

· 基础论著 ·

Toll 样受体 4 单克隆抗体对慢加急性肝功能衰竭大鼠的保护作用

李汛 杨凡 张倩 周培 龚作炯

【摘要】目的 观察 Toll 样受体 4 (TLR4) 单克隆抗体对慢加急性肝功能衰竭大鼠的治疗效果以及对高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 的影响。**方法** 采用人血白蛋白, D-氨基半乳糖以及 LPS 联合诱导的大鼠慢加急性肝功能衰竭模型, 并应用 TLR4 单克隆抗体作为干预剂以及兔抗鼠 IgG 作为对照, 观察 TLR4 单克隆抗体对慢加急性肝功能衰竭大鼠的肝脏组织学、血清 ALT、TNF- α 、IFN- γ 、HMGB1 水平以及肝组织中 HMGB1 水平的影响。**结果** TLR4 单克隆抗体能够明显改善慢加急性肝功能衰竭大鼠肝脏组织病理学损害, 降低血清中 ALT、TNF- α 、IFN- γ 和 HMGB1 水平, 并且降低肝组织中 HMGB1 水平 (P 均 < 0.05)。而与模型组相比, 以上指标在对照组中差异无统计学意义 (P 均 > 0.05)。**结论** TLR4 单克隆抗体能够保护慢加急性肝功能衰竭大鼠并减少 HMGB1 胞外释放以及肝组织中 HMGB1 的产生。

【关键词】 TLR4 单克隆抗体; 慢加急性肝功能衰竭; 高迁移率族蛋白 B1

Blockade of Toll like receptor 4 confers protection to rats with acute on chronic liver failure LI Xun, YANG Fan, ZHANG Qian, ZHOU Pei, GONG Zuojiong. Renmin Hospital of Wuhan University, Wuhan 430060, China

Corresponding author: GONG Zuojiong, Email: zjgong@163.com

【Abstract】Objective To investigate the effect of Toll like receptor 4 (TLR4) blockade on rats with acute on chronic liver failure and the high mobility group box 1 (HMGB1). **Methods** An acute on chronic liver failure was induced by human serum albumin (HSA), D-galactosamine (D-Gal) and lipopolysaccharide (LPS), anti-TLR4 antibody was applied to treat the rats and rabbit anti-mouse IgG was applied as controls. **Results** The pathological changes of liver tissue were improved by blockade of TLR4, serum levels of ALT, TNF- α , IFN- γ and HMGB1 were decreased by TLR4 antibody as well as HMGB1 levels in liver tissue (P all < 0.05). However, there were no significant differences between the model group and the IgG control group (P all > 0.05). **Conclusion** Blockade of TLR4 could confer protection to rats with acute on chronic liver failure and decrease HMGB1 levels in sera and liver tissue.

【Key words】 Anti-TLR4 antibody; Acute on chronic liver failure; High mobility group box 1 (HMGB1)

慢加急性肝功能衰竭是临床上常见危重症之一, 其起病急, 病情复杂, 病死率高。内毒素血症及其所引起的大量的炎症因子的释放在肝功能衰竭的发病过程中起着重要的作用。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 是内毒素的主要成分之一, 一旦过量则可引起全身性炎症反应^[1]。Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR) 主要分布在体内固有免疫细胞上, 是常见的病原相关模式识别受体,

其可以被细菌、病毒和真菌等病原的固有成份激活而启动体内的固有免疫^[2]。TLR4 是 LPS 最重要的受体之一^[3], 认为在内毒素引起的炎症反应过程中起着关键作用。

高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1) 是一种非组蛋白 DNA 结合蛋白, 能够促进基因转录、DNA 的复制以及修复等^[4-6]。除在核内所发挥的功能外, 近年来研究发现, 在炎症过程中 HMGB1 还可以被释放至胞外, 成为一种强大的炎症介质^[7]。在前期研究中, 本课题组也证明 HMGB1 在肝功能衰竭的发病过程中起着很重要作用^[8]。

DOI: 10.3877/cma.j.issn.1674-1358.2014.02.002

基金项目: 国家自然科学基金 (No. 81071342)

