

# TLR4/NF- $\kappa$ B 通路在异氟醚预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护中的作用

芦曼 陈永权

**【摘要】**目的 探讨 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路在异氟醚预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤保护中的作用,为防治心肌缺血/再灌注损伤提供新的理论依据。方法 将成年雄性 SD 大鼠 40 只随机分成 5 组:假手术组(S 组)、缺血再灌注损伤组(IR 组)、异氟醚预处理组(ISO 组)、TLR4 抑制剂 TAK-242 组(T 组)、异氟醚+TAK-242 预处理组(ISOT 组),每组 8 只。S 组左冠状动脉前降支只穿线不结扎;IR 组只进行缺血再灌注;ISO 组:吸入 1.0MAC 异氟醚 30min,停止吸入 15min;T 组:予尾静脉注射 TLR4 受体抑制剂 TAK-242 (10mg/kg);ISOT 组:吸入异氟醚前 1min 尾静脉注射 TAK-242(10mg/kg),之后建立缺血再灌注模型。再灌注完成后取出心脏,HE 染色在光学显微镜下观察心肌组织形态学变化并测定各组大鼠心肌梗死面积;分别采用 RT-PCR 和 Western blot 技术检测心肌组织中 TLR4 受体在转录和蛋白水平上的变化,以及 NF- $\kappa$ B 的表达情况。结果 与 IR 组比较,其余各组 TLR4 mRNA 和 TLR4 表达水平均明显降低(均  $P < 0.01$ );与 ISO、T 组比较,ISOT 组 TLR4 mRNA 和 TLR4 表达显著降低(均  $P < 0.01$ );与 ISO 组比较,T 组 TLR4 mRNA 和 TLR4 表达显著降低(均  $P < 0.01$ )。与 IR 组比较,其余各组 NF- $\kappa$ B 的表达显著降低( $P < 0.01$ );与 T、ISOT 组比较,ISO 组 NF- $\kappa$ B 的表达均明显降低(均  $P < 0.01$ )。与 IR 组比较,其余各组心肌梗死面积均明显减少( $P < 0.01$ );与 ISO 组和 T 组比较,ISOT 组心肌梗死面积显著减小( $P < 0.01$ );而 ISO 组和 T 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。结论 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路参与了异氟醚预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用。

**【关键词】** 缺血再灌注损伤 心肌保护 异氟醚 TLR4 NF- $\kappa$ B

Isoflurane preconditioning protects myocardium after ischemic-reperfusion injury in rats through toll-like receptor 4/NF- $\kappa$ B signaling pathway LU Man, CHEN Yongquan. Department of Anesthesiology, the First Affiliated Hospital of Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310006, China

**【Abstract】** Objective To investigate the effect of isoflurane preconditioning on myocardium after ischemia/reperfusion (I/R) injury in rats and its relation to toll-like receptor 4 (TLR4)/NF- $\kappa$ B signaling pathway. Methods Forty SD rats were randomly divided into five groups with 8 in each: sham-operated group (group S), ischemia/reperfusion group (group IR), isoflurane preconditioning group (group ISO), TAK-242 inhibitor group (group T) and isoflurane preconditioning and TAK-242 inhibitor group (group ISOT). The rats were given 1.0 MAC isoflurane inhalation for 30min before I/R induced; TLR4 receptor inhibitor TAK-242 10mg/kg was injected through tail vein 1 minute before inhaling isoflurane, and ischemic/reperfusion model was induced by ligation of anterior descending coronary artery. The myocardial tissue samples were obtained at the end of reperfusion. The size of myocardial infarction was measured by light microscope with HE staining. The expression of TLR4 mRNA and protein in myocardial tissue was detected by RT-PCR and Western blot, respectively, the expression of NF- $\kappa$ B was detected by Western blotting. Results Compared with group IR, the expression levels of TLR4 mRNA and protein was significantly lower in other groups ( $P < 0.01$ ), compared with groups ISO and T, the expression of TLR4 mRNA and protein was down-regulated significantly ( $P < 0.01$ ) in group ISOT, compared with group ISO, the expression of TLR4 mRNA and protein was down-regulated significantly ( $P < 0.01$ ) in group T. Compared with group IR, the expression of NF- $\kappa$ B protein in other groups decreased significantly ( $P < 0.01$ ), compared with groups T and ISOT, the expression of NF- $\kappa$ B protein in group ISO decreased significantly ( $P < 0.01$ ). Compared with group IR, the size of myocardial infarction in other experimental groups were significantly reduced ( $P < 0.01$ ), compared with

