落新妇苷对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响及机制Δ

陈兴华[1*]，韩　露[2]，贡　鸣[3]，张继倬[1#]（1.首都医科大学附属北京世纪坛医院心脏外科，北京　100038；2.首都医科大学附属朝阳医院医学研究中心，北京　100020；3.首都医科大学附属北京安贞医院心外科，北京　100029）

中图分类号　R965　　**文献标志码**　A　　**文章编号**　1001-0408（2023）10-1193-07
DOI　10.6039/j.issn.1001-0408.2023.10.08

摘　要　目的　探究落新妇苷（AST）对大鼠心肌缺血再灌注损伤（MIRI）的影响，以及可能的作用机制。**方法**　将SD雄性大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性对照组（复方丹参片240 mg/kg）和AST低、高剂量组（30、90 mg/kg）以及AST高剂量+缺氧诱导因子1α（HIF-1α）抑制剂组（AST 90 mg/kg+2-甲氧基雌二醇15 mg/kg），每组25只。除假手术组外，其他各组大鼠均建立MIRI模型，灌胃或腹腔注射相应药物或生理盐水，连续28 d。测定各组大鼠血清中心肌肌钙蛋白I（cTnI）、肌酸激酶同工酶（CK-MB）含量，测量心肌梗死体积比，观察心肌组织病理形态变化、心肌细胞凋亡率和心肌组织线粒体的超微结构，测定心肌组织中肿瘤坏死因子α（TNF-α）、白细胞介素6（IL-6）、丙二醛（MDA）含量和超氧化物歧化酶（SOD）活性以及HIF-1α、腺病毒E1B相互作用蛋白3（BNIP3）、肌球蛋白样Bcl-2结合蛋白（Beclin1）的表达，并计算微管相关蛋白轻链3（LC3）Ⅱ与Ⅰ的比值（简称“LC3Ⅱ/Ⅰ”）。**结果**　与模型组比较，阳性对照组和AST低、高剂量组大鼠的心肌组织无明显肿胀，心肌纤维排列整齐，心肌梗死体积比和cTnI、CK-MB、TNF-α、IL-6、MDA含量以及细胞凋亡率均显著降低（$P<0.05$），SOD活性和HIF-1α、BNIP3、Beclin1蛋白表达量以及LC3Ⅱ/Ⅰ均显著升高（$P<0.05$）。HIF-1α抑制剂可显著削弱AST对MIRI模型大鼠上述指标的改善作用（$P<0.05$）。**结论**　AST可以通过激活HIF-1α/BNIP3信号通路来增强线粒体自噬，从而减轻大鼠MIRI。

关键词　落新妇苷；心肌缺血再灌注损伤；缺氧诱导因子1α；B细胞淋巴瘤2/腺病毒E1B相互作用蛋白3；自噬

Effects and mechanism of astilbin on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats

CHEN Xinghua[1], HAN Lu[2], GONG Ming[3], ZHANG Jizhuo[1] (1. Dept. of Cardiac Surgery, Beijing Shijitan Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100038, China; 2. Medical Research Center, Beijing Chaoyang Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100020, China; 3. Dept. of Cardiac Surgery, Beijing Anzhen Hospital Affiliated to Capital Medical University, Beijing 100029, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To investigate the effects of astilbin (AST) on myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in rats and its potential mechanism. **METHODS** SD male rats were randomly divided into sham operation group, model group, positive control group (Compound *Salvia miltiorrhiza* tablets, 240 mg/kg), AST low-dose and high-dose groups (30, 90 mg/kg), and high-dose of AST+hypoxia-inducible factor-1α (HIF-1α) inhibitor group (AST 90 mg/kg+2ME2 15 mg/kg), with 25 rats in each group. Except for sham operation group, MIRI model was induced in other groups, and then given relevant drug or normal saline intragastrically or intraperitoneally, for consecutive 28 d. Serum contents of cardiac troponin I (cTnI) and creatine kinase isoenzyme (CK-MB) were detected; volume ratio of myocardial infarction was measured; the pathological changes of myocardium, the apoptotic rate of myocardial cells and ultrastructure of mitochondria in myocardial tissue were all observed. The contents of tumor necrosis factor α (TNF-α), interleukin 6 (IL-6) and malondialdehyde (MDA), the activity of superoxide dismutase (SOD), the expressions of HIF-1α, adenovirus E1B interacting protein 3 (BNIP3) and myosin-like Bcl-2 interacting protein (Beclin1) were determined in myocardium. The ratio of microtubule-associated protein light chain 3 (LC3) Ⅱ to Ⅰ (LC3 Ⅱ/Ⅰ) in rat myocardium was calculated. **RESULTS** Compared with model group, no obvious swelling was found in the myocardial tissue of rats in positive control group, AST low-dose and high-dose groups, and the myocardial fibers were arranged regularly; the volume ratio of myocardial infarction, the contents of cTnI, CK-MB, TNF-α, IL-6 and MDA, the apoptotic rate were decreased significantly ($P<0.05$), while SOD activity, protein expressions of HIF-1α, BNIP3 and Beclin1, LC3 Ⅱ/Ⅰ were increased significantly ($P<0.05$). HIF-1α inhibitor could significantly weaken the improvement effect of AST on the above indicators in MIRI model rats ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** AST enhances mitochondrial autophagy by activating HIF-1α/BNIP3 signaling pathway, thereby reducing MIRI in rats.

