

· 论著 ·

卡格列净减轻心肌梗死后细胞凋亡及炎症反应改善预后

李铭 高继先 吴冰 刘小熊 夏豪

(武汉大学人民医院心内科 武汉大学心血管病研究所 心血管病湖北省重点实验室, 湖北 武汉 430060)

【摘要】目的 探究在心肌梗死(MI)后使用卡格列净(CANA)对心脏炎症反应及细胞凋亡的作用。**方法** 选用 15 只 8~10 周龄 C57/BL6 小鼠(SPF 级),用抽签法随机抽取 5 只小鼠为 Sham 组(假手术+生理盐水灌胃),剩余 10 只小鼠通过结扎左冠状动脉前降支的方法制作 MI 模型,制作成功后的 10 只 MI 小鼠随机分为 2 组:MI 组(生理盐水灌胃)、CANA + MI 组(CANA 灌胃),每组 5 只。CANA + MI 组小鼠以 20 mg/(kg·d⁻¹)卡格列净灌胃 4 周,Sham 组及 MI 组则使用同等体积生理盐水灌胃 4 周。4 周后,使用小鼠超声机测量左室收缩末期内径及左室射血分数。苏木精染色、Tunel 染色用于明确心脏结构及 MI 后细胞凋亡状况。IF 免疫荧光染色用于检测 MI 后心脏炎症反应程度。Western blotting 用于检测炎症及凋亡相关蛋白表达水平。**结果** 与 MI 组相比,CANA + MI 组左室射血分数升高、梗死面积减小。Tunel 染色显示,CANA + MI 组小鼠 MI 边缘区凋亡细胞数量较 MI 组显著减少,相应促凋亡蛋白 Bax 表达降低,抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达升高。CANA + MI 组小鼠 CD3⁺T 细胞、F480⁺巨噬细胞和 LY6G⁺中性粒细胞数量较 MI 组明显减少,相关蛋白 p-P65、p-IκBα 表达量明显降低。**结论** CANA 抑制了 MI 后心脏炎症反应,减轻了细胞凋亡。

【关键词】 卡格列净;炎症反应;心肌梗死;细胞凋亡**【DOI】**10.16806/j.cnki.issn.1004-3934.2024.04.018

Canagliflozin Alleviates Apoptosis and Inflammation After Myocardial Infarction and Improves Prognosis

LI Ming, GAO Jixian, WU Bing, LIU Xiaoxiong, XIA Hao

(Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University, Cardiovascular Research Institute, Wuhan University, Hubei Key Laboratory of Cardiology, Wuhan 430060, Hubei, China)

【Abstract】Objective To investigate the effect of canagliflozin (CANA) on cardiac inflammatory response and apoptosis after myocardial infarction (MI). **Methods** This study selected 15 C57/BL6 mice (SPF grade) aged 8~10 weeks, and randomly selected 5 mice as the Sham group (sham surgery + saline gavage) using a lottery method. The remaining 10 mice were used to create an MI model by ligating the anterior descending branch of the left coronary artery. After successful production, the 10 MI mice were randomly divided into two groups: the MI group (saline gavage) and the CANA + MI group (Canagliflozin gavage), with 5 mice in each group. The mice in the CANA + MI group were gavaged with 20 mg/(kg·d⁻¹) of Canagliflozin for 4 weeks, while the Sham and MI groups were gavaged with the same volume of physiological saline for 4 weeks. After 4 weeks, left ventricular end systolic diameter and left ventricular ejection fraction were measured using a mouse ultrasound machine. Hematoxylin (HE staining) and Tunel staining are used to clarify the cardiac structure and cell apoptosis status after MI. IF immunofluorescence staining is used to detect the degree of cardiac inflammatory response after MI. Western blotting is used to detect the expression levels of inflammation and apoptosis related proteins. **Results** Compared with the MI group, left ventricular ejection fraction increased and infarct size decreased in CANA + MI group. Tunel staining showed that the number of apoptotic cells in the MI margin area of the CANA + MI group mice was significantly reduced compared to the MI group, with a corresponding decrease in the expression of pro apoptotic protein Bax and an increase in the expression of anti apoptotic protein Bcl-2. The number of CD3⁺T cells, F480⁺ macrophages, and LY6G⁺ neutrophils in the CANA + MI group mice was significantly reduced compared to the MI group, with associated proteins p-P65, p-IκBα. The expression level was significantly reduced. **Conclusion** Canagliflozin inhibits cardiac inflammatory response after MI and reduces cell apoptosis.

