

doi: 10.7499/j.issn.1008-8830.2019.02.005

论著·临床研究

高迁移率族蛋白1在新生儿败血症中的表达与机制

卓素艳 廖莉

(重庆市沙坪坝区人民医院儿科, 重庆 400030)

[摘要] **目的** 探讨高迁移率族蛋白1(HMGB1)在新生儿败血症中的表达与机制。**方法** 选取62例新生儿败血症患儿为败血症组,66例局部感染新生儿为局部感染组,70例健康新生儿为健康对照组。检测三组新生儿血清中IL-6、IL-8、IL-17、IL-23、C反应蛋白(CRP)和降钙素原(PCT)的含量,外周血单个核细胞中HMGB1、Toll样受体4(TLR4)、核转录因子 κ B(NF- κ B)mRNA及TLR4、NF- κ B蛋白的表达。将健康新生儿的外周血单个核细胞分为对照组、HMGB1处理组、HMGB1+TAK-242(TLR4抑制剂)组、HMGB1+PDTC(NF- κ B抑制剂)组,检测各组TLR4、NF- κ B、IL-8 mRNA及TLR4、NF- κ B蛋白的表达。将健康新生儿的外周血单个核细胞分为对照组、LPS处理组、LPS+甘草甜素(HMGB1抑制剂)组,检测HMGB1、TLR4、NF- κ B、IL-8 mRNA及TLR4、NF- κ B蛋白的表达。**结果** 败血症组患儿血清中IL-6、IL-8、IL-17、IL-23、CRP、PCT含量均显著高于局部感染组和健康对照组($P<0.05$)。败血症组患儿外周血单个核细胞中HMGB1、TLR4、NF- κ B mRNA及TLR4、NF- κ B蛋白的相对表达量均显著高于局部感染组和健康对照组($P<0.05$)。HMGB1可以显著诱导外周血单个核细胞高表达TLR4、NF- κ B mRNA及其蛋白($P<0.05$);使用TAK-242可抑制TLR4、NF- κ B mRNA及其蛋白的高表达,并进而抑制IL-8 mRNA的表达($P<0.05$);使用PDTC可抑制NF- κ B mRNA及其蛋白的高表达,并进而抑制IL-8 mRNA的表达($P<0.05$)。LPS可显著诱导HMGB1 mRNA,以及TLR4、NF- κ B mRNA及其蛋白的高表达,进而刺激IL-8 mRNA的表达($P<0.05$);使用甘草甜素可抑制HMGB1 mRNA的高表达,抑制TLR4、NF- κ B mRNA及其蛋白的高表达,进而降低IL-8 mRNA的高表达($P<0.05$)。**结论** HMGB1可能通过激活TLR4/NF- κ B信号通路诱导IL-8等炎症因子的高分泌在新生儿败血症的发病中起重要作用,HMGB1阻断剂甘草甜素可抑制TLR4/NF- κ B信号通路的活化及炎症因子的分泌。

[中国当代儿科杂志, 2019, 21(2): 131-138]

[关键词] 新生儿败血症;高迁移率族蛋白1;Toll样受体4;核转录因子 κ B;白细胞介素-8;甘草甜素;新生儿

Expression of high-mobility group box 1 in neonates with sepsis

ZHUO Su-Yan, LIAO Li. Department of Pediatrics, People's Hospital of Chongqing Shapingba District, Chongqing 400030, China (Liao L, Email: 13888523@qq.com)

Abstract: Objective To study the expression of high-mobility group box 1 (HMGB1) in neonates with sepsis and its role in the pathogenesis of neonatal sepsis. **Methods** A total of 62 neonates with sepsis were enrolled as the sepsis group, 66 neonates with local infection were enrolled as the local infection group, and 70 healthy neonates were enrolled as the healthy control group. Serum levels of interleukin-6 (IL-6), interleukin-8 (IL-8), interleukin-17 (IL-17), interleukin-23 (IL-23), C-reactive protein (CRP) and procalcitonin (PCT) were measured. The mRNA expression of HMGB1, Toll-like receptor 4 (TLR4) and nuclear factor-kappa B (NF- κ B) and the protein expression of TLR4 and NF- κ B in peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were also measured. PBMCs from healthy neonates were divided into 4 groups: control, HMGB1 treatment, HMGB1+TAK-242 (a TLR4 inhibitor) treatment and HMGB1+PDTC (an NF- κ B inhibitor) treatment, and the mRNA expression of TLR4, NF- κ B and IL-8 and the protein expression of TLR4 and NF- κ B were measured. PBMCs from healthy neonates were divided into another 3 groups: control, LPS treatment and LPS+glycyrrhizin (an HMGB1 inhibitor) treatment, and the mRNA expression of HMGB1, TLR4, NF- κ B and IL-8

