

# TAK-242 调控 TLR4/NF- $\kappa$ B 对大鼠冠状动脉微栓塞后心肌细胞凋亡的影响

王现涛 李浪 陆元喜 孙羽涵 贺文慨 梁家宝

**【摘要】目的** 探讨 TAK-242 调控 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路对大鼠冠状动脉微栓塞 (CME) 后心肌细胞凋亡的影响及意义。**方法** 45 只 SD 大鼠按照随机数字表法分为假手术组、CME 组和 CME + TAK-242 组 ( $n = 15$ )；经左心室注入微栓塞球构建 CME 模型；假手术组注射等量生理盐水；CME + TAK-242 组构建 CME 模型前 30 min 经尾静脉注射 TAK-242 (2 mg/kg)。各组术后 6 h 行心脏超声检测心功能；组织切片 HBFP 染色测定微梗死面积；TUNEL 法检测心肌细胞凋亡；荧光定量 PCR 检测 TLR4 mRNA 表达；Western blot 检测 TLR4、NF- $\kappa$ B p65 及活化 Caspase-3 蛋白表达。采用 SPSS 16.0 统计软件进行数据分析，计量资料以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示，组间比较采用单因素方差分析。**结果** 与假手术组比较，CME 组左室射血分数 (LVEF) 显著降低 [ (68.91  $\pm$  4.12)% 和 (84.80  $\pm$  2.51)% ,  $P < 0.05$ ]，心肌微梗死面积 ( $P < 0.05$ ) 及心肌细胞凋亡指数明显增加 [ (3.36  $\pm$  0.63)% 和 (0.19  $\pm$  0.08)% ,  $P < 0.05$ ]，TLR4、NF- $\kappa$ B p65 及活化 Caspase-3 表达水平显著增加 (均  $P < 0.05$ )；与 CME 组比较，CME + TAK-242 组 LVEF 明显改善 [ (75.58  $\pm$  5.01)% 和 (68.91  $\pm$  4.12)% ,  $P < 0.05$ ]，心肌微梗死面积比 [ (8.58  $\pm$  2.12)% 和 (14.65  $\pm$  4.23)% ,  $P < 0.05$ ] 及心肌细胞凋亡指数 [ (1.43  $\pm$  0.51)% 和 (3.36  $\pm$  0.63)% ,  $P < 0.05$ ] 明显减少，TLR4、NF- $\kappa$ B p65 及活化 Caspase-3 表达水平显著降低 (均  $P < 0.05$ )。**结论** TAK-242 可改善大鼠 CME 后心功能，其机制可能与调控 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路进而减少心肌细胞凋亡有关。

**【关键词】** 冠状动脉微栓塞；Toll 样受体-4；TAK-242；凋亡；NF- $\kappa$ B

**Protective effects of TAK-242 against coronary microembolization in rat associated with involvement of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway** Wang Xiantao, Li Lang, Lu Yuanxi, Sun Yuhan, He Wenkai, Liang Jiabao

Department of Cardiology, The First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Nanning 530021, China

Corresponding author: Li Lang, Email: drlilang@163.com

**【Abstract】 Objective** To investigate the role of TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway under the action of TAK-242 in the cardiomyocyte apoptosis after coronary micro-embolism (CME) in rats. **Methods** Forty-five rats were randomized (random number) into three groups: sham operation, CME and CME plus TAK-242 groups ( $n = 15$  per group). CME was induced by injecting polyethylene microspheres (42  $\mu$ m) into the left ventricle except the sham group. CME plus TAK-242 group was treated with TAK-242 (2 mg/kg) via the tail vein of mice 30 min before CME modeling. Cardiac function was evaluated 6 h after operation. Tissue biopsy was stained with HBFP to measure the size of infarction area. TUNEL assay was used to detect cardiomyocyte apoptosis. Western blot and qPCR were used to evaluate the protein levels and mRNA expressions of TLR4, NF- $\kappa$ B p65 and cleaved caspase-3, respectively. Statistical analysis was performed using one-way analysis of variance followed by LSD- $t$  test. **Results** Compared with the sham group, left

DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2017.07.006

基金项目: 国家自然科学基金 (81260042); 广西医疗卫生适宜技术与开发项目 (S2015 21)

作者单位: 530021 南宁, 广西医科大学第一附属医院心内科 广西心血管病研究所

通信作者: 李浪, Email: drlilang@163.com

ventricular ejection fraction (LVEF) in the CME group was significantly decreased [ (68.91 ± 4.12) % vs. (84.80 ± 2.51) % ,  $P < 0.05$  ], and the infarction area ( $P < 0.05$ ), the apoptosis index [ (3.36 ± 0.63) % vs. (0.19 ± 0.08) % ,  $P < 0.05$  ], the mRNA expressions of TLR4, NF- $\kappa$ B p65 and cleaved caspase-3 in CME group were increased significantly (all  $P < 0.05$ ). Compared with CME group, LVEF in the CME plus TAK-242 group was significantly improved [ (75.58 ± 5.01) % vs. (68.91 ± 4.12) % ,  $P < 0.05$  ], and the infarction area [ (8.58 ± 2.12) % vs. (14.65 ± 4.23) % ,  $P < 0.05$  ], the apoptosis index [ (1.43 ± 0.51) % vs. (3.36 ± 0.63) % ,  $P < 0.05$  ], the mRNA expressions of TLR4, NF- $\kappa$ B p65 and cleaved caspase-3 in CME + TAK-242 group were decreased significantly (all  $P < 0.05$ ).

**Conclusions** TAK-242 effectively improved CME-induced cardiac dysfunction by regulating TLR4/NF- $\kappa$ B signaling pathway and then reducing the cardiomyocyte apoptosis.

**【Key words】** Coronary microembolization; Toll-like receptor 4; TAK-242; Apoptosis; NF- $\kappa$ B

冠状动脉微栓塞 (coronary microembolization, CME) 是急性冠状动脉综合征 (acute coronary syndromes, ACS) 患者行经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI) 过程中的常见并发症<sup>[1]</sup>。CME 可导致心肌无复流或慢血流, 引起局部心肌收缩功能障碍, 并可导致致死性心律失常, 严重影响患者心功能及预后<sup>[2-3]</sup>。如何准确评估并有效预防 CME 的发生是心血管介入医生亟需解决的难题。笔者前期研究发现, CME 发生后心肌细胞凋亡是导致心功能受损的主要机制之一, 抑制心肌细胞凋亡可以显著改善 CME 后心功能<sup>[4-5]</sup>。

Toll 样受体 (toll-like receptors, TLRs) 是一种识别病原相关分子模式的受体, 其与心血管疾病的相关研究以 TLR4 研究最多。研究发现心肌梗死后 TLR4 激活, 心肌细胞凋亡增加, 当敲除 TLR4 基因后, 心肌细胞凋亡减少, 同时小鼠的存活率增加<sup>[6]</sup>。TLR4 激活进而诱导心肌细胞凋亡广泛参与包括动脉粥样硬化在内的多种心脑血管疾病的进展<sup>[7-9]</sup>。研究发现 TLR4 同样参与心肌缺血-再灌注损伤所致的细胞凋亡及炎症性损伤<sup>[10-12]</sup>。TLR4 是否参与 CME 所致心肌损伤并导致心功能障碍目前还不得而知。因此, 本研究拟通过建立大鼠 CME 模型, 检测 CME 后心肌组织 TLR4 及核转录因子- $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) 表达量的变化, 探讨 TAK-242 调控 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路对 CME 后心功能障碍的影响, 为 CME 的临床防治提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

微栓塞球 (42  $\mu$ m) 购自美国 Biosphere Medical 公司; TAK-242 购自上海皓元生物医药科

技有限公司; TUNEL 染色试剂盒购自美国 Roche 公司; TRIzol、总 RNA 提取试剂、RT-PCR 逆转录试剂盒、实时荧光定量 PCR 酶及 SYBR GREEN II 等购自美国 Promega 公司; 小鼠抗大鼠 TLR4、NF- $\kappa$ B p65、活化 Caspase-3 单克隆抗体及内参 GAPDH 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司; HRP 标记羊抗小鼠 IgG 多克隆抗体购自中国 KeyGEN 公司。

