

多器官功能障碍综合征小鼠脾脏高迁移率族蛋白 B1 及免疫细胞功能变化的研究

吕艺 陆江阳 赵敏 李志宏 杨毅

【摘要】 目的 观察多器官功能障碍综合征(MODS)小鼠脾脏高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)与主要组织相容复合体(MHC)-I 类分子 I-A^b 表达变化的规律,探讨 HMGB1 对脾脏免疫细胞功能状态的影响及其与 MODS 病程发展的关系。方法 选择 57BL/6 小鼠 90 只,按随机数字表法分为正常对照组,致伤后 3、8、12 h 及 1、2、3、5 和 10~12 d 组,每组 10 只。采用腹腔注射酵母多糖的方法复制小鼠 MODS 模型;检测小鼠脾脏 HMGB1 和 I-A^b 表达水平及脾脏免疫细胞的凋亡率。结果 正常小鼠脾脏中仅有少量 HMGB1 mRNA 表达;在 MODS 病程中呈双峰升高,表现为伤后 1~2 d HMGB1 mRNA 表达量达高峰($P < 0.01$),随后表达下调,伤后 5 d 明显减少,但在 10~12 d 时表达再次升高($P < 0.05$);HMGB1 蛋白表达量的变化与 mRNA 表达变化规律基本一致。在伤后 8 h 脾脏单核细胞 I-A^b 与 HMGB1 蛋白表达同时升高($P < 0.01$),随后两者在病程中呈反相变化。脾脏免疫细胞凋亡率在伤后呈双峰升高,与 HMGB1 变化规律一致。结论 MODS 小鼠脾脏 HMGB1 表达上调与淋巴细胞凋亡密切相关,并影响脾脏抗原呈递细胞对 MHC-I 类分子的表达,由此削弱细胞免疫应答能力,影响 MODS 的病情发展。

【关键词】 多器官功能障碍综合征; 脾脏; 高迁移率族蛋白 B1; 主要组织相容复合体-I 类分子; 细胞凋亡

Effect of change in high mobility group protein box 1 expression on activity of immunocytes in spleen of mice with multiple organ dysfunction syndrome LÜ Yi*, LU Jiang-yang, ZHAO Min, LI Zhi-hong, YANG Yi. * Burn Institute, First Affiliated Hospital of PLA General Hospital, Beijing 100037, China
Corresponding author: LU Jiang-yang, Email: lujiy@263.net

【Abstract】 Objective To explore the regularity of high mobility group protein box 1 (HMGB1) expression and major histocompatibility complex I I-A^b in spleen of mice with multiple organ dysfunction syndrome (MODS), and its effect on the activity of immunocytes and relationship with pathogenesis of MODS. **Methods** MODS model was replicated by injecting zymosan into abdominal cavity of mice. The mice were randomly divided into normal control group, and 3, 8, 12 hours, and 1, 2, 3, 5, 10 - 12 days after injection groups. The expression levels of HMGB1, I-A^b and apoptosis rate in the spleen were detected. **Results** There was a little HMGB1 expression in the spleen of control mice. After zymosan administration, HMGB1 expression was increased, it reached the highest level on 1 - 2 days ($P < 0.01$), decreased on day 5, then elevated on 10 - 12 days ($P < 0.05$). Change in HMGB1 mRNA expression was in accordance with that of the protein. At 8 hours following injury, the I-A^b expressed on the splenocytes was enhanced similar to that of HMGB1, and then it reversed. The occurrence of splenocyte apoptosis was also consistent with change in HMGB1 content in the spleen. **Conclusion** The increased apoptosis of splenocytes in mice with MODS is closely related with up-regulation of HMGB1 expression, which inhibits the expression level of I-A^b on antigen presenting cells, thus weakens the capability of immune responses and affected the development of MODS.

