

网络出版时间:2025-10-13 11:30:36 网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/34.1065.R.20260115.1418.008

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 μmol/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 μmol/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;Western blot 法检测 AC16 细胞中线粒体自噬相关蛋白(Parkin、Pink1、P62、LC3BII)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 μmol/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、LC3B II 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、LC3B II 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;人心肌细胞系 AC16

中图分类号 R 363.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2026)01-0053-07

doi:10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2026.01.009

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至坏死,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 Biologi-

2025-09-17 接收

基金项目:国家自然科学基金项目(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

cal Industries 公司), P62、LC3 II 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(上海申花公司), PCR 机、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(瑞士 Daitome 公司), 透射电子显微镜(日本 JEOL 公司)。

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 H/R 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 6 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 μ L 含终浓度为 0、6.25、12.5、25、50、100、200、300、400、500 μ mol/L 的 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 μ L 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 1×10^5 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 μ mol/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 $2^{-\Delta\Delta C_T}$ 法计算待测样品的相对表达量。

表 1 引物序列

Tab. 1 Primer sequences

Primer	Sequences (5'-3')
Parkin-F	F: GCAGCCTCAAGAAACCATCAAG
	R: TTCCACTCGCAGCCACAGTTC
Pink1	F: GGAGTATGGCAGTCACTTACAG
	R: AGCAGCGGCACGGAAGAG
P62	F: GAGTCGGATAACTGTTTCAGGAGGAG
	R: CTTCCGATTCTGGCATCTGTAGGG
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 项”。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)、LC3 II 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, ImageJ 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 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 H/R 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。

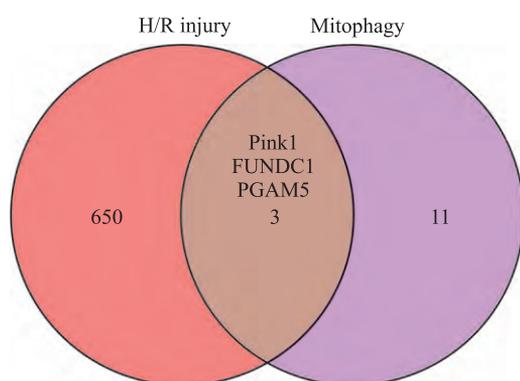


图 1 线粒体自噬与 H/R 相关基因取交集

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 $\mu\text{mol/L}$ 及以上的 NGR1 可提高 AC16 细胞活力 ($F=140.0, P < 0.01$)。见图 2。

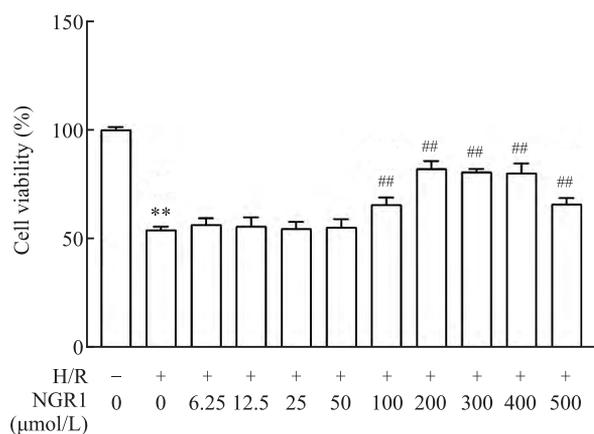


图 2 CCK-8 检测 NGR1 对 H/R AC16 细胞的影响

Fig. 2 The effects of NGR1 on H/R AC16 cell viability detected by CCK-8

** $P < 0.01$ 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。

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 ($F=101.3, P < 0.01$; $F=17.36, P < 0.05$; $F=32.15, P < 0.01$)。表明 H/R 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。

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、LC3B II 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、LC3B II 蛋白表达均有明显降低 ($F=12.07, P < 0.05$; $F=8.483, P < 0.05$; $F=12.95, P < 0.05$),而 P62 蛋白表达升高 ($F=10.50, P < 0.05$)。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。

