Review Article

สัญญาณจากเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย High mobility group box 1 (HMGB1)

High Mobility Group Box 1 (HMGB1): A Signal of Tissue Damage

พียศ ภมรศิลปธรรม[1*] และ ประพิมพ์พักตร์ เถื่อนสุคนธ์[2]

[1] ภาควิชาชีวเภสัชศาสตร์ คณะเภสัชศาสตร์ มหาวิทยาลัยศิลปากร (ส่วนพระราชวังสนามจันทร์) จ.นครปฐม

[2] กลุ่มวิจัยอุตสาหกรรมเทคโนโลยีชีวภาพ องค์การเภสัชกรรม กรุงเทพฯ

* Corresponding author: perayot@su.ac.th

บทคัดย่อ

เมื่อมีการทำลายของเนื้อเยื่อ หรือในกรณีเกิดการติดเชื้อรุนแรงในกระแสเลือด ระบบภูมิคุ้มกันของร่างกาย มีกระบวนการตอบสนอง โดยเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อ มีการสร้างสารสำคัญหลายชนิด อาทิเช่น สารไซโตไคน์และสารไซโตไคน์ที่กระตุ้นให้เกิดการอักเสบ นอกจากนี้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันยังมีการสร้างสารสำคัญอีกชนิดหนึ่ง คือ โปรตีน high mobility group box 1 (HMGB1) เป็นนิวเคลียร์โปรตีนที่มีการสร้างและส่งออกภายนอกเซลล์ โดย HMGB1 มีบทบาทสำคัญต่อการทำงานของเซลล์หลายชนิด การศึกษาถึงคุณสมบัติ โครงสร้างของโปรตีนชนิดนี้ ทำให้เกิดความเข้าใจเกี่ยวกับกระบวนการอักเสบได้มากขึ้น และสามารถใช้โปรตีนนี้เป็นตัวติดตามระดับความรุนแรงที่เกิดขึ้นสำหรับการติดเชื้อหรือบริเวณที่มีการทำลายของเนื้อเยื่อได้ มีข้อมูลที่สนับสนุนได้ว่าโปรตีนนี้มีส่วนสัมพันธ์กับกระบวนการอักเสบของโรคหลายชนิด รวมไปถึงโรคที่เกิดจากระบบภูมิคุ้มกันต่อตัวเอง และภาวะที่เกิดการติดเชื้อรุนแรงที่นำไปสู่การเสียชีวิต การศึกษาในหนูทดลองแสดงผลสัมฤทธิ์ของการให้แอนติบอดีต่อโปรตีนนี้ สามารถลดอัตราตายจากการติดเชื้อในกระแสเลือดได้ ดังนั้นจึงมีความเป็นไปได้สูงที่จะพัฒนาโปรตีนนี้เพื่อเป็นเป้าหมายใหม่ของการรักษา และนำไปสู่วิธีการรักษาแบบใหม่ต่อโรคทางภูมิคุ้มกัน และโรคที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบ หรือติดเชื้อรุนแรงได้

คำสำคัญ: เอชเอ็มจีบีวัน, การติดเชื้อรุนแรงในกระแสเลือด, การทำลายเนื้อเยื่อ, ไซโตไคน์, สัญญาณเซลล์

ไทยเภสัชศาสตร์และวิทยาการสุขภาพ 2553;5(1):82-87[§]

บทนำ

โปรตีน high mobility group box 1 (HMGB1 หรือ HMG-1 amphoterin) เป็นโพลีเปปไทด์ (polypeptide) ที่ประกอบด้วยกรดอะมิโน 215 ตัว มีน้ำหนักโมเลกุลโดยประมาณ 25 - 30 กิโลดาลตัน (kD)[1] มีคุณสมบัติคล้ายสารไซโตไคน์ (cytokine)[2] แสดงบทบาทสำคัญในกระบวนการอักเสบ กระบวนการติดเชื้อ และการกระตุ้นระบบภูมิคุ้มกันทั้งแบบไม่จำเพาะเจาะจง (non-specific immunity) และแบบจำเพาะเจาะจง (specific immunity) โปรตีน HMGB1 มีการสังเคราะห์และถูกปลดปล่อยจากเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน ได้แก่ เซลล์ทีลิมโฟไซต์ (T lymphocyte cell) และโมโนนิวเคลียร์ฟาโกไซต์ (mononuclear phagocyte) อาทิเช่น เซลล์แมคโครฟาจ (macrophage)[3,4]

Waga และคณะ[5] สามารถสกัดแยกโปรตีนบริสุทธิ์ HMGB1 ได้ในปี ค.ศ. 1990 และพบว่าเป็นนิวเคลียร์โปรตีน (nuclear protein) ซึ่งจัดอยู่ในกลุ่มโปรตีนที่สามารถจับกับดีเอ็นเอ (ubiquitous DNA-binding protein)[6] ในมนุษย์โปรตีนนี้ถูกควบคุมโดยยีนบนโครโมโซมคู่ที่ 13 band 12 (หรือ 13q12)[7] ซึ่งแตกต่างจากในหนูซึ่งยีนที่ควบคุมโปรตีนนี้อยู่บนโครโมโซมคู่ที่ 5

