



DOI:10.12404/j.issn.1671-1815.2403806

引用格式: 杨晓龙, 苟玮, 艾飞, 等. 参附注射液调控 HDAC3 抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 HMGB1 核转位的机制[J]. 科学技术与工程, 2025, 25(6): 2265-2273.

Yang Xiaolong, Gou Wei, Ai Fei, et al. Mechanistic on the inhibition of LPS-induced nuclear translocation of HMGB1 in macrophages by modulation of HDAC3 by Shenfu injection[J]. Science Technology and Engineering, 2025, 25(6): 2265-2273.

医药、卫生

参附注射液调控 HDAC3 抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 HMGB1 核转位的机制

杨晓龙¹, 苟玮¹, 艾飞², 刘霞^{3*}, 褚春薇¹, 陈向云¹, 郭俊峰¹

(1. 贵州中医药大学基础医学院, 贵阳 550025; 2. 贵州中医药大学第二临床医学院, 贵阳 550025;
3. 贵州中医药大学中医养生学院, 贵阳 550025)

摘要 为观察脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS) 诱导的 RAW264.7 细胞中组蛋白去乙酰化酶 3 (histone deacetylase 3, HDAC3) 对高迁移率组蛋白 B1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1) 表达和核移位的影响及参附注射液 (Shenfu injection, SFI) 的干预作用。通过 LPS 诱导 RAW264.7 细胞建立细胞炎症损伤模型, 分别用 3、6、12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 剂量 SFI 干预细胞 24 h。实时荧光 PCR 法 (RT-qPCR) 检测细胞中 HDAC3、HMGB1、白介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor α , TNF- α) 转录水平; Western-blot 法检测 HMGB1 和 HDAC3 蛋白表达; 免疫荧光法观察 SFI 对 HMGB1 亚细胞定位的影响; ELISA 法检测细胞上清 HMGB1、IL-1 β 和 TNF- α 分泌水平; 小干扰 RNA (small interfering RNA, siRNA) 靶向沉默 RAW264.7 细胞中 HDAC3 后, 免疫荧光法观察 SFI 对 HMGB1 亚细胞定位的影响。结果表明模型组与对照组比较, 模型组 RAW264.7 细胞中 HDAC3 的转录和表达均显著降低 ($P < 0.01$), HMGB1 表达显著升高 ($P < 0.01$) 且同时从核内向胞浆迁移; 细胞上清中炎症因子 HMGB1、IL-1 β 和 TNF- α 明显升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, SFI (6、12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 剂量组) 上调 RAW264.7 细胞中 HDAC3 的转录和表达水平, 下调炎症因子 HMGB1 的转录、表达、核移位, 抑制 HMGB1、IL-1 β 和 TNF- α 的分泌; 靶向沉默 HDAC3 后, 大量 HMGB1 定位于胞浆, 经 LPS 刺激后蛋白定位无明显变化, 且 SFI 不能逆转 HMGB1 的异常定位。可见 SFI 可能通过上调 HDAC3 表达从而抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 HMGB1 核外迁移, 进而抑制了其下游的炎症反应。

关键词 参附注射液; HMGB1; HDAC3; 巨噬细胞; 炎症; 内毒素休克

中图分类号 R259; 文献标志码 A

Mechanistic on the Inhibition of LPS-induced Nuclear Translocation of HMGB1 in Macrophages by Modulation of HDAC3 by Shenfu Injection

YANG Xiao-long¹, GOU Wei¹, AI Fei², LIU Xia^{3*}, CHU Chun-wei¹,
CHEN Xiang-yun¹, GUO Jun-feng¹

(1. School of Basic Medical Sciences, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China;

2. The Second Clinical Medical College, Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China;

3. The Yangsheng College of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025, China)

[Abstract] To observe the effects of LPS (lipopolysaccharide)-HDAC3 (induced histone deacetylase 3) on the expression of HMGB1 (high mobility histone B1) and nuclear translocation in RAW264.7 cells, and the intervention effect of SFI (Shenfu injection). RAW264.7 cells were induced by LPS to establish a cellular inflammatory injury model, and the cells were intervened with SFI at doses of 3, 6, and 12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ for 24 h. RT-qPCR (real-time fluorescence PCR) was used to detect the transcriptional levels of HDAC3, HMGB1, IL-1 β , and TNF- α in the cells, and Western-blot was used to detect the protein expression of HMGB1 and HDAC3, and immune immunoassay to detect the protein expression of HMGB1 and HDAC3. HDAC3 protein expression, immunofluorescence to

收稿日期: 2024-05-22; 修订日期: 2024-12-16

基金项目: 国家自然科学基金地区基金 (82260874); 贵州中医药大学博士启动基金 [(2018)36]

第一作者: 杨晓龙 (1994—), 男, 苗族, 湖北恩施人, 硕士研究生。研究方向: 中医药治疗炎性相关疾病的物质基础及分子机制。E-mail: 1005408276@qq.com。

* 通信作者: 刘霞 (1980—), 女, 汉族, 贵州盘县人, 博士, 教授, 博士研究生导师。研究方向: 中医药治疗炎性相关疾病的物质基础及分子机制。E-mail: liuxia0851@126.com。

observe the effect of SFI on the subcellular localization of HMGB1. ELISA to detect the secretion levels of HMGB1, IL-1 β , and TNF- α in the cell supernatant. And small interfering RNA (siRNA) after targeting to silence the HDAC3 in RAW264.7 cells. to observe the effect of SFI on HMGB1 subcellular localization. Compared with the control group, the transcription and expression of HDAC3 in RAW264.7 cells in the model group were significantly reduced ($P < 0.01$), and the expression of HMGB1 was significantly elevated ($P < 0.01$) and simultaneously migrated from the nucleus to the cytoplasm. The inflammatory factors in the supernatant of the cells, such as HMGB1, IL-1 β and TNF- α , were significantly elevated ($P < 0.01$). And compared with the model group, SFI (6, 12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ dose group) up-regulated the transcription and expression levels of HDAC3, down-regulated the transcription, expression, and nuclear translocation of the inflammatory factor HMGB1, and inhibited the secretion of HMGB1, IL-1 β , and TNF- α in RAW264.7 cells. After targeted silencing of HDAC3, a large amount of HMGB1 was localized in the cytoplasm, and there was no significant change in protein localization after LPS stimulation, and SFI could not reverse the abnormal localization of HMGB1. SFI may inhibit LPS-induced extra-nuclear migration of HMGB1 in RAW264.7 cells by up-regulating HDAC3 expression, which in turn inhibited its downstream inflammatory response.

