

• 论 著 •

HMGB1 介导细胞焦亡参与肺动脉高压 小鼠肺血管重构的机制研究*

李鸣远, 吴雷琪, 武 云[△]

新疆医科大学第一附属医院全科医学科, 新疆乌鲁木齐 830054

摘要:目的 探讨高迁移率族蛋白 1(HMGB1)介导细胞焦亡参与肺动脉高压(PAH)小鼠肺血管重构的机制。方法 将 40 只 SD 小鼠分为对照组、PAH 组、PAH+HMGB1 中和抗体(HMGB1 Ab)组、PAH+焦亡抑制剂(NSA)组,除对照组外的其余 3 组均采用低氧处理建立 PAH 模型,PAH+HMGB1 Ab 组和 PAH+NSA 组再分别给予 HMGB1 Ab、NSA 处理,结束后,检测各组小鼠平均肺动脉压(mPAP)、右心室肥厚指数(RVHI),苏木精-伊红染色观察各组小鼠肺组织病理学变化情况并计算肺动脉血管壁厚度百分比(WT)及肺动脉管壁面积百分比(WA)。酶联免疫吸附试验检测各组小鼠血清中白细胞介素(IL)-1 β 、IL-18 水平。免疫组化染色观察各组小鼠肺组织中消皮素 D(GSDMD)表达。实时荧光定量 PCR 和蛋白质免疫印迹检测各组小鼠肺组织中 HMGB1 及核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)、GSDMD 表达。结果 与对照组[(1.81 $\pm$ 0.19)kPa、(0.27 $\pm$ 0.03)]比较,PAH 组小鼠 mPAP 和 RVHI[(3.97 $\pm$ 0.41)kPa、(0.41 $\pm$ 0.04)]显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组比较,PAH 组肺动脉血管壁明显增厚,血管平滑肌细胞增殖肥大;PAH+HMGB1 Ab 组和 PAH+NSA 组肺动脉血管壁增厚程度较 PAH 组明显减轻。PAH 组小鼠 WT 和 WA[(42.06 $\pm$ 4.38)%、(50.56 $\pm$ 5.24)%]显著高于对照组[(23.64 $\pm$ 2.46)%、(25.12 $\pm$ 2.63)%],差异有统计学意义($P<0.05$)。与对照组[(23.56 $\pm$ 2.48)pg/mL、(22.68 $\pm$ 2.32)pg/mL]比较,PAH 组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-18 水平 [(94.51 $\pm$ 9.62)pg/mL、(58.21 $\pm$ 5.97)pg/mL]显著增加,差异有统计学意义($P<0.05$)。与 PAH 组[(48.57 $\pm$ 5.02)%]比较,PAH+HMGB1 Ab 组和 PAH+NSA 组肺组织中 GSDMD 阳性率[(16.52 $\pm$ 1.76)%、(14.62 $\pm$ 1.59)%]显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。PAH 组小鼠肺组织中 HMGB1、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达显著高于对照组($P<0.05$)。结论 HMGB1 中和抗体能够抑制细胞焦亡从而降低 PAH 小鼠肺动脉压力,改善肺血管重构。

关键词:肺动脉高压; 高迁移率族蛋白 1; 细胞焦亡

DOI:10.3969/j.issn.1673-4130.2024.16.012

中图法分类号:R544.1

文章编号:1673-4130(2024)16-1979-07

文献标志码:A

Mechanism of HMGB1-mediated pyroptosis involved in pulmonary vascular remodeling in mice with pulmonary arterial hypertension*

LI Mingyuan, WU Leiqi, WU Yun[△]

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

Abstract: **Objective** To investigate the mechanism of high mobility group protein 1 (HMGB1) -mediated pyroptosis involved in pulmonary vascular remodeling in mice with pulmonary arterial hypertension (PAH). **Methods** Forty SD mice were divided into control group, PAH group, PAH+HMGB1 neutralizing antibody (HMGB1 Ab) group and PAH+ necrolysis inhibitor (NSA) group. Except the control group, the remaining 3 groups were treated with hypoxia to establish PAH model. PAH+HMGB1 Ab group and PAH+NSA group were treated with HMGB1 Ab and NSA respectively. After the treatment, the mean pulmonary artery pressure (mPAP) and right ventricular hypertrophy index (RVHI) of mice in each group were detected. Hematoxylin-eosin staining was used to observe the pulmonary histopathological changes and calculate the percentage of pulmonary artery wall thickness (WT) and the percentage of pulmonary artery wall area (WA). The serum levels of interleukin (IL)-1 β and IL-18 were detected by enzyme-linked immunosorbent assay. The ex-

