

拮抗高迁移率族蛋白 B1 对烫伤小鼠 白细胞介素 -35 表达及 T 淋巴细胞免疫功能的影响

童森¹ 祝筱梅² 吴瑶² 于燕² 李志清¹ 姚咏明²

(1. 南方医科大学南方医院, 广东 广州 510515; 2. 解放军总医院第一附属医院创伤研究中心, 北京 100048)

【摘要】 目的 观察特异性拮抗高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 对烫伤小鼠白细胞介素 -35 (IL-35) 表达及 T 淋巴细胞免疫功能的影响。**方法** 选择成年雄性 BALB/c 小鼠 30 只, 按随机数字表法分为正常组、假伤组、烫伤组、Abox 干预组, 正常组 6 只, 其余各组每组 8 只。将小鼠背部皮肤置于 97 °C 恒温热水中 6 s 造成约 15% 体表面积烫伤模型, Abox 干预组小鼠烫伤后 2 h 和 12 h 腹腔注射 HMGB1 特异性拮抗剂 Abox 300 μg。烫伤后 24 h 处死小鼠, 取心、肝、脾、肺等组织, 用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 测定各组织中 HMGB1 和 IL-35 含量; 用实时荧光定量反转录 - 聚合酶链反应 (qRT-PCR) 分析 IL-35 亚基 p35 和 EB 病毒诱导基因 3 (EBI3) 的 mRNA 表达水平; 由脾脏提取单个核细胞检测 HMGB1 和 IL-35 分泌水平, 分离脾脏淋巴细胞检测效应 T 细胞增殖活性及 IL-2、γ-干扰素 (IFN-γ)、IL-4 分泌水平。**结果** 与烫伤组比较, Abox 干预后, 各器官 HMGB1 含量和脾脏单个核细胞 HMGB1 分泌水平显著降低 [心脏 (mg/g): 65.78 ± 4.42 比 110.49 ± 11.19, 肝脏 (mg/g): 50.90 ± 3.72 比 117.77 ± 8.10, 脾脏 (mg/g): 83.34 ± 3.90 比 149.84 ± 11.93, 肺脏 (mg/g): 125.15 ± 8.75 比 236.20 ± 17.51, 脾脏单个核细胞 (μg/L): 34.57 ± 0.69 比 73.66 ± 19.03]; 各器官组织 p35 和 EBI3 的 mRNA 表达 [相对定量 (RQ) 值] 及 IL-35 蛋白水平均有不同程度下降 [p35 mRNA (RQ 值): 心脏为 0.91 ± 0.62 比 19.74 ± 18.05, 肝脏为 0.42 ± 0.19 比 14.85 ± 8.39, 脾脏为 1.99 ± 1.12 比 21.94 ± 6.90, 肺脏为 0.50 ± 0.21 比 5.15 ± 3.46; EBI3 mRNA (RQ 值) 心脏为 0.63 ± 0.61 比 74.25 ± 15.19, 肝脏为 0.64 ± 0.09 比 56.59 ± 19.99, 脾脏为 1.24 ± 0.48 比 32.72 ± 3.34, 肺脏为 0.30 ± 0.06 比 2.41 ± 1.43; IL-35 蛋白 (μg/g): 心脏为 142.40 ± 19.95 比 241.64 ± 12.40, 肝脏为 272.68 ± 14.90 比 409.76 ± 21.60, 脾脏为 66.94 ± 9.60 比 92.28 ± 8.82, 肺脏为 235.88 ± 15.65 比 193.50 ± 27.06; 均 $P < 0.05$], 脾脏 T 淋巴细胞增殖活性增强 (A 值: 1.26 ± 0.26 比 1.03 ± 0.05) 及 IL-2 分泌水平也显著升高 (ng/L: 153.48 ± 26.64 比 101.77 ± 34.55), IFN-γ/IL-4 比值显著增加 (7.44 ± 1.70 比 0.33 ± 0.07), 差异均有统计学意义 (均 $P < 0.01$)。**结论** 特异性拮抗 HMGB1 可显著下调烫伤小鼠重要组织 IL-35 表达水平, 有效促进脾脏 T 细胞增殖及 Th1 功能极化, 从而有助于改善严重烧伤后免疫抑制状态。

