

• 论著 •

高迁移率族蛋白 B1 介导内质网应激在脑缺血 / 再灌注损伤中的作用

赵菁 耿文静 翟博智 宋毅军

300052 天津医科大学总医院神经科(赵菁、宋毅军); 300211 天津市天津医院神经科(赵菁、耿文静、翟博智)

通讯作者: 宋毅军, Email: songyijun2000@126.com

DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095-4352.2016.04.015

【摘要】目的 以“缺血 / 再灌注 - 高迁移率族蛋白 B1- 内质网应激”(I/R-HMGB1-ERS)为切入点, 探讨 HMGB1 参与脑 I/R 损伤中 ERS 的机制。**方法** 取出生 1~3 d 乳鼠脑组织, 体外培养脑细胞, 待细胞传代至第 3 代用于实验。将细胞分为两组: 空白对照组细胞正常培养, 不予任何处理; 缺氧 / 复氧组以 99.9% 氮气培养细胞 60 min(缺氧), 开放瓶口复氧 120 min 模拟 I/R 模型。利用小干扰 RNA(siRNA)沉默 HMGB1 基因(将 siRNA 和转染试剂 Lipofectamine 2000 混合物梯度转染至细胞中)作为 HMGB1-siRNA 转染组, 并设空白对照组(未经任何处理)和阴性对照组(转染对照 siRNA)。采用反转录 - 聚合酶链反应(RT-PCR)和蛋白质免疫印迹试验(Western Blot)检测细胞中 HMGB1 和 ERS 相关分子的 mRNA 及蛋白表达。**结果** ① 缺氧 / 复氧组细胞内 HMGB1 和 ERS 相关分子葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、C/EBP 同源蛋白(CHOP)、天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 12(caspase-12)的 mRNA 及蛋白表达均较空白对照组明显升高(以空白对照组数值为基数 1, HMGB1 mRNA: 3.19 ± 0.48 比 1, $t=2.183$, $P=0.008$; GRP78 mRNA: 2.07 ± 0.33 比 1, $t=3.292$, $P=0.016$; CHOP mRNA: 1.93 ± 0.28 比 1, $t=2.573$, $P=0.021$; caspase-12 mRNA: 2.42 ± 0.42 比 1, $t=2.261$, $P=0.027$; HMGB1 蛋白: 2.28 ± 0.36 比 1, $t=2.042$, $P=0.009$; GRP78 蛋白: 1.33 ± 0.24 比 1, $t=2.781$, $P=0.016$; CHOP 蛋白: 1.67 ± 0.34 比 1, $t=2.174$, $P=0.021$; caspase-12 蛋白: 1.36 ± 0.44 比 1, $t=3.192$, $P=0.008$)。说明 ERS 相关分子参与了细胞缺氧 / 复氧过程。② siRNA 沉默 HMGB1 基因后, 缺氧 / 复氧模型细胞内 HMGB1 和 ERS 相关分子的 mRNA 及蛋白表达水平均较空白对照组和阴性对照组明显下调(以空白对照组数值为基数 1, HMGB1 mRNA: 0.27 ± 0.12 比 1, 1.02 ± 0.04 , GRP78 mRNA: 0.16 ± 0.13 比 1, 0.96 ± 0.04 , CHOP mRNA: 0.47 ± 0.09 比 1, 0.98 ± 0.07 , caspase-12 mRNA: 0.31 ± 0.11 比 1, 1.05 ± 0.02 ; HMGB1 蛋白: 0.23 ± 0.04 比 1, 1.08 ± 0.01 , GRP78 蛋白: 0.14 ± 0.09 比 1, 1.35 ± 0.03 , CHOP 蛋白: 0.32 ± 0.10 比 1, 0.93 ± 0.06 , caspase-12 蛋白: 0.27 ± 0.09 比 1, 0.97 ± 0.08 ; $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。说明 HMGB1 参与 ERS 的过程可能与 GPR78、CHOP、caspase-12 等分子有关。**结论** 缺氧 / 复氧脑细胞内 HMGB1 和 ERS 相关分子表达水平均显著上调, 而沉默 HMGB1 基因可明显抑制上述分子的表达水平, “I/R-HMGB1-ERS”路径可能参与脑 I/R 损伤的发生机制。

