

大黄酚通过抑制NLRP3介导的细胞焦亡减轻糖氧剥夺诱导心肌细胞损伤的研究

梅淋^{1,2} 陈云杰³ 姚月清¹ 谢桢烨¹ 袁茜¹ 安宁^{4*} 陈川^{1*}

(¹厦门医学院药学院, 厦门 361000; ²厦门医学院厦门市中药生物工程重点实验室, 厦门 361000;

³宁波大学附属第一医院药学部, 宁波 315010; ⁴宁波大学附属李惠利医院药学部, 宁波 315000)

摘要 该研究旨在探究大黄酚(Chrysophanol, CHR)通过抑制NLRP3介导的细胞焦亡减轻糖氧剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)诱导H9c2心肌细胞损伤的作用及其分子机制。在OGD条件下刺激H9c2心肌细胞, 构建心肌缺血细胞模型。使用0~80 $\mu\text{mol/L}$ 的CHR处理正常和OGD刺激下的H9c2心肌细胞, 筛选最佳药物浓度; 将H9c2心肌细胞随机分为正常培养组(Control组)、大黄酚最佳浓度组(CHR组)、糖氧剥夺组(OGD组)、糖氧剥夺+大黄酚最佳浓度组(OGD+CHR组)、糖氧剥夺+NLRP3激活剂组(OGD+Nig组)、糖氧剥夺+大黄酚最佳浓度+NLRP3激活剂组(OGD+CHR+Nig组)、糖氧剥夺+NLRP3抑制剂组(OGD+MCC950组); CCK-8试剂盒检测H9c2心肌细胞活性; LDH试剂盒检测H9c2心肌细胞损伤情况; IL-1 β 、IL-18 ELISA试剂盒检测细胞上清液中IL-1 β 、IL-18分泌情况; TUNEL染色检测H9c2心肌细胞DNA损伤水平; 免疫荧光检测炎症小体NLRP3表达和分布情况; Western blot检测细胞焦亡信号通路相关蛋白表达情况。结果显示, 与Control组相比, OGD组的细胞活力显著下降, IL-1 β 、IL-18分泌水平, DNA损伤水平, LDH含量和NLRP3、GSDMD-N等蛋白含量显著上升; 与OGD组相比, OGD+CHR组心肌细胞活力上升, IL-1 β 、IL-18分泌水平, DNA损伤水平, LDH含量和NLRP3、GSDMD-N等蛋白含量显著下降; 与OGD+CHR组相比, OGD+CHR+Nig组H9c2心肌细胞的DNA损伤水平, NLRP3、GSDMD-N等蛋白含量显著上升, 心肌细胞活力显著下降; 此外, 与OGD+Nig组相比, OGD+CHR+Nig组H9c2心肌细胞NLRP3、GSDMD-N蛋白含量, DNA损伤细胞数量和心肌细胞活力无明显差异; 与OGD+MCC950组相比, OGD+CHR组IL-1 β 、IL-18分泌水平, LDH含量和NLRP3、GSDMD-N等蛋白含量相似, 但相较于OGD组都有显著的下降。由此提示, CHR可能是通过抑制NLRP3介导的H9c2心肌细胞焦亡, 进而减轻OGD诱导的心肌细胞损伤的。

关键词 大黄酚; 糖氧剥夺损伤; 细胞焦亡; NLRP3

Chrysophanol Alleviates Oxygen-Glucose Deprivation-Induced Cardiomyocyte Injury by Inhibiting NLRP3-Mediated Pyroptosis

MEI Lin^{1,2}, CHEN Yunjie³, YAO Yueqing¹, XIE Zhenye¹, YUAN Xi¹, AN Ning^{4*}, CHEN Chuan^{1*}

收稿日期: 2025-02-28

接受日期: 2025-05-20

国家自然科学基金(批准号: 32101155)、厦门市自然科学基金(批准号: 3502Z202372061)、福建省科技创新联合资金项目(批准号: 2024Y9725)、福建省教育厅中青年项目(批准号: JAT220398)、浙江省自然科学基金(批准号: LQ23H020003)、厦门医学院创新探索项目(批准号: K2023-36)和福建省大学生创新创业训练计划(批准号: 202412631014)资助的课题

*通信作者。Tel: 18858716166, E-mail: lhlanning@nbu.edu.cn; Tel: 18959215249, E-mail: cc@xmmc.edu.cn

Received: February 28, 2025

Accepted: May 20, 2025

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No.32101155), the Natural Science Foundation of Xiamen (Grant No. 3502Z202372061), the Joint Funds for the Innovation of Science and Technology, Fujian Province (Grant No.2024Y9725), the Fujian Provincial Department of Education Youth Project (Grant No.JAT220398), the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (Grant No.LQ23H020003), the Xiamen Medical College Innovation Exploration Project (Grant No.K2023-36) and the Fujian Provincial College Students' Innovation and Entrepreneurship Training Plan (Grant No.202412631014)

*Corresponding authors. Tel: +86-18858716166, E-mail: lhlanning@nbu.edu.cn; Tel: +86-18959215249, E-mail: cc@xmmc.edu.cn

(¹School of Pharmacy, Xiamen Medical College, Xiamen 361000, China; ²Xiamen Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Bioengineering, Xiamen Medical College, Xiamen 361000, China; ³Department of Pharmacy, the First Affiliated Hospital of Ningbo University, Ningbo 315010, China; ⁴Department of Pharmacy, Ningbo University Li Huili Hospital, Ningbo 315000, China)

Abstract This study aimed to investigate the protective effect and molecular mechanism of CHR (Chrysophanol) on OGD (oxygen-glucose deprivation)-induced H9c2 cardiomyocyte injury by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis. Subject H9c2 cardiomyocytes to OGD conditions to establish an *in vitro* model of myocardial ischemia. Cells were treated with CHR (0-80 $\mu\text{mol/L}$) under normal and OGD conditions to determine the optimal concentration. The H9c2 cardiomyocytes were divided into seven groups: normal control (Control), CHR optimal concentration (CHR), OGD, OGD+CHR, OGD+Nig, OGD+CHR+NLRP3 activator (OGD+CHR+Nig), and OGD+NLRP3 inhibitor (OGD+MCC950). Cell viability was assessed using CCK-8 assay, while LDH (lactate dehydrogenase) release was measured to evaluate cellular damage. Secretion levels of IL-1 β and IL-18 in the supernatant were quantified by ELISA. DNA damage was detected via TUNEL staining. NLRP3 inflammasome expression and localization were analyzed by immunofluorescence. Western blot was performed to examine pyroptosis-related proteins (NLRP3, GSDMD-N). The results demonstrated that compared to the Control group, the OGD group exhibited significantly reduced cell viability, along with markedly elevated secretion levels of IL-1 β and IL-18, increased DNA damage, elevated LDH content, and upregulated protein expression of NLRP3 and GSDMD-N. In contrast, the OGD+CHR group showed improved cardiomyocyte viability, accompanied by significantly decreased IL-1 β and IL-18 secretion, reduced DNA damage, diminished LDH levels, and downregulated NLRP3 and GSDMD-N protein expression compared to the OGD group. However, the OGD+CHR+Nig group displayed significantly increased DNA damage levels, upregulated NLRP3 and GSDMD-N protein expression, and decreased cardiomyocyte viability compared to the OGD+CHR group. Notably, no significant differences were observed in NLRP3/GSDMD-N protein levels, DNA-damaged cell counts, or cardiomyocyte viability between the OGD+CHR+Nig and OGD+Nig groups. Intriguingly, the OGD+CHR group showed comparable reductions in IL-1 β /IL-18 secretion, LDH content, and NLRP3/GSDMD-N protein expression to those observed in the OGD+MCC950 group, with both groups demonstrating significant decreases compared to the OGD group. These findings suggest that CHR may ameliorate OGD-induced cardiomyocyte injury through suppression of NLRP3-mediated pyroptosis in H9c2 cells.

