

论著·临床研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2017.31.006

HMGB1 与炎症因子在脊髓损伤患者血清中的表达及临床意义*

王良勇¹,李建刚¹,张春¹,张俊¹,杜红军¹,崔操²,陈森³

(1.新疆维吾尔自治区阿克苏市兵团第一师医院创伤骨科,新疆阿克苏 843000;2.湖北省十堰市太和医院骨科 442000;3.湖北医药学院附属东风医院骨科,湖北十堰 442000)

[摘要] **目的** 探讨高迁移率族蛋白 1(HMGB1)在脊髓损伤患者血清中的表达及其临床意义。**方法** 收集 2007 年 1 月至 2014 年 1 月在新疆维吾尔自治区阿克苏市兵团第一师医院就诊的 87 例脊髓损伤患者作为脊髓损伤组,脊髓损伤的严重程度根据美国脊髓损伤协会(ASIA)残损分级进行评估,分别于脊髓损伤后 1、3、7 d 行静脉采血,另外取 87 例健康成年人血清做对照组,酶联免疫吸附试验检测患者血清中 HMGB1、白细胞介素(IL)-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平,并分析 HMGB1 与 IL-1 β 、IL-6、TNF- α 的相关性及患者损伤程度的关系。**结果** 脊髓损伤组伤后 1、3、7 d 的 HMGB1、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均较高。脊髓损伤患者血清中 HMGB1 和 IL-6 水平在损伤后 1 d 明显升高,在 3 d 时水平达峰值;IL-1 β 和 TNF- α 在伤后 1 d 最高,3、5 d 后逐渐降低。相关性分析表示伤后 1、3 d 中 HMGB1 水平与 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平呈正相关($P < 0.05$)。髓损伤后 1、3 d,患者血清中 HMGB1 水平与脊髓损伤的严重程度密切相关($P < 0.05$),脊髓损伤的程度越重,患者血清中的 HMGB1 水平越高。**结论** HMGB1 在早期脊髓损伤患者血清中的水平显著升高,并可作为早期脊髓损伤严重程度的评估指标之一。

[关键词] HMGB1 蛋白质;白细胞介素 6;肿瘤坏死因子 α ;脊髓;脊髓损伤**[中图分类号]** R651.2**[文献标识码]** A**[文章编号]** 1671-8348(2017)31-4339-03**Expression and clinical significance of serum HMGB1 and inflammatory factors in patients with spinal cord injury***Wang Liangyong¹, Li Jiangan¹, Zhang Chun¹, Zhang Jun¹, Du Hongjun¹, Cui Cao², Chen Sen³

(1. Department of Traumatic Orthopedics, Aksu Corps First Division Hospital, Aksu, Xinjiang 843000, China; 2. Department of Orthopedics, Taihe Hospital, Shiyan, Hubei 442000, China; 3. Department of Orthopedics, Affiliated Dongfeng Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan, Hubei 442000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the expression and clinical significance of serum high-mobility group box 1(HMGB1) in the patients with spinal cord injury (SCI). **Methods** A total of 87 cases of acute SCI treated in the Aksu Corps First Division Hospital from January 2007 to January 2014 were collected as the SCI group. The SCI severity was evaluated according to the damage grade by the American Spinal Cord Injury Association(ASIA). Venous blood was collected on 1, 3, 7 d after SCI. Other 87 healthy adults served as the control group. The expression levels of serum HMGB1, interleukin-6 (IL-6), IL-1 β and tumor necrosis factor alpha (TNF- α) in the two groups were measured by ELISA. Then the correlation between the HMGB1 expression level with IL-1 β , IL-6 and TNF- α and the relation between HMGB1 with SCI severity were analyzed. **Results** The HMGB1, IL-6, IL-1 and TNF- α levels on 1, 3, 7 d after SCI in the SCI group were higher. The expression levels of serum HMGB1 and IL-6 on 1 d after SCI in the SCI patients were significantly increased, and reached the peak value on 3 d; the levels of IL-1 β and TNF- α on 1 d after SCI were highest, and gradually decreased on 3, 5 d. The correlation analysis showed that the expression levels of HMGB1 on 1, 3 d after SCI were positively correlated with the IL-6, IL-1 β and TNF- α expression levels($P < 0.05$). The serum HMGB1 expression level on 1, 3 d after SCI was closely correlated with the SCI severity ($P < 0.05$). The severe the SCI severity, the higher the serum HMGB1 expression level. **Conclusion** The expression level of serum HMGB1 in the patients with early SCI is significantly increased, and can be used as one of indicators for assessing the severity of early SCI.