【关键词】 高迁移率族蛋白 B1; 白细胞介素 -35; T 淋巴细胞; 免疫抑制; 烫伤

Effects of antagonist of high mobility group box-1 protein on interleukin-35 expression and T cell-mediated immunity in mice after thermal injury Tong Sen*, Zhu Xiaomei, Wu Yao, Yu Yan, Li Zhiqing, Yao Yongming. *Department of Burn Surgery, Nanfang Hospital, Southern Medical University, Guangzhou 510515, Guangdong, China

Corresponding authors: Yao Yongming, Trauma Research Center, First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China, Email: c_ff@sina.com; Li Zhiqing, Email: lizq@fimmu.com

【Abstract】 Objective To investigate the effects of specific antagonist of high mobility group box-1 protein (HMGB1) on interleukin-35 (IL-35) expression and T cell-mediated immunity in mice after major burns. **Methods** Thirty male adult BALB/c mice were randomly divided into normal control group ($n = 6$), sham group ($n = 8$), burn group ($n = 8$) and Abox (specific antagonist of HMGB1) treatment group ($n = 8$). The dorsal and lateral surfaces of the mice were shaved for 15% total body surface area (TBSA) under ether anesthesia, and the shaved areas in burn group and Abox treatment group were exposed and immersed in 97 °C hot water for 6 seconds creating burn models. Abox interference group was given intraperitoneal injection of the specific antagonist of HMGB1 300 μg per mouse at 2 hours and 12 hours after burn injury. After modeling for 24 hours, the mice were sacrificed and their hearts, livers, spleens and lungs were harvested and homogenized. Enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) was applied to measure the contents of HMGB1 and IL-35. The real time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (q-PCR) was used to analyze the mRNA expression levels of the sub-gene p35 of IL-35 and EB virus induced gene 3 (EBI3). Lymphocytes collected from the spleen were used to detect the effective T cell proliferation activity and secretion levels of IL-2, γ-interferon (IFN-γ) and IL-4. **Results** Compared with burn group, the levels of HMGB1 in different organ tissues and spleen mononuclear cells were significantly decreased after interference of Abox [hearts

doi: 10.3969/j.issn.1008-9691.2016.01.004

基金项目: 国家自然科学基金重点项目 (81130035, 81372054, 81272090); 国家重点基础研究发展计划项目 (2012CB518102)

童森为南方医科大学南方医院与解放军总医院第一附属医院联合培养研究生, 实验在解放军总医院第一附属医院完成。

通讯作者: 姚咏明, Email: c_ff@sina.com; 李志清, Email: lizq@fimmu.com

(mg/g): 65.78 ± 4.42 vs. 110.49 ± 11.19 , livers (mg/g): 50.90 ± 3.72 vs. 117.77 ± 8.10 , spleens (mg/g): 83.34 ± 3.90 vs. 149.84 ± 11.93 , lungs (mg/g): 125.15 ± 8.75 vs. 236.20 ± 17.51 , spleen mononuclear cells ($\mu\text{g/L}$): 34.57 ± 0.69 vs. 73.66 ± 19.03 , all $P < 0.01$]; the mRNA expressions of p35 and EBI3 and protein levels of IL-35 in various organ tissues were decreased to certain different degrees [hearts (p35 mRNA): 0.91 ± 0.62 vs. 19.74 ± 18.05 , livers (p35 mRNA): 0.42 ± 0.19 vs. 14.85 ± 8.39 , spleens (p35 mRNA): 1.99 ± 1.12 vs. 21.94 ± 6.90 , lungs (p35 mRNA): 0.50 ± 0.21 vs. 5.15 ± 3.46 ; hearts (EBI3 mRNA): 0.63 ± 0.61 vs. 74.25 ± 15.19 , livers (EBI3 mRNA): 0.64 ± 0.09 vs. 56.59 ± 19.99 , spleens (EBI3 mRNA): 1.24 ± 0.48 vs. 32.72 ± 3.34 , lungs (EBI3 mRNA): 0.30 ± 0.06 vs. 2.41 ± 1.43 ; hearts (IL-35 protein, $\mu\text{g/g}$): 142.40 ± 19.95 vs. 241.64 ± 12.40 , livers (IL-35 protein, $\mu\text{g/g}$): 272.68 ± 14.90 vs. 409.76 ± 21.6 , spleens (IL-35 protein, $\mu\text{g/g}$): 66.94 ± 9.60 vs. 92.28 ± 8.82 , lungs (IL-35 protein, $\mu\text{g/g}$): 235.88 ± 15.65 vs. 193.50 ± 27.06 , all $P < 0.05$], the T cell proliferate activity was enhanced (A value: 1.26 ± 0.26 vs. 1.03 ± 0.05), the secretion level of IL-2 was significantly elevated (ng/L: 153.48 ± 26.64 vs. 101.77 ± 34.55) and the IFN- γ /IL-4 ratio was obviously increased (7.44 ± 1.70 vs. 0.33 ± 0.07), all the differences being statistically significant (all $P < 0.01$). **Conclusions** The specific antagonist of HMGB1 can obviously down-regulate the IL-35 expression in vital organs and effectively promote the T cell proliferation and the Th1 cell function polarization in spleen in mice with thermal injury, in turn contributing to improving the immune inhibitory status after severe burn.

