

## 诱导急性脊髓损伤模型大鼠炎症反应信号通路的变化

<https://doi.org/10.3969/j.issn.2095-4344.3060>柴乐<sup>1</sup>, 吕建兰<sup>2</sup>, 胡劲涛<sup>2</sup>, 胡华辉<sup>3</sup>, 许庆军<sup>1</sup>, 余进伟<sup>1</sup>, 全仁夫<sup>3</sup>

2095-4344.3060

投稿日期: 2020-01-16

送审日期: 2020-01-18

采用日期: 2020-05-09

在线日期: 2020-09-25

中图分类号:

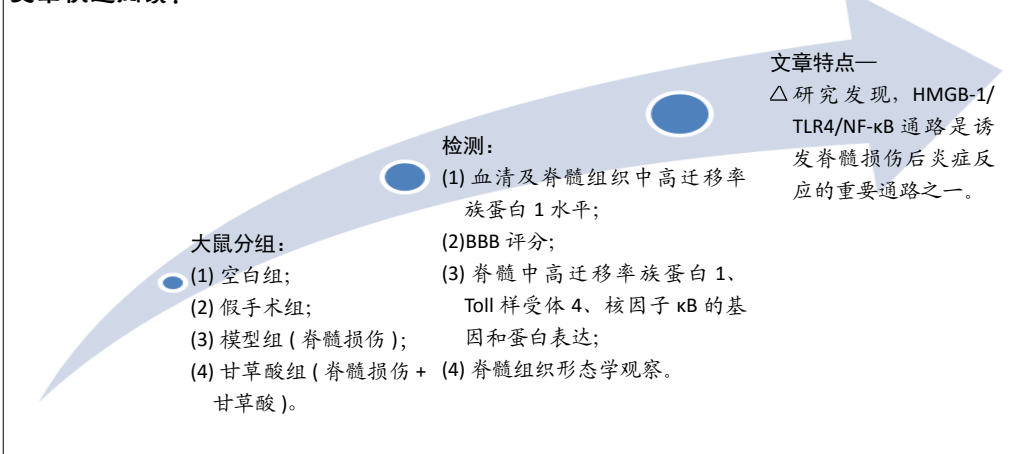
R446; R496; R318

文章编号:

2095-4344(2021)08-01218-06

文献标识码: B

## 文章快速阅读:



## 主题释义:

**高迁移率族蛋白1:** 是一种高度保守的DNA结合蛋白, 与基因修复及转录调控密切相关。同时大量研究表明高迁移率族蛋白1也是坏死损伤和缺血损伤的模型中是重要的炎症递质。

**Toll样受体(Toll-like receptors, TLR):** 是参与非特异性免疫(天然免疫)的一类重要蛋白质分子, 也是连接非特异性免疫和特异性免疫的桥梁。Toll样受体是单个的跨膜非催化性蛋白质, 可以识别来源于微生物的具有保守结构的分子。当微生物突破机体的物理屏障, 如皮肤、黏膜等时, Toll样受体可以识别它们并激活机体产生免疫细胞应答。

## 摘要

**背景:** 前期研究发现采用芒针治疗可改善脊髓损伤后的炎症反应, 降低高迁移率族蛋白1和促炎性因子的表达, 抑制核转录因子的活性及神经细胞凋亡的发生。

**目的:** 分析脊髓损伤后炎症反应发生机制与HMGB-1/TLR4/NF-κB信号通路的相关性。

**方法:** 参考国际公认的改良Allen's造模法制作T<sub>9</sub>-T<sub>10</sub>脊髓损伤大鼠模型, 分别在造模后6 h, 24 h, 3 d, 7 d获取大鼠脊髓及尾动脉血液标本并进行BBB评分; ELISA分别检测脊髓及尾动脉血清中高迁移率族蛋白1的水平, 确定脊髓中高迁移率族蛋白1最高点及血清与脊髓中高迁移率族蛋白1含量的变化规律。将大鼠分为模型组、甘草酸组(采用甘草酸灌胃200 mg/kg)、空白组、假手术组4组, 在高迁移率族蛋白1表达最高时间点获取脊髓, 通过RT-PCR、免疫印迹技术检测大鼠脊髓中高迁移率族蛋白1、Toll样受体4、核因子κB的基因和蛋白表达, 观察大鼠脊髓病理形态变化。实验方案经浙江中医药大学动物实验伦理委员会批准。

**结果与结论:** ①脊髓损伤后, 3 d脊髓及血液中高迁移率族蛋白1的表达量明显高于6 h, 24 h, 7 d( $P < 0.05$ ); ②脊髓损伤3 d时, 甘草酸组脊髓中高迁移率族蛋白1、Toll样受体4、核因子κB、白细胞介素6、肿瘤坏死因子表达低于模型组, 高于空白组及假手术组( $P < 0.05$ ); ③甘草酸组高迁移率族蛋白1、Toll样受体4、核因子κB蛋白和基因表达显著低于模型组, 高于空白组及假手术组( $P < 0.05$ ); ④结果说明, 脊髓损伤后, 血液及脊髓中高迁移率族蛋白1显著升高, 3 d时处于最高值; 通过抑制高迁移率族蛋白1后, 发现HMGB-1/TLR4/NF-κB通路是诱发脊髓损伤后炎症反应的重要通路之一。

