

• 论著 •

高迁移率族蛋白 B1 在脂多糖诱导的 ALI/ARDS 中的作用机制研究

曲建宇¹ 冯佳丽² 李君³ 黄潇¹ 齐博洋⁴ 钱甜甜¹ 王晓芝¹¹滨州医学院附属医院重症医学科, 山东滨州 256600; ²烟台市烟台山医院呼吸与危重症医学科, 山东烟台 264000; ³滨州医学院烟台附院呼吸与危重症医学科, 山东烟台 264000; ⁴烟台毓璜顶医院心外 ICU, 山东烟台 264000

通信作者: 王晓芝, Email: hxicuwxz@163.com

【摘要】 目的 探讨高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)在脂多糖(LPS)诱导的急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)中的作用及可能的发病机制。**方法** ① 体内实验: 将 24 只 SPF 级野生 C57BL/6 雄性小鼠随机分为正常对照组、ALI/ARDS 模型组、丙酮酸乙酯(EP)治疗组和 EP 对照组, 每组 6 只。采用腹腔注射 20 mg/kg LPS 制备 ALI/ARDS 模型, 正常对照组和 EP 对照组小鼠腹腔注射等量生理盐水; 之后 EP 治疗组和 EP 对照组小鼠分别腹腔注射 40 mg/kg HMGB1 抑制剂 EP。6 h 后处死小鼠取肺组织, 采用免疫荧光技术检测小鼠肺组织硫酸乙酰肝素(HS)、多配体蛋白聚糖-1(SDC-1)、乙酰肝素酶(HPA)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)表达。取小鼠眼眶血, 采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清 HMGB1 含量。② 体外实验: 将人脐静脉内皮细胞(HUVECs)随机分为正常对照组、HUVECs 损伤组(1 mg/L LPS 处理 6 h)、HMGB1 组(1 μmol/L 重组 HMGB1 处理 6 h)、HMGB1+EP 组(重组 HMGB1 处理 1 h 后加入 1 μmol/L EP 处理 6 h)、LPS+EP 组(LPS 处理 1 h 后加入 1 μmol/L EP 处理 6 h)和 EP 组(1 μmol/L EP 处理 6 h)。采用免疫荧光技术检测内皮细胞 HS、SDC-1、HPA 和 MMP-9 的表达。**结果** ① 体内实验: 光镜下显示, LPS 制模后肺泡间隔增厚, 肺泡间隙有大量炎症细胞浸润。与 ALI/ARDS 模型组相比, EP 治疗组小鼠肺组织 HS 和 SDC-1 表达量均明显升高[HS(荧光强度): 0.80 ± 0.20 比 0.53 ± 0.02 , SDC-1(荧光强度): 0.72 ± 0.02 比 0.51 ± 0.01 , 均 $P < 0.05$], HPA 和 MMP-9 表达量均明显降低[HPA(荧光强度): 2.36 ± 0.05 比 3.00 ± 0.04 , MMP-9(荧光强度): 2.55 ± 0.13 比 3.26 ± 0.05 , 均 $P < 0.05$]; EP 对照组上述指标表达量均无明显变化。与 ALI/ARDS 模型组相比, EP 治疗组血清 HMGB1 含量明显降低(μg/L: 131.88 ± 16.67 比 341.13 ± 22.47 , $P < 0.05$); EP 对照组无明显变化。② 体外实验: 与 HMGB1 组相比, HMGB1+EP 组内皮细胞 HS 和 SDC-1 表达量均明显升高[HS(荧光强度): 0.83 ± 0.07 比 0.56 ± 0.03 , SDC-1(荧光强度): 0.80 ± 0.01 比 0.61 ± 0.01 , 均 $P < 0.05$], HPA 和 MMP-9 表达量均明显降低[HPA(荧光强度): 1.30 ± 0.02 比 2.29 ± 0.05 , MMP-9(荧光强度): 1.55 ± 0.04 比 2.50 ± 0.06 , 均 $P < 0.05$]; EP 组 HS、SDC-1、HPA 和 MMP-9 表达量均无明显变化。**结论** HMGB1 参与 LPS 所致内皮细胞多糖包被的损伤, 导致肺通透性增加, 抑制 HMGB1 可减轻肺损伤。

【关键词】 急性肺损伤; 急性呼吸窘迫综合征; 内皮多糖包被; 脂多糖; 高迁移率族蛋白 B1**基金项目:** 国家自然科学基金(81670078)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220308-00224

Mechanism of high mobility group protein B1 in lipopolysaccharide-induced acute lung injury/acute respiratory distress syndromeQu Jianyu¹, Feng Jiali², Li Jun³, Huang Xiao¹, Qi Boyang⁴, Qian Tiantian¹, Wang Xiaozhi¹¹Department of Critical Care Medicine and Intensive Care Unit, Binzhou Medical University Hospital, Binzhou 256600, Shandong, China; ²Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Yantaishan Hospital, Yantai 264000, Shandong, China; ³Department of Respiratory and Critical Care Medicine, Yantai Affiliated Hospital of Binzhou Medical University, Yantai 264000, Shandong, China; ⁴Department of Cardiac Surgical Intensive Care Unit, Yantai Yuhuangding Hospital of Qingdao University Medical College, Yantai 264000, Shandong, China

