

· 基础研究 ·

热量限制对小鼠心肌缺血/再灌注损伤的影响及其作用机制

王文丽, 贺忠梅, 吉晔楠, 孙思雨, 杨瑞瑞, 燕子, 曹济民
山西医科大学生理学系 细胞生理学教育部重点实验室, 山西 太原 030001

摘要: 目的 探讨热量限制(caloric restriction, CR)对小鼠心肌缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia / reperfusion injury, MI / RI)的影响及其作用机制。方法 将C57小鼠随机分为正常饮食组(AL组, 自由摄食)和CR组(饮食量每周递减10%),持续8周,监测体重变化。每组再分为假手术组和MI / RI组,共4组,即AL + Sham组、AL + I / R组和CR + Sham组、CR + I / R组,其中MI / RI组小鼠结扎冠状动脉左前降支30 min后,再灌注24 h;Sham组只穿线不结扎。伊文思兰 / TTC染色法检测小鼠心肌缺血和梗死面积;HE染色法对心肌组织进行病理学观察;相应试剂盒检测心肌组织中乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性及肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB, CK-MB)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量;ELISA法检测血清中IL-1 β 及IL-18含量;Western blot法检测心肌组织中细胞焦亡相关蛋白表达水平。结果 8周后,CR组小鼠体重质量[(24.54 \pm 0.41) g]明显低于AL组[(31.46 \pm 0.25) g] ($t = 14.34, P < 0.05$)。与AL + I / R组比较,CR + I / R组小鼠心肌缺血区面积差异无统计学意义($t = 0.7830, P > 0.05$),心梗面积明显减小($t = 7.250, P < 0.01$);心肌排列相对整齐,病变程度明显减轻;LDH活性及CK-MB、MDA含量明显降低(t 分别为4.331、2.875、5.343, P 均 < 0.05),SOD活性明显增加($t = 4.211, P < 0.05$);血清中IL-1 β 及IL-18含量均明显降低(t 分别为3.375和4.266, P 均 < 0.05);心肌组织中Nod样蛋白受体3(nod-like receptor protein 3, NLRP3)、gasdermin蛋白家族D(gasdermin D, GSDMD)、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speckle-like protein, ASC)及caspase-1的表达水平均明显降低(t 分别为3.412、3.420、3.480、2.585, P 均 < 0.05)。结论 CR可减轻小鼠MI / RI,其作用机制与抑制心肌细胞焦亡有关。

关键词: 缺血 / 再灌注损伤;热量限制;细胞焦亡

中图分类号: R331.3 文献标识码: A 文章编号: 1004-5503(2023)02-0166-06

Effect of caloric restriction on myocardial ischemia / reperfusion injury in mice and its mechanism

WANG Wen-li, HE Zhong-mei, JI Ye-nan, SUN Si-yu, YANG Rui-rui, YAN Zi, CAO Ji-min

Department of Physiology, Key Laboratory for Cellular Physiology of Ministry of Education, Shanxi Medical University, Taiyuan 030001, Shanxi Province, China

Corresponding author: HE Zhong-mei, E-mail: hezmei@126.com

Abstract: Objective To investigate the effect of caloric restriction (CR) on myocardial ischemia / reperfusion injury (MI / RI) in mice and its mechanism. **Methods** C57 mice were randomly divided into normal diet group (AL group, free feeding) and CR group (diet decreased by 10% every 2 weeks) for 8 weeks and monitored for weight changes. Each group was divided into sham operation group and MI / RI group, total 4 groups, AL + Sham group, AL + I / R group, CR + Sham group and CR + I / R group). The left anterior descending coronary artery was ligated for 30 minutes and then reperfused for 24 hours in mice of MI / RI group and mice in Sham group were only threaded but not ligated. The mice were determined for myocardial ischemia and infarct size by Evans blue / TTC staining, observed for the pathology of myocardium by HE staining, determined for the activities of lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and the contents of creatine kinase-MB (CK-MB)

基金项目: 山西省自然科学基金(201601D011115);山西省回国留学人员科研项目(2020-078).

