

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2015.32.007

心肺复苏术后大鼠海马组织高迁移率族蛋白 B1 和 NF- $\kappa$ B 的表达及相关性分析\*侯安然,康秀文,陈晓兵,王言理,刘克喜 $\Delta$ 

(徐州医学院附属连云港医院重症监护室,江苏连云港 222002)

**[摘要]** **目的** 观察高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)、核转录因子(NF- $\kappa$ B)在心肺复苏术后大鼠海马组织内的表达,以期探讨其可能意义。**方法** 40 只 SD 大鼠分为假手术组和复苏组(按复苏后自主循环恢复后 2、6、12、24 和 48 h 各时间点分为 5 亚组)。在相应的时间点断头处死,取海马组织,HE 染色观察海马病理变化,RT-PCR 和 Western Blot 检测 HMGB1、NF- $\kappa$ B 水平表达,并对二者进行相关分析。**结果** 病理切片显示假手术组海马结构未见明显变化,复苏组存在缺血病理改变,24 h 最为显著,48 h 损伤仍比较重;与假手术组比较,复苏组海马 HMGB1、NF- $\kappa$ B mRNA 表达均呈先上升后下降的趋势,均于 24 h 达峰值( $P < 0.01$ );复苏组 HMGB1 蛋白表达在自主循环恢复后 2 h 显著降低,24 h 达到峰值,在 48 h 稍下降,差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );HMGB1 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达呈显著正相关。**结论** HMGB1/NF- $\kappa$ B 信号通路可能参与心肺复苏术后早期脑炎性损伤,干预此通路的靶向性治疗有望减轻心肺复苏术后脑炎性损伤。

**[关键词]** 心肺复苏术;NF- $\kappa$ B;高迁移率族蛋白 B1;神经炎症损伤**[中图分类号]** R446.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2015)32-4483-04Time-course of HMGB1 and NF- $\kappa$ B expression and its implication in the hippocampus of rats after cardiopulmonary resuscitation\*Hou Anran, Kang Xiuwen, Chen Xiaobing, Wang Yanli, Liu Kexi $\Delta$ 

(Department of ICU, Affiliated Lianyungang Hospital of Xuzhou Medical College, Lianyungang, Xuzhou 222002, China)

**[Abstract]** **Objective** To observe the changes of high mobility group box 1(HMGB1) and nuclear factor  $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B) expression in the hippocampus of rats after cardiopulmonary resuscitation so as to unravel the role of HMGB1 and NF- $\kappa$ B in neuroinflammation. **Methods** Totally 40 Sprague-Dawley rats were randomly divided into sham-operated group and recover group[including 2, 6, 12, 24 and 48 h of 5 sub-groups after restoration of spontaneous circulation(ROSC)]. The animals were sacrificed and hippocampus were removed at the indicated time. Pathological changes were observed at each time point. The expression of HMGB1 and NF- $\kappa$ B were determined using RT-PCR and Western blot respectively. **Results** There were no histopathological in the hippocampus of rats in sham-operated group, brain tissue appeared change of ischemia pathology in recover group, it was the most severest at ROSC 24 h and still obviously at ROSC 48 h time point. HMGB1 mRNA and NF- $\kappa$ B mRNA expression in the hippocampus of rats of recover group increased obviously along with the prolongation of time following ROSC and reached its peak at ROSC 24 h( $P < 0.01$ ), much higher than that of sham-operated group; the HMGB1 level in the hippocampus of rats after recover significantly declined at 2 h after ROSC and increased obviously at 6, 12 h and reached peak 24 h later, then decreased 48 h later( $P < 0.01$ ), there was positive correlation between the expression of HMGB1 and NF- $\kappa$ B protein. **Conclusion** HMGB1/NF- $\kappa$ B signaling pathway may play an important role in the early stages of brain injury after cardiopulmonary resuscitation. Targeted therapies of this pathway would be possible to open a new avenue for preventing neuroinflammation after recover.

