

## 高迁移率族蛋白 1 在小鼠动脉粥样硬化斑块中的分布及表达

肖湖南, 刘宏斌, 侯聪聪, 于 茜

解放军总医院 南楼心血管内科, 北京 100853

**摘要:** **目的** 研究高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box 1, HMGB1) 在正常小鼠及高脂喂养的 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉及动脉粥样硬化斑块中分布及其在动脉粥样硬化不同时期的表达。**方法** 8 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 12 只以及 C57BL/6 ApoE<sup>-/-</sup> 雄性小鼠 12 只分别作为对照组及实验组, 每组分为两个亚组, 早中期组 (10 周高脂饮食) 及晚期组 (20 周高脂饮食)。10 周、20 周时处死小鼠, 主动脉窦冷冻切片用于油红 O 染色评估斑块大小, 巨噬细胞免疫组化染色用于定位巨噬细胞; 主动脉窦石蜡切片用于 HMGB1 免疫组化染色检测 HMGB1 表达。**结果** HMGB1 在正常小鼠主动脉中主要表达于内皮细胞胞核, 在 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉粥样硬化斑块中主要表达于内皮细胞、巨噬细胞胞核及细胞质, 平滑肌细胞胞核亦有少量表达; 早中期动脉粥样硬化 HMGB1 的表达高于晚期动脉粥样硬化 HMGB1 的表达 ( $0.05 \pm 0.067$  vs  $0.02 \pm 0.053$ ); 晚期动脉粥样硬化斑块面积比高于早中期动脉粥样硬化斑块面积比 ( $0.40 \pm 0.03$  vs  $0.25 \pm 0.02$ ); 巨噬细胞分布于内膜下, 是斑块的主要成分。**结论** HMGB1 在动脉粥样硬化斑块中主要表达于内皮细胞、巨噬细胞; 早中期 HMGB1 的表达高于晚期。

**关键词:** 高迁移率族蛋白 1; 动脉粥样硬化; 炎症

**中图分类号:** R 543 **文献标志码:** A **文章编号:** 2095-5227(2015)12-1236-04 **DOI:** 10.3969/j.issn.2095-5227.2015.12.020

**网络出版时间:** 2015-09-24 09:48:22

**网络出版地址:** <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.3275.R.20150924.0948.006.html>

### Distribution and expression of high mobility group box 1 in atherosclerotic plaques of mice

XIAO Hu'nan, LIU Hongbin, HOU Congcong, YU Qian

Department of Geriatric Cardiology, Chinese PLA General Hospital, Beijing 100853, China

Corresponding author: LIU Hongbin. Email: liuhbin301@sohu.com

**Abstract: Objective** To study the distribution of high mobility group box 1 (HMGB1) in aorta of normal mice and aorta atherosclerotic plaque of high fat fed ApoE<sup>-/-</sup> mice and its expression in atherosclerosis at different stages. **Methods** Twelve 8-week-old SPF C57BL/6 male mice and twelve C57BL/6 ApoE<sup>-/-</sup> male mice were used as control group and experimental group, each group was divided into two subgroups, the early and medial stage group (10 weeks high fat diet) and late stage group (20 weeks high fat diet). After feeding for 10 weeks and 20 weeks, the mice were sacrificed. Aortic sinus frozen sections for oil red O staining was used to assess plaque size, macrophage immunohistochemical staining for localization of macrophages and aortic sinus paraffin sections for immunohistochemical staining to detect the expression of HMGB1. **Results** HMGB1 in normal mice aorta mainly expressed in endothelial cells nucleus, while in aorta atherosclerotic plaques of ApoE<sup>-/-</sup> mice it mainly expressed in nucleus and cytoplasm of endothelial cells and macrophages, and also a small amount in smooth muscle cell nuclei; HMGB1 expression in early and medial stage atherosclerosis was higher than advanced atherosclerosis ( $0.05 \pm 0.067$  vs  $0.02 \pm 0.053$ ). Atherosclerotic plaque area ratio in advanced stage was higher than early stage ( $0.40 \pm 0.03$  vs  $0.25 \pm 0.02$ ). Macrophages were located in the intima, as the main component of plaque. **Conclusion** HMGB1 in atherosclerotic plaques mainly expresses in endothelial cells and macrophages; The expression of HMGB1 in atherosclerosis is higher in early and medial stage than advanced stage.

