

高迁移率族蛋白 B1 拮抗剂 BoxA 对癫痫大鼠的脑保护作用

郝劲博,黄贤径,余 年,张燕芳,狄 晴*

(南京医科大学附属脑科医院神经内科,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)拮抗剂 BoxA 对癫痫大鼠发作与海马损伤的影响。**方法:**将雄性 SD 大鼠随机分为假手术组、癫痫模型(EP)组和高、中、低剂量 BoxA 干预组;海马微量注射海人酸制作癫痫大鼠模型,造模前侧脑室注射不同剂量 BoxA 对大鼠进行干预,其中假手术组海马及侧脑室分别注射等体积生理盐水。记录各组大鼠达到Ⅲ级发作的潜伏时间(seizure onset time, SOT),作为评价癫痫发作易感性指标;HE 染色观察脑组织病理变化,NeuN 免疫组化染色评价海马神经元丢失情况,作为评价脑组织损伤指标,磷酸化细胞核因子 κ B-p65(p-NF κ B-p65)免疫组化染色观察其表达情况。**结果:**高、中、低剂量 BoxA 干预组大鼠 SOT 均显著长于 EP 组($P < 0.05$);与 EP 组相比,BoxA 干预组海马组织损伤均明显减轻,神经元丢失减少($P < 0.05$);高剂量 BoxA 干预组较中低剂量干预组 SOT 延长、脑组织损伤程度减轻,但差异无统计学意义;高、中剂量 BoxA 干预组大鼠 p-NF κ B-p65 表达水平较 EP 组明显降低($P < 0.05$),而低剂量 BoxA 干预组与 EP 组间差异未显示统计学意义。**结论:**HMGB1 拮抗剂 BoxA 可通过抑制 NF κ B 活化,降低大鼠的癫痫易感性,减轻脑组织损伤,具有一定脑保护作用。

[关键词] 癫痫;高迁移率族蛋白 B1;BoxA;海马

[中图分类号] R742.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1007-4368(2014)07-904-05

doi:10.7655/NYDXBNS20140710

Protective effects of HMGB1 antagonist BoxA on the brain of epileptic rats

Hao Jinbo, Huang Xianjing, Yu Nian, Zhang Yanfang, Di Qing*

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

[Abstract] **Objective:**To investigate the effects of high mobility group box 1 (HMGB1) antagonist BoxA on seizure onset and hippocampus injury in a rat epilepsy model. **Methods:**Male SD rats were divided into the sham operation group, the epilepsy model group, the low, middle and high doses of BoxA pretreated epilepsy groups. The rat epilepsy model was made by micro-injection of kainic acid into the hippocampus. Various doses of BoxA were administered to the epilepsy model by intracerebroventricular injection prior to kainic acid injection. The sham operation group were injected with the same volume of normal saline into the hippocampus and lateral ventricle, respectively. We observed the rats' behavior during seizure and recorded seizure onset time(SOT) to stage III as an indicator to assess epileptic susceptibility. The brain pathological change was observed by HE staining. The injury degree of the hippocampus was estimated by NeuN staining as an indicator to assess the damage of brain tissue. The expression of phosphorylated nuclear factor- κ B-p65 (p-NF κ B-p65) was also detected by immunohistochemical staining. **Results:**SOT in the low, middle and high doses of BoxA pretreated epilepsy group all significantly prolonged compared to the epilepsy group ($P < 0.05$). Compared to the epilepsy group, hippocampus injury and neuron loss were obviously reduced in the BoxA pretreated epilepsy group ($P < 0.05$). Although pretreatment with high dose BoxA also prolonged SOT and decreased the intensity of brain injury compared to the middle and low dose BoxA, there were no statistically significant differences. The expressions of p-NF κ B-p65 in the middle and high dose BoxA groups were reduced remarkably compared with the EP group ($P < 0.05$), and there was no statistical difference between the EP group and the low dose BoxA group. **Conclusion:**Administration of HMGB1 antagonist BoxA to epileptic rats could reduce seizure susceptibility and attenuate the injury of brain by inhibit the activation of NF κ B, which showed brain protective effect in epilepsy rats.