* 基金项目:新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目(2022D01C476)。

作者简介:李鸣远,女,副主任医师,主要从事风湿免疫疾病的诊疗研究。 [△] 通信作者, E-mail: wuyun8009@163.com。

pression of gasdermin D (GSDMD) in lung tissues of mice in each group was observed by immunohistochemical staining. Real-time fluorescence quantitative PCR and western blot were used to detect the expression of HMGB1, nucleotide-binding oligomerized domain-like receptor protein 3 (NLRP3), apoptosis-associated speck-like protein (ASC), Cysteinyl aspartate-specific proteinase-1 (Caspase-1), and GSDMD in lung tissues of mice in each group. **Results** Compared with control group [(1.81 ± 0.19) kPa, (0.27 ± 0.03)], mPAP and RVHI in PAH group [(3.97 ± 0.41) kPa, (0.41 ± 0.04)] were significantly increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with the control group, the pulmonary artery wall of PAH group was significantly thickened, and the vascular smooth muscle cells proliferated and hypertrophy. The degree of pulmonary artery wall thickening in PAH+ HMGB1Ab and PAH+ NSA groups was significantly reduced compared with PAH group. WT and WA in PAH group [$(42.06 \pm 4.38)\%$, $(50.56 \pm 5.24)\%$] were significantly higher than those in control group [$(23.64 \pm 2.46)\%$, $(25.12 \pm 2.63)\%$], the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with control group [(23.56 ± 2.48) pg/mL, (22.68 ± 2.32) pg/mL], serum levels of IL-1 β and IL-18 in PAH group [(94.51 ± 9.62) pg/mL, (58.21 ± 5.97) pg/mL] were significantly increased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). Compared with PAH group [$(48.57 \pm 5.02)\%$], the positive rate of GSDMD in PAH+ HMGB1Ab and PAH+ NSA groups [$(16.52 \pm 1.76)\%$, $(14.62 \pm 1.59)\%$] was significantly decreased, and the difference was statistically significant ($P < 0.05$). The protein expression of HMGB1, NLRP3, ASC, Caspase-1 and GSDMD in lung tissues of PAH group were significantly higher than those of control group ($P < 0.05$). **Conclusion** HMGB1 neutralizing antibody can inhibit pyroptosis of PAH mice, thereby reducing pulmonary artery pressure and improving pulmonary vascular remodeling.

Key words: pulmonary arterial hypertension; high mobility group protein 1; pyroptosis

肺动脉高压(PAH)是一种起病隐匿、进展迅速的致命性疾病,其特征是肺动脉壁内侧层和内膜层硬化,肺动脉发生不可逆重塑,导致肺血管阻力持续升高和血流动力学紊乱,右心室衰竭最终引发患者死亡^[1-2]。有研究表明,肺动脉重构在 PAH 的高风险阶段起着关键作用,目前针对 PAH 的靶向药物主要作用是松弛血管壁平滑肌和扩张血管,但对逆转肺动脉重构影响不大^[3]。因此,迫切需要探讨抑制 PAH 肺血管重构的潜在靶点及有效药物。高迁移率族蛋白 1 (HMGB1)是一种高度保守的非组蛋白 DNA 结合蛋白,广泛分布在真核细胞的细胞核中,可从凋亡细胞、坏死细胞及细胞因子刺激激活的细胞中释放出来。释放在细胞外的 HMGB1 通过与几种受体结合来促进细胞增殖、迁移和分化等过程^[4-5],并在许多炎症性疾病中起着至关重要的作用,例如,铜积累诱导的三磷酸腺苷耗竭激活 AMP 活化蛋白激酶以促进 HMGB1 磷酸化,从而增加细胞外释放水平,并与晚期糖基化终产物受体(RAGE)结合增强促炎细胞因子产生,表明 HMGB1 是铜下垂引发的无菌炎症的关键免疫介质^[6];脓毒症合并急性呼吸窘迫综合征患者的血清中 HMGB1 和可溶性尿激酶型纤溶酶原激活因子受体上调,并与炎症标志物呈正相关,两者高表达可能与患者预后不良有关^[7];在焦虑症引起的神经性疼痛的内侧前额叶皮层中 HMGB1 表达上调,其从细胞核到细胞质的易位主要发生在神经元中,并伴有小胶质细胞和星形胶质细胞的活化^[8]。目前, HMGB1 已被确定为 PAH 发病机制的生物标志物,

已有证据表明 HMGB1 在 PAH 患者的肺部和血清中表达升高,并且与疾病严重程度呈正相关^[9]。此外, HMGB1 可以通过激活内质网应激来促进肺动脉平滑肌细胞的异常增殖和迁移,加快 PAH 病理进展,并介导 RAGE 的表达促进炎症反应,导致肺功能障碍,加重缺氧性 PAH 的症状^[10-11]。由此提示,靶向阻断 HMGB1 途径可能是 PAH 的潜在治疗方法。然而, HMGB1 驱动 PAH 的发病机制仍有待阐明。细胞焦亡是一种不同于细胞凋亡、坏死和自噬的炎症细胞死亡形式,其特征是炎症小体和半胱天冬酶家族的活化及多种促炎细胞因子的释放^[12]。现已知缺氧环境会诱导 PASMC 发生焦亡,这与 PAH 的发生发展密切相关^[13]。但 HMGB1 是否通过介导细胞焦亡影响 PAH 中肺血管重塑,目前尚不清楚。因此,本研究通过在低氧环境下诱导小鼠构建 PAH 模型,观察 HMGB1 中和抗体对小鼠肺血管重塑的影响,并进一步探究其对细胞焦亡的调控作用。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料来源 40 只雄性 BALB/c 小鼠,无特定病原体级,体重 180 g~220 g,购买和饲养于新疆医科大学实验动物中心,生产许可证号: SCXK(新)2023-0001,使用许可证号: SYXK(新)2023-0004,环境温度为 22~25 ℃,湿度 40%~60%,通风良好,12 h 光照/黑暗周期,食物和水供应充足,常规饲养 7 d 后进行实验。本研究符合动物伦理学管理要求,获得本院伦理委员会审批。

