

RNA 干扰技术下调 Toll 样受体 4 对急性心肌缺血坏死的影响

任云¹, 陈洁², 杜广胜²

(石河子大学医学院第一附属医院 1. 药剂科, 2. 心血管内科, 新疆石河子市 832000)

[关键词] RNA 干扰; Toll 样受体 4; 异丙肾上腺素; 急性心肌缺血坏死

[摘要] **目的** 观察利用 RNA 干扰(RNAi)技术下调 Toll 样受体 4(TLR4)的表达对异丙肾上腺素(ISO)诱导的急性缺血坏死心肌细胞的影响。**方法** 采用大剂量 ISO 注射液连续腹腔注射 3 天,建立小鼠急性心肌缺血坏死模型,分为正常对照组、心肌缺血组(MI 组)、心肌缺血加阴性质粒处理组(PCN 组)和心肌缺血加 siRNA-TLR4 处理组(siRNA-TLR4 组),通过构建好的靶向 TLR4 基因的 siRNA-TLR4 质粒来下调小鼠体内 TLR4 基因的表达,取心肌组织进行 HE 染色,观察各组心肌组织缺血坏死情况,Western blot 检测各组心肌组织 TLR4 的表达变化,利用 TUNEL 法检测各组心肌细胞凋亡率。**结果** siRNA-TLR4 组心肌细胞 TLR4 的表达水平与正常对照组、MI 组、PCN 组相比明显下调,siRNA-TLR4 组心肌缺血损伤较 MI 组和 PCN 组明显减轻,siRNA-TLR4 组心肌细胞凋亡率显著低于 MI 组和 PCN 组(9.39% ± 2.61% 比 61.44% ± 2.34% 和 57.21% ± 4.40%)。**结论** 利用 RNAi 可有效下调小鼠体内 TLR4 的表达,改善 ISO 诱导的急性心肌缺血坏死,提示 RNAi 可为急性心肌缺血坏死治疗提供新的思路。

[中图分类号] R363

[文献标识码] A

Influence of TLR4 Inhibited by RNA Interference on Acute Myocardial Ischemic Necrosis

REN Yun¹, CHEN Jie², and DU Guang-Sheng²

(1. Department of Pharmacy, 2. Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital, Medical College of Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832000, China)

[KEY WORDS] RNA Interference; Toll Like Receptor 4; Isoproterenol; Acute Myocardial Ischemic Necrosis

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the effects of RNA interference (RNAi) downregulating TLR4 of mice with isoproterenol (ISO) induced myocardial ischemic necrosis. **Methods** A myocardial ischemic necrosis model of mice was established by abdominal cavity injection of ISO for 3 days. The rats were divided into four groups: control group, myocardial ischemic group (MI group) and myocardial ischemic treated with negative plasmid group (PCN group), myocardial ischemic treated with siRNA-TLR4 plasmid group (siRNA-TLR4 group). Inhibition of TLR4 by siRNA-TLR4 plasmid was constructed. Pathological changes of myocardial ischemic were observed through myocardial tissue stained with HE. The expression level of TLR4 was detected by Western blot. The variation of cardiomyocytes apoptosis was measured with TUNEL.

Results The expressions of protein of TLR4 in siRNA-TLR4 group were significantly decreased compared with those of control group, PCN group, and MI group. Compared to MI group and PCN group, myocardial ischemic necrosis was relieved in the siRNA-TLR4 group. And numbers of apoptosis cardiomyocytes in siRNA-TLR4 group were lower than those in MI group and PCN group (9.39% ± 2.61% vs. 61.44% ± 2.34% and 57.21% ± 4.40%).

Conclusions RNAi can inhibit TLR4 expression and ameliorat myocardial ischemic necrosis induced by ISO efficiently. It may be promising as a new treatment of acute myocardial ischemic necrosis.

