

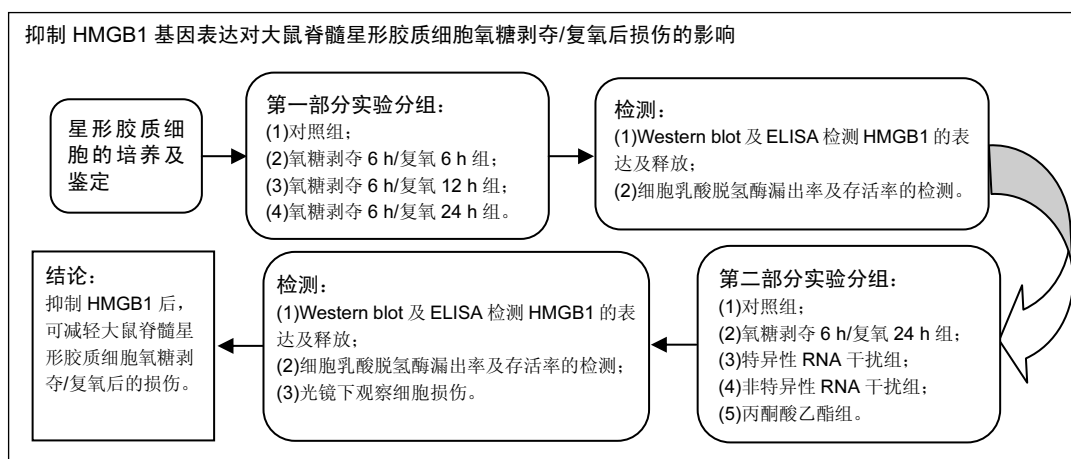
# 抑制高迁移率族蛋白1减轻大鼠脊髓星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后的损伤

宋君来<sup>1</sup>, 李满<sup>2</sup>, 孙麟<sup>1</sup>, 马迅<sup>1</sup>, 吕聪<sup>1</sup>, 贺亚军<sup>1</sup> (<sup>1</sup>山西医科大学附属大医院骨科, 山西省太原市 030032; <sup>2</sup>山西医科大学第二医院神经内科, 山西省太原市 030001)

DOI:10.3969/j.issn.2095-4344.0836

ORCID: 0000-0002-5545-2376(宋君来)

文章快速阅读:



宋君来, 男, 1992年生, 湖北省黄冈市人, 汉族, 山西医科大学在读硕士, 医师, 主要从事脊柱外科临床与基础研究。

通讯作者: 孙麟, 博士, 副主任医师, 硕士研究生导师, 山西医科大学附属大医院骨科, 山西省太原市 030032

中图分类号:R318

文献标识码:B

稿件接受: 2018-01-20



## 文题释义:

**高迁移率族蛋白 1:** HMGB1 是一种广泛存在于真核生物细胞核内, 结合于 DNA 的非组蛋白。当细胞损伤或坏死后, HMGB1 会被动释放到细胞外, 而胞外的 HMGB1 具有较强的促炎作用, 它能和多种受体结合, 引起等多种炎症因子的大量释放, 从而在多种炎症性疾病中发挥着重要作用。

**氧糖剥夺/复氧:** 体外培养大鼠脊髓星形胶质细胞, 首先, 细胞在含有体积分数 10% 的胎牛血清星形胶质细胞培养基中培养, 氧糖剥夺时细胞加入到无血清的 DMEM 无糖培养基, 并置于体积分数 1%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、94%N<sub>2</sub> 的三气培养箱中孵育, 复氧时, 再换回原来的培养基及培养条件下进行培养。

## 摘要

**背景:** 既往对于抑制大鼠体内高迁移率族蛋白 1(high mobility group protein, HMGB1)的释放改善脊髓功能的恢复较多, 但对于体外培养脊髓星形胶质细胞, 抑制 HMGB1 改善细胞氧糖剥夺/复氧的损伤研究尚少。

**目的:** 探讨抑制大鼠脊髓星形胶质细胞 HMGB1 后减轻细胞氧糖剥夺/复氧的损伤作用。

**方法:** 星形胶质细胞从新生 SD 大鼠脊髓提取, 分离, 培养鉴定。实验分两部分: 第一部分实验, 体外培养大鼠脊髓原代星形胶质细胞, 对细胞行氧糖剥夺/复氧处理, 实验分组: 对照组, 正常培养; 氧糖剥夺 6 h/复氧 6, 12, 24 h 组。第二部分实验, 星形胶质细胞分组: 对照组, 正常培养; 氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组; 特异性 RNA 干扰组; 非特异性 RNA 干扰组; 丙酮酸乙酯组。利用 Western blot 和 ELISA 法检测各部分实验各组星形胶质细胞 HMGB1 的表达和释放量, 利用乳酸脱氢酶的漏出率和 MTT 法检测细胞的损伤和存活率, 光镜下观察细胞损伤后细胞形态结构的变化。

**结果与结论:** ①脊髓星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后, HMGB1 蛋白表达及分泌升高( $P < 0.01$ ), 且复氧至 24 h 时达到最高值( $P < 0.01$ ); 特异性 RNA 干扰组及丙酮酸乙酯组 HMGB1 的表达量明显降低, 提示特异的 HMGB1 shRNA 和丙酮酸乙酯能有效抑制 HMGB1 表达; ②细胞氧糖剥夺/复氧后, 乳酸脱氢酶漏出率均明显增加, 细胞存活率降低( $P < 0.01$ ), 复氧至 24 h 时损伤最为严重( $P < 0.01$ )。与氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组相比, 特异性 RNA 干扰组及丙酮酸乙酯组细胞的乳酸脱氢酶漏出率明显下降; ③光镜下观察细胞在氧糖剥夺/复氧后, 细胞出现肿胀, 分解等损伤变化, 而特异 RNA 干扰和丙酮酸乙酯组细胞损伤明显减轻; ④结果提示, HMGB1 在脊髓星形胶质细胞损伤发生与发展中起到关键性的作用, 且抑制 HMGB1 后能减轻氧糖剥夺/复氧对大鼠脊髓星形胶质细胞的损伤作用。

