

# 高速泳动族蛋白-1 在成体干细胞迁移中的作用

张旭芳综述 凌均荣审校

(中山大学光华口腔医学院·附属口腔医院牙体牙髓病科 广州 510055)

**[摘要]** 高速泳动族蛋白-1(HMGB1)是一种广泛存在于真核生物中且高度保守的核蛋白,在组织损伤和细胞应激状态下可以被释放至细胞外基质之中,除作为炎症递质参与免疫反应外,也介导成体干细胞的迁移,促进多种组织的修复和再生。本文就 HMGB1 和高级糖基化终末产物受体(RAGE)的结构及生化特点、HMGB1 对成体干细胞迁移的影响、HMGB1/RAGE 信号转导途径等作一综述,为研究牙髓干细胞迁移、牙髓损伤的修复提供新的方向。

**[关键词]** 高速泳动族蛋白-1; 高级糖基化终末产物受体; 成体干细胞; 迁移

**[中图分类号]** Q 51 **[文献标志码]** A **[doi]** 10.3969/j.issn.1673-5749.2011.03.017

**Role of high mobility group box-1 in the migration of adult stem cells** ZHANG Xu-fang, LING Jun-qi. (Dept. of Conservative Dentistry and Endodontics, Guanghua School of Stomatology, Sun Yat-Sen University, Guangzhou 510055, China)

**[Abstract]** High mobility group box-1(HMGB1) is a ubiquitous and highly-conserved nuclear protein within all eukaryotic cells, and it can be released into extracellular space during tissue damage or stress state. Apart from playing a role of inflammatory cytokine in immune response, HMGB1 could also mediate migration of adult stem cells, promoting repair and regeneration of various tissues. This review focuses on the structure and biochemistry features of HMGB1 and receptor for advanced glycation end product(RAGE), and their effect on adult stem cells migration as well as signal transduction pathway, providing a new clue for migration of dental pulp stem cells and restoration of damaged dental pulp.

**[Key words]** high mobility group box-1; receptor for advanced glycation end product; adult stem cell; cell migration

成体干细胞(adult stem cell, ASC)包括来源于骨髓的干细胞和多数器官组织中的原位干细胞,如心脏、中枢神经、骨骼肌、脂肪等组织,它们一般定居于特定的微环境中<sup>[1]</sup>。当组织损伤后,ASC 受微环境中一系列趋化和生长因子的影响而被动员、趋化、分化和增殖,参与损伤组织的修复<sup>[2-3]</sup>。高速泳动族(high mobility group, HMG)蛋白作为一种非组蛋白的染色质相关蛋白,以其在凝胶电泳中高速泳动而得名<sup>[4]</sup>。HMG 是一个包括 12 个成员的大家族,在真核细胞生物中广泛存在,分为 HMGA、HMGB 和 HMGN 三大类<sup>[5]</sup>。其中, HMGB1 是一种广泛存在且高度保守的 DNA 结合蛋白。当组织受到损伤或者炎症刺激的时候, HMGB1 被修饰并释放到细胞外作为内源性信号分

子介导炎症反应。细胞外的 HMGB1 及其受体高级糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end product, RAGE)可介导 ASC 定向迁移,从而在心肌梗死后的修复以及血管新生、骨骼肌再生等方面发挥作用。

## 1 HMGB1 及其受体

### 1.1 HMGB1 的结构

HMGB1 在 HMG 中蛋白质质量最高,在平均 10~15 个核小体中就含有一个 HMGB1 分子<sup>[6]</sup>。人类 hmgb1 基因位于 13q12,编码 215 个氨基酸,分别是位于 N 端 A 框和 B 框以及 C 端的多聚阴离子序列(30个重复的天冬氨酸和谷氨酸残基)<sup>[7]</sup>。其中, A 框和 B 框分别由近 80 个氨基酸残基以 3 个 α-螺旋的方式组成 L 型结构域,与 DNA 均有很高的亲和力,带有强烈的正电荷。B 框是引起炎症反应的功能结构域, A 框对 B 框有一定的拮

