

# 高迁移率族蛋白-1 与家兔急性一氧化碳中毒迟发性脑病的关系

王慧峰,何先弟

[摘要]目的:通过动态观测急性一氧化碳(CO)中毒后血浆高迁移率族蛋白-1(HMGB-1)含量的变化,探讨HMGB-1与迟发性脑病发生的相关性及可能作用机制。方法:普通级健康家兔24只,随机分为对照组、急性CO中毒迟发性脑病组(模型组)和正丁酸钠预处理组(干预组),每组各8只。家兔腹腔连续间隔注射高纯CO气体,制备急性CO中毒迟发性脑病模型。造模结束后1、3、6、12、24h及3、7、14、21天各时间点分别耳缘静脉采血检测HMGB-1含量。结果:血浆HMGB-1含量,在造模结束后3h,模型组与对照组比较,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。6h至21天,模型组较对照组差异均有统计学意义( $P < 0.01$ ),而干预组较对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ );在造模结束6h至21天,染毒家兔(模型组与干预组)最终形成迟发性脑病组较未形成组差异也均有统计学意义( $P < 0.01$ )。结论:早期血浆HMGB-1含量与迟发性脑病的发生呈高度相关,且HMGB-1在迟发性脑病的形成过程中发挥至关重要的作用。

[关键词] 高迁移率族蛋白-1; CO中毒; 迟发性脑病; 正丁酸钠

[中国图书资料分类号] R 977.6 [文献标识码] A

## Relationship between high mobility group protein-1 and delayed neuropsychological sequelae after acute CO poisoning

WANG Hui-feng, HE Xian-di

(ICU, The First Affiliated Hospital of Bengbu Medical College, Bengbu Anhui 233004, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the changes of plasma high mobility group protein-1 (HMGB-1) in rabbits after acute CO poisoning dynamically, discuss the association between HMGB-1 and delayed neuropsychological sequelae and to analyze its possible mechanism in the course of the disease. **Methods:** Twenty-four healthy rabbits were randomly divided into control group, delayed neuropsychological sequelae after acute CO poisoning group (model group), and sodium butyrate pretreatment group (intervention group), 8 in each. The rabbits were injected continuously interval high purity CO gas intraperitoneally to prepare the model of delayed neuropsychological sequelae after acute CO poisoning. After the end of modeling, 1, 3, 6, 12, 24 h and 3, 7, 14, 21 d, blood was drawn from ear vein each time to test the levels of HMGB-1. **Results:** The plasma HMGB-1 levels at 3 h after the end of modeling in model group had statistical difference in contrast to control group ( $P < 0.05$ ). From 6 h to 21 d after the end of modeling, the differences between model group and control group were all significance ( $P < 0.01$ ), while were not statistical difference between intervention group and control group ( $P > 0.05$ ); from 6 h to 21 d in poisoned rabbits (model group and intervention group), the rate of delayed encephalopathy was significant difference compared to no encephalopathy happening ( $P < 0.01$ ). **Conclusions:** Early plasma HMGB-1 levels are highly correlated with delayed neuropsychological sequelae after acute CO poisoning, and HMGB-1 can play a crucial role in the formation of delayed encephalopathy.

[Key words] high mobility group protein-1; CO poisoning; neuropsychological sequelae; sodium butyrate

临床上,急性一氧化碳(CO)中毒患者经及时救治,多数可以痊愈,但少数患者经历数日或数周的“假愈期”后,仍再次出现以急性痴呆为主要表现的神经精神功能紊乱,称为急性CO中毒迟发性脑病(delayed neuropsychological sequelae, DNS)<sup>[1]</sup>。近年来,随着对DNS的深入研究进展,国内外学者<sup>[2-4]</sup>先后证实,免疫炎症损伤是导致该病发生的主要机

