

• 论著 •

高迁移率族蛋白 1 抑制剂甘草酸对大鼠癫痫持续状态后血脑屏障的影响

范真¹, 黄斌², 孙红斌²

1. 德阳市人民医院神经内科, 四川省德阳市 618100

2. 四川省医学科学院·四川省人民医院神经内科, 四川省成都市 610072

摘要: 目的 研究高迁移率族蛋白 1 (HMGB1) 在大鼠癫痫持续状态后的表达情况, 以及给予 HMGB1 抑制剂甘草酸干预对大鼠癫痫持续状态后血脑屏障的影响。方法 将 SD 大鼠随机分为 3 h 对照组、癫痫 3 h 组、癫痫 24 h 组和癫痫 72 h 组, 每组 8 只。癫痫组构建癫痫持续状态模型后, 分别于癫痫造模成功后 3 h、24 h、72 h 处死, 3 h 对照组则在对应时间点给予等量生理盐水, 并在匹罗卡品注射时间点后 3 h 处死, 所有大鼠处死后提取海马组织, 利用 Western-blot 法检测 HMGB1 蛋白表达情况。将大鼠随机分为对照组、癫痫组、甘草酸干预组 (GA 30 mg/kg), 每组 8 只, 癫痫组及甘草酸干预组均采用上述方法造模, 此外, 甘草酸干预组在癫痫造模成功后 2 h 给予 30 mg/kg 甘草酸腹腔注射, 其余两组则在对应时间点给予等量生理盐水, 3 组大鼠均在癫痫造模成功后 24 h 处死, 取大脑测定伊文思蓝渗出量。结果 HMGB1 表达情况: 癫痫 3 h 组较 3 h 对照组表达增加 ($P < 0.05$); 癫痫 24 h 组较癫痫 3 h 组表达进一步增高 ($P < 0.05$); 癫痫 72 h 组较癫痫 24 h 组表达有所下降 ($P < 0.05$)。伊文思蓝渗出情况: 癫痫持续状态后 24 h, 癫痫组较对照组渗出量增加 ($P < 0.05$); 甘草酸干预组较癫痫组渗出量明显减少 ($P < 0.05$)。结论 大鼠癫痫持续状态后可出现 HMGB1 表达增高以及血脑屏障受损, 在给予 HMGB1 活性抑制剂甘草酸干预后可减轻癫痫对大鼠血脑屏障完整性的破坏。

关键词: 癫痫持续状态; 高迁移率族蛋白 1; 甘草酸; 血脑屏障; 大鼠

Effects of high-mobility group box 1 inhibitor glycyrrhizic acid on blood-brain barrier of rats after status epilepticus

FAN Zhen, HUANG Bin, SUN Hong-Bin. Department of Neurology, People's Hospital of Deyang City, Deyang 618100, Sichuan, China

Abstract: **Objective** To investigate the expression of high-mobility group box 1 (HMGB1) in rats after status epilepticus and the effects of HMGB1 inhibitor glycyrrhizic acid on the blood-brain barrier of rats after status epilepticus. **Methods** Sprague-Dawley rats were randomly divided into 3-h control group, 3-h epilepticus group, 24-h epilepticus group, and 72-h epilepticus group, with 8 rats in each group. After the status epilepticus model was established in epilepticus groups, rats were sacrificed at 3, 24, and 72 hours, respectively, after successful establishment of the status epilepticus model, while the rats in the 3-h control group were given injection of normal saline at corresponding time points and were sacrificed 3 hours after pilocarpine injection. Then the hippocampus tissues from all rats were collected, and Western blot was applied to measure the expression of HMGB1. Rats were randomly divided into control group, epilepticus group, and glycyrrhizic acid treatment group (GA 30 mg/kg), with 8 rats in each group, and the measures above were applied to establish the model in epilepticus group and glycyrrhizic acid treatment group. In addition, the rats in glycyrrhizic acid treatment group were given intraperitoneal injection of glycyrrhizic acid 30 mg/kg 2 hours after successful establishment of epilepticus model, and the rats in the other two groups were given injection of normal saline at corresponding time points. The rats in 3 groups were all sacrificed 24 hours after successful establishment of epilepticus model, and brain tissues were collected to measure Evans blue seepage. **Results** The expression of HMGB1 in the 3-h epilepticus group increased significantly compared with that in the 3-h control group ($P < 0.05$); the expression of HMGB1 in the 24-h epilepticus group increased further compared with that in the 3-h epilepticus group ($P < 0.05$), while the expression of HMGB1 in the 72-h epilepticus group decreased significantly compared with that in the 24-h epi-