doi: 10.12056/j.issn.1006-2785.2017.39.15.2017-63

作者单位: 310006 杭州, 浙江省中医院麻醉科(芦曼); 皖南医学院附属第一医院麻醉科(陈永权)

通信作者: 陈永权, E-mail: chenylq263@163.com

group ISO and T, the infarct size was significantly reduced in group ISOT ( $P < 0.01$ ), and there was no difference between group ISO and group T ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** TLR4/NF- $\kappa$ B signaling may be involved in protective effect of isoflurane preconditioning against myocardial ischemia-reperfusion injury in rats.

**【Key words】** Ischemia reperfusion injury Isoflurane Myocardial preservation Toll-like receptor 4 NF- $\kappa$ B

心肌缺血再灌注损伤是心肺复苏(CPR)、心肌梗死溶栓、心脏移植以及心脏瓣膜置换等治疗过程中心肌发生的主要病理生理过程。近年来,随着心脏手术及心脏病非心脏手术的开展,人们发现异氟醚预处理对心肌缺血再灌注损伤有保护作用。有研究发现缺血预适应可通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路对缺血再灌注的大鼠心肌起保护作用<sup>[1]</sup>。然而,异氟醚是否通过 TLR4/NF- $\kappa$ B 这条信号通路起到心肌保护作用尚不得而知。笔者旨在探究 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路在异氟醚预处理心肌保护中起的作用进行了研究,以期对异氟醚的心肌保护机制探索提供新思路。

## 1 材料和方法

**1.1 材料** SPF 级成年雄性 SD 大鼠 40 只,体重(300±20)g,购自南京青龙山实验动物饲养公司。大鼠进行分笼饲养,饲养温度控制在 18~22℃,饲养环境符合 12h 昼夜循环。

**1.2 实验分组处理** 40 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组:假手术组(S 组)、缺血再灌注组(IR 组)、异氟醚预处理组(ISO 组)、TAK-242 抑制剂组(T 组)和异氟醚+TAK-242 预处理组(ISOT 组),每组 8 只。S 组:左冠状动脉前降支穿 5-0 线不结扎持续 150min;IR 组:建立缺血再灌注模型;ISO 组:先吸入 1.0 MAC 的异氟醚 30min,接着吸入 30%氧浓度的空气 15min,建立缺血再灌注模型;T 组:参照文献[2],尾静脉注射 TLR4 抑制剂 TAK-242(10mg/kg),后行缺血再灌注;ISOT 组:吸入异氟醚前 1min 尾静脉注射 TAK-242(10mg/kg),然后吸入 1.0MAC 异氟醚 30min,接着吸入 30%氧气 15min,后建立缺血再灌注模型。

**1.3 大鼠缺血再灌注模型制备** 实验前大鼠禁食 8h,腹腔注射 3%戊巴比妥钠 30~40mg/kg 进行麻醉。翻正反射消失后将大鼠仰卧固定,行气管切开插管,接小动物呼吸机(北京众实迪创)行机械通气,吸入氧浓度为 30%,潮气量为 10~15ml/kg,频率 60~70 次/min,根据血气调节呼吸频率和潮气量,维持 PaCO<sub>2</sub> 在 25~40mmHg,保持室温在 25℃。手术部位备皮后用碘伏消毒,持续监测大鼠心电活动。于左侧第 3、4 肋,依次切开皮肤、胸前组织、肋间肌肉,开胸后使用眼科专用撑开器撑开肋骨,

