DOI:10.16016/j.1000-5404.2002.02.014
第24卷第2期 第三军医大学学报 Vol. 24, No. 2
2002年2月 ACTA ACADEMIAE MEDICINAE MILITARIS TERTIAE Feb. 2002

文章编号:1000-5404(2002)02-0149-03

论著

NF-κB在缺血再灌注肝脏枯否细胞活化中的作用

徐明清[1],薛 兰[2],龚建平[1],韩本立[1],董家鸿[1] ([1]第三军医大学附属西南医院全军肝胆外科研究所、西南肝胆外科医院,重庆 400038;[2]解放军208医院,长春 130062)

提 要:目的 探讨缺血再灌注肝脏枯否细胞(KCs)的活化机制。方法 Wistar大鼠随机分为肝缺血30 min再灌注组(HIR-30 min组)、肝缺血60 min再灌注组(HIR-60 min组)及对照组。EMSA、ELISA法检测HIR后KCs NF-κB激活及KCs培养上清液TNF-α含量。结果 肝缺血30 min或60 min再灌注后0 h KCs NF-κB均已激活,NF-κB活性均于HIR后3 h达到高峰,肝缺血时间越长,KCs NF-κB激活越明显;KCs培养上清TNF-α含量于HIR后0 h增高,HIR后6 h达到高峰,肝缺血时间越长,KCs培养上清TNF-α含量越高。结论 NF-κB是缺血再灌注肝脏KCs活化的关键因子。

关键词:肝缺血/再灌注;Kupffer细胞;NF-κB
中图法分类号:R322.47;R341.31;R619.9 文献标识码:A

The effect of NF-κB on Kupffer cell activation during hepatic ischemia-reperfusion

XU Ming-qing, XUE Lan, Gong Jian-ping, HAN Ben-li, DONG Jia-hong (Department of Hepatobiliary Surgery, Southwest Hospital, Third Military Medical University, Chongqing 400038, China)

Abstract: objective To study the effect of NF-κB on Kupffer cells (KCs) activation during hepatic ischemia-reperfusion (HIR). **Methods** Wistar rats were randomly divided into HIR-30 min and HIR-60 min group in which hepatic reperfusion was performed after 30 minutes' and 60 minutes' ischemia with respectively interruption of the portal venous blood supply to liver, and sham control group in which midline laparotomy was operated without vascular occlusion. The DNA binding activity of KCs nuclear NF-κB, levels of TNF-α in the cultured supernatant of KCs were measured with EMSA and ELISA 0、1、3、6 and 12 h after reperfusion respectively. **Results** KCs NF-κB was activated 0 h after reperfusion and their activity reached their peek values 3 h later, and levels of KCs NF-κB activecty increased with increase of time after hepatic, reperfusion; Levels of TNF-α in the cultured supernatant of KCs increased 0 h and peaked 6 h after HIR, and levels of TNF-α in the cultured supernatant of KCs increased with the increase of KCs NF-κB activity levels. **Conclusion** NF-κB is the crucial factor of KCs activation during HIR.

Key words: Hepatic ischemia-reperfusion (HIR); Kupffer cell (KC); NF-κB

由于大量的研究发现枯否细胞(KCs)是肝脏缺血再灌注(Hepatic ischemia reperfusion,HIR)损伤的重要介导细胞,因此探讨HIR过程中KCs活化机制对HIR损伤的控制具有特别重要的临床意义,但目前HIR过程中KCs活化机制并不清楚。鉴于核转录因子NF-κB激活是内毒素血症时KCs活化以及HIR损伤的重要信号传导[1,2],因此可假设NF-κB亦可能是HIR过程中KCs活化的关键因子。我们就不同时间肝脏缺血再灌注后KCs NF-κB激活以及KCs源性TNF-α产生作了探讨,试图证明NF-κB激活是HIR过程中KCs活化的关键信号传导,从而为临床HIR损伤的控制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 HIR损伤模型制作

健康雄性Wistar大鼠,体重(220~250)g,随机分为肝缺血30 min再灌注组(HIR-30 min组)、肝缺血60 min再灌注组(HIR-60 min组)及对照组。HIR模型制作方法如下:大鼠乙醚麻醉后开腹,阻断门静脉30 min或60 min后恢复其入肝血流,对照组仅显露肝门部血管但不阻断入肝血流。观察时相为HIR后0、1、3、6、12 h,每时相点检测6只大鼠。

1.2 KCs分离与培养

采用Wanner[3]介绍的Seglen的原位灌注胶原酶消化法,通过多次差速离心分离出肝非实质细胞,用含10%小牛血清的RPMI1640培养液清洗离心后,将沉淀细胞于37℃、5%CO_2培养箱内孵育6 h后收集贴壁细胞即为KCs,调整细胞浓度为1×10^6/ml,继续孵育12 h后,吸取培养液,过滤后-20 ℃保存待测。培养孔内的KCs用0.25%胰酶消化后,再调节细胞浓度为1×10^6/ml,收集细胞待测。