**Keywords:** high mobility group box 1; atherosclerosis; inflammation

近年来, 在脓毒症等危重医学研究领域发现高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box 1, HMGB1) 作为晚期炎症因子参与炎症反应, 中和 HMGB1 可明显抑制炎症反应及动物模型的死亡率<sup>[1]</sup>。多种炎症因子 (TNF- $\alpha$ 、IL-1 等) 能作用于炎症细胞, 刺激其释放 HMGB1<sup>[2]</sup>。目前认为, HMGB1 在炎症进展过程中, 存在着炎症瀑布反应, 对多种疾病如脓毒症、自身免疫性疾病、肿瘤等均有促进疾病发展

的作用<sup>[3]</sup>。HMGB1 有两个主要功能: 一是作为核蛋白, 稳定核小体及 DNA, 促进转录; 二是由坏死细胞释放或者炎症细胞 (如巨噬细胞、NK 细胞) 分泌, 具有触发炎症的功能<sup>[1,3]</sup>。细胞外的 HMGB1 主要通过细胞的 RAGE、TLR4、TLR2 等受体作用激活炎症通路, 可以促进巨噬细胞、树突状细胞等炎症细胞分泌炎症因子 (TNF- $\alpha$ 、IL- $\beta$ 、IL-6 等)<sup>[3-5]</sup>。HMGB1 对血管细胞的影响主要是刺激平滑肌细胞的迁移和增殖、活化内皮细胞、诱导巨噬细胞的侵入以及促进树突状细胞的成熟<sup>[6]</sup>。在动脉粥样硬化斑块进展中, HMGB1 与斑块中的炎症反应密切相关<sup>[7-8]</sup>。研究 HMGB1 在小鼠主动脉及动脉粥样

收稿日期: 2015-05-27

作者简介: 肖湖南, 男, 在读硕士。研究方向: 心血管疾病的诊治及预防。Email: xiaohunan0804@163.com

通信作者: 刘宏斌, 男, 主任医师。Email: liuhbin301@sohu.com

硬化斑块中的分布及其在不同时期的表达能够更加明确 HMGB1 在斑块进展中的作用。本研究通过对正常小鼠及动脉粥样硬化模型小鼠主动脉进行免疫组化分析, 研究 HMGB1 在小鼠主动脉及动脉粥样硬化斑块中分布。

### 材料和方法

**1 材料与试剂** 兔抗小鼠 HMGB1 抗体 (Boster Bioengineering Company Limited, Wuhan, China); 兔免疫组化检测试剂盒 (CW BIO, China); 大鼠抗小鼠巨噬细胞抗体 MOMA-2 (Bio-Rad AbD Serotec, Oxford, UK); 大鼠免疫组化检测试剂盒 (Beijing Zhong Shan Golden Bridge Biotechnology Co., Ltd., Beijing, China); DAB 显色试剂盒 (TIANGEN BIOTECH, BEIJING, CO, LTD); 改良油红 O 染色试剂盒 (Beijing Leagene Biotech. CO, Ltd)。

**2 实验动物及分组** 8 周龄 SPF 级 C57BL/6 雄性小鼠 12 只, C57BL/6 ApoE<sup>-/-</sup> 雄性小鼠 12 只, C57BL/6 小鼠平均体质量为 (25 ± 2) g, ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠平均体质量为 (25 ± 1) g, 均购自南京君科生物科技有限公司 (Better Biotechnology Co, Ltd.)。对照组为正常饮食的 C57BL/6 小鼠; 实验组为高脂喂养的 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠, 分为两个亚组, 早中期组 (10 周高脂饮食) 及晚期组 (20 周高脂饮食)。饲养于 IVC 环境, 高脂饮食 (21% 猪油脂肪, 0.15% 胆固醇, 南京君科生物科技有限公司), 12 h 光照周期。自由饮水, 室温为 (23 ± 2) °C, 湿度 50% ± 5%。