急性心肌缺血坏死影响了心肌的收缩及舒张功能,可导致心律失常、心力衰竭、猝死等心血管事件的发生,严重危害人类健康。近年来研究证实,

在急性心肌缺血坏死的发生发展过程中,Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) 能够通过激活内源性及外源性配体、参与心肌组织的损伤,如果抑制

[收稿日期] 2014-04-09

[基金项目] 石河子大学科学技术研究发展计划项目-高层次人才科研启动资金专项(RCZX201110)

[作者简介] 任云,硕士,主管药师,研究方向为药理学,E-mail 为 miaomiao7634@163.com。陈洁,硕士研究生,研究方向为心血管疾病,E-mail 为 c_j1116@sina.cn。通讯作者杜广胜,博士,主任医师,副教授,硕士研究生导师,研究方向为冠心病的基础和临床,E-mail 为 dugsh@163.com。

TLR4 的作用,可使心肌梗死面积减少^[1]。目前通过 RNA 干扰(RNA interference, RNAi)抑制 TLR4 的表达从而减少心肌细胞凋亡,缓解心肌缺血损伤的相关研究尚不多。故本研究拟应用 RNAi 技术来下调小鼠心肌中 TLR4 的表达,观察其对心肌缺血坏死后的心肌细胞凋亡产生的影响,以探索该方法能否缓解急性心肌缺血坏死。

1 材料和方法

1.1 实验动物和试剂

健康雌性 6~8 周龄 BALB/c 小鼠 30 只,体重 18~20 g。RIPA 蛋白裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、细胞凋亡检测试剂盒(江苏碧云天公司),兔抗 TLR4 蛋白多克隆抗体(美国 Santa Cruze 公司)。

1.2 重组质粒的构建

前期实验已成功构建了 siRNA 质粒,并进行 BALB/c 小鼠原代心肌细胞的培养及质粒转染^[2],通过类似方法构建、检测和筛选出了沉默效果最明显的 siRNA-TLR4 质粒。

1.3 动物模型的制备及分组

BALB/c 小鼠连续 3 天腹腔注射异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)注射液 20 mg/(kg·d),建立小鼠心肌缺血坏死模型。健康 6~8 周龄 BALB/c 小鼠随机分为正常对照组($n=6$)、心肌缺血组(MI 组, $n=8$)、心肌缺血加阴性质粒处理组(PCN 组, $n=8$)和心肌缺血加 siRNA-TLR4 处理组(siRNA-TLR4 组, $n=8$),正常对照组:每只小鼠给予总体积为 1 mL 的 0.9% 氯化钠溶液,通过尾静脉快速注入小鼠体内,5 天后给予 1 mL 的 0.9% 氯化钠溶液腹腔注射,连续 3 天。MI 组:每只小鼠给予总体积为 1 mL 的 0.9% 氯化钠溶液,通过尾静脉快速注入小鼠体内,5 天后给予 ISO 注射液腹腔注射,连续 3 天。PCN 组:每只小鼠给予阴性质粒 PCN,加入总体积为 1 mL 的 0.9% 氯化钠溶液,通过尾静脉快速注入小鼠体内,5 天后给予 ISO 注射液腹腔注射,连续 3 天。siRNA-TLR4 组:每只小鼠给予 siRNA-TLR4 质粒,加入总体积为 1 mL 的 0.9% 氯化钠溶液,通过尾静脉快速注入小鼠体内,5 天后给予 ISO 注射液腹腔注射连续 3 天。利用小动物活体荧光成像系统观察小鼠体内绿色荧光表达情况。

1.4 病理组织学检测

四组小鼠予以 1% 戊巴比妥钠溶液 0.01 mL/g 腹腔注射麻醉,取下心脏,用生理盐水清洗,取一部分浸入 10% 甲醛固定 24 h,将固定好的心肌组织经乙醇脱水,二甲苯透明,石蜡浸透、包埋、切片,然后

