

TLR4 对大鼠急性脑梗死体积与 Nrf2、HO-1 表达水平的影响

贾复敏 魏衡 周瑞 余勇飞 徐子辉 尹虹祥

【摘要】 目的 探讨 Toll 样受体 4(TLR4)对大鼠急性脑梗死体积与核因子 E2 相关性因子 2(Nrf2)、血红素加氧酶-1(HO-1)表达水平的影响。**方法** 制备大鼠急性脑缺血模型后,比较模型组与 TLR4 特异性抑制剂-TAK-242 组行为学及脑梗死体积、Nrf2、HO-1 表达水平改变;通过 Morris 水迷宫实验比较不同组小鼠脑梗死后学习功能的恢复;TTC 染色比较不同组脑梗死体积变化;免疫组织化学染色及 Western Blot 比较各组 Nrf2、HO-1 表达水平变化。**结果** 与假手术组比较,模型组与 TAK-242 组潜伏期延长,穿越平台次数减少,同时 TAK-242 组潜伏期明显短于模型组($P<0.05$);TAK-242 组穿越平台的次数明显多于模型组($P<0.05$)。TAK-242 组脑梗死体积明显小于模型组($P<0.05$)。Nrf2、HO-1 主要表达在神经元与星形胶质细胞中。另外,假手术组 Nrf2、HO-1 的表达水平明显低于模型组与 TAK-242 组,同时 TAK-242 组 Nrf2、HO-1 的表达水平明显高于模型组。3 组大鼠 Nrf2、HO-1 表达水平有明显差异($P<0.05$),且 TAK-242 组 Nrf2、HO-1 的表达水平显著高于模型组($P<0.05$)。**结论** 通过 TLR4 特异性抑制剂-TAK-242 干预可以显著改善大鼠急性脑缺血的神经功能,减小脑梗死体积,促进神经元与星形胶质细胞 Nrf2、HO-1 的表达。

【关键词】 脑梗死 Toll 样受体 4 核因子 E2 相关性因子 2 血红素加氧酶-1 Toll 样受体 4 特异性抑制剂

【中图分类号】 R743.3 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1007-0478(2019)01-0013-04

【DOI】 10.3969/j.issn.1007-0478.2019.01.003

The effect of TLR4 on cerebral infarction volume and expression levels of Nrf2 and HO-1 in acute cerebral infarction rats Jia Fumin, Wei Heng, Zhou Rui, et al. Department of Neurology, Hubei Provincial Hospital of Integrated Chinese & Western Medicine, Wuhan 430015

【Abstract】 Objective To investigate the effect of TLR4 on the volume and expression levels of Nrf2 and HO-1 in acute cerebral infarction rats. **Methods** The changes of behavior, infarct volume, Nrf2 and HO-1 expression levels between model group and TAK-242 group were compared after acute cerebral ischemia. The Morris water maze test was used to compare the recovery of learning function after injury among different groups, and the changes of infarct volume among different groups were compared with TTC staining, and the changes of Nrf2 and HO-1 expression levels among different groups were compared by immunohistochemistry and Western Blot. **Results** Compared with the sham group, the latency of the model group and the TAK-242 group was prolonged and the number of crossing platform decreased, while the latency of the TAK-242 group was significantly shorter than that of the model group ($P<0.05$), and the number of the TAK-242 group crossing the platform was significantly more than that of the model group ($P<0.05$). The volume of cerebral infarction in TAK-242 group was significantly smaller than that in model group ($P<0.05$). Nrf2 and HO-1 were mainly expressed in neuronal cells and astrocytes, and the expression levels of Nrf2 and HO-1 in the sham operation group were significantly lower than those in the model group and the TAK-242 group. At the same time, the expression levels of Nrf2 and HO-1 in the TAK-242 group were significantly higher than that in the model group. There was significant difference in the expression levels of Nrf2 and HO-1 among the three groups ($P<0.05$), and the expression levels of Nrf2 and HO-1 in group TAK-242 were significantly higher than those in the model group ($P<0.05$). **Conclusion** The intervention of TLR4 specific inhibitor - TAK-242 could significantly improve the neural function of acute cerebral ischemia injury in rats, reduce the infarct volume, and promote the expression levels of Nrf2 and HO-1 in neurons and astrocytes.

