

高迁移率族蛋白 B1 在创伤免疫功能紊乱中的作用及其调节机制

姚咏明 林洪远



The potential role of high mobility group box 1 protein in immune dysfunction and its regulatory mechanism after major trauma YAO Yong-ming, LIN Hong-yuan. Emergency and Critical Care Center, First Hospital Affiliated to The Chinese People's Liberation Army General Hospital, Beijing 100037, China

【Abstract】 Objective To investigate the potential effect of high mobility group box 1 protein (HMGB1) on host immune response and its molecular regulation mechanism as well as its interventional pathway following major burns/trauma. **Methods** With both animal experiments and clinical investigation, serial studies were conducted to observe the effects of HMGB1 on changes in immune function of T lymphocytes, dendritic cells, and macrophages both in vivo and in vitro. **Results** It was found that thermal injury or trauma

induced a delayed and persistent increase in HMGB1 expression as well as its release in various tissues. HMGB1 formation could markedly influence the cell-mediated immunity, including the changes in T lymphocytes, dendritic cells, and macrophages following major trauma or burns. These effects were closely related with dysfunction of various organs in the course of sepsis. **Conclusion** These data proved that HMGB1 not only acts as a novel "late" inflammatory mediator but is also closely associated with immunosuppression after acute insults. HMGB1 might play an important role in inducing systemic inflammatory response together with host immunological dissonance, resulting in the development of septic complications. Intervention of HMGB1 expression and release presumably provides a potentially effective way to regulate both excessive inflammatory and immune response, thereby as a measure to improve the prognosis of severe sepsis secondary to major trauma.

【Key words】 trauma; burn; high mobility group box 1 protein; immune function; sepsis

在探索脓毒症的发病机制中,人们已经认识到早期炎症因子肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1(IL-1)在脓毒症的病理过程中具有重要作用,但应用 TNF- α 或 IL-1 拮抗剂干预并没有明显改善脓毒症患者的预后。其原因是多方面的,但主要与 TNF- α 的早期迅速合成、释放以及临床很难做到早期或预防性干预有关。另有资料表明,用致死剂量的内毒素攻击小鼠,部分动物 5 d 后才死亡,而此时 TNF- α 、IL-1 水平已降至正常范围;给 TNF- α 基因缺陷的小鼠注入内毒素数日后亦可导致死亡,这说明可能存在某些重要的晚期炎症介质介导了内毒素的致死效应。晚近研究发现,脂多糖和炎症介质可刺激巨噬细胞产生一种被称为高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)的蛋白质,在内毒素的致病过程中可能具有潜在作用。由于 HMGB1 的产生明显晚于其他细胞因子,有人称之为“脓毒症的晚期介质”。

目前诸多研究主要集中在 HMGB1 炎症效应及其受体、信号调节机制方面,它是否参与了严重创、烧伤后细胞免疫功能障碍的病理生理过程尚不清楚。尽管 HMGB1 在感染发病中确实表现出促炎细胞因子活性,但我们认为就脓毒症、多器官功能障碍综合征(MODS)病程进展的全过程而言, HMGB1 对机体病理过程的调节作用可能不仅局限于单纯促炎反应。虽然病原菌种类、数量和宿主年龄、基础疾病等因素对感染后免疫抑制发生的时相能造成一定影响,但总体上免疫反应由高至低的变迁过程与体内 HMGB1 浓度上升在时相上相吻合,且延迟拮抗 HMGB1 可显著改善脓毒症动物预后,在此阶段仅用促炎效应难以解释 HMGB1 的病

基金项目:国家重点基础研究发展规划项目(2005CB522602);国家自然科学基金资助项目(30672178);国家杰出青年基金资助项目(30125020)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第一附属医院急危重症救治中心,解放军总医院野战外科研究所

作者简介:姚咏明(1965-),男(汉族),湖北省人,教授,博士生导师,清华大学兼职教授。现任国际休克学会执委、中国医师协会急救与复苏分会副主任委员、中国微生物学会微生物毒素分会副主任委员等,《中华外科杂志》《中国危重病急救医学》等 21 种杂志副主编或编委。发表论文 395 篇(SCI 收录 50 篇、ISTP 收录 7 篇),主编及参编专著 25 部,获国际希拉格奖、中国青年科技奖和求是杰出青年奖各 1 项,国家科技进步二等奖 8 项、三等奖 1 项,省部级科技进步一、二等奖 10 项。

