

人高迁移率族蛋白 B1, 高迁移率族蛋白 B1 A box 和 B box 的原核表达、纯化及高迁移率族蛋白 B1 多克隆抗血清的制备*

周红颜 任向荣 苏绍波[△]

(中山大学中山眼科中心 眼科学国家重点实验室 广东广州 510060)

摘要 目的: 获取重组人高迁移率族蛋白 B1 (HMGB1), HMGB1 A box 和 B box 的纯化蛋白, 制备 HMGB1 的多克隆抗血清。方法: 采用 PCR 方法扩增人 HMGB1, HMGB1 的 A box 和 B box 目的基因片段, 构建原核表达载体, 进行原核表达与蛋白纯化, 然后用 HMGB1 免疫新西兰大白兔, 制备多克隆抗血清。采用 ELISA 检测抗血清效价, 用免疫组化检测 HMGB1 在肝损伤组织中的表达。结果: 成功构建了人 HMGB1, HMGB1 的 A box 和 B box 原核表达载体 pET28-HMGB1、pET28-Abox、pET28-Bbox, 在 E. coli BL21 中表达, 镍亲和层析柱提纯, 获取纯净目的蛋白。HMGB1 免疫新西兰大白兔后, 抗血清效价为 1:2,000,000, 具有高度特异性。免疫组化显示小鼠坏死肝组织 HMGB1 表达增加。结论: 本研究获得了人 HMGB1 以及 HMGB1 的 A box 和 B box 的纯化蛋白, 制备了人 HMGB1 的多克隆抗血清, 为 HMGB1 的结构、组织表达谱及其功能的研究奠定了基础。

关键词: HMGB1; A Box; B Box; 蛋白表达纯化; 多克隆抗血清

中图分类号: Q75, Q78 **文献标识码:** A **文章编号:** 1673-6273 (2011) 21-4005-05

Prokaryotic Expression and Purification of Human HMGB1, A box, B box and Preparation of HMGB1 Anti-sera*

ZHOU Hong-yan, REN Xiang-rong, SU Shao-bo[△]

(The State Key Laboratory of Ophthalmology, Zhongshan Ophthalmic Center, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510060, China)

ABSTRACT: To obtain the purified recombinant proteins of human HMGB1, HMGB1 B box and A box and prepare HMGB1 polyclonal anti-sera. The target genes were amplified by PCR from human PBMCs, and cloned into pET28a vectors, respectively. The sequences were confirmed by enzymes digestion and DNA sequencing. The constructed vectors were transformed into E. coli BL21 and the expressed proteins were purified. Rabbits were immunized with the purified HMGB1 protein and the high titer antiserum was obtained. Immunohistochemical staining of mouse liver inflammatory tissue with the antiserum was performed. The vectors of pET28-HMGB1, pET28-A box, pET28-B box were successfully constructed. The proteins expressed in E. coli BL21 were purified by Ni-NTA column. ELISA analysis showed that anti-sera were high titer against rHMGB1. Immunohistochemical staining showed that HMGB1 was increased in mouse inflammatory liver tissue. The proteins of recombinant HMGB1, B box and A box and HMGB1 anti-serum have been obtained. This work provides the means for research on the role of HMGB1 in the pathogenesis of human diseases.

Key words: HMGB1; A box; B box; Protein purification; Antibody preparation

Chinese Library Classification: Q75, Q78 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2011)21-4005-05

前言

人高迁移率族蛋白 B1 (high-mobility group box-1, HMGB1) 最初由 Goodwin, Sanders, Johns 三位科学家于 1973 年发现, 最初定义为一组高酸性和碱性的染色质相关蛋白^[1], 普遍存在于大多数的哺乳动物细胞的细胞核中, 高度保守^[2,3]。1979 年 Michael B 发现该蛋白存在于胞浆中^[4,5], 此后, 陆续发现该蛋白具有多功能性。在细胞核内, HMGB1 能够稳定染色体, 调节许多基因转录^[6,7]。在损伤、感染或其他炎症刺激时, 巨噬细胞^[8,9], 成熟的树突状细胞^[10], 和自然杀伤细胞^[11]能够主动分泌 HMGB1, 坏死细胞也可以被动释放, 而发挥细胞样因子的作用。HMGB1 能与 TLR2 和 TLR4 结合产生 LPS 样作