KEYWORDS astilbin; myocardial ischemia-reperfusion injury; hypoxia-inducible factor-1α; B-cell lymphoma-2/adenovirus E1B interacting protein 3; autophagy

Δ**基金项目** 国家自然科学基金资助项目（No.81770466）

＊**第一作者** 主治医师，硕士。研究方向：心肌缺血再灌注损伤。E-mail：sjtxzwk@163.com

＃**通信作者** 主任医师，硕士。研究方向：心肌缺血再灌注损伤。E-mail：13911028861@163.com

心肌缺血，即心脏血管阻塞，是全球最普遍的心血管疾病死亡原因之一。伴随着血流恢复的再灌注治疗是有效恢复梗死的治疗方法，且对短时间内缺血的疗效会更好[1]。然而，再灌注也会导致缺血性心肌损伤，即心肌缺血再灌注损伤（myocardial ischemia-reperfusion injury，MIRI）[2]。因此寻找减轻MIRI的方法对治疗心血管疾病具有重要意义。已知MIRI的标志包括缺氧诱导因子1α（hypoxia-inducible factor-1α，HIF-1α）增加。HIF-1α是细胞缺氧反应的主要调节因子，与细胞增殖、血管生成及肿瘤转移等相关下游靶基因表达的关系密切，还可调节一些促凋亡基因的表达[3—4]。B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）/腺病毒E1B相互作用蛋白3（adenovirus E1B interacting protein 3，BNIP3）是Bcl-2蛋白家族中由缺氧诱导的促凋亡成员，*BNIP3*也是HIF-1α的靶基因[5]。已有研究证明，HIF-1α/BNIP3信号通路诱导的自噬可改善MIRI[6]。落新妇苷（astilbin，AST）是从落新妇的根茎中提取出来的一种天然类黄酮化合物，因具有抗氧化、抗炎、抗肿瘤等药理活性而被广泛使用[7]。已知AST可以通过抑制Toll样受体4/髓样分化因子88/核转录因子-κB通路来减轻脑部缺血再灌注损伤[8]，但对MIRI的影响以及调节机制尚不清楚。基于此，本研究探讨了AST对大鼠MIRI的影响及机制，旨在为MIRI的临床治疗提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括AIView V10型多参数心电图监测仪（深圳市科瑞康实业有限公司）、BX53型半电动荧光显微镜[仪景通光学科技（上海）有限公司]、ChemiDoc MP E-Gel全能型荧光成像系统[伯乐生命医学产品（上海）有限公司]、HT7800型透射电子显微镜[日立科学仪器（北京）有限公司]、ESO 5D Mark Ⅳ型数码相机[佳能（中国）有限公司]。

1.2 主要药品与试剂

本研究所用主要药品与试剂包括AST原料药（货号TC1039，纯度98%，四川精萃天成药物科技有限公司），复方丹参片（批号20220324，规格相当于饮片0.6 g，北京顺鑫祥云药业有限责任公司），HIF-1α抑制剂2-甲氧基雌二醇（2-Methoxyestradiol，2ME2，货号HY-12033，美国Med Chem Express公司）；心肌肌钙蛋白I（cardiac troponin I，cTnI）、肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor α，TNF-α）、白细胞介素6（interleukin 6，IL-6）ELISA试剂盒（货号分别为ELISA-1178、ELISA-1100、ELISA-1092，北京凯诗源生物科技有限公司）；肌酸激酶同工酶（creatine kinase isoenzymes，CK-MB）、超氧化物歧化酶（superoxide dismutase，SOD）、丙二醛（malondialdehyde，MDA）检测试剂盒[货号分别为BKBZ20、EKRA1034、EKRA1059，迪信泰检测科技（北京）有限公司]；2，3，5-氯化三苯基四氮唑（TTC）染色试剂盒（货号R30127，上海源叶生物科技有限公司）；苏木素-伊红染色液（货号AG1120，上海吉至生化科技有限公司）；TUNEL凋亡检测试剂盒（货号T2130-50T，北京索莱宝科技有限公司）；HIF-1α、BNIP3、微管相关蛋白轻链3（microtubule-associated protein light chain 3，LC3）、肌球蛋白样Bcl-2结合蛋白（myosin-like Bcl-2 interacting protein，Beclin1）抗体（货号分别为ab179483、ab109362、ab128025、ab207612，英国Abcam公司）；山羊抗兔IgG（H+L）二抗（货号FNab09778，武汉菲恩生物科技有限公司）；水为焦碳酸二乙酯处理水[货号10601ES60，翌圣生物科技（上海）股份有限公司]。

