

TLR4 和 NF- $\kappa$ B 在脑出血大鼠炎症损伤中的表达及意义\*

杨莎莎, 田清友, 周洪霞<sup>△</sup>, 孟令丽, 张作风, 王 茜, 魏子峰  
(河北联合大学基础医学院解剖教研室, 河北唐山 063000)

**摘要:**目的 探讨 Toll 样受体 4(TLR4)和核因子- $\kappa$ B(NF- $\kappa$ B)在脑出血(ICH)大鼠炎症损伤中的表达和意义。方法 选取雄性 SD 大鼠 60 只,分为假手术(Sham 组)、ICH 术后 12 h(ICH 12 h 组)、24 h(ICH 24 h 组)、72 h(ICH 72 h 组)、7 d(ICH 7 d 组),每组 12 只。采用自体血注入法制作脑出血模型,Garcia 法对各组大鼠进行神经行为功能学评分,干/湿质量法测定脑组织含水量的变化,尼氏染色观察脑组织病理学变化,免疫组织化学及蛋白免疫印迹法(Western blot)观察大鼠脑出血后血肿周围 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 的蛋白表达水平。结果 ICH 后 12 h,血肿周围 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 开始阳性表达,随着时间的延续,表达逐渐增多,72 h 达到高峰,出现严重脑组织水肿及神经功能损伤,Western blot 显示 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 的表达量与之结果一致。结论 大鼠 ICH 可引起血肿周围脑组织炎症损伤,TLR4 可能通过激活 NF- $\kappa$ B 参与 ICH 后引起的继发性炎症损伤。

**关键词:**脑出血;Toll 样受体 4;NF- $\kappa$ B;炎症因子

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2014.05.027

文献标识码:A

文章编号:1671-8348(2014)05-0584-03

### Expression and significance of TLR4 and NF- $\kappa$ B on inflammatory injure after intracerebral hemorrhage in rats\*

Yang Shasha, Tian Qingyou, Zhou Hongxia<sup>△</sup>, Meng Lingli, Zhang Zuofeng, Wang Qian, Wei Zi feng

(Department of Anatomy of the School of Basic Medical Sciences, Hebei Union University, Tangshan, Hebei 063000, China)

**Abstract:** Objective To evaluate expression and significance of TLR4 and NF- $\kappa$ B on inflammatory injure after intracerebral hemorrhage in rats. **Methods** 60 Sprague Dawley maleness rats were randomly divided into Sham group, 12 h, 24 h, 72 h and 7 d after ICH group(12 s). The ICH was induced by injection of autologous blood in rats. The behavioral changes were detected by neurologic deficit score. The water content of the brain was used to evaluate brain edema changes. Number of TLR4 and NF- $\kappa$ B positive cells by Nissl staining and the expression of protein determined by immunohistochemistry and Western blot. **Results** After ICH 12 h, expression of TLR4 and NF- $\kappa$ B positive cells around the hematoma were expressed, with the extension of the time, expression was gradually increasing, and after ICH 72 h the expression of protein were the highest. Cerebral edema and severe neurological damage occurred. Western blot shows the amount of TLR4 expression and NF- $\kappa$ B were in line with the result. **Conclusion** After intracerebral hemorrhage in rat causing inflammatory injure of brain tissue around the hematoma. TLR4 may activate the expression of NF- $\kappa$ B involved in the secondary inflammatory injure after intracerebral hemorrhage in rats.

**Key words:** intracerebral hemorrhage; Toll-like receptor 4; NF- $\kappa$ B; inflammatory

脑出血(intracerebral hemorrhage, ICH)引起的血肿周围脑组织继发性损伤在出血性脑损伤中的作用日益受到重视。研究显示,脑组织水肿、炎性细胞浸润和细胞凋亡坏死等因素均可参与 ICH 继发性脑损伤的发病过程<sup>[1]</sup>。其中血肿周围继发性炎症反应在继发性 ICH 损伤中发挥重要作用。杨继文等<sup>[2]</sup>研究显示,Toll 样受体 4(toll-like receptor 4, TLR4)通过跨膜结构将信号转入细胞内,引起一系列级联信号反应,启动 IL-1、IL-6 和肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )等促炎细胞因子的表达<sup>[3]</sup>。核因子- $\kappa$ B(nuclear factor- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B)位于 TLR4 下游信号通路的枢纽位置,其活化水平直接反映着 TLR4 的配体识别和信号传导能力<sup>[4]</sup>。有实验证明<sup>[5-6]</sup>,在大鼠脑缺血再灌注损伤后,脑组织 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 阳性表达上调,且有显著相关性。那么,大鼠 ICH 后 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 是否参与脑组织继发性炎症损伤过程有待进一步研究。因此,本实验通过建立大鼠 ICH 模型,进一步研究 ICH 后引起的继发性炎症损伤机制,现报道如下。

