

本文引用: 王建军, 李晶, 马旭明, 等. 脂肪间充质干细胞外泌体调控心脏成纤维细胞自噬和 NLRP3 炎症小体平衡抑制心肌梗死后不良室重塑[J]. 中国动脉硬化杂志, 2024, 32(8): 654-662. DOI: 10.20039/j.cnki.1007-3949.2024.08.002.

· 实验研究 ·

[文章编号] 1007-3949(2024)32-08-0654-09

脂肪间充质干细胞外泌体调控心脏成纤维细胞自噬和 NLRP3 炎症小体平衡抑制心肌梗死后不良室重塑

王建军¹, 李晶², 马旭明², 万招飞³, 朱滨⁴, 刘亚萍⁵, 郭向前⁵, 潘吉平⁵, 樊艳²

1. 兰州市第一人民医院骨科, 甘肃省兰州市 730050; 2. 甘肃省人民医院心内科二病区, 甘肃省兰州市 730000; 3. 西安交通大学医学院第二附属医院心血管内科, 陕西省西安市 710061; 4. 甘肃省人民医院急诊科, 甘肃省兰州市 730000; 5. 甘肃中医药大学, 甘肃省兰州市 730000

[摘要] [目的] 探讨脂肪间充质干细胞(ADMSC)外泌体(Exo)对心肌梗死(MI)后不良室重塑的抑制作用和机制。[方法] 观察心脏成纤维细胞经过氧化氢(H₂O₂)处理后自噬和炎症表型的改变。MI大鼠经尾静脉注射等体积的生理盐水、ADMSC外泌体(MSC-Exo)、成纤维细胞外泌体(MEF-Exo),观察心脏成纤维细胞自噬相关16样蛋白1(ATG16L1)、自噬相关蛋白7(ATG7)和NOD样受体蛋白3(NLRP3)炎症小体的表达,炎症反应,心肌纤维化程度以及心功能。[结果] 心脏成纤维细胞经H₂O₂处理后,自噬相关蛋白ATG16L1和ATG7表达显著降低($P < 0.001$),NLRP3表达显著升高($P < 0.001$),促炎细胞因子白细胞介素1 β (IL-1 β)和IL-18水平显著增加($P < 0.001$)。MI大鼠经MSC-Exo干预后,自噬相关蛋白ATG16L1和ATG7表达显著上调($P < 0.001$),NLRP3表达显著下调($P < 0.001$),血清IL-1 β 和IL-18水平显著降低($P < 0.001$),纤维化相关蛋白胶原蛋白I和III显著减少($P < 0.001$),心肌纤维化程度显著减轻($P < 0.001$),心功能明显改善($P < 0.001$)。[结论] 脂肪MSC-Exo通过调控心脏成纤维细胞自噬和NLRP3炎症小体的平衡,发挥抑制MI后不良室重塑的作用。

[关键词] 脂肪间充质干细胞; 外泌体; 自噬相关16样蛋白1; 自噬相关蛋白7; NLRP3炎症小体; 心肌纤维化; 室重塑; 心肌梗死

[中图分类号] R543.3;R363

[文献标识码] A

Adipose derived mesenchymal stem cell exosomes inhibit adverse ventricular remodeling after myocardial infarction by regulating autophagy and NLRP3 inflammasomes balance of cardiac fibroblasts

WANG Jianjun¹, LI Jing², MA Xuming², WAN Zhaofei³, ZHU Bin⁴, LIU Yaping⁵, GUO Xiangqian⁵, PAN Jiping⁵, FAN Yan²

1. Department of Orthopedics, the First People's Hospital of Lanzhou, Lanzhou, Gansu 730050, China; 2. The Second Ward of Cardiology Department, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou, Gansu 730000, China; 3. Department of Cardiovascular Medicine, the Second Affiliated Hospital of Medical College, Xi'an Jiaotong University, Xi'an, Shaanxi 710004, China; 4. Department of Emergency, Gansu Provincial Hospital, Lanzhou, Gansu 730000, China; 5. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou, Gansu 730000, China

[ABSTRACT] **Aim** To investigate the inhibition role and mechanism of adipose derived mesenchymal stem cell (ADMSC) exosomes (Exo) on adverse ventricular remodeling after myocardial infarction (MI). **Methods** The changes of autophagy and inflammasomes phenotype of cardiac fibroblasts after H₂O₂ treatment were observed. MI rats were injected with an equal volume of normal saline, adipose derived mesenchymal stem cell exosomes (MSC-Exo) or fibroblast exosomes (MEF-Exo) via a tail vein. The expression of autophagy related 16 like protein 1 (ATG16L1), autophagy related protein 7 (ATG7) and NOD-like receptor protein 3 (NLRP3), inflammatory response, the degree of myocardial fi-

[收稿日期] 2023-10-24

[修回日期] 2024-02-19

[基金项目] 甘肃省自然科学基金项目(20JR10RA406);甘肃省人民医院科研基金项目(23GSSYD-29)

[作者简介] 王建军, 硕士, 副主任医师, 研究方向为骨与周围血管病, E-mail: fancy677@163.com。通信作者樊艳, 博士, 主任医师, 硕士研究生导师, 研究方向为动脉粥样硬化和心力衰竭的基础和临床研究, E-mail: 441429048@qq.com。

brosis, and the cardiac function were observed in different groups. **Results** After treatment with H_2O_2 on cardiac fibroblasts, the expressions of ATG16L1 and ATG7 were significantly decreased ($P < 0.001$), NLRP3 was significantly increased ($P < 0.001$), and the levels of inflammatory cytokines interleukin-1 β (IL-1 β) and IL-18 were significantly elevated ($P < 0.001$). After MI rats were intervened with MSC-Exo, the expressions of autophagy related proteins ATG16L1 and ATG7 were significantly up-regulated ($P < 0.001$), NLRP3 was significantly down-regulated ($P < 0.001$), serum IL-1 β and IL-18 levels were significantly decreased ($P < 0.001$), fibrosis-related proteins collagen I and III were significantly reduced ($P < 0.001$), myocardial fibrosis was significantly relieved ($P < 0.001$), and cardiac function was significantly improved ($P < 0.001$). **Conclusion** Adipose derived MSC-Exo play a role in inhibiting adverse ventricular remodeling after MI by regulating the balance of autophagy and NLRP3 inflammasomes.

