

脑死亡状态对巴马小型猪胰腺及小肠组织中蛋白激酶-C的影响

李文涛, 周闯, 宋燕, 翟文龙, 马秀现, 张水军

■背景资料

器官移植是治疗终末期器官疾病的最有效方法。供体来源短缺是制约移植技术发展的主要因素。欧美国家、新加坡、日本、中国的香港和台湾地区已建立了脑死亡法及其器官捐献的法律, 我国尚未出台脑死亡的相关法律, 器官短缺更为突出。目前全国普遍采用的无心跳者(尸体)供体, 数量少、质量差, 并因有悖于国际上供体来源的主流, 将很快被限制使用。

■研发前沿

国外临床器官移植中发现, 脑死亡供体的器官在移植前形态和功能方面都有损伤性变化。因此, 建立稳定的动物供体脑死亡模型和脑死亡供体器官移植模型, 探讨脑死亡状态下供体器官损伤和机制及其损伤防护的途径, 已成为移植学界必须面对的课题。

李文涛, 周闯, 宋燕, 翟文龙, 马秀现, 张水军, 郑州大学第一附属医院普外科 河南省郑州市 450052

通讯作者: 张水军, 450052, 河南省郑州市建设东路1号, 郑州大学第一附属医院普外科. zhangshuijun@zzu.edu.cn
电话: 0371-65066615

收稿日期: 2006-09-29 接受日期: 2006-10-25

Effects of brain death on protein kinase C expression in pancreatic and intestinal tissues of Ba-Ma mini pigs

Wen-Tao Li, Chuang Zhou, Yan Song, Wen-Long Zhai, Xiu-Xian Ma, Shui-Jun Zhang

Wen-Tao Li, Chuang Zhou, Yan Song, Wen-Long Zhai, Xiu-Xian Ma, Shui-Jun Zhang, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, He'nan Province, China
Correspondence to: Shui-Jun Zhang, Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, 1 Jianshe East Road, Zhengzhou 450052, He'nan Province China. zhangshuijun@zzu.edu.cn
Received: 2006-09-29 Accepted: 2006-10-25

Abstract

AIM: To investigate the effects of brain death on the expression of protein kinase C (PKC) in the pancreatic and intestinal tissues of Ba-Ma mini pigs.

METHODS: Ten Ba-Ma mini pigs were randomized into 2 groups: brain-dead group (group B, $n = 5$) and control group (group C, $n = 5$). Intracranial pressure was increased to induced the brain-dead model. Pancreatic and intestinal tissues were sampled for electron microscopy at the 6th, 12th and 24th hour after modeling. Reverse transcription-polymerase chain reaction and immunohistochemistry were used to detect the expression of PKC- α both at mRNA and protein levels, respectively.

RESULTS: PKC- α mRNA was expressed in both pancreatic and intestinal tissues and it was increased with brain-dead time. However, the expression of PKC- α mRNA was not found in the

normal controls. The protein expression of PKC- α was significantly higher in pancreatic and intestinal tissues of group B than that of group C, and it was also significantly varied between different time points (0.151 ± 0.0108 vs 0.381 ± 0.038 vs 0.6209 ± 0.031 ; $P < 0.05$). PKC- α protein expression was located in the cytoplasm of pancreatic and intestinal cells, and few positive cells were found. Electron microscopy showed that the pathological changes were more severe in group B.

CONCLUSION: Brain death may lead to functional and morphological injury in pancreas and intestine and the up-regulation of PKC- α may play a role in this process.

Key Words: Brain death; Ba-Ma mini pigs; Protein kinase C; Pancreas; Intestine

Li WT, Zhou C, Song Y, Zhai WL, Ma XX, Zhang SJ. Effects of brain death on protein kinase C expression in pancreatic and intestinal tissues of Ba-Ma mini pigs. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2007;15(2):168-170

摘要

目的: 探讨脑死亡状态下胰腺及小肠组织中蛋白激酶C(protein kinase C, PKC)水平的变化。

方法: 巴马小型猪10只, 随机平均分为脑死亡组及对照组。用颅内加压法建立脑死亡模型, 脑死亡后6、12和24 h点活检部分胰腺和小肠组织行电镜观察, 并用RT-PCR和免疫组化法检测PKC- α mRNA和蛋白的表达情况。

