论著

文章编号:1000-5404(2008)21-1984-04

丙酮酸乙酯对烫伤大鼠肺组织高迁移率族蛋白B1表达和肺损伤的影响

王彦博[1],姚咏明[2],王 强[3],王文江[2],刘玉峰[1] ([1]第四军医大学西京医院皮肤科,西安 710032;解放军总医院:[2]第一附属医院全军烧伤研究所,北京 100037,[3]第二附属医院普外科,北京 100091)

摘 要:目的 观察丙酮酸乙酯(ethyl pyruvate, EP)对烫伤大鼠肺组织高迁移率族蛋白B1(high mobility group box-1 protein, HMGB1)表达水平及急性肺损伤的影响。**方法** 采用大鼠30%总体表面积Ⅲ度烫伤延迟复苏模型,78只雄性Wistar大鼠按随机数字表法分为假烫伤组($n=18$)、烫伤组($n=30$)、EP治疗组($n=30$),每组分别在假伤或伤后第8、24、72小时活杀留取肺组织。HMGB1基因/蛋白表达分别采用逆转录聚合酶链反应及蛋白免疫印记法、免疫组化方法检测;髓过氧化物酶(myeloperoxidase, MPO)活性采用酶学分光光度法测定;并采用HE染色、光镜下观察肺组织病理改变。**结果** 与假烫伤组比较,烫伤组肺组织HMGB1基因/蛋白表达于伤后8~72 h显著增强($P<0.05$,$P<0.01$),同时肺组织MPO活性在8 h及24 h明显升高($P<0.01$),病理学观察见肺组织炎细胞浸润,正常结构破坏,其中以24 h改变最重。与烫伤组比较,EP治疗组大鼠肺组织8~72 h时间点HMGB1表达显著下调($P<0.05$),肺组织MPO活性在8、24 h时间点显著下降($P<0.01$),EP治疗组8~72 h肺组织病理形态损害明显减轻。**结论** HMGB1作为晚期炎症因子参与了烫伤后肺组织炎症反应的病理过程,EP治疗可明显下调肺组织HMGB1表达,并有助于降低肺组织MPO活性,从而减轻烫伤延迟复苏所致急性肺损伤。

关键词: 烫伤;丙酮酸乙酯;高迁移率族蛋白B1;急性肺损伤

中图法分类号: R322.35; R644.02; R914.3 **文献标识码:** A

Effect of ethyl pyruvate on expression of pulmonary high mobility group box-1 protein and acute lung injury in rats with delayed resuscitation after burn injury

WANG Yan-bo[1], YAO Yong-ming[2], WANG Qiang, WANG Wen-jiang[2], LIU Yu-feng[1] ([1]Department of Dermatology, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an 710032; [2]Burns Institute, First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA, Beijing 100037, [3]Department of General Surgery, Second Affiliated Hospital of General Hospital of PLA, Beijing 100091, China)

Abstract: Objective To investigate the effect of ethyl pyruvate (EP) on pulmonary high mobility group box-1 protein (HMGB1) expression and acute lung injury in rats with delayed resuscitation after burn injury. **Methods** Wistar rats were inflicted to 30% full-thickness scald injury followed with delayed resuscitation. Seventy-eight male rats were randomly divided into sham scald group ($n=18$), scald group ($n=30$), and EP treatment group ($n=30$), and they were sacrificed at 8, 24, and 72 h after scald injury. Lung tissue samples were collected to determine HMGB1 mRNA as well as protein expressions, and pulmonary myeloperoxidase (MPO) activity. HMGB1 mRNA level was semi-quantitatively measured by the reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) taking GAPDH as an internal standard, and protein expression of HMGB1 was detected by Western blotting and immunohistochemistry. The pathological changes of lung tissues were observed with light microscopy after HE staining. **Results** Compared to sham scald controls, both mRNA and protein expressions of HMGB1 were significantly enhanced in the lung at 8 to 72 h after scald injury ($P<0.05$ or 0.01), meanwhile pulmonary MPO activities were markedly increased at 8 and 24 h after scald ($P<0.01$). In addition, many inflammatory cells in pulmonary tissues were observed under light microscope following injury. Treatment with EP markedly down-regulated pulmonary HMGB1 mRNA and protein expressions at 8 to 72 h

基金项目: 国家重点基础研究发展计划(973计划)(2005CB522602);国家自然科学基金(30672178, 30872683)