[**KEY WORDS**] adipose derived mesenchymal stem cell; exosomes; autophagy related 16 like protein 1; autophagy related protein 7; NOD-like receptor protein 3 inflammasomes; myocardial fibrosis; ventricular remodeling; myocardial infarction

心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 的发病率和死亡率仍逐年增加,且呈年轻化趋势,严重危害人类健康,同时带来沉重的社会经济问题^[1]。MI 后继发不良室重塑,最终进展为心力衰竭,是导致 MI 患者不良预后的主要原因,亦是临床亟待解决的棘手问题^[2]。目前已经阐明,MI 后不良室重塑的本质是过度激活的炎症反应^[3]。

NOD 样受体蛋白 3 (NOD-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体是一种在固有免疫和疾病发生过程中起重要作用的多蛋白复合体^[4-5],介导胰岛素抵抗、动脉粥样硬化、缺血再灌注损伤等多种心血管疾病的病理生理进程^[6-10]。自噬 (autophagy) 是循环和清除受损蛋白质和细胞器,以及破坏细胞内病原体的重要细胞内过程,是真核细胞中高度保守的维持内环境稳态和适应微环境改变的生命现象^[11]。近年来的研究显示,自噬与 NLRP3 炎症小体有着密切的联系,是 NLRP3 炎症小体激活的重要调节机制^[12]。心脏成纤维细胞是 MI 后炎症反应的主要场所,是梗死心肌中炎症介质的主要来源^[13]。现有研究显示,心脏成纤维细胞自噬功能障碍,将导致炎症反应加剧,进而引起心肌炎症、纤维化和心功能异常^[14]。因此,恢复心脏成纤维细胞自噬功能与 NLRP3 炎症小体激活的平衡可能是改善 MI 后不良室重塑的重要靶点。

既往研究表明,间充质干细胞 (mesenchymal stem cell, MSC) 具有调节免疫、抑制室重塑和保护心功能的作用^[15],而且这些作用并不依赖于它们自身的增殖和分化,而是依赖于它们的旁分泌和内分泌生物活性物质^[16]。新近研究表明,MSC 具有产生外泌体 (exosomes, Exo),发挥调节并逆转疾病发展的作用^[17]。那么,间充质干细胞源性外泌体 (mesenchymal stem cell derived exosomes, MSC-Exo) 是否通过调节心脏成纤维细胞自噬和 NLRP3 炎症小体

平衡发挥抑制 MI 后不良室重塑的作用,目前未见报道。脂肪间充质干细胞 (adipose derived mesenchymal stem cell, ADMSC) 具有取材方便、来源充足、患者痛苦小、较少受伦理约束等诸多优点,在干细胞研究领域具有独特的优势^[18]。本研究拟采用脂肪 MSC-Exo,观察其抑制 MI 后不良室重塑的作用和机制,为深入探讨 MI 后不良室重塑的确切分子机制和有效干预靶点提供理论基础。

1 材料和方法

1.1 实验动物、试剂和仪器

健康 1 月龄 (体质量 80 ~ 100 g) 雄性 SD 大鼠,用于 ADMSC 的分离培养。健康 4 ~ 5 月龄 (体质量 180 ~ 200 g) 雄性 SD 大鼠,用于 MI 动物模型的建立。实验过程中对动物的处置符合医学伦理学要求。心脏成纤维细胞购自青旗生物科技发展有限公司 (上海)。HG-DMEM 培养基、去 Exo 胎牛血清和 I 型胶原酶 (Gibco),胰蛋白酶 (Invitrogen),100 \times 青霉素-链霉素 (上海生工),RNA 提取试剂盒 (Cell Signaling),自噬相关 16 样蛋白 1 (autophagy related 16 like protein 1, ATG16L1) 抗体、自噬相关蛋白 7 (autophagy related protein 7, ATG7) 抗体、NLRP3 抗体、胶原蛋白 I (Collagen I) 和胶原蛋白 III (Collagen III) 抗体以及相应二抗 (Santa Cruz), β -actin 和 GAPDH (Abclonal),RIPA 蛋白裂解液 (北京索莱宝),BCA 蛋白定量试剂盒和 ECL 发光液 (Thermo Fisher),白细胞介素 1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 和 IL-18 ELISA 试剂盒 (上海酶联),凝胶成像仪 (Bio-Rad),倒置相差显微镜和电子显微镜 (Olympus) 等。

1.2 ADMSC 的分离培养和鉴定

按照既往实验方法分离培养 ADMSC,并经流式细胞仪鉴定^[18]。取大鼠腹股沟部皮下脂肪垫,将脂

肪组织剪碎,加入2倍体积的0.1% I型胶原酶,37 °C 振荡消化30 min,1 000 r/min 离心10 min,弃上层, HG-DMEM 培养基吹打细胞沉淀,200 目细胞筛过滤,于37 °C、5% CO₂、饱和湿度条件下培养。待细胞生长至70%~80%融合时,0.25%胰蛋白酶消化传代。收集第3代细胞,流式细胞仪检测细胞表面分子标志 CD44 和 CD34, Cell Quest 软件分析。分离培养的 ADMSC 呈 CD44 阳性, CD34 阴性^[18]。

1.3 脂肪 MSC-Exo 的提取和鉴定

ADMSC 生长至70%融合时,培养24 h,收集细胞培养上清,800 r/min 离心去除细胞,将收集的上清加入超速离心管中,4 °C、20 000 r/min 离心20 min,去除细胞碎片和凋亡小体,将离心上清转移至新的超速离心管中,100 000 r/min 离心70 min 得到 Exo 沉淀,将 Exo 沉淀加入 PBS 溶解稀释,再次100 000 r/min 离心70 min,弃上清,获得纯 Exo,加入400 μL 的 PBS 溶解,0.22 μm 滤膜过滤除菌。

取10 μL 提取的 Exo,用等体积 PBS 稀释后,滴加于2 mm 的载样铜网上,于室温静置1 min,用3% 醋酸双氧铀溶液室温孵染5 min,用双蒸水轻洗1遍,室温晾干,电子显微镜观察 Exo 的形态。

将提取的 Exo 用 BCA 定量后取15~20 μg, SDS-PAGE 电泳、转膜、封闭后加入 Exo 标志蛋白 CD9 和 CD63 一抗,4 °C 孵育过夜,洗膜,加入二抗。37 °C 孵育1 h,再洗膜,用 ECL 显影发光,在化学发光成像仪上分析 Exo 标志分子 CD9 和 CD63。

