DOI:10.16016/j.1000-5404.202011210

骨髓源性生长因子对高糖诱导 H9c2 细胞焦亡的改善作用

张 玉,王 艳,赵然尊,仇治梅,龙仙萍,李朝富,陈文明,石 蓓 563000 贵州 遵义,遵义医科大学附属医院心内科

[摘要] **目的** 探讨骨髓源性生长因子(myeloid-derived growth factor,Mydgf)是否通过调控 NLRP3 改善高糖诱导的心肌细胞焦亡。**方法** 培养大鼠心肌细胞株 H9c2,实验分为 4 组:①正常组(normal, Nor)为正常培养的 H9c2 细胞;②高糖组(high glucose,HG)予以 50 mmol/L 葡萄糖干预 H9c2 细胞 24 h;③Mydgf 组采用 25 ng/mL 重组 Mydgf 蛋白处理细胞 12 h,随后以 50 mmol/L 葡萄糖干预 H9c2 细胞 24 h;④Necrosulfonamide 组(NSA)采用 32 μmol/L NSA 处理细胞 0.5 h,然后予 50 mmol/L 葡萄糖干预 H9c2 细胞 24 h。Western blot 法检测 H9c2 细胞中天冬氨酸蛋白水解酶剪切体-1(cleaved Caspase-1)、凋亡相关斑点样蛋白(ACS)、炎症复合体(NLRP3)及成孔蛋白 gasdermin D (GSDMD)的表达水平。ELISA 法检测细胞培养液中 IL-1β 和 IL-18 的分泌量。CCK-8 法检测 Mydgf 及 NLRP3 对 H9c2 细胞活力的影响。将携带 NLRP3 的增强型绿色荧光蛋白(enhanced green fluorescent protein,EGFP)慢病毒载体(NLRP3-EGFP)及空病毒载体(EGFP)分别转染至 H9c2 细胞,做回复实验,检测焦亡相关指标变化。**结果** Western blot 结果显示,HG 组焦亡相关蛋白 cleaved Caspase-1、ACS、NLRP3、GSDMD 表达量较正常组明显增高($P<0.05$),Mydgf 处理后,焦亡相关蛋白的表达受到明显抑制($P<0.05$),但抑制效率低于 NSA 组($P<0.05$)。ELISA 检测结果表明炎症相关指标 IL-1β 和 IL-18 在 HG 组中表达增高($P<0.05$),而在 Mydgf 组中表达下降($P<0.05$),NSA 组明显下降($P<0.05$)。CCK-8 法检测结果表明 <25 ng/mL 的 Mydgf 对 H9c2 细胞活力无明显影响,>25 ng/mL 的 Mydgf 明显降低 H9c2 细胞活力($P<0.05$)。与对照组相比,过表达 NLRP3 使 HG 条件下的细胞活力明显下降。EGFP 慢病毒转染 NLRP3 至 H9c2 细胞中,RT-qPCR 及 Western blot 结果发现 EGFP 组中 NLRP3 的 mRNA 及蛋白表达与正常组差异无统计学意义($P>0.05$),而 NLRP3-EGFP 组中 NLRP3 的 mRNA 及蛋白表达均显著增高($P<0.05$)。回复实验的 Western blot 结果显示,在高糖环境中,与 Mydgf 组相比,Mydgf+NLRP3-EGFP 组中焦亡相关蛋白 NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1 表达显著增加($P<0.05$);ELISA 检测结果也表明 IL-1β 和 IL-18 表达较 Mydgf 组明显增高($P<0.05$)。**结论** Mydgf 可能通过抑制 NLRP3 来改善高糖诱导的心肌细胞焦亡。

[关键词] 骨髓源性生长因子;H9c2 细胞;细胞焦亡;NLRP3 ;糖尿病性心肌病
[中图法分类号] R542.2; R587.2; R977.6 [文献标志码] A

Myeloid-derived growth factor improves pyroptosis in H9c2 cells induced by high glucose

ZHANG Yu, WANG Yan, ZHAO Ranzun, QIU Zhimei, LONG Xianping, LI Chaofu, CHEN Wenming, SHI Bei
Department of Cardiology, Affiliated Hospital of Zunyi Medical University, Zunyi, Guizhou Province, 563000, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate whether myeloid-derived growth factor (Mydgf) can improve cardiomyocyte pyroptosis induced by hyperglycemia by regulating nucleotide-binding domain-like receptor protein 3 (NLRP3). **Methods** Cultured rat cardiomyocyte H9c2 cells were divided into 4 groups: normal

[基金项目] 国家自然科学基金地区科学基金(81860061,82060061);贵州省高层次创新型人才培养"百层次"[黔科合人才(2015)4025];遵义医科大学附属医院硕士科研启动基金[院字(2016)51 号]

