

缺血预处理对大鼠移植胰缺血再灌注损伤的保护作用及其与细胞凋亡的相关性

刘小南, 霍婷婷, 王为忠, 陈彩平, 管文贤, 陈冬利

刘小南, 王为忠, 管文贤, 陈冬利, 中国人民解放军第四军医大学西京医院胃肠外科 陕西省西安市 710033

霍婷婷, 中国人民解放军第四军医大学西京医院麻醉科 陕西省西安市 710033

陈彩平, 中国人民解放军第四军医大学西京医院小儿科 陕西省西安市 710033

刘小南, 男, 1972-12 生, 陕西省西安市, 主治医师, 讲师, 医学博士, 主要从事器官移植方面的研究。

通讯作者: 刘小南, 710033, 陕西省西安市, 中国人民解放军第四军医大学西京医院胃肠外科. liuxnys@yahoo.com.cn

电话: 029-83375161

收稿日期: 2004-11-29 接受日期: 2005-01-26

Effect of ischemic preconditioning on ischemia reperfusion injury of graft after pancreas transplantation and correlations with apoptosis in rat

Xiao-Nan Liu, Ting-Ting Huo, Wei-Zhong Wang, Cai-Ping Chen, Wen-Xian Guan, Dong-Li Chen

Xiao-Nan Liu, Wei-Zhong Wang, Wen-Xian Guan, Dong-Li Chen, Department of Gastrointestinal Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China
Ting-Ting Huo, Department of Anesthesia, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China
Cai-Ping Chen, Department of Pediatrics, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China
Correspondence to: Xiao-Nan Liu, Department of Gastrointestinal Surgery, Xijing Hospital, the Fourth Military Medical University, Xi'an 710033, Shaanxi Province, China. liuxnys@yahoo.com.cn
Received: 2004-11-29 Accepted: 2005-01-26

Abstract

AIM: To investigate the effect of ischemic preconditioning on ischemia reperfusion injury of the pancreas graft in rat, and to analyze the possible mechanism.

METHODS: Six normal SD rats in the control group received sham operation. Twenty-four SD rats with streptozotocin-induced diabetes were randomly assigned to 2 groups: Group I/R consisted of 6 diabetic rats which received pancreas transplantation; Group IPC consisted of 18 diabetic rats which received pancreas transplantation and were exposed to 5 min ischemia and 5 min reperfusion once (IPC₁, *n* = 6), twice (IPC₂, *n* = 6) or thrice (IPC₃, *n* = 6) before ablating donors. Blood glucose, serum NO and TNF- α , MDA, SOD, MPO, TUNEL cells, and the expression of Bcl-2 and Bax protein (Western Blot) in graft were monitored.

RESULTS: The mean blood glucose levels in Group IPC₁,

(14.3 \pm 1.1 vs 12.1 \pm 0.9 mmol/L, *P* < 0.05), Group IPC₂ (12.1 \pm 0.9 vs 16.5 \pm 1.4 mmol/L, *P* < 0.01) and Group IPC₃ (14.7 \pm 1.3 vs 12.1 \pm 0.9 mmol/L, *P* < 0.05) were lower than that in Group I/R, and the glucose level in Group IPC₂ was lower than those in IPC₁ (12.1 \pm 0.9 vs 14.3 \pm 1.1 mmol/L, *P* < 0.05) and IPC₃ (12.1 \pm 0.9 vs 14.7 \pm 1.3 mmol/L, *P* < 0.05) 2 hours after reperfusion. The mean NO (13.13 \pm 2.87 vs 8.91 \pm 1.23 μ g/L, *P* < 0.05, 18.79 \pm 2.39 vs 8.91 \pm 1.23 μ g/L, *P* < 0.01, 14.36 \pm 1.78 vs 8.91 \pm 1.23 μ g/L, *P* < 0.05) and SOD (179.82 \pm 19.54 vs 153.47 \pm 17.67 mU/g, *P* < 0.05, 213.64 \pm 22.97 vs 153.47 \pm 17.67 mU/g, *P* < 0.01, 181.68 \pm 20.32 vs 153.47 \pm 17.67 mU/g, *P* < 0.05) levels in Group IPC₁, IPC₂ and IPC₃ were higher than that in Group I/R, and the levels in Group IPC₂ were higher than those in Group IPC₁ and Group IPC₃ 2 hours after reperfusion (18.79 \pm 2.39 vs 13.13 \pm 2.87 μ g/L, 18.79 \pm 2.39 vs 14.36 \pm 1.78 μ g/L, 213.64 \pm 22.97 vs 179.82 \pm 19.54 mU/g, 213.64 \pm 22.97 vs 181.68 \pm 20.32 mU/g, *P* < 0.05). The mean levels of TNF- α (1.41 \pm 0.17 vs 1.79 \pm 0.25 kU/L, *P* < 0.05, 1.05 \pm 0.16 vs 1.79 \pm 0.25 kU/L, *P* < 0.01, 1.43 \pm 0.20 vs 1.79 \pm 0.25 kU/L, *P* < 0.05, MDA (0.70 \pm 0.26 vs 0.87 \pm 0.31 mmol/g, *P* < 0.05, 0.46 \pm 0.18 vs 0.87 \pm 0.31 mmol/g, *P* < 0.01; 0.67 \pm 0.15 vs 0.87 \pm 0.31 mmol/g, *P* < 0.05) and MPO (0.81 \pm 0.23 vs 0.96 \pm 0.34 A/g, *P* < 0.05, 0.51 \pm 0.16 vs 0.96 \pm 0.34 A/g, *P* < 0.01, 0.78 \pm 0.22 vs 0.96 \pm 0.34 A/g, *P* < 0.05) in Group IPC₁, IPC₂ and IPC₃ were lower than those in Group I/R, and those in Group IPC₂ were lower than in IPC₁ and IPC₃ 2 hours after reperfusion (1.05 \pm 0.16 vs 1.41 \pm 0.17 kU/L, 1.05 \pm 0.16 vs 1.43 \pm 0.20 kU/L, 0.46 \pm 0.18 vs 0.70 \pm 0.26 mmol/g, 0.46 \pm 0.18 vs 10.67 \pm 0.15 mmol/g, 0.51 \pm 0.16 vs 0.81 \pm 0.23 A/g, 0.51 \pm 0.16 vs 0.78 \pm 0.22 A/g, *P* < 0.05). The apoptotic indexes in IPC₁ (25.21 \pm 3.47 vs 35.65 \pm 4.78%, *P* < 0.01), IPC₂ (15.47 \pm 2.09 vs 35.65 \pm 4.78%, *P* < 0.01) and IPC₃ (24.89 \pm 3.56 vs 35.65 \pm 4.78%, *P* < 0.01) were lower than Group I/R, and that in Group IPC₂ was lower than IPC₁ (15.47 \pm 2.09 vs 25.21 \pm 3.47%, *P* < 0.01) and IPC₃ (15.47 \pm 2.09 vs 24.89 \pm 3.56%, *P* < 0.01) 2 hours after reperfusion. The expression of the Bax protein in Group I/R was higher than that in Group IPC, while that in Group IPC₂ was the lowest. The expression of Bcl-2 protein in Group IPC was higher than in Group I/R, and that in Group IPC₂ was the highest. The expression of the Bax protein in Group IPC was lower than Group I/R, and that in Group IPC₂ was the lowest.

