

## HO-1 对脓毒症大鼠血浆中 HMGB-1 表达的影响及其心肌保护机制\*

周仪华<sup>1</sup>, 袁影<sup>1</sup>, 盛志勇<sup>1</sup>, 王舒<sup>1</sup>, 王萌<sup>1</sup>, 郭良云<sup>2△</sup>

(南昌大学第二附属医院:1. 重症医学科;2. 超声科, 南昌 330006)

**[摘要]** **目的** 探讨血红素氧合酶-1(HO-1)对脓毒症心肌损伤大鼠血浆中高迁移率族蛋白 B-1(HMGB-1)变化的影响及其心肌保护机制。**方法** 采用盲肠结扎穿孔术(CLP)建立脓毒症大鼠模型。SPF 级 SD 雄性大鼠 128 只,分为 4 组:假手术组、脓毒症组、钴原卟啉 IX 组(Copp IX 组)、锌原卟啉 IX 组(Znpp IX 组),每组 32 只。术后分别在 0、6、12、24 h 取全血检测血浆中肌酸激酶同工酶(CK-MB)、心肌肌钙蛋白 I (cTn I)、心型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)及 HMGB-1 的表达;24 h 除取全血检测上述指标外,留取心脏组织行苏木素-伊红(HE)染色,观察心肌损伤情况,提取心肌细胞总蛋白,Western Blot 检测心肌细胞 HMGB-1 及 HO-1 蛋白的表达。**结果** 除假手术组外,各实验组 HMGB-1 水平随时间增加均升高,其中 Znpp IX 组升高最明显,与脓毒症组相比,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),与 Copp IX 组相比,差异亦有统计学意义( $P < 0.01$ )。光镜下假手术组细胞结构基本正常,Copp IX 组细胞肿胀、胞核完整,脓毒症组及 Znpp IX 组细胞肿胀明显,核溶解坏死。Western Blot 检测结果表明,Znpp IX 组 HMGB-1 蛋白表达最高,HO-1 蛋白表达最低,而 Copp IX 组 HO-1 蛋白表达最高,HMGB-1 蛋白表达最低。**结论** HO-1 抑制脓毒症心肌损伤大鼠血浆中 HMGB-1 的表达,并可能通过抑制 HMGB-1 的表达而发挥心肌保护作用。

**[关键词]** 血红素氧合酶-1;脓毒症;高迁移率族蛋白 B1;心肌保护**[中图分类号]** R542.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2019)05-0748-04

## Effect of HO-1 on expression of plasma HMGB-1 in septic rats and its myocardial protection mechanism\*

ZHOU Yihua<sup>1</sup>, YUAN Ying<sup>1</sup>, SHENG Zhiyong<sup>1</sup>, WANG Shu<sup>1</sup>, WANG Meng<sup>1</sup>, GUO Liangyun<sup>2△</sup>

(1. Department of Critical Care Medicine; 2. Department of Ultrasound, Second Affiliated Hospital of Nanchang University, Nanchang, Jiangxi 330006, China)

**[Abstract]** **Objective** To explore the effect of heme oxygenase-1(HO-1) on the expression of plasma high mobility group protein B1(HMGB-1) in septic rats and its myocardial protection mechanism. **Methods** The sepsis rat model was established by the cecal ligation and perforation (CLP). One hundred and twenty-eight male SD rats of SPF grade were divided into the four groups: the sham operation group, sepsis group, Copp IX group and Znpp IX group, 32 cases in each group. The expression levels of CK-MB, cTn I, H-FABP and HMGB-1 in plasma were measured by collecting the whole blood at postoperative 0, 6, 12 and 24 h. Besides collecting the whole blood for detecting the above indicators at postoperative 24 h, the cardiac tissue was taken to conduct the HE staining for observing the myocardial injury situation and extracting the total protein of cardiac myocytes. Then the expressions of myocardial cell HMGB-1 and HO-1 protein were detected by Western blot. **Results** Except for the sham operation group, the level of HMGB-1 in all other groups was increased, among which the Znpp IX group increase was most significant, compared with the sepsis group, the difference was statistically significant ( $P < 0.05$ ), compared with the Copp IX group, the difference also was statistically significant ( $P < 0.01$ ). Under the light microscope, the cells structure of the sham operation group was basically normal, the cells in the Copp IX group were swollen and the nucleus was intact, the cells in the sepsis group and the Znpp IX group were swollen obviously, and the nucleus dissolved and necrosed. The Western blot detection results showed that the expression of HMGB-1 protein was the highest in the Znpp IX group, and the expression of HO-1 protein was the lowest, while the expression of HO-1 protein in the Copp IX group was the highest, and the expression of HMGB-1 protein was the lowest. **Conclusion** HO-1 inhibits the expression of plasma HMGB-1 in septic rats, moreover may play the myocardial protection role by inhibiting the expression of HMGB-1.