[通信作者] 石 蓓,E-mail:shibei2147@163.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

group (Nor), high glucose group (HG, 50 mmol/L glucose for 24 h), Mydgf group (25 ng/mL recombinant Mydgf protein for 12 h, followed by 50 mmol/L glucose for 24 h), and necrosulfonamide group (NSA, 32 μmol/L necrosulfonamide for 0.5 h, followed by 50 mmol/L glucose for 24 h). Western blotting was used to detect the protein levels of cleaved Caspase-1, NLRP3, apoptosis-related speckle-like proteins (ACS) and gasdermin D (GSDMD). The secretions of IL-1β and IL-18 in cell culture medium were detected by ELISA. CCK-8 assay was used to detect the effect of Mydgf or NLRP3 on the viability of H9c2 cells. Lentiviral vector carrying NLRP3 and enhanced green fluorescent protein (EGFP) (NLRP3-EGFP) and empty viral vector (EGFP) were transfected into H9c2 cells respectively, and the changes of pyroptosis related indexes were detected by recovery experiments. **Results** Western blot results showed that the expression levels of pyroptosis related proteins, cleaved Caspase 1, ACS, NLRP3 and GSDMD were significantly higher in the HG group than the Nor group ($P<0.05$). Mydgf treatment effectively inhibited the expression of above proteins ($P<0.05$), but the inhibitory efficiencies were lower than that in the NSA group ($P<0.05$). ELISA demonstrated that the secretions of IL-1β and IL-18 were increased in the HG group ($P<0.05$), but decreased in the Mydgf group ($P<0.05$), and more significantly reduced in the NSA group ($P<0.05$). CCK-8 assay indicated that Mydgf at a concentration of below 25 ng/mL had no significant effect on the viability of H9c2 cells, while when the concentration above 25 ng/mL, the treatment significantly decreased the cell viability ($P<0.05$). Compared with the control group, overexpression of NLRP3 significantly decreased H9c2 cells viability under the condition of HG. Transfection of lentiviral vector NLRP3-EGFP resulted in obvious increases in the mRNA and protein expression of NLRP3 ($P<0.05$), but that of empty vector had no such effects ($P>0.05$). In the recovery experiment, Western blot results showed that in the high-glucose environment, the expression level of NLRP3, ASC, and cleaved Caspase-1 were significantly increased ($P<0.05$), and the secretions of IL-1β and IL-18 were also significantly enhanced in the Mydgf + NLRP3-EGFP group compared with the Mydgf group ($P<0.05$). **Conclusion** Mydgf may ameliorate cardiomyocyte pyroptosis induced by hyperglycemia by inhibiting NLRP3.

[**Key words**] myeloid-derived growth factor; H9c2 cells; pyroptosis; NLRP3; diabetic cardiomyopathy

Supported by the Regional Program of National Natural Science Foundation of China (81860061, 82060061), the "Hundred-Level" Cultivation Project of High-Level Innovative Talents in Guizhou Province (2015-4025), and the Start-up Fund for Master's Scientific Research of the Affiliated Hospital of Zunyi Medical University (2016-51). Corresponding author: SHI Bei, E-mail: shibei2147@163.com

糖尿病是一组以高血糖为特征的代谢紊乱性疾病。糖尿病患者心血管疾病的发病率为非糖尿病患者的2~4倍[1],而合并急性心肌梗死的病死率是血糖正常者的2~8倍[2]。糖尿病性心肌病(diabetic cardiomyopathy,DCM)是糖尿病的主要并发症,是慢性糖尿病患者死亡的重要原因。在DCM中,慢性心脏炎症的特征是心肌细胞的持续丢失,从而导致心脏收缩功能受损[3-4],但确切的损伤机制仍尚未阐明。

越来越多的证据表明,焦亡是DCM心肌炎症的关键因素[5-6]。细胞焦亡是一种坏死性和炎症性细胞程序性死亡,与细胞坏死和细胞凋亡的机制不同[7]。在DCM中,高血糖诱导活性氧(reactive oxygen species,ROS)升高,刺激核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3 (nucleotide binding oligomerization domain-like receptor protein 3,NLRP3)炎症小体的激活[8-9],促使半胱天冬酶1(Caspase-1)被募集到炎性小体中并通过自身加工而被激活[10]。活化的Caspase-1作用于IL-1β、IL-18和成孔蛋白gasdermin D (GSDMD),最终导致细胞强力裂解并快速释放促炎细胞因子[11]。NLRP3和Caspase-1作为信号级联的核心被认为是DCM的炎性标志物和药物靶点[12]。

骨髓源性生长因子(myeloid-derived growth factor,Mydgf)是来源于骨髓单核巨噬细胞的旁分泌蛋白,在小鼠心肌梗死的动物实验中,与野生型小鼠相比,心肌梗死后Mydgf基因敲除小鼠的心肌细胞死亡增加,梗死区域血管生成减少,心功能下降[13]。研究发现Mydgf可通过c-Myc/FoxM1通路促进心肌细胞增殖,改善小鼠心脏损伤后的心脏再生[14]。此外,Mydgf还

