

# 棕榈油酸在缺氧/复氧心肌细胞焦亡中的作用及机制研究

李云权<sup>1,2,3</sup>,段宗刚<sup>1,2,3</sup>,鲍海龙<sup>1,2</sup>,王清腾<sup>1,2</sup>,安洪鑫<sup>1,2</sup>,夏侯鸾达<sup>1,2</sup>,  
王旭<sup>1,2</sup>,蒋孟庭<sup>1,2</sup>,周海燕<sup>1,2</sup>,罗振华<sup>3</sup>,李伟<sup>1,2</sup>

**摘要** 目的 探讨棕榈油酸(POA)对心肌缺氧/复氧损伤后心肌细胞焦亡的影响。方法 实验设置对照组(Control)、缺氧/复氧组(HR)、棕榈油酸处理组(HR+POA)、溶剂无水乙醇(ET)对照组(HR+ET);采用CCK-8法检测心肌细胞活力,Hoechst33342/PI双染和乳酸脱氢酶(LDH)试验检测心肌细胞焦亡水平。ELISA法检测细胞培养上清液中炎症因子白细胞介素(IL)-1 $\beta$ 、IL-18释放量,qRT-PCR法和Western blot分别检测细胞焦亡相关分子NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$ 及IL-18的mRNA和蛋白相对表达水平。结果

CCK-8结果显示,与HR组相比,加入不同浓度POA干预,POA浓度在25~100  $\mu$ mol/L时能增加缺氧/复氧心肌细胞活力;构建心肌细胞缺氧/复氧模型,与对照组相比,HR组中NLRP3、ASC、Cleaved-caspase 1、GSDMD-N、IL-1 $\beta$ 及IL-18基因的蛋白和mRNA表达增加( $P < 0.05$ ),Hoechst33342/PI心肌细胞染色阳性百分比增加( $P < 0.05$ ),且LDH、IL-1 $\beta$ 及IL-18释放增加( $P < 0.05$ );100  $\mu$ mol/L POA干预后,与HR+ET组相比,HR+POA组中NLRP3、ASC、Cleaved-caspase 1、GSDMD-N、IL-1 $\beta$ 及IL-18的蛋白和mRNA表达降低( $P < 0.05$ ),Hoechst33342/PI心肌细胞染色阳性百分比降低,且LDH、IL-1 $\beta$ 及IL-18水平降低( $P < 0.05$ )。结论 棕榈油酸可能通过抑制缺氧/复氧后心肌细胞焦亡和炎症反应,改善心肌细胞缺氧/复氧损伤。

**关键词** 棕榈油酸;心肌细胞;缺氧/复氧损伤;细胞焦亡;炎症

**中图分类号** R 541.4

**文献标志码** A **文章编号** 1000-1492(2024)06-1006-07  
**doi**:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2024.06.015

急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)是严重且常见的冠心病类型,心肌梗死后心力衰竭严重影响患者预后。因此,急性心肌缺血发生

后如何挽救更多的心肌,抑制过度的炎症反应和心肌纤维化值得深入研究。AMI伴有各种类型的心肌细胞损伤,包括细胞焦亡等。研究表明急性心梗、心肌缺血再灌注损伤<sup>[1-4]</sup>、心力衰竭过程伴有细胞焦亡<sup>[5]</sup>。据文献<sup>[6]</sup>报道,棕榈油酸可以抑制巨噬细胞炎性小体激活延缓动脉粥样硬化,细胞焦亡与核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白3(nod-like receptor pyrin domain containing 3, NLRP3)炎性小体激活密切相关,后者下游介导心肌缺血再灌注损伤中细胞焦亡发生<sup>[7]</sup>。课题组前期研究显示AMI患者血清中棕榈油酸(palmitoleic acid, POA)显著升高,POA是否抑制急性心肌梗死后心肌细胞焦亡及其相关机制尚不清楚。因此,该研究拟建立体外缺氧/复氧模型探讨POA对心肌细胞焦亡是否具有改善作用,为临床上心肌缺血/再灌注损伤的发生机制和治疗提供基础性理论依据。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞系** 人源AC16心肌细胞株购自美国the American Type Culture Collection(ATCC),用含10%胎牛血清的高糖培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)(美国Gibco Laboratories)、5% CO<sub>2</sub>、21% O<sub>2</sub>培养,置于湿度饱和、37  $^{\circ}$ C恒温培养箱中,当AC16处于对数生长期时进行后续实验。

**1.2 主要试剂与药品** DMEM培养基、胎牛血清、无水乙醇、CCK-8、qRT-PCR试剂盒均购自北京索莱宝科技有限公司;PVDF膜购自美国millipore公司;Hoechst33342/PI染色、BCA蛋白定量、LDH、IL-1 $\beta$ 、IL-18 ELISA检测试剂盒及 $\beta$ -actin抗体、山羊抗兔均购自武汉proteintech Biotechnology公司;棕榈油酸(顺式)购自美国Sigma-Aldrich公司;NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白(apoptosis-related speck-like protein containing CARD, ASC)抗体购自美国Santa Cruz Biotechnology公司;裂解的半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-1(cystein-containing aspartate-specific protease-1, Cleaved caspase-1)、白细胞介素1 $\beta$ (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )抗体购自美国Cell Signaling Technol-

2024-05-10 接收

基金项目:国家自然科学基金(编号:81960047,82160086);贵州省科学技术基金[编号:黔科合平台人才GCC(2022)040-1]