[收稿日期] 2018-08-31; [接受日期] 2019-01-09

[作者简介] 卓素艳,女,本科,主治医师。

[通信作者] 廖莉,女,主任医师。Email: 13888523@qq.com。

and the protein expression of TLR4 and NF- κ B were measured. **Results** Compared with the local infection and healthy control groups, the sepsis group had significantly higher serum levels of IL-6, IL-8, IL-17, IL-23, CRP and PCT ($P<0.05$), as well as significantly higher mRNA expression of HMGB1, TLR4 and NF- κ B and protein expression of TLR4 and NF- κ B in PBMCs ($P<0.05$). HMGB1 significantly induced the mRNA and protein expression of TLR4 and NF- κ B in PBMCs ($P<0.05$). TAK-242 inhibited the mRNA and protein expression of TLR4 and NF- κ B and mRNA expression of IL-8 ($P<0.05$). PDTC inhibited the mRNA and protein expression of NF- κ B and the mRNA expression of IL-8 ($P<0.05$). LPS significantly induced the mRNA expression of HMGB1 and the mRNA and protein expression of TLR4 and NF- κ B and then stimulated the mRNA expression of IL-8 ($P<0.05$). Glycyrrhizin inhibited the mRNA expression of HMGB1 and the mRNA and protein expression of TLR4 and NF- κ B and then reduced the mRNA expression of IL-8 ($P<0.05$). **Conclusions** HMGB1 plays an important role in the pathogenesis of neonatal sepsis by activating the TLR4/NF- κ B signaling pathway and inducing the secretion of inflammatory factors including IL-8. The HMGB1 blocker glycyrrhizin can inhibit activation of the TLR4/NF- κ B signaling pathway and the secretion of inflammatory factors.

[Chin J Contemp Pediatr, 2019, 21(2): 131-138]

Key words: Neonatal sepsis; High-mobility group box 1; Toll-like receptor 4; Nuclear factor-kappa B; Interleukin-8; Glycyrrhizin; Neonate

新生儿败血症是由于致病菌侵入循环系统后大量繁殖并不断分泌毒素导致的全身感染性疾病,发病隐匿,临床症状不典型,是导致新生儿死亡的主要原因。2015年世界卫生组织对194个国家进行调查,发现在280万新生儿死亡病例中,败血症和其他严重感染占43万,仅次于早产和分娩期并发症,而且在晚期(出生72h以后)位居致死原因之首^[1]。高迁移率族蛋白1(high mobility group box 1, HMGB1)是广泛存在于免疫细胞、内皮细胞、上皮细胞等一系列细胞中的DNA结合蛋白,参与调节基因的复制、转录等生物学功能,但是在感染、创伤、烧伤等外界刺激下, HMGB1可发生乙酰化从细胞核转移至胞浆,然后释放至血液循环中,通过活化单核巨噬细胞、中性粒细胞等并大量释放炎症因子,从而在一系列疾病中发挥重要的病理作用,包括感染性肺炎、感染性腹泻、化脓性脑膜炎等^[2-5]。研究发现, HMGB1也参与败血症的病理进展,如Yu等^[6]发现败血症死亡者的HMGB1水平显著高于幸存者,阻断HMGB1介导的内皮高通透性、炎症细胞迁移和促炎因子的释放可以降低内毒素诱导的组织损伤和高病死率^[7-9]。何静雅等^[10]发现胎膜早破新生儿血清中HMGB1的含量显著高于无胎膜早破新生儿,其中胎膜早破新生儿组包括新生儿败血症、新生儿肺炎、呼吸窘迫综合征等患儿,但是未对不同感染程度的患儿进行HMGB1表达的分析,而且HMGB1在新生儿败血症中的作用机制以及阻断HMGB1能否缓解新生儿败血症的病理进展尚无报道,因此本文选取新生儿败血症患儿作为研究对象,观察HMGB1的表达状况,并分离新生儿的外

周血单个核细胞以研究HMGB1的作用机制,并使用药物阻断HMGB1以观察相关生物学效应。

1 资料与方法

1.1 一般资料

选取2016年5月至2018年1月收治的62例新生儿败血症患儿作为败血症组,选取66例局部感染新生儿和70例健康新生儿分别作为局部感染组和健康对照组。败血症组患儿中,男39例,女23例,胎龄 39.0 ± 1.6 周,体重 3327 ± 658 g;局部感染组患儿中,男35例,女31例,胎龄 39.1 ± 1.3 周,体重 3371 ± 644 g;健康对照组新生儿中,男40例,女30例,胎龄 39.4 ± 1.5 周,体重 3425 ± 680 g。各组新生儿在性别、胎龄、体重方面比较差异无统计学意义($P>0.05$),具有可比性。收集各组新生儿的一般临床资料进行比较分析。本研究已获伦理委员会批准及所有入选患儿家属的知情同意。

1.2 纳入标准与排除标准

纳入标准:(1)足月新生儿:出生时胎龄37~42周,体重 ≥ 2500 g,出生28d以内的婴儿;(2)根据2003年中华医学会儿科学分会制定的《新生儿败血症诊疗方案》^[11]诊断新生儿败血症:出现发热或低体温、少吃、少哭、少动、面色欠佳、四肢凉、体重不增、黄疸、休克等临床表现,血培养或无菌体腔内培养出条件致病菌;(3)根据《实用新生儿学》第4版诊断局部感染性疾病,包括感染性肺炎、感染性腹泻、化脓性脑膜炎、皮肤感染等。排除标准:(1)入院前经抗感染治疗;

