

HMGB1在急性肝衰竭大鼠中的表达及作用

刘娟¹, 许海波², 向天新¹, 李细女³, 邬小萍¹ (1.南昌大学第一附属医院, 南昌, 330006; 2.九江市第一人民医院, 江西 九江市, 332000; 3.新余市第一人民医院, 江西 新余市, 338000)

摘要: 目的 探讨HMGB1在急性肝衰竭大鼠肝组织和血中的变化规律及作用。方法 将48只健康雌性SD大鼠按数字表随机分为对照组、模型组, 每组24只, 采用腹腔内注射D-GalN (400 mg/kg) + LPS (100 µg/kg) 的方法诱导急性肝衰竭, 同时对照组予腹腔注射等量生理盐水。两组大鼠均在4、8、12小时时间点取血液及肝组织标本, 检测血清ALT、AST水平, HE染色观察肝组织病理变化, ELISA法检测血清HMGB1浓度, RT-PCR法检测肝组织HMGB1 mRNA表达, 免疫组化法检测肝组织HMGB1的表达。结果 D-GalN (400 mg/kg) + LPS (100 µg/kg) 的方法能成功诱导急性肝衰竭模型。对照组血清HMGB1浓度及肝组织HMGB1 mRNA表达在各时间点均较低, 而模型组随时间延长而升高。对照组肝细胞核与胞浆中仅见少量HMGB1蛋白表达, 模型组肝组织HMGB1蛋白表达随时间延长升高。结论 急性肝衰竭时血和肝组织中HMGB1水平均随时间延长而升高, 且两者变化与肝损程度正相关。

关键词: 急性肝衰竭; 高迁移率族蛋白1; 免疫组化; RT-PCR

Expression and function of high mobility group box 1 protein in rats with acute liver failure

LIU Juan¹, XU Hai-bo², XIANG Tian-xin¹, LI Xi-nv³, WU Xiao-ping¹ (1.The First Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang 330006, China; 2.Jiujiang NO.1 People's Hospital, Jiujiang 332000, China; 3.The First of Xinyu People's Hospital, Xinyu 332000, China)

Abstract: **Objective** To investigate the liver tissue and blood of HMGB1 variation and function in rats with acute liver failure. **Methods** The 48 healthy female SD rats were randomly divided into control group (n = 24), and model group (n = 24). D-GalN (400 mg/kg) and LPS (100 µg/kg) were used to manufacture of acute liver failure model by intraperitoneal injection. Model group was given D-GalN/LPS by intraperitoneal injection, simultaneously, control group was given the same amount of saline. Each groups were taken specimens at 4 h, 8 h and 12 h after ALF induction. Each group was detected for serum ALT and AST concentration, observed liver pathological changes by HE staining, evaluated serum HMGB1 concentration by ELISA assay, and determined the level of HMGB1 mRNA by RT-PCR and the protein expression level of liver tissue HMGB1 by immunohistochemistry. **Results** The ALF models were successfully induced by D-GalN (400 mg/kg) and LPS (100 µg/kg) injection. The serum HMGB1 concentrations and the liver tissue of HMGB1 mRNA expression of control group were lower at all time points, and they increased with time in the model group. Liver nuclei and cytoplasm of the control group only saw a small amount of HMGB1 protein expression in liver tissue, the model group HMGB1 protein expression increased with time. **Conclusions** The blood and liver tissue HMGB1 levels of rats with acute liver failure increased with time, there was a positive correlation between them and the degrees of liver damage.

