

文章编号: 1004-0374(2013)01-0058-05

## 高迁移率族蛋白1和Treg细胞与动脉粥样硬化 相关性的研究进展

郑晓云, 王嘉军\*

(三峡大学医学院, 宜昌 443002)

**摘要:** 动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是动脉系统的慢性炎症性疾病, 免疫细胞和炎症介质对其发生、发展均有重要作用。高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box 1 protein, HMGB1) 这一新发现的晚期炎症介质, 具有促血管损伤后再狭窄和 AS 等多种病理生理效应。Treg 细胞负向调节免疫应答, 有效抑制机体炎症反应。AS 患者 Treg 细胞的数量减少或功能下降, 提示 Treg 细胞与 AS 病变相关。Toll 样受体 (Toll like receptors, TLRs) 是诱导机体炎症反应重要的模式识别受体 (pattern recognition receptors, PRRs), 现认为 HMGB1 是其家族中 TLR2、4 的内源性配体, 而 Treg 细胞表达这两种受体。HMGB1 与 Treg 细胞上的 TLR2、4 结合, 可能直接影响其抑制作用, 导致机体持续慢性炎症反应, 参与 AS 的形成和发展。

**关键词:** 高迁移率族蛋白 1; Treg 细胞; 动脉粥样硬化; Toll 样受体

**中图分类号:** R392.11; R541.4   **文献标志码:** A

## Advance in relationship among HMGB1, regulatory T cells and atherosclerosis

ZHENG Xiao-Yun, WANG Jia-Jun\*

(Medical School, China Three Gorges University, Yichang 443002, China)

**Abstract:** Atherosclerosis (AS) is a chronic inflammatory autoimmune disease whose initiation and development could be affected by many immunial cells and inflammatory cytokine. At present, HMGB1 has been found to act as a late inflammtoy molecule that may damage endothelial cells, promote the proliferation of smooth muscle cells, and favor foam cell formation through various ways, which lead to the formation of lipid streaks and AS plaque. The regulatory T (Treg) cells can decrease inflammtory reaction and maintain immune tolerance effectively. Much evidence had showed the number or function of Treg cells decrease in patients of AS to imply some relation bewteen Treg cells's changed and the incidence of AS. Toll like receptors (TLRs) are important pattern recognition receptors (PRRs), which can promote immune inflammation. The combination of HMGB1 and TLR2 or TLR4 expressing on the surface of Treg cells, will interfere the function and number of Treg cells directly and maintain or prolong body's chornic inflammation which is the one most reason of AS. This paper briefly reviewed relative reports of the relationship among HMGB1, Treg cells and AS.

**Key words:** HMGB1; Treg cells; AS; TLR

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 严重危害人类健康, AS 形成的主要学说有脂质学说、炎症学说和感染学说等<sup>[1-2]</sup>, 但仍未完全阐明其发生机制, 因此对 AS 的防治缺乏有效的措施。现已证明, AS 是一种慢性炎症性的自身免疫性疾病, 固有性和获得性免疫应答均参与调节 AS 的发生、发展, 多种免疫细胞和炎症因子在 AS 病变过程中起着重要作

用<sup>[3-5]</sup>。高迁移率族蛋白 1 (high mobility group box 1 protein, HMGB1) 是一种晚期炎性介质, 也是 TLR2、4 的内源性配体, 与炎症细胞上相应受体结合后可

收稿日期: 2012-06-03; 修回日期: 2012-08-24

基金项目: 湖北省自然科学基金项目(2009CDB280)

\*通信作者: E-mail: wangjiajunzhch@126.com; Tel: 0717-6397438

促进炎症因子释放延长和增强炎症反应诱导 AS 病变。Treg 细胞是具有抑制炎症反应的调节性 T 细胞, AS 时其数目及功能降低, 提示可能参与 AS 病变。Treg 细胞表达 TLR2、4, HMGB1 可能通过 TLR2、4 直接影响 Treg 抑制炎症功能, 造成机体持续炎症, 促进 AS 的形成和发展。本文就其三者间可能的作用关系进行综述并讨论。

