

• 颞下颌关节研究 •

## 三叉神经节 TLR4—MyD88 信号通路参与大鼠 颞下颌关节炎诱发的神经免疫反应

李维佳<sup>1,2</sup> 李路佳<sup>1</sup> 樊帆<sup>1</sup> 金海威<sup>1\*</sup>

(1. 大连医科大学口腔医学院 辽宁 大连 116044;

2. 呼伦贝尔市人民医院口腔内科 内蒙古 呼伦贝尔 021008)

**[摘要]** 目的:利用大鼠颞下颌关节炎(temporomandibular joint inflammation, TMJI)模型,检测 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4)及其信号通路在三叉神经节中的动态表达,探究神经系统 TLR4 信号通路在 TMJI 及疼痛反应中的作用。方法:颞下颌关节下腔注射完全弗氏佐剂法建立大鼠 TMJI 动物模型,应用苏木精-伊红(hematoxylin-eosin staining, HE)染色法观察 TMJI 进展,免疫组织化学染色法检测三叉神经节中 TLR4 与髓样分化因子 88(myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88)的表达变化。结果:完全弗氏佐剂诱发 TMJI 后,三叉神经节神经元 TLR4 与 MyD88 的表达显著增加,且两者表达呈低度相关性。结论:三叉神经节 TLR4—MyD88 信号通路参与 TMJI 诱发的神经免疫反应,神经元 TLR4 的激活可能通过 MyD88 依赖途径进行信号转导。

**[关键词]** 颞下颌关节炎 Toll 样受体 4 髓样分化因子 88 神经免疫反应

**[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671—7651(2018)11—1244—05

**[doi]** 10.13701/j.cnki.kqyxj.2018.11.023

**TLR4—MyD88 Signal Pathway in Trigeminal Ganglia Involved in Immunoreactivity Induced by Temporomandibular Joint Inflammation in Rats.** LI Wei-jia<sup>1,2</sup>, LI Lu-jia<sup>1</sup>, FAN Fan<sup>1</sup>, JIN Hai-wei<sup>1\*</sup>. 1. School of Stomatology, Dalian Medical University, Dalian 116044, China; 2. Department of Oral Medicine, HulunBuir People's Hospital, Hulunbeier 021008, China.

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the dynamic expression of TLR4 and its signal pathway in trigeminal ganglia (TG) by using a temporomandibular joint inflammation (TMJI) animal model in rats, and further to explore the role of TLR4 signal pathway involved in the neural immune response during process of TMJI and accompanied pain. **Methods:** Rats model of TMJI were established by intra-articular injection of Freund's adjuvant complete. Histopathological examination showed the progressive pathological changes in the TMJ were detected by HE staining, and the expression of TLR4 or MyD88 in TG were observed by immunohistochemistry. **Results:** The expression of TLR4 and MyD88 in TG increased significantly post TMJI. Correlation analysis showed low correlation between TLR4 and MyD88 expression. **Conclusion:** TLR4—MyD88 signal pathway in TG involved in neural immune response during TMJI. The signal transduction of activation of TLR4 in neurons may be mediated by MyD88 dependent pathway.

**[Key words]** Temporomandibular joint inflammation TLR4 MyD88 Neural immune response

颞下颌关节炎(temporomandibular joint inflammation, TMJI)可导致关节组织退化性疾病,表现为关节疼痛、滑膜炎、软骨进行性退变等。颞下颌关节病变发病机制复杂,关节病变及疼痛的治疗仍然是临床难题。研究证明,神经因素对 TMJI

及痛觉过敏的发生、发展与预后起到重要作用。前期研究表明,三叉神经节(trigeminal ganglia, TG)神经细胞在口腔颌面部损伤及痛觉过敏的发生及发展中发挥重要作用<sup>[1]</sup>,TG 中降钙素基因相关肽、趋化因子 CX3CL1 等均参与外周组织炎症诱发的神经免疫反应<sup>[2]</sup>。

Toll 样受体(Toll-like receptors, TLRs)在炎症反应、细胞信号转导、细胞凋亡等多种生理进程中发挥重要的作用。Toll 样受体 4(Toll-like recep-

