

外源性重组 HMGB1 对神经干细胞增殖分化的影响及其机制研究*

张会敏, 吴波[△], 曹甜, 严玉颖, 刘鸣

四川大学华西医院 神经内科(成都 610041)

【摘要】 目的 研究外源性重组高迁移率组蛋白 B1(HMGB1)对神经干细胞增殖及分化的影响及其作用机制。方法 在无血清的神经干细胞培养基中培养 SD 鼠大脑皮层细胞,传代扩增及纯化神经干细胞,免疫荧光检测神经干细胞标记物巢蛋白(nestin),分析神经干细胞纯度。CCK-8 测定加入不同浓度的重组 HMGB1 对神经干细胞增殖活性的影响,选择重组 HMGB1 的最适浓度进行后续实验;细胞免疫荧光检测重组 HMGB1 对神经干细胞分化的影响,Real-time PCR 检测晚期糖基化终末产物受体(RAGE)mRNA、Toll 样受体(TLRs)mRNA、基质金属蛋白酶 9(MMP-9)mRNA、神经生长因子(NGF)mRNA 的表达,Western blot 检测 RAGE、TLRs、MMP-9、NGF 蛋白的表达。结果 大鼠大脑皮层细胞在培养至第 3 代时,nestin 鉴定神经干细胞纯度可达 99% 及以上。在重组 HMGB1 10 ng/mL 刺激下,神经干细胞增殖活性最高。实验组神经Ⅲ类 β -微管蛋白(TUJ1)表达高于对照组($P < 0.05$),实验组 RAGE、TLRs、MMP-9、NGF mRNA 及蛋白表达均高于对照组($P < 0.05$)。结论 外源性重组 HMGB1 或可通过 RAGE、TLRs、MMP-9 等信号通路促进神经干细胞增殖及其向神经元方向分化。

【关键词】 神经干细胞 重组高迁移率组蛋白 B1 晚期糖基化终末产物受体 Toll 样受体 基质金属蛋白酶 9 神经生长因子

The Effect of Exogenous Recombinant HMGB1 on Neural Stem Cells and Related Mechanism ZHANG Hui-min, WU Bo[△], CAO Tian, YAN Yu-ying, LIU Ming. Department of Neurology, West China Hospital, Sichuan University, Chengdu 610041, China

[△] Corresponding author, E-mail: dr.bowu@hotmail.com

【Abstract】 Objective To explore the effect of exogenous recombinant high mobility group protein box1 (rHMGB1) on proliferation and differentiation of neural stem cells (NSCs) and the related mechanism. **Methods** SD rat cerebral cortex cells were cultured in serum-free medium, extending the culture and purification of neural stem cells. NSCs were identified by detecting nestin-label with immunofluorescence method. The NSCs proliferation activity after adding different concentrations of rHMGB1 was determined by CCK-8 assay and the optimal concentration of rHMGB1 for the follow-up experiments was selected. The effect of rHMGB1 on NSCs differentiation was detected by immunofluorescence assay. The mRNA and protein expression of involved factors were studied by real-time PCR and Western blot separately. **Results** The neural cells isolated from the cortex of rat embryos showed the expression of nestin antigen and the neural stem cells purity could reach more than 99% when cultured to the third generation. Under the stimulation of 10 ng/mL rHMGB1, neural stem cells proliferation activity were the highest, therefore, 10 ng/mL rHMGB1 was selected to treat the experimental group. The expression of TUJ1 in the experimental group was higher than that in the control group ($P < 0.05$). Real-time PCR and Western blot confirmed rHMGB1 could improve the expression of receptor for advanced glycation end products (RAGE), Toll-like receptor 2 (TLR2), Toll-like receptor 4 (TLR4), matrix metalloproteinase 9 (MMP-9) and nerve growth factor (NGF) respectively at the level of mRNA and protein expression. **Conclusion** Exogenous rHMGB1 promoted rat NSCs proliferation and differentiation into neurons *in vitro* by activating RAGE, TLRs, MMP-9 signaling.

