

文章编号:1005-6947(2006)06-0445-04

· 基础研究 ·

洛沙坦对缺血再灌注大鼠胰腺氧自由基、细胞凋亡和 Bcl-2 表达的影响

邢军¹, 许评², 梁德森², 陈艳波¹, 李爱东², 宋纯², 宋春芳²

(哈尔滨医科大学 1. 第三临床医学院 腹外科 2. 第一临床医学院 普通外科, 卫生部细胞移植重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘要:目的 探讨洛沙坦(losartan)对大鼠胰腺缺血再灌注(I/R)损伤的保护作用及机制。方法 SD大鼠72只随机分为假手术组、I/R组和Losartan组,每组24只。采用钳闭大鼠腹腔干、肠系膜上动脉15,30,60min,再灌注6h,制成胰腺I/R损伤模型。losartan组给予losartan(40mg/kg)灌胃预处理;假手术组和I/R给予等容积的无菌蒸馏水。3组均于术后6h断颈处死动物。用TUNEL法检测I/R区胰腺细胞凋亡、免疫组化法检测Bcl-2蛋白的表达,并观察胰腺组织病理改变。结果 losartan可逆转胰腺组织炎症细胞浸润、腺泡萎缩等异常改变。缺血15,30min时段,losartan组胰腺细胞凋亡率为(6.5±2.9)%和(10.5±4.3)%显著低于I/R组的(10.2±3.2)%和(18.4±3.1)%($P < 0.05$);丙二醛水平为(17.9±2.1)nmol/g(湿重)和(25.2±3.3)nmol/g(湿重)显著低于I/R组的(20.1±1.2)nmol/g(湿重)和(34.9±2.6)nmol/g(湿重)($P < 0.05$);Bcl-2阳性细胞为(11.3±2.2)%和(16.2±2.7)%显著高于I/R组的(6.1±1.7)%和(10.3±2.1)%($P < 0.05$)。结论 losartan可减轻I/R对大鼠胰腺病理改变、抑制细胞凋亡。

关键词:洛沙坦/药理学;再灌注损伤;胰腺/病理学;细胞凋亡

中图分类号:R619.9;R322.491

文献标识码:A

Effects of losartan on oxygen free radicals, cell apoptosis and Bcl-2 expression in ischemia-reperfusion injury of pancreas in rats

XING Jun¹, XU Ping², LIANG De-sen², CHEN Yan-bo¹, LI Ai-dong², SONG Chun², SONG Chun-fang²

(1. The Third Affiliated Hospital, 2. The Cell Transplantation Key Laboratory of National Health Ministry, Harbin Medical University, Harbin 150040, China)

Abstract: **Objective** To investigate the protective effect of losartan on acute ischemia-reperfusion (I/R) injury of pancreas in rats. **Methods** Seventy-two Wister rats were randomly divided into 3 groups: (1) Control group; (2) Ischemia-reperfusion group: the anterior mesenteric artery and the celiac artery were occluded for 15 min, 30min and 60min followed by 6 hours reperfusion; (3) Losartan group: losartan (40mg/kg) were administered by gavage at 12h and 1h before arterial occlusion. The pathologic changes of pancreatic tissue were observed under light microscopy; TUNEL was used to detect apoptotic of pancreatic cells; Bcl-2 expression in the pancreatic cells of rats was analyzed by immunohistochemistry technique. **Results** Losartan treatment reversed the histological abnormalities including infiltration of inflammatory cells and atrophy of acinar cells. Compared with losartan group, pancreatic tissue of I/R group exhibited increased MDA [(20.1±1.2)nmol/g and (34.9±2.6) vs (17.9±2.1)nmol/g and (25.2±3.3)nmol/g, $P < 0.05$] and apoptosis [(10.2±3.2)% and (18.4±3.1)% vs. (6.5±2.9)% and (10.5±4.3)% , $P < 0.05$]. The administration of losartan increased expression of Bcl-2 (11.3±2.2)% and

收稿日期:2005-11-11; 修订日期:2006-04-29。

作者简介:邢军,男,黑龙江孙吴人,哈尔滨医科大学第三临床医学院主治医师,主要从事细胞移植的基础与临床方面的研究。

通讯作者:邢军 电话:0451-84260067; E-mail:junxing08hotmail.com。

(16.2 ± 2.7)% vs (6.1 ± 1.7)%、(10.3 ± 2.1)%, $P < 0.05$). **Conclusions** Losartan can decrease the pathologic changes and suppress cell apoptosis in pancreas of rats with I/R.

