

论著·基础研究

doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2022.19.003

网络首发 [https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220830.1757.011.html\(2022-08-31\)](https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20220830.1757.011.html(2022-08-31))替格瑞洛对急性心肌梗死小鼠心肌的保护作用及机制研究^{*}宋占春¹,陈 亮²,何廉旗¹,张 迪¹,任智超¹,张 建¹

(辽宁省抚顺市中心医院:1. 心内科;2. 普通外科 113006)

[摘要] **目的** 探讨替格瑞洛对急性心肌梗死(AMI)小鼠心肌的保护作用,并阐明其作用机制。**方法** 将 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 5 组:假手术组(sham 组)、AMI 组、替格瑞洛治疗组、替格瑞洛预处理组、替格瑞洛预处理+治疗组。除 sham 组外,其余各组小鼠均采用结扎左前降支冠状动脉的方法建立 AMI 小鼠模型,各实验组(替格瑞洛治疗组、替格瑞洛预处理组、替格瑞洛预处理+治疗组)分别在造模后、造模前和造模前后灌胃相同剂量替格瑞洛治疗小鼠,超声心动图测定小鼠心脏功能相关指标;采用试剂盒检测小鼠血清肌钙蛋白(cTn I)水平、肌酸激酶同工酶(CK-MB)和乳酸脱氢酶(LDH)活性;统计并计算各小鼠心脏质量/体重比值;苏木素-伊红(HE)染色和 2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色检测小鼠心肌组织病理变化;ELISA 检测心肌组织白细胞介素(IL)-18、IL-1 β 、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)水平;免疫荧光检测心肌组织 CD68、p62 表达及分布情况;Western blot 检测心肌组织 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)、半胱天冬酶-1 前体(pro-caspase-1)、活化型半胱天冬酶-1(cleaved caspase-1)、IL-1 β 前体(pro-IL-1 β)、活化型 IL-1 β (cleaved IL-1 β)、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)、Beclin-1、p62 表达;透射电镜观察自噬小体的形成情况。**结果** 超声心动图结果表明,与 sham 组相比,AMI 组左心室舒张末期内径(LVIDd)、左心室收缩末期内径(LVIDs)明显增加($P < 0.01$),而短轴缩短率(FS)、射血分数(EF)明显降低($P < 0.01$),但各实验组较 AMI 组均呈不同程度恢复。ELISA 结果表明,与 sham 组相比,AMI 组小鼠血清 cTn I 水平、CK-MB 和 LDH 活性及小鼠心脏质量/体重比值明显增加($P < 0.01$),各实验组较 AMI 组均降低。病理结果提示,与 sham 组相比,AMI 组小鼠心肌组织病理损伤加重,各实验组损伤程度较 AMI 组均减轻。ELISA 结果表明,与 sham 组相比,AMI 组小鼠心肌组织 IL-18、IL-1 β 、TNF- α 水平均明显升高($P < 0.01$),各实验组上述炎症因子水平较 AMI 组均明显降低。此外,与 sham 组相比,AMI 组小鼠心肌组织 CD68、NLRP3、cleaved caspase-1、pro-IL-1 β 、cleaved IL-1 β 、p62 水平均升高,各实验组上述蛋白水平呈不同程度降低,而 LC3 II / I 和 Beclin-1 水平均升高($P < 0.01$)。透射电镜结果表明,各实验组小鼠心肌细胞自噬小体数量较 AMI 组有所增加。**结论** 替格瑞洛通过抑制 NLRP3 炎症小体途径和促进细胞自噬,减轻巨噬细胞浸润和炎症反应,对小鼠 AMI 产生治疗作用。

[关键词] 急性心肌梗死;替格瑞洛;NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3;细胞自噬;炎症细胞浸润**[中图法分类号]** R542.22 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2022)19-3253-08Protective effects and mechanism of ticagrelor on myocardium of acute myocardial infarction in mice^{*}SONG Zhanchun¹,CHEN Liang²,HE Lianqi¹,ZHANG Di¹,REN Zhichao¹,ZHANG Jian¹

(1. Department of Cardiology;2. Department of General Surgery, Fushun

Central Hospital, Fushun, Liaoning 113006, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of ticagrelor on myocardium of the mice with acute myocardial infarction (AMI), and to elucidate its mechanism. **Methods** Eight-week-old male C57BL/6 mice were randomly divided into five groups: sham operation group (sham group), AMI group, ticagrelor treatment group, ticagrelor pretreatment group and ticagrelor pretreatment + treatment group. Except for the sham group, the mice in other groups were established the AMI mouse model by ligating the left anterior descending coronary artery. The experimental groups (ticagrelor treatment group, ticagrelor pretreatment group, ticagrelor pretreatment + treatment group) were treated with the same dose of ticagrelor by gavage after model establish, before model establish, and before and after model establish. The cardiac function related

^{*} **基金项目:** 辽宁省抚顺市“抚顺英才计划”项目(FSYC202007002)。 **作者简介:** 宋占春(1980—),主任医师,博士,主要从事高血压和冠状动脉粥样硬化的防治研究。 $\triangle$ **通信作者,** E-mail: szcslszcl@163.com。