[**Keywords**] Shenfu injection; HMGB1; HDAC3; macrophage; inflammation; endotoxic shock

内毒素休克是一种高致死性的全身炎症反应综合征,其致死率居高不下的主要原因与发病初期促炎因子迅速合成释放(免疫系统过度激活)有关^[1]。临床数据发现血液中高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box-1 protein, HMGB1)水平显著升高与内毒素休克严重程度和死亡率成正相关^[2],HMGB1 可由活化的巨噬细胞释放,分泌出胞的 HMGB1 触发炎症级联放大效应,可能是导致脓毒症休克晚期致死性的关键因子^[3-4]。既往研究表明, HMGB1 的超乙酰化是导致其向核外迁移和分泌出胞重要条件,在组蛋白乙酰基转移酶 (histone acetyltransferases, HATs) 作用下高乙酰化出核,组蛋白去乙酰化酶 (histone deacetylase, HDACs), 如组蛋白去乙酰化酶 3 (histone deacetylase 3, HDAC3) 的作用下去乙酰化而入核^[5]。因此,通过抑制 HMGB1 的乙酰化水平,阻断 HMGB1 的分泌和释放,可作为治疗内毒素休克的治疗手段。

内毒素休克属于中医外感病“厥脱”范畴。参附注射液 (Shenfu injection, SFI) 以红参和附子相伍,共奏回阳救逆、益气固脱之功,临床上用于阳气脱失的厥脱证疗效显著^[6]。课题组前期研究表明, SFI 可有效抑制 LPS 诱导的巨噬细胞 HMGB1 核外迁移及分泌^[7-8],但参附注射液是否通过调节 HMGB1 乙酰化水平(或去乙酰化水平)从而影响其分泌还有待进一步证实。基于此,本文研究选用 LPS 诱导小鼠 RAW264.7 巨噬细胞的方法建立炎症细胞模型。观察 SFI 对 HDAC3 和 HMGB1 的影响,旨在探索 SFI 是否通过调节 HDAC3 的表达从而抑制 LPS 介导的 HMGB1 核转位,以期补充和完善 SFI 治疗内毒素休克的机制。

1 实验材料

1.1 细胞

RAW264.7 小鼠巨噬细胞株,购于中国科学院

上海生命科学院细胞资源中心。

1.2 药物

参附注射液(批号:Z51020664,华润三九药业有限公司,规格:10 mL/支,即用即取);LPS(美国 Sigma 公司,批号:039M4004V,来自大肠杆菌 055:B5,用 PBS 配制成 10 mg/mL 的药液)。

1.3 主要试剂

胎牛血清(批号:2156874)、DMEM 培养基(批号:8120111)、0.25% Trypsin-EDTA(批号:2085174);青-链霉素混合液(批号:15140-122)均购自 Gibco 公司;Cell Counting Kit-8 检测试剂盒(东仁化学科技有限公司,批号:NN710);抗体 HMGB1、HDAC3、GAPDH(均购自 Abcam 生物科技有限公司,批号分别为:2600-1、S1306、ab9485);HRP 标记的二抗羊抗兔(武汉博士德生物工程有限公司,批号 BA1054);Trizol(天根,批号:DP424);荧光定量 PCR 检测试剂盒(公司:Genecopies,批号:AOPR-1200);逆转录试剂盒公司:批号:DBI-2220);小鼠 HMGB1、TNF- α 、IL-1 β 酶联免疫吸附测定检测试剂盒(购自欣博盛生物科技有限公司;批号分别为:M173318-215a、M170318102a、M190325-318a);RIPA 裂解液(批号:P0013C)、PMSF(批号:C1002)、BCA 蛋白定量试剂盒(批号:P0010)、Triton X-100(ST795)、DAPI(C1002)均购自碧云天生物公司;PCR 引物(由生工生物工程(上海)股份有限公司设计、合成,详见表 1);HDAC3 的化学合成双链小分子 RNA(由锐博生物合成),如表 2 所示。

1.4 主要仪器

ABI 荧光定量 PCR 仪(型号 7500);Merinton 微量核酸定量仪(型号:SMA4000);CO₂ 培养箱(CLASS100 型)、MK3 型酶标仪(美国 Thermo 公司);低温离心机(德国 Sigma 公司,型号:3-18K);高压灭菌锅(德国 Systec 公司);德国 Leica 倒置显微镜;奥林巴斯 BX53 型生物显微镜;Bio-Rad 蛋白

凝胶电泳仪、Bio-Rad 凝胶成像系统(美国 BioRad); HI650 型离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); LSM800 型激光共聚焦扫描显微镜(德国 Leica 公司, SM800 型); 全自动化学发光图像分析仪(上海天能科技有限公司, 型号 Tanon5200)。

表 1 PCR 引物序列及长度

Table 1 PCR primer sequence and length

基因	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
β -Actin	上游: GAGGTATCCTGACCCCTGAAGTA	104
	下游: CACACGCAGCTCATTGTAGA	
TNF- α	上游: CTACCTTGTGCTCCTCTTT	116
	下游: GAGCAGAGTTTCACTGATGTAG	
HMGB1	上游: CTGATTGGCTGGAGGAATGT	99
	下游: ATACCACCAAGTTTCCCATCTC	
IL- β	上游: GCAGCATCTCGACAAGAGCTT	91
	下游: GCTCCACGGGCAAGACATAG	
HDAC3	上游: ATGCCTCAACGTGGGTGAC	99
	下游: TTAGCTGTCTGCCCCTTGC	

表 2 siRNA-1、siRNA-2 和 siRNA-3 的引物序列

Table 2 The sequences of siRNA-1、siRNA-2 and siRNA-3

组别	引物序列(5'-3')
siRNA-1	上游: AUUGGUAUCCUGGAGCUGCTT
	下游: GCAGCUCCAGGAUACCAAUTT
siRNA-2	上游: AAUGCCUUAACGUGGGUGTT
	下游: CACCCACGUUGAAGGCAUUTT
siRNA-3	上游: UGUGCCUUAACGAGAUUGGCTT
	下游: GCCAUCUCGUAAGGGCACATT
siRNA NC	上游: UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	下游: ACCGUGACAGUUCGGAGAATT

