

# HMGB1 基因敲除通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路 减轻脓毒症小鼠急性肺损伤

张志斌,李瑞彤,郑卫伟,林雪容,牛宁宁,王慧,苑萌,韩树池,薛乾隆

**摘要 目的** 研究高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1) 基因敲除减轻脓毒症小鼠急性肺损伤及抑制 Toll 样受体 4 (TLR4)/核因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 通路的作用。**方法** 野生型 (WT) 小鼠分为 WT-Sham 组和 WT-模型组, HMGB1 基因敲除 (KO) 小鼠分为 KO-Sham 组和 KO-模型组。WT-模型组和 KO-模型组采用盲肠结扎穿孔术制备脓毒症 ALI 模型, WT-Sham 组和 KO-Sham 组进行假手术操作。造模后 24 h, 检测动脉血氧分压 (PaO<sub>2</sub>), 计算氧合指数 (OI), 检测肺组织病理改变, 计算肺损伤评分, 检测血清及肺组织中肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、IL-6、活性氧簇 (ROS)、丙二醛

(MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 的浓度, 肺组织中 HMGB1、TLR4、核 NF- $\kappa$ B 的表达。**结果** WT-模型组的 PaO<sub>2</sub>、OI、血清及肺组织 SOD 的浓度低于 WT-Sham 组, 肺损伤评分、血清及肺组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、ROS、MDA 的浓度、肺组织中 HMGB1、TLR4、核 NF- $\kappa$ B 的表达水平高于 WT-Sham 组 ( $P < 0.05$ ); KO-模型组肺组织中不表达 HMGB1, PaO<sub>2</sub>、OI、血清及肺组织 SOD 的浓度高于 WT-模型组, 肺损伤评分、血清及肺组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、ROS、MDA 的浓度、肺组织中 TLR4、核 NF- $\kappa$ B 的表达水平低于 WT-模型组 ( $P < 0.05$ )。**结论** 敲除 HMGB1 减轻脓毒症小鼠 ALI, 相关的分子机制可能是抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路介导的炎症反应和氧化应激反应。

**关键词** 脓毒症; 急性肺损伤; 高迁移率族蛋白 B1; Toll 样受体 4; 核因子- $\kappa$ B

**中图分类号** R 631

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)02-0248-06  
**doi**: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.02.011

2023-11-12 接收

基金项目: 2023 年度河北省卫生健康委科研基金项目 (编号: 20231452)

作者单位: 河北北方学院附属第一医院急诊科, 张家口 075000

作者简介: 张志斌, 男, 主治医师;

薛乾隆, 男, 主任医师, 责任作者, E-mail: 4641614@qq.com

com

tion. The supernatant and exocrine were extracted, and then the normal and LPS-induced inflammation were extracted. The human cartilage tissue obtained during the operation was isolated and cultured into chondrocytes, which were divided into five groups: the first group was added with FLS secretion, the second group was added with normal FLS secretion, the third group was added with secretion after co-culture of two kinds of synovial cells, the fourth group was added with inflammatory MLS secretion, and the fifth group was added with inflammatory FLS secretion. CCK-8 was used to detect the viability of chondrocytes in each group. TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 level in the supernatant of chondrocytes in each group was detected by ELISA. The protein expression of TLR4, NF- $\kappa$ B, IkK, I $\kappa$ B, ADAMTS5 in chondrocytes of each group was detected by Western blot method. **Results** CCK-8 showed that the activity of chondrocytes in the three groups of inflammatory secretions decreased compared with the secretions from normal synovial cells ( $P < 0.05$ ); ELISA showed TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 level in the supernatant of group III, IV and V was higher than that of group I and II ( $P < 0.05$ ), TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6 level in group III was higher than that in group IV but lower than that in group V ( $P < 0.05$ ). Western blot showed the protein expression of TLR4, NF- $\kappa$ B, IkK, I $\kappa$ B, ADAMTS5 in chondrocytes of group III, IV and V was higher than that in group I and II ( $P < 0.05$ ), the protein expression of TLR4, NF- $\kappa$ B, IkK, I $\kappa$ B, ADAMTS5 in group III was higher than that in group IV but lower than that in group V ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Two kinds of synovial cell-derived secretions after LPS-induced inflammation can regulate cartilage TLRs/NF- $\kappa$ B signal pathway, causing cartilage inflammation. The inflammatory effect of MLS secretion is stronger than that of FLS secretion, but the inflammatory effect of MLS secretion under two co-cultures is weaker than that of MLS secretion alone.

