

• 基础研究 •

腺苷不参与大鼠双后肢缺血预处理对移植胰的保护作用

刘小南 霍婷婷 王为忠 管文贤

[摘要] 目的 探讨腺苷是否参与了大鼠双后肢缺血预处理对移植胰保护作用的信号传导机制。方法 18 只糖尿病大鼠随机分为缺血再灌注组(I/R 组, $n=6$) ;缺血预处理组(IPC 组, $n=6$) 和缺血预处理 + 8-环戊基-1,3-二丙基黄嘌呤(DPCPX)组(IPC + DPCPX 组, $n=6$) ,各组大鼠均行胰腺移植。检测各组再灌注前、后血糖,再灌注后 2 h 血清中肿瘤坏死因子(TNF)- α 、胰腺组织中髓过氧化物酶(MPO)和丙二醛(MDA)含量,并利用 TUNEL 法检测移植胰凋亡细胞。结果 再灌注后 I/R 组血糖、TNF- α 、胰腺组织凋亡指数(AI)、MPO 和 MDA 含量均显著高于 IPC 组($P<0.01$)和 IPC + DPCPX 组($P<0.01$) ,IPC + DPCPX 组与 IPC 组再灌注后各项指标无显著性差异($P>0.05$)。结论 大鼠双后肢缺血预处理对大鼠移植胰的缺血再灌注损伤具有保护作用,腺苷与这种保护作用无关。

[关键词] 胰腺移植;缺血预处理;腺苷;大鼠

Protection of ischemic preconditioning in the posterior limbs of donor pancreas graft without involvement adenosine in rat LIU Xiao-Nan, HUO Ting-Ting, WANG Wei-Zhong, et al. Department of Gastrointestinal Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shanxi, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effect of ischemic preconditioning (IPC) in the posterior limbs of rats of donor pancreas graft, and analyze the correlations with adenosine. **Methods** 18 streptozotocin (STZ)-induced diabetic SD rats were randomly assigned to 3 groups: group I/R ($n=6$) received pancreas transplantation alone (PTA), Group IPC ($n=6$) received pancreas transplantation alone exposed IPC with 5 minutes ischemic and 5 minutes reperfusion induced by ligating donor's posterior limb three times before ablating donors, Group IPC + DPCPX received same treatment with Group IPC, but separately injected adenosine A1 receptor antagonist 8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine (DPCPX) before IPC. The blood glucose, TNF- α in serum, MDA and MPO in pancreatic tissue were monitored before and after reperfusion, and apoptotic cells were stained by TUNEL technique 2 h after reperfusion. **Results** The blood glucose, TNF- α , apoptotic index (AI), MDA and MPO of group I/R were higher than that of Group IPC and Group IPC + DPCPX after reperfusion ($P<0.01$), but those of Group IPC + DPCPX were not markedly different with Group IPC ($P>0.05$). **Conclusion** IPC in the posterior limbs of rats can protect rat pancreas graft from I/R injury during PTA. Adenosine do not participate in the signal mechanism of this protection.

[Key words] pancreas transplantation; ischemic preconditioning; adenosine; rat

中图分类号:R617.5 文献标识码:A 文章编号:1006-9771(2005)05-0553-02

[本文著录格式] 刘小南,霍婷婷,王为忠.腺苷不参与大鼠双后肢缺血预处理对移植胰的保护作用[J].中国康复理论与实践,2005,11(5):553-554.

缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)是通过释放一些内源性活性物质激活了某些信号传导机制,从而完成对机体的保护,目前已在不同种属的动物不同器官及临床上得到证实。近来发现,IPC 对远隔器官的缺血再灌注损伤(ischemic reperfusion, I/R)也有保护作用^[1-2]。我们在大鼠双后肢 IPC 对移植胰远隔保护作用的机制研究中发现,腺苷不参与这种保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物及器材 55 只 SD 雄性大鼠(250 ~ 320 g),标准实验室饲养,由第四军医大学动物实验中心提供。27 只大鼠自阴茎静脉注射链脲霉素(STZ) 65 mg/kg 后,18 只空腹血糖持续 2 周超过 17.4 mmol/L