2 实验方法

2.1 细胞培养

RAW264.7 细胞培养瓶中加入完全培养基(含 1% 双抗、100 μ g/mL 链霉素、100 U/mL 青霉素和 10% 胎牛血清的杜氏改良 Eagle(dulbecco's modified eagle medium, DMEM)高糖培养基, 以下简称“基础培养基”), 置于参数为 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的恒温加湿培养箱中孵育。镜下观察细胞状态和生长情况, 当细胞生长至融合度为 70% ~ 80% 时, 取对数生长期细胞用于后续实验。

2.2 免疫荧光观察 SFI 对 RAW264.7 细胞 HMGB1 核转位情况

2.2.1 细胞爬片制作及分组给药

爬片制作方法和给药浓度参照前期研究^[8], 将细胞以 2×10^4 /孔的密度滴加于置有盖玻片的 24 孔板中, 随机分正常对照组、模型组和参附注射液

(Shenfu injection, SFI) 3、6、12 μ L/mL 组, 每组设 3 个复孔, 每孔培养基为 0.5 mL。当细胞融合度为 30% 时, 弃上清, 加入无血清培养基, 除正常组外, 其余组均以终浓度为 0.2 μ g/mL 的脂多糖(lipopolysaccharides, LPS)刺激 30 min, 随后分别以 SFI 3、6、12 μ L/mL 干预细胞 24 h。

2.2.2 免疫荧光标记法

爬片用磷酸盐缓冲液(phosphate buffered saline, PBS)洗 3 次; 加 4% 的多聚甲醛固定 15 min; PBS 洗净后加 0.5% Triton X-100, 室温下通透 20 min; PBS 洗净, 充分吸干液体后, 滴山羊血清, 室温下封闭 30 min; 吸去液体加一抗(HMGB1 稀释比为 1:200), 放入湿盒, 于 4 $^{\circ}$ C 冰箱中过夜; 磷酸盐吐温缓冲液(phosphate buffered saline with tween 20, PBST)洗净液体, 避光环境下(后续步骤均避光操作)加入 Cy3 标记的羊抗兔 IgG(稀释比为 1:100), 湿盒中室温孵育 1 h; PBST 洗净, DAPI 染核, 孵育室温 5 min; PBST 洗净, 吸干多余液体, 用含抗荧光淬灭剂的封片液封片, 然后在荧光显微镜下观察 HMGB1 的亚细胞定位并采集图像。

2.3 SFI 对 RAW264.7 细胞中 HDAC3、HMGB1 等的影响

2.3.1 RT-qPCR 法检测细胞中 HDAC3、HMGB1、IL-1 β 、TNF- α 的 mRNA 水平

取对数期生长期细胞按 1×10^5 /mL 的密度接种于 6 孔板, 实验分组及给药同 2.2.1 节。经 Trizol 提取细胞总 RNA, 然后根据逆转录试剂盒上的说明, 将其逆转录成 cDNA。以该 cDNA 为模板进行定量聚合酶链反应。引物序列如表 1 所示。反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 10 min; 95 $^{\circ}$ C 变性 10 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 20 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 35 s, 共计 40 个循环。循环结束后从 55 $^{\circ}$ C 升高到 95 $^{\circ}$ C 获取溶解曲线。溶解曲线分析和数据采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 方法进行分析^[9]。

2.3.2 采用 Western-blot 法检测 HMGB1 和 HDAC3 蛋白表达量

细胞处理方法同 2.3.1 节, 预冷 PBS 清洗细胞后, 每孔加入 120 μ L/孔细胞裂解液[含 100:1:1 的放射免疫沉淀法裂解缓冲液(radio immunoprecipitation assay, RIPA)、苯基甲磺酰氟(Phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)(100 mmol/L)和磷酸酶抑制剂], 摇匀置于冰上裂解 30 min 后, 收集裂解液于离心管中, 4 $^{\circ}$ C 离心机 12 000 r/min 离心 5 min。取上清即为总蛋白, 样品存放于 -20 $^{\circ}$ C 备用。经双吡啶甲酸(bicinchoninic acid, BCA)法计算出总蛋白浓度后, 将蛋白与 5 \times 上样缓冲液以体积比 4:1 混合, 置于沸水煮 10 min 变性, 随后进行 SDS-PAGE 凝胶电

泳、转膜[0.45 μm 聚偏二氟乙烯膜 (polyvinylidene fluoride, PVDF)]、封闭、TBST 洗净分别加 HMGB1、HDAC3 和 GAPDH 一抗(稀释浓度为 1:1 000)4 °C 过夜、TBST 洗净加相应辣根过氧化物酶 (horseradish peroxidase, HRP) 标记的二抗(稀释浓度为 1:5 000)37 °C 摇床 2 h。TBST 洗净后,利用 ECL 显色剂和化学发光分析仪对条带进行显影成像。用 Image J 软件计算条带灰度值,以目的蛋白(HMGB1、HDAC3)与内参 GAPDH 的比值作为标准化的目的蛋白表达量。

2.3.3 ELISA 法检测细胞上清液中 HMGB1、IL-1β、TNF-α 分泌水平

收集各组细胞上清于提前标记的离心管,按照 ELISA 试剂盒说明书步骤,进行实验,用酶标仪检测 HMGB1、TNF-α、IL-1β 的水平。

2.4 SFI 对 LPS 诱导的 RAW264.7 HDAC3^{-/-}细胞中 HMGB1 定位的影响

2.4.1 HDAC3-SiRNA 转染片段筛选

HDAC3-SiRNA 由锐博生物合成,共 3 个片段供筛选。细胞铺板后分空白对照组(CON 组)、阴性对照 siRNA 组(NC 组)、HDAC3-siRNA-1 组、HDAC3-siRNA-2 组、HDAC3-siRNA-3 组,每组设 3 个复孔。当细胞达 30% 融合度时,将每孔液体换成基础培养基,用 LipofectamineTM 2000 作为转染试剂分别以上片段转入细胞中,6 h 后换成完全培养基,继续培养 24 h 收集细胞,通过 Western-blot 的方法检测 HDAC3 蛋白表达量,选取沉默效果最优的片段进行后续转染实验。

