

HMGB1 在  $\alpha$ 2A- 肾上腺素受体介导脓毒血症大鼠急性肺损伤的作用 \*纪木火<sup>1</sup> 吴 晶<sup>1</sup> 田 蜜<sup>1</sup> 李仁奇<sup>1</sup> 李国民<sup>2</sup> 范云霞<sup>2</sup> 杨建军<sup>1△</sup>

(1 南京大学医学院南京军区南京总医院麻醉科 江苏 南京 210002 2 江苏大学附属金坛医院 ICU 江苏 金坛 213200)

**摘要** 目的 探讨 HMGB1 在  $\alpha$ 2A- 肾上腺素受体介导脓毒血症大鼠急性肺损伤(ALI)的作用。方法 64 大鼠建立盲肠结扎穿孔法(CLP)脓毒症模型 随机均分为以下两组:CLP 组及 CLP+ 马来酸钠组。各组分于模型建立后 2( $T_1$ )、6( $T_2$ )、12( $T_3$ )、24 h( $T_4$ )时检测大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、高迁移率族蛋白 1(HMGB1)及 IL-10 含量。CLP24 h 后检测肺组织干湿重比(W/D)和髓过氧化物酶活性(MPO)及 HMGB1 表达 并采用 HE 法进行肺组织学评分。结果 CLP+ 马来酸钠组  $T_2$  时的 TNF- $\alpha$  水平明显低于 CLP 组( $P<0.05$ ) ; 而 HMGB1 在  $T_2$ 、 $T_3$  及  $T_4$  均明显低于 CLP 组( $P<0.05$ ) ;IL-10 在各个时间点比较结果差异无统计学意义( $P>0.05$ )。CLP+ 马来酸钠组肺组织 W/D、MPO 活性、肺组织损伤评分均明显低于 CLP 组( $P<0.05$ )。CLP+ 马来酸钠组肺组织 HMGB1 表达明显低于 CLP 组( $P<0.05$ )。结论 HMGB1 参与了 ALI 的病理过程,  $\alpha$ 2A- 肾上腺素受体阻断可以通过抑制 HMGB1 从而改善 ALI 时的肺功能。

**关键词** 高迁移率族蛋白-1  $\alpha$ 2A- 肾上腺素受体 脓毒症 急性肺损伤

中图分类号:Q95-3 R631.2 文献标识码:A 文章编号:1673-6273(2012)02-215-03

Effect of High Mobility Group Box-1 Protein on  $\alpha$ 2A-Adrenoceptors-Mediated Acute Lung Injury in a Rat Model of Sepsis\*JI Mu-huo<sup>1</sup>, WU Jing<sup>1</sup>, TIAN Mi<sup>1</sup>, LI Ren-qi<sup>1</sup>, LI Guo-min<sup>2</sup>, FAN Yun-xia<sup>2</sup>, YANG Jian-jun<sup>1△</sup>

(1 Dept. of Anesthesiology, Nanjing General Hospital of Nanjing Military Command, School of Medicine, Nanjing University, Nanjing, 210002, China; 2 Department of Anesthesiology and Intensive Care, Jintan Hospital, Changzhou, 213200, CHINA)

**ABSTRACT Objective:** To investigate the effect of high mobility group box-1 protein on  $\alpha$ 2A-adrenaline receptors-mediated acute lung injury in a rat model of sepsis. **Methods:** In a sepsis model by cecal ligation and puncture (CLP), sixty-four SD rats were randomly divided into the following groups: CLP group and CLP + maleate group. Plasma levels of TNF- $\alpha$ , HMGB1 and IL-10 were determined at the following time points: 2 ( $T_1$ ), 6 ( $T_2$ ), 12 ( $T_3$ ) and 24 h ( $T_4$ ) after CLP. Lung was removed for the determinations of pulmonary wet-to-dry ratio (W/D), myeloperoxidase activity (MPO), total histological scores and HMGB1 immunohistochemistry analysis 24 h after CLP. **Results:** Plasma levels of TNF- $\alpha$  at  $T_2$  and HMGB1 at  $T_2$ ,  $T_3$  and  $T_4$  were significantly lower in CLP + maleate group than CLP group ( $P<0.05$ ). There was no difference in IL-10 over time between groups ( $P>0.05$ ). Pulmonary levels of W/D, MPO, total histological scores and HMGB1 expression were significantly lower than those in CLP group ( $P<0.05$ ). **Conclusions:** HMGB1 plays a key role in the pathophysiology of ALI, and antagonism of  $\alpha$ 2A-adrenoceptors improves pulmonary function by inhibiting HMGB1.

