

## 硝普钠灌注对移植小肠粘膜细胞凋亡的影响 \*

陈桂明<sup>1</sup> 尹路<sup>2△</sup> 周光文<sup>1</sup> 施敏敏<sup>2</sup> 颜召文<sup>3</sup>

(1 上海交通大学附属第一人民医院普外科 上海 200080 2 上海交通大学附属瑞金医院消化外科研究所 上海 200025 ;

3 上海交通大学医学院病理科 上海 200025)

**摘要** 目的 探讨外源性一氧化氮(nitric oxide, NO)供体硝普钠(sodium nitroprusside, SNP)对移植小肠粘膜细胞凋亡的影响。方法 64只 220~300g 雄性 SD 大鼠随机分成 3 组 :A1 组(n=8) ,仅行剖腹关腹手术 ;A2 组(n=12) :12 对大鼠随机作为供受体行同种异体节段小肠移植 ,无 SNP 干预 ;A3 组(n=16) :16 对大鼠随机作为供受体行同种异体节段小肠移植 ,SNP 加入灌注液进行供肠灌注。采用前述 3 组动物模型再灌注 5 小时肠造口标本 ,TUNEL 法检测小肠蜡块标本的细胞凋亡情况。结果 :与 A1 组(3.86±4.74%)相比 ,A2(22.44±10.94%)、A3 组(17.12±8.44%)小肠粘膜的细胞凋亡指数均有显著增高(P<0.05) A3 组较 A2 组细胞凋亡指数显著降低(P<0.05)。结论 小肠移植导致小肠粘膜细胞凋亡增加 ,外源性 NO 供体 SNP 灌注能够显著降低植入小肠的细胞凋亡 ,从而可能减弱粘膜屏障的损伤。

**关键词** 小肠移植 粘膜屏障 细胞凋亡 硝普钠

中图分类号 :R656 文献标识码 :A 文章编号 :1673-6273(2011)11-2011-03

## Effects of Sodium Nitroprusside on Mucosal Epithelium Apoptosis in Rats after Small Bowel Transplantation\*

CHEN Gui-ming<sup>1</sup>, YIN Lu<sup>2△</sup>, ZHOU Guang-wen<sup>1</sup>, SHI Min-min<sup>2</sup>, YAN Zhao-wen<sup>3</sup>

(1 Department of General Surgery, Jiao Tong University Affiliated First People's Hospital, Shanghai, 200080, China;

2 Institute of Digestive Surgery, Ruijin Hospital, Shanghai Jiao Tong University Medical college, Shanghai 200025, China;

3 Department of Pathology, Shanghai Jiao Tong University Medical college, Shanghai 200025, China)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of sodium nitroprusside (SNP) treatment on mucosal epithelium apoptosis of the transplanted intestine in rat. **Methods:** Sixty-four male Sprague-Dawley (SD) rats weighing 220~300g were randomly divided into three groups. Group A1 (n=8): only performed laparotomy. Group A2 (n=12): 24 rats were randomly assigned to be donor or recipient to establish small bowel transplantation (SBT) model, but no SNP treatment. Group A3 (n=16), 32 rats were randomly assigned to be donor or recipient to establish SBT model, flushed with SNP when harvesting the graft. Harvested intestine samples from stoma 5h after reperfusion. Detected apoptosis of transplanted intestine by TUNEL method. **Results:** There is higher apoptosis index of mucosal epithelial cells of transplanted intestine in group A2(22.44±10.94%) and A3(17.12±8.44%) than that in A1(3.86±4.74%) (P<0.05). Fewer cells apoptosis was found in group A3 (SNP flushed group) compared with A2. **Conclusion:** SNP used as a flushing solution element may attenuate the mucosal barrier injury of transplanted intestine by depressing the mucosal cells apoptosis significantly.

**Key words:** Small bowel transplantation; Mucosal barrier; Apoptosis; Sodium nitroprusside

**Chinese Library Classification(CLC):** R656 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2011)11-2011-03

小肠移植后植入肠的粘膜上皮细胞大量凋亡是导致小肠粘膜损伤的重要机制之一 ,后者与移植后细菌异位有着密切的相关性 ,通过研究外源性 NO 干预后植入肠细胞凋亡变化 ,可以推断外源性 NO 是否能够降低小肠对移植后粘膜损伤与细菌感染的易感性。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

选用 220~300 g 的健康雌性 SD 大鼠作为实验动物(购自

上海松江松联实验动物中心) ,清洁级 ,共 64 只 ,饲养于通风保温(18~25℃)的饲养室内 ,适应 1 周后开始用于实验。

### 1.2 主要试剂

原位细胞凋亡检测试剂盒 II ,AP、Bcl-2 I 抗、SABC (兔 IgG)-POD 试剂盒 购自武汉博士德生物工程有限公司。硝普钠粉剂(50mg/支) 购自北京双鹤现代医药技术有限责任公司(灌注用 4℃乳酸林格硝普钠液 ,临时配制成 0.015% ,避光 ,用于 A3 组获取供肠灌注 ;4℃乳酸林格液用于 A1、A2 组获取小肠灌注)。