作者单位: 430060 武汉市, 武汉大学人民医院感染科

通讯作者: 龚作炯, Email: zjgong@163.com

本研究应用人血白蛋白(human serum albumin, HSA), D-氨基半乳糖以及LPS联合诱导的慢加急性肝功能衰竭大鼠模型, 并应用TLR4单克隆抗体作为干预剂, 观察了其对慢加急性肝功能衰竭大鼠的治疗效果以及对HMGB1的影响。

材料与方法

一、实验动物及主要试剂

选取雌性Wistar大鼠32只, SPF级, 体重120~150 g, 购于湖北省动物实验中心, 许可证为SCXK(鄂)2008-0005, 实验动物质量合格证号为No. 00015108。D-氨基半乳糖盐酸盐、LPS和不完全福氏佐剂购于美国Sigma-aldrich公司。兔抗鼠TLR4单克隆抗体和兔抗鼠IgG购于英国Abcam公司。

二、动物分组及模型制备

实验前所有大鼠适应环境5 d, 将32只大鼠随机分为正常组、模型组、IgG对照组及TLR4单克隆抗体治疗组。将HSA用生理盐水稀释成8 g/L, 与等量的不完全福氏佐剂乳化。除正常组大鼠外, 其余各组每只大鼠皮下多点注射, 每次注射0.5 ml(内含HSA 4 mg), 共4次(前2次间隔14 d, 第3、4次间隔10 d)。HSA致敏后, 予尾静脉攻击注射HSA 2.5~4 mg, 每周2次, 共6周。然后, 联合D-氨基半乳糖及脂多糖(D-Gal/LPS)进行急性攻击: 大鼠腹腔注射D-Gal 400 mg/kg加LPS 100 μ g/kg。IgG对照组大鼠在急性攻击24 h后, 予以尾静脉注射兔抗鼠IgG 100 μ g/kg作为对照。TLR4单克隆抗体治疗组大鼠在急性攻击24 h后, 予以尾静脉注射兔抗鼠TLR4单克隆抗体100 μ g/kg。模型组大鼠腹腔注射等量的生理盐水作为对照。在给予干预剂24 h后处死所有大鼠, 并收集大鼠肝脏和血液等标本备检。

三、肝组织HE染色

剪下部分肝脏组织, 约0.3 cm \times 0.4 cm, 固定于10%中性甲醛溶液中, 石蜡常规包埋, 切片后进入HE染色, 光镜下观察肝组织结构。

四、血清ALT、HMGB1、TNF- α 和IFN- γ 水平检测

采用生化法检测血清中ALT水平, ELISA法检测血清中HMGB1、TNF- α 和IFN- γ 水平。

五、肝组织HMGB1水平检测

采用Western blot法^[8]检测肝脏组织中HMGB1的蛋白水平。

六、统计学处理

采用SPSS 13.0软件包分析数据, 实验数据以

$\bar{x} \pm s$ 表示, 两组间比较用 t 检验, 以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

结 果

一、TLR4单克隆抗体能够减轻肝脏组织病理学损害

肝组织HE染色结果显示, 模型组大鼠的肝组织结构紊乱, 能够清晰的观察到假小叶的形成, 肝细胞肿胀、破坏, 汇管区有大量的炎症细胞浸润。与模型组相比, IgG对照组大鼠肝组织病理损害无明显改善。与模型组相比, TLR4单克隆抗体治疗组大鼠肝细胞损害程度明显降低, 汇管区炎症细胞浸润减少, 见图1。

