



安徽医科大学学报  
*Acta Universitatis Medicinalis Anhui*  
ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

## 《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: TLR4 介导的 NETs 形成在异丙肾上腺素诱导的老龄小鼠心力衰竭中的作用  
作者: 刘焕, 陈向东, 吴志林  
网络首发日期: 2026-02-09  
引用格式: 刘焕, 陈向东, 吴志林. TLR4 介导的 NETs 形成在异丙肾上腺素诱导的老龄小鼠心力衰竭中的作用[J/OL]. 安徽医科大学学报.  
<https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260209.1625.014>



**网络首发:** 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

**出版确认:** 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

## TLR4 介导的 NETs 形成在异丙肾上腺素诱导的老齡小鼠心力衰竭中的作用

刘 焕<sup>1,2,3</sup>, 陈向东<sup>1,2,3</sup>, 吴志林<sup>1,2,3</sup>

[华中科技大学同济医学院附属协和医院<sup>1</sup>麻醉科、<sup>2</sup>麻醉与危重病研究所, 武汉 430022; <sup>3</sup>麻醉复苏教育部重点实验室(华中科技大学), 武汉 430022]

**摘要 目的** 探讨 Toll 样受体 4 (TLR4) 介导的中性粒细胞胞外诱捕网 (NETs) 形成对异丙肾上腺素 (ISO) 诱导的老齡小鼠心力衰竭 (HF) 的作用。**方法** 将小鼠随机分为 Control 组、Model 组、TAK-242 (TLR4 抑制剂) 组、LPS (TLR4 激动剂) 组和 LPS+DNaseI (NETs 抑制剂) 组, 每组 8 只。通过渗透泵持续输注 ISO 建立 HF 模型, 输注最后 1 周给予 TAK-242、LPS 和 LPS+DNaseI 干预, 连续 7 天。采用小动物超声系统评估各组小鼠心功能变化; ELISA 法检测各组小鼠血清中 N 末端 B 型利钠肽原 (NT-pro BNP)、心肌肌钙蛋白 I (cTn I)、白细胞介素 (IL) -1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) 及血清和心肌组织中髓过氧化物酶-DNA (MPO-DNA)、中性粒细胞弹性蛋白酶-DNA (NE-DNA) 水平; HE 染色观察各组小鼠心肌组织病理学变化; Masson 染色观察各组小鼠心肌组织胶原纤维的沉淀情况; 免疫荧光观察小鼠心肌组织中 Ly6G 与 MPO 共定位水平; Western blot 检测各组小鼠心肌组织中 TLR4、MPO、NE、cit-H3 蛋白表达量。**结果** 与 Control 组比较, Model 组小鼠舒张末期室间隔厚度 (IVSD)、左心室舒张末期内径 (LVEDD)、左心室收缩末期内径 (LVESD) 升高 ( $P<0.01$ ), 短轴缩短率 (FS) 和射血分数 (EF) 降低 ( $P<0.01$ ), 心肌结构明显受损, 心肌组织胶原纤维的沉淀增加, 血清中 NT-pro BNP、cTnI、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  含量显著升高 ( $P<0.01$ ), 血清及心肌组织中 MPO-DNA 和 NE-DNA 含量升高 ( $P<0.01$ ), 心肌组织中 Ly6G 与 MPO 共定位水平及 TLR4、MPO、NE、cit-H3 等蛋白表达量均增加 ( $P<0.01$ )。TAK-242 干预后上述指标显著逆转, 而 LPS 组损伤进一步加剧。DNaseI 处理可部分缓解 LPS 诱导的心肌结构及功能恶化。**结论** TLR4 及 NETs 在老齡 HF 小鼠心肌组织中异常增多。给予 TLR4 抑制剂 TAK-242 干预可抑制 NETs 的形成, 降低炎症反应, 改善老齡 HF 小鼠心功能。

**关键词** 心力衰竭; Toll 样受体 4; 中性粒细胞胞外诱捕网; 炎症; 异丙肾上腺素; 心血管疾病

**中图分类号** R 541.6

基金项目: 湖北省自然科学基金一般面上项目 (编号: 2025AFB760)

作者简介: 刘 焕, 女, 主治医师;

吴志林, 男, 副主任医师, 通信作者, E-mail: 840916@qq.com

## Role of TLR4-mediated NETs formation in isoproterenol-induced heart failure in aged mice

Liu Huan<sup>1,2,3</sup>, Chen Xiangdong<sup>1,2,3</sup>, Wu Zhilin<sup>1,2,3</sup>

*(<sup>1</sup>Dept of Anesthesiology, <sup>2</sup>Institute of Anesthesia and Critical Care Medicine, Union Hospital, Tongji Medical College, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022; <sup>3</sup>Key Laboratory of Anesthesiology and Resuscitation, Ministry of Education, Huazhong University of Science and Technology, Wuhan 430022)*

