

高迁移率族蛋白 B1 在高氧致支气管肺发育不良的表达

冯洁 邓春 余加林 郭春宝 赵倩倩

(重庆医科大学附属儿童医院新生儿科,重庆 400014)

[摘要] 目的 检测高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)在高浓度氧(60% O₂)暴露新生小鼠肺组织损伤模型中的表达水平,探讨 HMGB1 在支气管肺发育不良(BPD)发病机制中的作用。方法 新生足月 C57BL/6 小鼠随机分为 BPD 组 and 对照组,制备高氧浓度致新生鼠 BPD 模型,应用苏木精-伊红染色、Masson 染色、放射性肺泡计数(RAC)、免疫荧光和实时荧光定量 PCR 技术,观察氧暴露后 3 d、7 d、14 d 肺组织病理改变及 HMGB1 的蛋白和 mRNA 表达水平。结果 BPD 组在氧暴露后随时间推移,出现肺泡上皮肿胀,肺泡壁增厚,间质水肿,炎症细胞浸润,胶原样物质产生,肺泡结构紊乱,数量减少,较空白对照组明显发育迟滞。在氧暴露后 7 d、14 d, HMGB1 及其 mRNA 表达均强于对照组($P < 0.05$)。结论 高氧暴露所致 BPD 中, HMGB1 表达增加。BPD 的病理过程可能与 HMGB1 表达增加有关。 [中国当代儿科杂志, 2010, 12(3): 219-223]

[关键词] 高氧;支气管肺发育不良;高迁移率族蛋白 B1;新生小鼠

[中图分类号] R722 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1008-8830(2010)03-0219-05

Expression of high mobility group protein-B1 in mice with hyperoxia-induced bronchopulmonary dysplasia

FENG Jie, DENG Chun, YU Jia-Lin, GUO Chun-Bao, ZHAO Qian-Qian. Department of Neonatology, Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400014, China (Deng C, Email: dengcgcb@yahoo.com.cn)

Abstract: Objective To study the effect of hyperoxia exposure on high mobility group protein-B1 (HMGB1) expression in neonatal mice and the role of HMGB1 in the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia (BPD). **Methods** C57BL/6 mice were randomly exposed to 60% O₂ or air 1 day after birth. BPD was induced by 60% O₂ exposure. The pulmonary tissue samples were harvested 3, 7 and 14 days after exposure. The pathologic changes of pulmonary tissues were observed by hematoxylin and eosin staining, Masson staining and radical alveolar count. The expression of HMGB1 protein in lungs was detected by immunofluorescence. The expression of HMGB1 mRNA was detected by real-time fluorescent quantitative PCR. **Results** In the BPD group, the lungs developed decreased alveolar septation, swollen alveolar epithelium, stroma edema, interstitial fibrosis and developmental lag when compared with the control group. These changes became more obvious with more prolonged hyperoxia exposure. The expression of HMGB1 protein and mRNA 7 and 14 days after exposure increased significantly in the BPD group compared with that in the control group. **Conclusions** Hyperoxia exposure results in an increase in lung HMGB1 expression. The increased HMGB1 expression may be associated with the development of BPD. [Chin J Contemp Pediatr, 2010, 12(3): 219-223]

Key words: Hyperxia; Bronchopulmonary dysplasia; High mobility group protein-B1; Neonatal mice

支气管肺发育不良(bronchopulmonary dysplasia, BPD)是新生儿尤其是早产儿的常见病,高氧暴露是重要原因之一。有研究显示,BPD 已经成为早产儿出生后最主要的死亡原因^[1]。高氧暴露可促进炎症反应和纤维化,导致肺损伤,但其明确的病理机制还不清楚^[2]。肺内成纤维细胞和损伤的气道上皮细胞向成肌纤维细胞转分化是 BPD 中纤维化发生的重要病理因素,许多细胞因子参与了这一过程。高

