

文章编号:1005-6947(2007)05-0418-04

· 胰腺炎专题研究 ·

急性坏死性胰腺炎大鼠胰腺高迁移率族蛋白-1的表达及意义

朱峰, 龙锦, 何忠野, 葛春林, 郭仁宣, 郭克建

(中国医科大学附属第一医院 普通外科, 辽宁 沈阳 110001)

摘要:目的 探讨急性坏死性胰腺炎(ANP)大鼠模型胰腺组织高迁移率族蛋白-1(HMGB1)的表达及其意义。方法 72只大鼠随机分成3组,即对照组、ANP组和正丁酸钠治疗组(治疗组)。逆行性胰胆管注射5%牛磺胆酸钠建立ANP模型。ELISA法检测血清TNF- α 和IL-1 β 水平;RT-PCR法检测胰腺组织HMGB1 mRNA的表达,并观察其病理变化。结果 ANP组血清TNF- α 和IL-1 β 水平在ANP建模后6h达高峰,12h下降。ANP组大鼠胰腺组织HMGB1 mRNA表达水平在ANP后12h明显升高,至24h仍维持在较高水平。治疗组胰腺组织HMGB1 mRNA表达水平在ANP后12、24h明显低于ANP组($P < 0.05$),且同期胰腺损伤比ANP组轻($P < 0.05$)。建模后24h血清TNF- α 和IL-1 β 水平ANP组与治疗组间差异无显著性。结论 HMGB1作为晚期炎症因子参与了ANP的全身炎症反应。HMGB1抑制剂正丁酸钠能降低ANP大鼠胰腺组织HMGB1基因表达水平,减轻ANP胰腺组织的损伤。

[中国普通外科杂志, 2007, 16(5):418-421]

关键词: 胰腺炎, 急性坏死性/病理学; 高迁移率族蛋白-1; 模型, 动物

中图分类号: R 657.51

文献标识码: A

The role of the expression of high mobility group box 1 in the pancreas of acute necrotizing pancreatitis in rats

ZHU Feng, LONG Jin, HE Zhong-ye, GE Chun-lin, GUO Ren-xuan, GUO Ke-jian

(Department of General Surgery, the First Affiliated Hospital, China Medical University, Shenyang 110001, China)

Abstract: Objective To study the significance of change of high mobility group box 1 (HMGB1) level of pancreas in acute necrotizing pancreatitis (ANP) in rats. **Methods** ANP model was induced by retrograde injection of sodium taurocholate in pancreatic duct. Animals were divided randomly into three groups: control group, ANP group, and sodium butyrate treatment group (treatment group). The serum levels of TNF- α and IL-1 β were measured by ELISA. The HMGB1 mRNA level of pancreas was detected by RT-PCR. **Results** The serum levels of TNF- α and IL-1 β were quickly increased after the model was induced, and reached a peak at 6h, but decreased at 12h. The HMGB1 mRNA level of pancreas was increased significantly at 12h, and maintained to 24h. Whereas in treatment group, the HMGB1 level of pancreas was lower than ANP group ($P < 0.05$) and injury of pancreas was milder than that of ANP group ($P < 0.05$). **Conclusions** HMGB1 seems to act as a late mediator in ANP. Sodium butyrate treatment could decrease HMGB1 levels of ANP rats. [Chinese Journal of General Surgery, 2007, 16(5):418-421]

Key words: Pancreatitis, Acute Necrotizing/pathol; High Mobility Group Box 1 (HMGB1); Models, Animal

CLC number: R657.51

Document code: A

收稿日期:2007-03-05; 修订日期:2007-05-12。

作者简介:朱峰,男,辽宁锦州人,中国医科大学附属第一医院博士生,主要从事急性胰腺炎诊治方面的研究。

通讯作者:郭仁宣 E-mail:zhuzhufeng-7@163.com

高迁移率族蛋白-1 (high mobility group box1, HMGB1) 是一类广泛存在于真核细胞内的非组核蛋白。近年的研究结果^[1]表明, HMGB1 可能由巨噬细胞分泌, 作为重要的晚期炎症介质参与了脓毒症的病理生理过程。笔者通过急性坏死性胰腺炎 (acute necrotizing pancreatitis, ANP) 大鼠模型, 探讨 HMGB1 在 ANP 大鼠发病机制中所起的作用及其意义, 旨在为 ANP 的治疗提供新思路。

