

DOI: 10.3969/j.issn.1671-9638.2015.12.001

• 论 著 •

HMGB1 抗体对刀豆蛋白 A 引起小鼠肝损伤的保护作用

黄泽炳, 黄 燕, 周蓉蓉, 陈若蝉, 易盼盼, 李 宁, 范学工

(中南大学湘雅医院, 湖南 长沙 410008)

[摘要] **目的** 研究高迁移率族蛋白 1(HMGB1) 抗体对刀豆蛋白 A(ConA) 引起小鼠肝损伤的保护作用。**方法** 将健康无污染雄性 Balb/c 小鼠分成空白对照组(注射生理盐水)、模型组(注射 ConA)和实验组(注射 ConA + HMGB1 抗体), 3 组小鼠注射药物 6 h 后摘眼球取血, 所获血液离心后取血清检测谷丙转氨酶(ALT)和 HMGB1, 留取肝脏组织进行 HE 染色、Tunel、免疫荧光等检测。**结果** 实验组小鼠肝组织病理炎症反应轻于模型组。小鼠血清中 ALT、HMGB1: 空白对照组分别为 (52.00 ± 8.34) U/L、 (7.54 ± 0.53) ng/mL, 模型组分别为 $(5\ 551.50 \pm 1\ 445.74)$ U/L、 (18.06 ± 1.65) ng/mL, 实验组分别为 $(1\ 977.40 \pm 654.89)$ U/L、 (10.77 ± 0.71) ng/mL; 肝组织中 HMGB1 mRNA、HMGB1 表达量(相对值): 空白对照组分别为 1.886 ± 0.253 、 0.086 ± 0.028 , 模型组分别为 4.718 ± 0.341 、 0.268 ± 0.043 , 实验组分别为 3.005 ± 0.331 、 0.116 ± 0.008 ; 实验组小鼠血清中 ALT、HMGB1, 以及肝组织中 HMGB1 mRNA、HMGB1 表达量均低于模型组(均 $P < 0.001$)。肝组织细胞凋亡、肝细胞内 HMGB1 迁移(标准化): 空白对照组均为 1 ± 0 , 模型组分别为 4.67 ± 0.33 、 4.50 ± 0.22 , 实验组分别为 2.67 ± 0.21 、 2.33 ± 0.21 ; 实验组小鼠肝组织细胞凋亡、肝细胞内 HMGB1 迁移均低于模型组(均 $P < 0.001$)。**结论** HMGB1 抗体能改善肝组织的病理损伤, 可以保护 ConA 引起的小鼠肝损伤。

[关键词] HMGB1 抗体; 高迁移率族蛋白 1; 刀豆蛋白 A; 肝损伤; 保护作用; 肝损伤模型; 急性肝损伤; 模型小鼠

[中图分类号] R575 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9638(2015)12-0793-05

Protective role of high mobility group box-1 protein antibody in ConA-induced liver injury in mice

HUANG Ze-bing, HUANG Yan, ZHOU Rong-rong, CHEN Ruo-chan, YI Pan-pan, LI Ning, FAN Xue-gong (Xiangya Hospital, Central South University, Changsha 410008, China)

[Abstract] **Objective** To detect the protective role of high mobility group box-1 protein (HMGB1) antibody in concanavalin A(ConA)-induced liver injury in mice. **Methods** The healthy male Balb/c mice were grouped into control group (saline injection), model group(ConA injection) and experimental group(ConA + HMGB1 antibody injection). After 6 hours of injection, mice blood was collected for detecting alanine transaminase (ALT) and HMGB1, liver tissue was used to do HE stain, Tunel, and immunofluorescence detection. **Results** Pathological inflammation in experimental group was slighter than model group. The levels of ALT and HMGB1 in mice serum were (52.00 ± 8.34) U/L and (7.54 ± 0.53) ng/mL in control group, $(5\ 551.50 \pm 1\ 445.74)$ U/L and (18.06 ± 1.65) ng/mL in model group, $(1\ 977.40 \pm 654.89)$ U/L and (10.77 ± 0.71) ng/mL in experimental group, respectively; the expression levels of HMGB1 mRNA and HMGB1 (relative value) in liver tissue were 1.886 ± 0.253 and 0.086 ± 0.028 in control group, 4.718 ± 0.341 and 0.268 ± 0.043 in model group, 3.005 ± 0.331 and 0.116 ± 0.008 in experimental group, respectively; the expression levels of ALT and HMGB1 in serum, as well as HMGB1 mRNA and HMGB1 in liver tissue of experimental group were all lower than model group(all $P < 0.001$). Apoptosis and HMGB1 migra-

