

# 心肺复苏患者血中高迁移率族蛋白 B1 的表达与预后的关系

王世奇, 俞锐敏

暨南大学第一附属医院急诊科, 广东 广州 510632

**摘要: 目的** 探讨实施心肺复苏(CPR)后血液中高迁移率族蛋白 B1(HMGB1)的表达水平与病人预后的关系。**方法** 收集心脏骤停后实施 CPR 患者 90 例,根据 CPR 救治结果分组:P1 组(CPR 30 min 无效死亡)30 例;P2 组(复苏成功,自主循环建立 $\geq 2$  h,但最终出现死亡)30 例;H 组(复苏成功,预后较好)30 例。同时选择暨南大学第一附属医院体检健康者 30 例为 C 组。采用酶链免疫吸附法(ELISA)检测患者血清白细胞介素(IL)-1 $\beta$ ,IL-4,IL-10 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )的含量。采用 Western-blot 方法,检测患者血液样本中 HMGB1 蛋白相对表达量。**结果** IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-10 四组间差异具有统计学意义( $P$  均 $<0.05$ ),其中 H 组、P1 组、P2 组 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-10 水平均高于 C 组,P1 组和 P2 组高于 H 组,差异均具有统计学意义( $P$  均 $<0.05$ ),说明随着患者预后不良程度的增加,血清的炎性因子的水平逐渐增加。C 组、H 组、P2 组、P1 组 HMGB1 蛋白相对表达量分别为  $101.23 \pm 14.67$ 、 $175.45 \pm 8.89$ 、 $213.23 \pm 10.12$ 、 $298.48 \pm 11.48$ ,各组差异具有统计学意义( $F = 23.561, P = 0.000$ ),其中 C 组、H 组、P2 组 HMGB1 蛋白水平均低于 P1 组,C 组和 H 组低于 P2 组,C 组低于 H 组,差异均具有统计学意义( $P$  均 $<0.05$ ),说明随着进行 CPR 病人预后的不良程度的增加, HMGB1 的表达逐渐升高。**结论** 患者经过 CPR 后,外周血中促炎/抗炎因子的释放与病人的预后密切相关。

**关键词:** 心肺复苏; 高迁移率族蛋白 B1; 白细胞介素-1 $\beta$ ; 白细胞介素-4; 白细胞介素-10; 肿瘤坏死因子- $\alpha$ ; 预后

中图分类号: R 541.7<sup>+</sup>8 文献标识码: A 文章编号: 1674-8182(2016)09-1174-04

## Association of high mobility group box protein 1 expression with prognosis in patients with cardiopulmonary resuscitation

WANG Shi-qi, YU Rui-min

The First Hospital Affiliated to Jinan University, Guangzhou, Guangdong 510632, China

**Abstract: Objective** To explore the relationship between high mobility group box protein 1(HMGB1) expression in peripheral blood and patients' prognosis after cardiopulmonary resuscitation(CPR). **Method** A total of 90 patients who performed CPR after cardiac arrest were collected and divided into P1 group[invalid(death) after CPR of 30 minutes], P2 group(establishing spantangous circulation for more than or equal to 2 hours after CPR, but died eventually) and H group(successful CPR and good prognosis) based on the outcomes of CPR ( $n = 30$  each). Meanwhile, 30 healthy subjects were served as control group. The serum interleukin(IL)-1 $\beta$ , IL-4, IL-10 and tumor necrosis factor- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ ) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA), and the levels of HMGB1 protein relative expression in blood samples were tested by Western-blot. **Results** There were statistical differences in levels of serum IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 among four groups(all  $P < 0.05$ ). Compared with control group, the levels of IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 in groups P1, P2, H significantly increased, and compared with H group, they significantly increased in groups P1 and P2(all  $P < 0.05$ ). Namely, the serum inflammatory factors levels increased gradually with the increase of the degree of poor prognosis. HMGB1 protein relative expression quantities in groups C, H, P2 and P1 were  $101.23 \pm 14.67$ ,  $175.45 \pm 8.89$ ,  $213.23 \pm 10.12$ ,  $298.48 \pm 11.48$ , respectively, and there was statistical difference in the four groups( $F = 23.561, P = 0.000$ ), in which the HMGB1 protein relative expression quantities in groups C, H and P2 were significantly lower than that in group P1, lower in groups C and H than that in group P2, lower in group C than that in group H(all  $P < 0.05$ ), namely, the HMGB1 protein relative expression quantities increased gradually with the increase of the degree of poor prognosis. **Conclusion** After

CPR, the release of pro-inflammatory/ anti-inflammatory factors is closely associated with patients' prognosis.

