

文章编号:1005-6947(2008)11-1093-04

· 基础研究 ·

硫酸锌对大鼠移植胰腺再灌注损伤的保护作用

原春辉¹, 修典荣¹, 李丽君², 宁力², 袁国红¹, 张同琳¹

(1. 北京大学第三医院 普通外科, 北京 100191; 2. 中国医学科学院北京协和医院 基本外科, 北京 100730)

摘要:目的 探讨腹腔注射硫酸锌($ZnSO_4$)诱导热休克蛋白(HSP70)合成及其对大鼠移植胰腺再灌注损伤的保护作用。方法 应用同系大鼠异位全胰十二指肠移植模型, 移植术前和术后5 min大鼠腹腔注射 $ZnSO_4$ [锌离子(Zn^{2+}): 5 mg/kg(Zn-1组), 10 mg/kg(Zn-2组), 15 mg/kg(Zn-3组)]。移植术后24 h经腹主动脉取血测定大鼠空腹血糖、血清脂肪酶和淀粉酶含量, 测定移植胰腺组织中HSP70含量(免疫印迹法)及髓过氧化物酶(MPO)活性, 并观察组织学变化。结果 移植术后24 h Zn-1组, Zn-2组, Zn-3组移植胰腺HSP70含量均较术前明显升高(均为 $P < 0.05$), 3组间差异无显著性($P > 0.05$); 移植后24 h血糖、血清脂肪酶和胰腺组织中MPO水平: Zn-2组 < Zn-1组 < 移植对照组 < Zn-3组, 差异均有显著意义($P < 0.05$)。Zn-2组和Zn-1组胰小叶间质水肿和胰小叶内中性粒细胞浸润较轻。结论 外源性应用恰当剂量的 $ZnSO_4$ (Zn2 + 5 mg/kg和10 mg/kg)能增加胰腺组织HSP70含量, 对移植胰腺再灌注损伤起保护作用; 剂量过大则其保护作用消失。

[中国普通外科杂志, 2008, 17(11): 1093-1096]

关键词: 胰腺/移植; 再灌注; 锌; 热休克蛋白

中图分类号: R 617 文献标识码: A

Protective effects of zinc sulfate on the reperfusion injury following pancreaticoduodenal transplantation in rats

YUAN Chunhui¹, XIU Dianrong¹, LI Lijun², NING Li², YUAN Guohong¹, ZHANG Tonglin¹

(1. Department of General Surgery; the Third Hospital, Peking University, Beijing 100083, China; 2. Department of Basic Surgery, Beijing Union Hospital, Chinese Academy of Medical Science, Beijing 100730, China)

Abstract: **Objective** To study the protective effects of the heat shock protein 70 (HSP70) induced by zinc sulfate on reperfusion injury following pancreaticoduodenal transplantation in rats. **Methods** The homologous male Wistar rat model of heterotopic total pancreaticoduodenal transplantation was used. The $ZnSO_4$ treated rats received the intravenous injection of Zn^{2+} 5 mins before and after operation at a dose of 5 mg/kg (Zn-1 group), 10 mg/kg (Zn-2 group) and 15 mg/kg (Zn-3 group), and the control group with the same volume of saline. The tissue concentration of HSP70 was determined using Western-Blot. In addition, blood sugar (BG) and serum concentration of amylase and lipase were examined 24h after transplantation, and the activity of myeloperoxidase (MPO) in the pancreas graft was measured at the same time. Histological observation was performed. **Results** Light microscopic studies showed that histomorphological changes of pancreas in Zn-2 group and Zn-1 group were much less than those in control group and Zn-3 group. The value of BG and serum lipase and MPO in Zn-2 group < Zn-1 group < control group < Zn-3 group ($P < 0.05$). **Conclusions** Zn^{2+} (at the dose of 5 mg/kg and 10 mg/kg) can increase the amount of HSP. Zn^{2+} has protective effects on the ischemia/reperfusion injury of pancreaticoduodenal transplantation, but the

