

- [21]PACCOU J, HARDOUIN P, COTTEN A, et al. The role of bone marrow fat in skeletal health: Usefulness and perspectives for clinicians[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2015, 100(10): 3613-3621.
- [22]MOERMAN E J, TENG K, LIPSCHITZ D A, et al. Aging activates adipogenic and suppresses osteogenic programs in mesenchymal marrow stroma/stem cells: The role of PPAR-gamma2 transcription factor and TGF-beta/BMP signaling pathways[J]. *Aging Cell*, 2004, 3(6): 379-389.
- (责任编辑: 李 晓)

红景天苷调控线粒体自噬抵抗冠状动脉内皮细胞缺血再灌注损伤

梁 政, 黄瑶英, 温 文, 钟剑锋, 莫少门, 侯高星, 黎明亮 (广东医科大学附属医院, 广东湛江 524001)

摘 要: **目的** 探讨红景天苷(Sal)对心肌梗死后冠状动脉内皮细胞(CoECs)线粒体自噬的调控机制。**方法** CoECs分为正常对照组(Control组)、阴性对照组(PBS组)、红景天苷组(Sal组)、红景天苷+氯喹组(Sal+CQ组),其中Control组用常氧处理,其余3组进行氧糖剥夺及恢复处理(OGD/R);CCK-8法、荧光探针法、Western Blot检测细胞活性、凋亡、线粒体溶酶体共定位、线粒体膜电位(MMP)、ROS及自噬相关蛋白表达。18只C57/BL6小鼠随机分为假手术(Sham组)、缺血再灌注组(MIRI组)和缺血再灌注+红景天苷组(MIRI+Sal组),其中MIRI组、MIRI+Sal组在LAD结扎手术前后28d分别腹腔注射生理盐水、50 mg/(kg·d) Sal;利用小动物超声成像系统、Masson染色和Western Blot检测射血分数(EF)、左室短轴缩短率(FS)、心肌纤维化和小鼠梗死冠状动脉中自噬相关蛋白表达。**结果** 与PBS组比较,Sal组细胞活力、MMP、线粒体溶酶体共定位和PINK1、Beclin1、Parkin表达增加,而细胞凋亡率、ROS含量和Mtf1、P62、LC3 II/LC3 I表达下降($P<0.05$);与Sal组比较,Sal+CQ组细胞活力、线粒体溶酶体共定位和PINK1、Beclin1、Parkin表达下降,而细胞凋亡率、ROS含量和Mtf1、P62、LC3 II/LC3 I表达增加($P<0.05$)。与MIRI组比较,Sal+MIRI组FS、EF和梗死区域冠状动脉PINK1、Parkin和Beclin1表达增加,而心肌纤维化和Mtf1、P62/SQSTM1和LC3 II/LC3 I表达下降($P<0.05$)。**结论** Sal对OGD/R的CoECs和MIRI小鼠梗死区域冠状动脉内皮具有抑制氧化应激和促进线粒体自噬的保护作用。

关键词: 红景天苷;缺血再灌注损伤;氧化应激;线粒体自噬;细胞凋亡

中图分类号: R 285.5

文献标志码: A

文章编号: 2096-3610 (2024) 04-0375-09

Salidroside protects coronary endothelial cells against ischemia-reperfusion injury by regulating mitophagy

LIANG Zheng, HUANG Yao-ying, WEN Wen, ZHONG Jian-feng, MO Shao-men, HOU Gao-xing, LI Ming-liang (Affiliated Hospital of Guangdong Medical University, Zhangjiang 524001, China)

Abstract: **Objective** To investigate the modulation of salidroside (Sal) on mitophagy in coronary endothelial cells (CoECs) after myocardial infarction. **Methods** CoECs were divided into normal control, negative control (PBS), Sal, and Sal + Chloroquine (Sal+CQ) groups; Control group was treated with normoxic condition, while the other groups with oxygen/glucose deprivation and reperfusion (OGD/R). Cell viability, apoptosis, mitochondrial-lysosomal colocalization (MLCL), mitochondrial membrane potential (MMP), ROS, and autophagy-related protein levels were detected using CCK-8, fluorescent probe, and Western blot. Eighteen C57/BL6 mice were randomized to Sham, ischemia-reperfusion (MIRI), and MIRI+Sal groups. MIRI or MIRI+Sal group was intraperitoneally injected with normal saline or 50 mg/(kg·d) Sal 28 days before and after LAD ligation. Ejection fraction (EF), left ventricular fractional shortening (FS), myocardial fibrosis, and expression of autophagy-related proteins in infarcted coronary arteries were determined by small animal ultrasound imaging system, Masson stain and Western blot. **Results** Compared with PBS group, cell viability, MMP, MLCL, and expression of PINK1, Beclin1, and Parkin were increased ($P<0.05$), while apoptosis, ROS content, and expression of Mtf1, P62, and LC3 II/I decreased

收稿日期: 2024-04-16

基金项目: 广东省中医药局科研项目(20221208)

作者简介: 梁 政,男,硕士,主任医师, E-mail: 471185143@qq.com

in Sal Group ($P<0.05$). Compared with Sal group, cell viability, MLCL and expression of PINK1, Beclin1, and Parkin were reduced ($P<0.05$), while apoptosis, ROS content and expression of Mtf1, P62, and LC3 II/I elevated ($P<0.05$) in Sal+CQ group. Compared with MIRI group, FS, EF and expression of PINK1, Parkin and Beclin1 were increased in infarcted coronary arteries, while myocardial fibrosis and expression of Mtf1, P62/SQSTM1 and LC3 II/I decreased ($P<0.05$) in Sal+MIRI group.

Conclusion Sal is protective for OGD/R-induced CoECs and infarcted coronary arteries in MIRI mice by inhibiting oxidative stress and promoting mitophagy.

