

## 黄芪甲苷通过调节线粒体稳态减轻大鼠心肌细胞缺氧复氧损伤

刘啊敏<sup>1#</sup>, 牟幼灵<sup>2#</sup>, 徐紫薇<sup>2</sup>, 刘 骞<sup>2\*</sup>

(1. 浙江大学医学院附属第二医院临床研究中心, 浙江 杭州 310009; 2. 浙江中医药大学药学院, 浙江 杭州 311402)

**摘要:** 探讨黄芪甲苷对缺氧复氧损伤大鼠心肌细胞及线粒体形态和功能的影响及机制。大鼠心肌细胞H9c2分为正常对照组、缺氧复氧组和黄芪甲苷组。CCK-8 (cell counting kit-8) 法检测细胞活力; 酶标法检测细胞培养液上清乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 活性、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 活性、谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 含量和丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 含量; DHE (dihydroethidium) 和MitoSOX 荧光探针法检测细胞和线粒体活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 含量; JC-1 荧光探针法检测线粒体膜电位; calcein-AM (acetoxymethyl ester) 荧光探针法检测线粒体通透性转换孔开放性; TUNEL (terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling) 法检测细胞凋亡率; Western blot 法检测线粒体分裂/融合蛋白 Drp1 (dynamin-related protein 1)、Mfn1 (mitofusin1) 和 Mfn2, 以及细胞凋亡蛋白 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)、Bax 和 cleaved caspase (cysteine-aspartic protease)-3 的表达量。与正常对照组相比, 缺氧复氧损伤造成H9c2细胞活力、SOD活性和GSH含量显著降低, LDH漏出量和细胞MDA含量明显增加; 细胞和线粒体ROS含量显著增加; 线粒体膜电位去极化, 伴随线粒体通透性转换孔显著开放; 线粒体分裂蛋白表达量上调, 融合蛋白表达量下调; 细胞凋亡蛋白量及凋亡率显著增加。黄芪甲苷 (100  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 预处理可显著改善缺氧复氧造成的H9c2细胞损伤、线粒体形态改变和功能障碍。此外, 在大鼠原代心肌细胞上也验证了黄芪甲苷抗缺氧复氧损伤的作用。动物福利和实验过程均遵循浙江中医药大学动物伦理委员会的规定。结果表明, 黄芪甲苷可能通过调节线粒体形态动态稳定维持线粒体正常功能, 抑制ROS过度合成, 改善氧化应激内环境并减轻细胞凋亡, 从而发挥抗心肌细胞缺氧复氧损伤作用。

**关键词:** 黄芪甲苷; 心肌细胞; 缺氧复氧损伤; 线粒体稳态; 细胞凋亡

中图分类号: R285.5 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2020)10-2398-07

## Astragaloside IV ameliorates hypoxia/reoxygenation injury via regulating mitochondrial homeostasis in rat cardiomyocytes

LIU A-min<sup>1#</sup>, MOU You-ling<sup>2#</sup>, XU Zi-wei<sup>2</sup>, LIU Qian<sup>2\*</sup>

(1. Clinical Research Center of the Second Affiliated Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, Hangzhou 310009, China; 2. College of Pharmaceutical Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311402, China)

**Abstract:** This study was designed to investigate the effect and mechanism of astragaloside IV (ASIV) on mitochondrial morphology and function of rat cardiomyocytes under hypoxia/reoxygenation injury. H9c2 cells were divided into control group, hypoxia/reoxygenation (H/R) group, and H/R + ASIV group. Cell viability and lactate dehydrogenase (LDH) leakage were measured by cell counting kit-8 (CCK-8) and LDH assay kit, respectively. Oxidative stress levels, such as superoxide dismutase (SOD), glutathione (GSH), and malondialdehyde

收稿日期: 2020-06-17; 修回日期: 2020-07-21.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81903830); 浙江省中医药优秀青年人才基金资助项目 (2018ZQ014); 浙江省教育厅一般科研项目 (Y201942309); 浙江省高等教育“十三五”第一批教学改革研究项目 (jg20180150); 浙江中医药大学中青年科研创新基金 (KC201910); 浙江中医药大学校级科研基金重点项目 (2018ZZ07).

#共同第一作者.

\*通讯作者 Tel / Fax: 86-571-61768136, E-mail: liuqian@zcmu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2020-1015

(MDA), were analyzed by commercial kits. Intracellular and mitochondrial reactive oxygen species (ROS) levels were detected by dihydroethidium (DHE) and MitoSOX. Changes of the mitochondrial membrane potential were detected using the fluorescent probe JC-1. Opening of mitochondrial permeability transition pore was examined *via* calcein acetoxymethyl ester (calcein-AM). Apoptosis was assessed using terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL) assay kit. To detect protein expression of dynamin-related protein 1 (Drp1), mitofusin1 (Mfn1), Mfn2, Bax, B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), and cleaved cysteine-aspartic protease (caspase)-3, Western blot analysis was carried out. Compared with the control group, ASIV ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) significantly improved H/R induced cell injury, LDH leakage, decrease of SOD activity, and GSH content, increase of MDA content and ROS content, loss of mitochondrial membrane potential, mitochondrial permeability transition pore opening, ROS production activation, mitochondrial fission/fusion imbalance, and cell apoptosis. In addition, the effect of ASIV against H/R injury was also verified on primary rat cardiomyocytes. The animal welfare and experimental process follow the rules of Animal Ethics Committee of Zhejiang Chinese Medical University. In conclusion, ASIV may play a protective role in mitochondria by regulating morphological dynamic stability and mitochondrial function, inhibiting excessive synthesis of ROS, improving the internal environment of oxidative stress, reducing cell apoptosis, and thereby protecting against cardiomyocytes' hypoxia/reoxygenation injury.

