

DOI:10.3724/SP.J.1008.2009.01353

高迁移率族蛋白1促进巨噬细胞表达IL-18及其受体

秦阳华¹,戴生明^{2*},沈茜¹

1. 第二军医大学长海医院实验诊断科,上海 200433

2. 第二军医大学长海医院风湿免疫科,上海 200433

[摘要] **目的:**探讨高迁移率族蛋白1(HMGB1)能否激活巨噬细胞表达IL-18及其受体。**方法:**HMGB1与小鼠腹腔巨噬细胞共孵育后,采用实时RT-PCR、ELISA和流式细胞术分别检测IL-18的基因表达和蛋白含量以及IL-18受体(IL-18R)表达水平。Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)2激动剂Pam3Cys(1 μg/ml)和TLR4激动剂脂多糖(LPS, 100 ng/ml)设为平行对照。**结果:**100 ng/ml HMGB1刺激巨噬细胞2 h, IL-18 mRNA的表达明显增加;HMGB1刺激24 h后IL-18蛋白的产生明显增加,并且轻度上调细胞表面IL-18R的表达。TLR2激动剂Pam3Cys和TLR4激动剂LPS也能促进IL-18的基因表达和蛋白产生以及上调IL-18R的表达。**结论:**HMGB1可以直接激活巨噬细胞表达IL-18及其受体,提示HMGB1在炎症反应中可能通过IL-18加强致炎作用。

[关键词] 类风湿关节炎;高迁移率族蛋白1;巨噬细胞;白细胞介素18

[中图分类号] R 593.22 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2009)12-1353-05

High mobility group box chromosomal protein 1 promotes IL-18 production and IL-18 receptor expression in macrophages

QIN Yang-hua¹, DAI Sheng-ming^{2*}, SHEN Qian¹

1. Department of Laboratory Diagnosis, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China

2. Department of Rheumatology and Immunology, Changhai Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200433

[ABSTRACT] **Objective:** To investigate whether high mobility group box chromosomal protein 1 (HMGB1) can activate macrophages to secrete IL-18. **Methods:** Mouse peritoneal macrophages were cultured with HMGB1 for indicated period, then the mRNA and protein expression of IL-18 and IL-18 receptors were examined by real-time PCR, ELISA, and flow cytometric analysis. Toll-like receptor (TLR) 2 and 4 agonists (1 μg/ml Pam3Cys or 100 ng/ml LPS) were used as parallel controls. **Results:** Two hours after culture with HMGB1 (100 ng/ml), IL-18 mRNA expression was greatly increased. The expression of IL-18 protein was also greatly increased 24 h after culture with HMGB1, and the expression of IL-18R was slightly up-regulated. Pam3Cys (1 μg/ml) and LPS (100 ng/ml) could promote the expression of IL-18 at both mRNA and protein levels in the macrophages, and could up-regulate IL-18 receptors. **Conclusion:** HMGB1 can directly activate macrophages to secrete IL-18 and to express IL-18 receptor, suggesting that IL-18 may mediate the proinflammatory activity of HMGB1.

[KEY WORDS] rheumatoid arthritis; high mobility group box chromosomal protein 1; macrophages; interleukin-18

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2009, 30(12):1353-1357]

高迁移率族蛋白1 (high mobility group box chromosomal protein 1, HMGB1) 是高迁移率族蛋白中的一种, 因其在聚丙烯酰胺凝胶电泳中迁移率快而得名。最初发现 HMGB1 是一种与组蛋白不同的核蛋白, 在核内能够识别和结合 DNA, 改变 DNA

的螺旋状态, 参与 DNA 的转录、复制、修复以及细胞运动等, 后续的研究表明, HMGB1 是一种具有双功能的警报素 (alarmin), 在细胞外具有细胞因子功能, 可以启动天然和获得性免疫过程, 并参与了败血症、感染和自身免疫反应等炎症过程, 尤其在类风湿

[收稿日期] 2009-04-17 **[接受日期]** 2009-09-07

[基金项目] 国家自然科学基金(30872338), 上海市浦江人才计划(06PJ14121). Supported by National Natural Science Foundation of China (30872338) and Shanghai Pujiang Talent Program(06PJ14121).