## 1 高迁移率族蛋白1(HMGB1)的生物学活性及与AS的相互关系

### 1.1 HMGB1的生物功能及作用机制

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, 在真核细胞内、外均有表达, 具有高度的保守结构(哺乳动物之间的同源性高达 99%)和广泛的生物学效应。HMGB1 包括 2 个“DNA-box”的 DNA 受体结合模体(A-box 和 B-box)和 1 个带负电荷的 C 末端<sup>[6]</sup>。胞核内的 HMGB1 是 DNA 结合蛋白, 参与稳定核小体、细胞分化、DNA 修复、DNA 重组及类固醇激素调控等生命活动。结合质膜的 HMGB1 参与神经轴突外生、平滑肌细胞趋化, 以及肿瘤细胞转移等<sup>[7]</sup>。

由于 HMGB1 比肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 和白细胞介素-1(IL-1) 等促炎因子有明显迟发动力学特性, 故认为是晚期炎症介质。HMGB1 可由坏死及受损细胞或由活化单核/巨噬细胞主动释放胞外发挥其生物学活性<sup>[8]</sup>, 其诱导加重炎症反应的机制可能是释放胞外的 HMGB1 在炎症过程中可主动迁移至相应的器官或组织位点, 作为 TLRs 家族中 TLR2、4 的内源性配体与炎症细胞相应受体结合, 激活细胞内 NF- $\kappa$ B 信号通道, 促使下游促炎因子, 如 TNF- $\alpha$ 、IL-1、巨噬细胞炎症蛋白(MIP)等多种促炎因子表达及释放, 同时使活化的单核-巨噬细胞释放 HMGB1, 形成正反馈, 造成炎症的级联放大效应, 促进慢性炎症的发生并延长和增强炎症反应<sup>[9]</sup>。研究显示, TLR-4 受体缺陷小鼠对于 HMGB1 介导的缺血损伤具有耐受性, 表明 TLR4 在 HMGB1 介导的炎症反应中作用重大<sup>[10]</sup>, 而敲除 HMGB1 的细胞致炎性反应能力也大大下降<sup>[11]</sup>, 显示全身炎症反应中 HMGB1 和 TLR4 等具有重要作用。

### 1.2 HMGB1对AS的作用

HMGB1 不仅具有促炎、调节神经细胞轴突生长、肿瘤转移的作用, 国外和本课题组均发现其具有促 AS 和血管损伤后再狭窄等多种病理生理效应<sup>[12]</sup>。研究证实, AS 形成病变后, 受损的血管内

皮细胞和活化的炎症细胞可主动释放大量 HMGB1, 刺激临近的内皮细胞表达促炎细胞因子、趋化因子、黏附分子及 RAGE<sup>[13-14]</sup>; 这些分子可反向促进 HMGB1 和其他炎症因子释放, 造成粥样硬化血管的 HMGB1 水平明显高于正常血管<sup>[15]</sup>。Kalinina 等<sup>[16]</sup>研究表明, 激活巨噬细胞释放的 HMGB1 可导致血管内皮损伤, 受损内皮细胞失去抗凝功能促使血小板聚集, 激活的血小板也会释放 HMGB1, 有助于血栓的形成, 促进 AS 斑块发展<sup>[17]</sup>。本课题组前期研究发现, HMGB1 可诱导血管平滑肌细胞的趋化, 引起血管平滑肌细胞的迁移及释放 HMGB1, 动脉血管基底膜增厚, 对 AS 形成起重要作用<sup>[18]</sup>。此外, HMGB1 能直接激活冠状动脉疾病的重要预测因子 C 反应蛋白的产生, 且 C 反应蛋白也能诱导激活巨噬细胞分泌 HMGB1, 说明粥样硬化斑块内 HMGB1 的释放对促进 AS 过程意义重大<sup>[19]</sup>。由于 HMGB1 与 AS 的形成、发展过程密切相关(见图 1), 现认为其可能成为用以治疗、预防 AS 相关疾病的新靶点<sup>[20]</sup>。然而, HMGB1 是 AS 的诱因, 还是 AS 出现后引起 HMGB1 释放, 仍需深入研究。

