

牡荆素调节自噬与自噬流介导缺氧复氧大鼠 原代心肌细胞的保护作用

胡景春^{1,2}, 唐虹¹, 薛威¹, 江勤¹, 张骏艳¹, 董六一¹

摘要 目的 探讨牡荆素调节自噬与自噬流介导缺氧复氧大鼠原代心肌细胞的保护作用。方法 采用原代心肌细胞缺氧/复氧(H/R)模拟缺血再灌注损伤。CCK-8检测心肌细胞的活力。试剂盒检测心肌细胞上清液中乳酸脱氢酶(LDH)水平。2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐(DCFH-DA)检测原代心肌细胞中活性氧(ROS)的水平。自噬双标记腺病毒(mRFP-GFP-LC3)转染原代心肌细胞,观察自噬小体和自噬溶酶体数量。Western blot检测LC3B II/I、Beclin1、P62蛋白的表达。结果 大鼠原代心肌细胞缺氧复氧后,H/R组心肌细胞活力显著降低,LDH漏出增多,心肌细胞内ROS水平明显升高,而牡荆素各剂量组可提高缺氧复氧心肌细胞活力,抑制心肌细胞的LDH释放,降低心肌细胞中ROS水平。心肌细胞转染mRFP-GFP-LC3病毒后,检测结果显示,与正常对照组比较,H/R组心肌细胞出现明显的自噬和自噬流增强,而牡荆素各剂量组可抑制心肌细胞H/R后的自噬和自噬流增强,减少心肌细胞内自噬小体的累积。另外,Western blot结果显示,与正常对照组比较,H/R组原代心肌细胞中自噬蛋白Beclin1、LC3 II蛋白表达增加,LC3 II/I比值增大,而P62蛋白表达下调。与H/R组比较,牡荆素各剂量组均不同程度抑制Beclin1上调,降低LC3 II蛋白表达,LC3 II/I的比值减小,同时上调P62蛋白表达。结论 牡荆素对大鼠原代心肌细胞H/R损伤有明显的保护作用,其机制可能与其抑制心肌细胞H/R后ROS产生,抑制自噬和自噬流增强,减少心肌细胞自噬体累积,防止过度自噬有关。

关键词 牡荆素; 缺氧/复氧; ROS; 自噬; 自噬流

中图分类号 R 965.1

文献标志码 A **文章编号** 1000-1492(2020)08-1174-06
doi: 10.19405/j.cnki.issn1000-1492.2020.08.005

心血管疾病已成为近年来人类死亡的最主要杀手之一,研究心血管疾病的发病机制与药物开发已

成为当前热点课题。在心血管疾病中,心肌缺血再灌注损伤因其具有高发病率、高致死率等而严重影响心血管疾病的健康。已有文献报道^[1-2],心肌缺血再灌注损伤机制复杂、牵涉途径广,如氧化应激、自噬、凋亡以及能量代谢障碍等。牡荆素是从山楂叶中提取分离的有效单体成分^[3],课题组前期研究表明牡荆素具有抗氧化、抑制凋亡和保护心脑血管缺血等作用^[4-5],但其抗缺血再灌注损伤的机制仍不明确。该研究旨在前期研究的基础上通过制备大鼠原代心肌细胞缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation,H/R)模型,探讨牡荆素是否通过抑制自噬和自噬流途径介导原代心肌细胞缺氧复氧损伤的保护作用,并初步分析牡荆素潜在的抗心肌细胞缺氧复氧损伤的作用机制,为临床应用提供新思路 and 实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物 SPF级SD大鼠乳鼠(出生24 h)共30只,购自安徽医科大学省级实验动物中心,生产许可证号:SCXK(皖)2017-001。

1.2 药品与试剂 牡荆素(冻干粉针剂,30 mg/瓶,批号20171215,纯度99.5%,购自合肥七星医药科技有限公司,常温保存,临用前稀释成所需浓度);DMEM/F12购自美国Gibco公司;II型胶原酶购自美国Sigma公司;Cellmax胎牛血清购自北京赛澳美细胞技术有限公司;胰蛋白酶购自美国Gibco公司;细胞裂解液购自江苏碧云天生物技术公司;吐温-20购自美国Sigma公司;青-链霉素(双抗)购自江苏碧云天生物技术公司;磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution,PBS)购自北京中杉金桥有限公司;LDH试剂盒、CCK-8试剂盒和DCFH-DA试剂盒购自凯基生物科技有限公司;RIPA蛋白裂解液、BCA蛋白浓度测定试剂盒和SDS-PAGE蛋白上样缓冲液(5×)购自江苏碧云天生物技术公司;PMSF购自美国Sigma公司;SDS-PAGE凝胶配制试剂盒购自上海雅酶生物科技有限公司;预染蛋白Marker购自美国Thermo Fisher Scientific公司;PVDF膜购自美国Millipore公司;β-actin抗体购自北京中杉金桥生物

