

基础研究

DOI: 10.3969/j.issn.0253-3626.2013.02.007

高迁移率族蛋白 B1 预处理对大鼠脊髓缺血再灌注损伤的影响

薛婷如, 刘丹彦, 安 民

(重庆医科大学附属第一医院麻醉科, 重庆 400016)

【摘要】目的:评价高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1) 预处理对大鼠脊髓缺血再灌注损伤 (spinal cord ischemia reperfusion injury, SCII) 的影响。**方法:**健康成年雄性 SD 大鼠于缺血前 18 h 经侧脑室给予不同浓度的重组 HMGB1 预处理。采用 Zivin 改进法建立大鼠 SCII 模型, 阻断腹主动脉 45 min 后行再灌注。于再灌注 6、12、24 h 取血清检测循环中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) 水平, 取脊髓组织检测核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 活性及其抑制蛋白 (inhibitors κ B- α , I κ B- α) 含量。评价大鼠后肢运动神经功能, 观察脊髓组织病理学改变。**结果:**再灌注各时间点, 与行单纯缺血再灌注损伤的大鼠相比, 给予 HMGB1 预处理后大鼠后肢运动神经功能评分明显提高, 脊髓前角正常运动神经元的计数增多, 血清中 TNF- α 、IL-6 水平下降, 脊髓组织中 I κ B- α 含量增高, NF- κ B 活性降低。**结论:**HMGB1 预处理对大鼠 SCII 具有保护作用, 其机制与预处理减少 I κ B- α 降解, 抑制 NF- κ B 活性, 从而减轻炎症反应有关。

【关键词】脊髓缺血再灌注损伤; 高迁移率族蛋白 B1; 预处理

【中国图书分类法分类号】R365

【文献标志码】A

【收稿日期】2012-06-27

Effects of high mobility group box 1 preconditioning on spinal cord ischemia reperfusion injury in rats

XUE Tingru, LIU Danyan, AN Min

(Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University)

【Abstract】Objective: To investigate the effects of high mobility group box 1 (HMGB1) preconditioning on spinal cord ischemia reperfusion injury (SCII) in rats. **Methods:** Various concentrations of HMGB1 were injected into lateral ventricle of male SD rats at 18 h before ischemia. SCII model was completed by clamping the abdominal aorta for 45 min according to modified Zivin. At 6, 12, 24 h after reperfusion, blood samples were collected to measure the levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) and the spinal cord segment was harvested to detect the activity of nuclear factor- κ B (NF- κ B) and expression of inhibitor κ B- α (I κ B- α). Meanwhile, functional evaluation on hind limbs was done and pathological change of spinal cord was observed. **Results:** Preconditioning with HMGB1 significantly improved the hind-limb motor function scores and increased the numbers of normal motor neurons, which was accompanied with reduction of levels of TNF- α and IL-6 in serum as well as degradation of I κ B- α and activity of NF- κ B in spinal cord. **Conclusions:** Preconditioning with HMGB1 protects spinal cord against ischemia-reperfusion injury by attenuating inflammatory response.

【Key words】spinal cord ischemia reperfusion injury; high mobility group box 1; preconditioning

脊髓缺血再灌注损伤 (spinal cord ischemia reperfusion injury, SCII) 是脊柱手术、胸腹主动脉瘤等手术术后严重并发症之一, 重者甚至可导致截瘫, 对患者身心健康及家庭经济造成严重负担。临床上常采用低温和激素等措施防治 SCII, 但仍不能有效避免脊髓损伤的发生。因此, 如何防治 SCII 依然是

国内外医学界亟待解决的一大难题。高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group box 1, HMGB1) 是广泛存在于真核细胞中的非组 DNA 结合蛋白, 以往的研究一直关注其核内功能。近年来研究发现, 进入胞外介质的 HMGB1 可作为一种重要的炎症介质介导免疫应答, 参与多种疾病的发生发展, 如脓毒血症、关节炎、缺血再灌注损伤等。本实验拟通过建立大鼠 SCII 模型, 探讨 HMGB1 预处理对 SCII 的影响, 为临床提供参考。