1.2 主要试剂 HMGB1 中和抗体(HMGB1 Ab)购

于沈阳万类生物科技有限公司,焦亡抑制剂 Necro-sulfonamide (NSA) 购于美国 MedChemExpress 公司,苏木精-伊红(HE)染色试剂液购于北京雷根生物技术有限公司,小鼠血清白细胞介素(IL)-1 β 和 IL-18 的酶联免疫吸附试验(ELISA)检测试剂盒购于上海酶研生物科技有限公司,二氨基联苯胺(DAB)显色试剂盒和化学发光试剂(ECL)购于上海碧云天生物科技有限公司,Trizol 试剂盒、逆转录试剂盒及实时荧光定量 PCR(qPCR)检测试剂盒购于日本 Takara 公司,蛋白质裂解液购于北京百奥莱博科技有限公司,PVDF 膜购于武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,脱脂奶粉购于内蒙古伊利集团,兔抗 HMGB1、核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)、含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白水解酶-1(Caspase-1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)多克隆抗体及兔抗消皮素 D(GSDMD)单克隆抗体购于英国 Abcam 公司,生物素标记山羊抗兔 IgG 抗体购于上海羽喙生物科技有限公司。

1.3 方法

1.3.1 动物分组、造模及处理 将 40 只 SD 小鼠随机分为对照组、PAH 组、PAH + HMGB1 Ab 组、PAH + NSA 组,共 4 组,每组 10 只。除对照组外,其余 3 组小鼠均以低氧处理构建 PAH 模型:在小鼠饲养仓注入氮气以维持低氧状态,氧气浓度维持在 10.0% $\pm$ 0.5%,每天低氧处理 8 h,每周处理 6 d,持续 3 周。PAH + HMGB1 Ab 组小鼠低氧处理后尾静脉注射 HMGB1 中和抗体(1 mg/kg),每周注射两次,间隔为 3 d,持续 4 周。PAH + NSA 组小鼠在低氧处理前腹腔注射 20 mg/kg NSA。对照组和 PAH 组同时注射等量无菌生理盐水。

1.3.2 肺动脉压力与右心室肥厚指数测定 实验结束后,腹腔注射 3%戊巴比妥钠麻醉小鼠,从颈部正中处切口,分离血管,将聚乙烯导管经右颈外静脉缓慢穿过右心房、右心室,插至肺动脉,通过 BL-420S 生物信号采集和分析系统检测平均肺动脉压(mPAP)。测压结束之后处死小鼠,解剖取出心脏组织,分离左心室、右心室及室间隔,清洗后擦干,依次称量,计算右心室肥厚指数(RVHI),RVHI = 右心室重量/(左心室重量 + 室间隔重量)。

1.3.3 HE 染色检测肺动脉组织病理学变化 解剖取小鼠肺组织,经 4%多聚甲醛固定 24 h,梯度乙醇脱水,常规石蜡包埋,制备成厚度约为 5 μ m 的组织切片。取切片在 60 $^{\circ}$ C 烘箱烘烤,二甲苯脱蜡,梯度乙醇水化,进行 HE 染色,中性树胶滴在切片上封固,在光镜下观察组织形态学改变并采集图像。并采用 Image J 图像分析软件测量血管壁厚度、血管管径、血管腔面积及血管总面积,计算肺血管重构相关指标:肺动脉血管壁厚度占血管管径百分比[WT(%)] = 2 $\times$ 管壁厚度/血管管径 $\times$ 100%,肺动脉血管腔面积占血管总

面积百分比[WA(%)] = 血管腔面积/血管总面积 $\times$ 100%。

1.3.4 ELISA 法检测血清 IL-1 β 和 IL-18 水平 小鼠经腹主动取血,置于 4 $^{\circ}$ C 离心机中,以 4 000 r/min 离心 10 min,收集上清,采用 ELISA 试剂盒检测各组血清样本中 IL-1 β 和 IL-18 水平,操作严格参照产品说明书。

1.3.5 免疫组化染色观察肺组织 GSDMD 阳性表达 将小鼠肺组织切片经二甲苯透明和梯度乙醇脱水后,加入柠檬酸钠溶液高温处理修复抗原,3%过氧化氢常温孵育。10%山羊血清封闭,滴加兔抗 GSDMD 单克隆抗体(1 : 100)溶液覆盖切片,4 $^{\circ}$ C 环境下孵育过夜。次日,PBS 冲洗切片,在切片上滴加对应山羊抗兔 IgG 抗体(1 : 200)溶液,室温孵育 2 h。DAB 显色,苏木精复染,脱水与透明,中性树胶封固,在光学显微镜下观察肺组织染色情况并采集图像,Image J 软件分析 GSDMD 阳性表达,GSDMD 阳性率 = GSDMD 阳性染色面积/组织总面积 $\times$ 100%。