收稿日期: 2015-05-29; 修回日期: 2015-08-10

作者简介: 范真 (1988-), 男, 硕士研究生, 主要从事癫痫疾病研究。Email: 534384186@qq.com。

通讯作者: 孙红斌, 男, 主任医师, 硕士研究生导师, 主要从事癫痫基础和临床研究。Email: 2332289243@qq.com。

lepticus group ($P < 0.05$)。As for Evans blue seepage, at 24 hours after status epilepticus, Evans blue seepage in epilepticus groups increased significantly compared with that in the control group ($P < 0.05$), and Evans blue seepage in the glycyrrhizic acid treatment group decreased significantly compared with that in the epilepticus groups ($P < 0.05$)。Conclusions Increase in expression of HMGB 1 and blood-brain barrier damage can be observed in rats after status epilepticus, and administration of HMGB 1 inhibitor glycyrrhizic acid can reduce blood-brain barrier damage.

Key words: status epilepticus; high-mobility group box 1; glycyrrhizic acid; blood-brain barrier; rats

高迁移率族蛋白 1 (high-mobility group box 1, HMGB 1) 是一种高度保守的非组 DNA 结合蛋白, 具有稳定核酸结构、调节转录和基因表达等多种生物学功能。近年来发现在一定因素作用下其可以释放到细胞外发挥促炎因子作用。HMGB 1 可由坏死细胞被动释放或由活化的免疫细胞主动释放, 通过与其受体如 Toll 样受体 4 (toll-like receptor-4, TLR4)、Toll 样受体 2 (TLR2) 和晚期糖基化终末产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 等结合, 激活核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 及其他信号传导通路, 促进炎症因子及趋化因子的产生, 从而发挥其促炎作用^[1,2]。既往动物试验表明 HMGB 1 参与了脑缺血、脑外伤、脑炎等疾病的病理生理过程^[3-5]。而甘草酸被作为 HMGB 1 的高选择性抑制剂给予上述模型干预, 可以有效减轻炎症反应以及血脑屏障破坏, 发挥一定的脑保护作用^[3,6,7]。

近年来的研究表明, 痫性发作与炎症反应密切相关。越来越多的实验室癫痫模型和切除的人类脑组织中发现, 癫痫发作可激活自身免疫系统, 导致炎症介质的释放增加。已有很多确切的证据提示, 白细胞介素-1 β 、转化生长因子- β 、前列腺素 E2、环氧化酶-2 等炎症介质在痫性发作起始和进展过程中起了重要作用^[9]。那么作为促炎症因子的 HMGB 1 是否也参与了癫痫的发生发展? 给予 HMGB 1 抑制剂是否可以减轻癫痫所致血脑屏障破坏等脑损伤? 为此我们建立了氯化锂匹罗卡品大鼠癫痫持续状态 (status epilepticus, SE) 模型, 通过 Western-blot 测定了大鼠癫痫持续状态后 HMGB 1 的表达情况; 并通过检测伊文思蓝渗出量, 探索 HMGB 1 抑制剂甘草酸干预对 SE 后大鼠血脑屏障的影响。

1 材料与方法

1.1 实验动物

12 周龄的雄性 SD 大鼠, 体重 220 ~ 250 g, 由四川省人民医院实验动物中心提供, 并经过医院动物伦理委员会批准。

1.2 主要试剂及仪器

甘草酸 (上海碧云天)、氯化锂 (Sigma, USA)、匹罗卡品 (Sigma, USA)、伊文思蓝 (Sigma, USA)、PVDF 膜 (美国 Millipore 公司)、PMSF (上海碧云天)、BCA 蛋白浓度试剂盒 (北京鼎国昌盛生物技术有限公司)、5xSDS 上样缓冲液 (上海碧云天)、恒温水浴摇床 (Bio-Rad, USA)、切片机 (Leica, 德国)、微量进样器 (高鸽, 上海)、荧光显微镜 (Olympus, 日本)。

