



Tlr4 基因敲除小鼠生长和繁殖的实验研究

郑洋¹, 王佳慧¹, 刘露露¹, 黎桂玉², 彭岳², 赵铁建^{2*}

(1. 研究生学院; 2. 基础医学院; 广西中医药大学, 南宁 530001)

【摘要】 目的 研究 *Tlr4* 基因敲除小鼠和 KM 小鼠在生长繁殖方面的异同点。方法 选取 *Tlr4* 基因敲除小鼠和 KM 小鼠各 20 只, 雌雄各半, 测量第 4 周到 12 周小鼠的体重和体长以及两者的增长率, 并且随机选择 20 笼, 每笼一雌一雄, 对其产的第二胎幼仔进行统计。结果 *Tlr4* 基因敲除小鼠体重以及增长率明显小于 KM 小鼠, $P < 0.05$; 在体长和其增长率上第 4 和第 5 周两种小鼠差异不明显, $P > 0.05$, 其它时间段 *Tlr4* 基因敲除小鼠体长和其增长率明显小于 KM 小鼠, $P < 0.05$; 在繁殖能力上 *Tlr4* 基因敲除小鼠明显小于 KM 小鼠, $P < 0.05$ 。结论 *Tlr4* 基因敲除对小鼠的生长发育和繁殖均产生了一定的影响。

【关键词】 *Tlr4* 基因敲除小鼠; KM 小鼠; 生长; 繁殖

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2018)12-0038-03

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2018.12.007

Experimental study on growth and reproduction of *Tlr4* knockout mice

ZHENG Yang¹, WANG Jiahui¹, LIU Lulu¹, LI Guiyu², PENG Yue², ZHAO Tiejian^{2*}

(1. Graduate School; 2. School of Basic Medical Sciences; Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530001; China)

【Abstract】 Objective To study the similarities and differences in growth and reproduction of *Tlr4* knockout and KM mice. **Methods** Twenty *Tlr4* knockout mice and 20 KM mice (half male and half female) were selected to measure body weight, body length, and growth rate from 4 to 12 weeks. Twenty cages were randomly selected with one female and one male in each cage. Statistical analysis was performed for the number of second born pups. **Results** The body weight and growth rate of *Tlr4* knockout mice were significantly lower than those of KM mice ($P < 0.05$), but there was no significant difference between 4 and 5 weeks in body length and growth rate. The body length and growth rate of *Tlr4* knockout mice at other periods were obvious. *Tlr4* knockout mice had a significantly lower reproductive ability than KM mice. **Conclusions** *Tlr4* knockout affects the growth, development, and reproduction of mice.

【Keywords】 *Tlr4* knockout mice; KM mice; growth; reproduction

Toll 样受体 (Toll-like receptors, TLRs) 是一类天然免疫受体, 能引发一系列信号转导, 导致炎症介质的释放, 在天然免疫防御中起重要作用^[1]。其中 TLR4 是人类发现的第一个 TLRs 相关蛋白, 革兰氏阴性菌细胞壁的主要成分脂多糖

(lipopolysaccharides, LPS) 是其主要配体^[2-3]。近年研究发现, TLR4 表达于各类肝脏细胞中, 可以调节肝脏细胞的天然免疫反应, 参与肝脏的病理生理过程, 在肝脏疾病的发生发展中发挥重要作用^[4]。为了深入研究肝纤维化的发病机制, 本课题组购买了

【基金项目】 国家自然科学基金项目 (81460682, 81660705) 广西中医药大学研究生重点创新课题 (YCSZ2018013, YCSY2018004)。

【作者简介】 郑洋 (1991—), 男, 硕士, 专业: 民族药防治慢性肝病。E-mail: 1793853705@qq.com

【通信作者】 赵铁建 (1957—), 男, 教授, 研究方向: 民族药防治慢性肝病。E-mail: 570041687@qq.com

Tlr4 基因敲除的小鼠,在造肝纤维化模型前的饲养阶段,研究人员发现 *Tlr4* 基因敲除小鼠和 KM 小鼠在生长和繁殖方面具有一些差异,所以本文将两种小鼠进行比较,为研究 *Tlr4* 基因在肝纤维化形成过程中的作用,提供更加完整详细的实验数据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

