

Toll 样受体 4 信号通路在蛛网膜下腔出血后早期脑损伤中的机制研究

王超, 杨智勇, 路华, 王东, 张胜平

昆明医学院第一附属医院神经外科, 云南省昆明市 650032

摘要:目的 观察蛛网膜下腔出血(SAH)后 Toll 样受体 4(TLR4)、肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 和干扰素 β (IFN- β) 的表达及其对 SAH 后早期脑损伤的影响, 探讨 SAH 后早期脑损伤的可能发病机制。方法 健康成年雄性新西兰白兔 36 只, 采用枕大池自体动脉血二次注血法制成蛛网膜下腔出血模型。实验动物随机分成对照组、SAH 组和给药组, 每组 12 只。对照组枕大池穿刺后注入生理盐水, SAH 组造成蛛网膜下腔出血模型, 给药组在造蛛网膜下腔出血模型后静脉注入 Eritoran (E5564, 1.5 mg/kg)。每天行神经功能评定。取右侧海马行实时荧光定量聚合酶链反应法(QPCR)检测 TLR4、TNF- α 和 IFN- β 的 mRNA 表达。结果 SAH 组中 TLR4、TNF- α 和 IFN- β 的 mRNA 表达量较对照组明显增加 ($P < 0.05$), 给药组 TLR4、TNF- α 和 IFN- β 的 mRNA 表达量较 SAH 组明显下降 ($P < 0.05$)。SAH 组神经功能缺损较对照组明显严重 ($P < 0.05$), 给药组经 E5564 干预后神经功能较 SAH 组得到改善 ($P < 0.05$)。结论 TLR4 在蛛网膜下腔出血后的早期脑损伤中起到重要作用, 其具体机制可能是通过 TLR4 介导的信号通路, 而 E5564 对这一信号通路的抑制可减轻 SAH 后的脑损伤。

关键词: 蛛网膜下腔出血; Toll 样受体 4; 信号通路; Eritoran; 兔

Mechanisms of Toll-like receptor 4 signaling pathway in early brain damage following subarachnoid hemorrhage

WANG Chao, YANG Zhi-Yong, LU Hua, WANG Dong, ZANG Sheng-Ping. Department of Neurosurgery, First Affiliated Hospital, Kunming Medical College, Kunming 650032, China (Corresponding author: YANG Zhi-yong, Email: 13808721500@163.com; LU Hua, Email: luhuakmmc@163.com)

Abstract: Objective To examine the expression of Toll-like receptor 4 (TLR4), tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interferon- β (IFN- β) in the brain of rabbits with subarachnoid hemorrhage (SHA), and investigate the mechanisms of TLR4 signaling pathway in the early brain damage following SAH. **Methods** The SAH model of rabbits were prepared by injecting autologous arterial blood into the cisterna magna. A total of 36 rabbits were randomly divided into three groups: control, SAH and E5564 treatment ($n = 12$ each). Normal saline and autologous arterial blood were injected into the cisterna magna in the control and SAH groups respectively. In the E5564 group, Eritoran (1.5 mg/kg) was administered by vein injections (twice) after SAH inducement. The neurologic deficits were determined every day. The expression levels of TLR4, TNF- α and IFN- β mRNA in the hippocampus were measured by real-time quantitative PCR. **Results** The expression of TLR4, TNF- α and IFN- β mRNA in the SAH group was significantly higher than in the control group ($P < 0.05$). The E5564 group showed obviously decreased the expression of TLR4, TNF- α and IFN- β mRNA compared with the SHA group ($P < 0.05$). The neurologic deficits were improved in the E5564 group compared with the SAH group ($P < 0.05$). **Conclusions** TLR4 may play a crucial role in the brain damage following SAH. The mechanisms may be associated with the TLR4 signaling pathway. E5564 may attenuate the brain damage following SAH by inhibiting TLR4.

