

丹酚酸 B 调节 SIRT1 信号途径抑制 H₂O₂ 诱导的 NLRP3 炎症小体激活

李庆菊, 潘韵铮, 张琦, 蒋宝平, 许立(江苏省中药药效与安全性评价重点实验室, 南京中医药大学药学院, 江苏 南京 210023)

摘要: **目的** 基于沉默信息调节因子 1(SIRT1)/NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体途径探讨丹酚酸 B(SalB)抗氧化应激致细胞损伤的作用机制, 以期阐明丹酚酸 B 抗心肌缺血的作用机制。**方法** 采用体外构建 H₂O₂ 诱导的氧化应激细胞模型, 将 H9c2 细胞分为 6 组, 分别为正常组、模型组(600 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ H₂O₂ 刺激)、H₂O₂+丹酚酸 B(5、10、20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组和 H₂O₂+丹酚酸 B(20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)+EX527(10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)组。采用 MTT 法测定细胞活性; Hoechst 染色法测定细胞凋亡; 比色法及 ELISA 法分别测定乳酸脱氢酶(LDH)、白细胞介素(IL)-1 β 水平; 采用 DCFH-DA 荧光探针检测细胞内活性氧(ROS)水平; 采用 JC-1 荧光探针测定线粒体膜电位; Western Blot 法测定 H9c2 细胞中 NLRP3、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1(Caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC), 以及 SIRT1 信号通路相关的 SIRT1、磷酸化 AMP 蛋白活化激酶 α (p-AMPK α)、AMP 蛋白活化激酶 α (AMPK α)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1 α (PGC-1 α)蛋白表达。**结果** 与正常组比较, 模型组细胞活力及线粒体膜电位明显降低($P<0.01$), 细胞凋亡程度及细胞内 ROS、LDH 和炎症因子 IL-1 β 水平明显升高($P<0.01$); 与 NLRP3 炎症小体相关的 NLRP3、Caspase-1 和 ASC 蛋白表达显著上调($P<0.01$), SIRT1、p-AMPK α /AMPK α 和 PGC-1 α 蛋白表达明显下调($P<0.01$)。与模型组比较, 丹酚酸 B 组的细胞活力以及线粒体膜电位显著升高($P<0.05$, $P<0.01$), 细胞凋亡程度及细胞内 ROS、LDH 及炎症因子 IL-1 β 释放水平明显降低($P<0.01$)。丹酚酸 B 能够明显上调 SIRT1 信号通路中 SIRT1、p-AMPK α /AMPK α 、PGC-1 α 蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$), 下调 NLRP3 炎症小体相关的 NLRP3、Caspase-1 和 ASC 蛋白表达($P<0.05$, $P<0.01$), 且呈一定量效关系。在应用 SIRT1 特异性抑制剂 EX527 干预后, 丹酚酸 B 抑制 H₂O₂ 诱导的 NLRP3 炎症小体激活作用被明显逆转。**结论** 丹酚酸 B 可能通过激活 SIRT1/AMPK/PGC-1 α 信号通路, 抑制氧化应激诱导的 NLRP3 炎症小体的激活, 继而发挥抗心肌缺血作用。

关键词: 丹酚酸 B; 氧化应激; 心肌缺血; NLRP3 炎症小体; SIRT1/AMPK/PGC-1 α 信号通路; H9c2 细胞

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)05-0604-08

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.05.002

Salvianolic Acid B Attenuates H₂O₂-induced NLRP3 Inflammasome Activation via Regulating SIRT1 Signaling Pathway

LI Qingju, PAN Yunzheng, ZHANG Qi, JIANG Baoping, XU Li (Jiangsu Key Laboratory for Pharmacology and Safety Evaluation of Chinese Materia Medica, School of Pharmacy, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210023 Jiangsu, China)

Abstract: **Objective** To investigate whether salvianolic acid B (SalB) inhibits the activation of NOD like receptor protein 3 (NLRP3) inflammasome is closely related to the regulation of silent information regulator 1 (SIRT1) signaling pathway. **Methods** Oxidative stress injury was constructed *in vitro* with hydrogen peroxide (H₂O₂). H9c2

收稿日期: 2020-12-01

作者简介: 李庆菊, 女, 硕士研究生, 研究方向: 中药药理。Email: m18921741130@163.com。通信作者: 许立, 博士, 教授, 研究方向: 中药药理与毒理。Email: xuli64@163.com。

基金项目: 江苏省中医药局科技项目(ZD301701)。

cells were divided into the control group, H_2O_2 group, different doses (5, 10, 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) of salvianolic acid B groups and EX527 (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) group. MTT assay was performed to detect the cell viability. Cells were stained with Hoechst to observe the apoptotic morphological changes. The levels of LDH, IL-1 β were detected respectively by colorimetry and ELISA. The level of intracellular reactive oxygen species (ROS) was detected by DCFH-DA fluorescent probe, and mitochondrial membrane potential (MMP) was determined using the fluorescent dye JC-1. Western Blot was used to detect nucleotide binding oligomeric domain-like receptor protein 3 (NLRP3), apoptosis related speckle protein (ASC), Caspase-1 and the expression levels of related proteins in SIRT1/AMP-activated protein kinase (AMPK)/peroxisome proliferator-activated receptor- γ coactivator 1 α (PGC-1 α) pathway. **Results** Compared with the normal control group, cell viability and MMP of cells in model group were significantly decreased ($P < 0.01$), the percentage of apoptotic cells and levels of ROS, LDH and IL-1 β increased significantly ($P < 0.01$); and the levels of NLRP3 inflammasome related proteins including NLRP3, Caspase-1 and ASC were significantly up-regulated ($P < 0.01$). After pretreatment by different concentrations of SalB for 24 h on H9c2 cells, compared with the model group, the cell viability and MMP showed a dose-dependent increase ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The percentage of apoptotic cells and release of LDH, ROS and IL-1 β were decreased after being pretreated with different concentrations of SalB ($P < 0.01$). SIRT1, p-AMPK α /AMPK α , PGC-1 α proteins expression increased after pretreatment with SalB ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and protein expression levels of NLRP3, ASC, and Caspase-1 were down-regulated in a dose-dependent manner ($P < 0.05$, $P < 0.01$). The effect of inhibiting the activation of NLRP3 inflammasomes induced by H_2O_2 can be reversed by SIRT1 specific inhibitor EX527. **Conclusion** These results indicate that SIRT1 regulates NLRP3 inflammasome-mediated inflammatory response is an important mechanism of H_2O_2 -induced myocardial ischemia. Pretreatment with SalB could inhibit the NLRP3 inflammasome activation and alleviating myocardial inflammatory injury by up-regulating SIRT1/AMPK/PGC-1 α signaling pathway.