Corresponding author: Wang Xiaozhi, Email: hxicuwxz@163.com

【Abstract】 Objective To investigate the role and possible pathogenesis of high mobility group protein B1 (HMGB1) in lipopolysaccharide (LPS)-induced acute lung injury/acute respiratory distress syndrome (ALI/ARDS). **Methods** ① *In vivo*, 24 SPF C57BL/6 male mice were randomly divided into normal control group, ALI/ARDS model group, ethyl pyruvate (EP) treatment group and EP control group, with 6 mice in each group. The ALI/ARDS model was established by intraperitoneal injection of 20 mg/kg LPS. Mice in normal control group and EP control group were intraperitoneally injected with the same amount of sterile normal saline. Then, mice in the EP treatment group and EP control group were intraperitoneally injected with 40 mg/kg HMGB1 inhibitor EP. After 6 hours, the mice were sacrificed and lung tissues were collected. The expressions of heparan sulfate (HS), syndecans-1 (SDC-1), heparanase (HPA) and matrix metalloproteinases-9 (MMP-9) in lung tissues were detected by immunofluorescence technique. Orbital blood of mice was collected and serum was extracted to detect the content of HMGB1 by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). ② *In vitro*, human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) were randomly divided into 6 groups: normal control group,

HUVECs damage group (treated with 1 mg/L LPS for 6 hours), HMGB1 group (treated with 1 μ mol/L recombinant HMGB1 for 6 hours), HMGB1+EP group (treated with recombinant HMGB1 for 1 hour and then added 1 μ mol/L EP for 6 hours), LPS+EP group (treated with LPS for 1 hour and then added 1 μ mol/L EP for 6 hours), EP group (treated with 1 μ mol/L EP for 6 hours). The expressions of HS, SDC-1, HPA and MMP-9 in endothelial cells were detected by immunofluorescence technique.

Results ① *In vivo*, light microscopy showed that the alveolar space was thickened after LPS stimulation, and there were a large number of inflammatory cells infiltrating in the alveolar space. Compared with ALI/ARDS model group, the expressions of HS and SDC-1 in lung tissue of EP treatment group were significantly increased [HS (fluorescence intensity): 0.80 ± 0.20 vs. 0.53 ± 0.02 , SDC-1 (fluorescence intensity): 0.72 ± 0.02 vs. 0.51 ± 0.01 , both $P < 0.05$], and the expressions of HPA and MMP-9 were significantly decreased [HPA (fluorescence intensity): 2.36 ± 0.05 vs. 3.00 ± 0.04 , MMP-9 (fluorescence intensity): 2.55 ± 0.13 vs. 3.26 ± 0.05 , both $P < 0.05$]; there were no significant changes of the above indexes in EP control group. Compared with ALI/ARDS model group, the content of serum HMGB1 in EP treatment group decreased significantly (μ g/L: 131.88 ± 16.67 vs. 341.13 ± 22.47 , $P < 0.05$); there was no significant change in the EP control group. ② *In vitro*, compared with HMGB1 group, the expressions of HS and SDC-1 in HMGB1+EP group were significantly higher [HS (fluorescence intensity): 0.83 ± 0.07 vs. 0.56 ± 0.03 , SDC-1 (fluorescence intensity): 0.80 ± 0.01 vs. 0.61 ± 0.01 , both $P < 0.05$], and the expressions of HPA and MMP-9 were significantly lower [HPA (fluorescence intensity): 1.30 ± 0.02 vs. 2.29 ± 0.05 , MMP-9 (fluorescence intensity): 1.55 ± 0.04 vs. 2.50 ± 0.06 , both $P < 0.05$]; the expression of HS, SDC-1, HPA and MMP-9 had no significant changes in EP group.

Conclusion HMGB1 participates in LPS-induced injury of endothelial cell glycocalyx, leading to increased lung permeability, and inhibition of HMGB1 can alleviate lung injury.

【Key words】 Acute lung injury; Acute respiratory distress syndrome; Glycocalyx; Lipopolysaccharide; High mobility group protein B1

Fund program: National Natural Science Foundation of China (81670078)

DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20220308-00224

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) / 急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 在临床上具有较高的发病率和病死率。微血管通透性增加和炎症反应是 ALI/ARDS 相关肺水肿形成的机制, 内皮功能障碍是血管通透性增加的病理生理学基础。内皮多糖包被是血管内皮管腔侧的一层带负电荷的纤维网, 在血管通透性方面发挥着重要的生理作用^[1-3]。内皮多糖包被的主要成分是内皮细胞表面的多配体蛋白聚糖 (syndecans, SDC) 和硫酸乙酰肝素 (heparan sulfate, HS) 蛋白聚糖, 通常用 HS 和 SDC-1 的变化来评价多糖包被的完整性^[4]; LPS (lipopolysaccharide, LPS) 诱导的乙酰肝素酶 (heparanase, HPA) 及基质金属蛋白酶 (matrix metalloproteinases, MMPs) 激活可以破坏多糖包被结构^[5]。本课题组前期研究发现, LPS 可导致人脐静脉内皮细胞 (human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) 模型和小鼠模型中内皮 HS 和 SDC-1 显著脱落; 高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1) 作为一种炎症介质, 在 ALI/ARDS 的发病过程起到重要作用, 也是晚期导致患者死亡的重要炎症介质^[6]。HMGB1 广泛分布于单核 / 巨噬细胞、内皮细胞等多种细胞内, 是染色质的结构成分, 可与 DNA 某些结构发生特异性结合, 从而在 DNA 复制、细胞分化及基因表达调控等多种生命活动中发挥重要作用^[7]。有研究表明, 丙酮酸乙酯 (ethyl pyruvate, EP) 可抑制 HMGB1 的分泌, 有助于机体抗炎作用^[8-11]。因此, 本研究通过 HMGB1 及