迁移率族蛋白 B1(HMGB1)作为一类通常存在于哺乳动物细胞核内的非组蛋白^[3],不仅有调节 DNA 和染色质构象改变的重要作用,还可以作为一种晚期炎症因子被破坏的细胞释放,影响多种炎症细胞因子的表达^[4]。有研究表明 HMGB1 与组织纤维化有密切关系^[5],故推测 HMGB1 可能参与了 BPD 中肺纤维化的病理过程,目前国内外未见相关研究报道。本实验通过对高氧暴露致 BPD 模型小鼠肺组织中

[收稿日期] 2009-09-25; [修回日期] 2009-10-24
[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(30770950)。
[作者简介] 冯洁,女,硕士研究生。
[通信作者] 邓春,副教授。

HMGB1 的表达进行检测,分析纤维化程度,探讨 HMGB1 在 BPD 发病机制中的作用,从而在其复杂的发病环节中找寻一个新靶点,为今后临床治疗提供依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物分组

体重 23~25 g 清洁级 C57BL/6 成年小鼠(由重庆医科大学实验动物中心提供),雌雄鼠按照 2:3 和笼交配,发现阴栓之日记为妊娠第 1 天。孕鼠分笼单独饲养至分娩,新生鼠随机分为对照组和 BPD 组,各组再分为 3 d、7 d、14 d 等亚组,每组 10 只。

1.2 动物模型的制备

参照文献^[6]自制氧箱(55 cm × 35 cm × 30 cm),BPD 组置于氧箱内,使氧浓度维持在 600 mL/L,以测氧仪控制氧体积分数,用钙石灰以吸附 CO₂,温度 25~26℃,湿度 60%~70%,每天开箱 1 h,清洁氧箱,更换敷料,添加饲料及饮水,称重,与对照组互换母鼠以避免母鼠因氧中毒而护理能力降低;对照组置于同一室内空气中(氧浓度 21%),饲养条件与 BPD 组相同。

1.3 标本收集

第 3 天、第 7 天及第 14 天分别从各组中随机抽取 8 只,腹腔注射 100 g/L 水合氯醛(0.3 mL/g)麻醉。于心脏搏动最强处穿刺,用生理盐水充分灌注直至肺成白色。迅速切取左肺,用生理盐水洗净残血,吸干水分,放于冻存管中液氮速冻后存于 -80℃ 冰箱,用于实时荧光定量 PCR。取右肺,用 4% 多聚甲醛固定 24 h,石蜡包埋,5 μm 切片,苏木精-伊红染色,Masson 三色胶胶原染色,光镜下检查肺组织病理变化,在 400 倍光镜下行放射性肺泡计数(RAC);同时行免疫组化检测肺组织 HMGB1 表达。

1.4 检测方法

1.4.1 病理检测 肺组织经梯度酒精常规脱水、石蜡包埋、切片后,行常规苏木精-伊红染色及 Masson 胶原染色,胶原染色操作严格按照 Masson 染色试剂盒(福建迈新生物技术公司)产品说明书进行。每例标本选 2 个切片,每个切片取 5 个视野,以 10 个视野的单位面积肺泡数(alveolar number per μm²)平均肺泡面积(mean alveolar area)的均值作为该标本的相应指标。单位面积肺泡数 = 肺泡数/视场面积;平均肺泡面积 = 目标总面积/肺泡数(单位:μm²)。

1.4.2 放射性肺泡计数(RAC) 苏木精-伊红染色后做 RAC 值计数。RAC 值是指从终末细支气管

中心至最近纤维隔引垂直线,该直线上的肺泡计数,反映终末呼吸单位所含肺泡数目,为肺泡化程度的检测指标。每叶肺组织取 4 张切片,每张切片观察不重叠的 10 个视野,4 张切片的平均值即代表 RAC 值。在高倍镜下(×400),每张切片 10 次计数,取平均值。

