

· 研究原著 ·

文章编号 1000-2790( 2006 )16-1477-03

## 外源性 ATP 对大鼠移植胰腺的作用及机制

牛万成, 李 玺 ( 解放军第 97 医院普外科, 江苏 徐州 221004 )

### Protective effect of exogenous ATP on transplanted pancreas in rats and its mechanism

NIU Wan-Cheng, LI Xi

Department of General Surgery, PLA 97 Hospital, Xuzhou 221004, China

**【Abstract】** AIM: To study the protective effect of exogenous adenosine triphosphate( ATP ) on transplanted pancreas in rats and its mechanism. **METHODS:** The allogeneic male SD rat models of heterotopic whole pancreaticoduodenal transplantation were established. The isolated pancreas of rats was perfused and stored with calparine balanced solution in which ATP was added as an additive agent in ATP group. No ATP was added to calparine balanced solution in control group. The organs were stored at 0-4°C for 60 min in both groups. Blood sugar plasma concentrations of amylase and lipase were examined and histological observation was performed at 0, 1, 6 and 12 h after reperfusion. The concentration of ATP in pancreatic tissue was determined. The percentages of normal, apoptotic and oncotic cells were measured. **RESULTS:** Light microscopic observation showed that histomorphological changes of pancreas in ATP group were much milder than those in control group. The blood sugar concent, plasma concentrations of amylase and lipase were significantly lower in ATP group than those in control group at 6, 12 h after reperfusion ( blood sugar, lipase,  $P < 0.05$ ; amylase,  $P < 0.01$  ). Tissue concentration of ATP in ATP group was higher than that in control group at 0, 1 h after reperfusion(  $P < 0.01$  ). The percentage of oncotic cells was significantly lower in ATP group than that in control group at all time points after reperfusion( 0, 1, 6 h,  $P < 0.01$ ; 12 h,  $P < 0.05$  ). Tissue concentration of ATP had a significant negative correlation with the percentage of oncotic cells (  $r = -0.756$ ,  $P < 0.01$  ), but no evident correlation with the percentage of apoptotic cells. **CONCLUSION:** Exogenous ATP has a protective effect on transplanted pancreas in rats. The mechanism of the protective effect maybe lies in that ATP can decrease the percentage of oncotic cells.

**【Keywords】** pancreaticoduodenal transplantation; adenosine

收稿日期 2006-04-25; 接受日期 2006-06-09

作者简介:牛万成, 硕士生( 导师李 玺 ), 主治医师. Tel: ( 0516 )

83349045 Email: nwclym@126.com

triphosphate; apoptosis; oncosis

**【摘要】**目的:探讨外源性三磷酸腺苷(ATP)对大鼠移植胰腺的作用和机制. 方法:建立SD大鼠同种异位全胰十二指肠移植模型,供体胰腺分别用肝素平衡盐液或肝素平衡盐添加ATP液进行低温(0~4°C)灌注并保存60 min后行移植手术.检测再灌注0, 1, 6, 12 h时血糖、脂肪酶、淀粉酶含量,同时检查胰腺组织病理学变化,ATP含量及凋亡、胀亡细胞百分数.结果:ATP组胰腺组织结构损伤明显轻于对照组,ATP 6, 12 h组血糖、血清淀粉酶、脂肪酶含量明显低于同时间点对照组(血糖、脂肪酶  $P < 0.05$ , 淀粉酶  $P < 0.01$ ).ATP 0, 1 h组胰腺组织ATP含量明显高于同时间点对照组( $P < 0.01$ ),ATP组各时间点胀亡细胞百分数明显小于同时间点对照组(0, 1, 6 h,  $P < 0.01$ ; 12 h,  $P < 0.05$ ),ATP含量与胀亡细胞百分数明显负相关( $r = -0.756$ ,  $P < 0.01$ )与凋亡细胞百分数无明显相关.结论:外源性ATP对移植胰腺有保护作用,减少胰腺组织细胞胀亡的发生可能是其重要的保护机制.

**【关键词】**胰十二指肠移植;三磷酸腺苷;细胞凋亡;细胞胀亡  
【中图分类号】R657.5 【文献标识码】A

## 0 引言

提高移植植物低温保存质量,减少移植植物细胞死亡是移植成功的重要因素<sup>[1-2]</sup>.有资料显示,外源性三磷酸腺苷(ATP)能够进入低温保存的胰腺细胞内<sup>[3]</sup>.我们通过补充外源性ATP以提高移植器官内ATP的储备,研究其对胰腺组织中能量代谢以及细胞死亡方式的影响,探讨外源性ATP对移植胰腺的作用及机制.