【Key words】 multiple organ dysfunction syndrome; spleen; high mobility group protein box 1; major histocompatibility complex I; apoptosis

多器官功能障碍综合征(MODS)是严重创、烧伤后最严重的并发症,也是脓毒症发展的终末阶段^[1]。其主要病理机制是失控性炎症反应,且与机体

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2009.01.007

基金项目:全军医学科研“十一五”计划项目(06MB307);首都医学发展科研基金项目(2003-3025)

作者单位:100037 北京,解放军总医院第一附属医院创伤外科研究室(吕艺),病理科(陆江阳、赵敏、李志宏、杨毅)

通信作者:陆江阳,Email:lujiy@263.net

免疫失衡有密切关系。近年来研究发现,脓毒症晚期介质高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)参与炎症介质表达、合成的调控,而且其自身具备炎症介质的某些特性^[2-3];同时还发现, HMGB1 的增多与自身免疫性疾病的发生发展密切相关^[4]。从而推论, HMGB1 可能通过影响机体免疫功能参与疾病的发生发展过程。脾脏是人体内最大的网状内皮系统,对机体免疫功能的调节至关重要。我们以往的研究结果提示,脾

脏 HMGB1 表达上调可能参与炎症反应的持续性发展机制,并与 MODS 形成有重要关系^[5]。本研究拟观察 MODS 病程中 HMGB1 表达变化与脾脏免疫细胞功能状态变化的关系,探讨其在 MODS 免疫紊乱中的作用。

1 材料与方 法

1.1 实验动物分组及模型制备:6~8 周龄雄性 57BL/6 小鼠 90 只,体重 20~25 g,购自军事医学科学院实验动物中心。采用腹腔注射无菌酵母多糖的方法^[6]制作 MODS 动物模型。按随机数字表法将动物分为正常对照组,致伤后 3、8、12 h 及 1、2、3、5 和 10~12 d 组。

1.2 检测指标及方法

1.2.1 脾组织中 HMGB1 蛋白含量:用蛋白质免疫印迹法(Western blotting)检测。脾组织加入磷酸盐缓冲液匀浆,冰浴,离心取上清液进行蛋白定量(BCA 法,美国 Pierce 公司)。将上清液加入凝胶上样缓冲液混匀、水浴,离心上样、分离凝胶电泳;转膜,免疫印迹:一抗为抗小鼠 HMGB1 多克隆抗体,二抗为辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔 IgG(北京中杉金桥公司),用化学发光法进行检测(美国 Pierce 公司)。

1.2.2 脾脏 HMGB1 mRNA 表达水平:将脾组织加入 TRIzol 提取组织总 RNA;取总 RNA 逆转录为 cDNA(Promega A3500 逆转录试剂盒)后,用聚合酶链反应(PCR)方法扩增 HMGB1。引物序列^[2],上游:5'-ATG GGC AAA GGA GAT CCT-3',下游:5'-ATT CAT CAT CAT CAT CTT CT-3',扩增产物大小为 648 bp。PCR 条件:95 ℃ 5 min;95 ℃ 55 s,53 ℃ 45 s,72 ℃ 45 s,共 34 个循环;72 ℃,10 min。取 PCR 产物 10 μl 进行电泳,凝胶成像(UVP-GDS800,英国),用 bandlead 3.0 软件分析 HMGB1 的相对表达量。

1.2.3 脾脏单核细胞主要组织相容复合体(MHC)-I 类分子 I-A^b 表达的检测:将脾组织包埋,液氮速冻,切片,贴于 APES 胶片上室温干燥,用间接酶标法标记。一抗为大鼠抗小鼠 I-A^b 抗体,二抗为 HRP 标记的羊抗大鼠 IgG(Serotec 生物技术公司,美国)。

1.2.4 脾脏细胞凋亡检测:用原位末端缺刻标记法(TUNEL)检测,按试剂盒说明书操作(Boehringer Mannheim 公司,德国)。阴性对照用含有核苷酸混合液代替 TUNEL 反应混合物。

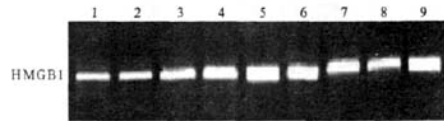
1.3 免疫组化和凋亡阳性细胞计数分析:在切片的

脾脏边缘区随机选取 10 个高倍视野(400 倍),计数所有染色阳性的细胞及细胞总数,阳性细胞率=阳性细胞数/细胞总数×100%。

1.4 统计学处理:实验数据采用 Stata 7.0 统计分析软件。计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用方差分析和 t 检验,P<0.05 为差异有统计学意义。