**关键词:** 脊髓; 损伤; 蛋白; 核因子; 通路; 炎症反应; 模型; 鼠

## Signal pathway variation after induction of inflammatory response in rats with acute spinal cord injury

Chai Le<sup>1</sup>, Lü Jianlan<sup>2</sup>, Hu Jintao<sup>2</sup>, Hu Huahui<sup>3</sup>, Xu Qingjun<sup>1</sup>, Yu Jinwei<sup>1</sup>, Quan Renfu<sup>3</sup><sup>1</sup>Jiaozuo Second People's Hospital, Jiaozuo 454190, Henan Province, China; <sup>2</sup>Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, Zhejiang Province, China;<sup>3</sup>Jiangnan Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311200, Zhejiang Province, China

Chai Le, Master, Physician, Jiaozuo Second People's Hospital, Jiaozuo 454190, Henan Province, China

**Corresponding author:** Quan Renfu, MD, Chief physician, Jiangnan Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311200, Zhejiang Province, China<sup>1</sup>焦作市第二人民医院, 河南省焦作市 454190; <sup>2</sup>浙江中医药大学, 浙江省杭州市 310053; <sup>3</sup>浙江中医药大学附属江南医院, 浙江省杭州市 311200

第一作者: 柴乐, 男, 1991年生, 河南省焦作市人, 汉族, 2019年浙江中医药大学毕业, 硕士, 医师, 主要从事脊髓损伤后炎症反应研究。

通讯作者: 全仁夫, 博士, 主任医师, 浙江中医药大学附属江南医院, 浙江省杭州市 311200

<https://orcid.org/0000-0002-4230-5465> (柴乐)

基金资助: 杭州市卫生计生科技计划项目(OO20191175); 萧山区科技项目(2018216), 项目负责人: 胡华辉

引用本文: 柴乐, 吕建兰, 胡劲涛, 胡华辉, 许庆军, 余进伟, 全仁夫. 诱导急性脊髓损伤模型大鼠炎症反应信号通路的变化 [J].

中国组织工程研究, 2021, 25(8):1218-1223.



## Abstract

**BACKGROUND:** Previous studies found that treatment with awn needles can improve the inflammatory response after spinal cord injury, reduce the expression of high-mobility group protein 1 (HMGB-1) and pro-inflammatory factors, and inhibit the activity of nuclear transcription factors and the occurrence of neuronal apoptosis.

**OBJECTIVE:** To analyze the relationship between the mechanism of inflammatory response and the HMGB-1/Toll-like receptor 4 (TLR4)/nuclear factor- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) signaling pathway after spinal cord injury.

**METHODS:** The T<sub>9-10</sub> spinal cord injury model was made according to the internationally recognized modified Allen's modeling method. The blood samples of the spinal cord and tail artery were obtained for Basso, Beattie and Bresnahan scoring at 6, 24 hours, 3 and 7 days after modeling. The HMGB-1 content in the spinal cord and tail artery serum was measured by ELISA to determine the highest point of HMGB-1 in the spinal cord and the change rule of HMGB-1 content in serum and spinal cord. Taking the highest HMGB-1 content as the research point and using glycyrrhizic acid as the HMGB-1 inhibitor, the rats were divided into four groups: model group, glycyrrhizic acid group (intragastric administration of glycyrrhizic acid, 200 mg/kg), blank group and sham operation group. The highest HMGB-1 expression was determined by ELISA. The spinal cord was obtained at the highest point of HMGB-1 expression. The correlation between HMGB-1/TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway and inflammation after spinal cord injury was explored by immunoblotting and RT-PCR detection, and the pathological changes of spinal cord in rats were observed. Approval for this study was obtained by the Animal Experimental Ethics Committee of Zhejiang Chinese Medical University.

**RESULTS AND CONCLUSION:** The expression of HMGB-1 in the spinal cord and blood at 3 days after spinal cord injury was significantly higher than that at 6 hours, 24 hours, and 7 days ( $P < 0.05$ ). At 3 days after spinal cord injury, the expressions of HMGB-1, TLR4, NF- $\kappa$ B, interleukin-6, and tumor necrosis factor- $\alpha$  in the glycyrrhizic acid group were lower than those in the model group, but higher than those in the blank group and sham operation group ( $P < 0.05$ ). The expressions of HMGB-1, TLR4 and NF- $\kappa$ B at gene and protein levels in the glycyrrhizic acid group were lower than those in the model group, but higher than those in the blank group and the sham operation group ( $P < 0.05$ ). To conclude, after spinal cord injury, HMGB-1 in blood and spinal cord increased significantly and reached the highest value at 3 days. After inhibiting HMGB-1, it was found that the HMGB-1/TLR4/NF- $\kappa$ B pathway is one of the important pathways to induce inflammation after spinal cord injury.

**Key words:** spinal cord; injury; protein; nuclear factor; pathway; inflammatory response; model; rat

**Funding:** Hangzhou Municipal Health and Family Planning Technology Project, No. 0020191175; Science and Technology Project of Xiaoshan District, No. 2018216 (to HHH)

**How to cite this article:** CHAI L, LÜ JL, HU JT, HU HH, XU QJ, YU JW, QUAN RF. Signal pathway variation after induction of inflammatory response in rats with acute spinal cord injury. *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu*. 2021;25(8):1218-1223.

