

临床与基础
桥接研究Clinical and Basic
Bridging Research匹伐他汀经 NLRP3 通路对脂多糖诱导大鼠
心肌细胞的影响Effects of pitavastatin on lipopolysaccharide - induced rat cardiomyocytes via
NLRP3 pathway林 丽, 李春平, 刘 彬,
孙源胜, 付宝才(烟台市烟台山医院 重症医学科, 山东 烟台
264001)LIN Li, LI Chun - ping,
LIU Bin, SUN Yuan - sheng,
FU Bao - cai(Department of Critical Care Medicine,
Yantai Mountain Hospital, Yantai City,
Yantai 264001, Shandong Province,
China)作者简介: 林丽(1965 -), 女, 主任医师, 主要从
事重症疾病方面的相关研究工作

通信作者: 付宝才, 主任医师

MP: 13884932585

E - mail: 17276618147@163.com

摘要:目的 探讨匹伐他汀对脂多糖(LPS)诱导的 H9c2 细胞的影响及其机制。
方法 将 H9c2 细胞分为对照组(正常培养)、模型组($10\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 处理)、
实验组($1\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 匹伐他汀处理后 $10\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS 处理)和联合组[在实
验组基础之上,加入 $1.28\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3(NLRP3)激动药]。
用蛋白质印迹法检测 NLRP3/半胱氨酸蛋白酶 - 1(caspase - 1)/成孔蛋白
(GSDMD)信号通路相关蛋白表达水平,用实时定量反转录聚合酶链反应检测炎
症、线粒体功能相关信使核糖核酸(mRNA)相对表达水平。**结果** 对照组、模型
组、实验组和联合组的 NLRP3 蛋白相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、
 2.56 ± 0.38 、 1.35 ± 0.19 和 2.15 ± 0.31 , caspase - 1 蛋白相对表达水平分别为
 1.00 ± 0.18 、 1.88 ± 0.22 、 1.22 ± 0.20 和 1.75 ± 0.22 , GSDMD 蛋白相对表达水平
分别为 1.00 ± 0.14 、 2.12 ± 0.32 、 1.55 ± 0.21 和 1.99 ± 0.23 , 肿瘤坏死因子 - α
mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 4.12 ± 0.65 、 2.11 ± 0.29 和
 3.54 ± 0.48 , 白细胞介素 - 1β mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.18 、
 3.33 ± 0.39 、 1.42 ± 0.25 和 2.23 ± 0.33 , 白细胞介素 - 18 mRNA 相对表达水平
分别为 1.00 ± 0.14 、 2.28 ± 0.28 、 1.33 ± 0.26 和 1.98 ± 0.22 , PPAR γ 共激活因子 - 1 α
(PGC - 1 α) mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.14 、 0.45 ± 0.07 、 0.89 ± 0.12 和
 0.61 ± 0.08 , 线粒体转录因子 A mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.19 、
 0.53 ± 0.07 、 0.77 ± 0.09 和 0.58 ± 0.08 , 核呼吸因子 - 1 mRNA 相对表达水平
分别为 1.00 ± 0.17 、 0.62 ± 0.08 、 0.85 ± 0.13 和 0.65 ± 0.08 , 解耦联蛋白 2 mRNA
相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 0.34 ± 0.05 、 0.92 ± 0.16 和 0.48 ± 0.07 。模
型组的上述指标与对照组相比,实验组的上述指标与模型组相比,联合组的上述
指标与试验组相比,在统计学上差异均有统计学意义(均 $P < 0.05$)。**结论** 匹
伐他汀能够抑制炎症反应,减轻 H9c2 细胞焦亡,保护线粒体功能,这可能是通
过抑制 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 信号通路实现的。

关键词: 匹伐他汀;线粒体;细胞焦亡;心肌细胞;NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3/半胱
氨酸蛋白酶 - 1/成孔蛋白信号通路

DOI: 10.13699/j.cnki.1001-6821.2025.09.009

中图分类号: R972 文献标志码: A

文章编号: 1001-6821(2025)09-1248-06

Abstract: Objective To investigate the effects of pitavastatin on
lipopolysaccharide (LPS) - induced H9c2 cells and its mechanism.