2020-04-17 接收

基金项目: 国家自然科学基金(编号:81470432);安徽省高校自然科学基金(编号:KJ2019A0226)

作者单位: 安徽医科大学药理学教研室,合肥 230032

安徽医科大学第三附属医院急救部,合肥 230061

作者简介: 胡景春,男,副主任医师;

董六一,男,教授,博士生导师,责任作者,E-mail: dongly@ahmu.edu.cn

张骏艳,女,副教授,硕士生导师,责任作者,E-mail: zjy404.student@sina.com

技术有限公司; LC3B 抗体、Beclin1 抗体、P62 抗体购自英国 Abcam 公司; 辣根酶标记山羊抗兔 IgG 购自北京中杉金桥生物技术有限公司; 自噬双标腺病毒购自上海汉恒生物科技有限公司。

1.3 主要仪器 HH-4 数据恒温水浴锅购自江苏常州国华电器有限公司; BX-51 型荧光正置显微镜购自日本 Olympus Corporation 公司; NW10UF 超纯水机购自上海康雷分析仪器有限公司; TGL-16R 高速冷冻离心机购自珠海黑马医学仪器有限公司; SpectraMax190 全波长酶标仪购自美国 Molecular Devices 公司; 制冰机购自常熟雪科电器有限公司; 电泳仪和转移槽购自美国 BIO-RAD 公司; JA1203A 电子天平购自上海精天电子仪器有限公司; WD-9405B 水平摇床购自北京市六一仪器厂; Bioshine ChemiQ4600 荧光及化学发光成像系统购自上海欧翔科学仪器有限公司。

1.4 实验方法

1.4.1 大鼠原代心肌细胞培养 取 24 h 内新生出的 SD 乳鼠 10 只, 先将乳鼠颈部剪一道小口排出血液(防干扰后续操作); 将乳鼠浸于 75% 的乙醇中约 75 s 后取出, 于超净台中迅速取出乳鼠心脏置于装有 D-Hank 液的培养皿中, 此操作在冰浴上进行; 将剪下的乳鼠心脏在 D-Hank 液中清洗 2~3 次并剪去多余的组织, 然后将其转移至青霉素瓶中剪碎, 大小约为 1 mm × 1 mm × 1 mm; 加入适量的 D-Hank 液洗去残留的血液, 静置弃去上清液; 加入适量的混合酶, 将组织块转移至 15 ml 的离心管中, 置于 37 °C 的水浴锅中水浴消化 15 min; 待消化结束后取出离心管, 弃去上清液, 加入适量的完全培养基吹打混匀, 静置, 将上清液转移至干净的离心管中; 加入适量的 D-Hank 液吹打混匀后静置弃去上清液; 重复上述操作步骤两次; 将 3 次消化后得到的上清液用 200 目的细胞筛过滤, 将过滤后的上清液置于培养皿中于 5% CO₂ 37 °C 恒温培养箱中差速贴壁培养 1.5 h; 待培养结束后, 取出培养皿, 将上清液转移至培养瓶中, 加入终浓度为 0.1 mmol/L 5-溴脱氧尿嘧啶核苷(5-bromo-2-deoxyUridine, Brdu) 溶液抑制成纤维细胞的生长, 再置于 5% CO₂ 37 °C 恒温培养箱中培养 24 h 后进行首次换液。

1.4.2 H/R 模型的建立 将细胞接种在培养瓶中待其生长至 90% 左右时, 按照分组加入含有合适浓度药物的培养基, 然后置于 5% CO₂ 37 °C 恒温培养箱中培养 1 h; 待培养结束后取出培养瓶, 弃去含药培养基, 用 PBS 清洗 1 次, 再加入预先配制好的缺

氧液, 再将其放入含 95% N₂ 和 5% CO₂ 的三气培养箱中进行缺氧 5 h, 缺氧时间结束后将缺氧液换成正常的完全培养基再置于 5% CO₂ 37 °C 恒温培养箱中培养 1 h。