## 0 引言 Introduction

急性脊髓损伤作为世界性临床医学难题, 可导致损伤平面以下各种感觉、运动神经功能障碍, 是一种严重的中枢神经系统损伤<sup>[1-2]</sup>。临床上一般以糖皮质激素类固醇药物、抗生素、嗅鞘细胞移植、神经营养素等治疗急性脊髓损伤。但由于脊髓损伤需要长期的治疗过程, 上述药物的持续应用存在不良反应较大、临床效果不明显等问题。脊髓损伤后产生的继发性反应是导致神经通路受损及功能丧失的重要原因。继发性脊髓损伤微环境改变主要是通过炎症反应和凋亡反应, 在急性脊髓损伤的病理生理学机制中处于重要地位<sup>[3-4]</sup>。前期研究发现采用芒针治疗可改善脊髓损伤后的炎症反应, 降低高迁移率族蛋白 1 (high mobility group protein, HMGB-1) 和促炎性因子的表达, 抑制核转录因子  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 的活性及神经细胞凋亡的发生<sup>[5-8]</sup>。然而, 急性脊髓损伤导致核因子  $\kappa$ B 和促炎性因子表达和活性增强的机制尚有待于进一步研究。

此次研究在课题组前期发现芒针刺急性脊髓损伤模型大鼠可下调高迁移率族蛋白 1 和核因子  $\kappa$ B 及促炎性因子表达发生的基础上, 通过对 HMGB-1/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路在急性脊髓损伤中的作用研究, 分析急性脊髓损伤后炎症调控方面的作用及分子机制。同时通过监测高迁移率族蛋白 1 在脊髓损伤后不同时间点内的表达变化, 评估脊髓损伤后 HMGB-1/TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路介导的细胞炎症与继发性脊髓损伤进展的相关性。

## 1 材料和方法 Materials and methods

1.1 设计 随机对照动物观察。

1.2 时间及地点 实验于 2018 年 1 月至 2019 年 11 月在浙江中医药大学及焦作市第二人民医院完成。

### 1.3 材料

1.3.1 实验用主要试剂 甘草酸干粉 (大连美仑生物技术有限公司); 酶联免疫检测试剂盒 (美国 R&D); 细胞膜蛋白与细胞浆蛋白提取试剂盒 (上海碧云天生物技术有限公司); RIPA 裂解液、BCA 蛋白定量试剂盒、ECL 化学发光试剂盒 (北京普利莱基因技术有限公司); TaKaRa 试剂盒 (美国 Invitrogen 公司); 水合氯醛 (上海国药集团); 庆大霉素 (河北远征药业); 多聚甲醛 (天津市化学试剂研究所); 二甲苯 (国药集团化学试剂有限公司); OCT 包埋剂 (美国 Sakura 公司); 超纯水机 (美国 Thermo 公司); AB135-S 电子天平 (法国 METTLE TOLEDO 公司); CJJ-6A 恒温磁力搅拌器 (江苏金伟实验仪器); 冷冻干燥仪 (美国 Labconco); 酶联免疫测试仪 (Thermo Scientific Vari-oskan Flash); 扫描电镜 (S-3000N)、真空离子溅射仪 (E-1010) (日本 HITACHI); 纯水仪 (Millipore)。

1.3.2 实验动物 清洁级雄性 Wistar 大鼠 64 只, 体质量 (200±20) g, 来源于上海斯莱克实验动物有限责任公司, 许可证号为 SCXK(沪)2017-0005。动物在实验前 1 周适应环境, 控制室温 20-22 °C, 相对湿度 65%-70%, 自然光, 在浙江中医药大学动物实验中心 (SPF) 分组饲养。

### 1.4 实验方法

1.4.1 实验分组 所有大鼠按照随机数字法将 24 只分为 6 h, 24 h, 3 d, 7 d 4 组 ( $n=6$ )。确定脊髓中高迁移率族蛋白 1 最高时间点后, 将 40 只大鼠按照随机数字法分为模型组、假手术组、甘草酸组、空白组,  $n=10$ 。模型组: 脊髓损伤后不做处理; 假手术组: 只去除椎管, 不做处理; 甘草酸组: 脊髓损伤后 2 h, 采用甘草酸灌胃 (200 mg/kg)<sup>[9]</sup>; 空白组: 不损伤脊髓。

1.4.2 脊髓损伤模型的制备 参照改良的 Allens 造模法制作<sup>[10]</sup>, 大鼠根据体质量将 3% 戊巴比妥钠以 1.5 mL/kg 剂量注入腹腔

麻醉, 假手术组在无菌条件下暴露 T<sub>9</sub>-T<sub>10</sub> 段 0.5 cm 宽硬膜, 模型组在暴露脊髓后, 以击打装置造模, 致伤量为 60 g/cm, 以大鼠出现痉挛性摆动、摆尾反射为造模成功。术后 4 h 对造模大鼠进行 BBB 评分, 将评分高于 2 分的大鼠去除, 并注射庆大霉素抗感染。采用 Crede 手法按摩膀胱辅助大鼠排尿<sup>[11]</sup>, 3 次/d, 直至处死为止。

实验动物造模过程的相关问题

造模目的:	分析脊髓损伤后炎症反应发生机制与 HMGB-1/TLR4/NF-κB 信号通路的相关性
借鉴已有标准实施	参照改良的 Allens 造模法制作脊髓损伤模型 <sup>[10]</sup>
动物造模:	
动物来源及品系:	雄性 Wistar 大鼠, 上海斯莱克实验动物有限责任公司
造模技术描述:	模型组在暴露脊髓后, 以击打装置造模, 致伤量为 60 g/cm
动物数量及分组方法:	将 40 只大鼠按照随机数字法分为模型组、假手术组、甘草酸组、空白组, 每组 10 只
造模成功评价指标:	以大鼠出现痉挛性摆动、摆尾反射为造模成功
造模后实验观察指标:	①大鼠血清及脊髓组织中高迁移率族蛋白 1 水平; ② BBB 评分; ③脊髓中高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4、核因子 κB 的基因和蛋白表达; ④脊髓组织形态学观察
造模后动物处理:	分别在术后 6 h、24 h、3 d、7 d 及高迁移率族蛋白 1 最高时间点取材。麻醉大鼠后, 取脊髓组织待检测
伦理委员会批准:	实验方案经浙江中医药大学动物实验伦理委员会批准