制之一。高迁移率族蛋白-1 (high mobility group protein-1, HMGB-1) 作为一种重要的炎症介质参与多种疾病的病理生理过程,并发挥关键作用,然而HMGB-1在DNS形成过程中的作用目前国内外尚未见报道。本研究拟通过动态连续监测实验家兔血浆HMGB-1含量变化,结合后期脑组织病理结果,探讨HMGB-1与DNS发生的相关性及其在DNS发生过程中的可能作用机制,旨在为临床早期诊治DNS提出新见解和新思路。

### 1 材料与方法

1.1 动物分组及给药 普通级健康雄性家兔 24

[收稿日期] 2010-07-18

[作者单位] 蚌埠医学院第一附属医院 ICU, 安徽 蚌埠 233004

[作者简介] 王慧峰(1978-),女,回族,硕士研究生,主治医师。

[通讯作者] 何先弟,硕士研究生导师,主任医师。E-mail: bbyfxyhd@sina.com

只,体重 2.0 ~ 3.0 kg,由本院动物实验中心提供。随机分为对照组、急性 CO 中毒迟发性脑病组(模型组)和正丁酸钠预处理组(干预组),各 8 只。干预组在造模前 10 min 经耳缘静脉给予正丁酸钠 500 mg/kg(购自 Sigma 公司)。

1.2 模型复制 参照文献[5],制备急性 CO 中毒迟发性脑病模型:实验动物造模前禁食 12 h,禁水 4 h,仰卧固定后不麻醉状态下经腹腔连续间隔注入高纯 CO 气体(纯度  $\geq 99.95\%$ ,购自南京特种气体厂),首次剂量为 200 ml/kg,然后每间隔 6 h 追加 1 次,每次追加 100 ml/kg,共 3 次,同时观察染毒动物症状及体征。对照组按同样方法腹腔注入等量空气。

1.3 血液标本采集与处理 造模结束后 1、3、6、12、24 h 及 3、7、14、21 天各时间点分别耳缘静脉采血 0.9 ml,经 3.8% 枸橼酸钠(1:9)抗凝离心取血浆 -70 °C 冰箱保存,标本采集结束后酶标仪(Model-680 型 美国伯乐公司生产)ELISA 法检测 HMGB-1 含量(试剂盒购自 Sigma 公司)。

1.4 脑组织病理标本采集与处理 死亡家兔直接断头取脑,未死亡家兔 21 天时以 3% 戊巴比妥钠(1 ml/kg)耳缘静脉麻醉后,暴露胸腔,剪开右心耳,夹闭腹主动脉后,用 1 000 ml 预冷(4 °C)肝素生理

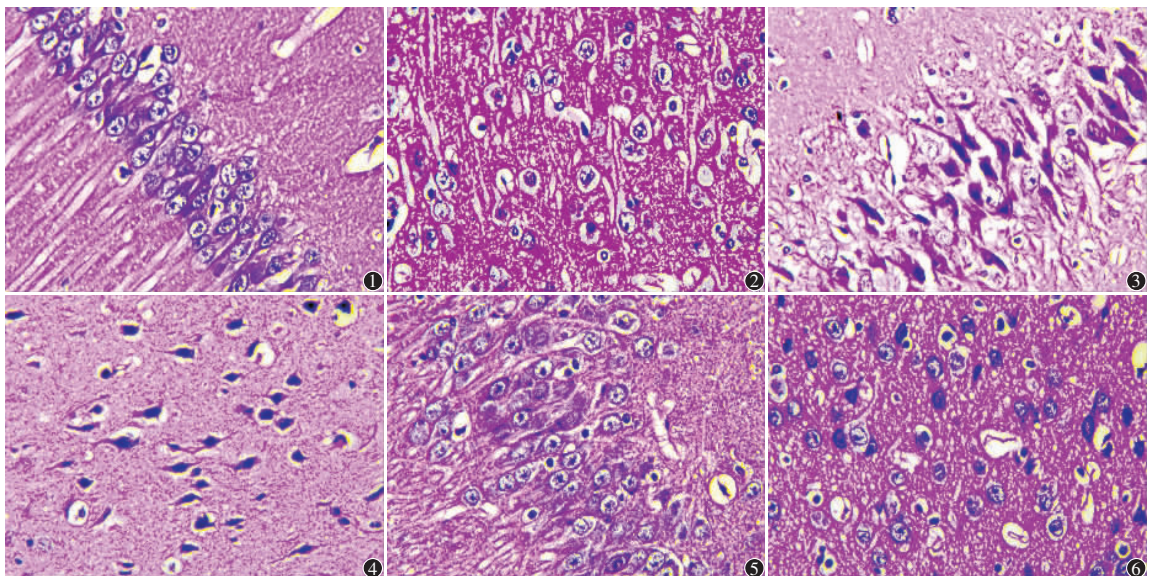
盐水经左心室快速灌注,再用 4% 多聚甲醛灌注固定 15 min,剥离取脑后常规制备石蜡切片,苏木精-伊红(HE)染色,光镜下观察脑神经元形态变化。