### 1.2 实验动物及分组

健康成年雄性 SD 大鼠 45 只, 体质量 250 ~ 300 g, 由广西医科大学实验动物中心提供, 本实验经广西医科大学动物实验伦理委员会审核批准。按随机数字表法分为假手术组 ( $n = 15$ ), CME 组 ( $n = 15$ ), CME + TAK-242 组 ( $n = 15$ )。笔者前期研究<sup>[13]</sup>发现 CME 后心肌细胞凋亡高峰出现在 6 h, 因此本研究以 CME 后 6 h 为观察检测时间点。

### 1.3 CME 模型建立及给药方法

参考笔者前期研究<sup>[13]</sup>的方法制作 SD 大鼠 CME 模型。以先盐酸戊巴比妥 (30 ~ 40 mg/kg) 腹腔内注射诱导麻醉, 后经喉气管内插管, 小动物呼吸机辅助呼吸。经胸骨左缘第 3 ~ 5 肋间开胸, 用血管夹夹闭升主动脉约 10 s, 同时迅速以微量注射器从左心室心尖部向左心室内注入微栓塞球 (100 mL, 约 3 000 个)。心律平稳后逐层关胸, 待其自主呼吸恢复后, 拔除气管插管。术毕腹腔内注射 80 万单位青霉素, 常规饲养。假手术组以同样的方法向左心室内注入 100 mL 生理盐水。CME + TAK-242 组于微栓塞前 30 min 经尾静脉注射 TAK-242 (2 mg/kg)<sup>[14]</sup>。

### 1.4 心功能检测

于术后 6 h 检测各组大鼠左心室射血分数 (LVEF)、左心室短轴缩短率 (FS)、心排血量

(CO) 和左心室舒张期末径 (LVEDd)。超声探头频率为 10 MHz。所有测量值均取 3 个心动周期的平均值。超声心动图检查均由一位经验丰富的专科医生完成。

### 1.5 组织取材与样本处理

心功能检测结束后, 于大鼠尾静脉注射 10% KCl 3 mL, 心脏停搏后立即开胸取出心脏, 去除心耳及心房, 心尖部立即经液氮速冻后移至 -80 °C 冰箱保存, 用于后续 RT-PCR 及 Western blot 检测, 心底部经 4% 多聚甲醛固定 12 h 后, 石蜡包埋并切片, 行苏木精-碱性复红-苦味酸 (HBFP) 染色及 TUNEL 检测。

### 1.6 心肌微梗死面积测量

用 DMR + Q550 病理图像分析仪检查, 每张 HBFP 染色切片随机选取 5 个视野 (×100), 使用平面法测量梗死区域 (Leica Qwin 分析软件), 结果以总分析切片面积百分比表示, 取其平均数<sup>[15]</sup>。

### 1.7 TUNEL 法测定心肌细胞凋亡指数

严格按照试剂盒说明书操作, 光镜下凋亡细胞核呈棕黄色 (TUNEL 阳性), 每张切片分别在微梗死区、梗死边缘区和远离梗死区各取 10 个 (共 30 个) 非重叠 400 倍光镜视野, 计算 TUNEL 阳性细胞数和心肌细胞总数, 心肌细胞凋亡指数 = TUNEL 阳性细胞数/心肌细胞总数 × 100%<sup>[13]</sup>。

### 1.8 荧光定量 PCR 检测 TLR4 mRNA 含量

按照 TRIzol 操作说明提取细胞总 RNA, 并用 NanoDrop 测定其浓度后逆转录合成 cDNA。根据荧光定量 PCR 说明书设置反应体系及参数, 每个样本均设置复孔。引物由 Takara 公司提供, TLR4 上游引物: 5'-AAGTTATTGTGCTGCTGTCTAG-3', 下游引物: 5'-GAGGTAGGTGTTTCTGCTAAG-3';