Key words: salidroside; ischemia-reperfusion injury; oxidative stress; mitophagy; apoptosis

血管内皮缺血再灌注损伤是指急性心肌梗死或脑梗后血管完全闭塞,经过治疗之后又重新再通,但是血管损伤反而加重的一个现象^[1]。红景天苷(Salidroside, Sal)具有保护心脏,预防缺氧损伤的作用^[2-3]。然而关于Sal保护血管内皮细胞抵抗缺血再灌注损伤的机制尚不明确。本研究主要通过体外培养的缺血再灌注后冠状动脉内皮(CoECs),探讨Sal通过调控线粒体自噬保护血管内皮细胞抵抗缺血再灌注损伤的机制,并在小鼠体内进行进一步的验证,以期为其临床应用于急性心肌梗死的后续治疗提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

CoECs购自武汉普诺赛生命科技有限公司,DMEM培养基、胎牛血清购自美国Hyclone公司,ECM培养基购自美国ScienCell公司,红景天苷和氯喹购自美国Sigma公司, Parkin抗体、P62/SQSTM1抗体、Beclin抗体、LC3 I/II抗体购自美国CST公司, PINK1抗体购自艾博抗(上海)贸易有限公司, Mtf1抗体购自武汉亚科因生物科技有限公司,线粒体膜电位检测试剂盒、活性氧检测试剂盒、Mito-Tracker Red CMXRos/MitoTracker Green探针、Masson染色试剂盒购自上海碧云天生物技术有限公司、Tunel试剂盒购自上海罗氏制药有限公司; OLYMPUS激光扫描共聚焦显微镜由日本OLYMPUS公司提供, Vevo3100小动物超声心动仪由美国VisualSonics公司提供。雄性C57/BL6小鼠, 身体质量15~20 g, 由广东省医学实验动物中心提供, 许可证号码SYXK(粤)2020-0147。饲养于广东医科大学动物中心SPF屏障环境内, 本研究的动物实验伦理审批号: GDY2302051。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 将CoECs培养于含10%胎牛血清、1%抗菌剂(青霉素、链霉素)的ECM培养基中, 置于37℃、5%CO₂环境下培养, 每3天更换培养基, 待细胞密度达到90%左右, 用含0.25% EDTA胰蛋白酶消化后传代备用。

1.2.2 建立 OGD/R 模型与分组 4~6 代的 CoECs 生长至细胞密度约为 80 % 时, 用不含血清的低糖 DMEM 培养基处理 CoECs 16 h 进行饥饿化处理; 将 CoECs 分为 4 组: 正常对照组 (Control 组)、阴性对照组 (PBS 组)、红景天苷组 (Sal 组)、红景天苷+氯喹组 (Sal+CQ 组)。Control 组置于二氧化碳培养箱中培养 (37℃, 21 % O₂, 5 % CO₂); 缺氧 2 h 后将培养液更换为新鲜的完全培养基, 并置于二氧化碳培养箱中继续培养 24 h。另外 3 组则分别给予 PBS、100 μmol/L Sal 和 100 μmol/L Sal 联合 50 μmol/L CQ 处理, 给药后进行 OGD/R 处理。进行氧糖剥夺的细胞更换为不含血清的无糖 DMEM 培养基, 置于三气培养箱中缺氧培养 (37℃, 1 % O₂, 5 % CO₂)。

1.2.3 CCK-8 细胞活力检测 CoECs 经胰酶消化后接种于 96 孔板, 密度约为 5×10⁵ 个/孔, 每组 6 个重复, 给予相应造模处理及药物干预后, 用 PBS 洗涤细胞 3 次, 吸干残液后, 每孔加入 100 μL 稀释后的 CCK-8 溶液, 培养箱孵育 2 h, 用超微量分光光度计在 450 nm 处测定吸光度。

1.2.4 Tunel 染色 将爬片浸泡无水乙醇消毒后放置于 24 孔板, 晾干残液, CoECs 经胰酶消化后接种于玻璃爬片上, 密度约为 5×10⁵ 个/每孔, 每组 6 个重复, 给予相应造模处理及药物干预后, 用 4 % 多聚甲醛固定细胞 40 min, PBS 洗涤 3 次, 加入含 0.1 % Triton X-100 的预冷 PBS 孵育 2 min; PBS 洗涤 3 次, 加入 Tunel 检测液, 37℃避光孵育 1 h; PBS 洗涤 3 次, DAPI 复染 15 min, 封片后在荧光显微镜下观察。

1.2.5 线粒体溶酶体共定位检测 CoECs 经胰酶消化后接种于共聚焦培养皿, 密度约为 10⁶ 个/皿, 每组 10 个重复, 给予相应处理及培养后以 PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 移液枪吸取残液, 加入无血清低糖 DMEM 培养基稀释的 MitoTracker Green (100 nmol/L) 和 LysoTracker Red (50 nmol/L)。细胞培养箱孵育 30 min。PBS 洗涤 3 次, 每次 5 min, 用移液枪去除残液。激光共聚焦显微镜检测, 通过软件计算线粒体和溶

酶体。

1.2.6 检测ROS生成 CoECs经胰酶消化后接种于96孔板,密度约为 5×10^5 个/孔,给予相应造模处理及药物干预后,用PBS洗涤细胞3次,每次5 min,每孔加入 $10 \mu\text{mol/L}$ 的ROS探针(DCFH-DA) $100 \mu\text{L}$, 37°C 孵育20 min, PBS洗涤细胞3次,每次5 min,用荧光酶标仪检测各孔细胞的荧光强度。

1.2.7 JC-1 探针检测线粒体膜电位 CoECs经胰酶消化后接种于共聚焦培养皿,密度约为 10^6 个/孔,给予相应处理及培养后,加入1 mL JC-1 染色工作液, 37°C 孵育20 min,用JC-1 染色缓冲液($1 \times$)洗涤3次,用荧光显微镜进行观察并拍照(激发光 490 nm ,发射光 530 nm 检测JC-1 单体;激发光 525 nm ,发射光 590 nm 检测JC-1 聚合物)。

1.2.8 Western Blot检测 提取细胞总蛋白,用BCA法测其浓度;采用免疫沉淀法富集酪氨酸残基硝基化的蛋白质;进行SDS-PAGE电泳,然后电转印至PVDF膜;放入封闭液中于室温封闭2 h;Tbst洗膜3次,每次5 min,加入对应一抗, 4°C 孵育过夜;以Tbst洗膜5次,每次10 min,加入对应的HRP标记的二抗孵育,室温轻摇1 h;Tbst洗膜5次,每次10 min用ECL显影并拍照,实验重复3次,Image j分析灰度值。