【Key words】 Cerebral infarction TLR4 Nrf2 HO-1 TAK-242

近年来急性缺血性脑卒中逐渐成为危害国人健康的重要疾病,成为近年研究的热点。急性缺血性脑损伤的机制复杂,其中氧化应激、炎症反应等机制发挥了重要作用,是导致继发性损伤的关键因素^[1]。有研究表明,Toll样受体4(Toll-like receptors 4;TLR4)作为主要的固有免疫受体类型,过与相应的损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns;DAMPs)结合,启动下游的髓样分化因子88(MyD88)依赖/Myd88非依赖信号通路,进而激活核因子- κ B(nuclear factor-kappa B,NF- κ B),发挥调节免疫反应,启动维持继发性损伤的作用^[2]。另外,核因子E2相关性因子2(nuclear factor erythroid 2-related factor 2,Nrf2)是细胞内调节氧化应激的重要转录因子,在氧化应激条件下通过与相应的顺式作用元件结合,激活抗氧化系统,启动血红素加氧酶-1(hemeoxygenase-1,HO-1)等抗氧化酶基因的表达,从而发挥抗氧化作用^[3]。目前在急性脑缺血中TLR4是否通过影响Nrf2与HO-1表达,进而调控脑缺血损伤尚缺乏相关文献报道。本研究拟通过建立大鼠永久性局灶性脑缺血模型,通过TLR4特异性抑制剂-TAK-242干预,探讨TLR4对小鼠急性脑梗死组织体积与Nrf2、HO-1表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 动物选择与分组 成年雄性SD大鼠(体重230~275 g),由湖北省实验动物研究中心提供,标准饮食及相同的饲养环境。实验分为假手术组、模型组、TAK-242组,每组大鼠各14只。

1.2 急性脑缺血模型建立 采用改良Zea-Longa法制备大鼠急性脑缺血模型,简述如下:术前禁食24 h、禁水4 h;0.6%戊巴比妥溶液,80mg/kg,腹腔注射麻醉;固定大鼠;颈正中切口,暴露并钝性分离左侧颈总动脉、颈外动脉、颈内动脉;动脉瘤夹暂时夹闭颈外动脉远端、颈总动脉近心端、颈内动脉;于动脉分叉部剪小口,轻轻插入蘸有石蜡的直径0.26 mm尼龙线约18~20 mm,稍遇阻力停止,持续3~5 min;结扎颈总动脉,逐层缝合^[4]。假手术组不行线栓与结扎外,余步骤同模型组。根据Bederson评分法判断模型建立是否成功。TAK-242组于术前3d开始,以0.5 mg TAK-242/kg体质量的计量腹腔注射TAK-242,1次/d,持续至术后第7 d。

1.3 Morris水迷宫实验 于手术后24 h行水迷宫

实验。水池内放入墨水使之成为黑色,水迷宫直径1 m,水温20℃,平台位于水面下2 cm,分别行(1)定位航行试验:试验前1 d在水池内自由游泳60 s,试验时间共5 d,每天上午进行1次(随机从每个象限的中点内壁式入水1次)。图像采集及分析系统自动记录保存大鼠的运动轨迹、找到站台的潜伏期、游泳时间、游泳速度、游泳距离及寻找站台的搜寻策略等信息。 ≥ 60 s仍未找到站台者由操作者引上站台休息5 s并将潜伏期记为60 s;(2)空间探索试验:于第6 d上午将站台撤除,选定和站台区域相对象限的中点为入水点,记录60 s内为搜寻站台而穿过站台区域的次数、时间比例及搜寻策略。

1.4 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(2,3,5-triphenyltetrazolium chloride,TTC)染色0.6%戊巴比妥溶液,80 mg/kg,腹腔注射麻醉;经腹主动脉灌注磷酸盐缓冲液(phosphate-buffered saline,PBS)100 mL;快速断头取脑,4℃的冰生理盐水中冰冻5 min后由前极向后沿冠状位用Rat Brain Matrix每隔2 mm切片;含2.0% TTC的磷酸盐缓冲液,37℃避光孵育30 min,每5 min轻柔晃动平皿1次;PBS液漂洗3次,每次1 min;4%的中性福尔马林PBS溶液中固定。照片采用Image-J软件计算水肿体积。

1.5 免疫组织化学染色 组织标本包埋切片,二甲苯脱蜡,梯度酒精水化,0.01 mol/L枸橼酸缓冲液高温抗原修复7 min,3% H_2O_2 10 min,10%山羊血清室温封闭1 h;Nrf2单克隆兔抗(1:100, proteintech公司,USA)、HO-1多克隆兔抗(1:100, proteintech公司,USA)4℃孵育过夜;通用型抗鼠/兔免疫组化检测试剂盒(proteintech公司,USA)检测Nrf2、HO-1抗体结合情况并显色;苏木素复染2 min后进行脱水处理,中性树脂封片。采用Image-J(National Institutes of Health, USA)软件分析图像,每一只大鼠的每一张免疫组化片子,任取3个200倍视野,测量区域的阳性累积吸光度,计算每一组的阳性细胞比例。