GAPDH 上游引物: 5'-TGCACCACCAACTGCTTAG-3', 下游引物: 5'-GATGCAGGGATGATGTTTC-3'。GAPDH 作为内参对照, 结果采用 2<sup>-ΔΔCT</sup>法比较。

### 1.9 Western blot 检测 TLR4、NF-κB p65 及活化 Caspase-3 蛋白含量

按照蛋白提取试剂盒 (索莱宝, 北京) 说明书操作, 分别提取心肌组织总蛋白和核蛋白, 采用 BCA 法测定蛋白浓度, 内参为 GAPDH。各组均取 20 μg 蛋白样品, 10% SDS-PAGE 电泳后, 电转至 PVDF 膜, 用 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 然后分别以相应的一抗 4 °C 孵育过夜, 二抗室温孵育 2 h。抗原抗体复合物用增强化学发光法显示, 胶片暗室 X 线曝光。采用 Quantity one 软件对结果图像进行吸光度测定, 以目的条带与内参 GAPDH 条带信号强度比值表示心肌组织中 TLR4、NF-κB p65 (细胞核) 及活化 Caspase-3 的相对表达量。

### 1.10 统计学方法

采用 SPSS 16.0 统计软件对实验数据进行分析, 计量资料以均数 ± 标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示多组间比较采用单因素方差分析, 多组间两两比较采用 LSD-*t* 检验。以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 心功能测定结果

术后 6 h 心功能结果显示 (表 1), 与假手术组比较, CME 组和 CME + TAK-242 组 LVEF、FS、CO 明显下降, LVEDd 明显增大, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ ); 与 CME 组比较, CME + TAK-242 组 LVEF、FS、CO 明显升高, LVEDd 明显减小, 差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。

表 1 各组大鼠心功能指标的比较 ( $\bar{x} \pm s$ )

Table 1 The comparison of rat cardiac function among three groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	只数	LVEF (%)	FS (%)	CO (L/min)	LVEDd (mm)
假手术组	15	84.80 ± 2.51	41.65 ± 1.12	0.218 ± 0.018	5.26 ± 0.37
CME 组	15	68.91 ± 4.12 <sup>a</sup>	22.68 ± 2.54 <sup>a</sup>	0.103 ± 0.025 <sup>a</sup>	7.69 ± 0.51 <sup>a</sup>
CME + TAK-242 组	15	75.58 ± 5.01 <sup>ab</sup>	33.21 ± 3.04 <sup>ab</sup>	0.155 ± 0.031 <sup>ab</sup>	6.43 ± 0.18 <sup>ab</sup>

注: LVEF 为左心室射血分数, FS 为左心室短轴缩短率, CO 为心排量, LVEDd 为左心室舒张末期径; 与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 CME 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

### 2.2 心肌微梗死面积变化

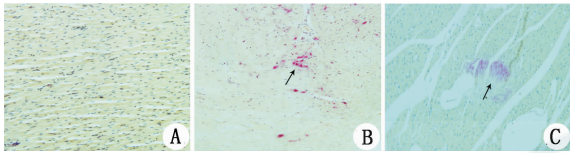
HBFP 染色结果显示, 假手术组未见明显微梗死灶, CME 组和 CME + TAK-242 组均可见局灶性分布的多发微梗死灶 (图 1)。CME 组和 CME + TAK-242

组梗死面积比分别为 (14.65 ± 4.23)% 和 (8.58 ± 2.12)%, 两组间差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

