

清热化痰中药复方对急性肝衰竭大鼠 肝组织 HMGB1 表达的干预研究

扈晓宇*, 张扬

(成都中医药大学附属医院感染科, 成都 610075)

[摘要] 目的: 观察清热化痰中药复方——清肝方对急性肝衰竭(acute liver failure, ALF)大鼠高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)表达的影响, 从 mRNA 水平探讨其抗 ALF 的机制。方法: 采用 D-氨基半乳糖(D-GalN)单次腹腔注射构建 ALF 大鼠模型, 125 只 SD 大鼠以是否接受造模和药物干预随机分为空白组、模型组、复方甘草酸苷组和清肝方组, 每组再以 36, 96 h 2 个时间点继续随机分为 1, 2 两个亚组, 共 8 组, 其中亚组 1 用于造模后 36 h 取血及肝组织标本, 亚组 2 用于 96 h 后观察大鼠的生存率。用全自动生化分析法检测血清丙氨酸转氨酶(ALT)、天冬氨酸转氨酶(AST)和总胆红素(TBiL); 全自动凝血分析法检测血浆凝血酶原时间(PT); 常规 HE 染色作肝组织病理学观察。实时荧光定量(RT-PCR)检测 HMGB1 mRNA 的表达变化, 以管家基因 β -actin 为对照, $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因相对表达量。结果: 模型组、复方甘草酸苷组及清肝方组估计平均生存时间分别为 64.6, 71.9, 83.3 h; log-rank 检验提示清肝方组累积生存率高于模型组($P < 0.05$)。空白组、清肝方组和复方甘草酸苷组肝组织 HMGB1 RNA/ β -actin 值均显著降低($0.006 \pm 0.003, 0.067 \pm 0.033, 0.112 \pm 0.027$ vs 0.245 ± 0.153 , 均 $P < 0.01$), 清肝方组低于复方甘草酸苷组($P < 0.01$)。与模型组相比, 空白组、清肝方组和复方甘草酸苷组在血清 ALT, AST, TBiL 和血浆 PT 水平方面与模型组相比均明显下降($P < 0.01$), 清肝方组低于复方甘草酸苷组($P < 0.01$)。清肝方组和复方甘草酸苷组肝组织损害程度积分与模型组相比明显下降($1.84 \pm 0.13, 2.85 \pm 0.20$ vs 3.56 ± 0.24 , 均 $P < 0.01$), 清热化痰复方组低于复方甘草酸苷组($P < 0.01$)。结论: 清肝方可有效改善 D-GalN 诱导的大鼠的肝功能、凝血功能及肝脏病理, 降低死亡率, 其发挥作用的分子机制与抑制 HMGB1 的表达有关。

[关键词] 清肝方; 急性肝衰竭; 清热化痰; 生存率; 高迁移率族蛋白 B1

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2013)02-0172-06

[网络出版地址] <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20121107.1343.012.html>

[网络出版时间] 2012-11-7 13:43

[收稿日期] 20120901(006)

[基金项目] 国家“十一五”科技重大专项课题项目(2008ZX10005, 2009ZX10005); 国家自然科学基金项目(81273748); 四川省科技厅重大科技招标基金项目(310312); 四川省中医药管理局中医药科学技术研究专项(2012-A-097)

[通讯作者] * 扈晓宇, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 从事中医药防治感染性疾病及中晚期恶性肿瘤的临床及实验研究, Tel: 028-87765459, E-mail: meddmail@yahoo.com.cn

[7] Brewer J W, Hendershot L M, Sherr C J, et al. Mammalian unfolded protein response inhibits cyclin D₁ translation and cell-cycle progression[J]. Proc Natl Sci U S A. 1999, 96(15):8505.

[8] Ajehnum F, Ando K, Decpario J A, et al. Independent regulation of human D-type cyclin gene expression during G₁ phase in primary human T lymphocytes[J]. J Biol Chem, 1993, 268(6):4113.