通信作者: 贺忠梅, E-mail: hezmei@126.com

and malondialdehyde (MDA) in myocardium by the corresponding kits, determined for serum levels of IL-1 β and IL-18 by ELISA and detected for the expression of pyroptosis-associated proteins in myocardium by Western blot. **Results** After 8 weeks, the weights of mice in CR group [(24.54 \pm 0.41) g] were significantly lower than those in AL group [(31.46 \pm 0.25) g] ($t = 14.34, P < 0.05$). Compared with those in AL+I/R group, the area of myocardial ischemia in CR+I/R group showed no significant difference ($t = 0.7830, P > 0.05$), while the area of myocardial infarction decreased significantly ($t = 7.250, P < 0.01$); The myocardial arrangement was relatively neat, and the degree of pathological changes was obviously reduced; LDH activity, CK-MB and MDA contents decreased significantly ($t = 4.331, 2.875$ and 5.343 respectively, each $P < 0.05$), while SOD activity increased significantly ($t = 4.211, P < 0.05$); Serum levels of IL-1 β and IL-18 decreased significantly ($t = 3.375$ and 4.266 respectively, each $P < 0.05$); The expression levels of nod-like receptor protein 3 (NLRP3), gasdermin D (GSDMD), apoptosis-associated speckle-like protein (ASC) and caspase-1 significantly decreased ($t = 3.412, 3.420, 3.480$ and 2.585 respectively, each $P < 0.05$). **Conclusion** CR alleviated MI/R I in mice, and its mechanism was related to the inhibition of cardiac pyroptosis.

Keywords: Ischemia / reperfusion injury; Caloric restriction; Pyroptosis

心血管疾病位居全球人类死因的首位,且发病率及死亡率呈逐年上升趋势^[1-2]。目前,对急性缺血性心脏病患者的主要治疗方式为缺血区域再灌注,这是提高救治成功率、改善患者生活质量的重要措施^[3]。研究表明,单纯再灌注疗法可能加重已有的缺血性心肌损伤,甚至威胁患者生命,即心肌缺血/再灌注损伤(myocardial ischemia / reperfusion injury, MI / RI)^[4]。MI / RI的发生机制与氧自由基生成过多,中性粒细胞浸润,线粒体结构与功能受损,心肌细胞坏死、凋亡及焦亡等密切相关^[5-6]。

细胞焦亡(pyroptosis)是由 gasdermin 蛋白家族 D (gasdermin D, GSDMD)介导的一种新型程序性细胞死亡方式,表现为 Nod 样蛋白受体 3(nod-like receptor protein 3, NLRP3)炎性小体活化、caspase-1 激活及细胞膜孔形成,胞浆内 IL-1 β 和 IL-18 释放,从而放大炎症级联反应^[7]。细胞焦亡与细胞凋亡有相似特征,如 DNA 损伤、核固缩和 caspase 依赖性,但细胞焦亡有其特殊的形态学特征,如焦亡细胞会发生染色质浓缩和 DNA 断裂,但细胞核仍保持完整^[8];焦亡过程产生的 DNA 损伤不依赖 caspase 活化的 DNA 酶(caspase activated DNase, CAD)^[9];细胞焦亡时炎症诱导的孔隙形成导致细胞肿胀和胞膜渗透溶解,而凋亡的细胞膜是完整的^[8]。有研究发现,细胞焦亡和相关炎症小体激活在动脉粥样硬化、心肌梗死、MI / RI 等心血管疾病进展中发挥重要作用^[10-11]。热量限制(caloric restriction, CR)是一种抗衰老、抗肥胖、推迟或减少老龄相关疾病的饮食调控方法。研究发现,CR 对心血管系统具有多重保护作用,可防止血管发生动脉粥样硬化,提高心肌耐受性,延缓心脏衰老^[12]。另有研究报道,在大鼠 MI / RI 模型中,CR 可通过减少活性氧自由基(reactive oxygen species,

ROS)的产生改善 MI / RI^[13],但 CR 对 MI / RI 产生的影响与细胞焦亡的相关性尚未明确。因此,本研究在对小鼠进行 CR 干预基础上,构建 MI / RI 模型,观察细胞焦亡情况,以评价 CR 对 MI / RI 的保护作用,并探讨相关机制。