## 1 材料和方法

**1.1 材料** 采用健康清洁级、近交系封闭群SD大鼠96只,均为雄性,体质量250~300 g,由徐州医学院实验动物中心提供.实验前1 wk受体大鼠经阴茎背静脉按55 mg/kg一次注入链脲霉素(美国Sigma公司)制备非空腹血糖>19.4 mmol/L的糖尿病模型.实验分为2组:对照组,供体胰十二指肠单纯用4°C肝素平衡盐液(150 ku/L, 15~20 mL)灌注并保存60 min后行移植手术;ATP组,供体胰十二指肠用4°C肝素平衡盐液添加ATP(5 mmol/L, 15~20 mL)进行灌注并保存60 min后行移植手术.两组按移植

后再灌注时间各分为再灌注 0, 1, 6, 12 h 亚组( 每亚组 12 只大鼠 )。

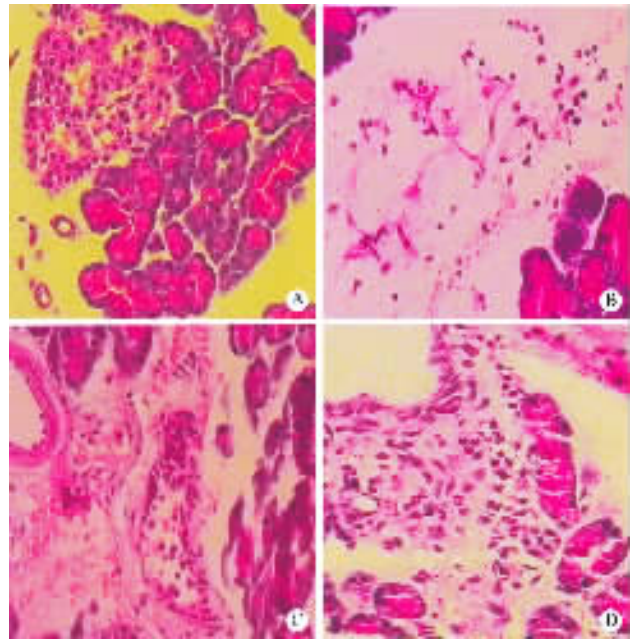
**1.2 方法** 采用全胰十二指肠移植模型, 供体胰十二指肠根据分组分别用 4℃ 肝素平衡盐液和添加了 ATP 的肝素平衡盐液灌注并保存 60 min。切除受体左肾, 将供体带腹腔动脉和肠系膜上动脉的腹主动脉段与受体腹主动脉端侧吻合, 供体门静脉与受体左肾静脉行端端吻合, 供体的十二指肠近端关闭, 远端与受体 Treitz 韧带下 2 cm 空肠作端侧吻合。分别于设计时间点经下腔静脉采血后处死动物并切取移植胰腺行各项检查。血糖测定采用美国强生血糖仪, 淀粉酶、脂肪酶测定采用日立 7600-010 型全自动生化仪。切取部分胰腺标本制成石蜡切片后行 HE 染色, 光镜下观察胰腺组织病理学改变。切取胰腺组织约 0.5 cm × 0.5 cm × 0.5 cm, 应用岛津 SCL-10AVP 高效液相色谱仪以反相高效液相色谱法测定胰腺组织 ATP 含量。取胰腺组织 1 g, 生理盐水洗净, 剪碎, 振荡后 300 目筛网过滤, 收集细胞制成细胞悬液, 调整细胞密度至  $1 \times 10^9$  个/L, 加标记有异硫氰酸荧光素的联结素 V (Annexin V-FITC, 上海晶美生物工程有限公司) 与碘化丙锭 (PI, 武汉博士德生物工程有限公司) 混匀双染色。避光冰浴 10 min, 使用流式细胞仪上机检测各类细胞百分数。结果判断: 正常活细胞不着色 (Annexin V<sup>-</sup>, PI<sup>-</sup>); 凋亡细胞能与 Annexin V, PI 结合, 呈强绿色和红色荧光 (Annexin V<sup>+</sup>, PI<sup>+</sup>); 凋亡细胞不与 PI 结合但与 Annexin V 结合, 显示绿色荧光 (Annexin V<sup>+</sup>, PI<sup>-</sup>)。

统计学处理: 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用 *t* 检验及相关分析  $P < 0.05$  为有统计学差异。

## 2 结果

**2.1 组织学变化** ATP 组再灌注 0 h 时胰腺组织光镜检查未见明显异常, 再灌注 1 h 时胰腺组织结构改变轻微, 腺泡轮廓清晰, 局部有胰腺小叶间隙增宽, 间质无炎性细胞浸润及外渗, 6 h 时胰腺组织光镜下仍可保持基本正常结构, 仅有小叶间隙水肿, 少量炎性细胞浸润 (图 1A), 12 h 时可见少量出血及炎细胞浸润, 偶见腺泡坏死 (图 1B)。对照组再灌注 0 h 时胰腺组织光镜检查未见明显异常, 1 h 时见胰腺组织结构基本完整, 可见较多炎性细胞浸润, 6, 12 h 时组织破坏明显, 腺泡坏死、出血和炎症细胞浸润严重 (图 1C、D)。

