

• 论著 •

# 辛伐他汀干预对大鼠动脉粥样硬化斑块内高迁移率族蛋白 B1 表达的影响

殷亚昕 姚咏明 刘润梅 翟红霞 李良 张津津 陈海威 王磊 李娜 夏云峰

**【摘要】** 目的 观察辛伐他汀对动脉粥样硬化(AS)大鼠高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)表达及斑块形态学的影响,以期揭示其抗 AS 的作用机制。方法 60 只 Wistar 大鼠按随机数字表法均分为对照组、AS 模型组、辛伐他汀干预组。给予高脂饮食同时灌胃维生素 D3 建立 AS 模型;干预组于第 8 周开始给予辛伐他汀  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  灌胃;各组分别于 10 周、12 周用免疫组化法检测主动脉粥样硬化斑块内 HMGB1 蛋白表达,实时逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)检测 HMGB1 mRNA 表达,并观察主动脉斑块形态学变化。结果 模型组主动脉斑块内 HMGB1 蛋白表达呈强阳性,辛伐他汀干预组 HMGB1 表达较模型组明显减少,12 周时更为显著。与对照组比较,模型组 10 周、12 周时 HMGB1 mRNA 表达均明显升高(10 周:  $19.695 \pm 1.418$  比  $2.981 \pm 0.753$ , 12 周:  $20.542 \pm 1.132$  比  $3.219 \pm 0.332$ , 均  $P < 0.01$ );辛伐他汀干预组 10 周、12 周 HMGB1 mRNA 表达( $15.798 \pm 0.891$ ,  $12.641 \pm 0.734$ )明显低于模型组相应时间点,且 12 周时表达低于 10 周时( $P < 0.05$  或  $P < 0.01$ )。模型组主动脉内有明显钙化斑块,呈环状,斑块遍及整条动脉;辛伐他汀干预后可明显抑制斑块形成,12 周斑块面积较 10 周时进一步减小。结论 辛伐他汀能减轻 AS 大鼠主动脉粥样斑块形成,降低斑块组织中 HMGB1 的蛋白及 mRNA 表达,通过减轻炎症反应起到血管保护作用。

**【关键词】** 高迁移率族蛋白 B1; 动脉粥样硬化; 斑块; 辛伐他汀

**The effect of simvastatin on the expression of high mobility group box-1 protein in atherosclerotic rats** YIN Ya-xin, YAO Yong-ming, LIU Run-mei, ZHAI Hong-xia, LI Liang, ZHANG Jin-jin, CHEN Hai-wei, WANG Lei, LI Na, XIA Yun-feng. First Affiliated Hospital of General Hospital of PLA, Beijing 100048, China

Corresponding author: XIA Yun-feng, Email: xiayf3691@sina.com

**【Abstract】 Objective** To observe the effect of simvastatin on the expression of high mobility group box-1 protein (HMGB1) and morphology of atherosclerotic plaques in atherosclerotic rats, to ascertain whether HMGB1 plays a role in the preventive mechanism of simvastatin from atherosclerosis (AS). **Methods** Sixty Wistar rats were divided randomly into three groups: control group, model group and simvastatin treatment group. Gastric gavage of vitamin D3 with high fat food was used to reproduce atherosclerotic rat model. The rats in the treatment group were treated with simvastatin of  $2.5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  (gatric perfusion) 8 weeks after fat diet. The expression of the histopathology and protein of HMGB1 in atherosclerotic plaques of the aorta was observed by immunohistochemistry at 10 weeks and 12 weeks. The gene expression of HMGB1 at atherosclerotic plaques of aorta was observed with real time-polymerase chain reaction (RT-PCR). The morphology of the atherosclerotic plaques was observed. **Results** The expression of HMGB1 increased significantly in atherosclerotic plaques in model group, and simvastatin could evidently inhibit the expression of HMGB1, and it was more obvious in 12-week group. Compared with control group, the HMGB1 mRNA expression was upregulated in all atherosclerotic model groups (10 weeks:  $19.695 \pm 1.418$  vs.  $2.981 \pm 0.753$ , 12 weeks:  $20.542 \pm 1.132$  vs.  $3.219 \pm 0.332$ , both  $P < 0.01$ ). In the simvastatin treatment group, the gene expression of HMGB1 was lower than the age-match model group at 10 weeks ( $15.798 \pm 0.891$ ) and 12 weeks ( $12.641 \pm 0.734$ ), and in the 12-week treatment group it was lower than that in the 10-week treatment group ( $P < 0.05$  or  $P < 0.01$ ). In the model group, the ring-shape calcified atherosclerotic plaques were extensively found in the wall of the aorta. Simvastatin could obviously inhibit the formation of the atherosclerotic plaques, and the effect was more obvious in the 12-week treatment group than that of the 10-week treatment group. **Conclusion** Simvastatin can alleviate the formation of the atherosclerotic plaques in the atherosclerotic rats, decrease the protein and mRNA expression of HMGB1. The results suggest that the vessels are protected from forming AS through alleviating inflammatory reaction.

**【Key words】** High mobility group box-1 protein; Atherosclerosis; Plaque; Simvastatin

DOI:10.3760/cma.j.issn.1003-0603.2010.05.016

基金项目:国家自然科学基金项目(30672178)

作者单位:100048 北京,解放军总医院第一附属医院干一科

通信作者:夏云峰,Email:xiayf3691@sina.com

炎症被认为是动脉粥样硬化(AS)的核心发病机制。高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)是一种炎症因子,研究表明,其在 AS 的不同阶段中均有表达及分

布<sup>[1]</sup>。他汀类降脂药物不仅有降脂、调脂作用,还有调节炎症、稳定斑块的作用。本实验中主要观察 AS 斑块内 HMGB1 基因表达变化,以期揭示 AS 与炎症的关系,并观察应用辛伐他汀进行干预是否能通过改善 HMGB1 的表达来抑制 AS 的进展,从而达到保护血管的目的。

## 1 材料与方法

### 1.1 动物分组与模型制备:

6 周龄雄性 Wistar 大鼠 60 只,体重 130~150 g,由军事医学科学院实验动物中心提供。按随机数字表法分为 3 组,对照组给予标准饲养;AS 模型组给予高脂饮食(蛋黄、花生、普通饲料喷油),同时给予维生素 D<sub>3</sub> 400 kU/kg 灌胃,每周 1 次,连续 3 周;辛伐他汀干预组于制模后第 8 周开始给予辛伐他汀(美国礼来公司) 2.5 mg·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>灌胃,同时继续给予高脂饮食。