1 材料与方法

1.1 主要试剂 伊文思蓝 / TTC 试剂、SDS-PAGE 凝胶试剂盒及蛋白酶抑制剂苯甲基磺酰氟(phenylmethanesulfonyl fluoride, PMSF)均购自北京索莱宝技术有限公司;超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性、丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量及乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活性检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB, CK-MB)含量检测试剂盒购自武汉 Bio-Swamp 公司;IL-1 β 及 IL-18 ELISA 检测试剂盒均购自北京 Sino Biological 公司;HRP 标记的羊抗兔 IgG 和兔抗 GAPDH 多克隆抗体均购自北京中杉金桥生物有限公司;超敏 ECL 化学发光试剂盒购自美国 Affinity 公司;兔抗 NLRP3 及 caspase-1 多克隆抗体均购自沈阳万类生物有限公司;兔抗凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speckle-like protein, ASC)多克隆抗体购自中国 ABclonal 公司;兔抗 GSDMD 多克隆抗体购自美国 Abcam 公司。

1.2 实验动物 SPF 级 C57 小鼠,40 只,雄性,8 月龄,体质量 25 ~ 30 g,由北京市昌扬西山养殖场提供,动物许可证号为:SCXK(京)2016-0002。本实验对小鼠的所有处理均以科研为目的进行养殖和使用,且按照动物伦理相关规定进行(文件号:SYDL2019012)。

1.3 动物分组及处理 将 40 只小鼠随机分为正常饮

食组(AL组)和CR组,每组20只,AL组小鼠每日自由摄食;CR组小鼠控制日进食量,每2周递减10%,持续8周,监测体质量变化。每组再分为假手术组和MI/RI组,共4组,即AL+Sham组、AL+I/R组和CR+Sham组、CR+I/R组,每组10只。将AL+I/R组和CR+I/R组小鼠用七氟醚麻醉后,气管插管,连接小动物呼吸机,于左侧第3~4肋间开胸,暴露心脏,结扎冠状动脉左前降支,30 min后松开结扎线再灌注24 h;相应Sham组只穿线不结扎。

1.4 各组小鼠心肌缺血和梗死面积的测定 采用伊文思兰/TTC染色法。再灌注24 h后,原位结扎冠状动脉,右心腔注射0.2 mL 2%伊文思蓝,钳夹腹主动脉,30 s后剪下心脏,0.9%氯化钠溶液冲洗,-80 °C放置5 min;取出,将心脏组织切成1~1.5 mm厚的切片,放入预热的2% TTC中,37 °C避光孵育30 min;置多聚甲醛中固定30 min,拍照,计算心肌缺血区面积和梗死面积。假手术组未经缺血再灌注手术,因此未进行伊文思兰/TTC染色。

1.5 各组小鼠心肌组织病理学观察 采用HE染色法。将小鼠心肌组织置于10%甲醛溶液中固定,石蜡包埋后常规切片,将切片置65 °C烤炙1 h;经二甲苯脱蜡及酒精梯度脱水后进行常规HE染色,置光镜下观察。

1.6 各组小鼠心肌组织损伤情况的测定 取20 mg小鼠心肌组织,置EP管中,加入180 μ L的0.9%氯化钠溶液,于冰上剪碎,超声粉碎后,3 000 \times g离心10 min,收集上清,采用相应试剂盒检测LDH、SOD活性及CK-MB、MDA含量。

1.7 各组小鼠血清中IL-1 β 及IL-18含量的检测 采用ELISA法。再灌注24 h后,经小鼠腹主动脉采血,分离血清,采用相应试剂盒检测血清中IL-1 β 及IL-18含量。