**[Key words]** heme oxygenase -1; sepsis; high mobility group protein B1; myocardial protection

脓毒症性心肌损伤是脓毒症休克难以纠正,导致患者最终死亡的重要原因,血红素氧合酶-1(HO-1)对脓毒症心肌损伤具有保护作用<sup>[1]</sup>。经脂多糖(LPS)刺激后,有活力的心肌细胞通过 TLR4/p13k $\gamma$  信号通路分泌高迁移率族蛋白 B-1(HMGB-1),HMGB-1 在 LPS 诱导的心脏收缩功能障碍中发挥重要作用<sup>[2]</sup>。在肺部、肠道等器官功能炎症损伤动物模型中,机体通过调节 HO-1 及 HMGB-1 的释放而发挥器官功能的保护作用<sup>[3-4]</sup>。HO-1 的心肌保护作用是否与 HMGB-1 的表达存在特定关系仍然不清楚。本研究通过盲肠结扎穿孔术(CLP)方法建立脓毒症大鼠心肌损伤模型,给予 HO-1 增强剂和抑制剂,检测脓毒症大鼠血浆中心肌损伤标志物和 HMGB-1 的表达,明确 HO-1 与 HMGB-1 是否存在特定关系,并探讨其机制。

**1 材料与方法**

**1.1 材料** SPF 级 SD 雄性大鼠 128 只(南昌大学江西医学院动物科学部提供),体质量 180~220 g。

**1.2 方法**

**1.2.1 模型的建立** 所有大鼠术前禁食 12 h,采用异氟烷吸入麻醉法诱导和维持大鼠麻醉状态,用手术直剪于腹白线中点下方约 0.3 cm 处逐层剪开皮肤、肌层和腹膜,直视下探查腹腔,将盲肠末端取出并置于腹壁外,采用 4 号缝合线距盲肠末端 1.6 cm 处结扎,结扎后用 3 号三棱针穿刺 1 孔,之后分别将盲肠回纳腹腔,4 号缝合针逐层缝合关腹。术后 3 h 左右自由进食、饮水。观察大鼠活动、进食、竖毛、腹泻、眼球凹陷、呼吸等情况。

**1.2.2 实验分组** SPF 级 SD 雄性大鼠 128 只,随机分为 4 组:假手术组、脓毒症组、钴原卟啉(Copp) IX 组、锌原卟啉(Znpp) IX 组,每组 32 只。假手术组除不做 CLP 术外,其余操作均同脓毒症组;Copp IX 组和 Znpp IX 组分别提前 24 h 给予 HO-1 增强剂 Copp IX (10 mg/kg,腹腔注射)和抑制剂 Znpp IX (10 mg/kg,腹腔注射),以同样方法制作脓毒症模型。

**1.2.3 主要试剂及观察指标** HO-1 增强剂 Copp IX

(美国 Santa Cruz Biotechnology 公司),HO-1 抑制剂 Znpp IX (美国 Sigma 公司),10%水合氯醛溶液(上海强顺化工有限公司),10%甲醛溶液(西陇化工股份有限公司),HMGB1 和 HO-1 抗体及相关二抗(美国 Cell Signaling 公司)。各组均于 0、6、12、24 h 处死大鼠 8 只,开腹经腹主动脉抽取全血 5~6 mL,采用酶联免疫吸附试验(ELISA)检测各组血浆中 CK-MB、cTn I、心型脂肪酸结合蛋白(H-FABP)、HMGB-1 水平,按试剂盒(美国 Amersham 公司)说明书进行操作。

