

基于线粒体分裂融合探讨丹酚酸 B 保护 H9C2 细胞 OGD/R 损伤的作用机制研究

刘子馨, 辛高杰, 尤越, 陈原原, 高佳明, 李玲美, 孟红旭, 韩笑, 李磊,
张业昊, 付建华*, 刘建勋

(中国中医科学院西苑医院基础医学研究所, 中药药理北京市重点实验室, 国家中医心血管病临床医学研究中心,
北京 100091)

摘要: 本研究旨在探讨丹参的有效成分丹酚酸 B (salvianolic acid B, Sal B) 通过调控线粒体分裂融合对氧糖剥夺/再复 (oxygen and glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 损伤的 H9C2 心肌细胞的保护作用。通过建立 OGD/R 模型模拟心肌缺血再灌注损伤过程。细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒 (cell counting kit-8, CCK-8) 检测细胞活力; 试剂盒法检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、总谷胱甘肽 (total glutamyl cysteinyl glycine, t-GSH)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 含量, 蛋白质印迹法检测线粒体分裂融合、细胞凋亡相关蛋白表达水平, 线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 检测试剂盒与 Hoechst 33342 荧光观察 MPTP 开放水平, 分子对接技术确定丹酚酸 B 分子靶点。结果表明, 与对照组相比, OGD/R 损伤降低 H9C2 细胞活力, ROS 含量增加, t-GSH、NO 含量减少, 线粒体动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1)、线粒体融合蛋白有线粒体融合蛋白 2 (mitofusins 2, Mfn2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、半胱氨酸蛋白酶 3 (cysteine specific proteinase 3, caspase 3) 的蛋白表达水平升高, Mfn1 的蛋白表达水平降低, MPTP 开放水平增加。与 OGD/R 组相比, 丹酚酸 B 各组在 6.25~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 具有保护作用, 丹酚酸 B 降低 ROS 含量, 增加 t-GSH、NO 含量, 降低 Drp1、Mfn2、Bax、caspase 3 的蛋白表达水平, 增加 Mfn1 的蛋白表达水平, 降低 MPTP 开放水平。综上所述, 丹酚酸 B 可能通过调节氧化与抗氧化平衡、线粒体分裂融合平衡, 抑制 MPTP 开放, 减少细胞凋亡进而使 H9C2 细胞减少 OGD/R 损伤, 可为丹酚酸 B 治疗心肌缺血再灌注损伤提供有价值的科学依据。

关键词: 丹酚酸 B; 心肌细胞; 线粒体分裂; 线粒体融合; 细胞凋亡

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2024)02-0374-08

Mechanism of salvianolic acid B protecting H9C2 from OGD/R injury based on mitochondrial fission and fusion

LIU Zi-xin, XIN Gao-jie, YOU Yue, CHEN Yuan-yuan, GAO Jia-ming, LI Ling-mei,
MENG Hong-xu, HAN Xiao, LI Lei, ZHANG Ye-hao, FU Jian-hua*, LIU Jian-xun

(National Clinical Research Center of Traditional Chinese Medicine for Cardiovascular Diseases, Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

Abstract: This study aims to investigate the effect of salvianolic acid B (Sal B), the active ingredient of *Salvia miltiorrhiza*, on H9C2 cardiomyocytes injured by oxygen and glucose deprivation/reperfusion (OGD/R) through

收稿日期: 2023-06-20; 修回日期: 2023-08-09.

基金项目: 国家自然科学基金重点资助项目 (82174219); 中国中医科学院科技创新工程 (CI2021A00912); 国家中医心血管病临床医学研究中心专项科研基金 (CMC2022005).

*通讯作者 Tel: 86-10-63835016, E-mail: jianhuaffcn@263.net

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2023-0767

regulating mitochondrial fission and fusion. The process of myocardial ischemia-reperfusion injury was simulated by establishing OGD/R model. The cell proliferation and cytotoxicity detection kit (cell counting kit-8, CCK-8) was used to detect cell viability; the kit method was used to detect intracellular reactive oxygen species (ROS), total glutathione (t-GSH), nitric oxide (NO) content, protein expression levels of mitochondrial fission and fusion, apoptosis-related detection by Western blot. Mitochondrial permeability transition pore (MPTP) detection kit and Hoechst 33342 fluorescence was used to observe the opening level of MPTP, and molecular docking technology was used to determine the molecular target of Sal B. The results showed that relative to control group, OGD/R injury reduced cell viability, increased the content of ROS, decreased the content of t-GSH and NO. Furthermore, OGD/R injury increased the protein expression levels of dynamin-related protein 1 (Drp1), mitofusions 2 (Mfn2), Bcl-2 associated X protein (Bax) and cysteinyl aspartate specific proteinase 3 (caspase 3), and decreased the protein expression levels of Mfn1, increased MPTP opening level. Compared with the OGD/R group, it was observed that Sal B had a protective effect at concentrations ranging from 6.25 to 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$. Sal B decreased the content of ROS, increased the content of t-GSH and NO, and Western blot showed that Sal B decreased the protein expression levels of Drp1, Mfn2, Bax and caspase 3, increased the protein expression level of Mfn1, and decreased the opening level of MPTP. In summary, Sal B may inhibit the opening of MPTP, reduce cell apoptosis and reduce OGD/R damage in H9C2 cells by regulating the balance of oxidation and anti-oxidation, mitochondrial fission and fusion, thereby providing a scientific basis for the use of Sal B in the treatment of myocardial ischemia reperfusion injury.