1.8 各组小鼠心肌组织细胞中焦亡相关蛋白表达水平的检测 采用Western blot法。再灌注24 h后,用RIPA裂解液提取各组小鼠心脏组织蛋白,经12% SDS-PAGE分离后,转移至PVDF膜,用5%脱脂奶粉室温封闭2 h;分别加入兔抗NLRP3、GSDMD、ASC、caspase-1多克隆抗体(均1:1 000稀释),4 °C孵育过夜;用TBST洗涤3次,加入HRP标记的羊抗兔IgG(均1:2 000稀释),室温孵育2 h;ECL法显色。采用Image J软件分析条带的灰度值,目的蛋白与GAPDH灰度值的比值表示目的蛋白相对表达水平。

1.9 统计学分析 应用Graphpad Prism 6.02软件进行统计学分析,试验数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析(one-way

ANOVA),两组比较采用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠体质量变化 AL组小鼠体质量较平稳,呈略增趋势,而CR组小鼠体质量有所降低。8周后,CR组小鼠体质量[(24.54 \pm 0.41) g]明显低于AL组[(31.46 \pm 0.25) g],且差异有统计学意义($t = 14.34$, $P < 0.05$),见图1。

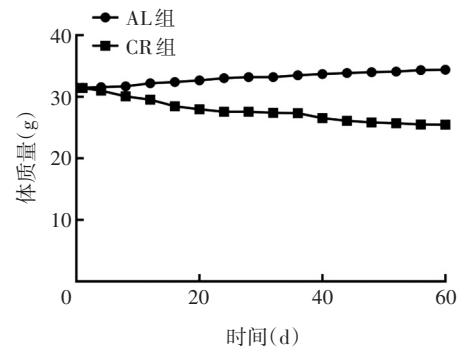


图1 各组小鼠的体质量

Fig. 1 Body weights of mice in various groups

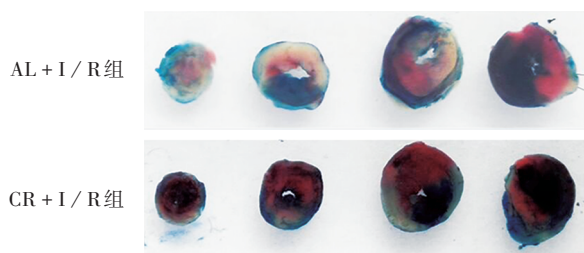
2.2 各组小鼠的心肌缺血和梗死面积 AL+I/R组及CR+I/R组小鼠心肌缺血区面积分别为(72.04 \pm 4.50)%和(76.28 \pm 3.01)%,差异无统计学意义($t = 0.7830$, $P > 0.05$);心梗面积分别为(73.33 \pm 3.14)%和(47.53 \pm 1.69)%,CR+I/R组较AL+I/R组明显减少($t = 7.250$, $P < 0.01$)。见图2。

2.3 各组小鼠心肌组织病理学观察 AL+Sham及CR+Sham组小鼠心肌纤维排列整齐;AL+I/R组小鼠心肌纤维断裂,失去正常的整齐排列结构,并伴有心肌细胞的坏死,CR+I/R组小鼠心肌纤维排列则相对整齐,病理改变明显减轻。见图3。

2.4 各组小鼠心肌组织的损伤情况 与AL+Sham组比较,AL+I/R组小鼠心肌组织中的LDH活性及CK-MB、MDA含量明显增加(t 分别为7.691、5.051、5.515, P 均 < 0.01),SOD活性明显降低($t = 7.458$, $P < 0.05$);与AL+I/R组比较,CR+I/R组LDH活性及CK-MB、MDA含量明显降低(t 分别为4.331、2.875、5.343, P 均 < 0.05),SOD活性明显增加($t = 4.211$, $P < 0.05$)。见表1。表明CR能改善MI/RI所致的心肌损伤。

2.5 各组小鼠血清中IL-1 β 及IL-18的含量 与AL+Sham组比较,AL+I/R组小鼠血清中IL-1 β 及IL-18含量明显升高(t 分别为6.626和13.500, P 均 < 0.05);

与AL+I/R组比较,CR+I/R组小鼠血清中IL-1 β 及IL-18含量明显降低(t 分别为3.375和4.266, P 均<0.05)。见表2。表明CR可降低MI/RI后炎症因子IL-1 β 及IL-18的表达。