**关键词:**

脊髓损伤; 星形胶质细胞; HMGB1; 细胞损伤; 氧糖剥夺/复氧; 干扰; 丙酮酸乙酯; MTT; LDH

**主题词:**

脊髓损伤; 高迁移率族蛋白质类; 组织工程

**基金资助:**

国家自然科学基金(81401028); 山西省青年科技研究基金(2015021201); 山西医科大学博士启动基金(03201422)

Song Jun-lai, Master candidate, Physician, Department of Orthopedics, Shanxi Dayi Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030032, Shanxi Province, China

Corresponding author: Sun Lin, M.D., Associate chief physician, Master's supervisor, Department of Orthopedics, Shanxi Dayi Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030032, Shanxi Province, China

缩略语:

高迁移率族蛋白1: high mobility group protein, HMGB1

## Inhibition of high mobility group protein attenuates spinal astrocyte injury in rats after oxygen glucose deprivation/reoxygenation

Song Jun-lai<sup>1</sup>, Li Man<sup>2</sup>, Sun Lin<sup>1</sup>, Ma Xun<sup>1</sup>, Lü Cong<sup>1</sup>, He Ya-jun<sup>1</sup> (<sup>1</sup>Department of Orthopedics, Shanxi Dayi Hospital Affiliated to Shanxi Medical University, Taiyuan 030032, Shanxi Province, China; <sup>2</sup>Department of Neurology, Second Hospital of Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China)

### Abstract

**BACKGROUND:** Many investigations focus on the inhibition of high mobility group protein (HMGB1) for improving the functional recovery of spinal cord in mice, but how to culture spinal cord astrocytes *in vitro* and inhibit the expression of HMGB1 for attenuating oxygen glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) injury is rarely reported.

**OBJECTIVE:** To investigate the effect of HMGB1 inhibition on spinal cord astrocytes after OGD/R *in vitro*.

**METHODS:** Astrocytes were isolated from rat spinal cord, and were then cultured and identified. (1) The rat primary spinal cord astrocytes were subjected to 6-hour OGD, followed by 6-, 12-, and 24-hour reoxygenation, respectively. The rat primary spinal cord astrocytes cultured in the normal medium were used as controls. (2) The rat spinal cord astrocytes were divided into five groups: control group (normal medium); 6-hour OGD/24-hour R group; 6-hour OGD/24-hour R plus HMGB1 shRNA group; 6-hour OGD/24-hour R plus non-targeting shRNA group; 6-hour OGD/24-hour R plus ethyl pyruvate group. The expression and release of HMGB1 in astrocytes were determined by western blot assay and ELISA. The cell injury and survival rate were assessed by lactate dehydrogenase and MTT assay. The morphological changes of the cells were observed under light microscope.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The expression and release of HMGB1 protein was increased after OGD/R ( $P < 0.01$ ), and reached the highest value at reoxygenation for 24 hours ( $P < 0.01$ ). The expression level of HMGB1 in the HMGB1 shRNA and ethyl pyruvate groups was significantly decreased, suggesting that specific RNA interference and ethyl pyruvate could effectively inhibit the expression of HMGB1. The leakage rate of lactate dehydrogenase was increased and cell survival rate was decreased after OGD/R, and cell injury was the most serious at reoxygenation for 24 hours ( $P < 0.01$ ). Compared with the 6-hour OGD/24-hour R group, the leakage rate of lactate dehydrogenase in the HMGB1 shRNA and ethyl pyruvate groups was significantly reduced. There were cell swelling, decomposition and other damage changes after OGD/R, while HMGB1 shRNA and ethyl pyruvate RNA could significantly reduce cell injury. Our findings imply that HMGB1 plays an important role in the occurrence and development of spinal cord astrocyte injury, and inhibition of HMGB1 can alleviate spinal cord astrocyte injury in rats after OGD/R.

**Subject headings:** Spinal Cord Injuries; High Mobility Group Proteins; Tissue Engineering

**Funding:** the National Natural Science Foundation of China, No. 81401028; the Science and Technology Research Foundation for the Youth in Shanxi Province, No. 2015021201; the Doctoral Startup Foundation of Shanxi Medical University of China, No. 03201422

## 0 引言 Introduction

脊髓损伤是一种临床上较为常见且预后较差的创伤,其病理机制分为原发性损伤和继发性损伤。原发性损伤直接破坏组织并造成不可恢复的机体损伤;对于脊髓损伤预后产生影响主要是继发性损伤,其病理生理机制包括氧自由基释放、炎性损伤和凋亡、脊髓水肿及局部缺血等<sup>[1-6]</sup>。

高迁移率族蛋白1(high mobility group protein, HMGB1)是一种广泛存在于真核生物细胞核内,结合于DNA的非组蛋白,因其相对分子量较小且在凝胶电泳中的迁移能力快而得名。正常情况下, HMGB1在细胞核中稳定表达,结构高度保守,它能帮助核仁结构的稳定并且调节基因的表达。当细胞受到刺激或者细胞损伤或坏死后, HMGB1可主动或被动释放到细胞外,而胞外的HMGB1具有较强的促炎作用,它能和多种受体Toll样受体2、4和晚期糖基化终产物结合,引起白细胞介素1、白细胞介素6、肿瘤坏死因子等多种炎症因子的大量释放,并且能激活核因子 $\kappa$ B的表达,从而在多种炎症性疾病中发挥着重要作用<sup>[7-9]</sup>。Kikuchi等<sup>[10]</sup>在研究过程中发现,在动物脊髓损伤模型中,局部损伤的脊髓组织中HMGB1水平急剧升高,而释放到胞外的HMGB1引起炎症因子表达加重脊髓的损伤作用。Gong等<sup>[11]</sup>在脊髓损伤模型也发现HMGB1水平急剧升高,