(2) 合并肝肾功能障碍、先天性畸形、心脑血管疾病、自身免疫性疾病等。

1.3 酶联免疫吸附试验

所有新生儿于抗感染治疗前采集 2 mL 静脉血，室温静置 10 min，12000 r/min 离心 10 min 后取上清液。使用 ELISA 试剂盒（江苏晶美生物科技有限公司）测定血清中 IL-6（JM-03204H1）、IL-8（JM-04713H1）、IL-17（JM-05071H1）、IL-23（JM-03351H2）、C 反应蛋白（CRP，JM-03290H2）、降钙素原（PCT，JM-03972H2）的含量。

1.4 人外周血单个核细胞的分离

在每组新生儿中分别随机选取 20 例，于抗感染治疗前采集 5 mL EDTA 抗凝血，使用 Ficoll 密度梯度离心法分离人外周血单个核细胞，主要步骤为：使用 5 mL PBS 稀释等体积的抗凝血，将稀释后的血液缓缓平铺于 10 mL 人外周血单个核细胞分离液上方（北京索莱宝科技有限公司，P8900），1000 r/min 室温离心 30 min，可观察到溶液分为 4 层，从上至下依次为淡黄色的血浆层、透明的分离液层、乳白色的单个核细胞层及红细胞层，小心吸取单个核细胞至无菌的离心管，PBS 洗涤 2 次后，即得到人外周血单个核细胞。使用实时荧光定量聚合酶链式反应（qRT-PCR）检测各组新生儿外周血单个核细胞中 HMGB1、Toll 样受体 4（TLR4）和核转录因子 κ B（NF- κ B）mRNA 的表达，使用 Western blot 检测各组新生儿外周血单个核细胞中 TLR4 和 NF- κ B 蛋白的表达。

1.5 细胞培养与分组

Ficoll 密度梯度离心法分离健康新生儿的外周血单个核细胞，使用含 10% 胎牛血清的 RPMI 1640 培养基（美国 Gibco 公司）进行培养。将对数生长期的细胞分为对照组、HMGB1 处理组、HMGB1+TAK-242 组、HMGB1+PDTC 组。HMGB1 处理组细胞添加终浓度为 10 ng/mL 的 HMGB1（美国 Sigma 公司，H4652），HMGB1+TAK-242 组细胞添加 10 ng/mL HMGB1 和 40 nmol/L TLR4 抑制剂 TAK-242（美国 MCE 公司，HY11109），HMGB1+PDTC 组细胞添加 10 ng/mL HMGB1 和 50 μ mol/L NF- κ B 抑制剂 PDTC（美国 MCE 公司，HY18738），对照组细胞添加等体积的培养基。细胞培养 24 h 后，采用 qRT-PCR 检测 TLR4、NF- κ B 和 IL-8 mRNA 的表达，采用 Western blot 检测 TLR4 和

NF- κ B 蛋白的表达。实验独立重复 3 次。

另将外周血单个核细胞分为对照组、LPS 处理组、LPS+ 甘草甜素组。LPS 处理组细胞添加终浓度为 100 μ g/L 的 LPS（美国 Gibco 公司，L2880），LPS+ 甘草甜素组细胞添加 100 μ g/L 的 LPS 和 1 mmol/L 的甘草甜素（美国 Gibco 公司，PHR1516），对照组细胞添加等体积的培养基。细胞培养 24 h 后，采用 qRT-PCR 检测 HMGB1、TLR4、NF- κ B 和 IL-8 mRNA 的表达，采用 Western blot 检测 TLR4 和 NF- κ B 蛋白的表达。实验独立重复 3 次。

1.6 qRT-PCR 法检测 HMGB1、TLR4、NF- κ B 及 IL-8 mRNA 的表达

使用哈佛大学 Primer Bank 数据库查找基因的引物序列，通过 NCBI 的 Primer Blast 和 Primer 5.0 软件验证序列，最后由上海生工生物工程有限公司合成（表 1）。使用 TRIzol（美国 Invitrogen 公司，15596026）提取细胞中的 mRNA，Prime Script RT reagent Kit 逆转录试剂盒（日本 Takara 公司，RR037A）将 mRNA 逆转录为 cDNA，SYBR Premix Ex Taq II 荧光定量试剂盒（日本 Takara 公司，RR820A）进行 PCR 扩增。PCR 反应体系共 20 μ L，包括 cDNA 8 μ L，10 \times PCR 预混液 10 μ L，上下游引物各 1 μ L。PCR 反应条件：95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min；95 $^{\circ}$ C 变性 10 s，58 $^{\circ}$ C 退火 30 s，72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s，共循环 40 次。取 5 μ L 的反应产物，加入 1 μ L 的 6 \times 上样缓冲液混匀，使用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳，结束后成像仪下曝光和拍照。结果以目的基因与 GAPDH 的灰度值之比表示，将对照组目的基因的相对表达量设置为 1。