**[Key words]** cardiopulmonary resuscitation; NF- $\kappa$ B; high mobility group box 1; neuroinflammation

心搏骤停(sudden cardiac arrest, SCA)一直是威胁人类生命健康的重大问题<sup>[1]</sup>。随着医疗体系的完善与心肺复苏技术的规范化,院外及院内的 SCA 患者心肺复苏成功率得到一定的提高,但在自主循环恢复后的患者中大约仍有 68% 的院外和 23% 院内 SCA 患者死于脑损伤<sup>[2]</sup>。近年来关于心肺复苏术后全脑缺血损伤研究涉及了能量代谢异常、炎症反应、钙离子超载、神经细胞凋亡等诸多方面,其中心肺复苏术后脑组织内炎症瀑布效应备受关注<sup>[3-4]</sup>。研究报道胞外高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)表现炎症因子样作用与多种炎症介质共同参与炎症

反应<sup>[5-6]</sup>。既往研究证实,在脑出血、脑卒中及脑膜炎患者的外周血和脑脊液中 HMGB1 水平均显著升高<sup>[7-9]</sup>。近年来发现在心肺复苏术后患者脑脊液和血液中 HMGB1 水平亦显著升高<sup>[10]</sup>。但是,对心肺复苏术后脑组织 HMGB1 表达规律尚未见相关研究报道。本研究通过窒息法制备大鼠 SCA 模型,检测心肺复苏术后大鼠不同时间点海马组织内 HMGB1 和核转录因子(NF- $\kappa$ B)表达及其相关性,同时观察病理形态学改变,初步探讨 HMGB1 和 NF- $\kappa$ B 在心肺复苏术后脑炎性损伤中的作用,为临床治疗心肺复苏术后脑炎性损伤寻求潜在的治疗新靶点。

\* 基金项目:江苏省连云港市科技局科研基金资助项目(sh1001)。

作者简介:侯安然(1988—),硕士,主要从事心肺复苏方面的基础研究。

 $\Delta$  通讯作者, E-mail: Liukexi2006@163.com。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 清洁级、雄性 SD 大鼠 40 只,体质量 200~280 g (徐州医学院动物实验中心,合格证号:苏 SCXK2010-0003); Trizol 试剂和逆转录试剂盒(北京天根公司);HMGB1 和 NF- $\kappa$ B PCR 引物(上海生物工程公司);RIPA 裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、蛋白质分子量标准、碱性磷酸酶标记山羊抗兔 IgG 和 BCIP/NBT 显色试剂盒(中国碧云天生物技术研究 所);兔抗大鼠 HMGB1 抗体(美国 Abcam 公司),兔抗鼠 NF- $\kappa$ B 抗体(武汉三鹰生物技术有限公司),兔抗大鼠  $\beta$ -actin 抗体(巴傲德生物技术有限公司);呼吸机(BW 动物呼吸,上海软隆 有限公司制造)。

### 1.2 方 法

**1.2.1 分组** 采用随机数字表法分为假手术组( $n=6$ )、复苏组(按复苏后自由循环恢复后 2、6、12、24 和 48 h 各时间点分为 5 亚组, $n=6$ )。

**1.2.2 模型制备** 在实验大鼠腹腔注射 10%水合氯醛 3 mL/kg 麻醉,将大鼠仰卧位固定于手术台上,四肢接心电图导联,监测标准肢体 II 导联。颈部正中切口,气管切开置管固定,接呼吸机。行右侧股动、静脉置管,动脉导管接压力传感器,显示动脉压波形,待大鼠血压和心率稳定后,假手术组开始计时实验。复苏组继续于呼气末夹闭大鼠气管导管制备窒息性 SCA 模型,并给予心肺复苏,在自主循环恢复后开始计时实验。初始继续以纯氧机械通气 60 min,后剪断气管导管(体外留 1 cm 供通气),结扎股动、静脉,缝合皮肤切口,送回鼠笼饲养。

**1.2.3 标准** SCA 判断标准:心电图呈室颤、停搏,收缩压小于或等于 25 mm Hg。心肺复苏标准方法:在出现 SCA,且夹闭气管插管 8 min 后开放气道,呼吸机控制通气(纯氧),频率每分钟 80 次,潮气量 6 mL/kg,吸/呼比 1:2,并快速行人工胸外按压,按压频率为每分钟 200 次,按压深度为大鼠胸廓前后径 1/3,同时经股静脉快速推注肾上腺素 0.02 mg/kg,必要时追加 1 次。自主循环恢复判断标准:心电图出现自主节律,收缩压大于 60 mm Hg,持续 10 min 以上。复苏无效判定:持续复苏 30 min 无效终止抢救。大鼠补充标准:假手术组、复苏组在留取标本之前发生死亡的,该动物的实验数据无效,则另进行补充实验,以满足每个亚组实验数据 6 只。