**Key words:** HMGB1;  $\alpha$ 2A-adrenaline receptors; Sepsis; Acute lung injury

**Chinese Library Classification(CLC):** Q95-3, R631.2 **Document code:** A

**Article ID:**1673-6273(2012)02-215-03

## 前言

急性肺损伤(ALI)的本质是早期和晚期炎性介质共同参与的肺内失控性炎症反应<sup>[1]</sup>。最近文献报道通过阻断  $\alpha$ 2A- 肾上腺素受体可以降低脓毒血症 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等 " 早期 " 炎症介质的表达从而改善 ALI<sup>[2]</sup>,但 " 晚期 " 炎性因子如高迁移率族蛋白 B1(high mobility group box 1, HMGB1)在  $\alpha$ 2A- 肾上腺素受体介导脓毒血症 ALI 的作用目前还不清楚。本实验拟采用大鼠盲肠结扎穿孔(CLP)模型,观察 HMGB1 在  $\alpha$ 2A- 肾上腺素受体介导脓毒血症大鼠 ALI 的作用,旨在为有效防治 ALI 提供新的线索。

## 1 材料与方

## 1.1 一般材料及材料

健康雄性清洁级 SD 大鼠 64 只,体重 300-420g(由南京军区总医院动物实验中心提供),随机均分为以下两组( $n=8$ ): CLP 组及 CLP+ 马来酸钠组。大鼠肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )和自细胞介素-10(IL-10)酶联免疫吸附法(ELISA)检测试剂盒(美国 Biosource International 公司生产);大鼠 HMGB1 ELISA 检测试剂盒(日本 Shino-Test 公司产品)。马来酸钠(美国 Tocris Bioscience 公司)

## 1.2 动物模型制备和药物处理

采用盲肠结扎穿孔法(CLP)复制脓毒血症模型,术前禁食 12 h,乌拉坦(1250 mg/kg)腹腔注射剂量麻醉,沿腹正中线做一 1 cm 长的切口,游离肠系膜和盲肠,以 4-0 丝线环形结扎盲肠

\* 基金项目 江苏省 " 六大人才高峰 " 课题(2008093);常州市卫生局科技计划项目(WZ201044)

作者简介 纪木火(1982-) 男,硕士研究生,主要研究方向 危重病医学

$\Delta$ 通讯作者 杨建军 电话 025-52323834 E-mail: jianjunyang1971@163.com

(收稿日期 2011-06-02 接受日期 2011-06-30)

根部,用 18 号针头在结扎端贯通穿刺 1 次,挤出粪便少许,还纳肠段,依次缝合腹膜和皮肤。对照组仅做剖腹、分离盲肠远端、关腹手术。术后立即皮下注射生理盐水 1 ml,补充术中液体丢失。对应时间点腹腔内注射同等剂量生理盐水。CLP+ 马来酸钠组于 CLP 后 4 及 12 h 腹腔分别注射马来酸钠 2.5 mg/kg; CLP 组于 CLP 后 4 及 12 h 腹腔分别注射生理盐水 1 ml。

1.3 检测指标及方法

分别于 CLP 后 2(T<sub>1</sub>)、6(T<sub>2</sub>)、12(T<sub>3</sub>)、24 h(T<sub>4</sub>)取股静脉血 3 ml,离心 10 min 后取血清,-80 °C 保存。采用 ELISA 法检测血清中 TNF-α、HMGB1 及 IL-10 的水平。按试剂盒说明书步骤进行操作,根据标准品吸光度(A)值分别求出标准曲线回归方程,将样品值代入标准曲线并乘以相应的稀释倍数,计算出样品浓度,免疫组织化学检测肺组织 HMGB1 表达。此外,CLP24 h 后检测肺组织干湿重比(W/D)和髓过氧化物酶活性(MPO);并采用 HE 染色法进行肺组织学评分。

统计学处理 采用 SPSS16.0 统计软件进行分析,计量资料

以均数± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用成组 t 检验。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血浆炎症因子水平(表 1)

CLP+ 马来酸钠组 T<sub>2</sub> 时的 TNF- 水平明显低于 CLP 组(P<0.05);而 HMGB1 在 T<sub>2</sub>、T<sub>3</sub> 及 T<sub>4</sub> 均明显低于 CLP 组(P<0.05),IL-10 在各个时间点比较结果差异无统计学意义(P>0.05)。

2.2 肺组织 W/D、MPO 活性、肺组织损伤评分(表 2)

CLP+ 马来酸钠组肺组织 W/D、MPO 活性、肺组织损伤评分均明显低于 CLP 组(P<0.05)。

2.3 肺组织 HMGB1 免疫组织化学结果(图 1)