作者介绍: 薛婷如, Email: 547304441@qq.com,

研究方向: 围术期脑保护。

通信作者: 刘丹彦, Email: liudanyan418@sina.com.cn。

1 材料与方法

1.1 实验动物与分组

实验分成两个部分。实验 I: 清洁级健康成年雄性 SD 大鼠 24 只, 体质量 250~280 g (由重庆医科大学实验动物中心提供), 随机分为缺血再灌注损伤对照组 (IR 组, 6 只)、HMGB1 20 ng 预处理组 (H_{20} 组, 6 只)、HMGB1 50 ng 预处理组 (H_{50} 组, 6 只)、HMGB1 200 ng 预处理组 (H_{200} 组, 6 只)。各组于再灌注 24 h 后处死大鼠。实验 II: 清洁级健康成年雄性 SD 大鼠 54 只, 体质量 250~280 g (由重庆医科大学实验动物中心提供), 随机分为假手术组 (S 组, 18 只)、缺血再灌注损伤对照组 (C 组, 18 只) 以及 HMGB1 预处理组 (H 组, 18 只)。预处理组浓度参考实验 I 结果, 选择 200 ng HMGB1 预处理进行进一步研究。各组大鼠在造模成功后, 按再灌注时间不同随机分为 3 个亚组, 即再灌注 6 h 组、12 h 组以及 24 h 组, 每个亚组 6 只大鼠。

1.2 给药

H_{20} 组、 H_{50} 组、 H_{200} 组以及 H 组于造模前 18 h, 经侧脑室给予不同浓度重组 HMGB1 (溶于 5 μ l 无菌生理盐水中)。S 组、C 组及 IR 组于造模前 18 h, 经侧脑室给予 5 μ l 无菌生理盐水。给药时间 5~10 min, 留针 3 min。参照 Paxinos-Watson 图谱进行大鼠侧脑室定位: 前囟中点向后 1.1 mm, 旁开 1.5 mm, 颅骨表面下 4.0 mm。实验中重组 HMGB1 给药时间、剂量及方式均是参照文献及预实验效果设计而成^[1-5]。

1.3 材料与试剂

重组人 HMGB1 (Sigma-Aldrich 公司), 核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) p65 多克隆抗体 (santa cruz, 北京中杉分装), 抑制蛋白 (inhibitor κ B- α , I κ B- α) 多克隆抗体 (碧云天生物技术研究所), 细胞核蛋白与细胞浆蛋白抽提试剂盒 (碧云天生物技术研究所), 肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) ELISA 试剂盒 (Shanghai ExCell Biology, Inc.), 白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6) ELISA 试剂盒 (上海沪尚生物科技有限公司)

1.4 动物模型的建立

采用 Zivin 改进法^[6]建立 SCII 模型。建模前动物禁食 8 h。腹腔注射 10% 水合氯醛 0.4 ml/100 g 麻醉大鼠, 仰卧位固定于手术台, 常规脱毛、消毒。严格无菌操作, 沿腹正中纵行切口打开腹腔, 分离暴露腹主动脉, 辨认双侧肾动脉。S 组在左右肾动脉之间的腹主动脉穿线, 不结扎; C 组、IR 组及 HMGB1 不同浓度预处理组 (H_{20} 组、 H_{50} 组、 H_{200} 组以及 H 组) 于左肾动脉上方约 1 cm, 右肾动脉分支下方, 以无创动脉夹夹闭腹主动脉, 触及夹闭部位远端的腹主动脉搏动消失、观察到后肢发绀时表明缺血成功。45 min 后松开动脉夹进行再灌注。检查腹腔内无出血, 关闭腹腔。

1.5 指标检测

1.5.1 标本制备 实验 I: 4 组大鼠于再灌注 24 h 后, 10% 水合氯醛麻醉下采血 2 ml, 离心取血清, -20 $^{\circ}$ C 保存, 用于血

清炎症因子检测。采集血样后立即处死大鼠, 冰上取大鼠 L_4 脊髓节段, 置于 4% 多聚甲醛中固定, HE 染色观察脊髓组织形态学改变。实验 II: 各组全部大鼠分别于再灌注 6、12、24 h, 10% 水合氯醛麻醉下采血 2 ml, 离心取血清, -20 $^{\circ}$ C 保存, 用于血清炎症因子检测。采集血样后立即处死大鼠, 冰上取大鼠 L_{2-5} 脊髓节段, 迅速用液氮转运, -70 $^{\circ}$ C 保存, 用于检测脊髓中 I κ B- α 含量及 NF- κ B 的表达。

