

本文引用:陈玉磊,吕风华,陈云玲,等.曲美他嗪对缺氧/复氧心肌细胞焦亡的影响[J].新乡医学院学报,2020,37(1):34-38. DOI:10.7683/xyxyxb.2020.01.009.

【基础研究】

## 曲美他嗪对缺氧/复氧心肌细胞焦亡的影响

陈玉磊, 吕风华, 陈云玲, 尹宏磊, 王 卓, 司澳洋

(新乡医学院第一附属医院心血管内科, 河南 卫辉 453100)

**摘要:** **目的** 探讨曲美他嗪(TMZ)对急性缺氧/复氧(H/R)心肌细胞焦亡的影响。**方法** 选择大鼠胚胎 H9C2 心肌细胞为研究对象,将细胞分为正常对照组、H/R 组、H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组、H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组、H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组。H/R 组、H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组、H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组、H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组细胞行缺氧 12 h/复氧 4 h 处理模拟大鼠心肌缺血再灌注损伤;H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组、H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组、H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组细胞在构建 H/R 模型前分别给予 50、100、500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 共孵育 1 h;正常对照组细胞常规培养;采用细胞计数试剂盒(CCK8)检测各组心肌细胞活性,乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒检测各组心肌细胞培养基中 LDH 活性,采用实时荧光定量聚合酶链反应法和 Western blot 法检测心肌细胞中 Caspase-1、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)和 Nod 样受体蛋白 3(NLRP3) mRNA 及蛋白表达水平的变化。**结果** 与正常对照组比较,H/R 组心肌细胞活性降低,LDH 活性显著升高,细胞中 Caspase-1、NLRP3、ASC mRNA 和蛋白表达水平升高( $P < 0.05$ );与 H/R 组比较,H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组、H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组、H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组细胞活性显著增加,LDH 活性显著下降,细胞中 Caspase-1、NLRP3、ASC mRNA 和蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ );与 H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组和 H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组比较,H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组细胞活性增加,LDH 活性下降,细胞中 Caspase-1、NLRP3、ASC mRNA 和蛋白表达水平降低( $P < 0.05$ );H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组细胞活性、LDH 活性、细胞中 Caspase-1、NLRP3、ASC mRNA 和蛋白表达水平与 H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。**结论** TMZ 能通过抑制细胞焦亡对 H/R 的心肌细胞起保护作用;TMZ 处理心肌细胞的最适浓度为 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

**关键词:** 曲美他嗪;缺氧/复氧;H9C2 细胞;缺血再灌注损伤;细胞焦亡

**中图分类号:** R541;R965 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-7239(2020)01-0034-05

## Effect of trimetazidine on pyroptosis of hypoxia/reoxygenation cardiomyocytes

CHEN Yulei, LYU Fenghua, CHEN Yunling, YIN Honglei, WANG Zhuo, SI Aoyang

(Department of Cardiology, the First Affiliated Hospital of Xinxiang Medical University, Weihui 453100, Henan Province, China)

**Abstract:** **Objective** To investigate the effects of trimetazidine(TMZ) on pyroptosis of acute hypoxia/reoxygenation(H/R) cardiomyocytes. **Methods** The rat embryonic H9C2 cardiomyocytes were selected as subjects, and they were divided into normal control group, H/R group, H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group, H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group, H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group. The cardiomyocytes in the H/R group, H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group, H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group and H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group were given hypoxia for 12 hours and reoxygenation for 4 hours to simulate the myocardial ischemia-reperfusion injury of rats. The cardiomyocytes in the H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group, H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group and H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group were incubated with 50, 100, and 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ for one hour before constructing the H/R model. The cardiomyocytes in the normal control group were routinely cultured. The viability of cardiomyocytes was detected by cell counting kit-8. The activity of lactate dehydrogenase(LDH) was detected by lactate dehydrogenase kit. The mRNA and protein expression levels of Caspase-1, apoptosis-associated speck-like protein containing(ASC) and NOD-like receptor pyrin domain containing 3(NLRP3) in the cardiomyocytes were measured by real-time quantitative polymerase chain reaction and western blot. **Results** Compared with the control group, in the H/R group the cell viability was lower, the LDH activity was higher and the mRNA and protein expression levels of Caspase-1, ASC and NLRP3 in the cardiomyocytes were higher( $P < 0.05$ ). Compared with the H/R group, the cell viability was higher, the LDH activity was lower and the mRNA and protein expression levels of Caspase-1, ASC and NLRP3 in the cardiomyocytes were lower in the