作者单位:<sup>1</sup> 贵州医科大学附属医院心内科,贵阳 550004

<sup>2</sup> 贵州医科大学临床医学院,贵阳 550004

<sup>3</sup> 贵州省人民医院中心实验室,贵阳 550002

作者简介:李云权,男,硕士研究生;

李伟,男,教授,主任医师,博士生导师,责任作者, E-mail:liwei249188@sina.com

ogy (CST) 公司; 消皮素 D (gasdermin-D, GSDMD) 氮端片段 (GSDMD-N)、IL-18 抗体购自英国 ABcam 公司。NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$ 、IL-18 基因引物序列由上海生工生物技术有限公司合成。

### 1.3 方法

**1.3.1 实验细胞分组及心肌细胞缺氧/复氧模型的建立** 将 AC16 心肌细胞分为对照组 (Control 组, 10% 胎牛血清的 DMEM、5% CO<sub>2</sub>、21% O<sub>2</sub>, 湿度饱和、37 °C 恒温培养箱培养), 缺氧/复氧组 (HR 组, 将正常培养的 AC16 细胞置于低糖无血清培养基、1% O<sub>2</sub> 培养 12 h, 再在对照组条件下培养 12 h), AC16 缺氧/复氧模型构建的同时给予不同浓度的 POA 或者溶剂 (无水乙醇) 干预, 为 HR + POA 组、HR + ET 组。

**1.3.2 CCK-8 检测细胞存活率** 使用对数生长期的 AC16, 待生长融合约 90% 时进行细胞铺板, 96 孔板每孔加入 100  $\mu$ l 约 4 000 ~ 5 000 个细胞。将上述 96 孔板放入低氧培养箱培养 12 h, 后取出 96 孔板, 去除低糖无血清 DMEM, 加入完全培养基 100  $\mu$ l/孔, 并加入 POA (浓度为 25、50、100、200、400、800、1 600  $\mu$ mol/L) 或者溶剂, 正常培养 12 h, 每孔加入 10  $\mu$ l CCK-8 试剂, 孵育 30 min, 酶标仪测量 450 nm 处吸光度 (absorbance, A) 值。导出数据, 计算各组细胞存活率。

**1.3.3 心肌细胞总蛋白的提取** 取出各组 AC16 培养皿, 加入 300 ~ 400  $\mu$ l 细胞裂解液 (预先加入 1/100 体积的 PMSF), 冰上裂解 30 min 后离心, 吸取上清液, 按照 BCA 蛋白定量试剂盒测定心肌细胞总蛋白浓度。加入 1/4 体积蛋白样品的 5  $\times$  上样缓冲液, 100 °C 金属浴 5 min, 分装蛋白样品, -80 °C 冰箱保存。

**1.3.4 Western blot 及分析处理** 将提取的蛋白样品上样至预先制好的凝胶 (十二烷基硫酸钠 - 聚丙烯酰胺凝胶), 经电泳分离、转膜, 5% 脱脂奶粉封闭 1 ~ 2 h, 加入按照抗体说明稀释的一抗 (NLRP3、ASC、Cleaved caspase-1、GSDMD-N、IL-1 $\beta$ 、IL-18 抗体, 稀释浓度 1 : 500 ~ 1 : 1 000;  $\beta$ -actin 抗体 1 : 10 000), 4 °C 冰箱孵育过夜, 加入二抗 (抗鼠或兔, 稀释浓度 1 : 5 000 ~ 1 : 10 000) 常温孵育 1 ~ 2 h, 后进行曝光显影, 并保存条带, 并使用 ImageJ 分析处理灰度值, GraphPad Prism 统计分析。

**1.3.5 ELISA 检测炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-18 的量** 取各组 AC16 培养皿, 移液器吸取上清液至 15 ml 离心管中, 离心除去细胞碎片及杂质, 收集上清液。按照

ELISA 试剂盒使用操作说明, 完成 IL-1 $\beta$ 、IL-18 检测, 保存数据并进行统计分析。

**1.3.6 乳酸脱氢酶实验 (lactate dehydrogenase, LDH)** 取各组 AC16 培养皿, 移液器吸取上清液至 15 ml 离心管中, 离心除去细胞碎片及杂质, 收集上清液。按照 LDH 检测试剂盒使用操作说明, 完成 LDH 的检测, 用酶标仪检测 490 nm 波长处的 A 值, 计算心肌细胞 LDH 释放量 (%) =  $(A_{\text{实验样品}} - A_{\text{对照组}}) / (A_{\text{标准品}} - A_{\text{对照组}}) \times 100\%$ 。

**1.3.7 Hoechst33342/PI 染色检测 AC16 心肌细胞焦亡** 取 AC16 心肌细胞进行铺板, 进行缺氧/复氧造模并同时给予 POA 处理, 按照 Hoechst33342/PI 染色试剂盒操作流程进行染色。染色结束以后, 倒置显微镜下观察, PI 染色阳性细胞为红色, Hoechst33342 将所有细胞染为蓝色。进行拍照并保存图片。

**1.3.8 实时逆转录聚合酶链式反应 (qRT-PCR) 检测细胞焦亡相关基因的 mRNA 表达水平** 按照 qRT-PCR 检测试剂盒说明检测各组  $\beta$ -actin、IL-1 $\beta$ 、IL-18、NLRP3、ASC、caspase-1 及 GSDMD 的 mRNA 相对表达量。提取各分组总 RNA; 使用 DNA 反转录试剂盒进行逆转录即得 cDNA。最后使用 2<sup>- $\Delta\Delta$ C<sub>T</sub></sup> 法进行相关基因 mRNA 的相对定量分析。所用引物见表 1。