**Key words** fibroblast-like synoviocytes; macrophage-like synoviocytes; exosomes; TLRs/NF- $\kappa$ B signal pathway; knee osteoarthritis; chondrocytes

脓毒症是机体对感染的反应失调而引起危及生命的器官功能障碍,肺脏是脓毒症进程中受累的首位靶器官,急性肺损伤(acute lung injury, ALI)是导致脓毒症患者死亡的主要原因之一。脓毒症 ALI 的病理生理机制复杂,包括炎症因子失控性释放、氧化应激反应激活等。高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box B1, HMGB1) 是一种存在于炎症反应晚期的炎症介质,其来源包括细胞主动分泌和被动释放,能够激活 Toll 样受体 4 (toll like receptor 4, TLR4)、促进下游核因子- $\kappa$ B (nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B) 核转位并一方面使炎症反应持续活化,另一方面促进自由基生成、引起氧化应激反应<sup>[1-2]</sup>。相关的临床研究<sup>[3]</sup>结果显示,脓毒症患者血清 HMGB1 含量增加且与肺脏、肾脏等脏器损伤相关;相关的动物实验<sup>[4-5]</sup>结果显示,多种药物减轻脓毒症 ALI 的治疗作用与抑制 HMGB1 表达有关。但 HMGB1 在脓毒症 ALI 发生发展中的生物学作用及相关机制尚不完全明确。该研究将通过基因敲除 (knock out, KO) 的手段分析 HMGB1 基因减轻脓毒症 ALI 及抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路的作用,为深入认识 HMGB1 在脓毒症 ALI 发生发展中的生物学作用及可能机制提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 野生型 (wild type, WT) SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 24 只及 HMGB1 KO 雄性小鼠 24 只,体质量 18 ~ 22 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司。本研究经医院伦理委员会批准,实验过程遵循 3R 原则。

**1.1.2 试剂** RIPA 裂解液、核蛋白提取试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司), HMGB1、TLR4、NF- $\kappa$ B p65 抗体(美国 Abcam 公司),肿瘤坏死因子- $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-6、活性氧簇 (reactive oxygen species, ROS)、丙二醛 (malondialdehyd, MDA)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 检测试剂盒(南京建成生物有限公司)。

### 1.2 方法

**1.2.1 分组及建模** WT C57BL/6J 小鼠分为 WT-Sham 组和 WT-模型组, HMGB1 KO 小鼠分为 KO-Sham 组和 KO-模型组,每组 12 只。WT-模型组和 KO-模型组采用盲肠结扎穿孔术制备脓毒症 ALI 模型,方法如下:造模前禁食 12 h、自由饮水,腹腔注射

1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉小鼠,摆放仰卧位并做长度 2 cm 的腹正中切口,分离盲肠并轻轻挤压盲肠近端粪便,使盲肠末充盈,在盲瓣与盲肠中点用无菌 4 号线结扎,在结扎部位与盲肠顶端中点用 21G 针头穿刺盲肠壁,将少许肠内容物轻轻挤出并保证穿孔处通畅,然后将挤出的内容物擦净,将盲肠还纳腹腔,最后关闭腹腔、缝合切口、完成造模。Sham 组进行假手术操作如下:造模前禁食 12 h、自由饮水,按照脓毒症 ALI 造模相同的方法麻醉及分离盲肠,在盲瓣与盲肠中点穿无菌 4 号线,但不进行结扎和穿孔操作,而后将盲肠还纳腹腔,最后关闭腹腔、缝合切口。

**1.2.2 血气分析** 造模后 24 h,腹腔注射 1% 戊巴比妥钠 50 mg/kg 麻醉小鼠,再次做 2 cm 的腹正中切口,在小肠后方分离腹主动脉,用 1 ml 注射器在腹主动脉处抽取 0.7 ml 动脉血,采用 i-STAT 型血气分析仪(美国 Abbott)进行动脉血气分析,检测动脉血氧分压 (partial pressure of arterial oxygen, PaO<sub>2</sub>),计算氧合指数 (oxygenation index, OI) = PaO<sub>2</sub> ÷ FiO<sub>2</sub>。