理生理效应,其是否还参与了免疫调节过程值得怀疑。因此,我们通过动物实验与临床观察相结合、从多个层次及不同侧面进一步探讨了 HMGB1 在严重创、烧伤后机体细胞免疫功能紊乱中的调节作用、分子机制与干预措施,这对于从新的角度深入认识 HMGB1 在创、烧伤脓毒症发病中的地位具有重要理论意义和临床价值,并通过对 HMGB1 进行干预的研究,寻求一条调节机体炎症反应与免疫应答过程的新途径。

1 HMGB1 与严重创、烧伤后细胞功能障碍的关系及其意义

在观察休克期切痂对烫伤大鼠肝、肺组织 HMGB1 表达及促炎/抗炎反应平衡的影响研究中,我们观察到严重烧伤后肝组织 TNF- α /IL-10 异常改变,休克期切痂能明显改善机体促炎/抗炎反应失衡状况,而且肝组织 TNF- α /IL-10 与 HMGB1 表达量呈正相关。该结果初步提示肝脏 HMGB1 可能参与了组织局部促炎和抗炎细胞因子表达的调节,并对局部免疫产生影响。采用 HMGB1 合成抑制剂干预可调节体内致炎和抑炎反应的异常改变,对于维持免疫微环境的稳定发挥着重要作用。

我们在研究中采用 30% 总体表面积(TBSA)Ⅲ度烫伤后延迟 6 h 复苏大鼠模型,通过逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)、蛋白质免疫印迹法(Western blotting)等技术观察烫伤延迟复苏后血浆中 HMGB1 含量及脾组织中 HMGB1 mRNA 表达;同时应用噻唑蓝(MTT)比色法、流式细胞技术、酶联免疫吸附法(ELISA)等方法从淋巴细胞表型、细胞周期及细胞因子蛋白水平观察了 HMGB1 对脾淋巴细胞增殖活性、细胞周期、IL-2 受体(IL-2R)表达及 IL-2 分泌量的改变;并在以上研究的基础上,进一步明确活化 T 淋巴细胞的核转录因子(NFAT)在 HMGB1 介导免疫抑制中的作用。结果显示:①烫伤延迟复苏可促进 HMGB1 合成释放及基因表达,其动力学变化规律体现了 HMGB1 产生较晚、下降缓慢的“晚期炎症介质”特点。②烫伤早期 HMGB1 的过度释放与脾淋巴细胞增殖反应抑制、IL-2 生成减少、IL-2R 表达降低以及细胞周期由 G1 期向 G2+S 期转移抑制有关,证实 HMGB1 与烫伤早期机体细胞免疫功能抑制密切相关。③烫伤后 1 d 和 3 d NFAT 结合活性明显降低,应用 HMGB1 抑制剂后能够明显改善 NFAT 的结合活性,可见 HMGB1 通过调节 NFAT 从 DNA 水平影响了 IL-2 mRNA 表达。④烫伤后大量产生 HMGB1 影响了脾 T 淋巴细胞的凋亡,进而诱导了细胞免疫功能障碍。⑤丙酮酸乙酯(EP)可通过抑制 HMGB1 的释放减轻 T 淋巴细胞的功能异常,即显著增加脾 T 淋巴细胞的增殖反应能力和 IL-2 的产生(基本恢复至伤前范围),从而逆转烫伤延迟复苏后细胞免疫功能低下状态,并改善动物预后,这对于严重烧伤后感染并发症的防治具有潜在应用价值。

我们进一步探讨了严重烧伤患者 T 淋巴细胞免疫功能的变化规律及其与 HMGB1 的相关性。观察到严重烧伤患者伤后 1 d 血浆中 HMGB1 含量即明显升高,其中伤后 1、7、21 和 28 d MODS 组 HMGB1 含量显著高于非 MODS 组。MODS 组在伤后 1、14、21 和 28 d 外周血 T 淋巴细胞增殖活性、IL-2 含量和 CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞比值显著低于非 MODS 组。大面积烧伤患者伤后血浆 HMGB1 含量与细胞免疫功能指标包括 T 淋巴细胞增殖活性、IL-2 含量、CD4⁺/CD8⁺ T 淋巴细胞比值呈显著负相关。大面积烧伤后 T 淋巴细胞免疫功能紊乱与患者并发 MODS 密切相关,严重烧伤患者血浆 HMGB1 水平的持续升高对机体细胞免疫功能异常具有显著影响。