[9] Fukada T, Ohtani T, Yoshida Y, et al. STAT3 orchestrates contradictory signals in cytokine-induced G₁

to Scell-cycletransition [J]. EMBO J, 1998, 17(22):6670.

[10] Akama Y, Yasui W, Yokozkai H, et al. Frequent amplification of the cyclin E gene in human gastric carcinomas[J]. JPN J Cancer Res, 1995, 86(7):617.

[11] Khool M L, Freeman J L, Witterick I J, et al. Underexpression of p27/Kip in thyroid papillary microcarinoma with gross metastasis disease [J]. Arch Otolaryngol Head Neck Surg, 2002, 128(3):253.

[责任编辑 聂淑琴]

Effect of Qingre Huayu Decoction on Expression of HMGB1 in Liver Tissue of Acute Liver Failure Rats

HU Xiao-Yu*, ZHANG Yang

(Department of Infectious Diseases, Affiliated Hospital of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China)

[Abstract] Objective: To observe the effect of Qingre Huayu decoction (Qinggan decoction) on expression of high mobility group box 1 protein (HMGB1) in liver tissue of acute liver failure (ALF) rats, and to explore the mechanism of anti-ALF from mRNA level. **Method:** Rats were injected intraperitoneally with *D*-GalN 1.4 g·kg⁻¹ to induce ALF rat model. One hundred and twenty five SD rats were randomly divided into four groups, that was normal group, model group, Stronger Neo-Minophagen C (SNMC) group and Qinggan decoction group according to whether or not to accept the modeling and drug intervention. Each group was further randomly divided into two subgroups according to different time points, a total of 8 groups. The first subgroup was used to collect blood and liver tissue samples at hour 36, while the second was applied to observe the survival rate of rats at hour 96. Serum alanine aminotransferase (ALT), aspartate aminotransferase (AST) and total bilirubin (TBiL) levels were measured via automatic biochemical analysis; plasma prothrombin time (PT) level was measured via automatic coagulation analysis while for liver pathomorphology observation via HE staining. To detect high mobility group box 1 protein (HMGB1) mRNA expression changes via quantitative RT-PCR, and to calculate the target gene relative expression level of the housekeeping gene β -actin as control by 2^{- $\Delta\Delta C_t$} method. **Result:** After 96-hour treatment, mean survival times of the three groups were 64.6, 71.9, 83.3 hours respectively; cumulative survival rate of rats in Qinggan decoction group was higher than that of rats in model group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the levels of HMGB1 mRNA/ β -actin were remarkably reduced in the normal group, Qinggan decoction group and SNMC group (0.006 ± 0.003 , 0.067 ± 0.033 , 0.112 ± 0.027 vs 0.245 ± 0.153 , all $P < 0.01$). The level of ALT, AST, TBiL and PT were significantly lower in the Qinggan decoction group than in the SNMC group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the levels of ALT, AST, TBiL and PT were remarkably reduced in the normal group, Qinggan decoction group and SNMC group ($P < 0.01$). The level of ALT, AST, TBiL and PT were significantly lower in the Qinggan decoction group than in the SNMC group ($P < 0.01$). Compared with the model group, the level of liver tissue damage degree score was also significantly reduced in the Qinggan decoction group and SNMC group (1.84 ± 0.13 , 2.85 ± 0.20 vs 3.56 ± 0.24 , both $P < 0.01$). The level of liver tissue damage degree score was significantly lower in the Qinggan group than in the SNMC group ($P < 0.01$). **Conclusion:** Qinggan decoction can be effective in improving liver function, blood coagulation, liver pathology and reducing mortality in *D*-GalN-induced acute liver failure rats, and its molecular mechanisms may be related to inhibition of HMGB1 expression.

