

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.04.006

## HMGB1、TLR4 在重症急性胰腺炎大鼠胰腺组织中的表达及乌司他丁的干预效应

王 静<sup>1</sup>, 王 焯<sup>2△</sup>, 邓明明<sup>2</sup>, 孟 娅<sup>2</sup>

(1. 四川省自贡市第一人民医院消化内科 643000; 2. 泸州医学院附属医院消化内科, 四川泸州 646000)

**摘要:**目的 探讨 HMGB1、TLR4 在重症急性胰腺炎大鼠胰腺组织中的作用机制以及乌司他丁的干预效应。方法 将 54 只 SD 大鼠分为对照组、SAP 组和乌司他丁治疗组, 3 组又分为 6、12 h 和 24 h 3 个小组(每组  $n=6$ )。对照组开腹后仅翻动胰腺组织, SAP 组用 5% 的牛磺胆酸钠制备 SAP 模型, 治疗组在 SAP 造模成功后经尾静脉注射乌司他丁。观察 3 组大鼠胰腺组织的病理学改变; EPS-G7 法检测血清中的淀粉酶; ELISA 法检测血清及胰腺组织中的 HMGB1; Envision 两步免疫法检测胰腺组织中的 HMGB1、TLR4 的表达水平。结果 SAP 组、治疗组各时间点的淀粉酶与对照组比较明显升高, 病理学改变明显, 差异均有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 示 SAP 造模成功; SAP 组在胰腺组织及血清中的 HMGB1 表达在 6 h 开始升高, 于 12 h 快速上升, 至 24 h 保持上升趋势, 与对照组大鼠相同时间点比较明显升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ), 治疗组与 SAP 组相同时间点的 HMGB1 比较明显降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ ); SAP 组胰腺组织中的 TLR4 表达在 6 h 开始升高, 12 h 达高峰, 24 h 开始下降, 与对照组大鼠相同时间点比较明显升高, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。治疗组与 SAP 组相同时间点的 TLR4 比较明显降低, 差异有统计学意义 ( $P<0.05$ )。结论 HMGB1 在 SAP 大鼠胰腺中的致炎作用可能是部分结合其受体 TLR4 并通过 MyD88 依赖性途径而实现的, 而乌司他丁可能是通过中断 SAP 大鼠胰腺组织中的 HMGB1、TLR4 信号通路发挥保护作用。

**关键词:** 胰腺炎; 高迁移率族蛋白-1; Toll 样受体 4; 乌司他丁

中图分类号: R57

文献标识码: A

文章编号: 1671-8348(2015)04-0450-03

### The expression of HMGB1 and TLR4 in pancreatic tissue of rats with severe acute pancreatitis and the intervention effects of Ulinastatin

Wang Jing<sup>1</sup>, Wang Xuan<sup>2△</sup>, Deng Mingming<sup>2</sup>, Meng Ya<sup>2</sup>

(1. Department of Gastroenterology, the First People's Hospital of Zigong City, Zigong, Sichuan 643000, China;

2. Department of Gastroenterology, the Affiliated Hospital of Luzhou Medical College, Luzhou, Sichuan 646000, China)

**Abstract:** Objective To explore the mechanism of HMGB1 and TLR4 in pancreatic tissue of rats with severe acute pancreatitis and the intervention effect of Ulinastatin. Methods The 54 SD rats were completely random divided into control group, SAP group and Ulinastatin treatment group, and each group was divided into three groups; 6, 12 h and 24 h groups (each group  $n=6$ ). In control group, we turned the pancreatic tissue, in SAP group, the SAP model was made with 5% taurocholic acid; and in the treatment group, and intravenous injection of ulinastatin was conducted after the SAP model was successfully made. Then we observed the pancreatic tissue pathology in the three groups. The amylase in serum was detected by EPS-G7 assay, the HMGB1 in serum and pancreatic tissue was detected by ELISA assay, the expression levels of HMGB1 and TLR4 in pancreatic tissue were detected by Envision two-step immunoassay. Results Compared with control group, the amylase of each time point in SAP group and treatment group were significantly higher, and the pathology changed obviously ( $P<0.05$ ), and the SAP model was successfully made. The HMGB1 expression in pancreatic tissue and serum started increase at 6 h, increased quickly at 12 h and maintained the increasing trend to 24 h in SAP group and it was significantly higher at the same time point compared with that of control group ( $P<0.05$ ); at the same time point, the HMGB1 in treatment group was significantly lower than that of SAP group ( $P<0.05$ ); in SAP group, the expression of TLR4 in pancreatic tissue started increasing at 6 h, reached its peak at 12 h and started decreasing at 24 h, it was significantly higher than the control group at the same time point ( $P<0.05$ ). At the same time point, the TLR4 was significantly lower in the treatment group than SAP group ( $P<0.05$ ). Conclusion The proinflammatory effect of HMGB1 in SAP rats pancreatic could be partly combine its receptor TLR4 and MyD88-dependent pathway through implementation, and the protecting mechanism of Ulinastatin could be interrupt the HMGB1 and TLR4 signaling pathway in SAP rats pancreatic tissue.