### 2.3 心肌细胞凋亡指数变化

TUNEL 检测凋亡心肌细胞核呈棕黄色, 正常

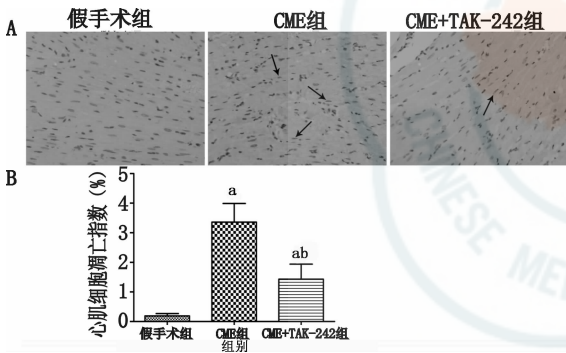
心肌细胞核呈淡蓝色。凋亡细胞主要分布于微梗死区及其边缘区，假手术组在心内膜下偶可见凋亡细胞。假手术组、CME 组、CME + TAK-242 组心肌细胞凋亡指数分别为  $(0.19 \pm 0.08)\%$ 、 $(3.36 \pm 0.63)\%$ 、 $(1.43 \pm 0.51)\%$  (图 2)。与假手术组比较，CME 组和 CME + TAK-242 组心肌细胞凋亡指数升高 (均  $P < 0.05$ )；与 CME 组比较，CME + TAK-242 组心肌细胞凋亡指数下降 ( $P < 0.05$ )。



A~C 分别为假手术组、CME 组、CME + TAK-242 组；缺血心肌红染，箭头示微梗死灶

图 1 大鼠心肌微梗死灶 HBFp 染色 ( $\times 200$ )

Fig 1 HBFp staining of rat myocardial microinfarction ( $\times 200$ )



与假手术组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与 CME 组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 2 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡 ( $\times 400$ )

Fig 2 Myocardial apoptosis detected using TUNEL ( $\times 400$ )

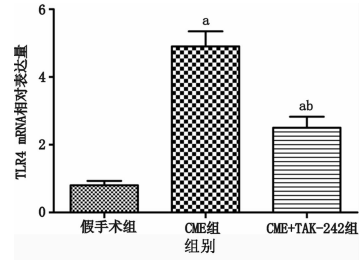
## 2.4 各组 TLR4 mRNA 表达量的变化

荧光定量 PCR 结果显示 (图 3)，与假手术组比较，CME 组、CME + TAK-242 组 TLR4 mRNA 表达量均显著增加，差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )；与 CME 组比较，CME + TAK-242 组 TLR4 mRNA 表达量显著减少，差异有统计学意义 ( $P < 0.05$ )。

## 2.5 TLR4、NF- $\kappa$ B p65 及活化 Caspase-3 蛋白表达量的变化

Western blot 定量分析结果显示，与假手术组比较，CME 组、CME + TAK-242 组 TLR4、NF- $\kappa$ B p65 (细胞核) 和活化 Caspase-3 蛋白表达均显著增加，差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )；与 CME 组比较，CME + TAK-242 组 TLR4、NF- $\kappa$ B p65 (细胞核) 和活

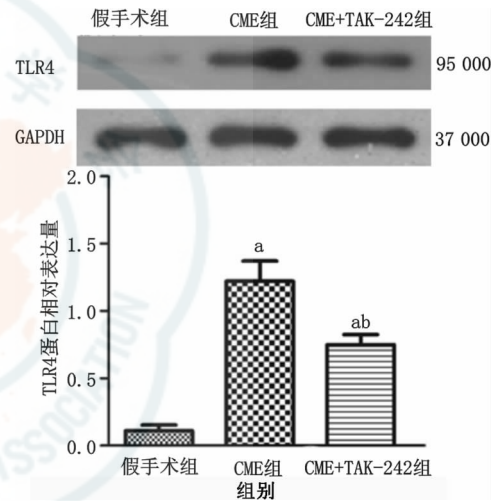
化 Caspase-3 蛋白表达均显著减少，差异均有统计学意义 (均  $P < 0.05$ )。见图 4~6。



与假手术组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与 CME 组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 3 荧光定量 PCR 检测 TLR4 mRNA 相对表达量