\* 基金项目 国家自然科学基金资助项目(30671972)

作者简介 陈桂明(1969-) ,男 ,博士 ,主治医师 ,研究方向 :胃肠外科基础与临床。

电话 :13817512688 E-mail: chengm2010@sohu.com

△ 通讯作者 尹路 E-mail: abcde10308464@sohu.com

(收稿日期 2011-03-05 接受日期 2011-03-28)

1.3 实验设计与分组

参照国外资料<sup>[1]</sup>,冷缺血时间设定为 3h,再灌注时间设定为 5h,以保证足够长的缺血再灌注时间导致供肠受损,同时尚不足以开始修复。64 只 SD 大鼠随机分组如下:

A1 组(n=8):仅行剖腹手术,术中湿生理盐水纱布覆盖切口减少水分蒸发,3h 后关腹,术后 5h 处死获取上段小肠标本进一步实验;

A2 组(n=12):12 对大鼠随机作为供受体行同种异体节段小肠移植,供肠冷缺血时间 3h,然后进行小肠移植,开放血流 5 小时后获取标本。术中无 SNP 干预;

A3 组(n=16):16 对大鼠随机作为供受体行同种异体节段小肠移植,SNP 加入灌注液进行供肠灌注,供肠冷缺血时间 3h,然后进行小肠移植,开放血流 5 小时后获取标本。

1.4 大鼠移植模型的建立

原位小肠灌注,获取供体近段小肠约 20 cm,灌洗后利用 Cuff 套管将供肠门静脉与受体大鼠的左肾静脉进行套扎(受体左肾切除),将带有腹主动脉片的供肠肠系膜上动脉与受体腹主动脉端侧吻合。供肠近端封闭,远端造口。

1.5 TUNEL 法凋亡细胞检测

在细胞凋亡过程中因内源性内切酶的激活,使细胞本身的染色质或 DNA 被切割,并产生与 DNA 断点数目相同的 3'-羟基末端。末端脱氧核糖核苷酸转移酶(Terminal deoxynucleotidyl transferase,TdT)能在游离的 DNA 3'-羟基末端缺口连接上标

记的核苷酸,利用亲和素-生物素-酶放大系统,在 DNA 断裂处显色,从而指示凋亡细胞。正常细胞无 DNA 断裂,故不显色。细胞核中有深蓝颗粒者为阳性细胞。

实验组受体大鼠血管吻合开放后 5h,自小肠造口获取部分植入肠标本(A1 组取上段肠标本),采用 TUNEL 法检测肠粘膜细胞凋亡情况。每张切片在高倍镜( $\times 400$ )下随机选取 5 个视野,计数凋亡细胞总数和总的细胞数。凋亡指数=每一高倍视野中凋亡细胞数目/每一高倍视野中总的细胞数 $\times 100\%$ 。以 5 个视野的均值代表该实验大鼠植入小肠的凋亡指数。

1.6 统计学处理

计数资料以平均值 标准差表示,进行单向方差分析(SPSS13.0 统计软件)。P<0.05 认为有显著性差异。

2 结果

2.1 小肠粘膜凋亡细胞的染色情况

各组大鼠肠标本检测显示,粘膜上皮、腺上皮细胞均有凋亡现象。凋亡细胞以 DAB 标记,为棕褐色或棕黄色,染色位于胞核。各组凋亡染色情况见图 1。

2.2 各组小肠粘膜细胞凋亡指数的统计比较

A1、A2、A3 组粘膜细胞的凋亡指数分别为  $3.86\pm 4.74\%$ 、 $22.44\pm 10.94\%$ 、 $17.12\pm 8.44\%$ 。三组凋亡指数两两比较均有显著性差异(P<0.05)。各组凋亡指数统计比较见图 2 凋亡指数柱形图。

