

· 论 著 ·

## 脊髓 Toll 样受体 4 在慢性瘙痒中的作用研究\*

孔 敏, 周 芳, 党秀静, 武静茹<sup>△</sup>

(徐州医学院/江苏省麻醉学重点实验室, 江苏徐州 221002)

**摘要:**目的 研究脊髓 Toll 样受体 4(TLR4)在重复使用噁唑酮引起的慢性瘙痒中的作用。方法 选择雄性昆明小鼠 152 只,先随机分为 3 组:对照组、丙酮溶媒组和噁唑酮组,每组 40 只,每组再分为首次刺激前、激发 0、4、9、11 d 5 个亚组,按模型制作方法在相应时间点涂抹相应试剂,记录激发后 30 min 行为学后处死小鼠,取脊髓颈膨大采用 Western blot 法检测 TLR4 表达水平。在确定噁唑酮致慢性瘙痒后 9 d 小鼠脊髓 TLR4 表达水平接近高峰的基础上,为研究腹腔注射表没食子儿茶素没食子酸酯(EGCG)的作用,小鼠随机分为 4 组( $n=8$ ),丙酮溶媒组(A 组)、丙酮溶媒+EGCG 组(A+E 组),噁唑酮组(O 组)和噁唑酮+EGCG 组(O+E 组)。各组在第 9 天激发后 8 h 开始腹腔注射 EGCG(40 mg/kg)或生理盐水,每 8 小时 1 次直到第 11 天激发前,共计 6 次,最后一次给药后立即激发,观察激发后 30 min 内行为学改变,之后处死小鼠采用 Western blot 法检测颈段脊髓 TLR4 表达。结果 噁唑酮组在激发后各时间点搔抓行为明显多于对照组和丙酮溶媒组( $P<0.05$ ),且脊髓 TLR4 表达水平与搔抓行为呈正相关( $r=0.947$ )。结论 腹腔注射 EGCG 可以减少脊髓 TLR4 表达水平与搔抓行为。脊髓 TLR4 参与重复使用噁唑酮引起的慢性瘙痒过程。

**关键词:**噁唑酮;瘙痒;Toll 样受体 4

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2013.09.001

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2013)09-0961-03

## Role of spinal Toll-like receptor 4 in chronic pruritus\*

Kong Min, Zhou Fang, Dang Xiujing, Wu Jingru<sup>△</sup>

(Jiangsu Provincial Key Laboratory of Anesthesiology, Xuzhou Medical College, Xuzhou, Jiangsu 221002, China)

**Abstract:** Objective To investigate the role of spinal Toll-like receptor 4(TLR4) in chronic pruritus induced by repeated administration of oxazolone. **Methods** 152 male kunming mice were selected and divided into 3 groups with 40 mice in each group; the control group(C), acetone group(A) and oxazolone group(O), and each group was redivided into 5 sub-groups including before first stimulation, on 0, 4, 9, 11 d stimulation sub-groups. Mice in each group were treated with nothing, acetone or oxazolone. The scratching behaviors were observed for 30 min after every stimulation, then the cervical enlargement of spinal cord of mice was used to test the expression of TLR4. To investigate the effect of intraperitoneal injection of EGCG(40 mg/kg), mice were randomly divided into four groups; acetone group(A), acetone+EGCG group(A+E), oxazolone group(O) and oxazolone+EGCG group(O+E). EGCG was intraperitoneally injected from 8 h after stimulation on 9 d, one time/8 h, for 6 times to the beginning of the last stimulation on 11 d. The TLR4 expression from mice was detected with Western blot assaying 30 min after the last stimulation on 11 d. **Results** From the first stimulation, the scratching behaviors at various time points in the group O were significantly more than those in the group C and A( $P<0.05$ ), and the spinal TLR4 expression was positively correlated with the scratching behaviors( $r=0.947$ ). **Conclusion** Intraperitoneal injection of EGCG could reduce the spinal TLR4 expression and the scratching behaviors. Spinal TLR4 mediates the chronic pruritus induced by repeated administration of oxazolone.