**Abstract** ***Objective*** To examine the impact of Toll-like receptor 4 (TLR4)-mediated neutrophil extracellular traps (NETs) formation on isoproterenol (ISO)-induced heart failure (HF) in aged mice. ***Methods*** The mice were randomly divided into Control group, Model group, TAK-242 (TLR4 inhibitor) group, LPS (TLR4 agonist) group and LPS+DNaseI (NETs inhibitor) group, with 8 mice in each group. The HF model was established by continuous infusion of ISO through an osmotic pump, and TAK-242, LPS, and LPS+DNaseI interventions were administered during the last week of infusion for 7 consecutive days. ELISA was used to detect the N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-pro BNP), cardiac troponin I (cTnI), interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), and serum and myocardial tissue myeloperoxidase-DNA (MPO-DNA) and neutrophil elastase-DNA (NE-DNA) levels. HE staining was used to observe the pathological changes of myocardial tissue. Masson staining was used to observe the deposition of collagen fibers in myocardial tissue. Immunofluorescence was used to observe the colocalization of Ly6G and MPO in myocardial tissue. The protein expressions of TLR4, MPO, NE and cit-H3 in myocardial tissue were detected by Western blot. ***Results*** Compared with the Control group, the end-diastolic interventricular septal thickness (IVSD), left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD) and left ventricular end-systolic diameter (LVESD) in the Mode group significantly increased ( $P<0.01$ ), fractional shortening (FS) and ejection fraction (EF) significantly decreased ( $P<0.01$ ), and the myocardial structure was significantly damaged. The myocardial collagen fiber precipitation, serum NT-pro BNP, cTnI, IL-1 $\beta$ , IL-6 and TNF- $\alpha$  contents, MPO-DNA and NE-DNA contents in serum and myocardial tissue significantly increased ( $P<0.01$ ). The co-localization of Ly6G and MPO and the expression of TLR4, MPO, NE and cit-H3 proteins in myocardial tissue significantly increased ( $P<0.01$ ). After TAK-242 intervention, the above indicators were significantly reversed, while the injury was further aggravated in LPS group. DNaseI treatment could partially alleviate the deterioration of myocardial structure and function induced by LPS. ***Conclusion*** TLR4 and NETs are abnormally elevated in the myocardial tissue of aged HF mice. Treatment with the TLR4 inhibitor TAK-242 effectively suppresses NET formation, attenuates inflammatory responses, and enhances cardiac function in aged HF mice.

**Keywords** heart failure; Toll like receptor 4; neutrophil extracellular traps; inflammation; isoproterenol; cardiovascular diseases

**Fund program** Natural Science Foundation of Hubei Province (No. 2025AFB760)

**Corresponding author** Wu Zhilin, E-mail: 840916@qq.com

心力衰竭 (heart failure, HF) 是一种因心脏结构或功能异常引发的临床危重综合征, 主要表现为心室充盈或射血功能障碍, 导致心脏泵血量无法满足机体代谢需求, 并伴随呼吸困难、心悸及体液滞留等症状。HF 病因多样, 可继发于多种心脏疾病。HF 在 65 岁及以上的老年群体中呈现高发病率和死亡风险, 是心血管类疾病研究的重点及难点。HF 的发病因素复杂, 常伴有炎症反应及免疫功能异常。Toll 样受体 (Toll like receptor, TLR) 是模式识别受体 (pattern recognition receptor, PRR) 家族的一员, 可以识别病原体相关分子模式和损伤相关分子模式, 以激发先天免疫反应, 从而导致急性或慢性炎症<sup>[1]</sup>。课题组前期研究<sup>[2]</sup>表明, Toll 样受体 4 (Toll like receptor 4, TLR4) 在老年 HF 小鼠的心脏中表达显著上调, TLR4 缺失可增加老年小鼠的胰岛素敏感性, 改善心脏功能和内皮依赖性老年小鼠的血管松弛, 抑制心脏和主动脉的氧化应激, 减少炎症反应和氧化应激。中性粒细胞是机体重要的免疫细胞, 参与机体各种生理病理过程, 而中性粒细胞胞外诱捕网 (neutrophil extracellular traps, NETs) 是由中性粒细胞的 DNA、组蛋白和细胞毒性颗粒衍生蛋白等构成的网状结构, 参与人体诸多疾病进程。作为先天免疫反应的主要组成部分, NETs 已被证实心血管疾病中发挥重要作用。Zhao et al<sup>[3]</sup>研究发现, 抗炎糖蛋白内皮细胞发育调节蛋白 1 缺乏可通过促进中性粒细胞浸润和 NETs 形成而加重压力超负荷诱导的 HF。同时有研究显示, 在炎症和感染过程中, TLR4 的激活对 NETs 的释放具有显著影响<sup>[4]</sup>, 提示 TLR4 表达上调可能通过促进 NETs 形成, 加重老年性 HF 的进展。因此, 本研究通过建立 HF 老龄小鼠模型, 拟探讨 TLR4 介导的 NETs 形成在 HF 中的作用, 以为老年心脏病的治疗提供新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 本研究选用 18 月龄 (老龄) 雄性 C57BL/6J 小鼠, 体质量 30~35 g, 购自三峡大学实验动物中心, 动物生产许可证号: SCXK (鄂) 2022-0012。饲养环境: 温度 22 °C±2 °C, 相对湿度 50%±5%, 昼夜光照各 12 h 循环照明, 动物自由进食、饮水。

**1.1.2 主要试剂** 异丙肾上腺素 (isoproterenol, ISO)、TAK-242、脂多糖 (lipopolysaccharides, LPS)、DNase I 购自美国 MedChemExpress 公司; 小鼠 N 末端 B 型利钠肽原 (N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, NT-pro BNP)、心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI)、白细胞介素 (interleukin, IL)-1 $\beta$ 、IL-6、肿瘤坏死因子  $\alpha$  (tumor necrosis factor- $\alpha$ , TNF- $\alpha$ ) ELISA 检测试剂盒购自上海酶联生物; 小鼠髓过氧化物酶 (myeloperoxidase, MPO)-DNA 和中性粒细胞弹性蛋白酶 (neutrophil elastase, NE)-DNA ELISA 检测试剂盒购自武汉赛培生物科技有限公司; Ly6G、MPO、TLR4、NE、瓜氨酸化组蛋白 H3 (citrullinated histone H3, cit-

