

· 基础论著 ·

高迁移率蛋白-1 在急性肝衰竭模型猪血清中的变化及意义

张帆 贺永文 段钟平 陈煜 闫丽 李亚明 杨松 张威

【摘要】 目的 探讨高迁移率蛋白-1(HMGB-1)在急性肝衰竭模型猪血清中的变化,以及人工肝治疗对其影响和意义。**方法** 采用D-氨基半乳糖制备猪肝衰竭模型,随机分为模型组和人工肝治疗组。Western blot法检测各组动物血清中HMGB-1,用酶联免疫吸附试验检测各组动物肿瘤坏死因子(TNF- α)和白细胞介素1 β (IL-1 β)水平,并观察人工肝治疗对血清HMGB-1、肝功能和肝组织病理的影响。**结果** 模型组猪血清TNF- α 和IL-1 β 在造模后24 h内即达到高峰,后迅速下降;血清HMGB-1在建模后24 h开始升高,48 h达到高峰,后一直维持较高水平。造模后模型动物肝组织24 h出现明显损害,并进行性加重。人工肝治疗组在同期肝损伤较对照组明显减轻,同期血清HMGB-1水平也较对照组明显降低($P < 0.05$)。**结论** 高迁移率蛋白-1可能参与了急性肝衰竭后期的炎症反应和肝脏病理损伤,人工肝治疗能降低高迁移率蛋白-1在血清中的水平,改善肝脏病理损伤。

【关键词】 高迁移率蛋白-1;急性肝衰竭;人工肝治疗

Role of the high mobility group box 1 in acute hepatic failure in pig ZHANG Fan, HE Yong-wen, DUAN Zhong-ping, CHEN Yu, YAN Li, LI Ya-ming, YANG Song, ZHANG Wei. Department of Infectious Diseases, Union Hospital of Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022, China
Corresponding author: HE Yong-wen, Email: hyw581441@yahoo.com.cn

【Abstract】 Objective To investigate the role of the high mobility group box 1 (HMGB-1) in acute hepatic failure model and the effect of artificial liver support system treatment on HMGB-1 level. **Methods** Pig models of acute hepatic failure were induced by D-galactosamine and randomly divided into two groups with or without artificial liver support system treatment. Tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-1 β (IL-1 β) levels were detected by the enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), the expression of HMGB-1 was detected by Western blot in different groups. Serum levels of HMGB-1, liver function and hepatic pathology were observed

作者单位:430032 武汉市,华中科技大学同济医学院附属协和医院感染性疾病科(张帆、贺永文);北京佑安医院(段钟平、陈煜、闫丽、李亚明);洛阳东方医院(杨松、张威)

通讯作者:贺永文, Email: hyw581441@yahoo.com.cn

after artificial liver support system treatment. **Results** Levels of $\text{TNF-}\alpha$ and $\text{IL-1}\beta$ increased and reached a peak at 24 h in the acute hepatic failure group, then quickly decreased. The serum level of HMGB1 started to increase at 24 h in the acute hepatic failure group and reached a peak at 48 h, then kept at a stable high level. Significant liver injury appeared at 24 h and was continuously getting worse in the pig models of acute hepatic failure. In contrast, the liver injury was significantly alleviated and serum level of HMGB1 was significantly decreased in the group treated with artificial liver support system ($P < 0.05$). **Conclusions** HMGB-1 may participate in the inflammatory response and liver injury in the late stage of the acute liver failure, artificial liver support system treatment may reduce serum HMGB1 level and relieve liver pathological damage.

【Key words】 High mobility group box 1 protein; Acute liver failure; Artificial liver support system treatment

内毒素血症常常是导致急性肝衰竭病情加重并促成患者死亡的重要因素之一,其发病机理尚不完全明确。高迁移率蛋白-1 (high mobility group box 1, HMGB-1) 是一种广泛存在于真核细胞胞浆和胞核内的非组核蛋白,具有 DNA 结合、参与细胞分化成熟、DNA 修复和基因调控等功能^[1,2]。最近发现 HMGB-1 是介导内毒素致死性休克的重要炎症介质之一^[3],而其在急性肝衰竭发病中的作用迄今未见报道。我们应用急性肝衰竭猪动物模型,对此进行探讨,同时应用人工肝支持系统进行干预治疗,以了解急性肝衰竭猪动物模型血清中 HMGB-1 的变化及其意义。