1.4 MI 动物模型的建立

将大鼠用100 g/L 水合氯醛以3 mL/kg 剂量腹腔注射麻醉,连接小动物呼吸机(呼吸频率60次/min,潮气量3 mL)。于左胸第4肋间做横形切口,钝性分离皮下组织及肌肉,剪开胸膜,暴露心脏,于左心耳与肺动脉圆锥交界处平左心耳下缘,用7-0号缝合线结扎冠状动脉前降支,以左心室前壁变青紫或苍白色,搏动减弱,心电图示 ST 段抬高(≥0.25 mV)为造模成功。术后肌肉注射青霉素4×10⁵ U/d,连续3天,预防感染。

1.5 超声心动图观察心脏结构和功能

将大鼠用2% 异氟醚吸入麻醉后固定于37 °C 恒温垫上,左胸前区脱毛,采用高频高分辨率超声(Vevo[®] 2100,30-MHz transducer, Visual Sonics)经胸壁测定5个心动周期,评价心脏结构和功能。M 模式测量左心室舒张期末内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)、左心室收缩期末内径(left ventricular end systolic diameter, LVESD)、左心室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening,

LVFS); Simpson's 法测量左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)。

1.6 Masson 染色观察心肌纤维化程度

心室组织石蜡切片脱蜡至水,铬化处理,蒸馏水漂洗,苏木精染液染核10 min,蒸馏水漂洗, Masson 丽春红酸性复红液染10 min,2% 冰醋酸溶液浸洗,1% 磷钼酸溶液5 min,不水洗,直接用苯胺蓝液染5 min,0.2% 冰醋酸溶液浸洗,95% 乙醇、无水乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂封固,镜下观察。心肌细胞细胞质呈红色,细胞核呈蓝褐色,而胶原纤维呈蓝色。

1.7 RT-qPCR 检测自噬相关蛋白 ATG16L1 和 ATG7、NLRP3 炎症小体、促炎细胞因子 IL-1β 和 IL-18 的 mRNA 水平

消化收集心脏成纤维细胞,用 Trizol 裂解后提取 RNA,按照说明书将 RNA 反转录,用 Takara 公司合成的实时定量引物(表1)和 SYBR Green 试剂配制 PCR 反应体系,将样品放入 iCycler (Biorad) 荧光定量 PCR 仪,95 °C 预变性2 min,95 °C 变性10 s,60 °C 退火10 s,72 °C 延伸12 s,共40个循环,温度变化速率为20 °C/s。反应条件设置、荧光型号检测、溶解曲线、熔点温度、原始数据提取和分析均由配套的 Roche Light Cycle Run 5.32 软件完成。

表1. 实时荧光定量 PCR 分析的引物序列

Table 1. Primer sequences for real-time quantitative PCR analysis

| 基因 | 序列 |
|---------|-------------------------------------------------------------------|
| ATG16L1 | Forward: CAGAGCAGCTACTAAGCGACT Reverse: AAAAGGGGAGATTCCGACAGA |
| ATG7 | Forward: TGACCTTCGCGGACCTAAAGA Reverse: CCCGGATTAGAGGGATGCTC |
| NLRP3 | Forward: TGTGAGAAGCAGGTTCTACTCT Reverse: GACTGTTGAGGTCCACACTCT |
| IL-1β | Forward: ATGAGAGCATCCAGCTTCAA Reverse: TGAAGGAAAAGAAGGTGCTC |
| IL-18 | Forward: GTGAACCCAGACCAGACTG Reverse: CCTGGAACACGTTTCTGAAAGA |
| GAPDH | Forward: AGGCCGGTGCTGAGTATGTC Reverse: TGCCTGCTTACCACCTTCT |

1.8 Western blot 检测自噬相关蛋白 ATG16L1 和 ATG7、NLRP3 炎症小体、纤维化相关蛋白 Collagen I 和 Collagen III 的蛋白水平

消化收集心脏成纤维细胞,用含蛋白酶抑制剂

的裂解缓冲液(20 mmol/L Tris, pH 7.4, 150 mmol/L NaCl, 1% TritonX-100, 5 mmol/L EDTA, 10 mg/L Leupeptin, 10 mg/L Aprotinin, 1 mmol/L PMSF)充分裂解, BCA 法进行蛋白定量, 取 50 μ g 蛋白样品进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 100 V 恒压转移 2 h, 5% 脱脂牛奶室温封闭 1 h, 然后将 PVDF 膜与待检测分子的抗体室温孵育 1 h, 4 $^{\circ}$ C 过夜, TBST 缓冲液洗膜 3 次, 每次 10 min, 加入荧光二抗, 室温孵育 1 h, 洗膜 3 次, 每次 10 min。结果用凝胶成像分析系统及 Labimage version 2.7.1 软件(Kapelan GmbH, Halle, Germany)分析蛋白产物条带密度。

1.9 ELISA 检测 IL-1 β 和 IL-18 的水平

离心收集细胞培养上清或大鼠血清, 按照 ELISA 检测试剂盒说明书检测促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的浓度。

1.10 统计学方法

计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 经 Kolmogorov-Smirnov 分

析进行数据的正态性检验。两样本均数的比较, 符合正态分布的采用两独立样本 *t* 检验, 不符合正态分布的采用 Mann-Whitney *U* 检验。多个样本均数的比较, 符合正态分布且方差齐性的采用单因素方差分析(ANOVA), 不符合上述条件的采用 Kruskal-Wallis *H* 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 脂肪 MSC-Exo 的鉴定结果

电子显微镜观察发现, Exo 呈杯口状, 圆形或椭圆形, 直径较均一, 有膜性微囊泡结构, 囊泡内含有致密的云状物质, 为 Exo 内容物(图 1A)。Western blot 检测 Exo 标志分子, 结果显示, Exo 的 CD9 相对表达量是 ADMSC 的 4.91 倍($P < 0.001$), CD63 相对表达量是 ADMSC 的 4.78 倍($P < 0.001$, 图 1B)。