**3 油红 O 染色检测斑块大小** 分别于 10 周高脂饮食、20 周高脂饮食后, 用致死剂量的戊巴比妥钠处死小鼠, 胸腹联合解剖, 心脏直视下取血; 左心室 PBS 缓冲液冲洗循环系统, 主动脉根部剪断主动脉, 为了分析斑块大小, 主动脉窦连续冷冻切片 (6 μm thick) 从主动脉瓣出现开始收集, 每隔 10 张切片取 1 张, 每只小鼠取 5 张。切片用改良油红 O 试剂盒染色, 苏木素复染。斑块区域的面积评估采用 Image Pro Plus version 6 (Media Cybernetics, Bethesda, MD) 分析, 以斑块占动脉管腔横截面的面积比来表示斑块相对大小。

**4 HMGB1 免疫组化** 主动脉窦冷冻切片后, 将剩余组织于 4% 多聚甲醛固定 24 h, 脱水并石蜡包埋, 连续石蜡切片 (4 μm thick), 每间隔 10 张收集 1 张, 每只小鼠共 5 张。石蜡切片常规脱蜡置水, 柠檬酸钠缓冲液 98 °C, 20 min 抗原修复。PBS 充分淋洗后, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭内源性过氧化氢酶 10 min, PBS 充分淋洗后, 山羊血清封闭 10 min, 兔

抗小鼠 HMGB1 抗体 (1 : 100 稀释) 4 °C 孵育过夜。PBS 充分淋洗后, 二抗 (山羊抗兔) 孵育 10 min, PBS 充分淋洗后, 三抗孵育 10 min, PBS 充分淋洗后, DAB 镜下显色, 适时终止显色, 苏木素复染, 脱水后中性树脂封片, 于显微镜下观察、拍照。Image Pro Plus version 6 对其进行定量分析。

**5 巨噬细胞免疫组化** 采用冷冻切片, 切片经 PBS 淋洗后, 0.1% Triton 孵育透膜 15 min, PBS 充分淋洗后, 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 封闭内源性过氧化氢酶 10 min, PBS 充分淋洗后, 山羊血清封闭 10 min, MOMA-2, 巨噬细胞特异性抗体 (1 : 50 稀释) 4 °C 孵育过夜。PBS 充分淋洗后, 二抗 (山羊抗大鼠) 孵育 10 min, PBS 充分淋洗后, 三抗孵育 10 min, PBS 充分淋洗后, DAB 镜下显色, 适时终止显色, 苏木素复染, 脱水后中性树脂封片, 于显微镜下观察、拍照。

**6 统计学处理** 所得数据均用 SPSS19.0 统计软件处理, 数据用  $\bar{x} \pm s$  表示, 组间资料比较采用 *t* 检验, *P* < 0.05 为差异有统计学意义。

### 结果

**1 HMGB1 在小鼠主动脉及动脉粥样硬化斑块中的表达** HMGB1 表达在正常小鼠主动脉中, 主要表达在内皮细胞核。在 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉中, 广泛表达于内膜及内膜下, 平滑肌细胞核亦有少量表达 (图 1)。

**2 HMGB1 在 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化斑块中不同时期的表达** ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠早中期动脉粥样硬化斑块 (10 周) HMGB1 的表达要比晚期 (20 周) HMGB1 的表达含量高 (图 2)。定量分析动脉粥样硬化早中期斑块内 HMGB1 表达平均光密度为 0.050 ± 0.067, 动脉粥样硬化晚期斑块内 HMGB1 表达平均光密度为 0.020 ± 0.053, 两者差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。

**3 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化斑块大小及斑块内巨噬细胞分布** 早中期斑块面积比为 0.25 ± 0.02, 晚期斑块面积比 0.40 ± 0.03, 两者差异有统计学意义 (*P* < 0.05)。巨噬细胞分布于内膜下, 是斑块的主要成分 (图 3)。

