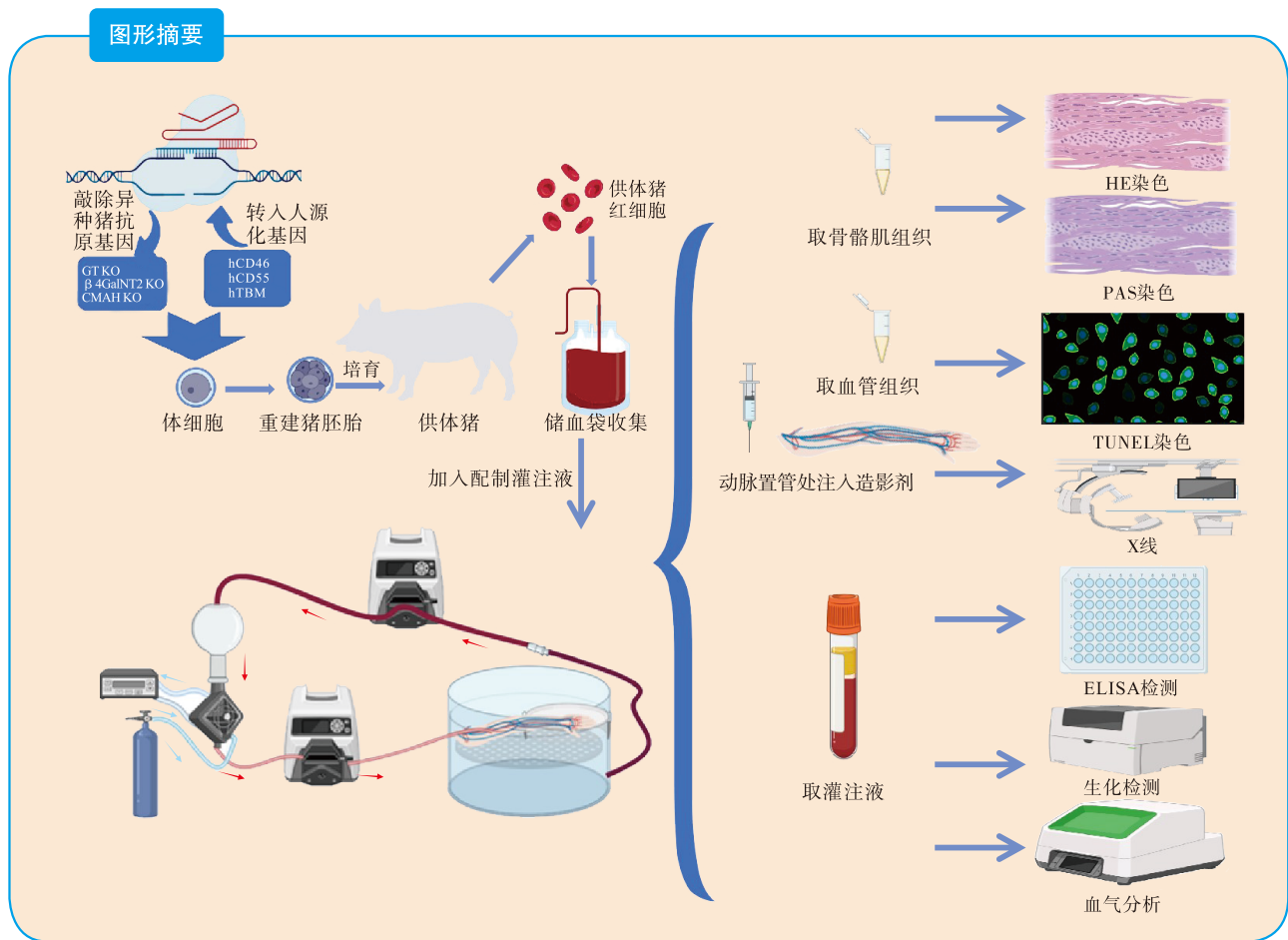


· 论著 ·

# 人源化基因修饰猪红细胞常温机械灌注技术 对人断肢的保护作用

董阳辉 宋翔宇 杨臻璞 贾志博 陈蕾佳 陈恒 杨占程 左浩辰 许文静 彭江



**【摘要】** 目的 探讨人源化基因修饰猪红细胞常温机械灌注对人离断肢体的保存作用。方法 采用人源化基因修饰猪红细胞灌注人离断肢体 6 h。每小时取灌注液检测血氧分压、 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、pH 值、葡萄糖、乳酸

DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2024102

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFA0110704)

作者单位: 075000 河北张家口, 河北北方学院研究生院 (董阳辉、宋翔宇、杨臻璞、贾志博、陈蕾佳); 中国人民解放军总医院第四医学中心骨科医学部研究所 (董阳辉、宋翔宇、杨臻璞、贾志博、陈蕾佳、陈恒、杨占程、左浩辰、许文静、彭江)

作者简介: 董阳辉 (ORCID 0009-0003-0348-6472), 硕士研究生, 研究方向为骨外科学, Email: 583652764@qq.com; 宋翔宇 (ORCID 0009-0003-3673-3839), 硕士, 医师, 研究方向为外科学, Email: songxiangyu5281@163.com (董阳辉、宋翔宇为共同第一作者)

通信作者: 许文静 (ORCID 0000-0003-3411-5060), 硕士, 副主任技师, 研究方向为组织工程和断肢灌注, Email: wenjingkitty@163.com; 彭江 (ORCID 0000-0003-4662-9288), 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 研究方向为骨外科学, Email: pengjiang301@126.com