Key words: Losartan/pharm; Reperfusion Injury; Pancreas/pathol; Apoptosis

CLC number: R619.9; R322.491

Document code: A

缺血再灌注 (ischemia/reperfusion, I/R) 损伤是一种常见的临床病理生理过程, I/R 引起胰腺微循环障碍, 如血管收缩、静脉淤滞、微循环灌注不足, 导致胰腺组织进一步缺血缺氧而加重损伤, 在急性胰腺炎 (AP) 的发病机制中起重要作用。有研究证明在 AP 时存在局部肾素-血管紧张素系统 (RAS) 的激活和血管紧张素 II (Ang II) 的升高, 引起胰腺血流动力学紊乱^[1]。本实验观察 RAS 是否参与了胰腺 I/R 过程, 探讨 Ang II 型受体阻断剂 (AT1R) 洛沙坦 (Losartan) 对 I/R 大鼠胰腺保护的作用。

1 材料与方法

1.1 实验动物与主要试剂

清洁级健康雄性 SD 大鼠 72 只, 体重 240 ~ 300 g, 由哈尔滨医科大学实验动物中心提供。洛沙坦 (losartan) 购自 Sigma 公司; 原位凋亡 (TUNEL) 试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司, 其中试剂包括, TDT (美国 Promega 公司), Dig-dUTP (德国 BM 公司) 和生物素化抗地高辛抗体 (美国 Sigma 公司)。兔抗大鼠 Bcl-2 单克隆抗体购自美国 Calbiochem 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 胰腺 I/R 模型制作与分组 动物术前 6h 禁食不禁水。术时戊巴比妥钠 25 mg/kg 腹腔注射麻醉、气管插管, 呼吸机辅助呼吸。仰卧固定, 常规消毒, 腹正中切口, 找到腹腔干和肠系膜上动脉。按编号法随机分组, 每组 24 只: (1) 假手术组, 显露腹腔干和肠系膜上动脉, 不用血管钛钳闭。(2) I/R 组用血管钛钳闭腹腔干和肠系膜上动脉 15 min, 30 min 和 60 min, 再灌注 6h。(3) losartan 组, 于 I/R 术前晚及术前 1h 分别给予洛沙坦 (10 mg/kg) 灌胃, 假手术组及 I/R 组给予等容积的无菌蒸馏水。腹部切口连续缝合。活杀, 取胰体组织, 一部分胰组织用 4% 多聚甲醛室温固定, 石蜡包埋, 连续切片, 备凋亡和免疫组织化学 (免疫组化) 检测; 另一部分置入液氮中冻存, 备丙二醛 (MDA) 测定。

1.2.2 脂质过氧化产物 MDA 的测定 用日立 F-3010 荧光分光光度计, 在 25 mL 比色管中加入 0.1

mL 组织匀浆上清液, 加磷钨酸 0.5 mL, 硫酸 2 mL 及 0.5 mL 硫代巴比妥酸溶液。混匀后 95℃ 水浴 40 min; 冷却后加正丁醇 4 mL, 振荡 5 min。取上层于激发波长 515 nm, 发射波长 553 nm 进行荧光测定。

1.2.3 检测细胞凋亡及 Bcl-2 表达 原位末端标记法 (TUNEL) 检测细胞凋亡, 免疫组织化学 (免疫组化) 检测 Bcl-2 表达。凋亡阳性细胞核呈棕褐色; Bcl-2 蛋白阳性表达的细胞浆呈棕黄色。100× 光镜下观察, 在每张玻片上随机取 100 个细胞, 计算阳性细胞百分率, 3 次计数求平均值。