[Key words] Qinggan decoction; acute liver failure; clearing heat and resolving stasis; survival time; HMGB1

急性肝衰竭(ALF)是多种因素引起的严重肝脏功能损害,出现以凝血障碍和黄疸、肝性脑病为特征的一种暴发性临床综合征,部分进展为多脏器功能衰竭,未经肝移植者死亡率超过90%^[1]。近年来,随着人工肝支持系统为基础的内科综合治疗的不断进步,临床疗效有所提高,但总体病死率仍高达

40%^[2-3]。我们自2007年9月至2010年1月应用前瞻性、队列研究方法,对清热化痰中药复方(清肝方)治疗ALF的临床疗效及对ALF模型大鼠的肝功能及生存期的影响进行了初步观察^[4-5],但尚不清楚其作用机制。近年来的研究表明,高迁移率族蛋白B1(HMGB1)是一种晚期强致炎因子,在内毒素

血症、肝炎、关节炎、急性肺炎和自身免疫性疾病等多种疾病中明显表达^[6-7],是多种炎症性疾病共同的分子靶点。为此,本研究以 HMGB1 为切入点,选择 ALF 疾病模型大鼠为研究对象,从 mRNA 水平探讨清肝方的保肝抗炎机制。

1 材料

1.1 动物 清洁级雌性 SD 大鼠,8 周龄,体质量(180 ± 20) g,共 125 只,购自成都中医药大学实验动物中心,许可证号 SCXK(川)2008-011。

1.2 药物 *D*-氨基半乳糖(*D*-GalN,上海弘邦医药科技有限公司,批号 HB-S0009-20111202),复方甘草酸苷片(日本米诺发源制药株式会社,批号 10111),用前加蒸馏水稀释为 1.56 g·L⁻¹;清肝方(茵陈:败酱草:黄芩:虎杖:生大黄:赤芍 2:4:4:4:1:4,购自成都中医药大学附属医院药局,经成都中医药大学药学院中药鉴定教研室严铸云教授鉴定为正品药材后,水煎、过滤、浓缩至 2.97 g·mL⁻¹,4 °C 保存备用)。

1.3 试剂 Trizol 提取液(美国 Invitrogen 公司,批号 28222),RNA 酶抑制剂(美国 Invitrogen 公司,批号 c10777000),DEPC(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号 0A100120),AMV[普洛麦格(北京)生物技术有限公司(批号 M5101)],引物(桑尼公司合成),dNTP[购自宝生物工程(大连)有限公司,批号 CB601C];*Taq* 酶[天根生化科技(北京)有限公司,批号 17326];Sybrgreen[宝生物工程(大连)有限公司,批号 DRR071A],TBE 缓冲液(北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司,批号 NEP031),6 × loading Buffer[宝生物工程(大连)有限公司,批号 D604]。

1.4 仪器 Pico 17 型台式高速离心机(美国 Thermo Scientific 公司),Unico UV-2000 型紫外分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司);TY3112 型 POWER PAC 3000, DNA SUB CELL(美国 BIO-RAD 公司);GIS-2008 型凝胶成像系统(上海天能科技有限公司);ABI Step-One Plus Real Time PCR System(美国 Applied Biosystems 公司)。

2 方法

2.1 *D*-GalN 造模剂量的筛选及动物模型的构建 分别以 *D*-GalN 1.2,1.4,1.6,1.8 g·kg⁻¹ 单次腹腔注射进行建模预实验,根据动物死亡率、肝脏病理、肝功能损害及相关文献报道^[8],确定 1.4 g·kg⁻¹ 为建模最佳中毒剂量。建模前 12 h 禁食,以 *D*-GalN 1.4 g·kg⁻¹ 单次腹腔注射建立 ALF 大鼠模型。建模

后正常饮水、进食。

2.2 动物分组及给药 125 只 SD 大鼠随机分为空白组、模型组、复方甘草酸苷组和清肝方组,每组再以 36,96 h 2 个时间点继续随机分为 1,2 两个亚组,共 8 组。其中空白组中的两个亚组各有 10 只,其他各组中的亚组 1,2 各有 20,15 只。