Key words: salvianolic acid B; cardiomyocyte; mitochondrial fission; mitochondrial fusion; apoptosis

急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 是以心律失常、疼痛、休克、心力衰竭等症状为主的缺血性心脏病, AMI发生发展不仅危害人类的生命健康, 也造成人民群众财产损失。AMI发生后, 临床常采用溶栓、经皮冠状动脉介入术等方式恢复血液与氧气的供应, 然而再灌注后反而引起心肌损伤进一步呈进行性加重, 这一过程又称为心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)。缺血再灌注 (ischemia/reperfusion) 的心脏出现活性氧增多、钙超载、炎症因子释放增加, 大量心肌细胞凋亡^[1]的现象。研究发现, 心肌细胞凋亡被认为是引起MIRI的主要表现形式之一^[2]。抑制心肌细胞凋亡是预防心脏病的合理措施。细胞凋亡主要有3条途径分别为线粒体途径、内质网途径及死亡受体途径, 其中线粒体途径是细胞凋亡的关键环节, 因此维持线粒体结构功能稳定对保护心肌细胞至关重要^[3]。心脏内富含线粒体, 线粒体是细胞内的能量中心, 处于代谢和细胞凋亡的中心地位^[4], 同时线粒体是高度动态变化的细胞器, 通过不断的分裂与融合来维持线粒体正常的结构与功能, 研究证实线粒体分裂融合之间的不平衡是MIRI的关键因素, 在MIRI过程中, 线粒体分裂增多而融合减少, 线粒体分裂和融合之间的失衡与MIRI心脏功能障碍相关, 抑制线粒体分裂, 促进线粒体融合是I/R损伤后心脏功能障碍的保护机制靶点^[5]。

丹酚酸B (salvianolic acid B, Sal B) (图1) 是丹参的主要水溶性复合物之一, 丹参是我国一种治疗慢性血管病的传统中药, 研究发现, 丹酚酸B在心脑血管方

面有较好的疗效, 丹酚酸B具有抗氧化、抗MIRI、抗动脉粥样硬化等疗效^[6]。本团队前期研究结果表明, 丹酚酸B可通过调控NIX介导的线粒体自噬保护H9C2心肌细胞缺氧/复氧损伤^[7]。然而, 丹酚酸B是否可以通过调控线粒体分裂融合发挥对H9C2心肌细胞氧糖剥夺/再复 (oxygen and glucose deprivation/reperfusion, OGD/R) 损伤起保护作用尚未报道, 因此本研究通过建立OGD/R诱导的H9C2细胞损伤模型, 进一步探讨丹酚酸B对OGD/R诱导的H9C2细胞保护作用是否与调控线粒体分裂融合相关。

材料与方法

材料 大鼠H9C2心肌细胞购于北京协和医学院细胞实验中心。丹酚酸B (111562-201917), 中国食品药品检定研究院; DMEM高糖培养基 (C11995500 BT)、胎牛血清 (16000044), Gibco公司; PBS缓冲液 (P1020-500)、胰蛋白酶-EDTA消化液 (0.25%, 无酚红) (T1300-100), Solarbio公司; CCK8 (CK04-500), DojinDo公司; 青链霉素双抗 (SV30010), HyClone公司; 总谷胱甘肽 (total glutathione, t-GSH) 检测试剂盒 (S0052)、一氧化氮 (nitric oxide, NO) 检测试剂盒 (S2001S)、线粒体通透性转换孔 (mitochondrial permeability transition pore, MPTP) 检测试剂盒 (C2009S)、活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 检测试剂盒 (S0033S)、Hoechst 33342 (C1022), 碧云天生物技术; 线粒体动力相关蛋白1 (dynamin-related protein 1, Drp1) 抗体 (ab184247)、线粒体融合蛋白1 (mitofusions 1,

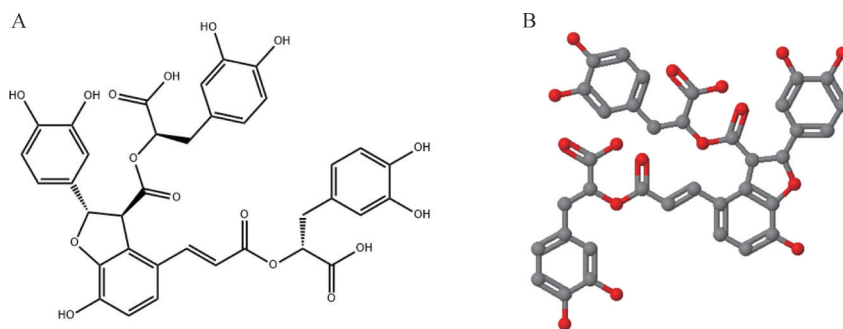


Figure 1 The 2D (A) and 3D (B) molecular formula of salvianolic acid B (Sal B)

