

基于线粒体质量控制的荇草苷抗心肌缺血/再灌注损伤的机制研究

孙秀玉¹, 徐俊¹, 吴宥熹¹, 万思琦¹, 刘梦思¹, 刘立亚², 黄秀兰^{1*}

1. 中央民族大学药学院, 北京 100081

2. 中央民族大学生命与环境科学学院, 北京 100081

摘要: **目的** 探讨荇草苷对心肌缺血/再灌注损伤(MIRI)大鼠心肌细胞内线粒体质量的调控作用。**方法** 75只SD雄性大鼠随机分为假手术组、模型组、不同剂量(1.0、2.0、4.0 mg/kg)荇草苷预处理组。除假手术组外,其余各组大鼠均通过结扎冠状动脉左前降支致缺血30 min,再灌注120 min,制备MIRI模型。酶标仪检测线粒体膜电位(MMP)和线粒体通透性转换孔(mPTP)开放程度,分光光度法测定线粒体呼吸链酶复合物I~IV活性,TUNEL法检测心肌细胞凋亡水平,Western blotting法检测心肌细胞内凋亡与线粒体自噬相关蛋白的表达水平,免疫共沉淀法检测心肌细胞内Parkin与p62结合程度。

结果 荇草苷可显著恢复MIRI诱导的MMP、mPTP开放阈值和线粒体呼吸链酶复合物I~IV活性降低,减少心肌细胞凋亡;并能抑制心肌细胞内凋亡及线粒体自噬相关蛋白表达水平,减弱Parkin与p62的结合程度。**结论** 荇草苷对MIRI大鼠心肌细胞内线粒体具有明显保护作用,其机制可能通过Parkin依赖性和Parkin非依赖性信号通路抑制心肌细胞内线粒体自噬过度激活有关。

关键词: 荇草苷; 心肌缺血/再灌注损伤; 线粒体自噬; 凋亡; 线粒体质量控制

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)18-4337-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.18.018

Mechanism study of orientin protecting rat heart from myocardial ischemia/reperfusion injury based on mitochondrial quality control

SUN Xiu-yu¹, XU Jun¹, WU You-xi¹, WAN Si-qi¹, LIU Meng-si¹, LIU Li-ya², HUANG Xiu-lan¹

1. College of Pharmacy, Minzu University of China, Beijing 100081, China

2. College of Life and Environmental Sciences, Minzu University of China, Beijing 100081, China

Abstract: Objective To investigate the regulation effects of orientin on mitochondrial quality control in cardiomyocytes of rats with myocardial ischemia/reperfusion injury (MIRI). **Methods** A total of 75 Sprague-Dawley male rats were randomly divided into five groups: sham group, model group, and orientin preconditioning groups (1.0, 2.0, and 4.0 mg/kg). Except for sham group, all rats were exposed to modeling of MIRI with ligation of left anterior descending coronary artery (LADCA) for 30 min, and then releasing for 120 min. Mitochondrial membrane potential (MMP) and opening of mitochondrial permeability transition pore (mPTP) were detected by Microplate Reader; Activity of mitochondrial respiratory chain complexes I—IV was detected by Spectrophotometer; Cardiomyocyte apoptosis was detected by TUNEL method; Apoptosis and mitophagy related proteins were detected by Western Blot and the interaction between Parkin and p62 on mitochondria were detected by Co-IP. **Results** Orientin significantly restored MMP, mPTP opening threshold and activity of mitochondrial respiratory chain complexes I—IV, and reduced cardiomyocyte apoptosis. Additionally, orientin can dramatically inhibit the protein expression level apoptosis and mitophagy related proteins and weaken the interaction between Parkin and p62. **Conclusion** Orientin has a significant protective effect on cardiomyocyte mitochondria in MIRI rats. Its underlying mechanism is related to inhibition of hyperactivity of mitophagy in cardiomyocytes via Parkin-dependent and Parkin-independent signaling pathways.

Key words: orientin; myocardial ischemia/reperfusion injury; mitophagy; apoptosis; mitochondrial quality control

收稿日期: 2018-03-13

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81470182)

作者简介: 孙秀玉(1988—),女,博士生,研究方向为中药/民族药心血管药理学。E-mail: sxy880423@126.com

*通信作者 黄秀兰(1964—),女,重庆人,教授,博士,博士研究生导师,主要从事中药/民族药心血管药理学研究工作。

Tel: (010)68933254 E-mail: hxlcn@126.com

线粒体是调控细胞能量代谢最重要的细胞器,在细胞信号转导、活性氧产生及细胞凋亡诱导等方面发挥关键作用,决定细胞的生存和死亡^[1-2]。研究发现,心肌缺血/再灌注损伤(MIRI)过程中,心肌细胞内线粒体质量受损,是导致活性氧爆发性生成、线粒体通透性转换孔(mPTP)持续开放及线粒体凋亡途径激活的关键因素^[3-4]。因此,通过调控与线粒体质量控制相关的内源性机制改善线粒体质量,将成为防治 MIRI 的重要途径^[5]。