【Key words】 High mobility group box-1 protein; Interleukin-35; T lymphocytes; Immunosuppression; Burns

严重烧伤可导致全身性炎症反应,激发免疫功能异常,尤其当患者烧伤面积超过 60% 时,并发脓毒症的发生率为 15%~26% 或可并发多器官功能衰竭(MOF)^[1],病死率高^[2]。高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 作为经典的损伤相关分子模式(DAMP)因子和晚期炎性介质在创烧伤、脓毒症等病理生理过程中扮演着重要角色^[3-4]。本课题组既往研究证实,严重烧伤后体内 HMGB1 水平明显升高,与器官损害及预后密切相关。调节性 T 细胞(Treg)是一类具有负性免疫调节效应的 T 细胞亚型^[5],烧伤后其相对数量增加和功能增强是机体免疫功能抑制的重要发病机制^[6],而白细胞介素-35(IL-35)与 Treg 免疫抑制功能密切相关。本研究通过特异性拮抗烫伤动物模型体内 HMGB1 的作用,观察对烧伤小鼠各器官 IL-35 表达的影响及其与 T 细胞免疫功能的关系,并初步探讨其可能作用机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物与材料: 雄性 SPF 级 BALB/c 小鼠,购自中国医学科学院实验动物研究所,动物许可证号: SCXK(京)2014-004。HMGB1 特异性拮抗剂 Abox 购于意大利 HMGBiotech 公司; HMGB1 酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒购于日本 Shino-Test 公司; IL-35 ELISA 试剂盒购于美国 Biolegend 公司; IL-2、IL-4、 γ -干扰素(IFN- γ) ELISA 试剂盒购于江苏太仓依科赛生物科技有限公司; CD3、CD28 单克隆抗体(单抗)购于美国 Sigma 公司; CCK-8 试剂盒购于日本同仁公司; 反转录试剂盒购于美国 Promega 公司; 实时荧光定量反转录-聚合酶链反应(qRT-PCR)系统购于美国 Illumina 公司。

1.2 动物分组及模型复制: 30 只小鼠,体质量

24~26 g。实验前适应性饲养 1 周,称体质量、编号,按随机数字表法分为正常组(6 只)、假伤组(8 只)、烫伤组(8 只)、Abox 干预组(8 只)。使用恒温自动控制水浴锅,将水温保持于 97 °C,设定时间为 6 s,造成 15% 总体表面积(TBSA)烫伤模型。假伤组动物则浸于 37 °C 温水中。将小鼠背部皮肤残余热水用无菌纱布吸净,涂抹碘伏抗感染;并于伤后 0、6、12 h 颈后皮下注射 37 °C 生理盐水 1.0 mL 补液抗休克。Abox 干预组小鼠分别于伤后 2、12 h 腹腔注射 Abox 溶液(2.5 g/L,每只 120 μL),假伤组同时时间点腹腔注射等量生理盐水。

