

本文引文格式:杨复锵,刘东菊,潘路娟,等. HMGB1 调控重症急性胰腺炎脾淋巴细胞凋亡的实验研究[J]. 右江民族医学院学报, 2021, 43(1): 22-27.

【论著与临床报道】

## HMGB1 调控重症急性胰腺炎脾淋巴细胞凋亡的实验研究

杨复锵,刘东菊,潘路娟,梁华益,覃月秋

(右江民族医学院附属医院消化内科,广西 百色 533000)

**摘要:**目的 研究高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)在重症急性胰腺炎(SAP)小鼠脾淋巴细胞中的表达及其对 SAP 小鼠脾淋巴细胞凋亡的影响。方法 成年雄性 SPF 级 BALB/C 小鼠 30 只,随机分为对照组、SAP 组、SAP+Ab 组,每组 10 只。实验前 BALB/C 小鼠禁食 12 h,自由饮水。SAP 组采用腹腔注射雨蛙素和脂多糖诱导,SAP+Ab 组于 SAP 造模成功后立即腹腔注射抗-HMGB1 抗体。各组造模后 12 h 取材,胰腺组织 HE 染色并对胰腺损伤进行评分,ELISA 检测小鼠血清 HMGB1 和 Caspase-3 表达水平,流式细胞术检测小鼠脾淋巴细胞凋亡率,RT-PCR 检测脾淋巴细胞 HMGB1、Caspase-3 mRNA 的表达情况。结果 与对照组比较,SAP 组和 SAP+Ab 组胰腺损伤评分增加,血清中 HMGB1 和 Caspase-3 含量升高( $P < 0.05$ ),脾淋巴细胞凋亡率增高( $P < 0.05$ ),脾淋巴细胞 HMGB1 mRNA 和 Caspase-3 mRNA 表达升高( $P < 0.05$ )。与 SAP 组比较,SAP+Ab 组胰腺的损伤评分降低,血清中 HMGB1 和 Caspase-3 含量降低( $P < 0.05$ ),脾淋巴细胞凋亡率降低( $P < 0.05$ ),脾淋巴细胞 HMGB1 mRNA、Caspase-3 mRNA 表达降低( $P < 0.05$ )。SAP 组脾淋巴细胞 HMGB1 mRNA、血清 HMGB1 水平与脾淋巴细胞凋亡率、脾淋巴细胞 Caspase-3 mRNA、血清 Caspase-3 水平呈正相关( $P < 0.05$ )。结论 HMGB1 与 SAP 脾淋巴细胞凋亡密切相关,可作为治疗 SAP 的一个潜在靶点。

**关键词:**胰腺炎,急性;高迁移率族蛋白 B1;淋巴细胞;凋亡

中图分类号:R576 文献标识码:A 文章编号:1001-5817(2021)01-0022-06

doi:10.3969/j.issn.1001-5817.2021.01.005

### Experimental study on HMGB1 for regulating spleen lymphocyte apoptosis in severe acute pancreatitis

Yang Fuqiang, Liu Dongju, Pan Lujuan, Liang Huayi, Qin Yueqiu

(Department of Gastroenterology, The Affiliated Hospital of Youjiang Medical University for Nationalities, Baise 533000, Guangxi, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the expression change of high mobility group protein B1 (HMGB1) in spleen lymphocytes of mice with severe acute pancreatitis (SAP) and its effect on apoptosis of spleen lymphocytes of SAP mice. **Methods** Thirty adult male BALB/C mice with SPF grade were randomly divided into a control group, a SAP group and a SAP + Ab group, with 10 mice in each group. Before experiment, BALB/C mice fasted for 12 hours and drank water freely. The SAP group was induced by intraperitoneal injection of caerulein and lipopolysaccharide and the SAP + Ab group was intraperitoneally injected with anti-HMGB1 antibody immediately after successful modeling. Samples were collected from each group at 12 h after modeling and the pancreatic injury was scored after pancreatic tissue was stained with HE. The expression levels of HMGB1 and Caspase-3 in serum were detected by ELISA. The apoptosis rate of spleen lymphocytes was detected by flow cytometry, and the expressions of HMGB1 and Caspase-3 mRNA in spleen lymphocytes were

基金项目:广西自然科学基金(2017GXNSFAA198030);广西医学高层次骨干人才培养计划资助(桂卫科教发[2018]22号)