1.4.3 CCK-8 检测原代大鼠心肌细胞活力 用胰酶消化收集对数生长时期的细胞悬液, 取合适浓度的细胞悬液加入 96 孔板中, 每孔加入 200 μl, 待其长至 90% 左右后造模; 结束后向每孔加入 10 μl CCK-8 溶液; 将培养板在培养箱内孵育 1~4 h; 用酶标仪测定在 450 nm 处的吸光度。

1.4.4 LDH 检测 用胰酶消化收集对数生长时期的细胞悬液, 取合适浓度的细胞悬液加入 96 孔板中, 每孔加入 200 μl, 每组设置 6 个复孔, 待其长至 90% 左右后造模, 结束后吸取每孔上清液进行 LDH 测定。

1.4.5 DCFH-DA 检测细胞内活性氧(reactive oxygen species, ROS) 水平 用胰酶消化收集对数生长时期的细胞悬液, 取合适浓度的细胞悬液加入 24 孔板中, 每孔加入 500 μl; 待其长至 90% 左右造模, 结束后加入 DCFH-DA 溶液, 孵育 0.5 h 后拍照观察。

1.4.6 自噬双标腺病毒转染原代心肌细胞 将生长状态良好的原代心肌细胞接种到 24 孔板中, 并且使细胞浓度在 1 × 10⁵/ml 左右, 待其长至 50%~70% 时, 加入 mRFP-GFP-LC3, 感染 2 h 后将培养基换成正常的培养基继续培养, 待病毒感染 24 h 后可以观察到 GFP 以及 RFP 的表达情况。48 h 后先用药物孵育 1 h 后再进行 H/R 模型的建立, 待造模结束后将细胞进行固定以及封片, 最后进行拍照分析。

1.4.7 Western blot 检测相关蛋白表达水平 采用 Western blot 分别检测大鼠缺血再灌注损伤心脏中 LC3B II / I、Beclin 1 与 P62 蛋白表达的变化。用 Bioshine ChemiQ 4600 荧光及化学发光成像系统显影, 用 Image J 图像分析软件分析, 计算蛋白条带的灰度值。

1.5 统计学处理 实验所得数据均用 SPSS 18.0 分析, 实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间数据比较采用单因素方差分析, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 牡荆素对大鼠原代心肌细胞活力的影响 对原代心肌细胞正常培养后, 观察不同浓度牡荆素(1、3、10、30、50、100、300、500 μmol/L) 对其细胞活力的影响, 结果显示, 不同浓度的牡荆素与心肌细胞

共同培养 24 h 后 3、10、30 $\mu\text{mol/L}$ 牡荆素可提高心肌细胞的活力,随着牡荆素浓度的增加心肌细胞活力降低,但与正常对照组比较差异无统计学意义,结果见图 1。

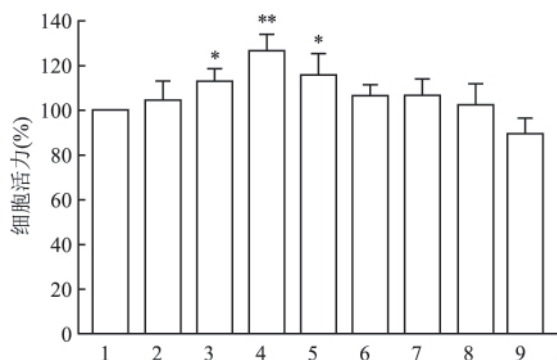
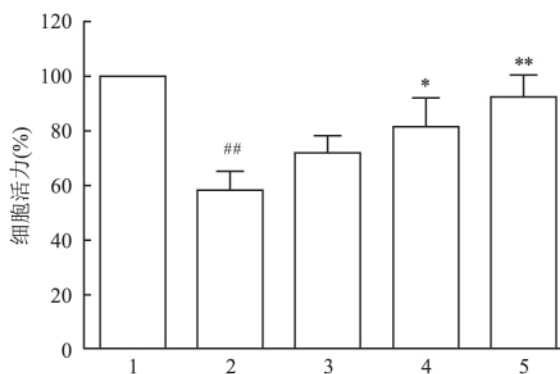


图1 牡荆素对正常培养大鼠原代心肌细胞活力的影响($n=6$)