静脉给予HMGB1的一种有效抑制剂(甘草甜素)后,可明显降低血浆中HMGB1及多种炎性因子 肿瘤坏死因子 $\alpha$ 、白细胞介素1 $\beta$ 、白细胞介素6水平,并发现两者有很高的关联性,同时还可明显减少坏死细胞数目,改善脊髓损伤后下肢神经功能。在神经系统中,星形胶质细胞广泛分布于中枢神经系统各个区域,是最主要的细胞组成部分。在营养支持、信号传递、神经营养因子的释放、能量产生和新陈代谢等方面发挥着重要的作用。脊髓损伤后,其中星形胶质细胞在脊髓损伤的发生、发展与脊髓功能的恢复过程中起到关键性的作用,利用其胶质分隔作用,保护神经元胞体、轴突和微小血管结构的结构和功能,证据表明其在脊髓损伤中扮演着越来越重要的作用<sup>[12-13]</sup>。

在当前研究中,通过体外培养大鼠脊髓星形胶质细胞,并对其行氧糖剥夺/复氧处理,模拟体内脊髓损伤后星形胶质细胞病理变化,建立大鼠脊髓损伤星形胶质细胞损伤模型,观察星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后HMGB1表达变化及损伤的情况,并通过大鼠特异性shRNA和丙酮酸乙酯抑制星形胶质细胞HMGB1后,观察其是否能降低细胞氧糖剥夺/复氧的损伤效果,为治疗脊髓损伤引起的星形胶质细胞损伤及多种炎症反应提供一个重要的治疗靶点和新的思路。

## 1 材料和方法 Materials and methods

### 1.1 设计 体外细胞学实验。

1.2 时间及地点 于2017年2月至2017年9月在山西医科大学转化医学中心实验室完成。

### 1.3 材料

1.3.1 实验动物 新生SD大鼠5只,日龄一两天,体质量为10-20 g,由山西医科大学实验动物中心提供,许可证号:SCXK(晋)2015-0001。

1.3.2 实验用主要试剂及器材 DMEM高糖、胎牛血清、无糖DMEM培养基(美国Gibco),慢病毒载体HMGB1 shRNA试剂盒(汉恒生物科技有限公司),丙酮酸乙酯(sigma),兔抗大鼠HMGB1抗体(abcam),小鼠抗大鼠S100 $\beta$ 抗体(博士德),小鼠抗大鼠GAPDH(碧云天)抗体,山羊抗小鼠FITC、辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔二抗、辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠二抗(biosharp),乳酸脱氢酶细胞毒性检测试剂盒及MTT细胞增殖-毒性试剂盒(碧云天)。

### 1.4 方法

1.4.1 星形胶质细胞的培养<sup>[14]</sup> 取新生SD大鼠5只,消毒固定后,剖开椎管取出脊髓组织,用PBS清洗,仔细剥离脊膜和血管,用剪刀将脊髓剪碎成约1 mm的小块,收集后加体积分数0.125%胰蛋白酶,轻轻吹打,放于37 °C温箱中反复消化后加入完全培养基终止消化,离心收集细胞沉淀,加入培养液吹打形成单细胞悬液,吹打后200目筛网过滤。将 $1 \times 10^6$  /cm<sup>2</sup>细胞悬液接种于培养瓶中,置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>的培养箱中培养30 min进行差速黏附处理。取出培养瓶,轻轻翻转,吸取细胞悬液以 $1 \times 10^6$  /cm<sup>2</sup>接种于新的培养瓶中培养,培养三四天后,弃去原培养基加入PBS漂洗1次,加入含体积分数10%胎牛血清的培养基,继续培养,待细胞长成致密单层后进行消化传代培养,生长第3代时得到纯化成熟的星形胶质细胞,用S100 $\beta$ 行免疫荧光法进行鉴定<sup>[15]</sup>。

### 1.4.2 分组

**第一部分实验分组:** ①对照组,未进行氧糖剥夺/复氧,细胞正常培养;②氧糖剥夺6 h/复氧6 h组;③氧糖剥夺6 h/复氧12 h组;④氧糖剥夺6 h/复氧24 h组。利用Western blot和ELISA法检测各组星形胶质细胞HMGB1的表达和释放量,利用乳酸脱氢酶的漏出率和MTT法检测细胞的损伤和存活率。

**第二部分实验分组:** ①对照组;②氧糖剥夺6 h/复氧24 h组;③特异性RNA干扰组:对星形胶质细胞行特异性HMGB1 shRNA干扰,然后氧糖剥夺6 h并复氧至24 h;④非特异性RNA干扰组:对星形胶质细胞行非特异性HMGB1 shRNA处理,然后氧糖剥夺6 h并复氧至24 h;⑤丙酮酸乙酯组:在星形胶质细胞氧糖剥夺6 h时及复氧24 h后的培养基中加有12  $\mu$ mol/L HMGB1特异性抑制剂丙酮酸乙酯。利用Western blot和ELISA法检测各组星形胶质

细胞HMGB1的表达和释放量,利用乳酸脱氢酶的漏出率和MTT法检测细胞的损伤和存活率,光镜下观察细胞损伤情况。

1.4.3 氧糖剥夺/复氧模型的建立<sup>[16-17]</sup> 首先,去掉原有培养瓶内含有的体积分数10%胎牛血清星形胶质细胞培养基,并用无菌PBS快速冲洗2次。实验开始时,加入无血清的DMEM无糖培养基,置于体积分数1%O<sub>2</sub>、5%CO<sub>2</sub>、94%N<sub>2</sub>的三气培养箱中孵育6 h(以O<sub>2</sub>含量达到设定值1%开始进行计时)。再灌注实验时,首先去掉无血清的DMEM无糖培养基,再添加原来的星形胶质细胞培养基,并更换至体积分数5%CO<sub>2</sub>,37 °C复氧培养箱进行,复氧6,12和24 h进行细胞观察并行相关实验检测。