【关键词】 高迁移率族蛋白 1; 内质网应激; 缺氧 / 复氧; 缺血 / 再灌注, 脑

The role of high mobility group protein 1 mediated the endoplasmic reticulum stress in cerebral ischemia/reperfusion injury Zhao Jing, Geng Wenjing, Zhai Bozhi, Song Yijun

Department of Neurology, General Hospital of Tianjin Medical University, Tianjin 300052, China (Zhao J, Song YJ);

Department of Neurology, Tianjin Hospital, Tianjin 300211, China (Zhao J, Geng WJ, Zhai BZ)

Corresponding author: Song Yijun, Email: songyijun2000@126.com

【Abstract】Objective To explore the mechanism of high mobility group protein 1 (HMGB1) involved in endoplasmic reticulum stress (ERS) induced by brain ischemia/reperfusion (I/R), based on I/R-HMGB1-ERS as the breakthrough point. **Methods** The brain of rats birthed 1~3 days was harvested, and the brain cells were cultured *in vitro*, which were used in the experiment when the cells were in the third passage. The cells were divided into two groups: cells in blank control group were cultured under the normal conditions without any treatment, and the cells in hypoxia/reoxygenation group were cultured with 99.9% nitrogen for 60 minutes (hypoxia) followed by opening the bottle neck for reoxygenation 120 minutes to simulate I/R model. The HMGB1 gene was silenced by using small interfering RNA (siRNA, siRNA and transfection reagent Lipofectamine 2000 mixture gradient was transfected into the cultured cells) as HMGB1-siRNA transfection group, and blank control (without any treatment) and negative control group (transfected with control siRNA) served as controls. The mRNA and protein expressions of HMGB1 and ERS related

molecules were determined by real-time reverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR) and Western Blot. **Results** ① In cells of hypoxia/reoxygenation group, the mRNA and protein expressions of HMGB1 and ESR related proteins, including glucose regulating protein 78 (GRP78), C/EBP homologous protein (CHOP) and caspase-12, were significantly higher than those of blank control group with statistical difference (the value in blank control group was served as baseline 1, HMGB1 mRNA: 3.19 ± 0.48 vs. 1, $t = 2.183$, $P = 0.008$; GRP78 mRNA: 2.07 ± 0.33 vs. 1, $t = 3.292$, $P = 0.016$; CHOP mRNA: 1.93 ± 0.28 vs. 1, $t = 2.573$, $P = 0.021$; caspase-12 mRNA: 2.42 ± 0.42 vs. 1, $t = 2.261$, $P = 0.027$; HMGB1 protein: 2.28 ± 0.36 vs. 1, $t = 2.042$, $P = 0.009$; GRP78 protein: 1.33 ± 0.24 vs. 1, $t = 2.781$, $P = 0.016$; CHOP protein: 1.67 ± 0.34 vs. 1, $t = 2.174$, $P = 0.021$; caspase-12 protein: 1.36 ± 0.44 vs. 1, $t = 3.192$, $P = 0.008$). It was indicated that ERS related molecules involved in cell hypoxia/reoxygenation process. ② After HMGB1 gene was silenced by siRNA, the cells after hypoxia/reoxygenation showed a decrease in the mRNA and protein expressions of HMGB1 and ERS related moleculars as compared with those of blank control group and negative control group (served the value in blank control group as baseline 1, HMGB1 mRNA: 0.27 ± 0.12 vs. 1, 1.02 ± 0.04 ; GRP78 mRNA: 0.16 ± 0.13 vs. 1, 0.96 ± 0.04 ; CHOP mRNA: 0.47 ± 0.09 vs. 1, 0.98 ± 0.07 ; caspase-12 mRNA: 0.31 ± 0.11 vs. 1, 1.05 ± 0.02 ; HMGB1 protein: 0.23 ± 0.04 vs. 1, 1.08 ± 0.01 ; GRP78 protein: 0.14 ± 0.09 vs. 1, 1.35 ± 0.03 ; CHOP protein: 0.32 ± 0.10 vs. 1, 0.93 ± 0.06 ; caspase-12 protein: 0.27 ± 0.09 vs. 1, 0.97 ± 0.08 ; $P < 0.05$ or $P < 0.01$). It was indicated that HMGB1 involved in ERS related with GPR7, CHOP, caspase-12.

