

重要炎性介质高迁移率族蛋白 1 研究进展

陈婧 袁志强 彭毅志

高迁移率族蛋白 1 (HMGB-1) 于 20 世纪 60 年代由 Johns 发现, 因其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中有很高的迁移率而得名。它是一种在真核细胞中广泛表达并且高度保守的蛋白, 主要作为核内非组蛋白, 稳定核小体, 参与 DNA 的转录、复制、修复等^[1]。近来研究显示, HMGB-1 除在细胞内发挥作用外, 还能由被激活的免疫细胞 (如巨噬细胞、单核细胞) 释放到细胞外, 作为潜在的致炎因子, 介导内毒素血症和脓毒症的发生^[2,3], 因而其胞外功能成为研究热点。

1 HMGB-1 的结构

HMGB-1 的 N 端富含赖氨酸, 含有 2 个约 80 个氨基酸残基组成的 L 型“box”, 即 A box (1~85 位氨基酸) 和 B box (88~162 位氨基酸), 它们都是结合 DNA 的功能结构域。

结构功能分析表明, B box 是 HMGB-1 发挥致炎功能的主要区域。对 B box 的进一步分析显示, 这个结构域的前 20 个氨基酸 (89~108 位氨基酸) 是 HMGB-1 发挥致炎功能的最小结构单位。而 A box 对巨噬细胞的刺激作用很小或者没有。A box 是 HMGB-1 (全长) 的竞争性拮抗剂, 它与 B box 之间的区域包括了血浆酶优先消化的位点, 它们可以潜在释放出 A box 肽段。HMGB-1 的 C 端含有一酸性尾端 (acidic tail), 富含天冬氨酸和谷氨酸。

2 HMGB-1 作为细胞因子介导炎性反应

在对内毒素血症和脓毒症的研究中, 人们认识到 HMGB-1 可释放到细胞外成为致炎细胞因子。当 HMGB-1 出现在胞外时, 作为坏死标志物被免疫系统识别, 成为组织损伤的标志^[4,5]。HMGB-1 通过促进多种促炎细胞因子的合成, 介导致死性内毒素血症^[6]、急性肺损伤和缺血性休克^[7]。HMGB-1 可通过下列途径释放到细胞外: (1) 已被激活的巨噬

细胞和单核细胞的主动分泌^[5,8-10]; (2) 坏死或受损细胞的被动释放^[11-13]。具体释放机制虽然未知, 但能肯定的是细胞外 HMGB-1 是促炎因素, 导致感染和炎症反应^[4,5,14]。值得注意的是, 凋亡细胞不能释放 HMGB-1^[11,15]。在急、慢性炎症反应中, 细胞外和细胞质中都可检出 HMGB-1^[16]。炎症反应中释放至细胞外的 HMGB-1 能导致关节炎、脓毒症, 脓症患者血清中 HMGB-1 浓度较高, 以病死者中最高^[4]。

除了作为致炎细胞因子释放至细胞外介导炎症反应外, HMGB-1 本身也能刺激其他致炎细胞因子的释放。例如, 受 HMGB-1 刺激的巨噬细胞合成肿瘤坏死因子 (TNF) 量增加, TNF mRNA 表达量亦增多。受 HMGB-1 刺激的单核细胞释放 TNF、白细胞介素 1 α (IL-1 α)、IL-1 β 、IL-6、IL-8、单核细胞炎性蛋白 1 α (MIP-1 α)、MIP-1 β 。中性粒细胞受 HMGB-1 刺激后, 其 TNF、IL-1 β 、IL-8 的分泌量增加。有意义的是, HMGB-1 诱导 TNF 的释放是双相的、延迟的, 其诱导 TNF 表达在 3 h 后出现第 1 个峰值, 8~10 h 后出现第 2 个峰值。相对于 HMGB-1 而言, 内毒素/脂多糖 (LPS) 诱导 TNF 的释放是单相的、一过性的, TNF 释放在 2 h 后出现峰值, 而 8 h 后几乎检测不到。另外, 内皮细胞受 HMGB-1 (全长) 或 HMGB-1 B box 刺激后, 其黏附分子如细胞黏附分子 1、血管细胞黏附分子 1 和 E 选择素表达量增加 (这些变化呈剂量依赖性), 并释放 TNF、IL-8 和粒细胞巨噬细胞集落刺激因子, 从而募集中性粒细胞、单核细胞和巨噬细胞至炎症位点。HMGB-1 不仅能诱导不同细胞分泌大量、多种致炎细胞因子, 更重要的是可诱导其自身从巨噬细胞或单核细胞中释放。

