

# 羟乙基淀粉(130/0.4)预处理减轻肝脏缺血再灌注损伤相关急性肺损伤的作用机制研究

郑蓓洁, 杨中伟, 陈煜, 吴广喜, 何征宇, 王祥瑞

(上海交通大学医学院附属仁济医院麻醉科, 上海, 200127)

**摘要:** 目的:研究羟乙基淀粉预处理减轻肝脏缺血/再灌注损伤相关急性肺损伤的作用机制。方法: 30 只雄性 SD 大鼠随机分为五组: 空白对照组、生理盐水组、肝脏缺血/再灌注组、羟乙基淀粉预处理组和羟乙基淀粉预处理+肝脏缺血/再灌注组。手术组动物肝脏缺血 90min, 再灌注 18 小时, 术前和术后取血检测 HMGB1 的表达, Realtime PCR 检测肺组织 HMGB1 和 TLR4 mRNA 的水平, Western Blot 检测肺组织 HMGB1, TLR4 和磷酸化 p38 蛋白的表达, EMSA 法检测肺组织 AP-1 的活性。结果: 肝脏缺血再灌注损伤引起血清 HMGB1 升高; 肺组织 HMGB1 的 mRNA 和蛋白表达升高; TLR4 的 mRNA 和蛋白表达升高; p-p38 蛋白表达升高以及 AP-1 活性增高。羟乙基淀粉预处理并不影响以上各项指标。结论: 羟乙基淀粉(130/0.4)预处理改善肝脏缺血/再灌注损伤相关 ALI/ARDS 的作用机制与 HMGB1/TLR4/p38 MAPK/AP-1 信号通路无关, 具体的作用机制还需进一步研究。

**关键词:** 急性肺损伤; 羟乙基淀粉(130/0.4); 高迁移率组蛋白 1; Toll 样受体; p38 丝裂原激活蛋白激酶; 活化蛋白-1

**中图分类号:** 请查阅《中国图书馆分类法》

## The of HMGB1/TLR4/p38 MAPK/AP-1 Signaling Pathway in Hydroxyethyl starch(130 kD)-mediated attenuation of Liver Ischemia/Reperfusion Injury-induced Acute Lung Injury

ZHENG Beijie, YANG Zhongwei, CHEN Yu, WU Gangxi, HE Zhengyu, WANG Xiangrui

(Department of Anesthesiology, Renji Hospital, Shanghai Jiaotong University School of Medicine, Shanghai 200127)

**Abstract:** Objective: To investigate the role of HMGB1/TLR4/p38MAPK/AP-1 signalling pathway in hydroxyethyl starch (HES) -mediated attenuation of liver ischemia/reperfusion (I/R) injury- induced Acute Lung Injury (ALI) . Methods: A rat model of liver I/R was used to induce ALI in our study. A total of 30 male Sprague-Dawley rats (180 – 220 g) were randomly divided into five groups (n = 6 per group):Control group, Liver I/R injury group, Normal saline group, HES group and HES with liver I/R injury treatment group. Levels of HMGB1 in serum in lung tissue were determined by ELISA. Levels of TLR4 and HMGB1 mRNA in lung tissue were detected by real-time PCR. Expressions of TLR4, HMGB1 and phosphor-P38 protein in lung tissue were determined by Western blot analysis. Activation of activator protein 1 (AP-1) in lung tissue was measured by electrophoretic mobility shift assay (EMSA). Results: Serum HMGB1 were found significantly higher after liver I/R injury, and more importantly, expression of HMGB1 mRNA and protein in lung tissue was also significantly increased. We further found that liver I/R injury enhanced expression of TLR4 mRNA and protein, and activities of p38MAPK and AP-1 in lung tissue. However, HES treatment did not inhibit HMGB1 levels, expression of TLR4, and its downstream p38MAPK/AP-1 signaling pathway in lung tissue after liver I/R injury.