用^[12]。已有报道证实许多疾病与 HMGB1 有关, 比如阿尔茨海默病、败血症、缺血再灌注疾病、关节炎和癌症等^[13-17]。近来也有报道本蛋白与自身免疫病密切相关, 如多发性硬化症、类风湿性关节炎、系统性红斑狼疮、葡萄膜炎等^[18-21]。本实验的目的是获取重组人 HMGB1, HMGB1 的 A box 和 B box 纯化蛋白, 制备 HMGB1 的多克隆抗血清, 为 HMGB1 功能的进一步研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 质粒、菌株和动物

重组克隆载体 pET28a, E. coli BL21 DE3, DH5α 均由本室保存。2 kg 左右雌性新西兰大白兔与 6-8 周龄 Bal B/c,

* 基金项目: 国家自然科学基金 (81072483)

作者简介: 周红颜, E-mail: hyz010203@126.com

[△] 通讯作者: 苏绍波, 电话: 020-87330402, E-mail: shaobosu@yahoo.com

(收稿日期: 2011-05-18 接受日期: 2011-06-13)

C57BL/6 小鼠均购自广东省中山大学动物中心。

1.2 主要试剂

Nco I、Xho I、Hind III、T4 DNA 连接酶, Taq DNA 聚合酶均购自 TaKaRa 公司。胶回收试剂盒, 小量质粒提取试剂盒购自上海生工公司。镍亲和层 Ni-NTA resin 购自 Invitrogen 公司。DAB 显色增强型试剂盒, Anti-His Antibody, 羊抗鼠 IgG-HRP 购自天根公司。羊抗兔 IgG-HRP 购自博士德公司。其他常规化学试剂为分析纯以上产品。引物及 DNA 序列测定在

广州 invitrogen 公司完成。

1.3 引物设计和 HMGB1, A box, B box 片段的扩增

根据 Gen Bank 中人 HMGB1 基因序列, 登录号: NM_002128, 设计三对引物(见表 1)扩增目的片段。以外周血单个核细胞(PBMC)提取的 Total RNA 反转的 cDNA 为模板, 进行常规 PCR 扩增, PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中电泳, 用凝胶成像系统进行分析 and 照相。

表 1 原核表达载体的引物
Table 1 The primers for vector construction of HMGB1, A box and B box

	Product (bp)	Sense (5'-3')	Antisense (5'-3')	Digestion site
HMGB1	648	GCGCCATGGGCAAA	GCGCTCGAGTTCAT	Nco I/Xho I
		GGAGATCCTAAGA	CATCATCATCTTCT	
A box	281	GCGCCATGGGCAAA	GCGCTCGAGGAACT	Nco I/Xho I
		GGAGATCTAAGA	TCTTTTTTGTCTCC	
B box	282	AAGCCATGGGCAA	GCGCTCGAGGACAA	Nco I/Xho I
		GGATCCAATGCAC	CTCCCTTTTTTGCT	

1.4 HMGB1, A box, B box 片段克隆和鉴定

PCR 产物和 pET28a 载体在 Nco I、Xho I(37℃, 5h) 双酶切后进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析, 切割目的条带并进行胶回收, T4 连接酶将目的基因片段与 pET28a 载体连接 (16℃ 过夜)。连接产物转化 DH5α 菌。转化子经增菌后提质粒, 酶切和 PCR 鉴定连接是否成功, 并送广州 Invitrogen 公司测序。