Methods H9c2 cells were divided into control group, model group
(treated with $10\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS), experimental group (after $1\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$
pitavastatin treatment, $10\ \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS treatment), and combination
group [treated with $1.28\ \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NLR family pyrin domain
containing protein 3 (NLRP3) agonist on the basis of experimental

group]. The NLRP3/cysteine – requiring aspartate protease 1 (caspase – 1)/gasdermin D (GSDMD) signaling pathway related protein levels were detected by Western blot. The messenger ribonucleic acid (mRNA) relative expression levels related to inflammation and mitochondrial function were detected by quantitative real time polymerase chain reaction. **Results** The relative expression levels of NLRP3 protein in control group, model group, experimental group and combination group were 1.00 ± 0.15 , 2.56 ± 0.38 , 1.35 ± 0.19 and 2.15 ± 0.31 , respectively; the relative expression levels of caspase – 1 protein were 1.00 ± 0.18 , 1.88 ± 0.22 , 1.22 ± 0.20 and 1.75 ± 0.22 , respectively; the relative expression levels of GSDMD protein were 1.00 ± 0.14 , 2.12 ± 0.32 , 1.55 ± 0.21 and 1.99 ± 0.23 , respectively; the relative expression levels of tumor necrosis factor – α mRNA were 1.00 ± 0.15 , 4.12 ± 0.65 , 2.11 ± 0.29 and 3.54 ± 0.48 , respectively; the relative expression levels of interleukin – 1β mRNA were 1.00 ± 0.18 , 3.33 ± 0.39 , 1.42 ± 0.25 and 2.23 ± 0.33 , respectively; the relative expression levels of interleukin – 18 mRNA were 1.00 ± 0.14 , 2.28 ± 0.28 , 1.33 ± 0.26 and 1.98 ± 0.22 , respectively; the relative expression levels of PPAR – γ coactivator 1 alpha (PGC – 1α) mRNA were 1.00 ± 0.14 , 0.45 ± 0.07 , 0.89 ± 0.12 and 0.61 ± 0.08 , respectively; the relative expression levels of mitochondrial transcription factor A mRNA were 1.00 ± 0.19 , 0.53 ± 0.07 , 0.77 ± 0.09 and 0.58 ± 0.08 , respectively; the relative expression levels of nuclear respiratory factor – 1 mRNA were 1.00 ± 0.17 , 0.62 ± 0.08 , 0.85 ± 0.13 and 0.65 ± 0.08 , respectively; the relative expression levels of uncoupling protein 2 mRNA were 1.00 ± 0.15 , 0.34 ± 0.05 , 0.92 ± 0.16 and 0.48 ± 0.07 , respectively. The above indexes in model group were compared with those in control group, those in experimental group were compared with those in model group, and those in combination group were compared with those in experimental group, the differences were statistically significant (all $P < 0.05$). **Conclusion** Pitavastatin can inhibit inflammation, reduce pyroptosis of H9c2 cells, and protect mitochondrial function, which may be achieved by inhibiting the NLRP3/caspase – 1/GSDMD signaling pathway.

Key words: pitavastatin; mitochondria; pyroptosis; cardiomyocyte; NLR family pyrin domain containing protein 3/cysteine – requiring aspartate protease 1/gasdermin D signaling pathway

机体受病原微生物感染后,可能会导致器官功能障碍。心脏功能障碍是脓毒症中最常见的并发症。脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 具备显著的细胞毒性,可诱导细胞凋亡、氧化应激、炎症反应等多种细胞损伤过程^[1]。匹伐他汀具有抑制炎症因子释放和血小板聚集的作用,从而有助于改善细胞内皮的功能^[2]。近年来,NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3 (NLR family pyrin domain containing protein 3, NLRP3)/半胱氨酸蛋白酶 – 1 (cysteine – requiring aspartate protease 1, caspase – 1)/成孔蛋白 (gasdermin D, GSDMD) 被证实为介导细胞焦亡的关键机制,能引起细胞渗透性肿胀、质膜破裂,造成强烈的炎症反应^[3]。本研究基于 NLRP3/caspase – 1/GSDMD 信号通路,旨在探讨匹伐他汀对 LPS 诱导的大鼠心肌 H9c2 细胞焦亡、炎症性损伤及线粒体功能的影响机制,以期为开发更有效的治疗策略提供实验支持。

材料与方法

1 材料

细胞 大鼠心肌细胞 H9c2 细胞,购自上海盖宁

生物科技有限公司。

药品与试剂 匹伐他汀钙片,规格:每片 2 mg,批号:SP387691,批准文号:国药准字:H20193061,深圳信立泰药业股份有限公司生产;LPS,规格:每瓶 5 mg,批号:150797,美国 Sigma 公司生产;NLRP3 激动药 (BMS – 986299),规格:每瓶 5 mg,批号:25741T,美国 SelleckChemicals 公司生产。二甲基亚砜,德国 BioFroxx 公司生产;细胞计数试剂盒 – 8 (cell counting kit – 8, CCK – 8),上海炎熙生物科技有限公司生产;5 – 乙炔基 – 2' – 脱氧尿嘧啶核苷 (5 – ethynyl – 2' – deoxyuridine, EdU) 试剂盒,上海雅吉生物科技有限公司生产;4',6 – 二脒基 – 2 – 苯基吲哚 (4',6 – diamidino – 2 – phenylindole dihydrochloride, DAPI),上海尚宝生物科技有限公司生产;兔抗大鼠 caspase – 1、NLRP3、GSDMD、甘油醛 – 3 – 磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde – 3 – phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体及二抗,均为英国 Abcam 公司生产;乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 酶联免疫吸附试验 (enzyme – linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒,上海泛音生物科技有限公司生产;心肌肌钙蛋白 (cardiac troponin)

