

重组高迁移率族蛋白 B1 对肺上皮细胞细胞因子释放的影响及其机制

吴国荣¹, 王发龙¹, 陈文¹, 陈静瑜², 刘洁³, 王琼¹, 赵琪¹, 陈国千^{1*}

(¹南京医科大学附属无锡市人民医院医学检验科, ²胸外科, ³呼吸科, 江苏 无锡 214023)

[摘要] 目的:观察重组高迁移率族蛋白 B1(high mobility group box 1, HMGB1)对肺上皮细胞致炎细胞因子释放的影响,并初步探讨其机制。方法:采用 BEAS-2B 人正常肺上皮细胞,观察 1、10、100、1 000 $\mu\text{g/L}$ 重组 HMGB1 蛋白对细胞培养上清液中致炎细胞因子肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6 含量的影响,及 10 mg/L Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)抗体处理对 HMGB1 诱导致炎细胞因子释放的抑制作用。TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量均采用酶联免疫吸附试验检测。结果:不同剂量重组 HMGB1 诱导肺上皮细胞 12 h 后,培养上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量均呈 HMGB1 剂量依赖性升高;100 $\mu\text{g/L}$ HMGB1 分别诱导肺上皮细胞 3、6、12 和 24 h 后,培养上清液中 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量均呈显著性升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),IL-1 β 、IL-6 含量随诱导时间延长而升高,而 TNF- α 含量于诱导后 6 h 达峰值;TLR4 抗体处理后 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 释放均受到部分抑制($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论:HMGB1 对肺上皮细胞释放 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 具有诱导作用,其机制可能与胞膜 TLR4 有关。

[关键词] 高迁移率族蛋白 B1; 上皮细胞; Toll 样受体 4; 细胞因子

[中图分类号] Q813

[文献标识码] A

[文章编号] 1007-4368(2012)05-641-04

Effects of recombinant HMGB1 on the release of proinflammatory cytokines in lung epithelial cells and its mechanism

WU Guo-rong¹, WANG Fa-long¹, CHEN Wen¹, CHEN Jing-yu², LIU Jie³, WANG Qiong¹, ZHAO Qi¹, CHEN Guo-qian^{1*}
(¹Department of Medical Laboratory, ²Department of Thoracic Surgery, ³Department of Respiration, Wuxi People's Hospital Affiliated to NJMU, Wuxi 214023, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effects of high mobility group box 1 (high mobility group box1, HMGB1) on the extracellular release of proinflammatory cytokines in lung epithelial cells, and its possible mechanism. **Methods:** The cytokines levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin(IL)-1 β , IL-6 in the culture supernatants of BEAS-2B human lung epithelial cells was determined by ELISA assay after induction with different concentrations of recombinant HMGB1 protein (1, 10, 100 and 1000 $\mu\text{g/L}$). The inhibitory effect of Toll-like receptor 4 (TLR4) antibody (10 mg/L) on the release of these cytokines was observed. **Results:** Recombinant HMGB1 dose-dependently increased the levels of TNF- α , IL-1 β and IL-6 in the culture supernatants of BEAS-2B cells. The levels of IL-1 β and IL-6 in the culture supernatants were time-dependently increased, and TNF- α level reached to the peak after 6 h induction of 100 $\mu\text{g/L}$ HMGB1. TLR4 antibody partly inhibited HMGB1-induced release of TNF- α , IL-1 β and IL-6 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion:** HMGB1 can induce lung epithelial cells to release TNF- α , IL-1 β and IL-6, and TLR4 may be involved in the regulatory mechanism.