Supported by the National Key Basic Research and Development of Plan of China (973 Program, 2005CB522602) and the National Natural Science Foundation of China (30672178, 30872683)

作者简介: 王彦博,女,北京市人,博士研究生,主治医师,主要从事皮肤病免疫学机制方面的研究。电话:(010) 66867398

通信作者: 姚咏明,电话:(010)66867394, E-mail: c_ff@sina.com

收稿日期: 2008-06-06;**修回日期:** 2008-07-28

($P<0.05$ or 0.01), and reduced pulmonary MPO activities at 8 and 24 h following scald injury ($P<0.01$). The histological morphology of pulmonary lesions was ameliorated after treatment with EP. **Conclusion** These results suggest that HMGB1 might act as a late mediator in the pathogenesis of postburn acute lung injury. Treatment with EP could obviously inhibit pulmonary HMGB1 expression and reduce MPO activity, thereby prevent the development of acute lung injury induced by major burns with delayed resuscitation.

Key words: scald; ethyl pyruvate; high mobility group box-1 protein; acute lung injury

脓毒症系严重烧伤、感染、胰腺炎等疾病过程中出现的失控性炎症反应,是多器官功能障碍综合征(multiple organ dysfunction syndrome, MODS)的重要病理基础,其发病机制复杂,迄今尚未完全阐明[1-3]。近年来,高迁移率族蛋白 B1(high mobility group box-1 protein,HMGB1)在炎症发生发展过程中的作用日益受到人们的重视。本实验通过烫伤延迟复苏大鼠模型对肺组织 HMGB1 变化规律进行观察,同时应用丙酮酸乙酯(ethyl pyruvate, EP)进行干预,探讨其对烫伤大鼠肺组织 HMGB1 基因/蛋白表达和急性肺损伤的可能作用。

1　材料与方法

1.1　实验动物与模型制备

雄性清洁级 Wistar 大鼠 78 只(北京维通利华实验动物有限公司提供),体质量 230~250 g。大鼠称量、编号,禁食 12 h。盐酸氯胺酮注射液与速眠新(保定宁、氟哌啶醇等药物制成的复方制剂,长春军事兽医研究所产品)2∶1混合液 0.1 ml 肌内注射麻醉,刮除背部及侧胸部毛,浸于(99±0.5)℃的沸水中 12 s,造成 30% 体表面积Ⅲ度烫伤,背部涂 2% 碘酒抗感染(2 次/d),伤后延迟 6 h 开始抗休克治疗,麻醉苏醒后单笼饲养。假烫伤动物浸于温水(37 ℃)中 12 s。

1.2　EP 液的制备

EP 液中包括钠离子(130 mmol/L)、钾离子(4 mmol/L)、钙离子(27 mmol/L)、氯离子(139 mmol/L)、EP(28 mmol/L),pH=7.02。

1.3　实验分组

78 只动物按随机数字表法分为 3 组:①假伤组($n=18$),在假烫伤后 8、24、72 h 活杀无菌取材,各时间点均为 6 只动物;②烫伤组($n=30$),烫伤后 2 h 给予林格液 3 ml,伤后 6 h 腹腔内注入生理盐水(40 ml/kg)抗休克治疗;③EP 液(3.23 mg/ml)治疗组($n=30$),烫伤后 2 h 给予 EP 3 ml,伤后 6 h 腹腔内注入生理盐水(40 ml/kg)抗休克治疗。后 2 组于伤后 8、24、72 h 分别活杀 10 只动物,无菌取材,其中 EP 治疗组 24 h 亚组伤后 12 h 腹腔内注射 EP 3 ml,72 h 亚组伤后分别在 12、24、36、48、60 h 腹腔内注射 EP 3 ml;烫伤组 24 h 亚组伤后 12 h 腹腔注射给予林格液 3 ml,72 h 亚组伤后分别在 12、24、36、48、60 h 腹腔注射给予林格液 3 ml。

