**DOI:** 10.14188/j.1671-8852.2024.0386
**文章编号** 1671-8852(2025)06-0703-06

# 非奈利酮对脂多糖诱导的大鼠心肌H9C2细胞凋亡和氧化应激的影响及作用机制

张 恒[1,2] 邓 伟[1,2]
[1]武汉大学人民医院心血管内科； [2]代谢与相关慢病湖北省重点实验室 湖北 武汉 430060

**摘要** 目的：分析非奈利酮（Finerenone）对大鼠心肌H9C2细胞在脂多糖（LPS）刺激下引起的凋亡和氧化应激的影响及其作用机制。方法：使用不同浓度的非奈利酮（0，2.5，5，10，20 mmol•L$^{-1}$）经过24 h的处理，接着给予12 h的脂多糖（10 μg•mL$^{-1}$）刺激，使用CCK-8试剂盒评估细胞活性，并确定适宜的非奈利酮浓度以进行后续研究。将大鼠心肌H9C2细胞随机分成4组：对照组、仅非奈利酮处理组（浓度为5 mmol•L$^{-1}$）、单独LPS处理组（浓度为10 μg•mL$^{-1}$）以及同时接受LPS和非奈利酮处理组（浓度分别为10 μg•mL$^{-1}$和5 mmol•L$^{-1}$）。使用活性氧（ROS）检测试剂盒评估细胞的氧化应激水平，一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒检测细胞凋亡；Western Blot法检测C-caspase-3、Bax、Bcl-2、PI3K、AKT和GSK-3β表达水平。结果：不同浓度的非奈利酮处理后，对大鼠心肌H9C2细胞的存活率差异无统计意义（$P>0.05$）。给予非奈利酮处理可挽救由LPS刺激诱导的细胞存活率下降，在非奈利酮浓度为5、10、20 mmol•L$^{-1}$的组中，差异具有统计学意义（$P<0.05$）。LPS组细胞凋亡、氧化应激显著高于对照组（$P<0.05$）；非奈利酮处理后能抑制LPS诱导的凋亡因子的表达（$P<0.05$），同时减轻凋亡和氧化应激的水平（$P<0.05$）。机制方面，Western Blot显示非奈利酮能激活PI3K/AKT/GSK-3β信号通路。结论：非奈利酮能减轻LPS诱导的细胞毒性，抑制凋亡和氧化应激，而这些作用可能是通过激活PI3K/AKT/GSK-3β信号通路实现的。

**关键词** 非奈利酮；大鼠心肌H9C2细胞；脂多糖；凋亡；氧化应激
**中图分类号** R542.2$^{+}$1
**文献标识码** A
**开放科学（资源服务）标识码（OSID）：**

# Effect of finerenone on apoptosis and oxidative stress of rat myocardial H9C2 cells induced by lipopolysaccharide and its mechanism

**ZHANG Heng[1,2], DENG Wei[1,2]**
*[1]Dept. of Cardiovascular Medicine, Renmin Hospital of Wuhan University; [2]Hubei Provincial Key Laboratory of Metabolism and Related Chronic Diseases, Wuhan 430060, Hubei, China*

## Abstract

**Objective:** To investigate the mechanism of action of finerenone and its effect on oxidative stress and apoptosis in rat myocardial H9C2 cells stimulated with lipopolysaccharide (LPS). **Methods:** Following a 24-hour course of therapy with varying finerenone concentrations (0, 2.5, 5, 10, and 20 mmol•L$^{-1}$) followed by 12 hours of LPS (10 μg•mL$^{-1}$) stimulation, cellular activity was assessed using a CCK-8 kit, and the appropriate finerenone concentration was determined for subsequent studies. Rat myocardial H9C2 cells were randomly divided into four groups: a control group, a finerenone-treated group only (at a concentration of 5 mmol•L$^{-1}$), an LPS-treated group alone (at a concentration of

