

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; 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 $\mu\text{mol/L}$ 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、LC3BII 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、LC3BII 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 R363.1

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-

2025-10-17 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

cal 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 APExBIO 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), CO_2 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、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 Mito-Carta 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% O_2 , 5% CO_2 , 92% N_2 , 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% CO_2 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 $\mu\text{mol/L}$ 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 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 1×10^5 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 $\mu\text{mol/L}$)。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 $2^{\Delta\Delta\text{CT}}$ 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: AGCAGCGGCACCGAAGAG
P62	F: GAGTCGGATAACTGTTCAGGAGG R: CTTCGGATTCTGGCATCTGTAGGG
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)、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。

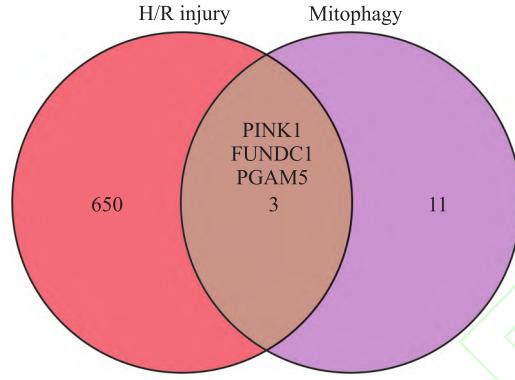


图1 线粒体自噬与H/R相关基因取交集

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。

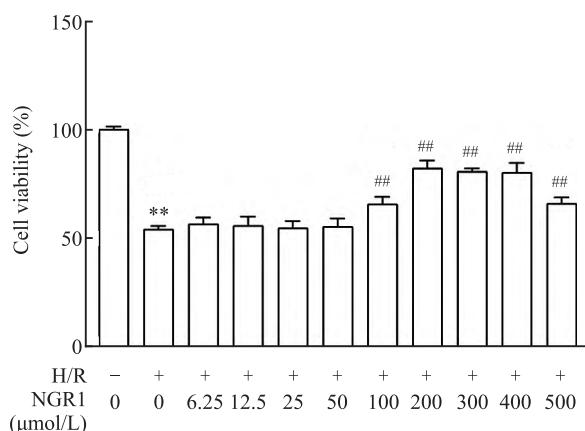


图2 CCK-8检测NGR1对H/R AC16细胞的影响

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、LC3BII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、LC3BII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。

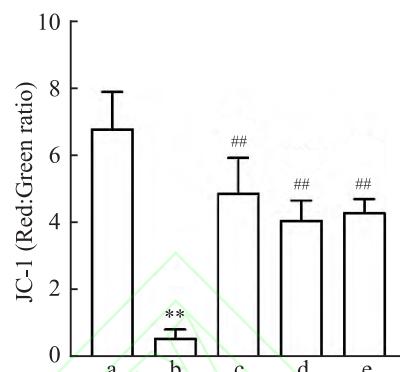
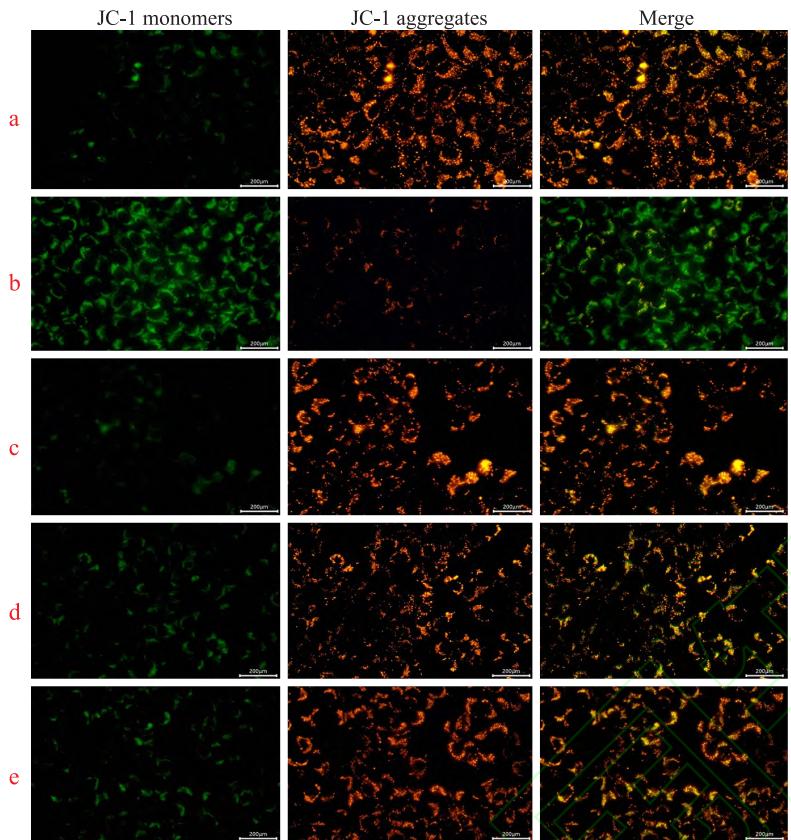


