

doi:10.3969/j.issn.1005-1457.2018.04.001

高迁移率组蛋白 B1 对大鼠门静脉 血栓形成的调控机制

姚露露¹ 葛立峰¹ 周骆苗¹ 于群楚¹ 王泽帆¹ 蓝沁雅¹ 潘闻政¹
曹建青¹ 洪鸣奇¹ 王伟伟^{1△} 陈卫显^{2△}

1(湖州师范学院 医学院,湖州 313000)

2(湖州市中心医院 超声科,湖州 313000)

【摘要】 目的 探究高迁移率组蛋白 B1(HMGB1)对静脉血栓(Portal vein thrombosis,PVT)形成的调控机制,为改进 PVT 的治疗策略提供新思路。方法 将 SD 大鼠随机分为假手术组、模型组和治疗组;模型组和假手术组通过门静脉短暂结扎联合破坏血管内膜的方法建立大鼠 PVT 模型,假手术组仅分离门静脉;治疗组在术前给予抗 HMGB1 单克隆抗体治疗;通过超声检测 3 组大鼠肝门静脉血栓的大小;采用 ELISA 方法检测血清 P 选择素(P-Selectin)和 D-二聚体(D-Dimer)的含量。结果 超声检查发现模型组门静脉内形成稳定血栓,治疗组经抗 HMGB1 单抗治疗后门静脉内血栓明显减小;ELISA 结果显示模型组血清 P-Selectin 和 D-Dimer 含量较假手术组明显增多;而治疗组经抗 HMGB1 单抗治疗 P-Selectin 和 D-Dimer 水平显著减少。结论 HMGB1 通过上调 P-Selectin 和 D-Dimer 表达促进大鼠门静脉血栓的形成。

【关键词】 高迁移率组蛋白 B1;门静脉血栓;D-二聚体;P-选择素

【中图分类号】 R575.2 **【文献标识码】** A **【文章编号】**1005-1457(2018)04-01-03

Regulatory Mechanism of High Mobility Group Protein B1 on Portal Vein Thrombosis in Rats

Yao Lulu¹ Ge Lifeng¹ Zhou Luomiao¹ Yu Qunchu¹ Wang Zefan¹ Lan Qinya¹
Pan Wenzheng¹ Cao Jianqing¹ Hong Mingqi¹ Wang Weiwei^{1△} Chen Weixian^{2△}

1(Schools of Medicine & Nursing Sciences, Huzhou University, Huzhou 313000, China)

2(Department of Ultrasonography, Huzhou Central Hospital, Huzhou 313000, China)

【Abstract】 Objective This study aimed to explore the regulatory mechanism of high mobility group protein B1 (HMGB1) on the formation of portal vein thrombosis (PVT) and provide a new idea for improving the therapy of PVT. **Methods** The SD rats were randomly divided into sham operation group, model group and treated group. In model group and treated operation group, PVT model was established by temporary ligation of portal vein in combination with the destruction of intima. The sham operation group was only separated the portal vein. Treated group was intraperitoneally injected with anti-HMGB1 antibody before the operation. The size of PVT was detected by ultrasound scan. ELISA was used to detect the content of serum P selectin and D-Dimer. **Results** Ultrasonography showed the formation of stable thrombosis in the portal vein of the model group, and the thrombosis significantly decreased in treated group after treating with anti-HMGB1 antibody. ELISA showed that the contents of serum P-Selectin and D-Dimer in model group were higher than those in sham operation group. In treated group, the levels of P-Selectin and D-Dimer significantly decreased after the treatment with anti HMGB1 antibody. **Conclusion** HMGB1 may promot PVT formation through increasing the expression of P-Selectin and D-Dimer.

