

## 高迁移率族蛋白 B1 对癫痫大鼠海马 P-糖蛋白表达的影响

黄贤径,郝劲博,狄 晴\*,余 年,张燕芳,闻 芳,陈 艳

(南京医科大学附属南京脑科医院神经内科,江苏 南京 210029)

**[摘要]** 目的:探讨高迁移率族蛋白 B1(high-mobility group box-1, HMGB1)对癫痫大鼠脑 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)表达的调控作用。方法:将 60 只雄性 SD 大鼠随机分为假手术组,癫痫组,低、中、高剂量 HMGB1 干预组,每组 12 只。采用海马微量注射海人酸(kainic acid, KA)制作癫痫大鼠模型,各 HMGB1 干预组于注射 KA 前 15 min,通过侧脑室微量注射不同剂量重组 HMGB1 蛋白进行干预。记录癫痫大鼠自注射 KA 后至初次达到Ⅲ级发作的时间(seizure onset time, SOT),作为评价癫痫发作易感性指标;造模成功 24 h 后处死大鼠,分别采用免疫组化法、实时定量荧光 PCR 和蛋白质免疫印迹法检测并比较各组大鼠海马组织损伤、P-gp 多药耐药基因 1(multidrug resistance-1, mdr1)mRNA 及蛋白表达。结果:与癫痫组比较,中、高剂量 HMGB1 干预组 SOT 缩短( $P < 0.05$ ),海马组织结构紊乱,海马 CA3 区神经元过度丢失( $P < 0.05$ ),海马 mdr1 mRNA 及 P-gp 表达增加( $P < 0.05$ )。而低剂量 HMGB1 干预组与癫痫组比较,以上各项指标差异则无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论:HMGB1 可增加癫痫鼠发作易感性,加重海马组织损伤,促进海马组织 P-gp 过表达。

**[关键词]** 癫痫;高迁移率族蛋白 B1;P-糖蛋白;海马

**[中图分类号]** R742.1

**[文献标志码]** A

**[文章编号]** 1007-4368(2014)08-1029-05

**doi:** 10.7655/NYDXBNS20140806

## Effect of high-mobility group box-1 on P-glycoprotein expression in the hippocampus of epileptic rats

Huang Xianjing, Hao Jinbo, Di Qing\*, Yu Nian, Zhang Yanfang, Wen Fang, Chen Yan

(Department of Neurology, Nanjing Brain Hospital Affiliated to NJMU, Nanjing 210029, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the regulation of high-mobility group box-1 (HMGB1) on P-glycoprotein (P-gp) expression in the hippocampus of epileptic rats. **Methods:** Sixty male SD rats were randomly divided into the sham operation group, epilepsy group, low, medium and high doses of HMGB1 pretreated groups with 12 rats in each group. Various doses of recombinant HMGB1 protein were injected intraventricularly 15 min before micro-injection of kainic acid (KA) into the hippocampus. The latency period to the onset of stage III first seizure time was observed to assess epileptic susceptibility and all the rats were sacrificed after 24 hours of the operation. The damage of the hippocampal tissue, the expression levels of mdr1 mRNA and P-gp were detected by immunohistochemical method, real-time PCR and Western blot, respectively. **Results:** Compared with the epilepsy group, the SOT of epileptic seizure latency in the medium and high doses of HMGB1 pretreated groups were lower than that of the epilepsy group ( $P < 0.05$ ), the damage of the hippocampal tissue and neuron loss in the hippocampus CA3 area were increased ( $P < 0.05$ ), and the expression levels of mdr1 mRNA and P-gp were up-regulated in the medium and high doses of HMGB1 pretreated groups ( $P < 0.05$ ), but there was no significant differences between the low-doses HMGB1 pretreated group and epilepsy group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion:** HMGB1 could increase seizure susceptibility, the damage of hippocampal tissue and the over-expression levels of P-gp in the hippocampus of seizure rats.