#### 1 材料与方 法

**1.1 材料** 选取健康雄性 SD 大鼠 60 只,体质量为 250~300 g,SPF 级,购于北京华阜康生物科技股份有限公司,自由进食饮水。大鼠分为假手术(Sham 组);ICH(模型组)术后 12 h

(ICH 12 h 组)、24 h(ICH 24 h 组)、72 h(ICH 72 h 组)、7 d(ICH 7 d 组),每组 12 只。

#### 1.2 方法

**1.2.1 ICH 模型制作** 采用 Fredrik 法复制实验性 ICH 模型<sup>[7]</sup>。大鼠给予 10%水合氯醛腹腔注射麻醉成功后,固定于脑立体定位仪上,切开皮肤,暴露前囟,将微量注射器尖端定位于前囟前 0.2 mm,中线右侧旁开 3.0 mm 处。用牙钻在此钻一直径约 3.0 mm 的孔。用微量进样器沿钻孔进针,深度为 6.0 mm,注入自体股动脉血 50  $\mu$ L,5 min 注射完毕,留针 15 min 后缓慢将针退出,无菌骨腊封闭小孔,缝合。Sham 组模型制作步骤相同,注射生理盐水。

**1.2.2 神经功能障碍评分和脑含水量测定** 采用 Garcia 法进行神经功能行为学评分(neurologic deficit score, NDS),分数越低,神经功能障碍越重。采用双盲法进行评定。脑组织含水量(water content of brain, BWC)的测定:处死动物,取出大脑,将脑组织用分析天平称质量,后置入恒温箱中烘干,取出秤干质量, BWC=(湿质量-干质量)/湿质量 $\times$ 100%。

**1.2.3 尼氏染色观察 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 的阳性细胞表达** 大鼠 ICH 模型,于术后 12 h、24 h、72 h、7 d 各时间点将大鼠麻醉,4%多聚甲磷酸盐缓冲液灌注后断头取脑,石蜡包埋,切

片后行尼氏染色、分色、透明、封片。阳性染色为尼氏小体数量减少甚至消失。

1.2.4 免疫组织化学染色观察 TLR4 和 NF-κB 的蛋白表达

各组大鼠麻醉后,常规 4%多聚甲醛磷酸盐缓冲液灌注后断头取脑,石蜡包埋,切片后行免疫组织化学分析。一抗(TLR4、NF-κB 多克隆抗体均由武汉博士德生物试剂公司提供),SP 试剂盒和 3,3'-二氨基联苯胺(DAB)由福建迈新公司提供。DAB 显色,苏木素复染细胞核,蒸馏水洗、脱水、透明、封片。阳性染色为胞浆或胞核棕色颗粒。阴性对照以磷酸盐缓冲液(PBS)代替一抗,其余步骤同上。

1.2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 TLR4 和 NF-κB 的蛋白表达水平 将大鼠断头快速取脑,匀浆离心后取上清液,采用 BCA 法测定蛋白量。取 30 μL 处理后的蛋白样品采用 12%聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)转移至聚偏氟乙烯(PVDF)膜,以标准蛋白 Maker 为参照,5%脱脂奶粉封闭,相应条带分别加入 TLR4 抗体(1:1 000)和 NF-κB 抗体(1:1 000),4℃孵育过夜。ECL 显色,用荧光 CCD 荧光相机扫描。

1.2.6 图像分析 将已染好的切片在显微镜下放大 100 倍,随机选择不重叠的 5 个视野,统计阳性细胞数量并经图像分析仪在计算机下测定其灰度值。

1.3 统计学处理 采用 SAS6.12 统计软件进行分析,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,采用方差分析和组间 *t* 检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 神经功能障碍评分和脑组织含水量分析 术后 3 h 左右实验大鼠苏醒,各组大鼠在术后 5 h 采用 Garcia 法进行神经功能行为学评分。大鼠 ICH 模型术后各组大鼠均出现严重神经功能障碍,站立不稳,肢体无力,追尾等,BWC 明显升高,说明有脑水肿形成,各时间点相比较 72 h 时最为严重,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 1。