将标本切片常规脱蜡、水化、苏木素-伊红(HE)染色,在显微镜下形态学观察,以控制染色时间,中性树脂封片,光镜下观察各组小鼠心肌缺血坏死情况。

1.5 Western blot 检测心肌组织 TLR4 蛋白的表达

按照说明书操作步骤进行心肌组织蛋白质提取,BCA 法进行蛋白定量,取约 20 μ L 蛋白质用于 10% SDS-PAGE 凝胶电泳,转移至 PVDF 膜,然后用含 5% 脱脂奶粉溶液的 TBST 缓冲液室温封闭 2 h,TLR4 抗体 4 $^{\circ}$ C 孵育过夜, TBST 溶液洗膜 3 次,室温下加入羊抗兔 IgG 抗体孵育 2 h,同法洗膜 4 次,用增强型化学发光试剂显色, X 线片曝光显影,用凝胶成像分析系统进行灰度扫描, Quantity one 软件对结果进行定量分析,目的基因蛋白表达量以其与内参照 β -actin 条带的灰度比值(相对光密度值)表示。

1.6 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡率

将心肌组织切片常规脱蜡、水化,严格按照 TUNEL 试剂盒提供的实验步骤进行操作, DAB 显色,苏木精复染,光镜下观察细胞核呈深棕色的为阳性细胞,细胞核呈蓝色的为阴性细胞,未发生凋亡。每只动物选取 3 张切片,每张切片随机选取 5 个不相互重叠的视野,光镜下观察并照相,分别计数阳性细胞和细胞总数,计算心肌细胞凋亡率,细胞凋亡率 = 凋亡细胞/细胞总数 \times 100%,取平均值。

1.7 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件对数据进行分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用方差分析,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 绿色荧光表达情况

siRNA-TLR4 质粒注入小鼠体内后,经小动物活体荧光成像系统观察显示,小鼠体内绿色荧光表达良好(图 1)。

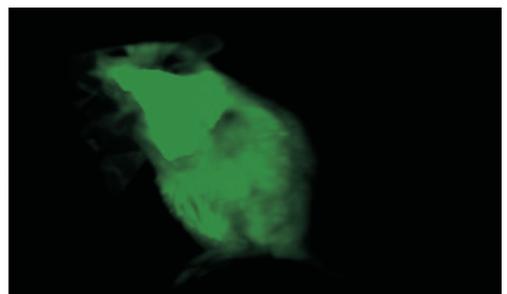


图 1. 质粒注入后小鼠体内绿色荧光的表达

Figure 1. Green fluorescent expressions in the mice after plasmid injection

2.2 心肌组织病理学改变

小鼠心肌组织 HE 染色后光镜下显示,正常对照组心肌纤维排列整齐,无心肌坏死发生;MI 组、PCN 组可见片状心肌缺血坏死改变,病变区可见嗜伊红染色增强,肌纤维排列紊乱、断裂、坏死甚至融

合成片状,可见心肌细胞肿胀,部分心肌细胞出现空泡变性,炎症细胞浸润等,证实本实验通过腹腔注射大剂量 ISO 注射液,成功建立了小鼠心肌缺血坏死模型;siRNA-TLR4 组可见心肌缺血坏死改变,较 MI 组和 PCN 组明显减轻(图 2)。