结果: 脑死亡组胰腺和小肠组织中PKC- α mRNA均表达, 并随着脑死亡时间的增加表达亮度增高, 而在对照组胰腺和小肠组织中PKC- α mRNA无表达。脑死亡组PKC- α 蛋白在胰腺和小肠组织中的表达显著高于对照组, 并且6、12、24 h间也有显著差异(0.6209 ± 0.031 vs 0.381 ± 0.038 vs 0.151 ± 0.0108 ; $P < 0.05$)。对照组PKC- α 蛋白在胰腺及小肠细胞胞质内表达, 仅见少量阳性细胞。电镜下, 脑死亡组胰腺及小肠组织形态学变化明显重

于对照组。

结论: 脑死亡状态下胰腺及小肠组织中PKC- α mRNA和蛋白表达水平明显升高, 这可能与脑死亡状态下胰腺及小肠的组织损伤有关。

关键词: 脑死亡; 巴马小型猪; 蛋白激酶C; 胰腺; 小肠

李文涛, 周闯, 宋燕, 翟文龙, 马秀现, 张水军. 脑死亡状态对巴马小型猪胰腺及小肠组织中蛋白激酶-C的影响. 世界华人消化杂志 2007;15(2):168-170

<http://www.wjgnet.com/1009-3079/15/168.asp>

0 引言

脑死亡状态能够引起机体器官的损伤性改变, 是器官移植中导致器官慢性丧失功能的一项重要危险因素^[1]。蛋白激酶C可能参与了该损伤的发生, 但这方面的研究较少。本实验利用巴马小型猪建立脑死亡模型, 探讨了脑死亡状态下胰腺及小肠组织中蛋白激酶C水平的变化。

1 材料和方法

1.1 材料 巴马小型猪10只(购自第三军医大学实验动物中心), 雌雄不限。随机分为脑死亡组、对照组, 每组5只动物。参照并改进Pratschke *et al*^[2]方法, 用颅内加压法建立脑死亡模型, 脑死亡组人工维持呼吸及血压, 记录巴马小型猪硬脑膜外腔压力的变化, 记录实验动物脑电变化, 观察心率和血压变化, 直至确认达到脑死亡状态。巴氏小型猪脑死亡判定标准^[4-6]: (1)深昏迷; (2)瞳孔对光反射和角膜反射消失; (3)自主呼吸停止; (4)脑电静息; (5)阿托品试验阴性; (6)首次判定符合(1), (2), (3), (4)和(5)后, 观察12 h无变化, 方可判定为脑死亡。对照组仅开颅, 维持全身麻醉。在初次判定脑死亡后6, 12, 24 h, 开腹, 切取相同部位的部分胰腺及小肠组织。

1.2 方法

1.2.1 电子显微镜观察胰腺和小肠组织变化 用刀快速切取组织约50 mg, 将切取的组织切成30-50块放在25 g/L的戊二醛磷酸缓冲液固定液中, 用蔗糖冲洗液冲洗3次, 每次1-2 h, 过夜后, 用10 g/L的四氧化锇缓冲液冲洗后固定1-2 h, 用500, 700, 800, 900 mL/L乙醇以及无水乙醇各脱水10-15 min, 脱水后的组织块, 先用无水乙醇与环氧树脂1:1的混合剂浸透1 h, 再用纯环氧树脂浸透, 次日升温至60℃聚合固化, 48 h取出切片,

先切成半薄切片(厚约1 μ m), 行甲苯胺兰染色, 在光学显微镜下观察组织的形态, 并进行光学定位, 确定满意的部位后, 再修块定向作超薄切片, 应用醋酸双氧铀及柠檬酸铅双染色, 置于铜网上, 电镜下观察(日立H-5700透射电镜)。

