

鞘内注射针对 Toll 样受体 4 基因的 siRNA 缓解坐骨神经结扎大鼠的神经病理性疼痛

吴飞翔, 缪雪蓉, 徐学武, 孙玉明, 俞卫锋*

第二军医大学东方肝胆外科医院麻醉科, 上海 200438

[摘要] **目的** 观察坐骨神经结扎(CCI)大鼠鞘内注射针对 Toll 样受体 4 基因(TLR4)的 siRNA(TLR4-siRNA)的镇痛作用及对脊髓 TLR4、IL-1 β 、TNF- α 表达的影响。**方法** 大鼠随机分为 4 组(每组 10 只):假手术组、CCI 组(鞘内注射生理盐水)、错配 siRNA 组(鞘内注射错配 siRNA)及 siRNA-TLR4 组(鞘内注射 TLR4-siRNA)。后 3 组大鼠均行右侧坐骨神经结扎术,并行 L₅~L₆鞘内置管;假手术组仅暴露坐骨神经而不结扎。TLR4-siRNA 组大鼠从 CCI 术前 1 d 开始鞘内注射脂质体包裹的有效 TLR4-siRNA(10 μ g/30 μ l),连续 7 d;CCI 组、错配 siRNA 组分别注射等量生理盐水和错配 siRNA。采用热辐射及 von Frey 测痛丝分别测定各组大鼠的热痛阈及机械性痛阈;采用实时定量 RT-PCR 法观察各组大鼠脊髓组织 TLR4 mRNA 的表达;采用 ELISA 法测各组大鼠脊髓组织炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 的含量。**结果** 与假手术组相比,坐骨神经结扎后,大鼠热痛阈及机械性痛阈降低,脊髓 TLR4 mRNA 表达量增加,脊髓组织 IL-1 β 、TNF- α 的含量也增加($P < 0.05$)。与生理盐水组及错配 siRNA 组相比,鞘内注射 TLR4-siRNA 可抑制坐骨神经结扎引起的热痛觉过敏及机械性异常性疼痛(结扎后 1、3、7 d, $P < 0.05$),降低脊髓 TLR4 mRNA 表达($P < 0.05$),降低脊髓 IL-1 β 、TNF- α 含量($P < 0.05$)。**结论** 鞘内注射 TLR4-siRNA 可通过干扰大鼠脊髓 TLR4 基因表达抑制其信号通路下游炎症因子的水平,进而缓解坐骨神经结扎引起的神经病理性疼痛。

[关键词] Toll 样受体 4;神经病理性疼痛;siRNA;坐骨神经结扎;RNA 干扰;白介素 1 β ;肿瘤坏死因子 α

[中图分类号] R 441.1 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 0258-879X(2011)04-0377-05

Intrathecal injection of siRNA targeting Toll-like receptor 4 reduces neuropathic pain in rat model of chronic constriction injury

WU Fei-xiang, MIAO Xue-rong, XU Xue-wu, SUN Yu-ming, YU Wei-feng*

Department of Anesthesiology, Eastern Hepatobiliary Surgery Hospital, Second Military Medical University, Shanghai 200438, China

[Abstract] **Objective** To observe the effect of intrathecal injection of siRNA targeting Toll-like receptor 4 (TLR4) on neuropathic pain and spinal cord levels of TLR4, IL-1 β , and TNF- α in rat model of chronic constriction injury (CCI). **Methods** Male Sprague-Dawley rats were randomly divided into four groups ($n=10$): the sham group (intrathecal normal saline, IT NS), CCI group (CCI+IT NS), mismatch siRNA group (CCI+IT mismatch siRNA), and siRNA-TLR4 group (CCI+IT siRNA-TLR4). The lumbar intrathecal catheters were implanted in rats and CCI models were established as previously described. The TLR4 siRNA were administered intrathecally for 7 days starting from 1 day before surgery. The spinal cord expression of TLR4 mRNA was assessed by real-time PCR. Levels of TNF- α and IL-1 β in spinal cord were detected by ELISA. The thermal and mechanical nociceptive thresholds were assessed by paw withdrawal latency (PWL) to radiant heat and von Frey filaments. **Results** Compared with the sham group, animals in CCI group had significantly lower mechanical and thermal pain thresholds, higher expression of TLR4 mRNA and levels of IL-1 β , TNF- α in the spinal cord ($P < 0.05$). Rats in the siRNA-TLR4 group had significantly higher mechanical and thermal pain thresholds (at 1, 3, and 7 days after ligation, $P < 0.05$) and significantly lower expression of TLR4 mRNA and levels of IL-1 β , TNF- α in the spinal cord compared with those in the CCI group and mismatch siRNA group ($P < 0.05$). **Conclusion** Intrathecal injection of siRNA-TLR4 can decrease the levels of inflammatory factors by silencing the TLR4 in the spinal cord of rats, and subsequently relieve the neuropathic pain induced by CCI.