基金项目: 中国博士后科学基金(2003034029)。

收稿日期: 2008-07-29; **修订日期:** 2008-10-10。

作者简介: 原春辉, 男, 北京大学第三医院副教授, 主要从事器官移植方面的研究。

通讯作者: 原春辉 E-mail: ychdoctor@163.com

effect will disappear when the dose is over high.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17 (11) : 1093 - 1096]

Key words: Pancreas/transpl; Reperfusion; Zinc; Heat Shock Protein

CLC number: R 617

Document code: A

热休克蛋白70(heat shock protein, HSP70)属于细胞应激蛋白,可由多种应激原诱导生成^[1-2]。有研究表明,通过应激预处理调动细胞内源性保护机制诱导HSP70的产生对移植器官具有保护作用^[3-4]。本课题组利用同系大鼠异位全胰十二指肠移植模型^[5],应用外源性硫酸锌(ZnSO₄)腹腔注射,探讨其对胰腺组织HSP70含量的影响及其对胰腺缺血再灌注损伤的保护作用。

1 材料与方 法

1.1 实验动物和移植手术

雄性Wistar大鼠只体重250~300g(由协和医科大学基础医学院实验动物中心提供),实验前1周受体鼠经阴茎背静脉注入链脲霉素55mg/kg,制备非空腹血糖>19.4mmol/L的大鼠糖尿病模型。然后全组大鼠均依据Lee等^[5]的方法进行同系大鼠异位全胰十二指肠移植。

1.2 实验分组

根据术前预处理因素及不同剂量随机分为5组:Zn-1组,Zn-2组,Zn-3组,分别于术前和术后5min腹腔注射0.5%ZnSO₄注射液,剂量分别为Zn²⁺5mg/kg,10mg/kg和15mg/kg;移植对照组于移植术前及术后5min2次经阴茎背静脉注射与以上3组等体积的生理盐水(以上4组n=8);另设假手术对照组,仅麻醉、开腹和暴露胰腺(n=6)。各组大鼠均于术后24h用断颈法处死取材备检。

1.3 检测项目

1.3.1 空腹血糖、血清淀粉酶及脂肪酶水平测定 处死大鼠后经腹主动脉采血,测定空腹血糖(one touch profile 血糖仪),测定血清淀粉酶和脂肪酶(岛津CL-7150型全自动生化分析仪)。

1.3.2 胰腺组织中髓过氧化物酶(MPO)测定 处死大鼠后切取移植胰腺,立即置入磷酸盐平衡液中,并将胰腺粉碎,用超声波将细胞破坏,离心后取上清液。将50μL上清液与200μL邻二甲氧基苯胺液和200μL H₂O₂混合,反应后用紫外分光光度计(美国Beckman公司生产)测定460nm的吸光度值;MPO活性用吸光度变化率来表示。

1.3.3 胰腺组织中HSP70测定 利用免疫印迹(Western Blot)方法检测移植24h后胰腺组织中

HSP70含量。以免抗鼠HSP70抗体和碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体(由北京中山生物技术有限公司提供)分别为一抗和二抗,并利用凝胶成像及半定量分析系统进行半定量分析。

1.3.4 组织学检测 保存后和胰腺移植术后24h,切取移植胰腺,分别进行苏木素-伊红(HE)染色和萘酚AS-D氯乙酸脂酶染色(中性粒细胞特异性组织化学染色),并计算单位面积的中性粒细胞数。

1.4 统计学处理

数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。所有数据均经SPSS13.0软件处理,采用方差分析。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结 果

2.1 移植物组织中HSP70浓度

移植24h后,胰腺组织中HSP70浓度:Zn-1组,Zn-2组,Zn-3组均明显高于移植对照组和假手术对照组($P < 0.05$),但Zn-1组,Zn-2组,Zn-33组间差异无显著性($P > 0.05$)(表1)。

2.2 移植物组织MPO活性

移植24h后,胰腺组织中MPO活性:Zn-2组<Zn-1组<移植对照组<Zn-3组<假手术对照组(均 $P < 0.05$)(表1)。

2.3 空腹血糖、血清淀粉酶及脂肪酶变化

移植术后24h空腹血糖和血清脂肪酶水平:Zn-2组<Zn-1组<移植对照组<Zn-3组(P 均<0.05)。血清淀粉酶:Zn-2组低于其他移植组,但各组间差异均无显著性($P > 0.05$)(表2)。

