

高迁移率族蛋白 B1 在糖尿病肾病中的表达及意义

姚迪¹, 陆卫平^{1*}, 周莉¹, 毛莉¹, 姜玉章²

(¹南京医科大学附属淮安第一医院内分泌科, ²临床检验中心, 江苏 淮安 223300)

[摘要] 目的:检测糖尿病肾病患者血清中高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)及相关炎症因子和氧化应激指标,探讨 HMGB1 在糖尿病肾病发生发展中的作用。方法:收集 120 例临床糖尿病肾病及 60 例单纯糖尿病患者的临床资料及血液标本。临床糖尿病肾病患者按 24 h 尿白蛋白定量分为微量白蛋白尿组($n=60$)和大量白蛋白尿组($n=60$)。检测血液中糖化血红蛋白(HbA1c)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、甘油三酯(TG)、肌酐等水平,并采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清中 HMGB1、晚期糖基化终末产物受体(RAGE)、丙二醛(MDA)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)浓度。变量之间相关性分析采用 Pearson 相关性分析。结果:①临床糖尿病肾病组血清中 HMGB1、RAGE、TNF- α 、MDA 水平高于单纯糖尿病组,且差异具有统计学意义($P < 0.01$);②HMGB1、RAGE、TNF- α 、MDA 在大量白蛋白尿组中表达量最高;③HMGB1 与 RAGE、TNF- α 、MDA 呈正相关。结论:HMGB1 在临床糖尿病肾病患者血清中水平显著升高,且随着蛋白尿加重,其血清中的水平亦升高。HMGB1 可能通过促进炎症反应及氧化应激等机制参与糖尿病肾病发生发展。

[关键词] 高迁移率族蛋白 B1;糖尿病肾病;炎症反应;氧化应激

[中图分类号] R587.2

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2016)01-060-05

doi: 10.7655/NYDXBNS20160112

Expression and role of HMGB1 in serum of patients with diabetic nephropathy

Yao Di¹, Lu Weipin^{1*}, Zhou Li¹, Miao Li¹, Jiang Yuzhang²

(¹Departments of Endocrinology, ²Clinical Laboratory Center, Huai'an First People's Hospital Affiliated to NJMU, Huai'an 223300, China)

[Abstract] **Objective:** To elucidate the role of HMGB1 in the pathogenesis of diabetic nephropathy by detecting serum concentrations of HMGB1 and related inflammatory factors and oxidative stress makers in patients suffer with diabetic nephropathy. **Methods:** Collected clinical data and blood samples of 120 cases of diabetic nephropathy and 60 cases of simple diabetic patients. The patients with diabetic nephropathy were divided into two groups according to the 24 hours urinary albumin quantitative, microalbuminuria group ($n=60$) and macroalbuminuria group ($n=60$). HbA1c, TC, LDL-C, HDL-C, TG, creatinine of the samples were detected. Enzyme-linked immunosorbent (ELISA) was used to detect the concentration of HMGB1, RAGE, TNF- α and MDA of three groups. **Results:** ① Compared with simple diabetes group, the serum concentration of HMGB1, RAGE, TNF- α and MDA significantly increased in two groups of diabetic nephropathy, and the difference is statistically significant ($P < 0.01$). ② The serum concentration of HMGB1, RAGE, TNF- α and MDA was highest in macroalbuminuria group of diabetic nephropathy. ③ The expression of HMGB1 was positively correlated with RAGE, TNF- α and MDA. **Conclusion:** The serum concentration of HMGB1 was significantly increased in patients with clinical diabetic nephropathy. With the deterioration of albuminuria, the expression of HMGB1 gradually increased. HMGB1 may participate in the development of diabetic nephropathy by promoting inflammation and oxidative stress.