1.3 实验方法

1.3.1 模型建立 大鼠在清醒状态下腹腔注射氯化锂 127 mg/kg, 18 ~ 22 h 后腹腔注射硫酸阿托品 1 mg/kg, 30 min 后, 腹腔注射匹罗卡品 30 mg/kg, 给药后根据 Racine 分级观察大鼠行为学表现, 持续性发作 (反复的 Racine 分级 IV 级以上发作), 持续 60 min 以上视为癫痫持续状态造模成功, 腹腔注射匹罗卡品半小时后, 如未出现 IV 级及以上痫性发作的大鼠, 每间隔 10 min 给予 10 mg/kg 匹罗卡品追加注射, 直至大鼠出现 IV 级及以上的发作。造模成功后, 立即给予地西泮 10 mg/kg 腹腔注射终止其发作, 15 min 后若还未能终止, 可追加地西泮 10 mg/kg。

1.3.2 分组及给药 ①将成年雄性 SD 大鼠随机分为 3 h 对照组、癫痫 3 h 组、癫痫 24 h 组、癫痫 72 h 组, 每组各 8 只, 癫痫组经腹腔注射氯化锂-匹罗卡品构建癫痫持续状态模型, 并分别在癫痫造模成功后 3 h、24 h、72 h 处死, 3 h 对照组与癫痫 3 h 组同时造模, 在对应时间点给予等量生理盐水腹腔注射, 并在匹罗卡品注药时间点后 3 h 处死, 所有大鼠处死后提取海马组织, 利用 Western-blot 法检测 HMGB 1 蛋白表达情况。②将大鼠随机分为对照组、癫痫组、甘草酸干预组 (GA 30 mg/kg), 每组各 8 只, 癫痫组及甘草酸干预组均采用上述方法造模, 此外, 甘草酸干预组在癫痫造模成功后 2 h 给予 30 mg/kg 甘草酸腹腔注射 (本实验的预实验结果表明, 在癫痫造模成功后 1 h、2 h、3 h 各时间点测定 HMGB 1 表达量, 1 h 时表达并无增加, 2 h 时有轻度升高趋势, 3 h 时即显著增加, 故我们选用了

HMGB 1 表达出现增高之初,即 SE 后 2 h 给予 HMGB 1 活性抑制剂干预,其余两组则在对应时间点给予等量生理盐水,3 组大鼠均在造模成功后 24 h 处死,取大脑测定伊文思蓝渗出量。③所有上述各组如果因模型不成功、死亡等因素,造成每个子组的样本量不足,需按照随机原则对应样本进行补充。

1.4 检测指标及步骤

1.4.1 Western blot 法测定 HMGB 1 表达量 将大鼠海马组织分别研磨匀浆后,加入蛋白裂解液,4℃放置 2 h,低温离心机 10000 转离心 10 min,收集上清分装。按考马斯亮蓝试剂盒操作检测蛋白含量。制备 100 g/L 的分离胶、50 g/L 的浓缩胶的聚丙烯酰胺凝胶,依次经上样,电泳,转印于 NC 膜上,封闭。用一抗稀释液分别稀释 β -actin 抗体(1:5000),HMGB 1 抗体(1:2000),将 PVDF 膜放入一抗反应液中,4℃孵育过夜。将 PVDF 膜放入用 5% 脱脂牛奶封闭液配制的二抗反应液中(根据一抗选用相应的二抗及浓度),室温震荡混匀 1 h。TBST 振荡洗涤 3 次 \times 15 min。将显色剂按说明书比例配液,振荡器摇匀,显影,以 β -actin 作为内参照,条带光密度分采用数字凝胶成像分析系统进行扫描,使用 Imaging software 4.0 系统分析条带光密度,将目的蛋白条带的光密度值与内参(β -actin)的光密度值做比较,计算各目的蛋白的相对含量。

1.4.2 伊文思蓝测定血脑屏障通透性 给予各组大鼠一侧股静脉 2% 伊文思蓝 4 ml/kg 注射,1 h 后行心脏灌注,取出大脑后称重,置于试管,按照 1 ml/100 mg 脑组织的比例加入甲酰胺溶液。轻微撵碎,安置于 60℃ 水浴箱 24 h,取出后离心(4000 r/min),取上清液,再离心(12000 r/min),再取上清液,每个标本取出 200 μ l 上清液置于 96 孔板,同时制作标准孔,放置于全波长酶标仪,选取波长 620 nm 测 OD 值,根据测量结果,计算每个标本伊文思蓝浓度,通过伊文思蓝渗出量来作为血脑屏障通透性的评价指标。