及肌酸激酶水平,取浅层屈肌检测肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 、白细胞介素(IL)-2、IL-1变化。灌注0 h、6 h取适量前臂浅层屈肌,进行病理学检查,观察骨骼肌细胞间隙及糖原消耗情况。每2 h取适量前臂血管,检测血管内皮细胞凋亡情况。灌注开始前及灌注6 h行X线造影,观察指端末梢血管充盈度。**结果** 灌注过程中氧分压处于正常范围。 $\text{Na}^+$ 在1 h出现高峰,达到138.7 mmol/L,之后波动于正常范围; $\text{K}^+$ 在2 h出现高峰,为6.08 mmol/L,之后下降,波动于正常范围; $\text{Ca}^{2+}$ 在4 h达高峰,为1.03 mmol/L。葡萄糖在灌注开始时逐渐降低,灌注2 h时达最低值17.7 mmol/L,之后维持动态平衡。pH值在灌注6 h降低为7.28,乳酸水平在灌注1 h时升高,达到9.6 mmol/L,之后逐渐呈下降趋势。肌酸激酶水平从灌注开始升高,于2 h到达高峰,为20 030 U/L,之后下降,在灌注结束时保持稳定。灌注结束肌纤维形态正常,肌纤维间隙略有增大,骨骼肌糖原未见明显蓄积。灌注0 h时血管内皮凋亡细胞数量较多,6 h时凋亡细胞数量减少。灌注0 h时血管充盈明显,6 h时指间部分血管充盈程度减低。**结论** 人源化基因修饰猪血红细胞常温机械灌注人断肢能持续稳定的供能供氧,保持灌注液离子酸碱度平衡,维持细胞正常代谢,对离断肢体有一定保护作用。

【关键词】 常温机械灌注;基因修饰猪;红细胞;离断肢体;缺血-再灌注损伤;炎症因子;酸碱度;乳酸

【中图分类号】 R617, R658 【文献标志码】 A 【文章编号】 1674-7445 (2024) 05-0012-08

**Protective effect of normothermic mechanical perfusion with red blood cells from humanized genetically modified pigs on severed human limb**

Dong Yanghui\*, Song Xiangyu, Yang Liupu, Jia Zhibo, Chen Leijia, Chen Heng, Yang Zhancheng, Zuo Haochen, Xu Wenjing, Peng Jiang. \*Graduate School of Hebei North University, Zhangjiakou 075000, China

Corresponding authors: Xu Wenjing, Email: wenjingkitty@163.com

Peng Jiang, Email: pengjiang301@126.com

【Abstract】 **Objective** To evaluate the preservation effect of normothermic mechanical perfusion with red blood cells from humanized genetically modified pig on severed human limbs. **Methods** Severed human limbs were perfused with red blood cells from humanized genetically modified pigs for 6 h. Perfusion solution was taken every hour to measure the oxygen partial pressure,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$ , pH value, glucose, lactic acid and creatine kinase levels. Superficial flexor muscle was sampled to detect the changes of tumor necrosis factor (TNF)- $\alpha$ , interleukin (IL)-2 and IL-1 levels. At 0 and 6 h after perfusion, the superficial flexor muscles of the forearm were taken for pathological examination. Intercellular space and glycogen consumption of skeletal muscles were observed. An appropriate amount of forearm vessels was collected every 2 h to detect the apoptosis of vascular endothelial cells. X-ray angiography was performed before perfusion and 6 h after perfusion to observe the filling degree of finger-tip peripheral vessels. **Results** The oxygen partial pressure was observed in the normal range throughout the perfusion.  $\text{Na}^+$  concentration peaked at 1 h, reaching 138.7 mmol/L, and then fluctuated within the normal range.  $\text{K}^+$  level peaked at 2 h up to 6.08 mmol/L, then decreased and fluctuated within the normal range.  $\text{Ca}^{2+}$  concentration reached the peak at 4 h, up to 1.03 mmol/L. Glucose level was gradually decreased at the beginning of perfusion, reaching the lowest value of 17.7 mmol/L at 2 h after perfusion, and then maintained a dynamic balance. The pH value was decreased to 7.28 at 6 h after perfusion. The lactic acid level was increased to 9.6 mmol/L at 1 h after perfusion, and then gradually decreased. The creatine kinase level was increased at the start of perfusion, reached the peak at 2 h up to 20 030 U/L, then decreased and remained stable at the end of perfusion. At the end of perfusion, the morphology of muscle fibers was normal, the gap among muscle fibers was expanded slightly, and the glycogen of skeletal muscles was not significantly accumulated. At 0 h perfusion, the number of apoptotic cells in vascular endothelial cells was large, which was declined at 6 h perfusion. Evident vascular filling was observed at 0 h, and the filling degree of some finger-tip vessels was decreased at 6 h. **Conclusions** Normothermic mechanical perfusion of severed human limbs with red blood cells from humanized genetically modified pigs may continuously and stably supply energy and oxygen, adjust the ion pH balance of perfusion solution, maintain normal cellular metabolism and exerts certain protective effect upon severed human limbs.

【Key words】 Normothermic machine perfusion; Genetically modified pig; Red blood cell; Severed limb; Ischemia-reperfusion injury; Inflammatory factor; pH value; Lactic acid

严重创伤引起肢体离断、血流终止，离断肢体缺血、缺氧产生的有害分子引起级联反应最终导致死亡。目前研究认为机体缺血后细胞发生酸中毒及水肿，进而引起细胞膜和细胞器的继发性损伤，造成细胞死亡，同时与自由基的产生、三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）耗竭、离子稳态失衡有关<sup>[1]</sup>。当发生肢体离断或毁损伤时，目前对离断肢体保存的金标准仍是静态冷保存（static cold storage, SCS），但其对离断肢体的保存时间有限，离断肢体在静态冷保存条件为 4~6 h，超过 6 h 会对肢体造成不可逆损伤<sup>[2-3]</sup>。