1.4.3 免疫荧光染色 切片脱蜡至水(二甲苯 10 min × 2 次,无水乙醇 5 min × 2 次,90%、80%、70%乙醇各 2 min),蒸馏水 5 min,0.01 mol/L PBS 液 5 min,热抗原修复,0.3% H₂O₂ 封闭 20 min,0.01 mol/L PBS 液 5 min × 3 次,滴加兔抗小鼠 HMGB1 单克隆抗体(1:250,Epitomics 公司),4℃ 孵育过夜,0.01 mol/L PBS 液 5 min × 3 次,滴加 FITC 标记山羊抗兔 IgG(1:100),37℃ 避光孵育 30 min,DAPI 染核,50%甘油封片后,荧光显微镜(BX51 型, Olympus, Japan)下观察荧光激发后的结果,以有绿色荧光颗粒激发为阳性表达。阴性对照为 0.01 mol/L PBS 液代替一抗。每个样本随机抽取完整清晰的切片 8 张,每张切片在荧光显微镜下(×200)随机抽取 5 个视野,固定窗口面积,利用 Imagepro plus 5.0 专业图像分析软件系统采集肺组织免疫荧光图像,测量并记录每个视野阳性表达的荧光强度。

1.4.4 实时荧光定量 PCR 根据 GenBank(Gene ID:15289)中的小鼠 HMGB1 核酸序列设计引物, HMGB1 上游引物 5'-GCACTTCAGCAGGTCAAGCA-CA-3',下游引物 5'-AGGAAAAGAATCACCCCTCGT-CAGA-3'; β-actin 上游引物 5'-CACACCCGCCAC-CAGTTCG-3',下游引物 5'-GTCCTTCTGACCCATTC-CCACC-3'。引物序列采用序列局部相似性查询系统(BLAST)软件分析,由上海鼎安生物科技有限公司合成。

肺组织标本采用 Trizol 法(KaTaRa 大连宝生物有限公司)提取总 RNA,紫外分光光度计(BIO-RAD, USA)测定 A₂₆₀/A₂₈₀ 值,计算 RNA 的纯度。使用 RerverAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit(Fermentas 公司)反转录合成 cDNA 的第一条链。所有操作均严格按照说明书进行,将所得 20 μL 产物冻存于 -20℃ 冰箱以备进行 PCR。

分别取 2 × SYBR® Premix Ex Taq™ 12.5 μL,上、下游引物各 0.5 μL,50 × ROX 染料 0.5 μL, cDNA 2.0 μL 加入 PCR 反应管中,灭菌水补充至总体积 25 μL。β-actin 反应条件:95℃ 10 s,95℃ 5 s,61℃ 31 s,40 个循环。溶解曲线分析:95℃ 15 s,60℃ 30 s,95℃ 15 s。HMGB1 反应条件退火温度为 65℃,其他条件同上。反应在 CFX96™ 荧光定量

PCR 仪(BIO-RAD, USA)中进行,每个样本设3个复管,每个反应板均设空白对照。

采用相对定量法^[7]分别分析空白对照组和BPD组不同时间点 HMGB1 基因表达水平的差异,以 β -actin 为内参,调整基线,以空白管不出现阳性为准,将 PCR 报告中的循环阈值(C_t)输入 EXCEL 表格中,计算3个复管的平均 C_t 值。根据目的基因的量 $=2^{-\Delta C_t}$ 分别计算 HMGB1 mRNA 的相对表达量。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 13.0 对所得数据进行分析,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。不同时间点均数之间的比较采用单因素方差分析(ANOVA)和 SNK- q 检验,对照组和 BPD 组之间的比较采用配对 t 检验,

$P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肺组织病理改变

对照组在第3天、第7天及第14天肺部组织未见明显病理变化。苏木精-伊红染色镜下,BPD 3 d 组可见肺泡上皮细胞肿胀,肺泡壁增厚,肺间质少量充血、水肿,肺泡结构紊乱,7 d 组上述病理损害加重,少量炎症细胞浸润,14 d 组肺内炎症渗出减少,水肿减轻,肺间质增生明显,胶原样物质增多,肺泡间隔增宽,肺泡数量明显减少,肺泡结构紊乱,部分萎陷,与对照组比较肺组织明显发育迟滞。见图1。