1.2.9 构建MIRI小鼠模型与分组 18只4~6周龄C57/BL6野生型雄性小鼠随机分为3组,假手术对照组(Sham组)、缺血再灌注组(MIRI组)和缺血再灌注+红景天苷组(MIRI+Sal组),每组6只。小鼠适应性喂养7 d后, MIRI+Sal组腹腔注射 $50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ Sal, Sham组和MIRI组腹腔注射等体积生理盐水。腹腔注射28 d后MIRI组和MIRI+Sal组行LAD结扎手术,而Sham组小鼠结扎线不打结,术后2 h 3组小鼠取出结扎线。MIRI+Sal组继续腹腔注射 $50 \text{ mg}/(\text{kg} \cdot \text{d})$ Sal, Sham组和MIRI组继续腹腔注射等体积生理盐水28 d进行后续检测。

1.2.10 左心功能检测 用1%戊巴比妥钠麻醉小鼠,仰卧位固定于 37°C 恒温加热板上,左胸前脱毛后,采用Vevo 770超高分辨率小动物超声实时影像系统(VisualSonics Inc.)进行超声检测。探头置于小鼠左侧胸前,2D超声示左室短轴切面,在乳头肌水平应用M模式超声记录左心室运动情况,测量FS和EF。

1.2.11 Masson染色 小鼠心脏石蜡切片依次以二甲苯I 5 min、二甲苯II 5 min、二甲苯III 5 min、无水乙醇1 min、95%乙醇1 min、75%乙醇1 min进行固定脱水后,置于Weigert铁苏木素染色液染色8 min;酸性

乙醇分化液分化15 s,蒸馏水冲洗1 min; Masson 蓝色液返蓝5 min,蒸馏水冲洗1 min;丽春红品红染色液染色5 min,弱酸工作液冲洗1 min;苯胺蓝染色液染2 min,弱酸洗涤1 min;95%乙醇快速浸泡2~3 s,无水乙醇浸泡3次,每次5~10 s,二甲苯浸泡3次,每次1~2 min,中性树胶封固后拍照。

1.2.12 小鼠梗死区域冠状动脉分离及蛋白质提取 小鼠处死后沿腹中线切开皮肤和筋膜层,充分暴露胸腔后摘取心脏,切去梗死部位,将梗死部位心脏浸泡在生理盐水中洗涤后显微镜下分离粘附的心肌组织,按100 mg 冠状动脉加入1 mL RIPA裂解液的比例加入适量体积的RIPA裂解液于研磨管充分研磨,保存于 -80°C 。

1.3 统计学处理

采用Graphpad Prism 9.0统计软件,计量资料以均数 $\pm$ 标准差表示,多组间两两比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)和Tukey's 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