H3) 抗体购自美国 CST 公司。

## 1.2 方法

**1.2.1 实验分组及 HF 模型制备** 选取 40 只 C57BL/6J 小鼠随机分成 Control 组、Model 组、TAK-242 (TLR4 抑制剂) 组、LPS (TLR4 激动剂) 组和 LPS+DNaseI (NETs 抑制剂) 组, 每组 8 只。除 Control 组外, 其余各组小鼠均采用皮下注射 ISO 诱导 HF 小鼠模型, 即腹腔注射 0.3% 戊巴比妥钠溶液 (50 mg/kg) 麻醉小鼠, 于小鼠背部皮下植入渗透微型泵, 持续输注 ISO 3 周 [30 mg/(kg d), 溶解于 0.002% 抗坏血酸溶液], 而 Control 组小鼠植入渗透微型泵后等量输注 0.002% 抗坏血酸溶液。

**1.2.2 给药干预** 渗透泵输注 ISO 的最后 1 周, TAK-242 组、LPS 组和 LPS+DNaseI 组小鼠分别腹腔注射 TAK-242 (2 mg/kg, 1 次/d)、LPS (3.12  $\mu$ g/只/d) 和 DNaseI (50  $\mu$ g/只/d), 而 Control 组和 Model 组腹腔注射等量生理盐水, 连续 7 d。

**1.2.3 心功能指标检测** 麻醉前 12 h 小鼠禁食不禁水, 小鼠麻醉后以仰卧位固定于操作台, 剔除前胸毛发, 采用小动物超声系统, 于左心室长轴切面水平采集 M 型超声心动图, 测量舒张末期室间隔厚度 (interventricular septal thickness, IVSD)、左心室舒张末期内径 (left ventricular end-diastolic diameter, LVEDD)、左心室收缩末期内径 (left ventricular end-systolic diameter, LVESD) 结果均测量 3 个心动周期, 取平均值, 并计算短轴缩短率 (fractional shortening, FS) 和射血分数 (ejection fraction, EF)。

**1.2.4 ELISA 法检测** 心功能检测结束后, 小鼠经眼球取血, 血液样本以 3 000 r/min 离心 15 min, 收集上清液待测。取血后颈椎脱臼处死小鼠, 迅速摘取心脏, 清洗残留血液后取部分组织与 PBS 混合后匀浆, 组织匀浆液离心收集上清液待测。按照 ELISA 检测试剂盒说明书, 450 nm 波长检测吸光度 (Absorbance, A) 值。计算各组小鼠血清中 NT-pro BNP、cTnI、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平, 以及血清和心肌组织中 MPO-DNA 和 NE-DNA 水平。

**1.2.5 HE 染色和 Masson 染色** 取心肌组织置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h 后进行石蜡包埋, 制作切片。组织切片遵循 HE 和 Masson 染色试剂盒说明书进行染色, 观察各组小鼠心肌组织病理学变化和胶原纤维的沉淀情况, 拍照留存。

**1.2.6 免疫荧光** 取心肌组织置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h 后进行 OCT 包埋。切片加入 0.5% Triton X-100 浸泡 15 min, 10% 山羊血清封闭 2 h, 加入一抗 (Ly6G、MPO, 1:500 稀释) 4  $^{\circ}$ C 孵育过夜, PBS 清洗 3 次, 避光环境下加入荧光素标记的二抗, 室温孵育 2 h, 弃去二抗加入 DAPI, 室温孵育 15 min, PBS 清洗 3 次后封片, 荧光显微镜下观察并拍照。

**1.2.7 Western blot 检测** 取心肌组织, 与 RIPA 组织裂解液混合后匀浆, 遵循 RIPA 试剂盒说明书抽提蛋白, BCA 法检测蛋白浓度。上样后进行 SDS-PAGE 电泳、转膜, 5% 脱脂奶粉室温封闭 1 h, TBST 洗膜 3 次, 加入一抗 (TLR4、MPO、NE、cit-H3、GAPDH, 1:1 000 稀释) 4  $^{\circ}$ C 冰箱孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1:3 000 稀释), 室温孵育 1 h。ECL 化学发光法显色, 条带经 ImageJ 软件分析得出 TLR4、MPO、NE、

cit-H3 蛋白表达含量。

**1.3 统计学处理** 采用 SPSS 26.0 和 GraphPad Prism 8.0 进行数据分析和图表绘制。结果均以均数±标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析法, 两组间比较采用 LSD-*t* 分析法,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 各组小鼠心功能比较** 与 Control 组比较, Model 组小鼠 IVSD、LVEDD 和 LVESD 升高 (均  $P < 0.01$ ), FS 和 EF 降低 (均  $P < 0.01$ ); 与 Model 组比较, TAK-242 组小鼠 IVSD、LVEDD 和 LVESD 降低, FS 和 EF 升高 (均  $P < 0.01$ ), 而 LPS 组小鼠 IVSD、LVEDD 和 LVESD 升高, FS 和 EF 降低 (均  $P < 0.05$ )。与 LPS 组比较, LPS+DNaseI 组小鼠 IVSD、LVEDD 和 LVESD 降低, FS 和 EF 升高 (均  $P < 0.05$ )。见图 1。