nin, cTnT) ELISA 试剂盒, 厦门慧嘉生物科技有限公司生产; 肌酸激酶同工酶 (creatinase - MB, CK - MB) ELISA 试剂盒, 武汉菲恩生物科技有限公司生产; 过氧化氢酶 (catalase, CAT) 试剂盒, 上海瑞番生物科技有限公司生产; 实时定量反转录聚合酶链反应 (quantitative real time polymerase chain reaction, qRT - PCR) 试剂盒, 广州华韵生物科技有限公司生产; 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 试剂盒, 上海笃玛生物科技有限公司生产; 线粒体红色荧光探针试剂盒, 上海圻明生物科技有限公司生产; 2', 7' - 二氯荧光素二乙酸酯 (2', 7' - dichlorodihydrofluorescein diacetate, DCFH - DA) 活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 试剂盒, 上海博尔森生物科技有限公司生产。

仪器 ReadMax 1500 酶标仪, 上海闪谱生物科技有限公司产品; Delphi - X 荧光显微镜, 济南一诺世纪试验仪器有限公司产品。

2 实验方法

2.1 细胞培养^[4]

H9c2 细胞用添加 10% 胎牛血清及 1% 青链霉素的 DMEM 高糖培养基进行培养。将细胞置于 37 ℃、5% CO₂ 的培养箱中培养。

2.2 细胞分组与给药方法

将 H9c2 细胞分为对照组、模型组、实验组和联合组。对照组: H9c2 细胞正常培养。模型组: 用 10 μg · mL⁻¹ LPS 处理 H9c2 细胞 12 h。实验组: 用 1 μmol · L⁻¹ 匹伐他汀预处理 1 h, 随后同 10 μg · mL⁻¹ LPS 共处理 H9c2 细胞 12 h。联合组: 用 1 μmol · L⁻¹ 匹伐他汀预处理 1 h, 随后同 10 μg · mL⁻¹ LPS 共处理 H9c2 细胞 12 h, 于 LPS 预处理 2 h 后, 加入 1.28 μmol · L⁻¹ NLRP3 激动药, 处理 24 h。

2.3 CCK - 8 检测细胞活性^[4]

取各组细胞培养液, 按 CCK - 8 试剂盒说明书操作, 于 450 nm 处测光密度值, 计算各组细胞活性。

2.4 EdU 实验检测各组细胞增殖情况^[5]

取各组细胞, 按试剂盒说明书依次加入 EdU 工作液孵育 2 h、4% 甲醛固定 30 min、0.5% TritonX - 100 透化 10 min、DAPI 染核, 在荧光显微镜下观察。

2.5 蛋白质印迹法检测通路相关蛋白表达水平^[6]

从各组细胞中提取总蛋白, 并测定其浓度并进行凝胶电泳, 随后将蛋白转移到膜上。用 5% 的脱脂牛奶在室温下对膜进行 2 h 的封闭处理。加入一抗, 并在 4 ℃ 下孵育过夜。洗膜后加入二抗, 并在室温下孵育 1 h。用电化学发光法进行显影, 并用 Image J 软件测定条带的灰度值。以 GAPDH 作为内参, 计算各蛋

白的相对表达水平。

2.6 ELISA 法检测 LDH、cTnT 和 CK - MB 水平^[6]

收集各组细胞, 以 1.2 × 10⁴ r · min⁻¹ 离心 7 min, 收集上清液, 按各 ELISA 试剂盒说明书步骤进行检测。

2.7 qRT - PCR 检测炎症、线粒体功能、细胞焦亡相关信使核糖核酸 (messenger ribonucleic acid, mRNA) 相对表达水平^[7]

提取各组细胞总 RNA, 反转录获得 cDNA, 按试剂盒要求进行 qRT - PCR, 以 GAPDH 为内参, 用 2^{-ΔΔCt} 法计算各相对表达水平。

2.8 试剂盒检测 CAT 和 SOD 酶活水平^[8]