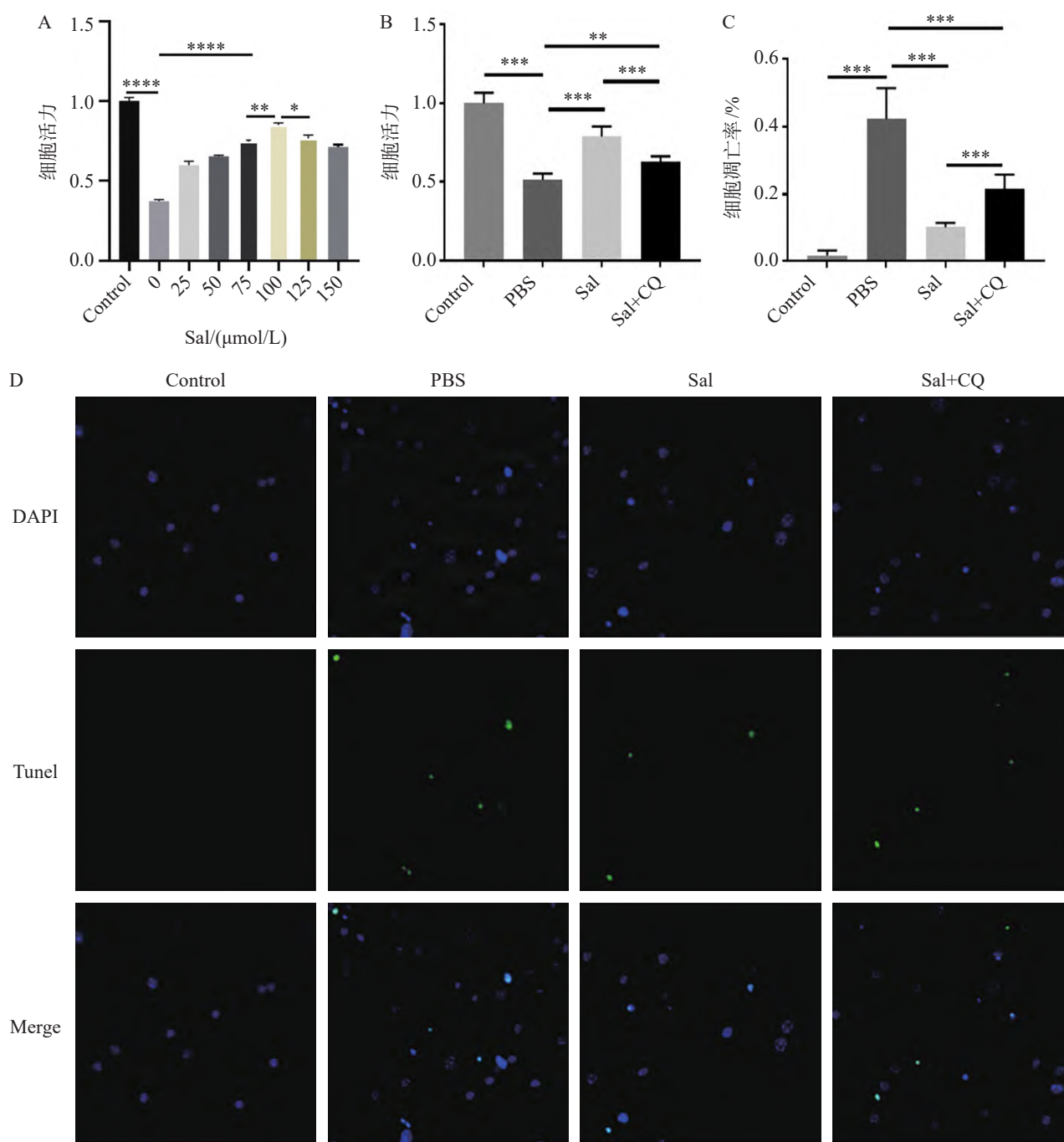
2 结果

2.1 Sal对OGD/R处理后CoECs的影响

分别给予不同浓度的Sal($0 \sim 150 \mu\text{mol/L}$)处理CoECs后进行OGD/R处理。与Control组比,OGD/R后细胞活力显著降低($P < 0.001$)。相比 $0 \mu\text{mol/L}$, $25 \sim 150 \mu\text{mol/L}$ 处理后的CoECs细胞活力均有上升,以 $100 \mu\text{mol/L}$ Sal效果最为显著($P < 0.001$),见图1 A。Sal组的细胞活力较PBS组显著上升($P < 0.001$),而SAal+CQ组的细胞活力较Sal组显著下降($P < 0.001$),见图1 B。与Control组相比,PBS组的细胞凋亡率显著增加($P < 0.001$),Sal组的细胞活力较PBS组明显下降($P < 0.001$),而SAal+CQ组的细胞活力较Sal组显著上升($P < 0.001$),见图1 C、D。

2.2 SalOGD/R处理后CoECs后线粒体自噬途径的影响

与Control组相比,PBS组细胞线粒体膜电位显著降低($P < 0.001$),Sal组的细胞线粒体膜电位较PBS组上升($P < 0.05$),但Sal+CQ组的细胞线粒体膜电位与Sal组相比差异无统计学意义($P = 0.4636$),详见图2 A、B。Mito-TrackerGreen和Lyso-TrackerRed荧光探针结果如图2 C、D所示。与Control组相比,PBS组细胞溶酶体/线粒体比例增加($P < 0.05$),Sal组的溶酶体/线粒体比例较PBS组增加($P < 0.001$),而Sal+CQ组的细胞溶酶体/线粒体比例较Sal组显著下降($P < 0.001$)。此外,DCFH-DA(ROS探针)检测结果如图2 E-F所



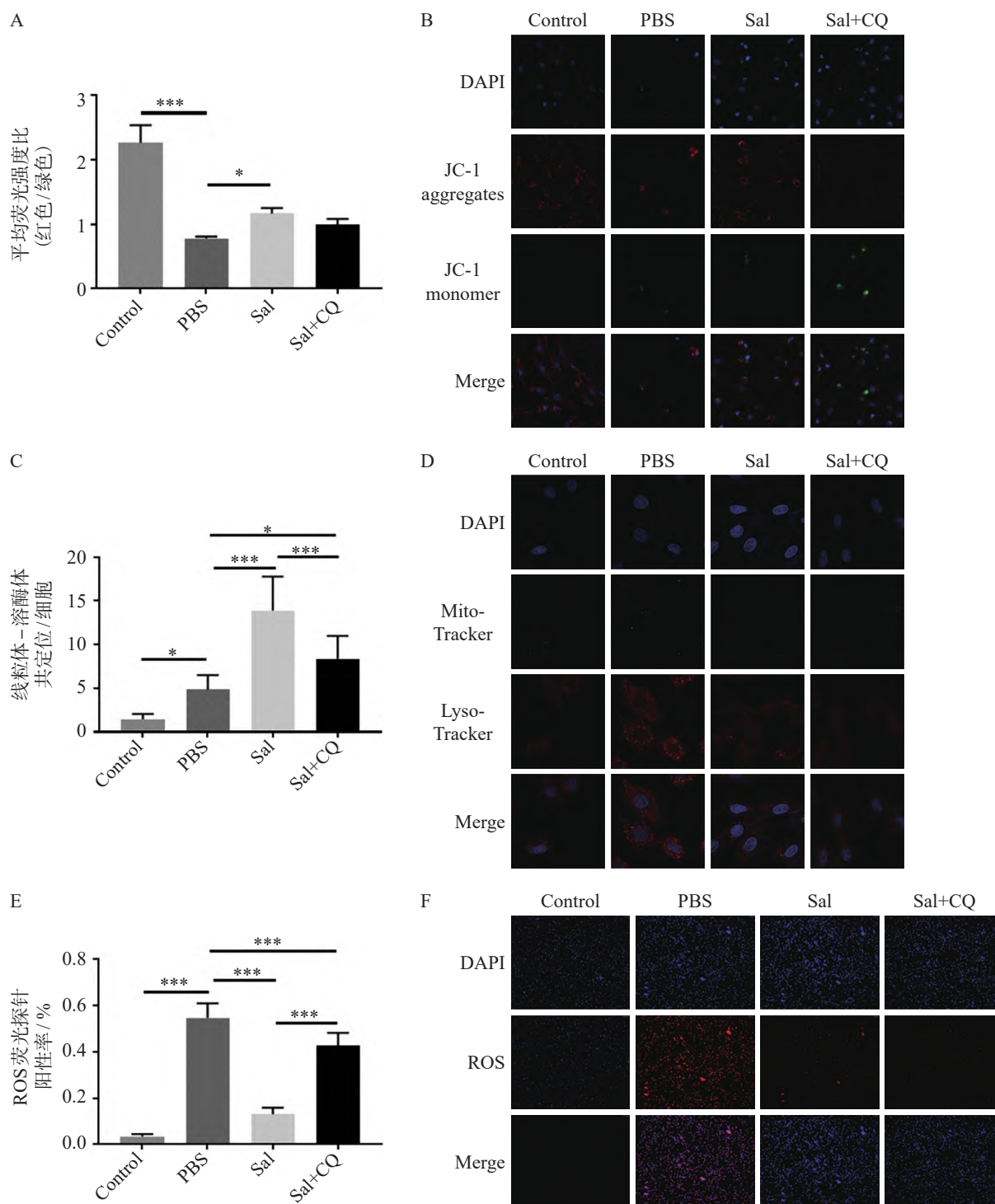
A、B. 各组 CoECs 的细胞活力；C、D. 各组 CoECs 的凋亡率 ($\times 100$)