**课题来源**：国家自然科学基金面上项目（编号：82170245；82370284）
**作者简介**：张恒，男，1998—，医学硕士，主要从事心血管疾病研究，E-mail：hengzhang98@whu.edu.cn
**通信作者**：邓伟，男，1982—，医学博士，副教授，主任医师，博士生导师，主要从事心力衰竭与心肌病研究，E-mail：vivideng1982@whu.edu.cn

10 μg•mL$^{-1}$), and a group that received both LPS and finerenone treatment (at concentrations of 10 μg•mL$^{-1}$ and 5 mmol•L$^{-1}$, respectively). Oxidative stress levels in cells were assessed using a reactive oxygen species (ROS) assay kit, a one-step TUNEL apoptosis assay kit to assess apoptosis levels; and Western Blot was adopted to detect C-caspase-3, Bax, Bcl-2, PI3K, AKT, and GSK-3β expression levels. **Results:** There was no statistically significant difference in the survival of rat myocardial H9C2 cells after treatment with different concentrations of finerenone ($P>0.05$). Administration of finerenone treatment rescued the decline in cell survival induced by LPS stimulation, and the difference was statistically significant in the groups with finerenone treatment at concentrations of 5, 10, and 20 mmol•L$^{-1}$ ($P<0.05$). When compared to the control group, the LPS group showed noticeably higher levels of oxidative stress and apoptosis. It was discovered that finerenone treatment reduced the amount of apoptotic proteins produced in response to LPS ($P<0.05$), and at the same time attenuated the levels of apoptosis and oxidative stress ($P<0.05$). Mechanistically, Western Blot showed that finerenone activated the PI3K/AKT/GSK-3β signaling pathway. **Conclusion:** Finerenone attenuates LPS-induced cytotoxicity and inhibits apoptosis and oxidative stress, and these effects may be achieved by activating the PI3K/AKT/GSK-3β signaling pathway.

**Key Words** Finerenone; Rat Myocardial H9C2 Cells; Lipopolysaccharide; Apoptosis; Oxidative Stress

脓毒症的特征是由病原微生物产生的毒素引起的多器官衰竭[1]。脓毒症心肌病占所有脓毒症并发症的18%～65%,全球死亡率更是高达36%～55%[2]。醛固酮受体拮抗剂(mineralocorticoid receptor antagonist,MRA)可以分为两类:选择性和非选择性。选择性MRA主要是指针对醛固酮受体的选择性较高,如非奈利酮(Finerenone);非选择性MRA代表如螺内酯(Spironolactone)。非奈利酮是基于二氢吡啶结构的一类萘啶类化合物,具有对醛固酮受体(MR)高度亲和力和选择性的特点。它的半衰期相对较短,口服生物利用度高且与蛋白质的结合率也较高。此外,非甾体结构使非奈利酮能更有效地抑制转录共激活因子的招募[3],从而有效阻断MR的活化。这种针对性的抑制有助于减缓肾脏的结构和功能损伤,同时抑制炎症和肾纤维化。与此同时,非奈利酮的使用风险较低,不易导致高钾血症和不良激素反应的同时又能保持高效和安全[4]。作为一种新型的MRA,非奈利酮被验证具有心脏和肾脏双重保护的优点。在2型糖尿病(T2DM)患者中,非奈利酮能够有效地延缓肾病的进展,并降低心血管事件的发生率[5]。在心肌细胞中,脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)的暴露可显著诱导细胞毒性,包括凋亡、氧化应激、炎症反应、细胞功能障碍和细胞坏死等,这些效应不仅影响心肌细胞的存活和功能,还可能进一步加剧心脏疾病的发展,其中凋亡与氧化应激发挥了重要作用[6]。LPS通过激活细胞内的凋亡信号通路,如线粒体途径或死亡受体途径,上调凋亡相关蛋白(如Bax)的表达,下调抗凋亡蛋白(如Bcl-2)的表达,进而激活Caspase级联反应,导致DNA断裂和细胞解体[7]。另一方面,氧化应激是LPS诱导心肌细胞毒性的另一重要机制。LPS刺激可促使心肌细胞内活性氧(ROS)和自由基的过量产生,同时降低抗氧化酶的活性,导致氧化还原平衡失调。过量的ROS和自由基能够攻击细胞膜、蛋白质和DNA,引起细胞结构和功能的严重损害,进而促进细胞凋亡和坏死[8]。因此,在LPS诱导的心肌细胞毒性中,凋亡和氧化应激相互关联、相互促进,共同加剧了心肌细胞的损伤。目前关于非奈利酮在心肌细胞脂毒性中的作用未见报道,故本研究着重立足LPS诱导的心肌细胞毒性中凋亡和氧化应激两个方面,探讨非奈利酮在LPS诱导的大鼠心肌H9C2细胞毒性中的作用及潜在机制。