[Key words] Toll-like receptor 4; neuropathic pain; siRNA; chronic constriction injury; RNA interference; interleukin-1 β ; tumor necrosis factor- α

[Acad J Sec Mil Med Univ, 2011, 32(4):377-381]

[收稿日期] 2011-02-14 **[接受日期]** 2011-03-17

[基金项目] 国家自然科学基金(30901403)。Supported by National Natural Science Foundation of China(30901403)。

[作者简介] 吴飞翔, 博士。E-mail: feixiangwu@yahoo.com.cn

* 通信作者(Corresponding author)。Tel: 021-81875231, E-mail: ywf808@sohu.com

神经病理性疼痛(neuropathic pain)的痛觉反应性较高,表现为痛觉过敏(hyperalgesia)和异常性疼痛(allodynia),对强效麻醉性镇痛药反应较差,目前机制仍不明确,临床处理比较棘手^[1-2]。Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)是细菌脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)胞内信号转导的重要通路^[3],是LPS靶细胞膜上跨膜受体和自然免疫系统主要的病原模式识别受体,可能参与感染引起的疼痛^[4],但在神经病理性疼痛中的作用仍不清楚。我们的前期研究发现,坐骨神经结扎引起的大鼠神经病理性疼痛可能与脊髓组织TLR4表达增加有关,TLR4可能是神经病理性疼痛治疗的潜在靶标^[5]。RNA干扰(RNA interference, RNAi)技术能够使目标基因表达沉默^[6],可作为筛选神经病理性疼痛干预靶位的重要方法。因此,本研究采用RNA干扰技术下调目标基因TLR4表达,观察鞘内注射siRNA-TLR4对坐骨神经结扎(chronic constriction injury, CCI)大鼠的镇痛作用,并探讨其可能的作用机制或途径,为后续研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 主要材料及试剂 大鼠IL-1 β 、TNF- α ELISA检测试剂盒为上海晶美生物工程有限公司产品。BME-410 C型光热刺激仪、von Frey测痛丝为中国医学科学院生物医学工程研究所产品。RT-PCR试剂盒为美国NEB(New England Biolabs)公司产品;DNA相对分子质量标准品为上海皓嘉科技发展有限公司产品。

1.2 动物分组及处理 健康成年雄性SD大鼠,体质量200~250 g,购自第二军医大学实验动物中心。实验前禁食12 h,自由饮水。大鼠随机分为4组:假手术组(Sham组)、CCI组(CCI+鞘内注射生理盐水)、错配siRNA组(CCI+鞘内注射错配siRNA)及TLR4 siRNA组(CCI+鞘内注射TLR4-siRNA),每组10只。后3组大鼠均参照文献^[7]制备右侧坐骨神经结扎模型,并行L₅~L₆鞘内置管。模型制作方法:戊巴比妥(40 ml/kg)腹腔注射麻醉,分离右侧坐骨神经,用4-0丝线在坐骨神经的中段间隔2 mm结扎4条线,仅留下缢痕而不阻断神经血供,然后分层缝合皮肤,待大鼠清醒后归笼饲养观察。假手术组大鼠仅暴露坐骨神经而不结扎。TLR4-siRNA组大鼠从CCI术前1 d开始鞘内注射脂质体包裹的有效TLR4-siRNA(10 μ g/30 μ l),连续7 d;CCI组、错配siRNA组分别注射等量生理盐水和错配siRNA。TLR4-siRNA及错配siRNA根据GenBank TLR4序列(NM_019178)在前期研究中已利用报告载体筛选获得^[8]。TLR4-siRNA

序列:5'-GUC UCA GAU AUC UAG AUC U-3'(序列位置:1352-70);错配siRNA序列:5'-GGC GUG UCU CUC UUA CGA C-3'。