### 1.2 检测指标及方法

#### 1.2.1 动脉标本采集:

各组分别于喂养 10 周、12 周时用水合氯醛麻醉大鼠,腹主动脉采血,分离血清,-80℃冰箱储存备用。取主动脉临心脏根部至腹主动脉分叉处血管,一部分行常规苏木素-伊红(HE)染色及 HMGB1 免疫组化染色,其余部分用于 RT-PCR 检测 HMGB1 mRNA 表达。

#### 1.2.2 血管组织病理观察:

用中性甲醛水溶液固定血管,HE 染色,光镜下观察血管内膜 AS 情况。

#### 1.2.3 血脂检测:

用 7170 型自动生化分析仪检测大鼠血清三酰甘油、总胆固醇水平。

#### 1.2.4 HMGB1 mRNA 表达测定:

提取主动脉组织总 RNA,取紫外分光光度计 260/280 nm 处的吸光度(A)值为 1.8~2.1 的样品进行逆转录及实时荧光定量 PCR 扩增,以 β-肌动蛋白(β-actin)为内参对照,每个指标均设正常对照组。大鼠 HMGB1、β-actin 引物由北京奥科生物技术有限公司合成。按逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)试剂盒(美国 Promega 公司)步骤进行操作。

#### 1.2.5 HMGB1 蛋白表达测定:

采用免疫组化法,石蜡切片常规脱蜡至水化,抑制内源性过氧化物酶,用枸橼酸钠缓冲液进行抗原修复;加正常山羊封闭

血清,加 1:300 稀释兔抗鼠 HMGB1 多克隆抗体进行抗原抗体中和反应,加生物素化山羊抗兔 IgG 二抗,加辣根过氧化物酶标记链酶卵白素(SP);用 3,3'-二氨基联苯胺(DBA)显色,切片内出现不同深浅棕黄色的点、团簇为阳性表达。

### 1.3 统计学处理:

采用 SPSS 11.0 统计软件,计量资料以均数±标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用 *t* 检验,*P*<0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 各组血脂比较(表 1):

模型组 10 周、12 周时胆固醇水平明显高于对照组(均 *P*<0.01);辛伐他汀干预组胆固醇水平较模型组显著降低,且 12 周时显著低于 10 周时(均 *P*<0.01)。各组间三酰甘油水平无明显差异。

### 2.2 各组 AS 程度比较(彩色插图 1):

HE 染色显示,对照组主动脉各层结构完整,未见明显的钙化及脂肪沉积。模型组主动脉管壁明显增厚,平滑肌细胞增生且排列不规则,内皮及内皮下层有明显水肿、变性,弹性纤维层结构不清,局部管壁向管腔内突出,形成纤维增生性动脉硬化斑块,管壁钙化程度明显加重,病变范围可包绕整个动脉管壁。干预组 10 周时粥样病变明显减轻,主要位于主动脉弓及胸、腹主动脉的环状乳白色斑块较模型组减少,动脉内膜隆起程度减轻,且动脉较模型组柔软、有弹性;12 周时斑块覆盖面积进一步减少,大部分未成环状,仅表现为内膜粗糙或呈粟粒状表现。

### 2.3 各组主动脉 HMGB1 mRNA 表达(表 1):

模型组主动脉 HMGB1 mRNA 表达较对照组明显升高(均 *P*<0.01),12 周时较 10 周时无明显变化。干预组 HMGB1 mRNA 表达较模型组下降,且 12 周时较 10 周时进一步下降(*P*<0.05 或 *P*<0.01)。

### 2.4 各组主动脉 HMGB1 蛋白表达(彩色插图 2):

对照组主动脉内 HMGB1 表达分布较均匀,主要位于部分血管内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞的核内,细胞内表达较少,12 周时与 10 周时比较无差异。HMGB1 蛋白在 AS 斑块内表达不均匀,炎性细胞浸润区和坏死区周边基质内表达明显增高,在

表 1 各组大鼠血脂指标及主动脉 HMGB1 mRNA 比较( $\bar{x}\pm s$ )

组别	动物数	胆固醇		三酰甘油		HMGB1 mRNA	
		10 周	12 周	10 周	12 周	10 周	12 周
对照组	10	1.20±0.09	1.19±0.08	1.13±0.06	1.12±0.05	2.981±0.753	3.219±0.332
模型组	10	4.25±0.15 <sup>a</sup>	4.26±0.13 <sup>a</sup>	1.10±0.05	1.09±0.07	19.695±1.418 <sup>a</sup>	20.542±1.132 <sup>a</sup>
干预组	10	3.64±0.31 <sup>ac</sup>	2.55±0.31 <sup>acd</sup>	1.06±0.05	1.10±0.05	15.798±0.891 <sup>ac</sup>	12.641±0.734 <sup>abd</sup>

注:HMGB1:高迁移率族蛋白 B1;与对照组比较,<sup>a</sup>*P*<0.01;与模型组比较,<sup>b</sup>*P*<0.05,<sup>c</sup>*P*<0.01;与本组 10 周比较,<sup>d</sup>*P*<0.01

各种炎性细胞、平滑肌细胞及泡沫细胞的细胞核、胞质内表达,在坏死区边缘呈条带状分布,而钙化区 HMGB1 表达较少。模型组 HMGB1 在血管壁内表达较对照组明显增高,但 12 周时与 10 周时无明显差异。干预组 HMGB1 表达较模型组逐渐减弱,阳性细胞逐渐减少,颜色逐渐变淡,但仍较对照组明显增强,12 周时与 10 周时比较有一定差异。

### 3 讨论

高脂血症是 AS 及冠心病的主要危险因素之一<sup>[2-3]</sup>。大规模的临床研究表明,应用他汀类降脂药物进行一级预防或二级预防可有效减少高脂血症患者心血管事件的发生率<sup>[4-6]</sup>。研究表明,他汀类降脂药物可有效降低血清胆固醇水平,同时抑制肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)、细胞间黏附分子-1 等炎症因子的表达,从而抑制单核细胞和 T 淋巴细胞的黏附、聚集及平滑肌细胞的聚集、增生,改善冠状动脉内皮功能并抑制斑块形成<sup>[7-9]</sup>。近年来研究发现,在多种非特异性炎症的病理过程中,组织细胞坏死、损伤均可使 HMGB1 释放至细胞外,导致炎症因子释放增多,促进 AS 形成<sup>[10-12]</sup>。目前已证实,AS 是血管壁对损伤表现出的一种炎症反应;HMGB1 可促进单核/巨噬细胞释放 TNF- $\alpha$ 、IL-6、细胞间黏附分子-1,从而影响 AS 病变内的炎性细胞、平滑肌细胞功能,促进局部炎症反应<sup>[13]</sup>;胆固醇沉积后,激活平滑肌细胞大量分泌 HMGB1,同时 HMGB1 可反作用于平滑肌细胞,促进其移行、增殖并分泌更多的 HMGB1,形成一种正反馈作用,促进 AS 斑块的形成<sup>[14]</sup>。临床观察发现,急性冠脉综合征患者中血清 HMGB1 升高者较 HMGB1 正常者 1 个月内再次心血管事件的发生率明显升高<sup>[15]</sup>。

