



安徽医科大学学报
Acta Universitatis Medicinalis Anhui
ISSN 1000-1492, CN 34-1065/R

《安徽医科大学学报》网络首发论文

题目: 三七皂苷 R1 通过 PINK1/Parkin 途径调控缺氧/复氧后人心肌细胞线粒体自噬的作用

作者: 熊晓满, 吴欢, 卢尚林, 王勇, 郑玉华, 向怡, 周海燕, 刘兴德

收稿日期: 2025-10-17

网络首发日期: 2025-10-13

引用格式: 熊晓满, 吴欢, 卢尚林, 王勇, 郑玉华, 向怡, 周海燕, 刘兴德. 三七皂苷 R1 通过 PINK1/Parkin 途径调控缺氧/复氧后人心肌细胞线粒体自噬的作用 [J/OL]. 安徽医科大学学报. <https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20251011.1707.010>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式 (包括网络呈现版式) 排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊 (光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊 (网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊 (网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物 (ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

三七皂苷 R1 通过 PINK1/Parkin 途径调控缺氧/复氧后人心肌细胞线粒体自噬的作用

熊晓满¹, 吴欢¹, 卢尚林², 王勇¹, 郑玉华¹, 向怡¹, 周海燕², 刘兴德¹

(¹ 贵州中医药大学第二临床医学院, 贵阳 550025; ² 贵州医科大学附属医院心内科, 贵阳 550004)

摘要 **目的** 探讨三七皂苷 R1 (NGR1) 通过调控线粒体自噬改善缺氧/复氧 (H/R) 后人心肌细胞系 AC16 细胞损伤的作用机制。**方法** 利用 GeneCards 及 MitoCarta 数据库分别获取缺氧/复氧损伤、线粒体自噬相关基因后取交集获得共同基因; 采用 CCK-8 实验检测不同浓度的 NGR1 (0、6.25、12.5、25、50、100、200、300、400、500 $\mu\text{mol/L}$) 对 AC16 细胞活力的影响; 将 AC16 细胞分为对照组 (Control)、模型组 (H/R)、给药组 (H/R+NGR1 100、200、300 $\mu\text{mol/L}$), 5,5',6,6'-四氯-1,1',3,3'-四乙基苯并咪唑羰花青碘化物 (JC-1) 检测 AC16 细胞线粒体膜电位变化情况; RT-qPCR 检测 AC16 细胞中线粒体自噬相关蛋白 (Parkin、Pink1、P62) 的 mRNA 转录水平; 采用 Western blot 法检测 AC16 细胞中线粒体自噬相关蛋白 (Parkin、Pink1、P62、LC3II) 表达的情况, 电子透射内镜 (TEM) 观察 AC16 细胞的线粒体超微结构。**结果** 与对照组比较, H/R 组细胞活力明显下降 ($P<0.01$); 与 H/R 组比较, 100 $\mu\text{mol/L}$ 以上的 NGR1 处理后 AC16 细胞活力明显上升 ($P<0.01$); 与对照组比较, H/R 组细胞线粒体膜电位明显下降 ($P<0.01$), 与 H/R 组比较, NGR1 干预后膜电位明显上升 ($P<0.01$); 与对照组比较, H/R 组线粒体自噬相关蛋白 Parkin、Pink1、P62 的 mRNA 转录水平升高, 而 NGR1 干预后均降低 ($P<0.05$); 与对照组比较, H/R 组线粒体自噬相关蛋白 Parkin、Pink1、LC3II 蛋白表达升高, 而 P62 蛋白表达降低 ($P<0.01$); 与 H/R 组比较, H/R+NGR1 不同剂量组自噬相关蛋白 Parkin、Pink1、LC3II 蛋白表达均有明显降低, 而 P62 蛋白表达升高 ($P<0.05$); 与对照组比较, H/R 组细胞线粒体的结构被破坏明显, 线粒体内嵴破裂、紊乱; 与 H/R 组比较, NGR1 给药后线粒体结构破坏情况及内嵴线紊乱情况明显减轻。**结论** NGR1 可以改善 H/R 后 AC16 损伤, 其机制可能与调控 PINK1/Parkin 通路表达, 抑制线粒体过度自噬有关。

关键词 三七皂苷 R1; PINK1/Parkin; 线粒体自噬; 缺氧/复氧; 人心肌细胞

中图分类号 R 363.1

2025-10-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金地区项目 (编号: 82260987)

作者简介: 熊晓满, 女, 博士研究生;

刘兴德, 男, 博士, 博士生导师, 通信作者, E-mail: 2360040895@qq.com

文献标志码 A

NGR1 modulates mitophagy in human cardiomyocytes via the PINK1/Parkin pathway after hypoxia/reoxygenation

Xiong Xiaoman¹, Wu Huan¹, Lu Shanglin², Wang Yong¹, Zheng Yuhua¹, Xiang Yi¹, Zhou Haiyan²,
Liu Xingde¹

(¹ The Second Clinical Medical College of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550025; ² Department of Cardiovascular Medicine, The Affiliated Hospital of Guizhou Medical University, Guiyang 550004)