**基金项目:** 高等学校博士学科点专项科研基金 (No. 20110073110073)

**作者简介:** 郑蓓洁(1982 年 2 月),女,医师,急性肺损伤

**通信联系人:** 王祥瑞, 男, 教授, 主要研究方向: 急性肺损伤. E-mail: xiangruiwangshsmu@163.com

Conclusion: HMGB1/TLR4/p38MAPK/AP-1 signalling pathway did not involved in HES-mediated attenuation of liver I/R injury- induced ALI, furthermore studies are needed to investigate the underlying mechanisms.

**Key words:** acute lung injury; Hydroxyethyl starch; HMGB1; TLR4; p38MAPK; AP-1

## 0 引言

急性肺损伤 (acute lung injury, ALI) 及其严重形式急性呼吸窘迫综合征 (acute respiratory distress syndrome, ARDS) 是肝移植术等重大肝脏手术围手术期最常见和致命性的危重综合征, 其死亡率高达 24%-60%[1,2]。在肝移植手术期间, 因缺血/再灌注损伤 (ischemia/reperfusion, I/R) 产生各类炎性细胞因子, 通过血液循环作用于肺, 引起肺组织的急性炎性反应, 毛细血管通透性增高是肝移植围手术期 ALI/ARDS 发病的核心机制[3]。我们之前的研究也发现肝脏 I/R 可引起肝脏高迁移率蛋白 1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 合成和释放增加, 并通过血循环作用于肺, HMGB1 作为 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 的内源性配体活化肺组织的 TLR4, 并引起 p38 丝裂原激活蛋白激酶 (p38-mitogen activated protein kinase, p38MAPK) /活化蛋白-1 (activator protein-1, AP-1) 信号通路的活化, 启动肺组织的急性炎性反应, 最终导致围手术期 ALI/ARDS 的发生[4]。

近年来, 羟乙基淀粉(130/0.4)在围手术期脏器功能保护中的重要作用已经引起了广泛的重视。我们之前的研究也发现, 羟乙基淀粉(130/0.4)可以显著改善肝脏 I/R 相关 ALI[5]。此外, 羟乙基淀粉(130/0.4)可以显著改善 LPS 所诱导的 ALI/ARDS 急性期肺炎性反应, 该现象与羟乙基淀粉(130/0.4)抑制肺组织 TLR4 的表达及其下游的 p38 MAPK/AP-1 通路密切相关[7]。但是, 羟乙基淀粉(130/0.4)减轻肝脏 I/R 相关 ALI 的机制尚不清楚。

本文通过肝脏 I/R 诱导大鼠 ALI 模型, 探讨羟乙基淀粉(130/0.4)对肝脏 I/R 相关 ALI 的机制进行初步研究, 为肝移植等肝脏重大手术围手术期的肺保护策略制定提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物

雄性 SD 大鼠 30 只, 体重 180~300g, 购自上海斯莱克实验动物有限公司。饲养于 12h: 12h 光暗环境, 给予标准饲料, 自由摄食及饮水。所有实验动物的使用, 都得到上海交通大学动物管理机构的同意, 符合美国国立卫生研究院出版的动物相关管理准则, 所有的动物均得到了人性化的对待。

### 1.2 药品及仪器

细胞 / 组织蛋白提取液 (上海康成生物科技公司), BSA 蛋白分析试剂盒 (天根公司), 兔源 HMGB1 多克隆抗体 (1: 1000, 美国 Abcam 公司), 兔源 TLR4 抗体 (1: 1000, 美国 Cell Signaling Technology 公司), 兔源 phospho-p38 抗体 (1:1000, 美国 Abcam 公司), 兔源  $\beta$ -actin 抗体 (1:1000, 美国 Epitomics 公司), Infrared Dye 800 CW 绵羊抗兔 IgG (美国 Rockland 公司), Odyssey Infrared Imaging System (美国 LI COR 公司)。