表1 移植后24h大鼠胰腺组织中HSP浓度及MPO活性($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	HSP(吸收系数)	MPO(U/g)
假手术对照	6	1 167 ± 328 ¹⁾	0.10 ± 0.03 ²⁾
移植对照	8	2 936 ± 558 ¹⁾	2.35 ± 0.48 ²⁾
Zn-1	8	13 248 ± 4 230	2.11 ± 0.36 ²⁾
Zn-2	8	15 770 ± 3 665	1.19 ± 0.25 ²⁾
Zn-3	8	14 485 ± 3 869	3.49 ± 0.51 ²⁾

注:1)与ZnSO₄(1~3)组间比较, $F = 131.0, P < 0.05$;2)组间比较, $F = 93.4, P < 0.05$

表 2 大鼠胰腺移植 24 h 后空腹血糖、血清淀粉酶、脂肪酶变化($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	血糖(mmol/L)	血清淀粉酶(U/L)	血清脂肪酶(U/L)
假手术对照	6	6.5 \pm 1.8 ¹⁾	426 \pm 65	138 \pm 28 ²⁾
移植对照	8	12.9 \pm 3.6 ¹⁾	12220 \pm 830	311 \pm 38 ²⁾
Zn-1	8	11.2 \pm 3.5 ¹⁾	11 680 \pm 1 120	182 \pm 51 ²⁾
Zn-2	8	9.3 \pm 2.8 ¹⁾	12 250 \pm 850	160 \pm 41 ²⁾
Zn-3	8	14.7 \pm 4.7 ¹⁾	11 460 \pm 1 290	377 \pm 69 ²⁾

注:1)组间比较, $F=101.7$, $P<0.05$; 2)组间比较, $F=79.8$, $P<0.01$

2.4 组织学变化

移植后 24 h 组织结构变化 Zn-2 组和 Zn-1 组胰腺组织光学显微镜下仍可保持基本正常结构,仅有小叶间隙水肿,少量中性粒细胞浸润;而在 Zn-3 组和移植对照组组织破坏明显,腺泡坏死、出血和中性粒细胞浸润严重(图 1)。