[收稿日期] 2010-08-28; [修回日期] 2011-01-15

[作者简介] 张旭芳(1986—),女,河南人,硕士

[通讯作者] 凌均荣, Tel: 020-83862621

抗作用。HMGB1在物种进化过程中高度保守，不同物种之间结构的同源度高达85%<sup>[6]</sup>。

## 1.2 HMGB1的释放与受体

正常情况下，HMGB1局限于细胞核中，参与基因转录，稳定核小体的结构。HMGB1主要由坏死细胞被动释放或免疫细胞主动分泌这两条途径释放至细胞外<sup>[8]</sup>。HMGB1缺少信号肽，主动分泌不能通过经典的内质网-高尔基体途径，而是在HMGB1赖氨酸残基高度乙酰化之后，由分泌型溶酶体将其释放至细胞外。在程序性细胞死亡中，HMGB1未被乙酰化，不能释放HMGB1。研究<sup>[9]</sup>显示，垂体、肠上皮、肝脏、骨骼肌和心肌等在组织损伤或氧化应激状态下也可释放HMGB1。

HMGB1的细胞外受体包括：Toll样受体家族(Toll-like receptor, TLR)成员TLR-2、4、9、RAGE<sup>[6,9]</sup>。TLR家族主要参与感染和创伤引起的免疫反应。RAGE为跨膜蛋白，属于免疫球蛋白超家族成员，配体有HMGB1、高级糖基化终产物、 $\beta$ -淀粉样蛋白等，在免疫细胞和神经元以及多数ASC和肿瘤细胞表面表达。正常情况下表达量较低，但是当其配体积累升高时，RAGE即被上调<sup>[10]</sup>。HMGB1与RAGE结合后，参与免疫细胞的分化成熟与迁移，神经系统的发育，并在多种ASC的迁移以及肿瘤的侵袭和转移中起重要的作用<sup>[6,10]</sup>。

## 2 HMGB1对ASC迁移的影响

### 2.1 促进骨髓间充质干细胞迁移及分化

促进骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cell, BMSC)的迁移分化，可为低血性组织器官损伤的修复提供新的治疗途径。Meng等<sup>[11]</sup>通过Transwell试验发现：人的BMSC沿着质量浓度为12.5~50  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的HMGB1迁移，并呈剂量依赖性，且这一效应不能被RAGE完全阻断；BMSC有低免疫原性、抑制炎症反应和移植后免疫反应的特点，HMGB1对BMSC细胞表型几乎无影响，BMSC仍能够抑制淋巴细胞增殖的活性；HMGB1可使BMSC的碱性磷酸酶的活性明显增高，骨钙蛋白(osteocalcin, OCN)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN) mRNA表达上调，也就是HMGB1有诱导BMSC向成骨细胞分化的潜能。

### 2.2 促进血管新生

血管新生在肿瘤生长和转移起重要的作用，

同时影响损伤、低血和移植组织的再生与修复。多项独立的体外Transwell试验<sup>[12-14]</sup>证实，HMGB1能够促进多种不同来源的血管内皮细胞、中层成血管细胞和内皮前期细胞(endothelial progenitor cell, EPC)的迁移，而且迁移与RAGE相关并呈HMGB1质量浓度依赖性。Mitola等<sup>[13]</sup>通过单层内皮细胞划痕试验发现，HMGB1能促进创伤边缘的内皮细胞形成皱折，即呈现内皮细胞迁移的形态特征。Schlueter等<sup>[15]</sup>发现，HMGB1直接引起内皮细胞多细胞球体的出芽。

HMGB1对血管相关性干细胞也有趋化作用。Palumbo等<sup>[14]</sup>在Boyden装置的聚碳酸酯滤膜上种植单层内皮细胞，结果D16细胞沿100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的HMGB1迁移的数目是对照组的8倍，甚至强于血管内皮生长因子的试验组；在健康小鼠的胫前肌中植入HMGB1包被的肝素琼脂糖颗粒，腓动脉D16细胞出现了募集。Chavakis等<sup>[12]</sup>利用活体电视显微镜技术在小鼠神经胶质瘤模型上发现，用HMGB1预刺激的EPC对肿瘤微血管的初始黏附能力明显提高，2d后归巢EPC的数量是对照组的3倍。HMGB1还能促进EPC在低血的肌肉组织中归巢，这一过程与增加整联蛋白对纤连蛋白和纤维蛋白原的亲合力有关。