[收稿日期] 2015-10-05

[基金项目] 国家国际科技合作专项(2015DFA31490); 国家自然科学基金(81272253、30972621); 湖南省科技厅国际科技合作重点项目(2012WK2001); 湖南省科技厅计划项目(2014SK4066); 湖南省自然科学基金项目(11JJ6072); 湖南省科技厅课题(2012TT2009)

[作者简介] 黄泽炳(1982-), 男(汉族), 湖南省郴州市人, 医师, 主要从事感染与免疫研究。

[通信作者] 范学工 E-mail: xgfan@hotmail.com; 李 宁 E-mail: nxli1970@126.com

tion in the liver cell (normalized) were 1 ± 0 and 1 ± 0 in control group, 4.67 ± 0.33 and 4.50 ± 0.22 in model group, 2.67 ± 0.21 and 2.33 ± 0.21 in experimental group, respectively; apoptosis and HMGB1 migration in liver tissue of experimental group were both lower than model group (both $P < 0.001$). **Conclusion** HMGB1 antibody can improve the pathological injury of liver tissue, and protect mice liver against the injury induced by ConA.

[Key words] HMGB1 antibody; high mobility group box-1; concanavalin A; liver injury; protective role; liver injury model; acute liver injury; mouse model

[Chin Infect Control, 2015, 14(12): 793 - 797]

肝损伤是一种临床常见情况,其临床表现复杂,并发症多,甚至病情危急,不及时处理会发展为肝衰竭而死亡。乙型肝炎病毒(HBV)感染是我国急性肝损伤最常见的病因,一般认为肝损伤是由 HBV 感染引起的宿主免疫反应所导致^[1]。在 HBV 感染导致的肝损伤过程中,乙型肝炎表面抗原(HBsAg)特异性 CD8⁺ 细胞毒性 T 淋巴细胞(CTLs)在肝损伤过程中起关键作用^[2],其他非特异性免疫细胞如巨噬细胞、NK 细胞等也发挥了重要作用^[3]。此外,由活化的免疫细胞所分泌的细胞因子如 IFN- γ 、TNF- α 等也参与了肝细胞损伤作用^[4-5]。目前仍缺乏有效的治疗肝损伤的医疗手段。高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 是一类在真核细胞中含量丰富的非组蛋白核蛋白^[6]。近年研究^[7]表明,细胞核内 HMGB1 转移至胞外后,演变成一种炎症介质。HMGB1 既可以作为炎症细胞因子参与信号转导,又能与多种促炎介质相互诱导表达,还能引起炎症信号分子 NF- κ B 核移位,形成一个复杂的细胞因子分泌调节网络,启动、维持和放大炎症反应^[8-9]。因此, HMGB1 在致炎细胞因子网络中可能是一个关键中心环节^[10]。纽约大学 Wang 等^[11-12]认为, HMGB1 抗体可以用来治疗败血症。本课题在前期工作的基础上使用刀豆蛋白 A (ConA) 建立小鼠肝损伤模型,观察 HMGB1 抗体对小鼠肝损伤的保护作用。

1 材料与方法

1.1 动物 雄性 Balb/c 小鼠(SPE 级),6 周龄,体重约 20 g,由中南大学动物学部提供。动物实验得到中南大学动物学部实验动物管理与使用认证协会(IA CU C)批准。

