

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2018.20.004

## 大豆异黄酮下调 TLR4/MyD88 介导的信号通路保护心肌肥厚的作用机制\*

刁爱芹,王卉,潘爱萍,李晓洁,周瑞芳,陈国富  
(泰州职业技术学院,江苏泰州 225300)

**[摘要]** **目的** 研究大豆异黄酮(SI)对压力负荷性大鼠心肌肥厚的保护作用及其作用机制。**方法** 采用主动脉弓缩窄法制备大鼠心肌肥厚模型,造模后将大鼠分为假手术组(Sham组)、主动脉缩窄模型组(TAC组)、溶剂对照组(TAC+placebo组)和SI治疗组(TAC+SI组);4周后处死大鼠,测量大鼠全心质量指数(HW/BW)和左心室质量指数(LVW/TL);左心室组织切片 Masson 染色和 HE 染色后观察胶原沉积和心肌细胞形态;免疫共沉淀法测定 TLR4 和 MyD88 的交互情况。**结果** 模型组大鼠的 HW/BW 和 LVW/TL 的值显著升高( $t=4.344, P=0.0122$  和  $t=8.762, P=0.0009, n=6$ );胶原沉积增多,心肌细胞直径增大,TLR4 和 MyD88 的交互增加( $t=16.07, P=0.0039, n=6$ );SI 能显著减轻心脏质量指数( $t=3.432, P=0.0265$  和  $t=5.738, P=0.1050, n=6$ ),使得心肌细胞横截面积减小,同时能明显抑制 TLR4 和 MyD88 的交互( $t=13.88, P=0.0051, n=6$ )。**结论** SI 对主动脉缩窄所致心肌肥厚具有一定的保护作用,其机制与降低 TLR4 和 MyD88 的交互,抑制压力负荷激活的 TLR4/MyD88 信号通路有关。

**[关键词]** 大豆异黄酮;心肌肥厚;压力负荷;TLR4/MyD88

**[中图法分类号]** R3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2018)20-2659-04

### Mechanism of soybean isoflavones down-regulate TLR4/MyD88 mediated signaling pathways to protect myocardial hypertrophy\*

DIAO Aiqin, WANG Hui, PAN Aiping, LI Xiaojie, ZHOU Ruifang, CHEN Guofu  
(Taizhou Polytechnic College, Taizhou, Jiangsu 225300, China)

**[Abstract]** **Objective** To study the protective effect of soybean isoflavones (SI) on cardiac hypertrophy induced by pressure overload in rats and its mechanism. **Methods** A model of cardiac hypertrophy was made by constricting the aortic arch. After modeling, the rats were divided into the sham operation group (the Sham group), the aorta constriction model group (the TAC group), the solvent control group (the TAC+placebo group) and the treatment group (the TAC+SI group); the rats were sacrificed 4 weeks later, and the heart quality index (HW/BW) and left ventricular mass index (LVW/TL) were measured; the left ventricle tissue section was stained with Masson and HE staining to observe the collagen deposition and myocardial cell morphology; co-immunoprecipitation assay for the interaction of TLR4 and MyD88. **Results** HW/BW and LVW/TL values of the model rats increased significantly ( $t=4.344, P=0.0122$  and  $t=8.762, P=0.0009, n=6$ ); collagen deposition increased, myocardial cell diameter increased, the interaction of TLR4 and MyD88 increased ( $t=16.07, P=0.0039, n=6$ ); SI significantly reduced the heart weight parameters ( $t=3.432, P=0.0265$  and  $t=5.738, P=0.1050, n=6$ ), which reduced myocardial cell cross-sectional area, the same interaction significantly inhibited TLR4 and MyD88 ( $t=13.88, P=0.0051, n=6$ ). **Conclusion** SI has protective effect on myocardial hypertrophy induced by stenosis of the aorta, and its mechanism is related to the reduction of TLR4 and MyD88 interactions and suppression of pressure-activated TLR4/MyD88 signaling pathways.