【Key words】 Neural stem cells Recombinant high mobility group protein box 1 Receptor for advanced glycation end products Toll-like receptors Matrix metalloproteinase 9 Nerve growth factor

高迁移率组蛋白B1(HMGB1)是高迁移率组蛋

白(HMG)超家族成员,在真核生物细胞中大量存在,因其所处的位置不同(核内或胞质、胞外)及相互作用的因子不同而发挥各种重要的功能^[1]。核内 HMGB1 被称为 DNA 分子伴侣,作用于弯曲的

* 国家自然科学基金(No. 81371283 和 No. 81671146)资助

[△] 通信作者, E-mail: dr.bowu@hotmail.com

DNA 而促进染色质稳定和促进转录调控^[2];胞外 HMGB1 通常由坏死细胞被动释放或被激活的免疫和非免疫细胞主动释放,作为一种趋化因子,加速炎症及细胞凋亡、坏死的发生,参与炎症、自身免疫性疾病以及癌症的发病及进展,包括脓毒症、中风、风湿性关节炎、动脉硬化、慢性肾脏疾病、系统性红斑狼疮(SLE)、肝细胞癌、前列腺癌等^[3]。HMGB1 亦可吸引干细胞聚集及加速其增殖、分化从而促进组织再生^[4]。有研究表明:HMGB1 可通过多种不同因子促进骨骼肌或平滑肌再生^[5-6];外源性 HMGB1 能够诱导小鼠 3T3 成纤维细胞增殖,促进细胞迁移和划痕伤口闭合^[7]。然而,外源性 HMGB1 对大鼠神经干/祖细胞(NSCs/NPCs)的增殖和分化影响及其作用机制的研究鲜见。众所周知,HMGB1 发挥上述胞外功能主要通过结合晚期糖基化终末产物受体(RAGE),Toll 样受体(TLRs) 2、4、9(Toll2、4、9)以及基质金属蛋白酶-9(MMP-9)实现^[8-10]。故本实验旨在探讨外源性 HMGB1 可否促进大鼠 NSCs 分化为神经元,其潜在影响因子(即 TLRs、MMP-9、RAGE)在 NSCs 细胞增殖和分化中有何作用,为临床药物应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器

实验动物:E15-16 SD 大鼠(四川省成都达硕公司提供)。主要试剂:重组 HMGB1(货号:50913-M01H),购自北京义翘神州生物科技有限公司;DMEM/F12 培养液(货号:10565-018)、B-27 supplement (50×)(货号:17504-044)、双抗(Penicillin-Streptomycin, 15140-122),购自赛默飞世尔科技公司;人重组碱性成纤维生长因子(bFGF)(货号:354060)、肝素(Heparin, H3149),购自 Sigma 公司;磷酸盐缓冲液(PBS)、胰蛋白酶,购自武汉博士德公司;逆转录试剂盒(RR047A),购自 TaKaRa 公司;巢蛋白(nestin)羊抗大鼠多克隆一抗(sc-21248),购自 Santa 公司;神经Ⅲ类β微管蛋白(TUJ1)小鼠抗大鼠多克隆一抗(ab7751)、RAGE 兔抗大鼠多克隆一抗(ab37647)、TLR2 兔抗大鼠多克隆一抗(ab251110)、TLR4 小鼠抗大鼠多克隆一抗(ab30667)、MMP-9 兔抗大鼠多克隆一抗(ab76003)、神经生长因子(NGF)兔抗大鼠多克隆一抗(ab6199),购自 Abcam 公司。主要设备和仪器:超净工作台(苏州净化),恒温培养箱(SANYO MCO-15AC 型),倒置相差显微镜(PNASONIC

XD_S_B 型),体视显微镜(奥林巴斯 SZX7)。

1.2 NSCs 培养及鉴定

腹腔静脉注射 3.6% 水合氯醛深度麻醉大鼠,腹部浸泡于 75% 乙醇溶液中 5 min,取出后用无菌 PBS 冲洗鼠体表面的乙醇,在超净台内解剖子宫,取出胎鼠。更换器械及超净台,将取出的胎鼠大脑在体视显微镜下仔细剥除脑膜,取出大脑皮层置于 15 mL BD 管中,胰酶消化,用无血清的 NSCs 培养液制成单细胞悬液,按 NSCs 1×10^6 mL⁻¹ 密度接种于 25 mL 培养瓶(原代细胞记为 P1)。37℃、体积分数 5% CO₂ 恒温箱中培养,每天换液,去掉贴壁细胞,待悬浮细胞增殖呈球状,直径约 100 μm 时用 2.5 g/L 胰蛋白酶消化 1~2 min 进行传代培养^[11]。培养到 P3 时进行 NSCs 标记物 nestin 鉴定及分析 NSCs 纯度,取 P3~P16 代 NSCs 用于后续的实验研究。

