

高迁移率族蛋白 1 在急性酒精中毒中的作用 *

陈小彬^{1, 2)} 朱卫彬¹⁾ 阮林浩¹⁾ 唐捷^{1)**}

(¹⁾中国科学院生物物理研究所, 北京 100101; ²⁾中国科学院大学, 北京 100049)

摘要 急性酒精中毒是一种有害的临床病理状态, 短时间内摄入大量的乙醇, 会造成多脏器功能损害, 通常包括中枢神经抑制、呼吸循环功能障碍、代谢紊乱及免疫系统异常, 严重者导致死亡. 为了探索急性酒精中毒导致死亡的原因, 采用腹腔注射的方法构建了重度急性酒精中毒小鼠模型, 发现在模型早期(至迟 0.5 h)高迁移率族蛋白 1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)已显著升高, 体外实验也证实酒精导致细胞 HMGB1 释放, 应用单克隆抗体阻断 HMGB1 有显著的保护作用, 这种保护作用是通过降低损伤性炎症反应实现的. 在此模型中发现, HMGB1 在急性酒精中毒中有着重要的中介作用, 调控急性系统性炎症反应, 并决定了急性酒精中毒疾病的进程与结局.

关键词 急性酒精中毒, HMGB1, IL-6

学科分类号 Q256

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00077

急性酒精中毒是指短时间内摄入过量的酒或酒类饮料, 出现先兴奋后抑制的状态, 中毒后主要症状包括行为改变、中枢神经抑制、呼吸循环功能障碍、代谢紊乱及免疫系统异常, 严重者导致死亡. 多数观点认为急性酒精中毒死亡的原因因为中毒诱发呼吸中枢麻痹或心血管系统疾患^[1-2]. 另有研究发现, 炎症反应在此过程中也起了一定作用^[3]. 我们前期的中药筛查研究显示炙红芪对急性酒精中毒致死有保护作用, 并发现这种保护作用与其对高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1)的抑制有关.

HMGB1 是一种分子质量为 30 ku, 序列高度保守的蛋白, 几乎存在于所有细胞的细胞核和细胞质中, HMGB1 分子既是一个核因子又是分泌蛋白. 在细胞核, 它作为染色体骨架结合因子结合 DNA, 并增强蛋白在某些靶 DNA 区域的聚集. 在细胞外, 它高亲和力结合晚期糖基化终产物受体 (Receptor for advanced glycation end products, RAGE), 可作为炎症的中介分子. HMGB1 由激活的单核巨噬细胞分泌, 也可由坏死或受损的细胞被动漏出^[4]. Fiuza 等^[5]的实验证实, HMGB1 升高 ICAM-1(细胞间粘附分子 1)、VCAM-1(血管细胞粘附分子 1)和 RAGE 的表达并呈现剂量和时间的依

赖性, HMGB1 还诱导 TNF α 、IL-8、MCP-1(单核细胞趋化蛋白 1)、PAI-1(纤溶酶原激活物抑制物 1)和 tPA(组织型纤溶酶原激活物)的分泌, 以及 MAPK、ERK、JNK、p38、NF- κ B 和 Sp1 的磷酸化, 并促进微血管内皮炎症活性. HMGB1 作为一个细胞损伤后的危险信号, 在急性炎症反应中起重要作用^[5-8].

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 动物. 雌性 C57BL/6 小鼠购自斯倍福公司 (SPF), 所有实验小鼠均在 SPF 动物房饲养, 并且所有实验都遵循实验动物管理规定.

1.1.2 药物. 抗鼠 HMGB1(3E8)单克隆抗体(专利号: 201010122562), 抗鼠 TNF α (9C6)单克隆抗体由本实验室制备. 炙红芪提取物: 20 g 炙红芪加水 100 ml, 泡 20 min, 煮 20 min, 取上清, 定容到 100 ml, 0.22 μ mol/L 滤膜过滤除菌, 分装, -20 $^{\circ}$ C 保存.

* 国家自然科学基金资助项目(30940064).

** 通讯联系人.

Tel: 014086097577, E-mail: jtang@ibp.ac.cn, tang88563484@163.com

收稿日期: 2013-05-08, 接受日期: 2013-05-27

1.1.3 主要试剂. 无水乙醇购自北京化工厂, 小鼠 IL-6 (88-7064)、TNF α (88-7324)ELISA Ready-SET-Go!® 试剂盒购自 eBioscience 公司.