Mfn1) 抗体 (ab126575)、线粒体融合蛋白 2 (mitofusions 2, Mfn2) 抗体 (ab124773)、半胱氨酸蛋白酶 3 (cysteiny aspartate specific proteinase 3, caspase 3) 抗体 (ab49822), Abcam 公司; Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体 (50599-2-Ig)、 β -actin 抗体 (60008-1-Ig), Proteintech 公司。

H9C2 心肌细胞培养 复苏冻存的 H9C2 心肌细胞, 取冻存的 H9C2 心肌细胞迅速在 37 °C 水中解冻, 在解冻的细胞中迅速加入 5 mL 完全培养基 (DMEM 高糖培养基+10% 胎牛血清+1% 青链霉素双抗) 中转移至 15 mL 离心管, 1 500 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 3 min, 重悬后更换完全培养液, 37 °C、5% CO_2 培养箱内培养, 细胞培养 24 h 后进行换液, 显微镜下观察 H9C2 心肌细胞生长状态, 待细胞生长至培养瓶 80% 时, 使用胰蛋白酶进行传代, 复苏细胞至二代或三代稳定后进行下一步实验。

细胞药物处理及 OGD/R 模型建立 根据文献^[7] 研究及实验室前期研究基础设置 Sal B 浓度梯度为 100、50、25、12.5、6.25 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的实验组、对照组 (normal, N) 和模型组 (model, M)。细胞以每毫升 1×10^5 个接种于 96 孔板或细胞瓶中, 待细胞生长至 80% 左右时, 弃去完全培养基, PBS 洗 2 遍, 对照组细胞更换为完全培养基, 模型组更换为无糖 DMEM 培养基, 实验组为含 Sal B 的无糖 DMEM 培养基。模型组与实验组放置于自制的密封盒中, 充入标气 (95% 氮气+5% 二氧化碳)。15 min 后将密封盒置于 37 °C、5% CO_2 的培养箱中培养, 4 h 后拿出密封盒, 打开密封盒向无糖 DMEM 培养基中加入葡萄糖, 使葡萄糖浓度为 4.5 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$, 将细胞放回培养箱中继续培养 2 h。此过程即为细胞 OGD/R 过程。实验结束后, 根据实验目的收集细胞或细胞上清进行检测。

CCK8 法测定细胞活力 H9C2 细胞接种于 96 孔板中, 按“细胞药物处理及 OGD/R 模型建立”方法处理细胞后, 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液, 并设置空白对照孔: 只加入培养基与 CCK-8 溶液。培养箱孵育 2 h 后酶标仪 450 nm 测定吸光度 (A) 值。细胞活力 (%) =

$[(A_{\text{实验组}} - A_{\text{空白对照}}) / (A_{\text{对照组}} - A_{\text{空白对照}})] \times 100\%$ 。

t-GSH 测定 H9C2 细胞接种于 96 孔板后, 待细胞生长至 80% 时, 按“细胞药物处理及 OGD/R 模型建立”方法处理细胞, 按照 t-GSH 检测试剂盒配制 5 倍稀释谷胱甘肽还原酶、DTNB 储备液、t-GSH 检测缓冲液, 设置空白对照组、标准品组、样品组, 酶标仪在 412 nm 处检测吸光度值, 检测后绘制标准曲线, 并根据标准曲线计算样品 t-GSH 含量。

ROS 检测 H9C2 细胞接种于板后, 待细胞生长至 80% 时, 按“细胞药物处理及 OGD/R 模型建立”方法处理细胞, 按照 ROS 检测试剂盒步骤将收集好的细胞悬浮于无血清培养基稀释的 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DCFH-DA, 37 °C 细胞培养箱内孵育 20 min, 每隔 5 min 颠倒混匀, 20 min 后用无血清培养液洗涤细胞 3 次, 酶标仪设置激发波长为 488 nm, 发射波长为 525 nm 检测细胞 ROS。

NO 检测 H9C2 细胞接种于 96 孔板后, 待细胞生长至 80% 时, 按“细胞药物处理及 OGD/R 模型建立”方法处理细胞, 按照 ROS 检测试剂盒步骤, 室温放置 Griess Reagent I 和 II, 测定标准品后, 每孔收集细胞上清 50 μL 加入 96 孔板中, 随后依次加入室温 Griess Reagent I、Griess Reagent II 各 50 μL , 酶标仪 540 nm 测定吸光度值。