**Key words:** astragaloside IV; cardiomyocyte; hypoxia/reoxygenation injury; mitochondrial homeostasis; apoptosis

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 的全球发病率和致死率一直居高不下, 目前临床治疗方案是迅速恢复心肌梗死区血流供应, 通过介入性心脏治疗如经皮冠脉成形术等能够快速重建缺氧区氧供应, 有效减少心肌不可逆坏死程度<sup>[1]</sup>。然而, 即使在及时恢复血液供应的情况下, 心梗患者1年内心衰发生率仍高达25%, 其主要原因之一是心肌恢复血液供应时发生了缺血再灌注损伤 (ischemia-reperfusion injury, IRI)<sup>[2]</sup>。心肌缺血再灌注损伤是指当缺血心肌恢复血流供应时, 受损心肌细胞合成并释放大量活性氧 (reactive oxygen species, ROS), 诱发多种病理因素的级联反应, 如氧化应激、钙超载、炎症和线粒体功能障碍等, 最终导致更加严重的心肌损伤<sup>[3]</sup>。因此, 如何有效干预心肌缺血再灌注损伤并维持心肌细胞存活是心梗治疗面对的重点问题, 并且由于心肌组织高能量需求的特殊性, 对其线粒体功能的保护更加重要。

传统中药材黄芪是临床常用的补气要药, 具有补气固表和利尿消肿等功效<sup>[4]</sup>, 同时兼有活血之功, 能够延缓衰老<sup>[5]</sup>, 用于治疗恶性肿瘤<sup>[6]</sup>、缺铁性贫血<sup>[7]</sup>、脑缺血<sup>[8]</sup>、认知障碍<sup>[9]</sup>、糖尿病<sup>[10]</sup>、糖尿病心肌病<sup>[11]</sup>、心肌纤维化<sup>[12]</sup>和心肌缺血<sup>[13]</sup>等疾病。黄芪主要活性成分之一黄芪甲苷 (astragaloside IV, ASIV) 具有抗炎<sup>[14]</sup>、抗氧化<sup>[15]</sup>、抗脑缺血再灌注损伤<sup>[16]</sup>、抗动脉粥样硬化<sup>[17]</sup>、抗心肌纤维化<sup>[18]</sup>及抗心肌缺血再灌注损伤<sup>[19]</sup>等活性。此外, 研究发现 ASIV 能够清除自由基和抗氧化应激损伤, 维持细胞氧化还原系统稳态<sup>[20]</sup>, 对线粒体功能调节具有重要作用<sup>[21]</sup>, 但其是否通过调节线粒体稳态提升心肌存活以实现抗心肌缺血再灌注损伤的作用机制

仍不清楚。本研究应用大鼠心肌细胞 H9c2 缺氧复氧 (hypoxia/reoxygenation, H/R) 损伤模型研究 ASIV 对心肌细胞线粒体稳态的调控作用, 以进一步阐明其对缺血再灌注心肌细胞氧化损伤的保护作用及机制。

## 材料与方法

**药物与细胞** H9c2 细胞购自中国科学院细胞库; ASIV (质量分数 $\geq 98\%$ , 批号 140913), 购自四川省维克奇生物科技有限公司。

**试剂** 二甲基亚砜 (dimethylsulfoxide, DMSO) 和 JC-1 荧光探针 (美国 Sigma 公司); DMEM (Dulbecco's modified eagle medium) 培养基和胎牛血清 (美国 Gibco 公司); CCK-8 (cell counting kit-8) 试剂盒、BCA (bicinchoninic acid) 蛋白检测试剂盒、DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) 荧光探针和  $\beta$ -actin 抗体 (上海碧云天生物技术有限公司); 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 和谷胱甘肽 (glutathione, GSH) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); DHE (dihydroethidium) 荧光探针 (美国 Invitrogen 公司); MitoSOX 荧光探针和 calcein-AM (acetoxymethyl ester) 荧光探针 (美国 Life Technologies 公司); TUNEL (terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling) 试剂盒 (美国 Roche 公司); Bax、Bcl-2 (B-cell lymphoma-2) 和 cleaved caspase (cysteine-aspartic protease)-3 抗体 (美国 Cell Signaling Technology 公司)。

**仪器** iMark 酶标仪和 ChemiDoc 凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司); FACS Aria II 流式细胞仪 (美国 BD

公司); IX70 荧光显微镜 (日本 Olympus 公司)。

**细胞培养与实验分组** H9c2 细胞培养于高糖 DMEM 培养基 (含 10% 胎牛血清) 中, 培养条件为 5% CO<sub>2</sub>、37 °C 恒温。ASIV 用 DMEM 配制成终浓度为 10 mmol·L<sup>-1</sup> 的储备液, 临用前使用相应培养液稀释到对应浓度, 确保 DMSO 终浓度不高于 0.1%。H9c2 细胞随机分成 4 组: ① 正常对照组 (control): 置于正常培养液和培养箱中培养; ② 缺氧复氧组 (H/R): 置于无糖 DMEM 培养液中缺氧 [混合气 N<sub>2</sub>:O<sub>2</sub>:CO<sub>2</sub> (94:1:5)] 培养 16 h 后, 更换高糖 DMEM 培养液并常氧条件 [空气:CO<sub>2</sub> (95:5)] 培养 2 h; ③ ASIV 组 (H/R + ASIV): 培养液中加入 ASIV (1、10 和 100 μmol·L<sup>-1</sup>) 预处理 1 h, 再进行缺氧复氧处理, 整个过程不同条件的培养液中均含有相应浓度的黄芪甲苷。