1: 正常对照组; 2: 牡荆素 1 $\mu\text{mol/L}$; 3: 牡荆素 3 $\mu\text{mol/L}$; 4: 牡荆素 10 $\mu\text{mol/L}$; 5: 牡荆素 30 $\mu\text{mol/L}$; 6: 牡荆素 50 $\mu\text{mol/L}$; 7: 牡荆素 100 $\mu\text{mol/L}$; 8: 牡荆素 300 $\mu\text{mol/L}$; 9: 牡荆素 500 $\mu\text{mol/L}$; 与正常对照组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

2.2 牡荆素对 H/R 损伤心肌细胞活力和 LDH 释放



放量的影响 与正常对照组比较, H/R 组原代心肌细胞活力降低为 $(58.02 \pm 6.71)\%$ ($F = 20.91$, $P < 0.01$), LDH 释放量增多为 (0.81 ± 0.06) ($F = 53.62$, $P < 0.01$), 提示心肌细胞损伤加重; 与 H/R 组比较, 牡荆素 3、10 $\mu\text{mol/L}$ 给药组可明显提高 H/R 后心肌细胞活力, 抑制心肌细胞 LDH 的释放。结果见图 2。

2.3 牡荆素对 H/R 损伤心肌细胞内 ROS 水平的影响 DCFH-DA 检测结果显示, 与正常对照组比较, 缺氧复氧诱导后 H/R 组心肌细胞内 ROS 水平明显上升, 其相对荧光密度值为 (3.28 ± 0.45) ($F = 63.97$, $P < 0.01$); 与 H/R 组比较, 牡荆素 3、10 $\mu\text{mol/L}$ 给药组可明显抑制 H/R 后心肌细胞内 ROS 的产生。结果见图 3。

2.4 牡荆素对 H/R 损伤后心肌细胞自噬及自噬流的影响 mRFP-GFP-LC3 结果显示, 与正常对照组比较, 缺氧复氧诱导后 H/R 组心肌细胞出现明显的自噬和自噬流增强, 并且心肌细胞 LC3 II 蛋白表达增加 ($F = 16.11$, $P < 0.01$), LC3 II / I 比值增大, 提

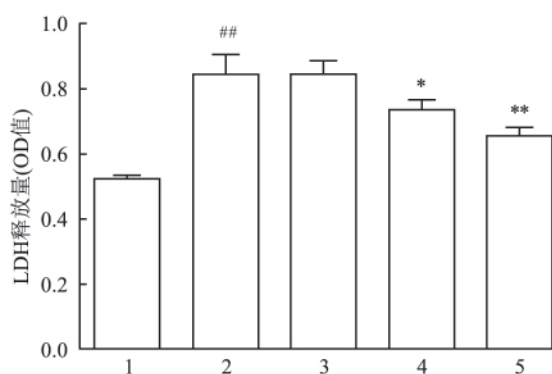


图2 牡荆素对 H/R 损伤心肌细胞活力和 LDH 释放量的影响($n=6$)

1: 正常对照组; 2: H/R 组; 3: 牡荆素 1 $\mu\text{mol/L}$; 4: 牡荆素 3 $\mu\text{mol/L}$; 5: 牡荆素 10 $\mu\text{mol/L}$; 与正常对照组比较: ## $P < 0.01$; 与 H/R 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

