

腺苷A2受体激动剂对大鼠胰腺缺血再灌注损伤时氧自由基和细胞凋亡的影响

宋少伟, 刘永锋

宋少伟, 刘永锋, 中国医科大学附属第一医院普通外科教研室 辽宁省沈阳市 110001

作者贡献分布: 此课题研究设计, 实验数据检测及论文撰写由宋少伟完成; 技术指导由刘永锋完成。

通讯作者: 宋少伟, 110001, 沈阳市和平区南京北街155号, 中国医科大学附属第一医院普通外科教研室。

songsw10@hotmail.com

电话: 024-83283330

收稿日期: 2008-07-09 修回日期: 2008-08-27

接受日期: 2008-09-01 在线出版日期: 2008-09-28

Effect of adenosine A2 receptor agonist on oxygen free radicals and apoptosis during ischemia reperfusion injury in rat pancreas

Shao-Wei Song, Yong-Feng Liu

Shao-Wei Song, Yong-Feng Liu, Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, Liaonian Province, China

Correspondence to: Shao-Wei Song, Department of General Surgery, the First Hospital of China Medical University, 155 Nanjing North Street, Heping District, Shenyang 110001, Liaonian Province, China. songsw10@hotmail.com

Received: 2008-07-09 Revised: 2008-08-27

Accepted: 2008-09-01 Published online: 2008-09-28

Abstract

AIM: To investigate the role of adenosine A2 receptor agonist in protection from production of oxygen free radicals and induction of apoptosis during ischemia and reperfusion injury in rat pancreas.

METHODS: The rats were divided randomly into sham, control and experimental groups. After 30 min clamping of subsplenic artery, normal saline (2 mL/kg body weight) or A2 receptor agonist CGS21680 (300 µg/kg body weight) was injected via dorsal penis vein, and at 15 min, 30 min and 60 min reperfusion, the changes of lipoperoxides (LPO), apoptosis and morphology in pancreas tissues were examined.

RESULTS: After 15, 30 and 60 min reperfusion, LPO increased significantly in control group

compared with the sham operation group (8.25 ± 1.15 vs 1.63 ± 0.46 , 10.67 ± 2.04 vs 1.85 ± 0.62 , 15.31 ± 3.02 vs 2.02 ± 0.86 , all $P < 0.05$) and experimental group (8.25 ± 1.15 vs 6.51 ± 1.38 , 10.67 ± 2.04 vs 6.84 ± 1.74 , 15.31 ± 3.02 vs 10.22 ± 2.91 µmol/L, all $P < 0.05$). Apoptosis increased significantly in control group compared with the sham operation group (0.55 ± 0.08 vs 0.18 ± 0.04 , 1.21 ± 0.15 vs 0.20 ± 0.06 , 2.63 ± 0.52 vs 0.23 ± 0.06 , $P < 0.05$ or 0.01) and experimental group (0.55 ± 0.08 vs 0.32 ± 0.16 $P < 0.05$; 1.21 ± 0.15 vs 0.44 ± 0.20 , 2.63 ± 0.52 vs 0.50 ± 0.43 , all $P < 0.05$ or 0.01). In the control group, compared with 15 min reperfusion, LPO and apoptosis increased significantly at 30 min or 60 min reperfusion ($P < 0.05$ or 0.01). In sham operation group and experimental group, no remarked damage of pancreas was detected, but in control group, the pancreas damage became more serious with the prolonging of reperfusion.

CONCLUSION: Adenosine A2 receptor agonist attenuates postischemic production of oxygen free radicals and induction of apoptosis in pancreas tissues, thereby minimizes the ischemia reperfusion injury.