**作者简介** 李维佳(1992~),女,内蒙古人,硕士,主要从事口腔颌面部疼痛的医学研究,现就职于呼伦贝尔市人民医院口腔内科。

\* 通讯作者 金海威, E-mail:1760684062@qq.com

tors 4, TLR4) 是 TLRs 家族的重要跨膜式识别受体。近年来越来越多的研究发现 TLR4 不仅表达于固有免疫细胞,在中枢神经系统的小胶质细胞、初级感觉神经元细胞上也存在 TLR4 的表达,在神经免疫反应中发挥重要的作用。髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 是 TLR4 信号通路中重要的转导蛋白。越来越多的研究结果提示,神经系统存在 TLR4,其信号转导通路可能在外周炎症诱发的神经免疫应答及疼痛反应中起重要作用,以 TLR4 为靶点调控神经免疫反应可能成为疾病治疗的新策略。

本研究通过颞下颌关节腔注射完全弗氏佐剂 (complete Freund's adjuvant, CFA), 建立大鼠 TMJI 模型,应用苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin staining, HE) 染色、免疫组织化学染色等方法观察 TLR4 及其信号通路在 TG 中的动态表达,探究神经系统 TLR4 信号通路在 TMJI 及疼痛反应中的作用。

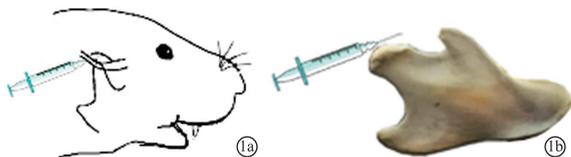
## 1 材料与方法

1.1 实验动物 由大连医科大学重大疾病基因工程模式动物研究所提供的成年雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 18 只随机分组,于颞下颌关节上腔注射 CFA,建立 TMJI 动物模型。正常对照组 (Naive 组) 大鼠不进行任何处理。

1.2 实验试剂 小鼠抗大鼠 TLR4 单克隆抗体 (Abcam 公司, ab22048); 兔抗大鼠 MyD88 多克隆抗体 (上海生工, D121009); CFA (Sigma 公司); 生物素-链霉卵白素免疫组织化学检测试剂盒 (中杉金桥, SP9001、SP9002)、浓缩型二氨基联苯胺 (diaminobenzidine, DAB) 试剂盒 (中杉金桥, ZLI9018)。

## 1.3 方法

1.3.1 建立大鼠 TMJI 模型 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉大鼠 (0.3 mL/100 g 体重), 消毒大鼠双侧颞下颌关节区域, 以外眼眶眶连线上 1 mm 与耳前 2 mm 交点处为进针点, 沿前、上、内方向进针, 止于颞窝壁, 稍后退, 回抽无血后缓慢注射 50  $\mu$ L CFA 乳化液 (CFA : 生理盐水, 1 : 1) 于关节上腔 (图 1)。



1a: TMJI 模型示意图; 1b: TMJI 模型建立解剖示意图

图 1 大鼠颞下颌关节炎模型建立示意图

Fig. 1 Schematic diagram of establishment of TMJI model in rats.

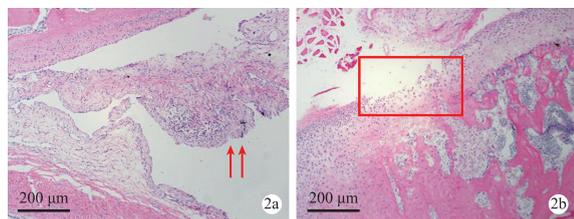
1.3.2 标本制备 实验组大鼠分别于 CFA 注入后 72 h、1、2、4 和 6 周, 乙醚全身麻醉至呼吸停止后立即将大鼠仰卧位置于操作台上, 迅速经胸骨柄处打开胸腔, 暴露心脏, 经左心室依次灌注生理盐水和 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液进行灌注固定, 取颞下颌关节及 TG, 于新鲜的 4% 多聚甲醛磷酸盐缓冲液进行固定。剖取的 TG 经 20% 蔗糖隔夜浸润、包埋, 制备厚 10  $\mu$ m 的连续冰冻切片。