Keywords Chrysophanol; oxygen-glucose deprivation injury; pyroptosis; NLRP3

随着人口老龄化进程的加快和不健康生活方式的影响,中国心血管疾病危险因素流行趋势明显,并呈现低龄化和快速增长的态势,而且患病率和死亡率呈持续上升趋势,是居民死亡的重要诱因,严重威胁居民的生命健康^[1]。世界卫生组织指出,在心血管疾病中威胁人类健康的“头号杀手”依然是缺血性心脏病,而导致缺血性心脏病死亡风险升高的主要原因之一为急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)^[2]。心肌梗死是在冠状动脉病变的基础上,其血流急剧减少或中断,相应的心肌出现严重而持久的急性缺血,导致心肌的缺血性坏死,最终导致大量心肌细胞发生死亡,患者发生心律失常、休克或心力衰竭^[3]。

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)是NOD样受体家族中重要的一员,由NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-associated Speck-like protein containing a CARD, ASC)和半胱氨酸天冬氨酸酶1前体蛋白(pro-Caspase-1)组成的一种蛋白复合物,是介导细胞焦亡(pyroptosis)和炎症的重要因子。与细胞凋亡相比较,细胞焦亡是由Caspase-1或其他炎症相关Caspase介导的,导致细胞膜穿孔,释放大量炎症因子,但同时也表现出细胞皱缩和DNA断裂^[4-5]。因此,细胞焦亡在炎症反应中占据重要地位,会导致心肌梗死患者血液中炎症因子的高表达,并进一步加剧心肌梗死损伤^[6]。细胞经受刺激时,会启动NLRP3炎症小体(NLRP3-ASC-Caspase-1)组装,激活Caspase-1裂解为Cleaved

Caspase-1, Cleaved Caspase-1一方面将致炎因子前体 pro-IL-18、pro-IL-1 β 剪切为成熟的 IL-18、IL-1 β ^[7-9], 另一方面通过识别并切割焦亡的关键执行蛋白——GSDMD特定位点释放 GSDMD-N 结构域并聚集于细胞膜形成焦亡孔, 释放炎症因子等细胞内容物诱发炎症级联反应^[10-11]。据相关研究表明, IL-1 β 、IL-18 和 LDH 的水平高低可以反映细胞或者组织的损伤程度^[12-13]。研究发现抑制 NLRP3 炎症小体激活可下调 Caspase-1 蛋白表达和减少炎症因子的释放, 从而抑制心肌梗死诱导的心肌细胞焦亡, 保护心脏功能^[14-17]。

大黄酚(Chrysophanol, CHR, 化学名为 1,8-二羟基-3-甲基蒽醌)是从大黄、何首乌和虎杖等蓼科植物中分离出的一种天然蒽醌衍生物, 具有抗癌、抗病毒、抗糖尿病、抗炎、抗原虫、降血脂、保肝、神经保护、抗溃疡和抗肥胖等多种药理作用^[18-20]。研究表明, 在小鼠脑缺血再灌注损伤模型中, CHR 可通过抑制 NLRP3 炎症小体的激活, 抑制炎症因子的释放, 提高小鼠的存活率^[21]。最近有研究表明, CHR 具有心脏保护作用的潜力, 如 YUAN 等^[22]在体内外实验证实, CHR 可通过抑制 JAK2 和 STAT3 的磷酸化和抑制 STAT3 入核, 减轻异丙肾上腺素诱发的心肌肥大损伤; LU 等^[23]还证实 CHR 对阿霉素诱导的心肌细胞凋亡、线粒体损伤和心肌功能障碍具有保护作用。然而, CHR 在心肌缺血损伤疾病中的作用及作用机制尚不明确。

因此, 本研究采用大鼠 H9c2 心肌细胞构建 OGD 模型, 观察 CHR 对 H9c2 心肌细胞活力和蛋白表达的影响, 探究 CHR 对 NLRP3 信号通路的影响, 并结合分子对接分析, 探索 CHR 与 NLRP3 的相互作用, 进一步阐明 CHR 减轻 H9c2 心肌细胞 OGD 损伤的分子机制, 为临床防治心肌梗死损伤及新药研发提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 主要试剂与仪器

大黄酚(货号: S2406, 分子式为 C₁₅H₁₀O₄, 化学结构见图 1A, 相对分子质量为 254.24)、尼日利亚菌素(Nigericin, Nig, 货号: S6653)、MCC950(货号: S8930)购自美国 Selleck 公司; H9c2 心肌细胞(货号: CL-0089)购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 细胞增殖-毒性检测试剂盒(货号: CK001)、BCA 蛋白浓度检测试剂盒(货号: B5001)、ECL 超敏发光液(货号:

E1080)购自北京兰博利德商贸有限公司; 超氧化物阴离子荧光探针(货号: S0063)、DAPI 染色液(货号: C1005)、一步法 TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(货号: C1086)、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(货号: C0018S)、大鼠 IL-18 ELISA 试剂盒(货号: PI555)、IL-1 β ELISA 试剂盒(货号: PI303)购自上海碧云天生物技术有限公司; 高糖 DMEM(货号: MA0212)、胎牛血清(货号: PWL001-3)、青/链霉素(货号: PWL062)购自大连美仑生物技术有限公司; 磷酸盐缓冲溶液(PBS, 货号: 20012027)、DMEM(不含葡萄糖)(货号: 11966-025)购自美国 Gibco 公司; PVDF 膜(货号: ISEQ00010)购自美国 Millipore 公司; 脱脂牛奶(货号: BD232100)购自美国 BD 公司; 5 $\times$ 蛋白上样缓冲液(货号: LT101S)购自上海雅酶生物医药科技有限公司; GSDMD(Gasdermin D)抗体(货号: 20770-1-AP)、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3(NLRP3)抗体(货号: ab283819)、荧光二抗(货号: ab150077)购自美国 Abcam 公司; β -肌动蛋白(β -actin)抗体(货号: AC026)购自美国 ABclonal 公司。

酶标仪(型号: M1000 Pro)购自瑞士 Tecan 公司; 二氧化碳培养箱、三气培养箱购自新加坡 ESCO 公司; 荧光共聚焦显微镜(型号: TCS SP8)购自德国 Leica 公司; 化学发光仪购自上海易亨特光电技术有限公司; MINI 垂直电泳及转印槽购自美国 Bio-Rad 公司。

1.2 方法

1.2.1 CCK-8 法检测各组 H9c2 心肌细胞活力 H9c2 心肌细胞使用 DMEM 高糖培养基(10% 胎牛血清、1% 青/链霉素), 放置在 37 $^{\circ}$ C、5% CO₂ 的湿润培养箱中培养。OGD 模型是模拟心肌缺血的经典体外模型, H9c2 心肌细胞培养至细胞融合度达到 80% 左右, 将处于对数生长期的 H9c2 心肌细胞接种于 96 孔板内, 每孔加入 100 μ L 细胞悬液, 细胞密度为 4 $\times$ 10⁴/mL, 细胞贴壁后, 将完全培养基替换为等体积无糖培养基, 用不同浓度(0、5、10、20、40、80 μ mol/L) CHR 处理 H9c2 心肌细胞, 并将其放置于三气培养箱(5% CO₂、94% N₂、1% O₂)中, 37 $^{\circ}$ C 条件下培养 6 h 构建 OGD 模型。造模结束后, 每孔加入 10 μ L CCK-8 溶液, 37 $^{\circ}$ C 条件下孵育 2 h 左右; 使用多功能酶标仪, 检测各孔在 450 nm 波长下的吸光度(*D*)值; 计算细胞存活率(%)=[(*D*_{实验组}-*D*_{空白对照组})/(*D*_{对照组}-*D*_{空白对照组})] $\times$ 100%。

