

小鼠视神经损伤后视网膜中 TLR-9 与 MyD88 表达变化

李雪颖, 李迪, 陈丽平, 李静

引用: 李雪颖, 李迪, 陈丽平, 等. 小鼠视神经损伤后视网膜中 TLR-9 与 MyD88 表达变化. 国际眼科杂志 2022; 22(6): 916-919

基金项目: 陕西省人民医院科技人才支持计划项目(No.2021JY-37)

作者单位: (710068) 中国陕西省西安市, 陕西省人民医院眼科
作者简介: 李雪颖, 女, 博士, 主治医师, 研究方向: 青光眼、眼底病。

通讯作者: 李静, 硕士, 副教授, 副主任医师, 研究方向: 眼底病。
lix-www@163.com

收稿日期: 2021-01-15 修回日期: 2022-05-13

摘要

目的: 探讨 Toll 样受体-9 (TLR-9) 与髓样分化因子 (MyD88) 在小鼠视神经损伤 (ONI) 后视网膜中的表达变化。

方法: 选取 8 周大小的雄性 C57BL/6J 小鼠 36 只, 随机分为 6 组: 空白对照组 (未做任何处理)、ONI 1d 组 (视神经损伤后 1d 取材)、ONI 3d 组 (视神经损伤后 3d 取材)、ONI 5d 组 (视神经损伤后 5d 取材)、ONI 7d 组 (视神经损伤后 7d 取材)、ONI 14d 组 (视神经损伤后 14d 取材)。分组后通过视神经夹持的方法制作小鼠视神经损伤模型, 利用 RT-qPCR 与 Western-blot 检测各组小鼠视网膜中 TLR-9 与 MyD88 的 mRNA 和蛋白水平。

结果: ONI 1d 组视网膜中 TLR-9 与 MyD88 的 mRNA 和蛋白水平与空白对照组比较无差异 ($P>0.05$); ONI 3d、ONI 5d、ONI 7d、ONI 14d 组视网膜中 TLR-9 与 MyD88 的 mRNA 和蛋白水平与空白对照组比较均明显增加 ($P<0.01$)。与空白对照组比较视网膜中 TLR-9 与 MyD88 的 mRNA 和蛋白水平在小鼠 ONI 3d 开始升高 ($P<0.01$), ONI 5d 达到峰值 ($P<0.001$), ONI 7d 开始逐渐下降 ($P<0.01$)。

结论: 小鼠视神经损伤能够激活视网膜中 TLR-9 与 MyD88 表达, TLR-9 与 MyD88 可能在视神经损伤的进程中起重要作用。

关键词: 视神经损伤; Toll 样受体-9 (TLR-9); 髓样分化因子 (MyD88); 视网膜

DOI: 10.3980/j.issn.1672-5123.2022.6.06

Expression changes of TLR-9 and MyD88 in retina of mice following optic nerve injury

Xue-Ying Li, Di Li, Li-Ping Chen, Jing Li

Foundation item: Science and Technology Talents Support Program

of Shaanxi Provincial People's Hospital (No.2021JY-37)

Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China

Correspondence to: Jing Li. Department of Ophthalmology, Shaanxi Provincial People's Hospital, Xi'an 710068, Shaanxi Province, China. lix-www@163.com

Received: 2021-01-15 Accepted: 2022-05-13

Abstract

• **AIM:** To investigate the expression changes of Toll like receptor 9 (TLR-9) and myeloid differentiation factor 88 (MyD88) in retina of mice following optic nerve injury (ONI).

• **METHODS:** There were 36 male 8-week-old C57BL/6J mice randomly divided into 6 groups: blank control (no treatment), ONI 1d group (materials were taken at 1d after optic nerve injury), ONI 3d group (materials were taken at 3d after optic nerve injury), ONI 5d group (materials were taken at 5d after optic nerve injury), ONI 7d group (materials were taken at 7d after optic nerve injury), ONI 14d group (materials were taken at 14d after optic nerve injury). The mice optic nerve model was made by optic nerve gripping, and the mRNA and protein levels of Toll like receptor 9 and myeloid differentiation factor 88 in each retinal were measured by RT-qPCR and Western-blot.