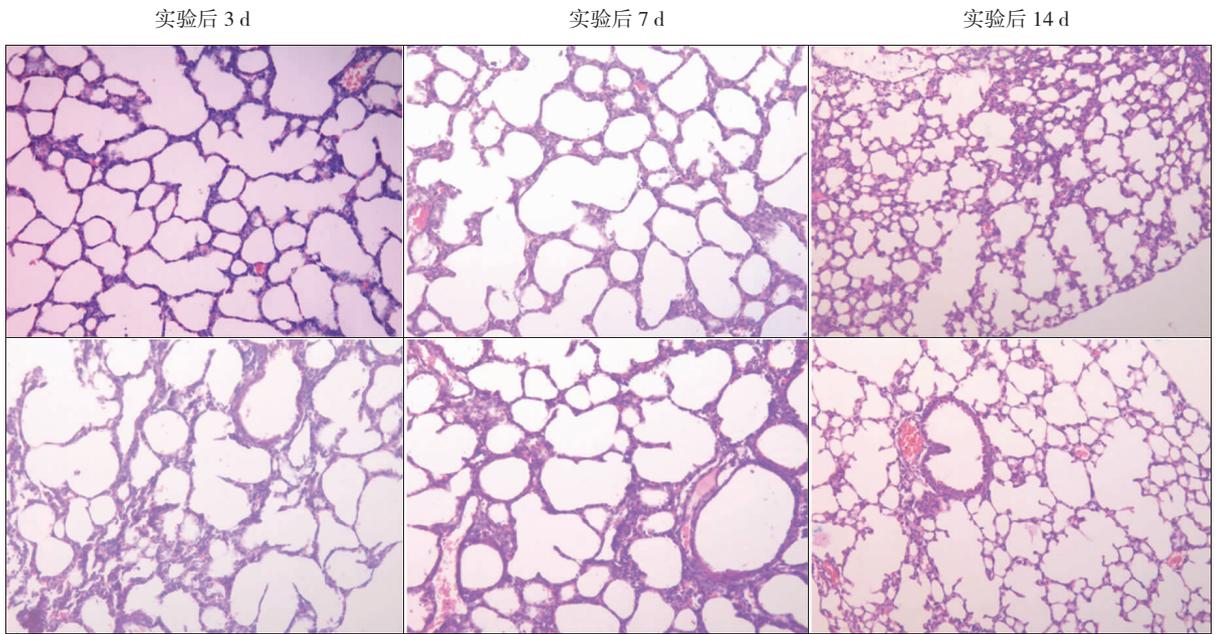


图1 肺组织的病理变化(苏木精-伊红染色, $\times 200$) 上排为对照组,实验后3、7、14 d 未见明显病理变化。下排为BPD组,实验后3、7、14 d 与同时间点对照组比较,可见肺泡结构紊乱,肺泡数量减少,肺泡间隔增宽、断裂,肺泡部分萎陷、发育迟滞。

对照组实验后3 d、7 d 及14 d 比较,平均肺泡面积依次下降;单位面积肺泡数依次增多,肺组织发育逐渐成熟,肺泡结构逐渐规整,大小较均匀,肺泡间隔变薄。BPD 3 d 组与对照组比较,均为大而规则的肺泡腔,肺泡间隔少而厚;7 d 组平均肺泡面积、单位面积肺泡数与对照组比较差异无统计学意义;14 d 组平均肺泡面积较对照组明显增大;单位面积肺泡数较对照组显著减少,肺泡间隔较薄,肺泡结构简单化,部分肺间质纤维化。

RAC 检测发现 BPD 3 d 组和对照3 d 组相比,差异无统计学意义。BPD 7 d 组低于对照7 d 组($P < 0.05$),14 d 组继续下降,显著低于对照组($P < 0.01$)。见表1。

