论著

文章编号:1000-5404(2011)12-1216-04

参附注射液改善大鼠肝移植缺血再灌注后 Kupffer 细胞的激活

柴跃龙,龚建平,涂 兵 (400010 重庆,重庆医科大学附属第二医院肝胆外科)

【摘要】 **目的** 观察参附(Shenfu,SF)注射液预处理对大鼠肝移植缺血再灌注后 Kupffer 细胞中糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor,GR)、核转录因子 κB(NF-κB)表达的影响,探讨参附预处理保护缺血再灌注损害(ischemia reperfusion injury,IRI)的机制。**方法** 将雄性 SD 大鼠按完全随机分组法分为正常对照组、缺血再灌注组和 SF 组,其中缺血再灌注组、SF 组建立肝移植缺血再灌注模型,于缺血再灌注后 6 h 分离培养受体移植肝脏的 Kupffer 细胞。通过 RT-PCR、Western blot 和激光共聚焦显微镜技术、免疫荧光法、ELISA 等实验技术检测 Kupffer 细胞 GR 的 mRNA 和蛋白表达、NF-κB 的蛋白表达、培养上清中 TNF-α 的含量。**结果** 缺血再灌注组 Kupffer 细胞 GR mRNA 和蛋白表达均明显低于正常对照组($P<0.01$),缺血再灌注组 NF-κB、培养上清 TNF-α 表达量(830.19±71.34)明显高于正常对照组 NF-κB、培养上清 TNF-α 表达量(65.41±37.63,$P<0.01$)。与缺血再灌注组相比,SF 组 GR 水平明显上升($P<0.01$),NF-κB 活性、TNF-α 表达量(543.59±41.27)明显下降($P<0.01$)。**结论** 缺血再灌注损伤会导致 Kupffer 细胞 GR 的表达下调,NF-κB 的激活;参附预处理可以改善肝移植缺血再灌注后 Kupffer 细胞的激活。

【关键词】 Kupffer 细胞;肝移植;再灌注损伤;参附注射液;糖皮质激素受体;核因子-κB;大鼠
【中图法分类号】 R285.5;R575.05;R363.27 【文献标志码】 A

Pretreatment of Ginseng and Prepared Aconite Injection improves activation of Kupffer cells in rats after ischemia/reperfusion injury due to liver transplantation

Chai Yuelong, Gong Jianping, Tu Bing (Department of Hepatobiliary Surgery, Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing, 400010, China)

【**Abstract**】 **Objective** To observe the effect of pretreatment with Ginseng and Prepared Aconite Injection on expressions of glucocorticoid receptor (GR) and nuclear factor kappa B (NF-κB) in Kupfer cells (KCs) of rats after ischemia/reperfusion (I/R) injury due to liver transplantation. **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into control group, I/R group, and Ginseng and Prepared Aconite Injection group. An liver transplantation I/R injury model was established in 2 later groups. The injection at 2 ml/100 g was given by tail vein to the donors of the Injection group 1 h before operation. Six hours after I/R injury, KCs were isolated from cultured blood of liver transplantation recipients. Expressions of GR mRNA and protein as well as NF-κB in KCs were detected, and TNF-α level in supernatant was measured by RT-PCR, Western blotting, laser confocal microscopy and ELISA, respectively. **Results** The expression level of GR mRNA and protein in KCs was significantly lower, while the expression level of NF-κB in KCs and the TNF-α level in supernatant were significantly higher in I/R group than in control group (TNF-α level: 830.19±71.34 *vs* 65.41±37.63, $P<0.01$). The GR expression level, NF-κB activity, and TNF-α level in supernatant were significantly lower in Ginseng and Prepared Aconite Injection group than in I/R group (TNF-α level: 543.59±41.27 *vs* 830.19±71.34, $P<0.01$). **Conclusion** I/R injury can down-regulate the expression of GR and the activation of NF-κB in KCs. Pretreatment with Ginseng and Prepared Aconite Injection can improve the activation of KC after I/R injury due to liver transplantation.

