基础研究 文章编号:0253-3626(2010)07-0999-05

内毒素诱导巨噬细胞 HMGB1 表达的实验研究

冯华国[1],孙 航[2],吴传新[1],郭 晖[2],龚建平[1],刘 杞[2],李生伟[1]
(1.重庆医科大学附属第二医院肝胆外科;2.重庆医科大学病毒性肝炎研究所,重庆 400010)

【摘 要】目的:探讨内毒素(脂多糖,Lipoplysaccharide,LPS)刺激巨噬细胞后高迁移率族蛋白 B1(High mobility group protein B1,HMGB1)的释放和表达水平。方法:用 100 ng/ml 的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞,分别于刺激后 0、6、12、18、24、30、36 h 和 48 h,用 Western blot 检测细胞培养上清、细胞浆和细胞核内 HMGB1 蛋白的含量;用 RT-PCR 检测细胞中 HMGB1 的 mRNA 表达情况;用免疫细胞化学、激光共聚焦显微镜观察 LPS 刺激后细胞浆和胞核内 HMGB1 的含量变化。分别于 LPS 刺激后 0、1、2、4 h 和 6 h,用酶联免疫吸附实验(Enzymelinked immunoassay,ELISA)测定细胞培养上清中 TNF-α、IL-6 的含量。结果:LPS 刺激后 0~12 h 细胞培养上清中无法检测到 HMGB1 蛋白,18 h 后细胞培养上清中 HMGB1 蛋白的含量开始增加,于 24 h 达到高峰,以后稳定维持在较高水平;LPS 刺激前,HMGB1 主要分布于细胞核内,胞核中 HMGB1 蛋白含量较高,胞浆中 HMGB1 蛋白含量少;LPS 刺激后 12~48 h 细胞浆中 HMGB1 蛋白含量逐渐增加;而 LPS 刺激后 12~24 h 细胞核内 HMGB1 含量逐渐减少,30 h 后细胞核内 HMGB1 含量又逐渐增多。RT-PCR 结果显示,LPS 刺激后 0~18 h,培养细胞中 HMGB1 的 mRNA 表达量无明显变化,24~36 h 培养细胞中 HMGB1 的 mRNA 表达量明显增加。ELISA 结果显示,LPS 刺激后 1 h,细胞培养上清中 TNF-α、IL-6 的含量明显增高,2 h 达到高峰。结论:LPS 可诱导单核-巨噬细胞内 HMGB1、TNF-α、IL-6 表达和释放增加,LPS 诱导巨噬细胞释放 HMGB1 的时间明显晚于 TNF-α、IL-6 的释放时间;LPS 诱导巨噬细胞内的 HMGB1 从细胞核向细胞浆转位,并释放到细胞外;LPS 诱导巨噬细胞 HMGB1 mRNA 基因表达上调的时间和蛋白合成的时间出现较晚。

【关键词】高迁移率族蛋白 B1;脓毒症;内毒素
【中国图书分类法分类号】R631+.2 【文献标识码】A 【收稿日期】2009-08-31

The experimental study of HMGB1 expression in macrophage induced by LPS

FENG Hua-guo, et al
(*Department of Hepatobiliary Surgery, the Second Affiliated Hospital, Chongqing Medical University*)