清洁级 *Tlr4* 基因敲除小鼠 20 只,雌雄各半,2 周龄,体重 4 ~ 10 g,购买于南京大学-南京生物医药研究院,种系为 C57BL/10ScNJ,合格证号 [SCXK(苏)2015-0001],清洁级 KM 小鼠 20 只,雌雄各半,2 周龄,体重 10 ~ 15 g,购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,合格证号 [SCXK(湘)2016-0002]。使用许可证号 [SYXK(桂)2015-0001]。按照实验动物使用的 3R 原则予以人道关怀。

按照清洁级动物的环境要求饲养两个小鼠品系,环境中温度 25℃ 左右,相对湿度控制在 30% ~ 60%,小鼠笼和饮水瓶每 3 d 用 84 消毒液和 75% 酒精消毒一次,鼠笼的垫料、饲料、水均经灭菌处理,垫料 3 d 更换一次。两个小鼠品系均采用一雌一雄同笼进行繁殖。

1.2 主要仪器

电子天平 HLD-10001 (四川中浪科技有限公司),最大称重重量为 1000 g,精度为 0.1 g。卡尺 A635051 (上海艾测电子科技有限公司),范围为 0 ~ 150 mm,分辨率为 0.05 mm。

1.3 实验方法

在周龄刚好达到时测量体重和体长。体长指双耳连线的中点到尾体交接处,体长测量需借助于不锈钢网,当小鼠在网上抓紧时,拉住它的尾巴使其自然伸直,然后进行测量。增长率 = (体重或体长 - 第 2 周的体重或体长) / 第 2 周的体重或体长。从第 4 周开始一直测量到 12 周结束,因为小鼠的哺乳期约为 3 周,在 6 周龄的时候是性成熟的时间段,所以选择快速进展期的小鼠进行测量。繁殖能力的测量对象是一雌一雄所产的第 2 胎的幼仔数量,可代表繁殖能力^[5-6]。

1.4 统计学方法

数据由 SPSS22.0 软件进行统计分析,各组数据均以平均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,对数据先进行方差齐性检验(F 检验),如果方差齐则可以进行 *t* 检验,不齐采用 Tamhane' T2 法。以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 小鼠生长的比较

2.1.1 小鼠体重及其增长率的比较

Tlr4 基因敲除小鼠体重及其增长率明显小于 KM 小鼠,从第 4 周到第 12 周差异显著 ($P < 0.05$),详见表 1 ~ 2。

2.1.2 小鼠体长及其增长率的比较

在第 4 周和第 5 周两者相比差异不明显, $P > 0.05$;在其它的时间段,*Tlr4* 基因敲除小鼠体长及其增长率明显小于 KM 小鼠, $P < 0.05$ 。具体见表 3 ~ 4。

表 1 *Tlr4* 基因敲除小鼠和 KM 小鼠体重比较(g, n = 20)

Table 1 Comparison of the body weight of *Tlr4* knockout mice and KM mice

品系 Strains	周龄 (W) Weeks									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
TLR4	21.96 ± 1.83*	23.52 ± 1.83*	23.60 ± 2.46	23.90 ± 3.40*	24.53 ± 3.52*	25.70 ± 3.74*	26.21 ± 3.89*	27.04 ± 3.73*	27.57 ± 3.77*	
KM	38.41 ± 1.86	39.47 ± 1.86	40.08 ± 3.01	40.17 ± 2.89	40.35 ± 3.25	41.42 ± 2.97	41.76 ± 2.89	41.31 ± 3.48	42.55 ± 3.33	

注:两者相比差异显著, * $P < 0.05$ 。

Note. There were significant differences between the two, * $P < 0.05$.

