

高迁移率族蛋白 B-1 和钙粒蛋白在矽肺发病中的作用

万文娟¹, 曲晨菲², 梁圆圆², 祝丽丽¹, 李素平¹

(1. 山西医科大学公共卫生学院, 山西 太原 030001; 2. 青岛滨海学院医学院, 山东 青岛 266000)

摘要: 目的 探讨高迁移率族蛋白 B-1 (HMGB1) 和钙粒蛋白 (S100) 在矽肺发病中的作用, 为充分认识炎症在其中的地位提供新的理论依据。方法 选 C56BL/6 小鼠 48 只, 分为 6 组: 对照组及 3、7、14、21、42 天实验组, 每组 8 只。进行支气管染矽尘, 染尘浓度为 200 mg/kg。在不同的观察时间处死动物, 收集支气管灌洗液, 离心后沉淀用于细胞计数。上清液用于检测 HMGB1、S100 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)。分离肺组织, 取右肺用 Western blot 检测 RAGE。左肺做病理切片, 光镜下观察肺组织的病理改变。结果 (1) 支气管灌洗液中巨噬细胞和中性粒细胞在 3 d 和 21 d 时表现最高, 与 7、14、42 d 比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 (2) HMGB1 和 S100 在染尘 3~21 d 时逐渐增高且具有时间效应关系 ($P < 0.05$), 42 d 时有所降低。 (3) TNF- α 在 3~14 d 染尘时逐渐降低, 21 d 又升高, 42 d 时明显下降, 且各时段间差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。 (4) RAGE 表达水平随观察时间的延长明显降低, 并具有时间效应关系 ($P < 0.05$)。 (5) 随着观察时段的延长, 肺泡壁增厚, 结构明显破坏, 肺泡腔逐渐融合, 肺组织炎症病灶增多, 在 42 d 时形成了大量的纤维化, 几乎看不清肺泡结构。结论 HMGB1 和钙粒蛋白可能参与矽肺晚期炎症的形成, 其生物学效应的发挥不依赖 RAGE 受体。

关键词: 矽肺; 晚期糖基化终末产物受体 (RAGE); 高迁移率族蛋白 B-1 (HMGB1); 钙粒蛋白 (S100 protein); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)

中图分类号: R994 文献标识码: A 文章编号: 1002-221X(2014)02-0090-03 DOI: 10.13631/j.cnki.zggyyx.2014.02.003

Role of high mobility group protein B-1 and calgranulin on the pathogenesis of silicosis

WAN Wen-juan*, QU Chen-fei, LIANG Yuan-yuan, ZHU Li-li, LI Su-ping

(*: School of Public Health, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, China)

Abstract: **Objective** To explore the role of high mobility group protein (HMG) and calgranulin (S100 protein) on the pathogenesis of silicosis, thereby provide a new theoretical basis for understanding the position of inflammation in it. **Methods** C56BL/6 mice were randomly divided to 6 groups: control group and different observation time (3, 7, 14, 21 and 42 days) groups, eight mice for each group. Silica dusts were given by bronchial instillation method, the silica suspension concentration was 200 mg/kg (in 0.9% saline). The mice were killed at a regular period, collect the bronchial lavage fluids and count cell number in centrifugal precipitate, while the supernatant fluid was used for detection of HMGB1 and TNF alpha. The right lung was used for detecting the content of RAGE with the method of Western blot and the left lungs were prepared for the observation of pathological changes. **Results** (1) The neutrophils at 3rd and 21st day after silica-exposure showed the highest values compared with the 7th, 14th, 42nd day. The differences were statistically significant ($P < 0.05$); (2) HMGB1 and S100 protein were increased gradually during the period between 3rd to 21st days ($P < 0.05$), but fell at 42nd day; (3) TNF- α showed gradually reduced after silica exposure, until the 21st day, but was decreased again at the 42nd day ($P < 0.05$); (4) The RAGE expression levels decreased obviously with the time after silica exposure ($P < 0.05$); (5) With the growing of time after silica exposure, the alveolar walls were thickened, the structure was damaged obviously, the alveolar cavity also gradually merged, the inflammation lesions increased, and the fibrosis were so much in lung tissues at the 42nd day that there was nearly no alveolar structure could be seen at that time. **Conclusion** HMGB1 and S100 protein may participate in the inflammation process of silicosis, and its biological effects do not depended on the RAGE.