[Key words] high-mobility group box-1 protein; diabetic nephropathy; pathogenesis; inflammation; oxidative stress

[Acta Univ Med Nanjing, 2016, 36(01):060-064]

近年来,我国糖尿病肾病(DN)的患病率不断上升,且 DN 是目前导致终末期肾脏疾病(ESRD)的最

常见病因,并成为糖尿病患者致死和致残率高的主要原因之一,严重危害人类生存和生活质量。而 DN 确切的发病机制至今还未完全阐明,探寻 DN 的发病机制及新的治疗靶点一直是研究的热点^[1]。高迁移率族蛋白 B1(HMGB1),是广泛存在于真核细胞

[基金项目] 江苏省卫生厅科研项目(H201458)

*通信作者(Corresponding author), E-mail:hyhalwp@sina.com

核中的一种非组蛋白染色体结合蛋白,最早在上个世纪60年代从牛胸腺中提取和鉴定^[2]。HMGB1在体内广泛分布,正常情况下存在于细胞核中,但在某些特殊条件下, HMGB1能通过活化的巨噬细胞和单核细胞等炎症细胞的主动分泌和坏死细胞的被动释放转移至细胞外,参与多种疾病及炎症的发生发展^[3],例如脓毒血症、类风湿性关节炎和动脉粥样硬化等。HMGB1作为配体能与细胞表面多种受体结合发挥不同生理作用,其中晚期糖基化终末产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)和Toll样蛋白受体(TLR2/4)研究最为广泛。近年来有报道认为HMGB1可能是导致肾脏损害的潜在因素^[4],但HMGB1在糖尿病肾病发病过程中的作用并不清楚。本研究通过检测临床糖尿病肾病患者及单纯糖尿病患者血清中HMGB1及相关炎症及氧化应激指标的浓度,并进行相关统计学分析来探讨HMGB1在糖尿病肾病发生发展中的作用。

1 对象和方法

1.1 对象

选自2014年9月至2015年5月于南京医科大学附属淮安第一医院内分泌与代谢病科住院的180例糖尿病患者(男98例,女82例),其中24h尿白蛋白定量(24h urine protein quantitation, 24hUPQ) ≥ 30 mg 归为临床糖尿病肾病组,并进一步分为微量白蛋白尿组($30 \text{ mg} \leq 24\text{hUPQ} < 300 \text{ mg}$)60例和大量白蛋白尿组($24\text{hUPQ} \geq 300 \text{ mg}$)60例,60例单纯糖尿病组无肾病证据($24\text{hUPQ} < 30 \text{ mg}$,肌酐 $< 104 \text{ mmol/L}$,无肾小球滤过率降低等)和糖尿病其他并发症依据。

病例纳入标准:符合世界卫生组织(WHO)1999年颁布的糖尿病诊断标准的2型糖尿病患者。排除标准:①1型糖尿病;②妊娠期、哺乳期女性;③活动性感染;④心力衰竭;⑤糖尿病急性并发症:糖尿病酮症酸中毒、糖尿病高血糖高渗性综合征、乳酸酸中毒等;⑥近期(1个月内)有尿路感染者、尿路结石、服用肾毒性药物、近期(1个月内)行泌尿系手术、急性肾损伤及脱水患者。

1.2 方法

所有患者至少禁食8~10h后采集空腹静脉血,常温静置2h,放入台式离心机,3000 r/min离心10 min,分离上层血清,采用全自动生化分析仪检测糖化血红蛋白(HbA1c)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-

C)、甘油三酯(TG)、肌酐等水平,留取24h尿液贮存在一容器内,混匀后采用比浊法测定24hUPQ。采用酶联免疫吸附(ELISA)法检测血清中HMGB1、RAGE、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、丙二醛(MDA)浓度(ELISA试剂盒购自武汉优尔生科技股份有限公司,检测范围:HMGB1:62.5~4000.0 pg/mL;RAGE:0.156~10.000 ng/mL;TNF- α :1.56~100.00 pg/mL;MDA:24.69~2000.00 ng/mL)。

1.3 统计学方法

应用SPSS20.0统计软件进行统计分析,实验数据以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组均数比较采用单因素方差分析,每两组均数比较采用SNK- q 检验,双变量间采用Pearson相关性分析,以 $P \leq 0.05$ 为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 临床资料