1.4　检测指标和方法

1.4.1　肺组织 HMGB1 mRNA 表达　采用逆转录聚合酶链反应(RT-PCR)测定各组肺组织 HMGB1 mRNA 表达水平。称取肺组织约 100 mg,以异硫氰酸胍一步法提取细胞总 RNA(美国 Promega 公司试剂盒)。RT-PCR 技术扩增转录产物,以三磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)作内参对照。大鼠 HMGB1 引物序列(扩增片段为 680 bp):5′-ATGGGCAAAGGAGATCCTA-3′(上游),5′-ATTCATCATCATCTTCT-3′(下游)[4];GAPDH 引物序列(扩增片段为 309 bp):5′-TCCCTCAAGATTGTCAGCAA-3′(上游),5′-AGATCCACAACGGATACATT-3′(下游)。反应采用 50 μl体系,包括模板 DNA 5 μl,10×PCR 缓冲液 5 μl,dNTPs(2.5 mmol/L)4 μl,镁离子 3 μl,引物 PCO3 1 μl,引物 PCO4 1 μl,*Taq* DNA 聚合酶 0.5 μl,灭菌去离子水 30.5 μl;50 μl 体系,反应条件:95 ℃变性 10 min;95 ℃,30 s;60 ℃30 s;72 ℃,45 s;72 ℃延伸 10 min,4 ℃保存,31 次循环。扩增产物经 2% 琼脂糖凝胶电泳后照相,底片冲洗后采用 Leica Q-550IW 图像分析处理系统进行分析,目的基因与内参对照的积分吸光度比值表示 mRNA 相对表达量。

1.4.2　肺组织 HMGB1 蛋白水平　①采用 Western blot 检测,硝酸纤维素膜在封闭液中与一抗(兔抗 HMGB1 多克隆抗体,美国 BD PharMingen 公司产品)结合,然后再与二抗(辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔 IgG)室温孵育,在暗室中采用化学发光反应试剂盒进行发光,底片经 Leica Q-550IW 图像分析系统分析各条带的光密度值。②应用免疫组织化学方法检测细胞内 HMGB1 阳性表达强度,肺组织每例蜡块行 4 μm 厚连续切片,脱蜡、水化,3% H_2O_2 孵育 5 min,pH 6.0 枸橼酸缓冲液微波修复(95 ℃,10 min),加 1∶100 稀释兔抗 HMGBl 多克隆抗体(美国 BD PharMingen 公司产品)结合,4 ℃过夜。PBS 冲洗后,加山羊抗兔 IgG 抗体辣根过氧化物酶 HRP 多聚体(购自北京中山公司),37 ℃孵育 30 min,DAB 显色,苏木精复染后脱水、透明、封片,光镜下观察。同时,用 PBS 代替一抗做阴性对照。显色结果采用 HPLAS2000 型多媒体彩色图像分析系统(空军总医院病理科)对染色阳性部位进行光密度值测定。在相同光强度下,以高倍镜(×400)在每张切片上选取 5 个不相重叠视野,分别以细胞内出现棕黄色颗粒为阳性表达,测定其平均光密度值(mean optical density, MOD),测量中采用固定大小的测量面积。不加一抗的阴性对照无特异性染色。

1.4.3　肺组织髓过氧化物酶(MPO)活性检测　采用酶学分光光度法测定。

1.4.4　肺组织形态学观察　所有标本经 10% 中性福尔马林液固定、常规脱水、石蜡包埋、HE 染色。

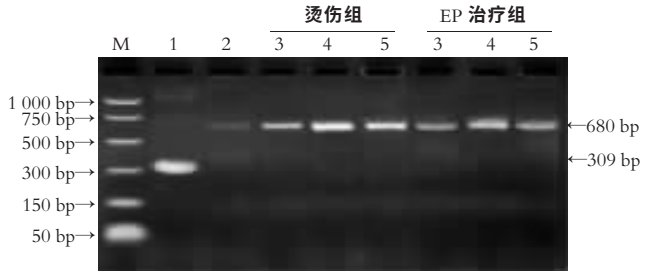
1.5　统计学方法

各项指标均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用 SPSS 12.0 统计软件对数据进行 t 检验和方差分析。

2 结果

2.1 肺组织 HMGB1 mRNA 的表达

假伤组大鼠肺组织中有一定量的 HMGB1 mRNA 表达;与假伤组相比较,烫伤后 8 h 肺组织 HMGB1 mRNA 表达即明显增高($P<0.05$),伤后 24 h 其表达至峰值($P<0.01$),并持续至 72 h($P<0.01$);与烫伤组相比,给予 EP 治疗可显著降低烫伤延迟复苏大鼠 8、24、72 h 肺组织 HMGB1 mRNA 表达水平($P<0.05$,图 1,表 1)。