Conclusion Hypoxia/reoxygenation brain intracellular HMGB1 and ERS related molecules expression levels were significantly up-regulated, and silencing HMGB1 gene can significantly inhibit the expression levels of these molecules, and "I/R-HMGB1-ERS" pathway may participate in the mechanism of brain I/R injury.

【Key words】 High mobility group protein 1; Endoplasmic reticulum stress; Hypoxia/reoxygenation; Brain ischemia/reperfusion injury

脑缺血 / 再灌注 (I/R) 损伤是多种机制参与的一种复杂的病理生理过程, 内质网应激 (ERS) 是其中一个重要的环节^[1-2]。ERS 是细胞受到各种危害因素刺激时, 正常的内质网形态功能受到破坏, 蛋白加工运输受阻, 从而导致内质网形态功能受损^[3]。ERS 对缺血、缺氧等应激刺激极为敏感^[4-6], I/R 损伤时, ATP 耗竭、Ca²⁺ 超载及大量自由基生成等因素诱导过度 ERS, 导致组织损伤, 参与了脑 I/R 损伤的发生发展^[7-8]。高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 是一种存在于真核细胞核内的非组蛋白染色体结合蛋白, 通过与细胞表面受体, 如晚期糖基化终末产物受体 (RAGE)、Toll 样受体 4 (TLR4) 等结合, 介导和参与炎症反应的发生^[9-12]。已有研究证实, HMGB1 作为晚期关键的“损伤信号”, 参与了脑 I/R 损伤的发生^[13-14]。本实验以“I/R-HMGB1-ERS”学说为切入点, 通过 RNA 干扰技术沉默 HMGB1 基因, 观察脑 I/R 损伤后 ERS 的变化, 以阐明 HMGB1 在脑 I/R 损伤后 ERS 中的作用及机制, 进一步补充 I/R 损伤的发病机制, 为其防治提供新方向。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料: HMGB1 兔抗人多克隆抗体 (多抗, 英国 Abcam 公司), 羊抗兔多抗 (美国 Sigma 公司); Lipofectamine 2000 (Lip 2000) 转染试剂 (美国 Thermo Fisher 公司)、TRIzol (美国 Invitrogen 公司);

反转录 - 聚合酶链反应 (RT-PCR) 试剂盒 (日本 TaKaRa 公司)。

1.2 细胞培养: 取出生 1~3 d 乳鼠, 处死后取脑组织剪碎, 加入 0.1% II 型胶原酶和 0.2% 胰酶混合液 (1:1) 5 mL, 37 °C 下消化 20 min 后轻轻吹打, 静置 1 min 后收集上清液, 终止消化, 过滤后取上清液, 以 1×10^6 /mL 密度接种于 6 孔板中, 每孔 3 mL, 待细胞生长至约 85% 融合时, 换无抗低血清培养基, 细胞传至第 3 代时进行实验。

1.3 细胞分组及缺氧 / 复氧模型建立: 将细胞分为两组。空白对照组细胞正常培养, 不予缺氧 / 复氧处理; 缺氧 / 复氧组制备细胞缺氧 60 min、复氧 120 min 模型。取细胞培养基, 弃去培养液, 加入预先充氮的饱和 D-Hank 缓冲液 5 mL, 培养瓶中充入 99.9% 氮气 (流速为 2 L/min), 以置换培养瓶中的空气, 密闭瓶口后用微量气体分析仪检测并维持瓶中氧分压低于 15 mmHg (1 mmHg = 0.133 kPa)。于缺氧环境下培养细胞 60 min 后去胶塞, 换以含糖、含钙的 Hank 缓冲液 5 mL, 开放培养瓶口, 于 37 °C、CO₂ 孵箱中继续培养 120 min, 模拟 I/R 模型。

1.4 小干扰 RNA (siRNA) 技术沉默 HMGB1 基因: 用适量无血清 Opti-MEM 培养液稀释 siRNA, 按照 Lip 2000 说明书转染细胞。取部分细胞分为 3 组: 空白对照组细胞不做任何处理; 阴性对照组转染对

