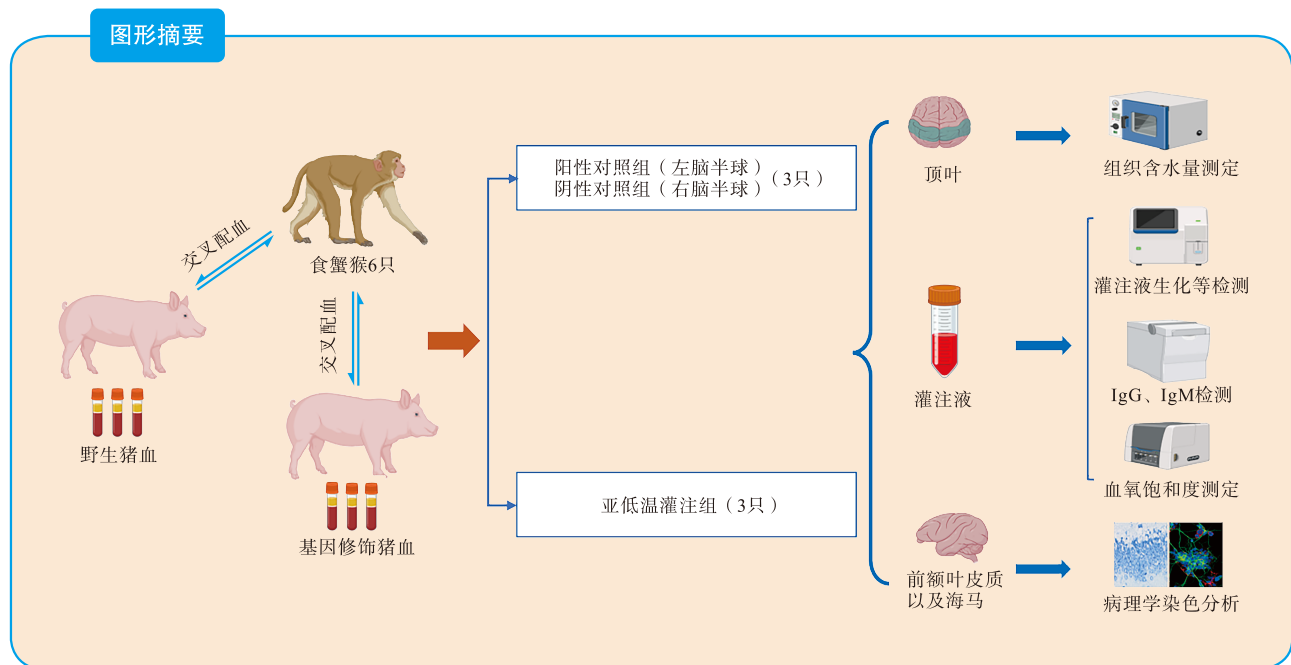


· 论著 ·

探索基于基因修饰猪红细胞灌注液亚低温有氧机械灌注对食蟹猴缺血缺氧脑损伤的保护作用

李申 董阳辉 宋翔宇 李鹏凯 米召迪 朱奕宣 崔梦一 彭熙为 程龙 袁满 许文静 彭江 赵亚群



【摘要】 目的 探讨基因修饰猪红细胞作为亚低温有氧机械灌注液对创伤性失血引起的食蟹猴脑组织缺血缺氧脑损伤的保护作用。**方法** 按随机数字表法将食蟹猴分为阳性对照组（左脑半球）、阴性对照组（右脑半球）（共3只）和亚低温灌注组（3只）。阳性对照组为自循环停止1 h直接取材，阴性对照组为自循环停止1 h亚低温放置6 h，亚低温灌注组为自循环停止1 h后利用基于基因修饰猪红细胞灌注液对食蟹猴缺血缺氧脑损伤模型双侧颈总动脉进行6 h亚低温有氧机械灌注。灌注前进行六基因修饰猪与食蟹猴交叉配血实验，灌注开始后检测0、1、2、3、4、5、6 h各时间点灌注液血常规指标水平变化，记录血氧饱和度，检测灌注液 Na^+ 、 K^+ 、

DOI: 10.12464/j.issn.1674-7445.2025148

基金项目：国家重点研发计划（2019YFA0110704）

作者单位：075051 河北张家口，河北北方学院研究生院（李申、董阳辉、米召迪、朱奕宣）；中国人民解放军总医院第一医学中心神经外科医学部（李申、朱奕宣、赵亚群），骨科医学部研究所（许文静）；骨科再生医学北京市重点实验室和全军骨科创伤重点实验室（李申、董阳辉、李鹏凯、米召迪、朱奕宣、崔梦一、彭熙为、许文静、彭江）；河北大学临床医学院（宋翔宇）；解放军医学院研究生院（李鹏凯）；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、李鹏凯、米召迪、崔梦一、彭熙为、彭江）；长治医学院（程龙、袁满）

作者简介：李申（ORCID 0009-0002-3554-3155），硕士研究生，研究方向为神经外科学，Email: 1298654653@qq.com；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（李申、董阳辉为本文共同第一作者）

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），博士，主任医师，研究方向为骨外科学，Email: pengjiang301@126.com；赵亚群（ORCID 0000-0001-8318-2660），医学博士，主任医师，研究方向为神经外科学、颅脑创伤等，Email: zhaoyaquan2@sina.com

Ca²⁺、葡萄糖水平和血液酸碱度 (pH 值), 以及灌注液 IgG 和 IgM 水平。灌注 6 h 后, 检测食蟹猴脑组织含水量。取额叶皮质区和海马区进行尼氏染色, 免疫荧光染色检测胶质纤维酸性蛋白 (GFAP)、离子钙结合适配器分子 1 (Iba1) 和神经元核抗原 (NEUN) 的表达情况。**结果** 六基因修饰猪与食蟹猴交叉配血结果呈阴性。在灌注 3 h 时灌注液红细胞数量下降较为明显, 血红蛋白水平在 1、3、5、6 h 均呈下降趋势, 白细胞和血小板数量在各时间点均呈下降趋势。亚低温灌注组血氧饱和度始终保持在 95%~98%, 血氧饱和度、Na⁺、Ca²⁺、葡萄糖水平以及 pH 值均保持稳定, K⁺水平先升高后降低。灌注前后 IgG 和 IgM 水平差异无统计学意义。亚低温灌注组灌注终末脑组织含水量显著高于阳性对照组 ($P<0.001$)。尼氏染色结果显示, 与阳性对照组比较, 亚低温灌注组前额叶皮质区锥体神经元保持较好的形态结构完整性, 肿大变型细胞无明显增多; 海马 CA1 区肿大变型细胞稍增多, 少数结构未被破坏细胞出现胞体缩小; 海马齿状回区有较少颗粒神经元细胞结构完整性被破坏, 细胞水肿增加。NEUN 免疫荧光染色显示, 与阳性对照组比较, 亚低温灌注组前额叶皮质区和海马 CA1 区锥体神经元细胞形态结构状态较好, 轴突清晰可见, 海马齿状回区颗粒细胞保存完整, 但细胞核保护欠佳。GFAP 免疫荧光染色显示, 与阳性对照组比较, 亚低温灌注组突起片段较为稀疏, 与神经元结合较为紧密。Iba1 免疫荧光染色显示, 与阳性对照组比较, 亚低温灌注组突起片段较粗壮, 数量较少。**结论** 与阳性对照组相比, 基因修饰猪红细胞灌注液亚低温有氧机械灌注后食蟹猴脑组织水肿增加, 神经元细胞和胶质细胞结构形态保存相对完整, 保护作用可能与该技术持续供氧供能、平衡离子稳态和灌注液 pH 值、降低排斥反应及维持全脑低代谢相关。