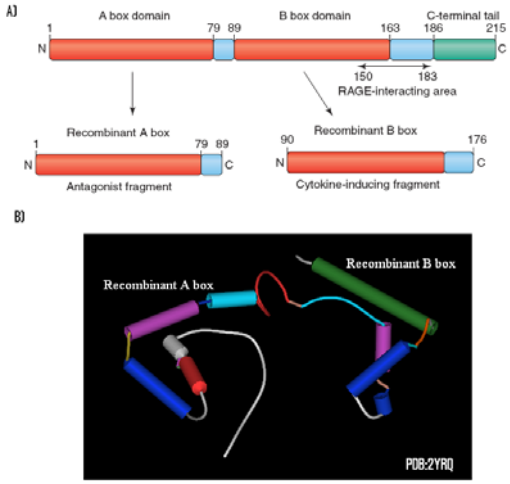
โปรตีน HMGB1 จะมีการสร้างและถูกปลดปล่อยในบริเวณที่มีการอักเสบเกิดขึ้น ดังเช่นในกรณีที่เกิดการติดเชื้อในกระแสเลือดรุนแรง (sepsis) ซึ่งเป็นกระบวนการอักเสบทั่วร่างกายร่วมกับการเกิดกระบวนการแข็งตัวของเลือดที่ผิดปกติ[8,9] โดยพบว่าเมื่อเกิดการบาดเจ็บหรือมีการทำลายเนื้อเยื่อในร่างกาย จะมีผลกระตุ้นให้เกิดการหลั่งสารไซโตไคน์ที่เกี่ยวข้องกับการอักเสบต่าง ๆ โดยพบว่ามีการสร้างโปรตีน HMGB1 เพิ่มขึ้นมากกว่าปกติ และสามารถตรวจวัดระดับโปรตีนชนิดนี้ได้ในกระแสเลือด นอกจากนี้ยังพบว่าโปรตีน HMGB1 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการเหนี่ยวนำไปสู่การตายของเซลล์ แต่ยังไม่ทราบกลไกการทำงานหรือกลไกการออกฤทธิ์ในระดับโมเลกุลที่ชัดเจน จากผลการศึกษาในหนูทดลองพบว่าระดับของโปรตีน HMGB1 ในพลาสมามีส่วนสัมพันธ์กับค่า disseminated intravascular coagulation (DIC) score โดยระดับโปรตีน HMGB1 ที่เพิ่มขึ้น มีส่วนเกี่ยวข้องกับความผิดปกติของระบบการแข็งตัวของเลือด (coagulation system) เกิดการอุดตันของลิ่มเลือดในหลอดเลือด สามารถชักนำไปสู่การตายของเซลล์[10] จึงกล่าวได้ว่าโปรตีน HMGB1 เป็นสัญญาณสำคัญที่แสดงถึงกระบวนการที่ก่อให้เกิดการอักเสบและสามารถชักนำไปสู่การตายของเซลล์ได้ในที่สุด[1,3,11] บทความนี้รวบรวมความรู้เกี่ยวกับโปรตีน

[§] 15th year of Srinakharinwirot Journal of Pharmaceutical Science

HMGB1 การศึกษาโครงสร้างและหน้าที่การทำงานของโปรตีน โดยมีข้อมูลสนับสนุนได้ว่าโปรตีน HMGB1 สามารถพัฒนาไปสู่เป้าหมายใหม่ในการรักษาภาวะเกิดการอักเสบของเนื้อเยื่อ หรือในกรณีที่เกิดภาวะการติดเชื้อในกระแสเลือดรุนแรงได้ในอนาคต

โครงสร้างของโปรตีน HMGB1

HMGB1 ทำหน้าที่เป็นสารไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบและจัดเป็นสารที่เกี่ยวข้องในกระบวนการขั้นสุดท้ายของการชักนำให้เกิดการตายด้วยสารพิษ โปรตีนนี้มีโครงสร้างสำคัญ 3 ส่วน คือ ส่วนที่สามารถจับกับดีเอ็นเอ (DNA binding motifs) สองส่วนคือ HMG A box และ HMG B box ส่วนที่สามเป็นส่วนปลายคาร์บอกซิลิก (acidic carboxyl terminus) (รูปที่ 1A และ 1B)



รูปที่ 1 โครงสร้างจำลอง HMGB1 (A) โปรตีน HMGB1 ประกอบด้วย HMG A box และ HMG B box เป็นส่วนที่สามารถจับกับดีเอ็นเอ (DNA binding motifs) และส่วนปลายคาร์บอกซิลิก (acidic carboxyl terminus) และ (B) โครงสร้างจำลองทางสามมิติของโปรตีน HMGB1

การศึกษาโครงสร้างของโปรตีนนี้ พบว่าส่วน HMGB1 B box มีคุณสมบัติในการกระตุ้นการหลั่งสารไซโตไคน์เช่นเดียวกับโปรตีน HMGB1 และมีประสิทธิภาพพอที่กระตุ้นการทำงานของเซลล์แมคโครฟาจให้ปลดปล่อยสาร tumor necrosis factor (TNF) และสารไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบอื่นๆ เช่น IL-10, IL-6 และ IL-1β โดยพบว่าส่วนของ HMG1 B box ที่สามารถกระตุ้น TNF-stimulating activity มีความยาวของกรดอะมิโน 20 ตัว (อยู่ที่ตำแหน่งกรดอะมิโนลำดับที่ 89-108)[4] ในขณะที่ส่วน HMGB1 A Box มีผลในทางตรงกันข้ามโดยมีผลการยับยั้งการทำงานโปรตีน HMGB1 ในการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้หลั่งสารไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ[9]