1.5 统计学方法

数据用 SPSS 19.0 软件进行分析,计量资料采用均数 \pm 标准差表示,多组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 氯化锂-匹鲁卡品癫痫持续状态模型中海马区 HMGB 1 表达变化

Western-blot 检测结果表明,大鼠海马组织

HMGB 1 蛋白在癫痫 3 h 组较 3 h 对照组表达增加($P < 0.05$);在癫痫 24 h 组较癫痫 3 h 组表达升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);在 72 h 癫痫组较 24 h 对照组表达有所下降($P < 0.05$)。见图 1。

2.2 伊文思蓝渗出量测定

将伊文思蓝渗出量作为血脑屏障通透性的评价指标。在酶标仪测量后,经过数据转换和统计,单位取 μ g/100mg 脑组织,癫痫发作后 24 h 各组大鼠大脑伊文思蓝浓度测定分别为:对照组 5.5 ± 1.1 、癫痫组 10.9 ± 1.3 、甘草酸干预组 9.4 ± 1.8 。癫痫组较对照组渗出增加($P < 0.05$);甘草酸干预组后相较癫痫组渗出明显减少($P < 0.05$)。见图 2。

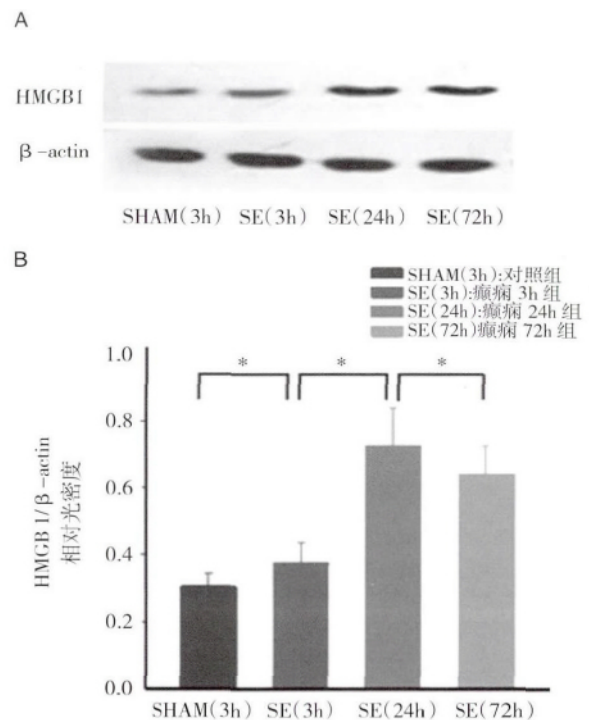


图 1 各组大鼠海马组织 HMGB 1 蛋白的表达情况。A: HMGB 1 蛋白及 β -actin 的典型 Western-Blot 条带。B: HMGB 1/ β -actin 的相对光密度值。SHAM(3 h) = 3 h 对照组,SE(3 h) = 癫痫 3 h 组,SE(24 h) = 癫痫 24 h 组,SE(72 h) = 癫痫 72 h 组。* 表示两组差异有统计学意义, $P < 0.05$ 。

3 讨论

HMGB 1 蛋白是一种促炎症细胞因子,其几乎存在于所有有核细胞核内,发挥稳定核小体结构、调节基因转录等功能。在机体受到刺激时 HMGB 1 可通过主动或被动形式释放到细胞外,发挥促炎症

子的作用,引发组织损伤及炎症反应。现有研究表明HMGB 1参与了许多组织脏器的炎症反应,在脑缺血、脑外伤、脑炎及脑发育畸形等神经系统疾病中,均可观察到脑实质内、脑脊液及血液中HMGB 1升高^[4-6]。本研究发现氯化锂匹罗卡品诱导大鼠癫痫持续状态后,大鼠海马组织中同样也出现了HMGB 1的合成和表达增加,该结果提示HMGB 1可能参与了癫痫持续状态后的病理生理过程。