能通过调控足细胞自噬和凋亡水平改善糖尿病肾脏损害[15]。可见 Mydgf 具有心脏保护作用,并可改善高糖诱导的细胞损伤。但 Mydgf 是否参与改善高糖诱导的心肌细胞焦亡及相关机制,目前尚不清楚。近年来研究发现,Mydgf 主要定位于细胞内质网[16],而内质网应激可介导 NLRP3 调控细胞焦亡及炎症反应[17]。因此,本研究拟通过观察 Mydgf 在高糖诱导 H9c2 细胞焦亡中的作用,并阐明其是否通过介导 NLRP3 表达,从而调控 H9c2 细胞焦亡。

1 材料与方法

1.1 主要试剂

低糖、高糖 DMEM 培养基和胰蛋白酶购自美国 Gibco 公司。胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)购自美国 BI 公司。葡萄糖粉购自美国 Simga 公司。NLRP3 mRNA 引物和 cDNA 反转录试剂盒购自广州锐博生物科技有限公司。RT-qPCR 试剂盒和 IL-1β、IL-18 的 ELISA 检测试剂盒购自生工生物工程(上海)股份有限公司。cleaved Caspase-1、NLRP3、ACS、GSDMD、β-actin 兔抗大鼠一抗购自武汉博士德生物工程有限公司。ECL 化学发光试剂盒购自美国 Thermo Scientific 公司。过表达 NLRP3 基因和空载体携带 EGFP 的慢病毒载体购自南京凯基生物公司。

1.2 H9c2 细胞系传代培养及体外 DCM 模型建立

H9c2 细胞系(大鼠胚胎心肌细胞株)购自中国科学院上海细胞库,在含 10%FBS 的低糖 DMEM 培养基中,置于 37 ℃、5%CO_2 的培养箱中传代培养。选取第 5~8 代生长良好的细胞用于后续实验。采用含 50 mmol/L 葡萄糖的高糖 DMEM 培养基处理细胞 24 h,建立体外 DCM 模型[9,18]。

1.3 实验分组及方法

为了观察过表达 Mydgf 对高糖所致的 H9c2 细胞焦亡及相关蛋白表达的影响,取培养的第 5~8 代 H9c2 心肌细胞分为 4 组。正常组(Nor):H9c2 细胞由低糖 DMEM 培养,无干预。高糖组(HG):H9c2 细胞由低糖 DMEM 培养同前,24 h 后加入 50 mmol/L 高糖 DMEM 培养。Mydgf 组:采用重组 Mydgf(25 ng/mL)处理细胞 12 h[14],随后以 50 mmol/L 高糖 DMEM 干预 H9c2 细胞 24 h。Necrosulfonamide 组(NSA):予 32 μmol/L NSA 处理细胞 30 min[19],随后 50 mmol/L 葡萄糖干预 H9c2 细胞 24 h。

为进一步验证 Mydgf 通过调控 NLRP3 发挥抗高糖诱导的细胞焦亡作用,以细胞过表达 NLRP3 做回复实验,将细胞分为 3 组。高糖组(HG 组):50 mmol/L 高糖 DMEM 干预 H9c2 细胞 24 h。Mydgf 组:H9c2 细胞予以人重组 Mydgf 蛋白处理 12 h 后,再予以 50 mmol/L 高糖处理 24 h。Mydgf+携带 NLRP3 基因的绿色荧光蛋白慢病毒组(Mydgf + NLRP3-EGFP 组):采用携带增强型绿色荧光蛋白的慢病毒转染 NLRP3 至 H9c2 细胞 48 h,随后予以重组 Mydgf 蛋白处理细胞 12 h,然后予以 50 mmol/L 高糖处理 24 h。

1.4 实时荧光定量 PCR(RT-qPCR)检测细胞中 NLRP3 mRNA 表达水平

按 RNA 抽提试剂盒说明书进行,提取总 RNA,按 mRNA 反转录试剂盒进行操作,以 β-actin 为内参,随后按荧光定量 PCR 试剂盒进行 cDNA 扩增。数据通过 Ct 比较法进行分析、定量($2^{-\Delta\Delta Ct}$)。实验独立重复 3 次。

1.5 Western blot 检测

按产品说明书提取总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。将提取的总蛋白与 5×蛋白上样缓冲液按 4∶1比例充分混匀后,蛋白变性(99 ℃,10 min)。等量上样至十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)凝胶,55 V 跑积层胶 55 min,100 V 跑至胶底部,然后转膜至 PVDF 膜,用封闭液室温封闭 1 h,加入 NLRP3、ACS、cleaved Caspase-1 和 GSDMD 的一抗, 4 ℃孵育过夜;TBST 缓冲液洗 3 次后,加入山羊抗兔二抗室温摇床孵育 1 h,最后曝光显影进行分析。以 β-actin 为内参照。实验独立重复 3 次。