ภายหลังการกระตุ้นเซลล์โมโนไซต์ (monocyte cell) และแมคโครฟาจของหนูทดลองด้วยสารไลโปโพลีแซคคาไรด์ (lipopolysaccharide หรือ LPS) หรือกระตุ้นด้วย tumor-necrosis factor-α (TNF-α) หรืออินเตอร์ลิวคินวัน (interleukin-1; IL-1) พบว่ามีการหลั่งสารโปรตีน HMGB1 เพิ่มขึ้น และพบว่าโปรตีนชนิดนี้มีความสัมพันธ์ในการชักนำให้หนูทดลองตายหลังจากการให้สารพิษ (endotoxin lethality)[12] นอกจากนี้ การศึกษาอื่นในหนูทดลอง พบว่าโปรตีน HMGB1 เกี่ยวข้องกับการเกิดพยาธิสภาพของการติดเชื้อในกระแสเลือดรุนแรง โดยการใช้แอนติบอดี (antibody) ที่มีความจำเพาะเจาะจงต่อโปรตีน HMGB1 หรือการใช้โปรตีน recombinant box A (HMGB1-A Box) ให้ในหนูทดลองภายใน 24 ชั่วโมงหลังจากถูกกระตุ้นด้วยสารพิษ พบว่าสามารถลดการตายจากการติดเชื้อในกระแสเลือดรุนแรงได้ ในปัจจุบันยังไม่มีเป้าหมายใหม่ในการรักษาการติดเชื้อในกระแสเลือดรุนแรงนอกจากรักษาด้วยแอนติบอดีต่อทีเอ็นเอฟ (anti-TNF antibodies) และแอนติบอดีต่อ macrophage migration inhibitory factor

กลไกการปลดปล่อย HMGB1 สู่ภายนอกเซลล์

โปรตีน HMGB1 เป็นนิวเคลียร์แฟคเตอร์ (non-histone nuclear factor) มีการสังเคราะห์และรวมตัวอยู่บริเวณนิวเคลียส เมื่อเซลล์ถูกกระตุ้นด้วยสัญญาณเซลล์หรือสิ่งเร้าจะมีการกระจายตัวของโปรตีน HMGB1 ไปยังส่วนไซโตพลาสซึม และมีการส่งออกหรือหลั่งไปยังภายนอกเซลล์ได้

การศึกษาเซลล์โมโนไซต์ด้วยการกระตุ้นด้วยสารไลโปโพลีแซคคาไรด์ (LPS) หรือ tumor necrosis factor (TNF-α) หรืออินเตอร์ลิวคินวัน (IL-1) แสดงให้เห็นการเคลื่อนที่ของโปรตีน HMGB1 จากบริเวณส่วนนิวเคลียสไปยังไซโตพลาสซึมซึ่งอยู่ในรูปของเอนโดไลโซโซม (endolysosome) เมื่อเปรียบเทียบกับเซลล์โมโนไซต์ที่ไม่ได้รับการกระตุ้นซึ่งพบว่าโปรตีน HMGB1 กระจายอยู่รอบนิวเคลียส และเมื่อศึกษาเซลล์โมโนไซต์โดยการกระตุ้นด้วยสารไลโซฟอสฟาทิดิลโคลีน (lysophosphatidylcholine หรือ LPC) จำนวน 20 ไมโครโมล่าร์ (μM) เพื่อศึกษากระบวนการปลดปล่อยของโปรตีน HMGB1 จากภายในเซลล์สู่ภายนอกเซลล์ พบว่าภายหลังกระตุ้นด้วยสารไลโซฟอสฟาทิดิลโคลีนเป็นเวลา 18 ชั่วโมง มีการปลดปล่อยโปรตีน HMGB1 ร่วมกับตัวชี้วัดของสารไลโซโซม (lysosome marker) คือ CD and β-hexoso-aminidase ด้วยวิธีเอกโซไซโตซิส (exocytosis) โดยเทคนิคการวิเคราะห์ทางอิมมูโนฟลูออเรสเซนซ์ (immunofluorescence analysis) และการวิเคราะห์ด้วยกล้องจุลทรรศน์อิเล็คตรอนทางอิมมูโนวิทยา (immunoelectron microscopy analysis)[13]