Abstract Objective To investigate the mechanism by which Notoginsenoside R1 (NGR1) ameliorates hypoxia/reoxygenation (H/R)-induced injury in AC16 human cardiomyocyte cell lines through the regulation of mitophagy. **Methods** Common genes linked to hypoxia/reoxygenation injury and mitophagy were identified by intersecting data from GeneCards and MitoCarta databases. AC16 cell viability was assessed via CCK-8 assay under varying NGR1 concentrations (0, 6.25, 12.5, 25, 50, 100, 200, 300, 400, 500 $\mu\text{mol/L}$). AC16 cells were divided into the following groups: control group (Control), model group (H/R), and treatment groups (H/R + NGR1 at 100, 200, and 300 $\mu\text{mol/L}$). Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi\text{m}$) was measured using 5,5',6,6'-tetrachloro-1,1',3,3'-tetraethylbenzimidazolylcarbocyanine iodide (JC-1) staining. Transcriptional levels of mitophagy-related genes (Parkin, Pink1, P62) were quantified by reverse transcription-quantitative PCR (RT-qPCR). Protein expression of mitophagy-related markers (Parkin, Pink1, P62, and LC3II) was evaluated via Western blot analysis. Mitochondrial ultrastructure was visualized by transmission electron microscopy (TEM). **Results** Compared to the control group, cell viability in the H/R group significantly decreased ($P < 0.01$). Treatment with NGR1 at concentrations above 100 $\mu\text{mol/L}$ significantly enhanced the cell viability of AC16 cells compared to the H/R group ($P < 0.01$). H/R induced a significant decrease in mitochondrial membrane potential ($P < 0.01$), which was restored by NGR1 treatment ($P < 0.01$). The mRNA levels of Parkin, PINK1, and P62 in the H/R group were upregulated compared to the control group ($P < 0.05$), while NGR1 intervention downregulated their expression ($P < 0.05$). Protein expression levels of Parkin, Pink1, and LC3II in the H/R group significantly increased, while P62 expression decreased compared to the control group ($P < 0.01$). In contrast, different doses of NGR1 treatment significantly reduced the expression of Parkin, Pink1, and LC3II while increasing

P62 expression ($P<0.05$). TEM revealed that the mitochondrial structure in the H/R group was severely disrupted, with fragmented and disorganized cristae, which was alleviated by NGR1.

Conclusion NGR1 ameliorates H/R-induced AC16 cell injury, and its mechanism may be associated with modulating the PINK1/Parkin pathway to suppress excessive mitophagy.

Keywords Notoginsenoside R1, PINK1/Parkin, Mitophagy, Hypoxia/Reoxygenation, AC16

Fund program National Natural Science Foundation of China (No.82260987)

Corresponding author Liu Xingde, E-mail: 2360040895@qq.com

心血管疾病是全球发病率和病死率最高的疾病,带来了巨大的健康及经济负担^[1-2],其中又以急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)最为紧要,AMI的治疗中心环节是血运重建,即尽快恢复冠脉血流,以减少对心脏的损伤^[3]。心肌再灌注治疗改善心肌供血的同时伴随着一系列病理生理反应,包括过氧化反应、炎症和线粒体功能障碍等,最后出现不可逆的细胞损伤甚则坏死,这一病理过程为心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemic reperfusion injury, MIRI)^[4]。MIRI的机制涉及多方面,如炎症、线粒体自噬、氧化应激、细胞死亡和凋亡等^[5]。线粒体异常是MIRI的重要病理机制^[6],其完整性和功能的丧失被认为是心脏结构和功能改变的病理因素之一。研究^[7]显示缓解MIRI过程中的过度线粒体自噬,可以防止心肌细胞凋亡,保护心功能。三七皂苷R1(notoginsenoside R1, NGR1)是三七中特有的一种皂苷成分,可以改善MIRI小鼠心肌梗死面积及心功能^[8]。在大鼠心肌细胞缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)模型中,NGR1可提高大鼠心肌细胞的活力,改善线粒体形态,减轻心肌细胞凋亡^[9]。该文通过体外实验研究NGR1是否通过调控线粒体自噬以减少H/R引起的心肌细胞损伤进而减轻MIRI。

1 材料与方法

1.1 细胞

AC16细胞由贵州医科大学赠予,细胞传至3代后进行后续实验。

1.2 药物与试剂

NGR1标准品、线粒体膜电位检测试剂盒JC-1(北京索莱宝科技有限公司,货号SN8230、C2003S),DMEM培养基、1×0.25% Trysin-EDTA(美国Gibco公司),胎牛血清(以色列Biological Industries公司),P62、LC3II A/B、Parkin(美国Cell Signaling Technology公司,货号5114、12741、4211),Pink1(美国Santa Cruz Biotechnology公司,货号SC-517353), β -actin(武汉三鹰生物技术有限公司,货号66009-1-Ig),细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(美国APEX BIO Technology公司,货号K1018),RNA快速提取试剂盒(上海奕杉生

物公司，货号 RN001），Premix（日本 Takara 公司，货号 RR820），电镜固定液（贵州双螺旋生物公司，货号 B0012），丙酮（中国国药集团化学试剂有限公司，货号 10000418），包埋剂（美国 Structure Probe Incorporated 公司，货号 90529-77-4）。

1.3 仪器

显微镜（日本奥林巴斯公司），CO₂ 恒温培养箱、生物安全柜、三气培养箱（青海海尔生物医疗股份有限公司），酶标仪、RNA 浓度测量仪、化学发光成像系统（上海申花），PCR 机（美国 Bio-Rad 公司），电泳仪及转膜仪（美国 Bio-Rad 公司），低温高速离心机（上海美瑞克有限公司），恒温金属浴（常州市鸿科仪器厂），切片机（德国 Leica 公司），钻石切片刀（Daitome），投射电子显微镜（日本电子）。