2.4.2 观察 SFI 对敲减 HDAC3 后各组 RAW264.7 细胞中 HDAC3 的表达情况

将细胞接种于六孔板,随机分 CON 组、NC 组、HDAC3-siRNA 组、HDAC3-siRNA + LPS 组和 HDAC3-siRNA + LPS + SFI 6 μL/mL 组。当细胞融合度为 30% 左右时,按上述分组进行细胞转染(方法同 2.4.1 节),培养 6 h 后,按分组要求给予 LPS 刺激和 SFI 干预(处理方法同 2.2.1 节)24 h 后收集细胞。蛋白免疫印迹(western blot, WB)检测各组细胞 HDAC3 的表达情况。

2.4.3 观察 SFI 对敲减 HDAC3 后对各组 RAW264.7 细胞中 HMGB1 核转位的影响

制作细胞爬片并分组处理(方法同 2.4.2 节)。对细胞爬片进行免疫荧光染色(方法同 2.2.2 节),在荧光显微镜下观察并采集图像。

2.5 数据分析

所有统计均使用 SPSS 22.0 进行分析。通过 GraphPad Prism 7 软件绘制图形。各组之间的比较

采用单因素方差分析进行评估, $P < 0.05$ 视为具有统计学意义。

3 实验结果

3.1 SFI 上调 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中的 HDAC3 mRNA, 同时抑制 HMGB1、TNF-α 和 mRNA

RT-qPCR 结果提示如表 3 所示,与正常对照组比较,LPS 可以显著下调 HDAC3 mRNA 水平,同时上调 HMGB1、IL-1β 和 TNF-α mRNA 水平($P < 0.01$)。与模型组比较,SFI 6 μL/mL 和 12 μL/mL 可显著上调 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中 HDAC3 的转录,同时抑制 HMGB1、IL-1β 和 TNF-α 的转录。

表 3 SFI 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 HDAC3、HMGB1、IL-1β、TNF-α mRNA 表达的影响($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Effects of SFI on mRNA expression of HDAC3, HDAC5, HMGB1, P300, IL-1β, TNF-α in LPS-induced RAW264.7 cells($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别	HDAC3	HMGB1	IL-1β	TNF-α
空白组	1	1	1	1
模型组	0.397 ± 0.050 ^{###}	2.347 ± 0.231 ^{###}	2.827 ± 0.375 ^{###}	2.037 ± 0.320 ^{###}
SFL 组	0.420 ± 0.053	1.573 ± 0.297 [*]	2.130 ± 0.281 [*]	1.657 ± 0.273
SFM 组	0.732 ± 0.038 ^{**}	1.010 ± 0.079 ^{**}	1.223 ± 0.199 ^{**}	1.263 ± 0.110 ^{**}
SFH 组	0.703 ± 0.140 ^{**}	1.073 ± 0.136 ^{**}	1.200 ± 0.108 ^{**}	1.243 ± 0.134 ^{**}

注: ^{###}表示与正常组比较, $P < 0.01$; ^{*}表示与模型组比较, $P < 0.05$; ^{**}表示与模型组比较, $P < 0.01$ 。

3.2 SFI 上调 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中的 HDAC3 表达,同时抑制 HMGB1 的表达

WB 检测结果如图 1 和表 4 所示,LPS 可以显著下调 HDAC3 的表达,同时上调 HMGB1 的表达,参附注射液 6 μL/mL 和 12 μL/mL 处理后,均可显著上调 RAW 264.7 细胞中 HDAC3 的表达,从而更接近于正常水平,同时抑制 HMGB1 的表达。

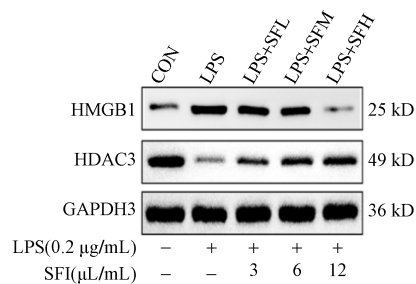


图 1 SFI 对 LPS 诱导的 RAW 264.7 细胞中 HMGB1 和 HDAC3 的蛋白表达的影响

Fig. 1 Effects of SFI on protein expression of HDAC3 and HMGB1 in LPS-induced RAW264.7 cells

表 4 SFI 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 HDAC3、HMGB1 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effects of SFI on protein expression of HDAC3, HMGB1 in LPS-induced RAW264.7 cells($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	HDAC3	HMGB1
空白组	0.909 ± 0.036	1.048 ± 0.192
模型组	0.311 ± 0.036 ^{##}	2.721 ± 0.206 ^{##}
SFL 组	0.391 ± 0.021	2.411 ± 0.076
SFM 组	0.582 ± 0.028 ^{**}	1.810 ± 0.256 ^{**}
SFH 组	0.742 ± 0.037 ^{**}	1.013 ± 0.181 ^{**}

注:CON 为空白组;LPS 为模型组;LPS + SFL 为 SFI 3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 组;LPS + SFM 为 SFI 6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 组;LPS + SFH 为 SFI 12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 组;^{##}表示与空白组比较, $P < 0.01$;^{**}表示与模型组比较, $P < 0.01$ 。

