

水苏碱调节 HIF-1 α /NLRP3 信号通路对缺氧/复氧诱导的心肌细胞焦亡的影响

李效丽^{1a}, 王涛^{1a}, 董传芳^{1b}, 许亚男^{1a}, 张晓苹^{2*} (1. 山东省立第三医院, a. 特需保健科, b. 老年病科, 济南 250031; 2. 解放军第九六零医院全科医学科, 济南 250031)

摘要:目的 研究水苏碱(stachydrine, STA)对缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)诱导的心肌细胞焦亡模型缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)/NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)信号通路的影响。方法 将心肌细胞 H9C2 细胞分为对照组(Control组)、模型组(H/R组)、H/R+低浓度 STA组(H/R+STA-L组, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、H/R+中浓度 STA组(H/R+STA-M组, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、H/R+高浓度 STA组(H/R+STA-H组, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、H/R+高浓度 STA(20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + HIF-1 α 激活剂组[H/R+STA-H+二甲基草酰甘氨酸(DMOG)组, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 STA+10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DMOG]。细胞计数试剂盒8(CCK-8)检测 H9C2 细胞活性;流式细胞仪检测 H9C2 细胞焦亡;酶联免疫吸附法(ELISA)检测细胞白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18(IL-18)、乳酸脱氢酶(LDH)水平。蛋白质印迹(Western blot)检测 IL-1 β 、IL-18、半胱天冬酶-1(Caspase-1)、HIF-1 α 、NLRP3 表达。结果 与 Control 组比较, H/R 组细胞存活率降低($P < 0.05$), Caspase-1 阳性表达率、IL-1 β 、IL-18、LDH 水平、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、HIF-1 α 、NLRP3 蛋白表达升高($P < 0.05$); 与 H/R 组比较, H/R+STA-L 组、H/R+STA-M 组、H/R+STA-H 组细胞存活率增加, Caspase-1 阳性表达率、IL-1 β 、IL-18、LDH 水平、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、HIF-1 α 、NLRP3 蛋白表达降低($P < 0.05$); 与 H/R+STA-H 组比较, H/R+STA-H+DMOG 组的细胞存活率显著降低($P < 0.05$), Caspase-1 阳性表达率、IL-1 β 、IL-18、LDH 水平、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18、HIF-1 α 、NLRP3 蛋白表达显著升高($P < 0.05$)。结论 STA 能够抑制 H/R 诱导的心肌细胞焦亡, 其机制可能与 HIF-1 α /NLRP3 信号通路相关。

关键词:水苏碱;缺氧诱导因子-1 α /NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3;缺氧/复氧;心肌细胞;细胞焦亡

doi: 10.11669/cpj.2024.24.006 中图分类号: R966 文献标志码: A 文章编号: 1001-2494(2024)24-2337-06

Effect of Stachydrine on Hypoxia/Reoxygenation Induced Cardiomyocyte Pyroptosis by Regulating the HIF-1 α /NLRP3 Signaling Pathway

LI Xiaoli^{1a}, WANG Tao^{1a}, DONG Chuanfang^{1b}, XU Yanan^{1a}, ZHANG Xiaoping^{2*} (1a. Department of Special Health Care, 1b. Department of geriatrics, The Third Hospital of Shandong Province, Jinan 250031, China; 2. Department of General Medicine, 960 Hospital of PLA, Jinan 250031, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To investigate the effect of stachydrine (STA) on hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α)/NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3) signaling pathway in hypoxia/reoxygenation (H/R) induced cardiomyocyte pyroptosis model. **METHODS** H9C2 cardiomyocytes were separated into control group (Control group), model group (H/R group), H/R + low concentration STA group (H/R + STA-L group, 5 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), H/R + medium concentration STA group (H/R + STA-M group, 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), H/R + high concentration STA group (H/R + STA-H group, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$), H/R + high concentration STA (20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) + HIF-1 α activator group [H/R + STA-H + dimethylxaloglycine (DMOG) group, 20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ STA + 10 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ DMOG]. H9C2 cell viability was tested by cell counting kit-8 (CCK-8) assay. H9C2 cell apoptosis was measured by flow cytometry. The levels of IL-1 β , IL-18, and LDH in cells were detected by enzyme linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of IL-1 β , IL-18, Caspase-1, HIF-1 α , and NLRP3 were quantified using Western blot. **RESULTS** Compared with the control group, the cell survival rate of the H/R group decreased ($P < 0.05$), the positive expression rate of Caspase-1, levels of IL-1 β , IL-18, LDH, and protein expression of Caspase-1, IL-1 β , IL-18, HIF-1 α , and NLRP3 increased ($P < 0.05$). Compared with the H/R group, the cell survival rates of the H/R + STA-L group, H/R + STA-M group and H/R + STA-H group increased, the positive expression rate of Caspase-1, levels of IL-1 β , IL-18, LDH, and protein expression of Caspase-1, IL-1 β , IL-18, HIF-1 α , and NLRP3 reduced ($P < 0.05$). Compared with the H/R + STA-H group, the cell survival rate of the H/R + STA-H + DMOG group obviously reduced ($P < 0.05$), the positive expression rate of Caspase-1, levels of IL-1 β , IL-18, LDH, and protein expression of

