

## • 药理与临床 •

通脉养心丸通过增强 PGC-1 $\alpha$  介导的线粒体功能减轻心肌缺血再灌注损伤于 鲁<sup>1</sup>, 王 旭<sup>2</sup>, 刘雨桐<sup>1</sup>, 高 杉<sup>1</sup>, 于春泉<sup>1\*</sup>, 李 琳<sup>1\*</sup>

1. 天津中医药大学, 天津 301617

2. 河北工程大学附属医院, 河北 邯郸 056000

**摘要:** **目的** 阐明通脉养心丸通过调节过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  共激活因子-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ ) 介导的线粒体功能从而发挥心肌缺血/再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MI/RI) 保护作用的机制。**方法** 构建缺氧复氧 (hypoxia-reoxygenation, H/R) 心肌细胞模型, 给予通脉养心丸干预后, 采用 DCFH-DA 和 MitoSOX<sup>TM</sup> Red 荧光探针检测细胞内活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 水平; 采用增强型三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 检测试剂盒检测 ATP 水平; JC-1 染色观察线粒体膜电位变化; 采用 Seahorse XF 细胞线粒体压力测试分析线粒体呼吸功能; Mitotracker 与透射电镜观察线粒体的形态与结构变化; 采用 Western blotting 与 qRT-PCR 检测线粒体融合分裂[线粒体融合素 1 (mitofusin 1, Mfn1)、线粒体融合素 2 (mitofusin 2, Mfn2)、线粒体分裂蛋白 1 (fission 1, Fis1)、动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1)]、生物合成[核呼吸因子 1 (nuclear respiratory factor 1, Nrf1)、线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM)、线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 拷贝数]及自噬[Beclin1、PTEN 诱导激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)、帕金蛋白 (Parkin)、p62]相关蛋白和基因的表达水平。通过 PGC-1 $\alpha$  siRNA 转染实验进一步观察通脉养心丸对 PGC-1 $\alpha$  沉默表达后 H9c2 细胞上述功能的影响。**结果** 与模型组比较, 通脉养心丸显著增强线粒体 ATP 合成 ( $P < 0.01$ ), 改善线粒体膜电位 ( $P < 0.01$ ), 减少氧化应激 ( $P < 0.01$ ), 并促进线粒体自噬 ( $P < 0.05, 0.01$ )。沉默 PGC-1 $\alpha$  后, 通脉养心丸对线粒体功能的保护作用显著削弱 ( $P < 0.05, 0.01$ )。**结论** 通脉养心丸能够通过 PGC-1 $\alpha$  调控线粒体的生物合成、动态平衡及自噬, 从而有效改善 MI/RI 引发的线粒体功能紊乱与形态结构变化。揭示了 PGC-1 $\alpha$  作为线粒体功能调控的核心因子, 其在 MI/RI 中的潜在治疗价值, 为 MI/RI 的治疗提供了新的思路。

**关键词:** 通脉养心丸; 心肌缺血/再灌注损伤; 线粒体功能; 心肌细胞损伤; 过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  共激活因子-1 $\alpha$   
**中图分类号:** R285.5      **文献标志码:** A      **文章编号:** 0253-2670(2026)03-0925-10

**DOI:** 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.03.012

Tongmai Yangxin Pill mitigates myocardial ischemia-reperfusion injury through enhancement of PGC-1 $\alpha$ -mediated mitochondrial functionYU Lu<sup>1</sup>, WANG Xu<sup>2</sup>, LIU Yutong<sup>1</sup>, GAO Shan<sup>1</sup>, YU Chunquan<sup>1</sup>, LI Lin<sup>1</sup>

1. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

2. Affiliated Hospital of Hebei Engineering University, Handan 056000, China

**Abstract: Objective** To elucidate how Tongmai Yangxin Pill (通脉养心丸, TMYX) confers cardioprotective effects during myocardial ischemia/reperfusion injury (MI/RI) through the regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$  (PGC-1 $\alpha$ )-mediated mitochondrial function. **Methods** A hypoxia-reoxygenation (H/R) model in cardiomyocytes was established. After intervention with TMYX, intracellular reactive oxygen species (ROS) levels were measured using DCFH-DA and MitoSOX<sup>TM</sup> red fluorescent probes. Cellular adenosine triphosphate (ATP) content was quantified using an enhanced ATP assay kit.