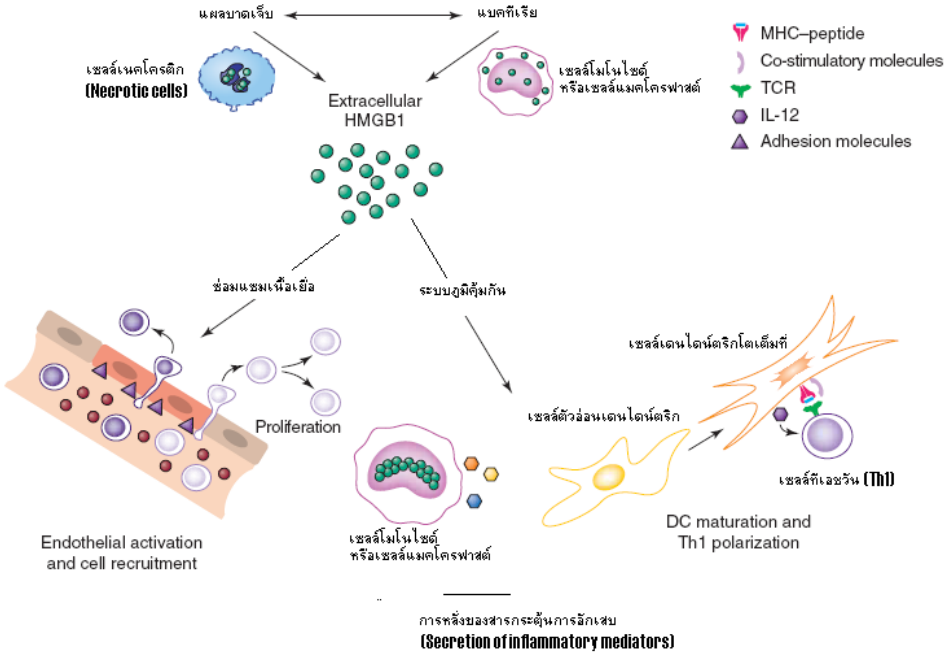
Gardella และคณะ ได้เสนอว่ากระบวนการปลดปล่อยโปรตีน HMGB1 แบบใช้พลังงาน ประกอบด้วย 3 ขั้นตอน คือ 1) การ

ขนส่ง HMGB1 จากบริเวณนิวเคลียสไปยังส่วนไซโตพลาสซึม 2) เกิดการเคลื่อนย้าย (translocation) ของโปรตีน HMGB1 จากส่วนของไซโตพลาสซึม ที่กระจายตัวอยู่ภายในไซโตพลาสมิกออร์แกเนลล์ (cytoplasmic organelle) และ 3) กระบวนการส่งออกภายนอกเซลล์ด้วยกระบวนการเอกโซไซโตซิสเพื่อไปยังเป้าหมายต่อไป[13] นอกจากนี้โปรตีน HGMB1 สามารถปลดปล่อยสู่ภายนอกเซลล์ได้โดยกระบวนการที่ไม่ใช่พลังงาน (passive release) ซึ่งเกิดภายหลังจากมีการตายเฉพาะส่วนของเซลล์ (necrotic cell death) โปรตีน HMGB1 มีหน้าที่การทำงานที่มีความหลากหลายตามเซลล์เป้าหมาย (ตารางที่ 1)[14]

ตัวรับของโปรตีน HMGB1 มีชื่อว่า RAGE (receptor for advanced glycation end product) ซึ่งจัดเป็นส่วนหนึ่งในกลุ่มตัวรับอิมมูโนโกลบุลิน (Ig superfamily) และอาจจะมีตัวรับอื่น ๆ ของโปรตีน HMGB1 ซึ่งในขณะนี้ยังไม่ทราบแน่ชัด ตำแหน่งของกรดอะมิโนลำดับที่ 150 - 183 บนโปรตีน HMGB1 เป็นส่วนที่สามารถจับกับตัวรับ RAGE[3] โดยหน้าที่และความสัมพันธ์ของการทำงานของ HMGB1 และตัวรับ RAGE เกี่ยวข้องกับเซลล์เยื่อบุเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน และเซลล์เดนไดรท์ (รูปที่ 2)[14]

ตารางที่ 1 หน้าที่การทำงานของโปรตีน HMGB1[14]

ฤทธิ์ทางชีววิทยา (Biological activity)	เซลล์เป้าหมาย (Target cell)
การหลั่งสารที่กระตุ้นการอักเสบ	monocyte, macrophage, dendritic cell, endothelial cell
เพิ่มการแสดงออกของยีนที่กระตุ้นการอักเสบ	neutrophil
เพิ่มคุณสมบัติกระตุ้นภูมิคุ้มกัน (immunogenicity) ของแอนติเจนที่ละลายน้ำ (soluble or corpusculate antigen)	dendritic cell
การเจริญเป็นเซลล์เต็มตัว (polarization) ของเซลล์เดนไดรท์ และเซลล์ทีเอชวัน (Th1)	dendritic cell
เพิ่มจำนวนโมเลกุลที่เกี่ยวข้องกับการยึดติด (upregulation of adhesion molecule)	endothelial cell, monocyte
การจัดรูปแบบโครงสร้างที่เกี่ยวข้องกับการเคลื่อนที่ (cytoskeleton reorganization and transendothelial migration)	vascular smooth muscle cell, vessel-associated stem cell (mesangioblast)
การเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็ว (proliferation)	vessel-associated stem cell (mesangioblast)



รูปที่ 2 โปรตีน HMGB1 และการส่งสัญญาณไปยังเซลล์ต่าง ๆ เมื่อเกิดการทำลายเนื้อเยื่อหรือมีการติดเชื้อจุลชีพ: เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกัน โมโนไซต์ (monocyte) หรือเซลล์แมคโครฟาจ (macrophage) และเซลล์เดนไดรท์ (dendritic cell: DC) มีการปลดปล่อยของโปรตีน HMGB1 สู่ภายนอกเซลล์ และส่งสัญญาณไปยังเซลล์เป้าหมาย โดยมีผลต่อระบบหลอดเลือด ทำให้เกิดกระตุ้นเซลล์มีการเพิ่มจำนวนอย่างรวดเร็วและเกิดการกระตุ้นให้เซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันเกิดการสร้างสารกระตุ้นการอักเสบ และมีการเปลี่ยนแปลงของเซลล์เดนไดรท์ให้โตเต็มที่ (ดัดแปลงจาก Dumitriu IE, et al. *Trends Immunol* 2005;26(7):381-387[14])