【Keywords】 Canagliflozin; Inflammatory response; Myocardial infarction; Apoptosis

心血管疾病仍然是世界上人类死亡的主要原因之一,而心肌梗死(myocardial infarction, MI)是心血管

基金项目:国家科技支撑计划(2015BAI08B01);国家自然科学基金(81900364)

通信作者:夏豪, E-mail: xiahao1966@163.com

疾病中最严重的表现,在发达国家中每年因急性 MI 造成的死亡人数超过 1/3^[1]。尽管越来越多的生活干预及治疗方法使 65 岁以上老年人急性 MI 的死亡率有所降低,但 65 岁以下的男性及女性心血管事件发生率并没有类似的下降^[2],因此 MI 对人类的健康仍然有着重大威胁,寻找新的治疗方案及作用靶点势在必行。

钠-葡萄糖共转运蛋白 2 抑制剂 (sodium-glucose cotransporter 2 inhibitor, SGLT2i) 最初被发现是一种治疗 2 型糖尿病的药物,通过促进尿液中的糖及钠的排泄,来发挥降糖作用。后来具有重要意义的临床试验 EMPA^[3] 和 CANVAS^[4] 证实了 SGLT2i 在 2 型糖尿病高危患者中具有显著心血管益处。最近的研究^[5] 证明长期口服卡格列净 (canagliflozin, CANA) 发挥心血管保护作用并不受体内血糖的影响。CANA 发挥作用可能与多种因素相关,例如抗炎、抗氧化应激、心肌重构和离子代谢等。因此, SGLT2i 发挥心血管益处的具体机制仍不明确,本研究试图探索 CANA 影响非糖尿病 MI 小鼠的炎症反应、心肌细胞凋亡及心脏重构的相关机制。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

8~10 周龄雄性 C57/BL6 小鼠 (SPF 级) 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 (许可证号: SCXX2021-0006), 所有动物均饲养于 SPF 级环境中, 予以 12 h 光照及无光照环境养育, 环境湿度 50%~80%, 温度 21~23 °C, 予以普通食物饲养。本实验采用的动物实验方案经武汉大学人民医院动物保护与使用委员会批准 [伦理编号: WDRM 动 (福) 20211203D 号]。

1.1.2 试剂与仪器

GAPDH 抗体 (AC001)、p-P65 抗体 (AP1294)、p-IκBα 抗体 (AP0707)、Bcl-2 抗体 (A19693)、HRP 山羊抗兔 IgG 二抗、TRIzol (RK30129) 均购自于武汉爱博泰克生物 (Abelonal)。抗 Bax 一抗 (GB114122)、RIPA 裂解液 (G2002)、5 × 蛋白上样缓冲液、SDS-PAGE 凝胶快速制备试剂盒、Servicebio RT First Stand cDNA Synthesis Kit、Servicebio 2 × SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒 (Low ROX) 均购自于武汉塞维尔生物科技有限公司 (Servicebio)。

1.2 方法

1.2.1 动物 MI 模型及给药

小鼠通过腹腔注射 3% 戊巴比妥钠 (90 mg/kg) 进

行麻醉,剔除左侧胸部体毛且使用酒精对相应部位进行消毒,将其仰卧位固定于手术台上,然后使用小动物呼吸机 (Kent Scientific VFA-23-BV 型) 保证通气。在胸骨左缘第 3、4 肋间切开,逐步暴露心脏,使用 7-0 丝线结扎左前降支,结扎后可以发现结扎部位心肌变白或者颜色变浅,接着逐步缝合,抽出残存空气后关闭胸部。术后将小鼠放于加热板上,完全苏醒前将小鼠放回独立通气的笼内。Sham 组小鼠进行相同操作,但不进行结扎。在术后第 3 天开始, CANA + MI 组小鼠每天行 CANA 灌胃处理 [20 mg/(kg·d⁻¹)], 持续 4 周^[6]。Sham 组及 MI 组每天以等量生理盐水进行灌胃,持续 4 周。