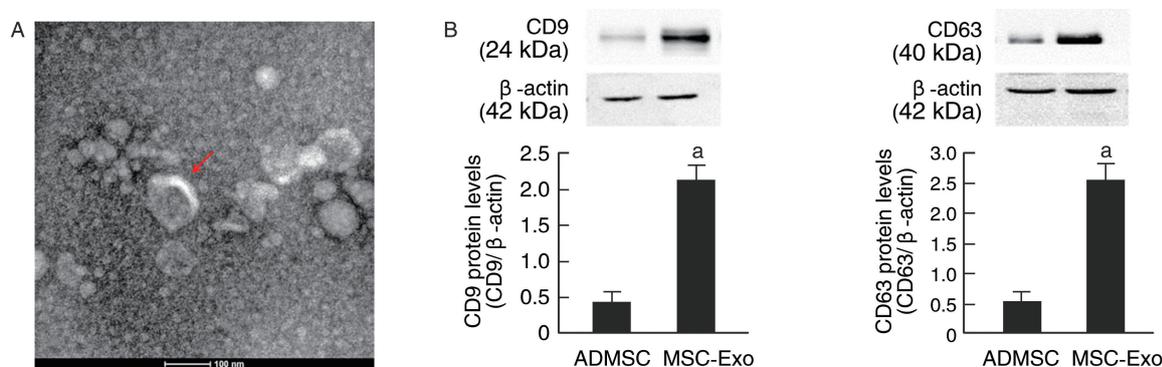


图 1. 脂肪间充质干细胞外泌体的鉴定

A 为电子显微镜下观察外泌体的形态特征; 红色箭头标示为脂肪间充质干细胞来源外泌体; B 为 Western blot 检测 ADMSC 或其来源外泌体 CD9 和 CD63 的表达($n=3$)。a 为 $P < 0.001$, 与 ADMSC 比较。

Figure 1. Identification of adipose derived mesenchymal stem cell exosomes

2.2 心脏成纤维细胞经 H_2O_2 处理后发生自噬和炎症表型的改变

心脏成纤维细胞经 H_2O_2 (100 μ mol/L) 处理 24 h, 收集细胞和上清, 利用 RT-qPCR、Western blot、ELISA 方法检测自噬相关蛋白 ATG16L1 和 ATG7、NLRP3 炎症小体、促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的表达。结果显示, 与对照组相比, H_2O_2 处理组自噬相关蛋白 ATG16L1 的 mRNA 和蛋白表达分别减少 41% 和 50% (均 $P < 0.001$); ATG7 的 mRNA 和蛋白表达分别减少 41% 和 45% (均 $P < 0.001$)。NLRP3 的 mRNA 和蛋白表达分别是对照组的 1.87 倍和 2.65 倍 (均 $P < 0.001$)。炎症因子 IL-1 β 的 mRNA 表达和上清水平分别是对照组的 2.09 倍和 2.14 倍

(均 $P < 0.001$); IL-18 的 mRNA 表达和上清水平分别是对照组的 1.87 倍和 1.92 倍 (均 $P < 0.001$)。提示心脏成纤维细胞经 H_2O_2 刺激后自噬水平降低, NLRP3 炎症小体激活, 炎症因子分泌增加, 发生自噬功能和 NLRP3 炎症小体活性的失衡, 炎症反应加剧(图 2)。

2.3 脂肪 MSC-Exo 调节 MI 后心脏成纤维细胞自噬和 NLRP3 炎症小体的平衡

为了排除其他细胞 Exo 的作用, 我们设立成纤维细胞外泌体(fibroblast exosomes, MEF-Exo)为阴性对照。结扎大鼠冠状动脉前降支制作 MI 动物模型, 于术后当日起经尾静脉分别注射 200 μ g 生理盐水、MEF-Exo、MSC-Exo, 每天 1 次, 连续注射 4 周, 经

酶消化法分离收集心脏成纤维细胞,利用 RT-qPCR、Western blot 检测自噬相关蛋白 ATG16L1 和 ATG7 以及 NLRP3 炎症小体的表达。结果显示,与其他各组相比,脂肪 MSC-Exo 干预组自噬相关蛋白

ATG16L1、ATG7 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著增加,而 NLRP3 的 mRNA 和蛋白表达水平均显著降低,表明脂肪 MSC-Exo 能够恢复 MI 后心脏成纤维细胞自噬功能和 NLRP3 炎症小体活性的平衡(图 3)。

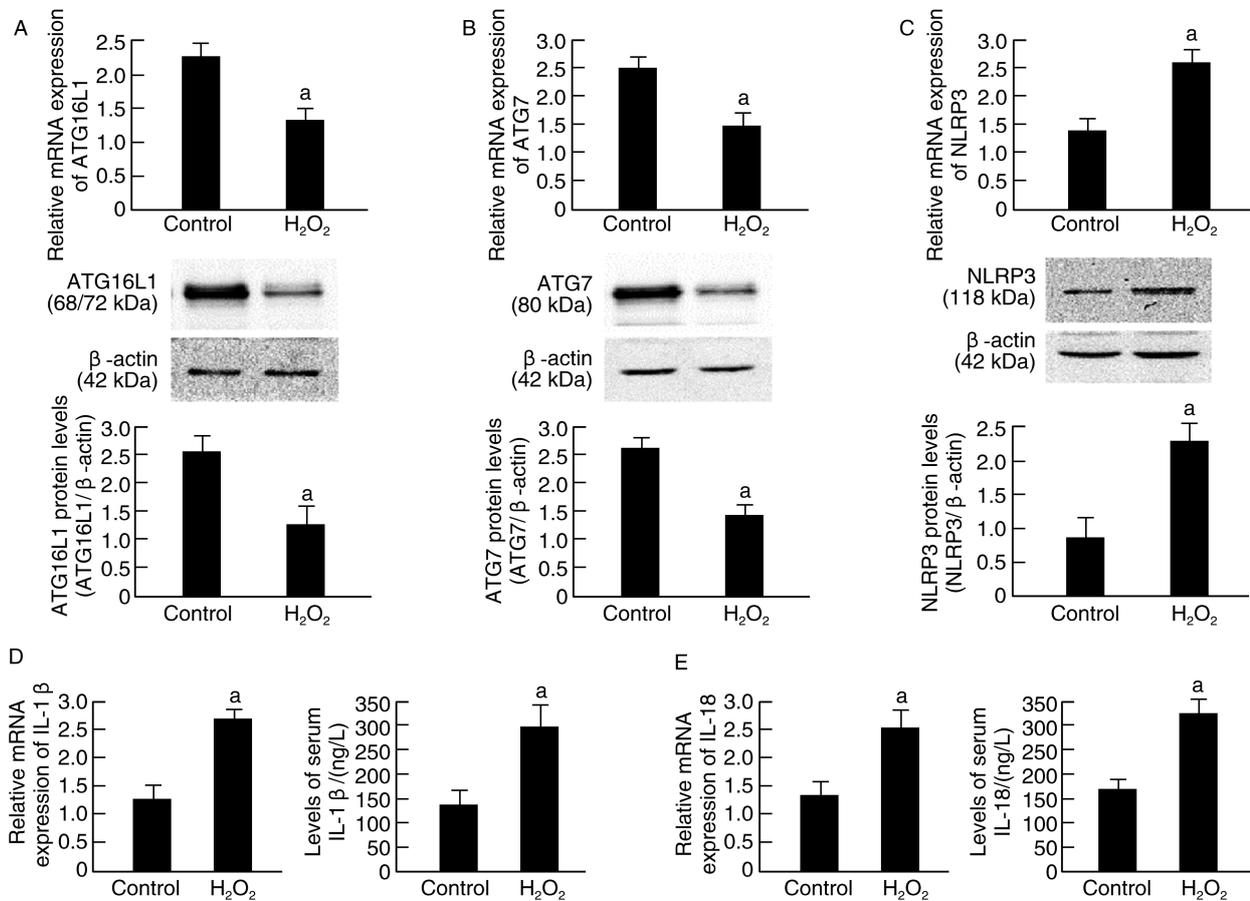


图 2. 心脏成纤维细胞经 H_2O_2 处理后自噬和炎症表型的检测 ($n=20$)