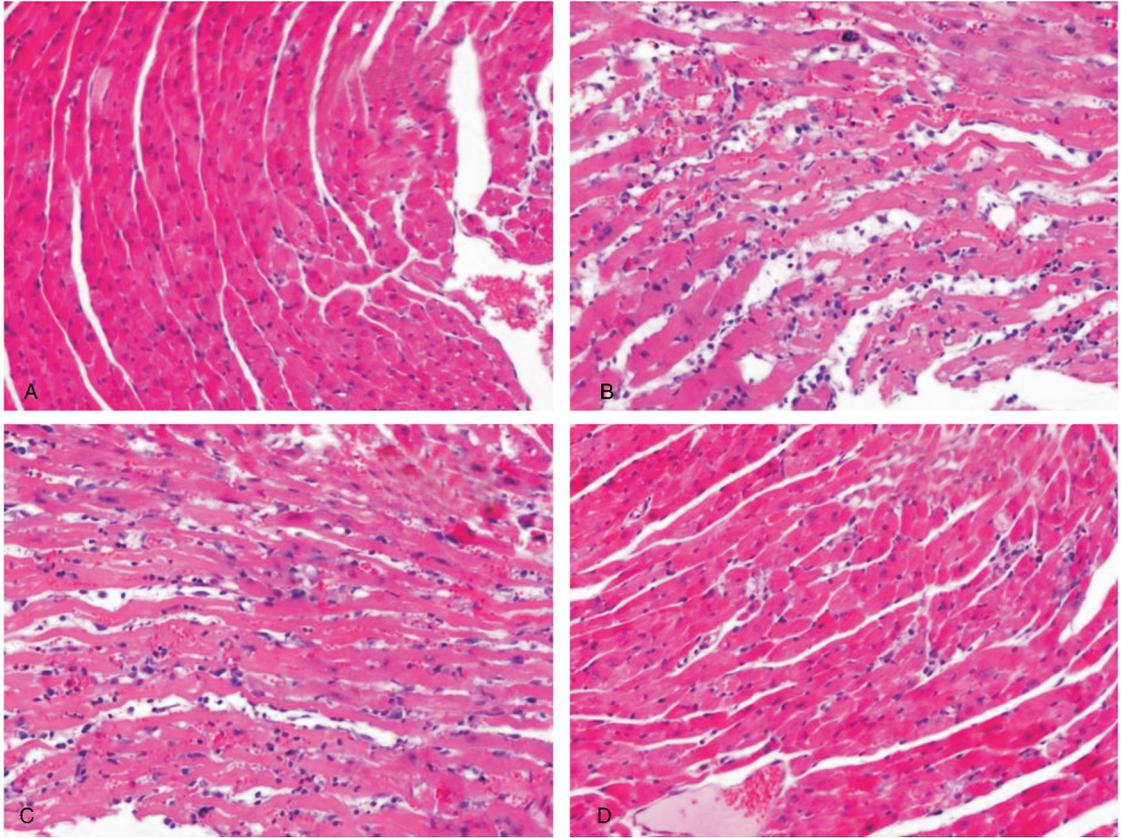


图 2. 心肌组织 HE 染色($\times 200$) A 为正常对照组,B 为 MI 组,C 为 PCN 组,D 为 siRNA-TLR4 组。

Figure 2. HE staining of the myocardial tissue($\times 200$)

2.3 心肌组织内 TLR4 蛋白的表达

siRNA-TLR4 组 TLR4 的表达明显低于正常对照

组、MI 组和 PCN 组($P < 0.01$),表明给予 siRNA-TLR4 质粒后可下调心肌组织 TLR4 表达水平(图 3)。

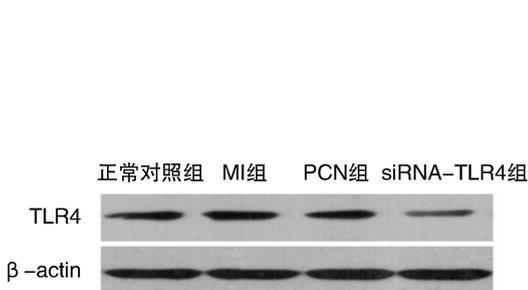
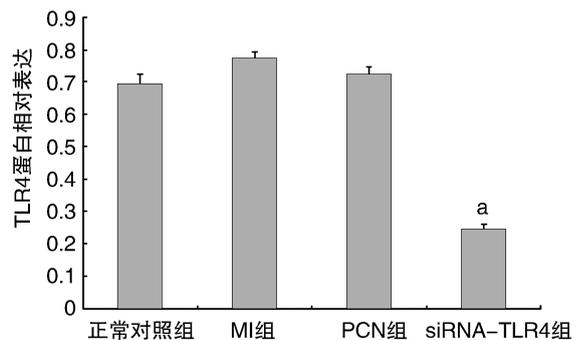