所有给药剂量均为《医用实验动物学》“动物与人体的每公斤体重剂量折算系数表”^[9] 折算出的大鼠等效剂量。给药如下:清肝方组大鼠 ig 给予 29.7 g·kg⁻¹ 清肝方;复方甘草酸苷组 15.6 mg·kg⁻¹;ig 容积 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹;空白组与模型组 ig 10 mL·kg⁻¹·d⁻¹ 灭菌蒸馏水。从造模前的第 3 天起定时灌胃,1 次/d。

2.3 标本采集及处理 动物处死前 12 h,禁食不禁水。*D*-GalN 造模 36 h 后,取各亚组 1 只存活大鼠,经股动脉取血 4 mL 置于干燥管中,另 2 mL 置于枸橼酸钠抗凝管中,分离血清作肝功能及凝血功能检测。断颈处死动物后,沿腹正中线剖开皮肤,分离出肝组织,取肝左叶相同部位(1.0 cm × 1.0 cm × 0.2 cm)存放于 10% 中性福尔马林液固定,作常规 HE 染色观察肝脏病理学改变。另取肝右叶置于冰块上,以 PBS 缓冲液清洗干净后,切取 1.0 cm × 1.0 cm × 0.2 cm 大小的肝组织 1 块,用液氮速冻后转运至 -70 °C 冰箱保存备检。

2.4 观察指标及检测方法

2.4.1 一般情况 观察造模 96 h 内各组大鼠行为学变化。

2.4.2 生存率 以腹腔注射的时间为标准点,观察各组大鼠造模后 96 h 的存活情况,并记录其生存时间。

2.4.3 肝功能检测 血清 ALT,AST 及 TBil 测定用全自动生化分析法。

2.4.4 凝血功能检测 血浆 PT 测定用全自动血凝分析法。

2.4.5 病理组织学观察 常规 HE 染色后在光镜下观察,同时对肝脏病变程度作半定量分析,其赋值标准^[10]:“-”为组织结构正常,记 0 分;“+”为可见肝细胞点状坏死,记 1 分;“++”为肝细胞坏死范围 < 1/3,记 2 分;“+++”为肝细胞坏死范围占肝小叶 1/3 ~ 2/3,记 3 分;“++++”为肝细胞坏死范围 > 2/3,记 4 分。由 2 位工作 3 年以上的病理医生读片,结果判定不一致的大鼠不纳入此研究。

2.4.6 RT-PCR 检测 HMGB1 mRNA 表达 ①总 RNA 提取:取冻存的肝组织 0.1 g,采用 Trizol 提取

组织的总 RNA,琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性,紫外分光光度计检测 A,并计算出 RNA 浓度。RNA 抽样电泳图见图 1。②逆转录:逆转录参照 Promega 公司的 ImRrom-II™ 使用说明书,反应体系为 2 μg RNA,2 μL 随机引物,补 DEPC 水至 10.5 μL;65 °C 水浴 5 min,降到 37 °C 放置 10 min;再依次加入 4 μL 5 × 逆转录缓冲液,2 μL dNTP Mix(各 10 mmol·L⁻¹),1 μL 逆转录酶,2 μL DTT,至终体积为 20 μL;40 °C 水浴 1 h,加热到 90 °C 维持 5 min,再冰浴 5 min。③引物设计:依据 Gene Bank 中 HMGB1 和管家基因 β-actin 的 mRNA 序列设计引物,采用 Primer Express Software v 2.0 软件设计,由上海桑尼公司合成,序列列表 1。④实时荧光定量 PCR 检测 2 个基因的表达:优化反应条件,如引物浓度、退火温度和延伸时间等,使目的基因和管家基因的扩增效率保持一致。按照 TaKaRa 公司的 QRT-PCR 反应体系,组成如下:1 μL cDNA 模板、上下游引物各 0.2 μL,0.2 μL Taq 聚合酶,0.4 μL dNTP Mix(各 10 mmol·L⁻¹),1.6 μL MgCl₂,0.1 μL ROX,2 μL 10 × PCR 缓冲液和 0.1 μL Sybgreen,加超纯水至总体积 20 μL。采用两步 PCR 法,扩增条件为:95 °C 预性 2 min,94 °C 变性 45 s,40 个 PCR 循环,各基因退火温度见表 1。根据各基因的实时扩增曲线和熔解曲线进行分析,取 CT 值,按 2^{-ΔΔCt}法^[11]计算待测目的基因相对表达量,其前提是目的基因和 β-actin 扩增效率相似且均接近于 100%。计算各样本平均 CT 值和 CT 值(CT = CT_{目的基因} - CT_{β-actin}),计算 2^{-ΔΔCt}(ΔΔCT = CT_{目的样本} - CT_{参照样本})。