A 为 RT-qPCR 和 Western blot 分别检测 ATG16L1 的 mRNA 和蛋白的相对表达量;B 为 RT-qPCR 和 Western blot 分别检测 ATG7 的 mRNA 和蛋白的相对表达量;C 为 RT-qPCR 和 Western blot 分别检测 NLRP3 的 mRNA 和蛋白的相对表达量;D 为 RT-qPCR 和 ELISA 分别检测细胞 IL-1 β mRNA 相对表达量和上清 IL-1 β 水平;E 为 RT-qPCR 和 ELISA 分别检测细胞 IL-18 mRNA 相对表达量和上清 IL-18 水平。
a 为 $P<0.001$, 与对照组比较。

Figure 2. Detection of autophagy and inflammatory phenotypes in cardiac fibroblasts treated with H_2O_2 ($n=20$)

2.4 脂肪 MSC-Exo 抑制 MI 后炎症反应

收集大鼠心脏成纤维细胞和血清,利用 RT-qPCR 和 ELISA 方法检测促炎细胞因子 IL-1 β 和 IL-18 的 mRNA 表达和水平。结果显示,与其他各组相比,脂肪 MSC-Exo 干预组细胞 IL-1 β 和 IL-18 的 mRNA 表达水平显著降低,同时血清 IL-1 β 和 IL-18 的水平亦显著减低,表明脂肪 MSC-Exo 能够抑制 MI 后心脏成纤维细胞 IL-1 β 和 IL-18 的分泌,抑制炎症反应(图 4)。

2.5 脂肪 MSC-Exo 抑制 MI 后心肌纤维化

大鼠心脏成纤维细胞经 Western blot 法检测纤

维化相关蛋白 Collagen I 和 Collagen III 的表达(图 5A、5B),大鼠心室组织病理切片经 Masson 染色检测心肌纤维化程度(图 5C)。结果显示,与其他各组相比,脂肪 MSC-Exo 干预组纤维化相关蛋白 Collagen I 和 Collagen III 的蛋白表达水平均显著降低。Masson 染色显示,脂肪 MSC-Exo 干预组心肌纤维化程度显著低于其他各组。上述结果表明,脂肪 MSC-Exo 能够上调自噬水平、下调 NLRP3 活性,减少炎症因子 IL-1 β 和 IL-18 的分泌,减轻炎症反应,进而抑制 MI 后心肌纤维化。

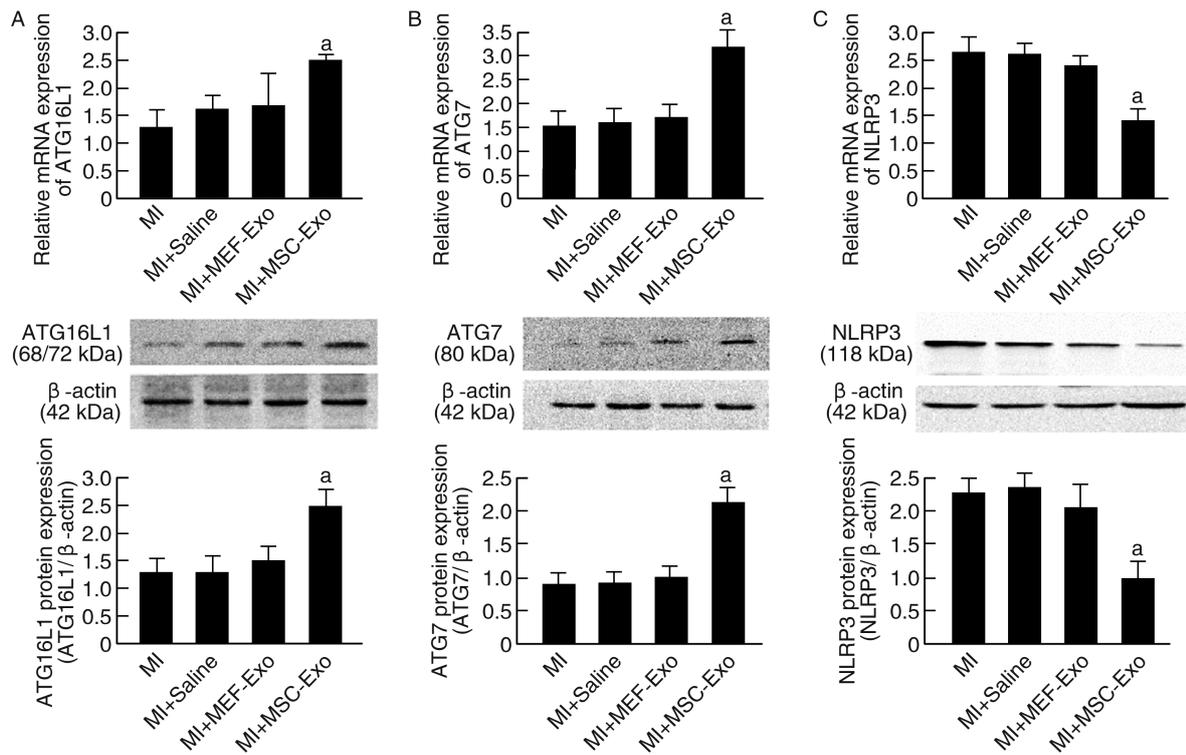


图 3. 脂肪 MSC-Exo 对 MI 后心脏成纤维细胞自噬和 NLRP3 炎症小体的作用 ($n=10$)

A 为 RT-qPCR 和 Western blot 分别检测 ATG16L1 的 mRNA 和蛋白的相对表达量;B 为 RT-qPCR 和 Western blot 分别检测 ATG7 的 mRNA 和蛋白的相对表达量;C 为 RT-qPCR 和 Western blot 分别检测 NLRP3 的 mRNA 和蛋白的相对表达量。a 为 $P<0.001$,与其他三组比较。

