

• 基础研究 •

缺血预处理对大鼠移植胰细胞凋亡的影响

刘小南 霍婷婷 王为忠 管文贤 陈冬利

[摘要] 目的 观察缺血预处理对大鼠移植胰细胞凋亡的影响。方法 6 只正常大鼠为对照组, 18 只糖尿病 SD 大鼠随机分为缺血再灌注组(I/R 组, $n=6$)、供胰缺血预处理组(DIPC 组, $n=6$)和受体双后肢缺血预处理组(RIPC 组, $n=6$), 均行单纯胰腺移植(18 只正常 SD 大鼠为供体); 检测各组大鼠再灌注前、后血糖; 再灌注后 2 h 移植胰组织中超氧化物歧化酶(SOD)和髓过氧化物酶(MPO)含量; 用 TUNEL 法观察移植胰组织细胞凋亡情况。结果 与 I/R 组比较, DIPC 组和 RIPC 组大鼠再灌注后的血糖、MPO 活性和移植胰组织细胞凋亡指数明显降低, 移植胰组织中 SOD 活性明显增高(均为 $P < 0.01$)。结论 供胰和受体大鼠双后肢缺血预处理能减轻大鼠移植胰细胞的凋亡现象。

[关键词] 胰腺移植; 缺血预处理; 缺血再灌注; 细胞凋亡; 大鼠

Effect of ischemic preconditioning on apoptosis of transplanted pancreas cells in rats LIU Xiao-nan, HUO Ting-ting, WANG Wei-zhong, et al. The Department of Gastrointestinal Surgery, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xian 710033, Shanxi, China

[Abstract] Objective To observe the effect of ischemic preconditioning (IPC) on apoptosis of transplanted pancreas cells in rats. Methods 6 normal SD rats were assigned as control group. 18 streptozotocin-induced diabetic SD rats were randomly divided into 3 groups: the I/R group ($n=6$, received pancreas transplantation alone), DIPC group ($n=6$, received pancreas transplantation exposed IPC with 5 min ischemic and 5 min reperfusion twice) and RIPC group ($n=6$, received pancreas transplantation exposed IPC with 5 minutes ischemic and 5 minutes reperfusion induced by ligating donors' posterior limbs three times before anastomosing vessel). The blood glucose in serum, superoxide dismutase (SOD), myeloperoxidase (MPO), TUNEL cells in graft were monitored. Results After reperfusion, compared with the I/R group, the mean blood glucose levels, MPO levels and apoptotic index of graft reduced, the mean SOD levels of graft heightened in DIPC and RIPC groups significantly (all $P < 0.01$). Conclusion Ischemic preconditioning induced by graft and ligating donors' posterior limbs can reduce apoptosis of transplanted pancreas cells.

[Key words] pancreas transplantation; ischemic preconditioning; ischemic reperfusion; apoptosis; rat

中图分类号: R657.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-9771(2005)08-0618-03

[本文著录格式] 刘小南, 霍婷婷, 王为忠, 等. 缺血预处理对大鼠移植胰细胞凋亡的影响[J]. 中国康复理论与实践, 2005, 11(8): 618-620.

研究表明, 缺血预处理(ischemic preconditioning, IPC)可减轻靶器官缺血再灌注损伤(ischemic reperfusion, I/R)导致的细胞凋亡^[1-3]。本实验探讨 IPC 能否减轻大鼠移植胰细胞的凋亡。

1 材料与方法

1.1 实验动物 53 只 SD 雄性大鼠(体重 250 ~ 320 g), 由第四军医大学动物实验中心提供, 标准实验室饲养。

1.2 主要器材和药品 血糖监测仪购自美国强生公司; 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)和细胞凋亡检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所。