[作者简介] 秦阳华, 博士, 讲师、主治医师. E-mail: qinyanghua@smmu.edu.cn

* 通讯作者 (Corresponding author). Tel: 021-81873313, E-mail: daism69@yahoo.com.cn

性关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的发生和发展过程中起了重要作用^[1-3]。以往的实验表明 HMGB1 可以激活免疫系统产生 IL-1、IL-6 和 TNF- α 等炎症因子,参与了 RA 的发病。最近很多研究发现 IL-18 也在 RA 的发病过程中起重要作用^[4],但目前尚不清楚 HMGB1 是否能调节 IL-18 的产生。本研究采取体外实验的方法,观察 HMGB1 是否调节巨噬细胞产生 IL-18 和(或)表达 IL-18 受体(IL-18 receptor, IL-18R),并且利用 Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)2 和 4 激动剂做平行对照实验,证实 HMGB1 促进巨噬细胞产生 IL-18 是其介导 RA 发病的一个新的可能途径。

1 材料和方法

1.1 实验动物 雄性 C57BL/6 小鼠,8~12 周龄,购于上海必凯实验动物有限公司,饲养于长海医院实验动物中心清洁级动物房。

1.2 实验试剂 重组 HMGB1, TLR2 激动剂 Pam3Cys, TLR4 激动剂 LPS 购于 Sigma-Aldrich 公司;鼠 IL-18 的 ELISA 检测试剂盒和 FITC 标记的抗鼠 IL-18R 的 α 链(IL-18R α)抗体购于 R&D 公司;PE 标记抗鼠 CD11b、I-A^b、CD80、CD86、TLR2 和 TLR4 抗体购于 eBioScience 公司;TRIzol 购于 Invitrogen 公司;实时 RT-PCR 试剂盒购于 TaKaRa 公司。

1.3 实验方法

1.3.1 小鼠腹腔巨噬细胞的获取和培养 8~12 周龄 C57BL/6 小鼠腹腔内注射 6% 肉汤培养液 2 ml 后 3 d,颈椎脱臼法处死小鼠,无菌条件下用预冷的 RPMI 1640 培养液灌洗腹腔,灌洗液 1 000 r/min 离心 5 min 后,沉淀重悬于含有 10% 灭活胎牛血清的 RPMI 1640 培养液(含青、链霉素各 100 U/ml)。调整细胞密度至 5×10^5 /ml,接种于 96 孔板(200 μ l)或 24 孔板(800 μ l),于 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 孵箱中培养。2 h 后去除未贴壁细胞,换新鲜培养液继续培养 8~12 h 后进行实验。采用流式细胞术检测小鼠腹腔巨噬细胞的纯度,收集细胞分别加入 PE 标记的抗鼠 CD11b、I-A^b、CD80、CD86、TLR2 和 TLR4 抗体室温孵育 30 min, PBS 洗涤后用 Becton-Dickson 公司的 FACScalibur 检测,计数 10 000 个细胞,用 CellQuest 软件分析。根据细胞表面巨噬细胞特异的 CD11b 分子的表达比例计算细胞纯度。实验时根据实验设计加入相应浓度的 HMGB1、Pam3Cys、LPS 或不加任何试剂继续培养一定时间,收集细胞,检测细胞内 IL-18 mRNA 或细胞表面 IL-18R 的表

达,或者收集培养上清检测 IL-18 的浓度。

1.3.2 细胞因子的 ELISA 检测 收集细胞培养上清,IL-18 浓度的检测采用双抗体夹心法 ELISA,具体操作根据试剂盒说明书进行。

1.3.3 IL-18 mRNA 表达水平的定量分析 采用实时 RT-PCR 进行。先用 TRIzol 抽提培养的巨噬细胞总 RNA,取 0.5 μ g 总 RNA 进行逆转录,采用 SYBR[®]PrimeScript[™] RT-PCR 试剂盒于 Roche 公司 LightCycler2 定量 PCR 仪进行。扩增引物分别为:(1)IL-18,前向引物 5'-AAG ACT CTT GCG TCA ACT TCA AGG A-3';反向引物 5'-AGT CGG CCA AAG TTG TCT GAT TC-3'。(2) β -actin,前向引物 5'-CAT CCG TAA AGA CCT CTA TGC CAA C-3';反向引物 5'-ATG GAG CCA CCG ATC CAC A-3'。逆转录体系为 10 μ l,包含 2 μ l $5 \times$ 缓冲液、0.5 μ l 酶混合物、0.5 μ l Random 6 mers、0.5 μ l Oligo dT 和 0.5 μ g 总 RNA,添加 ddH₂O 至 10 μ l。逆转录条件为 37 $^{\circ}$ C 逆转录 15 min,85 $^{\circ}$ C 灭活 5 s。PCR 反应体系为 20 μ l,包含 10 μ l $2 \times$ 反应混合物、20 μ mol/L 引物各 0.4 μ l、0.5 μ l 逆转录产物和 8.7 μ l ddH₂O。扩增条件为 95 $^{\circ}$ C 退火 15 s,60 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,共 35 个循环。数据分析以 β -actin 表达量为参照采用 $\Delta\Delta$ Ct 法进行相对定量分析。