HMGB1 และความสัมพันธ์เกี่ยวกับโรคต่าง ๆ

การศึกษาโปรตีน HMGB1 กับความเกี่ยวข้องในโรคต่าง ๆ เริ่มมีการศึกษาอย่างมากในช่วง 10 ปีที่แล้ว (คศ. 1998 - 2008) ในปัจจุบันเป็นหัวข้อที่มีการศึกษาอย่างกว้างขวาง เพื่อค้นหาเป้าหมายใหม่ซึ่งจะนำไปสู่แนวทางการรักษาใหม่[15,16] ดังตัวอย่างโรคต่อไปนี้

โรคติดเชื้อรุนแรงในกระแสเลือด (sepsis)

มีการศึกษาถึงการยับยั้งการเกิดการติดเชื้อรุนแรงในกระแสเลือดในหนูทดลอง โดยการฉีดสารต่อต้านโปรตีน HMGB1 อย่างเช่น แอนติบอดีต่อ HMGB1 หรือการใช้ส่วนที่เป็นโปรตีนสังเคราะห์ส่วน HMGB1 A box แสดงผลลดอัตราการตายในหนูทดลอง ส่วนการศึกษาในมนุษย์ต้องศึกษาในขั้นการทดลองทางคลินิก (clinical trial)

การอักเสบของปอด (lung inflammation)

การให้โปรตีน HMGB1 โดยทางหลอดลมสามารถชักนำให้เกิดกระบวนการอักเสบของปอด โดยเพิ่มการรวมตัวของเซลล์นิวโตฟิล (neutrophil) การเกิดภาวะบวมน้ำ (edema) และการเพิ่มขึ้นของสารไซโตไคน์ของเนื้อเยื่อภายในปอด[17] การให้แอนติบอดีต่อ HMGB1 ในสัตว์ทดลองให้ผลการลดลงของการรวมตัวของเซลล์นิวโตฟิลและลดภาวะบวมน้ำที่ปอดได้ แต่ว่าแอนติบอดีดังกล่าวไม่สามารถลดระดับการเพิ่มขึ้นของสารไซโตไคน์ (TNF, IL-1β, และ MIP-2) แสดงได้ว่าการใช้แอนติบอดีต่อ HMGB1 ให้ผลเฉพาะเจาะจงและพบว่า HMGB1 มีฤทธิ์เป็นสารเหนี่ยวนำกระบวนการอักเสบในส่วนอื่น ๆ ได้ (จากหลอดลมไปสู่ปอด) หลังจากเกิดภาวะการบาดเจ็บหรืออักเสบของระบบทางเดินหายใจแบบเฉียบพลัน

ภาวะข้ออักเสบ (arthritis)

การเกิดภาวะข้ออักเสบ เซลล์แมคโครฟาจแสดงบทบาทที่สำคัญในกระบวนการทางพยาธิวิทยา จากการศึกษาพบว่าเซลล์แมคโครฟาจที่ถูกกระตุ้นมีบทบาทสำคัญโดยการหลั่ง HMGB1 ในสารน้ำในไขข้อ (synovial) และมีส่วนพัฒนาไปเกิดภาวะข้ออักเสบในหนูทดลอง[18-20] สอดคล้องกับการศึกษาในผู้ป่วยที่มีภาวะข้ออักเสบ จากการตัดชิ้นเนื้อ (biopsy sample) พบเซลล์คล้ายแมคโครฟาจ และในจำนวนตัวอย่าง 12 จาก 14 ราย ตรวจพบระดับของโปรตีน HMGB1 ในช่วง 1-10 μg/ml[20]

โรคมะเร็ง (cancer)

การศึกษาบทบาทของการแสดงออกที่มากเกิน (over-expression) ของโปรตีน HMGB1 และส่วนของตัวรับ RAGE[16] พบว่ามีส่วนเกี่ยวข้องกับกระบวนการเพิ่มจำนวนอย่างมากมาย (proliferation) และกระบวนการแพร่กระจาย (metastasis) ในโรคมะเร็งหลายชนิด เช่น มะเร็งเต้านม (breast cancer)[21] มะเร็งลำไส้ (colon cancer)[22] มะเร็งผิวหนัง (melanoma) และอื่น ๆ การศึกษา HMGB1 กับโรคมะเร็งมีความเป็นไปได้ที่จะพัฒนาไปสู่ยารักษาโรคใหม่ได้[16]

การศึกษาในอนาคตเกี่ยวกับความสัมพันธ์ของโรคและ HMGB1 เพื่อพัฒนาไปสู่แนวทางการรักษาโรค สามารถศึกษาด้วยเทคนิคการเปรียบเทียบข้อมูลทางสารสนเทศศาสตร์ โดยสามารถเชื่อมโยง และวิเคราะห์ความสัมพันธ์ระหว่าง HMGB1 และโรคที่เกี่ยวข้องได้ (ตารางที่ 2)

ตารางที่ 2 ความสัมพันธ์ของยีน HMGB1 ที่เกี่ยวข้องกับโรคต่าง ๆ จากการศึกษาด้วยเทคนิคทางสารสนเทศศาสตร์ (data mining) จากฐานข้อมูลของ AKS2 (almaKnowleadeServer)[31]