**1.2.3 血清炎症及氧化应激指标检测** 造模后 24 h,腹主动脉血进行血气分析后剩余的样本在 4 °C、3 000 r/min、半径 10 cm 条件下离心 10 min,分离血清并采用试剂盒检测 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、MDA、ROS、SOD 的浓度。

**1.2.4 肺组织病理改变检测** 造模后 24 h,取各组小鼠的左肺组织适量,经生理盐水清洗后用 4% 多聚甲醛固定,制作组织蜡块后切片,采用 HE 染色试剂盒对组织切片进行染色后在显微镜下观察肺组织的病理改变。采用半定量评分系统对肺病理改变进行评分,包括炎症、水肿、出血和肺泡间隔增厚 4 个项目,每项 0 ~ 4 分,合计评分即为肺损伤评分。

**1.2.5 肺组织湿重 (W)/干重 (D) 比值测量** 造模后 24 h,取各组小鼠的右肺组织,称量湿重后将组织放入烘箱中,烘干至恒重后记录干重,而后计算 W/D。

**1.2.6 肺组织中炎症及氧化应激指标检测** 造模后 24 h,取各组小鼠的左肺组织适量,剪碎后加入 RIPA 裂解液,加入放射免疫沉淀试验 (radio immunoprecipitation assay, RIPA) 裂解液匀浆后按照转速 12 000 r/min、半径 10 min、温度 4 °C 离心 10 min,取上清液,采用 BCA 法检测匀浆液的蛋白含量,采用试剂盒检测匀浆液中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、MDA、ROS、SOD 含量,计算每毫克匀浆液蛋白中 TNF- $\alpha$ 、

IL-1β、IL-6、MDA、ROS、SOD 的浓度。

**1.2.7 肺组织中蛋白表达的检测** 取 1.2.5 中的匀浆液进行 HMGB1、TLR4 表达的检测;另取各组小鼠的左肺组织适量,剪碎后采用核蛋白提取试剂盒提取核蛋白,进行核 NF-κB 表达的检测。检测时,将 30 μg 蛋白样本加入十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶中进行电泳,而后电转移至硝酸纤维素膜,室温下 5% 脱脂牛奶封闭 1 h,4 ℃ 下孵育 HMGB1 一抗(1:500)、TLR4 一抗(1:1 000)、NF-κB 一抗(1:400)或 β-actin 一抗(1:5 000)、LaminB 一抗(1:3 000)过夜。次日,洗膜 3 次后室温下孵育二抗(1:2 000)1 h,最后在凝胶成像仪中进行化学显影,得到蛋白条带及对应的灰度值,以 HMGB1/β-actin、TLR4/β-actin、NF-κB/LaminB 的比值作为蛋白表达水平。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 软件(版本号 23.0)进行实验数据的统计学处理,计量资料经正态性检验,均符合正态分布,以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD-*t* 检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 4 组小鼠肺组织中 HMGB1 表达的比较

WT-模型组小鼠肺组织中 HMGB1 的表达水平高于 WT-Sham 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。KO-Sham 组和 KO-模型组小鼠肺组织中不表达 HMGB1。见图 1。

**2.2 4 组小鼠肺损伤程度的比较** WT-模型组小鼠 PaO<sub>2</sub>、OI 水平低于 WT-Sham 组,肺损伤评分、W/D 比值高于 WT-Sham 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );KO-Sham 组小鼠 PaO<sub>2</sub>、OI 水平及肺损伤评分、W/D 比值与 WT-Sham 组比较,差异无统计学意义;KO-模型组小鼠 PaO<sub>2</sub>、OI 水平高于 WT-模型组,肺损伤评分、W/D 比值低于 WT-模型组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。见表 1、图 2。

**2.3 4 组小鼠炎症反应程度的比较** WT-模型组小

鼠血清及肺组织中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的浓度高于 WT-Sham 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );KO-Sham 组小鼠血清及肺组织中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的浓度与 WT-Sham 组比较,差异无统计学意义;KO-模型组小鼠血清及肺组织中 TNF-α、IL-1β、IL-6 的浓度低于 WT-模型组,差异有统计学意义( $P <$