1.3.3 免疫组织化学染色 取 TG 切片, 磷酸缓冲液 (phosphate buffer saline, PBS) 清洗后, 柠檬酸钠水浴抗原修复 20 min, 用含有 0.3%  $H_2O_2$  的甲醇溶液固定组织并灭活内源性过氧化物酶, PBS 清洗后滴加标准驴血清封闭非特异性抗原。滴加一抗兔抗大鼠 TLR4 抗体 (1 : 500) 或 MyD88 (1 : 50) 4  $^{\circ}$ C 过夜 (阴性对照组以等量 PBS 替代一抗), PBS 清洗后加入生物素标记的山羊抗小鼠/兔 IgG, 孵育 1 h。PBS 漂洗后滴加辣根过氧化物酶标记链霉卵白素工作液体, 孵育 1 h, 漂洗后 DAB 显色, 梯度酒精脱水, 中性树胶封片, Olympus BX-43 显微镜下观察取像。TLR4 与 MyD88 阳性细胞率统计 每个 TG 标本依次选取 6 ~ 10 个组织切片 (间隔 100  $\mu$ m), 每个切片镜下选取 3 ~ 4 个独立视野, 分别计数每个视野内 TLR4 或 MyD88 阳性神经元细胞数及总神经元数, 分别计算 TLR4 及 MyD88 阳性细胞率。

1.4 统计学分析 数据采用 SPSS 19.0 软件进行统计学分析, 各组间比较采用 ANOVA 检验及相关性分析, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

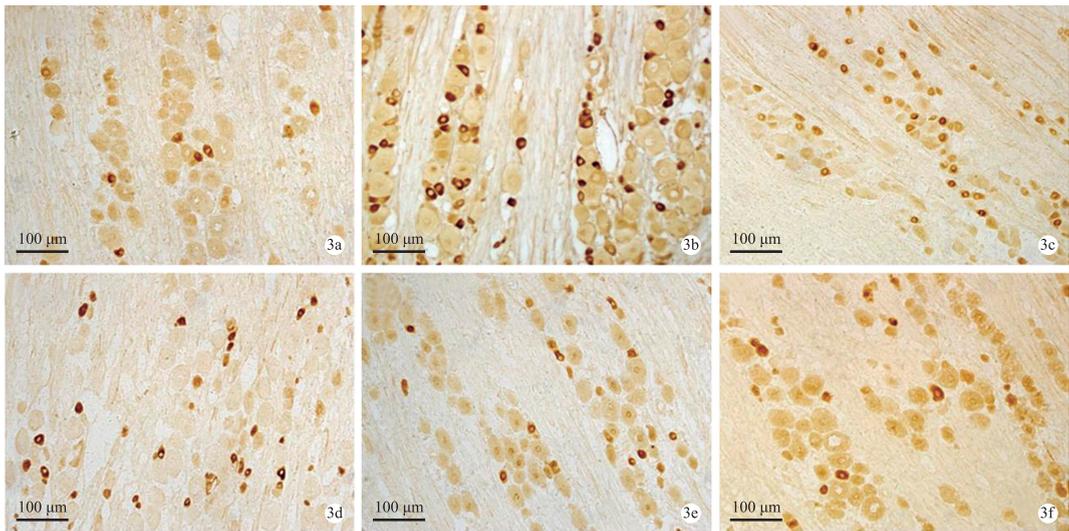
2.1 HE 染色结果 如图 2 所示, CFA 作用 72 h 后, 滑膜增生, 且滑膜皱褶明显增多 (箭头所示区域)。CFA 作用 6 周后, 髁突软骨细胞层次紊乱, 局部纤维层剥脱、软骨缺损 (方框处), 提示 CFA 诱发大鼠 TMJI 及继发颞下颌关节骨关节炎。



2a: 实验组 72 h; 2b: 实验组 6 周

图 2 苏木精-伊红染色显示 CFA 诱发的颞下颌关节病理进程 ( $\times 40$ )