## 1 材料与方法

**1.1 细胞、仪器与试剂** 大鼠心肌H9C2细胞购自上海中国科学院细胞库。非奈利酮购自TargetMol公司(纯度≥99%)。脂多糖购自Sigma公司。Bcl-2、Bax、C-caspase-3、p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、p-GSK-3β、GSK-3β、GAPDH抗体从美国CST公司订购。CCK-8检测试剂盒、一步法Tunel检测试剂

盒和活性氧检测试剂盒，从上海碧云天生物有限公司订购（No. C0037，No. C1086，No. S0033）。

**1.2　方法**

**1.2.1　细胞培养**　将添加有 10% 胎牛血清的 DMEM 培养液的大鼠心肌 H9C2 细胞放至 $CO_2$ 培养箱中，当细胞密度达到 80% 或更高时，用 1.5 mL 胰酶消化 60 s 进行传代，直到传代结束 24 h 左右，再进行不同的刺激处理。各组细胞经不同浓度的非奈利酮（0，2.5，5，10，20 mmol•$L^{-1}$）对细胞存活率进行检测。另外，对经过不同浓度非奈利酮预处理后并加入 LPS 刺激的细胞存活率也进行检测。

**1.2.2　CCK-8 法检测大鼠心肌 H9C2 细胞活性**　细胞悬液接种在 96 孔板中，体积为每孔 100 μL，用不同浓度非奈利酮处理后，每孔分别添加 10 μL 的 CCK-8 检测试剂，在培养箱中孵育 4 h 后用酶联免疫检测仪测定每组细胞在 450 nm 下的吸光度（$A$），检测非奈利酮对细胞活性的影响。根据下面公式计算细胞存活率：细胞存活率（%）＝治疗组 $A$ 值/对照组 $A$ 值×100%（对照组为 0 mmol•$L^{-1}$ 非奈利酮）。采用相同方法，先给予不同浓度非奈利酮作用 24 h，再给予 LPS 作用 12 h，检测各组细胞的细胞存活率，选择适当的非奈利酮浓度进行后续实验。

**1.2.3　细胞内 ROS 检测实验**　按如下方式进行分组：对照组、仅非奈利酮处理组（浓度为 5 mmol•$L^{-1}$）、单独 LPS 处理组（浓度为 10 μg•$mL^{-1}$）以及同时接受 LPS 和非奈利酮处理的组（浓度分别为 10 μg•$mL^{-1}$ 和 5 mmol•$L^{-1}$）。将大鼠心肌 H9C2 细胞接种到 6 孔板上，每组细胞按照分组处理 24 h 后弃培养液，用含 1 μL•$mL^{-1}$ DCFH-DA 的 DMEM 培养基进行培养。在 37 ℃温箱孵育 30 min 后，用无血清的 DMEM 培养液在避光条件下轻柔漂洗 3 遍，目的是除去未能进入胞内的 DCFH-DA。随后，使用倒置荧光显微镜观察 ROS 水平，并进行拍照。