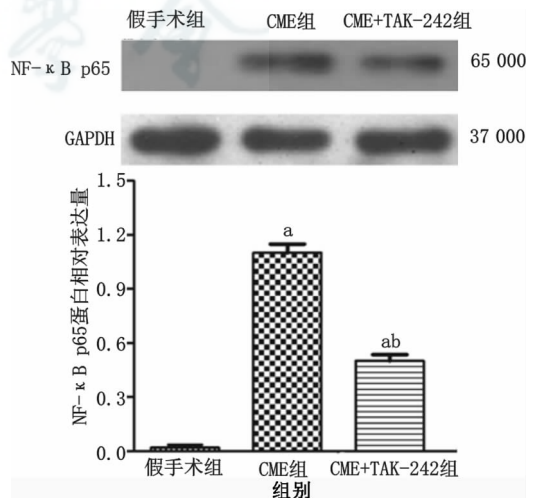
Fig 3 Quantitative PCR detected expression of TLR4 mRNA



与假手术组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与 CME 组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 4 Western blot 检测 TLR4 蛋白相对表达量

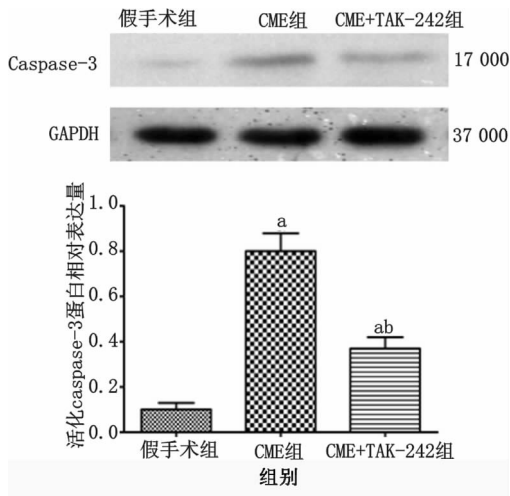
Fig 4 Western blot detected the levels of TLR4 protein in three groups



与假手术组比较，<sup>a</sup> $P < 0.05$ ；与 CME 组比较，<sup>b</sup> $P < 0.05$

图 5 Western blot 检测细胞核 NF- $\kappa$ B p65 蛋白相对表达量

Fig 5 Western blot detected the levels of NF- $\kappa$ B p65 (Nuclei) protein



与假手术组比较, <sup>a</sup> $P < 0.05$ ; 与 CME 组比较, <sup>b</sup> $P < 0.05$

图 6 Western blot 检测活化 Caspase-3 蛋白相对表达量

Fig 6 Western blot detected the levels of cleaved Caspase-3 protein

### 3 讨论

探索有效防治 PCI 术中 CME 的新途径是摆在冠心病介入医师面前的重要挑战。研究发现, CME 后局部心肌组织出现微梗死灶, 广泛炎症损伤及心肌细胞凋亡、坏死并存, 心功能进行性下降<sup>[16]</sup>。CME 一旦发生, 冠状动脉内应用溶栓剂、硝酸甘油、钙离子拮抗剂、血小板 GP II b/III a 等措施均不能有效改善患者预后<sup>[17]</sup>。本研究通过建立大鼠 CME 动物模型, 探讨 TAK-242 调控 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路对大鼠 CME 后心肌细胞凋亡的影响及意义。

本研究结果发现, 大鼠 CME 发生后 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路显著激活, 心肌组织中 TLR4 及 NF- $\kappa$ B p65 表达明显上调, 同时凋亡相关蛋白活化 caspase-3 明显增加, 心肌细胞凋亡指数升高, 心功能明显受损。应用 TLR4 抑制剂 TAK-242 后, 心肌组织中 TLR4 及 NF- $\kappa$ B p65 表达下调, 心肌细胞凋亡指数下降, 同时心功能也明显改善。这提示 TAK-242 通过调控 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路能抑制 CME 所致心肌细胞凋亡, 减少心肌微梗死面积, 改善心功能。

细胞凋亡在心功能不全中扮演重要角色, CME 后心肌细胞凋亡及炎症反应是导致心功能受损的两大重要病理机制, 笔者前期研究已发现抑制心肌细胞凋亡可有效改善 CME 后心功能损伤<sup>[5,15]</sup>。CME 发生后心肌收缩功能明显下降, 心肌血流灌注却未明显改变甚至有所增加, 变现为心肌灌注与收缩不