**Key words:** Cardiopulmonary resuscitation; High mobility group box protein 1; Interleukin-1 $\beta$ ; Interleukin-4; Interleukin-10; Tumor necrosis factor- $\alpha$ ; Prognosis

心脏骤停是指心脏射血功能的突然终止,大动脉搏动与心音消失,重要器官严重缺血、缺氧,导致生命终止<sup>[1]</sup>。心肺复苏(CPR)是针对心脏骤停而采取的常用急救措施,心搏骤停一旦发生,如得不到即刻及时地抢救复苏,4~6 min 后会造患者脑和其他重要器官组织的不可逆的损害;此外由于缺血再灌注损伤的存在,会导致机体许多重要脏器出现继发性的损伤<sup>[2]</sup>,从而严重影响 CPR 后患者的预后效果,研究发现 CPR 后导致的缺血再灌注损伤与机体内的炎症密切相关<sup>[3]</sup>。高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein, HMGB1) 是一种高度保守的核蛋白,随着其晚期促炎作用的发现, HMGB1 成为近年来危重医学研究的热点之一<sup>[4]</sup>。本研究在 CPR 不同预后的患者的血液样本中检测血清促炎/抗炎因子的水平以及 HMGB1 在外周血中的表达水平,以期更加深入的评价炎症过程对 CPR 后患者预后的影响。

## 1 对象与方法

**1.1 研究对象** 收集暨南大学第一附属医院 2012 年 1 月到 2014 年 6 月收治的经过 CPR 的心脏骤停患者 90 例,其中男性 59 例,女性 31 例,年龄 34~67 (50.78 $\pm$ 2.34) 岁。纳入标准:(1) 可以收集到患者完整的检测和治疗资料;(2) 患者多因心肌梗死、脑血管意外以及重大外伤而引起;(3) 经过管委会批准,并且符合伦理道德,签署知情同意书。排除标准:(1) 患有严重肝、肾、心等重要器官衰竭性疾病,或者严重感染性疾病;(2) 患有严重消耗性疾病,或者正在服用影响研究结果药物者;(3) 不依从、不配合、容易产生失访以及拒绝参加试验者;(4) 研究期间患者病情加重不能参加研究者。90 例患者根据 CPR 救治结果分组:P1 组,30 例,实施 CPR 30 min 无效死亡,男 21 例,女 9 例,年龄 35~66 (51.37 $\pm$ 3.18) 岁;P2 组:30 例,复苏成功,自主循环建立 $\geq$ 2 h,但最终出现死亡,男 18 例,女 12 例,年龄 38~62 (53.78 $\pm$ 5.39) 岁;H 组:30 例,复苏成功,预后较好,男 20 例,女 10 例,年龄 40~69 (55.19 $\pm$ 4.67) 岁;同时选择我院体检健康者 30 例为 C 组,男 19 例,女 11 例,年龄 38~65 (53.42 $\pm$ 3.62) 岁,4 组年龄、性别等基础资料间差异无统计学意义( $P$  均 $>$ 0.05),具有可比性。

### 1.2 检测方法

**1.2.1 血液白介素(IL)-1 $\beta$ , IL-4, IL-10, 肿瘤坏死因**

**子 $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )检测** 采用 ELISA 法检测各组患者血清 IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 和 IL-10 含量,于 CPR 术后采集血标本并进行室温离心(1 500 $\times$ g, 3 min),收集上清放置 -80 $^{\circ}$ C 保存待用。将各试剂移至室温平衡 5 min,并与加样之前配置好质控品、洗涤液(配置方法:20X 洗液:H<sub>2</sub>O=1:19)和标准品。每孔中加入 50  $\mu$ l 稀释液,并加入标准品,质控,样品各 50  $\mu$ l。摇晃混匀,覆盖上板贴,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。然后弃去液体,甩干。洗板 5 次,每孔 300  $\mu$ l,每次 1 min,甩干。每孔加入 100  $\mu$ l IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-4 和 IL-10,盖上新的板贴,37 $^{\circ}$ C 孵育 2 h。弃去液体,甩干,并吸去残留的液体。每孔加入 100  $\mu$ l 显色底物(需提前配制),避光 37 $^{\circ}$ C 孵育 30 min。每孔加入 100  $\mu$ l 终止液,充分混匀,避光操作,在 450 nm 波长检测吸光度(OD 值)。