【关键词】 基因修饰猪; 亚低温有氧机械灌注; 缺血缺氧; 脑损伤; 创伤性失血; 神经元细胞; 离子稳态; 血氧饱和度

【中图分类号】 R617, R651 【文献标志码】 A 【文章编号】 1674-7445 (2025) 05-0007-10

Exploring the protective effects of subnormothermic normoxic mechanical perfusion of genetically modified porcine erythrocyte perfusate on ischemic and hypoxic brain injury in cynomolgus monkeys Li Shen*, Dong Yanghui, Song Xiangyu, Li Pengkai, Mi Zhaodi, Zhu Yixuan, Cui Mengyi, Peng Xiwei, Cheng Long, Yuan Man, Xu Wenjing, Peng Jiang, Zhao Yaqun.

*Graduate School of Hebei North College, Zhangjiakou 075051, China

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

Peng Jiang, Email: pengjiang301@126.com

Zhao Yaqun, Email: zhaoyaqun2@sina.com

【Abstract】 **Objective** To explore the protective effects of genetically modified porcine erythrocyte suspension as a subnormothermic normoxic mechanical perfusate on hypoxic-ischemic brain injury in cynomolgus monkeys caused by traumatic hemorrhage. **Methods** Cynomolgus monkeys were randomly divided into positive and negative control groups (a total of 3 monkeys, with 3 left cerebral hemispheres as the positive control group and 3 right cerebral hemispheres as the negative control group) and the subnormothermic perfusion group ($n=3$). The positive control group was directly sampled 1 hour after circulatory arrest, while the negative control group was placed at subnormothermic conditions for 6 hours after circulatory arrest. The subnormothermic perfusion group underwent 6 hours of subnormothermic normoxic mechanical perfusion of the bilateral common carotid arteries of the cynomolgus monkey hypoxic-ischemic brain injury model using genetically modified porcine erythrocyte suspension 1 hour after circulatory arrest. Before perfusion, cross-matching experiments were conducted between the six genetically modified pig and the cynomolgus monkeys. After the start of perfusion, the levels of routine blood indicators in the perfusate were detected at 0, 1, 2, 3, 4, 5 and 6 hours. Blood oxygen saturation was recorded, and the levels of Na⁺, K⁺, Ca²⁺, glucose and blood pH in the perfusate were measured, as well as the levels of IgG and IgM in the perfusate. After 6 hours of perfusion, the water content of the brain tissue was measured. Nissl staining was performed on the frontal cortex and hippocampal regions, and immunofluorescence staining was used to detect the expression of glial fibrillary acidic protein (GFAP), ionized calcium-binding adapter molecule 1 (Iba1) and neuronal nuclear antigen (NEUN). **Results** The cross-matching results between the six genetically modified pig and the cynomolgus monkeys were negative. The number of red blood cells in the perfusate decreased significantly at 3 hours of perfusion, and the hemoglobin level showed a downward trend at 1, 3, 5 and 6 hours. The number of white blood cells and platelets decreased at all time points. The blood oxygen saturation in the subnormothermic perfusion group remained stable

at 95%-98%, and the levels of blood oxygen saturation, Na^+ , Ca^{2+} , glucose and pH were stable, while the K^+ level first increased and then decreased. There was no significant difference in the levels of IgG and IgM before and after perfusion. The water content of brain tissue at the end of perfusion in the subnormothermic perfusion group was significantly higher than that in the positive control group ($P < 0.001$). Nissl staining results showed that compared with the positive control group, the pyramidal neurons in the prefrontal cortex of the subnormothermic perfusion group maintained better morphological integrity, with no significant increase in enlarged and deformed cells. In the hippocampal CA1 region, there was a slight increase in enlarged and deformed cells, and a few cells with undamaged structures showed reduced cell size. In the hippocampal dentate gyrus, fewer granule neurons had compromised structural integrity, with increased cell edema. NEUN immunofluorescence staining showed that compared with the positive control group, the pyramidal neurons in the prefrontal cortex and hippocampal CA1 region of the subnormothermic perfusion group had better morphological states, with clear axons. The granule cells in the hippocampal dentate gyrus were well preserved, but the nuclei were less well protected. GFAP immunofluorescence staining showed that compared with the positive control group, the subnormothermic perfusion group had sparser protrusions that were more tightly associated with neurons. Iba1 immunofluorescence staining showed that compared with the positive control group, the subnormothermic perfusion group had thicker and fewer protrusions. **Conclusions** Compared with the positive control group, subnormothermic normoxic mechanical perfusion with genetically modified porcine erythrocyte perfusate increases brain tissue edema in cynomolgus monkeys, but better preserves the morphological integrity of neurons and glial cells. The protective effects may be related to the continuous oxygen and energy supply, maintenance of ion homeostasis and perfusate pH, reduced rejection, and low metabolic state of the whole brain.

【 Key words 】 Genetically modified pig; Subnormothermic normoxic mechanical perfusion; Ischemia and hypoxia; Brain injury; Traumatic hemorrhage; Neuronal cell; Ion homeostasis; Blood oxygen saturation

创伤性失血是全球创伤发生后高病死率的主要原因之一^[1-3]。当失血过多发生失血性休克时,会出现血流动力学稳态丧失、氧传递减少、细胞坏死和器官损伤,最终导致死亡^[4-6]。众所周知,在众多器官和组织中,脑组织需要更多的氧气维持自身代谢,对缺血缺氧耐受极差^[7]。一旦脑组织缺血缺氧后,会发生离子稳态失衡、膜去极化、炎症因子释放和血管通透性增加等危险因素^[8],甚至可能导致精神发育异常、癫痫、脑瘫和认知障碍^[9],进而产生缺血缺氧脑损伤。

对于缺血缺氧脑损伤,早期识别、及时反应和快速治疗是成功救治患者的前提^[10]。一部分学者认为亚低温是脑组织保护的有效方法,且被广泛应用在重型颅脑损伤、心脏手术和主动脉弓置换手术等^[11],也有部分学者认为亚低温与脑灌注相结合可以通过持续给予能量供应而提供最佳脑组织保护效果^[12]。尽早尽快恢复再灌注对缺血缺氧发生后改善脑组织神经元凋亡、认知水平、水肿程度以及患者术后生存质量具有极为重要的作用^[13]。近年来,心脏骤停对躯干、内脏和大脑的影响日益受到关注,此类病例通常需要采取保护性干预措施,同时还会辅以亚低温或联合机械灌注等治疗手段^[14],提示亚低温机械灌注是一种有效的脑组织保护方法。

