

电针对睡眠剥夺大鼠脾脏 TLR4 信号通路以及 miR146a 的影响

胡天俊¹, 何扬子²

1. 盘州市中医院, 贵州 六盘水 553500; 2. 暨南大学附属第一医院, 广东 广州 510000

[摘要] 目的: 观察电针对睡眠剥夺大鼠脾脏 TLR4/NF- κ B 信号通路上关键因子 Toll 样受体 4 (TLR4)、核因子- κ B (NF- κ B)、白细胞介素 1 受体相关激酶 1 (IRAK1)、肿瘤坏死因子受体相关因子 6 (TRAF6) 和微小核糖核酸 146a (miR146a) 表达的影响。方法: 将 32 只雄性 SPF 级 Wistar 大鼠随机分为对照组、模型组、安定组和电针组, 每组 8 只。对照组未做任何处理, 其余 3 组注射对氯苯丙氨酸 (PCPA) 进行睡眠剥夺后, 安定组腹腔注射安定注射液, 电针组给予电针百会、神庭, 每组每天治疗 1 次, 连续 5 天后采用 RT-PCR 检测大鼠脾脏 TLR4、NF- κ B、IRAK1、TRAF6 和 miR146a 的表达情况。结果: 与对照组比较, 模型组大鼠脾脏 TLR4、NF- κ B、IRAK1、TRAF6 的 mRNA 表达量明显升高, 脾脏 miR146a 的表达量升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 安定组和电针组大鼠脾脏 TLR4、NF- κ B、IRAK1、TRAF6 的 mRNA 表达量显著降低, 安定组大鼠脾脏 miR146a 的表达量显著降低, 电针组大鼠脾脏 miR146a 的表达量明显升高, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$)。结论: 电针百会、神庭可以提高睡眠剥夺大鼠体内 miR146a 的表达, 进而负性调节 TLR4 信号通路, 最终达到对固有免疫应答的调控作用, 减轻睡眠剥夺对机体的损害。

[关键词] 电针; 睡眠剥夺; TLR4 信号通路 (TLR4); 微小核糖核酸 146a (miR146a); 动物实验; 大鼠

[中图分类号] R-332 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0256-7415 (2018) 06-0203-03

DOI: 10.13457/j.cnki.jncm.2018.06.059

Electroacupuncture Has Effect on TLR4 Signal Pathway and miR146a in Spleen of Rats with Sleep Deprivation

HU Tianjun, HE Yangzi

Abstract: Objective: To observed the effect of electroacupuncture on the expression of key factors as Toll like receptor 4 (TLR4), Nuclear factor κ B (NF- κ B), Interleukin 1 receptor related kinase1 (IRAK1), Tumor necrosis factor receptor related factor 6 (TRAF6), MicroRNA146a (miR146a) in TLR4/NF- κ B signal pathway in spleen of rats with sleep deprivation. **Methods:** Randomly divided 32 male Wistar rats of SPF grade into the control group, model group, diazepam group and electroacupuncture group, 8 rats in each group. The control group did not receive any treatment. After the other three groups received sleep deprivation by injection of para-chlorophenylalanine (PCPA), the diazepam group received intraperitoneal injection of diazepam and the electroacupuncture group received electroacupuncture at Bai Hui and Shen Ting. Each group was given treatment once a day. After continuous treatment of five days, detected the expression of TLR4, NF- κ B, IRAK1, TRAF6 and miR146a in spleen of rats by RT-PCR. **Results:** Compared with the control group, the mRNA expression of TLR4, NF- κ B, IRAK1 and TRAF6 in spleen of rats was obviously increased and the expression of miR146a in spleen of rats was increased in the model group, differences being significant ($P < 0.05$). Compared with the model group, the mRNA expression of TLR4, NF- κ B, IRAK1 and TRAF6 in spleen of rats in the diazepam group and the electroacupuncture group was obviously decreased, the expression of miR146a in spleen of rats in the diazepam group was obviously decreased, and the expression of miR146a in spleen of rats in the electroacupuncture group was obviously increased, differences being significant ($P < 0.05$). **Conclusion:** The therapy of electroacupuncture at Bai Hui and Shen Ting can improve the expression of miR146a in spleen of rats with sleep deprivation so as to negatively regulate TLR4 signal pathway, and eventually regulate innate immune response and relive the injury of body by sleep deprivation.