研究表明,他汀类降脂药物可通过降低血清胆固醇水平,逆转高脂血症内皮细胞功能紊乱,使 AS 斑块面积减少 78%,同时还可减少巨噬细胞源性泡沫细胞大小和脂纹面积 21%<sup>[16]</sup>。本结果提示:辛伐他汀在降低血清胆固醇的同时可以减轻胆固醇在损伤动脉内膜下的沉积,进而减少炎症因子的释放,减轻 AS 程度。免疫组化结果提示,干预组 HMGB1 表达较模型组逐渐减弱,可能是辛伐他汀干预后,抑制了内皮细胞及平滑肌细胞以及单核/巨噬细胞释放 HMGB1,进一步减少其他炎症因子的释放,减轻了动脉的炎症反应,抑制了 AS 的炎症过程。

### 参考文献

[1] Kalinina N, Agrotis A, Antropova Y, et al. Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB-1 in human

atherosclerotic lesions; role of activated macrophages and cytokines. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24: 2320-2325.

[2] Stamler J, Wentworth D, Neaton JD. Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356 222 primary screenees of the Multiple Risk Factor Intervention Trial (MRFIT). *JAMA*, 1986, 256: 2823-2828.

[3] 刘健, 丛洪良. 高三酰甘油血症与冠状动脉粥样硬化病变严重程度关系的临床研究. *中国中西医结合急救杂志*, 2008, 11: 357-360.

[4] Shepherd J, Cobbe SM, Ford I, et al. Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia. *N Engl J Med*, 1995, 333: 1301-1307.

[5] Scandinavian Simvastatin Survival Study Group. Randomised trial of cholesterol lowering in 4 444 patients with coronary heart disease; the scandinavian simvastatin survival study (4S). *Lancet*, 1994, 344: 1383-1389.

[6] The Long-Term Intervention with Pravastatin in Ischemic Disease (LIPID) Study Group. Prevention of cardiovascular events and death with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels. *N Engl J Med*, 1998, 339: 1349-1357.

[7] Egashira K, Hirooka Y, Kai H, et al. Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia. *Circulation*, 1994, 89: 2519-2524.

[8] 韦叶生, 蓝艳, 刘运广, 等. 白细胞介素-6 基因多态性与冠心病的相关性研究及其对血脂的影响. *中国危重病急救医学*, 2006, 18: 233-236.

[9] 许竹梅, 赵水平, 聂赛, 等. 阿托伐他汀增加单核细胞过氧化物酶增殖体激活受体 V 表达改善炎症反应. *中华心血管病杂志*, 2004, 32: 329-332.

[10] Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 as a mediator of necrosis-induced inflammation and a therapeutic target in arthritis. *Rheum Dis Clin North Am*, 2004, 30: 627-637.

[11] Erlandsson Harris H, Andersson U. Mini-review; the nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur J Immunol*, 2004, 34: 1503-1512.

[12] Chen G, Ward MF, Sama AE, et al. Extracellular HMGB1 as a proinflammatory cytokine. *J Interferon Cytokine Res*, 2004, 24: 329-333.

[13] Inoue K, Kawahara K, Biswas KK, et al. HMGB1 expression by activated vascular smooth muscle cells in advanced human atherosclerosis plaques. *Cardiovasc Pathol*, 2007, 16: 136-143.

[14] Porto A, Palumbo R, Pieroni M, et al. Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to high mobility group box 1 protein. *FASEB J*, 2006, 20: 2565-2566.

[15] Yamada S, Yakabe K, Ishii J, et al. New high mobility group box 1 assay system. *Clin Chim Acta*, 2006, 372: 173-178.

[16] Dupuis J, Tardif JC, Cernacek P, et al. Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes; the RECIFE (reduction of cholesterol in ischemia and function of the endothelium) trial. *Circulation*, 1999, 99: 3227-3233.

(收稿日期: 2009-11-28)

(本文编辑: 李银平)

# 慢性阻塞性肺疾病急性加重期痰热证与痰湿证模型生物学指标的比较研究

(正文见 267 页)

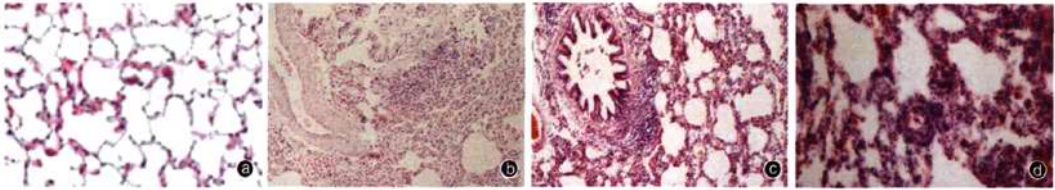


图1 光镜下观察各组大鼠肺组织病理改变 正常组(a)大鼠气管、支气管上皮完整, 上皮细胞无变性, 气管黏膜下层基本无炎性细胞浸润, 肺泡腔内无渗出物, 肺泡隔无增厚, 肺小动脉管壁无增厚; AECOPD组(b)可见气管周围中性粒细胞浸润增多, 气管上皮杯状细胞增生, 肺泡管、肺泡囊明显扩大, 肺泡壁变薄破裂形成肺大泡; AECOPD痰热证组(c)各级支气管有轻度炎症, 肺间质内有少量炎性细胞浸润, 肺泡间隔增厚, 血管扩张; AECOPD痰湿证组(d)大鼠气管上皮细胞不完整, 杯状细胞增多, 黏膜层、黏膜下层大量炎性细胞浸润, 支气管平滑肌增厚, 管腔及纤毛导管内充满大量中性粒细胞、肺泡巨噬细胞及黏液, 肺泡扩张 HE  $\times 100$

# 辛伐他汀干预对大鼠动脉粥样硬化斑块内高迁移率族蛋白B1表达的影响

(正文见 306 页)

