

HMGB1在狼疮性肾炎肾小球细胞外基质沉积中的作用及其可能机制

杨冉^{1#} 田月新^{1#} 赵璐¹ 苗心妍¹ 封晓娟¹ 李玉哲¹ 朱缘军² 王紫薇¹ 刘淑霞^{1*}

(¹河北医科大学病理教研室, 石家庄 050017; ²河北省人民医院体检中心, 石家庄 050017)

摘要 狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)的病理改变多种多样, 硬化性肾小球肾炎是多数LN患者的终末阶段, 因此, 该研究探讨了肾小球硬化的原因及机制。该研究通过免疫组化技术检测发现, 与癌旁远端正常组织相比, LN肾组织晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)与IV型胶原蛋白(collagen IV, Col IV)的表达水平均明显上调且二者呈明显正相关; ELISA技术检测结果发现, 甘草酸及Box A均可抑制由狼疮性肾炎患者置换血浆所诱导的人系膜细胞培养上清中FN蛋白表达的上调; Western blot及IP检测显示, 高迁移率组蛋白B1(high mobility group box 1, HMGB1)可与HMC表面的RAGE结合并上调其表达水平。综上所述, 研究者推测, HMGB1可能先与系膜细胞表面的RAGE结合, 继而诱导系膜细胞细胞外基质沉积, 从而参与LN肾损伤的发生。

关键词 狼疮性肾炎; HMGB1; RAGE; 系膜细胞; 细胞外基质沉积

HMGB1 Mediate Extracellular Matrix Deposition of Glomerular Mesangial Cell of Lupus Nephritis through Combining with RAGE

Yang Ran^{1#}, Tian Yuexin^{1#}, Zhao Lu¹, Miao Xinyan¹, Feng Xiaojuan¹,
Li Yuzhe¹, Zhu Yuanjun², Wang Ziwei¹, Liu Shuxia^{1*}

(¹Department of Pathology, Hebei Medical University, Shijiazhuang 050017, China;

²Physical Examination Center, Hebei General Hospital, Shijiazhuang 050017, China)

Abstract Lupus nephritis (LN) is the most frequent visceral complication of SLE, accounting for an increased morbidity, including end stage renal disease and mortality. Above all, it is an important significance to explore the mechanism of LN and look for personalized treatment options. Our previous researches had revealed that HMGB1 was significantly increased in renal tissue and correlated with the renal glomeruli proliferation in MRL/Faspr mice. In this study, we want to further explore the relationship between HMGB1 and extracellular matrix deposition of renal glomeruli with lupus nephritis. Plasmas from patients with LN and glycyrrhizic acid, a specific inhibitor of HMGB1, were used to infer the role of HMGB1 in extracellular matrix deposition of HMC; renopuncture tissues were used to revealed the correlation of RAGE and Collagen IV; human recombinant His-HMGB1 and Box A, a specific inhibitor of RAGE, were used to infer the mechanism of HMGB1 in extracellular matrix deposition of HMC. The ELISA result showed that compared with control group, the expression of FN

收稿日期: 2018-01-31 接受日期: 2018-04-28

国家自然科学基金(批准号: GZR81700611)、河北省杰出青年基金(批准号: H2015206494)和河北省自然科学基金(批准号: H2016206305)资助的课题

*通讯作者。Tel: 0311-86265734, E-mail: susanliu1976@163.com

Received: January 31, 2018 Accepted: April 28, 2018

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.GZR81700611), the Preeminent Youth Fund of Hebei (Grant No.H2015206494), the National Natural Science Foundation of Hebei (Grant No.H2016206305)

Corresponding author. Tel: +86-311-86265734, E-mail: susanliu1976@163.com

网络出版时间: 2018-07-30 10:54:18

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20180730.1054.008.html>

protein in LN plasma group was increased and the secretion of FN in Gly+LN plasma group was downregulated compared with LN plasma group, indicated that the Gly blocked the FN secretion induced by plasma from patients with LN; the secretion of FN in HMC of Box A+His-HMGB1 group was decreased compared with His-HMGB1 group, which showed that Box A blocked the FN secretion induced by His-HMGB1. The immunohistochemical result showed that the expression of RAGE protein in renopuncture tissues of patients with LN was upregulated and showed statistic correlation with the expression of Collagen IV. The Western blot result showed that the expression of RAGE protein in HMC was upregulated by His-HMGB1 compared with control group. The IP result revealed that the combine of RAGE and His-HMGB1 protein in HMC. In conclusion, HMGB1 mediate the extracellular matrix deposition of glomerular mesangial cell of LN through combining with RAGE.