苗药都木油为陵齿蕨科乌蕨属植物乌蕨 *Stenoloma chusanum* Ching 的全草和根茎,具有解毒、利湿、止血等功效,有“万能解毒药”之称,苗医常将其用于胸口胀痛等“毒”性病症的治疗^[6]。现代药理学研究发现,都木油具有显著的心血管保护作用^[7-8]。其含有的黄酮类化合物荭草苷被认为是都木油作用于心血管系统的主要活性成分之一,能够有效缓解缺血/再灌注(IR)诱导的心肌损伤^[9-10]。本课题组前期研究结果表明,荭草苷对 IR 损伤心脏的保护作用与调控自噬活性相关^[11-12];而线粒体自噬是心肌细胞内主要的自噬方式之一^[13],故以线粒体自噬为核心的线粒体质量控制可能成为抗 MIRI 的新靶点。本研究通过结扎大鼠左冠状动脉前降支,制备大鼠在体 MIRI 模型,探讨荭草苷对心肌细胞线粒体质量的调控作用,为荭草苷及都木油防治 MIRI 提供理论依据。

1 材料

1.1 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 75 只,体质量(200±20)g,购自军事医学科学院动物研究所,许可证号 SCXK-(军)0007-004。

1.2 药品与试剂

荭草苷(质量分数>98%,上海融禾医药科技发展有限公司,批号 100329);戊巴比妥钠、渥曼青霉素(美国 Sigma 公司);DeadEnd™ 荧光测定 TUNEL 系统(美国 Promega 公司);组织线粒体分离试剂盒、BCA 蛋白浓度测定试剂盒和线粒体膜电位检测试剂盒(JC-1),均为碧云天生物技术有限公司产品;纯化线粒体冻存液(生物能量保护型)、纯化 mPTP 荧光检测试剂盒、线粒体呼吸链酶复合物 I~IV 活性比色法定量检测试剂盒(美国 GENMED 公司);Bax、Bak、Bcl-2、Bcl-xl、Parkin、p62、Bnip3、β-actin、COX IV 等抗体(美国 Cell Signaling Technology 公司);其他试剂均

为国产或进口分析纯试剂。

1.3 实验仪器

ML880/P PowerLab16/30 十六道生理记录仪(澳大利亚 AD Instruments 公司);HX-300S 动物呼吸机(成都泰盟科技有限公司);Olympus IX-8 倒置荧光显微镜(日本奥林巴斯株式会社);FlexStation3 型多功能酶标仪(美国 Molecular Devices 公司);分光光度计(上海尤尼柯仪器有限公司);电泳仪及湿法转移仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 动物分组及给药方案

将 SD 大鼠随机分为 5 组,每组 15 只,分别为假手术组、模型组、不同剂量(1.0、2.0、4.0 mg/kg)荭草苷预给药组。各组大鼠分别 ip 给予相应药物,假手术组及模型组给予等量生理盐水,每日 1 次,连续 7 d。将各组大鼠适应性喂养后,按相应药物及剂量连续给药 7 d 后造模。

2.2 大鼠 MIRI 模型的制备

除假手术组外,其余各组通过结扎冠状动脉左前降支法制备大鼠在体 MIRI 模型,缺血 30 min,再灌注 120 min。具体方法如下:造模前所有大鼠禁食 12 h,3%戊巴比妥钠 ip 麻醉后,仰卧位固定。用标准 II 导联记录大鼠心电图。手术前 5 min,于大鼠大腿根部腓静脉注入肝素(500 U/kg)。连接呼吸机,钝性分离胸骨左缘肌肉组织后,切断第 4 肋骨,小心剪开心包膜,用无创缝合丝线结扎冠状动脉左前降支,引起缺血。缺血后,放松止血钳及结扎线,ST 段下降为再灌注成功标志。再灌注结束后,迅速摘除大鼠心脏,于预冷的 PBS 中洗净心腔内残血后,切下左心室肌,迅速转移至液氮中冷冻后,用锡箔纸包裹,按组别分别标记后转移至-80℃冰箱保存。

2.3 心肌细胞线粒体质量相关指标检测

2.3.1 心肌细胞线粒体的提取与储存 大鼠心肌细胞线粒体的提取按组织线粒体分离试剂盒说明书操作进行,并使用 BCA 法测定提纯后的线粒体蛋白浓度。将纯化后的线粒体用 400 μL GENMED 线粒体储存液(能量保护)重悬,并保存于细胞冻存管中,4℃放置 1 h,-20℃放置 2 h,最后转移至-80℃冰箱保存待测。