【Abstract】*Objective*: To elucidate the release and expression of high mobility group protein B1 (HMGB1) in macrophage induced by Lipoplysaccharide (LPS). *Methods*: The murine macrophage-like cell line RAW264.7 was stimulated by LPS. The contents of HMGB1 protein were detected by Western blot in cultured cells supernatant, cytoplasm and nucleus. The expression of HMGB1 mRNA in cultured cell was determined by RT-PCR. The HMGB1 contents in cytoplasm and nucelus were observed using immunocytochemistry and laser confocal scanning microscopy (LCSM). *Results*: The contents of HMGB1 protein in supernatant could not be detected at 0~12 h, but increased gradually from 18h, reached a peak at 24 h and maintained stably at high level after the stimulation of LPS. The level of HMGB1 protein in cytoplasm increased gradually from 0 h to 48 h. The HMGB1 protein level in nucleus was higher at 0 h and decreased gradually at 12~24 h, but increased gradually at 36~48h after LPS stimulated. The expression of HMGB1 mRNA was not significantly changed at 0~18 h but enhanced significantly at 24~36 h after LPS stimulated. *Conclusion*: The release of HMGB1, TNF-α and IL-6 increased in macrophages induced by LPS. HMGB1 was released later than that of TNF-α and IL-6. The expression of HMGB1 mRNA is delayed. HMGB1 released to outside of the cells was come from the prior synthetic reservation in nucleus at early time. Lately new HMGB1 protein was synthesized in nucleus and was transferred into cytoplasm, which led to the level of HMGB1 in nucleus and in cytoplasm increased.

【Key words】High mobility group protein B1;Sepsis;LPS

脓毒症是由细菌感染引起的一种致死性、全身性炎症反应,是临床危重患者主要的死亡原因之一[1]。脓毒症发生发展的根本原因在于机体过度释放细胞因子和炎性介质,导致炎症反应失控和免疫功能紊乱。因此,细胞因子和炎性介质在脓毒症的发生发展中起十分重要的作用。近年来发现,高迁移率族蛋白 B1(High mobility group protein B1,HMGB1)是一

作者介绍:冯华国(1982-),男,硕士,研究方向:外科感染与信号转导。
通讯作者:吴传新,男,副教授,E-mail:wuchuanxin@medmail.com.cn
基金资助:重庆市卫生局中医药科技项目(编号:2009-2-148);重庆市科委自然科学基金(编号:CSTC,2008BB5228)

种重要的脓毒症"晚期炎性介质",其出现时间晚,维持时间长,在脓毒症的延迟性致死效应中发挥十分重要的作用,因此可作为脓毒症防治研究中的一个潜在的分子靶点[2,3]。然而,尽管目前对 HMGB1 在脓毒症所致的多器官功能衰竭中的作用有了较多的认识和肯定,但脓毒症时 HMGB1 释放的规律尚未完全阐明。本研究拟采用 LPS 刺激巨噬细胞,观察LPS 刺激后 HMGB1 表达和释放的情况,试图阐明脓毒症 HMGB1 表达和释放的规律,为临床治疗脓毒症提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 细胞株 小鼠腹腔巨噬细胞株 RAW264.7,购于中国科学院上海细胞研究所,由重庆医科大学附属第二医院外科实验室保存。

1.1.2 主要试剂 HMGB1 抗体(兔多克隆抗体)购自 BD Pharmingen 公司;脂多糖 LPS(*Escherichia coli*,O111:B4)购自美国 Sigma 公司;RNeasy Mini Kit(RNA 抽提)购自上海飞捷生物技术有限公司;TaKaRa RNA PCR Kit(AMV)Ver.3.0 购自宝生物(大连)工程有限公司;细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒、Western blot 及 IP 细胞裂解液购自碧云天生物技术研究所;TNF-α ELISA Kit、IL-6 ELISA Kit 购自晶美生物工程有限公司;FITC 标记的羊抗兔 IgG、FITC 标记羊抗小鼠 IgG、辣根过氧化物酶标记羊抗兔 IgG 、辣根过氧化物酶标记羊抗小鼠 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司;抗 β-actin 小鼠单抗购自武汉博士德生物工程有限公司;TNF-α ELISA 试剂盒购自晶美生物工程有限公司;IL-6 ELISA 试剂盒购自晶美生物工程有限公司。

