文章编号:1000-5404(2014)12-1279-05

论著

GPR48与TLR4在大鼠激素性股骨头坏死组织中的表达及其相关性分析

宋会平[1],郑小平[1],王志强[1],李琪佳[2] (063000 河北 唐山,河北联合大学:附属医院骨科[1];实验中心[2])

[摘要] **目的** 探讨G蛋白偶联受体48(G protein coupled receptor 48,GPR48)和Toll样受体4(toll like receptor 4,TLR4)在大鼠激素性股骨头坏死组织中的表达变化及其相关性,阐明GPR48与TLR4在激素性股骨头坏死进程中的调控作用。**方法** 健康SD大鼠68只,按随机数字表法分为实验组(44只,肌注地塞米松10 mg/kg,每周1次)和对照组(24只,注射等体积生理盐水代替激素),于2、6、8、10周时分别获取实验组11只和对照组6只大鼠的双侧股骨头,进行组织学观察(HE、Masson三色染色)、免疫组化及RT-PCR检测。**结果** ①HE染色显示,实验组2周可见骨小梁微小断裂,10周骨小梁断裂范围扩大,形成大量空骨陷窝;Masson三色染色及胶原含量分析显示,与对照组相比,实验组单位面积内胶原含量从第6周开始下降,第10周明显下降,差异有统计学意义($P<0.05$),实验组组内各个时间点的比较差异有统计学意义($P<0.05$),胶原含量呈逐渐下降趋势;②免疫组织化学染色分析:实验组6、8、10周各个时间点GPR48表达的累积光密度(5.87±0.53)、(4.82±0.52)、(3.94±0.49)均低于对照组($P<0.05$),并呈逐渐降低趋势;实验组6、8、10周各个时间点TLR4表达的累积光密度(6.93±0.58)、(8.10±0.46)、(8.70±0.95)均高于对照组($P<0.05$),并呈逐渐上升趋势;实验组不同时间点GPR48与TLR4表达呈负相关($r=-0.821$,$P<0.05$);③RT-PCR检测:GPR48 mRNA表达在实验组内各个时间点之间呈逐渐降低趋势,而TLR4 mRNA表达则呈逐渐上升趋势;实验组不同时间点GPR48与TLR4 mRNA表达呈负相关($r=-0.791$,$P<0.05$)。**结论** 大鼠激素性股骨头坏死发展进程中GPR48和TLR4的表达呈负相关性,共同介导坏死过程中的炎症免疫反应。

[关键词] 激素;股骨头缺血坏死;G蛋白偶联受体48;Toll样受体4;大鼠
[中图法分类号] R341;R363.21;R681.8 [文献标志码] A

GPR48 and TLR4 expression regulates progression of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in rats

Song Huiping[1], Zheng Xiaoping[1], Wang Zhiqiang[1], Li Qijia[2] ([1]Department of Orthopeadics Affiliated Hospital, [2]Experimental Center Hebei United University, Tangshan, Hebei Province 063000, China)

[**Abstract**] **Objective** To analyze G protein-coupled receptor 48 (GPR48) and toll-like receptor 4 (TLR4) expression changes and regulation activities in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in rats. **Methods** Sixty-eight SD rats were randomly divided into 2 groups, an experimental group (44 rats injected with dexamethasone sodium phosphate 10 mg/kg weekly) and a control group (22 rats injected with an equal volume of normal saline). At week 2, 6, 8, and 10, rats were sacrificed (11 rats in the experimental group and 6 rats in the control group at each time point) to obtain femoral heads, followed by histological observation, immunohistochemistry assay and RT-PCR detection. **Results** (1) HE staining results revealed that the experimental group showed occasionally small micro-fractures at week 2 and displayed a wide range of trabecular bone fracture at week 10. Masson trichrome staining results revealed that the per unit area of collagen content in the experimental group was significantly higher at weeks 6, 8 and 10 than that in the control group ($P<0.05$). (2) Compared with the control group at weeks 6, 8 and 10, the experimental group showed significantly decreased GPR48 level (5.87±0.53, 4.82±0.52, and 3.94±0.49, respectively, $P<0.05$) and increased TLR4 level (6.93±0.58, 8.10±0.46 and 8.70±0.95, respectively, $P<0.05$). It displayed a

