

文章编号:1005-6947(2005)05-0351-04

· 实验研究 ·

腺苷对移植胰腺再灌注损伤保护作用的实验研究

原春辉, 刘永锋, 赵宁, 李桂臣, 程颖, 何三光

(中国医科大学附属第一医院 器官移植科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 探讨腺苷(ADO)对大鼠移植胰腺再灌注损伤的保护作用。方法 制备同系大鼠异位全胰十二指肠移植模型。大鼠移植术前和术后5 min 分别静脉注射药物 ADO, 8-PT(1, 3 二甲基-8-苯基黄嘌呤)和 ADO + 8-PT, 然后将实验分为6组:(1)空白对照组(C组);(2)移植对照组;(3)移植 + ADO 组(ADO);(4)移植 + 8-PT 组(8-PT);(5)移植 + ADO + 8-PT 组(ADO + 8-PT);(6)移植 + [α - 32 P] ADO(放射自显影组)。移植24 h 后检测胰腺组织中三磷酸腺苷(ATP)和总腺苷核苷酸(TAN)水平,检测血糖、血清脂肪酶、淀粉酶,测定移植胰腺组织中髓过氧化物酶(MPO)活性,并进行组织学观察;放射自显影组鉴定胰腺细胞内 ADO 含量。结果 胰腺组织 ATP 和 TAN 水平:ADO 组 > 移植对照组 > ADO + 8-PT 组 > 8-PT 组(均为 $P < 0.05$);移植后24 h 血糖、血清脂肪酶和胰腺组织中 MPO 水平:ADO 组 < 移植对照组 < ADO + 8-PT 组 < 8-PT 组(均为 $P < 0.05$);ADO 组保存的胰腺组织结构损伤明显轻于其他移植组;放射自显影显示外源性 [α - 32 P] ADO 进入胰腺细胞内。结论 外源性应用 ADO 或 8-PT 能分别增加或减少移植后胰腺组织 ATP 和 TAN 含量;腺苷对移植胰腺再灌注损伤有保护作用。

关键词:腺苷/治疗应用;胰腺移植;再灌注损伤

中图分类号:R657.5; Q525 文献标识码:A

Experimental study on the protective effects of adenosine on reperfusion injury following pancreaticoduodenal transplantation in rats

YUAN Chun-hui, LIU Yong-feng, ZHAO Ning, LI Gui-chen, Cheng Ying, He San-guang
(Department of Organ Transplantation, The First Affiliated Hospital of China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: **Objective** To study the protective effects of adenosine (ADO) on reperfusion injury following pancreaticoduodenal transplantation in rats. **Methods** The homologous male Wistar rat model of heterotopic total pancreaticoduodenal transplantation was made. The rats received IV injection of either ADO, 8-PT (1, 3-dimethyl 8-phenylxanthine) or ADO + 8PT at 5 min before or 5 min after operation, and then were divided into 6 groups: (1) blank control (C group); (2) transplant control group; (3) transplant + ADO group (ADO); (4) transplant + 8-PT group (8-PT); (5) transplant + ADO + 8-PT group (ADO + 8-PT), and (6) transplant + [α - 32 P] ADO (radiation-visible group). AT 24 h after transplantation, the pancreatic tissue concentration of adenosine triphosphate (ATP) and total adenine nucleotides (TAN) were determined, blood sugar (BG) and serum concentration of amylase and lipase were examined, the activity of myeloperoxidase (MPO) in pancreatic graft tissue was measured, and histological observation was made. [α - 32 P] ADO was used to radiologically identify the content of ADO in pancreatic tissue. **Results** Pancreatic tissue concentration of ATP and TAN [$(5.72 \pm 0.47) \mu\text{mol/g}$, $(8.71 \pm 0.91) \mu\text{mol/g}$] in ADO group > transplant control group [$(3.39 \pm 0.58) \mu\text{mol/g}$, $(5.01 \pm 0.78) \mu\text{mol/g}$] > (ADO + 8-PT) group [$(2.92 \pm 0.24) \mu\text{mol/g}$, $(4.84 \pm 0.41) \mu\text{mol/g}$] > 8-PT group [$(2.05 \pm 0.66) \mu\text{mol/g}$, $(3.98 \pm 0.41) \mu\text{mol/g}$] 24 h after transplantation ($P < 0.05$). The value of BG and serum lipase and MPO in ADO group < transplant control group < (ADO + 8-PT) group < 8-PT group ($P < 0.05$). Lightmicroscopic studies showed that histomorphological changes of pancreas in experimental group were much

