

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2018)26-12-1252-07

基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路探讨大蒜素对大鼠冠状动脉微栓塞的影响及作用机制

杨丹阳¹, 姜涛¹, 周径²

(1.四川中医药高等专科学校,四川省绵阳市 621000;2.绵阳市中医院,四川省绵阳市 621000)

[关键词] TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路; 大蒜素; 冠状动脉微栓塞; 炎症因子

[摘要] **目的** 基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路探讨大蒜素对大鼠冠状动脉微栓塞(CME)的影响及作用机制。**方法** 将 60 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组、阳性对照组、大蒜素低、中、高剂量组,每组 10 只,其中空白对照组和模型组给予等体积生理盐水灌胃,阳性对照组给予瑞舒伐他汀[3.0 mg/(kg·d)]灌胃,大蒜素低、中、高剂量组分别给予大蒜素[10、20、40 mg/(kg·d)]灌胃,预处理 14 天后,模型组、阳性对照组及大蒜素低、中、高剂量组采用左心室注射 42 μ m 微栓塞球造模,空白对照组采用左心室注射等体积生理盐水。检测大鼠心功能变化;HBFP 染色法检测心肌微梗死面积;TUNEL 法检测心肌细胞凋亡情况;ELISA 法检测白细胞介素 1 β (IL-1 β)和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)含量;电化学法检测肌钙蛋白 I(cTnI)和肌酸激酶同工酶(CK-MB)水平;RT-PCR 法检测大鼠心肌组织中 Toll 样受体 4(TLR4)、髓样分化因子 88(MyD88)和核因子 κ B p65(NF- κ B p65) mRNA 水平;Western blot 法检测大鼠心肌组织中 TLR4、MyD88 和 NF- κ B p65 蛋白表达。**结果** 大蒜素可显著改善 CME 大鼠心功能,明显降低心肌微梗死面积和心肌细胞凋亡率,有效抑制炎症因子 IL-1 β 、TNF- α 和心肌损伤指标 cTnI、CK-MB 表达,明显下调 TLR4、MyD88 和 NF- κ B p65 mRNA 和蛋白相对表达量。**结论** 大蒜素可抑制 CME 大鼠心脏功能障碍和心肌损伤,其作用机制可能与 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路密切相关。

[中图分类号] R96

[文献标识码] A

Effect and mechanism of diallyl trisulfide on coronary microembolization in rats based on TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway

YANG Danyang¹, JIANG Tao¹, ZHOU Jing²

(1.Sichuan College of Traditional Chinese Medicine, Mianyang, Sichuan 621000; 2.Mianyang Hospital of Traditional Chinese Medicine, Mianyang, Sichuan 621000, China)

[KEY WORDS] TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway; diallyl trisulfide; coronary microembolization; inflammatory factors

[ABSTRACT] **Aim** To discuss the effect and mechanism of diallyl trisulfide on coronary microembolization (CME) in rats based on the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway. **Methods** Sixty SD rats were randomly divided into blank control group, model group, positive control group, low, medium and high dose groups of diallyl trisulfide, 10 rats in each group. The blank control group and model group were given the same volume of normal saline, the positive control group was given rosuvastatin (3.0 mg/(kg·d)), and the diallyl trisulfide low, medium and high dose groups were given diallyl trisulfide (10, 20, 40 mg/(kg·d)). After 14 days of pretreatment, CME models were established in the model group, the positive control group, the diallyl trisulfide low, middle and high dose groups by injecting 42 μ m microembolic balls into the left ventricle, and the blank control group was injected the same volume of normal saline into the left ventricle. The changes of cardiac function were detected, the area of myocardial microinfarction was detected by HBFP staining, the apoptosis of myocardial cells was detected by TUNEL, the content of interleukin-1 β (IL-1 β) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were detected by ELISA, electrochemical method was used to detect troponin I (cTnI) and creatine kinase isoenzyme (CK-MB), the mRNA expressions of Toll-like receptor 4 (TLR4), myeloid differentiation factor 88 (MyD88) and nuclear factor κ B p65 (NF- κ B p65) were detected by RT-PCR, Western blot was used to detect the pro-

[收稿日期] 2018-10-11

[修回日期] 2018-12-28

[作者简介] 杨丹阳,讲师,研究方向为内科学,E-mail 为 434740561@qq.com。

tein expression of TLR4, MyD88 and NF- κ B p65 in rat myocardium. **Results** Diallyl trisulfide can significantly improve the cardiac function of CME rats, significantly reduce the area of myocardial microinfarction and the apoptotic rate of myocardial cells, effectively inhibit the expression of inflammatory factors IL-1 β , TNF- α and myocardial injury indicators cTnI, CK-MB, and significantly reduce the relative expression of TLR4, MyD88 and NF- κ B p65 mRNA and protein.

Conclusion Diallyl trisulfide can inhibit cardiac dysfunction and myocardial injury in CME rats, and its mechanism may be closely related to TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway.