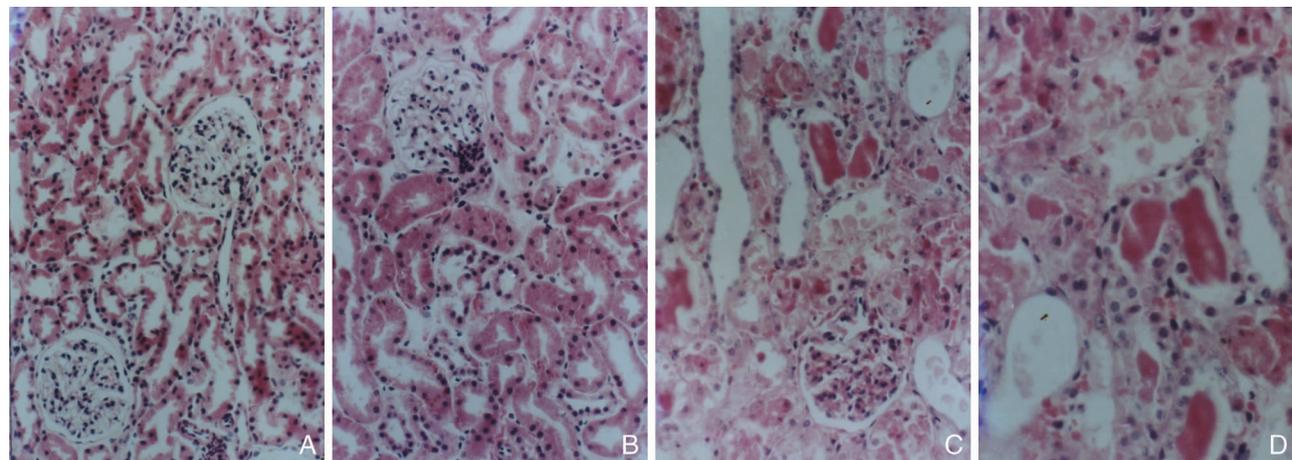


图 1 胰腺组织学检查 A:Zn-1 组; B:Zn-2 组; C:Zn-3 组; D:对照组

3 讨论

本实验结果显示:胰腺移植术前和术后 5 min 腹腔注射 $ZnSO_4$ 溶液可有效诱导 HSP70 合成,其诱导效果与经典的热休克方法相当。说明 Zn^{2+} 是 HSP70 的诱导剂。腹腔注射 $ZnSO_4$ 属于药物预处理,即是指以亚致损量对机体有损伤或刺激作用的药物诱导机体对后继应激的抵抗力^[6]。 Zn^{2+} 属于重金属离子,是机体必需的微量元素,是多种代谢酶类的辅助成分。此外,近年来发现锌还以各种锌蛋白的结构方式参与基因复制、转录及蛋白质合成的调控^[7]。锌可通过改变热休克基因转录因子(heat shock transcription factor, HSTF)的结构,使其直接活化,并促使与热休克成分(heat shock element, HSE)结合,启动 HSP 基因的转录活化,诱导 HSP 大量合成^[8]。本实验应用凝胶成像系统半定量分析,发现经腹腔注射 $ZnSO_4$ 预处理 24 h 后鼠胰腺腺泡细胞中可检测到大量 HSP70,证明 Zn^{2+} 确为一种有效的预处理方法。本实验可见 Zn^{2+} 5 mg/kg, 10 mg/kg 和 15 mg/kg 剂量不同诱导 HSP70 产生的效果相同,但 5 mg/kg ~ 15 mg/kg 不存在量效关系。

胰腺移植 24 h 后,Zn-2 组和 Zn-1 组血糖、血

清脂肪酶和胰腺组织 MPO 水平低于对照组和 Zn-1 组;病理结果显示 Zn-2 组和 Zn-1 组胰腺损伤较轻。证明适量 Zn^{2+} (5 mg/kg, 10 mg/kg) 对大鼠移植胰腺具有保护作用。这与 HSP70 的保护作用有关。HSP70 作用机制复杂,可与各种变性蛋白疏水端、肽链疏水端、脂肪酸、核酸、钙调蛋白可逆性结合,阻止由变性蛋白之间相互结合而导致的不可逆损伤^[9];HSP70 这种结合是在 ATP 缺乏的情况下进行的。移植器官在缺血再灌注过程中,缺血、缺氧将会造成 ATP 迅速衰减;这种情况促使 HSP70 发挥作用。HSP70 参与细胞内蛋白质的折叠与转运,保证蛋白质的功能及其在亚细胞器中的分布,并可有效消除效应蛋白,将变性蛋白运输到溶酶体降解,保证微管、微丝结构完整,防止胞内钙超载及增强触酶活性等。

本实验还观察到当 Zn^{2+} 剂量增至 15 mg/kg 时,移植后 24 h 病理显示组织破坏明显,腺泡坏死、出血和中性粒细胞浸润严重。提示 Zn 剂量过大可已致胰腺损伤,不宜作为预处理条件。因为 Zn^{2+} 作为一种重金属离子,在体内与 Cu^{2+} 竞争,可引起代谢障碍。次大剂量给大鼠腹腔注射 $ZnSO_4$ 可引起脱毛、腹泻及肝脏、肾脏损伤等^[10-11]。本实验大剂量应用外源性 Zn (15 mg/kg

Zn²⁺)虽然可有效诱导了HSP70产生,但其保护作用消失,且不能逆转其损伤。

参考文献:

- [1] Ahn TB, Jeon BS. Protective role of heat shock and heat shock protein 70 in lactacystin-induced cell death both in the rat substantia nigra and PC12 cells [J]. *Brain Res*, 2006, 1087(1):159-167.
- [2] Shindo Y, Asanuma Y, Furuya T, et al. Pretransplant heat loading on pancreatic graft reduces posttransplant ischemia-reperfusion injury [J]. *Transplant Proc*, 2002, 34(4):1329-1334.
- [3] Fuller TF, Rose F, Singleton KD, et al. Glutamine donor pretreatment in rat kidney transplants with severe preservation reperfusion injury [J]. *J Surg Res*, 2007, 140(1):77-83.
- [4] 何建宏, 李玉民, 巩爱霞. 高温诱导热休克蛋白70在无心跳供体大鼠肝移植中的保护作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(8):629-631.
- [5] Lee S, Tung KSK, Koopmans H, et al. Pancreaticoduodenal transplantation in the rat [J]. *Transplantation*, 1971, 13(1):421-425.