### 讨论

本研究利用免疫组化方法对 HMGB1 在小鼠主动脉中分布进行研究, 并联合巨噬细胞染色, 探讨 HMGB1 与斑块内炎症的相关性。研究发现, 正常小鼠中 HMGB1 主要表达于内皮细胞核, 结

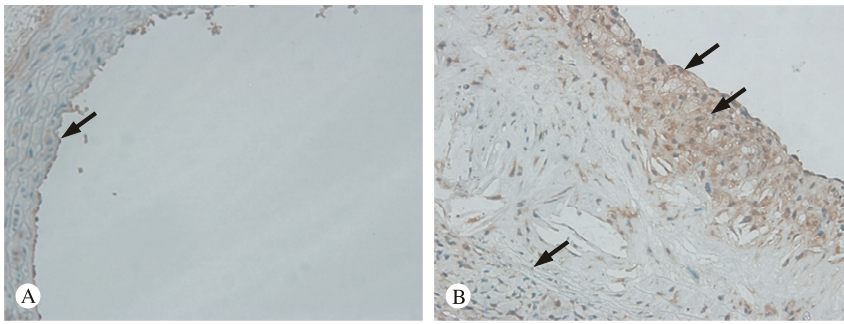


图 1 HMGB1 在小鼠主动脉中表达

A: 对照组中, HMGB1 主要表达内皮细胞细胞核; B: 实验组中, 广泛表达于内膜及内膜下, 平滑肌细胞核亦有少量表达

Fig.1 HMGB1 expression in aorta of mice A: HMGB1 in aorta of normal mice mainly expressed in the endothelial cells nucleus; B: HMGB1 in aorta atherosclerotic plaques of ApoE<sup>-/-</sup> mice mainly expressed in nucleus and cytoplasm of endothelial cells and macrophages, and also a small amount smooth muscle cell nuclei

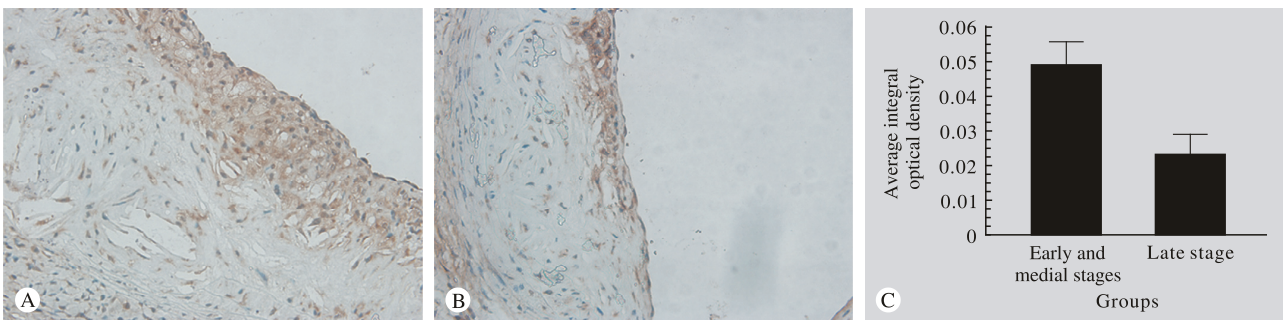


图 2 HMGB1 在动脉粥样硬化不同时期表达 A: 动脉粥样硬化早期; B: 动脉粥样硬化晚期; C: HMGB1 在斑块内的定量分析, 每组 n=6

Fig.2 HMGB1 expression at different stages of atherosclerosis A: HMGB1 expression at early and medial stage of atherosclerosis; B: HMGB1 expression at late stage of atherosclerosis; C: Quantitative of HMGB1 expression at different stages of atherosclerosis. 6 in each group