[基金项目] 河北省自然科学基金(C2011401025);河北省科技厅资助项目(10276111D)
[通信作者] 王志强, E-mail: wzhq@163.com
[优先出版] http://www.cnki.net/kcms/detail/51.1095.R.20140116.1056.006.html(2014-01-16)

negative correlation between GPR48 and TLR4 expression ($r = -0.821$, $P < 0.05$) at different time points. (4) Compared with the control group, GPR48 mRNA expression in the experimental group was markedly decreased while TLR4 mRNA was increased in a time-dependent manner ($P < 0.05$). It also displayed a negative correlation between GPR48 and TLR4 mRNA levels ($r = -0.791$, $P < 0.05$) at different time points. **Conclusion** GPR48 and TLR4 expression is negatively correlated and mediates the inflammation and immune reaction in the progression of steroid-induced avascular necrosis of the femoral head in rats.

[**Key words**] hormone; femoral head necrosis; G protein coupled receptor 48; toll-like receptor 4; rat

Supported by the Natural Science Foundation of Hebei Province (C2011401025) and the Project of Department of Science and Technology of Hebei Province (10276111D). Corresponding author: Wang Zhiqiang, E-mail: wzqde@163.com

糖皮质激素长期大量应用常并发骨坏死,其中以股骨头无菌缺血性坏死最为常见,但机制尚未完全搞清楚。已有研究表明激素性股骨头缺血性坏死会激活前炎症性Toll样受体4(toll-like receptor 4, TLR4)介导的信号转导通路[1],提示坏死过程与炎症免疫反应有关,但上游关键分子不明。新近研究发现G蛋白偶联受体48(G protein coupled receptor 48,GPR48),敲除后可引起血液、骨组织发育异常[2-3],并能够通过负性调控TLR2/4等因子介导炎症免疫反应过程[4]。提示GPR48与TLR4可能存在某种联控效应,但目前尚不清楚两者的联控调节是否在股骨头坏死进程中发挥作用。本实验通过研究激素诱导股骨头坏死进程中GPR48和TLR4表达变化及两者相关性,旨在从新角度了解其潜在的分子调控机制。

1 材料与方法

1.1 实验动物及主要试剂、仪器

6月龄SD大鼠68只,体质量550~600 g,雌雄不限,由华北煤炭医学院实验动物中心提供。GPR48和TLR4兔抗鼠多克隆抗体(北京博奥森生物技术有限公司),Trizol(天津翔天科技有限公司),DEPC(美国Amresco公司),M-MLV逆转录试剂盒(上海生物工程有限公司),PCR引物(上海生物工程有限公司),RT-PCR机(Corbett Research公司),低温平衡离心沉淀机(北京医学离心机厂),图像分析系统(Image-Pro Plus 6.0),石蜡切片机(Leica,德国),超净台(美国Forma scientific公司)。

1.2 激素性股骨头坏死大鼠模型的建立

68只SD大鼠按随机数字表法随机分为两组,实验组44只,对照组24只。实验组臀肌注射地塞米松磷酸钠10 mg/kg,每周1次,对照组注射等量生理盐水代替激素。在开始用药后2、6、8、10周末随机选取实验组11只、对照组6只处死取双侧股骨头。

1.3 观察指标

1.3.1 组织学分析 2组大鼠在用药后2、6、8、10周末,获取股骨头,经40 g/L多聚甲醛固定后EDTA脱钙,常规脱水、透明,石蜡包埋,制作4 μm厚度切片,HE染色和Masson三色染色,光镜下观察组织形态学变化。Masson三色染色光镜下观察骨小梁内胶原分布情况,Image-Pro Plus 6.0图像分析测得单位面积骨小梁内胶原含量。

1.3.2 免疫组织化学观察 上述载玻片经多聚赖氨酸处理,制石蜡切片,常规脱蜡至水,用3% H_2O_2甲醇溶液室温孵育15 min,PBS盒洗3次,每次3 min;胰酶消化,37 ℃孵育30 min,PBS盒洗3次,每次3 min;分别滴加经1∶300稀释的兔抗鼠GPR48和TLR4兔抗鼠多克隆抗体,4 ℃过夜;PBS洗片后滴加二抗工作液,37 ℃孵育50 min,PBS洗3次,每次3 min;DAB显色,显微镜下有棕黄色物质出现时终止显色;蒸馏冲洗,苏木精复染细胞核,乙醇梯度脱水,二甲苯透明,中性树胶封片。免疫组化图像分析:实验组每个时间点取5个标本,每个标本做3张切片,每张切片按等距抽样原则随机选择同一放大倍数下5个视野,Image-Pro Plus图像分析软件分析染色强度,结果用IOD值表示。