注:每组4幅图分别为小鼠心脏的4个横切面。

图2 小鼠心肌缺血和梗死面积的比较

Fig. 2 Comparison of myocardial ischemia and infarct size in mice

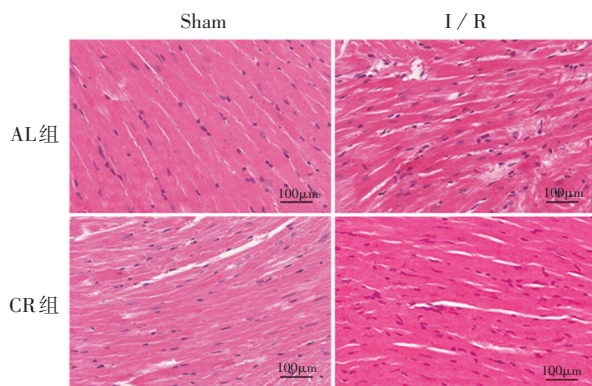


图3 各组小鼠心肌组织的镜下观察(HE染色, $\times 200$)

Fig. 3 Microscopy of myocardial tissue of mice in various groups (HE staining, $\times 200$)

表1 各组小鼠心肌组织中LDH、SOD的活性及CK-MB、MDA的含量($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Tab. 1 Activity of LDH and SOD and content of CK-MB and MDA in myocardium of mice in various groups ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	LDH (U/L)	CK-MB (ng/mL)	SOD (U/mL)	MDA (nmol/mL)
AL+Sham	7821 \pm 241.1	10.24 \pm 0.33	138.7 \pm 4.45	6.24 \pm 0.43
AL+I/R	11626 \pm 432.0 ^{aa}	14.12 \pm 0.69 ^{aa}	102.7 \pm 1.89 ^a	9.28 \pm 0.34 ^{aa}
CR+Sham	6101 \pm 533.6	9.52 \pm 0.59	141.9 \pm 4.46	4.89 \pm 0.76
CR+I/R	9613 \pm 171.4 ^b	12.06 \pm 0.18 ^b	119.5 \pm 3.51 ^b	7.29 \pm 0.15 ^b

注:与AL+Sham组比较,a表示 $P < 0.05$,aa表示 $P < 0.01$;与AL+I/R组比较,b表示 $P < 0.05$ 。

2.6 各组小鼠心肌组织中细胞焦亡相关蛋白的表达水平 与AL+Sham组比较,AL+I/R组小鼠心肌

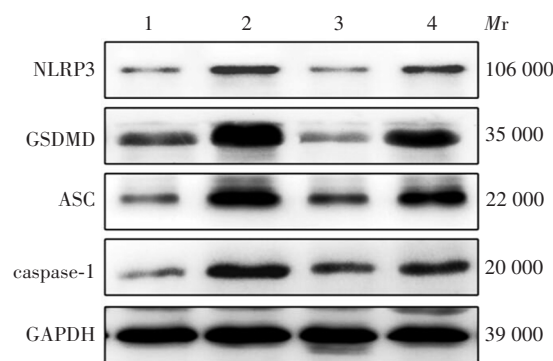
组织细胞中NLRP3、GSDMD、ASC、caspase-1的相对表达水平显著上调(t 分别为5.919、4.071、7.033、6.495, P 均<0.01);与AL+I/R组比较,CR+I/R组的NLRP3、GSDMD、ASC、caspase-1蛋白表达水平分别降低了32%、36%、26%和30%,差异均有统计学意义(t 分别为3.412、3.420、3.480、2.585, P 均<0.05)。见图4和表3。

表2 ELISA法检测各组小鼠血清中IL-1 β 及IL-18的含量($\text{pg/mL}, \bar{x} \pm s, n = 5$)

Tab. 2 Determination of serum levels of IL-1 β and IL-18 in mice of various groups by ELISA ($\text{pg/mL}, \bar{x} \pm s, n = 5$)

组别	IL-1 β	IL-18
AL+Sham	23.68 \pm 0.88	234.9 \pm 12.38
AL+I/R	55.39 \pm 4.71 ^a	746.3 \pm 54.21 ^a
CR+Sham	24.00 \pm 0.94	210.6 \pm 27.02
CR+I/R	37.96 \pm 2.13 ^b	500.6 \pm 19.46 ^b