• **RESULTS:** The mRNA and protein levels of Toll like receptor 9 and myeloid differentiation factor 88 in the retina of ONI 1d group were not significantly different from those of the blank control group ($P>0.05$), the mRNA and protein levels of TLR-9 and MyD88 in the retina of ONI 3d group, ONI 5d group, ONI 7d group and ONI 14d group were significantly increased compared with the blank control group, and the differences were statistically significant ($P<0.01$). Compared with the blank control group, the mRNA and protein levels of TLR-9 and MyD88 in the retina of mice began to increase at ONI 3d ($P<0.01$), peaked at ONI 5d ($P<0.001$), and gradually decreased at ONI 7d ($P<0.01$).

• **CONCLUSION:** Optic nerve injury can activate the expression of TLR-9 and MyD88 in mice retina. TLR-9 and MyD88 may play an essential role in the process of optic nerve injury.

• **KEYWORDS:** optic nerve injury; Toll like receptor 9 (TLR-9); myeloid differentiation factor 88 (MyD88); retina

Citation: Li XY, Li D, Chen LP, *et al.* Expression changes of TLR-9 and MyD88 in retina of mice following optic nerve injury. *Guoji Yanke Zazhi (Int Eye Sci)* 2022;22(6):916-919

0 引言

外伤性视神经病变是常见的临床问题,研究发现闭合性颅脑外伤的患者中有 0.5%~5% 伴有视神经损伤^[1]。如发生颅面部骨折,视神经损伤(optic nerve injury, ONI)的发生率上升为 10%^[2]。目前对于外伤性视神经损伤主要的治疗方法还是视神经管减压术、糖皮质激素治疗、营养神经治疗及改善循环治疗^[3]。研究报道视神经管减压术治疗外伤性视神经病变的有效率为 50%~60%^[4-5]。而药物、基因、干细胞移植等一些治疗方法的效果也不确切。目前创伤性视神经损伤的治疗仍是临床面临的难题。

Toll 样受体-9(Toll like receptor 9, TLR-9)是 Toll 样模式识别受体家族成员之一,是 Hemmi 等^[5]在 2000 年发现的 Tolls 家族新成员,表达于免疫细胞,通过与细菌 DNA 作用而诱导机体的固有免疫反应。髓样分化因子(myeloid differentiation factor 88, MyD88)是 TLR-9 和其他 TLRs 的衔接分子^[6-7]。近年发现 TLR-9 在很多疾病进程中起重要作用,而 TLR-9 是否参与视神经损伤的病理过程鲜见报道。本实验旨在研究 TLR-9 及其衔接分子 MyD88 在视神经损伤后的变化特点,为视神经损伤病变的治疗提供新的思路。

1 材料和方法

1.1 材料 选取清洁级 8 周龄雄性 C57BL/6J 小鼠 36 只,无眼疾(由西安交通大学医学部实验动物中心提供)。动物饲养保持 12h 昼夜交替的生物节律,能自由饮用水和食物,室温保持在 20℃~24℃ 条件下每日定时清洗笼舍。饲养环境及实验操作均符合国家科学技术委员会《实验动物管理条例》规定,并获得陕西省人民医院动物伦理委员会许可。随机分为 6 组每组 6 只:空白对照组(未做任何处理)、ONI 1d 组(视神经损伤后 1d 取材)、ONI 3d 组(视神经损伤后 3d 取材)、ONI 5d 组(视神经损伤后 5d 取材)、ONI 7d 组(视神经损伤后 7d 取材)、ONI 14d 组(视神经损伤后 14d 取材),分组后进行造模。

1.2 方法

1.2.1 视神经损伤模型 1%戊巴比妥钠(50mg/kg)腹腔注射麻醉,经颞侧入路显露左侧视神经,延长轴方向剪开神经鞘,分离视神经,避免损伤视网膜中央动脉。于球后 0.5~1mm 处夹持视神经,夹持时间为 5s。手术完术眼涂红霉素眼膏,放置于电热毯上苏醒。苏醒后于动物房中正常饲养。1%戊巴比妥钠腹腔注射安乐处死小鼠。模型制作成功标准:伤后 10min 瞳孔散大,间接对光反射存在,直接对光反射消失,且眼底明确未损伤大鼠眼动脉、眼底供血情况恢复良好。30 只模型鼠经确认均建模成功。