**Key words:** oxazolone; pruritus; Toll-like receptor 4

瘙痒是危害人类健康、影响人类生活质量最常见的临床病症之一。流行病学调查显示,普通人群瘙痒的发病率为 8%~12%<sup>[1]</sup>,临床上瘙痒症状可见于许多疾病及一些药物的不良反应<sup>[2-4]</sup>,其虽不致死却给患者生存和生活带来诸多不便<sup>[5]</sup>。最近研究发现,Toll 样受体(Toll-like receptor, TLR)家族参与瘙痒过程,比如 TLR7 介导了氯喹引起的急性瘙痒行为<sup>[6]</sup>,TLR2 参与了溢脂性皮炎的发病过程<sup>[7]</sup>。TLR7 与 TLR 家族中另一个成员 TLR4 在脊髓均有丰富的表达且分享诸多下游信号通路<sup>[8-9]</sup>,而后者在瘙痒过程中的作用,尤其是慢性瘙痒过程中的作用尚有待研究。因此,本研究拟探讨脊髓 TLR4 在噁唑酮引起的慢性瘙痒中的作用。

## 1 材料与方法

**1.1 实验动物** 选择雄性昆明小鼠 152 只,体质量 18~20 g,由徐州医学院实验动物中心提供。于 24 ℃下和昼夜交替的环境中饲养,自由摄食、饮水。所有动物适应环境 7 d 后进行实验。本研究获得徐州医学院动物实验伦理委员会批准。

**1.2 主要试剂** 噁唑酮购自 Sigma 公司,用丙酮溶解至 0.5%;表没食子儿茶素没食子酸酯(epigallocatechin-3-gallate, EGCG)购自上海源叶生物科技有限公司;TLR4 和  $\beta$ -肌动蛋白( $\beta$ -actin)一抗购自 Abcam 公司,对应二抗和 Western blot 显色试剂盒购自碧云天生物科技有限公司。

**1.3 模型制作** 按照文献<sup>[10]</sup>的方法,实验前 1 d,瘙痒部位

脱毛。在动物颈背部脱毛处一次性涂抹噻唑酮(10  $\mu$ L, 0.5%, 溶于丙酮), 7 d 后(时间重新从零计数, 因此, 首次刺激当天记作 -7 d) 开始激发, 在第 0、2、4、7、9、11 天给予同等剂量噻唑酮进行激发, 观察行为学和分子生物学改变。

**1.4 行为学观察** 所有实验动物在激发前均放入 15 cm $\times$ 15 cm $\times$ 15 cm 的透明玻璃盒子中适应 1 h, 涂抹溶媒或噻唑酮后重新放入盒子观察其搔抓行为。动物从后爪抬起接触到颈背部皮肤, 不管其在瘙痒部位搔抓多长时间均记为一次完整的搔抓动作, 最后以 30 min 内完成的搔抓次数来衡量搔抓行为。

**1.5 分组及处理** 研究噻唑酮制慢性瘙痒模型, 将小鼠随机分为 3 组: 对照组(C 组) 40 只, 只在颈背部脱毛, 不做任何处理; 丙酮溶媒组(A 组) 40 只, 颈背部脱毛处涂抹 10  $\mu$ L 丙酮; 噻唑酮组(O 组) 40 只, 颈背部脱毛处涂抹 10  $\mu$ L 噻唑酮。每组再分为 -7、0、4、9、11 d 5 个亚组( $n=8$ ), 按模型制作方法涂抹相应试剂, 并在观察激发后 30 min 内的行为学改变之后立即处死小鼠取脊髓颈膨大检测 TLR4。在确定噻唑酮致慢性瘙痒后 9 d 小鼠脊髓 TLR4 表达水平接近高峰的基础上, 为研究腹腔注射 EGCG 的作用, 将小鼠随机分为丙酮溶媒组(A 组)、丙酮溶媒+EGCG 组(A+E 组)、噻唑酮组(O 组)和噻唑酮+EGCG 组(O+E 组),  $n=8$ 。各组在第 9 天激发后 8 h 开始腹腔注射 EGCG(40 mg/kg)或生理盐水, 每 8 小时 1 次, 直到第 11 天激发前, 共计 6 次, 最后一次给药 30 min 后激发, 观察激发后 30 min 内的行为学改变, 之后立即处死小鼠取脊髓颈膨大检测 TLR4。