冠状动脉微栓塞 (coronary microembolization, CME) 是由动脉粥样硬化斑块破裂或经皮冠状动脉介入治疗 (PCI) 引起的冠状动脉微循环栓塞和心肌梗死, 一般发病率为 15%~20%, 高危患者高达 30%~45%^[1]。CME 常引起心功能不全, 包括心肌梗死、局部心肌炎症、心肌细胞凋亡和坏死、冠状动脉血流储备下降, 故 CME 是导致心脏功能障碍和心肌损伤的重要原因^[2-3]。一旦 CME 发生, 使用冠状动脉溶栓剂、硝酸甘油和血小板 GP II b/III a 受体拮抗剂均不能有效改善 CME 患者的临床症状^[4]。因此, CME 的治疗仍然是一个棘手问题, 而且 CME 病理生理学的潜在分子机制还有待进一步阐明。研究表明, Toll 样受体 (Toll-like receptor 4, TLR) 可介导机体炎症反应, 主要是通过 TLR4 触发的髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) 进行信号转导, 激活细胞核因子 κ B (nuclear factor κ B, NF- κ B), 从而引起炎症反应^[5]。TLR 介导的心肌炎症反应可使心肌受到严重损伤, 故 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路在 CME 诱导的心肌损伤中具有重要作用^[6]。

大蒜素 (diallyl trisulfide, DATS) 是一种从大蒜素前体化合物中获得的二烯丙基三硫化物, 主要存在于百合科植物大蒜鳞茎中^[7], 药理研究表明, 其具有抗心肌纤维化、抗糖尿病、降脂、抗肿瘤、抗老年痴呆、抗感染、抗氧化和抗动脉粥样硬化等作用^[8], 也有报道称 DATS 可明显降低 CME 诱导的大鼠心肌损伤及心肌细胞凋亡^[9]。本研究旨在基于 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路探讨大蒜素对大鼠 CME 的影响及作用机制, 为大蒜素治疗 CME 的研究提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

所用大鼠均从四川大学实验动物中心购买, 选择鼠龄均在 7~8 周龄的 SPF 级健康 SD 大鼠 60 只, 雌雄不分, 体质量为 180~220 g, 在恒温 (24 \pm 1 $^{\circ}$ C) 下每笼饲养 5 只, 湿度条件为 45%~55%, 暗/光循

环 12 h, 所有大鼠自由饮食和饮水, 适应性喂养 1 周后开始实验。

1.2 主要药品与试剂

大蒜素注射液 (江苏吴中医药集团有限公司, 国药准字 H20045734); 瑞舒伐他汀钙片 (阿斯利康药业 (中国) 有限公司, 国药准字 J201700008); 生理盐水 (常州兰陵制药有限公司, 生产批号: H52020069); 苏木精、碱性复红、明矾 (南宁恒因生物科技有限公司); 白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 试剂盒 (美国 eBioscience 公司); 心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) 和肌酸激酶同工酶 (creatinase isoenzyme, CK-MB) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); TUNEL 试剂盒 (美国 Roche 公司); TLR4、MyD88 和 NF- κ B p65 引物 (南京金斯瑞科技有限公司); TLR4、MyD88、NF- κ B p65 和 β -actin 鼠单克隆抗体 (美国 Abcam 公司); HRP 羊抗鼠 IgG 二抗 (美国 Invitrogen 公司)。

1.3 仪器

BS110S 型电子分析天平 (赛多利斯科学仪器有限公司); CS-15R 冷冻离心机 (美国 Beckman 公司); BCD-629WDEYU1 型冰箱 (赛多利斯科学仪器有限公司); 5010 全自动染色机 (德国徕卡公司); BX50 生物显微镜 (日本奥林巴斯公司); 包埋机 (型号: JB-P5) 及病理切片机 (型号: RM-P6)、超声雾化器 (型号: JB-L5) (上海斯科茨曼有限公司); 荧光定量 PCR 循环仪 (美国 ABI 公司); 凝胶电泳和电转仪 (美国 Bio-Rad 公司); 细胞计数仪 (美国 Nexcelom 公司); Sonos 7500 型多普勒超声机 (荷兰 Philips 公司); DW-2000 型动物呼吸机 (上海恒勤仪器设备有限公司)。

1.4 动物分组与给药

将 60 只 SD 大鼠随机分为空白对照组、模型组、阳性对照组及大蒜素低、中、高剂量组, 每组 10 只, 其中空白对照组和模型组于术前给予等体积生理盐水灌胃, 阳性对照组于术前给予瑞舒伐他汀 [3.0 mg/(kg \cdot d)] 灌胃, 大蒜素低、中、高剂量组于术前分别给予大蒜素 [10、20、40 mg/(kg \cdot d)] 灌

胃。预处理 14 天后模型组、阳性对照组及大蒜素低、中、高剂量组采用左心室注射 42 μm 微栓塞球的方法建立大鼠 CME 模型,空白对照组采用左心室注射等体积生理盐水。