基金项目:辽宁省科委重大资助项目(00225001)。

收稿日期:2004-07-15; **修订日期:**2004-11-29。

作者简介:原春辉(1971-),男,辽宁营口人,中国医科大学附属第一医院主治医师,主要从事胰腺移植方面的研究。

通讯作者:原春辉 电话:010-65296016, 13121997978(手机); E-mail:ychedoctor@hotmail.com。

less than that in other groups. Radioactive [α - 32 P] ADO was found that the radioactive materia can enter the pancreatic acinar cells. **Conclusions** Exogenous ADO can increase the amount of ATP and TAN in pancreatic graft tissue, while 8-PT reduces it. ADO has protective effects on the ischemia/reperfusion injury of pancreaticoduodenal graft.

Key words: Adenosine/ther use; Pancreas Transplantation; Reperfusion Injury

CLC number: R657.5; Q525

Document code: A

腺苷(ADO)是一种内生性的核苷,由三磷酸腺苷(ATP)代谢产生。组织能量储备是有限的,当机体对能量有较高要求时,必须不断地有氧和底物供给以维持正常的细胞结构和功能。有研究表明,器官缺血时器官生存所必需的能量底物缺乏与器官再灌注损伤有关^[1]。笔者应用同系大鼠异位全胰十二指肠移植模型,外源性应用 ADO 或腺苷非选择性阻滞剂 8-PT(1,3 二甲基-8-苯基黄嘌呤),研究它们对胰腺能量代谢及功能的影响,探讨 ADO 对大鼠移植胰腺缺血再灌注损伤的作用和机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及分组

雄性 Wistar 大鼠(由中国医科大学实验动物中心提供),体重 250~300 g。实验前 1 周受体鼠经阴茎背静脉注入链脲霉素 55 mg/kg,制备非空腹血糖 > 19.4 mmol/L 的大鼠糖尿病模型,模型成功率 81.1% (30/37)。成模后,动物随机分为 6 组,每组 6 只。(1) ADO 组:移植术前及术后 5 min 经阴茎背静脉注射 ADO (500 mg/kg, 中国医药集团上海分公司)。(2) 8-PT 组:移植术前及术后 5 min 经阴茎背静脉注射 8-PT (10 mg/kg, Sigma 公司)。(3) ADO + 8-PT 组:移植术前及术后 5 min 经阴茎背静脉注射 ADO (500 mg/kg) 和 8-PT (10 mg/kg)。(4) 空白对照组(C 组):只麻醉及开腹,不作移植。(5) 移植对照组:只作移植,不注射药物。(6) [α - 32 P] ADO 放射自显影组:移植术前及术后 5 min 经阴茎背静脉注射 [α - 32 P] 标记的 ADO (500 mg/kg)。

1.2 移植手术

依据 Lee 等^[2]的方法进行同系大鼠异位全胰十二指肠移植。行供体带腹腔动脉和肠系膜上动脉的腹主动脉段与受体腹主动脉端侧吻合,供体门静脉与受体下腔静脉端侧吻合,胰腺外分泌经膀胱引流。移植术后 24 h 处死大鼠,经腹主动脉采血,并取胰腺组织备检。

1.3 检测指标及方法

1.3.1 空腹血糖、血清淀粉酶、脂肪酶测定 测定空腹血糖(One touch profile 血糖仪)、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 将切取移植胰腺,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 50 μ L 上清液与 200 μ L 邻二甲氧基苯胺液和 200 μ L H₂O₂ 混合,反应后测定 460 nm 的吸光度值,MPO 活性用吸光度变化率来表示。

1.3.3 移植胰腺组织 ATP,ADP(二磷酸腺苷)和 AMP(一磷酸腺苷)检测 切取小块胰腺组织,大小约 0.5 cm \times 0.5 cm \times 0.5 cm,置于液氮中保存,取 100 mg 冻干组织,用碾碎机制成粉末,将粉末放入 3 mL 0.5 N 高氯酸中混匀,用低温高速离心机(0 $^{\circ}$ C,10 000 r/min,10 min)离心后将沉淀物质去除。取上清液 500 μ L,加入 50 μ L 1.0 N KHCO₃ 和 50 μ L Tris 液,用以中和至 pH7.0,再离心(0 $^{\circ}$ C,10 000r/min,10 min)。取 10 μ L 上清液进行 HPLC 分析。HPLC: Water 2010 色谱系统,应用 C18(15 cm \times 3.96 mm, 4 μ m)分析柱,磷酸盐缓冲液为流动相(pH = 6.0)。洗脱液 A:0.05 mmol/L KH₂PO₄/K₂HPO₄ + 1 mmol/L 乙二胺乙四酸。洗脱液 B:洗脱液 A + 体积分数为 2.5% 甲醇(9:1)。流速:1.0 mL/min。检测:紫外线 254 nm,柱温 23 $^{\circ}$ C。计算总腺苷核苷酸(TAN,公式:TAN = ATP + ADP + AMP)。所用标准品购于 Sigma 公司。