表 1 目的基因引物序列

基因名称	引物序列 (5'-3')
$\beta$ -actin	F CCTGGCACCCAGCACAAT
	R GGGCCGGACTCGTCATAC
IL-1 $\beta$	F CAGAAGTACCTGAGCTCGCC
	R AGATTTCGTAGCTGGATGCCG
IL-18	F CGCTTTACTTTATAGCTGAAGATGA
	R ATGGTCCGGGGTGCATTATC
NLRP3	F TGGTTGGTGAATTCTGGCCT
	R TTGTCTCCGAGAGTGTGGCC
ASC	F GCACAGCCAGAACAGAACATTT
	R GCCATACAGAGCATCCAGCAA
Caspase-1	F GACCGACTGGTTCCTCAAG
	R GACGTGTACGACTGGGTGTT
GSDMD	F CCATCGGCCTTTGAGAAAAGTG
	R ACACATGAATAACGGGGTTTCC

**1.4 统计学处理** 各实验进行 3 次重复, 所有结果采用 ImageJ 和 (或) GraphPad Prism 8.0 软件进行分析处理, 定量资料结果采用  $\bar{x} \pm s$  表示, 两组间比较采用 *t* 检验, 多组间采用 ANOVA, 即单因素方差分析, 以  $\alpha = 0.05$  为检验水准,  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

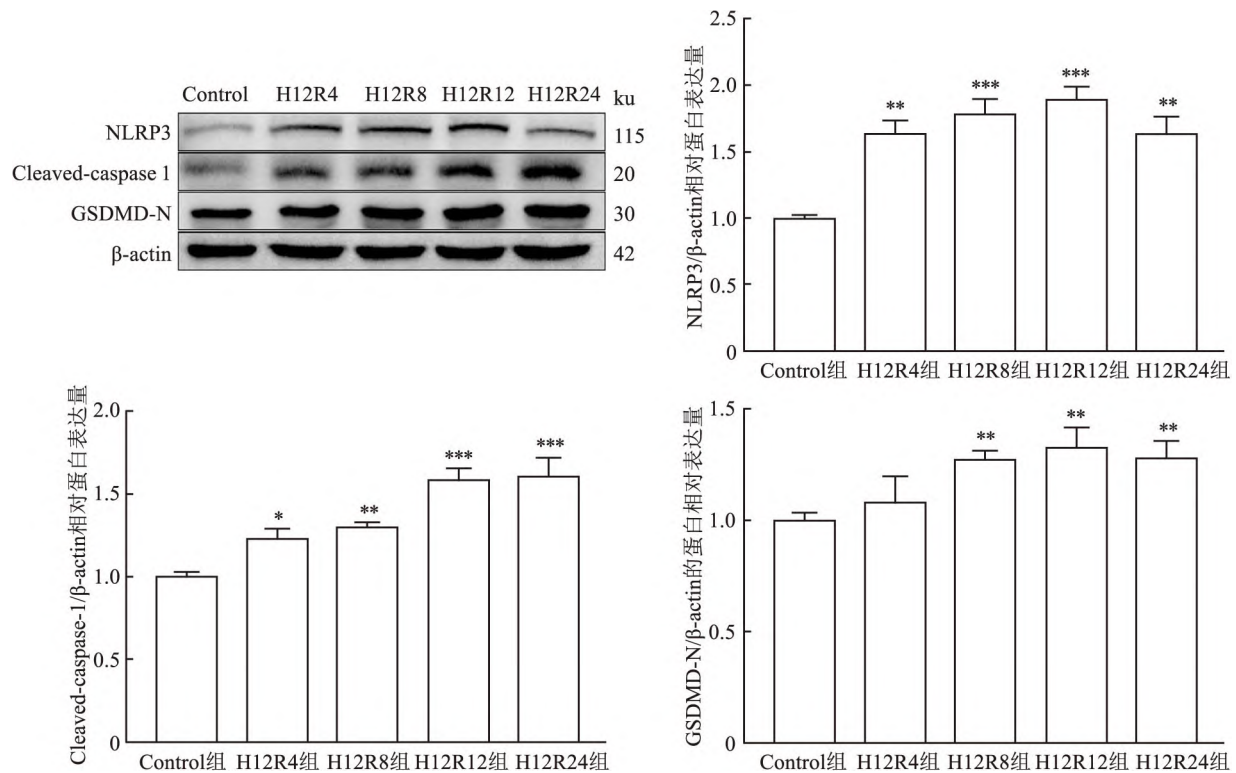


图1 缺氧/复氧不同时间 NLRP3、Cleaved caspase-1、GSDMD-N 蛋白的相对表达量

H12H4、H12R8、H12R12、H12R24 为缺氧 12 h,复氧 4、8、12、24 h;与 Control 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

## 2 结果

**2.1 成功构建人源 AC16 缺氧/复氧模型** 采用 AC16 心肌细胞建立缺氧/复氧 (H/R) 模型,结果显示,与对照组相比,缺氧 12 h、复氧 12 h NLRP3、Cleaved caspase-1、GSDMD-N 蛋白表达显著增加 ( $P < 0.01$ ),故采用缺氧 12 h、复氧 12 h 的条件进行后续实验,如图 1。