匹配现象。由于心肌细胞为终末期分化不可再生细胞, 凋亡所致心肌细胞缺失可能在心肌收缩功能障碍的发生发展过程中发挥关键作用。参与 CME 后心肌细胞凋亡的调控机制极其复杂, 至今仍未完全阐明。

TLR4 是一种介导机体固有免疫反应的受体, 其在冠心病的发生与进展中发挥关键作用, 抑制 TLR4 激活有望成为冠心病治疗的靶标之一<sup>[10,18]</sup>。TLR4 同样参与心肌缺血-再灌注损伤, TLR4 基因敲除小鼠在心肌缺血-再灌注后, 心肌梗死面积较野生型小鼠显著减少, 进一步研究发现, TLR4 基因敲除或使用拮抗剂可下调缺血-再灌注引起的 NF- $\kappa$ B 活化, TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的激活与心肌缺血-再灌注损伤密切相关<sup>[11-12,19]</sup>。Ishikawa 等<sup>[20]</sup>研究发现 TLR4 在急性心肌梗死和稳定性心绞痛等患者破裂的粥样斑块中有所表达; 与健康对照者比较, 急性心肌梗死和稳定性心绞痛患者 TLR4 表达水平显著增高。本研究结果同样发现 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路可能在 CME 致心肌损伤中发挥重要作用。

NF- $\kappa$ B 是广泛表达于哺乳动物细胞中的重要转录调节因子, 参与调控多种基因转录, 在机体细胞凋亡调控及炎症免疫应答反应中扮演重要角色。NF- $\kappa$ B 通过调控心肌细胞凋亡相关基因的表达, 参与多种心脏疾病的发生与发展。NF- $\kappa$ B 的激活在 TLR4 信号通路下游调控凋亡蛋白酶转录与翻译中发挥关键作用<sup>[21]</sup>。抑制 TLR4 介导的 NF- $\kappa$ B 激活有望成为改善 CME 后心功能的重要途径。

综上所述, 本研究通过构建大鼠 CME 模型, 采用 TAK-242 抑制 TLR4/NF- $\kappa$ B 信号通路的传导能够有效改善 CME 后心功能。本研究结果初步证实 TLR4 在 CME 致心功能障碍中扮演重要角色, 为下一步以 TLR4 为治疗靶点的心肌保护研究提供依据, 并为 PCI 术中 CME 的防治提供新思路。但同时本研究仍存在一些局限性, 应用塑料微栓塞球建立 CME 造模是机械性造成冠状动脉微栓塞, 与临床实际动脉粥样硬化斑块破裂形成的富含血小板、红细胞等具有生物活性的微栓子不同, 并不能完美模拟临床 CME 后实际病理生理过程。CME 防治是一项复杂系统工程, 仍需要大量的动物及临床试验提供理论支持。