除HMGB1之外，血管新生还受到血管内皮生长因子、肿瘤坏死因子- $\alpha$ 、白细胞介素(interleukin, IL)-8和基质金属蛋白酶-9等细胞因子的影响<sup>[15-16]</sup>。HMGB1还可以炎症性地激活巨噬细胞，诱导上述因子的释放，起到间接促进血管生成的作用<sup>[16]</sup>。

### 2.3 对心脏干细胞迁移的调节

心肌损伤后的修复能力非常有限，利用骨髓干细胞或心脏原位干细胞促进心肌再生是目前研究的热点。研究<sup>[17-19]</sup>显示，在心肌梗死个体的血清和梗死区局部组织中，HMGB1 mRNA及其蛋白水平均明显升高。在Limana等<sup>[20]</sup>的Transwell试验中，心脏原位c-kit<sup>+</sup>干细胞沿100  $\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的HMGB1的迁移率是对照组的2倍。他们结扎小鼠冠状动脉以制作心肌梗死模型，在梗死区周围注射200 ng的纯化HMGB1，一周之后梗死区由新形成的心肌细胞所重建。用5-溴脱氧尿苷(5-bromodeoxyuridine, BrdU)免疫荧光染色法追踪新生心肌细胞是否来源于骨髓，结果新生心肌细胞几乎均为BrdU<sup>-</sup>，提示HMGB1对循环中的c-kit<sup>+</sup>细胞募集作用不大；与此相反，Andrassy等<sup>[17]</sup>却发

现 HMGB1 皮内注射(10 mg/每只), 恶化了小鼠的心脏低血再灌注损伤。

HMGB1 以旁分泌的方式刺激成心肌纤维细胞(cardiac fibroblast, cFb)释放生长因子、趋化因子等来调节心肌干细胞(cardiac stem cell, CSC)的功能, 促进心肌再生<sup>[21]</sup>。低质量浓度的HMGB1 (<100 μg·L<sup>-1</sup>)可促进 cFb 迁移, 以 10 μg·L<sup>-1</sup> 的 HMGB1 刺激体外培养的 cFb, 其上清液可明显提高 CSC 的迁移率, 且诱导作用远强于在培养基中直接加入 HMGB1<sup>[21]</sup>。另外, HMGB1 对血管形成的影响也可能是促进心肌修复的机制之一。心肌特异性 HMGB1 过度表达的转基因小鼠(HMGB1-Tg)在心肌梗死 4 周后, 其心功能的恢复水平和存活率升高, 免疫荧光染色示梗死区毛细血管和小动脉的密度明显增高<sup>[22]</sup>。

#### 2.4 对成肌细胞及其他组织细胞的迁移作用

de Mori等<sup>[23]</sup>研究发现, 在成肌细胞表面可表达 RAGE 和 TLR-4, 其表达量在成肌细胞分化过程中下降, 成熟的肌细胞可释放 HMGB1 至细胞外, 对肌源性细胞有趋化活性, 并可被 HMGB1 阻断剂 A 框所抑制。在小鼠单侧后肢低血模型上, 肌肉内注射 HMGB1 可提高血液灌注量和再生肌纤维的数量。即 HMGB1 通过自分泌或旁分泌的方式调节成肌细胞和血管内皮细胞的功能, 促进骨骼肌再生。

HMGB1 可促进大鼠平滑肌细胞呈剂量依赖性迁移, 快速短暂的形变、细胞骨架重组和极性改变, 呈现出运动细胞的特征<sup>[24]</sup>。HMGB1/RAGE 还可以介导神经元轴突的生长和细胞的迁移, 诱导皮肤成纤维细胞和角化细胞迁移, 促进糖尿病小鼠的皮肤伤口愈合以及参与某些肿瘤的侵袭与转移<sup>[25-27]</sup>。

### 3 HMGB1/RAGE 信号转导途径

HMGB1 诱导的细胞迁移由受体 RAGE 所介导<sup>[6, 28]</sup>。HMGB1/RAGE 主要激活两条信号转导途径: 1)通过激活细胞内的 CDC42 和 Rac1 通路, 引起细胞骨架的改变, 介导神经轴突生长、成肌细胞分化和肿瘤细胞迁移<sup>[25, 27, 29]</sup>; 2)通过激活促丝裂原激活蛋白激酶信号转导途径最终激活核因子-κB(nuclear factor-κB, NF-κB), 引起多种炎症反应基因和细胞因子表达上调, 如细胞间黏附分子-1、血管细胞黏附因子-1、肿瘤坏死因子-α、IL-1β 等。此途径参与了平滑肌细胞和血管内