1.4 [α - 32 P] ADO 放射自显影

放射自显影组移植术后 24 h 切取胰腺组织,HE 染色,石蜡切片。利用放射自显影的方法^[3]判定 [α - 32 P] ADO 是否进入胰腺细胞内。

1.5 组织学检查

切取移植胰腺,分别进行 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。

1.6 统计学方法

实验数据以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示;所有数据均经 SPSS 软件处理;多组间数值比较采用方差分析。 $P < 0.05$ 具有统计学意义。

2 结果

2.1 移植后胰腺组织中 ATP 和 TAN 浓度

移植 24h 后胰腺组织中 ATP 和 TAN 浓度在 ADO 组仍可保持在较高水平,而在其他移植组水平明显降低,空白对照组 > ADO 组 > 移植对照组 > ADO + 8-PT 组 > 8-PT 组,差异均有显著性 ($P < 0.05$) (表 1)。

2.2 移植植物组织 MPO 活性

胰腺移植 24h 后,ADO 组移植植物组织中 MPO 活性低于其他移植对照组;空白对照组 < ADO 组 < 移植对照组 < ADO + 8-PT 组 < 8-PT 组,差异均有显著性 ($P < 0.05$) (表 1)。

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

组别	n	ATP($\mu\text{mol/g}$)	TAN($\mu\text{mol/g}$)	MPO(U/g)
空白对照	6	7.18 ± 0.65	10.43 ± 1.49	0.23 ± 0.07
移植对照	6	3.39 ± 0.58	5.01 ± 0.78	2.06 ± 0.33
ADO	6	5.72 ± 0.47	8.71 ± 0.91	1.19 ± 0.16
8-PT	6	2.05 ± 0.66	3.98 ± 0.44	3.66 ± 0.58
ADO + 8-PT	6	2.92 ± 0.24	4.84 ± 0.41	2.25 ± 0.28
F 值		123	76.9	25.9
P 值		<0.05	<0.05	<0.05

2.3 空腹血糖、血清淀粉酶及脂肪酶变化

移植术后 24h ADO 组空腹血糖水平低于其他移植组,差异均有显著性 ($P < 0.05$)。ADO 组血清淀粉酶低于其他移植组,但差异无显著性 ($P > 0.05$); 而血清脂肪酶,ADO 组低于其他移植组,差异均有显著性 ($P < 0.05$) (表 2)。

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

组别	n	血糖 (mmol/L)	血清淀粉酶 (U/L)	血清脂肪酶 (U/L)
空白对照	6	6.4 ± 2.1	420 ± 170	138 ± 19
移植对照	6	12.9 ± 4.8	12380 ± 930	305 ± 38
ADO	6	9.1 ± 3.6	11680 ± 1120	162 ± 26
8-PT	6	15.3 ± 5.5	13250 ± 750	520 ± 71
ADO + 8-PT	6	14.2 ± 4.9	11580 ± 1320	347 ± 41
F 值		87.5	-	119.5
P 值		$P < 0.05$	$P > 0.05$	$P < 0.01$

2.4 组织学变化

移植后 24h 组织结构的变化: ADO 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。在其他移植组组织破坏明显,腺泡坏死、出血和中性粒细胞浸润严重,组织破坏程度在移植对照组、ADO + 8-PT 组和 8-PT 组依次更加严重(附图 a ~ d)。