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。

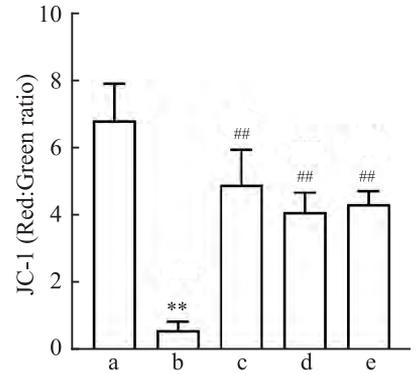
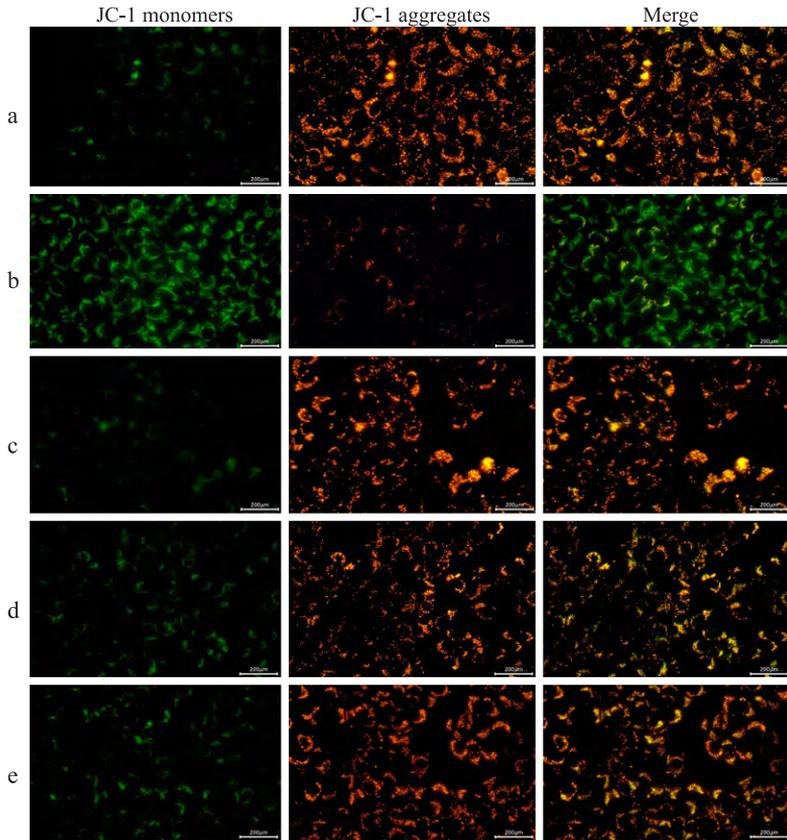


图3 不同浓度的NGR1对H/R后AC16细胞线粒体膜电位的影响 ×400

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 μmol/L group; ***P*<0.01 vs Control group; ##*P*<0.01 vs H/R group.

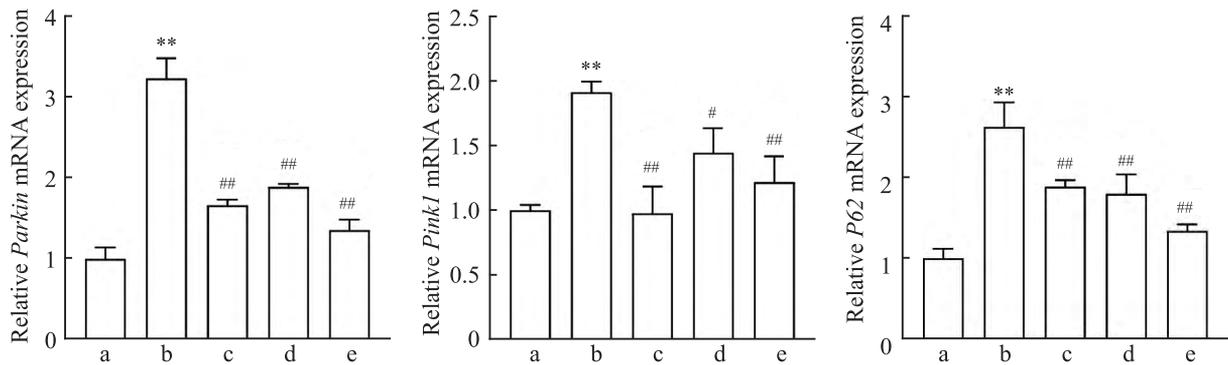


图4 不同浓度的NGR1对H/R后AC16细胞的Parkin、Pink1、P62的mRNA表达情况

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

a: 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.