癫痫具有复杂的病理生理机制。目前,越来越多基础及临床研究表明,癫痫可导致血脑屏障的损害。大量的动物及临床试验均证实,癫痫发作后可检测到相应血脑屏障渗透性标记物渗出增加^[20,21]。而血脑屏障完整性的破坏后,可继而出现白蛋白渗出、脑水肿、胶质细胞增生、神经元变性等脑损伤导致了癫痫的病情进展、恶化^[10,11]。影响血脑屏障的机制众多,既往的研究表明,对影响血脑屏障

通透性的主要机制可能是通过影响白蛋白、水通道蛋白AQP 4、整流钾通道Kir 4.1、内皮素1等实现^[12,13]。但随着研究的深入,越来越多的学者认为,IL-1 β 、IL-6、IFN- γ 、TNF- α 等炎症因子表达增加可能是主要导致血脑屏障破坏的重要因素,因此,减少癫痫发作后炎症介质的表达,对维持血脑屏障的完整性至关重要^[13-15]。HMGB 1为促炎症因子,有研究表明抑制HMGB 1活性可以减轻HMGB 1释放引起的级联炎症反应及血脑屏障破坏、脑组织损伤等。Liu等^[18]报道静脉注射HMGB 1中和抗体可以显著减少大脑中动脉闭塞引起的脑梗死面积,改善运动功能,并且可以减轻血脑屏障破坏、抑制胶质细胞活化及炎症介质TNF- α 、iNOS的合成。Okuma等^[19]对外伤性脑损伤大鼠的研究也得出类似结果。

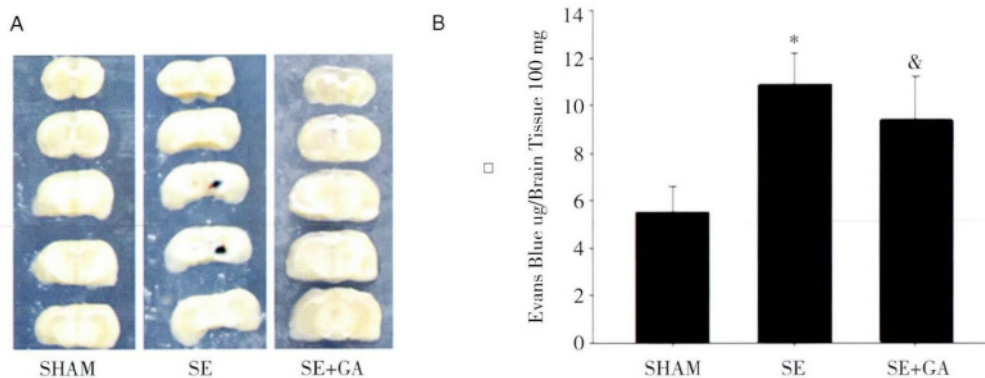


图2 各组大鼠脑伊文思蓝渗出情况。A: 三组之间伊文思蓝染色后连续脑组织切片典型图像,癫痫模型组与对照组相比明显蓝染,黄芩苷干预后脑组织蓝色渗出减少。B: 三组伊文思蓝渗出情况柱状图。SHAM = 对照组,SE = 癫痫组,SE + GA = 甘草酸干预组。*表示与对照组相比, $P < 0.05$; &表示与癫痫组相比, $P < 0.05$ 。

既往研究证实,甘草酸可作为HMGB 1的高选择性抑制剂^[3,6,7],本实验在大鼠癫痫持续状态后给予了HMGB 1抑制剂甘草酸拮抗HMGB 1的活性,减少了大鼠SE后血脑屏障的完整性的破坏。其原因可能是因为抑制了HMGB 1活性后,减少了一系列炎症因子的表达,从而减轻癫痫持续状态后血脑屏障破坏。

本研究初步探讨了癫痫持续状态与HMGB 1蛋白的因果关系,证实了癫痫持续状态可引起大鼠血脑屏障损害,HMGB 1活性抑制剂甘草酸可减轻了大癫痫持续状态后血脑屏障破坏,从而可能减少因血脑屏障受损继发的脑组织损害。本研究表明

HMGB 1可能参与了防治癫痫后脑损伤的发生、发展,为癫痫防治提供了新的实验基础。

参考文献

- [1] Yang H, Wang H, Czura CJ, et al. The cytokine activity of HMGB 1. *J Leukoc Biol*, 2005, 78(1): 1-8.
- [2] Yang H, Tracey KJ. Targeting HMGB 1 in inflammation. *Biochimica Et Biophysica Acta*, 2010, 1799(1799): 149-156.
- [3] Yang QW, Lu FL, Zhou Y, et al. HMGB1 mediates ischemia-reperfusion injury by TRIF-adaptor independent Toll-like receptor 4 signaling. *Cereb Blood Flow Metab*, 2011, 31: 593-605.