临床上,亚低温机械灌注常常使用自体或同种异体血作为灌注液^[15]。近年来血液短缺是世界性难题,并且在血袋中的红细胞寿命较短(约 42 d)^[16-17]。受疫情冲击,世界各地血库告急,临床用血极为困难^[18],人类在制造血液替代品方面进行不断尝试,人造血、氟碳化合物和动物血红蛋白相继被研发^[19-21],但能与血液媲美的能量物质载体仍较难以研制,因而人类将目光转向异种动物间血液输注^[15]。动物血液输入人体的方法源自于 1667 年,最终失败告终^[22]。进入 21 世纪,随着科学技术和免疫学的不断深入研究以及转基因猪技术的发展,异种输血研究又重燃了希望^[23]。为了更好地研究转基因猪血异种输注的安全性和有效性,笔者团队设计了食蟹猴脑组织缺血缺氧脑损伤模型亚低温机械灌注的实验,探究转基因猪全血作为灌注液保护食蟹猴脑组织缺血缺氧脑损伤模型是否可行,初步探讨六基因修饰猪全血对猴脑组织缺血缺氧脑损伤排斥反应相关安全性和有效保护效能问题。

1 材料与方 法

1.1 实验动物与材料

食蟹猴 6 只,4 周龄雌性,体质量约 3.5 kg,购

自北京华福源生物技术有限公司。六基因修饰猪1只, 8月龄雄性, 体质量约41.2 kg, 购自成都中科奥格生物科技有限公司。该猪为GTKO/ β 4GalNT2KO/CMAHKO/hCD55/hCD46/hTBM的六基因编辑猪, 详见文献[24]。野生猪来自北京大兴屠宰场。本实验获北京华福源生物技术有限公司福利伦理委员会审核批准(批号: HFYIACUC20230809001)。

盐酸赛拉嗪购自吉林华牧动物保健品有限公司; 舒泰50购自上海维克贸易有限公司; 羟乙基淀粉电解质溶液购自湖南科伦制药有限公司; D-葡萄糖酸钙购自北京索莱宝科技有限公司; 头孢唑啉钠购自广州白云山天心制药股份有限公司; 甲泼尼龙购自北京辉瑞制药有限公司; 肝素钠、生理盐水均购自武汉赛维尔生物科技有限公司。膜式氧合器购自意大利Sorin Group公司; 低温恒温槽购自上海助蓝仪器科技有限公司; 蠕动泵购自河北保定融柏恒流泵制造有限公司; 回流管路连接单人用透析装置购自日本日机装株式会社; 监护仪器购自深圳科曼医疗设备有限公司。

1.2 实验分组与步骤

按随机数字表法将食蟹猴分为阳性对照组、阴性对照组(共3只, 其中3只取左脑半球作为阳性对照组, 3只取右脑半球作为阴性对照组)和亚低温灌注组(3只)。阳性对照组为自循环停止1 h直接取材, 阴性对照组为自循环停止1 h亚低温放置6 h, 亚低温灌注组为自循环停止1 h后利用基因修饰猪红细胞灌注液对食蟹猴脑缺氧缺血损伤模型双侧颈总动脉进行6 h亚低温有氧机械灌注。灌注液温度设定在33 ℃。对照组除不进行灌注外, 其余处理包括对食蟹猴脑的备皮、置管、冲洗等均与亚低温灌注组处理相同。

1.2.1 实验灌注流程 血液经过膜式氧合器及低温恒温槽恒温后, 利用蠕动泵加压, 最终进入左右颈总动脉。回流管路连接单人用透析装置排除多余水分以及代谢废物以维持内环境稳态, 静脉血收集至收集瓶, 再通过蠕动泵泵回至膜式氧合器。在灌注过程中, 全程使用监护仪器监测温度、血氧饱和度和灌注液温度(图1)。

1.2.2 食蟹猴脑处理 将舒泰50(0.03 mg/kg)和盐酸赛拉嗪(0.03 mL/kg)注射至食蟹猴的臀肌进行麻醉, 观察一段时间后将食蟹猴头颅以及颈部毛发剃干净, 碘伏消毒。从颈部正中线依次切开皮肤、皮下组织, 剥开肌层, 找到左右颈总动脉, 结扎近心端。用

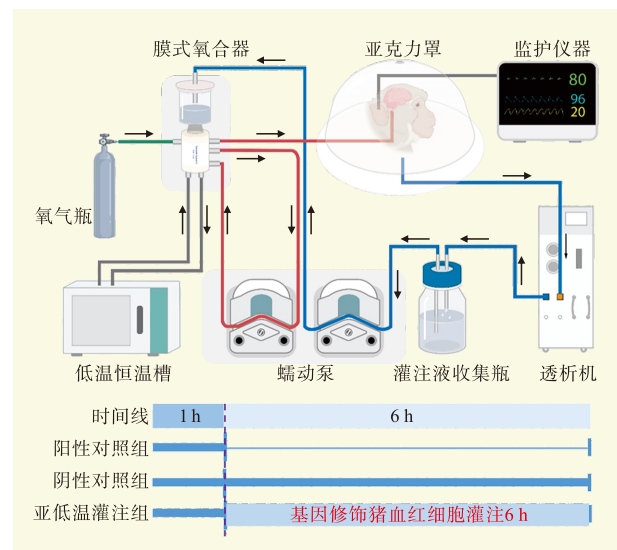


图1 实验装置示意图

Figure 1 Schematic diagram of the experimental setup

眼科剪刀剪开一个斜口, 将两根7F管路分别置入左右颈总动脉, 方向朝向远心端, 4-0丝线结扎。用含肝素的9 g/L生理盐水进行冲洗以防脑组织血管血栓形成, 直至无红色血水流出后, 再冲洗30 min, 总时长约为1 h。最后从颈部近心端将头离断。对照组与亚低温灌注组均按以上方法处理。

1.2.3 灌注液采集及制备 六基因修饰猪右侧臀肌注射盐酸赛拉嗪(0.03 mL/kg)和舒泰50(0.03 mg/kg)对其麻醉。对颈部进行备皮和消毒, 而后将六基因猪置于手术台上。经颈部自皮肤依次解剖直至暴露颈外静脉, 而后置入10F管路, 将血液采集至血袋备用。将250 mL羟乙基淀粉电解质溶液、250 mg D-葡萄糖酸钙、6 250 IU肝素钠、500 mg头孢唑啉钠、甲泼尼龙500 mg、2 mL 50%葡萄糖溶液和0.5 μ L胰岛素注射液, 加入至250 mL自体血液中制备灌注液。添加物质根据最初检测指标进行适当调整, 在灌注3 h时更换灌注液。

1.2.4 灌注后大脑取材 灌注结束后取出完整大脑。取左右额叶皮质和双侧海马组织, 置于40 g/L多聚甲醛中固定。取出双侧部分顶叶组织, 称取湿质量后将其置于56 ℃烘箱, 比较干湿质量。

1.3 研究内容及检测方法

1.3.1 血液配型 在灌注前进行交叉配血。将六基因猪全血1 000 \times g离心5 min后弃上清及白膜层; 加入等体积磷酸盐缓冲液颠倒混匀后, 离心弃上清及白膜层, 洗涤3次; 压积红细胞以磷酸盐缓冲液配制为

1% 红细胞悬液；取 20 μL 红细胞悬液+40 μL 猴血清，112 \times g 离心 1 min，取出后吹打混匀。移至 96 孔板于镜下观察凝集情况。