1.2.2 小鼠心脏超声检查

4 周后小鼠通过吸入 2% 异氟醚进行麻醉,通过小动物高分辨超声成像采集心脏的长轴及短轴图像,测量出左室收缩末期内径,计算左室射血分数。

1.2.3 免疫荧光染色

取出术后 4 周小鼠心脏,先用生理盐水取出残存血液,再使用 10% 氯化钾溶液浸泡使心脏停搏于舒张期,用 4',6-二脒基-2-苯基吲哚 (D4054, Bioscience, 中国) 对细胞核进行标记。最后在荧光显微镜下进行图像采集,用 Image J 软件进行定量分析。

1.2.4 苏木精染色

用准备好的石蜡切片进行二甲苯透明、梯度酒精脱水、苏木精染色、盐酸酒精分化、清洗后伊红染色、梯度酒精脱水、二甲苯透明等步骤后,进行封片,最后于显微镜下观察。使用 Image J 软件进行计算左心室梗死面积。

1.2.5 Tunel 染色

将 MI 后 4 周小鼠心脏取出,使用 Tunel 染色对 MI 边缘区凋亡心肌进行检测,应用 ApopTag Plus 荧光素原位凋亡检测试剂盒 (S7111, Millipore) 进行染色,随后使用荧光显微镜下进行图像采集,用 Image J 软件进行定量分析。

1.2.6 Western blotting 检测

首先从心脏心室组织 (MI 小鼠则为 MI 边缘区) 中提取总蛋白。将准备好的心脏组织放入蛋白酶及磷酸酶抑制剂混合物中,经过研磨、离心后,取上清液加入蛋白上样缓冲液后金属浴 100 °C 10 min,提取好的蛋白使用 BCA 蛋白测定试剂盒 (Servicebio) 测定蛋白浓度。蛋白通过 10% SDS-PAGE (Servicebio) 进行

电泳分离,并转移到聚偏氟乙烯膜上,进行封闭及三羟甲基氨基甲烷缓冲液清洗,然后放入对应一抗在 4 ℃ 冰箱中孵育过夜。随后,将聚偏氟乙烯膜与相应二抗在室温下孵育 90 min。最后在 Bio-Rad 检测系统上使用增强化学发光将图像可视化。根据目的条带与加载控制的灰度值比采用 Image J 软件评估蛋白的相对表达量。

1.3 统计学处理

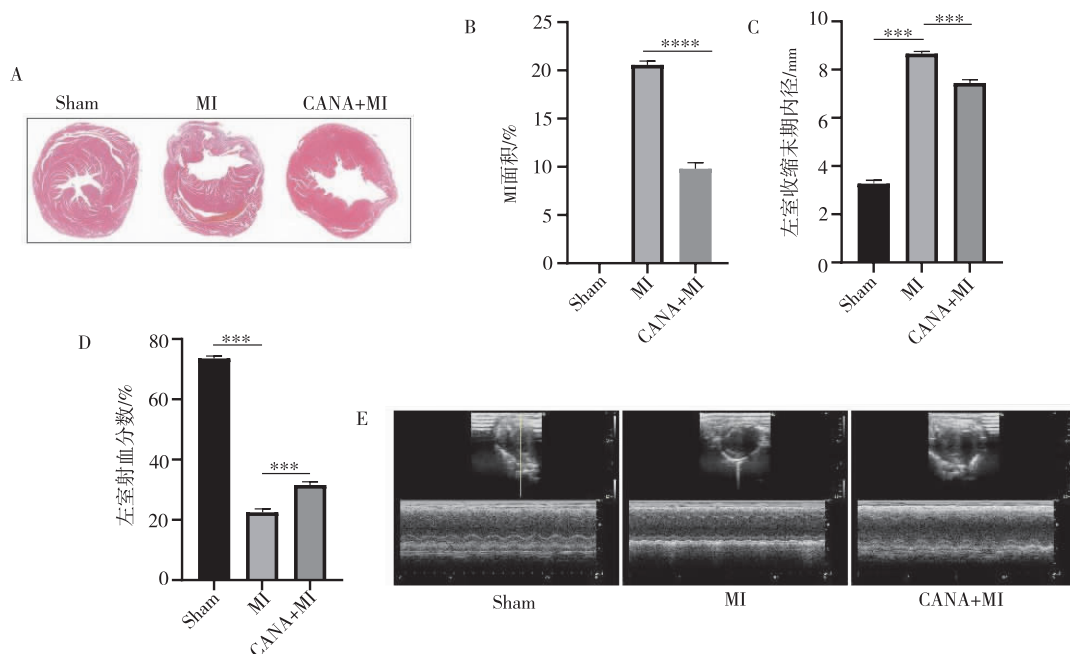
应用 GraphPad Prism 9 统计软件进行数据分析。计量资料采用均数 ± 标准差表示,两组间比较采用