打开心包,暴露出心脏,于左心耳根部下方 2mm 处,穿入 5-0 无损伤缝合线,缝线末端穿入自制的橡皮圈套管,结扎左冠状动脉钱降支 30min。当心电图显示 ST 段弓背向上抬高,结扎线下心肌颜色变暗,左心室发绀苍白时,认定心肌已经缺血,剪断结扎线后再灌注 120min,原苍白区出现充血反应即为再灌注成功的标志。于再灌注 120min 后处死大鼠,同时迅速切取病变心肌(包括边缘部分正常心肌)组织,0.9%氯化钠溶液冲洗后置于-80℃冰箱备用。排除心肌缺血再灌注模型制备时心肌缺血前心电图有异常以及实验过程未结束就死亡的大鼠。

### 1.4 观测指标

**1.4.1 RT-PCR 测定 TLR4 mRNA 表达** 用 Trizol 法提取心肌组织总 RNA,用紫外线分光光度测量 A260/280 的比值鉴定 RNA 的纯度和浓度。取 1 $\mu$ g 总 RNA 进行逆转录。逆转录条件:65℃5min,37℃50min,70℃10min。以 GAPDH 为内参,设计引物:GAPDH 上游为 TGGAGTC-TACTGGCGTCTT,下游为 TGTCATATTTCTCGTGGTTC,扩增产物 138bp;TLR4 上游为 CTGCATAGAGGTAGTTC-CT,下游为 TCCAGCCACTGAAGTTCTGA,扩增产物 128bp。通过逆转录合成的 cDNA 2 $\mu$ l 进行 PCR 扩增。PCR 反应条件为:95℃10min,95℃15s,60℃60s,循环扩增后用 1%琼脂糖凝胶进行电泳,后将凝胶置于凝胶成像系统观察和分析。

**1.4.2 Western-blot 测定 TLR4、NF- $\kappa$ B 的表达** 选取心肌组织(5mg)放于无菌 EP 管中,加入 200 $\mu$ l 裂解液。用匀浆器将组织匀浆直至充分裂解。离心机设置于 12 000r,离心 10min,离心后取出上清液。各细胞样本的蛋白含量采用考马斯亮蓝法测定,灌胶上样进行 SDS 聚丙烯酰胺凝胶恒压电泳,待电泳使染料达分离胶的适当位置时停止电泳。半干法将蛋白转移至 PVDF 膜,封闭,洗膜,按照对应分子量切割后分别置于 1:300 稀释的兔抗大鼠 TLR4、NF- $\kappa$ Bp65 一抗溶液中,4℃杂交过夜,用洗膜液漂洗后加入 1:3 000 稀释的二抗,摇床上杂交 1h,然后取出用洗膜液冲洗,ECL 显色,采用 Image J 软件分析灰度值。

**1.4.3 光镜检查** 将取下的左心室经石蜡包埋后,制成病理切片后 HE 染色,由同一位研究人员在光镜下观察

各切片的病理改变。待找到典型梗死区域,拍照后在形态学图像分析系统(JEDA801D,捷达)上分析各个截面的梗死面积,结果以梗死区面积占视野区面积的百分比表示。

1.5 统计学处理 应用 SPSS19.0 统计软件,计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

2.1 各组大鼠 TLR4 mRNA、TLR4 以及 NF- $\kappa$ B 表达的比较 与 IR 组比较,其余各组 TLR4 mRNA 和 TLR4 表达均明显降低(均  $P < 0.01$ );与 ISO、T 组比较,ISOT 组 TLR4 mRNA 和 TLR4 表达显著降低(均  $P < 0.01$ );T 组 TLR4 mRNA 和 TLR4 表达低于 ISO 组(均  $P < 0.01$ )。与 IR 组比较,其余各组 NF- $\kappa$ B 表达均显著降低(均  $P < 0.01$ );与 T、ISOT 组比较,ISO 组 NF- $\kappa$ B 表达均显著降低(均  $P < 0.01$ ),详见表 1。

