

## . 实验研究 .

## TLR4 基因突变对小鼠坐骨神经损伤修复的影响

贾 杉 鲁德忠

**【摘要】目的** 探讨Toll样受体4(TLR4)基因突变对小鼠坐骨神经损伤修复的影响。**方法** 取10只C3H/HeJ小鼠(TLR4基因突变作为突变组,20只C3H/HeN小鼠(TLR4基因正常)随机分为假手术组(n=10)和模型组(n=10)。突变组和模型组在暴露的坐骨神经中部用止血钳夹持60 s以建立小鼠坐骨神经损伤模型,假手术组仅暴露坐骨神经而不进行夹伤。造模后4周,采用坐骨神经功能指数(SFI)评分评定坐骨神经功能,然后每组取3只小鼠行HE染色观察坐骨神经病理改变,每组取3只小鼠采用RT-PCR检测坐骨神经组织白细胞介素-1 $\beta$ (IL-1 $\beta$ )、肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)mRNA表达水平,每组取4只小鼠采用免疫印迹法检测坐骨神经组织生长相关蛋白43(GAP43)、p75神经营养受体(p75NTR)蛋白表达水平。**结果** 与假手术组相比,模型组SFI评分显著降低( $P<0.05$ ),HE染色显示细胞形态异常并出现大量嗜中性粒细胞和巨噬细胞,坐骨神经组织IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA表达水平以及GAP43、p75NTR蛋白表达水平均显著增高( $P<0.05$ )。与模型组相比,突变组SFI评分明显增高( $P<0.05$ ),组织结构病理改变明显改善,IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA表达水平以及GAP43、p75NTR蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ )。**结论** TLR4基因突变可促进小鼠坐骨神经损伤后修复,可能与降低IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$ 等炎症因子水平有关。

**【关键词】** 坐骨神经损伤;Toll样受体4;C3H/HeJ小鼠;炎症因子;神经修复

**【文章编号】** 1009-153X(2019)12-0755-03 **【文献标志码】** A **【中国图书资料分类号】** R 745.4<sup>9</sup>; Q 786

**Effect of inflammatory factors expression induced by Toll-like receptor 4 mutation on repair of injured sciatic nerve**

JIA Shan<sup>1</sup>, LU De-zhong<sup>2</sup>. 1. Department of Neurosurgery, Shanxi Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Xi'an 710077, China; 2. Department of Neurosurgery, Shihezi Municipal People's Hospital, Shihezi 832000, China

**【Abstract】 Objective** To investigate the effect of low expression of inflammatory factors induced by toll-like receptor 4 (TLR4) mutation on the repair of injured sciatic nerve. **Methods** Ten C3H/HeJ mice were served as mutant injury group (n=10), and 20 C3H/HeN mice were randomly divided into sham operation group (n=10) and normal injury group (n=10). The models of sciatic nerve injury were made by clipping the middle part of sciatic nerve for 60 seconds in all the mice of mutant and normal injury groups. The sciatic nerve function was assessed by sciatic function index (SFI), the histopathological changes were observed, and the levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) mRNA expressions, and the levels of growth-associated protein-43 (GAP43) and p75 neurotrophin receptor (p75NTR) protein expressions in the sciatic nerve tissues were detected respectively by RT-PCR and western blot 4 weeks after the injury. **Results** The histopathological examination showed that the inflammatory reaction of sciatic nerve tissues was weaker in the mutant injury group than that in the normal injury group. The levels of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  mRNA expressions in the sciatic nerve tissues and SFI were significantly lower in the sham group than those in the mutant injury group ( $P<0.05$ ), which were significantly lower than those in the normal injury group ( $P<0.05$ ). The levels of GAP43 and p75NTR protein expressions in the sciatic nerve tissues were significant higher in the sham group than those in the mutant injury group ( $P<0.05$ ), which were significantly higher than those in the normal injury group ( $P<0.05$ ). **Conclusion** It is suggested that TLR4 may accelerate the repair of the injured sciatic nerve injury by inducing the low expression of IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  and high expressions of GAP43 and p75NTR in the injured sciatic nerve tissues.