资料与方法

一、实验对象

1. 实验动物:中国实验小型猪(五指山系)12 只雌性,7~8 月龄,体重在 18~25 kg 之间,购于中国农业科学院畜牧研究所。

2. 动物模型的建立:应用阿托品 0.05 mg/kg,盐酸氯胺酮 10 mg/kg,安定 10 mg 实施基础麻醉,耳静脉穿刺建立循环通路,丙泊酚 10 mg 溶于 100 ml 的生理盐水中静脉滴注维持麻醉状态。在右锁骨中线旁开 3~4 cm 处为切口部位做一长约 5 cm 纵行切口,在胸锁乳突肌外缘处分离出颈外静脉,留置双腔中心静脉导管,用于给药取血检测和人工肝治疗。所有动物按每公斤体重 1.2 g 给予 D-氨基半乳糖葡萄糖溶液,经颈外静脉插管于 10 min 内输入动物体内。造模后将动物模型猪随机分为两组:(1)模型组 6 只猪,造模后 6 h、12 h、24 h、36 h、48 h、60 h、72 h、96 h 从颈静脉处取血,室温静置 2 h,分离血清 -80℃ 保存,以备测定 HMGB-1、 $\text{TNF-}\alpha$ 、 $\text{IL-1}\beta$ 。并分别在造模后 24 h、48 h、72 h 在 B 超引导下进行肝组织活检;(2)人工肝治疗组 6 只猪,在造模 48 h 后,即给予人工肝治疗一次,余同模型组。

二、实验方法

1. 人工肝治疗:人工肝治疗组件包括 Plasauto-iQ 型血浆置换仪、OP-08W 膜型血浆分离器,ACH-10 血液滤过净化仪、APF-105 持续徐缓式血液滤器,均购自日本韶华松和公司。动物全麻后,捉持、仰卧位固定于实验台上,通过颈外静脉插管建立循环通路,连接血浆交换机进行血浆置换,血液流速 50 ~ 80 ml/min。抗凝剂为肝素,首剂为 100 U/kg,维持量用肝素泵维持给入,治疗前 3 h 的肝素维持量为 50 U/kg/h。新鲜冰冻血浆提前在 37℃ 水浴箱中融化、加热。血浆用量按照动物血浆总量的 1.3 倍量给予。血浆置换治疗结束后立即进行血液滤过治疗,血液流速 150 ml/min,每小时置换液量为动物血浆总量的 1.3 ~ 1.5 倍,总置换液量为 8000 ~ 10 000 ml。

2. HMGB-1 的检测:采用 Western blot 法检测各时点 HMGB-1 水平。静脉取血 5 ml,室温静置 2 h,分离血清,先用 Centricon YM-100 浓缩纯化管清除血清的细胞碎片和凝血时形成的大分子复合物,然后用 Centricon YM-3 浓缩纯化管将血清浓缩 10 倍,将样品经 15% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳,并转移至硝酸纤维素膜上。然后置于 5% 封闭液中,4℃,过夜。次日,弃去封闭液,以杂交洗液漂洗数分钟,加入细胞为 1:500 抗-HMGB-1 抗体(试剂购自 RnD 公司),室温,孵育 2 h。每次 10 min。加入 1:500 辣根过氧化物酶标记的抗小鼠 IgG 抗体(试剂购自华美公司)3 ml,室温下与杂交膜孵育 1 h。化学发光剂、增强剂按 1:1 配成应用液并滴加于膜上,震荡共育 60 ~ 90 s,除去检测液,滤纸蘸干膜后,将其包于塑料保鲜膜中。在暗室,将一张放射自显影底片压在膜上,曝光 1 min,取出冲洗。同时再放另一张底片于膜上,并根据第一张底片的冲印质量决定第二张底片的曝光时间。用 Fuji-3000 多媒体凝胶成像分析系统拍照,并分析 30 kD 显色条带的强弱,以各条带密度表示。以 r HMGB-I(Sigma)绘制标准曲线。

3. 其他观察项目:血清生物化学(ALT、AST 和 TBil)检测应用全自动生物化学分析仪(日本奥林巴斯-400)测定。凝血酶原时间(PT)采用半自动血凝仪(倍肯-4BC)测定。ELISA 法检测各时点的血清肿瘤坏死因子(TNF- α)、白细胞介素-1 β (试剂购自 Biosource 公司)。