1.3 病理观察与评分

胰腺组织石蜡切片, HE 染色, 光镜下观察 I/R 区胰腺组织的病理改变, 病理组织学评分参照 Schmidt 等^[2]的方法, 单盲评定。

1.4 统计学处理

数据以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示。Sigma Stat 统计学软件行方差分析和两两比较。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。 $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。行 MDA 含量、细胞凋亡率、Bcl-2 阳性细胞率的相关性检验。

2 结果

2.1 组织学观察^[2]

2.1.1 假手术组 光镜下血管周围和腺泡细胞结构正常, 酶原颗粒嗜蓝染, 较丰富, 核较清楚, 腺泡结构正常。

2.1.2 I/R 组 I/R 15 min, 胰腺组织间质轻度充血、水肿, 血管周围有少量炎症细胞浸润; I/R 30 min, 胰腺组织间质出血较明显, 小静脉内微血栓形成 (纤维素、血小板为主), 多处间质血管出血, 未出血处可见水肿, 局限性腺泡溶解、坏死, 内有中性粒细胞浸润; I/R 60 min, 胰腺组织间质出血明显, 可见较彻底的坏死灶, 溶解性坏死, 核及细胞结构消失, 内有炎细胞浸润, 还可见少量钙盐沉着, 酶原颗粒大量减少或消失 (见图 1)。

2.1.3 losartan 组 I/R 15 min 和 30 min 可见胰腺间质少量出血, 水肿轻微, 部分腺泡细胞胞浆酶原颗粒减少, 炎细胞浸润轻微 (见图 2)。

图 1 I/R 组 I/R 30 min, 胰腺组织间质出血较明显, 小静脉内微血栓形成, 多处间质血管出血, 未出血处可见水肿, 局限性腺泡溶解、坏死, 内有中性粒细胞浸润

I/R 15 min 和 30 min 胰腺组织病理学评分: I/R 组较 losartan 组明显增高 ($P < 0.05$); I/R 60 min 两者评分差异无显著性意义 ($P > 0.05$)。评分结果见表 1。

表 1 3 组大鼠胰腺组织病理评分结果

组别	n	胰腺组织病理评分(分)		
		I/R 15min	I/R 30min	I/R 60min
		(n=8)	(n=8)	(n=8)
假手术	24	1.0±0.5	1.2±0.3	1.1±0.7
I/R	24	3.9±0.7 ¹⁾	7.7±1.8 ¹⁾	11.9±1.5 ¹⁾
losartan	24	2.7±0.4 ²⁾	5.1±1.1 ²⁾	11.2±1.7 ³⁾

注:1)与假手术组比较, $P < 0.05$; 2)与 I/R 组比较, $P < 0.05$; 3)与 I/R 组比较, $P > 0.05$

2.2 各组胰组织 MDA 的变化

I/R 组各时间 MDA 含量较 losartan 组和假手术组均显著升高 ($P < 0.05$) (表 2)。

表 2 3 组大鼠胰腺组织 MDA 含量

组别	n	MDA [nmol/g 湿重]		
		I/R 15min	I/R 30min	I/R 60min
		(n=8)	(n=8)	(n=8)
假手术	24	6.0±2.2	9.0±2.0	9.9±3.2
I/R	24	20.1±1.2 ¹⁾	34.9±2.6 ¹⁾	41.2±3.7 ¹⁾
losartan	24	17.9±2.1 ²⁾	25.2±3.3 ²⁾	37.1±2.6 ²⁾

注:1)与假手术组比较, $P < 0.05$; 2)与 I/R 组比较, $P < 0.05$

2.3 各组大鼠的胰腺细胞凋亡率

假手术组可见极少量凋亡细胞存在。I/R 15 min 和 30 min 时段, I/R 组较 losartan 组胰腺细胞凋亡率明显增多 ($P < 0.05$); I/R 60 min 时段两组差异无显著性 ($P > 0.05$) (表 3)。

2.4 凋亡相关基因 Bcl-2 的表达

I/R 组和 losartan 组各时点 Bcl-2 的表达均较假

图 2 losartan 组 I/R 30 min 可见胰腺间质少量出血, 水肿轻微, 部分腺泡细胞胞浆酶原颗粒减少, 炎细胞浸润轻微

手术组明显增高 ($P < 0.05$)。Bcl-2 阳性细胞表达率 losartan 组依次为 I/R 30 min > I/R 15 min > I/R 60 min (表 4)。