表 2 *Tlr4* 基因敲除小鼠和 KM 小鼠体重增长率比较(% , n = 20)

Table 2 Comparison of the body weight growth rates between *Tlr4* knockout mice and KM mice

品系 Strains	周龄 (W) Weeks									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
TLR4	9.28 ± 0.40*	17.06 ± 0.52*	17.99 ± 0.37	19.42 ± 1.02*	22.72 ± 0.46*	28.29 ± 0.73*	31.51 ± 0.41*	35.36 ± 0.46*	37.90 ± 0.66*	
KM	59.91 ± 0.59	64.19 ± 0.55	67.04 ± 0.20	67.79 ± 0.78	67.97 ± 0.23	68.63 ± 0.52	73.96 ± 0.38	71.91 ± 0.58	77.67 ± 0.53	

注:两者相比差异显著, * $P < 0.05$ 。

Note. There were significant differences between the two, * $P < 0.05$.

2.2 小鼠繁殖能力的比较

在 *Tlr4* 基因敲除小鼠和 KM 小鼠的群体中,随机选取 20 笼一雄一雌合笼的小鼠为研究对象,统计其第 2 胎所产的幼仔个数,具体见表 5, *Tlr4* 基因敲除小鼠繁殖能力明显小于 KM 小鼠, $P < 0.05$ 。

3 讨论

本课题组用 *Tlr4* 基因敲除小鼠制备肝纤维化模型,研究 *Tlr4* 如何通过 NF- κ B、MARKs 两条信号通路在肝脏炎症反应中发挥作用, *Tlr4* 基因敲除小鼠成本高昂,而在制备肝纤维化模型过程中,小鼠死亡率较高,因此如何更好的饲养以及将基因敲除小鼠品系保存下去,具有十分重要的意义。本研究发现 *Tlr4* 基因敲除小鼠在生长和繁殖均弱于正常 KM 小鼠,而 *Tlr4* 已经证实和多种疾病的发生相关,例如肝纤维化,如果研究 *Tlr4* 和肝纤维化之间的关系, *Tlr4* 基因敲除小鼠则是理想的动物模型,因为 *Tlr4* 通过 MyD88 调控 NF- κ B、MAPKs 两条信号通路^[7],当 *Tlr4* 基因被敲除后,这两条通路的信号传导被阻断,通过对信号通路中的关键分子检测,可以得到疾病相关的分子机

制,以及 *Tlr4* 和肝纤维化之间的关系。所以正确的饲养,对于 *Tlr4* 基因敲除小鼠的获得和保种十分重要。在饲养 *Tlr4* 基因敲除小鼠的过程中,报告发现有食子的现象,有研究表明很多基因敲除小鼠都有食子现象^[8],根据李巍^[9]的饲养方法进行改良,减少每天观察小鼠的次数,这样可以减少对小鼠的惊吓,给予花生米、葵花籽以及熟鸡蛋黄发现食子现象得到很好的缓解,另 *Tlr4* 基因敲除的小鼠比 KM 小鼠对环境的要求更高,在饲养过程中,如果消毒不及时或者对饲养环境的卫生处理不得当,基因敲除小鼠会出现死亡的现象,笔者认为这可能和其 *Tlr4* 基因敲除,使其免疫力下降有关,有研究表明 TLR4 与免疫力的关系密切^[10]。TLR4 是 TLR4 信号通路中的关键分子也可以调控 NF- κ B、MAPKs 信号通路,这些信号通路都是炎性通路。有研究表明^[11],发生炎症性疾病时,使用药物抑制 TLR4 表达后疾病的严重程度下降。但当敲除 *Tlr4* 基因后,免疫细胞表面没有 TLR4 的表达,TLR4 与病原体的结合受到阻碍,将影响机体的适应性免疫应答^[12]。所以 *Tlr4* 基因敲除后会对小鼠的生长产生很大的影响。

表 3 *Tlr4* 基因敲除小鼠和 KM 小鼠体长比较 (cm, n = 20)

Table 3 Comparison of the body length of *Tlr4* knockout mice and KM mice

品系 Strains	周龄 (W) Weeks									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
TLR4	6.94 ± 0.73	6.97 ± 0.72	7.21 ± 0.66*	7.63 ± 0.60*	8.20 ± 0.55*	8.82 ± 0.60*	9.25 ± 0.56*	10.20 ± 0.61*	10.58 ± 0.67*	
KM	7.42 ± 0.79	7.47 ± 0.81	8.26 ± 0.77	8.92 ± 0.79	9.42 ± 0.79	10.08 ± 0.70	10.87 ± 0.84	11.58 ± 0.91	12.16 ± 0.94	

注:两者相比差异显著, * $P < 0.05$ 。

Note. There were significant differences between the two, * $P < 0.05$.