2.5 统计学处理 计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间差异用单因素方差分析进行比较,方差齐性用 LSD 检验,方差不齐用 Dunnett's 检验;计数资料采用 RC 检验。应用 Kaplan-Meier 法估计各组大鼠的生存时间,采用 log-rank 检验进行组间生存分布比较。全部统计分析采用 SPSS 17.0 统计分析软件进行计算,P < 0.05 为差异有统计学意义。

表 1 HMGB1 和 β-actin 的引物序列

引物名称	序列 5'→3'片段	长度 /bp	退火温度 /°C
HMGB1	F TGTTCTGAGTACCGCCCAAA	200	56
	R TTTCGCTGCATCAGGTTTTC		
β-actin	F AAGGAGGCAAAGGACACCAA	203	60
	R AATGGCCCTTCACAGTTA		

3 结果

3.1 各组大鼠行为学的比较 模型组于造模后 12 h 出现进食及活动减少,反应迟钝,毛蓬松、竖立,或全身皮毛为汗液浸湿,部分伴尿失禁、尿黄,精神萎靡、嗜睡,也可呈激惹状态。40 h 可发展至昏睡状态,痛觉反应迟钝或消失,尿深黄。终末期可见四肢或全身抽搐,口腔、四肢末端出血。复方甘草酸苷组及清肝方组大鼠,出现上述症状的次数较少,程度较轻,且持续时间更短。空白组大鼠一切正常。

3.2 各组大鼠生存率、生存期的比较 各亚组 2 只大鼠观察至造模后 96 h,模型组(n = 15)死亡 10 例(66.7%),复方甘草酸苷组(n = 15)死亡 8 例(53.3%),清肝方组(n = 15)死亡 5 例(33.3%),经 RC 检验,3 组存活及死亡大鼠数比较,差异无统计学意义。模型组、复方甘草酸苷组及清肝方组估计平均生存时间分别为 64.6,71.9,83.3 h;Log-rank 检验提示清肝方组累积生存率高于对照组(P < 0.05),而复方甘草酸苷组与模型组、清肝方组差异均无统计学意义。

3.3 各组大鼠肝功能和凝血功能的比较 与模型组相比,空白组、清肝方组和复方甘草酸苷组血清 ALT,AST,TBil 和血浆 PT 水平均显著下降(P < 0.01),复方中药清肝方组低于复方甘草酸苷组(P < 0.01),具有统计学意义。见表 2。

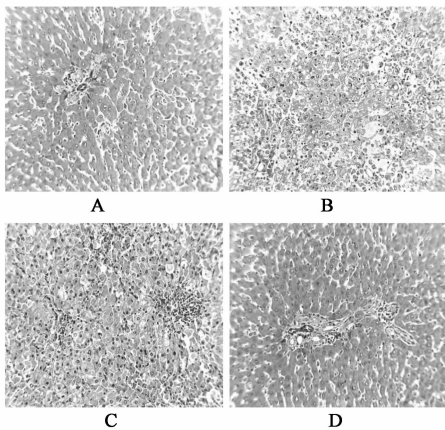
3.4 各组大鼠肝组织病理学的比较 模型组肝小叶结构紊乱,肝索及肝窦形态不清楚,部分肝细胞极度肿胀或有脂肪空泡,并进一步胞核消失、肝细胞坏死,坏死区域呈大片状分布,坏死灶内有孤立成团炎