**2.2 血生化变化** 再灌注后 6 h 及 12 h ATP 组血糖、血清淀粉酶和脂肪酶含量均较对照组同时间点明显降低 (表 1)。



A: ATP 组再灌注 6 h; B: ATP 组再灌注 12 h; C: 对照组再灌注 6 h; D: 对照组再灌注 12 h。

图 1 组织学变化

表 1 移植胰腺再灌注后血糖、血清淀粉酶和脂肪酶含量变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	再灌注 (h, n=12)	血糖 (mmol/L)	淀粉酶 (nkat/L)	脂肪酶 (nkat/L)
对照	0	19.8 ± 1.7	10.4 ± 2.1	3.2 ± 0.9
	1	17.9 ± 1.5	29.8 ± 6.4	5.4 ± 1.5
	6	14.1 ± 1.6	106.5 ± 8.9	10.8 ± 2.4
	12	10.2 ± 1.4	172.0 ± 17.2	7.8 ± 1.3
ATP	0	19.7 ± 1.4	10.0 ± 2.1	3.0 ± 0.9
	1	16.1 ± 1.2	26.2 ± 7.1	4.3 ± 1.3
	6	10.6 ± 1.1 <sup>a</sup>	36.9 ± 6.6 <sup>b</sup>	5.4 ± 1.5 <sup>a</sup>
	12	6.0 ± 0.6 <sup>a</sup>	89.8 ± 9.4 <sup>b</sup>	4.0 ± 0.4 <sup>a</sup>

<sup>a</sup> $P < 0.05$ , <sup>b</sup> $P < 0.01$  vs 对照。

**2.3 胰腺组织 ATP 和各类细胞的变化** ATP 组再灌注 0, 1 h 时胰腺组织 ATP 含量较对照组明显增高 ( $P < 0.01$ ), ATP 组各时间点凋亡细胞百分数较对照组均明显降低 ( $P < 0.05$ ), ATP 含量与凋亡细胞百分数明显负相关 ( $r = -0.756$ ,  $P < 0.01$ ), 与凋亡细胞百分数无明显相关 (表 2)。

## 3 讨论

凋亡细胞与坏死细胞膜上的磷脂酰丝氨酸 (PS) 暴露于细胞膜外, 标记有 FITC 的 Annexin V 可特异结合 PS, 凋亡细胞细胞膜通透性改变, PI 可以穿

表2 大鼠移植胰腺再灌注后胰腺组织 ATP 及各类细胞的变化 ( $\bar{x} \pm s$ )

分组	再灌注 (h, n=12)	ATP ( $\mu\text{mol/g}$ )	胀亡 (%)	凋亡 (%)	正常 (%)
对照	0	3.3 ± 0.3	16.6 ± 2.4	7.2 ± 1.6	74.3 ± 6.2
	1	5.2 ± 0.4	20.3 ± 3.0	16.7 ± 2.1	62.0 ± 5.3
	6	6.2 ± 0.4	12.6 ± 2.0	21.3 ± 6.0	64.3 ± 6.9
	12	7.4 ± 0.5	4.3 ± 1.4	15.6 ± 3.3	79.1 ± 7.1
ATP	0	7.7 ± 0.4 <sup>b</sup>	3.3 ± 1.5 <sup>b</sup>	6.3 ± 2.3	89.1 ± 6.2 <sup>a</sup>
	1	8.0 ± 0.4 <sup>b</sup>	4.2 ± 1.5 <sup>b</sup>	24.3 ± 5.2 <sup>b</sup>	70.5 ± 4.5 <sup>a</sup>
	6	8.3 ± 0.6	2.5 ± 1.2 <sup>b</sup>	19.2 ± 6.8	77.5 ± 6.8 <sup>a</sup>
	12	8.3 ± 0.4	1.4 ± 0.8 <sup>a</sup>	14.6 ± 1.7	83.4 ± 7.8