Keywords: Electroacupuncture; Sleep deprivation; TLR4 signal pathway (TLR4); MicroRNA146a (miR146a); Animal experiment; Rats

[收稿日期] 2017-10-18

[作者简介] 胡天俊 (1986-), 男, 主治医师, 研究方向: 针灸治疗神经系统疾病。

[通信作者] 何扬子, E-mail: thzy@jnu.edu.cn。

由于经济社会的快速发展及生活、工作节奏的日益加快, 迫使人们不断延长工作和学习时间, 导致睡眠时间缩短, 呈现出不同程度的睡眠剥夺(Sleep Deprivation, SD)现象。睡眠剥夺是指剥夺部分或整个睡眠过程后迫使受试对象出现持续觉醒的状态(通常以 24 h 中睡眠时间不超过 4 h 来衡量)。研究表明, 睡眠剥夺可改变机体情绪、记忆、学习及免疫等多种功能; 随着睡眠剥夺的持续存在, 甚至可引起生理、心理及行为的变化, 进而带来更大的危害^[1-5]。本研究拟从机体 TLR4 免疫信号通路及 miR146a 的表达情况来探讨电针改善睡眠剥夺的机制。

1 材料与方法

1.1 动物与分组 32 只 SPF 级雄性 Wistar 大鼠, 体质量(200 ± 20)g, 6 ~ 8 周龄, 南方医科大学实验动物中心提供, 生产许可证号: SCXK(粤)2011-0015, 生产批号: NO. 44002100004077, 饲养于暨南大学动物实验管理中心 SPF 级动物房内。按照随机数字表法分为对照组、模型组、安定组和电针组, 每组 8 只, 正常隔离饲养 7 天后进行实验干预。实验条件为室内温度 26℃, 相对湿度 50%, 照明周期 12 h/12 h, 工作照度 150 ~ 300 Lux, 噪声与震动控制 ≤ 60 dB, 实验时间为每天 8:00-17:00。

1.2 药物与试剂 安定(地西洋)注射液: 天津金耀氨基酸有限公司, 10 mg/2 mL, 批号: 1407101。戊巴比妥钠(Pentobarbital Sodium): 北京化学试剂公司, 25 g/瓶, 批号: 69020100。对氯苯丙氨酸(Para-chlorophenylalanine, PCPA): 日本 TCI 公司, 250 g/瓶, 批号: H110130000。

1.3 实验器材 YP601N 型电子天平: 上海精密科学仪器有限公司, 编号 380507070012, d=0.1 mg。KWD-808 系列(I 型)脉冲针灸治疗仪: 常州英迪电子医疗器械有限公司。0.22 × 25 mm 无菌针灸针: 苏州市华佗医疗用品有限公司, 批号: 150102。

1.4 模型制备与处理方法 对照组常规饲养, 未作任何处理, 自由进食、饮水, 定期更换垫料; 模型组、安定组和电针组在实验第 1、2 天按每只 45 mg/100 g 的剂量每天腹腔注射对氯苯丙氨酸(PCPA)混悬液制作大鼠睡眠剥夺模型。造模成功后, 模型组不再做任何处理。安定组于实验第 3 天开始连续 5 天, 每天腹腔注射安定注射液(给药剂量: 根据人-鼠给药剂量体表面积折换率, 按成人安定注射液催眠剂量折算出大鼠催眠剂量为 0.92 mg/kg); 电针组给予每天电针百会、神庭 20 min, 连续 5 天。取穴与电针操作方法: 参照《常用实验动物针灸穴位图》, 神庭穴位于大鼠头部额顶骨缝交界线前方, 前正中线上; 百会穴位于大鼠头部两耳连线中点, 顶骨正中。电针操作: 取 1 寸无菌针灸针(型号 0.22 × 25 mm)斜刺或平刺神庭、百会穴, 进针 3 ~ 5 mm 后连接电针仪, 选用连续波型(电压 6 V, 频率 10 Hz)并留针 20 min。实验第 8 天, 各组大鼠在戊巴比妥钠麻醉下采集脾脏作为实验样本。

1.5 指标检测 运用 RT-PCR 法, 将 10 mg 大鼠脾脏组织置于组织捣碎机中破碎、匀浆提取总 RNA, 用反转录试剂盒配制反转录反应体系(总 RNA 质量约 1 μg), 得到反转录产物 cDNA。TLR4、NF-κβ、IRAK1、TRAF6 的 mRNA 检测采用 SYBR Green I 荧光法(引物序列见表 1), 反应总体系为 15 μL; miR146a 的 mRNA 检测采用 TaqMan 探针法, 反应总体系为 15 μL, 此两法反应条件均为 95℃ 预变性 5 min; 95℃ 变性 10 s, 60℃ 退火延伸 34 s(40 个循环)。反应结束后, 将获得的目的基因 mRNA 循环阈值(Cycle threshold, CT), 采用 ΔΔCT (ΔΔCT=ΔCT - ΔCT 基础值; ΔCT=CT 目的基因 - CT 内参)方法分析, 根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 公式计算出相对表达量。