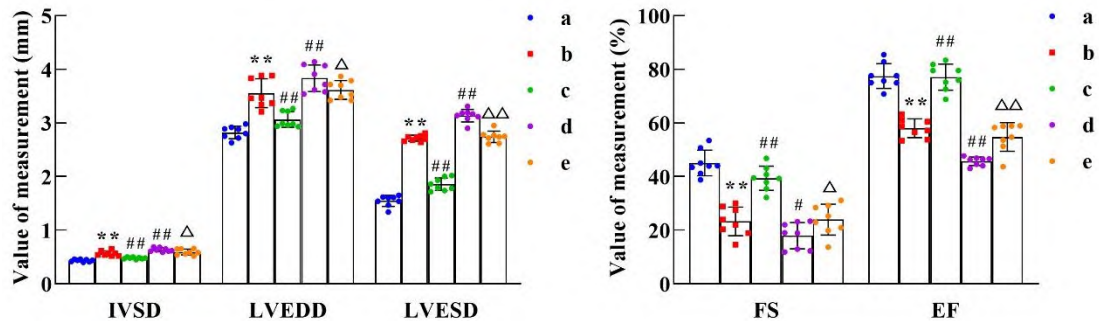


图 1 各组小鼠心功能比较

Fig.1 Comparison of cardiac function of mice in each group

a: Control group; b: Model group; c: TAK-242 group; d: LPS group; e: LPS+DNase I group; \*\* $P < 0.01$  vs Control group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs Model group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs LPS group.

**2.2 各组小鼠血清心肌损伤标志物及炎症指标水平** 与 Control 组比较, Model 组小鼠血清中心肌损伤标志物 NT-pro BNP、cTnI 及炎症指标 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平升高 (均  $P < 0.01$ ); 与 Model 组比较, TAK-242 组小鼠血清中 NT-pro BNP、cTnI、IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平降低 (均  $P < 0.01$ ), 而 LPS 处理则进一步加剧其升高 (均  $P < 0.05$ ); 与 LPS 组比较, LPS+DNaseI 组小鼠血清 NT-pro BNP、cTnI 及 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平降低 (均  $P < 0.05$ )。见图 2。

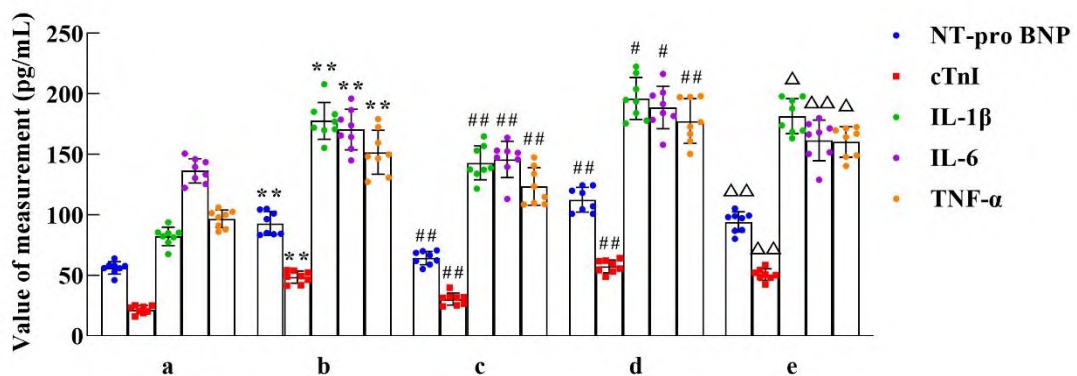


图 2 各组小鼠血清心肌损伤标志物及炎症指标水平

Fig.2 Levels of serum myocardial injury markers and inflammatory indicators of mice in each group

a: Control group; b: Model group; c: TAK-242 group; d: LPS group; e: LPS+DNase I group;  
\*\* $P < 0.01$  vs Control group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$  vs Model group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs LPS group.

2.3 各组小鼠心肌组织病理学变化 心肌组织 HE 染色结果显示, Control 组小鼠心肌组织结构完整, 细胞排列整齐。Model 组和 LPS 组均表现出心肌细胞数量减少, 间隙增宽, 组织断裂及排列紊乱。TAK-242 组心肌损伤较 Model 组有明显改善, 而 LPS+DNaseI 联合干预也对 LPS 诱导的心肌损伤具有修复作用。见图 3。

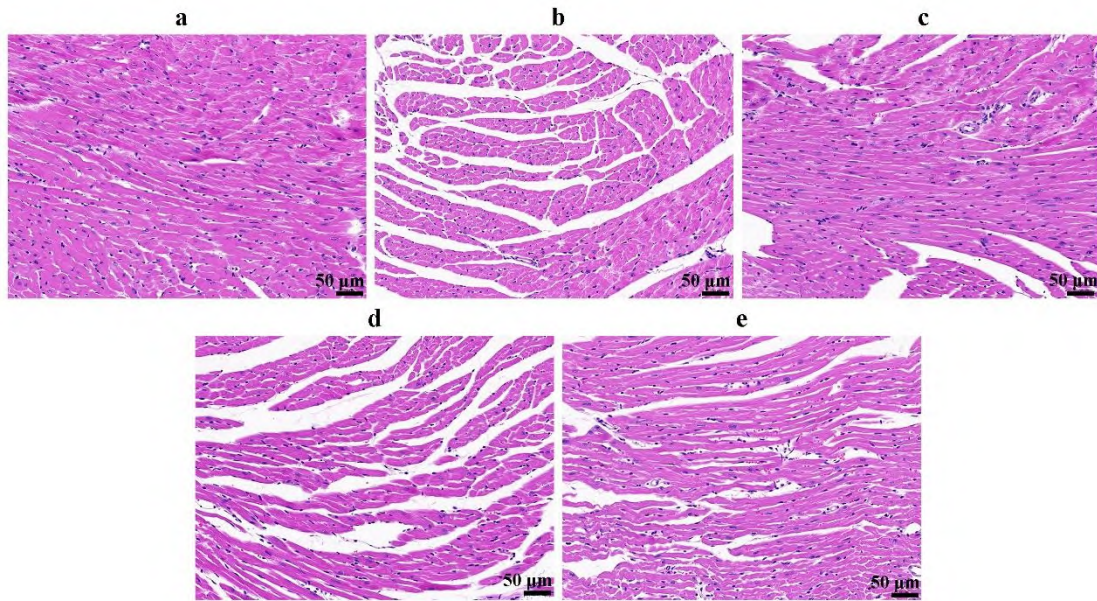


图 3 各组小鼠心肌组织病理学变化  $\times 200$

Fig.3 Histopathological changes in myocardial tissue of mice in each group  $\times 200$