1.5.2 后肢运动神经功能评分 实验 I 各组大鼠于再灌注 24 h 取标本前, 由另 1 位不知具体分组情况的观察者进行后肢运动功能评分。评分标准参照文献[6]介绍的方法, 0 分: 无自发运动, 压夹后肢无反应; 1 分: 无自发运动, 但夹后肢有嘶叫、逃避等反应; 2 分: 有自发运动, 后肢不能负重站立; 3 分: 能站立但不能行走; 4 分: 能行走, 但只能靠足内侧或膝关节行走且腹部着地, 不稳定; 5 分: 能行走, 后肢负重有改善, 前肢和后肢步态协调, 腹不着地, 数趾拖步; 6 分: 能行走, 有 1 个或 2 个足趾拖步, 快速转弯时不稳; 7 分: 正常步态和行走。

1.5.3 脊髓病理形态学观察 实验 I 取下的脊髓节段常规固定、脱水, 石蜡包埋, 横截面连续切片, HE 染色, 光学显微镜下观察脊髓病理变化。病理损伤程度通过计数脊髓前角 (沿中央导水管横线以前) 正常运动神经元数目来评估。正常神经元表现为细胞呈多角形, 细胞质中尼氏体存在, 结构清晰, 细胞核居中呈圆形, 轮廓清晰, 核仁明显。该操作由 1 名不了解分组情况的观察者独立完成。

1.5.4 血清 TNF- α 、IL-6 水平检测 实验 I 与实验 II 所采集的血清标本, 运用酶联免疫吸附法测定其 TNF- α 、IL-6 含量。具体操作依据试剂盒说明书进行。

1.5.5 NF- κ B 及 I κ B- α 表达的检测 采用 Western blot 法进行检测。用细胞核蛋白与细胞质蛋白抽提试剂盒提取脊髓组织细胞核蛋白检测 NF- κ B 的含量, 提取浆蛋白检测 I κ B- α 含量。BCA 法进行蛋白定量。接着, 利用 SDS-PAGE 进行蛋白质分离电泳, 电转至硝酸纤维素膜上, 用 5% 脱脂奶粉封闭 4 h, 洗膜后按 1:1 000 加入一抗即 NF- κ B p65 多克隆抗体和 I κ B- α 多克隆抗体, 4 $^{\circ}$ C 缓慢摇动过夜, 弃去一抗, 洗膜, 加入羊抗兔 IgG 二抗, 缓慢摇动 1 h, 洗膜。ECL 发光试剂显影, 暗室内行 X 线胶片曝光, 显影定影, 并分别用 Quantity One 软件分析 NF- κ B/Histone H1 和 I κ B- α /GAPDH 灰度比值。

1.6 统计学方法

采用 SPSS 17.0 统计学软件进行分析。计量资料以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间比较采用单因素方差分析。检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧), 以 $P \leq 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 后肢运动神经功能检查

图 1 为实验 I 各组大鼠再灌注 24 h 后肢运动功能评分图示。与 IR 组相比, H_{200} 组大鼠后肢运动功能评分显著提高

($P=0.032, F=3.704$)。H₂₀ 组、H₅₀ 组与 IR 组相比大鼠后肢运动功能评分差异无统计学意义。

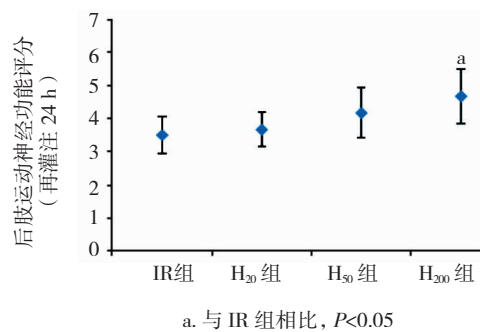


图 1 4 组大鼠后肢运动神经功能评分比较

Fig.1 Comparison of hind-limb motor function scores of rats in four groups

2.2 光镜观察 HE 染色结果

实验 I 光镜下观察再灌注 24 h, 各组大鼠脊髓组织病理形态改变, 并计数脊髓前角正常神经元数目。IR 组正常运动神经元数目明显减少, 多数神经元胞体皱缩, 胞核固缩深染, 空泡形成, 伴炎性细胞浸润。H₂₀₀ 组可观察到较多正常神经元, 部分神经元极性变钝、核仁不清, 杂有少许嗜伊红神经元。见图 2、图 3。与 IR 组相比, H₅₀ 组、H₂₀₀ 组脊髓前角正常运动神经元计数升高 (P 值分别为 0.037 和 0.001, $F=8.345$); H₂₀ 组与 IR 组比较, 前角剩余正常运动神经元计数差异无统计学意义, 见图 4。