Keywords: Salvianolic acid B; oxidative stress; myocardial ischemia; NLRP3 inflammasome; SIRT1/AMPK/PGC-1 α pathway; H9c2 cells

心肌缺血是一种由冠状动脉阻塞引发的心脏病理状态,伴随着氧供需失衡,心肌灌流减少,最终可能导致缺血性心脏病以及心力衰竭^[1]。有研究^[2-3]显示, NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)炎症小体介导的无菌性炎症参与了心肌缺血损伤。丹酚酸 B(SalB)是丹参中主要水溶性成分之一,研究^[4-6]表明,丹酚酸 B 可以通过抗炎以及抗氧化发挥抗心肌缺血作用。本课题组前期研究^[7-9]结果显示,丹酚酸 B 抗心肌缺血作用与其抑制 NLRP3 炎症小体活化相关。沉默信息调节因子 1(SIRT1)被认为是心脏的重要保护分子,它作为一种依赖于烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(NAD⁺)的去乙酰化酶,能够通过去乙酰化相关因子发挥抗氧化、减少细胞凋亡、抗炎以及调节能量代谢的作用^[10]。已有研究^[11]发现, SIRT1 激动剂可以抑制 NLRP3 炎症小体的激活。尚不清楚丹酚酸 B 抑制 NLRP3 炎症小体的激活是否与调节 SIRT1 信号途径有关。因此,本研究拟通过建立体外氧化应激模型,探究丹酚酸 B 是否通过上调 SIRT1 来抑制

NLRP3 炎症小体的激活,以进一步阐明丹酚酸 B 抗心肌缺血的作用机制。

1 材料与方法

1.1 细胞及其培养 H9c2 细胞株,购自南京凯基生物科技股份有限公司。将 H9c2 心肌细胞培养于含 10%胎牛血清的高糖培养基中,置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 的细胞孵育箱中培养,每 2 d 传代 1 次。

1.2 药物及试剂 丹酚酸 B(纯度 $\geq 98\%$),上海源叶生物科技有限公司,批号: B20261; 3%过氧化氢(H_2O_2),美国 Sigma 公司,货号: STBH9407; EX527 (SIRT1 特异性抑制剂),美国 MCE 公司,货号: HY-15452; DMEM 培养基,南京凯基生物科技股份有限公司,批号: 20200923; 胎牛血清,以色列 BI 生物科技公司,货号: 04-001-1ACS; 噻唑蓝(MTT),广州赛国生物科技股份有限公司,批号: EZ2811A179; Rat IL-1 β 检测试剂盒,杭州联科生物技术有限公司,批号: A301B91044; 乳酸脱氢酶

(LDH)检测试剂盒(批号:121719200413)、Hoechst 染色试剂盒(批号:122419200512)、线粒体膜电位检测试剂盒(批号:082819200612)、活性氧(ROS)检测试剂盒(批号:011520200504),均购自上海碧云天生物科技有限公司;β-肌动蛋白(β-actin)抗体,上海泊弯生物科技有限公司,货号:AB0035;NLRP3 抗体(货号:bs-10021R)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶 1 (Caspase-1)抗体(货号:bs-10442R)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)抗体(货号:bs-6741R),均购自北京博奥森生物技术有限公司;SIRT1 抗体,美国 CST 公司,货号:D1D7;磷酸化 AMP 蛋白活化激酶 α(p-AMPKα)抗体(货号:AP1171)、AMP 蛋白活化激酶 α(AMPKα)抗体(货号:A17290)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子 1α(PGC-1α)抗体(货号:A11971),均购自武汉爱博泰克生物技术有限公司。

1.3 主要仪器 Synergy2 型多功能酶标仪,美国 Bio-Tek 公司;Allegra 64R 型超速冷冻离心机,美国 Beckman 公司;Discovery.V20 荧光倒置显微镜,德国 ZEISS 公司;164-5050 型电泳仪及 GelDoc-2000 凝胶成像仪,美国 Bio-Rad 公司。

1.4 细胞分组及处理 取对数生长期的 H9c2 细胞,分别接种于 96 孔板、6 孔板中培养 24 h,按照实验要求将细胞分为正常组、模型组、不同剂量丹酚酸 B 组以及 EX527 组。其中正常组细胞在 37 °C 孵育箱中生长 48 h 后,换用 DMEM 不完全培养基继续孵育 4 h;模型组细胞在细胞孵育箱中生长 48 h 后,换用 600 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 刺激 4 h;丹酚酸 B 组细胞在细胞孵育箱中生长 24 h 后,分别加入不同浓度的丹酚酸 B(5、10、20 μmol·L⁻¹)继续孵育 24 h,然后加入 600 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 刺激 4 h;EX527 组细胞在 37 °C 细胞孵育箱中生长 24 h 后,加入 20 μmol·L⁻¹ 的丹酚酸 B 以及 10 μmol·L⁻¹ 的 EX527 继续孵育 24 h,然后加入 600 μmol·L⁻¹ 的 H₂O₂ 刺激 4 h。