1.5 统计学方法 采用 *t* 检验和方差分析及 *q* 检验。

## 2 结果

2.1 家兔染毒后表现 清醒状态下家兔染毒 10 ~ 15 min 后,开始出现呼吸频率加快,呼吸幅度明显增大,20 min 后逐渐进入昏迷状态。染毒结束 4 h 大部分家兔开始逐渐清醒,然而少部分家兔 5 h 仍处于昏迷状态。结果模型组染毒结束后 6、12 h 各死亡 1 例;干预组 6 h 时死亡 1 例;对照组无死亡。死亡家兔及时尸体解剖可见心、肺等内脏器官重度充血伴散在出血点。

2.2 脑组织病理变化 对照组家兔脑神经元呈圆形或椭圆形,排列整齐,核膜完整,核仁清晰,胞核呈淡蓝色(见图 1、2);模型组脑组织发生广泛病理损伤,以海马、皮质病理改变最为明显,大量神经元变性坏死或凋亡,胞体变形,胞膜不清,核仁固缩或碎裂,正常神经元几乎消失(见图 3、4);干预组海马、白质变性坏死神经元较模型组明显减少(见图 5、6)。



黑箭头示变性坏死神经元,红箭头示正常神经元

图 1 对照组家兔海马结构 图 2 对照组家兔皮质结构 图 3 模型组家兔海马结构 图 4 模型组家兔皮质结构 图 5 干预组家兔海马结构 图 6 干预组家兔皮质结构(HE 染色)

2.3 DNS 模型复制成功标志 依据后期脑组织病理切片,海马区出现大量神经元变性坏死或凋亡为 DNS 模型复制成功标志。本实验模型组均出现 DNS 改变,干预组仅出现 1 例。

2.4 不同时间点家兔血浆 HMGB-1 含量的变化

血浆 HMGB-1 的含量,在造模结束 3 h,模型组较对照组差异有统计学意义( $P < 0.05$ );在造模结束 6 h 至 21 天,模型组较对照组差异均有统计学意义( $P < 0.01$ );而实验全过程干预组较对照组差异无统计学意义( $P > 0.05$ ) (见表 1)。在造模结束 6 h

至 21 天,染毒家兔(模型组与干预组)最终形成 DNS 组 HMGB-1 含量较未形成 DNS 组高,差异均有

统计学意义( $P < 0.01$ ) (见表 2)。

表 1 3 组家兔不同时间血浆 HMGB-1 ( $\mu\text{g/L}$ ) 含量变化( $n_i = 8; \bar{x} \pm s$ )