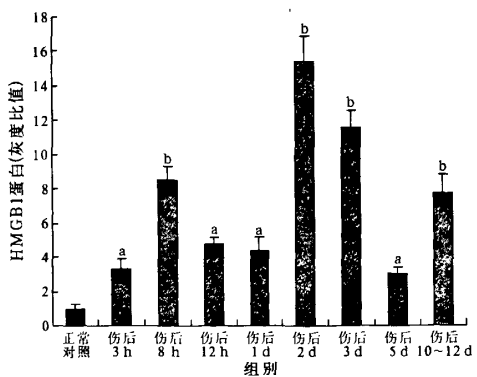
2 结 果

2.1 脾脏 HMGB1 mRNA 表达(图 1):正常对照组小鼠脾脏只有少量 HMGB1 表达。伤后 3 h HMGB1 mRNA 表达开始上调(P<0.05),12 h 表达量进一步增加,至伤后 1~2 d 达高峰(P<0.01),随后表达下调,5 d 时明显减少,但 10~12 d 再次升高出现第二个高峰(P<0.05)。



1:正常对照组;2~9:伤后 3、8、12 h 及 1、2、3、5 和 10~12 d 组
图 1 各组小鼠脾脏 HMGB1 mRNA 表达 RT-PCR 电泳图

2.2 脾脏 HMGB1 蛋白表达(图 2):正常小鼠脾脏组织内有一定量的 HMGB1 表达。酵母多糖致伤后 3 h 脾脏 HMGB1 蛋白含量即增加,至 12 h 后回降,2 d 又增加并达高峰,5 d 明显降低,而 10~12 d 又有所升高。在整个病程中,蛋白变化和 mRNA 表达变化规律一致。

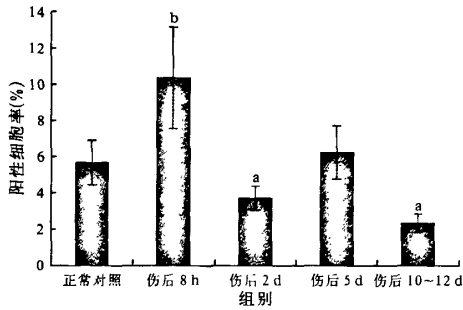


注:与正常对照组比较,*P<0.05, bP<0.01

图 2 各组小鼠脾脏 HMGB1 蛋白含量变化

2.3 脾脏单核细胞 I-A^b 的表达(图 3):正常小鼠脾脏骨髓和脾脏内的抗原呈递细胞(包括树突细胞、B 细胞、巨噬细胞和活化的 T 细胞)可见 I-A^b 表达。伤后 8 h 脾脏 I-A^b 阳性表达细胞数较正常对照组明显增多(P<0.01),2 d 则减少(P<0.05),5 d 有

所回升,但 10~12 d 又再次减少($P < 0.05$),仅为正常对照组的 41%。



注:与正常对照组比较,* $P < 0.05$,^b $P < 0.01$
 图 3 各组小鼠脾脏 I-A^b 表达阳性细胞率的变化

2.4 脾组织细胞凋亡结果(彩色插页图 4):正常对照组小鼠脾脏的白髓和红髓中可见少量单个散在分布的细胞核呈深棕色的 TUNEL 染色阳性细胞(凋亡细胞);伤后早期(3~12 h)脾脏白髓与红髓中有散在的小片状阳性细胞;伤后 24~48 h 白髓和红髓中的凋亡细胞数明显增加,呈大片状或巢状分布,与正常对照组比较差异显著;伤后 5 d 凋亡细胞数明显减少,略多于正常对照组;伤后 10~12 d 凋亡细胞数再次增加,白髓与红髓中可见大量阳性细胞呈片状分布,与正常对照组比较差异显著。