2.3.2 线粒体膜电位(MMP)的测定 根据 BCA 蛋白测定结果,调整纯化线粒体质量浓度为 1 mg/mL。将 100 μL 样品加入到 24 孔板中(每组设 3 个平行孔),临测前,每孔再加入 0.9 mL 5 倍稀释的 JC-1

染色工作液，震荡，使样品与染色工作液充分混匀，然后置于酶标仪中检测。JC-1 聚合物检测（红色荧光强度）：激发光 525 nm，发射光 590 nm；JC-1 单体检测（绿色荧光强度）：激发光 490 nm，发射光 530 nm。计算红绿荧光相对比值表征 MMP 的变化。

2.3.3 mPTP 开放程度的测定 取 100 μL 线粒体样品到 1.5 mL EP 管中，4 $^{\circ}\text{C}$ 、16 000 $\times g$ 离心 5 min。去上清液后，加入 100 μL GENMED 染色工作液，充分混匀，放进 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱中孵育 15 min。再取 100 μL 上述悬液至黑色 96 孔板中，即刻放入荧光酶标仪检测（激发波长为 488 nm，发射波长 505 nm），每隔 5 min 检测 1 次，持续 30 min。相对荧光单位（RFU）降低，表明 mPTP 活性增强。

2.3.4 线粒体呼吸链酶 I~IV 活性测定 用分光光度法测定呼吸链酶复合物 I~IV 活性，具体实验步骤按线粒体呼吸链酶复合物 I~IV 活性比色法定量检测试剂盒说明书操作。

2.4 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡水平

心脏复灌 120 min 后，每组随机选取 6 只大鼠，取左心室组织，4%多聚甲醛固定，乙醇梯度脱水，石蜡包埋并切片，按 TUNEL 试剂盒说明书操作，用荧光显微镜观察心肌细胞凋亡情况，具体实验操作参考 DeadEndTM 荧光测定 TUNEL 系统试剂盒说明书。根据心肌细胞凋亡的分布情况，每例样本随机选取 3 个 200 倍视野，并计算出平均每 100 个细胞中的凋亡细胞数，并以百分数表示作为凋亡率，以此反映凋亡程度。

凋亡率 = 凋亡阳性细胞数 / 总细胞数

2.5 Western blotting 法检测心肌细胞内凋亡与线粒体自噬相关蛋白的表达水平

心脏复灌 120 min 后，提取左心室心肌组织总

蛋白，BCA 测定蛋白浓度，均衡各组蛋白浓度后，以 SDS-PAGE 凝胶电泳分离。湿法转移蛋白至 PVDF 膜，5%脱脂奶粉封闭过夜，加入一抗于 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭袋中孵育过夜，二抗室温孵育 1 h。ECL 化学发光法检测蛋白条带，并对目的条带进行灰度分析，结果用目标条带与内参的灰度比值表示。

2.6 免疫共沉淀法检测线粒体内 Parkin 和 p62 的结合程度

心脏复灌 120 min 后，提取左心室心肌组织线粒体蛋白，BCA 测定蛋白浓度，均衡各组蛋白浓度后，加入标记有 Parkin 抗体的磁珠，4 $^{\circ}\text{C}$ 振摇过夜，离心，进行 Western blotting 检测。

2.7 统计学处理

数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 SPSS 18.0 软件进行统计学处理，组间比较用单因素方差分析（One-Way ANOVA）。

3 结果

3.1 对心肌细胞线粒体质量的影响

3.1.1 对心肌细胞 MMP 的影响 倒置荧光显微镜所摄的各组具代表性的 MMP 红/绿荧光照片见图 1。红色荧光代表聚集在线粒体基质中的 JC-1 聚合物的活性，此时线粒体膜电位较高；绿色荧光代表不能聚集在线粒体基质中的 JC-1 单体的活性，此时线粒体膜电位较低；常用红绿荧光的相对比值衡量线粒体去极化（MMP）的状况。半定量分析结果表明，与假手术组比较，模型组大鼠心肌细胞 MMP 降低（ $P < 0.01$ ）；与模型组比较，荭草苷中、高剂量组大鼠心肌细胞 MMP 显著提高（ $P < 0.01$ ），见图 1。

3.1.2 对心肌细胞 mPTP 开放程度的影响 与假手术组较，模型组大鼠心肌细胞 mPTP 开放程度显著提高（ $P < 0.01$ ）。与模型组比较，荭草苷低、中剂