**1.2.2 Western-blot 法检测 HMGB1 表达水平** 含有蛋白酶抑制剂和磷酸酶抑制剂(Roche Diagnostics Corp.)的裂解液(Beyotime Company, Jiangsu, China)均化血液样本,进行蛋白免疫印迹检查。在 4 $^{\circ}$ C 孵育 30 min 后,将样品离心(1 500 $\times$ g, 30 min),收集上清液,用 BCA 蛋白试剂盒(Beyotime)测定浓度。每个样品中的蛋白提取物添加到凝胶电泳的缓冲液(100 mM Tris, pH 值 6.8, 20% 甘油, 200 mM DTT, 4% SDS, 0.03% 溴酚蓝)中,并在 97 $^{\circ}$ C 变性 10 min。缓冲液中的蛋白(100 mg/样品)在 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶中电泳 1.5 h。将胶转移到 PVDF 膜上,并用 5% 脱脂牛奶在 PBS 中封闭 1 h。将膜与一抗 HMGB1 或  $\beta$ -actin (Sigma-Aldrich, 1:1 000)在 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。用含有 0.1% Tween-20 的 PBS 清洗 3 次,每次 5 min,然后将膜与辣根过氧化物酶标记的抗兔-或抗鼠-IgG (Abcam, 1:2 000)孵育。清洗后,印迹使用增强的化学发光(ECL)系统(Amersham Corp., CardiV, UK)显色。

**1.3 统计学分析** 实验中所有指标数据均服从正态分布,采用 SPSS 19.0 软件对本研究数据进行分析,其中计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,两组比较采用  $t$  检验;多组间的均数比较采用单因素方差分析(ANOVA)。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 不同实验分组中促炎/抗炎因子水平 IL-1 $\beta$ 、**

TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-10 等在四组间差异具有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.01$ ), 其中 H 组、P1 组、P2 组 IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-10 水平均高于 C 组, 差异具有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ ), P1 组和 P2 组高于 H 组, P1 组高于 P2 组, 差异均具有统计学意义 ( $P$  均  $< 0.05$ ), 说明随着病人预后结果的不良程度的增加, 研究对象血清的炎性因子的水平逐渐增加。见表 1。

## 2.2 不同分组患者体内 HMGB1 的表达水平

C 组、H 组、P2 组、P1 组 HMGB1 蛋白相对表达量分别为  $101.23 \pm 14.67$ 、 $175.45 \pm 8.89$ 、 $213.23 \pm 10.12$ 、 $298.48 \pm 11.48$ , 各组差异具有统计学意义 ( $F = 23.561$ ,  $P = 0.000$ ), 其中 C 组、H 组、P1 组 HMGB1 蛋白水平均低于 P2 组, C 组和 H 组低于 P1 组, C 组低于 H 组, 差异均具有统计学意义 ( $P < 0.05$ ), 随着进行 CPR 病人预后的不良程度的增加, HMGB1 的表达逐渐升高。HMGB1 蛋白 Western-blot 检测结果见图 1。

表 1 各组患者血清中细胞因子的水平 ( $n = 30$ , nmol/L,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	IL-1 $\beta$	TNF- $\alpha$	IL-4	IL-10
C 组	$33.2 \pm 4.8$	$7.7 \pm 1.2$	$11.5 \pm 3.2$	$24.2 \pm 6.9$
H 组	$65.2 \pm 10.4^*$	$29.6 \pm 6.5^*$	$31.6 \pm 6.7^*$	$45.3 \pm 9.7^*$
P2 组	$112.5 \pm 17.0^{*#}$	$58.5 \pm 7.2^{*#}$	$60.2 \pm 10.9^{*#}$	$93.1 \pm 24.5^{*#}$
P1 组	$129.4 \pm 15.3^{*#\Delta}$	$64.5 \pm 9.6^{*#\Delta}$	$66.3 \pm 11.8^{*#\Delta}$	$102.6 \pm 21.8^{*#\Delta}$
F 值	23.123	6.331	6.234	10.673
P 值	0.000	0.001	0.001	0.000

注: 与 C 组相比,  $*P < 0.05$ ; 与 H 组相比,  $^{\#}P < 0.05$ ; 与 P2 组相比,  $^{\Delta}P < 0.05$ 。

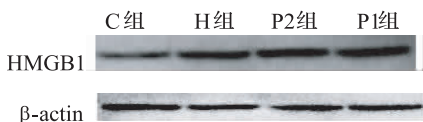


图 1 4 组 HMGB1 蛋白 Western-blot 检测结果

## 3 讨论

HMGB1 是一种以非组蛋白形式存在的核蛋白, 其在胞核之内可以与 DNA 结合, 并能调节转录的过程<sup>[5-6]</sup>。当机体受到炎症刺激的情况下, HMGB1 从胞核转运至胞浆内, 并且可与 Toll 样受体 2 (TLR-2) 相互作用作为一种促炎性因子, 参与体内炎症疾病的发生发展变化<sup>[7]</sup>。已有动物研究表明, 使用 HMGB1 特异性的抑制剂, 能够减轻动物发生炎症的程度以及提高动物的存活率<sup>[8]</sup>, 在一定程度上, 这可成为将来药物治疗的靶点<sup>[9-10]</sup>。