1.2.2 RT-qPCR 视神经损伤后 1、3、5、7、14d 利用 RNeasy Lipid Tissue Mini Kit 试剂盒(QIAGEN, Germany)从小鼠视网膜提取总 RNA,然后用逆转录酶 III(Invitrogen, USA)和寡核苷酸 oligo-dT 将总 RNA 转录成

cDNA。用 UNICONTM qPCR SYBR[®] Green Master Mix 试剂盒(Yeasen, Shanghai, China)在 StepOnePlus unit(Applied Biosystems, USA)实时荧光定量 PCR 仪上完成 RT-qPCR 检测。方法:94℃ 预变性 55s,然后进行一下循环:95℃ 变性 30s,57℃ 退火 30s,73℃ 延伸 30s,共进行 45 个循环。然后再 95℃ 变性 10s,65℃ 退火 45s,40℃ 延伸 60s。使用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算相对 mRNA 水平。甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)作为内参。引物序列如下:TLR-9:正向引物,5'-GCA ATG TTC TAT ATG CAT TCT C-3',反向引物,5'-TGA TAT TGG CAC ACC AAC AC-3';MyD88:正向引物,5'-AGG GTC GCA CAG TGG GTG A-3',反向引物,5'-CGT GTT CTC TTG CGC ATT CC-3'。

1.2.3 Western-blot 视网膜组织在 lysis buffer(Roche Biochemicals, USA)缓冲液中裂解。Pierce BCA Protein Assay Kit(Thermo Fisher Scientific, USA)蛋白质分析试剂盒测定蛋白浓度。通过 SDS-PAGE(Invitrogen)分离等量的蛋白质,然后将其转移到聚偏二氟乙烯(PVDF, Millipore, USA)膜中。在室温下用 5%脱脂牛奶封闭 1.5h 后,将膜与一抗 TLR-9(ab134368)(以 1:1000 稀释)、一抗 MyD88(ab219413)(以 1:1000 稀释)和 GAPDH(ab9485)(以 1:1000 稀释)在 4℃ 下孵育过夜,将膜与辣根过氧化物酶偶联的二抗山羊抗小鼠 IgG(Bio-Rad, USA)(以 1:1000 稀释)或二抗山羊抗兔 IgG(Bio-Rad)(以 1:1000 稀释)在常温下孵育 1.5h。用增强的化学发光试剂检测蛋白条带,并用 Image J 系统定量。GAPDH 为内参。

统计学分析:使用 GraphPad Prism 5.0 进行统计分析。实验数据经检验呈正态分布、方差齐、用 $\bar{x} \pm s$ 表示。多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA), $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。Bonferroni 法进行事后校正分析,校正 $P < 0.01$ 为差异具有统计学意义($k = 5$)。

2 结果

2.1 各组小鼠视网膜中 TLR-9 mRNA 和 TLR-9 蛋白表达变化情况 各组小鼠视网膜中 TLR-9 mRNA 的表达量比较差异有统计学意义($F = 560.1, P < 0.0001$),见表 1。RT-qPCR 结果见图 1。ONI 1d 组视网膜中 TLR-9 mRNA 的表达量与空白对照组比较差异无统计学意义($P > 0.05$);

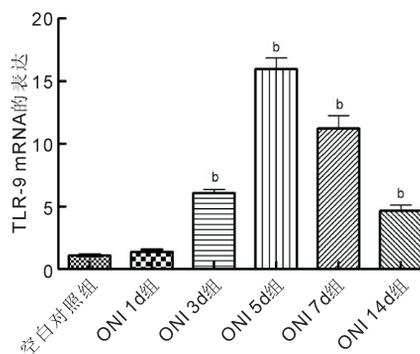


图 1 RT-qPCR 检测各组小鼠视神经损伤后 TLR-9 mRNA 的表达情况 ^b $P < 0.01$ vs 空白对照组。

表1 各组小鼠视网膜中TLR-9和MyD88的表达情况

($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	TLR-9 mRNA	TLR-9 蛋白	MyD88 mRNA	MyD88 蛋白
空白对照组	1.0976±0.0610	1.0226±0.0602	1.0180±0.0599	1.0370±0.0741
ONI 1d组	1.3720±0.1829	1.1429±0.0902	1.2575±0.0898	1.0667±0.0593
ONI 3d组	6.0670±0.3049	4.7218±0.3008	4.3114±0.2695	4.2963±0.2667
ONI 5d组	15.9756±0.8841	8.1203±0.4511	14.4311±0.7485	7.1407±0.4593
ONI 7d组	11.2195±1.0366	4.2707±0.2556	9.2216±1.1078	5.2296±0.4000
ONI 14d组	4.6646±0.4573	3.1880±0.1353	4.3713±0.5689	2.7556±0.2222
<i>F</i>	560.1	305.5	439.3	422.6
<i>P</i>	<0.0001	<0.0001	<0.0001	<0.0001