1.4.3 实验取材 造模结束后不进行治疗干预, 模型组每天予以辅助排尿, 分别在术后 6, 24 h 与 3, 7 d 及高迁移率族蛋白 1 最高时间点取材。将大鼠用水合氯醛麻醉后, 用含肝素的采血管采取尾动脉血液 1 mL, 离心后 4 °C 保存。解剖大鼠胸腔后, 采用生理盐灌注直至肝脏变白。冰上用咬骨钳剥离受伤脊髓 1.5 cm, 从中间截断。一段液氮冻存后置于 -80 °C 中; 另一段置于多聚甲醛中固定。

1.4.4 BBB 评分 使用 Basso, Beattie 和 Bresnahan(BBB) 评分系统评估脊髓损伤大鼠的功能恢复情况<sup>[12]</sup>。采用双人双盲的方式分别在术后 6, 24 h 与 3, 7 d 及高迁移率族蛋白 1 最高时间点的相同时间段进行评分。

1.4.5 ELISA 检测 严格按照酶联免疫检测试剂盒使用说明书进行操作, 采用生物素双抗夹心技术检测大鼠脊髓组织中 Toll 样受体 4、高迁移率族蛋白 1、核因子 κB、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子水平。简要实验步骤: 准备试剂(生物素标记的抗 Toll 样受体 4、HMGB1、核因子 κB、白细胞介素 6 和肿瘤坏死因子抗体), 将标准品梯度稀释; 将标准品、准备好的样品、酶标试剂和生物素标记二抗加入, 37 °C 下反应 1 h; 将板洗 5 次, 加入显色液 A、B, 37 °C 下避光显色 10 min; 加入终止液终止反应; 10 min 以内读取各孔的吸光度(A 值); 计算出样品的实际浓度。

1.4.6 Western blotting 检测 取脊髓损伤段 100 mg<sup>[13]</sup>, 用组织剪切成细小的碎片, 加入 1 mL 组织裂解液后, 匀浆, 直到完全裂解后, 再在 10 000 ×g 离心 5 min, 取上清溶液, 于 -80 °C 冰箱保存, 按 1 : 4 比例加入上样缓冲液, 100 °C 水浴锅变

性 10 min, 10%SDS-PAGE 凝胶电泳分离(每孔蛋白上样量为 35 μg), 电泳后转膜, 5% 的脱脂奶粉封闭 1 h, 一抗兔抗高迁移率族蛋白 1 多克隆抗体(1 : 1 000)、兔抗 Toll 样受体 4 多克隆抗体(1 : 1 000)、兔抗核因子 κB 多克隆抗体(1 : 1 000)和内参兔抗 β-actin 多克隆抗体(1 : 5 000)用 5% 牛奶稀释(1 : 200), 4 °C 过夜, TBST 洗膜, 5% 的牛奶稀释的辣根过氧化物酶标记的兔抗羊二抗, 洗膜后, 按照 ECL 说明书, 1 : 1 配置发光工作液, 凝胶成像仪成像, ImageJ 软件进行灰度分析。

1.4.7 RT-PCR 检测 按 TaKaRa 试剂盒说明书进行操作。RT-PCR 扩增程序: 预变性: 95 °C、30 s; PCR 反应: 95 °C、5 s, 60 °C、30 s; 40 个循环; Dissociation Stage: 95 °C、15 s, 60 °C、30 s, 90 °C、15 s。数据采用仪器自带软件分析 ABI Prism 7500 SDS Software 分析, 采用 2<sup>-ΔΔCt</sup> 法计算各基因(高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4、核因子 κB) 相对表达量。引物序列见表 1。

表 1 | 引物序列  
Table 1 | Primer sequences

基因	引物序列	长度 (bp)
高迁移率族蛋白 1	上游 5'-ATG GGC AAA GGA GAT CCT A-3'	303
	下游 5'-ATT CTC ATC ATC TCT TCT-3'	
核因子 κB	上游 5'-CGA TCT GTT TCC CCT CAT CT-3'	174
	下游 5'-ATT GGG TGC GTC TTA GTG GT-3'	
Toll 样受体 4	上游 5'-GCC GGA AAG TTA TTG TGG TGG T-3'	356
	下游 5'-ATG GGT TTT AGG CGC AGA GTT T-3'	
β-actin	上游 5'-GCC ATG TAC GTA GCC ATC CA-3'	375
	下游 5'-GAA CCG CTC ATT GCC GAT AG-3'	

1.4.8 脊髓组织苏木精 - 伊红染色 取脊髓组织采用多聚甲醛固定后脱水, 石蜡包埋, 切片, 采用苏木精 - 伊红染色, 脱水, 封固, 在显微镜下观察。

1.5 主要观察指标 ①大鼠脊髓损伤后血清及脊髓组织中高迁移率族蛋白 1 水平; ②大鼠 BBB 评分; ③大鼠脊髓中高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4、核因子 κB 的基因和蛋白表达; ④脊髓组织形态学观察。

1.6 统计学分析 应用 SPSS 18.0 统计软件分析, 计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示, 正态资料采用单因素方差分析, 两两比较应用 LSD 法(方差齐)或 Tunnnett T3 法(方差不齐), 非正态资料采用秩和检验, 以 P < 0.05 为差异有显著性意义。