3 HMGB-1——一种晚期炎性介质

最近, HMGB-1 被证明是一种全身炎症反应晚期炎性介质。研究显示, 小鼠注射 LPS 后 8~32 h 才出现内毒素血症, 其血清 HMGB-1 浓度升高。盲肠结扎穿孔 (CLP) 导致的脓毒症小鼠模型, 也出现类似的延迟释放, 即使在 TNF- α 浓度峰值出现以后使用抗 HMGB-1 抗体, 也可保护小鼠免于死亡^[4]。

基金项目: 国家自然科学基金 (30400469)

作者单位: 400038 重庆, 第三军医大学西南医院全军烧伤研究所, 创伤、烧伤与复合伤国家重点实验室

通讯作者: 袁志强、彭毅志, Email: cqburn@yahoo.com.cn, 电话:

023-68754149-8031

在炎症反应发生后 24 h 给予乙基丙酮酸盐(其在体内实验中可抑制 HMGB-1 的产生),可以延长脓毒症小鼠的存活时间^[5]。即使在诱导腹膜炎后 24 h 给予 A box 或者抗 HMGB-1 抗体,均可显著降低脓毒症死亡率^[17]。这些进一步证明了 HMGB-1 作为一种晚期炎症因子,在炎症反应发生、发展中发挥着重要作用,提示 HMGB-1 的治疗窗口期比其他早期炎症因子更宽。例如 TNF 在机体受到刺激后几分钟就产生了,其循环浓度在疾病进展的头几个小时即达到基础水平^[14,18,19],因此针对这些炎症因子的临床干预窗口期很窄。而 HMGB-1 在受到刺激大约 20 h 后才由巨噬细胞分泌^[5,9,10]。在内毒素血症和其他全身炎症反应的实验模型中,只有在疾病发生后 20 ~ 70 h 才能检测到血清 HMGB-1 水平升高^[9,20,21]。这些研究表明,针对 HMGB-1 的治疗可扩大临床治疗的窗口期。

4 HMGB-1 拮抗剂

炎症级联反应过程中, HMGB-1 的出现较 TNF、IL-1 迟,因此, HMGB-1 的治疗较其他致炎细胞因子具有更宽的治疗窗口期;且其作为致炎细胞因子,在炎症反应过程中具有重要的中心作用。这些都使寻找 HMGB-1 拮抗剂具有非常重要的临床意义,为抗感染治疗带来新的希望。目前, HMGB-1 拮抗剂已经引起了研究者的广泛关注。

首先报道的研究是,针对 HMGB-1 的兔多克隆抗体用于 LPS 诱导的内毒素血症中,能有效阻止内毒素血症导致的死亡。另一项研究表明, HMGB-1 特异性抗体能减缓 LPS 引起的肺炎。在 CLP 模型的实验研究中,多克隆抗 HMGB-1 抗体可在 CLP 后 24 h 给予,并仍能维持效应^[4],进一步证明针对 HMGB-1 的治疗较其他致炎细胞因子具有更宽的治疗窗口期,而以往所用的抗 TNF、抗 IL-1 抗体的治疗效果远不如此。制备具有中和活性的抗 HMGB-1 单克隆抗体比较困难,但目前已经获得,并用于脓毒症和关节炎动物模型的实验研究。

除了抗 HMGB-1 抗体外,还有 2 种不同的拮抗剂: HMGB-1 A box 和乙基丙酮酸盐^[22]。HMGB-1 A box 针对 HMGB-1 诱导的细胞因子的产生具有拮抗作用,其治疗作用已经在 CLP 模型和关节炎模型中得到评估。在这 2 种模型中,每日给予 A box 的治疗效果与给予抗 HMGB-1 多克隆抗体的治疗效果一致,提示 A box 蛋白具有潜在的治疗作用。但 A box 是小蛋白或短肽,其半寿期短,需重复给药,