1.3 动物

SD雄性大鼠150只，8周龄，体质量为200～220 g，购于江苏华创信诺医药科技有限公司，生产许可证号为SCXK（苏）2020-0009。所有大鼠均在温度25 ℃、相对湿度60%的环境中饲养，饲养期间自由饮食，光照和黑暗环境12 h交替。本实验方案经首都医科大学附属北京世纪坛医院科学研究伦理委员会批准[批准号为sjtky11-1x-2022（15）]。

2 方法

2.1 MIRI模型的建立

参照相关文献[9]方法制备MIRI模型大鼠。先腹腔注射1%戊巴比妥钠（40 mg/kg）麻醉大鼠，然后将大鼠气管插管连接到呼吸机（呼吸比3∶1，潮气量2 mL，频率每分钟50次）。将大鼠固定，监测心电图。在胸骨左侧3～4肋骨处解剖胸腔，露出心脏，然后用6-0缝合线结扎左前降冠状动脉，阻断血流。根据心电图显示，以ST段抬高表示缺血成功；30 min后取出缝合线恢复血液灌注2 h，升高的ST段下降一半及以上、T波恢复，表示再灌注成功。假手术组大鼠穿线后冠状动脉未结扎，其他操作相同。

2.2 分组和给药

将大鼠随机分为假手术组、模型组、阳性对照组和AST低、高剂量组以及AST高剂量+HIF-1α抑制剂组，每组25只。除假手术组外，其余各组大鼠均按“2.1”项下方法建立MIRI模型。造模成功后，阳性对照组大鼠灌胃240 mg/kg复方丹参片[10]；AST低、高剂量组大鼠分别灌胃30、90 mg/kg AST[11]；AST高剂量+HIF-1α抑制剂组大鼠先灌胃90 mg/kg AST后，再腹腔注射15 mg/kg 2ME2[12]；假手术组和模型组大鼠均灌胃等体积的生理盐水，每天1次，持续28 d。

2.3 血清中cTnI、CK-MB含量测定

末次给药12 h后，将所有大鼠用1%戊巴比妥钠麻醉后，腹主动脉采血，于4 ℃下3 000×*g*离心15 min，收集上清液。根据ELISA试剂盒说明书操作，测定血清中cTnI、CK-MB含量。

2.4 心肌梗死体积比测量

将大鼠麻醉处死后，摘取心脏，用磷酸盐缓冲液（PBS）清洗后，冻存在－80 ℃的冰箱中。5 min后，每组随机选取5只大鼠的心肌组织，切片，放入1%TTC溶液中，于37 ℃下避光孵育30 min，再将组织用4%多聚甲醛溶液浸泡24 h。用数码相机收集图像并通过Image-Pro Plus软件测量大鼠心肌梗死面积，计算心肌梗死体积比＝（心肌梗死面积×厚度）/（心肌面积×厚度）×100%。

2.5 心肌组织病理形态观察

每组随机选取5只剩余大鼠冻存的心肌组织，用4%多聚甲醛溶液固定过夜，石蜡包埋、切片、脱蜡，水化后用苏木素-伊红染色、PBS清洗切片、脱水、透明、封片。用光学显微镜观察大鼠的心肌组织病理形态。

2.6 心肌细胞凋亡率测定

取“2.5”项下石蜡切片进行脱蜡，PBS清洗3次，加入蛋白酶K孵育30 min；加入配制好的TUNEL工作液，于37 ℃下避光放置1 h；用4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（DAPI）染液复染10 min，PBS脱色3次，晾干后封片。用荧光显微镜观察拍照，并计算大鼠心肌细胞凋亡率。

2.7 心肌组织中TNF-α、IL-6、MDA含量和SOD活性测定

每组随机选取5只剩余大鼠冻存的心肌组织，加入PBS研磨，于4 ℃下5 000×g离心10 min，收集上清液。根据试剂盒说明书操作，测定大鼠心肌组织中TNF-α、IL-6、MDA含量和SOD活性。

2.8 心肌组织线粒体的超微结构观察

每组随机选取5只剩余大鼠冻存的心肌组织，用1.5%戊二醛和1%四氧化锇双重固定，丙酮脱水后用环氧丙烷包埋，切片，用乙酸铀酰和柠檬酸铅双染色。用透射电子显微镜观察大鼠心肌组织线粒体的超微结构。

