

Toll样受体4在热射病大鼠心功能损伤及心肌铁死亡中的作用

陈丹丹¹, 徐涛¹, 薛姝婧¹, 朱玲勤², 李光华^{1,2*}¹宁夏医科大学基础医学院生理学系, 宁夏银川 750004; ²宁夏医科大学公共卫生与管理学院, 宁夏银川 750004

[中图分类号] R135.3 [文献标志码] A [DOI] 10.11855/j.issn.0577-7402.2023.03.0249

[声明] 本文所有作者声明无利益冲突

[引用本文] 陈丹丹, 徐涛, 薛姝婧, 等. Toll样受体4在热射病大鼠心功能损伤及心肌铁死亡中的作用[J]. 解放军医学杂志, 2023, 48(3): 249-257.

[收稿日期] 2022-04-20 [录用日期] 2022-06-28 [上线日期] 2022-10-21

[摘要] **目的** 探讨Toll样受体4(TLR4)在高温致热射病大鼠心功能损伤及心肌铁死亡中的作用。**方法** (1)24只SD大鼠随机分为对照组与热射病(HS)组, 每组12只。热打击期间, 采用肛温计测量大鼠核心体温, BL-420F生物功能实验系统测量大鼠心率及平均动脉压。(2)24只SD大鼠随机分为对照组、铁死亡抑制剂(Liproxstatin-1)组、HS组与HS+Liproxstatin-1组, 每组6只。建模前30 min, Liproxstatin-1组和HS+Liproxstatin-1组腹腔注射Liproxstatin-1(10 mg/kg)。采用免疫荧光染色检测大鼠心肌组织中溶质载体家庭成员7A11(SLC7A11)蛋白表达情况, Western blotting检测大鼠心肌组织中SLC7A11、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX4)蛋白的表达。(3)48只SD大鼠随机分为对照组、TLR4抑制剂(TAK-242)组、HS组与HS+TAK-242组, 每组12只。建模前30 min, TAK-242组和HS+TAK-242组腹腔注射TAK-242(3 mg/kg)。采用免疫荧光染色检测心肌组织中TLR4蛋白表达情况, BL-420F生物功能实验系统检测心脏血流动力学指标[左心室收缩压(LVSP)、左心室舒张末期压(LVEDP)、左室内压最大升高速率(+dp/dt_{max})及最大下降速率(-dp/dt_{max})], 超声检测心功能指标[心输出量(CO)、舒张期左室后壁厚度(LVPWd)和收缩期左室后壁厚度(LVPWs)], Western blotting检测TLR4/NF-κB-p53信号通路蛋白[TLR4、核因子κB(NF-κB)、p53]与铁死亡相关蛋白(SLC7A11、GPX4)的表达。**结果** 与对照组比较, HS组大鼠热打击180 min时核心体温及心率明显升高($P<0.01$), 平均动脉压明显降低($P<0.05$)。免疫荧光染色结果显示, 与对照组比较, HS组大鼠心肌组织中SLC7A11表达明显降低($P<0.01$); 与HS组比较, HS+Liproxstatin-1组SLC7A11表达明显增高($P<0.01$)。Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, HS组大鼠心肌组织中SLC7A11、GPX4表达水平明显下降($P<0.05$); 与HS组比较, HS+Liproxstatin-1组大鼠SLC7A11、GPX4表达水平明显增高($P<0.05$)。免疫荧光染色结果显示, 与对照组比较, HS组大鼠心肌组织中TLR4表达明显增高($P<0.01$); 与HS组比较, HS+TAK-242组TLR4表达明显降低($P<0.01$)。与对照组比较, HS组LVEDP升高, LVSP降低($P<0.01$); 与HS组比较, HS+TAK-242组LVSP、LVEDP、+dp/dt_{max}及-dp/dt_{max}明显改善($P<0.05$)。与对照组比较, HS组大鼠CO降低, LVPWd、LVPWs增高($P<0.01$); 与HS组比较, HS+TAK-242组CO增高, LVPWd、LVPWs降低($P<0.05$)。Western blotting检测结果显示, 与对照组比较, HS组大鼠心肌组织中TLR4、NF-κB、p53表达水平明显增高($P<0.01$), SLC7A11、GPX4表达水平明显降低($P<0.01$); 与HS组比较, HS+TAK-242组TLR4、NF-κB、p53表达水平明显降低, SLC7A11、GPX4表达水平明显升高($P<0.05$)。**结论** 热射病所致大鼠心功能损伤过程中可能存在铁死亡, 抑制TLR4可减轻心功能异常, 其机制可能与TLR4/NF-κB-p53/SLC7A11信号通路介导的铁死亡相关。

[关键词] 热射病; Toll样受体4; 铁死亡; 心功能

Effects of Toll-like receptor 4 on cardiac function injury and cardiac ferroptosis in rats with heat stroke

Chen Dan-Dan¹, Xu Tao¹, Xue Shu-Jing¹, Zhu Ling-Qin², Li Guang-Hua^{1,2*}¹Department of Physiology, Basic Medical School, ²School of Public Health and Management, Ningxia Medical University, Yinchuan, Ningxia 750004, China

*Corresponding author. Li Guang-Hua, E-mail: ghlee0404@163.com; Xu Tao, E-mail: 653546982@qq.com

[基金项目] 国家自然科学基金(82060050); 宁夏自然科学基金(2022AAC03190)

[作者简介] 陈丹丹, 硕士研究生, 主要从事热应激与心血管功能变化方面的研究

[通信作者] 李光华, E-mail: ghlee0404@163.com; 徐涛, E-mail: 653546982@qq.com

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (82060050), and the Ningxia Natural Science Foundation (2022AAC03190)