CLP+ 马来酸钠组肺组织 HMGB1 表达明显低于 CLP 组(P<0.05)。

表 1 两组血浆中 TNF-α、HMGB1 及 IL-10 比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 Comparison of plasma levels of TNF-α, HMGB1 and IL-10 in both groups after CLP

Group/Time		T <sub>1</sub>	T <sub>2</sub>	T <sub>3</sub>	T <sub>4</sub>
TNF-α	CLP group	116± 15	306± 51	78± 20	59± 14
(pg/mL)	CLP+ maleate group	123± 17	225± 42 <sup>a</sup>	67± 17	51± 13
HMGB1	CLP group	3± 1	9± 3	19± 6	13± 3
(g/L)	CLP+ mal eate group	3± 1	5± 2 <sup>a</sup>	10± 4 <sup>a</sup>	6± 2 <sup>a</sup>
IL-10	CLP+ maleate group	6± 2	12± 3	15± 4	13± 4
(pg/mL)	CLP + maleate group	5± 2	13± 4	17± 6	12± 3

注 a P<0.05 与 CLP 组同时间点比较

Note: a P<0.05 vs CLP group at the same time point

表 2 两组 W/D、MPO 活性、肺组织损伤评分比较( $\bar{x} \pm s$ )

Table 2 Comparison of lung W/D, MPO and histological scores 24 h after CLP in both groups

Group	W/D	MPO(U/g)	Total histological scores
CLP group	5.4 ± 0.3	12 ± 4	12.6 ± 1.4
CLP + maleate group	4.9 ± 0.2 <sup>a</sup>	7 ± 2 <sup>a</sup>	10.2 ± 1.1 <sup>a</sup>

注 a P<0.05 与 CLP 组比较

Note: a P<0.05 vs CLP group

3 讨论

本实验采用了临床相关的 CLP 脓毒症模型,病理学检查显示肺组织充血明显,大量炎性细胞浸润、肺泡壁严重水肿、肺泡完整性破坏,肺泡腔内可见出血和渗出,肺呈现急性弥漫性炎症表现,上述病理结果表明脓毒症性 ALI 模型制备成功。本研究发现 a2A- 肾上腺素受体拮抗剂马来酸钠可以降低脓毒症大鼠 HMGB1 表达及改善 ALI。

肺脏是脓毒症时最易受累的靶器官,TNF- 及 IL-1β 是导致炎症反应和急性肺损伤发病过程中最早释放的细胞因子,为炎症中重要的启动因子。然而,这些炎性因子在血浆中上升快

而降低也快,这也是既往炎性因子拮抗方案临床应用失败的主要原因。HMGB1 为分子量为 30000 的非组 DNA 结合蛋白,因其在凝胶电泳时泳动速度快而得名。HMGB1 较 TNF- 及 IL-1β 等早期释放的炎性因子产生迟且持续高水平释放时间持久,因此 HMGB1 也被称作为 "晚期" 炎性介质<sup>[3]</sup>。研究显示 HMGB1 的释放在脓毒症及 ALI 的发生发展中扮演了重要角色。Ueno 等<sup>[4]</sup>报道 ALI 时血浆中 HMGB1 浓度明显升高,而使用抗 HMGB1 抗体可以明显改善 LPS 引起的 ALI<sup>[5]</sup>。HMGB1 可诱导多种促炎介质的表达进而加重肺脏损害,这促使人们将 HMGB1 等分泌较晚、体内持续时间较长、且与临床脓毒症患者死亡时相接近、临床治疗 "窗口" 较宽炎症因子作为新的干

预目标。

研究发现脓毒血症时巨噬细胞  $\alpha 2A$ - 肾上腺素受体表达显著增加<sup>[1]</sup>,且  $\alpha 2A$ - 肾上腺素受体兴奋在介导去甲肾上腺素的释放起了关键作用。而去甲肾上腺素水平升高又促进 TNF- $\alpha$ 、IL-6 的释放,从而扩大全身炎症反应,对机体不利<sup>[2,6]</sup>。新近的一

项研究支持了这一观点,Zhang 等<sup>[7]</sup>应用  $\alpha 2A$ - 肾上腺素受体拮抗剂马来酸钠明显降低脓毒血症大鼠血浆中的 TNF-、IL-6 及乳酸水平,并且减轻肠组织中的炎症反应和延长动物的生存率。