Key Words: Adenosine A2 receptor agonist; Ischemia reperfusion injury; Oxygen free radicals; Apoptosis

Song SW, Liu YF. Effect of adenosine A2 receptor agonist on oxygen free radicals and apoptosis during ischemia reperfusion injury in rat pancreas. *Shijie Huaren Xiaohua Zazhi* 2008; 16(27): 3099-3102

摘要

目的: 研究腺苷A2受体激动剂对大鼠胰腺缺血再灌注损伤时的氧自由基和细胞凋亡的影响。

方法: 大鼠随机分成3组($n = 18$), 即假手术组、对照组和实验组, 对照组和实验组大鼠脾下动脉钳夹30 min, 假手术组不进行缺血处理; 三组再灌注前经阴茎背静脉分别注射生理盐水(2 mL/kg)或A2受体激动剂

■背景资料

胰腺移植是治疗糖尿病的有效方法之一, 但移植物的缺血再灌注损伤是造成移植胰腺炎的主要原因。如何有效的减少胰腺的缺血再灌注损伤是提高移植效果的关键。

■同行评议者

韩天权, 教授, 上海交通大学医学院附属瑞金医院外科, 上海消化外科研究所

■研发前沿

细胞凋亡在器官缺血再灌注损伤中的作用越加受到重视,但其具体作用机制还亟待进一步阐明。

CGS21680(300 $\mu\text{g/kg}$);再灌注15 min、30 min和60 min分别检测胰腺组织中脂质过氧化物(liperoxides, LPO)、细胞凋亡的变化以及观察胰腺组织的形态学变化。

结果:再灌注15、30和60 min后,对照组胰腺组织中LPO和细胞凋亡明显高于假手术组(LPO: 8.25 ± 1.15 vs 1.63 ± 0.46 , 10.67 ± 2.04 vs 1.85 ± 0.62 , 15.31 ± 3.02 vs 2.02 ± 0.86 , 均 $P < 0.05$; 细胞凋亡: 0.55 ± 0.08 vs 0.18 ± 0.04 , 1.21 ± 0.15 vs 0.20 ± 0.06 , 2.63 ± 0.52 vs 0.23 ± 0.06 , 均 $P < 0.05$ 或 0.01)和实验组(LPO: 8.25 ± 1.15 vs 6.51 ± 1.38 , 10.67 ± 2.04 vs 6.84 ± 1.74 , 15.31 ± 3.02 vs 10.22 ± 2.91 , 均 $P < 0.05$; 细胞凋亡: 0.55 ± 0.08 vs 0.32 ± 0.16 , $P < 0.05$; 1.21 ± 0.15 vs 0.44 ± 0.20 , 2.63 ± 0.52 vs 0.50 ± 0.43 , 均 $P < 0.05$ 或 0.01);对照组中,再灌注30 min和60 min同15 min相比,前两者LPO、细胞凋亡增高明显,且差异有统计学意义($P < 0.05$ or $P < 0.01$)。假手术组和实验组胰腺组织损伤不明显,而对照组胰腺组织随再灌注时间的延长损伤加重。

结论:腺苷A2受体激动剂可减轻大鼠胰腺缺血再灌注损伤时氧自由基和细胞凋亡的发生,从而减轻胰腺缺血再灌注损伤。

关键词:腺苷A2受体激动剂;缺血再灌注损伤;氧自由基;细胞凋亡

宋少伟, 刘永锋. 腺苷A2受体激动剂对大鼠胰腺缺血再灌注损伤时的氧自由基和细胞凋亡的影响. 世界华人消化杂志 2008; 16(27): 3099-3102
<http://www.wjgnet.com/1009-3079/16/3099.asp>

0 引言

胰腺缺血再灌注损伤过程是胰腺移植不可避免的,如何有效的抑制缺血再灌注损伤,减少移植物的术后并发症,从而延长移植物的存活时间并改善其功能是目前研究的热点,具有重要的临床意义^[1]。本实验目的旨在研究腺苷受体激动剂对大鼠胰腺缺血再灌注损伤时氧自由基和细胞凋亡的影响。