1.3 伦理学: 本实验中动物处置方法符合动物伦理学标准。

1.4 检测指标及方法: 4 组小鼠伤后 24 h 处死,取心、肝、脾及肺脏等组织标本,放入 4 °C 无菌磷酸盐缓冲液(PBS)中保存备检。

1.4.1 小鼠脾脏单个核细胞制备及脾脏 T 淋巴细胞分离: 取脾脏标本,剪碎、研磨、过滤,收集细胞悬液,离心 8 min,弃上清液;加入 1 mL PBS 重配细胞悬液和 2 mL 小鼠淋巴细胞分离液,离心 15 min,取中层云雾状细胞团;用 PBS 反复洗涤后,加 PBS 10 mL 离心 5 min;弃上清液并计数细胞。部分细胞加入新培养液(含 0.1% CD3 及 0.1% CD28 单抗),按 2×10^6 个/ μL 接种于 96 孔板,置于培养箱,72 h 后每孔收集 100 μL 上清液放入小离心管(EP 管),-80 °C 保存,待测细胞因子(HMGB1、IL-35)。剩余细胞加入含体积浓度 10% 胎牛血清(FBS)的 RPMI1640 培养液重悬,调整细胞浓度后接种于 75 cm^2 培养皿培养 2~3 h,收集细胞悬液,移入离心管离心 5 min,弃上清液,加入新培养液,调整细胞浓度后按相同细胞

浓度种于 96 孔板,置入培养箱。

1.4.2 细胞增殖活性检测:72 h 后,96 孔板每孔收集 100 μ L 上清液放入小离心管(EP 管)中, -80°C 保存,待测细胞因子(IL-2、IL-4、IFN- γ);然后每孔加 10 μ L CCK-8 溶液继续培养 8 h,酶标仪检测波长 450 nm 处吸光度($A_{450\text{nm}}$)值。

1.4.3 组织 IL-35 mRNA 表达水平测定:IL-35 由 IL-12 α (即 p35) 和 EB 病毒诱导基因 3(EBI3) 两个亚基构成,故分别检测 IL-35 两个亚基的 mRNA 表达改变。取 100 mg 待测器官加入少量 4 $^{\circ}\text{C}$ 匀浆液(1 mL PBS:10 μ L 复合蛋白酶抑制剂配制)制备组织匀浆,以 TRIzol 法提取 RNA,当吸光度 A_{260}/A_{280} 比值在 1.7~2.0、质量浓度大于 300 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 即为合格标本, -80°C 保存。使用购于美国 Promega 公司的反转录试剂盒,反转录总 RNA,引物由上海生工公司设计并合成。使用 SYBR Mix 试剂盒扩增。qPCR 反应总体系为 10 μ L,模板 cDNA 0.5 μ L,上下游引物各 0.25 μ L,无酶水 4 μ L,SYBR Mix 5 μ L。加热程序:95 $^{\circ}\text{C}$ 酶激活 3 min,95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 3 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火及延伸 40 s,共 40 个循环。结束后自动进入仪器设定溶解曲线程序计算,以相对定量(RQ)值表示其表达量。

1.4.4 HMGB1、IL-35、IL-2、IL-4、IFN- γ 的蛋白表达水平测定:取 100 mg 组织加入少量匀浆液[1 mL PBS、0.5 μ L 叠氮化钠、5 μ L 曲通 100 (Triton X-100)、10 μ L 复合蛋白酶抑制剂配制)制备组织匀浆。低温离心 10 min 后取上清液,蛋白定量后 -80°C 保存。采用 ELISA 法检测组织中 HMGB1、IL-35 及 T 细胞培养上清中 IL-2、IL-4、IFN- γ 蛋白水平,操作按试剂盒说明书进行,酶标

仪分析每孔的 $A_{450\text{nm}}$ 值。根据标准品 $A_{450\text{nm}}$ 值及蛋白浓度求出标准曲线回归方程后,将样品 A 值代入标准曲线并乘以相应的稀释倍数,计算出样品浓度。

1.5 统计学方法:使用 SPSS16.0 软件对各组数据进行统计分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,资料满足正态分布时,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Abox 干预对烫伤小鼠组织 HMGB1 水平的影响(表 1):与假伤组比较,烫伤组各器官 HMGB1 含量和脾脏单个核细胞 HMGB1 分泌水平显著上升,Abox 干预后均明显下降(均 $P < 0.01$)。

2.2 Abox 干预对烫伤小鼠体内 IL-35 表达水平的影响:IL-35 由 p35 和 EBI3 两个亚基构成,故分别检测 IL-35 的两个亚基 mRNA 表达水平。

2.2.1 Abox 干预对烫伤小鼠 IL-35 mRNA 表达的影响(表 1):与假伤组比较,烫伤组小鼠各器官 p35 和 EBI3 mRNA 表达均显著升高,Abox 干预后各器官中的表达均明显下调(均 $P < 0.01$)。

2.2.2 Abox 干预对烫伤小鼠 IL-35 蛋白水平的影响(表 1):烫伤组心、肝、脾脏组织 IL-35 蛋白含量及脾脏单个核细胞分泌 IL-35 蛋白水平均较假伤组明显升高,肺组织 IL-35 蛋白变化趋势与其他组织完全相反;Abox 干预后心、肝、脾、IL-35 蛋白含量及脾脏单个核细胞分泌 IL-35 蛋白水平均明显下降,肺 IL-35 蛋白水平则明显上升(均 $P < 0.05$)。