2 结果 Results

2.1 实验动物数量分析 实验选用大鼠 40 只, 分为 4 组, 实验过程无脱失, 全部进入结果分析。

2.2 ELSA 检测结果 脊髓损伤后随着时间的推移脊髓组织中高迁移率族蛋白 1 水平出现了先增高, 然后再逐渐降低的过程, 在损伤后第 3 天时达到峰值(P < 0.05)。血清中高迁移率族蛋白 1 水平变化趋势与脊髓中高迁移率族蛋白 1 水平变化趋势相似, 同样是在 3 d 时达到最高值(P < 0.05), 且脊髓中高迁移率族蛋白 1 水平要高于血清中, 见表 2。脊髓损伤后 3 d 高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4、核因子 κB、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子水平, 假手术组与空白组之间差异较小,

说明去除椎管对脊髓中高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4、核因子  $\kappa$ B、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子的表达无明显作用。甘草酸作为高迁移率族蛋白 1 的抑制剂，可有效抑制高迁移率族蛋白 1 的表达。通过抑制高迁移率族蛋白 1 后，发现甘草酸组脊髓中 Toll 样受体 4、核因子  $\kappa$ B、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子的表达量都低于模型组，见图 1。

表 2 | 大鼠脊髓损伤后不同时间点脊髓及血液中高迁移率族蛋白 1 水平比较 ( $\bar{x} \pm s, n=6, \mu\text{g/L}$ )

Table 2 | Comparison of high-mobility group protein 1 levels in spinal cord and blood at different time points after spinal cord injury

分组	6 h	1 d	3 d	7 d	F 值	P 值
脊髓中	1.89±0.13	1.93±0.12	1.95±0.11	1.93±0.20	0.22	$P < 0.05$
血液中	1.43±0.08	1.37±0.07	1.45±0.05	1.44±0.08	1.74	$P < 0.05$

表注：脊髓损伤 3 d 时，大鼠外周血及脊髓中高迁移率族蛋白 1 的水平最高

2.3 BBB 评分 造模后 6 h 大鼠运动功能最差，随着时间的推移，大鼠在自身的恢复作用下，运动功能逐渐变好。损伤后第 3 天，空白组、假手术组大鼠因未损伤脊髓，后肢运动无障碍；甘草酸组在甘草酸作用下后肢运动功能 BBB 评分高于模型组 ( $P < 0.05$ )，见图 2。

2.4 Western blotting 检测结果 各组中高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4、核因子  $\kappa$ B 的蛋白表达趋势相似。在甘草酸抑制后，高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4、核因子  $\kappa$ B 表达显著下降，均低于模型组，且高于空白组和假手术组 ( $P < 0.05$ )，见图 3。

2.5 PCR 检测结果 假手术组与空白组高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4、核因子  $\kappa$ B 基因表达差异无显著性意义 ( $P > 0.05$ )。模型组高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4、核因子  $\kappa$ B 基因的表达明显高于空白组；甘草酸抑制后高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4、核因子  $\kappa$ B 基因的表达低于模型组，但均未低于空白组 ( $P < 0.05$ )，见图 4。

2.6 脊髓组织形态学观察 空白组脊髓组织无空洞，神经细胞排列整齐，细胞形态完好，间隙正常；假手术组与空白组对比无明显变化。模型组与甘草酸组由于遭受损伤出现不同程度的空洞，神经纤维出现不同程度的断裂与溶解，神经细胞出现不同程度的变性与坏死；细胞排列紊乱，间隙增宽，炎性细胞不同程度的浸润。甘草酸组神经纤维、细胞形态、细胞间隙及炎性细胞浸润较模型组有明显改善。见图 5。

### 3 讨论 Discussion

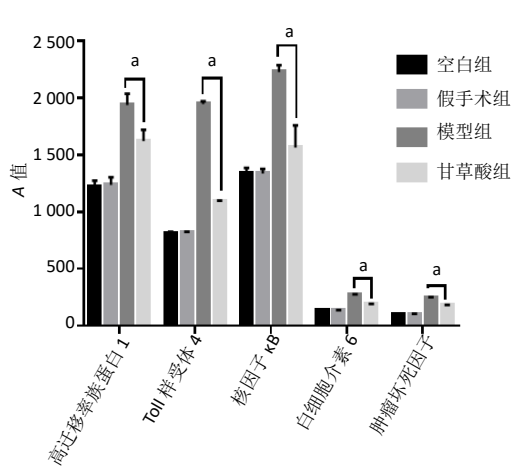
通过此次实验证明当脊髓损伤后脊髓组织中的高迁移率族蛋白 1 逐渐升高，到第 3 天时达到最高值，之后随着自身修复开始逐渐下降，同时，Toll 样受体 4 和核因子  $\kappa$ B 的表达量与高迁移率族蛋白 1 成正相关。脊髓损伤后第 3 天可诱导高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4 和核因子  $\kappa$ B 表达量上调，通过甘草酸抑制高迁移率族蛋白 1 后，Toll 样受体 4、核因子  $\kappa$ B 表达量减低，表明脊髓损伤后炎症可能是通过 HMGB-1/TLR4/NF- $\kappa$ B 炎症信号通路产生，同时证明甘草酸干预可通过

降低高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4 和核因子  $\kappa$ B 的表达来调节该通路炎症反应。对比 4 组大鼠脊髓病理图片时发现通过甘草酸抑制脊髓损伤后炎症反应的同时，可降低炎症细胞的浸润，减少脊髓空洞的形成。对比大鼠 BBB 评分可发现，降低大鼠的炎症反应后，大鼠运动功能恢复有较好的改善。