DOI:10.7683/xyxyxb.2020.01.009

收稿日期:2019-03-14

作者简介:陈玉磊(1991-),女,河南平顶山人,硕士,住院医师,主要从事冠状动脉粥样硬化性心脏病的基础、临床及介入研究。

通信作者:吕风华(1970-),女,河南驻马店人,博士,主任医师,主要从事冠状动脉粥样硬化性心脏病的基础、临床及介入研究;E-mail:doctorlvfh@163.com。

H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group, H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group and H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group ( $P < 0.05$ ). Compared with the H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group and the H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group, the cell viability was higher, the LDH activity was lower and the mRNA and protein expression levels of Caspase-1, ASC and NLRP3 in the cardiomyocytes were lower in the H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group ( $P < 0.05$ ). There was no significant difference in the cell viability, LDH activity and the mRNA and protein expression levels of Caspase-1, ASC and NLRP3 between the H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group and the H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ group ( $P > 0.05$ ). **Conclusion** TMZ may protect H/R cardiomyocytes by inhibiting pyroptosis. The optimal concentration of TMZ for cardiomyocytes is 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ .

**Key words:** trimetazidine; hypoxia/reoxygenation; H9C2 cell; ischemia reperfusion injury; pyroptosis

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 已成为致死率高、最常见的心血管急症之一<sup>[1]</sup>。AMI 发生后,行及时再灌注的溶栓治疗或经皮冠状动脉介入治疗是减少梗死面积最有效的策略<sup>[2]</sup>。但当缺血心肌恢复血供后,可能会导致局部心肌组织损伤或心功能异常,引起心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)。MIRI 涉及炎症、钙超载、氧化应激、细胞因子释放和中性粒细胞浸润等多种机制<sup>[3]</sup>。其中心肌缺血再灌注所诱导的无菌炎症反应会导致心肌梗死区域的进一步损伤,而有证据显示,细胞焦亡与 Nod 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3) 炎性小体的触发和凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing, ASC)、Caspase-1 的活化有关,通过检测细胞中 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白的表达情况可证实细胞是否发生焦亡<sup>[4]</sup>。曲美他嗪 (trimetazidine, TMZ) 能通过抑制游离脂肪酸氧化、加强心肌葡萄糖代谢、降低血管阻力、增加冠状动脉及周围循环血流量,从而对缺血的心肌发挥保护效应<sup>[5]</sup>。研究发现, TMZ 除了具有传统的改善缺血心肌细胞能量代谢的作用外,还具有抗炎作用<sup>[6]</sup>。细胞焦亡是近期发现的一种特殊的细胞程序性死亡方式,并伴有炎症级联反应,它依赖于 NLRP3 炎症小体的激活, NLRP3 通过 ASC 来募集和激活 Caspase-1, Caspase-1 通过切割白细胞介素 1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ ) 和 IL-18 前体使其形成有活性的 IL-1 $\beta$  和 IL-18,并将其释放,从而介导细胞损伤<sup>[7-8]</sup>。本研究利用 H9C2 细胞缺氧/复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 模型模拟 MIRI, 观察 TMZ 对 H/R 诱导的心肌细胞焦亡的影响,寻找 MIRI 治疗的新靶点。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、试剂与仪器** 大鼠胚胎 H9C2 细胞系购自中国科学院上海细胞库; II 型胶原酶、胰蛋白酶、胎

牛血清、达尔伯克改良伊戈尔培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 购自美国 Gibco 公司, DMEM 高糖培养基和青链霉素混合液购自北京索莱宝生物科技有限公司, 1-(2,3,4-三甲氧苯甲基) 哌嗪二盐酸盐购自上海源叶生物有限公司, 细胞计数试剂盒 (cell counting kit-8, CKK8) 购自奥默生物技术 (上海) 有限公司, 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒购自南京建成生物工程研究所, 二喹啉甲酸 (bicinchoninic acid disodium, BCA) 蛋白测定试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司, 荧光定量检测试剂盒购自柏圣澳科生物科技有限公司, ASC 抗体购自北京博奥森生物技术有限公司, Caspase-1 抗体、NLRP3 抗体购自美国 Abcam 公司, 磷酸甘油醛脱氢酶 (reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体购自美国 Affinity Biosciences 公司; 二氧化碳培养箱、缺氧培养箱、低温离心机、酶标仪购自美国 Thermo 公司, 聚合酶链反应 (polymerase chain reaction, PCR) 仪 (LightCycler)、电泳仪、电泳槽购自美国 Bio-Rad 公司。