1.6 Western Blot 腹腔注射麻醉,冰上断头取脑,取脑梗死组织,加入RIPA裂解液(每10 mg组织150 μ L RIPA),超声粉碎,离心取上清,BCA法测定蛋白水平,等量蛋白经SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转印,封闭,孵育一抗(GAPDH,1:1000,博士德生物科技公司;Nrf2,1:1000,Cell Signaling;HO-1,1:1000,Cell Signaling),孵育二抗(羊抗小鼠,1:2000,博士德生物科技公司;羊抗兔,1:1000,Pro-

teintech Group), ECL 反应, 曝光机采集信号, GeneTools 分析 OD 值, 目标蛋白 OD 值与内参照 β -Actin OD 值的比值为相对表达水平。

1.7 统计学处理 采用 SPSS 18.0 软件 (SPSS 16.0; SPSS Inc., USA)。计数资料均以均数 \pm 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 组间差异比较前行方差齐性检验, 方差齐者行 t 检验, 方差不齐者行秩和检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 TAK-242 对大鼠学习能力的影 响 与假手术组比较, 模型组与 TAK-242 组潜伏期均明显延长, TAK-242 组潜伏期明显短于模型组 ($P < 0.05$); 与假手术组比较, 模型组与 TAK-242 组穿越平台次数均明显减少, TAK-242 组穿越平台的次数明显多于模型组 ($P < 0.05$) (图 1)。

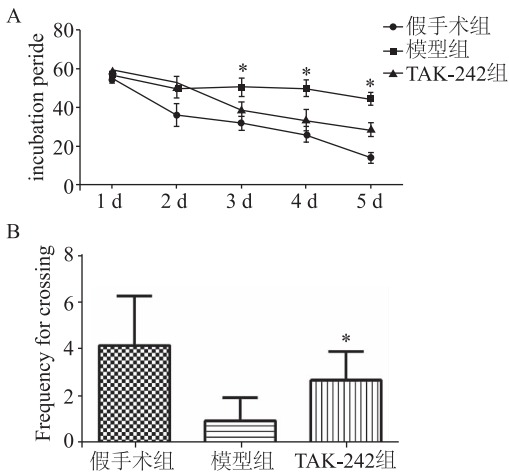


图 1 Morris 水迷宫实验 A 为 3 组潜伏期;B 为 3 组穿越平台次数;与模型组比较, * $P < 0.05$

2.2 TAK-242 对脑梗死体积的影响 假手术组中未见梗死灶。与假手术组比较, 模型组与 TAK-242 组均可见明显梗死灶; TAK-242 组脑梗死体积比例明显小于模型组 ($P < 0.05$) (图 2)。

2.3 TAK-242 对脑梗死区 Nrf2、HO-1 表达水平的影响 通过免疫组织化学染色检测梗死区 Nrf2、HO-1 的表达水平, Nrf2、HO-1 主要表达在神经元与星形胶质细胞中。另外, 假手术组 Nrf2、HO-1 的表达水平明显低于模型组与 TAK-242 组, 同时 TAK-242 组 Nrf2、HO-1 的表达水平明显高于模型组 (图 3)。进一步通过 Western Blot 检测 Nrf2、HO-1 的表达水平, 发现 3 组大鼠 Nrf2 ($F = 12.33$, $P = 0.01$)、HO-1 ($F = 8.56$, $P = 0.02$) 表达水平有

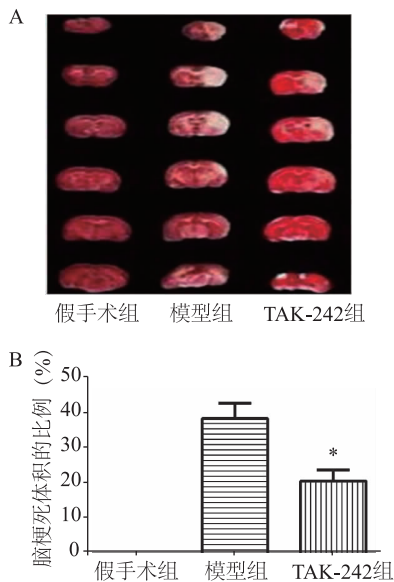


图 2 TTC 染色 A 为 3 组梗死灶;B 为 3 组梗死体积百分比;与模型组比较, * $P < 0.05$

明星差异, 且 TAK-242 组 Nrf2 ($t = 4.117$, $P = 0.015$)、HO-1 ($t = 3.448$, $P = 0.026$) 的表达水平显著高于模型组 (图 3)。