**2.2 CCK-8 筛选 POA 最佳干预浓度** CCK-8 结果显示,与 HR 组相比,当 POA 为 25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  时,心肌细胞存活率显著增加 ( $P < 0.05$ ),且呈浓度依赖性;当 POA 为 200、400  $\mu\text{mol/L}$  或者仅加 POA 的溶剂时,心肌细胞存活率差异无统计学意义 ( $P > 0.05$ ),当 POA 为 800、1 600  $\mu\text{mol/L}$  时,细胞存活率显著降低 ( $P < 0.05$ ),根据以上结果,选取 100  $\mu\text{mol/L}$  的 POA 作为后续实验浓度。见图 2。

**2.3 qRT-PCR 检测 POA 对缺氧、复氧心肌细胞焦亡相关基因 NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1 $\beta$ 、IL-18 的 mRNA 表达水平的影响** 结果显示,与 Control 组相比,HR 组细胞焦亡相关基因 mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.05$ );与 HR 组相比,HR + ET 组无显著差异;与 HR + ET 组相比,HR +

POA 组细胞焦亡相关基因 mRNA 表达水平降低 ( $P < 0.05$ )。见图 3。

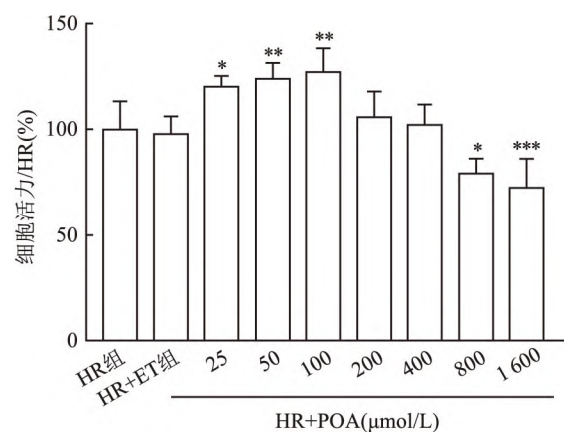


图2 CCK-8 检测 POA 对缺氧/复氧心肌细胞的影响

与 HR 组比较: \*  $P < 0.05$ , \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

**2.4 Western blot 检测 POA 对各组 NLRP3、ASC、Cleaved caspase-1、GSDMD-N、IL-1 $\beta$ 、IL-18 蛋白表达的影响** Western blot 结果显示,与 Control 组比较,HR 组焦亡相关蛋白显著增加 ( $P < 0.05$ );与 HR 组相比,HR + ET 组焦亡相关蛋白无显著差异;与 HR + ET 组比较,HR + POA 组细胞焦亡相关蛋白表达降低 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