照 siRNA; HMGB1-siRNA 组转染 HMGB1-siRNA, 每孔分别以感染复数(MOI)20、50、100、150、200 加入 siRNA 和 Lip 2000 试剂混合物。

1.5 检测指标及方法

1.5.1 RT-PCR 法检测 HMGB1 及 ERS 相关分子的 mRNA 表达水平: 以每孔 5×10^5 个细胞接种于 6 孔板中培养 48 h 后, 按 TRIzol 试剂盒操作手册提取总 RNA 2 μg , 并按 RT-PCR 试剂盒说明书进行反转录及 PCR 扩增。引物序列见表 1。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法表示表达量, 以对照组数值为基数, 计算基因表达倍数。

表 1 PCR 引物序列及扩增产物大小

基因	引物序列	扩增产物 (bp)
HMGB1	上游 5'-GTGGATCGCGATGGGACCAA-3'	430
	下游 5'-CCCATAGGATGCAACAAACA-3'	
GRP78	上游 5'-GTCCATGGACGATTGCAGCAGC-3'	523
	下游 5'-TGCCCCAACGCCAAGCAACCAAGC-3'	
CHOP	上游 5'-AGAGAGTGTCAAGAAGGAAGTG-3'	398
	下游 5'-CTCATTCCCCAGCCCCGGCTG-3'	
caspase-12	上游 5'-AGTATAGATTCTGTTCTCCCTTC-3'	465
	下游 5'-TTGTTTATTCTTTGTTCTATTATA-3'	
GAPDH	上游 5'-GCACCGTCAAGGCTGAGAAC-3'	442
	下游 5'-TGGTGAAGACGCCAGTGGA-3'	

注: PCR 为聚合酶链反应, HMGB1 为高迁移率族蛋白 B1, GRP78 为葡萄糖调节蛋白 78, CHOP 为 C/EBP 同源蛋白, caspase-12 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 12, GAPDH 为 3- 磷酸甘油醛脱氢酶

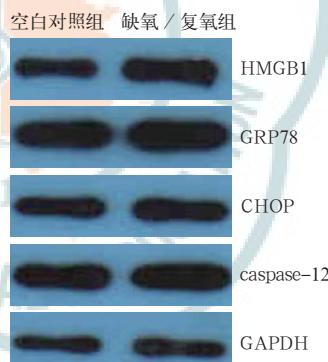
1.5.2 蛋白质免疫印迹试验(Western Bolt) 检测 HMGB1 蛋白表达: 细胞裂解液 RIPA 裂解细胞, 十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE) 分离蛋白, 并转移到聚偏氟乙烯(PVDF)膜上, 封闭后加 HMGB1 一抗(兔抗人多抗, 1:1000)及二抗(羊抗兔多抗, 1:10000), 4 °C 孵育过夜, 用含吐温 20 的磷酸盐缓冲液(PBST)洗脱 5 次, 采用电化学发光

法(ECL), 在凝胶成像系统上曝光观察并拍照。实验重复 3 次。以目的蛋白与内参照 3- 磷酸甘油醛脱氢酶(GAPDH)的灰度值比值作为表达量, 以对照组数值为基数, 计算蛋白表达的倍数。

1.6 统计学处理: 采用 SPSS 16.0 软件分析数据, 计量资料以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较使用单因素方差分析, 两两比较采用 *t* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 细胞缺氧 / 复氧后 HMGB1 及 ERS 相关分子表达(图 1; 表 2): 缺氧 / 复氧模型细胞 HMGB1 以及 ERS 相关分子葡萄糖调节蛋白 78(GRP78)、C/EBP 同源蛋白(CHOP)和天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 12(caspase-12)的 mRNA 和蛋白表达水平均较空白对照组明显升高(均 $P < 0.05$)。说明 ERS 相关分子参与了细胞缺氧 / 复氧过程。



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, HMGB1 为高迁移率族蛋白 B1, ERS 为内质网应激, GRP78 为葡萄糖调节蛋白 78, CHOP 为 C/EBP 同源蛋白, caspase-12 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 12, GAPDH 为 3- 磷酸甘油醛脱氢酶