1.3 检测指标和方法

1.3.1 形态学观察 每天在倒置相差显微镜下观察细胞形态、生长情况;取 P3 代细胞贴壁于已用层粘连蛋白及多聚赖氨酸包被的 6 孔板的盖玻片上,NSCs 培养基培养 24 h 后,弃上清液,冰冷 PBS 冲洗 3 次,缓慢加入 4% 戊二醛固定,室温 30 min, PBS 冲洗 3 次,打孔及 BSA 封闭 30 min,孵育 nestin 一抗(1:250),4℃过夜, PBS 冲洗 2~3 次,免疫荧光二抗 Fluorescein(FITC)-conjugated 兔抗羊 IgG(H+L)(1:1000, ZF-0314),室温孵育 1 h, PBS 冲洗 2~3 次,用含有 DAPI 的防淬灭封片剂染色 5 min,倒置显微镜下观察荧光情况。

1.3.2 CCK-8 检测细胞活性 用完全培养液调整细胞浓度为 1×10^4 mL⁻¹,并接种于 96 孔板,每孔 100 μL。培养 24 h 后分别加入 0、1、5、10、50、100 ng/mL 重组 HMGB1(每个质量浓度设 6 个复孔),继续培养 24 h 后,每孔加入 5 mg/mL CCK-8 试剂 10 μL,避光 37℃孵育 4 h 后,酶标仪(检测波长 450 nm)测定每孔吸光度(A_{450})值(A 值与活细胞数呈正比),取其平均值。

1.3.3 NSCs 分化检测 取 P3~P16 代 NSCs 贴壁于已用层粘连蛋白及多聚赖氨酸包被的 6 孔板的盖玻片上,NSCs 培养基培养 24 h 后,弃上清液,转用不含 bFGF 的分化培养基(对照组)及加入 10 ng/mL 重组 HMGB1 的不含 bFGF 的分化培养基(实验组)培养 7 d,弃上清液,冰冷 PBS 冲洗 3 次,缓慢加入 4% 戊二醛固定,室温 1 h, PBS 冲洗 3 次,打孔及 BSA 封闭 30 min,同时孵育 TUJ1 一抗,4℃过

夜,PBS 冲洗 2~3 次,免疫荧光二抗:Alexa Fluor-488-conjugated 驴抗兔 IgG (1 : 200, bs-0295D-AF488)、Alexa Fluor 555-conjugated 驴抗小鼠 IgG (1 : 150, A0460),室温孵育 1 h,PBS 冲洗 2~3 次,用含有 DAPI 的防淬灭封片剂染色 5 min,倒置显微镜下观察荧光情况。阴性对照以 PBS 代替一抗。结果判断:TUJ1 表达于细胞的细胞浆和细胞膜,红色为阳性染色。用 Image Pro plus 6.0 进行图像分析。计算阳性率:每例随机选取 400 倍视野 5~10 个,计算阳性细胞数所占的百分比例。

1.3.4 Real-time PCR 检测重组 HMGB1 对 RAGE、TLRs、MMP-9 和 NGF mRNA 表达水平的影响 取 P3~P16 代 NSCs 贴壁于已用层粘连蛋白及多聚赖氨酸包被的 6 孔板,NSCs 培养基培养 24 h 后,弃上清液,转用不含 bFGF 的分化培养基(对照组)及加入 10 ng/mL 重组 HMGB1 的不含 bFGF 的分化培养基(实验组)培养 3 d,弃上清液,冰冷 PBS 冲洗 3 次,TRIZOL 裂解提取细胞总 RNA,按逆转录试剂盒所推荐方法合成 cDNA,进行 Real-teim PCR,反应体系 15 μ L。PCR 扩增反应条件:95 $^{\circ}$ C 30 s;95 $^{\circ}$ C 5 s,60 $^{\circ}$ C 30 s,40 个循环。扩增仪器:BIO Real-Time PCR Detection System,成都百乐科技有限公司。所有实验均重复 3 次,前后实验条件一致。以 β -actin 为内参照,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算目的基因的表达量。扩增引物序列见表 1。

