福辛普利钠预处理对缺血后适应大鼠心肌组织Toll样受体表达及炎症因子的影响

张大武, 张蕾, 刘剑刚*, 王承龙, 史大卓

中国中医科学院西苑医院心血管病中心, 北京 100091

* 联系人, E-mail: liujiangang2002@sina.com

2009-12-11收稿, 2010-06-13接受

国家自然科学基金资助项目(30772868)

摘要 大鼠预先灌胃福辛普利钠, 观察其和缺血后适应(ischemic postconditioning, IPoC)对大鼠心肌缺血再灌注(ischemic reperfusion, I/R)损伤后心肌组织Toll样受体(toll-like receptor, TLR)表达及心肌组织炎症浸润的影响. 将60只SD (Sprague-Dawley)大鼠随机分为假手术组、I/R组、IPoC组以及福辛普利钠+IPoC组, 每组15只. 假手术组大鼠心脏前降支下置线不结扎; I/R组予以心脏前降支结扎30 min, 再灌注1 h; IPoC组给予心脏前降支结扎30 min, 后予以3次10 s的再灌注/缺血循环, 再持续灌注1 h; 福辛普利钠+IPoC组则预先给予福辛普利钠片0.9 mg/kg, 连续灌胃14 d, 于末次灌胃2 h后, 施以IPoC组的干预过程. 所有实验大鼠腹主动脉取血并分离出心脏组织. 比色法测定血清肌钙蛋白T (cardiac troponin T, cTNT)的含量, NBT染色测定大鼠左室心肌梗死面积, 酶联免疫吸附测定法测定心肌组织单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)水平. 免疫组织化学方法测定心肌组织TLR2及TLR4的表达, HE染色观察心肌组织炎性细胞的浸润. 结果表明, 与I/R组比较, IPoC组大鼠心肌梗死面积明显缩小($P<0.01$), 大鼠血清cTNT水平显著降低($P<0.01$), 心肌组织MCP-1, TNF- α 含量和炎性细胞浸润数量明显下降($P<0.05$, $P<0.01$), 心肌组织TLR2及TLR4的表达被显著抑制($P<0.01$); 与IPoC组比较, 福辛普利钠预处理可进一步降低IPoC大鼠心肌梗死面积($P<0.05$), 心肌组织TNF- α 水平也显著降低($P<0.01$), 对心肌TLR2及TLR4的表达有进一步抑制($P<0.05$). 血管紧张素转化酶抑制剂福辛普利钠预处理可加强IPoC对I/R大鼠心肌的保护作用, 其机理可能与抑制TLR介导的炎症信号通路和趋化因子反应有关.

关键词

福辛普利钠
缺血后适应
再灌注损伤
Toll样受体
炎症因子

随着现代生活节奏的加快, 急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)已是严重危害人类健康的世界性问题, 其发病通常是在冠状动脉粥样硬化病变的基础上继发斑块破裂, 导致血栓形成, 阻塞冠状动脉, 相应的心肌组织持久的急性缺血所致. 因此, 建立绿色通道早期开通患者闭塞的冠状动脉, 有效恢复缺血心肌的血流灌注, 是限制和缩小心肌梗死面积、改善患者预后的关键措施. 近年来的临床研究发现, 在冠状动脉再灌注开始时对冠脉进行短暂、重

复的开通及再闭过程, 随后恢复冠状动脉血流, 即“缺血后适应”(ischemic postconditioning, IPoC), 对缺血再灌注心脏有显著保护作用^[1].