1.2.2 ELISA 法检测 H9c2 心肌细胞上清液 IL-1 β 和

IL-18含量 收集各组细胞,取H9c2心肌细胞上清液,严格按照ELISA试剂盒说明书进行,在全自动酶标仪上450 nm波长处检测各组吸光度(D)值,绘制标准曲线并求出浓度。

1.2.3 LDH释放实验检测H9c2心肌细胞的LDH释放量 将H9c2心肌细胞以 4×10^3 /孔铺入96孔板中,于37℃、5% CO₂培养箱中培养过夜,分组造模后,根据LDH释放检测试剂盒说明书,取各组细胞培养上清液进行LDH释放量测定,LDH释放率= $[(D_{\text{样品}} - D_{\text{对照孔}}) / (D_{\text{标准品}} - D_{\text{对照孔}})] \times 100\%$ 。

1.2.4 蛋白免疫印迹检测NLRP3信号通路相关蛋白的表达情况 加入RIPA裂解液,冰上裂解H9c2心肌细胞,制备蛋白提取液,采用BCA法测量蛋白浓度,以蛋白上样量30 μg计算上样体积,加入5× SDS-PAGE蛋白上样缓冲液使蛋白变性,蛋白样品经SDS-PAGE胶电泳,然后将其转至PVDF膜上,5%牛奶室温封闭2 h,封闭后加入相应一抗,GSDMD(1:1 000)、NLRP3(1:1 000)、β-actin(1:1 000) 4℃孵育过夜,回收一抗后用1× TBST洗涤3次,与相应种属二抗(1:5 000)室温孵育2 h。采用ECL超敏发光液曝光,显影。采用ImageJ软件分析蛋白相对表达量。

1.2.5 免疫荧光染色法检测NLRP3炎症小体蛋白表达水平及分布情况 将处于对数生长期的H9c2心肌细胞接种于6孔板内,生长至80%左右造模。造模结束后,使用4%多聚甲醛室温固定15 min,随后用PBS稀释的0.2%的Triton X-100作用15 min,再用PBS洗3次,每次5 min。接着用5% BSA室温封闭30 min封闭处理1 h后洗涤,按1:200稀释NLRP3抗体,置于4℃冰箱孵育过夜。再与稀释好的Alexa Fluor 488荧光二抗室温孵育2 h。孵育完成后,最后用DAPI浸染30 min,用PBS清洗多余的DAPI,抗荧光淬灭剂封片后置于激光共聚焦显微镜400倍数(Zoom: 2)下观察并采集图像。

1.2.6 TUNEL染色检测H9c2心肌细胞DNA损伤情况 将处于对数生长期的H9c2心肌细胞接种于6孔板内,生长至80%左右造模。细胞造模结束后,按照TUNEL试剂盒说明书进行染色,最后置于激光共聚焦显微镜200倍数下观察并采集图像。

1.2.7 光学显微镜下观察H9c2心肌细胞形态变化 将H9c2心肌细胞接种至6孔板中(1×10^5 /mL, 2 mL/孔)。待细胞生长至80%左右,给予OGD和CHR处理,结束后在光学显微镜下观察各组细胞形态,并于400倍数

采集图像。

1.2.8 分子对接 采用ChemBioDraw软件绘制CHR的2D结构,并将其导入Schrödinger软件用Lig-Prep模块进行结构优化和3D结构转换,保存成sdf格式;检索PDB数据库(<https://www.rcsb.org>)下载NLRP3的3D结构,并将其导入Schrödinger软件用ProteinPreparation Wizard模块进行加氢、去水、氢键优化和能量最小化,保存成pdb格式;根据算法及特点使用Schrödinger软件的Glide模块完成CHR和NLRP3的分子对接,对接模式为柔性对接,对接精度为标准对接,计算对接得分^[24]。结合能越低表示构象越稳定,最后在PyMOL软件中进行分子对接结果的可视化分析。

1.2.9 数据统计分析 定量数据以均数±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,每组实验独立重复至少3次。采用Graph-Pad Prism 8.0软件进行数据分析,多组间比较采用单因素ANOVA分析,若ANOVA结果显示显著性差异($P < 0.05$),进一步通过Tukey's HSD检验进行两两比较。 $P < 0.05$ 视为统计学具有显著性差异。

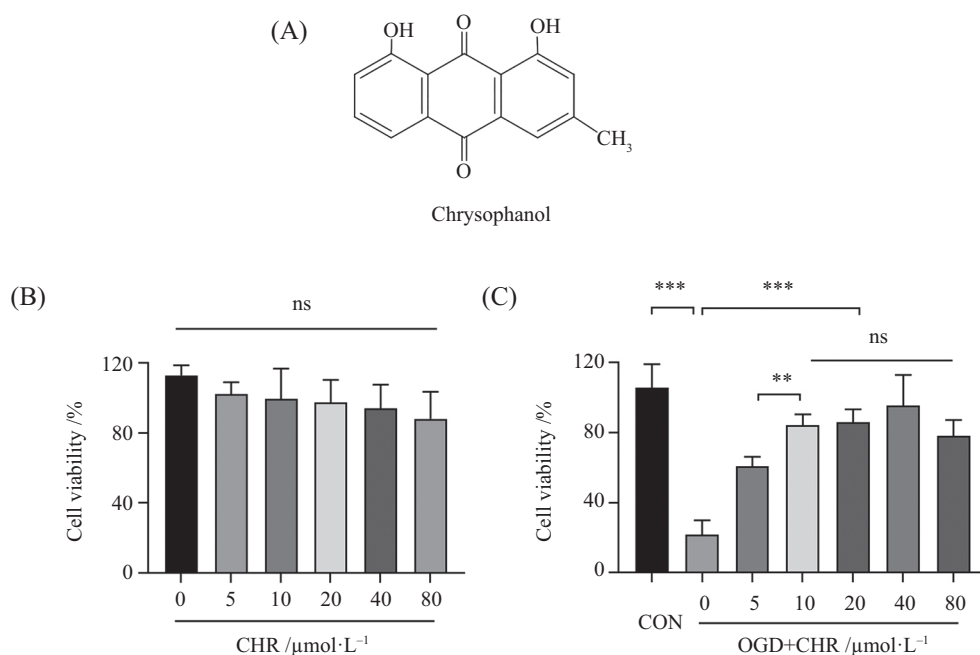
2 结果

2.1 不同浓度CHR对H9c2心肌细胞的活力影响

为了探究CHR(图1A)在H9c2心肌细胞中的安全剂量,本研究使用不同浓度(0、5、10、20、40、80 μmol/L)的CHR刺激H9c2心肌细胞6 h,随后用CCK-8法检测H9c2心肌细胞活力。结果显示,在0~80 μmol/L浓度范围内,CHR处理对H9c2心肌细胞活力无明显影响(图1B)。与Control组相比,OGD组H9c2心肌细胞活力明显下降;而与OGD组比较,CHR(5、10、20、40、80 μmol/L)处理的H9c2心肌细胞活力却显著提高($P < 0.001$)。由于10 μmol/L CHR提升细胞活力的作用比5 μmol/L CHR强,并且与20、40、80 μmol/L CHR无显著差异(图1C),因此,本研究选取10 μmol/L为后续实验CHR给药的使用浓度。

2.2 CHR对细胞焦亡具有抑制作用,并减轻细胞DNA损伤

为研究CHR对OGD刺激下H9c2心肌细胞损伤的作用,采用10 μmol/L CHR处理H9c2心肌细胞。光学显微镜下细胞形态观察发现,与Control组相比,单给CHR组细胞形态无明显改变,OGD组细胞出现肿胀、胞膜现破裂、胞质皱缩、内容物流出,此为细



A: 大黄酚的化学结构; B: 正常条件下, CCK-8法检测不同浓度CHR处理后的细胞活性变化; C: OGD条件下, CCK-8法检测不同浓度CHR对H9c2心肌细胞活力的影响; ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: 无显著性差异。

A: chemical structure of CHR; B: in H9c2 cardiomyocytes, CCK-8 was used to detect the changes of cell viability after different concentrations of CHR; C: under OGD conditions, the CCK-8 method was used to detect the effects of different concentrations of CHR on the viability of H9c2 cardiomyocytes. ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns: no significance.