1.4.4 星形胶质细胞HMGB1的抑制 ①RNA干扰抑制HMGB1的方法:氧糖剥夺前,将细胞以 $5 \times 10^4$  /cm<sup>2</sup>接种于培养瓶中,置于37 °C、体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中培养24 h,将病毒按MOI值为60稀释于2 mL星形胶质细胞培养基中,放入培养瓶中继续培养12 h,更换新鲜的培养基继续培养72 h后,行氧糖剥夺/复氧处理;②丙酮酸乙酯抑制HMGB1的方法:细胞培养方法同前,在细胞氧糖剥夺时及复氧后的培养基中均加入12  $\mu$ mol/L丙酮酸乙酯。

1.4.5 Western blot检测星形胶质细胞HMGB1蛋白表达水平 使用细胞刮刀收集各组细胞,并加入膜浆蛋白抽提液中,并用移液枪吹打均匀置于冰面上,裂解30 min,抽提细胞的膜浆蛋白,用BCA法测定蛋白含量,调整蛋白样品的终浓度为2 g/L,加入蛋白上样缓冲液,煮沸变性5 min。配制SDS-PAGE凝胶,每个泳道内加入20  $\mu$ g蛋白样品进行电泳,用PVDF膜进行转膜1.5 h,脂奶粉封闭2 h,孵育一抗(HMGB1抗体1:1 000, GAPDH抗体1:1 000),置于4 °C冰箱过夜。次日,脱将膜置于37 °C恒温箱中复温1 h,加入含有HRP标记的山羊抗小鼠/兔二抗(1:5 000),摇床室温孵育2 h,洗涤PVDF膜3次,用增强型化学发光试剂进行显色,并利用灰度分析软件定量分析。

1.4.6 ELISA检测细胞上清液中HMGB1蛋白的浓度 按照ELISA试剂盒操作说明书步骤,每个样本取细胞培养上清液50  $\mu$ L,检测各组星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后培养上清中HMGB1蛋白的浓度。

1.4.7 乳酸脱氢酶漏出率的测定 细胞氧糖剥夺/复氧后,收集细胞培养液。各组细胞按照乳酸脱氢酶试剂盒说明书对培养液中及细胞内总的乳酸脱氢酶进行测定,计算出乳酸脱氢酶漏出率。乳酸脱氢酶漏出率=培养液中乳酸脱氢酶活性/(培养液中乳酸脱氢酶活性+细胞内总乳酸脱氢酶活性) $\times 100\%$ 。

1.4.8 MTT检测细胞存活率 星形胶质细胞以 $10^9$  L<sup>-1</sup>细胞浓度接种于96孔板中,培养48 h后,每组细胞经过氧糖剥夺/复氧后,各组细胞中加入50  $\mu$ L的MTT溶液,放于37 °C,体积分数5%CO<sub>2</sub>培养箱中继续孵育4 h。光镜下可见黑色晶体状物质,弃去原有培养液,加入150  $\mu$ L DMSO溶液,

摇床轻轻振荡30 min, 于酶标仪570 nm光波长下测定其吸光度值。

1.4.9 星形胶质细胞的形态观察 在光学显微镜下观察各组细胞形态与损伤情况。

1.5 主要观察指标 ①Western blot测定星形胶质细胞HMGB1蛋白表达水平; ②ELISA检测细胞上清液中HMGB1蛋白的浓度; ③乳酸脱氢酶和MTT法分别检测乳酸脱氢酶漏出率和细胞存活率; ④光学显微镜下各组细胞形态与损伤情况。

1.6 统计学分析 采用SPSS 19.0进行统计分析, 计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较均采用单因素方差分析处理, 进一步两两比较采用LSD法,  $P < 0.05$ 为差异有显著性意义。

## 2 结果 Results

2.1 星形胶质细胞的培养与鉴定 在光学显微镜下观察成熟的脊髓星形胶质细胞, 细胞成宽大扁平状, 形状多不规则, 有多个突起, 互相连接, 细胞质丰富、核大质浅, 偶有小胶质细胞等杂细胞, 采用免疫荧光的化学方法, S100 $\beta$ 染色阳性可鉴定其为星形胶质细胞, 细胞纯度达95%以上, 图1。

2.2 Western blot检测星形胶质细胞HMGB1的表达 与对照组(0.20 $\pm$ 0.02)相比, 细胞氧糖剥夺6 h/复氧6 h(0.38 $\pm$ 0.03)后HMGB1的表达显著升高( $P < 0.01$ ), 复氧培养至12 h时(0.38 $\pm$ 0.03), 继续升高, 培养至24 h时(0.61 $\pm$ 0.03), 达到最高值( $P < 0.01$ )。与氧糖剥夺6 h/复氧24 h组相比, 特异性RNA干扰组(0.15 $\pm$ 0.02)及丙酮酸乙酯组(0.29 $\pm$ 0.02)HMGB1的表达量明显降低, 说明特异性的HMGB1 shRNA及丙酮酸乙酯能抑制细胞中HMGB1表达, 见图2-4。

2.3 ELISA检测细胞上清中HMGB1的质量浓度 与对照组相比, 细胞氧糖剥夺/复氧后细胞上清中的HMGB1的质量浓度显著升高( $P < 0.01$ ), 并随着复氧时间延长, 其质量浓度逐渐升高, 复氧至24 h时, 达到最高值( $P < 0.01$ )。与氧糖剥夺6 h/复氧24 h组相比, 特异性RNA干扰组及丙酮酸乙酯组HMGB1的质量浓度明显降低, 说明特异性的HMGB1 shRNA和丙酮酸乙酯能明显抑制细胞中HMGB1的表达和释放, 见表1。

2.4 星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后乳酸脱氢酶漏出率的变化 与对照组细胞相比, 细胞氧糖剥夺/复氧后, 乳酸脱氢酶漏出率均明显增加, 并且随着复氧时间延长乳酸脱氢酶漏出率逐渐升高, 复氧培养至24 h时达到最高值。与氧糖剥夺6 h/复氧24 h组相比, 特异性RNA干扰组及丙酮酸乙酯组细胞的乳酸脱氢酶漏出率明显下降, 而非特异性RNA干扰组乳酸脱氢酶漏出率无明显差异, 图5。