Key words: subarachnoid hemorrhage; Toll like receptor 4; signaling pathway; Eritoran; rabbits

基金项目: 云南省教育厅科学研究基金项目(2010J022)

收稿日期: 2011-11-29; 修回日期: 2012-01-19

作者简介: 王超(1979-), 男, 硕士研究生, 主治医师, 主要从事脑血管病的基础与研究。E-mail: chao002@sina.cn。

通讯作者: 杨智勇(1961-), 男, 主任医师, 科室主任, 主要从事桥小脑角区肿瘤外科治疗临床研究。E-mail: 13808721500@163.com。

路华(1974-), 男, 博士 副主任医师, 主要从事脑血管病的介入治疗临床研究。Email: luhuakmmc@163.com。

蛛网膜下腔出血 (subarachnoid hemorrhage, SAH), 是常见的脑血管疾病, 占脑卒中的 5% ~ 10%^[1], 其中高达 12.4% 的患者发病后即突然死亡^[2], 另有 40% ~ 60% 的患者于初次出血后 48 h 内死亡, 在幸存的患者中大多不同程度的遗留脑神经功能缺损症状。蛛网膜下腔出血后可导致脑血液动力学、脑代谢变化及脑损伤, 而脑损伤是决定其预后的主要因素之一。随着分子生物学的深入研究, 发现炎症反应在脑损伤的形成机制中起重要作用。既往已明确 Toll 样受体参与病原相关分子的识别, 是诱导炎症反应的关键因素, 且有研究发现 Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) 参与脑卒中后炎症性脑损伤的发病过程^[3], 故 TLR4 介导的信号通路可能在 SAH 后的脑损伤机制中起到重要作用^[4]。现已明确内毒素可通过结合细胞表面的 TLR4 并激活该受体, 从而触发一系列炎症细胞因子的连锁反应。所以与内毒素结构相似的 Eritoran (E5564) 能选择性阻断 TLR4 信号通路从而阻断下游的炎症反应。本研究通过采用实时荧光定量聚合酶链反应 (real-time quantitative PCR, QPCR) 检测海马中 TLR4、TNF- α 和 IFN- β 的 mRNA 的表达, 探讨 TLR4 介导的信号通路是否在蛛网膜下腔出血后脑损伤的形成机制中起到重要作用, 为临床治疗蛛网膜下腔出血后脑损伤提供实验及理论依据。

1 材料与方法

1.1 主要材料与试剂

健康成年雄性新西兰白兔 36 只 (重量 1.8 ~ 2.2 kg, 由昆明医学院动物中心提供); 所用引物由美国 Invitrogen 公司合成; 荧光定量 PCR 仪 (美国 ABI 公司 7000 型); RNA-prep pure 组织 RNA 提取试剂盒 (北京天根生化公司); Quant cDNA 第一链合成试剂盒 (北京天根生化公司); Golden Taq PCR 试剂盒 (北京天根生化公司), Real Master Mix 荧光定量试剂盒 (北京天根生化公司)。

1.2 方法

1.2.1 动物分组 将动物随机分为 3 组 (每组 12 只): 对照组、蛛网膜下腔出血 (SAH) 组和给药组。SAH 组采用枕大池自体动脉血二次注血法制备 SAH; 给药组在制备 SAH 模型后分两次静脉注入 E5564 (1.5 mg/kg); 对照组枕大池二次注入生理盐水。3 个组在建模后均饲养 5 d 后再处死。

1.2.2 模型的制作 采用枕大池自体动脉血二

次注血法^[5], 在第 0 天给兔子静脉注射 3% 的戊巴比妥钠 (1 ml/kg) 麻醉, 兔子取头胸侧卧位, 暴露寰枕筋膜外皮肤穿刺点, 备皮后穿刺点常规消毒铺巾, 用 7 号针刺破穿刺点皮肤换钝头穿刺针穿刺, 刺破寰枕筋膜有突破感确定进入枕大池, 可见清亮脑脊液流出, 留取 1.0 ml, 然后缓慢注入等量新鲜非肝素化的自体耳缘动脉血, 注射结束后拔出穿刺针, 压迫穿刺点 1 min。然后保持兔子头低位 30° 约 30 min, 使血液均匀分布于基底池。并同时给予兔子保暖麻醉复苏。48 h 后进行第二次相同操作。给药组每次经枕大池注血后立即静脉注射 Eritoran (E5564) 一次, 剂量为 1.5 mg/kg; 对照组操作同 SAH 组, 但注入无菌盐水。