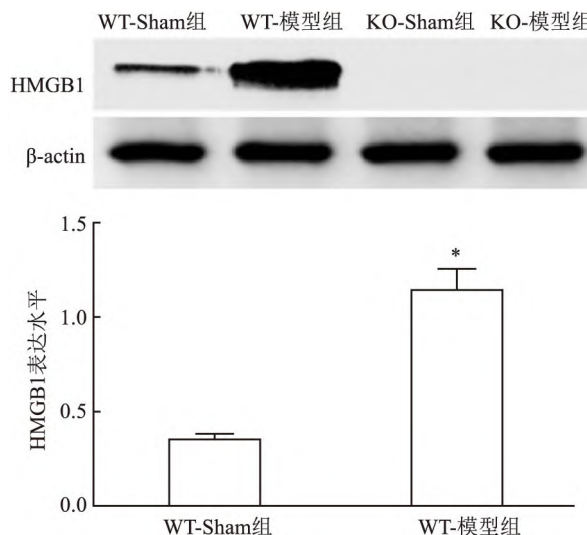


图 1 4 组小鼠肺组织中 HMGB1 表达的比较  
与 WT-Sham 组比较: \*  $P < 0.05$

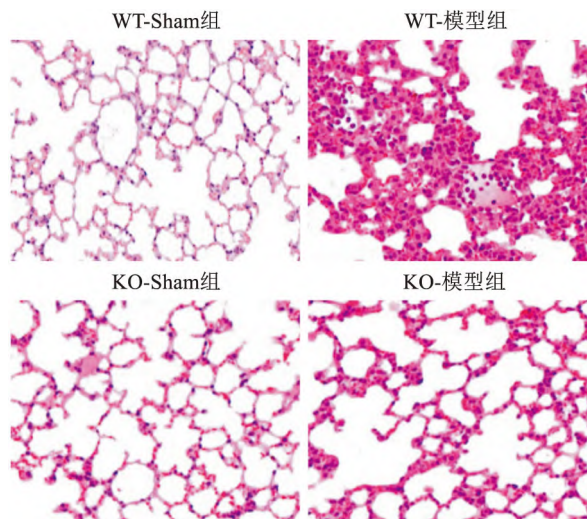


图 2 4 组小鼠肺组织的病理改变 HE × 400

表 1 4 组小鼠肺损伤程度的比较( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

| 组别      | PaO <sub>2</sub> (kPa)    | OI                          | 肺损伤评分                    | W/D                      |
|---------|---------------------------|-----------------------------|--------------------------|--------------------------|
| WT-Sham | 12.59 ± 0.74              | 477.12 ± 21.83              | 0.93 ± 0.08              | 4.03 ± 0.35              |
| WT-模型   | 7.69 ± 0.60*              | 248.58 ± 18.58*             | 11.24 ± 1.03*            | 7.62 ± 0.59*             |
| KO-Sham | 12.53 ± 0.82              | 480.23 ± 25.76              | 1.01 ± 0.11              | 4.12 ± 0.44              |
| KO-模型   | 10.22 ± 0.75 <sup>#</sup> | 379.19 ± 28.68 <sup>#</sup> | 5.58 ± 0.48 <sup>#</sup> | 5.25 ± 0.41 <sup>#</sup> |
| F 值     | 21.578                    | 18.572                      | 136.813                  | 20.671                   |
| P 值     | <0.001                    | <0.001                      | <0.001                   | <0.001                   |

与 WT-Sham 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 WT 模型组比较: <sup>#</sup>  $P < 0.05$



表2 4组小鼠炎症反应程度的比较( $n=12, \bar{x} \pm s$ )