### 1.3 实验分组

实验用大鼠 30 只, 随机分为以下 5 组, 每组 5 只。

A 组 (空白对照组, Control): 动物未经特殊处理。

B 组（生理盐水组, NS）：动物经尾静脉输入 30ml/kg 的生理盐水，30 分钟后接受开腹假手术。

85 C 组（肝脏缺血/再灌注组, NS+I/R）：动物经尾静脉输入 30ml/kg 的生理盐水，30 分钟后接受肝脏缺血/再灌注手术。

D 组（羟乙基淀粉预处理组, HES）：动物经尾静脉输入 30ml/kg 的羟乙基淀粉(130/0.4)，30 分钟后接受开腹假手术。

90 E 组（羟乙基淀粉预处理+肝脏缺血/再灌注组, HES+I/R）：动物经尾静脉输入 30ml/kg 的羟乙基淀粉(130/0.4)，30 分钟后接受肝脏缺血/再灌注手术。

#### 1.4 肝脏部分缺血再灌注模型制备

利用 200-300g 的 SD 大鼠造模，大鼠经腹腔注射戊巴比妥钠溶液麻醉（100mg/kg），在麻醉深度达手术要求后，延腹中线切开一约 2cm 的切口，分离支配肝脏左中叶、左叶和右中叶的血管，然后用动脉夹夹闭门静脉、动脉和胆管（约 70% 的肝脏血供阻断），保留  
95 右叶、尾状叶和乳突的血供，缺血 90min 后移除动脉夹，补充约 5ml 生理盐水后关腹，肝脏开始再灌注。

#### 1.5 Western Blot 法检测肺组织 HMGB1 和 TLR4 的表达

大鼠脱颈椎处死后立即剪取约 100mg 肺组织，加入 1 ml 的细胞 / 组织蛋白提取液中（含 1% 蛋白酶抑制剂、磷酸酶抑制剂和 PMSF），冰浴匀浆。4℃，11000×g 离心 10min  
100 并取上清，BSA 蛋白定量分析试剂盒测定蛋白浓度，分装后置于-80℃保存。10% SDS PAGE，然后电转移至 NC 膜上，恒压 100V，1h。用含 10% 脱脂牛奶的 PBS 室温封闭 4h，加入一抗，室温孵育 2h，加二抗，室温孵育 1h。用 1×磷酸盐缓冲液（含 0.1% Tween 20）洗膜 4 次，每次 5 min，于 Odyssey Infrared Imaging System 获得并存储图像。使用 Bio Rad 公司的 Quantity One 软件对条带进行灰度分析，计算目的蛋白与 GAPDH 的比值即为目的  
105 蛋白的相对表达量。实验重复 2 次。

#### 1.6 Real-time PCR 法检测肺组织 HMGB1 和 TLR4 mRNA 的水平

选用 GAPDH 作为内参照。HMGB1 基因引物序列为：上游引物为 5' TCCCCTACTAAAGACCTGAGAATG 3'，下游引物为 5' TTTATCCGCTTTCCTTGTATCTG 3'。TLR4 基因引物序列为：上游引物为 5' CAGGGAGCACGAGGCTTCTAACC 3'，下游引  
110 物为 5' CTTGTGCCCTGTGAGGTCGTTGA 3'。GAPDH 基因引物序列为：上游引物为 5' GCCCTCACGATAACCAATTACCT 3'，下游引物为 5' CATGGTGCCTTCATAGTTCTCAGA 3'。使用 Takara 公司开发的 SYBR Premix Ex Taq Kit，在 Bio-Rad 的 Opticon Monitor 3 Real time PCR system 上进行，采取复孔，重复 3 次以上。以目的基因的表达式除以 GAPDH 的表达式作为相对表达式。数据分析采用  $2^{-\Delta\Delta CT}$  法。