**1.6 Western blot 检测** -7 d 组在首次刺激后 30 min, 其余各组在激发 30 min 后随机取 6 只小鼠, 断头处死, 快速取出脊髓组织, 匀浆后, 4  $^{\circ}$ C 下 10 000 $\times$ g 离心 30 min, 收集上清液, 采用 BCA(bicinchoninic acid)法测定蛋白浓度, 蛋白样品于 -80  $^{\circ}$ C 保存。蛋白样本按 1:4 加入 5 $\times$ SDS-PAGE 上样缓冲液, 95  $^{\circ}$ C 变性 5 min, 每孔加样 30  $\mu$ g 用 10% SDS-PAGE 电泳, 转至硝酸纤维素膜上。加入 1:500 稀释的抗 TLR4 或  $\beta$ -actin 一抗 4  $^{\circ}$ C 过夜, TBST 缓冲液, 10 $\times$ (Tris Buffered Saline Tween-20, 10 $\times$ )洗膜后, 加入 1:1 000 稀释的碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗(购自中国南京碧云天生物科技有限公司)室温孵育 1 h, NBT/BCIP 试剂盒(购自中国南京碧云天生物科技有限公司)显色。扫描条带, 采用 Adobe Photoshop 软件分析各组灰度值, 并以激发前 TLR4 表达为整体进行标准化后反映 TLR4 的表达水平。

**1.7 统计学处理** 应用 SPSS11.0 软件进行统计学数据分析, 计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示, 组间比较采用  $q$  检验, 以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

与首次激发前相比, 激发后各时间点小鼠的脊髓 TLR4 表达逐渐增加(图 1), 且与搔抓行为呈正相关关系( $r=0.947$ )。3 组小鼠在不同时间点 30 min 内的搔抓次数见表 1。

表 1 3 组小鼠不同时间点 30 min 内搔抓次数比较( $\bar{x}\pm s$ , 次)

组别	$n$	-7 d	0 d	4 d	9 d	11 d
对照组	40	2.03 $\pm$ 0.27	2.13 $\pm$ 0.35*	2.00 $\pm$ 0.93*	2.00 $\pm$ 0.76*	2.38 $\pm$ 0.74*
丙酮溶媒组	40	2.21 $\pm$ 0.37	2.22 $\pm$ 0.31*	3.62 $\pm$ 0.74*	6.75 $\pm$ 1.98*	7.25 $\pm$ 1.83*
噻唑酮组	40	2.13 $\pm$ 0.26	26.37 $\pm$ 5.32	76.25 $\pm$ 15.11	139.25 $\pm$ 15.53	173.00 $\pm$ 13.84

\*:  $P<0.05$ , 与噻唑酮组比较。

在 EGCG 腹腔注射实验中(图 2~3), 与噻唑酮组相比, O+E 组小鼠搔抓次数明显减少( $P<0.05$ )、脊髓 TLR4 表达明显降低( $P<0.05$ ), 但仍高于丙酮溶媒组和 A+E 组( $P<0.05$ )。丙酮溶媒组和 A+E 组的搔抓次数及 TLR4 表达水平比较, 差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

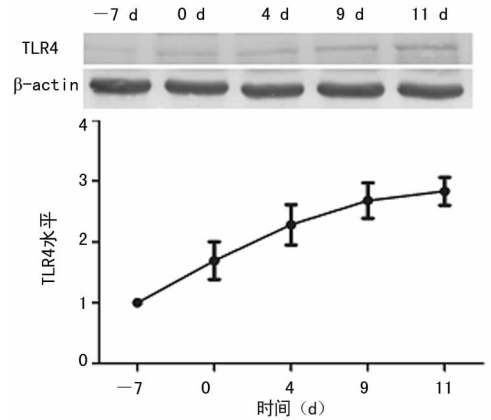
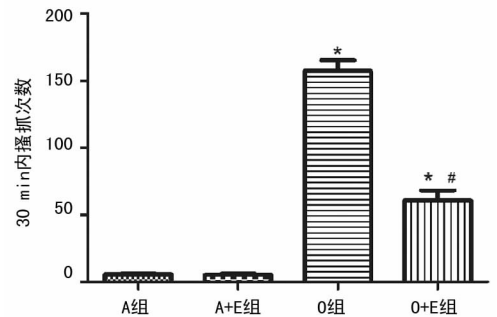
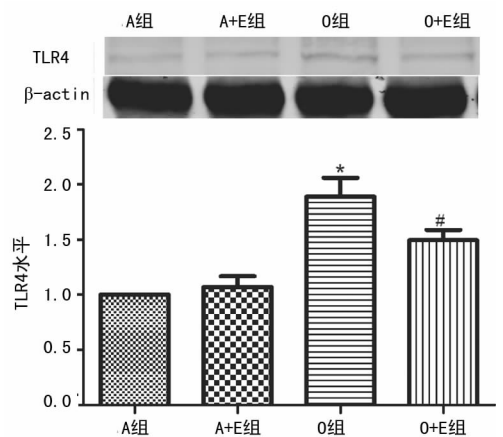