其抑制剂 EP 来研究 LPS 诱导的 ALI/ARDS 中内皮多糖包被破坏的可能机制, 从而为 ALI/ARDS 中血管内皮细胞多糖包被损伤修复提供新的理论依据。

1 材料方法

1.1 体内实验

1.1.1 实验动物及分组: 24 只 SPF 级野生 C57BL/6 雄性小鼠, 8~10 周龄, 体质量约 18~22 g, 购于山东济南朋悦实验动物繁育有限公司 [动物合格证号: SCXK (鲁) 20140007]。将小鼠按随机数字表法分为正常对照组、ALI/ARDS 模型组、EP 治疗组和 EP 对照组, 每组 6 只。采用腹腔注射 20 mg/kg LPS 制备 ALI/ARDS 小鼠模型, 正常对照组和 EP 对照组小鼠腹腔注射等量无菌生理盐水; 然后 EP 治疗组和 EP 对照组小鼠分别腹腔注射 40 mg/kg EP 进行干预。6 h 后处死小鼠, 经眼眶取血并提取血清, 取新鲜肺组织和灌注肺组织用于指标检测。

本研究动物处理符合实验动物管理及福利标准, 经滨州医学院附属医院实验动物伦理委员会审批 (审批号: 20220128-40)。

1.1.2 检测指标及方法

1.1.2.1 肺湿/干质量比值 (wet/dry weight ratio, W/D) 检测: 使用滤纸充分吸干左侧肺组织标本表面的血迹及液体后, 称湿质量 (W); 然后将标本置于 75 $^{\circ}$ C 电热恒温干燥箱中 24 h, 烘干完全脱水后称干质量 (D)。计算 W/D 比值。

1.1.2.2 肺组织形态学观察及 HS、SDC-1、HPA、MMP-9 和 HMGB1 检测: 小鼠肺组织用苏木素-伊

红(hematoxylin-eosin, HE)染色,光镜下观察形态学改变。采用免疫荧光技术检测 HS、SDC-1、HPA、MMP-9 和 HMGB1 在小鼠肺组织中的表达。

1.1.2.3 血清 HMGB1 水平检测:按照酶联免疫吸附试验(enzyme linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒说明书制备小鼠血清,采用多功能酶标分析仪测定血清 HMGB1 含量。

1.2 体外实验

1.2.1 实验细胞:将 HUVECs 种植于细胞培养瓶中,在 37℃、含 5% CO₂ 培养箱中进行培养。待细胞成长到密度约为 80% 时,对细胞进行处理。

1.2.2 细胞分组及处理:将 HUVECs 随机分为 5 组,正常对照组细胞不给予任何处理,直接培养;HUVECs 损伤组细胞给予 1 mg/L LPS 处理 6 h 后培养;HMGB1 组给予 1 μmol/L 重组 HMGB1 处理 6 h 后培养;HMGB1+EP 组及 LPS+EP 组分别在重组 HMGB1 和 LPS 处理 1 h 后加入 1 μmol/L EP 处理 6 h 后培养;EP 组加入 1 μmol/L EP 处理 6 h 后培养。

1.2.3 检测指标及方法:当培养瓶中的细胞密度达到 90% 时,用胰酶消化细胞,将细胞种在含玻璃爬片的 24 孔板中,放入培养箱中培养。待爬片上的细胞密度达到 90% 时,对其进行分组和加药处理。将细胞进行固定、透膜、封闭、封一抗、封二抗、染核处理后,采用细胞免疫荧光法定量检测内皮细胞 HS、SDC-1、HPA、MMP-9 的表达,用倒置荧光显微镜观察拍片。每组实验均重复 3 次。

1.3 统计学分析:采用 SPSS 17.0 统计软件分析处理数据。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,多样本间两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 体内实验

2.1.1 ALI/ARDS 模型小鼠肺水肿程度和肺组织病理学改变:ALI/ARDS 模型组小鼠肺组织 W/D 比值较正常对照组明显升

高(9.93 ± 0.24 比 4.62 ± 0.12 , $P < 0.05$)。HE 染色结果显示,与正常对照组相比,ALI/ARDS 模型组小鼠的肺泡间隔增厚,肺泡间隙中有大量炎症细胞浸润(图 1)。

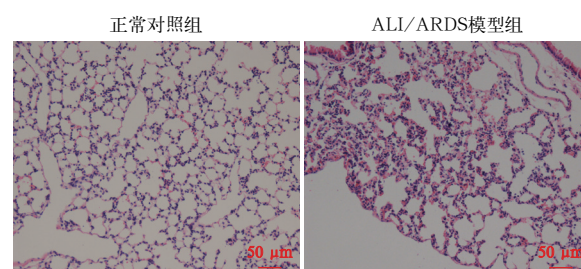


图 1 光镜下观察正常对照组和急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)模型组小鼠肺组织病理学改变 ALI/ARDS 模型组小鼠的肺泡间隔增厚,肺泡间隙中有大量炎症细胞浸润 苏木素-伊红(HE)染色 中倍放大