1.2 试剂 ConA、Elisa 试剂盒等购自于 Sigma 公司。HMGB1 抗体由美国纽约大学王海潮(Haichao Wang)提供^[11-12]。

1.3 动物模型 将健康无污染雄性 Balb/c 小鼠分

成 3 组:空白对照组、模型组和实验组。模型组、实验组小鼠尾静脉注射 ConA 20 mg/kg (ConA 溶于无热源的生理盐水,浓度为 2 mg/mL),空白对照组的小鼠尾静脉注射生理盐水(200 μ L/20 g。1 h 后,空白对照组、模型组小鼠腹腔注射生理盐水 200 μ L/20 g,实验组小鼠腹腔注射 anti-HMGB1 100 μ g/20 g (anti-HMGB1 溶于生理盐水,浓度为 0.5 mg/mL)。6 h 后摘小鼠眼球取血,颈椎脱臼处死后取肝脏。血液离心后获的血清及所取肝组织保存备用。

1.4 方法

1.4.1 HE 染色 采用 HE 染色检测小鼠肝组织病理变化。石蜡切片 5 μ m 脱蜡后苏木素染色 3 min,自来水冲洗后 0.5% 盐酸乙醇分化 30 s,自来水冲洗后伊红染色 1 min,切片水洗后快速通过梯度乙醇脱水,晾干后封片备用。

1.4.2 Tunel 使用 Tunel 方法观察肝组织的细胞凋亡。石蜡切片在二甲苯中脱蜡 2 次,每次 5~10 min。乙醇水合(100%、95%、90%、80%、75%) 每组 2 min; PBS 漂洗 2 次,滴加 20 μ g/mL 不含 DNase 的蛋白酶 K, 20~37 $^{\circ}$ C 作用 20 min, PBS 洗涤 3 次。室温在封闭液(3% 双氧水溶于甲醇)中封闭 10 min, PBS 漂洗 3 次,根据试剂盒制备 Tunel 反应混合液,每个样本加反应液 50 μ L, 加盖玻片 37 $^{\circ}$ C 恒温避光湿润反应 60 min, 荧光显微镜下检测观察(其中阴性对照组中反应液不加 TdT 酶)。

1.4.3 免疫荧光 采用免疫荧光法检测肝细胞内 HMGB1 的迁移。取石蜡切片,二甲苯中脱蜡 2 次,每次 5~10 min。乙醇水合(100%、95%、90%、80%、75%) 每组 2 min; PBS 冲洗 3 次,1% 的 Triton 破膜 20 min,羊血清封闭 30 min,加第一抗体(1:200)后孵育 12 h,阴性对照用荧光二抗代替第一抗体;第二抗体室温(避光)孵育 2 h,甘油封片,荧光显微镜下观察,照相,图像软件分析平均灰度值。

1.4.4 血清谷丙转氨酶(ALT)和 HMGB1 检测 使

用速率法检测 ALT,ELISA 检测血清中 HMGB1。

1.4.5 Western blot 应用 Western blot 检测肝组织 HMGB1 表达量。提取组织总蛋白,10%SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳后,转移至 PVDF 膜。5%脱脂牛奶封闭 2 h,加 1:500 一抗(HMGB1)4℃孵育过夜,1:2 000 二抗室温孵育 2 h,TBST 洗净 3 次后加 ECL 发光液,观察结果。

1.4.6 实时定量荧光 PCR(real time PCR)检测 按照说明书步骤,采用 TRIZOL(Invitrogen 公司)法提取 RNA,取 1 μg 总 RNA 进行逆转录成 cDNA;HMGB1 上下游引物分别为 5'-CTGCCTA-CAGAGCTAAAGGA-3',5'-CTGCGCTAGAAC-CAACTTAT-3';β-actin 引物分别为 5'-GGCATC-CATGAACTACATT-3',5'-GATCTTCATG-GTGCTAGGAG-3'。反应体系:反转录产物 1 μL,

上下游引物各 2 μL,2×SYBR Green PCR Master mix 12.5 μL,ddH₂O 补充至 25 μL。PCR 反应条件 95℃ 30 s,95℃ 5 s,60℃ 34 s,95℃ 15 s,60℃ 1 min,40 个循环结束。