脊髓损伤后，神经细胞产生不可逆的死亡，随之出现一系列继发性损伤，最终导致轴突束断裂并引起运动或感觉功能障碍<sup>[14]</sup>。继发性损伤主要由代谢紊乱，大量炎症反应和神经毒素引起，使神经细胞死亡增加<sup>[15-17]</sup>，而过度的炎症阻碍神经修复和再生正常过程<sup>[18-20]</sup>。因此，减少继发性炎症损伤成为脊髓损伤治疗的重点<sup>[20]</sup>。前期研究发现脊髓损伤后可促进高迁移率族蛋白 1 和促炎性因子的表达并增强核转录因子  $\kappa$ B 的活性，而高迁移率族蛋白 1 作为一种高度保守的 DNA 结合蛋白，与基因修复及转录调控密切相关。同时大量研究表明高迁移率族蛋白 1 也是坏死损伤和缺血损伤的模型中是重要的炎性递质，细胞外的高迁移率族蛋白 1 与靶细胞表面相应受体结合后，即可启动信号转导通路，激活核转录因子  $\kappa$ B，即高迁移率族蛋白 1 与 Toll 样受体 4 结合，导致核因子  $\kappa$ B 通路激活，通过肿瘤坏死因子以及白细胞介素 6 的诱导作用，在炎症反应中发挥了重要调节<sup>[21-22]</sup>。甘草酸作为一种天然的高迁移率族蛋白 1 抑制剂，其中的甘氨酸可直接结合在高迁移率族蛋白 1 中的两个 HMGB 盒，从而抑制成纤维细胞和平滑肌细胞趋化功能<sup>[23-25]</sup>。当用甘草酸降低高迁移率族蛋白 1 的生成后，可有效减少与 Toll 样受体 4 结合。由于 Toll 样受体 4 在自身免疫和非感染性免疫应答中起重要作用<sup>[26]</sup>，同时 Toll 样受体 4 可依赖小胶质细胞活化从而调节脊髓损伤程度<sup>[27]</sup>，所以当缺乏功能性 Toll 样受体 4 可减少神经元损伤，降低小胶质细胞激活、减少促炎细胞因子的产生并降低脊髓损伤程度。

而脊髓组织细胞中的核因子  $\kappa$ B 具有调控炎症相关基因的转录作用。当脊髓损伤致细胞受刺激后，可导致核因子  $\kappa$ B 信号通路被激活，使肿瘤坏死因子、白细胞介素 1 $\beta$ 、白细胞介素 6 等炎性因子产生高表达，从而导致脊髓损伤后炎症反应以及继发性神经损害<sup>[28-30]</sup>。实验中抑制高迁移率族蛋白 1 的同时，也间接阻断了高迁移率族蛋白 1 与 Toll 样受体 4 的结合，有效缓解了核因子  $\kappa$ B 信号通路的激活，从而下调编码炎症相关因子基因的表达，减少炎症递质的合成和释放。由于该炎症递质与核因子  $\kappa$ B 信号通路在细胞外的反馈调节作用，所以减少炎症递质的生成，同时也可抑制炎症效应增加，进一步减少脊髓损伤后神经损伤<sup>[31]</sup>。

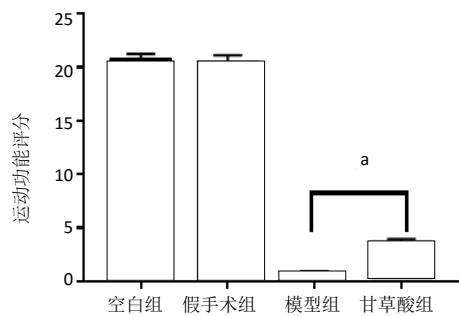
综上所述，高迁移率族蛋白 1 可能是急性脊髓损伤后继发性损伤中起始病理进程中的一个关键性事件，且高迁移率族蛋白 1 表达与病情变化密切相关。而 HMGB-1/TLR4/NF- $\kappa$ B 通路可能是诱发脊髓损伤后炎症反应的重要通路之一。同时高迁移率族蛋白 1 也可作为治疗脊髓损伤后炎症反应的治疗靶点，为今后治疗脊髓损伤继发性炎症损伤开辟新思路。



图注：甘草酸组脊髓中 Toll 样受体 4、核因子 κB、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子的表达量均低于模型组。n=6, P<0.05

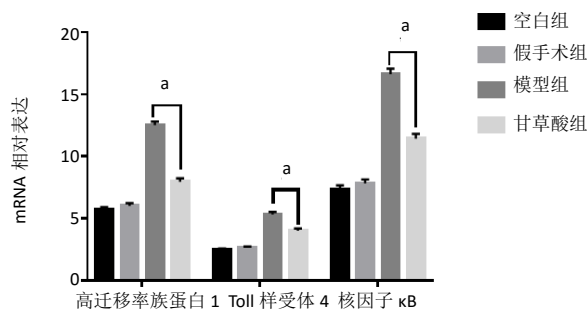
图 1 | 大鼠脊髓损伤 3 d 脊髓中高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4、核因子 κB、白细胞介素 6、肿瘤坏死因子表达

Figure 1 | ELISA detection of high-mobility group protein 1, Toll-like receptor 4, nuclear factor-κB, interleukin-6, and tumor necrosis factor-α expression in the rat spinal cord at 3 days after spinal cord injury



图注：3 d 时甘草酸组运动功能恢复情况优于模型组，n=6, P<0.05

图 2 | 各组大鼠运动功能评分  
Figure 2 | Rat motor function scoring



图注：甘草酸组高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4、核因子 κB 基因的表达低于模型组，但均未低于空白组。n=6, P<0.05