1.2 实验方法

1.2.1 细胞培养及处理 将对数生长期的 RAW264.7 细胞消化后,接种于培养瓶,用无血清的 RPMI1640 培养液在 37℃,5% CO_2 孵箱内培养 12 h,加入含 100 ng/ml LPS 的 RPMI1640 培养液培养 0、6、12、18、24、30、36、42 h 和 48 h,用 Western blot 检测培养液中 HMGB1 蛋白含量;提取细胞总 RNA,用 RT-PCR 检测培养细胞 HMGB1 mRNA 水平;提取培养细胞胞核蛋白和胞浆蛋白,用 Western blot 检测细胞核和细胞浆 HMGB1 蛋白含量;用细胞免疫化学、共聚焦显微镜观察细胞内 HMGB1 蛋白的表达和细胞内分布;加入含 100 ng/ml LPS 的 RPMI1640 培养液培养 0、1、2、4 h 和 6 h,按 ELISA 检测试剂盒说明书测量细胞培养液中 TNF-α 、IL-6 的含量。

1.2.2 Western 蛋白印迹分析(Western blot) 采用 BIO-RAD 垂直板电泳槽、转移电泳芯、电泳仪,按说明步骤进行。将处理好的样品加入电泳槽,每孔 15 ml,12%的聚丙烯酰胺凝胶电泳分离,电转至 PVDF 膜,在 5%牛血清白蛋白的 TBS 缓冲液中封闭 1 h, 加入兔抗 HMGB1 多克隆抗体 (1:250),于 370C 摇床上平缓摇动 2 h,加入以 1:1 000 的 HRP 标记的羊抗兔 IgG,于 37℃摇床上平缓摇动 2 h,DAB(新鲜配制)显色约 5 min,自来水终止后成像仪中曝光,存像。利用 GENE GNOME 凝胶成像分析系统进行成像和图形分析,测出各条带的光密度值,对目的蛋白条带进行密度分析,结果以 HMGB1 条带的光密度值(ROD)×面积(mm^2)表示,然后进行统计分析。

1.2.3 逆转录-多聚酶链聚合物反应 (RT-PCR) 按 FAST GEN-RNA fast200(上海飞捷生物技术有限公司)总 RNA 提取的说明步骤提取总 RNA。根据参考文献[4]由 Primier4.1 软件设计小鼠 HMGB1 和内参照 β-actin 引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。小鼠 HMGB1 引物:上游引物:5'-CCG AAT TCG CTT CTG TCA ACT TCT CAG AGT TTT CC-3'; 下游引物:5'-GCG TAA TAC GAC TCA CTA TAG GGC GAG GAT CCC GAA GGA GGC CTC TTG GGT GCA TTG-3'; 扩增产物大小为 210 bp 左右。小鼠 β-actin 引物:上游引物:5'-TCA TGA AGT GTG ACG TTG ACA TCC GT-3'; 下游引物:5'-CCT AGA AGC ATT TGC GGT GCA CGA TG-3';扩增产物大小为 284 bp 左右。

RT-PCR 扩增:参照试剂盒操作说明书进行。逆转录反应体系 10 μl, 逆转录反应条件:30℃10 min、50℃30 min、99℃5 min、5℃5 min;PCR 扩增反应体系 50 μl,PCR 扩增反应条件:94℃ AMV RT 灭活和 RNA/cDNA/引物变性 2 min、94℃ 变性 30 s、60℃退火 30 s、72℃延伸 20 s、35 个 cycles;72℃延伸 7 min、4℃soak。反应结束后,取 PCR 扩增产物 5 ml,在 1.5%的琼脂糖凝胶上点样,90 V 电压电泳 20 min,紫外灯下观察结果。利用凝胶成像分析系统进行紫外光成像和图形分析,测出各条带的光密度值,结果以 HMGB1 条带的光密度值/β-actin 条带的光密度值表示。