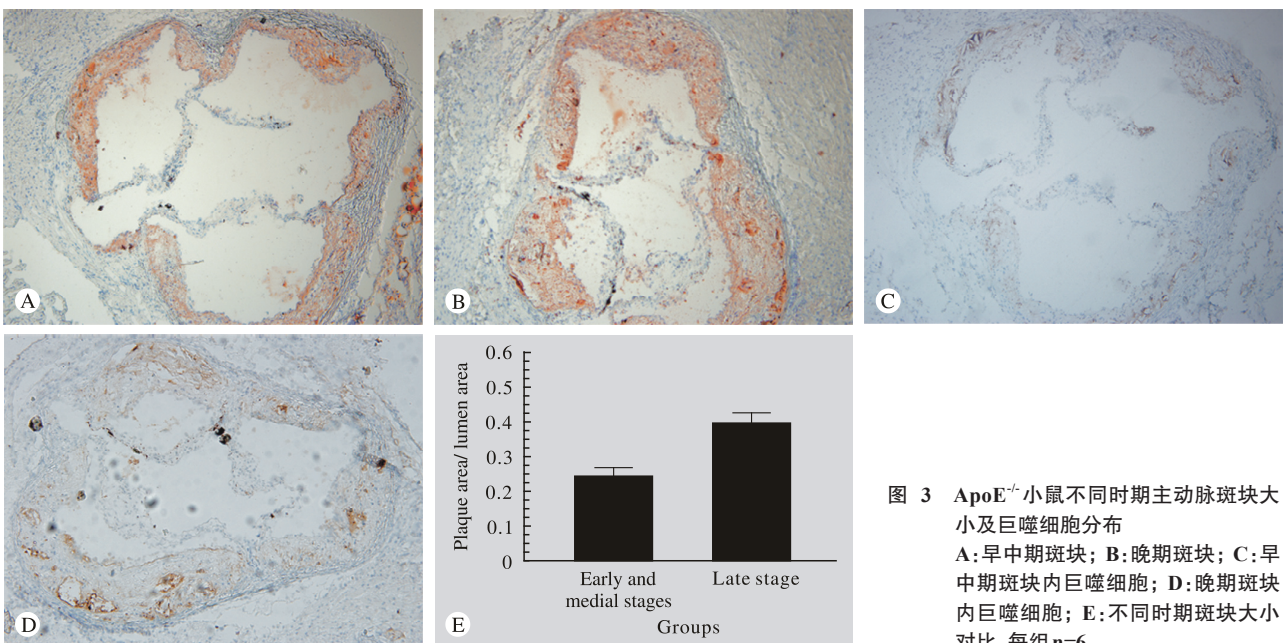


图 3 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠不同时期主动脉斑块大小及巨噬细胞分布

A: 早中期斑块; B: 晚期斑块; C: 早中期斑块内巨噬细胞; D: 晚期斑块内巨噬细胞; E: 不同时期斑块大小对比, 每组 n=6

Fig.3 Aortic plaque size and distribution of macrophages of ApoE<sup>-/-</sup> mice at different atherosclerosis stages A: Aortic plaque size at early and medial atherosclerosis stage; B: Aortic plaque size at late atherosclerosis stage; C: Macrophages distribution at early and medial atherosclerosis stage; D: Macrophages distribution at late atherosclerosis stage; E: Comparison of relative area of AS lesion. 6 in each group

合既往研究, 正常组织中 HMGB1 作为核蛋白稳定 DNA 结构, 当内皮细胞受损时, 可释放 HMGB1 作为炎症介质, 增加黏附因子 VCAM-1 等的表

达, 从而使炎症细胞黏附并迁移进入内膜下 [4,9-10]。在 Kanellakis 等 [11] 的研究中, 对高脂喂养 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠主动脉窦行冷冻切片进行 HMGB1 免疫组化

染色时,发现 HMGB1 广泛分布于内膜中。我们采用石蜡切片,更好地保持了组织的抗原性及结构,清晰地展示了 HMGB1 在动脉粥样硬化斑块内重点分布于内皮细胞。与 HMGB1 对内皮细胞功能影响的研究一致<sup>[9]</sup>,证实 HMGB1 可能参与斑块形成进展时内皮细胞功能的调控。而且,我们在中膜平滑肌细胞中也发现了少量 HMGB1 的表达,为 HMGB1 对平滑肌细胞功能调控提供了证据。