体外机械灌注技术联合氧合膜肺，可以替代心肺功能将血液输送到组织同时提供氧气和能量，在肝、心、肾、肢体和肺组织移植前的保存和术后功能恢复有重要作用<sup>[4-8]</sup>。与 SCS 不同，机械灌注是从器官固有血管系统插管，连续灌注输送养分，同时对器官进行保存与修复<sup>[5]</sup>。常温机械灌注（normothermic machine perfusion, NMP）作为机械灌注方式的一种，因其接近人体生理环境（32~37℃），在肾脏、肝脏、心脏以及小肠移植等方面已有应用且可使相应器官的功能恢复<sup>[9-13]</sup>。NMP 有可能补充和维持 ATP 水平，从而减轻缺血-再灌注损伤（ischemia-reperfusion injury, IRI）<sup>[14]</sup>，且其温度接近生理条件，使器官在移植前保存生存能力和质量评估成为可能<sup>[6]</sup>。国内外相关研究表明，离断肢体借助机械灌注维持 24 h，组织损伤仍低于 SCS 4~6 h<sup>[15-18]</sup>。

NMP 采用血液灌注，更符合生理条件，保存效果更好，但由于血液紧缺，且存在配型不合，运输困难和传染病等问题，获得困难和应用受限<sup>[19]</sup>。异种血是良好的选择，基因修饰猪饲养周期短，可大量获得血红细胞，解决血液短缺问题，更易在低温下保存和远距离运输。近年来，随着基因修饰技术的发展，排斥反应、凝血功能失调，炎症反应以及猪逆转录病毒等问题有望得到解决<sup>[20-24]</sup>。据此，本研究设计一种人源化基因修饰猪红细胞联合便携式机械灌注装置在常温下灌注离断肢体的模型，探索 NMP 对离断肢体的保存作用，为肢体的保存提供参考。

## 1 材料与方 法

### 1.1 动物及断肢来源

转基因猪由成都中科奥格生物科技有限公司提供，敲除  $\alpha$ -1, 3-半乳糖基转移酶（ $\alpha$ -1, 3-galactosyltransferase, GGTA1）基因、 $\beta$ -1,4-N-乙酰氨基半乳糖转移酶 2（ $\beta$ -1,4-N-acetylgalactosaminyltransferase

2,  $\beta$ 4GalNT2）基因、单磷酸胞嘧啶-N-乙酰神经氨酸羟化酶（cytidine monophospho-N-acetylneuraminic acid hydroxylase, CMAH）基因，转入人补体调节蛋白（hCD46、hCD55）和人血栓调节蛋白（human thrombomodulin, hTBM），即 GTKO/ $\beta$ 4GalNT2KO/CMAHKO/hCD55/hCD46/hTBM 的六基因修饰猪，本实验经中国人民解放军军事医学研究院生物医学伦理委员会批准（审批号：IACUC-DWZX-2021-503）。

断肢来源于 1 例 68 岁女性患者，于 2023 年 8 月因右上肢肱骨近端淋巴管肉瘤于解放军总医院第四医学中心行右上肢经腋孟关节离断术。本研究经解放军总医院临床伦理委员会审批通过（审批号：S2021-685-01）。

### 1.2 主要试剂与仪器

主要试剂包括 4% 多聚甲醛、0.9% 氯化钠溶液、葡萄糖酸钙、盐酸赛拉嗪、盐酸替来他明、盐酸唑拉西洋、肝素钠、羟乙基淀粉 130/0.4 氯化钠、头孢唑林钠、甲泼尼龙琥珀酸钠、葡萄糖、胰岛素、碳酸氢钠注射液，苏木素-伊红（hematoxylin-eosin, HE）、过碘酸-雪夫（periodic acid-Schiff, PAS）染色液，脱氧核糖核酸末端转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记（terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling, TUNEL）细胞凋亡检测试剂盒，人肿瘤坏死因子（tumor necrosis factor, TNF）- $\alpha$ 、白细胞介素（interleukin, IL）-2、IL-1 酶联免疫吸附试验（enzyme-linked immune absorbent assay, ELISA）试剂盒，磷酸盐缓冲液（phosphate buffer saline, PBS）。

主要仪器包括荧光显微镜、冷冻切片机、膜式氧合器、蠕动泵、恒温箱、制氧机、储物槽、全自动血生化分析仪、血细胞分析仪、离心机。

### 1.3 实验方法

血液收集：在猪右侧臀部分别注射 0.03 mL/kg 的盐酸赛拉嗪和盐酸唑拉西洋。备皮、消毒后仰卧于手术台上，铺无菌巾单，沿右侧颈部切开一小口置入 10F 引流管，结扎固定，外接无菌血袋，储存于 4℃ 冰箱。

灌注液配备：从 4℃ 冰箱中取出采集好的血液，将 400 mL 羟乙基淀粉 130/0.4 氯化钠注射液加入至 400 mL 血液中，依次加入葡萄糖酸钙注射液 20 mL、头孢唑林钠注射液 1 g、甲泼尼龙琥珀酸钠注射液 500 mg、肝素钠注射液 12 500 U、葡萄糖注射液 10 mL、胰岛素注射液 1 U、碳酸氢钠注射液

10 mL, 根据灌注液检测数值进行调整。

灌注装置包括膜式氧合器、蠕动泵、恒温箱、制氧机、储物槽、连接管(内径 6.44 mm, 外径 9.6 mm)。灌注过程中, 每 2 h 取少量前臂浅层屈肌, 分别在多聚甲醛中固定和 Ep 管中深低温冰箱保存。

#### 1.4 研究内容及方法

1.4.1 血氧分压检测 自灌注开始, 每小时抽取灌注液进行血气分析, 记录动脉血氧分压。

1.4.2 离子和酸碱度检测 每小时收集灌注液, 检测  $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 、 $\text{Ca}^{2+}$ 、葡萄糖水平、pH 值、乳酸水平, 分析离断肢体的细胞代谢和酸碱平衡。

1.4.3 肌酸激酶水平 每小时收集灌注液 2 mL, 放置乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)管中离心后留取血清检测。

1.4.4 组织炎症因子变化 取灌注 0 h、2 h、4 h、6 h 肌肉组织, 按照 ELISA 试剂盒说明书, 检测 TNF- $\alpha$ 、IL-2、IL-1 水平。