[Abstract] Objective To investigate the role of Toll-like receptor 4 (TLR4) in cardiac function injury of rats with heat stroke disease by regulating myocardial ferroptosis. **Methods** (1) 24 SD rats were randomly divided into control group and heat stroke disease (HS) group (12 in each group). During heat attack, anal temperature of rats was measured by anal thermometer, heart rate and mean arterial pressure of rats were measured by BL-420F biological function experiment system. (2) 24 SD rats were randomly divided into control group, ferroptosis inhibitor (Liproxstatin-1) group, HS group and HS+Liproxstatin-1 group (6 in each group). Thirty minutes before modeling, rats in Liproxstatin-1 group and HS+Liproxstatin-1 group were intraperitoneally injected with Liproxstatin-1 (10 mg/kg). The expression of solute carrier family 7 member 11 (SLC7A11) in myocardial tissue was detected by immunofluorescence staining, and the expression levels of SLC7A11 and glutathione peroxidase 4 (GPX4) were detected by Western blotting. (3) 48 SD rats were randomly divided into control group, TLR4 inhibitor (TAK-242) group, HS group and HS+TAK-242 group (12 in each group). Thirty minutes before modeling, rats in TAK-242 group and HS+TAK-242 group were intraperitoneally injected with TAK-242 (3 mg/kg). The expression of TLR4 in myocardial tissue was detected by immunofluorescence staining, cardiac hemodynamic indexes [left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), maximum rate of increase (+dp/dt_{max}) and maximum rate of decrease (-dp/dt_{max}) of left ventricular pressure] were detected by BL-420F biological function experiment system, cardiac function indexes [cardiac output (CO), diastolic left ventricular posterior wall thickness (LVPWd) and systolic left ventricular posterior wall thickness (LVPWs)] were detected by cardiac ultrasound, the expression levels of TLR4/NF-κB-p53 signaling pathway protein [TLR4, nuclear factor kappa B (NF-κB), p53] and ferroptosis related protein (SLC7A11 and GPX4) were detected by Western blotting. **Results** Compared with control group, the core body temperature and heart rate of rats in HS group increased significantly after heat shock for 180 minutes ($P<0.01$), the mean arterial pressure decreased significantly ($P<0.05$). Immunofluorescence staining results showed that compared with control group, the expression of myocardial SLC7A11 in HS group significantly decreased ($P<0.01$); Compared with HS group, the expression of SLC7A11 in HS+TAK-242 group improved significantly ($P<0.01$). The results of Western blotting showed that compared with control group, the expression levels of SLC7A11 and GPX4 in myocardium of HS group decreased significantly ($P<0.05$); Compared with HS group, the expression levels of SLC7A11 and GPX4 in HS+Liproxstatin-1 group improved significantly ($P<0.05$). Immunofluorescence staining results showed that compared with control group, the expression level of myocardial TLR4 in HS group increased significantly ($P<0.01$); Compared with HS group, the expression level of TLR4 in HS+TAK-242 group improved significantly ($P<0.01$). The results of BL-420F biological function test system showed that compared with control group, LVEDP increased, LVSP decreased ($P<0.01$) in HS group. LVSP, LVEDP, +dp/dt_{max} and -dp/dt_{max} were improved in HS+TAK-242 group ($P<0.05$). Compared with control group, CO was significantly decreased, and LVPWd and LVPWs were increased in HS group ($P<0.01$). Compared with HS group, CO increased, and LVPWd and LVPWs decreased in HS+TAK-242 group ($P<0.05$). Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of TLR4, NF-κB and p53 in the HS group increased significantly ($P<0.01$), and of SLC7A11 and GPX4 decreased significantly ($P<0.01$); Compared with HS group, the expression levels of TLR4, NF-κB and p53 decreased significantly, and of SLC7A11 and GPX4 increased significantly ($P<0.05$) in HS+TAK-242 group. **Conclusion** Ferroptosis may exist in myocardial injury caused by heat stroke. Inhibition of TLR4 can improve cardiac function of rats with heatstroke, and the mechanism may be related to ferroptosis mediated by TLR4/NF-κB-p53/SLC7A11 signaling pathway.

[Key words] heatstroke; Toll-like receptor 4; ferroptosis; cardiac function

热射病又称重症中暑,是指机体剧烈运动后或暴露于极端热环境时,体内热量蓄积远超散热而导致的体温急剧升高(通常 $>40.5^{\circ}\text{C}$),常伴有全身炎症反应综合征,是热损伤相关疾病进程中最危险的阶段^[1-2]。心脏是热射病损伤的主要脏器之一,在热射病导致的多脏器功能障碍中,心血管功能障碍发生率高达43.4%~65.2%^[3]。有研究发现,Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4)与热射病诱导的不同器官炎症损伤过程有关^[4],且参与了心血管疾病的病理生理过程^[5],可为中暑的治疗提供新的研究思路^[6-8]。抑癌基因p53作为TLR4的下游因子,可调控

多种细胞生物学过程和代谢相关途径,并通过下调溶质载体家庭成员7A11(solute carrier family 7 member 11, SLC7A11)的表达而下调谷胱甘肽过氧化物酶4(glutathione peroxidase 4, GPX4)的活性,进而诱导细胞铁死亡^[9-10]。铁死亡是一种新型的细胞程序性死亡方式,是由于细胞内铁依赖性脂质活性氧(reactive oxygen species, ROS)积聚过多而发生的一种可调节性细胞死亡形式^[11-12]。近年来研究发现,铁死亡在心血管疾病中发挥了重要作用^[13]。目前,在热射病诱导的心血管功能障碍中是否存在铁死亡尚不明确。本研究通过建立热射病大鼠模型,基于

TLR4/NF- κ B-p53/SLC7A11信号通路探讨热射病大鼠心功能损伤的机制, 以期为临床治疗热射病引起的心血管功能障碍提供新思路。

1 材料与方 法

1.1 主要试剂及仪器 鼠抗TLR4单克隆抗体(sc-293072, 上海圣克鲁斯生物技术有限公司); 鼠抗核因子 κ B(nuclear factor kappa B, NF- κ B)单克隆抗体(ABM0017, 武汉亚科因生物技术有限公司); 兔抗SLC7A11多克隆抗体(DF12509, 美国Affinity生物技术公司); 兔抗p53多克隆抗体(CPA2188)、兔抗GPX4多克隆抗体(CQA1094, 北京博蕾德生物科技有限公司); 兔抗GAPDH多克隆抗体(E-AB-20059, 武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司); 山羊抗兔IgG(HRP)抗体(BS13278)、山羊抗小鼠IgG(HRP)抗体(BS12478, 南京巴傲得生物科技有限公司); TRITC标记的山羊抗兔IgG抗体(ZF-0316, 1:50)、FITC标记的山羊抗小鼠IgG抗体(ZF-0312, 1:50)、抗荧光衰减封片剂(含DAPI)(S2110, 北京中杉金桥生物技术有限公司); TLR-4抑制剂TAK-242(HY-11109)、铁死亡抑制剂Liproxstatin-1(HY-12726, 上海皓元生物医药科技有限公司)。ZRS-1JSW智能人工气候培养室(杭州钱江仪器设备有限公司); 酶标仪(美国Thermo Scientific公司); 蛋白电泳仪及电泳槽(美国Bio-Rad公司); Z383高速型离心机(德国Hermle公司); BL-420F生物机能实验系统(成都泰盟科技有限公司); Vevo2100小动物超声成像仪(富士胶片投资有限公司); 高速组织冷冻研磨器(上海净信实业发展有限公司)。

