

• 研究报告 •

高迁移率族蛋白 B1 在脓毒症大鼠急性肺损伤中的作用

朱虹 蔡佩佩 尹小燕 朱健

【关键词】高迁移率族蛋白 B1; 脓毒症; 肺损伤, 急性; 大鼠

脓毒症是由感染引发的全身炎症反应, 进一步发展可导致脓毒性休克、多器官功能障碍综合征(MODS), 是现代危重病医学面临的难题, 已成为临床危重病患者的重要死亡原因之一^[1]。肺是脓毒症最常累及的靶器官且常并发急性肺损伤(ALI)。目前国内外学者普遍认为, 炎症介质过度表达在 ALI 的发生发展中起关键作用^[2-4]。高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)是一种强大的致炎细胞因子, 是脓毒症致机体死亡病理过程的中间介质^[3-4], 在急性炎症反应中起重要作用。本研究中观察脓毒症大鼠 ALI 肺组织 HMGB1 的动态表达, 探讨 HMGB1 在脓毒症 ALI 发生发展中的作用。

1 材料与与方法

1.1 动物分组与模型制备: 清洁级雄性 Wistar 大鼠 32 只, 体重 200~250 g, 购自中国科学院上海实验动物中心, 动物合格证号: SCXK(沪)2007-005。按随机数字表法将大鼠分成假手术组(12 只)和脓毒症组(20 只)。参照 Wichterman 等^[5]报道的盲肠结扎穿孔术(CLP)复制脓毒症大鼠模型。假手术组除不作环形结扎和针刺穿孔外, 其余操作均与脓毒症组相同。本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.2 标本收集及处理: 假手术组和脓毒症组分别在术后 6、12、24、48 h 处死 3 只和 5 只大鼠, 取右下肺组织, 部分肺组织置 -80 °C 冰箱保存, 用于测定 HMGB1 mRNA 表达; 部分肺组织用 4% 中性甲醛溶液固定, 用于病理观察及 HMGB1 蛋白表达测定。

1.3 实时定量聚合酶链反应(PCR)检测肺组织 HMGB1 mRNA 表达: 取肺组

织 50 mg, 按 TRIzol 法常规提取细胞总 RNA, 反转录合成 cDNA, 行实时 PCR 扩增。HMGB1 引物由上海生物工程技术有限公司合成。HMGB1 引物序列: 上游 5'-CGGATGCTTCTGTCAACTTC T-3', 下游 5'-AGTTTCTTCGCAACA TCACCA-3', 扩增产物大小为 292 bp。行实时定量 PCR, 反应体系 20 μ l, 2 \times SYBR 绿色荧光染料(美国 Stratagene 公司产品)10 μ l, 逆转录产物 1 μ l, 基因上下游引物各 1.5 μ l, 参比荧光(ROX)染料 0.3 μ l, 焦碳酸二乙酯(DEPC)水 5.7 μ l。PCR 反应条件: 95 °C 10 min, 95 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 45 s, 共 40 个循环。待检标本每组设 3 个平行孔, 各重复 3 次。以 HMGB1 基因 Ct 值与相应内参照基因 β -肌动蛋白(β -actin) Ct 值的差值表示 HMGB1 基因的表达量。

1.4 免疫组化法检测肺组织 HMGB1 蛋白表达: 采用过氧化物酶标记的链霉菌卵白素法(SP 法), 将肺组织石蜡包埋、切片, 常规脱蜡, 磷酸盐缓冲液(PBS)漂洗, 3% H₂O₂ 溶液消除内源性过氧化物酶, 胰蛋白酶修复后, 正常兔血清封闭非特异性抗原, 滴加 1:500 羊抗大鼠 HMGB1 抗体(购自美国 Abcam 公司)2 °C 过夜。PBS 漂洗后滴加辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗, 37 °C 孵育 30 min, PBS 漂洗后 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)显色, 苏木素复染, 脱水、透明、封片, 光镜下观察, 以细胞核呈棕黄色染色为阳性细胞。

1.5 肺组织病理观察: 取肺组织, 用 4% 多聚甲醛溶液浸泡固定 24 h, 梯度乙醇脱水、包埋, 苏木素-伊红(HE)染色, 光镜下观察。

1.6 统计学分析: 实验数据以均数士标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 使用 SPSS 11.0 统计软件进行处理, 均数间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织 HMGB1 mRNA 的表达(表 1): 脓毒症组大鼠各时间点肺组织

HMGB1 mRNA 表达水平均较假手术组明显增高(均 $P < 0.01$), 且随术后时间的延长呈逐渐增加趋势, 至术后 24 h 达高峰后下降。

表 1 脓毒症大鼠急性肺损伤肺组织中 HMGB1 mRNA 表达($\bar{x} \pm s$)