缺血后适应已被实验和临床研究证实可减轻再灌注损伤心肌的梗死面积, 改善心脏功能^[2,3]. 药物预处理对心肌缺血再灌注(ischemic reperfusion I/R)损伤心肌的保护也有较多报道, 其中血管紧张素转化酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)对保护I/R心肌的作用较为明显^[4], 但ACEI预

英文引用格式: Zhang D W, Zhang L, Liu J G, et al. Effect of fosinopril sodium pretreatment on toll-like receptor and inflammatory factor in rat myocardium with ischemic postconditioning (in Chinese). Chinese Sci Bull (Chinese Ver), 2010, 55: 2378–2383, doi: 10.1360/972009-2610

处理是否具有增加 IPoC 对 I/R 损伤心肌的保护作用, 目前尚无报道. 缺血后适应心脏保护作用的机制尚未完全阐明, 本实验观察 ACEI 制剂福辛普利钠预处理结合 IPoC 对再灌注损伤心肌的保护作用, 并从 Toll 样受体(toll-like receptor, TLR)及促炎性细胞因子水平研究其作用机理.

1 材料和方法

(i) 实验动物. 健康SD (Spragu-Dawley)大鼠, 清洁级, 60只, 雌雄兼用, 体重180~200 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 合格证号: SCXK(京)2007-0001. 适应性饲养3 d后进行实验, 动物自由饮水, 室温控制23~25℃, 湿度为50%~70%, 光照12 h, 黑暗12 h.

(ii) 药物和试剂. 福辛普利钠片(商品名: 蒙诺), 10 mg/粒, 批号: 0804087, 中美上海施贵宝制药有限公司生产. 肌钙蛋白T (cardiac troponin T, cTNT)试剂盒由美国RapidBio Lab公司生产, 北京莱博特利生物医学科技公司提供, 批号: 08060502; 单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemotactic protein-1, MCP-1)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)酶联免疫吸附测定 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒、氯化硝基四氮唑蓝(nitro blue tetrazolium chloride, NBT), 由美国R&D (R&D systems)公司生产. 考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒, 由南京建成科技有限公司生产, 批号: 090828; Toll样受体2 (toll-like receptor 2, TLR2)抗体试剂盒, Toll样受体4 (toll-like receptor 4, TLR4)抗体试剂盒, 由北京博奥森生物技术有限公司提供. 浓缩型DAB试剂盒和免疫组化试剂盒, 由北京中杉金桥生物技术有限公司提供.

(iii) 实验仪器. 动物人工呼吸机, 型号: DW-2000, 上海嘉鹏科技有限公司; 心电图机, 型号: ECG-6511, 上海光电仪器有限公司生产; Ultra Turax T18高速分散机, 德国IKA公司; 7020型全自动生化仪, 日本日立公司; Multiskan MK3型酶标仪, 荷兰雷勃生物医学有限公司; DpxView Pro型显微彩色图像处理系统, 丹麦Delta Pix公司.

(iv) 动物缺血后适应模型的建立. 大鼠以20%氨基甲酸乙酯(乌拉坦)6 mL/kg腹腔麻醉, 置于解剖台上仰卧位固定, 记录II导联心电图. 颈部、胸骨左

侧、腹部消毒, 并剪毛备皮. 剪开颈部皮肤, 暴露气管并插管, 连接动物呼吸机(潮气量3 mL/100 g体重, 呼吸频率为60次/min), 沿胸骨左缘3~4肋间开胸, 暴露心脏, 剪开心包膜, 在左心耳的下缘、肺动脉圆锥的左缘之间穿刺进针, 围绕左冠状动脉前降支上1/3处穿3-0缝合线, 缝合线两端穿过一直径为1.5 mm的硅胶软管, 拉线推管, 蚊式止血钳固定以阻断左冠状动脉血流. 结扎后II导联心电图示ST段明显抬高或T波高尖, 结扎线下左室前壁呈暗红色为结扎成功. 30 min后松开蚊式止血钳放松缝合线, 恢复冠状动脉血流再灌注60 min. 后适应操作在结扎30 min结束后, 立即给予3次10 s的再灌注/缺血循环(松开蚊式止血钳放松缝合线为再灌注, 拉线推管用止血钳夹紧硅胶管为缺血).