## 2 Treg细胞与AS的相关研究

### 2.1 Treg细胞的生物学特性

Treg 细胞是具有维持机体免疫功能动态平衡, 诱导自身耐受, 调节免疫应答, 抑制移植排斥反应等重要功能的特殊 CD4<sup>+</sup>T 细胞亚群。现已证实, Treg 细胞缺乏或功能抑制会导致多种自身免疫疾病(如类风湿关节炎患者和系统性红斑狼疮), 输入 Treg 细胞后症状明显改善<sup>[21]</sup>。Flemming<sup>[22]</sup> 研究发现, Treg 细胞能降低机体抗炎反应和参与抗肿瘤免疫调节。

Treg 细胞根据其来源可分为两类。一类是来源于胸腺的天然 Treg 细胞, 特征性标记是 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>, 占 CD4<sup>+</sup> 细胞总数的 5%~15%, 活化后可强烈抑制效应性 CD4<sup>+</sup> 和 CD8<sup>+</sup> T 细胞的免疫应答<sup>[23]</sup>。另一类为外周诱导形成的适应性 Treg 细胞, 包括 Tr1 和 Th3 细胞。Tr1 通过分泌高浓度的 IL-10 产生抑制作用, Th3 可分泌大量的 TGF- $\beta$  抑制免疫应答, 对诱导和维持外周免疫耐受具有重要作用<sup>[24]</sup>。

Treg 细胞产生抑制作用主要有以下三种方式<sup>[25]</sup>。

(1) 细胞-细胞接触。Treg 细胞必须与靶细胞相互接触, 通过细胞膜抑制分子(膜型 TGF- $\beta$ 、Fas 和颗粒酶  $\beta$ , LAG3 和 CTLA-4)的作用抑制靶细胞的活化、增殖和分化。(2) 局部分泌抑制性因子。Treg 细胞

分泌的可溶性TGF-β、IL-10和IL-35产生抑制活性效应。(3)局部竞争生长因子。Treg细胞因高表达CD25剥夺了效应性T细胞利用IL-2并诱导剥夺后细胞凋亡。最近研究发现，Treg细胞可能通过调节来源于组织的腺苷(cAMP)促使T细胞失能和消除自身免疫的破坏能力。