Key words: Acute liver failure; High mobility group protein 1; Immunohistochemistry; RT-PCR

高迁移率族蛋白B1 (high mobility group box 1 protein, HMGB1) 是核内一类非组蛋白核蛋白, 当外源性微生物或内源性组织损伤发生时, HMGB1 作为应激信号和炎性介质通过两种方式释

放到胞外,一种是由活化的单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞(DC)等免疫细胞主动分泌到胞外,另一种是由多种病理过程中组织细胞的坏死、损伤使核内的HMGB1释放至细胞外。

有研究^[1]表明释放至胞外的HMGB1可诱导单核细胞产生多种细胞因子TNF- α 、IL-1、IL-6等,即直接作为炎性细胞因子参与固有免疫应答,也可激活APC,促使树突状细胞成熟,进而使初始T细胞活化、增殖、分化为辅助性T淋巴细胞(Th)1,从而启动适应性免疫应答^[2]。由此推测出HMGB1可能在肝衰竭肝损的病理生理过程中发挥重要作用,故本课题以此为切入点,研究HMGB1在D-GalN(400 mg/kg)+LPS(100 μ g/kg)诱导的实验大鼠急性肝衰竭模型中的表达,探讨HMGB1在急性肝衰竭大鼠肝脏组织和血中的变化规律及其与肝损伤的关系。

1 材料与方法

1.1 实验材料 健康雌性清洁级SD大鼠48只(南昌大学动科部提供),体质量200~250 g。D-氨基半乳糖及脂多糖购自Sigma公司。TRIzol购自北京全式金公司,RT试剂盒和PCR试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。兔抗多克隆HMGB1抗体购自Anbo生物科技有限公司,马抗兔HRP二抗购自武汉博士德生物工程有限公司, HMGB1 ELISA试剂盒购自上海西塘生物科技有限公司,两步法免疫组织化学检测试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司。

1.2 ALF动物模型的制备及标本收集 雌性SD大鼠入恒温恒湿的实验室普通饲料饲养1周。实验前动物禁食12小时。按数字表随机分为对照组和模型组各24只。参照丁美等^[3]的方法,采用腹腔内注射D-GalN(400 mg/kg)+LPS(100 μ g/kg)诱导急性肝衰竭,模型组仅予D-GalN+LPS腹腔注射诱导急性肝衰竭,同时对照组给予腹腔注射等量生理盐水。上述D-GalN溶液浓度均为100 mg/ml, LPS溶液浓度均为100 μ g/ml。两组大鼠均在4、8、12小时麻醉后采血,取肝组织标本。给予100 mg/ml水合氯醛按0.3 ml/100 mg剂量给大鼠腹腔注射,打开腹

腔,钝性分离后腔静脉,普通管采血4 ml后放血致死;暴露肝脏,剪下肝脏右叶大小50~100 mg组织若干块置于冻存管中,迅速放置液氮中保存,用于RT-PCR法检测HMGB1 mRNA;其余肝组织标本立即置于冷10%中性甲醛中固定,取肝脏相同部位用于石蜡切片,然后进行免疫组织化学检测HMGB1表达;血样静置1小时后,4 $^{\circ}$ C 4000 r/min离心10分钟,分装血清至-20 $^{\circ}$ C冰箱保存,用于血清ALT、AST检测及HMGB1 ELISA检测。

1.3 血清ALT、AST水平测定 采用日立7600全自动生化分析仪系统检测大鼠血清ALT/AST含量。

1.4 ELISA法测定血清HMGB1浓度 应用ELISA试剂盒检测,采用双抗体夹心ABC-ELISA法,将血清从-20 $^{\circ}$ C冰箱中拿出解冻20分钟,解冻后至涡旋混合器涡旋15~30秒,使血清混匀;根据说明书准备试剂,每孔各加入标准品或待测样品100 μ l,将反应板充分混匀后置37 $^{\circ}$ C 120分钟;用洗涤板仪将反应板充分洗涤5次,向滤纸上印干;每孔加入标本稀释液和第一抗体工作液各50 μ l(空白孔除外),将反应板充分混匀后置37 $^{\circ}$ C水浴箱60分钟;洗板同前;每孔加入酶标抗体工作液100 μ l,将反应板充分混匀后置37 $^{\circ}$ C水浴箱30分钟;同前洗板;每孔加入底物工作液100 μ l,置37 $^{\circ}$ C暗处反应15分钟;每孔加入100 μ l终止液混匀;30分钟内用酶标仪在450 nm处测吸光值。结果计算与判断:所有A值减除空白值后计算。以标准品200、100、50、25、12.5、6.25、3.12、0 ng/ml为横坐标,A值为纵坐标,使用软件作图(CurveExpert软件),画出标准曲线。根据样品A值计算相应HMGB1含量,再乘上稀释倍数(8倍)即为原血清中HMGB1的浓度。