表 1 PCR 引物序列		
Table 1 Sequences of fluorecence quantitative primers		
Gene	Sequence (5'-3')	Amplified product length/bp
β -actin	F: CGCGAGTACAACCTTCTTGC	70
	R: CGTCATCCATGGCGAACTGG	
RAGE	F: CCGAGTCCGAGTCTACCAGA	96
	R: ACACACGTCCCCACCTTATT	
TLR2	F: GAGGTCTCCAGGTCAAAATCTCA	116
	R: ACATGACAGAGATGCCTGGG	
TLR4	F: GCTGGTTGCAGAAAATGCCA	120
	R: GGAAGTACCTCTATGCAGGGAT	
MMP-9	F: AGGGCCCCCTTCTTATTGCC	112
	R: CACATTTTGCGCCAGAGAA	
NGF	F: CGCATCGCTCTCCTTCACAG	112
	R: TGGCAAAGCCTTTATTGGGC	

1.3.5 Western blot 检测重组 HMGB1 对 RAGE、TLRs、MMP-9 和 NGF 蛋白水平的影响 取 P3~P16 代 NSCs 贴壁于已用层粘连蛋白及多聚赖氨酸包被的 100 mm 培养皿,NSCs 培养基培养 24 h 后,弃上清液,转用不含 bFGF 的分化培养基(对照组)及加入 10 ng/mL 重组 HMGB1 的不含 bFGF 的分化培养基(实验组)培养 3 d,弃上清液,冰冷 PBS 冲

洗 3 次,每孔加入 100 μ L RIPA 裂解液和 1 μ L PMSF,用 200 μ L TIP 管直接吸打,冰里放置 30 min;将样品转移到 1.5 mL 离心管,4 $^{\circ}$ C,20 000 $\times g$ 离心 30 min;采用 Bradford 法用紫外可见分光光度仪测定蛋白浓度,各样本稀释成统一浓度 5 μ g/ μ L,-70 $^{\circ}$ C 保存。加入 5 $\times$ SDS 上样缓冲液,混合后 100 $^{\circ}$ C 煮沸 5 min 使蛋白充分变性,按照顺序依次加样,每泳道上样量为 30 μ g 总蛋白,80 V 电泳 20 min,120 V 电泳 50 min。转膜 100 V 1 h;取出 PVDF 膜,用 5%脱脂奶封闭液进行膜封闭,然后一抗(RAGE 1 : 1 000,TLR2 1 : 500,TLR4 1 : 500,MMP-9 1 : 1 000,NGF 1 : 1 000, β -actin 1 : 1 000)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜,二抗(1 : 1000)室温下孵育 1 h,最后用试剂盒显色剂显色。用 Image J 软件对各抗体条带灰度值进行统计,以目的蛋白与内参蛋白 β -actin 灰度值的比值作为目的蛋白的相对表达量。

1.4 统计学方法

实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 描述,组间比较采用 t 检验, $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 免疫荧光鉴定 NSCs

结果见图 1。SD 胎鼠大脑皮层细胞在无血清 NSCs 培养液中增殖传代,至 P3 时进行细胞免疫荧光检测,nestin 阳性(绿色)细胞率达 95%以上。

2.2 外源性重组 HMGB1 对 NSCs 增殖活性的影响

结果见图 2。在其他条件相同情况下,NSCs 在含不同质量浓度重组 HMGB1 (0、1、5、10、50、100 ng/mL)的 NSCs 培养液中培养 24 h,其 A_{450} 值依次为:0.692 $\pm$ 0.089、1.162 $\pm$ 0.081、1.384 $\pm$ 0.064、1.526 $\pm$ 0.054、1.454 $\pm$ 0.107、0.861 $\pm$ 0.026。1~50 ng/mL 质量浓度组 A_{450} 值与对照组(0 ng/mL)比较差异均有统计学意义($P<0.05$),其中尤以 10 ng/mL 质量浓度组差异最明显。可见,NSCs 在含 10 ng/mL 重组 HMGB1 的培养液中增殖最为活跃,所以选择 10 ng/mL 重组 HMGB1 作为后续实验的作用浓度。

2.3 外源性重组 HMGB1 对 NSCs 分化的影响

细胞免疫荧光检查结果显示(图 3),重组 HMGB1 诱导 7 d 后实验组 TUJ1 阳性细胞较对照组增多(91.45% $\pm$ 0.59% vs. 2.64% $\pm$ 0.61%),差异有统计学意义($P<0.05$)。

2.4 外源性重组 HMGB1 对 NSCs 的 RAGE、TLR2、TLR4、MMP-9 和 NGF mRNA 表达的影响

PCR 结果显示(表 2),实验组与对照组比较,RAGE、TLR2、TLR4、MMP-9 和 NGF mRNA 表达均升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。