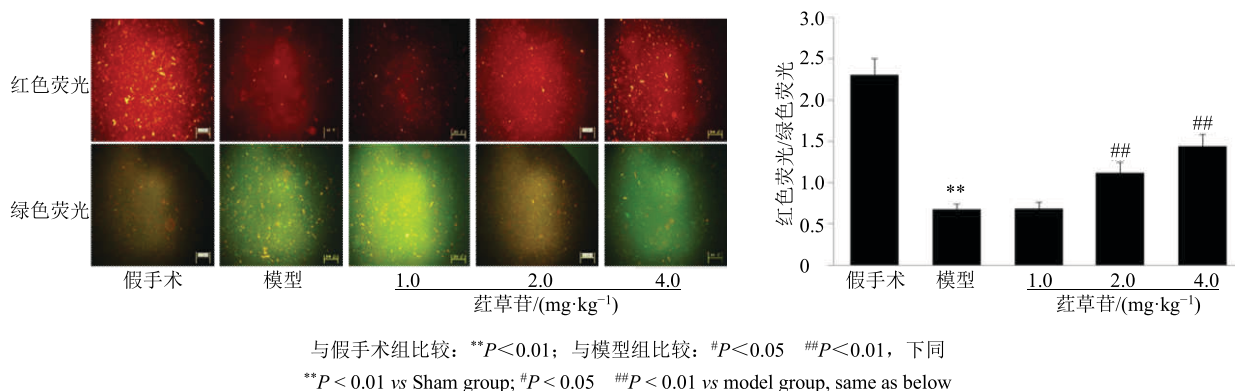


图 1 荭草苷对 MIRI 模型大鼠心肌细胞 MMP 的影响（ $\bar{x} \pm s$, $n = 6$ ）

Fig. 1 Effect of orientin on MMP of cardiac myocyte in MIRI rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

量组大鼠心肌细胞的 mPTP 开放程度无明显变化 ($P>0.05$), 但荇草苷高剂量组大鼠心肌细胞内 mPTP 开放程度显著降低 ($P<0.01$)。结果见图 2。

3.1.3 对心肌细胞线粒体呼吸链酶复合物 I~IV 活性的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠心肌细胞线粒体复合物 I~IV 的活性显著下降 ($P<0.01$), 表明 IR 诱发了线粒体的功能障碍。而与模型组比较, 荇草苷高剂量组大鼠心肌细胞线粒体复合物 I~IV 的活性显著升高 ($P<0.01$), 结果见图 3。表明预防性给予荇草苷可使线粒体的功能明显恢复。

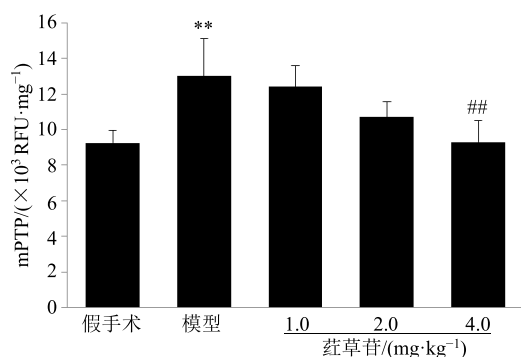
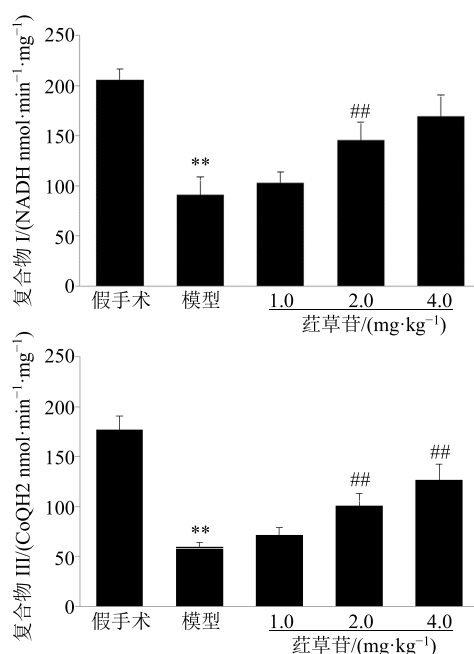


图2 荇草苷对 MIRI 模型大鼠心肌细胞 mPTP 开放程度的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 2 Effect of orientin on mPTP opening of cardiac myocyte in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)



3.2 对 MIRI 诱导的心肌细胞凋亡的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠心肌细胞凋亡率明显升高 ($P<0.01$), 表明 MIRI 可明显诱导心肌细胞凋亡。与模型组比较, 荇草苷可剂量依赖性降低 MIRI 诱导的心肌细胞凋亡率 ($P<0.01$)。结果见图 4。

3.3 对心肌细胞内凋亡相关蛋白表达水平的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠心肌细胞内促凋亡蛋白 Bax 和 Bak 表达水平明显升高 ($P<0.01$), 抑凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-xl 表达水平明显降低 ($P<0.01$)。与模型组比较, 荇草苷高剂量组大鼠心肌细胞内 Bax 和 Bak 蛋白表达水平有下降趋势 ($P<0.01$), 而中、高剂量组 Bcl-2 和 Bcl-xl 的蛋白表达水平明显上升 ($P<0.05, 0.01$)。结果见图 5。