1.3 EMSA检测KCs核NF-κB激活

按Chang等[4]介绍的方法提取KCs核蛋白,参照Jefferson等[5]介绍的方法进行EMSA测定。NF-κB寡核苷酸探针(序列为:5′-GCC TCC AAT GTT CGC GAA CTT TCG-3′)购于Santa Cruz生物公司。结果判定:测定每条电泳滞后带的相对光密度ROD×面积(mm^2),所得结果表示核转录因子NF-κB与探针结合的相对量。

1.4 统计学处理

实验结果以$\bar{x}\pm s$表达,采用t检验。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(39970719)
作者简介:徐明清(1968-),男,四川省乐山市人,博士,主治医师,主要从事肝损伤肝再生研究,发表论文7篇。电话:13022303642
收稿日期:2001-01-16;修回日期:2001-07-13

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2 结果

2.1 HIR 后 KCs NF-κB 活性变化

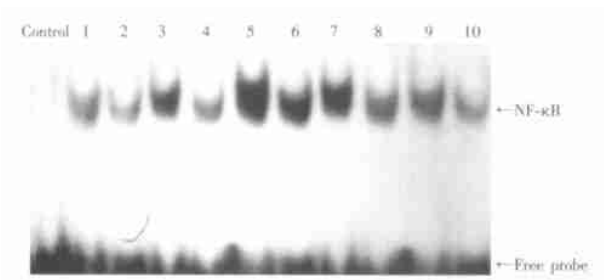
HIR 后 12 h 前 KCs 核 NF-κB 活性均明显增高，HIR 后 3 h KCs NF-κB 活性达到高峰；肝缺血时间越长，KCs NF-κB 活性越高，提示肝缺血时间越长，再灌注后 KCs NF-κB 激活越明显，见表 1，图 1。

表 1 HIR 后 KCs 核内 NF-κB 活性变化($\bar{x}\pm s$)

Tab 1 Nuclear NF-κB activity of KCs after HIR($\bar{x}\pm s$)

Group	n	Post-reperfusion time				
		0 h	1 h	3 h	6 h	12 h
HIR-30 min	6	1.25±0.71△	1.89±0.92△	3.67±1.42△	2.16±0.89△	0.74±0.32△
HIR-60 min	6	2.56±1.12 *	3.97±1.53 *	7.69±1.86 **	5.72±1.45 **	1.85±0.78 **
Control	6	0.04±0.03	0.05±0.04	0.02±0.01	0.03±0.02	0.04±0.02

*: $P<0.05$ **: $P<0.01$ *vs* HIR-30 min; △: $P<0.01$ *vs* control



Lane 1, 3, 5, 7, 9 and 2, 4, 6, 8, 10: NF-κB activity of KCs 0, 1, 3, 6, 12 h after HIR in HIR-60 min group and HIR-30 min group respectively

图 1 HIR 后 KCs NF-κB 活性变化(EMSA)

Fig 1 EMSA for KCs NF-κB activation after HIR

2.2 HIR 后 KCs 培养上清 TNF-α 含量变化

HIR 后 12 h 前 KCs 培养上清中 TNF-α 含量均增高，HIR 后 6 h TNF-α 含量达到峰值，以后逐渐下降，但仍高于对照组，见表 2。肝缺血时间越长(亦即 KCs NF-κB 激活越明显)，再灌注后 KCs 上清中 TNF-α 含量越高。

表 2 HIR 后 KCs 培养上清中 TNF-α 含量变化(pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

Tab 2 TNF-α levels in the culture supernatant of KCs after HIR (pg/ml, $\bar{x}\pm s$)

Group	n	Post-reperfusion time				
		0 h	1 h	3 h	6 h	12 h
HIR-30 min	6	61.2±11.6△	88.4±15.8△	104.6±15.3△	122.7±21.7△	70.3±14.7△
HIR-60 min	6	138.6±19.8 **	152.6±21.8 **	182.5±20.2 **	273.4±27.2 **	134.6±18.4 **
Control	6	31.2±8.3	30.5±10.1	34.2±13.4	32.6±11.8	36.2±13.2