1.5 动物模型的建立

各组大鼠采取腹腔注射 10% 水合氯醛溶液进行麻醉,仰卧位固定大鼠,将气管插管经口快速插入后,连接动物呼吸机,待大鼠呼吸平稳后,剪除前胸部皮毛,切开皮肤,分离组织,使心脏和主动脉暴露并分离,用注射器于左心室心尖部注入 42 μm 微栓塞球 0.1 mL,同时夹闭主动脉约 8~10 s。空白对照组采取相同的处理方法注射等体积生理盐水。待各组大鼠心率正常后关胸,并于自主呼吸后拔除插管,为防止感染静脉注射青霉素。

1.6 大鼠心功能变化检测

于术后 12 h,应用多普勒超声机检测各组大鼠心功能,将探头置于大鼠左胸前壁,探头频率为 10 MHz,分别检测心尖四腔切面、左心室长轴切面及两腔心切面,重复测量 3 次取平均值,检测左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)、心排血量(cardiac output, CO)、左心室短轴缩短率(fractional shortening, FS)及左心室舒张期末内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)。

1.7 大鼠心脏组织取材

大鼠心功能检测完毕后,麻醉处死取血,开胸取出心脏,用冰生理盐水清洗心脏,并去除心脏周围组织及心房,将心室沿长轴平均分为左、中、右三份,左份采用 4% 多聚甲醛固定 12 h 后,石蜡包埋,用于检测大鼠心肌微梗死面积和心肌细胞凋亡情况;中份与右份冻存于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 条件下用于 RT-PCR 和 Western blot 检测。

1.8 HBFP 染色法检测大鼠心肌微梗死面积

将各组大鼠的石蜡标本切成 5 μm 薄片后,附着于玻片上,65 $^{\circ}\text{C}$ 烘烤 4 h,二甲苯脱蜡 4 次,不同梯度乙醇溶液水化,去离子水冲洗 2~3 次后,置于明矾-苏木精染液中染色 1 min,用去离子水冲洗染液,碱性品红溶液复染 5 min 后,洗涤染液,再将玻片置于丙酮中脱水 10 s,分化玻片至碱性品红消失,继续用丙酮脱水,封片后置显微镜下观察,每组随机选取 5 个视野(200 \times),使用 Leica Qwin 分析软件(德国)平面法测量坏死区域,并表示为以坏死切片区域面积与所分析的总切片面积的百分比值,最后取平均值。

1.9 TUNEL 法检测大鼠心肌细胞凋亡情况

将各组大鼠石蜡标本切成 5 μm 薄片后,附着

于玻片上,并用 4% 多聚甲醛固定,严格按照 TUNEL 试剂盒说明书进行后续操作。在荧光显微镜下观察标本,每组随机选取 5 个视野,放大 400 倍后统计凋亡细胞与总细胞的数目,计算心肌细胞凋亡率(凋亡细胞数/总细胞数 $\times 100\%$)。

1.10 ELISA 法检测 IL-1 β 和 TNF- α 含量

麻醉处死后收集外周血 10 mL,3000 r/min 离心 10 min,收集上层血清,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内低温保存。严格按试剂盒说明书采用 ELISA 法测定大鼠血清中 IL-1 β 和 TNF- α 含量。

1.11 电化学法检测 cTnI 和 CK-MB 水平

麻醉处死后收集外周血 5 mL,3000 r/min 离心 10 min,收集上层血清,置于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内低温保存。严格按试剂盒说明书采用电化学法测定大鼠血清中 cTnI 和 CK-MB 水平。

1.12 RT-PCR 法检测大鼠心肌组织中 TLR4、MyD88 和 NF- κB p65 的 mRNA 表达水平

将各组大鼠心肌组织解冻后,放入去酶 EP 管中。提取大鼠心肌组织的总 RNA,逆转录合成 cDNA,根据引物(表 1)进行扩增,反应条件如下:94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 反应 60 s,共进行 40 个循环,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 5 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 反应 5 min,每组进行 3 次独立测定,图像分析仪扫描凝胶密度,分析得到 mRNA 的相对含量。

表 1. RT-PCR 反应引物序列

Table 1. RT-PCR reaction primer sequence

引物名称	引物序列
β -actin	Forward 5'-ACTATCGGCAATGAGCGGTT-3' Reverse 5'-CAGCTCAGTAACAGTCCGC-3'
TLR4	Forward 5'-AAATGCACTGAGCTTTAGTGGT-3' Reverse 5'-TGGCACTCATAATGATGGCAC-3'
MyD88	Forward 5'-GACCGTGAGGATATACTGAAGGA-3' Reverse 5'-GGCCACCTGTAAAGGCTTCTC-3'
NF- κB p65	Forward 5'-ACTGCCGGGATGGCTACTAT-3' Reverse 5'-TCTGGATTGCTGGCTAATGG-3'