表 2 清肝方对 D-GalN 至急性肝衰竭大鼠肝功能和凝血功能的影响($\bar{x} \pm s$)

分组	n	剂量/g·kg ⁻¹	ALT/U·L ⁻¹	AST/U·L ⁻¹	TBil/μmol·L ⁻¹	PT/s
空白	10	-	35.02 ± 3.41	148.30 ± 13.54	1.61 ± 0.29	13.56 ± 1.15
模型	20	-	442.09 ± 36.04 ¹⁾	913.67 ± 77.57 ¹⁾	36.97 ± 3.62 ¹⁾	32.10 ± 2.43 ¹⁾
复方甘草酸苷	20	0.0156	256.93 ± 24.37 ²⁾	384.03 ± 23.28 ²⁾	23.41 ± 2.42 ²⁾	30.24 ± 2.11 ²⁾
清肝方	20	29.7	138.53 ± 14.14 ^{2,3)}	313.13 ± 39.48 ^{2,3)}	18.93 ± 1.87 ^{2,3)}	24.83 ± 2.16 ^{2,3)}

注:与空白组比较¹⁾P < 0.01;与模型组比较²⁾P < 0.01;与复方甘草酸苷组比较³⁾P < 0.01(表 3 同)。

细胞。残余汇管区内亦可见炎细胞。复方甘草酸苷组肝小叶结构紊乱,部分肝细胞明显肿胀或有脂肪空泡,细胞间界限不清,胞浆淡染,肝细胞呈灶状坏死、崩解,坏死灶内有孤成团立炎细胞。清肝方组肝小叶结构正常,肝索及肝窦清楚,部分肝细胞浆轻度浊肿,细胞间尚有界限,胞浆淡染。肝小叶内可见散在的肝细胞坏死。汇管区结构正常,个别汇管区内有少许炎细胞分布。空白组肝小叶结构正常,肝索及肝窦清楚,肝细胞以中央静脉为中心呈放射状排列。肝细胞大小较均匀,肝细胞质丰富。细胞核圆形、丰满,汇管区结构正常。见图 1。



A. 空白组; B. 模型组; C. 复方甘草酸苷 0.015 6 g·kg⁻¹ 组; D. 清肝方 29.7 g·kg⁻¹ 组

图 1 1.4 g·kg⁻¹ D-GalN 诱导 36 h 后各组大鼠肝组织病理学观察 (HE, ×200)

3.5 各组大鼠肝组织病理评分比较 与模型组相比,清肝方组和复方甘草酸苷组肝组织病理损害程度积分明显下降 ($P < 0.01$),清肝方组低于复方甘草酸苷组 ($P < 0.01$),具有统计学意义。见表 3。

表 3 各组肝组织病理评分和 HMGB1 相对表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

分组	n	剂量 /g·kg ⁻¹	病理损害程度积分	HMGB1 /β-actin
空白	10	-	0	0.006 ± 0.003
模型	20	-	3.56 ± 0.24 ¹⁾	0.245 ± 0.153 ¹⁾
复方甘草酸苷	20	0.015 6	2.85 ± 0.20 ²⁾	0.112 ± 0.027 ²⁾
清肝方	20	29.7	1.84 ± 0.13 ^{2, 3)}	0.067 ± 0.033 ^{2, 3)}

3.6 各组大鼠 HMGB1 mRNA 相对表达量的比较 与模型组相比,空白组、清肝方组和复方甘草酸苷组肝组织 HMGB1 mRNA/β-actin 值均显著降低,清肝方组低于复方甘草酸苷组 ($P < 0.01$),具有统计学意义。见表 3。