1.2.4 细胞核蛋白与细胞浆蛋白提取 按试剂盒说明书进行。具体步骤如下:收集细胞沉淀,每 20 ml 细胞沉淀中加入 200 ml 添加了 PMSF 的细胞浆蛋白抽提试剂 A,最高速剧烈 Vortex 5 s,冰浴 10~15 min;加入细胞浆蛋白抽提试剂 B 10 ml,最高速剧烈 Vortex 5 s,冰浴 1 min,最高速剧烈 Vortex 5 s,4℃、12 000~16 000 g 离心 5 min,立即吸取上清至一预冷的塑料管中,即为细胞浆蛋白;于沉淀中加入 50 ml 添加了 PMSF 的细胞核蛋白抽提试剂,最高速剧烈 Vortex 15~30 s,放回冰浴中,每隔 1~2 min 再高速剧烈 Vortex 15~30 s,共 30 min,4℃、12 000~16 000 g 离心 10 min, 立即吸取上清至一预冷的塑料管中,即为细胞核蛋白。

1.2.5 细胞免疫化学、共聚焦显微镜观察 将对数生长期的 RAW264.7 细胞在载有血盖片的 24 孔培养板中(1×10^6 个/孔)中培养 12 h 后,加入含 100 ng/ml LPS 的 RPMI1640 培养液培养 0、6、12、18、24、30、36、42 h 和 48 h,用 0.01 mol/L PBS 漂洗,4%多聚甲醛室温下固定 30 min,3% H_2O_2 封闭 30 min,加正常封闭血清室温下孵 10 min,加入兔抗 HMGB1 多克隆抗体(1:250),置湿盒内 4℃ 过夜;加二抗(FITC 标记的二

抗),置湿盒内置湿盒内 4℃ 过夜;加 50 mg/ml PI,室温孵育 10~30 min;50%的甘油封片;激光共聚焦显微镜观察,成像。

1.2.6 ELISA 检测方法 按双抗体夹心法 ELISA 检测试剂盒说明书进行。

1.2.7 统计学处理 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示。两组间比较用 t 检验,$P<0.05$ 有统计学差异,$P<0.01$ 有显著性差异。所有数据应用 SPSS12.0 统计软件进行数据分析。

2 结 果

2.1 LPS 刺激后 RAW264.7 细胞 HMGB1 mRNA 的表达

用 100 ng/ml 的 LPS 刺激 RAW264.7 细胞,提取每一时相点细胞总 RNA,行 RT-PCR 扩增,1.5%的琼脂糖凝胶电泳,结果显示:在 210 bp 左右的位置处有一条明显的 DNA 条带,与 HMGB1 的编码基因大小一致;在 284 bp 左右有一条明显的 DNA 带,与 β-actin 的编码基因大小一致,无非特异性电泳带。以 β-actin 的 DNA 条带作为内参,LPS 刺激后 0~18 h RAW264.7 细胞内 HMGB1 mRNA 基因表达无明显变化,24、30 h 和 36 h RAW264.7 细胞内 HMGB1 mRNA 基因表达明显增高,与 0~18 h 相比,有显著性差异($P<0.01$)(图 1,图 2)。

2.2 LPS 刺激后 RAW264.7 细胞培养液中 HMGB1 蛋白含量

用 Western blot 检测培养液中 HMGB1 蛋白水平,结果显示,LPS 刺激后 0~12 h,细胞培养液中 HMGB1 的含量较低,几乎无法检测出;LPS 刺激后 18 h 开始,细胞培养液中 HMGB1 的含量明显增加,并一直持续到 36 h,与 LPS 刺激后 0~12 h 相比,有显著性差异($P<0.01$)(图 3,图 4)。

2.3 LPS 刺激后 RAW264.7 细胞培养液中 TNF-α、IL-6 的水平

用双抗体夹心法检测细胞培养液中 TNF-α、IL-6 的含量,结果显示,细胞培养液中 TNF-α、IL-6 的含量在 LPS 刺激后 1 h 开始增高,2 h 达到高峰,与 0 h 相比,有显著性差异($P<0.01$,图 5)。