表 3 3 组大鼠胰腺组织 MDA 含量

组别	n	细胞凋亡率(%)		
		I/R 15min	I/R 30min	I/R 60min
		(n=8)	(n=8)	(n=8)
假手术	24	3.0±1.0	2.9±1.9	4.0±1.8
I/R	24	10.2±3.2 ¹⁾	18.4±3.1 ¹⁾	22.1±4.5 ¹⁾
losartan	24	6.5±2.9 ²⁾	10.5±4.3 ²⁾	20.9±3.0 ³⁾

注:1)与假手术组比较, $P < 0.05$; 2)与 I/R 组比较, $P < 0.05$; 3)与 I/R 组比较, $P > 0.05$

表 4 3 组大鼠胰腺组织 Bcl-2 表达情况

组别	n	Bcl-2 阳性细胞率(%)		
		I/R 15min	I/R 30min	I/R 60min
		(n=8)	(n=8)	(n=8)
假手术	24	2.4±0.8	2.3±0.4	2.6±0.7
I/R	24	6.1±1.7 ¹⁾	10.3±2.1 ¹⁾	8.9±1.4 ¹⁾
losartan	24	11.3±2.2 ²⁾	16.2±2.7 ²⁾	12.5±3.1 ²⁾

注:1)与假手术组比较, $P < 0.05$; 2)与 I/R 组比较, $P < 0.05$ 。

2.5 MDA 含量、细胞凋亡率、Bcl-2 阳性细胞率相关分析

I/R 30 min 时, losartan 组和 I/R 组 MDA 含量与细胞凋亡率的相关分析显示, 相关系数分别为 ($r = 0.72$, $P < 0.05$) 和 ($r = 0.65$, $P < 0.05$), 呈正相关; Bcl-2 阳性细胞率与细胞凋亡率的相关分析显示, 相关系数分别为 ($r = -0.76$, $P < 0.05$) 和 ($r = -0.69$, $P < 0.05$), 呈负相关。

3 讨论

肾素 - 血管紧张素系统 (renin-angiotensin sys-

tem, RAS)有着很强的血管收缩和刺激醛固酮分泌的作用,是重要的水电解质平衡调节系统。RAS主要包括肾素、血管紧张素原、血管紧张素 I (Ang I)、血管紧张素转换酶和血管紧张素 II (Ang II)。其效应肽 Ang II 通过相应的受体 AT1 和 AT2 发挥关键作用^[3]。近年研究认为 RAS 分为循环 RAS 和局部 RAS。前者主要参与血压和心肾内稳态的调节;后者由组织局部产生,除通过自分泌以及旁分泌等方式参与调节血管张力、血流及促进细胞生长、增殖的作用之外^[4],还参与多种物质表达的调控、纤维化及炎症反应,以适应各自不同的功能调节^[5],其在调节局部组织生长和分化中发挥重要作用。许多组织、器官都有局部 RAS 的表达。在胰腺的血管内皮细胞、导管内皮细胞、腺泡细胞、胰岛细胞等处也发现有胰腺局部组织 RAS 的表达^[6]。Ang II 还可引起多种细胞凋亡,如心肌细胞、糖尿病大鼠的肾脏细胞等。其引起凋亡的机制是某些凋亡相关基因的表达,如 bax/bcl-2, Fas 和 FasL, p53 等^[7]。

胰腺的 I/R 损伤可引起胰腺微循环障碍,血管痉挛,静脉淤血,胰腺组织 RAS 激活,可加重胰腺细胞缺血、缺氧的恶性循环,诱发胰腺炎的发生、发展。有研究显示,在 I/R 中存在细胞凋亡现象^[8-10]。