1.2 热射病大鼠模型构建及分组 SPF级雄性SD大鼠96只, 体重180~220 g, 由宁夏医科大学实验动物中心提供(实验动物质量合格证号: 2020-0001)。动物饲养环境干燥舒适, 温度(24 \pm 5) $^{\circ}$ C, 湿度60% \pm 5%。大鼠分笼饲养, 每笼4只, 自由进食进水, 光/暗周期为12 h/12 h。本研究经宁夏医科大学实验动物伦理委员会审批(2017-030), 实验过程符合国家和单位有关实验动物的管理和使用规定。

(1)取24只SD大鼠, 随机分为对照组与HS组, 每组12只, 对照组大鼠置于温度(25 \pm 1) $^{\circ}$ C的环境中禁食禁水, HS组大鼠置于预设温度(36 \pm 0.5) $^{\circ}$ C、湿度65% \pm 5%的人工仿真气候动物舱内维持一定的体温, 再将气候舱温度设置为(40 \pm 0.5) $^{\circ}$ C、湿度65% \pm 5%开始热打击诱发热射病, 直至直肠温度达到42 $^{\circ}$ C, 立刻将其转移至温度为(25 \pm 1) $^{\circ}$ C的环境中恢复12 h; 热打击期间, 大鼠禁食禁水, 采用肛温计每30 min测量1次核心体温,

BL-420F生物机能实验系统测量大鼠心率及平均动脉压。

(2)取24只SD大鼠, 随机分为对照组、Liproxstatin-1组、HS组与HS+Liproxstatin-1组, 每组6只, Liproxstatin-1组和HS+Liproxstatin-1组大鼠腹腔注射Liproxstatin-1(10 mg/kg), 30 min后, HS组、HS+Liproxstatin-1组大鼠按上述方法进行造模。造模后, 采用免疫荧光染色检测大鼠心肌组织中SLC7A11蛋白表达情况, Western blotting检测大鼠心肌组织中SLC7A11、GPX4蛋白表达量。

(3)取48只SD大鼠, 随机分为对照组、TAK-242组、HS组与HS+TAK-242组, 每组12只, TAK-242组和HS+TAK-242组大鼠腹腔注射TAK-242(3 mg/kg), 30 min后, HS组、HS+TAK-242组大鼠按上述方法进行造模。造模后, 采用免疫荧光染色检测大鼠心肌组织中TLR4蛋白表达情况, BL-420F生物机能实验系统检测大鼠心脏血流动力学指标[左心室收缩压(left ventricular systolic pressure, LVSP)、左心室舒张末期压(left ventricular end-diastolic pressure, LVEDP)、左室内压最大升高速率(+dp/dt_{max})及最大下降速率(-dp/dt_{max})], 超声检测大鼠心功能指标[心输出量(cardiac output, CO)、舒张期左室后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness during diastole, LVPWd)和收缩期左室后壁厚度(left ventricular posterior wall thickness during systole, LVPWs)], Western blotting检测大鼠心肌组织中TLR4、NF- κ B、p53、SLC7A11、GPX4蛋白表达量。

1.2.1 核心体温测量 核心温度以直肠温度代替, 将肛温计软头部位插入大鼠直肠5~8 cm后, 按下开关(ON/OFF)键, 听到“嘀”声后开始测量, 当听到持续“嘀....”声后, 测量结束, 3~5 s抽出肛温计, 记录测量结果。每30 min测量1次。

1.2.2 BL-420F生物机能实验系统检测大鼠心脏血流动力学指标 大鼠注射2%戊巴比妥钠麻醉后固定于JR-30恒温鼠台, 剪去大鼠颈部皮毛, 钝性分离颈部组织, 在气管两侧暴露并游离颈总动脉并穿双线备用, 结扎颈总动脉远心端, 近心端用动脉夹阻断血流, 用眼科剪以45 $^{\circ}$ C剪一小口, 将准备好的动脉插管、左心室插管向近心端插入, 结扎血管并固定。同时将针灸针扎入大鼠四肢皮下, 连接信号输入线, 记录大鼠心率、平均动脉压、LVSP、LVEDP、+dp/dt_{max}及-dp/dt_{max}。所有数据采用BL-420F生物功能实验系统进行记录分析。

1.2.3 免疫荧光染色检测大鼠心肌组织中SLC7A11、TLR4蛋白表达情况 取大鼠心脏置于4%多聚甲醛固定液中, 经梯度乙醇脱水处理后进

行包埋、切片；将制备好的心肌组织石蜡切片置于60℃烤箱烘烤2h，二甲苯I和二甲苯II各透明10min，依次置于100% I、100% II、95%、90%、80%、70%乙醇中进行梯度脱蜡，PBS清洗5min×3次；用柠檬酸钠缓冲液高温抗原修复5min，自然冷却至室温；加入内源性过氧化物酶阻断剂室温孵育10min，加入封闭用正常山羊血清工作液室温封闭1h，PBS清洗5min×3次；分别滴加SLC7A11兔来源一抗(1:200)、TLR4鼠来源一抗(1:200)4℃过夜，PBS清洗5min×3次；分别加入100μl对应的荧光二抗，TRITC标记的山羊抗兔IgG抗体(1:50)、FITC标记的山羊抗小鼠IgG抗体(1:50)37℃温箱孵育30min，PBS清洗5min×3次，滴加含DAPI的抗荧光衰减封片剂，荧光显微镜下观察拍照，最后采用ImageJ图像分析软件分析各组大鼠心肌组织中SLC7A11、TLR4蛋白表达情况。

1.2.4 超声检测大鼠心功能指标 大鼠胸部备皮后置于麻醉诱导盒中，打开挥发罐注入一定量的异氟烷，麻醉后将气体流量阀拨向“Mask”，使气体流向麻醉面罩，并将大鼠置于手术台面上固定，将其口鼻对准麻醉面罩，涂上适量耦合剂，用线阵探头进行超声检查。选取合适的左心室长轴切面图，将M型取样线置于左室短轴乳头肌水平，获得相应的M型曲线，保存图片后测量CO、LVPWd和LVPWs，测量3个连续心动周期，结果取平均值。

1.2.5 Western blotting检测大鼠心肌组织中TLR4、NF-κB、p53、SLC7A11及GPX4蛋白表达量 麻醉后，取各组大鼠心脏，并置于-80℃保存。取适量心肌组织并切碎，加入适量裂解液，用高速组织冷冻研磨器进行充分破碎，4℃下20000r/min离心5min，静置10min提取总蛋白，99.5℃加热变性后，根据分子量大小配制合适浓度的凝胶，80V电泳半小时后120V继续电泳至结束，80V电压转膜后用5%脱脂奶粉封闭3h，PBST清洗10min×3次；加入一抗鼠抗TLR4单克隆抗体(1:1000)、鼠抗NF-κB单克隆抗体(1:2000)、兔抗SLC7A11多克隆抗体(1:500)、兔抗p53多克隆抗体(1:1000)、兔抗GPX4多克隆抗体(1:1000)及兔抗GAPDH多克隆抗体(1:5000)4℃孵育过夜，PBST洗10min×3次；加入辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔IgG(1:5000)或山羊抗小鼠IgG(1:5000)二抗室温孵育1h，PBST洗10min×3次后，使用ECL发光液显色曝光条带，用ImageJ软件进行分析。