(v) 动物分组及用药. 大鼠随机分为4组, 每组15只: (1) 假手术组, 开胸冠状动脉前降支下置线不结扎; (2) I/R组, 冠状动脉前降支结扎30 min, 再灌注1 h, 建立I/R损伤模型; (3) IPoC组, 建立I/R模型中予以3次10 s的再灌注/缺血循环; (4) 福辛普利钠+IPoC组, 福辛普利钠, $0.9 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$, 用等量蒸馏水稀释后灌胃14 d, 于末次灌胃2 h后建立I/R模型, 过程中给予IPoC干预. 各组(除福辛普利钠+IPoC组外)均给予等量生理盐水灌胃14 d.

(vi) 动物样本的取材、分离和左室心肌梗死面积测量. 完全松开缝合线再灌注60 min结束后, 腹主动脉取血并分离血清, 取出大鼠心脏生理盐水冲洗干净后, 每组按随机数字表检测心肌组织指标, 5只做NBT染色测量大鼠左室心肌梗死面积, 5只液氮快速冷冻后, -80℃冰箱保存用于组织ELISA检测, 5只10%中性甲醛溶液中保存用于免疫组织化学检测. 实验中假手术组因灌胃死亡1只, I/R组造模中死亡4只, 其余2组死亡各2只, 后均予相应补充.

将取下的大鼠心脏用生理盐水冲洗干净, 滤纸吸除多余水分, 均匀切成5片, 放入NBT染色液中, 置于37℃水箱中温浴5 min, 温浴过程中观察心肌组织颜色, 当非梗死区显示蓝色, 梗死区为红色时, 取出放置在滤纸上, 用Canon IXUS 90IS数码相机微距拍摄后, 使用DpxView Pro型显微彩色图像处理系统计算出左室梗死面积(%), 用心肌梗死面积/左室面积 $\times 100\%$ 表示.

(vii) 血清学指标和心肌组织MCP-1和TNF- α 含量的检测. 比色法测定大鼠血清cTnT水平. 每组5只心脏, 取前降支结扎线下3 mm至心尖部左室缺血

心肌组织100 mg, 加入2 mL低温生理盐水(0℃), T18高速分散机匀浆后, 离心取上清液, 于-80℃保存待测. 所有标本均采用ELISA法检测, 操作过程严格按说明书操作程序进行. 同时用考马斯亮蓝蛋白测定法检测每个组织标本的蛋白含量, 得出数值后, 将每毫升匀浆液中的细胞因子含量换算成每毫克蛋白中的细胞因子含量.

(viii) 心肌组织TLR定位和免疫组织化学检测. 心肌标本用10%中性缓冲甲醛液固定18 h. 脱水、透明、浸蜡、石蜡包埋. 连续切片约5 μm厚, 捞片于多聚赖氨酸防脱处理过的载玻片上. 根据SABC试剂盒说明书操作, 大鼠心肌切片常规脱腊, 封闭内源性过氧化物酶, 10%正常山羊血清封闭. 分别滴加一抗TLR2抗体(1:200)和TLR4抗体(1:800), 37℃孵育1 h, 磷酸缓冲液(PBS)冲洗; 滴加二抗生物素化山羊抗小鼠IgG, 室温20 min, PBS溶液冲洗; 滴加SABC复合物, 室温20 min, PBS溶液冲洗; DAB-H₂O₂显色, 苏木素轻度复染; 乙醇脱水、透明、中性胶封片, 选取同批染色切片进行光学显微镜下观察. 每张切片随机选取3个不重叠的视野(×400), 每只共计15个视野, 以心肌炎症部位的胞浆染成棕褐色为阳性细胞标志, 经病理图像计算机分析系统半定量分析大鼠心肌组织阳性细胞的表达, 以阳性细胞面积占所有细胞面积百分比表示结果.

(ix) 统计学处理. 所有数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示, 使用SPSS16.0软件进行统计学分析. 单因素方差分析各组别之间的差异, 组间两两比较采用LSD法, $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义.

2 结果

2.1 福辛普利钠预处理结合IPoC对大鼠血清cTnT和心肌梗死范围的影响

与假手术组比较, 各组大鼠心肌损伤后cTnT有显著升高($P < 0.01$), 与I/R组比较, IPoC组cTnT有显著降低($P < 0.01$). 定量组织学NBT染色法显示左室心肌梗死范围, I/R组左室梗死面积为35.28%±3.85%, IPoC组减少到21.02%±2.29% ($P < 0.01$), 福辛普利钠+IPoC组和IPoC组相比, 可进一步缩小心肌梗死面积(17.17%±3.12%, $P < 0.05$)(表1).