2.9 心肌组织中HIF-1α、BNIP3、LC3Ⅱ/Ⅰ、Beclin1蛋白表达测定

取每组剩余的5只大鼠的冻存心肌组织，加入蛋白裂解液，置于冰上匀浆，离心收集上清液，BCA法测定蛋白浓度后，用电泳分离蛋白并转至聚偏二氟乙烯膜，封闭过夜，用一抗（HIF-1α、BNIP3抗体稀释比例1∶1 000，LC3抗体稀释比例1∶500，Beclin1抗体稀释比例1∶2 000）室温孵育2 h，再用羊抗兔IgG二抗（稀释比例1∶1 000）室温振荡孵育2 h，洗膜后显影，在凝胶成像仪中观察蛋白条带。以β-肌动蛋白（β-actin）为内参，用Gel-Pro analyzer4软件分析目标蛋白表达量，并计算LC3Ⅱ与LC3Ⅰ的比值（以下简称“LC3Ⅱ/Ⅰ”）。

2.10 统计学分析

本研究数据均采用Graphpad prism8.0软件进行统计学分析，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用SNK-q检验。检验水准α＝0.05。

3 结果

3.1 血清中cTnI、CK-MB含量比较

与假手术组比较，模型组大鼠血清中cTnI、CK-MB含量均显著升高（P＜0.05）；与模型组比较，阳性对照组和AST低、高剂量组大鼠血清中cTnI、CK-MB含量均显著降低（P＜0.05）；与AST高剂量组比较，AST高剂量+HIF-1α抑制剂组大鼠血清中cTnI、CK-MB含量均显著升高（P＜0.05）。结果见表1。

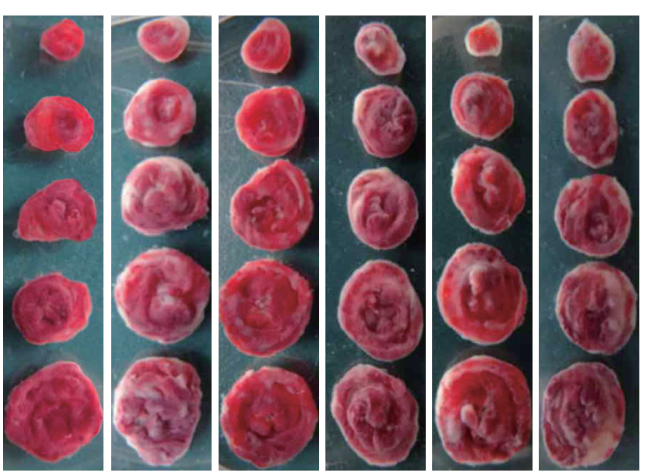
表1 各组大鼠血清中cTnI、CK-MB含量和心肌梗死体积比、细胞凋亡率比较（$\bar{x}\pm s$，n＝25或n＝5）

组别	cTnI/（pg/mL）	CK-MB/（U/mL）	心肌梗死体积比/%	细胞凋亡率/%
假手术组	42.35±2.36	82.16±2.56	0	2.67±0.42
模型组	118.73±4.12[a]	163.86±4.28[a]	27.63±2.75[a]	35.47±2.63[a]
阳性对照组	50.62±2.28[b]	90.38±2.87[b]	12.96±1.37[b]	11.64±1.26[b]
AST低剂量组	83.32±3.27[b]	131.27±3.43[b]	20.18±2.34[b]	25.19±2.21[b]
AST高剂量组	56.17±2.43[b]	98.46±3.11[b]	14.37±1.42[b]	17.43±1.82[b]
AST高剂量+HIF-1α抑制剂组	107.66±3.86[c]	157.61±3.80[c]	25.59±2.51[c]	31.58±2.50[c]

a：与假手术组比较，P＜0.05；b：与模型组比较，P＜0.05；c：与AST高剂量组比较，P＜0.05

3.2 心肌梗死体积比和细胞凋亡率比较

与假手术组比较，模型组大鼠心肌梗死体积比和细胞凋亡率均显著升高（P＜0.05）；与模型组比较，阳性对照组和AST低、高剂量组大鼠心肌梗死体积比和细胞凋亡率均显著降低（P＜0.05）；与AST高剂量组比较，AST高剂量+HIF-1α抑制剂组大鼠心肌梗死体积比和细胞凋亡率均显著升高（P＜0.05）。结果见表1、图1和图2。



A B C D E F

A：假手术组；B：模型组；C：阳性对照组；D：AST低剂量组；E：AST高剂量组；F：AST高剂量+HIF-1α抑制剂组

图1 各组大鼠心肌梗死的TTC染色图

3.3 心肌组织病理形态比较

如图3所示，假手术组大鼠心肌组织结构正常，细胞整齐；与假手术组比较，模型组大鼠心肌组织中细胞减少、肿胀明显，且心肌纤维排列紊乱；与模型组比较，阳性对照组和AST低、高剂量组大鼠心肌组织中细胞变多、无明显肿胀，心肌纤维排列整齐；AST高剂量+HIF-1α抑制剂组大鼠心肌组织的形态与模型组相似。