Figure 3. Effects of adipose derived mesenchymal stem cell exosomes on autophagy and NLRP3 inflammasome of cardiac fibroblast after myocardial infarction ($n=10$)

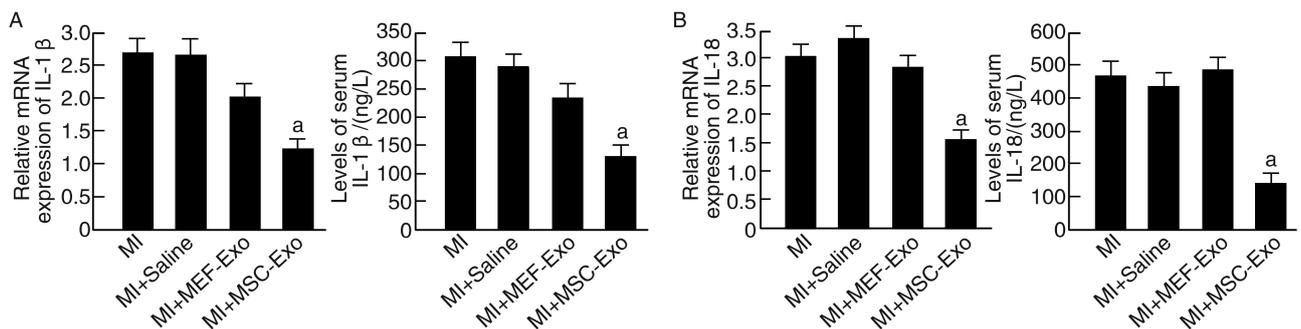


图 4. 脂肪 MSC-Exo 对 MI 后 IL-1 β 和 IL-18 分泌的影响 ($n=10$)

A 为 RT-qPCR 和 ELISA 分别检测细胞 IL-1 β mRNA 表达和血清 IL-1 β 水平;B 为 RT-qPCR 和 ELISA 分别检测细胞 IL-18 mRNA 表达和血清 IL-18 水平。a 为 $P<0.001$,与其他三组比较。

Figure 4. Effects of adipose derived mesenchymal stem cell exosomes on IL-1 β and IL-18 secretion after myocardial infarction ($n=10$)

2.6 脂肪 MSC-Exo 能够改善 MI 后心功能

超声心动图观察 MI 后不同干预组心脏结构和功能,结果显示,脂肪 MSC-Exo 干预组 LVEDD 和 LVESD 明显减小,LVFS 和 LVEF 明显提高,心功能显著改善(表 2)。表明脂肪 MSC-Exo 能够显著抑制 MI 后不良室重塑,改善心功能。

3 讨论

本研究中,我们观察到心脏成纤维细胞经 H_2O_2 处理后发生自噬和炎症表型的改变,表现为自噬相关蛋白 ATG16L1 和 ATG7 水平降低,NLRP3 炎症小体激活,全身炎症反应加剧。脂肪 MSC-Exo 能够恢复 MI 后心脏成纤维细胞的自噬功能,限制 NLRP3

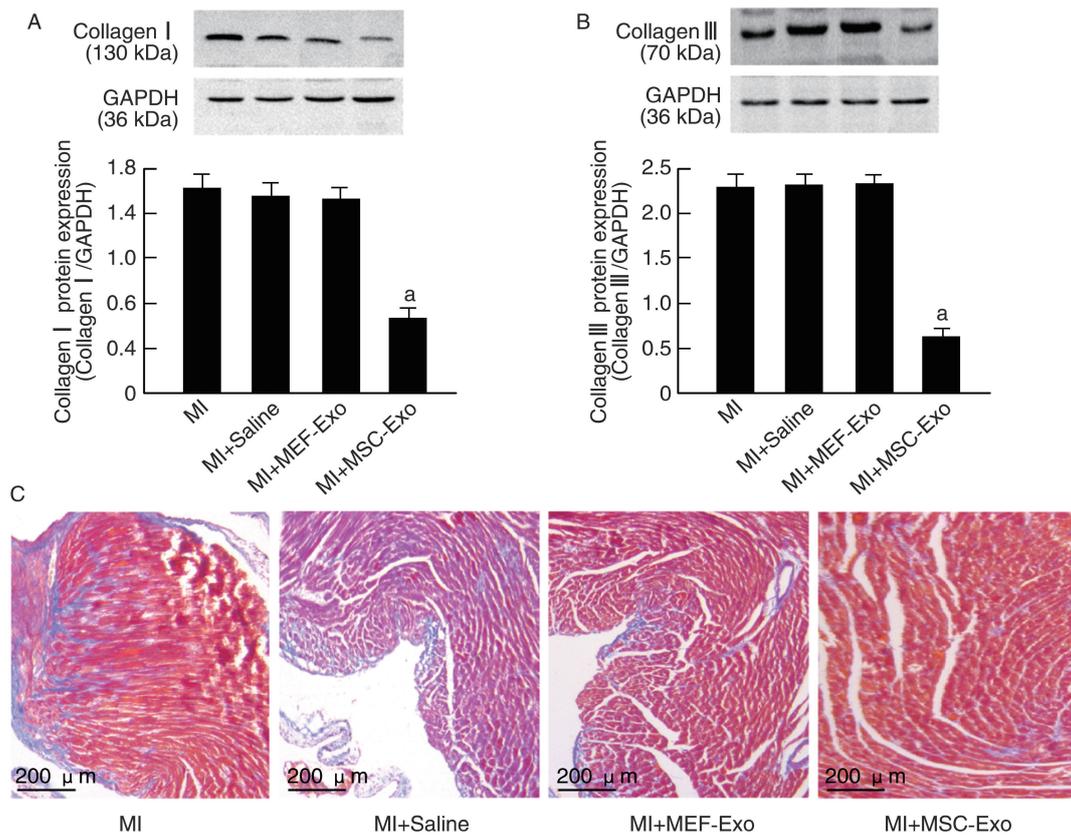


图 5. 心肌纤维化检测($n=10$)

A 为 Western blot 检测 Collagen I 的表达;B 为 Western blot 检测 Collagen III 的表达;C 为 Masson 染色检测心肌纤维化程度(蓝色为胶原纤维)。a 为 $P<0.001$,与其他三组比较。

Figure 5. Myocardial fibrosis testing($n=10$)

表 2. MSC-Exo 对 MI 后心脏结构和功能的影响($n=10$)