收集各组细胞, 以 1.2 × 10⁴ r · min⁻¹ 离心 7 min, 收集上清液, 按各试剂盒说明书检测 CAT 和 SOD 酶活水平。

2.9 DCFH - DA 染色法检测 ROS 相对荧光强度^[9]

将细胞按每孔 5 × 10⁴ 个接种于 6 孔板中, 给药干预后, 按照 1:1 000 稀释 DCFH - DA 荧光探针, 使其终浓度为 10 μmol · L⁻¹, 每孔加入工作液 1 mL, 37 ℃ 避光孵育 30 min, 吸除工作液并洗涤细胞, 加入抗荧光淬灭封片剂, 在荧光显微镜观察并拍照, 用 Image J 软件计算 ROS 相对荧光强度。

2.10 Mitotracker Red 荧光探针检测各组细胞线粒体膜电位^[10]

制备各组细胞爬片, Mitotracker Red 荧光探针稀释至浓度为 10 μmol · L⁻¹。取细胞爬片, 加入预热的荧光探针检测工作液 1 mL, 于细胞培养箱中 37 ℃ 孵育 30 min, 洗涤后用荧光显微镜观察细胞线粒体的荧光强度。

3 统计学处理

用 SPSS 24.0 软件进行统计分析。计量资料用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较用独立样本 *t* 检验。

结 果

1 匹伐他汀对 LPS 诱导的 H9c2 细胞存活影响

对照组细胞正常培养; 模型组用 10 μg · mL⁻¹ LPS 处理 H9c2 细胞 12 h; 实验组在模型组基础上用 1 μmol · L⁻¹ 匹伐他汀处理 1 h; 联合组在实验组基础之上, 加入 1.28 μmol · L⁻¹ NLRP3 激动药, 处理 24 h。

CCK - 8 结果显示: 对照组、模型组和实验组细胞 48 h 存活率分别为 (100.00 ± 4.99)%、(52.99 ± 3.02)% 和 (76.32 ± 4.12)%, 细胞增殖率分别为 (54.85 ± 7.02)%、(12.22 ± 2.11)% 和 (26.25 ± 3.32)%。模型组与对照组相比, 细胞存活率和细胞增殖率均显著降低, 实验组与模型组相比, 细胞存活率和细胞增殖率

均明显升高(均 $P<0.001$)。

2 匹伐他汀对 LPS 诱导的 H9c2 细胞 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 信号通路影响

模型组与对照组相比, NLRP3、caspase - 1 和 GSDMD 蛋白相对表达水平均明显升高(均 $P<0.001$);实验组与模型组相比, NLRP3、caspase - 1 和 GSDMD 蛋白相对表达水平均明显降低(均 $P<0.001$);联合组与实验组相比, NLRP3、caspase - 1 和 GSDMD 蛋白相对表达水平均明显升高($P<0.001, P<0.01$), 见图 1 和表 1。

3 匹伐他汀通过 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 信号通路抑制细胞损伤

模型组与对照组相比, LDH、cTnT 和 CK - MB 水平均明显升高(均 $P<0.001$);实验组与模型组相比, LDH、cTnT 和 CK - MB 水平均明显降低(均 $P<0.001$);联合组与实验组相比, LDH、cTnT 和 CK - MB 水平均明显升高($P<0.05, P<0.001$), 见表 2。

4 匹伐他汀通过 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 信号通路抑制细胞凋亡

对照组、模型组、实验组和联合组 NLRP3 mRNA 相对表达水平分别为 1.00 ± 0.15 、 1.65 ± 0.21 、 1.15 ± 0.17 和 1.55 ± 0.19 , caspase - 1 mRNA 相对表

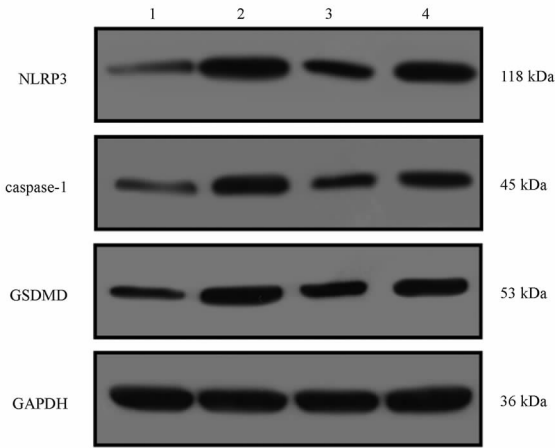


图 1 各组细胞 NLR 家族 Pyrin 域蛋白 3(NLRP3)/半胱氨酸蛋白酶 - 1(caspase - 1)/成孔蛋白(GSDMD)信号通路相关蛋白水平

Figure 1 NLR family pyrin domain containing protein 3 (NLRP3)/cysteine - requiring aspartate protease 1 (caspase - 1)/gasdermin D (GSDMD) signaling pathway related protein levels in each group of cells

1: Control group, H9c2 cells were cultured normally; 2: Model group, H9c2 cells were treated with $10 \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ LPS for 12 h; 3: Experimental group, on the basis of the model group, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ pitavastatin was treated for 1 h; 4: Combination group, on the basis of experimental group, $1.28 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NLRP3 agonist was added and treated for 24 h.