三、统计学分析

采用 SPSS 11.0 分析,均数之间比较用 t 检验。

结 果

一、肝脏病理组织变化

造模后动物肝损害逐渐加重,模型动物对照组动物平均存活时间为(67.9 \pm 9.4) h,均死于严重肝衰竭。动物不同时期肝穿活体组织与尸检肝组织切片、染色后光镜下观察,可看到肝脏炎症、坏死的发展演变过程。给药后 24 h,肝组织病理变化显示肝小叶结构存在,肝窦轻度扩张,肝小叶内可见肝细胞点状坏死,并可见凋亡小体,汇管区未见明显变化。给药后 48 h,肝细胞坏死区域明显增多,呈大片状坏死,面积大于 50%,坏死灶网眼扩张、充血,少见单个核细胞浸润(图 1)。

尸检肝组织可见以中央静脉为中心肝细胞呈亚大块坏死,坏死灶内红细胞充填,大量中性粒细胞浸润,肝小叶周边残存正常肝组织,部分残留肝细胞呈大、小泡性脂肪变性(图2)。

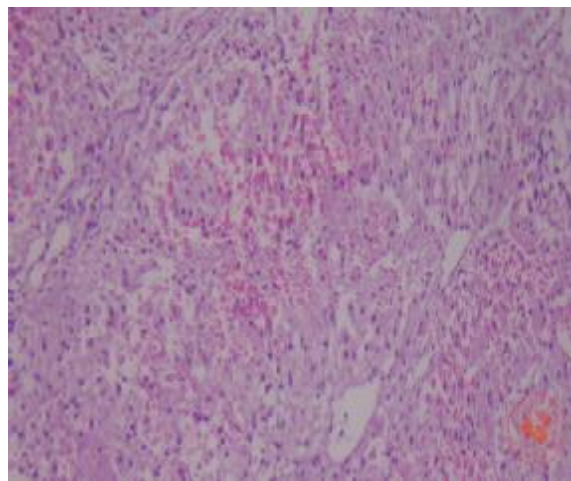


图1 造模48 h肝脏病理变化(HE, 100×)

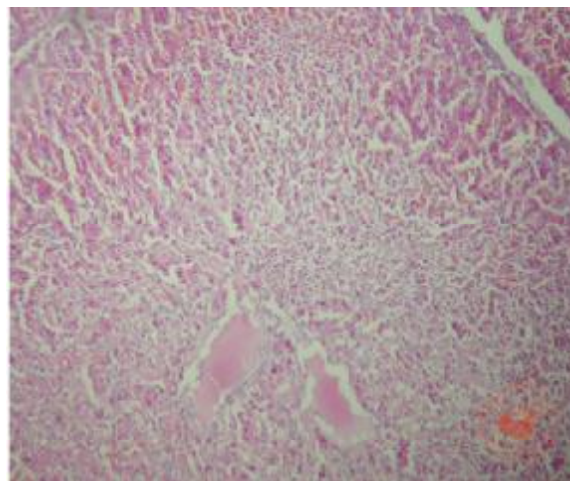


图2 造模72 h肝脏病理变化(HE, 100×)

二、造模后肝损伤指标的变化

造模后动物肝损伤逐渐加重,生物化学指标(ALT、AST、TBil)及PT的检测结果见表1。可见造模后12 h、18 h起,ALT、AST显著升高,从24 h起已明显高于0 h($P < 0.05$),并随时间增长继续升高,总胆红素和凝血酶原时间在24 h起均明显升高和延长,与0 h相比均有明显差异($P < 0.05$)。

表1 造模前后动物肝功能变化($\bar{x} \pm s$)

肝功	0 h	6 h	12 h	18 h	24 h	48 h	60 h	72 h
ALT(U/L)	43.0 ± 5.0	127.0 ± 11.0	423.0 ± 51.0*	561.0 ± 77.0*	961.0 ± 155.0*	1335.0 ± 255.0	1553 ± 289*	1439 ± 261*
AST(U/L)	47.0 ± 4.0	110.0 ± 13.0	348.0 ± 53.0	535.0 ± 65.0*	775.0 ± 98.0*	979.0 ± 203.0*	1844 ± 312*	1855 ± 353*
TBil(μmol/L)	0.8 ± 0.4	18.2 ± 6.3.0	30.0 ± 6.4	42.3 ± 9.6*	715.0 ± 116.0*	1015.0 ± 20.3.0*	159.0 ± 15.4*	189 ± 21.7*
PT(s)	9.0 ± 0.9	13.7 ± 1.0	22.4 ± 2.9	38.8 ± 5.4	50.3 ± 11.2*	80.6 ± 15.3*	>120*	>120*