第一作者简介:杨复锵(1994-),男,在读硕士研究生,研究方向:急性胰腺炎发病机制及诊治,E-mail:1275762669@qq.com

通讯作者简介:覃月秋(1976-),女,博士,教授,硕士研究生导师,研究方向:胰腺疾病基础及临床研究,E-mail:gxbsqyq@

detected by RT-PCR. **Results** Compared with those of the control group, the pancreatic injury score, the content of HMGB1 and Caspase-3 in serum, the apoptosis rate of spleen lymphocytes, the expressions of HMGB1 mRNA and Caspase-3 mRNA in spleen lymphocytes increased in the SAP group as well as the SAP+Ab group ( $P < 0.05$ ). Compared with those of the SAP group, the pancreatic injury score, the content of HMGB1 and Caspase-3 in serum, the apoptosis rate of spleen lymphocytes, the expressions of HMGB1 mRNA and Caspase-3 mRNA in spleen lymphocytes decreased in the SAP+Ab group ( $P < 0.05$ ). In the SAP group, the levels of HMGB1 mRNA in spleen lymphocytes and HMGB1 in serum were positively correlated with the apoptosis rate of spleen lymphocytes, the levels of Caspase-3 mRNA in spleen lymphocytes and Caspase-3 in serum ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** HMGB1 is closely related to the apoptosis of spleen lymphocytes in SAP patients and can be used as a potential target for the treatment of SAP.

**Key words:** pancreatitis, severe; high mobility group protein B1; lymphocyte; apoptosis

重症急性胰腺炎(severe acute pancreatitis, SAP)是临床上常见的急腹症,该病起病急,并发症多,病情重,病死率高达 20%,部分病人可遗留不同程度的胰腺功能不全<sup>[1-2]</sup>。近年来,虽然 SAP 在诊疗措施方面取得了很大进展,然而其病死率仍居高不下,与其发病机制不明有关。既往研究认为全身炎症反应综合征是 SAP 死亡的主要原因,但近年研究发现 SAP 淋巴细胞过度凋亡,引起免疫抑制和感染并发症的发生,是导致患者病情加重及死亡的重要原因<sup>[3-4]</sup>。然而 SAP 淋巴细胞凋亡的机制尚不清楚。高迁移率族蛋白 B1 (high-mobility group protein 1, HMGB1)是一个经典的损伤相关模式分子,可由细胞主动分泌或被动释放,通过与一系列分子相互作用而引起机体生理或病理改变。HMGB1 表达增加可导致细胞凋亡增加,与多囊卵巢综合征内分泌失调、认知功能障碍、SAP 相关性心肌损伤等疾病的发生发展密切相关<sup>[5-7]</sup>,然而 HMGB1 在 SAP 淋巴细胞凋亡中的作用尚不清楚。本研究通过腹腔注射雨蛙素和脂多糖(LPS)诱导 SAP 小鼠模型,检测 HMGB1 表达情况,分析 HMGB1 表达与脾淋巴细胞凋亡率及凋亡标志物 Caspase-3 表达的相关性,探讨 HMGB1 与 SAP 脾淋巴细胞凋亡的关系。

## 1 材料与方 法

1.1 材料 成年雄性 SPF 级 BALB/C 小鼠 30 只,体重 25~30 g,购自长沙市天勤生物技术有限公司;雨蛙素(C9026, Sigma);LPS(L2880, Sigma);抗 HMGB1 多克隆抗体(ST326052233);脂肪酶和淀粉酶的测定试剂盒购自南京建成公司;HMGB1 ELISA 试剂盒(CSB-E08225m, 华美);Caspase-3 ELISA 试剂盒(CSB-E08858m, 华美);AxyPrep 总 RNA 小量制备试剂盒(AP-MN-MS-RNA-50G);FastKing RT Kit (With gDNase)(KR116-02, Tiangen);SuperReal-PreMix Plus (SYBR Green)(FP205-02, Tiangen);PCR 引物合成(上海捷瑞);FITC Annexin V Apopto-

sis Detection Kit I(556547, BD 公司);红细胞裂解液(R1010, Solarbio)。

1.2 动物分组与建模 采取随机数字表法将小鼠分为对照组、SAP 组、SAP+Ab 组。小鼠在试验前均给予禁食 12 h 和自由饮水处理。对照组 10 只,给予腹腔注射 0.9%的氯化钠水溶液。SAP 组 10 只,采用腹腔注射雨蛙素+LPS[雨蛙素 50  $\mu\text{g}/(\text{kg} \cdot \text{h})$ ,共 13 次,在注射雨蛙素后,立即向腹腔内注射 LPS, LPS 给药剂量 30 mg/kg]。SAP+Ab 组 10 只,于 SAP 造模后腹腔注射 HMGB1 特异性抑制剂抗-HMGB1 抗体 10 mg/kg。观察各组小鼠的生理活动、生命征、死亡情况。造模后 12 h 处死取材。