表1 各组肺泡面积、单位面积肺泡数 RAC 比较

($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	平均肺泡面积 (μm^2)	单位面积肺泡数 ($/\mu\text{m}^2$)	RAC
对照组			
3 d	5 321 \pm 216	31.10 \pm 1.55	9.02 \pm 0.52
7 d	4 168 \pm 210	34.11 \pm 1.61	7.56 \pm 0.38
14 d	1 022 \pm 213	89.02 \pm 1.75	9.03 \pm 0.51
BPD 组			
3 d	8 799 \pm 395 ^{a,c}	21.33 \pm 1.45 ^{a,c}	6.17 \pm 0.34 ^c
7 d	4 566 \pm 201 ^{a,c}	31.86 \pm 1.44 ^a	6.79 \pm 0.59 ^{a,c}
14 d	7 162 \pm 289 ^a	31.75 \pm 1.22 ^a	4.89 \pm 0.43 ^b

a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与对照组比较, $P < 0.01$; c: 与同组14 d 比较, $P < 0.05$

Masson 胶原染色示对照组肺组织含有少量胶原纤维,为细胞外基质(ECM)的主要组成部分。BPD 3 d组和对照组无明显差异;随时间推移 BPD 组胶原纤维逐渐增多,有蓝色胶原沉积,BPD 7 d 组可见纤维增生明显,14 d 组纤维化程度较 7 d 组和对照组显著。

2.2 肺内 HMGB1 蛋白表达的变化

HMGB1 主要在细胞浆表达,BPD 3 d 组肺组织

HMGB1 免疫荧光强度与对照组差异无统计学意义,7 d 组荧光强度较对照组明显增强,14 d 组可见显著表达。见表 2,图 2。

2.3 肺内 HMGB1 mRNA 表达的变化

在 BPD 7 d 组、14 d 组, HMGB1 mRNA 的表达明显高于对照组,差异有统计学意义($P < 0.05$),3 d 组和对照组之间差异无统计学意义($P > 0.05$)。见表 2。

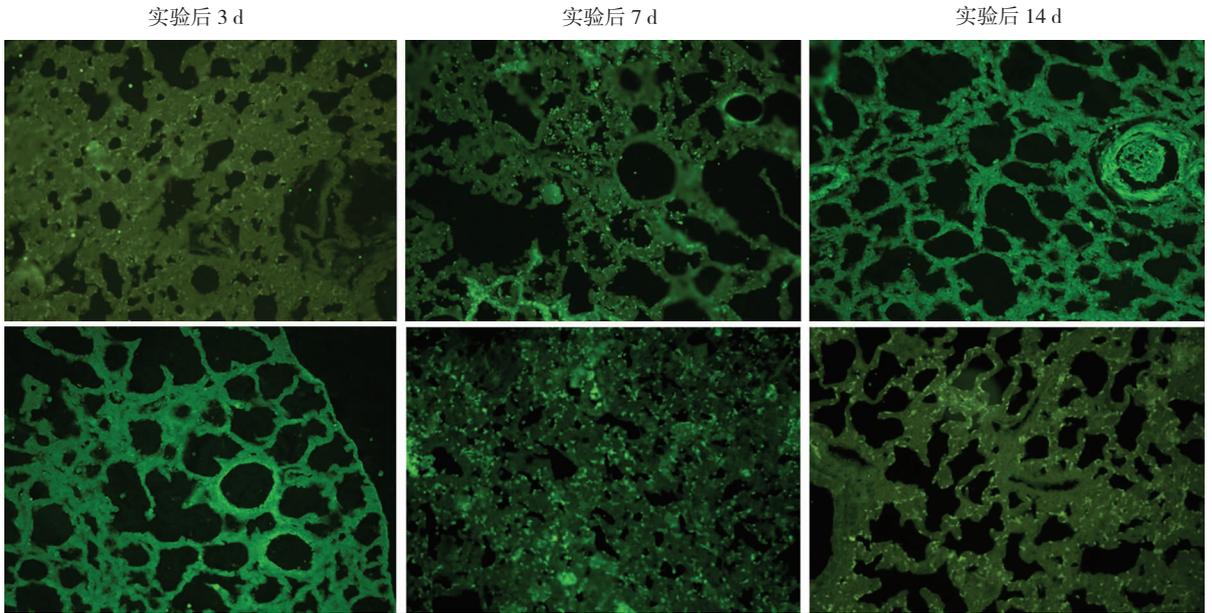


图 2 肺组织 HMGB1 免疫荧光强度变化(FITC, $\times 200$) 上排为对照组,下排为 BPD 组。与同时间点对照组比较, BPD 组可见阳性表达的绿色荧光亮点数量和强度增强。