**[Key words]** soybean isoflavones; myocardial hypertrophy; pressure overload; TLR4/MyD88

心肌肥厚是心脏长期负荷过重的一种代偿性反应,各种致心肌肥厚因素通过心脏细胞内信号转导途径改变相关核转录因子的活性,导致心脏组织中大量

基因/蛋白质的表达出现异常,是以心脏的形态结构和功能发生变化为特征的心室重构<sup>[1]</sup>,是多种心血管疾病常见的一种并发症,常导致心力衰竭,如何

\* 基金项目:泰州市社会发展课题资助项目(TZ201523);泰州职业技术学院重点科研课题资助项目(TZYT16-1)。作者简介:刁爱芹(1985-),讲师,硕士,主要从事心血管信号转导研究。

预防和逆转心室重构已成为当今治疗的重要目标。大豆异黄酮(SI)即大豆苷元是一种异黄酮类化合物,研究发现其具有雌激素样作用、抗心肌缺血-再灌注损伤作用、抗心衰作用、对过氧化氢诱导的肝细胞损伤的保护作用等<sup>[2-4]</sup>。周茜等<sup>[5]</sup>研究表明 SI 对压力负荷性大鼠心肌肥厚具有保护作用。本研究采用主动脉弓缩窄(TAC)法致压力负荷性心肌肥厚模型,探讨 SI 对心肌肥厚的保护作用机制,旨在为 SI 在心肌肥厚防治中的作用提供科学依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 实验动物** 清洁级雄性 SD 大鼠,体质量 210~260 g,由扬州大学医学院实验动物中心提供。

**1.1.2 药品** SI(华北制药股份有限公司),异黄酮总含量大于或等于 98%,Masson 染色试剂盒购自福建迈新生物技术开发有限公司,TLR4 抗体、MyD88 抗体购自美国 Santa Cruz 公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 大鼠心肌肥厚模型建立** 将大鼠分成 4 组:假手术组(Sham 组)、主动脉弓缩窄模型组(TAC 组)、溶剂对照组(TAC+placebo 组)和 SI 治疗组(TAC+SI 组)。参照文献<sup>[6]</sup>方法制备大鼠心肌肥厚模型。3.6%水合氯醛(1 mL/100 g)腹腔麻醉后,经气管插管与动物呼吸机链接。胸部左侧第三肋间隙打开胸腔,在左颈总动脉与头臂干之间穿一 0 号丝线,并紧贴其上置一 10 号针头,用丝线将动脉与针头一起扎紧并迅速抽出针头,按照统一标准造成不完全缩窄。假手术对照组除不进行缩窄外,其余手术步骤与其他组相同。TAC+SI 组大鼠于造模第 2 天开始分别灌胃给药 120 mg/(kg·d),连续 4 周,TAC+placebo 组每天灌胃相同体积的溶剂,药物临用时溶于 0.5%羧甲基纤维素钠(CMC-Na)溶剂中。

**1.2.2 标本收集和处理** 术后 4 周,末次给药后禁食 12 h 大鼠称质量后处死,取其心脏,去除大血管、心外膜脂肪组织,用生理盐水清洗,吸干后计算全心质量指数(HW/BW)和左心室质量指数(LVW/TL)。

**1.2.3 组织学染色** 心肌组织胶原及纤维组织的鉴定染色(Masson 染色),取大鼠心脏新鲜组织置于 10%甲醛溶液固定,石蜡切片,根据 Masson 染色试剂盒说明书,进行心肌组织染色,通过光学显微镜观察心肌组织胶原沉积情况。苏木素(HE)染色,取大鼠心脏新鲜组织置于 10%甲醛固定,脱蜡脱水处理。置入 HE 染核 3~5 min,自来水洗 5 min 共 3 次,1%盐酸乙醇分化 0.5~1 min,流水冲洗 5 min 共 3 次,氨水反蓝 1 min,流水冲洗 15 min。0.5%伊红水溶液(对比染色),95%乙醇、无水乙醇脱水,透明,封固,通过显微镜观察心肌细胞形态。