### 参考文献

[1] Heusch G, Kleinbongard P, Bose D, et al. Coronary micro-

- embolization: from bedside to bench and back to bedside [J]. *Circulation*, 2009, 120 (18): 1822-1836. DOI: 10.1161/Circulationaha.109.888784.
- [2] Breuckmann F, Nassenstein K, Bucher C, et al. Systematic analysis of functional and structural changes after coronary microembolization: a cardiac magnetic resonance imaging study [J]. *JACC Cardiovasc Imaging*, 2009, 2 (2): 121-130. DOI: 10.1016/j.jcmg.2008.10.011.
- [3] Erbel R, Heusch G. Coronary microembolization [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2000, 36 (1): 22-24. DOI: 10.1016/S0735-1097(00)00708-7.
- [4] 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. DOI: 10.1016/j.cjca.2015.01.013.
- [5] 苏强, 李浪, 刘阳春, 等. 超声微泡靶向转染 MicroRNA-21 对猪冠状动脉微栓塞后心肌细胞凋亡的影响 [J]. *中华急诊医学杂志*, 2015, 24 (7): 712-718. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1671-0282.2015.07.005.
- [6] Riad A, Jäger S, Sobirey M, et al. Toll-like receptor-4 modulates survival by induction of left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice [J]. *J Immunol*, 2008, 180 (10): 6954-6961. DOI: 10.4049/jimmunol.180.10.6954.
- [7] Hori M, Nishida K. Toll-like receptor signaling: defensive or offensive for the heart [J]. *Circ Res*, 2008, 102 (2): 137-139. DOI: 10.1161/Circresaha.107.170225.
- [8] Jenke A, Wilk S, Poller W, et al. Adiponectin protects against toll-like receptor 4-mediated cardiac inflammation and injury [J]. *Cardiovas Res*, 2013, 99 (3): 422-431. DOI: 10.1093/cvr/cvt118.
- [9] Trotta T, Porro C, Calvello R, et al. Biological role of toll-like receptor-4 in the brain [J]. *J Neuroimmunol*, 2014, 268 (1/2): 1-12. DOI: 10.1016/j.jneuroim.2014.01.014.
- [10] Jia SJ, Niu PP, Cong JZ, et al. TLR4 signaling: a potential therapeutic target in ischemic coronary artery disease [J]. *Int Immunopharmacol*, 2014, 23 (1): 54-59. DOI: 10.1016/j.intimp.2014.08.011.
- [11] Chong AJ, Shimamoto A, Hampton CR, et al. Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004, 128 (2): 170-179. DOI: 10.1016/j.jtcvs.2003.11.036.
- [12] Oyama J, Blais C Jr, Liu X, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice [J]. *Circulation*, 2004, 109 (6): 784-789. DOI: 10.1161/01.Cir.0000112575.66565.84.
- [13] 李浪, 苏强, 王炎, 等. 冠状动脉微栓塞致心肌细胞凋亡及心功能损伤的死亡受体途径研究 [J]. *中华心血管病杂志*, 2010, 38 (4): 363-368. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2010.04.021.
- [14] Zhang Y, Peng W, Ao X, et al. TAK-242, a toll-like receptor 4 antagonist, protects against aldosterone-induced cardiac and renal injury [J]. *PLoS One*, 2015, 10 (11): e0142456. DOI: ARTN e0142456 10.1371/journal.pone.0142456.
- [15] Su Q, Li L, Liu Y, et al. Effect of metoprolol on myocardial apoptosis after coronary microembolization in rats [J]. *World J Emerg Med*, 2013, 4 (2): 138-143. DOI: 10.5847/wjem.j.1920-8642.2013.02.010.
- [16] Thielmann M, Dorge H, Martin C, et al. Myocardial dysfunction with coronary microembolization: signal transduction through a sequence of nitric oxide, tumor necrosis factor-alpha, and sphingosine [J]. *Circ Res*, 2002, 90 (7): 807-813. DOI: 10.1161/01.Res.0000014451.75412.36.
- [17] Kunadian V, Zorkun C, Williams SP, et al. Intracoronary pharmacotherapy in the management of coronary microvascular dysfunction [J]. *J Thromb Thrombolysis*, 2008, 26 (3): 234-242. DOI: 10.1007/s11239-008-0276-0.
- [18] Chao W. Toll-like receptor signaling: a critical modulator of cell survival and ischemic injury in the heart [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 296 (1): H1-12. DOI: 10.1152/ajpheart.00995.2008.
- [19] Fang Y, Hu J. Toll-like receptor and its roles in myocardial ischemic/reperfusion injury [J]. *Med Sci Monit*, 2011, 17 (4): RA100-109. DOI: 10.12659/MSM.881709.
- [20] Ishikawa Y, Satoh M, Itoh T, et al. Local expression of Toll-like receptor 4 at the site of ruptured plaques in patients with acute myocardial infarction [J]. *Clin Sci*, 2008, 115 (3/4): 133-140. DOI: 10.1041/Cs20070379.
- [21] Li T, Yu J, Chen R, et al. Mycophenolate mofetil attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via regulation of the TLR4/NF-kappaB signaling pathway [J]. *Pharmazie*, 2014, 69 (11): 850-855. DOI: 10.1691/ph.2014.4598.

(收稿日期: 2016-12-14)

(本文编辑: 郑辛甜)