图 1 Sal 对 OGD/R 处理后 CoECs 的影响 (* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

示。与 Control 组相比, PBS 组细胞 ROS 含量显著增加 ($P < 0.001$), Sal 组的细胞 ROS 含量较 PBS 组显著下降 ($P < 0.001$), 而 Sal+CQ 组的细胞 ROS 含量较 Sal 组显著增加 ($P < 0.001$)。

Western Blot 检测线粒体自噬相关蛋白 Mtf1r、PINK1、Parkin、P62/SQSTM1、Beclin1 和 LC3II/LC3I 的表达, 结果如图 3 A~G 所示。与 Control 组相比, PBS 组 Mtf1r 表达水平显著增加 ($P < 0.001$), Sal 组的 Mtf1r 表达水平较 PBS 组显著下降 ($P < 0.001$), 而

Sal+CQ 组的 Mtf1r 表达水平较 Sal 组增加 ($P < 0.05$), 见图 3 B。与 Control 组相比, PBS 组 P62 表达水平显著增加 ($P < 0.001$), Sal 组的 P62 表达水平较 PBS 组显著下降 ($P < 0.001$), 而 Sal+CQ 组的 P62 表达水平较 Sal 组增加 ($P < 0.05$), 见图 3 C。与 Control 组相比, PBS 组 PINK1 表达水平增加 ($P < 0.05$), Sal 组的 PINK1 表达水平较 PBS 组增加 ($P < 0.05$), 而 Sal+CQ 组的 PINK1 表达水平较 Sal 组下降 ($P < 0.05$), 见图 3 D。与 Control 组相比, PBS 组 Beclin1 表达水平增加 ($P < 0.05$), Sal



A、B. JC-1 探针检测线粒体膜电位 ($\times 600$)；C、D. Mito-TrackerGreen 和 Lyso-TrackerRed 荧光探针检测线粒体溶酶体共定位 ($\times 600$)；E、F. DCFH-DA 检测细胞 ROS 生成情况 ($\times 10$)

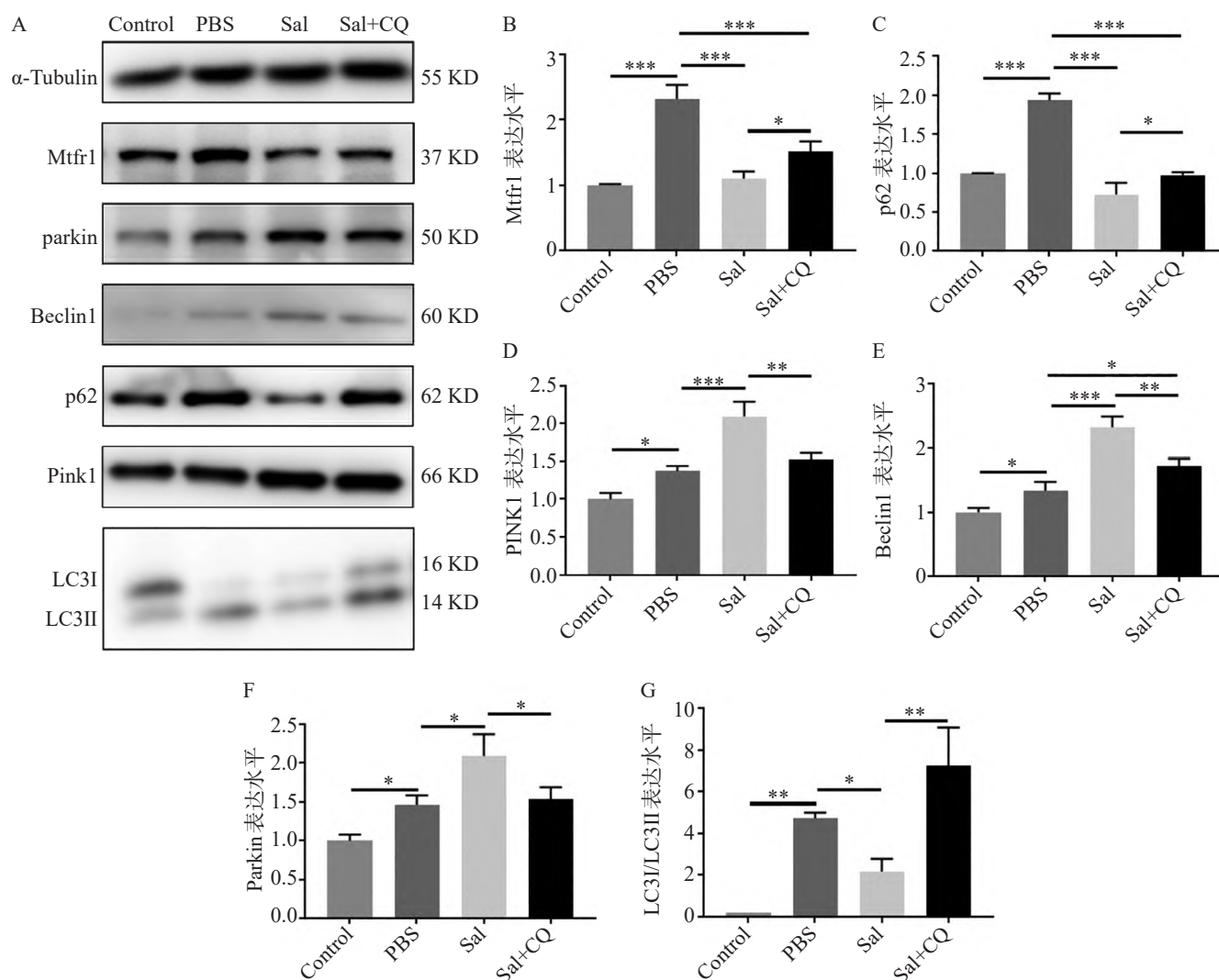
图 2 Sal 对 OGD/R 后 CoECs 线粒体的影响 (* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$)