组别	术后时间	动物数	HMGB1 mRNA
假手术组	6 h	3	1.02 \pm 0.11
	12 h	3	0.97 \pm 0.08
	24 h	3	1.01 \pm 0.13
	48 h	3	0.97 \pm 0.09
脓毒症组	6 h	5	2.13 \pm 0.19 ^a
	12 h	5	3.11 \pm 0.19 ^a
	24 h	5	4.68 \pm 0.35 ^a
	48 h	5	2.35 \pm 0.21 ^a

注: HMGB1, 高迁移率族蛋白 B1; 与假手术组比较, ^a $P < 0.01$

2.2 肺组织 HMGB1 蛋白的表达(彩色插页图 1): 假手术组 HMGB1 主要少量表达在肺泡上皮细胞中。脓毒症组肺组织 HMGB1 蛋白阳性染色表达在肺泡上皮细胞、肺间质和支气管黏膜上皮细胞, 且随着术后时间延长肺组织 HMGB1 蛋白表达水平呈逐渐增加趋势, 至术后 24 h 达高峰后下降。

2.3 肺组织病理改变: 脓毒症组大鼠随着病程的进展肺间质显著增宽, 伴有严重的充血、出血、大量炎性细胞浸润, 血管周围间隙增大。假手术组大鼠肺间质无明显充血、出血、炎性细胞浸润。

3 讨论

在脓毒症常累及的靶器官中, 肺是最容易受到损伤的器官之一^[7], 常并发 ALI, 进而发展为急性呼吸窘迫综合征(ARDS)和 MODS。其中 HMGB1 在 ALI 的发病机制中起重要作用。1999 年 Wang 等^[8]首次报道了 HMGB1 可能具有“晚期”炎症因子作用; 研究证实其参与了脓毒症后期病理生理发展过程^[9]。CLP 模型是以革兰阴性菌为主的混和性感染, 细菌可产生大量的内毒素脂多

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.

2011.04.022

基金项目: 上海高校选拔培养优秀青年教师科研专项基金(Jdy08073)

作者单位: 200011 上海交通大学医学院附属第九人民医院急诊科

通信作者: 蔡佩佩, Email: Luzhoubj@126.com

糖(LPS)。LPS 通过刺激单核/巨噬细胞分泌 HMGB1,可介导一系列级联信号:HMGB1 进一步活化巨噬细胞,促进肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6)等促炎细胞因子与重组人巨噬细胞炎症蛋白-1 α (MIP-1 α)等趋化因子的释放^[10];有研究认为, HMGB1 可与内皮细胞表面的晚期糖基化终产物受体(RAGE)相结合,通过氨基末端激酶(JNK)、细胞外信号调节激酶 1/2(ERK1/2)、p38 丝裂素活化蛋白激酶(p38MAPK)等激酶的磷酸化激活细胞内的信号转导,导致核转录因子- κ B(NF- κ B)和 Sp1 转录因子(SP-1)等转录因子入核^[11-13],从而促进内皮细胞表达 RAGE 黏附分子、TNF- α 、趋化因子、组织型纤溶酶原激活物(t-PA)及纤溶酶原激活物抑制剂-1(PAI-1),参与纤维蛋白溶解的调控^[14]。当炎症刺激引起细胞坏死或受损时,核内的 HMGB1 可释放到胞外,引发单核/巨噬细胞分泌促炎因子;而促炎因子又可促进 HMGB1 的分泌,同时 HMGB1 和促炎因子互为诱导,正反馈“瀑布式”扩大全身炎症反应综合征(SIRS),并且这种正反馈效应对后期炎症反应维持起到了相当重要的作用,可能成为多种疾病治疗的新靶点^[15]和“时间窗”^[16]。研究证实,血必净注射液、乌司他丁等治疗脓毒症可明显降低血浆或肝、肺组织中 HMGB1 水平^[17-18],提示对 HMGB1 的干预可能为今后临床干预脓毒症 ALI 开辟新的途径。

本研究中动态观察脓毒症大鼠 ALI 肺组织 HMGB1 的表达,结果显示:假手术组 HMGB1 少量表达在肺泡上皮细胞中,脓毒症大鼠肺组织 HMGB1 蛋白表达明显增高,主要表达在肺泡上皮细胞、肺间质和支气管黏膜上皮细胞中,与许多研究^[16,19]基本一致。同时脓毒症大鼠肺组织 HMGB1 mRNA 表达明显增高,且随着术后时间的延长呈逐渐增加趋