2.2 福辛普利钠预处理结合IPoC对大鼠心肌组织Toll样受体2, 4表达的影响

假手术组可见少量棕褐色颗粒, I/R组心肌内棕褐色颗粒明显增多. 与假手术组比较, I/R组心肌组织TLR2, 4的表达均有显著升高($P < 0.01$); 与I/R组比较, IPoC组TLR2, 4表达显著降低($P < 0.01$); 与IPoC组比较福辛普利钠+IPoC组可进一步抑制TLR2, 4表达($P > 0.05$)(表2, 图1和2).

2.3 福辛普利钠预处理结合IPoC对大鼠心肌TNF-α和MCP-1水平以及炎性细胞浸润的影响

与假手术组比较, 缺血再灌注后炎性细胞因子MCP-1和TNF-α显著增高($P < 0.01$); 与I/R组比较, IPoC干预能显著降低TNF-α和MCP-1($P < 0.05$, $P < 0.01$); 在此基础上, 福辛普利钠能进一步降低IPoC心肌TNF-α水平($P < 0.01$), 对MCP-1有降低趋势, 但统计学处理尚不显著. 见表3.

HE染色结果显示, 与假手术组比较, 缺血再灌注后浸润的炎性细胞数显著增加($P < 0.01$); 与I/R组比较, IPoC干预能显著降低浸润细胞数($P < 0.01$); 福辛普利钠+IPoC有进一步减少炎性细胞浸润的趋势, 但统计学处理尚不显著(表3, 图3).

3 讨论

在药物干预I/R损伤中, 大量研究表明ACEI有

表1 各组大鼠血清cTnT含量和心肌梗死面积^{a)}

组别	<i>n</i>	cTnT/ng·mL ⁻¹	<i>n</i>	左室梗死区比例(%)
假手术组	14	0.015±0.01	5	0
I/R组	11	4.41±0.93**	5	35.28±3.85**
IPoC组	13	2.53±0.51**△△	5	21.02±2.29△△
福辛普利钠+IPoC组	13	2.36±0.96**△△	5	17.17±3.12△△□

a)**, 与假手术组比较, $P < 0.01$; △△, 与I/R组比较, $P < 0.01$; □, 与IPoC组比较, $P < 0.05$

表2 各组大鼠心肌TLR2, 4表达水平变化^{a)}

组别	<i>n</i>	TLR2(%)	TLR4(%)
假手术组	5	10.92±5.28	12.37±6.64
I/R组	5	45.12±7.53**	49.33±9.52**
IPoC组	5	35.89±8.19△△	38.42±8.16△△
福辛普利钠+IPoC组	5	29.02±6.50△△□	30.59±7.17△△□

a)**, 与假手术组比较, $P < 0.01$; △△, 与I/R组比较, $P < 0.01$; □, 与IPoC组比较, $P < 0.05$

图1 免疫组织化学法检测各组大鼠心肌 TLR2 表达(光学显微镜, ×400)
(a) 假手术组($n=5$); (b) I/R 组 ($n=5$); (c) IPoC 组($n=5$); (d) 福辛普利钠+IPoC 组($n=5$)

图2 免疫组织化学法检测各组大鼠心肌 TLR4 表达(光学显微镜, ×400)
(a) 假手术组($n=5$); (b) I/R 组 ($n=5$); (c) IPoC 组($n=5$); (d) 福辛普利钠+IPoC 组($n=5$)