2 HMGB1 对 T 淋巴细胞免疫应答反应的影响

通过离体、在体实验发现, HMGB1 不同作用时相、不同刺激浓度对小鼠脾 T 淋巴细胞、肠道潘氏结淋巴细胞免疫反应的影响存在差异,即高剂量 HMGB1 攻击后脾淋巴细胞增殖明显抑制,凋亡增加,同时血浆 IL-2 水平显著降低,IL-2/可溶性 IL-2R 比值下降。而高、低剂量 HMGB1 攻击 24 h 均能促进潘氏结淋巴细胞增殖,减少细胞凋亡;低剂量 HMGB1 攻击 48 h 潘氏结淋巴细胞增殖反应进一步增强,但高剂量 HMGB1 组淋巴细胞增殖活性明显受抑,淋巴细胞凋亡率增加。该结果提示不同浓度 HMGB1 能够影响淋巴细胞增殖功能,并且在不同淋巴器官中发挥的效应明显不同。

在上述工作的基础上,我们以体外培养的健康人 T 淋巴细胞为实验对象,观察了不同 HMGB1 剂量与刺激时间对细胞增殖、分化漂移的影响;并从蛋白与基因水平探讨 HMGB1 调控 T 淋巴细胞重要细胞因子 IL-2/IL-2R 表达效应的分子机制。结果证实,500 μ g/L 以上剂量 HMGB1 作用 48 h 后,淋巴细胞增殖显著抑制,低于这一剂量对增殖影响不显著。不同 HMGB1 刺激时间和作用剂量对 CD4⁺ T 淋巴细胞和 T 辅助细胞(Th1)亚群比例未造成明显改变,但发现 HMGB1 能时间-剂量依赖性增加 Th2 亚群比例,并因此降低 Th1/Th2 比值,提示在刺激后 T 淋巴细胞免疫功能出现 Th1 优势向 Th2 优势偏移;HMGB1 与 T 淋巴细胞共培养 12 h 后,10 μ g/L 以上剂量即可明显上调 IL-2、IL-2R α 基因表达水平与蛋白产生量,而 HMGB1 刺激持续 48 h 上述效应则衰竭,并表现出相反变化趋势。上述资料表明, HMGB1 对 T 淋巴细胞包括增殖、分化

和细胞因子分泌等免疫功能具有直接双向调节效应,其浓度蓄积和存在时间持续能造成免疫应答反应由高至低的转化, HMGB1 对 T 淋巴细胞免疫功能的抑制效应可能是导致感染后机体免疫麻痹发生的重要调控机制。

3 HMGB1 对树突状细胞(DC)的作用及其调控机制

通过采用大鼠脾脏 DC 模型,我们探讨了 HMGB1 对 DC 分化成熟的影响与受体机制,并进一步分析 HMGB1 刺激后 DC 对 T 淋巴细胞功能的影响及其信号转导途径,该研究有助于深化对 HMGB1 介导细胞免疫功能异常的新认识。结果证实, HMGB1 可直接促进 DC 表面共刺激分子 CD80、CD86 和主要组织相容性复合物 I (MHC I) 表达上调,而且 HMGB1 介导 DC 成熟分化过程中 TNF- α 、IL-12 的 mRNA 表达、蛋白合成与 DC 分化成熟具有一致性,提示 HMGB1 能诱导 DC 分化成熟。采用流式细胞仪和激光扫描共聚焦显微镜检测细胞表面受体晚期糖基化终末产物受体 (RAGE) 的表达改变,发现 HMGB1 能促进 DC 表面 RAGE 表达增强, RAGE 可能是参与 HMGB1 诱导 DC 成熟分化的重要受体。进一步观察显示,一定剂量 HMGB1 诱导的 DC 使脾 T 淋巴细胞对丝裂原刺激的增殖反应明显增强,随着 HMGB1 刺激剂量和作用时间增加,上述反应则有所减弱;通过分析脾 T 淋巴细胞核转录因子- κ B (NF- κ B) 的活性及其与 IL-2、IL-2R mRNA 表达与蛋白生成的关系,发现 HMGB1 诱导的 DC 可通过增强 NF- κ B 的转录活性使脾 T 淋巴细胞 IL-2 及 IL-2R 表达显著增强。