[Key words] high-mobility group box 1; interleukin-6; tumor necrosis factor-alpha; spinal cord; spinal cord injury

脊髓损伤在我国具有较高的发病率^[1],研究发现脊髓损伤的病理机制包括原发性脊髓损伤和继发性脊髓损伤,原发性脊髓损伤是外部暴力当时造成的损伤,是不能通过医学治疗手段改变的;继发性损伤是脊髓损伤后数小时至数天内发生的,目前研究的重点主要集中在在这方面。尽管现代医学的发展使更多脊髓损伤患者从原发性损伤中存活下来,但是幸存患者的生活自理能力往往明显下降,严重影响了患者的生存质量,并给家庭和社会带来一定的负担。因此,深入、全面地了解脊髓损伤发生的具体病理机制,开发出确切有效的药物是脊髓治疗中亟须解决的问题。高迁移率族蛋白 1(HMGB1)是一种强大的

致炎因子,在脊髓损伤的继发性损害中发挥重要的作用^[2],本文通过探讨其在血清中的表达及意义,以期更深入地了解其在脊髓损伤中的作用,为脊髓损伤患者的诊疗带来新的思路。

1 资料与方法

1.1 一般资料 选取 2007 年 1 月至 2014 年 1 月在新疆维吾尔自治区阿克苏市兵团第一师医院接受住院治疗的脊髓损伤患者 87 例作为脊髓损伤组。其中男 50 例,女 37 例,年龄 18~60 岁,平均(42.3 \pm 13.5)岁;高处坠落伤 40 例,车祸 41 例,跌倒损伤 6 例;根据美国脊髓损伤协会(ASIA)残损分级法,A 级 26 例,B 级 20 例,C 级 21 例,D 级 20 例;颈椎损伤患者 27 例,

* 基金项目:湖北省教育厅课题(B20112106)。 作者简介:王良勇(1980—),副主任医师,在读硕士,主要从事骨科方面研究。

表 1 两组血清中的 HMGB1、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 的表达水平($\bar{x}\pm s$)

组别	n	HMGB1(ng/mL)	IL-6(pg/mL)	IL-1 β (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
对照组	30	6.11 \pm 0.79	2.36 \pm 0.39	12.91 \pm 2.09	7.67 \pm 0.86
脊髓损伤组					
伤后 1 d	87	12.73 \pm 2.12 ^a	5.81 \pm 1.02 ^a	29.43 \pm 4.23 ^a	51.13 \pm 6.98 ^a
伤后 3 d	87	13.51 \pm 2.13 ^a	6.95 \pm 1.13 ^a	27.23 \pm 4.01 ^a	46.91 \pm 6.21 ^a
伤后 7 d	87	7.14 \pm 1.03 ^a	3.18 \pm 0.45 ^a	15.64 \pm 3.45 ^a	39.77 \pm 3.24 ^a

^a: $P < 0.05$, 与对照组比较

胸腰椎损伤患者 60 例; 20 例患者采用非手术治疗, 67 例患者采用手术治疗(主要根据患者的具体情况决定行前路减压或者后路减压手术); 从创伤到入院时间为(12.8 \pm 4.1)h。入选标准: 外伤致脊髓损伤, 均经过 CT 和磁共振成像(MRI)确诊; 排除标准: 颅脑外伤并伴有认知功能障碍的患者。另选同期在本院进行健康体检的健康者 87 例作为对照组, 其中男 54 例, 女 33 例, 年龄 18~62 岁, 平均(42.9 \pm 11.3)岁。两组一般资料比较差异无统计学意义($P > 0.05$), 具有可比性。本研究均经患者或其家属知情和同意, 并通过本院伦理委员会批准。

