

文章编号:1003-2754(2019)04-0300-03

TLR4/MyD88 介导的炎症反应在体外培养 癫痫海马组织中的作用研究

叶洁梅¹, 黄国雄¹, 黄媛恒²

摘要: **目的** 研究在无镁液所致自发性癫痫样放电海马组织中 Toll 样受体 4 (TLR4)、髓样分化因子 88 (MyD88)、IL-1 β 和 IL-6 的表达,探讨 TLR4 介导的炎症反应在癫痫发病中的作用。**方法** 取新生 6~9 d SD 鼠的海马,体外培养至 7 d 时用无 Mg²⁺ ACSF 灌注 3 h,于造模前和造模后 1 d、3 d、1 w,采用 real-time PCR 检测 TLR4、MyD88、IL-1 β 、IL-6 基因,采用 Western blot 检测 TLR4 和信号蛋白 MyD88 的表达。**结果** 与体外培养条件下正常海马组织相比,无镁细胞外液灌注后的癫痫样放电模型的 TLR4、MyD88、IL-1 β 、IL-6 mRNA 升高,TLR4 和 MyD88 的蛋白表达升高,并且随时间延长而增强 ($P < 0.001$)。**结论** 体外培养无 Mg²⁺ ACSF 所致的癫痫样放电海马组织中,可通过 TLR4-MyD88 信号通路,激活炎症反应,在癫痫的发病机制中发挥一定的作用。

关键词: TLR4; MyD88; 癫痫; 炎症反应; 作用机制

中图分类号:R742.1 **文献标识码:**A

Inflammation through TLR4/MyD88 signaling pathway in low-Mg²⁺-induced epileptic hippocampal slice models

YE Jiemei, HUANG Guoxiong, HUANG Yuanheng. (Department of Neurology, Ruikang Affiliated Hospital to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, China)

Abstract: **Objective** To explore The expression of toll-like receptor 4 (TLR4), medullary differentiation factor (MyD88), IL-1 β and IL-6 in low-Mg²⁺-induced epileptic hippocampal slice models, and the role of TLR4 mediated inflammatory response in epilepsy was investigated. **Methods** He hippocampal slice from newborn 6~9 d SD rat was cultured in vitro to 7 days treated by low-Mg²⁺ ACSF perfusion 3 h. Quantitative real-time-polymerase chain reaction (qRT-PCR) was used for detections of TLR4, MyD88, IL-1 β and IL-6 genes, western blot was also determined to detect TLR4 and MyD88 proteins before and after the molding 1 d, 3 d, 1 w. **Results** Compared to control group, the mRNA levels of TLR4, MyD88, IL-1 β and IL-6 increased significantly in epileptic hippocampal slice after low-Mg²⁺ ACSF treatment, there was also a significant increase in TLR4, MyD88 proteins expression. **Conclusion** Neuroinflammation plays an important role in the development of epilepsy via TLR4/MyD88 signaling pathway in low-Mg²⁺-induced epileptic hippocampal slice models.

Key words: TLR4; MyD88; Epilepsy; Inflammation; Mechanism

癫痫是神经系统的常见病。近年来,癫痫与免疫相关的学说渐渐倍受关注,异常免疫反应可能是痫性发作和癫痫形成的始动因素之一,小胶质细胞、星型胶质细胞和神经元可作为免疫活性细胞,参与和影响炎症反应。天然免疫受体 Toll 样受体家族 (Toll-like receptors, TLRs) 是连接先天免疫和适应性免疫的桥梁,TLR4 (toll-like receptor 4) 作为 TLRs 家族的一名重要成员,是神经元、星型胶质细胞、小胶质细胞的炎性受体,可以促进免疫调控分子和细胞因子表达,影响癫痫的发生和进展,具体作用尚不十分清楚^[1]。本研究拟体外观察大鼠海马癫痫组织中细胞 TLR4 介导的炎症效应和作用通路,进一步阐明癫痫发病中的炎症机制。