indexes of the mice were measured by echocardiography; the kits were used to detect the activities of serum troponin I (cTnI) levels, creatine kinase isoenzyme (CK-MB) and lactate dehydrogenase (LDH). The heart mass/body weight ratio of each mouse was counted and calculated. The hematoxylin eosin (HE) staining and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining were used to detect the pathological changes of mouse myocardial tissue. ELISA was used to detect the levels of interleukin (IL)-18, IL-1 β and tumor necrosis factor- α (TNF- α) in myocardial tissue. The expression and distribution of CD68 and p62 were detected by immunofluorescence. Western blot was used to detect nod like receptor thermoprotein domain related protein 3 (NLRP3), caspase-1 precursor (pro-caspase-1), activated caspase-1 (cleaved caspase-1), IL-1 β precursor (pro-IL-1 β), activated IL-1 β (cleaved IL-1 β), microtubule associated protein 1 light chain 3 (LC3), beclin-1 and p62 expression. The formation of autophagosomes was observed by transmission electron microscopy. **Results** The echocardiographic results showed that compared with the sham group, the left ventricular end diastolic diameter (LVIDd) and left ventricular end systolic diameter (LVIDs) in the AMI group were significantly increased ($P < 0.01$), while the short axis shortening rate (FS) and ejection fraction (EF) were significantly decreased ($P < 0.01$). However, each experimental group recovered to varying degrees compared with the AMI group. The ELISA results showed that compared with the sham group, the serum cTnI level, CK-MB and LDH activities and the ratio of the heart weight/body weight of the mice in the AMI group were significantly increased ($P < 0.01$), and all experimental groups were decreased compared with the AMI group. The pathological results showed that compared with the sham group, the myocardial tissue pathological damage of the mice in the AMI group was aggravated, and the degree of damage in each experimental group was less than that in the AMI group. The ELISA results showed that compared with the sham group, the levels of IL-18, IL-1 β and TNF- α in the myocardial tissue of the mice in the AMI group were significantly increased ($P < 0.01$), and the levels of the above inflammatory factors in each experimental group were significantly decreased compared with the AMI group ($P < 0.05$). In addition, compared with the sham group, the levels of CD68, NLRP3, cleaved caspase-1, pro-IL-1 β , cleaved IL-1 β and p62 in the myocardial tissue of the mice in the AMI group were increased, and the levels of the above proteins in each experimental group were decreased to varying degrees. However, the levels of LC3 II / I and Beclin-1 were increased ($P < 0.05$). The transmission electron microscopic results showed that the number of autophagosomes in myocardial cells in each experimental group was increased compared with that in the AMI group. **Conclusion** Ticagrelor has a therapeutic effect on AMI mice by inhibiting the NLRP3 inflammasome pathway and promoting cellular autophagy, reducing macrophage infiltration and inflammatory response.

[Key words] acute myocardial infarction; ticagrelor; NOD-like receptor pyrin domain containing3; autophagy; inflammatory cell infiltration

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是一种突发严重的缺血性心脏病, 严重威胁着人类生命健康。心肌梗死部位炎症细胞的浸润与活化在 AMI 过程中发挥重要作用, 尤其以巨噬细胞浸润为主^[1]。替格瑞洛 (ticagrelor) 是一种新型血小板抑制剂, 通过和 P2Y₁₂ 受体结合, 抑制血小板活性, 防止冠心病患者发生血栓事件, 但目前对替格瑞洛的其他药理功能仍知之甚少^[2-3]。据报道, 替格瑞洛可抑制巨噬细胞中 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain-containing 3, NLRP3) 炎症小体的激活, 进而抑制炎症反应的发展^[4]。在 AMI 中, 通过抑制巨噬细胞浸润和 NLRP3 炎症小体激活可明显改善心肌功能, 发挥对 AMI 的治疗作用^[5-6]。研究表明, P2Y₁₂ 受体被抑制可促进血管平滑肌细胞自噬, 进而改善动脉粥样硬化进程^[7]。而在 AMI 中, 促进心肌细胞自噬可缓解疾病

进程^[8]。推测替格瑞洛可能通过影响 NLRP3 炎症小体激活和细胞自噬作用调节巨噬细胞浸润在 AMI 中发挥保护作用。因此, 本实验对替格瑞洛在小鼠 AMI 模型中的作用开展研究, 以期临床开发治疗 AMI 的有效药物提供新的方向和理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠 30 只 (辽宁长生生物科技股份有限公司), 体重 22 ~ 22 g; 替格瑞洛 (T125095); 小鼠肌钙蛋白 (cardiac troponin I, cTnI) ELISA 检测试剂盒 (武汉菲恩生物科技有限公司); 肌酸激酶同工酶 (CK-MB)、乳酸脱氢酶 (LDH) 测定试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-18 ELISA 试剂盒 [联科集团 (中国) 有限公司]; CD68 抗体、P62 抗体、pro-IL-1 β (武汉爱博泰克生物科技有限公司);

NLRP3 抗体、半胱天冬酶-1(caspase-1)抗体、cleaved IL-1 β 抗体、微管相关蛋白 1 轻链 3(LC3)抗体、Bec-lin-1 抗体、p62 抗体、 β -actin 抗体(沈阳万类生物科技有限公司)。

1.2 方法

1.2.1 小鼠 AMI 模型建立及药物干预

将 8 周龄雄性 C57BL/6 小鼠随机分为 5 组:假手术组(sham 组)、AMI 组、替格瑞洛治疗组、替格瑞洛预处理组、替格瑞洛预处理+治疗组。除 sham 组外,其余各组小鼠均采用左前降支冠状动脉结扎的方法建立 AMI 模型。小鼠术前禁食禁水 12 h 后,麻醉,剃胸毛,消毒。切开皮肤,用钝器剥离肌肉,切开心包,露出心脏。结扎冠状动脉左前降支,观察到结扎端苍白,表明结扎成功。替格瑞洛治疗组建模成功后每天同一时间给予替格瑞洛(27 mg/kg),灌胃 7 d;替格瑞洛预处理组于建模前 7 d 每天同一时间给予替格瑞洛(27 mg/kg),灌胃 7 d;替格瑞洛预处理+治疗组于建模前 7 d 至建模后 7 d 持续每天同一时间给予替格瑞洛(27 mg/kg)灌胃。sham 组和 AMI 组为对照组,给予与实验组等量生理盐水灌胃。到达时间点后取小鼠血清、心肌组织,并统计心脏质量和小鼠体重。

1.2.2 超声心动图检测

采用美国 GE Voluson E8 四维彩超仪对各组小鼠进行超声心动图检测,计算心脏功能相关指标,包括左心室舒张末期内径(LVIDd)、左心室收缩末期内径(LVIDs)、短轴缩短率(FS)、射血分数(EF)。

1.2.3 ELISA 检测 cTn I 水平、CK-MB 和 LDH 活性

将各组小鼠全血室温放置 2 h 后,1 000 $\times$ g 离心 20 min,获得血清标本。参考 ELISA 试剂盒说明书,检测血清 cTn I 水平、CK-MB 和 LDH 活性。