M: 标准; 1: GADPH; 2: 假伤组 8 h; 3: 8 h;4: 24 h; 5: 72 h

图 1 肺组织 HMGB1 mRNA 的表达

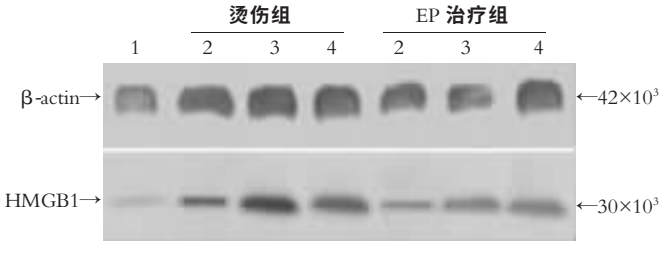
表 1 烫伤大鼠肺组织 HMGB1 mRNA 表达的改变($\bar{x}\pm s$)

组 别	8 h	24 h	72 h
假伤组	0.471 ± 0.078	0.473 ± 0.062	0.453 ± 0.063
烫伤组	0.585 ± 0.073[a]	0.675 ± 0.095[b]	0.643 ± 0.088[b]
EP 治疗组	0.506 ± 0.092[c]	0.522 ± 0.100[c]	0.525 ± 0.056[c]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与假伤组相应时间点比较;c:$P<0.05$,与烫伤组相应时间点比较

2.2 肺组织 HMGB1 蛋白表达改变

2.2.1 免疫印迹法测定结果 如图 2、表 2 所示,与假伤组相比,烫伤组肺组织 HMGB1 蛋白表达阳性信号明显增强,EP 治疗可使 HMGB1 蛋白表达信号减弱。光密度扫描结果显示,严重烫伤大鼠肺组织 HMGB1 蛋白表达强度在 8、24、72 h 较假伤组显著增强($P<0.05$,$P<0.01$),EP 治疗组 HMGB1 蛋白表达强度在 8、72 h 则明显低于烫伤组($P<0.05$)。



1:假伤组 8 h; 2: 8 h;3: 24 h;4: 72 h

图 2 Western blot 检测肺组织 HMGB1 蛋白的表达

2.2.2 免疫组织化学方法检测细胞内 HMGB1 阳性表达强度

由表 3 可见,假伤组大鼠肺脏细胞有一定量 HMGB1 阳性表达,严重烫伤后 8、24、72 h,其表达显著增强($P<0.05$,$P<0.01$);EP 治疗后在 8、24 h 和 72 h 肺脏细胞 HMGB1 蛋白阳性表达强度显著减弱($P<0.05$,$P<0.01$)。

表 2 EP 对烫伤大鼠肺组织 HMGB1 蛋白表达水平的影响($\bar{x}\pm s$)

组别	8 h	24 h	72 h
假伤组	129.7 ± 6.53	128.3 ± 10.58	130.4 ± 6.86
烫伤组	149.2 ± 18.18[a]	166.3 ± 18.84[b]	157.0 ± 19.5[b]
EP 治疗组	133.7 ± 13.20[c]	150.5 ± 12.40	137.1 ± 9.95[c]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与假伤组相应时间点比较;c:$P<0.05$,与烫伤组相应时间点比较

表 3 肺组织 HMGB1 蛋白免疫组织化学定量分析结果($\bar{x}\pm s$)

组别	8 h	24 h	72 h
假伤组	5.98 ± 0.94	6.01 ± 0.30	6.03 ± 0.62
烫伤组	8.33 ± 1.85[a]	8.56 ± 2.42[b]	7.86 ± 1.67[a]
EP 治疗组	5.76 ± 1.09[d]	6.14 ± 1.93[c]	6.10 ± 1.84[c]

a:$P<0.05$,b:$P<0.01$,与假伤组相应时间点比较;c:$P<0.05$,d:$P<0.01$,与烫伤组相应时间点比较

2.3 肺组织 MPO 活性

严重烫伤后肺组织 MPO 活性在 8、24 h 显著高于假伤组($P<0.01$),其中 24 h 达峰值,为假伤组的 4.34 倍。与烫伤组相比,给予 EP 治疗后肺组织 MPO 活性在 8、24 h 均明显降低($P<0.05$,$P<0.01$),见表 4。