组的 Beclin1 表达水平较 PBS 组显著增加 ($P < 0.001$), 而 Sal+CQ 组的 Beclin1 表达水平较 Sal 组明显下降 ($P < 0.01$), 见图 3 E。与 Control 组相比, PBS 组 Parkin 表达水平增加 ($P < 0.05$), Sal 组的 Parkin 表达水平较 PBS 组增加 ($P < 0.05$), 而 Sal+CQ 组的 Parkin 表达水平较 Sal 组下降 ($P < 0.05$), 见图 3 F。与 Control 组相

比, PBS 组 LC3II/LC3I 表达水平增加 ($P < 0.05$), Sal 组的 LC3II/LC3I 表达水平较 PBS 组下降 ($P < 0.05$), 而 Sal+CQ 组的 LC3II/LC3I 表达水平较 Sal 组明显增加 ($P < 0.01$), 见图 3 G。

2.3 Sal 对 MIRI 小鼠的影响

如图 4 A~B 所示, 与 Sham 组小鼠相比, MIRI



A~G. Western Blot检测线粒体自噬相关蛋白 Mtf1、PINK1、Parkin、P62/SQSTM1、Beclin1 和 LC3II/LC3I 的表达

图3 Sal对OGD/R后CoECs自噬相关蛋白的影响(* $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$)

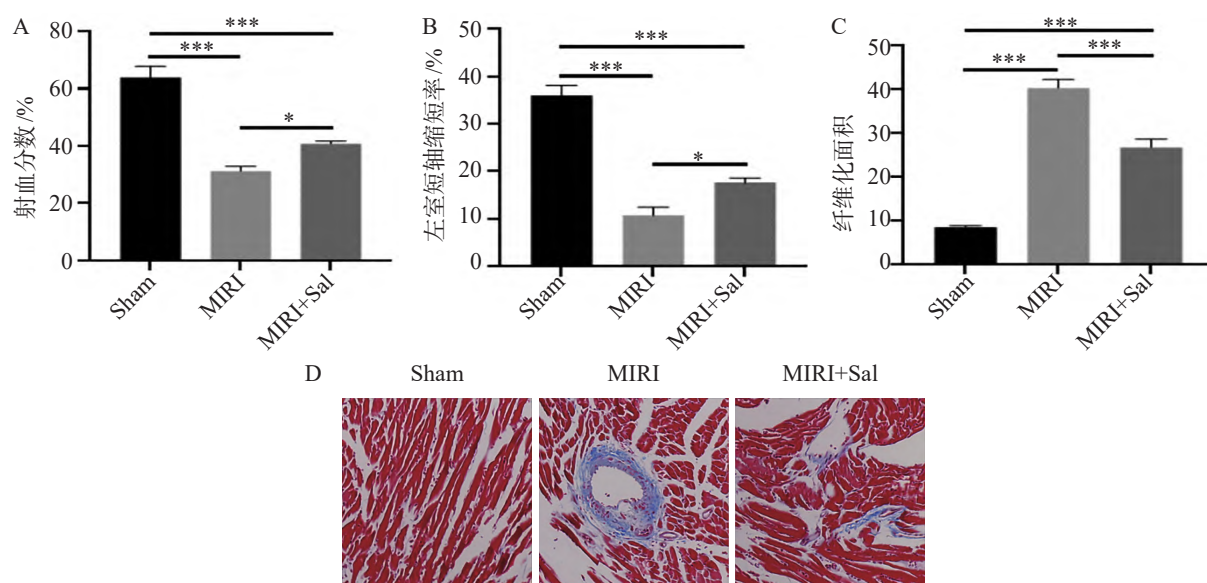
组和MIRI+Sal组小鼠的左室FS和EF显著降低($P<0.001$)。但MIRI+Sal组小鼠的左室FS和EF较MIRI组上升($P<0.05$)。此外,Masson染色结果显示,与Sham组小鼠相比,MIRI组和MIRI+Sal组小鼠心肌纤维化面积显著增加($P<0.001$),而MIRI+Sal组的小鼠心肌纤维化面积较MIRI组小鼠明显下降($P<0.001$),见图4 C-D。

与Sham组小鼠相比,MIRI组小鼠冠状动脉的Mtf1表达明显增加($P<0.01$),但MIRI+Sal组小鼠冠状动脉的Mtf1表达较MIRI组明显下降($P<0.01$),见图5 B。与Sham组小鼠相比,MIRI组小鼠冠状动脉的Parkin表达增加($P<0.05$),MIRI+Sal组小鼠冠状动脉的Parkin表达较MIRI组增加($P<0.05$),见图5 C。与Sham组小鼠相比,MIRI组小鼠冠状动脉的Beclin1表达增加($P<0.05$),MIRI+Sal组小鼠冠状动脉的Beclin1表达较MIRI组增加($P<0.05$),见图5 D。

与Sham组小鼠相比,MIRI组小鼠冠状动脉的p62表达增加($P<0.05$),MIRI+Sal组小鼠冠状动脉的P62表达较MIRI组下降($P<0.05$),见图5 E。与Sham组小鼠相比,MIRI组小鼠冠状动脉的Parkin表达增加($P<0.05$),MIRI+Sal组小鼠冠状动脉的Parkin表达较MIRI组明显增加($P<0.01$),见图5 F。与Sham组小鼠相比,MIRI组小鼠冠状动脉的LC3II/LC3I表达显著增加($P<0.001$),MIRI+Sal组小鼠冠状动脉的LC3II/LC3I表达较MIRI组下降($P<0.05$),见图5 F。