1.5 RT-PCR检测肝组织HMGB1 mRNA表达 取250 mg肝组织按试剂盒说明书提取总RNA,用紫外分光光度计测定总RNA在波长260 nm和280 nm的吸光度值,两者比值可估算总RNA的纯度。RNA纯品的 A_{260}/A_{280} 比值范围为1.8~2.0,若所提取的总RNA纯度不在此范围,则考虑重新提取。逆转录合成cDNA, HMGB1上游引物5'-GATGACAAGCAGCCCTAT-3',下游引物5'-

TCCATGCCAATTTACAAC-3'，大小481 bp；PCR反应条件：94℃ 5分钟，94℃ 35秒，57℃ 35秒，72℃ 60秒，72℃ 7分钟，35个循环。 β -actin：上游引物5'-CCAACCGTGAAAAGATGACC-3'，下游引物5'-CAGGAGGAGCAATGATCTTG-3'，大小660 bp；PCR反应条件：94℃ 5分钟，94℃ 35秒，57℃ 35秒，72℃ 60秒，72℃ 7分钟，35个循环。PCR产物在1.2%琼脂糖凝胶电泳，用凝胶分析系统对条带进行拍照分析，将每个样本所测得的HMGB1 mRNA的灰度值分别与对应的 β -actin mRNA的灰度值相比，计算两者灰度值比值，该比值表示HMGB1 mRNA的相对表达量。

1.6 免疫组织化学检测肝组织HMGB1表达 石蜡切片经脱蜡、水化、室温孵育、抗原修复、封闭非特异性位点后，实验组切片滴加稀释为1:100的兔抗HMGB1一抗，37℃孵育1小时，4℃冰箱过夜，滴加适当稀释比例的HRP标记的马抗兔二抗，37℃孵育1小时，DAB显色，苏木素复染，封片。阴性对照：以PBS替代一抗设立阴性对照。结果评判方法如下：参考Fridman学者的方法^[4]，每张切片分别观察5个不同的显色较好的高倍镜视野，分别记录显色程度和显色范围即融合成片状的大小。显色程度分弱、中、强，用(+)、(2+)、(3+)记录；显色范围据片状大小依次记录为无片状为(+)、< 1/3为(2+)、1/3~2/3为(3+)、> 2/3为(4+)。将显色程度和范围换算成显色指数，即显色指数=显色程度×显色范围(+)、2+、3+、4+分别按1、2、3、4分计算)，最后以5个视野显色指数的平均数为蛋白表达的最终显色指数。

1.7 肝组织标本苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色 肝组织经10%中性甲醛固定后，常规石蜡包埋，4 μ m切片，经脱蜡、染色、脱水、透明、封固制成。

1.8 统计学处理 应用SPSS 18.0统计软件进行分析处理，数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示，两样本均数的比较采用 t 检验， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 D-GalN + LPS诱导大鼠急性肝衰竭模型 肝组