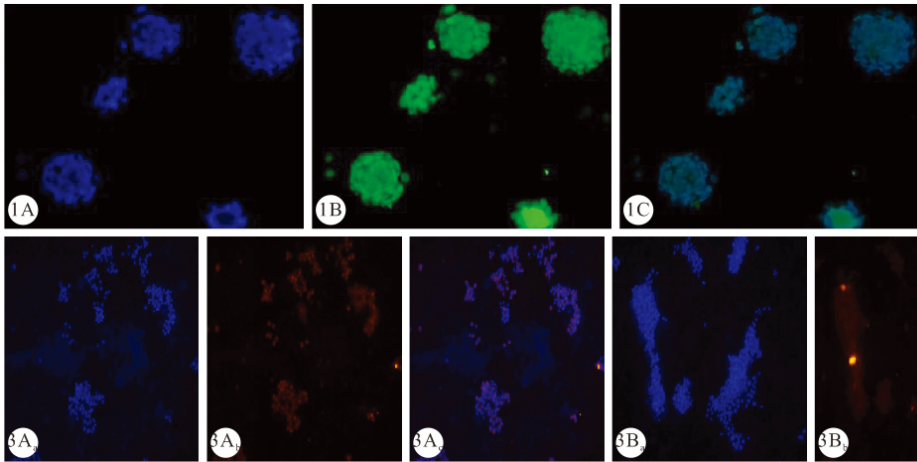


图 1 免疫荧光鉴定 NSCs。×40

图 2 外源性重组 HMGB1 对 NSCs 增殖活性的影响

图 3 免疫荧光下观察 NSCs 的分化。×20

Fig 1 Identification of NSCs by immunofluorescence. ×40

Fig 2 The effect of exogenous recombinant HMGB1 on NSCs proliferation

Fig 3 NSCs differentiation under immunofluorescent scope. ×20

1A, 3A_a, 3B_a: DAPI; 1B: Nestin; 3A_b, 3B_b: TUJ1; 1C, 3A_c, 3B_c: Merged; 3A: Experimental group; 3B: Control group. * * $P<0.01$, vs. control group (0 ng/mL recombinant HMGB1)

表 2 两组 NSCs 中 RAGE、TLR2、TLR4、MMP-9 和 NGF mRNA 的表达($n=3$)

Table 2 Expressions of RAGE, TLR2, TLR4, MMP-9 and NGF mRNA in NSCs ($n=3$)

Group	RAGE	TLR2	TLR4	MMP-9	NGF
Control	0.930±0.122	0.411±0.078	1.032±0.055	0.712±0.145	0.176±0.017
Experimental	1.324±0.144 *	1.050±0.091 * *	1.140±0.013 *	1.053±0.091 *	0.797±0.352 * *

* $P<0.05$, * * $P<0.01$, vs. control group

表 3 两组 NSCs 中 RAGE、TLR2、TLR4、MMP-9 和 NGF 蛋白的表达($n=3$)

Table 3 Expressions of RAGE, TLR2, TLR4, MMP-9 and NGF proteins in NSCs ($n=3$)

Group	RAGE	TLR-2	TLR-4	MMP-9	NGF
Control	0.963±0.046	0.909±0.080	0.978±0.030	0.961±0.033	0.985±0.014
Experimental	1.284±0.044 * *	1.269±0.017 *	1.100±0.013 *	1.328±0.015 * *	1.843±0.083 * *

* $P<0.05$, * * $P<0.01$, vs. control group

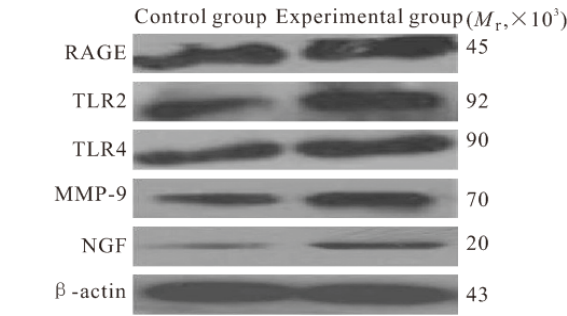
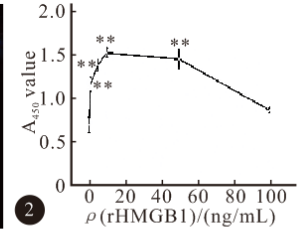