1.4 H/R 与线粒体自噬相关基因的筛选与分析

使用 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)，以“Hypoxia Reoxygenation”为关键词进行检索（相关度 > 5），获取缺氧/复氧损伤相关基因；使用 MitoCarta 数据库 (<https://www.broadinstitute.org/>)，获取线粒体自噬相关基因，两者取交集，获得 H/R 与线粒体自噬相关基因。

1.5 造模方法

取对数生长期的 AC16 细胞接种到孔板中培养，吸弃旧培养基，生理盐水清洗 2 次，加入无糖 DMEM 培养基后将细胞置于三气培养箱中，参数设置：3%O₂，5%CO₂，92%N₂，37 °C，缺氧 6 h 后更换完全培养基，置于正常培养箱中 37 °C、5% CO₂ 继续培养 24 h，造模完毕后继续后续实验操作。

1.6 CCK-8 法检测不同浓度 NGR1 对 AC16 细胞活性的影响

取对数生长期的 AC16 细胞，以 3 000 个/孔接种到 96 孔板中，将细胞分为对照组（Control）、模型组（H/R），每组设置 6 个复孔。H/R 组用 100 μL 含终浓度为 0、6.25、12.5、25、50、100、200、300、400、500 μmol/L NGR1 处理细胞 24 h。待达到预定时间后，小心移除含药培养基，各孔加入 100 μL 的 0.5% CCK-8 溶液，孵育 1 h 后，用酶标仪测定 450 nm 处各孔吸光度，计算细胞存活率。

1.7 线粒体膜电位检测

取对数生长期 AC16 细胞，以 1×10⁵ 个/孔的密度接种于 6 孔板中，细胞分组为对照组（Control）、模型组（H/R）、给药组（H/R+NGR1 100、200、300 μmol/L）。造模完成后加入 1 mL JC-1 染色工作液，充分混匀，细胞培养箱中 37 °C 孵育 10 min，JC-1 染色缓冲液洗涤 2 次，于荧光显微镜下拍照。

1.8 RT-qPCR

造模结束后提取各组细胞的 RNA，随后将 RNA 进行逆转录成 cDNA，程序是 42 °C、15 min，之后按照试剂盒说明将样本、基因引物（引物序列见表 1）、Premix 等充分混合制备成 PCR 反应液进行 PCR 反应，反应条件：预变性 95 °C、30 s，变性 95 °C、5 s，60 °C、30 s，退火 95 °C、5 s，60 °C、60 s，变性至退火过程循环 40 次。反应结束后记录各数值，以 β -actin 为内参，根据 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算待测样品的相对表达量。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences	
Primer	Sequences (5'-3')
Parkin-F	F: GCAGCCTCAAGAAACCATCAAG
	R: TTCCACTCGCAGCCACAGTTC
Pink1	F: GGAGTATGGCAGTCACTTACAG
	R: AGCAGCGGCACGGAAGAG
P62	F: GAGTCGGATAACTGTTCAGGAGGAG
	R: CTTCCGGATTCTGGCATCTGTAGGG
β -actin	F: GGCCAACCGCGAGAAGATGAC
	R: GGATAGCACAGCCTGGATAGCAAC

1.9 Western blot 检测线粒体自噬相关蛋白表达量

取处于对数生长期 AC16 细胞，以 1×10^5 个/孔的密度接种于 6 孔板中，细胞分组及处理方式同“1.7。将各分组细胞原培养液吸弃，加入 1 mL 蛋白裂解液并提取总蛋白。利用 SDS 变性 10%聚丙烯酰胺凝胶电泳蛋白，后进行转膜，将蛋白转移至 PVDF 膜上，使用 5%脱脂奶粉室温封闭 1 h。加入稀释后的 β -Actin（1:20 000）、P62（1:1 000）、LC3II A/B（1:1 000）、Parkin（1:1 000）、Pink1（1:500）一抗 4 °C 孵育过夜，TBST 洗涤 3 次，加入通用型兔鼠二抗（1:6 000）常温孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次，置于 ECL 显色剂中 30 s，用化学发光成像系统进行拍照，Image J 软件分析各组蛋白条带的亮度值。

1.10 电镜观线粒体超微结构

将细胞离心后加入电镜固定液 4 °C 固定 4 h，PBS 漂洗 3 次后置于 1%的锇酸室温固定 2 h；梯度脱水，渗透过夜，包埋 60 °C 聚合 48 h，切片，铀铅双染色，透射电镜下观察。

1.11 统计学处理

使用 GraphPad Prism 8 软件对实验数据进行统计分析，实验数据结果用 $\bar{x} \pm s$ 记录，多组之间的比较采用单因素方差分析， $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 H/R 与线粒体自噬相关基因分析

通过 GeneCards 数据库筛选，共获得 653 个缺氧/复氧损伤相关基因；通过 MitoCarta 数据库获得 14 个线粒体自噬相关基因，两组取交集可获得 3 个 H/R 与线粒体自噬相关基因：PINK1、FUNDC1、PGAM5。图 1。