CONCLUSION: Ischemic preconditioning can protect pan-

creas graft from I/R injury. The possible mechanism may be related to the increased production of serum NO and tissue SOD, reduced conglutination and aggregation of PMNs in pancreas and diminished synthesis TNF- α . Ischemic preconditioning can reduce apoptosis of the graft, which may be resulted from alleviated conglutination and aggregation of PMNs, increased oxygen radical, increased Bcl-2 protein and reduced P53 protein expression. Five min ischemia and five min reperfusion twice is the best way to induce ischemic preconditioning in rat pancreas transplantation.

Key Words: Pancreas transplantation; Ischemic preconditioning; Ischemia/reperfusion; apoptosis; Rats

Liu XN, Huo TT, Wang WZ, Chen CP, Guan WX, Chen DL. Effect of ischemic preconditioning on ischemia reperfusion injury of graft after pancreas transplantation and correlations with apoptosis in rat. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2005;13(7):871-876

摘要

目的: 探讨缺血预处理对大鼠移植胰缺血再灌注损伤的早期保护作用及其与细胞凋亡的相关性。

方法: 正常大鼠6只为对照组,糖尿病SD大鼠24只随机分为缺血再灌注组(I/R组, $n=6$)和缺血预处理组(IPC组, $n=18$),IPC组又根据不同方法分为3个亚组:IPC₁组(缺血5 min再灌注5 min 1次, $n=6$)、IPC₂组(缺血5 min再灌注5 min 2次, $n=6$)和IPC₃组(缺血5 min再灌注5 min 3次, $n=6$),I/R组和IPC组均行单纯胰腺移植,24只SD大鼠为供体;检测各组再灌注前、后血糖;再灌注后2 h血清中TNF- α 和NO的含量、移植胰组织中SOD、MPO和MDA含量;用TUNEL法观察移植胰组织细胞凋亡情况,Western Blot法检测移植胰组织Bax和Bcl-2蛋白表达情况。

结果: 再灌注后IPC₁(14.3 ± 1.1 vs 12.1 ± 0.9 mmol/L, $P<0.05$)组、IPC₂(12.1 ± 0.9 vs 16.5 ± 1.4 mmol/L, $P<0.01$)和IPC₃组(14.7 ± 1.3 vs 12.1 ± 0.9 mmol/L, $P<0.05$)相对于I/R组血糖低;IPC₂组较IPC₁组(12.1 ± 0.9 vs 14.3 ± 1.1 mmol/L, $P<0.05$)和IPC₃组(12.1 ± 0.9 vs 14.7 ± 1.3 mmol/L, $P<0.05$)血糖低。再灌注后IPC₁(1.41 ± 0.17 vs 1.79 ± 0.25 kU/L, $P<0.05$)组、IPC₂(1.05 ± 0.16 vs 1.79 ± 0.25 kU/L, $P<0.01$)和IPC₃组(1.43 ± 0.20 vs 1.79 ± 0.25 kU/L, $P<0.05$)较I/R组血清中TNF- α 含量低;IPC₂组较IPC₁组(1.05 ± 0.16 vs 1.41 ± 0.17 kU/L, $P<0.05$)和IPC₃组(1.05 ± 0.16 vs 1.43 ± 0.20 kU/L, $P<0.05$)TNF- α 含量低。再灌注后IPC₁(13.13 ± 2.87 vs 8.91 ± 1.23 μ g/L, $P<0.05$)组、IPC₂(18.79 ± 2.39 vs 8.91 ± 1.23 μ g/L, $P<0.01$)和IPC₃组(14.36 ± 1.78 vs 8.91 ± 1.23 μ g/L, $P<0.05$)较I/R组血清中NO含量高;IPC₂组较IPC₁组(18.79 ± 2.39 vs 13.13 ± 1.87 μ g/L, $P<0.05$)和IPC₃组(18.79 ± 2.39 vs 14.36 ± 1.78 μ g/L, $P<0.05$)NO含量高。再灌注后IPC₁(179.82 ± 19.54 vs 153.47 ± 17.67 mU/g,