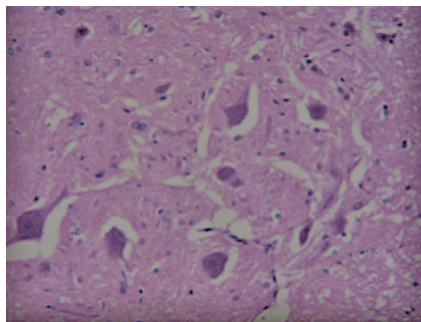


图 2 IR 组大鼠脊髓组织病理学改变 (HE, 200 ×)

Fig.2 Pathological changes of spinal cord in IR tissues (HE, 200 ×)

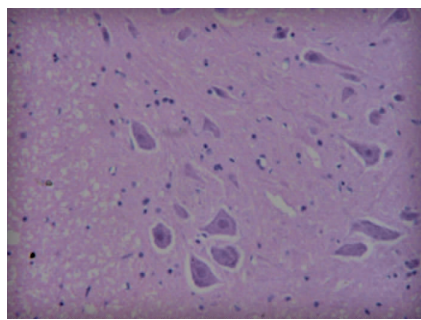


图 3 H₂₀₀ 组大鼠脊髓组织病理学改变 (HE, 200 ×)

Fig.3 Pathological changes of spinal cord in H₂₀₀ group (HE, 200 ×)

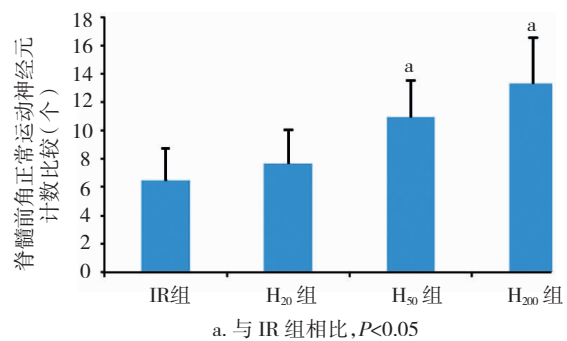


图 4 4 组脊髓前角正常运动神经元计数比较

Fig.4 Comparison of numbers of normal motor neurons in the anterior horn of spinal cord in four groups

2.3 大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 含量

实验 I 中, 检测再灌注 24 h, 各实验组大鼠循环中 TNF- α 水平为: 与 IR 组相比, HMGB1 预处理组血清中 TNF- α 浓度降低, 其中 H₅₀ 组、H₂₀₀ 组差异有统计学意义 (P 值分别为 0.047 和 0.002, $F=7.676$), 见图 5。实验 II 中, 检测再灌注 6、12、24 h, 各组大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 的表达水平为: 与 S 组相比, C 组、H 组再灌注各时间点大鼠血清中 TNF- α 、IL-6 表达均升高, 其中 C 组再灌注 6 h 即可观察到 TNF- α 、IL-6 表达水平升高, 24 h 时明显升高且相对达高峰。H 组再灌注各时间点 TNF- α 、IL-6 表达趋势与 C 组一致, 但在同一时间点 TNF- α 、IL-6 的表达均低于 C 组 (P 值分别为 0.002、0.006、0.011 和 0.042、0.061、0.024, F 值分别为 56.443、74.475), 见表 1。