图 3. 心肌组织 TLR4 蛋白的表达 a 为 $P < 0.01$,与正常对照组、PCN 组和 MI 组比较。

Figure 3. Expression of TLR4 protein in cardiac tissue



2.4 心肌细胞凋亡率

siRNA-TLR4 组小鼠心肌细胞凋亡率显著低于

MI 组和 PCN 组,存在显著性差异($9.39\% \pm 2.61\%$ 比 $61.44\% \pm 2.34\%$ 和 $57.21\% \pm 4.40\%$, $P <$

0.01),证实通过下调心肌组织 TLR4 蛋白表达水平

可降低缺血心肌组织内的细胞凋亡率(图 4)。

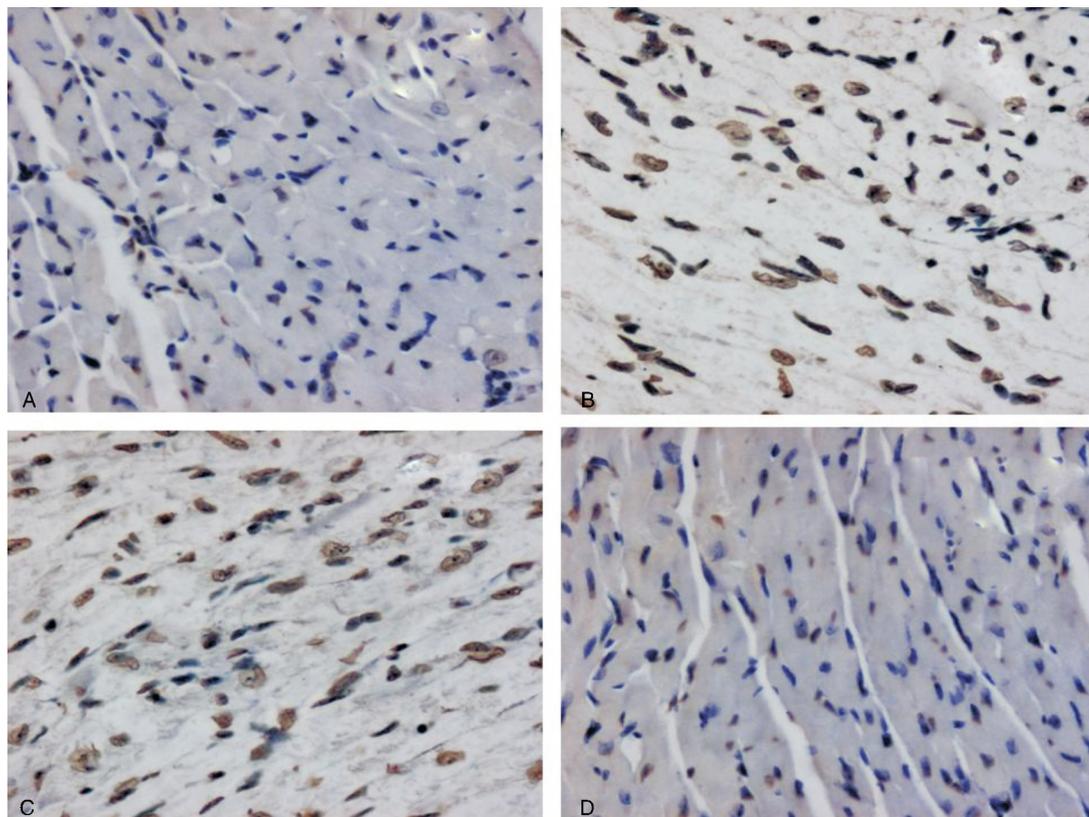


图 4. TUNEL 显示各组心肌细胞凋亡情况(×400) A 为正常对照组,B 为 MI 组,C 为 PCN 组,D 为 siRNA-TLR4 组。

Figure 4. The variation of cardiomyocytes apoptosis was measured with TUNEL(×400)