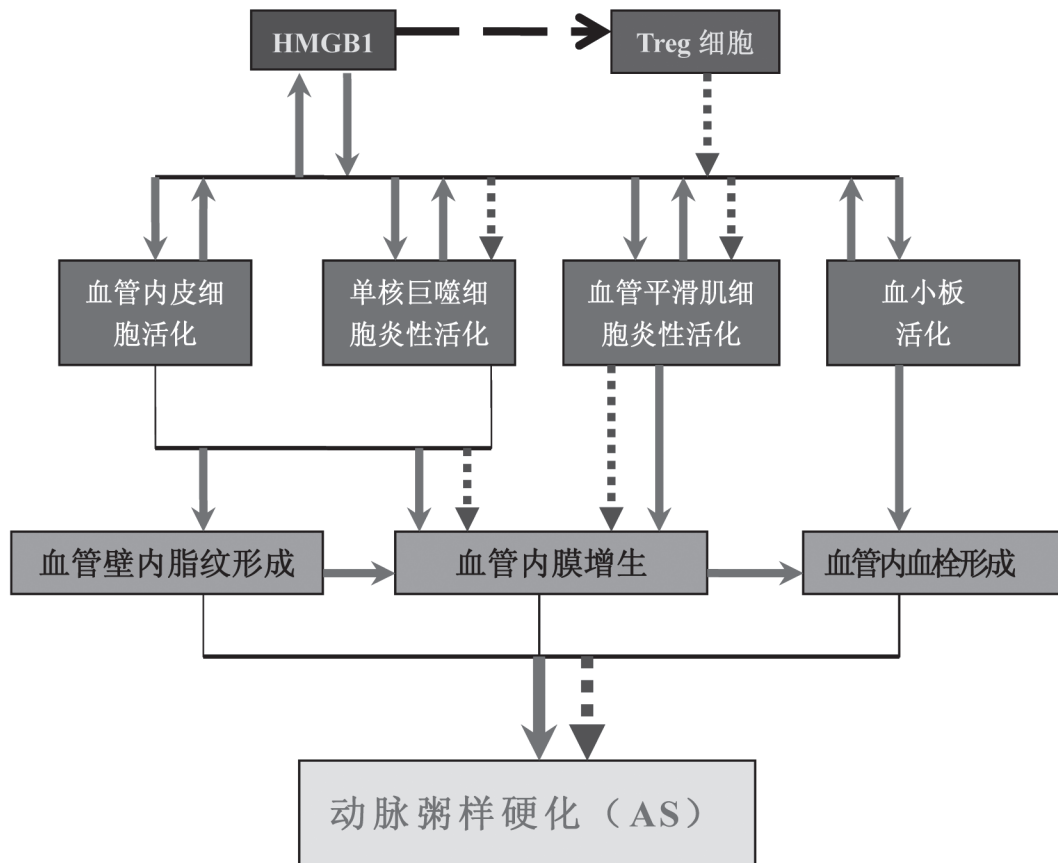
### 2.2 Treg细胞与AS的相互关系

AS小鼠模型中血和斑块中Treg细胞数量减少，抑制功能降低，而输注Treg细胞能使斑块明显变小，提出AS形成涉及Treg细胞的免疫调控机制，其变化是AS和ACS发生、发展的重要原因之一<sup>[26]</sup>。在人AS斑块形成的所有阶段，Treg细胞始终低表达，显示与AS形成有关。最近研究显示，AS患者外周血Treg细胞数量减少或功能下降，表明Treg细胞对AS发生可能具有保护作用，但Treg细胞抗AS作用的机制尚不明确。现认为可能的机制是Treg细胞分泌抑制性细胞因子(如IL-10和TGF-β)或者通过直接的细胞间接触，抑制初始T细胞的增殖，并降低Th1和Th2反应，具有抗动脉粥样硬化

的效应<sup>[27-28]</sup>。本课题组推断，正是由于AS患者体内Treg细胞功能的降低，抑制炎症作用减弱，从而诱使炎症长期存在，持续刺激炎症局部，进一步加重了AS的发展。Treg细胞对AS的作用总结见图1。

### 3 HMGB1对Treg的影响

HMGB1作为TLR2、4受体的内源性配体，多见作用于单核-巨噬细胞和粒细胞等炎症细胞诱发AS的形成。而对Treg细胞的影响及与AS的相关报道甚少。本课题组根据脓毒症患者HMGB1对Treg细胞的影响和前期发表的文章作出以下推断。首先，脓症患者及实验动物研究结果显示，HMGB1可能增强Treg细胞抑制炎症的功能，从而有效地抑制炎症，导致多功能脏器损伤产生<sup>[29]</sup>。另有文献报道AS病变时，HMGB1可刺激诱导单核-巨噬细胞分泌多种炎症因子加重炎症反应。如果AS病变中，HMGB1对Treg细胞的作用与单核-巨噬细胞一样，即促进其释放炎症因子，那么Treg细胞已失去炎症抑制作用转变成了加剧炎症的细



实线箭头：正向增强；短虚线箭头：负向减弱；长虚线箭头：作用未知

图1 HMGB1和Treg细胞对动脉粥样硬化的作用



胞, 这与 Treg 细胞显著的抑炎作用相悖。因此, 应当考虑 AS 患者 HMGB1 对 Treg 细胞的影响与对单核 - 巨噬细胞的作用有所差异。AS 病变 HMGB1 是否能对其 Treg 细胞产生与脓毒症中 Treg 细胞相同的增强抑制炎症的作用, 该课题具有较强的研究价值。尽管 TLR2、4 结合配体后对 Treg 数目及功能的影响尚待深入研究, 但文献报道多为可增强其抑制功能。分述如下。

### 3.1 TLR2对Treg细胞功能的调节

TLR2 具有直接调节 Treg 细胞增殖和抑制功能的双重作用。使用 TLR2 缺陷效应性 T 细胞的体内外抑制性实验均发现, 应用 TLR2 内源性配体 HSP60, Treg 细胞对靶细胞 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>T 或 CD8<sup>+</sup>T 细胞抑制作用增强, 提示 HSP60 与 TLR2 结合后, 通过 TLR2 信号转导导致蛋白激酶 C(PKC)、磷脂酰肌醇激酶 3(PI3K) 和 P38 活化增强 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞抑制, 从而下调免疫应答, 与 APC 无关。HSP60 可通过细胞间接触机制和分泌细胞因子 IL-10 和 TGF- $\beta$  增强 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 抑制靶细胞的能力<sup>[30]</sup>。