表 1 引物序列

基因		Primer (5' \rightarrow 3')
HMGB1	Forward	TATGGCAAAAGCGACAAGG
	Reverse	CTTCGCAACATCACCAATGGA
TLR4	Forward	AGACCTGTCCCTGAACCCTAT
	Reverse	CGATGGACTTCTAAACCAGCCA
NF- κ B	Forward	AACAGAGAGGATTTTCGTTTCCG
	Reverse	TTTGACCTGAGCGTAAGACTTCT
IL-8	Forward	TTTTGCCAAGGAGTGCTAAAGA
	Reverse	AACCCTCTGCCACCCAGTTTTC
GAPDH	Forward	GGAGCGAGATCCCTCCAAAAT
	Reverse	GGCTGTTGTCATACTTCTCATGG

1.7 Western blot 法检测 TLR4 及 NF-κB 蛋白的表达

取 10^6 个细胞加入 100 μL 细胞裂解液，充分裂解后 12000 r/min 离心 5 min，取上清液进行 BCA 蛋白定量。取 40 μg 总蛋白，加入 SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液，100℃加热 5 min。使用 10% 的分离胶进行电泳，将目的蛋白电转膜至聚偏二氟乙烯膜，5% 的牛血清白蛋白封闭 1 h，使用英国 Abcam 公司生产的兔抗人 TLR4 多克隆抗体（1:500）、兔抗人 NF-κB 单克隆抗体（1:1000）和兔抗人 GAPDH 单克隆抗体（1:5000）4℃孵育过夜。洗涤 3 次，使用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔多克隆抗体（武汉博士德生物工程有限公司，1:1000）室温孵育 1 h，洗涤 3 次，DAB 显色液显色后成像仪下曝光和拍照。结果以目的蛋白与 GAPDH 的灰度值之比表示，将对照组中目的蛋白与 GAPDH 的灰度值之比设置为 1。

1.8 统计学分析

使用 SPSS 20.0 统计软件对数据进行统计学分析。符合正态分布的计量资料以均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，多组计量资料间的比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用 SNK-*q* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组新生儿的一般临床资料

纳入的 62 例败血症患儿中，血培养共分离得到 62 株病原菌，均为单一菌株感染，其中革兰阴性菌 43 例，以肺炎克雷伯菌（29 例）和大肠埃希菌（5 例）为主；革兰阳性菌 18 例，以表皮葡萄球菌（6 例）和金黄色葡萄球菌（5 例）为主；真菌 1 例，为热带假丝酵母菌。纳入的 66 例局部感染组患儿，血培养共分离得到 66 株病原菌，均为单一菌株感染，包括感染性肺炎 39 例，以肺炎克雷伯菌（15 例）、大肠埃希菌（8 例）和金黄色葡萄球菌（5 例）为主；感染性腹泻 11 例，以诺如病毒（3 例）、致泻性大肠埃希菌（3 例）和轮状病毒（2 例）为主；化脓性脑膜炎 8 例，以表皮葡萄球菌（4 例）和大肠埃希菌（2 例）为主；皮肤感染 8 例，以金黄色葡萄球菌（4 例）为主。

2.2 各组新生儿血清炎症因子水平变化

败血症组患儿血清中 IL-6、IL-8、IL-17、IL-23、CRP、PCT 水平均显著高于局部感染组和健康对照组 ($P < 0.05$)；局部感染组患儿血清中上述指标水平均显著高于健康对照组 ($P < 0.05$)。见表 2。

表 2 各组新生儿血清炎症因子水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	例数	IL-6 (ng/L)	IL-8 (ng/L)	IL-17 (ng/L)	IL-23 (ng/L)	CRP (mg/L)	PCT (mg/L)
健康对照组	70	14 ± 4	37 ± 11	46 ± 12	26 ± 8	4.9 ± 2.4	0.31 ± 0.28
局部感染组	66	26 ± 8 ^a	46 ± 15 ^a	53 ± 14 ^a	36 ± 10 ^a	11.2 ± 5.0 ^a	1.04 ± 0.36 ^a
败血症组	62	35 ± 11 ^{a,b}	54 ± 17 ^{a,b}	90 ± 19 ^{a,b}	60 ± 14 ^{a,b}	15.3 ± 5.1 ^{a,b}	2.54 ± 0.68 ^{a,b}
F 值		108.700	22.280	158.300	172.500	98.910	389.500
P 值		<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注：a 示与对照组比较， $P < 0.05$ ；b 示与局部感染组比较， $P < 0.05$ 。

2.3 各组新生儿外周血单个核细胞中 HMGB1、TLR4、NF-κB mRNA 及其蛋白表达水平变化

败血症组患儿外周血单个核细胞中 HMGB1 mRNA，以及 TLR4、NF-κB mRNA 及其蛋白的相对表达量均显著高于局部感染组和健康对照组 ($P < 0.05$)；局部感染组患儿外周血单个核细胞中 HMGB1 mRNA，以及 TLR4、NF-κB mRNA 及其蛋白的相对表达量均显著高于健康对照组 ($P < 0.05$)。见图 1~2。