[Key words] epilepsy; HMGB1; BoxA; hippocampus

[Acta Univ Med Nanjing, 2014, 34(07):904-908]

[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

癫痫反复发作可诱发和加重脑组织损伤,迄今其确切机制尚未完全明确。新近研究表明,大脑炎症反应参与癫痫的发生、发展,与癫痫所致脑组织损伤密切相关^[1-4]。高迁移率族蛋白 B1 (high-mobility group protein B1, HMGB1) 为损伤相关模式分子家族成员之一,作用于模式识别受体间接介导免疫炎症反应。研究发现,在耐药性癫痫患者和急、慢性癫痫小鼠模型脑组织中,神经元、小胶质细胞、星形胶质细胞变性坏死后释放大量 HMGB1^[3,5],增加癫痫发作易感性,那么能否通过抑制 HMGB1 活性降低癫痫易感性,从而减轻癫痫发作所致的脑损伤,目前未见相关报道,本文采用 HMGB1 拮抗剂 BoxA 对此进行了观察。

1 材料和方法

1.1 材料

健康雄性 SD 大鼠(清洁级)37 只,购于上海斯莱克实验动物有限责任公司 [SCXK (沪)2012-0002]。饲养环境:室温 18~24℃,湿度:60%,光照时间 12 h,自由进食进水。实验前动物至少在新环境中饲养 2 周,体重 200~250 g。

1.2 方法

1.2.1 动物分组

将大鼠随机分为 5 组:假手术组(Sham 组, $n = 5$),癫痫模型组(EP 组, $n = 8$),高剂量 BoxA(1 400 ng)干预组(B_{1400} 组, $n = 8$),中剂量 BoxA(140 ng)干预组(B_{140} 组, $n = 8$),低剂量 BoxA(14 ng)干预组(B_{14} 组, $n = 8$)。

1.2.2 药物干预

1 400、140、14 ng BoxA(德国 HMGBiotech, HM-012)分别溶于 10 μ l 生理盐水(NS),腹腔注射 10% 水合氯醛(3.5 ml/kg)对大鼠进行麻醉,于造模前 15 min 对大鼠行侧脑室给药,侧脑室定位:前囟后 1.0 mm,正中左侧 1.5 mm 处钻孔,微量注射器进针,深度 4.5 mm。于 5 min 内缓慢匀速注射完毕,留置注射器 5 min,缓慢退出。Sham 组和 EP 组仅注射 10 μ l NS。

1.2.3 癫痫模型制作

选择左侧海马 CA3 区进行注射海人酸(kainic acid, KA)制作癫痫模型,定位:前囟后 5.0 mm,正中左侧 5.0 mm 处钻孔,微量注射器进针,深度 5.0 mm。注射 KA(美国 Sigma, CASRN 58002-62-3)3 μ l (0.5 μ g/ μ l), Sham 组以 3 μ l NS 替代。于 5 min 内缓慢匀速注射完毕,留置注射器 5 min,缓慢退出。

1.2.4 癫痫发作观察

根据 Racine 标准^[6]对大鼠的癫痫发作程度进行评定,共 0~V 级,达到 III 级及以上为制模成功。记录注射完 KA 至达到初次 III 级发作的时间(seizure onset time, SOT),作为癫痫发作潜伏期指标,评价癫痫易感性^[7]。对癫痫发作持续超过 90 min 的大鼠腹腔注射 10%水合氯醛终止发作,降低死亡率。