1.2 实验方法

1.2.1 模型制备. 急性酒精中毒模型, 取(16 $\pm$ 0.5) g C57BL/6 雌鼠, 每组 6 只, 模型前 1.5 h(-1.5h)每只腹腔注射 100 μ l 生理盐水, 0 h 按 10.6 ml/kg 给予 50%(体积比)乙醇腹腔注射. 改良动物模型是在此模型的基础上于模型前 1 h 眼眶取血 80 μ l, 其余同前.

1.2.2 原代肝细胞分离培养. 按照 Seglen^[9]改良的两步灌注法分离肝细胞制备肝细胞悬液. 具体为: 用肝素按每 100 g 体重 20 U 的剂量腹腔注射抗凝, 小鼠断颈处死, 75%乙醇浸泡消毒, 在超净台上打开腹腔, 将头皮针插入门静脉, 用预温的 37℃ D-Hanks 液进行门静脉快速灌注至肝脏变白膨胀, 剪短下腔静脉. 肝脏冲洗干净后注入 5 ml 胶原酶 V, 室温原位消化 10 min, 将肝脏剪成小块置于 5 ml 0.02%的胶原酶 V 中, 37℃ 消化 30 min, 滴管反复吸打, 经 100、200 目筛过滤 2 次, 吸取滤液移至离心管中, 4℃ 离心, 弃上清, 将沉淀再以同样条件清洗, 离心 3 次, 加入 5 ml DMEM 完全培养基终止反应, 800 r/min 离心 5 min, 见管底有白色沉淀, 吸弃上清, 反复 2~3 次, 将纯化后的肝细胞计数并调整细胞密度为 10⁶/ml, 按 10⁵/孔接种于 96 孔板.

1.2.3 检测指标. 小鼠血清 ALT 由 306 医院检验科检测.

a. 鼠血清 IL-6、TNF α 检测. 采用 eBioscience ELISA 试剂盒检测, 步骤为: 100 μ l 含捕获抗体的包被液包被 96 孔板, 封板 4℃ 孵育过夜, 洗液 300 μ l 洗 3 次, 样品稀释液 200 μ l 室温封闭 1 h, 洗液 300 μ l 洗 1 遍, 对应孔加入标准品和样品, 室温孵育 2 h, 洗液 300 μ l 洗 3~5 遍, 加入 100 μ l 稀释检测抗体, 室温孵育 1 h, 洗液 300 μ l 洗 3~5 遍加入 100 μ l 稀释 Avidin-HRP, 封板室温 30 min, 洗液洗 5~7 遍, 加入 100 μ l 底物液, 室温避光孵育 15 min, 加入 50 μ l 终止液, 分光光度计 450 nm 0.1 s 读板.

b. 血清及上清 HMGB1 检测. 采用 HMGB1 ELISA 试剂(由本实验室邓泳昊, 王惟建立), 具体步骤为: 100 μ l 含捕获抗体(兔抗鼠 HMGB1 多抗血清 1:100)的包被液包被 96 孔板, 室温孵育 2 h, 洗液 300 μ l 洗 5 次, 样品稀释液 200 μ l 4℃ 封闭过

夜, 洗液 300 μ l 洗 1 遍, 对应孔加入标准品和样品, 室温孵育 2 h, 洗液 300 μ l 洗 5 遍, 加入 100 μ l 稀释检测抗体(偶联生物素鼠 HMGB1 单抗 3E8), 室温孵育 1 h, 洗液 300 μ l 洗 5 遍加入 100 μ l 稀释 Avidin-HRP, 封板室温温育 30 min, 洗液洗 7 遍, 加入 100 μ l 底物液, 室温避光孵育 15 min, 加入 50 μ l 终止液, 分光光度计 450 nm 0.1 s 读板.

1.2.4 统计分析. 应用快速分析软件包(Graph Pad 软件), 采用 Student *t* 检验. *P* < 0.05 具有显著性.

2 结果与分析

2.1 炙红芪提取物有效保护急性酒精中毒模型小鼠

首先, 我们在-1.5 h 腹腔注射炙红芪提取物(100 μ l/只), 以相同剂量的 PBS 为对照, 0 h 腹腔注射 10.6 ml/Kg 50%(体积比)酒精, 观察小鼠的存活状况, 连续观察 72 h, 结果发现, 炙红芪组小鼠均存活, 而对照组多在 24 h 内死亡(图 1), *P* < 0.05, 差异具有统计学意义.