1.3 统计学处理 采用SPSS 22.0软件进行统计分析，GraphPad 8.0软件绘图。所有计量数据均呈正态分布，以 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间比较采用One-way ANOVA分析，进一步两两比较采用Tukey's检验。

$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 热射病大鼠模型构建

2.1.1 热打击后大鼠核心体温变化 对照组大鼠在模型建立过程中体温保持正常；与对照组比较，HS组大鼠热打击后60min体温明显增高，差异有统计学意义($P<0.05$) (图1)。

2.1.2 热打击对大鼠心率、平均动脉压的影响 热打击期间对照组大鼠心率、平均动脉压无明显变化。与对照组比较，HS组大鼠热打击后90min内心率无明显上升，120min后心率上升速度明显加快，并在180min时达到峰值($P<0.01$)；与对照组比较，HS组大鼠热打击后60min内平均动脉压无明显改变，90min后平均动脉压明显增高并达到峰值且维持至120min，120min后平均动脉压明显降低($P<0.05$) (图2)。

2.2 各组大鼠心肌组织中SLC7A11表达变化 免疫荧光染色检测结果显示，与对照组比较，Liproxstatin-1组大鼠心肌组织中SLC7A11表达无明显变化($P>0.05$)，HS组部分心肌组织中SLC7A11表达明显降低($P<0.01$)；与HS组比较，HS+Liproxstatin-1组心肌组织中SLC7A11表达明显增高($P<0.01$) (图3)。

2.3 抑制铁死亡对热射病大鼠心肌组织中铁死亡相关蛋白SLC7A11、GPX4表达的影响 Western blotting检测结果显示，与对照组比较，Liproxstatin-1组大鼠心肌组织中SLC7A11、GPX4蛋白相对表达水平无明显变化($P>0.05$)，HS组大鼠心肌组织中SLC7A11、GPX4蛋白相对表达水平明显降低($P<0.01$)；与HS组比较，HS+Liproxstatin-1组大鼠心肌组织中SLC7A11、GPX4蛋白相对表达水平明显升高($P<0.05$) (图4)。

2.4 各组大鼠心肌组织中TLR4表达变化 免疫荧光染色检测结果显示，与对照组比较，TAK-242组大鼠心肌组织中TLR4表达无明显变化($P>0.05$)，HS组部分心肌组织中TLR4表达明显增高($P<0.01$)；与HS组比较，HS+TAK-242组心肌组织中TLR4表达明显降低($P<0.01$) (图5)。

2.5 抑制TLR4对热射病大鼠心功能的影响

2.5.1 抑制TLR4对热射病大鼠心脏血流动力学指标的影响 对照组大鼠血流动力学指标正常。与对照组比较，TAK-242组大鼠血流动力学指标无明显变化($P>0.05$)，HS组大鼠LVSP、 $+dp/dt_{max}$ 下降，LVEDP、 $-dp/dt_{max}$ 增高($P<0.01$)；与HS组比较，HS+TAK-242组血流动力学指标改善，LVSP、 $+dp/dt_{max}$ 升高，LVEDP、 $-dp/dt_{max}$ 降低($P<0.05$) (表1)。

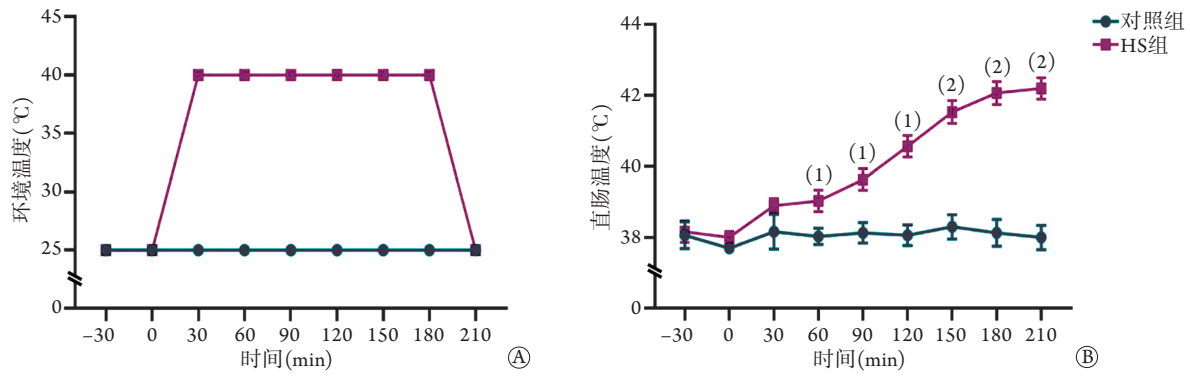


图1 热打击期间环境温度和aris大鼠直肠温度的变化

Fig.1 Changes of ambient temperature and rectal temperature of rats during heat shock