1.2.5 组织病理学检查

注射 KA 24 h 后,10%中性福尔马林灌注固定后断头取脑,继续固定 24 h,取视交叉后 2 mm 海马 CA3 区组织作冠状面切片。梯度乙醇脱水,石蜡包埋,连续切片(厚 4 μ m)。常规 HE 染色观察脑组织病理变化。采用免疫组化二步染色法检测 NeuN:切片脱蜡至水,置于柠檬酸盐抗原修复液(pH6.0)高温高压修复,3%过氧化氢处理 5 min,山羊血清孵育 10 min; 分别滴加 NeuN 抗体(美国 Chemicon, MAB377, 1:500 稀释)、磷酸化细胞核因子 κ B-p65 (p-NF κ B-p65)抗体(美国 bioworld, BS4135, 1:100 稀释)各 50 μ l,阴性对照以 PBS 代替一抗,4℃过夜; PBS 冲洗,滴加即用型酶标羊抗兔/鼠二抗(福州迈新, kit-5010),显微镜下控制 DAB 显色,复染,封片。NeuN 染色结果分析参照文献^[8],对海马 CA3 区神经元损伤严重程度评分:0 级,正常;1 级,CA3 区 < 10%的神经元固缩;2 级,CA3 区 11%~40%的神经元固缩;3 级,CA3 区 > 40%的神经元固缩;4 级,CA3 区 < 10%(轻度)的神经元丢失;5 级,CA3 区 11%~40%(中度)神经元丢失;6 级,CA3 区 > 40%(重度)的神经元丢失。

随机选取大鼠海马 CA3 区 5 个不重复的高倍视野($\times 400$),计算 p-NF κ B-p65 阳性细胞(胞核或胞浆为棕色)表达百分比,取其平均值,分为 I ($\leq 25%$), II (26%~50%), III (51%~75%), IV (>75%) 4 个等级。

1.3 统计学方法

使用 SPSS13.0 统计软件进行统计学处理。先进行频数分布和方差齐性分析,如为正态分布且方差齐,则采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法;如方差不齐或等级资料,采用多个样本秩和检验(Kruskal-Wallis, H 检验),两两比较采用 Wilcoxon 符号秩和检验。假设检验采用双侧检验,取 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 造模情况

Sham 组、 B_{1400} 组各有 1 只大鼠死于麻醉意外。

EP组1只大鼠死于过度发作, B₁₄₀₀组1只大鼠取材失败, 此2只大鼠发作等级已评定, 组织损伤程度无法评定。

2.2 各组大鼠癫痫发作情况

如表1所示, 不同剂量 BoxA 干预组 SOT 均较 EP 组长, 差别有统计学意义 ($P < 0.05$); 高剂量 BoxA 干预组较中低剂量干预组 SOT 延长, 但差异无统计学意义。

表1 各组大鼠癫痫发作评分及 SOT

Table 1 The seizure stage and SOT of different rat groups

组别	未达到发作标准			达到发作标准			SOT (min)
	0级	I级	II级	III级	IV级	V级	
Sham组 (n=4)	4	0	0	0	0	0	-
EP组 (n=8)	0	0	0	0	5	3	48.13 ± 11.95
B ₁₄₀₀ 组 (n=7)	0	2	0	1	3	1	105.80 ± 24.95*
B ₁₄₀ 组 (n=8)	0	1	2	3	2	0	90.40 ± 39.02*
B ₁₄ 组 (n=8)	0	1	1	2	2	2	103.00 ± 31.04*

与EP组比, * $P < 0.05$ 。

2.3 各组大鼠神经损伤情况

2.3.1 HE 染色

如图1所示, Sham组大鼠海马CA3区组织未见异常, 神经元结构完整, 排列整齐, 层次清楚, 染色均匀, 胞核清晰可见; EP组可见大量神经元严重变性, 固缩、丢失, 组织广泛疏松水肿, 呈空泡状, 残存神经元排列紊乱, 层次不清, 染色不均; 不同剂量 BoxA 干预组大鼠海马CA3区部分神经元出现固缩, 有少量细胞丢失, 少数区域呈空泡状, 细胞排列轻度紊乱, 层次尚可辨认, 大部分细胞核可见。