Keywords lupus nephritis; HMGB1; RAGE; mesangial cell; extracellular matrix

狼疮性肾炎(lupus nephritis, LN)是系统性红斑狼疮(systemic lupus erythematosus, SLE)的主要并发症之一,其发病率及死亡率逐渐升高,因此,探明LN发病机制,寻找有效的LN治疗靶点对提高LN患者的治愈率尤为重要。肾小球硬化是LN肾损伤进展到终末期的一种不可逆性病理改变,其发生主要是由于IV型胶原蛋白(collagen IV, Col IV)、纤连蛋白(fibronectin, FN)、层黏连蛋白(laminin, LN)等细胞外基质(extracellular matrix, ECM)在系膜区及毛细血管基底膜过度沉积造成的^[1-2]。近年来,高迁移率组蛋白B1(high mobility group box 1, HMGB1)与纤维化的关系得到越来越多的证实,我们在前期实验中发现:HMGB1蛋白能够明显上调人系膜细胞的增殖水平;HMGB1蛋白抑制MRL/faslpr小鼠体内HMGB1的表达,可有效缓解小鼠肾脏损伤及系膜细胞的增殖水平^[3-5]。但是,除了介导系膜细胞的异常增殖,HMGB1是否还与ECM合成及沉积有关,目前尚不清楚。分泌至胞外的HMGB1多通过与靶细胞表面受体结合激活细胞内相关信号通路,从而发挥其生物学活性。晚期糖基化终产物受体(receptor for advanced glycation end products, RAGE)^[6]是常见的与HMGB1相关的受体之一,因此我们推测,外周血单核细胞分泌的HMGB1可能是通过与肾小球系膜细胞表面RAGE受体结合而介导其细胞外基质沉积的。

综上所述:细胞外基质沉积所致肾小球硬化是LN的终末阶段,但机制不明;HMGB1被证实参与了LN的发生,但其与细胞外基质沉积关系不明;HMGB1是否被系膜细胞表面RAGE识别而发挥作用尚不清楚。因此,本研究拟以LN患者肾穿标本及人系膜细胞系为研究对象,His-HMGB1和LN置换血

浆为刺激物,通过研究HMGB1对系膜细胞FN的分泌作用及机制,探讨HMGB1是否通过与肾小球系膜细胞表面RAGE结合诱导系膜细胞的细胞外基质沉积从而参与LN的发生。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验试剂 Fibronectin Human ELISA Kit、甘草酸(glycyrrhizic acid)、兔多克隆RAGE抗体、兔多克隆Collagen IV抗体购自Abcam公司;Box A from HMGB1购自HMGBiotech公司;小鼠多克隆His抗体、兔抗单克隆 β -actin抗体购自Proteintech公司。

1.1.2 肾穿标本 选取2014年1月到2015年12月河北医科大学第二医院肾内科收治的明确诊断的初治LN患者30例,所有患者均符合1997年美国风湿病协会制定的SLE的诊断标准,同时连续两次尿蛋白>1+或24 h尿蛋白定量>0.5 g。所有患者根据Austin的LN半定量评估指标进行活动性评分,根据国际肾脏病学会/肾脏病理学会(ISN/RPS)2003年LN分型标准进行分型,所有患者均无其他原发性继发性肾脏疾病或自身免疫性疾病。同时,选用20例肾脏肿瘤患者癌旁5 cm以外组织(病理确认为正常肾脏组织)为对照组。实验所用样本都已获得患者知情同意。

1.1.3 LN置换血浆 选取5例无其他原发性继发性肾脏疾病或自身免疫性疾病并处于活动期的LN患者置换血浆。

1.1.4 细胞 人系膜细胞(HMC)购自中南大学高等研究中心。正常培养条件为DMEM/F12(3:1)培养基,10% FBS,1%青链霉素,37 °C、5% CO₂环境培养。