织HE染色结果可见，对照组各时间点大鼠肝组织病理改变差别不大，镜下小叶结构清晰完整，肝板排列整齐，肝细胞形态正常，无变性坏死，无炎症细胞浸润，无缺血坏死及淤血、出血现象，见图1A~C。模型组大鼠肝组织病理改变随着给药时间的延长而逐渐加重。模型组4小时肝组织镜下见肝小叶结构模糊，肝索部分融合成条状或片状，部分肝细胞肿胀，呈气球样变，可见桥接坏死、小灶性坏死，有散在的嗜酸性变，炎症细胞浸润增加，肝窦可见充血，见图1D。模型组8小时肝组织镜下见肝小叶结构紊乱，肝索解离，肝细胞呈片状融合坏死，嗜酸性变增多，细胞核溶解、碎裂，细胞碎片较多，炎症细胞浸润明显增多，肝窦可见充血并出血，见图1E。模型组12小时组织镜下见肝小叶正常结构已消失，融合成大片状坏死，超过整个切片面积的2/3，大量细胞碎片，嗜酸性变明显增多，仅残留少量正常肝细胞，汇管区及坏死区可见大量炎症细胞浸泡润，肝窦充血、出血明显，见图1F。模型组血清ALT、AST水平亦随时间延长明显升高，在12小时均较对照组升高约10倍，见图2、3。

2.2 ELISA法检测实验大鼠血清HMGB1水平变化 对照组血清HMGB1浓度较低，各时间点浓度无明显变化，均在40 ng/ml左右，而模型组血清HMGB1浓度均随时间延长逐渐升高，在模型组12小时浓度 $[386.57 \pm 57.05 \text{ ng/ml}]$ 较对照组 $[40.25 \pm 7.59 \text{ ng/ml}]$ 升高7~10倍，差异有统计学意义($t_{12\text{小时}} = -18.19$, $P < 0.001$)，见表1。

表1 实验大鼠血清 HMGB1水平变化 (ng/ml, $\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	HMGB1		
	4小时	8小时	12小时
模型组	90.68 \pm 9.14	140.94 \pm 10.95	386.57 \pm 57.05
对照组	41.20 \pm 8.59	40.00 \pm 7.27	40.25 \pm 7.59
<i>P</i>	0.000	0.000	0.000

2.3 RT-PCR检测实验大鼠肝组织HMGB1 mRNA表达变化 对照组各时间点肝HMGB1 mRNA表达均较低[HMGB1/ β -actin: 4小时为(0.51 \pm 0.11)，8小时为(0.53 \pm 0.11)，12小时为(0.47 \pm 0.09)]，而模型组肝HMGB1 mRNA表达均随时间逐渐升高，