表 2 各组肺组织 HMGB1 蛋白荧光强度和 mRNA 相对表达量 ($n = 8, \bar{x} \pm s$)

组别	HMGB1 蛋白	HMGB1 mRNA
对照组		
3 d	0.087 \pm 0.025	1.56 \pm 0.68
7 d	0.090 \pm 0.051	1.18 \pm 0.057
14 d	0.990 \pm 0.043	1.94 \pm 0.76
BPD 组		
3 d	0.095 \pm 0.003 ^b	1.83 \pm 0.49 ^b
7 d	0.159 \pm 0.044 ^{a,b}	3.47 \pm 1.77 ^{a,b}
14 d	0.213 \pm 0.006 ^a	5.02 \pm 0.96 ^a

a:与对照组比较, $P < 0.05$;b:与 BPD 14 d 组比较, $P < 0.05$

3 讨论

氧疗是临床上常用的改善机体缺氧状态的治疗措施之一,但长时间持续高浓度输氧会导致急性肺损伤,尤其对于早产儿,可导致 BPD,成为早产儿重要的致死原因,严重影响患儿的预后和生活质量。而高氧浓度的划分标准国内外尚无统一定论,通常

氧浓度大于 50% 即作为高氧。近年来有研究表明,不同高氧浓度输注导致的 BPD 的病理变化并不相同。大于 80% 高氧输注,肺组织以渗出,大量炎症细胞浸润,胶原生成,严重纤维化为主。当氧浓度在 60% 左右时,肺组织的病理变化却是以肺泡简单化,间隔变厚,发育迟滞为主要表现,炎症渗出和纤维化较为轻微^[8]。这与近年来 BPD 新病理模式认为的肺泡发育迟滞是其主要表现,而肺纤维化和炎症反应则较为轻微的观点相吻合^[9-10]。

HMGB1 作为一个普遍存在、高度保守的蛋白,在 30 年前作为核蛋白被首次发现^[11]。它除了由坏死细胞被动释放,还可以由巨噬细胞、单核细胞和 NK 细胞主动释放,刺激其他前炎症细胞因子产生并放大其作用。动物模型和一些临床研究已经表明, HMGB1 在肺急性炎症损伤、肠道炎症、肝脏炎症、关节炎、皮肤红斑狼疮、烧伤及神经系统疾病(如阿尔兹海默病模型中增加 β -淀粉样蛋白的毒性)等的发生和发展过程中都起了重要作用^[12]。

既往研究已证实,小鼠肺泡发育经历假腺期、小管期、原始肺泡期及肺泡期等4个阶段,提示其肺泡化集成具有与人类相似的时序性^[13]。但与人类胚胎发育所不同的是新生鼠肺组织只完成了大体形态的发生,生后3日龄方才开始肺泡化^[14-15]。本研究以新生1d小鼠为研究对象,选用600 mL/L氧,分别处理3d、7d、14d,建立新生鼠BPD模型,观察该浓度的氧对于肺组织发育的影响以及相应肺发生纤维化的程度,探讨HMGB1在此种浓度氧暴露下所致BPD中的表达和作用。肺发育成熟的重要标志是体积大、数量少的囊泡向体积小、数量多的肺泡转化,因此通常把RAC作为评价肺泡发育程度的重要指标^[16]。结果显示,对照组小鼠RAC随生后日龄逐渐增加,而在BPD组小鼠RAC值较同期对照组显著降低,提示肺泡化程度降低,肺泡发育受阻;同时随着氧暴露时间延长,BPD组RAC不增反减,间接证明氧损伤后肺泡数减少^[17]。BPD组各时间点HMGB1蛋白表达明显强于对应对照组,且随时间推移,蛋白表达相应增强。同时,实时荧光定量PCR结果显示,HMGB1 mRNA表达与相应蛋白表达成平行关系。以上结果表明HMGB1参与了BPD的病理过程。因此,应用HMGB1抗体或其拮抗剂阻止其活化作用减轻其对组织的损伤作用和其他病理作用,将有可能为临床治疗提供新的方向。