### 1.2 实验方法

**1.2.1 细胞培养** 将细胞置于含体积分数 10% 胎牛血清的 DMEM 中, 于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5%  $\text{CO}_2$  细胞培养箱中培养, 待细胞融合至 80% 左右时传代。

**1.2.2 细胞 H/R 模型的构建** 将无血清无糖 DMEM 置于 37  $^{\circ}\text{C}$  低氧培养箱中, 持续通入体积分数 95%  $\text{N}_2$  和 体积分数 5%  $\text{CO}_2$  混合气体 3 h, 流速为 2  $\text{L} \cdot \text{min}^{-1}$ , 充分饱和无血清无糖 DMEM。将含有细胞的培养瓶中的高糖培养基迅速替换成上述培养基, 并将培养瓶放入低氧培养箱中培养 12 h, 之后更换为含体积分数 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 并置于 37  $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5%  $\text{CO}_2$  培养箱中复氧 4 h<sup>[9]</sup>。

**1.2.3 细胞分组与处理** 将细胞分为正常对照组、H/R 组、H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组、H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组、H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组。正常对照组细胞在 37  $^{\circ}\text{C}$ 、含体积分数 5%  $\text{CO}_2$

培养箱中培养;H/R 组、H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组、H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组、H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组细胞构建 H/R 模型,并在模型构建前与相应浓度的 TMZ 共孵育 1 h<sup>[10]</sup>。

**1.2.4 CCK8 法检测各组细胞活性** 将细胞密度调整至  $1 \times 10^7 \text{ L}^{-1}$ ,每孔 100  $\mu\text{L}$  接种于 96 孔板中,1 d 后随机分组(细胞分组见 1.2.3)给予对应处理,每组至少设置 6 个复孔,每孔加入 10  $\mu\text{L}$  的 CCK8 溶液,将 96 孔板在培养箱内避光孵育 2 h,用酶标仪测定其在 450 nm 处的吸光度值,同时设置调零孔和对照孔。依据说明书公式计算各组心肌细胞活性。

**1.2.5 各组细胞中 LDH 活性检测** 取各组细胞的培养基,吹打均匀,采用 LDH 检测试剂盒检测各组细胞释放的 LDH,用酶标仪测定其在 450 nm 处的吸光度值,操作步骤严格按照试剂盒说明书进行。吸光度值越大,LDH 活性越高。

**1.2.6 荧光定量 PCR 法检测各组心肌细胞中 Caspase-1、NLRP3、ASC mRNA 的表达** Caspase-1、NLRP3、ASC 上下游引物由广州锐博生物科技有限公司设计合成,GAPDH 上游引物序列为 5'-GAACGGGAAGCTCACTGG-3',下游引物序列为 5'-GCCTGCTTCACCACCTTCT-3';ASC 上游引物序列为 5'-GCACAGCCAGAACAGAACATTT-3',下游引物序列为 5'-GCCATACAGAGCATCCAGCAA-3';Caspase-1 上游引物序列为 5'-GGGACAATAAATGGATTGCTGG-3',下游引物序列为 5'-CGTGCCTTTTCCATAACAGTGA-3';NLRP3 上游引物序列为 5'-CTGAACTTGAGCAACAACGACC-3',下游引物序列为 5'-ACATTTACCCAACTGTAGGCT-3'。根据试剂盒说明书,用 TRIzol 提取各组心肌细胞总 RNA,检测 RNA 浓度,反转录为 cDNA,然后行荧光定量 PCR。PCR 反应条件:95  $^{\circ}\text{C}$  30 s;95  $^{\circ}\text{C}$  3 s,60  $^{\circ}\text{C}$  10 s,共 40 个循环;95  $^{\circ}\text{C}$  5 s,60  $^{\circ}\text{C}$  60 s,95  $^{\circ}\text{C}$  15 s 融解。用  $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$  法计算 Caspase-1、NLRP3、ASC mRNA 的表达水平。实验重复 5 次,取均值。