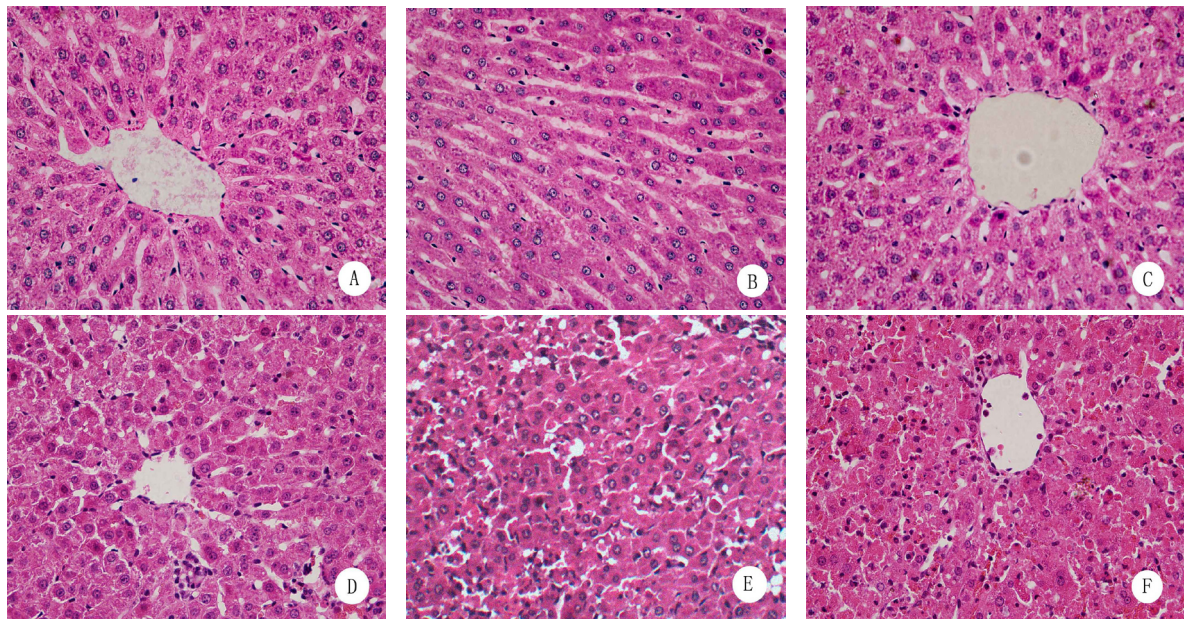


图1 实验大鼠肝脏病理变化(HE染色, 400 ×)

注: A: 对照组4小时; B: 对照组8小时; C: 对照组12小时; D: 模型组4小时; E: 模型组8小时; F: 模型组12小时

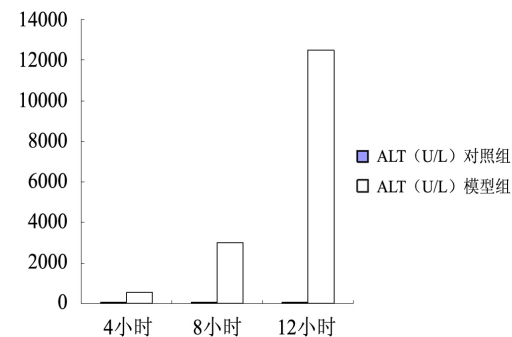


图2 实验大鼠血清ALT水平变化

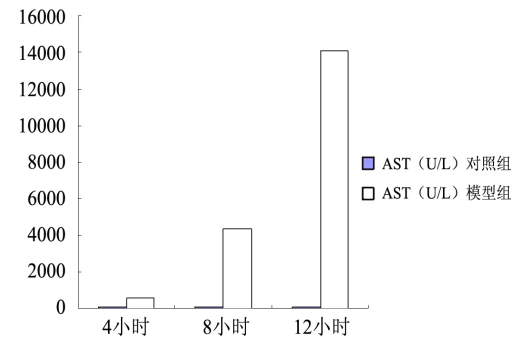


图3 实验大鼠血清AST水平变化

灰度比值较对照组明显升高, 4小时为 (0.80 ± 0.17), 8小时为 (1.08 ± 0.12), 12小时为 (1.33 ± 0.12), 与对照组比较, 差异均有显著统计学意义 ($t_{4\text{小时}} = -4.04$, $t_{8\text{小时}} = -9.59$, $t_{12\text{小时}} = -16.70$, $P_{4\text{小时}} = 0.001$, $P_{8\text{小时}}$ 、 $P_{12\text{小时}}$ 均 < 0.001), 见表2。

2.4 免疫组化法检测实验大鼠肝组织HMGB1蛋白表达 对照组核内及胞浆内均可见少量浅褐色颗粒,

表2 实验大鼠肝组织HMGB1 mRNA表达变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	HMGB1 mRNA		
	4小时	8小时	12小时
模型组	0.80 ± 0.17	1.08 ± 0.12	1.33 ± 0.12
对照组	0.51 ± 0.11	0.53 ± 0.11	0.47 ± 0.09
<i>P</i>	0.001	0.000	0.000

