

· 实验研究 ·

沉默髓系细胞触发受体 1 基因对神经病理性痛大鼠的影响

曾令清 鲍红光 斯妍娜 张媛 景灵 耿圆 谢辉兰 孙蓓

【摘要】 目的 探讨髓系细胞触发受体 1(triggering receptor expressed on myeloid cells 1, TREM1)在大鼠神经病理性痛中的作用及可能机制。**方法** 成年雄性 SD 大鼠,体重 220~300 g,取鞘内置管成功大鼠 48 只,随机分为四组($n=12$):对照组(S 组)、神经病理性痛组(CCI 组)、TREM1 shRNA 组(RNAi 组)和阴性慢病毒组(Virus 组)。采用慢性坐骨神经压榨性损伤法(CCI)制备神经病理性痛模型。RNAi 组于造模前 1 周鞘内注射 pGLVU6/RFP/Puro-shRNA $30\ \mu\text{l}$ (1×10^9 IU/ml);Virus 组、CCI 组和 S 组分别鞘内注射等量阴性慢病毒和生理盐水。于造模前 1 d 和造模后 1、3、7、14 d 测定机械缩足反应阈(MWT)和热缩足潜伏期(TWL)。于造模后 14 d 痛阈测定结束后,处死大鼠,取 L₄₋₅ 节段脊髓组织,采用 Western blot 法测定脊髓 TREM1、TLR4、MyD88、I κ B α 和 p-NF- κ B p65 蛋白含量,RT-PCR 法测定脊髓 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达量。**结果** 与 S 组比较,CCI 组和 Virus 组 TREM1 蛋白含量明显增加($P<0.05$);与 CCI 组比较,RNAi 组 TREM1 蛋白含量明显降低($P<0.05$)。与 S 组比较,CCI 组、RNAi 组和 Virus 组造模后各时点 MWT 和 TWL 明显降低($P<0.05$);脊髓 TLR4、MyD88 和 p-NF- κ B p65 蛋白含量明显增加,I κ B α 蛋白含量明显降低($P<0.05$);IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达量明显升高($P<0.05$)。与 CCI 组比较,RNAi 组大鼠造模后各时点 MWT 和 TWL 明显升高($P<0.05$);脊髓 TLR4、MyD88 和 p-NF- κ B p65 蛋白含量明显降低,I κ B α 蛋白含量明显增加($P<0.05$);IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达量明显降低($P<0.05$)。**结论** 干扰 TREM1 基因可以缓解大鼠神经病理性痛,其机制可能与抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路有关。

【关键词】 炎症;神经病理性痛;髓系细胞触发受体 1;Toll 样受体 4

Effect of silencing TREM1 on rats with neuropathic pain ZENG Lingqing, BAO Hongguang, SI Yanna, ZHANG Yuan, JING Ling, GENG Yuan, XIE Huilan, SUN Bei. Department of Anesthesiology, Nanjing First Hospital/Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing Medical University, Nanjing 210006, China

Corresponding author: BAO Hongguang, Email: hongguang_bao@hotmail.com

【Abstract】 Objective To investigate the role of triggering receptor expressed on myeloid cells 1 (TREM1) in rats with neuropathic pain and its possible mechanism. **Methods** Forty-eight male adult Sprague-Dawley rats, weighing 220-300 g, were successfully placed intrathecal catheters, and then randomly divided into 4 groups ($n=12$): sham operation group (group S), neuropathic pain group (group CCI), TREM1 shRNA group (group RNAi) and negative lentivirus group (group Virus). The neuropathic pain was induced by chronic sciatic nerve compression injury (CCI). In group RNAi, $30\ \mu\text{l}$ pGLVU6/RFP/Puro-shRNA (1×10^9 IU/ml) was injected intrathecally 1 week before modeling. Group Virus was injected with $30\ \mu\text{l}$ negative lentivirus, whereas group CCI and group S with equal amount of normal saline. MWT and TWL were measured 1 day before (baseline) and 1, 3, 7, 14 day after modeling. When behavioral test finished, the expression levels of TREM1, TLR4, MyD88, I κ B α and p-NF- κ B p65 in spinal cord were determined by Western blot. Whereas the mRNA expression levels of IL-1 β , TNF- α and IL-6 in spinal cord were measured by RT-PCR. **Results** Compared with group S, the expression levels of TREM1 in groups CCI and Virus significantly increased ($P<0.05$). While compared with group CCI, the TREM1 expression of group RNAi in spinal cord significantly decreased ($P<0.05$). Compared with group S, MWT and TWL of groups CCI, Virus