基金项目:山东省医药卫生科研资助(2023BJ000005)

作者简介:李效丽,女,硕士,主治医师 研究方向:老年心脑血管病 * **通讯作者:**张晓苹,女,硕士,主治医师 研究方向:老年医学心肾 Tel: (0531)51666666

Caspase-1, IL-1 β , IL-18, HIF-1 α , and NLRP3 obviously increased ($P < 0.05$). **CONCLUSION** STA can inhibit H/R induced cardiomyocyte pyroptosis, and its mechanism may be related to the HIF-1 α /NLRP3 signaling pathway.

KEY WORDS: stachydrine; hypoxia inducible factor-1 α /NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3; hypoxia/reoxygenation; cardiomyocyte; cell pyroptosis

心肌梗死是全球患者死亡的主要原因之一,临床上,及时的再灌注对挽救缺血心肌组织、减少梗死面积、维持左心室收缩功能、防止心力衰竭的发生至关重要。然而,治疗本身可能矛盾地诱发心肌损伤和心功能恶化,这种现象被称为心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)^[1]。已有相关研究发现,细胞焦亡参与 MIRI 的发生发展过程^[2]。因此,对缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)诱导的心肌细胞焦亡的分子机制进行研究具有重要意义。水苏碱(stachydrine, STA)主要是从菊科、唇形科等多种中药植物中分离提取出的一种生物碱^[3]。已有研究发现,STA 在肾脏、心脏等多种脏器部位中发挥重要的作用^[4]。Guo 等^[5] 报道,STA 能够改善心肌细胞的能量代谢,发挥抗心肌缺血的功能。细胞焦亡是一种依赖于半胱天冬酶-1(Caspase-1)的新的程序性死亡,会诱导炎症级联反应的发生^[6]。已有相关研究发现,缺氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α)可对炎性小体热蛋白结构域相关蛋白 3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)进行激活,诱导炎症反应的发生,进而促进神经细胞焦亡^[7]。本研究利用 H/R 诱导大鼠心肌细胞(H9C2)焦亡模型,基于 HIF-1 α /NLRP3 信号通路探讨 STA 的心肌细胞保护作用。

1 材料与方法

1.1 实验细胞

H9C2 细胞(货号:ZQ0102,上海中乔新舟生物科技有限公司)。

1.2 主要试剂与仪器

杜氏改良 Eagle 培养基(DEME)培养基(含体积分数 10% 胎牛血清(FBS)和质量分数 1% 青霉素-链霉素)(上海酶联生物科技有限公司,货号:OMDCM-031);STA(四川省维克奇生物科技有限公司,纯度:HPLC \geq 96%,相对分子质量:143.18,分子式:C₇H₁₃NO₂,货号:WKQ-0001874);HIF-1 α 激活剂[二甲基草酰甘氨酸(DMOG),上海嵘崑达实业有限公司,货号:R024469-250 mg];细胞计数试剂盒 8(cell counting kit-8, CCK-8)(艾美捷科技有限公司,

货号:BY-Q50356);FAM-FLICA Caspase-1 试剂盒(北京诺博莱德科技有限公司,货号:ICT097);白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)酶联免疫吸附测定(enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)试剂盒(浙江羽翔生物科技有限公司,货号:EYX-DD02225);乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)ELISA 试剂盒(上海富雨生物科技有限公司,货号:FY-A014670);白细胞介素-18(interleukin-18, IL-18)ELISA 试剂盒(杭州铂赛生物科技有限公司,货号:MM-0169M1);IL-1 β 、IL-18、Caspase-1、HIF-1 α 、NLRP3、磷酸甘油醛脱氢酶(reduced glyceraldehyde-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(美国 Abcam 公司,货号:ab283818、ab207324、ab62698、ab51608、ab283819、ab181602);流式细胞仪(赛默飞世尔科技公司,型号:Attune™ NxT);CO₂ 细胞培养箱(Eppendorf 艾本德中国公司,型号:CellXpert);显微镜(Cytek Biosciences,型号:DMi1);凝胶成像仪(上海金鹏分析仪器有限公司,型号:ZF-208)等。

1.3 方法

1.3.1 细胞培养 将 H9C2 细胞接种在 DMEM 培养基中,细胞培养箱(温度 37 °C,体积分数为 5% CO₂)中进行培养,在培养过程中对细胞的颜色以及生长状态进行观察,并将培养液进行定期更换,待细胞生长密度达到 70% 以上时,对细胞进行收集传代,用于后续实验。