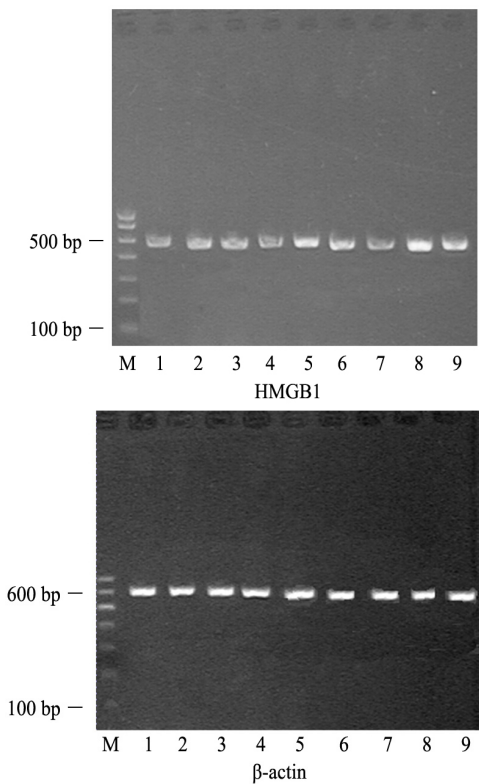


图4 实验大鼠肝组织HMGB1 mRNA表达变化

注: M: marker; 1: 对照组4小时; 2: 模型组4h; 4: 对照组8小时; 5: 模型组8小时; 7: 对照组12小时; 8: 模型组12小时

见图5A~C。模型组4小时可见分泌HMGB1的肝细胞呈点状分布,颗粒在胞浆内分布均匀密集,为浅褐色,少数肝细胞胞浆内颗粒为深褐色,见图5D。模型组8小时可见细胞内颗粒转为褐色, HMGB1在部分肝组织内融合成片,形成褐色片状,见图5E。模型组12小时可见HMGB1大量存在于胞外,呈片状分布,形成大片深褐色染区,随着细胞溶解,间质中亦可见到褐色HMGB1颗粒,见图5F。对照组各时间点肝HMGB1蛋白表达均较低[HMGB1蛋白显色指数:4小时为 (1.8 ± 1.3) ,8小时为 (2.0 ± 1.23) ,12小时为 (1.6 ± 0.55)],而模型组肝HMGB1蛋白表达均随时间逐渐升高[4小时为 (3.4 ± 1.95) ,8小时为 (4.4 ± 1.67) ,12小时为 (7.8 ± 3.42)];两组4小时HMGB1蛋白表达差异无统计学意义($t_{4\text{小时}} = -1.53$, $P_{4\text{小时}} = 0.17$),两组8、12小时差异均有统计学意义($t_{8\text{小时}} = -2.59$, $P_{8\text{小时}} = 0.032$; $t_{12\text{小时}} = -4.0$, $P_{12\text{小时}} = 0.015$),见表3。

表3 实验大鼠肝组织 HMGB1 蛋白表达变化 ($\bar{x} \pm s$, $n=8$)

组别	HMGB1 蛋白表达		
	4小时	8小时	12小时
模型组	3.40 ± 1.95	4.40 ± 1.67	7.80 ± 3.42
对照组	1.80 ± 1.30	2.00 ± 1.23	1.60 ± 0.55
<i>P</i>	0.170	0.032	0.015

3 讨论

肝组织在肝衰竭发生过程中依次经受了免疫损伤、缺血缺氧和内毒素血症三重致死性打击,其中免疫损伤在肝衰竭的发生中至关重要。

急性肝衰竭时大量坏死的肝细胞及免疫活化的单核、巨噬细胞释放大量的HMGB1至胞外,有研究^[5]认为其信号调节与NF- κ B有关,与RAGE、TLR2或TLR4结合可刺激TNF、IL-18、IL-1等炎症因子释放,炎症因子对免疫应答起正反馈作用,进一步放大炎症反应^[6]。肝组织局部炎症反应导致微循环障碍,造成缺血缺氧性损伤,在肝脏缺血时, HMGB1由胞核转移至胞质,与缺血所引起的即时促炎症反应相互作用^[7],而缺血再灌注时, HMGB1与TLR4依赖的自由氧化基和钙离子介导的信号通路相互影响^[8]。缺血缺氧性损伤时既能直接导致肝

细胞死亡,也能够促进内毒素血症的发生,肠道产生的内毒素主要是LPS,其通过Toll样受体诱导核因子NF- κ B活化,刺激大量炎症因子释放,促进继发性炎症反应。综上认为, HMGB1可能通过促进炎症反应因子的释放及级联激活,进一步放大炎症反应,加重病情,加快疾病进展。