大鼠原代心肌细胞分离与培养操作如下: SD (Sprague-Dawley) 乳大鼠 6 只, 酒精浸泡 30 s 左右后取出心脏, 加入冰磷酸缓冲盐溶液 (phosphate buffer saline, PBS) 冲洗。用眼科剪剪成 1 mm<sup>3</sup> 组织块后加入 0.1% 胰酶消化吹打, 并于 37 °C、100 r·min<sup>-1</sup> 的摇床中进行消化, 每次消化结束后反复吹打消化液 10 次, 每次 10 min, 使组织块自然沉淀, 并将上清转移至 10% 胎牛血清 (fetal bovine serum, FBS) 的中和液中, 结束消化后, 于室温 1 500 r·min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 去除上清, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液重悬沉淀并种板。根据差速贴壁法, 于 90 min 后将上清转移至新的培养皿中, 用含 10% FBS 的 DMEM 培养液培养细胞, 并加入 5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (5-bromodeoxyuridine, Brdu) 抑制非心肌细胞的生长。缺氧复氧损伤及 ASIV 预处理操作同 H9c2 细胞。动物福利和实验过程均遵循浙江中医药大学动物伦理委员会的规定。

**细胞活力检测** H9c2 细胞以每孔 5×10<sup>3</sup> 个接种于 96 孔板, 分组给药后, 用 CCK-8 法检测各组细胞活力: 每孔加入 10 μL CCK-8 试剂, 继续孵育 2 h 后, 用酶标仪检测各孔在 450 nm 波长处的吸光度值 (A<sub>450</sub>)。细胞活力 (%) = [(A<sub>450</sub> 处理组 - A<sub>450</sub> 溶剂对照孔)/(A<sub>450</sub> 正常对照组 - A<sub>450</sub> 溶剂对照孔)]×100%。

**培养液上清 LDH 活性检测** H9c2 细胞以每孔 1×10<sup>5</sup> 个接种于 6 孔板, 分组给药后, 收集培养液上清, 根据 LDH 检测试剂盒的方法检测培养液上清中 LDH 活性。

**细胞 SOD 活力、MDA 和 GSH 含量检测** 分别收集培养液上清和细胞总蛋白, 根据 SOD、MDA 及 GSH 检测试剂盒和 BCA 蛋白含量检测试剂盒的方法分别检测细胞 SOD 活力、MDA 和 GSH 含量及细胞总蛋白量, 计算结果以单位总蛋白含量 (mg) 均一化处理。

**细胞 ROS 含量和线粒体 ROS 含量检测** 使用 DHE 荧光探针 (10 μmol·L<sup>-1</sup>) 避光孵育细胞 30 min, PBS 润洗 2 次后, 于荧光显微镜下拍照, 每组随机拍摄 6 个视野, Image J 软件分析荧光强度。H9c2 细胞经 MitoSOX 荧光探针 (5 μmol·L<sup>-1</sup>) 避光标记 30 min 后, 用 Hank's 平衡盐溶液 (Hank's balanced salt solution, HBSS) (含 Ca<sup>2+</sup>/Mg<sup>2+</sup> 离子) 润洗 2 次后, 消化并计数, 调整细胞数为每管 (5~8)×10<sup>6</sup> 个, 流式细胞仪检测荧光强度 (发射波长为 580 nm)。

**线粒体膜电位检测** 使用 JC-1 荧光探针 (2 μmol·L<sup>-1</sup>) 避光孵育细胞 20 min, PBS 润洗 2 次后, 于荧光显微镜下拍照, 每组随机拍摄 6 个视野, Image J 软件分析荧光强度。

**线粒体通透性转换孔检测** 使用 calcein-AM (1 μmol·L<sup>-1</sup>) 和 CoCl<sub>2</sub> (2 mmol·L<sup>-1</sup>) 避光孵育细胞 20 min, PBS 润洗 2 次后, 于荧光显微镜下拍照, 每组随机拍摄 6 个视野, Image J 软件分析荧光强度。

**细胞凋亡检测** 按照 TUNEL 检测试剂盒提供的方法结合 DAPI 荧光探针标记凋亡细胞和总细胞, 在原代心肌细胞凋亡染色的同时共染 troponin I。荧光显微镜每组随机拍摄 6 个视野, 细胞凋亡率 (%) = 凋亡细胞数/总细胞数×100%。