蛋白质印迹法检测 Drp1、Mfn1、Mfn2、Bax、caspase 3 H9C2 细胞接种于 T75 培养瓶中, 待细胞生长至 80% 时, 按“细胞药物处理及 OGD/R 模型建立”方法处理细胞, 裂解收集细胞, BCA 法蛋白定量, 加入 5 \times 蛋白上样缓冲液, 放置于沸水中使蛋白充分变性。蛋白上样, SDS-PAGE 分离, 蛋白转印至 PVDF 膜, 脱脂牛奶封闭, 加入相应一抗, 4 °C 摇床孵育过夜。TBST 洗膜 3 次, 加入对应二抗, 室温孵育 2 h, TBST 洗膜, 超敏感型化学发光试剂显色, β -actin 的蛋白表达水平为内参, Image Lab 系统拍摄成像, Image J 软件进行灰度值分析, 每个蛋白均重复实验 3 次。

MPTP 检测 H9C2 细胞接种于含有细胞爬片的 6 孔板中, 待细胞生长至 80% 时, 按“细胞药物处理及

OGD/R模型建立”方法处理细胞后,舍弃细胞培养基PBS洗2遍,按照MPTP检测说明书所述,先配制Calcein AM染色液,1 mL Calcein AM染色液中加入1 μL Calcein AM (1 000 \times)和10 μL 促溶剂(100 \times)混匀,并添加1 \times CoCl₂配制成荧光淬灭工作液。在配制好的荧光淬灭工作液中添加Hoechst 33342后混匀,荧光淬灭工作液与Hoechst 33342比例为1 000:1。6孔板吸除培养基后PBS清洗2遍,每孔中加入荧光淬灭工作液(覆盖爬片即可)37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育5 min,更换37 $^{\circ}\text{C}$ 预热含血清培养基避光孵育10 min, PBS清洗2遍,6孔板每孔加入1 mL检测缓冲液后,立即在荧光显微镜(日本Olympus公司, Olympus BX53)下观察并拍照,用Image J软件分析。

分子对接 RCSB Protein Data Bank (RCSB PDB) (<https://www.rcsb.org/>)数据库获得核心靶点蛋白结构, PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库下载丹酚酸B结构作为配体,利用Autodock Tools 1.5.6软件完成受体与配体的分子对接,PyMOL 2.2.0软件进行可视化分析。

统计学处理 用SPSS 26.00软件进行统计分析,多组数据比较用单因素方差分析,组间两两比较用*t*检验。GraphPad Prism 9软件作图。计量数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, $P < 0.05$ 被认为具有统计学差异。

结果

1 Sal B对H9C2细胞OGD/R损伤具有保护作用

与正常组相比,OGD/R组吸光度值显著降低,具有统计学差异,说明OGD/R损伤H9C2细胞活力;与模型组相比,Sal B (6.25~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)处理后吸光度值升高($P < 0.05$; $P < 0.01$,图2),结果提示Sal B在6.25~100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度范围内对OGD/R H9C2细胞具有保护作用,根据本次实验结果及前期研究,选择50 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Sal B浓度进行后续研究^[7]。

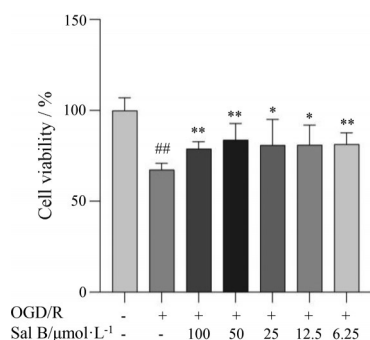


Figure 2 The protective effects of Sal B in H9C2 cells injured by oxygen and glucose deprivation/reperfusion (OGD/R). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$, ^{**} $P < 0.01$ vs OGD/R group

2 Sal B增加OGD/R损伤的H9C2细胞t-GSH水平

如图3所示,与正常组相比,OGD/R组t-GSH含量显著降低($P < 0.01$);与OGD/R组相比,Sal B组增加t-GSH含量($P < 0.05$)。结果表明,Sal B可增加OGD/R损伤的H9C2细胞t-GSH含量。

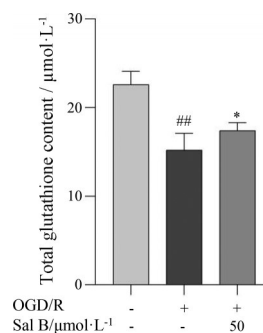


Figure 3 Effects of Sal B on the levels of total glutathione in H9C2 cells induced by OGD/R. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs OGD/R group

3 Sal B增加OGD/R损伤的H9C2细胞NO含量

如图4所示,与正常组相比,OGD/R组NO含量显著降低($P < 0.01$);与OGD/R组相比,Sal B组显著增加NO含量($P < 0.05$)。结果表明,Sal B可增加OGD/R损伤的H9C2细胞NO含量。

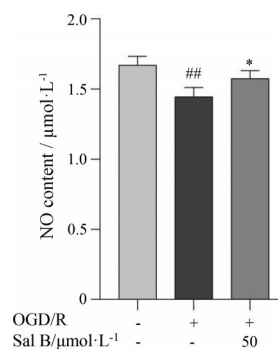


Figure 4 Effects of Sal B on the content of nitric oxide (NO) in H9C2 cells induced by OGD/R. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs OGD/R group