$P<0.05$)组、IPC₂(213.64 ± 22.97 vs 153.47 ± 17.67 mU/g, $P<0.01$)和IPC₃组(181.68 ± 20.32 vs 153.47 ± 17.67 mU/g, $P<0.05$)较I/R组移植胰组织中SOD活性高;IPC₂组较IPC₁组(213.64 ± 22.97 vs 179.82 ± 19.54 mU/g, $P<0.05$)和IPC₃组(213.64 ± 22.97 vs 181.68 ± 20.32 mU/g, $P<0.05$)SOD活性高。再灌注后IPC₁(0.70 ± 0.26 vs 0.87 ± 0.31 mmol/g, $P<0.05$)组、IPC₂(0.46 ± 0.18 vs 0.87 ± 0.31 mmol/g, $P<0.01$)和IPC₃组(0.67 ± 0.15 vs 0.87 ± 0.31 mmol/g, $P<0.05$)较I/R组移植胰组织中MDA含量低;IPC₂组较IPC₁组(0.46 ± 0.18 vs 0.70 ± 0.26 mmol/g, $P<0.05$)和IPC₃组(0.46 ± 0.18 vs 0.67 ± 0.15 mmol/g, $P<0.05$)MDA含量低。再灌注后IPC₁(0.81 ± 0.23 vs 0.96 ± 0.34 A/g, $P<0.05$)组、IPC₂(0.51 ± 0.16 vs 0.96 ± 0.34 A/g, $P<0.01$)和IPC₃组(0.78 ± 0.22 vs 0.96 ± 0.34 A/g, $P<0.05$)较I/R组移植胰组织中MPO活性低;IPC₂组较IPC₁组(0.51 ± 0.16 vs 0.81 ± 0.23 A/g, $P<0.05$)和IPC₃组(0.51 ± 0.16 vs 0.78 ± 0.22 A/g, $P<0.05$)MPO活性低。再灌注后IPC₁(25.21 ± 3.47 vs $35.65\pm4.78\%$, $P<0.01$)组、IPC₂(15.47 ± 2.09 vs $35.65\pm4.78\%$, $P<0.01$)和IPC₃组(24.89 ± 3.56 vs $35.65\pm4.78\%$, $P<0.01$)较I/R组移植胰组织中AI值低;IPC₂组较IPC₁组(15.47 ± 2.09 vs $25.21\pm3.47\%$, $P<0.05$)和IPC₃组(15.47 ± 2.09 vs $24.89\pm3.56\%$, $P<0.05$)AI值低。再灌注后I/R组胰组织Bax蛋白高表达,Bcl-2蛋白低表达,IPC各组再灌注后移植胰组织Bax蛋白低表达,Bcl-2蛋白高表达,而IPC₂组Bcl-2蛋白表达最高Bax蛋白表达最低。

结论: 缺血预处理对大鼠移植胰的缺血再灌注损伤具有早期保护作用,可能于提高SOD的活性、增加内源性NO的合成、下调TNF- α 和减轻PMNs黏附与聚集有关;缺血预处理可以减少移植胰缺血再灌注后的细胞凋亡,可能于减轻PMNs黏附与聚集、减少氧自由基、上调Bcl-2蛋白和下调Bax蛋白有关;缺血5 min再灌注5 min 2次是最佳的大鼠移植胰缺血预处理诱导办法。

关键词: 胰腺移植; 缺血预处理; 缺血再灌注; 凋亡; 大鼠

刘小南, 霍婷婷, 王为忠, 陈彩平, 管文贤, 陈冬利. 缺血预处理对大鼠移植胰缺血再灌注损伤的保护作用及其与细胞凋亡的相关性. *世界华人消化杂志* 2005;13(7):871-876

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/13/871.asp>

0 引言

胰腺移植过程中, 缺血再灌注(Ischemic reperfusion, I/R)损伤会导致许多并发症, 直接威胁着供胰和受体本身的存活, 严重时可导致移植失败. 缺血预处理(Ischemic preconditioning, IPC)可使心肌在随后的缺血中得到保护, 即IPC的早期保护作用. 近来体内体外的试验表明早期IPC还可以减少细胞凋亡^[1], 这种现象在心脏^[2]、肝脏^[3]和脑^[4]的实验中得到了证实, 但在胰腺移植方面的研究很少, 我们应用大鼠胰腺移植模型, 研究IPC对大鼠移植胰缺血再灌注损伤的早期保护作用, 以及其与凋亡相关蛋白的相关性。

1 材料和方法

1.1 材料 SD 雄性大鼠 70 只(250–320 g),标准实验室内饲养,由第四军医大学动物实验中心提供.血糖监测仪购自美国强生公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、一氧化氮(nitric oxide, NO)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)和细胞凋亡检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所;肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)- α 测试盒购自北京东亚免疫技术研究;兔抗鼠 Bax、Bcl-2 和 actin 多克隆抗体、Western blotting luminol reagent 购自德国 Santa Cruz 公司;Tri[®]LS Reagent 购自美国 GibcoBRL 公司.