1.13 Western blot 法检测大鼠心肌组织中 TLR4、MyD88 和 NF- κB p65 的蛋白表达

将各组大鼠心肌组织在研钵中充分研磨,加入裂解液置冰上充分裂解,14000 r/min 离心 10 min (4 $^{\circ}\text{C}$),吸取上清液即为蛋白质提取物。采用 BCA 试剂盒测量蛋白质含量,取等量蛋白质用上样缓冲液进行处理,通过电泳、转膜、封闭、孵育抗体等步

骤后,用 ECL 化学发光试剂显色后,化学发光仪成像。分别依次使用 TLR4、MyD88、NF- κ B p65 和 β -actin 鼠单克隆抗体作为一抗,HRP 标记羊抗鼠作为二抗。

1.14 统计方法

运用 SPSS 21.0 统计软件进行实验数据分析,计量资料用 $\bar{x}\pm s$ 来表示,多组数据比较采用单因素方差分析,两两比较采用 LSD 法,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心功能的变化

与空白对照组相比,模型组 LVEF、CO、FS 明显

减小,LVEDD 明显增加($P<0.01$);与模型组相比,大蒜素中、高剂量组 LVEF、CO、FS 明显增加,LVEDD 明显减小($P<0.01$),阳性对照组、大蒜素低剂量组 LVEF、CO、FS 和 LVEDD 无明显变化($P>0.05$)。结果表明,大蒜素可显著改善 CME 大鼠的心功能(表 2)。

2.2 大鼠心肌微梗死面积

模型组心肌微梗死面积明显高于空白对照组($P<0.05$),阳性对照组及大蒜素低、中、高剂量组心肌微梗死面积明显低于模型组($P<0.05$),大蒜素中、高剂量组心肌微梗死面积明显低于阳性对照组($P<0.05$),大蒜素低剂量组与阳性对照组心肌微梗死面积差异无显著性($P>0.05$)。结果表明,大蒜素可显著减少 CME 大鼠心肌微梗死面积(图 1)。

表 2. 各组大鼠心功能变化($\bar{x}\pm s$)

Table 2. Changes of cardiac function in rats of each group ($\bar{x}\pm s$)

分组	n	LVEF (%)	CO (L/min)	FS (%)	LVEDD (mm)
空白对照组	10	80.67 \pm 4.28	0.195 \pm 0.021	49.78 \pm 3.89	5.67 \pm 0.28
模型组	10	54.31 \pm 4.19 ^a	0.098 \pm 0.008 ^a	31.08 \pm 3.27 ^a	7.86 \pm 0.37 ^a
阳性对照组	10	58.54 \pm 4.37	0.101 \pm 0.008	34.22 \pm 3.64	7.39 \pm 0.41
大蒜素低剂量组	10	57.23 \pm 4.63	0.097 \pm 0.009	34.56 \pm 3.53	7.24 \pm 0.35
大蒜素中剂量组	10	68.92 \pm 4.56 ^b	0.173 \pm 0.025 ^b	46.36 \pm 3.44 ^b	5.82 \pm 0.26 ^b
大蒜素高剂量组	10	69.18 \pm 4.41 ^b	0.176 \pm 0.023 ^b	46.92 \pm 3.21 ^b	5.74 \pm 0.23 ^b