a: Control group; b: Model group; c: TAK-242 group; d: LPS group; e: LPS+DNase I group.

2.4 各组小鼠心肌组织胶原纤维的沉淀情况 心肌组织 Masson 染色结果显示, 与 Control 组比较, Model 组小鼠心肌组织胶原纤维沉淀明显增多, 提示心肌组织纤维化严重; 与 Model 组比较, TAK-242 组小鼠心肌组织胶原纤维沉淀减少, 而 LPS 组小鼠心肌组织胶原纤维沉淀增多; 与 LPS 组比较, LPS+DNaseI 组小鼠心肌组织胶原纤维沉淀减少。见图 4。

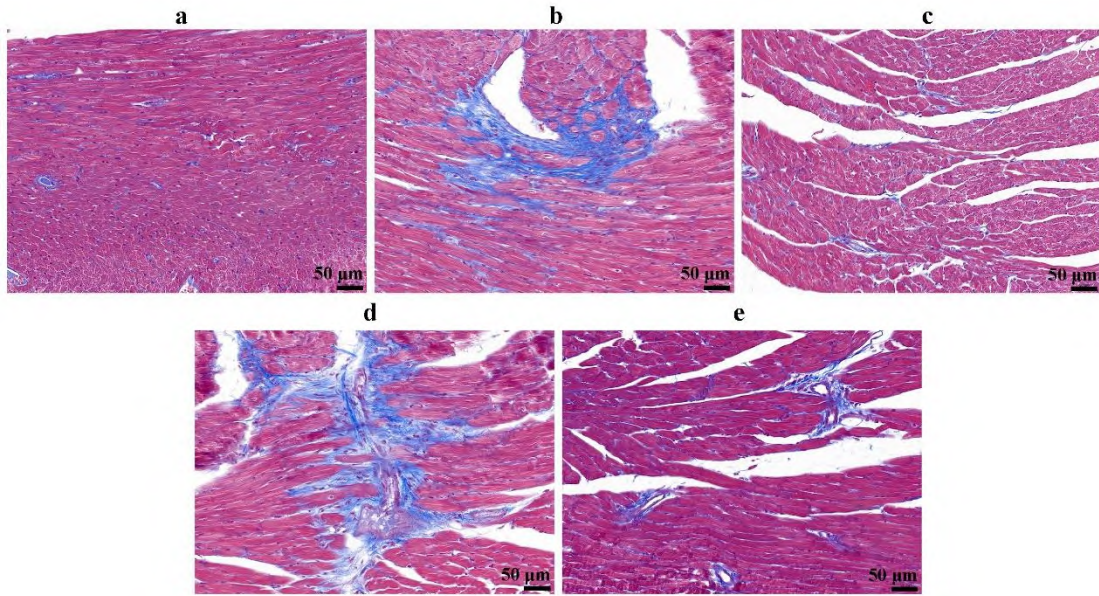


图 4 各组小鼠心肌组织胶原纤维的沉淀情况  $\times 200$

**Fig.4 Precipitation of collagen fibers in myocardial tissues of mice in each group  $\times 200$**

a: Control group; b: Model group; c: TAK-242 group; d: LPS group; e: LPS+DNase I group; Blue areas represent collagen deposition.

**2.5 各组小鼠血清及心肌组织中 MPO-DNA 和 NE-DNA 含量** ELISA 检测各组小鼠血清和心肌组织中 MPO-DNA 和 NE-DNA 水平, 结果显示, 与 Control 组比较, Model 组小鼠血清及心肌组织中 MPO-DNA 和 NE-DNA 水平升高 (均  $P < 0.01$ ); 与 Model 组比较, TAK-242 组小鼠血清及心肌组织中 MPO-DNA 和 NE-DNA 水平降低 (均  $P < 0.01$ ), 而 LPS 处理则进一步加剧其升高 (均  $P < 0.01$ ); 与 LPS 组比较, LPS+DNase I 组小鼠血清及心肌组织中 MPO-DNA 和 NE-DNA 水平降低 (均  $P < 0.05$ )。见图 5。