**[Key words]** epilepsy; high-mobility group box-1; P-glycoprotein; hippocampus

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(08): 1029-1033]

**[基金项目]** 国家自然科学基金(81171222)

\*通信作者 (Corresponding author), E-mail: diqing@medmail.com.cn

尽管近 20 年有 20 余种新型抗癫痫药 (anti-epileptic drugs, AEDs) 应用于临床, 但仍有 1/3 癫痫患者不能终止其发作, 发展为耐药性癫痫 (drug-re-

sistant epilepsy, DRE)。由多药耐药基因 1(multidrug resistance-1, *mdr1*)编码的 P-糖蛋白(P-glycoprotein, P-gp)等脑内药物转运体过表达,可阻止不同药理机制的 AEDs 进入致痫灶内,能更好解释 DRE 患者多药耐药现象<sup>[1]</sup>,是 DRE 发生的主要机制之一,然而 DRE 脑内 P-gp 过表达的调控机制目前仍不明确。新近研究发现,炎症反应可能是所有类型癫痫发生发展的一个共同危险因素<sup>[2-5]</sup>,癫痫相关炎症反应可诱导脑内 P-gp 过表达<sup>[6-7]</sup>。高迁移率族蛋白 B1(high-mobility group box-1, HMGB1)为主要损伤相关模式分子家族成员之一,作用于模式识别受体或直接作为转录因子介导免疫炎症反应,可能与 DRE 的形成有关<sup>[8-10]</sup>,那么癫痫脑内高表达的 HMGB1 是否能通过调控 *mdr1* 基因介导 P-gp 过表达,目前未见相关报道。本研究拟通过癫痫大鼠模型,观察 HMGB1 对癫痫脑内 P-gp 表达的影响,探讨是否可通过调控 HMGB1 而达到降低 P-gp 的目的,为临床治疗 DRE 提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

成年雄性 SD(清洁级)大鼠 60 只,由上海斯莱克实验动物有限公司提供[SCXK(沪)2012-0002]。饲养室环境:室温 20~22℃,湿度 60%,光照时间 12 h/d,标准饲料喂养,自由摄食饮水,实验前动物至少适应新环境 1 周,体重(220 ± 20) g。将大鼠随机分为:假手术组(sham 组)、癫痫组(EP 组)、HMGB1 干预组[低剂量组(H10 组)10 ng/10 μl;中剂量组(H100 组)100 ng/10 μl;高剂量组(H1000 组)1 000 ng/10 μl],每组 12 只。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 药物干预及癫痫模型制作

腹腔注射 10%水合氯醛(3.5 ml/kg)对大鼠进行麻醉,将其固定于立体定位仪上。假手术组、癫痫组分别予侧脑室(前囟后 1.0 mm,正中左侧 1.5 mm,深度 4.5 mm)微量注射 10 μl 生理盐水, HMGB1 干预组分别注射相应剂量 HMGB1(H4652,美国 Sigma 公司);15 min 后,假手术组大鼠海马(前囟后 5.0 mm,正中左侧 5.0 mm,深度 5.0 mm)微量注射 3 μl 生理盐水,其他组分别注射 3 μl (0.5 μg/μl) 海人酸(kainic acid, KA, 美国 Sigma 公司, CASRN 58002-62-3)制作癫痫大鼠模型,5 min 内匀速注射药物,留针 5 min 缓慢退出。根据 Racine 标准对大鼠的癫痫发作程度进行评定<sup>[11]</sup>,注射 KA 后 6 h 内达到 IV 级

或者以上为造模成功,癫痫持续发作超过 90 min 者予 10%水合氯醛腹腔注射,降低死亡率。

#### 1.2.2 癫痫发作易感性及海马组织损伤评价

以注射 KA 后至初次达到 III 级发作的时间(seizure onset time, SOT),作为癫痫发作潜伏期指标,评价癫痫发作的易感性。造模成功 24 h 后,各组大鼠经心脏灌注固定后断头取脑,在 10%中性福尔马林中固定 24 h,取视交叉后 2 mm 冠状面切片脑组织,切片厚 4 μm,常规石蜡包埋,采用免疫组化二步染色法进行 NeuN 染色, NeuN 抗体(MAB377, 1:500, 美国 Chemicon 公司),即用型酶标羊抗/兔鼠二抗(kit-5010, 福州迈新公司)。随机选取 CA3 区 5 个不重复的视野(×400)观察, NeuN 染色阳性细胞呈棕色,计数每个视野阳性细胞数,取其平均值。