1.3.3 RT-PCR检测GPR48和TLR4 mRNA表达 按照TRIzol RNA标准分离方法抽提股骨头组织总RNA,在M-MuLV逆转录酶作用下将RNA逆转录成cDNA,采用PCR扩增技术,以β-actin为内参,检测组织中GPR48和TLR4 mRNA表达。引物序列见表1。反应结束后,以对照组(0 μmol/L)GPR48和TLR4 mRNA表达为1,采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法计算基因表达的相对变化。

表1 PCR引物序列及目的基因大小

基因名称	引物	引物序列(5′-3′)	产物长度(bp)
GPR48	上游	GGTCTCTGGCAGTCTTCTCCTC	104
	下游	GCTCTTCCCGTGTTTCATCAAATC	
TLR4	上游	CATCCAAAGGAATACTGCAACA	398
	下游	GTTTCTCACCCAGTCCTCATTC	
β-actin	上游	TATCGGCAATGAGCGGTTCC	150
	下游	AGCACTGTGTTGGCATAGAGG	

1.4 统计学方法

数据用$\bar{x} \pm s$表示,采用SPSS 13.0统计软件,进行单因素方差分析和Pearson相关性分析。

2 结果

2.1 大鼠激素性股骨头坏死组织形态学观察

HE染色观察显示,实验组2周时与对照组相比无明显变化,软骨下骨小梁粗大规整,结构正常,脂肪空泡少见(图1A);

10 周时骨小梁结构紊乱,较大范围内出现骨小梁稀疏、纤细、断裂,可见游离的碎骨块,形成大量空骨陷窝,骨髓腔内脂肪空泡增大融合(图 1B)。对照组 2 周时股骨头关节软骨表面光滑,各层软骨细胞排列整齐(图 1C),10 周时仍表现为正常形态(图 1D)。

Masson 三色染色(纤维染成蓝色,红细胞呈红色,细胞核呈蓝黑色)观察显示,实验组 2 周(图 2A)胶原含量与对照组无明显异常,6 周(图 2B)蓝色胶原纤维数量明显下降,10 周(图 2C)骨小梁间胶原分布杂乱无规则,单位面积内胶原含量逐渐较低,且随着时间的延长有逐渐下降的趋势。对照组 10 周(图 2D)时骨小梁间胶原分布仍规则均匀,胶原含量较高。实验组与对照组单位面积内胶原含量从第 6 周开始相比差异有统计学意义($P<0.05$),实验组同组内各个时间点的比较差异有统计学意义($P<0.05$),胶原含量呈逐渐下降趋势(表 2)。

表 2　2 组大鼠不同时间点单位面积内胶原含量的比较($\bar{x}\pm s$,%)

组别	n	2 周	6 周	8 周	10 周
实验组	8	54.84 ± 2.81	45.29 ± 3.20[a]	35.97 ± 3.68[a]	26.69 ± 4.41[a]
对照组	6	54.59 ± 2.64	53.84 ± 2.30	55.04 ± 2.09	54.17 ± 2.81