3.4 对心肌细胞内线粒体自噬相关蛋白表达水平的影响

与假手术组比较, 模型组大鼠心肌细胞内线粒体自噬关键调控蛋白 Parkin、p62 和 Bnip3 表达水平明显升高 ($P<0.05, 0.01$)。与模型组相比, 荇草苷中、高剂量组大鼠心肌细胞内 Parkin、p62 和 Bnip3 表达水平有明显下降趋势 ($P<0.01$)。结果见图 6。

3.5 对线粒体内 Parkin 和 p62 结合程度的影响

Parkin 和 p62 的免疫共沉淀实验结果如图 7 所

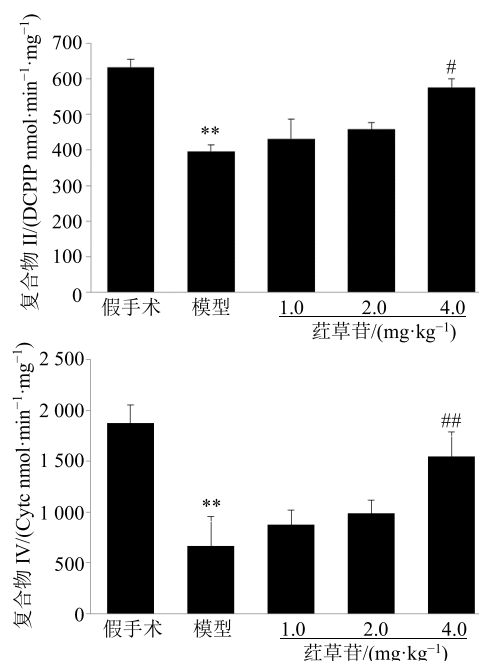


图3 荇草苷对心肌细胞线粒体呼吸链酶复合物 I~IV 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 3 Effect of orientin on complex I—IV activities of cardiac myocyte in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

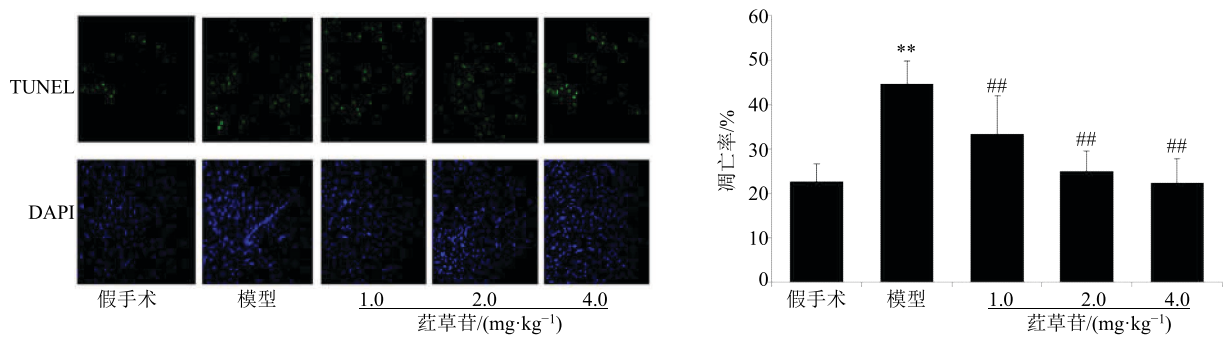


图 4 荇草苷对 MIRI 模型大鼠心肌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of orientin on apoptosis of cardiac myocyte in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