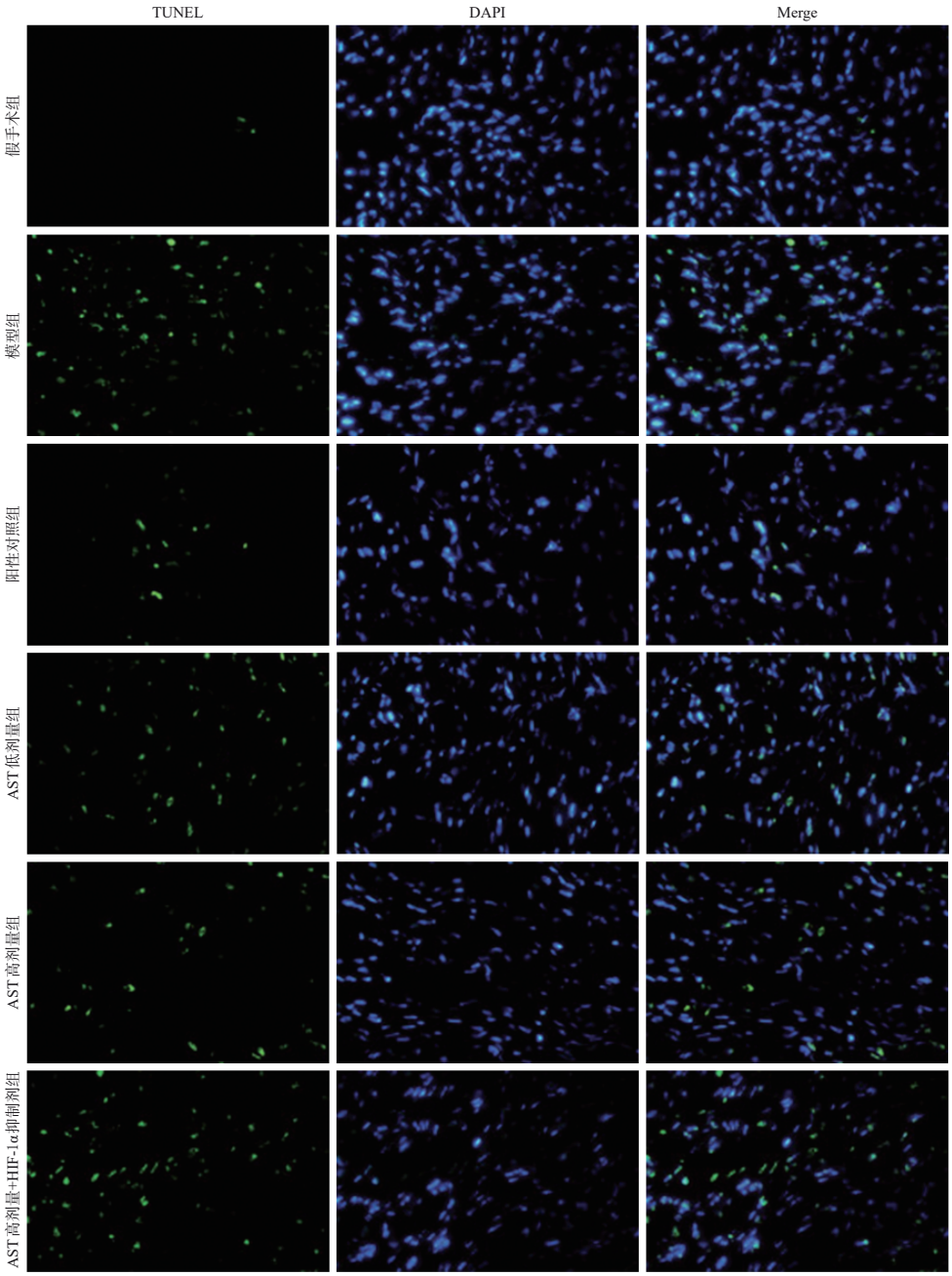


图2　各组大鼠心肌细胞凋亡的染色图（×200）

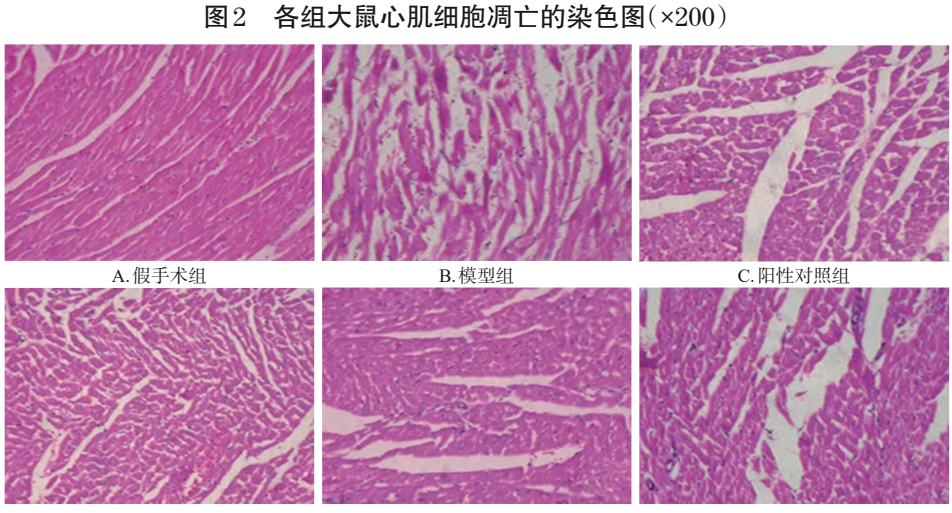


图3　各组大鼠心肌组织病理形态的苏木精-伊红染色图（×400）

3.4 心肌组织中TNF-α、IL-6、MDA含量和SOD活性比较

与假手术组比较，模型组大鼠心肌组织中TNF-α、IL-6、MDA含量均显著升高，SOD活性显著降低（$P<0.05$）；与模型组比较，阳性对照组和AST低、高剂量组大鼠心肌组织中TNF-α、IL-6、MDA含量均显著降低，SOD活性均显著升高（$P<0.05$）；与AST高剂量组比较，AST高剂量+HIF-1α抑制剂组大鼠心肌组织中TNF-α、IL-6、MDA含量均显著升高，SOD活性显著降低（$P<0.05$）。结果见表2。

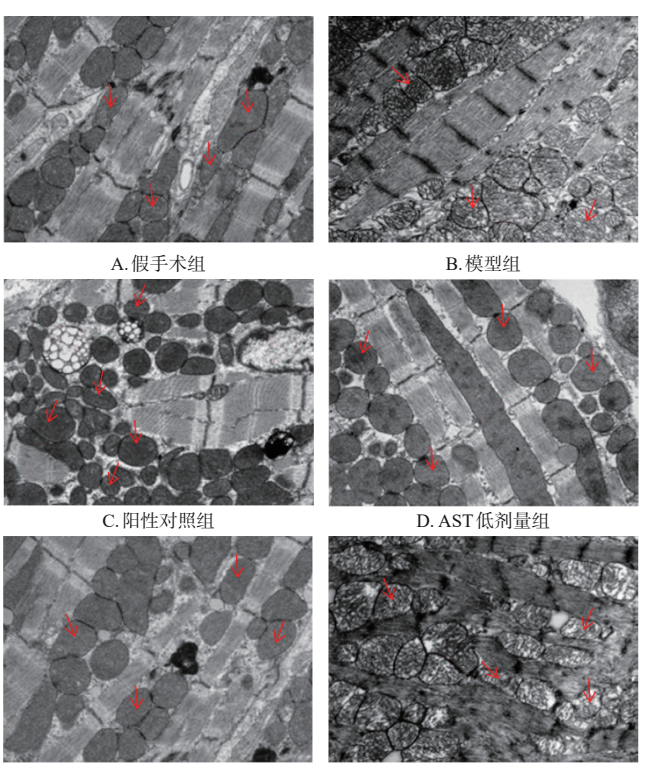
表2 各组大鼠心肌组织中TNF-α、IL-6、MDA含量和SOD活性比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	TNF-α/(pg/mL)	IL-6/(pg/mL)	SOD/(U/mL)	MDA/(μmol/mL)