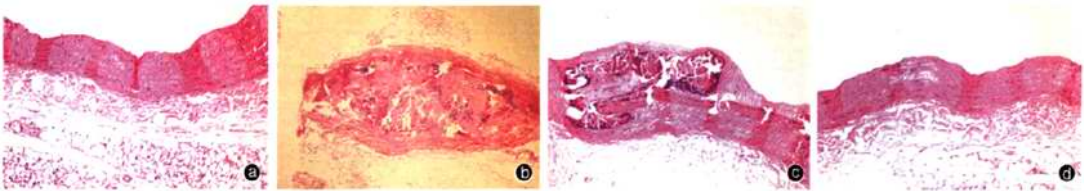


图1 光镜下观察各组大鼠动脉粥样硬化程度 对照组(a)动脉各层结构完整, 未见钙化及脂肪沉积; 模型组(b)管壁增厚, 平滑肌细胞增生, 弹性纤维层结构不清, 形成动脉硬化斑块, 管壁钙化程度明显加重, 病变范围包绕整个动脉管壁; 辛伐他汀干预组10周时(c)动脉内膜隆起程度减轻, 可见钙质及脂质沉积, 平滑肌细胞排列尚整齐; 辛伐他汀干预组12周时(d)斑块覆盖面积进一步减少, 仅表现为内膜粗糙或呈粟粒状表现, 平滑肌细胞排列稍显紊乱, 可见少量脂质沉积, 未见钙化形成 HE  $\times 200$

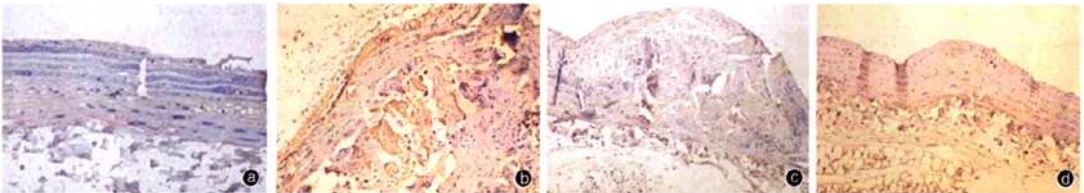


图2 光镜下观察各组大鼠动脉高迁移率族蛋白B1(HMGB1)表达 对照组(a)HMGB1表达分布较均匀, 位于内皮细胞、平滑肌细胞和成纤维细胞的核内, 胞内表达较少; 模型组(b)表达不均匀, 炎性细胞浸润区和坏死区周边基质内表达明显增高, 在细胞核、胞质内表达, 在坏死区边缘呈条带状分布, 而钙化区HMGB1表达较少; 辛伐他汀干预10周、12周时(c、d)HMGB1表达减弱, 表达阳性的细胞逐渐减少、颜色逐渐变淡 免疫组化  $\times 200$

# 高渗盐溶液经骨髓腔通路复苏失血性休克犬的骨髓细胞学及病理学改变

(正文见 309 页)

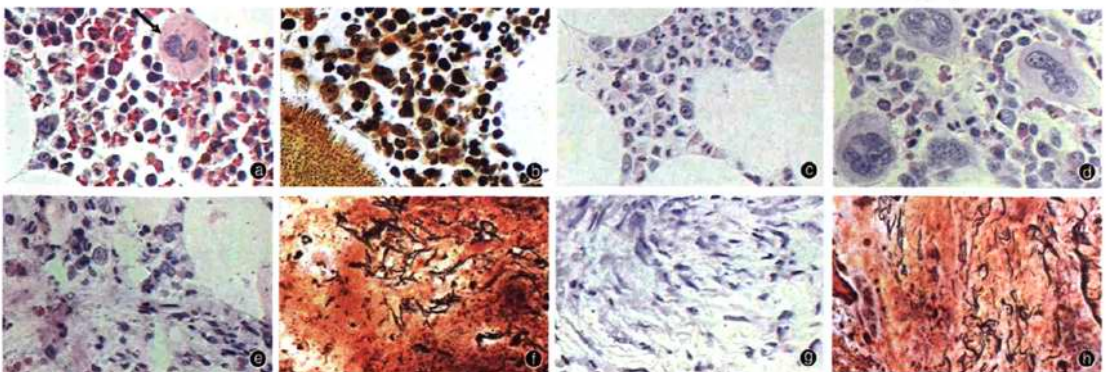


图1 光镜下观察各组犬休克复苏后骨髓活检病理改变 假手术组各造血系细胞增生活跃, 箭头所示为巨核细胞[a, 酸性品红(HGF)  $\times 400$ ]; 网状纤维反应(-)[b, 格瑞瑞(Gomori)  $\times 400$ ]; 生理盐水组复苏后1周中性粒细胞浸润, 以分叶核多见(c, HGF  $\times 400$ ); 高渗盐溶液组(7.5%氯化钠-6%羟乙基淀粉40溶液, HSH)组复苏后1周可见多个巨核细胞(d, HGF  $\times 400$ ); 生理盐水组复苏后4周可见轻度纤维化(e, HGF  $\times 400$ ); 网状纤维阳性反应(++)(f, Gomori  $\times 400$ ); HSH组复苏后4周成纤维细胞增多, 出现纤维化(g, HGF  $\times 400$ ); 网状纤维阳性反应(+++), 可见弥漫性以粗纤维为主的网络形成(h, Gomori  $\times 400$ )



## B1表达的影响

作者: [殷亚昕](#), [姚咏明](#), [刘润梅](#), [翟红霞](#), [李良](#), [张津津](#), [陈海威](#), [王磊](#), [李娜](#), [夏云峰](#), [YIN Ya-xin](#), [YAO Yong-ming](#), [LIU Run-mei](#), [ZHAI Hong-xia](#), [LI Liang](#), [ZHANG Jin-jin](#), [CHEN Hai-wei](#), [WANG Lei](#), [LI Na](#), [XIA Yun-feng](#)

作者单位: [解放军总医院第一附属医院干一科, 北京, 100048](#)

刊名: [中国危重病急救医学](#) **ISTIC** **PKU**

英文刊名: [CHINESE CRITICAL CARE MEDICINE](#)

年, 卷(期): 2010, 22(5)