**Key words:** pancreatitis; high mobility group box 1 protein; Toll-like receptors 4; Ulinastatin

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)来势猛, 病死率可高达 20%~30%。SAP 确切发病机制尚未完全阐明, 近年来有研究提示作为炎性反应启动闸门的 Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)<sup>[1]</sup>及作为晚期炎性介质的高迁移率族蛋白-1(high mobility group box 1 protein, HMGB1)<sup>[2]</sup>可能通过某些传导通路共同参与了 SAP 的发生、发展, 而乌司他丁则可通过抑制炎性介质和细胞因子的释放, 从而减轻 SAP 全身炎性反应并降低病死率。本研究试图通过 SAP 大鼠模型

及采用乌司他丁干预, 探讨 HMGB1、TLR-4 在 SAP 大鼠胰腺组织中的表达及其作用机制以及乌司他丁对胰腺组织中的 HMGB1、TLR4 的影响。

#### 1 材料与方法

**1.1 实验动物和主要试剂** 健康 SD 大鼠 24 只(雄性, 清洁级, 体质量 200~250 g)购自简阳达硕动物科技有限公司; 牛磺胆酸钠(美国 Sigma 公司); 乌司他丁(广东天普生物化学制药有限公司); 大鼠 HMGB1 ELISA 试剂盒(上海生工); 大鼠

TLR4 多克隆抗体(武汉博士德生物工程有限公司);大鼠 HMGB1 多克隆抗体(美国 Bioworld 公司)。

**1.2 动物分组及造模** 54 只 SD 大鼠分为对照组、SAP 组和治疗组,3 组又分为 6、12 h 和 24 h 3 个小组(每组  $n=6$ )。术前 12 h 及术后禁食不禁饮。(1)对照组:常规备皮、消毒、铺巾后,予 1% 戊巴比妥钠(4 mL/kg)行腹腔注射麻醉后,经正中中线入腹,开腹后仅翻动胰腺组织;(2)SAP 组:参照 Zhang 等<sup>[3]</sup>方法用 5% 的牛磺胆酸钠(4 mL/kg)胰腺被膜下注射方法复制 SAP 模型;(3)治疗组:在 SAP 造模制备成功后,经尾静脉注射由生理盐水配制的乌司他丁(5 万 U/kg)进行干预。

**1.3 获取血清及胰腺组织** 于术后 6、12 h 和 24 h 分别处死各组大鼠,剖腹经大鼠腹腔下腔静脉穿刺取血并分离血清,部分血清置于 -20 °C 冰箱冻存用于淀粉酶及 ELISA 检测;提取胰腺组织,一份胰腺组织置于 10% 中性甲醛中固定用于病理学检查;一份置于 -80 °C 冰箱冻存用于 ELISA 检测。

**1.4 胰腺病理观察** 将标本固定、包埋、切片,行 HE 染色,按 Schimidt 法<sup>[4]</sup>进行评分。

**1.5 血清 EPS-G7、HMGB1 及胰腺 HMGB1 的检测** EPS-G7 法检测血清中的淀粉酶,操作严格按照试剂说明书进行,由德国西门子全自动生化分析仪测定。ELISA 法检测血清及胰腺中的 HMGB1,操作严格按照试剂说明书进行,30 min 内用酶标仪在 450 nm 处测定吸光度(OD)值,根据样品 OD 值算出相应 HMGB1 含量。

**1.6 胰腺组织 HMGB1、TLR4 的蛋白浓度检测** 免疫组织化学 Envision 两步免疫法检测胰腺组织中的 HMGB1、TLR4 蛋白浓度,免疫组织化学结果判定在放大 400 倍的条件下。以细胞膜或细胞质内呈现棕黄色颗粒者为阳性,随机观察 10 个具有代表性的高倍视野,并根据 HMGB1、TLR4 阳性细胞占总细胞数的比例记 0~4 分:小于 5% 记 0 分,5%~25% 记 1 分,26%~50% 记 2 分,51%~75% 记 3 分,>75% 记 4 分。