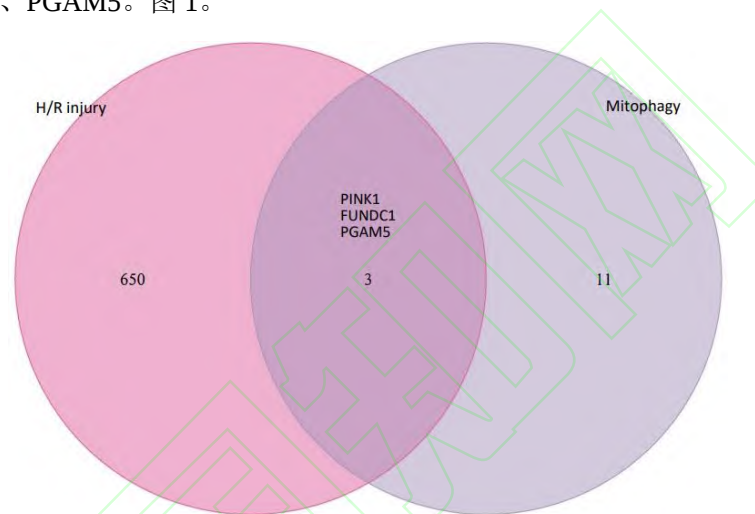


图 1 线粒体自噬与 H/R 相关基因取交集

Fig.1 Mitophagy intersects with H/R-related genes

2.2 NGR1 能促进 H/R 模型下 AC16 细胞活力

与未经 H/R 及 NGR1 处理的对照组比较，H/R 模型组 AC16 细胞活力明显下降，而与 H/R 模型组比较，100 μM 及以上的 NGR1 可提高 AC16 细胞活力 ($F=140.0$, $P < 0.01$)。见图 2。

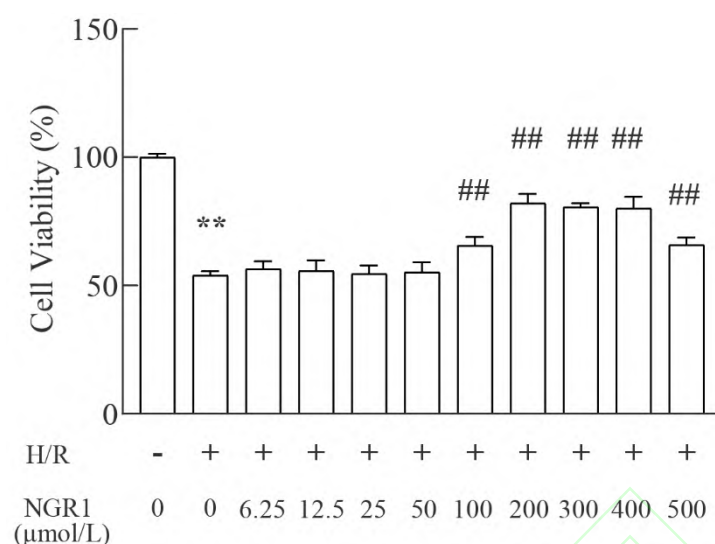


图 2 CCK8 检测 NGR1 对缺氧 / 复氧 AC16 细胞的影响

Fig.2 The effects of NGR1 on AC16 cell viability

** $P < 0.01$ vs the control group without hypoxia/reoxygenation treatment and NGR1 intervention;

$P < 0.01$ vs H/R group.

2.3 NGR1 影响线粒体膜电位

通过 JC-1 染色观察红色荧光及绿色荧光的变化,可以反映细胞线粒体膜电位下降(去极化)的过程。对照组红色荧光强而绿色荧光弱,此时为线粒体正常的膜电位;与对照组相比, H/R 组绿色荧光明显增强,红色/绿色荧光的比值明显减小 ($P < 0.01$),表明在 H/R 后细胞线粒体膜电位下降;与 H/R 组比较, NGR1 各干预组红色/绿色荧光比值均明显增大 ($F = 44.77$, $P < 0.01$),说明 NGR1 可以有效改善由 H/R 所造成的 AC16 细胞线粒体膜电位的去极化。见图 3。