**1.2.4　Tunel 凋亡水平检测**　分组同 1.2.3 部分。用胰酶消化后接种到 6 孔板上培养 24 h，更换培养基后根据不同分组对其进行 24 h 培养，弃掉培养液，用 Tunel 探头对其温育 1 h 之后漂洗，并在荧光显微镜下拍照。

**1.2.5　蛋白印迹检测大鼠心肌 H9C2 细胞中蛋白表达**　分组同 1.2.3 部分。对大鼠心肌 H9C2 细胞蛋白进行提取和定量，用 RIPA 裂解液裂解大鼠心肌 H9C2 细胞约 30 min，小心收集细胞残液，然后在超声作用下进行裂解，在 12 000 r•$min^{-1}$、15 min 的超速离心机中进行离心分离。采用 BSA 法测定蛋白浓度，并修正每一种样本的蛋白最终浓度。将样品置于水浴锅中加热 10 min 后，保存在 −80 ℃的冷冻箱中。取 30 μg 制得样品用 SDS-PAGE 对其进行电泳，然后使用 PVDF 膜湿转移。在摇床上用脱脂乳室温封闭 1 h 左右，加入一抗后放入 4 ℃冰箱过夜，次日将其取出用配制好的 TBST 漂洗 3 遍，二抗孵育 1 h 后进行化学发光显像。以 GAPDH 作为内参，并利用 Image Lab 软件对蛋白条带进行分析。

**1.3　统计学分析**　利用 Graphpad Prism9 软件进行统计学分析，采用单因素方差分析和 $t$ 检验比较各组均数之间的差异，以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

## 2　结果

**2.1　不同浓度的非奈利酮对大鼠心肌 H9C2 细胞存活率的影响**　用不同浓度（0，2.5，5，10，20 mmol•$L^{-1}$）非奈利酮处理大鼠心肌 H9C2 细胞后，存活率差异无统计学意义（$P>0.05$，见图 1A）。LPS 刺激显著降低了大鼠心肌 H9C2 细胞的存活率（$P<0.05$，见图 1B），给予非奈利酮处理能够逆转 LPS 诱导引起的存活率下降，并呈现出剂量-效应依赖性关系。非奈利酮的浓度为 5 mmol•$L^{-1}$ 时开始发挥作用（$P<0.05$，图 1B），遂在此药物浓度下进行随后的实验。

**2.2　非奈利酮抑制 LPS 诱导的大鼠心肌 H9C2 细胞凋亡**　为了评估非奈利酮对大鼠心肌 H9C2 细胞凋亡的影响，我们采用 Tunel 染色和 Western Blot 技术检测大鼠心肌 H9C2 细胞凋亡水平以及相关凋亡蛋白。结果显示，与对照组相比，LPS 刺激后大鼠心肌 H9C2 细胞凋亡数目显著增加，非奈利酮处理后，细胞凋亡明显改善（$P<0.05$，图 2A、2B）。Western Blot 检测各组 C-caspase-3、Bax 和 Bcl-2 的蛋白表达。结果表明，LPS 组 Bax 和 C-caspase-3 的表达上调，而 Bcl-2 的表达明显下调。给予非奈利酮后，C-caspase-3、Bax 的表达出现下调，而 Bcl-2 表达上调（$P<0.05$，见图 2C～2F）。表明非奈利酮可以减轻 LPS 诱导的细胞凋亡。

**2.3　非奈利酮抑制 LPS 诱导的大鼠心肌 H9C2 细胞氧化应激**　为了评估非奈利酮对大鼠心肌 H9C2 细胞氧化应激水平的影响，我们采用 ROS 检测试剂盒检测细胞 ROS 水平。结果发现，LPS 组的 ROS 水平较对照组显著上升。然而，在非奈利酮预处理后，LPS 诱导的 ROS 水平显著降低（$P<0.05$，见图 3A、3B）。这表明非奈利酮可以减轻 LPS 诱导的细胞氧化应激。