1.4.5 组织病理学 取灌注 0 h、6 h 肌肉组织, 制备石蜡切片行 HE 染色, 观察骨骼肌形态和肌间隙变化。行 PAS 染色观察肌肉组织中葡萄糖的消耗。

1.4.6 血管细胞凋亡检测 留取每 2 h 血管, 使用 TUNEL 染色检测细胞凋亡情况。

1.4.7 X 线造影观察末梢血管充盈度 实验前后拍摄离断肢体的正斜位片。灌注 0 h、6 h 拍摄 X 线片(电压: 90 KV, 电流: 4 mA), 并从肱动脉置管处注入 15 mL 碘海醇造影剂进行对比, 观察末梢血管的充盈程度。

#### 1.5 统计学方法

采用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示, 两组间的比较采用独立样本 *t* 检验。所有检验为双侧,

$P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 灌注过程中动脉血氧分压及肌酸激酶变化

灌注期间氧分压波动于 304.95~318.21 mmHg (1 mmHg=0.133 kPa), 肢体含氧量较高, 未见肢体缺氧, 血氧分压波动较大(图 1A); 肌酸激酶水平为 3 538~20 030 U/L(图 1B)。

### 2.2 灌注过程中细胞代谢和组织炎症因子变化

灌注液  $\text{Na}^+$  水平为 136.6~138.7 mmol/L,  $\text{K}^+$  水平为 4.46~6.08 mmol/L,  $\text{Ca}^{2+}$  水平为 0.25~1.03 mmol/L, 葡萄糖水平为 17.7~59.0 mmol/L, pH 值为 7.28~7.48, 乳酸水平为 4.60~9.62 mmol/L(图 2A~F)。

灌注过程中, 肌肉组织 TNF- $\alpha$  水平相对稳定, IL-2 水平略微波动, IL-1 水平总体呈下降趋势(图 2G~I)。

### 2.3 灌注前后组织病理学表现

HE 染色结果显示, 灌注 0 h 骨骼肌纤维排列致密, 肌间隙正常; 6 h 肌纤维排列仍较致密, 失去部分组织形态, 肌间隙未见明显增大(图 3A~B)。

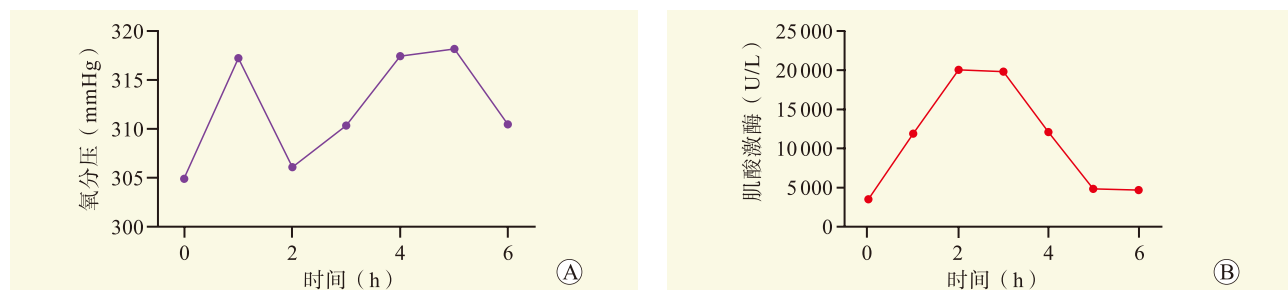
PAS 染色显示, 灌注 0 h 肌肉组织糖原水平正常; 6 h 肌糖原消耗, 未见明显蓄积(图 3C~E)。

### 2.4 灌注过程中血管细胞凋亡情况

TUNEL 染色结果显示, 灌注 0 h 时凋亡细胞数量较多, 2 h、4 h 时凋亡细胞数量无明显变化, 6 h 时凋亡细胞数量减少(图 4)。

### 2.5 灌注前后末梢血管充盈程度

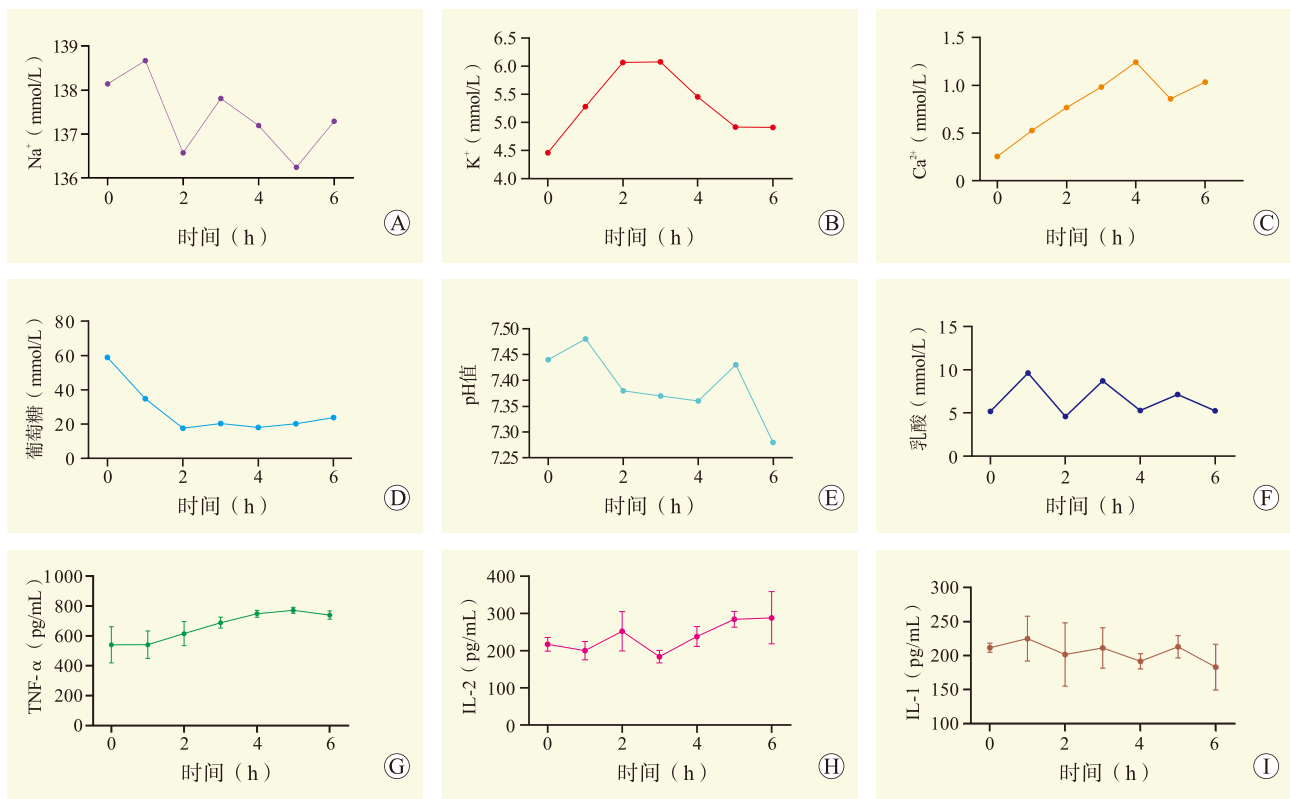
灌注 0 h 可见末梢指间动脉显影明显, 其增强图像更能明显看到充盈的指间动脉。6 h 末梢血管的充盈程度较 0 h 部分充盈程度减弱, 增强图像表现出相同的征象(图 5)。