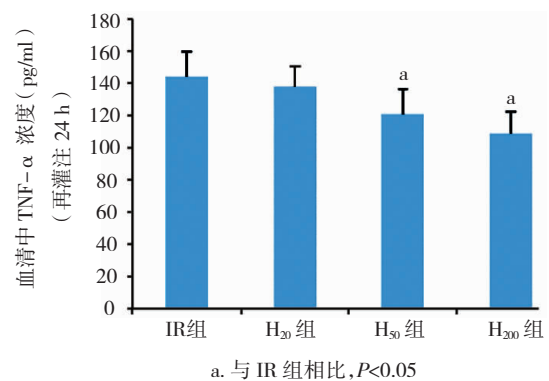


图 5 4 组大鼠血清中 TNF- α 含量的比较

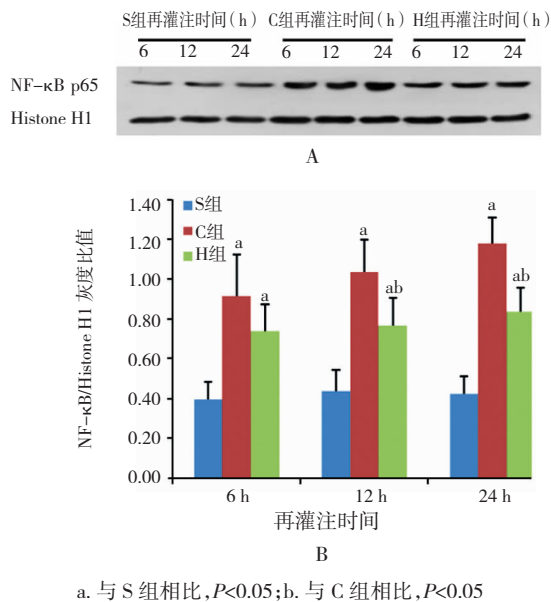
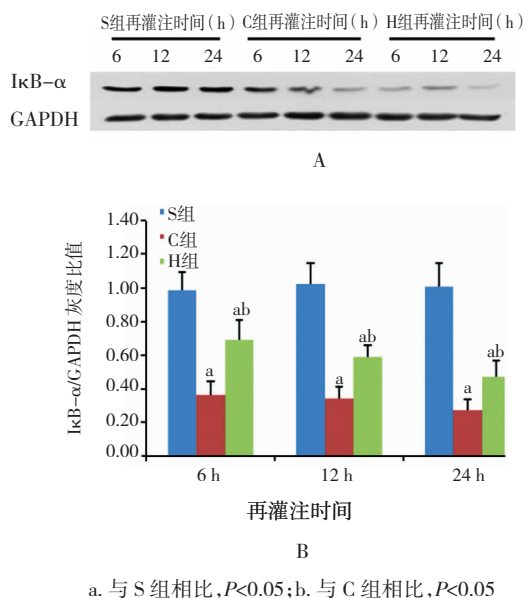
Fig.5 Comparison of levels of serum TNF- α in four groups

2.4 大鼠脊髓 NF- κ B 及 I κ B- α 蛋白的表达

实验 II 中 Western blot 检测大鼠脊髓组织 NF- κ B 的表达及 I κ B- α 的含量。各组脊髓组织细胞核中 NF- κ B p65 均有表达。与 S 组相比, C 组再灌注 6 h 即出现 NF- κ B 表达增多, 随时间延长呈上升趋势, 24 h 达高峰。H 组在再灌注相同时间点 NF- κ B 表达呈中度增多, 但均低于 C 组 (P 值分别为 0.136、0.012、 <0.001 , F 值分别为 17.952、28.133、66.684)。同时, 再灌注 6 h 时 C 组就观察到 I κ B- α 发生明显降解, 随后降解逐渐增加。而在再灌注相同时间点 H 组脊髓组织 I κ B- α 的降解均明显少于 C 组 (P 值分别为 <0.001 、0.001、0.014, F 值分别为 55.567、84.555、76.498), 见图 6、图 7。

表 1 不同再灌注时间点各组大鼠血清中炎症因子含量的比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)Tab.1 Comparison of levels of serum inflammatory cytokines in various groups at different time points ($n=6, \bar{x} \pm s$)

分组		再灌注 6 h	再灌注 12 h	再灌注 24 h
TNF- α (pg/ml)	S组	29.93 $\pm$ 3.81	27.68 $\pm$ 3.53	28.63 $\pm$ 5.85
	C组	75.11 $\pm$ 9.88 ^a	89.50 $\pm$ 10.94 ^a	108.68 $\pm$ 14.59 ^a
	H组	57.09 $\pm$ 7.27 ^{ab}	70.48 $\pm$ 10.50 ^{ab}	87.51 $\pm$ 10.27 ^{ab}
IL-6 (pg/ml)	S组	79.91 $\pm$ 10.86	81.79 $\pm$ 10.79	78.24 $\pm$ 10.67
	C组	129.29 $\pm$ 17.89 ^a	139.82 $\pm$ 19.62 ^a	167.13 $\pm$ 17.59 ^a
	H组	106.85 $\pm$ 13.81 ^{ab}	118.81 $\pm$ 11.84 ^a	142.46 $\pm$ 13.79 ^{ab}