分组	n	时间点								
		1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	3 d	7 d	14 d	21 d
对照组	8	1.28 ± 0.16	1.36 ± 0.19	1.37 ± 0.15	1.36 ± 0.17	1.39 ± 0.18	1.41 ± 0.17	1.42 ± 0.14	1.39 ± 0.21	1.41 ± 0.15
模型组	8	1.38 ± 0.18	1.6 ± 0.18*	1.82 ± 0.2**	1.73 ± 0.11**	1.83 ± 0.13**	2.02 ± 0.18**	2.29 ± 0.19**	1.93 ± 0.12**	1.73 ± 0.11**
干预组	8	1.32 ± 0.19	1.52 ± 0.2	1.52 ± 0.10	1.46 ± 0.10	1.54 ± 0.11	1.5 ± 0.09	1.49 ± 0.12	1.45 ± 0.11	1.44 ± 0.11
F	—	0.53	3.28	16.29	13.96	16.44	29.35	67.95	22.73	12.65
P	—	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01
MS <sub>组内</sub>	—	0.037	0.037	0.024	0.017	0.021	0.023	0.022	0.025	0.016

q 检验: 与对照组比较\*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$

表 2 染毒家兔形成 DNS 组与未形成 DNS 组不同时间 HMGB-1 ( $\mu\text{g/L}$ ) 含量的变化( $\bar{x} \pm s$ )

分组	n	时间点								
		1 h	3 h	6 h	12 h	24 h	3 d	7 d	14 d	21 d
未形成 DNS 组	6	1.21 ± 0.11	1.43 ± 0.06	1.5 ± 0.08	1.45 ± 0.10	1.5 ± 0.10	1.48 ± 0.06	1.47 ± 0.11	1.43 ± 0.08	1.41 ± 0.09
DNS 组	7	1.35 ± 0.17	1.55 ± 0.15	1.76 ± 0.18	1.69 ± 0.13	1.81 ± 0.13	1.97 ± 0.21	2.2 ± 0.30	1.88 ± 0.16	1.71 ± 0.11
t	—	1.73	1.83	3.26	3.68	4.75	5.50	5.62	6.23	5.32
P	—	>0.05	>0.05	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

### 3 讨论

DNS 是急性 CO 中毒后最严重的并发症之一,国内外学者近年对该病进行了大量临床和基础性研究,虽相继提出众多理论学说,但确切发病机制迄今尚未完全阐明。目前临床上对于该病仍缺乏客观可靠的早期预测指标,同时又缺乏特异性的治疗手段,以至于严重威胁了患者生存质量并给家庭和社会带来了巨大负担,现该病已成为医学界研究的热点与难点之一。

随着对 DNS 研究深入进展,近年来越来越多的证据表明,免疫炎症损伤可能是导致该病发生的主要机制之一。Thom 等<sup>[2]</sup>在染毒大鼠脑内检测到巨噬细胞、CD4<sup>+</sup> 淋巴细胞浸润以及大量活化的小胶质细胞,活化的小胶质细胞攻击抗原性改变的髓鞘碱性蛋白,从而导致了迟发性神经元的损伤。国内学者<sup>[3-4]</sup>也检测到急性 CO 中毒大鼠脑内 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞浸润,以及神经元变性坏死区域有大量神经元和胶质细胞表达白细胞介素-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ )、 $\gamma$ -干扰素( $\gamma$ -IFN) 从而进一步证实免疫炎症损伤参与了 DNS 的发病过程。

HMGB-1 是近年来新发现的强大致炎细胞因子,参与了脓毒症、肿瘤等多种疾病的病理生理过程。Kim 等<sup>[6]</sup>通过复制大鼠脑缺血再灌注损伤模型证实,