**【Key words】** Sciatic nerve injury; Toll-like receptor 4; C3H/HeJ; Inflammatory factors; Expressions; Nerve repair; Mice

坐骨神经为腰髓4、5和骶髓1、2、3神经根组成<sup>[1]</sup>,常因挤压、牵拉、创伤等造成神经毁损及离断,导致运动、感觉功能障碍<sup>[2]</sup>。目前,坐骨神经损伤修复方法主要为神经束膜-神经外膜吻合,但可能发生神经吻合错对而导致神经断端膨胀形成神经瘤<sup>[3]</sup>。有

文献报道神经损伤修复与炎症反应密切相关<sup>[4]</sup>。Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)是固有免疫反应中一类模式识别受体,可快速感知外界环境变化,被激活后,可进一步激活下游信号分子,引起炎症因子释放<sup>[5]</sup>。本文探讨TLR4突变诱导炎症因子低表达对小鼠坐骨神经损伤修复的影响。

**1 材料与方法****1.1 实验动物与分组** C3H/HeJ小鼠10只(TLR4基

doi:10.13798/j.issn.1009-153X.2019.12.012

作者单位:710077 西安,陕西省中医医院神经外科(贾 杉);832000 新疆,石河子市人民医院神经外科(鲁德忠)

通讯作者:鲁德忠,E-mail:chenyanlin14@sina.com

因突变),SPF级,雄性,6~8周龄,体质量(23±3)g,购于中国科学院上海药物研究所,生产许可SCXK(沪)2018-0002。C3H/HeN小鼠20只(TLR4基因正常),SPF级,雄性,6~8周龄,体质量(23±3)g,购于上海生物制品研究所有限责任公司,生产许可SCXK(沪)2015-0003。30只小鼠适应性喂养7d后进行分组,C3H/HeJ小鼠作为突变组(n=10),C3H/HeN小鼠随机分为假手术组(n=10)和模型组(n=10)。

1.2 坐骨神经损伤模型制备 腹腔注射5%水合氯醛(350 mg/kg,上海暄科生物科技有限公司)将小鼠麻醉后以俯卧位固定,用宠物剃毛器(宁波爱克利浦电器有限公司)将小鼠股骨后及周围区域的被毛剃干净,酒精消毒剪毛区,用手术剪(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)剪开小鼠双侧股骨正上方的皮肤约1.5 cm,止血钳(上海金粒医疗器械有限公司)钝性分离肌肉,暴露坐骨神经,用止血钳夹持坐骨神经60 s,肉眼见夹伤处坐骨神经颜色与周围不同且神经束连接在一起,则提示造模成功。突变组以同样方法造模。假手术组仅暴露坐骨神经而不进行夹伤。

1.3 评价指标 造模后4周,采用坐骨神经功能指数(sciatic functional index, SFI)评分<sup>[3]</sup>评定坐骨神经功能,正常SFI为0分,神经功能完全丧失为-100分;然后,各组处死3只小鼠,取坐骨神经组织,采用HE染色观察病理改变;各组处死3只小鼠,取坐骨神经组织,采用RT-PCR检测白细胞介素1β(interleukin,

IL)-1β、IL-6、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor alpha, TNF-α)mRNA表达水平;各组处死4只小鼠取坐骨神经组织,采用免疫印迹法检测生长相关蛋白43(growth associated protein 43, GAP43)、p75神经营养素受体(p75 neurotrophin receptor, p75NTR)蛋白表达水平。

1.4 统计学方法 采用SPSS 22.0软件进行分析;定量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用F检验和SNK-q检验;P<0.05表示差异具有统计学意义。

## 2 结果

2.1 SFI评分比较 突变组SFI评分[-(31.28±7.74)]和模型组SFI评分[-(57.19±15.40)]均显著低于假手术组[-(17.67±5.11)];P<0.05],但是突变组显著高于模型组(P<0.05)。

2.2 坐骨神经组织病理学改变 假手术组细胞形态

表1 各组小鼠坐骨神经组织IL-1β、IL-6、TNF-α mRNA表达量比较

| 组别   | IL-1β       | IL-6        | TNF-α       |
|------|-------------|-------------|-------------|
| 假手术组 | 0.94±0.12   | 0.87±0.06   | 0.61±0.04   |
| 模型组  | 12.57±2.12* | 7.62±1.01*  | 7.88±1.14*  |
| 突变组  | 7.81±2.44*# | 3.07±0.65*# | 2.75±1.33*# |