假手术组	26.34±1.42	41.65±2.10	61.24±2.86	5.31±0.58
模型组	98.47±3.06[a]	124.27±3.81[a]	17.62±1.87[a]	20.16±1.93[a]
阳性对照组	42.56±1.37[b]	52.46±2.21[b]	56.17±2.45[b]	6.72±0.86[b]
AST低剂量组	68.54±2.53[b]	91.08±3.26[b]	34.46±2.16[b]	13.48±1.52[b]
AST高剂量组	45.18±1.62[b]	54.63±2.43[b]	52.73±2.31[b]	7.54±1.05[b]
AST高剂量+HIF-1α抑制剂组	93.64±2.83[c]	107.65±3.37[c]	23.34±1.25[c]	18.37±1.68[c]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与AST高剂量组比较，$P<0.05$

3.5 心肌组织线粒体结构比较

如图4所示，假手术组大鼠心肌组织线粒体结构完整；与假手术组比较，模型组大鼠心肌组织线粒体明显肿胀，部分嵴消失；与模型组比较，阳性对照组和AST低、高剂量组大鼠心肌组织线粒体肿胀明显减轻，嵴清晰；与AST高剂量组比较，AST高剂量+HIF-1α抑制剂组大鼠心肌组织的线粒体再次出现肿胀，与模型组相似。