1.2 方法

1.2.1 细胞分组 将生长状态良好的细胞随机分

为正常对照组、5% LN置换血浆组和2 mmol/L甘草酸+5% LN置换血浆组。血浆刺激48 h后收取细胞培养上清, ELISA技术检测FN蛋白表达水平。将生长状态良好的细胞随机分为正常对照组和50 ng/mL His-HMGB1组, 分别于His-HMGB1刺激10、20、30、40、50、60 min后收取细胞, 提取细胞蛋白, Western blot技术检测RAGE蛋白和 β -actin蛋白的表达水平。将生长状态良好的细胞随机分为正常对照组和50 ng/mL His-HMGB1组, 于His-HMGB1刺激30 min后收取细胞, 提取细胞蛋白, IP技术检测His-HMGB1与RAGE蛋白结合水平。将生长状态良好的细胞随机分为5、10、25、100 ng/mL His-HMGB1刺激组, ELISA技术检测FN蛋白表达水平。将生长状态良好的细胞随机分为正常对照组, 50 ng/mL His-HMGB1组和2 mmol/L Box A+50 ng/mL His-HMGB1组, His-HMGB1刺激48 h后收取细胞培养上清, ELISA技术检测FN蛋白表达水平。

1.2.2 ELISA技术检测HMC培养上清FN蛋白的表达水平 严格按照说明书稀释标准蛋白, 将标准蛋白及待测样品依次加入96孔板中, 同时设2个复孔。每孔加50 μ L Antibody Cocktail, 覆膜室温摇床放置1 h; 每孔加入1 $\times$ Wash Buffer 350 μ L, 洗板3次, 将孔内液体拍干; 每孔加入100 μ L底物溶液(TMB)摇床放置10 min; 每孔加入100 μ L终止液(Stop Solution)终止反应。立即用酶标仪于 $D_{450\text{ nm}}$ 处检测标本, 绘制标准曲线并计算出蛋白浓度。

1.2.3 免疫组织化学技术检测LN肾穿标本RAGE和Collagen IV蛋白表达水平 肾组织常规脱蜡至水, 3%过氧化氢避光孵育20 min, 0.01 mol/L枸橼酸修复液高压修复10 min, 自然晾干。用正常山羊血清于37 $^{\circ}$ C封闭60 min, 然后滴加抗RAGE或Collagen IV抗体(1:200稀释)于4 $^{\circ}$ C过夜。第2天滴加二抗和三抗, DAB显色液显色2 min并以蒸馏水终止显色, 苏木素复染, 氨水返蓝及盐酸酒精分化后脱水透明封片。应用Image Pro-Plus(IPP)软件分析免疫荧光结果 D 值, 每张切片选取10~15个完整的肾小球, 计算单位面积阳性染色区域平均光密度, 以各组的均值进行比较。

1.2.4 Western blot技术检测HMC RAGE蛋白表达水平 收集各时间点的细胞提取细胞蛋白并应用BCA法定量, 30 μ g蛋白煮沸7 min变性, 以10% SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳; 90 V恒压低温湿转至PVDF膜, 脱

脂奶粉37 $^{\circ}$ C封闭2 h; 孵育RAGE(1:1 000)和 β -actin抗体(1:1 000)于4 $^{\circ}$ C摇床过夜。第2天, 37 $^{\circ}$ C孵育辣根过氧化物酶标记的羊抗兔/小鼠IgG(1:7 500稀释)1 h后, 用HRP化学发光法发光, Odyssey FC成像系统显影并对Western blot条带进行定量分析, 以目的条带和 β -actin条带积分光密度值(D 值)的比值代表目的蛋白的相对表达量。

1.2.5 IP技术检测HMC RAGE His-HMGB1与RAGE蛋白结合水平 提取细胞总蛋白共1 mL并将细胞蛋白分为3组, Ab组(100 μ L)、IgG阴性对照组(300 μ L)和Input阳性对照组(600 μ L), Ab组和IgG组分别加入His抗体和IgG抗体(2 μ g抗体/1 mg蛋白)并轻柔混匀, 封口后4 $^{\circ}$ C摇床过夜, Input阳性对照组直接冻存于-80 $^{\circ}$ C。第2天, 依据蛋白的量加入beads(80 μ L beads/3 mg蛋白), 封口后于4 $^{\circ}$ C摇床过夜。第3天, 将蛋白500 $\times$ g离心5 min, 弃上清, 加入1 mL washing buffer, 冰上静置3 min, 然后500 $\times$ g离心5 min弃上清, 重复3次, 即得到蛋白复合物。与冻存的Input阳性对照组蛋白同时进行Western blot技术检测。