2.4 LPS 刺激后 RAW264.7 细胞浆和细胞核内 HMGB1 蛋白含量

用 Western blot 检测细胞核和细胞浆 HMGB1 蛋白含量,结果显示,LPS 刺激后 0、6 h,培养细胞胞浆中 HMGB1 蛋白含量少,12~48 h 细胞浆中 HMGB1 蛋白含量逐渐增加,与 0 h 相比有显著性差异($P<0.01$)。LPS 刺激后 0 h,胞核中 HMGB1 蛋白含量较高,12~24 h 细胞核内 HMGB1 含量逐渐减少,与 0 h 相比有显著性差异($P<0.01$);30~48 h 细胞核内 HMGB1 含量又逐渐增多,与 12~24 h 相比有显著性差异($P<0.01$)(图 6、图 7)。

2.5 LPS 刺激后 RAW264.7 细胞内 HMGB1 蛋白的分布

细胞免疫化学、共聚焦显微镜观察结果显示,LPS 刺激后 0 h,细胞浆呈弱的绿色荧光染色,6 h 后细胞浆中荧光染色开

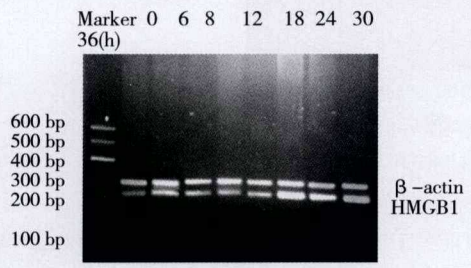


图 1 100 ng/ml LPS 刺激后 RAW264.7 细胞 HMGB1 mRNA 的表达

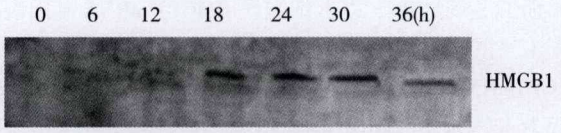
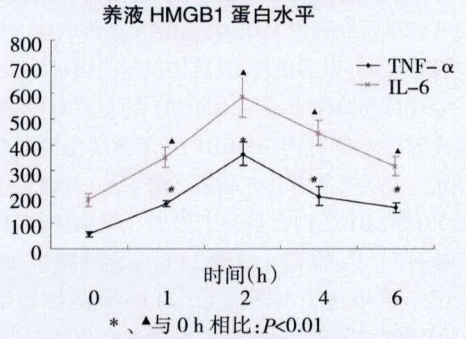
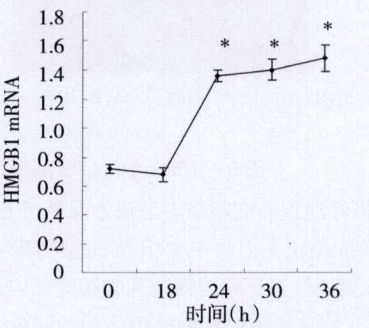


图 3 100 ng/ml LPS 刺激后 RAW264.7 细胞培养液 HMGB1 蛋白水平



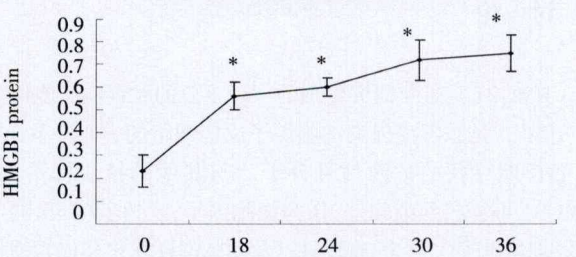
*、▲与 0 h 相比:$P<0.01$

图 5 100 ng/ml LPS 刺激后 RAW264.7 细胞培养液中 TNF-α、IL-6 的含量(pg/ml)