2.3.2 NeuN 免疫组化评估神经元损伤程度

5组间神经元损伤评分总体比较差异有统计学意义 ($H = 19.33, P < 0.05$), 其中 EP 组及药物干预

组神经元损伤均明显重于 Sham 组 (EP vs Sham, $P = 0.005$; B₁₄₀₀ vs Sham, $P = 0.008$; B₁₄₀ vs Sham, $P = 0.013$; B₁₄ vs Sham, $P = 0.004$); 不同剂量 BoxA 干预组神经损伤较 EP 组轻, 差异均有统计学意义 (EP vs B₁₄₀₀, $P = 0.008$; EP vs B₁₄₀, $P = 0.006$; EP vs B₁₄, $P = 0.035$); 不同剂量 BoxA 干预组之间神经损伤未显示明显差异 ($P > 0.05$, 图2, 表2)。

2.4 p-NFκB-p65 表达情况

各组大鼠海马CA3区可见 p-NFκB-p65 主要在细胞核内表达。5组间表达水平差异有统计学意义 ($H = 16.65, P < 0.05$)。Sham 组仅个别细胞有表达; EP 组可见 p-NFκB-p65 大量表达, 明显高于对照组; B₁₄₀₀ 组、B₁₄₀ 组只有少量细胞表达, 与 EP 组相比明



Sham组海马结构未见异常; EP组广泛细胞丢失, 组织疏松水肿, 呈空泡状; 不同剂量 BoxA 干预组 (B₁₄₀₀、B₁₄₀、B₁₄) 组织结构损伤较 EP 组减轻。

图1 各组大鼠海马CA3区 HE 染色 (×200)

Figure 1 Hippocampus CA3 region HE staining of different rat groups (×200)



Sham组海马CA3区神经元大小及形态正常, 结构层次完好; EP组大量神经元丢失, 残存神经元极性紊乱; 不同剂量 BoxA 干预组 (B₁₄₀₀、B₁₄₀、B₁₄) 存活神经元数目多于 EP 组。

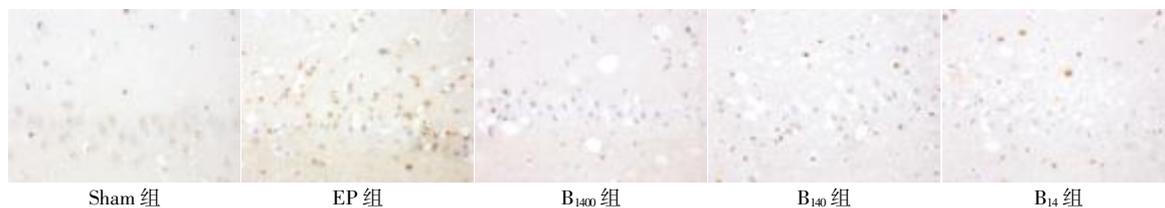
图2 各组大鼠海马CA3区 NeuN 免疫组化染色 (×100)

Figure 2 Immunohistochemical staining of NeuN in hippocampus CA3 region of different rat groups (×100)

表 2 各组大鼠海马 CA3 区神经元损伤严重程度评定
Table 2 The hippocampus damage degree evaluation of different rat groups (n)

神经元损伤程度	Sham	EP [#]	B ₁₄₀₀ ^{*#}	B ₁₄₀ ^{*#}	B ₁₄ ^{*#}
0 级	4	0	0	1	0
1 级	0	0	1	1	1
2 级	0	0	2	0	0
3 级	0	0	0	2	0
4 级	0	1	2	2	2
5 级	0	2	1	2	5
6 级	0	4	0	0	0
合计	4	7	6	8	8

与 Sham 组相比,[#]*P* < 0.05; 与 EP 组相比,^{*}*P* < 0.05。



EP 组 p-NFκB-p65 表达水平高于其余各组(除 B₁₄ 组外均 *P* < 0.05)。

图 3 各组大鼠海马 CA3 区 p-NFκB-p65 免疫组化染色(×400)