2.5 星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后细胞存活率的变化 与对照组细胞相比, 细胞氧糖剥夺/复氧后, 细胞存活率明显降低, 并且随着复氧时间延长细胞存活率逐渐下降, 复

氧培养至24 h时细胞存活率达到最低( $P < 0.01$ ), 与与氧糖剥夺6 h/复氧24 h组相比, 特异性RNA干扰组及丙酮酸乙酯细胞的存活率明显升高( $P < 0.01$ ), 而非特异性RNA干扰组存活率无明显差异, 图6。

2.6 光镜下观察氧糖剥夺/复氧后的星形胶质细胞 显微镜下观察, 对照组细胞生长状态良好, 胞浆丰富饱满, 形态多样, 呈多边形, 扁平状, 连接较为紧密。星形胶质细胞经氧糖剥夺6 h复氧24 h后, 出现边缘皱缩, 折光性增高, 胞体略增大, 胞内形成少量的颗粒样物质, 突起增粗缩短, 少量细胞呈凝固性坏死。特异RNA干扰及丙酮酸乙酯组可见细胞肿胀明显减轻, 胞内颗粒样物质明显减少, 所以从微观角度看抑制掉HMGB1能改善星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后损伤的效果, 见图7。

## 3 讨论 Discussion

星形胶质细胞是中枢神经系统中胶质细胞数量最多的细胞, 之前的研究认为星形胶质细胞对脊髓神经修复几乎没有影响, 现在越来越多的证据表明星形胶质细胞在脊髓损伤的修复过程中起到关键性的作用<sup>[18]</sup>。星形胶质细胞也能分泌大量神经营养因子, 包括转化生长因子 $\beta$ 、表皮生长因子、血小板源性生长因子等, 对神经组织的生长, 发育, 分化等有重要的作用<sup>[19-20]</sup>。越来越多的证据表明星形胶质细胞对脊髓损伤后神经的发展和保护起到重要的作用。HMGB1是一种核内与DNA结合的非组蛋白。脊髓损伤后, 从损伤组织释放到胞外的HMGB1可引起多种炎症细胞因子的大量释放, 进一步加重了组织的损伤, 表明HMGB1在脊髓损伤的发生发展中起到关键性的作用<sup>[21-27]</sup>。Kawabata等<sup>[28]</sup>报道急性脊髓损伤后能引起局部损伤组织的HMGB1从胞核释放到胞质中, 能够激活胞质中caspase-3的表达, 引发大量神经元的凋亡, 加重脊髓组织的损伤。Kang等<sup>[29]</sup>研究结果表明, 大鼠脊髓损伤后能明显引起HMGB1的高表达, 并引起Toll样受体4和核因子 $\kappa$ B表达增加, 高压氧治疗大鼠的脊髓损伤是通过降低HMGB1的释放与表达, 从而降低一系列炎症因子的释放, 来改善脊髓损伤的效果, 恢复脊髓的功能。Bi等<sup>[30]</sup>研究发现, 紫草素可通过抑制HMGB1/Toll样受体4/核因子 $\kappa$ B信号通路来调节脊髓损伤中的炎症反应, 减轻脊髓损伤后带来的不良反应, 改善脊髓的功能, 也进一步揭示了脊髓损伤后继发性损伤(包括炎症反应)中分子信号通路的传递。

上述结果都是体内模型模拟脊髓损伤后通过各种药物及干预等处理降低HMGB1的表达及释放, 来减轻脊髓损伤后的第2次炎症反应, 改善脊髓的神经功能。当前研究通过体外培养大鼠脊髓星形胶质细胞, 行氧糖剥夺/复氧处理模拟体内脊髓损伤后星形胶质细胞的病理机制, 可观察到脊髓星形胶质细胞在氧糖剥夺/复氧后细胞表达的HMGB1明显升高, 随着复氧的时间延长, HMGB1的表达逐渐升高, 细胞存活率逐渐降低, 细胞乳酸脱氢酶漏出率逐渐增加。

表 1 星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后的高迁移率族蛋白 1(HMGB1) 的释放 ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 1 Release of high mobility group protein in the spinal cord astrocytes after oxygen glucose deprivation/reoxygenation

组别	细胞上清中 HMGB1 的质量浓度( $\mu\text{g/L}$ )
对照组	0.21 $\pm$ 0.02
氧糖剥夺 6 h/复氧 6 h 组	14.62 $\pm$ 1.02 <sup>ab</sup>
氧糖剥夺 6 h/复氧 12 h 组	18.49 $\pm$ 2.11 <sup>ab</sup>
氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组	23.20 $\pm$ 1.72 <sup>a</sup>
特异性 RNA 干扰组	6.96 $\pm$ 1.45 <sup>b</sup>
非特异性 RNA 干扰组	23.66 $\pm$ 1.96
丙酮酸乙酯组	14.22 $\pm$ 1.50 <sup>b</sup>

表注: 与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

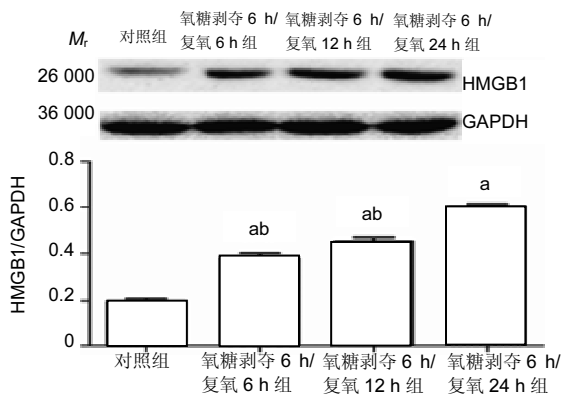


图 2 星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后高迁移率族蛋白 1(HMGB1) 的表达

Figure 2 Expression level of high mobility group protein in the spinal cord astrocytes after oxygen glucose deprivation/reoxygenation

图注: 与对照组相比, 星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后 HMGB1 的表达增加, 并且在复氧 24 h 时表达量最高。与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