1.3.2 STA 储备液配置 2 mg STA 溶于 1 379 μ L 磷酸盐缓冲液中,混匀后用滤菌器过滤,并在 -20 °C 冻存备用,实验时无血清 DMEM 稀释至所需浓度。

1.3.3 细胞分组 H/R 细胞模型的构建^[8] 将 H9C2 细胞在含有体积分数 95% N₂ 和体积分数 5% CO₂ 缺氧的条件下,置于不含有血清的培养基中培养 6 h,之后,将其在含有体积分数 95% O₂ 和体积分数 5% CO₂ 有氧的条件下,置于含有血清的培养基中培养 12 h,构建 H/R 细胞模型。本研究共分为以下几组:对照组(Control 组):正常培养基培养细胞;模型组(H/R):H/R 条件下培养细胞;H/R + 低、中、高浓度 STA 组(H/R + STA-L、M、H 组):在 H/R 条件下分别加入 5、10、20 μ mol \cdot L⁻¹ STA^[9] 培养细胞;H/R + 高浓度 STA + HIF-1 α 激活剂组:在 H/R 条件

下加入 $20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ STA 和 $10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ HIF-1 α 激活剂 DMOG^[10] 培养细胞。

1.3.4 CCK-8 试剂盒检测 H9C2 细胞活性 收集各组 H9C2 细胞,将其接种在 96 孔板中,培养 48 h,在每个孔中加入 $10 \mu\text{L}$ CCK-8 溶液,在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$,体积分数 5% CO_2 的细胞培养箱中进行孵育,4 h 后,利用酶标仪对各个孔 450 nm 处的吸光值进行检测。实验重复 6 次。

1.3.5 流式细胞术检测 H9C2 细胞焦亡 收集处于对数生长期的各组 H9C2 细胞,离心取沉淀,并进行重悬。将经过 FAM-FLICA 标记的 Caspase-1 抗体加入细胞沉淀中混匀,在黑暗条件下反应 1 h,对细胞洗涤($1 \times$ Wash Buffer)2 次,加入碘化丙锭(PI)染色液对细胞进行重悬。利用流式细胞仪对细胞焦亡情况进行检测。细胞焦亡水平用 Caspase-1 和 PI 双阳性的细胞代表^[11]。实验重复 6 次。

1.3.6 ELISA 检测 IL-1 β 、IL-18、LDH 水平 收集各组处于对数生长期的 H9C2 细胞, $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min,弃沉淀,取上清置于 $-80 \text{ }^\circ\text{C}$ 冰箱中进行保存。采用 ELISA 对细胞 IL-1 β 、IL-18、LDH 水平进行检测,检测操作方法按照试剂盒的说明书进行。实验重复 6 次。

1.3.7 Western blot 检测 H9C2 细胞中 IL-1 β 、IL-18、Caspase-1、HIF-1 α 、NLRP3 蛋白表达情况 收集各组培养至对数生长期的 H9C2 细胞,在蛋白裂解液的作用下冰上裂解 30 min,将裂解后的细胞进行离心,取上清液,利用二辛可宁酸(BCA)试剂盒对蛋白总量进行测定。蛋白提取物的分离用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行,分离后的蛋白凝胶置于聚偏二氟乙烯(PVDF)膜上进行转膜,在冰上反应 1 h,清洗,质量分数 5% 的脱脂奶粉封闭 30 min,清洗,分别加入(IL-1 β 、IL-18、Caspase-1、HIF-1 α 、NLRP3 和 GAPDH)抗体,4 $^\circ\text{C}$ 过夜;加入二抗,室温孵育 2 h。用凝胶成像仪对蛋白表达情况进行观察。实验重复 6 次。

1.4 统计学分析

所得数据采用均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,SPSS 25.0 处理数据。各组间比较,如 H/R 组、H/R + STA-L 组以及 H/R + STA-M 组、H/R + STA-H 组等采用 F 检验,组间两两比较采用 SNK-q 检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

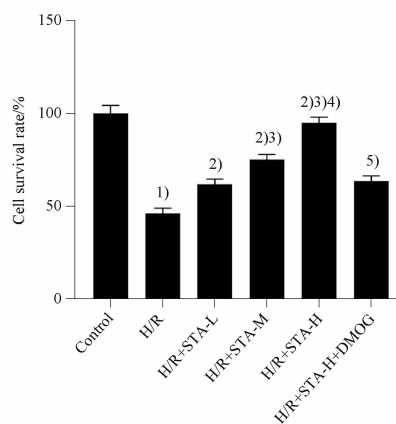
2.1 STA 对 H9C2 细胞活性的影响

与 Control 组比较,H/R 组的细胞存活率降低

($P < 0.05$);与 H/R 组比较,H/R + STA-L 组、H/R + STA-M 组、H/R + STA-H 组细胞存活率均增加,且随着 STA 浓度的增加,细胞存活率逐渐增加($P < 0.05$);与 H/R + STA-H 组比较,H/R + STA-H + DMOG 组的细胞存活率显著降低($P < 0.05$)。结果见图 1。

2.2 STA 对 H9C2 细胞焦亡的影响

与 Control 组比较,H/R 组 Caspase-1 阳性表达率升高($P < 0.05$);与 H/R 组比较,H/R + STA-L 组、H/R + STA-M 组、H/R + STA-H 组 Caspase-1 阳性表达率均降低,且随着 STA 浓度的增加,Caspase-1 阳性表达率逐渐降低($P < 0.05$);与 H/R + STA-H 组比较,H/R + STA-H + DMOG 组的 Caspase-1 阳性表达率显著升高($P < 0.05$)。结果见图 2。