1.3 鞘内置管 大鼠麻醉后腰中线备皮消毒后切开约2.5 cm的小口,剪开筋膜,一手托起动物,尽量暴露L₅~L₆间隙,用小剪刀垂直L₅棘突剪开,再在L₆棘突上斜向L₅方向向下剪开肌肉,剪除部分L₆棘突,暴露L₅~L₆间的三角间隙,用小针穿破硬膜,可见动物嘶叫或甩尾,夹取PE-10导管延穿刺孔插入,插入时可见动物嘶叫或甩尾或蹬腿,置入约1 cm,可见脑脊液流出或注入生理盐水可见水回流,即可封闭管口。导管周围敷以氨苄青霉素粉末,依次缝合妥善固定导管于肌肉和皮肤,在皮下再敷以氨苄青霉素粉末,缝合皮肤对合完整,腹腔注射0.3 ml氨苄青霉素(100 mg/ml)。术后单笼饲养。

1.4 热痛阈测定 以大鼠在辐射热照射下出现缩爪反射的潜伏时间(paw withdrawal latency, PWL)为热痛阈^[9],分别于CCI术前1 d及术后1、3、7、10、14 d测定各组大鼠双足热痛阈,测定值精确到0.1 s。所有动物照射内侧第1足趾的着力点,每个时点测定3次,每次间隔5 min,取平均值作为热痛阈。单次照射不超过20 s,以免损伤照射部位。所有测定由同一位不知情实验人员在相同时间段和相同实验条件下完成。

1.5 机械性刺激痛阈测定 将大鼠置于升高的金属网上,盖以透明的有机玻璃罩。先让大鼠适应环境15 min,待大鼠的梳理和探究活动基本消失后,用一系列标准化的von Frey纤维垂直刺激大鼠后肢足底中部,使之稍成S形,持续6~8 s,观察是否出现缩足反应。大鼠在刺激时间内或在移开von Frey纤维时立即出现快速的缩足反应,记为阳性反应,而身体活动所引起的缩爪反应不记作阳性反应。以“up-and-down”的方法测量缩足反应阈值(paw withdrawal threshold, PWT)。

1.6 RT-PCR及实时定量PCR法测定脊髓组织TLR4 mRNA的表达 术后1、3、7、10、14 d取L₄~L₅段脊髓组织,抽提与纯化总RNA,在紫外分光光度计上测定纯度与浓度,反转录合成第一条链cDNA,以5'-TCA TCC AGG AAG GCT TCC AC-3'(正向)、5'-GGC GAT ACA ATT CGA CCT GC-3'(反向)为引物,94 $^{\circ}$ C 5 min解链;94 $^{\circ}$ C 50 s,55 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 90 s共30个循环;72 $^{\circ}$ C 10 min延伸。取5 μ l,1%琼脂糖凝胶电泳鉴定RT-PCR产物。实时定量PCR的引物同前, β -actin(NM_031144)序列:5'-ACC CGC GAG TAC AAC CTT C-3'(正向)、5'-CCC ATA CCC ACC ATC ACA CC-3'(反向)。体

系总反应量为 25 μ l, 在实时定量 PCR 扩增仪上, 按照以下程序进行实时 PCR: 预变性: 95 $^{\circ}$ C 10 s, 20 $^{\circ}$ C / s, 1 cycle; PCR 反应: 95 $^{\circ}$ C 5 s, 20 $^{\circ}$ C / s, 62 $^{\circ}$ C 20 s, 20 $^{\circ}$ C / s, 40 cycles; 熔解曲线分析: 95 $^{\circ}$ C 0 s, 20 $^{\circ}$ C / s, 65 $^{\circ}$ C 15 s, 20 $^{\circ}$ C / s, 95 $^{\circ}$ C 0 s, 0.1 $^{\circ}$ C / s. 反应结束后确认扩增曲线和熔解曲线, 分析各组大鼠脊髓组织 TLR4 mRNA 的表达水平。