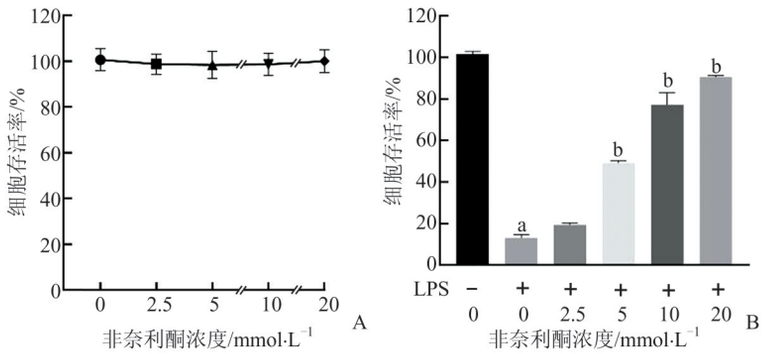



**图1 不同浓度的非奈利酮对大鼠心肌H9C2细胞存活率的影响**($n$=6)

A. 正常大鼠心肌H9C2细胞;B. 经LPS处理后的大鼠心肌H9C2细胞。与对照组比较,$^aP<0.05$;与LPS组比较,$^bP<0.05$

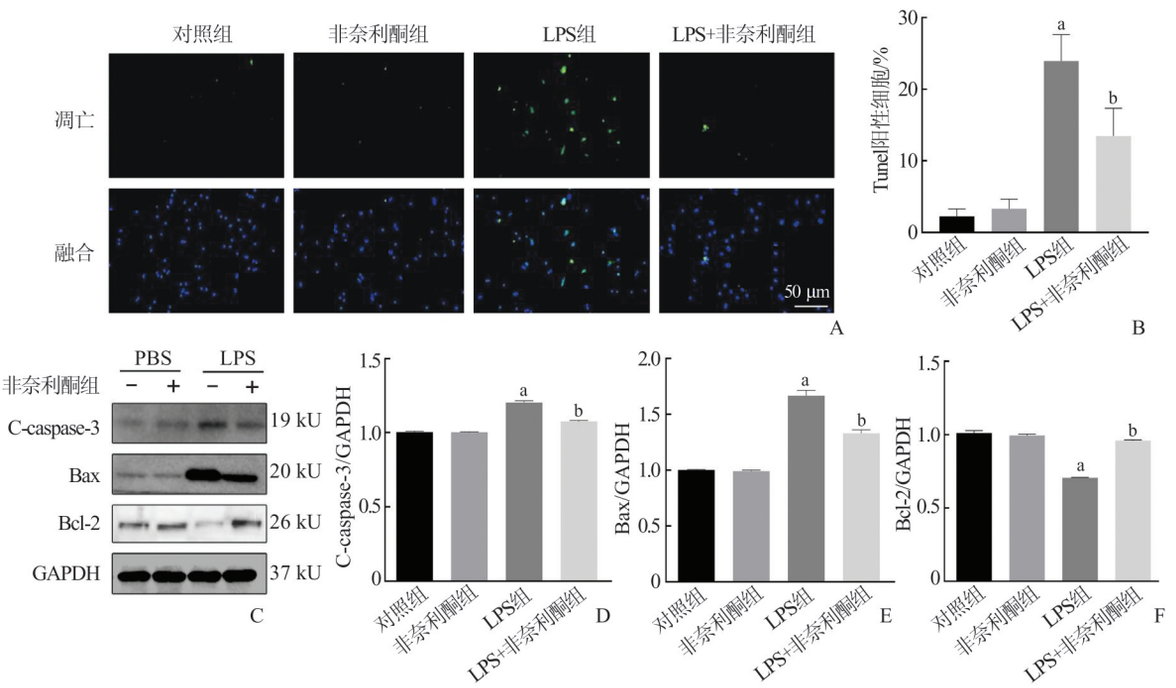



**图2 非奈利酮抑制LPS诱导的大鼠心肌H9C2细胞凋亡**

A、B. 各组大鼠心肌H9C2的细胞凋亡水平及定量分析($n$=6);C～F. Western Blot检测C-caspase-3、Bax及Bcl-2表达水平,以GAPDH为内参作定量分析($n$=5)。PBS:磷酸盐缓冲液;与对照组比较,$^aP<0.05$;与LPS组比较,$^bP<0.05$