与 Control 组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与 H/R 组相比,²⁾ $P < 0.05$;与 H/R + STA-L 组相比,³⁾ $P < 0.05$;与 H/R + STA-M 组相比,⁴⁾ $P < 0.05$;与 H/R + STA-H 组相比,⁵⁾ $P < 0.05$ 。

¹⁾ $P < 0.05$, vs Control group; ²⁾ $P < 0.05$, vs H/R group; ³⁾ $P < 0.05$, vs H/R + STA-L group; ⁴⁾ $P < 0.05$, vs H/R + STA-M group; ⁵⁾ $P < 0.05$, vs H/R + STA-H group.

图 1 水苏碱(STA)对 H9C2 细胞活性的影响。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 1 The effect of STA on the activity of H9C2 cells. $n = 6, \bar{x} \pm s$

2.3 STA 对 H9C2 细胞中 IL-1 β 、IL-18、LDH 水平的影响

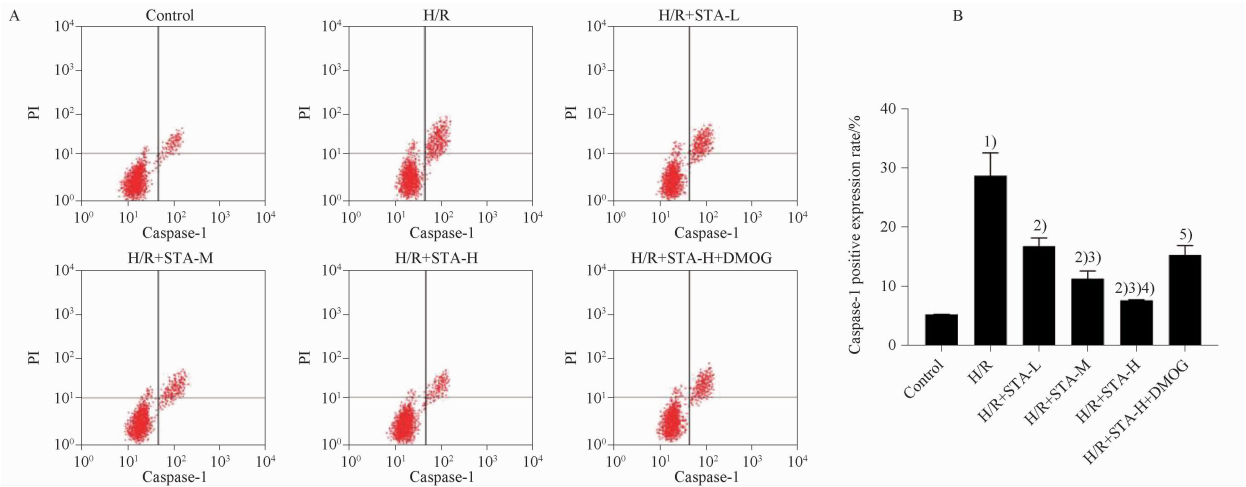
与 Control 组比较,H/R 组 IL-1 β 、IL-18、LDH 水平均升高($P < 0.05$);与 H/R 组比较,H/R + STA-L 组、H/R + STA-M 组、H/R + STA-H 组 IL-1 β 、IL-18、LDH 水平均降低,且随着 STA 浓度的增加,IL-1 β 、IL-18、LDH 水平逐渐降低($P < 0.05$);与 H/R + STA-H 组比较,H/R + STA-H + DMOG 组的 IL-1 β 、IL-18、LDH 水平显著升高($P < 0.05$)。结果见表 1。

2.4 STA 对 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达的影响

与 Control 组比较,H/R 组 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达均升高($P < 0.05$);与 H/R 组比较,

H/R + STA-L 组、H/R + STA-M 组、H/R + STA-H 组 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达均降低,且随着 STA 浓度的增加,Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达

逐渐降低 ($P < 0.05$);与 H/R + STA-H 组比较,H/R + STA-H + DMOG 组的 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。结果见图 3。



A - 流式细胞术检测细胞焦亡 [半胱天冬酶-1 (Caspase-1) + PI]; B - Caspase-1 阳性表达率比较。与 Control 组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与 H/R 组相比,²⁾ $P < 0.05$;与 H/R + STA-L 组相比,³⁾ $P < 0.05$;与 H/R + STA-M 组相比,⁴⁾ $P < 0.05$;与 H/R + STA-H 组相比,⁵⁾ $P < 0.05$ 。

A - flow cytometry was used to detect cell pyroptosis (Caspase-1 + PI); B - comparison of Caspase-1 positive expression rates. ¹⁾ $P < 0.05$, vs control group; ²⁾ $P < 0.05$, vs H/R group; ³⁾ $P < 0.05$, vs H/R + STA-L group; ⁴⁾ $P < 0.05$, vs H/R + STA-M group; ⁵⁾ $P < 0.05$, vs H/R + STA-H group.