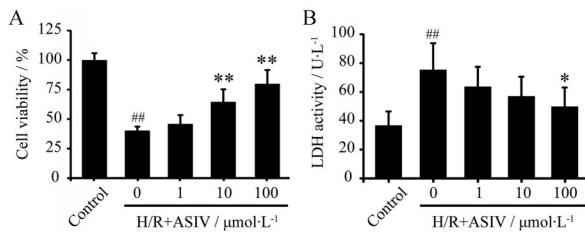
**Western blot 检测目的蛋白表达** H9c2 细胞经预冷 PBS 润洗 3 次后, 使用 RIPA (radio immunoprecipitation assay) 裂解液制备总蛋白提取液, 用于检测 Drp1 (dynamin-related protein 1, 1:1 000)、Mfn1 (mitofusin 1, 1:1 000)、Mfn2 (1:1 000)、Bax (1:1 000)、Bcl-2 (1:1 000)、cleaved caspase-3 (1:1 000) 和 β-actin (1:4 000) 蛋白含量。使用化学发光成像仪收集目的蛋白条带图像并通过 Image Lab 软件分析计算相对蛋白表达量。

**统计分析** 使用 Minitab 14 软件统计分析实验结果, 以  $\bar{x} \pm s$  表示实验结果, 使用 ANOVA 分析组间差异, 其中 P<0.05 认为差异具有统计学意义。

## 结果

### 1 ASIV 对 H/R 诱导的 H9c2 细胞损伤的影响

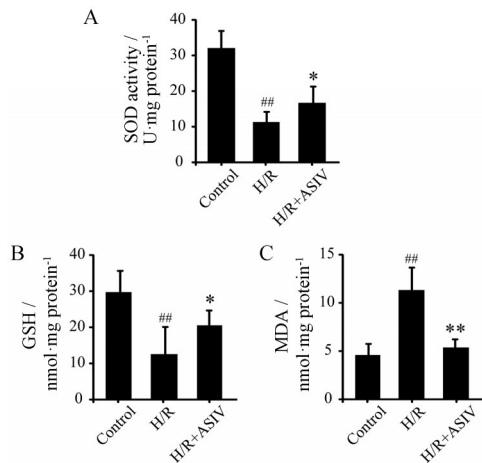
ASIV 对 H/R 诱导的 H9c2 细胞损伤的影响结果见图 1, 与正常对照组比较, H/R 处理显著降低 H9c2 细胞活力 (P<0.01), 同时增加 H9c2 细胞 LDH 泄露 (P<0.01); ASIV (10 和 100 μmol·L<sup>-1</sup>) 预处理能够显著恢复细胞活力 (P<0.01), 且呈剂量依赖性; ASIV (100 μmol·L<sup>-1</sup>) 预处理能够明显降低培养液上清中 LDH 活性 (P<0.05)。以上实验结果发现, ASIV (100 μmol·L<sup>-1</sup>) 具有较好的抗细胞缺氧复氧损伤活性, 后续实验均采用 100 μmol·L<sup>-1</sup> 浓度 ASIV 开展实验。



**Figure 1** Effects of astragaloside IV (ASIV) on hypoxia/reoxygenation (H/R) induced H9c2 cells injury. A: The cell viability was determined by cell counting kit-8 (CCK-8) assay; B: The lactate dehydrogenase (LDH) release was determined by LDH assay kit.  $n = 6, \bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model (H/R)

## 2 ASIV对H/R诱导的H9c2细胞氧化应激的影响

图2结果显示,与正常对照组比较,H/R处理显著降低细胞SOD活力( $P < 0.01$ ),减少GSH含量( $P < 0.01$ )并增加MDA含量( $P < 0.01$ );ASIV( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )预处理能够显著增加SOD活力( $P < 0.05$ )和GSH含量( $P < 0.05$ ),并降低MDA含量( $P < 0.01$ )。



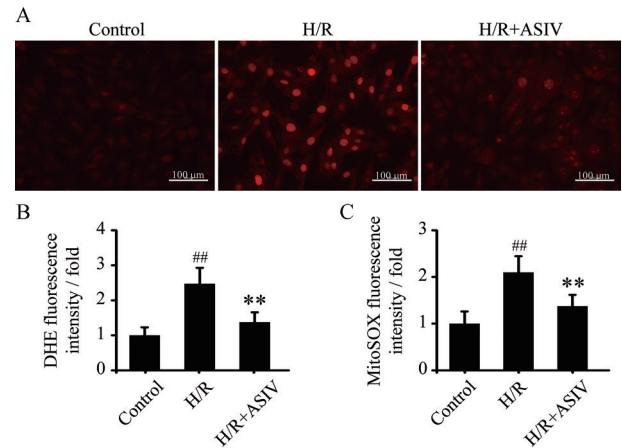
**Figure 2** Effects of ASIV on H/R induced H9c2 cells oxidative stress injury. A: Superoxide dismutase (SOD) activity was determined by SOD assay kit; B: Glutathione (GSH) content was estimated by GSH assay kit; C: Malondialdehyde (MDA) content was estimated by MDA assay kit.  $n = 6, \bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model (H/R)

## 3 ASIV对ROS含量的影响

与正常对照组比较(图3),H/R处理显著增加细胞ROS含量和线粒体ROS含量( $P < 0.01$ );ASIV( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )预处理能够显著降低细胞ROS含量和线粒体ROS含量( $P < 0.01$ )。