表 1 RT-PCR 的引物序列

基因序列	引物序列(5'-3')	扩增长度
TLR4	上游 GGAGGCACATCTTCTGGA	103 bp
	下游 GGTTCATAGTTGTTGCTTCTTG	
NF-κβ	上游 AAGCACTGTGAGGACGGC	84 bp
	下游 CGTGAAGTATCCAGGTTTG	
IRAK1	上游 CGTCCCTCCCATTTTG	158 bp
	下游 GTCAGCCTCCTTTCAGTC	
TRAF6	上游 CTGCACCTCCAGTACCG	166 bp
	下游 TCTTCGTCGTTTTGCCTTATT	
β-actin	上游 CCTAGACTTCGAGCAAGAGA	139 bp
	下游 GGAAGGAAGGCTGGAAGA	
miR146a	环颈 GAGTAGACCAATGGGTTTCATTTCTGGGTCTT	---
miR146a	上游 TGGGTTTCATTTCTGGGTCTT	---
miR146a	下游 CGCTGAGAACTGAATTCCA	72 bp
miR146a	探针 HEX- TCTATTCATTGGTCTACT-MGB	---
5SrRNA	上游 TGGGTTTCATTTCTGGGTCTT	---
5SrRNA	下游 GGATGGGAGACCGCTGGGAATAC	77 bp
5SrRNA	探针 HEX-TCTATTCATTGGTCTACT-MGB	---

1.6 统计学方法 使用 ABI7500 software(Version 2.0.5)和 Data Assist3.01 软件对数据进行处理, 用公式 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算基因相对表达量 RQ 值, 将所得结果运用 SPSS13.0 软件进行分析, 计量资料以($\bar{x} \pm s$)表示, 进行方差齐性检验, 采用单因素方差分析(One-Way-ANOVA)表现组间差异。

2 结果

2.1 各组大鼠脾脏 TLR4 信号通路关键基因的表达水平比较 见表 2。与对照组比较, 模型组大鼠脾脏 TLR4、NF-κβ、IRAK1、TRAF6 的 mRNA 表达量明显升高($P < 0.01$)。与模型组比较, 安定组和电针组大鼠脾脏 TLR4、NF-κβ、IRAK1、TRAF6 的 mRNA 表达量显著降低($P < 0.05$), 但并未观察到安定组与电针组间有统计学差异($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠脾脏 miR146a 的表达水平比较 见表 3。与对照组比较, 模型组大鼠脾脏 miR146a 的表达量升高($P < 0.05$)。

与模型组比较, 安定组大鼠脾脏 miR146a 的表达量显著降低, 而电针组大鼠脾脏 miR146a 的表达量却明显升高, 差异均有统计学意义($P < 0.05$); 但并未观察到安定组与电针组间有统计学差异($P > 0.05$)。

表2 各组大鼠脾脏 TLR4 信号通路关键基因的表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	TLR4	NF- κ B	IRAK1	TRAF6
对照组	8	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00	1.00 ± 0.00
模型组	8	1.39 ± 0.16 ^①	1.52 ± 0.19 ^①	1.34 ± 0.17 ^①	1.35 ± 0.12 ^①
安定组	8	1.09 ± 0.09 ^②	1.14 ± 0.17 ^②	1.09 ± 0.15 ^②	1.08 ± 0.12 ^②
电针组	8	1.08 ± 0.10 ^②	1.05 ± 0.13 ^②	1.06 ± 0.12 ^②	1.07 ± 0.11 ^②

与对照组比较, ① $P < 0.01$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

表3 各组大鼠脾脏 miR146a 的表达水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	n	miR146a
对照组	8	1.00 ± 0.00
模型组	8	1.20 ± 0.80 ^①
安定组	8	1.03 ± 0.44 ^②
电针组	8	2.23 ± 0.11 ^②

与对照组比较, ① $P < 0.05$; 与模型组比较, ② $P < 0.05$

3 讨论

现代医学认为, 睡眠剥夺可引起神经-内分泌-免疫调节网络的失衡, 进而影响或破坏正常睡眠过程^[6]。有研究表明, 睡眠剥夺大鼠体内免疫应激水平激活, 促使白细胞介素-1(IL-1)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)等炎性细胞因子增多, 一定程度上起到调节睡眠-觉醒中枢的作用, 进而达到改善睡眠及机体免疫水平的目的^[7]。