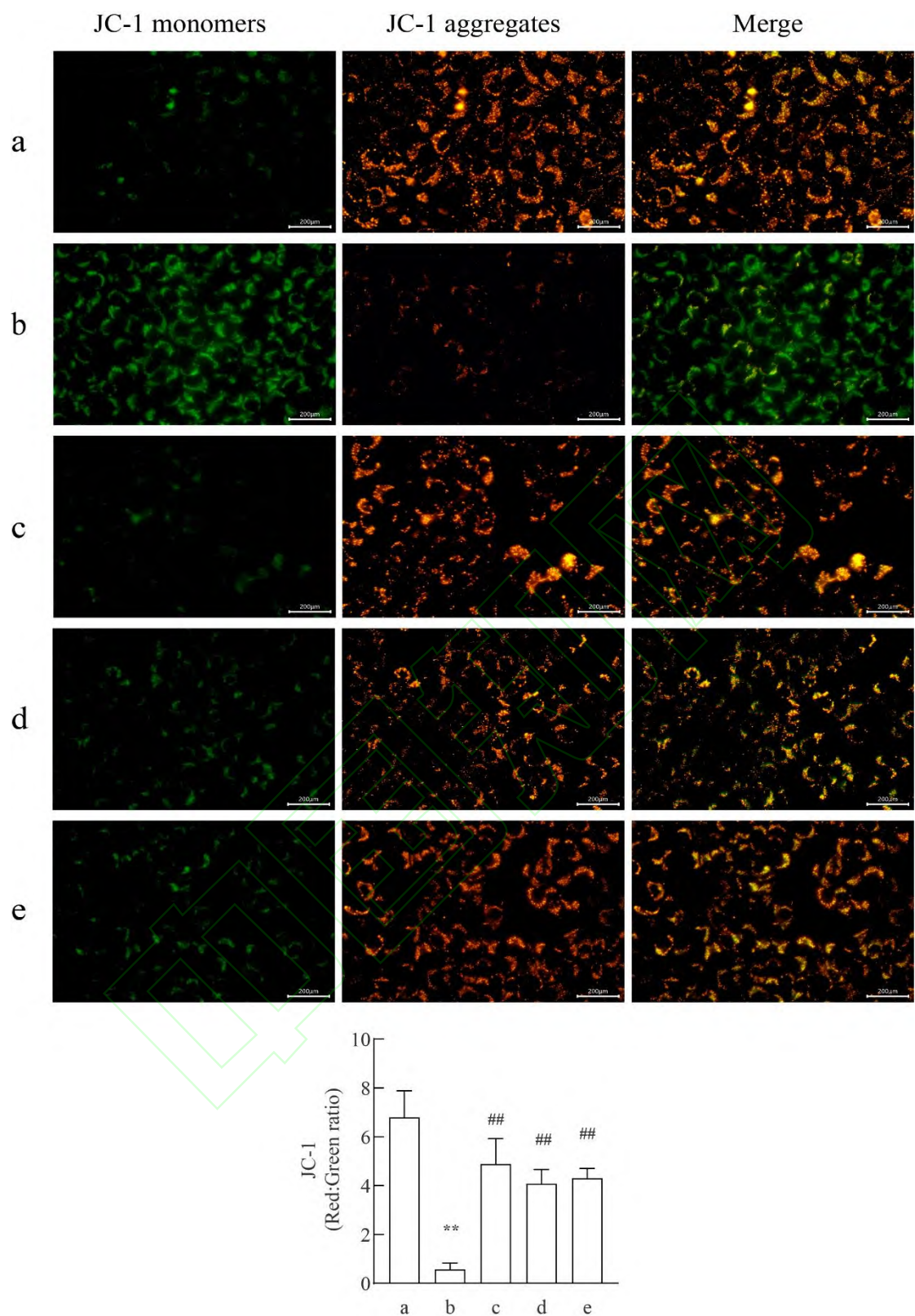


图 3 不同浓度的 NGR1 对 H/R 后 AC16 细胞线粒体膜电位的影响 ×400

Fig.3 The mitochondrial membrane potential in AC16 cells after hypoxia/reoxygenation under different concentrations of NGR1 ×400

a: Control group; b: H/R group; c: H/R+NGR1 100 μmol/L group; d: H/R+NGR1 200 μmol/L

group; e: H/R+NGR1 300 $\mu\text{mol/L}$ group; ** $P < 0.01$ vs Control group; ## $P < 0.01$ vs H/R group.

2.4 NGR1 影响线粒体自噬相关蛋白的转录水平

通过 RT-qPCR 观察 NGR1 干预后线粒体自噬相关 mRNA 转录情况。与对照组比较，H/R 组线粒体自噬相关蛋白 Parkin、Pink1、P62 的 mRNA 转录水平升高，而 NGR1 干预后降低 ($F = 101.3$, $P < 0.01$; $F = 17.36$, $P < 0.05$ 、 0.01 ; $F = 32.15$, $P < 0.01$)。表明缺氧复氧后，线粒体自噬相关蛋白 Parkin、Pink1、P62 的 mRNA 表达增加，而 NGR1 可以有效抑制这种增加的趋势。见图 4。

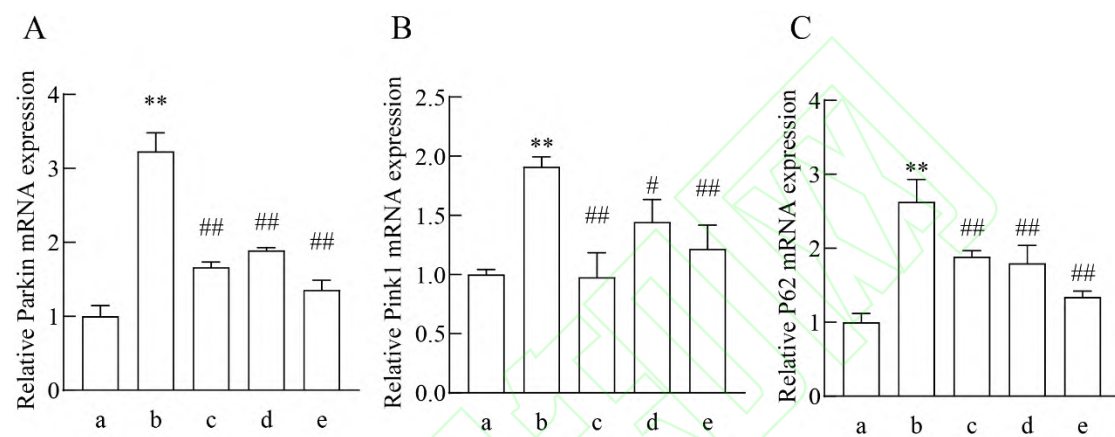


图 4 不同浓度的 NGR1 对 H/R 后 AC16 细胞的 Parkin、Pink1、P62 的 mRNA 表达情况

Fig.4 The mRNA expression of Parkin, Pink1 and P62 in AC16 cells after hypoxia/reoxygenation under different concentrations of NGR1

A: Relative expression level of Parkin mRNA; B: Relative expression level of Pink1 mRNA; C: Relative expression level of P62 mRNA; a: Control group; b: H/R group; c: H/R+NGR1 100 $\mu\text{mol/L}$ group; d: H/R+NGR1 200 $\mu\text{mol/L}$ group; e: H/R+NGR1 300 $\mu\text{mol/L}$ group; ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs H/R group.