图1 不同浓度CHR对H9c2心肌细胞的活力影响

Fig.1 Effect of different concentrations of CHR on the viability of H9c2 cardiomyocytes

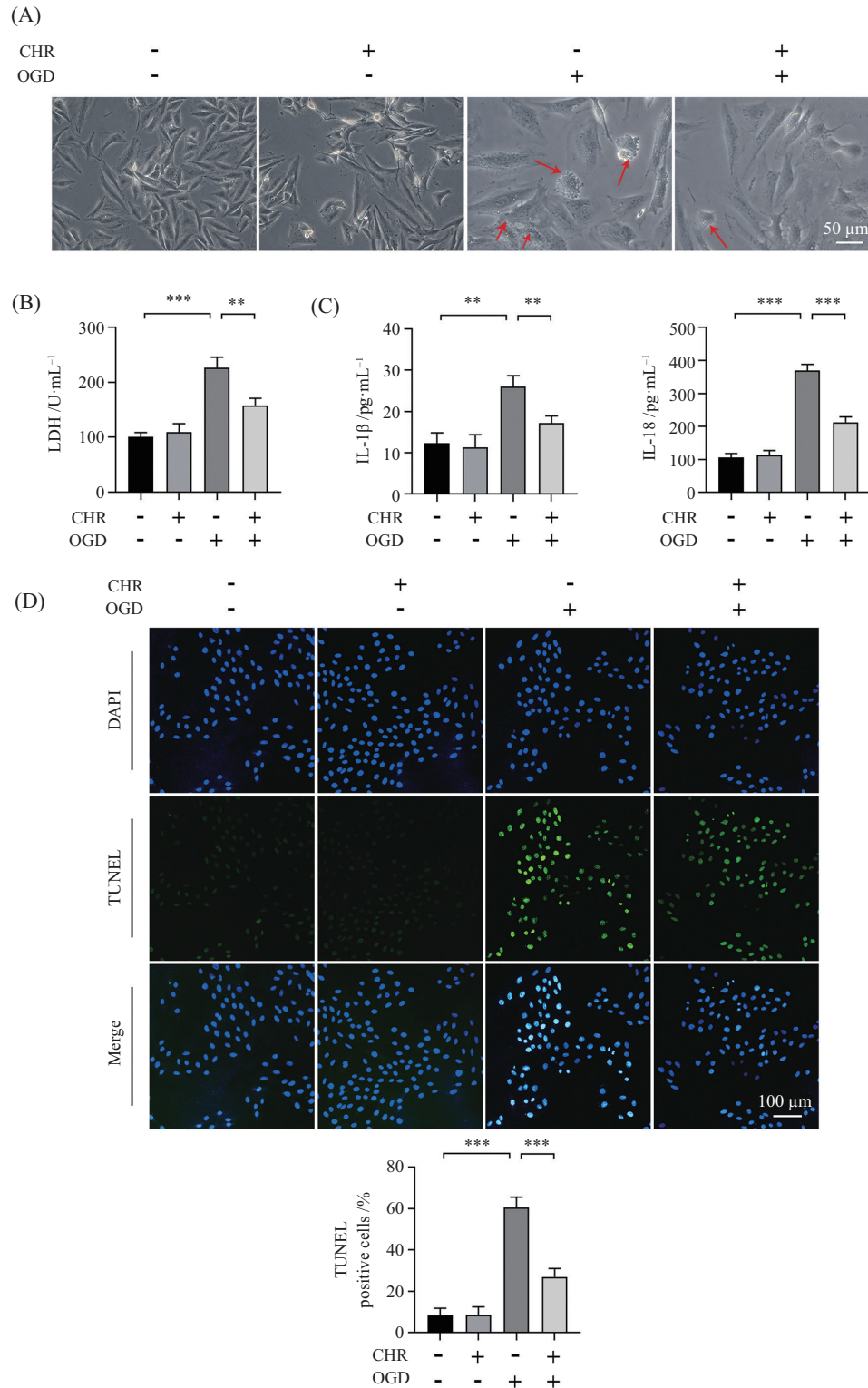
胞焦亡的典型表现, 而CHR+OGD组细胞肿胀、破裂等情况出现改善(图2A)。此外, LDH和ELISA检测结果显示, 与Control组相比, OGD组细胞上清液中LDH和IL-18、IL-1 β 含量明显升高, 而CHR处理后, 细胞上清液中LDH和IL-18、IL-1 β 含量明显下降($P<0.01$, 图2B和图2C)。TUNEL染色检测结果显示, 与Control组相比, OGD组TUNEL阳性细胞数明显增多; 而CHR+OGD组TUNEL阳性细胞数明显低于OGD组($P<0.001$, 图2D)。以上结果表明CHR对细胞焦亡具有抑制作用, 并减轻心肌细胞DNA损伤。

2.3 OGD条件下, CHR可降低NLRP3信号通路相关蛋白含量

为探究CHR对NLRP3信号通路细胞焦亡相关蛋白的影响, 采用免疫印迹法检测CHR处理后H9c2心肌细胞内NLRP3、GSDMD-N蛋白的含量。结果显示, 与Control组相比, OGD处理后, NLRP3、GSDMD-N蛋白含量都显著上升, 而CHR处理后, NLRP3、GSDMD-N蛋白含量都有所下降($P<0.01$, 图3A和图3B)。此外, 免疫荧光结果也表明, CHR可降低OGD刺激下NLRP3的蛋白含量(图3C)。

2.4 CHR通过抑制NLRP3介导的细胞焦亡减轻OGD诱导的H9c2心肌细胞损伤

为验证CHR通过抑制H9c2心肌细胞焦亡发挥心肌细胞保护作用, 我们在OGD条件下分别给予CHR、NLRP3激活剂(Nig, 10 $\mu\text{mol/L}$)和CHR+Nig处理, 即OGD+CHR、OGD+Nig、OGD+CHR+Nig, 并采用蛋白免疫印记法检测各组细胞中NLRP3、GSDMD-N蛋白含量; TUNEL染色检测各组细胞DNA损伤情况和CCK-8法检测各组心肌细胞活力。结果显示, 与OGD+CHR组相比, OGD+CHR+Nig处理可明显上调NLRP3、GSDMD-N蛋白含量($P<0.01$, 图4A和图4B), 削弱CHR对OGD条件下H9c2心肌细胞DNA损伤的保护作用($P<0.01$, 图4C)和降低H9c2心肌细胞活力($P<0.001$, 图4D)。但与OGD+Nig组相比, OGD+CHR+Nig处理后, 在NLRP3、GSDMD-N蛋白含量, 心肌细胞DNA损伤和细胞活力等方面无明显差异(图4A~图4D), Nig处理可逆转CHR对OGD条件下H9c2心肌细胞焦亡的保护作用。以上结果表明CHR可能通过抑制NLRP3介导的细胞焦亡减轻OGD诱导的H9c2心肌细胞损伤。