โรค (Disease)	คะแนน (Score)*	จำนวนผลงานวิจัย
Sepsis	62.56	113
Inflammation	54.70	82
Septic shock	46.50	15
Arthritis	42.79	41
Necrosis	41.72	44
Systemic inflammatory response syndrome	37.12	1
Tumors	32.57	81
Chronic arthritis	32.20	2
Rheumatoid arthritis	28.82	10
Cell damage	24.62	4

* ค่าคะแนน (score) ที่แสดง คำนวนจาก ASK score โดยการใช้ literature text-mining algorithms โดยข้อมูลนำมาจากผลงานวิจัยที่ปรากฏอยู่ในฐานข้อมูล Medline โดยค่าที่คำนวนได้บ่งบอกถึงความสัมพันธ์ระหว่างโรคและโปรตีน HMGB1 ค่า (score) ที่มีค่ามากแสดงถึงมีความเกี่ยวข้องกันมาก ค่าน้อยแสดงถึงความเกี่ยวข้องกันน้อย

การศึกษายับยั้งการทำงานโปรตีน HMGB1

การศึกษาในหนูตะเภาด้วยการให้สารทรอมบิน (thrombin) หรือการให้สารทรอมบินร่วมกับ HMGB1 และวัดผลการมีชีวิตอยู่รอด วิเคราะห์ผลเลือด และการตรวจทางพยาธิวิทยา พบว่ากรณีที่ใช้สารสองตัวร่วมกัน ภายหลัง 6 ชั่วโมง การตรวจทางพยาธิวิทยาพบว่า เกิดการรวมตัวของไฟบริน (fibrin) มากมายในบริเวณหน่วยไต (glomeruli) เกิดการเสื่อมสภาพของท่อไต (renal tubular degeneration) และพบเลือดออกบริเวณถุงลม (alveolar hemorrhage) การตรวจทางโลหิตวิทยา พบว่ามีการเพิ่มระยะเวลาการแข็งตัวของเลือด 1.5 เท่าอย่างมีนัยสำคัญ และมีการกระตุ้นสารไซโตไคน์ที่ก่อให้เกิดการอักเสบ คือ IL-6 และ TNF-α ส่งผลรบกวนการทำงานของระบบเลือดและกระบวนการอักเสบ

การทำงานของอัวยวะล้มเหลว (organ failure) และนำไปสู่การตายในหนูตะเภา จากการวิเคราะห์เพิ่มเติมในสภาวะหลอดทดลอง (*in vitro*) พบว่า HMGB1 ไม่มีผลต่อการแข็งตัวของเลือดโดยตรง แต่มีการยับยั้งการทำงานของโปรตีนซี (protein C) ที่เหนี่ยวนำโดยโครงสร้างเชิงซ้อนของทรอมบินและทรอมโบโมดูลิน (thrombin-thrombomodulin complex) และกระตุ้นการแสดงออกของโปรตีน tissue factor บนเซลล์โมโนไซต์[10]

ในการศึกษาในหนูทดลองหลังจากกระตุ้นด้วยสารเอ็นโดทอกซิน พบว่าระดับของโปรตีน HMGB1 มีปริมาณเพิ่มขึ้นในช่วง 8 - 32 ชั่วโมง[12,23] นอกจากนี้ หลังจากชักนำให้หนูเกิดภาวะการติดเชื้อในกระแสเลือดรุนแรงโดยใช้เทคนิค Cecal ligation and puncture (CLP) การให้แอนติบอดีที่จำเพาะต่อ HMGB1 B Box (Anti-HMGB1 B-Box antibody 600 µg/mouse) ภายใน 12 ถึง 24 ชั่วโมง สามารถลดอัตราการตายและการติดเชื้อรุนแรงได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.03$)[4] สอดคล้องกับการศึกษาอื่น ๆ หลังจากหนูทดลองถูกเหนี่ยวนำให้เกิดการติดเชื้อที่ผนังช่องท้องหลังการผ่าตัด (surgical induction of peritonitis) ภายหลัง 24 ชั่วโมง พบว่าถ้าให้แอนติบอดีที่มีความจำเพาะต่อโปรตีน HMGB1 (anti-HMBG1 antibody 600 µg /mouse) หรือส่วนของ HMGB1 A Box (600 µg/mouse) สามารถเพิ่มอัตราการมีชีวิตรอดของหนูทดลองได้อย่างมีนัยสำคัญทางสถิติ ($P < 0.03$)[24]