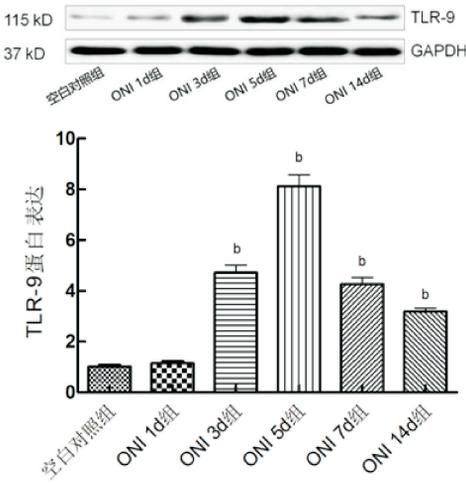


图2 Western-blot 检测小鼠视神经损伤后 TLR-9 蛋白的表达情况 ^b $P<0.01$ vs 空白对照组。

ONI 3d、ONI 5d、ONI 7d、ONI 14d 组视网膜中 TLR-9 mRNA 的表达量与空白对照组比较明显增加,差异均有统计学意义($P<0.01$)。各组小鼠视网膜中 TLR-9 蛋白的表达比较差异有统计学意义($F=305.5, P<0.0001$),见表1。Western-blot 结果见图2。ONI 1d 组视网膜中 TLR-9 蛋白的表达量与空白对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$); ONI 3d、ONI 5d、ONI 7d、ONI 14d 组视网膜中 TLR-9 蛋白的表达量与空白对照组比较明显增加,差异均有统计学意义($P<0.01$)。TLR-9 mRNA 和 TLR-9 蛋白的变化规律为 ONI 3d 表达开始升高, ONI 5d 达到顶峰, ONI 7d 表达开始下降, ONI 14d 表达依然高于空白对照组。

2.2 各组小鼠视网膜中 MyD88 mRNA 和 MyD88 蛋白表达变化情况 各组小鼠视神经损伤后视网膜中 MyD88 mRNA 的表达比较差异有统计学意义($F=439.3, P<0.0001$),见表1。RT-qPCR 结果见图3。ONI 1d 组视网膜中 MyD88 mRNA 的表达量与空白对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$); ONI 3d、ONI 5d、ONI 7d、ONI 14d 组视网膜中 MyD88 mRNA 的表达量与空白对照组比较均明显增加,差异均有统计学意义($P<0.01$)。各组小鼠视神经损伤后视网膜中 MyD88 蛋白的表达比较差异有统计学意义($F=422.6, P<0.0001$),见表1。Western-blot 结果见图4, ONI 1d 组视网膜中 MyD88 蛋白的表达量与空白对照组比较差异无统计学意义($P>0.05$); ONI 3d、ONI 5d、ONI 7d、ONI 14d 组视网膜中 MyD88 蛋白的表达量与空白

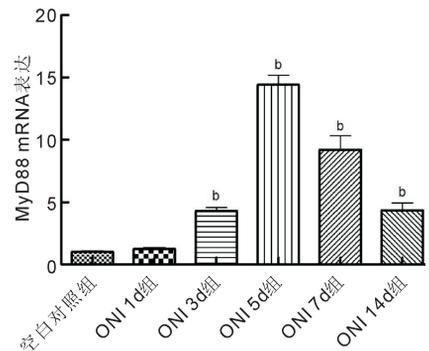


图3 RT-qPCR 检测小鼠视神经损伤后 MyD88 mRNA 的表达情况 ^b $P<0.01$ vs 空白对照组。

对照组比较均明显增加,差异均有统计学意义($P<0.01$)。MyD88 mRNA 和 MyD88 蛋白的变化规律为 ONI 3d 表达开始升高, ONI 5d 达到顶峰, ONI 7d 表达开始下降, ONI 14d 表达依然高于空白对照组。