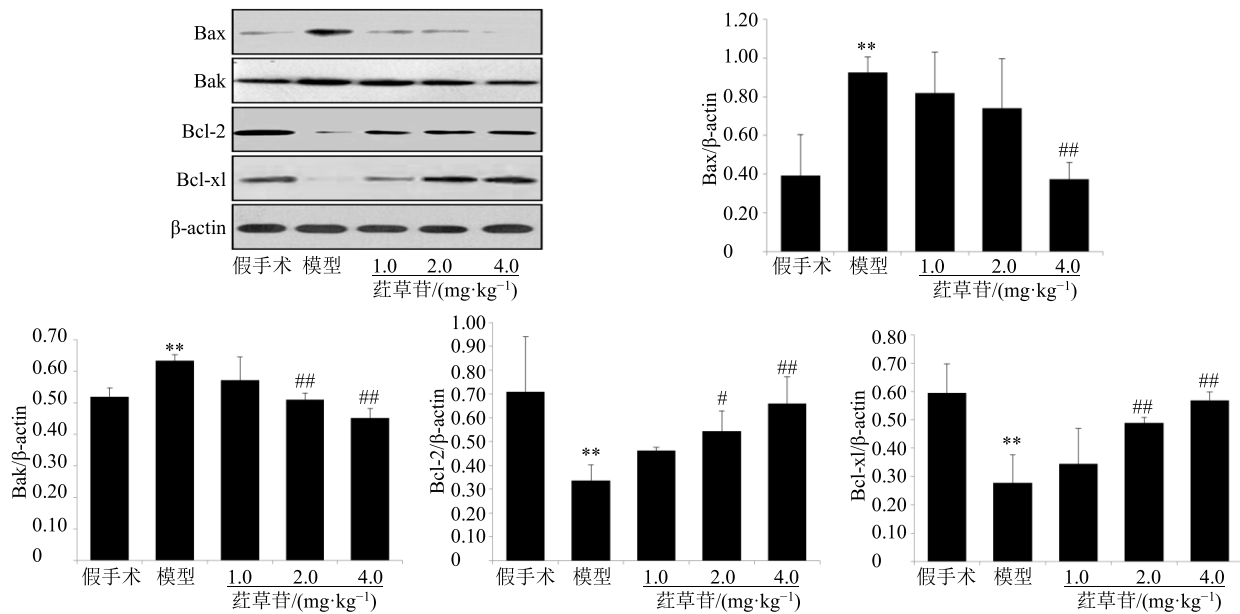


图 5 荇草苷对 MIRI 模型大鼠心肌细胞 Bax、Bak、Bcl-2、Bcl-xl 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of orientin on expression of Bax, Bak, Bcl-2, and Bcl-xl in cardiac myocyte of MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

示,与假手术组比较,模型组大鼠心肌细胞内 Parkin 和 p62 的结合程度明显升高。与模型组比较,各荇草苷给药组 Parkin 和 p62 的结合程度降低,表明荇草苷可通过减少 Parkin 和 p62 的结合,抑制再灌注阶段过度的线粒体自噬。

4 讨论

MIRI 是一个由多种因素共同调控的病理生理过程,涉及氧化应激、 Ca^{2+} 超载、线粒体自噬及凋亡等^[14],与线粒体质量有着直接的联系。本研究发现,荇草苷预防给药可使 MIRI 大鼠心肌细胞内 MMP、mPTP 开放阈值及线粒体呼吸链酶复合物 I~IV 活性明显升高,并能抑制心肌细胞凋亡,表明荇草苷能显著改善心肌细胞线粒体质量,从而增强心肌对 IR 损伤的耐受。

线粒体质量控制是细胞内维持线粒体功能内稳态的重要机制,包括防御、修复、清除与更新等多层次调控机制^[15]。其中,线粒体自噬是线粒体质量控制的核心环节,能特异性降解受损或衰老线粒体,并通过降解成分再利用,实现线粒体更新,维持细胞内线粒体数量与质量相对平衡^[16-17]。在 IR 过程中,适度上调线粒体自噬活性可保证应激状态下细胞的基本能量需求,维系心肌细胞存活^[13];而随着心肌损伤加剧,过度激活线粒体自噬将导致线粒体数量大幅度减少,难以满足细胞能量代谢需求,加速细胞死亡^[18]。那么,调控线粒体自噬的程度将是解决线粒体自噬“双刃剑”的关键。

目前研究认为,哺乳动物中线粒体自噬主要与 Parkin 依赖性和 Parkin 非依赖性 2 条路径相关。

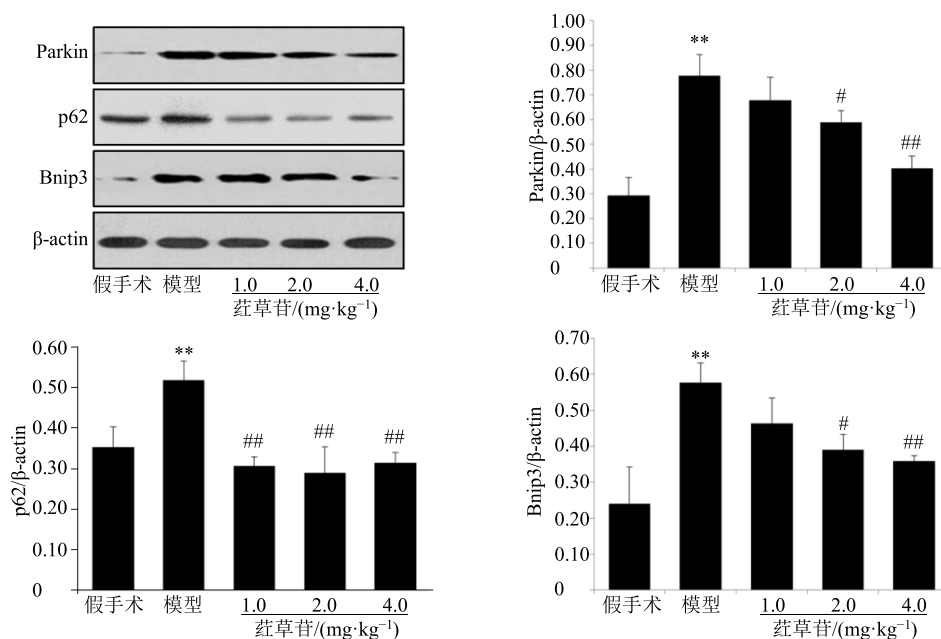


图 6 荇草苷对 MIRI 模型大鼠心肌细胞 Parkin、p62、Bnip3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of orientin on expression of Parkin, p62, and Bnip3 of cardiac myocyte in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