**1.2.7 Western blot 法检测各组细胞中 Caspase-1、NLRP3、ASC 蛋白表达** 细胞分组及处理同“1.2.3 项”,向各组心肌细胞中加入 200  $\mu\text{L}$  细胞裂解液,加 2  $\mu\text{L}$  苯甲基磺酰氟(phenylmethylsulfonyl fluoride,PMSF),用 BCA 试剂盒检测蛋白浓度,以细胞裂解液调整各组蛋白浓度后,5  $\times$  loading buffer 煮沸变性。配置相应浓度的分离胶和积层胶,进行电泳、转膜,质量分数 5% 脱脂奶粉封闭,加入一抗 4  $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜,加

入二抗室温孵育 1 h,电化学发光法使条带显影,保存图片;用 Image J 软件测定各组细胞条带的灰度值;实验重复 5 次,取均值。

**1.3 统计学处理** 应用 GrapaPad 8.0 统计软件对数据进行分析处理,计量资料以均数  $\pm$  标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,组间比较采用配对  $t$  检验, $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

2 结果

**2.1 5 组心肌细胞活性及 LDH 活性比较** 结果见表 1。与正常对照组比较,H/R 组心肌细胞活性降低,LDH 活性显著升高,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 H/R 组比较,H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组、H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组、H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组细胞活性显著增加,LDH 活性显著下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与 H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组和 H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组比较,H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组细胞活性增加,LDH 活性下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组细胞活性、LDH 活性与 H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组比较差异无统计学意义( $P > 0.05$ )。

表 1 5 组心肌细胞活性、LDH 活性的比较  
Tab. 1 Comparison of the cardiomyocyte viability and LDH activity among the five groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	细胞活性/%	LDH 活性/(U $\cdot \text{L}^{-1}$ )
正常对照组	5	144.3 $\pm$ 5.6	21.3 $\pm$ 0.3
H/R 组	5	50.1 $\pm$ 4.9 <sup>a</sup>	159.2 $\pm$ 9.2 <sup>a</sup>
H/R + 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组	5	77.2 $\pm$ 3.7 <sup>bc</sup>	80.6 $\pm$ 1.7 <sup>bc</sup>
H/R + 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组	5	103.4 $\pm$ 15.4 <sup>b</sup>	43.1 $\pm$ 1.3 <sup>b</sup>
H/R + 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组	5	77.6 $\pm$ 1.3 <sup>bc</sup>	59.2 $\pm$ 1.3 <sup>bc</sup>

注:与正常对照组比较<sup>a</sup> $P < 0.05$ ;与 H/R 组比较<sup>b</sup> $P < 0.05$ ;与 H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组比较<sup>c</sup> $P < 0.05$ 。

**2.2 5 组细胞焦亡相关蛋白 Caspase-1、NLRP3、ASC mRNA 表达比较** 结果见表 2。与正常对照组比较,H/R 组细胞中 Caspase-1、NLRP3、ASC mRNA 表达水平上调,差异有统计学意义( $P < 0.05$ )。与 H/R 组比较,H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组、H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组、H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组细胞中 Caspase-1、NLRP3、ASC mRNA 表达水平均下降,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );与 H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组和 H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组比较,H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组细胞中 Caspase-1、NLRP3、ASC mRNA 表达水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.05$ );H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ

组细胞中 Caspase-1、NLRP3、ASC mRNA 表达水平与 H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。

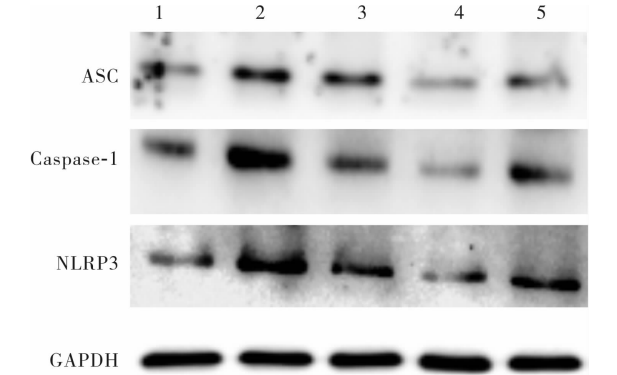
表 2 5 组细胞焦亡相关蛋白 Caspase-1、NLRP3、ASC mRNA 表达比较

