

• 论著 •

高迁移率族蛋白 B1 在大鼠肝脏热缺血/再灌注损伤中的作用

谭向龙, 王世斌, 姚咏明, 董 宁, 熊瑜琳, 吴 瑶

(解放军总医院第一附属医院肝胆外科, 北京 100048)

【摘要】 目的 探讨高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)在大鼠肝脏热缺血/再灌注(I/R)损伤中的作用。方法 90 只 Wistar 大鼠被随机分为正常对照组、林格液组、丙酮酸乙酯(EP)治疗组。采用夹闭左、右肝蒂使 95% 肝脏缺血 90 min 再恢复血流并切除未缺血的尾叶肝脏制模。林格液组和 EP 治疗组制模前分别经阴茎背静脉注射林格液 4 ml 或 EP 3.26 g/L(溶于林格液 4 ml 中),于术后 2、8、24、48 h 取下腔静脉血检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)水平,处死动物后检测肝组织 HMGB1、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-10(IL-10)含量。结果 林格液组和 EP 治疗组血清 ALT、AST 水平均显著高于正常对照组,EP 治疗组各时间点 ALT 及术后 2 h、8 h AST 水平均显著低于林格液组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。林格液组 8、24、48 h 肝组织 HMGB1 水平显著高于正常对照组,EP 治疗组仅 48 h 显著升高;EP 治疗组在 8 h、24 h 时 HMGB1 水平显著低于林格液组;林格液组和 EP 治疗组在 8 h 时 TNF- α 水平均高于正常对照组,而 EP 治疗组显著低于林格液组($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。各组 IL-10 水平无明显差异。结论 HMGB1 参与了肝 I/R 损伤的病理过程。

【关键词】 高迁移率族蛋白 B1; 丙酮酸乙酯; 缺血/再灌注损伤; 肝; 细胞因子

中图分类号:R256.4 文献标识码:A DOI:10.3969/j.issn.1008-9691.2009.03.015

The potential role of high mobility group box-1 protein in rats with liver warm ischemia/reperfusion injury
TAN Xiang-long, WANG Shi-bin, YAO Yong-ming, DONG Ning, XIONG Yu-lin, WU Yao. Department of Hepatobiliary Surgery, First Hospital Affiliated to the Chinese PLA General Hospital, Beijing 100048, China
Corresponding author: YAO Yong-ming, Email: c_ff@sina.com

【Abstract】 Objective To investigate the potential role of high mobility group box-1 protein (HMGB1) in rats with liver warm ischemia/reperfusion (I/R) injury. **Methods** Ninety Wistar rats were randomly divided into three groups: normal controls (group A), Ringer's solution treatment group (group B), and Ringer's ethyl pyruvate (EP) treatment group (group C). The animal model of I/R was prepared by clamping all the liver pedicles of liver lobes except caudate lobe for 90 minutes, then the un-ischemic caudate lobe was resected after liver reperfusion. The model made this way could establish 95% of liver ischemia. Just before the model establishment, the animals in group B were given 4 ml Ringer's solution and in group C, Ringer's EP solution (EP was diluted in Ringer's solution, and the concentration was 3.26 g/L) by intravenous injection via dorsal penile vein, then they underwent the non-lethal segmental hepatic warm ischemia. The blood samples from inferior vena cava were collected at 2, 8, 24 and 48 hours after the establishment of model respectively, and the animals were sacrificed to get liver tissues. The changes of serum levels of alanine aminotransferase (ALT), aspartate transaminase (AST), and the contents of HMGB1, tumor necrosis factor- α (TNF- α) as well as interleukin-10 (IL-10) in hepatic tissues were determined at various time points. **Results** At 2 - 48 hours after I/R, serum ALT as well as AST levels in group B and C were significantly higher than those in normal controls. The serum ALT levels at every time point and serum AST levels at 2 hours and 8 hours in group C were markedly lower than those in group B ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). At 8, 24 and 48 hours, the liver levels of HMGB1 in group B were significantly higher than those in normal controls, while the liver HMGB1 level in group C was only at 48 hours significantly higher than that in normal controls. At 8 hours and 24 hours, the HMGB1 levels in group C were lower than those in group B markedly. TNF- α levels in group B and C were obviously higher than those in normal controls at 8 hours, and the TNF- α level was markedly lower in group C than that in group B ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The differences in level of IL-10 in all groups were not significant. **Conclusion** The HMGB1 plays an important role in the pathologic processes of hepatic I/R injury.