二、TLR4单克隆抗体能够降低血清中ALT水平

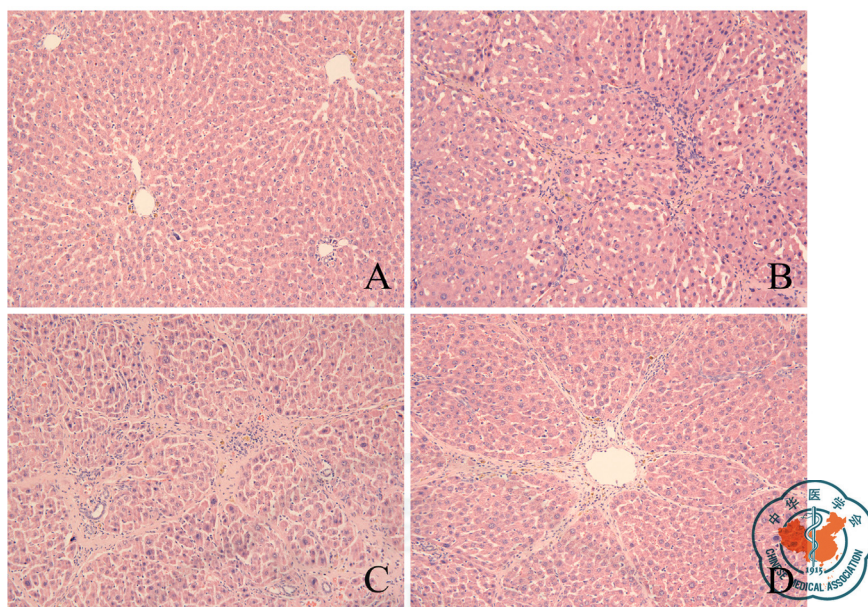
检测血清中ALT水平, 结果显示模型组大鼠血清中ALT水平较正常组显著升高($t = 33.84$, $P < 0.05$), 与模型组相比, IgG对照组大鼠血清中ALT水平差异无统计学意义($t = 0.8325$, $P > 0.05$)。与模型组相比, TLR4单克隆抗体治疗组大鼠血清中ALT水平显著降低($t = 14.62$, $P < 0.05$), 见图2。

三、TLR4单克隆抗体能够降低血清中TNF- α 和IFN- γ 水平

检测血清中TNF- α 和IFN- γ 水平, 结果显示模型组大鼠血清中TNF- α 和IFN- γ 水平较正常组显著升高($t = 16.41$ 、 15.78 , $P < 0.05$), 与模型组相比, IgG对照组大鼠血清中TNF- α 和IFN- γ 水平差异无统计学意义($t = 0.3257$ 、 0.1375 , $P > 0.05$)。与模型组相比, TLR4单克隆抗体治疗组大鼠血清中TNF- α 和IFN- γ 水平显著降低($t = 14.00$ 、 15.62 , $P < 0.05$), 见图3。

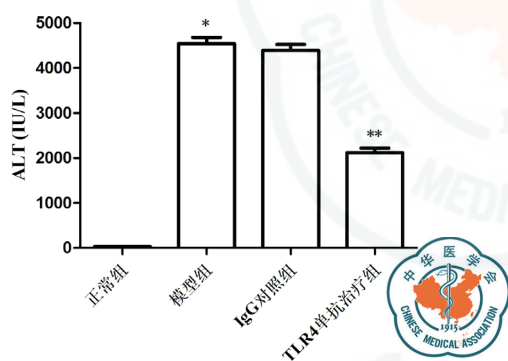
四、TLR4单克隆抗体能够降低血清及肝组织中HMGB1水平

检测血清中HMGB1水平发现, 模型组大鼠血清中HMGB1水平较正常组显著升高($t = 20.14$, $P < 0.05$)。IgG对照组大鼠血清中HMGB1水平较模型组无显著性降低($t = 0.6029$, $P > 0.05$)。与模型组相比, TLR4单克隆抗体治疗组大鼠血清中HMGB1水平显著降低($t = 11.37$, $P < 0.05$)。检测肝组织中HMGB1水平发现, 模型组大鼠肝组织中HMGB1水平较正常组显著升高($t = 6.565$, $P < 0.05$), 而TLR4单克隆抗体组大鼠肝组织中HMGB1水平较模型组显著降低($t = 0.1508$, $P < 0.05$)。IgG对照组大鼠肝组织中HMGB1水平较模型组大鼠差异无统计学意义($t = 4.585$, $P >$



注: A: 正常组; B: 模型组; C: IgG 对照组; D: TLR4 单克隆抗体治疗组

图1 肝组织 HE 染色 (200×)