注: *与本组0 h相比, $P < 0.05$

三、HMGB-1、TNF-α 和 IL-1β 水平变化

模型猪血清 TNF-α 和 IL-1β 在建模后迅速升高,分别在12 h、24 h达到高峰,分别与建模初期6 h、12 h相比($P < 0.05$)之后迅速下降在48 ~ 72 h维持较低水平。血清 HMGB-1 在建模后24 h开始升高,48 h达到高峰,后一直维持较高水平(图3),与建模24 h相比($P < 0.05$)。

四、人工肝治疗对猪 HMGB-1 水平的影响

模型组血清 HMGB-1 水平在60 h和72 h分别是(156.6 ± 17.7) μg/L 和 (86.6 ± 11.1) μg/L,治疗组经人工肝治疗后, HMGB-1 水平明显下降(图4),分别是(103 ± 13.3) μg/L 和 (36.9 ± 7.7) μg/L ($P < 0.05$)。人工肝治疗后 TNF-α 和 IL-1β 水平虽略有下降,但差异不明显(表2)。人工肝治疗后(72 h),治疗组

ALT、AST、TBil、PT 等指标(表3)较治疗前(48 h)有明显降低,并与模型组同一时间点(72 h)也具有明显差异($P < 0.05$)。

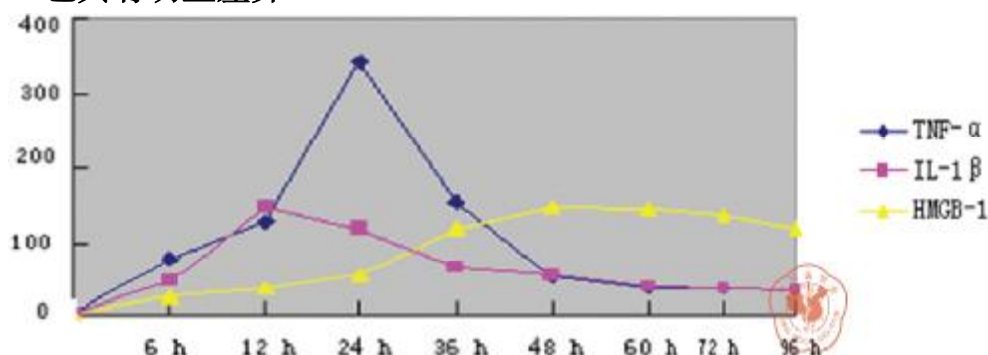


图3 急性肝衰竭猪血清 HMGB-1、TNF-α 和 IL-1β 水平变化
注: TNF、IL-1 单位为 pg/L, HMGB-1 单位为 μg/L

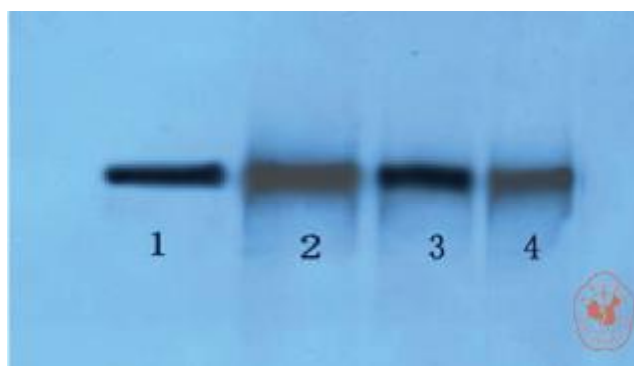


图4 血清 HMGB-1 染色结果(条带所在位置为 30 kD)

1、2: 60 h 模型组与治疗组 Western blot 结果; 3、4: 72 h 模型组与治疗组 Western blot 结果

表2 人工肝治疗对猪血清 HMGB-1、TNF-α 和 IL-1β 水平的影响($\bar{x} \pm s$)

	HMGB-1(μg/L)		IL-1β(pg/L)		TNF-α(pg/L)	
	60 h	72 h	60 h	72 h	60 h	72 h
模型组	156.6 ± 17.7	86.6 ± 11.1	40.5 ± 9.6	39.6 ± 6.7	31.3 ± 6.4	28.6 ± 5.3
人工肝组	103.0 ± 13.3 *	36.9 ± 7.7 *	37.7 ± 7.7	34.9 ± 7.2	29.3 ± 4.1	25.5 ± 5.1