Tab.2 Comparison of the expression of Caspase-1,NLRP3 and ASC mRNA among the five groups ( $\bar{x} \pm s$ )

组别	<i>n</i>	ASC mRNA	Caspase-1 mRNA	NLRP3 mRNA
正常对照组	5	1.0±0.1	1.0±0.1	1.0±0.1
H/R 组	5	51.5±0.6 <sup>a</sup>	97.7±0.4 <sup>a</sup>	34.0±0.3 <sup>a</sup>
H/R + 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组	5	30.9±0.4 <sup>bc</sup>	46.5±1.3 <sup>bc</sup>	16.6±0.4 <sup>bc</sup>
H/R + 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组	5	16.6±0.4 <sup>b</sup>	16.5±0.5 <sup>b</sup>	9.8±0.2 <sup>b</sup>
H/R + 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组	5	24.5±0.6 <sup>bc</sup>	37.8±0.4 <sup>bc</sup>	14.1±0.5 <sup>bc</sup>

注:与正常对照组比较<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 H/R 组比较<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与 H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组比较<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

2.3 5 组细胞焦亡相关蛋白 Caspase-1、NLRP3、ASC 表达比较 结果见图 1 和表 3。与正常对照组比较,H/R 组细胞中 Caspase-1、NLRP3、ASC 蛋白表达水平升高,差异有统计学意义( $P<0.05$ )。与 H/R 组比较,H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组、H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组、H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组细胞中 Caspase-1、NLRP3、ASC 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );与 H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组和 H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组比较,H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组细胞中 Caspase-1、NLRP3、ASC 蛋白表达水平降低,差异有统计学意义( $P<0.05$ );H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组细胞中 Caspase-1、NLRP3、ASC 蛋白水平与 H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组比较差异无统计学意义( $P>0.05$ )。



1:正常对照组;2:H/R 组;3:H/R + 50  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组;4:H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组;5:H/R + 500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组。

图 1 5 组心肌细胞中 ASC、Caspase-1、NLRP3 蛋白表达 (Western blot)

Fig.1 Expression of Caspase-1,NLRP3 and ASC protein in cardiomyocytes in the five groups(Western blot)

表 3 5 组心肌细胞中 ASC、Caspase-1、NLRP3 蛋白表达水平比较

Tab.3 Comparison of the expression of ASC, Caspase-1, NLRP3 protein in cardiomyocytes among the five groups

组别	<i>n</i>	ASC	Caspase-1	NLRP3
正常对照组	5	1.1±0.1	1.0±0.2	0.9±0.2
H/R 组	5	1.8±0.1 <sup>a</sup>	1.8±0.1 <sup>a</sup>	1.7±0.1 <sup>a</sup>
H/R + 50 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组	5	1.4±0.1 <sup>bc</sup>	1.1±0.1 <sup>bc</sup>	1.4±0.1 <sup>bc</sup>
H/R + 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组	5	1.1±0.1 <sup>b</sup>	0.7±0.1 <sup>b</sup>	0.7±0.3 <sup>b</sup>
H/R + 500 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ TMZ 组	5	1.6±0.1 <sup>bc</sup>	1.0±0.2 <sup>bc</sup>	1.2±0.1 <sup>bc</sup>

注:与正常对照组比较<sup>a</sup> $P<0.05$ ;与 H/R 组比较<sup>b</sup> $P<0.05$ ;与 H/R + 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组比较<sup>c</sup> $P<0.05$ 。

3 讨论

心肌缺血本质是心肌的氧供需求平衡失调,减少心肌缺血后损伤的最有效办法就是恢复组织灌注,但缺血心肌恢复灌注后,会出现心律失常、心肌能量代谢障碍、心肌细胞超微结构改变的现象,即为 MIRI<sup>[11]</sup>。心肌缺血再灌注引起的组织损伤和无菌促炎反应会影响缺血性心肌病的治疗效果<sup>[12-14]</sup>。如何避免上述情况的发生是目前临床研究的热点。