Students' t 检验,多组间比较采用单因素方差分析。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 CANA 减轻 MI 后 MI 面积和心功能障碍

MI 后 4 周,HE 染色结果显示,与 MI 组相比,CANA + MI 组小鼠 MI 面积明显减少(图 1A、1B),同时进行的小鼠心脏超声结果显示(图 1C、1D 及 1E),与 MI 组对比,CANA + MI 组小鼠的左室射血分数显著提高。综上所述,这些数据表明,CANA 可以减少 MI 后的梗死面积,改善心功能,有利于预后。



注:A,CANA + MI 组及 MI 组的 HE 染色图;B,MI 面积的定量分析;C,MI 后超声心动图评估左室收缩末期左室射血分数;D,MI 后超声心动图评估左室射血分数;E,各组超声心动图变化。***表示 $P < 0.001$,****表示 $P < 0.0001$ 。

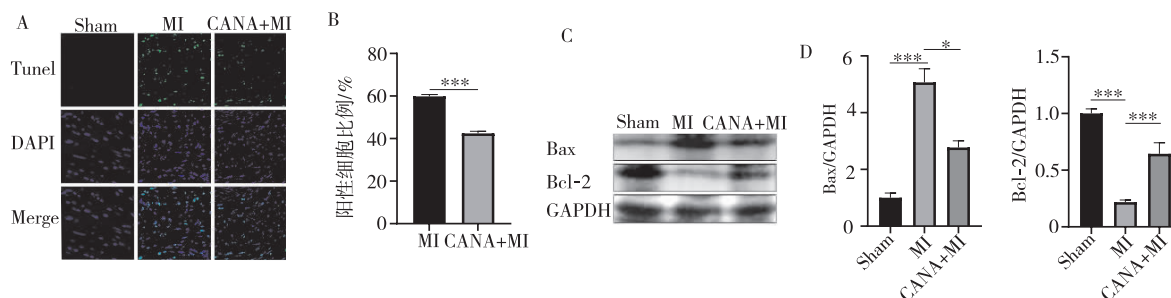
图1 CANA 减少 MI 后 MI 面积且改善心功能

2.2 CANA 减轻 MI 后心肌细胞凋亡

细胞凋亡是 MI 后梗死面积大小与患者死亡的主要原因。因此笔者通过 Tunel 染色进一步研究 CANA 是否减少 MI 边缘区细胞凋亡。如图 2A、2B 所示,Sham 组小鼠 Tunel 阳性细胞极少,且各组间差异没有统计学意义,MI 组小鼠 MI 边缘区凋亡细胞数量明显增加。而相比于 MI 组小鼠,CANA + MI 组小鼠的凋亡细胞数量明显减少。为了收集更多的证据证实 CANA 减轻 MI 后心肌细胞凋亡,笔者检测了相关因子蛋白水平。Western blotting 结果显示,相比于 MI 组,CANA + MI 组小鼠促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达,抑制促凋亡蛋白 Bax 的表达(图 2C、2D)。这表明 CANA 可以减轻 MI 后心肌细胞凋亡。