4 Sal B降低OGD/R损伤的H9C2细胞ROS水平

通过检测发现,OGD/R组ROS水平显著高于正常组($P < 0.01$);经Sal B干预后,OGD/R诱导损伤的H9C2细胞ROS水平显著低于OGD/R组($P < 0.01$)。结果提示,Sal B干预可降低OGD/R损伤的H9C2细胞ROS水平(图5)。

5 Sal B对OGD/R损伤的H9C2细胞线粒体分裂融合相关蛋白表达的影响

如图6结果所示,与正常组相比,H9C2细胞OGD/R损伤后Drp1、Mfn2、Bax、caspase 3蛋白表达水平增加

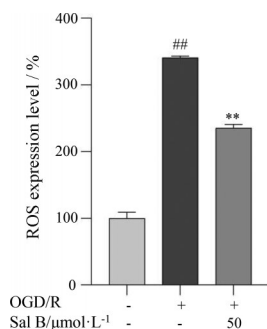


Figure 5 Effects of Sal B on the levels of reactive oxygen species (ROS) in H9C2 cells induced by OGD/R. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs OGD/R group

($P < 0.05$; $P < 0.01$), Mfn1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与 OGD/R 组相比, Sal B 组降低 Drp1、Mfn2、Bax、caspase 3 蛋白表达水平, 增加 Mfn1 蛋白表达水平 ($P < 0.05$).

6 Sal B降低 OGD/R 损伤的 H9C2 细胞 MPTP 开放水平

根据试剂盒说明, 绿色荧光越强, 线粒体 MPTP 开放程度越低。如图 7 所示, 与正常组相比, H9C2 细胞在 OGD/R 损伤后绿色荧光减弱, 提示 OGD/R 组细胞 MPTP 开放水平显著增加 ($P < 0.01$); 与 OGD/R 组相

比, Sal B 组绿色荧光增强, 提示 Sal B 可减轻 OGD/R 损伤的 H9C2 细胞 MPTP 开放水平。

7 Sal B 分子对接

Sal B 分子对接结果如图 8 所示, Sal B 的氧原子与 Drp1 第 179 位甲硫氨酸结合形成一个氢键 (2.8 Å), 与 Drp1 第 181 位亮氨酸形成两个较强氢键 (2.2 和 2.4 Å)。

讨论

目前, 药物溶栓、血管成形术等广泛应用于缺血再灌注, 然而急性心肌梗死仍是全球主要致死原因之一^[8]。如何有效地预防 MIRI 依然是当前研究的热点问题, 研究发现心肌细胞过多死亡是 MIRI 的重要原因之一, MIRI 主要病理机制与心肌细胞内大量氧自由基产生、钙超载、细胞凋亡等有关^[9]。现代药理学研究结果表明, 丹酚酸 B 能够降低氧自由基、提高谷胱甘肽过氧化物酶 (GSH-Px) 和还原型谷胱甘肽 (G-SH) 活性、抑制心肌组织中的凋亡相关蛋白、抑制钙超载等保护心肌缺血再灌注损伤^[7]。本研究使用氧糖剥夺/再复处理 H9C2 心肌细胞作为缺血/再灌注损伤的体外模型, 进一步探索丹酚酸 B 保护 H9C2 细胞的机制是否与丹酚酸 B 调控线粒体分裂融合抑制心肌细胞凋亡

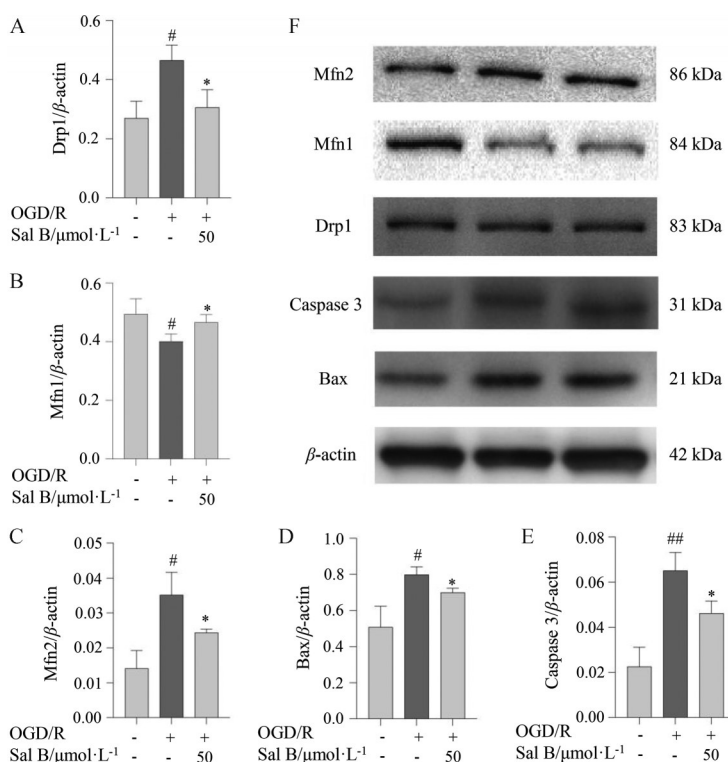


Figure 6 Effect of Sal B on the expression of mitochondrial fission and fusion related proteins in H9C2 cells induced by OGD/R. A: Dynamin-related protein 1 (Drp1); B: Mitofusions 1 (Mfn1); C: Mitofusions 2 (Mfn2); D: Bcl-2 associated X protein (Bax); E: Cysteinyln aspartate specific proteinase 3 (caspase 3); F: The Western blot of mitochondrial fission and fusion related proteins in H9C2 cells induced by OGD/R. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. [#] $P < 0.05$, ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ vs OGD/R group