Table 2. Effects of MSC-Exo on cardiac structure and function after MI($n=10$)

| 参数 | MI 组 | MI+Saline 组 | MI+MEF-Exo 组 | MI+MSC-Exo 组 | <i>F</i> | <i>P</i> |
|----------|------------|-------------|--------------|-------------------------|----------|----------|
| LVEDD/mm | 7.17±0.28 | 7.11±0.30 | 6.99±0.21 | 4.93±0.35 ^a | 99.749 | <0.001 |
| LVESD/mm | 4.94±0.26 | 5.18±0.22 | 4.81±0.42 | 3.32±0.20 ^a | 66.245 | <0.001 |
| LVEF/% | 24.60±1.26 | 25.00±2.21 | 28.10±1.37 | 36.20±3.12 ^a | 64.020 | <0.001 |
| LVFS/% | 19.00±1.56 | 19.40±1.35 | 19.60±1.43 | 22.50±1.65 ^a | 11.376 | <0.001 |

注:a 为 $P<0.01$,与其他三组相比。

炎症小体的过度激活,抑制炎症反应,进而抑制 MI 后心肌纤维化、保护心功能。本研究结果提示,脂肪 MSC-Exo 能够通过调控心脏成纤维细胞自噬和 NLRP3 炎症小体的平衡,发挥抑制 MI 后不良室重塑的作用。

炎症反应是 MI 后不良室重塑的重要机制^[3]。心脏组织中含有丰富的心脏成纤维细胞,是心肌间质中数目最多的细胞成分。在没有损伤的情况下,心脏成纤维细胞保持静止状态,发挥维持细胞外基质网络的作用;当受到损伤刺激时,心脏成纤维细胞获得促炎表型,分泌大量炎症介质,导

致不良室重塑^[13]。NLRP3 炎症小体是近年来备受关注的多蛋白复合体^[4-5],其激活后促使 IL-1 β 和 IL-18 分泌,它们是重要的循环促炎细胞因子,发挥广阔的促炎生物学效应^[19]。研究证实,NLRP3 炎症小体介导多种慢性炎症性疾病的发生发展,如家族周期性自身炎症反应、关节炎、多发性硬化、痛风、肿瘤、阿尔茨海默病、2 型糖尿病、代谢综合征、动脉粥样硬化、心房颤动、心力衰竭等^[20]。新近研究表明,自噬是 NLRP3 炎症小体的重要调控机制^[12]。研究揭示,自噬相关基因缺陷会增强 NLRP3 炎症小体的激活,而诱导自噬可以抑制 NLRP3 炎症

小体的激活。比如,Beclin1 和 LC3B 基因缺陷的小鼠单核巨噬细胞分泌 IL-1 β 和 IL-18 增加^[21];小鼠肝组织 Beclin1 基因突变,增加细胞凋亡和组织损伤,还促进炎症发展为脂肪性肝炎和肝细胞癌^[22];小鼠肝源性巨噬细胞中 ATG16L1 或 ATG7 缺失导致内毒素处理后 Caspase-1 激活和 IL-1 β 加工增加^[23];Han 等^[24]用小分子山奈酚诱导自噬可以促进 NLRP3 炎症小体成分降解,减少 NLRP3 炎症小体激活,而自噬抑制剂 3-甲基腺嘌呤(3-methyladenine,3-MA)则抵消这种作用。本研究中,我们发现在体外用 H₂O₂ 处理心脏成纤维细胞 ATG16L1 和 ATG7 表达降低,NLRP3 炎症小体激活,IL-1 β 和 IL-18 分泌增加。表明心脏成纤维细胞在受到缺血缺氧刺激后,自噬程度降低,NLRP3 炎症小体过度激活,这可能是 MI 后不良室重塑的重要分子机制之一。

MSC 是来源于中胚层的多能干细胞,具有调节免疫、抑制室重塑、保护心脏功能的作用^[18]。近年来的研究发现,MSC 的生物学特性并不完全依赖于它们自身的增殖和分化,MSC 能够通过产生 Exo 发挥调节并逆转疾病发展的强大作用^[16-17]。更重要的是,MSC-Exo 能够调节自噬和炎症,进而调控疾病的发生。比如,人脐带 MSC-Exo 通过靶向 mTOR 复合物 1 的调节相关蛋白(regulatory associated protein of mTOR complex 1 gene,RPTOR)诱导自噬来改善脂多糖诱导的急性肺损伤^[25];脂肪 MSC-Exo 可以提高 ATP 水平,防止氧化应激诱导的心肌细胞凋亡^[26];骨髓 MSC-Exo 可以通过磷脂酰肌醇 3 激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)/蛋白激酶 B(protein kinase B,PKB)途径^[27]或 Wnt/ β -catenin 途径^[28],防止心肌缺血再灌注损伤后的不良室重塑。本研究中,我们观察到脂肪 MSC-Exo 能够上调 ATG16L1 和 ATG7,下调 NLRP3 炎症小体,抑制 IL-1 β 和 IL-18 分泌,进而抑制心肌纤维化,发挥抑制不良室重塑、保护心功能的作用。

Exo 是细胞在活化或受到刺激时,向细胞外释放的微囊泡,具有脂质双层膜结构,是细胞间物质信息交换的一种重要方式^[29]。Exo 含有丰富的蛋白质、mRNA、lncRNA、miRNA、circRNA、细胞因子等多种生物活性物质,参与调控细胞增殖、分化、死亡等众多病理生理过程^[30]。Exo 和靶细胞之间的相互作用是非常特异的,其稳定的磷脂双分子层膜结构能够保护其内部物质在细胞外环境中长期存在而不被降解或稀释,并能够通过组织液或血液输送

到远隔靶向受体^[31]。Exo 不但可以作为疾病诊断和病情评估的生物学标志,而且能够成为靶向递送生物学信息的理想工具^[32]。今后,我们将通过高通量测序等方法进一步深入探究脂肪 MSC-Exo 调控自噬和 NLRP3 炎症小体的具体生物活性物质及分子机制,并以期实现靶向递送,对防治 MI 后不良室重塑、改善 MI 患者远期预后具有十分重要的临床意义。

[参考文献]