1.3.6 qPCR 测定肺组织 HMGB1、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 的 mRNA 相对表达水平 在小鼠肺组织中加入液氮研磨,Trizol 法提取小鼠肺组织总 RNA,采用微量核酸蛋白检测仪测定 RNA 浓度与纯度。取适量 RNA 样品,使用逆转录酶合成 cDNA, -20 $^{\circ}$ C 保存备用。Primer Premier 5.0 设计各基因的上、下游引物,选择 β -actin 作为内参基因,引物序列见表 1。采用 qPCR 检测表达水平,按照试剂盒说明书配制反应体系,在 LightCycler[®] 96 实时定量 PCR 仪上进行扩增,反应程序设置:95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min,循环 1 次;95 $^{\circ}$ C 变性 10 s,60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 30 s,循环 40 次,各基因 mRNA 相对表达水平采用 2^{- $\Delta\Delta$ CT} 法分析计算。

1.3.7 蛋白质免疫印迹(Western blot)测定肺组织 HMGB1、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达 将小鼠肺组织研磨成粉,加入蛋白质裂解液充分混合,冰上静置 30 min 裂解后,置于 4 $^{\circ}$ C 离心机中以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清测定蛋白质浓度。将蛋白质加热变性,取等量蛋白上样至凝胶孔内,通过 10%十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳分离并转至 PVDF 膜上。将膜浸入 5%脱脂奶粉中封闭后,加入稀释后的兔抗 HMGB1、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 多克隆抗体(均按 1 : 1 000 稀释)溶液,4 $^{\circ}$ C 环境下孵育过夜。次日,TBST 洗膜,加入稀释后对应的生物素标记山羊抗兔 IgG 抗体(1 : 5 000)溶液,室温孵育 2 h,TBST 再洗膜,ECL 显影,凝胶成像仪成像,采集的图像应用 ImageJ 软件进行蛋白灰度值分析,以 β -actin 作为内参蛋白,目的蛋白相对表达量 = 目的蛋白灰度值/GAPDH 灰度值。

1.4 统计学处理 采用统计软件 GraphPad Prism 8.0.1 进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间

数据分析应用单因素方差分析法,两两数据比较采用LSD-*t* 检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

表 1 引物序列

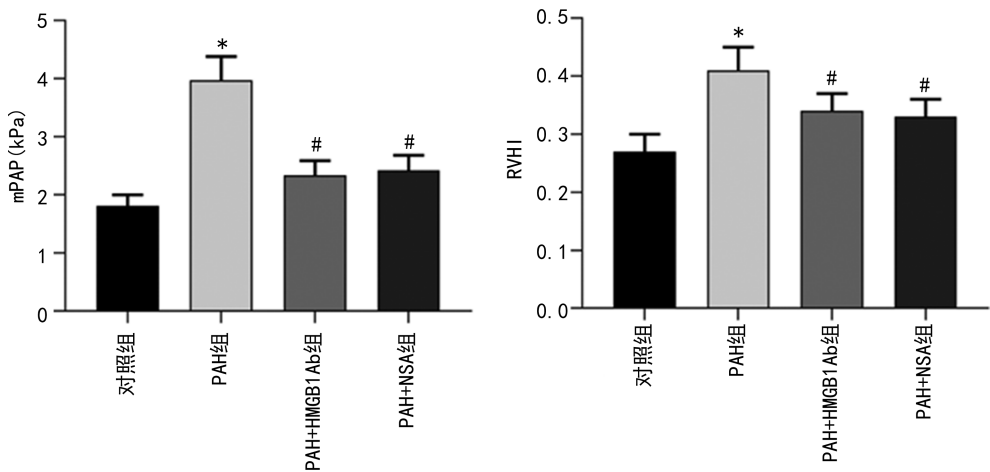
基因	上游引物(5′-3′)	下游引物(5′-3′)
HMGB1	CTGCCTTCTCTTGTGACAAAGTGAC	ACATACTCAGCACCAGCATCACC
NLRP3	CGGTGACCTTGTGTGTGCTT	TCATGTCCTGAGCCATGGAAG
ASC	TGACGGATGAGCAGTACCA	GGCCTGGAGGAGCAAGT
Caspase-1	CTGAGTCCGCAGCAGGTG	CCACATCCGCCGTAA AAGAATG
GSDMD	AAGATCGTGGATCATGCCGT	CTCAGGAGGCAGTAGGGCTT
β-actin	GACCAGATCATGTTTGAGACC	AGGCATACAGGGACAACACA

