

· 论著 ·

高迁移率族蛋白 1 对低氧状态下肺动脉平滑肌细胞的影响研究

扫描二维码
查看更多

李鸣远, 李倩, 武云

作者单位: 830054新疆维吾尔自治区乌鲁木齐市, 新疆医科大学第一附属医院全科医学科

通信作者: 武云, E-mail: wuyun8009@163.com

【摘要】 目的 探讨高迁移率族蛋白1 (HMGB1) 对低氧状态下肺动脉平滑肌细胞 (PASMC) 的影响。方法 本实验时间为2022年3月—2023年9月。将PASMC分为对照组、低氧组、HMGB1中和抗体 (HMGB1 Ab) 组、HMGB1 Ab+单钠尿酸盐 (MSU) 组, 对照组: PASMC置于37 ℃、21% O₂、5% CO₂培养箱中常氧培养24 h; 低氧组: PASMC置于37 ℃、3% O₂、5% CO₂培养箱中低氧培养24 h; HMGB1 Ab组: PASMC置于37 ℃、3% O₂、5% CO₂培养箱中低氧培养24 h, 加入终浓度为20 μg/ml的HMGB1 Ab培养3 h; HMGB1 Ab+MSU组: PASMC置于37 ℃、3% O₂、5% CO₂培养箱中低氧培养24 h, 加入终浓度为20 μg/ml的HMGB1 Ab培养3 h, 然后加入终浓度为200 g/L的MSU培养3 h。采用CCK-8法检测各组细胞增殖活力, 细胞划痕实验检测各组细胞迁移能力, 免疫荧光染色观察各组PASMC中α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA) 表达情况, 实时荧光定量反转录聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 检测各组PASMC中HMGB1及细胞焦亡相关因子 [NLRP3、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶1 (Caspase-1)、gasdermin D (GSDMD)、白介素1β (IL-1β)、白介素18 (IL-18)] 的mRNA相对表达量, Western blot法检测各组PASMC中HMGB1及细胞焦亡相关因子相对表达量。**结果** 低氧组细胞增殖活力高于对照组, HMGB1 Ab组细胞增殖活力低于低氧组, HMGB1 Ab+MSU组细胞增殖活力高于HMGB1 Ab组 ($P<0.05$)。低氧组划痕愈合率高于对照组, HMGB1 Ab组划痕愈合率低于低氧组, HMGB1 Ab+MSU组划痕愈合率高于HMGB1 Ab组 ($P<0.05$)。免疫荧光染色结果显示, 与对照组比较, 低氧组细胞荧光染色强度明显增强, α-SMA表达增加; 与低氧组比较, HMGB1 Ab组细胞荧光染色强度明显减弱, α-SMA表达减少; 与HMGB1 Ab组比较, HMGB1 Ab+MSU组细胞荧光染色强度明显增强, α-SMA表达增加。低氧组PASMC中HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1β、IL-18 mRNA及蛋白相对表达量高于对照组, HMGB1 Ab组PASMC中HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1β、IL-18 mRNA及蛋白相对表达量低于低氧组, HMGB1 Ab+MSU组PASMC中HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1β、IL-18 mRNA及其相对表达量高于HMGB1 Ab组 ($P<0.05$)。**结论** HMGB1与低氧状态下PASMC增殖、迁移相关, 靶向HMGB1 Ab能够抑制低氧诱导的PASMC异常增殖、迁移, 该作用与其抑制细胞焦亡有关。

【关键词】 肺动脉高压; 肌细胞, 平滑肌; 低氧; 高迁移率族蛋白1; 细胞焦亡**【中图分类号】** R 541.5 **【文献标识码】** A DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2024.00.031**Effect of High Mobility Group Box 1 on Pulmonary Arterial Smooth Muscle Cell Under Hypoxic Conditions**

LI Mingyuan, LI Qian, WU Yun

Department of General Medicine, the First Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi 830054, China

Corresponding author: WU Yun, E-mail: wuyun8009@163.com

【Abstract】 **Objective** To investigate the effect of high mobility group box 1 (HMGB1) on pulmonary arterial smooth muscle cell (PASMC) under hypoxic conditions. **Methods** This experiment was conducted from March 2022 to September 2023. PASMC was divided into control group, hypoxia group, HMGB1 neutralizing antibody (HMGB1 Ab) group, HMGB1 Ab+monosodium urate (MSU) group. Control group: PASMC was incubated at 37 ℃, 21% O₂, and 5% CO₂ incubator under normal oxygen for 24 hours; hypoxia group: PASMC was incubated at 37 ℃, 3% O₂, and 5% CO₂ in a low oxygen incubator for 24 hours; HMGB1 Ab group: PASMC was incubated at 37 ℃, 3% O₂, and 5% CO₂ in a low oxygen incubator for 24 hours, add a final concentration of 20 μg/ml HMGB1 Ab cultivate for 3 hours; HMGB1 Ab+MSU group: PASMC was incubated at 37 ℃, 3% O₂, and 5% CO₂ in a low oxygen incubator for 24 hours, add a final concentration of 20 μg/ml HMGB1 Ab cultivate for 3 hours, then add a final concentration of 200 g/L MSU cultivate for 3 hours. The cell proliferation activity of each group was detected by CCK-8, the cell migration ability of each group was detected by cell