【**Key words**】 Kupffer cell; liver transplantation; reperfusion injury; Ginseng and Prepared Aconite Injection; glucocorticoid receptor; nuclear factor kappa B; rats

Supported by the National Natural Science Foundation of China(30772098). Corresponding author: Tu Bing, E-mail: bing_tu@yahoo.com

【基金项目】 国家自然科学基金(30772098)
【通信作者】 涂 兵,E-mail:bing_tu@yahoo.com

肝移植是治疗终末期肝病的重要技术,可以使晚期肝病患者重获生机。但是肝移植术后的再灌注损伤可导致各种并发症,严重影响患者的预后[1]。供体肝植入受体前处在缺血缺氧期,类似于器官缺血休克期。再灌注时供体肝脏Kupffer细胞的激活,其自由基的大量产生和细胞内钙超载等都可能是肝移植缺血再灌注的发病环节。缺血再灌注可能创造了一种炎症环境,而相应的抗炎机制的减弱也加重了炎症效应。近年来研究[2-3]表明,休克性肝脏的糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)数目减少,同时伴有靶细胞对糖皮质激素反应性降低,而参附注射液可以增强失血性大鼠GR功能而起到抗休克作用。关于GR的变化是否也参与了肝移植的缺血再灌注损伤,以及参附是否同样对大鼠肝移植缺血再灌注GR有作用尚有待进一步研究。本研究采用大鼠原位肝移植模型,模拟供肝缺血再灌注损伤,观察GR以及核转录因子κB(NF-κB)在Kupffer细胞中的表达变化,探讨参附在大鼠肝移植缺血再灌注损伤中的作用。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物 雄性Sprague Dawley大鼠30只,鼠龄3个月余,体质量180~220 g,由重庆医科大学实验动物中心提供。

1.1.2 主要试剂 GR抗体(兔多克隆抗体)购自Abcam公司,Trizol Reagent(15596-026)购自美国Invitrogen公司,RT-PCR试剂盒购自Cwbio公司,大鼠核因子-κB抗体(NF-κB的兔多克隆抗体)购自Santa Cruz公司,免疫组化试剂盒、免疫荧光二抗购自康为世纪公司,TNF-α ELISA测定试剂盒均购于美国Active Motif公司。

1.1.3 药物 参附注射液(SF)由雅安三九药业有限公司提供。

1.2 缺血再灌注模型制备和实验分组

大鼠原位肝移植模型采用Kamada's袖套法改良技术,术前12 h禁食但不禁饮。采用原位灌注切取术,经门静脉灌注0~4 ℃生理盐水20 ml(含肝素100 U),肝脏中心温度为0~4 ℃。①供体手术:乙醚吸入麻醉,游离门静脉和肝上下腔静脉,结扎肝动脉,完成胆管内支架插管,灌洗供肝后,连同上述血管一起切取供肝。在水浴中完成门静脉、肝下下腔静脉袖套准备。②受体手术:切除原肝,原位植入供肝,用7-0带线缝合线两点法端端吻合供肝、受体的膈肌腔静脉环,肝下下腔静脉采用袖套法吻合(内径0.3 cm的聚乙烯管),门静脉重建采用套管法(0.2 cm长的聚乙烯管),胆总管重建采用插管法(0.5 cm长的硬膜外导管)。供肝的冷缺血时间60 min,无肝期为(19.11±2.71)min。

分组:①对照组($n=6$),取健康大鼠Kupffer细胞为实验对象;②SF组,供受体各6只,供体于术前1 h经尾静脉注射参附注射液(2 ml/100 g),取受体($n=6$)再灌注后6 h的Kupffer细胞为实验对象。③缺血再灌注(I/R)组,供受体各6只,以同等量的生理盐水于术前1 h经尾静脉注射处理供体,取受体($n=6$)再灌注后6 h的Kupffer细胞为实验对象。

1.3 实验方法

1.3.1 Kupffer细胞的分离和培养 Kupffer细胞的分离培养按照文献[4]方法加以改动,大鼠从下腔静脉抽血后,剪断下腔静脉,门静脉穿刺,肝脏原位灌注PBS及0.05% Ⅳ型胶原酶,取下肝脏用显微镊划碎肝脏,0.05% Ⅳ型胶原酶进一步消化约40 min,加入20 ml RPMI1640制成混合细胞悬液,于4 ℃、50×g离心3 min后将肝实质细胞与非实质细胞分开。将含非实质细胞的细胞悬液,4 ℃、300×g离心5 min后弃上清液,采用Percoll原液9份和浓PBS(10倍浓度)1份混合配成等渗的Percoll(SIP),把混有非实质细胞的RPMI1640细胞悬液加到25%∶50% SIP梯度的Percoll液上,4 ℃、500×g离心15 min,25%与50% SIP液之间为Kupffer细胞悬液。收集Kupffer细胞悬液,用RPMI1640洗涤3次,加入含10%胎牛血清的DMEM培养基,接种于培养板。1 h后,洗去非贴壁细胞,再次培养4 h后,检测细胞蛋白及RNA及细胞上清液TNF-α。