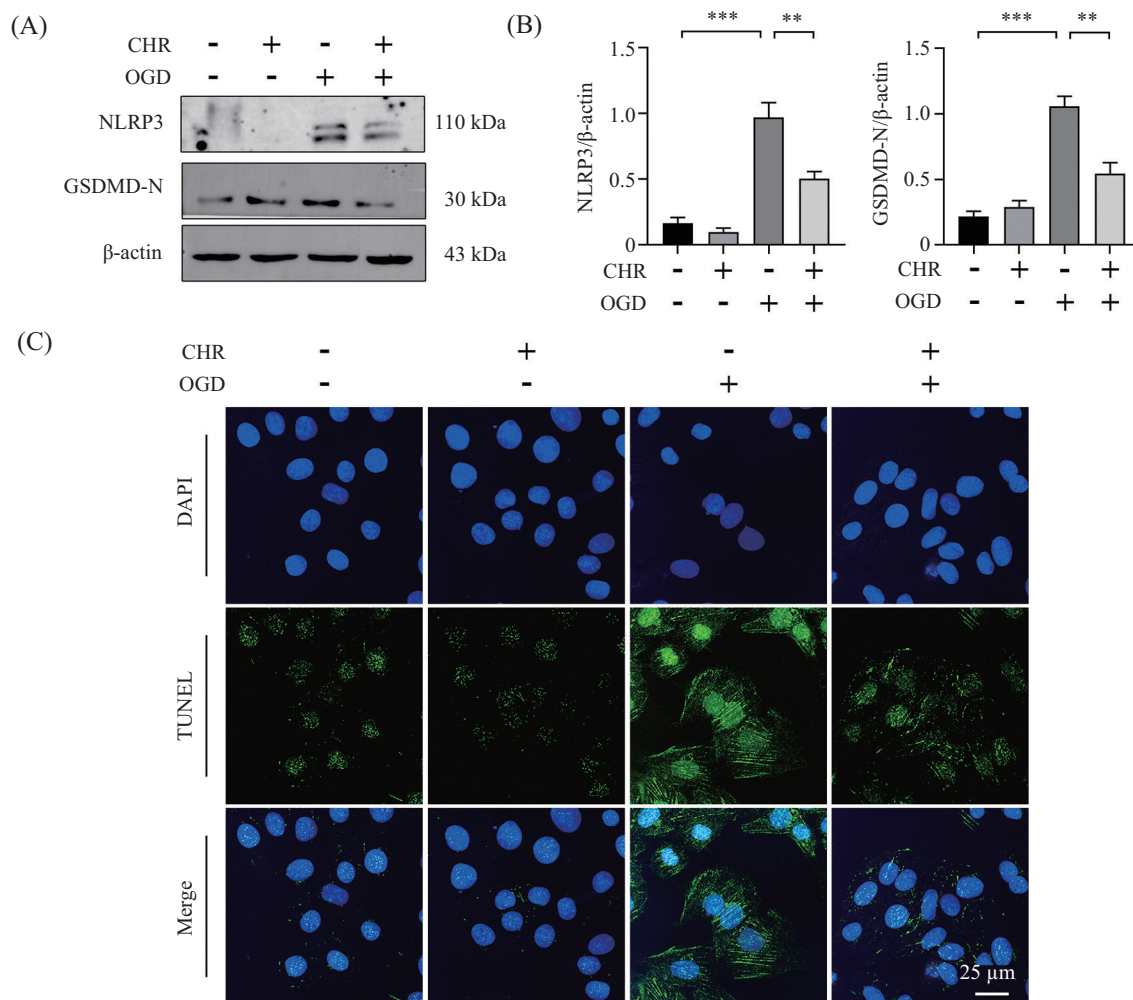


A: 光学显微镜下各组H9c2心肌细胞形态; 红色箭头: 异常形态的心肌细胞; B: LDH试剂盒检测细胞上清液中LDH含量; C: ELISA试剂盒检测细胞上清液中IL-18、IL-1 β 含量; D: 采用一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒检测各组H9c2心肌细胞DNA损伤数量并定量分析。*** P <0.001, ** P <0.01.

A: morphological changes of H9c2 cardiomyocytes with different treatments; red arrow: abnormal morphology of cardiomyocytes; B: LDH kit was used to detect LDH content in cell supernatants; C: ELISA kits were used to detect the contents of IL-18 and IL-1 β in cell supernatants; D: the one-step TUNEL apoptosis assay kit was used to detect the amount of DNA damage in H9c2 cardiomyocytes in each group and quantitatively analyzed. *** P <0.001, ** P <0.01.

图2 CHR对细胞焦亡具有抑制作用, 并减轻细胞DNA损伤

Fig.2 CHR inhibits pyroptosis and ameliorates DNA damage in cardiomyocytes



A: 蛋白免疫印迹检测H9c2心肌细胞中焦亡相关蛋白NLRP3、GSDMD-N的蛋白含量; B: NLRP3和GSDMD-N蛋白含量的定量分析; C: 免疫荧光检测H9c2心肌细胞中NLRP3蛋白表达情况。 ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ 。

A: Western blot was used to detect the protein content of pyroptosis-related proteins NLRP3 and GSDMD-N in H9c2 cardiomyocytes; B: quantitative analysis of NLRP3 and GSDMD-N protein content; C: immunofluorescence detection of NLRP3 protein expression in H9c2 cardiomyocytes. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$.

图3 CHR对NLRP3信号通路细胞焦亡相关蛋白含量的影响

Fig.3 Effect of CHR on the content of pyroptosis-related proteins in NLRP3 signaling pathway

2.5 CHR和MCC950可抑制NLRP3信号通路抑制炎症因子的分泌,减轻心肌细胞损伤

为进一步验证CHR通过抑制NLRP3信号通路抑制心肌细胞焦亡,减轻心肌细胞损伤,我们在OGD条件下分别使用CHR或NLRP3抑制剂(MCC950: 5 $\mu\text{mol/L}$)处理H9c2心肌细胞,结果发现,相较于OGD组,OGD+MCC950组可显著降低NLRP3和GSDMD-N蛋白含量($P < 0.05$,图5A),但与OGD+CHR组比较无明显差异。ELISA试剂盒和LDH试剂盒检测发现,MCC950可显著降低OGD条件下炎症因子IL-18、IL-1 β 和LDH的含量($P < 0.05$,图5B和图5C),但与OGD+CHR组比较无明显差异。