1.5 MTT 法检测细胞活力 取对数生长期的 H9c2 细胞,按照“1.4”项下方法对 96 孔板中细胞进行分组及相应药物处理。37 °C、5% CO₂ 孵育结束后,吸弃上清液,每孔加入 200 μL DMEM 高糖不完全培养液,然后每孔加入 20 μL MTT 溶液(5 mg·mL⁻¹);放入 37 °C 孵育箱中孵育 4 h,吸弃上清液,每孔加入 150 μL DMSO 溶液以溶解甲臞结晶,避光,摇床上轻摇 10 min;在 570 nm 波长处测定各孔光密度(OD)值。计算:细胞存活率(%)=(实验组 OD 值-空

白孔 OD 值)/(正常组 OD 值-空白孔 OD 值)×100%。

1.6 Hoechst 染色法检测细胞凋亡 将 75%酒精消毒灭菌过的细胞爬片放置于 6 孔板中,取对数生长期的 H9c2 细胞,按照“1.4”项下方法对 6 孔板中细胞进行分组及相应药物处理。37 °C、5% CO₂ 孵育结束后,吸弃上清液,无菌 PBS 洗涤 3 次,DMEM 不完全高糖培养基洗涤 1 次;每孔加入 1 mL 固定液,4 °C 孵育过夜后,无菌 PBS 洗涤 3 次,每次 3 min;每孔加入 0.5 mL Hoechst 染色液,染色 5 min,去除染色液,PBS 洗涤 2 次,每次 3 min;吸净上清液,置于荧光显微镜下进行拍照。

1.7 比色法检测 LDH 释放量 将处于对数生长期的 H9c2 细胞接种于 96 孔板中,按照“1.4”项下方法进行细胞分组及相应药物处理。H₂O₂ 刺激结束后,收集细胞上清液,以离心半径 8.3 cm、2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 去除沉淀物。将处理后的细胞上清液转移至新的 96 孔板中,与 LDH 工作试剂共孵育 30 min,采用酶标仪在 450 nm 波长处测定 OD 值。

1.8 DCFH-DA 法检测 ROS 释放量 按照试剂盒说明书步骤操作,采用 DCFH-DA 荧光探针评估 ROS 水平。用无血清细胞培养液稀释 DCFH-DA,使终浓度为 10 μmol·L⁻¹;将各组 H9c2 细胞收集后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中,置于 37 °C 孵育箱中孵育 20 min;采用酶标仪在 488 nm 激发波长以及 525 nm 发射波长下分析荧光强度。

1.9 JC-1 法检测线粒体膜电位 按照试剂盒说明书步骤操作,采用 JC-1 荧光探针测定线粒体膜电位。将处理后的 H9c2 细胞与 5 μg·mL⁻¹ JC-1 在 37 °C 孵育箱中孵育 20 min,然后用 PBS 洗涤 2 次,在荧光显微镜下观察、拍照。

1.10 ELISA 法检测白细胞介素 1β(IL-1β)水平 将处于对数生长期的 H9c2 细胞接种于 6 孔板中,按照“1.4”项下方法进行细胞分组及相应药物处理。H₂O₂ 刺激结束后,收集细胞上清液,以离心半径 8.3 cm、2 000 r·min⁻¹ 离心 10 min 去除沉淀物。严格遵照 ELISA 试剂盒说明书步骤操作,测定细胞上清液中 IL-1β 的含量。

1.11 Western Blot 法检测 NLRP3 炎症小体及 SIRT1/AMPK/PGC-1α 信号通路相关蛋白表达 按照“1.4”项下方法进行细胞分组及处理后,将各组 H9c2 细胞在含有磷酸酶抑制剂以及蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解缓冲液中裂解 30 min;以离心半径 8.3 cm、12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min 提取上清液,采

用 BCA 试剂盒测定总蛋白含量；通过 SDS-PAGE 分离每组 30 μg 蛋白并转移至 PVDF 膜上；室温下采用 5% 脱脂奶粉进行封闭 1 h，加入相应一抗(1:1 000) 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜；加入二抗(1:5 000)室温孵育 2 h。采用 ECL 化学发光法检测目的条带，通过目的条带与内参条带(β -actin)灰度值的比值来衡量目的条带的蛋白表达水平。

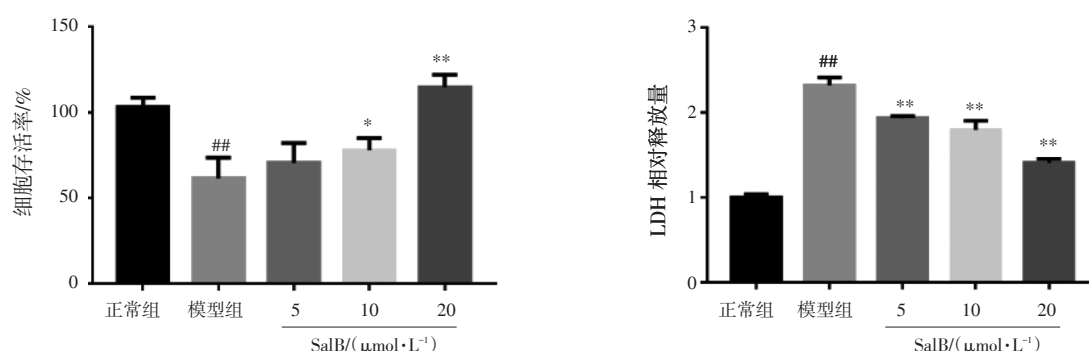
1.12 统计学处理方法 采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析，计量资料以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示；多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)，两两比较用 LSD 检验；以 $P < 0.05$ 为差异具有统计