1.3 方法

1.3.1 糖尿病大鼠模型建立 29 只大鼠自阴茎静脉

注射链脲霉素(streptozotocin, STZ) 65 mg/kg, 18 只空腹血糖持续 2 周超过 17.4 mmol/L 的糖尿病大鼠供本实验用。

1.3.2 动物分组及手术 6 只正常大鼠为对照组。18 只糖尿病 SD 大鼠随机分为缺血再灌注组(I/R 组, $n=6$)和供胰缺血预处理组(DIPC 组, $n=6$)、受体双后肢缺血预处理组(RIPC 组, $n=6$)。I/R 组、DIPC 组和 RIPC 组均行胰腺移植, 18 只正常 SD 大鼠为供体。对照组仅行开腹术。余两组大鼠胰腺移植动物模型根据文献^[4], I/R 组于获取供胰前以 4℃肝素冰平衡盐液(150 U/ml)灌洗 20 min; IPC 组于获取供胰前阻断脾血管 5 min 再灌注 5 min 2 次; RIPC 组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。供胰均置入 4℃肝素冰平衡盐液(150 U/ml)保存。各组控制缺血时间为 180 min, 热缺血时间为 15 min。

1.3.3 围手术期处理 术前禁食不禁水 24 h, 并肌注氯苄青霉素 100 mg/kg。氯氨酮 100 mg/kg 腹腔麻

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、陈冬利); 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: 器官移植。

醉。术后肌注氨苄青霉素 200 mg/kg,24 h 后正常饮食。

1.3.4 监测内容及方法

1.3.4.1 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 后经下腔静脉取血,用血糖监测仪测血糖。

1.3.4.2 组织检测 各组大鼠于胰腺再灌注 2 h 后取移植胰组织,部分保存于 - 70 ℃ 冰箱用相应试剂盒测定髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)(操作步骤见后)和 SOD 活性(采用黄嘌呤氧化酶法测定,具体操作步骤参照说明书);部分组织保存于含 10 % 中性甲醛中,HE 和脱氧核糖核酸末端转移酶介导的缺口末端标记(terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated nick end labeling, TUNEL) 染色,光镜检查。

1.3.4.3 胰腺组织 MPO 活性测定 取胰腺组织块(0.1 g) 在冰生理盐水中漂洗,除去血液,滤纸拭干,称重,放入小烧杯内,用普通滴管取预冷的 2 ml 匀浆介质(pH 7.4, 0.01 mol/L 蔗糖; 0.01 mol/L Tris-HCl; 0.001 mol/L EDTA₂ Na 溶液) 置入烧杯中,用眼科小剪尽快剪碎组织块。将剪碎的组织倒入玻璃匀浆管中进行匀浆,捣杆垂直插入套管中上下转动研磨数 10 次(6 ~ 8 min),充分研碎,使组织匀浆化。将匀浆以 3000 ~ 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。采用恒温紫外分光光度计在 460 nm 处每隔 15 s 连续记录 A 值 1 min。MPO 活性定义为 27 ℃ 平均每克胰腺组织单位时间(min) A 值的变化,即用每分钟 A/g 表达 MPO 的活性。

1.3.4.4 胰腺细胞凋亡检测 采用 TUNEL 法检测,每例石蜡切片均取一张常规脱蜡入水,用新鲜配制的体积分数为 3 % H₂O₂ 处理,蒸馏水洗涤。加入以 Tris 缓冲盐水(TBS) 1 : 100 新鲜稀释的蛋白酶 K, 37 ℃ 10 min,蒸馏水洗;加含 TdT 和 DIG-dUTP 的标记缓冲液 20 μl, 37 ℃, 2 h, TBS 洗涤;加封闭液 50 μl, 室温 30 min,甩干;加入以封闭液 1 : 100 稀释的抗 DIG 生物素 50 μl, 37 ℃, 30 min, TBS 洗涤;加入以 TBS 1 : 100 稀释的链酶亲和素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC), 37 ℃, 30 min, TBS 洗涤;然后用 3,3'-二氨基联苯胺盐酸盐(DAB) 显色 20 min,蒸馏水洗涤,苏木素复染, TBS 洗涤,脱水,透明,封片。将切片置显微镜下观察,细胞核中有棕黄色颗粒者为凋亡细胞。每张切片光镜(20 × 10 倍) 观察 10 × 500 个细胞,计算平均阳性细胞率,即凋亡指数(apoptosis index, AI) 。