2.1.2 各组小鼠肺组织 HS、SDC-1、HPA 和 MMP-9 表达量比较(图 2;表 1):与正常对照组小鼠相比,ALI/ARDS 模型组小鼠肺组织 HS 和 SDC-1 表达量均明显降低,HPA 和 MMP-9 表达量均明显升高(均 $P < 0.05$)。与 ALI/ARDS 模型组相比,EP 治疗组小鼠肺组织 HS 和 SDC-1 表达量均明显升高,HPA 和 MMP-9 表达量均明显降低(均 $P < 0.05$);EP 对对照组小鼠肺组织上述指标表达量均无明显变化。

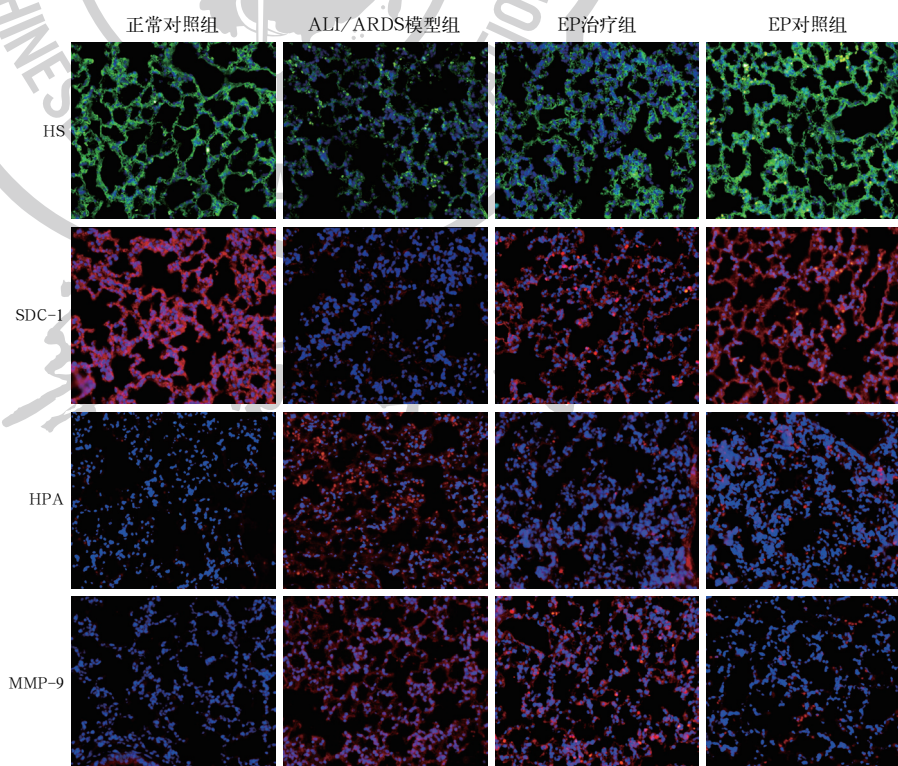


图 2 荧光显微镜下观察各组小鼠肺组织硫酸乙酰肝素(HS)、多配体蛋白聚糖-1(SDC-1)、乙酰肝素酶(HPA)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达 HS 标记的小鼠肺组织呈绿色荧光,SDC-1、HPA 和 MMP-9 标记的小鼠肺组织呈红色荧光。经脂多糖(LPS)刺激后,小鼠肺组织 HS 和 SDC-1 表达较正常对照组明显减少,HPA 和 MMP-9 表达较正常对照组明显增多;经丙酮酸乙酯(EP)处理后,小鼠肺组织 HS 和 SDC-1 表达较急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)模型组明显增多,HPA 和 MMP-9 表达较 ALI/ARDS 模型组明显减少 免疫荧光染色 低倍放大

2.1.3 各组小鼠肺组织 HMGB1 表达量及血清 HMGB1 含量比较(图 3;表 1):与正常对照组相比,ALI/ARDS 模型组肺组织 HMGB1 表达量和血清 HMGB1 含量均明显升高(均 $P<0.05$)。与 ALI/ARDS 模型组相比,EP 治疗组血清 HMGB1 含量明显降低($P<0.05$)。

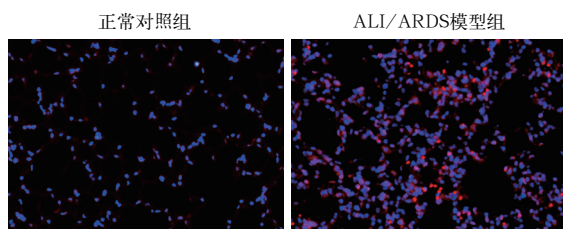


图 3 荧光显微镜下观察正常对照组和急性肺损伤/急性呼吸窘迫综合征(ALI/ARDS)模型组小鼠肺组织高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)的表达 HMGB1 标记的小鼠肺组织呈红色荧光;经脂多糖(LPS)刺激后,小鼠肺组织 HMGB1 表达较正常对照组明显增多 免疫荧光染色 低倍放大