1.3.2 Kupffer细胞的鉴定 用对照组Kupffer细胞进行吞噬法鉴定,培养于6孔板的Kupffer细胞,加入1/1 000浓度碳素墨汁,光学显微镜下观察Kupffer细胞的细胞形态,是否有巨噬细胞吞噬功能。

1.3.3 Kupffer细胞的GR mRNA检测 采用Trizol试剂盒提取Kupffer细胞总RNA,具体方法按试剂盒说明,以2 μg RNA产物进行逆转录反应,产物-70 ℃保存。GR引物序列:上游5′-AGCAGAGAATGTCTCTAC-3′,下游5′-GGAATTCAATACTCATGGTC-3′(扩增产物376 bp)。β-actin内参:上游5′-TTGTCACCAACTGGGACGATAGG-3′,下游5′-GATCTTGATCTTCATGGTGCTAGG-3′(扩增产物764 bp)。按RT-PCR试剂盒操作说明进行RT-PCR。程序设定为:94 ℃ 5 min DNA变性,55 ℃ 1 min退火,70 ℃ 1 min延伸,30个循环,70 ℃延长7 min。电泳并凝胶成像,图像分析并半定量计算PCR产物的相对表达量,结果以各组目的基因与β-actin mRNA比值表示。

1.3.4 Kupffer细胞的GR蛋白Western blot检测 每孔15 μl样品,12%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转至PVDF膜,在5%牛血清白蛋白的TBS缓冲液中封闭1 h,加入兔抗GR多克隆抗体(1∶250),于37 ℃摇床上平缓摇动2 h,加入以1∶1 000的HRP标记的羊抗兔IgG,于37 ℃摇床上平缓摇动2 h,DAB显色约5 min后,利用GeneGnome凝胶成像分析系统进行成像和图形分析,测出各蛋白条带灰度值,与β-actin灰度值的比值作为蛋白相对表达量,定量分析GR蛋白表达。

1.3.5 免疫荧光间接法检测Kupffer细胞的GR和NF-κB蛋白表达 甲醛固定,Trution穿透,羊血清封闭,一抗4 ℃过夜。GR蛋白用荧光二抗(RBITC标记)显示,50%甘油封片,激光共聚焦扫描显微镜扫描成像。Kupffer细胞NF-κB蛋白加HRP标记的二抗,DAB显色,细胞板镜下检测。图像结果用专业Image-Pro软件分析。

1.3.6 细胞培养上清液TNF-α检测 具体步骤参照试剂盒(美国Active Motif公司)说明书进行。

1.4 统计学分析

采用SPSS 10.0统计软件分析,计量资料以$\bar{x}\pm s$表示,组间两两比较行独立样本t检验。

2 结果

2.1 Kupffer细胞形态观察和吞噬功能鉴定

Kupffer细胞随时间变化形态结构也发生变化。新分离的Kupffer细胞悬浮于培养液中，类圆形，细胞形状不一。37 ℃恒温室培养1 h，细胞即可完全贴壁、伸展，体积增大，外形不规则。镜下持续观察1 h，可见黏附细胞的胞质内吞噬大量碳素墨汁颗粒，证明所养细胞为具有吞噬功能的Kupffer细胞。见图1。