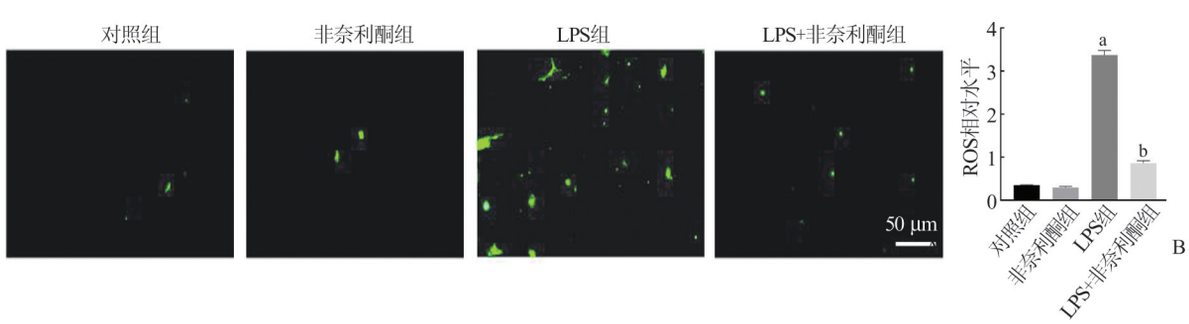



**图3 非奈利酮抑制LPS诱导的大鼠心肌H9C2细胞氧化应激**

A、B. 各组大鼠心肌H9C2细胞的ROS水平及定量分析($n$=6)。与对照组比较,$^aP<0.05$;与LPS组比较,$^bP<0.05$

**2.4 相关通路改变情况** Western Blot结果表明,在LPS组中,p-PI3K、p-AKT和p-GSK-3β的表达显著下调($P<0.05$)。给予非奈利酮处理可恢复LPS处理后的p-PI3K、p-AKT和p-GSK-3β的含量

（$P<0.05$，图 4）。以上结果说明，非奈利酮可能是通过 PI3K/AKT/GSK-3β 通路发挥对 LPS 所致心肌细胞损伤的保护作用。

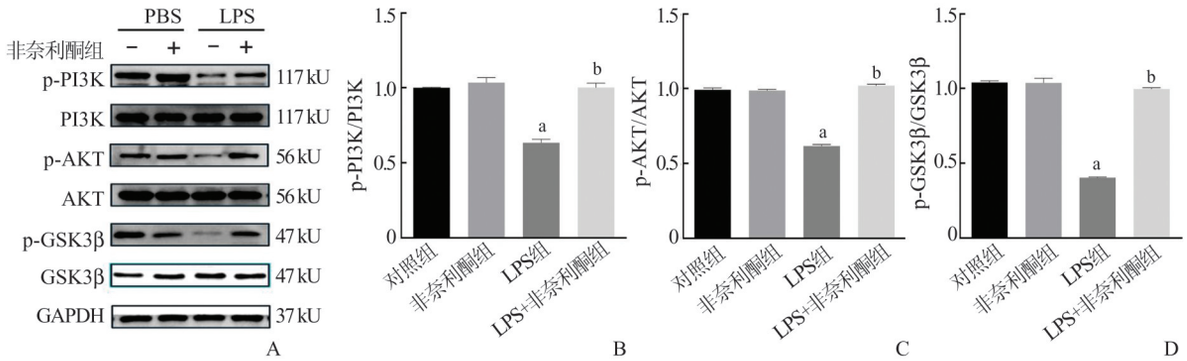



**图 4　相关通路改变情况**

A～D. Western Blot 法分别检测各组 p-PI3K、PI3K、p-AKT、AKT、p-GSK-3β、GSK-3β 和 GAPDH 表达水平及定量分析（$n=4$）；PBS：磷酸盐缓冲液。与对照组比较，$^{a}P<0.05$；与 LPS 组比较，$^{b}P<0.05$