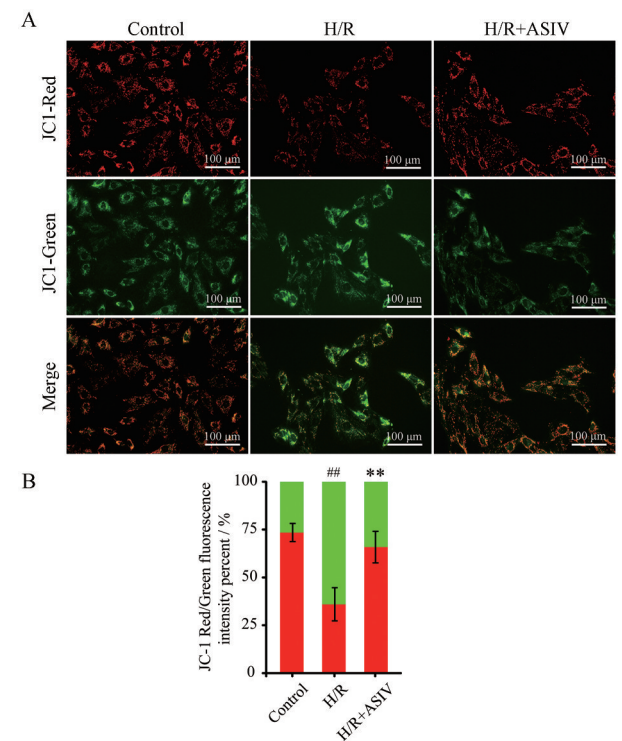
## 4 ASIV对线粒体膜电位的影响

JC-1是一种常用于检测线粒体膜电位的荧光探针,当线粒体膜电位较高时,JC-1在线粒体内形成聚合物,产生红色荧光;当线粒体膜电位较低时,JC-1在线粒体



**Figure 3** Effects of ASIV on reactive oxygen species (ROS) content in H/R induced H9c2 cells. A: Representative fluorescence images of dihydroethidium (DHE) fluorescence ( $\times 200$ ). Scale bar:  $100 \mu\text{m}$ ; B: Quantification of DHE fluorescence intensity; C: Quantification of MitoSOX fluorescence intensity.  $n = 6, \bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model (H/R)

内处于离散状态,产生绿色荧光。图4结果显示,与正常对照组比较,H/R处理显著增强绿色荧光( $P < 0.01$ );ASIV( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ )预处理能够显著降低绿色荧光( $P < 0.01$ ),维持线粒体膜电位。



**Figure 4** Effects of ASIV on the collapse of mitochondrial transmembrane potential in H/R induced H9c2 cells. A: Representative fluorescence images of JC-1 fluorescence ( $\times 200$ ). Scale bar:  $100 \mu\text{m}$ ; B: Quantification of JC-1 fluorescence.  $n = 6, \bar{x} \pm s$ . <sup>##</sup> $P < 0.01$  vs control; <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model (H/R)

### 5 ASIV对线粒体通透性转换孔开放的影响

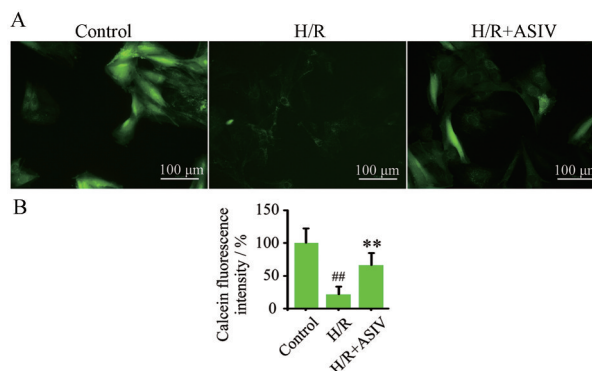
Calcein-AM 荧光探针进入细胞线粒体后被切割成 calcein 而无法离开线粒体,  $\text{CoCl}_2$  能够进入细胞淬灭 calcein 的绿色荧光但无法进入线粒体, 因此线粒体通透性转换孔的开放程度与绿色荧光强度成负相关。图5结果显示, 与正常对照组比较, H/R 处理显著降低绿色荧光 ( $P < 0.01$ ); ASIV ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 预处理能够显著增强绿色荧光 ( $P < 0.01$ ), 降低线粒体通透性转换孔开放程度。

### 6 ASIV对线粒体分裂/融合平衡的影响

与正常对照组比较, H/R 处理显著上调线粒体分裂蛋白 Drp1 表达量 ( $P < 0.001$ ), 下调线粒体融合蛋白 Mfn2 表达量 ( $P < 0.01$ ); ASIV ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 预处理显著改善 Drp1 蛋白的过表达 ( $P < 0.01$ ) 和 Mfn2 蛋白低表达 ( $P < 0.05$ ), 结果见图6。