1.2.2 RT-PCR检测PKC- α mRNA的表达情况 用TRIzol(Invitrogen)抽提RNA, 设计检测引物上游引物: 5'-ACCGAGTGAACTCACGGACTT-3', 下游引物: 5'-ATACTGCTTGTTGCTTCCTTAA-3', 产物321 bp, 使用一步法反转录试剂盒(TaKaRa)完成RT-PCR反应, 反应条件: RT反应, 50℃, 30 min; RTase失活, 94℃, 2 min; 94℃变性, 30 s; 55℃退火, 30 s; 72℃延伸, 6 min; 30次循环, cDNA检测应用 β -actin引物, 上游引物: 5'-TCAAGATCAT TGCTCCTCCTGA-3', 下游引物: 5'-CTCGTCATA CTCCTGCTTGCTG-3'产物, 113 bp。反应结束后, 取PCR反应液8 μ L进行20 g/L的琼脂糖凝胶电泳, 确认PCR扩增产物, 以表达PKC- α 的组织为阳性对照, 以目的基因与 β -actin的灰度比进行半定量分析。

1.2.3 S-P法免疫组化染色观察PKC- α 的表达情况 4 μ m厚石蜡切片65℃烘烤、脱蜡, 30 mL/L过氧化氢灭活内源性过氧化物酶5 min, 微波修复抗原, 加一抗4℃湿盒中过夜, 加生物素化二抗37℃反应30 min, 以辣根过氧化物酶标记链霉亲和素37℃处理30 min, 冲洗后加二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木素复染, 脱水、封片后在光镜下观察, 凡细胞质中出现明显的棕黄色颗粒者为阳性细胞。免疫组化结果判定细胞染色为棕黄色者为阳性, 呈颗粒状或片状, 位于胞质与胞膜, 高倍镜下数五个高倍镜视野, 计算其中阳性细胞率, 阳性率=阳性细胞数/总细胞数, 计算其均数。

统计学处理 所有数值变异均采用均数 \pm 标准差(mean \pm SD)表示, 应用SPSS10.0分析软件, 采用重复数据方差分析、单因素方差分析, 进行统计处理, $P<0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 胰腺与小肠PKC- α mRNA的表达情况 经RT-PCR检测在脑死亡组胰腺和小肠组织中PKC- α mRNA均表达, 并随着脑死亡时间的增加表达亮度增高。在对照组胰腺和小肠组织中PKC- α mRNA无表达。

2.2 胰腺与小肠PKC- α 蛋白的表达改变 PKC- α 在正常胰腺与小肠细胞表达在胞质内, 低倍镜($\times 200$)下仅见少量阳性细胞, 初次判定脑死亡

■应用要点

实验研究并临床推广应用脑死亡供体进行器官移植, 能够有效的缓解我国供体缺乏, 治愈更多急待器官移植的患者, 而且能够顺应国际供体来源的主流, 促进我国器官移植事业的发展, 具有重大的社会效益。

■名词解释

脑死亡: 指包括脑干在内的全脑机能丧失的不可逆性病理状态。

■同行评价

本研究脑死亡小猪胰腺及小肠的蛋白激酶-C表达,结果显示,蛋白激酶-C的mRNA和蛋白表达都明显升高,表示脑死亡后存在组织损伤;该研究对于器官移植具有临床借鉴意义,若同时测定细胞因子等炎症介质,并观察其时间顺序,则研究内容就更全面。

表 1 不同时间各组胰腺和小肠组织中PKC- α 蛋白表达率的变化 (mean \pm SD, $n = 5$)

分组	胰腺			小肠		
	6h	12 h	24 h	6 h	12 h	24 h
对照组	0.089 \pm 0.0113	0.095 \pm 0.028	0.099 \pm 0.011	0.084 \pm 0.011	0.093 \pm 0.027	0.099 \pm 0.012
脑死亡组	0.151 \pm 0.0108	0.381 \pm 0.038 ^a	0.6209 \pm 0.031 ^a	0.109 \pm 0.024	0.128 \pm 0.0142 ^a	0.300 \pm 0.0276 ^a

^a $P < 0.05$ vs 组内之间前一时间。

后6 h可见胰腺及小肠组织中阳性细胞显著增多,统计学分析表明6、12和24 h脑死亡组PKC- α 阳性细胞阳性率高于对照组($P < 0.05$)(表1)。

2.3 胰腺及小肠超微结构变化 脑死亡后至12 h胰腺和小肠的外观正常。电镜下,脑死亡后12 h胰腺细胞内出现轻微线粒体肿胀,嵴紊乱,24 h可见胰腺细胞胞质水肿,线粒体肿胀,嵴消失,线粒体部分膜溶解等改变,但未见明显细胞坏死。小肠电镜下观察,细胞内结构损伤相对较轻。