2.2 各组大鼠心肌组织结构光镜检查结果 S 组心肌

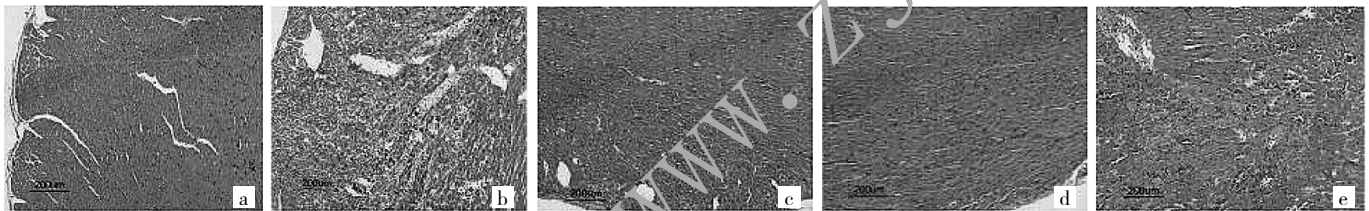


图 1 各组心肌细胞光镜检查结果(a:S 组;b:IR 组;c:ISO 组;d:T 组;e:ISOT 组;HE 染色,  $\times 100$ )

2.3 各组大鼠心肌梗死面积的比较 与 IR 组比较,其余各组心肌梗死面积均明显减少(均  $P < 0.01$ );ISOT 组与 ISO 组和 T 组比较,心肌梗死面积均明显减小(均  $P < 0.01$ );而 ISO 组和 T 组比较差异均无统计学意义(均  $P > 0.05$ ),详见表 2。

表 2 各组大鼠心肌梗死面积的比较(%)

组别	n	心肌梗死区 / 视野区总面积
IR 组	8	39.42 $\pm$ 7.49
ISO 组	8	20.43 $\pm$ 1.75 <sup>△</sup>
T 组	8	22.62 $\pm$ 1.64 <sup>△</sup>
ISOT 组	8	16.59 $\pm$ 3.04 <sup>*</sup>

注:与 IR 组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.01$ ;与 ISOT 组比较,<sup>△</sup> $P < 0.01$

## 3 讨论

随着缺血性心肌病发病率的不断升高,缺血性心肌病已成为心脏病非心脏手术的主要死亡原因,而缺血再灌注损伤成为了当今临床要解决的难题。全身麻醉药物种类繁多,选用具有心肌保护作用的麻醉药物有助于提高心脏手术及心脏病非心脏手术预后。吸入麻醉药如异

表 1 各组大鼠 TLR4 mRNA、TLR4 以及 NF- $\kappa$ B 表达的比较

分组	n	TLR4 mRNA	Protein TLR4	NF- $\kappa$ B
IR 组	8	3.10 $\pm$ 0.05	1.82 $\pm$ 0.05	1.65 $\pm$ 0.01
ISO 组	8	2.22 $\pm$ 0.05 <sup>*△</sup>	1.44 $\pm$ 0.01 <sup>*△</sup>	1.13 $\pm$ 0.01 <sup>*</sup>
T 组	8	1.50 $\pm$ 0.05 <sup>*△</sup>	1.12 $\pm$ 0.01 <sup>*△</sup>	1.34 $\pm$ 0.01 <sup>*△</sup>
ISOT 组	8	1.11 $\pm$ 0.08 <sup>*</sup>	0.94 $\pm$ 0.03 <sup>*</sup>	1.24 $\pm$ 0.01 <sup>*△</sup>
S 组	8	1.64 $\pm$ 0.02 <sup>*</sup>	1.22 $\pm$ 0.05 <sup>*</sup>	1.42 $\pm$ 0.01 <sup>*</sup>

注:与 IR 组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.01$ ;与 ISO 组比较,<sup>△</sup> $P < 0.01$ ;与 ISOT 组比较,<sup>△</sup> $P < 0.01$ ;与 ISO 组比较,<sup>\*</sup> $P < 0.01$