图 1 首次刺激及激发后各时间点脊髓 TLR4 表达



\*:  $P<0.05$ , 与 A 组和 A+E 组比较; #:  $P<0.05$ , 与 O 组比较。

图 2 4 组小鼠搔抓次数比较



\*:  $P<0.05$ , 与 A 组和 A+E 组比较; #:  $P<0.05$ , 与 O 组比较。

图 3 4 组小鼠脊髓颈膨大 TLR4 表达水平比较

### 3 讨 论

2009~2010 年是脊髓水平瘙痒发病机制研究突飞猛进的 2 年,有研究发现,脊髓背角表达谷氨酸转运体-2 (glutamine transporter type 2, VGLUT-2) 的神经元参与组胺依赖性和非组胺依赖性瘙痒的介导<sup>[11-12]</sup>; GRP/GRPR (gastin-releasing peptide, GRP; gastin-releasing peptide receptor, GRPR) 介导了从外周到脊髓的瘙痒信号的转导,并且认为 GRPR 可以作为瘙痒的脊髓标志物<sup>[13-14]</sup>,这些都提示,脊髓水平在瘙痒的发生过程中起着重要的作用。

最近研究发现,TLR7 介导了氯喹引起的急性瘙痒<sup>[6]</sup>。TLR 家族成员分享诸多下游信号通路,如 MyD88 作为 TLR7 和 TLR4 的共同下游分子参与了诸多病理、生理过程<sup>[8-9]</sup>。但 TLR4 是否也参与瘙痒过程尚有待研究。慢性瘙痒较急性瘙痒持续时间更长、危害更大,因此,研究慢性瘙痒的发病机制显得更为重要和现实。小鼠颈背部皮肤局部反复涂抹噻唑酮可以诱发慢性皮炎、引起搔抓行为,成功复制慢性瘙痒模型,在每次涂抹噻唑酮后能产生在 1 h 内较为严重的搔抓行为,此后温和的搔抓可持续至少 8 h,并且模型较稳定<sup>[10,15]</sup>。因此,本研究采用上述模型,选取代表性时间点(-7 d, 激发后 0、4、9、11 d),研究脊髓 TLR4 水平在慢性瘙痒过程中的表达变化。结果发现动物搔抓行为与脊髓 TLR4 表达呈正相关关系,相关系数  $r=0.947$ 。TLR7 通过进一步激活下游信号通路参与急性瘙痒过程,但是在噻唑酮引起的瘙痒过程中 TLR4 是否也同样是这些下游通路发挥作用尚需进一步的研究证实。

EGCG 是绿茶中的一种黄酮类物质,作为 TLR4 的抑制剂已经成熟应用于 TLR4 相关的病理、生理过程的研究<sup>[16]</sup>。离体和体实验均证实,EGCG 可能是通过抑制 TLR4 激活,进而抑制 TLR4 下游信号的传递发挥药理作用<sup>[17]</sup>。为进一步验证脊髓 TLR4 参与了噻唑酮引起的慢性瘙痒过程,本研究从噻唑酮激发后第 9 天开始每 8 小时腹腔注射 EGCG 1 次,每次剂量 (40 mg/kg),直到第 11 天激发前,共计 6 次。结果发现,多次注射 EGCG 可以部分抑制而不能完全抑制噻唑酮引起的搔抓行为,说明还有其他机制参与噻唑酮引起的慢性瘙痒过程。

