

基础研究

DOI:10.3969/j.issn.0253-3626.2012.02.007

HMGB1 表达水平与慢性阻塞性肺病大鼠模型气道、肺血管重构的关系及其临床意义

王昌明, 蒋 明, 王会娟, 曾锦荣, 莫碧文, 陈梅晞, 韦江红, 王绩英

(桂林医学院附属医院呼吸内科, 桂林 541001)

【摘要】目的:探讨慢性阻塞性肺病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)大鼠模型气道、肺血管重构与高迁移率族蛋白 B1(High mobility group protein B1, HMGB1)表达水平的相关性。方法:健康无特定病原体(Specific pathogen free, SPF)级 SD 雄性大鼠 24 只,分为 3 组,每组 8 只。正常对照组(A):正常饲养 6 周;COPD 组(B):第 1、14 天经气道内注入脂多糖(Lipopolysaccharide, LPS)溶液,200 μ g/次,烟熏 1 h/d,共 6 周;COPD 并低氧组(C):第 1、14 天经气道内注入 LPS,200 μ g/次,熏香烟 1 h/d,共 6 周,实验最后 2 周在烟熏的同时,给予 18%低氧 8 h/d。造模结束后观测各组大鼠气道炎症、重构以及肺小动脉的病理改变,用 Western blot 检测各组肺组织中 HMGB1 蛋白的表达。结果:①B、C 组气道重构指标细支气管管壁厚度与气管外径比值(MT%)、管壁面积和气管总面积比值(MA%)与 A 组比较均明显增高($P<0.05$)。②B、C 组肌化型动脉百分比与 A 组相比增多($P<0.05$);C 组肺小动脉管壁厚度与血管外径比值(WT%)以及管壁面积与血管总面积比值(WA%)与 A 组相比较均增大($P<0.05$)。③Western blot 电泳结果显示:B、C 组 HMGB1 蛋白表达水平与 A 组相比明显增强($P<0.05$),C 组较 B 组 HMGB1 蛋白表达增强($P<0.05$)。结论:随着 COPD 疾病进展出现进行性加重的气道、肺血管重构,同时 HMGB1 的表达逐渐增强,说明 HMGB1 的表达与 COPD 的气道、肺血管重构有关。

【关键词】高迁移率族蛋白 B1;慢性阻塞性肺疾病;气道重构;肺血管重构

【中国图书分类法分类号】R322;R331;R361⁺.2;R544.1

【文献标志码】A

【收稿日期】2011-11-10

The correlation between the expression of HMGB1 and the airway remodeling, pulmonary vascular reconstruction in rats with chronic obstructive pulmonary disease and clinical significance

WANG Changming, JIANG Ming, WANG Huijuan, ZENG Jinrong,

MO Biwen, CHEN Meixi, WEI Jianghong, WANG Jiying

(Department of Respiratory Disease, the Affiliated Hospital of Guilin Medical College)

【Abstract】Objective: To investigate the correlation between the expression of HMGB1 and the airway remodeling, pulmonary vascular reconstruction in COPD. **Methods:** 24 SD rats were divided into 3 groups randomly. Healthy control group (Group A): rats were bred for 6 weeks in normal circumstance before controlling a test later. COPD group (Group B): 200 μ g LPS was instilled intratracheally once on d1 and d14 in all rats. These rats were exposed to cigarette smoke 1 h/d for 6 weeks. COPD and chronic hypoxia group (Group C): 200 μ g LPS was instilled intratracheally once on d1 and d14 and the rats were exposed to cigarette smoke 1 h/d for 6 weeks. In the last 2 weeks chronic hypoxia (FiO₂=0.18) 8 h/d were performed simultaneously. We studied airway wall remodeling and morphologic changes of small pulmonary arteries. The positive expression of HMGB1 in lung tissue was examined by Western blot. **Results:** ① Compared with group A, the ratio of bronchial wall thickness over bronchial external diameter (MT%) and the ratio of bronchial wall area over total area (MA%) were significantly higher in group B&C ($P<0.05$). ② The muscularization of intra-aveolar arteries in group B&C was more severe than that in group A ($P<0.05$). The cross-sectional medial vascular wall area of pulmonary arteries was increased significantly in group C ($P<0.05$). ③ Western blot showed that compared with group A, the expression of HMGB1 protein in group B&C was significantly increased ($P<0.05$). The expression of HMGB1 protein in group C was higher than that of group B ($P<0.05$). **Conclusion:** With the progression of COPD, the airway remodeling and pulmonary vascular reconstruction aggravates progressively, while the expression of HMGB1 is increased in lung tissue. There may be some relevance between the expression of HMGB1 and the