Key words: silicosis; receptor for advanced glycation end product (RAGE); high mobility group protein B-1 (HMGB1); calgranulin (S100 protein); tumor necrosis factor alpha (TNF- α)

矽肺特征性病理改变是在炎症级联放大基础上产生的进行性弥漫性间质纤维化。高迁移率族蛋白-1 (high mobility group protein, HMG) 和钙粒蛋白

(S100) 是近几年提出的一种新型的晚期炎症介质, 在脓毒血症、败血症和失血性休克中发挥重要作用, 用 HMG 拮抗剂能降低败血症的死亡率^[1~3]。本文拟用体内实验方法, 探讨 HMG 和 S100 在矽肺发病中的作用, 为充分认识矽肺炎症的发生发展提供新的理论依据。

收稿日期: 2013-11-05; 修回日期: 2014-01-20

作者简介: 万文娟 (1987—), 女, 硕士研究生。

通讯作者: 李素平, 教授。

1 材料与方法

1.1 SiO₂ 处理

研磨 SiO₂, 分散度为 2 μm 的占 95%, 备用。

1.2 矽肺模型制备

选取 C56BL/6 野生型小鼠 48 只, 分为 6 组, 对照组及 3、7、14、21、42 d 实验组, 每组 8 只。鼠腹腔注射 0.5% 的戊巴比妥 0.7 ml 麻醉, 颈部 75% 的乙醇消毒, 行支气管切开术, 暴露支气管, 用 1 ml 注射器、27 号针头在气管软骨间穿刺, 回抽有气体后, 将 1 ml 的矽尘混悬液注入气管, 矽尘混悬液浓度为 200 mg/kg, 用生理盐水配制。实验组在支气管内注入浓度为 200 mg/kg 的 SiO₂ 粉尘。对照组注入生理盐水。

1.3 样本收集与指标测定

1.3.1 收集支气管灌洗液 在体全肺灌洗法, 用塑料套管针收集支气管灌洗液, 1 000 r/min, 4 ℃, 离心 10 min, 细胞沉淀用生理盐水悬浮, 制成细胞悬液, 将细胞悬液滴加在玻片上, 自然干燥后 diff-quick 染色, 倒置显微镜下计数细胞总数, 计数中性粒细胞、巨噬细胞及淋巴细胞, 计数 200 个细胞, 计算炎症细胞百分比。上清液用于检测高迁移率族蛋白 B-1 (HMGB1)、钙粒蛋白和肿瘤坏死因子-α (TNF-α)。

1.3.2 肺组织标本采集、病理切片和 RAGE 检测

在右心室注入生理盐水, 阻断肺循环, 使肺组织变白。取右肺放入液氮, 用考马斯亮蓝法提取蛋白。用 Western blot 检测 RAGE, 扫描仪扫描胶片结果, 采用捷达 801 系列凝胶电泳图像分析系统对结果进行分析, 然后计算待测蛋白与 β-actin 光密度 (IOD) 的比值, 比较各组间 IOD / β-actin 的大小。左肺用福尔马林固定 24 h, 将肺的气管、支气管和结缔组织去除, 用生理盐水洗干净, 吸取水分, 石蜡包埋, 做厚度为 5 μm 的病理切片, 苏木素-伊红 (HE) 染色。光镜下观察肺组织的病理改变。

1.4 统计方法

用 SPSS13.0 统计分析软件, 数据以均数 ± 标准差表示, 两组间的比较用单因素方差分析 LSD 法, 以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 支气管灌洗液中细胞总数及炎症细胞计数