为糖尿病大鼠供本试验用。TUNEL 染色试剂盒和 MDA 检测试剂盒:南京建成生物工程研究所;腺苷 A1 受体拮抗剂 8-环戊基-1,3-二丙基黄嘌呤(8-cyclopentyl-1,3-dipropylxanthine, DPCPX) :美国 Sigma 公司。1.2 手术方法 据参考文献^[3]制做大鼠单纯胰腺移植(PTA)模型(I/R 组, $n=6$) ;IPC 组($n=6$) 于供胰再灌注前阻断受体双后肢血流 5 min 再灌注 5 min,重复 3 次,余同 I/R 组;IPC + DPCPX 组($n=6$) 于预处理前 15 min 腹腔注射 DPCPX 1 mg/kg,余同 IPC 组。18 只正常大鼠为供体。

1.3 围手术期处理 术前禁食不禁水 24 h,并肌注氨苄青霉素 100 mg/kg。氯氨酮 100 mg/kg 腹腔麻醉。术后肌注氨苄青霉素 200 mg/kg,24 h 后正常饮食。

1.4 监测内容及方法

1.4.1 血样检测 各组大鼠于移植前 2 d 经阴茎静脉取血,再灌注 2 h 后处死大鼠,经下腔静脉取血,用血糖监测仪测血糖;部分血样离心(4℃, 4000 r/min, 10 min),上清置于 -70℃ 冰箱保存,用相应的试剂盒测

作者单位:1.710033 陕西西安市,第四军医大学西京医院胃肠外科(刘小南、王为忠、管文贤);2.710033 陕西西安市,第四军医大学西京医院麻醉科(霍婷婷)。作者简介:刘小南(1972-),男,陕西西安市人,博士,主治医师,讲师,主要研究方向:胃肠外科。

定肿瘤坏死因子(TNF)- α (放免法,按说明书操作) 。

1.4.2 组织检测 各组大鼠于胰腺再灌注 2 h 后取胰组织,部分保存于液氮中用于测定髓过氧化物酶(MPO) 活性(见后) 及丙二醛(MDA) 含量(改良八木国夫法,按说明书操作) ;部分组织保存于含 10 %中性甲醛中备石蜡切片,用于 HE 染色和 TUNEL 染色,光镜检查。

1.4.3 胰腺细胞凋亡检测 采用末端脱氧核苷酸转移酶介导的 dUTP 缺口末端标记法(TUNEL) 检测,每只从石蜡切片中取 1 张常规脱蜡入水,用新鲜配制的 3 % H_2O_2 处理,蒸馏水洗涤;加以 Tris 缓冲盐水(TBS) 新鲜稀释的蛋白酶 K(1 : 100) ,37 $^{\circ}C$ 10 min,蒸馏水洗;加含 TdT 和 DIG-dUTP 的标记缓冲液 20 μ l,37 $^{\circ}C$ 2 h,TBS 洗涤;加封闭液 50 μ l,室温 30 min,甩干;加以封闭液稀释的 Anti-DIG Biotin(1 : 100) 50 μ l,37 $^{\circ}C$ 30 min,TBS 洗;加以 TBS 稀释的链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC) (1 : 100) ,37 $^{\circ}C$ 30 min,TBS 洗;然后用 3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB) 显色 20 min,蒸馏水洗;苏木素复染,TBS 洗;脱水,透明,封片。将切片置 20 \times 15 显微镜下观察,细胞核中有棕黄色颗粒者为凋亡细胞。每张切片观察 10 \times 500 个细胞,计算每 100 个细胞中的平均阳性细胞数,即凋亡指数(apoptosis index, AI) 。

1.4.4 胰组织 MPO 活性测定 取胰腺组织块 0.1 g 剪碎匀浆,将匀浆以 4000 r/min 离心 15 min,取上清液 0.1 ml 加 0.167 g/L 邻联茴香胺二盐酸化物以及 0.0005 %过氧化氢混合液 2.9 ml。恒温紫外分光光度计在 460 nm 处每隔 15 s 连续记录 OD 值 1 min,MPO 活性定义为 27 $^{\circ}C$ 平均每克胰腺组织单位时间(min) 内 OD 值的变化(Δ OD/g \cdot min) 。

1.5 统计学方法 数据以($\bar{x}\pm s$) 表示,多组间均数比较用方差分析,两组间比较用配对 t 检验, $P<0.05$ 为有显著性差异。

2 结果

再灌注后,各组相对于再灌注前血糖下降($P<0.05$) 。I/R 组血糖、血清中 TNF- α 、胰腺组织中 MPO 和 MDA 含量,胰腺组织凋亡指数均高于 IPC 组和 IPC+DPCPX 组(均 $P<0.01$) ,IPC+DPCPX 组与 IPC 组再灌注后各项指标无显著性差异($P>0.05$) 。见表 1。