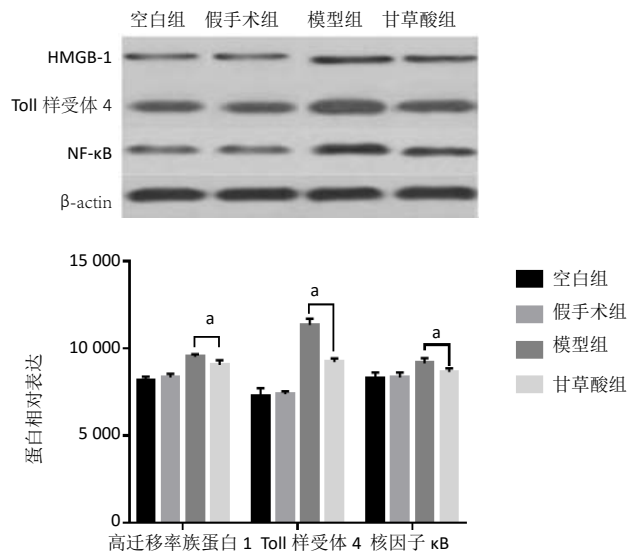
图 4 | 大鼠脊髓损伤 3 d 脊髓中高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4、核因子 κB 基因的表达

Figure 4 | Expression of high-mobility group protein 1, Toll-like receptor 4 and nuclear factor-κB genes in the rat spinal cord at 3 days after spinal cord injury

作者贡献：全仁夫，胡华辉进行实验设计，实验实施及资料收集为吕建兰，柴乐，实验评估为胡劲涛，许庆军，余进伟校审。双盲法评估。

经费支持：该文章接受了“杭州市卫生计生科技计划项目(OO20191175)”“萧山区科技项目(2018216)”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。

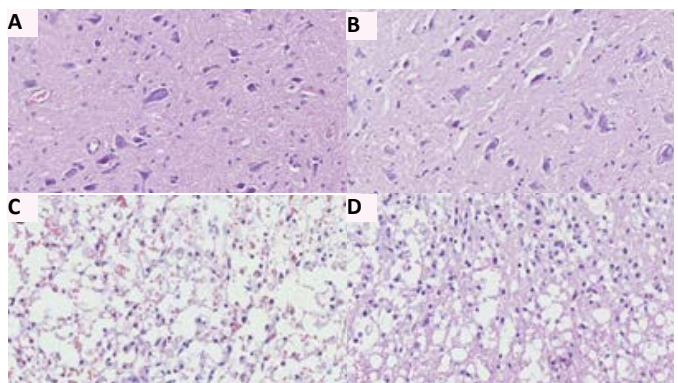
利益冲突：文章的全部作者声明，在课题研究和文章撰写过程中不存在利益冲突。



图注：在脊髓组织中，4 组高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4、核因子 κB 蛋白的表达趋势相似，且甘草酸组高迁移率族蛋白 1、Toll 样受体 4、核因子 κB 的蛋白表达量明显低于模型组。n=6, P<0.05

图 3 | 大鼠脊髓损伤 3 d 脊髓中高迁移率族蛋白 1(HMGB-1)、Toll 样受体 4、核因子 κB 蛋白表达水平

Figure 3 | Western blot detection of high-mobility group protein 1, Toll-like receptor 4, and nuclear factor-κB in the rat spinal cord at 3 days after spinal cord injury



图注：图 A 为空白组，B 为假手术组，C 为模型组，D 为甘草酸组。甘草酸组神经纤维、细胞形态、细胞间隙及炎性细胞浸润较模型组有明显改善

图 5 | 大鼠脊髓组织形态学观察(苏木精-伊红染色, ×200)

Figure 5 | Morphological observation of the rat spinal cord tissue (hematoxylin-eosin staining, ×200)