* 与 0 h 相比:$P<0.01$

图 2 100 ng/ml LPS 刺激后 RAW264.7 细胞 HMGB1 mRNA 的表达



* 与 0 h 相比,$P<0.01$

图 4 100 ng/ml LPS 刺激后 RAW264.7 细胞培养液 HMGB1 蛋白水平

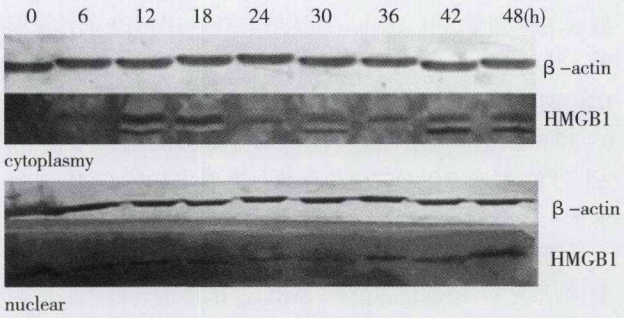
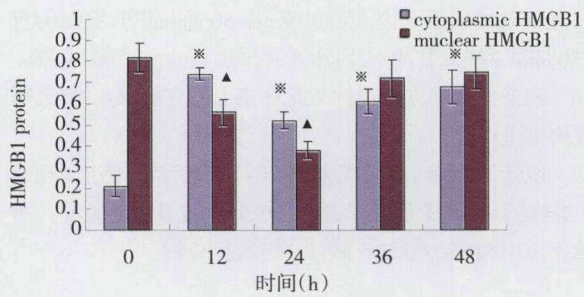
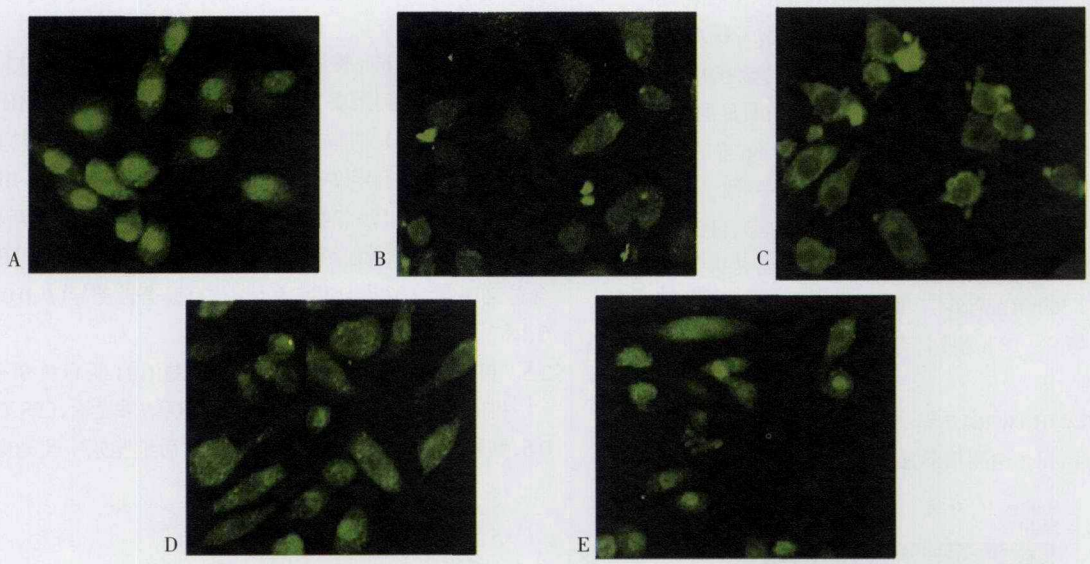


图 6 100 ng/ml LPS 刺激后 RAW264.7 细胞胞浆和胞核内 HMGB1 蛋白水平



※与 0 h 相比，$P<0.01$；▲与 0 h 相比，$P<0.01$

图 7 100 ng/ml LPS 刺激后 RAW264.7 细胞胞浆和胞核内 HMGB1 蛋白的表达



A.100 ng/ml LPS 刺激后 0 h；B. 100 ng/ml LPS 刺激后 12 h；C. 100 ng/ml LPS 刺激后 24 h；D. 100 ng/ml LPS 刺激后 36 h；E. 100 ng/ml LPS 刺激后 48 h