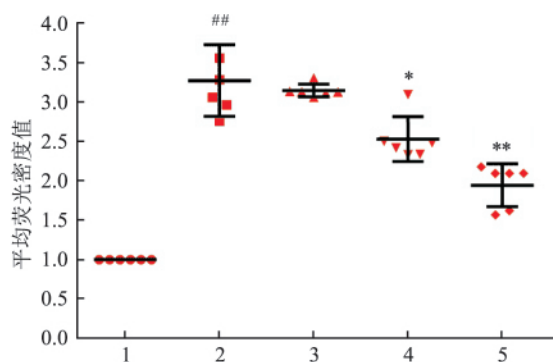
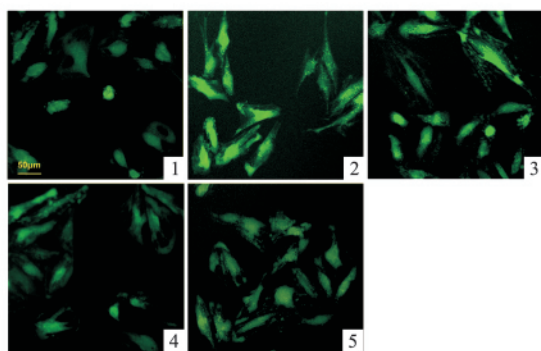
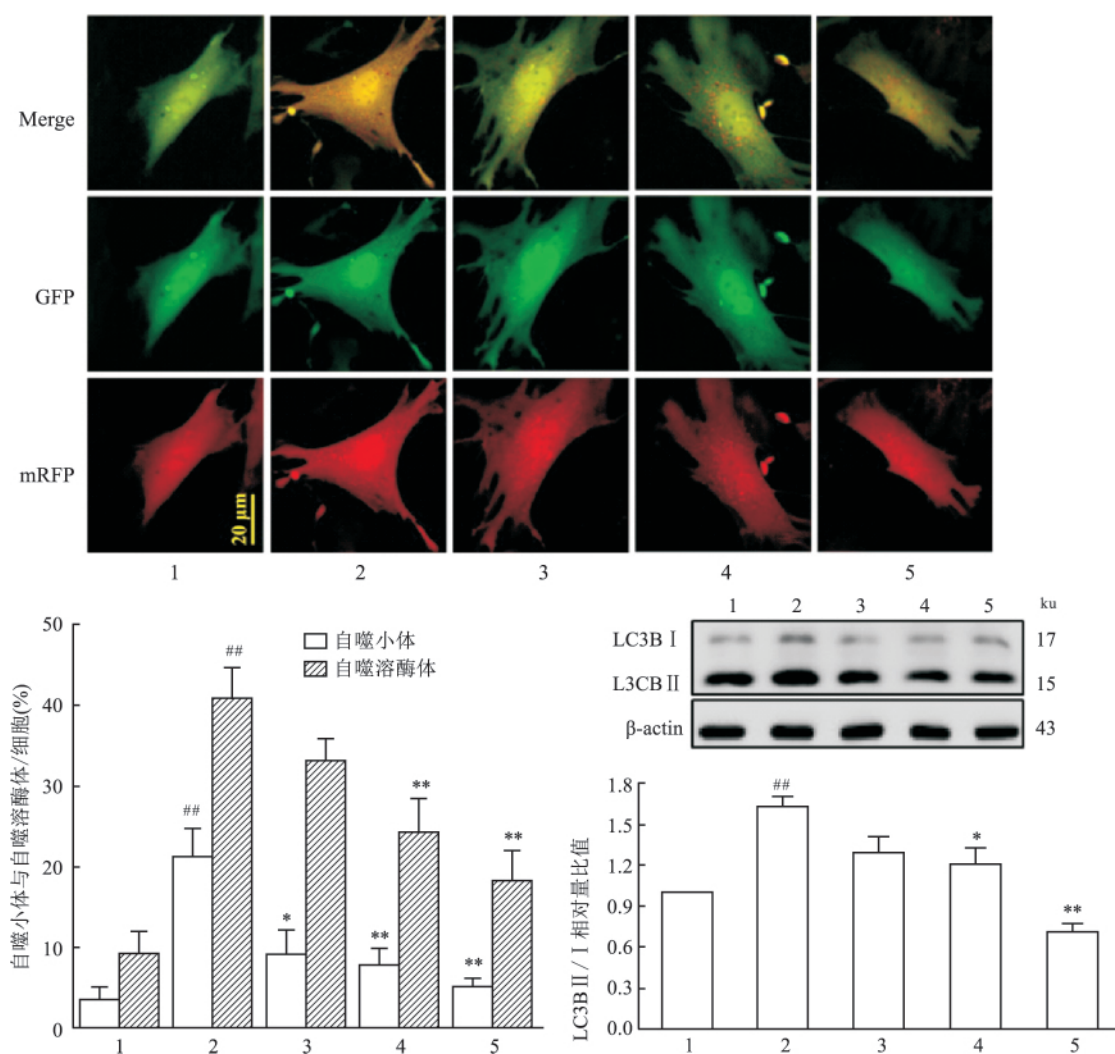


图3 牡荆素对 H/R 损伤心肌细胞内 ROS 水平的影响($n=6$)

