

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-KB、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造中,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, * $P < 0.05$.