2.5 NGR1 通过 PINK1/Parkin 减轻线粒体自噬

通过 Western blot 观察各组 AC16 细胞蛋白表达情况。与对照组比较，H/R 组线粒体自噬相关蛋白 Parkin、Pink1、LC3II 蛋白表达升高，而 P62 蛋白表达降低，而与 H/R 组比较，H/R+NGR1 不同剂量组线粒体自噬相关蛋白 Parkin、Pink1、LC3II 蛋白表达均有明显降低 ($F = 12.07$, $P < 0.05$ 、 0.01 ; $F = 8.483$, $P < 0.05$; $F = 12.95$, $P < 0.05$)，而 P62 蛋白表达升高 ($F = 10.50$, $P < 0.05$ 、 0.01)。说明说明由 H/R 造成的自噬相关蛋白表达增加（或降低）的趋势在 NGR1 干预后可以被有效缓解。见图 5。

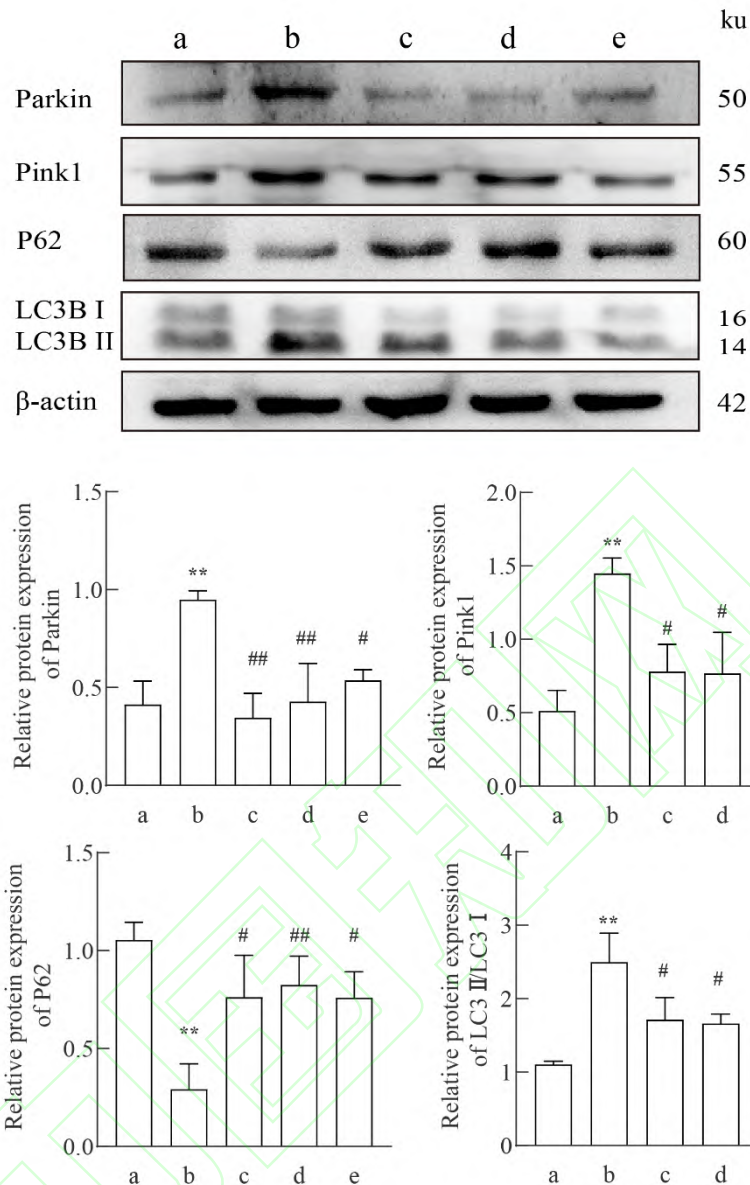


图 5 不同浓度的 NGR1 对 H/R 后 AC16 细胞的 Parkin、Pink1、P62、LC3II 蛋白表达的影响

Fig.5 The protein expression of Parkin, Pink1, P62 and LC3II in AC16 cells after hypoxia/reoxygenation under different concentrations of NGR1

a: Control group; b: H/R group; c: H/R+NGR1 100 μmol/L group; d: H/R+NGR1 200 μmol/L group; e: H/R+NGR1 300 μmol/L group; ** $P < 0.01$ vs Control group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs H/R group.

2.6 NGR1 影响线粒体超微结构

通过透射电镜观察显示,对照组细胞线粒体呈现典型的圆形或椭圆形形态,具有较高的电子密度,其双层膜结构完整,内嵴清晰。在 H/R 组中,多数线粒体出现显著的结构损伤,

表现为体积增大、电子密度降低，并伴有明显的肿胀或空泡化的现象，部分线粒体甚至破裂，其内嵴结构也呈现破裂和紊乱状态。相比之下，NGR1 干预组仅观察到部分线粒体结构损伤，表现为轻度肿胀或轻微空泡化，伴有少量嵴线紊乱，但其细胞超微结构损伤程度较 H/R 组显著减轻。这一结果表明，NGR1 对 H/R 诱导的线粒体损伤具有明显的保护作用。见图 6。