当各种情况导致机体出现心脏骤停时, 机体内个组织器官会出现缺血。此时, 代谢的废物不能及时进行转运, 同时细胞所需的营养物质也不能得到及时的

供给<sup>[11]</sup>, 线粒体的活动受限, 氧化呼吸链在一定程度上受到干扰, 极易引发机体出现炎症反应。另一方面, 当 CPR 成功后, 各组织器官血供恢复, 可发生再灌注损伤<sup>[12]</sup>, 表现为: 脑损害、心肌损害、持续诱发性病变, 最终导致患者死亡<sup>[13-14]</sup>。炎症过程在缺血再灌注损伤的过程中, 发挥了不容忽视的作用。有研究表明, IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$  等炎性因子可启动机体发生炎症级联反应, 释放大量的酶类和活性氧 (ROS), 导致机体出现内质网应激和脂质过氧化反应, 最终导致机体出现严重的炎症反应<sup>[15]</sup>。机体为维持内环境的稳态, 同时也会启动抗炎反应系统, 产生 IL-10, 抑制炎症细胞如单核巨噬细胞的激活以及各种炎症因子的释放。当机体的抗炎系统与促炎症系统失衡时, 机体内环境紊乱, 则会出现全身性的炎症反应, 进而导致机体的器官组织受损, 出现疾病<sup>[16]</sup>。

本组资料显示 H 组、P1 组、P2 组 IL- $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-4、IL-10 水平均高于 C 组, P1 组和 P2 组高于 H 组, P1 组高于 P2 组; 随着进行 CPR 患者预后的不良程度的增加, HMGB1 的表达逐渐升高, 患者的预后与 HMGB1 的水平密切相关。说明患者体内由于缺血再灌注损伤的影响, 会引发体内出现炎症反应, IL-1 $\beta$ 、TNF- $\alpha$ 、IL-4 和 IL-10 等炎症因子的表达水平明显升高, 同时 HMGB1 的表达水平也升高。

综上所述, 对患者实施 CPR 后, 患者的预后与体内的炎症反应的程度密切相关。预后不良的患者, 体内出现严重的炎症反应。可见, 在将来的临床治疗活动中, 对于 CPR 后的患者进行积极的抗炎反应, 能够提高病人的预后, 且 HMGB1 为一个有效的靶点。

## 参考文献

- [1] 易梦秋, 王秀芳, 张艳梅. 生脉注射液在老年心肺复苏患者心肌再灌注损伤中的保护作用[J]. 中国老年学杂志, 2012, 32(24): 5385-5386.
- [2] 徐卉芳, 张冒先, 海克蓉, 等. 心博骤停大鼠复苏即刻应用肝素对肾脏 MDA、SOD 的影响[J]. 宁夏医学杂志, 2012, 34(12): 1196-1198.
- [3] Wang H, Bloom O, Zhang M, et al. HMGB-1 as a later mediator of endotoxin lethality in mice[J]. Science, 1999, 285(5425): 248-251.
- [4] Bae JS. Role of high mobility group box 1 in inflammatory disease: focus on sepsis[J]. Arch Pharm Res, 2012, 35(9): 1151-1523.
- [5] Huan Y, Ochani M, Li J, et al. Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004, 101(1): 296-301.
- [6] Albayrak Y, Albayrak A, Celik M, et al. High mobility group box protein-1 (HMGB-1) as a new diagnostic marker in patients with acute appendicitis[J]. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2011, 19(1): 1-6.
- [7] 陈天铎, 姚巍. 心肺复苏中细胞因子的变化及意义探讨[J]. 中