注:与假手术组相比,\* P<0.05;与正常损伤组相比,# P<0.05;IL-1β. 白细胞介素1β;TNF-α. 肿瘤坏死因子-α;IL-6. 白细胞介素-6

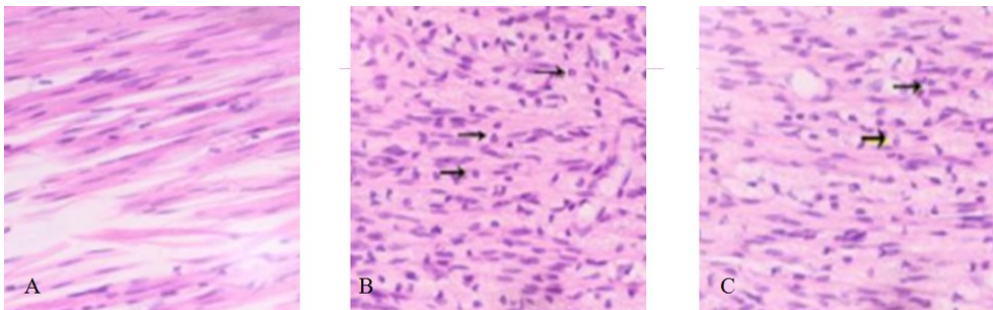


图1 各组小鼠坐骨神经组织病理学改变(HE,×400)

A. 假手术组;B. 模型组;C. 突变组;黑色↑示向中性粒细胞和巨噬细胞

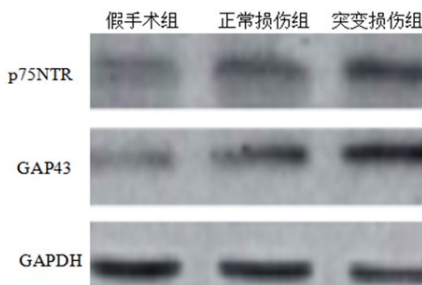


图2 各组小鼠坐骨神经组织GAP43、p75NTR蛋白表达电泳图

表2 各组小鼠坐骨神经组织GAP43、p75NTR蛋白表达量比较

| 组别    | GAP43       | p75NTR      |
|-------|-------------|-------------|
| 假手术组  | 0.06±0.01   | 0.21±0.02   |
| 正常损伤组 | 0.11±0.02*  | 0.56±0.02*  |
| 突变损伤组 | 0.14±0.02*# | 0.91±0.05*# |

注:与假手术组相比,\* P<0.05;与正常损伤组相比,# P<0.05;GAP43. 生长相关蛋白43;p75NTR. p75神经营养素受体

正常,分布较均匀,细胞核形态和核质比正常,神经纤维中无中性粒细胞和巨噬细胞分布。模型组细胞形态异常,细胞分布不均,具有较大的细胞核和较高的核质比,出现大量嗜中性粒细胞和巨噬细胞,中性粒细胞可见核分叶。突变组细胞形态及分布趋于正常,细胞核变小,核质比下降,嗜中性粒细胞、巨噬细胞等淋巴细胞明显减少。见图 1。

2.3 坐骨神经组织 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平比较 模型组和突变组 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平均显著高于假手术组 ( $P < 0.05$ ),但是突变组均显著低于模型组 ( $P < 0.05$ )。见表 1。

2.4 坐骨神经组织 GAP43、p75NTR 蛋白表达水平比较 模型组和突变组 GAP43、p75NTR 蛋白表达水平均显著高于假手术组 ( $P < 0.05$ ),但是突变组显著低于模型组 ( $P < 0.05$ )。见表 2、图 2。