图3 不同浓度的NGR1对H/R后AC16细胞线粒体膜电位的影响 $\times 400$

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

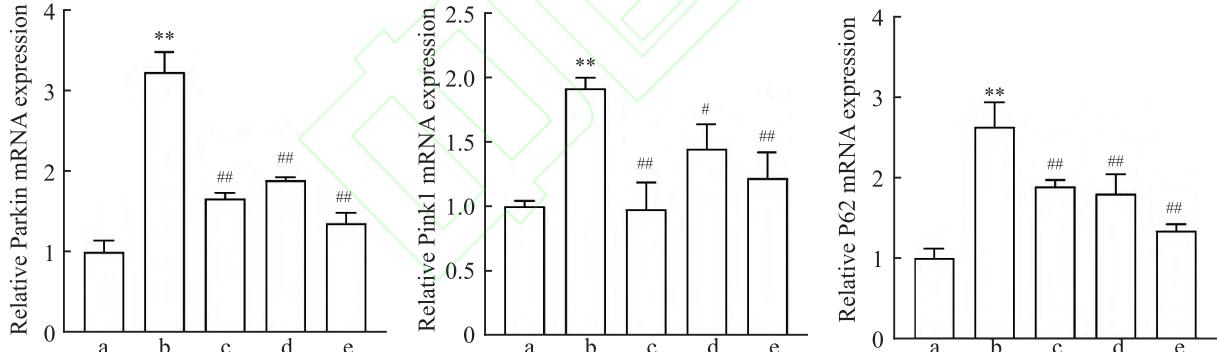


图4 不同浓度的NGR1对H/R后AC16细胞的Parkin、Pink1、P62的mRNA表达情况

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 $\mu\text{mol/L}$ 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.

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 $\mu\text{mol/L}$ 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

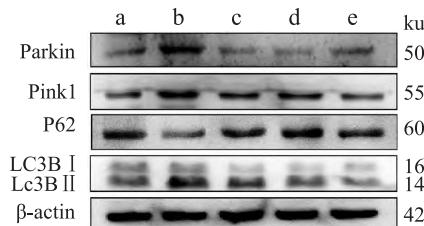


图5 不同浓度的NGR1对H/R后AC16细胞的Parkin、Pink1、P62、LC3BII蛋白表达的影响

Fig. 5 The protein expression of Parkin, Pink1, P62 and LC3BII in AC16 cells after H/R under different concentrations of NGR1

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

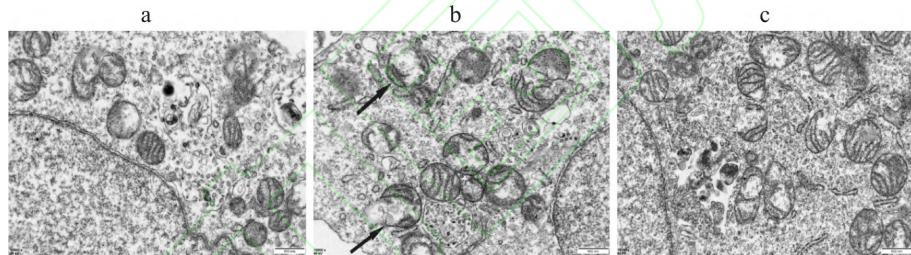
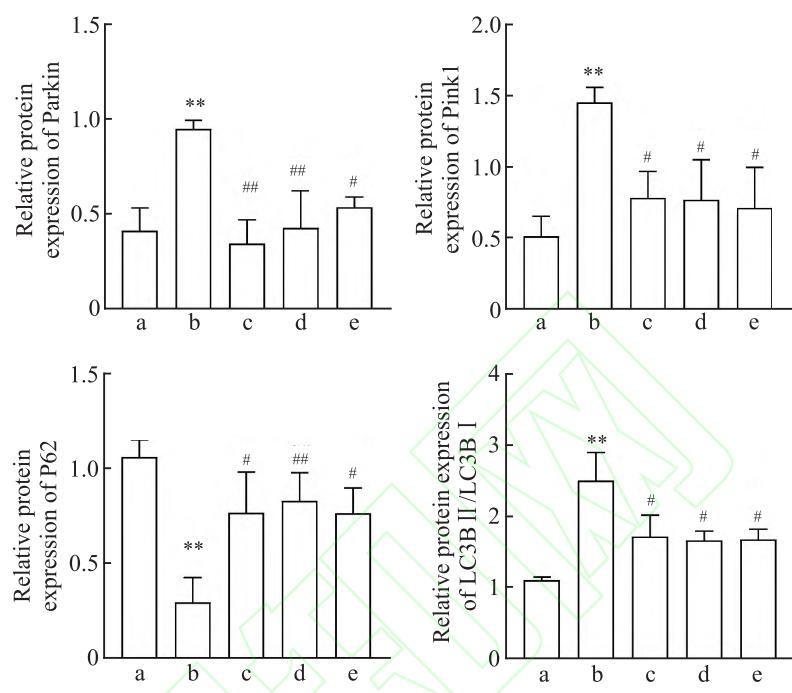


图6 NGR1对H/R后AC16细胞线粒体超微结构的影响 $\times 10000$

Fig. 6 The effects of NGR1 on the ultrastructure of mitochondrial in AC16 cells after hypoxia/reoxygenation $\times 10000$

a: Control group; b: H/R group; c: H/R+NGR1 200 μ mol/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、LC3BII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.bbadi.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.gszu.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.gszu.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.bioph.2024.116337.

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 μ 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 μ mol/L). Mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) 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 LC3BII) 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 μ 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 LC3BII 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 LC3BII 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