1.2.4 苏木素-伊红(HE)染色

对心肌组织切片进行常规 HE 染色,梯度乙醇脱水、二甲苯透明后封片。于显微镜下观察染色效果并拍照。

1.2.5 心肌组织炎症指标检测

取小鼠心肌组织,冰浴匀浆后,1 000 $\times$ g 离心 10 min,取上清液进行检测。按照 ELISA 试剂盒说明书,检测小鼠心肌组织 TNF- α 、IL-1 β 、IL-18 表达水平。

1.2.6 免疫荧光染色

将心肌组织脱水包埋切片。使用山羊血清室温封闭 15 min,加入一抗(1:100 稀释)4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗后,滴加荧光二抗(1:200 稀释)室温孵育 60 min,PBS 清洗后,晾干,盖玻片封片。于荧光显微镜下观察染色效果并拍照。

1.2.7 Western blot 检测蛋白水平

取小鼠心肌组织,冰上研磨后,于细胞裂解液静置 30 min,12 000 r/min,4 $^{\circ}$ C,离心 20 min,上清液为

蛋白质抽提物。采用二喹啉甲酸(BCA)法进行蛋白定量,40 μ g 蛋白上样,进行十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)并转印至聚偏氟乙烯(PVDF)膜。5%脱脂奶粉封闭 1 h 后,放入一抗,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日,辣根过氧化物酶标记 IgG(IgG-HRP)二抗室温孵育 45 min 后,电化学发光法(ECL)底物发光,采用凝胶图像处理系统分析目标条带光密度值。

1.2.8 透射电镜观察

将心肌组织于电镜固定液固定后,依次进行室温脱水、渗透包埋、聚合、超薄切片。于 2%醋酸铀饱和乙醇溶液避光染色 8 min,70%乙醇及超纯水各清洗 3 次,2.6%枸橼酸铅溶液避二氧化碳染色 8 min;超纯水清洗后,室温干燥过夜。于透射电子显微镜下观察染色效果,镜下采集图像分析。

1.2.9 统计学处理

利用 GraphPad Prism8 软件进行数据统计分析。正态分布计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 t 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 替格瑞洛对 AMI 小鼠模型心脏功能的影响

与 sham 组相比,造模成功后 AMI 组小鼠心脏 LVIDd、LVIDs 均明显增加($P < 0.01$),FS、EF 均明显降低($P < 0.01$)。与 AMI 组相比,替格瑞洛治疗组、替格瑞洛预处理组和替格瑞洛预处理+治疗组上述指标均出现不同程度恢复($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中,替格瑞洛预处理+治疗组恢复效果优于替格瑞洛治疗组和替格瑞洛预处理组($P < 0.01$),见表 1。

与 sham 组相比,AMI 组小鼠血清 cTn I 水平、CK-MB 和 LDH 活性及心脏质量/体重比值均明显增加($P < 0.01$)。与 AMI 组相比,替格瑞洛预处理组和替格瑞洛预处理+治疗组上述指标均明显降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),替格瑞洛治疗组除心脏质量/体重比值,其余各项指标均明显降低($P < 0.05$),见表 2。

2.2 替格瑞洛对 AMI 小鼠模型心肌组织病理变化的影响

HE 染色可见 AMI 组小鼠心肌组织肌纤维结构排列紊乱,大量炎症细胞浸润。与 AMI 组相比,替格瑞洛治疗组、替格瑞洛预处理组和替格瑞洛预处理+治疗组小鼠心肌组织炎症细胞减少,结构排列更整齐,其中替格瑞洛预处理+治疗组变化最明显,见图 1A~E。2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色结果显示,与 sham 组相比,AMI 组小鼠心肌组织梗死面积明显增大;与 AMI 组相比,替格瑞洛治疗组、替格瑞洛预处理组和替格瑞洛预处理+治疗组小鼠心肌组织梗死面积均出现不同程度的减小,其中,替格瑞洛预处理组和替格瑞洛预处理+治疗组小鼠梗死面积减少更明显,见图 1F。

2.3 替格瑞洛对 AMI 小鼠模型心肌组织炎症因子

的影响

ELISA 检测结果显示,与 sham 组相比,AMI 组小鼠心肌组织炎症因子 IL-18、IL-1 β 和 TNF- α 表达水平明显升高($P<0.01$)。与 AMI 组比较,替格瑞洛治疗组、替格瑞洛预处理组和替格瑞洛预处理+治疗组上述指标表达水平均明显降低($P<0.05$ 或 $P<0.01$),其中,替格瑞洛预处理+治疗组变化最明显,替格瑞洛预处理组次之,见图 2。

2.4 替格瑞洛对 AMI 小鼠模型心肌组织巨噬细胞的影响

免疫荧光结果显示,与 sham 组相比,AMI 组小鼠心肌组织 CD68 阳性细胞数目明显增多。与 AMI 组相比,替格瑞洛治疗组、替格瑞洛预处理组和替格瑞洛预处理+治疗组 CD68 阳性细胞数目明显减少,其中替格瑞洛预处理+治疗组变化最明显,见图 3。

表 1 小鼠超声心电图各参数结果比较($n=6,\bar{x}\pm s$)

