

文章编号:1005-6947(2005)01-0036-04

· 实验研究 ·

缺血预处理对大鼠移植小肠细胞外基质的保护作用

王曙逢¹, 李国威²

(西安交通大学 1. 第一医院普通外科 2. 第二医院普通外科, 陕西 西安 710061)

摘要:目的 研究缺血预处理(IP)对大鼠移植小肠细胞外基质的早期保护作用。方法 SD大鼠随机分为假手术组(S组, $n=6$), 小肠移植组(SBT组, $n=12$), 缺血预处理加小肠移植组(IPSBT组, $n=12$)。建立大鼠异位节段小肠移植模型。各组移植肠冷保存/再灌注1h取材。检测层粘连蛋白(LN)的表达。电镜观察小肠上皮细胞基底膜结构的变化。结果 S组、SBT组和IPSBT组LN表达灰度值分别为 39.52 ± 2.60 , 13.53 ± 0.44 和 25.40 ± 1.79 , SBT组明显低于S组($P < 0.05$), 而IPSBT组明显高于SBT组($P < 0.05$)。电镜显示, S组小肠上皮基底膜呈线性均匀连续完整的结构; SBT组上皮基底膜断裂、甚至缺失; IPSBT组上皮基底膜破坏程度比SBT组为轻。结论 移植小肠细胞外基质是冷保存/再灌注损伤靶点; IP对细胞外基质冷保存/再灌注损伤有明显的保护作用。

关键词: 肠移植; 细胞外基质; 缺血预处理; 再灌注损伤

中图分类号: R617; R619.9

文献标识码: A

Protective effect of ischemic preconditioning on extracellular matrix of small intestinal graft in rats

WANG Shu-feng¹, LI Guo-wei²

(1. Department of General Surgery, The First Hospital 2. Department of General Surgery, The Second Hospital, Xi'an Jiaotong University, Xi'an 710061, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of ischemic preconditioning on extracellular matrix of intestinal graft in rats. **Methods** SD rats were randomly assigned to the following study groups: sham operation group (S group, $n=6$), small bowel transplantation group (SBT group, $n=12$), ischemic preconditioning plus small bowel transplantation group (IPSBT group, $n=12$). Heterotopic segmental SBT model was established. When the graft was preserved and reperfused for 1h, samples were obtained from each group. Expression of laminin was studied by immunohistochemical means. The changes of epithelial basement membrane structure were examined by traversing electron microscopy. **Results** The mean gray value of laminin positive products was 39.52 ± 2.60 , 13.53 ± 0.44 , 25.40 ± 1.79 , respectively, in S, SBT and IPSBT group. The mean gray value of laminin positive products in SBT group was markedly lower than that in S group ($P < 0.05$). However, The mean gray value of laminin positive products in IPSBT group was markedly higher than that in SBT group ($P < 0.05$). Electron microscopically, the epithelial basement membrane in S group was linear and remained intact, but in SBT group it became disrupted, or even was absent. The degree of destruction of the epithelial basement membrane in IPSBT group was less than that in SBT group. **Conclusions** Extracellular matrix of intestinal graft is the target of cold preservation/reperfusion injury, and ischemic preconditioning has a protective effect on this injury of the extracellular matrix.

Key words: INTESTINAL TRANSPLANTATION; EXTRACELLULAR MATRIX; ISCHEMIC PRECONDITIONING; REPERFUSION INJURY

CLC number: R617; R619.9

Document code: A

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30271275)。

收稿日期:2004-09-25; 修订日期:2004-12-01。

作者简介:王曙逢(1971-),男,陕西扶风人,西安交大第一医院主治医师,博士,主要从事小肠移植基础与临床方面的研究。

通讯作者:王曙逢 电话:13152171022(手机); E-mail:dawn@mail.xjtu.edu.cn。

缺血预处理(ischemic preconditioning, IP)是指预先反复短暂缺血以延缓或减轻组织后续再灌注损伤的现象^[1]。临床小肠移植在获取移植体和移植过程中,冷保存/再灌注损伤是不可避免的事件,它不仅影响移植体的功能和存活,而且可能加剧移植体的急慢性排斥反应,也是移植体原发性失功能的原因^[2]。因此减轻移植体的冷保存/再灌注损伤对保证移植体的存活和功能有着重要意义。Yin^[3]的研究表明,IP对移植肝再灌注损伤具有保护作用。然而关于IP在小肠移植中的作用研究甚少。细胞外基质是移植肠再灌注损伤作用的早期靶点^[4]。本研究通过建立大鼠异位节段小肠移植模型,探讨IP对移植肠细胞外基质的保护作用。

1 材料和方法

1.1 实验动物分组和设计

健康雄性SD大鼠,体重(280±20)g,购自西安交大医学实验动物中心。适应性饲养1周后,随机分为:(1)假手术组(S组, n=6),接受麻醉、剖腹术和左肾切除术。(2)大鼠异位节段小肠移植组(SBT组, n=12),供、受体移植配对时体重相近。(3)IP加大鼠异位节段小肠移植组(IPSBT组, n=12),供肠切取前实施IP,即用无损伤显微外科动脉夹,夹闭肠系膜上动脉10min。松夹再灌注10min后,切取供肠操作同SBT组。移植体血管蒂重建成功,移植肠再灌注1h后,SBT和IPSBT组取移植小肠,S组取小肠组织备检。