#### 1.2.3 海马组织 *mdr1a/b* mRNA 的表达

于造模成功 24 h 后,脱颈处死各组大鼠,冰上迅速分离左侧海马,立即冻存于-80℃冰箱备用。取 20 mg 冻存海马组织,应用 RNAiso Plus(日本 TaKaRa 公司)提取总 RNA,紫外分光光度计检测总 RNA 质量和纯度。逆转录(A5001, 美国 Promega 公司)反应条件:42℃15 min, 95℃5 min, 4℃5 min。PCR 扩增(A6001, 美国 Promega 公司)反应条件:预变性 95℃ 2 min;循环时 95℃ 15 s, 60℃ 1 min;共 40 个循环。引物:*mdr1a* F:5'-TCACCAAGC-GACTCCGATACA-3' 和 R:5'-ACCCTGTAGCCC-CTTTCACCTT-3';*mdr1b* F:5'-CGCAGAA-GTATC-CACAGAAGACAA-3' 和 R:5'-ACCATAGGC-A-CATCTTCATCCACA-3';GAPDH F:5'-ATGACTC-TACCCACGGCAAG-3' 和 R:5'-TACTCAGCACCA-GCATCACC-3'。导出 Ct 值,采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法分析数据,*mdr1a/b* mRNA 与 GAPDH Ct 值比值作为其相对表达水平。

#### 1.2.4 海马组织 P-gp、HMGB1 的表达

备用海马组织提取总蛋白,考马斯亮蓝法检测样品蛋白浓度。样品加入 5×上样缓冲液并煮沸 5 min;上样量 50 μg,分别用 7.5%、12% SDS-PAGE 电泳分离 P-gp、HMGB1,并转移到 PVDF 膜上;在含 5%脱脂奶粉 TBST 封闭液中,室温封闭 2 h;分别加入 P-gp 抗体(C219, 1:100, 美国 Millipore 公司)、HMGB1 抗体(1:1 000, 美国 Abcam 公司)、β-actin 抗体(1:1 000, 北京 Bioss 公司),4℃过夜;次日用 TBST 缓冲液洗涤 5 min×3 次,分别相应加入酶标羊抗兔或鼠抗体(1:5 000, 北京 Bioss 公司),室温孵育 2 h;用 TBST 缓冲液洗涤 10 min×3 次, ECL 化学发光法

显色。用 Image J 1.43 软件定量分析各蛋白条带的灰度值,β-actin 作为内参照,以 P-gp、HMGB1 与内参照的灰度值比值作为其相对表达水平。

### 1.3 统计学方法

采用 SPSS13.0 版软件进行统计学分析,检测结果用均数 ± 标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,先进行频数分布和方差齐性分析,组间比较采用单因素方差分析 *t* 检验,两两比较采用 LSD 检验。假设检验采用双侧检验, $P \leq 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 大鼠癫痫发作的易感性

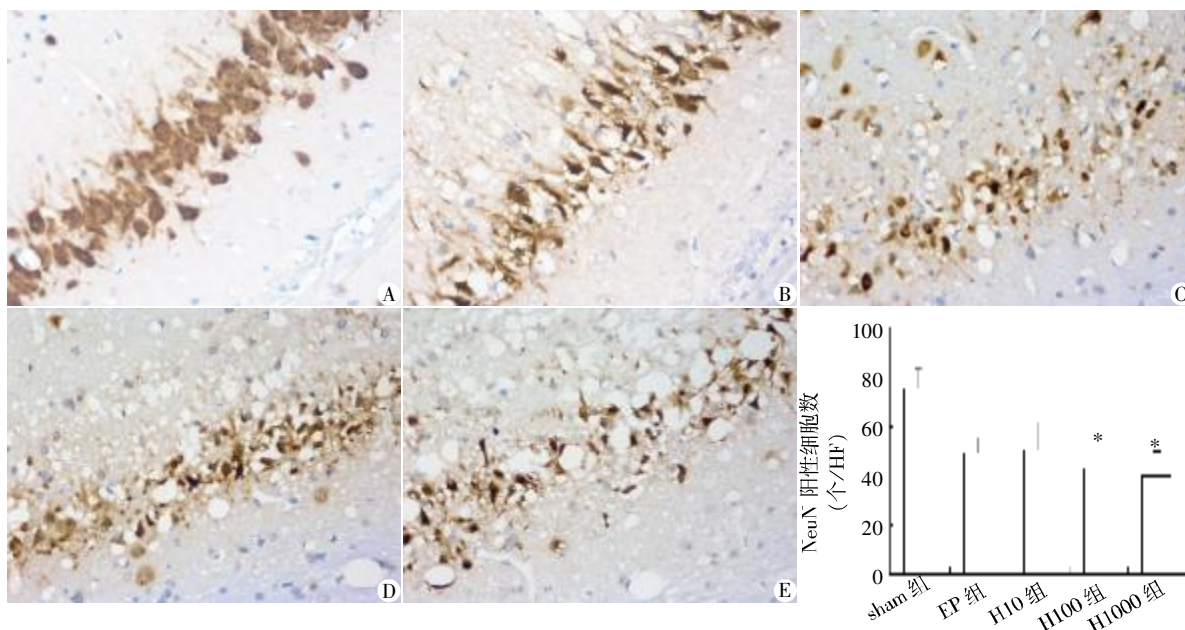
EP 组、H1000 组各有 1 只大鼠死于癫痫发作过度。低、中、高剂量 HMGB1 干预组癫痫发作潜伏时间分别为 (41.79 ± 4.99)min、(34.57 ± 7.56)min、