被引用次数: 2次

### 参考文献(16条)

1. [许竹梅;赵水平;聂赛](#) [阿托伐他汀增加单核细胞过氧化物酶增殖体激活受体V表达改善炎症反应](#) 2004
2. [Shepherd J;Cobbe SM;Ford I](#) [Prevention of coronary heart disease with pravastatin in men with hypercholesterolemia](#) 1995
3. [刘健;丛洪良](#) [高三酰甘油血症与冠状动脉粥样硬化病变严重程度关系的临床研究\[期刊论文\]-中国中西医结合急救杂志](#) 2008(6)
4. [Stamler J;Wentworth D;Neaton JD](#) [Is relationship between serum cholesterol and risk of premature death from coronary heart disease continuous and graded? Findings in 356 222 primary screenings of the Multiple Risk Factor Intervention Trial \(MRFIT\)](#) 1986
5. [韦叶生;蓝艳;刘运广](#) [白细胞介素-6基因多态性与冠心病的相关性研究及其对血脂的影响\[期刊论文\]-中国危重病急救医学](#) 2006(4)
6. [Dupuis J;Tardif JC;Cernacek P](#) [Cholesterol reduction rapidly improves endothelial function after acute coronary syndromes:the RECIFE \(reduction of cholesterol in ischemia and function of the endothelium\) trial](#) 1999
7. [Yamada S;Yakabe K;Ishii J](#) [New high mobility group box 1 assay system](#) 2006
8. [Egashira K;Hirooka Y;Kai H](#) [Reduction in serum cholesterol with pravastatin improves endothelium-dependent coronary vasomotion in patients with hypercholesterolemia](#) 1994
9. [The Long-Term Intervention with Pravastatin in IschemicDisease \(LIPID\) Study Group](#) [Prevention of cardiovascular events and death with coronary heart disease and a broad range of initial cholesterol levels](#) 1998(19)
10. [Scandinavian Simvastatin Survival Study Group](#) [Randomised trial of cholesterol lowering in 4 444 patients with coronary heart disease:the scandinavian simvastatin survival study\(4S\)](#) 1994
11. [Kalinina N;Agrotis A;Antropova Y](#) [Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB-1 in human atherosclerotic lesions:role of activated macrophages and cytokines](#) 2004
12. [Andersson U;Tracey KJ](#) [HMGB1 as a mediator of necrosisinduced inflammation and a therapeutic target in arthritis](#) 2004
13. [Porto A;Palumbo R;Pieroni M](#) [Smooth muscle cells in human atherosclerotic plaques secrete and proliferate in response to high mobility group box 1 protein](#) 2006
14. [Inoue K;Kawahara K;Biswas KK](#) [HMGB1 expression by activated vascular smooth muscle cells in advanced human atherosclerosis plaques](#) 2007

15. [Chen G;Ward MF;Sama AE Extracellular HMGB1 as a proinflammatory cytokine 2004](#)

16. [Erlandsson Harris H;Andersson U Mini-review:the nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator 2004](#)

## 相似文献(9条)

1. 期刊论文 [宫玉玲.邢启崇 高迁移率族蛋白B1与动脉粥样硬化 -中国动脉硬化杂志2008, 16\(9\)](#)

高迁移率族蛋白B1这一传统的非组DNA结合蛋白,与染色体的稳定性有关,并参与了细胞的转录等.近年研究发现,胞外高迁移率族蛋白B1具有致炎细胞因子作用.胞内高迁移率族蛋白B1可通过活化细胞的主动分泌和坏死细胞的被动释放进入胞外,与细胞表面晚期糖基化终产物受体等配体结合后引发信号转导,诱导其他炎症介质的产生,扩大炎症反应.在动脉粥样硬化过程中,从炎症始发到斑块破裂及血栓形成的各个时期,高迁移率族蛋白B1均发挥重要的作用.

2. 期刊论文 [丁华胜.杨俊.DING Huasheng.YANG Jun 高迁移率族蛋白B1在心血管系统疾病中的作用 -临床心血管病杂志2010, 26\(4\)](#)

高迁移率族蛋白(HMG)于1973年首次在牛胸腺中被提取和鉴定,因其分子量小在聚丙烯酰胺凝胶电泳中迁移率快而得名,是一类广泛分布于高等真核生物细胞核内的非组DNA结合蛋白.大量文献报道,其家族成员之一的HMGB1在炎症性疾病的发病机制中发挥重要作用.本文对近来HMGB1在心血管系统疾病研究作一综述.

3. 学位论文 [邢效如 人高迁移率族蛋白B1及其多克隆抗体的制备与鉴定 2005](#)

研究背景和目的:高迁移率族蛋白B1(highmobilitygroupbox-1, HMGB1)曾称为HMG1,是30多年前发现非组蛋白核蛋白,因其在凝胶电泳中泳动速度快而得名[1].在细胞核内, HMGB1作为核功能调节性辅助因子,参与基因转录、DNA复制、修复及V-(D)-J重排等重大生命活动调控过程[2].在细胞膜表面, HMGB1作为生长因子,与晚期糖基化终产物受体(receptorforadvancedglycationend-products, RAGE)结合介导神经轴突生长,与机体中神经系统的发育、成熟有关[3].在胞外, HMGB1作为细胞因子,具有多种生物学与病理学作用:介导单核/巨噬细胞[4]、中性粒细胞[5]、内皮细胞[6]释放多种炎症因子如TNF、IL-1 $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 等,与多种急性慢性炎症的发生发展有关;作为平滑肌细胞的趋化剂, HMGB1可促使平滑肌细胞向内膜转移,在动脉粥样硬化和动脉损伤后再狭窄的病理过程中发挥作用[7]; HMGB1可抑制肿瘤细胞凋亡[8]、促进纤维蛋白酶原活化而有利于肿瘤增殖及转移入侵时基质溶解[9];通过增加CD40、CD54、CD58、CD80和CD83的表达而使树突状细胞表型成熟,具有免疫增强效应[10,11]; HMGB1可诱导成年和胚胎血管相关干细胞迁移与增殖,参与组织再生[12].目前,我们对HMGB1的了解仍很肤浅,许多问题亟待解决,如HMGB1生物学合成的调节与释放的确切机制是什么?细胞膜表面HMGB1不诱导炎症而仅促进细胞生长?HMGB1靶向性抗炎治疗是否会妨碍神经轴突生长及基础修复机制?以及HMGB1在疾病如脓毒症、肿瘤等发生、发展及预后中的作用与临床意义?随着研究的深入,这些问题将得到解决.本研究中,我们制备具有功能活性的人HMGB1,并以此作为免疫原免疫,获得兔抗人HMGB1多克隆抗体,旨在为深入探讨人HMGB1的生物学特点及其与相关疾病的关系奠定基础.