注: 与人工肝治疗组同时时间点比较 * $P < 0.05$

表3 治疗组治疗前(48 h) 治疗后(72 h)与模型组同时时间点肝功能变化比较($\bar{x} \pm s$)

	ALT(U/L)		AST(U/L)		TBil(μmol/L)		PT(s)	
	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h	48 h	72 h
治疗组	1371.0 ± 261.0	773.0 ± 69.0 * ^Δ	1006.0 ± 119.0	637.0 ± 52.0 * ^Δ	101.9 ± 17.6	74.5 ± 11.4 * ^Δ	78.6 ± 19.7	65.6 ± 12.8 * ^Δ
模型组	1335.0 ± 255.0	1439.0 ± 261.0	979.0 ± 203.0	1855.0 ± 353.0	101.5 ± 20.3	189.0 ± 21.7	80.6 ± 15.3	> 120

注: * 组内比较(治疗组治疗前 48 h 与治疗组 72 h) * $P < 0.05$; ^Δ 组间比较(治疗组 72 h 与模型组 72 h) ^Δ $P < 0.05$

五、人工肝治疗对模型猪肝组织学变化的影响

72 h 时,模型组猪肝组织以中央静脉为中心肝细胞坏死面积可达肝小叶面

积的2/3,坏死区可见胆汁淤积,而人工肝治疗组72 h肝组织坏死区域为肝小叶面积的1/3,胆汁淤积较轻(图5、6)。

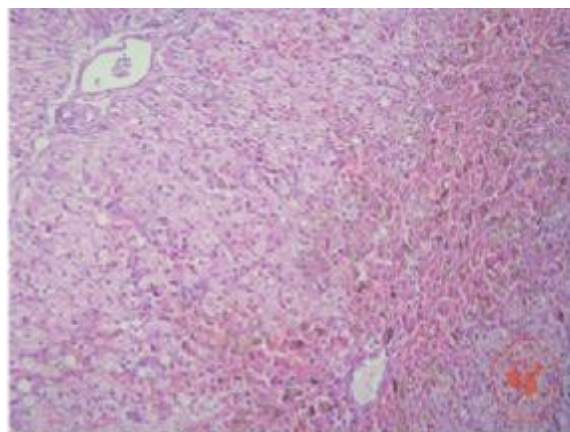


图5 对照组造模72 h肝组织变化(HE, 100×)

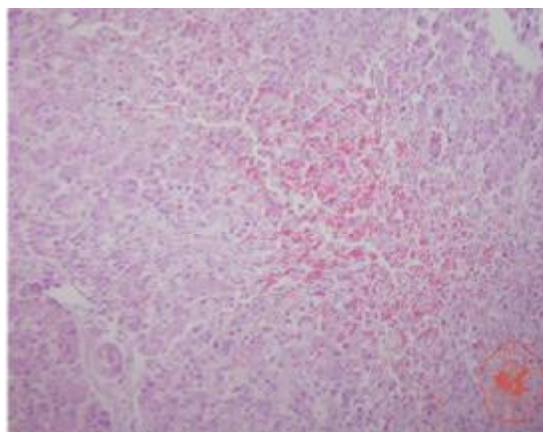


图6 治疗组造模72 h(HE, 10×)

六、生存时间

两组动物在给药后18 h肝功能损害开始明显出现。对照组动物平均存活时间为 (67.9 ± 9.4) h,均死于严重肝衰竭。治疗组存活时间为 (128.7 ± 11.3) h,与对照组相比差异有统计学意义($t=3.1$, $P<0.01$)。

讨 论

内毒素血症和炎症因子(如TNF- α 和IL-1 β 等)在急性肝衰竭的发生发展中发挥重要作用。急性肝衰竭时大量肝细胞坏死、炎症细胞浸润和炎症因子释放导致肝脏功能受损,肠道产生的内毒素,主要是革兰阴性菌脂多糖(LPS)不能被肝脏处理而出现内毒素血症。LPS通过TLRs(Toll-like receptors)诱导NF- κ B活化,刺激大量炎症因子释放,通常由于继发性全身炎症反应综合征促进急性肝衰竭的病情进展致死^[4]。