机构伦理问题：实验方案经浙江中医药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。

文章查重：文章出版前已经过专业反剽窃文献检测系统进行 3 次查重。

文章外审：文章经小同行外审专家双盲外审，同行评议认为文章符合期刊发稿宗旨。

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 4.0”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] CAO XJ, FENG SQ, FU CF, et al. Repair, protection and regeneration of spinal cord injury. *Neural Regen Res.* 2015;10(12):1953-1975.
- [2] BARTEL P, KREBS J, WOLLNER J, et al. Bladder stones in patients with spinal cord injury: a long-term study. *Spinal Cord.* 2014; 52(4): 295-297.
- [3] YANG W, YANG Y, YANG JY, et al. Treatment with bone marrow mesenchymal stem cells combined with plumbagin alleviates spinal cord injury by affecting oxidative stress, inflammation, apoptosis and the activation of the Nrf2 pathway. *Int J Mol Med.* 2016;37(4): 1075-1082.
- [4] SEO JY, KIM YH, KIM JW, et al. Effects of Therapeutic Hypothermia on Apoptosis and Autophagy After Spinal Cord Injury in Rats. *Spine.* 2015; 40(12):883-890.
- [5] MO YP, YAO HJ, LV W, et al. Effects of Electroacupuncture at Governor Vessel Acupoints on Neurotrophin-3 in Rats with Experimental Spinal Cord Injury. *Neural Plast.* 2016;2016:2371875.
- [6] JUAREZ BO, SALGADO CH, ANGUIANO SC, et al. Electro-Acupuncture at GV.4 Improves Functional Recovery in paralyzed rats after a Traumatic Spinal Cord Injury. *Acupunct Electrother Res.* 2015;40(4):355-369.
- [7] 李长明, 谢尚举, 王拓, 等. 电针对大鼠急性脊髓损伤后神经细胞凋亡及相关功能的影响 [J]. *中国骨伤*, 2015, 28(8):737-738.
- [8] DU M, CHEN R, QUAN R, et al. A Brief Analysis of Traditional Chinese Medical Elongated Needle Therapy on Acute Spinal Cord Injury and Its Mechanism. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013;2013:828754.
- [9] WANG B, LIAN YJ, DONG X, et al. Glycyrrhizic acid ameliorates the kynurenine pathway in association with its antidepressant effect. *Behav Brain Res.* 2018;353:250-257.
- [10] 胡华辉, 黄小龙, 全仁夫, 等. 急性脊髓损伤模型大鼠血清和脊髓的代谢组学研究 [J]. *中国骨伤*, 2017,30(2):152-158.
- [11] 许明, 张泓, 刘继生, 等. 电针对完全性脊髓损伤后神经源性膀胱大鼠脊髓组织中 Caspase-9 细胞色素 C 及凋亡蛋白酶激活因子-1 表达的影响 [J]. *中国康复理论与实践*, 2017,23(6):628-633.
- [12] YUN BH, CHON SJ, CHOI YS, et al. Pathophysiology of Endometriosis: Role of High Mobility Group Box-1 and Toll-Like Receptor 4 Developing Inflammation in Endometrium. *PLoS One.* 2016.11(2):e0148165.
- [13] 王双, 林斌, 陈志达, 等. 抑制 TNFR/RIPK 信号通路对大鼠急性脊髓损伤后神经功能的影响 [J]. *中国脊柱脊髓杂志*, 2017,27(4): 353-360.
- [14] RODEMER W, SELZER ME. Role of axon resealing in retrograde neuronal death and regeneration after spinal cord injury. *Neural Regen Res.* 2019;14(3):399-404.
- [15] HU AM, LI JJ, SUN W, et al. Myelotomy reduces spinal cord edema and inhibits aquaporin-4 and aquaporin-9 expression in rats with spinal cord injury. *Spinal Cord.* 2014; 53(2):98-102.
- [16] FAN ZK, WANG YF, CAO Y, et al. The effect of aminoguanidine on compression spinal cord injury in rats. *Brain Res.* 2010;1342:1-10.
- [17] LEONARD AV, THORNTON E, VINK R. The Relative Contribution of Edema and Hemorrhage to Raised Intrathecal Pressure after Traumatic Spinal Cord Injury. *J Neurotrauma.* 2015;32(6):397-402.
- [18] DONNELLY DJ, POPOVICH PG. Inflammation and its role in neuroprotection, axonal regeneration and functional recovery after spinal cord injury. *Exp Neurol.* 2008;209(2):378-388.
- [19] STAHEL PF, FLIERL MA. Targeted Modulation of the Neuroinflammatory Response after Spinal Cord Injury: The Ongoing Quest for the "Holy Grail". *Am J Pathol.* 2010;177(6):2685-2687.
- [20] ZHUO M, WU G, WU LJ. Neuronal and microglial mechanisms of neuropathic pain. *Mol Brain.* 2011;4:31.
- [21] YANG H, HREGGVIDSDOTTIR HS, PALMBLAD K, et al. A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release. *Proc Natl Acad Sci.* 2010;107(26): 11942-11947.
- [22] WANG H, LI W, GOLDSTEIN R, et al. HMGB1 as a potential therapeutic target. *Novartis Found Symp.* 2007;280:73-85. discussion 85-91, 160-164.
- [23] 王颖, 韩秀萍. 甘草酸苷作用机制的研究进展 [J]. *实用药物与临床*, 2018,21(1):109-113.
- [24] LICA L, DE MARCHIS F, SPITALERI A, et al. Glycyrrhizin binds to high-mobility group box 1 protein and inhibits its cytokine activities. *Chem Biol.* 2007;14:431-441.
- [25] LI JM, QUAN ZX, LIU B. Research progress of the NF- $\kappa$ B signaling pathway on acute secondary response to spinal cord injury. *Journal of Traumatic Surgery.* 2009;11:85-87.
- [26] BELL MT, PUSKAS F, AGOSTON VA, et al. Toll-like receptor 4-dependent microglial activation mediates spinal cord ischemia-reperfusion injury. *Circulation.* 2013;128:S152-156.
- [27] LEE HJ, SHIN JS, LEE WS, et al. Chikusetsusaponin IVa Methyl Ester Isolated from the Roots of *Achyranthes japonica* Suppresses LPS-Induced iNOS, TNF- $\alpha$ , IL-6, and IL-1 $\beta$  Expression by NF- $\kappa$ B and AP-1 Inactivation. *Biol Pharm Bull.* 2016;39(5):657-664.
- [28] XI L, HU R, GUO T, et al. Immunoreactivities of NF- $\kappa$ B, IL-1 $\beta$  and IL-1R in the skin of Chinese brown frog (*Rana dybowskii*). *Acta Histochem.* 2017;119(1):64-70.
- [29] AMINI PA, AKBARI M, FARAHABADI A, et al. Effect of estrogen therapy on TNF- $\alpha$  and iNOS gene expression in spinal cord injury model. *Acta Med Iran.* 2016.54: 296-301.
- [30] REN GY, SUN AN, ZHANG JJ, et al. Advances in roles of NF- $\kappa$ B in regulating pathways of apoptosis. *Chin J Pharmacol Toxicol.* 2015; 29:323-327.
- [31] SE Y, IKEDA K, MURASHIMA N, et al. The long term efficacy of glycyrrhizin in chronic hepatitis C patients. *Cancer.* 1997;79:1494-500.