1.2 方法

1.2.1 血液标本收集 分别于脊髓损伤后 1、3、7 d 空腹抽取肘静脉血 10 mL 于肝素抗凝管中, 对照组晨起空腹抽取静脉血 10 mL, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离的血清于 -80 °C 冰箱中保存待检。

1.2.2 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清中 HMGB1、白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α)蛋白的表达 人 HMGB1、IL-1 β 、IL-6 和 TNF- α 的 ELISA 试剂盒购自联科生物科技有限公司, 操作严格按照试剂盒说明书进行, 测量前将试剂盒及标本平衡至室温, 标本用标本稀释液 1:1 稀释后加入 50 μ L 于反应孔内, 加入稀释后的标准品 50 μ L 于反应孔, 加入待测样品 50 μ L 于反应孔内。立即加入 50 μ L 的生物素标记的抗体。盖上膜板, 轻轻振荡混匀, 37 °C 温育 1 h。甩去孔内液体, 每孔加满洗涤液, 振荡 30 s, 甩去洗涤液, 用吸水纸拍干。重复此操作 3 次。如果用洗板机洗涤, 洗涤次数增加 1 次, 每孔加入 80 μ L 的亲合链酶素, 轻轻振荡混匀, 37 °C 温育 30 min。甩去孔内液体, 每孔加满洗涤液, 振荡 30 s, 甩去洗涤液, 用吸水纸拍干。重复此操作 3 次。每孔加入底物 A、B 各 50 μ L, 轻轻振荡混匀, 37 °C 温育 10 min。避免光照。取出酶标板, 迅速加入 50 μ L 终止液, 加入终止液后应立即测定结果。在 450 nm 波长处测定各孔的光密度值(OD 值)。以 OD 值为纵坐标, 以标准品浓度为横坐标绘制标准曲线, 根据血浆样品的 OD 值在标准曲线上查出其对应的浓度。

1.2.3 脊髓损伤后神经功能的评定 本研究对象脊髓损伤的严重程度按照 ASIA 分级标准进行评估^[3]。A: 完全性损伤, 骶段 S₄~S₅ 无任何运动及感觉功能保留; B: 不完全性损伤神经平面以下, 包括骶段 S₄~S₅ 存在感觉功能, 但无任何运动功; C: 损伤神经平面以下有运动功能保留, 一半以上的关键肌肌力小于 3 级; D: 损伤神经平面以下有运动功能保留, 一半以上的关键肌肌力大于或等于 3 级; E: 正常, 感觉和运动功能正常。

1.3 统计学处理 采用 SPSS17.0 统计软件进行分析。计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示, 组间比较采用单因素方差分析, HMGB1 与 IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的关系采用 Spearman 相关性分析, 检验水准 $\alpha = 0.05$, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清中的 HMGB1、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平分析 与对照组相比, 脊髓损伤组伤后 1、3、7 d 的 HMGB1、IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平均较高($P < 0.05$)。脊髓损伤患者血清中 HMGB1 和 IL-6 水平在损伤后 1 d 明显升高, 在 3 d 后水平达峰值; IL-1 β 和 TNF- α 水平在伤后 1 d 最高, 3、5 d 后逐渐降低(表 1)。相关性分析显示伤后 1、3 d 中 HMGB1 水平与 IL-6、IL-1 β 和 TNF- α 水平呈正相关($P < 0.05$), 见表 2。

2.2 不同程度脊髓损伤患者血清中的 HMGB1 水平 脊髓损伤后 1、3 d, 患者血清中 HMGB1 水平与脊髓损伤的严重程度密切相关($P < 0.05$), 脊髓损伤的程度越重, 患者血清中的 HMGB1 水平越高, 见表 2。