1.7 ELISA 法测定脊髓组织 IL-1 β 、TNF- α 水平
 术后 1、3、7、10、14 d 取大鼠 L₄~L₅ 段脊髓组织, 匀浆后行总蛋白测定, 采用双抗体夹心 ABC-ELISA 法检测。将抗大鼠 IL-1 β 、TNF- α 单抗包被于酶标板上, 标准品和样品中的大鼠 IL-1 β 、TNF- α 与单抗结合, 加入生物素化的抗大鼠 IL-1 β 、TNF- α , 形成免疫复合物连接在板上, 辣根过氧化物酶标记的链霉素亲和素 (streptavidin) 与生物素结合, 加入酶底物 OPD, 出现黄色, 加终止液硫酸, 颜色变深, 在 492 nm 处测光密度 (D) 值, 通过绘制标准曲线求出标本的 IL-1 β 、TNF- α 水平。

1.8 统计学处理 采用 SAS 8.2 统计软件进行分析, 计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 数据比较均采用近似 F 检验 (SNK-q), 检验水准 (α) 为 0.05。

2 结果

2.1 各组大鼠痛阈的变化 结果(图 1)表明: 与假手术组相比, 坐骨神经结扎后 1、3、7、10、14 d, 大鼠右足 PWL 值降低 ($P < 0.05$), 右足 PWT 值也降低 ($P < 0.05$); 与 CCI 组相比, 结扎后 1、3、7 d, TLR4-siRNA 组大鼠右足 PWL、PWT 升高 ($P < 0.05$); 从术后 1 d 起, 鞘内注射 TLR4-siRNA 可抑制热痛觉过敏及机械性的异常性疼痛反应, 持续至术后 7 d 恢复至 CCI 组水平。结果说明, 结扎后大鼠出现热痛觉过敏及机械性异常性疼痛, 鞘内注射 TLR4-siRNA 具有一定镇痛作用。

2.2 各组大鼠脊髓 TLR4 mRNA 表达的变化
 RT-PCR(图 2)及实时荧光定量 PCR(图 3)结果表明: 大鼠坐骨神经结扎后 1 d, TLR4 mRNA 表达增高, 为假手术组的 3 倍以上; siRNA 处理后, TLR4 mRNA 表达下降, 与 CCI 组及错配 siRNA 组相比, 在 1~7 d 时差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。结果说明, CCI 大鼠脊髓 TLR4 mRNA 表达上调, 鞘内注射 TLR4-siRNA 可降低 TLR4 mRNA 的表达。

2.3 各组大鼠脊髓 IL-1 β 、TNF- α 表达的变化
 ELISA 结果(图 4)显示: IL-1 β 、TNF- α 在假手术组脊髓中有少量表达, 坐骨神经结扎后有明显表达 ($P < 0.05$), 在 siRNA 处理后表达降低, 在 1~7 d

时与 CCI 组相比差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。鉴于 IL-1 β 、TNF- α 位于 TLR4 信号通路的下游, 阻断 TLR4 可使 IL-1 β 、TNF- α 分泌降低。因此, 推测 IL-1 β 、TNF- α 的分泌增加可能与 TLR4 上调有关。

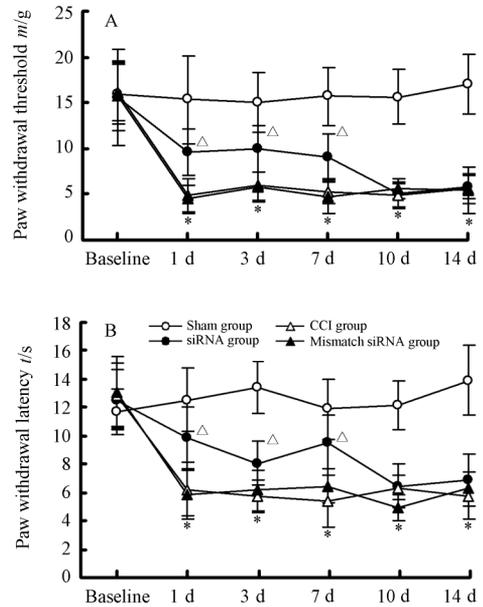


图 1 各组大鼠机械性刺激痛阈和热痛阈的变化

Fig 1 Mechanical allodynia and thermal hyperalgesia in rats of different groups

* $P < 0.05$ vs sham group; $\Delta P < 0.05$ vs chronic constriction injury (CCI) group. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