收稿日期: 2025-10-04

**基金项目:** 国家自然科学基金青年科学基金资助项目 (82104565); 天津中医药大学组分中药国家重点实验室青苗基金资助项目 (QMJJ202403)

**作者简介:** 于 鲁, 博士研究生, 研究方向为中医药治疗心脑血管疾病临床与基础研究。E-mail: yuluyulu2021@163.com

**\*通信作者:** 李 琳, 副研究员, 从事中医药治疗心脑血管疾病研究。E-mail: llbianji@163.com

于春泉, 研究员, 博士生导师, 从事中医药治疗心脑血管疾病研究。E-mail: ycqtjutcm@foxmail.com

Changes in mitochondrial membrane potential were evaluated by JC-1 staining. Mitochondrial respiratory function was assessed using Seahorse XF cell mitochondrial stress test. Mitochondrial morphology and ultrastructural alterations were examined using MitoTracker staining and transmission electron microscopy. Western blotting and qRT-PCR were used to determine the expression levels of proteins and genes associated with mitochondrial fusion and fission [mitofusin 1 (Mfn1), mitofusin 2 (Mfn2), fission 1 (Fis1), dynamin-related protein 1 (Drp1)], biogenesis [nuclear respiratory factor 1 (Nrf1), mitochondrial transcription factor A (TFAM), mitochondrial DNA (mtDNA) copy number] and autophagy [Beclin1, PTEN-induced putative kinase 1 (PINK1), Parkin, p62]. To further investigate the effects of TMYX on the above-mentioned functions of H9c2 cells after PGC-1 $\alpha$  silencing expression through PGC-1 $\alpha$  siRNA transfection experiment. **Results** Compared with model group, TMYX significantly enhanced mitochondrial ATP synthesis ( $P < 0.01$ ), improved mitochondrial membrane potential ( $P < 0.01$ ), reduced oxidative stress ( $P < 0.01$ ), and promoted mitochondrial autophagy ( $P < 0.05$ , 0.01). After silencing PGC-1 $\alpha$ , the protective effect of TMYX on mitochondrial function was significantly weakened ( $P < 0.05$ , 0.01). **Conclusion** TMYX could effectively improve mitochondrial dysfunction and morphological changes induced by MI/RI by regulating mitochondrial biosynthesis, dynamic balance and autophagy through PGC-1 $\alpha$ . This study reveals PGC-1 $\alpha$  as a core factor regulating mitochondrial function and its potential therapeutic value in MI/RI, providing new ideas for the treatment of MI/RI.

**Key words:** Tongmai Yangxin Pill; myocardial ischemia-reperfusion injury; mitochondrial function; cardiomyocyte injury; peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$

心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia-reperfusion injury, MI/RI) 是临床上急性心肌梗死后常见的病理生理现象。尽管快速恢复血流有助于恢复心肌的氧合状态,但随之而来的再灌注损伤却往往导致心肌细胞功能的严重障碍,甚至引发心衰等长期并发症<sup>[1]</sup>。MI/RI 的发生不仅增加了临床治疗的难度,还严重影响了患者的预后。近年来,研究表明线粒体在 MI/RI 过程中扮演了核心角色,特别是在细胞能量代谢、氧化应激及自噬等方面的变化<sup>[2-3]</sup>。尽管大量证据表明,线粒体功能的损伤是 MI/RI 损伤的重要机制之一,但对线粒体功能调控的深入机制及确切靶点仍未得到充分探索,这限制了临床治疗手段的进一步发展。