表 1 大鼠 NDS 和术后血肿周围 BWC 情况 ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

| 组别         | NDS                       | BWC                       |
|------------|---------------------------|---------------------------|
| Sham 组     | 17.23 ± 0.25              | 78.26 ± 0.56              |
| 模型组        |                           |                           |
| ICH 12 h 组 | 14.67 ± 1.38              | 78.83 ± 0.34              |
| ICH 24 h 组 | 11.80 ± 0.53              | 79.28 ± 0.38              |
| ICH 72 h 组 | 9.33 ± 2.46*              | 82.16 ± 0.46*             |
| ICH 7 d 组  | 13.56 ± 1.22 <sup>△</sup> | 80.47 ± 0.21 <sup>△</sup> |

\*:  $P < 0.05$ ,与 Sham 组比较;<sup>△</sup>:  $P < 0.05$ ,与 ICH 72 h 组比较。

2.2 尼氏染色检测结果 Sham 组脑组织基底节区尼氏小体大而且数量较多,ICH 72 h 组血肿周围神经细胞受到损伤,尼氏小体数量明显减少甚至消失,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 2。

表 2 TLR4 和 NF-κB 在尼氏染色中的阳性细胞数量的变化 ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

| 组别         | TLR4                      | NF-κB                     |
|------------|---------------------------|---------------------------|
| Sham 组     | 14.28 ± 1.26              | 8.67 ± 1.45               |
| 模型组        |                           |                           |
| ICH 12 h 组 | 18.34 ± 1.22              | 12.58 ± 1.67              |
| ICH 24 h 组 | 22.32 ± 1.38              | 16.27 ± 1.32              |
| ICH 72 h 组 | 34.56 ± 2.03*             | 28.32 ± 2.45*             |
| ICH 7 d 组  | 21.22 ± 1.32 <sup>△</sup> | 16.46 ± 1.57 <sup>△</sup> |

\*:  $P < 0.05$ ,与 Sham 组比较;<sup>△</sup>:  $P < 0.05$ ,与 ICH 72 h 组比较。

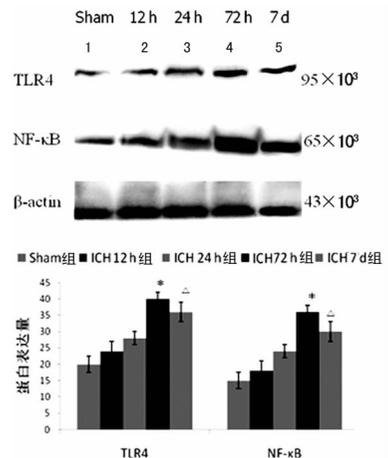
2.3 免疫组织化学检测结果 Sham 组脑组织基底节区可见丰富的神经细胞,胞体呈圆形,且排列整齐,结构致密,核仁清晰,无水肿。模型组基底节区神经细胞数目明显减少,排列紊乱、稀疏,其 NF-κB 阳性细胞为棕黄色。各时间点相比较,于 72 h 达到高峰,差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),见表 3。

表 3 TLR4 和 NF-κB 在免疫组织化学中的阳性细胞数量的变化 ( $n = 12, \bar{x} \pm s$ )

| 组别         | TLR4                      | NF-κB                     |
|------------|---------------------------|---------------------------|
| Sham 组     | 11.26 ± 0.34              | 7.53 ± 0.32               |
| 模型组        |                           |                           |
| ICH 12 h 组 | 16.34 ± 1.83              | 11.26 ± 1.56              |
| ICH 24 h 组 | 23.14 ± 1.24              | 14.34 ± 1.24              |
| ICH 72 h 组 | 31.44 ± 1.34*             | 26.36 ± 2.35*             |
| ICH 7 d 组  | 20.24 ± 2.25 <sup>△</sup> | 17.54 ± 1.63 <sup>△</sup> |