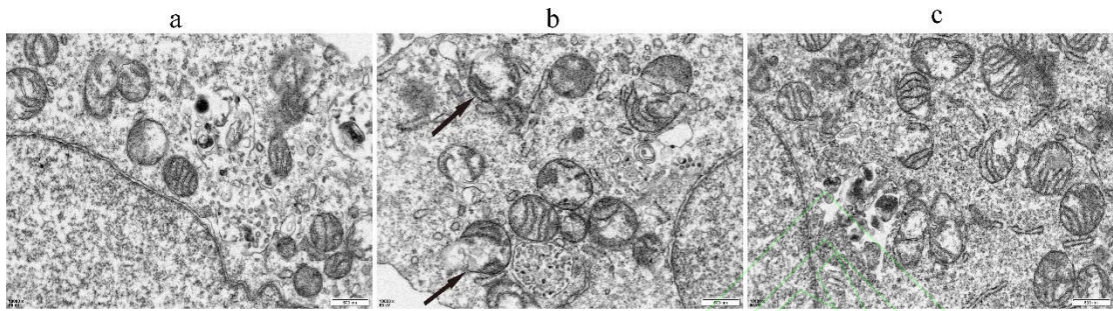


图 6 NGR1 对 H/R 后 AC16 细胞线粒体超微结构的影响 ×10 000

Fig.6 The effects of NGR1 on the ultrastructure of mitochondrial in AC16 cells after hypoxia/reoxygenation ×10 000

a: Control group; b: H/R group; c: H/R+NGR1 200 μmol/L group; the portion indicated by the arrow undergoes mitochondrial ultrastructural changes.

3 讨论

MIRI 作为缺血性心脏病治疗过程中的关键病理环节，目前尚缺乏有效的干预手段和药物，而临床治疗中，中医药的使用为其治疗拓展了新方向。而研究^[10]发现活血类药物之一的三七从多个方面改善 MIRI。而作为三七的特有成分，NGR1 对心肌细胞也有明显的保护作用，研究^[11]表明 NGR1 可以通过调节氧化应激及内质网应激以减轻 MIRI，而关于 NGR1 对 MIRI 心肌的具体作用机制仍有待研究。

MIRI 引起心肌组织及细胞的损伤，从而影响心脏正常的生理功能。既往实验研究^[12]已经证实，NGR1 可减轻 MIRI 模型大鼠的心脏损伤及心功能，且可通过维持线粒体稳态减轻大鼠心肌细胞 H/R 损伤^[13]。本实验结果表明，NGR1 浓度为 100 μmol/L 及以上时对 H/R 后的 AC16 细胞有保护作用。而为了进一步探究 NGR1 减轻 AC16 细胞 H/R 损伤的具体作用机制，本研究以线粒体为切入点，进一步对线粒体结构及功能相关指标进行检测。使用 JC-1 荧光探针检测线粒体膜电位的变化情况，H/R 组的细胞红/绿荧光比值降低，表明 JC-1 从线粒体释放至细胞质，进而反映出线粒体膜电位下降；而 NGR1 干预后，红/绿荧光比值显著升高；说明 NGR1 干预能有效减轻 AC16 细胞中线粒体膜电位的去极化现象。另外，借助电镜对线粒体结构进行观察，显示 H/R 组的线粒体结构遭受明显破坏，线粒体肿胀及断裂情

况更为严重；而 NGR1 干预后线粒体结构比 H/R 组有明显改善，本研究结果表明 NGR1 能减轻由 H/R 引起的 AC16 细胞的线粒体损伤。

线粒体自噬是控制线粒体质量的重要机制，在缺血缺氧等刺激下，激活线粒体自噬相关途径进而形成自噬小体，自噬小体与溶酶体结合形成自噬溶酶体，对受损线粒体进行降解^[14]，而持续的线粒体自噬则会进一步加重组织细胞损伤。研究^[15]显示促进线粒体自噬可改善 MIRI，然而本研究发现抑制线粒体自噬减轻心肌细胞损伤，且既往研究^[16]表明 MIRI 发生过程中会线粒体过度自噬，MIRI 引起线粒体自噬过度会导致线粒体能量代谢障碍，进一步加剧心肌组织及细胞损伤导致心脏功能障碍。PINK1/Parkin 通路是线粒体自噬的经典通路，线粒体受损后膜电位下降而激活 PINK1，进而招募 Parkin 至线粒体，Parkin 将线粒体外膜相关成分泛素化为多聚泛素链，P62 等蛋白则识别此多聚泛素链，与 LC3 相结合，促进自噬体形成^[17]。研究^[18-19]表明 MIRI 中 PINK1/Parkin 通路被激活，线粒体自噬明显增加，而通过抑制 PINK1/Parkin 介导的线粒体自噬则能明显缓解 MIRI。同样，本实验结果也显示，与正常细胞相比，H/R 组细胞 Parkin、Pink1、LC3II 的表达显著增强；而与 H/R 组相比，NGR1 干预后其表达均有明显减少。从自噬相关蛋白结果可以看出，H/R 可以诱导线粒体自噬增强，加剧 MIRI；而 NGR1 干预可以抑制 Pink1/Parkin 通路途径的线粒体自噬，减轻心肌损伤。然而，结合既往对 NGR1 的研究及本实验研究，尚无法说明其可直接调控线粒体自噬进而改善细胞损伤，NGR1 对线粒体自噬的调控机制还仍需深入研究。

综上所述，NGR1 可能通过调控 Pink1/Parkin 通路减轻由 H/R 引起的心肌细胞的线粒体自噬，进而保护心肌细胞，后续将通过 MIRI 动物模型进一步验证 NGR1 保护心肌的作用以及其具体调控机制。