图 2 STA 对 H9C2 细胞焦亡的影响。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 2 The effect of STA on pyroptosis in H9C2 cells. $n = 6, \bar{x} \pm s$

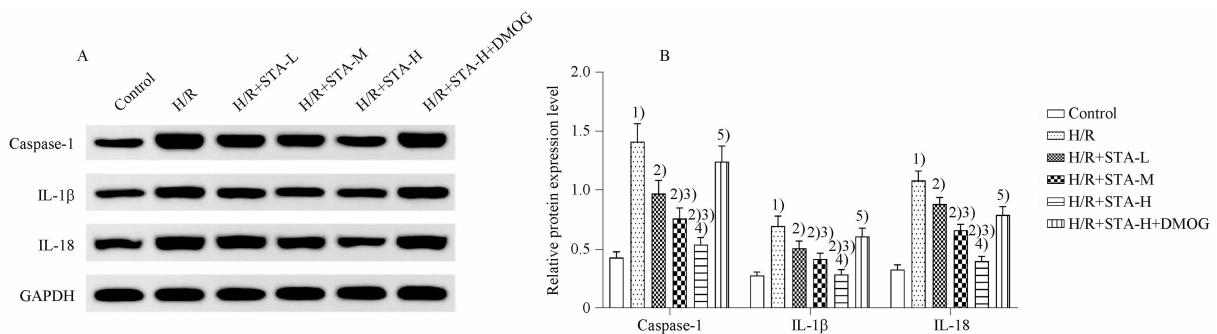
表 1 STA 对 H9C2 细胞中白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-18 (IL-18)、乳酸脱氢酶 (LDH) 水平的影响。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Tab. 1 Effects of STA on IL-1 β , IL-18, and LDH levels in H9C2 cells. $n = 6, \bar{x} \pm s$

Group	ρ (IL-1 β)/pg \cdot mL ⁻¹	ρ (IL-18)/pg \cdot mL ⁻¹	LDH/U \cdot L ⁻¹
Control	9.29 \pm 0.11	13.56 \pm 1.41	122.18 \pm 13.25
H/R	41.57 \pm 4.23 ¹⁾	42.39 \pm 4.36 ¹⁾	226.49 \pm 23.61 ¹⁾
H/R + STA-L	32.59 \pm 3.51 ²⁾	35.39 \pm 3.65 ²⁾	165.24 \pm 17.24 ²⁾
H/R + STA-M	23.16 \pm 2.45 ²⁾³⁾	26.37 \pm 2.71 ²⁾³⁾	152.36 \pm 16.36 ²⁾³⁾
H/R + STA-H	12.56 \pm 1.37 ²⁾³⁾⁴⁾	17.28 \pm 2.32 ²⁾³⁾⁴⁾	131.25 \pm 13.51 ²⁾³⁾⁴⁾
H/R + STA-H + DMOG	38.75 \pm 0.41 ⁵⁾	38.51 \pm 3.97 ⁵⁾	206.31 \pm 13.22 ⁵⁾

注:与 Control 组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与 H/R 组相比,²⁾ $P < 0.05$;与 H/R + STA-L 组相比,³⁾ $P < 0.05$;与 H/R + STA-M 组相比,⁴⁾ $P < 0.05$;与 H/R + STA-H 组相比,⁵⁾ $P < 0.05$ 。

Note: ¹⁾ $P < 0.05$, vs Control group; ²⁾ $P < 0.05$, vs H/R group; ³⁾ $P < 0.05$, vs H/R + STA-L group; ⁴⁾ $P < 0.05$, vs H/R + STA-M group; ⁵⁾ $P < 0.05$, vs H/R + STA-H group.



A - Western blot 检测 H9C2 细胞中 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达; B - Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白水平比较。与 Control 组相比,¹⁾ $P < 0.05$;与 H/R 组相比,²⁾ $P < 0.05$;与 H/R + STA-L 组相比,³⁾ $P < 0.05$;与 H/R + STA-M 组相比,⁴⁾ $P < 0.05$;与 H/R + STA-H 组相比,⁵⁾ $P < 0.05$ 。

A - Western blot was used to detect the protein expression of Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 in H9C2 cells; B - comparison of Caspase-1, IL-1 β , and IL-18 protein levels. ¹⁾ $P < 0.05$, vs Control group; ²⁾ $P < 0.05$, vs H/R group; ³⁾ $P < 0.05$, vs H/R + STA-L group; ⁴⁾ $P < 0.05$, vs H/R + STA-M group; ⁵⁾ $P < 0.05$, vs H/R + STA-H group.