【Key words】 high mobility group box-1 protein; ethyl pyruvate; liver ischemia/reperfusion injury; cytokine

肝缺血/再灌注损伤(HIRI)在临床上具有重要意义。高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)是晚近发现的一种新的晚期炎症介质,在多种急慢性炎症和免疫反应过程中均发挥重要作用^[1-2]。本研究采用大鼠肝脏热缺血/再灌注(I/R)模型,初步探讨 HMGB1 在 HIRI 病理过程中的可能作用及意义,旨在为有效防治急性肝损伤提供新的线索。

1 材料与方法

1.1 实验动物及材料:SPF 级 Wistar 大鼠 90 只(军事医学科学院实验动物中心提供),体重 200~250 g;丙酮酸乙酯(EP)用林格液稀释成 3.26 g/L;大鼠肿瘤坏死因子- α (TNF- α)和白细胞介素-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)。

1.2 动物分组及模型制备:按随机数字表法将动物分为正常对照组($n=10$)、林格液组($n=40$)、EP 治疗组($n=40$)。分别夹闭左、右肝蒂(仅剩余尾叶肝脏血管不夹闭),使 95% 肝脏缺血达 90 min,再开腹恢复肝脏血流,切除未缺血的尾叶肝脏^[3]。EP 治疗组于制模时经阴茎背静脉注射 EP 溶液 4 ml;林格液组于相应时间点注射等量林格液。

1.3 检测指标及方法:分别于术后 2、8、24、48 h 取下腔静脉血 2 ml,离心 10 min 后取血清,采用全自动生化仪检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)水平。取血后处死动物取肝脏标本,液氮中保存备检肝组织 HMGB1、TNF- α 及 IL-10 水平,检测时取 100 mg 肝组织,匀浆取上清液,采用考马斯亮蓝法测定组织匀浆上清液中蛋白含量。将上清液稀释(HMGB1 稀释 320 倍, TNF- α 稀释 20 倍, IL-10 稀释 40 倍),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 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。

1.4 统计学方法:使用 SPSS 16.0 软件,数据以均数士标准差($\bar{x}\pm s$)表示,方差齐者用方差分析,方差不齐者用秩和检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清 ALT、AST 水平(表 1):林格液组和 EP 治疗组血清 ALT、AST 水平均显著升高,随时间延

长 ALT、AST 逐渐下降,但至 48 h 仍均高于正常对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。EP 治疗组在各时间点 ALT 均明显低于林格液组(P 均 <0.01),AST 在 24 h、48 h 时两组差异已无统计学意义。

表 1 各组大鼠血清 ALT、AST 变化比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	ALT(kU/L)			
	2 h	8 h	24 h	48 h
林格液组	10.87 $\pm$ 1.95 ^b	5.24 $\pm$ 1.61 ^b	2.04 $\pm$ 0.26 ^b	0.16 $\pm$ 0.03 ^b
EP 治疗组	4.61 $\pm$ 1.30 ^{bd}	2.83 $\pm$ 0.71 ^{bd}	0.73 $\pm$ 0.24 ^{bd}	0.08 $\pm$ 0.03 ^{ad}

组别	AST(kU/L)			
	2 h	8 h	24 h	48 h
林格液组	7.52 $\pm$ 2.28 ^b	6.08 $\pm$ 1.87 ^b	2.06 $\pm$ 0.68 ^b	0.30 $\pm$ 0.11 ^b
EP 治疗组	3.41 $\pm$ 1.26 ^{bd}	2.78 $\pm$ 0.85 ^{bd}	1.56 $\pm$ 0.43 ^b	0.24 $\pm$ 0.06 ^b

注:正常对照组 ALT 为 (0.05 $\pm$ 0.01) kU/L, AST 为 (0.12 $\pm$ 0.03) kU/L;与正常对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与林格液组比较,^d $P<0.01$

2.2 肝组织 HMGB1、TNF- α 、IL-10 水平(表 2):林格液组从 8 h 开始 HMGB1 水平显著高于正常对照组,24 h 下降,至 48 h 又明显升高;EP 治疗组 8 h、24 h 显著低于林格液组,仅 48 h 显著高于正常对照组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。林格液组、EP 治疗组 TNF- α 8 h 时均明显高于正常对照组(P 均 <0.01),然后逐渐下降至正常对照组水平;且 EP 治疗组 8 h 时显著低于林格液组。林格液组、EP 治疗组各时间点 IL-10 水平比较差异均无统计学意义。