表3 各组大鼠心肌 MCP-1, TNF- α 水平及炎性细胞浸润的影响($\bar{x} \pm s$)^{a)}

组别	n	TNF- α /pg·mg ⁻¹	MCP-1/pg·mg ⁻¹	浸润细胞数(个)
假手术组	5	3.00±0.19	12.60±3.68	7.00±2.73
I/R 组	5	6.55±0.30**	39.27±7.55**	43.40±11.13**
IPoC 组	5	4.71±0.27 $\Delta\Delta$	29.97±2.29 Δ	24.80±4.44 $\Delta\Delta$
福辛普利钠+IPoC 组	5	4.21±0.32 $\Delta\Delta\Box\Box$	25.50±4.50 $\Delta\Delta$	22.60±4.88 $\Delta\Delta$

a) **, 与假手术组比较, $P<0.01$; Δ , $\Delta\Delta$ 与 I/R 组比较, $P<0.05$, $P<0.01$; $\Box\Box$, 与 IPoC 组比较, $P<0.01$

图3 大鼠心肌 HE 染色浸润细胞数的变化(光学显微镜, ×400)

(a) 假手术组($n=5$); (b) I/R 组 ($n=5$); (c) IPoC 组($n=5$); (d) 福辛普利钠+IPoC 组($n=5$). 黑色箭头所示为浸润细胞, 其中单核细胞为卵圆形, 细胞表面不规则, 细胞核长呈马蹄形, 或具浅的凹陷, 含有 1~2 个小的核仁; 淋巴细胞多为圆形或椭圆形, 核仁大而明显, 核内异染色质为主, 故核呈致密影

保护心肌免于 I/R 损伤的作用^[4-6]. 给荷兰猪灌胃赖诺普利 10 d 后, 再建立心肌 I/R 损伤模型, 结果显示 I/R 荷兰猪心肌损伤明显减轻, 心脏功能显著改善^[5]. ACEI 保护 I/R 心肌的机制可能与减少 I/R 过程中大量产生的血管紧张素 II 对心肌的损害有关^[6]. ACEI 还可使缓激肽生成增多, 分解减少, 促进前列腺素 I₂ 和一氧化氮生成, 用缓激肽受体拮抗剂后, ACEI 抑制再灌注心肌凋亡和减少心梗面积的作用明显减弱^[7].

但是对于缺血再灌注损伤而言, 其机制涉及活性氧产生、多形核中性粒细胞聚集、钙超载和血管内皮功能受损等诸多因素, 以及随之诱导活化的信号级联反应, 导致严重的心肌组织损伤和功能障碍. 其表现出的是一种多因素、多途径的发病机制, 故单纯的药物治疗对于缺血再灌注损伤, 未显示出有绝对的优势. 既往研究也表明, 药物治疗干预缺血再灌注损伤仍然停留于动物实验阶段, 未能进入大规模临

床实验. 近年来, IPoC作为缺血再灌注损伤的辅助性治疗手段被大量报道, 它有减少缺血再灌注损伤心肌梗死面积和心肌损伤标志物释放的保护作用, 本研究显示, IPoC能减少缺血再灌注大鼠心肌损伤标志物含量和心肌梗死面积, 与既往研究相符, 那么药物治疗联合缺血后适应是否能进一步减少心肌梗死面积, 改善心脏功能, 目前尚未见报道. 我们的实验研究表明, 福辛普利钠预先治疗, 可提高IPoC保护I/R大鼠心肌作用, 较单纯IPoC可进一步缩小心肌梗死面积.

TLR是一组I型跨膜受体, 通过与内、外源性配体结合, 激发天然免疫和获得性免疫应答, 启动与免疫和炎症相关的细胞因子IL-6, TNF- α 等基因的转录和蛋白的表达^[8]. 有研究^[9,10]将小鼠TLR4基因敲除后建立心肌I/R损伤模型, 发现其与同种野生型小鼠相比心肌梗死范围减少、炎症反应减轻、心肌梗死后的不良重塑改善. 给予TLR4的抑制剂eritoran干预后, I/R后心肌梗死面积减少, 心肌组织NF-kappa B和促炎性细胞因子MCP-1和TNF- α 水平降低^[11]. Sakata等人^[12]同样也发现TLR2缺陷小鼠遭受心肌I/R损伤后左室舒张末压较同种野生型小鼠下降, 促炎性细胞因子TNF- α 和IL-1 β 水平降低. 以上研究均表明抑制TLR2, 4的表达, 可保护I/R损伤心肌. 我们实验研究发现, IPoC干预再灌注损伤大鼠心肌后TLR2, 4表达降低, 心肌内MCP-1和TNF- α 含量也下降, 表明IPoC抑制TLR2, 4的表达可能是其保护I/R心肌的一个重要途径. 给予福辛普利钠预处理后, TLR2, 4的表达与IPoC组比较, 受到进一步抑制和降低. 心肌组织TNF- α 的含量也显著下降, 表明福辛普利钠联合IPoC