[Key words] HMGB1 protein; epithelial cells; Toll-like receptor 4; cytokines

[Acta Univ Med Nanjing, 2012, 32(5): 641-644]

高迁移率族蛋白 B1(high mobility group box 1, HMGB1)为细胞内的一种非组蛋白。近年研究发现,

胞外 HMGB1 作为一种重要炎症介质,参与脓毒症、肺炎、关节炎、急性胰腺炎、缺血再灌注损伤、烫伤等许多疾病的发病过程^[1-2]。诸多体内和体外实验结果表明,组织细胞在外部多种诱导因素如内毒素等刺激后,核内 HMGB1 基因表达增强, HMGB1 胞外释放增多^[3],但对胞外 HMGB1 的作用机制研究甚

[基金项目] 国家自然科学基金(81070074);南京医科大学科技发展基金重点项目(2010NJMUZ59)

*通讯作者, E-mail: guoqian@yahoo.com

少, HMGB1 对肺相关细胞的诱导作用及其通路尚未见报道。本研究旨在探讨 HMGB1 对肺上皮细胞致炎细胞因子释放的影响及胞膜 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 的作用, 为 HMGB1 在肺部病理中的作用机制提供一些理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

BEAS-2B 人正常肺上皮细胞购自中国科学院细胞库。重组 HMGB1 蛋白为美国 eBioscience 公司产品, 多黏菌素 B、台盼蓝为美国 Sigma 公司产品, 兔抗人 TLR4 多克隆抗体(H-80)为美国 Santa Cruz 公司产品, LHC-8 培养液为美国 Invitrogen 公司产品。肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白介素 (interleukin, IL)-1 β 和 IL-6 的人 ELISA 试剂盒均为美国 Invitrogen 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养实验

BEAS-2B 人正常肺上皮细胞以无血清 LHC-8 培养液(含 100 U/ml 青霉素、100 μ g/ml 链霉素、50 mg/L 多黏菌素 B)在 37 $^{\circ}$ C、5%CO₂、95%空气培养箱中培养, 细胞贴壁覆盖 70%~80%时用相同培养液洗涤 2 次, 随后进行细胞实验。实验分为对照组和 4

种剂量 (1、10、100、1 000 μ g/L)HMGB1 诱导组。TLR4 抗体于加入重组 HMGB1 前 2 h 加入培养细胞。

1.2.2 细胞因子含量测定

细胞培养液收集后离心取上清液检测 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量, 均采用酶联免疫吸附试验 (ELISA) 检测, 按产品使用说明书进行分析定量。实验重复 6 次。

1.3 统计学方法

使用 SPSS18.0 统计软件包, 剂量反应关系采用 Spearman 相关系数进行双变量相关分析, 两组间比较采用双侧 *t* 检验分析, 多组间比较采用 Dunnett-*t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 重组 HMGB1 对肺上皮细胞细胞因子释放的剂量效应

以不同剂量重组 HMGB1 诱导肺上皮细胞 12 h, 结果显示肺上皮细胞培养上清液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量均呈 HMGB1 剂量依赖性升高, 差异有统计学意义 (*P* < 0.01, 表 1), 但 1 μ g/L HMGB1 对 3 种细胞因子释放无显著性影响 (*P* > 0.05)。台盼蓝细胞染色显示, 肺上皮细胞经 1 000 μ g/L HMGB1 诱导 24 h 后细胞存活率无明显改变。

表 1 不同剂量 HMGB1 诱导后肺上皮细胞培养上清液中细胞因子水平

Table 1 Cytokine levels in the culture supernatants of BEAS-2B lung epithelial cells induced with different concentration of HMGB1 (ng/L, $\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	TNF- α	IL-1 β	IL-6
对照组	92.9 \pm 19.2	41.2 \pm 8.7	37.3 \pm 8.1
1 μ g/L HMGB1 组	101.3 \pm 21.7	44.7 \pm 10.9	41.1 \pm 10.3
10 μ g/L HMGB1 组	173.0 \pm 38.3**	63.3 \pm 11.9**	54.4 \pm 13.7*
100 μ g/L HMGB1 组	677.8 \pm 162.5**	96.2 \pm 23.4**	98.9 \pm 21.0**
1 000 μ g/L HMGB1 组	903.4 \pm 207.7**	137.8 \pm 34.7**	157.0 \pm 40.8**