scratch assay, the expression of α -smooth muscle actin (α -SMA) in PASMC of each group was observed by immunofluorescence staining, the mRNA relative expression levels of HMGB1 and pyroptosis related factors [NLRP3, cysteinyl aspartate specific proteinase 1 (Caspase-1), gasdermin D (GSDMD), interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin 18 (IL-18)] in PASMC of each group were detected by real time quantity polymerase chain reaction (qRT-PCR), the relative expression levels of HMGB1 and pyroptosis related factors in PASMC of each group were detected by Western blot. **Results** The cell proliferation activity of hypoxia group was higher than that of control group, the cell proliferation activity of HMGB1 Ab group was lower than that of hypoxia group, and the cell proliferation activity of HMGB1Ab+MSU group was higher than that of HMGB1 Ab group ($P < 0.05$). The scratch healing rate of hypoxia group was higher than that of control group, the scratch healing rate of HMGB1 Ab group was lower than that of hypoxia group, and the scratch healing rate of HMGB1Ab+MSU group was higher than that of HMGB1 Ab group ($P < 0.05$). Immunofluorescence staining results showed that, compared with the control group, the fluorescence staining intensity and α -SMA expression of cells in hypoxia group were significantly increased; compared with hypoxia group, the fluorescence staining intensity and α -SMA expression of cells in HMGB1 Ab group were significantly decreased; compared with HMGB1 Ab group, the fluorescence staining intensity and α -SMA expression of HMGB1Ab+MSU group was significantly increased. The mRNA and protein relative expression levels of HMGB1, NLRP3, Caspase-1, GSDMD, IL-1 β and IL-18 in PASMC in hypoxia group were higher than those in control group, the mRNA and protein relative expression levels of HMGB1, NLRP3, Caspase-1, GSDMD, IL-1 β and IL-18 in PASMC in HMGB1 Ab group were lower than those in hypoxia group, the mRNA and protein relative expression levels of HMGB1, NLRP3, Caspase-1, GSDMD, IL-1 β and IL-18 in PASMC in HMGB1Ab+MSU group were higher than those in HMGB1 Ab group ($P < 0.05$). **Conclusion** HMGB1 is associated with the proliferation and migration of PASMC under hypoxic conditions. Targeting HMGB1 Ab can inhibit hypoxia induced abnormal proliferation and migration of PASMC, which is related to the inhibition of pyroptosis.

【Key words】 Pulmonary arterial hypertension; Myocytes, smooth muscle; Hypoxia; High mobility group protein 1; Pyroptosis

肺动脉高压 (pulmonary arterial hypertension, PAH) 是一种由多因素所致的呼吸系统疾病, 表现为进行性肺血管重塑、肺动脉压持续升高, 随着病情持续进展, 会引发右心室代偿性肥厚, 最终导致右心衰竭^[1]。以中小肺动脉壁增厚和管腔闭塞为特征的肺血管重塑是PAH患者肺血管阻力和肺动脉压升高的主要原因。肺动脉平滑肌细胞 (pulmonary arterial smooth muscle cell, PASMC) 作为肺血管壁的主要成分, 其异常增殖和迁移是肺血管重塑的主要特征, 也是PAH发生和疾病进展的基础^[2-3]。细胞焦亡是一种新型程序性细胞死亡形式, 表现为细胞膜不断扩张, 引起细胞肿胀、破裂, 并释放大量促炎因子。在低氧环境下PASMC会发生细胞焦亡, 这与PAH的发病机制密切相关^[4]。

高迁移率族蛋白1 (high mobility group box 1, HMGB1) 是一种染色质相关蛋白, 在某些应激条件下, 其从巨噬细胞、单核细胞、内皮细胞或其他免疫活性细胞中释放, 并通过与受体结合来促进细胞增殖、迁移和分化^[5]。HMGB1现已被确定为PAH的生物标志物, 在PAH患者的肺组织和血清中HMGB1水平异常升高, 并且与疾病严重程度呈正相关^[6]。HMGB1靶向治疗可能成为PAH的有效治疗策略。然而, HMGB1如何驱动PAH发病的分子机制仍有待阐明。基于此, 本研究以PASMC为研究对象, 观察HMGB1对低氧状态下PASMC增殖和迁移的影响, 并进一步探讨HMGB1中和