2.3 Abox 干预对烫伤小鼠脾脏 T 细胞免疫功能的影响(表 2):与假伤组比较,烫伤组 T 淋巴细胞分泌 IFN- γ 及 IL-4 水平均明显增多;干预组 IFN- γ

表 1 烫伤后各组小鼠组织器官 HMGB1 蛋白含量及 IL-35 的 mRNA 和蛋白表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数 (只)	组织 HMGB1 蛋白(mg/g)				脾脏单个核细胞 分泌 HMGB1($\mu\text{g}/\text{L}$)		组织 IL-35 蛋白($\mu\text{g}/\text{g}$)				脾脏单个核细胞 分泌 IL-35($\mu\text{g}/\text{L}$)	
		心脏	肝脏	脾脏	肺脏			心脏	肝脏	脾脏	肺脏		
正常组	6	68.78 $\pm$ 3.15	70.86 $\pm$ 4.34	100.48 $\pm$ 4.78	119.21 $\pm$ 13.89	19.62 $\pm$ 1.25	165.15 $\pm$ 29.45	347.45 $\pm$ 28.85	49.32 $\pm$ 1.60	297.30 $\pm$ 41.03	0.24 $\pm$ 0.01		
假伤组	8	82.12 $\pm$ 8.84	81.92 $\pm$ 5.11	101.02 $\pm$ 4.67	137.66 $\pm$ 12.90	21.80 $\pm$ 5.70	208.47 $\pm$ 15.91	362.11 $\pm$ 12.60	41.43 $\pm$ 1.69	247.47 $\pm$ 19.05	0.68 $\pm$ 0.01		
烫伤组	8	110.49 $\pm$ 11.19 ^a	117.77 $\pm$ 8.10 ^a	149.84 $\pm$ 11.93 ^a	236.20 $\pm$ 17.51 ^a	73.66 $\pm$ 19.03 ^a	241.64 $\pm$ 12.40 ^a	409.76 $\pm$ 21.60 ^a	92.28 $\pm$ 8.82 ^a	193.50 $\pm$ 27.06 ^a	1.58 $\pm$ 0.22 ^a		
干预组	8	65.78 $\pm$ 4.42 ^c	50.90 $\pm$ 3.72 ^c	83.34 $\pm$ 3.90 ^c	125.15 $\pm$ 8.75 ^c	34.57 $\pm$ 0.69 ^c	142.40 $\pm$ 19.95 ^c	272.68 $\pm$ 14.90 ^c	66.94 $\pm$ 9.60 ^c	235.88 $\pm$ 15.65 ^c	0.25 $\pm$ 0.01 ^c		

组别	动物数 (只)	p35 mRNA(RQ 值)				EBI3 mRNA(RQ 值)			
		心脏	肝脏	脾脏	肺脏	心脏	肝脏	脾脏	肺脏
正常组	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	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00	1.00 $\pm$ 0.00
假伤组	8	3.15 $\pm$ 2.09	2.38 $\pm$ 0.54	1.28 $\pm$ 0.72	1.62 $\pm$ 1.27	3.04 $\pm$ 2.12	0.87 $\pm$ 0.19	1.14 $\pm$ 0.46	1.03 $\pm$ 0.45
烫伤组	8	19.74 $\pm$ 18.05 ^a	14.85 $\pm$ 8.39 ^a	21.94 $\pm$ 6.90 ^a	5.15 $\pm$ 3.46 ^a	74.25 $\pm$ 15.19 ^a	56.59 $\pm$ 19.99 ^a	32.72 $\pm$ 3.34 ^a	2.41 $\pm$ 1.43 ^b
干预组	8	0.91 $\pm$ 0.62 ^c	0.42 $\pm$ 0.19 ^c	1.99 $\pm$ 1.12 ^c	0.50 $\pm$ 0.21 ^c	0.63 $\pm$ 0.61 ^c	0.64 $\pm$ 0.09 ^c	1.24 $\pm$ 0.48 ^c	0.30 $\pm$ 0.06 ^c