表 2 不同程度脊髓损伤患者血清中 HMGB1 水平

脊髓损伤后时间	ASIA 分级	n	HMGB1 ($\bar{x}\pm s$, ng/mL)	P
伤后 1 d	A	26	10.23 \pm 1.76	<0.01
	B	20	10.65 \pm 1.81	
	C	21	12.69 \pm 1.93	
	D	20	13.21 \pm 2.37	
伤后 3 d	A	26	11.34 \pm 2.01	<0.01
	B	20	11.51 \pm 2.03	
	C	21	13.12 \pm 2.15	
	D	20	13.68 \pm 2.21	
伤后 7 d	A	26	6.56 \pm 0.98	0.11
	B	20	6.61 \pm 0.87	
	C	21	6.96 \pm 1.12	
	D	20	7.21 \pm 1.07	

3 讨论

继发性脊髓损伤的机制包括免疫炎性反应机制、氧化自由基脂质过氧化反应损伤、钙离子内流学说机制、兴奋性氨基酸毒性作用和脊髓微循环障碍, 其中, 免疫炎性反应在脊髓损伤中的作用逐渐受到重视^[4]。脊髓损伤后, 淋巴细胞和中性粒细胞通过破坏的血脊髓屏障浸润到脊髓组织, 释放出大量的炎性细胞因子、弹性蛋白酶和活性氧加重脊髓损伤的程度; 另一方面, 脊髓组织固有的小胶质细胞和星形胶质细胞在脊髓损伤后激活, 也产生大量的炎性细胞因子。在炎性细胞因子中目前作用研究比较确切的主要是 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6^[5], 它们在脊髓损伤的血清和脊髓组织中水平均增加^[6], TNF- α 可以通过损害内皮细胞及活化中性粒细胞加重脊髓组织的损坏, 此外还可以通过诱导 IL-1 β 和 IL-6 的表达, 抑制 TNF- α 的表达显著改善脊髓损伤的预后; IL-1 β 同样可以加重脊髓损伤的程度, 抑制其表达可以减少脊髓神经元的凋亡; IL-6 具有致炎作用, 它

促进炎性细胞浸润损伤局部,同时抑制神经功能的恢复,抑制其表达,可以显著改善脊髓损伤的神经功能评分^[7]。本研究结果发现,IL-1 β ,IL-6 和 TNF- α 在脊髓损伤患者的血清中水平明显升高,这与以往研究结果具有一致性。

HMGB1 是一组与染色质相结合的组蛋白,一般情况下主要位于细胞核内,起到稳定染色质的作用,在细胞受到外界信号刺激及坏死时可以从细胞核内转移到胞质中,进而释放到细胞外液中,一旦被释放到细胞外液中, HMGB1 能够启动一系列炎症相关的信号通路,加重炎症反应^[8]。HMGB1 在脊髓损伤灶周围的组织中水平明显升高,抑制其表达可以显著改善脊髓损伤的预后,多中心的研究认为 HMGB1 可以作为脊髓损伤治疗的靶点^[9]。以往研究发现血清中 HMGB1 水平在脑创伤、缺血性脑卒中和蛛网膜下腔出血等中枢神经系统急性损伤患者中明显升高^[10-12],并且与患者的病情严重程度密切相关。本研究结果发现, HMGB1 在脊髓损伤患者的血清中同样存在高表达,并且与下游炎性因子 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6 水平密切相关,此外, HMGB1 与脊髓损伤患者的病情严重程度同样存在显著相关性,脊髓损伤程度重的患者其血清中水平明显高于损伤轻的患者,提示早期检测患者血清中 HMGB1 对于判断脊髓损伤病情的轻重具有重要意义。

综上所述, HMGB1 在脊髓损伤患者的血清中水平明显升高,并与 TNF- α 、IL-1 β 及 IL-6 存在显著相关性,此外研究发现 HMGB1 水平与脊髓损伤患者的严重程度密切相关,提示早期检测 HMGB1 可能有助于判断脊髓损伤患者的预后。

参考文献

[1] 焦新旭,冯世庆. 创伤性脊髓损伤的流行病学研究进展[J]. 实用医学杂志,2011,27(7):1303-1305.
 [2] Fang P, Schachner M, Shen YQ. HMGB1 in development and diseases of the central nervous system[J]. Mol Neurobiol,2012,45(3):499-506.
 [3] Jia JP, Meng R, Sun YX, et al. Cerebrospinal fluid tau, Abeta1-42 and inflammatory cytokines in patients with Alzheimer's disease and vascular dementia[J]. Neurosci Lett,2005,383(1/2):12-16.
 [4] Neefkes-Zonneveld CR, Bakkum AJ, Bishop NC, et al.