抗体 (HMGB1 Ab) 治疗PAH的可能机制。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

本实验时间为2022年3月—2023年9月。PASMC购于武汉云克隆科技股份有限公司, HMGB1 Ab购于沈阳万类生物科技有限公司, 核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3 (nucleotide-binding oligomerization domain like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体激动剂——单钠尿酸盐 (monosodium urate, MSU) 购于美国InvivoGen公司, 胎牛血清、牛血清白蛋白、DMEM培养基及胰酶购于美国Hyclone公司, CCK-8细胞增殖检测试剂盒购于上海贝博生物科技有限公司, Triton X-100购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 染料购于北京康瑞纳生物科技股份有限公司, TRIzol RNA提取试剂盒购于美国Invitrogen公司, cDNA第一链合成试剂盒和探针法荧光定量PCR检测试剂盒购于南京诺唯赞生物科技股份有限公司, Bradford蛋白质定量试剂盒购于北京百奥莱博科技有限公司, 封闭用脱脂奶粉购于北京伊塔生物科技有限公司, RIPA裂解液和ECL试剂液购于上海碧云天生物技术研究, 聚偏二氟乙烯 (polyvinylidene fluoride, PVDF) 膜购于美国Thermo Fisher公司, AlexaFluor 488荧光标记的山羊抗兔IgG抗体和辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG抗体购于北京百

奥莱博科技有限公司, α -平滑肌肌动蛋白 (α -smooth muscle actin, α -SMA)、HMGB1、NLRP3、天冬氨酸蛋白水解酶1 (cysteiny aspartate specific proteinase 1, Caspase-1)、gasdermin D (GSDMD)、白介素1 β (interleukin 1 β , IL-1 β)、白介素18 (interleukin 18, IL-18) 兔多克隆抗体以及GAPDH兔多克隆抗体购于英国Abcam公司。

1.2 PSMC培养、分组及处理

将PSMC置于含10%胎牛血清的DMEM培养基, 在37℃、5% CO₂条件下培养, 常规传代, 选用第3~5代细胞进行后续实验。将PSMC分为4组: (1) 对照组: PSMC置于37℃、21% O₂、5% CO₂培养箱中常氧培养24 h; (2) 低氧组: PSMC置于37℃、3% O₂、5% CO₂培养箱中低氧培养24 h; (3) HMGB1 Ab组: PSMC置于37℃、3% O₂、5% CO₂培养箱中低氧培养24 h, 加入终浓度为20 μ g/ml的HMGB1 Ab培养3 h; (4) HMGB1 Ab+MSU组: PSMC置于37℃、3% O₂、5% CO₂培养箱中低氧培养24 h, 加入终浓度为20 μ g/ml的HMGB1 Ab培养3 h, 然后采用终浓度为200 g/L的MSU活化细胞3 h。

1.3 CCK-8法检测细胞增殖活力

将PSMC以5 \times 10³个/孔的密度种植在96孔板中, 每组设置6个复孔, 分组及处理同1.2。按照CCK-8细胞增殖检测试剂盒说明书, 每孔加入10 μ l CCK-8, 继续培养4 h, 采用酶标仪测定各孔在450 nm波长处的OD值, 代表细胞增殖活力。

1.4 细胞划痕实验检测细胞迁移能力

胰酶消化各组PSMC, 制备细胞悬液, 按照5 \times 10⁵个/孔的密度将PSMC种植在划好标记线的6孔板中, 生长24 h待细胞铺满后, 使用10 μ l无菌枪头在细胞的中央区域垂直划线, 使划痕与标记线相交, PBS洗去划下的细胞。将细胞放入37℃、5% CO₂条件下培养。24 h后取出细胞培养板, 在显微镜下观察划痕并拍照, 以0 h作为对照, 采用Image Pro Plus分析划痕愈合情况,

计算划痕愈合率 [划痕愈合率=(0 h划痕宽度-24 h划痕宽度)/0 h划痕宽度 \times 100%], 代表细胞迁移能力。

1.5 免疫荧光染色观察PSMC中 α -SMA表达情况

将PSMC以1 \times 10⁴个/孔的密度种植于含盖玻片的24孔板上, 过夜培养至细胞爬片贴壁后, 进行对应分组处理。采用PBS洗涤爬片, 采用4%多聚甲醛溶液固定10 min, 吸去多余液体, 再次采用PBS洗涤后加入0.3% Triton X-100透化10 min, 采用PBS洗涤, 采用5%牛血清白蛋白封闭非特异性结合位点。在玻片上滴加 α -SMA兔多克隆抗体(1:200), 放入湿盒内于4℃孵育过夜。次日, 采用PBS洗涤后滴加AlexaFluor 488荧光标记的山羊抗兔IgG抗体(1:500), 常温下避光孵育2 h。采用PBS再次洗涤后, 进行DAPI细胞核染色, 采用抗荧光淬灭封片剂封固, 晾干, 荧光共聚焦显微镜下观察细胞染色情况并拍照。

1.6 实时荧光定量反转录聚合酶链式反应 (real time quantity polymerase chain reaction, qRT-PCR) 检测PSMC中HMGB1及细胞焦亡相关因子 (NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18) 的mRNA相对表达量

采用TRIzol法提取各组PSMC总RNA, 吸取1 μ l总RNA样品, 通过微量光度计测定样品纯度与浓度, 采用1.5%琼脂糖凝胶电泳法检测RNA完整性。按照cDNA第一链合成试剂盒说明书步骤反转录合成cDNA。通过ABI QuantStudio5定量PCR仪测定各目的基因mRNA相对表达量, 根据探针法荧光定量PCR检测试剂盒说明书配置反应体系, 混匀后置于定量系统上, 设置反应条件为: 95℃ 15 min, 1个循环; 95℃ 10 s、60℃ 30 s, 共40个循环, 各引物序列见表1, 采用2^{- Δ Δ Ct}法分析目的基因相对表达量, 以 β -actin为内参基因。实验重复3次。