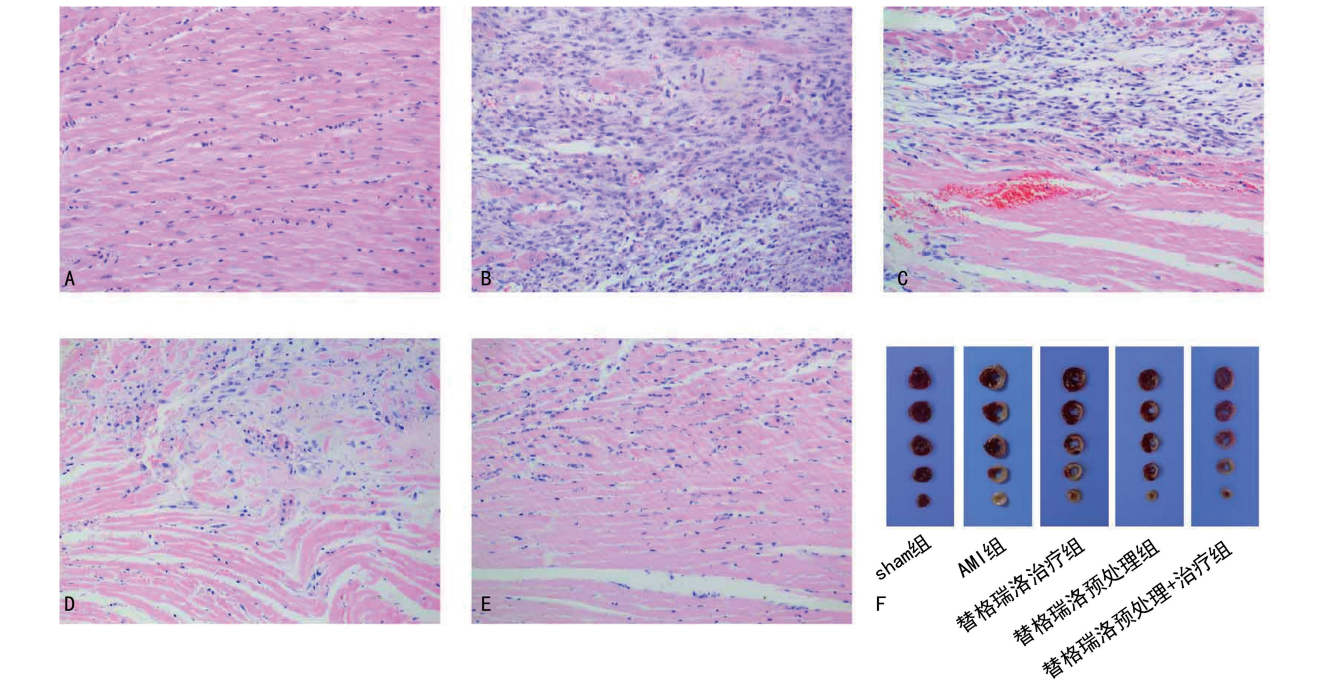
组别	LVIDd(mm)	LVIDs(mm)	FS(%)	EF(%)
sham 组	2.37 $\pm$ 0.31	1.23 $\pm$ 0.25	48.22 $\pm$ 3.95	84.93 $\pm$ 3.94
AMI 组	4.87 $\pm$ 0.45 ^a	4.20 $\pm$ 0.56 ^a	13.89 $\pm$ 3.86 ^a	35.87 $\pm$ 4.56 ^a
替格瑞洛治疗组	3.80 $\pm$ 0.36 ^b	2.43 $\pm$ 0.50 ^c	35.94 $\pm$ 12.67 ^b	52.32 $\pm$ 6.18 ^b
替格瑞洛预处理组	3.30 $\pm$ 0.46 ^{cd}	2.17 $\pm$ 0.21 ^{cd}	33.59 $\pm$ 10.11	56.25 $\pm$ 5.01 ^{cd}
替格瑞洛预处理+治疗组	3.03 $\pm$ 0.25 ^{cde}	1.73 $\pm$ 0.21 ^{cde}	42.95 $\pm$ 3.25 ^{cd}	79.93 $\pm$ 3.01 ^{cde}

^a: $P<0.01$,与 sham 组相比;^b: $P<0.05$,^c: $P<0.01$,与 AMI 组相比;^d: $P<0.05$,与替格瑞洛治疗组相比;^e: $P<0.05$,与替格瑞洛预处理组相比。

表 2 小鼠血清 cTn I 水平、CK-MB 和 LDH 活性及心脏质量/体重比值比较($n=6,\bar{x}\pm s$)

组别	cTn I(ng/mL)	CK-MB(U/L)	LDH(U/L)	心脏质量/体重(mg/g)
sham 组	11.87 $\pm$ 1.12	216.12 $\pm$ 44.90	81.86 $\pm$ 12.48	4.09 $\pm$ 0.37
AMI 组	39.11 $\pm$ 6.58 ^a	908.14 $\pm$ 195.96 ^a	328.74 $\pm$ 35.32 ^a	5.52 $\pm$ 0.22 ^a
替格瑞洛治疗组	28.22 $\pm$ 4.40 ^b	615.85 $\pm$ 95.24 ^b	228.62 $\pm$ 45.58 ^b	4.80 $\pm$ 0.29
替格瑞洛预处理组	26.21 $\pm$ 3.22 ^b	583.96 $\pm$ 74.06 ^b	184.92 $\pm$ 27.49 ^c	4.55 $\pm$ 0.05 ^c
替格瑞洛预处理+治疗组	15.41 $\pm$ 1.65 ^c	287.96 $\pm$ 34.37 ^c	122.61 $\pm$ 21.63 ^c	4.43 $\pm$ 0.30 ^c

^a: $P<0.01$,与 sham 组相比;^b: $P<0.05$,^c: $P<0.01$,与 AMI 组相比。



A: sham 组小鼠心肌组织 HE 染色(200 $\times$);B: AMI 组小鼠心肌组织 HE 染色(200 $\times$);C: 替格瑞洛治疗组小鼠心肌组织 HE 染色(200 $\times$);D: 替格瑞洛预处理组小鼠心肌组织 HE 染色(200 $\times$);E 组: 替格瑞洛预处理+治疗组小鼠心肌组织染色(200 $\times$);F: 小鼠心肌组织 TTC 染色。