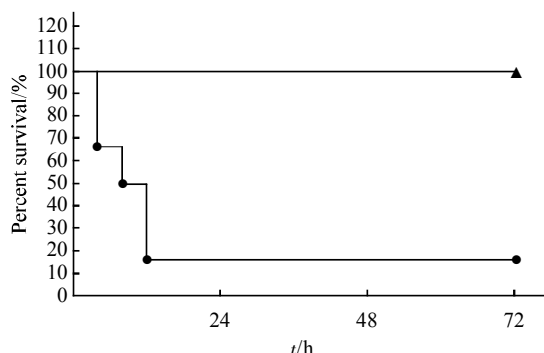


Fig. 1 Survival curve of experimental acute alcohol mouse model

Mice (6 per group) were pretreated with Radix Hedysari preparata vs saline, following alcohol (10.6 ml/Kg, 50% v/v through intraperitoneal injection), and survival was assessed 72 h after alcohol administration.

●—●: Saline; ▲—▲: Radix Hedysari preparata.

2.2 急性酒精中毒导致模型小鼠血清 HMGB1 升高

在急性酒精模型后检测血清中与损伤及炎症相关的生化指标 ALT、IL-6、TNF α 和 HMGB1, 相较于空白组, 发现 ALT、IL-6、TNF α 和 HMGB1 均有升高(图 2), 其中 HMGB1 具有更早的时相, 在酒精模型后 0.5 h 即已显著升高, IL-6 在模型后 4 h 升高显著, 对比模型组和应用有保护作用的炙红芪治疗组, 发现保护组在 IL-6 及 HMGB1 的血清水平上与模型组有显著差异, 我们猜测急性酒精

中毒导致死亡可能与 HMGB1 和 IL-6 细胞因子相关. 王惟等^[10]在 LPS+D-GalN 引起急性肝损伤模型中证实 HMGB1 也有上调, 并且应用 HMGB1 抗体

可以阻断凝血功能障碍所导致的小鼠死亡. 而在酒精模型中, 无相关 HMGB1 的作用报道, HMGB1 是否在急性酒精中毒中发挥调控作用呢?

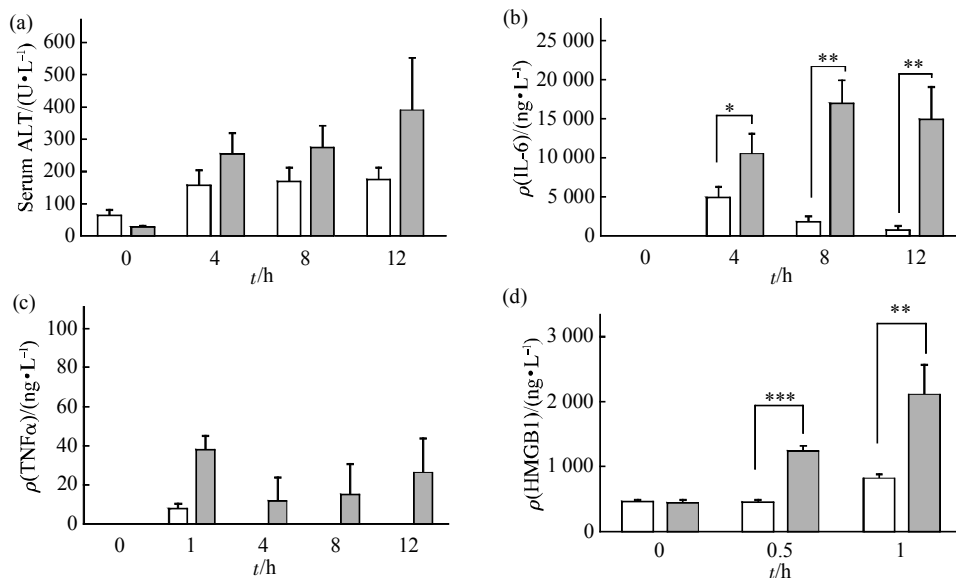


Fig. 2 Biochemical markers change in serum

Mice (6 per group) were pretreated with Radix Hedysari preparata *vs* saline, following alcohol (10.6 ml/Kg, 50% V/V through intraperitoneal injection), Serum were collected at indicated points and biochemical markers were measured. □: Saline; ■: Radix Hedysari preparata.