1.7 Western blot法检测PSMC中HMGB1及细胞焦亡相关因子 (NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18) 相对表达量

取各组PSMC, 加入适量RIPA裂解液, 冰上静置

表1 引物序列
Table 1 Primer sequence

基因	上游引物	下游引物
HMGB1	5'-CTGCCTTCTCTGTGACAAAGTGGAC-3'	5'-ACATACTCAGCACCAGCATCACC-3'
NLRP3	5'-CGGTGACCTTGTGTGTGCTT-3'	5'-TCATGTCCTGAGCCATGGAAG-3'
Caspase-1	5'-CTGAGTCCGCAGCAGGTG-3'	5'-CCACATCCGCCGTAAAAGAATG-3'
GSDMD	5'-AAGATCGTGGATCATGCCGT-3'	5'-CTCAGGAGGCACTAGGGCTT-3'
IL-1 β	5'-AAATGCCTCGTGTCTGA-3'	5'-AGGCCACAGGGATTTTGTGCG-3'
IL-18	5'-ACCACTTTGGCAGACTTCACT-3'	5'-ACACAGGCGGGTTTCTTTTG-3'
β -actin	5'-GACCCAGATCATGTTTGGAC-3'	5'-AGGCATACAGGACAACACA-3'

注: HMGB1=高迁移率族蛋白1, NLRP3=核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3, Caspase-1=天冬氨酸蛋白水解酶1, GSDMD=gasdermin D, IL-1 β =白介素1 β , IL-18=白介素18。

裂解30 min，于4 ℃条件下以12 000 r/min离心10 min（离心半径12.5 cm），获取上清液即为蛋白，采用Bradford法测定其浓度。将蛋白加热变性，将经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE）分离变性后的等量蛋白电转至PVDF膜上，采用5%脱脂牛奶封闭非特异性结合位点后，分别加入稀释的HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1β、IL-18抗体液（1：1 000），以GAPDH作为内参蛋白，于4 ℃孵育过夜。次日，加入稀释后的相应二抗液（1：5 000），室温孵育1 h，滴加ECL试剂液覆盖，曝光显色，采用Image J软件分析各目的蛋白条带灰度值，以目的蛋白与内参蛋白条带灰度值之比作为蛋白相对表达量。实验重复3次。

1.8 统计学方法

采用Gradpad Prism软件（8.0版本）进行数据处理。计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 细胞增殖活力

CCK-8法检测结果显示，对照组、低氧组、HMGB1 Ab组、HMGB1 Ab+MSU组细胞增殖活力分别为(0.53 ± 0.06)、(0.89 ± 0.09)、(0.55 ± 0.06)、(0.87 ± 0.09)。四组细胞增殖活力比较，差异有统计学意义($F = 32.514, P < 0.001$)；其中低氧组细胞增

殖活力高于对照组，差异有统计学意义($P < 0.05$)；HMGB1 Ab组细胞增殖活力低于低氧组，差异有统计学意义($P < 0.05$)；HMGB1 Ab+MSU组细胞增殖活力高于HMGB1 Ab组，差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.2 细胞迁移能力