**1.7 统计学处理** 采用 SPSS13.0 软件进行统计分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用  $t$  检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结 果**

**2.1 病理改变** 对照组大鼠胰腺大体及镜下无明显变化;SAP 组大体可见胰腺出血、坏死及皂化斑,大量血性腹腔积液,镜下可见 SAP 组明显小叶间水肿,大量炎性细胞浸润,片状出血,胰腺小叶结构破坏,腺泡细胞坏死明显。SAP 组、治

疗组 Schimidt 评分明显低于对照组且差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明 SAP 建模成功;治疗组大体及镜下较 SAP 组显著改善。SAP 组及治疗组病理改变随时间延长进行性加重,24 h 均重于 12 h,12 h 均重于 6 h,且各组相应时间点比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),各组大鼠胰腺病理评分见表 1。

表 1 各组大鼠胰腺 Schimidt 评分比较( $\bar{x} \pm s$ ,分, $n=6$ )

组别	术后 6 h	术后 12 h	术后 24 h
对照组	1.33±0.24	1.41±0.20	1.52±0.26
SAP 组	10.23±0.56 <sup>a</sup>	12.36±0.72 <sup>a</sup>	14.35±0.78 <sup>a</sup>
治疗组	6.32±0.21 <sup>ab</sup>	8.49±0.67 <sup>ab</sup>	11.12±0.86 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与对照组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与 SAP 组比较。

**2.2 血清淀粉酶测定** SAP 组、治疗组血清淀粉酶水平明显高于对照组且差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),说明 SAP 建模成功;治疗组数值明显低于 SAP 组且高于对照组,且差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

**2.3 ELISA 法检测血清及胰腺中的 HMGB1** SAP 组、治疗组的 HMGB1 水平在 6 h 开始升高,12 h 明显升高,至 24 h 继续上升,各时间点与对照组比较升高,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),治疗组各时间点与 SAP 组比较降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 2 各组大鼠血清淀粉酶变化( $\bar{x} \pm s$ ,U/L, $n=6$ )

组别	术后 6 h	术后 12 h	术后 24 h
对照组	1 041±96	1 055±87	1 121±91
SAP 组	1 867±181 <sup>a</sup>	2 363±23 <sup>a</sup>	2 662±251 <sup>a</sup>
治疗组	1 561±143 <sup>ab</sup>	2 021±198 <sup>ab</sup>	2 301±221 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与对照组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与 SAP 组比较。

**2.4 免疫组织化学检测胰腺组织中的 HMGB1、TLR4 表达** HMGB1 在对照组仅少量腺泡细胞质可见表达,SAP 组胰腺腺泡细胞核和细胞质可见 HMGB1 强表达,表达由强到弱依次为 SAP 组>治疗组>对照组,从 6 h 开始表达加强,至 24 h 持续上升。TLR4 在对照组胰腺腺泡细胞质有少量表达,SAP 组 TLR4 达阳性率显著高于其他各组,表达由强到弱依次为 SAP 组>治疗组>对照组,从 6 h 开始表达加强,至 12 h 达高峰,24 h 开始降低,见表 4。

表 3 ELISA 中各组不同时间点血清、胰腺中 HMGB1 的蛋白浓度( $\bar{x} \pm s$ ,ng/mL, $n=6$ )

组别	血清中的 HMGB1			胰腺中的 HMGB1		
	术后 6 h	术后 12 h	术后 24 h	术后 6 h	术后 12 h	术后 24 h
对照组	173.3±11.2	183.4±10.5	190.6±13.7	210.7±13.3	208.1±14.8	223.3±14.3
SAP 组	236.2±14.7 <sup>a</sup>	292.3±28.2 <sup>a</sup>	351.9±36.5 <sup>a</sup>	238.5±15.7 <sup>a</sup>	327.6±30.2 <sup>a</sup>	362.7±41.3 <sup>a</sup>
治疗组	212.1±13.2 <sup>ab</sup>	236.2±23.6 <sup>ab</sup>	288.5±29.7 <sup>ab</sup>	213.7±11.3 <sup>ab</sup>	281.3±27.3 <sup>ab</sup>	307.4±35.2 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与对照组相同时间点组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与 SAP 组相同时间点比较。

表 4 免疫组织化学中各组不同时间点胰腺中 HMGB1、TLR4 阳性细胞评分( $\bar{x} \pm s$ ,分, $n=6$ )