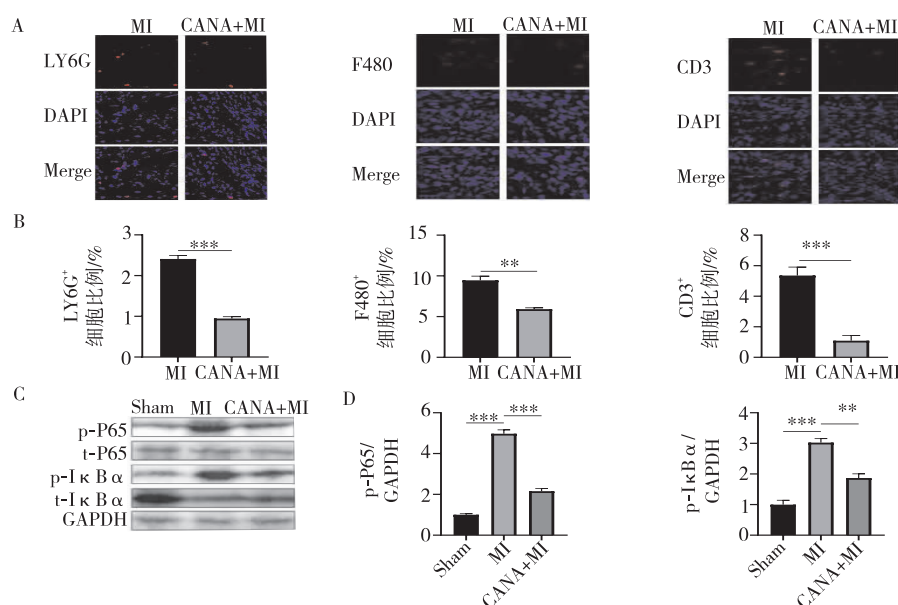
2.3 CANA 减轻 MI 后炎症反应

由于 MI 的发展过程中,持续的炎症反应会引起大量免疫细胞及炎性细胞浸润,加重心肌细胞凋亡及心功能损伤,因此探究 CANA 对 MI 后炎症反应的影响。如图 3A、3B 所示,与 MI 组小鼠相比,CANA + MI 组小鼠减轻了 MI 边缘区的炎症反应,抑制了炎症细胞聚集,CD3⁺T 细胞、F480⁺巨噬细胞及 LY6G⁺中性粒细胞明显减少。为了收集更多 CANA 干预 MI 炎症反应的证据,笔者对炎症的经典通路核因子 κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 进行了 Western blotting 分析,图 3C、3D 表明,与 MI 组相比,CANA + MI 组小鼠的 p-P65 及 p-I κ B α 水平明显降低。上述结果表明,CANA 可以通过调控 NF- κ B 通路来减轻 MI 后心脏炎症反应。



注:A,MI 后 4 周,TUNEL 染色显示 MI 组及 CANA + MI 组小鼠梗死边界区细胞凋亡;B,TUNEL 染色阳性细胞定量分析;C,Western blotting 结果显示促凋亡蛋白及抑凋亡蛋白表达情况;D,Western blotting 结果的相对定量分析。* 表示 $P < 0.05$,*** 表示 $P < 0.001$ 。

图 2 CANA 减轻 MI 后心肌细胞凋亡



注:A,MI 后 4 周,MI 组及 CANA + MI 组小鼠梗死边界区阳性巨噬细胞(F480⁺)、阳性中性粒细胞(LY6G⁺)和阳性 T 淋巴细胞(CD3⁺)聚集的免疫荧光染色图;B,相应炎症细胞浸润定量分析;C,Western blotting 结果显示 NF-κB 通路相关蛋白表达情况;D,Western blotting 结果的相对定量分析。** 表示 $P < 0.01$,*** 表示 $P < 0.001$ 。