- [4] Kim SW , Jin Y , Shin JH , et al. Glycyrrhizic acid affords robust neuroprotection in the postischemic brain via anti-inflammatory effect by inhibiting HMGB 1 phosphorylation and secretion. *Neurobiol Dis* , 2012 , 46(1) : 147-156.
- [5] Okuma Y , Liu K , Wake H , et al. Anti-high mobility group box-1 antibody therapy for traumatic brain injury. *Ann Neurol* , 2012 , 72: 373-384.
- [6] Huang J , Liu B , Yang C , et al. Acute hyperglycemia worsens ischemic stroke-induced brain damage via high mobility group box-1 in rats. *Brain Res* , 2013 , 1535: 148-155.
- [7] Ohnishi M , Katsuki H , Fukutomi C , et al. HMGB 1 Inhibitor Glycyrrhizin Attenuates Intracerebral Hemorrhage-Induced Injury In Rats. *Neuropharmacology* , 2011 , 61 (5-6) : 975-980.
- [8] Faraco G , Fossati S , Bianchi ME , et al. High mobility group box 1 protein is released by neural cells upon different stresses and worsens ischemic neurodegeneration in vitro and in vivo. *J Neurochem* , 2007 , 103(2) : 590-603.
- [9] 邹雪梅 ,洪 桢 ,周东. 抗炎性药物在癫痫治疗中的潜在作用. *国际神经病学神经外科学杂志* , 2012 , 39(6) : 549-553.
- [10] Michalak Z , Sano T , Engel T , et al. Spatio-temporally restricted blood-brain barrier disruption after intra-amygdala kainic acid-induced status epilepticus in mice. *Epilepsy Res* , 2013 , 103(2) : 167-179.
- [11] van Vliet EA , Araujo SDC , Redeker S , et al. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain* , 2007 , 130: 521-534.
- [12] Heinemann U , Kaufer D , Friedman A. Blood-Brain Barrier Dysfunction , TGF β Signaling , and Astrocyte Dysfunction in Epilepsy. *Glia* , 2012 , 60(8) : 1251-1257.
- [13] Kovács R , Heinemann U , Steinhilber C. Mechanisms underlying blood-brain barrier dysfunction in brain pathology and epileptogenesis: Role of astroglia. *Epilepsia* , 2012 , 53 (Supplement s6) : 53-59.
- [14] Vliet EAV , Arajo SDC , Redeker S , et al. Blood-brain barrier leakage may lead to progression of temporal lobe epilepsy. *Brain J Neurol* , 2007 , 130(2) : 521-534.
- [15] van Vliet EA , Otte WM , Gorter JA , et al. Longitudinal assessment of blood-brain barrier leakage during epileptogenesis in rats. A quantitative MRI study. *Neurobiol Dis* , 2014 , 63(3) : 74-84.
- [16] Weissberg I , Reichert A , Heinemann U , et al. Blood-Brain Barrier Dysfunction in Epileptogenesis of the Temporal Lobe. *Epilepsy Res Treat* , 2011 , 2011: 143908.
- [17] Qiu J , Nishimura M , Wang Y , et al. Early release of HMGB-1 from neurons after the onset of brain ischemia. *J Cereb Blood Flow Metab* , 2008 , 28(5) : 927-938.
- [18] Karlsson S , Pettila V , Tenhunen J , et al. HMGB1 as a predictor of organ dysfunction and outcome in patients with severe sepsis. *Intensive Care Med* , 2008 , 34: 1046-1053.
- [19] Yang H , Tracey KJ. Targeting HMGB1 in inflammation. *Biochim Biophys Acta* , 2010 , 1799: 149-156.
- [20] Michalak Z , Sano T , Engel T , et al. Spatio-temporally restricted blood-brain barrier disruption after intra-amygdala kainic acid-induced status epilepticus in mice. *Epilepsy Res* , 2013 , 103(2) : 167-179.