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]表明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

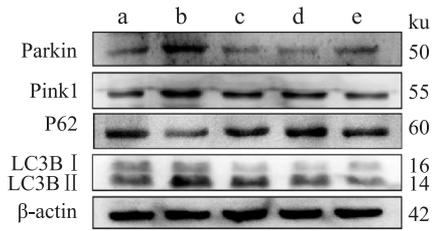


图5 不同浓度的NGR1对H/R后AC16细胞的Parkin、Pink1、P62、LC3B II蛋白表达的影响

Fig. 5 The protein expression of Parkin, Pink1, P62 and LC3B II in AC16 cells after H/R 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.

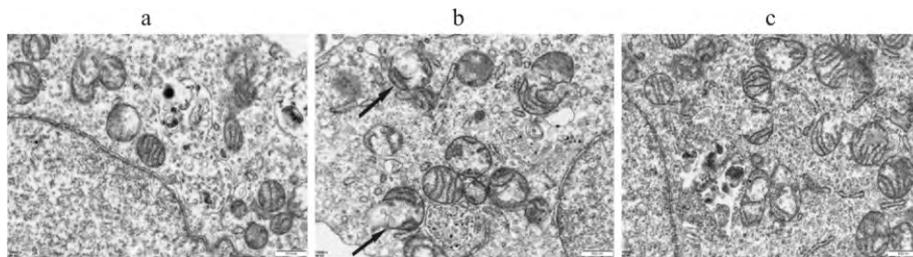
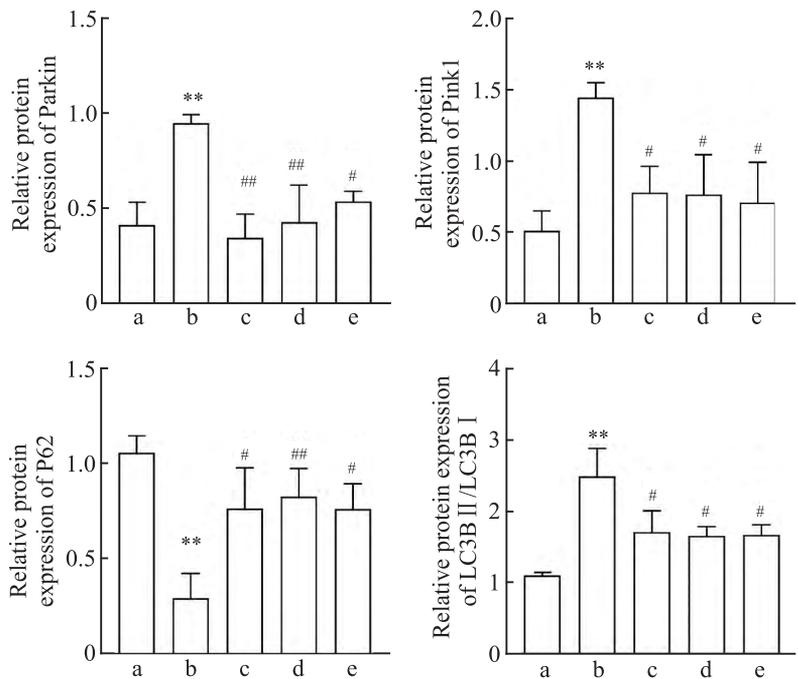


图6 NGR1对H/R后AC16细胞线粒体超微结构的影响 ×10 000

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.

细胞红/绿荧光比值降低,表明JC-1从线粒体释放至细胞质,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,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,然而本研究中,抑制

线粒体自噬可减轻心肌细胞损伤,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、LC3B II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]. *Biomedicine*, 2024, 12(4): 802. doi:10.3390/biomedicine12040802.
- [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.bbdis.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.cjte.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.

Notoginsenoside R1 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 LC3B II) 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 LC3B II 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 LC3B II 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.

Key words 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