1.3.2 灌注液生化等指标检测 自灌注 0 h 起，检测 0、1、2、3、4、5、6 h 各时间点灌注液中红细胞、血红蛋白、白细胞和血小板等水平，并监测 Na^+ 、 K^+ 、 Ca^{2+} 、葡萄糖水平及血液酸碱度（pH 值），以此评价炎症反应以及灌注液效能。

1.3.3 血氧饱和度监测 自灌注 0 h 起，使用监护仪器持续监测 0、1、2、3、4、5、6 h 各时间点血氧饱和度，评估动脉血含氧量。含氧量 $<95\%$ 时提示缺氧，含氧量越低则表示机体缺氧越严重。

1.3.4 灌注液抗体检测 在灌注 0 h（起始）和 6 h（终止）两个时间节点取灌注液血清检测 IgG 和 IgM 水平，以评估食蟹猴脑组织对六基因修饰猪血液排斥反应。

1.3.5 脑组织含水量检测 灌注 6 h 后取顶叶一定组织称取组织湿质量，置于 56 $^{\circ}\text{C}$ 烘箱中烘干处理 24 h，将其取出后称取干质量^[25]，含水量=（湿质量-干质量）/湿质量 $\times 100\%$ ，脑组织含水量与脑组织水肿程度呈正比。

1.3.6 组织病理学观察 在灌注 6 h 时切取前额叶皮质以及分离海马组织，置于 40 g/L 多聚甲醛中固定。对前额叶皮质和海马组织进行尼氏染色和免疫荧光染色，检测胶质纤维酸性蛋白（glial fibrillary acidic protein, GFAP）、离子钙结合适配器分子 1（ionized calcium-binding adapter molecule 1, Iba1）以及神经元核抗原（neuronal nuclei antigen, NEUN）的表达情况。GFAP 和 Iba1 评价胶质细胞保存完整性和活跃性，NEUN 评价神经元保存完整性。染色方法详见文献 [26]。

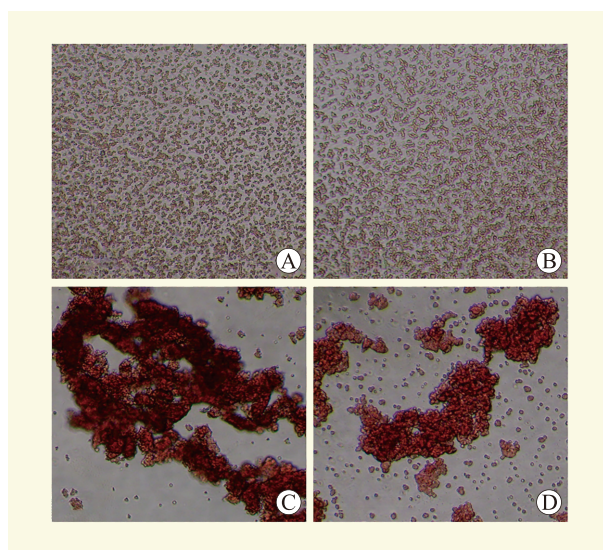
1.4 统计学方法

使用 Graphpad Prism 8 软件进行统计分析。符合正态分布的计量资料以均数 \pm 标准差表示，两样本比较采用配对样本 t 检验，计数资料以率表示，所有检验为双侧。 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 六基因修饰猪与食蟹猴交叉配血结果呈阴性

交叉配血实验结果显示，六基因修饰猪与食蟹猴主次侧配血均未出现凝集，结果呈阴性；而野生猪与食蟹猴主次侧配血均发生凝集，结果呈阳性（图 2）。



注：A、B 图分别为六基因修饰猪与食蟹猴主侧和次侧配血结果；C、D 图分别为野生猪与食蟹猴主侧和次侧配血结果。

图 2 交叉配血实验结果（ $\times 10$ ）

Figure 2 Results of the crossmatching experiment

2.2 灌注液血常规指标呈下降趋势

图 3 为灌注液在 0、1、2、3、4、5、6 h 各时间点血常规指标的变化情况。在灌注 3 h 时灌注液红细胞数量下降较为明显（图 3A），血红蛋白水平在 1、3、5、6 h 均呈下降趋势（图 3B），白细胞和血小板数量在各时间点均呈下降趋势，但血小板数量最低点保持在 $135 \times 10^9/\text{L}$ 左右（图 3C、D）。

2.3 亚低温灌注组血氧饱和度、 Na^+ 、 Ca^{2+} 、葡萄糖水平以及 pH 值均保持稳定， K^+ 水平先升高后降低

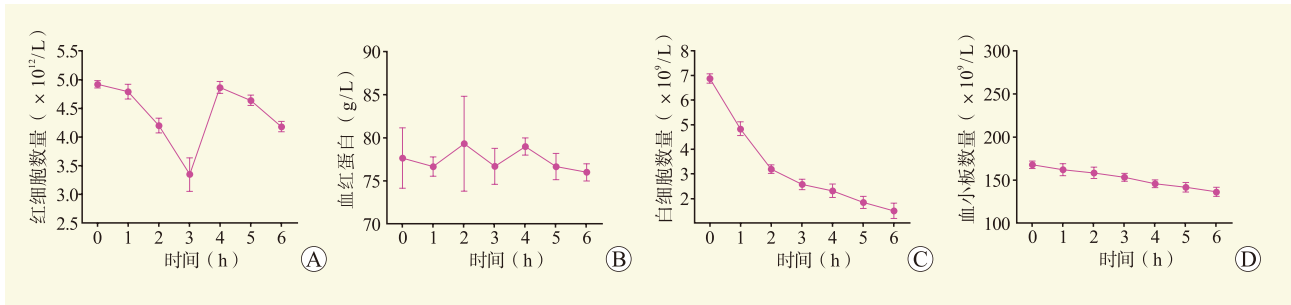
亚低温灌注组血氧饱和度始终保持在 95%~98%（图 4A）。灌注液 Na^+ 水平始终维持在 140~155 mmol/L； K^+ 水平在灌注 3 h 时达 7 mmol/L，更换灌注液后降低至 5.1 mmol/L 左右； Ca^{2+} 水平保持在 1.8~2.0 mmol/L；葡萄糖水平维持在 5.0~6.2 mmol/L；pH 值维持在 7.15~7.30（图 4B~F）。

2.4 灌注前后 IgG 和 IgM 水平无显著变化

为评估食蟹猴脑组织对基因修饰猪血液的排斥反应，灌注前后分别抽取部分灌注液样本，对 IgG 和 IgM 水平进行测定，结果如图 5 所示，灌注前后 IgG 和 IgM 水平差异均无统计学意义。