组别	HMGB1			TLR4		
	术后 6 h	术后 12 h	术后 24 h	术后 6 h	术后 12 h	术后 24 h
对照组	0.109±0.020	0.148±0.023	0.151±0.027	0.096±0.010	0.112±0.021	0.129±0.021
SAP 组	2.671±0.431 <sup>a</sup>	3.580±0.573 <sup>a</sup>	3.812±0.641 <sup>a</sup>	2.872±0.523 <sup>a</sup>	3.611±0.787 <sup>a</sup>	3.416±0.709 <sup>a</sup>
治疗组	2.163±0.324 <sup>ab</sup>	2.881±0.684 <sup>ab</sup>	3.021±0.512 <sup>ab</sup>	2.166±0.674 <sup>ab</sup>	2.613±0.746 <sup>ab</sup>	2.431±0.635 <sup>ab</sup>

<sup>a</sup>: $P < 0.05$ ,与对照组比较;<sup>b</sup>: $P < 0.05$ ,与 SAP 组比较。

### 3 讨 论

SAP 病情重,病死率高,其确切发病机制尚未完全明了,因此探讨 SAP 发病机制中的信号传导通路并中断该通路具有重要意义。HMGB1 是真核细胞核内的非 DNA 结合蛋白,分布于胰、肺、肝、肾、淋巴等组织细胞中。作为晚期炎症介质的 HMGB1 可通过多条途径促使炎症反应增强,最终使炎症失控迁延<sup>[5]</sup>,Mouri 等<sup>[6]</sup>从基因水平上初步揭示 HMGB1 与其他炎症介质之间相互加强的分泌效应,并由此形成复杂的分泌调节网络。当细胞受损或坏死时,核内 HMGB1 释放到细胞外,激活炎性及免疫反应,使单核、巨噬等细胞分泌促炎因子;而促炎因子反过来又促使 HMGB1 分泌从而形成正反馈环路,使炎症反应加重、放大<sup>[7]</sup>。HMGB1 中最重要的受体是 TLRs 和晚期糖基化终末产物受体(RAGE),Nogueira-Machado 等<sup>[8]</sup>研究证实 HMGB1、TLR、RAGE 三者相互作用构成了一个三足鼎立的局面,HMGB1 介导的损伤和炎症在其中起着核心作用, Park 等<sup>[9]</sup>发现 TLR4 可作为 HMGB1 受体与 HMGB1 结合,通过 MyD88 依赖性途径,最终导致 NF- $\kappa$ B 的移位。TLRs 发现于果蝇,是一类天然免疫受体家族,TLRs 被认为是炎症瀑链式反应的闸门<sup>[1]</sup>。Zhang 等<sup>[10]</sup>研究证明,LR4 在 SAP 的发病早期就参与了机体的免疫反应,最终触发炎症级联反应。因此,以 TLR4 为靶点控制这种瀑链式炎症反应的有序性,可能是解决类似临床问题的新方向<sup>[1]</sup>。

在本研究中,SAP 组、治疗组胰腺组织中 HMGB1、TLR4 的表达均较对照组明显上调,胰腺组织病理评分(Schimdt 评分)也高于对照组,表明 SAP 胰腺损伤与 HMGB1、TLR4 的异常表达有关,其机制可能是 TLR4 可作为 HMGB1 受体与 HMGB1 结合,并可能通过以 MyD88 依赖性途径及 TRIF 依赖性途径诱导 TNF- $\alpha$ 、NF- $\kappa$ B 等炎症因子的释放<sup>[9]</sup>。本研究发现, HMGB1 表达上升比 TLR4 晚;胰腺中和血清及胰腺组织中的 HMGB1 数据都提示,从 6 h 开始表达加强,至 24 h 持续上升,进一步证明 HMGB1 可能是晚期炎症介质;而用免疫组织化学检测胰腺中的 TLR4,发现从 6 h 开始表达加强,至 12 h 达高峰,到 24 h 开始降低,则进一步证明 TLR4 可能是炎症反应启动闸门。