2.2 体外实验

2.2.1 各组内皮细胞 HS、SDC-1、HPA 和 MMP-9 表达量比较(图 4;表 2):与正常对照组相比, HUVECs 损伤组内皮细胞经 LPS 刺激后 HS 和 SDC-1 表达量均明显降低, HPA 和 MMP-9 表达量均明显升高(均 $P<0.05$)。HMGB1 组内皮细胞经外源性添加 HMGB1 处理后 HS 和 SDC-1 表达量较正常对照组均明显降低, HPA 和 MMP-9 表达量较正常对照组均明显升高(均 $P<0.05$)。与 HMGB1 组相比, HMGB1+EP 组内皮细胞经 EP 处理后 HS 和 SDC-1 表达量均明显升高, HPA 和 MMP-9 表达量均明显降低(均 $P<0.05$); EP 组 HS、SDC-1、HPA 和 MMP-9 表达量均无明显变化(均 $P>0.05$)。

表 1 各组小鼠肺组织 HS、SDC-1、HPA、MMP-9、HMGB1 表达量和血清 HMGB1 含量比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	肺组织中表达量(荧光强度)					血清 HMGB1 含量 ($\mu\text{g/L}$)
		HS	SDC-1	HPA	MMP-9	HMGB1	
正常对照组	6	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	74.65 $\pm$ 0.95
ALI/ARDS 模型组	6	0.53 $\pm$ 0.02 ^a	0.51 $\pm$ 0.01 ^a	3.00 $\pm$ 0.04 ^a	3.26 $\pm$ 0.05 ^a	2.92 $\pm$ 0.09 ^a	341.13 $\pm$ 22.47 ^a
EP 治疗组	6	0.80 $\pm$ 0.20 ^b	0.72 $\pm$ 0.02 ^b	2.36 $\pm$ 0.05 ^b	2.55 $\pm$ 0.13 ^b		131.88 $\pm$ 16.67 ^b
EP 对照组	6	1.00 $\pm$ 0.07	1.00 $\pm$ 0.02	0.97 $\pm$ 0.05	1.08 $\pm$ 0.05		82.72 $\pm$ 14.39

注:HS 为硫酸乙酰肝素,SDC-1 为多配体蛋白聚糖-1,HPA 为乙酰肝素酶,MMP-9 为基质金属蛋白酶-9,HMGB1 为高迁移率族蛋白 B1,ALI 为急性肺损伤,ARDS 为急性呼吸窘迫综合征,EP 为丙酮酸乙酯;与正常对照组比较,^a $P<0.05$;与 ALI/ARDS 模型组比较,^b $P<0.05$;空白代表无此项