**: $P<0.01$ *vs* HIR-30 min; △: $P<0.01$ *vs* control

3 讨论

NF-κB 是近年发现的转录因子家族中的新成员，是细胞内最重要的核转录因子，它在 LPS 等细胞外刺激介导的细胞信息的转录调控中起核心作用，参与多种基因的表达和调控，是细胞激活的标志。在静息细胞中，NF-κB 二聚体通过非共价键的形式与其抑制蛋白(IκB)结合而分隔在细胞浆内，包括内质网应激在内的许多因素可激活 NF-κB(内质网应激导致 NF-κB 激活需要细胞内活性氧介质与 Ca^{2+} 的增高)，激活后的 NF-κB 进入细胞核，与 DNA 模块上的特异蛋白结合，诱导特异 mRNA 的产生，最后转录、产生和释放各种细胞因子。HIR 过程中肝内 NF-κB 是通过细胞内活性氧介质与 Ca^{2+} 的增高从而导致 IκB 酪氨酸化而激活的[6]。

KCs 是 HIR 损伤的重要介导细胞，在 HIR 损伤启动阶段，KCs 激活并释放活性氧介质、炎症因子(TNF-α、IL-1、IL-6)[3]、CINC[2] 及 MIP-2[1] 等损伤介质而导致 HIR 损伤，而在这些介质中，TNF-α 是 HIR 损伤的关键因子。虽然 KCs 激活促进 HIR 损伤，但其活化机制并不清楚，鉴于在其它肝损害模型中 TNF-α、IL-1、IL-6、CINC 及 MIP-2 等肝损害介质的产生在转录水平上均不同程度的受核转录因子 NF-κB 激活的调节[1,4,7,8]，以及肝内 NF-κB 激活是 HIR 损伤的重要信号传导[1,6] 等前提，可假设 NF-κB 激活亦可能是 HIR 过程中 KCs 活化的重要信号传导。

为证实此假设，我们检测了大鼠肝脏门静脉阻断 30 min/60 min 再灌注后 KCs NF-κB 活性变化及其对 KCs 培养上清中 TNF-α 含量的影响。我们在实验中发现肝脏缺血 30 min/60 min 再灌注后 0 h KCs NF-κB 均已高水平激活，KCs NF-κB 活性均于 HIR 后 3 h 达到高峰，HIR 后 12 h 前 KCs NF-κB 均保持激活状态，其中肝缺血 60 min 再灌注后 KCs NF-κB 活性明显高于肝缺血 30 min 再灌注后 KCs NF-κB 活性，说明肝缺血时间越长，再灌注后 KCs NF-κB 激活越明显；伴随着 KCs NF-κB 的激活，KCs 培养上清中 TNF-α 含量显著增高，其中肝缺血 60 min 再灌注后 KCs 上清 TNF-α 含量明显高于肝缺血 30 min 再灌注后 KCs 上清 TNF-α 含量，提示 KCs NF-κB 激活越明显，KCs 上清 TNF-α 含量越高，说明 HIR 后 KCs 源性 TNF-α 的产生受 KCs NF-κB 激活的调控。

由于肝损害时肝内 TNF-α 主要由 KCs 产生以及 TNF-α 是 HIR 损伤的关键因子，而我们的实验又发现 HIR 后 KCs 源性 TNF-α 的产生受 KCs NF-κB 激活的调控，这就提示 NF-κB 激活可能是 HIR 过程中 KCs 活化的重要信号传导，通过调节 KCs NF-κB 激活可能缓解 HIR 损伤，从而为临床肝移植及肝部分切除过程中 HIR 损伤的控制提供一定的理论依据。

参考文献：

[1] Yoshidome H, Kato A, Edwards M J, *et al*. IL-10 suppresses hepatic ischemia/reperfusion injury in mice: Implication of a central role for nuclear κB [J]. Hepatology, 1999, 30(1): 203—208.

[2] Liang J, Yamaguchi Y, Matsumura F, *et al*. Calcium-channel blocker attenuates Kupffer cell production of cytokine-induced neutrophil chemoattractant following ischemia/reperfusion in the rat liver[J]. Dig Dis Sci, 2000, 45

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

(1): 201—209.
[3] Wanner G A, Muller P, Ertel W, *et al*. Differential effect of cyclooxygenase metabolites on proinflammatory cytokine release by Kupffer cells after liver ischemia and reperfusion[J]. Am J Surg, 1998, 175(1): 146—151.
[4] Chang C K, Lianes S, Schumer W. Inhibitory effect of dimethyl sulfoxide on NF-κB activation and intercellular adhesion molecular 1 gene expression in septic rats[J]. J Surg Res, 1999, 82(2): 294—299.
[5] Jefferson K K, Smith M F, Bobak D A. Role of intracellular calcium and NF-κB in the clostridium difficile toxin A-induced up-regulation and secretion of IL-8 from human monocytes[J]. J Immunol, 1999, 163(9): 5 183—5 191.
[6] Zwacka R M, Zhang Y L, Zhou W H, *et al*. Ischemia/reperfusion injury in the liver of BALB/c mice activates AP-1 and nuclear factor κB independently of IκB degradation[J]. Hepatology, 1998, 28(5): 1 022—1 030.
[7] Iimuro Y, Bradford B U, Yamashina S, *et al*. The glutathione precursor OTC protects against liver injury due to chronic enteral ethanol exposure in the rat[J]. Hepatology, 2000, 31(1): 391—398.
[8] 徐明清, 龚建平, 薛 兰, 等. Kupffer 细胞 NF-κB 激活对胆道梗阻合并肝部分切除鼠肝细胞再生的影响[J]. 第三军医大学学报, 2001, 23(10): 1 143-1 145.