学意义。

2 结果

2.1 丹酚酸 B 对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞损伤的影响

结果见图 1。与正常组比较，模型组的细胞活力显著降低，LDH 活性显著升高，差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较，丹酚酸 B 能够剂量依赖性地提高细胞活力，降低 LDH 活性，差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明，丹酚酸 B 能够减轻 H_2O_2 所致的 H9c2 细胞氧化应激损伤。



注：与正常组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$

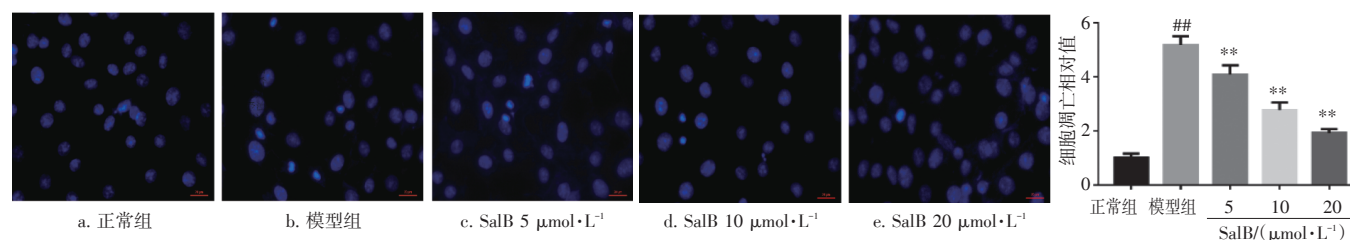
图 1 丹酚酸 B(SalB)对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞活力及 LDH 活性的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 1 Effects of Salvianolic acid B on cell viability and medium LDH activity of H_2O_2 -induced H9c2 cells($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.2 丹酚酸 B 对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞凋亡的影响

结果见图 2。正常组细胞的细胞核在荧光显微镜下呈现弥散均匀的荧光，并且荧光强度较低。与正常组比较，模型组细胞出现了细胞核破裂，并且颜色发白，细胞核呈致密浓染，细胞凋亡程度显著升高，差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较，不同

浓度丹酚酸 B 处理后，细胞染色质固缩及颜色发白的细胞核数目明显减少，细胞凋亡程度显著降低，差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明，丹酚酸 B 对 H_2O_2 氧化应激诱导的 H9c2 细胞凋亡具有一定的抑制作用。



注：与正常组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$

图 2 丹酚酸 B(SalB)对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞凋亡的影响(Hoechst 染色, $\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 2 Effects of Salvianolic acid B on cell apoptosis of H_2O_2 -induced H9c2 cells(Hoechst staining, $\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

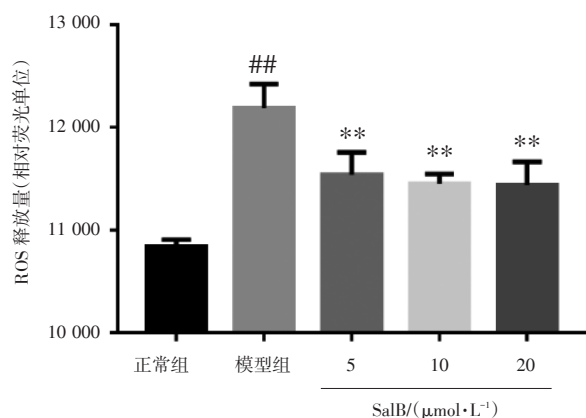
2.3 丹酚酸 B 对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞内 ROS 的影响

结果见图 3。与正常组比较，模型组细胞的 ROS 含量显著升高，差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较，给予不同浓度的丹酚酸 B 干预后，细胞内 ROS 的释放量显著降低，差异均有统计学意

义($P < 0.01$)。结果表明，丹酚酸 B 可以减少 H_2O_2 氧化应激诱导的 H9c2 细胞内 ROS 的生成。

2.4 丹酚酸 B 对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞线粒体膜电位的影响

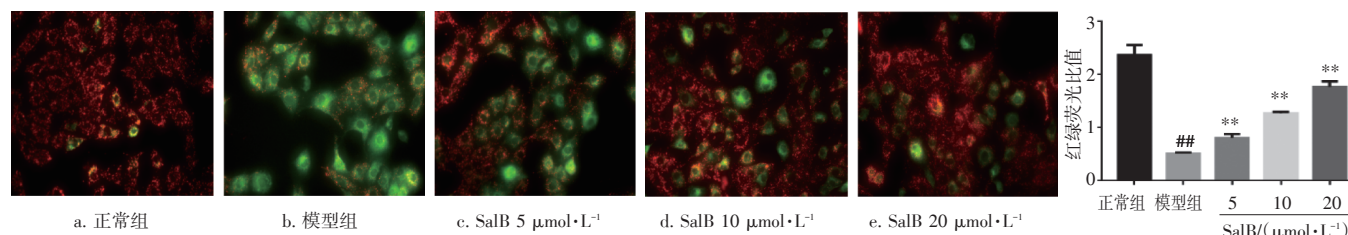
结果见图 4。正常组细胞显示强烈的红色荧光，与正常组比较，模型组细胞呈现出高绿低红的



注:与正常组比较, ^{##} $P < 0.01$;与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$

图3 丹酚酸B(SalB)对 H_2O_2 诱导的H9c2细胞内活性氧(ROS)的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