1.2 异位节段小肠移植

参照 Monchik^[5] 和 Wang^[6] 的方法并加以改进^[7]。

1.3 检测项目

1.3.1 移植肠层粘连蛋白(LN)的表达 各组分别取材,以4%多聚甲醛固定,常规石蜡包埋。连续切片厚约4μm,行SP免疫组织化学染色。兔抗大鼠LN多克隆抗体(购自武汉博士德生物工程有限公司)工作浓度为1:100。阴性对照用PBS代替LN多克隆抗体。DAB染色,封片光镜观察。免疫组化结果判定:LN是基底膜的主要成分之一,免疫组化阳性表达为基底膜呈棕黄色。采用德国QWin550CW图像信号采集与分析系统对各组进行

LN表达定量分析。每张切片随机选取5个高倍视野,测定LN阳性产物灰度值,取平均灰度值作为LN表达量。

1.3.2 移植肠组织形态学观察

1.3.2.1 光镜观察 各组小肠组织的石蜡切片,常规HE染色,行光镜检查。

1.3.2.2 电镜观察 移植肠冷保存/再灌注1h后,各组采取大小约1mm×2mm×1mm的移植小肠组织块,2.5%戊二醛固定3h,PBS浸洗,1%四氧化锇后固定2h,梯度酒精脱水,环氧树脂812包埋,超薄切片,醋酸铀、柠檬酸铅染色,透射电镜(Hitachi H-600)观察。

1.4 统计学方法

实验数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用单因素方差分析q检验。P<0.05认为有统计学差异。

2 结果

2.1 LN表达定量分析

S组、SBT组和IPSBT组小肠上皮细胞基底膜呈现LN免疫反应阳性染色,为棕色。SBT组移植小肠LN表达灰度值明显低于S组(P<0.05),而IPSBT组移植小肠LN表达灰度值明显高于SBT组(P<0.05),但仍低于S组(P<0.05)(附表)。说明IP有保护小肠上皮细胞外基质基底膜的作用。

附表 LN在各组表达量

组别	n	LN表达灰度值
S	6	39.52±2.60
SBT	6	13.53±0.44 ¹⁾
IPSBT	6	25.40±1.79 ²⁾

1)与S组比, q=29.87, P<0.05; 2)与SBT组比, q=13.64, P<0.05

2.2 小肠上皮细胞基底膜形态学分析

光镜下观察发现三组上皮细胞基底膜的形态结构有所不同。S组基底膜呈线性、连续、完整、均匀结构。SBT组基底膜线性结构有不同程度的破坏,出现分解断裂甚至缺失。IPSBT组基底膜结构破坏程度明显较SBT组为轻。透射电镜下上皮基底膜形态学变化与光镜下形态学变化一致(附图)。

A, B: S 组小肠上皮基底膜呈线性连续完整的结构
C, D: SBT 组小肠上皮基底膜分解断裂、甚至消失
E, F: IPSBT 组小肠上皮基底膜破坏程度比 SBT 组为轻
附图 上皮基底膜光镜和电镜下形态学变化

3 讨论

小肠移植是治疗终末期肠衰竭如短肠综合征惟一有效的方法^[8,9]。除了排斥反应和多源性感染外,冷保存/再灌注损伤也是临床小肠移植所面临的主要障碍。缺血再灌注损伤作为一种非特异性损伤,可以提高移植物免疫原性,加剧急慢性排斥反应程度,从而影响移植物的存活和功能^[2]。因此预防和减轻移植小肠的冷保存/再灌注损伤有十分重要的临床意义。研究^[10]表明,小肠是对缺血再灌注损伤十分敏感的组织,但多数研究集中在如何减轻和预防冷保存/再灌注对移植小肠上皮的损伤,而较少注意其对细胞外基质的作用。细胞外基

质对小肠上皮再生分化有促进作用^[11],也就是说完整的细胞外基质结构对受损小肠上皮再生修复有重要意义。Mueller^[4]发现移植小肠的细胞外基质是冷保存和再灌注损伤的早期靶点,在再灌注 20 min 后,受体血内细胞外基质成分之一的透明质酸升高。生理条件下,消化道黏膜自我更新速度很快。Taguchi^[12]研究发现小肠缺血 30 min 再灌注 1 h 后,由再灌注损伤触发的上皮修复过程已经开始。因为再灌注时小肠上皮细胞再生修复速度很快,可能合成细胞外基质成分,为了准确显示冷保存/再灌注对细胞外基质的损伤作用和 IP 的干预作用,避免再灌注过程中小肠上皮再生修复对再灌注和 IP 作用的混杂影响^[13],故本实验在移植肠血管重