表 1 各组细胞 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 信号通路相关蛋白水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of the levels of NLRP3/caspase - 1/GSDMD signaling pathway related proteins in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	n	NLRP3	caspase - 1	GSDMD
Control	8	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.14
Model	8	$2.56 \pm 0.38^{***}$	$1.88 \pm 0.22^{***}$	$2.12 \pm 0.32^{***}$
Experimental	8	$1.35 \pm 0.19^{###}$	$1.22 \pm 0.20^{###}$	$1.55 \pm 0.21^{###}$
Combination	8	$2.15 \pm 0.31^{\Delta\Delta\Delta}$	$1.75 \pm 0.22^{\Delta\Delta\Delta}$	$1.99 \pm 0.23^{\Delta\Delta}$

Compared with control group, $^{***}P<0.001$; Compared with model group, $^{###}P<0.001$; Compared with experimental group, $^{\Delta\Delta}P<0.01$, $^{\Delta\Delta\Delta}P<0.001$.

表 2 各组乳酸脱氢酶(LDH)、心肌肌钙蛋白(cTnT)和肌酸激酶同工酶(CK - MB)水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the lactate dehydrogenase (LDH), cardiac troponin (cTnT) and creatine kinase - MB (CK - MB) levels in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	LDH ($\text{U} \cdot \text{L}^{-1}$)	cTnT ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)	CK - MB ($\text{pg} \cdot \text{mL}^{-1}$)
Control	243.65 ± 33.22	114.65 ± 18.02	1.08 ± 0.15
Model	$812.25 \pm 98.25^{***}$	$248.12 \pm 30.23^{***}$	$2.58 \pm 0.33^{***}$
Experimental	$402.55 \pm 50.25^{###}$	$186.32 \pm 22.22^{###}$	$1.52 \pm 0.21^{###}$
Combination	$662.45 \pm 73.13^{\Delta\Delta\Delta}$	$223.56 \pm 29.35^{\Delta}$	$2.18 \pm 0.31^{\Delta\Delta\Delta}$

Dose and n refer to table 1; Compared with control group, $^{***}P<0.001$; Compared with model group, $^{###}P<0.001$; Compared with experimental group, $^{\Delta}P<0.05$, $^{\Delta\Delta\Delta}P<0.001$.

达水平分别为 1.00 ± 0.13 、 1.88 ± 0.23 、 1.22 ± 0.19 和 1.66 ± 0.20 。模型组与对照组相比, NLRP3 和 caspase - 1 mRNA 相对表达水平均明显升高(均 $P<0.001$);实验组与模型组相比, NLRP3 和 caspase - 1 mRNA 相对表达水平均明显降低(均 $P<0.001$);联合组与试验组相比, NLRP3 和 caspase - 1 mRNA 相对表达水平均明显升高(均 $P<0.001$)。

5 匹伐他汀通过 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 信号通路抑制细胞炎症水平

模型组与对照组相比, $TNF - \alpha$ 、 $IL - 1\beta$ 和 $IL - 18$ mRNA 相对表达水平均明显升高(均 $P<0.001$);实验组与模型组相比, $TNF - \alpha$ 、 $IL - 1\beta$ 和 $IL - 18$ mRNA 相对表达水平均明显降低(均 $P<0.001$);联合组与实验组相比, $TNF - \alpha$ 、 $IL - 1\beta$ 和 $IL - 18$ mRNA 相对表达水平均明显升高(均 $P<0.001$), 见表 3。

6 匹伐他汀通过 NLRP3/caspase - 1/GSDMD 信号通路抑制氧化应激

模型组与对照组相比, CAT 和 SOD 酶活均明显降低(均 $P<0.001$);实验组与模型组相比, CAT 和

SOD 酶活均明显升高(均 $P < 0.001$);联合组与实验组相比,CAT 和 SOD 酶活均明显降低(均 $P < 0.001$)。结果见表 4。模型组与对照组相比,ROS 相对荧光强度明显升高($P < 0.001$)实验组与模型组相比,ROS 相对荧光强度明显降低($P < 0.001$)联合组与实验组相比,ROS 相对荧光强度均明显升高($P < 0.001$),见表 4。