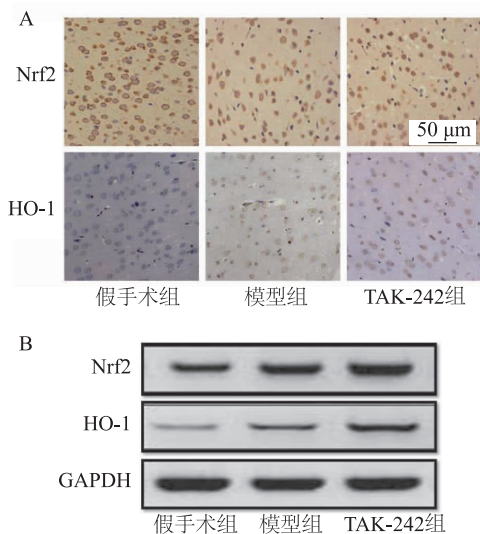


图 3 免疫组织化学染色及 Western Blot A 为 3 组脑梗死灶组织 Nrf2、HO-1 染色;B 为 3 组脑梗死组织 Nrf2、HO-1 蛋白水平

3 讨 论

最近研究表明, Nrf2/ARE 信号通路是神经元对损伤的重要调节机制, 通过启动抗氧化应激系统, 发挥神经元保护作用^[5]。但是, 关于 TLR4 是否通过调控 Nrf2/ARE 信号通路来发挥神经保护作用尚不明确。本研究发现, 通过腹腔注射 TLR4 抑制

剂可以显著提高细胞 Nrf2、HO-1 的表达水平,增强细胞的抗氧化能力,发挥神经保护作用。

有研究表明,Nrf2 是中枢神经系统组织的重要保护性生存因子和抗氧化防御反应的主调节器。Nrf2 是一种碱性亮氨酸拉链转录因子,它结合和激活许多抗氧化剂和解毒基因的启动子中的抗氧化应答元件(WAS)^[6]。Nrf2 的活性通常通过与 KEAP1 的特异性结合在细胞质中被抑制。然而,当具有亲电剂或具有巯基修饰能力的化合物刺激时 KEAP1 对 Nrf2 的抑制作用丢失,允许 Nrf2 蛋白转运到其激活的细胞核上,结合到 HO-1 启动子上^[7]。有研究表明,Nrf2 和 HO-1 在脑缺血中的表达有一定的时间规律,在缺血后 3 h 表达水平明显上调,24 h 达到高峰,后逐渐下降,这为 Nrf2、HO-1 信号通路在脑卒中后早期起重要作用提供了证据^[8]。因此,推测早期上调 Nrf2、HO-1 表达水平可能对脑缺血大有好处。Nrf2 和 HO-1 在脑卒中后 48 h 和 72 h 逐渐降低,这可能是因为 KEAP1 的作用。KEAP1 激活下游信号通路,通过下调其基因表达而促进 Nrf2 降解。这将允许 Nrf2 在转录前激活其作为转录激活子的作用^[9]。

TLRs 作为主要的固有免疫相关受体,在启动继发性损伤中发挥了重要作用。在中枢系统中 TLR4 除表达在小胶质细胞外,在星形胶质细胞、神经元等其他细胞上亦有表达^[10]。因此,TLR4 可能在调节中枢神经系统炎症反应中发挥核心作用。有研究表明,脑梗死后大量的 DAMPs 结合到 TLR4 受体上,激活下游的 MyD88 依赖/MyD88 非依赖信号通路,进而激活转录因子 NF- κ B,启动炎症因子或者炎症相关因子的转录,最终释放大量的炎症因子与炎症趋化因子,加重神经损伤^[11]。通过敲除 TLR4 或注射 TLR4 抑制剂可以显著降低脑梗死体积,改善脑梗死后神经功能^[12]。本研究亦证实,通过腹腔注射 TLR4 抑制剂-TAK-242 可以显著改善大鼠急性脑缺血后的神经功能,减少脑梗死体积。