1.3.4 IL-18R 表达水平的定量分析 采用流式细胞术分析。收集 HMGB1 处理和对照的巨噬细胞, PBS 缓冲液洗涤后分别用 FITC 标记抗鼠 IL-18R α 抗体,室温 30 min 孵育进行标记。PBS 洗涤后用 Becton-Dickson 公司的 FACScalibur 检测,计数 10 000 个细胞,用 CellQuest 软件分析。实验重复 3 次,趋势一致给出有代表性的结果。

1.4 统计学处理 每个实验重复 3~4 次,结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 GraphPad Prism 软件进行 Two-Way ANOVA 分析和 Bonferroni 两两分析。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 小鼠腹腔巨噬细胞的鉴定 采用肉汤培养基法获得的小鼠腹腔巨噬细胞在光镜下形态较为均一(图 1A),流式细胞术检测结果显示表达巨噬细胞特异表面分子 CD11b 的细胞占总数的 95% 左右(图 1B),达到实验使用要求,其他特征 CD 分子如 CD80、CD86 和 TLR2 的表达情况也与文献报道一致。

2.2 HMGB1 促进巨噬细胞表达 IL-18 mRNA 离体培养的小鼠腹腔巨噬细胞在加入 100 ng/ml

HMGB1、1 $\mu\text{g/ml}$ Pam3Cys 或 100 ng/ml LPS 后分别培养 1~3 h, 采用实时 RT-PCR 定量分析细胞内 IL-18 mRNA 的表达情况(图 2)。HMGB1 刺激 2 h 后, 细胞内 IL-18 mRNA 表达明显上调, 刺激 3 h 后 IL-18 mRNA 的表达进一步上升; LPS 刺激巨噬细

胞 IL-18 mRNA 表达情况与 HMGB1 作用类似, 3 h 组 IL-18 表达显著上调; Pam3Cys 在刺激巨噬细胞 1 h 后 IL-18 mRNA 的表达就显著上调, 3 h 略有下降。可见 HMGB1 可以作用于巨噬细胞并上调其 IL-18 的表达。