1 材料和方法

1.1 材料 ♂健康清洁级Wistar大鼠,体质量250-300 g,由中国医科大学动物部提供,饲养温度为18-24℃,相对湿度为55%-65%,自由饮水。腺苷A2受体激动剂CGS21680购于Sigma Chemical公司, St. Louis, 美国。检测与组蛋白

相关的DNA片段ELISA试剂盒购于Boehinger Mannheim GmbH公司,德国。

1.2 方法

1.2.1 分组及给药:大鼠随机分成3组,即假手术组、对照组和实验组,各组组内分成3个时段,每时段6只。每只大鼠由乙醚诱导麻醉,10%水合氯醛0.3 mL/100 g ip。假手术组:寻找到脾下动脉后,不进行缺血处理,30 min后经阴茎背静脉注入生理盐水2 mL/kg体质量,分别于15、30和60 min后胰腺取材。对照组:寻找到脾下动脉后,夹闭30 min后再灌注,并于再灌注5 min前,经阴茎背静脉注入生理盐水2 mL/kg体质量,分别于15、30和60 min后胰腺取材,测定胰腺组织中脂质过氧化物(liperoxides, LPO)含量和细胞凋亡的变化,并进行HE染色,观察形态学变化。实验组同对照组不同的是注射液中含有腺苷A2受体激动剂CGS21680(300 $\mu\text{g/kg}$ 体质量)

1.2.2 LPO检测^[2]:取1/12 mol/L硫酸0.2 mL和100 g/L钨酸钠0.5 mL,剧烈振荡后离心10 min,弃上清液后在沉淀中加1/12 mol/L硫酸2 mL和100 g/L钨酸钠0.3 mL,混匀再离心10 min,取沉淀加2 mL蒸馏水和5 g/L, TBA 0.5 mL,煮沸60 min,冷却后加15:1的正丁醇吡啶液2 mL,离心取上清比色,波长533 nm。

1.2.3 细胞凋亡检测^[3]:采用ELISA法测定与组蛋白相关的DNA片段(Boehinger Mannheim GmbH, Germany)。具体方法如下:将冰冻的胰腺组织放入盛有液氮的研钵中(周围覆有冰屑)用研棒研磨后,将研碎的胰腺组织标本放入溶解缓冲液(10 mmol/L pH7.4磷酸缓冲液,10 g/L的白蛋白(BSA),5 g/L的Tween 20,1.0 mmol/L EDTA)中溶解30 min,使细胞内的DNA释放,4500 r/min 4℃离心10 min,留取上清液,将20 μL 稀释后的上清液加入包被(streptavidine)的酶标孔板的每孔中。再向每孔中加入80 μL 抗组胺生物素、过氧化物标记的抗DNA及孵育缓冲液的混合物(三者的比例1:1:18),室温下孵育2 h后,弃掉未反应的液体,再向每孔中加入孵育液250-300 μL ,反复冲洗三次。向每孔中加入100 μL 含ABTS的底物溶液,10 min后在405 nm的Thermomax的微孔板阅读器(Molecular Devices Corp.ser)应用SOFTmax软件(Molecular Devices Corp)自动读取吸收值。按下列公式计算与组蛋白相关的DNA片段的特别聚集值:聚集值 = 样品的吸收值(10^{-3})/对照的吸收值(10^{-3})。

统计学处理 所有结果均以mean \pm SD表

■创新盘点

腺苷A2受体激动剂在减轻肝脏、肾脏和心脑血管系统缺血再灌注损伤方面有诸多报道,但关于对胰腺缺血再灌注损伤的保护作用还未见报道。

表 1 再灌注不同时间点LPO变化 ($\mu\text{mol/L}$)

t/min	假手术组	对照组	实验组
15	1.63 \pm 0.46 ^a	8.25 \pm 1.15	6.51 \pm 1.38 ^a
30	1.85 \pm 0.62 ^a	10.67 \pm 2.04 ^c	6.84 \pm 1.74 ^a
60	2.02 \pm 0.86 ^a	15.31 \pm 3.06 ^d	10.22 \pm 2.91 ^{ac}

^a $P < 0.05$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 15 min.