注:a, 与 S 组相比, $P<0.05$; b, 与 C 组相比, $P<0.05$ 图 6 各组大鼠脊髓组织再灌注不同时间点 NF- κ B 的表达
Fig.6 Expressions of NF- κ B in spinal cord in various groups at different time points图 7 各组大鼠脊髓组织再灌注不同时间点 I κ B- α 蛋白的表达
Fig.7 Expressions of I κ B- α in spinal cord in various groups at different time points

3 讨论

HMGB1 存在于大多数真核细胞的胞核中。近年来研究发现,在感染、组织损伤、缺血缺氧等应激情况下, HMGB1 可由活化的免疫细胞主动分泌或坏死细胞被动释放进入胞外,通过结合相应的胞膜受体,启动天然免疫和炎症反应^[7-8]。进入胞外介质的 HMGB1 是一种内源性危险信号,警示免疫系统有炎症或坏死的存在。这类内源性的危险信号分子,对应于外源性的病原体相关模式分子,人们称之为预警素^[9]。已有研究发现,类似于病原体相关模式分子如脂多糖(lipopo-lysaccharide, LPS),小剂量 HMGB1 预处理也可诱导产生 LPS^[2]、脂磷壁酸^[3]耐受现象。LPS 耐受是指预先以小剂量 LPS 或同系物刺激动物或单核巨噬细胞系统,随后再用致死剂量的 LPS 攻击时,表现为对 LPS 的低反应性的现象。Izuishi 等^[4]、Hu 等^[5]研究也证实了小剂量 HMGB1 预处理可明显减轻大鼠肝脏、心脏缺血再灌注损伤。然而,关于 HMGB1 预处理对 SCII 的影响还不得而知。因此,本文假设小剂量的 HMGB1 预处理也能够诱导产生脊髓缺血耐受。实验分为 2 个部分,第 I 部分选择了 20、50、200 ng 重组 HMGB1 来观察不同浓度的 HMGB1 预处理对大鼠 SCII 的影响。研究结果显示,再灌注 24 h 时,与 IR 组相比, H₅₀ 组、H₂₀₀ 组大鼠后肢神经功能评分均有所提高,脊髓前角正常运动神经元计数增多,循环中 TNF- α 水平明显降低,以 H₂₀₀ 组更为显著。TNF- α 是机体炎症反应过程中释放最早、最重要的促炎细胞因子之一。以往诸多 LPS 耐受研究证实, TNF- α 的分泌下调作为评价产生 LPS 耐受的指标具有良好的代表性。这一结果提示 HMGB1 预处理可能诱导产生缺血耐受,使大鼠脊髓病理损伤及神经功能得到改善,从而表现出对 SCII 的保护作用,并且这种保护效应在一定范

围内呈浓度依耐性。

本实验第 I 部分研究首次证实了 HMGB1 预处理可以明显改善由缺血再灌注损伤导致的脊髓组织病理学改变及神经功能损伤,对 SCII 具有保护作用。为了深入探讨这种保护作用的可能机制,结合第 I 部分实验结果,选择具有良好保护效应的 200 ng HMGB1 预处理进行下一步机制研究。SCII 是原发性脊髓损伤的继发性损害,其病理生理过程复杂,目前公认的由多种损伤机制共同作用。其中免疫炎症性损伤的作用日益受到人们的重视。近年来,对 Toll 样受体家族中 Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)及其内源性配体的研究提示,二者的结合可能是缺血再灌注损伤中最重要的炎症应答的触发器,并引起一系列炎症和免疫应答级联反应^[10-12]。缺血再灌注损伤病理过程中形成的大量的内源性分子如 HMGB1、热休克蛋白等,均是 TLR4 的内源性配体。这些配体激活 TLR4 后,激活信号主要通过髓样分化蛋白 88 依赖性途径进入下游信号传导,连续激活多个蛋白激酶,最终导致 NF- κ B 活化,形成缺血再灌注损伤的炎症信号转导。