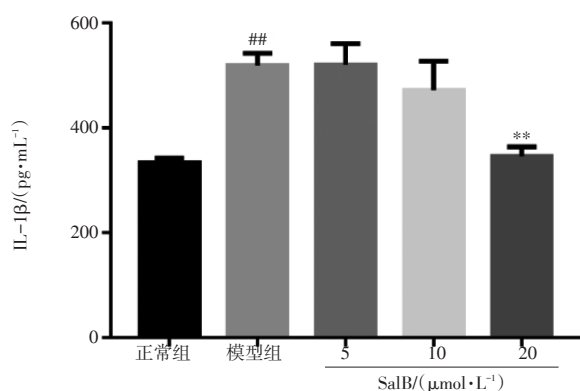
Figure 3 Effects of Salvianolic acid B on the intracellular ROS of H_2O_2 -induced H9c2 cells($\bar{x} \pm s$, $n=6$)



注:与正常组比较, ^{##} $P < 0.01$;与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$

图4 丹酚酸B(SalB)对 H_2O_2 诱导的H9c2细胞线粒体膜电位的影响(JC-1染色, $\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 4 Effects of Salvianolic acid B on the mitochondrial membrane potential of H_2O_2 -induced H9c2 cells(JC-1 staining, $\times 400$; $\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注:与正常组比较, ^{##} $P < 0.01$;与模型组比较, ^{**} $P < 0.01$

图5 丹酚酸B(SalB)对 H_2O_2 诱导的H9c2细胞分泌IL-1β的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Figure 5 Effects of Salvianolic acid B on the release of IL-1β of H_2O_2 -induced H9c2 cells($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

2.6 丹酚酸B对 H_2O_2 诱导的H9c2细胞中NLRP3炎症小体蛋白表达的影响

结果见图6。与正常组比较,

荧光状态,线粒体膜电位显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,给予不同浓度的丹酚酸B干预后,H9c2细胞中的绿色荧光逐渐降低,红色荧光逐渐增强,表明线粒体膜电位逐渐升高,差异均有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明,丹酚酸B能够有效抵抗 H_2O_2 氧化应激诱导的H9c2细胞线粒体膜电位降低。

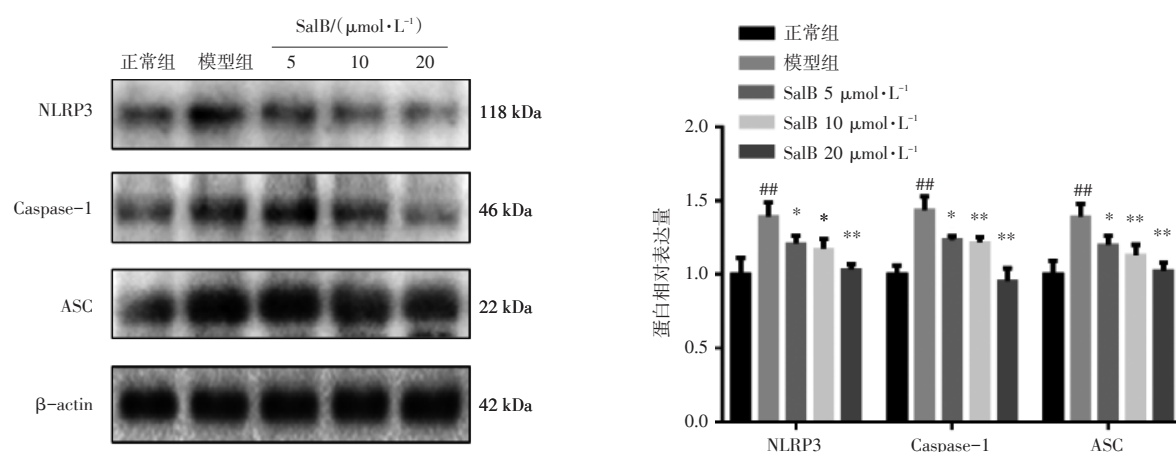
2.5 丹酚酸B对 H_2O_2 诱导的H9c2细胞分泌IL-1β的影响

结果见图5。与正常组比较,模型组细胞上清液中的IL-1β含量显著升高,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,给予20 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 丹酚酸B干预后,细胞上清液中的IL-1β含量显著降低,差异有统计学意义($P < 0.01$)。结果表明, H_2O_2 诱导的氧化应激能够导致H9c2细胞大量释放促炎因子IL-1β,而给予丹酚酸B干预可以有效抑制细胞中IL-1β的释放。

模型组细胞中NLRP3、Caspase-1和ASC蛋白表达显著上调,差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,丹酚酸B能够剂量依赖性地下调H9c2细胞中NLRP3、Caspase-1和ASC蛋白表达,差异均有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明,丹酚酸B能够抑制 H_2O_2 氧化应激诱导的NLRP3炎症小体的激活。