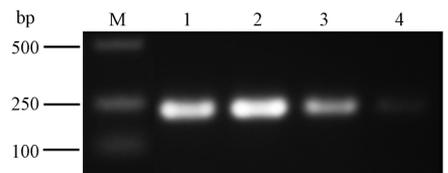


图 2 RT-PCR 检测大鼠脊髓组织 TLR4 表达

Fig 2 RT-PCR analyses of TLR4 mRNA expression in rat lumbar spinal cord

M: Marker; 1: CCI group; 2: Mismatch siRNA group; 3: TLR4-siRNA group; 4: Sham group

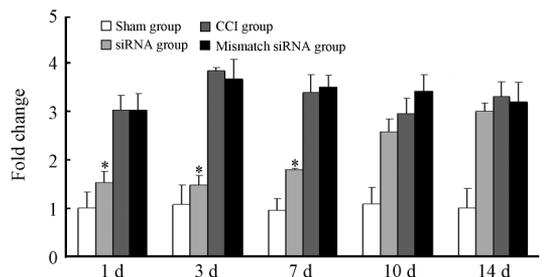


图 3 实时荧光定量 PCR 检测大鼠脊髓组织 TLR4 表达

Fig 3 Real-time quantitative RT-PCR analysis of TLR4 mRNA expression in rat lumbar spinal cord

* $P < 0.05$ vs CCI and mismatch siRNA group; $n = 10$, $\bar{x} \pm s$

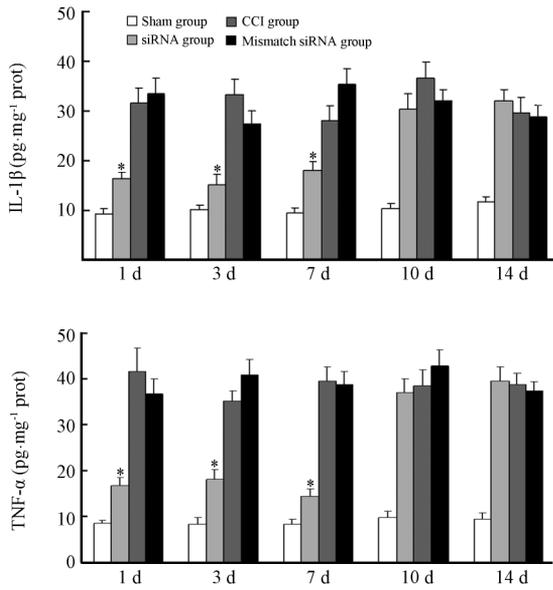


图4 各组大鼠脊髓 IL-1β、TNF-α 表达的变化

Fig 4 Effects of intrathecal siRNA-TLR4 on CCI-induced IL-1β and TNF-α in lumbosacral spinal cord

* P<0.05 vs CCI and mismatch siRNA group; n=10, $\bar{x} \pm s$

3 讨论

TLR4 是 I 型膜受体,可识别病原微生物进化中保守分子,如脂多糖、肽聚糖、酵母多糖及病原微生物的核酸等,激活免疫反应,可在啮齿类动物的中枢神经系统中表达^[10],尤其在小胶质细胞大量表达^[11]。TLR4 胞外的信号通过传递给 CD14 来实现 TLR4 的激活,而胞内活化的 TLR4 与接头蛋白 MyD88 的 TLR4 受体域结合,MyD88 通过其死亡域 (death domain) 再与 IL-1 受体相关激酶 (IL-1 receptor associated kinase, IRAK) 结合^[12],导致 IRAK 的自身磷酸化,从而激活肿瘤坏死因子受体相关因子-6 (TNF-α receptor associated factor 6, TRAF-6),而后通过激活 IKK 使 IκB 家族 α、β 激酶活化^[13],导致 IκB 家族的广泛磷酸化而降解,使 NF-κB 转位到胞核,其活性二聚体启动细胞因子 (如 IL-1、IL-6、IL-8、IL-12 等) 和辅助刺激分子 CD80 和 CD86 基因的转录、翻译,最终导致炎症因子释放。

实时荧光定量 PCR 分析脊髓内小胶质细胞显示,在脊髓 L₅ 神经切除后 TLR4 mRNA 的表达升高^[3]。Tanga 等^[14]的研究指出,神经病变的小鼠小胶质细胞 TLR4 可能诱导痛觉过敏的发生。本研究发现,在大鼠坐骨神经结扎后,大鼠出现热诱发的痛觉过敏和机械性的异常性疼痛反应,且脊髓 TLR4 mRNA 的表达均明显升高,鉴于 TLR4 在免疫反应中的重要作用,推测坐骨神经结扎后的 TLR4 表达