HMGB-1 贯穿从早期缺血中心以兴奋性毒性诱导的急性神经元坏死到半暗带内的迟发性神经元凋亡的整个过程。脑缺血损伤后, HMGB-1 立即从变性坏死神经元中被大量释放到细胞外,细胞外的 HMGB-1 充当早期炎症介质刺激小胶质细胞(巨噬细胞)的活化,激活的小胶质细胞释放 HMGB-1 和其他炎症介质,这些炎症介质又能加强 HMGB-1 的分泌效应,形成了具有级联放大效应的复杂细胞因子分泌调节网络,从而导致了严重的脑组织损伤。给予 HMGB-1 单克隆抗体预处理,可明显改善脑组织预后,说明 HMGB-1 在整个脑缺血再灌注损伤的免疫炎症过程中发挥了至关重要的作用。本实验观察到造模结束 6 h 至 21 天,最终形成 DNS 组家兔血浆 HMGB-1 含量较未形成 DNS 组的差异均有统计学意义,说明早期血浆 HMGB-1 含量与 DNS 的发生已呈高度相关,那么血浆 HMGB-1 有可能成为今后临床上早期预测 DNS 的客观可靠的生化指标。通过对比 HMGB-1 在 DNS 形成过程中的动态变化规律,与 Kim 等<sup>[6]</sup>报道的在脑缺血再灌注损伤过程中极其相似,推测 HMGB-1 在 DNS 形成过程中极可能发挥与脑缺血再灌注损伤中同样的作用。

Huuskonen 等<sup>[7]</sup>研究报道,正丁酸钠可明显抑制内毒素诱导的小胶质细胞炎症。巨噬细胞、单核细胞、垂体细胞受内毒素、IL-1、肿瘤坏死(下转第 129 页)

对应激的适应<sup>[6]</sup>。RAS 和 HPA 轴激活,去甲肾上腺素分泌增加,通过旁分泌或自血流直接与淋巴细胞的受体结合,激活淋巴细胞,从而使 IL-6、TNF- $\alpha$  分泌增加。RAS 激活后,血管紧张素 II 分泌增加,可通过核因子- $\kappa$ B 诱导 IL-6 基因表达,引起 IL-6 水平升高<sup>[7]</sup>。同时慢性应激时糖皮质激素的长期增高可使巨噬细胞的糖皮质激素受体敏感性降低,而使巨噬细胞产生炎症因子增加<sup>[8]</sup>。本实验结果提示,慢性应激引起 HPA 轴的激活,引发炎症反应,从而使细胞因子 IL-6、TNF- $\alpha$  分泌增加。

慢性应激时通过自主神经系统和 HPA 轴的激活,儿茶酚胺释放增加,引起血压升高,心率加快,这是一种生理保护性机制。而持久的应激状态,交感张力反复增高,导致体内儿茶酚胺长期升高,机体则产生一系列病理变化。遗传和行为因素并不能完全解释高血压的发展,社会心理因素也可能发挥了重要作用,暴露于慢性应激已成为高血压的可能危险因素<sup>[9]</sup>。本研究表明,慢性应激时,精神紧张度增加,血压升高,心率加快,血清炎症因子 IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高,这些因素均可能对心血管系统产生一定的影响,并可能促成心血管事件的发生、发展。毕竟动物模型和人类的具体情况还有一定的差距,不能完全运用动物模型来解释人类的疾病过程,还需要进一步的研究寻求慢性应激对人类心理、行为的影响及策略。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] Andersen BL, Farrar WB, Golden-Kreutz D *et al.* Distress reduction from a psychological intervention contributes to improve health for cancer patients[J]. *Brain Behav Immun* 2007 21(7): 953-961.
- [2] Katz RJ, Roth KA, Carroll BJ. Acute and chronic stress effects on open field activity in the rat: implications for a model of depression[J]. *Neurosci Biobehav Rev* 1981 5(2): 247-251.
- [3] Capuron L, Hauser P, Hinze-Selch D *et al.* Treatment of cytokine-induced depression[J]. *Brain Behav Immun* 2002 16(5): 575-580.
- [4] Goshen I, Yirmiya R. Interleukin-1: central regulator of stress responses[J]. *Front Neuroendocrinol* 2009 30(1): 30-45.
- [5] Berthold-Losleben M, Himmerich H. The TNF- $\alpha$  system: functional aspects in depression, narcolepsy and psychopharmacology[J]. *Curr Neuropharmacol* 2008 6(3): 193-202.
- [6] Banach M, Markuszewski L, Zaslowska J, *et al.* The role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. *Przegl Epidemiol* 2004 58(4): 663-670.
- [7] Schieffer B, Schieffer E, Hilfiker-Kleiner D. Expression of angiotensin II and interleukin 6 in human coronary atherosclerotic plaques: potential implications for inflammation and plaque instability[J]. *Circulation* 2000 101(12): 1372-1378.
- [8] Maes M, Meeus H, Bosmans E, *et al.* Increased plasma concentrations of interleukin-6, soluble interleukin-6, soluble interleukin-2 and transferrin receptor in major depression[J]. *J Affect Disord* 1995 34(4): 301-309.
- [9] Spruill TM. Chronic psychosocial stress and hypertension[J]. *Curr Hypertens Rep* 2010 12(1): 10-16.