1.2.3 神经功能评分 按照 Endo 神经功能评分标准^[6], 观察每只兔子在 SAH 建模后 5 d 内的神经缺损症状并进行功能评分。按 Endo 标准将神经功能缺损症状分为 4 级。I 级: 无神经功能缺损, 评 0 分; II 级: 轻度或者可疑神经功能缺损 (嗜睡、活动减少), 评 1 分; III 级: 中度神经功能缺损 (肢体无力、跛行), 评 2 分; IV 级: 重度神经功能缺损 (划圈运动或行走困难) 评 3 分。

1.2.4 标本的采集 于第 5 天经兔子静脉注射过量的 3% 戊巴比妥钠麻醉处死, 然后取右侧海马, 立即将海马置于液氮中冰冻以行 QPCR 检测。

1.2.5 QPCR 检测海马 TLR4、TNF- α 和 IFN- β 的 mRNA 表达 海马组织总 RNA 的提取及逆转录反应总 RNA 的提取及逆转录参照 RNA 提取及逆转录试剂盒 (北京天根生化公司) 说明书进行。PCR 反应 TLR4、TNF- α 、IFN- β 及 GAPDH (内参对照) 引物序列利用 GenBank 数据库中提供的 TLR4、TNF- α 、IFN- β 及 GAPDH 基因序列, 经 GenBank BLAST 进行同源性检测。由美国 Invitrogen 公司合成: GAPDH-F: 5'-GGTCTCTCTGACTTCAACA-3', GAPDH-R: 5'-GAGGGTCTCTCTTCTTCT-3'; TLR4-F: 5'-AAGCCGAAAGGTGATTGTTG-3', TLR4-R: 5'-CTGTCCTCCCACTCCAGGTA-3'; TNF- α -F: 5'-GTCTTCCTCTCTACGCACC-3', TNF- α -R: 5'-TGGGCTAGAGGCTTGTCCT-3'; IFN- β -F: 5'-TTCTTCAGCCTCACTCTCTCC-3', IFN- β -R: 5'-TGTTGTCCTCTCTCTTCC-3'。TLR4、TNF- α 、IFN- β 的 PCR 反应体系 (25 μ l 体系) 如下: 超纯水 10.75 μ l, 2.5* RealMasterMix/20* SYBR solution 11.25 μ l, 上游引物 (10 uM) 1 μ l, 下游引物 (10 uM) 1 μ l, 模板 1 μ l。共 25 μ l 体系混合在一个 0.2 ml PCR 试管内。

PCR 反应条件为预变性 95℃ 2 min 后,变性 95℃ 15 s,退火 60.5℃ 30s,共 40 个循环。溶解曲线阶段,变性 95℃ 15s,退火 60~64℃ 30s,最后 72℃ 延伸 30s。TLR4、TNF- α 和 IFN- β 的 mRNA 表达量以 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 来表示,其值为以 TLR4、TNF- α 和 IFN- β 的 mRNA 表达量与 GAPDH 表达量的比值。再根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 制成三线表格表示 mRNA 的表达量。

1.3 统计学处理

数据均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,采用 SPSS 17.0 软件进行方差分析和 LSD 检验比较组间差异, $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 神经功能评分

按 Endo 神经功能评分标准对照术后未见神经行为功能异常,评分 0 分。SAH 组评分 (2.2 ± 0.61) 和给药组评分 (1.2 ± 0.41) 均显著高于对照组 ($P < 0.05$)。给药组评分显著低于 SAH 组 ($P < 0.05$)。