DOI:10.12089/jca.2018.04.016

基金项目:江苏省临床医学科技专项(BL2014012);南京市医学科技发展资金(QRX17019);南京医科大学科技发展基金(2014NJMU044);南京市医学科技发展项目(YKK15088)

作者单位:210006 南京医科大学附属南京医院(南京市第一医院)麻醉科

通信作者:鲍红光,Email:hongguang_bao@hotmail.com

and RNAi after modeling and the expression of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ significantly decreased ($P < 0.05$), whereas the expression of TLR4, MyD88, p-NF- κB p65 increased significantly ($P < 0.05$), as well as the expression of IL-1 β , TNF- α and IL-6 mRNA ($P < 0.05$). Compared with group CCI, the MWT and TWL of group RNAi after modeling and the expression of $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ remarkably increased ($P < 0.05$), whereas the expression of TLR4, MyD88 and p-NF- κB p65 in the spinal cord remarkably decreased ($P < 0.05$), as well as the expression of IL-1 β , TNF- α and IL-6 mRNA ($P < 0.05$). **Conclusion** TREM1 knock-down can alleviate neuropathic pain, the underlying mechanism might be the inhibition of TLR4/MyD88/NF- κB signaling pathway.

【Key words】 Inflammation; Neuropathic pain; Triggering receptor expressed on myeloid cells 1; Toll-like receptor 4

神经病理性痛(neuropathic pain, NP)的主要临床表现为自发痛、痛觉过敏和痛觉超敏,严重影响患者生存质量^[1,2]。但目前临床药物干预和物理治疗效果均不理想。研究表明,诱发 NP 的初级损伤往往伴随炎症激活、离子通道改变等“次级损伤”,加剧神经病理性痛^[3]。因此,炎症调控成为 NP 治疗领域的研究热点。

Toll 样受体 4(Toll-like receptor 4, TLR4)介导的炎症反应可以促进神经病理性痛的进展;TLR4 抑制剂可以显著降低神经病理性痛小鼠脊髓炎症水平,缓解痛觉超敏^[4]。髓系细胞触发受体 1(triggering receptor expressed on myeloid cells 1, TREM1)属于免疫球蛋白超家族受体,主要表达于单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞及小胶质细胞。研究表明,TREM1 可以“放大”TLR4 介导的炎症反应,TREM1 激动剂与 LPS 共刺激显著增加单核细胞中 TNF- α 和 IL-1 β 表达水平^[5]。但 TREM1 对神经病理性痛发生发展的影响未见报道。因此,本研究拟探讨 TREM1 对神经病理性痛的影响及可能机制。

材料与方法

实验动物 清洁级成年雄性 SD 大鼠,体重 220~300 g,由南京医科大学附属南京医院动物实验中心提供。饲养条件:昼夜交替,环境温度 22~25℃,相对湿度 40%~70%,饮水和进食不限。

鞘内置管 大鼠腹腔注射 10%水合氯醛 350 mg/kg 麻醉后,参照文献^[6],于大鼠髂棘连线中点作纵向切口。套管针从 L₅₋₆ 椎间隙进针,针尖指向中线。特征性尾巴甩动或脑脊液流出标志置入成功。然后向头端继续置入 3 cm,脑脊液流出通畅则说明导管位于蛛网膜下腔,妥善固定。术后 3 d 连续肌注青霉素钠 4×10⁴ U。置管后观察 3 d,排除肢体瘫痪的大鼠。