a : ADO 组

b : 移植对照组

c : ADO + 8-PT 组

d : 8-PT 组

附图 移植 24h 后各组光镜下组织学变化

2.5 [α - 32 P] ADO 胰腺内放射自显影

移植 24h 后大鼠胰腺细胞内可见较多大小不等的 [α - 32 P] 银粒显影,提示 [α - 32 P] ADO 进入了大鼠胰腺细胞内。

3 讨论

胰腺是相对低血流量的器官,对缺血耐受能力较差,对能量物质变化反应敏感^[4,5]。如何提高移植后胰腺细胞内能量物质含量,尽可能提高其对缺血再灌注损伤的耐受能力是胰腺移植成败的重要因素^[6]。Bowers 等^[7]提出器官移植前细胞内 ATP 水平是判定保存器官活力的一项重要指标。如果能为移植器官提供供能物,如 ADO,则应是维持细胞内较高 ATP 水平的一种简捷有效的方法^[8]。但目前将外源性 ADO 用于移植胰腺保护方面的研究鲜有报道。本实验结果表明,ADO 组移植胰腺组织中 ATP 和 TAN 水平比对照组明显升高 ($P < 0.05$);移植后 ADO 组胰腺组织损伤明显轻于对照组,血糖值明显低于对照组。另外,在反映胰腺缺血再灌注损伤较为敏感的指标如组织 MPO 活性、血清淀粉酶及脂肪酶检测结果均显示 ADO 组低于移植对照组。因而在移植前后外源性应用 ADO 的方法可以为减轻移植胰腺缺血再灌注损伤提供一个新策略。另外,本实验外源性应用 ADO 非选择性阻滞剂 8-PT 使移植物组织 ATP 和 TAN 水平减低,移植胰腺损伤加重,从而说明内源性腺苷对移植胰腺也具有保护作用。

本实验结果表明,移植对照组大鼠胰腺低温灌注保存后细胞内 ATP 水平迅速降低,同时细胞内酶类释放增多,而 ADO 组细胞内 ATP 水平维持近于正常水平。此结果说明胰腺组织可以利用外源性 ADO 合成自身供能物质如 ATP 等。后者直接向细胞提供能量,供给 $\text{Na}^+ - \text{K}^+$ ATP 酶及 $\text{Ca}^{2+} - \text{ATP}$ 酶等,用于细胞内离子平衡,从而减轻细胞内酸中毒及细胞水肿。同时由于 ATP 的细胞膜稳定作用,恢复了胰腺细胞的正常代谢供能,ADO 组细胞内酶类释放减少。此外,ADO 还具有改善微循环、恢复细胞膜电位、改善细胞功能等作用^[9],同时

ADO 也是一种信号分子,可以通过第二信使对组织细胞的变化起作用。可见外源性 ADO 对大鼠移植胰腺的保护作用可能是多种作用的综合效应。再者,本实验利用放射自显影技术明确显示 ADO 能够进入胰腺细胞内,这也直接证实了外源性 ADO 对大鼠胰腺的保护作用是通过细胞内机制完成的。至于其进入细胞内的途径目前尚不清楚,有待研究。

参考文献:

- [1] Troisi R, Meester D, Regaert B, *et al.* Tolerance of the porcine pancreas to warm and cold ischemia: comparison between University of Wisconsin and histidine-tryptophan-ketoglutarate solution [J]. *Transplant Proc*, 2002, 34(3): 820 - 822.
- [2] Lee S, Tung KSK, Koopmans H, *et al.* Pancreaticoduodenal transplantation in the rat [J]. *Transplantation*, 1971, 13(2): 421 - 425.
- [3] 章静波. 细胞生物学实用方法与技术[M]. 北京:北京医科大学,中国协和医科大学联合出版社,1995. 154 - 155.
- [4] Pi F, Badosa F, Sola A, *et al.* Effects of adenosine on ischaemia-reperfusion injury associated with rat pancreas transplantation [J]. *Br J Surg*, 2001, 88(10): 1366 - 1375.
- [5] SALEHA. Ahmed, 秦仁义, 邹声泉, 等. 胰腺缺血再灌注加微球栓塞诱导鼠胰腺癌细胞凋亡的研究 [J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 11(3): 157 - 160.
- [6] 张翀. 急性胰腺炎大鼠胰腺各部血流的变化 [J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(9): 656 - 658.
- [7] Bowers JL, Teramoto K, Khetry U, *et al.* 31pNMR assessment of orthotopic rat liver transplantation [J]. *Transplantation*, 1992, 54(4): 604 - 609.
- [8] Ludwig S, Armann B, Escher E, *et al.* Pathomorphologic and microcirculatory changes and endothelin-1 expression in UW- and Celsior-preserved pancreata in experimental pancreas transplantation [J]. *Transplant Proc*, 2002, 34(6): 2364 - 2365.
- [9] Uhlmann D, Armann B, Ludwig S, *et al.* Comparison of celsior and UW solution in experimental pancreas preservation [J]. *J Surg Res*, 2002, 105(2): 173 - 180.