1 材料与方法

1.1 动物模型与分组

雄性 Wistar 大鼠 72 只, 体重 200 ~ 250 g, 随机分成 3 组, 每组各 24 只, 即对照组, ANP 组, 正丁酸钠治疗组 (治疗组)。实验前大鼠禁食 24 h, 自由饮水。2.5% 戊巴比妥钠 [35 mg/kg (体重)] 腹腔注射麻醉。腹正中切口, 进入腹腔, 找到胆总管及胰管, 胰管逆行穿刺插管; 为防止逆行进入肝脏及十二指肠, 近肝门及十二指肠乳头处暂时夹闭胆总管两端, 以 1 mL/kg 剂量经胰管内缓慢匀速注入 5% 牛磺胆酸钠溶液 (Sigma 公司)。对照组胰管内缓慢匀速注入等量生理盐水。治疗组于模型制备后 0.5 h 和 4 h, 两次分别经尾静脉缓慢匀速正丁酸钠, 每次剂量 500 mg/kg。对照组和 ANP 组模型制备后 0.5 h, 4 h 尾静脉注射等量生理盐水。

各组按模型制备后 6, 12, 24 h 分成 3 个亚组, 每组 8 只。于上述时点分别再次开腹自下腔静脉采血, 切取胰腺, 待测。

1.2 主要检测指标及方法

1.2.1 血清肿瘤坏死因子 α (TNF- α), 白细胞介素 1 β (IL-1 β) 血样在室温下静置 2 h, 待析出血清后, 将血清分装冻存于 -80 $^{\circ}$ C 待检测。采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测各时点血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平 (ELISA 检测试剂盒购自

Endogen 公司)。具体操作步骤按说明书进行。

1.2.2 胰腺组织 HMGB1 mRNA 的表达 采用逆转录聚合酶链反应技术 (RT-PCR) 检测胰腺组织中 HMGB1 mRNA 的表达 (总 RNA 提取及逆转录试剂盒均为 Promega 公司产品), 以三磷酸甘油醛脱氢酶 (GAPDH) 作为内对照。大鼠 HMGB1 序列 (扩增片段为 680 bp): 5' - ATGGGCAAAGGAGATCCTA-3' (上游); 5' - AATTCATCATCATCATCTTCT-3' (下游)。GAPDH 序列 (扩增片段为 309 bp): 5' - TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3' (上游); 5' - AGATCCACAACGGATACATT-3' (下游)。PCR 反应条件: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 45 s, 61 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min; 扩增 35 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 终止反应。取 10 μ L 扩增产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳 (120 V, 40 min), 溴化乙锭染色后, 于凝胶成像分析系统 (GDS-8000) 中进行条带密度扫描分析。以 HMGB1 与 GAPDH 条带密度比值表示 HMGB1 mRNA 的表达水平。

1.2.3 胰腺组织学评分 胰腺组织用 10% 中性福尔马林液固定, 石蜡包埋, 切片, HE 染色观察。光镜下专人阅片, 并进行组织学评分。胰腺组织病理学评分采用的 Schimidt 评分方法^[2]。

1.3 统计学处理

数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 SPSS10.0 软件行 t 检验及单因素方差分析, SNK- q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平的变化

ANP 组大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平在 ANP 建模后迅速升高, 约在 6 h 达高峰, 之后迅速下降, 12 h 即大幅下降, 然后一直维持至 24 h。治疗组大鼠血清 TNF- α 和 IL-1 β 水平均低于 ANP 组, 且在 6 h 和 12 h 差异显著 ($P < 0.05$) (表 1)。

表 1 各组建模后各时点血清 TNF- α 及 IL-1 β 检测值 (ng/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	血清 TNF- α 检测值			血清 IL-1 β 检测值		
		6h	12h	24h	6h	12h	24h
对照	8	20.1 \pm 5.4	21.9 \pm 4.9	20.4 \pm 6.2	19.5 \pm 2.1	20.5 \pm 3.6	18.7 \pm 2.5
ANP	8	159.9 \pm 18.7 ¹⁾	72.8 \pm 9.5 ¹⁾	37.8 \pm 8.1 ¹⁾	121.8 \pm 7.2 ¹⁾	56.6 \pm 8.3 ¹⁾	43.9 \pm 5.6 ¹⁾
治疗	8	97.5 \pm 9.2 ^{1),2)}	45.0 \pm 5.7 ^{1),2)}	35.4 \pm 6.9 ¹⁾	78.6 \pm 8.8 ^{1),2)}	35.6 \pm 8.0 ^{1),2)}	33.4 \pm 5.2 ¹⁾

注: 1) 与对照组比较 $P < 0.05$; 2) 与 ANP 组比较 $P < 0.05$

2.2 胰腺组织中 HMGB1 mRNA 表达水平的变化

ANP 组大鼠胰腺组织 HMGB1 mRNA 水平在 ANP 后 12h 明显升高,至 24h 仍维持在较高水平。治疗组胰腺组织 HMGB1 mRNA 水平 12h 和 24h 明显低于 ANP 组 ($P < 0.05$) (表 2) (图 1)。