图 8 100 ng/ml LPS 刺激后 RAW264.7 细胞内 HMGB1 免疫荧光染色

始增强，12～48 h 培养细胞的细胞浆内呈强的绿色荧光染色。LPS 刺激后 0 h，荧光染色主要集中在培养细胞的细胞核，细胞核呈强的绿色荧光染色；6 h 后培养细胞的细胞核内荧光染色逐渐减弱，到 24 h 培养细胞的细胞核内呈弱的绿色荧光染色；30～48 h 细胞核内荧光染色又逐渐增强（图 8）。

3 讨 论

HMGB1 是近年研究发现的一种重要的脓毒症“晚期炎性介质”，是脓毒症促炎细胞因子反应网络的中心环节，是人们长期寻找的危险信号分子。与其他的核蛋白不同，HMGB1 可释放到细胞外，作为细胞因子，发挥着促炎、调节神经细胞轴突生长、肿瘤转移以及动脉粥样硬化和血管损伤后再狭窄等多种病理生理效应[5,6]。近年研究发现，细胞外的 HMGB1 可能作为潜在的“晚期”炎症介质参与脓毒症的发病过程，并作为脓毒症前炎性细胞因子反应网络的中心环节，在脓毒症的发生发展中起着十分重要的作用[7～10]。尽管目前对 HMGB1 在脓毒症发生发展及引起多器官功能衰竭中的作用有了较多的认识和肯定，但脓毒症时 HMGB1 释放的规律仍然未完全阐明。

目前关于 LPS 刺激后巨噬细胞内 HMGB1 mRNA 基因表达有无变化以及如何变化尚有争议。文献报道用 LPS 刺激巨噬细胞后 24 h 以内细胞内 HMGB1 mRNA 基因表达无明显表化[7]，而 LPS 刺激 24 h 以上细胞内 HMGB1 mRNA 基因表达情况未见报道。本研究采用 LPS 刺激巨噬细胞，检测细胞内 HMGB1mRNA 的表达水平，结果显示，LPS 刺激后 0～18 h RAW264.7 细胞内 HMGB1 mRNA 基因表达无明显变化，24 h 后 RAW264.7 细胞内 HMGB1 mRNA 基因表达明显增强。提示 LPS 刺激后细胞内 HMGB1 mRNA 基因表达上调出现时间晚，在刺激 24 h 以后出现，其具体机制尚需进一步研究。

尽管目前对脓毒症时 HMGB1 的释放有较多的研究，但脓毒症时巨噬细胞内 HMGB1 的含量变化情况尚缺乏深入的研究。文献报道用 LPS 刺激巨噬细胞，刺激后 12～24 h 细胞浆中 HMGB1 蛋白含量逐渐增加，细胞核内 HMGB1 含量逐渐减少[7,11～13]，而 LPS 刺激 24 h 以上细胞中 HMGB1 的变化情况罕见报道。本研究采用 LPS 刺激巨噬细胞，检测 HMGB1 蛋白的释放和在细胞内含量变化情况，结果显示，LPS 刺激后 18 h 开始，细胞培养液中 HMGB1 的含量明显增

加,并一直持续到 36 h。用 Western blot 和细胞免疫化学检测 LPS 刺激后细胞浆和细胞核内 HMGB1 蛋白的含量变化,结果显示,刺激前 HMGB1 蛋白主要分布在细胞核内,胞浆中含量少,刺激后 12 ~ 24 h 细胞浆中 HMGB1 蛋白含量逐渐增加, 细胞核内 HMGB1 含量逐渐减少;LPS 刺激后 30 ~ 48 h 细胞浆中 HMGB1 蛋白含量维持在较高水平, 而细胞核内 HMGB1 含量又逐渐增加; 核内 HMGB1 蛋白含量的增加与 HMGB1 mRNA 基因表达上调一致,表明 LPS 刺激后 30 ~ 48 h 巨噬细胞核内有新的 HMGB1 蛋白合成,新合成的 HMGB1 补充细胞核内减少的 HMGB1 蛋白,并进一步从细胞核转位到细胞浆,再释放到细胞外。以上结果表明 LPS 刺激后 0 ~ 24 h 巨噬细胞内 HMGB1 的释放来自先期合成的储备,LPS 刺激后早期细胞核内先期合成的 HMGB1 逐渐由细胞核转位到细胞浆,并释放到细胞外,导致 LPS 刺激后 0 ~ 24 h 细胞核内 HMGB1 含量逐渐减少,细胞浆中 HMGB1 蛋白含量逐渐增加;24 h 后细胞内 HMGB1 mRNA 基因表达上调,开始新合成 HMGB1 蛋白,细胞内出现新合成的 HMGB1,以补充细胞核和细胞浆内因释放到细胞外而减少的 HMGB1, 引起胞浆和胞核内 HMGB1 蛋白含量增加。