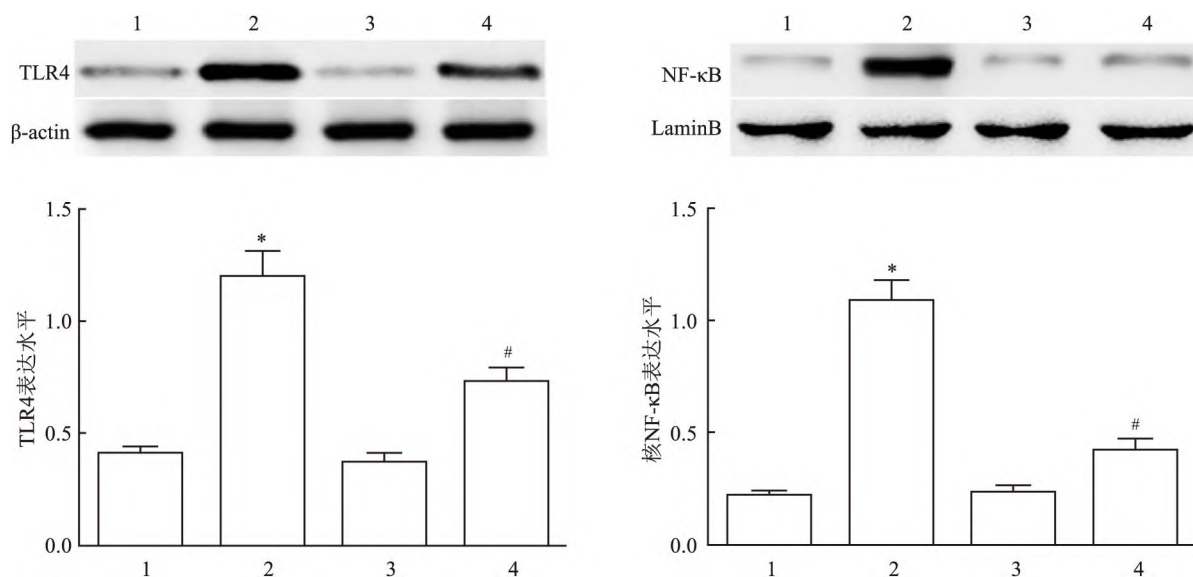
| 组别      | 血清 (pg/ml)                   |                              |                              | 肺组织 (pg/g)                   |                              |                              |
|---------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|
|         | TNF- $\alpha$                | IL-1 $\beta$                 | IL-6                         | TNF- $\alpha$                | IL-1 $\beta$                 | IL-6                         |
| WT-Sham | 0.84 $\pm$ 0.07              | 0.59 $\pm$ 0.03              | 1.14 $\pm$ 0.08              | 1.86 $\pm$ 0.14              | 1.26 $\pm$ 0.11              | 1.14 $\pm$ 0.10              |
| WT-模型   | 4.41 $\pm$ 0.29*             | 2.85 $\pm$ 0.23*             | 5.61 $\pm$ 0.34*             | 5.77 $\pm$ 0.36*             | 4.09 $\pm$ 0.32*             | 4.66 $\pm$ 0.36*             |
| KO-Sham | 0.90 $\pm$ 0.05              | 0.61 $\pm$ 0.04              | 1.06 $\pm$ 0.09              | 1.92 $\pm$ 0.20              | 1.31 $\pm$ 0.12              | 1.21 $\pm$ 0.12              |
| KO-模型   | 1.88 $\pm$ 0.14 <sup>#</sup> | 1.13 $\pm$ 0.09 <sup>#</sup> | 2.86 $\pm$ 0.22 <sup>#</sup> | 3.01 $\pm$ 0.25 <sup>#</sup> | 2.21 $\pm$ 0.22 <sup>#</sup> | 2.67 $\pm$ 0.22 <sup>#</sup> |
| F 值     | 122.581                      | 89.483                       | 117.564                      | 105.682                      | 94.587                       | 109.582                      |
| P 值     | <0.001                       | <0.001                       | <0.001                       | <0.001                       | <0.001                       | <0.001                       |

与 WT-Sham 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 WT 模型组比较: <sup>#</sup>  $P < 0.05$

表3 4组小鼠炎症反应程度的比较( $n=12, \bar{x} \pm s$ )

| 组别      | 血清 (pg/ml)                   |                              |                               | 肺组织 (pg/g)                   |                              |                               |
|---------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|------------------------------|------------------------------|-------------------------------|
|         | MDA (nmol/L)                 | ROS (U/L)                    | SOD (U/L)                     | MDA (nmol/L)                 | ROS (U/L)                    | SOD (U/L)                     |
| WT-Sham | 2.13 $\pm$ 0.16              | 1.44 $\pm$ 0.12              | 32.58 $\pm$ 2.52              | 1.96 $\pm$ 0.14              | 0.94 $\pm$ 0.06              | 48.58 $\pm$ 3.25              |
| WT-模型   | 6.74 $\pm$ 0.52*             | 4.95 $\pm$ 0.34*             | 15.52 $\pm$ 1.71*             | 7.01 $\pm$ 0.51*             | 5.51 $\pm$ 0.36*             | 30.12 $\pm$ 2.21*             |
| KO-Sham | 2.21 $\pm$ 0.14              | 1.50 $\pm$ 0.15              | 33.12 $\pm$ 2.74              | 1.92 $\pm$ 0.15              | 1.01 $\pm$ 0.08              | 49.12 $\pm$ 3.62              |
| KO-模型   | 3.36 $\pm$ 0.32 <sup>#</sup> | 2.76 $\pm$ 0.23 <sup>#</sup> | 24.09 $\pm$ 2.85 <sup>#</sup> | 3.44 $\pm$ 0.28 <sup>#</sup> | 2.31 $\pm$ 0.18 <sup>#</sup> | 41.58 $\pm$ 3.28 <sup>#</sup> |
| F 值     | 53.852                       | 60.375                       | 41.382                        | 63.961                       | 76.694                       | 31.681                        |
| P 值     | <0.001                       | <0.001                       | <0.001                        | <0.001                       | <0.001                       | <0.001                        |