示, 样本间均数比较采用one way ANOVA检验, $P < 0.05$ 为有统计学意义。

2 结果

2.1 再灌注不同时间点胰腺组织中LPO($\mu\text{mol/L}$)变化 假手术组和实验组再灌注后不同时间胰腺组织中LPO明显低于对照组($P < 0.05$); 假手术组中, 不同时间差异无统计学意义; 对照组中, 再灌注30 min和60 min与15 min相比, 前两者LPO增高明显, 且差异有统计学意义($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 实验组中, 再灌注60 min与15 min相比, 胰腺组织中的LPO差异有统计学意义($P < 0.05$, 表1)。

2.2 再灌注后不同时间胰腺组织中与组蛋白相关的DNA片段聚集值的变化 假手术组和实验组明显低于对照组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 假手术组和实验组组内再灌注期间与组蛋白相关的DNA片段聚集值的变化无统计学差异。而对照组中, 再灌注30 min和60 min后明显增加, 且差异显著($P < 0.05$); 实验组中, 再灌注30 min和60 min后, 胰腺组织中与组蛋白相关的DNA片段聚集值与15 min相比, 显著增高($P < 0.05$, 表2)。

假手术组和实验组再灌注各时段胰腺结构损伤均不明显, 对照组胰腺组织变化比较明显且随再灌注时间的延长而加重。再灌注15 min组织肿胀界限不清, 胞质内可见粉染颗粒, 血管扩张、淤血; 30 min后组织有灶状坏死, 核溶解; 60 min后可见组织大片坏死。

3 讨论

胰腺和胰岛细胞移植是治疗糖尿病的根本措施之一, 他不仅能够解决胰腺的内分泌功能, 而且能够减轻原有的并发症^[4]。在尸体供胰的情况下, 在胰腺的切取和保存过程中, 缺血再灌注损伤势必影响移植胰腺的功能。氧自由基在胰腺获取保存和移植过程中对其损伤发挥重要作用, 缺血再灌注过程就是氧自由基产生的过程^[5]。机体缺血再灌注时可通过黄嘌呤脱氢酶转化为黄嘌呤

表 2 再灌注不同时间点与组蛋白相关的DNA片段聚集值的变化

t/min	假手术组	对照组	实验组
15	0.18 \pm 0.04 ^b	0.55 \pm 0.08	0.32 \pm 0.16 ^a
30	0.20 \pm 0.06 ^b	1.21 \pm 0.15 ^c	0.44 \pm 0.20 ^b
60	0.23 \pm 0.06 ^b	2.63 \pm 0.52 ^d	0.50 \pm 0.43 ^b

^a $P < 0.05$, ^b $P < 0.01$ vs 对照组; ^c $P < 0.05$, ^d $P < 0.01$ vs 15 min.