1.5 目的蛋白的诱导表达

测序结果证实插入目的序列正确。将 pET28-HMGB1、pET28-A box、pET28-B box 分别转化感受态 E. coli BL21 细胞, 挑取单菌落 37℃ 振荡培养过夜, 按照 1% 的比例转接, 振荡培养至 OD 为 0.5~0.7 时, 按 0.1% 的比例, 加入 1M IPTG 进行诱导。5 小时后离心收集菌体, 进行 SDS--PAGE 分析。

1.6 非变性条件下目的蛋白的纯化

SDS-PAGE 分析显示目的蛋白大部分在可溶部分中。在非变性条件下提取纯化目的蛋白: 取 200 mL 细菌培养液离心收获菌体, 每克湿菌体加入 5 mL 裂解液 (10 mmol/L 咪唑, 100 mmol/L NaH₂ PO₄·2H₂ O, 10 mmol/L Tris-HCl, 8 mol/L 尿素), 振荡混匀, 超声离心后, 收获上清液。过镍亲和层析柱, 用含 250 mmol/L 咪唑洗脱液洗脱, 收集目的蛋白, 并进行 SDS-PAGE 分析。

1.7 Western blot 检测

将目的蛋白经 SDS--PAGE 电泳, 湿法转移至 PVDF 膜, 先后加入 Anti-His 抗体、羊抗鼠 IgG-HRP 抗体, 用 DAB 显色试剂盒显色后, 照相分析。

1.8 HMGB1 多克隆抗血清制备、纯化和特异性检测

初次免疫: 将 1mL 0.2 mg/mL 的目的蛋白与等体积的 CFA 充分混合, 皮下多点注射新西兰大白兔。加强免疫: 0.1 mg 的目的蛋白与等体积的 IFA 充分混合, 每间隔 10 天加强注射 1 次, 共加强 4 次。末次免疫 2 周后, 间接 ELISA 检测血清抗血清效价, 经颈动脉采血, 分离血清, 分装放 -20℃ 保存。

1.9 小鼠肝炎模型及肝组织的免疫组化

Con A 组按照 18μg/g 小鼠体重尾静脉注射 (100μL), PBS 组以相同的体积尾静脉注射, 18 小时后取肝组织石蜡切片。免疫组化根据文献操作^[22]: 切片脱蜡至水, 去除内源性过氧化物酶活性, 抗原修复、封闭, 加 HMGB1 多克隆抗血清 (1:100 稀释) 4℃ 过夜, 洗涤, 加生物素标记的二抗, DAB 显色, 苏木素复染, 二甲苯透明, 中性树胶封片, 镜下观察, 照相保存。

2 结果

2.1 目的基因片段的扩增

以外周血单个核细胞 (PBMCs) 提取的 Total RNA 经 RT 反转为 cDNA, 以其为模板, 进行常规 PCR 扩增, 经 10 g/L 琼脂糖凝胶电泳, PCR 产物大小为 648bp, 281bp, 282bp, 与预期值相同。见图 1。

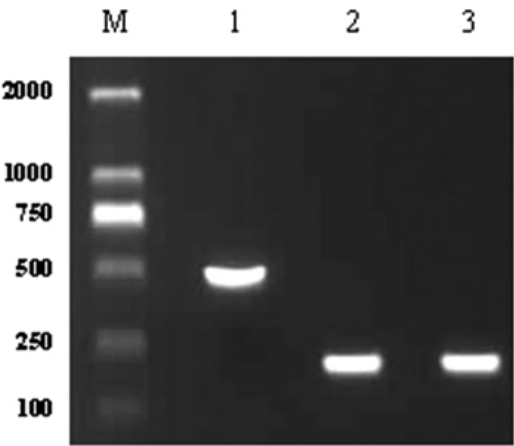


图 1 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳 M 标准分子量, 1 HMGB1, 2 Abox, 3 B box
Fig. 1 PCR products in agarose gel : Lane 1 :HMGB1; Lane 2: A Box; Lane 3: B Box

2.2 重组载体的鉴定

将重组克隆载体 pET28-HMGB1、pET28-Abox、pET28-Bbox 进行酶切鉴定,可得到 648bp,281bp,282bp 和 5220bp 左右两个片段,与预期值一致(图 2)。经 Invitrogen 公司测序,目的片段序列分别与 Gene Bank 的 HMGB1, A box 和 B box 一致。