细胞凋亡是一种受基因调控的程序性细胞死亡,受多种抑制和促进因素的影响。I/R 可引起氧自由基急剧增加及细胞内钙超载,这些均可成为细胞凋亡的诱导因素^[8]。本实验 I/R 各时段, losartan 组胰腺组织 MDA 含量和细胞凋亡率显著低于 I/R 组 ($P < 0.05$);而在 I/R 60min 时段细胞凋亡率差异无显著性 ($P > 0.05$)。实验结果说明,胰腺不同 I/R 时段氧自由基水平及细胞凋亡率随着缺血时间延长而上升,且两者呈正相关,提示氧自由基参与了 I/R 胰腺细胞凋亡。losartan 可以减少 I/R 过程中胰腺组织 MDA 含量和凋亡细胞数量,对胰腺有保护作用。

RAS 中其效应肽为 Ang II,并通过相应的受体 AT1 和 AT2 发挥关键作用^[3]。根据本实验结果,笔者考虑 Losartan 对 I/R 胰腺保护作用的可能机制是:Losartan 可阻断 Ang II 与 AT1 受体结合后所产生的强烈收缩外周和胰腺局部小动脉、微小动脉的作用,同时也阻断血管平滑肌痉挛、交感神经兴奋等作用,从而减轻胰腺缺血、缺氧,改善微循环;losar-

tan 通过直接阻断 Ang II 对胰腺细胞的作用而保护胰腺;阻断缺氧导致局部 RAS 暂时性升高,抑制了随后由缺血/再灌注而产生的大量氧自由基。笔者还发现,缺血 60min 时段 losartan 组和 I/R 组细胞凋亡率差异无显著性,故在缺血 30min 内应用 losartan 以减少细胞凋亡为最佳。

Bcl-2 是最重要的抗凋亡和抗氧化基因,能抑制许多因素诱发的细胞凋亡。本实验通过免疫组化法检测发现,缺血各时段胰腺细胞 Bcl-2 表达 losartan 组均较 I/R 组明显增加 ($P < 0.05$),而且胰腺细胞中表达 Bcl-2 蛋白的细胞与 TUNEL 法检测结果及分布区域相反。相关分析显示,Bcl-2 阳性表达细胞数与胰腺细胞凋亡数呈高度负相关。此结果进一步支持 losartan 可能与降低氧自由基水平,调控凋亡相关基因 Bcl-2 的表达而具有胰腺保护作用的观点。

参考文献:

- [1] Ip SP, Che CT, Leung PS. Association of free radicals and the tissue renin - angiotensin system: prospective effects of rhodiola, a genus of Chinese herb, on hypoxia - induced pancreatic injury [J]. *J Pancreas*, 2001, 2(1): 16 - 25.
- [2] Schmidt J, Lewandrowski K, Fernandez-del, et al. Histopathologic correlates of serum amylase activity in acute experimental pancreatitis [J]. *Dig Dis Sci*, 1992, 37(9): 1426 - 1433.
- [3] Egidio J. Vasoactive hormones and renal sclerosis [J]. *Kidney Int*, 1996, 49(2): 578 - 597.
- [4] 刘艳,张世馥,金叔敏,等. 血管紧张素 II 受体介导细胞凋亡及其功能的研究进展 [J]. *解剖学报*, 2003, 34(3): 333 - 335.
- [5] Ruiz-Ortega M, Lorenzo O, Suzuki Y, et al. Proinflammatory action of angiotensin II [J]. *Curr Opin Nephrol Hypertens*, 2001, 10(3): 321 - 329.
- [6] Conrad A. A critical appraisal of the intrinsic pancreatic angiotensin-generating system [J]. *Pancreas*, 2001, 2(1): 50 - 55.
- [7] 张汝玲,王兴鹏,吴恺,等. I 型血管紧张素 II 受体拮抗剂抑制大鼠胰腺纤维化形成 [J]. *中华肝胆外科杂志*, 2005, 11(1): 20 - 23.
- [8] SALEH A, Ahmed, 秦仁义,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.
- [9] 梁法生,宋继昌,高英堂,等. 趋化因子 MIP-2 在大鼠肝缺血/再灌注损伤后的表达 [J]. *中国普通外科杂志*, 2004, 13(2): 104 - 106.
- [10] 霍婷婷,刘小南,王为忠,等. 缺血预处理对大鼠胰腺移植的保护作用 [J]. *中国普通外科杂志*, 2005, 14(5): 343 - 346.