神经病理性痛模型制备 选取鞘内置管成功

大鼠 48 只,按随机数字表法分为四组($n = 12$):对照组(S 组)、NP 组(CCI 组)、TREM1 shRNA 组(RNAi 组)和阴性慢病毒组(Virus 组)。RNAi 组于造模前 1 周鞘内注射 pGLVU6/RFP/Puro-shRNA 30 μl (1×10^9 IU/ml);Virus 组、CCI 组和 S 组分别鞘内注射等量阴性慢病毒和生理盐水。CCI 组、RNAi 组和 Virus 组参照文献^[7]制备 CCI 模型。大鼠麻醉后,方法同鞘内置管,沿左侧股骨中部作纵向切口,钝性分离股二头肌,游离坐骨神经主干及其分支。用 4-0 铬制羊肠线环绕坐骨神经主干,于坐骨神经分叉近端 5 mm 结扎 4 道,间隔 1 mm,结扎时观察到小腿肌肉轻微抖动即可;S 组仅暴露坐骨神经,不结扎。然后分层缝合切口,术后 3 d 连续肌注青霉素钠 4×10⁴ U。

行为学测定 于造模前 1 d(基础值)和造模后 1、3、7、14 d 测定机械缩足反应阈(MWT)和热缩足潜伏期(TWL)^[7]。大鼠置于金属丝网垫上,透明观察笼中自由活动 10~30 min。将 von Frey 纤维丝对准左后足掌心,大鼠出现缩足、舔足等动作视为阳性反应。初始刺激力度为 2 g,若出现阳性反应,则刺激力度降低一个阶段;否则相反。采用序贯法计算 50% von Frey 反应阈值,即为 MWT,测量 3 次取平均值。大鼠置于金属丝网垫上,透明观察笼中自由活动 10~30 min。将热板仪激光束对准大鼠左后足底掌心,记录照射至大鼠抬足的时间,即为 TWL,测量 3 次取平均值。

Western blot 法测定蛋白含量 行为学测试结束后,每组随机取 6 只大鼠,断头处死,取 L₄₋₆ 脊髓节段。加入适量 RIPA 和 PMSF 提取蛋白,BCA 法测定蛋白浓度。蛋白上样量 40 μg ,经 10%~12% SDS-PAGE 凝胶电泳后,转移到 PVDF 膜,然后室温封闭 1 h。分别加入一抗:小鼠 TREM1 单抗(1:1 000)、小鼠 TLR4 单抗(1:1 000)、兔 MyD88 多抗(1:1 000)、小鼠 p-NF- κB p65 单抗(1:1 000)单抗、兔 $\text{I}\kappa\text{B}\alpha$ 单抗(1:1 000)和小鼠 GAPDH 单抗(1:

2 500), 4℃ 孵育过夜。漂洗 3 遍后加入二抗(1:2 000), 室温孵育 1 h。漂洗 3 遍后显色曝光。采用 Image lab 图像软件分析蛋白条带灰度值, 以目的蛋白与 GAPDH 的条带灰度值比值反映目的蛋白含量。