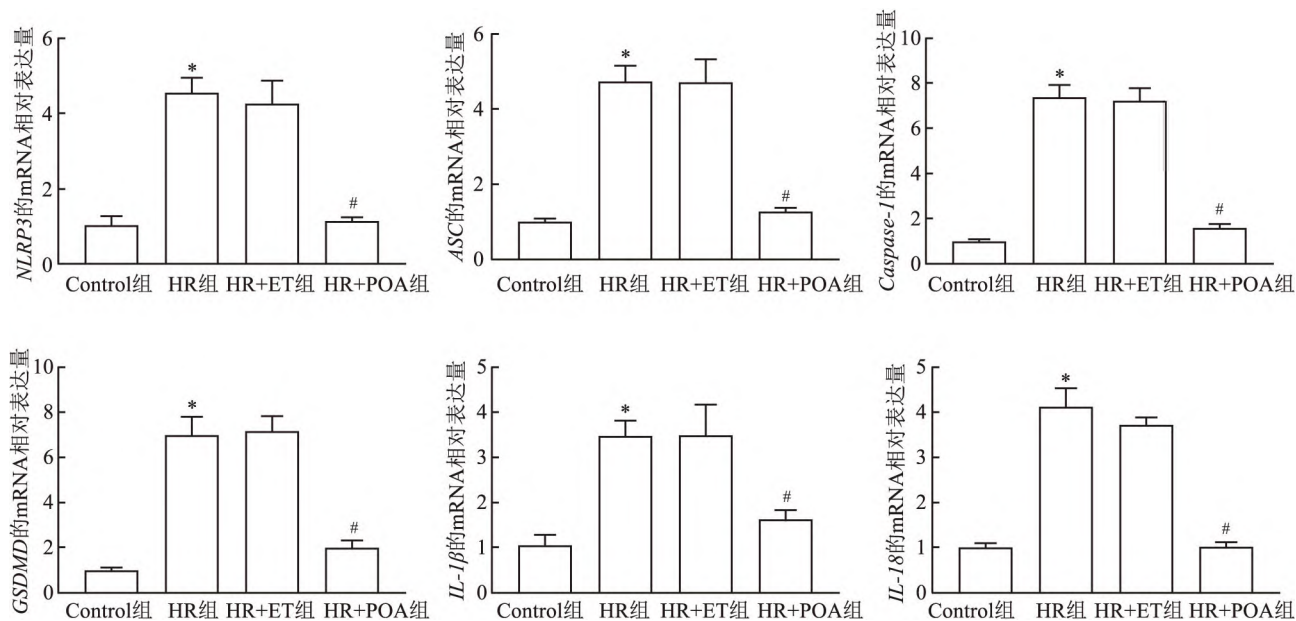


图3 POA对各组中NLRP3、ASC、Caspase-1、GSDMD、IL-1β、IL-18 mRNA表达量的影响

与Control组比较: \*  $P < 0.05$ ; 与HR + ET组比较: #  $P < 0.05$

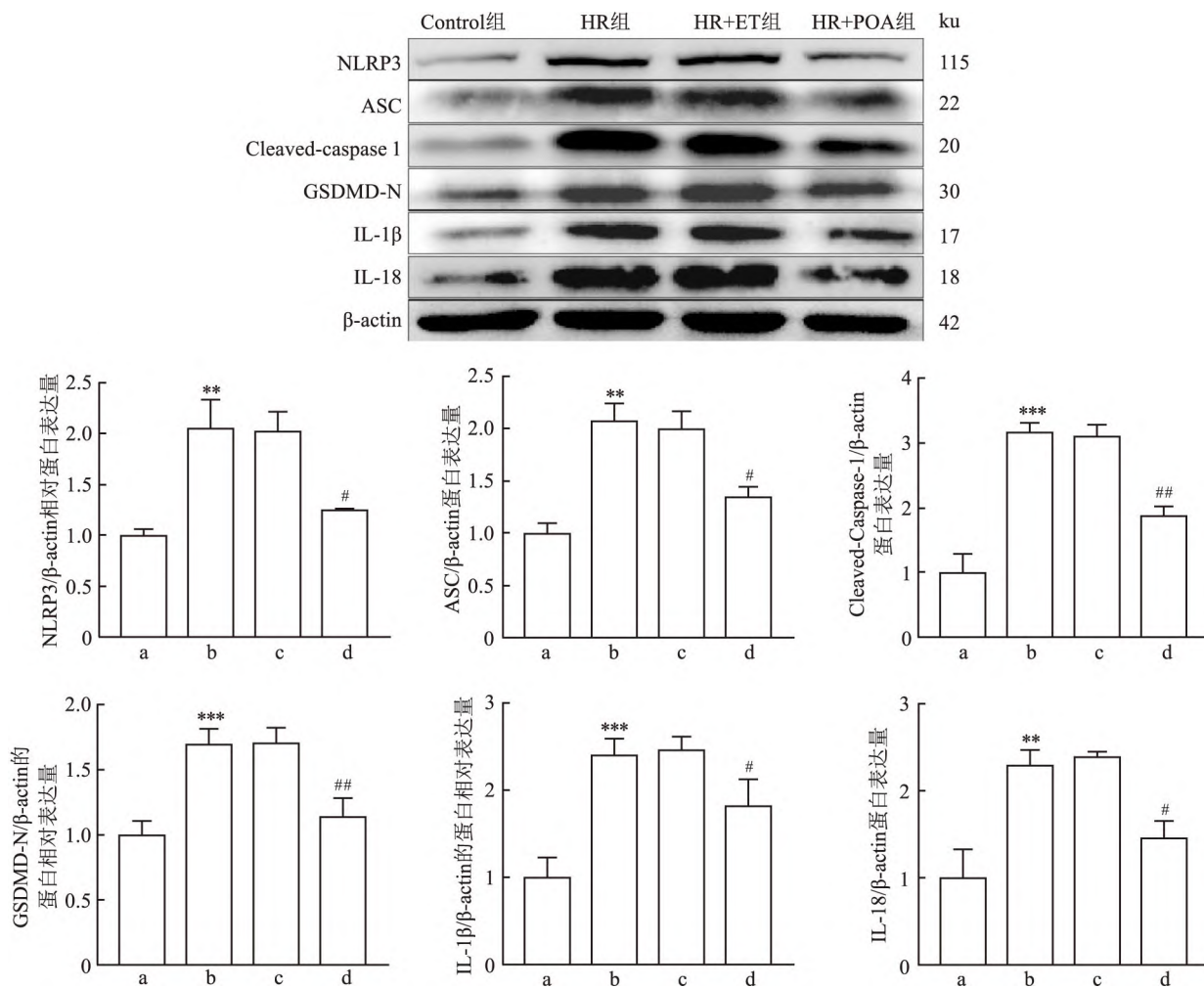


图4 Western blot检测各组NLRP3、ASC、Cleaved caspase-1、GSDMD-N、IL-1β、IL-18蛋白表达水平

a: Control组; b: HR组; c: HR + ET组; d: HR + POA组; 与Control组比较: \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$ ; 与HR + ET组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

**2.5 Hoechst33342/PI 染色和 LDH 释放实验检测 POA 对缺氧/复氧心肌细胞焦亡的影响** Hoechst33342/PI 染色和 LDH 实验结果显示,与 Control 组相比,HR 组 PI 染色阳性细胞百分比显著增加( $P < 0.05$ ),LDH 活性增加( $P < 0.05$ );与 HR 组相比,HR + ET 组染色和 LDH 释放无显著差异;与 HR + ET 组相比,HR + POA 组 PI 染色阳性细胞百

分比显著降低,LDH 活性降低( $P < 0.05$ )。见图 5。  
**2.6 ELISA 检测细胞培养上清炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-18 的量** ELISA 结果显示,与 Control 组相比,HR 组细胞上清液中 IL-1 $\beta$ 、IL-18 释放量显著增加( $P < 0.05$ );与 HR 组相比,HR + ET 组 IL-1 $\beta$ 、IL-18 释放无显著差异;与 HR + ET 组相比,HR + POA 组 IL-1 $\beta$ 、IL-18 释放显著降低( $P < 0.05$ )。见图 6。