图 1 Western Blot 检测乳鼠脑细胞缺氧 / 复氧后 HMGB1 和 ERS 相关分子的蛋白表达

2.2 HMGB1-siRNA 转染对缺氧 / 复氧脑细胞 ERS 的影响(表 3; 图 2): 与空白对照组和阴性对照组比较, siRNA 沉默 HMGB1 基因后能够有效抑制缺氧 / 复氧细胞内 HMGB1 表达, 下调 ERS 相关分子表达(均 $P < 0.05$); 而空白对照组与阴性对照组各分子表达均无明显差异。说明 HMGB1 参与 ERS 的过程可能与 GRP78、CHOP、caspase-12 等分子有关。

表 2 乳鼠脑细胞缺氧 / 复氧后 HMGB1 和 ERS 相关分子的 mRNA 及蛋白表达变化($\bar{x} \pm s$)

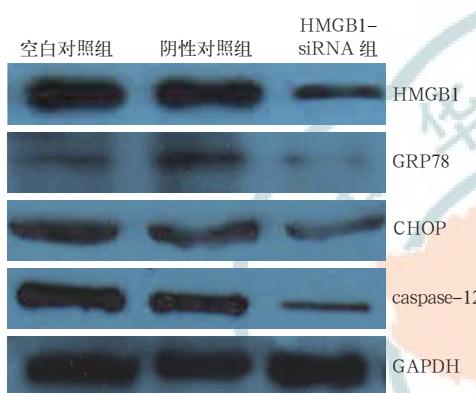
组别	样本数 (孔)	mRNA 表达				蛋白表达			
		HMGB1	GRP78	CHOP	caspase-12	HMGB1	GRP78	CHOP	caspase-12
空白对照组	5	1	1	1	1	1	1	1	1
缺氧 / 复氧组	5	3.19 ± 0.48	2.07 ± 0.33	1.93 ± 0.28	2.42 ± 0.42	2.28 ± 0.36	1.33 ± 0.24	1.67 ± 0.34	1.36 ± 0.44
<i>t</i> 值		2.183	3.292	2.573	2.261	2.042	2.781	2.174	3.192
<i>P</i> 值		0.008	0.016	0.021	0.027	0.009	0.016	0.021	0.008

注: HMGB1 为高迁移率族蛋白 B1, ERS 为内质网应激, GRP78 为葡萄糖调节蛋白 78, CHOP 为 C/EBP 同源蛋白, caspase-12 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 12

表3 HMGB1-siRNA 转染对缺氧/复氧乳鼠脑细胞 HMGB1 和 ERS 相关分子 mRNA 及蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$)

组别	样本数 (孔)	mRNA 表达				蛋白表达			
		HMGB1	GRP78	CHOP	caspase-12	HMGB1	GRP78	CHOP	caspase-12
空白对照组	5	1	1	1	1	1	1	1	1
阴性对照组	5	1.02±0.04	0.96±0.04	0.98±0.07	1.05±0.02	1.08±0.01	1.35±0.03	0.93±0.06	0.97±0.08
HMGB1-siRNA 组	5	0.27±0.12 ^{ac}	0.16±0.13 ^{bd}	0.47±0.09 ^{ac}	0.31±0.11 ^{ac}	0.23±0.04 ^{bd}	0.14±0.09 ^{bd}	0.32±0.10 ^{bd}	0.27±0.09 ^{bd}
F 值		2.371	3.592	1.964	2.032	3.144	4.262	3.291	2.872
P 值		0.016	0.009	0.021	0.019	0.008	0.002	0.003	0.003

注: HMGB1 为高迁移率族蛋白 B1, siRNA 为小干扰 RNA, ERS 为内质网应激, GRP78 为葡萄糖调节蛋白 78, CHOP 为 C/EBP 同源蛋白, caspase-12 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 12; 与空白对照组比较, ^aP<0.05, ^bP<0.01; 与阴性对照组比较, ^cP<0.05, ^dP<0.01



Western Blot 为蛋白质免疫印迹试验, HMGB1 为高迁移率族蛋白 B1, siRNA 为小干扰 RNA, ERS 为内质网应激, GRP78 为葡萄糖调节蛋白 78, CHOP 为 C/EBP 同源蛋白, caspase-12 为天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶 12, GAPDH 为 3- 磷酸甘油醛脱氢酶