3 讨论

本研究中通过腹腔注射酵母多糖诱发过度的免疫反应与过度炎症反应,进而引起炎症反应迁延失控,导致脓毒症和 MODS。该模型基本上模拟了临床 MODS 的“双相打击”病程:第一次打击为伤后 12 h~3 d,此阶段由过度炎症反应引发了全身炎症反应综合征;第二次打击是指 MODS 期(伤后 10~12 d),主要表现为免疫失衡。

HMGB1 是致死性炎症反应的必要和充分介质,在内毒素血症、脓毒症及缺血/再灌注损伤等实验性动物模型和患者中均观察到 HMGB1 水平的升高^[3,7],并与病情严重程度相关^[6]。而抗 HMGB1 治疗措施可以改善动物的生存状态,降低死亡率^[9-10]。以往对细胞外 HMGB1 在脓毒症发展中作用的研究注重体液中 HMGB1 对机体的影响^[11],而较少观察脏器中 HMGB1 表达和分布的变化与病情发展的关系。我们采用酵母多糖腹腔注射诱发的小鼠 MODS 具有脓毒症的特征表现,脾脏 HMGB1 表达的消长与 MODS 病情的缓解和加重密切相关^[5]。伤后早期(8 h),脾脏 HMGB1 的表达已经开始增加,此时也

正是早期炎症介质表达的高峰;伤后 1~3 d 脾脏 HMGB1 mRNA 和蛋白表达量均大幅度增加,此时正值动物全身性损伤的急性进展期,也是动物死亡的第一个高峰;伤后 5~7 d HMGB1 表达量减少时,动物的病情也进入缓解状态;伤后 10~12 d 动物病情再次恶化,出现第二个死亡高峰,其脾脏 HMGB1 的表达也再次升高。动物病情发展过程与脾脏 HMGB1 表达的变化密切相关。进一步分析发现,脾脏 HMGB1 表达的增加早于以往报道的脓毒症动物血清 HMGB1 升高的时间^[3],提示血清中 HMGB1 的增加不仅源于外周血单核细胞,可能更多地源自脏器中的单核/巨噬细胞的活化和主动分泌,以及组织细胞损伤、坏死后释放^[11-12]。因此,脏器来源的 HMGB1 可能更早地通过旁分泌或自分泌途径发挥其致病效应。最近有研究报道,盲肠结扎穿孔大鼠血清 HMGB1 浓度在术后 4 h 就开始升高^[10];在肝缺血/再灌注小鼠血中 HMGB1 的升高出现在伤后 6 h^[13]。因此,以往根据血清中 HMGB1 升高较晚而将其定位于“脓毒症晚期介质”的观点已经面临部分实验结果的挑战。失控炎症反应早期动物脏器中 HMGB1 表达增加这一现象提示,在血清 HMGB1 含量升高前实施抑制 HMGB1 表达、释放的措施,可以更加有效地防治脓毒症。

机体免疫功能衰竭是脓毒症及 MODS 重要的致死机制^[1]。而抗原呈递细胞表面 MHC- I 类分子低表达是机体免疫功能低下的关键因素,它影响 T 细胞的活化水平和免疫应答能力。本研究中发现,伤后 8 h 脾脏 HMGB1 蛋白量与脾脏单核细胞 I-A^b 表达量同向升高,但随后则表现为反向变化,即伤后 2 d HMGB1 增加,I-A^b 表达减少;伤后 5 d HMGB1 减少,I-A^b 表达增加;伤后 10 d HMGB1 再次增加时,I-A^b 表达又减少。可以看出,I-A^b 表达的消长不仅与脾脏 HMGB1 浓度的增减相关,而且与病情严重程度相关。提示 HMGB1 对 MODS 预后的影响可能与其抑制抗原呈递细胞 MHC- I 类分子表达、抑制细胞免疫应答能力有关。

脾脏是各种免疫细胞居住、增殖、进行免疫应答及产生免疫效应物质的重要基地,与抗原识别和随后的抗体形成密切相关。因此,脾脏细胞的大量凋亡将会直接影响机体的细胞和体液免疫功能。MODS 发生时,以器官损伤和脾脏、胸腺及其他器官的淋巴细胞大量凋亡为特征^[14-15]。细胞凋亡不仅影响机体免疫机能,还激活巨噬细胞释放 HMGB1^[16]。本研究结果显示,动物脾脏细胞凋亡率在伤后呈双相升高,