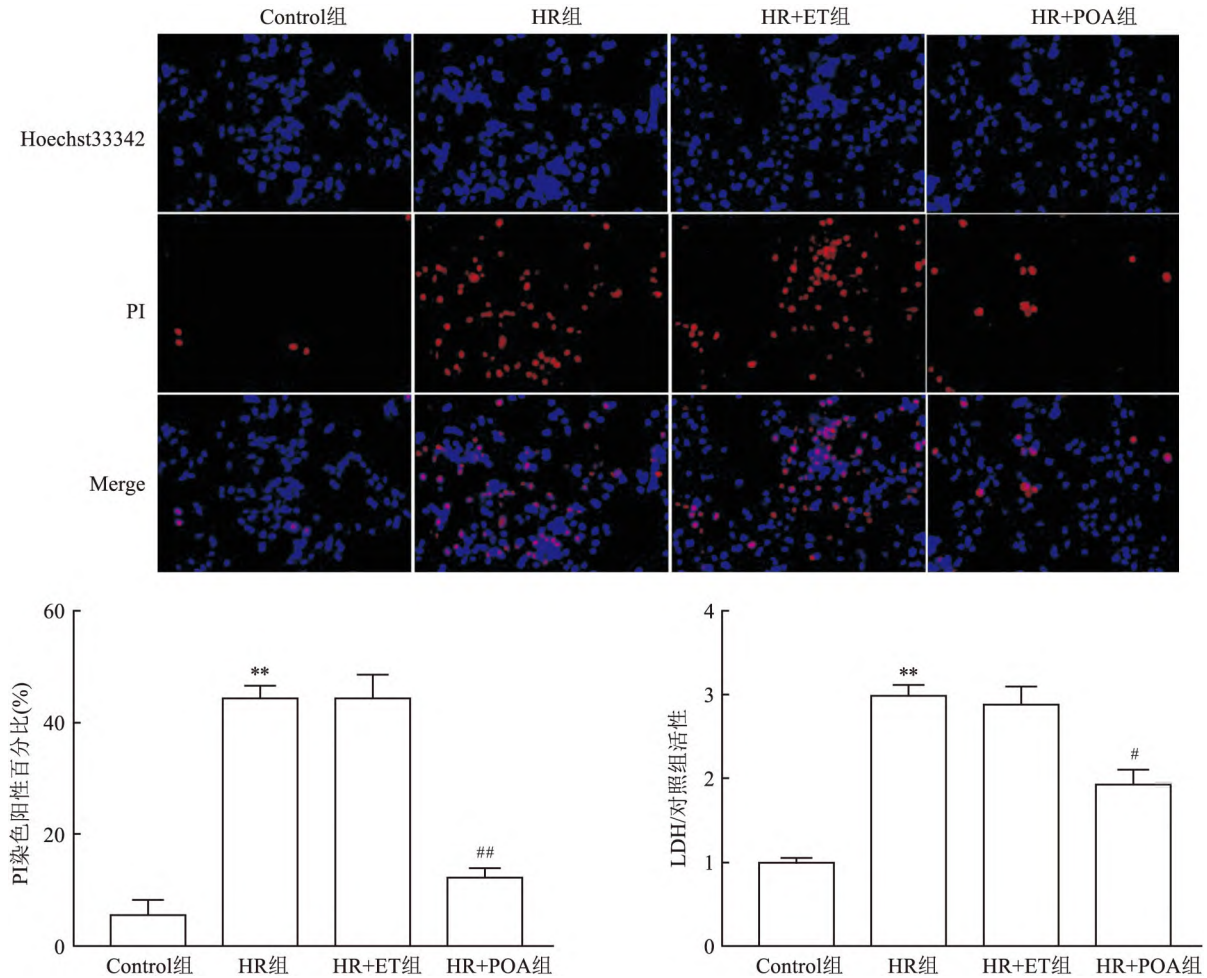


图5 各组 Hoechst33342/PI 染色和 LDH 实验评估 POA 对缺氧复氧心肌细胞焦亡的影响 ×100  
 与 Control 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 HR + ET 组比较: #  $P < 0.05$ , ##  $P < 0.01$

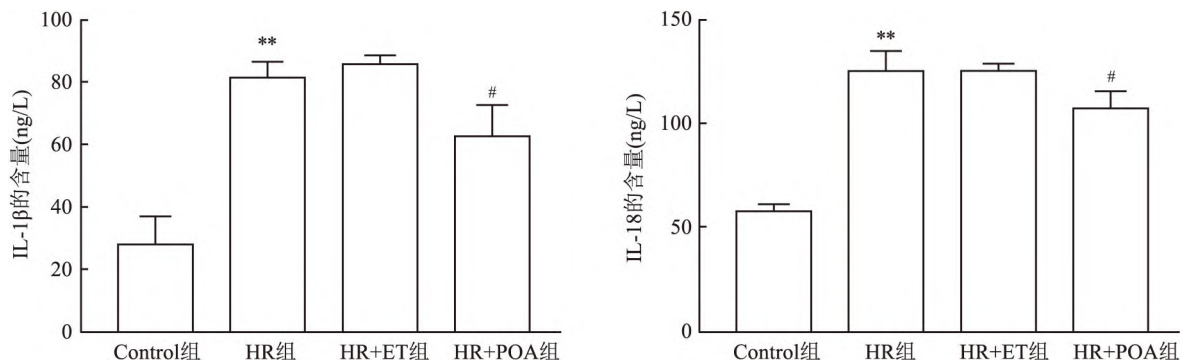


图6 ELISA 检测细胞培养上清液中炎症因子 IL-1 $\beta$ 、IL-18 释放  
 与 Control 组比较: \*\*  $P < 0.01$ ; 与 HR + ET 组比较: #  $P < 0.05$