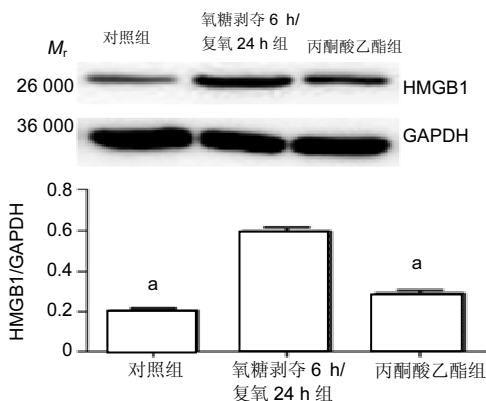


图 4 丙酮酸乙酯对星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后的高迁移率族蛋白 1(HMGB1) 的表达

Figure 4 Effects of ethyl pyruvate on the expression level of high mobility group protein in the spinal cord astrocytes after oxygen glucose deprivation/reoxygenation

图注: 与氧糖剥夺/复氧组相比, 丙酮酸乙酯能降低星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后的 HMGB1 的表达。与氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ 。

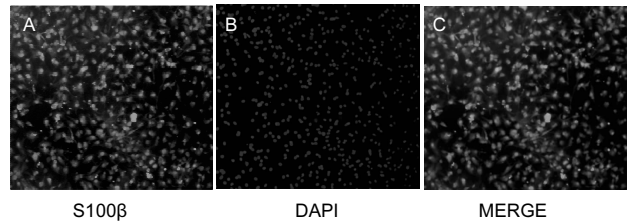


图 1 S100 $\beta$  鉴定星形胶质细胞纯度(x100)

Figure 1 Spinal cord astrocytes identified by S100 $\beta$  using immunofluorescence (x100)

图注: 图中 A 为星形胶质细胞用 S100 $\beta$  染色在荧光显微镜下观察; B 为星形胶质细胞的细胞核用 DAPI 染色在荧光显微镜下观察; C 为图 A 和图 B 的合成图。

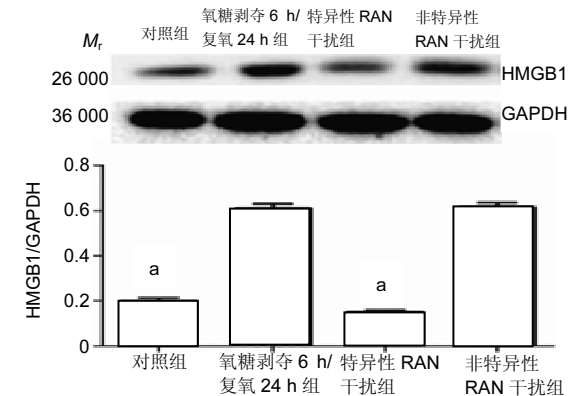


图 3 RNA 干扰对星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后的高迁移率族蛋白 1(HMGB1) 的表达

Figure 3 Effect of RNA interference on the expression level of high mobility group protein in the spinal cord astrocytes after oxygen glucose deprivation/reoxygenation

图注: 与氧糖剥夺/复氧组相比, RNA 干扰能降低星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后的 HMGB1 的表达。与氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ 。

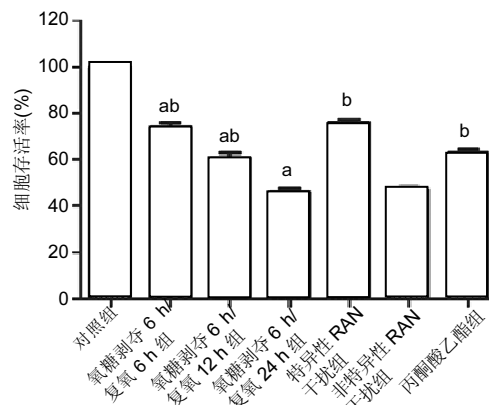
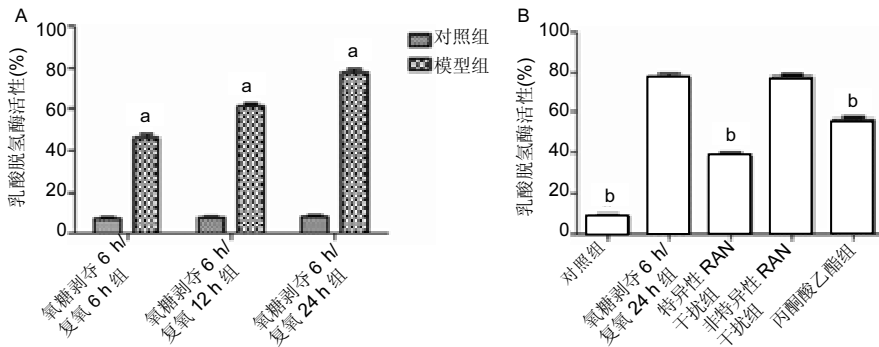


图 6 星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后细胞存活率的变化

Figure 6 Survival rate of the spinal cord astrocytes after oxygen glucose deprivation/reoxygenation

图注: 星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后细胞存活率逐渐下降, 复氧培养至 24 h 时细胞存活率达到最低, RNA 干扰、丙酮酸乙酯能提高星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后细胞存活率。与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。



图注: 图中 A 为第一部分实验各组的乳酸脱氢酶漏出率, 与对照组相比, 星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后细胞乳酸脱氢酶漏出率逐渐升高, 并且在复氧 24 h 时漏出率最高; B 为第二部分实验各组的乳酸脱氢酶漏出率, 与氧糖剥夺/复氧组相比, RNA 干扰、丙酮酸乙酯能降低星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后的乳酸脱氢酶漏出率。与对照组相比, <sup>a</sup> $P < 0.01$ ; 与氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组相比, <sup>b</sup> $P < 0.01$ 。

图 5 星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后乳酸脱氢酶漏出率的变化  
Figure 5 Leakage rate of lactate dehydrogenase in the spinal cord astrocytes after oxygen glucose deprivation/reoxygenation