2.4 HMGB1 对 TLR4/NF-κB 信号通路及炎症因子表达的影响

HMGB1 可以显著诱导外周血单个核细胞高表达 TLR4、NF-κB mRNA 及其蛋白 ($P < 0.05$)；使用 TLR4 抑制剂 TAK-242 可以抑制 TLR4、NF-κB mRNA 及其蛋白的高表达，并进而抑制 IL-8 mRNA 的表达 ($P < 0.05$)；使用 NF-κB 抑制剂 PDTC 可以抑制 NF-κB mRNA 及其蛋白的高表达，并进而抑制 IL-8 mRNA 的表达 ($P < 0.05$)。见图 3~4。

2.5 甘草甜素对LPS诱导HMGB1/TLR4/NF-κB信号通路及炎症因子表达的影响

LPS可以显著诱导HMGB1 mRNA的表达,诱导TLR4、NF-κB mRNA及其蛋白的表达,进而刺激IL-8 mRNA的表达($P<0.05$);使用HMGB1抑

制剂甘草甜素可以抑制HMGB1 mRNA的高表达,抑制TLR4、NF-κB mRNA及其蛋白的高表达,进而降低IL-8 mRNA的高表达($P<0.05$)。见图5~6。

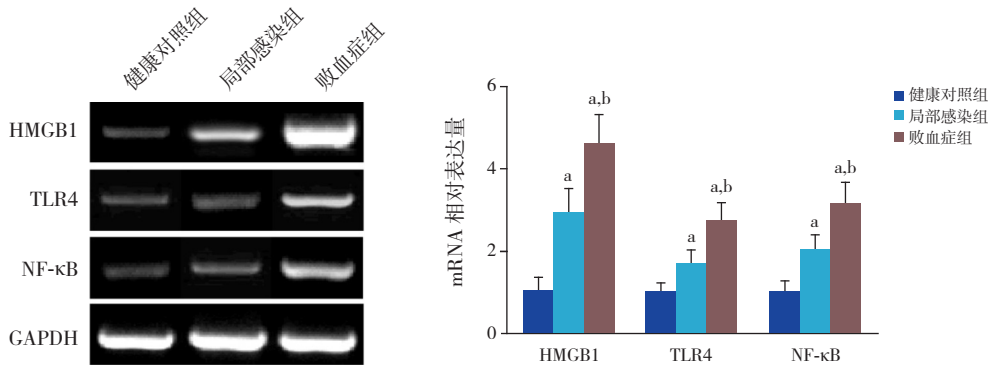


图1 各组新生儿外周血单个核细胞中HMGB1、TLR4及NF-κB mRNA表达变化 左图为电泳图。右图为统计图($n=20$), a示与健康对照组比较, $P<0.05$; b示与局部感染组比较, $P<0.05$ 。

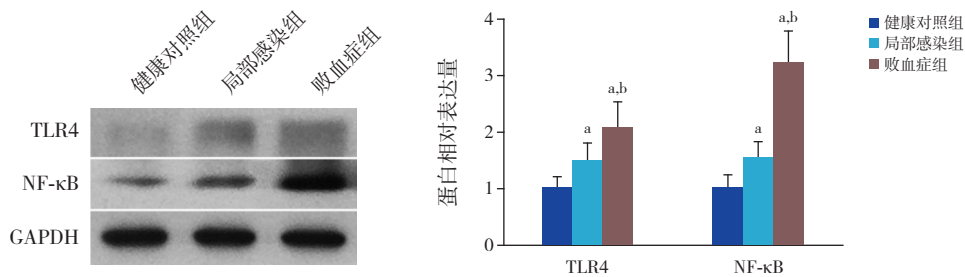


图2 各组新生儿外周血单个核细胞中TLR4和NF-κB蛋白表达变化 左图为电泳图。右图为统计图($n=20$), a示与健康对照组比较, $P<0.05$; b示与局部感染组比较, $P<0.05$ 。

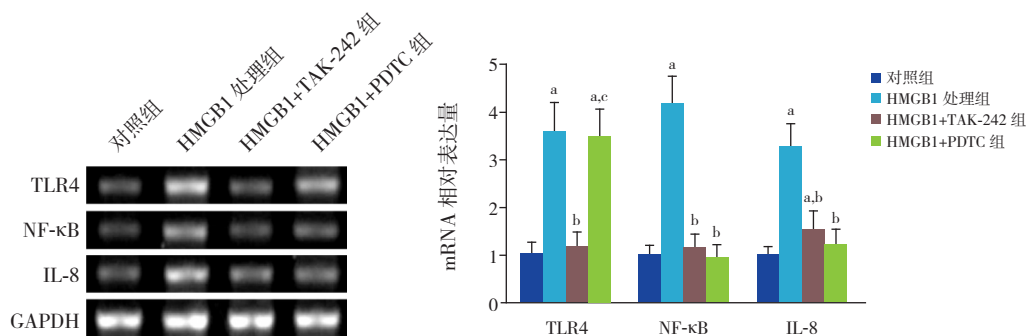


图3 各组细胞中TLR4、NF-κB和IL-8 mRNA表达变化 左图为电泳图。右图为统计图($n=3$), a示与对照组比较, $P<0.05$; b示与HMGB1组比较, $P<0.05$; c示与HMGB1+TAK-242组比较, $P<0.05$ 。