**1.2.4 苏木素-伊红(HE)染色法观察心肌组织结构变化** 取心脏组织,以 10%甲醛溶液固定,常规脱水、透明、浸蜡、包埋,制备石蜡切片,超薄切片机切片,切片厚度 5  $\mu$ m,行常规 HE 染色。石蜡切片常规脱蜡水化,苏木素液染色,1%盐酸乙醇分化,返蓝,乙醇伊红染色,脱水,透明,中性树胶封片,选择横断心肌的切片放大 200 倍,显微镜下观察心肌组织病理结构变化情况。

**1.2.5 Western Blot 检测 HMGB-1 和 HO-1 蛋白表达** 提取心肌细胞总蛋白,取 25  $\mu$ g 总蛋白行聚丙烯酰胺凝胶电泳,转膜、封闭,加入 HMGB-1 兔抗人单克隆抗体(1:1 000)孵育,洗脱后加入辣根过氧化氢酶标记的二抗进行孵育,通过化学发光法检测蛋白条带,充分洗脱后添加显影液孵育,并于暗室中曝光。同样方法检测心肌细胞 HO-1 蛋白表达。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS22.0 软件对数据进行处理,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,组间比较采用单因素方差分析,两变量非正态分布数据相关性分析采用 Spearman 秩相关分析,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 术后各组实验动物一般情况观察** 所有实验动物术后均很快苏醒,各组均出现心率、呼吸加快,精神反应差,部分呈嗜睡状态,饮食差,竖毛,腹泻等状态,少数出现出血或出血倾向。假手术组术后 3 h 左右恢复正常活动、进食、进水。脓毒症组在 24 h 死亡 1 只,Znpp IX 组 24 h 死亡 2 只。

表 1 各时间点血清 H-FABP、HMGB-1 及 HO-1 水平

组别	n	CK-MB(IU/L)	cTn I (ng/L)	H-FABP(ng/mL)	HMGB-1(g/L)
假手术组	32				
0 h		7.12 $\pm$ 1.23	0.46 $\pm$ 0.12	6.12 $\pm$ 0.73	4.73 $\pm$ 0.57
6 h		8.34 $\pm$ 1.52	0.39 $\pm$ 0.18	7.77 $\pm$ 0.69	5.24 $\pm$ 0.49
12 h		6.56 $\pm$ 1.36	0.41 $\pm$ 0.17	6.45 $\pm$ 0.68	4.89 $\pm$ 0.55
24 h		7.69 $\pm$ 1.78	0.47 $\pm$ 0.10	6.99 $\pm$ 0.87	5.63 $\pm$ 0.51
脓毒症组	32				
0 h		7.68 $\pm$ 1.44	0.54 $\pm$ 0.21	6.58 $\pm$ 0.71	5.33 $\pm$ 0.62
6 h		14.36 $\pm$ 3.25	1 126.20 $\pm$ 326.30	27.47 $\pm$ 3.48	8.58 $\pm$ 0.66
12 h		19.07 $\pm$ 4.72	3 784.50 $\pm$ 569.70	20.87 $\pm$ 2.93	11.95 $\pm$ 0.43
24 h		38.49 $\pm$ 7.86	8 963.20 $\pm$ 768.00	15.13 $\pm$ 2.36	19.44 $\pm$ 0.71
Copp IX 组	32				
0 h		7.25 $\pm$ 1.33	0.51 $\pm$ 0.13	6.74 $\pm$ 0.63	5.95 $\pm$ 0.43
6 h		8.76 $\pm$ 3.59	963.1 $\pm$ 138.9	21.35 $\pm$ 3.12	6.34 $\pm$ 0.47