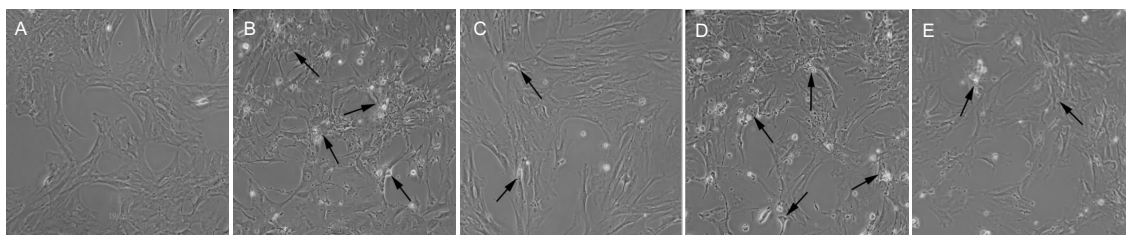


图 7 光镜下观察氧糖剥夺/复氧后的星形胶质细胞 (x200)  
Figure 7 Morphology of the spinal cord astrocytes after oxygen glucose deprivation/reoxygenation under light microscope (x200)  
图注: 图中 A 为对照组, B 为氧糖剥夺 6 h/复氧 24 h 组, C 为特异性 RNA 干扰组, D 为非特异性 RNA 干扰组, E 为丙酮酸乙酯组(图中箭头所指为细胞的水肿状态)。在光镜下观察, 星形胶质细胞经氧糖剥夺/复氧后, 出现边缘皱缩, 折光性增高, 胞体略增大, 少量细胞呈凝固性坏死。特异 RNA 干扰、丙酮酸乙酯能明显改善星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后的损伤。

并于复氧至 24 h 时, HMGB1 表达量最高, 细胞存活率最低, 细胞乳酸脱氢酶漏出率最高。而特异性转染 HMGB1 shRNA 组及加入丙酮酸乙酯组的星形胶质细胞损伤明显减轻, 细胞存活率明显提高。说明对于氧糖剥夺/复氧后的脊髓星形胶质细胞, 抑制 HMGB1 后能明显减轻细胞损伤效果。通过上述结果分析发现, 体外培养的脊髓星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧后, 细胞表达及释放的 HMGB1 也是急剧升高, 随着缺氧复氧时间的变化而变化, 并且其释放和表达的程度和细胞损伤高度相关。当前研究通过 shRNA 干扰技术及化学试剂两种方法抑制 HMGB1 的表达, 发现可明显减轻细胞的损伤情况, 进而从细胞水平展示了 HMGB1 对脊髓损伤的发展及预后起着至关重要的作用。但研究也存在一定的局限性: 如氧糖剥夺/复氧时间点设计的组别较少, 没有精细的展示 HMGB1 表达随着复氧时间变化的情况, 另外仅从脊髓星形胶质细胞水平揭示了抑制 HMGB1 减轻脊髓损伤的效果, 没有从在体及其他神经细胞水平进一步揭示其损伤的机制。

综上所述, 研究通过脊髓星形胶质细胞氧糖剥夺/复氧模拟脊髓损伤后星形胶质细胞病理反应, 揭示了细胞损伤情况和 HMGB1 表达之间的关系, 进一步阐释了 HMGB1 作为一个重要的炎症启动递质在脊髓星形胶质细胞损伤发生与发展起到关键性的作用, 但抑制细胞 HMGB1 的表达如何从通路分子水平来改善细胞损伤情况需要进一步研究与探索。

**作者贡献:** 实验设计为宋君来、孙麟, 细胞培养、模型制作、蛋白及上清的提取由宋君来、李满、吕聪、贺亚军完成, 免疫生化检测由宋君来、李满完成, 实验资料收集、整理与统计由宋君来、吕聪完成, 宋君来、孙麟、马迅成文。

**经费支持:** 该文章接受了“国家自然科学基金(81401028)”、“山西省青年科技研究基金(2015021201)”、“山西医科大学博士启动基金(03201422)”的资助。所有作者声明, 经费支持没有影响文章观点和对研究数据客观结果的统计分析及其报道。

**利益冲突:** 文章的全部作者声明, 在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。

**伦理问题:** 实验方案经山西医科大学动物实验伦理委员会批准。实验过程遵循了国际兽医学编辑协会《关于动物伦理与福利的作者指南共识》和本地及国家法规。实验动物在戊巴比妥麻醉下进行所有的手术, 并尽一切努力最大限度地减少其疼痛、痛苦和死亡。文章的撰写与编辑修改后文章遵守了《动物实验体内实验研究报告规范指南》(ARRIVE 指南)。

**文章查重:** 文章出版前已经过 CNKI 反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

**文章外审:** 文章经国内小同行外审专家双盲外审, 符合本刊发稿宗旨。

**作者声明:** 第一作者和通讯作者对研究和撰写的论文中出现的不端行为承担责任。论文中涉及的原始图片、数据(包括计算机数据库)记录及样本已按照有关规定保存、分享和销毁, 可接受核查。

**文章版权:** 文章出版前杂志已与全体作者授权人签署了版权相关协议。

**开放获取声明:** 这是一篇开放获取文章, 根据《知识共享许可协议》“署名-非商业性使用-相同方式共享 3.0”条款, 在合理引用的情况下, 允许他人以非商业性目的基于原文内容编辑、调整和扩展, 同时允许任何用户阅读、下载、拷贝、传递、打印、检索、超级链接该文献, 并为之建立索引, 用作软件的输入数据或其它任何合法用途。