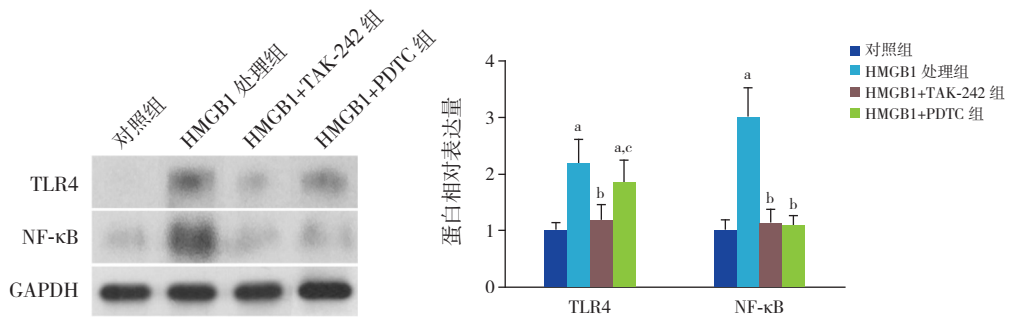


图4 各组细胞中 TLR4 和 NF-κB 蛋白表达变化 左图为电泳图。右图为统计图 ($n=3$), a 示与对照组比较, $P<0.05$; b 示与 HMGB1 组比较, $P<0.05$; c 示与 HMGB1+TAK-242 组比较, $P<0.05$ 。

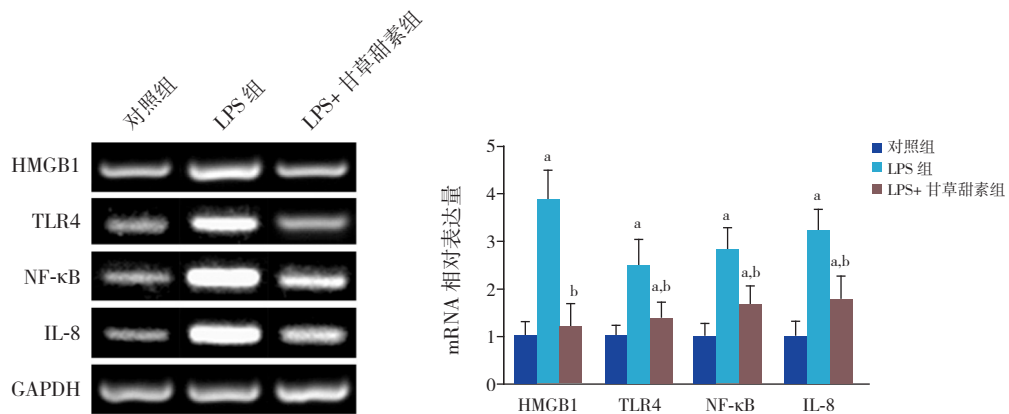


图5 各组细胞中 HMGB1、TLR4、NF-κB 及 IL-8 mRNA 的表达变化 左图为电泳图。右图为统计图 ($n=3$), a 示与健康对照组比较, $P<0.05$; b 示与 LPS 组比较, $P<0.05$ 。

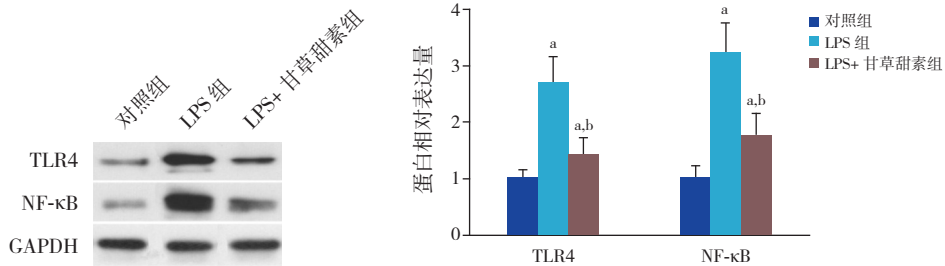


图6 各组细胞中 TLR4 及 NF-κB 蛋白的表达变化 左图为电泳图。右图为统计图 ($n=3$), a 示与健康对照组比较, $P<0.05$; b 示与 LPS 组比较, $P<0.05$ 。

3 讨论

败血症以严重的感染诱导炎症因子大量释放为主要临床表现, 包括 IL-6、IL-8、IL-17、IL-23、CRP、PCT 等。使用药物抑制炎症细胞的信号通路活化和促炎因子释放可以显著缓解败血症诱导的组织损伤, 改善患者的临床症状^[12]。因此, 本文首先对新生儿败血症患儿的炎症因子表达进行了检测, 结果显示败血症组患儿血清中 IL-6、

IL-8、IL-17、IL-23、CRP、PCT 的含量均显著高于局部感染组和健康对照组, 表明新生儿败血症具有高炎症状态, 间接表明了临床症状的严重性。

大量研究发现, 释放至血液循环中的 HMGB1 具有明显的促炎效应^[13-14], 如 Scaffidi 等^[15]发现 HMGB1 可由活化的单核巨噬细胞分泌或者坏死细胞被动释放, 然后通过高级糖基化终末产物受体结合促进炎症, 而 HMGB1 敲除的细胞促炎的能力显著减弱。为了研究新生儿败血症高炎症