各组间患者年龄分布、性别比例、体重指数、HbA1c、TG无明显差异($P > 0.05$);大量白蛋白尿组病程明显高于单纯糖尿病组($P < 0.01$);大量白蛋白尿组与前两组比较,收缩压($P < 0.01$)和舒张压($P < 0.05$)、24hUPQ($P < 0.01$)、肌酐($P < 0.01$)的差异均有统计学意义;与单纯糖尿病组比较,微量白蛋白尿组TC下降($P < 0.05$),HDL-C升高($P < 0.01$),大量白蛋白尿组LDL-C升高($P < 0.01$);与微量白蛋白尿组比较,大量白蛋白尿组TC升高($P < 0.01$),HDL-C下降($P < 0.05$,表1)。

2.2 ELISA法检测血清中HMGB1等指标浓度

大量白蛋白尿组与前两组比较, HMGB1、RAGE、TNF- α 、MDA均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.01$),微量白蛋白尿组与单纯糖尿病组比较, HMGB1($P < 0.05$)、RAGE($P < 0.05$)、TNF- α 有显著差异($P < 0.01$,表2)。

2.3 3组患者血清中HMGB1与RAGE、TNF- α 、MDA的相关性分析

通过相关分析,3组患者血清中HMGB1与RAGE、TNF- α 、MDA的表达量呈正相关,且具有统计学意义(表3)。

3 讨论

HMGB1在1999年首次被描述为一种重要的内源性信号分子,并且是一种晚期炎症介质^[5]。目前一些重要的细胞表面受体被证明参与了HMGB1的信号通路,其中RAGE和Toll样受体,主要包括

表 1 3 组患者一般资料比较

Table 1 Comparison of clinical data of patients in three groups (X ± s)

	单纯糖尿病组(n=60)	微量白蛋白尿组(n=60)	大量白蛋白尿组(n=60)
年龄(岁)	57 ± 15	58 ± 15	63 ± 10
性别(男/女)	24 / 36	34 / 26	32 / 28
病程(年)	6.64 ± 6.92	9.05 ± 7.22	11.40 ± 6.41**
体重指数(kg/m ²)	24.16 ± 3.12	25.42 ± 3.57	24.42 ± 3.87
收缩压(mmHg)	134.98 ± 19.00	138.75 ± 17.95	160.68 ± 23.20***
舒张压(mmHg)	76.33 ± 10.23	79.62 ± 10.43	86.40 ± 12.86**
HbA1c(%)	9.04 ± 2.23	8.89 ± 2.30	8.44 ± 1.90
TC(mmol/L)	4.60 ± 0.92	3.96 ± 1.24*	4.91 ± 1.76 [#]
TG(mmol/L)	1.66 ± 0.82	1.90 ± 1.20	2.10 ± 1.66
HDL-C(mmol/L)	1.20 ± 0.24	1.64 ± 0.76**	1.31 ± 0.31 [#]
LDL-C(mmol/L)	2.49 ± 0.62	2.77 ± 0.96	3.14 ± 1.28**
24hUPQ(mg)	19.30 ± 18.10	93.04 ± 66.91	1 925.45 ± 1 819.80***
肌酐(μmol/L)	60.57 ± 19.56	74.40 ± 42.44	173.65 ± 114.40***

与单纯糖尿病组比较, *P < 0.05, **P < 0.01; 与微量白蛋白尿组比较, [#]P < 0.05, [#]#P < 0.01。

表 2 3 组患者血清中各指标表达量比较

Table 2 Comparison of expression of four indicators in three groups (X ± s)

检测指标	单纯糖尿病组(n=60)	微量白蛋白尿组(n=60)	大量白蛋白尿组(n=60)
HMGB1(pg/mL)	345.07 ± 229.26	771.06 ± 324.54*	1 876.66 ± 863.53***
RAGE(ng/mL)	1.66 ± 1.32	2.31 ± 2.22*	7.25 ± 0.95***
TNF-α(pg/mL)	8.96 ± 4.83	16.49 ± 6.98*	77.92 ± 7.77***
MDA(ng/mL)	15.53 ± 19.5	121.70 ± 113.30	301.03 ± 139.48***