1 材料与方法

1.1 主要实验材料和仪器 新生 6~9 d SD

鼠由广西医科大学实验动物中心提供,雌雄不限。HBSS 购于 Sigma 公司,总 RNA 提取试剂盒购于 Invitrogen, SYBR Green Supermix 试剂盒购于 Bio-Rad 公司,逆转录试剂盒购于 Promega 公司, Anti-MyD88 购于 Bioss 公司, TLR4 Polyclonal Antibody 购于 Abbkine 公司, Western blotting DAB 显色试剂盒购于 Solarbio 公司。实时定量 PCR 仪购于 Bio-Rad 公司。

收稿日期:2018-12-06; 修订日期:2019-01-30

基金项目:广西自然科学基金项目 (No. 2015GXNSFBA139125); 广西壮族自治区教育厅项目 (No. KY2015LX158)

作者单位:(1. 广西中医药大学附属瑞康医院,广西 南宁 530011; 2. 广西医科大学基础医学院实验生理学教研室,广西 南宁 530021)

通讯作者:叶洁梅, E-mail: jiemeiye616@yahoo.com

1.2 研究方法

1.2.1 体外自发性癫痫样放电海马脑片模型制备 无菌条件下分离出新生6~9 d SD鼠的完整海马,置于4℃ HBSS液中,在振动切片机的载物平台上,以400 μm厚度进行切片。随后将海马脑片放在6孔培养板各孔内的滤膜上,各孔内分别加入1.3~1.5 ml的完全培养基,置37℃、5% CO₂条件下培养,每周半量更换培养液两次,倒置相差显微镜下观察生长情况,培养至7 d。人工脑脊液(ACSF)成分(mmol/L):NaCl 124、KCl 3.3、KH₂PO₄ 1.2、NaHCO₃ 26、CaCl₂ 2.5、MgSO₄ 2.4、葡萄糖 10、pH 7.4。脑片在ACSF中通95% O₂及5% CO₂孵育至少1 h,实验时改用未加Mg²⁺ ACSF(即无Mg²⁺ ACSF)灌流3 h,制备自发性癫痫样放电海马脑片模型,于造模前和造模后1 d、3 d、1 w各时点收集样品进行检测。

1.2.2 Real-time PCR检测TLR4、MyD88、IL-1β、IL-6基因 于造模前和造模后1 d、3 d、1 w各个时间点收取组织标本,冰上碾磨,提取海马组织总RNA,紫外分光光度计鉴定纯度,根据逆转录试剂盒合成cDNA。用SYBR Green核酸荧光染料,根据试剂盒说明书操作,进行40个PCR循环后分析结果,采用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算各目的基因mRNA的表达水平。每个样品均设3个复孔,实验重复3次。

1.2.3 Western blot检测TLR4和信号蛋白MyD88的表达 于造模前后1 d、3 d、1 w各时点,采用蛋白提取试剂盒按说明书操作提取总蛋白,测定蛋白浓度后煮沸变性,SDS-PAGE凝胶电泳,70 V电转4 h至PVDF膜,5%脱脂奶粉室温下封闭1 h,分别加入稀释后的待检测的蛋白单克隆抗体,4℃过夜,洗膜3次,每次10 min,加入相应二抗,室温1 h,洗膜3次,每次10 min,显色曝光,分析TLR4和MyD88的表达水平。

1.2.4 统计学方法 本实验中所有的数据均采用SPSS 19.0统计学软件分析,采用均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。符合正态分布,采用单因素方差分析(one-way ANOVA), $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

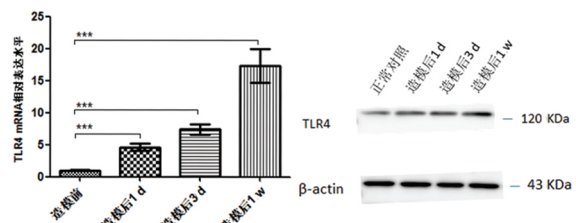
2 结果

2.1 大鼠正常海马组织和癫痫样放电海马脑片中TLR4 mRNA和蛋白的比较 和造模前大鼠正常海马组织对照组相比,造模后1 d、3 d、1 w大鼠癫痫样放电海马脑片中TLR4 mRNA的相对表达水平均明显增高($P < 0.001$),TLR4蛋白的表达水平也均明显增高($P < 0.001$)(见图1A、1B)。