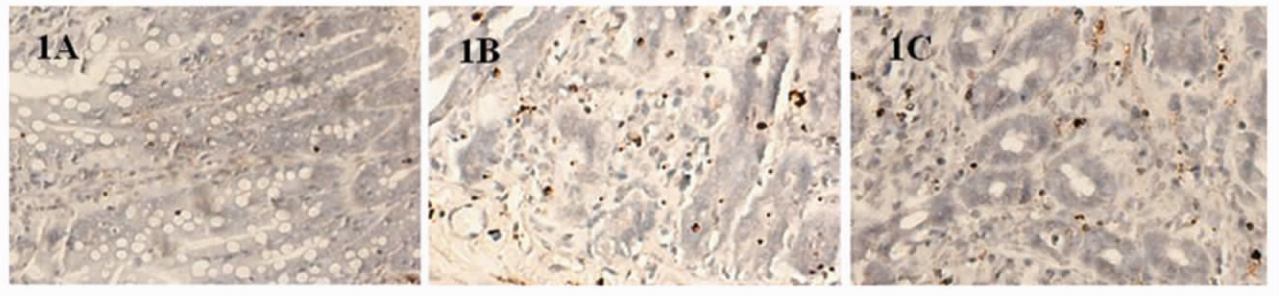


图 1 各组小肠粘膜细胞凋亡染色情况(TUNNEL 法)( $\times 400$ )

(A. A1 组术后 5h 植入肠粘膜细胞可见最少凋亡小体; B. A2 组再灌注 5h 植入肠粘膜细胞可见最多量凋亡小体; C. A3 组再灌注后 5h 植入肠粘膜细胞可见较少凋亡小体)

Fig.1 Apoptotic bodies in intestinal mucosa of the three groups(TUNNEL) ( $\times 400$ )

A. Group A1: apoptotic bodies in the intestinal mucosa of 5h after operation, showing the smallest number of apoptotic bodies in three groups.  
B:Group A2: apoptotic bodies in the intestinal mucosa of graft in 5h after reperfusion, showing the largest number of apoptotic bodies in three groups.  
C. Group A3: apoptotic bodies in the intestinal mucosa of graft in 5h after reperfusion, showing the smaller number of apoptotic bodies than in group A2

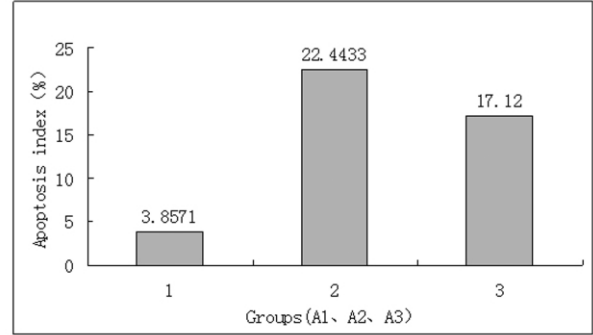


图 2 各组凋亡指数柱形图:A1、A2、A3 组凋亡指数有显著差异(P<0.05)

Fig 2 Column diagram demonstration of the comparison of Apoptosis index of three groups: significantly difference in three groups(P<0.05)

3 讨论

小肠移植在技术上并不比其他器官移植困难,却一直面临着术后移植存活率低、受体生存期短的结局。小肠移植容易失败的一个重要原因就是小肠对缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, I/R)有着特殊易感性<sup>[2]</sup>。通常情况下,小肠粘膜细胞的增生和死亡表现为一个平衡状态。近几年越来越多的文献资料显示,异常凋亡是导致胃肠道 I/R 损伤期间粘膜细胞死亡的主要方式<sup>[3-5]</sup>。本实验把外源性 NO 作为干预因素,通过检测植入小肠粘膜细胞的凋亡情况,探讨 SNP 灌注抑制移植小肠粘膜细胞异常凋亡的可行性,为小肠移植的移植后保护提供新的思路和实验依据。

细胞凋亡是由基因调控的细胞主动死亡过程,与细胞坏死不同,通常是细胞的生理性死亡方式。其凋亡的形态学和生物化学变化主要包括细胞膜肿胀、细胞萎缩、蛋白断裂、染色质浓缩和 DNA 降解等。最后死亡细胞被吞噬。凋亡在生物学上是由肿瘤坏死因子受体家族如 Fas(Apo-1/CD95)、TNFR1 和 TRAIL 受体等与配体结合而诱导启动的。受体与配体的结合促使细胞内的接头分子如 Fas 相关死亡域蛋白(Fas-associated with death domain protein, FADD) 和死亡区肿瘤坏死因子受体-1 相关蛋白(TNF receptor 1 associated via death domain, TRADD) 形成死亡诱导信号复合体,活化 Caspase。激活的 Caspase 又可以活化下游的凋亡信号通路,最终导致蛋白底物裂解、染色质凝聚,并促进凋亡小体形成。细胞凋亡在维持机体自身稳定方面具有重要作用,如果细胞凋亡严重失衡使凋亡数量异常增加,对机体具有破坏性影响,凋亡不足则可导致自身免疫性疾病和肿瘤的发生。近年来,人们对细胞凋亡机制的研究不断深入,发现小分子化合物也参与了凋亡的生物调控,NO 就是其中重要的小分子化合物之一。