乌司他丁是一种单链多肽糖蛋白,对胰蛋白酶、透明质酸酶等多种酶有抑制作用,还具有稳定溶酶体膜,抑制溶酶体酶的释放,并通过阻断蛋白酶所介导的中性细胞聚集,清除氧自由基,抑制炎症介质和细胞因子释放<sup>[11]</sup>,减轻 SAP 中 SIRS 并预防 MODS 的发生。刘淑霞等<sup>[12]</sup>研究证实 HMGB1 在小鼠狼疮性肾炎中的致炎作用可能部分通过结合其受体 TLR2,激活 NF- $\kappa$ B 信号途径而实现的;米亚英等<sup>[13]</sup>实验证明类风湿关节炎患者血清 HMGB1 及外周血单核细胞表面 TLR2、TLR4 的表达可能与类风湿关节炎病情发生、发展有关,且具协同作用;杨野等<sup>[14]</sup>实验显示 HMGB1 作为晚期炎症介质可能参与了 SAP 肝损伤的病理生理过程;向珂等<sup>[15]</sup>实验证明 NF- $\kappa$ B 及 TLR4 在 SAP 发病机制中具有重要枢纽作用,乌司他丁腹腔灌注能减轻胰腺组织及全身的损害。本研究中,治疗组胰腺组织中 HMGB1、TLR4 的表达均较 SAP 组明显减轻,血清淀粉酶、胰腺组织病理评分也明显低于 SAP 组,差异均有统计学意义( $P < 0.05$ ),表明乌司他丁能显著改善 SAP 严重程度。

综上所述, HMGB1 在 SAP 大鼠胰腺中的致炎作用可能是部分结合其受体 TLR4 并通过 MyD88 依赖性途径而实现的,而乌司他丁可能是通过中断 SAP 大鼠胰腺组织中的 HMGB1、TLR4 信号通路发挥保护作用。因此,以 HMGB1 及

其受体 TLR4 为治疗靶点,通过中断 HMGB1、TLR4 通路,可望用于治疗 SAP。

### 参考文献:

- [1] 卫文俊,陶霖玉,李蓉,等. 乌司他丁对重症急性胰腺炎患者早期外周血单核细胞 Toll 样受体 4 表达的影响[J]. 东南大学学报:医学版,2012,31(1):97-100.
- [2] Wang H, Li W, Goldstein R, et al. HMGB1 as a potential therapeutic target[J]. Novartis Found Symp, 2007, 280(1):73-85.
- [3] Zhang JX, Dang SC, Qu JG, et al. Preventive effect of tetramethylpyrazine on intestinal mucosal injury in rats with acute necrotizing pancreatitis[J]. World J Gastroenterol, 2006, 12(39):6386-6390.
- [4] Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy[J]. Ann Surg, 1992, 215(1):44-56.
- [5] Yan Y, Min X, Rui K, et al. HMGB1 is a therapeutic target for leukemia[J]. Am J Blood Res, 2012, 2(1):36-43.
- [6] Mouri F, Tsukada J, Mizobe T, et al. Intracellular HMGB1 transactivates the human IL1B gene promoter through association with an Ets transcription factor PU. 1. [J]. Eur J Haematol, 2008, 80(1):10-19.
- [7] 刘旺华,李花. 高迁移率族蛋白 B-1 与炎症关系的研究进展[J]. 中国病理生理杂志, 2008, 24(8):1656-1660.
- [8] Nogueira-Machado JA, Volpe CM, Veloso CA, et al. HMGB1, TLR and RAGE: a functional tripod that leads to diabetic inflammation[J]. Expert Opin Ther Targets, 2011, 15(8):1023-1035.
- [9] Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors[J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2006, 290(3):917-924.
- [10] Zhang X, Zhu C, Wu D, et al. Possible role of toll-like receptor 4 in acute pancreatitis[J]. Pancreas, 2010, 39(6):819-824.
- [11] Park WY, Goodman RB, Steinberg KP, et al. Cytokine balance in the lungs of patients with acute respiratory distress syndrome[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2001, 164(10 Pt 1):1896-1903.
- [12] 刘淑霞,郝军,郭惠芳. HMGB1/TLR/NF- $\kappa$ B 在狼疮性肾炎小鼠肾组织中的表达及意义[J]. 中国免疫学杂志, 2009, 5(25):450-453.
- [13] 米亚英,杨丽丽,孙利平. HMGB1 及 TLR2, TLR4 在类风湿关节炎中的表达及意义[J]. 基础医学与临床, 2013, 33(4):476-479.
- [14] 杨野,栾正刚,郭仁宣. 重症急性胰腺炎大鼠肝组织 HMGB1 表达与肝功能损害的关系[J]. 中国医科大学学报, 2008, 37(6):343-345.
- [15] 向珂,汤礼军,陈涛,等. NF- $\kappa$ B 和 TLR4 在重症急性胰腺炎大鼠中的表达及乌司他丁腹腔灌注的影响[J]. 广东医学, 2010, 31(24):3168-3170.