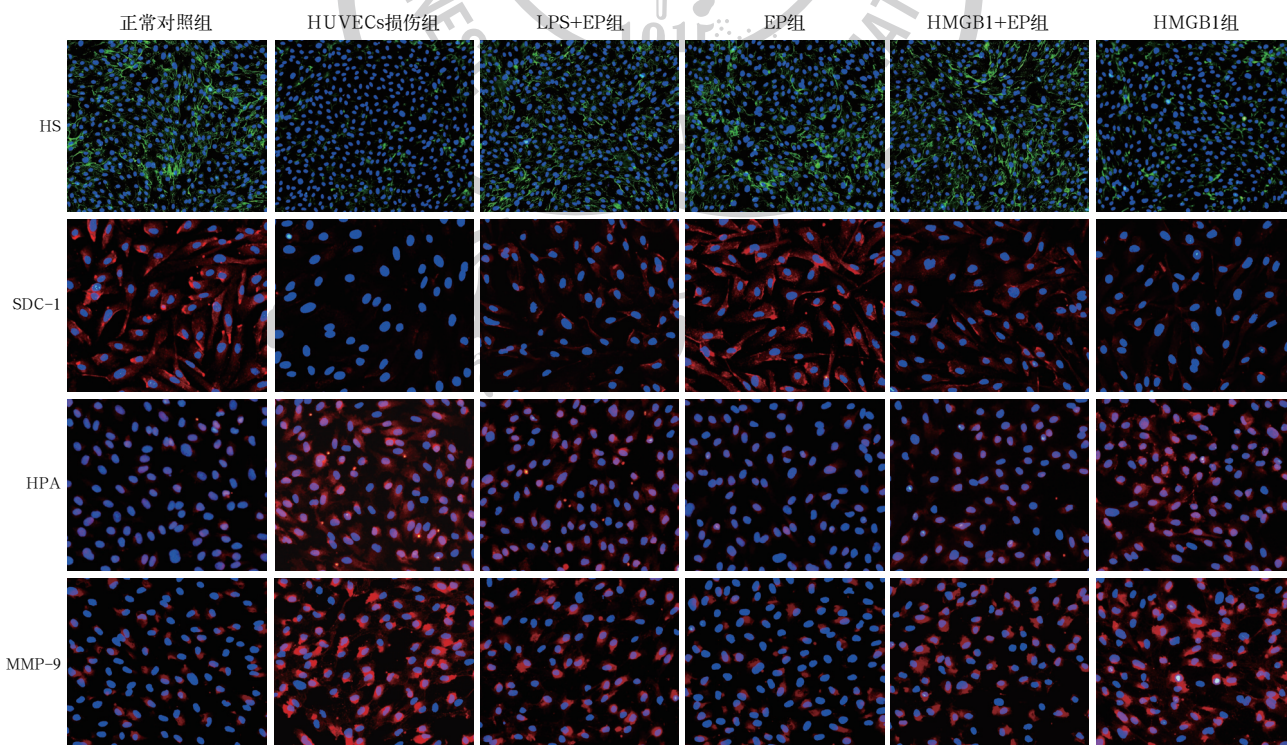


图 4 荧光显微镜下观察各组内皮细胞硫酸乙酰肝素(HS)、多配体蛋白聚糖-1(SDC-1)、乙酰肝素酶(HPA)和基质金属蛋白酶-9(MMP-9)的表达 HS 标记的人脐静脉内皮细胞(HUVECs)呈绿色荧光,SDC-1、HPA 和 MMP-9 标记的 HUVECs 呈红色荧光。经脂多糖(LPS)刺激后, HUVECs HS 和 SDC-1 表达较正常对照组明显减少, HPA 和 MMP-9 表达较正常对照组明显增多;经丙酮酸乙酯(EP)处理后, HUVECs HS 和 SDC-1 表达较 HUVECs 损伤组明显增多, HPA 和 MMP-9 表达明显减少;经外源性添加高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)处理后, HUVECs HS 和 SDC-1 表达较正常对照组明显减少, HPA 和 MMP-9 表达明显增多 免疫荧光染色 低倍放大

表 2 各组内皮细胞 HS、SDC-1、HPA 和 MMP-9 表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	HS 表达量 (荧光强度)	SDC-1 表达量 (荧光强度)	HPA 表达量 (荧光强度)	MMP-9 表达量 (荧光强度)
正常对照组	6	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
HUVECs 损伤组	6	0.31 ± 0.01 ^a	0.32 ± 0.02 ^a	2.85 ± 0.07 ^a	3.23 ± 0.09 ^a
LPS+EP 组	6	0.75 ± 0.02	0.79 ± 0.03	1.82 ± 0.05	2.08 ± 0.02
EP 组	6	1.01 ± 0.06	0.99 ± 0.07	1.01 ± 0.03	1.08 ± 0.04
HMGB1+EP 组	6	0.83 ± 0.07 ^b	0.80 ± 0.01 ^b	1.30 ± 0.02 ^b	1.55 ± 0.04 ^b
HMGB1 组	6	0.56 ± 0.03 ^a	0.61 ± 0.01 ^a	2.29 ± 0.05 ^a	2.50 ± 0.06 ^a

注: HS 为硫酸乙酰肝素, SDC-1 为多配体蛋白聚糖-1, HPA 为乙酰肝素酶, MMP-9 为基质金属蛋白酶-9, HUVECs 为人脐静脉内皮细胞, LPS 为脂多糖, EP 为丙酮酸乙酯, HMGB1 为高迁移率族蛋白 B1; 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$; 与 HMGB1 组比较, ^b $P < 0.05$

2.2.2 各组内皮细胞 HMGB1 表达量和上清液 HMGB1 含量比较(图 5; 表 3): 与正常对照组相比, HUVECs 损伤组内皮细胞 HMGB1 表达量和上清液 HMGB1 含量均明显升高(均 $P < 0.05$)。

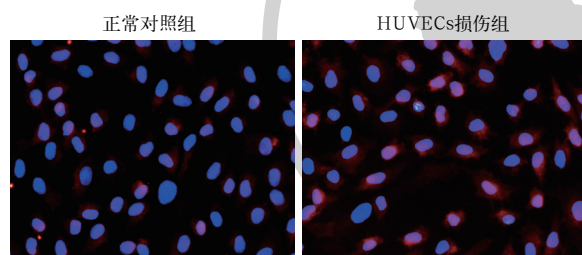


图 5 荧光显微镜下观察正常对照组和人脐静脉内皮细胞(HUVECs)损伤组内皮细胞高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)的表达 HMGB1 标记的 HUVECs 呈红色荧光。经脂多糖(LPS)刺激后, HUVECs 损伤组内皮细胞 HMGB1 较正常对照组明显增多 免疫荧光染色 低倍放大

表 3 正常对照组和 HUVECs 损伤组内皮细胞 HMGB1 表达量和上清液 HMGB1 含量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	HMGB1 表达量 (荧光强度)	HMGB1 含量 ($\mu\text{g/L}$)
正常对照组	6	1.00 ± 0.00	22.17 ± 1.95
HUVECs 损伤组	6	3.13 ± 0.13 ^a	89.82 ± 5.51 ^a

注: HUVECs 为人脐静脉内皮细胞, HMGB1 为高迁移率族蛋白 B1; 与正常对照组比较, ^a $P < 0.05$

3 讨论

本团队前期研究结果表明,无论是在 LPS 诱导的 ALI/ARDS 小鼠模型中,还是在细胞模型中,炎症因子释放均导致多糖包被结构破坏。有研究证明,多糖包被主要结构 HS 和 SDC-1 的脱落分别是由 HPA 和 MMP-9 释放增加所致^[6]。HPA 作为专一性水解 HS 的酶在人体内广泛存在,当其被 LPS 等刺激后会引起内源性 HPA 的增加,进而导致 HS 大量水解。MMP-9 是 MMPs 中的一种,其前体被酶激活