a 为 $P<0.01$,与空白对照组比较;b 为 $P<0.01$,与模型组比较。

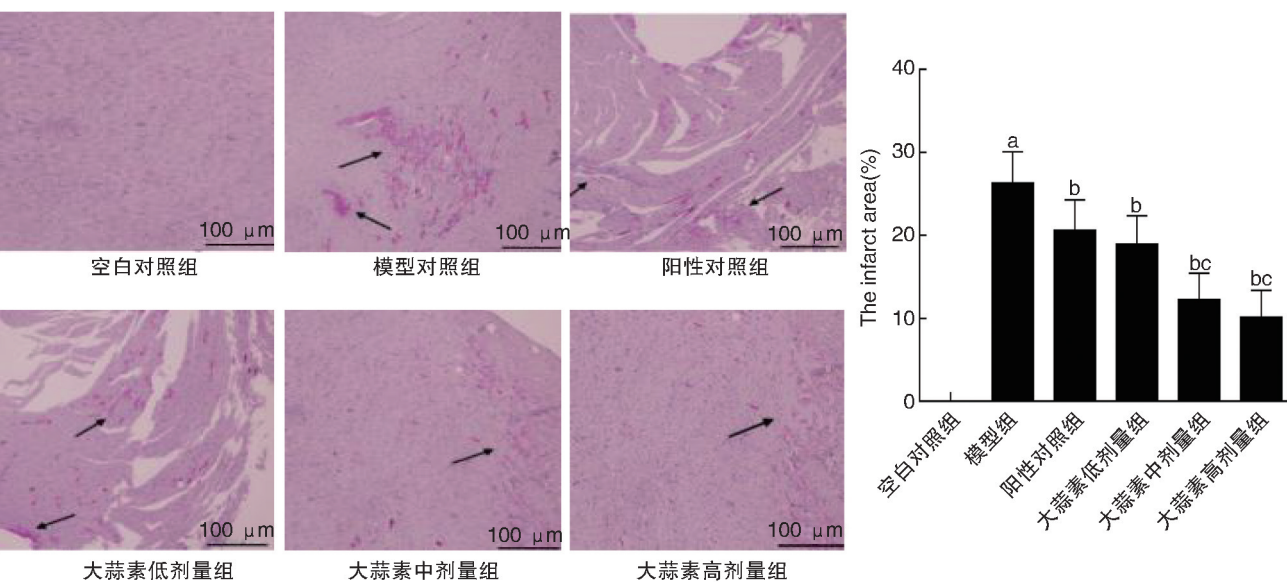


图 1. 各组大鼠心肌微梗死面积比较($n=10$) 缺血心肌呈红色,箭头表示微梗死区域。a 为 $P<0.05$,与空白对照组比较;b 为 $P<0.05$,与模型组比较;c 为 $P<0.05$,与阳性对照组比较。

Figure 1. Comparison of myocardial infarct size in rats of each group ($n=10$)

2.3 心肌细胞的凋亡情况

模型组心肌细胞凋亡率明显高于空白对照组 ($P<0.05$), 阳性对照组及大蒜素低、中、高剂量组心肌细胞凋亡率明显低于模型组 ($P<0.05$), 大蒜素

中、高剂量组心肌细胞凋亡率明显低于阳性对照组 ($P<0.05$), 大蒜素低剂量组与阳性对照组心肌细胞凋亡率差异无显著性 ($P>0.05$)。结果表明, 大蒜素可显著降低 CME 诱导的心肌细胞凋亡 (图 2)。

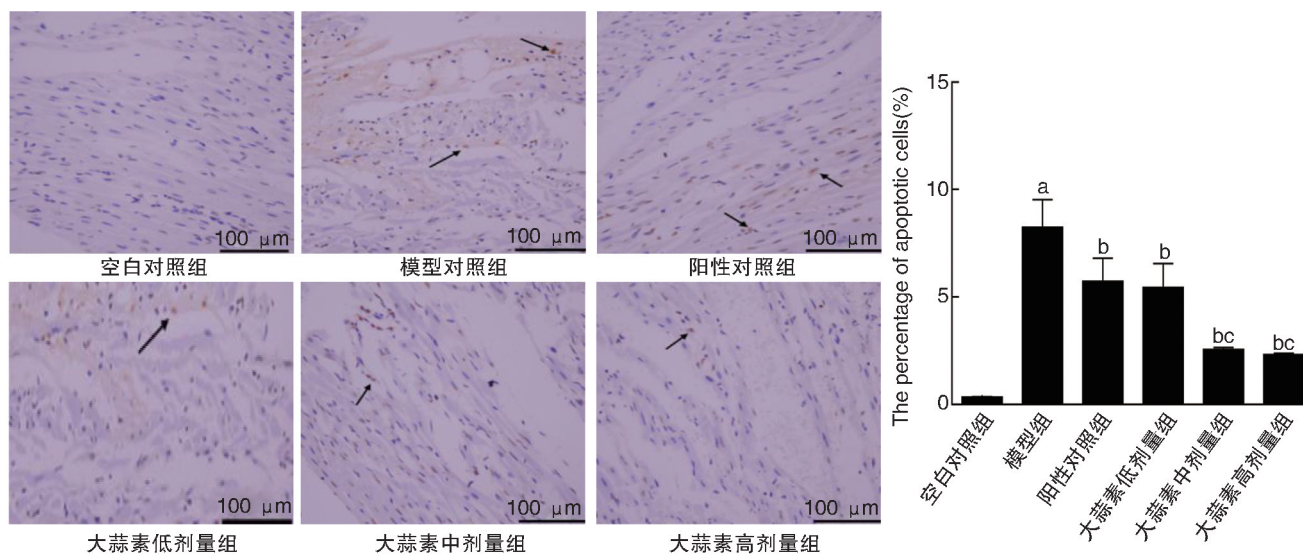


图 2. 各组大鼠心肌细胞的凋亡情况 ($n=10$) 箭头表示心肌细胞凋亡的细胞核。a 为 $P<0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与模型组比较; c 为 $P<0.05$, 与阳性对照组比较。

Figure 2. Cardiomyocyte apoptosis in rats of each group ($n=10$)

2.4 血清中 IL-1 β 和 TNF- α 含量

模型组 IL-1 β 和 TNF- α 含量明显高于空白对照组 ($P<0.01$), 阳性对照组及大蒜素低、中、高剂量组 IL-1 β 和 TNF- α 含量明显低于模型组 ($P<0.01$), 大蒜素中、高剂量组 IL-1 β 和 TNF- α 含量明显低于阳性对照组 ($P<0.01$), 大蒜素低剂量组与阳性对照组 IL-1 β 和 TNF- α 含量差异无显著性 ($P>0.05$)。结果表明, 大蒜素可抑制促炎因子 IL-1 β 和 TNF- α 的表达 (图 3)。