**1.2.4 标本留取** 假手术组大鼠操作成功 20 min 后留取静脉血 5 mL,断头留取脑组织。复苏组在模型制备成功后于各时间点留取标本:麻醉后取下腔静脉血 5 mL,并断头处死,取左侧海马,-80℃保存;取右侧海马放 4%多聚甲醛固定备用。

**1.2.5 光镜下观察海马组织病理变化** 海马(右)常规进行 HE 染色。以假手术组海马组织病理变化为参照,观察各时间点复苏组海马组织病理变化。

**1.2.6 RT-PCR 法检测大鼠海马组织 HMGB1、NF- $\kappa$ B mRNA 表达** 按照 RT-PCR 试剂盒操作说明,HMGB1 mRNA 反应条件为:94℃预变性 5 min,94℃变性 30 s,退火 59℃30 s,延伸 72℃60 s,共进行 27 个循环,最后 72℃延伸 10 min。NF- $\kappa$ B mRNA 反应条件为:94℃预变性 5 min,94℃变性 50 s,退火 53℃45 s,延伸 72℃60 s,共 28 个循环,最后 72℃延伸 8 min。引物序列及 PCR 条件见表 1。扩增的 PCR 产物在 2%琼脂糖电泳后,采用凝胶成像分析系统观察电泳结果,Quantity One 分析软件进行分析,以目的基因/GAPDH 为本基因表达的相对值。

表 1 RT-PCR 引物序列及条件

基因	引物序列	T (°C)	PCR 产物 (bp)
HMGB1	Forward	59.0	214
	Reverse		
NF- $\kappa$ B	Forward	57.0	175
	Reverse		
GAPDH	Forward	58.3	595
	Reverse		

### 1.2.7 Western Blot 检测大鼠海马组织 HMGB1、NF- $\kappa$ B 表达

按照 RIPA 裂解液说明书提取蛋白,BCA 法定量蛋白,配制 12%分离胶,5%浓缩胶,样品上样量为 5  $\mu$ L(约 30  $\mu$ g),80 V 下电泳 30 min,120 V 下电泳至溴酚蓝到胶底,转膜 300 mA (60 min),室温下封闭 90 min,加一抗 4℃孵育过夜,碱性磷酸酶标记山羊抗兔二抗(1:1 000)室温下孵育 90 min,洗膜、BCIP/NBT 显色。扫描后将目的蛋白条带与内参蛋白( $\beta$ -actin)条带吸光度比值以  $\bar{x} \pm s$  表示。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 16.0 统计软件进行实验数据分析处理。计量资料用  $\bar{x} \pm s$  表示,两样本均数比较采用  $t$  检验,多个样本均数比较采用单因素方差分析,多组计量资料间的多重比较采用 LSD- $q$  检验;若方差不齐采用随机区组设计的秩和检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