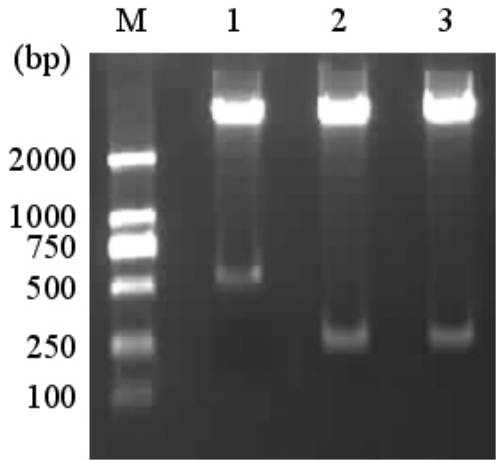


图 2 重组质粒酶切鉴定电泳图:M 标准分子量,1 HMGB1,2 Abox,3 B box

Fig. 2 Endonuclease digestion of HMGB1: Lane 1 HMGB1; Lane 2 A Box; Lane 3 B Box

2.3 HMGB1, A box, B box 目的蛋白的表达及纯化

HMGB1, A box, B box 目的蛋白经诱导表达,收取表达菌体。通过超声、电泳分析可知,上清中存在大量的诱导蛋白,提示目的蛋白以可溶性的形式存在(图 3)。在非变性条件下,用镍亲和和层析柱纯化,可得到电泳均一的目的蛋白(图 4)。免疫印迹结果验证了我们所纯化的蛋白含有 6 个组胺酸(图 5)。

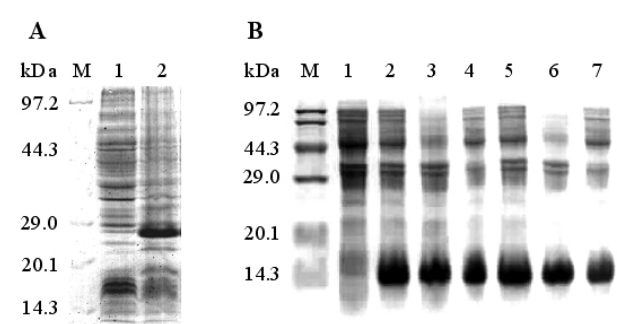


图 3 HMGB1, A box 和 B box 蛋白的原核表达:(A) 1 未诱导的细菌总蛋白,2 IPTG 诱导表达 HMGB1 (B) 1 未诱导的细菌总蛋白,2 IPTG 诱导 A box 的总蛋白,3 IPTG 诱导 A box 的总蛋白沉淀部分,4 IPTG 诱导 A box 的总蛋白可溶性部分;5 IPTG 诱导 B box 的总蛋白,6 IPTG 诱导 B box 的总蛋白沉淀部分,7 IPTG 诱导 B box 的总蛋白可溶性部分
Fig.3 The expression of HMGB1, A box and B box by BL21 E. coli. (A) Lane 1, control (non-induced). Lane 2, expression of HMGB1 induced by IPTG. (B) Lane 1, control (non-induced). Lane 2, 3 and 4 were whole lysate, precipitation fraction and soluble fraction of A box induced by IPTG, respectively. Lane 5, 6 and 7 were whole lysate, precipitation fraction and soluble fraction of B box induced by IPTG, respectively