## 3　讨论

脓毒症是临床上常见的严重的感染性疾病，通常病原体是细菌、真菌或病毒，其主要特征是全身性炎症反应综合征（SIRS），包括体温升高或降低、心率增快、呼吸急促和白细胞计数异常[9]。脓毒症心肌病是脓毒症的严重并发症之一，其特征是心肌功能受损导致心脏功能不全。脓毒症心肌病的发病机制主要包括感染性毒素直接损伤心肌细胞、炎症介质引起心肌细胞凋亡以及免疫反应介导的心肌损伤等[10]。临床上，脓毒症心肌病的表现多样，包括心功能不全、心律失常以及心肌细胞的结构和功能改变等。治疗脓毒症心肌病的方法主要包括控制感染、支持心功能、抗炎治疗以及针对病因的治疗等综合措施[10]。虽然脓毒症心肌病的治疗仍然具有挑战性，但随着对脓毒症及其并发症机制的深入研究，针对性的治疗策略正在不断发展，为患者的治疗提供了新的希望。LPS 是细菌外膜的主要组成部分之一，它能够模拟细菌感染时释放的毒素，在本实验中，LPS 处理后的大鼠心肌 H9C2 细胞可以迅速诱导产生毒性反应，从而模拟脓毒症的发生过程。

在药代动力学方面，与甾体类 MRA 相比，非奈利酮具有更高的极性和更短的半衰期。由于在体内药物的累积较少，因此它可能具备更好的安全性。相比之下，停药 3 周后，使用螺内酯的患者有 38% 的个体在尿液中仍可检测到代谢物水平[11]；抗纤维化效应方面，非奈利酮在与盐皮质激素受体的结合模式以及理化性质与甾体类 MRA 相比有所不同，这体现在了抗纤维化的效果上。在动物模型和临床前研究中，非奈利酮都表现出了更好的抗纤维化作用[12]；非奈利酮在心脏和肾脏两种器官中的分布比较均衡，而螺内酯则主要集中在肾脏，此外，非奈利酮无法透过血脑屏障，前期临床药物示踪研究发现，未在脑组织中检测到非奈利酮的存在[12]，可能意味着非奈利酮不会对大脑功能产生影响。PI3K/Akt/GSK-3β 通路是一个重要的生物信号传导通路，对生存、增殖、分化和代谢等细胞过程具有复杂而重要的调节作用。磷脂酰肌醇 3-激酶（PI3K）是一种重要的生物酶，蛋白激酶 B（Akt）则是 PI3K 激活的下游效应器，激活 Akt 后可参与调节机体的许多生物学过程，如提高细胞存活、减少细胞凋亡、调节细胞代谢和促进细胞增殖等[13]。糖原合成酶激酶-3β（GSK-3β）是 Akt 的一个重要下游靶点，通过对 GSK-3β 进行磷酸化来抑制其活性，而激活的 GSK-3β 通常参与调节细胞生长周期、凋亡以及增殖等过程[14-15]。本研究发现，LPS 刺激大鼠心肌 H9C2 细胞后，PI3K、AKT、GSK-3β 表达无明显变化，而 p-PI3K、p-AKT、p-GSK-3β 表达均下降，给予非奈利酮后 p-PI3K、p-AKT、p-GSK-3β 表达均显著升高。

综上所述，非奈利酮可以减轻 LPS 引起的心肌细胞毒性、凋亡和氧化应激损伤，而这些作用可能是通过激活 PI3K/AKT/GSK-3β 通路实现的。根据此结果推测，非奈利酮可能在脓毒症中对心肌细胞损伤具有预防保护作用。这一发现有望阻止脓毒症心肌病的进展，改善患者的预后和生存期。然而，为了全面了解其作用机制和临床药效，仍需要进行更多的体内外研究。

## 参考文献


[1] SEYMOUR C, LIU V, IWASHYNA T, et al. Assessment of clinical criteria for sepsis: For the third international consensus definitions for sepsis and septic shock (sepsis-3)[J]. JAMA, 2016,315(8): 801-810.