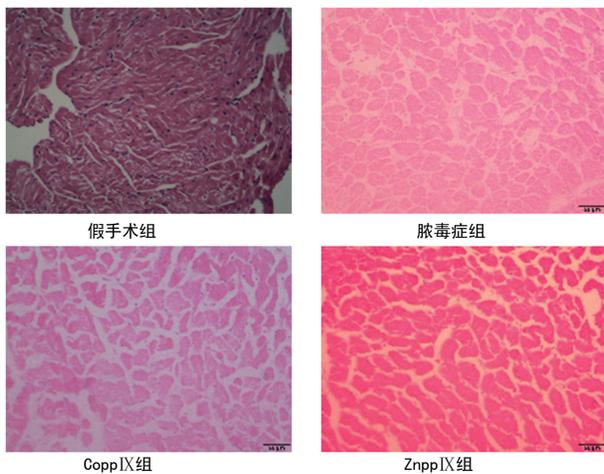
续表 1 各时间点血清 H-FABP、HMGB-1 以及 HO-1 水平

组别	n	CK-MB(IU/L)	cTn I (ng/L)	H-FABP(ng/mL)	HMGB-1(g/L)
12 h		16.11±4.02	675.8±127.4	15.72±2.14	8.46±0.67
24 h		22.25±3.41	453.0±96.3b	10.24±2.09	11.37±0.75
ZnppIX 组	32				
0 h		7.32±1.51	0.45±0.11	6.92±0.75	7.10±0.67
6 h		17.50±2.14 <sup>ab</sup>	1 356.7±333.5 <sup>ab</sup>	33.26±4.57 <sup>c</sup>	10.33±0.75 <sup>de</sup>
12 h		26.43±5.65 <sup>ab</sup>	4 667.3±526.4 <sup>ab</sup>	29.45±4.66 <sup>c</sup>	15.17±0.59 <sup>de</sup>
24 h		49.78±11.29 <sup>ab</sup>	9 917.1±682.2 <sup>ab</sup>	17.22±2.71 <sup>c</sup>	25.21±0.87 <sup>de</sup>

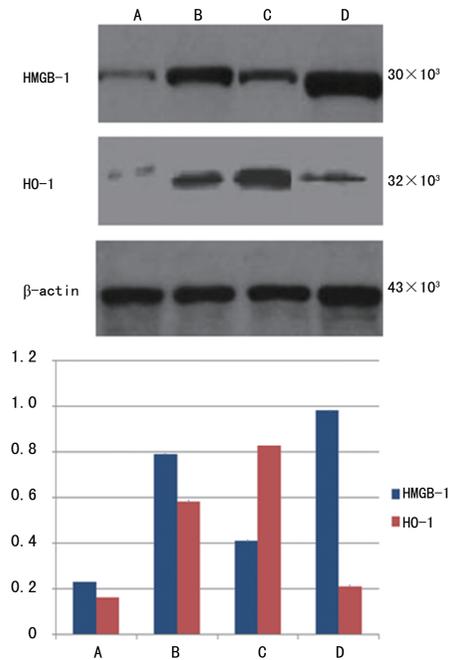
<sup>a</sup>:  $P < 0.05$ , 与脓毒症组同时时间点比较; <sup>b</sup>:  $P < 0.01$ , 与 CppIX 组同时时间点相比较; <sup>c</sup>:  $P < 0.05$ , 与 CppIX 组同时时间点相比较; <sup>d</sup>:  $P < 0.05$ , 与脓毒症组同时时间点比较; <sup>e</sup>:  $P < 0.01$ , 与 CppIX 组同时时间点相比较

**2.2 各时间点血浆 CK-MB、cTn I、H-FABP 及 HMGB-1 表达水平变化** 脓毒症组和 ZnppIX 组 CK-MB、cTn I 升高, CppIX 组短暂升高后呈下降趋势, 与脓毒症组和 CppIX 组相比, ZnppIX 组 CK-MB、cTn I 升高明显 ( $P < 0.05$ )。除假手术组外, 其余各组 H-FABP 均在 6 h 内升高, 6 h 后开始下降, 与 CppIX 组相比, ZnppIX 组升高明显 ( $P < 0.05$ )。假手术组 HMGB-1 表达水平无明显变化, 其余各组 HMGB-1 表达水平均升高, 其中 ZnppIX 组升高最明显, 与脓毒症组和 CppIX 组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见表 1。

**2.3 HE 染色法观察心肌组织结构变化** 光镜下观察大鼠心脏的形态学变化: 假手术组心肌结构清晰, 胞核完整, 心肌纤维排列整齐, 横纹清晰, 结构正常; 脓毒症组可见心肌细胞水肿显著, 核溶解、坏死; CppIX 组细胞肿胀、心肌纤维排列尚整齐, 胞核完整, 未见核溶解、坏死; ZnppIX 组可见明显细胞肿胀, 心肌纤维排列紊乱, 核溶解坏死。见图 1。