2.2 大鼠正常海马组织和癫痫样放电海马脑

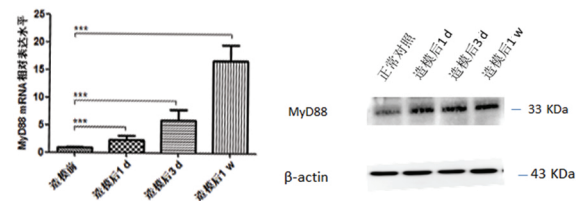
片中MyD88 mRNA和蛋白的比较 和造模前大鼠正常海马组织对照组相比,造模后1 d、3 d、1 w癫痫样放电海马脑片中各时间点实验组MyD88 mRNA的相对表达水平均明显增高($P < 0.001$),MyD88蛋白的表达水平也均明显增高($P < 0.001$)(见图2A、2B)。

2.3 大鼠正常海马组织和癫痫样放电海马脑片中IL-1β和IL-6 mRNA的比较 和造模前大鼠正常海马组织对照组相比,造模后1 d、3 d、1 w癫痫样放电海马脑片中各时间点实验组IL-1β和IL-6 mRNA的相对表达水平均明显增高($P < 0.001$)(见图3A、3B)。



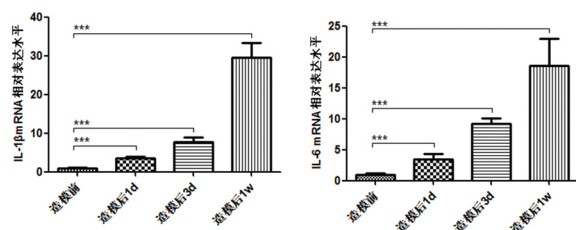
(注:*** $P < 0.001$)

图1 A:大鼠正常海马组织和癫痫样放电海马中TLR4 mRNA水平;B:大鼠正常海马组织和癫痫样放电海马中TLR4蛋白表达



(注:*** $P < 0.001$)

图2 A:大鼠正常海马组织和癫痫样放电海马中MyD88 mRNA水平;B:大鼠正常海马组织和癫痫样放电海马中MyD88蛋白表达



(注:*** $P < 0.001$)

(注:*** $P < 0.001$)

图3 A:大鼠正常海马组织和癫痫样放电海马中IL-1β mRNA水平;B:大鼠正常海马组织和癫痫样放电海马中IL-1β蛋白表达

3 讨 论

癫痫是神经系统的常见病,流行病学调查显示其发病率为5%~7%。由于血脑屏障的存在及脑内缺乏淋巴系统,中枢神经系统曾被认为是免疫豁免的场所,癫痫曾被认为是非炎症性病变。近年来,大量临床和实验研究证据表明,脑部炎症反应是痫性发作和癫痫形成的重要机制之一,癫痫发作后快速诱导的炎症反应,包括神经元、胶质细胞和外周免疫细胞的活化以及炎症细胞因子的分泌,同时,炎症也可诱导癫痫发作,促进其病理进程,并导致海马发生病理性改变,例如局部神经元损伤凋亡、胶质细胞修复再生等^[1-3]。

TLRs 家族中的 TLR4 可被体内受损细胞释放的内源性配体如热休克蛋白、脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS)、高迁移率组蛋白 1 (high mobility group box 1 protein, HMGB1) 激活,发挥转录调控作用^[4]。MyD88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 是 TLR4 的胞内接头蛋白,具有募集下游信号分子的 N 端死亡结构域 (Death domain, DD) 和承接 TLRs 活化信号的 C 端 TIR 结构域。TLR4 与细胞内源性配体激活后,通过 C 端 TIR 结构域募集 MyD88 样接头蛋白 MAL (MyD88 adaptor like protein, MAL) 和 MyD88,与 IRAK (IL-1 receptor-associated kinase, IRAK) 家族分子结合成为信号转导复合物,随后后者磷酸化从 MyD88/IRAK 复合体脱离,激活接头蛋白 TNF 受体相关因子 (TNFR-associated factor-6, TRAF-6),促使 NF- κ B 由胞浆转移到核内,发挥转录调控作用,激活 IL-1 β 、IL-8、环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, Cox-2)、肿瘤坏死因子- α (Tumor Necrosis Factor- α , TNF- α)、补体、趋化因子等基因,最终导致炎症因子释放^[5,6]。