2 结 果

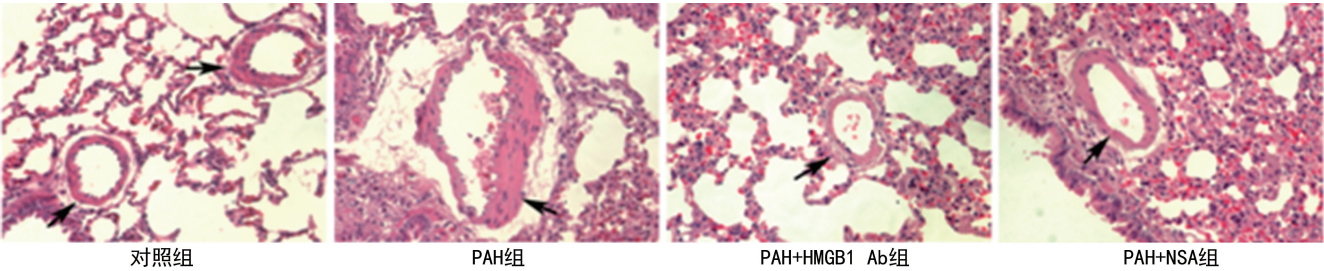
2.1 各组小鼠 mPAP 和 RVHI 比较 与对照组 [(1.81±0.19)kPa、(0.27±0.03)]比较,PAH 组小鼠 mPAP 和 RVHI [(3.97±0.41) kPa、(0.41±0.04)]显著升高,差异有统计学意义($P<0.05$);与 PAH 组 [(3.97±0.41)kPa、(0.41±0.04)]比较, PAH+HMGB1 Ab 组 [(2.34±0.25)kPa、(0.34±0.03)] 和 PAH+NSA 组小鼠 mPAP 和 RVHI

[(2.42±0.26)kPa、(0.33±0.03)]显著降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 1。

2.2 各组小鼠肺血管重构情况 HE 染色观察各组小鼠肺动脉组织病理学变化,结果见图 2,与对照组比较,PAH 组肺动脉血管壁明显增厚,血管平滑肌细胞增殖肥大;PAH+HMGB1 Ab 组和 PAH+NSA 组肺动脉血管壁增厚程度较 PAH 组明显减轻。



注:与对照组比较,* $P<0.05$;与 PAH 组比较,# $P<0.05$ 。
图 1 各组小鼠 mPAP 和 RVHI 比较

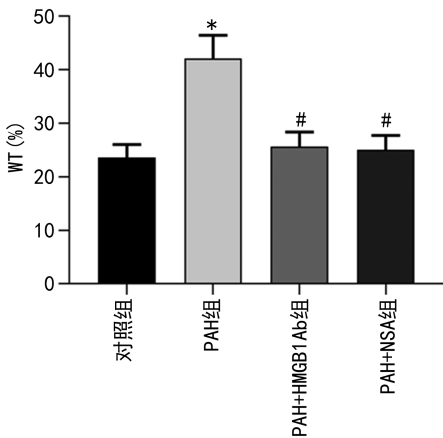


注:黑色箭头所指为血管壁。
图 2 各组小鼠肺组织病理学变化情况(HE 染色,×100)

经测定发现,PAH 组小鼠 WT 和 WA [(42.06±4.38)%、(50.56±5.24)%]显著高于对照组 [(23.64±2.46)%、(25.12±2.63)%],差异有统计学意义($P<0.05$);PAH+HMGB1 Ab 组 [(25.64±

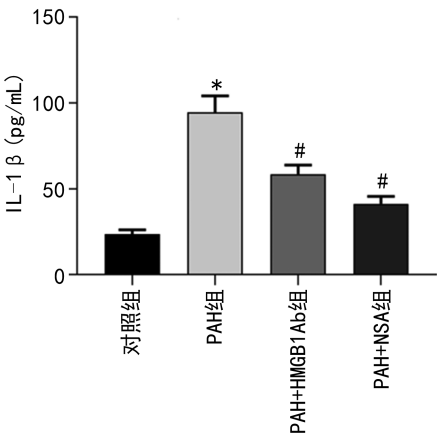
2.71)%、(35.21±3.29)%]和 PAH+NSA 组小鼠 WT 和 WA [(25.06±2.65)%、(36.02±3.63)%]显著低于 PAH 组 [(42.06±4.38)%、(50.56±5.24)%],差异有统计学意义($P<0.05$)。见图 3。

2.3 各组小鼠血清炎症因子水平比较 ELISA 测定结果显示,与对照组 [(23. 56 ± 2. 48) pg/mL、(22. 68 ± 2. 32)pg/mL]比较,PAH 组小鼠血清中 IL-1β、IL-18 水平 [(94. 51 ± 9. 62)pg/mL、(58. 21 ± 5. 97)pg/mL] 显著增加,差异有统计学意义 ($P < 0. 05$);与 PAH 组 [(94. 51 ± 9. 62)pg/mL、(58. 21 ± 5. 97)pg/mL]比较,PAH+HMGB1 Ab 组血清中 IL-1β、IL-18 水平 [(58. 52 ± 5. 24)pg/mL、(38. 19 ± 4. 03)pg/mL]和 PAH+NSA 组血清中 IL-1β、IL-18 水平 [(41. 24 ± 4. 35)pg/mL、(36. 22 ± 3. 84)pg/mL] 显著减少,差异有统计学意义 ($P < 0. 05$)。见