#### 4 参考文献 References

- [1] Okada S, Hara M, Kobayakawa K, et al. Astrocyte reactivity and astrogliosis after spinal cord injury. *Neurosci Res*. 2018; 126:39-43.
- [2] Anwar MA, Ai STS, Eid AH. Inflammogenesis of secondary spinal cord injury. *Front Cell Neurosci*. 2016;10:98.
- [3] Liu X, Huang S, Liu C, et al. PPP1CC is associated with astrocyte and microglia proliferation after traumatic spinal cord injury in rats. *Pathol Res Pract*. 2017;213(11): 1355-1364.
- [4] Wang Y, Li W, Wang M, et al. Quercetin reduces neural tissue damage and promotes astrocyte activation after spinal cord injury in rats. *J Cell Biochem*. 2018;119(2):2298-2306.
- [5] Casula M, Iyer AM, Spliet WG, et al. Toll-like receptor signaling in amyotrophic lateral sclerosis spinal cord tissue. *Neuroscience*. 2011;179:233-243.
- [6] Ahmed A, Patil AA, Agrawal DK. Immunobiology of spinal cord injuries and potential therapeutic approaches. *Mol Cell Biochem*. 2017. doi:10.1007/s11010-017-3184-9.
- [7] Wang H, Li W, Goldstein R, et al. HMGB1 as a potential therapeutic target. *Novartis Found Symp*. 2007;280:73-85.
- [8] Park JS, Gamboni-Robertson F, He Q, et al. High mobility group box 1 protein interacts with multiple Toll-like receptors. *Am J Physiol Cell Physiol*. 2006;290(3):C917-924.
- [9] Taguchi A, Blood DC, del TG, et al. Blockade of RAGE-amphoterin signalling suppresses tumour growth and metastases. *Nature*. 2000;405(6784):354-360.
- [10] Kikuchi K, Uchikado H, Miura N, et al. HMGB1 as a therapeutic target in spinal cord injury: A hypothesis for novel therapy development. *Exp Ther Med*. 2011;2(5):767-770.
- [11] Gong G, Yuan LB, Hu L, et al. Glycyrrhizin attenuates rat ischemic spinal cord injury by suppressing inflammatory cytokines and HMGB1. *Acta Pharmacol Sin*. 2012;33(1): 11-18.
- [12] 沈劲松,徐伟杰,武绍远,等.星形胶质细胞在脊髓损伤中的研究展望[J].*生命科学*,2017,29(02):170-173.
- [13] Buffo A, Rolando C, Ceruti S. Astrocytes in the damaged brain: molecular and cellular insights into their reactive response and healing potential. *Biochem Pharmacol*. 2010; 79(2):77-89.
- [14] Kerstetter AE, Miller RH. Isolation and culture of spinal cord astrocytes. *Methods Mol Biol*. 2012;814:93-104.
- [15] Takebayashi H, Nabeshima Y, Yoshida S, et al. The basic helix-loop-helix factor olig2 is essential for the development of motoneuron and oligodendrocyte lineages. *Curr Biol*. 2002; 12(13):1157-1163.
- [16] Jian Z, Ding S, Deng H, et al. Probenecid protects against oxygen-glucose deprivation injury in primary astrocytes by regulating inflammasome activity. *Brain Res*. 2016;1643: 123-129.
- [17] Ouyang L, Liu Y, Wang BY, et al. Carnosine suppresses oxygen-glucose deprivation/recovery-induced proliferation and migration of reactive astrocytes of rats in vitro. *Acta Pharmacol Sin*. 2018;39(1):24-34.
- [18] Wang D, Wang S, Ji B, et al. Spatiotemporal expression of FOXA1 correlates with reactive gliosis after spinal cord injury. *Neuropeptides*. 2017;66:36-44.
- [19] Burda JE, Sofroniew MV. Reactive gliosis and the multicellular response to CNS damage and disease. *Neuron*. 2014;81(2):229-248.
- [20] Gabriel C, Ali C, Lesné S, et al. Transforming growth factor alpha-induced expression of type 1 plasminogen activator inhibitor in astrocytes rescues neurons from excitotoxicity. *FASEB J*. 2003;17(2):277-279.
- [21] van Beijnum JR, Buurman WA, Griffioen AW. Convergence and amplification of toll-like receptor (TLR) and receptor for advanced glycation end products (RAGE) signaling pathways via high mobility group B1 (HMGB1). *Angiogenesis*. 2008; 11(1):91-99.
- [22] Zhang Y, Zhu T, Zhang X, et al. Role of high-mobility group box 1 in methamphetamine-induced activation and migration of astrocytes. *J Neuroinflammation*. 2015;12:156.
- [23] Luan G, Gao Q, Zhai F, et al. Upregulation of HMGB1, toll-like receptor and RAGE in human Rasmussen's encephalitis. *Epilepsy Res*. 2016;123:36-49
- [24] Chiavegato A, Zurolo E, Losi G, et al. The inflammatory molecules IL-1 $\beta$  and HMGB1 can rapidly enhance focal seizure generation in a brain slice model of temporal lobe epilepsy. *Front Cell Neurosci*. 2014;8:155.
- [25] Hayakawa K, Miyamoto N, Seo JH, et al. High-mobility group box 1 from reactive astrocytes enhances the accumulation of endothelial progenitor cells in damaged white matter. *J Neurochem*. 2013;125(2):273-280.
- [26] Zurolo E, Iyer A, Maroso M, et al. Activation of Toll-like receptor, RAGE and HMGB1 signalling in malformations of cortical development. *Brain*. 2011;134(Pt 4):1015-1032.
- [27] Qiu J, Xu J, Zheng Y, et al. High-mobility group box 1 promotes metalloproteinase-9 upregulation through Toll-like receptor 4 after cerebral ischemia. *Stroke*. 2010;41(9): 2077-2082.
- [28] Kawabata H, Setoguchi T, Yone K, et al. High mobility group box 1 is upregulated after spinal cord injury and is associated with neuronal cell apoptosis. *Spine (Phila Pa 1976)*. 2010; 35(11):1109-1115.
- [29] Kang N, Hai Y, Yang J, et al. Hyperbaric oxygen intervention reduces secondary spinal cord injury in rats via regulation of HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(2):1141-1153.
- [30] Bi Y, Zhu Y, Zhang M, et al. Effect of shikonin on spinal cord Injury in rats via regulation of HMGB1/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway. *Cell Physiol Biochem*. 2017;43(2):481-491.