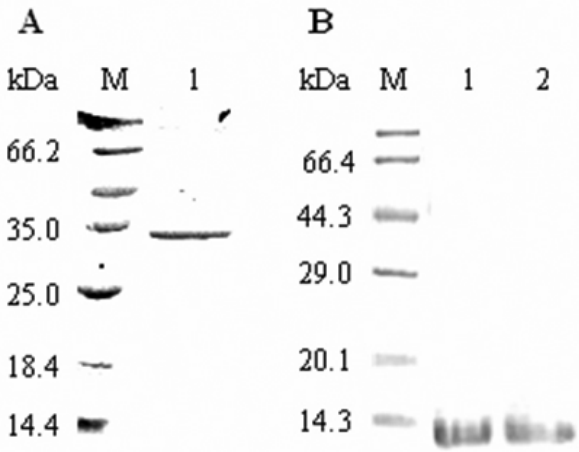


图 4 纯化的 HMGB1, A box 和 B box:M 标准蛋白分子量,(A) 1 纯化的 HMGB1, (B) 1 纯化的 A box,2 纯化的 B box。

Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified recombinant HMGB1, A box and B box Lane M, protein molecular weight marker; (A) Lane 1, purified recombinant HMGB1; (B) Lane 1, purified recombinant A box; Lane 2, purified recombinant B box.

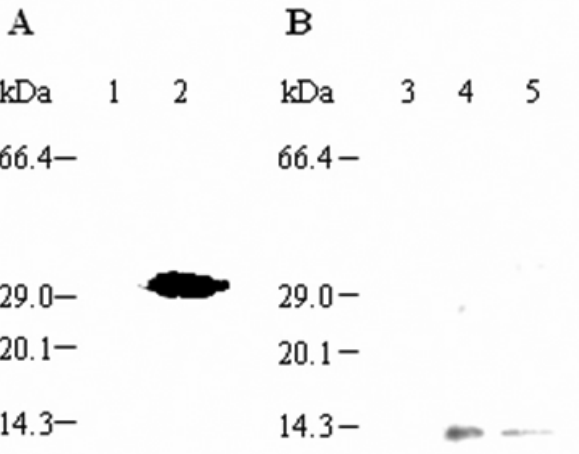


图 5 Western blot 结果:M 标准蛋白分子量,1 和 3 未诱导的总蛋白,2 纯化的 HMGB1,4 纯化的 A box,5 纯化的 B box。

Fig. 5 Western blot analysis of purified HMGB1 proteins using monoclonal antibody against His tag. Lane 1 and Lane 3, bacterial lysates of BL21 as negative controls. Lane 2, purified recombinant HMGB1. Lane 4, purified recombinant A box. Lane 5, purified recombinant B box.

2.4 HMGB1 蛋白多克隆抗血清的检测

经间接 ELISA 检测进行滴度的检测,制备的抗血清效价达 1:2,000,000。

2.5 免疫组化结果

PBS 组的肝组织 HMGB1 染色也显色,但颜色较浅,说明正常肝细胞中表达一定量的 HMGB1。在 Con A 诱导的肝炎组织中,HMGB1 在坏死区的表达明显增加,其中坏死周边区较中央区染色更为明显(图 6)。

3 讨论

HMGB1 在真核细胞的细胞核中组成性的表达,与细胞核中的特定的 DNA 结构(三个 α 螺旋和 L 型折叠结构)结合从而引起固有免疫反应。HMGB1 在染色体上的具体位置是 13q12, 它有六个外显子。它的表达受无 TATA 框启动子的控制, 其位点位于第一个外显子上游 57 个碱基处。结构上, HMGB1 由两个带阳离子的区域(A box 和 B box)和一个带阴离子的羧基末端组成。HMGB1 具有促进炎症反应的作用, 其有两个组成部分 A box 和 B box, B box 具有 HMGB1 的促进炎症反应的作用, A box 能够拮抗 B box 的功能从而达到减轻炎症反应的作用^[8, 16, 22]。

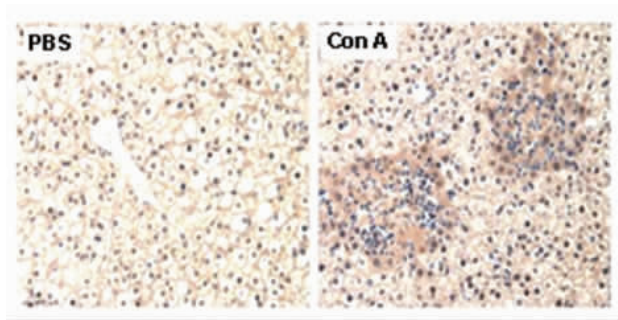


图 6 HMGB1 在肝组织中的表达 小鼠肝组织的切片用 HMGB1 抗血清(1:100)染色,结果如图,PBS 正常组肝组织,Con A 组 Con A 诱导的肝炎模型肝组织