与 WT-Sham 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 WT 模型组比较: <sup>#</sup>  $P < 0.05$

图3 4组小鼠 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路的比较

1: WT-Sham 组; 2: WT-模型组; 3: KO-Sham 组; 4: KO-模型组; 与 WT-Sham 组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与 WT 模型组比较: <sup>#</sup>  $P < 0.05$

0.05)。见表2。

**2.4 4组小鼠氧化应激反应程度的比较** WT-模型组小鼠血清及肺组织中 MDA、ROS 的浓度高于 WT-Sham 组, SOD 的浓度低于 WT-Sham 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); KO-Sham 组小鼠血清及肺组织中 MDA、ROS、SOD 的浓度与 WT-Sham 组比较, 差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ); KO-模型组小鼠血清及肺组织中 MDA、ROS 的浓度低于 WT-模型组, SOD 的浓度高于 WT-模型组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见表3。

**2.5 4组小鼠 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路的比较** WT-模

型组小鼠肺组织中 TLR4、核 NF- $\kappa$ B p65 的表达水平高于 WT-Sham 组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ); KO-Sham 组小鼠肺组织中 TLR4、核 NF- $\kappa$ B p65 的表达水平与 WT-Sham 组比较, 差异无统计学意义; KO-模型组小鼠肺组织中 TLR4、核 NF- $\kappa$ B p65 的表达水平低于 WT-模型组, 差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。见图3。

### 3 讨论

炎症细胞因子失控性释放与脓毒症 ALI 的发生发展密切相关, 但具体的调控机制尚不完全清楚。

HMGB1 是重要的炎症介质,炎症反应激活过程中 HMGB1 的来源包括细胞主动分泌和被动释放,前者指单核/巨噬细胞、中性粒细胞、树突状细胞等受到感染、缺血缺氧等刺激时主动合成和释放 HMGB1,后者指组织细胞损伤后发生破裂、死亡并导致 HMGB1 被动释放。本研究中,脓毒症 ALI 小鼠肺组织中 HMGB1 表达增加。以上结果提示 HMGB1 高表达可能参与脓毒症 ALI 的发生发展,但脓毒症 ALI 中 HMGB1 的生物学作用尚缺乏直接的动物实验证据。

本研究采用基因敲除的手段对脓毒症 ALI 模型中 HMGB1 的生物学作用展开分析。野生型小鼠进行脓毒症 ALI 建模后 PaO<sub>2</sub> 及 OI 降低,肺组织出现间质充血水肿、炎症细胞浸润等典型的 ALI 病理表现且肺损伤评分增加,表明脓毒症 ALI 模型制备成功。HMGB1 在脓毒症的发生和进展中发挥促炎作用,促进中性粒细胞、单核巨噬细胞、淋巴细胞等向肺组织聚集,进而使炎症反应持续激活、肺损伤加剧<sup>[6-7]</sup>。本研究使用 HMGB1 敲除小鼠进行脓毒症 ALI 建模,敲除 HMGB1 使 PaO<sub>2</sub> 及 OI 增加,肺组织间质充血水肿、炎症细胞浸润的病理改变减轻且肺损伤评分降低,这一结果为 HMGB1 参与脓毒症 ALI 提供了直接证据。