组织形态结构基本正常,心肌细胞形态正常,炎性细胞少见,心肌纤维排列较紧密。IR 组心肌细胞形态结构紊乱,细胞萎缩,横纹消失,中性粒细胞、淋巴细胞等炎性细胞浸润明显,间质出血明显,心肌纤维走向紊乱。ISO 组与 T 组能减少心肌组织损伤,心肌细胞萎缩,间质出血及炎性细胞浸润较 IR 组有所减轻。ISOT 组则能明显减轻心肌细胞受损情况,其光镜下的微观变化与 S 组基本接近(图 1)。

氟醚、七氟醚在已证实可产生类似于缺血预适应的效应,增强缺血后的心肌功能,减少心肌梗死面积,从而起到心肌保护作用<sup>[3]</sup>。Cason 等<sup>[4]</sup>于 1997 年率先用实验证明了吸入麻醉药异氟醚预处理较 IR 组可以使兔心肌梗死面积明显缩小,这种作用被称为麻醉药物预处理(APC)。Li 等<sup>[5]</sup>通过实验证明了异氟醚预处理对缺血再灌注大鼠的心脏保护强于七氟醚,他们发现缺血再灌注后 1h,七氟醚和异氟醚预处理组和 IR 组比较,虽都有心肌保护作用,但七氟醚预处理组的左心室收缩功能只能恢复到基础值的 23%,异氟醚组则可恢复到 42%。同时,另一项研究证实实用 1%~2%异氟醚预处理可达到对缺血再灌注心肌的延迟性保护作用,并且不会对心血管有明显的抑制<sup>[6]</sup>。因此本实验选用 1.0MAC 异氟醚进行预处理。

TLR4 作为炎症反应的其中一个闸门,其适度表达可开启正常的防御以维持机体功能稳定;但若过度表达则可引起相关的组织损伤。而心肌缺血再灌注损伤主要原因就是炎症反应与心肌细胞死亡的恶性循环。TLR4 对 LPS 识别的胞内信号转导通路有接头蛋白髓样细胞

分化因子(MyD88)依赖的信号通路和 MyD88 非依赖的信号通路<sup>[7]</sup>。在 TLR4 的信号转导中,这两条通路分别引起早期和晚期的 NF- $\kappa$ B 活化。TLR4 介导 LPS 胞内信号传递至少要涉及几条通路,但最终都要激活 NF- $\kappa$ B 或丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)。

NF- $\kappa$ B 是调控多基因转录的防御性蛋白,主要通过调控炎症介质的释放和细胞凋亡参与心肌缺血再灌注的病理生理过程。NF- $\kappa$ B 信号转导通路心肌细胞凋亡是密切相关的<sup>[8]</sup>,大量研究证实通过抑制 NF- $\kappa$ B 的活化,下调该通道下游的促炎因子的表达,可促进缺血再灌注后心功能的恢复<sup>[9-12]</sup>。其作用机制为: NF- $\kappa$ B 与抑制性蛋白 I $\kappa$ B 结合后以二聚体的形式存在于胞质中呈无活性状态,当一些刺激性因素,如心肌缺血再灌注可通过一系列信号转导使 NF- $\kappa$ B-I $\kappa$ B 二聚体解体,无活性的 NF- $\kappa$ B 活化,并借助核定位信号(NLS)入细胞核内,在核内与 NF- $\kappa$ B 靶基因的特异性序列结合从而启动转录,过度表达一些炎性因子、黏附分子,从而诱发加重 MIRI<sup>[13]</sup>。

杨晶等<sup>[14]</sup>证实,TLR4 受体的激活可通过 MyD88 激活下游的 NF- $\kappa$ B 通路。本研究中使用 TLR4 通路抑制剂 TAK-242。TAK-242 能通过结合 TLR4 胞内区域抑制脂多糖诱导的炎症介质的产生,作为新型的 TLR4 受体阻滞剂,具有分子量小、能迅速分布到组织达到抑制炎症反应的作用。本研究结果显示:与 IR 组比较,使用 TLR4 抑制剂 TAK-242 后,TLR4 mRNA 和 TLR4 蛋白的表达明显下降、NF- $\kappa$ B 表达也相应下降、心肌梗死面积减少,验证了 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路参与大鼠心肌缺血再灌注损伤。同时,使用异氟醚预处理也显著下调了 TLR4 mRNA 和 TLR4 蛋白及 NF- $\kappa$ B 表达水平、缩小了心肌梗死面积。由此可认为 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路参与了异氟醚预处理的心肌保护作用。

TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路只是异氟醚心肌保护众多信号通路中的一条,而研究发现,在此条信号通路上的 TLR4、NF- $\kappa$ B 等都存在有多种上下游物质,而且各个靶点的具体位置及上下游物质相互之间关系尚未明确。因此找寻此条通路上各个重要靶点的具体位置及上下游之间存在何种具体联系将成为日后进一步研究的方向。

#### 4 参考文献

[1] 杨晶,李元建,胡长平.缺血预适应通过抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路

保护大鼠心肌缺血再灌注损伤[J].中南大学学报(医学版),2011,36(10):972-978.

- [2] Matsunaga N, Tsuchimori N, Matsumoto T, et al. TAK-242 (resatorvid), a small-molecule inhibitor of Toll-like receptor (TLR) 4 signaling, binds selectively to TLR4 and interferes with interactions between TLR4 and its adaptor molecules[J]. *Mol Pharmacol*, 2011, 79(1):34-41.
- [3] Nishiyama T. Hemodynamic and catecholamine response to a rapid increase in isoflurane or sevoflurane concentration during a maintenance phase of anesthesia in humans[J]. *J Anesth*, 2005, 19(3):213-217.
- [4] Cason B A, Gamperl A K, Slocum R E, et al. Anesthetic-induced preconditioning: previous administration of isoflurane decreases myocardial infarct size in rabbits[J]. *Anesthesiology*, 1997, 87(5): 1182-1190.
- [5] Li F, Hayes J K, Wong K C, et al. Administration of sevoflurane and isoflurane prior to prolonged global ischemia improves heart function in isolated rat heart[J]. *Acta Anaesthologica Sinica*, 2000, 38(3):113-121.
- [6] Chiari P C, Pagel P S, Tanaka K, et al. Intravenous emulsified halogenated anesthetics produce acute and delayed preconditioning against myocardial infarction in rabbits[J]. *Anesthesiology*, 2004, 101(5): 1160-1166.
- [7] MacLeod H, Wetzler L M. T cell activation by TLRs: a role for TLRs in the adaptive immune response[J]. *Science Signaling*, 2007, 2007(402): 48.
- [8] Kirshenbaum L A. Bcl-2 intersects the NF- $\kappa$ B signalling pathway and suppresses apoptosis in ventricular myocytes[J]. *Clin Invest Med*, 2000, 23(5):322-330.
- [9] Zhang B J, Wang Y L, Wang C Y. Effect of Shenfu injection on nuclear factor- $\kappa$ B during myocardial ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Chin J Traumatol*, 2005, 8(4):200-204.
- [10] Yeh C H, Chen T P, Wu Y C, et al. Inhibition of NF $\kappa$ B activation with curcumin attenuates plasma inflammatory cytokines surge and cardiomyocyte apoptosis following cardiac ischemia/reperfusion[J]. *J Surg Res*, 2005, 125(1):109-116.
- [11] Zhang M, Xu Y J, Saini H K, et al. Pentoxifylline attenuates cardiac dysfunction and reduces TNF- $\alpha$  level in ischemic-reperfused heart[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(2): H832-H839.
- [12] Onai Y, Suzuki J, Kakuta T, et al. Inhibition of I $\kappa$ B phosphorylation in cardiomyocytes attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Cardiovascular research*, 2004, 63(1):51-59.
- [13] Valen G. Signal transduction through nuclear factor kappa B in ischemia-reperfusion and heart failure[J]. *Basic Res Cardiol*, 2004, 99(1):1-7.

(收稿日期:2017-01-09)

(本文编辑:严玮雯)