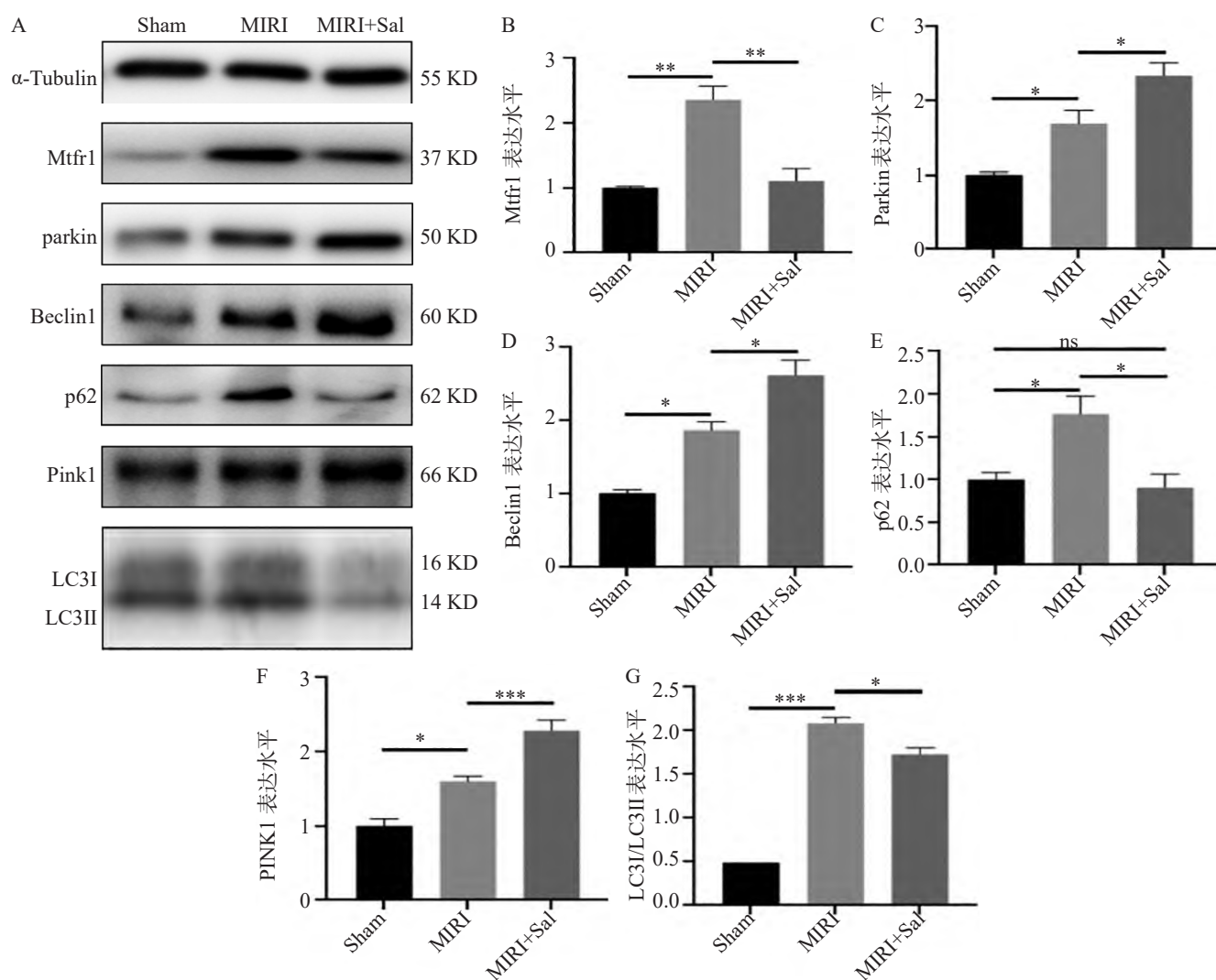
3 讨论

血管内皮缺血再灌注对内皮细胞造成不可逆转的损害,引发心功能衰竭和恶性心律失常,成为患者康复过程中的重大潜在威胁^[4-5]。ROS增多和线粒体功能障碍是内皮细胞缺血再灌注损伤的主要原因^[6]。在ROS增多、线粒体功能障碍的作用下,会导致线粒



A. 超声检测小鼠左室EF; B. 超声检测小鼠左室FS; C、D. Masson染色检测小鼠心脏纤维化程度($\times 100$)

图4 Sal对MIRI小鼠心脏功能的影响(* $P < 0.05$, *** $P < 0.001$)



A~G. Western Blot检测缺血再灌注模型小鼠冠状动脉线粒体自噬相关蛋白Mtf1、PINK1、Parkin、P62/SQSTM1、Beclin1和LC3II/LC3I的表达

图5 Sal对MIRI小鼠冠状动脉自噬相关蛋白的影响(* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$)

体DNA(mtDNA)突变逐渐累积,还会使细胞内线粒体膜电位降低和去极化损伤^[7]。为了维持线粒体和细胞稳态,防止受损线粒体损伤细胞,损伤的线粒体被特异性包裹进自噬体中并与溶酶体融合,从而完成溶酶体的降解,这个过程称为线粒体自噬^[8]。早期的线粒体自噬通过降解受损的线粒体和减少细胞质中促凋亡蛋白的丰度,以防止细胞的凋亡,然而应激强度或持续时间达到细胞的极限时,细胞死亡程序就会被激活^[9]。Sal是一种从传统藏药红景天中分离出的天然苯丙烷类糖苷,具有抗缺氧、抗衰老、抗炎和抗肿瘤等药理特性^[5]。重要的是,越来越多的证据表明Sal对线粒体稳态和心血管疾病具有保护作用^[10-11]。在这项研究中,Sal对OGD/R处理的CoECs和MIRI模型小鼠冠状动脉内皮具有保护作用。其机制可能与抑制氧化应激和促进线粒体自噬有关。

首先,本研究通过评估Sal对内皮细胞OGD/R后的影响表明Sal能有效保护CoECs抵抗OGD/R损伤。然后,本研究通过评估各组细胞线粒体自噬的发生率进一步证明了Sal的保护作用。与之前报道一致的是^[10-11],Sal能促进OGD/R处理后CoECs线粒体膜电位和线粒体溶酶体共定位,而CQ能抑制Sal的保护作用,证明Sal的保护作用与促进线粒体自噬密切相关。Western Blot结果进一步支持了上述结果。研究表明,Mtfr1调节线粒体裂变,敲低Mtfr1可抑制线粒体裂变、细胞凋亡^[12]。然而,Mtfr1是否调节细胞线粒体自噬仍未确定。结果提示Sal能显著抑制Mtfr1的表达,而CQ处理能抑制Sal的作用,表明Sal通过促进线粒体自噬抑制Mtfr1,从而抑制细胞凋亡。研究表明,50 mg/(kg·d)的Sal灌胃能有效抑制高脂饮食诱导的apoE-/-小鼠冠状动脉NLRP3的表达,抑制IL-1 β 等炎症因子,增加自噬,促进胆固醇排出,抑制泡沫细胞的形成,并激活eNOS,改善内皮功能,发挥抗AS的作用^[13-14]。在体内实验中,通过检测心功能指标以及心肌纤维化程度确定MIRI小鼠模型构建成功以及Sal的治疗效果。与体外实验一致的是,Sal显著促进MIRI小鼠冠状动脉Beclin1的蛋白表达水平,并抑制Mtfr1、P62/SQSTM1和LC3II/LC3I的表达。此外,在体内外模型中,Sal促进了PINK1和Parkin的表达,这表明Sal可能通过经典的PINK1-Parkin信号通路介导的泛素依赖途径促进线粒体自噬。