**1.2.4 免疫共沉淀(immunoprecipitation, IP)** 每组取细胞质蛋白 300  $\mu$ g,用 Lysis Buffer 补足体积至 150  $\mu$ L,加入 TLR4 抗体 5  $\mu$ L,4  $^{\circ}$ C 持续混合过夜后再加入 Protein-A agrose 20  $\mu$ L,4  $^{\circ}$ C 充分混合 1 h,离心弃上清液。沉淀用 Lysis Wash Buffer 洗 3 次,同样方法离心后再用 20  $\mu$ L 的 Lysis Buffer 混旋沉淀,加 4  $\mu$ L 6 $\times$ SDS Loading Buf,煮沸 3 min 后收集上清液 Western blot 方法分析 MyD88 及 TLR4 蛋白表达水平。

**1.3 统计学处理** 利用 GraphPad Prism4 统计软件进行资料分析,计量资料以  $\bar{x}\pm s$  表示。ANOVA 方法进行组间变异度分析,两两比较采用 *t* 检验。以  $P<0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 SI 对 TAC 术后心脏外观变化** 从图 1 可见,雄性 SD 大鼠进行 TAC 后 4 周,其心脏发生明显肥大,与 Sham 组相比,HW/BW 和 LVW/TL 的值显著升高( $t=4.344, P=0.0122$  和  $t=8.762, P=0.0009, n=6$ );TAC+placebo 组 HW/BW 和 LVW/TL 与 TAC 组比较差异无统计学意义( $t=0.2227, P=0.8347$  和  $t=0.5196, P=0.6308, n=6$ ),与 Sham 组比较明显升高( $t=3.375, P=0.0279$  和  $t=6.640, P=0.0027, n=6$ );而 TAC+SI 组心脏大小与 TAC 组相比,HW/BW 和 LVW/TL 的值显著降低( $t=3.432, P=0.0265$  和  $t=5.738, P=0.105, n=6$ )。

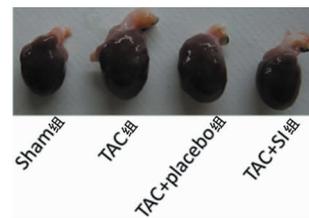
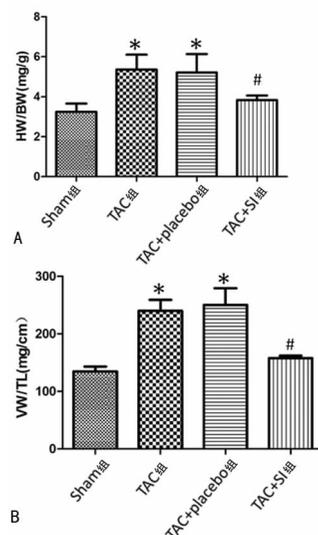


图 1 TAC 诱导的雄性 SD 大鼠的心室肥大



A: 各组 HW/BW 比较; B: 各组 LVW/TL 比较; \* :  $P<0.05$ , 与 Sham 组比较; # :  $P<0.05$ , 与 TAC 组、TAC+placebo 组比较