注:与对照组比较, * $P < 0. 05$;与 PAH 组比较, # $P < 0. 05$ 。

图 3 各组小鼠肺动脉 WT 与 WA 比较

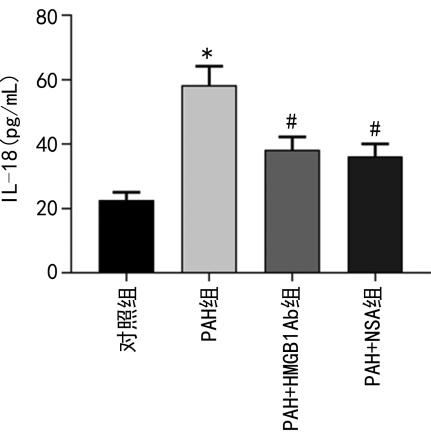
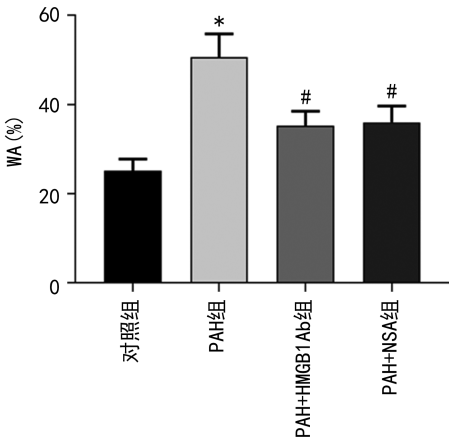


注:与对照组比较, * $P < 0. 05$;与 PAH 组比较, # $P < 0. 05$ 。

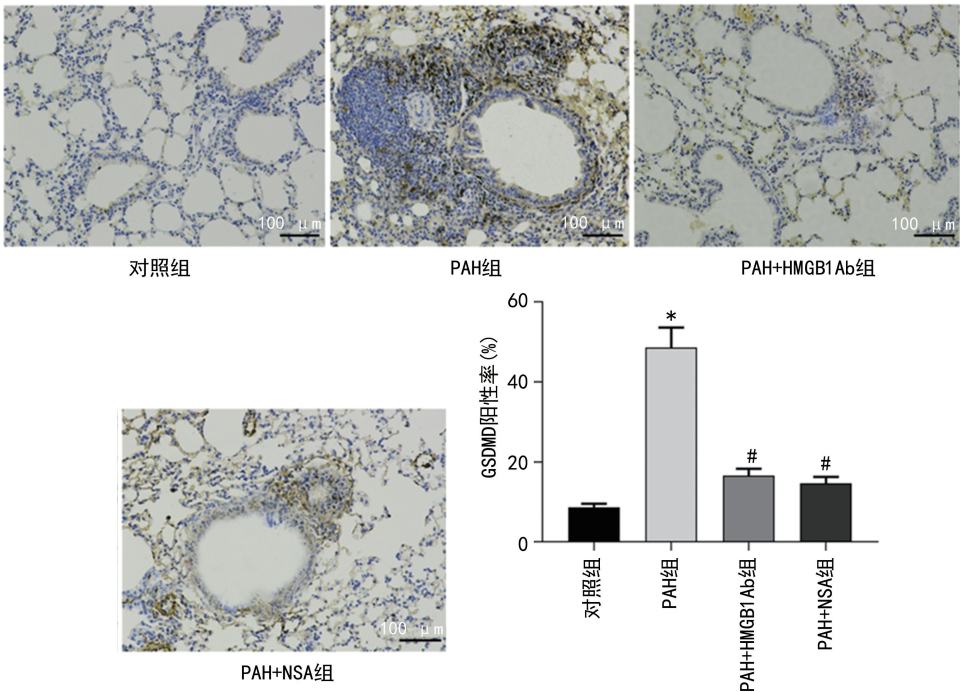
图 4 各组小鼠血清 IL-1β 和 IL-18 水平比较

2.5 各组小鼠肺组织焦亡相关途径蛋白表达比较 qPCR 检测结果显示,与对照组比较,PAH 组小鼠肺组织中 HMGB1 及焦亡相关分子 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 的 mRNA 相对表达水平显著上调,差异有统计学意义 ($P < 0. 05$);与 PAH 组比较,PAH+HMGB1 Ab 组和 PAH+NSA 组小鼠肺组织中 HMGB1、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 的 mRNA 相对表达水平显著下调,差异有统计学意义

图 4。
2.4 各组小鼠肺组织 GSDMD 表达比较 免疫组化染色检测各组小鼠肺组织内 GSDMD 表达情况,棕色至棕褐色染色代表阳性表达,结果见图 5。与对照组 [(8. 65 ± 0. 87)%]比较,PAH 组肺组织中 GSDMD 阳性率显著升高 [(48. 57 ± 5. 02)%],差异有统计学意义 ($P < 0. 05$);与 PAH 组 [(48. 57 ± 5. 02)%]比较,PAH+HMGB1 Ab 组肺组织中 GSDMD 阳性率 [(16. 52 ± 1. 76)%]和 PAH+NSA 组肺组织中 GSDMD 阳性率 [(14. 62 ± 1. 59)%]显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0. 05$)。