【Key words】 High mobility group protein B1;Portal vein thrombosis;D-Dimer;P-Selectin

肝门静脉血栓(Portal vein thrombosis,PVT)是指发生在肝门静脉及其属支的血栓。PVT 多见于肝硬化患者,可进一步加重门静脉高压,发生难治

性腹水、血性腹水等严重并发症。因此,防治 PVT 形成对改善肝病患者的预后具有重要作用。

P-选择素(P-Selectin)和 D-二聚体(D-Dimer)被

基金项目:2017 年国家大学生创新训练计划项目(No.201710347021),2018 年浙江省大学生科技创新暨新苗人才计划项目(No.2018R431024)和 2018 年国家大学生创新训练计划项目(No.201810347018)联合资助。

△通讯作者:王伟伟,副教授,E-mail:wwwbqh@126.com;陈卫显,副主任医师,E-mail:13567231382@163.com。

证实与血栓的形成密切相关。Myers 等^[1]研究发现 P-Selectin 具有诱导静脉壁炎症和促进静脉血栓形成的作用,可反映体内血小板活化程度和功能状态。D-Dimer 是纤溶酶激活后降解交联纤维蛋白多聚体的特异性产物,反映体内血液高凝和纤溶亢进的理想标志物之一^[2]。

高迁移率组蛋白 B1(HMGB1)是一种新发现的炎症介质,在免疫和炎症反应过程中发挥重要作用。近年来有报道称 HMGB1 与血栓形成关系密切^[3]。在小鼠脑静脉窦血栓模型中 HMGB1 表达明显增高^[4],抑制 HMGB1 可阻断血栓形成^[5]。但其是否调控了 PVT 形成目前未见相关报道。本研究通过门静脉短暂结扎联合破坏血管内膜的方法建立大鼠 PVT 模型,给予抗 HMGB1 单克隆抗体治疗,探究 HMGB1 是否通过调节 P-Selectin 和 D-Dimer 实现其对门静脉血栓形成的调控,为改进 PVT 的治疗策略提供临床前依据。

1 材料与方法

1.1 材料

雄性 SD 大鼠(100~120g)购于上海杰思捷实验动物有限公司,兔抗 HMGB1 单克隆抗体购于美国 Sigma 公司,ELISA 试剂盒购于武汉赛培科技生物有限公司;MyLab70 型彩色多普勒超声仪(意大利百胜彩超,LA523 探头)。

1.2 分组、PVT 建模及治疗

将 SD 大鼠随机分为 3 组:假手术组、模型组和治疗组,每组 6 只。模型组和治疗组参照文献报道^[6]通过门静脉结扎联合破坏血管内膜的方法建立

PVT 模型;假手术组仅分离门静脉,未结扎门静脉和破坏血管内膜。治疗组:术前 0.5h 通过腹腔注射抗 HMGB1 单抗(20mg/kg);模型组:术前 0.5h 通过腹腔注射等剂量生理盐水;假手术组:术前 0.5h 通过腹腔注射等剂量生理盐水。术后 24h 进行 B 超检查和收集血清。

1.3 超声检查

5%水合氯醛溶液(0.7ml/100g)腹腔注射麻醉,通过 B 超检测 3 组大鼠门静脉内血栓的大小。

1.4 血清标本的收集

5%水合氯醛溶液麻醉后,打开腹腔,收集下腔静脉血约 3ml,置于含抗凝剂的采血管中;4℃离心 15min(3500 转/min),收集上清液。

1.5 酶联免疫吸附法(ELISA)检测 P-Selectin 和 D-Dimer 含量

采用 ELISA 试剂盒检测 3 组大鼠血清 P-Selectin 和 D-Dimer 含量,严格按照说明书操作,反应结束后,用酶标仪在 450nm 处读取 OD 值。根据标准曲线计算血清 P-Selectin 和 D-Dimer 的浓度值。

1.6 统计分析

使用 SPSS13.0 统计学软件进行统计学分析,实验数据用均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,采用 t 检验进行两两比较, $P < 0.05$ 表示组间有显著性差异。