与对照组比较, **P* < 0.05, ***P* < 0.01。

2.2 重组 HMGB1 对肺上皮细胞细胞因子释放的时间效应

以 100 μ g/L HMGB1 诱导肺上皮细胞不同时间(3、6、12、24 h)后, 结果显示培养上清液中 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 含量均较对照组显著性升高 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01)。IL-1 β 和 IL-6 含量随诱导时间延长而升高, 而 TNF- α 含量于诱导后 6 h 达峰值, 随后下降, 见图 1。

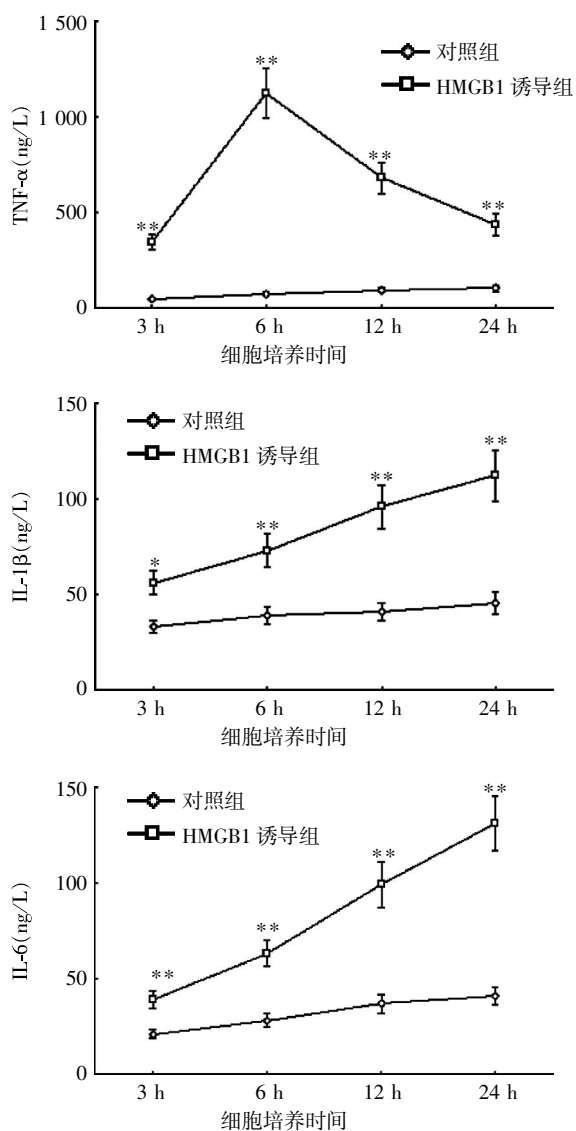
2.3 TLR4 抗体对 HMGB1 诱导肺上皮细胞细胞因子释放的影响

以 10 mg/L TLR4 中和抗体处理 100 μ g/L

HMGB1 诱导 12 h 的肺上皮细胞, 结果显示, 抗体处理后 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 释放均受到明显抑制 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01), 但抗体处理后 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 含量仍均高于对照组 (*P* < 0.05 或 *P* < 0.01, 图 2)。

3 讨论

HMGB1 为细胞内一种非组蛋白, 由 214 个氨基酸组成, 分子量约 30 000, 广泛分布于各种组织细胞, 主要存在于细胞核中, 因其在凝胶电泳中迁移速度快而得名。种族间 HMGB1 一级结构具有高度同源性, 大鼠和小鼠的 HMGB1 氨基酸序列具有



