速度的调节。适量的氧交换速度可以使隔离肢体处于接近生理状态的氧含量及酸碱环境。本组无氧灌注 10min 的血气值结果显示, pH 值、PO₂ 值下降均超过生理正常值范围(生理正常范围 pH7.31~7.43; PO₂62~84mmHg)。肢体处于缺氧酸中毒状态。200ml/min 氧流组血气值 pH 及 PO₂ 值均明显高于灌注前及生理正常值,因氧流速速度加大,气体交换加量,CO₂ 排出增多,PCO₂ 明显低于生理正常值(PCO₂ 30~40mmHg), 肢体虽未缺氧,但处于碱中毒状态,导致血红蛋白氧解离能力下降,组织供氧相对不足,碱中毒也可引起细胞内糖原分解。100ml/min 氧流组 pH 值、PCO₂ 值与灌注前无显著差异,在正常值范围内; PO₂ 值虽然显著高于灌注前,但也在生理正常值范围内。肢体内环境既未缺氧亦未出现酸碱平衡失调。根据实验结果可以认为 100ml/min 氧流速速度是合适的气体交换速度。本实验中氧流速速度决定着血液中 CO₂ 排出速度,从而决定了 PCO₂ 及 pH 值走向。

血糖变化是本实验值得考虑的另一个因素。从

实验结果看,30min 的血糖值已降至生理正常范围以下(血糖正常值范围(6.30~8.8mmol/L),未补充血糖第 60min 血糖值(3.6±0.5)mmol/L 是灌注前的一半[(7.84±0.54)mmol/L]。因此血糖的改变在模型的建立中应该作为关键因素加以调整。低血糖可以导致肌肉组织分解;血糖的高低影响着红细胞及神经组织的功能。从实验结果分析,补充血糖(于实验半程中)后第 40min 血糖值可以达到灌注前的水平($P>0.05$)。40~60min,补充血糖组与未补充血糖组血糖值均有显著差异($P<0.01$)。综上所述,实验半程有必要补充血糖,灌注前平均血糖下限值与灌注 30min 的平均血糖下限值之差,可以作为补充血糖量的依据。

侧支循环阻断的程度决定着肢体隔离灌注化疗药漏出的量。实验中绑扎止血带前后及调整止血带松紧度,通过 DSA 造影结果看,绑扎止血带水平以上,原先显影的血管其血液回流,可以完全被阻断。因此 DSA 可以验证止血带对侧支循环阻断的程度。通常情况下长时间过紧绑扎肢体尤其在人体上应用时,所担心的是肢体缺血坏死。本实验通过体外灌注不会引起缺血缺氧,在实验中有氧灌注前后的肢体围径未发生改变,肢体无水肿。调整后的体外循环系统能够避免长时间绑扎隔离所导致的肢体缺血缺氧水肿坏死。上述方法可以在人体肢体隔离灌注化疗中加以应用。

参 考 文 献

1 Creech OJ, Krement ET, Ryan PR, et al. Chemotherapy of can-

- cer: regional perfusion utilizing an extracorporeal circuit. *Ann Surg* 1958, 148:616-632.
- 2 Eggermont AM, Koops S, Klausner JM, et al. Isolated limb perfusion with tumor necrosis factor and melphalan for limb salvage in 186 patients with locally advanced soft tissue extremity sarcoma. The cumulative multi center European experience. *Ann Surg*, 1996, 224: 756-764.
- 3 Eroglu A, Kocaoglu H, Demirci S, et al. Isolated limb perfusion with cisplatin and doxorubicin for locally advanced soft tissue sarcoma of an extremity. *Eur J Surg Oncol*, 2000, 26:213-221.
- 4 Issakov J, Merimsky O, Gutman M, et al. Hyperthermic isolated limb perfusion with tumor necrosis factor-alpha and melphalan in advanced soft-tissue sarcomas: histopathological considerations. *Ann Surg Oncol*. 2000, 7:155-159.
- 5 夏贤良,杨迪生,范顺武,等.下肢骨肉瘤高温隔离灌注化疗初步报告. *中华骨科杂志*,1994,14:64-67.
- 6 杨迪生,范顺武,陶惠民,等.高温隔离灌注化疗在下肢骨与软组织肉瘤保肢治疗中的价值与限度. *中国矫形外科杂志*,1997,4: 347-349.
- 7 叶华,贾雨辰,田建明,等.恶性肿瘤的介入治疗(附 38 例报告). *中国实用外科杂志*,1995,15:155-157.
- 8 李成朗,陈君坤,黄伟,等.动脉灌注治疗肢体恶性肿瘤(附 50 例分析). *中国影像医学杂志*,1994,2:155-157.
- 9 徐世伟,陈芳,赵玉华,等.铂剂在下肢骨肉瘤区域高温隔离灌注化疗中的应用. *中国肿瘤临床与康复*,1997,4:33-34.
- 10 Klaase J M, Kroon BBB, Van Geel AN, et al. Systemic leakage during isolated limb perfusion for melanoma. *Br J Surg*, 1993, 80: 1124-1126.
- 11 Borel Rinkes IH, de Vries MR, Jonker AM, et al. Isolated hepatic perfusion in the pig with TNF- α with and without melphalan. *Br J Cancer*, 1997, 75:1447-1453.
- 12 王卫东,李麟芬,王杰.高温顺铂液肢体区域性隔离灌注不良反应的观察. *介入放射学杂志*,2000,9:102-104.

(收稿日期:2001-09-17)

·消息·

介入放射学新技术论坛通知

介入放射学杂志与青岛市海慈医疗集团海慈医学影像中心、青岛市海慈医学影像研究院联合举办的“介入放射学新技术论坛”,被定为青岛市重点继续教育项目,并颁发学分证书。届时将邀请著名介入放射学教授 Dr Apitzsch(德国)、Dr Sciafani(美国)和国内有关专家分别讲授椎体成形术、血管支架置入术、动脉创伤的介入治疗、多弹头射频消融治疗肿瘤、CT 引导下神经丛阻滞治疗癌性疼痛的理论与临床经验。以上内容采取理论授课与手术观摩相结合的方式,并重点传授椎体成形术技术。学员对象为具有中级或中级以上职称的卫生专业人员。介入放射学新技术论坛将于 2002 年

10 月 23~25 日在青岛市海慈医疗集团海慈医学影像中心学术报告厅举行。欲参加者请即向会务组报名。

联系电话:0532-3755465 13685322419。(念丁芳)

通讯地址:青岛市人民路 4 号 海慈医学影像中心 念丁芳

邮 编:266033

(附:2002 年 10 月 22 日报到,26 日撤离,会务、材料、食宿费共收 1000 元。报到地点青岛市山东路青岛大酒店会务组。)