荧光实时定量 PCR(RT-PCR)测定炎症因子表达水平 行为学测试结束后, 每组随机取 6 只大鼠, 取 L_{4~6} 脊髓节段。离心匀浆, 按照试剂盒操作步骤, Trizol 试剂盒提取脊髓总 mRNA, 逆转录试剂盒合成 cDNA。引物由上海吉玛生物有限公司合成。IL-1β: 上游引物序列 5'-CCCAACTGGTACA-TCAGCACCTCTC-3', 下游引物序列 5'-CTATGTCCCGACCATTTGCTG-3'; TNF-α: 上游引物序列 5'-TCAGTTCCATGGCCAGAC-3', 下游引物序列 5'-GTTGTCTTTGAGATCCATGCCT-3'; IL-6: 上游引物序列 5'-GATTGTATGAACAGCGATGATGC-3', 下游引物序列 5'-AGAAACGGAACCTCCAGAAGACC-3'; GAPDH: 上游引物序列 5'-CC-AATGTGTCCGTCGCGTGGATCT-3', 下游引物序列 5'-GTTGAAGTTCGAGGAGACAACC-3'。PCR 反应条件: 95℃ 预变性 20 s, 95℃ 变性 3 s, 60℃ 退火延伸 30 s, 45 个循环。采用 Roche-LightCycler 96 型荧光定量 PCR 仪测定 IL-1β、TNF-α、IL-6 和 GAPDH 基因的 C_T 值, 采用 2^{-ΔΔC_T} 法计算 IL-1β、TNF-α 和 IL-6 mRNA 的相对表达量。

统计分析 采用 SPSS 19.0 统计学软件进行分析。正态分布计量资料以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 组间比较采用单因素方差分析。组内不同时间点采用重复测量方差分析。P<0.05 为差异有统计学意义。

表 1 四组大鼠不同时点 MWT 和 TWL 的比较($\bar{x} \pm s$)

指标	组别	只数	造模前 1 d	造模后 1 d	造模后 3 d	造模后 7 d	造模后 14 d
MWT(g)	S 组	12	13.4±1.1	13.9±1.2	13.5±0.9	13.1±1.1	13.6±1.0
	CCI 组	12	13.6±1.2	7.3±1.0 ^{ac}	5.8±0.9 ^{ac}	4.9±0.6 ^{ac}	3.9±0.5 ^{ac}
	Virus 组	12	13.3±0.9	6.9±1.1 ^{ac}	6.7±0.7 ^{ac}	5.1±0.8 ^{ac}	3.3±0.4 ^{ac}
	RNAi 组	12	13.7±1.2	10.1±0.7 ^{abc}	9.1±0.5 ^{abc}	8.4±0.7 ^{abc}	6.5±0.6 ^{abc}
TWL(s)	S 组	12	18.1±0.9	17.9±1.3	17.7±1.2	17.5±1.4	18.0±1.3
	CCI 组	12	18.3±1.2	10.3±0.9 ^{ac}	7.7±2.5 ^{ac}	5.3±1.9 ^{ac}	4.9±1.5 ^{ac}
	Virus 组	12	17.9±2.3	11.2±1.2 ^{ac}	8.5±2.0 ^{ac}	4.3±1.6 ^{ac}	5.1±1.2 ^{ac}
	RNAi 组	12	18.0±1.9	14.7±0.8 ^{abc}	13.3±0.5 ^{abc}	11.5±0.9 ^{abc}	10.8±1.3 ^{abc}

注: 与 S 组比较, ^aP<0.05; 与 CCI 组比较, ^bP<0.05; 与造模前 1 d 比较, ^cP<0.05

结 果

与 S 组比较, CCI 组和 Virus 组 TREM1 蛋白含量明显增加(P<0.05); 与 CCI 组比较, RNAi 组 TREM1 蛋白含量明显降低(P<0.05)(图 1)。