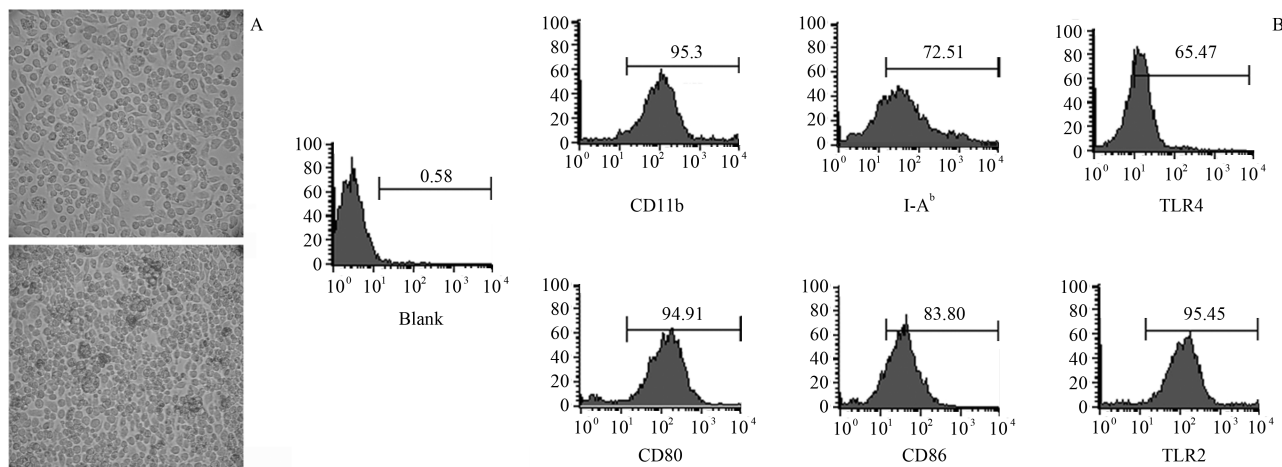


图 1 小鼠腹腔巨噬细胞培养鉴定

Fig 1 Identification of mouse peritoneal macrophages

A: Peritoneal macrophages under microscope (Original magnification: $\times 100$. The cells were cultured at $5 \times 10^5/\text{ml}$ and $1 \times 10^6/\text{ml}$); B: Expression of CDs on the surface of macrophages (numbers indicated the percent of gated).

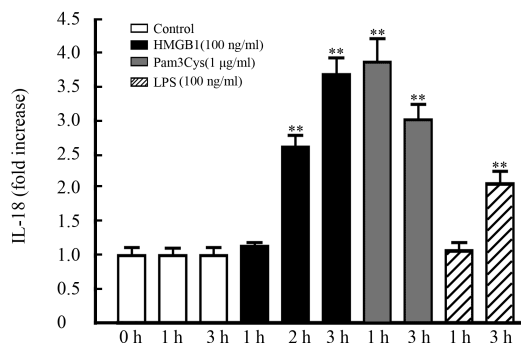


图 2 HMGB1 促进巨噬细胞 IL-18 mRNA 表达

Fig 2 HMGB1 promoted expression of IL-18 mRNA in macrophages

Mouse peritoneal macrophages were cultured with 1 $\mu\text{g/ml}$ rHMGB1, 1 $\mu\text{g/ml}$ Pam3Cys, 0.1 $\mu\text{g/ml}$ LPS, or remained untreated for indicated periods. Intracellular IL-18 mRNA levels were then determined by real-time PCR. ** $P < 0.01$ vs control group

2.3 HMGB1 促进巨噬细胞分泌 IL-18 小鼠巨噬细胞在加入 HMGB1、Pam3Cys 或 LPS 后培养 24 h, 收集培养上清, 采用 ELISA 测定 IL-18(图 3)。加入 100 ng/ml HMGB1 培养 24 h 上清中就可以检测到较高浓度的 IL-18, 1 $\mu\text{g/ml}$ HMGB1 组上清中 IL-18 浓度更高。1 $\mu\text{g/ml}$ Pam3Cys 和 100 ng/ml LPS 也可以诱导巨噬细胞分泌大量的 IL-18。可见

HMGB1 可以促进巨噬细胞分泌细胞因子 IL-18。

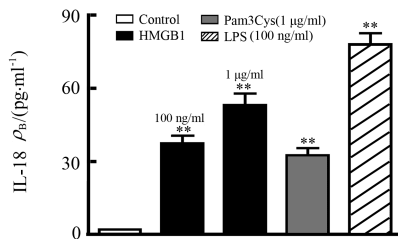


图 3 HMGB1 促进巨噬细胞分泌 IL-18

Fig 3 HMGB1 promoted secretion of IL-18 in macrophages

Mouse peritoneal macrophages were cultured with 100 ng/ml and 1 $\mu\text{g/ml}$ HMGB1, 1 $\mu\text{g/ml}$ Pam3Cys, 100 ng/ml LPS, or remained untreated for 24 hours. IL-18 concentrations in the culture supernatants were determined by ELISA kit. ** $P < 0.01$ vs control group

2.4 HMGB1 激活的小鼠腹腔巨噬细胞表面 IL-18R 表达上调 实验表明 HMGB1 可以作用巨噬细胞使其表达、分泌 IL-18, 进一步将培养的小鼠腹腔巨噬细胞与不同浓度 HMGB1、1 $\mu\text{g/ml}$ Pam3Cys 和 100 ng/ml LPS 共同孵育培养 24 h, 然后收集巨噬细胞采用流式细胞术检测细胞表面 IL-18R 的表达水平。结果表明, HMGB1 呈剂量依赖性地上调细胞表面 IL-18R 的表达, 1 $\mu\text{g/ml}$ Pam3Cys 和 100 ng/ml LPS 也可明显上调 IL-18R 的表达水平(图 4)。