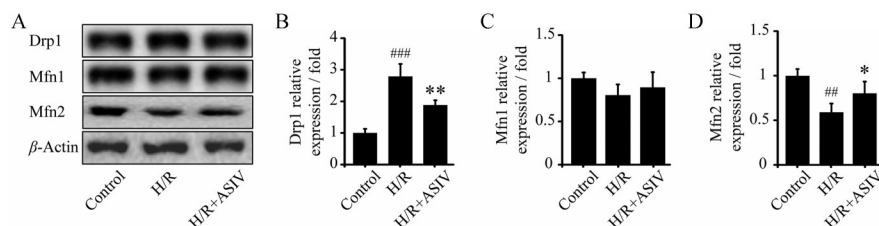
### 7 ASIV对细胞凋亡的影响

图7结果显示, 与正常对照组比较, H/R 处理显著增加细胞凋亡率 ( $P < 0.01$ ) 和凋亡蛋白 cleaved caspase-3

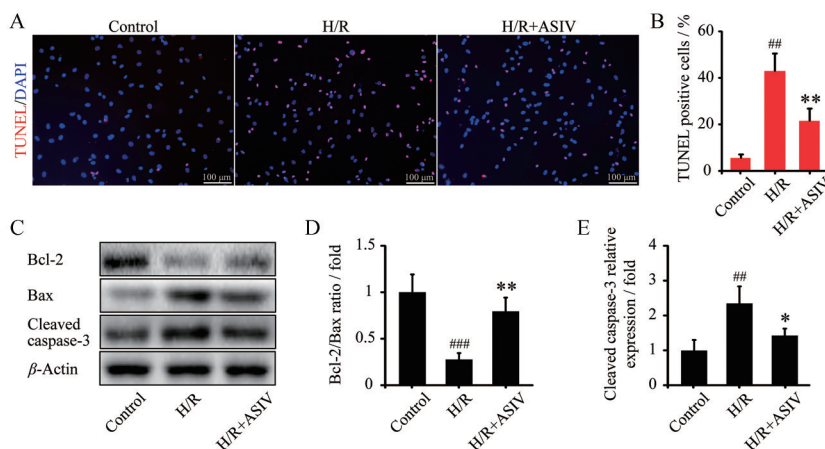


**Figure 5** Effects of ASIV on opening of the mitochondrial permeability transition pore in H/R induced H9c2 cells. A: Representative fluorescence images of calcein fluorescence ( $\times 200$ ). Scale bar:  $100 \mu\text{m}$ ; B: Quantification of calcein fluorescence.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{###}P < 0.01$  vs control;  $^{**}P < 0.01$  vs model (H/R)

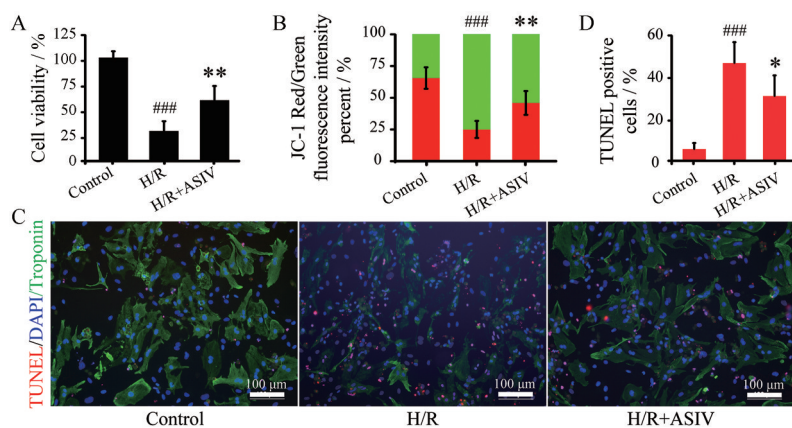
表达量 ( $P < 0.01$ ), 降低 Bcl-2/Bax 比值 ( $P < 0.001$ ); ASIV ( $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ) 预处理能够显著降低细胞凋亡率 ( $P < 0.01$ ) 和 cleaved caspase-3 表达量 ( $P < 0.05$ ), 增加 Bcl-2/Bax 比值 ( $P < 0.01$ )。



**Figure 6** Effect of ASIV on modulation of mitochondrial fission/fusion proteins in H/R induced H9c2 cells. Relative expressions of dynamin-related protein 1 (Drp1), mitofusin1 (Mfn1), and Mfn2 were determined by Western blot. A: Representative blots of Drp1, Mfn1, and Mfn2; B: Quantified expression of Drp1 protein; C: Quantified expression of Mfn1 protein; D: Quantified expression of Mfn2 protein.  $n = 4$ ,  $\bar{x} \pm s$ .  $^{###}P < 0.01$ ,  $^{####}P < 0.001$  vs control;  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs model (H/R)



**Figure 7** Effects of ASIV on apoptosis of H/R induced H9c2 cells. A: Representative fluorescence images of terminal-deoxynucleotidyl transferase mediated nick end labeling (TUNEL, red) and 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI, blue) fluorescence ( $\times 200$ ). Scale bar:  $100 \mu\text{m}$ ; B: Quantification of TUNEL positive cells ( $n = 6$ ); C: Representative blots of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bax, and cleaved caspase-3; D: Quantified expression of Bcl-2/Bax ratio ( $n = 4$ ); E: Quantified expression of cleaved caspase-3 protein ( $n = 4$ ). Results were represented as  $\bar{x} \pm s$ .  $^{##}P < 0.01$ ,  $^{###}P < 0.001$  vs control;  $^{*}P < 0.05$ ,  $^{**}P < 0.01$  vs model (H/R)



**Figure 8** Effects of ASIV on apoptosis of H/R induced primary neonatal Sprague-Dawley (SD) rat cardiomyocytes. A: The cell viability was determined by CCK-8 assay; B: Quantification of JC-1 fluorescence; C: Representative fluorescence images of TUNEL (red), DAPI (blue), and troponin (green) fluorescence ( $\times 200$ ). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ; D: Quantification of TUNEL positive cells.  $n = 6$ ,  $\bar{x} \pm s$ . <sup>###</sup> $P < 0.001$  vs control; <sup>\*</sup> $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup> $P < 0.01$  vs model (H/R)

## 8 大鼠原代心肌细胞验证 ASIV 抗 H/R 损伤的作用

ASIV 对 H/R 诱导的大鼠原代心肌细胞损伤的影响结果见图 8, 与正常对照组比较, H/R 处理显著降低大鼠原代心肌细胞活力 ( $P < 0.001$ ), 降低线粒体膜电位 ( $P < 0.001$ ), 增加细胞凋亡率 ( $P < 0.001$ ); ASIV ( $100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ ) 预处理能够显著恢复细胞活力 ( $P < 0.01$ ), 维持线粒体膜电位 ( $P < 0.01$ ), 降低细胞凋亡率 ( $P < 0.05$ ).