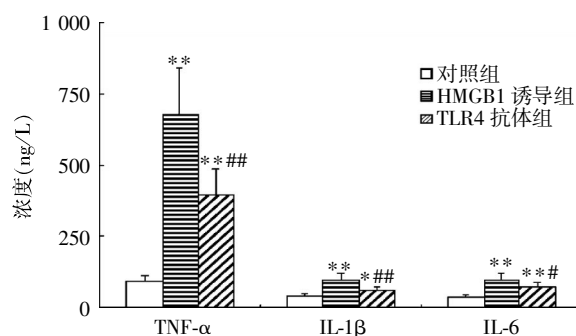
与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 6$ 。

图 1 HMGB1 诱导不同时间后肺上皮细胞培养上清液中细胞因子水平

Figure 1 Cytokine levels in the culture supernatants of BEAS-2B lung epithelial cells induced by HMGB1 for different time

100%同源性,而啮齿类动物与人的 HMGB1 仅存在 2 个氨基酸的差异。胞内 HMGB1 主要参与核小体的构建和稳定、基因转录的调节、DNA 的重组修复和复制等。1999 年, Wang 等^[4]发现 HMGB1 可以释放到胞外并介导炎症反应, 为一种重要的炎症介质; 随后 HMGB1 作为炎症介质引起广泛重视, 诸多研究表明, HMGB1 在脓毒症、肺炎、关节炎、急性胰腺炎、烫伤、脑梗塞、脑膜炎、系统性红斑狼疮、烫伤、缺血再灌注损伤、出血性休克等疾病的发病过程中具有重要作用^[1-2]。

近年研究显示, 巨噬细胞、单核细胞、垂体细



与对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 HMGB1 诱导组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; $n = 6$ 。

图 2 TLR4 抗体处理后肺上皮细胞培养上清液中细胞因子水平

Figure 2 Cytokine levels in the culture supernatants of BEAS-2B lung epithelial cells with TLR4 antibody treatment

胞、上皮细胞、树突状细胞、肝细胞等受内毒素、干扰素 γ 、生物活性脂或缺氧等诱导后, 胞内 HMGB1 可通过非经典途径(如分泌溶酶体)主动分泌、释放到胞外^[3,5]。另外, HMGB1 也可通过坏死或受损组织细胞被动释放至胞外。释放到胞外的 HMGB1 作为一种炎症介质介导炎症反应, 但其机制尚未完全阐明。Andersson 等^[6]研究结果显示, 重组 HMGB1 能刺激人外周血单核细胞表达释放 TNF- α 、IL-1 α 、IL-1 β 、IL-6、IL-8、巨噬细胞炎性蛋白 (macrophage inflammatory protein, MIP)-1 α 和 MIP-1 β , 但对 IL-10 和 IL-12 释放没有影响; Fiuza 等^[7]报道, 重组 HMGB1 也能诱导人微血管内皮细胞释放 TNF- α 、IL-8、单核细胞趋化蛋白 1 (monocyte chemoattractant protein, MCP-1) 等, 并与胞内 MAPKs 通路活化有关; 国内刘峰等^[8]报道, 重组 HMGB1 可以诱导小鼠巨噬细胞 TNF- α 和细胞间黏附分子-1 (intercellular adhesion molecular-1, ICAM-1) 的基因表达和蛋白释放, 而只有在高剂量 HMGB1 (1 000 $\mu\text{g/L}$) 作用下 IL-10 基因表达才有所增加。HMGB1 在肺炎、肺损伤中的重要作用已有诸多报道^[9-10], 通过小鼠气管内给予重组 HMGB1, 结果诱发急性肺损伤, 肺组织出现水肿、中性粒细胞聚集及 TNF- α 、IL-1 β 、MIP-2 等含量增多, 但 HMGB1 对肺相关细胞致炎因子的诱导作用及其通路尚未见报道。本研究采用 BEAS-2B 人正常肺上皮细胞株进行实验, 结果显示重组 HMGB1 蛋白具有诱导肺上皮细胞释放致炎细胞因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 等的作用。我们已经进行了重组 HMGB1 诱导肺巨噬细胞释放细胞因子的实验研究, 结果与本研究基本一致(另文报道), 提示 HMGB1 可通过诱导肺组织相关细胞致炎细胞因子的释放而参