表 4 *Tlr4* 基因敲除小鼠和 KM 小鼠体长增长率比较 (% , n = 20)

Table 4 Comparison of body length growth rates between the *Tlr4* knockout mice and km mice

品系 Strains	周龄 (W) Weeks									
	4	5	6	7	8	9	10	11	12	
TLR4	15.25 ± 0.33	15.97 ± 0.57	20.14 ± 0.38*	27.12 ± 0.32*	36.60 ± 0.41*	47.11 ± 0.17*	54.05 ± 0.61*	70.05 ± 0.55*	76.95 ± 0.33*	
KM	23.35 ± 0.40	24.08 ± 0.33	37.19 ± 0.42	48.18 ± 0.34	57.09 ± 0.39	67.50 ± 0.44	81.55 ± 0.52	93.15 ± 0.54	102.59 ± 0.72	

注:两者相比差异显著, * $P < 0.05$ 。

Note. There were significant differences between the two, * $P < 0.05$.

表 5 *Tlr4* 基因敲除小鼠与 KM 小鼠繁殖能力 (幼仔个数) 比较

Table 5 Reproductive performance (number of cubs) of the *Tlr4* knockout mice and KM mice

品系 Strains	笼号 Cage									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
TLR4	6	4	5	6	4	3	5	2	4	5*
KM	8	7	6	9	6	7	8	5	8	7

品系 Strains	笼号 Cage									
	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
TLR4	2	2	3	4	3	5	6	3	2	5
KM	4	6	8	8	9	7	8	8	6	9

注:两者相比差异显著, * $P < 0.05$ 。

Note. There were significant differences between the two, * $P < 0.05$.

- 与评价研究进展[J]. 中国康复医学杂志, 2014, 29(12): 1196-1199.
- [15] 薛涛, 郭丽莎, 刘新民, 等. 抑郁症动物模型及评价方法研究进展[J]. 中国实验动物学报, 2015, (3): 321-326.
- [16] Bourin M, Fiocco AJ, Clenet F. How valuable are animal models in defining antidepressant activity? [J]. Hum Psychopharm Clin, 2001, 16(1): 9-21.
- [17] von Bohlen und Halbach O. Immunohistological markers for proliferative events, gliogenesis, and neurogenesis within the adult hippocampus [J]. Cell Tissue Res, 2011, 345(1): 1-19.
- [18] Daszuta A, Ban M Sr, Soumier A, et al. Depression and neuroplasticity: implication of serotonergic systems [J]. Therapie, 2005, 60: 461-468.
- [19] Radley JJ, Jacobs BL. 5-HT1A receptor antagonist administration decreases cell proliferation in the dentate gyrus [J]. Brain Res, 2002, 955: 264-267.
- [20] Katz R J. Animal model of depression: pharmacological sensitivity of a hedonic deficit [J]. Pharmacol Biochem Behav, 1982, 16(6): 965-968.
- [21] Mead GE. Post-stroke fatigue: new evidence of a possible biological cause [J]. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2015, 86(8): 824.
- [22] Zhao Q, Guo Y, Yang D, et al. Serotonin transporter gene 5-HTTLPR polymorphism as a protective factor against the progression of post-stroke depression [J]. Mol Neurobiol, 2016, 53(3): 1699-1705.
- [23] 王少华, 张志珺, 郭怡菁, 等. 脑卒中后抑郁大鼠海马齿状回 5-HT1A 受体的表达[J]. 中华精神科杂志, 2008, 41(2): 107-110.
- [24] Paolucci S. Advances in antidepressants for treating post-stroke depression [J]. Expert Opin Pharmacother, 2017, 18(10): 1011-1017.
- [25] Spalletta G, Boss P, Ciaramella A, et al. The etiology of post-stroke depression: a review of the literature and a new hypothesis involving inflammatory cytokines [J]. Mol Psychiatry, 2006, 11(11): 984-991.
- [26] 张亚同, 傅得兴. 艾司西酞普兰的药理及临床评价[J]. 中国新药杂志, 2006, 15(22): 1979-1983.
- [27] 肖玲, 高国庆, 王高华, 等. 不同时程的氟西汀与艾司西酞普兰应用对大鼠抑郁样行为及海马齿状回神经发生的影响[J]. 武汉大学学报(医学版), 2015, 36(6): 862-866.