1.3 标本采集及检测 水合氯醛麻醉小鼠后行眼眶采血,待血液静置凝固后于 4℃ 3000 r/min 离心 15 min,取上清液,EP 管分装后置于-80℃冰箱保存用于脂肪酶、淀粉酶和 ELISA 检测。采血后将以颈椎脱臼法处死小鼠,取出脾脏置于 1640 培养基中,用于分离淋巴细胞进行流式细胞术检测及 PCR 检测。取胰腺组织放入装有 10%甲醛溶液的 50 ml 离心管中固定,随后送病理科做 HE 染色。

1.3.1 HE 染色 胰腺组织先用 10%甲醛进行固定过夜,然后进行脱水,用石蜡包埋处理后即可进行石蜡切片,苏木精和伊红染色。请 2 位资深病理科医生双盲阅片,根据改良的 Schmidt 法<sup>[8]</sup>和 Pozsar 法<sup>[9]</sup>评分标准进行胰腺的损伤评分:①水肿:0=无水肿,1=叶间隙轻度增宽,2=叶间隙重度增宽,3=腺泡间隙增宽,4=细胞间隙增宽;②坏死:0=无,1=坏死面积为 1%~10%,2=坏死面积为 11%~20%,3=坏死面积为 21%~30%,4=坏死面积>30%;③出血:0=无,1=有;④炎性细胞浸润(计数高倍镜视野下血管周围或小叶内白细胞数量):0=0~1 个,1=2~10 个,2=11~20 个,3=21~30 个,4=30 个以上或出现微脓肿。每张切片随机选 5 个高倍视野计数。

1.3.2 小鼠血清淀粉酶和脂肪酶的检测 从-80℃冰

箱取出备用的小鼠血清并适当稀释后,根据试剂盒使用说明书严格操作,用分光光度计测定各组的 OD 值并计算出各组血清中淀粉酶浓度(淀粉-碘比色法)和脂肪酶浓度(比色法)。

1.3.3 小鼠血清 HMGB1 和 Caspase-3 的检测 从-80℃冰箱取出各组备用的小鼠血清,采用 ELISA 试剂盒说明书的方法,用 ELISA 试剂盒检测 HMGB1 和 Caspase-3 的表达水平。

1.3.4 流式细胞术检测 取小鼠脾脏,200 目尼龙膜研磨,经红细胞裂解液处理后收集淋巴细胞;将上述淋巴细胞以 PBS 配成浓度为  $1 \times 10^6$ /ml 的细胞悬液,用移液枪吸取上述细胞悬液 200  $\mu$ l,加入 AnnexinV-FITC、PI 各 10  $\mu$ l,置于室温、黑暗的环境中孵育 15 min,加入 1 $\times$ buffer 400  $\mu$ l,立即上流式细胞仪去检测脾淋巴细胞凋亡率。

1.3.5 脾淋巴细胞 RT-PCR 检测 检测按照说明书所述步骤提取各实验组脾淋巴细胞的总 RNA,经紫外分光光度计(TU-1810PC,北京普析)测定 OD<sub>260</sub>、OD<sub>280</sub> 及浓度。取 1  $\mu$ g 总 RNA 用反转录试剂盒并按说明书方法进行反转录获得 cDNA 单链,并保存在-80℃。应用 SYBR Green Master Mix 扩增上述 cDNA,使用 LightCycler<sup>®</sup>96 qPCR 仪进行检测。HMGB1 引物序列:上游 5'-AGGCGAGCATCCTGGCTTATC-3',下游 5'-CCTTCAGCTTGGCAGCTTTCT-3'。Caspase-3 引物的序列:上游 5'-CTGACTGGAAAGCCGAAACTC-3',下游 5'-CCCAGTGTCTGTCTCAATGCC-3'。GAPDH 引物的序列:上游 5'-GGTGTCTCCTGCGACTTCA-3',下游 5'-TGGTCCAGGGTTTCTTACTCC-3'。记录 GAPDH、HMGB1、Caspase-3 的 Ct 值。所有样品均设 3 个复孔,取均值并采用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  法计算目的基因的相对表达量。