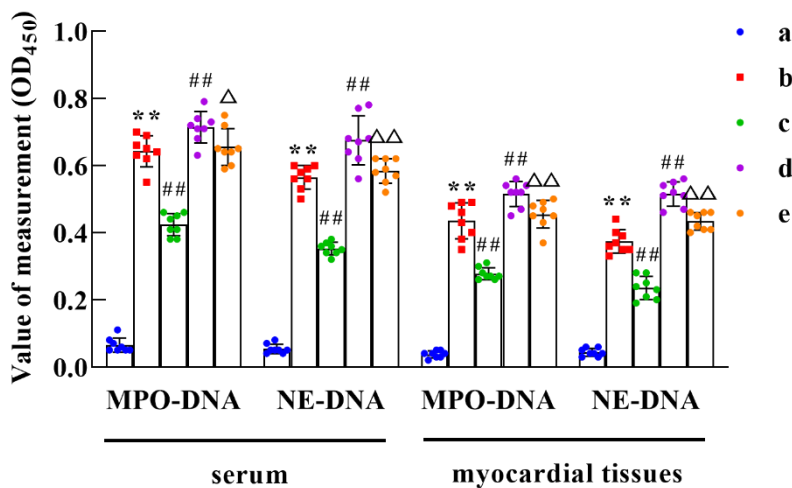


图 5 各组小鼠血清及心肌组织中 MPO-DNA 和 NE-DNA 水平

**Fig.5 Levels of MPO-DNA and NE-DNA in the serum and myocardial tissues of mice in each group**

MPO-DNA and NE-DNA levels are presented as absorbance values measured at 450 nm. a: Control group; b: Model group; c: TAK-242 group; d: LPS group; e: LPS+DNase I group; \*\* $P<0.01$  vs Control group; ## $P<0.01$  vs Model group;  $\Delta P<0.05$ ,  $\Delta\Delta P<0.01$  vs LPS group.

**2.6 各组小鼠心肌组织中 Ly6G 与 MPO 共定位水平** 与 Control 组比较, Model 组小鼠心肌组织中中性粒细胞标志物 Ly6G 与 NETs 标志物 MPO 共定位水平升高( $P<0.01$ ); 与 Model 组比较, TAK-242 组小鼠心肌组织中 Ly6G 与 MPO 共定位水平降低 ( $P<0.01$ ), LPS 组小鼠心肌组织中 Ly6G 与 MPO 共定位水平升高 ( $P<0.01$ ); 与 LPS 组比较, LPS+DNaseI 组小鼠心肌组织中 Ly6G 与 MPO 共定位水平降低 ( $P<0.01$ )。见图 6。

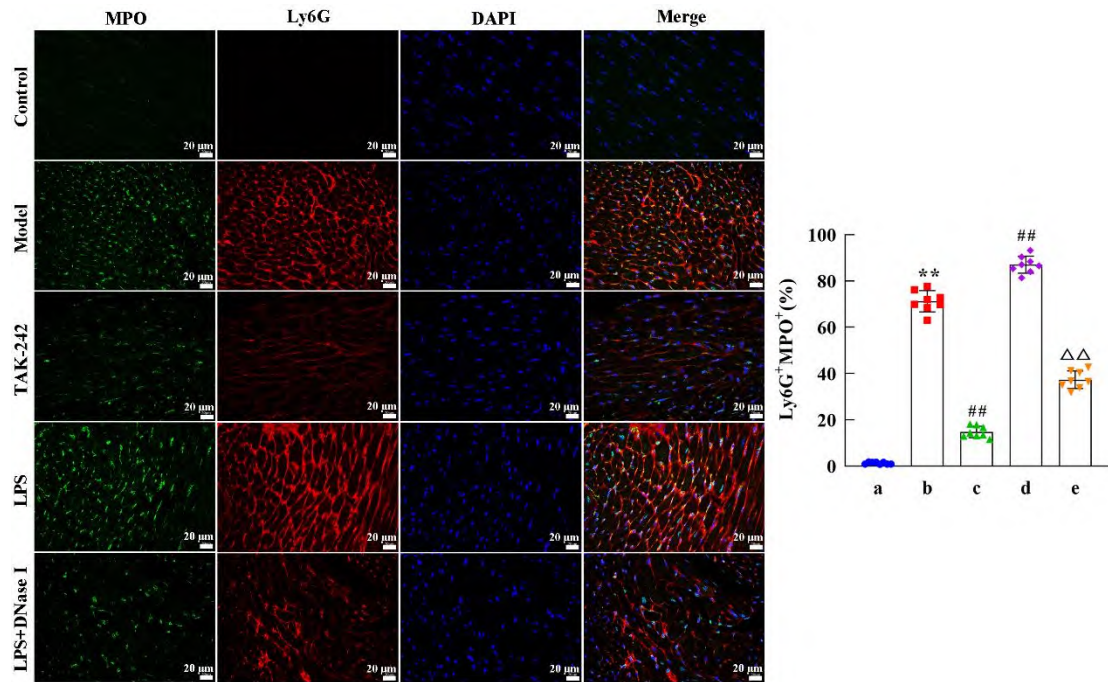


图 6 各组小鼠心肌组织中 Ly6G 与 MPO 共定位水平

**Fig.6 Co-localization levels of Ly6G and MPO in myocardial tissues of mice in each group** a: Control group; b: Model group; c: TAK-242 group; d: LPS group; e: LPS+DNase I group; \*\* $P<0.01$  vs Control group; ## $P<0.01$  vs Model group;  $\Delta\Delta P<0.01$  vs LPS group; Bar=20  $\mu$ m.