再灌注后,相对于 IPC 组和 IPC+DPCPX 组,I/R 组胰小叶间隙增宽,间质血管扩张充血,大量中性粒细胞浸润,胰腺实质可见散在的点状坏死灶。IPC 组和 IPC+DPCPX 组胰腺组织结构尚正常,但小叶间质水肿,可见少量中性粒细胞浸润。

表 1 各组检测结果比较

组别	n	再灌注前血糖 (mmol/L)	再灌注后血糖 (mmol/L)	TNF- α (U/ml)	MDA (mmol/gprot)	MPO (Δ OD/g)	AI (%)
I/R 组	6	19.6 \pm 1.8	16.5 \pm 1.4 ^a	1.79 \pm 0.25	0.87 \pm 0.31	0.96 \pm 0.34	33.41 \pm 5.78
IPC 组	6	19.9 \pm 2.1	12.9 \pm 1.2 ^{b,c}	1.12 \pm 0.15 ^c	0.54 \pm 0.16 ^c	0.43 \pm 0.12 ^c	17.64 \pm 3.61 ^c
IPC+DPCPX 组	6	19.5 \pm 1.6	11.9 \pm 1.4 ^{b,c}	1.16 \pm 0.20 ^c	0.51 \pm 0.13 ^c	0.46 \pm 0.14 ^c	18.79 \pm 4.04 ^c

注:与再灌注前比较,a: $P<0.05$,b: $P<0.01$;c:与 I/R 组比较, $P<0.01$ 。

3 讨论

Pell^[1]等和 Kharbanda^[2]等发现,肢体和肾脏 IPC 可明显缩小后续心脏 I/R 所致的心肌梗死面积,证实 IPC 也具有远隔保护作用。我们发现,双后肢 IPC 可以改善大鼠移植胰的内分泌功能,减少移植胰的细胞凋亡现象,减轻其组织病理损害,提示双后肢 IPC 对大鼠移植胰具有保护作用,机制可能涉及多种内源性保护物质的释放。腺苷是一种内源性嘌呤核苷酸,主要由三磷酸腺苷(ATP) 不断降解产生。目前已知有 4 种腺苷受体,即腺苷 A₁、A_{2A}、A_{2B}、A₃ 受体,腺苷主要通过与其效应器官上的特殊受体相结合来完成它的生理功能。以前的研究发现,腺苷可能是早期 IPC 的激发剂,在不同动物的不同器官发现应用腺苷可以模拟 IPC 的保护作用,腺苷在 IPC 中的保护机制可能是:减轻中性粒细胞(PMNs) 粘附,增加膜稳定性和减少 Ca^{2+} 内流。但最新的研究发现,应用腺苷 A₁ 受体阻滞剂并不能干预 IPC 对犬心肌的保护作用^[4],提示腺

苷可能在 IPC 过程中的释放及其作用程度具有动物种属差异。本实验应用腺苷 A₁ 受体阻滞剂和双后肢 IPC 的大鼠移植后血糖水平无恶化,炎性介质 TNF- α 和脂质过氧化物 MDA 未增加,反映 PMNs 在组织中的聚集程度的 MPO 活性无升高,移植胰细胞凋亡并未加重,提示腺苷可能未参与双后肢 IPC 对大鼠移植胰的远隔保护作用。

[参考文献]

[1] Pell TJ, Baxter GF, Yellon DM, et al. Renal ischemia preconditions myocardium: role of adenosine receptors and ATP-sensitive potassium channels[J]. Am J Physiol, 1998, 275(5 Pt 2) : H1542 - 1547.

[2] Kharbanda RK, Mortensen UM, White PA, et al. Transient limb ischemia induces remote ischemic preconditioning in vivo[J]. Circulation, 2002, 106(23) : 2881 - 2883.

[3] 刘小南,王为忠,陈彩平,等.大鼠胰肠重建式单纯胰腺移植动物模型的构建[J].第四军医大学学报,2004,25(5) : 865 - 867.

[4] Nakamura M, Wang NP, Zhao ZQ, et al. Preconditioning decreases Bax expression, PMN accumulation and apoptosis in reperfused rat heart[J]. Cardiovasc Res, 2000, 45(3) : 661 - 670.

(收稿日期:2005-05-09)