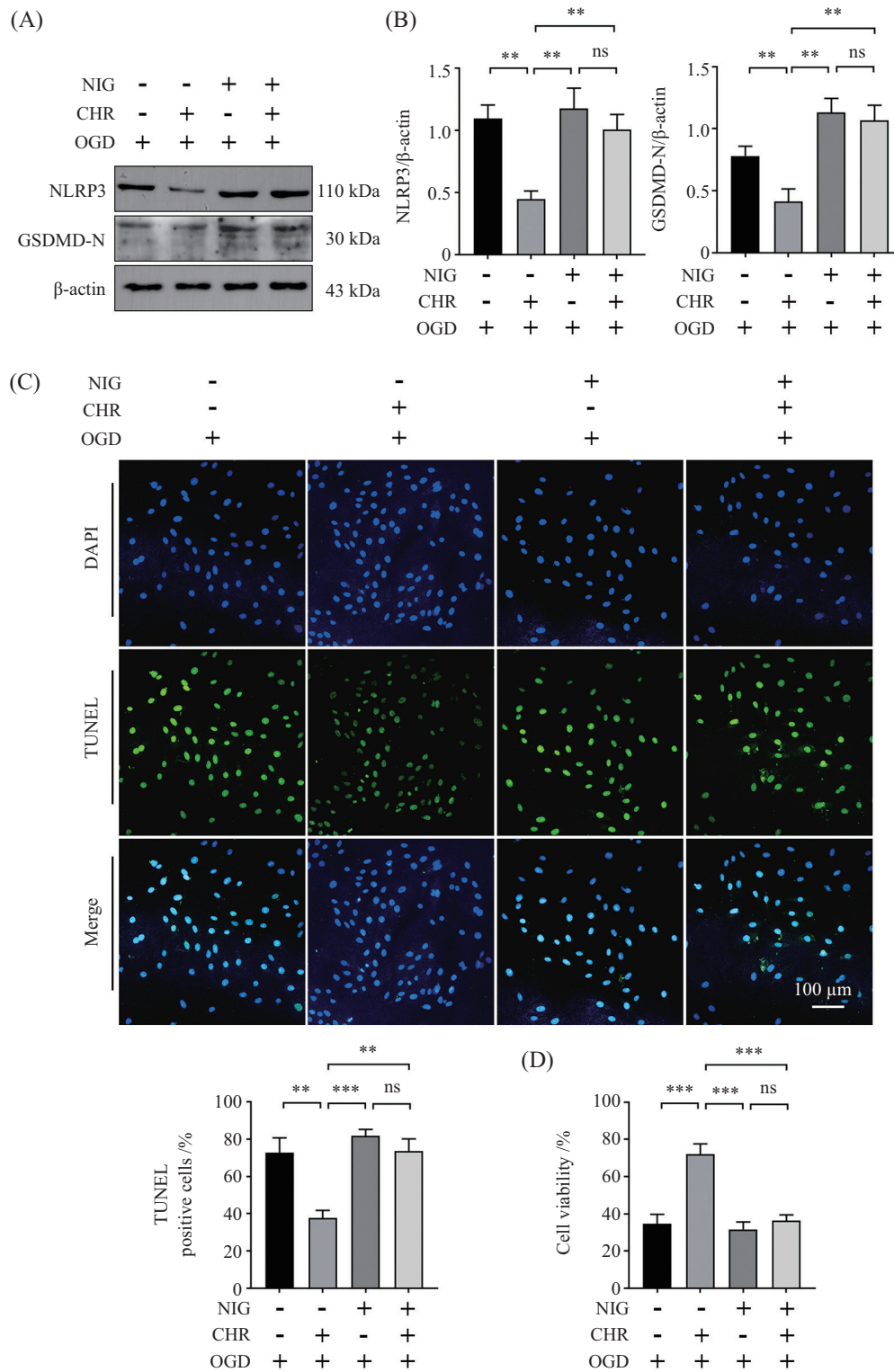
综合以上结果表明,CHR可能是通过抑制NLRP3介导的H9c2心肌细胞焦亡,从而抑制炎症因子的分泌,进而减轻OGD诱导的心肌细胞损伤。

2.6 CHR与NLRP3具有较好的结合能力

我们将CHR与NLRP3进行分子对接,预测其结合能力。如图5所示,CHR与NLRP3的结合能为 $-9.3 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 。当结合能 $\leq -7 \text{ kcal}\cdot\text{mol}^{-1}$ 时,分子与蛋白质具有较好的结合性^[25-26]。因此,CHR与NLRP3具有较好的结合能力。

3 讨论

心肌梗死是导致病人死亡的主要疾病之一。从



A: 蛋白免疫印迹检测H9c2心肌细胞中焦亡相关蛋白NLRP3、GSDMD-N的蛋白含量; B: NLRP3、GSDMD-N蛋白含量的定量分析; C: 采用一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒检测各组H9c2心肌细胞DNA损伤数量; D: CCK-8法检测各组H9c2心肌细胞活力。** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns:无显著性差异。

A: Western blot was used to detect the protein content of pyroptosis-related proteins NLRP3 and GSDMD-N in H9c2 cardiomyocytes; B: quantitative analysis of NLRP3 and GSDMD-N protein content; C: the one-step TUNEL apoptosis assay kit was used to detect the amount of DNA damage in H9c2 cardiomyocytes in each group; D: CCK-8 method was used to detect the viability of H9c2 cardiomyocytes in each group. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, ns: no significance.

图4 CHR通过抑制NLRP3介导的细胞焦亡减轻OGD诱导的H9c2心肌细胞损伤

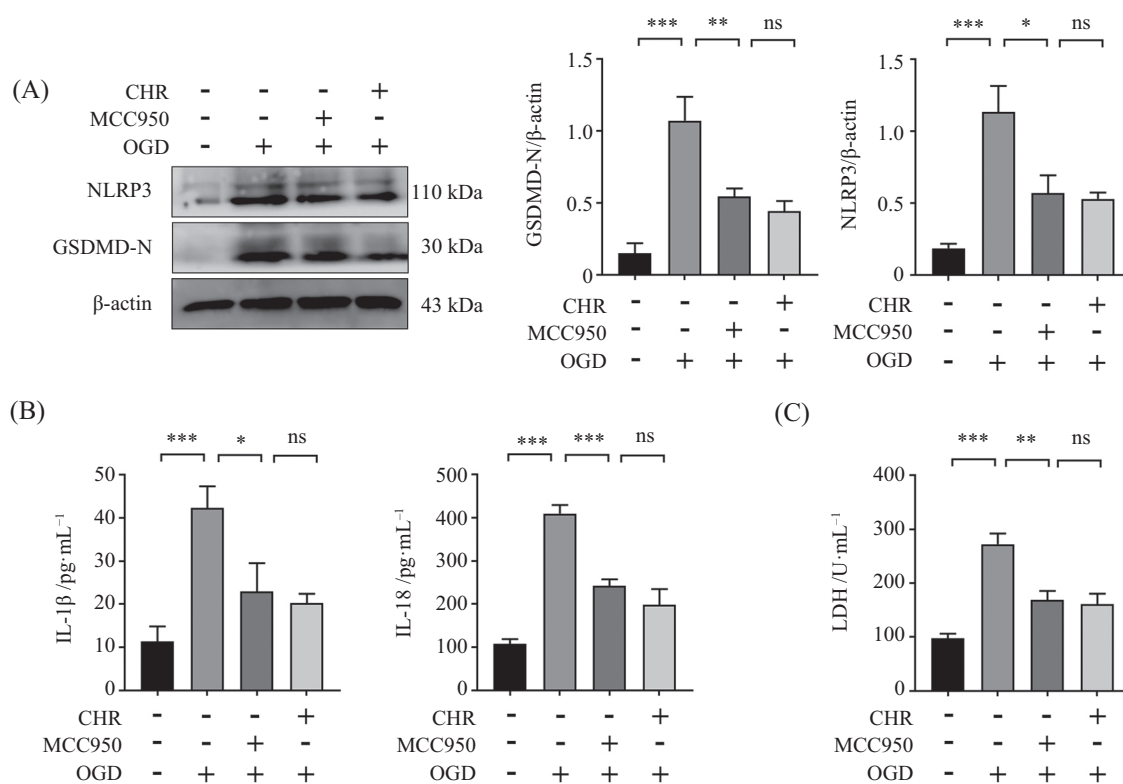
Fig.4 CHR ameliorates OGD-induced injury in H9c2 cardiomyocytes by inhibiting NLRP3-mediated pyroptosis

2005年开始,我国心肌梗死病人发病率和死亡率一直呈快速上升趋势^[27]。研究表明,心肌细胞是心肌梗死发生发展的主要效应细胞^[28],并且心肌细胞的大量丢失是心肌梗死造成心肌损伤的主要原因^[29]。本研究选用OGD处理大鼠H9c2心肌细胞系构建体外心肌缺血模型,给予CHR干预,在细胞水平上探索心肌梗死的发病机制。