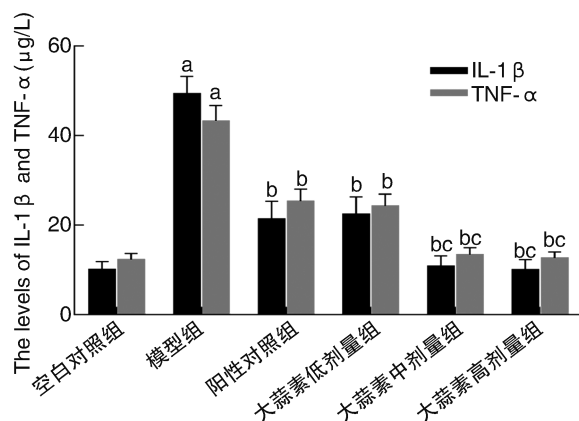


图 3. 各组大鼠血清中 IL-1 β 和 TNF- α 含量 ($n=10$) a 为 $P<0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与模型组比较; c 为 $P<0.01$, 与阳性对照组比较。

Figure 3. The contents of IL-1 β and TNF- α in rats of each group ($n=10$)

2.5 血清中 cTnI 和 CK-MB 水平

模型组 cTnI 和 CK-MB 水平明显高于空白对照组 ($P<0.05$), 阳性对照组及大蒜素低、中、高剂量组 cTnI 和 CK-MB 水平明显低于模型组 ($P<0.05$), 大蒜素中、高剂量组 cTnI 和 CK-MB 水平明显低于阳性对照组 ($P<0.05$), 阳性对照组与大蒜素低剂量组 cTnI 和 CK-MB 水平差异无显著性 ($P>0.05$)。结果表明, 大蒜素可抑制心肌损伤 (图 4)。

2.6 心肌组织中 TLR4、MyD88 和 NF- κ B p65 的 mRNA 表达水平

与空白对照组相比, 模型组 TLR4、MyD88 和 NF- κ B p65 的 mRNA 表达水平明显升高 ($P<0.01$); 与模型组相比, 阳性对照组及大蒜素低、中、高剂量组 TLR4、MyD88 和 NF- κ B p65 的 mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.01$); 与阳性对照组相比, 大蒜素中、高剂量组 TLR4、MyD88 和 NF- κ B p65 的 mRNA 表达水平明显降低 ($P<0.01$)。结果表明, 大蒜素可明显降低 CME 大鼠心肌组织中 TLR4、MyD88 和 NF- κ B p65 的 mRNA 表达水平 (图 5)。

2.7 心肌组织中 TLR4、MyD88 和 NF- κ B p65 的蛋白表达

Western blot 结果显示, 与空白对照组相比, 模型组 TLR4、MyD88 和 NF- κ B p65 蛋白表达明显升高

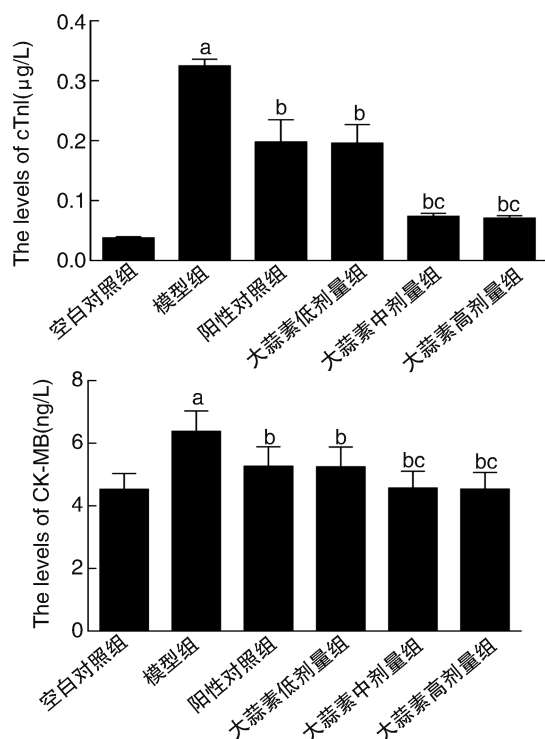


图 4. 各组大鼠血清中 cTnI 和 CK-MB 水平 ($n=10$) a 为 $P<0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与模型组比较; c 为 $P<0.05$, 与阳性对照组比较。

Figure 4. The levels of cTnI and CK-MB in rats of each group ($n=10$)