[收稿日期] 2018-07-05

(上接第 40 页)

本研究发现 *Tlr4* 基因敲除对小鼠生长和繁殖的影响, 在体重和其增长率上 *Tlr4* 基因敲除小鼠明显小于 KM 小鼠, 在体长和其增长率上在第 4 周和第 5 周时, 两个小鼠品系差异不明显, 在其它的时间段 *Tlr4* 基因敲除小鼠明显小于 KM 小鼠, 在繁殖上 *Tlr4* 基因敲除小鼠明显弱于 KM 小鼠。

参考文献:

- [1] Beutler B. Inferences, questions and possibilities in Toll-like receptor signalling [J]. Nature, 2004, 430(3): 257-263.
- [2] Doyle SL, Husebye H, Connolly DJ, et al. The GOLD domain-containing protein TMED7 inhibits TLR4 signalling from the endosome upon LPS stimulation [J]. Nat Commun, 2012, 3(1): 707.
- [3] Hoshino K, Takeuchi O, Kawai T, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4)-deficient mice are hyporesponsive to lipopolysaccharide: evidence for TLR4 as the LPS gene product [J]. J Immunol, 2016, 197(7): 2563-2566.
- [4] 朱晓静, 张峰, 孔德松, 等. 脂多糖/Toll 样受体 4 信号转导与肝纤维化的研究进展[J]. 中国药理学与毒理学杂志, 2013, 27(1): 106-109.
- [5] 田小芸, 孙敬方. 近交系 NJS 小鼠的生物学特性研究 I. 繁殖性能与生长发育的观察[J]. 实验动物科学与管理, 1996(4): 1-4.
- [6] 李志东, 王晖, 欧阳轶强, 等. 不同光照时间对 BALB/c 裸小鼠生长发育及繁殖影响的比较研究[J]. 实验动物科学, 2008(2): 13-15.
- [7] 赵方, 邹松杉, 胡明道, 等. 抑制 TLR4 信号通路对小鼠肝原位种植瘤的影响[J]. 医学研究生学报, 2018, 31(5): 476-480.
- [8] 乔录新, 徐萌, 柴梦音, 等. p53 基因敲除小鼠的饲养繁殖及鉴定[J]. 实验动物科学, 2012, 2: 100-102.
- [9] 李巍, 贺国洋. *Muc2* 和 *DCN* 基因敲除小鼠食子现象的初步研究[J]. 中国比较医学杂志, 2013, 23(4): 28-30.
- [10] 张敏, 王守安, 刘黎星. 雷公藤多苷干预 TLR-NF- κ B 通路发挥免疫抑制作用[J]. 中草药, 2014, 45(9): 1288-1292.
- [11] Derbigny WA, Shobe LR, Kamran JC, et al. Identifying a role for Toll-like receptor 3 in the innate immune response to chlamydia muridarum infection in murine oviduct epithelial cells [J]. Infect Immun, 2012, 80(1): 254-265.
- [12] Chen LL, Lei L, Chang XT, et al. Mice deficient in MyD88 develop a Th2-dominant response and severe pathology in the upper genital tract following chlamydia muridarum infection [J]. J Immunol, 2010, 184: 2602-2610.

[收稿日期] 2018-05-14