图 1 各组小鼠心肌组织病理变化情况

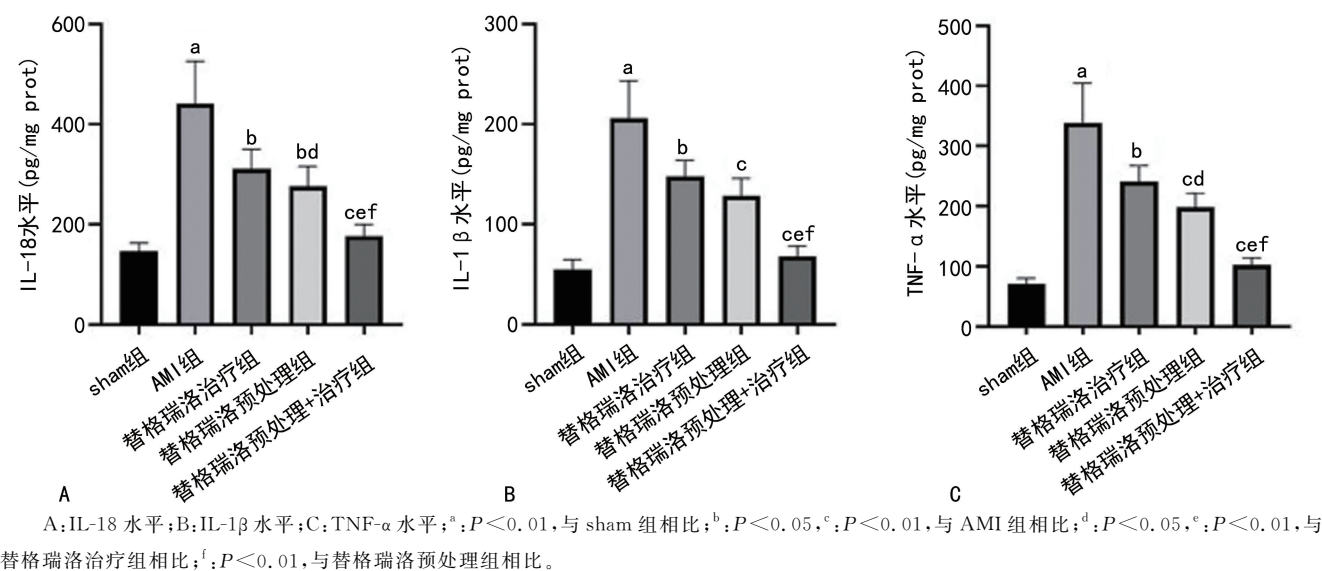


图 2 各组小鼠心肌组织炎症因子的变化情况

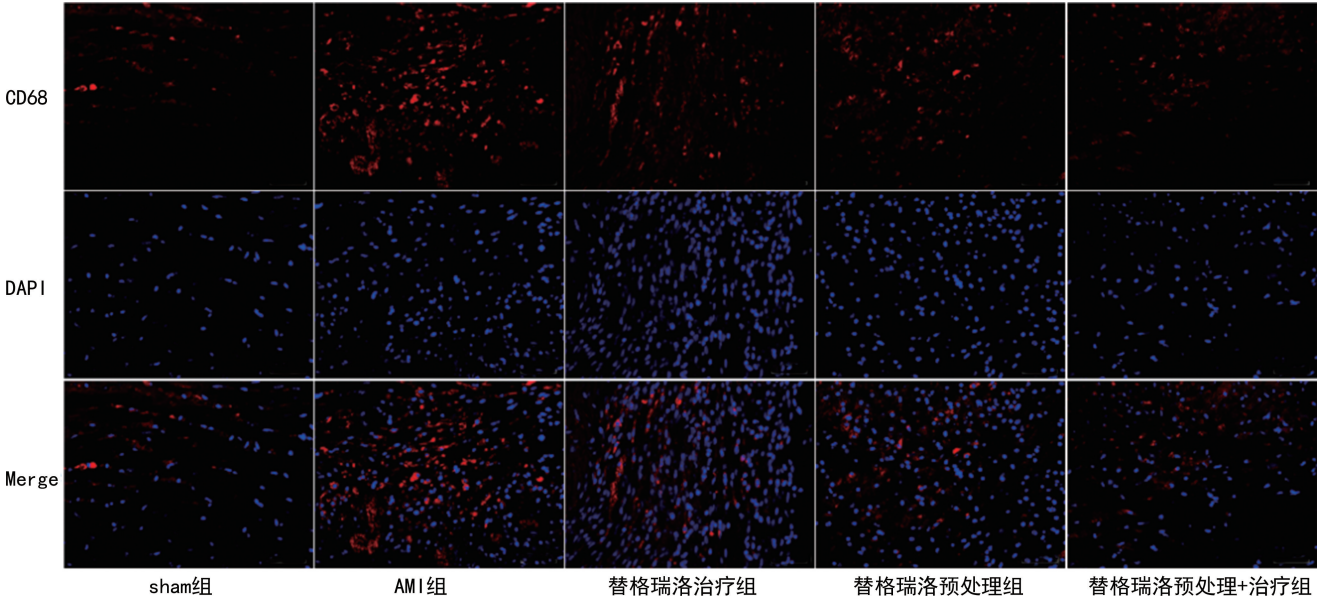


图 3 各组小鼠心肌组织 CD68 表达情况 (IF, 400×)

2.5 替格瑞洛对 AMI 小鼠模型心肌组织 NLRP3 炎症小体通路相关蛋白的影响

Western blot 结果显示,与 sham 组相比,AMI 组小鼠心肌组织 NLRP3、cleaved caspase-1、pro-IL-1β 和 cleaved IL-1β 表达水平明显增加 ($P < 0.01$)。与 AMI 组相比,替格瑞洛治疗组、替格瑞洛预处理组和替格瑞洛预处理+治疗组上述蛋白表达水平均呈不同程度降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),其中替格瑞洛预处理+治疗组变化最明显,替格瑞洛预处理组次之,见图 4。

2.6 替格瑞洛对 AMI 小鼠模型心脏组织自噬的影响

免疫荧光结果显示,与 sham 组相比,AMI 组 p62 阳性细胞数目明显增多;与 AMI 组相比,替格瑞洛治疗组、替格瑞洛预处理组和替格瑞洛预处理+治疗组

p62 阳性细胞数目明显减少,其中替格瑞洛预处理+治疗组变化最明显,见图 5。

Western blot 检测结果显示,与 sham 组相比,AMI 组 p62 表达水平明显增加 ($P < 0.01$),而 LC3 II / I、Beclin-1 表达水平有所增加,差异均无统计学意义 ($P > 0.05$);与 AMI 组相比,替格瑞洛治疗组、替格瑞洛预处理组和替格瑞洛预处理+治疗组 LC3 II / I、Beclin-1 表达水平均明显增加 ($P < 0.01$),而 p62 表达水平明显降低 ($P < 0.01$),其中替格瑞洛预处理+治疗组变化最明显,替格瑞洛预处理组次之,见图 6。