## 讨论

对于包括急性心肌缺血在内的各类组织缺血, 临床常规治疗手段都是优先恢复血流再灌注, 此时会面对包括血管、内皮及线粒体功能障碍, 水肿和炎症等一系列并发症, 最终导致细胞不可逆坏死等严重组织损伤<sup>[22]</sup>。因此, 能够减轻心肌缺血再灌注过程中各类损伤的辅助治疗都有助于改善急性心肌梗死患者的预后。黄芪作为传统补气药材, 能够提高机体免疫力和抗氧化能力<sup>[23]</sup>, 治疗心肌缺血在内的多种疾病, 实验研究发现其主要活性成分之一 ASIV 具有抗心肌肥大<sup>[24]</sup>、抗心肌缺氧损伤<sup>[25]</sup>、抗心肌细胞氧化损伤<sup>[26]</sup>等心肌保护活性, 但其具体作用机制仍不十分明确。本实验结果显示, ASIV 能够显著改善缺氧复氧导致的 H9c2 细胞活力下降和 LDH 泄露, 表明 ASIV 对心肌细胞氧化应激损伤具有一定的保护作用。

缺血心肌再灌注时, 心肌细胞会在恢复血氧供应时合成过量 ROS, 直接氧化细胞内脂质、蛋白质和 DNA 等生物大分子, 对细胞造成不可逆损伤<sup>[27]</sup>, 因此提高缺血心肌组织的抗氧化能力对防止再灌注损伤具有重要作用。本实验发现 ASIV 显著提升细胞 SOD 活性, 增加 GSH 含量, 降低了 MDA 含量, 显示出良好的抗氧化能力。为了检测更直接的抗氧化指标, 本研究

通过 DHE 和 MitoSOX 荧光探针分别检测了 H9c2 细胞 ROS 含量和线粒体中 ROS 含量, 发现 ASIV 能够显著降低细胞 ROS 含量和线粒体中 ROS 含量。

心肌细胞中 ROS 主要合成于线粒体, 而线粒体功能障碍会导致 ROS 爆发性合成并大量释放到细胞质中, 造成严重的氧化损伤<sup>[28]</sup>。本实验通过 JC-1 和 calcein 荧光探针检测线粒体膜电位和通透性转换孔开放程度, 发现 ASIV 能够显著恢复线粒体膜电位去极化并抑制通透性转换孔过度开放, 提示 ASIV 能够有效维持线粒体形态和功能正常。此外, 线粒体形态的动态稳定对保障线粒体功能正常也具有重要意义<sup>[29]</sup>, 线粒体过度分裂造成的碎片化会使线粒体失去正常功能, 同时诱发细胞凋亡。本实验发现 ASIV 能够显著恢复线粒体分裂蛋白 Drp1 和线粒体融合蛋白 Mfn2 的表达失衡, 抑制线粒体过度分裂, 促进线粒体融合, 表明 ASIV 对调节心肌细胞线粒体形态动态稳定具有重要作用。

综上, 本研究结果表明 ASIV 可能通过稳定心肌细胞线粒体形态动态稳定, 维持线粒体功能, 抑制 ROS 过度合成, 从而减轻缺氧复氧诱导的氧化应激损伤。

**作者贡献:** 刘啊敏和牟幼灵负责实验设计和具体实验; 徐紫薇负责实验数据分析; 刘鸾负责实验指导和论文修改。

**利益冲突:** 所有作者声明不存在利益冲突。

## References

- [1] González-Montero J, Brito R, Gajardo AI, et al. Myocardial reperfusion injury and oxidative stress: therapeutic opportunities [J]. World J Cardiol, 2018, 10: 74-86.
- [2] Esposito ML, Zhang Y, Qiao X, et al. Left ventricular unloading before reperfusion promotes functional recovery after acute myocardial infarction [J]. J Am Coll Cardiol, 2018, 72: 501-514.