图2 Western Blot 检测 HMGB1-siRNA 转染对缺氧/复氧乳鼠脑细胞 HMGB1 和 ERS 相关分子表达的影响

3 讨论

内质网是多数细胞内、细胞表面及细胞外蛋白质合成、加工和转运的主要场所, Ca^{2+} 耗竭、葡萄糖/营养缺乏、活性氧(ROS)和自由基等刺激均可导致内质网功能失调, 引起 ERS^[15-16]。未折叠蛋白(URP)由分子伴侣蛋白 GRP78 以及蛋白激酶样内质网激酶(PERK)、活化转录因子 6(ATF6)和内质网转膜蛋白激酶 1(IKE1)构成, 这 3 个感受器蛋白分别通过诱导 caspase-12、CHOP 等活化而促进细胞凋亡, 过度的 ERS 可通过 URP 信号转导通路导致细胞发生应激性凋亡^[17-19]。已有研究证明, ERS 在 I/R 导致的细胞功能障碍中起到重要的作用。周彦明等^[20]研究显示, 肝脏 I/R 模型小鼠再灌注 6 h 后 GRP78 和活化 caspase-3 蛋白表达均显著增高, 同时出现大量凋亡细胞。说明 ERS 参与了小鼠肝脏 I/R 损伤的发生。陈鹏等^[21]研究显示, 心肌梗死(心梗)后心力衰竭(心衰)小鼠 GRP78、CHOP、

磷酸化 c-Jun 氨基末端激酶(p-JNK)、剪切后活化 caspase-12 的蛋白表达均明显增高, 说明 ERS 参与了心梗小鼠心衰后心肌细胞的凋亡。姚凤华等^[22]发现, ERS 的标志性蛋白 GRP78 表达在急性肾缺血损伤早期上调, 说明此时 ERS 已启动。本研究结果也显示, 在构建细胞缺氧/复氧模型后, ERS 标志性蛋白 GRP78、CHOP、caspase-12 的表达水平均明显提高, 同时 HMGB1 的表达也明显升高。以上研究均说明 I/R 损伤的发生发展与内质网功能状态的关系密切。

HMGB1 作为一种重要的晚期炎性介质, 可通过促进细胞增殖及迁移, 从而介导炎症免疫反应^[23]。在小鼠肝脏 I/R 损伤模型中, 随着 I/R 时间延长, 肝组织 HMGB1 表达逐渐上调, 而给予抗 HMGB1 中和抗体能减轻肝脏 I/R 损伤^[24]; 在小鼠心脏 I/R 损伤模型中, HMGB1 表达增多, 而使用重组 HMGB1 处理后, 心肌损伤进一步加重^[25]; 肾脏 I/R 后, 肾组织 HMGB1 的表达明显增强^[26]; 大鼠脑组织 I/R 早期即可观察到神经细胞 HMGB1 发生核-质转移, 应用抗 HMGB1 抗体能明显减小脑缺血所致脑梗死体积^[27]。本研究结果显示, 通过 RNA 干扰技术降低 HMGB1 表达, 可减弱 ERS 反应程度, 从而减轻脑 I/R 损伤。

综上, 本研究显示, HMGB1 作为调控因子可能介导了脑 I/R 损伤时的 ERS, 揭示了 HMGB1 的一种新的生物学功能, 补充了 I/R 损伤与 ERS 之间的相互作用机制, 提出了 I/R-HMGB1-ERS 路径, 为进一步深入认识复杂疾病的发病机制提供了实验证据。

参考文献

- [1] Tian Y, Zhang W, Xia D, et al. Postconditioning inhibits myocardial apoptosis during prolonged reperfusion via a JAK2-STAT3-Bcl-2 pathway [J]. J Biomed Sci, 2011, 18: 53. DOI: 10.1186/1423-0127-18-53.
- [2] Jennings RB. Historical perspective on the pathology of myocardial