[2] CARBONE F, LIBERALE L, PREDA A, et al. Septic cardiomyopathy: From pathophysiology to the clinical setting[J]. Cells, 2022, 11(18): 2833.

[3] GERISCH M, HEINIG R, ENGELEN A, et al. Biotransformation of finerenone, a novel nonsteroidal mineralocorticoid receptor antagonist, in dogs, rats, and humans, *in vivo* and *in vitro*[J]. Drug Metab Dispos, 2018, 46(11): 1546-1555.

[4] AGARWAL R, KOLKHOF P, BAKRIS G, et al. Steroidal and non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonists in cardiorenal medicine[J]. Eur Heart J, 2021, 42(2): 152-161.

[5] LV R L, XU L L, CHE L, et al. Cardiovascular-renal protective effect and molecular mechanism of finerenone in type 2 diabetic mellitus[J]. Front Endocrinol, 2023, 14: 1125693.

[6] HOLLENBERG S M, SINGER M. Pathophysiology of sepsis-induced cardiomyopathy[J]. Nat Rev Cardiol, 2021, 18(6): 424-434.

[7] FENG M, ZHENG C, LI X, et al. Reversal of lipopolysaccharide-induced cardiomyocyte apoptosis via α 7nAChR by dexmedetomidine[J]. Cell Mol Biol (Noisy-le-grand), 2024,70(5):127-131.

[8] ZHAO H, LIN X, CHEN Q, et al. Quercetin inhibits the NOX2/ROS-mediated NF-κB/TXNIP signaling pathway to ameliorate pyroptosis of cardiomyocytes to relieve sepsis-induced cardiomyopathy[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2023,477:116672.

[9] PEI X B, LIU B. Research progress on the mechanism and management of septic cardiomyopathy: A comprehensive review[J]. Emerg Med Int, 2023, 2023: 8107336.

[10] LU N F, NIU H X, LIU A Q, et al. Types of septic cardiomyopathy: Prognosis and influencing factors - A clinical study[J]. Risk Manag Healthc Policy, 2024, 17: 1015-1025.

[11] BAKRIS G L, AGARWAL R, ANKER S D, et al. Effect of finerenone on chronic kidney disease outcomes in type 2 diabetes[J]. N Engl J Med, 2020, 383(23): 2219-2229.

[12] KOLKHOF P, JAISSER F, KIM S Y, et al. Steroidal and novel non-steroidal mineralocorticoid receptor antagonists in heart failure and cardiorenal diseases: Comparison at bench and bedside[J]. Handb Exp Pharmacol, 2017, 243: 271-305.

[13] FRUMAN D A, CHIU H, HOPKINS B D, et al. The PI3K pathway in human disease[J]. Cell, 2017, 170(4): 605-635.

[14] GHAFFARI-NASAB A, GHIASI F, KEYHANMANESH R, et al. Bone marrow-derived c-kit positive stem cell administration protects against diabetes-induced nephropathy in a rat model by reversing PI3K/AKT/GSK-3β pathway and inhibiting cell apoptosis[J]. Mol Cell Biochem, 2024, 479(3): 603-615.

[15] LUO H, SONG B, XIONG G, et al. Cadmium inhibits neural stem/progenitor cells proliferation via Mito-ROS-dependent AKT/GSK-3β/β-catenin signaling pathway[J]. J Appl Toxicol, 2021, 41(12):1998-2010.


(2024-05-18收稿)
编辑 张 峻