2.5 亚低温灌注组灌注终末脑组织含水量显著高于阳性对照组

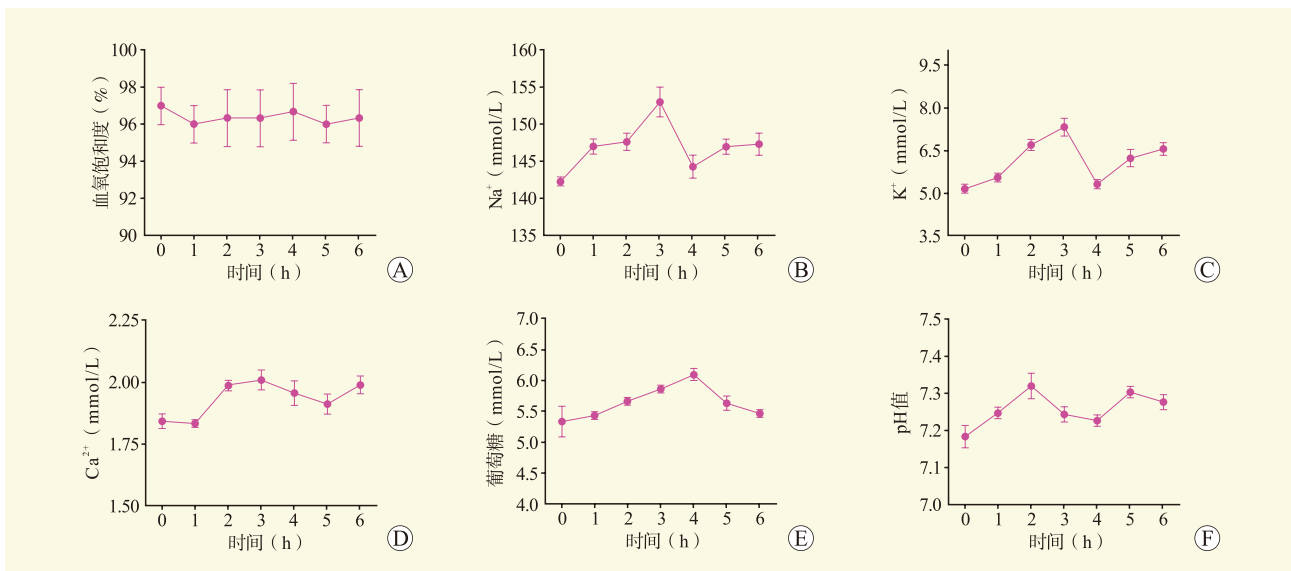
在灌注 6 h 时，取脑组织测定相应范围脑组织含水量（图 6A、B）。亚低温灌注组灌注终末脑组织



注: A 图为红细胞数量; B 图为血红蛋白水平; C 图为白细胞数量; D 图为血小板数量。

图 3 灌注液血常规指标变化情况

Figure 3 Changes in the routine blood test indicators of perfusion fluid



注: A 图为血氧饱和度; B 图为 Na⁺水平; C 图为 K⁺水平; D 图为 Ca²⁺水平; E 图为葡萄糖水平; F 图为 pH 值。

图 4 血氧饱和度、离子水平、葡萄糖水平和 pH 值变化情况

Figure 4 Changes in oxygen saturation, ion levels, glucose levels and pH values

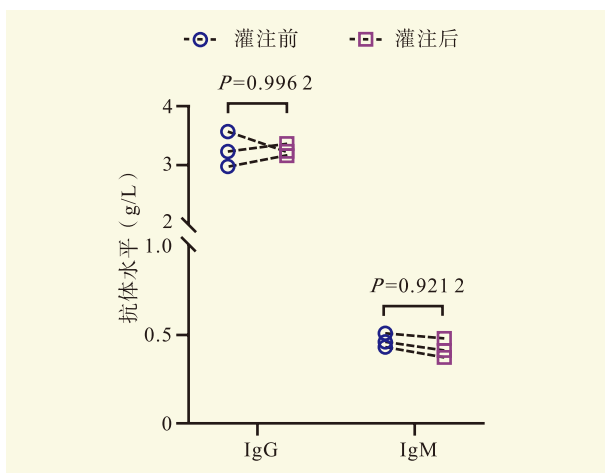


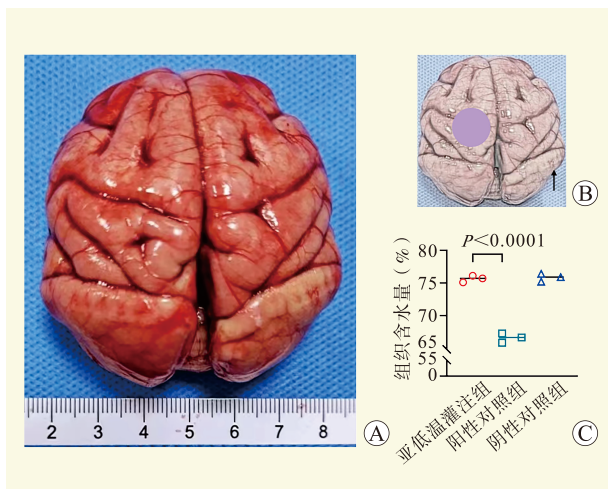
图 5 灌注前后 IgG 和 IgM 水平变化

Figure 5 Changes in IgG and IgM levels before and after perfusion

含水量显著高于阳性对照组 ($P < 0.001$), 但与阴性对照组比较差异无统计学意义 (图 6C)。

2.6 灌注后脑组织大多数神经元细胞形态结构保持相对完整

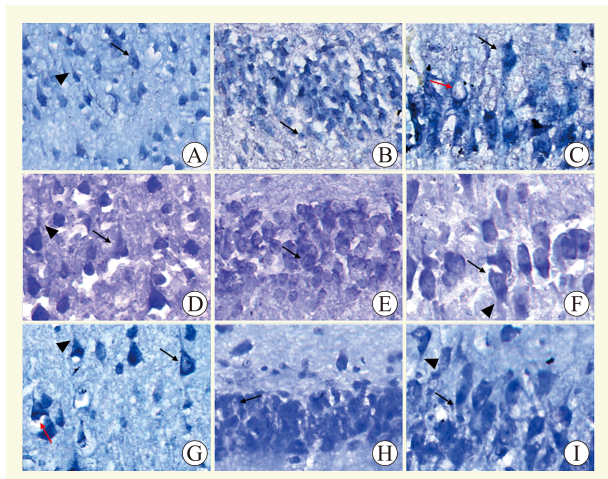
尼氏染色结果显示 (图 7), 阳性对照组前额叶皮质区锥体神经元细胞形态相对完整, 轴突及树突较多, 肿大变型细胞数量较少; 亚低温灌注组锥体神经元保持较好的形态结构完整性, 肿大变型细胞无明显增多。阳性对照组海马 CA1 区灌注前锥体神经元细胞未发生明显水肿, 形态结构几乎无破坏; 亚低温灌注组肿大变型细胞稍增多, 少数结构未被破坏细胞出现胞体缩小。阳性对照组海马齿状回区颗粒细胞层形态未被破坏, 多数细胞出现轻微肿胀, 但仍存在完整细胞结构; 亚低温灌注组有较少颗粒神经元细胞结构



注：A 图为脑组织取材后大体观；B 图为脑组织含水量测定取材区域，紫色圆圈为取材范围，黑色箭头方向为前额叶方向；C 图为各组脑组织含水量比较。

图 6 灌注终末脑组织含水量比较

Figure 6 Comparison of brain tissue water content at the end of perfusion



注：A~C 图分别为亚低温灌注组前额叶皮质区、海马齿状回区、CA1 区；D~F 图分别为阳性对照组前额叶皮质区、海马齿状回区、CA1 区；G~I 图分别为阴性对照组前额叶皮质区、海马齿状回区、CA1 区。红色箭头代表受损细胞，黑色箭头代表细胞核，三角箭头代表轴突。

图 7 不同组别脑组织神经元尼氏染色 ($\times 200$)