与单纯糖尿病组比较, *P < 0.05, **P < 0.01; 与微量白蛋白尿组比较, [#]#P < 0.01。

表 3 3 组患者血清中 HMGB1 与 RAGE、TNF-α、MDA 的相关性分析

Table 3 Correlation analysis of HMGB1 and RAGE, TNF-α and MDA

HMGB1	RAGE	TNF-α	MDA
r 值	0.652	0.780	0.740
P 值	< 0.01	< 0.01	< 0.01

TLR-2 和 TLR-4, 研究最为广泛^[6]。大量证据表明, HMGB1、RAGE 以及 TLR2/4 在糖尿病肾病等慢性炎症的发展中起到重要作用^[7]。

Dasu 等^[8]观察到在新诊断的 2 型糖尿病患者中 HMGB1 活性上调, 提示 HMGB1 的炎性作用在糖尿病初期已显现, 并参与了糖尿病的发展及胰岛素抵抗的产生。本研究通过检测糖尿病患者血清中 HMGB1 及相关炎症指标, 发现 HMGB1 在糖尿病肾病患者血清中均有不同程度的表达, 即使是在单纯糖尿病患者中也能检测到 HMGB1 的存在, 这一结果与 Dasu 等的研究结果相符。

RAGE 作为 HMGB1 的受体, 同样检测了血清中 RAGE 的含量, 结果发现, 与单纯糖尿病组相比, DN 患者血清中 RAGE 表达量显著升高(P < 0.01),

且在大量白蛋白尿组中最高, 随后通过 Pearson 相关分析对两者的相关性进行了分析, 结果提示 HMGB1 与 RAGE 的表达呈正相关。

RAGE 最初被定义为糖基化终末产物受体 (AGEs) 受体, 广泛表达于单核细胞、巨噬细胞、神经元、内皮细胞和各种肿瘤细胞^[9]。在高糖环境下, AGEs 大量产生, 并随着糖尿病患者患病年限的增加, 沉积在肾小球基底膜、系膜细胞、内皮细胞和足细胞中, 并与其受体 RAGE 相互作用, 引起一系列炎症反应和导致氧化应激产生。而高糖环境下同样也能诱导 HMGB1 分泌增加, 相比于 AGEs, HMGB1 与 RAGE 的亲和力更高, 而且 RAGE 被认为是 HMGB1 最重要的受体之一^[10], HMGB1 与 RAGE 相互作用能激活两种信号通路, 即 CDC42/Rac 和 MAPKs 通路, 这两条信号通路的激活最终导致细胞骨架改变及 NF-κB 的激活^[11-12]。HMGB1 与 RAGE 相结合能够促使免疫细胞的趋化、成熟和迁移, 并上调细胞表面受体, 增加白细胞介素 8 (IL-8)、TNF-α、单核细胞趋化蛋白 (MCP1)、血管内皮生长因子 (VEGF) 和细胞间黏附分子 (ICAM-1)、血管细胞黏附分子 (VCAM-1) 的表达^[13]。Kim 等^[3]研究认为 HMGB1 广泛表达于糖

尿病大鼠的肾脏组织,在高血糖作用下,肾小球细胞和肾小管上皮细胞释放 HMGB1 引起糖尿病大鼠的肾脏损伤,这一过程可能与 HMGB1 激活核因子 κ B (NF- κ B) 并上调 RAGE 表达有关。