氧化酶、白细胞呼吸爆发及超氧化物歧化酶生成减少等途径产生大量氧自由基, 并可以同细胞膜上的脂质发生过氧化反应^[6], 因此脂质过氧化物含量可间接反映体内氧自由基水平。本实验发现, 假手术组, 因为没有施加任何影响因素, 单纯手术过程不会增加氧自由基的产生。而对照组由于胰腺30 min的缺血, 再灌注时就有大量的氧自由基产生, 且随再灌注时间的延长而增加。大量的氧自由基可以直接损伤DNA和膜脂质过氧化造成细胞膜透过性增加, 导致细胞损伤。本实验中对照组再灌注60 min后, 光镜下可见胰腺组织大片坏死。氧自由基除直接损害外, 还可以间接激活细胞内核酸内切酶, 导致缺血再灌注时的细胞凋亡的发生, 细胞凋亡是造成缺血再灌注损伤的主要机制之一^[7]。细胞凋亡在移植后再灌注的早期即可发生, 并参与缺血再灌注损伤的过程^[8]。有研究表明再灌注时, 氧自由基对线粒体的损害可以产生凋亡诱导因子^[9]。凋亡细胞形态学的特征是“凋亡小体”和小分子量的DNA片段的出现, 目前检测细胞凋亡的方法包括形态学、生物化学、原位末端转移标记技术、靶细胞DNA片段的定量分析与杀伤细胞介导的细胞溶解实验、流式细胞分析术和本实验采用酶联免疫的方法检测与组蛋白相关的DNA片段。其原理是细胞凋亡发生时, 由于内源性核酸内切酶的激活, 这种钙和镁依赖性核酸酶在最容易进入的核小体间区解开双链DNA, 产生单/低聚核小体片段, 而核小体DNA与组蛋白H2A、H2B、H3和H4形成紧密复合物而不被核酸内切酶裂解。采用双抗体夹心酶联免疫法, 应用小鼠抗DNA和抗组蛋白的mAb, 与核小体片段形成夹心结构, 可特异性检测细胞溶解物中的单/低聚核小体(细胞凋亡时发生DNA的降解)。这种方法是一种简单、快速和高敏的定量检测细胞凋亡的方法。本实验中发现对照组再灌注时, 脂质过氧化物生成增多, 而胰腺组织中组蛋白相关的DNA片段也随之增加,

■应用要点

腺苷A2受体激动剂在防治器官缺血再灌注损伤方面有广阔的临床应用前景。

■名词解释

凋亡小体: 细胞凋亡发生时, 保持完整膜结构的细胞固缩, 特异性的细胞质大泡, 染色质浓集, 核碎裂后被细胞膜包裹而形成。除核裂解外, 外有膜包绕, 内有完整的细胞器。他在组织中很快被临近组织细胞吞噬, 并在溶酶体中被降解。

■同行评价

本文通过动物实验得出腺苷A2受体激动剂可以减少胰腺缺血再灌注损伤中的脂质过氧化物以及减轻动物的细胞凋亡, 研究结果对于探讨胰腺移植中再灌注损伤的机制及其防治有一定的参考意义。

说明氧自由基与胰腺缺血再灌注损伤时的细胞凋亡密切相关。

腺苷受体在缺血再灌注损伤防治中的作用是目前研究的热点^[10-12], 腺苷受体分为A1、A2A、A2B和A3四种, 其中A1和A2在缺血再灌注损伤中发挥重要作用^[13]. 缺血后, 细胞内的ATP大量消耗, 最后在5'核苷酸酶的作用下形成腺苷, 致使细胞外的腺苷浓度增加, 腺苷可兴奋A2受体刺激NOS使胰腺组织内NO水平上升, 组织内的腺苷和NO水平提高后, 可通过多种方式对抗缺血再灌注损伤, 如强烈抑制再灌注后血管收缩因子内皮素的生成, 同时抑制黄嘌呤氧化酶的活性, 减少各种活性氧自由基的生成^[14]. 本实验中实验组LPO的明显减少, 说明腺苷受体激动剂有抗氧自由基的生成的作用, 利于缺血胰腺组织的保护. 腺苷受体激动剂的作用如同缺血预处理的机制, 本实验中发现再灌注前经iv腺苷A2受体激动剂CGS21680明显减少了再灌注时细胞凋亡的发生, 其机制可能与腺苷A2受体激活, 阻止细胞NO合成酶下调, 下调凋亡基因Caspase-3、Bax活性和上调了抑制细胞凋亡基因**bcl-2**有关^[15].