### 3.2 TLR4对Treg细胞功能的调节

Caramalho 等<sup>[31]</sup> 研究显示, Treg 细胞的 TLR4 与配体 LPS 结合后, 诱导 Treg 细胞活化和增殖, 使细胞的抑制能力上升 10 倍, 并且激活 Treg 细胞能有效控制幼稚 CD4<sup>+</sup>T 细胞介导的疾病发生。提出 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞可经 TLR4 调控含 LPS 细菌所致炎症, 增强 Treg 细胞抑制炎症反应的作用。但 Matharu 等<sup>[32]</sup> 的研究并未发现 LPS 对 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg 细胞类似的作用。

## 4 结语

上述依据可见 HMGB1 作为 TLR2、4 的内源性配体, 与 Treg 细胞相应结合后能否有效增强其抑制炎症的功能与 AS 的形成和发展关系密切。现已肯定 AS 是慢性免疫炎症, 合乎逻辑的推断是 AS 中 Treg 细胞抑炎功能可能显著降低, 从而表现出机体持续慢性的炎症现象(见图 1)。由于 AS 中 HMGB1 大量释放, 而且炎症局部具有浸润的 Treg 细胞, 那么 HMGB1 与 TLR2、4 结合后对 Treg 细胞究竟产生何种机制影响, 是否与刺激单核 - 巨噬细胞等炎性细胞诱导产生炎症因子的作用存在差异, 应做进一步切实有效的研究。