NF- κ B 是炎症、免疫反应、细胞生存和细胞增生的关键调节因子,也是 RAGE 在细胞内的主要信号通路,NF- κ B 的激活能引起 ICAM-1、促炎症因子及血管生成因子的增加,从而促使炎症反应发生^[14],另外 NF- κ B 的激活也能诱导 HMGB1 的分泌增多,并由此放大炎症反应^[15]。炎症反应在 DN 的发病过程中起到重要作用,并且,糖尿病患者肾功能的退化和蛋白尿的产生与肾小管间质炎症密切相关^[16]。本研究发现 DN 患者的血清 TNF- α 含量较单纯糖尿病高,且大量白蛋白尿组高于微量白蛋白尿组。TNF- α 作为一种炎性细胞因子,参与了体内多种炎症反应的发生。高血糖状态下,TNF- α 水平升高,刺激足细胞产生大量单核细胞趋化分子-1(MCP-1),能引起 NF- κ B 和 PI3K 信号通路激活,并可能通过细胞毒作用造成足细胞损伤,且 TNF- α 水平与糖尿病肾病蛋白尿严重程度平行^[17],且 TNF- α 的升高与 HMGB1 激活 RAGE—NF- κ B 信号通路相关。

除了炎症反应外,氧化应激也是 DN 的发病机制之一。氧化应激反应中产生的活性氧(ROS)能够直接造成肾脏细胞氧化损伤而引起肾脏组织结构和功能破坏,并且能间接通过激活 NF- κ B 通路来诱导炎症反应^[18]。MDA 是氧化应激的标志物,本研究选择 MDA 来反映体内氧化应激状态。在 3 组研究病例中,MDA 均有表达,提示氧化应激在糖尿病发病的全程均有参与,而与单纯糖尿病组相比,DN 患者 MDA 表达量更高,其中大量白蛋白尿组最高,表明随着糖尿病状态下氧化应激产物的不断合成和积聚,对肾脏的损伤也逐步增加,在糖尿病肾病的中后期,氧化应激反应进一步加重。氧化应激反应中 ROS 的合成伴随着 ERK 1/2、NF- κ B 的磷酸化和 RAGE 的产生^[19],并且 ROS 在细胞内可以作为 RAGE 的第二信使参与多种反应^[20]。由此,本文推测 HMGB1 作为 RAGE 的配体之一,通过 NF- κ B 信号通路激活可能也参与了氧化应激反应的发生,而其中的具体机制尚不清楚,需要进一步研究来阐明。

随着 DN 的进展,肾功能及肾小球滤过率明显下降,血压也随之升高,发现 3 组患者中,大量白蛋白尿组血压(包括收缩压和舒张压)增高最明显, HMGB1 水平也最高。高血压病被认为是慢性低度炎症性疾病,可导致如 CRP、IL-6、TNF- α 、MCP-1 等炎

症因子的表达增高^[21]。本文推测 HMGB1 与高血压可能存在相关性,相互影响,从而促进 DN 的发展。

本研究观察到,大量白蛋白尿组中 LDL-C 水平亦最高,LDL-C 是 DN 的危险因素^[22-23]。LDL-C 水平的升高与 HMGB1 表达的显著增加是否存在因果关系,共同促进 DN 的发展,未见相关报道,值得后续进一步研究。

本研究证明,RAGE—NF- κ B 通路的激活可以引起炎症反应及氧化应激的发生,并且随着糖尿病病程的延长,造成糖尿病肾病患者肾脏组织结构和功能的破坏持续加重,而 RAGE 的配体 HMGB1 对于该通路的激活至关重要,因此推断抑制 HMGB1—RAGE—NF- κ B 通路的激活可能成为 DN 的治疗靶点,而这需要更多的研究来进一步证实。

[参考文献]