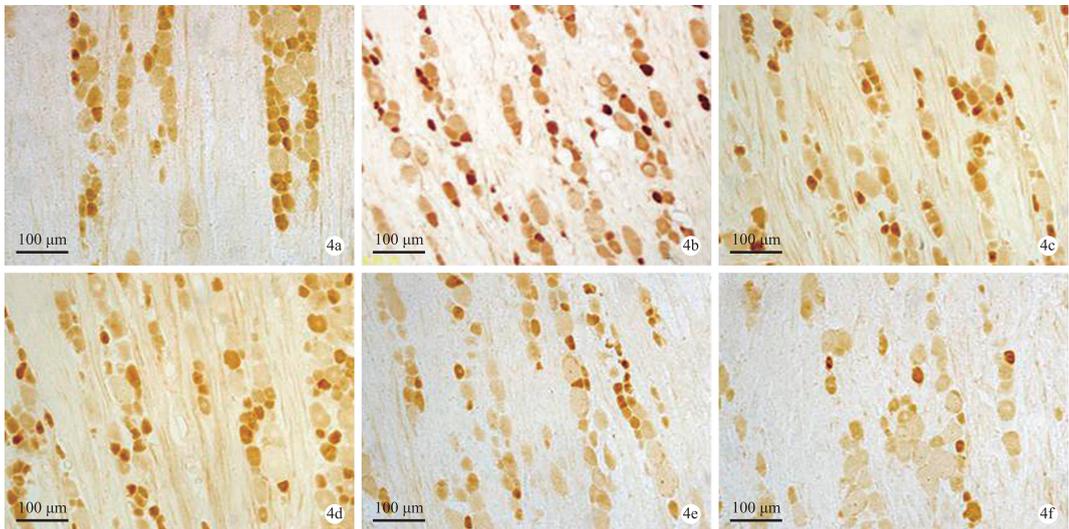
Fig. 2 HE staining showed the CFA-induced pathological progress in temporomandibular joint ( $\times 40$ ).



3a: Naive 组; 3b: 实验组 72 h; 3c: 实验组 1 周; 3d 实验组 2 周; 3e: 实验组 4 周; 3f: 实验组 6 周

图 3 TMJI 后 TG 中 TLR4 的动态表达 ( $\times 20$ )

Fig. 3 Dynamic expression of TLR4 in TG post TMJI ( $\times 20$ ).



4a: Naive 组; 4b: 实验组 72 h; 4c: 实验组 1 周; 4d 实验组 2 周; 4e: 实验组 4 周; 4f: 实验组 6 周

图 4 TMJI 后 TG 中 MyD88 的动态表达 ( $\times 20$ )

Fig. 4 Dynamic expression of MyD88 in TG post TMJI ( $\times 20$ ).

### 2.3 CFA 诱发 TMJI 后 TG 中 TLR4 的表达

Naive 组与实验组大鼠 TG 都存在 TLR4 表达, TLR4 阳性神经元散在分布于 TG 中, 表达 TLR4 的神经元主要为中、小型神经元。TLR4 阳性信号主要表达在细胞浆中(图 3 所示)。TLR4 阳性神经元细胞率统计学分析结果显示, CFA 作用 72 h ( $27.93 \pm 2.91$ ) 后, TLR4 表达显著增加并达到峰值, 持续到 2 周 ( $22.34 \pm 0.97$ ), 于 4 周 ( $15.94 \pm 0.46$ ) 时恢复至正常水平, 6 周 ( $20.57 \pm 0.63$ ) 时再次显著增加。各组与 Naive 组 ( $12.91 \pm 0.63$ ) 比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

### 2.4 CFA 诱发大鼠 TMJI 后 TG 中 MyD88 的表

达 免疫组织化学染色结果显示, TG 内 MyD88 阳性神经元主要为中、小型神经元。MyD88 阳性信号主要表达在细胞浆中(图 4)。MyD88 阳性神经元细胞率统计学分析结果显示, CFA 作用 72 h ( $31.60 \pm 1.49$ ) 后, MyD88 阳性神经元细胞数显著增加, 在 2 周 ( $32.31 \pm 1.22$ ) 达到峰值, 持续至 4 周 ( $27.42 \pm 1.33$ )。各组与 Naive 组 ( $14.54 \pm 1.66$ ) 比较差异有统计学意义 ( $P < 0.01$ )。

### 2.5 TG 内 TLR4 与 MyD88 表达的相关性分析

TLR4 与 MyD88 阳性神经元细胞率相关性分析结果显示, TLR4 与 MyD88 之间呈低度相关性 ( $r = 0.392, P < 0.05$ )。

### 3 讨论

目前,国内外有多种诱导 TMJI 动物模型的实验方法。本实验采用颞下颌关节上腔注射 CFA 法,属于非手术方法,可以消除对关节组织的过度破坏及影响,更加符合 TMJI 病理进程。CFA 注射法具有创伤小,药物能够迅速到达颞下颌关节腔内,从而快速稳定诱导 TMJI 等优点,但该方法对实验者注射技术和方法要求较高。本课题组前期研究结果显示,CFA 诱发大鼠 TMJI 后,TG 神经元内疼痛相关因子降钙素基因相关肽(calcitonin gene-related peptide, CGRP)表达显著增强,神经元内 CGRP 的表达于 CFA 致炎 72 h 开始增加,2 周时达到峰值,提示 CFA 诱导 TMJI 炎性疼痛<sup>[3]</sup>。本研究通过 HE 组织病理染色证实,注射 CFA 72 h 后, TMJ 滑膜增生,滑膜皱褶增多;6 周后突软骨细胞层次紊乱,局部纤维软骨剥脱,出现骨质缺损。这些结果提示我们成功构建大鼠颞下颌关节炎模型。