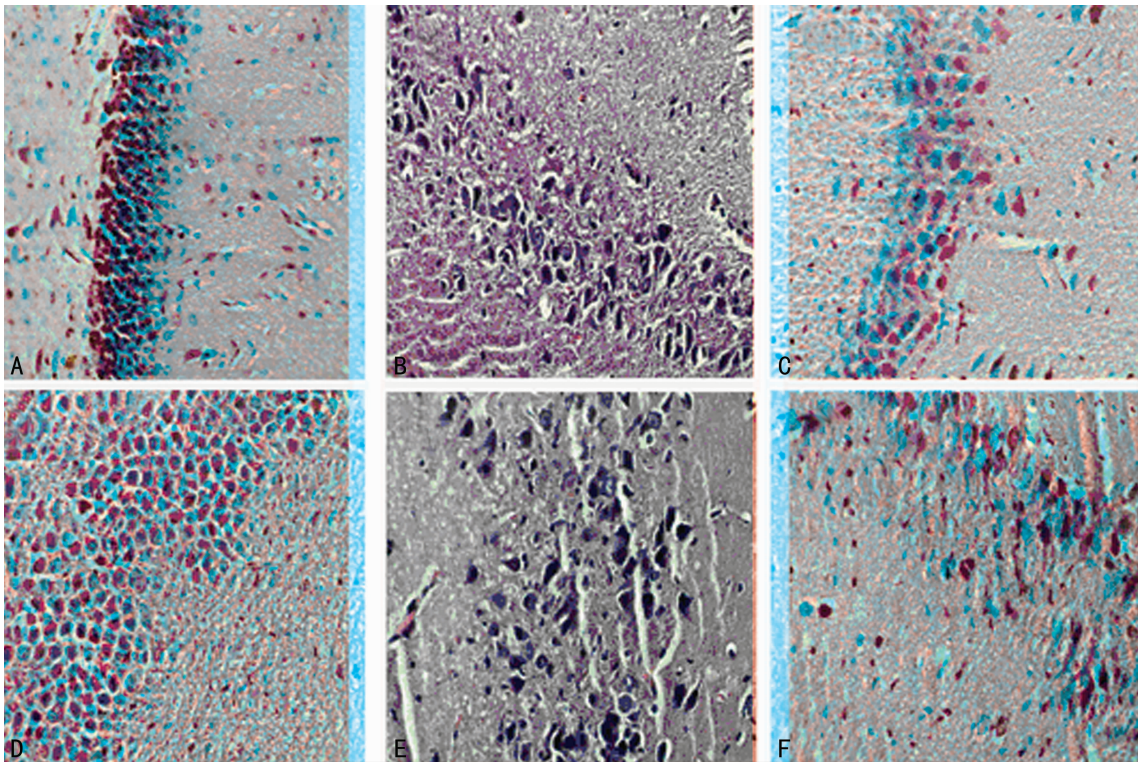
## 2 结 果

**2.1 海马组织病理切片结果** 假手术组神经细胞排列整齐,形态完好,圆形或椭圆形,核染色较淡,染色质分布较均匀,尼氏体分布正常,未见细胞肿胀及变性坏死等病理改变。复苏组海马组织存在缺血性病理改变,随着自主循环恢复延长光镜下细胞周围间隙出现增宽,形态不规则,组织结构疏松,间质水肿,胞质结构不清,尼氏体边缘或消失,核固缩,神经细胞出现变性坏死,以自主循环恢复后 24 h 最为显著,自主循环恢复后 48 h 水肿减轻,但损伤仍较重,间质胶原纤维增多,见图 1。

**2.2 大鼠海马组织 HMGB1、NF- $\kappa$ B mRNA 表达变化** 与假手术组比较,复苏组自主循环恢复后 2、6、12、24 和 48 h 的海马 HMGB1、NF- $\kappa$ B mRNA 表达量均明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),其中 24 h 为峰值( $P < 0.01$ ),在 48 h 略下降( $P < 0.01$ ),见图 2。

**2.3 大鼠海马组织 HMGB1、NF- $\kappa$ B 蛋白表达变化** 与假手术组比较,海马组织 HMGB1 在复苏组自主循环恢复后 2 h 蛋白表达显著降低( $P < 0.01$ ),24 h 达到峰值( $P < 0.01$ ),48 h 稍下降( $P < 0.01$ )。与假手术组比较,复苏组自主循环恢复后 2、6、12、24 和 48 h 的 NF- $\kappa$ B 蛋白表达量均明显增高,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ),其中 24 h 为峰值( $P < 0.01$ ),48 h 略下降( $P < 0.01$ ),见图 3。

**2.4 HMGB1 和 NF- $\kappa$ B 蛋白表达间的相关性分析** 复苏组各时间点海马组织 HMGB1 与 NF- $\kappa$ B 蛋白表达趋势相同,相关性分析显示二者呈正相关( $r=0.978, P=0.000$ )。



A:假手术组;B:复苏组 2 h;C:复苏组 6 h;D:复苏组 12 h;E:复苏组 24 h;F:复苏组 48 h。

图 1 各组海马组织病理形态学变化(HE×400)