**2.7 各组小鼠心肌组织中 TLR4、MPO、NE、cit-H3 蛋白表达量** 与 Control 组比较, Model 组小鼠心肌组织中 TLR4、MPO、NE、cit-H3 蛋白表达量升高 (均  $P<0.01$ ); 与 Model 组比较, TAK-242 组小鼠心肌组织中 TLR4、MPO、NE、cit-H3 蛋白表达量降低 (均  $P<0.01$ ), 而 LPS 处理则进一步加剧其升高 (均  $P<0.01$ ); 与 LPS 组比较, LPS+DNaseI 组小鼠心肌组织中 TLR4、MPO、NE、cit-H3 蛋白表达量降低 (均  $P<0.05$ )。见图 7。

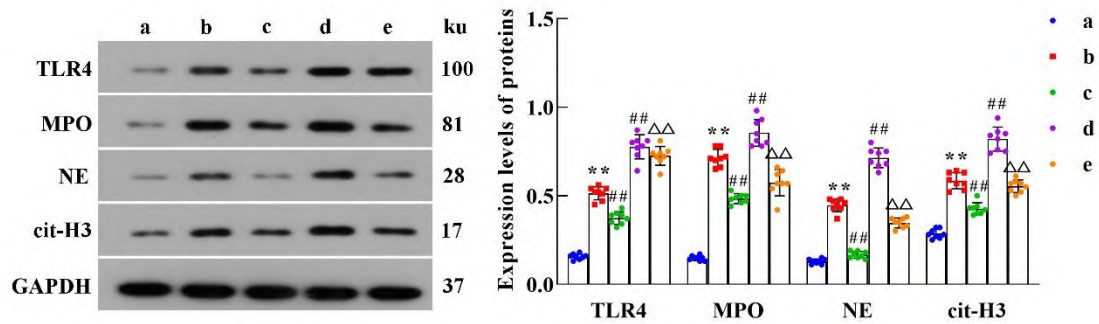


图 7 各组小鼠心肌组织中 TLR4、MPO、NE、cit-H3 蛋白表达量

Fig.7 Expression levels of TLR4, MPO, NE and CT-H3 proteins in the myocardial tissues of mice in each group

a: Control group; b: Model group; c: TAK-242 group; d: LPS group; e: LPS+DNase I group;  
 \*\* $P < 0.01$  vs Control group; ## $P < 0.01$  vs Model group;  $\Delta P < 0.05$ ,  $\Delta\Delta P < 0.01$  vs LPS group.

### 3 讨论

由于人口老龄化、全球人口增长等因素，HF 的患病率呈逐年上升趋势，给患者家庭和社会带来严重负担。心脏超声检查是心脏疾病诊断中的常规手段，能够直观反映患者心脏结构及功能异常。NT-pro BNP 是一种主要由心室分泌的心脏激素，常被用于评估心脏功能及诊断 HF 等心脏疾病的严重程度<sup>[5]</sup>。cTnI 作为心肌细胞特异性表达的调控蛋白，是心肌细胞损伤或坏死的特异性生物标志物，临床用于评估心肌损伤严重程度及心功能受损状况。ISO 是一种非选择性  $\beta$  受体激动剂，被广泛用于诱导小鼠心脏损伤<sup>[6]</sup>，其中，急性给药模型可用于模拟应激诱发的心肌病，而通过渗透泵实现持续给药的慢性模型则能够更好地模拟人类 HF 的病理特征。本研究通过向小鼠背部皮下植入渗透微型泵，持续输注 ISO，构建 HF 小鼠模型，结果显示 Model 组小鼠心肌组织病理损伤明显，心肌组织胶原纤维的沉淀增多且 IVSD、LVEDD、LVESD 显著增加，FS 和 EF 显著降低，血清中心肌损伤标志物 NT-pro BNP、cTnI 水平显著上调，提示 HF 小鼠心脏结构及功能受损。

研究<sup>[7]</sup>显示，老龄化伴随的心肌和血管系统退行性变化及免疫系统的失调，会引发慢性低度炎症、氧化应激和代谢紊乱等症状，加速老年患者的心功能衰退。作为先天免疫反应的一部分，TLR 在与 HF 相关的致病性炎症反应中充当激活炎症因子的上游调节因子，被认为是 HF 的潜在治疗靶点。心肌细胞损伤后释放的损伤相关分子被 PRR（如 TLR）识别，激活先天性免疫级联反应，促进炎症因子分泌。衰竭心肌组织内 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  等炎症因子表达水平呈现病理性上调，通过促进心肌细胞凋亡、坏死，加重心肌纤维化等途径促使 HF 发展恶化<sup>[8]</sup>。进一步研究<sup>[9-11]</sup>揭示，TLR4 在心肌炎症性疾病中具有关键调控作用，其异常活化可显著加剧包括 HF、病毒性心肌炎、心肌梗死等多种心血管疾病的病理进程。在本研究中，Model 组小鼠心肌组织中 TLR4 蛋白表达显著升高，经 TLR4 抑制剂 TAK-242 干预后，HF 小鼠心功能明显改善，炎症指标 IL-1 $\beta$ 、IL-6、TNF- $\alpha$  水平降低。而采用 LPS 干预激活

TLR4 信号后, HF 小鼠心脏损伤加重, 炎症指标进一步上调。这些结果提示, TLR4 信号通路的激活参与了 HF 小鼠心肌炎症反应的调控, 抑制 TLR4 表达可有效减轻心肌炎症, 从而改善 HF 小鼠心脏功能。