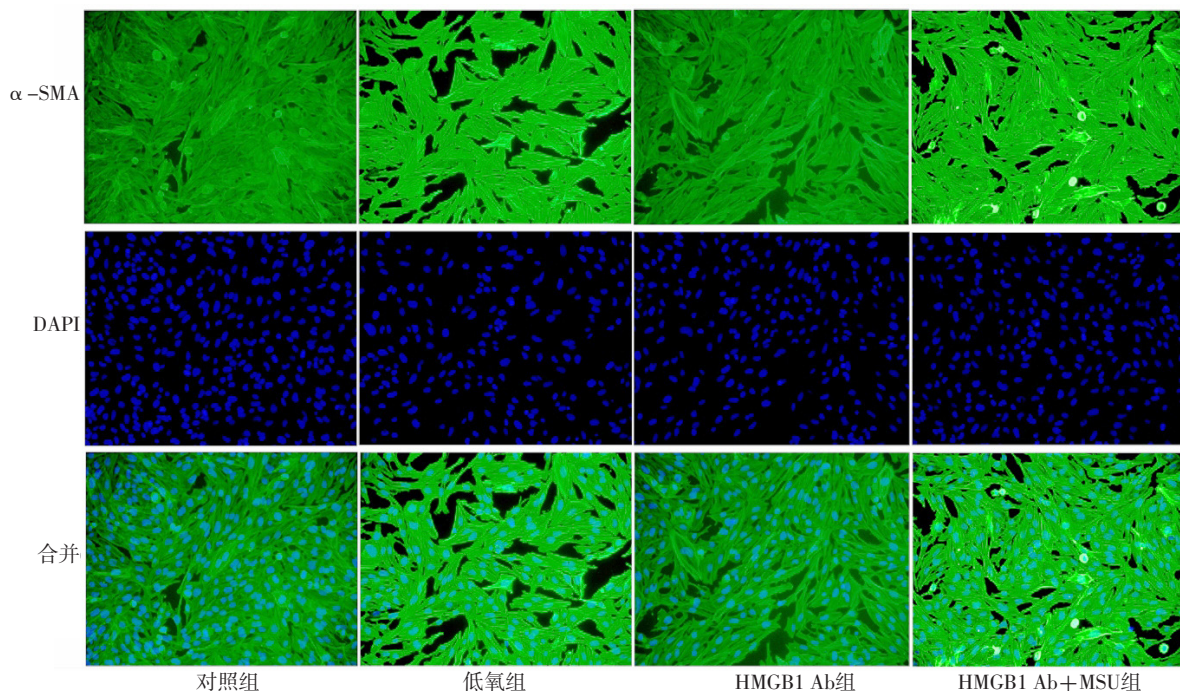
细胞划痕实验检测结果显示，对照组、低氧组、HMGB1 Ab组、HMGB1 Ab+MSU组划痕愈合率分别为(40.25 ± 4.21)%、(77.56 ± 7.94)%、(41.68 ± 4.30)%、(76.67 ± 7.82)%。四组划痕愈合率比较，差异有统计学意义($F = 241.996, P < 0.001$)；其中低氧组划痕愈合率高于对照组，差异有统计学意义($P < 0.05$)；HMGB1 Ab组划痕愈合率低于低氧组，差异有统计学意义($P < 0.05$)；HMGB1 Ab+MSU组划痕愈合率高于HMGB1 Ab组，差异有统计学意义($P < 0.05$)。

2.3 PASMCM中α-SMA表达情况

免疫荧光染色结果显示，与对照组比较，低氧组细胞荧光染色强度明显增强，α-SMA表达增加；与低氧组比较，HMGB1 Ab组细胞荧光染色强度明显减弱，α-SMA表达减少；与HMGB1 Ab组比较，HMGB1 Ab+MSU组细胞荧光染色强度明显增强，α-SMA表达增加，见图1。

2.4 PASMCM中HMGB1及细胞焦亡相关因子的mRNA相对表达量

qRT-PCR检测结果显示，四组PASMCM中HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1β、IL-18 mRNA



注：α-SMA=α-平滑肌肌动蛋白，DAPI=4', 6-二脒基-2-苯基吡啶，HMGB1 Ab=高迁移率族蛋白1中和抗体，MSU=单钠尿酸盐。

图1 各组PASC中α-SMA表达情况（免疫荧光染色，×100）

Figure 1 Expression of α-SMA in PASC in each group

相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 其中低氧组PASMC中HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18 mRNA相对表达量高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); HMGB1 Ab组PASMC中HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18 mRNA相对表达量低于低氧组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); HMGB1 Ab+MSU组PASMC中HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18 mRNA相对表达量高于HMGB1 Ab组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表2。

2.5 PASMC中HMGB1及细胞焦亡相关因子相对表达量

Western blot检测结果显示, 四组PASMC中HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18相对表达量比较, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 其中低氧组PASMC中HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18相对表达量高于对照组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); HMGB1 Ab组PASMC中HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18相对表达量低于低氧组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); HMGB1 Ab+MSU组PASMC中HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18相对表达量高于HMGB1 Ab组, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 见表3、图2。

3 讨论

PAH作为一种慢性破坏性心肺疾病, 对人类健康造

成严重威胁, 遗传因素和环境因素均是PAH发生发展的主要因素, 长期暴露于高海拔或继发性肺部疾病状态可造成肺泡缺氧, 导致肺动脉压逐渐升高, 造成心肺结构与功能被破坏^[7-8]。PASMC具有收缩和舒张功能, 可调节血压和血流量, 维持血液循环。正常状态下, PASMC处于稳定的终末分化阶段, 表现为收缩型; 而缺氧引起血管收缩异常, 导致肺血管阻力可逆性增加, 使PASMC由收缩型向合成型转化, 并获得异常的增殖和迁移能力, 引起肺血管重塑^[9]。 α -SMA是PASMC由收缩型向合成型转化的标志物^[10]。为了探索PAH发展的机制及有效治疗方案, 通常采用低氧诱导PASMC来模拟体外PAH模型。本研究结果显示, 低氧状态下PASMC增殖、迁移能力异常增高, α -SMA表达也明显增加。

HMGB1是一种普遍存在的DNA结合蛋白, 在各种病理生理过程中起着重要作用。HMGB1可以从坏死或受损细胞中被动释放, 在低氧条件下也可以由免疫细胞或组织主动分泌。当HMGB1进入细胞外空间时, 能够与受体结合, 并作为损伤相关分子发挥作用; 此外, HMGB1还通过作用于模式识别受体来传导细胞信号, 诱导促炎细胞因子的释放, 并加速炎症反应^[11-13]。目前, 大量研究表明, HMGB1在PAH的发病过程中发挥重要作用, 其可能是PAH的潜在治疗靶点^[14-15]。ZABINI等^[16]在特发性PAH和PAH患者血清中均检测到HMGB1水平升高, 并发现HMGB1通过激活c-Jun氨基末