3 讨论

视神经是中枢神经的一部分,是将视觉信息从眼部传输到大脑的重要结构,视神经损伤后会激活多种继发性损伤机制,从而导致不可逆的视力损伤^[8]。临床对于视神经损伤的治疗主要有手术治疗和药物,手术的有效率在一半左右,而药物治疗的疗效也不确定,能不能有更好的治疗方法来挽救视神经损伤患者的视力仍是我们要迫切解决的问题。

Toll 样受体(TLRs) 家族是一类重要的表面模式识别受体,其信号通路是介导免疫细胞产生固有免疫应答的极为重要的机制。人类 TLR 家族已发现 10 个成员(TLR1~10),可分为两类:表达于细胞膜上和表达于胞内细胞器膜上。TLR-9 表达于细胞器膜上,主要识别细胞质中的病毒或细菌^[9]。TLRs 可以在多种疾病中参与炎症反应的过程^[10-12]。有研究发现阻断 TLR 介导的 MyD88 依赖的 MAPK 信号通路能够减轻颗粒物诱导的炎症反应^[13]。也有研究发现 TLR-9 的缺乏会加重一些自身免疫性疾病的病情。有研究发现狼疮倾向的 Sle1 小鼠与 TLR-9 缺乏的鼠杂交形成 Sle1TLR-9 小鼠,小鼠病情比 Sle1 小鼠更加严重^[14]。TLR-9 在眼科相关疾病的研究少见报道,我们的研究发现视神经损伤后视网膜中的 TLR-9 mRNA 和 TLR-9 蛋白水平都显著增加,与空白对照组比较具有统计学意义,这提示 TLR-9 可能在视神经损伤的病程中起重要作用。但是它对疾病的发展起到的是正向的作用还是负向的作用还有待我们进一步研究。

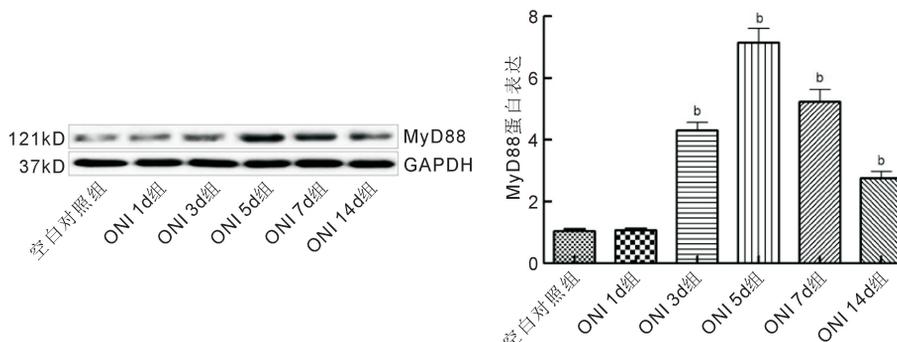


图4 Western-blot 检测大鼠视神经损伤后 MyD88 蛋白的表达情况 ^b $P < 0.01$ vs 空白对照组。

有研究发现,眶内视神经损伤后 5~6d 视网膜神经节细胞开始不可逆的凋亡^[15]。我们的研究也发现了视神经损伤后 TLR-9 在视网膜中表达变化的规律,TLR-9 的表达在视神经损伤后 3d 开始升高,损伤后 5d 达到顶峰,损伤后 7d 表达开始下降,TLR-9 的表达早于神经节细胞开始凋亡的时间,TLR-9 的升高可能与神经节细胞的凋亡有关。这也为我们后续的研究提供的一定的实验基础,也为治疗干预的时间窗选择提供了依据。

MyD88 基因主要表达于免疫细胞中,最初在髓样细胞的分化过程中被发现,是细胞质中的一种可溶性蛋白。MyD88 是细胞内信号传导的关键衔接蛋白,能够介导多种 Toll 样受体 (TLRs)、白细胞介素 1 受体 (IL-1R) 及白细胞介素-18 受体 (IL-18R) 的信号传递,在固有免疫中担任重要角色^[16]。研究发现大鼠视神经损伤后 TLR-4 与 MyD88 表达增加,脂肪干细胞移植能够降低视神经损伤大鼠 TLR-4 与 MyD88 表达,改善大鼠的视功能^[17]。Syeda 等^[18]对 MyD88 基因敲除小鼠的研究发现,与空白对照组相比基因敲除组促炎性细胞因子分泌显著减少,激活的视网膜小胶质细胞数量减少、聚集减弱,视网膜感光受体细胞的凋亡坏死明显减少。我们的研究发现小鼠视神经损伤后 MyD88 的表达变化规律与 TLR-9 的表达变化规律是一致的,这也证明 TLR-9/MyD88 信号通路与小鼠视神经损伤进程的相关性。MyD88 激动剂和抑制剂可以调节 MyD88 的表达,从而在疾病中起到治疗的作用。