图 2 TAC 诱导的 SD 大鼠心脏质量改变

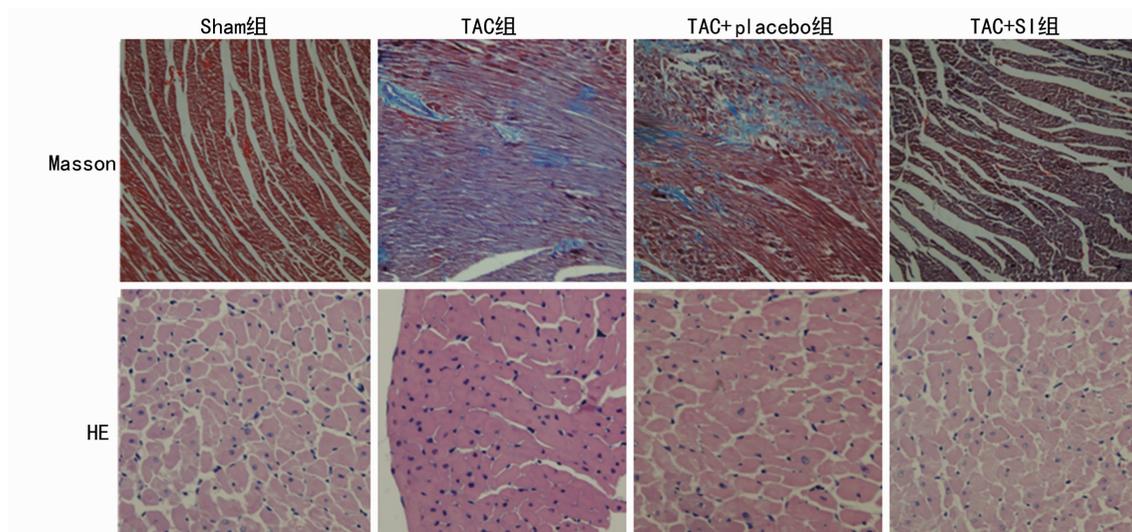


图 3 TAC 后 4 周心肌组织的形态学改变(HE×400, Masson×100)

**2.2 SI 对 TAC 术后心肌形态学和心肌纤维化变化**  
与 Sham 组比较, TAC 组的心肌组织细胞间隙中的纤维结缔组织明显增多。使用 SI 处理 4 周的 TAC+SI 组, 心肌组织内纤维结缔组织与 TAC 组相比则明显减少, TAC+placebo 组心肌组织内胶原含量与 TAC 组相比则没有明显改变。对左心室心肌组织进行常规切片, Sham 组心肌结构正常, TAC 组心肌细胞直径增宽, 肌纤维排列紊乱。使用 SI 治疗 4 周后, 心肌细胞横截面积减小, 而 TAC+placebo 组 4 周后的心肌细胞横截面积仍显著增加, 肌纤维排列紊乱。见图 3。

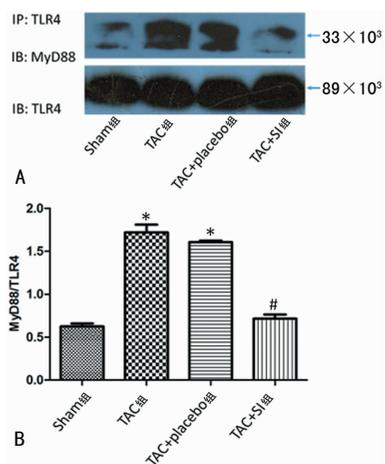
TAC 组比较无明显变化( $t=1.761, P=0.2202, n=6$ ), 给予 SI 治疗后, TAC 后 4 周心室心肌组织 TLR4 与 MyD88 的结合与 TAC+placebo 组显著降低( $t=13.88, P=0.0051, n=6$ )。见图 4。

**3 讨 论**

TAC 可引起大鼠压力超负荷性心肌肥厚和心室重构。本实验模型组的心脏质量指标(HW/BW 和 LVW/TL)明显增加、Masson 染色和 HE 染色显示的形态学指标均高于 Sham 组, SI 治疗后可抑制心脏质量及形态学指标, 说明 SI 可减轻 TAC 所致的大鼠心肌肥厚。