1: 正常对照组; 2: H/R 组; 3: 牡荆素 1 $\mu\text{mol/L}$; 4: 牡荆素 3 $\mu\text{mol/L}$; 5: 牡荆素 10 $\mu\text{mol/L}$; 与正常对照组比较: ## $P < 0.01$; 与 H/R 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图4 牡荆素对H/R损伤后心肌细胞自噬及自噬流的影响($n=4$)

1: 正常对照组; 2: H/R 组; 3: 牡荆素 1 μmol/L; 4: 牡荆素 3 μmol/L; 5: 牡荆素 10 μmol/L; 与正常对照组比较: # $P < 0.01$; 与 H/R 组比较:

* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

示 H/R 后心肌细胞中自噬小体累积增加, 自噬溶酶体随之增多; 而牡荆素各剂量组可抑制 H/R 后心肌细胞的自噬和自噬流增强, LC3 II 蛋白表达减少, LC3 II / I 比值减小, 心肌细胞内自噬小体的累积受抑制。结果见图 4。

2.5 牡荆素对 H/R 损伤后心肌细胞自噬相关蛋白表达的影响 Western blot 结果显示, 与正常对照组比较, 缺氧复氧诱导后 H/R 组心肌细胞中自噬蛋白 Beclin 1 上调 ($F=9.14$, $P < 0.01$)、而 P62 蛋白表达降低 ($F=10.96$, $P < 0.01$)。与 H/R 组比较, 牡荆素给药组可抑制 H/R 后心肌细胞 Beclin 1 蛋白表达, 同时上调 P62 蛋白表达, 结果见图 5。

3 讨论

心血管疾病是当今严重威胁人类健康的主要杀

手, 其发病率和死亡率均占据首位^[6]。深入研究其病理生理机制以及寻找有效的防治药物是一项紧迫的课题。牡荆素是一种天然的类黄酮化合物, 是从干燥的山楂叶中提取分离的有效单体成分, 具有许多重要的生物学活性^[7-8]。我们课题组前期研究发现牡荆素对心脑血管具有保护作用^[4-5, 9], 但对其保护作用机制仍不清楚。本实验在前期研究基础上进一步探讨牡荆素对心肌细胞缺氧复氧损伤的潜在作用机制。心肌缺氧复氧时内源性 ROS 产生过度蓄积可导致细胞脂质过氧化损伤, 细胞膜和线粒体受损破坏, 细胞自噬增强, 进一步导致细胞凋亡、坏死。本实验结果发现, 在原代心肌细胞 H/R 模型上, 缺氧复氧诱导后心肌细胞活力下降、LDH 释放增多, ROS 水平升高, 而牡荆素可提高缺氧复氧心肌细胞活力, 抑制 LDH 的释放, 同时可抑制心肌细胞 ROS

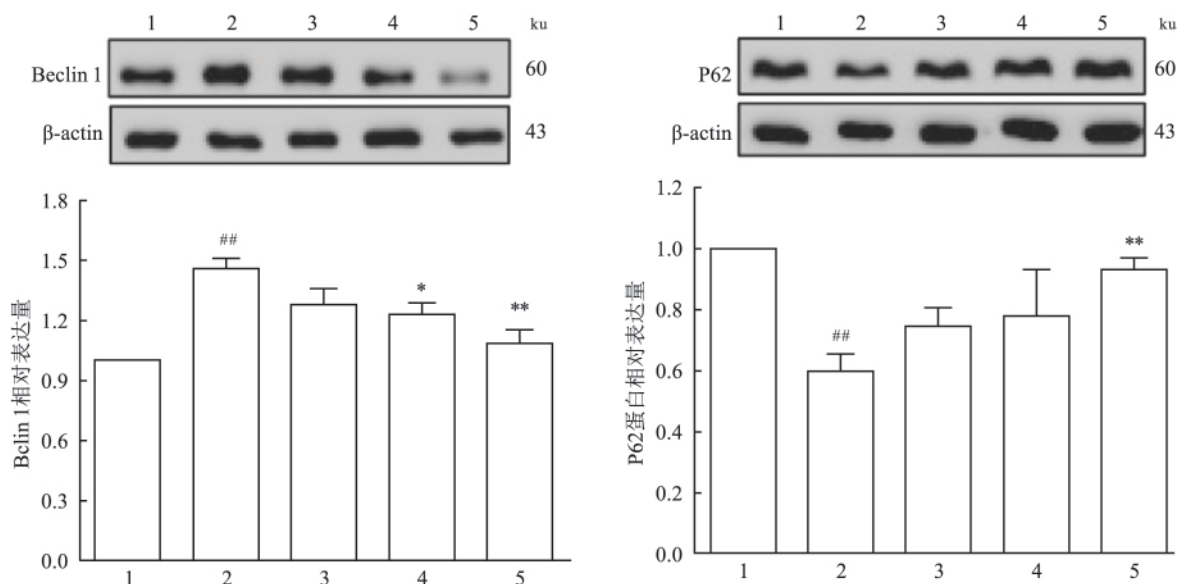


图5 牡荆素对 H/R 损伤后心肌细胞自噬相关蛋白表达的影响 (n=4)