2.7 丹酚酸B对 H_2O_2 诱导的H9c2细胞中SIRT1相关蛋白表达的影响

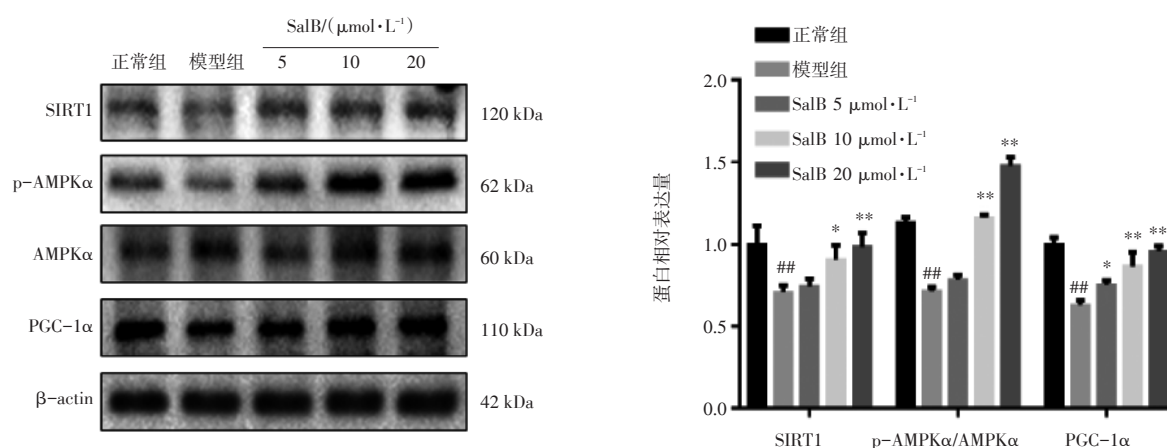
结果见图7。与正常组比较,模型组细胞中的SIRT1、p-AMPK α /AMPK α 及PGC-1 α 蛋白表达显著下调,差异具有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较,给予不同浓度丹酚酸B干预后,SIRT1、p-AMPK α /AMPK α 及PGC-1 α 蛋白表达明显上调,差异具有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明,丹酚酸B发挥心肌细胞保护作用可能与SIRT1/AMPK/PGC-1 α 信号途径有关。



注：与正常组比较， $^{##}P < 0.01$ ；与模型组比较， $^{*}P < 0.05$ ， $^{**}P < 0.01$

图 6 丹酚酸 B(SalB)对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞中 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 6 Effects of Salvianolic acid B on the expression of NLRP3, ASC and Caspase-1 proteins of H_2O_2 -induced H9c2 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)



注：与正常组比较， $^{##}P < 0.01$ ；与模型组比较， $^{*}P < 0.05$ ， $^{**}P < 0.01$

图 7 丹酚酸 B(SalB)对 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞中 SIRT1、p-AMPKα/AMPKα、PGC-1α 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 7 Effects of Salvianolic acid B on protein expression of SIRT1, p-AMPKα/AMPKα and PGC-1α in H_2O_2 -induced H9c2 cells($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

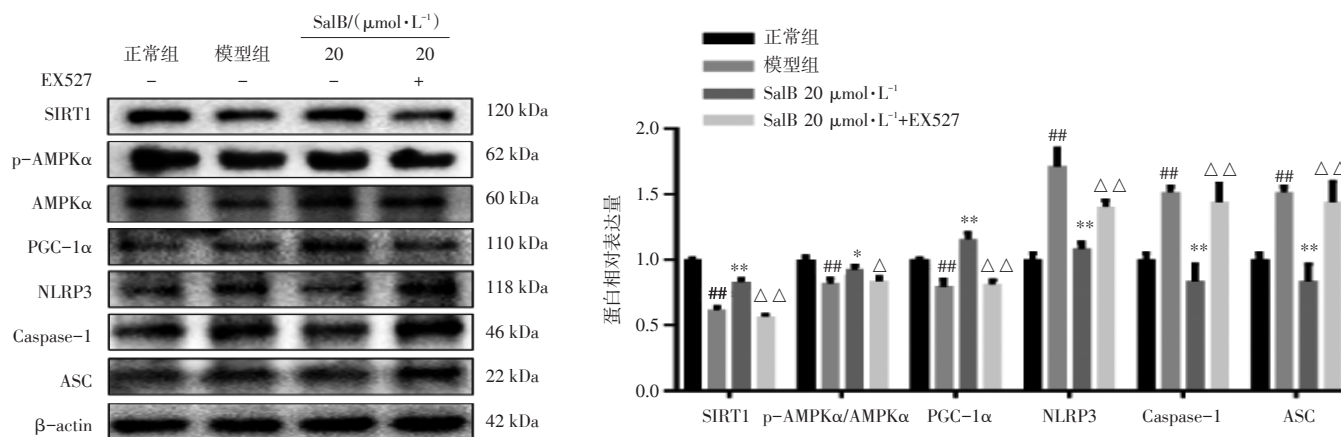
2.8 SIRT1 抑制剂 EX527 对丹酚酸 B 作用的干预

结果见图 8。与正常组比较，模型组细胞中的 SIRT1、p-AMPKα/AMPKα、PGC-1α 蛋白表达显著下调，同时 NLRP3 炎症小体下游的 NLRP3、Caspase-1、ASC 蛋白表达显著上调，差异均有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较，丹酚酸 B 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组能够明显逆转 H_2O_2 诱导的上述蛋白变化，差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与丹酚酸 B 20 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 组比较，SIRT1 抑制剂 EX527 能明显逆转丹酚酸 B 对 NLRP3 炎症小体和 SIRT1 信号途径相关蛋白表达的干预作用，差异有统计学意义($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果进一步证明，丹酚酸 B 抑制氧化应激诱导的 NLRP3 炎症小体激活可能与激

活 SIRT1/AMPK/PGC-1α 信号途径相关。

3 讨论

先天免疫系统的激活和产生炎症反应是急性心肌缺血病理过程的重要组成部分，其中由 NLRP3 炎症小体激活诱导的无菌性炎症在缺血性损伤中发挥着重要作用。NLRP3 炎症小体作为机体先天免疫的重要组成部分，主要由 NOD 样受体蛋白 3(NLRP3)、凋亡相关斑点样蛋白(ASC)以及 Caspase-1 的前体组成。当机体受到外界刺激时，NLRP3 炎症小体组装激活，活化的 Caspase-1 进一步裂解 pro-IL-18、pro-IL-1β，形成成熟的 IL-18、IL-1β，进而诱导炎症反应^[12-14]。