1.6 ELISA 法检测细胞培养液中 IL-1β 和 IL-18 的分泌

按分组分别干预细胞后,收集细胞培养液,随后按试剂盒说明书操作。

1.7 CCK-8 法测定细胞存活率

96 孔板中培养 H9c2 细胞,待细胞融合达标时,按 Mydgf 浓度梯度处理细胞 12 h 后或按分组条件处理细胞 24 h 后,PBS 液充分洗涤,加入 DMEM 稀释的 CCK-8 溶液 100 μL(DMEM 和 CCK-8 原液体积比为 9∶1),37 ℃培养箱内孵育 2 h,酶标仪上测定波长在 450 nm 处的吸光密度值[$D(450)$]。每组设 6 个复孔。

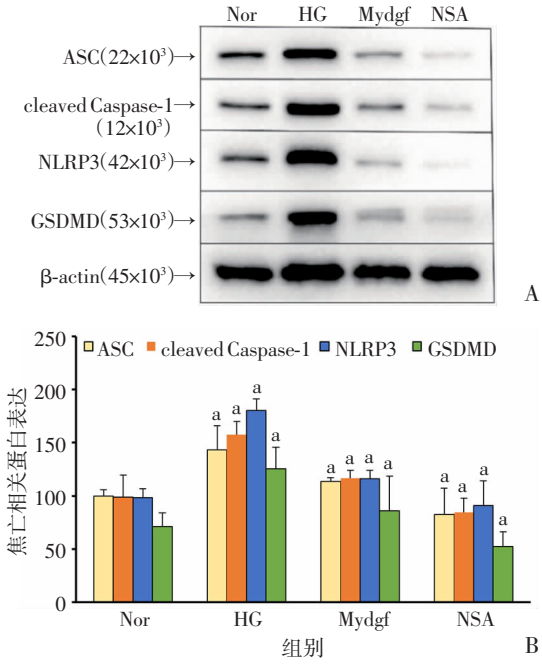
1.8 统计学分析

采用 SPSS19.0 统计软件进行分析。正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,两组间比较应用独立样本 t 检验,多组间均数比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Mydgf 对高糖诱导 H9c2 细胞焦亡的影响

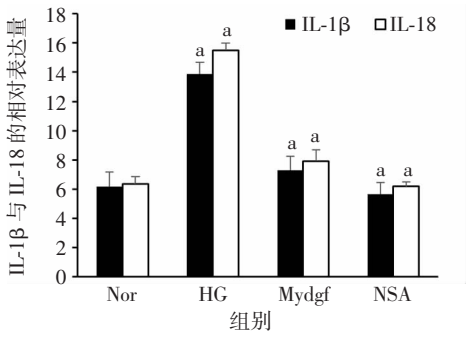
H9c2 细胞系经消化后传代培养,取 5~8 代细胞按分组条件处理细胞。经 Western blot 检测结果发现(图 1),与 Nor 组相比,HG 组中 ASC、cleaved Caspase-1、NLRP3、GSDMD 表达明显增高($P<0.05$),而 Mydgf 组中表达显著下降($P<0.05$),但下降程度低于 NSA 组。ELISA 检测结果发现(图 2),与 Nor 组相比,IL-1β 和 IL-18 的表达量在 HG 组明显增高,而在 Mydgf 组中显著下降($P<0.05$),但 NSA 组下降程度更大。提示重组 Mydgf 蛋白具有抗高糖诱导 H9c2 细胞焦亡的作用,但其抗焦亡效应较 NSA 弱。



A:Western blot 检测结果;B:半定量分析结果($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

a: $P<0.05$,与 Nor 组比较

图 1 Western blot 检测各组 H9c2 细胞中焦亡相关蛋白的表达

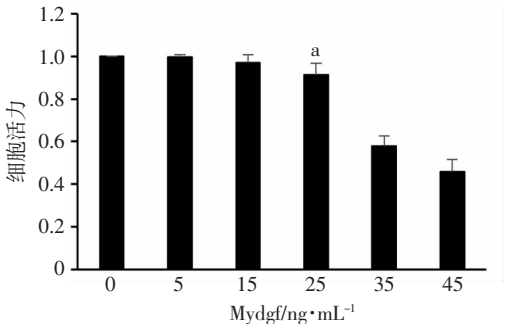


a: $P<0.05$,与 Nor 组比较

图 2 各组细胞培养液中 IL-1β 和 IL-18 的相对表达量
($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