2013年Majumdar等^[9]研究表明高水平的循环HMGB1是戊型肝炎所致急性肝衰竭患者的生物标记,其在疾病的暴发性过程中起重要作用。本实验采用D-GalN(400 mg/kg)+LPS(100 μ g/kg)诱导大鼠急性肝衰竭模型,给药后肝组织HE染色结果及血ALT/AST水平改变符合急性肝衰竭表现,成功诱导急性肝衰竭模型后不仅检测了急性肝衰竭大鼠血清中HMGB1水平,也检测了肝组织中HMGB1 mRNA水平及蛋白水平变化。本实验经ELISA法检测实验大鼠血清HMGB1水平,结果为对照组大鼠血清HMGB1水平在各时间点均较低(约40 ng/ml),而模型组血清HMGB1水平随时间逐渐升高,较对照组升高7倍;PT-PCR法检测实验大鼠肝组织HMGB1 mRNA表达水平发现对照组各时间点肝HMGB1 mRNA表达均较低,而模型组肝HMGB1 mRNA表达随时间逐渐升高,灰度比值较对照组明显升高,差异均有显著统计学意义(P 均 < 0.001);免疫组化检测实验大鼠HMGB1蛋白表达结果发现HMGB1少量表达于对照组细胞核与胞浆中,而模型组HMGB1蛋白表达明显高于对照组,且随着时间延长,模型组蛋白表达亦逐渐升高。同时, HE染色发现大鼠肝组织病理改变随着给药时间的延长而逐渐加重。由上可见,急性肝衰竭大鼠血清HMGB1水平及肝组织HMGB1 mRNA、蛋白的表达均随时间延长而升高,与急性肝衰竭大鼠肝损伤随时间延长病理改变加重的变化相一致,表明急性肝衰竭时血和肝组织中HMGB1水平变化与肝损程度呈正相关,是急性肝衰竭肝损程度的一个重要预测因子。