#### 115 1.7 凝胶迁移实验

提前一天配制非变性 PAGE，80V 电泳跑到三分之二处胶，调到 70V。转膜，400 mA，30 min。膜放在 120℃，30min 烘干。在 20ml 的 Washing buffer 中振荡 5min，10ml 的 Blocking solution 中振荡 30 min，10ml 的 Antibody solution 孵育 30min，Washing buffer 洗膜 2 次，15min/次。Detection buffer 中平衡 5min。然后加入 CSPD 中，25℃ 5 min，再放置 37℃ 10 min。  
120 用 X 射线胶片曝光 30 min，显影液 5 min，定影液 5min。

## 1.8 统计学处理

计量资料均以均数±标准差(mean ± SD)表示。HMGB1 ELISA 检测和动脉血气分析结果采用配对 t 检验。其它结果均采用 ANOVA 分析。P<0.05 认为统计分析具有显著性差异。采用 SAS8.1 统计软件进行处理。

## 2 结果

**2.1 HMGB1 mRNA 和蛋白在肺组织中的表达强度** 结果显示：与空白对照组相比，生理盐水组和羟乙基淀粉预处理组肺组织 HMGB1 mRNA 表达强度均无显著差异，肝脏缺血/再灌注组和羟乙基淀粉预处理+肝脏缺血再灌注组肺组织 HMGB1 mRNA 表达强度显著升高。与肝脏缺血/再灌注组相比，羟乙基淀粉预处理+肝脏缺血/再灌注组肺组织 HMGB1 mRNA 表达强度无显著差异（图 1 A）；蛋白表达趋势与 mRNA 一致(图 1B)。

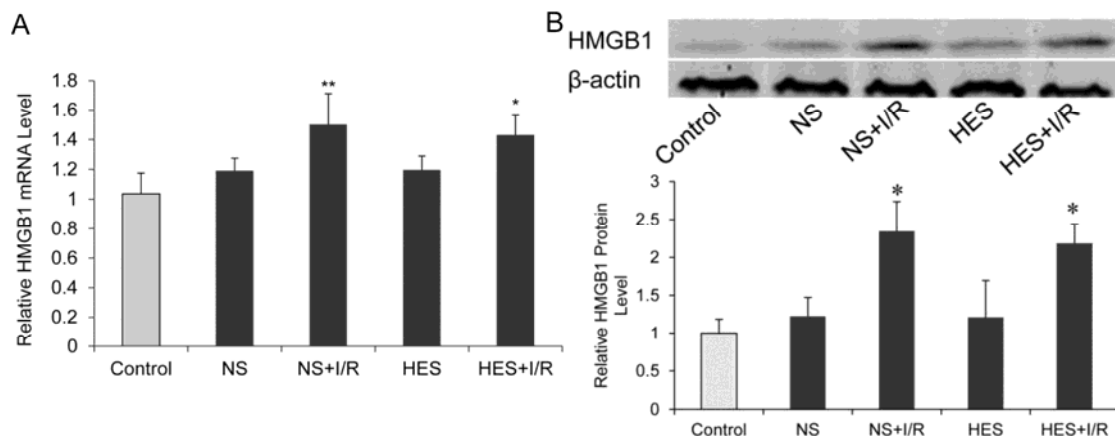


图1 肝脏缺血再灌注损伤后肺组织 HMGB1 mRNA 和蛋白表达水平

Fig. 1 Relative HMGB1 mRNA (A) and protein (B) levels in lung tissue at 18 hrs after liver I/R injury. \*P<0.05, \*\*P<0.01 compared to control group. Relative levels of HMGB1 mRNA to control group are normalized to GAPDH. Relative levels of HMGB1 protein to control group are normalized to β-actin. Data are expressed as means ± SD. (n=6 per group).