HMGB1 促进炎症细胞浸润的效应不仅能够使 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 等炎症因子大量释放,炎症反应持续激活,还能使 ROS 生成增多,引起组织发生氧化应激损伤,增加脂质氧化产物 MDA 的生成及抗氧化酶 SOD 的消耗<sup>[8-9]</sup>。脓毒症 ALI 相关的基础研究证实炎症反应和氧化应激反应是与肺损伤密切相关的两种生物学因素,多种抗炎、抗氧化治疗手段显著减轻脓毒症 ALI<sup>[10-12]</sup>。本研究中,野生型脓毒症 ALI 小鼠血清及肺组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、ROS、MDA 的浓度均增加,SOD 的浓度降低,符合脓毒症 ALI 发生发展中炎症反应和氧化应激过度激活的特征。HMGB1 敲除使脓毒症 ALI 小鼠的血清及肺组织中 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6、ROS、MDA 浓度降低,SOD 浓度增加,表明 HMGB1 在脓毒症 ALI 中起到促进炎症反应及氧化应激的作用,敲除 HMGB1 使炎症反应及氧化应激减轻。

HMGB1 促进炎症细胞浸润,调控炎症反应及氧化应激的机制可能与激活 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路有关。主动分泌和被动释放的 HMGB1 通过 TLR4 使 NF- $\kappa$ B 入核,进而启动多种炎症因子表达,导致“炎症瀑布”<sup>[13-14]</sup>。已有研究报道,脓毒症模型中 TLR4 及

核 NF- $\kappa$ B 表达增加与肺损伤、肾损伤等脏器功能障碍相关<sup>[15]</sup>。本研究中,野生型脓毒症小鼠肺组织中 TLR4 及核 NF- $\kappa$ B 表达增加,与既往研究中 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路参与脓毒症 ALI 的结果吻合。HMGB1 敲除使脓毒症 ALI 小鼠肺组织中 TLR4 及核 NF- $\kappa$ B 表达降低,表明脓毒症 ALI 中 HMGB1 调控 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路,敲除 HMGB1 使 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路受抑制,减少 NF- $\kappa$ B 入核,进而抑制 NF- $\kappa$ B 对多种炎症因子表达的促进作用,最终实现减轻炎症反应及氧化应激反应的效应。关于 HMGB1 调控 TLR4 的机制,可能涉及转录水平的启动子调控与转录后水平的非编码 RNA 调控,仍需今后设计相关的报告基因实验、mRNA 稳定性实验等进行探索。

综上所述,HMGB1 参与脓毒症 ALI 的发生发展,敲除 HMGB1 减轻脓毒症小鼠 ALI,与之相关的分子机制可能是抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 通路介导的炎症反应和氧化应激反应。TLR4/NF- $\kappa$ B 通路在 HMGB1 参与脓毒症 ALI 发生发展中的作用仍有待今后更多的实验探索。

#### 参考文献

- [1] Qu L, Chen C, Chen Y, et al. High-mobility group box 1 (HMGB1) and autophagy in acute lung injury (ALI): a review [J]. *Med Sci Monit*, 2019, 11(25): 1828-37.
- [2] Paterson C W, Ford M L, Coopersmith C M, et al. Breaking the bond between tetranectin and HMGB1 in sepsis [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(539): eabb2575.
- [3] Zang D, Li W, Cheng F, et al. Accuracy and sensitivity of high mobility group box 1 (HMGB1) in diagnosis of acute kidney injury caused by sepsis and relevance to prognosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2022, 1(535): 61-7.
- [4] Lee W, Lee H, Lee T, et al. Inhibitory functions of maslinic acid, a natural triterpene, on HMGB1-mediated septic responses [J]. *Phytomedicine*, 2020, 69: 153200.
- [5] Gu J, Ran X, Deng J, et al. Glycyrrhizin alleviates sepsis-induced acute respiratory distress syndrome via suppressing of HMGB1/TLR9 pathways and neutrophils extracellular traps formation [J]. *Int Immunopharmacol*, 2022, 108: 108730.
- [6] Deng C, Zhao L, Yang Z, et al. Targeting HMGB1 for the treatment of sepsis and sepsis-induced organ injury [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2022, 43(3): 520-8.
- [7] Li L, Lu Y. The regulatory role of high-mobility group protein 1 in sepsis-related immunity [J]. *Front Immunol*, 2021, 22(11): 601815.
- [8] Liu Z, Wang X, Li C, et al. SP1 promotes HDAC4 expression and inhibits HMGB1 expression to reduce intestinal barrier dysfunction, oxidative stress, and inflammatory response after sepsis [J]. *J Innate Immun*, 2022, 14(4): 366-79.