($P < 0. 05$)。见表 2。
Western blot 检测结果同样显示,PAH 组小鼠肺组织中 HMGB1、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达显著高于对照组,差异有统计学意义 ($P < 0. 05$);而与 PAH 组比较,PAH+HMGB1 Ab 组和 PAH+NSA 组小鼠肺组织中 HMGB1、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达显著下调,差异有统计学意义 ($P < 0. 05$)。见表 3、图 6。



注:与对照组比较, * $P<0.05$;与 PAH 组比较, # $P<0.05$ 。
图 5 各组小鼠肺组织 GSDMD 表达比较(免疫组化染色, $\times 100$)

表 2 各组小鼠肺组织 HMGB1、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 的 mRNA 表达比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

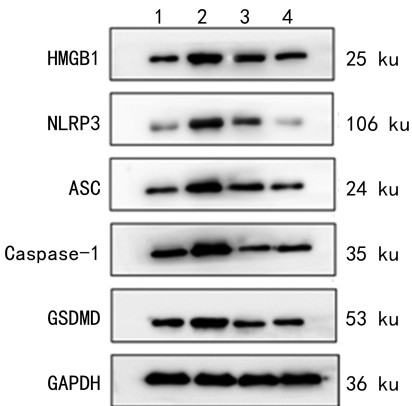
组别	HMGB1 mRNA	NLRP3 mRNA	ASC mRNA	Caspase-1 mRNA	GSDMD mRNA
对照组	1.00±0.06	1.00±0.04	1.00±0.05	1.00±0.05	1.00±0.04
PAH 组	2.25±0.24 *	1.86±0.19 *	1.99±0.20 *	2.37±0.25 *	2.01±0.22 *
PAH+HMGB1 Ab 组	1.56±0.17 #	1.30±0.12 #	1.54±0.16 #	0.96±0.09 #	0.87±0.09 #
PAH+NSA 组	1.45±0.16 #	1.02±0.10 #	1.04±0.11 #	0.98±0.09 #	0.85±0.08 #

注:与对照组比较, * $P<0.05$;与 PAH 组比较, # $P<0.05$ 。

表 3 各组小鼠肺组织 HMGB1、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 蛋白表达比较($\bar{x} \pm s, n=10$)

组别	HMGB1 蛋白表达	NLRP3 蛋白表达	ASC 蛋白表达	Caspase-1 蛋白表达	GSDMD 蛋白表达
对照组	0.20±0.02	0.06±0.01	0.18±0.02	0.34±0.03	0.32±0.03
PAH 组	0.94±0.09 *	0.85±0.08 *	0.89±0.09 *	1.07±0.09 *	0.95±0.10 *
PAH+HMGB1 Ab 组	0.35±0.03 #	0.13±0.01 #	0.32±0.03 #	0.12±0.01 #	0.13±0.01 #
PAH+NSA 组	0.24±0.02 #	0.05±0.03 #	0.19±0.02 #	0.15±0.01 #	0.13±0.01 #

注:对照组比较, * $P<0.05$;与 PAH 组比较, # $P<0.05$ 。



注:1 为对照组、2 为 PAH 组、3 为 PAH+HMGB1 Ab 组、4 为 PAH+NSA 组。
图 6 Western blot 检测各组小鼠肺组织 HMGB1、NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 蛋白条带

3 讨 论

目前 PAH 的多数治疗药物主要是通过改善肺血

管收缩功能以减轻患者的临床症状,但该疾病的发生率和病死率仍居高不下。PAH 是一种进行性致命性肺血管疾病,内皮功能障碍、平滑肌细胞增生和肥大、细胞外基质沉积及血管周围炎症浸润均有助于 PAH 的肺血管重塑^[14]。确定涉及肺血管重塑的分子机制可以揭示新的治疗靶点,从而改善 PAH 患者的临床结果。PAH 临床症状复杂,mPAP 和 RVHI 升高是 PAH 重要的检测指标,mPAP 的水平不仅取决于肺动脉系统的功能,还取决于右心室功能,其升高也是右心室肥厚的重要因素^[15]。WT 和 WA 则是衡量肺血管重构的指标,两者升高表示肺血管发生了重构。本研究结果显示,小鼠 mPAP 和 RVHI 显著升高,肺动脉血管壁明显增厚,WT 和 WA 也显著升高,上述结果提示,PAH 模型小鼠构建成功且伴有严重的肺血管重塑。另外,本研究还发现 PAH 小鼠肺组织中 HMGB1 表达显著升高,推测 HMGB1 异常表达与

PAH 的发病机制有关;采用 HMGB1 中和抗体作用 PAH 小鼠后,检测到小鼠 mPAP 和 RVHI 显著降低,肺动脉血管壁增厚程度减轻,WT 和 WA 也显著降低,这说明 HMGB1 中和抗体能够抑制 PAH 小鼠的肺血管重构,从而改善 PAH。