作者简介:王昌明(1963-),男,教授,博士,

研究方向:肺动脉高压,肺纤维化的防治。

基金项目:广西卫生厅资助项目(编号:重 200977);广西科技厅资助项目(编号:桂科自 0679012);桂林市课题资助项目(编号:市科[2007]0512 号)。

airway remodeling, and pulmonary vascular reconstruction.

【Key words】high mobility group protein B1; chronic obstructive pulmonary disease; pulmonary vascular reconstruction; airway remodeling

慢性阻塞性肺疾病(Chronic obstructive pulmonary disease, COPD)是一种呈进行性发展的肺部非特异性炎症性疾病,以气流受限不完全可逆为主要特征。COPD 气流受限的主要病理基础是气道重塑,小气道的慢性炎症刺激是气道重塑的主要原因。随着病程进展,COPD 可引起肺血管异常,最终导致肺动脉高压(Pulmonary arterial hypertension,PAH)发生。COPD 并发 PAH 形成的机制和主要病理表现之一是肺血管重构。COPD 早期的肺血管重构与 COPD 慢性炎症相关^[1]。高迁移率族蛋白 B1(High mobility group protein B1,HMGB1)是广泛存在于真核细胞核中重要的非组蛋白之一,具有多种核外的生物学功能,与诱导炎症反应、细胞分化、细胞迁移、细胞增殖与凋亡等密切相关,特别是其作为细胞因子广泛参与炎症反应^[2]亦可间接促进核因子- κ B(Nuclear factor kappa κ B,NF- κ B)、血管内皮生长因子(Vascular endothelial growth factor, VEGF)、肿瘤坏死因子- α (Tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、转化生长因子- β (Transforming growth factor- β ,TGF- β)的表达。本实验着重研究 COPD 气道炎症、气道以及肺血管重构与 HMGB1 的关系,为 COPD 的形成机制及早期防治提供理论支持和思路。

1 材料与方法

1.1 材料

动物:健康 SPF 级 SD 雄性大鼠 24 只(桂林医学院动物实验中心提供),体重(200 ± 20) g,在室温、安静和避强光环境中自由饮水和进食;药物及试剂:脂多糖(Lipopolysaccharide,LPS)(美国 Sigma 公司),HMGB1 兔单克隆抗体(美国 epitomics 公司),辣根过氧化物酶标记的羊抗兔二抗(美国 santa cruz), β -actin 小鼠单克隆抗体,甲天下牌烤烟型香烟(广西卷烟厂出品,焦油量:14 mg,烟气烟碱量:1.2 mg),医用氮气,无水氯化钙,钠石灰,总蛋白提取试剂盒,BCA 蛋白定量试剂盒,DAB 辣根过氧化物酶显色试剂盒(北京博奥森);主要仪器及设备:自制 $91 \text{ cm} \times 42 \text{ cm} \times 62 \text{ cm}$ 有机玻璃舱;OX-100A 数字测氧仪;Bio-rad 蛋白电泳及转膜仪。

1.2 方法

1.2.1 动物模型的建立 适应环境 1 周后,用随机数字表法分为正常对照组(A)、COPD 组(B)、COPD 并低氧组(C),每组 8 只。制作动物模型 A 组:正常饲养 6 周后检测。B 组:于实验第 1、14 天经气道内注入 LPS,200 $\mu\text{g}/\text{次}$,予自制有机玻璃舱内烟熏 1 h/d,共 6 周。将大鼠放入舱内,点燃香烟,舱内小孔与外界空气相通,保持舱内气压与外界相等,舱内放置无水氯化钙吸收水分、钠石灰吸收二氧化碳。C 组:于实验第 1、14 天经气道内注入 LPS 溶液,200 $\mu\text{g}/\text{次}$,烟熏 1 h/d,共 6 周,实验最后 2 周在烟熏同时,给予低氧 8 h/d(往舱内注入氮气调节氧浓度,使测氧仪监测氧浓度稳定于 18%)。