7 匹伐他汀通过 NLRP3/caspase-1/GSDMD 信号通路对线粒体功能影响

模型组与对照组相比, $PGC-1\alpha$ 、 $TFAM$ 、 $NRF-1$

表 3 各组肿瘤坏死因子- α ($TNF-\alpha$)、白细胞介素- 1β ($IL-1\beta$)和 $IL-18$ 信使核糖核酸(mRNA)相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 3 Comparison of the relative expression levels of tumor necrosis factor- α ($TNF-\alpha$), interleukin- 1β ($IL-1\beta$) and $IL-18$ messenger ribonucleic acid (mRNA) in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	$TNF-\alpha$	$IL-1\beta$	$IL-18$
Control	1.00 ± 0.15	1.00 ± 0.18	1.00 ± 0.14
Model	$4.12 \pm 0.65^{***}$	$3.33 \pm 0.39^{***}$	$2.28 \pm 0.28^{***}$
Experimental	$2.11 \pm 0.29^{###}$	$1.42 \pm 0.25^{###}$	$1.33 \pm 0.26^{###}$
Combination	$3.54 \pm 0.48^{\Delta\Delta\Delta}$	$2.23 \pm 0.33^{\Delta\Delta\Delta}$	$1.98 \pm 0.22^{\Delta\Delta\Delta}$

Dose and n refer to table 1; Compared with control group, $***P < 0.001$; Compared with model group, $###P < 0.001$; Compared with experimental group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

表 5 各组细胞过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子 1α ($PGC-1\alpha$)、线粒体转录因子 A ($TFAM$)、核呼吸因子-1 ($NRF-1$)和解耦联蛋白 2 ($UCP2$) mRNA 相对表达水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 5 Comparison of the relative mRNA expression levels of peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator- 1α ($PGC-1\alpha$), mitochondrial transcription factor A ($TFAM$), nuclear respiratory factor-1 ($NRF-1$) and uncoupling protein 2 ($UCP2$) in all groups ($\bar{x} \pm s$)

Group	$PGC-1\alpha$	$TFAM$	$NRF-1$	$UCP2$
Control	1.00 ± 0.14	1.00 ± 0.19	1.00 ± 0.17	1.00 ± 0.15
Model	$0.45 \pm 0.07^{***}$	$0.53 \pm 0.07^{***}$	$0.62 \pm 0.08^{***}$	$0.34 \pm 0.05^{***}$
Experimental	$0.89 \pm 0.12^{###}$	$0.77 \pm 0.09^{###}$	$0.85 \pm 0.13^{###}$	$0.92 \pm 0.16^{###}$
Combination	$0.61 \pm 0.08^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.58 \pm 0.08^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.65 \pm 0.08^{\Delta\Delta}$	$0.48 \pm 0.07^{\Delta\Delta\Delta}$

Compared with control group, $***P < 0.001$; Compared with model group, $###P < 0.001$; Compared with experimental group, $\Delta\Delta P < 0.01$, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

讨 论

心肌损伤是脓毒症相关心脏功能障碍的主要表现形式之一,常伴有氧化应激及炎症反应。匹伐他汀能够有效降低血脂并优化血管内皮功能,对急性心肌梗死展现出积极的治疗潜力。本研究发现,匹伐他汀处理后 H9c2 细胞活性、细胞增殖率明显升高,提示匹伐他汀能够促进

和 $UCP2$ mRNA 相对表达水平均明显降低(均 $P < 0.001$);实验组与模型组相比, $PGC-1\alpha$ 、 $TFAM$ 、 $NRF-1$ 和 $UCP2$ mRNA 相对表达水平均明显升高(均 $P < 0.001$);联合组与实验组相比, $PGC-1\alpha$ 、 $TFAM$ 、 $NRF-1$ 和 $UCP2$ mRNA 相对表达水平均明显降低($P < 0.01$, $P < 0.001$),见表 5。

对照组、模型组、实验组和联合组细胞线粒体膜电位相对荧光强度分别为 1.00 ± 0.22 、 0.34 ± 0.05 、 0.94 ± 0.16 和 0.56 ± 0.07 。模型组与对照组相比,线粒体膜电位明显降低($P < 0.001$);实验组与模型组相比,线粒体膜电位明显升高($P < 0.001$);联合组与实验组相比,线粒体膜电位明显降低($P < 0.001$)。

表 4 各组细胞过氧化氢酶 (CAT)、超氧化物歧化酶 (SOD) 和 ROS 水平的比较($\bar{x} \pm s$)

Table 4 Comparison of the levels of catalase (CAT), superoxide dismutase (SOD) and ROS in each group ($\bar{x} \pm s$)