TLR4 在脑组织中主要表达于星形胶质细胞、小胶质细胞及神经元。目前国内外关于 TLR4 及其信号通路与癫痫关系的研究较少。Das 等^[7]在大鼠出生后 2 w 给予注射 LPS 后发现激活的 TLR4 可以诱发炎症反应,并且这些大鼠成年后对癫痫的易感性增加。Rodger 等^[8]对大鼠脑皮质进行研究后发现,当 LPS 与 TLR4 结合后可引发局部癫痫样放电。Maroso 等^[9]发现 TLR4 在海人藻酸致痫小鼠的 CA₁、CA₃、DG 区星形胶质细胞和神经元上表达增多,TLR4 基因敲除或 TLR4 拮抗剂处理后小鼠痫性发作减轻。体外培养新生 SD 大鼠海马神经元无镁

细胞外液所致难治性癫痫模型中 TLR4 蛋白及 mRNA 增高,且随时间的延长而增强^[10]。本实验结果显示,模型组大鼠癫痫样放电海马组织中,TLR4 和 MyD88 的 mRNA 和蛋白的均不同程度的升高,炎症因子 IL-1 β 和 IL-8 mRNA 升高,表明 TLR4/MyD88 信号通路在癫痫发病和进展的炎症反应中起重要作用。

综上所述,本研究表明,癫痫海马内细胞表面表达的 TLR4 可作为重要的受体,通过 MyD88 介导神经炎症性损伤,可能是癫痫形成的异常免疫机制之一,免疫调节和抗炎治疗可能是癫痫治疗的新靶点。

[参考文献]

- [1] Do Nascimento AL, Dos Santos NF, Campos Pelagio F, et al. Neuronal degeneration and gliosis time-course in the mouse hippocampal formation after pilocarpine-induced status epilepticus[J]. Brain Research, 2012, 1470(35): 98-110.
- [2] Matin N, Tabatabaie O, Falsaperla R, et al. Epilepsy and innate immune system: A possible immunogenic predisposition and related therapeutic implications[J]. Human Vaccines, 2015, 11(8): 2021-2029.
- [3] Shen Y, Qin H, Chen J, et al. Postnatal activation of TLR4 in astrocytes promotes excitatory synaptogenesis in hippocampal neurons[J]. Journal of Cell Biology, 2016, 215(5): 719-734.
- [4] Zhang Z, Liu Q, Ming L, et al. Upregulation of HMGB1-TLR4 inflammatory pathway in focal cortical dysplasia type II [J]. Journal of Neuroinflammation, 2018, 15(1): 27.
- [5] Hu QP, Mao DA. Histone deacetylase inhibitor SAHA attenuates post-seizure hippocampal microglia TLR4/MyD88 signaling and inhibits TLR4 gene expression via histone acetylation[J]. Bmc Neuroscience, 2016, 17(1): 22.
- [6] Wen X, Han XR, Wang YJ, et al. MicroRNA-421 suppresses the apoptosis and autophagy of hippocampal neurons in epilepsy mice model by inhibition of the TLR/MyD88 pathway[J]. J Cell Physiol, 2018, 233(9): 7022-7034.
- [7] Das A, Th WG, Holmes C, et al. Hippocampal tissue of patients with refractory temporal lobe epilepsy is associated with astrocyte activation, inflammation, and altered expression of channels and receptors [J]. Neuroscience, 2012, 220(38): 237-246.
- [8] Rodgers KM, Hutchinson MR, Northcutt A, et al. The cortical innate immune response increases local neuronal excitability leading to seizures [J]. Brain, 2009, 132(9): 2478-2486.
- [9] Maroso M, Balosso S, Ravizza T, et al. Toll-like receptor 4 and high-mobility group box-1 are involved in ictogenesis and can be targeted to reduce seizures[J]. Nature Medicine, 2010, 16(4): 413-419.
- [10] 李德俊, 吴原, 黄金山, 等. Sombati 细胞模型中 Toll 样受体 4 的表达及意义[J]. 中国病理生理杂志, 2014, 30(1): 175-179.