图 4 外源性重组 HMGB1 对 NSCs 的 RAGE、TLR2、TLR4、MMP-9 和 NGF 蛋白表达的影响

Fig 4 The influence of exogenous recombinant HMGB1 on RAGE, TLR2, TLR4, MMP-9 and NGF protein expressions in NSCs

2.5 外源性重组 HMGB1 对 NSCs 的 RAGE、TLR2、TLR4、MMP-9 和 NGF 蛋白表达的影响

Western blot 结果显示(表 3、图 4),实验组与对照组比较,RAGE、TLR2、TLR4、MMP-9 和 NGF 蛋白表达均升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。



3 讨论

脑损伤的特点是神经元的大量丢失和星形胶质细胞的大量增生,可导致中风或神经退行性疾病(帕金森病、阿尔茨海默病)^[12-13]。因此,减少神经元的丢失和诱导神经元的再生成为大家关注的焦点。NSCs 是一种关键的细胞类型,有助于研究神经再生。探索 NSCs 增殖和分化的机制可能会给神经发育和调节神经发生过程带来更深刻的理解。近年来,NSCs 移植已成为治疗神经退行性疾病和中枢神经系统损伤的研究热点,但是移植的 NSCs 来源及移植条件(如移植时间窗及移植方式、部位、NSCs

稳定性及安全性)存在伦理争议及挑战^[14-15]。

众所周知, HMGB1 是损伤相关分子, 主要与炎症有关。然而, 最近的数据已表明其与组织修复密切相关^[16-17], 如 LIMANA 等^[16]证实了外源性 HMGB1 可诱导心肌 c-kit⁺ 细胞增殖及分化从而修复损伤的心肌梗死灶, 改善心室功能。更有相关研究表明, HMGB1 可调节某些类型的干细胞功能, 诱导成血管细胞定向迁移及增殖, 诱导胚胎 NSCs 增殖及分化^[18-19]。本研究分析了外源性重组 HMGB1 在体外对正常胚胎 NSCs 的作用, 添加重组 HMGB1 一定质量浓度范围内(1~50 ng/mL)培养细胞 24 h, 可以促进 NSCs 的增殖; 但超过该质量浓度范围的重组 HMGB1(100 ng/mL)作用 24 h 后, 对 NSCs 增殖无明显影响。既往研究表明 HMGB1 可以加重炎症反应, 促进组织细胞损伤^[4,19], 结合本实验结果可说明 HMGB1 具有细胞毒作用, 具有促进炎症发生与促进细胞增殖的双相调控功能, 且可能与 HMGB1 浓度及炎症时相有关。添加 10 ng/mL 外源性重组 HMGB1 于 NSCs 分化培养 7 d 后, 可检测到神经元标记物 TUJ1 表达明显增多, 进一步证实外源性 HMGB1 可促进 NSCs 向神经元方向分化。

Western blot 及 Real-time PCR 结果分别从蛋白及 mRNA 水平证实添加 10 ng/mL 重组 HMGB1 可提高 NSCs 中 RAGE、TLR2、TLR4 和 MMP-9 的表达, 首次证明了 HMGB1 与 RAGE、TLR2、TLR4、MMP-9 这些通路因子的结合或许在体外培养的 NSCs 增殖和分化的信号通路中起重要的作用。然而这些因子在 NSCs 增殖及分化中的特异性及必要性需要通过添加相应特异抑制剂或靶向敲除表达以进行进一步研究。而 NGF 促进 NSCs 增殖及分化为神经元的重要作用与已发表的文献研究一致^[20-21]。

但也有研究持有不同观点, 如 WANG 等^[20]表明 HMGB1 可通过 MAPK 信号途径促进 NSCs 增殖但不影响其分化, MENG 等^[21]表明 HMGB1 抑制间充质干细胞增殖但促进其分化为成骨细胞。产生此差异的原因可能是由实验方法及实验对象不同: WANG 等^[20]的研究是通过敲除内源性 HMGB1 的表达, 反向观察 NSCs 增殖及分化特性, 而本研究是添加外源性 HMGB1, 这存在浓度差的影响, 正如本研究表明不同质量浓度 HMGB1 对 NSCs 增殖的影响不同, 且外源性 HMGB1 对内源性 HMGB1 是否存在重要调控作用需要进一步研