- [1] TSAO C W, ADAY A W, ALMARZOOQ Z I, et al. Heart disease and stroke statistics-2023 update: a report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2023, 147(8): e93-e621.
- [2] LEANCA S A, CRISU D, PETRIS A O, et al. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: from pathophysiology to treatment[J]. *Life (Basel)*, 2022, 12(8): 1111.
- [3] 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.
- [4] XIAO L, MAGUPALLI V G, WU H. Cryo-EM structures of the active NLRP3 inflammasome disk [J]. *Nature*, 2023, 613(7944): 595-600.
- [5] FU J N, WU H. Structural mechanisms of NLRP3 inflammasome assembly and activation[J]. *Annu Rev Immunol*, 2023, 41: 301-316.
- [6] DUEWELL P, KONO H, RAYNER K J, et al. NLRP3 inflammasomes are required for atherogenesis and activated by cholesterol crystals [J]. *Nature*, 2010, 464(7293): 1357-1361.
- [7] VANDANMAGSAR B, YOUM Y H, RAVUSSIN A, et al. The NLRP3 inflammasome instigates obesity-induced inflammation and insulin resistance[J]. *Nat Med*, 2011, 17(2): 179-188.
- [8] KAWAGUCHI M, TAKAHASHI M, HATA T, et al. Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2011, 123(6): 594-604.
- [9] HE J, YANG Y, PENG D Q. Monosodium urate (MSU) crystals increase gout associated coronary heart disease (CHD) risk through the activation of NLRP3 inflammasome [J]. *Int J Cardiol*, 2012, 160(1): 72-73.
- [10] XIAO H, LU M, LIN T Y, et al. Sterol regulatory element binding protein 2 activation of NLRP3 inflammasome in endothelium mediates hemodynamic-induced atherosclerosis susceptibility [J]. *Circulation*, 2013, 128(6): 632-642.

- [11] CAO W Y, LI J H, YANG K P, et al. An overview of autophagy: mechanism, regulation and research progress [J]. *Bull Cancer*, 2021, 108(3): 304-322.
- [12] BIASIZZO M, KOPITAR-JERALA N. Interplay between NLRP3 inflammasome and autophagy [J]. *Front Immunol*, 2020, 11: 591803.
- [13] SHINDE A V, FRANGOIANNIS N G. Fibroblasts in myocardial infarction: a role in inflammation and repair [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2014, 70: 74-82.
- [14] LIU Q, DENG C Q, XING X L, et al. Silencing RIPK1/mTORC1 signalling attenuated the inflammation and oxidative stress in diabetic cardiomyopathy [J]. *Exp Cell Res*, 2023, 422(2): 113417.
- [15] HOSSEINPOUR A, KHESHTI F, KAZEMI A, et al. Comparing the effect of bone marrow mono-nuclear cells with mesenchymal stem cells after acute myocardial infarction on improvement of left ventricular function: a Meta-analysis of clinical trials [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1): 203.
- [16] LAI R C, CHEN T S, LIM S K. Mesenchymal stem cell exosome: a novel stem cell-based therapy for cardiovascular disease [J]. *Regen Med*, 2011, 6(4): 481-492.
- [17] NI J, SUN Y X, LIU Z. The potential of stem cells and stem cell-derived exosomes in treating cardiovascular diseases [J]. *J Cardiovasc Transl Res*, 2019, 12(1): 51-61.
- [18] 樊艳, 王建军, 魏峰, 等. 脂肪间充质干细胞移植对心肌梗死后炎症反应及心室重构的影响 [J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(6): 900-905.
- FAN Y, WANG J J, WEI F, et al. Effect of adipose-derived mesenchymal stem cell transplantation on inflammatory response and ventricular remodeling after myocardial infarction [J]. *Chin J Tissue Eng Res*, 2014, 18(6): 900-905.
- [19] KELLEY N, JELTEMA D, DUAN Y H, et al. The NLRP3 inflammasome: an overview of mechanisms of activation and regulation [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13): 3328.
- [20] HENAO-MEJIA J, ELINAV E, STROWIG T, et al. Inflammasomes: far beyond inflammation [J]. *Nat Immunol*, 2012, 13(4): 321-324.
- [21] NAKAHIRA K, HASPEL J A, RATHINAM V A K, et al. Autophagy proteins regulate innate immune responses by inhibiting the release of mitochondrial DNA mediated by the NALP3 inflammasome [J]. *Nat Immunol*, 2011, 12(3): 222-230.
- [22] MATHEW R, KARP C M, BEAUDOIN B, et al. Autophagy suppresses tumorigenesis through elimination of p62 [J]. *Cell*, 2009, 137(6): 1062-1075.
- [23] SAITOH T, FUJITA N, JANG M H, et al. Loss of the autophagy protein Atg16L1 enhances endotoxin-induced IL-1beta production [J]. *Nature*, 2008, 456(7219): 264-268.
- [24] HAN X J, SUN S F, SUN Y M, 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.
- [25] WEI X X, YI X M, LV H J, et al. Correction: microRNA-377-3p released by mesenchymal stem cell exosomes ameliorates lipopolysaccharide-induced acute lung injury by targeting RPTOR to induce autophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(9): 746.
- [26] LIU Z, XU Y Q, WAN Y G, et al. Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells prevent cardiomyocyte apoptosis induced by oxidative stress [J]. *Cell Death Discov*, 2019, 5: 79.
- [27] ARSLAN F, LAI R C, SMEETS M B, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosomes increase ATP levels, decrease oxidative stress and activate PI3K/Akt pathway to enhance myocardial viability and prevent adverse remodeling after myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Stem Cell Res*, 2013, 10(3): 301-312.
- [28] CUI X J, HE Z Y, LIANG Z H, et al. Exosomes from adipose-derived mesenchymal stem cells protect the myocardium against ischemia/reperfusion injury through Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol*, 2017, 70(4): 225-231.
- [29] BARILE L, MOCETTI T, MARBAN E, et al. Roles of exosomes in cardioprotection [J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(18): 1372-1379.
- [30] 高爽, 任雪雷, 韩翔宇, 等. 间充质干细胞来源的外泌体在心血管疾病中的研究现状 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(11): 1006-1012.
- GAO S, REN X L, HAN X Y, et al. Research progress of exosomes derived from mesenchymal stem cells in cardiovascular diseases [J]. *Chin J Arterioscler*, 2022, 30(11): 1006-1012.
- [31] 于晓朴, 边云飞, 庞有成, 等. 外泌体 miRNA 在缺血性心脏病中的作用机制及靶向治疗前景 [J]. *中国动脉硬化杂志*, 2021, 29(2): 171-178.
- YU X P, BIAN Y F, PANG Y C, et al. The mechanism of exosome miRNA in ischemic heart disease and the prospect of targeted therapy [J]. *Chin J Arterioscler*, 2021, 29(2): 171-178.
- [32] ZAMANI P, FEREDOUNI N, BUTLE AE, et al. The therapeutic and diagnostic role of exosomes in cardiovascular diseases [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2019, 29(6): 313-323.

(此文编辑 许雪梅)