2 结果

2.1 超声检查结果

假手术组:门静脉血流充盈良好,无血栓形成(见图 1);模型组门静脉管腔狭窄,血流充盈缺损,有血栓形成;治疗组门静脉管腔狭窄,血流充盈缺

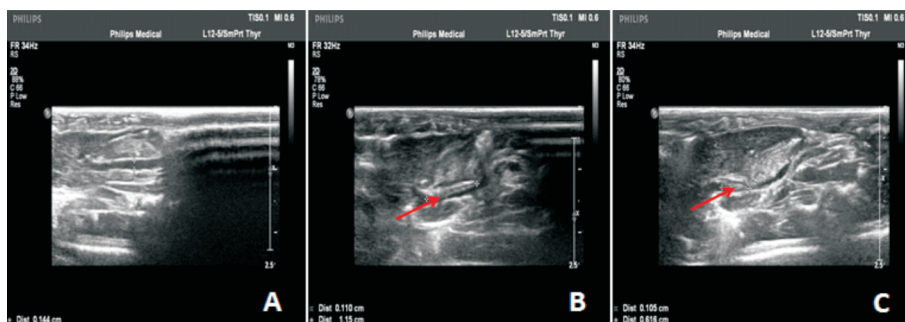


图 1 门静脉超声检查

注:A:假手术组;B:模型组;C:治疗组;红色箭头所示部位为门静脉血栓形成。

损,有血栓形成,但较模型组血栓大小明显减少,有显著性差异($P < 0.05$)(见表 1)。

表 1 门静脉内血栓的长度(mm, $n=6$)

	长度	宽度
假手术组	0	0
模型组	11.12±2.83	1.09±0.10
治疗组	0.79±0.31*	0.08±0.02*

注:*表示与模型组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 血清 P-Selectin 和 D-Dimer 含量

如表 2 所示:模型组 P-Selectin 和 D-Dimer 的血清含量均较假手术组显著增多($P < 0.05$),治疗组给予抗 HMGB1 单抗治疗后, P-Selectin 和 D-Dimer 的血清表达较模型组明显减少($P < 0.05$)。

3 讨论

传统观点认为 PVT 是临床较为罕见的疾病。但随着影像学技术的进步, PVT 的临床检出率明

表 2 血清 P-Selectin 和 D-Dimer 的浓度 (pg/ml)

	P-Selectin	D-Dimer
假手术组	14.40±7.37	17.98±10.22
模型组	39.54±14.57 [#]	46.08±15.14 [#]
治疗组	22.89±10.53 [*]	27.45±12.83 [*]

注: # 表示与假手术组比较 $P < 0.05$; * 表示与模型组比较, $P < 0.05$ ($n=6$)。

显增多。临床研究发现肝病后期 PVT 发生率可达 0.6~16%; 门脉高压症患者和肝癌患者 PVT 的发生可高达 30%; 肝移植术后的 PVT 形成率为 1~3%, 门脉高压症术后 PVT 发生率为 0.5~22%^[6]。急性 PVT 形成的病情更为凶险, 致死率可高达 50%; 亚急性和慢性 PVT 也可因某诱发因素进入 PVT 的急性期进而危及生命^[8]。目前肝素被广泛应用于静脉血栓性疾病的治疗, 但由于其削弱了生理性止血而增加了出血的风险。因此, 既能抑制 PVT 形成又不影响生理止血是目前一种更为理想的方法。

P-Selectin 是整合素家族成员之一, 主要存在于血小板 α 颗粒和内皮细胞 Weibel-Palada 小体内。其介导的细胞粘附在机体炎症反应和血栓形成中起主导作用。在炎症因子和凝血因子等刺激下, 血小板和内皮细胞活化, 使贮存的 P-Selectin 转位到细胞表面并快速表达, 进一步介导白细胞的粘附, 使白细胞朝受损部位滚动, 从而进一步引发炎症病理反应或血栓形成^[9]; D-Dimer 是纤溶酶激活后, 降解交联纤维蛋白多聚体的特异性产物^[4]。D-Dimer 作为凝血和纤溶系统敏感指标, 对于血栓形成有很高的预测价值^[10]。在本研究中, 我们通过超声检查发现模型组门静脉内有稳定血栓生成, 血流充盈缺损, 门静脉的管腔显著狭窄; ELISA 检测也进一步发现模型组的 P-Selectin 和 D-Dimer 的含量较假手术组明显增高, 提示 P-Selectin 和 D-Dimer 参与了 PVT 形成。