- ischemia/reperfusion injury [J]. *Circ Res*, 2013, 113 (4): 428–438. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.113.300987.
- [3] 马少林, 邵蕾, 刘杨, 等. 脓毒症淋巴细胞凋亡和内质网应激状态以及与预后关系的研究 [J]. 中华危重病急救医学, 2015, 27 (2): 115–120. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2015.02.008. Ma SL, Shao L, Liu Y, et al. A study of lymphocyte apoptosis and endoplasmic reticulum stress in the development of sepsis and their association with outcome in septic patients [J]. *Chin Crit Care Med*, 2015, 27 (2): 115–120. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2015.02.008.
- [4] Debattisti V, Pendin D, Ziviani E, et al. Reduction of endoplasmic reticulum stress attenuates the defects caused by Drosophila mitofusin depletion [J]. *J Cell Biol*, 2014, 204 (3): 303–312. DOI: 10.1083/jcb.201306121.
- [5] Sisinni L, Maddalena F, Lettini G, et al. TRAP1 role in endoplasmic reticulum stress protection favors resistance to anthracyclines in breast carcinoma cells [J]. *Int J Oncol*, 2014, 44 (2): 573–582. DOI: 10.3892/ijo.2013.2199.
- [6] 姚咏明, 祝筱梅. 提高内质网应激在脓毒症中作用和意义的认识 [J]. 中华危重病急救医学, 2010, 22 (9): 513–515. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003–0603.2010.09.001. Yao YM, Zhu XM. Pay emphasis on the significance and potential role of endoplasmic reticulum stress in sepsis [J]. *Chin Crit Care Med*, 2010, 22 (9): 513–515. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003–0603.2010.09.001.
- [7] Nickson P, Toth A, Erhardt P. PUMA is critical for neonatal cardiomyocyte apoptosis induced by endoplasmic reticulum stress [J]. *Cardiovasc Res*, 2007, 73 (1): 48–56. DOI: 10.1016/j.cardiores.2006.10.001.
- [8] Takagi H, Matsui Y, Sadoshima J. The role of autophagy in mediating cell survival and death during ischemia and reperfusion in the heart [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2007, 9 (9): 1373–1381. DOI: 10.1089/ars.2007.1689.
- [9] Yang H, Tracey KJ. Targeting HMGB1 in inflammation [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799 (1–2): 149–156. DOI: 10.1016/j.bbagen.2009.11.019.
- [10] Yamada S, Maruyama I. HMGB1, a novel inflammatory cytokine [J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 375 (1–2): 36–42. DOI: 10.1016/j.cca.2006.07.019.
- [11] 徐佳, 刘志锋, 王娟, 等. 人高迁移率族蛋白B1细胞内定位及移位研究 [J]. 中华危重病急救医学, 2006, 18 (6): 338–341. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003–0603.2006.06.006. Xu J, Liu ZF, Wang J, et al. Study of localization and translocation of human high mobility group protein B1 in eukaryotic cells [J]. *Chin Crit Care Med*, 2006, 18 (6): 338–341. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1003–0603.2006.06.006.
- [12] 杨丽萍, 姚咏明, 李杰萍, 等. 高迁移率族蛋白B1真核表达载体的构建及其对肿瘤坏死因子- α 报告基因活性的影响 [J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15 (3): 171–174. DOI: 10.3969/j.issn.1008–9691.2008.03.012. Yang LP, Yao YM, Li JP, et al. Construction of high mobility group box-1 protein eukaryotic expression vector and its effect on tumor necrosis factor- α reporter gene activity [J]. *Chin J TCM WM Crit Care*, 2008, 15 (3): 171–174. DOI: 10.3969/j.issn.1008–9691.2008.03.012.
- [13] Yang QW, Wang JZ, Li JC, et al. High-mobility group protein box-1 and its relevance to cerebral ischemia [J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30 (2): 243–254. DOI: 10.1038/jcbfm.2009.202.
- [14] Hayakawa K, Irie K, Sano K, et al. Therapeutic time window of cannabidiol treatment on delayed ischemic damage via high-mobility group box1-inhibiting mechanism [J]. *Biol Pharm Bull*, 2009, 32 (9): 1538–1544. DOI: 10.1248/bpb.32.1538.