视神经损伤的治疗是临床的难题,我们的研究发现 TLR-9 和 MyD88 可能是视神经损伤疾病病程进展过程的重要影响因素,调节 TLR-9 和 MyD88 的表达可能成这类疾病治疗的一个靶点。

参考文献

- Warner N, Eggenberger E. Traumatic optic neuropathy: a review of the current literature. *Curr Opin Ophthalmol* 2010;21(6):459-462
- Kumaran AM, Sundar G, Chye LT. Traumatic optic neuropathy: a review. *Craniofacial Trauma Reconstr* 2015;8(1):31-41
- 徐远志, 薛亚军, 汤俊佳, 等. 神经内镜经筛蝶窦入路视神经减压术治疗创伤性视神经病变的临床疗效. *中华神经外科杂志* 2020;36(2):168-172
- Yilmazlar S, Saraydaroglu O, Korfali E. Anatomical aspects in the transphenoidal - transethmoidal approach to the optic canal: an anatomic - cadaveric study. *J Cranio Maxillofac Surg* 2012; 40 (7): e198-e205

- Hemmi H, Takeuchi O, Kawai T, *et al.* A Toll - like receptor recognizes bacterial DNA. *Nature* 2000;408(6813):740-745
- Takeda K, Akira S. TLR signaling pathways. *Semin Immunol* 2004;16(1):3-9
- 钟勇. 关注继发性视神经损伤及视神经保护制剂的合理应用. *中华眼科杂志* 2016;52(12):881-884
- Mahla RS, Reddy MC, Prasad DVR, *et al.* Sweeten PAMPs: role of sugar complexed PAMPs in innate immunity and vaccine biology. *Front Immunol* 2013;4:248
- Zhang RL, Guo R, Liu Q, *et al.* Selenium deficiency via the TLR4/ TRIF/NF- κ B signaling pathway leading to inflammatory injury in chicken spleen. *Biol Trace Elem Res* 2021;199(2):693-702
- Manivannan S, Marei O, Elalfy O, *et al.* Neurogenesis after traumatic brain injury - The complex role of HMGB1 and neuroinflammation. *Neuropharmacology* 2021;183:108400
- Gupta S, Tsoporis JN, Jia SH, *et al.* Toll-like receptors, associated biochemical signaling networks, and S100 ligands. *Shock* 2020;56(2):167-177
- Herath KHINM, Kim HJ, Lee JH, *et al.* *Sargassum horneri* (Turner) C. Agardh containing polyphenols attenuates particulate matter-induced inflammatory response by blocking TLR-mediated MYD88-dependent MAPK signaling pathway in MLE-12 cells. *J Ethnopharmacol* 2021;265:113340
- Cellar T, Yasuga H, Lee HY, *et al.* Toll-like receptor 9 deficiency breaks tolerance to RNA-associated antigens and up-regulates toll-like receptor 7 protein in Sle1 mice. *Arthritis Rheumatol* 2018;70(10):1597-1609
- Berkelaar M, Clarke DB, Wang YC, *et al.* Axotomy results in delayed death and apoptosis of retinal ganglion cells in adult rats. *J Neurosci* 1994;14(7):4368-4374
- Bernard NJ, O'Neill LA. Mal, more than a bridge to MyD88. *IUBMB Life* 2013;65(9):777-786
- Zhan CD, Qi RX, Wei GH, *et al.* Conformational dynamics of cancer-associated MyD88 - TIR domain mutant L252P (L265P) allosterically tilts the landscape toward Homo-dimerization. *Protein Eng Des Sel* 2016;29(9):347-354
- Wang LJ, Liu LP, Gu XL, *et al.* Implantation of adipose-derived stem cells cures the optic nerve injury on rats through inhibiting the expression of inflammation factors in the TLR4 signaling pathway. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* 2018;22(5):1196-1202
- Syeda S, Patel AK, Lee T, *et al.* Reduced photoreceptor death and improved retinal function during retinal degeneration in mice lacking innate immunity adaptor protein MyD88. *Exp Neurol* 2015;267:1-12