(31.69 ± 10.73)min,均短于 EP 组 (42.54 ± 9.26)min,但仅中、高剂量 HMGB1 干预组与 EP 组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。

### 2.2 大鼠海马 CA3 区 NeuN 染色阳性细胞表达

与 sham 组比较,EP 组神经元大量丢失并呈空泡状,残存神经元排列紊乱,着色较浅且不均;随着干预剂量增加,HMGB1 干预组神经元丢失更严重,空泡更大,层次不清,着色更浅。EP 组 CA3 区 NeuN 染色阳性细胞计数(49.20 ± 5.81)个/HF 低于 sham 组(75.50 ± 7.64)个/HF;低、中、高剂量 HMGB1 干预组其计数分别为(50.00 ± 11.05)个/HF、(43.33 ± 7.06)个/HF、(39.00 ± 10.20)个/HF,均低于 EP 组,仅中、高剂量 HMGB1 干预组其计数与 EP 组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 1)。

### 2.3 大鼠海马组织 mdr1a/b mRNA 的表达比较



A: sham 组;B: EP 组;C: H10 组;D: H100 组;E: H1000 组。与 EP 组比较, \* $P < 0.05$ 。

图 1 各组大鼠海马 CA3 区 NeuN 染色(×400)

Figure 1 NeuN staining of hippocampus CA3 region in different rat groups(×400)

各组大鼠海马组织中 mdr1a/b 表达总体差异有统计学意义 ( $P < 0.001$ ), 与 sham 组比较,EP 组 mdr1a/b 表达下降,差异有统计学意义( $P < 0.01$ ,图 2);中、高剂量 HMGB1 干预组 mdr1a/b 表达水平高于 EP 组,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ,图 2),但低剂量 HMGB1 干预组与 EP 组比较差异无统计学意义。

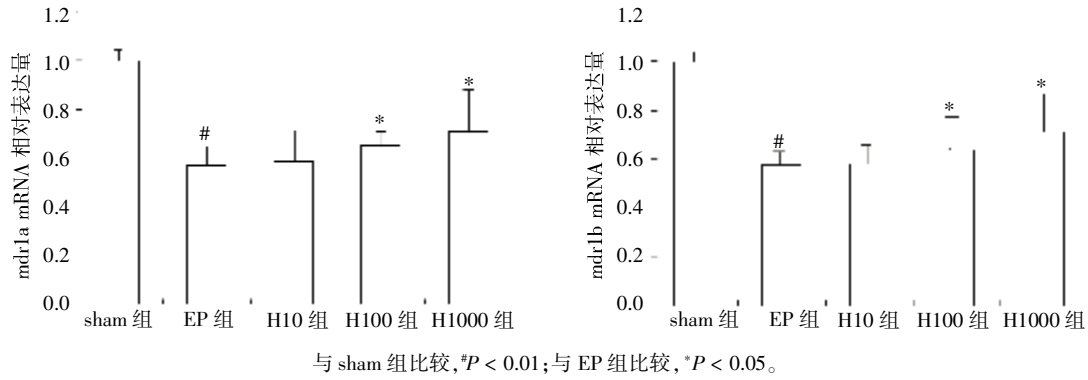
### 2.4 P-gp 和 HMGB1 蛋白的表达检测

各组 P-gp 及 HMGB1 表达总体差异均有统计学意义 ( $P < 0.001$ ),EP 组 P-gp、HMGB1 的表达水

平高于 sham 组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,图 3);中、高剂量 HMGB1 干预组 P-gp、HMGB1 表达水平高于 EP 组,差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ ,图 3),低剂量 HMGB1 干预组蛋白表达水平与 EP 组比较差异无统计学意义。