Fig.6 Immunohistochemical analysis of HMGB1 expression in mouse liver. The sections were stained with anti-HMGB1 anti-sera (1:100). PBS: normal tissue; Con A: hepatitis induced by Con A (18 μ g/kg). Magnification X 200

HMGB1 参与多种器官疾病发病过程。HMGB1 与脓毒症、风湿性关节炎、失血性休克、慢性肝病和恶性肿瘤等疾病的发病有关^[24]。HMGB1 可以作为组织损伤信号,刺激树突状细胞的成熟和增殖,参与免疫反应;刺激体细胞和干细胞的增殖、迁移和分化,参与组织损伤的修复、细胞再生和致病过程^[25,26],新近研究更是将 HMGB1 定义为一个促血管生成因子^[27,28],缘于其具直接或间接促血管生成活性。如 HMGB1 可活化巨噬细胞促其分泌血管生成因子如 VEGF, 且在体外三维血管模型中, HMGB1 可直接诱导凝胶中培养的血管内皮细胞生长,芽发而形成管腔样结构^[28]。Mitola 等^[29]报道体外实验中, HMGB1 还可激活血管内皮细胞的 MAPK 细胞外信号调节的激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK) 1/2 信号活化,促使内皮细胞增殖,迁移,修复机械性受损的血管内皮单细胞层。HMGB1 另一促血管生成的功能在于可直接活化干细胞如内皮祖细胞(endothelial progenitor cells, EPCs)和造血干细胞,动员其至受损的组织局部,以促进创伤组织的血管形成^[30,31]。

目前关于 HMGB1 在眼部炎症中的研究甚少,而对于角膜组织 HMGB1 的作用至今仍未见报道。Watanabe 等^[32]报道在 EAU 模型大鼠房水中检测到 HMGB1 表达上调, 其参与 EAU 发病的机制主要在于活化骨髓来源的巨噬细胞, 促进 TNF- α 的分泌。Arimura 等则通过建立大鼠视网膜剥离模型,发现模型动物的视网膜细胞可释放 HMGB1。在视网膜剥离患者的玻璃体中, HMGB1 表达显著上调, 且与趋化因子单核细胞趋化蛋

白(monocyte chemoattractant protein, MCP)-1 表达水平密切相关; 体外实验发现重组 HMGB1 可诱导视网膜色素上皮细胞(retinal pigment epithelium, RPE) 迁移。这些结果提示胞外释放的 HMGB1 可参与视网膜剥离后的创伤修复病理过程。

有报道内源性 HMGB1 在皮肤伤口愈合过程中起重要作用,糖尿病患者其创口难愈很大程度上与局部 HMGB1 分泌减少相关,对其创口局部给予外源性 HMGB1 可显著促进成纤维细胞和角质层细胞的迁移、肉芽组织沉积以及新生血管的生成^[33],提示 HMGB1 介导角膜创伤炎症反应的可能性极大。

HMGB1 为高度保守的蛋白,种属之间差异性不大,我们用 PubMed blast 比较人和小鼠 HMGB1 氨基酸序列的差异性,结果显示:在 189,212 位点的氨基酸不同(相互倒置),其余的均相同,相同率为 99%以上。所以, 本实验所制备的兔抗人 HMGB1 也能与小鼠的 HMGB1 结合,从而达到组织定位的作用。免疫组化显示, HMGB1 表达于胞浆和胞核,亦能分泌到外周组织中,在炎症中表达量增加,并可由坏死细胞释放到组织间隙中,本试验结果与之前的研究结果符合^[2-5, 8-12]。