3 讨论

研究证实,ISO 能够通过干扰线粒体能量代谢、诱导氧化应激反应、活化凋亡基因等方式诱导心肌缺血损伤^[3]。由于该方法操作简单,实验动物损伤小、病死率低,已被广泛应用于各种实验研究。本研究采用大剂量 ISO 注射液连续腹腔注射 3 天,建立小鼠心肌缺血坏死模型,HE 染色示病变区嗜伊红染色增强,肌纤维排列紊乱、断裂、坏死甚至融合成片状,可见心肌细胞肿胀,部分心肌细胞出现空泡变性,炎症细胞浸润等病理改变,证实成功建立小鼠急性心肌缺血模型。

Toll 样受体(Toll like receptor,TLR)是免疫系统中一类关键的的模式识别受体^[4],其中 TLR4 作为 Toll 样受体家族中的重要成员,在天然免疫与获得性免疫中均发挥重要作用^[5]。TLR4 与配体结合后,就可以激活细胞内几条信号传导途径,其中最重要的就是 NF- κ B 的激活,当 TLR4 发生二聚化,其胞质区通过 TIR 结构域募集连接蛋白 MyD88,通过一系列级联反应,激活 NF- κ B,可致 NF- κ B 控制

的一些细胞活性因子的产生,如白细胞介素 6、肿瘤坏死因子等基因转录,这些炎症因子参与了细胞损伤的炎症反应,并且在细胞增殖、分化和凋亡的过程中起到重要的调节作用^[6],该机制在急性心肌缺血坏死过程中也发挥了重要作用^[7]。有研究显示,当 TLR4 表达量低时,可减轻心肌缺血损伤所致的心功能障碍,降低心肌细胞凋亡率^[8];另外,研究表明抑制心肌组织 TLR4 表达后,能够减少通过结扎小鼠左前降支冠状动脉诱导的心肌梗死面积,并使心肌梗死区域促炎因子的释放减少^[9]。目前通过 RNAi 技术下调 TLR4 表达来发挥以上作用的研究较少,RNAi 是具有高度特异性、高效性的转录后基因沉默技术,siRNA 只有与靶基因的编码区严格配对的 siRNA 才能产生 RNAi,微量的 siRNA 就可使目的基因表达显著下降,RNAi 技术在心肌缺血损伤的基因治疗中能否发挥重要的作用,值得探索^[10-12]。

在本研究的前期实验中已设计合成并成功构建了抑制小鼠 TLR4 基因的 siRNA 质粒,通过体外转染小鼠原代心肌细胞,筛选出抑制 TLR4 基因效

率最高、沉默效果较好 siRNA-TLR4 质粒,本研究中将该质粒快速注入小鼠体内后,经过小动物活体荧光成像系统观察,小鼠体内绿色荧光表达良好,表明 siRNA-TLR4 质粒在体内表达良好。从各组心肌组织提取蛋白,采用 Western blot 检测,结果显示,siRNA-TLR4 组 TLR4 蛋白表达水平明显低于正常对照组、MI 组和 PCN 组,表明质粒 siRNA-TLR4 可下调心肌组织 TLR4 表达水平。本研究中发现 TLR4 的表达水平下调后,siRNA-TLR4 组心肌组织缺血坏死的病理学变化较 MI 组和 PCN 组明显减轻,表明下调 TLR4 蛋白表达后可缓解由 ISO 诱导的急性心肌缺血损伤。由于在急性心肌缺血损伤和心室重构的发展过程中,细胞凋亡发挥了重要的作用^[1,13],故本研究应用 TUNEL 法检测了各组心肌细胞凋亡情况,发现在下调心肌组织 TLR4 表达的 siRNA-TLR4 组,心肌细胞凋亡率显著低于 MI 组和 PCN 组,证实通过下调 TLR4 的表达水平,可降低缺血损伤的心肌细胞凋亡率,这可能是 siRNA-TLR4 组心肌缺血损伤明显减轻的原因之一,本研究结果与 Zhao 等^[8]报道的 TLR4 表达明显降低后,小鼠心肌缺血损伤的心肌细胞凋亡情况相类似,关于其信号通路及相关机制有待进一步研究。