- [9] 陶天柱, 张国荣, 杨晓明, 等. 免疫检查点 VISTA 分子对脓毒症小鼠免疫炎症反应的调节作用[J]. 安徽医科大学学报, 2022, 57(2): 193-6, 202.
- [10] Xie Q, Wang Y, Zou G. Protective effects of lavender oil on sepsis-induced acute lung injury *via* regulation of the NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 968-78.
- [11] Le J, Sun M, Zhu J, et al. Protective effect of N-acetylcysteine on acute lung injury in septic rats by inhibiting inflammation, oxidation, and apoptosis[J]. *Iran J Basic Med Sci*, 2022, 25(7): 859-64.
- [12] Tang X, Tang H. Cornus iridoid glycoside alleviates sepsis-induced acute lung injury by regulating NF- $\kappa$ B and Nrf2/HO-1 pathways[J]. *Allergol Immunopathol (Madr)*, 2022, 50(5): 121-8.
- [13] Zhang J, Chen Q, Dai Z, et al. MiR-22 alleviates sepsis-induced acute kidney injury *via* targeting the HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. *Int Urol Nephrol*, 2022, 55(2): 409-21.
- [14] Wang Z, Chen W, Li Y, et al. Reduning injection and its effective constituent luteoloside protect against sepsis partly *via* inhibition of HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B/MAPKs signaling pathways[J]. *J Ethnopharmacol*, 2021(270): 113783.
- [15] Wu W, Zhong W, Lin Z, et al. Blockade of Indoleamine 2,3-Dioxygenase attenuates lipopolysaccharide-induced kidney injury by inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B signaling [J]. *Clin Exp Nephrol*, 2023, 27(6): 495-505.

## HMGB1 gene knockout alleviates acute lung injury of sepsis mice *via* inhibiting TLR4/NF- $\kappa$ B pathway

Zhang Zhibin, Li Ruitong, Zheng Weiwei, Lin Xuerong, Niu Ningning,  
Wang Hui, Yuan Meng, Han Shuchi, Xue Qianlong

(Dept of Emergency, The First Affiliated Hospital of Hebei North University, Zhangjiakou 075000)

**Abstract Objective** To study the effect of high mobility group box B1 (HMGB1) gene knockout on alleviating acute lung injury and inhibiting toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) pathway of sepsis mice. **Methods** Wild-type (WT) mice were divided into WT-Sham group and WT-model group, and HMGB1 knockout (KO) mice were divided into KO-sham group and KO-model group. Sepsis ALI model was established by cecal ligation and perforation in WT-model group and KO-model group. Sham operation was performed in WT-Sham group and KO-Sham group. 24 h after modeling, the partial pressure of arterial oxygen (PaO<sub>2</sub>) was detected, oxygenation index (OI) was calculated, pathological changes of lung tissue were detected and lung injury score was calculated, the concentrations of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), reactive oxygen species (ROS), malondialdehyde (MDA), superoxide dismutase (SOD), in serum and lung tissues and the expression of HMGB1, TLR4 and nuclear NF- $\kappa$ B in lung tissues were detected. **Results** The PaO<sub>2</sub>, OI and the concentration of SOD in serum and lung tissue of WT-model group were lower than those of WT-Sham group, the lung injury scores, the concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, ROS and MDA in serum and lung tissue, and the expression levels of HMGB1, TLR4 and nuclear NF- $\kappa$ B in lung tissue were higher than those in WT-Sham group ( $P < 0.05$ ). HMGB1 was not expressed in lung tissue of KO-model group, and the concentrations of PaO<sub>2</sub>, OI and the concentration of SOD in serum and lung tissue of KO-model group were higher than those of WT-model group, the lung injury scores, the concentrations of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-6, ROS and MDA in serum and lung tissue, and the expression levels of TLR4 and nuclear NF- $\kappa$ B in lung tissue were lower than those of the WT-model group ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** HMGB1 gene knockout alleviates acute lung injury of sepsis mice, the related molecular mechanism may be the inhibition of TLR4/NF- $\kappa$ B pathway mediated inflammation and oxidative stress.

**Key words** sepsis; acute lung injury; high mobility group box B1; toll-like receptor 4; nuclear factor- $\kappa$ B