状态的病理机制, 本文对 HMGB1 在新生儿败血症中的表达进行检测, 结果发现败血症组患儿外周血单个核细胞中 HMGB1 mRNA 的相对表达量显著高于局部感染组和健康对照组。

TLR4/NF- κ B 信号通路与 HMGB1 介导的促炎效应密切相关, 参与心脏缺血再灌注损伤、哮喘、急性胰腺炎、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮等一系列疾病的病理机制^[16-18], 如 Li 等^[19]发现 HMGB1、TLR4 和 NF- κ B 在重症急性胰腺炎小鼠模型中高表达, 使用重组 HMGB1 蛋白靶向注射至胰腺可活化 TLR4/NF- κ B 信号通路, 显著诱导胰腺的病理损伤, 而对于 TLR4 敲除小鼠则可降低 HMGB1 的生物学效应。本研究结果也显示, 败血症组患儿外周血单个核细胞中 TLR4 和 NF- κ B mRNA 及其蛋白的相对表达量均显著高于局部感染组和健康对照组。为了更有效的验证 TLR4/NF- κ B 信号通路在 HMGB1 介导炎症因子释放中的作用, 本研究通过分离和培养新生儿外周血的单个核细胞进行机制研究, 结果显示 HMGB1 可以显著诱导外周血单个核细胞高表达 TLR4 和 NF- κ B, 然后促进 IL-8 的表达, 分别使用 TLR4 抑制剂 TAK-242 和 NF- κ B 抑制剂 PDTC 则可以显著抑制 TLR4 和 NF- κ B 的高表达, 并进而抑制 IL-8 的表达。综上所述, HMGB1 可通过活化 TLR4/NF- κ B 信号通路促进炎症因子的大量释放, 是新生儿败血症发生发展的重要病理机制。

甘草甜素是一种具有抗炎和抗氧化功能的传统中草药, 可与 HMGB1 直接结合, 因此常用于 HMGB1 阻断的相关研究^[20-21]。本文在 LPS 诱导的体外细胞模型中应用甘草甜素, 结果显示甘草甜素可以抑制 HMGB1 mRNA 的高表达, 抑制 TLR4、NF- κ B mRNA 及其蛋白的高表达, 进而降低 IL-8 mRNA 的高表达, 表明 HMGB1 的药物阻断可以抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路活化, 降低炎症因子表达, 未来针对 HMGB1 的靶向治疗对于新生儿败血症可能具有一定的临床治疗价值。

尽管本文初步探讨了 HMGB1 在新生儿败血症中的表达与机制, 但是仍然有许多问题亟待解决: (1) 本文仅从 HMGB1 mRNA 的表达进行研究, 对于 HMGB1 从外周血单个核细胞中释放在败血症中的作用尚不清楚; (2) 本文通过分离新生儿外周血单个核细胞进行体外实验, 但是体外细

胞学实验存在稳定性差、重复率低的不足, 未来仍需要通过构建相应的动物模型进行结论的验证; (3) 甘草甜素可以阻断 HMGB1 的生物学效应, 抑制炎症的级联放大, 具有广阔的应用前景, 但是能否应用到新生儿败血症的临床治疗中仍不清楚。

综上所述, HMGB1 在新生儿败血症患儿的外周血单个核细胞中呈高表达, 可能通过激活 TLR4/NF- κ B 信号通路诱导 IL-8 等炎症因子的高分泌, HMGB1 阻断剂甘草甜素可抑制 LPS 诱导的 HMGB1/TLR4/NF- κ B 信号通路活化和炎症因子分泌。

[参 考 文 献]

- [1] Oza S, Lawn JE, Hogan DR, et al. Neonatal cause-of-death estimates for the early and late neonatal periods for 194 countries: 2000-2013[J]. Bull World Health Organ, 2015, 93(1): 19-28.
- [2] Richard SA, Jiang Y, Xiang LH, et al. Post-translational modifications of high mobility group box 1 and cancer[J]. Am J Transl Res, 2017, 9(12): 5181-5196.
- [3] He SJ, Cheng J, Feng X, et al. The dual role and therapeutic potential of high-mobility group box 1 in cancer[J]. Oncotarget, 2017, 8(38): 64534-64550.
- [4] Dipasquale V, Cutrupi MC, Colavita L, et al. Neuroinflammation in autism spectrum disorders: role of high mobility group box 1 protein[J]. Int J Mol Cell Med, 2017, 6(3): 148-155.
- [5] Bianchi ME, Crippa MP, Manfredi AA, et al. High-mobility group box 1 protein orchestrates responses to tissue damage via inflammation, innate and adaptive immunity, and tissue repair[J]. Immunol Rev, 2017, 280(1): 74-82.
- [6] Yu H, Qi Z, Zhao L, et al. Prognostic value of dynamic monitoring of cellular immunity and HMGB1 in severe sepsis: delayed chronic inflammation may be the leading cause of death in late severe sepsis[J]. Clin Lab, 2016, 62(12): 2379-2385.
- [7] Lee W, Ku SK, Bae JS. Zingerone reduces HMGB1-mediated septic responses and improves survival in septic mice[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2017, 329: 202-211.
- [8] Yang M, Cao L, Xie M, et al. Chloroquine inhibits HMGB1 inflammatory signaling and protects mice from lethal sepsis[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 86(3): 410-418.
- [9] Wang H, Liao H, Ochani M, et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis[J]. Nat Med, 2004, 10(11): 1216-1221.
- [10] 何静雅, 章乐, 王晓蕾, 等. HMGB1 在胎膜早破新生儿及孕妇外周血中表达及临床意义 [J]. 江苏医药, 2015, 41(13): 1575-1576.
- [11] 中华医学会儿科学分会新生儿学组, 《中华医学会儿科学分会中华儿科杂志》编辑委员会. 新生儿败血症诊疗方案 [J]. 中华儿科杂志, 2003, 41(12): 897-899.
- [12] Huang Y, Zhou M, Li C, et al. Picoside II protects against sepsis via suppressing inflammation in mice[J]. Am J Transl Res, 2016,