Figure 7 Nissl staining of neurons in brain tissue among different groups

完整性被破坏，细胞水肿增加。

灌注 6 h 后，NEUN 免疫荧光染色结果显示，亚低温灌注组神经元细胞结构形态与阳性对照组比较发现，前额叶皮质区亚低温灌注组锥体神经元细胞保存

相对完整，轴突依旧存在，细胞水肿较阳性对照组增加；海马 CA1 区亚低温灌注组锥体神经元细胞保存较为完整，有轴突存在，细胞水肿较阳性对照组增加，核仁可见；海马齿状回区亚低温灌注组颗粒细胞保存完整，细胞水肿少，细胞密度与阳性对照组无显著差异，但细胞核保护欠佳（图 8）。

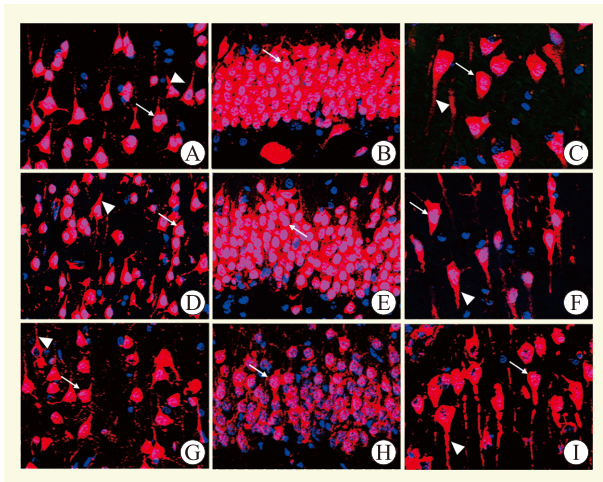
GFAP 免疫荧光染色结果显示，阳性对照组突起片段密集，与神经元结合紧密。与阳性对照组比较，亚低温灌注组突起片段较为稀疏，与神经元结合较为紧密；阴性对照组突起片段极为稀疏，与神经元连接欠紧密（图 9）。

Iba1 免疫荧光染色结果显示，阳性对照组突起片段较多，胞体多见。与阳性对照组比较，亚低温灌注组突起片段较粗壮，数量较少；阴性对照组突起片段较少（图 10）。

3 讨论

创伤性失血后及时补充血液制品对于缺血缺氧脑损伤患者的救治具有重要的临床意义^[27]，血液短缺已成为全球难题，国内外学者希望通过研制血液替代品解决这一困境^[28-29]。随着基因修饰猪的出现，其血液或可作为血液制品解决血液短缺的问题^[23,30-31]。亚低温机械灌注在动物实验和器官移植方面已被证明能够减轻心、肝、肾和肺等多器官缺血损伤^[32]。本研究结果表明以基因修饰猪全血为灌注液进行亚低温机械灌注，可通过持续供氧供能、减少排斥反应和降低代谢水平等，保护食蟹猴锥体神经元细胞和胶质细胞，从而减轻创伤性失血引起的缺血缺氧脑损伤。

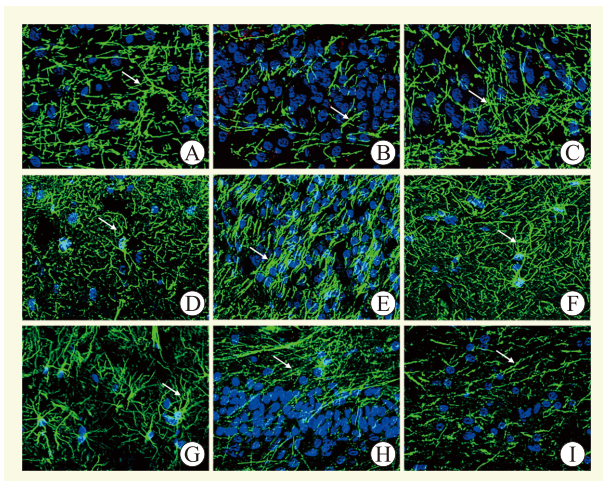
脑组织血流中断后导致氧和葡萄糖等供应缺失、有毒氨基酸堆积、离子稳态失衡，进而引发细胞水肿、脑电活动停止及细胞坏死凋亡^[33]。本研究建立食蟹猴创伤性失血脑组织损伤模型，在完全血流中断 1 h 后利用基因修饰猪全血进行亚低温机械灌注，灌注前的基因修饰猪-食蟹猴交叉配血实验结果呈阴性，这也是进行异种输血的基础^[34]。在 6 h 灌注期间，血氧饱和度始终保持在 95%~98%，表明在基因修饰猪全血为食蟹猴脑组织提供了充足氧供。Na⁺、K⁺、Ca²⁺对于维持细胞渗透压以及细胞电活动至关重要。本研究中，Na⁺和 K⁺水平在灌注 3 h 后均呈现升高趋势，可能与两方面因素相关：（1）蠕动泵对红细胞机械破坏导致细胞破裂膜内 K⁺的释放；（2）灌注液中 K⁺升高诱发脑组织细胞膜内 Na⁺外流。Ca²⁺水



注: A~C 图分别为亚低温灌注组前额叶皮质区、海马齿状回区、CA1 区; D~F 图分别为阳性对照组前额叶皮质区、海马齿状回区、CA1 区; G~I 图分别为阴性对照组前额叶皮质区、海马齿状回区、CA1 区。白色箭头表示神经元细胞胞体, 白色三角形箭头表示锥体神经元轴突。

图 8 不同组别锥体神经元及颗粒细胞 NEUN 染色 (×200)

Figure 8 NEUN staining of pyramidal neurons and granule cells among different groups

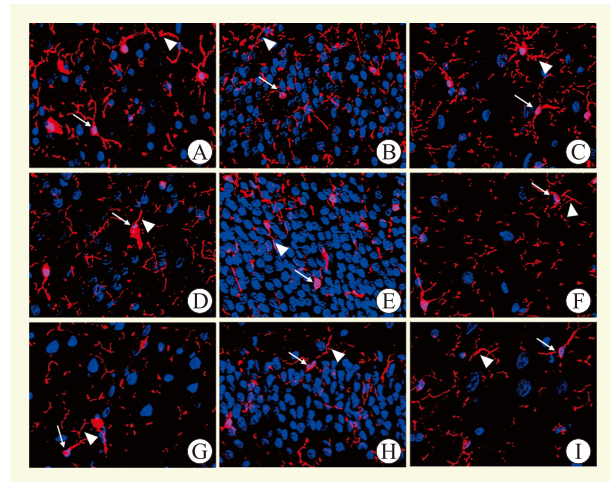


注: A~C 图分别为亚低温灌注组前额叶皮质区、海马齿状回区、CA1 区; D~F 图分别为阳性对照组前额叶皮质区、海马齿状回区、CA1 区; G~I 图分别为阴性对照组前额叶皮质区、海马齿状回区、CA1 区。白色箭头表示星形胶质细胞轴突。

图 9 不同组别前额叶皮质区及海马区 GFAP 染色 (×200)

Figure 9 GFAP staining in the prefrontal cortex and hippocampal regions among different groups

平在 6 h 灌注期间为 1.8~2.0 mmol/L, 这与该离子的额外添加有关。血液供应中断后, 脑组织细胞由有氧代谢转为无氧代谢, 2~4 min 后葡萄糖消耗殆尽, 无