1.4 统计学方法 计量资料用( $\bar{x} \pm s$ )表示,两组间的比较采用独立样本 *t* 检验,线性相关分析采用 Pearson 相关分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 小鼠胰腺病理评分比较 对照组胰腺腺泡结构基本完整,部分视野偶见水肿或少许炎性细胞;SAP 组可见胰腺腺泡细胞大量坏死,腺泡结构严重破坏,部分腺泡呈孤岛状,大部分胰腺腺叶正常结构消失,腺泡的间隔以及小叶的间隔均变宽,间质内可见红细胞和炎症细胞大量渗出。与 SAP 组相比,SAP+Ab 组胰腺的坏死、水肿、炎症细胞和红细胞渗出显著减少。根据改良的 Schmidt 法和 Pozsar 法评分标准,与对照组相比,SAP 组和 SAP+Ab 组的胰腺病理组织学评分均增加;与 SAP 组相比,SAP+Ab 组的胰腺病理组织学评分降低( $P < 0.05$ ),见表 1、图 1。

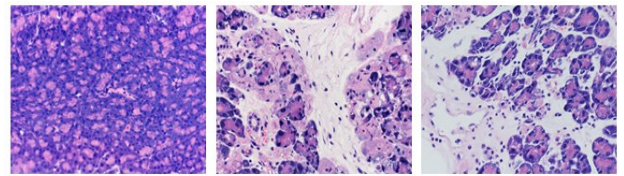


图 1 小鼠胰腺组织病理改变 (HE400 $\times$ )

表 1 小鼠胰腺组织评分比较

组别	<i>n</i>	胰腺损伤评分/分
对照组	10	0.40 $\pm$ 0.23
SAP 组	10	8.76 $\pm$ 0.56 <sup>a</sup>
SAP+Ab 组	10	6.58 $\pm$ 0.73 <sup>ab</sup>

注:①表内计量资料数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示;②与对照组比较,a: $P < 0.05$ ,与 SAP 组比较,b: $P < 0.05$ 。

2.2 小鼠血清淀粉酶和脂肪酶水平比较 与对照组相比,SAP 组和 SAP+Ab 组血清中的淀粉酶水平均升高,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ );与 SAP 组相比,SAP+Ab 组血清中的淀粉酶水平降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。与对照组相比,SAP 组和 SAP+Ab 组血清中的脂肪酶水平均升高,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ );与 SAP 组相比,SAP+Ab 组血清中的脂肪酶水平降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 小鼠血清淀粉酶和脂肪酶水平比较 单位:U/L

组别	<i>n</i>	淀粉酶	脂肪酶
对照组	10	1304.10 $\pm$ 130.01	75.12 $\pm$ 32.06
SAP 组	10	8416.50 $\pm$ 230.11 <sup>a</sup>	982.25 $\pm$ 76.02 <sup>a</sup>
SAP+Ab 组	10	6031.03 $\pm$ 441.21 <sup>ab</sup>	617.57 $\pm$ 56.84 <sup>ab</sup>

注:①表内计量资料数据以( $\bar{x} \pm s$ )表示;②与对照组相比,a: $P < 0.05$ ,与 SAP 组相比,b: $P < 0.05$ 。

2.3 小鼠血清 HMGB1 和 Caspase-3 水平比较 与对照组相比,SAP 组和 SAP+Ab 组血清 HMGB1 水平均显著升高,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ );与 SAP 组相比,SAP+Ab 组血清 HMGB1 水平明显降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ )。与对照组相比,SAP 组和 SAP+Ab 组血清 Caspase-3 水平均显著升高,差异均具有统计学意义( $P < 0.05$ );与 SAP 组相比,SAP+Ab 组血清 Caspase-3 水平降低,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 3。

2.4 小鼠脾淋巴细胞凋亡率 在双变量流式细胞仪的散点图上,以 Annexin-V FITC、PI 分别为散点图的横纵坐标。图中左下象限 Q4(FITC-/PI-)显示活细胞;右上象限 Q2(FITC+/PI+)代表坏死细胞;而右下象限 Q3(FITC+/PI-)代表早期凋亡细胞。与对照