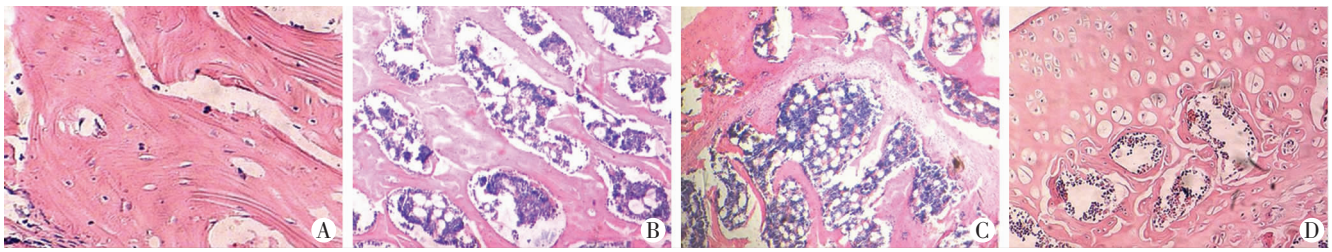
a: $P<0.05$,与对照组比较

2.2　免疫组化观察

2.2.1　GPR48 的表达　　光镜下,GPR48 呈现黄色或棕黄色,位于细胞膜,破骨细胞、成骨细胞、骨细胞、血管内皮、脂肪细胞等均可见阳性表达(图 3)。实验组 2 周时阳性细胞 GPR48 表达强度仍较高,6 周后开始表达下降,10 周时表达强度显著下降,而对照组 10 周时仍然有较高表达(图 3)。经计量分析,实验组随着时间的延长其表达强度逐渐下降,各个时间点无论是阳性表达细胞的数量和表达的强度都显著低于对照组,差异有统计学意义($P<0.05$)。实验组内各个时间点表达逐渐降低,差异有统计学意义($P<0.05$,表 3)。

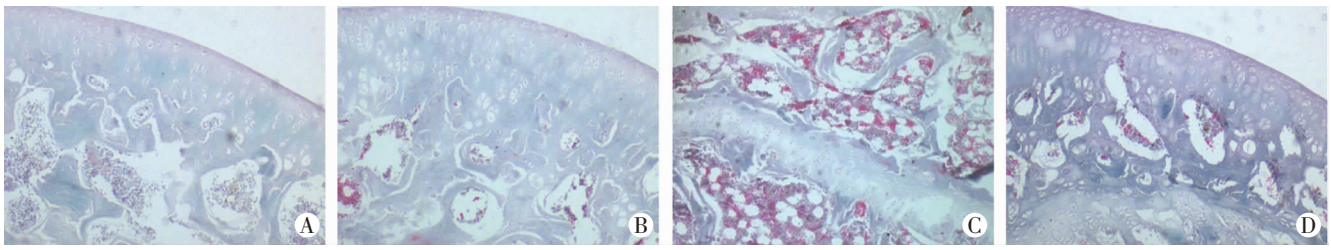
2.2.2　TLR4 蛋白的表达　　TLR4 蛋白的阳性染色呈棕黄色颗粒,位于细胞膜和细胞质,主要表达于软骨细胞、脂肪细胞,其次成骨细胞和骨细胞也可见少量表达。实验组 2 周时阳性细胞表达强度与对照组无明显差别,6 周后开始表达强度升高,10 周时 TLR4 表达强度显著升高,而对照组 10 周时仍然有较高表达(图 3)。计量结果显示,实验组无论是阳性表达细胞的数量和表达强度都高于对照组,且随着时间的延长逐渐增高,差异有统计学意义($P<0.05$)。实验组同组内各个时间点的比较差异有统计学意义($P<0.05$,表 3)。

2.2.3　实验组不同时间点 GPR48 和 TLR4 蛋白表达的相关性　　经 Pearson 相关性分析($r=-0.821$,$P<0.05$),相关性在 0.01 时有统计学意义。实验组不同时间点 GPR48 和 TLR4 蛋白的表达呈负相关。



A:实验组 2 周;B:实验组 10 周;C:对照组 2 周;D:对照组 10 周

图 1　2 组大鼠不同时间点组织学观察　(HE ×100)



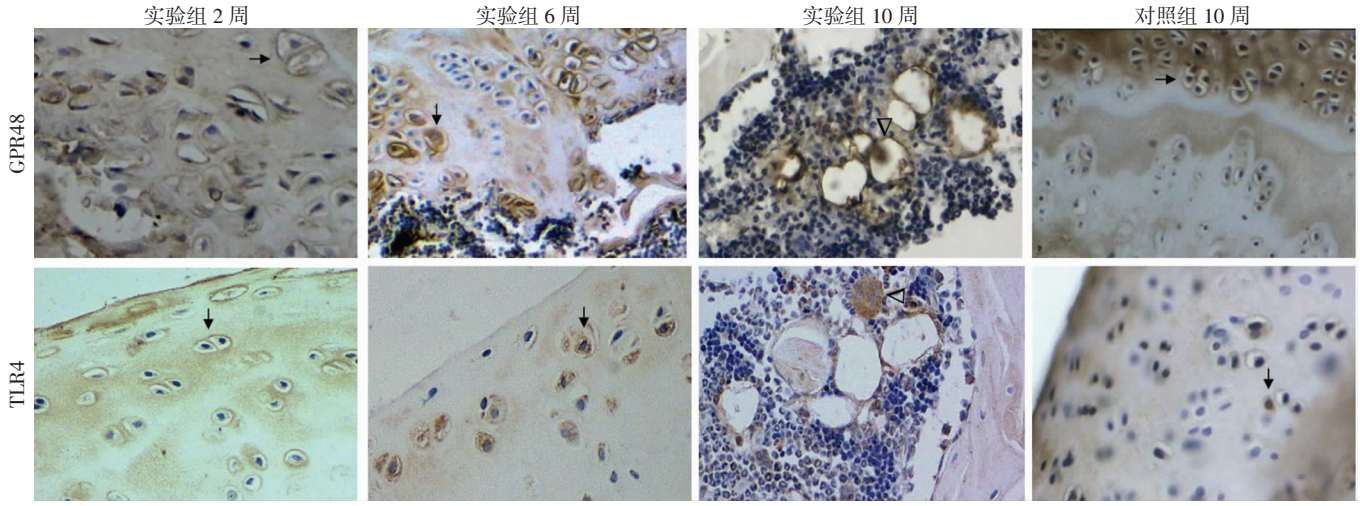
A:实验组 2 周;B:实验组 6 周;C:实验组 10 周;D:对照组 10 周