因此需要对 A box 进行修饰,以增加其可获得性。

乙基丙酮酸盐是一种稳定的丙酮酸酯类衍生物,被证明在体外能抑制受 LPS 刺激的单核巨噬细胞释放 TNF、HMGB-1,其抑制 HMGB-1 释放的机制目前尚不清楚。在 CLP 模型中观察到,乙基丙酮酸盐能降低小鼠死亡率,即使在腹膜炎发生后 24 h 给予,仍能有效发挥作用^[4]。利用乙基丙酮酸盐治疗能明显降低动物体内的 HMGB-1 水平,可见它是具有重要临床意义的化合物,已被美国食品和药物管理局批准为安全药物。

5 小结

HMGB-1 作为一种核蛋白,其核内功能已经被深入研究了很长时间,但其核外功能是在最近几年才发现并受重视的。HMGB-1 分泌至胞外后,可作为重要的致炎细胞因子成为引起和维持炎症级联反应的中心分子。这一功能的发现为抗感染治疗提供了新的方法。相对于早期的针对 TNF、IL-1 阻断剂的抗感染治疗, HMGB-1 具有更宽的治疗窗口期,其拮抗剂也正被广泛研究。但目前对于 HMGB-1 的胞外调节功能认识还很表浅,仍有许多问题悬而未决,需要进行更深入的研究。

参考文献

- [1] Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids. *Eur J Biochem*, 1973, 38(1):14-19.
- [2] Czura CJ, Wang H, Tracey KJ. Dual roles for HMGB1 DNA binding and cytokine. *J Endotoxin Res*, 2001, 7(4):315-321.
- [3] Yang H, Wang H, Tracey KJ. HMGB-1 rediscovered as a cytokine. *Shock*, 2001, 15(4):247-253.
- [4] Ulloa L, Batliwalla FM, Andersson U, et al. High mobility group box chromosomal protein 1 as a nuclear protein, cytokine, and potential therapeutic target in arthritis. *Arthritis Rheum*, 2003, 48(4):876-881.
- [5] Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB-1): nuclear weapon in the immune arsenal. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5(4):331-342.
- [6] Wang H, Yang H, Czura CJ, et al. HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation. *Am J Respir Crit Care Med*, 2001, 164(10 Pt 1):1768-1773.
- [7] Kokkola R, Sundberg E, Ulfgren AK, et al. High mobility group box chromosomal protein 1; a novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(10):2598-2603.
- [8] Gardella S, Andrei C, Ferrera D, et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep*, 2002, 3(10):995-1001.
- [9] Wang H, Liao H, Ochani M, et al. Cholinergic agonists inhibit HMGB1 release and improve survival in experimental sepsis. *Nat Med*, 2004, 10(11):1216-1221.
- [10] Ulloa L, Fink MP, Tracey KJ. Ethyl pyruvate protects against lethal systemic inflammation by preventing HMGB1 release. *Ann*

N Y Acad Sci, 2003,987(19):319-321.

[11] Scaffidi P, Misteli T, Bianchi ME. Release of chromatin protein HMGB1 by necrotic cells triggers inflammation. *Nature*, 2002, 418(6894):191-195.

[12] Rovere-Querini P, Capobianco A, Scaffidi P, et al. HMGB1 is an endogenous immune adjuvant released by necrotic cells. *EMBO Rep*, 2004, 5(8):825-830.

[13] Watanabe T, Kubota S, Nagaya M, et al. The role of HMGB1 on the development of necrosis during hepatic ischemia and hepatic ischemia/reperfusion injury in mice. *J Surg Res*, 2005, 124(1):59-66.

[14] Ulloa L, Tracey KJ. The “cytokine profile”: a code for sepsis. *Trends Mol Med*, 2005, 11(2):56-63.

[15] Muller S, Scaffidi P, Degryse B, et al. New EMBO members’ review: the double life of HMGB1 chromatin protein; architectural factor and extracellular signal. *EMBO J*, 2001, 20(16):4337-4340.

[16] Czura CJ, Tracey KJ. Targeting high mobility group box 1 as a late acting mediator of inflammation. *Crit Care Med*, 2003, 31(1):46-50.