表2 四组PASMC中HMGB1及细胞焦亡相关因子的mRNA相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 2 Comparison of mRNA relative expression levels of HMGB1 and pyroptosis related factors in PASMC among the four groups

组别	HMGB1	NLRP3	Caspase-1	GSDMD	IL-1 β	IL-18
对照组	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.05	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.06	1.00 \pm 0.05	1.00 \pm 0.06
低氧组	1.86 \pm 0.19 ^a	1.72 \pm 0.18 ^a	1.79 \pm 0.18 ^a	2.24 \pm 0.22 ^a	2.30 \pm 0.24 ^a	1.84 \pm 0.18 ^a
HMGB1 Ab组	1.16 \pm 0.11 ^b	1.31 \pm 0.13 ^b	1.35 \pm 0.13 ^b	1.51 \pm 0.13 ^b	0.98 \pm 0.09 ^b	1.01 \pm 0.10 ^b
HMGB1 Ab+MSU组	1.76 \pm 0.11 ^c	1.74 \pm 0.17 ^c	1.76 \pm 0.18 ^c	2.05 \pm 0.21 ^c	2.04 \pm 0.20 ^c	1.80 \pm 0.17 ^c
F值	53.540	38.127	42.394	78.643	95.701	60.228
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

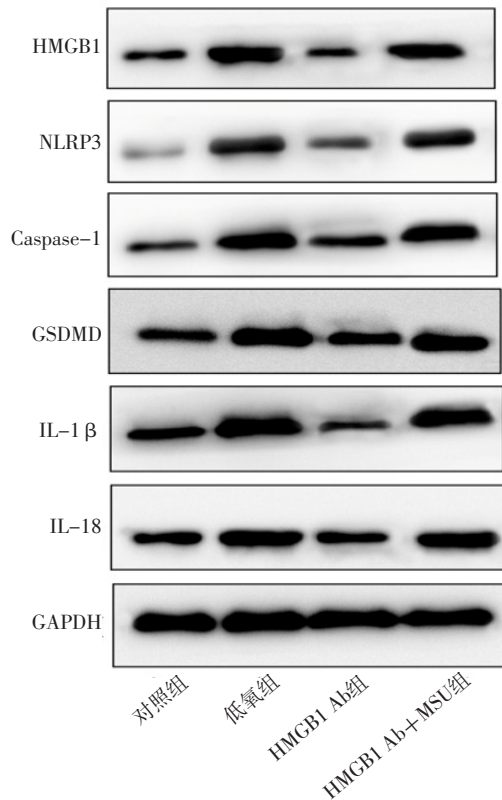
注: HMGB1 Ab=高迁移率族蛋白1中和抗体, MSU=单钠尿酸盐; ^a表示与对照组比较, $P < 0.05$; ^b表示与低氧组比较, $P < 0.05$; ^c表示与HMGB1 Ab组比较, $P < 0.05$ 。

表3 四组PASMC中HMGB1及细胞焦亡相关因子相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 3 Comparison of protein relative expression levels of HMGB1 and pyroptosis related factors in PASMC among the four groups

组别	HMGB1	NLRP3	Caspase-1	GSDMD	IL-1 β	IL-18
对照组	0.26 \pm 0.03	0.08 \pm 0.01	0.19 \pm 0.02	0.35 \pm 0.03	0.30 \pm 0.03	0.28 \pm 0.03
低氧组	0.94 \pm 0.09 ^a	0.76 \pm 0.08 ^a	0.83 \pm 0.08 ^a	1.10 \pm 0.12 ^a	1.18 \pm 0.13 ^a	0.94 \pm 0.09 ^a
HMGB1 Ab组	0.21 \pm 0.02 ^b	0.14 \pm 0.01 ^b	0.29 \pm 0.03 ^b	0.37 \pm 0.04 ^b	0.18 \pm 0.02 ^b	0.26 \pm 0.03 ^b
HMGB1 Ab+MSU组	0.89 \pm 0.08 ^c	0.77 \pm 0.08 ^c	0.81 \pm 0.08 ^c	1.02 \pm 0.10 ^c	1.01 \pm 0.11 ^c	0.92 \pm 0.10 ^c
F值	36.215	28.490	33.543	50.211	47.769	35.608
P值	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注: ^a表示与对照组比较, $P < 0.05$; ^b表示与低氧组比较, $P < 0.05$; ^c表示与HMGB1 Ab组比较, $P < 0.05$ 。



注：HMGB1=高迁移率族蛋白1，NLRP3=核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3，Caspase-1=天冬氨酸蛋白酶1，GSDMD=gasdermin D，IL-1 β =白介素1 β ，IL-18=白介素18。

图2 Western blot法检测四组PASM中HMGB1及细胞焦亡相关因子相对表达量的SDS-PAGE图

Figure 2 Electrophoretic map of protein relative expression levels of HMGB1 and pyroptosis related factors in PASM of four groups