Group	CAT ($U \cdot L^{-1}$)	SOD ($U \cdot mL^{-1}$)	ROS
Control	31.58 ± 3.89	14.86 ± 1.88	1.00 ± 0.23
Model	$11.56 \pm 1.81^{***}$	$5.32 \pm 0.78^{***}$	$6.68 \pm 0.89^{***}$
Experimental	$21.23 \pm 2.95^{###}$	$12.32 \pm 1.71^{###}$	$3.33 \pm 0.66^{###}$
Combination	$13.71 \pm 1.68^{\Delta\Delta\Delta}$	$8.01 \pm 1.12^{\Delta\Delta\Delta}$	$5.81 \pm 0.75^{\Delta\Delta\Delta}$

Dose and n refer to table 1; Compared with the control group, $***P < 0.001$; Compared with the model group, $###P < 0.001$; Compared with experimental group, $\Delta\Delta\Delta P < 0.001$.

LPS 诱导心肌损伤大鼠 H9c2 细胞增殖活性。

细胞焦亡是促炎的程序性死亡,参与多种感染性疾病,与脓毒症炎症反应密切相关,并可能在脓毒症心肌抑制中发挥重要作用。在外源性或内源性因素刺激下,NLRP3 激活,募集 caspase-1 前体形成炎症小体,激活后的 caspase-1 令 GSDMD 在细胞膜上形成孔洞,促进 $IL-1\beta$ 和 $IL-18$ 通过孔洞释放,导致炎症的形成^[11]。沈玄洋等^[12]研究发现,双硫仑通过抑

制 NLRP3/caspase-1/GSDMD 信号通路、减轻心力衰竭大鼠心肌炎症反应。本研究中,匹伐他汀处理后 NLRP3、caspase-1 和 GSDMD 蛋白水平均明显降低。孙瑜婧^[13]研究发现,艾司洛尔能够降低 cTnT 和 CK-MB 水平,减轻脓毒症相关心肌病患者的心肌损伤。本研究中,匹伐他汀处理后 LDH、cTnT 和 CK-MB 水平均明显降低,在此基础上用 NLRP3 激动药处理后,则表现出相反的结果,说明匹伐他汀通过抑制 NLRP3/caspase-1/GSDMD 信号通路,减轻 LPS 诱导大鼠 H9c2 细胞损伤,抑制细胞焦亡。

脓毒症导致的心肌功能障碍与炎症反应、氧化应激等密切相关。抑制 NLRP3 炎症小体活化可减轻脓毒症导致的心肌炎症、凋亡及功能障碍,有助于恢复心脏功能。次旦南卓等^[14]研究发现,甘青青兰多糖可以抑制 TNF- α 、IL-1 β 的表达,降低 LPS 诱导小鼠 H9c2 细胞凋亡情况。张晓红等^[15]研究发现,亚精胺能够降低 LDH 和 cTnT 水平,抑制 ROS 产生,抑制细胞发生凋亡,减轻脓毒症心肌损伤。本研究发现,匹伐他汀处理后 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-18 mRNA 相对表达水平,ROS 水平明显降低,CAT 和 SOD 酶活均明显升高;在此基础上用 NLRP3 激动药处理后,则表现出相反的结果,说明匹伐他汀通过抑制 NLRP3/caspase-1/GSDMD 信号通路,减轻 LPS 诱导大鼠 H9c2 细胞炎症和氧化应激反应,进而减轻细胞损伤。

线粒体在维持细胞稳定和细胞活力过程中发挥关键作用,氧化应激发生时,线粒体形态和功能受损,膜电位破坏,进而发生心肌细胞凋亡,加重心肌损伤。辛高杰等^[16]研究发现,人参皂苷 Re 能促进 PGC-1 α 表达,升高线粒体膜电位,进而升高线粒体数量、改善线粒体功能。王毓等^[17]研究发现,线粒体衍生肽能提高 PGC-1 α 、TFAM 和 NRF-1 水平,对心肌缺血再灌注损伤大鼠有保护作用。曾垂义等^[18]研究发现,抗纤益心方能提高线粒体膜电位及 UCP2 mRNA 表达,减轻扩张型心肌病大鼠心肌细胞线粒体损伤。本研究发现,匹伐他汀处理后线粒体膜电位,PGC-1 α 、TFAM、NRF-1 和 UCP2 mRNA 相对表达水平均明显升高;在此基础上用 NLRP3 激动药处理后,则表现出相反的结果,说明匹伐他汀通过抑制 NLRP3/caspase-1/GSDMD 信号通路,保护线粒体功能,进而减轻 H9c2 细胞损伤。