既往的研究多重点探讨 TLR4 炎症反应的调节,但是 TLR4 是否通过调节抗氧化应激系统来发挥神经损伤作用尚不明确。肝缺血损伤的研究表明,Nrf2、HO-1 表达上调可以抑制 TLR4 的表达,但是通过抑制 TLR4 的表达能否使 Nrf2、HO-1 表达上调目前尚不清楚^[13]。本研究证实,通过抑制 TLR4 可以促进脑缺血性损伤中 Nrf2、HO-1 的表达,从而增强脑缺血后神经元以及星形胶质细胞抗

氧化应激能力,从而发挥神经保护作用。但是,由于 TLR4 的作用机制复杂,通过抑制 TLR4 改善神经功能,减少脑梗死体积的作用可能还存在其他机制的参与。因此,Nrf2、HO-1 在脑梗死中发挥作用的重要性还有待进一步探讨。

综上所述,本研究证实通过 TLR4 特异性抑制剂-TAK-242 干预可以显著改善大鼠急性脑缺血损伤的神经功能,减小脑梗死体积,促进神经元与星形胶质细胞 Nrf2、HO-1 的表达。

参 考 文 献

- [1] Lan L, Tao J, Chen A, et al. Electroacupuncture exerts anti-inflammatory effects in cerebral ischemia-reperfusion injured rats via suppression of the TLR4/NF- κ B pathway[J]. *Int J Mol Med*, 2013, 31(1): 75-80.
- [2] Jou I, Lee JH, Park SY, et al. Gangliosides trigger inflammatory responses via TLR4 in brain glia[J]. *American Journal of Pathology*, 2006, 168(5): 1619-1630.
- [3] Shah ZA, Li RC, Ahmad AS, et al. The flavanol (-)-epicatechin prevents stroke damage through the Nrf2/HO1 pathway (vol 30, pg 1951, 2010)[J]. *Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 2014, 34(4): 735.
- [4] Zhang J, Fu B, Zhang X, et al. Bicyclol upregulates transcription factor Nrf2, HO-1 expression and protects rat brains against focal ischemia[J]. *Brain Res Bull*, 2014, 100(1): 38-43.
- [5] Sahin K, Tuzcu M, Gencoglu H, et al. Epigallocatechin-3-gallate activates Nrf2/HO-1 signaling pathway in cisplatin-induced nephrotoxicity in rats[J]. *Life Sci*, 2010, 87(7/8): 240-245.
- [6] Chen LY, Wang LA, Zhang XJ, et al. The protection by Octreotide against experimental ischemic stroke: Up-regulated transcription factor Nrf2, HO-1 and down-regulated NF-kappa B expression[J]. *Brain Res*, 2012, 1475: 80-87.
- [7] Rao J, Qian X, Li G, et al. ATF3-mediated NRF2/HO-1 signaling regulates TLR4 innate immune responses in mouse liver ischemia/reperfusion injury[J]. *Am J Transplant*, 2015, 15(1): 76-87.
- [8] Kadam L, Gomez-Lopez N, Mial TN, et al. Rosiglitazone regulates TLR4 and rescues HO-1 and NRF2 expression in myometrial and decidual macrophages in Inflammation-Induced preterm birth[J]. *Reproductive Sciences*, 2017, 24(12): 1590-1599.
- [9] Yao XL, Liu SW, Ding W, et al. TLR4 signal ablation attenuated neurological deficits by regulating microglial M1/M2 phenotype after traumatic brain injury in mice[J]. *J Neuroimmunol*, 2017, 310: 38-45.
- [10] Pan N, Lu LY, Li M, et al. Xylometolol B alleviates cerebral infarction and neurologic deficits in a mouse stroke model by suppressing the ROS/TLR4/NF-kappa B inflammatory signaling pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2017, 38(9): 1236-1247.
- [11] Li LT, Zhang XJ, Cui LL, et al. Ursolic acid promotes the neuroprotection by activating Nrf2 pathway after cerebral ischemia in mice[J]. *Brain Res*, 2013, 1497(6): 32-39.
- [12] Chen NN, Wang JP, Liu HF, et al. The bone marrow mononuclear cells reduce the oxidative stress of cerebral infarction through PI3K/AKT/NRF2 signaling pathway[J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2017, 21(24): 5729-5735.
- [13] Wang X, Shen B, Sun DZ, et al. Aspirin ameliorates cerebral infarction through regulation of TLR4/NF-kappa B-mediated endoplasmic reticulum stress in mouse model[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(1): 479-487.