### 3 讨论

急性心肌梗死起病急,病死率高,仍是人类健康的主要威胁<sup>[8]</sup>。目前主要的有效治疗手段,仍然是介入治疗,随着内科介入治疗技术的发展,急性心肌梗死的病死率已显著降低,然而,介入治疗让患者获益的同时也伴随支架植入后无复流、恶性心律失常、心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)等现象的发生。目前认为<sup>[9]</sup>, MIRI的发病机制是氧自由基的作用、细胞内钙超载、pH的快速恢复、线粒体通透性膜转换孔的开放以及炎症反应等。MIRI发生时,导致大量心肌细胞坏死、凋亡、焦亡等损伤,其中,心肌细胞焦亡伴有炎症瀑布形成,炎症风暴又会进一步加重心肌缺血再灌注损伤,这是一个恶性循环。预防急性心肌梗死最好的策略是预防冠心病的发生,当急性心肌梗死已然发生,最大限度地保护心肌是唯一策略。

细胞焦亡是一种由消皮素蛋白家族<sup>[10]</sup>介导的、细胞受到感染性或内源性损伤相关信号刺激后发生的程序性细胞死亡。其形态学特征首次在巨噬细胞中被发现,并被命名为细胞焦亡<sup>[11]</sup>。与凋亡不同的是,细胞焦亡由炎症小体介导(如 NLRP3 炎症小体)Caspase 1 活化从而裂解 GSDMD 形成 GSDMD-N,后者在细胞膜上打孔诱导细胞焦亡<sup>[12]</sup>,同时,细胞焦亡伴有炎症瀑布的形成<sup>[13]</sup>。AMI、MIRI 发生时,NLRP3 激活后与接头蛋白 ASC 组装,从而招募 Caspase-1 前体分子,使得 Caspase-1 前体发生自体剪切生成活化的 Cleaved caspase -1 分子,后者促进 IL-1 $\beta$  及 IL-18 的成熟和分泌,成熟细胞因子释放到胞外介导炎症的级联反应。

课题组前期的临床研究表明,在急性心肌梗死患者的血液中,POA 的水平显著高于非冠心病患者,本研究设计了 AC16 缺氧/复氧模型,在体外条件下探讨了 POA 的作用。POA 作为一种单不饱和 omega-7 脂肪酸与急性心肌梗死相关的研究报道较少,人体内棕榈油酸被认为是一种脂肪因子<sup>[14]</sup>,有反式、顺式两种构型,主要来源为脂肪酸的从头合成,且为顺式构型,其合成是由硬脂酰辅酶 A 去饱和酶 1(SCD1)介导的。在人类机体中,顺式棕榈油酸的生物合成主要发生在肝脏,研究<sup>[15]</sup>证实,棕榈油酸的双键构型对动脉粥样硬化的保护至关重要。多项研究<sup>[6-7,16-17]</sup>表明棕榈油酸具有抗炎作用。棕榈油酸对 MIRI 是否发挥保护作用以及可能的具体作用机制尚不清楚,需进一步的研究证实。

本研究成功建立 AC16 缺氧/复氧模型,观察 POA 对 NLRP3 小体介导的细胞焦亡、炎症反应的影响,探讨其对心肌细胞缺氧/复氧损伤的作用。Western blot 结果显示,在缺氧/复氧条件下,NLRP3、Cleaved-caspase 1、GSDMD-N 的蛋白表达显著升高,证实 AC16 发生了焦亡。CCK-8 实验结果显示加入浓度在 25、50、100  $\mu\text{mol/L}$  的 POA 时,心肌细胞生存率显著增加,且棕榈油酸在 100  $\mu\text{mol/L}$  时,心肌细胞的生存率最高,提示 POA 对缺氧复氧具有保护作用。qRT-PCR 和 Western blot 结果显示,NLRP3、ASC、Cleaved-caspase 1、GSDMD-N、IL-1 $\beta$ 、IL-18 分子的 mRNA 和蛋白水平高于对照组;加入 100  $\mu\text{mol/L}$  的 POA 干预后,上述分子的 mRNA 和蛋白水平降低,提示 POA 可能抑制缺氧/复氧心肌细胞的焦亡和炎症反应。Hoechst33342/PI 染色、LDH 释放实验和 ELISA 实验结果也佐证了上述观点。因此,POA 可能通过抑制 NLRP3 炎症小体介导的心肌细胞焦亡,改善心肌细胞缺氧/复氧损伤。

综上所述,POA 可能通过抑制缺氧/复氧后心肌细胞焦亡和炎症反应,发挥保护心肌细胞的作用,但是具体作用机制尚不十分清楚,需进一步深入研究加以证实。

### 参考文献

- [1] Li Y, Wang Y, Guo H, et al. IRF2 contributes to myocardial infarction via regulation of GSDMD induced pyroptosis[J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(2): 40.
- [2] Zhang J, Huang L, Shi X, et al. Metformin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury and cell pyroptosis via AMPK/NLRP3 inflammasome pathway[J]. *Aging (Albany NY)*, 2020, 12(23): 24270-87.
- [3] Yao M, Wang Z, Jiang L, et al. Oxytocin ameliorates high glucose- and ischemia/reperfusion-induced myocardial injury by suppressing pyroptosis via AMPK signaling pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 153: 113498.
- [4] Shen S, He F, Cheng C, et al. Uric acid aggravates myocardial ischemia-reperfusion injury via ROS/NLRP3 pyroptosis pathway[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 133: 110990.
- [5] Chen X, Tian P C, Wang K, et al. Pyroptosis: role and mechanisms in cardiovascular disease[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 897815.
- [6] Çimen I, Kocatürk B, Koyuncu S, et al. Prevention of atherosclerosis by bioactive palmitoleate through suppression of organelle stress and inflammasome activation[J]. *Sci Transl Med*, 2016, 8(358): 358ra126.
- [7] Ridker P M, Everett B M, Thuren T, et al. Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease[J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(12): 1119-31.