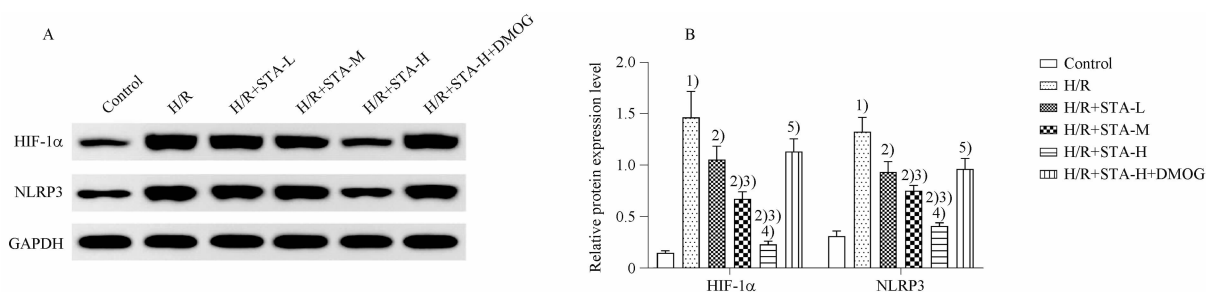
图 3 各组 H9C2 细胞中 Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白水平。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 3 Protein levels of Caspase-1, IL-1 β and IL-18 in H9C2 cells of each group. $n = 6, \bar{x} \pm s$

2.5 STA 对 HIF-1 α /NLRP3 信号通路相关蛋白表达的影响

与 Control 组比较, H/R 组 HIF-1 α 、NLRP3 蛋白表达均升高 ($P < 0.05$); 与 H/R 组比较, H/R + STA-L 组、H/R + STA-M 组、H/R + STA-H 组 HIF-

1 α 、NLRP3 蛋白表达均降低, 且随着 STA 浓度的增加, HIF-1 α 、NLRP3 蛋白表达逐渐降低 ($P < 0.05$); 与 H/R + STA-H 组比较, H/R + STA-H + DMOG 组的 HIF-1 α 、NLRP3 蛋白表达显著升高 ($P < 0.05$)。见图 4。



A - Western blot 检测 H9C2 细胞中 HIF-1 α 、NLRP3 蛋白表达; B - HIF-1 α 、NLRP3 蛋白水平比较。与 Control 组相比, ¹⁾ $P < 0.05$; 与 H/R 组相比, ²⁾ $P < 0.05$; 与 H/R + STA-L 组相比, ³⁾ $P < 0.05$; 与 H/R + STA-M 组相比, ⁴⁾ $P < 0.05$; 与 H/R + STA-H 组相比, ⁵⁾ $P < 0.05$ 。

A - Western blot was used to detect the expression of HIF-1 α and NLRP3 proteins in H9C2 cells; B - comparison of HIF-1 α and NLRP3 protein levels; ¹⁾ $P < 0.05$, vs control group; ²⁾ $P < 0.05$, vs H/R group; ³⁾ $P < 0.05$, vs H/R + STA-L group; ⁴⁾ $P < 0.05$, vs H/R + STA-M group; ⁵⁾ $P < 0.05$, vs H/R + STA-H group.

图 4 各组 H9C2 细胞中缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)/NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3) 信号通路相关蛋白水平。 $n = 6, \bar{x} \pm s$

Fig. 4 Levels of HIF-1 α /NLRP3 signaling pathway related proteins in H9C2 cells of each group. $n = 6, \bar{x} \pm s$

3 讨论

近年来,急性心肌梗死的发病率呈现一种不断增加的趋势,对人们的生命健康安全造成严重威胁^[12]。而治疗急性心肌梗死时发生的 MIRI 会加重心肌损伤,从而造成患者心功能的恶化,对治疗效果造成影响^[13]。目前,关于心肌梗死发生发展的分子机制还不十分明确,因此,需要深入研究其发生发展涉及的相关机制,为急性心肌梗死的早期诊断以及治疗提供理论依据。

近年来,人们对中药以及中药的活性成分的关注日趋增多。STA 已经被发现具有抗氧化、抗炎以及抗细胞凋亡的作用,是唇形科中药植物益母草的一种主要成分^[14]。Zhu 等^[15]研究显示,STA 通过激活 SIRT1-Nrf2 通路保护 H/R 损伤,抑制心肌细胞氧化应激和凋亡。Liu 等^[16]研究发现,在异丙肾上腺素导致的小鼠心肌纤维化中,STA 发挥重要作用。细胞焦亡是不同于细胞坏死和细胞凋亡的一种促炎性细胞程序性死亡,研究发现, Caspase-1 蛋白的表达是判断细胞焦亡的依据^[17]。IL-1 β 、IL-18 是在细胞焦亡中重要的促炎细胞因子,会进一步加重炎症反应,而 LDH 参与炎症反应^[18]。近期研究显示,水苏碱通过抑制 IL-1 β 、IL-18 和焦亡蛋白 GSDMD、GSDMD-N、GSDMD 表达缓解氧糖剥夺再灌注诱导的海马神经元焦亡^[19]。本研究结果显示,与 Control 组比较, H/R 组细胞存活率值降低, IL-1 β 、IL-18、