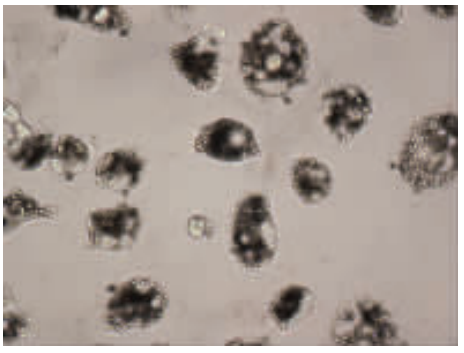
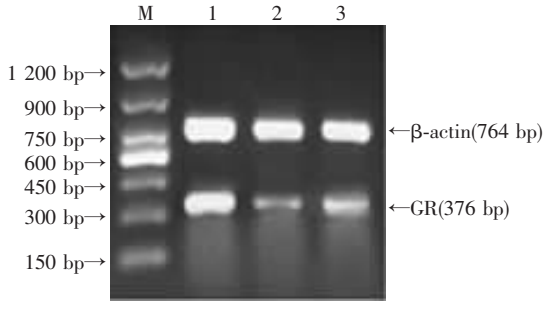


图1 Kupffer细胞的吞噬实验（×400）

2.2 Kupffer细胞的GR表达分析

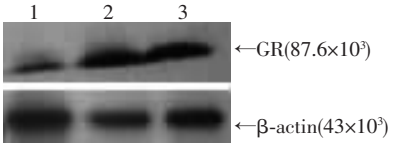
2.2.1 RT-PCR检测GR mRNA的表达 对照组Kupffer细胞中有高水平的GR mRNA（1.72±0.07）表达，I/R组细胞GR mRNA含量明显降低（0.63±0.02），SF组GR mRNA（1.38±0.04）较I/R组明显上升（$P<0.01$，图2）。



M：标准；1：对照组；2：I/R组；3：SF组

图2 RT-PCR检测各组Kupffer细胞中GR mRNA的表达

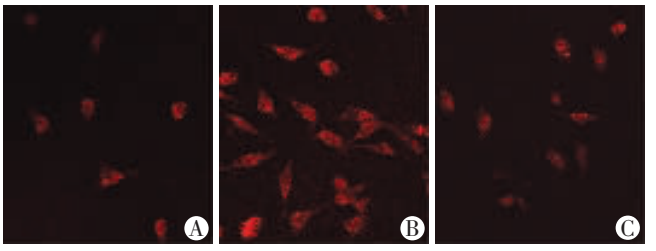
2.2.2 GR蛋白在各组Kupffer细胞的表达 I/R组细胞GR蛋白相对表达量为（0.43±0.03），对照组GR蛋白相对表达量（1.15±0.07）和SF组GR蛋白相对表达量（1.01±0.09）明显高于I/R组，差异具有统计学意义（$P<0.01$，图3）。



1：I/R组；2：对照组；3：SF组

图3 Western blot检测各组Kupffer细胞中GR蛋白表达

2.2.3 GR蛋白在各组Kupffer细胞中的分布 经免疫细胞荧光检测，激光共聚焦显像提示GR蛋白在各组Kupffer细胞内有表达，图像分析阳性区域显示，I/R组（图4A）细胞内GR分布含量少，细胞核与细胞质的GR代表亮度同时降低，细胞平均荧光强度为79.35；对照组（平均值为110.42，图4B）和SF组（平均值为102.94，图4C）与I/R组相比，细胞中GR增加，差异有统计学意义（$P<0.01$）。

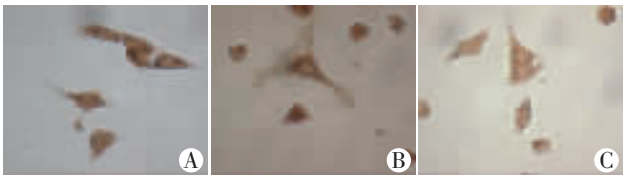


A：I/R组；B：对照组；C：SF组

图4 各组Kupffer细胞内GR免疫荧光染色观察 （×400）

2.3 Kupffer细胞中NF-κB的表达/活性的变化

经免疫组织化学检测和图像分析软件分析，在对照组和SF组NF-κB主要表达于细胞质，光密度值分别为（37.46±5.45）和（59.47±4.55）；在I/R组NF-κB表达为（88.93±7.32），且部分细胞出现了核转位，核内NF-κB蛋白表达增多。SF组较I/R组NF-κB表达/活性明显降低，差异有统计学意义（$P<0.01$，图5）。