我们的研究发现,早中期斑块的 HMGB1 表达要比晚期斑块稍强。对斑块 HMGB1 免疫组化分析可以发现, HMGB1 主要集中表达在内皮细胞及内皮细胞下巨噬细胞、泡沫细胞中;而胆固醇结晶附近脂核中心, HMGB1 表达并不高。我们猜测,在斑块早中期,斑块内泡沫细胞含量多<sup>[12]</sup>,这个时候表达了大量 HMGB1,促进斑块进一步形成。在斑块晚期,由于泡沫细胞大量坏死,形成了大脂核坏死中心<sup>[13]</sup>,故其在晚期表达水平不如早中期。从免疫组化中亦可发现,斑块晚期的 HMGB1 仍然主要集中在内皮细胞及内皮下细胞。正是大量泡沫细胞凋亡坏死,释放出大量 HMGB1,与炎症细胞本身分泌的 HMGB1 一起启动了 HMGB1 介导的炎症反应,加重了斑块进展<sup>[6]</sup>。

#### 参考文献

- 1 Asavarut P, Zhao H, Gu J, et al. The role of HMGB1 in inflammation-mediated organ injury [J]. Acta Anaesthesiol Taiwan, 2013, 51 (1): 28-33.
- 2 Musumeci D, Roviello GN, Montesarchio D. An overview on HMGB1 inhibitors as potential therapeutic agents in HMGB1-related pathologies [J]. Pharmacol Ther, 2014, 141 (3): 347-357.
- 3 Tang D, Kang R, Zeh HJ, et al. High-mobility group box 1, oxidative stress, and disease [J]. Antioxid Redox Signal, 2011, 14 (7): 1315-1335.
- 4 Yang J, Huang CX, Yang J, et al. Statins attenuate high mobility group box-1 protein induced vascular endothelial activation: a key role for TLR4/NF-kappa B signaling pathway [J]. Mol Cell Biochem, 2010, 345 (1/2): 189-195.
- 5 Fukami K, Yamagishi S, Okuda S. Role of AGEs-RAGE system in cardiovascular disease [J]. Curr Pharm Des, 2014, 20 (14): 2395-2402.
- 6 De Souza AW, Westra J, Limburg PC, et al. HMGB1 in vascular diseases: Its role in vascular inflammation and atherosclerosis [J]. Autoimmun Rev, 2012, 11 (12): 909-917.
- 7 Li W, Sama AE, Wang H. Role of HMGB1 in cardiovascular diseases [J]. Curr Opin Pharmacol, 2006, 6 (2): 130-135.
- 8 Ding HS, Yang J. High mobility group box-1 and cardiovascular diseases [J]. Saudi Med J, 2010, 31 (5): 486-489.
- 9 Luo Y, Li SJ, Yang J, et al. HMGB1 induces an inflammatory response in endothelial cells via the RAGE-dependent endoplasmic reticulum stress pathway [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2013, 438 (4): 732-738.
- 10 Lee PS, Poh KK. Endothelial progenitor cells in cardiovascular diseases [J]. World J Stem Cells, 2014, 6 (3): 355-366.
- 11 Kanellakis P, Agrotis A, Kyaw TS, et al. High-Mobility group box protein 1 neutralization reduces development of Diet-Induced atherosclerosis in apolipoprotein E-Deficient mice [J]. Arterioscler Thromb Vase Biol, 2011, 31 (2): 313-319.
- 12 Libby P. Inflammation in atherosclerosis [J]. Nature, 2002, 420 (6917): 868-874.
- 13 Kalinina N, Agrotis A, Antropova Y, et al. Increased expression of the DNA-binding cytokine HMGB1 in human atherosclerotic lesions - Role of activated macrophages and cytokines [J]. Arterioscler Thromb Vase Biol, 2004, 24 (12): 2320-2325.