A. 热打击过程中环境温度变化; B. 热打击过程中大鼠直肠温度变化; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.01$

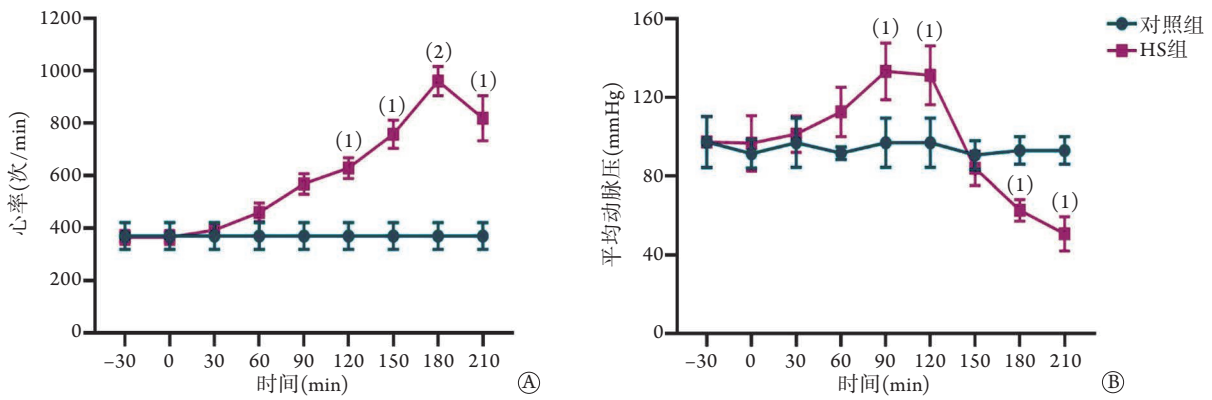


图2 热打击期间大鼠心率和平均动脉压的变化

Fig.2 Changes of heart rate and mean arterial pressure during heat shock in rats

A. 热打击对大鼠心率的影响; B. 热打击对大鼠平均动脉压的影响; 与对照组比较, (1) $P < 0.05$, (2) $P < 0.01$

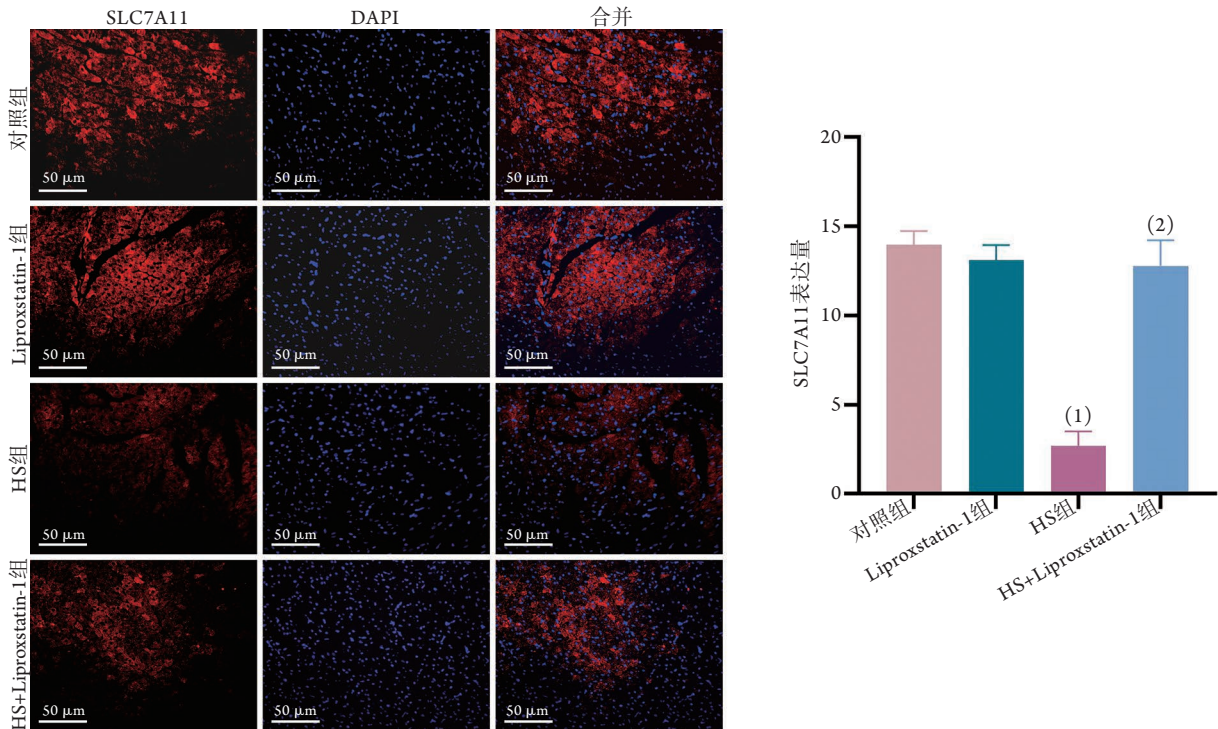


图3 各组大鼠心肌组织中SLC7A11表达变化($n=3$)

Fig.3 Changes of SLC7A11 expression in myocardial tissue of rats in each group ($n=3$)

SLC7A11. 溶质载体家族成员7A11; 与对照组比较, (1) $P < 0.01$; 与HS组比较, (2) $P < 0.01$

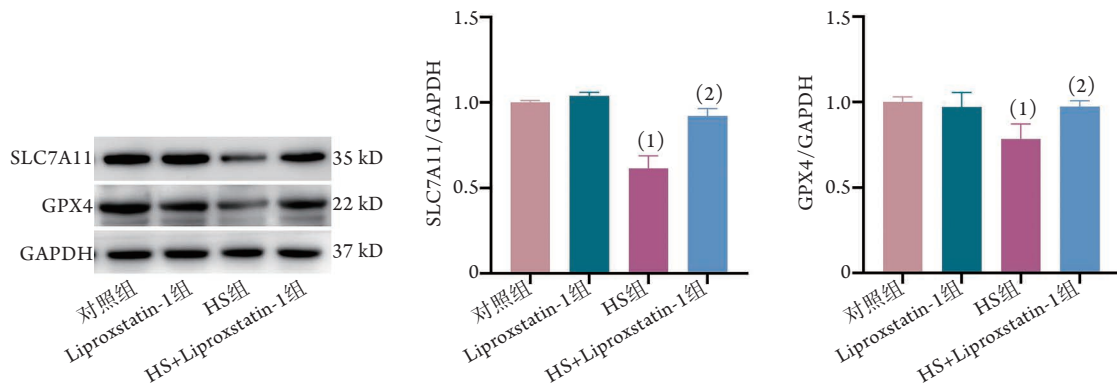


图4 各组大鼠心肌组织中SLC7A11、GPX4蛋白相对表达水平($n=3$)

Fig.4 Relative expression levels of SLC7A11 and GPX4 in myocardial tissue of rats in each group ($n=3$)
SLC7A11. 溶质载体家族成员7A11; GPX4. 谷胱甘肽过氧化物酶; 与对照组比较, (1) $P<0.01$; 与HS组比较, (2) $P<0.05$