这两个时相不仅是动物病情严重、死亡率高的时间段,也是 HMGB1 表达的高峰。提示脾脏 HMGB1 的表达增加可能也与脾脏淋巴细胞的大量凋亡有关,两者均可影响脾脏免疫状态而引起机体免疫紊乱,从而导致 MODS 的发展及不良预后。

参考文献

[1] 姚咏明, 柴家科, 林洪远. 现代脓毒症理论与实践. 北京: 科学出版社, 2005: 122.

[2] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science*, 1999, 285(5425): 248-251.

[3] Yang H, Wang H, Tracey KJ. HMG-1 rediscovered as a cytokine. *Shock*, 2001, 15(4): 247-253.

[4] Pullerits R, Jonsson IM, Verdreng M, et al. High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(6): 1693-1700.

[5] 赵敏, 陆江阳, 吕艺, 等. 多器官功能障碍综合征小鼠脾脏中高迁移率族蛋白-1 的表达. *临床与实验病理学杂志*, 2005, 21(5): 600-603.

[6] 孙宇, 陆江阳, 王晓虹, 等. 小鼠迟发型多器官功能障碍综合征模型复制及病理学观察. *中国危重病急救医学*, 2003, 15(1): 15-18.

[7] Goldstein RS, Gallowitsch-Puertam, Yang L, et al. Elevated high-mobility group box 1 levels in patients with cerebral and myocardial ischemia. *Shock*, 2006, 25(6): 571-574.

[8] Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB1 in

inflammation and sepsis. *J Intern Med*, 2004, 255(3): 320-331.

[9] Suda K, Kitagawa Y, Ozawa S, et al. Anti-high-mobility group box chromosomal protein 1 antibodies improve survival of rats with sepsis. *World J Surg*, 2006, 30(9): 1755-1762.

[10] Yang H, Ochani M, Li J, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101(1): 296-301.

[11] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 2002, 418(6894): 191-195.

[12] Chen G, Li J, Ochani M, et al. Bacterial endotoxin stimulates macrophages to release HMGB1 partly through CD14⁻ and TNF-dependent mechanisms. *J Leukoc Biol*, 2004, 76(5): 994-1001.

[13] Watanabe T, Kubota S, Nagaya M, et al. The role of HMGB-1 on the development of necrosis during hepatic ischemia and hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *J Surg Res*, 2005, 124(1): 59-66.

[14] 陆江阳, 王晓虹, 孙宇, 等. MODS 大鼠胸腺树突状细胞病理改变及作用的研究. *中国危重病急救医学*. 2001, 13(11): 675-678.

[15] 陆江阳, 李志宏, 王晓虹, 等. 多器官功能障碍综合征小鼠脾脏树突状细胞病理学观察. *中华病理学杂志*, 2005, 34(7): 427-428.

[16] Qin S, Wang H, Yuan R, et al. Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality. *J Exp Med*, 2006, 203(7): 1637-1642.

(收稿日期: 2008-08-20) (本文编辑: 李银平)

• 启事 •

中华医学会系列杂志从 2009 年开始标注数字对象惟一标识符

数字对象惟一标识符 (digital object identifier, DOI) 是对包括互联网信息在内的数字信息进行标识的一种工具。在传统的出版物中, 书刊、磁带、光盘都有国际标准编号 (ISBN, ISSN, ISCN) 及其条形码, 作为出版物的惟一标识。这些标识使出版物得到有效的管理, 便于读者查找和利用。而网上的文档一旦变更了网址便无从追索。数字信息标注 DOI 如同出版物的条形码, 是一个永久和惟一的标识号。随着时间推移, 数字对象的某些有关信息可能会有变化 (包括存储的物理位置), 而 DOI 可让使用者直接由此链接到出版商的数据库、文献、摘要甚至是全文, 识别码可直接指引到出版物的本身, 使国内外各种来源、不同物理地址的各种类型的学术信息实现互链互通。DOI 是一个可供全球期刊快速链接的管理系统, 整个系统由国际 DOI 基金会 (IDF) 进行全球分布式管理。随着 DOI 的普及, 可借助其进行相关的科研评价, 分析高被引频次作者、单位和论文等相关信息, 了解各领域学术研究的热点、影响和趋势, 以及研究者在本研究领域的影响力及最新研究成果。中文和外文资源, 一次和二次文献, 科技文献和数据通过 DOI 可实现动态、开放式的知识链接, 整体提升包括期刊在内的数字资源的使用率, 为读者提供更好的服务。进而逐步提高中国期刊的被引率, 整体上提高中国精品期刊在国际上的影响力和显示度, 最终推动并建立一个与世界接轨、永久、开放互动、成员主动参与、覆盖主要学术研究信息领域的知识链接系统, 推动数字期刊的发展和繁荣。