[参 考 文 献]

- [1] Walsh MC, Szeffler S, Davis J, Allen M, Van Marter L, Abman S, et al. Summary proceedings from the bronchopulmonary dysplasia group[J]. *Pediatrics*, 2006, 117(3):S52-56.
- [2] Alejandre-Alcázar MA, Kwapiszewska G, Reiss I. Hyperoxia modulates TGF-beta/BMP signaling in a mouse model of bronchopulmonary dysplasia[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292(2):537-549.
- [3] Sadikot RT, Christman JW, Blackwell TS. Molecular targets for modulating lung inflammation and injury[J]. *Curr Drug Targets*, 2004, 5(6):581-588.
- [4] Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein: nuclear weapon in the immune arsenal[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(4):331-342.
- [5] Bustin M. Regulation of DNA-dependent activities by the functional motifs of the high-mobility-group chromosomal proteins[J]. *Mol Cell Biol*, 1999, 19(8):5237-5246.
- [6] 田兆方,李玉红,付雪梅,封志纯,杜江. 不同来源间充质干细胞对新生大鼠高氧肺损伤的影响[J]. *临床儿科杂志*, 2008, 26(8):712-714.
- [7] 陈思,李扬秋,陈少华,杨力健,吴秀丽,岑东芝. 多发骨髓瘤患者外周血T细胞中T细胞受体ζ链基因表达特点[J]. *白血病·淋巴瘤*, 2009, 18(1):15-17.
- [8] 付红敏,许峰,黄波,方芳,黄栋,匡风梧. 高氧暴露对早产鼠ACE II生长增殖的影响及CGRP的干预作用[J]. *第四军医大学学报*, 2009, 30(5):389-392.
- [9] Ambalavanan N, Carlo WA. Bronchopulmonary dysplasia: new insights[J]. *Clin Perinatol*, 2004, 31(3):613-628.
- [10] De Paepe ME, Gundavarapu S, Tantravahi U. Fas-ligand induced apoptosis of respiratory epithelial cells causes disruption of post-canalicular development[J]. *Am J Pathol*, 2008, 173(1):42-56.
- [11] Goodain GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids[J]. *Eur J Biochem*, 1973, 38(1):14-19.
- [12] 吴林青. 高迁移率族蛋白B1:从核蛋白到新的细胞因子[J]. *国际免疫学杂志*, 2007, 30(2):96-101.
- [13] Mund SI, Stamparoni M, Schittny JC. Developmental alveolarization of the mouse lung[J]. *Dev Dynamics*, 2008, 237(8):2108-2116.
- [14] Manji JS, O'Kelly CJ, Leung WJ. Timing of hyperoxic exposure during alveolarization influences damages mediated by leukotrienes[J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2001, 281(4):799-806.
- [15] Yi M, Jankov RP, Belcastro R. Opposing effects of 60% oxygen and neutrophil influx on alveologenesis in the neonatal rat[J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2004, 170(11):1188-1196.
- [16] Balasubramanian V, Mervis CF, Maxey AM. Hyperoxia reduces bone marrow, circulating, and lung endothelial progenitor cells in the developing lung: implications for the pathogenesis of bronchopulmonary dysplasia[J]. *A J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 292(5):1073-1084.
- [17] 黄铃沂,段江,封志纯. 支气管肺发育不良小鼠模型的建立[J]. *中国实验动物学报*, 2009, 17(3):186-188.

(本文编辑:黄 榕)