细胞焦亡是一种新发现的细胞程序性、伴有炎症因子参与的死亡方式,细胞焦亡又被称为细胞炎症性坏死<sup>[15]</sup>。研究证实,由 NLRP3 炎症小体激活导致的细胞焦亡参与了 MIRI<sup>[16]</sup>。并且研究结果表明,与细胞凋亡相比,由 NLRP3 炎症小体激活导致的细胞焦亡在机制上与 MIRI 的相关性更大,MIRI 梗死部位残存细胞中炎症小体的激活和细胞焦亡可能会产生促炎性微小细胞,引起免疫细胞的募集,从而形成促进组织损伤的恶性循环<sup>[17]</sup>。有研究证实,NLRP3 的缺乏在心肌缺血再灌注损伤中起保护作用<sup>[16,18-19]</sup>。NAZIR 等<sup>[16]</sup>研究显示,在小鼠心肌缺血再灌注模型中心肌细胞及外周血中 NLRP3、Caspase-1、IL-1 $\beta$  的表达升高。研究显示,NLRP3 所诱导的细胞焦亡会加重糖尿病大鼠的 MIRI,通过抑制 NLRP3 炎症小体,可降低在高糖和 H/R 条件下培养的 H9C2 细胞的损伤和由细胞焦亡所引起的细胞死亡<sup>[20]</sup>。本研究结果表明,与对照组比较,H/R 组心肌细胞中 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达升高,证明细胞焦亡参与了 MIRI。

TMZ 是常见的抗心绞痛药物,具有改善心肌能量代谢、减轻 Ca<sup>2+</sup> 超载、清除氧自由基、抑制中性粒细胞聚集等作用<sup>[21]</sup>。有研究表明,TMZ 对氧化应激损伤<sup>[22]</sup>、细胞凋亡<sup>[6]</sup> 等均有抑制作用。并且 TMZ 可通过抑制凋亡<sup>[23-25]</sup>、炎症反应<sup>[26]</sup>、自噬<sup>[27-28]</sup> 等多

种机制减轻 MIRI。所以作者推断 TMZ 也可通过抑制细胞焦亡减轻 H/R 诱导的心肌细胞损伤。

本研究结果显示,经 H/R 处理的细胞中,焦亡相关蛋白 ASC、Caspase-1、NLRP3 的表达明显升高,证明在 H/R 诱导的细胞损伤中有细胞焦亡的发生;经 50、100、500  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 预处理后,焦亡相关蛋白 ASC、Caspase-1、NLRP3 表达水平下降,证实 TMZ 可抑制细胞焦亡,其中 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$  TMZ 组各焦亡相关蛋白下降最明显,说明 TMZ 处理 H/R 心肌细胞的最适浓度为 100  $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

# 参考文献:

- [1] SANCHI-GOMAR F, CARME P, ROMAN L, *et al.* Epidemiology of coronary heart disease and acute coronary syndrome [J]. *Ann Transl Med*, 2016, 4(13): 256-256.
- [2] HAUSENLOY D J, YELLON D M. Myocardial ischemia-reperfusion injury: a neglected therapeutic target [J]. *J Clin Invest*, 2013, 123(1): 92-100.
- [3] PRASAD A, STONE G W, HOLMES D R, *et al.* Reperfusion injury, microvascular dysfunction, and cardioprotection: the “dark side” of reperfusion [J]. *Circulation*, 2009, 120(21): 2105-2112.
- [4] TOLDO S, MAURO A G, CUTTER Z S, *et al.* Inflammasome, pyroptosis, and cytokines in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2018, 315(6): 1553-1568.
- [5] MCCARTHY C P, MULLINS K V, KERINS D M. The role of trimetazidine in cardiovascular disease: beyond an anti-anginal agent [J]. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*, 2016, 2(4): 266-272.
- [6] ZHOU X, LI C, XV W, *et al.* Trimetazidine protects against smoking-induced left ventricular remodeling via attenuating oxidative stress, apoptosis, and inflammation [J]. *PLoS One*, 2012, 7(7): e40424.
- [7] XIAO J, WANG C, YAO J C, *et al.* Gasdermin D mediates the pathogenesis of neonatal-onset multisystem inflammatory disease in mice [J]. *PLoS Biol*, 2018, 16(11): e3000047.
- [8] 王星星, 宋虎, 杜晨阳, 等. 细胞焦亡的研究进展 [J]. *天津医药*, 2018, 46(11): 1252-1256.
- [9] CHENG J, WU Q, LV R, *et al.* MicroRNA-449a inhibition protects H9C2 cells against hypoxia/reoxygenation-induced injury by targeting the Notch-1 signaling pathway [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 46(6): 2587-2600.
- [10] WEI J, XV H, SHI L, *et al.* Trimetazidine protects cardiomyocytes against hypoxia-induced injury through ameliorates calcium homeostasis [J]. *Chem Biol Interact*, 2015, 236(3): 47-56.
- [11] 王紫监, 张立民, 赵自刚, 等. 心肌缺血再灌注损伤研究进展 [J]. *中国老年学杂志*, 2018, 38(6): 1532-1535.
- [12] MARCHANT D J, BOYD J H, LIN D C, *et al.* Inflammation in myocardial diseases [J]. *Circ Res*, 2012, 110(1): 126-144.
- [13] ARSLAN F, DE KLEIJN D P, PASTERKAMP G. Innate immune