1.2.2 病理标本制备 取大鼠右肺中叶,向肺内注射 10%中性福尔马林直至肺膨胀,结扎肺门,浸泡于 10%中性福尔马林中固定,24 h 内右中叶距肺门 2~3 mm 处取材,常规石蜡包埋、切片。行 HE 染色、Van-Gieson + 维多利亚蓝染色。观察

以下指标:①气道重构指标,200 倍镜下任选 5 个视野测定直径 $\leq 100 \mu\text{m}$ (管腔最短径/最长径 $I \geq 0.7$)的细支气管的管壁厚度、管壁面积、气管总面积和外径,然后计算管壁面积和气管总面积比值(MA%)及管壁厚度与气管外径比值(MT%);②肺血管重塑评价,200 倍镜下测定直径 $<100 \mu\text{m}$ 的肺腺泡内肺动脉总数并分类,计算非肌性动脉(Nonmuscular artery,NMA)、部分肌性动脉(Partial muscular artery,PMA)和肌性动脉(Muscular artery,MA)3 型动脉构成比。400 倍镜下对直径 50~100 μm 的 MA 进行图像分析,计算管壁面积与血管总面积比(WA%)、管壁厚度与血管外径比(WT%)。

1.2.3 Western blot 方法检测 HMGB1 蛋白含量 参照《分子克隆》方法,提取肺组织总蛋白,测定总蛋白浓度用 BSA 试剂盒。计算上样量,使每孔蛋白上样量一致。SDS-PAGE 凝胶电泳后转移至 PVDF 膜上,将膜用(PBST+5%的脱脂奶粉)封闭后,加入抗 HMGB1 单抗(稀释度 1:10 000),室温孵育 2 h,将膜漂洗 3 次后加入二抗山羊抗兔 IgG(稀释度 1:5 000)室温孵育 1 h,用 PBST 将膜漂洗 3 次,加入化学发光试剂,X 线胶片曝光显影记录影像。结果用凝胶成像分析系统分析,计算相对表达量,以 HMGB1 与 β -actin 比值作为相对表达水平。

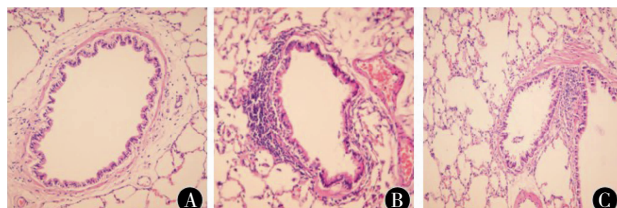
1.3 统计学分析

使用 SPSS 17.0 统计软件进行数据分析,各组数据用 $\bar{x} \pm s$ 描述。不同组间数据采用单因素方差分析,方差齐采用 SNK 法,不齐则采用 Games-Howell 法,HMGB1 表达与 COPD 气道及血管重塑之间进行相关性分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理学改变

本实验病理结果显示,A 组属正常气道结构,无炎症细胞浸润,管壁完整。B 组气道管壁有炎症细胞浸润,可见细支气管变短、纤毛倒伏、粘连,细支气管上皮黏液杯状细胞增生,可见肺大泡形成;A、B 组均未见明显的肺血管改变。C 组气道管壁可见大量炎症细胞浸润,管壁黏膜充血水肿,纤毛倒伏加重,气道平滑肌及黏液杯状细胞增生明显,局部可见肺泡壁及肌层断裂;C 组可见肌化型动脉百分比增高,肺血管壁增厚。以上结果说明 B、C 组的病理表现符合 COPD 和 COPD 并肺血管重构的病理改变(见图 1、2)。



A 组正常支气管和肺泡结构;B 组细支气管壁周围大量炎细胞浸润;C 组细支气管壁周围大量炎细胞浸润、肺泡壁断裂、黏液杯状细胞增生明显

图 1 肺组织病理学改变(HE 染色,200 $\times$)