1.2.6 统计学分析 所有实验结果均采用SPSS15.0软件进行统计分析, 计量资料组间比较采用 t 检验或Wilcoxon秩和检验, 相关性分析采用Pearson相关性分析, $P<0.05$ 差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 HMGB1介导了LN置换血浆所引起人系膜细胞的FN分泌上调

ELISA结果显示, 与对照组(0.12 ± 0.01)相比, LN置换血浆刺激组HMC的培养上清中FN表达升高(0.27 ± 0.02); 与LN置换血浆刺激组相比, 甘草酸+LN置换血浆组HMC的培养上清中FN表达下调(0.18 ± 0.02)(图1)。

2.2 HMGB1上调HMC表面的RAGE蛋白表达水平

免疫组化结果显示, 癌旁远端正常肾组织RAGE蛋白无明显表达, LN患者肾穿标本RAGE蛋白阳性信号主要定位于肾小球和肾小管细胞细胞核和细胞质; 癌旁远端正常肾组织和LN患者肾穿标本Collagen IV阳性信号均定位肾小球间质, 但LN患者肾穿标本Collagen IV蛋白表达明显升高。统计分析结果显示, RAGE和Collagen IV蛋白呈明显正相关

(图2)。

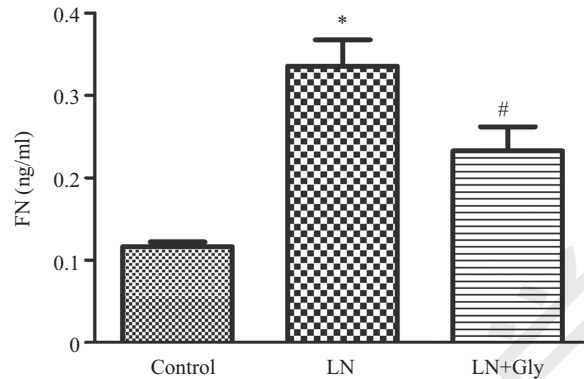
2.3 HMGB1上调HMC的RAGE表达水平且与其结合水平增加

Western blot结果显示, 与对照组相比, His-HMGB1刺激组HMC的RAGE蛋白表达水平明显升

高(图3)。IP结果显示, His-HMGB1刺激组HMC中可检测到与His结合的RAGE蛋白(图4)。