2.2 海马组织中 TLR4、TNF- α 和 IFN- β 的 mRNA 表达量

各实验组海马组织中 TLR4、TNF- α 和 IFN- β 的 mRNA 均有表达。SAH 组相对表达量与给药组及对照组相比显著升高 ($P < 0.05$)。经单因素方差分析显示,给药组相对表达量较 SAH 组显著降低,差异有统计学意义 ($P < 0.05$),见表 1。

表 1 海马组织中 TLR4、TNF- α 和 IFN- β 的 mRNA 表达量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	TLR4	TNF- α	IFN- β
对照组	1.02 \pm 0.19	0.99 \pm 0.12	0.94 \pm 0.22
SAH 组	1.82 \pm 0.10 [*]	2.30 \pm 0.42 [*]	1.70 \pm 0.11 [*]
给药组	1.35 \pm 0.07 ^{Δ}	1.50 \pm 0.27 ^{Δ}	1.20 \pm 0.14 ^{Δ}

注: * 为与对照组及给药组比较, $P < 0.05$; Δ 为与 SAH 组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

Toll 样受体 (Toll like receptors, TLRs) 是一类胞外区富含亮氨酸重复序列、胞内区与白细胞介素-1 受体 1 (interleukin-1 receptor 1, IL-1R1) 的胞内区同源,称为 TIR (TIR/IL-R1 homologous region) 区的跨膜受体。TLRs 的信号传导可通过依赖接头分子髓系分化因子 88 (myloid differentiation factor 88, MyD88) 和非依赖 MyD88 的含有 TIR 结构能诱导干扰素 β 的接头分子 (domain containing adaptor inducing interferon- γ , TRIF) TRIF 两类信号通路^[7]。前者

主要通过核因子 NF- κ B 进而启动炎症因子 TNF- α 、IL-1、IL-6 和 IL-8 等的释放,而后者是激活 I 型干扰素的转录,从而触发下游的炎症反应。研究发现 TLR4 介导的信号通路包括依赖 MyD88 及非依赖 MyD88 的两种途径。

目前的研究证实 TLR4 在小胶质细胞、神经元、星形胶质细胞、血管内皮细胞及少突胶质细胞中均有表达。其信号通路除了在感染性疾病有关的免疫反应中发挥重要作用外,还参予中枢神经系统自身免疫、神经退行性变和神经组织损伤^[8]。如 Qiu 等^[9] 研究发现抑制 TLR4 介导的信号通路可以减少脑缺血后炎症反应及组织损伤。Sun 等^[10] 认为 TLR4 和 TLR2 共同参与脑缺血再灌注损伤的炎症反应过程,其机制可能是通过 TLR4 信号激活 TLR2,并且在 NF- κ B 的调节下 TLR2 直接参与到脑缺血再灌注损伤中。而 Lee 等^[11] 认为除了脑血管病外,TLR4 在阿尔茨海默病、亨廷顿病及帕金森病等炎症有关的疾病中也发挥重要作用。

Eritoran (E5564) 是脂质 A (内毒素分子的一部分,与其炎症活性紧密相关) 的第二代人工合成类似物,与细胞表面 TLR4 受体选择性的结合阻断 TLR4 介导的炎症反应。蛛网膜下腔出血后必然导致脑血液动力学和脑代谢变化及脑损伤。目前研究已证实蛛网膜下腔出血后早期即出现血脑屏障通透性的显著性升高,至 3 h 可达最高。故本实验采用 E5564 干预 TLR4 介导的信号通路。另外大量研究发现炎症反应在脑损伤中起着很重要的作用,如 MACX 通过实验发现在大鼠 SAH 模型中脑组织内 TLR4 的 mRNA 和蛋白及下游的炎症分子 (TNF- α 、IL-1 β 、IL-6) 可呈阶段性升高^[12]。另外, Zhou 等^[4] 的实验亦发现在 SAH 动物模型中脑内 TLR4 被大量激活,其特异性配体 (氧化修饰低密度脂蛋白、热休克蛋白 60、70) 在脑脊液中明显上升。