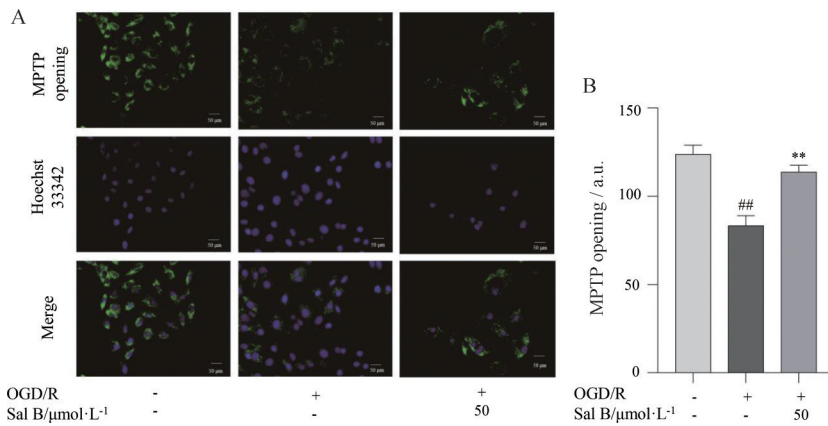


Figure 7 Sal B reduced the opening of mitochondrial permeability transition pore (MPTP). A: Representative images of MPTP opening under a fluorescence microscope (scale bar = 50 μm) were shown; B: Bar graph indicates the MPTP opening. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. ## $P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs OGD/R group

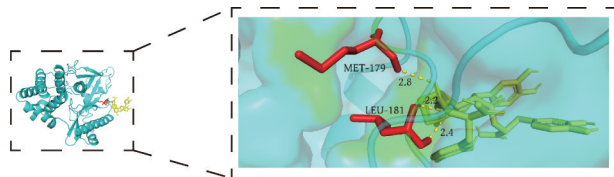


Figure 8 The results of molecular docking between Sal B and Drp1

有关^[10]。

首先,本研究体外建立 OGD/R 模型模拟心肌缺血再灌注损伤,丹酚酸B预给药在 $6.25 \sim 100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 对氧糖剥夺复氧复糖后细胞具有保护作用,根据本次实验结果及前期研究选择 Sal B $50 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 浓度进行后续研究^[7]。ROS 是细胞内多个氧化还原反应的正常代谢产物。在生理条件下,生物体内 ROS 的产生和清除处于动态平衡状态,当机体受到有害因素如缺血再灌注损伤等刺激时,ROS 动态平衡状态被破坏,ROS 的产生超过清除,造成细胞或组织内 ROS 堆积,诱导氧化应激发生,氧化应激进一步造成机体损伤,引起心血管疾病等。生理状态下,细胞具有完善的抗氧化系统主要分为两大类,一为抗氧化酶如超氧化物歧化酶(SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶等;二是非酶类抗氧化系统如类胡萝卜素、GSH 等^[11,12]。GSH 是一种由 3 个氨基酸残基组成的小肽,全称为谷氨酰-半胱氨酰-甘氨酸,GSH 几乎存在于每一个细胞中,GSH 包括 G-SH 和氧化型谷胱甘肽(G-S-S-G)^[13]。机体内 ROS 的生成和抗氧化之间的平衡决定了氧化应激的程度^[14]。本研究发现,H9C2 细胞 OGD/R 损伤后,ROS 含量增加,t-GSH 含量降低,说明 OGD/R 损伤破坏了 H9C2 细胞内氧化与抗氧化之间平衡,加重了氧化应激水平,丹酚酸B给药后 H9C2 细胞内 ROS 含量降低,t-GSH 含量增

加,表明丹酚酸B可以调节体内氧化与抗氧化之间平衡,降低细胞氧化应激损伤。NO 是生物体内重要的活性氮,一种亲脂性、可扩散的分子,是血管内皮细胞分泌的血管活性物质,有较强的舒血管、抗血栓的功能,现代研究发现 NO 参与调控线粒体的生理功能,一定浓度的外源 NO 可减轻线粒体的氧化损伤,进一步保护心脑血管系统^[15]。本研究结果表明,H9C2 细胞 OGD/R 损伤后降低了 NO 含量,OGD/R 后损伤细胞血管活性物质分泌降低,不利于血管舒张,丹酚酸B给药后 H9C2 细胞内 NO 含量增加,表明丹酚酸B增加 NO 含量,NO 参与了细胞缺氧复氧损伤过程,并通过调节 NO 含量保护 OGD/R 后损伤。