A：对照组；B：I/R组；C：SF组

图5 各组Kupffer细胞中NF-κB免疫组化染色观察 （SABC ×400）

2.4 细胞培养液中TNF-α的水平

I/R组TNF-α含量（830.19±71.34）较对照组（65.41±37.63）显著增加（$P<0.01$），SF组TNF-α含量（543.59±41.27）较I/R组明显下调（$P<0.01$）。

3 讨论

近年来在对肝移植缺血再灌注损伤（IRI）发生、发展的研究中，学者们发现以下几种主要机制都与Kupffer细胞密切相关：①细胞级联反应机制。大量证据[5]证明Kupffer细胞、中性白细胞与内皮细胞相互作用从而激活核转录因子-κB以及下游大量炎性细胞因子如TNF-α等，这个过程在缺血再灌注损伤的发病机制中起重要作用。NF-κB是调控多种炎性介质基因表达的枢纽，这些炎性因子形成“瀑布式的反应”，将引起炎症反应的放大乃至组织损伤。②氧自由基。Kupffer细胞以及黏附的中性白细胞是肝移植缺血再灌注的氧自由基的主要来源[6]。氧自由基可经其中间代谢产物不断生成新的自由基，引起内皮细胞损伤并导致微血管完整性的缺失和微循环紊乱。③钙超载。缺血再灌注初期Ca^{2+}通透性增加，大量流入胞内引起钙超载除了引起肝组织实质细胞坏死、凋亡，同时

也促进 Kupffer 细胞活化，激活 NF-κB，进一步加重缺血再灌注损伤[7]。

虽然肝移植 IRI 发生、发展比较复杂，但是过度炎症被证实是导致 IRI 最主要的原因。Kupffer 细胞作为寄居在肝血窦的特殊巨噬细胞，它通过大量释放细胞因子 TNF-α 和其他细胞因子在炎症中起到关键作用[8]。而 Kupffer 细胞的活化和 NF-κB 的激活紧密相关。有研究[9]发现，抑制 Kupffer 细胞中的 NF-κB 基因可以起到对 IRI 的保护作用。

参附注射液（SF）其有效成分为人参皂苷和乌头类生物碱。近年一些研究表明 SF 具体有抗炎、能明显减轻缺血性损伤对肝脏结构和功能上的破坏，提高机体耐受缺血再灌注损伤的能力。参附注射液也可通过保护肝窦内皮细胞，降低 TXA_2/PGI_2 比值及减轻肝窦内炎性反应，改善肝脏微循环灌注。研究[10]证实参附注射液可以抑制肝缺血再灌注中 NF-κB 的活化。我们先前研究[11]也发现参附注射液保护大鼠肝移植缺血再灌注损伤，但具体机制不清楚。究竟参附注射液如何抑制 NF-κB 的激活？本研究发现参附注射液可以上调 Kupffer 细胞中的 GR 蛋白以及抑制 NF-κB 激活。

GR 是细胞内的一种可溶性蛋白，属核受体超家族的重要成员，也是一种典型的激素依赖性转录调节因子。GR 与激素结合后通过和靶基因中的糖皮质激素反应元件相互作用，调节靶基因表达，引起各种生物学效应。研究[12]发现，GR 的变化与病情的严重程度有关，GR 表达下调越明显，器官衰竭越多，病情越重，致病死率增加。以往研究[13]提出，糖皮质激素（glucoeorticoid，GC）与其受体 GR 的复合物是机体内部最重要的抗炎机制，GR 减少是体内抗炎机制减弱的主要原因，它与 SIRS 的发生密切相关。