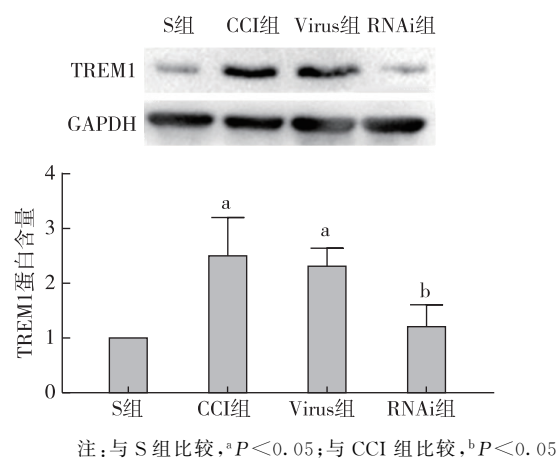
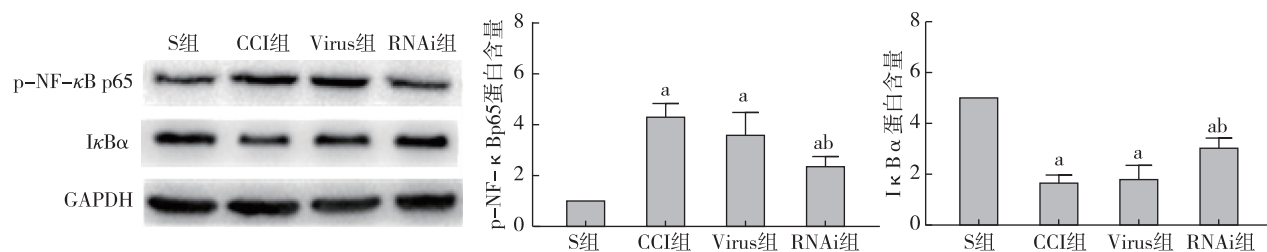


图 1 四组大鼠 TREM1 蛋白含量的比较

与造模前比较, CCI 组、RNAi 组和 Virus 组造模后各时点 MWT 和 TWL 均明显降低(P<0.05), 且明显低于 S 组(P<0.05), 而 RNAi 组明显高于 CCI 组(P<0.05)(表 1)。

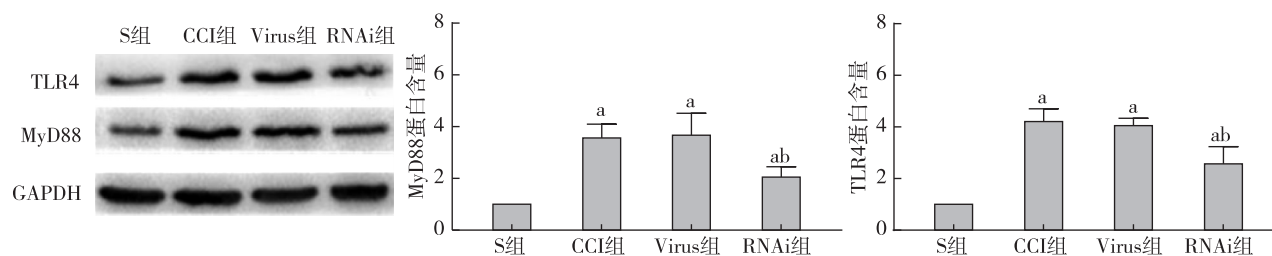
与 S 组比较, CCI 组、RNAi 组和 Virus 组大鼠脊髓 TLR4、MyD88 和 p-NF-κB p65 蛋白含量明显增加, IκBα 蛋白含量明显降低(P<0.05); 与 CCI 组比较, RNAi 组大鼠脊髓 TLR4、MyD88 和 p-NF-κB p65 蛋白含量明显降低, IκBα 蛋白含量明显增加(P<0.05)(图 2, 3)。

与 S 组比较, CCI 组、RNAi 组和 Virus 组 IL-1β、TNFα 和 IL-6 mRNA 表达量明显增加(P<



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 CCI 组比较,^b $P < 0.05$

图 2 四组大鼠 p-NF-κB p65、IκBα 蛋白含量的比较



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 CCI 组比较,^b $P < 0.05$

图 3 四组大鼠 TLR4 和 MyD88 蛋白含量的比较

0.05);与 CCI 组比较, RNAi 组大鼠脊髓 IL-1 β 、TNF α 和 IL-6 mRNA 表达量明显减少 ($P < 0.05$) (图 4)。