Figure 3 Immunohistochemical staining of p-NFκB-p65 hippocampus CA3 region of different rat groups(×400)

表 3 各组大鼠海马 CA3 区 p-NFκB-p65 表达水平
Table 3 Hippocampus CA3 region p-NFκB-p65 expression of different rat groups (n)

组别	p-NFκB-p65			
	I	II	III	IV
Sham 组 [*] (n=4)	4	0	0	0
EP 组(n=7)	0	5	2	0
B ₁₄₀₀ 组 [*] (n=6)	4	2	0	0
B ₁₄₀ 组 [*] (n=8)	5	3	0	0
B ₁₄ 组(n=8)	1	6	1	0

与 EP 组相比,^{*}*P* < 0.05。

后主动分泌,也可由坏死细胞被动释放^[9]。

释放到细胞外的 HMGB1 可通过晚期糖基化终产物受体、Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR)2/4 以及与细胞因子结合,发挥其强大促炎作用^[10],尤其是天然免疫介导的非感染性炎症,加重组织损伤、变性坏死^[9]。

炎症反应对癫痫的发生发展具有重要的促进作用^[11]。既往研究发现,在 KA 诱导的急、慢性癫痫动物模型中,双侧海马星形胶质细胞 HMGB1 表达量明显增加;而对耐药性癫痫患者术后脑组织病理标本研究显示,星形胶质细胞胞质中 HMGB1 表达高于对照。Maroso 等^[5]通过海马注射 HMGB1 增加了癫痫小鼠的易感性,但 HMGB1 在癫痫发生、发展中发挥的作用仍不十分清楚。

显下调(*P* < 0.05);B₁₄ 组仍可见较多表达但少于 EP 组,差异无统计学意义。各 BoxA 干预组之间 p-NFκB-p65 表达水平差异无统计学意义(B₁₄₀₀ vs B₁₄₀, *P* = 0.950;B₁₄₀₀ vs B₁₄,*P* = 0.081;B₁₄₀ vs B₁₄,*P* = 0.065,图 3,表 3)。

3 讨论

HMGB1 于 1973 年首先被发现,它能与 DNA 非特异性结合,促进 DNA 与其他转录因子特异性结合,调节基因转录。HMGB1 可由单核-巨噬细胞、树突状细胞、胶质细胞、神经元受到炎症、应激等刺激

BoxA 是 HMGB1 的一个片段,能竞争性拮抗 HMGB1 与相应受体结合抑制其促炎作用^[12]。本研究应用 BoxA 对 KA 癫痫大鼠模型进行干预后,癫痫大鼠 SOT 延长、海马损伤减轻、神经元丢失减少,相对较低剂量高剂量的脑保护作用有增强的趋势,尽管各干预组之间的差异未显示统计学意义。经过致痫刺激后,神经元和胶质细胞内原有的 HMGB1 释放到细胞外,参与首次癫痫发作;癫痫发作又诱导星形胶质细胞、小胶质细胞合成和释放 HMGB1,而神经元则无进一步 HMGB1 表达^[5]。各种细胞释放的 HMGB1 通过快速启动 NFκB 等介导的下游炎症因子基因转录,使脑组织中炎症反应持续存在,HMGB1 还能通过蛋白酶 C 和 C 反应蛋白介导刺激自身分泌,以及激活 NFκB 介导 HMGB1 自身表达^[13],形成癫痫发作和炎症反应之间的正反馈环路。NFκB 在中枢神经系统主要由 p50/p65 二聚体发挥作用,而 p-NFκB-p65 是其主要活化形式;本研究中应用 1 400、140 ng BoxA 干预后癫痫大鼠海马组织中 p-NFκB-p65 表达明显下调,提示 BoxA 干预可能阻断 NFκB 介导的癫痫与炎症反应的反馈过程,抑制 HMGB1 介导的炎症反应,缓解癫痫发作严重程度,减少 HMGB1 释放,发挥脑保护作用。我们的既往研究证实炎症反应的中心环节 NFκB 参与癫痫炎症反应,NFκB 活性抑制剂可降低癫痫发作易感性、