方法:

1. 人HMGB1cDNA的克隆自人扁桃体组织提取细胞总RNA,以RT-PCR法扩增人HMGB1cDNA片段,将此片段连接于pUC19质粒后送上海生工公司测序.
2. 重组原核表达质粒的构建将人HMGB1cDNA片段插入原核表达载体pQE-80L,然后行酶切鉴定.将所构建的重组表达质粒命名为pQE-80L/HMGB1.
3. 目的蛋白的诱导表达与鉴定将构建的重组表达质粒pQE-80L/HMGB1转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 并以IPTG诱导蛋白表达,用SDS-PAGE检测目的蛋白的表达情况,再以Westernblot进行鉴定,最后对重组蛋白的IPTG诱导浓度、诱导温度和诱导时间进行优化选择.
4. 目的蛋白的分离纯化收集并超声破碎IPTG诱导的细菌,离心后,分别取细菌裂解液上清和沉淀行SDS-PAGE,以鉴定目的蛋白的表达形式.将细菌裂解液上清过Ni $^{2+}$ -NTA柱纯化目的蛋白后,再过多粘菌素B柱以去除目的蛋白中混杂的LPS.
5. 目的蛋白生物学活性的检测将纯化的重组人HMGB1加入人外周血单核细胞培养体系,以ELISA法检测培养上清中TNF- $\alpha$ 与IL-6含量.
6. 兔抗人HMGB1多克隆抗体的制备以纯化的人HMGB1为免疫原免疫,ELISA法检测抗血清效价,Westernblot法鉴定抗体特异性.
7. Westernblot法检测脓毒症患者血清中的HMGB1.
8. 分析抗体对HMGB1生物学活性的拮抗效应分别将HMGB1、HMGB1+抗血清、HMGB1+免疫原血清加入人外周血单核细胞培养体系,作用4h后收集培养上清,以ELISA法检测TNF- $\alpha$ 、IL-6含量.

结果:

1. 经RT-PCR扩增人HMGB1cDNA,得到了长度为648bp的目的片段,经序列比对,与GenBank中报道的已知序列完全一致.
2. 重组表达质粒pQE-80L/HMGB1经HindIII+Kpn I 双酶切后,可见大小约为648bp的目的片段.表明重组原核表达质粒构建成功.
3. 经对诱导表达条件的优化,确定了最佳诱导表达条件为终浓度0.5mmol/L的IPTG,在37 $^{\circ}$ C诱导表达4h.SDS-PAGE分析可见,表达的目的蛋白分子量为30kDa,主要以分泌形式存在.经Westernblot证实,在大小约为30kDa的位置有清楚的单一蛋白条带.
4. 目的蛋白经Ni $^{2+}$ -NTA柱纯化后,再经多粘菌素B柱有效地去除了LPS,纯化的蛋白在SDS-PAGE上呈现单一条带,证明目的蛋白得到有效的纯化.
5. 生物学活性的初步分析显示,重组人HMGB1可有效刺激人外周血单核细胞分泌致炎因子TNF- $\alpha$ 、IL-6,与对照组相比, $p < 0.05$ ,具有显著性差异.
6. 用ELISA法测定未次免疫后抗血清的效价为1:25600.以制备的兔抗人HMGB1多克隆抗体为一抗行Westernblot检测,结果显示对应于E.coliDH5 $\alpha$ 诱导表达的人HMGB1蛋白位置(30kDa)上有单一阳性条带,同时对脓毒症患者血清的Westernblot检测亦显示在相同位置有单一反应条带,而抗体与细菌其它成分及正常人血清无明显反应.
7. 与HMGB1刺激组相比, HMGB1+抗血清与人外周血单核细胞作用后,炎症因子TNF- $\alpha$ 、IL-6分泌水平明显下降( $P < 0.01$ ),而HMGB1+免疫原血清与人外周血单核细胞作用后, TNF- $\alpha$ 、IL-6的分泌水平无明显下降( $P > 0.05$ ),表明HMGB1抗体能有效抑制HMGB1的致炎活性.

结论:本实验利用RT-PCR方法扩增了编码人HMGB1氨基酸序列的cDNA,成功构建了重组原核表达质粒pQE-80L/HMGB1.将此质粒转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ ,成功地表达、鉴定并纯化了重组人HMGB1.经检测,纯化的目的蛋白具有生物学活性.以重组人HMGB1为免疫原免疫,制备了兔抗人HMGB1多克隆抗体,该抗体具有较高特异性并能有效拮抗HMGB1的生物学活性.上述结果的取得,为进一步研究人HMGB1的作用机制、探索人HMGB1与相关疾病的关系奠定了基础.

4. 期刊论文 [李树合.周定标.余新光.许百男.孙同柱.卜博.佟怀宇 颈动脉粥样硬化斑块中HMGB1表达的改变及意义 -中华神经外科杂志2007, 23\(2\)](#)

目的 探讨颈动脉粥样硬化(CAS)斑块中高迁移率族蛋白B1(HMGB1)表达的改变,并分析其在CAS病理中的意义.方法 应用免疫组化方法研究了CAS斑块中HMGB1表达的改变,并对其与炎症细胞浸润之间的相关性进行了分析.结果 CAS斑块不同成分内存在不同的HMGB1表达,其中炎症细胞浸润区内表达显著增高,并与单核-巨噬细胞计数之间呈现明显的直线相关,另外在坏死区和钙化区周边基质内,存在不同程度的HMGB1聚积,而纤维化区HMGB1表达降低.结论 在CAS病理过程中存在HMGB1表达的改变,并且其与炎症细胞的浸润程度具有明显的相关性.

5. 学位论文 [李树合 CAS斑块的高分辨MRI影像病理对照和HMGB-1表达研究 2006](#)

研究背景

CAS导致缺血性脑卒中的危险性不仅在于颈动脉管腔的狭窄,更重要的是斑块结构的稳定性和成分的异质性.随着影像学技术的发展,对CAS斑块的高分辨多序列MRI对比成像显示效果和影像质量有了显著提高,但对其影像与病理对照研究相对滞后.病理研究证实,CAS是一种动脉壁的慢性炎症过程,在CAS斑块发展过程中有多种炎症因子参与了斑块内炎症细胞浸润、组织坏死、微血管生成、纤维化和钙化过程,并且与斑块稳定性之间具有一定的相

关性, 近年来研究表明, 细胞核内DNA结合非组蛋白HMGB-1在多种病理状态下表达增强, 并向细胞外大量释放, 作为一种晚期炎症介质, 对AS病理过程中的EC、SMC功能及其它炎症因子表达具有重要调节作用。但对在体CAS斑块内HMGB-1的表达及其分布尚无系统研究。