SI 是大豆生长形成的一类次生代谢产物, 它包括 15 种结构类似的化合物, 主要包括染料木黄酮、大豆素昔元和大豆昔元等, 其中染料木黄酮的活性最高。SI 的结构与雌激素相似, 在体内它可以与雌激素受体结合发挥弱的雌激素样作用而不携带雌激素的不良反应, 被认为是天然的雌激素替代品。流行病学研究证实 SI 在女性心血管疾病的发病和预防治疗中起重要作用<sup>[2,6]</sup>。也有研究表明, SI 对腹 TAC 所致心肌肥厚大鼠心室重构有一定的保护作用, 然而具体的作用机制还不是很清楚, 从而限制了临床应用 SI 治疗或预防心血管疾病<sup>[5]</sup>。

Toll 样受体是天然免疫系统内重要的模式识别受体。在这些受体中, TLR4 可被内毒素、热休克蛋白 60、纤维连接素等多种外源性或内源性配基激活, 招募髓样分化蛋白 88(MyD88), 诱导 MyD88 下游的核转录因子  $\kappa B$ (nuclear factor  $\kappa B$ , NF- $\kappa B$ ) 与 NF- $\kappa B$  的抑制蛋白 I $\kappa B\alpha$ (inhibitor of NF- $\kappa B$ ) 解离, 进入细胞核内, 编码不同肥大基因的转录活化及炎症因子的产生, 增强心肌细胞的肥大程度及凋亡。TLR4 信号通路的激活源于细胞质 TIR 域, 在 LPS 等配基的刺激



A: Western blot 图; B: TLR4 和 MyD88 蛋白相互作用统计分析; \*:  $P<0.01$ , 与 Sham 组比较; #:  $P<0.01$  与 TAC 组、TAC+placebo 组比较; IP: 免疫共沉淀; IB: Western blot 检测

图 4 SI 抑制 TAC 引起的大鼠心脏 TLR4 对 MyD88 相互作用

**2.3 SI 抑制 TAC 引起的 TLR4 对 MyD88 招募的增加**  
TAC 后 4 周, TAC 组大鼠左心室心肌组织 TLR4 与 MyD88 的结合与 Sham 组相比明显增加( $t=16.07, P=0.0039, n=6$ ); TAC+placebo 组与

下,TLR4 通过 TIR 域与 MyD88 的 TIR 域相结合,MyD88 被激活后,通过死亡域招募下游的 IL-1 受体相关激酶 (IRAKs),诱导下游的两条不同的信号通路,最终分别激活 c-Jun 氨基末端激酶和 NF- $\kappa$ B,其中,NF- $\kappa$ B 进入核内参与调控基因的表达。这些改变可能诱导心肌细胞的病理性肥大及细胞色素 c 的缺失等细胞表型的改变。文献[7-8]研究发现 TLR4/MyD88 介导的 NF- $\kappa$ B 信号通路在压力负荷增加或纤维蛋白原诱导心肌肥大过程中发挥重要作用,TLR4 基因缺陷小鼠与对照组相比,TAC 诱导的心肌肥大的程度与野生型小鼠相比明显减轻;而心肌局部转染 MyD88 无效抑制因子 (Ad5-dn-MyD88) 特异性抑制 MyD88 信号转导亦能够明显减少 TAC 或纤维蛋白原诱导的心肌肥大发生、发展过程中 NF- $\kappa$ B 的活化,减轻心肌肥大,改善心脏功能。

有资料表明,天然雌激素对心肌肥大具有保护作用,并且能降低 LPS 诱导的 H<sub>9</sub>C<sub>2</sub> 心肌细胞系中的 TLR4 mRNA 的表达<sup>[9-11]</sup>。另外有研究发现,在表皮角质细胞中,天然雌激素可以降低创伤性出血诱导的 TLR4 与 MyD88 的蛋白表达水平及下游的信号级联反应<sup>[12-13]</sup>。LOU 等<sup>[14]</sup>研究表明在脱膜间质细胞中雌激素能下调 LPS 激活的 TLR4 信号通路发挥抗炎抗凋亡作用,这些研究结果提示天然雌激素可能通过影响 TLR 介导的信号通路发挥其免疫保护作用。SI 作为天然雌激素的替代品,在本实验中发现 SI 能抑制 TAC 诱导的大鼠心肌组织内 TLR4/MyD88 交互作用增加,从而影响下游信号通路,抑制 TAC 诱导的心肌肥大的发生、发展。

综上所述,SI 可抑制压力超负荷导致的心肌肥厚和心室重构,而这种作用可能与抑制 TLR4/MyD88 介导的心肌肥厚信号通路有关,有关作用机制还有待深入研究。

## 参考文献

[1] FREY N, OLSON E N. Cardiac hypertrophy: the good, the bad, and the ugly[J]. *Annu Rev Physiol*, 2003, 65(65):45-79.