减轻脑组织损伤^[14]。我们推测, HMGB1 拮抗剂 BoxA 通过阻断 HMGB1 介导的 NFκB 活化从而对 KA 致痫大鼠发挥脑保护作用, HMGB1-NFκB 信号通路在癫痫发生发展中作用的具体机制有待继续探讨。

总之, 本研究发现, BoxA 作为 HMGB1 拮抗剂, 可降低 KA 致痫大鼠的发作易感性和海马损伤程度, 显示出一定抗癫痫效应和部分脑保护作用, 为早期干预癫痫的发生发展以及治疗癫痫提供了新的思路和理论基础。本研究中不同剂量 BoxA 干预组之间实验结果呈一定趋势但未显示统计学差异, 可能与样本量小有关, 需要进一步增加样本量, 并结合分子生物学检测手段深入研究。

[参考文献]

[1] Vezzani A, Friedman A, Dingledine RJ. The role of inflammation in epileptogenesis [J]. *Neuropharmacology*, 2013, 69(6): 16-24

[2] Aronica E, Ravizza T, Zurolo E, et al. Astrocyte immune responses in epilepsy [J]. *Glia*, 2012, 60(8): 1258-1268

[3] Kleen JK, Holmes GL. Taming TLR4 may ease seizures [J]. *Nat Med*, 2010, 16(4): 369-370

[4] Walker L, Sills GJ. Inflammation and epilepsy: The foundations for a new therapeutic approach in epilepsy? [J]. *Epilepsy Curr*, 2012, 12(1): 8-12

[5] 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

[6] Racine RJ. Modification of seizure activity by electrical stimulation: II. Motor seizure [J]. *Electroencephalogr Clin Neurophysiol*, 1972, 32(3): 281-294

[7] Galic MA, Riazi K, Henderson AK, et al. Viral-like brain inflammation during development causes increased seizure susceptibility in adult rats [J]. *Neurobiol Dis*, 2009, 36(2): 343-351

[8] Kim ST, Doo AR, Kim SN, et al. Acupuncture suppresses kainic acid-induced neuronal death and inflammatory events in mouse hippocampus [J]. *J Physiol Sci*, 2012, 62(5): 377-383

[9] Andersson U, Rauvala H. Introduction: HMGB1 in inflammation and innate immunity [J]. *J Intern Med*, 2011, 270(4): 296-300

[10] Mazarati A, Maroso M, Iori V, et al. High-mobility group box-1 impairs memory in mice through both toll-like receptor 4 and receptor for advanced glycation end products [J]. *Exp Neurol*, 2011, 232(2): 143-148

[11] Vezzani A, Maroso M, Balosso S, et al. IL-1 receptor/Toll-like receptor signaling in infection, inflammation, stress and neurodegeneration couples hyperexcitability and seizures [J]. *Brain Behav Immun*, 2011, 25(7): 1281-1289

[12] Nogueira-Machado JA, de Oliveira Volpe CM. HMGB-1 as a target for inflammation controlling [J]. *Recent Pat Endocr Metab Immune Drug Discov*, 2012, 6(3): 201-209

[13] van Beijnum JR, Nowak-Sliwinska P, van den Boezem E, et al. Tumor angiogenesis is enforced by autocrine regulation of high-mobility group box 1 [J]. *Oncogene*, 2012, 32(3): 363-374

[14] 余年, 狄晴, 胡勇, 等. 核因子-κB 活性抑制剂对癫痫大鼠的脑保护作用 [J]. *临床神经病学杂志*, 2011, 24(1): 30-33

[收稿日期] 2013-11-14

本刊邮发代号 28-61
网址: <http://jnmu.njmu.edu.cn>