电镜结果显示,与 AMI 组比较,替格瑞洛治疗组、替格瑞洛预处理组和替格瑞洛预处理+治疗组小鼠心肌细胞自噬小体数量均呈不同程度的增加,见图 7。

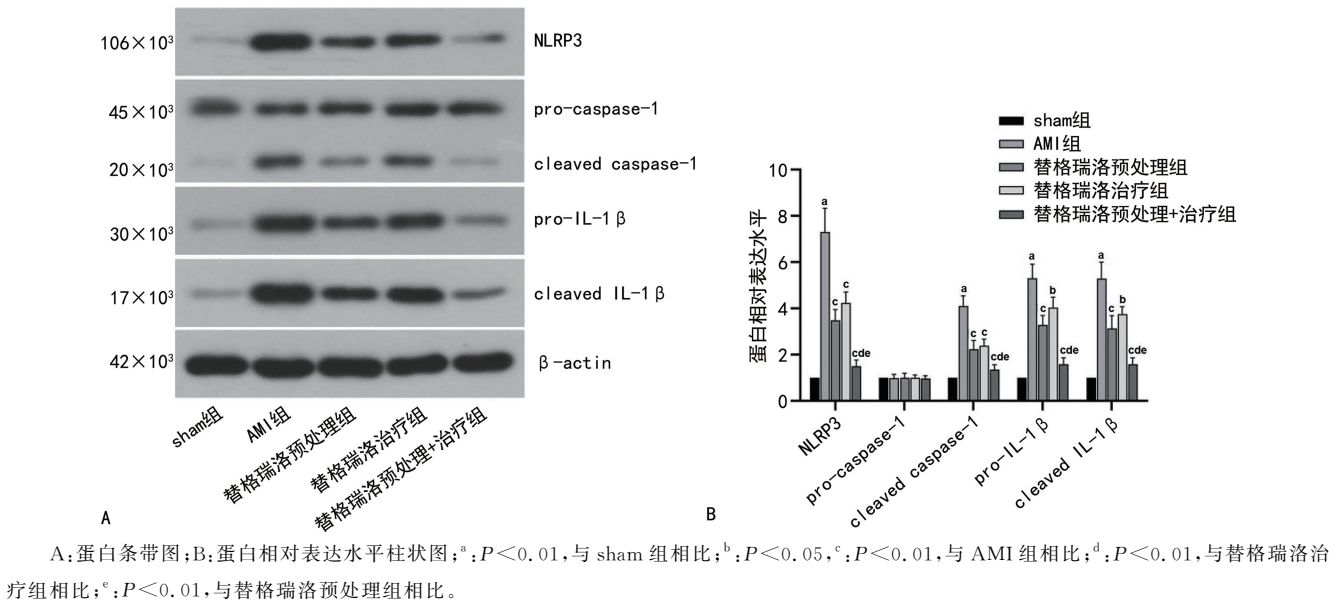


图 4 各组小鼠心肌组织 NLRP3 炎症小体通路相关蛋白表达情况

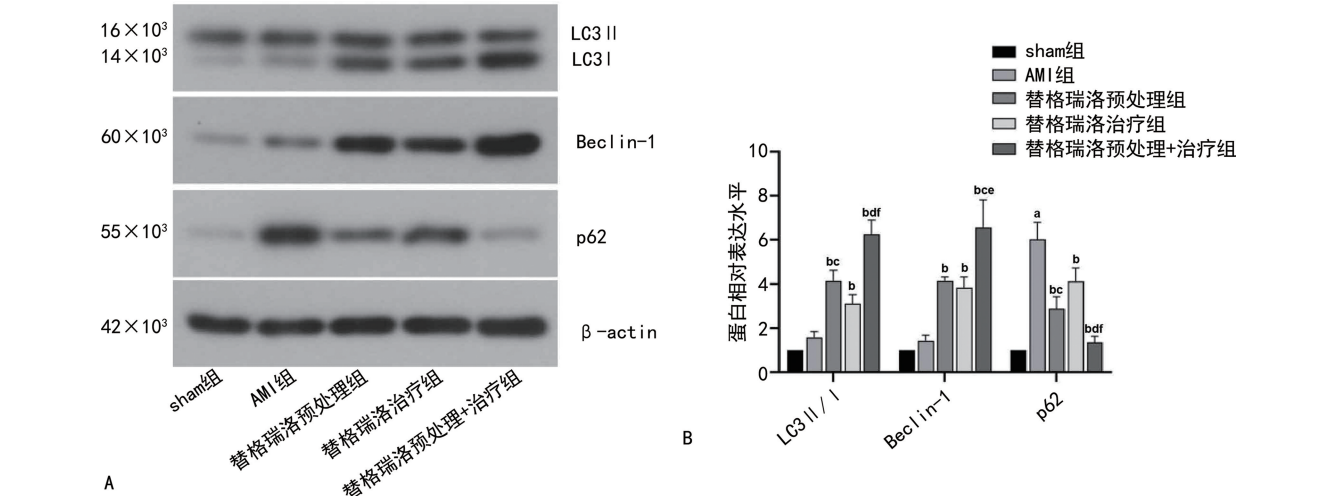
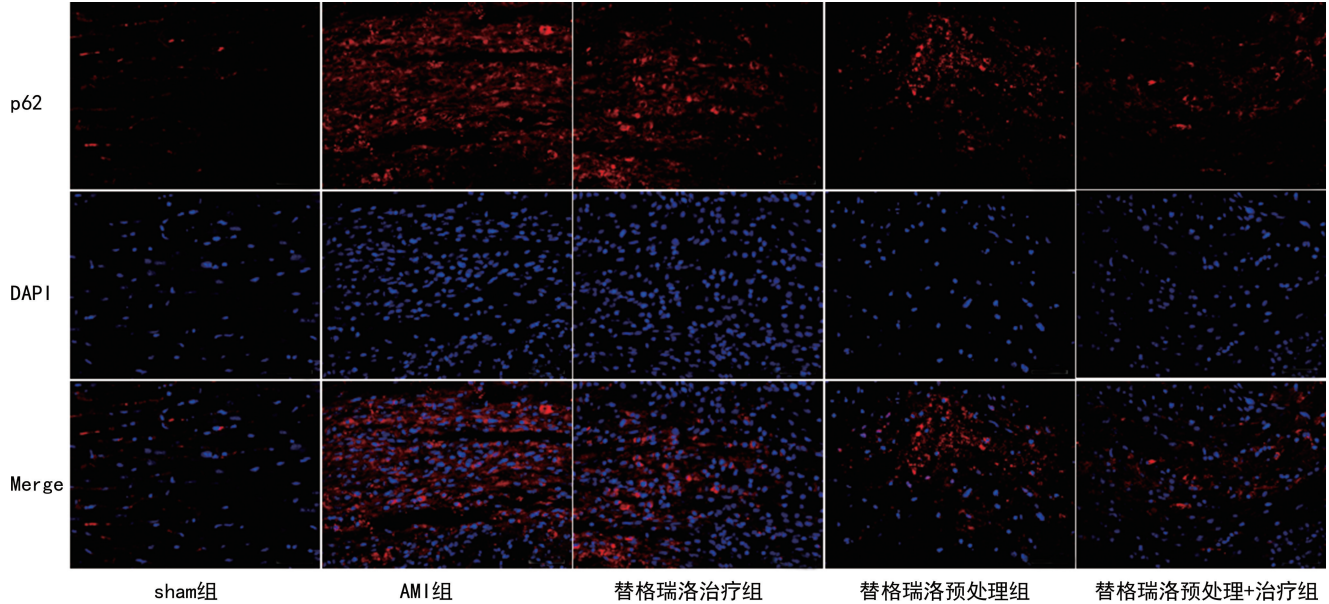