2.3 酒精导致原代肝细胞 HMGB1 的释放

文献较多报道急性酒精中毒可抑制细胞因子和趋化因子反应, 降低肺、脾巨噬细胞和血单核细胞促炎性细胞因子(包括 TNFα 和 IL-1β)的产生. HMGB1 既是核内非结构蛋白, 又是细胞因子, 前面的实验显示, 急性酒精中毒血清中 HMGB1 升高, 为了弄清酒精在造成损伤的情况下是否直接引起细胞的 HMGB1 释放, 我们分离出小鼠原代肝细胞进行培养, 培养基中加入不同浓度(0、0.5%、2%)的酒精, 培养 3 h 后收集细胞培养上清, 应用 ELISA 检测上清 HMGB1, 结果显示酒精引起培养液上清 HMGB1 升高, 且有剂量相关性(图 3).

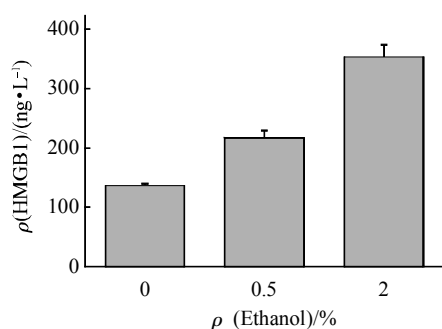


Fig. 3 Supernatant HMGB1 of cultured primary hepacytes treated by ethanol

Ethanol was added to the medium with appropriate concentration and supernatant was collected at 3 h, and HMGB1.

2.4 HMGB1 单抗保护急性酒精中毒模型小鼠

根据以上结果我们推论, HMGB1 释放入血是由于酒精导致机体组织细胞损伤所致, 为了确认 HMGB1 在急性酒精中毒导致小鼠死亡中的作用, 我们应用鼠源抗鼠 HMGB1 的单克隆抗体(3E8)中和血清中 HMGB1, 在酒精模型前 1 h 预注射 HMGB1 抗体(αHMGB1)5 mg/Kg, 以 TNFα 抗体(αTNFα)5 mg/Kg 作为同型对照, 以生理盐水组作为阴性对照, 观察小鼠存活情况. 结果显示, αHMGB1 组与阴性对照组及 αTNFα 组有显著统计学差异($P < 0.05$), αHMGB1 组有显著的保护作用, 而 αTNFα 组与阴性对照组无显著统计学差异, 未显示有明显保护作用($P > 0.05$)(图 4). 我们的实验说明, HMGB1 的升高与急性酒精中毒小鼠的死亡事件密切相关, 阻断 HMGB1 可有效保护小鼠, HMGB1 在急性酒精中毒中发挥重要作用.

2.5 HMGB1 调控模型鼠血清 IL-6 水平

另一方面, 实验显示急性酒精中毒导致血清 IL-6 明显升高, 为了查明模型中 IL-6 的升高是否为系统性损伤所导致后续反应, 我们用单克隆抗体阻断 HMGB1, 不同时间点收集血清检测血清 IL-6 水平. 在酒精模型前 1 h 给予 αHMGB 15 mg/Kg 腹腔注射, 分别于模型 0、4、8 和 12 h 取血检测血

清 IL-6 水平, 结果显示 HMGB1 单抗可显著降低急性酒精中毒小鼠各时间点 IL-6 水平, 并在 4 h IL-6 提前达到峰值后随之下降(图 5). 结果显示 HMGB1 具有调控 IL-6 的作用.

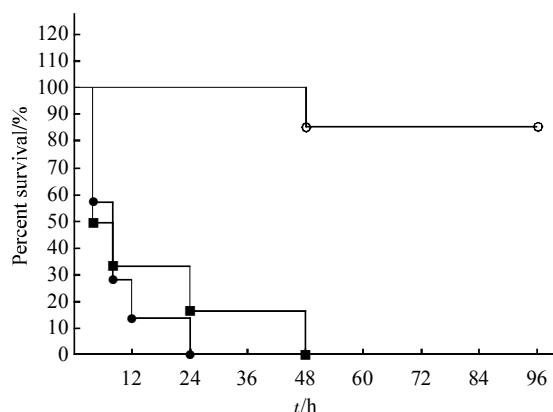


Fig. 4 Protection of anti-HMGB1 monoclonal antibody in the experimental acute alcohol mouse model

Survival curve in experimental acute alcohol mouse model. ●—●: Saline; ■—■: αTNFα; ○—○: αHMGB1.