为了实现中华医学会系列杂志内容资源的有效数字化传播, 同时保护这些数字资源在网络链接中的知识产权和网络传播权, 为标识对象的版权状态提供基础, 实现对数字对象版权状态的持续追踪, 自 2009 年第 1 期开始, 中华医学会系列杂志纸版期刊和数字化期刊的论文将全部标注 DOI。即中华医学会系列杂志除科普和消息类稿件外, 其他文章均需标注 DOI, DOI 标注于每篇文章首页脚注的第 1 项。由中华医学会杂志社各期刊编辑部为决定刊载的论文标注 DOI。

参照 IDF 编码方案 (美国标准 ANSI/NISO Z39.84-2000) 规定, 中华医学会系列杂志标注规则如下: “DOI: 统一前缀/学会标识. 信息资源类型. 杂志 ISSN. ****-****. 年. 期. 论文流水号”。即: “DOI: 10.3760/cma.j.issn.****-****.yyyy.nn.zzz”。中华医学会系列杂志标注 DOI 各字段释义: “10.3760” 为中文 DOI 管理机构分配给中华医学会系列杂志的统一前缀; “cma” 为中华医学会 (Chinese Medical Association) 缩写; “j” 为 journal 缩写, 代表信息资源类别为期刊; “issn.****-****” 为国际标准连续出版物号 (ISSN); “yyyy” 为 4 位出版年份; “nn” 为 2 位期号; “zzz” 为 3 位本期论文流水号。

(中华医学会杂志社)

核转录因子- κ B对过氧化物酶增殖体激活受体 γ 调控作用的体外研究

(正文见3页)

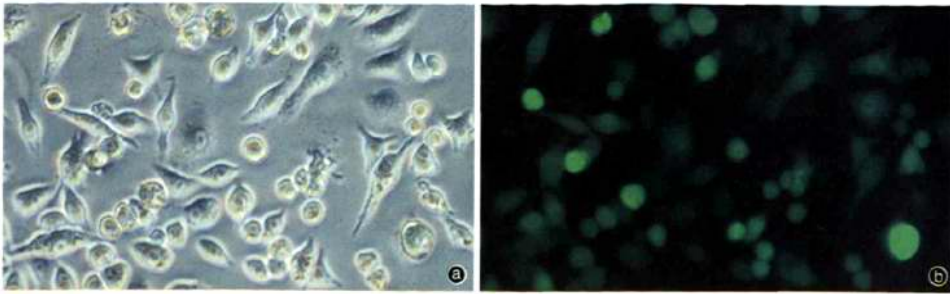


图4 光镜下(a)小鼠Ana-1细胞多呈圆形,部分贴壁伸展呈梭形;荧光显微镜下(b)所转染的小鼠Ana-1细胞呈绿色荧光 $\times 100$

内毒素血症小鼠骨骼 Toll 样受体 4 基因的变化

(正文见13页)