- [1] Van Buren PN, Toto R. Current update in the management of diabetic nephropathy[J]. *Curr Diabetes Rev*, 2013, 9(1):62-77
- [2] Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids[J]. *Eur J Biochem*, 1973, 38(1): 14-19
- [3] Kim J, Sohn E, Kim CS, et al. The role of high-mobility group box-1 protein in the development of diabetic nephropathy[J]. *Am J Nephrol*, 2011, 33(6):524-529
- [4] Penfold SA, Coughlan MT, Patel SK, et al. Circulating high-molecular-weight RAGE ligands activate pathways implicated in the development of diabetic nephropathy [J]. *Kidney Int*, 2010, 78(3):287-295
- [5] 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
- [6] Zhu P, Xie L, Ding HS, et al. High mobility group box 1 and kidney diseases (Review)[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(4):763-768
- [7] Nogueira-Machado JA, Volpe CM, Veloso CA, et al. HMGB1, TLR and RAGE: a functional tripod that leads to diabetic inflammation[J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2011, 15(8):1023-1035
- [8] Dasu MR, Devaraj S, Park S, et al. Increased toll-like receptor (TLR) activation and TLR ligands in recently diagnosed type 2 diabetic subjects[J]. *Diabetes Care*, 2010, 33(4):861-868
- [9] Hori O, Brett J, Slattery T, et al. The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphotericin. Mediation of neurite outgrowth

- and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270(43): 25752–25761
- [10] Yang H, Wang H, Czura CJ, et al. The cytokine activity of HMGB1[J]. *J Leukoc Biol*, 2005, 78(1): 1–8
- [11] Merenmies J, Pihlaskari R, Laitinen J, et al. 30kDa heparin-binding protein of brain(amphoterin) involved in neurite outgrowth. Amino acid sequence and localization in the filopodia of the advancing plasma membrane [J]. *J Biol Chem*, 1991, 266(25): 16722–16729
- [12] Taguchi A, Blood DC, del Toro G, et al. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases[J]. *Nature*, 2000, 405(6784): 354–360
- [13] Kanasaki K, Taduri G, Koya D. Diabetic nephropathy: the role of inflammation in fibroblast activation and kidney fibrosis[J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2013, 4: 7
- [14] Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, et al. HMGB1: endogenous danger signaling[J]. *Mol Med*, 2008, 14(7-8): 476–484
- [15] Mantell LL, Parrish WR, Ulloa L. Hmgb-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders [J]. *Shock*, 2006, 25(1): 4–11
- [16] Taft JL, Nolan CJ, Yeung SP, et al. Clinical and histological correlations of decline in renal function in diabetic patients with proteinuria[J]. *Diabetes*, 1994, 43(8): 1046–1051
- [17] Doublier S, Lupia E, Catanuto P, et al. Testosterone and 17beta-estradiol have opposite effects on podocyte apoptosis that precedes glomerulosclerosis in female estrogen receptor knockout mice[J]. *Kidney Int*, 2011, 79(4): 404–413
- [18] Liu J, Wang C, Liu F, et al. Metabonomics revealed xanthine oxidase-induced oxidative stress and inflammation in the pathogenesis of diabetic nephropathy[J]. *Anal Bioanal Chem*, 2015, 407(9): 2569–2579
- [19] Zhong Y, Cheng CF, Luo YZ, et al. C-reactive protein stimulates RAGE expression in human coronary artery endothelial cells *in vitro* via ROS generation and ERK/NF-kappaB activation[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2015, 36(4): 440–447
- [20] Ojima A, Ishibashi Y, Matsui T, et al. Glucagon-like peptide-1 receptor agonist inhibits asymmetric dimethylarginine generation in the kidney of streptozotocin-induced diabetic rats by blocking advanced glycation end product-induced protein arginine methyltransferase-1 expression [J]. *Am J Pathol*, 2013, 182(1): 132–141
- [21] Stumpf C, John S, Jukic J, et al. Enhanced levels of platelet P-selectin and circulating cytokines in young patients with mild arterial hypertension[J]. *J Hypertens*, 2005, 23(5): 995–1000
- [22] Atchley DH, Lopes-Virella MF, Zheng D, et al. Oxidized LDL-anti-oxidized LDL immune complexes and diabetic nephropathy[J]. *Diabetologia*, 2002, 45(11): 1562–1571
- [23] Abe M, Maruyama N, Okada K, et al. Effects of lipid-lowering therapy with rosuvastatin on kidney function and oxidative stress in patients with diabetic nephropathy[J]. *J Atheroscler Thromb*, 2011, 18(11): 1018–1028

[收稿日期] 2015-05-26