1.2 方法 正常大鼠 6 只为对照组,大鼠 46 只自阴茎静脉注射 STZ(65 mg/kg)后,30 只空腹血糖持续 2 wk 超过 17.4 mmol/L 为糖尿病大鼠模型成功,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, $n = 18$),IPC 组又根据不同方法分为 3 个亚组:IPC₁、IPC₂ 和 IPC₃ 组.对照组仅行开腹术.余两组大鼠 PTA 动物模型根据文献[5],I/R 组于获取供胰前以 4℃ 肝素冰平衡盐液(150 kU/L)灌洗 20 min;IPC₁ 组于获取供胰前阻断脾血管 5 min 再灌注 5 min 1 次;IPC₂ 组于获取供胰前阻断脾血管 5 min 再灌注 5 min 2 次;IPC₃ 组于获取供胰前阻断脾血管 5 min 再灌注 5 min 3 次,以 4℃ 肝素冰平衡盐液(150 kU/L)灌洗 10 min,供胰均置入 4℃ 肝素冰平衡盐液(150 kU/L)保存,各组控制缺血时间为 180 min,热缺血时间为 15 min.术前禁食不禁水 24 h,并 im 氨基青霉素 100 mg/kg.氯氨酮 100 mg/kg ip 麻醉.术后 im 氨基青霉素 200 mg/kg,24 h 后正常饮食.各组大鼠于移植前 2 d 经尾静脉取血,再灌注 2 h 后经下腔静脉取血,用血糖监测仪测血糖;部分血样离心(4℃, 4 000 r/min, 10 min),上清置于 -70℃ 冰箱保存,用相应的试剂盒测定 TNF- α (放免法,具体操作步骤参照说明书)及 NO (采用硝酸盐还原法,具体操作步骤参照说明书).各组大鼠于胰腺再灌注 2 h 后取胰组织,部分保存于 -70℃ 冰箱用相应试剂盒测定 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)及 MDA 含量(采用改良八木国夫法,具体操作步骤参照说明书);部分组织切成 1 mm × 1 mm × 0.5 mm 大小组织块,用 25 g/L 戊二醛固定备行电镜检查;部分组织保存于含 40 g/L 中性甲醛中用于 HE 和 TUNEL 染色,光镜检查;部分组织置入 -70℃ 冰箱备行凋亡相关蛋白的测定.

1.2.1 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,称质量,放入小烧杯内;用普通滴管取预冷的 2 mL 匀浆递质(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十次(6–8 min),充分研碎,使组织匀浆化,将匀浆以 3 000–4 000 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 0.5 mL/L 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 A 值 1 min, MPO 活性定义为 27℃ 平均每克胰腺组织单位时间(min)内 A 值的变化,即用每分钟 A/g 表达 MPO 的活性.

1.2.2 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 30 mL/L H₂O₂ 处理,蒸馏水洗涤;加以 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 μ L, 37℃, 2 h, TBS 洗涤;加封闭液 50 μ L, 室温 30 min,甩干;加以封闭液 1:100 稀释的 Anti-DIG-biotin 50 μ L, 37℃, 30 min, TBS 洗;加以 TBS 1:100 稀释的链酶亲合素-生物素-过氧化物酶复合物(SABC), 37℃, 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).

1.2.3 移植胰组织 Western 杂交 取 100 mg 胰腺组织,与 Trizol[®] reagent 0.75 mL 在匀浆器中匀浆,匀浆后在 15–30℃ 环境下放置 5 min;将匀浆物移入新的 Eppendorf 管中,加入氯仿 0.2 mL,剧烈振摇 15 s, 15–30℃ 环境下放置 10 min, 4℃ 下 12 000 g 离心 15 min,液体分为 3 层,取下层有机相,移入新的 eppendorf 管中,并加入 1.5 mL 异丙醇,混匀后室温放置 10 min, 4℃ 下 12 000 g 离心 15 min;弃去上清,加入 950 mL/L 乙醇 2 mL 溶解的 0.3 mol/L 盐酸胍,室温放置 20 min, 4℃ 下 7 500 g 离心 5 min 后弃上清,重复洗 3 次,然后加入无水乙醇 2 mL, Vortex 混匀,室温放置 20 min, 4℃ 下 7 500 g 离心 5 min 后弃上清;蛋白沉淀用真空干燥,然后溶于 SDS 溶液 30 mL.每管蛋白样品中加入 2 × loading buffer 30 μ L,经 120 g/L SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳,凝胶上的蛋白用 100 V 转移 3 h 至硝酸纤维素膜上,50 g/L 脱脂奶粉室温封闭 2 h;依次加入相应的 1:1 000 稀释的兔抗鼠一抗,Western 杂交 4℃ 孵育过夜;1:2 000 稀释的 HRP 标记的羊抗兔二抗作用 2 h,加入 luminol 试剂,并以 X-光片捕捉 HRP 催化 luminol 试剂所产生的激发光.