皮细胞的迁移以及骨骼肌再生和心肌低血的修复<sup>[14, 17, 24, 29]</sup>。值得注意的是, 活化后的 NF-κB 通过结合 rage 基因等多种启动子序列, 使 HMGB1 信号转导形成正反馈通路, 产生逐级放大效应<sup>[6, 28]</sup>。

细胞外基质的降解对细胞迁移至关重要。细胞外的 HMGB1 还可以与纤溶酶原激活系统相互作用, 促进组织型纤维蛋白溶酶原激活物生成, 使纤维蛋白溶酶原转化为纤溶酶。这可能也是 HMGB1 促进细胞迁移的机制之一<sup>[24, 30]</sup>。

### 4 结语

在发育期大鼠磨牙所有类型的牙源性细胞的细胞核中, HMGB1 蛋白表达, 且在矿化区域, 即成釉细胞和成牙本质细胞细胞质和细胞核中表达增强<sup>[31]</sup>。即 HMGB1 参与牙本质和釉质的矿化。

当牙本质受到破坏, 细菌及其毒素侵入牙髓, 除激起牙髓的炎症反应破坏组织之外, 也可诱导免疫细胞产生细胞因子调节牙髓的修复过程, 即激活具有再分化潜能的牙髓干细胞, 使其向受损部位迁移、分化, 分泌牙本质基质以及形成修复性牙本质。分泌至细胞外的 HMGB1, 不仅是炎症反应的重要递质, 也在多种 ASC 迁移的过程中起到趋化因子的作用。Sugars等<sup>[31]</sup>用 RT-PCR 检测到 HMGB1 和 rage mRNA 在成人牙髓成纤维细胞中的表达。由此推测, RAGE 在牙髓干细胞中也有表达, 在牙髓损伤的牙髓干细胞受到一个复杂精密的细胞因子网络调控向损伤处迁移修复的过程中, HMGB1/RAGE 也可能扮演了重要的角色。

### 5 参考文献

- [1] Mitsiadis TA, Barrandon O, Rochat A, et al. Stem cell niches in mammals[J]. *Exp Cell Res*, 2007, 313(16): 3377-3385.
- [2] 何飞, 谭颖徽, 张纲. 人牙髓干细胞的体外培养和鉴定[J]. *华西口腔医学杂志*, 2005, 23(1): 75-78.
- [3] 谭震, 宫苹, 赵青. 碱性成纤维细胞生长因子对成骨细胞和牙周膜成纤维细胞迁移、增殖的影响[J]. *华西口腔医学杂志*, 2005, 23(3): 202-203.
- [4] Goodwin GH, Sanders C, Johns EW. A new group of chromatin-associated proteins with a high content of acidic and basic amino acids[J]. *Eur J Biochem*, 1973, 38(1): 14-19.
- [5] Bustin M. Revised nomenclature for high mobility group (HMG) chromosomal proteins[J]. *Trends Biochem Sci*, 2001, 26(3): 152-153.
- [6] Klune JR, Dhupar R, Cardinal J, et al. HMGB1: Endogenous danger signaling[J]. *Mol Med*, 2008, 14(7/8):