注: A 图为氧分压变化; B 图为肌酸激酶变化。

图 1 灌注过程中氧分压及肌酸激酶变化

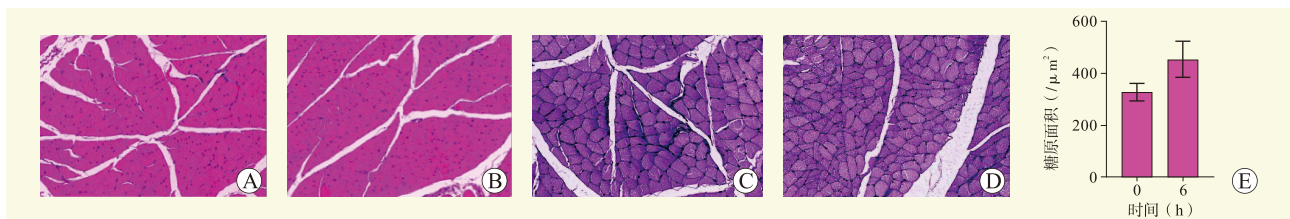
Figure 1 Changes in oxygen partial pressure and creatine kinase during perfusion



注：A 图为 Na<sup>+</sup>水平变化；B 图为 K<sup>+</sup>水平变化；C 图为 Ca<sup>2+</sup>水平变化；D 图为葡萄糖水平变化；E 图为 pH 值变化；F 图为乳酸水平变化；G 图为 TNF-α 水平变化；H 图为 IL-2 水平变化；I 图为 IL-1 水平变化。

图 2 灌注过程中细胞代谢和组织炎症因子变化

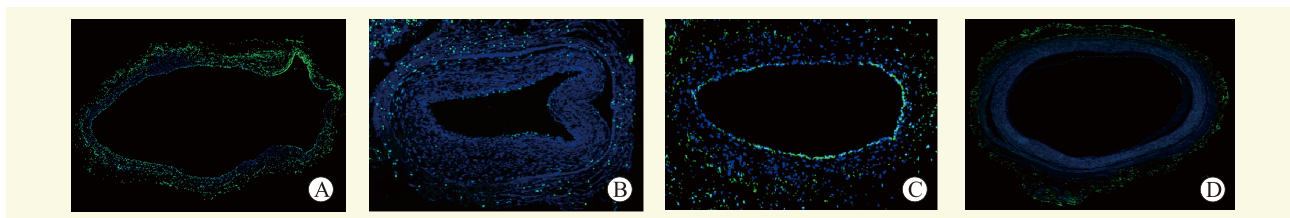
Figure 2 Changes in cellular metabolism and inflammatory factors in tissues during perfusion



注：A 图为灌注 0 h 断肢前臂浅层屈肌 (HE, ×200)；B 图灌注 6 h 断肢前臂浅层屈肌 (HE, ×200)；C 图为灌注 0 h 糖原表达 (PAS, ×200)；D 图为灌注 6 h 糖原表达 (PAS, ×200)；E 图为灌注 0 h、6 h 骨骼肌细胞内糖原面积比较。

图 3 灌注开始及结束时骨骼肌病理表现及糖原水平

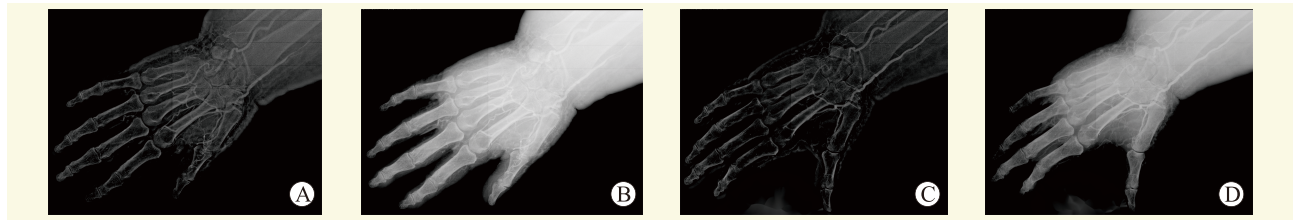
Figure 3 Skeletal muscle pathological manifestations and glycogen content at the beginning and end of perfusion