1.2.4 将用 25 g/L 戊二醛液固定的胰组织取出,用

PBS液洗10 min 3次, 锇酸后固定1 h, 再次PBS洗10 min 3次, 丙酮梯度脱水, 每级10 min, 环氧树脂丙酮混合液浸泡4 h, 再用纯环氧树脂包埋液浸泡4 h, 环氧树脂包埋液包埋成块, 超薄切片(厚500-700 nm), 铅铀双重染色透射电镜观察、照片。

统计学处理 数据资料以均数±标准差(mean±SD)表示. 组间显著性差异用方差分析. $P<0.05$ 为有统计学显著差异。

2 结果

I/R组(19.6 ± 1.8 vs 16.5 ± 1.4 mmol/L, $P<0.05$)、IPC₁组(20.2 ± 2.2 vs 14.3 ± 1.1 mmol/L, $P<0.01$)、IPC₂组(19.4 ± 1.6 vs 12.1 ± 0.9 mmol/L, $P<0.01$)和IPC₃组(20.1 ± 2.0 vs 14.7 ± 1.3 mmol/L, $P<0.01$)较再灌注前血糖即下降. 再灌注后IPC₁组(14.3 ± 1.1 vs 12.1 ± 0.9 mmol/L, $P<0.05$)和IPC₃组(14.7 ± 1.3 vs 12.1 ± 0.9 mmol/L, $P<0.05$)较I/R组血糖低; IPC₂组较I/R组(12.1 ± 0.9 vs 16.5 ± 1.4 mmol/L, $P<0.01$)、IPC₁组(12.1 ± 0.9 vs 14.3 ± 1.1 mmol/L, $P<0.05$)和IPC₃组(12.1 ± 0.9 vs 14.7 ± 1.3 mmol/L, $P<0.05$)血糖低, IPC₁组和IPC₃组血糖变化无明显差异. 对照组腺组织结构正常, 无中性粒细胞浸润. IPC₂组腺组织结构尚正常, 但小叶间质水肿, 可见少量中性粒细胞浸润. 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, 小叶结构有部分破坏. IPC₁组和IPC₃组腺组织结构差别不大, 其损伤程度介于I/R组和IPC₁组之间. 在透射电镜下I/R组、IPC₁组、IPC₂组和IPC₃组均可见细胞固缩; 染色质浓聚, 裂解, 边集; 胞浆内“小泡”及“凋亡小体”形成。

2.1 血清TNF- α 和NO的含量 I/R组、IPC₁组、IPC₂组和IPC₃组较对照组再灌注后2 h血清中TNF- α 含量升高、NO含量下降; 再灌注后IPC₁组、IPC₂组和IPC₃组较I/R组血清中TNF- α 含量高、NO含量低; IPC₂组再灌注后血清中TNF- α 含量低于、NO含量高于IPC₁组和IPC₃组; IPC₁组和IPC₃组TNF- α 和NO含量变化无明显差异(表1)。

2.2 胰腺组织SOD、MPO活性和MDA含量 I/R组、IPC₁组、IPC₂组和IPC₃组较对照组再灌注后2 h胰腺组织中SOD活性低, MDA活性和MPO含量高再灌注后IPC₁组IPC₂组和IPC₃组较I/R组胰腺组织中SOD活性高、MPO活性和MDA含量低; IPC₂组再灌注后胰腺组织中SOD活性低于、MDA活性和MPO含量高于I/R组、IPC₁组和IPC₃组; IPC₁组和IPC₃组SOD活性、MPO活性和MDA含量无明显差异(表1)。

2.3 移植胰组织凋亡情况 I/R组、IPC₁组、IPC₂组和IPC₃组相对于对照组再灌注后2 h胰腺组织中AI值升高. IPC₂组再灌注后胰腺组织中AI值相对于I/R组、IPC₁组和IPC₃组低; IPC₁组和IPC₃组再灌注后胰腺组织中AI值相对于I/R组高; IPC₁组和IPC₃组AI值无明显差异(图1)。

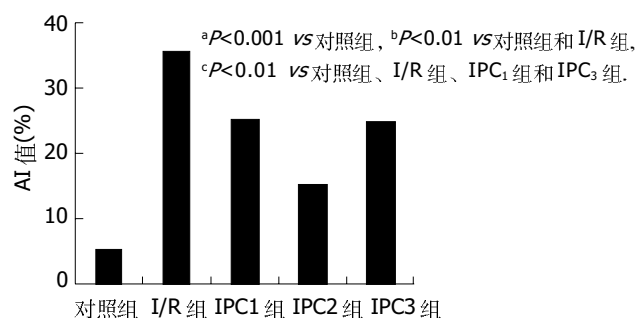


图1 各组再灌注后移植胰组织AI值。

2.4 Western blot结果 取各组供胰组织100 mg提取蛋白后, 经120 g/LSDS聚丙烯酰胺凝胶电泳, 然后电转移至硝酸纤维素膜上, 分别用兔抗鼠Bcl-2和Bax多抗进行Western blot (以actin为内对照). 结果显示, I/R组再灌注后移植胰组织P53蛋白表达, Bcl-2蛋白低表达; IPC各组再灌注后移植胰组织Bax蛋白低表达, Bcl-2蛋白高表达; 而IPC₂组Bcl-2蛋白表达最高, Bax蛋白表达最低(图2, 3)。