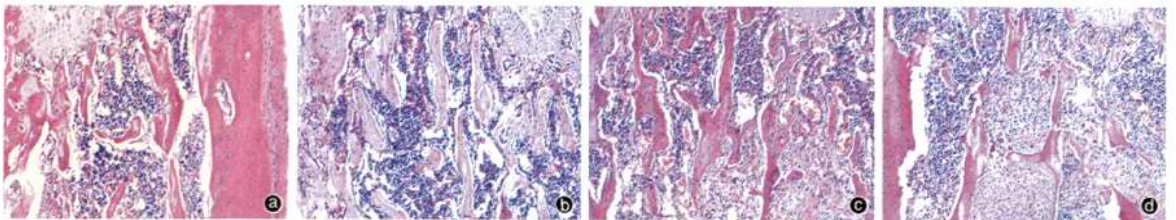


图6 光镜下正常组(a)小鼠骨骼正常,与正常组比较,LPS处理24、48、72 h组(b-d)小鼠骨骼均无明显变化 HE $\times 100$

多器官功能障碍综合征小鼠脾脏高迁移率族蛋白B1

及免疫细胞功能变化的研究

(正文见25页)

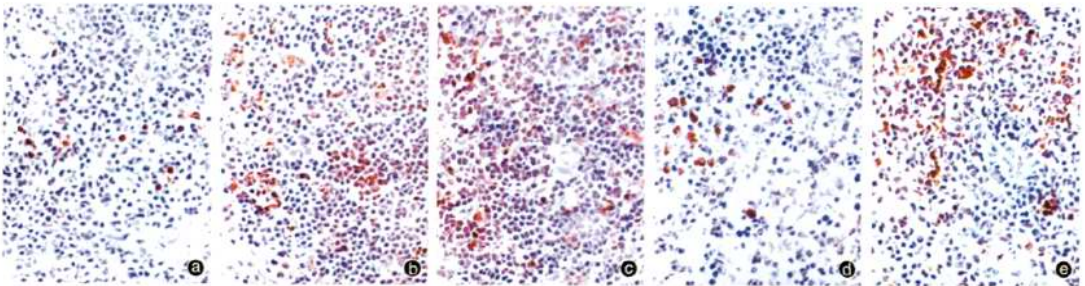


图4 TUNEL染色阳性细胞呈深棕色,正常对照组(a)小鼠脾脏白髓和红髓可见少量单个散在分布的阳性细胞;伤后12 h(b)可见散在分布的小片状阳性细胞;伤后24 h(c)阳性细胞较正常对照组明显增多,呈大片状或巢状分布;伤后5 d(d)阳性细胞明显减少,略多于正常对照组;伤后10~12 d(e)阳性细胞再次增加,大量阳性细胞呈片状分布 TUNEL $\times 400$

脓毒症早期大鼠肾上腺皮质功能变化及地塞米松的干预作用

(正文见40页)

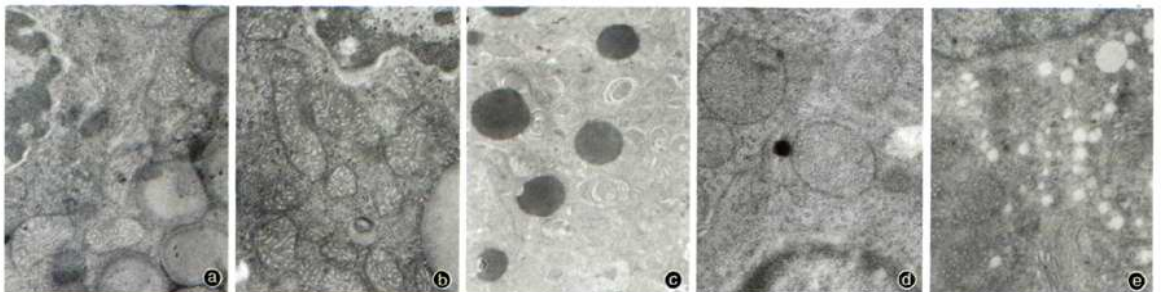


图2 正常对照组(a)、假手术组(b)大鼠肾上腺皮质束状带超微结构正常,模型组(c)、激素预处理组(d)和激素治疗组(e)大鼠肾上腺皮质束状带细胞均出现脂质耗减、髓鞘样小体以及管泡状嵴的线粒体嵴和膜部分或全部溶解消失,其中以模型组为重 铀-铅双染 a、b、d、e均 $\times 20\ 000$ c $\times 6\ 000$