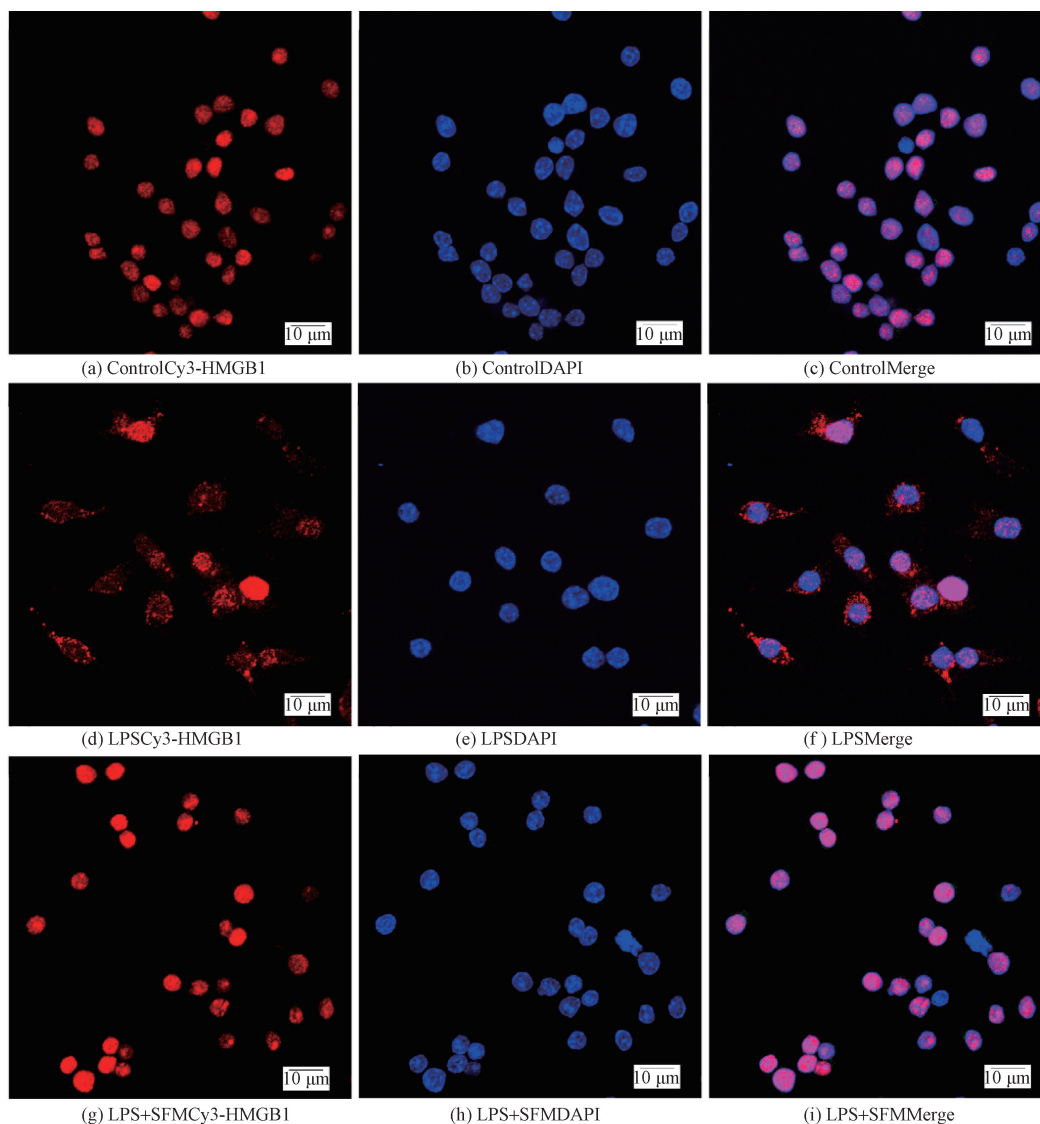
3.3 SFI 可抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 HMGB1 从细胞核向细胞质易位

从图 2 可知,正常组中,Cy3 标记的 HMGB1 为

红色,并与 DAPI 着色的细胞核(蓝色)相重叠,即 HMGB1 主要定位于细胞核中。在 LPS 刺激下, HMGB1 在细胞核和细胞质中均有发现,提示 LPS 可诱导 HMGB1 从细胞核向胞质转运。此外,可观察到 HMGB1 接近细胞膜的边缘,表明 HMGB1 可能从细胞质分泌到细胞的外部。在 SFI 干预组中, HMGB1 主要位于细胞核中,与对照组相似。结果提示,SFI 可以抑制 HMGB1 的核移位。

3.4 SFI 可抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞上清中 HMGB1、IL-1 β 、TNF- α 的分泌

通过 ELISA 的方法检测细胞上清液中炎症因子的分泌情况,结果如表 5 所示。与正常组比较,模型组细胞上清中 HMGB1、TNF- α 和 IL-1 β 分泌显著升高($P < 0.01$),与模型组比较,SFI 可剂量依赖性



Control 为对照组;LPS 为脂多糖;Merge 为合并图层
激光共聚焦 $\times 630$ 倍

图 2 SFI 抑制 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 HMGB1 从细胞核向细胞质转运

Fig. 2 SFI inhibited the translocation HMGB1 from nucleus to cytoplasm in LPS-induced RAW264.7 cells

表5 SFI对LPS诱导的RAW264.7细胞上清液中HMGB1、TNF- α 和IL-1 β 炎症因子影响

Table 5 Effect of SFI on inflammatory factors in the supernatant of LPS-induced RAW264.7 cells

组别	HMGB1/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	IL-1 β /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	TNF- α /($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)
空白组	0.071 \pm 0.007	0.157 \pm 0.004	0.080 \pm 0.005
模型组	0.140 \pm 0.021 ^{##}	0.226 \pm 0.013 ^{##}	0.162 \pm 0.011 ^{##}
SFL组	0.090 \pm 0.004 ^{**}	0.185 \pm 0.013 [*]	0.122 \pm 0.013 ^{**}
SFM组	0.070 \pm 0.019 ^{**}	0.131 \pm 0.046 ^{**}	0.118 \pm 0.014 ^{**}
SFH组	0.065 \pm 0.010 ^{**}	0.118 \pm 0.018 ^{**}	0.109 \pm 0.009 ^{**}

注:数值为 $\bar{x}\pm s$; $n=3$; CON为空白组; LPS为模型组; LPS+SFL为SFI 3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 组; LPS+SFM为SFI 6 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 组; LPS+SFH为SFI 12 $\mu\text{L}/\text{mL}$ 组; ^{##}表示与空白组比较, $P<0.01$; ^{*}表示与模型组比较, $0.01<P<0.05$; ^{**}表示与模型组比较, $P<0.01$ 。