**2.2 TLR4 mRNA 和蛋白在肺组织中的表达强度** 结果显示：与空白对照组相比，生理盐水组和羟乙基淀粉预处理组肺组织 TLR4 mRNA 表达强度均无显著差异，肝脏缺血/再灌注组和羟乙基淀粉预处理+肝脏缺血/再灌注组肺组织 TLR4 mRNA 表达强度显著升高。与肝脏缺血/再灌注组相比，羟乙基淀粉预处理+肝脏缺血/再灌注组肺组织 TLR4 mRNA 表达强度无显著差异；蛋白表达趋势与 mRNA 一致(图 2)。

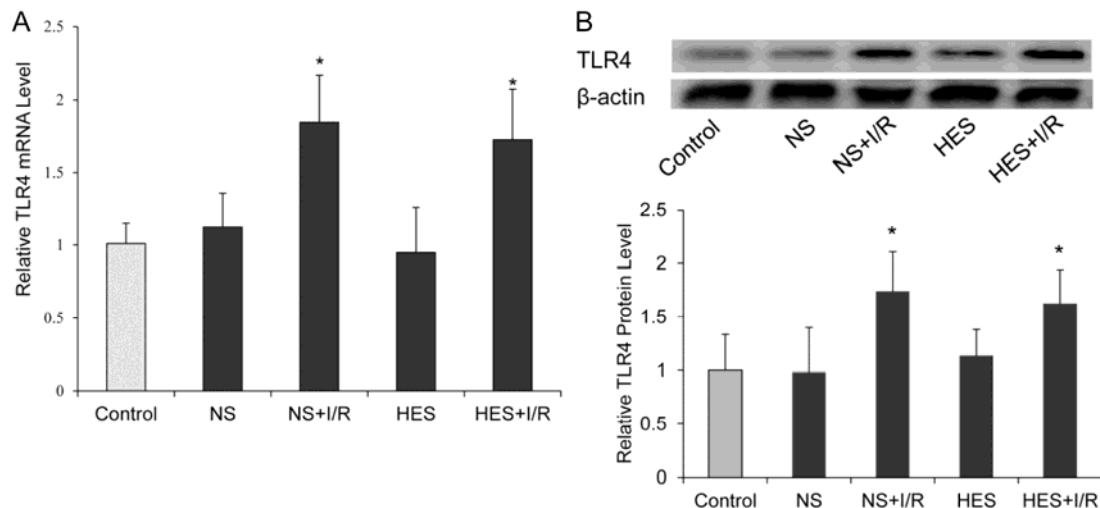


图 2 肝脏缺血再灌注损伤后肺组织 TLR4 mRNA 和蛋白的表达水平

Fig. 2 Relative TLR4 mRNA (A) and protein (B) levels in lung tissue at 18 hrs after liver I/R injury. \* $P < 0.05$ , compared to control group. Relative levels of TLR4 mRNA to control group are normalized to GAPDH. Relative levels of TLR4 protein to control group are normalized to  $\beta$ -actin. Data are expressed as means  $\pm$  SD. (n=6 per group).

**2.3 肺组织中 p38 MAPK 和 AP-1 的活性** 结果显示：与空白对照组相比，生理盐水组和羟乙基淀粉预处理组肺组织磷酸化 p38 蛋白的表达强度均无显著差异，肝脏缺血/再灌注组和羟乙基淀粉预处理+肝脏缺血/再灌注组肺组织磷酸化 p38 表达强度显著升高。与肝脏缺血/再灌注组相比，羟乙基淀粉预处理+肝脏缺血/再灌注组肺组织磷酸化 p38 表达强度无显著差异；AP-1 的活性与磷酸化 p38 的表达趋势一致(图 3)。