TLR4 是 TLRs 家族重要成员。TLR4 已确认为在关节炎发病机制中的一个重要影响因素。有研究也证实 TLR4 在类风湿性关节炎滑膜中过度表达<sup>[4]</sup>。此外,在大鼠坐骨神经慢性压榨性模型中,应用 TLR4 抑制剂可以减轻神经性疼痛症状<sup>[5]</sup>。进一步的研究结果显示在创伤性脑损伤动物模型中,TLR4 基因敲除,有助于巨噬细胞向具有抗炎修复功能型巨噬细胞转化,并减弱创伤性脑损伤程度<sup>[6]</sup>。TLRs 被认为与感觉神经元对局部外周炎症反应的疼痛检测相关。以往的研究证明,大鼠小胶质细胞上表达的 TLR4 影响中枢疼痛反应。大鼠后足注射 CFA,分别诱导脊髓 OX-42 和 TLR4 的表达增加,引起显著的疼痛过敏反应并伴随后足水肿以及脊髓背角小胶质细胞的活化<sup>[7]</sup>。Owens 等<sup>[8]</sup>报道,在神经损伤反应中,TLR1、TLR2 和 TLR4 在中枢神经系统中表达上调,可导致促炎细胞因子(TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ )和趋化因子释放。本研究证实成年大鼠 TMJI 过程 TG 神经元中 TLR4 及相关分子的动态表达。本研究结果也同样支持一种机制,即 TG 伤害感受器可以通过 TLR4 检测并应对外周组织的致病性攻击。

本研究结果表明,TLR4 在 TG 神经元细胞上表达而非神经胶质细胞,因此提示在 CFA 诱发的 TMJI 病理进程中,神经元细胞激活是 TLR4 信号通路参与引发神经免疫及疼痛反应的主要通道。基于目前的研究结果,TLR4 的活化可能直接且优先地在神经元伤害感受器上发生。神经元具有可以直

接检测和响应致病性配体的能力,这代表了其对急性伤害感受器具有显著快速激活反应机制的能力,并产生致敏且可以改变神经元及非神经元细胞之间的通讯。此外,感觉神经元还具有检测损伤相关模式分子的潜力,已经由研究者分别在对 TG 和背根神经节感觉神经元的实验中所证实。同时,以往的研究证实,神经元的损伤可以导致促炎因子的释放,微环境的变化进一步促进神经元细胞的活化及可塑性反应,从而维持慢性疼痛的发展。在牙髓炎动物模型的研究中证实,炎症牙髓组织表达的热休克蛋白(heat shock protein 70, Hsp70)可以通过神经轴突被逆行转运到 TG 神经元,Hsp70 结合 TLR4 进一步增强神经元兴奋性,导致疼痛<sup>[9]</sup>。

早期的研究结果表明,TLR4 的激活通常触发两个典型的信号级联,分别是 MyD88 依赖途径与 MyD88 非依赖性途径,两条信号通路分别涉及 MyD88 和/或  $\beta$  干扰素 TIR 结构域衔接蛋白(TIR-domain containing adaptor inducing interferon. B, TRIF)的初始募集。随后两种信号的传导最终导致核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)核转移并产生促炎症细胞因子的释放。Ohara 等<sup>[10]</sup>报道,TLR4 信号传导参与大鼠急性牙髓炎后 TG 伤害感受反应,受损牙髓同侧的 TG 与牙髓中的 TLR4、TLR7 及其下游信号分子 MyD88、TRIF、NF- $\kappa$ B 以及 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$  等细胞因子表达均增加。本研究结果表明,TLR4、MyD88 免疫阳性反应主要在中、小型神经元细胞体中。同时,神经元细胞体中 TLR4 与 MyD88 表达均显著增加,且两者具有相关性。CFA 诱发 TMJI 后,TG 神经元的 TLR4 激活反应可以通过 MyD88 依赖途径传导,TLR4-MyD88 信号通路参与 TMJI 诱发的神经免疫反应。