注:与假伤组比较,^a $P < 0.05$,^b $P < 0.01$;与烫伤组比较,^c $P < 0.05$,^d $P < 0.01$

表 2 各组脾脏 T 淋巴细胞免疫功能指标比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	动物数(只)	IFN- γ (ng/L)	IL-4 (ng/L)	IFN- γ /IL-4	T 淋巴细胞增殖活性(A 值)	IL-2 (ng/L)
正常组	6	31.0 $\pm$ 10.2	25.8 $\pm$ 2.1	1.20 $\pm$ 0.38	1.14 $\pm$ 0.18	163.51 $\pm$ 33.57
假伤组	8	10.4 $\pm$ 1.8	29.3 $\pm$ 6.78	0.37 $\pm$ 0.09	1.17 $\pm$ 0.05	191.49 $\pm$ 23.92
烫伤组	8	32.7 $\pm$ 5.6 ^a	99.6 $\pm$ 8.7 ^a	0.33 $\pm$ 0.07 ^c	1.03 $\pm$ 0.05	101.77 $\pm$ 34.55 ^b
干预组	8	157.7 $\pm$ 43.5 ^b	21.2 $\pm$ 2.5 ^b	7.44 $\pm$ 1.70 ^b	1.26 $\pm$ 0.26	153.48 $\pm$ 26.64 ^d

注:与假伤组比较,^a $P<0.01$;与烫伤组比较,^b $P<0.01$;与正常组比较,^c $P<0.01$

水平较烫伤组明显上升,而 IL-4 水平明显下降;与正常组比较,烫伤组 IFN- γ /IL-4 比值显著降低,而 Abox 干预组较烫伤组明显升高(均 $P<0.01$)。

2.4 T 淋巴细胞增殖活性及 IL-2 水平比较(表 2):烫伤组 T 淋巴细胞增殖活性低于假伤组,促进 T 细胞增殖的细胞因子 IL-2 水平也明显下降。Abox 干预后, T 细胞增殖能力明显恢复, IL-2 分泌水平也显著升高(均 $P<0.01$)。

3 讨论

严重烧伤后组织损伤及应激常会引起机体剧烈的炎症反应,损害机体免疫功能,增加患者发生感染的风险^[1]。Hotchkiss 等^[7]对并发脓毒症死亡病例的研究发现,绝大部分出现免疫功能抑制,脾淋巴细胞功能衰竭。有研究提示,脓毒症患者预后不良与机体免疫受抑有关,但导致脓毒症患者出现免疫抑制的机制尚不明确^[8]。HMGB1 作为一种晚期炎症介质在脓毒症病理生理过程中起重要作用,严重烧伤后主要组织广泛表达 HMGB1,且持续时间长^[9],应用 HMGB1 抑制剂可有效防止脓毒症的发生发展,并能不同程度地减轻组织损伤和降低动物死亡率^[10]。临床资料显示,严重烧伤患者第 1 天血浆 HMGB1 含量明显升高,其水平与严重脓毒症病理过程密切相关^[11]。

本课题组前期研究发现,严重烫伤动物 HMGB1 表达水平升高,与脾脏 Treg 表面标志分子表达上调、免疫抑制功能增强有关^[12-13],这可能是烫伤后机体免疫功能障碍发生的重要机制。本实验利用特异性抑制剂 Abox 对烫伤小鼠进行了干预研究。结果显示,与假伤组比较,烫伤后不同器官中 HMGB1 含量明显上升, Abox 干预则能明显降低组织中 HMGB1 水平,在心、肝、脾脏组织中 HMGB1 蛋白水平甚至低于正常组。究其原因,可能是因为 Abox 抑制 HMGB1 分泌后,切断了 HMGB1 的正反馈作用,使其既不能诱导其他炎症因子表达,也不能诱导其自身的更多分泌。与组织 HMGB1 改变相似, Abox 干预后烫伤诱导的脾脏单个核细胞分泌 HMGB1 的效应也明显抑制,证实 Abox 作为 HMGB1 的特异性