图 6 各组小鼠心肌组织自噬相关蛋白表达情况

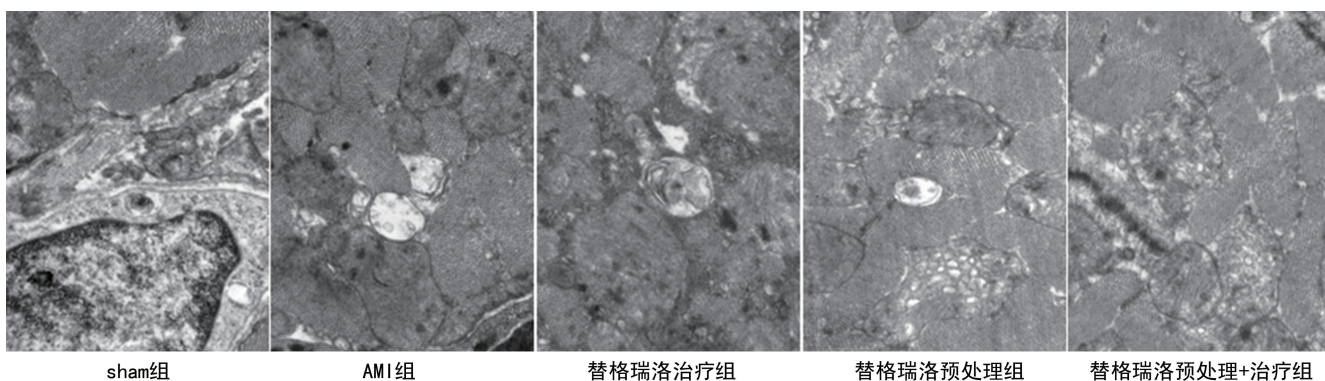


图 7 各组小鼠心肌细胞自噬小体数量的变化情况(电镜,40 000×)

3 讨 论

AMI 是冠心病常见的急重病,严重危害患者生命健康^[9]。P2Y₁₂ 受体拮抗剂替格瑞洛是 AMI 中抗血栓治疗的一线用药^[10]。CHEN 等^[11]发现,替格瑞洛通过抑制 NLRP3 炎症小体途径而不依赖 P2Y₁₂ 受体在糖尿病心肌病小鼠中发挥抗炎作用。NLRP3 炎症小体途径是机体先天免疫系统的重要组成部分,当该途径被激活时,NLRP3 与其他蛋白相互作用精细调节 caspase-1 激活,而活化的 caspase-1 (cleaved caspase-1)通过剪切 pro-IL-1 β 和 pro-IL-18,产生具有致炎活性的 IL-1 β 和 IL-18,进而激活其他免疫细胞,诱导更多的趋化因子和炎症因子的合成,放大炎症反应^[12]。自噬是体内重要的细胞内过程,用于回收和去除受损蛋白质和细胞器,以及破坏细胞内病原体^[13]。研究表明,自噬可通过多种机制调节 NLRP3 小体途径的激活,是炎症小体的主要调节因子^[14-16]。因此,自噬功能障碍可导致炎症小体过度激活,包括 NLRP3。研究证实,心肌细胞炎症反应和细胞自噬在 AMI 发病机制中占重要地位^[17-20]。

为了探究替格瑞洛在 AMI 中潜在的作用,本研究采用结扎左前降支冠状动脉的方法建立 AMI 小鼠模型,分别在造模前后不同时间给予替格瑞洛治疗。结果发现,替格瑞洛可保护心肌免受损伤,使 LVIDd、LVIDs 明显降低,FS、EF 明显增加,血清 cTn I 水平降低,CK-MB 和 LDH 活性降低,心脏的脏器系数(心脏质量/体重)降低,心肌组织炎症细胞浸润明显减少,心肌梗死面积明显减小。同时,本研究发现替格瑞洛可明显降低心肌组织中促炎细胞因子 IL-18、IL-1 β 和 TNF- α 表达,抑制 CD68 蛋白(巨噬细胞蛋白标志物)表达,表明替格瑞洛可能通过抑制促炎细胞因子释放和巨噬细胞浸润在 AMI 中发挥抗炎作用。进一步对 NLRP3 途径相关蛋白进行检测发现,替格瑞洛可明显降低 NLRP3、cleaved caspase-1、pro-IL-1 β 和 cleaved IL-1 β 表达,表明替格瑞洛可通过抑制 NLRP3 炎症小体途径的激活进而抑制心肌组织炎症反应。同时,为探究替格瑞洛是否干预 AMI 模型中心肌细胞自噬水平,本研究通过免疫荧光实验检测发现 AMI 模型小鼠心肌组织中有大量的 p62 分布,而应用