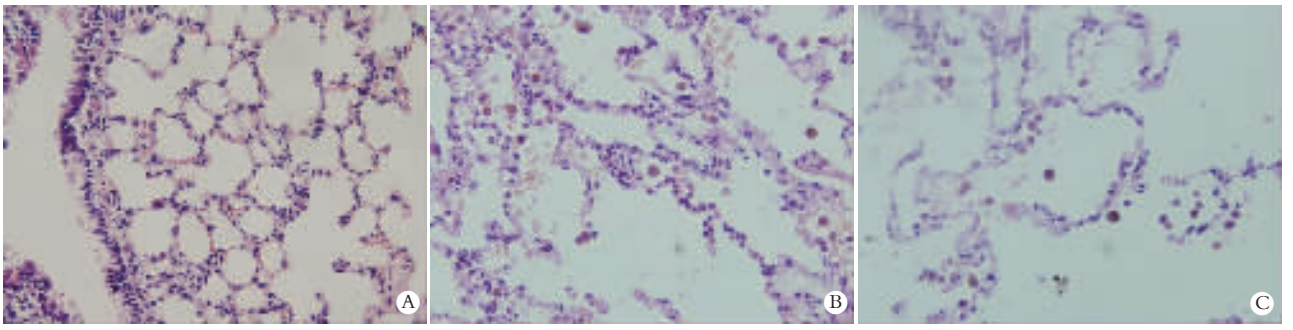
表 4 烫伤大鼠肺组织 MPO 活性的改变(U/g, $\bar{x}\pm s$)

组 别	8 h	24 h	72 h
假伤组	1.485 ± 0.093	1.496 ± 0.085	1.477 ± 0.025
烫伤组	2.599 ± 0.652[a]	6.443 ± 0.640[a]	1.586 ± 0.191
EP 治疗组	2.026 ± 0.188[b]	2.280 ± 0.424[c]	1.522 ± 0.056

a: $P<0.01$,与假伤组相应时间点比较;b:$P<0.05$,c:$P<0.01$,与烫伤组相应时间点比较

2.4 肺组织病理形态学改变

假伤组肺脏形态结构基本正常,未见组织病理学损伤性变化(图 3A)。烫伤后 8 h 均可见肺泡壁和肺间质广泛的充血和明显增厚,肺泡出血,肺间质水肿,毛细血管淤血与微血栓形成,可见不同程度的局灶性肺不张和透明膜形成。EP 治疗组 8 h 病变明显减轻,可见局灶性轻度肺泡壁充血,肺泡壁轻度增厚。烫伤后 24 h 损伤的范围进一步扩大,出现广泛性肺泡出血,肺泡腔内可见较多的炎性细胞浸润,肺间质明显水肿,毛细血管淤血与微血栓形成,可见不同程度地局灶性肺不张和透明膜形成,肺组织明显实变,并伴有不同程度的代偿性肺气肿(图 3B)。EP 治疗后肺组织 24 h 病变明显减轻,但可见局灶性轻度肺泡壁充血,肺泡壁轻度增厚,少数动物可见不同程度地局灶性肺不张、透明膜形成、毛细血管淤血(图 3C)。烫伤后 72 h 出现广泛性大量肺泡出血,肺泡腔内可见大量的炎性细胞浸润,毛细血管淤血与微血栓形成明显,可见不同程度的局灶性肺不张和透明膜形成,肺组织实变较烫伤 24 h 更严重。EP 干预后肺组织 72 h 病变显著减轻,可见局灶性轻-中度的肺泡壁充血,肺泡壁轻-中度增厚,少数动物可见不同程度的局灶性肺不张、透明膜形成、毛细血管淤血。



A:假伤组;B:烫伤组;C:EP 治疗组

图 3　烫伤后 24 h 肺组织形态学观察　(HE ×400)