Fig.1 Changes of pathology in lung(HE strains,200 $\times$)

2.2 气道重构检测

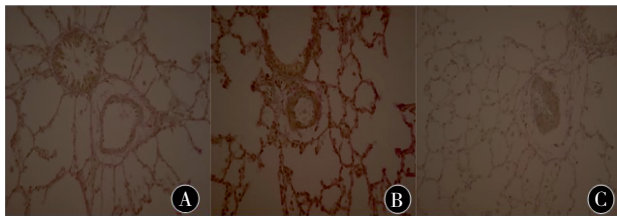
B、C 组气道重构指标 MA%、MT% 与 A 组相比均明显增高 ($P < 0.05$)。气道重构指标结果说明 B、C 组细支气管壁中膜肌层较 A 组增厚 (见表 1、图 3)。

表 1 气道重构指标 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.1 Analysis of indexes of airway remodeling ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MT%	MA%
A	8	5.86 ± 3.42	13.76 ± 1.39
B	8	8.42 ± 5.47*	20.45 ± 2.62*
C	8	9.35 ± 6.68*	22.36 ± 1.58*

注: MT%: 支气管壁厚度与气管外径比值; MA%: 支气管壁面积与气管总面积之比; 与 A 组比较, *, $P < 0.05$



A 组正常肺血管结构; B 组肌化型动脉管壁厚度尚未明显增加; C 组肌化型动脉管壁厚度明显增加, 壁中膜肌层肥厚较 B 组增加, 壁中膜肌层肥厚较 B 组增加

图 2 各组肺血管结构的改变

(VG+ 维多利亚蓝三联染色, 400 ×)

Fig.2 Structural changes of pulmonary vascular in groups

(VG& Victoria blue strains, 400 ×)

2.3 肺血管结构改变

各组与 A 组比较结果: B 组肌化型动脉百分比增高 ($P < 0.05$), 未出现肺血管壁的增厚; C 组肌化型动脉百分比增高, 同时 WT%、WA% 比值增高 ($P < 0.05$), 结果提示 C 组出现明显的肺血管重构。B 组肌化型动脉管壁厚度尚未增加, 仅出现肌化型动脉数量增多, 提示 B 组肺血管改变处于血管重构早期 (见表 2、图 2)。

2.4 大鼠肺组织 HMGB1 蛋白含量

正常情况下大鼠肺组织中有少量的 HMGB1 表达, B、C 组肺组织中可见 HMGB1 表达较 A 组明显增强 ($P < 0.05$)。B 组 HMGB1 蛋白表达低于 C 组 ($P < 0.05$)。B、C 组 HMGB1 蛋白表达逐渐增强 ($P < 0.05$) (见表 3、图 4)。

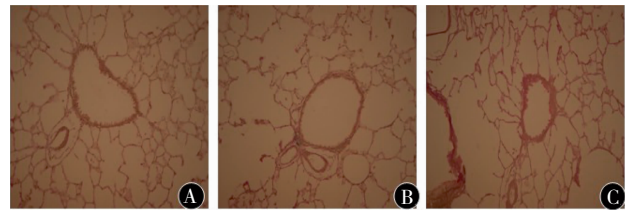
表 2 肺血管重构指标 ($\bar{x} \pm s$)

Tab.2 Analysis of indexes of pulmonary vascular reconstruction ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	MA%	PMA%	NMA%	WT%	WA%
A	8	20.69 ± 1.87	17.42 ± 1.62	61.89 ± 5.31	17.55 ± 1.76	42.84 ± 4.53
B	8	34.52 ± 1.56*	15.25 ± 1.96	50.23 ± 2.42*	21.23 ± 1.88#	46.82 ± 4.76#
C	8	36.63 ± 2.13*	15.03 ± 5.23	48.34 ± 2.36*	29.32 ± 2.15*	63.15 ± 3.94*

注: WA%: 管壁面积与血管总面积比; WT%: 计算管壁厚度与血管外径比; 与 A 组比较 *, $P < 0.05$; 与 C 组比较 #, $P < 0.05$