2.4 抑制RAGE与HMGB1结合后HMGB1诱导的HMC FN分泌降低

ELISA结果显示, 与对照组(0.12 ± 0.01)相比,

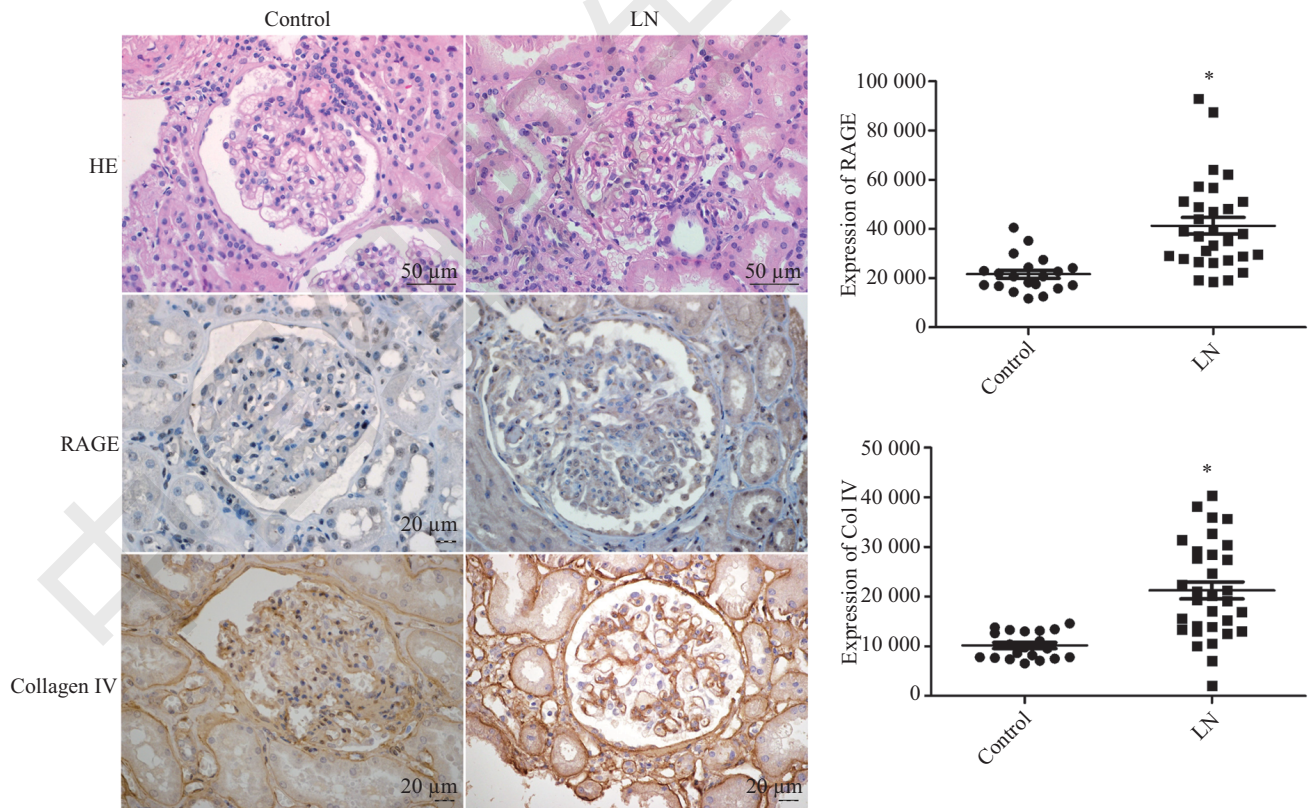


* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与LN患者血浆刺激组相比。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs LN plasma group.

图1 ELISA技术检测HMC培养上清FN蛋白的表达水平

Fig.1 The expression of FN protein detected by ELISA

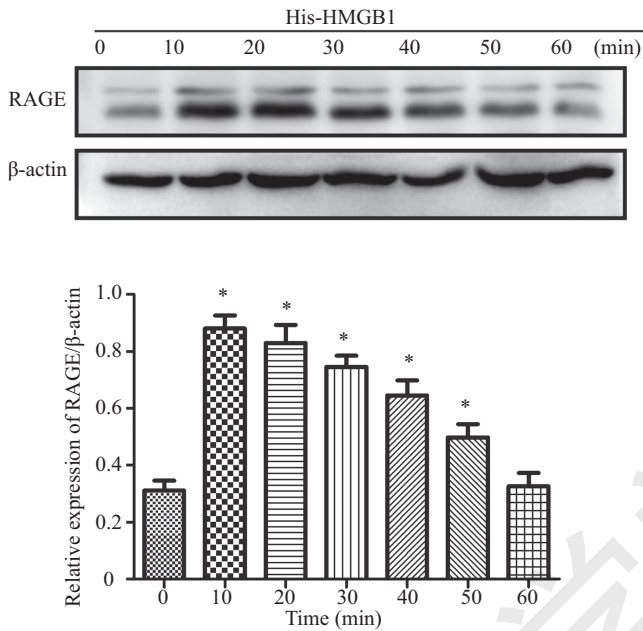


* $P < 0.05$, 与对照组相比。

* $P < 0.05$ vs control group.

图2 免疫组化技术检测LN患者肾穿组织和癌旁远端正常组织RAGE和Collagen IV蛋白的表达水平

Fig.2 Immunohistochemical staining for RAGE and Collagen IV in renopuncture tissues of LN patients and control group



* $P < 0.05$, 与对照组(0 min)相比。
* $P < 0.05$ vs control (0 min) group.