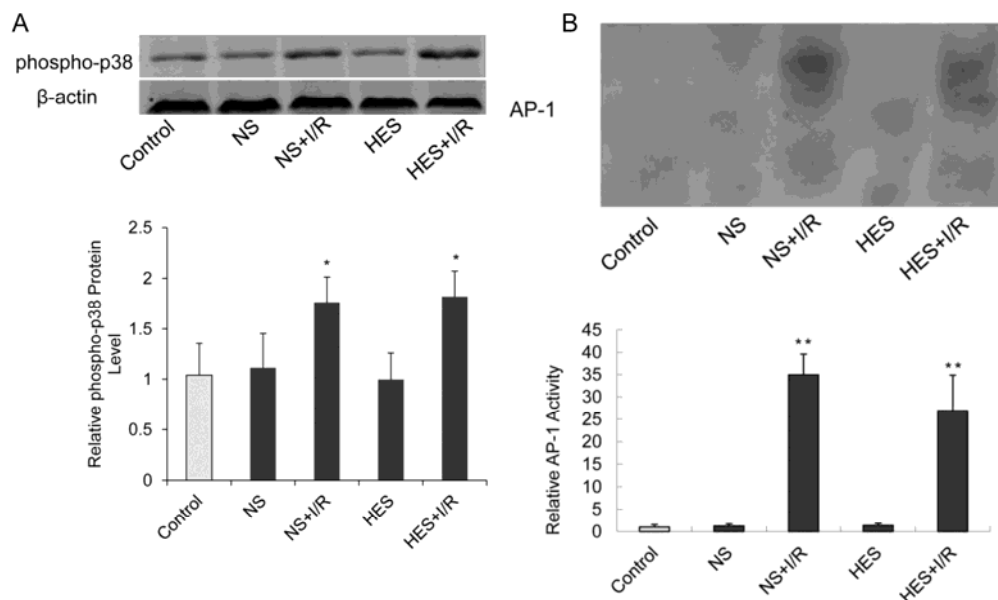


图 3 肝脏缺血再灌注损伤后肺组织 p38MAPK 和 AP-1 的活性

Fig. 3 Activation of p38MAPK in lung tissue from rats at 18 hrs after liver I/R injury or sham operation. A, Relative levels of phospho-p38 protein to control group are normalized to  $\beta$ -actin. B, AP-1 activity was evaluated with electrophoretic mobility shift assay (EMSA) with representative image shown. Blots shown here are from a representative experiment repeated three times with similar results. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , compared to control group. Data are expressed as means  $\pm$  SD (n=6 per group).



### 3 讨论

近年来,羟乙基淀粉(130/0.4)作为新一代的血浆代替品已广泛应用于临床的容量治疗。近期研究证实羟乙基淀粉(130/0.4)还具有较好的免疫抑制作用,可以显著降低肺组织毛细血管的通透性,改善肺组织渗出和急性炎症反应,具有重要的围手术期肺保护效应[6]。本课题组曾对羟乙基淀粉(130/0.4)在感染引起的脓毒血症过程中的肺保护机制进行了深入研究,发现羟乙基淀粉(130/0.4)可以显著改善 LPS 所诱导的 ALI/ARDS 急性期肺炎性反应,该现象与羟乙基淀粉(130/0.4)抑制肺组织 TLR4 的表达及其下游的 p38 MAPK/AP-1 通路密切相关。该研究初步确定了羟乙基淀粉(130/0.4)在 ALI/ARDS 过程中的肺保护作用是通过 TLR4 表达及其下游信号通路的调控实现的[7]。