表 3 小鼠血清 HMGB1 和 Caspase-3 水平比较

组别	n	HMGB1	Caspase-3
对照组	10	32.12±10.33	0.47±0.24
SAP 组	10	231.24±23.75 <sup>a</sup>	8.75±0.80 <sup>a</sup>
SAP+Ab 组	10	153.83±18.52 <sup>ab</sup>	6.49±1.13 <sup>ab</sup>

注:①表内计量资料数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示;②与对照组相比,a: $P<0.05$ ,与 SAP 组相比,b: $P<0.05$ 。

组对比,SAP 组和 SAP+Ab 组脾淋巴细胞凋亡率均升高,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ),与 SAP 组

相比,SAP+Ab 组脾淋巴细胞凋亡率下降,差异具有统计学意义( $P<0.05$ ),见表 4、图 2。

表 4 小鼠脾淋巴细胞凋亡率比较

组别	n	凋亡率/%
对照组	10	5.68±1.01
SAP 组	10	20.56±2.23 <sup>a</sup>
SAP+Ab 组	10	17.19±1.43 <sup>ab</sup>

注:①表内计量资料数据以( $\bar{x}\pm s$ )表示;②与对照组相比,a: $P<0.05$ ,与 SAP 组相比,b: $P<0.05$ 。

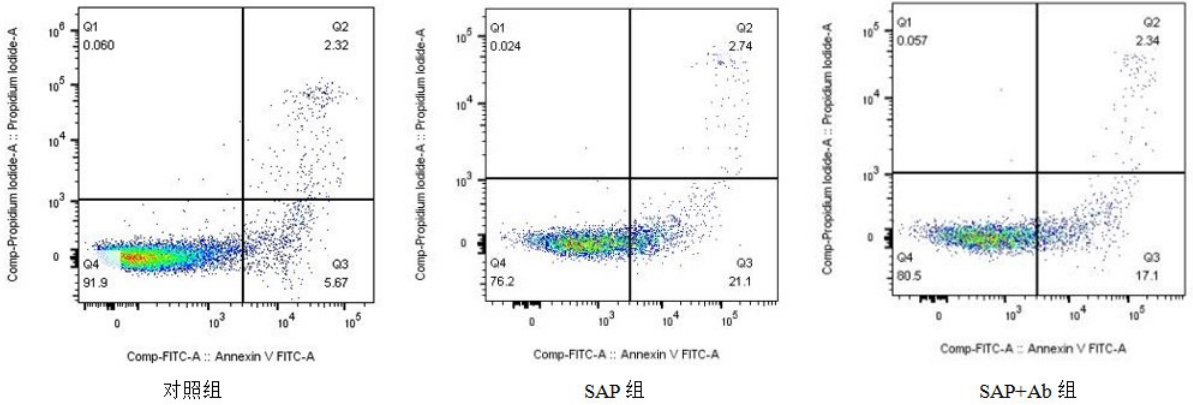
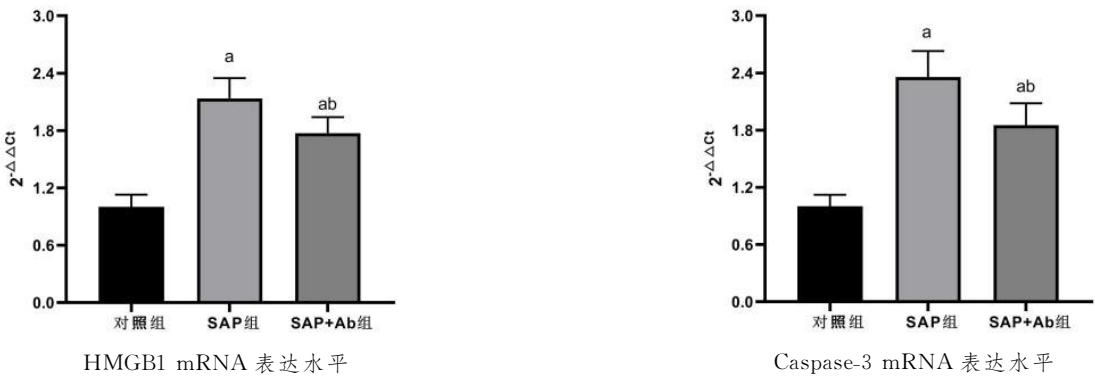