注:与AL+Sham组比较,a表示 $P < 0.05$;b表示与AL+I/R组比较, $P < 0.05$ 。



1:AL+Sham组;2:AL+I/R组;3:CR+Sham组;4:CR+I/R组。

图4 Western blot法检测各组小鼠心肌组织中细胞焦亡相关蛋白的表达

Fig. 4 Western blotting of expression of pyroptosis-associated proteins in myocardial tissue of mice in various groups

表3 各组小鼠心肌组织细胞中NLRP3、GSDMD、ASC、caspase-1的相对表达水平($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Tab. 3 Relative expression levels of NLRP3, GSDMD, ASC and caspase-1 in myocardial tissue of mice in various groups ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	NLRP3	GSDMD	ASC	caspase-1
AL+Sham	0.44 \pm 0.05	0.49 \pm 0.08	0.39 \pm 0.07	0.36 \pm 0.04
AL+I/R	1.06 \pm 0.09 ^a	1.03 \pm 0.10 ^a	0.97 \pm 0.04 ^a	0.76 \pm 0.05 ^a
CR+Sham	0.47 \pm 0.04	0.43 \pm 0.07	0.39 \pm 0.02	0.37 \pm 0.03
CR+I/R	0.72 \pm 0.03 ^b	0.66 \pm 0.04 ^b	0.72 \pm 0.06 ^b	0.53 \pm 0.07 ^b

注:a表示与AL+Sham组比较, $P < 0.01$;b表示与AL+I/R组比较, $P < 0.05$ 。

3 讨论

CR 是科学家于 1935 年提出的一种纯饮食调节方案,指摄食种类正常、摄入量总量减少 30%~40%,同时保证必需氨基酸的摄入。CR 能够延缓机体衰老,延长寿命,这种保护效应与降低机体新陈代谢,减少氧自由基产生有关^[14-15]。非药物的饮食调控可避免药物的毒副作用,但这种方法也受到一些质疑,因此探讨其对机体保护作用的具体机制是进行科学推广的一项重要环节。DAVID 等^[16]报道,在异丙肾上腺素诱导的心肌肥厚小鼠模型中,CR 可激活抗氧化酶 SOD 和 GSH-Px 的活性,调节细胞内的氧化还原平衡。另外,用间歇性禁食模拟 CR 可减小大鼠的心肌梗死面积,减少心肌细胞凋亡,降低心肌组织肥厚程度,改善心室重构^[17-18]。本研究发现,CR 对小鼠 MI/RI 具有保护作用,即 CR 能明显减少 MI/RI 引起的心肌组织 LDH 与 CK-MB 释放($P < 0.05$),减小心肌梗死面积($P < 0.01$),改善心肌组织的病理变化,同时能够减轻 MI/R 所致的氧自由基过度生成($P < 0.05$)。

细胞焦亡是一种新发现的细胞死亡方式,参与多种疾病的发生发展过程^[7],当机体受到伤害性刺激时,活化 NLRP3 炎性小体,激活 caspase-1 及切割 GSDMD,可产生具有成孔活性的 GSDMD-N 末端,GSDMD-N 末端在细胞膜上寡聚形成跨膜孔,使胞浆内 IL-1 β 、IL-18 等炎症因子释放,引发炎症反应^[19]。GUO 等^[20]报道,在 MI/RI 大鼠模型中,抑制 miR-383 可通过激活 RP105/PI3K/AKT 通路,从而减少 NLRP3 炎性小体的激活,改善 MI/RI,表现为 LDH 与 CK-MB 的释放减少及心肌梗死面积明显减小,表明抑制细胞焦亡是减轻 MI/RI 的一种有效策略。本研究结果发现,CR 可明显降低 MI/RI 小鼠细胞焦亡相关蛋白 NLRP3、GSDMD、ASC、caspase-1 的表达水平(P 均 < 0.05),表明 CR 可抑制细胞焦亡的发生,该结果与上述研究结果相符。