[2] 王燕,王艳春,范红艳,等.大豆异黄酮药理作用的研究进展[J]. *吉林医药学院学报*, 2013, 34(3):225-228.

[3] LI Y, ZHANG H Y. Soybean isoflavones ameliorate ischemic cardiomyopathy by activating Nrf2-mediated antioxidant responses[J]. *Food Function*, 2017, 8(8):2935-

2944.

- [4] 马善峰,关宿东,祝延,大豆异黄酮对阿霉素致心衰大鼠心功能的影响[J]. *中西医结合学报*, 2004, 2(4):278-280.
- [5] 周茜,吴维,周俐,等.大豆异黄酮压力负荷性大鼠心肌肥厚的保护作用[J]. *赣南医学院学报*, 2008, 28(1):4-7.
- [6] SOUZEAU E, BLANGER S, PICARD S, et al. Dietary isoflavones during pregnancy and lactation provide cardioprotection to offspring rats in adulthood[J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 289(2):H715-H721.
- [7] HA T, LI Y, HUA F, et al. Reduced cardiac hypertrophy in toll-like receptor 4-deficient mice following pressure overload[J]. *Cardiovasc Res*, 2005, 68(2):224-234.
- [8] LI T, WANG Y, LIU C, et al. MyD88-dependent NF- $\kappa$ B activation is involved in fibrinogen-induced hypertrophic response of cardiomyocytes[J]. *J Hypertens*, 2009, 27(5):1084-1093.
- [9] WANG Y C, LIN X X, LI N, et al. Oestrogen inhibits BMP4-induced BMP4 expression in cardiomyocytes: a potential mechanism of oestrogen-mediated protection against cardiac hypertrophy[J]. *Br J Pharmacol*, 2015, 172(23):5586-5595.
- [10] LUO T, KIM J K. The Role of Estrogen and Estrogen Receptors on Cardiomyocytes: An Overview[J]. *Can J Cardiol*, 2016, 32(8):1017-1025.
- [11] FAN M J, HUANG L R, SHEN C Y, et al. Reduction of TLR4 mRNA stability and protein expressions through inhibiting cytoplasmic translocation of HuR transcription factor by E $\beta$  and/or ER $\alpha$  in LPS-treated H9c2 cardiomyoblast cells[J]. *Chin J Physiol*, 2014, 57(1):8-18.
- [12] HSIEH Y C, FRINK M, THOBE B M, et al. 17 $\beta$ -estradiol downregulates Kupffer cell TLR4-dependent p38 MAPK pathway and normalizes inflammatory cytokine production following trauma-hemorrhage[J]. *Mol Immunol*, 2007, 44(9):2165-2172.
- [13] MOEINPOUR F, CHOUDHRY M A, KAWASAKI T, et al. 17  $\beta$ -estradiol normalizes Toll receptor 4, mitogen activated protein kinases and inflammatory response in epidermal keratinocytes following trauma-hemorrhage[J]. *Mol Immunol*, 2007, 44(13):3317-3323.
- [14] LOU Y Y, HU M H, WANG Q J, et al. Estradiol suppresses TLR4-triggered apoptosis of decidual stromal cells and drives an anti-inflammatory TH2 shift by activating SGK1[J]. *Int J Biol Sci*, 2017, 13(4):434-448.

(收稿日期:2017-10-18 修回日期:2018-02-21)