1.5 统计分析 应用 SPSS 10.0 统计软件进行方差分析,数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠肝组织病理变化 HE 染色结果显示:空白对照组小鼠病理切片未见肝细胞坏死与炎症细胞浸润;模型组小鼠见肝细胞变性、坏死,炎症细胞浸润;实验组未见明显的肝细胞坏死,但汇管区见炎症细胞浸润。见图 1。

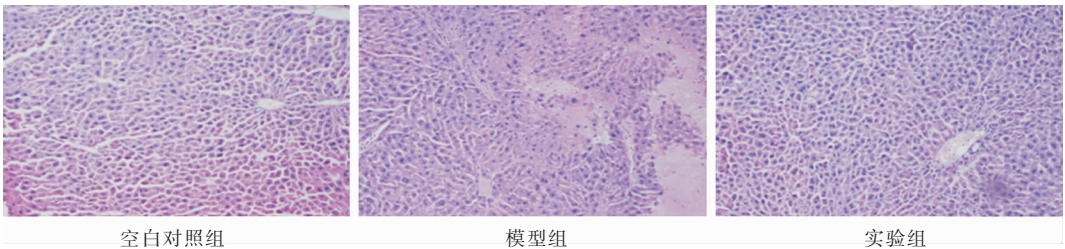


图 1 小鼠肝组织病理变化(HE 染色, n = 6)

Figure 1 Pathological change in mice liver tissue (HE stain, n = 6)

2.2 小鼠肝组织细胞凋亡情况 标准化细胞凋亡程度:空白对照组为 1 ± 0 ,模型组为 4.67 ± 0.33 ,实验组为 2.67 ± 0.21 ,各组比较,差异有统计学意义 ($F = 65, P < 0.001$);各组两两比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),实验组肝组织细胞凋亡程度轻于模型组。

2.3 肝细胞内 HMGB1 迁移情况 胞核转移至胞浆的 HMGB1(标准化迁移程度):空白对照组为 1 ± 0 ,模型组为 4.50 ± 0.22 ,实验组为 2.33 ± 0.21 。各组比较,差异有统计学意义 ($F = 99.12, P < 0.001$);两两比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),实验组 HMGB1 迁移量较模型组少。见图 2。

2.4 小鼠血清中 ALT 和 HMGB1 表达量 空白对照组小鼠血清中 ALT 为 $(52.00 \pm 8.34) \text{U/L}$,模型组为 $(5551.50 \pm 1445.74) \text{U/L}$,实验组为 $(1977.40 \pm 654.89) \text{U/L}$ 。各组比较,差异有统计学意义 ($F = 9.27, P = 0.002$);两两比较,差异均有

统计学意义(均 $P < 0.05$),实验组小鼠血清中 ALT 低于模型组。见图 3。小鼠血清中 HMGB1:空白对照组为 $(7.54 \pm 0.53) \text{ng/mL}$,模型组为 $(18.06 \pm 1.65) \text{ng/mL}$,实验组为 $(10.77 \pm 0.71) \text{ng/mL}$,各组比较,差异有统计学意义 ($F = 24.76, P < 0.001$);两两比较,差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$),实验组小鼠血清中 HMGB1 低于模型组。

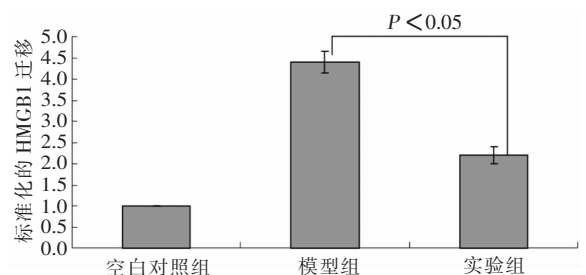


图 2 肝细胞中 HMGB1 迁移情况(n = 6)

Figure 2 Migration of HMGB1 in liver cells(n = 6)