本实验检测了 LPS 刺激后巨噬细胞养液中 TNF-α、IL-6 的含量,结果显示,细胞培养液中 TNF-α、IL-6 的含量在 LPS 刺激后 1 h 开始增高,2 h 达到高峰,而 LPS 刺激后细胞培养液中 HMGB1 的含量增加出现在刺激后 18 h, 表明 LPS 刺激后 HMGB1 释放的时间明显晚于 TNF-α、IL-6 释放时间,充分证明 HMGB1 是一种脓毒症"晚期炎性介质"。

参 考 文 献

[1] Angus D C, Linde-Zwirble W T, Lidicker J, et al. Epidemiology of severe sepsis in the United States: analysis of incidence, outcome, and associated costs of care[J]. Crit Care Med, 2001, 29(7): 1303-1310.

[2] Mantell L L, Parris W R, Ulloa L. Hmgb-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders[J]. Shock, 2006, 25(1): 4-11.

[3] Chen X, Li W, Wang H. More tea for septic patients-Green tea may reduce endotoxin-induced release of high mobility group box 1 and other pro-inflammatory cytokines[J]. Med Hypotheses, 2006, 66(3): 660-663.

[4] Beatriz R M, Mahendar O, Jianhua Li, et al. IFN-γ induces high mobility group Box 1 protein release partly through a TNF-dependent mechanism[J]. J Immuno, 2003, 170(7): 3890-3897.

[5] Sapojnikova N, Maman J, Myers F A, et al. Biochemical observation of the rapid mobility of nuclear HMGB1[J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1729(1): 57-63.

[6] Li W, Sama A E, Wang H. Role of HMGB1 in cardiovascular diseases[J]. Curr Opin Pharmacol, 2006, 6(2): 130-135.

[7] Wang H C, Bloom O, Zhang M H, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice[J]. Science, 1999, 285(5425): 248-251.

[8] Wang H, Li W, Li J, et al. The aqueous extract of a popular herbal nutrient supplement, Angelica sinensis, protects mice against lethal endotoxemia and sepsis[J]. J Nutr, 2006, 136(2): 360-365.

[9] Lin X, Yang H, Sakuragi T, et al. Alpha-chemokine receptor blockade reduces high mobility group box 1 protein-induced lung inflammation and injury and improves survival in sepsis[J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 2005, 289(4): 583-590.

[10] Sunden-Cullberg J, Norrby-Teglund A, Treutiger C J. The role of high mobility group box-1 protein in severe sepsis[J]. Current Opinion in Infectious Diseases, 2006, 19(3): 231-236.

[11] Fiuza C, Bustin M, Talwar S, et al. Inf lammatory promoting activity of HMGB1 on human microvascular endothelial cells[J]. Blood, 2003, 101(7): 2652-2660.

[12] Pachot A, Monneret G, Voirin N, et al. Longitudinal study of cytokine and immune transcription factor mRNA expression in septic shock [J]. Clinical Immunology, 2005, 114(1): 61-69.

[13] Harris H E, Andersson U. The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator[J]. Eur J Immunol, 2004, 34(6): 1503-1512.

(责任编辑:关蕴良)