替格瑞洛干预后发现,替格瑞洛抑制 p62 在心肌组织的分布,同时 Western blot 定量结果也显示了替格瑞洛可促进 LC3 II / I 和 Beclin-1 表达,抑制 p62 表达。最后,通过透射电镜观察发现替格瑞洛干预后自噬小体明显增多,结果均表明替格瑞洛可通过促进 AMI 模型心肌细胞自噬而发挥保护作用。此外,在上述全部实验结果中,替格瑞洛预处理+治疗组干预 AMI 效果最好,替格瑞洛预处理组次之,表明替格瑞洛对 AMI 的防治意义重大。

综上所述,本研究初步验证了替格瑞洛具有抗炎、促进自噬、改善梗死心脏功能和形态的作用,为 AMI 疾病的预防和治疗提供了理论基础和治疗见解。本研究的不足之处在于:(1)未进行细胞水平实验探究替格瑞洛作用于心肌细胞的具体分子机制;(2)未设立 NLRP3 激动剂组及自噬抑制剂组进行挽救实验,进一步探究替格瑞洛的防治效果;(3)未阐明 NLRP3 炎症小体途径和细胞自噬之间的 crosstalk 机制。今后可在此基础上进一步深入实验,以探索和阐明替格瑞洛对 AMI 的保护作用机制。

参考文献

- [1] HUANG L, XIANG M, YE P, et al. Beta-catenin promotes macrophage-mediated acute inflammatory response after myocardial infarction[J]. Immunol Cell Biol, 2018, 96(1): 100-113.
- [2] BANSILAL S, BONACA M P, CORNEL J H, et al. Ticagrelor for secondary prevention of atherothrombotic events in patients with multivessel coronary disease[J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 71(5): 489-496.
- [3] WALLENTIN L, BECKER R C, BUDAJ A, et al. Ticagrelor versus clopidogrel in patients with acute coronary syndromes[J]. N Engl J Med, 2009, 361(11): 1045-1057.
- [4] HUANG B, QIAN Y, XIE S, et al. Ticagrelor inhibits the NLRP3 inflammasome to protect a-

- against inflammatory disease independent of the P2Y₁₂ signaling pathway[J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(5): 1278-1289.
- [5] FUJISUE K, SUGAMURA K, KUROKAWA H, et al. Colchicine improves survival, left ventricular remodeling, and chronic cardiac function after acute myocardial infarction[J]. *Circ J*, 2017, 81(8): 1174-1182.
- [6] GAO R F, LI X, XIANG H Y, et al. The covalent NLRP3-inflammasome inhibitor oridonin relieves myocardial infarction induced myocardial fibrosis and cardiac remodeling in mice[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 90: 107133.
- [7] PI S, MAO L, CHEN J, et al. The P2RY₁₂ receptor promotes VSMC-derived foam cell formation by inhibiting autophagy in advanced atherosclerosis[J]. *Autophagy*, 2021, 17(4): 980-1000.
- [8] LIANG H, SU X, WU Q, et al. LncRNA 2810 403D21Rik/Mirf promotes ischemic myocardial injury by regulating autophagy through targeting Mir26a[J]. *Autophagy*, 2020, 16(6): 1077-1091.
- [9] SHIBATA T, KAWAKAMI S, NOGUCHI T, et al. Prevalence, clinical features, and prognosis of acute myocardial infarction attributable to coronary artery embolism [J]. *Circulation*, 2015, 132(4): 241-250.
- [10] KIM W, KIM J S, RHA S W, et al. Cilostazol-based triple versus potent P2Y₁₂ inhibitor-based dual antiplatelet therapy in patients with acute myocardial infarction undergoing percutaneous coronary intervention[J]. *Heart Vessels*, 2020, 35(9): 1181-1192.
- [11] CHEN H, TRAN D, YANG H C, et al. Dapagliflozin and ticagrelor have additive effects on the attenuation of the activation of the NLRP3 inflammasome and the progression of diabetic cardiomyopathy: an AMPK-mTOR interplay [J]. *Cardiovasc Drugs Ther*, 2020, 34(4): 443-461.
- [12] TOLDO S, ABBATE A. The NLRP3 inflammasome in acute myocardial infarction[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2018, 15(4): 203-214.
- [13] YU L, CHEN Y, TOOZE S A. Autophagy pathway: cellular and molecular mechanisms[J]. *Autophagy*, 2018, 14(2): 207-215.
- [14] KIM M J, BAE S H, RYU J C, et al. SESN2/sestrin2 suppresses sepsis by inducing mitophagy and inhibiting NLRP3 activation in macrophages [J]. *Autophagy*, 2016, 12(8): 1272-1291.
- [15] SU S H, WU Y F, LIN Q, et al. URB597 protects against NLRP3 inflammasome activation by inhibiting autophagy dysfunction in a rat model of chronic cerebral hypoperfusion[J]. *J Neuroinflammation*, 2019, 16(1): 260.
- [16] HAN X, SUN S, SUN Y, et al. Small molecule-driven NLRP3 inflammation inhibition via interplay between ubiquitination and autophagy: implications for Parkinson disease[J]. *Autophagy*, 2019, 15(11): 1860-1881.
- [17] MEZZAROMA E, TOLDO S, FARKAS D, et al. The inflammasome promotes adverse cardiac remodeling following acute myocardial infarction in the mouse[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2011, 108(49): 19725-19730.
- [18] SHIRAKABE A, ZHAI P, IKEDA Y, et al. Drp1-dependent mitochondrial autophagy plays a protective role against pressure overload-induced mitochondrial dysfunction and heart failure[J]. *Circulation*, 2016, 133(13): 1249-1263.
- [19] BAI Y D, YANG Y R, MU X P, et al. Hydrogen sulfide alleviates acute myocardial ischemia injury by modulating autophagy and inflammation response under oxidative stress[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2018, 2018: 3402809.
- [20] FEI Q, MA H, ZOU J, et al. Metformin protects against ischaemic myocardial injury by alleviating autophagy-ROS-NLRP3-mediated inflammatory response in macrophages[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 145: 1-13.

(收稿日期: 2022-01-08 修回日期: 2022-06-05)