2.5 小鼠肝组织 HMGB1 mRNA 和 HMGB1 表达量 肝组织 HMGB1 mRNA 相对表达量:空白对照组为 1.886 ± 0.253 ,模型组为 4.718 ± 0.341 ,实验组为 3.005 ± 0.331 ;各组比较,差异有统计学意义 ($F = 21.03, P < 0.001$);两两比较,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$),实验组小鼠肝组织 HMGB1 mRNA 低于模型组。见图 4。小鼠肝组织中 HMGB1 表达量(单位:相对灰度值):空白对照组为 0.086 ± 0.028 ,模型组为 0.268 ± 0.043 ,实验组为 0.116 ± 0.080 ,各组比较差异有统计学意义 ($F = 10.45, P = 0.001$);两两比较,差异均有统计学意义 (均 $P < 0.05$),实验组小鼠肝组织中 HMGB1 表达量低于模型组。见图 5。

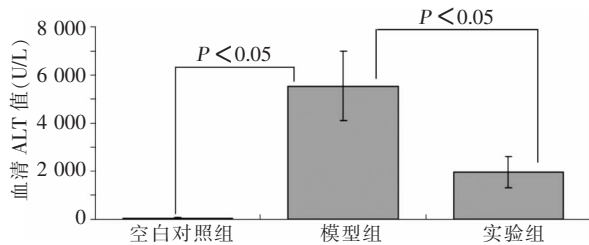


图 3 血清 ALT 的变化 ($n = 6$)

Figure 3 Change in serum ALT level ($n = 6$)

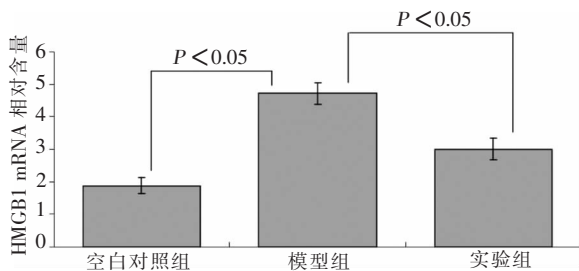


图 4 小鼠肝组织 HMGB1 mRNA 表达 ($n = 6$)

Figure 4 Expression of HMGB1 mRNA in mice liver tissue ($n = 6$)

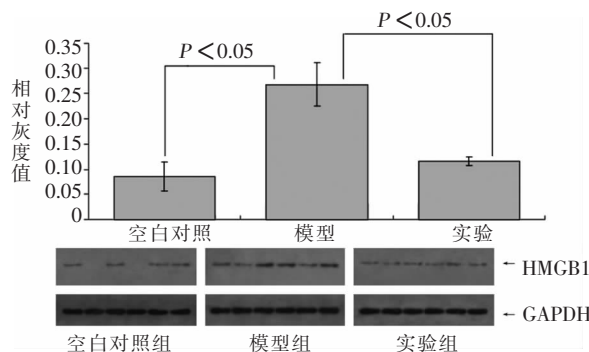


图 5 肝组织中 HMGB1 的表达 ($n = 6$)

Figure 5 Expression of HMGB1 in mice liver tissue ($n = 6$)

3 讨论

我国病毒性肝炎尤其是乙型肝炎所致的肝损伤患者数量居全球首位,由于缺乏有效的特异性治疗手段,肝损伤常发展为病死率极高的肝衰竭。肝损伤或肝衰竭的主要机制是宿主炎症反应,由于肝炎病毒感染宿主的特异性,当前缺乏理想的乙肝病毒所引起的肝损伤动物模型。学界认为,ConA 诱导小鼠肝损伤的免疫发病机制被认为与乙型肝炎病毒所致肝损伤相类似,是可替代后者的理想动物模型^[2,13-14]。通过尾静脉注射 ConA 至鼠体内后,可刺激 T 细胞产生 IL-6、IFN- γ 、TNF- α ^[13]。研究^[4-5]认为,IFN- γ 能激活包括 NK 细胞在内的免疫细胞定植或聚集在肝脏,引起炎症和损害,而 TNF- α 具有肝细胞毒性作用。