2.2 CCK-8 法测定不同浓度的 Mydgf 对 H9c2 细胞活力的影响

CCK-8 结果显示,<25 ng/mL 的 Mydgf 对 H9c2 细胞活力没有明显的影响,但 Mydgf >25 ng/mL 后,细胞活力随着浓度增加成逐渐下降趋势($P<0.05$,图 3),因此后续实验中,采用 25 ng/mL Mydgf 处理细胞。

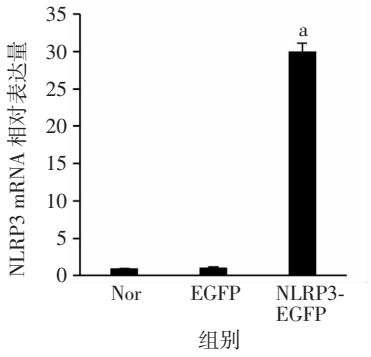


a: $P<0.05$,与 0 ng·mL^{-1} Mydgf 比较

图 3 不同浓度 Mydgf 对 H9c2 细胞活力的影响
($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

2.3 慢病毒转染过表达 H9c2 细胞系中的 NLRP3 基因

由于慢病毒携带绿色荧光蛋白(EGFP),将其转入 H9c2 细胞后,采用荧光显微镜检测发现,细胞绿色荧光转染效率超过 95%。RT-qPCR 及 Western blot 检测结果发现(图 4、5):与 Nor 组相比,EGFP 组中 NLRP3 在 mRNA 和蛋白水平上的表达水平无明显变化。而与 EGFP 组相比,NLRP3-EGFP 组中 NLRP3 的 mRNA 及蛋白水平均显著增高($P<0.05$),提示成功过表达了 H9c2 细胞系中的 NLRP3 基因。



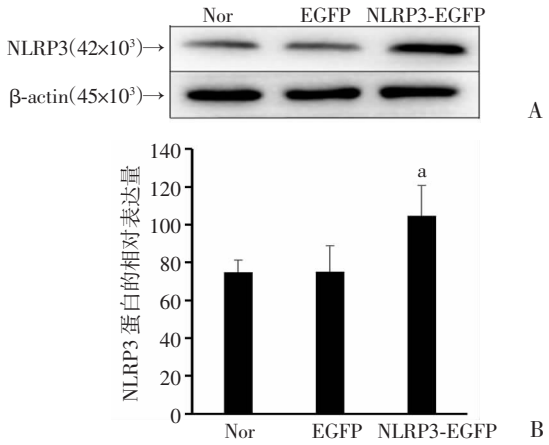
a: $P<0.05$,与 EGFP 组比较

图 4 RT-qPCR 检测转染后 NLRP3 mRNA 的相对表达量
($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

2.4 过表达 NLRP3 对 H9c2 细胞活力的影响

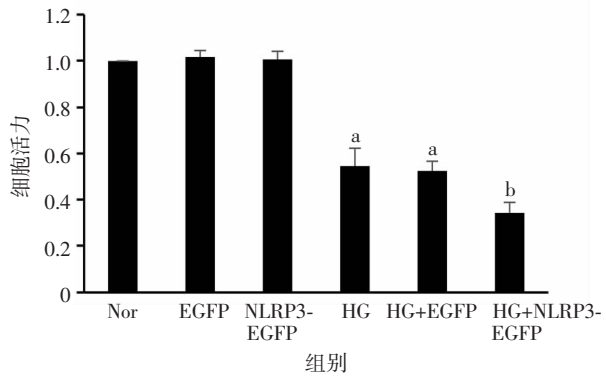
为了验证慢病毒转染对细胞活力的影响,采用 CCK-8 法检测各组细胞活力。可见 EGFP、NLRP3 转染

的细胞存活率无明显变化(图6),说明在正常情况下,过表达EGFP和NLRP3对细胞存活率没有影响。而在予以高糖处理后(图6),与Nor组相比,HG组和HG+EGFP组细胞存活率下降($P<0.05$);与HG组相比,HG+NLRP3-EGFP组活力进一步下降($P<0.05$),说明过表达NLRP3使HG条件下的细胞活力明显下降。



a: $P<0.05$,与EGFP组比较

图5 Western blot检测各组H9c2细胞中NLRP3蛋白的表达(A)与半定量分析(B) ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)