4 讨论

急性肝衰竭是指既往肝功能正常的患者,在短期内出现肝脏功能急剧恶化,导致进行性神志改变直至昏迷和凝血功能障碍的症候群。在肝移植技术推广之前,其病死率往往超过 90%,合并 III-IV 度肝性脑病的患者在 4 d 内的死亡率高达 50%^[2]。目前认为^[12-13],肝移植是 ALF 最有效的治疗手段,移植后短期生存率可达 65%。但由于供肝源短缺常常不能满足临床需求,在美国约有 14% 需要紧急肝移植的患者在等待供肝过程中死亡^[14]。如果在肝衰竭的进展阶段能够有效的调节肝脏抗炎免疫,延缓/或阻逆 ALF 的炎症进程,无疑将有益于疾病最终结局的改善、患者生存率的提高。

祖国医学认为,本病病因主要是外感湿热疫毒之邪,内有乖戾之气。病机责之于毒热炽盛内陷,湿浊蒙蔽清窍,气机升降失常,终致毒、热互结,迫血妄行;湿热熏蒸肝胆,胆汁不循常道而外溢;气机逆乱,水裹血阻。由此可见,ALF 的中医证型以热毒血瘀为基础,相对应的治则为清热通下,和解祛瘀。我们前期的研究显示,清热化瘀中药复方“清肝方”可显著改善肝衰竭患者的肝功能和凝血功能等,减少并发症,提高疗效,降低病死率^[4]。为进一步探讨其功效的分子生物学基础,以启动和维持炎症级联反应的中心分子 HMGB1 为切入点,进而探讨其作用机制。结果表明:清肝方组大鼠累计生存率优于复方甘草酸苷组 ($P < 0.05$),肝组织 HMGB1 mRNA/β-actin 相对表达量比值显著低于复方甘草酸苷组 ($P < 0.01$),血 ALT,AST,TBiL,PT 水平明显低于复方甘草酸苷组 ($P < 0.01$),肝组织病理损害程度积分显著低于复方甘草酸苷组 ($P < 0.01$)。

HMGB1 是一种细胞内 DNA 的结合蛋白,在多种器官(如淋巴组织、肝、肺、脑、脾、肾等)的细胞中均有表达,正常时大多数位于胞核和胞浆内,在细胞核内其作用可参与核小体结构的重构,调控 DNA 重组、修复、复制、翻译和基因转录等^[15-16]。新近研究发现^[17-18],HMGB1 除可以由坏死细胞被动释放外,还可以通过激活的巨噬细胞或单核细胞主动分泌到胞外。释放到胞外的 HMGB1 变成一种介导炎症反应的晚期细胞因子,与其晚期糖化终末产物受体 (advanced glycation end products, RAGE), TLR2 或 TLR4, Mac-1 和 CD24 等结合后,可刺激 IL-18 等炎症因子释放、活化组织性纤溶酶原和增加血管内皮细胞通透性,进一步放大炎症反应^[19-20]。有学者^[21]通过对小鼠进行外源性 HMGB1 攻击,发现 HMGB1

可通过诱导 Treg Fox p3 mRNA 表达的下调来影响其蛋白产物的合成,显著影响 CD4⁺ CD25⁺ Treg 所介导的免疫状态。所以在减轻 ALF 肝组织炎症损伤方面, HMGB1 为我们提供了一个新的靶点。

总之, HMGB1 参与了 ALF 后期肝脏的炎症反应和病理损伤,清肝方通过下调 HMGB1 表达,阻断 TLR, RAGE, Mac-1 和 CD24 等多种受体信号转导通路,抑制下游 NF- κ B 及炎症相关基因的表达;调控 CD4⁺ CD25⁺ Treg 的免疫功能,影响效应性 T 细胞应答反应的方向和强度,从而改善 ALF 大鼠的肝功能、凝血功能及肝脏病理,降低死亡率,这可能是清热化痰中药复方抗 ALF 的作用机制之一。

[参考文献]

[1] Bernal W, Auzinger G, Dhawan A, et al. Acute liver failure[J]. The Lancet, 2010, 376(9736): 190.