1.4 统计学处理 数据以($\bar{x} \pm s$) 表示,组间差异采用方差分析。

2 结果

2.1 血糖变化 再灌注后, I/ R 组、DIPC 组和 RIPC 组大鼠的血糖均下降,但 DIPC 组和 RIPC 组明显低于 I/ R 组,而 DIPC 组和 RIPC 组之间无显著性差异(见表 1) 。

表 1 各组再灌注后血糖变化情况($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | 血糖(mmol/L) | |
|--------|-------------|---------------------------|
| | 再灌注前 | 再灌注后 |
| I/ R 组 | 19.6 ± 1.8 | 16.5 ± 1.4 ^a |
| DIPC 组 | 19.4 ± 1.6 | 12.1 ± 0.9 ^{b,c} |
| RIPC 组 | 19.9 ± 2.1 | 12.9 ± 1.2 ^{b,c} |

注:a:与对照组比较, $P < 0.05$; b:与对照组比较, $P < 0.01$; c:与 I/ R 组比较, $P < 0.01$ 。

2.2 胰腺组织中 SOD 和 MPO 活性 再灌注后, I/ R 组、DIPC 组和 RIPC 组大鼠胰腺组织中 SOD 活性低于对照组, MPO 活性高于对照组, DIPC 组大鼠血清中 SOD 和 MPO 活性与 RIPC 组无显著性差异,但均较 I/ R 组血清中 SOD 活性升高, MPO 活性降低(见表 2) 。

2.3 移植胰组织细胞凋亡情况 再灌注后, I/ R 组、DIPC 组和 RIPC 组大鼠的胰腺组织 AI 值较对照组增高, DIPC 组大鼠的 AI 值与 RIPC 组无显著性差异,但均较 I/ R 组低(见表 2) 。

表 2 再灌注后移植胰 MPO SOD 含量和 AI 值($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | MPO(A/g) | SOD(mU/g) | AI 值(%) |
|--------|----------------------------|-------------------------------|-----------------------------|
| 对照组 | 0.31 ± 0.12 | 241.43 ± 23.45 | 5.35 ± 1.04 |
| I/ R 组 | 0.96 ± 0.34 ^a | 153.47 ± 17.67 ^a | 35.65 ± 5.78 ^a |
| DIPC 组 | 0.51 ± 0.16 ^{b,c} | 213.64 ± 22.97 ^{b,c} | 15.43 ± 2.88 ^{b,c} |
| RIPC 组 | 0.43 ± 0.12 ^{b,c} | 206.34 ± 19.56 ^{b,c} | 17.64 ± 3.51 ^{b,c} |

注:a:与对照组比较, $P < 0.01$; b:与对照组比较, $P < 0.05$; c:与 I/ R 组比较, $P < 0.01$ 。

3 讨论

研究显示, I/ R 损伤可导致细胞凋亡^[5]; I/ R 后随着嗜中性粒细胞(neutrophils, PMNs) 聚集的增加, 凋亡细胞也不断增加^[6]; PMNs 聚集与凋亡细胞的发生率成线性关系^[7]。前炎性介质、氧自由基及 PNM 释放的各种细胞因子被认为诱导了凋亡^[8]。而大量的证据表明, IPC 可以减轻 I/ R 损伤介导的细胞凋亡。Piot 等发现, IPC 可减轻大鼠在体心肌 I/ R 的细胞凋亡, 并且认为 IPC 减轻 I/ R 损伤可能与减少心肌细胞凋亡有关^[9]。Maulik 等认为, IPC 可减少再灌注过程的细胞凋亡, 而不是缺血阶段诱导的凋亡^[10]。IPC 减少靶器官细胞凋亡已在多种动物及器官得到印证。IPC 减轻靶器官细胞凋亡的机制可能与以下因素有关: ①减少凋亡启动因子: IPC 可通过抑制活性氧的生成^[11]和保护血管内皮细胞^[12,13]减轻细胞凋亡; ②改变凋亡信号途径: IPC 可通过上调 Bcl-2 和下调 P53 蛋白的表达^[14,15], 或者通过改变 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达比率^[16]