图 2　2 组大鼠不同时间点 Masson 三色染色观察　(×40)

表 3　2 组大鼠不同时间点 GPR48 与 TLR4 的相对表达量比较　($\bar{x}\pm s$)

组别	n	GPR48				TLR4			
		2 周	6 周	8 周	10 周	2 周	6 周	8 周	10 周
实验组	8	7.04 ± 0.56	5.87 ± 0.53[a]	4.82 ± 0.52[a]	3.94 ± 0.49[a]	6.03 ± 0.56	6.93 ± 0.58[a]	8.10 ± 0.46[a]	8.70 ± 0.95[a]
对照组	6	8.08 ± 0.58	7.74 ± 0.16	7.77 ± 0.69	7.60 ± 0.27	5.17 ± 0.21	5.48 ± 0.27	7.77 ± 0.69	7.60 ± 0.27

a: $P<0.05$,与对照组比较



↑:示软骨细胞膜和胞浆染色阳性;Δ:示破骨细胞染色阳性

图3 2组大鼠不同时间点免疫组化观察GPR48与TLR4的表达(×200)

2.3 RT-PCR定量分析

实时定量PCR结果显示,以对照组(0 μmol/L)GPR48和TLR4 mRNA表达为1,实验组GPR48 mRNA的相对表达随着时间的延长而下降,而TLR4 mRNA随着时间的延长而升高,实验组同组内各个时间点的比较,差异有统计学意义($P<0.05$,表4)。经Pearson相关分析,实验组不同时间点GPR48与TLR4 mRNA表达呈负相关($r=-0.791$,$P<0.05$)。

表4 实验组不同时间点GPR48和TLR4 mRNA的相对表达量($\bar{x}\pm s$)

时间	GPR48	TLR4
2周	5.553±0.232	7.670±0.160
6周	4.618±0.186	8.650±0.184
8周	3.688±0.149	9.517±0.217
10周	2.695±0.238	10.565±0.133

3 讨论

国际骨循环研究会(ARCO)及美国骨科医师协会(AAOS)将骨坏死的病理特点归纳为:骨小梁和骨髓坏死同时伴随有一定程度的组织修复[5]。激素性股骨头坏死的早期组织学改变是骨细胞核固缩,空骨陷窝增多,骨髓腔内脂肪细胞增生和肥大,无典型骨小梁和骨髓坏死。大剂量长期应用激素导致股骨头缺血性坏死在临床和实验研究中已被证实[6],Kerachian等[7]采用给大鼠注射缓释地塞米松2.26 mg/(kg·d)的方法,3个月后通过检测空骨陷窝率、单位面积内骨小梁面积百分比、最大脂肪细胞直径等,成功建立了大鼠激素性股骨头坏死动物模型。本研究采用该方法制模,并用组织病理学评价方法证实了该模型的成功性。

对于激素所引起的股骨头无菌缺血坏死的确切机制尚不完全清楚,可能与脂代谢紊乱、骨内压力增高、微血管损伤等有关,最终破骨细胞活动增强,骨细胞凋亡加速,从而加速骨坏死。近年研究表明,转录因子如OPG[8]、Osterix[9]、VEGF[10]等分子在股骨头坏死和修复过程中发挥着重要作用,但具体信号途径和联控方式尚未不清楚。