真核细胞染色质中含有丰富的进化高度保守的HMGB1。HMGB1含有2个约80 aa组成的L型HMG框,分别是N端A框和中间的B框。其中,B框是引起炎症反应的结构域。既往认为,HMGB1是一种DNA结合蛋白,具有维持核小体结构和调节基因转录的功能。近来发现HMGB1是一种很强的炎症因子,广泛参与全身和局部炎症反应^[3]。HMGB1由坏死细胞被动释放,也可通过炎症因子刺激单核/巨噬细胞主动分泌。LPS刺激单核/巨噬细胞核转录因子NF- κ B的活化,高度乙酰化的HMGB1从胞核转移至胞浆后分泌^[5]。HMGB1刺激炎症细胞活化并向炎症部位聚集,促进炎症因子分泌造成组织损伤^[6]。

本实验建立肝衰竭动物模型,动态观察TNF- α 、IL-1 β 和HMGB-1的变化,并与肝脏病理变化进行比较。结果显示血清TNF- α 、IL-1 β 在建模初期迅速增高,在12~24 h达到高峰,此时肝内炎症反应明显。之后迅速下降,在48 h以后维持较低水平。血清HMGB-1在建模后24 h才开始升高,48 h达到高峰,后一直维持在

较高水平。建模后 48 h 正是肝脏病理损伤明显加重之时,此时 TNF- α 和 IL-1 β 等炎性介质在此前已明显下降,处于低水平。提示 HMGB-1 可能为 TNF- α 、IL-1 β 的下游因子^[7]。在建模初期 TNF- α 、IL-1 β 参与和促进了肝内炎症反应,而随后 HMGB-1 作为炎症介质参与和促进了肝脏的炎症反应和病理损伤。最近发现, HMGB-1 可通过 TLR4 介导肝脏缺血后再灌注损伤^[8],并在促进微血管血栓形成方面具有重要作用^[9],这可能是 HMGB-1 作为炎症介质参与和促进肝脏的炎症反应和病理损伤的机制之一。

通过血浆置换联合持续血液滤过对治疗组动物进行治疗,结果发现治疗组动物 HMGB-1 较对照组的同期水平明显降低,肝脏病理损伤也明显减轻。进一步证实 HMGB-1 作为炎症介质参与和促进了肝脏的炎症反应和病理损伤,人工肝治疗可减轻或清除这类炎症介质对肝脏的损伤作用。人工肝治疗为非特异性地清除炎症因子,所以血浆置换联合持续血液滤过治疗能明显降低包括血清 HMGB-1 在内的许多炎症因子的水平,从而减轻其所导致的肝脏病理损伤,并延长实验动物的生存期限。但由于本实验的目的仅限于观察人工肝治疗对肝衰竭动物的相关因子的影响,未对模型动物持续进行支持治疗和药物治疗,所以动物没有能够长期生存。

综上所述, HMGB-1 作为炎症因子可能参与了急性肝衰竭后期的炎症反应和肝脏病理损伤,因而可能成为急性肝衰竭防治的潜在干预目标。血浆置换联合持续血液滤过能明显降低血清 HMGB-1 含量,有助于改善肝脏病理损伤并延长生存期,这为临床应用血浆置换联合持续血液滤过治疗急性肝衰竭这一有效手段提供了进一步的理论支持。但 HMGB-1 如何参与和促进急性肝衰竭晚期的肝脏病理损伤的具体机制仍有待进一步研究阐明。

参 考 文 献

- 1 Bustin M. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins. Trends Biochem Sci, 2001, 26: 152-153.
- 2 Thomas JO. HMGB-1 and 2: architectural DNA-binding proteins. Biochem Soc Trans, 2001, 29: 395-401.
- 3 Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMGB-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. Science, 1999, 285: 248-251.
- 4 Rolando N, Wade J, Davalos M, et al. The systemic inflammatory response syndrome in acute liver failure. Hepatology, 2000, 32: 734-739.
- 5 Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, et al. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion. EMBO J, 2003, 22: 5551-5560.
- 6 Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal. Nat Rev Immunol, 2005, 5: 331-342.
- 7 Anderresson U, Tracey KJ. HMGB1 in sepsis. Scand J Infect Dis, 2003, 35: 577-587.
- 8 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: 1135-1143.
- 9 Ito T, Kawahara K, Nakamura T, et al. High-mobility group box 1 protein promotes development of microvascular thrombosis in rats. J Thromb Haemost, 2007, 5: 109-116.

(收稿日期: 2008-03-04)

(本文编辑: 王丹静)

张帆, 贺永文, 段钟平, 等. 高迁移率蛋白-1 在急性肝衰竭模型猪血清中的变化及意义[J/CD]. 中华实验和临床感染病杂志: 电子版, 2009, 3(1): 6-12.