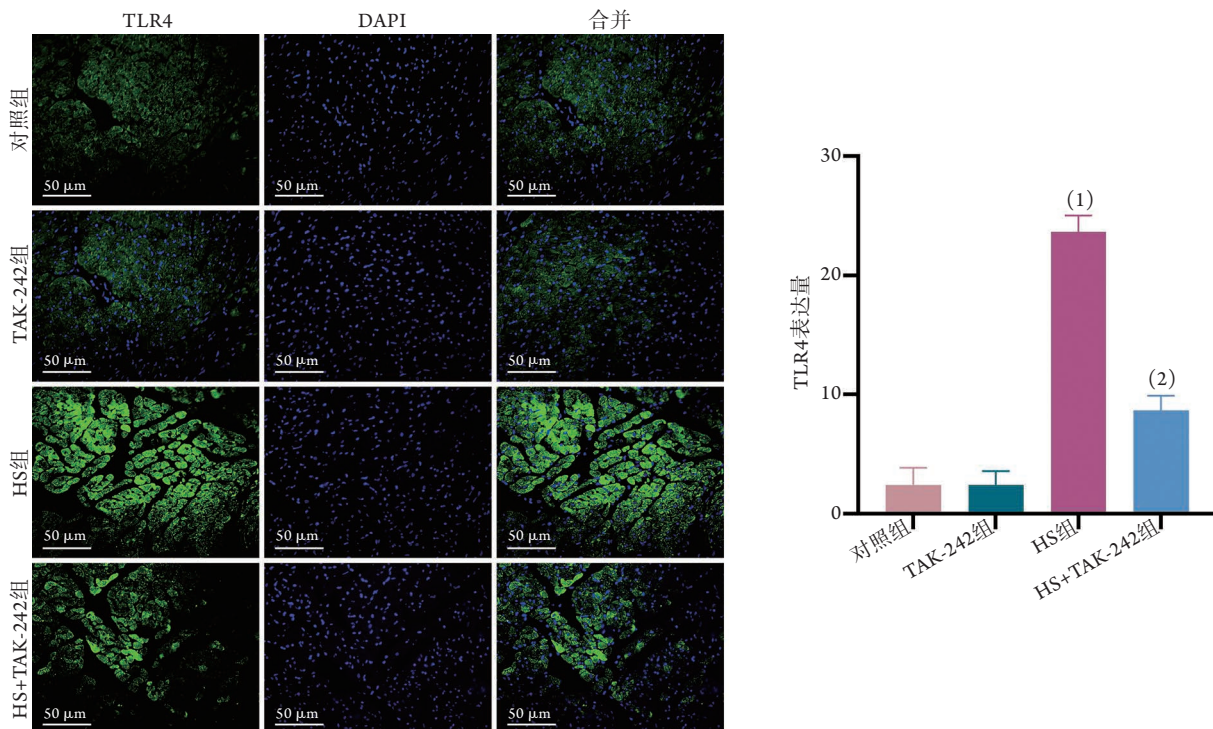


图5 各组大鼠心肌组织中TLR4表达变化($n=3$)

Fig.5 Changes of TLR4 expression in myocardial tissue of rats in each group ($n=3$)
TLR4. Toll样受体4; TAK-242. TLR4抑制剂; HS. 热射病; 与对照组比较, (1) $P<0.01$; 与HS组比较, (2) $P<0.01$

表1 各组大鼠血流动力学指标比较($\bar{x}\pm s, n=5$)

Tab.1 Comparison of the hemodynamic indexes of rats in each group ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	LVSP(mmHg)	LVEDP(mmHg)	+dp/dt _{max} (mmHg/s)	-dp/dt _{max} (mmHg/s)
对照组	87.31 ± 2.67	15.00 ± 0.66	2.25 ± 0.11	1.50 ± 0.26
TAK-242组	86.15 ± 4.12	13.80 ± 0.88	2.62 ± 0.39	1.56 ± 0.36
HS组	54.17 ± 5.09 ⁽¹⁾	22.20 ± 1.80 ⁽¹⁾	1.04 ± 0.17 ⁽¹⁾	3.08 ± 0.15 ⁽¹⁾
HS+TAK-242组	68.99 ± 2.38 ⁽²⁾	18.54 ± 0.86 ⁽²⁾	1.70 ± 0.08 ⁽²⁾	2.30 ± 0.23 ⁽²⁾

LVSP. 左心室收缩压; LVEDP. 左心室舒张末期压; +dp/dt_{max}. 左室内压最大升高速率; -dp/dt_{max}. 左室内压最大下降速率; TAK-242. TLR4抑制剂; HS. 热射病; 与对照组比较, (1) $P<0.01$; 与HS组比较, (2) $P<0.05$

2.5.2 抑制TLR4对热射病大鼠心功能指标的影响
与对照组比较, TAK-242组大鼠CO、LVPWd和LVPWs无明显变化($P>0.05$), HS组大鼠CO明显降

低, LVPWd与LVPWs明显增高($P<0.01$); 与HS组比较, HS+TAK-242组CO增加, LVPWd和LVPWs降低($P<0.05$) (图6)。

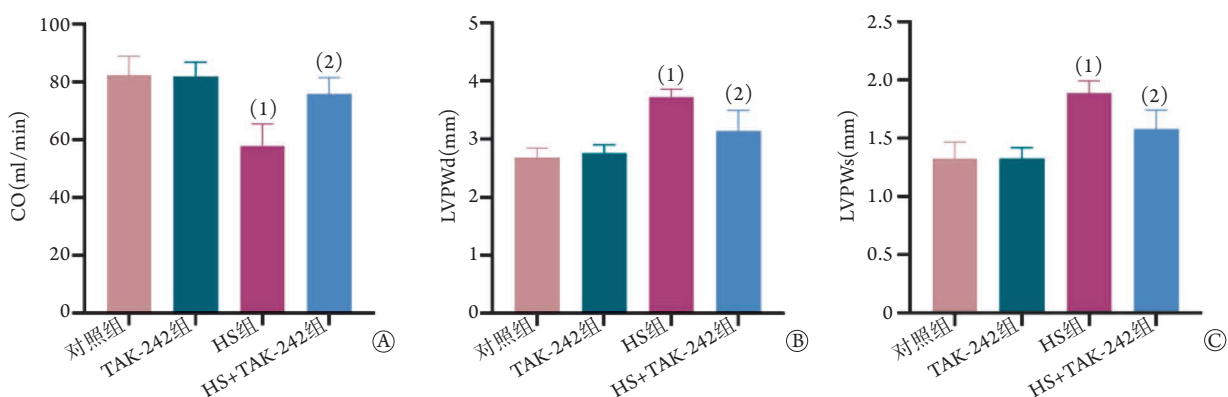


图6 各组大鼠CO、LVPWd和LVPWs水平比较(n=4)

Fig.6 Comparison of CO, LVPWd and LVPWs levels of rats in each group (n=4)

CO. 心输出量; LVPWd. 舒张期左室后壁厚度; LVPWs. 收缩期左室后壁厚度; A. 各组大鼠CO水平; B. 各组大鼠LVPWd水平; C. 各组大鼠LVPWs水平; 与对照组比较, (1) $P<0.01$; 与HS组比较, (2) $P<0.05$