综上所述,本实验通过建立 CR 小鼠模型,观察 CR 对 MI/RI 的影响,发现 CR 可减轻小鼠心肌组织的损伤状况和氧化应激水平,减小术后心肌梗死面积,缓解 MI/RI 病理损伤程度,改善 MI/RI 损伤。CR 可抑制细胞焦亡相关蛋白的表达,证明抑制细胞焦亡是 CR 减轻 MI/RI 的一种保护途径。本研究为缺血性疾病的治疗提供了新的非药物辅助策略,但由于 CR 的作用具有多靶点和复杂性,许多潜在的分子机制尚未明确,后续实验需设计多种 CR 方案或多个时间点深入探究其减轻 MI/RI 的其他可能作用机制。

参考文献

- [1] COWAN A J, ALLEN C, BARAC A, *et al.* Global burden of multiple myeloma: a systematic analysis for the global burden of disease study 2016 [J]. *Jama Oncol*, 2018, 4 (9): 1221-1227.
- [2] ZHAO D, LIU J, WANG M, *et al.* Epidemiology of cardiovascular disease in China: current features and implications [J]. *Nature Reviews*, 2019, 16 (4): 203-212.
- [3] ARSLAN F, VOSKUIL M, FOUNDATION N H. The management of acute coronary syndromes in patients presenting without persistent ST-segment elevation: early invasive strategy for all? [J]. *Netherlands Heart J*, 2017, 25 (3): 170-172.
- [4] MIHANFAR A, NEJABATI H, FATTAHI A, *et al.* The role of sphingosine 1 phosphate in coronary artery disease and ischemia reperfusion injury [J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234 (3): 2083-2094.
- [5] PETROVIC D, MEKIS D, TIBAUT M. Pathophysiology of myocardial infarction and acute management strategies [J]. *Cardiovascular & Hematological Agents Med Chem*, 2016, 14 (3): 150-159.
- [6] ZHANG J, HUANG L, SHI X, *et al.* Metformin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via AMPK/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12 (23): 24270-24287.
- [7] MCKENZIE B, DIXIT V, POWER C J T. Fiey cell death: Pyroptosis in the central nervous system [J]. *Trends Neurosci*, 2020, 43 (1): 55-73.
- [8] ZHAOLIN Z, GUOHUA L, SHIYUAN W, *et al.* Role of pyroptosis in cardiovascular disease [J]. *Cell Prolif*, 2019, 52 (2): e12563. DOI: 10.1111/cpr.12563.
- [9] SAKAHIRA H, ENARI M, NAGATA S. Corrigendum: cleavage of CAD inhibitor in CAD activation and DNA degradation during apoptosis [J]. *Nature*, 2015, 526 (7575): 728.
- [10] HU Q, ZHANG T, YI L, *et al.* Dihydropyridin inhibits NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis by activating the Nrf2 signaling pathway in vascular endothelial cells [J]. *Bio Factors*, 2018, 44 (2): 123-136.
- [11] REISETTER A C, STEBOUNOVA L V, BALTRUSAITIS J, *et al.* Induction of inflammasome-dependent pyroptosis by carbon black nanoparticles [J]. *J Biol Chem*, 2011, 286 (24): 21844-21852.
- [12] DOLINSKY V, DYCK J J B. Calorie restriction and resveratrol in cardiovascular health and disease [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2011, 1812 (11): 1477-1489.
- [13] MELO D S, COSTA-PEREIRA L V, SANTOS C S, *et al.* Severe calorie restriction reduces cardiometabolic risk factors and protects rat hearts from ischemia/reperfusion injury [J]. *Front Physiol*, 2016, 7: 106.
- [14] TOREN F. The metabolic regulation of aging [J]. *Nat Med*, 2015, 21 (12): 1416-1423.
- [15] SIMSEK B, YANAR K, KANSU A, *et al.* Caloric restriction improves the redox homeostasis in the aging male rat heart even when started in middle-adulthood and when the body weight is stable [J]. *Biogerontology*, 2019, 20 (1): 127-140.
- [16] DAVID C, LUCAS A, ARAÚJO M, *et al.* Calorie restriction