势,至术后 24 h 达高峰后开始下降。表明 HMGB1 表达的上调参与了脓毒症 ALI 的发病过程,与病情的发展密切相关^[20]。

参考文献

[1] 姚咏明, 盛志勇. 脓毒症研究的若干新动态. 中国危重病急救医学, 2000, 12: 323-325.
 [2] 钱桂生. 急性肺损伤和急性呼吸窘迫综合征研究现状与展望. 解放军医学杂志, 2003, 28, 97-101.
 [3] 王烁, 聂秀红, 郭德玉, 等. 急性肺损伤家兔早期中性粒细胞相关功能的变化研究. 中国危重病急救医学, 2004, 16: 403-408.
 [4] Bhatia M, Mochhala S. Role of inflammatory mediators in the pathophysiology of acute respiratory distress syndrome. J Pathol, 2004, 202, 145-156.
 [5] 王松柏, 姚咏明. 高迁移率族蛋白 B1 的细胞生物学效应及其与脓毒症的关系. 中国危重病急救医学, 2003, 15: 701-704.
 [6] 唐道林, 肖献忠. 高迁移率族蛋白-1 与脓毒症. 中国危重病急救医学, 2004, 16, 113-116.
 [7] Wichterman KA, Baue AE, Chaudry IH. Sepsis and septic shock, a review of laboratory models and a proposal. J Surg Res, 1980, 29, 189-201.
 [8] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science, 1999, 285, 248-251.
 [9] Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, et al. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. Mol Med, 2003, 9, 37-45.
 [10] Andersson U, Wang H, Palmblad K, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes. J Exp Med, 2000, 192, 565-570.
 [11] O'Neill LA. The role of MyD88-like adapters in Toll-like receptor signal

transduction. Biochem Soc Trans, 2003, 31, 643-647.
 [12] Fitzgerald KA, Palsson-McDermott EM, Bowie AG, et al. Mal (MyD88-adaptor-like) is required for Toll-like receptor-4 signal transduction. Nature, 2001, 413, 78-83.
 [13] Triantafyllou M, Triantafyllou K, Fernandez N. Rough and smooth forms of fluorescein-labelled bacterial endotoxin exhibit CD14/LBP dependent and independent binding that is influenced by endotoxin concentration. Eur J Biochem, 2000, 267, 2218-2226.
 [14] Fiuza C, Bustin M, Talwar S, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB-1 on human microvascular endothelial cells. Blood, 2003, 101, 2652-2660.
 [15] Mantell LL, Parrish WR, Ulloa L. HMGB-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders. Shock, 2006, 25, 4-11.
 [16] 刘辉, 姚咏明, 董月青, 等. 内毒素刺激大鼠腹腔巨噬细胞高迁移率族蛋白 B1 释放的研究. 中华实验外科杂志, 2005, 22, 37-38.
 [17] 李银平, 乔佑杰, 武子霞, 等. 血必净注射液对脓毒症大鼠高迁移率族蛋白 B1 的影响. 中国危重病急救医学, 2007, 19, 239-241.
 [18] 寇秋野, 杨祖立, 管向东, 等. 乌司他丁对脓毒症大鼠血浆高迁移率族蛋白 B1 水平的影响. 中国中西医结合急救杂志, 2009, 16, 103-105.
 [19] 冯英凯, 徐剑斌, 钱桂生, 等. 高迁移率族蛋白 1 对内毒素急性肺损伤大鼠中性粒细胞凋亡改变的影响. 免疫学杂志, 2006, 22, 410-415.
 [20] 邵文明, 姚华国, 梁小仲, 等. 高迁移率族蛋白 B1 表达水平与大鼠脓毒症严重程度及预后关系的实验研究. 中国危重病急救医学, 2006, 18, 668-672.

(收稿日期: 2010-11-09)

(本文编辑: 李银平)

• 读者 • 作者 • 编者 •

中华医学会系列杂志文献查询方法

中华医学会系列杂志 2007 年开始集体加入万方数据。《中国危重病急救医学》杂志历年文章的电子版内容可到万方医学网或万方数据上进行查询或下载, 万方医学网网址: www.med.wanfangdata.com.cn; 万方数据网址: www.wanfangdata.com.cn。

万方医学网查询方法: ①进入万方医学网首页 www.med.wanfangdata.com.cn, 在网页最上端选择“期刊导航”字段; ②在新网页中输入刊名或 ISSN、CN 号后选择“中国期刊”字段并点击期刊搜索; ③在新页面中点击期刊链接后则可进入期刊主页; ④在期刊主页中可按年、期检索杂志内容。

万方数据查询方法: ①进入万方数据网首页 www.wanfangdata.com.cn, 在网页最上端选择“学术期刊”字段; ②在新网页中输入刊名并点击刊名检索; ③在新页面中点击期刊链接后则可进入期刊主页; ④在期刊主页右端可按年、期检索杂志内容。