2.6 抑制TLR4对热射病大鼠心肌组织中TLR4/NF- κ B-p53/SLC7A11信号通路蛋白表达的影响 与对照组比较, TAK-242组大鼠心肌组织中TLR4、NF- κ B、p53、SLC7A11、GPX4蛋白相对表达水平无明显变化($P>0.05$), HS组大鼠心肌组织中TLR4、NF- κ B及p53蛋白相对表达水平明显增高($P<0.01$),

SLC7A11、GPX4蛋白相对表达水平明显降低($P<0.01$); 与HS组比较, HS+TAK-242组大鼠心肌组织中TLR4、NF- κ B、p53蛋白相对表达水平明显降低($P<0.05$), SLC7A11、GPX4蛋白相对表达水平明显升高($P<0.05$) (图7)。

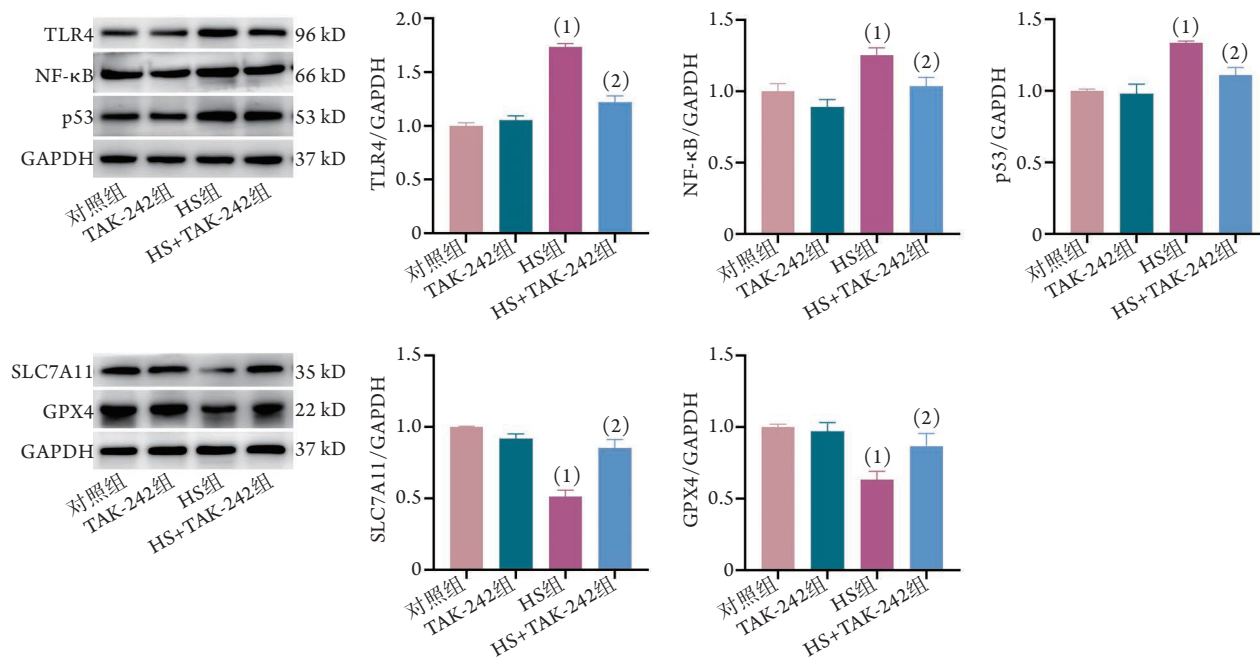


图7 各组大鼠心肌组织中TLR4、NF- κ B、p53、SLC7A11、GPX4蛋白相对表达水平比较(n=3)

Fig.7 Comparison of the relative expression levels of TLR4, NF- κ B, p53, SLC7A11 and GPX4 in myocardial tissue of rats in each group (n=3)

TLR4. Toll样受体4; NF- κ B. 核因子 κ B; SLC7A11. 溶质载体家庭成员7A11; GPX4. 谷胱甘肽过氧化物酶; 与对照组比较, (1) $P<0.01$; 与HS组比较, (2) $P<0.05$

3 讨论

随着全球气温逐年升高, 热射病的发生率和病死率在全球范围内呈明显上升趋势^[14-15]。调查显

示, 热射病住院病死率高达14%~65%^[16]。热射病以核心体温急剧升高(通常 $>40.5\text{ }^{\circ}\text{C}$)、低血压为主要特征^[1]。本研究发现, 随着热打击时间的延长, 大鼠心率逐渐加快、核心体温持续上升, 平均动脉压

在热打击早期增高,后呈现降低趋势,与既往研究结果一致^[17]。然而,目前对热射病所致心功能损伤的分子机制仍知之甚少,这也是临床预防和治疗热射病心功能障碍缺乏有效手段的重要原因。本研究通过建立热射病大鼠模型,探讨了热射病大鼠心功能损伤的可能机制。

近年来研究发现,铁死亡在多种心血管疾病中发挥了重要作用^[13]。铁死亡相关蛋白SLC7A11和GPX4表达减少可引起铁死亡^[9]。有研究证实,热打击诱导的肾小管上皮细胞死亡中存在由SLC7A11和GPX4表达减少而引起的铁死亡^[18]。然而,热射病大鼠心肌组织铁死亡的相关损伤机制尚不清楚。本研究发现,HS组大鼠铁死亡相关蛋白SLC7A11和GPX4表达明显减少,加入铁死亡抑制剂Liproxstatin-1后,SLC7A11和GPX4的表达明显增高。

TLR4参与了多种心血管疾病的病理生理过程^[5]。Chen等^[19]发现,敲低TLR4可抑制心肌细胞的自噬及铁死亡,改善心力衰竭。热射病常伴有全身炎症反应综合征,随着病程的延长可引起心力衰竭。有研究显示,TLR4/NF- κ B信号通路参与了多种心血管疾病的炎症反应过程^[20]。本研究采用免疫荧光染色检测TLR4的表达情况,证实了热射病大鼠心肌组织中TLR4的表达明显增高,给予TLR4抑制剂TAK-242后,热射病大鼠心肌组织中TLR4的表达明显降低。由此可见,TLR4在心功能障碍中发挥了重要作用,可作为改善心功能的作用靶点之一。为了进一步证实TLR4对心功能的影响,本研究采用BL-420F生物机能实验系统检测大鼠的心脏血流动力学指标。结果显示,热射病大鼠的LVEDP、 $-dp/dt_{max}$ 升高,LVSP、 $+dp/dt_{max}$ 降低,提示其心功能明显异常。使用TAK-242干预后,心脏血流动力学指标有所改善。采用超声检测大鼠心功能发现,热射病大鼠CO明显降低,LVPWd和LVPWs明显增高,而给予TAK-242干预后大鼠心功能指标明显改善。

p53是TLR4/NF- κ B信号通路的下游分子之一,可作用于SLC7A11并抑制其下游分子GPX4的表达^[8-9]。目前有研究发现,热打击人肾小管上皮细胞可使p53表达增高、SLC7A11和GPX4表达降低,从而引起细胞铁死亡^[17]。本研究采用Western blotting检测TLR4/NF- κ B/p53信号通路蛋白及铁死亡相关蛋白SLC7A11、GPX4的表达,结果显示,热射病大鼠心肌组织中TLR4、NF- κ B、p53蛋白相对表达水平明显增高,而铁死亡相关蛋白SLC7A11、GPX4相对表达水平明显降低。为深入探究其机制,进一步加入TLR4抑制剂TAK-242,结果显示,热射病大鼠心肌组织中TLR4、NF- κ B和p53蛋白相对表达水