可能与抑制TLR2, 4的表达和促炎性细胞因子的水平有密切关系.

另外, 本实验研究显示心肌缺血再灌注时MCP-1表达显著增加, 缺血再灌注心肌的炎性细胞浸润也显著增多. 有研究^[13]表明, 将MCP-1特异性受体CCR2基因敲除后, 小鼠缺血再灌注心肌炎性细胞浸润显著降低, 心肌梗死面积缩小. 同样, 转染家兔MCP-1抑制剂7ND基因抑制MCP-1活性后, 再建立心肌I/R损伤家兔模型, 结果显示心肌炎性细胞浸润减少, 促炎性细胞因子TNF- α 水平降低, 家兔心脏功能明显改善, 表明抑制MCP-1活性是保护I/R心肌的重要环节之一^[14]. 本研究应用IPoC干预I/R心肌后, 心肌组织MCP-1水平显著降低, 炎性细胞的浸润也明显减少, 表明IPoC保护I/R心肌的作用与抑制MCP-1表达和炎性细胞浸润有关, 福辛普利钠联合IPoC能进一步降低MCP-1水平和炎性细胞浸润, 统计学处理尚不显著, 可能和样本量较少有关, 今后有待进一步深入研究.

介入治疗技术已成为AMI再灌注治疗的重要手段, 而缺血后适应的干预手段方法简便, 可操作性强, 对心肌缺血I/R的保护作用如能得以证实并进而在临床应用, 可使患者在再灌注治疗中获得最大收益. 福辛普利钠预处理与IPoC的联合应用, 可能为临床上改善AMI早期再灌注治疗后患者的长期预后提供一个重要的干预手段, 尤其是对有AMI高危因素诸如高血压、糖尿病等疾病的患者, 预防性应用ACEI类药物对于改善AMI再灌注损伤的心脏功能具有重要意义.

参考文献

- 1 Zhao Z Q, Corvera J S, Halkos M E, et al. Inhibition of myocardial injury by ischemic postconditioning during reperfusion: Comparison with ischemic preconditioning. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2003, 285: H579—H588
- 2 Thibault H, Piot C, Staat P, et al. Long-term benefit of postconditioning. *Circulation*, 2008, 117: 1037—1044
- 3 Laskey W K, Yoon S, Calzada N, et al. Concordant improvements in coronary flow reserve and ST-segment resolution during percutaneous coronary intervention for acute myocardial infarction: A benefit of postconditioning. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2008, 72: 212—220
- 4 Ozer M K, Sahna E, Birincioglu M, et al. Effects of captopril and losartan on myocardial ischemia-reperfusion induced arrhythmias and necrosis in rats. *Pharmacol Res*, 2002, 45: 257—263
- 5 Doğan R, Farsak B, Isbir S, et al. Protective effect of lisinopril against ischemia-reperfusion injury in isolated guinea pig hearts. *Cardio-vasc Surg (Torino)*, 2001, 42: 43—48
- 6 Li K, Chen X. Protective effects of captopril and enalapril on myocardial ischemia and reperfusion damage of rat. *J Mol Cell Cardiol*, 1987, 19: 909—915
- 7 Wang L X, Ideishi M, Yahiro E, et al. Mechanism of the cardioprotective effect of inhibition of the renin-angiotensin system on ischemia/reperfusion-induced myocardial injury. *Hypertens Res*, 2001, 24: 179—187