总之, 腺苷A2受体激动剂可减轻大鼠胰腺缺血再灌注损伤和细胞凋亡的发生, 其作用机制可能与氧自由基的减少有关。

4 参考文献

- 1 Mayer H, Schmidt J, Thies J, Ryschich E, Gebhard MM, Herfarth C, Klar E. Characterization and reduction of ischemia/reperfusion injury after experimental pancreas transplantation. *J Gastrointest Surg* 1999; 3: 162-166
- 2 Minor T, Kötting M. Gaseous oxygen for hypothermic preservation of predamaged liver grafts: fuel to cellular homeostasis or radical tissue alteration? *Cryobiology* 2000; 40: 182-186
- 3 Abrahamse SL, van Rannard Heimel P, Hartman RJ, Chamuleau RA, van Gulik TM. Induction of necrosis and DNA fragmentation during hypothermic preservation of hepatocytes in UW, HTK, and Celsior solutions. *Cell Transplant* 2003; 12: 59-68
- 4 Meloche RM. Transplantation for the treatment of type 1 diabetes. *World J Gastroenterol* 2007; 13:

6347-6355

- 5 Drogitz O, Obermaier R, Liu X, Neeff H, von Dobschuetz E, Hopt UT, Benz S. Effects of organ preservation, ischemia time and caspase inhibition on apoptosis and microcirculation in rat pancreas transplantation. *Am J Transplant* 2004; 4: 1042-1050
- 6 Garcia-Gil FA, Gonzalvo E, Garcia-Garcia JJ, Albendea CD, Güemes A, Tome-Zelaya E, Fuentes L, Santa-Clotilde E, Aso J, Bejarano C, Garrido N, Garcia C, Gómez E, Sánchez M. Lipid peroxidation in ischemia-reperfusion oxidative injury of the graft preserved in Celsior and University of Wisconsin solutions on a pig pancreas transplantation model. *Transplant Proc* 2006; 38: 2595-2599
- 7 Drogitz O, Liu X, Benz S, Obermaier R, Herb T, Schareck W, Hopt UT. Ischemia/reperfusion injury induces acinar cell apoptosis in experimental pancreas transplantation. *Transplant Proc* 2002; 34: 2361
- 8 Liu X, Drogitz O, Neeff H, Benz S, Hopt UT. Apoptosis is caused by prolonged organ preservation and blocked by apoptosis inhibitor in experimental rat pancreatic grafts. *Transplant Proc* 2004; 36: 1209-1210
- 9 Czaja MJ. Induction and regulation of hepatocyte apoptosis by oxidative stress. *Antioxid Redox Signal* 2002; 4: 759-767
- 10 Xu Z, Mueller RA, Park SS, Boysen PG, Cohen MV, Downey JM. Cardioprotection with adenosine A2 receptor activation at reperfusion. *J Cardiovasc Pharmacol* 2005; 46: 794-802
- 11 Ben-Ari Z, Pappo O, Sulkes J, Cheporko Y, Vidne BA, Hochhauser E. Effect of adenosine A2A receptor agonist (CGS) on ischemia/reperfusion injury in isolated rat liver. *Apoptosis* 2005; 10: 955-962
- 12 Pedata F, Gianfriddo M, Turchi D, Melani A. The protective effect of adenosine A2A receptor antagonism in cerebral ischemia. *Neurol Res* 2005; 27: 169-174
- 13 Rivo J, Zeira E, Galun E, Einav S, Linden J, Matot I. Attenuation of reperfusion lung injury and apoptosis by A2A adenosine receptor activation is associated with modulation of Bcl-2 and Bax expression and activation of extracellular signal-regulated kinases. *Shock* 2007; 27: 266-273
- 14 于昕, 陈炜, 罗蒙, 邱江峰, 罗海峰, 王祥瑞, Joan Rosello-Catafau, 吴志勇. 腺苷A₂型受体在肝窦内皮细胞一氧化氮生成中的作用. *外科理论与实践* 2004; 9: 310-313
- 15 Zhao ZQ, Budde JM, Morris C, Wang NP, Velez DA, Muraki S, Guyton RA, Vinten-Johansen J. Adenosine attenuates reperfusion-induced apoptotic cell death by modulating expression of Bcl-2 and Bax proteins. *J Mol Cell Cardiol* 2001; 33: 57-68

编辑 李军亮 电编 吴鹏朕