图3 Western blot技术检测HMC的RAGE表达水平
Fig.3 Expression of RAGE in HMC detected by Western blot

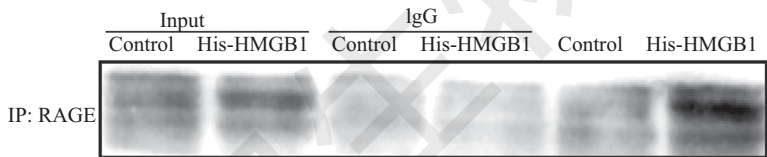
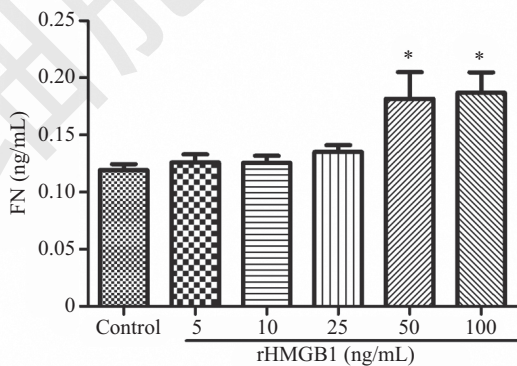


图4 免疫共沉淀技术检测HMC的RAGE与His-HMGB1结合水平
Fig.4 The combine of RAGE and His-HMGB1 detected by IP



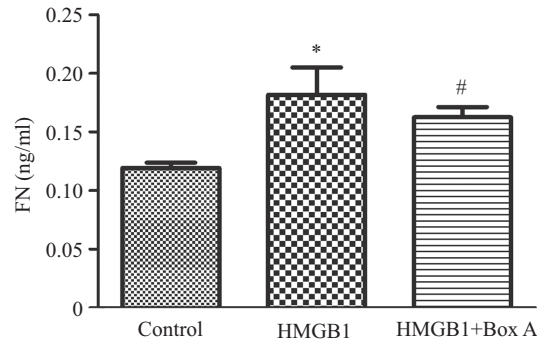
* $P < 0.05$, 与对照组相比。
* $P < 0.05$ vs control group.

图5 ELISA技术检测HMC培养上清FN蛋白的表达水平
Fig.5 The expression level of FN protein detected by ELISA

50 ng/mL和100 ng/mL HMGB1刺激组 HMC培养上清中FN蛋白表达水平均明显上调(0.17 ± 0.02 、 0.18 ± 0.01)(图5); 与His-HMGB1刺激组(0.24 ± 0.01)相比, Box A+His-HMGB1刺激组HMC培养上清中FN蛋白表达水平下降(0.15 ± 0.02)(图6)。

3 讨论

肾脏组织病理改变是肾损伤的基础, LN肾脏病理改变多种多样, 肾小球系膜细胞异常增殖、细胞外基质沉积、基底膜纤维素样坏死肾小球足细胞足突融合或缺失等均参与了肾小球滤损伤。其中, 细



* $P < 0.05$, 与对照组相比; # $P < 0.05$, 与HMGB1组相比。

* $P < 0.05$ vs control group; # $P < 0.05$ vs HMGB1 group.

图6 ELISA技术检测HMC培养上清FN蛋白的表达水平

Fig.6 The expression level of FN protein detected by ELISA

胞外基质沉积是多种肾小球肾炎的最终阶段, 探明其发生机制, 有可能为LN的治疗提供有效的靶点。

HMGB1与LN肾脏损伤的密切关系已得到多项研究的证实, 但其具体机制不明, Jog等^[1]证实, LN患者尿液中HMGB1水平和肾脏活动性及损伤程度均呈正相关, Simvastatin等^[2]则发现, 抑制HMGB1的表达可缓解LN小鼠肾损伤。我们的前期实验同样证实, 通过电转技术敲低了双侧肾组织HMGB1蛋白表达的MRL/fas小鼠尿蛋白水平得到改善, 肾小球细胞尤其是系膜区细胞数目减少, 提示HMGB1可能通过促进系膜细胞增殖参与了LN的发生^[3-5]。同时我们还发现, HMGB1蛋白低表达的MRL/fas小鼠肾小球系膜区明显变窄, 细胞外基质沉积减轻, 因此我们推测, HMGB1可能还通过诱导LN肾小球细胞外基质过度沉积参与了肾小球硬化。