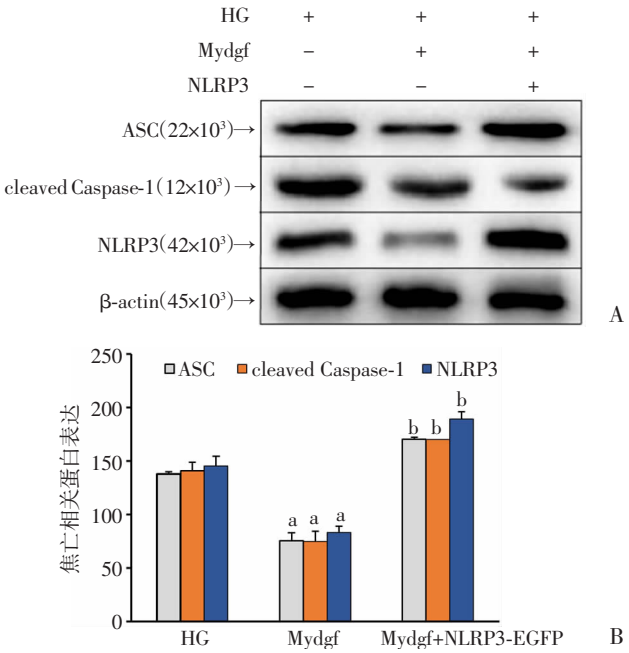


a: $P<0.05$,与Nor组比较;b: $P<0.05$,与HG组比较

图6 不同处理组H9c2细胞活力 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

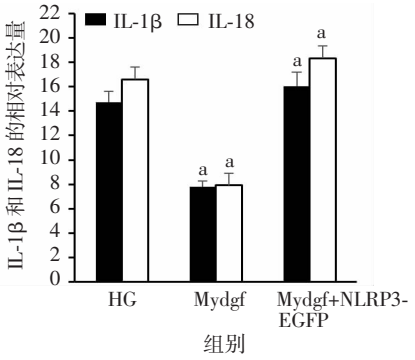
2.5 Mydgf调控NLRP3对高糖诱导心肌细胞焦亡的作用

Western blot结果表明(图7),与HG相比,Mydgf组中的ASC、cleaved Caspase-1、NLRP3表达明显下降($P<0.05$),Mydgf+NLRP3-EGFP组中表达则显著增加($P<0.05$)。ELISA检测结果发现(图8),与HG组相比,IL-1β和IL-18的表达量在Mydgf组明显下降,而在Mydgf+NLRP3-EGFP组中显著升高($P<0.05$),表明NLRP3的过表达可以阻断Mydgf的抗高糖诱导H9c2细胞焦亡作用。



a: $P<0.05$,与HG组比较;b: $P<0.05$,与HG组比较

图7 Western blot检测各组H9c2细胞中焦亡相关蛋白的表达 ($n=3$, $\bar{x}\pm s$)



a: $P<0.05$,与HG组比较

图8 各组细胞培养液中IL-1β和IL-18的相对表达量 ($n=6$, $\bar{x}\pm s$)

3 讨论

本研究旨在探讨Mydgf对高糖诱导的心脏损伤中焦亡的作用及其可能机制,发现Mydgf可能通过调控NLRP3减轻高糖诱导的H9c2细胞系焦亡。

糖尿病性心肌病(diabetic cardiomyopathy,DCM)是独立于冠心病、高血压心脏病以及心脏瓣膜病等的特异性心肌病,危害极大[20]。研究显示,免疫炎症反应参与了DCM的病理生理发展过程,在DCM患者或动物模型中,均发现了炎症相关因子如IL-6、IL-1β,肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor α,TNF-α)、NLRP3炎症小体等的表达[21]。炎症反应是一把双刃剑,在早

期是应对高血糖的保护性反应,而后期持续的慢性炎症则会导致心肌细胞的损失,最终导致心力衰竭。其中 NLRP3 炎症小体参与高血糖诱导的细胞毒性反应并启动细胞焦亡的进程[8]。焦亡是与炎症相关的程序性细胞死亡,参与了 DCM 的发生发展。高糖诱导的活性氧(ROS)可触发 NLRP3 炎症小体的激活,促进裂解的 Caspase-1 的产生,从而加速 IL-1β、IL-18 的释放[22]。因此抑制高糖诱导的心肌细胞焦亡可能成为 DCM 的治疗靶点。

既往研究表明,Mydgf 可以通过调控 PI3K/Akt 信号通路的激活,减少心肌缺血诱导的心肌细胞的凋亡[13]。同时通过调控 MAPKl/3,Cyclin D1 和 STAT3 相关信号通路促进内皮细胞增殖[23]。在 2 型糖尿病小鼠模型中,Mydgf 可促进肠道胰高血糖素样肽-1(GLP-1)的产生,改善糖/脂代谢[24]。此外,Mydgf 通过保护高糖诱导的肾小囊脏层上皮细胞损伤,激活 Akt/BAD 通路改善肾小囊脏层上皮细胞功能,在阻止糖尿病肾病的发展中发挥了重要作用[15]。但 Mydgf 是否能够改善高糖诱导的心肌细胞焦亡,目前尚不清楚。本研究发现高糖可诱导 H9c2 细胞高表达焦亡相关蛋白,如 NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1、GSDMD 等,而加入重组人 Mydgf 蛋白可使 NLRP3、ASC、cleaved Caspase-1、GSDMD 蛋白表达水平降低,上清液中 IL-1β 和 IL-18 的表达水平降低,说明重组人 Mydgf 蛋白可以降低高糖诱导的 NLRP3 炎症小体的激活和焦亡。