图 2 流式细胞术检测小鼠脾淋巴细胞凋亡率

2.5 小鼠脾淋巴细胞 HMGB1 mRNA 和 Caspase-3 mRNA 相对表达量 与对照组对比,SAP 组和 SAP+Ab 组 HMGB1 mRNA 表达均升高( $P<0.05$ );与 SAP 组比较,SAP+Ab 组 HMGB1 mRNA 表达下降( $P<0.05$ )。

与对照组对比,SAP 组和 SAP+Ab 组 Caspase-3 mRNA 表达均显著升高( $P<0.05$ );与 SAP 组对比,SAP+Ab 组 Caspase-3 mRNA 表达降低( $P<0.05$ ),见图 3。



注:与对照组比较,a: $P<0.05$ ;与 SAP 组比较,b: $P<0.05$ 。

图 3 小鼠脾淋巴细胞 RT-qPCR 结果

2.6 小鼠脾淋巴细胞 HMGB1 mRNA、血清 HMGB1 水平与脾淋巴细胞凋亡率、脾淋巴细胞 Caspase-3 mRNA、血清 Caspase-3 水平的相关性 SAP 组小鼠脾淋巴细胞 HMGB1 mRNA、血清 HMGB1 水平与脾淋巴细胞凋亡率、脾淋巴细胞 Caspase-3 mRNA、血清

Caspase-3 水平呈正相关( $r=0.9793$ 、 $r=0.9405$ 、 $r=0.9191$ 、 $r=0.9716$ 、 $r=0.9653$ 、 $r=0.9705$ 、 $P<0.05$ ),随着 HMGB1 mRNA 和血清 HMGB1 表达水平增高,脾淋巴细胞凋亡率、脾淋巴细胞 Caspase-3 mRNA 和血清 Caspase-3 升高,见图 4。

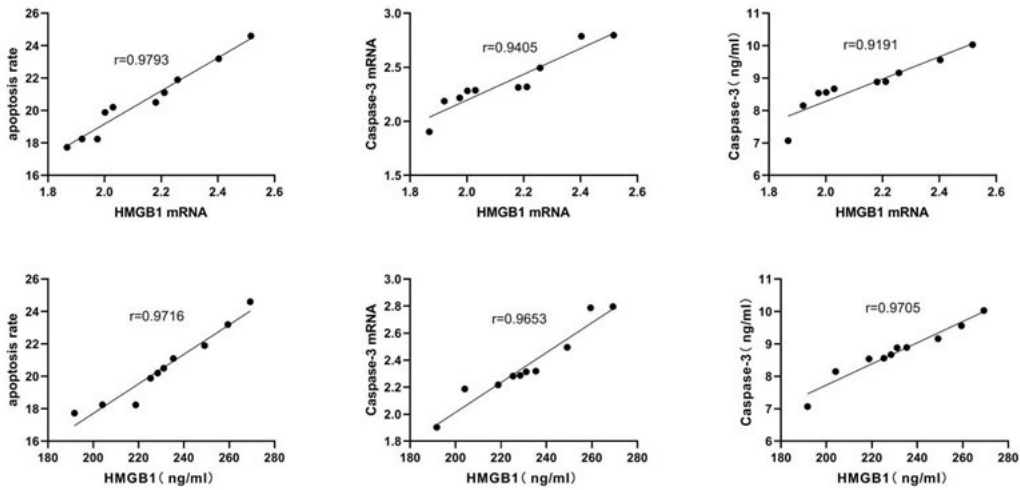


图 4 SAP 组小鼠脾淋巴细胞 HMGB1 mRNA、血清 HMGB1 水平与各指标的相关性

### 3 讨论

SAP 早期表现为强烈的全身炎症反应综合征 (systemic inflammatory response syndrome, SIRS), 后期常并发感染以及多器官功能障碍 (multiple organ dysfunction, MODS)<sup>[10]</sup>。外周血淋巴细胞是免疫系统的关键组成成分。淋巴细胞过度凋亡引起免疫抑制是 SAP 后期患者感染及死亡的重要原因<sup>[4]</sup>。本课题组的前期研究也证实了淋巴细胞 Fas 和 Fas 配体表达增加, 导致淋巴细胞过度凋亡, 与 SAP 严重程度、免疫抑制及继发感染等密切相关<sup>[3,11]</sup>。