上调可能与外周神经损伤后脊髓内细胞的损害有关,从而诱发病理性疼痛的发生。

RNAi 是利用双链 RNA (double stranded RNA, dsRNA) 高效、特异地阻断体内特定基因表达,促使 mRNA 降解,使细胞表现出特定基因缺失表型的过程^[15]。Dorn 等^[16]应用 siRNA 靶向 P2X₃,降低痛觉过敏,开创了 RNA 治疗慢性疼痛的先河。Tan 等^[17]又用 siRNA 靶向易化伤害性通路的重要分子 N-甲基-D-天冬氨酸 (NMDA) 受体亚单位 NR₂B,经鞘内注射后发现 NR₂B mRNA 及其相关蛋白含量明显降低,甲醛诱导的大鼠疼痛反应明显减轻,说明在此位点上运用 siRNA 治疗慢性疼痛具有一定的有效性和可行性。本研究以 RNAi 的方法在 CCI 大鼠鞘内注射 TLR4-siRNA,结果表明,TLR4-siRNA 可通过抑制 TLR4 的表达,而抑制热痛觉过敏及机械性异常性疼痛,也进一步说明 TLR4 受体可能参与神经病理性疼痛, RNAi 技术用于治疗慢性疼痛具有一定的可行性。

细胞因子在神经病理性疼痛的调控中具有重要作用。TNF-α、IL-1β、IL-10 和 IL-18 是 TLR4 信号通路下游的炎症因子。TNFα 可诱导 PGE₂ 合成,还可引发缓激肽、P 物质、儿茶酚胺释放,从而诱导痛觉敏化。IL-1β 也可上调 P 物质及神经生长因子的表达,敏化脊髓后角神经元,诱发痛觉过敏^[18-19]。鞘内注射 IL-1β 和 TNF-α 阻断剂可减轻痛觉过敏的发生^[20]。本研究发现,坐骨神经结扎大鼠脊髓 IL-1β、IL-6 的表达大量增加,明显高于假手术组,表明神经损伤后细胞因子大量表达,可能通过级联反应放大疼痛信号,从而诱发痛觉过敏。从理论上讲,阻断上游的信号通路中任何一个环节,都将导致炎症因子的基因表达、蛋白分泌的减少,TLR4 作为跨膜受体蛋白,是信号转导至细胞内的必经环节,是启动炎症反应的“门户”,若 TLR4 被阻断,理论上可以阻断或减少信号的细胞内转导,减少 IL-1β 和 TNF-α 等细胞因子的分泌,从而缓解疼痛。本研究通过 RNAi 的方法“敲低”TLR4 基因,减少了 IL-1β 和 TNF-α 的分泌,同时也抑制热痛觉过敏及机械性异常性疼痛。因此,TLR4 可能是治疗神经病理性疼痛的一个新的良好靶位。