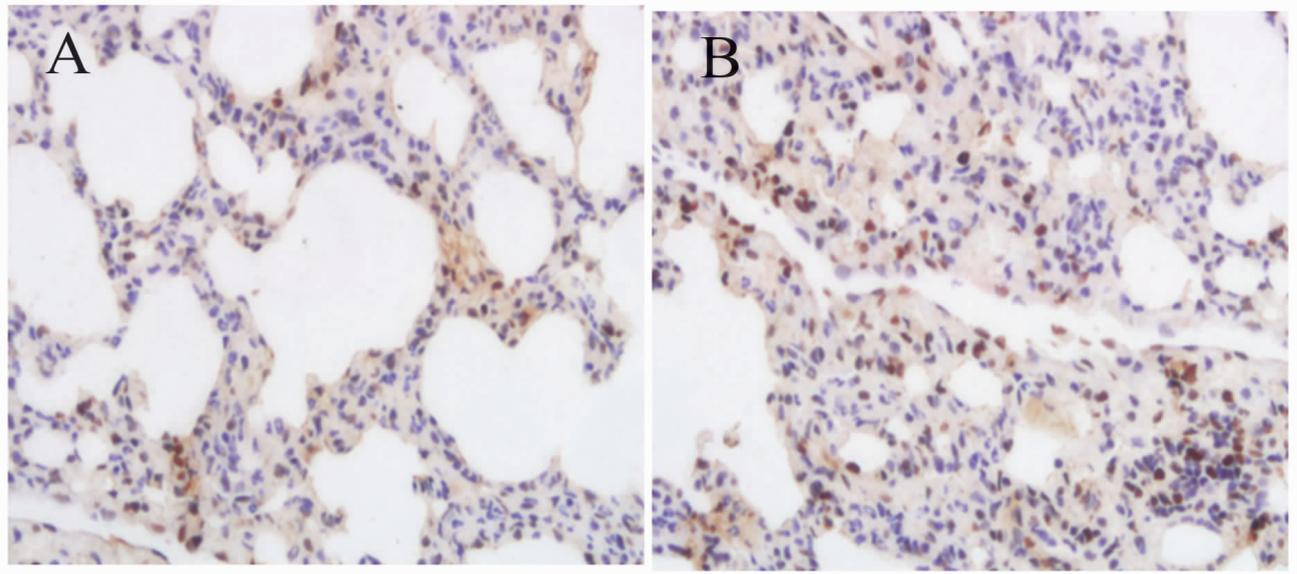


图 1 肺组织 HMGB1 免疫组织化学结果。A,CLP+ 马来酸钠组;B,CLP 组  
Fig. 1 Pulmonary HMGB1 stained by immunohistochemistry 24 h after CLP in both groups

本研究结果显示:马来酸钠组在 6 h 时血浆中的 TNF- 低于 CLP 组;而血浆中 HMGB1 的浓度在 12、18 及 24 h 时均明显低于 CLP 组,同时肺组织 HMGB1 的表达也明显低于 CLP 组。这一结果与肺组织病理学结果一致;此外,作为中性粒细胞活化的指标 MPO、肺水肿指标 W/D 也明显低于 CLP 组,提示 HMGB1 在 ALI 的发病过程中起到重要的作用。这一结果显示马来酸钠的保护作用持续至 24 h,而 TNF- 仅在 6 h 有差异,仅用马来酸钠抑制 TNF- 释放的作用难以充分解释其后期保护效应。

总之,本实验表明马来酸钠可显著抑制 HMGB1 的合成与释放,从而发挥明显抗炎作用,对 ALI 具有保护作用。

#### 参考文献(References)

[1] Ware LB, Koyama T, Billheimer DD, et al. Prognostic and pathogenetic value of combining clinical and biochemical indices in patients with acute lung injury[J]. Chest, 2010,137:288-296

- [2] Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, et al. Phagocyte-derived catecholamines enhance acute inflammatory injury[J]. Nature, 2007, 449: 721-725
- [3] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice[J]. Science, 1999, 285:248-251
- [4] Ueno H, Matsuda T, Hashimoto S, et al. Contributions of high mobility group box protein in experimental and clinical acute lung injury[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2004, 170:1310-1316
- [5] Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, et al. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation[J]. J Immunol, 2000, 165:2950-2954
- [6] Zhang F, Wu R, Qiang X, et al. Antagonism of  $\alpha 2A$ -adrenoceptor: a novel approach to inhibit inflammatory responses in sepsis[J]. J Mol Med, 2010, 88:289-296
- [7] Flierl MA, Rittirsch D, Nadeau BA, et al. Upregulation of phagocyte-derived catecholamines augments the acute inflammatory response[J]. PLoS One, 2009, 4:e4414