的抑制炎症因子HMGB1、IL-1 β 、TNF- α 的分泌。

3.5 SFI对LPS诱导的RAW264.7 HDAC3^{-/-}细胞中HMGB1定位的影响

3.5.1 转染效率检测

分别用siRNA-1、siRNA-2和siRNA-3分别转染RAW264.7细胞后,经Western blot的方法检测HDAC3的蛋白表达量。结果如图3所示,与空白对照组和阴性对照组相比,HDAC3 siRNA-1组、HDAC3 siRNA-2组和HDAC3 siRNA-3组差异均有统计学意义($P<0.01$),其中以HDAC3 siRNA-3组沉默效果最佳,因此,选取siRNA-3用于后续实验。

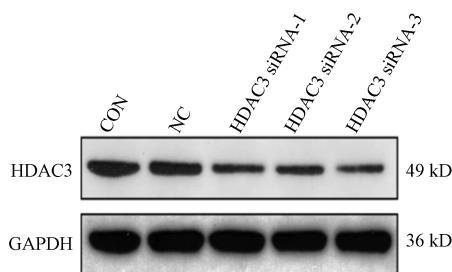


图3 Western blot检测RAW264.7细胞中HDAC3的表达
Fig. 3 Western blot detection of HDAC3 expression in RAW264.7 cells

表6 Western blot检测RAW264.7细胞中HDAC3蛋白的表达
Table 6 Western blot detection of HDAC3 expression in RAW264.7 cells

组别	HDAC3
空白组	0.772 \pm 0.032
NC组	0.699 \pm 0.033 ^{##}
HDAC3 siRNA-1组	0.408 \pm 0.030 ^{**}
HDAC3 siRNA-2组	0.386 \pm 0.023 ^{**}
HDAC3 siRNA-3组	0.314 \pm 0.023 ^{###}

注:CON为空白对照组;NC为阴性对照siRNA组;HDAC3 siRNA-1组为转染siRNA-1干扰片段;HDAC3 siRNA-2组为转染siRNA-2干扰片段;HDAC3 siRNA-3组为转染siRNA-3干扰片段;^{##}表示与空白对照组比较, $P<0.01$; ^{**}表示与空白对照组和阴性对照组比较, $P<0.01$; ^{###}表示与HDAC3 siRNA-1组和HDAC3 siRNA-2组相比, $P<0.05$ 。

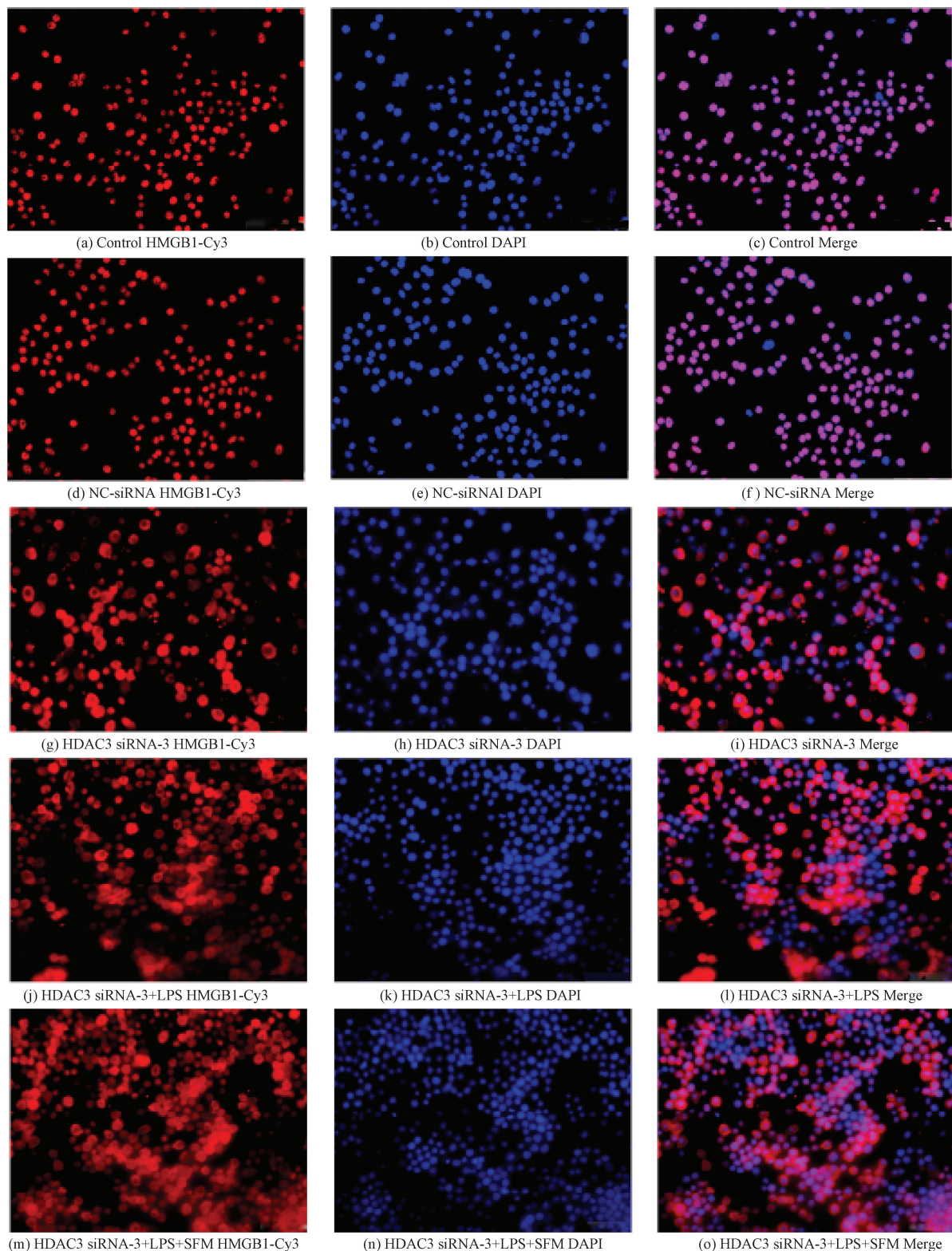
3.5.2 HDAC3沉默后参附注射液对HMGB1在细胞质中的转运无影响

为了确定HDAC3在HMGB1的核移位过程中是否起作用,课题组对HDAC3沉默后的RAW264.7细胞中HMGB1的定位进行了观察,结果如图4所示。HDAC3 siRNA-3组中,部分HMGB1从核转移到细胞质,经LPS进行刺激后, HMGB1的位置并未发生明显改变, SFI干预对HMGB1的转运也没有影响。