- 8(12): 5519-5531.
- [13] Xu M, Zhou GM, Wang LH, et al. Inhibiting high-mobility group box 1 (HMGB1) attenuates inflammatory cytokine expression and neurological deficit in ischemic brain injury following cardiac arrest in rats[J]. *Inflammation*, 2016, 39(4): 1594-1602.
- [14] Wang X, Guo Y, Wang C, et al. MicroRNA-142-3p inhibits chondrocyte apoptosis and inflammation in osteoarthritis by targeting HMGB1[J]. *Inflammation*, 2016, 39(5): 1718-1728.
- [15] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation[J]. *Nature*, 2002, 418(6894): 191-195.
- [16] Zhang H, Yang N, Wang T, et al. Vitamin D reduces inflammatory response in asthmatic mice through HMGB1/TLR4/NF-kappaB signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 2915-2920.
- [17] Dong LY, Chen F, Xu M, et al. Quercetin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via downregulation of the HMGB1-TLR4-NF-kappaB signaling pathway[J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10(5): 1273-1283.
- [18] Li MJ, Li F, Xu J, et al. rhHMGB1 drives osteoblast migration in a TLR2/TLR4- and NF-kappaB-dependent manner[J]. *Biosci Rep*, 2016, 36(1): e00300.
- [19] Li G, Wu X, Yang L, et al. TLR4-mediated NF-kappaB signaling pathway mediates HMGB1-induced pancreatic injury in mice with severe acute pancreatitis[J]. *Int J Mol Med*, 2016, 37(1): 99-107.
- [20] Xiong X, Gu L, Wang Y, et al. Glycyrrhizin protects against focal cerebral ischemia via inhibition of T cell activity and HMGB1-mediated mechanisms[J]. *J Neuroinflammation*, 2016, 13(1): 241.
- [21] Ekanayaka SA, McClellan SA, Barrett RP, et al. Glycyrrhizin reduces HMGB1 and bacterial load in pseudomonas aeruginosa keratitis[J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2016, 57(13): 5799-5809.

(本文编辑: 万静)

· 消息 ·

2019年《中国当代儿科杂志》征稿征订启事

《中国当代儿科杂志》是由中华人民共和国教育部主管,中南大学主办的国家级儿科专业学术期刊。本刊为国家科学技术部中国科技论文统计源期刊(中国科技核心期刊),中国科学引文数据库(CSCD)来源期刊,北京大学图书馆中文核心期刊和国际权威数据库美国MEDLINE、美国《化学文摘》(CA)、美国EBSCO、荷兰《医学文摘》(EM)及世界卫生组织西太平洋地区医学索引(WPRIM)收录期刊,同时被中国学术期刊(光盘版)、中国科学院文献情报中心、中国社会科学院文献信息中心评定为《中国学术期刊综合评价数据库》来源期刊,并获评2016中国国际影响力优秀学术期刊。

本刊内容以儿科临床与基础研究并重,反映我国当代儿科领域的最新进展与最新动态。辟有国内外儿科动态、论著(临床研究、疑难病研究、病例分析、儿童保健、流行病学调查和实验研究)、临床经验、病例报告、专家讲座、综述等栏目。读者对象主要为从事儿科及相关学科的临床、教学和科研工作者。

本刊为月刊,每月15日出版,向国内外公开发行人。欢迎全国各高等医学院校,各省、市、自治区、县医院和基层医疗单位,各级图书馆(室)、科技情报研究所及广大医务人员和医学科技人员订阅。每期定价20元,全年240元。邮发代号:国内42-188;国外3856(BM)。可通过全国各地邮局订阅或直接来函与本刊编辑部联系订阅。

向本刊投稿一律通过网上稿件处理系统,免审稿费,审稿周期2~4周。欲浏览本刊或投稿,请登录本刊网站。网站提供免费全文下载。

联系地址:湖南省长沙市湘雅路87号《中国当代儿科杂志》编辑部,邮编410008。

电话:0731-84327402;传真:0731-84327922;Email:ddek@vip.163.com;网址: <http://www.zgddk.com>。

《中国当代儿科杂志》编辑部