线粒体是高度动态化的双膜细胞器,处于不断分裂与融合的平衡中。线粒体分裂融合是线粒体稳态的重要部分,维持线粒体稳态是细胞正常代谢、正常电生理活动的重要调节部分。线粒体占心肌细胞总体积的 30%~40%,每日产生约 6 kg ATP 维持心脏的正常收缩^[16]。研究证实,线粒体分裂融合平衡的破坏是心肌缺血再灌注损伤、心力衰竭等多种心血管疾病病理过程的重要分子机制^[17]。线粒体分裂是通过分离线粒体损伤部位,并通过线粒体自噬降解清除的过程;线粒体融合是融合毗邻损伤线粒体的外膜与内膜,形成呈纤维状延伸和网络状结构的线粒体^[18]。线粒体分裂融合的过程受多种蛋白精确调控,线粒体分裂蛋白主要有 Drp1、Fis1;线粒体融合蛋白有 Mfn1、Mfn2、视神经萎缩蛋白 1 (optic atrophy-1, Opa1)^[19]。

Drp1 是线粒体分裂的主要调节因子,线粒体分裂时 Drp1 转位至线粒体外膜,聚合形成环状结构促进线粒体分裂,研究表明抑制 Drp1 可提高细胞存活率,且抑制 Drp1 保护心肌缺血再灌注损伤,此外发现 Drp1 直接结合 Bax,促进其转移,并通过 Bax/Bak 对 Drp1 修

饰诱导细胞凋亡^[20]。Mfn1、Mfn2在缺血性心脏病中起重要作用,使之成为保护心肌缺血损伤的新的研发热点,有研究报道,Mfn1的缺失导致线粒体融合减少,片段化的线粒体引起线粒体自噬和细胞死亡;Mfn2的高表达加重心肌损伤,敲低Mfn2能抑制线粒体钙超载,同时可降低线粒体膜通透性转换孔开放减轻心肌缺血再灌注损伤^[18]。Bax是Bcl-2家族中重要的促凋亡分子,可活化下游的凋亡蛋白caspase。Caspase 3属于caspase家族,是细胞凋亡的效应器,研究表明激活caspase 3的活性,可导致心肌细胞的凋亡,最终导致心脏功能损伤,同时研究表明Bax与caspase 3之间相互影响,共同参与并调控细胞凋亡进程,Qian等^[21]研究表明氢气可通过调节Bax/caspase 3凋亡通路减轻大鼠创伤性脑损伤。本研究发现,H9C2细胞OGD/R损伤造成线粒体分裂相关蛋白Drp1表达增加、线粒体融合相关蛋白Mfn1降低、Mfn2表达增加,凋亡相关蛋白Bax、caspase 3表达水平增加,说明OGD/R诱导的H9C2细胞线粒体分裂融合平衡被打破,引起细胞凋亡的发生。丹酚酸B预给药之后降低Drp1、Mfn2及凋亡相关蛋白Bax、caspase 3表达水平,增加Mfn1表达水平,说明丹酚酸B通过调控线粒体分裂融合相关蛋白水平,维持线粒体稳态,减少细胞凋亡的发生。MPTP是贯穿线粒体内外膜的孔道,MPTP过度开放是线粒体功能改变的先决条件,研究发现Drp1可识别并调控MPTP开放,加重线粒体损伤和细胞死亡^[22]。同时,外源性NO供体能够抑制MPTP开放,抑制线粒体损伤,从而保护心肌缺血再灌注损伤^[23]。本研究发现OGD/R诱导的H9C2细胞MPTP荧光强度降低,MPTP开放增加,丹酚酸B预给药之后MPTP荧光强度增加,MPTP开放降低,结合NO及Drp1蛋白表达,提示丹酚酸B可能通过调控Drp1及NO降低MPTP开放程度,保护线粒体功能。通过分子对接筛选丹酚酸B与线粒体分裂融合蛋白结合情况,结果显示丹酚酸B与线粒体分裂蛋白Drp1对接的结合自由能小于0,表明丹酚酸B与线粒体分裂蛋白Drp1能自由结合,具体结合位点为第179位甲硫氨酸、第181位亮氨酸形成氢键,结合位点以氢键连接构成较稳定的构象,表明丹酚酸B与Drp1良好的结合可能是丹酚酸B调控线粒体分裂减轻OGD/R诱导的H9C2心肌细胞损伤关键。

综上所述,本研究发现丹酚酸B对OGD/R诱导的H9C2心肌细胞具有保护作用,主要通过降低ROS含量,增加t-GSH、NO含量,降低Drp1、Mfn2、Bax、caspase 3的蛋白表达水平,增加Mfn1的蛋白表达水平,降低MPTP开放水平,维持线粒体分裂融合水平,减少细胞凋亡,为丹酚酸B保护心肌缺血再灌注损伤

作用提供了实验依据。

作者贡献: 刘子馨负责实验操作和文章撰写;付建华负责实验总体设计及稿件修改;辛高杰、尤越、陈原原、高佳明、李玲美参与了部分实验操作与论文修改;孟红旭、韩笑、李磊、张业昊、刘建勋参与了部分实验操作与方法理论建议。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