支气管灌洗液中巨噬细胞和中性粒细胞在 3 d 和 21 d 时表现最高, 与 7、14、42 d 比较差异有统计学意义, $P < 0.05$, 各时段的炎症细胞与对照组比较差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。见图 1 (封三) 和表 1。

表 1 支气管灌洗液中炎症细胞计数 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	细胞总数 ($\times 10^4$ 个/ml)	巨噬细胞 (%)	中性粒细胞 (%)	淋巴细胞 (%)
染尘 3 d	66 ± 5.73 ^a	98.0 ± 4.17 ^a	33 ± 4.30 ^a	0
染尘 7 d	46 ± 4.81 ^{ab}	74.5 ± 5.13 ^{ab}	24 ± 6.76 ^{ab}	1.5 ± 0.30
染尘 14 d	40 ± 6.33 ^{ab}	78.0 ± 8.07 ^{ab}	23 ± 3.29 ^{ab}	0.5 ± 0.27
染尘 21 d	52 ± 5.34 ^{abcd}	89.5 ± 7.20 ^{abcd}	37 ± 4.03 ^{acd}	2 ± 0.54
染尘 42 d	33 ± 3.40 ^{abcde}	67.0 ± 5.72 ^{abcde}	18 ± 5.1 ^{abcde}	1 ± 0.10
对照组	12 ± 2.11	57.0 ± 6.27	2 ± 1.3	0

注: 与对照组比较, a, $P < 0.05$; 与 3 d 组比较, b, $P < 0.05$; 与 7 d 组比较, c, $P < 0.05$; 与 14 d 组比较, d, $P < 0.05$; 与 21 d 组比较, e, $P < 0.05$ 。表 2 同。

2.2 肺组织病理学改变结果

随着观察时间的延长, 肺组织炎症逐渐加重, 表现肺泡壁增厚, 结构明显破坏, 肺泡腔逐渐融合, 肺组织炎症病灶增多, 在 42 d 时形成了大量的纤维化, 几乎看不清肺泡结构。3 d 和 21 d 肺组织显示明显增多的炎症细胞。见图 2 (封三)。

2.3 支气管上清液中 HMGB1、S100 和 TNF-α 结果

在 3 ~ 21 d 染尘时段, 随着染尘时间的延长, HMGB1 和 S100 逐渐增高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 42 d 时有所降低; 各染尘时间组与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。在 3 d 的矽肺模型支气管灌洗液中 TNF-α 高表达, 随着矽肺的持续发展, 在 7 d 和 14 d 时 TNF-α 降低, 21 d 时又出现了一次高峰, 42 d 明显降低; 各观察时段与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 支气管上清液中 HMGB1、S100 和 TNF-α 测定结果 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	HMGB1 (ng/ml)	S100 (pg/ml)	TNF-α (ng/ml)
染尘 3 d	1.04 ± 0.014 ^a	87.12 ± 2.18 ^a	28.13 ± 2.30 ^a
染尘 7 d	1.12 ± 0.023 ^{ab}	103.21 ± 4.20 ^{ab}	21.51 ± 1.03 ^{ab}
染尘 14 d	1.21 ± 0.025 ^{abc}	137.71 ± 5.16 ^{abc}	20.10 ± 2.16 ^{ab}
染尘 21 d	1.53 ± 0.018 ^{abcd}	163.54 ± 3.83 ^{abcd}	32.63 ± 2.65 ^{abcd}
染尘 42 d	1.43 ± 0.024 ^{abcde}	141.82 ± 3.90 ^{abcde}	16.63 ± 1.92 ^{abcde}
对照组	0.40 ± 0.036	23.92 ± 1.97	9.43 ± 1.73

2.4 肺组织中 RAGE 的表达

Western blot 检测结果显示, 随着观察时间的延长, RAGE 表达明显降低, 与对照组比较差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。见图 3。