[2] Lee W M. Acute liver failure[J]. Semin Respir Crit Care Med, 2012, 33(1): 36.

[3] 王淑香. 腺苷蛋氨酸联合甲基泼尼松龙治疗早期肝衰竭的临床观察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2010, 16(4): 193.

[4] 扈晓宇, 张扬, 陈果, 等. 大剂量清热化痰中药对乙肝相关性慢加急性肝衰竭生存影响的前瞻性队列研究[J]. 中西医结合学报, 2012, 10(2): 176.

[5] 张扬, 扈晓宇, 骆建兴, 等. 清热化痰中药对急性肝衰竭模型大鼠肝功能及生存期的影响[J]. 世界华人消化杂志, 2012, 20(21): 1961.

[6] Liu A, Dirsch O, Fang H, et al. HMGB1 in ischemic and non-ischemic liver after selective warm ischemia/reperfusion in rat[J]. Histochem Cell Biol, 2011, 135(5): 443.

[7] 温丽娜, 孙建宁, 张硕峰. 小儿止咳颗粒对急性肺损伤小鼠高迁移率族蛋白 B-1 含量的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(10): 202.

[8] Zhang L, Kang W, Lei Y, et al. Granulocyte colony-stimulating factor treatment ameliorates liver injury and improves survival in rats with D-galactosamine-induced acute liver failure [J]. Toxicol Lett, 2011, 204(1): 92.

[9] 施新猷. 医用实验动物学[M]. 西安: 陕西科学技术

出版社, 1989: 417.

[10] 张建军, 戴丹. 抗肝衰复方对急性肝衰竭大鼠高迁移率族蛋白-1 和增殖细胞核抗原表达的影响[J]. 中西医结合肝病杂志, 2009, 19(1): 38.

[11] Gallelli L, Pelaia G, D'Agostino B, et al. Endothelin-1 induces proliferation of human lung fibroblasts and IL-11 secretion through an ET (A) receptor-dependent activation of MAP kinases[J]. J Cell Biochem, 2005, 96(4): 858.

[12] Murray K F, Carithers R L Jr. AASLD. AASLD practice guidelines: Evaluation of the patient for liver transplantation[J]. Hepatology, 2005, 41(6): 1407.

[13] 李春风, 郜玉峰, 李旭. HBV 相关肝衰竭抗病毒治疗研究进展[J]. 实用肝脏病杂志, 2010, 13(4): 318.

[14] 张晶, 段钟平. 生物人工肝在肝衰竭治疗中的应用[J]. 中华肝脏病杂志, 2008, 16(10): 728.

[15] Muller, Seaffidi, Degryse B, et al. The double life of HMGB1 chromatin protein: architectural factor and extracellular signal [J]. Embo J, 2001, 20(16): 4337.

[16] 王焕亮, 周长青, 王春玲, 等. HMGB1 细胞因子作用研究进展[J]. 医学综述, 2009, 15(7): 963.

[17] Ge W S, Wu J X, Fan J G, et al. Inhibition of high-mobility group box 1 expression by siRNA in rat hepatic stellate cells [J]. World J Gastroenterol, 2011, 17(36): 4090.

[18] 李培志, 吴传新, 龚建平. HMGB1 在缺血-再灌注损伤中的作用机制研究进展[J]. 生理科学进展, 2011, 42(2): 148.

[19] 刘婷, 贺永文. 高迁移率族蛋白 B1 在急性肝功能衰竭小鼠中的表达变化[J]. 中华传染病杂志, 2010, 28(4): 209.

[20] 赵中夫, 韩德五. 高迁移率族蛋白 B-1 及其在肝损伤合并内毒素血症中的作用[J]. 中华肝脏病杂志, 2006, 14(9): 718.

[21] 张莹, 姚咏明, 董宁, 等. 高迁移率族蛋白 B1 对小鼠调节性 T 细胞 Foxp3 表达的影响[J]. 第三军医大学学报, 2008, 30(21): 1980.

[责任编辑 聂淑琴]