signaling in cardiac ischemia [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2011, 8(5): 292-300.

- [14] TIMMERS L, PASTERKAMP G, DE HOOG V C, *et al.* The innate immune response in reperfused myocardium [J]. *Cardiovasc Res*, 2012, 94(2): 276-283.
- [15] CHEN X, HE W T, HU L, *et al.* Pyroptosis is driven by non-selective gasdermin-D pore and its morphology is different from MLKL channel-mediated necroptosis [J]. *Cell Res*, 2016, 26(9): 1007-1020.
- [16] NAZIR S, GADI I, AL-DABET M M, *et al.* Cytoprotective activated protein C averts Nlrp3 inflammasome-induced ischemia-reperfusion injury via mTORC1 inhibition [J]. *Blood*, 2017, 130(24): 2664-2677.
- [17] TAKAHASHI M. NLRP3 inflammasome as a novel player in myocardial infarction [J]. *Int Heart J*, 2014, 55(2): 101-105.
- [18] GRUNDMANN S, BODE C, MOSER M. Inflammasome activation in reperfusion injury: friendly fire on myocardial infarction [J]. *Circulation*, 2011, 123(6): 574-576.
- [19] IKEDA U, IKEDA M, KANO S, *et al.* Neutrophil adherence to rat cardiac myocyte by proinflammatory cytokines [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 1994, 23(4): 647-652.
- [20] QIU Z, LEI S, ZHAO B, *et al.* NLRP3 inflammasome activation-mediated pyroptosis aggravates myocardial ischemia/reperfusion injury in diabetic Rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2017, 2017: 1-17.
- [21] 毕莹, 刘新林, 刘小伟, 等. 曲美他嗪对急性前壁心肌梗死心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *武警医学*, 2017, 22(10): 988-991.
- [22] CHEN J, LAI J, YANG L, *et al.* Trimetazidine prevents macrophage-mediated septic myocardial dysfunction via activation of the histone deacetylase sirtuin 1 [J]. *Br J Pharmacol*, 2016, 173(3): 545-561.
- [23] ENTURK T, AVUN S, AVCI B, *et al.* Effective inhibition of cardiomyocyte apoptosis through the combination of trimetazidine and N-acetylcysteine in a rat model of myocardial ischemia and reperfusion injury [J]. *Atherosclerosis*, 2014, 237(2): 760-766.
- [24] 朱雪梅. 曲美他嗪对急性心肌缺血再灌注损伤大鼠的治疗效果及对 Bcl-2、Caspase-3 蛋白表达的影响 [J]. *心脑血管病防治*, 2018, 18(1): 11-14.
- [25] 熊果, 马康华. 曲美他嗪预处理对缺血/再灌注大鼠心肌细胞凋亡的抑制及机制研究 [J]. *天津医科大学学报*, 2018, 24(2): 116-121.
- [26] 文冰, 韩辉, 焦周阳, 等. 曲美他嗪抗大鼠心肌缺血再灌注损伤中炎性反应的研究 [J]. *中华实验外科杂志*, 2014, 31(3): 597-599.
- [27] WU S, CHANG G, GAO L, *et al.* Trimetazidine protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2018, 96(8): 791-806.
- [28] 龙玉莹, 葛华, 王月, 等. 盐酸曲美他嗪调控自噬对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国医科大学学报*, 2017, 46(7): 656-659.