NETs 是中性粒细胞被激活后释放的一种胞外网状结构, 属于机体抵御病原体入侵的第一道防线。Ly6G 是中性粒细胞高表达的表面标记物, 与 MPO 共定位可特异性标记中性粒细胞来源的 NETs 结构, 直接反映 NETs 形成水平。过量释放的 NETs 通过为血小板聚集提供支架、激活凝血途径及刺激内皮细胞释放促凝物质, 显著增加血栓形成和微循环障碍风险<sup>[12]</sup>。冠状动脉血栓可导致心肌氧供不足, 引发心绞痛、心肌损伤甚至心脏骤停, 同时可能诱发心脏瓣膜功能障碍, 加重 HF 进程<sup>[13]</sup>。研究<sup>[14]</sup>表明, NETs 在心肌缺血和损伤中的表达显著增高, 其水平与心血管疾病的严重程度呈正相关性, 其相关成分(如 MPO-DNA、NE-DNA、cit-H3)已成为预测 HF 风险的潜在生物标志物。Zhang et al<sup>[15]</sup>研究显示, 射血分数保留的心力衰竭患者心肌组织中 cit-H3 水平升高, 提示 NETs 与 HF 的病理过程密切相关。本研究结果显示, TLR4 抑制剂 TAK-242 可显著降低 HF 小鼠心肌 MPO、NE、cit-H3 蛋白表达及 Ly6G<sup>+</sup>MPO<sup>+</sup>共定位水平。同时, 与单独使用 TLR4 激动剂 LPS 相比, 联合应用 NETs 抑制剂 DNaseI 干预的 HF 小鼠心肌损伤显著减轻, 进一步证实 TLR4 通过促进 NETs 形成加剧 HF 病理损伤, TLR4 抑制剂可能通过下调 NETs 水平发挥心肌保护作用。

综上所述, TLR4 及 NETs 在老龄 HF 小鼠心肌组织中异常增多, 给予 TLR4 抑制剂 TAK-242 干预可降低炎症水平, 改善 HF 小鼠心功能, 其机制可能与抑制 TLR4 介导的 NETs 形成有关。但 HF 过程中心肌炎症反应涉及多种分子机制, TLR4 表达在 HF 发病机制中的作用以及治疗方案中的潜在价值仍需深入探索。

#### 参考文献

- [1] Zhang Y, Wu J, Dong E, et al. Toll-like receptors in cardiac hypertrophy[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1143583. doi:10.3389/fcvm.2023.1143583.
- [2] Liu H, Chu S, Wu Z. Loss of toll-like receptor 4 ameliorates cardiovascular dysfunction in aged mice[J]. *Immun Ageing*, 2021, 18(1): 42. doi:10.1186/s12979-021-00251-y.
- [3] Zhao M, Zheng Z, Yin Z, et al. DEL-1 deficiency aggravates pressure overload-induced heart failure by promoting neutrophil infiltration and neutrophil extracellular traps formation[J]. *Biochem Pharmacol*, 2023, 218: 115912. doi:10.1016/j.bcp.2023.115912.
- [4] Kim H J, Kim H, Lee J H, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4): new insight immune and aging[J]. *Immun Ageing*, 2023, 20(1): 67. doi:10.1186/s12979-023-00383-3.
- [5] 陈方圆, 焦长青, 黎 冉, 等. BNP 水平联合心脏结构指标对高血压伴 HFREF 的临床预

测价值[J]. 安徽医科大学学报, 2021, 56(3): 471-5. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.027.

Chen F Y, Jiao C Q, Li R, et al. Clinical prediction value of BNP combined with LAD and LVEDD in hypertension patients with heart failure[J]. Acta Univ Med Anhui, 2021, 56(3): 471-5. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2021.03.027.

[6] Baburina Y, Krestinin R, Fedorov D, et al. The improvement of functional state of brain mitochondria with astaxanthin in rats after heart failure[J]. Int J Mol Sci, 2022, 24(1):31 . doi:10.3390/ijms24010031.

[7] Ji H, Kwan A C, Chen M T, et al. Sex differences in myocardial and vascular aging[J]. Circ Res, 2022, 130(4): 566-77. doi:10.1161/CIRCRESAHA.121.319902.

[8] Li J, Wang M, Yao L, et al. Yixin granules reduce myocardial inflammation and fibrosis in rats with heart failure by inhibiting the expression of ADAMTS8[J]. Int Heart J, 2023, 64(4): 741-9. doi:10.1536/ihj.22-715.

[9] Vaez H, Soraya H, Garjani A, et al. Toll-like receptor 4 (TLR4) and AMPK relevance in cardiovascular disease[J]. Adv Pharm Bull, 2023, 13(1): 36-47. doi:10.34172/apb.2023.004.

[10] Tao D D, Li Y, Tian X J, et al. Effect of FoxO1 on cardiomyocyte apoptosis and inflammation in viral myocarditis *via* modulation of the TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway[J]. Int Heart J, 2023, 64(4): 732-40. doi:10.1536/ihj.22-627.

[11] 胡楚婷, 宋 煜, 王 琳. TLR4 参与急性心肌梗死及其治疗的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(8): 705-11. doi:10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.08.009.

Hu C T, Song Y, Wang L. Research progress of TLR4 in acute myocardial infarction and its treatment[J]. Chin J Arterioscler, 2024, 32(8): 705-11. doi:10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.08.009.

[12] Ronchetti L, Terrenato I, Ferretti M, et al. Correction: circulating cell free DNA and citrullinated histone H3 as useful biomarkers of NETosis in endometrial cancer[J]. J Exp Clin Cancer Res, 2023, 42(1): 278. doi:10.1186/s13046-023-02826-7.

[13] Carnevale R, Sciarretta S, Valenti V, et al. Low-grade endotoxaemia enhances artery thrombus growth *via* Toll-like receptor 4: implication for myocardial infarction[J]. Eur Heart J, 2020, 41(33): 3156-65. doi:10.1093/eurheartj/ehz893.

[14] Carminita E, Crescence L, Panicot-Dubois L, et al. Role of neutrophils and NETs in animal models of thrombosis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(3): 1411. doi:10.3390/ijms23031411.

- [15] Zhang X L, Wang T Y, Chen Z, et al. HMGB1-promoted neutrophil extracellular traps contribute to cardiac diastolic dysfunction in mice[J]. *J Am Heart Assoc*, 2022, 11(4): e023800. doi:10.1161/JAHA.121.023800.