细胞凋亡也称 I 型程序性死亡, 是细胞在生理和病理条件下发生的系统且协调的死亡过程<sup>[12]</sup>。细胞凋亡依据其发生过程是否依赖蛋白酶 Caspases 分为 Caspases 依赖性细胞凋亡和 Caspases 非依赖性细胞凋亡两种。Caspase 依赖性细胞凋亡最终都可导致 Caspase-3 酶原的激活, 其与细胞凋亡的执行阶段的开始密切相关<sup>[13]</sup>。HMGB1 是一种在真核生物中普遍存在的、多功能的、与 DNA 结合的非组蛋白。HMGB1 在细胞外主要是通过晚期糖基化终产物受体、Toll 样受体 4 和 CXC 基序趋化因子受体 4 相互作用而发挥生物学效应。研究表明 HMGB1 与细胞凋亡密切相关<sup>[5-7]</sup>。Zhu HL 等<sup>[5]</sup>在实验中发现通过抑制 lncRNA ZFAS1/miR129/ HMGB1 信号轴可以减少卵巢颗粒细胞凋亡, 从而减轻多囊卵巢综合征内分泌功能紊乱。Shi Y 等<sup>[7]</sup>也证实了 HMGB1 也可通过其他途径导致细胞凋亡增加, 他们在共培养 Transwell 系统中, 发现 HMGB1 通过减少 PI3K/Akt/Gsk3 $\beta$  信号通路中的 Akt 和 Gsk3 $\beta$  的磷酸化引起海马神经元凋亡增加和认知功能障碍。Wen Y 等<sup>[6]</sup>在 SAP 大鼠中观察到 HMGB1 可促进心肌细胞烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶表达来增加活性氧的释放, 最终导致凋亡相关

蛋白 Caspase-3 的表达, SAP 大鼠的心肌细胞凋亡增加, 加重心肌损伤。上述研究表明 HMGB1 可能通过调控细胞凋亡参与疾病的发生、发展。周森等<sup>[14]</sup>采用胰胆管逆行注射 5% 的牛磺胆酸钠建立 SAP 大鼠模型, 发现 SAP 组大鼠回肠组织中的 HMGB1 mRNA 较对照组显著升高、同时 T 淋巴细胞凋亡率也比对照组大鼠显著增加, 提示 HMGB1 可能通过调节 T 淋巴细胞凋亡参与 SAP 时肠免疫功能障碍的发生。然而 HMGB1 对 SAP 脾淋巴细胞凋亡的调控作用尚不清楚。

本研究结果显示 SAP 组小鼠胰腺腺泡细胞大量坏死, 腺泡结构严重破坏, 并且有大量红细胞和白细胞渗出; 同时观察到血清淀粉酶和脂肪酶显著升高, 表明腹腔注射雨蛙素和 LPS 成功复制小鼠 SAP 模型。本研究发现 SAP 组脾淋巴细胞 HMGB1 mRNA 和血清 HMGB1 表达水平较对照组显著增加。同时, SAP 组小鼠脾淋巴细胞凋亡率及 Caspase-3 mRNA 表达水平和血清 Caspase-3 表达水平均较对照组显著升高, 这与我们课题组前期研究证实了 SAP 中脾淋巴细胞凋亡增加的结果一致<sup>[15]</sup>。提示 SAP 脾淋巴细胞凋亡增加可能与 HMGB1 高表达有关。为进一步探讨 HMGB1 基因表达对脾淋巴细胞凋亡的调节作用, 我们将 SAP 组小鼠脾淋巴细胞 HMGB1 mRNA、血清 HMGB1 表达水平与脾淋巴细胞凋亡率、Caspase-3 mRNA、血清 Caspase-3 水平分别进行相关性分析, 结果发现, SAP 组小鼠脾淋巴细胞 HMGB1 mRNA、血清 HMGB1 水平与脾淋巴细胞凋亡率、脾淋巴细胞 Caspase-3 mRNA、血清 Caspase-3 水平呈正相关, 随着 HMGB1 mRNA 和血清 HMGB1 表达水平增高, 脾淋巴细胞凋亡率、脾淋巴细胞 Caspase-3 mRNA 和血清 Caspase-3 表达水平升高。提示 HMGB1 对 SAP 小

鼠脾淋巴细胞的凋亡起正向调节作用。为了进一步证实 HMGB1 对脾淋巴细胞凋亡的调控作用,我们设置了 SAP+Ab 组,在 SAP 小鼠造模后予抗-HMGB1 抗体干预,抑制 HMGB1 的表达,发现脾淋巴细胞凋亡率、Caspase-3 mRNA、血清 Caspase-3 表达水平表达降低,证明抑制 HMGB1 的表达可减轻脾淋巴细胞凋亡,从而改善机体的免疫功能。然而在 SAP 中 HMGB1 对脾淋巴细胞凋亡的具体作用机制有待于未来进一步研究。