Effect of long-term physical activity and acute exercise on markers of systemic inflammation in persons with chronic spinal cord injury: a systematic review[J]. Arch Phys Med Rehabil,2015,96(1):30-42.

[5] Gaudet AD, Popovich PG. Extracellular matrix regulation of inflammation in the healthy and injured spinal cord[J]. Exp Neurol,2014,258(6):24-34.
 [6] Davies AL, Hayes KC, Dekaban GA. Clinical correlates of elevated serum concentrations of cytokines and autoantibodies in patients with spinal cord injury[J]. Arch Phys Med Rehabil,2007,88(11):1384-1393.
 [7] Kikuchi K, Uchikado H, Miura N, et al. HMGB1 as a therapeutic target in spinal cord injury: A hypothesis for novel therapy development[J]. Exp Ther Med,2011,2(5):767-770.
 [8] Nakahara T, Tsuruta R, Kaneko T, et al. High-mobility group box 1 protein in CSF of patients with subarachnoid hemorrhage[J]. Neurocrit Care,2009,11(3):362-368.
 [9] Huang JM, Hu J, Chen N, et al. Relationship between plasma high-mobility group box-1 levels and clinical outcomes of ischemic stroke[J]. J Crit Care,2013,28(5):792-797.
 [10] Parker TM, Nguyen AH, Rabang JR, et al. The danger zone: Systematic review of the role of HMGB1 danger signalling in traumatic brain injury[J]. Brain Inj,2017,31(1):2-8.
 [11] Singh V, Roth S, Veltkamp R, et al. HMGB1 as a key mediator of immune mechanisms in ischemic stroke[J]. Antioxid Redox Signal,2016,24(12):635-651.
 [12] Sokót B, Wozniak A, Jankowski R, et al. HMGB1 level in cerebrospinal fluid as a marker of treatment outcome in patients with acute hydrocephalus following aneurysmal subarachnoid hemorrhage[J]. J Stroke Cerebrovasc Dis,2015,24(8):1897-1904.

(收稿日期:2017-03-26 修回日期:2017-06-14)

(上接第 4338 页)

[16] Jin L, Zhang L, Li Z, et al. Placental concentrations of mercury, lead, cadmium, and arsenic and the risk of neural tube defects in a Chinese population[J]. Reprod Toxicol,2013,35(1):25-31.
 [17] Al-Saleh I, Shinwari N, Mashhour A, et al. Heavy metals (lead, cadmium and mercury) in maternal, cord blood and placenta of healthy women [J]. Int J Hyg Environ Health,2011,214(1):79-101.
 [18] Falcon M, Vinas P, Luna A. Placental lead and outcome of pregnancy[J]. Toxicology,2003,185(1):59-66.
 [19] Tekin D, Kayaalti Z, Aliyev V, et al. The effects of metallothionein 2A polymorphism on placental cadmium accumulation: Is metallothionein a modifying factor in transfer of micronutrients to the fetus [J]. J Appl Toxicol,2012,32(4):270-275.

[20] Roels H, Hubermont G, Buchet JP, et al. Placental transfer of lead, mercury, cadmium, and carbon monoxide in women. III. Factors influencing the accumulation of heavy metals in the placenta and the relationship between metal concentration in the placenta and in maternal and cord blood[J]. Environ Res,1978,16(1/3):236-247.
 [21] Needham LL, Grandjean P, Heinzow B, et al. Partition of environmental chemicals between maternal and fetal blood and tissues[J]. Environ Sci Technol,2011,45(3):1121-1126.
 [22] Gundacker C, Hengstschlager M. The role of the placenta in fetal exposure to heavy metals[J]. Wien Med Wochenschr,2012,162(9/10):201-206.

(收稿日期:2017-05-18 修回日期:2017-07-01)