建成功再灌注1h后,各组立即取材进行研究。

LN系一具有多种生物学功能的基底膜非胶原蛋白,是细胞外基质的主要成分之一,能调节细胞黏附、移动和生长分化等。它主要由基底膜的上皮细胞和内皮细胞合成。基底膜上皮细胞能分泌酶类如胶原酶,分解基底膜,因此基底膜处于不断合成和降解的动态平衡状态,维持完整结构。本实验结果显示,S组小肠上皮基底膜呈线性连续均匀的结构,而SBT组移植小肠基底膜断裂甚至缺损。SBT组LN表达平均灰度值较之S组明显下降($P < 0.05$)。此结果进一步证实细胞外基质亦是冷保存/再灌注损伤的靶点。再灌注时多形核白细胞依靠层粘连蛋白介导趋化至小肠绒毛,多形核白细胞释放氧自由基和蛋白水解酶分解基底膜,而小肠上皮细胞因冷保存/再灌注损伤合成层粘连蛋白能力下降;破坏增多合成减少即导致基底膜变薄并断裂缺损。与LN免疫组化结果一致,透射电镜检查显示小肠上皮细胞基底膜S组基底膜结构完整,而SBT组小肠基底膜出现裂隙变薄和断裂。

IP的保护作用可分为早期保护(产生于IP后1~3h)和晚期保护(第二窗口效应,产生于IP后24h)^[14],但IP保护作用的机制仍不甚清楚^[15]。本实验结果表明,经过短暂的IP,移植肠上皮细胞基底膜结构较单纯移植组明显好转,LN染色灰度值上升($P < 0.05$),透射电镜下上皮细胞基底膜损伤的程度较单纯移植组为轻。说明IP的确对移植肠的细胞外基质基底膜冷保存/再灌注损伤有保护作用,而且可能是IP的早期保护。因此在器官移植领域,实施IP可能具有非常重要的临床实际意义。通过IP可以减轻移植物的冷保存/再灌注损伤,对改善移植物的功能和延长移植存活有着十分重要的意义。

参考文献:

[1] Murphy E. Primary and secondary signaling pathways in early preconditioning that converge on the mitochondria to produce car-

- dioprotection [J]. *Circ Res*, 2004, 94(1): 7-16.
- [2] Guo WH, Chan KL, Fung PPCW, *et al.* Nitric oxide protects segmental intestinal grafts from ischemia and reperfusion injury [J]. *Transplantation Proc*, 2000, 32(6): 1297-1298.
- [3] Yin DP, Sankary HN, Chong ASF, *et al.* Protective effect of ischemic preconditioning on liver preservation reperfusion injury in rats [J]. *Transplantation*, 1998, 66(2): 152-157.
- [4] Mueller AR, Paltz KP, Heckert C, *et al.* Extracellular matrix: An early target of preservation/reperfusion injury and acute rejection after small bowel transplantation [J]. *Transplantation Proc*, 1998, 30(6): 2569-2571.
- [5] Monchik GJ, Russell PS. Transplantation of small bowel in the rat: technical and immunological considerations [J]. *Surgery*, 1971, 70(5): 693-702.
- [6] Wang SF, Li GW. Early protective effect of ischemic preconditioning on small intestinal graft in rats [J]. *World J Gastroenterol*, 2003, 9(8): 1866-1870.
- [7] 王曙逢,李国威. 大鼠小肠移植模型的改进 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(4): 279-282.
- [8] Kato T, Ruiz P, Thompson JF, *et al.* Intestinal and multivisceral transplantation [J]. *World J Surg*, 2002, 26(2): 226-237.
- [9] Gameron FE, Platell CF, Coster J, *et al.* The management of patients with the short bowel syndrome [J]. *World J Gastroenterol*, 2002, 8(1): 12-20.
- [10] Lindstrom LM, Ekblad E. Structural and neuronal changes in rat ileum after ischemia with reperfusion [J]. *Dig Dis Sci*, 2004, 49(7-8): 1212-1222.
- [11] Vachon PH, Beaulieu JF. Extracellular heterotrimeric laminin promotes differentiation in human enterocyte [J]. *Am J Physiol*, 1995, 268(5): G857-861.
- [12] Taguchi T, Shima Y, Nakao M, *et al.* Activation of immediate early genes in relation to proliferation and apoptosis of enterocytes after ischemia-reperfusion injury of small intestine [J]. *Transplantation Proc*, 2002, 34(3): 983.
- [13] Sola, Anna BS, DeDea, *et al.* Protective effect of ischemic preconditioning on cold preservation and reperfusion injury associated with rat intestinal transplantation [J]. *Annals of Surg*, 2001, 234(1): 98-106.
- [14] 刘秀华,苏静怡. 缺血预处理的研究的现状 [J]. *生理科学进展*, 2001, 32(1): 83-87.
- [15] 詹勇强,吕新生,王志明,等. 一氧化氮在大鼠肝缺血预处理中的作用 [J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(9): 541-544.

本刊为《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”期刊

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。作者著作权使用费将在本刊稿酬中一次性给付。如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明或另投它刊。

中国期刊网(www.chinajournal.net.cn)是中国知识基础设施工程网站(CNKI)的重要组成部分。CNKI集成整合和优化利用我国知识信息资源,向国内外读者提供动态信息服务,欢迎广大作者、读者浏览。