综上所述,本研究证实了通过应用 RNAi 技术可以下调小鼠心肌组织内 TLR4 的表达,可减轻由 ISO 诱导的急性心肌缺血损伤,其机制可能与心肌细胞的凋亡减少有关,可为心肌缺血坏死的研究提供新的思路。

[参考文献]

- [1] Usher MG, Duan SZ, Ivaschenko CY, et al. Myeloid mineralocorticoid receptor controls macrophage polarization and cardiovascular hypertrophy and remodeling in mice[J]. *J Clin Invest*, 2010, 120 (9): 3 350-364.
- [2] 杜广胜,文渊,马业新. RNA 干扰下调小鼠心肌细胞可溶性环氧化物水解酶的表达[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19 (3): 206-210.

- [3] Kubavat JB, Asdaq SM. Role of *Sida cordifolia* L. leaves on biochemical and antioxidant profile during myocardial injury[J]. *J Ethnopharmacol*, 2009, 124 (1): 162-165.
- [4] Fallach R, Shainberg A, Avlas O, et al. Cardiomyocyte Toll-like receptor 4 is involved in heart dysfunction following septic shock or myocardial ischemia[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2010, 48 (6): 1 236-244.
- [5] Hua F, Ha T, Ma J, et al. Protection against myocardial ischemia/reperfusion injury in TLR4-deficient mice is mediated through a phosphoinositide 3-kinase-dependent mechanism[J]. *J Immunol*, 2007, 178 (11): 7 317-324.
- [6] McGhan LJ, Jaroszewski DE. The role of Toll-like receptor-4 in the development of multi-organ failure following traumatic haemorrhagic shock and resuscitation[J]. *Injury*, 2012, 43 (2): 129-136.
- [7] Croce K, Libby P. Intertwining of thrombosis and inflammation in atherosclerosis[J]. *Curr Opin Hematol*, 2007, 14 (1): 55-61.
- [8] Zhao P, Wang J, He L, et al. Deficiency in TLR4 signal transduction ameliorates cardiac injury and cardiomyocyte contractile dysfunction during ischemia[J]. *J Cell Mol Med*, 2009, 13 (8A): 1 513-525.
- [9] Timmers L, Sluijter JP, van Keulen JK, et al. Toll-like receptor 4 mediates maladaptive left ventricular remodeling and impairs cardiac function after myocardial infarction[J]. *Circ Res*, 2008, 102 (2): 257-264.
- [10] Zhou Y, Liang Y, Wei J, et al. Lentiviral-mediated p38 MAPK RNAi attenuates aldosterone-induced myocyte apoptosis[J]. *Mol Med Rep*, 2013, 8 (2): 493-498.
- [11] Monaghan M, Greiser U, Wall JG, et al. Interference: an alternative therapy following acute myocardial infarction[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2012, 33 (12): 635-645.
- [12] Hannon GJ. RNA interference[J]. *Nature*, 2002, 418 (6894): 244-251.
- [13] Kinoshita H, Kuwahara K, Takano M, et al. T-type Ca²⁺ channel blockade prevents sudden death in mice with heart failure[J]. *Circulation*, 2009, 120 (9): 743-752.

(此文编辑 文玉珊)