研究表明,细胞焦亡导致心肌细胞丢失是心肌梗死发生发展的重要过程^[30]。LI等^[31]在急性心肌梗死大鼠模型中发现,焦亡相关蛋白表达水平明显升高,而抑制细胞焦亡能够抑制心肌组织炎症因子释放,改善心肌功能。这表明通过调节心肌细胞焦亡可能是减轻心肌梗死损伤的重要病理机制。近期研究表明,杨燕玲等^[32]和原平等^[33]发现中药方剂益心方和中药单体毛兰素均可通过抑制NLRP3信号通路缓解心肌缺血再灌注损伤诱导的细胞焦亡,降

低心肌梗死面积和心肌纤维化程度,改善心功能。CHR作为一种天然的抗炎蒽醌类化合物,既往研究发现,CHR可通过抑制NLRP3炎症小体的激活,抑制炎症因子的释放,提高脑缺血再灌注损伤小鼠的存活率^[21],且对心肌肥大损伤具有保护作用^[22]。这提示CHR在心肌梗死疾病中可能具有类似作用。

因此,本研究以不同浓度CHR处理OGD条件下的H9c2心肌细胞,发现CHR可增强其细胞活力。通过观察H9c2心肌细胞形态发现CHR可明显改善OGD条件下H9c2心肌细胞肿胀、破裂、泡状内容物流出等情况。试剂盒检测细胞焦亡相关指标和TUNEL染色发现OGD条件下H9c2心肌细胞上清液中LDH、IL-1 β 、IL-18含量和DNA断裂细胞数量显著升高,但给予CHR干预后,上述状况明显改善。这提示CHR可能通过抑制细胞焦亡,减轻OGD诱导的H9c2心肌细胞损伤。为验证该机制的作



A: 蛋白免疫印迹检测各组H9c2心肌细胞中焦亡相关蛋白NLRP3、GSDMD-N的蛋白含量; B: ELISA试剂盒检测细胞上清液中IL-18、IL-1 β 含量; C: LDH试剂盒检测细胞上清液中LDH含量。* P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, ns: 无显著性差异。

A: Western blot analysis of protein levels of pyroptosis-related proteins NLRP3 and GSDMD-N in H9c2 cardiomyocytes across experimental groups; B: ELISA kits were used to measure the levels of IL-18 and IL-1 β in the cell culture supernatant; C: LDH assay kits were employed to detect lactate LDH content in the cell culture supernatant. * P <0.05, ** P <0.01, *** P <0.001, ns: no significance.

图5 CHR和MCC950可抑制NLRP3信号通路降低炎症因子的分泌,减轻心肌细胞损伤

Fig.5 CHR and MCC950 inhibit the NLRP3 signaling pathway to reduce the secretion of inflammatory factors and alleviate myocardial cell injury

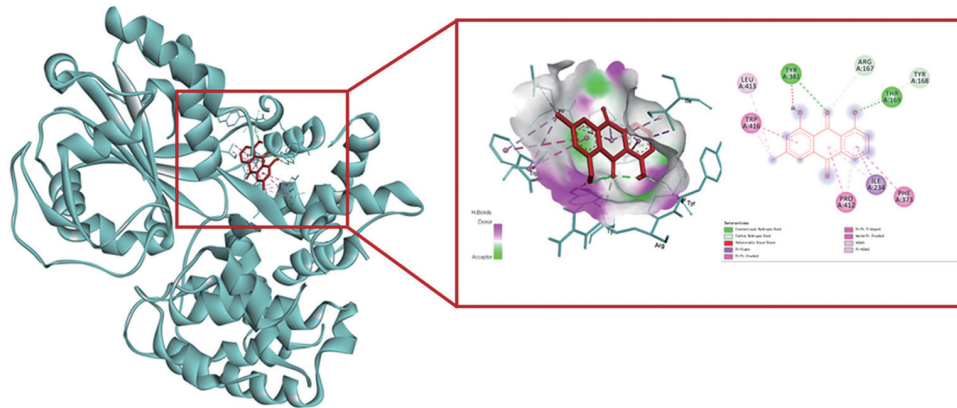


图6 CHR与NLRP3的分子对接结果

Fig.6 Visualization of docking between core targets and CHR

用,本研究进一步用NLRP3激活剂Nigericin和CHR共同处理OGD条件下的H9c2心肌细胞,结果发现Nigericin可促进NLRP3、GSDMD-N蛋白表达,并削弱OGD条件下CHR对H9c2心肌细胞DNA损伤和焦亡的抑制作用,另外,我们还使用NLRP3抑制剂MCC950和CHR相比较,结果发现CHR+MCC950组和OGD+CHR组NLRP3、GSDMD-N蛋白含量和IL-1 β 、IL-18等炎症因子含量无明显差异。最后采用分子对接法探究CHR与NLRP3的调控机制,结果显示CHR与NLRP3具有较好的结合能力,这提示CHR可能与NLRP3结合,抑制NLRP3去泛素化修饰,从而下调其蛋白含量,具体机制仍需进一步探究。以上结果表明CHR通过抑制NLRP3信号通路和细胞焦亡,减轻OGD诱导的H9c2心肌细胞损伤。

虽然本研究在H9c2心肌细胞中揭示CHR通过抑制NLRP3信号通路介导的细胞焦亡减轻OGD诱导心肌细胞损伤的作用机制,但仍存在值得深入探讨的科学问题。首先,该机制仍需在大鼠原代心肌细胞和动物模型中进一步详实。其次,Cleaved Caspase-1作为细胞焦亡的重要指标,然而本研究却未进行检测,因此这也是本研究的缺陷之处。此外,CHR调控NLRP3的具体机制尚未被阐明,虽然分子对接显示CHR与NLRP3具有较好的结合能力,但有研究发现激活Nrf2抗氧化通路可抑制NLRP3炎症小体减轻非酒精性脂肪性肝病和阿霉素诱导的心肌毒性损伤^[34],并且CHR具有抗氧化作用^[35],因此这可能是未来的研究方向之一。最后,CHR作为一种天然蒽醌类化合物,对其进行结构修饰或将其与其他具有协同作用的中药提取物结合,以提高生物利用度和降低肝肾毒性也值得深入探究。

综上所述,本研究发现CHR可通过抑制NLRP3信号通路介导的细胞焦亡,减少炎症因子释放进而减轻OGD诱导的H9c2心肌细胞损伤,为今后CHR治疗心肌缺血疾病提供了参考。

参考文献 (References)

- [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] 张蕾, 蔺琳, 武继彪, 等. 黄芪甲苷与丹参酮IIA配伍拮抗内皮细胞糖氧剥夺损伤促进血管新生[J]. *世界科学技术-中医药现代化* (ZHANG L, LIN L, WU J B, et al. Combination of Astragaloside IV and Tanshinone IIA promote angiogenesis after oxygen-glucose deprivation injury in endothelial cells [J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*), 2024, 26(5): 1279-89.
- [3] SEROPIAN I M, TOLDO S, VAN TASSELL B W, et al. Anti-inflammatory strategies for ventricular remodeling following ST-segment elevation acute myocardial infarction [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2014, 63(16): 1593-603.
- [4] LIANG F, ZHANG F, ZHANG L, et al. The advances in pyroptosis initiated by inflammasome in inflammatory and immune diseases [J]. *Inflamm Res*, 2020, 69(2): 159-66.
- [5] VASUDEVAN S O, BEHL B, RATHINAM V A. Pyroptosis-induced inflammation and tissue damage [J]. *Semin Immunol*, 2023, 69: 101781.
- [6] SHI H, GAO Y, DONG Z, et al. GSDMD-mediated cardiomyocyte pyroptosis promotes myocardial I/R injury [J]. *Circ Res*, 2021, 129(3): 383-96.
- [7] MULAY S R. Multifactorial functions of the inflammasome component NLRP3 in pathogenesis of chronic kidney diseases [J]. *Kidney Int*, 2019, 96(1): 58-66.
- [8] PLATNICH J M, MURUVE D A. NOD-like receptors and inflammasomes: a review of their canonical and non-canonical signaling pathways [J]. *Arch Biochem Biophys*, 2019, 670: 4-14.
- [9] LI Z, GUO J, BI L. Role of the NLRP3 inflammasome in autoimmune diseases [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 130: 110542.
- [10] WANG K, SUN Q, ZHONG X, et al. Structural mechanism for GSDMD targeting by autoprocessed caspases in pyroptosis [J].