3 讨论

脑死亡状态能够引起机体器官损伤性改变,是器官移植中影响脑死亡供体器官慢性丧失功能的一项重要危险因素。随着脑死亡研究的进展,有学者认为可能是炎症介质参与了此损伤过程,而蛋白激酶C可能在其中起了重要作用^[3-5]。PKC存在于胞质,在IP3-DG信号传导系统中发挥重要的作用。实验证实PKC- α 能促进炎症反应中TNF、IL-1 β 、IL-6、IL-8、PAF、NO等的合成与释放,现已明确,PKC- α 能够激活NF- κ B^[6-7],PKC可以使NF- κ B的抑制物I κ B磷酸化从而导致NF- κ B-I κ B在胞质中解离,NF- κ B从胞质进入胞核发挥生理作用^[8]。NF- κ B目前被认为是调控机体炎症反应的总源头,活化后上调各种炎症介质如:TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、氧自由基等一系列物质。因此研究脑死亡状态下胰腺及小肠组织中PKC- α 水平的变化,可以间接反映出组织的损伤情况^[9-10]。

本实验中,初次判定脑死亡6 h后,检测到胰腺与小肠组织内PKC- α 蛋白水平在胰腺与小肠中高表达。由此推测PKC- α 在脑死亡时参与了脑死亡动物胰腺与小肠损伤过程,其机制可能是PKC- α 激活NF- κ B,促进大量炎症介质的合成

与释放如:TNF- α 、IL-1 β 、IL-6等一系列物质,而引起胰腺及小肠组织的非特异炎症性损害。这种假设已经在我们的后续研究中得到证实,研究结果待发表。

4 参考文献

- 1 Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Beato F, Milford EL, Hancock WW, Tilney NL. Accelerated rejection of renal allografts from brain-dead donors. *Ann Surg* 2000; 232: 263-271
- 2 Pratschke J, Wilhelm MJ, Kusaka M, Laskowski I, Tilney NL. A model of gradual onset brain death for transplant-associated studies in rats. *Transplantation* 2000; 69: 427-430
- 3 张水军,李文涛,金中奎,苟建军,屈清荣,邓中月. 脑死亡状态对大鼠肝脏损伤的影响. *中华实验外科杂志* 2002; 19: 542-543
- 4 Jassem W, Koo DD, Cerundolo L, Rela M, Heaton ND, Fuggle SV. Leukocyte infiltration and inflammatory antigen expression in cadaveric and living-donor livers before transplant. *Transplantation* 2003; 75: 2001-2007
- 5 Van Der Hoeven JA, Moshage H, Schuurs T, Nijboer M, Van Schilfgaarde R, Ploeg RJ. Brain death induces apoptosis in donor liver of the rat. *Transplantation* 2003; 76: 1150-1154
- 6 Hsu HY, Twu YC. Tumor necrosis factor- α -mediated protein kinases in regulation of scavenger receptor and foam cell formation on macrophage. *J Biol Chem* 2000; 275: 41035-41048
- 7 Ward C, Chilvers ER, Lawson MF, Pryde JG, Fujihara S, Farrow SN, Haslett C, Rossi AG. NF- κ B activation is a critical regulator of human granulocyte apoptosis *in vitro*. *J Biol Chem* 1999; 274: 4309-4318
- 8 Whiteside ST, Israel A. I kappa B proteins: structure, function and regulation. *Semin Cancer Biol* 1997; 8: 75-82
- 9 李英华,田晓峰,王真真,张雪松,张峰,金松,姚继红. NF- κ B对肠缺血再灌注肝损伤P-选择素表达和中性粒细胞浸润的作用. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 486-490
- 10 赖铭裕,梁志海,唐国都,孙学成. 腹腔注射左旋精氨酸诱导急性坏死性胰腺炎大鼠模型. *世界华人消化杂志* 2006; 14: 2233-2236

电编 李琪 编辑 张焕兰