注: 与正常组比较, ^{##}*P* < 0.01; 与模型组比较, ^{*}*P* < 0.05, ^{**}*P* < 0.01; 与丹酚酸 B(SalB) 20 μmol·L⁻¹ 组比较, ^Δ*P* < 0.05, ^{ΔΔ}*P* < 0.01

图 8 EX527 对 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞中 NLRP3 炎症小体及 SIRT1 相关蛋白的影响($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)

Figure 8 Effects of EX527 on NLRP3 inflammasome related proteins and SIRT1 related proteins in H₂O₂-induced H9c2 cells($\bar{x} \pm s$, *n* = 3)

丹酚酸 B 是丹参中主要水溶性成分之一, 能够通过清除氧化应激过程中过度生成和积累的活性氧(ROS), 减轻心肌缺血损伤及减少心肌细胞死亡^[15]。本研究结果发现, 与正常组比较, 过氧化氢(H₂O₂)诱导的 H9c2 细胞活力明显降低, 细胞凋亡程度以及细胞上清液中 LDH 的释放量明显升高; 而丹酚酸 B 药物干预后, H9c2 细胞活力明显上升, 细胞凋亡程度以及 LDH 的释放量显著降低。表明丹酚酸 B 对于氧化应激诱导的细胞损伤具有一定的保护作用。同时, 丹酚酸 B 还能减少 ROS 的产生以及抑制 H₂O₂ 诱导的线粒体膜电位下降, 表明丹酚酸 B 具有线粒体保护作用。

大量研究^[16-18]表明, 钾离子外流、组织蛋白酶从溶酶体释放和 ROS 的产生均可激活 NLRP3 炎症小体, 其中细胞内尤其是线粒体的 ROS 生成是激活 NLRP3 炎症小体的关键。同时, 心肌缺血过程中氧自由基的产生和在体内的蓄积是造成心肌缺血性损伤的关键因素^[19]。本研究结果提示, H₂O₂ 刺激后, H9c2 细胞中与 NLRP3 炎症小体活化相关的 NLRP3、ASC、Caspase-1 蛋白表达显著上调, NLRP3 炎症小体下游的炎性细胞因子 IL-1β 的释放量明显上升, 而丹酚酸 B 能明显抑制这一变化, 表明其可通过抑制氧化应激和 NLRP3 炎症小体的激活来保护 H9c2 细胞免受 H₂O₂ 所致的细胞损伤, 这一结论与本课题组前期研究结果相符^[17-9]。

沉默信息调节因子 1(SIRT1)是酵母 Sir2 同源性最高的同源蛋白, 其可通过抗氧化、抗炎、抑制凋亡及维持能量代谢等多种方式发挥心肌保护作用,

在心肌缺血、心肌肥厚以及糖尿病心肌病等疾病发生过程中发挥着重要作用^[20]。上调 SIRT1 能够有效地抑制 NLRP3 炎症小体的激活。Yang 等^[21]证实秋水仙碱可通过调节 AMPK/SIRT1 信号通路抑制胆固醇晶体诱导的 NLRP3 炎症小体的激活。Wang 等^[22]证实粉防己碱可通过上调 SIRT1 抑制脑缺血再灌注引起的 NLRP3 炎症小体的激活。Sun 等^[23]证实二氢杨梅素可以通过介导 SIRT1/NLRP3 信号途径, 减轻阿霉素诱导的心脏毒性。本研究结果显示, H₂O₂ 氧化应激后细胞中的 SIRT1 及与其相关的 p-AMPKα/AMPKα、PGC-1α 蛋白表达均显著下调, 表明 SIRT1 下调与 NLRP3 炎症小体激活可能同时参与了氧化应激诱导的细胞损伤。而丹酚酸 B 预处理能够明显促进 SIRT1、p-AMPKα/AMPKα 及 PGC-1α 的表达。可以推测, 丹酚酸 B 可能是通过上调 SIRT1 改善心肌缺血期间的能量代谢紊乱, 抑制心肌缺血期间 ROS 诱导的 NLRP3 炎症小体的激活。

EX527 是一种特异性的 SIRT1 抑制剂, 可以有效抑制 SIRT1 蛋白表达。本研究结果提示, 应用 EX527 后, 与 SIRT1 信号通路相关的 SIRT1、p-AMPKα/AMPKα、PGC-1α 蛋白表达下调, 同时伴随着 NLRP3、Caspase-1 以及 ASC 蛋白表达显著上调。进一步证明了丹酚酸 B 可能是通过激活 SIRT1 来抑制 NLRP3 炎症小体活化, 从而减轻 H₂O₂ 诱导的细胞损伤。

综上所述, 丹酚酸 B 发挥抗心肌缺血作用可能与其本身具有抗氧化活性和抑制 NLRP3 炎症小体活化, 以及上调 SIRT1 有关。但关于丹酚酸 B 如何上

调 SIRT1 介导 NLRP3 炎症小体的激活还有待进一步探讨。有研究^[24]表明, 缺血再灌注后 3,4-二羟苯基乳酸(DLA)上的酚羟基可能与 SIRT1 蛋白结合, 促进其蛋白表达。丹酚酸 B 含有众多酚羟基, 其发挥上调 SIRT1 蛋白表达的作用是否与其化学结构中的酚羟基相关还有待证实, 本研究后期将采用分子对接技术进一步确定丹酚酸 B 与 SIRT1 的结合靶点。

参考文献:

- [1] SOKOLSKA J M, VON SPICZAK J, GOTSCHY A, et al. Cardiac magnetic resonance imaging to detect ischemia in chronic coronary syndromes: state of the art[J]. *Kardiologia Polska*, 2019, 77(12): 1123-1133.
- [2] LI H, ZHANG S, LI F, et al. NLRX1 attenuates apoptosis and inflammatory responses in myocardial ischemia by inhibiting MAVS-dependent NLRP3 inflammasome activation[J]. *Molecular Immunology*, 2016, 76(6): 90-97.
- [3] LIU Y, LIAN K, ZHANG L, et al. TXNIP mediates NLRP3 inflammasome activation in cardiac microvascular endothelial cells as a novel mechanism in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Basic Research in Cardiology*, 2014, 109(5): 415-419.
- [4] LIU Y X, HU Y Y, E Q K, et al. Salvianolic acid B inhibits mitochondrial dysfunction by up-regulating mortalin[J]. *Scientific Reports*, 2017, 7(1): 1-13.
- [5] ZHANG Y F, XU L W, LIANG K, et al. Protective effect of salvianolic acid B against oxidative injury associated with cystine stone formation[J]. *Urolithiasis*, 2019, 47(6): 503-510.
- [6] QIAO Z Y, XU Y W. Salvianolic acid B alleviating myocardium injury in ischemia reperfusion rats [J]. *Africa Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 13(4): 157-161.
- [7] HU Y, LI Q J, PAN Y Z, et al. Sal B alleviates myocardial ischemic injury by inhibiting TLR4 and the priming phase of NLRP3 inflammasome[J]. *Molecules*, 2019, 24(23): 4416.
- [8] 王新宇, 王曼, 孙帅军, 等. 丹酚酸B保护大鼠缺血心肌与炎症小体NLRP3表达的相关性研究[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(10): 1383-1388.
- [9] 胡洋, 潘韵铮, 李庆菊, 等. 丹酚酸B通过抑制NLRP3炎症小体priming阶段减轻缺氧诱导大鼠心肌细胞损伤[J]. *中国药理学通报*, 2020, 36(2): 210-215.
- [10] 尹茂山, 牟艳玲. Sirt1与心肌保护[J]. *生命科学*, 2015, 27(5): 601-608.
- [11] HAN Y, SUN W J, REN D, et al. SIRT1 agonism modulates cardiac NLRP3 inflammasome through pyruvate dehydrogenase during ischemia and reperfusion[J]. *Redox Biology*, 2020, 34(1): 1-13.
- [12] WANG Y Q, YAN X X, MI S L, et al. *Naoxintong* attenuates ischaemia/reperfusion injury through inhibiting NLRP3 inflammasome activation[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2017, 21(1): 4-12.
- [13] CHEN A, CHEN Z W, XIA Y, et al. Liraglutide attenuates NLRP3 inflammasome-dependent pyroptosis via regulating SIRT1/NOX4/ROS pathway in H9c2 cells[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2018, 499(2): 267-272.
- [14] QIU Z, HE Y H, MING H, et al. Lipopolysaccharide (LPS) aggravates high glucose- and hypoxia/reoxygenation-induced injury through activating ROS-dependent NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in H9c2 cardiomyocytes[J]. *Journal of Diabetes Research*, 2019, 2019(1): 1-12.
- [15] XUE L, WU Z, JI X P, et al. Effect and mechanism of salvianolic acid B on the myocardial ischemia reperfusion injury in rats[J]. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 2014, 7(4): 280-284.
- [16] SHO T, XU J X. Role and mechanism of ROS scavengers in alleviating NLRP3-mediated inflammation[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2019, 66(1): 4-13.
- [17] SONG J Q, JIANG L Y, FU C P, et al. Heterozygous SOD2 deletion deteriorated chronic intermittent hypoxia-induced lung inflammation and vascular remodeling through mtROS-NLRP3 signaling pathway[J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(9): 1197-1207.
- [18] JUN J H, SHIM J K, OH J E, et al. Protective effect of ethyl pyruvate against myocardial ischemia reperfusion injury through regulations of ROS-related NLRP3 inflammasome activation[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2019, 2019(1): 1-8.
- [19] HU Q H, WEI B, WEI L L, et al. Sodium tanshinone IIA sulfonate ameliorates ischemia-induced myocardial inflammation and lipid accumulation in Beagle dogs through NLRP3 inflammasome [J]. *International Journal of Cardiology*, 2015, 196(5): 183-192.
- [20] DU J K, CONG B H, YU Q, et al. Upregulation of microRNA-22 contributes to myocardial ischemia-reperfusion injury by interfering with the mitochondrial function[J]. *Free Radical Biology & Medicine the Official Journal of the Oxygen Society*, 2016, 96(5): 406-417.
- [21] YANG M Y, LV H, LIU Q, et al. Colchicine alleviates cholesterol crystal-induced endothelial cell pyroptosis through activating AMPK/SIRT1 pathway[J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2020, 2020(1): 1-18.
- [22] WANG J, GUO M, MA R J, et al. Tetrandrine alleviates cerebral ischemia/reperfusion injury by suppressing NLRP3 inflammasome activation via Sirt-1[J]. *PeerJ*, 2020, 8(1): 1-17.
- [23] SUN Z Z, LU W Q, LIN N, et al. Dihydromyricetin alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting NLRP3 inflammasome through activation of SIRT1[J]. *Biochemical Pharmacology*, 2020, 175(1): 1-10.
- [24] YANG X Y, HE K, PAN C S, et al. 3, 4-dihydroxyl-phenyl lactic acid restores NADH dehydrogenase 1 α subunit 10 to ameliorate cardiac reperfusion injury[J]. *Scientific Reports*, 2015, 5(1): e10739.

(编辑: 邹元平)