焦亡通过损伤相关分子模式直接组装 NLRP3 炎性小体并激活 Caspase-1, GSDMD 被激活的 Caspase-1 所切割,通过穿孔细胞膜释放切割形成的 GSDMD-N 片段从而诱导焦亡。此外,这种焦亡孔的形成使得质膜破裂并释放细胞内容物和大量炎症因子 IL-1 β 、IL-18 等,并向邻近细胞发送促炎信号以募集炎症细胞并加重炎症反应,最终导致细胞死亡^[16-17]。以往研究表明,细胞焦亡参与 PAH 的病理机制,在 PAH 中抑制肺动脉平滑肌细胞焦亡可抑制肺动脉压升高,减轻右心室肥厚和肺血管阻力^[18-19]。本研究结果显示,与对照组比较,PAH 组小鼠血清中 IL-1 β 、IL-18 水平显著增加,肺组织中 GSDMD 阳性率及 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 的 mRNA 和蛋白表达均显著上调,说明 PAH 小鼠焦亡水平升高;采用 HMGB1 中和抗体作用 PAH 小鼠后,与 PAH 组比较,PAH+HMGB1 Ab 组血清中 IL-1 β 、IL-18 水平显著减少,肺组织中 GSDMD 阳性率及 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 的 mRNA 和蛋白表达均显著下调,由此表明, HMGB1 中和抗体可能通过抑制焦亡减轻 PAH 小鼠肺血管重构。本研究使用焦亡抑制剂 NSA 作用 PAH 小鼠后,检测结果显示,与 PAH 组比较,PAH+NSA 组小鼠 mPAP 和 RVHI、WT 和 WA 均显著降低,肺动脉血管壁增厚程度减轻,PAH+NSA 组肺组织中 HMGB1 表达、GSDMD 阳性率及 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD 的 mRNA 和蛋白表达也均显著下调,该结果进一步表明了焦亡参与 PAH 小鼠肺血管重构, HMGB1 中和抗体能够通过调控焦亡途径来改善 PAH 小鼠肺血管重构。

综上所述,本研究表明 HMGB1 介导细胞焦亡参与 PAH 小鼠肺血管重构,利用 HMGB1 中和抗体能够降低 PAH 小鼠 mPAP、RVHI、WT 及 WA,改善肺动脉血管壁增厚现象,并抑制细胞焦亡。本研究结果提示靶向焦亡可能是 PAH 治疗的有效措施,并为以 HMGB1 作为 PAH 的治疗靶点提供了实验依据。

参考文献

- [1] SHAH A J, VORLA M, KALRA D K. Molecular pathways in pulmonary arterial hypertension[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(17): 10001.
- [2] TAICHMAN D B, LEOPOLD J A, ELLIOTT G. Continued progress in therapy for pulmonary arterial hypertension[J]. N Engl J Med, 2023, 388(16): 1524-1526.
- [3] HLA VATY A, ROUSTIT M, MONTANI D, et al. Identifying new drugs associated with pulmonary arterial hypertension; a WHO pharmacovigilance database disproportionality analysis[J]. Br J Clin Pharmacol, 2022, 88

- (12): 5227-5237.
- [4] CHEN R, KANG R, TANG D. The mechanism of HMGB1 secretion and release[J]. Exp Mol Med, 2022, 54(2): 91-102.
- [5] 邸鹏飞, 禹程远, 解汝娟. HMGB1 在肾病综合征及其心血管并发症中作用研究的进展[J]. 心血管康复医学杂志, 2022, 31(6): 742-745.
- [6] LIU J, LIU Y, WANG Y, et al. HMGB1 is a mediator of cuproptosis-related sterile inflammation[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10(1): 996307.
- [7] FAN Y, YE Z, TANG Y. Serum HMGB1 and soluble urokinase plasminogen activator receptor levels aid diagnosis and prognosis prediction of sepsis with acute respiratory distress syndrome[J]. Biomark Med, 2023, 17(4): 231-239.
- [8] DU Y, XU C L, YU J, et al. HMGB1 in the mPFC governs comorbid anxiety in neuropathic pain[J]. J Headache Pain, 2022, 23(1): 102.
- [9] 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.
- [10] ZHANG Q, CHEN Y, WANG Q, 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.
- [11] LIN Q, FAN C, GOMEZ-ARROYO J, et al. HIMF (hypoxia-induced mitogenic factor) signaling mediates the HMGB1 (high mobility group box 1)-dependent endothelial and smooth muscle cell crosstalk in pulmonary hypertension[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2019, 39(12): 2505-2519.
- [12] YU P, ZHANG X, LIU N, et al. Pyroptosis: mechanisms and diseases[J]. Signal Transduct Target Ther, 2021, 6(1): 128.
- [13] 周瑞玲, 张雯, 崔力心, 等. 从“毒瘀蚀心, 肺失百脉”探讨细胞焦亡与肺动脉高压右心衰竭的关系[J]. 中医学报, 2023, 38(2): 227-232.
- [14] HU Y, CHI L, KUEBLER W M, et al. Perivascular inflammation in pulmonary arterial hypertension[J]. Cells, 2020, 9(11): 2338.
- [15] D'ALTO M, BADAGLIACCA R. The importance of right ventricular remodelling in pulmonary arterial hypertension[J]. Heart, 2022, 108(17): 1338-1339.
- [16] 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.
- [17] 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.
- [18] HE S, MA C, ZHANG L, 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): 472-482.
- [19] WU Z, ZHOU G, WANG H, et al. Inhibition of KIF23 alleviates IPAH by targeting pyroptosis and proliferation of PASMCs[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(8): 4436.