表 2 各组大鼠肝组织 HMGB1、TNF- α 水平变化比较($\bar{x}\pm s, n=10$)

组别	HMGB1(ng/mg)			
	2 h	8 h	24 h	48 h
林格液组	45.4 $\pm$ 11.6	56.3 $\pm$ 16.9 ^b	53.7 $\pm$ 15.0 ^a	60.6 $\pm$ 13.3 ^b
EP 治疗组	44.2 $\pm$ 10.4	48.6 $\pm$ 11.6 ^d	43.2 $\pm$ 13.4 ^d	51.2 $\pm$ 14.1 ^a

组别	TNF- α (ng/mg)			
	2 h	8 h	24 h	48 h
林格液组	17.0 $\pm$ 5.1	26.6 $\pm$ 9.0 ^b	22.5 $\pm$ 6.6	17.1 $\pm$ 4.5
EP 治疗组	16.6 $\pm$ 4.2	20.0 $\pm$ 2.7 ^c	19.1 $\pm$ 5.1	18.5 $\pm$ 5.9

注:正常对照组 HMGB1 为 (38.7 $\pm$ 9.9) ng/mg, TNF- α 为 (15.6 $\pm$ 6.3) ng/mg;与正常对照组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与林格液组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$

3 讨论

业已明确,HIRI 有明显的阶段分期,再灌注后 2 h 内为早期,以氧化应激和释放氧自由基直接导致肝细胞损伤为特征;肝脏再灌注后 3~24 h 为 I/R 损伤晚期,中性粒细胞聚集介导的炎症紊乱过程,同时也通过释放氧自由基损伤肝细胞。此外,粒细胞聚

基金项目:国家自然科学基金项目(30672178, 30800437)

通信作者:姚咏明, Email: c_ff@sina.com

作者简介:谭向龙(1975-),男(汉族),陕西省人,博士研究生,主治医师, Email: txlwxm@sina.com.cn.

集于肝血窦内,加上一氧化氮及血栓素分泌的不平衡也可进一步加重肝脏微循环障碍,导致无复流现象的发生,造成急性肝损害^[4]。

近年研究已证实 HMGB1 是一种重要的晚期炎症介质^[1-2,5]。细胞核 HMGB1 可以囊泡方式分泌至细胞外,也可被坏死的细胞释放出来而不被凋亡的细胞释放^[6]。HMGB1 能刺激促炎细胞因子 TNF- α 、IL-1、IL-6、IL-8 的产生;同时促炎介质 TNF- α 或 IL-1 也可诱导 HMGB1 产生,并呈剂量依赖性^[1,7]。此外, HMGB1 本身也具有类内毒素毒性作用,可促发弥散性血管内凝血和微循环障碍^[8]。

活性氧可引起细胞生物大分子的氧化损伤,同时氧自由基可触发炎症反应,而炎症因子可刺激细胞释放内源性氧自由基,EP 是一种有效的氧自由基清除剂,在上述病理状态下可发挥抗氧化效应及清除活性氧物质作用^[9-12]。EP 同时还可抑制由休克引起的肠系膜淋巴结细菌移位及肠源性内毒素血症的发生^[13-14]。此外,EP 还能下调诱生型一氧化氮合酶 mRNA 的表达,减少 TNF- α 和 IL-6 的表达,减轻炎症反应和 I/R 引起的器官损伤^[15-17]。新近的研究显示,EP 的作用与其抑制晚期炎症介质 HMGB1 的释放及抑制核转录因子- κ B 的活化有关^[7,18]。