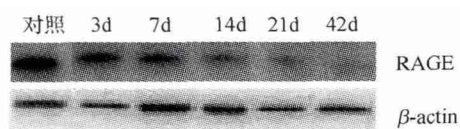


图 3 RAGE 蛋白 Western blot 检测结果

3 讨论

目前矽肺纤维化的发病机制尚不完全清楚,但持续性炎症反应是矽肺发生发展的基础,多年的研究表明, SiO₂ 刺激 AM 或在矽肺模型的支气管灌洗液中均可产生高于对照组的炎性介质如 TNF- α 、IL-1 等,这些介质在矽肺发病中起重要作用,但这些因子的高表达主要表现在矽肺发病的早期^[4]。学者们在脓毒血症、气道炎症等导致哮喘疾病的研究中发现 HMGB1 和 S100 是一种晚期炎症介质,在疾病的发生发展中起着重要作用。临床研究显示,严重脓毒血症所致死亡的病例,其血清中 HMGB1 水平较 TNF- α 高 30 倍^[5]。S100 能导致细胞增殖、凋亡和胶原合成,诱导气道炎症引起哮喘^[6]。目前已将 HMGB1 和 S100 作为许多疾病临床治疗的新靶点,欧美等国家已有多个临床试验论证 HMGB1 抑制剂的疗效和安全性^[7]。

受这些研究的启发,联想到在矽肺发病过程中,炎症的“瀑布”效应是否与 HMGB1 和 S100 有关。本实验研究发现,矽肺模型支气管上清液中 TNF- α 在 3 d 和 21 d 时高表达,7、14、42 d 表达明显降低。而细胞总数和炎性细胞计数持续增高状态基本不变,直至 42 d 时细胞计数明显降低,差异有统计学意义。而肺组织病理切片显示,在 3~21 d 肺部炎症逐渐加重,表现为肺组织炎性细胞大量浸润,肺泡结构明显破坏,气道壁和毛细血管壁增厚,气道的纤毛柱状上皮细胞脱落。提示随着观察时间延长,矽肺炎症持续发展。而本次实验显示 TNF- α 的作用并不是持续的,特别是晚期炎症的出现一定还有其他炎症因子的参与。故而检测了支气管上清液中 HMGB1 和 S100 的表达,发现在 3~21 d 时 HMGB1 和 S100 表达逐渐升高,42 d 时明显降低。综上结果可知, TNF- α 主要出现在矽肺发病早期,而 HMGB1 和 S100 的高峰却出现较晚。以往的研究资料表明, TNF- α 和 HMGB1、S100 之间通过自分泌和旁分泌方式存在正负反馈的调节效应^[8]。根据实验结果分析, TNF- α 的早期升高,通过细胞信号转导通路机制刺激 HMGB1 和 S100 从细胞核分泌到胞浆和胞膜,促使 HMGB1 和 S100 高表达;当 HMGB1 和 S100 高表达时,通过负反馈调节机制,促使 TNF- α 再次高表达。

信号转导理论认为,生物介质发挥生物学效应,必须由细胞膜上相应受体介导。研究证实, HMGB1 和 S100 是通过与细胞膜上 RAGE 受体和 TOLL 样受体 2 和 4 结合而发挥生物学效应^[9]。本次研究显示,随着矽肺的发生发展, RAGE 受体表达明显降低。这一结果与 Lasse Ramsgaard 等^[10] 研究结果一致。HMGB1 和 S100 可能是参与矽肺炎症“瀑布”效应和纤维化形成的因子,它们发挥生物学效应不依赖细胞膜上的 RAGE。

参考文献:

- [1] Erlandsson Harris H, Andersson U. The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator [J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34 (6): 1503-1512.
- [2] 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.
- [3] Yang H, Ochani M, Li J, *et al.* Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1 [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2004, 101 (1): 296-301.
- [4] Gossart S, Cambon C, Drfila C, *et al.* Reactive oxygen intermediate as regulators of TNF- α production in rat lung inflammation induced by silica [J]. *Immunology*, 1996, 156 (4): 1540-1548.
- [5] Huang W, Tang Y, Li L. HMGB1, a potent proinflammatory cytokine in sepsis [J]. *Cytokine*, 2010, 51 (2): 119-216.
- [6] Halayko A J, Ghavami S. S100A8/A9: a mediator of severe asthma pathogenesis and morbidity? [J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2009, 87 (10): 743-755.
- [7] Bierhaus A, Stern D M, Nawroth P P. RAGE inflammation: a new therapeutic target? [J]. *Curr Opin Investiq Drugs*, 2006, 7 (11): 985-991.
- [8] Hamada N, Maeyama T, Kawaguchi T. The role of high mobility group box 1 in pulmonary fibrosis [J]. *Am J Respir Cell Mol Biol*, 2008, 39 (4): 440-447.
- [9] van Beijnum J R, Buurman W A, Griffioen A W, *et al.* Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1) [J]. *Angiogenesis*, 2008, 11 (1): 91-99.
- [10] Ramsgaard L, Englert J M, Tobolewski J, *et al.* The role of the receptor for advanced glycation end-products in a murine model of silicosis [J]. *PLoS One*, 2010, 5 (3): e9604.