目前虽然有研究推测其肺组织保护效应与羟乙基淀粉形成的“分子塞”堵漏作用以及抑制 ALI/ARDS 过程中肺组织炎症细胞因子的释放反应有关[8, 9],但其具体作用机制仍未明了。我们之前的研究结果证实了肝移植围手术期 ALI 的发病机制,即在非转流原位肝移植手术无肝期出现的 I/R 过程中,肝组织损伤可引起 HMGB1 合成和释放增加,通过血液循环作用于肺。HMGB1 作为 TLR4 的内源性配体活化肺组织的 TLR4,并引起 p38 MAPK/AP-1 信号通路的活化,启动肺组织的急性炎症反应,最终导致围手术期 ALI/ARDS 的发生[4]。此外也发现,预防性地使用羟乙基淀粉(130/0.4)可以显著降低肝移植围手术期肝脏 I/R 相关 ALI。本研究尝试以 HMGB1/TLR4/p38 MAPK/AP-1 信号通路为中心,研究羟乙基淀粉(130/0.4)减轻肝脏 I/R 相关 ALI 的机制。结果发现,羟乙基淀粉(130/0.4)不能抑制 HMGB1 和 TLR4 的表达升高及其下游 p38MAPK/AP-1 信号通路的活化。提示其作用机制与 HMGB1/TLR4/p38 MAPK/AP-1 信号通路无关,其保护机制可能与提高器官灌注有关[6, 10],但具体的作用机制还需进一步研究。

### 4 结论

综上所述,羟乙基淀粉预处理对肝脏缺血再灌注损伤相关 ALI/ARDS 具有重要的肺保护作用,但其机制与 HMGB1/TLR4/p38 MAPK/AP-1 信号通路无关。

#### [参考文献] (References)

- [1] Hong SK, Hwang S, Lee SG, Lee LS, Ahn CS, Kim KH, Moon DB, Ha TY. Pulmonary complications following adult liver transplantation[J]. Transplantation proceedings, 2006, 38(9):2979-2981.
- [2] Bozbas SS, Eyuboglu FO, Ozturk Ergur F, Gullu Arslan N, Sevmis S, Karakayali H, Haberal M. Pulmonary complications and mortality after liver transplant[J]. Experimental and clinical transplantation : official journal of the Middle East Society for Organ Transplantation, 2008, 6(4):264-270.
- [3] Yost CS, Matthay MA, Gropper MA. Etiology of acute pulmonary edema during liver transplantation[J]. Chest, 2001, 119(1):219-223.
- [4] Yang Z, Deng Y, Su D, Tian J, Gao Y, He Z, Wang X. TLR4 as receptor for HMGB1-mediated acute lung injury after liver ischemia/reperfusion injury[J]. Lab Invest, 2013, 93(7):792-800.
- [5] 杨中伟, 陈煜, 郑蓓洁等. 羟乙基淀粉(130/0.4)预处理减轻肝脏缺血再灌注损伤相关急性肺损伤[EB/OL]. 北京: 中国科技论文在线 [2014-04-22]. <http://www.paper.edu.cn/releasepaper/content/201404-291>.
- [6] Huang CC, Kao KC, Hsu KH, Ko HW, Li LF, Hsieh MJ, Tsai YH. Effects of hydroxyethyl starch resuscitation on extravascular lung water and pulmonary permeability in sepsis-related acute respiratory distress syndrome[J]. Crit Care Med, 2009, 37(6):1948-1955.
- [7] Tian J, Wang Y, He Z, Gao Y, Rundhaug JE, Wang X. Hydroxyethyl starch (130 kD) inhibits Toll-like receptor 4 signaling pathways in rat lungs challenged with lipopolysaccharide. Anesth Analg[J]. 2011, 113(1):112-9.
- [8] Kobbe P, Kaczorowski DJ, Vodovotz Y, Tzioupis CH, Mollen KP, Billiar TR, Pape HC. Local exposure of bone components to injured soft tissue induces Toll-like receptor 4-dependent systemic inflammation with acute lung injury[J]. Shock, 2008, 30(6):686-691.
- [9] 田婕, 徐建国. 羟乙基淀粉对内毒素感染大鼠肺部毛细血管通透性的影响[J]. 中华麻醉学杂志, 2004,

- 210 24:122-125.  
[10] Rivers E, Nguyen B, Havstad S, Ressler J, Muzzin A, Knoblich B, Peterson E, Tomlanovich M. Early goal-directed therapy in the treatment of severe sepsis and septic shock[J]. The New England journal of medicine, 2001, 345(19):1368-1377.