\*:  $P < 0.05$ ,与 Sham 组比较;<sup>△</sup>:  $P < 0.05$ ,与 ICH 72 h 组比较。

2.4 Western blot 检测 TLR4 和 NF-κB 的蛋白表达 TLR4 电泳条带敏度分析,与 Sham 组比较,模型组 TLR4 基因表达于 ICH 后开始升高,在 72 h 时达到高峰,ICH 72 h 组与 Sham 组比较差异有统计学意义( $P < 0.05$ ),NF-κB 的蛋白表达量与 TLR4 相一致,见图 1。



1: Sham 组; 2: ICH 12 h 组; 3: ICH 24 h 组; 4: ICH 72 h 组; 5: ICH 7 d 组; \*:  $P < 0.05$ ,与 Sham 组比较;<sup>△</sup>:  $P < 0.05$ ,与 ICH 72 h 组比较。

图 1 Western blot 检测 TLR4 和 NF-κB 蛋白的表达

3 讨 论

近年来,随着对 ICH 损伤机制研究的深入,脑组织已经被证实并非完全是免疫豁免区,ICH 后引起炎症反应较非出血性损伤更加明显。以往研究证明,ICH 后脑内的病理生理变化是一个错综复杂的过程,NF-κB 在其中可能起中心环节作用<sup>[10]</sup>。有研究显示,NF-κB 与靶基因上特定的 κB 序列结合,从而启动核内相关基因转录出相应的 mRNA,继而合成释放 IL-1、6、8、10、TNF-α 等细胞炎症因子,引起机制局部或全身的炎症反应。本实验通过研究发现,与 Sham 组相比,模型组出现严重神经功能障碍,脑组织含水量明显升高,NF-κB 表达显著增高( $P < 0.05$ )。进一步验证 NF-κB 参与 ICH 后引起的继发性炎症损伤,研究 NF-κB 表达调控机制对于寻找 ICH 的防治策略有重要意义。

陈燕飞等<sup>[8]</sup>研究显示,TLR4 被称为人类发现的第一个天然免疫受体,是脑内免疫炎症反应链条上的上游核心作用因子。当受损组织和坏死细胞以及血管和细胞间质损伤后可释

放 TLR4 的内源性激活物,并进一步使 TLR4 触发级联免疫炎症反应<sup>[9-13]</sup>。有实验证实,ICH 后血肿周围脑组织 TLR4 mRNA 表达量逐渐升高,72 h 达到高峰,持续到术后第 7 天。杨继文等<sup>[2]</sup>证实,在外来信号(如炎症、缺血等)刺激下也可以激活 TLR4 的表达,而 TLR4 通过上调其下游因子 NF- $\kappa$ B 的表达调控了多种炎症因子的释放,从而使机体产生损伤。国外研究表明,敲除 TLR4 表达基因的老鼠,其炎症因子释放明显减少,其组织学损伤相对减轻。为此,本研究通过大鼠 ICH 模型,观察 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 的表达情况。免疫组织化学结果显示,随着时间的延续,与 Sham 组比较,模型组 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 均表达升高,脑组织损伤不断加重,神经功能损伤评分升高。Western blot 结果显示两者表达量与之相一致。提示激活 TLR4 可能是导致 ICH 后脑组织周围 NF- $\kappa$ B 介导炎症反应的一个重要原因。

综上所述,TLR4 和 NF- $\kappa$ B 的表达在大鼠 ICH 后血肿周围脑组织的继发性病理损伤过程中发挥重要作用,其表达的升高加重了脑的继发性炎症损伤,那么找到抑制 TLR4 和 NF- $\kappa$ B 表达的药物,可为 ICH 防治策略提供可靠理论依据。

#### 参考文献:

- [1] Cotena S, Piazza O, Tufano R. The use of erythropoietin in cerebral diseases[J]. *Panminerva Med*, 2008, 50(2): 185-192.
- [2] 杨继文, 龚树辉, 张利民, 等. 脑出血后炎症反应的研究进展[J]. *脑与神经疾病杂志*, 2009, 17(4): 317-319.
- [3] Lively S, Schlichter LC. Age-related comparisons of evolution of the inflammatory response after intracerebral hemorrhage in rats[J]. *Transl Stroke Res*, 2012, 3(1): 132-146.
- [4] Zhang B, Ramesh G, Uematsu S, et al. TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity

[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(15): 923-932.