欢迎投稿、订阅、发布广告

高迁移率族蛋白B-1和钙粒蛋白在矽肺发病中的作用（正文见90～92页）

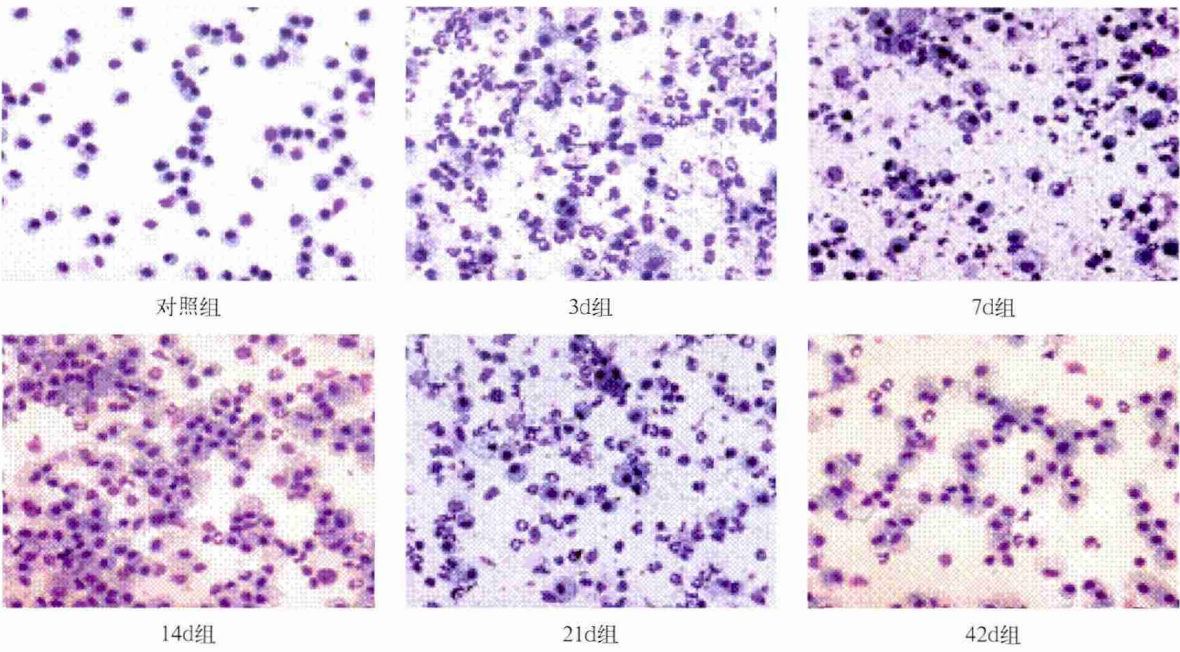


图1 矽肺模型支气管灌洗液细胞（×100）

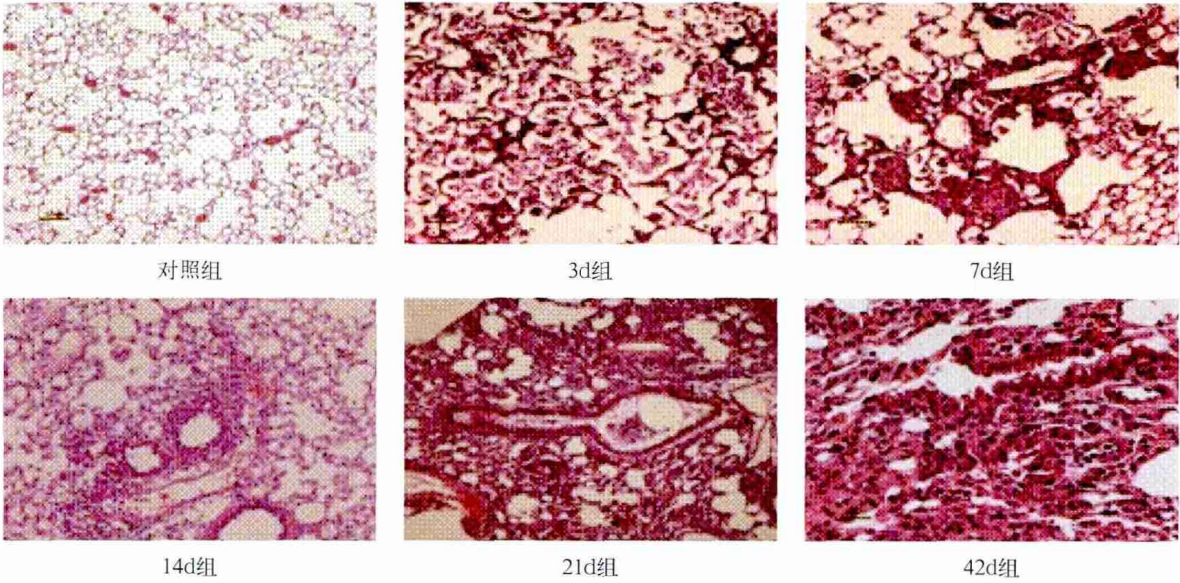


图2 矽肺模型肺组织病理光镜检测结果（×200）

大鼠矽肺相关基因组织蛋白酶B的电子克隆与验证（正文见93～96页）

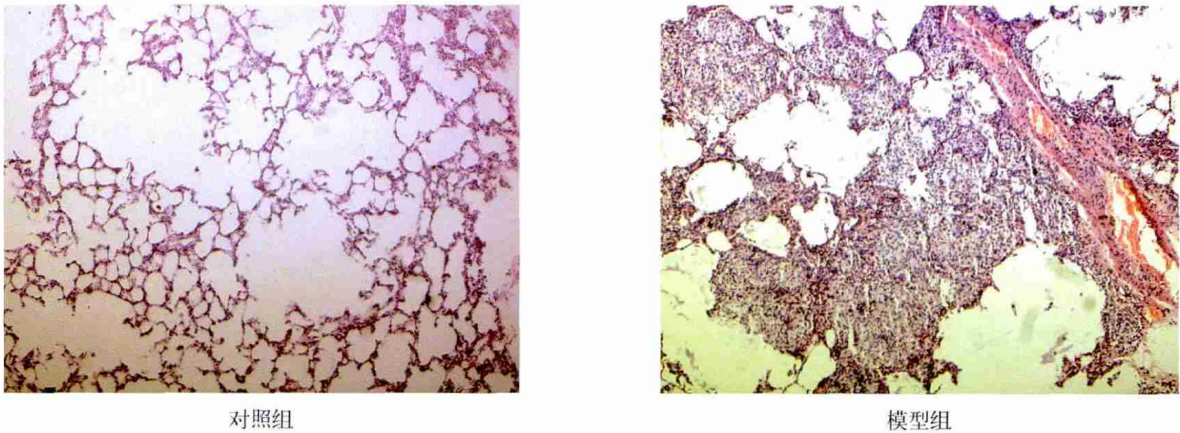


图2 两组大鼠60天时肺组织形态学改变（HE，×40）