综上所述,我们的研究发现 SAP 组小鼠脾淋巴细胞 HMGB1 mRNA、血清 HMGB1 表达显著增加,脾淋巴细胞凋亡率、Caspase-3 mRNA 及血清 Caspase-3 表达水平显著升高, HMGB1 mRNA、血清 HMGB1 水平与脾淋巴细胞凋亡率、脾淋巴细胞 Caspase-3 mRNA、血清 Caspase-3 水平呈显著正相关,提示 HMGB1 对 SAP 小鼠脾淋巴细胞凋亡起重要的调节作用,可能是由于 HMGB1 高表达,引起淋巴细胞过度凋亡,导致 SAP 免疫抑制的发生。这表明 HMGB1 可能是一个潜在的治疗靶点,通过阻断 HMGB1 表达将可能减少淋巴细胞凋亡,从而改善 SAP 患者的免疫功能。

#### 参考文献:

- [1] Lee PJ, Papachristou GI. New insights into acute pancreatitis[J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(8): 479-496.
- [2] Petrov MS, Yadav D. Global epidemiology and holistic prevention of pancreatitis [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2019, 16(3): 175-184.
- [3] Liao PH, Qin YQ, Xiong B, et al. Overexpression of Fas and FasL is associated with infectious complications and severity of experimental severe acute pancreatitis by promoting apoptosis of lymphocytes[J]. *Inflammation*, 2014, 37(4): 1202-1212.
- [4] Ding LL, Yang YM, Li HX, et al. Circulating lymphocyte subsets induce secondary infection in acute pancreatitis [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2020, 10: 128.
- [5] Zhu HL, Chen YQ, Zhang ZF. Downregulation of lncRNA ZFAS1 and upregulation of microRNA-129 repress endocrine disturbance, increase proliferation and inhibit apoptosis of ovarian granulosa cells in polycystic ovarian syndrome by downregulating HMGB1 [J]. *Genomics*, 2020, 112(5): 3597-3608.
- [6] Wen Y, Sun HY, Tan Z, et al. Abdominal paracentesis drainage ameliorates myocardial injury in severe experimental pancreatitis rats through suppressing oxidative stress[J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(1): 35-54.
- [7] Shi Y, Guo XY, Zhang J, et al. DNA binding protein HMGB1 secreted by activated microglia promotes the apoptosis of hippocampal neurons in diabetes complicated with OSA[J]. *Brain Behav Immun*, 2018, 73: 482-492.
- [8] Schmidt J, Rattner DW, Lewandrowski K, et al. A better model of acute pancreatitis for evaluating therapy[J]. *Ann Surg*, 1992, 215(1): 44-56.
- [9] Pozsar J, Berger Z, Simon K, et al. Biphasic effect of prostaglandin E1 on the severity of acute pancreatitis induced by a closed duodenal loop in rats[J]. *Pancreas*, 1996, 12(2): 159-164.
- [10] Maheshwari R, Subramanian RM. Severe Acute Pancreatitis and Necrotizing Pancreatitis [J]. *Crit Care Clin*, 2016, 32(2): 279-290.
- [11] Qin YQ, Liao PH, You YW, et al. The role of Fas expression on the occurrence of immunosuppression in severe acute pancreatitis[J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(11): 3300-3307.
- [12] Choo Z, Loh AHP, Chen ZX. Destined to Die: Apoptosis and Pediatric Cancers [J]. *Cancers (Basel)*, 2019, 11(11): 1623.
- [13] Cooper KF. Till death do us part; the marriage of autophagy and apoptosis [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018; 4701275.
- [14] 周淼,代静静,兑丹华,等. 清胰 II 号对重症急性胰腺炎大鼠肠道免疫损伤的影响[J]. *中国普通外科杂志*, 2017, 26(3): 317-324.
- [15] 徐晨阳,覃月秋,宋嗣恩,等. PERK 在重症急性胰腺炎大鼠淋巴细胞中的表达及其与细胞凋亡的相关性[J]. *右江民族医学院学报*, 2019, 41(1): 6-10.

收稿日期:2020-12-18;修回日期:2021-01-13