平明显降低,而铁死亡相关蛋白SLC7A11、GPX4相对表达水平明显增高,表明TLR4/NF- κ B-p53/SLC7A11信号通路可能参与了热射病大鼠的心功能损伤。

综上所述,本研究结果表明,热射病所致大鼠心功能损伤过程中可能存在铁死亡,抑制TLR4可改善热射病大鼠的心功能异常,其机制可能与TLR4/NF- κ B-p53/SLC7A11信号通路介导的铁死亡有关,这为热射病心肌损伤机制研究提供了新的思路。但本研究仅在动物水平对铁死亡相关蛋白进行检测,这些通路蛋白之间如何互相作用、是否存在其他铁死亡相关蛋白参与及其调控机制仍有待进一步验证。

【参考文献】

- [1] Epstein Y, Yanovich R. Heatstroke[J]. *N Engl J Med*, 2019, 380(25): 2449-2459.
- [2] Xin GJ, Shi LT. Research progress on safety and efficacy of intravascular cooling technique in the treatment of heat stroke[J]. *Med J Chin PLA*, 2021, 46(2): 207-211. [高建新,黎檀实. 血管内降温技术及其治疗热射病的有效性和安全性研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(2): 207-211.]
- [3] Leon LR, Bouchama A. Heat stroke[J]. *Compr Physiol*, 2015, 5(2): 611-647.
- [4] Zhang W, Wang L, Sun XH, et al. Toll-like receptor 5-mediated signaling enhances liver regeneration in mice[J]. *Mil Med Res*, 2021, 8(4): 490-502.
- [5] Jia H, Li BC, Tian Y. Role of Toll-like receptor 4 in cardiovascular disease[J]. *Int J Cardiovasc Dis*, 2017, 44(3): 143-145. [贾赫,李碧澄,田野. Toll样受体4在心血管疾病中的作用[J]. *国际心血管病杂志*, 2017, 44(3): 143-145.]
- [6] Geng Y, Li R, He SX, et al. Dexmedetomidine attenuates acute lung injury induced by heatstroke and improve outcome[J]. *Shock*, 2019, 52(5): 532-539.
- [7] Xia ZN, Zong Y, Zhang ZT, et al. Dexmedetomidine protects against multi-organ dysfunction induced by heatstroke via sustaining the intestinal integrity[J]. *Shock*, 2017, 48(2): 260-269.
- [8] Guerrero-Hue M, García-Caballero C, Palomino-Antolín A, et al. Curcumin reduces renal damage associated with rhabdomyolysis by decreasing ferroptosis-mediated cell death[J]. *FASEB J*, 2019, 33(8): 8961-8975.
- [9] Jiang L, Kon N, Li T, et al. Ferroptosis as a p53-mediated activity during tumour suppression[J]. *Nature*, 2015, 520(7545): 57-62.
- [10] Wang SJ, Li D, Ou Y, et al. Acetylation is crucial for p53-mediated ferroptosis and tumor suppression[J]. *Cell Rep*, 2016, 17(2): 366-373.
- [11] Stockwell BR, Jiang X, Gu W. Emerging mechanisms and disease relevance of ferroptosis[J]. *Trends Cell Biol*, 2020, 30(6): 478-490.
- [12] Lu HP, Dang YW, Chen G. Research progress on role of ferroptosis suppressor protein 1 in human diseases[J]. *Med J Chin PLA*, 2021, 46(7): 731-736. [陆会平,党裔武,陈罡. 铁死亡抑制蛋白1在人类疾病中的作用机制研究进展[J]. *解放军医学杂志*, 2021, 46(7): 731-736.]

- [13] Wu X, Li Y, Zhang S, *et al.* Ferroptosis as a novel therapeutic target for cardiovascular disease[J]. *Theranostics*, 2021, 11(7): 3052-3059.
- [14] Xiao WJ, Wang WC, Zhou QY, *et al.* Progress in studies on biomarkers related to heat stroke[J]. *Chin J Publ Heal*, 2021, 37(2): 381-384. [肖文静, 王武超, 周倩云, 等. 热射病相关生物标志物研究进展[J]. *中国公共卫生*, 2021, 37(2): 381-384.]
- [15] He JQ, Ni J, Zhang J. Review on the mechanism and research progress of renal injury related heat radiation disease[J]. *Chin J Disast Med*, 2021, 9(1): 754-757, 767. [何嘉骐, 倪军, 张静. 热射病相关肾脏损伤的机制及研究进展[J]. *中华灾害救援医学*, 2021, 9(1): 754-757, 767.]
- [16] Wu ZH. The protection of Ulinastatin and heparin in heatstroke rats nervous system[D]. Beijing: Chinese PLA Medical School, 2014. [吴振华. 乌司他丁及肝素对热射病大鼠神经系统损伤保护作用的研究[D]. 北京: 解放军医学院, 2014.]
- [17] Lin X, Lin CH, Liu R, *et al.* Myricetin against myocardial injury in rat heat stroke model[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 127: 110194.
- [18] Wu M. Clinical characteristics and molecular mechanisms of acute kidney injury induced by rhabdomyolysis after heatstroke[D]. Guangzhou: Southern Medical University, 2021. [吴明. 重症中暑横纹肌溶解介导急性肾损伤的临床特征及分子机制研究[D]. 广州: 南方医科大学, 2021.]
- [19] Chen X, Xu S, Zhao C, *et al.* Role of TLR4/NADPH oxidase 4 pathway in promoting cell death through autophagy and ferroptosis during heart failure[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2019, 516(1): 37-43.
- [20] Kong BH, Su Q. Research progress of Toll-like receptor 4 and myocardial inflammation[J]. *J Clin Cardiol*, 2018, 34(10): 1024-1027. [孔炳辉, 苏强. Toll样受体4与心肌炎症的研究进展[J]. *临床心血管病杂志*, 2018, 34(10): 1024-1027.]

(责任编辑: 纪方方)