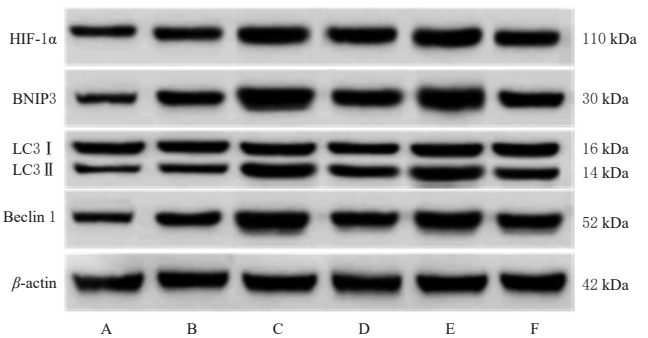


→：嵴

图4 各组大鼠心肌组织线粒体形态的显微图（×5 000）

3.6 心肌组织中HIF-1α、BNIP3、Beclin1蛋白以及LC3Ⅱ/Ⅰ比较

与假手术组比较，模型组大鼠心肌组织中HIF-1α、BNIP3、Beclin1蛋白表达量以及LC3Ⅱ/Ⅰ均显著升高（$P<0.05$）；与模型组比较，阳性对照组和AST低、高剂量组大鼠心肌组织中HIF-1α、BNIP3、Beclin1蛋白表达量以及LC3Ⅱ/Ⅰ均显著升高（$P<0.05$）；与AST高剂量组比较，AST高剂量+HIF-1α抑制剂组大鼠心肌组织中HIF-1α、BNIP3、Beclin1蛋白表达量以及LC3Ⅱ/Ⅰ均显著降低（$P<0.05$）。结果见图5和表3。



A：假手术组；B：模型组；C：阳性对照组；D：AST低剂量组；E：AST高剂量组；F：AST高剂量+HIF-1α抑制剂组

图5 各组大鼠心肌组织中HIF-1α、BNIP3、LC3Ⅱ/Ⅰ、Beclin1蛋白表达的电泳图

表3 各组大鼠心肌组织中HIF-1α、BNIP3、LC3Ⅱ/Ⅰ、Beclin1蛋白表达量比较（$\bar{x}\pm s$，$n=5$）

组别	HIF-1α	BNIP3	LC3Ⅱ/Ⅰ	Beclin1
假手术组	0.54±0.06	0.41±0.05	0.38±0.03	0.46±0.05
模型组	0.72±0.08[a]	0.81±0.06[a]	0.59±0.06[a]	0.79±0.09[a]
阳性对照组	1.43±0.10[b]	1.62±0.13[b]	1.32±0.13[b]	1.38±0.15[b]
AST低剂量组	1.23±0.09[b]	1.28±0.14[b]	0.83±0.09[b]	1.04±0.12[b]
AST高剂量组	1.52±0.12[b]	1.64±0.15[b]	1.27±0.11[b]	1.30±0.10[b]
AST高剂量+HIF-1α抑制剂组	0.76±0.09[c]	0.85±0.09[c]	0.62±0.07[c]	0.82±0.07[c]

a：与假手术组比较，$P<0.05$；b：与模型组比较，$P<0.05$；c：与AST高剂量组比较，$P<0.05$

4 讨论

再灌注是心肌缺血等心血管疾病常见的治疗方法。然而再灌注可能会进一步导致MIRI，从而引发心功能不全，例如心律失常、心肌细胞死亡以及微血管功能障碍等，甚至会造成比原始缺血性损伤更严重的心肌损伤[13-14]。cTnI和CK-MB是心肌损伤的生化标志物，在MIRI中表达水平升高。MIRI也会导致一系列复杂的炎症反应和氧化应激，其中TNF-α和IL-6是重要的炎症细胞因子，SOD活性和MDA水平可以分别作为抗氧化和氧化的指标[15]。AST作为一种类黄酮的植物化学物质，具有抗氧化、抗炎、抗凋亡和免疫调节等多种药理特性，而且AST可以通过细胞凋亡和炎症反应来抑制脑缺血再灌注损伤[16]。本研究结果显示，与假手术组比较，模型组大鼠血清中cTnI、CK-MB含量均显著升高，心肌组织中细胞减少、肿胀明显，且心肌纤维排列紊乱，心肌细

胞凋亡率和TNF-α、IL-6、MDA含量均显著升高，SOD活性显著降低，揭示本研究MIRI大鼠模型建立成功。与模型组比较，阳性对照组和AST低、高剂量组大鼠血清中cTnI、CK-MB含量均显著降低，心肌组织中细胞变多、无明显肿胀，心肌纤维排列整齐，心肌细胞凋亡率和TNF-α、IL-6、MDA含量均显著降低，SOD活性均显著升高，揭示AST能够抑制MIRI模型大鼠的炎症和氧化应激反应，减少细胞凋亡，减轻MIRI。