后,参与炎症反应、细胞因子的表达等^[12],前期研究已证明, MMP-9 会破坏多糖包被的重要组分 SDC-1,导致内皮屏障被破坏,诱发炎症反应^[6]。

本次实验通过构建体内 ALI/ARDS 小鼠模型和体外细胞模型发现, LPS 会导致 HMGB1 释放增加。HMGB1 作为一种晚期中介物,受到 LPS 刺激后,在肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)或白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)介导下积极释放,而通过靶向阻断 HMGB1 通路可保护小鼠免受因 LPS 引起的炎症反应而致死^[13]。HMGB1 激活核转录因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 转运,增加促炎细胞因子水平,增强肺通透性,参与内毒素诱导 ALI/ARDS 过程^[14]。HMGB1 在受到氧化应激或炎症刺激后释放至细胞外基质,细胞外的 HMGB1 参与气道慢性持续性的炎症反应、气道重构和纤维化等病理过程,而抑制 HMGB1 相关信号的激活能够减轻炎症因子释放、抑制炎症细胞募集、改善气道重塑和气道高反应性^[15]。本研究结果表明,在 LPS 诱导的小鼠模型中 HMGB1 水平的升高与多糖包被损伤有关。与此同时,我们通过构建 ALI/ARDS 体外细胞模型发现,外源性添加 HMGB1 可导致 HPA 和 MMP-9 表达升高,同时 HS 和 SDC-1 表达降低。而经过 HMGB1 抑制剂 EP 处理后, HPA 和 MMP-9 表达降低, HS 和 SDC-1 破坏减轻。实验数据表明,外源性添加 HMGB1 可增加 HPA 和 MMP-9 的生成,导致内皮多糖包被破坏,而 EP 特异性抑制 HMGB1 的活性,减少 HPA 和 MMP-9 的激活与释放,使内皮多糖包被破坏减少。综上所述,在 LPS 诱导的 ALI/ARDS 中, HMGB1 对 HPA 及 MMP-9 的调节起关键作用。

EP 是丙酮酸的一种简单脂族酯,已被证明在各种病理条件下具有抗炎和保护作用。在 LPS 诱导的休克或脓毒症模型中, EP 可降低血浆中 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 或 IL-10 水平,改善 ALI 并提高生存率^[16-17]。有研究报道, EP 可抑制 HMGB1 的分泌,并提示这可能有助于其抗炎作用^[18]。现已证明,在病毒性心肌炎中,病死率降低伴随 EP 抑制 HMGB1 和 NF- κ B 活化^[19]。有研究显示, HMGB1 可促进 T 淋巴细胞 IL-2 合成释放,而活化 T 细胞核因子(nuclear factor of activated T cells, NFAT)家族是淋巴细胞内调控免疫介质转录表达的关键信号通路^[20]。进一步实验结果表明,使用 EP 作为特异性抑制剂来抑制 HMGB1 的表达,发现 EP 可以减少 HMGB1 的激

活,保护多糖包被结构,使之与外源性添加 HMGB1 组形成对比。以上结果证实,高表达 HMGB1 对多糖包被具有破坏作用,低表达 HMGB1 的破坏作用明显减轻,进一步验证了 HMGB1 在 LPS 诱导的 ALI/ARDS 中起关键的调节作用。