图 3 CANA 减轻 MI 后炎症反应

3 讨论

在 MI 发生以后,梗死心脏的修复依赖于一个高度协调的反应,这包括炎症细胞和间充质细胞的连续募集和清除^[7]。梗死愈合可以分为三个不同但又相互重叠的阶段:炎症期、增殖期和成熟期^[8]。在炎症期中,坏死的细胞释放危险信号激活受体系统,如 Toll 样受体、晚期糖基化终产物受体、白细胞介素(interleukin,IL)等,这些受体又通过不同的方式激活下游促炎级联反应,引起强烈的炎症反应。大量的免疫细胞及炎性细胞(巨噬细胞)浸润于梗死心肌中,炎性巨噬细胞有助于消化和清除受损的细胞及细胞外基质,但同时分泌炎症因子,如肿瘤坏死因子-α、IL-1β、IL-6 和 IL-12,这些炎症因子在长时间持续的炎症

反应中也加重心肌细胞凋亡及心功能损伤^[9-11]。激活的多种受体系统中,NF-κB 转录因子的激活涉及多种细胞类型,在调节炎症反应、细胞黏附、生存和生长控制多个方面起着重要作用。有大量的研究报告与上述对应,NF-κB 缺失在再灌注梗死模型中可以减少梗死面积、改善心功能、降低促炎细胞因子水平^[12]。近年来,关于 SGLT2i 通过抑制 NF-κB 通路减轻炎症反应的研究大量报道^[13-15]。在本次研究中,笔者探究了 MI 发生以后,CANA 通过抑制 NF-κB 通路,也就是抑制 p-IκBα 的磷酸化,从而降低 P65 活化,最终减轻了 MI 后炎症反应,改善了预后。

炎症反应发生以后,MI 区的梗死细胞及细胞质基质碎片被清除,但长时间持续的炎症反应使促炎介质的表达增强,反而可能会激活促凋亡通路,诱导更多

的心肌细胞损失,这也是 MI 后心肌细胞损失的主要原因。细胞凋亡的激活也决定了 MI 后的心脏功能以及 MI 后心力衰竭的发生。据相关文献^[14,16-17]报道,在葡萄糖脂毒性诱导的心肌模型、阿霉素诱导的心肌缺血再灌注模型中,CANA 等 SGLT2i 均减轻了心肌细胞凋亡。在其他领域中,同样有 SGLT2i 减轻细胞凋亡,保护机体功能的研究报道^[18-19]。细胞凋亡的原因是促凋亡及抗凋亡相关蛋白之间的平衡失衡。结果表明,CANA 通过抑制促凋亡蛋白 Bax、促进抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达而减轻心肌细胞的凋亡。

目前关于 SGLT2i 在心力衰竭中的益处已被证实^[20-22],而 SGLT2i 在 MI 中的作用仍不明确。本研究在动物实验中初步说明了 CANA 可以通过抑制 MI 后心脏炎症反应及心肌细胞凋亡,从而改善心脏功能改善预后,为 MI 治疗过程中使用 SGLT2i 提供了一定支持,有潜力成为 MI 治疗过程中的新型药物,不足的是 CANA 发挥作用的具体分子机制需要进一步研究。