( 本文编辑 章新生 )

(上接第 126 页) 因子等刺激后均能释放 HMGB-1<sup>[8]</sup>。Wang 等<sup>[9]</sup>报道 HMGB-1 作为一种重要的炎症介质介导了内毒素的致死效应。正丁酸钠抑制 NF- $\kappa$ B 信号转导可能是阻止 HMGB-1 释放至胞外的重要途径,其机制是正丁酸钠对 HMGB-1 去乙酰化的抑制效应<sup>[10]</sup>,那么正丁酸钠抑制内毒素诱导的小胶质细胞炎症,极可能是通过对 HMGB-1 的抑制作用。本实验干预组给予正丁酸钠预处理,血浆 HMGB-1 含量明显下降,其干预机制可能也是通过对 HMGB-1 去乙酰化的抑制效应。干预组家兔后期脑神经元变性坏死程度较模型组明显减轻,进一步说明 HMGB-1 在 DNS 的形成过程中发挥了重要作用。

## [ 参 考 文 献 ]

- [1] Piantadosi CA. Carbon monoxide poisoning[J]. *Undersea Hyperb Med* 2004 31(1): 167-177.
- [2] Thom SR, Bhopale VM, Fisher D, *et al.* Delayed neuropathology after carbon monoxide poisoning is immune-mediated[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004 101(37): 13660-13665.
- [3] 赵天智,常耀明,李金声,等.急性 CO 中毒大鼠脑内的病理改变及白细胞介素-1 $\beta$ 、 $\gamma$ -干扰素表达的免疫组化研究[J]. *中华航海医学与高气压医学杂志* 2006 13(1): 26-29.

- [4] 吕晓宁,李金声,常耀明,等.急性 CO 中毒大鼠脑内 VCAM-1 表达 CD4<sup>+</sup> T 淋巴细胞浸润规律的研究及高压氧干预后的变化[J]. *中国急救医学* 2007 27(3): 225-228.
- [5] 温韬,赵金恒.一种制备急性 CO 中毒迟发性脑病动物模型的新方法[J]. *中国工业医学杂志* 2003 16(3): 129-132.
- [6] Kim JB, Choi JS, Yu YM, *et al.* HMGB1, a novel cytokine-like mediator linking acute neuronal death and delayed neuroinflammation in the postischemic brain[J]. *J Neurosci* 2006 26(24): 6413-6421.
- [7] Huuskonen J, Suuronen T, Nuutinen T *et al.* Regulation of microglial inflammatory response by sodium butyrate and short-chain fatty acids[J]. *British J Pharmacol* 2004 141(5): 874-880.
- [8] Wang H, Vishnubhakat JM, Bloom O, *et al.* Proinflammatory cytokines (tumor necrosis factor and interleukin 1) stimulate release of high mobility group protein-1 by pituitary cells[J]. *Surgery* 1999 126(2): 389-392.
- [9] 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.
- [10] Quivy V, Van Lint C. Regulation at multiple levels of NF- $\kappa$ B mediated transactivation by protein acetylation[J]. *Biochem Pharmacol* 2004 68(6): 1221-1229.

( 本文编辑 刘璐 )