4 讨论与结论

HMGB1是具有稳定核小体结构、修复及重组DNA、调控基因转录功能的一类核内非组蛋白结构蛋白。核外迁移与其高乙酰化水平有关,抑制HMGB1乙酰化水平可能是抑制HMGB1向核外迁移的有效途径。HMGB1具有两个核定位簇,即第27~29和第181~183位赖氨酸位点,研究证实,在LPS的诱导下,单核/巨噬细胞核内的HMGB1的核定位簇发生高度乙酰化,使其亚细胞定位发生改变,由核内向胞浆迁移,进一步分泌出胞成为致炎因子^[10]。乙酰化是一种动态的、可逆的翻译后修饰,组蛋白乙酰化水平均由HATs和HDACs维持,这两种可逆修饰在细胞的基因转录、凋亡、分化以及基因的激活或沉默过程中起着至关重要的作用^[11-12]。研究证实, HATs/HDACs可对非组蛋白的赖氨酸位点进行修饰,增加HATs(如P300/CBP)或减少HDACs(如HDAC3)可促进HMGB1的高乙酰化和易位,表明HAT/HDAC在调节HMGB1的分泌中起关键作用^[13]。

在感染或组织损伤时,先天免疫系统或适应性免疫系统会发生炎症反应,尽管炎症反应可清除大多数感染,但同样也可能会导致免疫过激,是导致内毒素休克的主要原因。免疫过激的与炎症因子风暴有关。巨噬细胞受到LPS刺激后,分泌的IL-1 β 、TNF- α 等细胞因子可与巨噬细胞相互作用形成细胞因子网络,激活急性期反应,此时HMGB1可作为内源性危险信号以高乙酰化状态由细胞核中大量释放出胞^[14],胞外HMGB1与其特异性受体结合,可激活NF- κ B这一核心炎症通路,再次导致TNF- α 、IL-1 β 和趋化因子(chemokines, CK)产生^[6],这些促炎因子又可刺激单核巨噬细胞分泌HMGB1,几种势力形成强大的正反馈环路,引发炎症因子风暴。胞外HMGB1是炎症晚期级联放大反应中的关键一环。单核/巨噬细胞经炎性刺激后6~8 h开始主动分泌HMGB1,16~24 h达到高峰,且持续3 d处于较高水平^[14]。与早期促炎因子相比, HMGB1



Control 为对照组; LPS 为脂多糖; Merge 为合并图层;
 荧光显微镜 $\times 400$ 倍

图 4 HDAC3 沉默后,免疫荧光法观察 SFI 对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞中 HMGB1 的亚细胞定位的影响
 Fig. 4 Effects of SFI on the subcellular localization of HMGB1 in LPS-induced RAW264.7 cells following silencing by HDAC3-siRNA was evaluated by immunofluorescence

出现较晚且持续时间更长,参与了内毒素休克病理生理大部分过程。HMGB1 释放的延迟动力学与疾病的严重程度和随后的致命结果有相关性^[3], HMGB1 可诱发或促进内毒素休克^[15-16],以 HMGB1 为靶标治疗炎症性疾病有较长的治疗时间窗^[17]。因此,阻断 HMGB1 的分泌和释放,或者阻断其与相应受体结合,已成为针对 HMGB1 为靶标的主要治疗手段。用 HMGB1 的特异性抗体以及其受体抑制物等治疗炎症也逐步进入研究领域,现已研发多种 HMGB1 抑制剂,如重组 box A、特异性 HMGB1 抗体、丙酮酸乙酯等,有些已经进入临床试验阶段^[18]。单味中药如当归、大黄,中药提取物如槲皮素、甘草甜素、丹参酮 IIA 磺酸钠及复方如血必净注射液等调控 HMGB1 治疗炎症也受到中外研究者的关注^[19-20]。

SFI 是临床治疗内毒素休克常用药^[21],为宋《严氏济生方》参附汤的改制方。《本经》所载的 365 味药中仅有 9 对药既互为相使,又自成一方,参附汤中的人参附子就占 1 对,开创了回阳救逆方之先河。SFI 的主要成分为红参和附片,对内毒素休克即阳气暴脱的厥脱证疗效卓越。现代药理表明,参附汤中的人参皂苷和乌头类生物碱可有效改善内毒素休克微循环、抑制炎症反应^[23]。

本文研究发现了 SFI 对 LPS 诱导的巨噬细胞中 HDAC3 的表达有影响,并且可能通过增加 HDAC3 而阻断 HMGB1 核浆迁徙。本文研究为 SFI 在表观遗传学方面治疗内毒素休克提供了新的研究方向和研究靶点,丰富了中医药抗炎机制。目前对中药复方抗炎机制研究仍有很长的路要走,如中药复方制剂难以制定国际评价体系,是阻碍其国际化发展进程的瓶颈问题^[24]。因此在今后的研究中,要进一步提取 SFI 在 HDACs 抑制内毒素休克关键通道上的有效成分,开展动物和细胞实验和临床研究。以期提升药物国际认可度和临床优势,使回阳救逆类复方药有更为广阔的发展空间。