- Cell, 2020, 180(5): 941-55, e920.
- [11] JORGENSEN I, RAYAMAJHI M, MIAO E A. Programmed cell death as a defence against infection [J]. *Nat Rev Immunol*, 2017, 17(3): 151-64.
- [12] 刘意, 金湘东, 贾宝辉, 等. 石斛酚抑制高糖诱导的视网膜血管内皮细胞凋亡及炎症反应机制[J]. *中国老年学杂志* (LIU Y, JIN X D, JIA B H, et al. Mechanisms of dendrobine inhibition on high glucose-induced apoptosis and inflammatory response in retinal vascular endothelial cells [J]. *Chinese Journal of Gerontology*), 2021, 41(5): 1085-8.
- [13] MCGINLEY A M, SUTTON C E, EDWARDS S C, et al. Interleukin-17A serves a priming role in autoimmunity by recruiting IL-1 β -producing myeloid cells that promote pathogenic T cells [J]. *Immunity*, 2020, 52(2): 342-56, e346.
- [14] LI B, XU L, LIU J, et al. Phloretin ameliorates heart function after myocardial infarction via NLRP3/Caspase-1/IL-1 β signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115083.
- [15] ZHANG X, QU H, YANG T, et al. Astragaloside IV attenuate MI-induced myocardial fibrosis and cardiac remodeling by inhibiting ROS/caspase-1/GSDMD signaling pathway [J]. *Cell Cycle*, 2022, 21(21): 2309-22.
- [16] CUI L G, WANG S H, KOMAL S, et al. ALKBH5 promotes cardiac fibroblasts pyroptosis after myocardial infarction through Notch1/NLRP3 pathway [J]. *Cell Signal*, 2025, 127: 111574.
- [17] 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.
- [18] KANG L, SI L, RAO J, et al. Polygoni multiflori radix derived anthraquinones alter bile acid disposition in sandwich-cultured rat hepatocytes [J]. *Toxicol In Vitro*, 2017, 40: 313-23.
- [19] ZHANG J, YAN C, WANG S, et al. Chrysophanol attenuates lead exposure-induced injury to hippocampal neurons in neonatal mice [J]. *Neural Regen Res*, 2014, 9(9): 924-30.
- [20] ZHAO Y, FANG Y, LI J, et al. Neuroprotective effects of Chrysophanol against inflammation in middle cerebral artery occlusion mice [J]. *Neurosci Lett*, 2016, 630: 16-22.
- [21] ZHANG N, ZHANG X, LIU X, et al. Chrysophanol inhibits NALP3 inflammasome activation and ameliorates cerebral ischemia/reperfusion in mice [J]. *Mediators Inflamm*, 2014, 2014: 370530.
- [22] YUAN J, HONG H, ZHANG Y, et al. Chrysophanol attenuated isoproterenol-induced cardiac hypertrophy by inhibiting Janus kinase 2/signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway [J]. *Cell Biol Int*, 2019, 43(6): 695-705.
- [23] LU J, LI J, HU Y, et al. Chrysophanol protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity by suppressing cellular PARylation [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(4): 782-93.
- [24] 许先进, 王存新. 分子对接方法在药物发现之外领域的应用 [J]. *北京工业大学学报* (XU X J, WANG C X. Applications of molecular docking: beyond the drug discovery [J]. *Journal of Beijing University of Technology*), 2017, 43(12): 1872-80.
- [25] 黄星瑞, 邹洁, 杨洁, 等. 咖啡豹蠹蛾普通气味结合蛋白ZcofGOBP1和ZcofGOBP2同源建模及其与杜仲挥发物分子对接 [J]. *应用昆虫学报* (HUANG X R, ZOU J, YANG J, et al. Homology modelling of general odorant binding proteins (ZcofGOBP1 and ZcofGOBP 2) in *Zeuzera coffeae* and their molecular docking with volatiles of *Eucommia ulmoides* [J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*), 2024, 61(6): 1183-96.
- [26] 徐曦, 陈双扣, 王瑜, 等. 基于网络药理学、分子对接及分子动力学研究巴马汀抗菌作用机制 [J]. *中国新药与临床杂志* (XU X, CHEN S K, WANG Y, et al. Exploration of antibacterial mechanism of palmatine based on network pharmacology, molecular docking, and molecular dynamics [J]. *Chinese Journal of New Drugs and Clinical Remedies*), 2024, 43(8): 627-35.
- [27] IN CHINA T, HU S S. Report on cardiovascular health and diseases in China 2021: an updated summary [J]. *J Geriatr Cardiol*, 2023, 20(6): 399-430.
- [28] MEI L, CHEN Y, CHEN P, et al. Fibroblast growth factor 7 alleviates myocardial infarction by improving oxidative stress via PI3K α /AKT-mediated regulation of Nrf2 and HXK2 [J]. *Redox Biol*, 2022, 56: 102468.
- [29] LEI Q, YI T, CHEN C, NF- κ B-Gasdermin D (GSDMD) axis couples oxidative stress and NACHT, LRR and PYD domains-containing protein 3 (NLRP3) inflammasome-mediated cardiomyocyte pyroptosis following myocardial infarction [J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 6044-52.
- [30] TOLDO S, ABBATE A. The role of the NLRP3 inflammasome and pyroptosis in cardiovascular diseases [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2024, 21(4): 219-37.
- [31] LI S, FENG L, LI G, et al. GSDME-dependent pyroptosis signaling pathway in diabetic nephropathy [J]. *Cell Death Discovery*, 2023, 9(1): 156.
- [32] 杨燕玲, 董莉, 郑钰凡, 等. 益心方抑制NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. *世界科学技术-中医药现代化* (YANG Y L, DONG L, ZHENG Y F, et al. Yixin Formula Inhibits NLRP3 inflammasomes mediated pyroptosis to attenuates myocardial ischemia reperfusion injury in rats [J]. *Modernization of Traditional Chinese Medicine and Materia Medica-World Science and Technology*), 2024, 26(9): 2483-91.
- [33] 原平利, 刘刚, 马兰香, 等. 毛兰素通过抑制NLRP3炎症小体介导的细胞焦亡减轻心肌缺血再灌注损伤 [J]. *山西医科大学学报* (YUAN P L, LIU G, MA L X, et al. Erianin alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting pyroptosis mediated by NLRP3 inflammasome [J]. *Journal of Shanxi Medical University*), 2023, 54(9): 1200-7.
- [34] YANG H B, LU Z Y, YUAN W, et al. Selenium attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity through Nrf2-NLRP3 pathway [J]. *Biol Trace Elem Res*, 2022, 200(6): 2848-56.
- [35] ZHANG M, DING Z X, HUANG W, et al. Chrysophanol exerts a protective effect against A β (25-35)-induced Alzheimer's disease model through regulating the ROS/TXNIP/NLRP3 pathway [J]. *Inflammopharmacology*, 2023, 31(3): 1511-27.