抑制剂,可显著拮抗 HMGB1 的生物学效应。

当 Treg 细胞内的 IL-35 的各亚基独立存在时,是影响 Treg 发育、成熟及发挥免疫调节功能不可或缺的因子^[14],而 Treg 可通过分泌 IL-35 来调节效应 T 细胞的免疫功能。在对自身免疫性疾病研究中观察到组织或血清中 IL-35 水平降低^[15-16];而在脓毒症患者血清中 IL-35 水平则明显升高,且与脓毒症病情严重程度密切相关^[17]。本实验结果显示,烫伤打击后组织器官 IL-35 mRNA 表达水平迅速上调,其中心、肝、脾脏及脾脏单个核细胞分泌 IL-35 水平亦同步升高;而 Abox 干预能显著抑制上述器官 IL-35 表达上调,脾脏单个核细胞分泌 IL-35 水平也有明显下降。提示拮抗 HMGB1 生物学效应可能有利于减弱烧伤动物 Treg 功能增强,进而改善免疫抑制状态。

与上述器官 IL-35 表达趋势不同,假伤处理可导致小鼠肺脏 IL-35 蛋白水平明显下降,烫伤 24 h 其表达水平较假伤组更低。使用 Abox 干预后,肺组织 IL-35 蛋白水平反而明显上升,笔者考虑可能与肺脏自身特点相关。在严重烧伤患者中,肺脏经常是第一个炎症反应受累器官,容易并发急性肺损伤^[18]。目前研究表明,早期炎症因子可引发肺脏炎症反应的“瀑布效应”^[19];而促炎细胞因子在肺部过度产生可能抑制局部 Treg 活化及 IL-35 释放,从而呈现与其他器官不同的状态。本实验烫伤后肺组织 IL-35 表达下调,可能与其高浓度的 HMGB1 作用有关,因为肺脏是体内 Treg 分布最为丰富的器官之一, HMGB1 对不同组织 Treg 活化可能具有抑制效应^[20-21]。由此可见, HMGB1 对 Treg 及其他免疫细胞分泌 IL-35 可能有双向调节作用,其确切机制有待深入探讨。

为进一步研究拮抗 HMGB1 活性对烫伤小鼠体内效应 T 细胞免疫功能的影响,本研究对小鼠脾脏中 T 淋巴细胞增殖分化能力进行了分析。结果显示, Abox 能显著改善 T 细胞在烫伤后增殖抑制状态,使 T 细胞分泌 IL-2 水平增加,增殖活性明显增强。同时, Abox 干预可有效改善烫伤引起的 Th2 功能极化,

促使 T 细胞向 Th1 方向分化^[22]。因此, Abox 通过拮抗烫伤小鼠 HMGB1 水平, 可有效改善机体细胞免疫功能状态。业已明确, Treg 对效应 T 细胞的增殖及分化具有抑制作用, 但 Abox 干预治疗烫伤小鼠后效应 T 细胞免疫活性的改变是否与 HMGB1 介导 Treg 功能及其 IL-35 水平直接相关, 目前尚不清楚, 需要体内外实验进一步明确。