端激酶而促进PASM和原代人动脉内皮细胞（primary arterial endothelial cell, PAEC）的增殖，从而诱导血管重塑；ZHANG等^[17]研究表明，HMGB1通过上调内质网应激相关蛋白表达而促进PASM的增殖和迁移，并发现利用甘草酸干扰HMGB1表达或4-苯基丁酸抑制内质网应激均能够减缓PAH的进展；LI等^[18]研究指出，HMGB1介导的晚期糖基化终产物受体（receptor for advanced glycation end products, RAGE）表达的增加促进了炎症反应，导致严重的肺功能障碍，加重了缺氧性PAH的症状。本研究结果显示，加入HMGB1 Ab处理后，PASM增殖、迁移能力降低， α -SMA表达也明显减少，表明HMGB1 Ab能够抑制低氧诱导的PASM异常增殖与迁移。

细胞焦亡是不同于凋亡和坏死的细胞死亡形式，NLRP3炎症小体是介导细胞焦亡的关键因子，其与ASC相互作用，募集Caspase-1前体并促进Caspase-1成熟体的产生，一方面，激活的Caspase-1剪切GSDMD后形成GSDMD-N端片段，该片段与脂质结合后会破坏细胞膜，并释放大促炎因子；另一方面，激活的

Caspase-1促进促炎细胞因子IL-1 β 和IL-18的成熟与释放，从而招募炎性细胞聚集，加重炎症反应^[19-21]。近年来，关于细胞焦亡参与PAH的研究报道越来越多，在低氧状态下PASM焦亡水平明显增加，而敲低PASM中的程序性死亡配体1（programmed death-ligand 1, PD-1）可抑制细胞焦亡，并减轻肺血管纤维化^[22]；低氧可诱导胶质瘤相关癌基因家族锌指1（glioma-associated oncogene family zinc finger 1, GLI1）异常表达，而抑制GLI1可减弱PASM焦亡，起到抑制PAH进展的作用^[23]；敲低驱动蛋白家族成员23（kinesin family member 23, KIF23）可抑制PASM焦亡和增殖，进而抑制PAH中肺动脉压升高、右心室肥厚和降低肺血管阻力^[24]。本研究结果显示，HMGB1 Ab可以抑制PASM中HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18 mRNA及其蛋白相对表达量，推测HMGB1 Ab抑制低氧诱导的PASM异常增殖与迁移的作用可能与调控细胞焦亡有关。为了进一步验证这一推测，采用NLRP3炎症小体激动剂——MSU处理PASM，结果显示，PASM增殖、迁移能力又明显升高， α -SMA表达明显增加，同时HMGB1、NLRP3、Caspase-1、GSDMD、IL-1 β 、IL-18 mRNA及其蛋白相对表达量升高，提示HMGB1 Ab通过抑制细胞焦亡来抑制低氧诱导的PASM异常增殖与迁移。

4 结论

综上所述，HMGB1与低氧状态下PASM增殖、迁移相关，HMGB1 Ab能够抑制低氧诱导的PASM异常增殖与迁移，该作用与其抑制细胞焦亡有关，这可为PAH的治疗提供新思路。但本研究仅从细胞水平上证实了HMGB1对低氧状态下PASM的影响，而HMGB1参与PAH发生发展的具体机制仍未完全阐明，HMGB1 Ab能否在体内通过抑制PASM异常增殖和迁移来改善肺血管重塑仍有待进一步探讨。

作者贡献：李鸣远、武云进行文章的构思与设计；李鸣远、李倩进行研究的实施与可行性分析，资料收集、整理；李鸣远进行论文撰写，统计学处理；武云进行论文的修订，负责文章的质量控制及审校，对文章整体负责、监督管理。

本文无利益冲突。

参考文献

- [1] GRANTON J, TEIJEIRO-PARADIS R. Management of the critically ill patient with pulmonary arterial hypertension and right heart failure [J]. Clin Chest Med, 2022, 43 (3): 425-439. DOI: 10.1016/j.ccm.2022.04.005.
- [2] BORDENAVE J, TU L, SAVALE L, et al. New insights in the pathogenesis of pulmonary arterial hypertension [J]. Rev Mal Respir, 2019, 36 (4): 433-437. DOI: 10.1016/j.rmr.2019.03.003.