3 讨论

正常细胞内每天能产生大量的氧自由基, 虽然其在细胞代谢过程中连续不断地产生, 但由于机体内存

表1 再灌注后血清TNF- α 、NO、移植胰MPO、SOD和MDA含量(mean±SD)

分组	TNF- α (kU/L)	NO(μ g/L)	MPO(A/g)	SOD(mU/g)	MDA(mmol/g)
对照组	0.62±0.12	21.45±3.43	0.31±0.12	241.43±23.45	0.37±0.14
I/R组	1.79±0.25 ^b	8.91±1.23 ^b	0.96±0.34 ^b	153.47±17.67 ^b	0.87±0.31 ^b
IPC ₁ 组	1.41±0.17 ^d	13.13±2.87 ^d	0.81±0.23 ^d	179.82±19.54 ^d	0.70±0.26 ^d
IPC ₂ 组	1.05±0.16 ^{af}	18.79±2.39 ^{af}	0.51±0.16 ^{af}	213.64±22.97 ^{af}	0.46±0.18 ^{af}
IPC ₃ 组	1.43±0.20 ^d	14.36±1.78 ^d	0.78±0.22 ^d	181.68±20.32 ^d	0.67±0.15 ^d

^a $P<0.05$ vs 对照组, ^b $P<0.01$ vs 对照组, ^d $P<0.01$ vs 对照组, ^e $P<0.05$ vs I/R组, ^f $P<0.01$, vs I/R组、IPC₁组和IPC₃组。

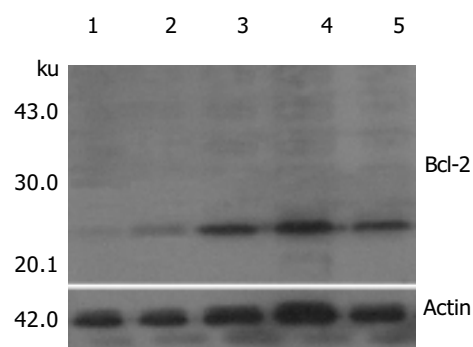


图2 移植胰 Bcl-2 蛋白印迹结果. 1: 对照组, 2: I/R 组, 3: IPC₁ 组, 4: IPC₂ 组, 5: IPC₃ 组.

在防御系统, 氧自由基可被 SOD、过氧化氢酶及过氧化物酶等所破坏而清除. I/R 后, 炎性细胞、内皮细胞和肌细胞释放的氧自由基可以触发细胞坏死与凋亡^[6]. 我们发现 IPC 可有效的减少移植胰脂质过氧化物 MDA 的产生, 同时内源性氧自由基清除剂 SOD 的活性增加, 说明 IPC 通过提高 SOD 的活性清除 I/R 过程中产生的氧自由基, 减轻其对移植胰的损伤, 从而达到保护移植胰功能的作用. 内源性 NO 具有调节血管张力、血压、器官血流量、血小板功能及改善微循环等作用, 应用 NO 前体可以减轻 I/R 损伤^[7], 反之应用 NOS 阻滞剂则可以阻断 IPC 的保护作用^[8], 在经典的 IPC 中 NO 可能是通过清除氧自由基、抑制 PMNs 黏附与聚集、减轻 TNF- α 对内皮细胞的损害和激活 PKC 来发挥其保护作用的. 我们发现移植后 I/R 组和 IPC 组血清中 NO 的含量均减少, 但 IPC 组 NO 的含量明显高于 I/R 组, 说明 IPC 可能通过增加内源性 NO 的合成来发挥其对移植胰 I/R 损伤的保护作用. TNF- α 具有多种促炎症作用, 可增强促凝活动和纤维蛋白沉积^[9], 从而增加 PMNs 向病变部位黏附、聚集和活化^[10], 引起移植胰的损伤. 本实验发现移植后 I/R 组和 IPC 组血清中 TNF- α 的含量均增加, 但 IPC 组 TNF- α 的含量明显低于 I/R 组, 说明 IPC 可能通过下调 TNF- α 减轻移植胰 I/R 介导的损伤. I/R 后 PMNs 在胰腺组织的黏附、聚集和激活可引起微循环障碍^[11], 同时释放 IL-1 β 、IL-2 和 TNF- α 等细胞因子介导器官损伤^[12], MPO 是 PMNs 内含量相对恒定的酶, 其活性的高低可以反映 PMNs 在组织中的聚集程度, 我们发现移植后 I/R 组和 IPC 组移植胰组织中 MPO 活性均增加, 但 IPC 组 MPO 活性显著低于 I/R 组, 说明 IPC 能减轻移植胰 I/R 引起的 PMNs 黏附与聚集及活化对胰细胞的损害. 综上所述, 在胰腺移植时, IPC 可能是通过提高 SOD 的活性、增加内源性 NO 的合成、下调 TNF- α 和减轻 PMNs 黏附、聚集及活化来减轻移植胰 I/R 损伤.