- 476-484.
- [7] Ferrari S, Finelli P, Rocchi M, et al. The active gene that encodes human high mobility group 1 protein(HM-G1) contains introns and maps to chromosome 13[J]. Genomics, 1996, 35(2) 367-371.
- [8] Gardella S, Andrei C, Ferrera D, et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway[J]. EMBO Rep, 2002, 3(10) 995-1001.
- [9] Ivanov S, Dragoi AM, Wang X, et al. A novel role for HMGB1 in TLR9-mediated inflammatory responses to CpG-DNA[J]. Blood, 2007, 110(6) :1970-1981.
- [10] O'Callaghan A, Wang J, Redmond HP. HMGB1 as a key mediator of tissue response to injury :Roles in inflammation and tissue repair[J]. Eur Surg, 2006, 38(4) 283-292.
- [11] Meng E, Guo Z, Wang H, et al. High mobility group box 1 protein inhibits the proliferation of human mesenchymal stem cells and promotes their migration and differentiation along osteoblastic pathway[J]. Stem Cells Dev, 2008, 17(4) 805-813.
- [12] Chavakis E, Hain A, Vinci M, et al. High-mobility group box 1 activates integrin-dependent homing of endothelial progenitor cells[J]. Circ Res, 2007, 100(2) 204-212.
- [13] Mitola S, Belleri M, Urbinati C, et al. Cutting edge :Extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine[J]. J Immunol, 2006, 176(1) :12-15.
- [14] Palumbo R, Sampalesi M, de Marchis F, et al. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation[J]. J Cell Biol, 2004, 164(3) :441-449.
- [15] Schlueter C, Weber H, Meyer B, et al. Angiogenic signaling through hypoxia: HMGB1 :An angiogenic switch molecule[J]. Am J Pathol, 2005, 166(4) :1259-1263.
- [16] Lolmede K, Campana L, Vezzoli M, et al. Inflammatory and alternatively activated human macrophages attract vessel-associated stem cells, relying on separate HMGB1- and MMP-9-dependent pathways[J]. J Leukoc Biol, 2009, 85(5) :779-787.
- [17] Andrassy M, Volz HC, Igwe JC, et al. High-mobility group box-1 in ischemia-reperfusion injury of the heart [J]. Circulation, 2008, 117(25) 3216-3226.
- [18] Cirillo P, Giallauria F, Pacileo M, et al. Increased high mobility group box-1 protein levels are associated with impaired cardiopulmonary and echocardiographic findings after acute myocardial infarction[J]. J Card Fail, 2009, 15(4) 362-367.
- [19] Kohno T, Anzai T, Naito K, et al. Role of high-mobility group box 1 protein in post-infarction healing process and left ventricular remodelling[J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(3) 565-573.
- [20] Limana F, Germani A, Zacheo A, et al. Exogenous high-mobility group box 1 protein induces myocardial regeneration after infarction via enhanced cardiac C-kit<sup>+</sup> cell proliferation and differentiation[J]. Circ Res, 2005, 97(8) : e73-e83.
- [21] Rossini A, Zacheo A, Mocini D, et al. HMGB1-stimulated human primary cardiac fibroblasts exert a paracrine action on human and murine cardiac stem cells[J]. J Mol Cell Cardiol, 2008, 44(4) :683-693.
- [22] Kitahara T, Takeishi Y, Harada M, et al. High-mobility group box 1 restores cardiac function after myocardial infarction in transgenic mice[J]. Cardiovasc Res, 2008, 80(1) :40-46.
- [23] de Mori R, Straino S, di Carlo A, et al. Multiple effects of high mobility group protein 1 in skeletal muscle regeneration[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2007, 27(11) 2377-2383.
- [24] Degryse B, Bonaldi T, Scaffidi P, et al. The high mobility group(HMG) boxes of the nuclear protein HMG1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells[J]. J Cell Biol, 2001, 152(6) :1197-1206.
- [25] Chou DK, Zhang J, Smith FI, et al. Developmental expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE), amphoterin and sulfoglucuronyl(HNK-1) carbohydrate in mouse cerebellum and their role in neurite outgrowth and cell migration[J]. J Neurochem, 2004, 90(6) :1389-1401.
- [26] Straino S, di Carlo A, Mangoni A, et al. High-mobility group box 1 protein in human and murine skin : Involvement in wound healing[J]. J Invest Dermatol, 2008, 128(6) :1545-1553.
- [27] Taguchi A, Blood DC, del Toro G, et al. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases[J]. Nature, 2000, 405(6784) 354-360.
- [28] 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) [J]. Angiogenesis, 2008, 11(1) 91-99.
- [29] Sorci G, Riuzzi F, Arcuri C, et al. Amphoterin stimulates myogenesis and counteracts the antimyogenic factors basic fibroblast growth factor and S100B via RAGE binding[J]. Mol Cell Biol, 2004, 24(11) :4880-4894.
- [30] Parkkinen J, Rauvala H. Interactions of plasminogen and tissue plasminogen activator(t-PA) with amphoterin. Enhancement of t-PA-catalyzed plasminogen activation by amphoterin[J]. J Biol Chem, 1991, 266(25) :16730-16735.
- [31] Sugars R, Karlström E, Christersson C, et al. Expression of HMGB1 during tooth development[J]. Cell Tissue Res, 2007, 327(3) 511-519.