目前本研究还有几个局限性。在自噬中,主要由4个过程组成,包括:(1)受损的线粒体去极化并失去膜电位;(2)线粒体被自噬体包裹形成线粒体自噬体;

(3)线粒体自噬体与溶酶体融合;(4)线粒体内容物被溶酶体降解^[15]。而本研究仅使用了CQ这一种自噬抑制剂,没有深入探讨Sal具体调控自噬的确切阶段,这也可能导致CQ没有有效抑制Sal引起的细胞粒体膜电位上升。其次,尽管在体内外证明了Sal增加了缺血再灌注后内皮细胞线粒体中PINK1和Parkin的表达,但应进一步检测非泛素依赖途径相关蛋白,探讨与Sal诱导的PINK1和Parkin表达相关的分子途径。

总之,本研究证明了Sal对OGD/R处理的CoECs和MIRI模型小鼠冠状动脉内皮具有保护作用。其机制可能与抑制氧化应激和促进线粒体自噬有关。Sal对线粒体的影响是多层次的;一方面,Sal通过消除ROS减轻了线粒体损伤;另一方面,Sal通过线粒体自噬促进受损线粒体的清除,以维持线粒体稳态。因此,Sal预防缺血再灌注后内皮损伤是一种有前途且有效的治疗策略。

参考文献:

- [1]王乃康,郝建红,罗振国.缺血再灌注诱导内皮细胞损伤相关机制与治疗的研究进展[J].医学综述,2022,28(8):1568-1572.
- [2]MAGANI S K J, MUPPARTHI S D, GOLLAPALLI B P, et al. Salidroside - Can it be a multifunctional drug?[J]. Curr Drug Metab, 2020, 21(7): 512-524.
- [3]黄壮伟,吴格怡,黄心蔚.红景天苷调控炎症反应及氧化应激机制对慢性间歇性缺氧大鼠心功能的保护作用[J].中国医药,2022,17(9):1338-1342.
- [4]TOMBOR L S, DIMMELER S. Why is endothelial resilience key to maintain cardiac health? [J]. Basic Res Cardiol, 2022, 117(1): 35.
- [5]ABASSI Z, ARMALY Z, HEYMAN S N. Glycocalyx degradation in ischemia-reperfusion injury[J]. Am J Pathol, 2020, 190(4): 752-767.
- [6]HEUSCH G. Myocardial ischaemia-reperfusion injury and cardioprotection in perspective[J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17(12): 773-789.
- [7]ABATE M, FESTA A, FALCO M, et al. Mitochondria as playmakers of apoptosis, autophagy and senescence[J]. Semin Cell Dev Biol, 2020, 98:139-153.
- [8]黄士蒙,李小妹,蒋振雄,等.线粒体自噬及生物发生与微血管缺血再灌注损伤关系的研究进展[J].中华实用诊断与治疗杂志,2024,38(3):304-307.
- [9]马聪聪,刘洋,吕洋,等.线粒体自噬在心肌缺血/再灌注损伤中的作用研究进展[J].基础医学与临床,2023,43(11):1723-1727.
- [10]ZHOU H, DAI Z, LI J, et al. TM6IM6 prevents VDAC1 multimerization and improves mitochondrial quality control to

- reduce sepsis-related myocardial injury[J]. Metabolism, 2023, 140: 155383.
- [11] GU C, LI L, HUANG Y, et al. Salidroside ameliorates mitochondria-dependent neuronal apoptosis after spinal cord ischemia-reperfusion injury partially through inhibiting oxidative stress and promoting mitophagy[J]. Oxid Med Cell Longev, 2020, 2020: 3549704.
- [12] WANG K, ZHANG D L, LONG B, et al. NFAT4-dependent miR-324-5p regulates mitochondrial morphology and cardiomyocyte cell death by targeting Mtf1[J]. Cell Death Dis, 2015, 6(12): e2007.
- [13] 王明明. 基于NLRP3 探讨红景天苷抑制 AS 中泡沫细胞形成的机制研究[D]. 昆明: 云南中医学院, 2018.
- [14] 邢莎莎. 红景天苷改善血管内皮功能及其抗动脉粥样硬化的作用与分子机制[D]. 武汉: 华中科技大学, 2015.
- [15] LU Y, LI Z, ZHANG S, et al. Cellular mitophagy: Mechanism, roles in diseases and small molecule pharmacological regulation[J]. Theranostics, 2023, 13(2): 736-766.
- (责任编辑: 林加西)

《广东医科大学学报》征稿启事

《广东医科大学学报》(CN 44-1731/R, ISSN 2096-3610)创刊于1983年,双月刊,为广东省教育厅主管、广东医科大学主办的综合性医学学术刊物,国内外公开发行,是中国核心期刊(遴选)数据库收录期刊、中国学术期刊综合评价数据库统计源期刊和中国期刊全文数据库全文收录期刊。

《广东医科大学学报》现设特邀综述、学术专题、基础研究、临床研究等栏目。为提升本刊的学术影响力,充分发挥学术期刊的导向功能,本刊还将推出衰老与老年医学、过敏性疾病的机制与干预、医学人文、医工融合、海洋医药、结核病的防治、呼吸性疾病防治、中医药等学术专题。现特向医学相关专业领域的研究人员征集稿件,除上述专题外,医学各学科领域的论文均欢迎投稿。来稿要求注重创新性、科学性、先进性及实用性,论点明确,文字精练,数据可靠,结构严密,文理通顺。请通过《广东医科大学学报》网站投稿(<https://gdykdx.xb.ijournals.cn/ch/index.aspx>)。

本刊编辑部