注: 与正常组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, ** $P < 0.05$

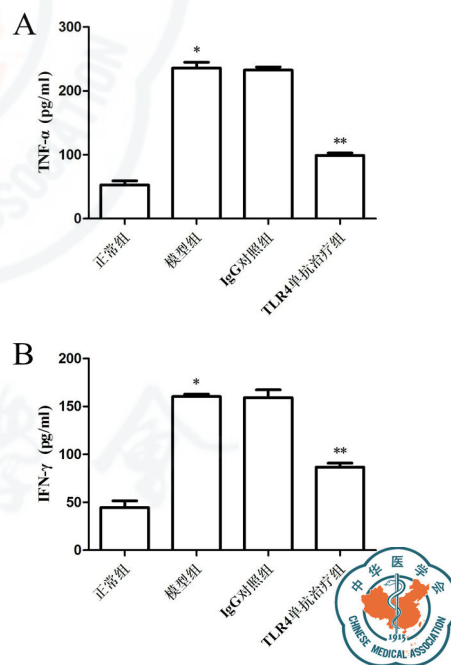
图2 各组大鼠血清 ALT 水平的比较

0.05), 见图4。

讨 论

在亚洲国家,尤其是在中国,最为常见的肝功能衰竭类型是在慢性乙型肝炎的基础上,由于各种原因引起的肝功能突然失代偿而发生的慢加急性肝功能衰竭^[9]。本研究应用人血白蛋白诱导大鼠肝硬化模型,在肝硬化的基础上利用 D-氨基半乳糖和 LPS 联合诱导大鼠的急性肝损害,很好的模拟了慢加急性肝功能衰竭的发生。

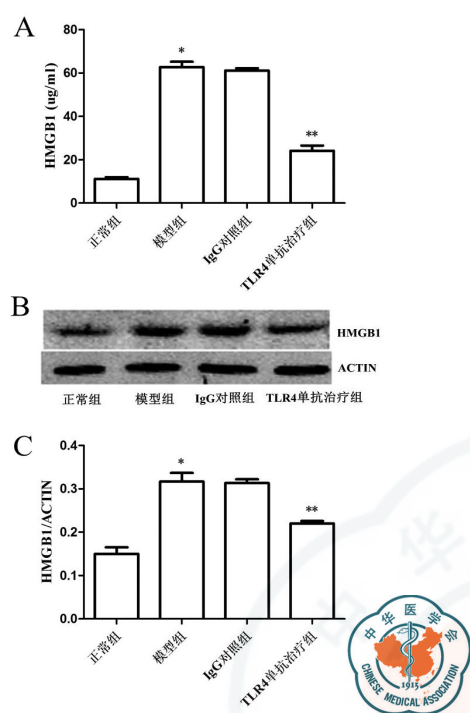
通过观察大鼠肝组织切片以及血清中 ALT 水平, 本研究发现, TLR4 单克隆抗体治疗能够明



注: 与正常组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, ** $P < 0.05$

图3 各组大鼠血清中 TNF-α 和 IFN-γ 水平

显改善大鼠的肝组织病理改变, 减少肝细胞的破坏, 降低肝功能的损害程度。进一步的检测 TNF-α 和 IFN-γ 水平发现, 模型组中 TNF-α 和 IFN-γ 水平显著升高, 而 TLR4 单克隆抗体能够显著降低大鼠血清中 TNF-α 和 IFN-γ 水平。以上结果显示 TLR4 单克隆抗体能够保护慢加急性肝功能衰竭大鼠肝功



A: 血清中 HMGB1 水平; B: HMGB1 水平 (Western blot); C: HMGB1 水平灰度分析; 与正常组相比, * $P < 0.05$; 与模型组相比, ** $P < 0.05$

图 4 肝组织中 HMGB1 的水平

能,同时降低炎症因子的水平,提示 TLR4 信号转导途径在慢加急性肝功能衰竭过程中发挥着重要作用。

研究显示, HMGB1 基因敲除的小鼠会在出生后短时间内死亡,原因是严重的能量利用障碍以及低血糖^[10]。而给正常的动物体内注射 HMGB1 会导致系统性炎症反应的产生,包括发热、体重减轻、厌食、表皮屏障功能障碍、关节炎甚至死亡^[11]。以上结果说明,小剂量的 HMGB1 对维持正常的生理功能至关重要,但一旦超过一定的剂量则会导致严重的炎症反应。而且在许多疾病中均发现有 HMGB1 的不同程度的升高,如急性胰腺炎^[12]、急性肺损伤^[13]、关节炎^[14]、出血性休克^[15]以及缺血再灌注损伤^[16]等。