值得注意的是,外界信号必须经过膜分子的介导,才能进入细胞内通过刺激转录因子发挥生物学效应,因此膜分子信号被称作信号转导级联反应中的第一闸门[11]。GPR48属于G蛋白偶联受体的糖蛋激素受体亚家族,研究发现GPR48在多种器官发育中发挥着关键作用,如对骨、软骨、肾、肝、造血发育等有重要的调节作用,尤其在骨、软骨发育过程中呈现高表达[14-15]。利用基因敲除技术研究表明,GPR48的灭活可显著引起小鼠肢体短小、骨质疏松、骨骼发育迟滞、血管发育不良及贫血等表征,多种细胞的增殖、分化和迁移能力显著下降[16-17]。因此,GPR48作为膜信号分子,对骨代谢调节起着重要作用,但在激素性股骨头无菌坏死过程中是否发挥作用尚不明确。本研究利用大鼠制模,初步表明激素诱导股骨头坏死过程中,GPR48蛋白和mRNA表达量均逐渐下降,同时伴随着骨组织坏死的不断加重,提示GPR48在激素性股骨头过程中发挥着某种调节机制,进一步研究其对关键靶向因子的调节过程将有助于深入揭示其调节机制。

激素性股骨头坏死与免疫炎症反应密切相关,可促进多种炎症因子的释放,包括IL-2、GM-CSF和IFN-γ等[20],但相关分子联控机制并不清楚。TLRs在天然免疫中发挥着重要作用,TLR4隶属于Toll家族,为Ⅰ型跨膜蛋白,与IL-1有着相似的胞内区,是介导细菌脂多糖(LPS)胞外到胞内信号转导的主要通

路[2,21]。TLR4 主要存在于中性粒细胞、巨噬细胞和树突状细胞的表面,可以诱导细胞释放炎性因子[2,10],如 TLR4 活化后可上调核因子 kappaB(NF-κB)的表达,诱导致炎细胞因子(IL-1、IL-6、IL-8、TNF-α 等)的释放,导致免疫反应的发生[21]。最新研究表明激素性股骨头坏死能够激活 TLR4 介导的炎症信号转导通路[1],从而调节坏死过程。本研究同样发现在大鼠激素性股骨头坏死发展进程中,伴随着坏死过程的不断加重,TLR4 表达无论在 mRNA 还是在蛋白表达上都是逐渐升高,说明 TLR4 在其中发挥着介导和调控作用,但该过程是否受到上游膜分子的调控尚不明确。

新近研究发现 GPR48 能够通过负性调控 TLR2/4 等因子介导炎症免疫反应过程[3-4],提示 GPR48 可能是 TLR4 的上游分子,因此两者联控调节模式就可能为研究激素性股骨头坏死提供新线索。本实验采用免疫组织化学和 RT-PCR 方法对激素性股骨头坏死中 GPR48 和 TRI4 的表达及相关性进行检测发现,实验组 GPR48 蛋白和 mRNA 表达量均显著降低,并且随着时间的延长有下降的趋势,而 TLR4 的表达随时间延长则表现为升高的趋势,这两个分子间呈现负相关表达模式,且与激素诱导下骨坏死病理发展过程和炎症免疫反应进程一致,因此,可以初步推测 GPR48 和 TLR4 的表达联控在股骨头坏死中发挥着某种调节效应。

综上所述,本实验从 GPR48 和 TLR4 联动表达模式角度研究激素性股骨头坏死的分子机制,初步结果显示这两种分子在坏死机制中介导了炎症免疫反应,但具体调节方式和信号途径还有待于深入探讨。

参考文献:

[1] Escoubet-Lozach L, Benner C, Kaikkinen M U, *et al*. Mechanisms establishing TLR4-responsive activation states of inflammatory response genes[J]. PLoS Genet, 2011, 7(12): e1002401.

[2] Song H, Luo J, Luo W, *et al*. Inactivation of G-protein-coupled receptor 48 (Gpr48/Lgr4) impairs definitive erythropoiesis at midgestation through down-regulation of ATF4 signaling pathway[J]. J Biol Chem, 2008, 283(52): 36687-36697.

[3] Luo J, Zhou W, Zhou X, *et al*. Regulation of bone formation and remodeling by G-protein-coupled receptor 48[J]. Development, 2009, 136(16): 2747-2756.