- [3] Maimaiti A, Li Y, Wang YT, et al. Association of platelet-to-lymphocyte count ratio with myocardial reperfusion and major adverse events in patients with acute myocardial infarction: a two-centre retrospective cohort study [J]. *BMJ Open*, 2019, 9: e025628.
- [4] Gu ZG, Ge B, Xu AX, et al. Research on the efficacy and indications of *Astragalus membranaceus* and excavation of contraindications [J]. *Chin Tradit Pat Med (中成药)*, 2018, 40: 2524-2530.
- [5] Liu P, Zhao H, Luo Y. Anti-aging implications of *Astragalus membranaceus* (huangqi): a well-known Chinese tonic [J]. *Aging Dis*, 2017, 8: 868-886.
- [6] Wang BB, Wang XH, Liu K, et al. Enhanced radiosensitivity of H22 ascitic tumor to  $^{125}\text{I}$  ions radiation in ultra-filtration extract mixture from *Astragalus mongholicus*-treated mice [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2015, 50: 1596-1602.
- [7] Jia N, Qiao H, Zhu W, et al. Antioxidant, immunomodulatory, oxidative stress inhibitory and iron supplementation effect of *Astragalus membranaceus* polysaccharide-iron (III) complex on iron-deficiency anemia mouse model [J]. *Int J Biol Macromol*, 2019, 132: 213-221.
- [8] Pan R, Zhou M, Zhong Y, et al. The combination of *Astragalus membranaceus* extract and ligustrazine to improve the inflammation in rats with thrombolytic cerebral ischemia [J]. *Int J Immunopathol Pharmacol*, 2019, 33: 2058738419869055. DOI: 10.1177/2058738419869055.
- [9] Liu Y, Liu W, Li J, et al. A polysaccharide extracted from *Astragalus membranaceus* residue improves cognitive dysfunction by altering gut microbiota in diabetic mice [J]. *Carbohydr Polym*, 2019, 205: 500-512.
- [10] Chen G, Yang X, Yang X, et al. Jia-Wei-Jiao-Tai-Wan ameliorates type 2 diabetes by improving  $\beta$  cell function and reducing insulin resistance in diabetic rats [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17: 507.
- [11] Sun S, Yang S, Dai M, et al. The effect of *Astragalus* polysaccharides on attenuation of diabetic cardiomyopathy through inhibiting the extrinsic and intrinsic apoptotic pathways in high glucose-stimulated H9C2 cells [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2017, 17: 310.
- [12] Qu H, Wang Y, Wang Y, et al. Luhong formula inhibits myocardial fibrosis in a paracrine manner by activating the gp130/JAK2/STAT3 pathway in cardiomyocytes [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 202: 28-37.
- [13] Liu D, Chen L, Zhao J, et al. Cardioprotection activity and mechanism of *Astragalus* polysaccharide *in vivo* and *in vitro* [J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 111: 947-952.
- [14] Li D, Li G, Chen Y, et al. Astragaloside IV protects ATDC5 cells from lipopolysaccharide-caused damage through regulating miR-203/MyD88 [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58: 89-97.
- [15] Chen T, Wang R, Jiang W, et al. Protective effect of astragaloside IV against paraquat-induced lung injury in mice by suppressing Rho signaling [J]. *Inflammation*, 2016, 39: 483-492.
- [16] Xu Z, Liu W, Huang H. Astragaloside IV alleviates cerebral ischemia-reperfusion injury by activating the janus kinase 2 and signal transducer and activator of transcription 3 signaling pathway [J]. *Pharmacology*, 2020, 105: 181-189.
- [17] Wang N, Zhang X, Ma Z, et al. Combination of tanshinone IIA and astragaloside IV attenuate atherosclerotic plaque vulnerability in ApoE(-/-) mice by activating PI3K/AKT signaling and suppressing TRIL4/NF- $\kappa$ B signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 123: 109729.
- [18] Wei Y, Wu Y, Feng K, et al. Astragaloside IV inhibits cardiac fibrosis *via* miR-135a-TRPM7-TGF- $\beta$ /Smads pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 249: 112404.
- [19] Lu M, Tang F, Zhang J, et al. Astragaloside IV attenuates injury caused by myocardial ischemia/reperfusion in rats *via* regulation of toll-like receptor 4/nuclear factor- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Phytother Res*, 2015, 29: 599-606.
- [20] Wang Y, Jiang F, Cheng H, et al. Astragaloside IV protects against oxidative stress in calf small intestine epithelial cells *via* NFE2L2-antioxidant response element signaling [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 6131.
- [21] Yin F, Zhou H, Fang Y, et al. Astragaloside IV alleviates ischemia reperfusion-induced apoptosis by inhibiting the activation of key factors in death receptor pathway and mitochondrial pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 248: 112319.
- [22] Soares ROS, Losada DM, Jordani MC, et al. Ischemia/reperfusion injury revisited: an overview of the latest pharmacological strategies [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20: 5034.
- [23] Elabd H, Wang HP, Shaheen A, et al. *Astragalus membranaceus* nanoparticles markedly improve immune and anti-oxidative responses; and protection against *Aeromonas veronii* in Nile tilapia *Oreochromis niloticus* [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2020, 97: 248-256.
- [24] Nie P, Meng F, Zhang J, et al. Astragaloside IV exerts a myocardial protective effect against cardiac hypertrophy in rats, partially *via* activating the Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 4625912.
- [25] Du J, Liu J, Zhen J, et al. Astragaloside IV protects cardiomyocytes from hypoxia-induced injury by down-regulation of lncRNA GAS5 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 116: 109028.
- [26] Yang P, Zhou Y, Xia Q, et al. Astragaloside IV regulates the PI3K/Akt/HO-1 signaling pathway and inhibits H9c2 cardiomyocyte injury induced by hypoxia-reoxygenation [J]. *Biol Pharm Bull*, 2019, 42: 721-727.
- [27] Liu NB, Wu M, Chen C, et al. Novel molecular targets participating in myocardial ischemia-reperfusion injury and cardioprotection [J]. *Cardiol Res Pract*, 2019, 2019: 6935147.
- [28] Herr DJ, Baarine M, Aune SE, et al. HDAC1 localizes to the mitochondria of cardiac myocytes and contributes to early cardiac reperfusion injury [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 114: 309-319.
- [29] Tilokani L, Nagashima S, Paupe V, et al. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms [J]. *Essays Biochem*, 2018, 62: 341-360.