3　讨论

既往普遍认为, TNF-α 和 IL-1 等早期致炎细胞因子是引起机体失控性炎症反应与组织损害的关键介质,但 TNF-α 和 IL-1 拮抗剂临床试验并未取得满意结果。研究发现,TNF-α 和 IL-1 通常在刺激后几分钟至 2 h 内释放;TNF-α 和 IL-1 拮抗剂治疗只是在菌血症早期有效,提示可能存在某些晚期炎症介质参与了脓毒症后期的病理生理过程[4]。新近研究表明,HMGB1 作为新的晚期炎症介质参与了脓毒症的发病过程,它可能成为脓毒症防治策略中切实可行的潜在干预目标[5]。本实验应用烫伤动物模型探讨了肺组织的 HMGB1 变化规律,结果显示烫伤大鼠肺组织 HMGB1 基因/蛋白表达在 8 h 开始增高,且持续时间较长,24 h 呈持续升高趋势并达峰值,72 h 仍显著高于假伤组,该动力反应特点与早期致炎细胞因子明显不同。进一步分析可见,烫伤后反映肺脏细胞炎症浸润程度的 MPO 活性显著增高,病理学观察见肺组织炎细胞浸润,正常结构破坏;均与肺组织 HMGB1 的表达密切相关,提示 HMGB1 可能参与了烫伤后肺组织炎症反应的病理过程。

EP 是丙酮酸的酯化物,有资料证实其具有抗氧化作用,可减少氧自由基的产生,是有效的活性氧清除剂[6]。最近有研究显示,EP 还可以调节炎症介质的合成与释放,包括早期和晚期炎性细胞因子[7]。据报道,EP 干预可有效地抑制内毒素诱导鼠巨噬细胞 RAW264.7 分泌一氧化氮和 IL-1,明显阻断诱生型一氧化氮合酶和 IL-1 mRNA 的转录过程[8]。我们既往研究证实,伤后 12 h 注射 EP 可有效降低严重烧伤延迟复苏大鼠的死亡率[9]。同时,EP 还能显著改善烫伤延迟复苏大鼠的细胞免疫功能[10]。

为了进一步了解 EP 对严重损伤后机体失控性炎症反应和器官损害发展的影响,本实验应用 EP 对烫伤大鼠进行干预,观察其对肺组织 HMGB1 表达水平和急性肺损伤的可能效应。结果证实,给予 EP 治疗能显著下调烧伤延迟复苏大鼠肺组织 HMGB1 的基因与蛋白表达,提示 EP 能通过抑制严重烫伤晚期炎症细胞因子 HMGB1 的合成与释放,从而减轻 HMGB1 所致肺组织炎症的发生与发展过程;进一步观察可见,EP 治疗组反映肺组织炎性细胞集聚程度的 MPO 活性也明显降低,肺组织形态学损害较烫伤组明显减轻,提示 EP 能有效减轻严重应激打击所致急性肺组织损伤,防止烧伤延迟复苏所致器官功能障碍,从而达到治疗和改善预后的目的。

参考文献:

[1] Hotchkiss R S, Karl I E. The pathophysiology and treatment of sepsis[J]. N Engl J Med, 2003, 348(2): 138 - 150.

[2] Volk T, Kox W J. Endothelium function in sepsis[J]. Inflamm Res, 2000, 49(5): 185 - 198.

[3] Reinhart K, Bayer O, Brunkhorst F, *et al*. Markers of endothelial damage in organ dysfunction and sepsis[J]. Crit Care Med, 2002, 30(5 Suppl): S302 - S312.

[4] Yang H, Wang H, Tracey K J. HMG-1 rediscovered as a cytokine[J]. Shock, 2001, 15(4): 247 - 253.

[5] 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.

[6] Desagher S, Glowinski J, Premont J. Pyruvate protects neurons against hydrogen peroxide-induced toxicity[J]. J Neurosci, 1997, 17(23): 9060 - 9067.

[7] Das U N. Is pyruvate an endogenous anti-inflammatory molecule?[J]. Nutrition, 2006, 22(9): 965 - 972.

[8] Song M, Kellum J A, Kaldas H, *et al*. Evidence that glutathione depletion is a mechanism responsible for the anti-inflammatory effects of ethyl pyruvate in cultured lipopolysaccharide-stimulated RAW 264.7 cells[J]. J Pharmacol Exp Ther, 2004, 308(1): 307 - 316.

[9] 姚咏明, 徐　珊, 盛志勇. 高迁移率族蛋白 B1 的组织损伤效应及其干预途径[J]. 中国医学科学院学报, 2007, 29(4): 459 - 465.

[10] Zhang L T, Yao Y M, Dong Y Q, *et al*. Relationship between high-mobility group box 1 protein release and T-cell suppression in rats after thermal injury[J]. Shock, 2008, 30(4): 449 - 455.

(编辑　吴培红)