注：A 图为灌注 0 h 血管细胞凋亡情况；B 图为灌注 2 h 血管细胞凋亡情况；C 图为灌注 4 h 血管细胞凋亡情况；D 图为灌注 6 h 血管细胞凋亡情况。

图 4 灌注过程中血管细胞凋亡情况 (TUNEL, ×500)

Figure 4 Apoptosis of vascular cell during perfusion



注: A 图为灌注 0 h 经肱动脉碘海醇增强造影, 指间动脉显影明显; B 图为灌注 0 h 经肱动脉碘海醇造影, 指间动脉可见明显充盈; C 图为灌注 6 h 经肱动脉碘海醇增强造影, 指间动脉部分显影; D 图为灌注 6 h 经肱动脉碘海醇造影, 指间动脉可见充盈不明显。

图 5 灌注前后末梢血管 X 线摄影

Figure 5 Peripheral vascular X-ray imaging before and after perfusion

### 3 讨论

肢体离断后的再灌注对于离断肢体组织的保护有显著的临床意义, 目前国内外对四肢离断的保存尚无明确结论。肢体由来源于不同胚层的细胞发育而来, 骨骼肌对 IRI 最为敏感<sup>[25-26]</sup>。本研究发现 NMP 可通过供能供氧、平衡离子稳态、减少炎症因子产生、减少乳酸产生等保护骨骼肌细胞, 减轻 IRI。

NMP 采用氧合的方法能减轻离断肢体再灌注后的氧化损伤<sup>[27-28]</sup>。美国耶鲁大学团队表明, 蠕动泵会破坏红细胞, 6 h 后对组织的保护作用明显降低<sup>[29]</sup>。本研究中, 人源化转基因猪血红细胞为骨骼肌细胞提供持续的氧气供给, 在整个灌注期间, 肢体含氧量较高, 未见肢体缺氧。 $\text{Na}^+$ 、 $\text{K}^+$ 和  $\text{Ca}^{2+}$ 主要维持细胞渗透压和细胞电活动, 本研究中  $\text{Na}^+$ 水平未见明显波动, 可以维持正常的机体  $\text{Na}^+$ - $\text{K}^+$ 泵交换,  $\text{K}^+$ 水平在灌注 2 h 时达最高, 6 h 略有升高, 可能因为灌注过程中蠕动泵造成红细胞机械性损伤使细胞内大量  $\text{K}^+$ 释放到细胞外, 以及骨骼肌细胞凋亡, 坏死膜内  $\text{K}^+$ 释放。 $\text{Ca}^{2+}$ 水平 4 h 内缓慢升高, 一定程度上是由于向灌注液中添加葡萄糖酸钙所致, 以及  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 交换增多引起。

肌酸激酶水平在 3 h 内升高可能是由于蠕动泵灌注对红细胞造成机械性损伤, 导致溶血。缺氧时机体进行无氧糖酵解, 引起 ATP 耗尽, ATP 产生障碍,  $\text{Na}^+$ - $\text{Ca}^{2+}$ 泵停止转运, 细胞内环境稳态丧失, 诱导炎症因子表达和组织水肿<sup>[30-32]</sup>。灌注过程中葡萄糖的水平在 2 h 内出现明显下降, 可能是由于骨骼肌耗能增多, 葡萄糖开始供能, 2 h 后温度平稳, 葡萄糖耗能基本维持平衡状态。葡萄糖水平过高可能受外部添加的影响。pH 值从 1 h 后开始略有下降, 可能是由于  $\text{H}^+$ - $\text{K}^+$

交换增多引起。灌注开始到灌注结束, 糖原水平出现明显下降, 是葡萄糖供能的表现。乳酸水平在灌注过程中未见明显增加, 与葡萄糖有氧供能有一定关系。

Said 等<sup>[33]</sup>对血红蛋白类氧载体进行了研究, 证明其免疫原性低、无溶血反应危险、扩散氧传递等优点。但是人工合成血红蛋白生产成本高, 产量和纯度过低, 不能满足大规模生产需求, 需探索新的合成体系<sup>[34]</sup>。另外由于其没有完整的细胞结构, 释氧速率快于天然红细胞<sup>[35]</sup>。猪红细胞的计数、直径、体积、渗透压和平均寿命等生理参数都与人类十分接近, 且猪血红蛋白与人血红蛋白也具有相似的三维结构, 存在 85% 基因相似度。本研究选用的基因修饰猪转入了人血栓调节蛋白, 具有抗炎、抗凝等功能<sup>[36-37]</sup>。灌注结束后灌注液中可见  $\text{TNF-}\alpha$  随着灌注时间的延长呈现相对稳定的变化,  $\text{IL-2}$  在灌注过程中略微波动,  $\text{IL-1}$  随着灌注时间的延长呈下降趋势, 总体呈现出炎症反应减轻。NMP 在骨骼肌组织保存方面可以较好维持血氧分压、离子稳态、葡萄糖供应和炎症因子水平, 能够较好的维持骨骼肌细胞的形态和功能, 有可能成为替代 SCS 的方法<sup>[38]</sup>。

当血流中断, 短时间内膜去极化、细胞水肿、血管通透性增加, 最终导致细胞坏死<sup>[4]</sup>。组织水肿可能通过纠正离子失衡和酸碱度来调节。本研究中, 人源化基因修饰猪血红细胞用于灌注 6 h 未发现明显细胞凋亡, 表明 NMP 可能为离断肢体提供 ATP, 减缓细胞凋亡。灌注 0 h 时离断肢体末端血管造影显示微循环血管充盈, 6 h 时末端血管造影显示微循环充盈程度差, 可能是由于灌注过程中离断肢体水肿, 微循环动脉阻力增加引起。

综上所述, 本研究发现人源化基因修饰猪血红细

胞用于 NMP 能持续稳定地对断肢供能供氧、保持离子稳态和调节酸碱度,减少炎症因子产生,在骨骼肌细胞保存方面有效,可为离断肢体缺血性损伤的保存开拓新的路径,为将来临床前试验提供参考。但本研究缺少免疫原性评价,未来还需从蛋白质和基因层面对通路和机制进行研究,以及从线粒体等细胞器方面进行评价。