### [参 考 文 献]

[1] Giallauria F, Cirillo P, Lucci R, et al. Autonomic

- dysfunction is associated with high mobility group box-1 levels in patients after acute myocardial infarction. *Atherosclerosis*, 2010, 208 (1): 280-4
- [2] Takeno M, Yasuda S, Oisuka Y, et al. Impact of metabolic syndrome on the long-term survival of patients with acute myocardial infarction: potential association with C-reactive protein. *Circ J*, 2008, 72(3): 415-9
- [3] Andersson J, Libby P, Hansson GK. Adaptive immunity and atherosclerosis. *Clin Immunol*, 2010, 134(1): 33-46
- [4] Hansson GK, Libby P. The immune response in atherosclerosis: a double-edged sword. *Nat Rev Immunol*, 2006, 6(7): 508-19
- [5] Binder CJ, Chang MK, Shaw PX, et al. Innate and acquired immunity in atherogenesis. *Nat Med*, 2002, 8(11): 1218-26
- [6] Lildballe DL, Pedersen DS, Kalamajka R, et al. The Expression level of the chromatin-associated HMGB1 protein influences growth, stress tolerance, and transcriptome in *Arabidopsis*. *J Mol Biol*, 2008, 384(1): 9-21
- [7] Cirillo P, Giallauria F, Petrillo G, et al. Increased high mobility group box-1 protein levels are associated with impaired cardiopulmonary and echocardiographic findings after acute myocardial infarction. *J Card Fail*, 2009, 15(4): 362-7
- [8] Liu H, Yao Y M, Yu Y, et al. Role of Janus kinase / signal transducer and activator of transcription pathway in regulation of expression and inflammation- promoting activity of high mobility group box protein 1 in rat peritoneal macrophages. *Shock*, 2007, 27(1): 55-60
- [9] Ding HS, Yang J. High mobility group box-1 and cardiovascular diseases. *Saudi Med J*, 2010, 31(5): 486-9
- [10] Hagiwara S, Iwasaka H, Uchino T, et al. Effect on the left ventricle in an isolated rat heart model of septic shock. *Circ J*, 2008, 72(6): 1012-7
- [11] Van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products( RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis*, 2008, 11(1): 91-9
- [12] Yang J, Huang C, 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. *Mol Cell Biochem*, 2010, 345(1-2): 189-95
- [13] Hu X, Zhou X, He B, et al. Minocycline protects against myocardial ischemia and reperfusion injury by inhibiting high mobility group box 1 protein in rats. *Eur J Pharmacol*, 2010, 638 (1-3) : 84-9
- [14] Hu X, Cui B, Zhou X, et al. Ethyl pyruvate reduces myocardial ischemia and reperfusion injury by inhibiting high mobility group box 1 protein in rats. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(1) : 227-31
- [15] Giallauria F, Cirillo P, D'Agostino M, et al. Effects of exercise training on high-mobility group box-1 levels after acute myocardial infarction. *J Card Fail*, 2011, 17(2): 108-14
- [16] 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. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2004, 24(12): 2320-5
- [17] Yang J, Chen LH, Yang J, et al. High mobility group box-1 induces migration of vascular smooth muscle cells via TLR4-dependent PI3K/Akt pathway activation. *Mol Biol Rep*, 2012, 39(3): 3361-7
- [18] Kawahara K, Biswat KK, Unoshima M, et al. C- reactive protein induces high- mobility group box- 1 protein release through activation of p38MAPK in macrophage RAW 264.7 cells. *Cardiovasc Pathol*, 2008, 17(3): 129-38
- [19] Xu H, Yao Y, Su Z, et al. Endogenous HMGB1 contributes to ischemia-reperfusion-induced myocardial apoptosis by potentiating the effect of TNF- $\alpha$ /JNK. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2011, 300(3): H913-21
- [20] Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 is therapeutic target for sterile inflammation and infection. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29(3): 139-62
- [21] Nyirenda MH, O'Brein K, Ssnvito L, et al. Modulation of regulatory T cells in health and disease: role of toll-like receptors. *Inflamm Allergy Drug Target*, 2009, 8(2): 124-9
- [22] Flemming A. Autoimmunity: Targeted Tregs tame autoimmune disease. *Nat Rev Drug Discov*, 2010, 9(1):19
- [23] Ochs HD, G ambineri E, Torgerson TR. IPEX, FOXP3 and regulatory T cells:a model for autoimmunity. *Immunol Res*, 2007, 38(1-3): 112-21
- [24] Awasthi A, Carrier Y, Person JPS, et al. A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti inflammatory T cells. *Nat Immunol*, 2007, 8(12): 1353-62
- [25] Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, et al. CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp<sup>3+</sup> regulatory T cells induce cytokine deprivation mediated apoptosis of effector CD4<sup>+</sup>T cells. *Nat Immunol*, 2007, 8(12): 1378-82
- [26] Wu HY, Maron R, Tukpah AM, et al. Mucosal anti-CD3 monoclonal antibody attenuates collagen induced arthritis that is associated with induction of LAP<sup>+</sup> regulatory T cells and is enhanced by administration of an emulsome based Th2 skewing adjuvant. *J Immunol*, 2010, 185 (6): 3401-7
- [27] Sasaki N, Yamashita T, Takeda M, et al. Oral anti-CD3 antibody treatment induces regulatory T cells and inhibits the development of atherosclerosis in mice. *Circulation*, 2009, 120(20): 1996-2005
- [28] Van ET, Van Puijvelde GH, Foks AC, et al. Vaccination against Foxp<sup>3+</sup> regulatory T cells aggravates atherosclerosis. *Atherosclerosis*, 2010, 209(1): 74-80
- [29] Venet F, Chung CS, Kherouf H, et al. Increased circulating regulatory T cell, CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup> contribute to lymphocyte anergy in septic shock patients. *Intensive Care Med*, 2009, 35(4): 678-86
- [30] Van Maren WW, Nierkens S, Toonen LW, et al. Multifaceted effect of synthetic TLR2 ligand and *Legionella pneumophila* on Treg-mediated suppression of T cells activation. *BMC Immunol*, 2011, 24(3): 12-23
- [31] Caramalho I, Lope-Carvalho T, Ostler D, et al. Regulatory T cells selectively express toll-like receptors and activated by lipopolysaccharide. *J Exp Med*, 2003, 197(4): 403-11
- [32] Matharu KS, Mizoguchi E, Cotoner CA, et al. Toll-like receptors 4-mediated regulation of helicobacter-depent colitis in IL-10-deficient mice. *Gastroenterology*, 2009, 137(4): 1380-90