- [8] Tsao C W, Aday A W, Almarzoq Z I, et al. Heart disease and stroke statistics-2022 update: a report from the American heart association[J]. *Circulation*, 2022, 145(8):e153–639.
- [9] Huang G, Lu X, Duan Z, et al. PCSK9 knockdown can improve myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting autophagy[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2022, 22(12): 951–61.
- [10] Shi J, Gao W, Shao F. Pyroptosis: gasdermin-mediated programmed necrotic cell death[J]. *Trends Biochem Sci*, 2017, 42(4): 245–54.
- [11] Wang Q, Wu J, Zeng Y, et al. Pyroptosis: A pro-inflammatory type of cell death in cardiovascular disease[J]. *Clin Chim Acta*, 2020, 510:62–72.
- [12] Wang L, Hauenstein A V. The NLRP3 inflammasome: Mechanism of action, role in disease and therapies[J]. *Mol Aspects Med*, 2020, 76:100889.
- [13] Lu F, Lan Z, Xin Z, et al. Emerging insights into molecular mechanisms underlying pyroptosis and functions of inflammasomes in diseases[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(4): 3207–21.
- [14] Frigolet M E, Gutiérrez-Aguilar R. The role of the novel lipokine palmitoleic acid in health and disease[J]. *Adv Nutr*, 2017, 8(1): 173S–81S.
- [15] Cimen I, Yildirim Z, Dogan A E, et al. Double bond configuration of palmitoleate is critical for atheroprotection[J]. *Mol Metab*, 2019, 28:58–72.
- [16] Souza C O, Valenzuela C A, Bakere J, et al. Palmitoleic acid has stronger anti-inflammatory potential in human endothelial cells compared to oleic and palmitic acids[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(20): e1800322.
- [17] Weimann E, Silva M B B, Murata G M, et al. Topical anti-inflammatory activity of palmitoleic acid improves wound healing[J]. *PLoS ONE*, 2018, 13(10): e0205338.

## The role and mechanism of palmitoleic acid in the pyroptosis of cardiomyocytes after hypoxia/reoxygenation-induced injury

Li Yunquan<sup>1,2,3</sup>, Duan Zonggang<sup>1,2,3</sup>, Bao Hailong<sup>1,2</sup>, Wang Qingteng<sup>1,2</sup>, An Hongxin<sup>1,2</sup>, Xiahou Luanda<sup>1,2</sup>, Wang Xu<sup>1,2</sup>, Jiang Mengting<sup>1,2</sup>, Zhou Haiyan<sup>1,2</sup>, Luo Zhenhua<sup>3</sup>, Li Wei<sup>1,2</sup>

(<sup>1</sup>Dept of Cardiovascular Medicine, The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004; <sup>2</sup>School of Clinical Medicine, Guizhou Medical University, Guiyang 550004; <sup>3</sup>Dept of Central Lab, Guizhou Provincial People's Hospital, Guiyang 550002)

**Abstract Objective** To investigate the effect of palmitoleic acid (POA) on pyroptosis of cardiomyocytes after hypoxia/reoxygenation-induced injury in the human myocardium. **Methods** The experiment comprised a control group (Control, normal culture), a hypoxia/reoxygenation group (HR), a palmitoleic acid-treated group (HR + POA), and an anhydrous ethanol control group (HR + ET). Cardiomyocytes viability was assessed using CCK-8 assay, and the level of pyroptosis of cardiomyocytes was measured through the double staining with Hoechst33342/PI and LDH assay. ELISA was employed to detect the release of inflammatory factors IL-1 $\beta$  and IL-18 in the cell culture supernatant. qRT-PCR and Western blot were utilized to determine the relative expression levels of mRNA and protein of pyroptosis-related genes, namely NLRP3, ASC, Caspase-1, GSDMD, IL-1 $\beta$  and IL-18, respectively. **Results** CCK-8 assay showed that the survival of hypoxic/reoxygenated cardiomyocytes increased with the addition of POA at concentrations ranging from 25 to 100  $\mu\text{mol/L}$ , as compared to the HR group; a hypoxia/reoxygenation model of cardiomyocyte was established. The expression of protein and mRNA increased in NLRP3, ASC, Cleaved caspase-1, GSDMD-N, IL-1 $\beta$  and IL-18 vs the control group ( $P < 0.05$ ), the positive percentage of Hoechst33342/PI staining in cardiomyocytes increased significantly ( $P < 0.05$ ), the release of LDH, IL-1 $\beta$ , and IL-18 increased ( $P < 0.05$ ). After intervention with 100  $\mu\text{mol/L}$  POA, the protein and mRNA expression levels of NLRP3, ASC, Cleaved caspase-1, GSDMD-N, IL-1 $\beta$ , and IL-18 were significantly reduced in the HR + POA group vs HR + ET group ( $P < 0.05$ ). The positive percentage of Hoechst33342/PI staining in cardiomyocytes decreased significantly, and the levels of LDH, IL-1 $\beta$  and IL-18 significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusion** Palmitoleic acid may alleviate hypoxia/reoxygenation-induced injury of cardiomyocytes by inhibiting pyroptosis and inflammatory response after hypoxia/reoxygenation in human myocardium.

**Key words** palmitoleic acid; cardiomyocyte; hypoxia/reoxygenation-induced injury; pyroptosis; inflammation