表 2 各组建模后各时点胰腺组织 HMGB1 mRNA 的变化 (积分光密度比值, $\bar{x} \pm s$)

组别	n	各組动物胰腺组织 HMGB1 mRNA 变化		
		6h	12h	24h
对照	8	0.60 ± 0.11	0.62 ± 0.13	0.70 ± 0.14
ANP	8	0.78 ± 0.15	2.12 ± 0.16 ¹⁾	1.45 ± 0.22 ¹⁾
治疗	8	0.71 ± 0.20	1.31 ± 0.21 ^{1),2)}	1.13 ± 0.15 ^{1),2)}

注: 1) 与对照组比较 $P < 0.05$; 2) 与 ANP 组比较 $P < 0.05$

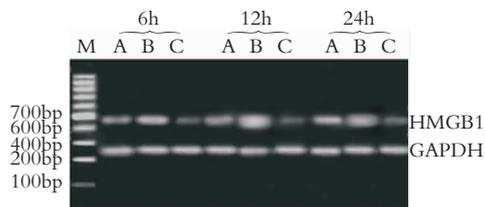


图 1 3 组动物胰腺组织中 HMGB1 mRNA 的表达

A: 治疗组; B: ANP 组; C: 对照组

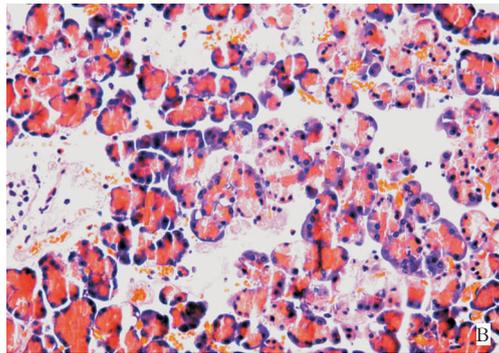
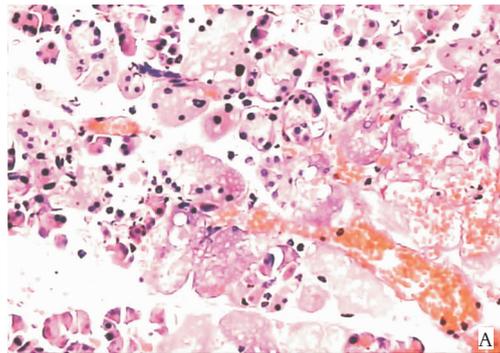


图 2 24h 时胰腺组织的病理变化 ($\times 200$) A: ANP 组; B: 治疗组

表 3 各组建模后各时点胰腺病理评分比较

组别	胰腺病理评分		
	6h	12h	24h
ANP	5.8 ± 0.4	9.7 ± 0.8	11.8 ± 1.2
治疗	3.5 ± 0.8	5.5 ± 0.5	7.0 ± 0.9
P 值	<0.05	<0.05	<0.01

3 讨论

近年来已经认识到 ANP 早期大量炎症因子过度释放导致严重的全身炎症反应综合征 (SIRS), 是造成全身毛细血管渗漏综合征、多器官功能不全综合征 (MODS)、多器官衰竭 (MOF)

2.3 正丁酸钠治疗对 ANP 大鼠胰腺组织损伤的影响

对照组各时点腹腔内未见异常,胰腺轻度水肿;光镜下,除局限间质水肿外,胰腺结构完全正常。ANP 各组可见腹腔内有不等量的血性腹水,胰腺体积增大,呈紫红至紫黑色,胰周组织也出现不同程度的水肿,可见散在或成片的皂化斑。ANP 各亚组镜下改变随着时间的延长而逐渐加重。光镜下,可见胰腺腺泡的病理改变表现为细胞周界消失、细胞核崩解成碎片状,同时有明显的出血、水肿及片状坏死,大量炎症细胞浸润。治疗组可见胰腺体积增大,呈紫红色,胰周组织也出现轻度水肿,各亚组腹腔内腹水和皂化斑明显减少。光镜下,胰腺出血不明显,腺泡细胞变性和腺小叶结构破坏程度较轻,炎症细胞浸润减少。ANP 建模后 24h 时治疗组动物胰腺组织损伤较 ANP 组明显减轻 (图 2) (表 3)。

的重要原因^[3-4]。但本实验结果显示,早期释放的炎症因子如 TNF- α 和 IL-1 β 等均在 ANP 后迅速升高至峰值,随即迅速下降。此时,炎症反应和脏器损害仍在继续,提示可能有某些晚期炎症因子参与了病理过程。