注: A~C 图分别为亚低温灌注组前额叶皮质区、海马齿状回区、CA1 区; D~F 图分别为阳性对照组前额叶皮质区、海马齿状回区、CA1 区; G~I 图分别为阴性对照组前额叶皮质区、海马齿状回区、CA1 区。白色箭头表示小胶质细胞胞体, 白色三角形箭头表示小胶质细胞轴突。

图 10 不同组别前额叶皮质区及海马区 Iba1 染色 (×200)

Figure 10 Iba1 staining in the prefrontal cortex and hippocampal regions among different groups

氧糖酵解也将消失; 4~5 min 后三磷酸腺苷耗竭, 细胞膜钠钾泵停止转运, 最终导致细胞内环境稳态丧失, 诱导炎症因子表达和组织水肿^[35]。本研究中葡萄糖水平在整个灌注期间为 5.0~6.2 mmol/L, 这将有利于缺氧缺血脑组织的复苏, 减少细胞坏死和凋亡。灌注 3 h 左右葡萄糖水平处于较高水平, 可能是神经元细胞和部分红细胞受损, 葡萄糖需求降低。本研究中 pH 值在 3 h 和 4 h 均呈下降趋势, 可能与脑组织损伤和红细胞破坏导致细胞膜外 K⁺ 的升高, H⁺ 从膜内转运至膜外有关。因此, 亚低温基因修饰猪全血机械灌注可以维持较好的血氧饱和度、离子稳态以及充分的能量供应, 这对脑组织神经元细胞和胶质细胞形态和功能维持极为重要^[36]。

研究表明, 创伤性失血数分钟内会出现细胞膜去极化、炎症反应和血管通透性增加等, 致使脑组织细胞发生不可逆损伤, 最终导致细胞凋亡坏死^[37]。本研究中, 亚低温灌注组终末脑组织含水量显著高于阳性对照组, 但与阴性对照组无显著差异, 表明创伤性失血脑组织损伤模型导致脑组织水肿, 诱发炎症反应, 破坏脑血管内皮, 最终加剧脑组织水肿^[38]。而亚低温灌注组水肿较为严重, 可能与细胞外离子水平增加相关。本研究中 IgG 和 IgM 水平在灌注前后差异无统

计学意义,可能是未产生排斥反应,抗体含量没有发生减少。尼氏染色结果表明,与阳性对照组相比,亚低温灌注组前额叶皮质区和海马 CA1 区锥体神经元细胞形态结构相对完整,破坏细胞数量较少;海马齿状回区颗粒细胞形态结构完整,破坏数量较少。其原因可能是基因修饰猪全血为食蟹猴脑组织细胞提供了充足的氧气和能量供应。NEUN 免疫荧光染色显示,与阳性对照组相比,亚低温灌注组前额叶皮质和海马 CA1 区锥体神经元细胞形态结构状态保存较好,轴突清晰可见,海马齿状回区颗粒细胞形态结构相对完整,破坏数量也较少。GFAP 免疫荧光染色显示,与阳性对照组比较,亚低温灌注组突起片段较为稀疏,与神经元结合较为紧密。Iba1 免疫荧光染色显示,与阳性对照组比较,亚低温灌注组前额叶皮质、海马 CA1 区和齿状回区突起片段较粗壮,提示小胶质细胞活跃。

综上所述,以基因修饰猪全血为灌注液的亚低温机械灌注,可通过持续供氧、维持离子稳态、供能以及减少排斥反应,有效保护脑组织锥体神经元和胶质细胞。本研究可为使用异种基因修饰猪血液治疗创伤性失血引起的大动物脑组织缺氧缺血脑损伤治疗,以及心、肝和肾等组织损伤治疗拓宽思路和参考依据,还可为将来临床前试验提供理论依据。

参考文献:

- [1] CARNE B, RAINA A, BOTHARA R, et al. Factors contributing to death of major trauma victims with haemorrhage: a retrospective case-control study[J]. *Emerg Med Australas*, 2023, 35(6): 968-975. DOI: 10.1111/1742-6723.14275.
- [2] KIA M, SALUJA R S, MARCOUX J. Acute traumatic subdural hematoma and anticoagulation risk[J]. *Can J Neurol Sci*, 2023, 50(2): 188-193. DOI: 10.1017/cjn.2021.518.
- [3] KIA M, SALUJA R S, MARCOUX J. Acute traumatic subdural hematoma and anticoagulation risk[J]. *Can J Neurol Sci*, 2023, 50(2): 188-193. DOI: 10.1017/cjn.2021.518.
- [4] LATIF R K, CLIFFORD S P, BAKER J A, et al. Traumatic hemorrhage and chain of survival[J]. *Scand J Trauma Resusc Emerg Med*, 2023, 31(1): 25. DOI: 10.1186/s13049-023-01088-8.
- [5] VELEZ D R. The history of hemorrhagic shock and damage control resuscitation[J]. *Am Surg*, 2022, 88(11): 2656-2659. DOI: 10.1177/00031348211011098.
- [6] VOELCKEL W G. Vasopressin in traumatic hemorrhagic shock[J]. *Curr Opin Anaesthesiol*, 2025, 38(2): 81-92. DOI: 10.1097/ACO.0000000000001456.
- [7] SONG X Y, DONG Y H, JIA Z B, et al. Protective effect of sub-hypothermic mechanical perfusion combined with membrane lung oxygenation on a Yorkshire model of brain injury after traumatic blood loss[J]. *Chin J Traumatol*, 2024, DOI: 10.1016/j.cjte.2024.10.003 [Epub ahead of print].
- [8] 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.
- [9] CHAKKARAPANI E, DE VRIES L S, FERRIERO D M, et al. Neonatal encephalopathy and hypoxic-ischemic encephalopathy: the state of the art[J]. *Pediatr Res*, 2025, DOI: 10.1038/s41390-025-03986-2 [Epub ahead of print].
- [10] SHAH A, KERNER V, STANWORTH S J, et al. Major haemorrhage: past, present and future[J]. *Anaesthesia*, 2023, 78(1): 93-104. DOI: 10.1111/anae.15866.
- [11] ZHANG Y, LI M, YU B, et al. Cold protection allows local cryotherapy in a clinical-relevant model of traumatic optic neuropathy[J]. *eLife*, 2022, 11: e75070. DOI: 10.7554/eLife.75070.
- [12] CEKMECELIOGLU D, PREVENTZA O. Bilateral antegrade cerebral perfusion may be the winner as an adjunct for brain protection[J]. *J Card Surg*, 2021, 36(2): 687-688. DOI: 10.1111/jocs.15270.
- [13] JABAGI H, WELLS G, BOODHWANI M. COMMENCE trial (Comparing hypOtherMic teMperaturEs duriNg hemiarCh surgery): a randomized controlled trial of mild vs moderate hypothermia on patient outcomes in aortic hemiarCh surgery with antegrade cerebral perfusion[J]. *Trials*, 2019, 20(1): 691. DOI: 10.1186/s13063-019-3713-9.
- [14] JABAGI H, JUANDA N, NANTSIOS A, et al. Aortic arch surgery at 32°C: mild hypothermia and unilateral antegrade cerebral perfusion[J]. *Interact Cardiovasc Thorac Surg*, 2021, 32(5): 773-780. DOI: 10.1093/icvts/ivaa321.
- [15] NGUYEN H Y, DESAI M S. The rise and fall of heterologous transfusion[J]. *J Anesth Hist*, 2020, 6(3): 127-132. DOI: 10.1016/j.janh.2020.07.001.
- [16] 董阳辉, 宋翔宇, 杨臻璞, 等. 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[J]. *器官移植*, 2024, 15(5): 764-771. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2024102.
DONG Y H, SONG X Y, YANG L P, et al. Protective effect of normothermic mechanical perfusion with red blood cells from humanized genetically modified pigs on severed human limb[J]. *Organ Transplant*, 2024, 15(5): 764-771. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2024102.
- [17] SHIH H, RAJENDRAN S. Stochastic inventory model for minimizing blood shortage and outdated in a blood supply chain under supply and demand uncertainty[J]. *J Healthc Eng*, 2020, 2020: 8881751. DOI: 10.1155/2020/8881751.
- [18] AL MAHMASANI L, HODROJ M H, FINIANOS A, et al. COVID-19 pandemic and transfusion medicine: the worldwide challenge and its implications[J]. *Ann Hematol*, 2021, 100(5): 1115-1122. DOI: 10.1007/s00277-021-04441-y.