- [15] Pahl HL. Signal transduction from the endoplasmic reticulum to the cell nucleus [J]. *Physiol Rev*, 1999, 79 (3): 683–701.
- [16] 孟潇潇, 刘刊, 谈玖婷, 等. 百草枯中毒大鼠肺纤维化与内质网应激的关系 [J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (6): 331–334. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2013.06.004. Meng XX, Liu K, Tan JT, et al. The relationship of endoplasmic reticulum stress with paraquat induced lung fibrosis in rats [J]. *Chin Crit Care Med*, 2013, 25 (6): 331–334. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2013.06.004.
- [17] Wu J, Kaufman RJ. From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13 (3): 374–384. DOI: 10.1038/sj.cdd.4401840.
- [18] Lai E, Teodoro T, Volchuk A. Endoplasmic reticulum stress: signaling the unfolded protein response [J]. *Physiology (Bethesda)*, 2007, 22 : 193–201. DOI: 10.1152/physiol.00050.2006.
- [19] Wolfson JJ, May KL, Thorpe CM, et al. Subtilase cytotoxin activates PERK, IRE1 and ATF6 endoplasmic reticulum stress-signalling pathways [J]. *Cell Microbiol*, 2008, 10 (9): 1775–1786. DOI: 10.1111/j.1462–5822.2008.01164.x.
- [20] 周彦明, 杨甲梅, 殷正丰, 等. 内质网应激诱导的细胞凋亡与小鼠肝脏缺血再灌注损伤的关系 [J]. 中国普通外科杂志, 2009, 18 (8): 870–872. Zhou YM, Yang JM, Yin ZF, et al. Endoplasmic reticulum stress induced apoptosis involved in hepatic ischemia reperfusion injury in mice [J]. *Chin J Gen Surg*, 2009, 18 (8): 870–872.
- [21] 陈鹏, 杨成明, 曾春雨, 等. 心肌梗死后心力衰竭小鼠心肌组织内质网应激相关凋亡途径的研究 [J]. 中国病理生理杂志, 2010, 26 (6): 1069–1074. DOI: 10.3969/j.issn.1000–4718.2010.06.006. Chen P, Yang CM, Zeng CY, et al. Effect of endoplasmic reticulum stress on cardiac myocyte apoptosis in mouse congestive heart failure induced by myocardial infarction [J]. *Chin J Pathophysiol*, 2010, 26 (6): 1069–1074. DOI: 10.3969/j.issn.1000–4718.2010.06.006.
- [22] 姚凤华, 何娅妮, 詹俊, 等. 内质网应激在急性缺血性大鼠肾损伤中的作用 [J]. 第三军医大学学报, 2009, 31 (11): 1002–1004. Yao FH, He YN, Zhan J, et al. Role of endoplasmic reticulum stress in acute ischemic renal injury in rats [J]. *Acta Acad Med Mil Tertiae*, 2009, 31 (11): 1002–1004.
- [23] 张晓娟, 栾正刚, 马晓春. 高迁移率族蛋白B1对人脐静脉内皮细胞增殖及迁移能力的影响 [J]. 中华危重病急救医学, 2013, 25 (12): 711–714. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2013.12.004. Zhang XJ, Luan ZG, Ma XC. Effect of down-regulation of high mobility group box-1 expression on proliferation and migration abilities of human umbilical vein endothelial cells [J]. *Chin Crit Care Med*, 2013, 25 (12): 711–714. DOI: 10.3760/cma.j.issn.2095–4352.2013.12.004.
- [24] Tsung A, Sahai R, Tanaka H, et al. The nuclear factor HMGB1 mediates hepatic injury after murine liver ischemia–reperfusion [J]. *J Exp Med*, 2005, 201 (7): 1135–1143. DOI: 10.1084/jem.20042614.
- [25] Andrassy M, Volz HC, Igwe JC, et al. High-mobility group box-1 in ischemia–reperfusion injury of the heart [J]. *Circulation*, 2008, 117 (25): 3216–3226. DOI: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.769331.
- [26] Krüger B, Krick S, Dhillon N, et al. Donor Toll-like receptor 4 contributes to ischemia and reperfusion injury following human kidney transplantation [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2009, 106 (9): 3390–3395. DOI: 10.1073/pnas.0810169106.
- [27] Kim JB, Lim CM, Yu YM, et al. Induction and subcellular localization of high-mobility group box-1 (HMGB1) in the postischemic rat brain [J]. *J Neurosci Res*, 2008, 86 (5): 1125–1131. DOI: 10.1002/jnr.21555.

(收稿日期: 2015-11-12)

(本文编辑: 孙茜, 李银平)