นอกจากนี้ การศึกษาผลของการยับยั้งการทำงานของ HMGB1 โดยสารสกัดสมุนไพรจากรากชะเอม (glycyrrhizin) พบว่าสามารถยับยั้งการทำงานของ HMGB1 ได้ดี[25,26] ผลการศึกษาการอักเสบของเซลล์ตับ โดยใช้หนูทดลอง (hepatitis B virus (HBV) transgenic mice lineage 1.3.32) พบว่าเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันสามารถชักนำให้เกิดการทำลายของเซลล์ตับ โดยเซลล์ไซโตทอกซิกทีลิมโฟไซต์ (cytotoxic T lymphocyte; CTL) และมี HMGB1 เกี่ยวข้องในกระบวนการกระตุ้นของเซลล์เหล่านี้[27] พบว่ามีการเพิ่มขึ้นของระดับเอ็มอาร์เอ็นเอ (mRNA HGMB1) และโปรตีน HMGB1 ในเซลล์ตับ นอกจากนี้การให้สาร recombinant HMGB1 Box-A (400 µg/mouse) หรือสารสกัดรากชะเอม (10 mg/mouse) ทางช่องท้อง (intraperitoneally) โดยทั้งสองเป็นสารยับยั้งการทำงานของ HMGB1 สามารถลดการเกิดการอักเสบของเซลล์ตับและเซลล์ในระบบภูมิคุ้มกันอื่น ๆ อย่างมีนัยสำคัญ ซึ่งทางผู้ศึกษาได้อธิบายได้ว่าการใช้สารสกัดรากชะเอมสามารถจับกับโปรตีน HMGB1 ที่ปลดปล่อยออกมาภายนอกเซลล์ โดยยับยั้งการทำงานของระบบไซโตไคน์ ให้ผลเช่นเดียวกับการใช้ HMGB1 Box-A ซึ่งมีความน่าสนใจที่จะพัฒนาไปสู่ยาใหม่ที่มีประโยชน์ในการที่จะนำมารักษาผู้ป่วยที่เป็นโรคติดเชื้อรุนแรงในกระแสเลือด และโรคที่เกิดการอักเสบจากไวรัสตับอักเสบ[26]

การศึกษาในมนุษย์ ซีรั่มของคนปกติจะตรวจไม่พบระดับของโปรตีน HMGB1 แต่ในซีรั่มของคนป่วยที่มีการติดเชื้อจะตรวจพบระดับโปรตีน HMGB1ได้[28,29] และระดับของโปรตีนนี้เพิ่มขึ้นอย่างมากในคนไข้ที่มีการติดเชื้ออย่างรุนแรง จึงมีการใช้ระดับของโปรตีน HMGB1 เป็นตัววัด (marker) เพื่อติดตามการเกิดภาวะรุนแรงของการติดเชื้อได้[28,30] ดังนั้นโปรตีน HMGB1 จึงเป็นเป้าหมายใหม่ที่สามารถพัฒนา เพื่อหาวิธีรักษาในโรคที่เกิดจากการอักเสบแบบเฉียบพลัน หรือโรคที่เกิดจากการติดเชื้อรุนแรงในกระแสเลือดได้ในอนาคต

บทสรุป

HMGB1 เป็นนิวเคลียร์โปรตีนที่ถูกปลดปล่อยโดยเซลล์แมคโครฟาจหรือโมโนไซต์ ในช่วงที่มีกระบวนการอักเสบเกิดขึ้น HMGB1 ประกอบด้วย ส่วน HMG box (A and B box) โดยส่วน HMGB1-Box A มีผลต่อการยับยั้งการทำงานของโปรตีนทั้งหมดของ HMGB1 ในการกระตุ้นเซลล์แมคโครฟาจให้หลั่งสารไซโตไคน์ที่กระตุ้นกระบวนการอักเสบ แตกต่างจากส่วน HMGB1-Box B สามารถกระตุ้นการหลั่งสารไซโตไคน์

โปรตีน HMGB1 มีส่วนเกี่ยวข้องกับการกระตุ้นการอักเสบ และเป็นสารที่สามารถตรวจวัดได้เมื่อมีการอักเสบหรือมีการทำงานของเนื้อเยื่อที่ถูกทำลาย ซึ่งน่าจะเป็นสารตัวหนึ่งที่ชี้วัดได้ว่าเกิดการทำงานของร่างกายที่บกพร่อง หรือนำไปสู่การตายของเซลล์อย่างเช่น ภายหลังจากภาวะติดเชื้อในกระแสเลือดรุนแรง กระบวนการปลดปล่อยสาร HMGB1 สู่ภายนอกเซลล์ทำได้สองวิธี คือ แบบไม่ใช้พลังงาน และแบบที่ใช้พลังงาน จากการศึกษาความสัมพันธ์ของ HMGB1 และโรคต่างๆ พบว่ามี ความเกี่ยวข้องกับโรคติดเชื้อรุนแรงในกระแสเลือด การอักเสบของปอด ภาวะข้ออักเสบ โรคมะเร็ง เป็นต้น การศึกษาการยับยั้งการทำงานของ HMGB1 พบว่าการใช้แอนติบอดีที่จำเพาะเจาะจง หรือการใช้ส่วนของ HMGB1-Box A ลดอัตราการตายจากภาวะติดเชื้อรุนแรงในกระแสเลือดได้ในหนูทดลอง นอกจากนี้การใช้สารสกัดจากรากชะเอมแสดงผลการจับกับโปรตีน HMGB1 ที่มีการหลั่งภายนอกเซลล์ และลดการอักเสบของเซลล์ตับในหนูทดลอง ดังนั้น HMGB1 จึงเป็นเป้าหมายใหม่ที่น่าสนใจ ควรมีการศึกษาเพิ่มเติมเพื่อพัฒนาไปสู่วิธีการรักษาอาการติดเชื้อรุนแรงหรือการอักเสบและนำไปสู่ยาใหม่ได้ในอนาคต

เอกสารอ้างอิง

1. Wang H, Li W, Goldstein R, Tracey KJ, Sama AE. HMGB1 as a potential therapeutic target. *Novartis Found Symp* 2007;280:73-85;discussion 85-91,160-164.
2. Yang H, Wang H, Czura CJ, Tracey KJ. HMGB1 as a cytokine and therapeutic target. *J Endotoxin Res* 2002;8 (6): 469-472.