[4] Du B, Luo W, Li R, *et al*. Lgr4/Gpr48 negatively regulates TLR2/4-associated pattern recognition and innate immunity by targeting CD14 expression[J]. J Biol Chem, 2013, 288(21): 15131-15141.

[5] Schmitt-Sody M, Kirchhoff C, Mayer W, *et al*. Avascular necrosis of the femoral head: inter- and intraobserver variations of Ficat and ARCO classifications[J]. Int Orthop, 2008, 32(3): 283-287.

[6] Yamashita R, Takegawa Y, Sakumoto M, *et al*. Defective development of the gall bladder and cystic duct in Lgr4- hypomorphic mice[J]. Dev Dyn, 2009, 238(4): 993-1000.

[7] Kerachian M A, Harvey E J, Cournoyer D, *et al*. A rat model of early stage osteonecrosis induced by glucocorticoids[J]. J Orthop Surg Res, 2011, 6: 62.

[8] 王建忠, 高鸿雁, 王坤正, 等. 激素性股骨头坏死 BMSCs 骨保护素/NFκB 受体活化因子配基 mRNA 的表达[J]. 中国修复重建外科杂志, 2009, 23(7): 777-780.

[9] Ma X L, Liu Z P, Ma J X, *et al*. Dynamic expression of Runx2, Osterix and AJ18 in the femoral head of steroid-induced osteonecrosis in rats[J]. Orthop Surg, 2010, 2(4): 278-284.

[10] El-Achkar T M, Dagher P C. Renal Toll-like receptors: recent advances and implications for disease[J]. Nat Clin Pract Nephrol, 2006, 2(10): 568-581.

[11] Perros F, Lambrecht B N, Hammad H. TLR4 signalling in pulmonary stromal cells is critical for inflammation and immunity in the airways [J]. Respir Res, 2011, 12: 125.

[12] Loh E D, Broussard S R, Liu Q, *et al*. Chromosomal localization of GPR48, a novel glycoprotein hormone receptor like GPCR, in human and mouse with radiation hybrid and interspecific backcross mapping [J]. Cytogenet Cell Genet, 2000, 89(1/2): 2-5.

[13] Hsu S Y, Liang S G, Hsueh A J. Characterization of two LGR genes homologous to gonadotropin and thyrotropin receptors with extracellular leucine-rich repeats and a G protein-coupled, seven-transmembrane region[J]. Mol Endocrinol, 1998, 12(12): 1830-1845.

[14] Mazerbourg S, Bouley D M, Sudo S, *et al*. Leucine-rich repeat-containing, G protein-coupled receptor 4 null mice exhibit intrauterine growth retardation associated with embryonic and perinatal lethality [J]. Mol Endocrinol, 2004, 18(9): 2241-2254.

[15] Jin C, Yin F, Lin M, *et al*. GPR48 regulates epithelial cell proliferation and migration by activating EGFR during eyelid development[J]. Invest Ophthalmol Vis Sci, 2008, 49(10): 4245-4253.

[16] Weng J, Luo J, Cheng X, *et al*. Deletion of G protein-coupled receptor 48 leads to ocular anterior segment dysgenesis (ASD) through down-regulation of Pitx2[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2008, 105(16): 6081-6086.

[17] Li X Y, Lu Y, Sun H Y, *et al*. G protein-coupled receptor 48 upregulates estrogen receptor alpha expression via cAMP/PKA signaling in the male reproductive tract[J]. Development, 2010, 137(1): 151-157.

[18] Yu S, Franceschi R T, Luo M, *et al*. Critical role of activating transcription factor 4 in the anabolic actions of parathyroid hormone in bone[J]. PLoS One, 2009, 4(10): e7583.

[19] Masuoka H C, Townes T M. Targeted disruption of the activating transcription factor 4 gene results in severe fetal anemia in mice[J]. Blood, 2002, 99(3): 736-745.

[20] Okazaki S, Nishiani Y, Nagoya S, *et al*. Femoral head osteonecrosis can be caused by disruption of the systemic immune response via the toll-like receptor 4 signalling pathway[J]. Rheumatology (Oxford), 2009, 48(3): 227-232.

[21] Yousif N G, Al-Amran F G. Novel Toll-like receptor-4 deficiency attenuates trastuzumab (Herceptin) induced cardiac injury in mice[J]. BMC Cardiovasc Didord, 2011, 11: 62.

(**收稿**:2013-10-30;**修回**:2013-11-17)

(编辑 龙 亮)