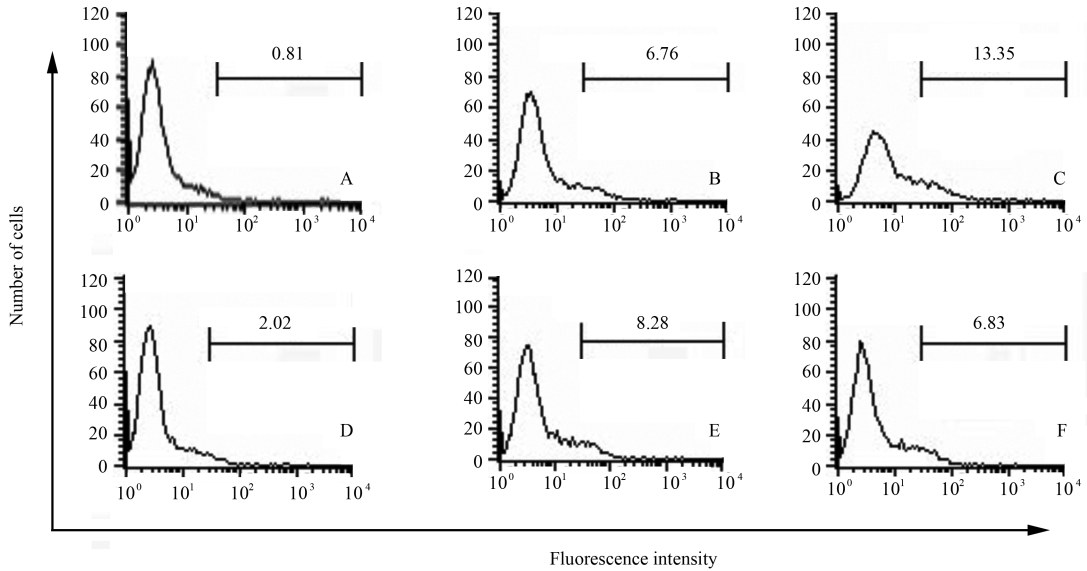


图 4 HMGB1 上调巨噬细胞表面 IL-18R

Fig 4 HMGB1 up-regulated expression of IL-18R in macrophages

A: Control; B: Pam3Cys(1 μg/ml); C: LPS(100 ng/ml); D: HMGB1(0. 25 μg/ml); E: HMGB1(0. 5 μg/ml); F: HMGB1(1 μg/ml). Mouse peritoneal macrophages were cultured with 1 μg/ml Pam3Cys, 100 ng/ml LPS, and indicated concentration of HMGB1 for 24 hours; the expression level of IL-18R was assessed by flow cytometry. Numbers indicated the proportion of gated

3 讨论

RA 是一个累及周围关节为主的多系统性炎症性的自身免疫病,主要表现为受累关节的疼痛、肿胀、功能下降,病变呈持续、反复发作过程。西方白种人 RA 的患病率约为 1%,我国 RA 的患病率约 0.3%^[5-6]。传统的抗风湿药物只能缓解临床症状和疾病进程,随着 TNF-α 抑制剂被美国 FDA 批准用于治疗 RA,免疫药物治疗 RA 逐渐受到重视。IL-1 抑制剂 Anakinra、抑制性共刺激分子 CTLA4-IgG 和针对 B 细胞的抗体 Rituximab 相继被批准用于对 TNF-α 抑制剂治疗反应低的 RA 患者,RA 的治疗效果比十几年前有了很大进步,但仍有部分患者应用上述药物治疗效果不佳,还需寻找新的免疫治疗靶点^[7-8]。RA 发病机制涉及整个细胞因子网络调节功能紊乱,针对新的重要靶点的治疗有望进一步提高 RA 的药物治疗效果。近 10 年来的研究发现, HMGB1 和 IL-18 是 RA 相关细胞因子网络中的两个重要的靶点分子^[9-10],是 RA 治疗的潜在靶点,两者正越来越受到研究者的关注。