1: 正常对照组; 2: H/R 组; 3: 牡荆素 1 $\mu\text{mol/L}$; 4: 牡荆素 3 $\mu\text{mol/L}$; 5: 牡荆素 10 $\mu\text{mol/L}$; 与正常对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与 H/R 组比较:

^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$

的产生。

自噬是细胞一种自我调节胞内代谢的过程,以实现细胞自我更新、促进生存和应对轻微应激,但过度应激可导致自噬增强,自噬体累积,并产生过度自噬而引发细胞自我消化死亡^[10-11]。Beclin1 是自噬起始阶段的关键调控蛋白,可促进自噬体膜形成,诱导自噬发生^[12-13]。LC3B 是一种特殊的蛋白质,其表达增加与自噬诱导有关,是自噬体形成的重要标志。P62 蛋白反映自噬活性,其可与自噬小体内膜上 LC3 II 形成复合物,被自噬溶酶体降解。过度自噬时 P62 蛋白不断被降解,自噬减弱时, P62 蛋白降解减少,胞质中蓄积增多。心肌缺血再灌注损伤是一种强应激反应,可能导致心肌细胞自噬增强,自噬体累积,自噬相关蛋白 Beclin1、LC3B 表达增加而产生过度自噬,导致细胞死亡^[14-15]。本研究结果显示,心肌细胞 H/R 后出现明显的自噬和自噬流增强,并且心肌细胞 LC3 II 蛋白表达增加, LC3 II / I 比值增大, Beclin1 蛋白表达上调, P62 蛋白表达降低,提示 H/R 后心肌细胞中自噬体累积增多,自噬溶酶体增加,加重细胞损伤。牡荆素可抑制 H/R 后心肌细胞的自噬和自噬流增强, LC3 II 蛋白表达减少, LC3 II / I 比值减小, Beclin1 蛋白表达减少, P62 蛋白表达增加,从而抑制心肌细胞内自噬体的累积,减轻心肌细胞的损伤。

参考文献

[1] Korayem A H, Mujica P E, Aramoto H, et al. Endothelial cAMP

deactivates ischemia-reperfusion-induced microvascular hyperpermeability via Rap1-mediated mechanisms [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2017, 313(1): H179-89.

- [2] Chen C, Chen W, Nong Z, et al. Cardioprotective effects of combined hyperbaric oxygen and diltiazem pretreatment on myocardial infarction injury in rats [J]. Cell Physiol Biochem, 2016, 38: 2015-29.
- [3] 王亚男, 彭成凤, 甄毅岚, 等. 注射用牡荆素与葛根素注射液抗大鼠心肌缺血/再灌注损伤量效关系的研究 [J]. 安徽医科大学学报, 2015, 50(3): 314-8.
- [4] Dong L Y, Li S, Zhen Y L, et al. Cardioprotection of vitexin on myocardial ischemia/reperfusion injury in rat via regulating inflammatory cytokines and MAPK pathway [J]. Am J Chin Med, 2013, 41(6): 1251-66.
- [5] Wang Y, Zhen Y, Wu X, et al. Vitexin protects brain against ischemia/reperfusion injury via modulating mitogen-activated protein kinase and apoptosis signaling in mice [J]. Phytomedicine, 2015, 22(3): 379-84.
- [6] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2018》概要 [J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-20.
- [7] He M, Min J W, Kong W L, et al. A review on the pharmacological effects of vitexin and isovitexin [J]. Fitoterapia, 2016, 115: 74-85.
- [8] Liu X, Jiang Q, Liu H, et al. Vitexin induces apoptosis through mitochondrial pathway and PI3K/Akt/mTOR signaling in human non-small cell lung cancer A549 cells [J]. Biol Res, 2019, 52(1): 7.
- [9] Xue W, Wang X, Tang H, et al. Vitexin attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by regulating mitochondrial dysfunction induced by mitochondrial dynamics imbalance [J]. Biomed Pharmacother, 2020, 124: 109849.