究; 而 MENG 等^[21]的研究对象骨髓间充质干细胞, 作为造血微环境的主要细胞成分(即基质细胞)而非传统所说的实质干细胞, 它主要通过分泌多种细胞因子如 IL-7、8、11 及干细胞生长因子(SCF)而在造血调控中起重要作用。

综上, 本研究发现外源性重组 HMGB1 通过激活 RAGE、TLR2、TLR4、MMP-9、NGF 信号通路可促进胚胎 NSCs 的增殖和分化, 未来还需进一步研究其相应抑制剂(特异性抑制剂或对应 siRNA)对神经干细胞增殖及分化的影响, 更加明确 RAGE、TLR2、TLR4、MMP-9、NGF 信号通路的重要性, 而且尚需进一步研究外源性重组 HMGB1 可否在老鼠体内促进 NSCs 增殖分化, 诱导内源性 NSCs 迁移, 从而改善大鼠神经功能及脑损伤结局。HMGB1 是神经细胞发育的关键因子, 可作为一种新的治疗脑卒中(缺血性或出血)和神经退行性疾病的手段。

参 考 文 献

- [1] ABRAHAM AB, BRONSTEIN R, CHEN EI, *et al.* Members of the high mobility group B protein family are dynamically expressed in embryonic neural stem cells. *Proteome Sci*, 2013, 11(1):18.
 - [2] STROS M. HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1799(1/2):101-113.
 - [3] PANDOLFI F, ALTAMURA S, FROSALI S, *et al.* Key role of DAMP in inflammation, cancer, and tissue repair. *Clin Ther*, 2016, 38(5):1017-1028.
 - [4] ULLOA L, MESSMER D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17(3):189-201.
 - [5] DE MORI R, STRAINO S, DI CARLO A, *et al.* Multiple effects of high mobility group box protein 1 in skeletal muscle regeneration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2007, 27(11):2377-2383.
 - [6] DEGRYSE B, BONALDI T, SCAFFIDI P, *et al.* The high mobility group (HMG) boxes of the nuclear protein HMGB1 induce chemotaxis and cytoskeleton reorganization in rat smooth muscle cells. *J Cell Biol*, 2001, 152(6):1197-1206.
 - [7] RANZATO E, PATRONE M, PEDRAZZI M, *et al.* Hmgb1 promotes wound healing of 3T3 mouse fibroblasts via rage-dependent ERK1/2 activation. *Cell Biochem Biophys*, 2010, 57(1):9-17.
 - [8] KOKKOLA R, ANDERSSON A, MULLINS G, *et al.* RAGE is the major receptor for the proinflammatory activity of HMGB1 in rodent macrophages. *Scand J Immunol*, 2005, 61(1):1-9.
- (下转第 409 页)

- microparticle production. *Science*, 2010, 327(5965): 580-583.
- [6] ROBERT S, PONCELET P, LACROIX R, *et al.* Standardization of platelet-derived microparticle counting using calibrated beads and a Cytomics FC500 routine flow cytometer: a first step towards multicenter studies. *J Thromb Haemost*, 2009, 7(1): 190-197.
- [7] KNIJFF-DUTMER EA, KOERTS J, NIEUWLAND R, *et al.* Elevated levels of platelet microparticles are associated with disease activity in rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(6): 1498-1503.
- [8] CLOUTIER N, TAN S, BOUDREAU LH, *et al.* The exposure of autoantigens by microparticles underlies the formation of potent inflammatory components: the microparticle-associated immune complexes. *EMBO Mol Med*, 2013, 5(2): 235-249.
- [9] BERCKMANS RJ, NIEUWLAND R, TAK PP, *et al.* Cell-derived microparticles in synovial fluid from inflamed arthritic joints support coagulation exclusively via a factor VII-dependent mechanism. *Arthritis Rheum*, 2002, 46(11): 2857-2866.
- [10] BERCKMANS RJ, NIEUWLAND R, KRAAN MC, *et al.* Synovial microparticles from arthritic patients modulate chemokine and cytokine release by synoviocytes. *Arthritis Res Ther*, 2005, 7(3): R536-544.
- [11] GASPARYAN AY, STAVROPOULOS-KALINOGLU A, MIKHAILIDIS DP, *et al.* Platelet function in rheumatoid arthritis: arthritic and cardiovascular implications. *Rheumatol Int*, 2011, 31(2): 153-164.
- [12] DYE JR, ULLAL AJ, PISETSKY DS. The role of microparticles in the pathogenesis of rheumatoid arthritis and systemic lupus erythematosus. *Scand J Immunol*, 2013, 78(2): 140-148.
- [13] DANESE S, FIOCCHI C. Platelet activation and the CD40/CD40 ligand pathway: mechanisms and implications for human disease. *Crit Rev Immunol*, 2005, 25(2): 103-121.
- [14] TAMURA N, KOBAYASHI S, KATO K, *et al.* Soluble CD154 in rheumatoid arthritis: elevated plasma levels in cases with vasculitis. *J Rheumatol*, 2001, 28(12): 2583-2590.
- [15] DINKLA S, VAN CRANENBROEK B, VAN DER HEIJDEN WA, *et al.* Platelet-derived microparticles inhibit IL-17 production by regulatory T cells through P-selectin. *Blood*, 2016, 127(16): 1976-1986.
- [16] SPRAGUE DL, ELZEY BD, CRIST SA, *et al.* Platelet-mediated modulation of adaptive immunity: unique delivery of CD154 signal by platelet-derived membrane vesicles. *Blood*, 2008, 111(10): 5028-5036.