LDH 水平升高,表明 H/R 诱导的 H9C2 细胞模型构建成功。与 H/R 组比较, H/R + STA-L 组、H/R + STA-M 组、H/R + STA-H 组细胞存活率值增加, IL-1 β 、IL-18、LDH 水平降低,表明使用不同浓度 STA 处理 H/R 诱导的 H9C2 细胞,可以增加细胞活性,降低促炎因子水平。与以往 STA 在 H/R 诱导的 H9C2 中的研究^[9,15]不同,本实验关注的是细胞焦亡的变化, Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白均是与细胞焦亡相关的蛋白^[20]。本研究首次通过检测焦亡标志蛋白的表达分析 STA 对 H/R 诱导的 H9C2 细胞焦亡的影响,结果显示,与 Control 组比较, H/R 组 Caspase-1 阳性表达率、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白表达升高;与 H/R 组比较, H/R + STA-L 组、H/R + STA-M 组、H/R + STA-H 组 Caspase-1 阳性表达率、Caspase-1、IL-1 β 、IL-18 蛋白降低,表明经 H/R 诱导会促进 H9C2 的细胞焦亡,而 STA 可以抑制 H/R 诱导的细胞焦亡。以上研究结果提示 STA 通过减少 Caspase-1、IL-1 β 蛋白表达,降低 H9C2 细胞中下游促炎介质的产生,从而减轻 H/R 导致的细胞焦亡。

已有相关研究发现, NLRP3 是最常见也是研究最为清楚的一种炎症小体^[21]。HIF-1 α 是一种可以感知氧浓度的转录因子,在正常的氧浓度状态下, HIF-1 α 表达水平相对较低,而当细胞因为炎症、损伤等原因处于缺氧状态时, HIF-1 α 表达水平会升高^[22]。Chen 等^[23]研究发现,通过对 HIF-1 α 信号通

路进行抑制可以一定程度减轻缺血性脑损伤产生的有害影响。且通过 HIF-1 α 对 NLRP3 的抑制,可对炎症反应进行一定程度的减轻,进一步缓解细胞焦亡^[7]。本研究中,与 Control 组比较,H/R 组 HIF-1 α 、NLRP3 蛋白表达升高,表明 H/R 诱导心肌细胞 HIF-1 α /NLRP3 通路激活。与 H/R 组比较,H/R + STA-L 组、H/R + STA-M 组、H/R + STA-H 组 HIF-1 α 、NLRP3 蛋白表达降低,说明不同浓度 STA 均可抑制 HIF-1 α /NLRP3 信号通路,且抑制作用随 STA 剂量的增高而增强,推测 STA 可以通过抑制 HIF-1 α /NLRP3 信号通路,从而改善细胞焦亡。进一步用 HIF-1 α 激活剂 DMOG 和 STA 共同处理细胞,结果发现 HIF-1 α 、NLRP3 蛋白水平较 H/R + STA-H 组升高,表明 DMOG 的加入激活了 HIF-1 α /NLRP3 信号通路,促进了 H9C2 细胞焦亡。上述结果提示 STA 可能通过抑制 HIF-1 α 水平减少 NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD,ASC)、消皮素 D 的 N 端(N terminal of gasdermin-D,N-GSDMD)、caspase-1 和 IL-1 β 蛋白表达,进而抑制 NLRP3 炎症小体的激活,减少了心肌细胞中下游促炎介质(包括 IL-18 和 IL-1 β)的产生,缓解 H/R 诱导的心肌细胞焦亡^[24]。

综上所述,STA 可以通过抑制 HIF-1 α /NLRP3 信号通路,减轻 H/R 诱导的心肌细胞焦亡,从而发挥抗炎作用。本研究为 STA 防治心血管疾病提供了实验依据,并对其作用机制提出了新的解释。但是本研究仅在体外实验细胞上进行了研究,后续会进一步通过体内实验进行验证。

REFERENCES

[1] CHEN W, ZHANG Y, WANG Z, *et al.* Dapagliflozin alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by reducing ferroptosis via MAPK signaling inhibition [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1078205.

[2] ZHANG Y, PENG J, YANG Y F, *et al.* Mechanism study of rhodiola wallichiana var. cholaensis on regulating miR-378a-3p against hypoxia/reoxygenation injury of myocardial cells [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2023, 58(18): 1693-1698.

[3] LIAO L, TANG Y, LI B, *et al.* Stachydrine, a potential drug for the treatment of cardiovascular system and central nervous system diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 161(1): 11448917.

[4] GU R, ZHANG W, XU D. Stachydrine is effective and selective against blast phase chronic myeloid leukaemia through inhibition of multiple receptor tyrosine kinases [J]. *Pharm Biol*, 2022, 60(1): 700-707.

[5] GUO S K, ZHOU Y L, CHEN W, *et al.* Protective effect of stachydrine on acute myocardial ischemia in mice [J]. *J Taishan Med Coll* (泰山医学院学报), 2018, 39(8): 844-846.

[6] XIE C, WU W, TANG A, *et al.* lncRNA GAS5/miR-452-5p Reduces oxidative stress and pyroptosis of high-glucose-stimulated renal tubular cells [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2019, 12(1): 2609-2617.