### 3 讨论

C3H/HeJ 小鼠是一种 TLR4 自然突变小鼠<sup>[6]</sup>,现已广泛应用于炎症、感觉神经、免疫、心血管、肿瘤等各个领域的研究。TLR 是一类参与非特异性免疫的重要蛋白质分子,当微生物突破机体皮肤、粘膜等物理屏障,TLR 可识别这些微生物并激活机体免疫应答。所有 TLR 同源分子都是 I 型跨膜蛋白,可分为胞膜外区、胞浆区、跨膜区三部分,其中胞膜外区含 3 个胞外段辅助蛋白即 MD-1、MD-2、RP105,17~31 个亮氨酸富集的重复序列,可参与对疾病相关分子模式的识别。胞浆区与 IL-1R 家族成员胞浆区高度同源,被称为 Toll-IL-1 受体结构域 (Toll-IL-1 receptor domain, TIR 结构域),在 TIR 信号传导中起作用<sup>[7]</sup>。TLR4 是人类发现的第 1 个 TLR 相关蛋白,在固有免疫系统细胞中呈高表达,活化后的 TLR4 可进一步激活下游信号分子,引起 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子释放<sup>[8]</sup>。IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  作为主要的炎症因子指标,可以反映坐骨神经损伤的程度<sup>[9]</sup>。Narayanan 等<sup>[10]</sup>发现 C3H/HeJ 小鼠血清炎症因子水平较野生小鼠明显下降。本研究模型组小鼠坐骨神经组织 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  mRNA 表达水平显著高于突变组,HE 染色显示突变组较模型组小鼠坐骨神经组织中淋巴细胞浸润明显减少,炎性反应明显较弱。GAP43、p75NTR 是神经发育再生过程中的标志性分子,能够很好地反映神经修复情况。本研究突变组小鼠坐骨神经组织 GAP43、p75NTR 蛋白表达水平显著高于模型组,模型组小鼠 SFI 评分显著低于

突变组,提示 TLR4 突变可诱导炎症因子释放减少而上调 GAP43、p75NTR 蛋白表达,进而加快坐骨神经损伤修复。

综上所述,TLR4 基因突变能够诱导 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子低表达而加快小鼠坐骨神经损伤修复。

### 【参考文献】

- [1] 黄慧慧,杨 渐,俞昌喜. 重组人胰岛素样生长因子-1 对坐骨神经损伤的修复作用[J]. 福建医科大学学报,2017,15(4):7-11.
- [2] 冯 扬,赖重媛,陈静燕,等. 大鼠坐骨神经损伤后局部自噬激活的动态变化[J]. 新医学,2018,49(7):29-34.
- [3] 唐国庆,解思滨,沈若武. TLR4 在基因突变小鼠 C3H/HeJ 坐骨神经损伤修复中的作用[J]. 免疫学杂志,2017,36(10):829-836.
- [4] Fang L, Gao H, Zhang W, *et al.* Resveratrol alleviates nerve injury after cerebral ischemia and reperfusion in mice by inhibiting inflammation and apoptosis [J]. *Int J Clin Exp Med*, 2015, 8(3): 3219-3222.
- [5] Rocha DM, Caldas AP, Oliveira LL, *et al.* Saturated fatty acids trigger TLR4-mediated inflammatory response [J]. *Atherosclerosis*, 2016, 244(2): 211-215.
- [6] 徐 丽,张运玮,曹春艳,等. TLR4 在小鼠心肺复苏后脑损伤中的表达及其意义[J]. 临床急诊杂志,2017,21(10):41-44.
- [7] Okuyama H, Tominaga A, Fukuoka S, *et al.* Spirulina lipopolysaccharides inhibit tumor growth in a Toll-like receptor 4-dependent manner by altering the cytokine milieu from interleukin-17/interleukin-23 to interferon- $\gamma$  [J]. *Oncol Rep*, 2017,19(2):145-153.
- [8] Carvalho GCD, Hirata FYA, Domingues R, *et al.* Up-regulation of HMGB1 and TLR4 in skin lesions of lichen planus [J]. *Arch Dermatol Res*, 2018, 310(3): 1-6.
- [9] 李秋月,许海玉,杨洪军. 促炎因子 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-6 在神经病理性疼痛中的研究进展[J]. 中国中药杂志,2017,12(19):256-261.
- [10] Narayanan KB, Park HH. Toll/interleukin-1 receptor (TIR) domain-mediated cellular signaling pathways [J]. *Apoptosis*, 2015, 20(2): 196-209.

(2019-05-24 收稿,2019-09-30 修回)