图 1 HE 染色光镜下心肌组织结构变化 ( $\times 200$ )

**2.4 Western Blot 检测心肌细胞 HMGB-1 及 HO-1 蛋白的表达** 假手术组 HMGB-1 和 HO-1 蛋白的表达较弱, 其余 3 组 HMGB-1 和 HO-1 蛋白均有不同程度的表达, 其中 ZnppIX 组 HMGB-1 蛋白的表达最显著, 与脓毒症组和 CppIX 组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。CppIX 组 HO-1 蛋白的表达最显著, 与脓毒症组和 ZnppIX 组相比, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 见图 2。



A: 假手术组; B: 脓毒症组; C: CppIX 组; D: ZnppIX 组

图 2 心肌细胞 HMGB-1 及 HO-1 蛋白的表达

### 3 讨论

脓毒症时产生的多种细胞因子, 如肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素 (IL)-1 $\beta$ 、IL-6 等, 这些炎症因子可直接或间接损害心肌。这些细胞因子相互作用, 可形成许多正反馈环, 导致炎症反应持续加重, 不仅可直接抑制心肌收缩功能, 还参与心肌组织结构的破坏, 增加心脏前负荷, 破坏心肌钙稳态。HMGB-1 是相对于 TNF- $\alpha$ 、IL-1 等新的“晚期”炎症因子, 是脓毒症致死效应的关键炎症介质, 其表达水平与脓毒症严重程度及预后高度相关<sup>[1]</sup>。H-FABP 主要存在于心肌细胞胞质中, 血液和其他组织中水平极低, 因此在诊断心肌损伤方面具有较高的特异性; 有研究显示, 当心肌受损时参与心肌脂肪酸的摄入、运输和代谢的 H-FABP 会在心肌损伤时穿过细胞膜漏入血液中<sup>[5]</sup>。由于其相对分子质量小, 在心肌受损情况下, 可迅速穿过细胞膜漏入血管内, 这在诊断心肌损伤方面具有较高的敏感性<sup>[6]</sup>。本研究通过 CLP 方法建立脓毒症大鼠模型, 给予 HO-1 增强剂和抑制剂, 检测脓毒症大鼠血浆中心肌损伤标志物和 HMGB-1 的表达。表 1 可以看出, 假手术组各个时间点血浆中 CK-MB、

cTn I、H-FABP 无明显变化,而其余 3 组各指标在实验 6 h 内均有不同程度升高,从一定程度上证实脓毒症大鼠心肌损伤动物模型造模成功。

HO-1 是一种细胞保护性蛋白,在炎症反应过程中可以抵抗各种有害刺激导致的机体损伤。目前已证实,在脓毒症心肌、肝脏、肺部等疾病的靶器官保护方面发挥重要作用<sup>[7-9]</sup>。从表 1 可以看出,Znpp IX 组血浆中各心肌损伤标志物 CK-MB、cTn I、H-FABP 均较 Copp IX 组明显升高,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。因为 Copp IX 是 HO-1 增强剂,而 Znpp IX 是 HO-1 抑制剂,因此,笔者推测在实验过程中 Copp IX 通过刺激 HO-1 的生成而发挥脓毒症心肌损伤的保护作用,这与上述多数研究所述的 HO-1 具有器官保护功能基本一致。同样,表 1 提示 HMGB-1 因子在 Znpp IX 组升高最明显,而在 Copp IX 组的表达虽有升高,但明显低于 Copp IX 组,两组比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。笔者推测在脓毒症心肌损伤动物模型中,HO-1 与 HMGB-1 之间可能有某种特定的关联。

本研究结果表明,假手术组大鼠心脏组织细胞结构完整,未见明显心肌损伤,Znpp IX 组心脏组织细胞严重破坏,脓毒症组次之,而 Copp IX 组心肌损伤明显较 Znpp IX 组和脓毒症组减轻,从心脏组织病理学角度证实脓毒症心肌损伤过程中 HO-1 发挥着心脏保护作用。