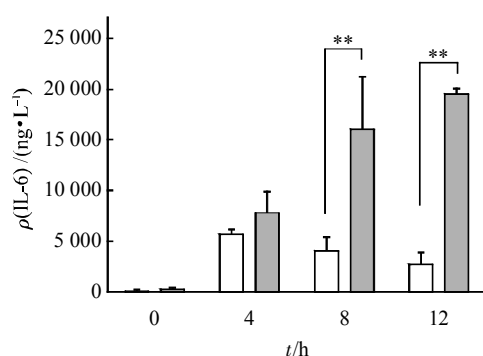


Fig. 5 Administration of anti-HMGB1 monoclonal antibody result in serum IL-6 level decrease

Mice (6 per group) were given acute alcohol (10.6 ml/Kg in intraperitoneal injection), following pretreating with αHMGB1. Serum were collected 0, 4, 8, 12 h after alcohol administration. □: Saline; ■: αHMGB1.

3 讨 论

酗酒是当代社会一个严重的社会问题, 不仅对社会造成潜在危害, 也对机体造成损伤. 急性酒精中毒对各个系统均有不同程度的损害, 尤其是神经系统、消化系统和免疫系统. 酒精介导细胞损伤主要通过内毒素、氧化应激和其代谢产物. 主要机制

为: a. 酒精代谢产物乙醛增加胃肠道通透性致使内毒素入血, 激活特定免疫细胞^[1]; b. 乙醛与蛋白质和脂质相互作用导致自由基形成和细胞损伤^[2]; c. 酒精诱导细胞色素酶 P450 2E1 活性升高, 代谢乙醇并产生 ROS, 导致脂质过氧化, 酶失活和蛋白氧化^[3]; d. 酒精性肝损伤募集白细胞, 释放反应性氧基团和溶酶体酶造成肝细胞损伤和坏死^[4].

然而急性酒精中毒导致死亡的原因文献报道较少, 可归结为中枢抑制、呼吸循环衰竭^[5], 具体机制尚不清楚. 我们的研究试图发现中毒损伤与死亡之间的重要中介分子, 以小鼠为研究对象, 建立急性酒精中毒模型. 实验结果表明, 急性酒精中毒导致小鼠血清 ALT 升高, IL-6 的升高水平说明机体存在较高的炎症状态, 更重要的是 HMGB1 在急性酒精中毒中也显著升高.

HMGB1 既是细胞核非结构蛋白, 在细胞发生坏死时漏出, 又是细胞因子在炎症时有单核巨噬细胞分泌, 是无菌性炎症及感染诱发炎症的中介分子^[10]. HMGB1 通常被认为是炎症反应的晚期介导者, 在一些模型中 24 h 后才有明显升高. 但我们的模型中在酒精注射 0.5 h 后, 模型组血清中 HMGB1 已明显升高, 这可能与模型造成的不同损伤类型有关. 如 Tsung 等^[13]发现 HMGB1 在肝缺血再灌注损伤作为早期炎症和器官损伤中介分子, HMGB1 至迟在再灌注后 1 h 已经升高. Qiu 等^[16]也发现在脑的缺血再灌注损伤模型中, HMGB1 在再灌注后 2 h 即可在脑脊液中检出. 在已报道的临床前疾病模型(致死性内毒素血症或脓毒血症, 诱导关节炎及缺血再灌注损伤)中应用 HMGB1 抗体或拮抗剂会起到保护作用. 我们的研究第一次揭示 HMGB1 抗体同样保护急性酒精中毒.

我们的实验发现 HMGB1 的降低与后续的 IL-6 水平降低相关, IL-6 升高是由细胞损伤后释放的 HMGB1 诱导. 酒精导致细胞内 HMGB1 释放, 由于 IL-6 代表了机体的炎症水平, IL-6 的降低说明中和 HMGB1 后机体整体的炎症水平降低, 实验揭示了作为内源性损伤标记的 HMGB1 在急性酒精中毒导致后续炎症反应中的中介与调节作用, 阻断 HMGB1, 避免了机体进一步的炎症损伤, 改变疾病的结局.