HMGB1 是一种炎症因子,能够介导其他炎症因子引起炎症瀑布。研究证实,HMGB1 在炎症的发生、发展过程中起重要作用^[7];HMGB1 在炎症发生后的数小时开始大量分泌^[15],因此我们认为较早中和 HMGB1 可能很大程度上减弱炎症反应。本组实验结果表明,HMGB1 抗体处理后的小鼠肝组织中 HMGB1 相对含量、mRNA 相对量,以及血清中 HMGB1 含量、ALT 值均低于模型组(ConA 处理)。HMGB1 抗体处理后小鼠肝组织 HE 染色见炎症细胞浸润,但未见坏死,肝细胞凋亡轻微。而未加 HMGB1 抗体处理的小鼠肝组织 HE 染色显示,肝组织大片坏死、炎症细胞浸润,且细胞凋亡明显。说明特异性 HMGB1 抗体能够通过中和降低肝组织中及体内 HMGB1,保护肝脏避免受到损伤。实验组小鼠注射 ConA 1 h 后即注射 HMGB1 抗体,目的是为较早中和炎症状态下释放出的 HMGB1,尽可能减少 HMGB1 引起的炎症损伤,以及炎症瀑布,结果显示,注射 HMGB1 抗体 6 h 后能有效阻止肝损伤。

肝损伤危害较大,尽早控制肝损伤对于患者的预后有很大帮助。本实验在其他研究者的研究基础之上,证实使用 HMGB1 抗体早期干预可以有效减轻肝脏的损害程度,说明 HMGB1 能成为有效防治肝损伤的重要靶点,为进一步研究防治肝损伤提供重要的实验依据。

[参考文献]

- [J]. *Annu Rev Immunol*, 1995,13: 29 - 60.
- [2] Nakamoto Y, Kaneko S. Mechanisms of viral hepatitis induced liver injury [J]. *Curr Mol Med*, 2003,3(6): 537 - 544.
- [3] Zheng Q, Zhu YY, Chen J, et al. Activated natural killer cells accelerate liver damage in patients with chronic hepatitis B virus infection[J]. *Clin Exp Immunol*, 2015,180(3): 499 - 508.
- [4] Horras CJ, Lamb CL, and Mitchell KA. Regulation of hepatocyte fate by interferon- γ [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2011,22(1): 35 - 43.
- [5] Leist M, Gantner F, Bohlinger I, et al. Murine hepatocyte apoptosis induced in vitro and in vivo by TNF-alpha requires transcriptional arrest[J]. *J Immunol*, 1994,153(4): 1778 - 1788.
- [6] Thomas JO, Travers AA. HMG1 and 2, and related 'architectural' DNA-binding proteins[J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(3): 167 - 174.
- [7] 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.
- [8] Fiuza C, Bustin M, Talwar S, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells [J]. *Blood*, 2003,101(7): 2652 - 2660.
- [9] Park JS, Svetkauskaite D, He Q, et al. Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein[J]. *J Biol Chem*, 2004,279(9): 7370 - 7377.
- [10] Erlandsson Harris H, Andersson U. Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator[J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(6): 1503 - 1512.
- [11] Wang H, Zhu S, Zhou R, et al. Therapeutic potential of HMGB1-targeting agents in sepsis[J]. *Expert Rev Mol Med*, 2008,10: e32.
- [12] Wang H, Ward MF, Sama AE. Targeting HMGB1 in the treatment of sepsis[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2014,18(3): 257 - 268.
- [13] Cao Q, Batey R, Pang G, et al. IL-6, IFN-gamma and TNF-alpha production by liver-associated T cells and acute liver injury in rats administered concanavalin A[J]. *Immunol Cell Biol*, 1998,76(6): 542 - 549.
- [14] Li N, Liu YH, Li SL, et al. Protective role of synthetic oligodeoxynucleotides expressing immunosuppressive TTAGGG motifs in concanavalin A-induced hepatitis[J]. *Immunol Lett*, 2013,151(1 - 2): 54 - 60.
- [15] 刘洪波, 范学工, 刘悦晖, 等. 肝损伤模型小鼠高迁移率族蛋白-1 的表达[J]. *生命科学研究*, 2008,12(2): 168 - 173.

(本文编辑:左双燕)