- [6] Murata M, Gorg P, Suzuki K, et al. Differential metal response and regulation of human heavy metal-inducible gene [J]. *J cell Physiol*, 1999, 180(1):105-113.
- [7] Satoh M, Shimoda Y, Akatsu T, et al. Elevated circulating levels of heat shock protein 70 are related to systemic inflammatory reaction through monocyte Toll signal in patients with heart failure after acute myocardial infarction [J]. *Eur J Heart Failure*, 2006, 8(8):810-815.
- [8] Kabakov A. Expression of inducible heat shock protein 70 in breast cancer cells correlates with their radioresistance [J]. *Eur J Cancer Supplements*, 2006, 4(2):101-??.
- [9] Bhagat L, Singh VP, Song AM, et al. Thermal stress-induced HSP70 mediates protection against intrapancreatic trypsinogen activation and acute pancreatitis in rats [J]. *Gastroenterology*, 2002, 122(1):156-165.
- [10] 王文祥, 陈胜喜, 王金胜, 等. 抑制热休克蛋白70表达对Eca-109细胞生长的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2007, 16(4):346-349.
- [11] 原春辉, 刘永锋, 赵宁, 等. 腺苷对移植胰腺再灌注损伤保护作用的实验研究[J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(5):351-354.

文章编号:1005-6947(2008)11-1096-01

· 病案报告 ·

大隐静脉畸形 1 例

刘广欣, 周松

(解放军第一七五医院 普通外科, 福建 漳州)

关键词: 静脉/畸形; 大隐静脉/外科学; 病例报告

中图分类号: R 654.4

文献标识码: D

患者 男性, 21岁。因“右下肢静脉曲张、扩张伴明显的酸胀痛感1年余”入院。体查: 双上肢及左下肢无畸形, 活动良好; 双下肢无肿胀; 右侧大隐静脉走行区浅静脉隆起、扩张、屈曲明显, 呈蚯蚓状, 未见皮肤色素沉着、脱屑、溃疡及渗出, 表面皮温略升高; 双侧股静脉走行区

无压痛。右侧股-隐静脉瓣膜功能试验阳性, 左侧阴性。双侧深静脉通畅试验阴性。双下肢足背动脉搏动良好。彩色多普勒超声检查提示右下肢深静脉通畅。完善术前检查后于持硬麻下行右大隐静脉高位结扎分段抽剥术, 术中于卵圆窝附近未探及大隐静脉, 分离大静脉各属支后见会阴浅、腹壁浅、旋髂浅、股外侧浅静脉等原大隐静脉属支直接汇入股静脉, 股内侧浅静脉缺如。予分离切断、结扎各属支后, 于内踝前1cm处找到大隐静脉后切开, 于腔内插入静脉剥离器逆行探查, 见大隐静脉从卵圆窝下方4cm处从内侧呈30°角汇

入股静脉。予距离股静脉汇入部约0.3cm处钳夹、切断大隐静脉, 完整抽剥大隐静脉。术后康复出院。

讨论 大隐静脉分支变异多样, 但主干解剖变异一般较少见。有时在手术当中难以辨别、确认, 以致有可能出现严重的手术并发症。本例警示若术中探查于卵圆窝附近找不到大隐静脉主干时千万不可轻易盲目结扎、切断甚至抽剥, 以防错把股静脉当作大隐静脉而造成严重后果。在此情况下可于内踝前找到大隐静脉切断后做逆向探查, 寻找大隐静脉汇入股静脉处, 以减少手术风险。

收稿日期: 2008-08-30。

作者简介: 刘广欣, 男, 解放军第一七五医院住院医师, 主要从事普外临床方面的研究。

通讯作者: 刘广欣 E-mail: lgxin@