研究目的

本研究分两个相互独立的部分: 第一部分试图通过CAS斑块T1WI、PDWI、T2WI和3D TOF四种MRI序列影像图像与斑块断面大体照片、H-E、Masson、Mallory和三原染色等病理结果对比, 探讨斑块内纤维帽形态和脂质池、坏死核、钙化、出血、纤维化等不同成分的MRI影像特点, 为临床特别是CEA术前判定斑块的稳定性提供依据。第二部分试图通过对CAS斑块内HMGB-1蛋白和mRNA表达的测定, 探讨CAS斑块内HMGB-1表达的改变及分布规律。

研究方法

研究对象来自我院神经外科2004年1月~2006年1月间进行CEA手术的32例CAS患者, 其中25例、248段切片纳入第一部分研究, 全部纳入第二部分研究。第一部分研究方法主要包括: 术前对患者行高分辨MRI检查并采集斑块的T1WI、PDWI、T2WI和3D TOF四种MRI序列影像; 术后对斑块照相并记录其断面照片; 标本制作石蜡切片, 行H-E、Masson、Mallory和三原染色, 记录其病理切片照片和显微镜下景观, 以显微镜下病理为参照对斑块分型, 并分析纤维帽形态和脂质池、坏死核、钙化、出血、纤维化等不同成分的MRI影像特点。第二部分研究方法包括: 制作石蜡标本的25例、248段切片进行HMGB-1免疫组化染色; 另外7例标本, 一部分提取蛋白进行western blot分析, 另一部分提取mRNA进行RT-PCR分析, 分析HMGB-1蛋白表达的改变和分布以及mRNA表达的改变。

研究结果

本研究共收集CAS斑块32例, 男性明显多于女性, 年龄、侧别分布和斑块长度均无性别差异, 斑块主体位于CCA分叉部。

第一部分: 25例切段后可用于影像病理对照的248段(72.37%), 分别根据AHA病理分型和MRI分型标准进行分型, 二者之间具有较高的一致性(Cohen's  $\kappa = 0.782$ , 95%可信区间为0.694~0.869)。纤维帽病理表现为内膜增厚和内膜下薄层带状纤维化, MRI影像主要表现为3D TOF序列的管腔周围带状或月牙状低信号, 其厚度和一致性提示纤维帽的厚薄和完整性。脂质池病理表现为团块状或带状聚集的脂质空泡; 坏死核表现为片状组织坏死, 细胞核聚集、纤维崩解, 和不形成坏死物的沉积, 炎症细胞浸润较多, 周边增生纤维组织有不同程度的水肿; 二者MRI影像均以T1WI、PDWI、T2WI相高信号和3D TOF序列稍高信号为主。钙化病理主要表现为组织内片状细胞和组织缺失区, 呈水晶体状斑斑排列, 周围多伴坏死、炎症细胞浸润和纤维化; MRI影像上表现为四种序列边界清楚的弧形或不规则低信号, 部分弥散型钙化与坏死、纤维化相混杂, 表现为混杂信号。斑块内出血的病理和MRI影像表现随出血时间不同而异, 新鲜出血病理表现为形态较为完整的红细胞聚集, Masson和Mallory染色呈橘红色, MRI影像T1WI和3D TOF多呈明显的稍高~高信号, T2WI以等~稍高信号为主, PDWI信号不定; 近期出血病理表现为红细胞形态不完整, 降解红细胞碎片聚集, 含有纤维素、胆固醇结晶和较多的巨噬细胞, 周边有新生血管形成, Masson和Mallory染色呈砖红色至棕色反应, MRI影像多表现为四种序列明显高~稍高信号; 陈旧出血病理表现为无定形坏死物质聚集, 炎症浸润较轻, Masson和Mallory染色分别呈绿色和蓝色反应, MRI影像上多呈四种序列低信号。纤维化病理表现为胶原纤维增生, 不同程度的新生血管形成, 斑块深层和肩部浅层存在平滑肌纤维增生; 高分辨MRI各序列影像上信号不特定, 以等信号为主, 少数PDWI和T2WI相呈高信号。

第二部分: 正常血管壁内存在HMGB-1蛋白的表达, 分布比较均匀, 主要位于部分血管EC、SMC和成纤维细胞核内。免疫组化染色显示CAS斑块内HMGB-1表达明显增强, 主要分布于炎症细胞浸润区和坏死、钙化区周边区域, 以单核-巨噬细胞胞核、胞浆和间质内表达为主; 在坏死区和钙化区周边区域呈条带状分布, 在新生血管内皮细胞内表达明显增强; 炎症细胞浸润区内HMGB-1阳性染色面积与炎症细胞浸润区面积之比与单核-巨噬细胞计数之间呈一定程度的线性相关。Western Blot和RT-PCR结果一致性地显示HMGB-1蛋白和mRNA在以坏死区为主的斑块内表达最高, 在钙化为主的斑块内表达次之, 而在纤维化和脂质核为主的斑块内表达较低。

结论

一、高分辨MRI多序列对比分析在显示CAS斑块形态结构同时, 可以分辨斑块内部不同成分组成。纤维帽在3D TOF影像显示较好, 并可以分辨纤维帽的厚薄和完整性。高分辨MRI在显示斑块内钙化和出血方面具有一定的优势, 钙化块在各序列影像上呈边界清楚的低信号, 弥散型钙化呈混杂信号; 高分辨MRI不仅可以较好地辨认斑块内出血, 并且多序列图像对比, 可以用以鉴别出血的早晚。脂质池和坏死核在高分辨MRI各序列以不同程度的高信号为主, 二者鉴别较难。纤维化在高分辨MRI各序列以等信号为主, 部分在PDWI和T2WI影像上呈高信号。

二、CAS斑块内HMGB-1表达明显增强, 主要分布于炎症细胞浸润区和坏死、钙化区周边基质内, 其中炎症细胞浸润区以单核-巨噬细胞和新生血管内皮细胞表达为主, 胞核、胞浆和间质内均有增高, 并且其表达与炎症细胞浸润之间呈一定的线性关系; 在坏死区和钙化区周边基质内呈条带状沉积。结果显示HMGB-1作为晚期炎症介质, 可能是CAS病理发展的一个重要方面。