MA%: B、C 组与 A 组比较采用单因素方差分析, P 值分别为 0.000、0.000; NMA%: B、C 组与 A 组比较采用单因素方差分析, P 值分别为 0.000、0.000; WT%: B、C 组与 A 组比较采用单因素方差分析, P 值分别为 0.065、0.000; MT%: B、C 组与 A 组比较采用单因素方差分析, P 值分别为 0.061、0.000



注: A 组正常肺血管结构; B 组肌化型动脉管壁厚度尚未明显增加; C 组肌化型动脉管壁厚度明显增加, 壁中膜肌层肥厚较 B 组增加

图 3 各组气道结构的改变

(VG+ 维多利亚蓝三联染色, 400 ×)

Fig.3 Structural changes of airway in groups

(VG& Victoria blue strains, 400 ×)

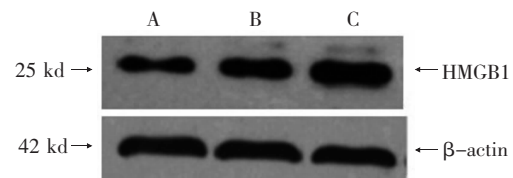


图 4 各组大鼠肺组织 HMGB1 蛋白的表达

Fig.4 Western blot amplification of HMGB1 protein in groups

HMGB1 蛋白表达 B、C 组与 A 组比较, B 组与 C 组采用单因素方差分析, P 值分别为 0.000、0.000、0.032。

2.5 相关性分析

将实验组气道重构指标 MT% 和肺血管重构指标 WT% 与大鼠肺组织内 HMGB1 蛋白的表达量进行相关性分析, 发现气道重构指标 MT%、肺小动脉 WT% 分别和 HMGB1 蛋白的表达呈正相关 (r 分别为 0.637、0.703, P 均 < 0.05 , P 值分别为 0.010、0.000)。

3 讨论

HMGB1 是一个新发现的具有显著促炎效应的细胞因子, 具有丰富的生物学功能, 它可以被分泌到胞质或胞外, 诱导细胞分化, 产生趋化作用, 作为重要的炎症因子在机体炎症反应中起重要作用^[9]。研究发现, HMGB1 可通过内分泌和旁分泌形式作用于单核细胞、内皮细胞等, 使其表达一系列炎性介质和炎症因子如: VEGF、TNF- α 、单核细胞趋化蛋白-

表 3 肺组织内 HMGB1 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$)Tab.3 Expression of HMGB1 protein in groups ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HMGB1/ β -actin
A	8	0.581 $\pm$ 0.030
B	8	1.246 $\pm$ 0.257*
C	8	1.525 $\pm$ 0.095#

注:与 A 组比较,*, $P < 0.05$;与 B 组比较,#, $P < 0.05$

1 (Monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)、白细胞介素-8 (IL-8) 等^[4];这些炎性介质和炎症因子又可进一步促进 HMGB1 的释放,从而形成恶性循环,导致炎症反应逐级放大^[5]。如:HMGB1 可通过 Toll 样受体 4 等,激活 NF- κ B 信号通路^[6],加剧炎症级联瀑布反应;HMGB1 进一步活化巨噬细胞,促进 TNF- α 、IL-1 β 、IL-10、IL-6 等促炎性细胞因子与巨噬细胞炎性蛋白 (MIP)-1A 等趋化因子的释放。在 COPD 中, HMGB1 可能通过一系列的炎症因子 NF- κ B、VEGF、TNF- α 、MCP-1、IL-6、IL-8 参与肺部的炎症。本实验中 HMGB1 的表达在 COPD 组增加,而在 COPD 并低氧组增加更明显,可见 HMGB1 与 COPD 肺部炎症关系密切。