高迁移率族蛋白 (HMG) 是一大类高度保守的蛋白质,相对分子质量较低 (约 30kD),带电荷氨基酸含量丰富,因其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中迁移迅速而得名^[5]。HMGB1 是 HMG 家族成员之一,既往的研究表明它是细胞核内含量最丰富的非组蛋白染色质蛋白,可参与 DNA 复制、细胞分化及基因表达等多种细胞生命活动。最近发现,细胞经内毒素刺激后,可将 HMGB1 分泌到细胞外,介导内毒素的致死效应。由于内毒素攻击后

HMGB1 的产生明显晚于其他介质并持续时间较长,故被称为脓毒症的“晚期”介质^[6]。与 TNF- α 和 IL-1 β 等早期细胞因子相比, HMGB1 出现较晚且持续时间更长,因而可能成为脓毒症防治切实可行的潜在干预目标^[7-8]。本实验对 ANP 时 HMGB1 表达的调控机制及其与胰腺损害的关系进行了初步探讨,旨在为其防治提供新的思路。

本研究结果表明,与 TNF- α 等早期炎症因子不同, ANP 时胰腺组织 HMGB1 表达增高较晚,且持续时间较长,至 ANP 建模后 24h 仍维持在高水平。表明 HMGB1 作为晚期炎症因子参与了 ANP 的全身炎症反应。为了进一步明确 HMGB1 表达在 ANP 中的意义,笔者采用 HMGB1 的抑制剂正丁酸钠^[9]进行治疗,观察其对胰腺组织损伤的影响。结果显示,正丁酸钠能明显下调 ANP 大鼠胰腺 HMGB1 mRNA 表达水平,而且显著减轻胰腺损伤程度。正丁酸钠可能系通过降低胰腺 HMGB1 水平,以及减轻 HMGB1 所导致的晚期炎症反应,对 ANP 大鼠产生有利的影响。

HMGB1 作为晚期炎症因子参与 ANP 的晚期炎症反应,通过各种途径下调 HMGB1 水平或拮抗其作用,可能在 ANP 的炎症调控中具有重要意义。HMGB1 作为晚期炎症介质,有望成为新的治疗靶点。

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] Schimidt J, Lewandrowsik, Warsaw AL, *et al.* Morphometric characteristics and homogeneity of a new model of acute pancreatitis in the rat [J]. *Int J Pancreatol*, 1992, 12(1): 41 - 51.
- [3] 冯新富, 芦灵军, 陈晓理. 5-氟尿嘧啶对大鼠急性胰腺炎炎症相关细胞因子的调节作用[J]. *中国普通外科杂志*, 2003, 12(10): 747 - 750.
- [4] 孙备, 李哈莉. 重症急性胰腺炎治疗的现代观[J]. *中国普通外科杂志*, 2002, 12(2): 131 - 133.
- [5] Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe [J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17(3): 189 - 201.
- [6] Sundén-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Treutiger CJ. The role of high mobility group box-1 protein in severe sepsis [J]. *Curr Opin Infect Dis*, 2006, 19(3): 231 - 236.
- [7] Fang WH, Yao YM, Shi ZG, *et al.* The significance of changes in high mobility group-1 protein mRNA expression in rats after thermal injury [J]. *Shock*, 2002, 17(4): 329 - 333.
- [8] Mantell LL, Parrish WR, Ulloa L. Hmgb-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders [J]. *Shock*, 2006, 25(1): 4 - 11.
- [9] 张立天, 姚咏明, 陆家齐, 等. 高迁移率族蛋白-1在脓毒症所致多器官功能损害中的作用[J]. *中华外科杂志*, 2003, 41(4): 303 - 306.

2007 年裘法祖普通外科医学青年基金申报办法

裘法祖普通外科医学青年基金旨在通过奖励和资助,鼓励从事普通外科研究和实践并作出成绩的青年同道,发奋图强,开拓创新,为提高我国普通外科事业的不断发展作出贡献。

奖励对象为对普通外科事业有突出贡献的 45 岁以下(含 45 岁)的青年人。具体申报条件、办法如下:

1. 至 2006 年 12 月 31 日年龄在 45 岁以下(即 1962 年元月 1 日以后出生),从事普通外科专业者。

2. 2006 年(2007 年 6 月 31 日以前获得或公布的)在普通外科研究和实践中获得省、部级(含省、部级)以上自然科学奖、科学技术进步奖、技术发明奖二等奖(含二等奖)以上奖励的项目完成人排名第一名或第二名者。

3. 申报表及具体手续请与裘法祖普通外科医学青年基金办公室(武汉市解放大道 1095 号同济医院外科,邮政编码:430030)联系。

4. 申报截止日期:2007 年 8 月 30 日

联系人童汉莲,电话:027-83663400 或 83662159;手机:63087865;传真:83662851;E-mail:waiketj@yahoo.