(2016-10-12 收稿, 2017-01-24 修回)

编辑 汤洁

(上接第 398 页)

- [9] PARK JS, SVETKAUSKAITE D, HE Q, *et al.* Involvement of toll-like receptors 2 and 4 in cellular activation by high mobility group box 1 protein. *J Biol Chem*, 2004, 279(9): 7370-7377.
- [10] LEI C, LIN S, ZHANG C, *et al.* Effects of high-mobility group box1 on cerebral angiogenesis and neurogenesis after intracerebral hemorrhage. *Neuroscience*, 2013, 229: 12-19 [2016-11-15]. [https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306-4522\(12\)01078-0](https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0306-4522(12)01078-0). doi: 10.1016/j.neuroscience.2012.10.054.
- [11] LOUIS SA, MAK CK, REYNOLDS BA. Methods to culture, differentiate, and characterize neural stem cells from the adult and embryonic mouse central nervous system. *Methods Mol Biol*, 2013, 946: 479-506. doi: 10.1007/978-1-62703-128-8_30.
- [12] FANG P, PAN HC, LIN SL, *et al.* HMGB1 contributes to regeneration after spinal cord injury in adult zebrafish. *Mol Neurobiol*, 2014, 49(1): 472-483.
- [13] MENEGHINI V, BORTOLOTO V, FRANCESE MT, *et al.* High-mobility group box-1 protein and β -amyloid oligomers promote neuronal differentiation of adult hippocampal neural progenitors via receptor for advanced glycation end products/nuclear factor- κ B axis: relevance for Alzheimer's disease. *J Neurosci*, 2013, 33(14): 6047-6059.
- [14] 曲艺, 孙正巍, 杨东波, 等. 神经干细胞移植治疗大鼠局灶性脑缺血损伤. *中国组织工程研究*, 2013, 17(10): 1876-1883.
- [15] HU Y, LIU N, ZHANG P, *et al.* Preclinical studies of stem cell transplantation in intracerebral hemorrhage: a systemic review and meta-analysis. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(8): 5269-5277.
- [16] 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⁺ cell proliferation and differentiation. *Circ Res*, 2005, 97(8): e73-e83 [2016-10-13]. <http://circres.ahajournals.org/content/97/8/e73.long>.
- [17] LI Q, YU B, YANG P. Hypoxia-induced HMGB1 in wound tissues promotes the osteoblast cell proliferation via activating ERK/JNK signaling. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(9): 15087-15097.
- [18] 李满, 罗勇, 李圆, 等. 高迁移率族蛋白 B1 对体外培养原代神经干细胞增殖能力的影响. *生理学报*, 2014, 66(4): 469-475.
- [19] PALUMBO R, SAMPAOLESI M, DE MARCHIS F, *et al.* Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol*, 2004, 164(3): 441-449.
- [20] WANG L, YU L, ZHANG T, *et al.* HMGB1 enhances embryonic neural stem cell proliferation by activating the MAPK signaling pathway. *Biotechnol Lett*, 2014, 36(8): 1631-1639.
- [21] 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. *Stem Cells Dev*, 2008, 17(4): 805-813.

(2017-01-14 收稿, 2017-03-27 修回)

编辑 余琳