## 6. 期刊论文 赖添顺, 郭振辉, 蔡绍曦, LAI Tian-shun, GUO Zhen-hui, CAI Shao-xi 高迁移率族蛋白1在肺部疾病中的研究进展 - 国际呼吸杂志2009, 29(19)

高迁移率族蛋白1具有增加抗原的免疫原性、促进炎症介质基因表达及炎症介质的释放、促进树突状细胞和Th1细胞极化成熟与促进纤维化的功能, 其在脓毒症、肾肝纤维化、动脉粥样硬化、血管损伤后再狭窄、神经发育、肿瘤转移以及类风湿性关节炎等疾病中起重要作用, 而其是否在肺部疾病中起作用的研究尚开始, 现就高迁移率族蛋白1在肺部疾病的研究进展作一介绍。

## 7. 学位论文 闫小响 高迁移率族蛋白1, 内源性分泌型糖化终末产物受体与冠状动脉病变的相关性研究 2009

冠心病是当今世界威胁人类健康的主要疾病之一, 然而其发病机理迄今仍未完全阐明。近20年的研究表明, 机体炎症在动脉粥样硬化形成和发展中发挥的作用不容忽视。动脉粥样硬化是一种慢性的炎症过程, 通过诱发粥样斑块破裂以及随后发生的血栓形成, 从而导致临床事件的发生。此外, 糖尿病也是动脉粥样硬化的独立危险因素, 与非糖尿病相比, 糖尿病合并动脉粥样硬化患者血管壁炎症反应更剧烈, 且预后较差。因此, 探讨动脉粥样硬化特别是糖尿病动脉粥样硬化的机制和预测指标, 对早期预防急性心脏事件及改善预后尤为重要。

胞外高迁移率族蛋白1(HMGB1)是近年发现的一种重要的炎症细胞因子, 与脓毒症、关节炎、急性肺炎等的发病关系密切。胞内HMGB1可通过活化细胞的主动分泌和坏死或受损细胞的被动释放进入细胞间隙, 与细胞膜糖化终末产物受体(RAGE)和To11样受体2(TLR2)和4(TLR4)受体结合启动炎症通路。近年的研究显示, HMGB1在动脉粥样硬化组织的内皮细胞、血管平滑肌细胞和巨噬细胞均有高表达, 而且表达HMGB1巨噬细胞的数量随着动脉粥样硬化加重而显著增加。这些研究提示, HMGB1可能通过RAGE途径参与动脉粥样斑块的发生和进展。可溶性糖化终末产物受体(sRAGE)是基质金属蛋白酶剪切细胞膜表面的RAGE释放到血流中的可溶性RAGE, 而内源性分泌型糖化终末产物受体(esRAGE)是糖化终末产物受体的一种mRNA异构体, 两者通过与晚期糖化终末产物结合, 中和后者的病理作用, 抑制病变的发生和发展。因此, sRAGE和esRAGE被认为是动脉粥样硬化特别是糖尿病动脉粥样硬化的保护因素。

本研究目的是探讨血清HMGB1、sRAGE、esRAGE及炎症水平与糖尿病或非糖尿病合并冠心病的关系。

依据是否存在2型糖尿病和冠心病将512例病人分为: 第一组, 无糖尿病无冠心病组132例; 第二组, 单纯冠心病组149例; 第三组, 单纯糖尿病组80例; 第四组, 糖尿病合并冠心病组151例。各例测定血清HMGB1, sRAGE, esRAGE, 高敏C反应蛋白(hsCRP), 肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ , 白介素(IL)-6。

结果发现, 第二组和第四组血清HMGB1和hsCRP水平分别较第一组和第三组显著增高。以所有病例为观察对象, HMGB1与hsCRP, TNF- $\alpha$ 和IL-6成正相关。与第一组相比, 第二组具有较低的血清sRAGE和esRAGE水平; 然而在糖尿病病人中, 第四组血清esRAGE显著低于第三组, 但是sRAGE水平却高于第三组。多元逐步回归分析显示, 在非糖尿病病例中, HMGB1, esRAGE和常规的冠心病危险因素(年龄, 吸烟, 高血压, 高密度脂蛋白胆固醇, hsCRP和TNF- $\alpha$ )是冠心病独立危险因素。而且, 在糖尿病病例中, HMGB1和esRAGE与冠心病相关, 并独立于其他冠心病危险因素。

本研究的结论是: 血清HMGB1水平增高, 低循环水平的esRAGE是糖尿病和非糖尿病合并冠状动脉病变的独立危险因素。因此, 抑制冠心病病人尤其是糖尿病患者血清HMGB1水平并提高esRAGE水平, 是治疗冠心病的重要策略。

## 8. 期刊论文 李树合, 周定标 高迁移率族蛋白HMGB1及其在动脉粥样硬化病理中的作用研究进展 - 感染、炎症、修复 2005, 6(3)

高迁移率族蛋白(high-mobility group protein, HMG), 是一类广泛分布于高等真核生物细胞核内的非组DNA结合蛋白, 是维持核小体稳定、调控基因复制、重组、转录等过程不可或缺的调控蛋白。近年来研究发现, 多种病理状态下细胞外可以检测到高迁移率族蛋白1(HMG box 1, HMGB1, 原分类中HMG1), 在炎症过程、神经轴突生长、肿瘤转移、损伤后修复以及动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)等多种病理过程中具有重要的调节作用。本文就近年来对HMGB1在AS病理中作用的研究作一简要综述。

## 9. 期刊论文 朱凤磊, 刘新峰 炎症介质与血栓形成和凝血的关系 - 中国动脉硬化杂志2008, 16(10)

近年来研究显示炎症介质与血栓形成和凝血的关系密切,本文主要介绍高迁移率族蛋白B1、组织因子、组织因子途径抑制物、蛋白C系统,凝血酶、血栓调节蛋白和血栓形成、凝血的关系.通过炎症介质与血栓形成和凝血的关系研究对认识动脉粥样硬化、血栓形成等疾病发病机制,指导临床治疗提供帮助.

## 引证文献(2条)

1. 杜秋明, 王存选 缺血性脑血管疾病与颈动脉斑块形成危险因素的关系[期刊论文]-中国中西医结合急救杂志 2010(6)
2. 马承泰, 蒋艳霞, 顾华丽, 崔昌星, 刘振芳 急性冠状动脉综合征患者血清基质金属蛋白酶-9和超敏C-反应蛋白水平及其相关性分析[期刊论文]-中国中西医结合急救杂志 2010(6)

本文链接: [http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical\\_zgwzbjyxx201005015.aspx](http://d.wanfangdata.com.cn/Periodical_zgwzbjyxx201005015.aspx)

授权使用: qkzgz16(qkzgz16), 授权号: 5b32a6a9-9bd6-4a81-8e65-9ede0163c6b0

下载时间: 2011年5月9日