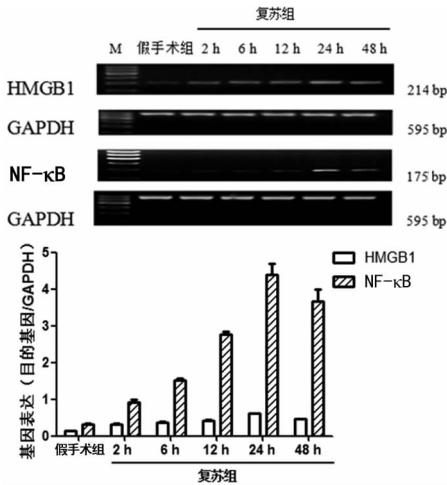


图 2 各组海马组织 HMGB1、NF-κB mRNA 表达比较

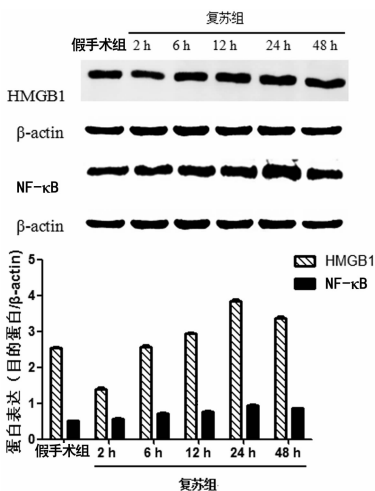


图 3 各组海马组织 HMGB1、NF-κB 蛋白表达比较

### 3 讨论

HMGB1 是一种高度保守的非组 DNA 结合蛋白,广泛存在于真核细胞核,参与基因转录、修复和核酸结构稳定等多种生物学过程。近年来研究表明胞内 HMGB1 释放到胞外则作为一种炎症因子在炎症反应瀑布中处于核心地位,在启动早期炎症反应、扩大和维持晚期炎症反应过程中均发挥重要作用<sup>[11]</sup>。又有研究表明 HMGB1 作为一种重要的炎症因子在脑梗死病情发展转归过程中能激活其他炎症介质,放大炎症反应,加剧脑损伤<sup>[12]</sup>。

本研究显示心肺复苏术后大鼠海马组织 HMGB1 蛋白表达水平于 2 h 降低,而后逐渐上升,24 h 达到高峰,在 48 h 略下降,但仍高于正常水平。本研究与 Wang 等<sup>[13]</sup>报道类似,但不同之处为本研究自主循环恢复后 2 h HMGB1 蛋白表达量降低,而 Wang 等<sup>[13]</sup>研究则为 2 h 时升高,原因可能为制作动物模型方式不同和缺血时间长短不同。SCA 所致为全脑缺血缺氧,其缺血面积及损伤程度更为显著,在心肺复苏术后早期阶段,神经细胞、胶质细胞及内皮细胞等出现缺血受损或坏死, HMGB1 迅速从胞核转移至胞质被动释放至胞外、耗竭,而后释放出来的 HMGB1 进一步激活小胶质细胞和其他免疫细胞主动分泌 HMGB1、炎症因子共同介导心肺复苏术后脑炎症损伤。从而出现心肺复苏术后海马组织 HMGB1 表达呈现明显的早期降低、晚期升高的趋势,有关研究也得到类似观点<sup>[14]</sup>。以上研究均提示 HMGB1 是触发心肺复苏术后脑缺血早期炎症反应的上游始动因子。HMGB1 基因表达呈现持续升高趋势,在 48 h 略下降,与蛋白表达趋势类似。

NF-κB 是一种功能多样的核转录因子,基础状态下主要存在于真核细胞胞质,在活化因素的激活下可迅速从胞质转移至胞核与相应的 DNA 结合位点特异性结合,随后启动、调控炎症因子的表达,造成组织损伤。然而升高的炎症因子反过来可

充当活化因素再次激活 NF- $\kappa$ B 形成一种正反馈途径不断地促进炎症的发生、发展,可见 NF- $\kappa$ B 是炎性反应的中心环节。脑缺血能诱导 NF- $\kappa$ B 的激活,激活的 NF- $\kappa$ B 在脑缺血无菌性炎性损伤<sup>[15]</sup>、脑水肿、神经细胞凋亡等方面均发挥着重要作用。

本研究得出 NF- $\kappa$ B 在心肺复苏术后海马组织蛋白表达随着自主循环恢复时间延长逐渐上升,24 h 为峰值,后缓慢下降,其基因表达与蛋白表达一致,与 Wang 等<sup>[13]</sup>的研究结果一致。NF- $\kappa$ B 与 HMGB1 蛋白表达相关性分析显示二者呈显著正相关( $r=0.978, P=0.000$ )。HE 染色观察大鼠心肺复苏术后脑缺血病理改变与海马组织中 HMGB1、NF- $\kappa$ B 表达变化趋势基本一致,从病理形态学方面支持以上结论。另外研究发现胞外的 HMGB1 可与受体 RAGE、TLR2/4 等结合通过不同信号通路介导 NF- $\kappa$ B 活化<sup>[16]</sup>。以上提示 HMGB1 位于 NF- $\kappa$ B 上游,进而推测在心肺复苏术后早期由受损、坏死的细胞被动释放的 HMGB1 是启动心肺复苏术后早期脑炎性反应的主要炎性因子。