- [3] MA B H, CAO Y Y, QIN J, et al. Pulmonary artery smooth muscle cell phenotypic switching: a key event in the early stage of pulmonary artery hypertension [J]. *Drug Discov Today*, 2023, 28 (5): 103559. DOI: 10.1016/j.drudis.2023.103559.
- [4] 孙宏晓, 泮思林. 细胞焦亡参与肺动脉高压病理生理的研究进展 [J]. *中国实用儿科杂志*, 2022, 37 (11): 868-871. DOI: 10.19538/j.ek.2022110615.
- [5] YANG H, WANG H C, ANDERSSON U. Targeting inflammation driven by HMGB1 [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 484. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00484.
- [6] 高宁, 杨梅, 吴娜. 血清HMGB1、BNP表达与新生儿持续性肺动脉高压的相关性研究 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2020, 29 (23): 2551-2555. DOI: 10.3969/j.issn.1008-8849.2020.23.010.
- [7] HUDSON J, FARKAS L. Epigenetic regulation of endothelial dysfunction and inflammation in pulmonary arterial hypertension [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22 (22): 12098. DOI: 10.3390/ijms222212098.
- [8] 王蔚, 钟子晴, 荀秋芬, 等. 肺动脉高压致病基因和靶向治疗研究进展 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2022, 30 (11): 26-31. DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2022.00.305.
- [9] XIAO X H, LUO F M, WANG E L, et al. Magnolol alleviates hypoxia-induced pulmonary vascular remodeling through inhibition of phenotypic transformation in pulmonary arterial smooth muscle cells [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2022, 150: 113060. DOI: 10.1016/j.biopha.2022.113060.
- [10] CAO G M, XUAN X Z, HU J, et al. How vascular smooth muscle cell phenotype switching contributes to vascular disease [J]. *Cell Commun Signal*, 2022, 20 (1): 180. DOI: 10.1186/s12964-022-00993-2.
- [11] CHEN R C, KANG R, TANG D L. The mechanism of HMGB1 secretion and release [J]. *Exp Mol Med*, 2022, 54 (2): 91-102. DOI: 10.1038/s12276-022-00736-w.
- [12] COLAVITA L, CIPRANDI G, SALPIETRO A, et al. HMGB1: a pleiotropic activity [J]. *Pediatr Allergy Immunol*, 2020, 31 (Suppl 26): 63-65. DOI: 10.1111/pai.13358.
- [13] 张国贤, 彭瑜, 张征. 高迁移率族蛋白1在心肌梗死中的作用及其靶向治疗研究进展 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2023, 31 (3): 1-5. DOI: 10.12114/j.issn.1008-5971.2023.00.083.
- [14] 滕飞, 刘勇乐, 林茂增, 等. 血清ET-1、HMGB1、VEGF在新生儿持续肺动脉高压中的水平变化及对预后的影响 [J]. *联勤军事医学*, 2023, 37 (1): 48-52. DOI: 10.13730/j.issn.2097-2148.2023.01.010.
- [15] GOLDENBERG N M, HU Y J, HU X D, et al. Therapeutic targeting of high-mobility group box-1 in pulmonary arterial hypertension [J]. *Am J Respir Crit Care Med*, 2019, 199 (12): 1566-1569. DOI: 10.1164/rccm.201808-1597LE.
- [16] ZABINI D, CRNKOVIC S, XU H, et al. High-mobility group box-1 induces vascular remodelling processes via c-Jun activation [J]. *J Cell Mol Med*, 2015, 19 (5): 1151-1161. DOI: 10.1111/jcmm.12519.
- [17] ZHANG Q Q, CHEN Y Q, WANG Q T, et al. HMGB1-induced activation of ER stress contributes to pulmonary artery hypertension in vitro and in vivo [J]. *Respir Res*, 2023, 24 (1): 149. DOI: 10.1186/s12931-023-02454-x.
- [18] LI W J, WEN Z P, XING Y, et al. HMGB1 upregulates RAGE to trigger the expression of inflammatory factors in the lung tissue in a hypoxic pulmonary hypertension rat model [J]. *Comput Math Methods Med*, 2022, 2022: 6823743. DOI: 10.1155/2022/6823743.
- [19] HACHIM M Y, KHALIL B A, ELEMAM N M, et al. Pyroptosis: the missing puzzle among innate and adaptive immunity crosstalk [J]. *J Leukoc Biol*, 2020, 108 (1): 323-338. DOI: 10.1002/JLB.3MIR0120-625R.
- [20] 朱晓龙, 侯阳. 细胞焦亡的分子机制及其在心血管病变中的研究进展 [J]. *心血管病学进展*, 2020, 41 (8): 847-850. DOI: 10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2020.08.016.
- [21] 周声志, 陈建英. 炎症及NLRP3炎性小体在肺动脉高压中的作用研究进展 [J]. *实用心脑血管病杂志*, 2020, 28 (5): 116-120. DOI: 10.3969/j.issn.1008-5971.2020.05.023.
- [22] ZHANG M, XIN W, YU Y, et al. Programmed death-ligand 1 triggers PSMCs pyroptosis and pulmonary vascular fibrosis in pulmonary hypertension [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 138: 23-33. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2019.10.008.
- [23] HE S Y, MA C, ZHANG L X, et al. GLI1-mediated pulmonary artery smooth muscle cell pyroptosis contributes to hypoxia-induced pulmonary hypertension [J]. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2020, 318 (3): L472-482. DOI: 10.1152/ajplung.00405.2019.
- [24] WU Z A, ZHOU G Y, WANG H X, et al. Inhibition of KIF23 alleviates IPAH by targeting pyroptosis and proliferation of PSMCs [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23 (8): 4436. DOI: 10.3390/ijms23084436.

(收稿日期: 2023-11-12; 修回日期: 2024-01-05)

(本文编辑: 陈素芳)