参 考 文 献

- [1] Foster D M, Kellum J A. Endotoxic septic shock: diagnosis and treatment[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(22). DOI: 10.3390/ijms242216185.
- [2] Yang K, Fan M, Wang X, et al. Lactate promotes macrophage HMGB1 lactylation, acetylation, and exosomal release in polymicrobial sepsis[J]. *Cell Death and Differentiation*, 2022, 29(1): 133-146.
- [3] Chen R, Kang R, Tang D. The mechanism of hmgb1 secretion and release[J]. *Experimental & Molecular Medicine*, 2022, 54(2): 91-102.
- [4] 薛亚楠, 张立德, 王建波, 等. 补阳还五汤调节血管内皮细胞炎症信号通路干预高血压前期血管损伤机制[J]. *科学技术与工程*, 2022, 22(25): 10906-10911.
- [5] Xue Yanan, Zhang Lide, Wang Jianbo, et al. Regulation of vascular endothelial cell inflammatory signaling pathway by tonifying Yang Huiwu Tang interferes with the mechanism of vascular injury in prehypertension[J]. *Science Technology and Engineering*, 2022, 22(25): 10906-10911.
- [6] Xu L, An T, Jia B, et al. Histone deacetylase 3-specific inhibitor RGF966 attenuates oxidative stress and inflammation after traumatic brain injury by activating the NRF2 pathway[J]. *Burns & Trauma*, 2024, 12. DOI: 10.1093/burnst/tkad062.
- [7] 艾飞, 薛艳, 杨晓龙, 等. 参附注射液通过调节核内 HMGB1 和 NF- κ B 结合发挥抗炎活性的机制[J]. *科学技术与工程*, 2024, 24(13): 5324-5335.
- [8] Ai Fei, Xue Yan, Yang Xiaolong, et al. Mechanism of the anti-inflammatory activity of Ginseng and Ginseng Injection by regulating the binding of HMGB1 and NF- κ B in the nucleus [J]. *Science Technology and Engineering*, 2024, 24(13): 5324-5335.
- [9] 艾飞, 刘霞, 褚春薇, 等. 基于 HMGB1/NF- κ B 信号通路评价参附注射液对脂多糖诱导 RAW264.7 细胞炎症的抑制作用[J]. *中华中医药学刊*, 2021, 39(9): 62-65, 264.
- [10] Ai Fei, Liu Xia, Chu Chunwei, et al. Evaluation of the inhibitory effect of ginseng injection on lipopolysaccharide-induced inflammation in RAW264.7 cells based on HMGB1/NF κ B signaling pathway [J]. *Chinese Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2021, 39(9): 62-65, 264.
- [11] 艾飞, 刘霞, 黎晖, 等. 参附注射液对 LPS 诱导的 RAW264.7 细胞 HMGB1 核转位的干预作用[J]. *中国药房*, 2020, 31(21): 2585-2591.
- [12] Ai Fei, Liu Xia, Li Hui, et al. Intervention effect of ginseng injection on LPS-induced HMGB1 nuclear translocation in RAW264.7 cells[J]. *Chinese Pharmacy*, 2020, 31(21): 2585-2591.
- [13] Maren N A, Duduit J R, Huang D, et al. Stepwise optimization of real-time RT-PCR analysis [J]. *Methods in Molecular Biology (Clifton, N. J.)*, 2023, 2653: 317-332.
- [14] Li J, Chen Y F, Gao L, et al. Honokiol prevents intestinal barrier dysfunction in mice with severe acute pancreatitis and inhibits JAK/STAT1 pathway and acetylation of HMGB1 [J]. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2024, 30(6): 534-542.
- [15] Hai R, Yang D, Zheng F, et al. The emerging roles of hdacs and their therapeutic implications in cancer[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2022, 931. DOI: 10.1016/j.ejphar.2022.175216.
- [16] Abdallah D I, De Araujo E D, Patel N H, et al. Medicinal chemistry advances in targeting class I histone deacetylases[J]. *Exploration of Targeted Anti-Tumor Therapy*, 2023, 4(4): 757-779.
- [17] Zheng S, Bulut G B, Kummarapurugu A B, et al. Neutrophil elastase degrades histone deacetylases and sirtuin 1 in primary human monocyte derived macrophages[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(8). DOI: 10.3390/ijms25084265.
- [18] Andersson U, Yang H, Harris H. High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells[J]. *Seminars in Immunology*, 2018, 38: 40-48.
- [19] Deng C, Zhao L, Yang Z, et al. Targeting HMGB1 for the treatment of sepsis and sepsis-induced organ injury[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2022, 43(3): 520-528.
- [20] Li J, Zhu C S, He L, et al. A two-decade journey in identifying

- high mobility group box 1 (HMGB1) and procathepsin I (PCTS-1) as potential therapeutic targets for sepsis[J]. *Expert Opinion on Therapeutic Targets*, 2023, 27(7): 575-591.
- [17] Yang H, Wang H, Andersson U. Targeting inflammation driven by HMGB1 [J]. *Frontiers in Immunology*, 2020, 11. DOI: 10.3389/fimmu.2020.00484.
- [18] Wang H. Regulation of HMGB1 release in health and diseases [J]. *Cells*, 2022, 12(1). DOI: 10.3390/cells12010046.
- [19] Wu A H, He L, Long W, et al. Novel mechanisms of herbal therapies for inhibiting HMGB1 secretion or action [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine: ECAM*, 2015, 2015. DOI: 10.1155/2015/456305.
- [20] Li Y F, Sheng H, Qian J, et al. The chinese medicine babaodan suppresses lps-induced sepsis by inhibiting NLRP3-mediated inflammasome activation[J]. *Journal of Ethnopharmacology*, 2022, 292. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115205.
- [21] 褚春薇, 艾飞, 陈向云, 等. 参附注射液对内毒素休克大鼠肺组织表达 PPAR γ 和 TNF α 的干预作用[J]. *实验动物科学*, 2020, 37(5): 14-18.
- Chun Chunwei, Ai Fei, Chen Xiangyun, et al. Interventional effects of ginseng and ginseng injection on the expression of PPAR γ and TNF α in lung tissues of endotoxin-shocked rats[J]. *Laboratory Animal Science*, 2020, 37(5): 14-18.
- [22] 侯一楠, 梁群, 杨俊, 等. 中药注射剂和中药提取物治疗脓毒症急性肺损伤的研究进展[J]. *中国医院用药评价与分析*, 2023, 23(1): 120-122, 128.
- Hou Yinan, Liang Qun, Yang Jun, et al. Progress in the treatment of acute lung injury in sepsis with Chinese medicine injections and Chinese medicine extracts[J]. *Evaluation and Analysis of Drug Use in Chinese Hospitals*, 2023, 23(1): 120-122, 128.
- [23] 杨冰, 封亮, 贾晓斌. 基于“组分结构”特征的中药制剂质量评价策略[J]. *中草药*, 2019, 50(17): 4003-4007.
- Yang Bing, Feng Liang, Jia Xiaobin. A quality evaluation strategy for Chinese medicinal preparations based on the characteristics of “component structure”[J]. *Chinese Herbal Medicine*, 2019, 50(17): 4003-4007.