综上所述, HMGB1 和 NF- $\kappa$ B 在心肺复苏术后大鼠海马组织中变化趋势一致,并且二者之间呈显著正相关性,表明 HMGB1/NF- $\kappa$ B 信号通路可能参与了心肺复苏术后早期脑炎性损伤,进而加剧脑组织损害。若在此时间窗内给予针对 HMGB1/NF- $\kappa$ B 信号通路的靶向治疗有望减轻心肺复苏术后脑炎性损伤、改善神经功能预后。但本研究仍需延长观察时间,扩大样本量,设计通道“分子开关”做进一步地研究探索、证实。

#### 参考文献

- [1] Lloyd-Jones D, Adams RJ, Brown TM, et al. American Heart Association Statistics Committee and Stroke Statistics Subcommittee[J]. Circulation, 2010, 121(7):948-954.
- [2] Wang Q, Tang XN, Yenari MA. The inflammatory response in stroke [J]. J Neuroimmunol, 2007, 184(1/2):53-68.
- [3] Xia W, Han J, Huang G, et al. Inflammation in ischemic brain injury: current advances and future perspectives[J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2010, 37(2):253-258.
- [4] 梁璐,于学忠. 脑复苏的临床研究进展[J]. 中国全科医学, 2006, 9(20):1664-1667.
- [5] Qiu J, Nishimura M, Wang Y, et al. Early release of HMGB1 from neurons after the onset of brain ischemia [J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2008, 28(5):927-938.
- [6] 杨丽萍,姚永明,李杰萍,等. 高迁移率族蛋白 B1 真核表

- 达载体的构建及其对肿瘤坏死因子- $\alpha$  报告基因活性的影响[J]. 中国中西医结合急救杂志, 2008, 15(3):171-174.
- [7] Kentaro M, Masayo K, Travis M, et al. Subarachnoid hemorrhage induces gliosis and increased expression of the pro-inflammatory cytokine high mobility group box 1 protein[J]. Transl Stroke Res, 2011, 2(1):72-79.
- [8] Kim ID, Shin JH, Lee HK, et al. Intranasal delivery of HMGB1-binding heptamer peptide confers a robust neuroprotection in the post ischemic brain[J]. Neurosci Lett, 2012, 525(2):179-183.
- [9] Tang D, Kang R, Cao L, et al. A pilot study to detect high mobility group box1 and heat shock protein 72 in cerebrospinal fluid of pediatric patients with meningitis[J]. Crit Care Med, 2008, 36(1):291-295.
- [10] Yasutaka O, Resume T, Fujita M, et al. Prediction of the neurological outcome with intrathecal high mobility group box1 and S100B in cardiac arrest victims: A pilot study [J]. Resuscitation, 2012, 83(8):1006-1012.
- [11] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice[J]. Science, 1999, 285(5425):248-251.
- [12] Zhang J, Takahashi HK, Liu K, et al. Anti-high mobility group box-1 monoclonal antibody protects the blood-brain barrier from ischemia-induced in rats[J]. Stroke, 2011, 42(5):1420-1428.
- [13] Wang L, Zhang X, Liu L, et al. Tanshinone II A down-regulates HMGB1, RAGE, TLR4, NF- $\kappa$ B expression, ameliorates BBB permeability and endothelial cell function, and protects rat brains against focal ischemia [J]. Brain Res, 2010, 132(1):143-151.
- [14] Kim JB, Siq Choi J, Yu YM, et al. HMGB1, a novel cytokine-like mediator Linking cute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain[J]. J Neurosci, 2006, 26(24):6413-6421.
- [15] Ridder DA, Schwaninger M. NF-kappa B signaling in cerebral ischemia[J]. Neuroscience, 2009, 158(3):995-1006.
- [16] Yang QW, Wang JZ, Li JC, et al. High-mobility group protein box-1 and its relevance to cerebral ischemia[J]. J Cereb Blood Flow Metab, 2010, 30(2):243-254.

(收稿日期:2015-07-12 修回日期:2015-09-02)

## 2015 年本刊投稿须知

尊敬的广大读者,本刊一律接受网上投稿,不再接受纸质和电子邮箱投稿!请您直接登陆网站 <http://cqyx.journalserv.com/> 进行注册投稿以及稿件查询。咨询电话:023-63604477。

来稿须将审稿费 100 元通过邮局或支付宝汇至本刊编辑部,编辑部若未收到审稿费,稿件将不予处理。

感谢您对本刊工作的支持!