研究表明 I/R 损伤可导致细胞凋亡^[13], I/R 后随着 PMNs 聚集的增加凋亡细胞也不断地增加^[14], 在犬

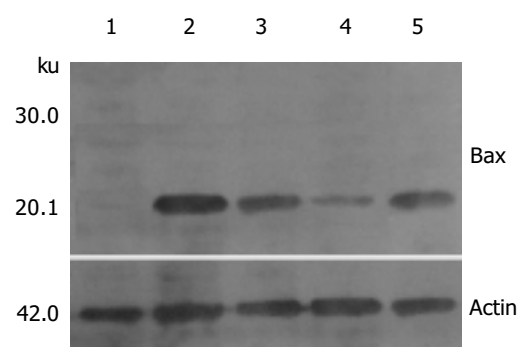


图3 移植胰 Bax 蛋白印迹结果. 1: 对照组, 2: I/R 组, 3: IPC₁ 组, 4: IPC₂ 组, 5: IPC₃ 组.

的 I/R 损伤模型中, PMNs 聚集与凋亡细胞的发生率成线性关系^[15], 此时, 前炎性递质、氧自由基及 PMNs 释放的各种细胞因子被认为诱导了凋亡^[16], 我们发现 IPC 可以显著降低移植胰组织的 MPO 活性, SOD 的活性增加, 同时细胞凋亡现象显著减少, 表明: IPC 可以减少移植胰 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. Bcl-2 家族蛋白是在细胞凋亡过程中起关键性作用的一类蛋白质. 在线粒体上, Bcl-2 家族蛋白通过与其他凋亡蛋白的协同作用, 调控线粒体结构与功能的稳定性, 发挥着细胞凋亡“主开关”的作用, Bcl-2 家族包括两类蛋白质: 一类是抗凋亡蛋白, 另一类是促凋亡蛋白. 在细胞凋亡时, Bcl-2 家族中的促凋亡蛋白成员发生蛋白质的加工修饰, 易位到线粒体的外膜上, 引起细胞色素 C、凋亡诱导因子等其他促凋亡因子的释放, 导致细胞凋亡; 而平时被隔离在线粒体等细胞器内的该家族的抗凋亡蛋白成员则抑制细胞色素 C 和凋亡诱导因子等促凋亡因子的释放, 具有抑制细胞凋亡的功能, 一旦这类抗凋亡蛋白成员与激活的促凋亡蛋白发生相互作用后, 便丧失了对细胞凋亡的抑制作用, 造成线粒体等细胞器的功能丧失和细胞器内促凋亡因子的释放, 导致细胞凋亡. Maulik *et al*^[17-18] 发现 IPC 可通过上调 Bcl-2 和下调 P53 的表达来显著地减少细胞凋亡, 而这些效应与炎症反应无关. Baghelai *et al*^[19] 认为, 早期的 IPC 不能改变以后 Bcl-2 的表达, 但是能显著地下调 Bax 蛋白表达, Bcl-2 和 Bax 蛋白表达比率的增高可减少细胞凋亡. Bcl-2 和 bax 蛋白的比率增加可以抑制线粒体释放细胞色素 C^[20] 是 IPC 减少细胞凋亡的重要机制. 本实验发现: I/R 组再灌注后移植胰组织 P53 蛋白高表达, Bcl-2 蛋白低表达, IPC 各组再灌注后移植胰组织虽 P53 蛋白低表达, Bcl-2 蛋白高表达, 而 IPC₂ 组 Bcl-2 蛋白表达最高, P53 蛋白表达最低, 提示 IPC 可能通过上调 Bcl-2 和下调 P53 蛋白来减少移植胰细胞凋亡, 从而起到保护移植胰的作用. 我们通过对大鼠胰腺不同方法的 IPC 研究

发现,缺血5 min再灌注5 min 1, 2和3次都可以对移植胰起到保护作用,但缺血5 min再灌注5 min 2次的保护作用更为强烈,表现在组织学、内分泌功能的恢复、细胞凋亡和脂质过氧化程度的减轻等方面。