综上所述,本研究成功复制了局部皮肤涂抹噻唑酮致慢性瘙痒模型,且发现脊髓 TLR4 表达水平与瘙痒行为相关,腹腔注射 EGCG 能抑制瘙痒行为和脊髓 TLR4 表达。脊髓 TLR4 参与了噻唑酮引起的慢性瘙痒过程,丰富了慢性瘙痒的发生机制,将为慢性瘙痒的治疗带来新的启示。

#### 参考文献:

- [1] Weisshaar E, Dalgard F. Epidemiology of itch; adding to the burden of skin morbidity[J]. *Acta Derm Venereol*, 2009, 89(4):339-350.
- [2] Pisoni RL, Wikstrom B, Elder SJ, et al. Pruritus in haemodialysis patients; International results from the Dialysis Outcomes and Practice Patterns Study[J]. *NDT Plus*, 2006, 21(12):3495-3505.
- [3] DeBalli P, Breen TW. Intrathecal opioids for combined spinal-epidural analgesia during labour[J]. *CNS drugs*, 2003, 17(12):889-904.

- [4] Ganesh A, Maxwell LG. Pathophysiology and management of opioid-induced pruritus[J]. *Drugs*, 2007, 67(16):2323-2333.
- [5] Zucker I, Yosipovitch G, David M, et al. Prevalence and characterization of uremic pruritus in patients undergoing hemodialysis; uremic pruritus is still a major problem for patients with end-stage renal disease[J]. *Am Acad Dermatol*, 2003, 49(5):842-846.
- [6] Liu T, Xu ZZ, Park CK, et al. Toll-like receptor 7 mediates pruritus[J]. *Nat Neurosci*, 2010, 13(12):1460-1462.
- [7] Ionescu MA, Baroni A, Brambilla L, et al. Double blind clinical trial in a series of 115 patients with seborrheic dermatitis; prevention of relapses using a topical modulator of Toll like receptor 2[J]. *G Ital Dermatol Venereol*, 2011, 146(3):185-189.
- [8] Akira S, Takeda K. Toll-like receptor signaling[J]. *Nat Rev Immunol*, 2004, 4(7):499-511.
- [9] Yamamoto M, Sato S, Hemmi H, et al. Role of adaptor TRIF in the MyD88-independent toll-like receptor signaling pathway[J]. *Sci Stke*, 2003, 301(5633):640-643.
- [10] Tsukumo Y, Harada D, Manabe H. Pharmacological characterization of itch-associated response induced by repeated application of oxazolone in mice[J]. *Pharmacol Sci*, 2010, 113(3):255-262.
- [11] Liu Y, Abdel Samad O, Zhang L, et al. VGLUT2-dependent glutamate release from nociceptors is required to sense pain and suppress itch[J]. *Neuron*, 2010, 68(3):543-556.
- [12] Lagerstrom MC, Rogoz K, Abrahamsen B, et al. VGLUT2-dependent sensory neurons in the TRPV1 population regulate pain and itch[J]. *Neuron*, 2010, 68(3):529-542.
- [13] Sun YG, Zhao ZQ, Meng XL, et al. Cellular basis of itch sensation[J]. *Science*, 2009, 325(5947):1531-1534.
- [14] Sun YG, Chen ZF. A gastrin-releasing peptide receptor mediates the itch sensation in the spinal cord[J]. *Nature*, 2007, 448(7154):700-703.
- [15] Tsukumo Y, Matsumoto Y, Miura H, et al. Gabapentin and pregabalin inhibit the itch-associated response induced by the repeated application of oxazolone in mice[J]. *Pharmacol Sci*, 2011, 115(1):27-35.
- [16] Hong Byun E, Fujimura Y, Yamada K, et al. TLR4 signaling inhibitory pathway induced by green tea polyphenol epigallocatechin-3-gallate through 67-kDa laminin receptor[J]. *Immunology*, 2010, 185(1):33-45.
- [17] Kuang X, Huang Y, Gu HF, et al. Effects of intrathecal epigallocatechin gallate, an inhibitor of Toll-like receptor 4, on chronic neuropathic pain in rats[J]. *Eur J Pharmacol*, 2012, 676(1/3):51-56.