NLRP3 炎症小体可在各种疾病条件下识别非微生物危险信号(如过量的葡萄糖、活性氧、低密度脂蛋白等)进而导致非细菌性炎性反应。有研究发现,NLRP3 的激活在糖尿病心肌病的心肌炎症反应过程中起到了举足轻重的作用[21]。越来越多的证据表明,抑制 NLPR3 可以减少高糖诱导心肌细胞死亡,调节钙稳态和心肌细胞骨架结构[25-26]。NLRP3 在高糖诱导心肌细胞损伤过程中的作用可见一斑。既往研究显示,Mydgf 主要定位于细胞内质网[16],而内质网应激可激活 NLRP3 介导的细胞焦亡[17]。我们猜想 Mydgf 的抗焦亡作用可能通过调控 NLRP3 的表达。为进一步验证该假设,予以过表达 H9c2 细胞中的 NLRP3 做回复实验,结果表明,采用慢病毒转染,可有效过表达 H9c2 细胞中的 NLRP3。并且在正常培养的细胞中,过表达 NLRP3 对细胞活力无明显影响,而高糖环境中,NLRP3 可促使细胞活力进一步下降。此外,过表达的 NLRP3 可抑制重组人 Mydgf 蛋白对抗高糖诱导细胞焦亡作用。

综上所述,本研究表明,重组人 Mydgf 蛋白可能改善高糖诱导的 H9c2 细胞焦亡,该作用可能通过抑制 NLRP3 炎症小体的激活来对抗高血糖诱导的细胞焦亡,但 Mydgf 调控 NLRP3 炎症小体的具体机制还有待进一步研究。

参考文献:

[1] BERTOLUCI M C, ROCHA V Z. Cardiovascular risk assessment in patients with diabetes[J]. Diabetol Metab Syndr, 2017, 9: 25. DOI: 10.1186/s13098-017-0225-1.

[2] SEVERINO P, D'AMATO A, NETTI L, *et al*. Myocardial ischemia and diabetes mellitus: Role of oxidative stress in the connection between cardiac metabolism and coronary blood flow[J]. J Diabetes Res, 2019, 2019: 9489826. DOI: 10.1155/2019/9489826.

[3] FRATI G, SCHIRONE L, CHIMENTI I, *et al*. An overview of the inflammatory signalling mechanisms in the myocardium underlying the development of diabetic cardiomyopathy[J]. Cardiovasc Res, 2017, 113(4): 378-388. DOI: 10.1093/cvr/cvx011.

[4] JIA G, HILL M A, SOWERS J R. Diabetic cardiomyopathy: an update of mechanisms contributing to this clinical entity[J]. Circ Res, 2018,1224(4): 624-638. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.117.311586.

[5] LUO B, HUANG F, LIU Y, *et al*. NLRP3 inflammasome as a molecular marker in diabetic cardiomyopathy[J]. Front Physiol, 2017, 8: 519. DOI: 10.3389/fphys.2017.00519.

[6] YANG F, QIN Y, LV J, *et al*. Silencing long non-coding RNA Kcnq1ot1 alleviates pyroptosis and fibrosis in diabetic cardiomyopathy[J]. Cell Death Dis, 2018, 9(10): 1000. DOI: 10.1038/s41419-018-1029-4.

[7] CHEN Y, HUA Y, LI X, *et al*. Distinct types of cell death and the implication in diabetic cardiomyopathy[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 42. DOI: 10.3389/fphar.2020.00042.

[8] LUO B, LI B, WANG W, *et al*. NLRP3 gene silencing ameliorates diabetic cardiomyopathy in a type 2 diabetes rat model[J]. PLoS ONE, 2014, 9(8): e104771. DOI: 10.1371/journal.pone.0104771.

[9] 王艳, 赵然尊, 陈攀科, 等. 微小 RNA-214 改善高糖诱导的 H9c2 细胞焦亡的机制探讨[J]. 中华心血管病杂志, 2019, 47(10): 820-828. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2019.10.009.
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 microRNA-214[J]. Chin J Cardiol, 2019, 47(10): 820-828. DOI: 10.3760/cma.j.issn.0253-3758.2019.10.009.

[10] FRANCHI L, EIGENBROD T, MUÑOZ-PLANILLO R, *et al*. The inflammasome: a caspase-1-activation platform

that regulates immune responses and disease pathogenesis [J]. Nat Immunol, 2009, 10(3): 241-247. DOI: 10.1038/ni.1703.