本研究在 SD 大鼠原位肝移植 IRI 模型上研究 GR 蛋白和 mRNA 的表达变化，更能贴近实际临床肝移植模型。本实验是在前期预实验[11]基础上，选取适宜的 SF 注射剂量为 2 ml/100 g，采用在大鼠原位肝移植模型上，用 Western blot 和细胞免疫化学检测 Kupffer 细胞 GR 蛋白的表达分布情况，结果显示，缺血再灌注损伤刺激后，Kupffer 细胞内可能出现 GR 的合成减少或者消耗增加，SF 注射液处理后提取的 Kupffer 细胞，其 GR 水平较 IR 组明显上调。GR 蛋白含量的增加与 mRNA 上调一致，表明 SF 处理后 Kupffer 细胞内 GR 蛋白明显高于 IR 组，可能是新合成的 GR 补充。细胞免疫组化分析细胞内的 NF-κB 的表达和分布，IR 组 NF-κB 的表达明显增加，意味着下游炎症因子的激活和抗炎机制的减弱。而 SF 组 NF-κB 的表达较 IR 组明显下调，提示 SF 可能是抑制了调控多种炎症介质的靶点 NF-κB 的活化。细胞培养液中 TNF-α 的含量在 3 组 Kupffer 细胞内的变化符合 NF-κB 的变化趋势。NF-κB 是调控多种炎性介质基因表达的枢纽，同时也是 GR 作用的靶基因之一[14]。GR 通过反式阻抑（the transrepression/the tethering mechanism）机制来调节 NF-κB[15]。参附注射液在肝移植缺血再灌注中保护作用的关键点可能是促进 GR 表达，抑制 NF-κB 激活，从而减少对 Kupffer 细胞的激活/活化。

参考文献：

[1] Gurusamy K S, Gonzalez H D, Davidson B R. Current protective strategies in liver surgery [J]. World J Gastroenterol, 2010, 16(48): 6098 - 6103.

[2] 陈洁，潘景业，王晓蓉，等. 失血性休克大鼠纤溶功能与组织因子变化及参附注射液的干预作用[J]. 现代实用医学，2010，22(3)：253 - 255.

[3] 凌昌全，李敏，谭金兴，等. 参附汤对休克大鼠不同器官糖皮质激素受体的上调作用[J]. 浙江中医学院学报，2003，27(3)：56 - 57.

[4] Liu Z J, Yan L N, Li X H, *et al*. Up - regulation of IRAK-M is essential for endotoxin tolerance induced by a low dose of lipopolysaccharide in Kupffer cells[J]. J Surg Res, 2008, 150(1): 34 - 39.

[5] 彭勇，刘作金，龚建平，等. Kupffer 细胞 CD14 及 toll 样受体 4 介导大鼠肝移植缺血再灌注损伤的机制[J]. 中华外科杂志，2005，43(5)：274 - 276.

[6] Shiotani S, Shimada M, Suehiro T, *et al*. Involvement of Rho-kinase in cold ischemia-reperfusion injury after liver transplantation in rats [J]. Transplantation, 2004, 78(3): 375 - 382.

[7] 姜楠，张宗明，郭金星，等. SK&F96365 对大鼠肝缺血再灌注损伤后 Kupffer 细胞钙池操纵的钙通道电流的影响[J]. 世界华人消化杂志，2006，14(24)：2372 - 2376.

[8] Su G L. Lipopolysaccharides in liver injury: molecular mechanisms of Kupffer cell activation[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2002, 283(2): G256 - G265.

[9] Li J D, Peng Y, Peng X Y, *et al*. Suppression of nuclear factor-kappa B activity in Kupffer cells protects rat liver graft from ischemia-reperfusion injury[J]. Transplant Proc, 2010, 42(5): 1582 - 1586.

[10] 彭松林，黄勇，顾玺，等. 参附注射液对大鼠肝缺血再灌注 NF-κB 和 PGI2/TXA2 的影响[J]. 世界华人消化杂志，2008，16(2)：203 - 207.

[11] 张义彬，涂兵，龚建平，等. 参附注射液对大鼠移植肝脏缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 重庆医科大学学报，2008，33(4)：428 - 431，445.

[12] 马钧，景炳文，杨兴易，等. 多器官衰竭患者白细胞糖皮质激素受体和血浆皮质醇变化的观察[J]. 中国危重病急救医学，1995，7(6)：371 - 373，388 - 389.

[13] 李越华，杨兴才，卜建宏. 中药抗炎合剂干预全身炎症反应综合征的临床研究[J]. 中国中西医结合急救杂志，2009，16(5)：262 - 264.

[14] De-Bosscher K, Haegeman G. Minireview: latest perspectives on antiinflammatory actions of glucocorticoids [J]. Mol Endocrinol, 2009, 23(3): 281 - 291.

[15] Newton R, Holden N S. Separating transrepression and transactivation: a distressing divorce for the glucocorticoid receptor? [J]. Mol Pharmacol, 2007, 72(4): 799 - 809.

（收稿 2010-12-02 修回 2010-12-26）

（编辑 张 维）