## 3 讨论

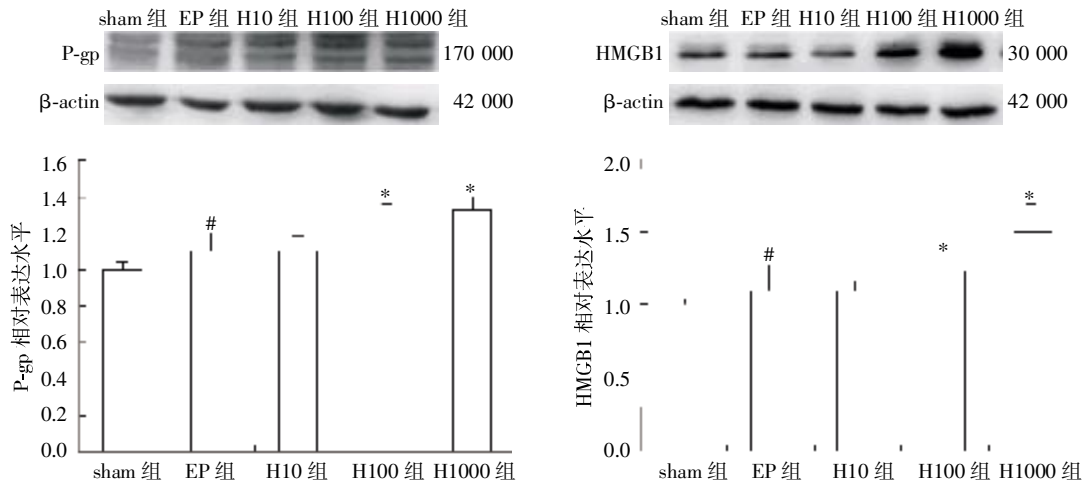
尽管癫痫的耐药机制目前尚未完全明确,但 P-gp 等耐药蛋白的过表达是癫痫耐药的原因之一,



与 sham 组比较, \* $P < 0.01$ ; 与 EP 组比较, \* $P < 0.05$ 。

图 2 各组大鼠海马 mdr1a/b mRNA 表达

Figure 2 mRNA expression of hippocampus mdr1a/b in different rat groups



与 sham 组比较, \* $P < 0.05$ ; 与 EP 组比较, \* $P < 0.05$ 。

图 3 各组大鼠海马 P-gp 和 HMGB1 表达

Figure 3 Hippocampus P-gp and HMGB1 expression in different rat groups

已得到一致的认可, 阻断 P-gp 作用或降低其表达, 已成为治疗 DRE 的靶点之一。然而目前为止的研究显示: P-gp 作用底物的竞争性抑制剂毒性较大, 作用靶点较为单一, 限制了其临床应用; 小干扰 RNA 靶向阻断 mdr1 基因表达上调, 抑制 P-gp 过表达, 仅停留于体外研究阶段<sup>[12]</sup>, 故探索新的调控 DRE 脑内 P-gp 过表达的机制就显得尤为必要。越来越多的证据表明炎症反应参与了癫痫脑内 P-gp 表达的调控, 对炎症反应的调节可能是 DRE 一个新的治疗方向<sup>[6-7]</sup>。

HMGB1 是主要炎症激活因子, 在细胞核中 HMGB1 可作为转录因子结合于 DNA, 直接启动基因表达; 亦可从免疫细胞主动分泌或损伤、坏死细胞被动释放至细胞外<sup>[8-9]</sup>, 作用于细胞膜上 Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4)、晚期糖基化终产物受体 (receptor for advanced glycation end products, RAGE) 等受体, 活化环氧合酶 2 (cyclooxygenase-2,

COX-2)、核因子-kappa B (nuclear factor-kappa B, NF- $\kappa$ B), 诱导免疫炎症反应, 增加癫痫发作易感性及严重程度<sup>[10,13]</sup>, 而癫痫发作又促进细胞分泌和释放更多 HMGB1, 形成正反馈环路。侧脑室注射重组 HMGB1 蛋白可进入海马组织启动固有免疫, 介导早期炎症反应, 缩短癫痫发作的潜伏期, 而炎症反应加重组织损伤。本研究发现 HMGB1 干预组大鼠癫痫发作易感性增加, 海马组织损伤加重, CA3 区神经元结构紊乱并过度丢失。

非癫痫领域证实 HMGB1 可促进胃癌 P-gp 过表达<sup>[14]</sup>。在癫痫动物模型中, 激活谷氨酸/ N-甲基-D-天冬氨酸受体 (N-methyl-D-aspartic acid receptor, NMDA)/COX-2 信号通路可诱导 P-gp 表达上调<sup>[6]</sup>; 我们近期研究发现抑制 NF- $\kappa$ B 活性, 可降低癫痫鼠脑内 P-gp 过表达<sup>[7]</sup>。那么癫痫脑内高表达的 HMGB1 是否可通过活化 COX-2 或 NF- $\kappa$ B 介导