NF- κ B 位于 TLR4 下游信号通路的枢纽位置。它广泛存在于真核细胞内,能够和许多基因启动子区域的固定核苷酸序列结合从而启动基因转录。活化的 NF- κ B 可直接调控参与缺血再灌注炎症损伤的多种介质的基因表达。因此,NF- κ B 的活化被认为是介导和加剧缺血再灌注损伤的中心环节。本实验结果显示,C 组于再灌注 6 h 即出现 NF- κ B 活性增强,24 h 相对达高峰,同时观察到再灌注各时间点循环中炎症因子 TNF- α 、IL-6 水平也有明显升高,其表达趋势与 NF- κ B 一致。表明 NF- κ B 参与 SCII 过程。

I κ B- α 是 NF- κ B 的抑制蛋白。在静息状态下,NF- κ B 与 I κ B- α 形成复合体存在于细胞质中,处于无活性状态。在缺血再灌注损伤病理生理过程中,I κ B- α 被磷酸化降解,使得 NF- κ B 得以活化进入核内,从而发挥其调控作用。本实验观察到 C 组在再灌注 6 h 时 I κ B- α 即发生显著降解,随时间降解逐渐增加。而经 HMGB1 预处理后,再灌注各时间点脊髓组织 I κ B- α 降解明显减少,NF- κ B 活性降低,循环中促炎因子 TNF- α 、IL-6 水平降低,表明 200

ng HMGB1 预处理可通过减少胞质中 I κ B- α 降解,降低 NF- κ B 活性,从而抑制 NF- κ B 介导的一系列促炎因子如 TNF- α 、IL-6 的产生,减轻 SCII。

综上所述,HMGB1 预处理可通过减少 I κ B- α 降解,降低 NF- κ B 活性,从而抑制炎症反应,对 SCII 具有保护作用。相信随着对其机制研究的进一步深入,会为临床上防治缺血再灌注损伤提供一种新的思路。

参 考 文 献

- [1] Klune J R, Billiar T R, Tsung A. HMGB1 preconditioning: therapeutic application for a danger signal? [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 83(3): 558-563.
- [2] Aneja R K, Tsung A, Sjodin H, et al. Preconditioning with high mobility group box 1 (HMGB1) induces lipopolysaccharide (LPS) tolerance [J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 84(5): 1326-1334.
- [3] Robert S M, Sjodin H, Fink M P, et al. Preconditioning with high mobility group box 1 (HMGB1) induces lipoteichoic acid (LTA) tolerance [J]. *J Immunother*, 2010, 33(7): 663-671.
- [4] Izuishi K, Tsung A, Jeyabalan G, et al. Cutting edge: high-mobility group box 1 preconditioning protects against liver ischemia-reperfusion injury [J]. *J Immunol*, 2006, 176(12): 7154-7158.
- [5] Hu X, Jiang H, Cui B, et al. Preconditioning with high mobility group box 1 protects against myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Int J Cardiol*, 2010, 145(1): 111-112.
- [6] Rivlin A S, Tator C H. Objective clinical assessment of motor function after experimental spinal cord injury in the rat [J]. *J Neurosurg*, 1977, 47(4): 577-581.
- [7] Andersson U, Rauvala H. Introduction: HMGB1 in inflammation and innate immunity [J]. *J Intern Med*, 2011, 270(4): 296-300.
- [8] Andersson U, Tracey K J. HMGB1 is a therapeutic target for inflammatory and infection [J]. *Annu Rev Immunol*, 2011, 29: 139-162.
- [9] Harris H E, Andersson U, Pisetsky D S. HMGB1: a multifunctional alarmin driving autoimmune and inflammatory disease [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2012, 8(4): 195-202.
- [10] Kaczorowski D J, Nakao A, Vallabhaneni R, et al. Mechanisms of Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated inflammation after cold ischemia/reperfusion in the heart [J]. *Transplantation*, 2009, 87(10): 1455-1463.
- [11] Kaczorowski D J, Tsung A, Billiar T R. Innate immune mechanisms in ischemia/reperfusion [J]. *Front Biosci (Elite Ed)*, 2009, 1: 91-98.
- [12] Goligorsky M S. TLR4 and HMGB1: partners in crime? [J]. *Kidney Int*, 2011, 80(5): 450-452.

(责任编辑:唐秋姗)