本实验成功的构建了 HMGB1 以及 B box, A box 的原核表达载体,在原核细胞中进行表达,大部分目的蛋白在可溶部分,利用镍柱进行纯化,快速、经济得到高纯度的目的蛋白。但是由于在 E. Coli 中表达,内毒素污染是不可避免的。我们正在用 Polymyxin B Column 清除提纯蛋白中的内毒素,用 Cambrex 的 Limalus Amebocyte lystate kit 检测内毒素,使获取的目的蛋白的内毒素含量降到尽可能低的水平。另一方面, 由于在 E. coli 中表达,所获取的蛋白缺乏糖基化,是否对功能有影响,有待观察,然而其他研究人员已在 E. coli 中表达有功能性的 HMGB1 报道^[23]。目前我们免疫新西兰大白兔制备了多抗血清,另外,我们已免疫 BAL B/c 小鼠,获取了 16 个抗 HMGB1 阳性杂交瘤细胞克隆,目前正在筛选分泌特异性、高亲和力和抗体的克隆株。

本实验成功的构建了 HMGB1 以及 B box, A box 的原核表达载体,并获得了可溶性蛋白,免疫新西兰大白兔后获得了多克隆抗血清。本实验成果为进一步研究人 HMGB1 与相关疾病的关系创造了条件,为疾病的防治提供新的思路。

参考文献(References)

- [1] 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: 14-19
- [2] Laudet V, Stehelin D, Clevers H. Ancestry and diversity of the HMG box superfamily[J]. Nucleic Acids Res, 1993, 21: 2493-2501
- [3] Vaccari T, Beltrame M, Ferrari S, et al. Hmg4, a new member of the Hmg1/2 gene family[J]. Genomics, 1998, 49: 247-252
- [4] Bustin M, Neihart NK. Antibodies against chromosomal HMG proteins stain the cytoplasm of mammalian cells[J]. Cell, 1979, 16: 181-189
- [5] Isackson PJ, Bidney DL, Reeck GR, et al. High mobility group chromosomal proteins isolated from nuclei and cytosol of cultured hepatoma cells are similar[J]. Biochemistry, 1980, 19: 4466-4471
- [6] Park JS, Arcaroli J, Yum HK, et al. Activation of gene expression in human neutrophils by high mobility group box 1 protein [J]. Am J Physiol Cell Physiol, 2003, 284: C870-879
- [7] Stros M, Ozaki T, Bacikova A, et al. HMGB1 and HMGB2 cell-specif-