在严重烫伤延迟复苏动物模型中,我们深入探讨了 HMGB1 的变化及其与 DC 分化成熟的关系、受体作用机制、DC 对 T 淋巴细胞免疫功能的影响与调节效应。观察到严重烫伤后 HMGB1 过度升高可刺激 DC 向成熟发展,但表型表达异常, DC 功能障碍,从而介导 T 淋巴细胞增殖反应降低,并向 Th2 漂移,免疫功能明显抑制。另一组资料证实,大量 HMGB1 释放主要通过受体 RAGE 介导 DC 表型表达异常、DC 功能障碍,其介导的 DC 功能障碍可通过下调 T 淋巴细胞 NF- κ B 活性而减少 IL-2 基因表达和蛋白合成,进而影响 T 淋巴细胞的增殖反应和免疫功能。此外, HMGB1 可诱导烫伤后 T 淋巴细胞毒性相关抗原 4 (CTLA-4) 表达,下调 DC 表面分子 CD80、CD86 表达,从而影响调节性 T 淋巴细胞免疫抑制活性。拮抗 HMGB1 的合成释放能显著改善烫伤延迟复苏动物细胞免疫功能紊乱,防止脓毒症发生发展,保护动物的重要脏器功能免受损伤。

4 HMGB1 对巨噬细胞免疫活性的影响

系列实验研究显示, HMGB1 能时间-剂量依赖性地影响离体培养的小鼠腹腔巨噬细胞吞噬功能和抗原呈递分子 I-A/I-E 表达。体内实验结果显示,无论高剂量还是低剂量 HMGB1 攻击小鼠,巨噬细胞吞噬能力均有较大幅度降低,其中高剂量 HMGB1 攻击 24 h 巨噬细胞吞噬功能抑制尤为明显。说明 HMGB1 可作为重要的免疫效应分子下调巨噬细胞的吞噬功能,从而降低其吞噬、杀菌活性。

通过体外分离培养 BALB/c 小鼠的腹腔巨噬细胞,我们观察了 HMGB1 对小鼠巨噬细胞免疫功能及细胞凋亡的影响,并探讨了 HMGB1 对巨噬细胞免疫功能及细胞凋亡的作用及其受体、信号机制。结果显示, 1~1 000 μ g/L 的 HMGB1 刺激可显著增加 TNF- α 与细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 的合成与释放,但对 IL-10 表达无明显影响; HMGB1 可诱导小鼠腹腔巨噬细胞凋亡,以高浓度引起细胞凋亡作用更为明显。进一步分析发现,天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶-3 (caspase-3) 与 NF- κ B 是 HMGB1 诱导巨噬细胞凋亡途径的重要信号分子, caspase-3 抑制剂可部分阻断 HMGB1 诱导的巨噬细胞凋亡; HMGB1 可诱导巨噬细胞表面 RAGE 表达增加, RAGE 是 HMGB1 作用于巨噬细胞免疫功能的主要受体之一。

5 HMGB1 免疫效应的临床意义

尽管早期液体复苏、新型抗生素应用、代谢支持及重要器官辅助性治疗已取得显著进步,但脓毒症和 MODS 的病死率仍居高不下,成为进一步提高危重症救治成功率的最大障碍,是世界范围内重症加强治疗病房 (ICU) 中死亡的主要原因。由于 HMGB1 出现较晚且持续时间更长,在脓毒症的发病中具有重要作用,我们推测它有可能成为反映脓毒症病理过程更方便、实用的指标;同时, HMGB1 还能为脓毒症和 MODS 的防治提供切实可行的干预目标。因此,进一步针对 HMGB1 进行研究,有助于从新的角度深化对脓毒症发病机制的认识,可望提出新的早期诊断和防治措施,具有重要的理论意义和潜在应用价值。我们的研究结果提示, HMGB1 不仅是体内重要的晚期促炎介质,而且与机体细胞免疫功能障碍密切相关,很可能是体内关键的免疫调节因子之一。该研究在 HMGB1 参与创、烧伤脓毒症发病过程的理论和观念上有所进步,从而对严重创、烧伤后机体炎症反应失控与免疫功能紊乱的发生机制形成有较完整的新认识,针对其干预可望达到“一箭双雕”之功效。

(收稿日期:2000-07-17) (本文编辑:李银平)