P-gp 过表达,目前未见有报道。本研究发现,癫痫大鼠海马 HMGB1 表达增加, HMGB1 干预大鼠海马组织 *mdr1* 基因上调 P-gp 过表达, 癫痫脑内高表达的 HMGB1 是直接调控 *mdr1* 基因介导 P-gp 过表达, 还是通过作用于模式识别受体后活化 COX-2 或 NF- $\kappa$ B, 从而间接介导癫痫脑内 P-gp 过表达, 或者是两者共同作用的结果, 目前尚不清楚, 有待进一步研究。此外本研究发现, 与正常大鼠比较癫痫大鼠海马 P-gp 表达增加, 而 *mdr1* 基因表达反而下降, 可能与 KA 本身对神经元有损伤作用, 其用量过大造成大量神经元脱失, 而 P-gp 主要在血管内皮细胞中表达有关<sup>[15]</sup>。

本研究表明 HMGB1 可增加癫痫鼠发作易感性, 加重海马组织损伤, 促进海马组织 P-gp 过表达, 仍需进一步研究是否可通过调控 HMGB1 降低癫痫脑内 P-gp 的表达, 从而达到治疗耐药性癫痫的目的。本研究仅证明 24 h 内 HMGB1 促进癫痫海马组织 P-gp 过表达, 有待于在慢性癫痫模型中进行深入研究。

#### [参考文献]

- [1] Margineanu DG, Klitgaard H. Mechanisms of drug resistance in epilepsy: relevance for antiepileptic drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2009, 4(1): 23-32
- [2] Vezzani A, Friedman A, Dingledine RJ. The role of inflammation in epileptogenesis [J]. *Neuropharmacology*, 2013, 69(1): 16-24
- [3] Walker L, Sills GJ. Inflammation and epilepsy: The foundations for a new therapeutic approach in epilepsy? [J]. *Epilepsy Currents*, 2012, 12(1): 8-12
- [4] Aronica E, Ravizza T, Zurolo E, et al. Astrocyte immune responses in epilepsy [J]. *Glia*, 2012, 60(8): 1258-1268
- [5] Kleen JK, Holmes GL. Brain inflammation initiates seizures [J]. *Nat Med*, 2008, 14(12): 1309-1310
- [6] Holtman L, van Vliet EA, Edelbroek PM, et al. Cox-2 inhibition can lead to adverse effects in a rat model for temporal lobe epilepsy [J]. *Epilepsy Res*, 2010, 91(1): 49-56
- [7] Yu N, Di Q, Liu H, et al. Nuclear factor-kappa B activity regulates brain expression of P-glycoprotein in the kainic acid induced seizure rats [J]. *Mediators Inflamm*, 2011, 2011: 670613
- [8] Kleen JK, Holmes GL. Taming TLR4 may ease seizures [J]. *Nat Med*, 2010, 16(4): 369-370
- [9] Zhu J, Mohan C. Toll-like receptor signaling pathways--therapeutic opportunities [J]. *Mediators Inflamm*, 2010, 2010: 781235
- [10] Maroso M, Balosso S, Ravizza T, et al. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures [J]. *Nat Med*, 2010, 16(4): 413-419
- [11] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 281-294
- [12] Pierzchala K. Pharmacoresistant epilepsy-epidemiology and current studies [J]. *Neurol Neurochir Pol*, 2010, 44(3): 285-290
- [13] Ioria V, Maroso M, Rizzi M, et al. Receptor for advanced glycation endproducts is upregulated in temporal lobe epilepsy and contributes to experimental seizures [J]. *Neurobiol Dis*, 2013, 58(10): 102-114
- [14] Yin Y, Li W, Deng M, et al. Extracellular high mobility group box chromosomal protein 1 promotes drug resistance by increasing the expression of Pglycoprotein expression in gastric adenocarcinoma cells [J]. *Mol Med Rep*, 2014, 9(2): 1439-1443
- [15] Karssem AM, Meijer O, Pons D, et al. Localization of mRNA expression of P-glycoprotein at the blood-brain barrier and in the hippocampus [J]. *Ann NY Acad Sci*, 2004, 1032(12): 308-311

[收稿日期] 2014-03-26