- [19] YE Q, ZHENG D, CHEN K, et al. Research progress in oxygen carrier design and application[J]. *Mol Pharm*, 2023, 20(9): 4373-4386. DOI: 10.1021/acs.molpharmaceut.3c00289.
- [20] HAFEEZ S, ZAIDI N U S S. Red blood cell substitutes: liposome encapsulated hemoglobin and magnetite nanoparticle conjugates as oxygen carriers[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(2): 1618. DOI: 10.3390/ijms24021618.
- [21] WANG Z, CHEN T, LI X, et al. Oxygen-releasing biomaterials for regenerative medicine[J]. *J Mater Chem B*, 2023, 11(31): 7300-7320. DOI: 10.1039/d3tb00670k.
- [22] MARINOZZI S, MESSINEO D, SANESE G. The origins of the blood transfusion: European literature and Italian debate on new innovations (1667-1668)[J]. *Acta Med Hist Adriat*, 2022, 20(1): 27-50. DOI: 10.31952/amha.20.1.2.
- [23] CHORNENKYY Y, YAMAMOTO T, HARA H, et al. Future prospects for the clinical transfusion of pig red blood cells[J]. *Blood Rev*, 2023, 61: 101113. DOI: 10.1016/j.blre.2023.101113.
- [24] 杨树军, 卫浩, 许勇, 等. 六基因编辑猪-食蟹猴异种肾移植围手术期监测初步报道[J]. *器官移植*, 2023, 14(4): 521-528. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023.04.008.
YANG S J, WEI H, XU Y, et al. Preliminary report of perioperative monitoring of six-gene-edited pig-to-cynomolgus monkey kidney xenotransplantation[J]. *Organ Transplant*, 2023, 14(4): 521-528. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7445.2023.04.008.
- [25] SHAHROKHI N, HADDAD M K, JOUKAR S, et al. Neuroprotective antioxidant effect of sex steroid hormones in traumatic brain injury[J]. *Pak J Pharm Sci*, 2012, 25(1): 219-225.
- [26] 宋翔宇, 陈蕾佳, 贾志博, 等. 亚低温顺行机械灌注对犬缺血性脑损伤脑组织的保护作用[J]. *中华创伤杂志*, 2023, 39(9): 830-839. DOI: 10.3760/cma.j.cn501098-20230602-00316.
SONG X Y, CHEN L J, JIA Z B, et al. Protective effect of mild hypothermic antegrade machine perfusion on ischemic brain injury in dogs[J]. *Chin J Trauma*, 2023, 39(9): 830-839. DOI: 10.3760/cma.j.cn501098-20230602-00316.
- [27] FARIA I, THIVALAPILL N, MAKIN J, et al. Bleeding, hemorrhagic shock, and the global blood supply[J]. *Crit Care Clin*, 2022, 38(4): 775-793. DOI: 10.1016/j.ccc.2022.06.013.
- [28] MELANSON V R, HERSHFELD J R, DEEGAN M K, et al. Artificial blood development implications for military medicine[J]. *J Spec Oper Med*, 2023, 23(3): 63-69. DOI: 10.55460/OVOP-V2QC.
- [29] CHERKASHINA D, PETRENKO O, FULLER B. Hypothermic organ perfusion in the 2020s: mixing the benefits of low temperatures and dynamic flow outside the body[J]. *Cryo Letters*, 2022, 43(5): 255-263. DOI: 10.54680/fr22510110112.
- [30] PARK S, LEE H, PARK E M, et al. Initial investigation on the feasibility of porcine red blood cells from genetically modified pigs as an alternative to human red blood cells for transfusion[J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1298035. DOI: 10.3389/fimmu.2023.1298035.
- [31] YANG C, WEI Y, LI X, et al. Production of four-gene (GTKO/hCD55/hTBM/hCD39)-Edited donor pigs and kidney xenotransplantation[J]. *Xenotransplantation*, 2024, 31(4): e12881. DOI: 10.1111/xen.12881.
- [32] ABRAHAM N, GAO Q, KAHAN R, et al. Subnormothermic oxygenated machine perfusion (24 h) in DCD kidney transplantation[J]. *Transplant Direct*, 2024, 10(6): e1633. DOI: 10.1097/TXD.0000000000001633.
- [33] CALABRESE B, JONES S L, 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.
- [34] QIU H, WANG X, SHAO Y. Forward and reverse typing discrepancy and crossmatch incompatibility of ABO blood groups: cause analysis and treatment[J]. *Hematology*, 2023, 28(1): 2240146. DOI: 10.1080/16078454.2023.2240146.
- [35] 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.
- [36] 唐卓, 张永, 杨忠路, 等. 中低温停循环和单侧顺行脑灌注在主动脉弓部置换中的应用[J]. *中国心血管病研究*, 2020, 18(9): 819-822. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5301.2020.09.011.
TANG Z, ZHANG Y, YANG Z L, et al. Moderate hypothermic circulatory arrest and unilateral antegrade cerebral perfusion for aortic arch replacement[J]. *Chin J Cardiovasc Res*, 2020, 18(9): 819-822. DOI: 10.3969/j.issn.1672-5301.2020.09.011.
- [37] ZHAO Y, ZHANG X, CHEN X, et al. Neuronal injuries in cerebral infarction and ischemic stroke: from mechanisms to treatment (Review)[J]. *Int J Mol Med*, 2022, 49(2): 15. DOI: 10.3892/ijmm.2021.5070.
- [38] 陈秋菊, 李瑞春. 有氧运动训练可通过调节脑血管生成及神经炎症反应改善大鼠缺血性脑损伤[J]. *中国免疫学杂志*, 2023, 39(4): 715-719, 726. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2023.04.008.
CHEN Q J, LI R C. Aerobic exercise repairs rats cerebral ischemic injury via regulating angiogenesis and neural inflammation[J]. *Chin J Immunol*, 2023, 39(4): 715-719, 726. DOI: 10.3969/j.issn.1000-484X.2023.04.008.

(收稿日期: 2025-04-30)

(本文编辑: 谢诗韵 吴秋玲)