20 世纪 90 年代初,就有研究者发现在约 40% 青少年 RA 患者血清中可以检测出抗 HMGB1 的抗体,后来发现在 RA 患者的血清和关节液内以及关节滑膜内均有异常增高的 HMGB1,并在实验性 RA 大鼠模型中得到证实^[11-13]。2003 年 Pullerits 等^[14]

在小鼠关节内注入重组 HMGB1 蛋白成功诱发小鼠关节炎模型。上述资料表明 HMGB1 可能在 RA 的发病机制中起重要作用。IL-18 又名 IFN-γ 诱导因子,在体内主要通过和细胞膜上的 IL-18R 结合而发挥作用。IL-18 在 RA 中的作用也受到越来越多的关注,RA 患者血清和关节液中 IL-18 异常升高,并且升高水平和血清 C 反应蛋白(CRP)水平以及病情活动度相关^[15]。RA 患者滑膜 IL-18 含量显著高于(OA)对照,免疫组化检查显示 IL-18 主要由 CD68⁺ 的巨噬细胞表达分泌^[16]。注射外源性 IL-18 会加重胶原诱导关节炎(CIA)小鼠的关节炎症和骨质破坏,而注射 IL-18 的中和抗体或 IL-18 结合蛋白可减轻 CIA 小鼠的关节炎症程度和降低 CIA 的发病率,IL-18 基因敲除小鼠表现出对 CIA 的明显抵抗^[4,17]。越来越多的证据表明, HMGB1 和 IL-18 参与了 RA 的病理进程,是 RA 相关的细胞因子网络的重要成员,然而有关 HMGB1 和 IL-18 之间的直接作用的实验结果尚未见报道。本研究采用小鼠腹腔巨噬细胞作为研究对象,通过实时 RT-PCR 检测证实 HMGB1 可以激活巨噬细胞上调 IL-18 mRNA 的表达,ELISA 实验结果表明细胞分泌 IL-18 增加,流式细胞术检测表明巨噬细胞表面 IL-18R 表达上调,实验结果证实 HMGB1 可以激活巨噬细胞分泌 IL-18。结合已发表的资料, HMGB1 作用巨噬细胞使其分泌大量 IL-6、IL-18 和 TNF-α 等致炎细胞因

子, 这些致炎细胞因子可以进一步激活巨噬细胞, 产生更多的致炎细胞因子和 HMGB1, 形成正反馈循环, 导致细胞因子调节网络失控和促进 RA 等疾病的发生和进展。

以往的研究表明 HMGB1 的受体可能有 3 个: 晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE)、TLR2 和 TLR4^[18]。Pullerits 等^[19]发现全身给予可溶性 RAGE 蛋白可以显著降低 HMGB1 诱发的关节炎的发病率和严重程度, 表明 HMGB1 通过 RAGE 激活靶细胞诱发实验性关节炎。但体外实验利用荧光显微镜发现 HMGB1 可与巨噬细胞表面的 TLR2 和 TLR4 结合, 而未观察到 HMGB1 与 RAGE 结合, 并且在激活巨噬细胞产生 TNF- α 时, TLR4 阻断剂可以剂量依赖性地降低 TNF- α 的产量^[20]。进一步实验发现 HMGB1 作用于 TLR2 缺陷小鼠来源的细胞时, 其产生 TNF- α 的量较作用于野生型小鼠来源的细胞时产生的量要低^[21], 提示 HMGB1 通过 TLR2 和 TLR4 起作用。我们的结果表明, TLR2 激动剂和 TLR4 激动剂可以诱导巨噬细胞产生 IL-18, 并且也可以上调巨噬细胞表面的 IL-18R, 初步提示 TLR2 和 TLR4 可能也参与 HMGB1 诱导巨噬细胞产生 IL-18 的作用。但 HMGB1 激活巨噬细胞通过哪个或哪几个受体, 以及需不需要 RAGE 的参与目前还不清楚, 有待进一步研究证实。

总之, 我们的研究表明, HMGB1 可以直接激活巨噬细胞产生 IL-18 并上调细胞表达 IL-18R, 因此 HMGB1 调节 IL-18 的作用也可能是其参与 RA 发病的机制之一。

[参考文献]

[1] Pisetsky D S, Erlandsson-Harris H, Andersson U. High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease [J]. *Arthritis Res Ther*, 2008, 10:209.