- 国急救医学, 2002, 22(6): 365-366.
- [8] 许国根, 陈澜, 陈雯, 等. 心肺复苏病人脑缺血-再灌注损伤后炎性细胞因子的监测及其意义[J]. 中国急救医学, 2001, 21(7): 385-386.
- [9] Søreide K. The role of high-mobility group box-1 (HMGB-1) in the management of suspected acute appendicitis: useful diagnostic biomarker or just another blind alley [J]. Scand J Trauma Resusc Emerg Med, 2011, 19: 28.
- [10] 邵伯云. 重症肺炎并发 ARDS 患者血清高迁移率蛋白 B1 水平及其与病情严重程度的关系[J]. 中国临床研究, 2015, 28(2): 167-169.
- [11] Mersmann J, Iskandar F, Latsch K, et al. Attenuation of myocardial injury by HMGB1 blockade during ischemia/reperfusion is toll-like receptor 2-dependent [J]. Mediators Inflamm, 2013, 2013: 174168.
- [12] Oda Y, Tsuruta R, Fujita M, et al. Prediction of the neurological outcome with intrathecal high mobility group box 1 and S100B in cardiac arrest victims: a pilot study [J]. Resuscitation, 2012, 83(8): 1006-1012.
- [13] Huo TT, Zeng Y, Liu XN, et al. Hydrogen-rich saline improves survival and neurological outcome after cardiac arrest and cardiopulmonary resuscitation in rats [J]. Anesth Analg, 2014, 119(2): 368-380.
- [14] Abdulhad DA, Westra J, Bijzet J, et al. High mobility group box 1 (HMGB1) and anti-HMGB1 antibodies and their relation to disease characteristics in systemic lupus erythematosus [J]. Arthritis Res Ther, 2011, 13(3): 1-9.
- [15] Kohno T, Anzai T, Naito K, et al. Role of high-mobility group box 1 protein in post-infarction healing process and left ventricular remodeling [J]. Cardiovasc Res, 2009, 81(3): 565-573.
- [16] Pisetsky DS, Erlandsson-Harris H, Andersson U. High-mobility group box protein 1 (HMGB1): an alarmin mediating the pathogenesis of rheumatic disease [J]. Arthritis Res Ther, 2008, 10(3): 1-10.
- 收稿日期: 2016-04-15 修回日期: 2016-06-07 编辑: 周永彬

(上接第 1173 页)

- [4] 秦桢楠, 钟耀刚, 李铮. 人肝星状细胞激活和抑制及其相关分子机制的研究进展 [J]. 中国细胞生物学学报, 2011, 33(10): 1127.
- [5] 杨悦杰, 黄芬. 肝星状细胞及相关细胞因子在肝纤维化形成中的作用 [J]. 世界华人消化杂志, 2007, 15(27): 2885-2890
- [6] Reeves HL, Friedman SL. Activation of hepatic stellate cells--a key issue in liver fibrosis [J]. Frontiers in Bioscience, 2002, 7(1): d808-d826.
- [7] 梁若筋, 蒋学禄, 姚庆华, 等. 姜黄素逆转 P-gp 介导卵巢癌多药耐药机制的研究 [J]. 中华全科医学, 2014, 12(6): 932-934.
- [8] 狄建彬, 顾振纶, 赵笑东, 等. 姜黄素的抗氧化和抗炎作用研究进展 [J]. 中草药, 2010, 41(5): 附 18-附 20.
- [9] 郑媛媛, 刘震雄, 赵曙光, 等. 姜黄素对氧化应激中肝星状细胞活化及细胞外基质分泌的影响 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2011, 20(4): 309-312.
- [10] Kawai T, Akira S. TLR signaling [J]. Cell Death & Differentiation, 2006, 13(5): 816-825.
- [11] 李雅娟, 鲁凤民, 庄辉. 髓样分化蛋白 88 在炎症感染相关原发性肝癌发生中的作用 [J]. 中华肝脏病杂志, 2010, 18(3): 232-234.
- [12] Seki E, Brenner DA, Schwabe RF. Toll-like receptor signaling in the liver [J]. Gastroenterology, 2006, 130(6): 1886-1900.
- [13] 贾媛媛, 高晓唯, 田艳明, 等. MyD88 依赖性 NF- $\kappa$ B 信号途径改变对家兔 PVR 模型玻璃体内 TNF- $\alpha$  变化的影响 [J]. 眼科新进展, 2010, 30(10): 933-936.
- [14] 艾国, 肖芳, 范翔雪, 等. TLR4/MyD88 在实验性自身免疫性肝炎小鼠中的表达和意义 [J]. 胃肠病学和肝病学杂志, 2013, 22(8): 800-803.
- [15] 何航, 沈晓君, 华海婴. 姜黄素对人肝星状细胞 LX-2 凋亡及 Collagen  $\alpha 1(I)$  mRNA 表达的影响 [J]. 中药材, 2009, 32(12): 1880-1882.
- [16] 王礼凤, 刘莉君, 孙守才, 等. 姜黄素对肝纤维化大鼠肝组织 Bcl-2 及 Bax 表达的影响 [J]. 实用中医药杂志, 2011, 27(4): 224-225.
- 收稿日期: 2016-04-03 修回日期: 2016-05-16 编辑: 王国品