HIF-1α是缺氧反应中的一种关键转录因子，可通过调节各种基因的表达来介导对缺氧的适应性反应，其在常氧条件下具有不稳定性，可以被蛋白酶体降解[17]。BNIP3位于线粒体中，可参与受损线粒体的自噬清除，与心脏病的发病机制有关[18]。HIF-1α信号通路可促进缺氧诱导的自噬，有研究证明HIF-1α在缺氧条件下能促进BNIP3的表达，进而导致LC3Ⅱ和Beclin1在缺氧下的积累，诱导线粒体自噬，抑制细胞凋亡，从而保护脑缺血再灌注损伤[19]。LC3的可溶性形式（LC3Ⅰ）转化为自噬囊泡相关形式（LC3Ⅱ）被认为是自噬的主要标志；*Beclin1*也是与自噬相关的必需基因[20]。本研究结果显示，与假手术组比较，模型组大鼠心肌组织线粒体明显肿胀，部分嵴消失，且心肌组织中HIF-1α、BNIP3、Beclin1蛋白表达量和LC3Ⅱ/Ⅰ均显著升高；与模型组比较，阳性对照组和AST低、高剂量组大鼠心肌组织线粒体肿胀明显减轻，嵴清晰，且HIF-1α、BNIP3、Beclin1蛋白表达量和LC3Ⅱ/Ⅰ均进一步升高。此外，HIF-1α抑制剂2ME2能明显削弱AST对MIRI模型大鼠的改善作用。由此可见，MIRI状态下HIF-1α及其下游基因*BNIP3*的表达均高于正常条件下，且经AST干预后可进一步加强HIF-1α和BNIP3启动子结合，进而诱导心肌组织线粒体自噬，抑制心肌细胞凋亡，改善心肌组织受损。

综上所述，AST可以通过激活HIF-1α/BNIP3信号通路来增强线粒体自噬，从而减轻大鼠MIRI。

参考文献

[1] YU S Y, DONG B, FANG Z F, et al. Knockdown of lncRNA AK139328 alleviates myocardial ischaemia/reperfusion injury in diabetic mice via modulating miR-204-3p and inhibiting autophagy[J]. J Cell Mol Med, 2018, 22(10): 4886-4898.

[2] LIN J H, LAI X H, FAN X X, et al. Oridonin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting GSDMD-mediated pyroptosis[J]. Genes (Basel), 2022, 13(11): 2133.

[3] FU Z J, WANG Z Y, XU L, et al. HIF-1α-BNIP3-mediated mitophagy in tubular cells protects against renal ischemia/reperfusion injury[J]. Redox Biol, 2020, 36: 101671.

[4] ZHAO X R, LIU L D, LI R, et al. Hypoxia-inducible factor 1-α (HIF-1α) induces apoptosis of human uterosacral ligament fibroblasts through the death receptor and mitochondrial pathways[J]. Med Sci Monit, 2018, 24: 8722-8733.

[5] PENG Y H, FANG Z Y, LIU M, et al. Testosterone induces renal tubular epithelial cell death through the HIF-1α/BNIP3 pathway[J]. J Transl Med, 2019, 17(1): 62.

[6] ZHANG Y N, LIU D W, HU H J, et al. HIF-1α/BNIP3 signaling pathway-induced-autophagy plays protective role during myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Biomedecine Pharmacother, 2019, 120: 109464.

[7] SUN S B, YAN Z J, SHUI X L, et al. Astilbin prevents osteoarthritis development through the TLR4/MD-2 pathway[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(22): 13104-13114.

[8] LI J, GU Z W, LIU Y, et al. Astilbin attenuates cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting the TLR4/MyD88/NF-κB pathway[J]. Toxicol Res (Camb), 2019, 8(6): 1002-1008.

[9] LIU X L, QI K, GONG Y, et al. Ferulic acid alleviates myocardial ischemia reperfusion injury via upregulating AMPKα2 expression-mediated ferroptosis depression[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2021, 79(4): 489-500.

[10] 范鹤馨，张志强. 葛花总黄酮对大鼠心肌缺血再灌注动物损伤模型的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志，2017，23(12)：119-125.

[11] LI Y, WANG R, XUE L, et al. Astilbin protects against cerebral ischaemia/reperfusion injury by inhibiting cellular apoptosis and ROS-NLRP3 inflammasome axis activation[J]. Int Immunopharmacol, 2020, 84: 106571.

[12] 杨龙，马宁，吴建江，等. HIF-1α/BNIP3信号通路在七氟烷减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用：与自噬的关系[J]. 中华麻醉学杂志，2020(1)：99-102.

[13] ZHOU M L, YU Y F, LUO X X, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury: therapeutics from a mitochondria-centric perspective[J]. Cardiology, 2021, 146(6): 781-792.

[14] CHEN H Y, XIAO Z Z, LING X, et al. ELAVL1 is transcriptionally activated by FOXC1 and promotes ferroptosis in myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating autophagy[J]. Mol Med, 2021, 27(1): 14.

[15] WEI H W, XUE Q J, SUN L, et al. BRD4 inhibition protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by suppressing inflammation and oxidative stress through the PI3K/AKT signaling pathway[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2021, 78(6): 839-846.

[16] WANG W, YUHAI, WANG H, et al. Astilbin reduces ROS accumulation and VEGF expression through Nrf2 in psoriasis-like skin disease[J]. Biol Res, 2019, 52(1): 49.

（下转第1203页）