**致谢:** 感谢解放军总医院第四医学中心为本研究提供离断肢体!

### 参考文献:

- [1] ANDRIJEVIC D, VRSELJA Z, LYSYY T, et al. Cellular recovery after prolonged warm ischaemia of the whole body[J]. *Nature*, 2022, 608(7922): 405-412. DOI: 10.1038/s41586-022-05016-1.
- [2] MOHR A, BROCKMANN JG, BECKER F. HTK-N: modified histidine-tryptophan-ketoglutarate solution-a promising new tool in solid organ preservation[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(18): 6468. DOI: 10.3390/ijms21186468.
- [3] 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.
- [4] MALINOSKI D, SAUNDERS C, SWAIN S, et al. Hypothermia or machine perfusion in kidney donors[J]. *N Engl J Med*, 2023, 388(5): 418-426. DOI: 10.1056/NEJMoa2118265.
- [5] 何世辉. 用于肝脏机械灌注的超声波流量传感器设计与研究[D]. 杭州: 浙江大学, 2023.
- [6] RESCH T, CARDINI B, OBERHUBER R, et al. Transplanting marginal organs in the era of modern machine perfusion and advanced organ monitoring[J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 631. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00631.
- [7] BONACCORSI-RIANI E, BRÜGGENWIRTH IMA, BUCHWALD JE, et al. Machine perfusion: cold versus warm, versus neither. update on clinical trials[J]. *Semin Liver Dis*, 2020, 40(3): 264-281. DOI: 10.1055/s-0040-1713118.
- [8] POSSOZ J, NEYRINCK A, VAN RAEMDONCK D. Ex vivo lung perfusion prior to transplantation: an overview of current clinical practice worldwide[J]. *J Thorac Dis*, 2019, 11(4): 1635-1650. DOI: 10.21037/jtd.2019.04.33.
- [9] 何宇, 余双进, 阮和欢, 等. 常温机械灌注体外修复心脏死亡供肾的初步探索[J/OL]. *实用器官移植电子杂志*, 2022, 10(3): 219-225. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2022.03.006.  
HE Y, YU SJ, RUAN HH, et al. Preliminary exploration on in vitro repair of donor kidney after cardiac death by normothermic machine perfusion[J/OL]. *Pract J Organ Transplant (Electr Vers)*, 2022, 10(3): 219-225. DOI: 10.3969/j.issn.2095-5332.2022.03.006.
- [10] MEDRESSOVA A, FAIZOV L, KUANYSHBEK A, et al. Successful heart transplantation after 17 h ex vivo time using the Organ Care System-3 years follow-up[J]. *J Card Surg*, 2021, 36(7): 2592-2595. DOI: 10.1111/jocs.15519.
- [11] HAMED MO, BARLOW AD, DOLEZALOVA N, et al. Ex vivo normothermic perfusion of isolated segmental porcine bowel: a novel functional model of the small intestine[J]. *BJS Open*, 2021, 5(2): zrab009. DOI: 10.1093/bjsopen/zrab009.
- [12] 汪恺, 苏仁义, 王周城, 等. “机械灌注+” 视阈下扩大标准供肝的修复与功能提升[J]. *中华消化外科杂志*, 2022, 21(1): 74-78. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20211220-00668.  
WANG K, SU RY, WANG ZC, et al. Extended criteria donor reconditioning and functional improvement in the viewshed of machine perfusion plus[J]. *Chin J Dig Surg*, 2022, 21(1): 74-78. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20211220-00668.
- [13] LAU NS, LY M, DENNIS C, et al. Long-term ex situ normothermic perfusion of human split livers for more than 1 week[J]. *Nat Commun*, 2023, 14(1): 4755. DOI: 10.1038/s41467-023-40154-8.
- [14] RIVEROS S, MARINO C, OCHOA G, et al. Customized normothermic machine perfusion decreases ischemia-reperfusion injury compared with static cold storage in a porcine model of liver transplantation[J]. *Artif Organs*, 2023, 47(1): 148-159. DOI: 10.1111/aor.14390.
- [15] 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.
- [16] 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.
- [17] OZER K, ROJAS-PENA A, MENDIAS CL, et al. The effect of ex situ perfusion in a swine limb vascularized composite tissue allograft on survival up to 24 hours[J]. *J Hand Surg Am*, 2016, 41(1): 3-12. DOI: 10.1016/j.jhssa.2015.11.003.
- [18] 尹叶锋, 王江宁, 高磊, 等. 不同温度对体外模拟体内生理环境寄养断肢系统的影响研究[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2013, 27(1): 72-76.  
YIN YF, WANG JN, GAO L, et al. Effect of different temperatures on system of in vitro physiological environment fostering limbs[J]. *Chin J Reparative Reconstr Surg*, 2013, 27(1): 72-76.
- [19] 陈鸣, 陈显成, 王经琳, 等. 新型携氧纳米粒人工灌注液用于猪心死亡后供肝常温灌注保存[J]. *浙江大学学报(医学版)*, 2022, 51(6): 697-706. DOI: 10.3724/zdxbyxb-2022-0402.  
CHEN M, CHEN XC, WANG JL, et al. Application of a novel artificial perfusate based on oxygen-carrying nanoparticles in normothermic machine perfusion for porcine liver preservation after cardiac death[J]. *J Zhejiang Univ (Med Sci)*, 2022, 51(6): 697-706. DOI: 10.3724/zdxbyxb-2022-0402.