COPD 的特点是气道炎症和气管重构,肺血管重构在 COPD 的发生、发展中起着重要作用,气道炎症的持续发展是 COPD 早期肺动脉重塑及气道重构的关键因素^[1,7]。缺氧性血管收缩在 COPD 患者 PAH 发病机制中起到关键的作用,但近年来的研究表明在 COPD 早期已经开始了肺血管重构^[8],但其重构原因并不是低氧。本实验中虽然 COPD 并低氧组气道及肺血管重构均较对照组及 COPD 组明显,COPD 组肺血管 WT%、WA% 也并未增大,但在未叠加低氧的 COPD 组肌化型动脉百分比已经发生变化,说明其肺血管重构处于早期。可见早期肺血管重构的原因可能是与 COPD 慢性气道及肺部炎症相关的因素,包括炎症介质、致炎因素及炎症过程。HMGB1 可通过作用一些炎症介质来干预 NO、ET-1、VEGF、FGF、TGF- β 等的调节,进而影响肺血管重构。有研究表明 HMGB1 可能通过 IL-1 β 和晚期糖化终产物参与 COPD 气道炎症和重构^[9]。本实验中 Western blot 结果表明, HMGB1 的表达与气道、肺血管结构的病理变化基本一致,提示随着气道、肺血管重构的发展, HMGB1 蛋白的表达也呈现逐渐增加的趋势。前期动物实验也证实 COPD 疾病进展期的肺血管、气道重构与 NF- κ B 的表达呈正相关^[10]。说明 NF- κ B、HMGB1 均与 COPD 的气道、肺血管重构密切相关, HMGB1 在炎症过程中具有潜在的中心作用,这使 HMGB1 成为抗炎治疗的新靶向分子。

HMGB1 可能是 COPD 发病中多种炎性介质、细胞因子表达的基本转录调控因子,可通过抑制其表达来调控参与炎

症反应的多种因子。HMGB1 的表达水平与 COPD 气道、肺血管重构密切相关,其或可作为 COPD 治疗的另一潜在靶点,为临床上 COPD 的防控提供帮助。

参 考 文 献

- [1] Barbera J A, Blanco I. Pulmonary hypertension in patients chronic Obstructive pulmonary disease advances in pathophysiology and management[J]. Drugs, 2009, 69(9):1153-1171.
- [2] Grasser M, Lentz A, Lichota J, et al. The arabidopsis genome encodes structurally and functionally diverse HMGB-type proteins[J]. J Mol Biol, 2006, 358(3):654-664.
- [3] Yamada S, Maruyama I. HMGB1, a novel inflammatory cytokine[J]. Clin Chim Acta, 2007, 375(1/2):36-42.
- [4] Shu Z, Wei L, Mary F, et al. High mobility group box 1 protein as a potential drug target for infection-and injury-elicited inflammation[J]. Inflamm Allergy Drug Targets, 2010, 9(1):60-72.
- [5] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMGB1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice[J]. Science, 1999, 285(5425):248-251.
- [6] Penzo M, Molteni R, Suda T, et al. Inhibitor of NF- κ B kinases α and β are both essential for high mobility group box 1-mediated chemotaxis[J]. The Journal of Immunology, 2010, 184(8):4497-4509.
- [7] 钟小宁, 郭韶梅. 慢性支气管炎与肺气肿大鼠肺血管炎症的实验研究[J]. 中华结核和呼吸杂志, 2006, 29(7):435-439.
- [8] Zhong X N, Guo S M. An experimental study on pulmonary vascular inflammation in a rat model of chronic bronchitis and emphysema[J]. Chinese Journal of Tuberculosis and Respiratory Diseases, 2006, 29(7):435-439.
- [9] Ferhani N, Letuve S, Kozhich A, et al. Expression of high-mobility group box 1 and of receptor for advanced glycation end products in chronic obstructive pulmonary disease[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2010, 181(9):917-927.
- [10] Weitzenblum E, Chaouat A, Canuet M, et al. Pulmonary hypertension in chronic obstructive pulmonary disease and interstitial lung diseases[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2009, 30(4):458-470.
- [11] 王昌明, 蒋明, 谭宁, 等. NF- κ B 表达水平与小鼠慢性阻塞性肺疾病气道、肺血管重构的相关性[J]. 中国药理学通报, 2010, 26(11):1495-1500.
- [12] Wang C M, Jiang M, Tan N, et al. The correlation between the expression of NF- κ B and the airway remodeling, pulmonary vascular reconstruction in rats with chronic obstructive pulmonary disease[J]. Chinese Pharmacological Bulletin, 2010, 26(11):1495-1500.

(责任编辑:冉明会)