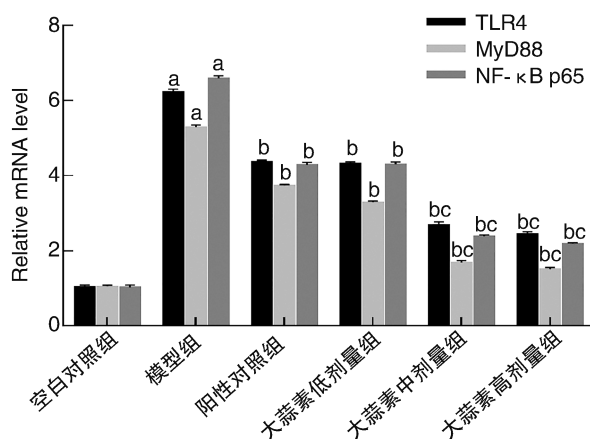


图 5. 各组大鼠心肌组织中 TLR4、MyD88 和 NF-κB p65 的 mRNA 表达水平 ($n=10$) a 为 $P<0.01$, 与空白对照组比较; b 为 $P<0.01$, 与模型组比较; c 为 $P<0.01$, 与阳性对照组比较。

Figure 5. mRNA expression level of TLR4, MyD88 and NF-κB p65 in myocardium of rats ($n=10$)

($P<0.05$); 与模型组相比, 阳性对照组及大蒜素低、中、高剂量组 TLR4、MyD88 和 NF-κB p65 蛋白表达明显降低($P<0.05$); 与阳性对照组相比, 大蒜素中、高剂量组 TLR4、MyD88 和 NF-κB p65 蛋白表达明显

降低($P<0.05$)。结果表明, 大蒜素可抑制 CME 大鼠心肌组织中 TLR4、MyD88 和 NF-κB p65 蛋白表达 (图 6)。

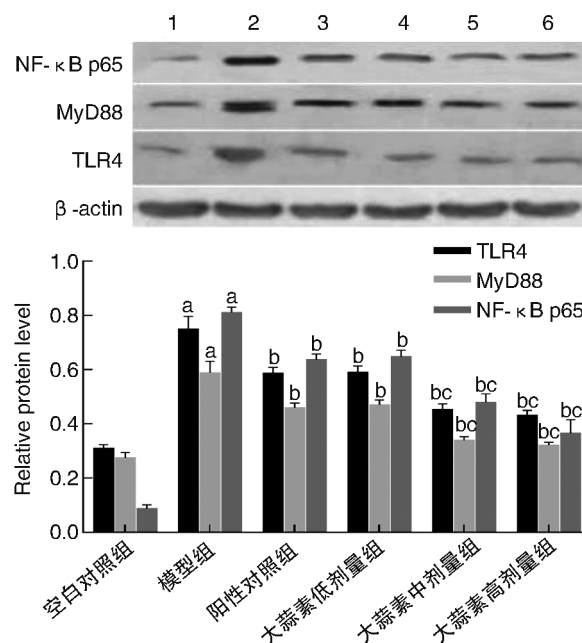


图 6. 各组大鼠心肌组织中 TLR4、MyD88 和 NF-κB p65 的蛋白表达 ($n=10$) 1 为空白对照组, 2 为模型组, 3 为阳性对照组, 4 为大蒜素低剂量组, 5 为大蒜素中剂量组, 6 为大蒜素高剂量组。a 为 $P<0.05$, 与空白对照组比较; b 为 $P<0.05$, 与模型组比较; c 为 $P<0.05$, 与阳性对照组比较。

Figure 6. Protein expression level of TLR4, MyD88 and NF-κB p65 in myocardium of rats ($n=10$)

3 讨论

CME 可导致短暂的“无血流”或“慢血流”, 从而对患者的心功能造成严重影响, 甚至可能导致患者死亡^[10]。CME 常常发生在动脉粥样硬化不稳定斑块破裂及 PCI 治疗期间, 其与心外膜近端血管阻塞不同^[11]。CME 导致左心室功能下降与心肌灌注损伤面积大小没有密切关系, 局部心肌灌注不足或小梗死不能完全解释这一现象^[12]。TLR4 是一种克隆跨膜信号受体, 它可以将先天免疫与特异性免疫联系起来, 其主要介导细菌脂多糖 (LPS) 的跨膜信号转导, 并在心脏中高度表达^[13]。TLR4 与配体的结合最终激活细胞 NF-κB, 而 NF-κB 可以调节炎症反应及免疫相关基因表达^[14]。一旦 TLR 识别并与损伤相关分子模式分子 (DAMP) 结合, 这种复合物就立即出现, 触发下游信号转导事件, 激活转录因子, 从而诱导炎症的发展^[15]。因此, 我们认为

TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路可能参与 CME 大鼠的心肌损伤及炎症反应。

由于性别对实验结果不会造成影响,故本实验动物分组时选择雌雄兼用。大量研究表明,心肌炎症可能是导致心脏进行性收缩功能障碍的主要因素,CME 诱导的心肌微梗死附近有大量炎症细胞浸润,并伴有炎症细胞因子释放(如 TNF- α 和 IL-1 β),导致局部心肌炎症,进而造成心肌损伤和进展性心功能障碍^[16-17],本研究发现 CME 可诱导大鼠心功能恶化,心肌微梗死,心肌细胞凋亡,血清 IL-1 β 、TNF- α 、cTnI 和 CK-MB 水平显著升高,经不同浓度大蒜素干预后这些指标明显改善,表明大蒜素对大鼠冠状动脉微栓塞具有一定的治疗效果。本研究通过 RT-PCR 和 Western blot 法检测发现 CME 大鼠心肌组织中 TLR4、MyD88 和 NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达均显著升高,表明大鼠冠状动脉微栓塞与 TLR4、MyD88 和 NF- κ B p65 有关,经不同浓度大蒜素干预后 TLR4、MyD88 和 NF- κ B p65 mRNA 及蛋白表达均明显降低,表明大蒜素可通过调节 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路进而影响大鼠冠状动脉微栓塞。

综上所述,大蒜素可显著改善 CME 大鼠的心功能、心肌微梗死面积、心肌细胞凋亡率、炎症因子及心肌损伤指数的表达水平,下调心肌炎症反应相关基因 TLR4、MyD88 和 NF- κ B p65 表达,抑制 CME 大鼠心脏功能障碍和心肌损伤,其作用机制可能与 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路密切相关。

[参考文献]

- [1] Liu T, Zhou Y, Liu YC, et al. Coronary microembolization induces cardiomyocyte apoptosis through the LOX-1-dependent endoplasmic reticulum stress pathway involving JNK/P38 MAPK [J]. *Can J Cardiol*, 2015, 31(10): 1272-1281.
- [2] Wang J, Han C, You Z, et al. Atorvastatin inhibits myocardial apoptosis in a swine model of coronary microembolization by regulating PTEN/PI3K/Akt signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38: 207-219.
- [3] Su Q, Li L, Zhao J, et al. miRNA expression profile of the myocardial tissue of pigs with coronary microembolization [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 43(3): 1012-1024.
- [4] Su Q, Li L, Wang J, et al. Mechanism of programmed cell death factor 4/nuclear factor- κ B signaling pathway in porcine coronary micro-embolization-induced cardiac dysfunction [J]. *Exp Biol Med*, 2015, 240(11): 1426-1433.
- [5] Heusch G. The coronary circulation as a target of cardioprotection [J]. *Circ Res*, 2016, 118(10): 1643-1658.
- [6] Heusch G, Gersh BJ. The pathophysiology of acute myocardial infarction and strategies of protection beyond reperfusion: a continual challenge [J]. *Eur Heart J*, 2016, 38(11): 774-784.
- [7] 丁志杰, 陈鹏. 大蒜素对链脲佐菌素所致糖尿病大鼠的保护作用及其机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(2): 10-13.
- [8] 金丽娟, 张娜, 杨伟, 等. 大蒜素通过抗氧化应激和抑制 COX-2 信号通路保护胃溃疡大鼠的机制研究[J]. *中药药理与临床*, 2017, 33(2): 37-41.
- [9] 梁家宝, 李浪, 贺文慨. 大蒜素对大鼠冠状动脉微栓塞后心肌凋亡的影响[J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(3): 371-375.
- [10] Chen ZW, Qian JY, Ma JY, et al. TNF-alpha-induced cardiomyocyte apoptosis contributes to cardiac dysfunction after coronary microembolization in mini-pigs [J]. *Cell Mol Med*, 2014, 18: 1953-1963.
- [11] Heusch G, Skyschally A, Kleinbongard P. Coronary microembolization and microvascular dysfunction [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 258: 17-23.
- [12] Su Q, Lv X, Sun Y, et al. Role of TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in coronary microembolization-induced myocardial injury prevented and treated with nicorandil [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 776-784.
- [13] Jang JC, Li J, Gambini L, et al. Human resistin protects against endotoxic shock by blocking LPS-TLR4 interaction [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2017, 114(48): E10399-E10408.
- [14] Han J, Zou C, Mei L, et al. MD2 mediates angiotensin II-induced cardiac inflammation and remodeling via directly binding to Ang II and activating TLR4/NF- κ B signaling pathway [J]. *Basic Res Cardiol*, 2017, 112(1): 9.
- [15] Rohde D, Schön C, Boerries M, et al. S100A1 is released from ischemic cardiomyocytes and signals myocardial damage via toll-like receptor 4 [J]. *EMBO Mol Med*, 2014, 6(6): 778-794.
- [16] Su Q, Li L, Liu Y, et al. Ultrasound-targeted microbubble destruction-mediated microrna-21 transfection regulated PD-CD4/NF- κ B/TNF- α pathway to prevent coronary microembolization-induced cardiac dysfunction [J]. *Gene Ther*, 2015, 22(12): 1000-1006.
- [17] Liang J, Li L, Sun Y, et al. The protective effect of activating Nrf2/HO-1 signaling pathway on cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization in rats [J]. *BMC Cardiovasc Disord*, 2017, 17(1): 272.

(此文编辑 许雪梅)