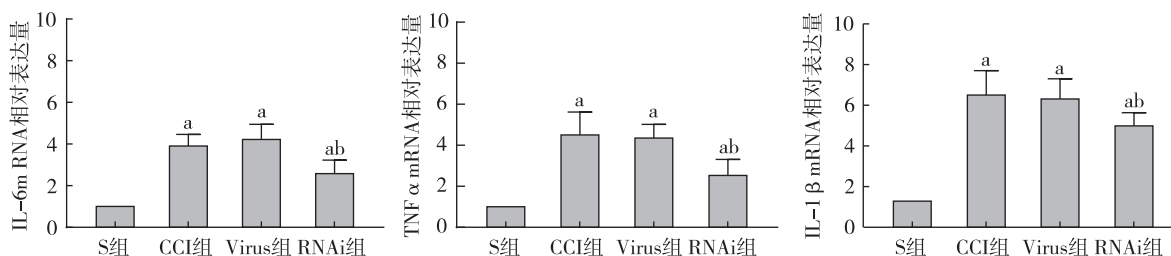
讨 论

慢性坐骨神经压榨性损伤法可较好地模拟神经病理性疼痛,是较理想的神经病理性痛模型^[8]。本研究中,大鼠造模后 1 d 开始出现机械痛觉过敏和热痛觉过敏,符合慢性坐骨神经压榨损伤的行为学特征,表明模型制备成功。

神经病理性痛涉及炎症激活、中枢敏化等多个方面^[9]。其中,TLR4 介导的炎症反应可以促进大鼠神经病理性痛的发生发展,其机制与 MyD88/NF-κB 通路激活,促炎因子释放增加有关^[10]。Jursa 等^[4]发现,TLR4 拮抗剂可以减轻 CCI 大鼠脊髓小胶质细胞激活,降低 TNF- α 的表达水平,缓解

痛觉超敏。本研究表明 CCI 组大鼠脊髓 TLR4、MyD88 和 p-NF-κB p65 水平升高, IκB α 表达水平降低,炎症因子转录水平升高,提示 CCI 组大鼠神经病理性痛的进展可能与 TLR4/MyD88/NF-κB 通路介导的炎症反应相关。

TREM1 作为一种免疫模式受体,已被证实与类风湿性关节炎、自身免疫性神经炎、感染性休克等多种以炎症紊乱为特征性疾病有关。本研究中, CCI 组和 Virus 组大鼠脊髓 TREM1 表达显著增加,说明 TREM1 可能与神经病理性痛的发生发展相关。Ornatowska 等^[11]发现, TREM1 siRNA 可以显著抑制 RAW 264.7 细胞 TLR4 信号通路中 CD14、MyD88、IL-1 β 等基因的表达。动物实验证实,干扰 TREM1 可以降低结肠炎小鼠病灶内 IL-1 β 、TNF- α 、IL-6 等炎症因子的转录水平,缓解结肠炎症状^[12]。由此可见, TREM1 对炎症反应具有重



注:与 S 组比较,^a $P < 0.05$;与 CCI 组比较,^b $P < 0.05$

图 4 四组大鼠脊髓 IL-1 β 、TNF- α 和 IL-6 mRNA 表达量的比较

要的调控作用。本研究通过鞘内注射干扰慢病毒证实,干扰 TREM1 可以缓解大鼠神经病理性痛。RNAi 组大鼠脊髓 TLR4、MyD88 和 p-NF- κ B p65 表达减少, I κ B α 表达升高, 炎症因子转录水平降低, 提示干扰 TREM1 可以降低脊髓炎症水平, 缓解大鼠神经病理性痛, 其机制可能与抑制脊髓 TLR4/MyD88/NF- κ B 通路介导的炎症反应有关。