- ically down-regulate the p53- and p73-dependent sequence-specific transactivation from the human Bax gene promoter [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 7157-7164
- [8] Bonaldi T, Talamo F, Scaffidi P, et al. Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion[J]. *EMBO J*, 2003, 22: 5551-5560
- [9] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice[J]. *Science*, 1999, 285: 248-251
- [10] Dumitriu IE, Baruah P, Valentini B, et al. Release of high mobility group box 1 by dendritic cells controls T cell activation via the receptor for advanced glycation end products [J]. *J Immunol*, 2005, 174: 7506-7515
- [11] Semino C, Angelini G, Poggi A, et al. NK/iDC interaction results in IL-18 secretion by DCs at the synaptic cleft followed by NK cell activation and release of the DC maturation factor HMGB1 [J]. *Blood*, 2005, 106: 609-616
- [12] van Zoelen MA, Yang H, Florquin S, et al. Role of toll-like receptors 2 and 4, and the receptor for advanced glycation end products in high-mobility group box 1-induced inflammation in vivo [J]. *Shock*, 2009, 31: 280-284
- [13] Takata K, Kitamura Y, Kakimura J, et al. Role of high mobility group protein-1 (HMG1) in amyloid-beta homeostasis[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2003, 301: 699-703
- [14] Qin S, Wang H, Yuan R, et al. Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality[J]. *J Exp Med*, 2006, 203: 1637-1642
- [15] Tsung A, Hoffman RA, Izuishi K, et al. Hepatic ischemia/reperfusion injury involves functional TLR4 signaling in nonparenchymal cells [J]. *J Immunol*, 2005, 175: 7661-7668
- [16] Ulloa L, Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe[J]. *Cytokine Growth Factor Rev*, 2006, 17: 189-201
- [17] Lotze MT, Tracey KJ. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal[J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5: 331-342
- [18] Tian J, Avalos AM, Mao SY, et al. Toll-like receptor 9-dependent activation by DNA-containing immune complexes is mediated by HMGB1 and RAGE[J]. *Nat Immunol*, 2007, 8: 487-496
- [19] Zuo XX, Gong YH, Zhou YO, et al. The plasmic translocation and release of high mobility group box chromosomal protein 1 in peripheral blood monocytes of patients with rheumatoid arthritis and the effect of thalidomide [J]. *Chinese Journal of Internal Medicine*, 2008, 47: 374-377
- [20] Andersson A, Covacu R, Sunnemark D, et al. Pivotal advance: HMGB1 expression in active lesions of human and experimental multiple sclerosis[J]. *J Leukoc Biol*, 2008, 84: 1248-1255
- [21] Watanabe T, Keino H, Sato Y, et al. High mobility group box protein-1 in experimental autoimmune uveoretinitis [J]. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50: 2283-2290
- [22] 王琪, 罗晓庆, 王慧, 王亚贤. 桂枝茯苓丸对荷瘤鼠 Survivin、PCNA、P21waf/cip 的影响[J]. *免疫学杂志*, 2009, 25(4): 382-384
Wang Qi, Luo Xiaqing, Wang Hui, Wng Yaxian. Effects of guizhi fuling wan on survivin, P21waf/cip, and proliferating cell nuclear antigen of cancer-bearing mouse. *Immunological Journal*, 2009, 25(4): 382-384
- [23] Ellerman JE, Brown CK, de Vera M, et al. Masquerader: high mobility group box-1 and cancer[J]. *Clin Cancer Res*, 2007, 13: 2836-2848
- [24] Yang H, Wang H, Czura CJ, et al. The cytokine activity of HMGB1 [J]. *J Leukoc Biol*, 2005, 78(1): 1-8
- [25] Raucci A, Palumbo R, Bianchi ME. HMGB1: a signal of necrosis[J]. *Autoimmunity*, 2007, 40(4): 285-289
- [26] Messmer D, Yang H, Telusma G, et al. High mobility group box 1 (HMGB1) is an endogenous Th1 polarizing signal for dendritic cell maturation[J]. *J Immunol*, 2004, 173(1): 307-313
- [27] van Beijnum JR, Dings RP, van der Linden E, et al. Gene expression of tumor angiogenesis dissected: specific targeting of colon cancer angiogenic vasculature. *Blood*, 2006, 108: 2339-2348
- [28] Schlueter C, Weber H, Meyer B, et al. Angiogenetic signaling through hypoxia: HMGB1: an angiogenetic switch molecule. *Am J Pathol*, 2005, 166: 1259-1263
- [29] Mitola S, Belleri M, Urbinati C, et al. Cutting edge: extracellular high mobility group box-1 protein is a proangiogenic cytokine. *J Immunol*, 2006, 176: 12-15
- [30] Chavakis E, Hain A, Vinci M, et al. High-mobility group box 1 activates integrin-dependent homing of endothelial progenitor cells. *Circ Res*, 2007, 100: 204-212
- [31] Palumbo R, Sampaiolesi M, De Marchis F, et al. Extracellular HMGB1, a signal of tissue damage, induces mesoangioblast migration and proliferation. *J Cell Biol*, 2004, 164: 441-449
- [32] Watanabe T, Keino H, Sato Y, et al. High mobility group box protein-1 in experimental autoimmune uveoretinitis. *Invest Ophthalmol Vis Sci*, 2009, 50: 2283-2290
- [33] 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 Invest Dermatol*, 2008, 128: 1545-1553