参 考 文 献

- [1] Leopold D. Cause of death in severe acute ethanol intoxication. *Beitrage zur gerichtlichen Medizin*, 1990, **48**: 163-167
- [2] Zivkovic V, Miletic B, Nikolic S, *et al.* Sudden cardiac death and

- acute drunken state-autopsy study. Serbian Archives for the Whole Medicine, 2010, **138**(9-10): 590-594
- [3] Imhof A, Froehlich M, Brenner H, *et al.* Effect of alcohol consumption on systemic markers of inflammation. The Lancet, 2001, **357**(9258): 763-767
- [4] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi M E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. Nature, 2002, **418**(6894): 191-195
- [5] Fiuza C, Bustin M, Talwar S, *et al.* Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells. Blood, 2003, **101**(7): 2652-2660
- [6] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi M E. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. Nature, 2002, **418**(6894): 191-195
- [7] Wang H, Yang H, Tracey K J. Extracellular role of HMGB1 in inflammation and sepsis. J Inter Med, 2004, **255**(3): 320-331
- [8] Yang H, Tracey K J. Targeting HMGB1 in inflammation. Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Gene Regulatory Mechanisms, 2010, **1799**(1): 149-156
- [9] Seglen P O. Preparation of isolated rat liver cells. Methods Cell Biol, 1976, **13**(1): 29-83
- [10] Wang W, Sun L, Deng Y, *et al.* Synergistic effects of antibodies against high-mobility group box 1 and tumor necrosis factor- α antibodies on d- (+)-galactosamine hydrochloride/lipopolysaccharide-induced acute liver failure. FEBS J, 2013, **280**(6): 1409-1419
- [11] Wheeler M D, Yamashina S, Froh M, *et al.* Adenoviral gene delivery can inactivate Kupffer cells: role of oxidants in NF- κ B activation and cytokine production. J Leuko Biol, 2001, **69**(4): 622-630
- [12] Mantle D, Preedy V R. Free radicals as mediators of alcohol toxicity. Adverse Drug Reactions and Toxicological Reviews, 1999, **18**(4): 235-252
- [13] Nanji A A, Zhao S, Sadrzadeh S M H, *et al.* Markedly enhanced cytochrome P450 2E1 induction and lipid peroxidation is associated with severe liver injury in fish oil—ethanol-fed rats. Alcoholism: Clin Exp Res, 1994, **18**(5): 1280-1285
- [14] Haorah J, Knipe B, Leibhart J, *et al.* Alcohol-induced oxidative stress in brain endothelial cells causes blood-brain barrier dysfunction. J Leuko Biol, 2005, **78**(6): 1223-1232
- [15] Tsung A, Sahai R, Tanaka H, *et al.* The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion. J Exp Med, 2005, **201**(7): 1135-1143
- [16] Qiu J, Nishimura M, Wang Y, *et al.* Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia. Journal of cerebral blood flow and metabolism: official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2008, **28**(5): 927-938

HMGB1 Plays a Key Role in Acute Alcoholism*

CHEN Xiao-Bin^{1,2)}, ZHU Wei-Bin¹⁾, RUAN Lin-Hao¹⁾, TANG Jie¹⁾**

⁽¹⁾ Institute of Biophysics, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101, China;

⁽²⁾ University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract Acute alcoholism is a common pathological state caused by excess intake of ethanol in a short period. It leads to multiple organ functional damage such as central nervous system depression, respiratory and circulatory system dysfunction, metabolism and immune system abnormal. In order to study the reason of death caused by acute alcoholism, we developed a mouse model of acute alcoholism by intraperitoneal injection method. We reported for the first time that HMGB1 played an important role in acute alcoholism. HMGB1 was released and detected in the serum as early as 0.5 h after the intraperitoneal injection of ethanol. Then HMGB1 induced subsequent acute systemic inflammatory response. We further provided evidences indicating that anti-HMGB1 antibody could effectively protect mouse from acute alcohol. This protection was achieved by significantly reducing HMGB1 release and suppressing systemic inflammation.

Key words acute alcoholism, HMGB1, IL-6

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2013.00077

*This work was supported by a grant from The National Natural Science Foundation of China (30940064).

**Corresponding author.

Tel: 86-0014086097577, E-mail: jtang@ibp.ac.cn, tang88563484@163.com

Received: May 8, 2013 Accepted: May 27, 2013