本研究提示:匹伐他汀能够抑制 LPS 诱导大鼠 H9c2 细胞炎症反应及氧化应激反应,减轻 H9c2 细胞焦亡与细胞损伤,保护线粒体功能,这可能是通过抑制 NLRP3/caspase-1/GSDMD 信号通路实现的。

参考文献:

- [1] 江艳艳,王晓平,李伟利,等. 自噬在脂多糖引发的心肌损伤中的作用机制及中医药研究[J]. 世界中医药,2021,16(14): 2200—2206.
- [2] 张玲姬,吴培颖,赵薇. 匹伐他汀与阿托伐他汀对 PCI 术后急性心肌梗死患者血脂、血管内皮功能、炎症因子的影响[J]. 河北医药,2023,45(20):3085—3089.
- [3] FAN G, XIAO H, YUE Y, et al. Hydroxysafflor yellow A inhibits pyroptosis and protecting HUVECs from OGD/R via NLRP3/caspase-1/GSDMD pathway[J]. Chin J Integr Med, 2024, 30(11):1027—1034.
- [4] 唐靖雯,龙立慧,田兴中,等. 丹参传统饮片与破壁饮片中脂溶性成分对缺血缺氧心肌细胞保护作用的对比研究[J]. 时珍国医国药,2020,31(9):2130—2133.
- [5] 王丽华,曹嘉,宋洁妮,等. 非奈利酮对 2 型糖尿病心肌细胞凋亡的影响[J]. 中国临床药理学杂志,2023,39(22):3266—3270.
- [6] 刘敏,陈喜云,吕建磊,等. ALKBH5 通过 TRAF1/NF- κ B 通路减轻脓毒症心肌损伤的机制[J]. 实用医学杂志,2024,40(17):2381—2389.
- [7] 湛盈帆,秦振先,齐小荣,等. 基于 p53/SLC7A11 轴探讨补肾活血颗粒含药血清对 MPP+ 诱导的 PC12 细胞铁死亡的影响[J]. 中华中医药杂志,2024,39(4):1735—1741.
- [8] 马海龙,李璐,姜洁. 松萝酸调节 cGAS-STING 信号通路对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用研究[J]. 河北医药,2024,46(1):20—24.
- [9] 梅丽军,周紫薇,赵婧莎,等. 熊果苷缓解脂多糖诱导的 H9c2 心肌氧化应激、细胞凋亡及炎症反应[J]. 免疫学杂志,2023,39(12):1028—1033.
- [10] 汤中,唐云鹏. DRP1 调控线粒体稳态对人视网膜色素上皮细胞上皮-间充质转化的影响[J]. 眼科新进展,2024,44(6):443—448.
- [11] 文日,张铁凝,杨妮,等. 细胞焦亡在脓毒症心肌抑制中的作用研究进展[J]. 中国当代儿科杂志,2024,26(7):774—781.
- [12] 沈玄洋,李卫东,蒋晓路,等. 基于 NLRP3/caspase-1/GSDMD 信号通路探讨双硫仑改善 HFpEF 大鼠心功能的机制[J]. 中国病理生理杂志,2024,40(10):1891—1897.
- [13] 孙瑜婧. 艾司洛尔治疗脓毒症相关心肌损害患者的临床研究[J]. 中国临床药理学杂志,2024,40(19):2811—2816.
- [14] 次旦南卓,米玛,侯豹,等. 甘青青兰多糖对脂多糖诱导小鼠脓毒症心肌损伤的保护作用[J]. 华西药理学杂志,2024,39(3):279—284.
- [15] 张晓红,赵品,蒯建科,等. 亚精胺通过抑制细胞凋亡、ROS 生成及铁死亡减轻脂多糖诱导的小鼠心肌损伤[J]. 南方医科大学学报,2024,44(1):166—172.
- [16] 辛高杰,陈原原,刘子馨,等. 人参皂苷 Re 通过 Nrf2/HO-1/PGC-1 α 通路调控线粒体生物发生减轻 H9c2 心肌细胞缺氧/复氧损伤的研究[J]. 中国中药杂志,2024,49(4):1064—1072.
- [17] 王毓,彭建业,朱明燕. MOTS-c 肽对心肌缺血再灌注大鼠心肌损伤的保护作用[J]. 安徽医科大学学报,2024,59(8):1405—1410.
- [18] 曾垂义,王振涛,黑炫鼎,等. 抗纤益心方对扩张型心肌病大鼠心肌细胞 PKA/CaMK II 信号通路及线粒体膜电位的影响[J]. 世界科学技术—中医药现代化,2024,26(6):1601—1607.

(收稿日期 2024-12-26)