通过构建 LPS 致 ALI/ARDS 的动物和细胞模型,提示 HMGB1 是 LPS 致内皮细胞多糖包被 HS 和 SDC-1 损伤的重要炎症通路,抑制 HMGB1 可减轻肺损伤程度,为 ALI/ARDS 药物开发提供新的思路。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Grundmann S, Fink K, Rabadzhieva L, et al. Perturbation of the endothelial glycocalyx in post cardiac arrest syndrome [J]. Resuscitation, 2012, 83 (6): 715–720. DOI: 10.1016/j.resuscitation.2012.01.028.
- [2] Henrich M, Gruss M, Weigand MA. Sepsis-induced degradation of endothelial glycocalyx [J]. Scientific World J, 2010, 10: 917–923. DOI: 10.1100/tsw.2010.88.
- [3] Hofmann-Kiefer KF, Knabl J, Martinoff N, et al. Increased serum concentrations of circulating glycocalyx components in HELLP syndrome compared to healthy pregnancy: an observational study [J]. Reprod Sci, 2013, 20 (3): 318–325. DOI: 10.1177/1933719112453508.
- [4] Johansson PI, Stensballe J, Rasmussen LS, et al. A high admission syndecan-1 level, a marker of endothelial glycocalyx degradation, is associated with inflammation, protein C depletion, fibrinolysis, and increased mortality in trauma patients [J]. Ann Surg, 2011, 254 (2): 194–200. DOI: 10.1097/SLA.0b013e318226113d.
- [5] Lipowsky HH. The endothelial glycocalyx as a barrier to leukocyte adhesion and its mediation by extracellular proteases [J]. Ann Biomed Eng, 2012, 40 (4): 840–848. DOI: 10.1007/s10439-011-0427-x.
- [6] Huang LN, Zhang XH, Ma XH, et al. Berberine alleviates endothelial glycocalyx degradation and promotes glycocalyx restoration in LPS-induced ARDS [J]. Int Immunopharmacol, 2018, 65: 96–107. DOI: 10.1016/j.intimp.2018.10.001.
- [7] 党伟, 张宪, 姚咏明, 等. 早期胰岛素强化治疗对严重创伤后高迁移率蛋白 B1 水平及患者预后的影响 [J]. 中国危重病急救医学, 2011, 23 (3): 173–175. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2011.03.014.
- [8] Chung KY, Park JJ, Kim YS. The role of high-mobility group box-1 in renal ischemia and reperfusion injury and the effect of ethyl pyruvate [J]. Transplant Proc, 2008, 40 (7): 2136–2138. DOI: 10.1016/j.transproceed.2008.06.040.
- [9] Davé SH, Tilstra JS, Matsuo K, et al. Ethyl pyruvate decreases HMGB1 release and ameliorates murine colitis [J]. J Leukoc Biol, 2009, 86 (3): 633–643. DOI: 10.1189/jlb.1008662.
- [10] Liang XY, Chavez AR, Schapiro NE, et al. Ethyl pyruvate administration inhibits hepatic tumor growth [J]. J Leukoc Biol, 2009, 86 (3): 599–607. DOI: 10.1189/jlb.0908578.
- [11] Shin JH, Lee HK, Lee HB, et al. Ethyl pyruvate inhibits HMGB1 phosphorylation and secretion in activated microglia and in the postischemic brain [J]. Neurosci Lett, 2014, 558: 159–163. DOI: 10.1016/j.neulet.2013.11.006.
- [12] 边伟帅, 陈炜, 赵磊, 等. 大剂量维生素 E 对急性呼吸窘迫综合征大鼠基质金属蛋白酶-9 表达水平的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2021, 28 (1): 39–42. DOI: 10.3969/j.issn.1008-9691.2021.01.010.
- [13] 舒小斌, 范绍辉, 徐宇, 等. 高迁移率蛋白 B1 在 ARDS 中的释放机制研究进展 [J]. 中华危重病急救医学, 2021, 33 (7): 889–893. DOI: 10.3760/cma.j.cn121430-20200421-00316.
- [14] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice [J]. Science, 1999, 285 (5425): 248–251. DOI: 10.1126/science.285.5425.248.
- [15] 张子霄, 卞涛. HMGB1 参与慢性气道炎症性疾病的研究进展 [J]. 国际呼吸杂志, 2021, 41 (24): 1890–1895. DOI: 10.3760/cma.j.cn131368-20201204-01109.
- [16] Hauser B, Kick J, Asfar P, et al. Ethyl pyruvate improves systemic and hepatosplanchnic hemodynamics and prevents lipid peroxidation in a porcine model of resuscitated hyperdynamic endotoxemia [J]. Crit Care Med, 2005, 33 (9): 2034–2042. DOI: 10.1097/01.ccm.0000178177.03979.ce.
- [17] Kang HJ, Mao Z, Zhao Y, et al. Ethyl pyruvate protects against sepsis by regulating energy metabolism [J]. Ther Clin Risk Manag, 2016, 12: 287–294. DOI: 10.2147/TCRM.S97989.
- [18] Uchiyama T, Delude RL, Fink MP. Dose-dependent effects of ethyl pyruvate in mice subjected to mesenteric ischemia and reperfusion [J]. Intensive Care Med, 2003, 29 (11): 2050–2058. DOI: 10.1007/s00134-003-1966-x.
- [19] Yu Y, Yu Y, Liu M, et al. Ethyl pyruvate attenuated coxsackievirus B3-induced acute viral myocarditis by suppression of HMGB1/RAGE/NF- κ B pathway [J]. Springerplus, 2016, 5: 215. DOI: 10.1186/s40064-016-1857-6.
- [20] 赵擎, 姚咏明, 丁丽华, 等. 高迁移率蛋白 B1 免疫调控机制研究 [J]. 中国医师杂志, 2014, 16 (1): 6–9. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1008-1372.2014.01.002.

(收稿日期: 2022-03-08)

• 科研新闻速递 •

PCI 治疗缺血性左心室功能: 一项随机临床试验

与单纯的内科治疗相比,目前尚未明确经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)血运重建是否可以改善严重缺血性左心室收缩功能障碍患者的无心血管事件生存率和左心室功能。为此,有学者进行了一项随机临床试验。研究人员将左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF) ≤ 0.35 、存在广泛冠状动脉病变、适合 PCI 且心肌有活力的患者随机分配接受 PCI 加最佳药物治疗(PCI 组)或单独的最佳药物治疗(药物治疗组)。主要复合结局是全因死亡或心力衰竭(心衰)住院;次要结局是 6 个月和 12 个月时的 LVEF 和生活质量评分。结果:共有 700 例患者接受了随机分组,其中 347 例被分配到 PCI 组,353 例被分配到最佳药物治疗组。在中位时间 41 个月内,PCI 组 129 例患者(37.16%)和最佳药物治疗组 134 例患者(37.96%)发生了主要结局事件[风险比为 0.99;95% 可信区间(95%CI)为 0.78 ~ 1.27; $P=0.96$]。两组的 LVEF 在 6 个月时平均差为 -1.6% (95%CI 为 -3.7 ~ 0.5) 和 12 个月时平均差为 0.9% (95%CI 为 -1.7 ~ 3.4)。PCI 组患者 6 个月和 12 个月的生活质量评分似乎要高一点,但在 24 个月时两组基本无明显差异。研究人员据此得出结论:在接受最佳药物治疗的严重缺血性左心室收缩功能障碍患者中,PCI 血运重建并未降低全因死亡或心衰住院率。

罗红敏,编译自《N Engl J Med》,2022-08-27(电子版)