TLR4 信号转导通路是目前科学研究发现的重要的传导信号通路之一,TLR4 信号通路参与许多疾病的发生、发展过程,而其下游的炎症信号的传导式反应也会使疾病向不利于患者的方向转变。其相关作用机制不断地被阐明,等带来突破性的进展,有望为临床 TLR4 相关疾病的治疗和判断预后等提供新的思路和治疗途径。因此,TLR4 信号通路可能成为治疗 TMJI 的新方向和策略。

### 参考文献

- [1] 王海棠,王云,田英,等.活化卫星胶质细胞参与牙髓炎症及痛觉过敏的实验研究[J].口腔医学研究,2015,31(2):171-174

- [2] 张丽丽, 阳司敏, 丛芳, 等. CX3CL1 与 CX3CR1 参与牙髓炎症及痛觉过敏的实验研究[J]. 口腔医学研究, 2016, 32(7): 685-688
- [3] 阳司敏. PAR4-ERK1/2-CGRP 途径参与 CFA 诱导的大鼠 TMJ 炎性痛的实验研究[D]. 大连医科大学, 2016
- [4] Sanchez-Pernaute O, Filkova M, Gabucio A, et al. Citrullination enhances the pro-inflammatory response to fibrin in rheumatoid arthritis synovial fibroblasts [J]. Ann Rheum Dis, 2013, 72(8): 1400-1406
- [5] Agnieszka MJ, Ewelina R, Anna P, et al. Blockade of toll-like receptors (tlr2, tlr4) attenuates pain and potentiates buprenorphine analgesia in a rat neuropathic pain model [J]. Neural Plast, 2016, 2016: 5238730
- [6] Yao X, Liu S, Ding W, et al. TLR4 signal ablation attenuated neurological deficits by regulating microglial M1/M2 phenotype after traumatic brain injury in mice [J]. J Neuroimmunol, 2017, 310: 38-45
- [7] Nazemi S, Manaheji H, Noorbakhsh SM, et al. Inhibition of microglial activity alters spinal wide dynamic range neuron discharge and reduces microglial Toll-like receptor 4 expression in neuropathic rats [J]. Clin Exp Pharmacol Physiol, 2015, 42(7): 772-779
- [8] Owens T, Babcock AA, Millward JM, et al. Cytokine and chemokine inter-regulation in the inflamed or injured CNS [J]. Brain Res Brain Res Rev, 2005, 48(2): 178-184
- [9] Helley MP, Abate W, Jackson SK, et al. The expression of Toll-like receptor 4, 7 and co-receptors in neurochemical sub-populations of rat trigeminal ganglion sensory neurons [J]. Neuroscience, 2015, 310: 686-698
- [10] Ohara K, Shimizu K, Matsuura S, et al. Toll-like receptor 4 signaling in trigeminal ganglion neurons contributes tongue-referred pain associated with tooth pulp inflammation [J]. J Neuroinflammation, 2013, 10: 139

[收稿日期: 2018-06-15]

(本文编辑 关隽)

## 欢迎订阅《中华实验外科杂志》

《中华实验外科杂志》是中华医学会主办的中华医学会系列杂志之一,是外科学类核心期刊,国家科学技术部中国科技论文统计源期刊,中国生物医学核心期刊,以“探讨理论,更新知识,指导科研,服务临床”为办刊宗旨,其内容包括外科各个专业,是紧密结合临床实践的全国实验外科专业刊物。

本刊设有“论坛”、“述评”、“实验研究”、“临床研究”、“新技术与新方法”、“动物模型”、“简报”、“综述”等栏目。创刊 30 余年来,本刊立足外科前沿,评论医学资讯,报道实验外科最新科技成果,回答外科工作者关心的问题,内容新颖,信息量大,杂志被引频次与影响因子逐年增加,已成为我国中高级外科医师学术交流的重要园地。

《中华实验外科杂志》为月刊,大 16 开本,每月 8 号出版,每期定价 15.00 元,全年 180.00 元。国际标准刊号:1001-9030,国内统一刊号:42-1213/R,邮发代号:38-85。

编辑部地址:武汉市武昌区东湖路 165 号;邮政编码:430071;联系电话:(027)87893475;Email:cjes@cma.org.cn

欢迎投稿! 欢迎订阅!