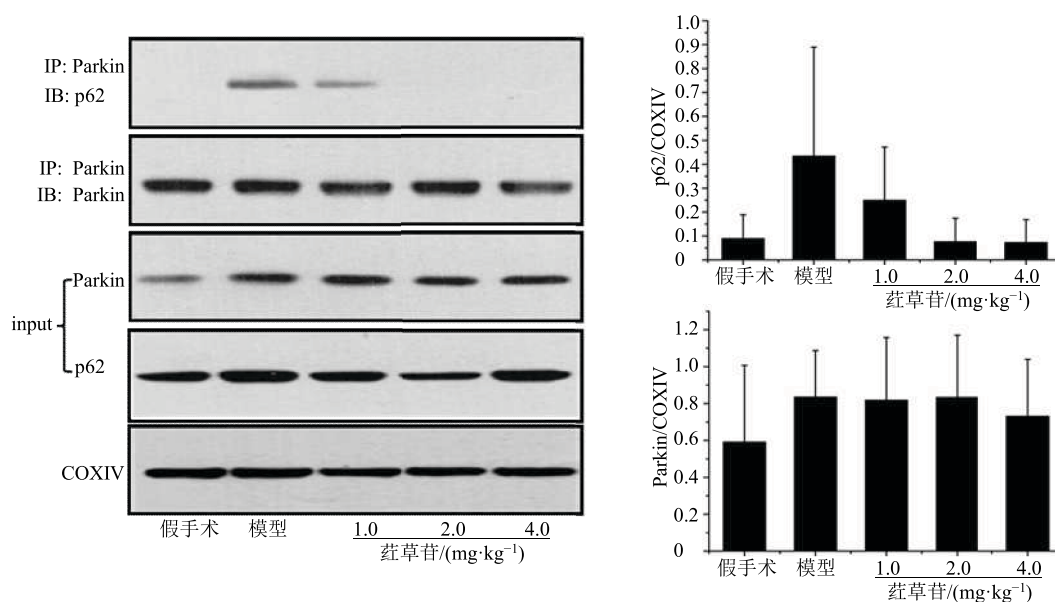


图 7 荇草苷对 MIRI 模型大鼠心肌细胞线粒体 Parkin/p62 结合程度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of orientin on Parkin/p62 interaction in mitochondria of cardiac myocyte in MIRI rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Parkin 依赖性信号通路主要由 PINK1-Parkin 通路介导：当线粒体受损及 MMP 降低时，PINK1 在线粒体外膜蓄积并从细胞质中招募 Parkin，随后 Parkin 通过泛素化作用吸引自噬受体 p62，启动线粒体自噬。研究发现，p62 在 Parkin 诱导的线粒体自噬过程中仅起连接作用，但敲除 p62 将完全阻止受损线粒体的清除。因此，在 Parkin 依赖性信号通路介导

的线粒体自噬中，Parkin 发挥关键调控作用，p62 也必不可少^[5,19]。本研究发现，荇草苷可降低 Parkin 和 p62 的蛋白表达、减弱 Parkin 与 p62 的结合程度，下调线粒体自噬活性。这表明，荇草苷可能通过抑制再灌注期间 Parkin 依赖性信号通路介导的线粒体自噬过度激活，维持心肌细胞线粒体数量与质量的双重内稳态，保护心肌细胞免遭更严重的损伤。

Bnip3 是 Parkin 非依赖性信号相关通路的重要节点, 并参与细胞凋亡的调控^[20]。研究表明, 低氧等诱导表达的 Bnip3 聚集到线粒体上, 通过激活促凋亡蛋白 Bax 和 Bak 促进细胞凋亡^[21]。本研究发现, 荳蔻苷可降低 Bnip3 表达水平, 下调促凋亡蛋白 Bax 和 Bak 表达、上调抑凋亡蛋白 Bcl-2 和 Bcl-表达, 表明 Bnip3 可作为荳蔻苷的作用靶点, 参与线粒体自噬与凋亡的调节, 实现荳蔻苷对细胞存活和线粒体质量变化的双重调控作用, 抵抗 MIRI。综上所述, 荳蔻苷可能通过抑制再灌注期间 Parkin 依赖性和 Parkin 非依赖性信号通路介导的线粒体自噬过度激活, 改善线粒体质量, 减少心肌细胞凋亡, 发挥心肌细胞保护作用。