- [5] Buchanan MM, Hutchinson M, Watkins LR, et al. Toll like receptor 4 in CNS pathologies[J]. *J Neurochem*, 2010, 114(1): 13-27.
- [6] 姚树桐, 刘秀华, 汤旭明, 等. 缺血后处理改善脑缺血再灌注大鼠软脑膜微循环[J]. *中国病理生理杂志*, 2009, 25(3): 451-455.
- [7] Fredrik DN, Alistair J, Dawid MA, et al. Early hemodynamic changes in experimental hemorrhage[J]. *Neurosurgery*, 1986, 65(5): 697-703.
- [8] 陈燕飞, 周丽, 高音. TLR4 对脑缺血再灌注小鼠海马 IRF-3 和 IFN- $\beta$  表达的影响[J]. *医学研究杂志*, 2010, 39(5): 58-60.
- [9] 谷翠芝, 冯飞玲. TLR4 与中枢神经系统损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(3): 608-612.
- [10] Wu H, Chen G, Wyburn KR, et al. TLR4 activation mediates kidney ischemia/reperfusion injury[J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(10): 2847-2859.
- [11] Zhang B, Ramesh G, Uematsu S, et al. TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity[J]. *J Am Soc Nephrol*, 2008, 19(5): 923-932.
- [12] 叶欣, 万曙, 詹仁雅, 等. NF- $\kappa$ B 信号通路和脑出血后的继发性脑损伤[J]. *国际神经病学神经外科学杂志*, 2010, 37(2): 171-175.
- [13] Ribes S, Ebert S, Czesnik D, et al. Toll-like receptor pre-stimulation increases phagocytosis of Escherichia coli DH5 alpha and Escherichia coli K1 strains by murine microglial cells[J]. *Infect Immune*, 2009, 77(1): 557-564.

(收稿日期:2013-06-04 修回日期:2013-08-29)

(上接第 583 页)

- [6] Son YS, Park HJ, Kwon OB, et al. Antipyretic effects of acupuncture on the lipopolysaccharide-induced fever and expression of interleukin-6 and interleukin-1 beta mRNA in the hypothalamus of rats[J]. *Neurosci Lett*, 2002, 319(1): 45-48.
- [7] Marubio LM, Changeux JP. Nicotinic acetylcholine receptor knockout mice as animal models for studying receptor function[J]. *Eur J Pharmacol*, 2000, 393(1/3): 113-121.
- [8] De Rosa MJ, Dionisio L, Agriello E, et al. Alpha7 nicotinic acetylcholine receptor modulates lymphocyte activation[J]. *Life Sci*, 2009, 85(11/12): 444-449.
- [9] Fujii YX, Tashiro A, Arimoto K, et al. Diminished antigen-specific IgG1 and interleukin-6 production and acetylcholinesterase expression in combined M1 and M5 muscarinic acetylcholine receptor knockout mice[J]. *J Neuroimmunol*, 2007, 188(1/2): 80-85.
- [10] Chernyavsky AI, Arredondo J, Galitovskiy V, et al. Structure and function of the nicotinic arm of acetylcholine regulatory axis in human leukemic T cells[J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2009, 22(2): 461-472.
- [11] Kawashima K, Yoshikawa K, Fujii YX, et al. Expression

and function of genes encoding cholinergic components in murine immune cells[J]. *Life Sci*, 2007, 80(24/25): 2314-2319.

- [12] Stuckenholtz V, Bacher M, Balzer-Geldsetzer M, et al. The  $\alpha 7$  nAChR agonist PNU-282987 reduces inflammation and MPTP-induced nigral dopaminergic cell loss in mice[J]. *J Parkinsons Dis*, 2013, 3(2): 161-172.
- [13] Gahring LC, Enioutina EY, Myers EJ, et al. Nicotinic receptor alpha7 expression identifies a novel hematopoietic progenitor lineage[J]. *PLoS One*, 2013, 8(3): e57481.
- [14] Vukelic M, Qing X, Redecha P, et al. Cholinergic receptors modulate immune complex-induced inflammation in vitro and in vivo[J]. *J Immunol*, 2013, 191(4): 1800-1807.
- [15] Thomsen MS, Mikkelsen JD. The  $\alpha 7$  nicotinic acetylcholine receptor ligands methyllycaconitine, NS6740 and GTS-21 reduce lipopolysaccharide-induced TNF- $\alpha$  release from microglia[J]. *J Neuroimmunol*, 2012, 251(1/2): 65-72.

(收稿日期:2013-09-22 修回日期:2013-11-12)