另外,通过 Western Blot 方法检测损伤心肌 HMGB-1 及 HO-1 的表达,从细胞的角度探讨 HMGB-1 及 HO-1 在脓毒症心肌损伤过程中发挥的作用以及它们之间可能存在的关系。图 2 结果表明,假手术组 HMGB-1 和 HO-1 蛋白的表达均较弱,其余 3 组蛋白表达均有不同程度的增加。其中 Znpp IX 组 HMGB-1 蛋白的表达最显著,而 Copp IX 组该蛋白表达最弱,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ );Copp IX 组 HO-1 蛋白的表达最显著,而 Znpp IX 组该蛋白表达最弱,组间比较差异有统计学意义( $P < 0.01$ )。

LI 等<sup>[3]</sup>的研究发现在小鼠模型中氢气可以通过上调 HO-1 的合成抑制 HMGB-1 的表达,改善肺组织的炎症反应,并改善模型动物的死亡率。YU 等<sup>[4]</sup>建立脓毒症大鼠肠功能损伤模型,给予氢气进行干预,研究发现,H<sub>2</sub> 对野生型严重脓毒症大鼠肠功能损伤具有保护作用,其机制是通过调节 HO-1 及 HMGB-1 的释放,减少氧化应激及炎症损伤,增加存活率。KIM 等<sup>[10]</sup>的研究也证实巨噬细胞系 RAW264.7 细胞中甘草皂苷可以通过上调 HO-1 的合成抑制 LPS 诱导的 HMGB-1 的表达。

本研究发现,HO-1 和 HMGB-1 可能存在特定关系,即 HO-1 升高 HMGB-1 即下降,而 HO-1 下降, HMGB-1 即明显升高。因此,笔者推测,HO-1 可能通过抑制 HMGB-1 的表达而发挥脓毒症心肌保护作用。

## 参考文献

- [1] 邵义明,姚华国,梁小仲,等.高迁移率族蛋白 B 表达水平与大鼠脓毒症严重程度及预后关系的实验研究[J].中国危重病急救医学,2006,18(11):668-672.
- [2] HUANG L F, YAO Y M, DONG N, et al. Association of high mobility group box-1 protein levels with sepsis and outcome of severely burned patients[J]. Cytokine, 2011, 53(1):29-34.
- [3] LI Y, XIE K L, CHEN H G, et al. Hydrogen gas inhibits high-mobility group box 1 release in septic mice by upregulation of heme oxygenase 1[J]. J Surg Res, 2015, 196(1):136-148.
- [4] YU Y, YANG Y, BIAN Y, et al. Hydrogen gas protects against intestinal injury in wild type but not NRF2 knockout mice with severe sepsis by regulating HO-1 and HMGB-1 release[J]. Shock, 2017, 48(3):364-370.
- [5] TESSIER J P, THURNER B, JÜNGLING E, et al. Impairment of glucose metabolism in hearts from rats treated with endotoxin[J]. Cardiovasc Res, 2003, 60(1):119-130.
- [6] LUCKE C, RADEMACHER M, ZIMMERMAN A W, et al. Spin-system heterogeneities indicate a selected-fit mechanism in fatty acid binding to heart-type fatty acid binding protein(HFABP)[J]. Biochem J, 2001, 354(2):259-266.
- [7] ZHAO B, FEI J, CHEN Y, et al. Vitamin C treatment attenuates hemorrhagic shock related multi-organ injuries through the induction of heme oxygenase-1 [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14(1):442.
- [8] ZHANG Y, YU J B, LUO X Q, et al. Effect of ERK1/2 signaling pathway in electro-acupuncture mediated up-regulation of heme oxygenase-1 in lungs of rabbits with endotoxic shock[J]. Med Sci Monit, 2014, 20(20):1452-1460.
- [9] CHUNG S W, LIU X, MACIAS A A, et al. Heme oxygenase-1-derived Carbon monoxide enhances the host defense response to microbial sepsis in mice[J]. J Clin Invest, 2008, 118(1):239-247.
- [10] KIM Y M, KIM H J, CHANG K C. Glycyrrhizin reduces HMGB-1 secretion in lipopolysaccharide-activated RAW 264.7 cells and endotoxemic mice by p38/Nrf2-dependent induction of HO-1 [J]. Int Immunopharmacol, 2015, 26(1):112-118.

(收稿日期:2018-09-20 修回日期:2018-11-08)