[11] BROUGH D, ROTHWELL N J. Caspase-1-dependent processing of pro-interleukin-1beta is cytosolic and precedes cell death[J]. J Cell Sci, 2007, 120(pt 5): 772-781. DOI: 10.1242/jcs.03377.

[12] ZHOU W, CHEN C, CHEN Z, *et al*. NLRP3: a novel mediator in cardiovascular disease[J]. J Immunol Res, 2018, 2018: 5702103. DOI: 10.1155/2018/5702103.

[13] KORF-KLINGEBIEL M, REBOLL M R, KLEDE S, *et al*. Myeloid-derived growth factor (C19orf10) mediates cardiac repair following myocardial infarction[J]. Nat Med, 2015, 21(2): 140-149. DOI: 10.1038/nm.3778.

[14] WANG Y Y, LI Y, FENG J, *et al*. Mydgf promotes cardiomyocyte proliferation and neonatal heart regeneration[J]. Theranostics, 2020, 10(20): 9100-9112. DOI: 10.7150/thno.44281.

[15] HE M, LI Y, WANG L, *et al*. MYDGF attenuates podocyte injury and proteinuria by activating Akt/BAD signal pathway in mice with diabetic kidney disease[J]. Diabetologia, 2020, 63(9): 1916-1931. DOI: 10.1007/s00125-020-05197-2.

[16] BORTNOV V, ANNIS D S, FOGERTY F J, *et al*. Myeloid-derived growth factor is a resident endoplasmic reticulum protein[J]. J Biol Chem, 2018, 293(34): 13166-13175. DOI: 10.1074/jbc.ac118.002052.

[17] WANG J, WEN Y, LV L L, *et al*. Involvement of endoplasmic reticulum stress in angiotensin II-induced NLRP3 inflammasome activation in human renal proximal tubular cells *in vitro*[J]. Acta Pharmacol Sin, 2015, 36(7): 821-830. DOI: 10.1038/aps.2015.21.

[18] YANG F, QIN Y, WANG Y, *et al*. LncRNA KCNQ1OT1 mediates pyroptosis in diabetic cardiomyopathy[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 50(4): 1230-1244. DOI: 10.1159/000494576.

[19] RATHKEY J K, ZHAO J, LIU Z, *et al*. Chemical disruption of the pyroptotic pore-forming protein gasdermin D inhibits inflammatory cell death and sepsis[J]. Sci Immunol, 2018, 3(26): eaat2738. DOI: 10.1126/sciimmunol.aat2738.

[20] LORENZO-ALMORÓS A, TUÑÓN J, OREJAS M, *et al*. Diagnostic approaches for diabetic cardiomyopathy[J]. Cardiovasc Diabetol, 2017, 16(1): 28. DOI: 10.1186/s12933-017-0506-x.

[21] FRATI G, SCHIRONE L, CHIMENTI I, *et al*. An overview of the inflammatory signalling mechanisms in the myocardium underlying the development of diabetic cardiomyopathy[J]. Cardiovasc Res, 2017, 113(4): 378-388. DOI: 10.1093/cvr/cvx011.

[22] SHARMA A, TATE M, MATHEW G, *et al*. Oxidative stress and NLRP3-inflammasome activity as significant drivers of diabetic cardiovascular complications: therapeutic implications[J]. Front Physiol, 2018, 9: 114. DOI: 10.3389/fphys.2018.00114.

[23] ZHAO L, FENG S, WANG S, *et al*. Production of bioactive recombinant human myeloid-derived growth factor in Escherichia coli and its mechanism on vascular endothelial cell proliferation[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(2): 1189-1199. DOI: 10.1111/jcmm.14602.

[24] LI W, LI Y, GUO B, *et al*. Myeloid-derived growth factor promotes intestinal glucagon-like peptide-1 production in male mice with type 2 diabetes[J]. Endocrinology, 2020, 1612(2): bqaa003. DOI: 10.1210/endocr/bqaa003.

[25] 李雪莲, 李智洋, 李宾公, 等. 槲皮素抑制糖尿病大鼠炎症小体激活并减轻心肌损伤[J]. 中国病理生理杂志, 2019, 35(8): 1345-1351. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2019.08.001.
LI X L, LI Z Y, LI B G, *et al*. Quercetin inhibits inflammasome activation in diabetic rats and attenuates myocardial injury[J]. Chin J Pathophysiol, 2019, 35(8): 1345-1351. DOI: 10.3969/j.issn.1000-4718.2019.08.001.

[26] XUE Y, DU M, ZHU M. Quercetin suppresses NLRP3 inflammasome activation in epithelial cells triggered by Escherichia coli O157: H7[J]. Free Radic Biol Med, 2017, 108: 760-769. DOI: 10.1016/j.freeradbiomed.2017.05.003.

(**收稿**:2020-11-22;**修回**:2021-02-09)

(编辑 汪勤俭)