[7] JIANG Q, GENG X, WARREN J, *et al.* Hypoxia inducible factor-1 α (HIF-1 α) mediates NLRP3 inflammasome-dependent-pyroptotic and apoptotic cell death following ischemic stroke [J]. *Neuroscience*, 2020, 448(1): 126-139.

[8] HUANG J, QI Z. MiR-21 mediates the protection of kaempferol against hypoxia/reoxygenation-induced cardiomyocyte injury via promoting Notch1/PTEN/AKT signaling pathway [J]. *PLoS One*, 2020, 15(11): e0241007.

[9] LIU P, ZHAO Y Y, DU C H. Effect of hydrostachyline on H/R-induced apoptosis of cardiomyocytes by regulating EPAC1/Rap1 signaling pathway [J]. *Chin J Cell Biol* (中国细胞生物学学报), 2023, 45(11): 1606-1613.

[10] YAO L X, TANG W B, HUANG S Q, *et al.* Role of mTOR/P70S6K/HIF-1 α signaling pathway in Caco-2 cell barrier injury induced by lipopolysaccharide [J]. *Chin J Pathophysiol* (中国病理生理杂志), 2022, 38(1): 122-129.

[11] LI D, REN W, JIANG Z, *et al.* Regulation of the NLRP3 inflammasome and macrophage pyroptosis by the p38 MAPK signaling pathway in a mouse model of acute lung injury [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 18(5): 4399-4409.

[12] DENG Y F, LIU J, SUN X, *et al.* Effects of amlodipine-benazepril tablets on peripheral blood endothelial microparticles and IL-6 and IL-17 levels in patients with acute myocardial infarction complicated with hypertension [J]. *Chin Pharm J* (中国药理学杂志), 2022, 57(18): 1571-1574.

[13] HOU M, WU X, ZHAO Z, *et al.* Endothelial cell-targeting, ROS-ultrasensitive drug/siRNA co-delivery nanocomplexes mitigate early-stage neutrophil recruitment for the anti-inflammatory treatment of myocardial ischemia reperfusion injury [J]. *Acta Biomater*, 2022, 143(1): 344-355.

[14] LI X Q, LU S, XIA L, *et al.* Stachydrine hydrochloride ameliorates cardiac hypertrophy through CaMKII/HDAC4/MEF2C signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2022, 14(6): 3840-3853.

[15] ZHU X, WU Y, ZHANG X, *et al.* Stachydrine ameliorates hypoxia reoxygenation injury of cardiomyocyte via enhancing SIRT1-Nrf2 pathway [J]. *J Cardiothorac Surg*, 2023, 18(1): 265.

[16] LIU S N, YANG D, MA X Y, *et al.* Effect of stachydrine on myocardial fibrosis induced by isoprenaline in mice [J]. *J Taishan Med Coll* (泰山医学院学报), 2020, 41(9): 655-658.

[17] WANG Y, ZHAO R Z, CHEN P K, *et al.* Impact and related mechanism on the improvement of hyperglycemia-induced pyroptosis in H9c2 cells by mircoRNA-214 [J]. *Chin J Cardiol* (中华心血管病杂志), 2019, 47(10): 820-828.

[18] YARIBEYGI H, MOHAMMADI M T, REZAEI E, *et al.* Fenofibrate improves renal function by amelioration of NOX-4, IL-18, and p53 expression in an experimental model of diabetic nephropathy [J]. *J Cell Biochem*, 2018, 119(9): 7458-7469.

[19] GAO L, YANG Y. Impacts of stachydrine on OGD/R-induced neuronal pyroptosis by regulating PI3K/Akt/NF- κ B signaling pathway [J]. *Stroke Nervous Dis* (卒中与神经疾病), 2024, 31(2): 159-166.

[20] CHAI R, YE Z, XUE W, *et al.* Tanshinone IIA inhibits cardiomyocyte pyroptosis through TLR4/NF- κ B p65 pathway after acute myocardial infarction [J]. *Front Cell Dev Biol*, 2023, 11: 1252942.

[21] WU X, WEI J, YI Y, *et al.* Epimedium aqueous extract ameliorates cerebral ischemia/reperfusion injury through inhibiting ROS/NLRP3-mediated pyroptosis [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2023, 12(5): 999.

[22] ABDEL-LATIF R G, RIFAAI R A, AMIN E F. Empagliflozin alleviates neuronal apoptosis induced by cerebral ischemia/reperfusion injury through HIF-1 α /VEGF signaling pathway [J]. *Arch Pharm Res*, 2020, 43(5): 514-525.

[23] CHEN S F, PAN M X, TANG J C, *et al.* Arginine is neuroprotective through suppressing HIF-1 α /LDHA-mediated inflammatory response after cerebral ischemia/reperfusion injury [J]. *Mol Brain*, 2020, 13(1): 63.

[24] LI H, YANG D H, ZHANG Y, *et al.* Geniposide suppresses NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis via the AMPK signaling pathway to mitigate myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Chin Med*, 2022, 17(1): 73. (收稿日期:2024-06-18)