- 8 Boyd J H, Mathur S, Wang Y, et al. Toll-like receptor stimulation in cardiomyocytes decreases contractility and initiates an NF-kappaB dependent inflammatory response. *Cardiovasc Res*, 2006, 72: 384—393
- 9 Oyama J, Blais C Jr, Liu X, et al. Reduced myocardial ischemiareperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice. *Circulation*, 2004, 109: 784—789
- 10 Riad A, Jager S, Sobirey M, et al. Toll-like receptor-4 modulates survival by induction of left ventricular remodeling after myocardial infarction in mice. *J Immunol*, 2008, 180: 6954—6961
- 11 Shimamoto A, Chong A J, Yada M, et al. Inhibition of Toll-like receptor 4 with eritoran attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury. *Circulation*, 2006, 114: I270—I274
- 12 Sakata Y, Dong J W, Vallejo J G, et al. Toll-like receptor 2 modulates left ventricular function following ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2007, 292: H503—H509
- 13 Hayasaki T, Kaikita K, Okuma T, et al. CC chemokine receptor-2 deficiency attenuates oxidative stress and infarct size caused by myocardial ischemia-reperfusion in mice. *Circ J*, 2006, 70: 342—351
- 14 Kajihara N, Morita S, Nishida T, et al. Transfection with a dominant-negative inhibitor of monocyte chemoattractant protein-1 gene improves cardiac function after 6 hours of cold preservation. *Circulation*, 2003, 108(Suppl 1): II213—II218

Effect of fosinopril sodium pretreatment on toll-like receptor and inflammatory factor in rat myocardium with ischemic postconditioning

ZHANG DaWu, ZHANG Lei, LIU JianGang, WANG ChengLong & SHI DaZhuo
& CHEN KeJi

Department of Cardiology, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China

To observe the effects of ischemic post-conditioning (IPoC) on Toll-like receptor expression and myocardial inflammatory infiltration in myocardial tissue of rats with ischemic reperfusion (I/R) injury and fosinopril sodium pre-treatment, a total of 60 Sprague-Dawley rats were randomly assigned to the following groups: sham (suture around left anterior descending coronary artery was not tied), ischemic reperfusion (30 min *in situ* transient occlusion of the left anterior descending artery, followed by 1 h reperfusion), IPoC (30-min occlusion of left anterior descending artery, followed by three cycles of 10-s reperfusion/10-s ischemia prior to 1-h reperfusion), and fosinopril sodium +IPoC (fosinopril sodium pre-treatment, 0.9 mg/kg, for 14 d, followed by 2-h I/R after last gavage, and IPoC treatment during I/R). Arterial blood and heart samples were extracted after 1-h reperfusion. Serum cTnT levels were measured using the colorimetric method, myocardial infarct size was measured using nitroterazolium blue/chloride staining, TNF- α and MCP-1 levels in myocardial tissue were measured by ELISA. TLR2 and TLR4 expression in myocardial tissue was analyzed using immunohistochemistry, and infiltrating cells were detected by hematoxylin-eosin staining. Compared with the I/R group, myocardial enzyme cTnT levels and infarct size significantly decreased in the IPoC group ($P < 0.01$). In addition, MCP-1 and TNF- α levels, as well as the number of infiltrating cells in myocardial tissue, significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively). TLR2 and 4 expressions also significantly decreased in the IPoC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$, respectively). Compared with the IPoC group, the combination of fosinopril sodium and IPoC further reduced infarct size ($P < 0.05$), as well as TNF- α levels in myocardial tissue ($P < 0.01$). TLR2 and 4 expressions and infiltration of inflammatory cells were also significantly decreased ($P < 0.05$). Therefore, fosinopril sodium enhanced the protective effect of IPoC in a rat model of myocardial I/R injury. These mechanisms could be related to inhibition of the TLR signal pathway and chemotactic factor reactions.

fosinopril sodium, ischemic postconditioning, reperfusion injury, toll-like receptor, inflammatory factor

doi: 10.1360/972009-2610