[2] 茹晋丽, 李小峰, 曾小峰, 魏 华. 类风湿关节炎治疗新靶点——高迁移率族蛋白 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2006, 10:302-305.

[3] 郑 毅, 董 馨, 陆江阳, 赵 敏. 类风湿关节炎滑膜中高迁移率族蛋白 1 的表达 [J]. *中华风湿病学杂志*, 2005, 9:684-686.

[4] Dai S M, Shan Z Z, Xu H, Nishioka K. Cellular targets of interleukin-18 in rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2007, 66:1411-1418.

[5] Xiang Y J, Dai S M. Prevalence of rheumatic diseases and disability in China [J]. *Rheumatol Int*, 2009, 29:481-490.

[6] Dai S M, Han X H, Zhao D B, Shi Y Q, Liu Y, Meng J M. Prevalence of rheumatic symptoms, rheumatoid arthritis, ankylosing spondylitis, and gout in Shanghai, China: a COPCORD study [J]. *J Rheumatol*, 2003, 30:2245-2251.

[7] Khoury M, Escriou V, Courties G, Galy A, Yao R, Largeau C, et al. Efficient suppression of murine arthritis by combined anti-cytokine small interfering RNA lipoplexes [J]. *Arthritis Rheum*, 2008, 58:2356-2367.

[8] Petrovic-Rackov L. Cytokines in rheumatoid arthritis and osteoarthritis [J]. *Med Pregl*, 2005, 58:245-251.

[9] Liew F Y, Wei X Q, McInnes I B. Role of interleukin 18 in rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2003, 62:ii48-ii50.

[10] Pollard L, Choy E. Rheumatoid arthritis; non-tumor necrosis factor targets [J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2005, 17:242-246.

[11] Wittemann B, Neuer G, Michels H, Truckenbrodt H, Bautz F A. Autoantibodies to nonhistone chromosomal proteins HMG-1 and HMG-2 in sera of patients with juvenile rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1990, 33:1378-1383.

[12] Jung F, Neuer G, Bautz F A. Antibodies against a peptide sequence located in the linker region of the HMG-1/2 box domains in sera from patients with juvenile rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 1997, 40:1803-1809.

[13] Kukkola R, Sundberg E, Ulfgren A K, Palmblad K, Li J, Wang H, et al. High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis [J]. *Arthritis Rheum*, 2002, 46:2598-2603.

[14] Pullerits R, Jonsson I M, Verdrengh M, Bokarewa M, Andersson U, Erlandsson-Harris H, et al. High mobility group box chromosomal protein 1, a DNA binding cytokine, induces arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2003, 48:1693-1700.

[15] Uppal S S, Raghupathy R, Hayat S J, Chowdhury R I, Abraham M, Rawoot P. Patient demographics and disease variables correlate with distinct cytokine patterns in mitogen-stimulated peripheral blood mononuclear cells from rheumatoid arthritis patients [J]. *Rheumatol Int*, 2008, 28:533-539.

[16] Nagai N, Fukuhata T, Ito Y, Usui S, Hirano K. Involvement of interleukin 18 in indomethacin-induced lesions of the gastric mucosa in adjuvant-induced arthritis rat [J]. *Toxicology*, 2009, 255:124-130.

[17] Leng J, Yao H, Shen J, Wang K, Zhuo G, Wang Z. Co-expression of IL-18 binding protein and IL-4 regulates Th1/Th2 cytokine response in murine collagen-induced arthritis [J]. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 2008, 40:116-124.

[18] Lotze M T, Tracey K J. High-mobility group box 1 protein (HMGB1): nuclear weapon in the immune arsenal [J]. *Nat Rev Immunol*, 2005, 5:331-342.

[19] Pullerits R, Brisslert M, Jonsson I M, Tarkowski A. Soluble receptor for advanced glycation end products triggers a proinflammatory cytokine cascade via beta2 integrin Mac-1 [J]. *Arthritis Rheum*, 2006, 54:3898-3907.

[20] Yu M, Wang H, Ding A, Golenbock D T, Latz E, Czura C J, et al. HMGB1 signals through toll-like receptor (TLR) 4 and TLR2 [J]. *Shock*, 2006, 26:174-179.

[21] Park J S, Gamboni-Robertson F, He Q, Svetkauskaite D, Kim J Y, Strassheim D, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors [J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2006, 290:C917-C924.