- [20] 窦科峰, 张玄, 陶开山. 异种移植存在的问题及国内发展现状[J]. 空军军医大学学报, 2024, 45(1): 1-4. DOI: 10.13276/j.issn.2097-1656.2024.01.001.  
DOU KF, ZHANG X, TAO KS. Existing problems and domestic development of xenotransplantation[J]. J Air Force Med Univ, 2024, 45(1): 1-4. DOI: 10.13276/j.issn.2097-1656.2024.01.001.
- [21] PREISINGER D, WINOGRODZKI T, KLINGER B, et al. Genome editing in pigs[J]. Methods Mol Biol, 2023, 2631: 393-417. DOI: 10.1007/978-1-0716-2990-1\_19.
- [22] ADAMS AB, LOVASIK BP, FABER DA, et al. Anti-C5 antibody tesidolumab reduces early antibody-mediated rejection and prolongs survival in renal xenotransplantation[J]. Ann Surg, 2021, 274(3): 473-480. DOI: 10.1097/SLA.0000000000004996.
- [23] YAMADA K, YAZAWA K, SHIMIZU A, et al. Marked prolongation of porcine renal xenograft survival in baboons through the use of alpha1, 3-galactosyltransferase gene-knockout donors and the cotransplantation of vascularized thymic tissue[J]. Nat Med, 2005, 11(1): 32-34. DOI: 10.1038/nm1172.
- [24] FISCHER K, SCHNIEKE A. Xenotransplantation becoming reality[J]. Transgenic Res, 2022, 31(3): 391-398. DOI: 10.1007/s11248-022-00306-w.
- [25] OZER K. Advances in limb preservation: from replantation to transplantation[J]. J Hand Surg Am, 2020, 45(7): 626-637. e5. DOI: 10.1016/j.jhsa.2020.04.006.
- [26] 中国肝移植注册中心, 国家肝脏移植质控中心, 国家人体捐献器官获取质控中心, 等. 中国移植器官保护专家共识(2022版)[J]. 中华消化外科杂志, 2022, 21(2): 169-184. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20220214-00078. China Liver Transplant Registry, National Center for Healthcare Quality Management in Liver Transplant, National Quality Control Center for Human Donated Organ Procurement, et al. Chinese expert consensus on organ protection of transplantation (2022 edition)[J]. Chin J Dig Surg, 2022, 21(2): 169-184. DOI: 10.3760/cma.j.cn115610-20220214-00078.
- [27] CERESA CDL, NASRALLA D, POLLOK JM, et al. Machine perfusion of the liver: applications in transplantation and beyond[J]. Nat Rev Gastroenterol Hepatol, 2022, 19(3): 199-209. DOI: 10.1038/s41575-021-00557-8.
- [28] SCHLEGEL A, MULLER X, MUELLER M, et al. Hypothermic oxygenated perfusion protects from mitochondrial injury before liver transplantation[J]. EBioMedicine, 2020, 60: 103014. DOI: 10.1016/j.ebiom.2020.103014.
- [29] QUADER M, TORRADO JF, MANGINO MJ, et al. Temperature and flow rate limit the optimal ex-vivo perfusion of the heart - an experimental study[J]. J Cardiothorac Surg, 2020, 15(1): 180. DOI: 10.1186/s13019-020-01223-x.
- [30] CALABRESE B, JONES SL, SHIRAIISHI-YAMAGUCHI Y, et al. INF2-mediated actin filament reorganization confers intrinsic resilience to neuronal ischemic injury[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 6037. DOI: 10.1038/s41467-022-33268-y.
- [31] AMIN KR, STONE JP, KERR J, et al. Randomized preclinical study of machine perfusion in vascularized composite allografts[J]. Br J Surg, 2021, 108(5): 574-582. DOI: 10.1002/bjs.11921.
- [32] HUANG N, LI S, XIE Y, et al. Reprogramming an energetic AKT-PAK5 axis boosts axon energy supply and facilitates neuron survival and regeneration after injury and ischemia[J]. Curr Biol, 2021, 31(14): 3098-3114. e7. DOI: 10.1016/j.cub.2021.04.079.
- [33] SAID SA, ORDEÑANA CX, REZAEI M, et al. Ex-vivo normothermic limb perfusion with a hemoglobin-based oxygen carrier perfusate[J]. Mil Med, 2020, 185(Suppl 1): 110-120. DOI: 10.1093/milmed/usz314.
- [34] 任烽, 金怡杉, 陈露, 等. 人造血液的研究进展[J]. 基础医学与临床, 2024, 44(1): 124-130. DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2024.01.0124.  
REN F, JIN YS, CHEN L, et al. Research progress of artificial blood[J]. Basic Clin Med, 2024, 44(1): 124-130. DOI: 10.16352/j.issn.1001-6325.2024.01.0124.
- [35] 李蒞, 韩槌夏, 杨芳. 血红蛋白氧载体的研究与应用进展[J]. 中国材料进展, 2022, 41(5): 338-344. DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.202104022.  
LI D, HAN YX, YANG F. Research and application progress of hemoglobin oxygen carrier[J]. Mater China, 2022, 41(5): 338-344. DOI: 10.7502/j.issn.1674-3962.202104022.
- [36] 牛小芸, 谢喜秀. 血栓调节蛋白在疾病中的作用[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 2021, 37(8): 998-1004. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2021.01.1376.  
NIU XY, XIE XX. The role of thrombomodulin in diseases[J]. Chin J Biochem Mol Biol, 2021, 37(8): 998-1004. DOI: 10.13865/j.cnki.cjbmb.2021.01.1376.
- [37] BORON M, HAUZER-MARTIN T, KEIL J, et al. Circulating thrombomodulin: release mechanisms, measurements, and levels in diseases and medical procedures[J]. TH Open, 2022, 6(3): e194-e212. DOI: 10.1055/a-1801-2055.
- [38] STIMMEDER S, LEBER B, SUCHER R, et al. Genetic modulation: future trends toward graft optimization during machine perfusion[J]. Transplantation, 2024, 108(3): 614-624. DOI: 10.1097/TP.0000000000004738.

(收稿日期: 2024-03-30)

(本文编辑: 方引超 吴秋玲)