本实验结果显示:在再灌注 2~48 h 时 EP 对急性肝损伤具有明显的保护作用,EP 治疗组、林格液组 TNF- α 水平在 8 h 时高于正常对照组,且 EP 治疗组低于林格液组。但 IL-10 水平无明显差异。进一步分析可见,林格液组在 8、24、48 h 时 HMGB1 水平显著高于正常对照组,而 EP 治疗组仅 48 h 高于正常对照组;EP 治疗组在 8 h、24 h 时 HMGB1 水平明显低于林格液组。提示在 HIRI 的发病过程中肝组织 HMGB1 的持续产生与急性肝功能障碍密切相关, HMGB1 是参与 HIRI 的重要晚期炎症介质之一^[7]。从上述数据来看,EP 的保护作用持续至 48 h,而 TNF- α 仅在 8 h 有差异,仅用 EP 的直接抗氧化及抑制 TNF- α 释放的作用难以充分解释其后期保护效应。HMGB1 可诱导多种促炎介质的表达进而加重肝脏损害,本组资料证实 EP 可显著抑制 HMGB1 的合成与释放,从而发挥明显抗炎作用,对 HIRI 具有持续保护作用^[19]。但有关 EP 对 HMGB1 的确切调节机制及其与 HIRI 保护效应的关系仍有待进一步研究。

参考文献

- [1] 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.

- [2] 姚咏明,林洪远. 高迁移率族蛋白 B1 在创伤免疫功能紊乱中的作用及其调节机制[J]. 中国危重病急救医学, 2008, 20(9): 513-515.
- [3] 何效东,董家鸿,蔡景修,等. 门静脉转流入肝血流阻断动物模型的建立及评价[J]. 西北国防医学杂志, 1999, 20(3): 175-177.
- [4] Jaeschke H. Molecular mechanisms of hepatic ischemia-reperfusion injury and preconditioning [J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2003, 284(1): G15-G26.
- [5] 姚咏明,刘辉. 对高迁移率族蛋白 B1 作用的新认识[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(7): 385-387.
- [6] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation [J]. Nature, 2002, 418(6894): 191-195.
- [7] 姚咏明,徐珊,盛志勇. 高迁移率族蛋白 B1 的组织损伤效应及其干预途径新进展[J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29(4): 459-465.
- [8] Rouhiainen A, Imai S, Rauvala H, et al. Occurrence of amphotericin (HMG1) as an endogenous protein of human platelets that is exported to the cell surface upon platelet activation [J]. Thromb Haemost, 2000, 84(6): 1087-1094.
- [9] Sims CA, Wattanasirichaigoon S, Menconi MJ, et al. Ringer's ethyl pyruvate solution ameliorates ischemia/reperfusion-induced intestinal mucosal injury in rats [J]. Crit Care Med, 2001, 29(8): 1513-1518.
- [10] Das UN. Is pyruvate an endogenous anti-inflammatory molecule [J]? Nutrition, 2006, 22(9): 965-972.
- [11] 寇秋野,管向东. 丙酮酸乙酯对脓毒性休克犬氧代谢及组织灌注指标的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2008, 20(1): 34-36.
- [12] 李锐,吴承堂,白雪红. 丙酮酸乙酯对严重腹腔感染时肠黏膜过氧化损伤的防治作用[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(3): 154-156.
- [13] Sappington PL, Han X, Yang R, et al. Ethyl pyruvate ameliorates intestinal epithelial barrier dysfunction in endotoxemic mice and immunostimulated caco-2 enterocytic monolayers [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2003, 304(1): 464-476.
- [14] 李锐,吴承堂. 丙酮酸乙酯抗脓毒症作用的研究进展[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(4): 254-255.
- [15] Miyaji T, Hu X, Yuen PS, et al. Ethyl pyruvate decreases sepsis-induced acute renal failure and multiple organ damage in aged mice [J]. Kidney Int, 2003, 64(5): 1620-1631.
- [16] 董宁,姚咏明,董月青,等. 丙酮酸乙酯对烫伤延迟复苏大鼠脾淋巴细胞增殖及凋亡影响[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(7): 393-396.
- [17] 董月青,姚咏明,魏鹏,等. 丙酮酸乙酯对烫伤延迟复苏大鼠细胞免疫功能的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2005, 17(1): 12-15.
- [18] Han Y, Englert JA, Yang R, et al. Ethyl pyruvate inhibits nuclear factor kappaB dependent signaling by directly targeting p65 [J]. J Pharmacol Exp Ther, 2005, 312(3): 1097-1105.
- [19] 王文江,姚咏明,威力明,等. 丙酮酸乙酯对烫伤延迟复苏大鼠多器官功能及存活率的影响[J]. 中国危重病急救医学, 2006, 18(3): 132-135.

(收稿日期: 2009-04-24 修回日期: 2009-05-10)

(本文编辑: 李银平)