参考文献

- [1] Kraft R, Herndon DN, Al-Mousawi AM, et al. Burn size and survival probability in paediatric patients in modern burn care: a prospective observational cohort study [J]. *Lancet*, 2012, 379 (9820): 1013-1021.
- [2] 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.
- [3] 张晓娟, 梁正刚, 马晓春. 高迁移率族蛋白 B1 对人脐静脉内皮细胞增殖及迁移能力的影响 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (12): 711-714.
- [4] Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5 (4): 331-342.
- [5] 艾宇航, 姚咏明, 戴新贵. 不同剂量血必净对内毒素诱导调节性 T 细胞凋亡的影响 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2010, 17 (3): 141-144.
- [6] 汪勤, 赵春辉, 蔡琴, 等. 脓毒症患者外周血微小 RNA-155 和调节性 T 细胞表达的关系 [J]. *中华危重病急救医学*, 2014, 26 (3): 179-183.
- [7] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Immunosuppression in sepsis: a novel understanding of the disorder and a new therapeutic approach [J]. *Lancet Infect Dis*, 2013, 13 (3): 260-268.
- [8] Hotchkiss RS, Monneret G, Payen D. Sepsis-induced immunosuppression: from cellular dysfunctions to immunotherapy [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13 (12): 862-874.
- [9] Liu H, Yao YM, Yu Y, et al. Role of Janus kinase/signal transducer and activator of transcription pathway in regulation of expression and inflammation-promoting activity of high mobility group box protein 1 in rat peritoneal macrophages [J]. *Shock*, 2007, 27 (1): 55-60.
- [10] Zhang LT, Yao YM, Dong YQ, et al. Relationship between high-mobility group box 1 protein release and T-cell suppression in rats after thermal injury [J]. *Shock*, 2008, 30 (4): 449-455.
- [11] 董宁, 金伯泉, 姚咏明, 等. 严重烧伤后细胞免疫改变及其与高迁移率族蛋白 B1 的相关性 [J]. *中华外科杂志*, 2008, 46 (10): 759-762.
- [12] Huang LF, Yao YM, Zhang LT, et al. The effect of high-mobility group box 1 protein on activity of regulatory T cells after thermal injury in rats [J]. *Shock*, 2009, 31 (3): 322-329.
- [13] Yang H, Ochani M, Li J, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1 [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101 (1): 296-301.
- [14] 刘艳存, 柴艳芬, 姚咏明. 巨噬细胞在脓毒症发病机制中的作用研究进展 [J]. *中华危重病急救医学*, 2013, 25 (4): 247-250.
- [15] Shen P, Roch T, Lampropoulou V, et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases [J]. *Nature*, 2014, 507 (7492): 366-370.
- [16] Li Y, Wang Y, Liu Y, et al. The possible role of the novel cytokines il-35 and il-37 in inflammatory bowel disease [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 136329.
- [17] Cao J, Xu F, Lin S, et al. IL-35 is elevated in clinical and experimental sepsis and mediates inflammation [J]. *Clin Immunol*, 2015, 161 (2): 89-95.
- [18] Turnage RH, Nwariaku F, Murphy J, et al. Mechanisms of pulmonary microvascular dysfunction during severe burn injury [J]. *World J Surg*, 2002, 26 (7): 848-853.
- [19] Wheeler AP, Bernard GR. Acute lung injury and the acute respiratory distress syndrome: a clinical review [J]. *Lancet*, 2007, 369 (9572): 1553-1564.
- [20] Gratz IK, Campbell DJ. Organ-specific and memory treg cells: specificity, development, function, and maintenance [J]. *Front Immunol*, 2014, 5: 333.
- [21] Zhang Y, Yao YM, Huang LF, et al. The potential effect and mechanism of high-mobility group box 1 protein on regulatory T cell-mediated immunosuppression [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2011, 31 (2): 249-257.
- [22] 邱海波, 周韶霞, 蒋雄斌, 等. 雷公藤多甙对小鼠急性肺损伤的防治作用 [J]. *中国中西医结合急救杂志*, 2001, 8 (2): 109-112.

(收稿日期: 2015-11-27)

(本文编辑: 邸美仙 李银平)

· 读者 · 作者 · 编者 ·

本刊对来稿的一般要求

文稿应具有科学性、创新性、实用性和导向性。要求资料真实、可靠, 数据准确, 必要时应进行统计学处理; 文字精炼, 层次清楚; 论点明确, 论据充分, 结论清晰。应特别注意对研究过程和方法陈述的严谨性、逻辑关系的严密性、文字表述的流畅性。

来稿需经第一作者或通讯作者所在单位审核, 并签署带有全体作者签字和盖有单位公章的论文投稿介绍信及授权书。论文投稿介绍信及授权书可在本刊网站下载 (<http://www.cccm-em120.com>)。推荐信应证明稿件内容和数据资料的真实性, 注明对稿件的审评意见以及无一稿两投、不涉及保密、署名无争议等项, 并加盖单位公章。如涉及保密问题, 需附有关部门审查同意发表的证明。需要特别说明的是, 科研论文一般具有职务作品的属性。为了保护知识产权, 对于原创性研究论文, 本刊要求稿件推荐信须由享有该研究知识产权的单位 (即科研立项单位、病例资料所在单位) 出具; 多中心研究的推荐信可由作为该项研究主持者的第一作者或通信作者的所在单位出具。述评、综述、论坛类稿件不受上述规定限制。

欢迎作者通过 Email 投稿, 《中国中西医结合急救杂志》的投稿邮箱: cccm@em120.com。Email 投稿后, 作者还需邮寄纸质版稿件 1 份以及各类基金项目批件复印件, 以及论文投稿介绍信及授权书。

《中国中西医结合急救杂志》一般不退还原稿, 请作者自留底稿。投稿时请自留论文的原始图片。为了便于必要时编辑部与作者及时取得联系, 请在文稿后注明第一作者或通讯作者的联系方式 (移动电话及 Email), 所有处理稿件的相关问题均通过 Email 完成。