参 考 文 献

- [1] Abdollahi E, Keyhanfar F, Delbandi AA, et al. Dapagliflozin exerts anti-inflammatory effects via inhibition of LPS-induced TLR-4 overexpression and NF- κ B activation in human endothelial cells and differentiated macrophages[J]. *Eur J Pharmacol*, 2022, 918: 174715.
- [2] Arab HH, Safar MM, Shahin NN. Targeting ROS-dependent AKT/GSK-3 β /NF- κ B and DJ-1/Nrf2 pathways by dapagliflozin attenuates neuronal injury and motor dysfunction in rotenone-induced parkinson's disease rat model[J]. *ACS Chem Neurosci*, 2021, 12(4): 689-703.
- [3] Arab HH, Al-Shorbagy MY, Saad MA. Activation of autophagy and suppression of apoptosis by dapagliflozin attenuates experimental inflammatory bowel disease in rats; targeting AMPK/mTOR, HMGB1/RAGE and Nrf2/HO-1 pathways[J]. *Chem Biol Interact*, 2021, 335: 109368.
- [4] Dasari D, Bhat A, Mangali S, et al. Canagliflozin and dapagliflozin attenuate glucolipotoxicity-induced oxidative stress and apoptosis in cardiomyocytes via inhibition of sodium-glucose cotransporter-1[J]. *ACS Pharmacol Transl Sci*, 2022, 5(4): 216-225.
- [5] El-Sherbiny M, El-Shafey M, Said E, et al. Dapagliflozin, liraglutide, and their combination attenuate diabetes mellitus-associated hepato-renal injury-insight into oxidative injury/inflammation/apoptosis modulation[J]. *Life (Basel)*, 2022, 12(5): 764.
- [6] Frangogiannis NG, Rosenzweig A. Regulation of the inflammatory response in cardiac repair[J]. *Circ Res*, 2012, 110(1): 159-173.
- [7] Frangogiannis NG. The inflammatory response in myocardial injury, repair, and remodeling[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2014, 11(5): 255-265.
- [8] Gulati R, Behfar A, Narula J, et al. Acute myocardial infarction in young individuals[J]. *Mayo Clinic Proceedings*, 2020, 95(1): 136-156.
- [9] Hsieh PL, Chu PM, Cheng HC, et al. Dapagliflozin mitigates doxorubicin-caused myocardium damage by regulating AKT-mediated oxidative stress, cardiac remodeling, and inflammation[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(17): 10146.
- [10] Kologrivova I, Shtatolkina M, Suslova T, et al. Cells of the immune system in cardiac remodeling: main players in resolution of inflammation and repair after myocardial infarction[J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 664457.
- [11] Kubota A, Frangogiannis NG. Macrophages in myocardial infarction[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2022, 323(4): C1304-C1324.
- [12] Li M, Zheng H, Han Y, et al. LncRNA Snhg1-driven self-reinforcing regulatory network promoted cardiac regeneration and repair after myocardial infarction[J]. *Theranostics*, 2021, 11(19): 9397-9414.
- [13] Lim VG, Bell RM, Arjun S, et al. SGLT2 inhibitor, canagliflozin, attenuates myocardial infarction in the diabetic and nondiabetic heart[J]. *JACC: Basic to Translational Science*, 2019, 4(1): 15-26.
- [14] Ma L, Zou R, Shi W, et al. SGLT2 inhibitor dapagliflozin reduces endothelial dysfunction and microvascular damage during cardiac ischemia/reperfusion injury through normalizing the XO-SERCA2-CAMK II-cofilin pathways[J]. *Theranostics*, 2022, 12(11): 5034-5050.
- [15] Neal B, Perkovic V, Matthews DR. Canagliflozin and cardiovascular and renal events in type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(21): 2099.
- [16] Ong SB, Hernandez-Resendiz S, Crespo-Avilan GE, et al. Inflammation following acute myocardial infarction: multiple players, dynamic roles, and novel therapeutic opportunities[J]. *Pharmacol Ther*, 2018, 186: 73-87.
- [17] Rådholm K, Figtree G, Perkovic V, et al. Canagliflozin and heart failure in type 2 diabetes mellitus: results from the canvas program[J]. *Circulation*, 2018, 138(5): 458-468.
- [18] Sarraju A, Li J, Cannon CP, et al. Effects of canagliflozin on cardiovascular, renal, and safety outcomes in participants with type 2 diabetes and chronic kidney disease according to history of heart failure: results from the credence trial[J]. *Am Heart J*, 2021, 233: 141-148.
- [19] Spertus JA, Birmingham MC, Nassif M, et al. The SGLT2 inhibitor canagliflozin in heart failure: the CHIEF-HF remote, patient-centered randomized trial[J]. *Nat Med*, 2022, 28(4): 809-813.
- [20] Zhang Q, Wang L, Wang S, et al. Signaling pathways and targeted therapy for myocardial infarction[J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 78.
- [21] Zinman B, Wanner C, Lachin JM, et al. Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes[J]. *N Engl J Med*, 2015, 373(22): 2117-2128.
- [22] Zuo Q, Zhang G, He L, et al. Canagliflozin attenuates hepatic steatosis and atherosclerosis progression in western diet-fed apoe-knockout mice[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2022, 16: 4161-4177.

收稿日期: 2023-11-29