[17] 姚咏明, 张立天, 陆家齐, 等. 脓毒症大鼠内毒素增敏系统改

变与高迁移率蛋白-1 表达的关系. *中华创伤杂志*, 2002, 18(9):540-543.

[18] Kim JY, Park JS, Strassheim D, et al. HMGB-1 contributes to the development of acute lung injury after hemorrhage. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2005, 288(5):958-965.

[19] Wang H, Yang H, Tracey KJ. Extracellular role of HMGB-1 in inflammation and sepsis. *J Intern Med*, 2004, 255(3):320-331.

[20] Li J, Wang H, Mason JM, et al. Recombinant HMGB-1 with cytokine-stimulating activity. *J Immunol Methods*, 2004, 289(1/2):221-223.

[21] 李红云, 姚咏明, 董宁, 等. 烫伤后金黄色葡萄球菌血症大鼠高迁移率蛋白-1 表达及其信号调节机制. *解放军医学杂志*, 2002, 27(9):760-762.

[22] Ulloa L, Ochani M, Yang H, et al. Ethyl pyruvate prevents lethality in mice with established lethal sepsis and systemic inflammation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(19):12351-12356.

(收稿日期:2006-06-02)

(本文编辑:罗勤)

严重创伤与胰岛素抗炎治疗研究进展

王耘川 胡大海

严重创伤后,失血、感染及应激等因素引发的失控性炎症反应,是进一步加重机体损伤甚至导致死亡的重要原因。近年来的研究表明,胰岛素作为一种激素,除了调节机体代谢之外,尚能减轻多种原因引起的炎症反应^[1,2]。本文就严重创伤与胰岛素抗炎治疗的相关研究进展作一综述。

1 胰岛素对炎症细胞因子的作用

严重创伤后早期相关细胞因子总体上可分为2类:一类为促炎性细胞因子,以白细胞介素 1β (IL-1β)、肿瘤坏死因子 α (TNF-α) 等为代表;另一类为抗炎性细胞因子,如 IL-2、IL-4、IL-10 等,其中 IL-10 被认为是创伤后炎症细胞因子释放的调速器,发挥着强有力的抗炎作用。创伤后早期,IL-1β、TNF-α 等大量释放,TNF-α 又进一步引起其他细胞因子(IL-6、IL-8 等)及内源性化学介质的生成和释放,使炎症反应不断发展;至反应后期,抗炎性细胞因子释放逐渐增多,使该反应得到抑制。研究表明,严重创伤后早期促炎性细胞因子大量释放,其与抗炎性细胞因子之间的平衡遭到破坏,引发级联放大

效应,导致失控性炎症反应,从而对全身重要脏器造成进一步损害。

为探讨胰岛素调节炎症反应的潜在机制,Krogh-Madsen 等^[2]在志愿者身上通过将血浆葡萄糖和胰岛素控制在一定浓度,观察内毒素对循环中的炎症细胞因子、非酯化脂肪酸、白细胞的影响。结果表明,血清胰岛素水平的增加可引起后期抗炎性细胞因子浓度持久升高,同时非酯化脂肪酸水平降低。Jeschke 等^[3]在脓毒症大鼠模型上进行胰岛素干预治疗,观察到胰岛素组和对照组的血糖、电解质无明显差异;前组肝脏和血清中 IL-1β、TNF-α 蛋白和 mRNA 水平明显低于后组,而 IL-2、IL-4、IL-10 则明显高于后组。他们认为,胰岛素对炎症反应的调节,并非完全依赖其对体内代谢的影响来实现,有可能是通过某种直接途径,甚至作为一种信号分子直接介导抗炎。此外,他们对大鼠肝脏进行的研究表明,应用胰岛素后,由肝脏合成的白蛋白增多,而急性期反应蛋白明显减少,血清中天冬氨酸转氨酶、丙氨酸转氨酶水平降低,肝细胞凋亡蛋白酶也明显降低,证实胰岛素调控炎症反应对脏器具有保护作用^[4]。由此认为,胰岛素通过调节促炎/抗炎性细胞因子水平来控制炎症反应,达到稳定内环境、保护机体重要脏器的目的。

作者单位:710032 西安,第四军医大学西京医院全军烧伤中心
通讯作者:胡大海, Email: burns @ fmmu. edu. cn; 电话:029-84775298