总之,本研究发现坐骨神经结扎大鼠神经病理性疼痛产生的同时,TLR4 表达上调及 IL-1β、TNF-α 分泌增加;以 RNAi 技术干扰 TLR4 可减少 IL-1β、TNF-α 分泌,同时抑制热痛觉过敏及机械性异常性疼痛反应,说明 TLR4-细胞因子信号通路可能与神经病理性疼痛有关,TLR4 可能是治疗神经病理性疼痛的新靶点,值得进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 严晓娣,陈前波,周双琼,袁红斌. 鞘内注射 p38 MAPK 抑制剂对神经病理性疼痛大鼠脊髓背角脑源性神经营养因子表达的影响[J]. 第二军医大学学报, 2010, 31: 883-886.
Yan X D, Chen Q B, Zhou S Q, Yuan H B. Influence of intrathecal injection of p38 MAPK inhibitor on BDNF expression in dorsal horn of spinal cord of rats with neuropathic pain[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2010, 31: 883-886.
- [2] 马蓓,倪鑫. Zn^{2+} 对大鼠不同自主神经节分离神经元 P2X 受体介导 ATP 诱导电流的调制作用[J]. 第二军医大学学报, 2006, 27: 373-377.
Ma B, Ni X. Regulatory effect of Zn^{2+} on P2X receptor-mediated, ATP-induced currents in different autonomic ganglion neurons in rats[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2006, 27: 373-377.
- [3] Tohno M, Shimazu T, Aso H, Kawai Y, Saito T, Kitazawa H. Molecular cloning and functional characterization of porcine MyD88 essential for TLR signaling[J]. Cell Mol Immunol, 2007, 4: 369-376.
- [4] Tanga F Y, Raghavendra V, DeLeo J A. Quantitative real-time RT-PCR assessment of spinal microglial and astrocytic activation markers in a rat model of neuropathic pain[J]. Neurochem Int, 2004, 45(2-3): 397-407.
- [5] 孙玉明,吴飞翔,缪雪蓉,吕欣,徐学武,杨立群,等. 坐骨神经结扎大鼠脊髓组织 Toll 样受体 4 及下游细胞因子表达的变化[J]. 第二军医大学学报, 2008, 29: 949-953.
Sun Y M, Wu F X, Miao X R, Lü X, Xu X W, Yang L Q, et al. Changes of Toll-like receptor 4 and its downstream cytokines in spinal cord of rat model of neuropathic pain[J]. Acad J Sec Mil Med Univ, 2008, 29: 949-953.
- [6] Moffat J, Sabatini D M. Building mammalian signalling pathways with RNAi screens[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2006, 7: 177-187.
- [7] Bennett G J, Xie Y K. A peripheral mononeuropathy in rat that produces disorders of pain sensation like those seen in man[J]. Pain, 1988, 33: 87-107.
- [8] Wu F X, Yu W F, Yuan Y, Miao X R, Xu X W, Huang S D, et al. Adenoviral vector mediated-expression of caspase-3 siRNA on apoptosis induced by lipopolysaccharide[J]. J Med Coll PLA, 2009, 24: 266-273.
- [9] Hargreaves K, Dubner R, Brown F, Flores C, Joris J. A new and sensitive method for measuring thermal nociception in cutaneous hyperalgesia[J]. Pain, 1988, 32: 77-88.
- [10] Zhou H, Lapointe B M, Clark S R, Zbytniuk L, Kubes P. A requirement for microglial TLR4 in leukocyte recruitment into brain in response to lipopolysaccharide[J]. J Immunol, 2006, 177: 8103-8110.
- [11] Blanco A M, Guerri C. Ethanol intake enhances inflammatory mediators in brain: role of glial cells and TLR4/IL-1RI receptors[J]. Front Biosci, 2007, 12: 2616-2630.
- [12] Akira S, Takeda K, Kaisho T. Toll-like receptors: critical proteins linking innate and acquired immunity[J]. Nat Immunol, 2001, 2: 675-680.
- [13] Takeuchi O, Akira S. Toll-like receptors: their physiological role and signal transduction system[J]. Int Immunopharmacol, 2001, 1: 625-635.
- [14] Tanga F Y, Nutille-McMenemy N, DeLeo J A. The CNS role of Toll-like receptor 4 in innate neuroimmunity and painful neuropathy[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2005, 102: 5856-5861.
- [15] Fire A, Xu S, Montgomery M K, Kostas S A, Driver S E, Mello C C. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. Nature, 1998, 391: 806-811.
- [16] Dorn G, Patel S, Wotherspoon G, Hemmings-Mieszczyk M, Barclay J, Natt F J, et al. siRNA relieves chronic neuropathic pain[J]. Nucleic Acids Res, 2004, 32: e49.
- [17] Tan P H, Yang L C, Shih H C, Lan K C, Cheng J T. Gene knockdown with intrathecal siRNA of NMDA receptor NR2B subunit reduces formalin-induced nociception in the rat[J]. Gene Ther, 2005, 12: 59-66.
- [18] Leslie M. Inflaming chronic pain[J]. Sci Aging Knowledge Environ, 2005, 2005: nf28.
- [19] Bianchi M, Martucci C, Ferrario P, Franchi S, Sacerdote P. Increased tumor necrosis factor-alpha and prostaglandin E₂ concentrations in the cerebrospinal fluid of rats with inflammatory hyperalgesia: the effects of analgesic drugs[J]. Anesth Analg, 2007, 104: 949-954.
- [20] Milligan E D, Twining C, Chacur M, Biedenkapp J, O'Connor K, Poole S, et al. Spinal glia and proinflammatory cytokines mediate mirror-image neuropathic pain in rats[J]. J Neurosci, 2003, 23: 1026-1040.

[本文编辑] 贾泽军