4 参考文献

- 1 Gross GJ, Fryer RM. Sarcolemmal versus mitochondrial ATP-sensitive K^+ channels and myocardial preconditioning. *Circ Res* 1999;84:973-979
- 2 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. *Zhonghua Neike Zazhi* 1999;38:753-756
- 3 Rudiger HA, Kang KJ, Sindram D, Riehle HM, Clavien PA. Comparison of ischemic preconditioning and intermittent and continuous inflow occlusion in the murine liver. *Ann Surg* 2002;235:400-407
- 4 Shake JG, Peck EA, Marban E, Gott VL, Johnston MV, Troncoso JC, Redmond JM, Baumgartner WA. Pharmacologically induced preconditioning with diazoxide: a novel approach to brain protection. *Ann Thorac Surg* 2001;72:1849-1854
- 5 刘小南, 王为忠, 陈彩平, 李开宗, 陈冬利, 罗兰. 大鼠单纯胰腺移植动物模型. *第四军医大学学报* 2004;25:865-867
- 6 Thourani VH, Nakamura M, Duarte IG, Bufkin BL, Zhao ZQ, Jordan JE, Shearer ST, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Ischemic preconditioning attenuates postischemic coronary artery endothelial dysfunction in a model of minimally invasive direct coronary artery bypass. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117:383-389
- 7 Brunner F, Maier R, Andrew P, Wolkart G, Zechner R, Mayer B. Attenuation of myocardial ischemia/reperfusion injury in mice with myocyte-specific overexpression of endothelial nitric oxide synthase. *Cardiovasc Res* 2003;57:55-62
- 8 Loucks EB, Godin DV, Walley KR, McManus BM, Rahimian R, Granville DJ, Hong JM, Aktary FM, Qayumi AK. Role of platelet activating factor in cardiac dysfunction, apoptosis and nitric oxide synthase mRNA expression in the ischemic-reperfused rabbit heart. *Can J Cardiol* 2003;19:267-274
- 9 Lichtman SN, Lemasters JJ. Role of cytokines and cytokine producing cells in reperfusion injury to the livers. *Semin Liver Dis* 1999;19:171-187
- 10 Shibuya H, Ohkohchi N, Tsukamoto S, Satomi S. Tumor necrosis factor induced superoxide-mediated neutrophil accumulation in cold ischemic/reperfused rat liver. *Hepatology* 1997;26:113-120
- 11 Obermaier R, Benz S, Von Dobschuetz E, Drognitz O, Schareck W, Jonas L, Messmer K, Hopt UT. Characterization of micro-circulatory disturbance in a novel model of pancreatic ischemia-reperfusion using intravital fluorescence-microscopy. *Pancreas* 2002;25:142-148
- 12 Fink GW, Norman JG. Intrapancreatic interleukin-1beta gene expression by specific leukocyte populations during acute pancreatitis. *J Surg Res* 1996;63:369-373
- 13 Gottlieb RA, Burleson KO, Kloner RA, Babior BM, Engler RL. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes. *J Clin Invest* 1994;94:1621-1628
- 14 Nakamura M, Wang NP, Zhao ZQ, Wilcox JN, Thourani V, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Preconditioning decreases Bax expression, PMN accumulation and apoptosis in reperfused rat heart. *Cardiovasc Res* 2000;45:661-670
- 15 Zhao ZQ, Velez DA, Wang NP, Hewan-Lowe KO, Nakamura M, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion. *Apoptosis* 2001;6:279-290
- 16 Yang JJ, Kettritz R, Falk RJ, Jennette JC, Gaido ML. Apoptosis of endothelial cells induced by the neutrophil serine proteases proteinase 3 and elastase. *Am J Pathol* 1996;149:1617-1626
- 17 Maulik N, Sasaki H, Addya S, Das DK. Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors. *FEBS Lett* 2000;485:7-12
- 18 Maulik N, Engelman RM, Rousou JA, Flack JE 3rd, Deaton D, Das DK. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating anti-death gene Bcl-2. *Circulation* 1999;100(19 Suppl):II369-375
- 19 Baghelai K, Graham LJ, Wechsler AS, Jakoi ER. Delayed myocardial preconditioning by α 1-adrenoceptors involves inhibition of apoptosis. *J Thorac Cardiovasc Surg* 1999;117:980-986
- 20 Yang J, Liu X, Bhalla K, Kim CN, Ibrado AM, Cai J, Peng TI, Jones DP, Wang X. Prevention of apoptosis by Bcl-2: release of cytochrome c from mitochondria blocked. *Science* 1997;275:1129-1132

编辑 潘伯荣 审读 张海宁

ISSN 1009-3079 CN 14-1260/R 2005年版权归世界胃肠病学杂志社

• 消息 •

《世界胃肠病学杂志(英文版)》第二次荣获 我国期刊界的最高政府奖项—国家期刊奖百种重点期刊

本刊讯 由中华人民共和国新闻出版总署举办的第三届国家期刊奖评选结果已经揭晓,由世界胃肠病学杂志社出版的《世界胃肠病学杂志(英文版)》荣获第二届国家期刊奖百种重点期刊之后,第二次获得此项殊荣。

第三届国家期刊奖颁奖大会于2005-02-28在北京举行。中共中央宣传部、国家新闻出版总署和国家科技部有关方面负责同志出席了颁奖大会。新闻出版总署署长暨第三届国家期刊奖评委会主任石宗源同志在颁奖大会上做了“坚持正确导向,促进期刊繁荣”的重要讲话。国家期刊奖是经中共中央宣传部批准,由国家新闻出版总署于1999年开始主办的我国期刊界的最高政府奖项,每两年评选一次,至今已举办了三届。

第三届国家期刊奖评选活动于2004-08开始。所有参评期刊经过评选工作办公室的参评资格、学术质量、出版规范、编校质量和广告内容审查后,由专家组和评选工作委员会进行了认真、严格的评选,于2004-12-21产生初评入围期刊名单,并在《中国新闻出版报》等新闻媒体上进行了为期一个月的公示,接受全社会的监督,最终从推荐参评的976种期刊中评出获本届国家期刊奖百种重点期刊科技类期刊100种。

获第三届国家期刊奖百种重点期刊的期刊是我国9000余种期刊的优秀代表,反映了我国期刊业近年来坚持正确舆论导向、促进期刊事业繁荣发展所取得的最新成果。(世界胃肠病学杂志社 2005-03-10)