本实验发现蛛网膜下腔出血后兔的海马组织中 TLR4、TNF- α 和 IFN- β 的 mRNA 表达较给药组及对照组明显增加,且神经功能缺损评分在蛛网膜下腔出血组与给药组之间存有显著差异。这提示 TLR4 信号通路在 SAH 后的早期脑损伤中起到重要作用,而 E5564 通过抑制 TLR4 信号通路能减少下游炎症因子的产生,从而减轻 SAH 后的脑损伤,改善神经功能缺损。这进一步证实了蛛网膜下腔出血后炎症反应所导致的脑损伤机制可能是通过

TLR4 介导的信号通路而实现,并且 TLR4 介导的信号通路在蛛网膜下腔出血后的炎症反应中可能包括依赖 MyD88 及非依赖 MyD88 的两种途径。

目前对蛛网膜下腔出血的治疗除外科治疗外,主要是防止再出血及预防并发症,而蛛网膜下腔的积血主要靠机体缓慢吸收,由于其细胞因子的毒性作用常导致严重的脑损伤。所以对 TLR4 介导的信号通路在蛛网膜下腔出血后炎症性脑损伤中的作用研究将有助于明确蛛网膜下腔出血后炎症性脑损伤的分子机制,这可能为临床治疗及研究蛛网膜下腔出血提供新的方向和方法。本研究仅为初步研究,今后我们将继续寻找更接近临床的 TLR4 信号通路的干预措施,从而进一步确证 TLR4 信号通路在蛛网膜下腔出血后炎症性早期脑损伤中的作用及机制。

参 考 文 献

- [1] Stoodley M, MacDonald RL, Weir B, et al. Subarachnoid hemorrhage as a cause of an adaptive response in cerebral arteries. *J Neurosurg*, 2000, 93(3): 463-470.
- [2] Huang J, van Gelder JM. The probability of sudden death from rupture of intracranial aneurysms: a meta-analysis. *Neurosurgery*, 2002, 51(5): 1101-1105.
- [3] Tu XK, Yang WZ, Shi SS, et al. Spatiotemporal distribution of inflammatory reaction and expression of TLR2/4 signaling pathway in rat brain following permanent focal cerebral ischemia. *Neurochem Res*, 2010, 35(8): 1147-1155.
- [4] Zhou ML, Shi JX, Hang CH, et al. Expression of Toll-like receptor 4 in the brain in a rabbit experimental subarachnoid haemorrhage model. *Inflamm Res*, 2007, 56(3): 93-97.
- [5] Baker KF, Zervas NT, Pile-Spellman J, et al. Angiographic evidence of basilar artery constriction in the rabbit: a new model of vasospasm. *Surg Neurol*, 1987, 27(2): 107-112.
- [6] Endo S, Branson PJ, Alksne JF. Experimental model of symptomatic vasospasm in rabbits. *Stroke*, 1988, 19(11): 1420-1425.
- [7] Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol*, 2005, 17(1): 1-14.
- [8] Campbell A. Inflammation, neurodegenerative diseases, and environmental exposures. *Ann NY Acad Sci*, 2004, 1035: 117-132.
- [9] Qiu J, Xu J, Zheng Y, et al. High-mobility group box 1 promotes metalloproteinase-9 up regulation through Toll-like receptor 4 after cerebral ischemia. *Stroke*, 2010, 41(9): 2077-2082.
- [10] Sun P, Zhang Q, Han J, et al. TLR4 signaling induced TLR2 expression in the process of mimic cerebral ischemia/reperfusion in vitro. *Sci China Life Sci*, 2010, 53(2): 223-228.
- [11] Lee SJ, Lee S. Toll-like receptors and inflammation in the CNS. *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 2002, 1(2): 181-191.
- [12] Ma CX, Yin WN, Cai BW, et al. Toll-like receptor 4/nuclear factor-kappa B signaling detected in brain after early subarachnoid hemorrhage. *Chin Med J (Engl)*, 2009, 122(13): 1575-1581.