与肺炎、肺损伤病理过程。

胞外 HMGB1 需与相应胞膜受体结合才能发挥其生物学效应。¹²⁵I-HMGB1 配体结合分析显示晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 与 HMGB1 具有高亲和力, 是 HMGB1 的主要受体^[11]。通过巨噬细胞、中性粒细胞、内皮细胞等细胞实验显示, HMGB1 与 RAGE 结合后, 可引发 MAPK 的磷酸化 (包括 p38 MAPK、JNK1/2、ERK1/2)、核转录因子(NF)- κ B 和特殊蛋白 SP-1 的核内转移, 使许多其他炎性因子表达加强和释放增多而启动炎症或使炎症恶化^[3]。然而, RAGE 不应该是 HMGB1 的唯一受体, 因为 HMGB1 B-box 是 HMGB1 引起炎症反应的功能结构域, 但不含与 RAGE 结合的 HMGB1 序列 (150~183 个氨基酸), 另外, 使用抗 RAGE 抗体仅能部分抑制 HMGB1 的炎症反应。近年研究显示, TLR4 也作为 HMGB1 的重要受体参与 HMGB1 的信号转导^[11-12]。本研究使用 TLR4 抗体进行干扰实验, 结果显示 TLR4 抗体处理后 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6 释放均受到部分抑制, 提示 HMGB1 生物学效应的信号转导涉及多种胞膜受体。

[参考文献]

- [1] Yang H, Tracey KJ. Targeting HMGB1 in inflammation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799(1-2): 149-156
- [2] Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection [J]. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29: 139-162
- [3] Chen G, Ward MF, Sama AE, et al. Extracellular HMGB1 as a proinflammatory cytokine [J]. *J Interferon Cytokine Res*, 2004, 24(6): 329-333
- [4] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice [J]. *Science*, 1999, 285(5425): 248-251
- [5] 陈国千, 邵耀明, 王春新, 等. 脂多糖诱导肝细胞 HMGB1 释放及其信号通路研究 [J]. *中国实验诊断学*, 2009, 13(11): 1518-1521
- [6] Andersson U, Wang H, Palmblad K, et al. High mobility group 1 protein (HMG-1) stimulates proinflammatory cytokine synthesis in human monocytes [J]. *J Exp Med*, 2000, 192(4): 565-570
- [7] Fiuza C, Bustin M, Talwar S, et al. Inflammation-promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells [J]. *Blood*, 2003, 101(7): 2652-2660
- [8] 刘峰, 姚咏明, 董宁, 等. 高迁移率族蛋白 B1 对小鼠巨噬细胞细胞因子和黏附分子表达的影响 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2008, 17(2): 119-122
- [9] Ito Y, Torii Y, Ohta R, et al. Increased levels of cytokines and high-mobility group box 1 are associated with the development of severe pneumonia, but not acute encephalopathy, in 2009 H1N1 influenza-infected children [J]. *Cytokine*, 2011, 56(2): 180-187
- [10] Ebina M, Taniguchi H, Miyasho T, et al. Gradual increase of high mobility group protein b1 in the lungs after the onset of acute exacerbation of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Pulm Med*, 2011, 2011: 916486
- [11] van Zoelen MA, Achouiti A, van der Poll T. RAGE during infectious diseases [J]. *Front Biosci (Schol Ed)*, 2011, 3: 1119-1132
- [12] Sims GP, Rowe DC, Rietdijk ST, et al. HMGB1 and RAGE in inflammation and cancer [J]. *Annu Rev Immunol*, 2010, 28: 367-388

[收稿日期] 2011-12-15

本刊现已启用网上稿件管理系统, 作者登陆
<http://jnmunjmu.edu.cn/>即可在线投稿并查询稿件
 审理情况。