近年来 HMGB1 被认为是启动和维持炎症级联反应的中心分子^[11]。在炎症反应中 HMGB1 既可作为早期启动因子从细胞释放, 也可作为晚期的炎症介质主动释放, 与白细胞介素、肿瘤坏死因子等炎症因子相互诱导。目前发现血管内皮损伤时, HMGB1 被释放至细胞外, 其通过与晚期糖蛋白终末产物受体 (RAGE) 和/或 Toll 样受体等结合, 激活血管内皮细胞, 释放炎症因子、趋化因子和黏附分子, 进而吸附单核/巨噬细胞^[12], 介导血栓形成。HMGB1 也可促进血管内皮细胞释放纤溶酶原激活物抑制因子 1、组织型纤溶酶原激活剂, 破坏生理的凝血和抗凝血系统之间的平衡, 在炎症反应过程中的组织缺血坏死、血栓形成及弥散性血管内凝血中

发挥重要作用^[13,14]。在本研究中, 治疗组在建模前给予抗 HMGB1 单抗治疗显著抑制了血清 P-Selectin 和 D-Dimer 的生成; 超声检测也发现治疗组门静脉内的血栓大小较模型组明显减少。因此, 抗 HMGB1 单抗通过下调 P-Selectin 和 D-Dimer 表达抑制了 PVT 形成。

4 结论

HMGB1 通过上调 P-Selectin 和 D-Dimer 表达促进 PVT 的形成, 预示以 HMGB1 为靶向分子有望治疗或预防 PVT 形成。

参考文献

- [1] Myers DD, Hawley AE, Fams DM, et al. P-selectin and leukocyte microparticles are associated with venous thrombogenesis[J]. *J Vasc Surg*, 2003, 38(5):1075-1089.
- [2] Gremmel T, Ay C, Seidinger D, Pabinger I, Panzer S, Koppensteiner R. Soluble p-selectin, d-dimer, and high-sensitivity c-reactive protein after acute deep vein thrombosis of the lower limb. *J Vasc Surg*, 2011, 54:48S-55S
- [3] Xu X, Zhu H, Wang T, et al. Exogenous high-mobility group box 1 inhibits apoptosis and promotes the proliferation of Lewis cells via RAGE/TLR4-dependent signal pathways[J]. *Scand J Immunol*, 2014, 79(6):386-394
- [4] Stark K, Philippi V, Stockhausen S, et al. Disulfide HMGB1 derived from platelets coordinates venous thrombosis in mice [J]. *Blood*, 2016, 128(20):2435-2449.
- [5] Gu JJ, Chen JB, Zhang JH, et al. Recombinant human soluble thrombomodulin protects against brain injury in a CVST rat model, via downregulation of the HMGB1-RAGE axis [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 14(6): 5217-5222.
- [6] 姚露露, 潘闻政, 葛立峰, 等. 门静脉血栓大鼠模型的建立及评价[J]. *四川解剖学杂志*, 2018, 26(2): 1-4.
- [7] 熊静平, 张跃新. 肝硬化合并门静脉血栓的研究现状[J]. *临床肝胆病杂志*, 2016, 32(6):1075-1078.
- [8] 王东琳, 王全楚, 许丽芝. 门静脉血栓形成的机制及诊治研究进展[J]. *实用医药杂志*, 2011, 28(8):751-754.
- [9] 葛郁芝, 刘冬生. P 选择素与心血管疾病[J]. *高血压杂志*, 2006, 14(2):88-90.
- [10] 李健, 宗成国, 林卫军, 等. D 二聚体定量测定排除静脉血栓的一致性研究[J]. *血栓与止血学*, 2017, 23(3):424-427.
- [11] 张再强, 丁家望, 罗彩云. 高迁移率族蛋白 B1 与动脉粥样硬化[J]. *生命的化学*, 2017(2):280-284.
- [12] 肖湖南. 高迁移率族蛋白 1 介导的炎症反应在动脉粥样硬化进展的作用及机制研究[D]. 中国人民解放军医学院, 2016.
- [13] Vogel S, Bodenstern R, Chen Q, et al. Platelet-derived HMGB1 is a critical mediator of thrombosis [J]. *J Clin Invest*, 2015, 125(12): 4638-54.
- [14] Vogel S, Rath D, Borst O, et al. Platelet-derived high-mobility group box 1 promotes recruitment and suppresses apoptosis of monocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 478(1):143-8.