TLR4 是 TLRs 家族中具有代表性的一员, 参与了炎症免疫反应等多种疾病的发生。TLR4 信号通路中依赖型骨髓样分化因子 88(Myeloid differentiation factor 88, MyD88)可通过激活核转录因子- κ B(Nuclear transcription factor κ B, NF- κ B)启动炎症反应中相关细胞因子基因的转录, 产生和分泌 IL-1、IL-6 及 TNF- α 等下游炎性因子, 参与机体免疫、睡眠结构和睡眠觉醒行为的调节^[8]。

miR146 是一种多功能基因, 不仅具有免疫调节功能, 而且还参与造血及肿瘤等多种生理病理过程的发生与发展^[9]。研究发现, miR146a 可以通过结合 TLR4 信号通路中关键蛋白 IRAK1 和 TRAF6 的 3'UTR 区进而抑制整个信号通路的翻译过程, 导致下游的信号分子不能激活或激活不足, 对 TLR4 信号通路具有负性调控作用^[10]。

本实验表明, 经睡眠剥夺后大鼠体内 TLR4 信号通路激活, 随之 TLR4、NF- κ B、IRAK1、TRAF6 关键基因表达增多, 而经过电针治疗后睡眠剥夺大鼠体内 miR146a 的表达升高, 负性调节 TLR4 信号通路, 使 TLR4、NF- κ B、IRAK1、TRAF6 基因表达下降, 并减少下游炎症细胞因子 IL-1、IL-6 和

TNF- α 的分泌与释放, 最终达到对固有免疫应答的调控作用。此外, 本实验还推测安定注射液对睡眠的调节改善作用不是通过升高 miR146a 的表达来调控 TLR4 信号通路实现的。

综上所述, miR146a 对 TLR4 信号通路的负性调控作用复杂而微妙。通过促进 miR146a 的表达来调控炎症反应重要通路之一的 TLR4 信号通路, 对于抑制过度炎症反应具有重大而深远的意义, 但 miR146a 和 TLR4 信号通路之间的关系并非如此简单, 它们之间已形成复杂的调节网络系统, 这一系统对于防止机体过度炎症反应和相关疾病的发生与发展, 维持机体正常生理功能起着十分重要的作用, 但同时也增加了人类认识 TLR4 信号通路和 miR146a 相关疾病的难度。

[参考文献]

- [1] Otmani S, Pebayle T, Roge J, et al. Effects of driving duration and partial sleep deprivation on subsequent alertness and performance of car drivers[J]. *Physiol Behav*, 2005, 84(5): 715-724.
- [2] Rogers NL, Szuba MP, Staab JP, et al. Neuroimmunologic aspects of sleep and sleep loss[J]. *Semin Clin Neuropsychiatry*, 2001, 6(4): 295-307.
- [3] 李宁, 汪熾, 刘锡禹, 等. 睡眠剥夺对认知功能影响的研究进展[J]. *生物医学工程学杂志*, 2008, 25: 1197-2000.
- [4] 王秀云, 李积胜, 刘公望, 等. 睡眠剥夺对亚健康的影响及相关机制[J]. *天津中医药杂志*, 2006, 23(2): 108-111.
- [5] 刘宁, 皇甫恩, 王小英, 等. 54 h 睡眠剥夺对 4 名健康志愿者情绪的影响[J]. *中国心理卫生杂志*, 1998, 12(4): 196-199.
- [6] 湛剑飞. 睡眠障碍的现代病因病机探索[J]. *中国中西医结合杂志*, 2012, 32(2): 151-152.
- [7] 胡天俊, 虞洁, 王秀莲, 等. 电针对睡眠剥夺大鼠行为和脾脏 IL-1 β , IL-6 和 TNF- α 的影响[J]. *天津中医药杂志*, 2016, 33(1): 35-38.
- [8] 李洋, 谢杨丽, 胡志安. 感染和免疫反应对睡眠的影响[J]. *生理科学进展*, 2007, 38(2): 187-190.
- [9] Yates LA, Norbury CJ, Gilbert RJ. The long and short of microRNA[J]. *Cell*, 2013, 153(3): 516-519.
- [10] Perry MM, Moschos SA, Williams AE, et al. Rapid changes in microRNA-146a expression negatively regulate the IL-1 β -induced inflammatory response in human lung alveolar epithelial cells[J]. *Immunol*, 2008, 180: 5689-5698.

(责任编辑: 冯天保, 郑锋玲)