肾小球硬化是LN肾损伤进展后期的一种不可逆性病理改变, 其发生主要是由于包括IV型胶原蛋白、纤连蛋白、层黏连蛋白等细胞外基合成增多或降解减少, 并在系膜区及毛细血管基底膜过度沉积造成的^[5]。肾小球系膜细胞是分泌ECM的主要细胞之一。因此, 抑制肾小球系膜细胞ECM沉积有助于减缓LN进程。LN肾损伤过程中肾小球细胞外基质沉积机制如何, 有待进一步研究。近年来免疫细胞功能紊乱所诱发的细胞因子的异常分泌在LN细胞外基质沉积过程中的作用得到越来越多的认可, 致纤维化因子(如TGF- β ^[6]和IL^[7]等)经受体信号途径激活肾小球系膜细胞, 促进细胞分泌过多的FN、蛋白多糖以及I和IV型胶原蛋白等, 或打破ECM降解酶系统之间的平衡, 从而影响ECM降解细胞外基质的沉积, 导致肾小球硬化。近年来, HMGB1也被证实与

细胞外基质释放密切相关^[8-9]。我们在本研究中应用了LN置换血浆刺激HMC, 结果发现, LN置换血浆能够明显上调HMC的FN的外泌, 而HMGB1特异性抑制剂甘草酸^[10]则部分缓解了LN置换血浆所诱导的HMC的FN的外泌。由此可知, LN患者外周血中HMGB1确实是参与LN肾小球系膜细胞细胞外基质沉积, 那么HMGB1介导LN系膜细胞的细胞外基质沉积的机制如何, 有待进一步研究。

HMGB1多由被活化的免疫细胞或坏死细胞释放入血, 以参与靶器官或组织的损伤。在肾小球系膜细胞表面存在多种HMGB1的受体, RAGE受体是最早发现的HMGB1受体之一^[11]。HMGB1通过与RAGE结合参与多种疾病的发生, HMGB1/RAGE通过抑制肿瘤细胞凋亡水平和上调肿瘤细胞异常增殖参与了胃癌肿瘤细胞的异常增生^[12], Karuppagounder等^[12]证实, HMGB1通过与RAGE结合激活NF-kappaB信号通路参与特异性皮炎的发生, 那么在LN肾小球细胞外基质沉积过程中HMGB1是否也通过与RAGE结合发挥了作用? 我们检测了RAGE蛋白在癌旁远端正常组织及LN患者肾穿组织的表达发现, RAGE蛋白在LN肾小球细胞表达明显升高, 且明显定于系膜区, 我们同时检测了Collagen IV蛋白的表达, 并进行定量分析发现, 二者表达量呈正相关。由此可推测, LN患者外周血中的HMGB1可能通过被肾小球系膜细胞表面RAGE受体识别并与之结合, 从而进一步介导系膜细胞细胞外基质沉积的。

为了证实这一猜想, 我们开展了细胞实验, 以人重组的His-HMGB1刺激HMC, 结果发现, 短时间内HMC的RAGE蛋白表达量剂明显上调, 证实了HMGB1能够上调系膜细胞表面RAGE的表达, 我们

同时通过免疫共沉淀技术检测到了HMGB1与His-RAGE的结合, 因此我们推测, HMGB1可能通过与RAGE受体结合, 正反馈性激活了RAGE蛋白的合成。HMGB1通过与RAGE受体结合参与肾小球系膜细胞的损伤, 那么HMGB1是否通过与RAGE结合参与了细胞外基质的过度沉积, 目前尚未有研究。

我们选用了RAGE特异性抑制剂Box A来验证HMGB1/RAGE复合物的作用机制。HMGB1是一种由215个氨基酸组成的非组核蛋白, 主要含有A box和B box两个结构域, B box是其发挥致炎活性的主要结构域, 而A box则是HMGB1与RAGE的结合区域, A box对HMGB1与RAGE的结合活性具有拮抗作用^[13-15]。我们在研究中发现, His-HMGB1能够上调HMC的FN分泌, 而预先加入的A box则能够通过下调HMGB1竞争性结合RAGE而下调HMC的FN分泌。因此, 我们得出结论, HMGB1确实通过与RAGE结合促进HMC的FN蛋白的分泌。

综上所述, LN患者外周血中HMGB1能够被肾小球系膜细胞表面的RAGE受体识别, 并通过其A box区域与RAGE受体结合, 进而激活细胞内相关信号通路, 打破ECM形成与降解之间的平衡, 促进ECM外泌, 加重了肾小球系膜区及毛细血管球基底膜的基质沉积, 造成肾小球硬化, 从而介导了LN肾小球肾脏损伤。