研究发现,NO 对细胞凋亡的调控具有双重性,特定情况下可以表现为促进凋亡,而有些情况下则抑制凋亡的发生。这种调控复杂性的机制并没有完全明了。持续长久的 NO 产生可通过活化 Caspase 蛋白酶家族,引起细胞色素 C 释放入胞浆、p53 表达上调、应激活化蛋白激酶/氨基末端激酶(SAPK/JNK)活化和凋亡相关蛋白(如 bcl-2)表达改变,从而充当促凋亡的调控剂。然而,短暂 NO 水平升高、生理水平或更低水平的 NO 却可以促进细胞抵抗某些诱导凋亡的因素(如 Fas、TNF- $\alpha$  及 LPS 等)的作用。抗凋亡的机制主要是由于热休克蛋白(heat shock protein, HSP)和 bcl-2 等保护性基因的表达以及由于巯基半胱氨酸的 S-亚硝基化所产生的对 Caspase 的直接抑制。同时,NO 是促进还是抑制凋亡还与细胞类型、模型制作以及复杂的其他情况有关。我们的实验发现小剂量外源性 NO 对小肠粘膜的细胞凋亡表现为抑制作用。

NO 作为一种氧化剂,会导致细胞的抗氧化能力显著降低,产生细胞内氧化或亚硝基化应激,这种应激能够诱导产生热休克蛋白 HSP32 和 HSP70 的表达上调。HSP 是重要的凋亡抑制蛋白,其表达上升抑制凋亡的分子机制有两种可能的途径:(1)直接抑制 Caspase 家族蛋白酶的活性而阻滞了凋亡信号的传导通路;(2)线粒体释放的细胞色素 C,是激活 Caspase 家族酶原的关键因子之一。HSP 调控线粒体的功能和线粒体膜的通透性,阻滞细胞色素 C 的释放,从而延缓细胞的凋亡<sup>[6]</sup>。

小肠移植过程中,小肠上皮细胞的坏死与凋亡可以破坏粘膜细胞层而增加其渗透性和增加细菌异位的发生率,使移植肠的生存力受到严重影响,这也是临床小肠移植一直面对的困难<sup>[7,8]</sup>。细胞凋亡在移植后的细菌异位中起到更重要的作用,抑制细胞凋亡比抑制细胞坏死更能降低移植后的细菌异位发生率<sup>[1]</sup>。

本实验中利用 SNP 进行供肠灌注(A2)制作外源性 NO 干预的大鼠小肠移植模型,通过与无移植组及无 NO 干预移植组的对比分析发现,小肠移植能够显著增加细胞凋亡,而 SNP 灌注能够使植入肠粘膜细胞凋亡有所减少。由此可以推测,外源性 NO 灌注能够减少植入肠粘膜上皮细胞的异常凋亡数量,保护植入肠的粘膜结构完整,对小肠移植的结局可能会带来有益的影响。

#### 参考文献(references)

- [1] Daniel A, Anna S, Georgina H, et al. Apoptosis inhibition plays a greater role than necrosis inhibition in decreasing bacterial translocation in experimental intestinal transplantation [J]. Surgery, 2005, 137 (1):85-91
- [2] Pontell L, Sharma P, Rivera LR, et al. Damaging effects of ischemia/reperfusion on intestinal muscle [J]. Cell Tissue Res, 2011, 343(2): 411-419
- [3] Grootjans J, Hodin CM, Haan JJ, et al. Level of activation of the unfolded protein response correlates with Paneth cell apoptosis in human small intestine exposed to ischemia/reperfusion [J]. Gastroenterology, 2011, 140(2):529-539
- [4] Liu KX, Chen SQ, Huang WQ, et al. Propofol pretreatment reduces ceramide production and attenuates intestinal mucosal apoptosis induced by intestinal ischemia/reperfusion in rats [J]. Anesth Analg, 2008,107(6): 1884-891
- [5] Ikeda H, Suzuki Y, Suzuki M, et al. Apoptosis is a major mode of cell death caused by ischemia and ischemia/reperfusion injury to the rat intestinal epithelium[J]. Gut, 1998, 42(4): 530-537
- [6] Kim YM, Kim TH, Seol DW, et al. Nitric oxide suppression of apoptosis occurs in association with an inhibition of Bcl-2 cleavage and cytochrome C release[J]. J Biol Chem, 1998, 273(47): 31437-31441
- [7] Kong SE, Blennerhassett LR, Heel KA, et al. Ischaemia-reperfusion injury to the intestine[J]. Aust NZ J Surg, 1998, 68(8): 554-561
- [8] Cicalese L, Sileri P, Green M, et al. Bacterial translocation in clinical intestinal transplantation [J]. Transplantation, 2001, 71 (10): 1414-1417