参考文献

- [1] Cosentino F, Grant P J, Aboyans V, et al. 2019 ESC Guidelines on diabetes, pre-diabetes, and cardiovascular diseases developed in collaboration with the EASD[J]. Eur Heart J, 2020, 41(2): 255-323. doi:10.1093/eurheartj/ehz486.
- [2] Timmis A, Vardas P, et al. European Society of Cardiology: cardiovascular disease statistics 2021[J]. Eur Heart J, 2022, 43(8): 716-99. doi:10.1093/eurheartj/ehab892.
- [3] Shi J, Yu Y, Yuan H, et al. Mitochondrial dysfunction in AMI: mechanisms and therapeutic perspectives[J]. J Transl Med, 2025, 23(1): 418. doi:10.1186/s12967-025-06406-5.
- [4] Sagris M, Apostolos A, Theofilis P, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury: unraveling pathophysiology, clinical manifestations, and emerging prevention strategies[J]. Biomedicines,

2024, 12(4): 802. doi:10.3390/biomedicines12040802.

[5] Chen L, Mao L S, Xue J Y, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury: the balance mechanism between mitophagy and NLRP3 inflammasome[J]. Life Sci, 2024, 355: 122998. doi:10.1016/j.lfs.2024.122998.

[6] Tian Y, Hu X, Zhang T, et al. Advances in Chinese herbal medicine in modulating mitochondria to treat myocardial ischemia-reperfusion injury: a narrative review[J]. Cardiovasc Diagn Ther, 2025, 15(1): 207-32. doi:10.21037/cdt-24-346.

[7] Fang Y, Niu X, Zhao W, et al. Cardioprotective potential of transcription factor PRRX1 silencing against myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating excessive mitophagy and ferroptosis through FKBP5-p38 MAPK axis[J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2025, 1871(5): 167766. doi:10.1016/j.bbadis.2025.167766.

[8] Zeng J J, Shi H Q, Ren F F, et al. Notoginsenoside R1 protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in mice *via* suppressing TAK1-JNK/p38 signaling[J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(7): 1366-79. doi:10.1038/s41401-023-01057-y.

[9] He K, Yan L, Pan C S, et al. ROCK-dependent ATP5D modulation contributes to the protection of notoginsenoside NR1 against ischemia-reperfusion-induced myocardial injury[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2014, 307(12): H1764-76. doi:10.1152/ajpheart.00259.2014.

[10] Zhu T, Wan Q. Pharmacological properties and mechanisms of Notoginsenoside R1 in ischemia-reperfusion injury[J]. Chin J Traumatol, 2023, 26(1): 20-6. doi:10.1016/j.cjtee.2022.06.008.

[11] Yu Y, Sun G, Luo Y, et al. Cardioprotective effects of Notoginsenoside R1 against ischemia/reperfusion injuries by regulating oxidative stress- and endoplasmic reticulum stress-related signaling pathways[J]. Sci Rep, 2016, 6: 21730. doi:10.1038/srep21730.

[12] 胡 婷. 三七皂苷 R1 通过调控 PI₃K/Akt 通路抑制线粒体途径凋亡对抗心肌缺血再灌注损伤的研究[D]. 上海: 上海中医药大学, 2020. doi:10.27320/d.cnki.gszyu.2020.000148.

[12] Hu T. Notoginsenoside R1 inhibits mitochondrial-dependent apoptosis by regulating PI3K / Akt pathway to reduce myocardial ischemia-reperfusion injury [D]. Shanghai: Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, 2020. doi:10.27320/d.cnki. gszyu. 2020.000148.

[13] Xu Y, Wang P, Hu T, et al. Notoginsenoside R1 attenuates H/R injury in H9c2 cells by maintaining mitochondrial homeostasis[J]. Curr Issues Mol Biol, 2025, 47(1): 44.

doi:10.3390/cimb47010044.

[14] Bravo-San Pedro J M, Kroemer G, Galluzzi L. Autophagy and mitophagy in cardiovascular disease[J]. Circ Res, 2017, 120(11): 1812-24. doi:10.1161/CIRCRESAHA.117.311082.

[15] 卢长青, 贾合磊, 雷震, 等. 五味子乙素通过诱导线粒体自噬减轻心肌缺血再灌注损伤[J]. 安徽医科大学学报, 2019, 54(3): 418-22, 428. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.016.

[15] Lu C Q, Jia H L, Lei Z, et al. Schisandrin B alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury via maintaining mitophagy[J]. Acta Univ Med Anhui, 2019, 54(3): 418-22, 428. doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2019.03.016.

[16] Jin Q, Li R, Hu N, et al. DUSP1 alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury by suppressing the Mff-required mitochondrial fission and Bnip3-related mitophagy via the JNK pathways[J]. Redox Biol, 2018, 14: 576-87. doi:10.1016/j.redox.2017.11.004.

[17] Zhao X, Wang Z, Wang L, et al. The PINK1/Parkin signaling pathway-mediated mitophagy: a forgotten protagonist in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. Pharmacol Res, 2024, 209: 107466. doi:10.1016/j.phrs.2024.107466.

[18] Cao S, Sun Y, Wang W, et al. Poly (ADP-ribose) polymerase inhibition protects against myocardial ischaemia/reperfusion injury via suppressing mitophagy[J]. J Cell Mol Med, 2019, 23(10): 6897-906. doi:10.1111/jcmm.14573.

[19] Deng J, Liu Q, Ye L, et al. The Janus face of mitophagy in myocardial ischemia/reperfusion injury and recovery[J]. Biomed Pharmacother, 2024, 173: 116337. doi:10.1016/j.biopha.2024.116337.