本课题组通过体外缺氧/复氧损伤模型探索都木油活性成分荳蔻苷心肌细胞保护作用机制时, 发现荳蔻苷在 MIRI 中诱导细胞适度自噬, 促进细胞存活^[22]。这可能与体内、体外模型中心肌细胞损伤程度不同有关, 有待进一步研究。

参考文献

- [1] Xu T, Ding W, Tariq M A, *et al.* Molecular mechanism and therapy application of necrosis during myocardial injury [J]. *J Cell Mol Med*, 2018, doi: 10.1111/jcmm.13575.
- [2] Kotiadis V N, Duchon M R, Osellame L D. Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2014, 1840(4): 1254-1265.
- [3] Sluijter J P, Condorelli G, Davidson S M, *et al.* Novel therapeutic strategies for cardioprotection [J]. *Pharmacol Therapeutic*, 2014, 144(1): 60-70.
- [4] Murphy E, Steenbergen C. Mechanisms underlying acute protection from cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *Physiol Rev*, 2008, 88(2): 581-609.
- [5] Nah J, Miyamoto S, Sadoshima J. Mitophagy as a protective mechanism against myocardial stress [J]. *Compr Physiol*, 2017, 7(4): 1407-1424.
- [6] 陆科闵, 王福荣. 苗族医学 [M]. 贵阳: 贵州科技出版社, 2006.
- [7] Kurian G A, Suryanarayanan S, Raman A, *et al.* Antioxidant effects of ethyl acetate extract of *Desmodium gangeticum* root on myocardial ischemia reperfusion injury in rat hearts [J]. *Chin Med*, 2010, doi: 10.1186/1749-8546-5-3.
- [8] Kurian G A, Paddikkala J. Role of mitochondrial enzymes and sarcoplasmic ATPase in cardioprotection mediated by aqueous extract of *Desmodium gangeticum* (L.) DC. root on ischemic reperfusion injury [J]. *Indian J Pharm Sci*, 2010, 72(6): 745-752.
- [9] Fu X C, Wang M W, Li S P, *et al.* Anti-apoptotic effect and the mechanism of orientin on ischaemic/reperfused myocardium [J]. *J Asian Nat Prod Res*, 2006, 8(3): 265-272.
- [10] 卢娜. 荳蔻素对缺血再灌注损伤心肌细胞的保护作用及相关机制研究 [D]. 杭州: 浙江大学, 2011.
- [11] 吴宥熹, 徐俊, 刘立亚, 等. PI3K-Akt-mTOR 信号通路介导的细胞自噬在荳蔻苷抗大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用研究 [J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(1): 20-24.
- [12] 黄秀兰, 刘丹妮, 刘立亚, 等. 荳蔻苷对大鼠急性心肌梗死的保护作用及机制研究 [J]. *药物评价研究*, 2012, 35(35): 412-416.
- [13] Thomas R L, Gustafsson A B. Mitochondrial autophagy—an essential quality control mechanism for myocardial homeostasis [J]. *Circ J*, 2013, 77(10): 2449-2454.
- [14] Webster K A. Mitochondrial membrane permeabilization and cell death during myocardial infarction: Roles of calcium and reactive oxygen species [J]. *Future Cardiol*, 2012, 8(6): 863-884.
- [15] Chu C T. A pivotal role for PINK1 and autophagy in mitochondrial quality control: Implications for Parkinson disease [J]. *Hum Mol Genet*, 2010, 19(R1): R28-R37.
- [16] Ashrafi G, Schwarz T L. The pathways of mitophagy for quality control and clearance of mitochondria [J]. *Cell Death Differ*, 2013, 20(1): 31-42.
- [17] Tolkovsky A M. Mitophagy [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2009, 1793(9): 1508-1515.
- [18] Green D R, Galluzzi L, Kroemer G. Mitochondria and the autophagy-inflammation-cell death axis in organismal aging [J]. *Science*, 2011, 333(6046): 1109-1112.
- [19] Novak I. Mitophagy: A complex mechanism of mitochondrial removal [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2012, 17(5): 794-802.
- [20] Gustafsson A B. Bnip3 as a dual regulator of mitochondrial turnover and cell death in the myocardium [J]. *Pediatr Cardiol*, 2011, 32(3): 267-274.
- [21] Zhang L, Li L, Liu H, *et al.* BNIP3 mediates cell death by different pathways following localization to endoplasmic reticulum and mitochondrion [J]. *FASEB J*, 2009, 23(10): 3405-3414.
- [22] Liu L, Wu Y, Huang X. Orientin protects myocardial cells against hypoxia-reoxygenation injury through induction of autophagy [J]. *Eur J Pharmacol*, 2016, 776: 90-98.