3. Ulloa L and Messmer D. High-mobility group box 1 (HMGB1) protein: friend and foe. *Cytokine Growth Factor Rev* 2006;17 (3): 189-201.
4. Li J, Kokkola R, Tabibzadeh S, et al. Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1. *Mol Med* 2003;9(1-2):37-45.
5. Waga S, Mizuno S, Yoshida M. Chromosomal protein HMG1 removes the transcriptional block caused by the cruciform in supercoiled DNA. *J Biol Chem* 1990;265(32):19424-19428.
6. Bruhn SL, Pil PM, Essigmann JM, Housman DE, Lippard SJ. Isolation and characterization of human cDNA clones encoding a high mobility group box protein that recognizes structural distortions to DNA caused by binding of the anticancer agent cisplatin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992;89(6):2307-2311.
7. Ferrari S, Finelli P, Rocchi M, Bianchi ME. The active gene that encodes human high mobility group 1 protein (HMG1) contains introns and maps to chromosome 13. *Genomics* 1996;35(2):367-371.
8. Lotze MT, DeMarco RA. Dealing with death: HMGB1 as a novel target for cancer therapy. *Curr Opin Investig Drugs* 2003;4 (12): 1405-1409.
9. Erlandsson HH, Andersson U. Mini-review: The nuclear protein HMGB1 as a proinflammatory mediator. *Eur J Immunol* 2004;34 (6):1503-1512.
10. Ito T, Kawahara K, Nakamura T, et al. High-mobility group box 1 protein promotes development of microvascular thrombosis in rats. *J Thromb Haemost* 2007;5 (1):109-116.
11. Mantell LL, Parrish WR, Ulloa L. Hmgb-1 as a therapeutic target for infectious and inflammatory disorders. *Shock* 2006;25(1): 4-11.
12. Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice. *Science* 1999;285(5425):248-251.
13. Gardella S, Andrei C, Ferrera D, et al. The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway. *EMBO Rep* 2002;3(10): 995-1001.
14. Dumitriu IE, Baruah P, Manfredi AA, Bianchi ME, Rovere-Querini P. HMGB1: guiding immunity from within. *Trends Immunol* 2005; 26(7):381-387.
15. Logsdon CD, Fuentes MK, Huang EH, Arumugam T. RAGE and RAGE ligands in cancer. *Curr Mol Med* 2007;7(8):777-789.
16. Ellerman JE, Brown CK, de Vera M, et al. Masquerader: high mobility group box-1 and cancer. *Clin Cancer Res* 2007;13(10): 2836-2848.
17. Abraham E, Arcaroli J, Carmody A, Wang H, Tracey KJ.. HMG-1 as a mediator of acute lung inflammation. *J Immunol* 2000;165(6): 2950-2954.
18. Andersson U, Tracey KJ. HMGB1 as a mediator of necrosis-induced inflammation and a therapeutic target in arthritis. *Rheum Dis Clin North Am* 2004;30(3):627-637, xi.
19. Ulloa L, Batliwalla FM, Andersson U, Gregersen PK, Tracey KJ. High mobility group box chromosomal protein 1 as a nuclear protein, cytokine, and potential therapeutic target in arthritis. *Arthritis Rheum* 2003;48(4):876-881.
20. Kokkola R, Sundberg E, Ulfgren AK, et al. High mobility group box chromosomal protein 1: a novel proinflammatory mediator in synovitis. *Arthritis Rheum* 2002;46(10):2598-2603.
21. Flohr AM, Rogalla P, Meiboom M, et al. Variation of HMGB1 expression in breast cancer. *Anticancer Res* 2001;21(6A): 3881-3885.
22. Volp K, Brezniceanu ML, Bosser S, et al. Increased expression of high mobility group box 1 (HMGB1) is associated with an elevated level of the antiapoptotic c-IAP2 protein in human colon carcinomas. *Gut* 2006;55(2):234-242.
23. Czura CJ, Wang H, Tracey KJ. Dual roles for HMGB1: DNA binding and cytokine. *J Endotoxin Res* 2001;7(4):315-321.
24. Yang H, Ochani M, Li J, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(1):296-301.
25. Mollica L, De Marchis F, Spitaleri A, et al. Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. *Chem Biol* 2007;14(4):431-441.
26. Girard JP. A direct inhibitor of HMGB1 cytokine. *Chem Biol* 2007;14(4):345-347.
27. Sitia G, Iannacone M, Muller S, Bianchi ME, Guidotti LG. Treatment with HMGB1 inhibitors diminishes CTL-induced liver disease in HBV transgenic mice. *J Leukoc Biol* 2007;81(1):100-107.
28. Yamada S, Yakabe K, Ishii J, Imaizumi H, Maruyama I. New high mobility group box 1 assay system. *Clin Chim Acta* 2006;372(1-2):173-178.
29. Urbonaviciute V, Furnrohr BG, Weber C, et al. Factors masking HMGB1 in human serum and plasma. *J Leukoc Biol* 2007;81(1): 67-74.
30. Hatada T, Wada H, Nobori T, et al. Plasma concentrations and importance of High Mobility Group Box protein in the prognosis of organ failure in patients with disseminated intravascular coagulation. *Thromb Haemost* 2005;94(5):975-979.
31. Ferrari F, Bortoluzzi S, Coppe A, et al. Novel definition files for human GeneChips based on GeneAnnot. *BMC Bioinformatics* 2007;8:446.