参考文献 (References)

- 1 Jog NR, Blanco I, Lee I, Putterman C, Caricchio R. Urinary high-mobility group box-1 associates specifically with lupus nephritis class V. *Lupus* 2016; 25(14): 1551-7.
- 2 Qin Y, Sun YT, Xia LX, Zhang YJ, Yang XJ. Effect of simvastatin on expression of IL17, HMGB1 and TLR4 in LN kidney tissues of rats. *Asian Pac J Trop Med* 2014; 7(10): 792-5.
- 3 Feng XJ, Wu C, Yang GF, Liu QJ, Liu JX, Hao J, *et al.* TLR2 plays a critical role in HMGB1-induced glomeruli cell proliferation through the FoxO1 signaling pathway in lupus nephritis. *J Interferon Cytokine Res* 2016; 36(4): 258-6.
- 4 Feng XJ, Hao J, Liu QJ, Yang L, Lv X, Zhang Y, *et al.* HMGB1 mediates IFN-gamma-induced cell proliferation in MMC cells through regulation of cyclin D1/CDK4/p16 pathway. *J Cell Biochem* 2012; 113(6): 2009-19.
- 5 Randles MJ, Woolf AS, Huang JL, Byron A, Humphries JD, Price KL, *et al.* Genetic background is a key determinant of glomerular extracellular matrix composition and organization. *J Am Soc Nephrol* 2015; 26(12): 3021-34.
- 6 Meng XM, Tang MK, Li J, Lan HY. TGF-beta/Smad signaling in renal fibrosis. *Front Physiol* 2015; 6: 82.
- 7 Stangou M, Bhargal G, Lai PC, Smith J, Keith JC Jr, Boyle JJ, *et al.* Effect of IL-11 on glomerular expression of TGF-beta and extracellular matrix in nephrotoxic nephritis in Wistar Kyoto rats. *J Nephrol* 2011; 24(1): 106-11.
- 8 He L, Sun F, Wang Y, Zhu J, Fang J, Zhang S, *et al.* HMGB1 exacerbates bronchiolitis obliterans syndrome via RAGE/NF-kappaB/HPSE signaling to enhance latent TGF-beta release from ECM. *Am J Transl Res* 2016; 8(5): 1971-84.
- 9 Dai S, Sodhi C, Cetin S, Richardson W, Branca M, Neal MD, *et al.* Extracellular high mobility group box-1 (HMGB1) inhibits enterocyte migration via activation of Toll-like receptor-4 and increased cell-matrix adhesiveness. *J Biol Chem* 2010; 285(7): 4995-5002.
- 10 Mollica L, De Marchis F, Spitaleri A, Dallacosta C, Pennacchini D, Zamai M, *et al.* Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. *Chem Biol* 2007; 14(4): 431-41.
- 11 Tian Y, Pan D, Chordia MD, French BA, Kron IL, Yang Z. The spleen contributes importantly to myocardial infarct exacerbation during post-ischemic reperfusion in mice via signaling between cardiac HMGB1 and splenic RAGE. *Basic Res Cardiol* 2016; 111(6): 62.
- 12 Karuppagounder V, Arumugam S, Thandavarayan RA, Pitchaimani V, Sreedhar R, Afrin R, *et al.* Modulation of HMGB1 translocation and RAGE/NFkappaB cascade by quercetin treatment mitigates atopic dermatitis in NC/Nga transgenic mice. *Exp Dermatol* 2015; 24(6): 418-23.
- 13 Dumitriu IE, Baruah P, Manfredi AA, Bianchi ME, Rovere-Querini P, *et al.* HMGB1: guiding immunity from within. *Trends Immunol* 2005; 26(7): 381-7.
- 14 Kang R, Tang D, Schapiro NE, Livesey KM, Farkas A, Loughran P, *et al.* The receptor for advanced glycation end products (RAGE) sustains autophagy and limits apoptosis, promoting pancreatic tumor cell survival. *Cell Death Differ* 2010; 17(4): 666-76.
- 15 Zhang L, Ji Y, Kang Z, Lv C, Jiang W. Protocatechuic aldehyde ameliorates experimental pulmonary fibrosis by modulating HMGB1/RAGE pathway. *Toxicol Appl Pharmacol* 2015; 283(1): 50-6.