有研究^[10-12]表明,在急性肝衰竭晚期阶段,肝组织中的单核及巨噬细胞也能主动分泌HMGB1。然而,从目前研究结果中尚未知主动分泌和被动分

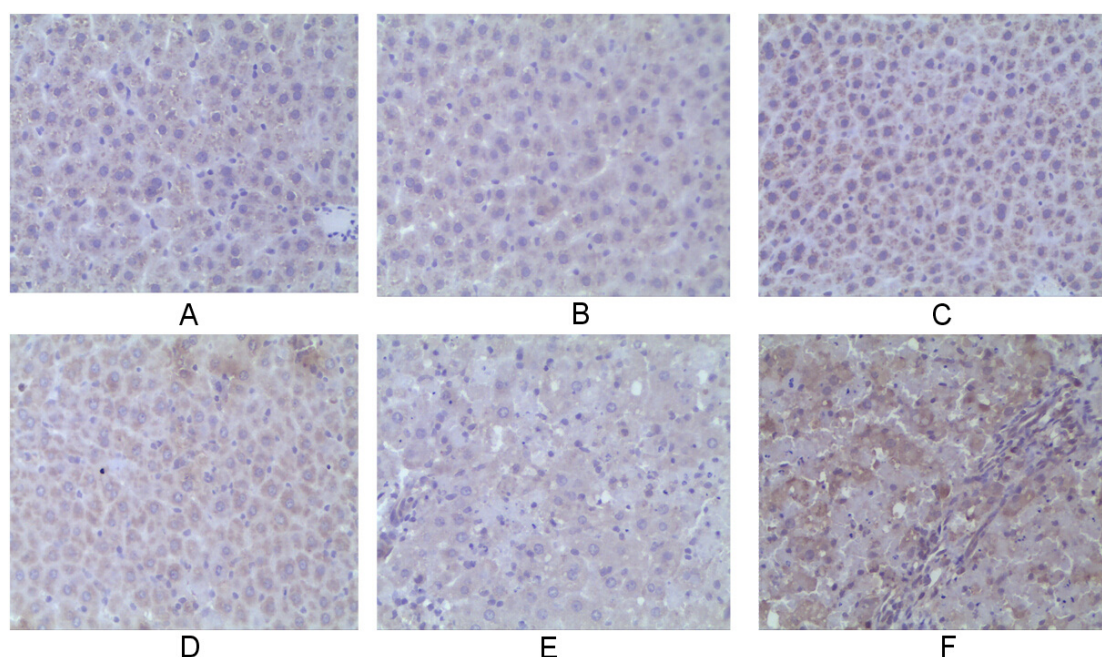


图5 免疫组化检测实验大鼠肝HMGB1蛋白表达(super vision两步法免疫组织化学染色, 400 ×)

注: A: 对照组4小时; B: 对照组8小时; C: 对照组12小时; D: 模型组4小时; E: 模型组8小时; F: 模型组12小时

泌是否均存在,或以何为主,而这些问题在急性和亚急性肝衰竭模型中均亟待解决,故不仅可以对急性肝衰竭的早期阶段做研究,对急性肝衰竭的晚期阶段也可进行研究。

本实验通过研究亚低温对D-GalN/LPS诱导的急性肝衰竭大鼠血清ALT、AST、HMGB1水平、肝组织HMGB1 mRNA表达和蛋白表达、肝组织病理改变的影响,表明HMGB1在急性肝衰竭肝损的病理生理过程中发挥重要作用,是急性肝衰竭肝损程度的一个重要预测因子,这为针对HMGB1治疗急性肝衰竭提供了实验依据,为治疗急性肝衰竭提供了另一种可能。

参考文献

- [1] Agresti A, Bianchi ME. HMGB proteins and gene expression[J]. *Curr Opin Genet Dev*,2003,3:170-178.
- [2] 王忠堂,姚咏明,盛志勇. HMGB1对小鼠腹腔巨噬细胞吞噬和I-A/E表达的影响[J]. *细胞与分子免疫学杂志*,2008,24:771-773.
- [3] 丁美,刘旭华,段钟平,等. D-氨基半乳糖/脂多糖诱导急性肝衰竭大鼠肝细胞凋亡的电镜观察[J]. *实用肝脏病杂志*,2008,11:357-360.
- [4] Friedman SL. Mechanisms of hepatic fibrogenesis[J]. *Gastroenterology*, 2008,134:1655-1669.
- [5] Fiuza C, Bustin M, Talwar S, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells[J]. *Blood*,2003,

101:2652-2660.

- [6] Voll RE, Urbanaviciute V, Herrmann M, et al. High mobility group box 1 in the pathogenesis of inflammatory and autoimmune diseases[J]. *Isr Med Assoc J*,2008,10:26-28.
- [7] Liu A, Dirsch O, Fang H, et al. HMGB1 in ischemic and non-ischemic liver after selective warm ischemia/reperfusion in rat[J]. *Histochem Cell Biol*,2011,135:443-452.
- [8] Tsung A, Klune JR, Zhang X, et al. HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling[J]. *J Exp Med*, 2007,204:2913-2923.
- [9] Majumdar M, Ratho R, Chawla Y, et al. High levels of circulating HMGB1 as a biomarker of acute liver failure in patients with viral hepatitis E[J]. *Liver Int*,2013,33:1341-1348.
- [10] Müller S, Scaffidi P, Degryse B, et al. New EMBO members review: the double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal[J]. *EMBO J*,2001,20:4337-4340.
- [11] Jiang W, Bell CW, Pisetsky DS. The relationship between apoptosis and high-mobility group protein 1 release from murine macrophages stimulated with lipopolysaccharide or polyinosinic-polycytidylic acid[J]. *J Immunol*,2007,178:6495-6503.
- [12] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation[J]. *Nature*,2002,418: 191-195.

收稿日期: 2014-06-02