本研究通过检测 HMGB1 水平发现,模型组大鼠血清以及肝组织中 HMGB1 较正常组显著升高,提示 HMGB1 在慢加急性肝功能衰竭中发挥了重要作用。一旦被释放到细胞外, HMGB1 可与不同细胞表面受体结合而发挥生物学效应, HMGB1 可结合的受体包括 RAGE、TLR2、TLR4 和 TLR9 等^[11, 17-18]。TLR4 受体被认为是介导其致炎作用的主要受体。本研究发现 TLR4 单克隆抗体能够显著降低肝功能衰

竭大鼠血清及肝组织中 HMGB1 水平,证明 TLR4 单克隆抗体能够减少 HMGB1 胞外释放以及肝组织中 HMGB1 的产生,提示 HMGB1 不仅是 TLR4 的受体,而且还可能是 TLR4 信号途径的下游产物。

尽管目前医疗技术得到了很大的发展,但是肝功能衰竭的病死率仍然很高。本研究结果显示 TLR4 单克隆抗体能够有效的保护慢加急性肝功能衰竭大鼠,提示 TLR4 信号途径可以作为今后治疗肝功能衰竭的靶点之一。

参考文献

- Beutler B, Rietschel ET. Innate immune sensing and its roots: the story of endotoxin[J]. Nat Rev Immunol, 2003, 3(2): 169-176.
- Cherry S, Silverman N. Host-pathogen interactions in drosophila: new tricks from an old friend[J]. Nat Immunol, 2006, 7(9): 911-917.
- Poltorak A, He X, Smirnova I, et al. Defective LPS signaling in C3H/HeJ and C57BL/10ScCr mice: mutations in Tlr4 gene[J]. Science, 1998, 282(5396): 2085-2088.
- 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.
- Zhang CC, Krieg S, Shapiro DJ. HMG-1 stimulates estrogen response element binding by estrogen receptor from stably transfected HeLa cells[J]. Mol Endocrinol, 1999, 13(4): 632-643.
- Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins[J]. Mol Cell Biol, 1999, 19(8): 5237-5246.
- 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 USA, 2004, 101(1): 296-301.
- Wang LW, Wang LK, Chen H, et al. Ethyl pyruvate protects against experimental acute-on-chronic liver failure in rats[J]. World J Gastroenterol, 2012, 18(40): 5709-5718.
- 中华医学会感染病学分会肝衰竭与人工肝学组, 中华医学会肝病学会重型肝病与人工肝学组. 肝衰竭诊疗指南[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(9): 643-646.
- Calogero S, Grassi F, Vaguzzi A, et al. The lack of chromosomal protein HMG1 does not disrupt cell growth but causes lethal hypoglycaemia in newborn mice[J]. Nat Genet, 1999, 22(3): 276-280.
- Yang H, Wang H, Czura CJ, et al. The cytokine activity of HMGB1[J]. J Leukoc Biol, 2005, 78(1): 1-8.
- Yasuda T, Ueda T, Shinzaki M, et al. Increase of high-mobility group box chromosomal protein 1 in blood and injured organs in experimental severe acute pancreatitis[J]. Pancreas, 2007, 34(4): 487-488.
- 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(12): 1310-1316.
- Hamada T, Torikai M, Kuwazuru A, et al. Extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 is a coupling factor for hypoxia and inflammation in arthritis[J]. Arthritis Rheum, 2008, 58(9): 2675-2685.
- Fan J, Li Y, Levy RM, et al. Hemorrhagic shock induces NAD(P)H oxidase activation in neutrophils: role of HMGB1-TLR4 signaling[J]. J Immunol, 2007, 178(10): 6573-6580.
- Tsung A, Sahai R, Tanaka H, et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia-reperfusion[J]. J Exp Med, 2005, 201(7): 1135-1143.
- Wang H, Ward MF, Sama AE. Novel HMGB1-inhibiting therapeutic agents for experimental sepsis[J]. Shock, 2009, 32(4): 348-357.
- Wang H, Yang H, Czura CJ, et al. HMGB1 as a late mediator

of lethal systemic inflammation[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164(10 Pt 1):1768-1773.

(本文编辑: 孙荣华)

(收稿日期: 2013-11-26)

李汛, 杨凡, 张倩, 等. Toll样受体4单克隆抗体对慢加急性肝功能衰竭大鼠的保护作用[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2014, 8(2): 158-162.