(编辑 薛国文)

文章编号: 1000-5404(2002)02-0151-01

个案与短篇

截瘫患者的心理护理

Psychological nursing for paraplegia patients

石含英 (第三军医大学附属西南医院康复理疗科, 重庆 400038)

截瘫患者多见于青壮年, 而且常常是意外致伤、致残。他们的心理承受着常人难以承受的巨大打击。因此, 患者的心理问题显得尤为突出。为了帮助他们最大程度完成瘫痪肢体的功能恢复与重建, 我们在心理护理方面进行了初步探讨。

1 资料与方法

11 例截瘫患者中, 男 9 例, 女 2 例, 平均 31(21～55)岁。因车祸致伤 5 例; 重物压伤 3 例; 坠落伤 2 例; 手术并发症 1 例。

由专人采用交谈法、观察法, 并结合汉密顿焦虑量表, 对患者康复期的心理状态进行调查分析, 并针对其心理特点采取相应的护理措施。

2 结果

用汉密顿量表调查显示, 11 例患者均有不同程度的焦虑心理。其中严重焦虑占 9%(总分超过 29 分); 明显焦虑占 18%(总分超过 21 分); 可能有焦虑占 73%(总分超过 7 分)[1]。

通过日常留心观察及多次谈心, 发现患者还都有明显的被动依赖及自尊心过度敏感等心理问题。

3 讨论

3.1 焦虑心理的护理

截瘫患者康复期虽已度过生命的危险期, 但仍面临着残疾的威胁。他们时常焦虑不安, 对未来生活感到恐惧, 对治疗及护理失去信心。我们护理上重点注意了以下三方面: ①注重建立良好的护患关系, 让患者感到护士亲切、耐心、关怀及体贴。②加强卫生宣教。在评估患者心理问题的基础上, 制定宣教方案, 针对性地介绍截瘫康复的方法、过程、目标等内容。并告诉患者本人通过积极努力可能达到的预期效果。③开展心理疏导与心理支持, 调动患者良好的情绪, 解除不良的情绪刺激。要让患者懂得: 良好的情绪一方面可以取代引起精神紧张的坏情绪, 另一方面又可以通过垂体使内分泌保持适度平衡, 从而使人感到轻松愉快[2]。

3.2 被动依赖心理的护理

截瘫患者由于生活不能自理, 自然就得到家人及亲友们的热情关心和照顾, 他们是家庭关照的中心。再通过消极的自我暗示而变得被动、顺从。我们在护理上注意了: ①告诉家属不要采取替代照顾, 全盘包办的方式, 而要让患者逐渐参与到自我护理中来。②激励患者主动进行自我照顾, 并且要善于发现患者一点一滴的进步, 抓住时机, 即时给予肯定和鼓励。③教会患者进行积极的自我暗示。

3.3 自尊心过度敏感的护理

人的价值感和自尊心是紧密相连的。截瘫患者连基本生活都难以自理, 其自我价值感必然受到挫折, 自尊心也不同程度地受到挫伤。因此, 他们的情感比常人更敏感, 自尊心也更强一些。我们的护理方法是: ①充分尊重患者, 随时满足患者的合理需要, 从不轻易对患者说"不"字。②进行操作和训练时, 动作轻柔, 技术娴熟, 态度和蔼。③注意语言的艺术性和暗示性。

通过上述有针对性的心理护理, 帮助患者及时消除或减轻了不良心理状态, 使患者在心理上得到了安慰和鼓励, 从而主动参与到治疗和护理中来, 让"自我护理"得到了一定程度的实现。使 11 例患者的康复达到了较好的效果: 有 4 例装上支具行走; 1 例拄拐行走; 其余均可熟练操作轮椅。

关键词: 心理护理; 截瘫
中图法分类号: R473.3 文献标识码: B

参考文献:

[1] 汪向东. 心理卫生评定量表手册[J]. 中国心理卫生杂志, 1993, (增刊): 223—223.
[2] 黄甫恩 主编. 医学心理学[M]. 西安: 陕西科学技术出版社, 1990. 328—328.

(编辑 潘式文)

作者简介: 石含英(1966—), 女, 重庆市人, 主管护师, 主要从事心理护理方面的研究。电话: (023)68754376

收稿日期: 2000-01-15; 修回日期: 2001-01-29

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net