\*P < 0.05, <sup>b</sup>P < 0.01 vs 对照。

过细胞膜结合在 DNA 双股螺旋链之间。以上 2 种染料对单细胞悬液进行双染色,则胀亡细胞可同时结合上述 2 种染料,凋亡细胞由于细胞膜完整,只能结合 AnnexinV-FITC,正常细胞则两种染料均不染色,据此可以应用双染色法通过流式细胞仪计算 3 种细胞百分数。本实验结果表明,再灌注后 ATP 组胰腺组织病理改变明显轻于对照组,再灌注 6, 12 h 后 ATP 组血糖、淀粉酶、脂肪酶比对照组明显降低,以上结果说明在灌注保存液中添加外源性 ATP 能够减轻移植胰腺缺血再灌注损伤。结果同时显示,ATP 组保存后胰腺组织中 ATP 水平比对照组明显升高且再灌注以后 ATP 水平恢复较对照组快;ATP 组胀亡细胞百分数明显小于对照组,ATP 水平与胀亡细胞百分数明显负相关,提示外源性 ATP 对大鼠移植胰腺的保护作用可能在于 ATP 能够减少细胞胀亡的发生。

诸多研究认为,ATP 水平影响细胞死亡方式,细胞凋亡是细胞消耗 ATP 的主动死亡,细胞胀亡是细胞缺乏 ATP 的被动死亡<sup>[4]</sup>。我们的结果表明,ATP 组保存后的胰腺组织能量状态优于移植对照组,提示 ATP 充足时组织细胞以凋亡这一主动死亡方式清除受损细胞,ATP 不足时,凋亡无法完成其程序,细胞转向胀亡。关于细胞死亡方式,尚有许多未知领域,有待更深入的研究。本实验仅提示当缺血再灌注损伤不可避免时,首先应减少缺血所引起缺氧及能量消耗这一始动因素,如在术前或术中给予能量物质暂时提高组织细胞能量储备,有利于减少细胞胀亡,减轻炎症反应,防止移植器官缺血/再灌注损伤。

## 【参考文献】

- [1] 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.
- [2] 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.
- [3] 原春辉,刘永锋,李桂臣,等. 外源性腺苷三磷酸对移植胰腺再灌注损伤保护作用的实验研究 [J]. 消化外科, 2004, 3(4): 274-277.
- [4] Hein S, Arnon E, Kostin S, et al. Progression from compensated hypertrophy to failure in the pressure overloaded human heart: Structural deterioration and compensatory mechanisms [J]. Circulation, 2003, 107(7): 984-991.

编辑 袁天峰

· 经验交流 · 文章编号 1000-2790(2006)16-1479-01

## 腰椎间盘突出症再手术 29 例

杨勇

(河南省郑州市骨科医院脊柱骨科,河南 郑州 450052)

【关键词】腰椎间盘突出症;手术并发症;再手术

【中图分类号】R687 【文献标识码】B

1 临床资料 1990/2004 共手术治疗腰椎间盘突出症 691 例,其中再手术治疗 29 例,占 4.2%,17 例来自本院,12 例来自其它医疗单位,男 17 例,女 12 例,初次手术年龄 21~64(平均 47)岁,再次手术年龄 29~70(平均 52.8)岁。两次手术间隔 0.3~21(平均 5.4)a。再次手术所行椎间盘切除的节段为 L3/4 3 例, L4/5 12 例, L5/S1 11 例,同时两节段 L4/5 及 L5/S1 3 例。采用硬膜外麻醉,取俯卧位,如为单侧病变只需行单侧椎板暴露,中央型或双侧椎间盘突出时则需行全椎板暴露,扩大开窗,椎间盘切除、神经根减压 22 例,椎间盘切除、椎

弓根钉固定及椎间植骨 7 例。从原手术部位周围正常组织处开始,仔细分离切除瘢痕组织,直至神经根无受压、松弛为止。本组 29 例均获得随访,平均随访时间 21 mo。结果:优 12 例(41.4%),良 9 例(31.0%),可 5 例(17.2%),差 1 例(3.5%),优良率 72.4%。

2 讨论 腰椎间盘突出症约 15% 患者因保守治疗无效需行手术治疗。大部分术后症状获得改善,但有一部分因疗效不佳,甚至症状加重而出现一些新问题,需要再次手术治疗<sup>[1]</sup>。如椎间隙定位错误,神经根粘连及硬膜囊周围纤维瘢痕形成。椎间盘切除术后再次突出,神经根减压不彻底,术后腰椎节段性不稳及术后椎间隙感染等。因此,要想得到腰椎间盘突出症好的手术效果,必须根据患者的临床症状和体征,结合必要的影像学检查,得出正确的诊断,包括明确突出的椎间隙、部位、大小及突出的类型,是否符合腰椎管狭窄和神经根管狭窄等,针对每 1 例患者的具体情况,制定手术方案,做到术者心中有数,才能取得好的效果。

## 【参考文献】

- [1] 靳安民,姚伟涛,张辉. 腰椎间盘突出症术后疗效不佳的原因分析及对策 [J]. 中华骨科杂志, 2003, 11: 657-660.

编辑 潘伯荣

收稿日期 2005-03-31; 接受日期 2005-05-17

作者简介 杨勇,主治医师。Tel: (0371) 67448275 Email: yangyong8798368@126.com