综上所述, 干扰 TREM1 可以缓解大鼠神经病理性痛, 其机制可能与抑制 TLR4/MyD88/NF- κ B 炎症通路有关。

参 考 文 献

- [1] Min K, Oh Y, Lee SH, et al. Symptom-based treatment of neuropathic pain in spinal cord-injured patients: a randomized crossover clinical trial. *Am J Phys Med Rehabil*, 2016, 95 (5): 330-338.
- [2] Freeman R, Baron R, Bouhassira D, et al. Sensory profiles of patients with neuropathic pain based on the neuropathic pain symptoms and signs. *Pain*, 2014, 155(2): 367-376.
- [3] Schomberg D, Ahmed M, Miranpuri G, et al. Neuropathic pain: role of inflammation, immune response, and ion channel activity in central injury mechanisms. *Ann Neurosci*, 2012, 19(3): 125-132.
- [4] Jurga AM, Rojewska E, Piotrowska A, et al. Blockade of Toll-like receptors (TLR2, TLR4) attenuates pain and potentiates buprenorphine analgesia in a rat neuropathic pain model. *Neural Plast*, 2016, 2016: 5238730.
- [5] Pelham CJ, Pandya AN, Agrawal DK. Triggering receptor expressed on myeloid cells receptor family modulators: a patent review. *Expert Opin Ther Pat*, 2014, 24 (12): 1383-1395.
- [6] Milligan ED, Hinde JL, Mehmert KK, et al. A method for increasing the viability of the external portion of lumbar catheters placed in the spinal subarachnoid space of rats. *J Neurosci Methods*, 1999, 90(1): 81-86.
- [7] Yu HM, Wang Q, Sun WB. Silencing of FKBP51 alleviates the mechanical pain threshold, inhibits DRG inflammatory factors and pain mediators through the NF-kappaB signaling pathway. *Gene*, 2017, 627: 169-175.
- [8] 张婷, 孙凯, 尹伟, 等. 鞘内注射 DNMT1-siRNA 对 CCI 大鼠行为和脊髓 SOCS1、p-ERK、p-CREB 表达的影响. *临床麻醉学杂志*, 2016, 32(9): 919-922.
- [9] Meacham K, Shepherd A, Mohapatra DP, et al. Neuropathic pain: central vs. peripheral mechanisms. *Curr Pain Headache Rep*, 2017, 21(6): 28.
- [10] Liu F, Wang Z, Qiu Y, et al. Suppression of MyD88-dependent signaling alleviates neuropathic pain induced by peripheral nerve injury in the rat. *J Neuroinflammation*, 2017, 14 (1): 70.
- [11] Ornatowska M, Azim AC, Wang X, et al. Functional genomics of silencing TREM-1 on TLR4 signaling in macrophages. *Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol*, 2007, 293 (6): L1377-1384.
- [12] Weber B, Schuster S, Zysset D, et al. TREM-1 deficiency can attenuate disease severity without affecting pathogen clearance. *PLoS Pathog*, 2014, 10(1): e1003900.

(收稿日期: 2017-08-09)

· 消息 ·

2018 中国心胸麻醉大会(CCAC 2018) 暨京津冀麻醉学协同发展论坛通知

由中国心胸血管麻醉学会心血管麻醉分会和中国心胸血管麻醉学会胸科麻醉分会联合主办, 天津市胸科医院承办的“2018 中国心胸麻醉大会(CCAC 2018)暨京津冀麻醉学协同发展论坛”将于 2018 年 6 月 29 日~7 月 2 日在天津市梅江会展中心隆重召开。届时将有心胸医学领域院士, 著名国内外专家学者和麻醉同道齐聚津门, 共襄盛事。本次大会还将同期举办术中心脏超声 Workshop 初级培训班、壁报评选和青年医生论文大赛等一系列活动。我们诚挚欢迎各位专家同道出席本次会议, 共襄盛举, 携手促进我国心胸麻醉事业的发展!

报名网址: www.ccac2018.com。

网上注册缴费及汇款截止日期: 2018 年 6 月 10 日 17:00。

联系人: 许平波(18017312996), 金沐(13366600987), 易杰(18612671787), 王越夫(13811491035)。