减少细胞凋亡;③IPC 还可能通过 K_{ATP} 通道的开放稳定线粒体的功能,从而发挥减轻细胞凋亡的作用^[17]。本研究结果显示,经供胰和受体双后肢诱导的 IPC 均可有效增加内源性氧自由基清除剂 SOD 的活性,而反映 PMNs 凝聚程度的酶 MPO 也显著减少,同时供胰的细胞凋亡现象减轻,提示供胰和受体双后肢 IPC 可以减少移植胰腺组织 I/R 后的细胞凋亡,其机制之一可能与减少 PMNs 聚集和氧自由基有关。

[参考文献]

- [1] Zhao M, Chen Y, Li Y. Changes of apoptosis and Fas gene expression in cardiomyocytes of rats with myocardial reperfusion and the effects of ischemic preconditioning[J]. Zhonghua Nei Ke Za Zhi, 1999, 38(11): 753—759.
- [2] Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, et al. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver[J]. Ann Surg, 2002, 235(3): 400—407.
- [3] Shake JG, Peck EA, Marban E, et al. Pharmacologically induced preconditioning with diazoxide: a novel approach to brain protection[J]. Ann Thorac Surg, 2001, 72(6): 1849—1854.
- [4] 刘小南, 王为忠, 陈彩平, 等. 大鼠胰肠重建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.
- [5] Gottlieb RA, Bursleson KO, Kloner RA, et al. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes[J]. J Clin Invest, 1994, 94(4): 1621—1628.
- [6] 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.
- [7] Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, et al. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion[J]. Apoptosis, 2001, 6(4): 279—290.
- [8] Yang JJ, Kettritz R, Falk RJ, et al. Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases proteinase 3 and elastase[J]. Am J Pathol, 1996, 149(5): 1617—1626.
- [9] Gho BC, Schoemaker RG, van Doel MA, et al. Myocardial protection by brief ischemia in noncardiac tissue[J]. Circulation, 1996, 94(9): 2193—2200.
- [10] Piot CA, Padmanaban D, Ursell PC, et al. Ischemic preconditioning decreases apoptosis in rat hearts in vivo[J]. Circulation, 1997, 96(6): 139.
- [11] Meldrum DR, Dinarello CA, Shames BD, et al. Ischemic preconditioning decreases postischemic myocardial tumor necrosis factor- α production. Potential ultimate effector mechanism of preconditioning[J]. Circulation, 1998, 98(19 suppl): 214—218.
- [12] Sawaya DE Jr, Brown M, Minardi A, et al. The role of ischemic preconditioning in the recruitment of rolling and adherent leukocytes in hepatic venules after ischemia / reperfusion[J]. J Surg Res, 1999, 85(1): 163—170.
- [13] Peralta C, Fernandez L, Panes J, et al. Preconditioning protects against systemic disorders associated with hepatic ischemia / reperfusion through blockade of tumor necrosis factor-induced P-selectin up-regulation in the rat[J]. Hepatology, 2001, 33(1): 100—113.
- [14] Maulik N, Sasaki H, Addya S, et al. Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors[J]. FEBS Lett, 2000, 485(1): 7—12.
- [15] Maulik N, Engelman RM, Rousou JA, et al. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2[J]. Circulation, 1999, 100(19 suppl): II 369—375.
- [16] Baghelai K, Graham LJ, Wechsler AS, et al. Cardiopulmonary support and physiology. Delayed myocardial preconditioning by α_1 -adrenoceptors involves inhibition of apoptosis[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 1999, 117: 980—986.
- [17] Liu D, Lu C, Wan R, et al. Activation of mitochondrial ATP-dependent potassium channels protects neurons against ischemia-induced death by a mechanism involving suppression of Bax translocation and cytochrome c release[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2002, 22(4): 431—443.

(收稿日期: 2005-05-30)