- [10] Eisenberg-Lerner A , Kimchi A. The paradox of autophagy and its implication in cancer etiology and therapy [J]. *Apoptosis* , 2009 , 14(4) : 376 – 91.
- [11] Przyklenk K , Dong Y , Undyala V V , et al . Autophagy as a therapeutic target for ischaemia/reperfusion injury concepts , controversies , and challenges [J]. *Cardiovasc Res* , 2012 , 94(2) : 197 – 205.
- [12] Fukui M , Yamabe N , Choi HJ , et al. Mechanism of ascorbate-induced cell death in human pancreatic cancer cells: role of Bcl-2 , Beclin 1 and autophagy [J]. *Planta Med* , 2015 , 81 (10) : 838 – 46.
- [13] 张奇龙 薛 威 徐博涵 等. 二苯乙烯苷减轻小鼠急性脑缺血再灌注后的氧化应激损伤及其对自噬的影响 [J]. *安徽医科大学学报* 2019 , 54(8) : 1232 – 6.
- [14] Mintern J D , Macri C , Chin W J , et al. Differential use of autophagy by primary dendritic cells specialized in cross-presentation [J]. *Autophagy* 2015 , 11(6) : 906 – 17.
- [15] Huang R , Liu W. Identifying an essential role of nuclear LC3 for autophagy [J]. *Autophagy* , 2015 , 11(5) : 852 – 3.

Protective effect and mechanism of vitexin on rat primary cardiomyocytes induced by hypoxia/reoxygenation injury via regulating autophagy and autophagic flow

Hu Jingchun^{1 2} , Tang Hong¹ , Xue Wei¹ , et al

(¹Dept of Pharmacology , Anhui Medical University , Hefei 230032;

²Dept of Emergency , The Third Affiliated Hospital of Anhui Medical University , Hefei 230061)

Abstract Objective To investigate protective effect and mechanism of vitexin on rat primary cardiomyocytes induced by hypoxia/reoxygenation injury via regulating autophagy and autophagic flow. **Methods** Hypoxia/reoxygenation (H/R) of primary cardiomyocytes was used to simulate ischemia-reperfusion injury. The viability of cardiomyocytes was tested by CCK8. LDH levels in cardiomyocyte supernatant were detected by kit. ROS levels were detected by DCFH-DA fluorescent probe. Primary cardiomyocytes were infected with mRFP-GFP-LC3 , and the number of Autophagolysosomes and autophagosomes was evaluated. Beclin1 , LC3 II / I and P62 protein expression were detected by Western blot. **Results** After hypoxia and reoxygenation (H/R) of primary cardiomyocytes , the LDH value of primary cardiomyocytes in the H/R group was significantly higher than that in the control group , and the ROS level significantly increased , the doses of vitexin could significantly inhibit the release of LDH from H/R cardiomyocytes and reduce the ROS level in cardiomyocytes. The primary cardiomyocytes were transfected with mRFP-GFP-LC3 virus , and the results showed that compared with the control group , the cardiomyocytes in the H/R group showed significant enhancement of autophagy and autophagy flow. suggesting that autophagosomes accumulated in myocardial cells after H/R , and autophagolysosomes increased accordingly; The vitexin dose groups could inhibit autophagy and increase autophagy flow in cardiomyocytes after H/R , and reduce the accumulation of autophagosomes in cardiomyocytes. In addition , Western blot results showed that compared with the normal control group , the expression of autophagy proteins Beclin 1 , and LC3 II in primary myocardial cells of the H/R group increased , and the ratio of LC3 II / I increased , P62 protein in cardiomyocytes was down regulated; Compared with the H/R group , vitexin inhibited Beclin 1 up-regulation and decreased the expression of LC3 II protein , the ratio of LC3 II / I reduced , and the expression of P62 protein also increased in cardiomyocytes. **Conclusion** Vitexin has a significant protective effect on H/R injury in rat primary myocardial cells , and its mechanism may be related to the inhibition of ROS production , autophagy and autophagic flow enhancement , and the accumulation of autophagosomes after H/R in myocardial cells.

Key words vitexin; hypoxia/reoxygenation; reactive oxygen species; autophagy; apoptosis