- [1] Wu XL, Han Y, Li JL, et al. piRNA-5938 can regulate cardiomyocyte apoptosis and mitochondrial fission [J]. *J Clin Rehabil Tis Eng Res*, 2023, 27: 1750-1757.
- [2] Zheng JB, Huang JZ, Li JF, et al. Effect of stellate ganglion block on cardiomyocyte apoptosis and expression of PI3K/Akt signaling pathway in cardiac failure rats [J]. *Chin J Mod Med (中国现代医学杂志)*, 2020, 30: 9-13.
- [3] Ding F, Shao ZW, Yang SH, et al. Role of mitochondrial pathway in compression-induced apoptosis of nucleus pulposus cells [J]. *Apoptosis*, 2012, 17: 579-590.
- [4] Hunter WG, Kelly JP, McGarrah RW 3rd, et al. Metabolic dysfunction in heart failure: diagnostic, prognostic, and pathophysiologic insights from metabolomic profiling [J]. *Curr Heart Fail Rep*, 2016, 13: 119-131.
- [5] Sharp WW, Beiser DG, Fang YH, et al. Inhibition of the mitochondrial fission protein dynamin-related protein 1 improves survival in a murine cardiac arrest model [J]. *Crit Care Med*, 2015, 43: e38-e47.
- [6] Wei XY, Yang T, Liu HR, et al. Research progress on pharmacological effects of salvianolic acid B [J]. *J Pharm Res (药学研究)*, 2021, 40: 748-752.
- [7] Xin GJ, Fu JH, Han X, et al. Salvianolic acid B regulates mitochondrial autophagy mediated by NIX to protect H9C2 cardiomyocytes from hypoxia/reoxygenation injury [J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2020, 45: 2960-2965.
- [8] Vogel B, Mehta SR, Mehran R. Reperfusion strategies in acute myocardial infarction and multivessel disease [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14: 665-678.
- [9] Del Re DP, Amgalan D, Linkermann A, et al. Fundamental mechanisms of regulated cell death and implications for heart disease [J]. *Physiol Rev*, 2019, 99: 1765-1817.
- [10] Cao C, Li LM, Han X, et al. Effect of asiaticoside on OGD/R induced injury of H9C2 cardiomyocytes based on PI3K/Akt/Beclin-1 signaling pathway [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2023, 58: 1149-1155.
- [11] Zorov DB, Juhaszova M, Sollott SJ. Mitochondrial reactive oxygen species (ROS) and ROS-induced ROS release [J]. *Physiol Rev*, 2014, 94: 909-950.
- [12] Indo HP, Davidson M, Yen HC, et al. Evidence of ROS

- generation by mitochondria in cells with impaired electron transport chain and mitochondrial DNA damage [J]. *Mitochondrion*, 2007, 7: 106-118.
- [13] Dickinson DA, Forman HJ. Cellular glutathione and thiols metabolism [J]. *Biochem Pharmacol*, 2002, 64: 1019-1026.
- [14] Xie JW, Su TD, Wei YT, et al. Research progress of antioxidant drugs in myocardial ischemia reperfusion injury [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2021, 56: 1845-1855.
- [15] Procházková D, Wilhelmová N. Nitric oxide, reactive nitrogen species and associated enzymes during plant senescence [J]. *Nitric Oxide*, 2011, 24: 61-65.
- [16] Ong SB, Hausenloy DJ. Mitochondrial morphology and cardiovascular disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 88: 16-29.
- [17] Chan DC. Mitochondrial dynamics and its involvement in disease [J]. *Annu Rev Pathol*, 2020, 15: 235-259.
- [18] Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, et al. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development [J]. *J Cell Biol*, 2003, 160: 189-200.
- [19] Vásquez-Trincado C, García-Carvajal I, Pennanen C, et al. Mitochondrial dynamics, mitophagy and cardiovascular disease [J]. *J Physiol*, 2016, 594: 509-525.
- [20] Xiong XX, Xiong WP, Li LR, et al. Down-regulation of miR-29a inhibits mitochondrial fusion and fission in rat H9c2 cardiomyocytes induced by oxygen and glucose appropriation/reoxygenation [J]. *Chin J Cell Mol Immunol (细胞与分子免疫学杂志)*, 2022, 38: 998-1004.
- [21] Qian B, Feng Y, Zou ZQ, et al. Study on hydrogen attenuating traumatic brain injury in rats through Bax/caspase 3 apoptosis pathway [J]. *Clin Misdiagn Misther (临床误诊误治)*, 2022, 35: 102-106.
- [22] Paradies G, Paradies V, Ruggiero FM, et al. Changes in the mitochondrial permeability transition pore in aging and age-associated diseases [J]. *Mech Ageing Dev*, 2013, 134: 1-9.
- [23] Wang G, Liem DA, Vondriska TM, et al. Nitric oxide donors protect murine myocardium against infarction *via* modulation of mitochondrial permeability transition [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2005, 288: H1290-H1295.