过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  共激活因子-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\alpha$ , PGC-1 $\alpha$ ) 作为线粒体生物合成的关键调控因子,在维持线粒体功能和细胞稳态中具有重要作用。PGC-1 $\alpha$  通过调节线粒体的生物合成、氧化磷酸化及自噬过程,参与心肌细胞在缺血再灌注过程中应对能量危机和氧化应激的反应<sup>[4-5]</sup>。研究发现,PGC-1 $\alpha$  不仅能通过提高线粒体的生物能量供应来减轻缺血引起的代谢紊乱,还能通过调节线粒体自噬作用,促进受损线粒体的去除,从而防止细胞功能的进一步恶化<sup>[6]</sup>。然而现有研究多侧重于其生物学效应的描述,缺乏对其在 MI/RI 中的具体机制的深入分析,尤其是在细胞内信号通路和分子机制层面的系统研究仍然不足。

通脉养心丸作为一种传统中药方剂,在治疗

MI/RI 方面展现了显著的疗效。研究表明,通脉养心丸通过改善心肌线粒体功能、增强能量代谢、减少氧化应激等多种途径,从而有效缓解 MI/RI 的损伤<sup>[7]</sup>。然而,通脉养心丸是否通过调节 PGC-1 $\alpha$  通路改善线粒体功能,减轻 MI/RI 的具体分子机制尚不清楚。因此,本研究旨在探讨通脉养心丸通过调节 PGC-1 $\alpha$  介导的线粒体功能改善 MI/RI 损伤的机制,通过深入研究通脉养心丸对核呼吸因子 1 (nuclear respiratory factor 1, Nrf1)/线粒体转录因子 A (mitochondrial transcription factor A, TFAM) 生物发生、PTEN 诱导激酶 1 (PTEN-induced putative kinase 1, PINK1)/帕金森蛋白 (Parkin) 自噬等通路的调控机制以及在线粒体质量控制中的作用,为防治 MI/RI 的创新药物研制提供实验基础,为其临床应用提供更为系统的理论依据。

## 1 材料

### 1.1 细胞

大鼠 H9c2 心肌细胞购自厦门逸漠生物科技有限公司。

### 1.2 药品与试剂

通脉养心丸 (国药准字 Z12020589, 批号 1070946) 购自天津中新药业集团乐仁堂制药厂;增强型三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 检测试剂盒 (批号 S0027)、增强型线粒体膜电位检测试剂盒 (批号 C2003S) 购自上海碧云天生物技术有限公司;活性氧 (reactive oxygen species, ROS) 试剂盒 (货号 E-BC-K138-F) 购自伊莱瑞特生物科技股份有限公司;Seahorse XF 细胞线粒体压力测试试

剂盒(批号 103015-100)购自美国安捷伦科技有限公司; HiFiScript cDNA 合成试剂盒(批号 CW2569M)购自北京康为世纪生物科技有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 D110016)购自生工生物工程股份有限公司; PGC-1 $\alpha$  抗体(批号 A12348)、线粒体融合素 1(mitofusin 1, Mfn1)抗体(批号 A21293)、线粒体融合素 2(mitofusin 2, Mfn2)抗体(批号 A19678)、线粒体分裂蛋白 1(fission 1, Fis1)抗体(批号 A5821)、动力相关蛋白 1(dynamin-related protein 1, Drp1)抗体(批号 A21968)购自 ABclonal 生物科技有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 23227)、Lipofectamine™ 2000 转染试剂(批号 11668019)、MitoTracker Green 探针(批号 M7514)购自美国赛默飞世尔科技公司; siRNA 由吉满生物科技有限公司提供, PGC-1 $\alpha$  siRNA 上游引物序列 5'-ACUGAGAGACCGCUUGAAdTdT-3', 下游引物序列 5'-UUCAAAGCGGUCUCUCAGUdTdT-3'。

### 1.3 仪器

Empire 多功能酶标仪(美国 PerkinElmer 公司); 流式细胞仪(美国 BD 公司); ProFlex™ 96 孔 PCR 系统(美国赛默飞世尔科技公司); QuantStudio 7 Flex 型实时荧光定量 PCR 仪(天津华生源科技有限公司); HT7800/HT7700 型透射电子显微镜(日本日立公司); Leica Stellaris 8 型共聚焦显微镜(德国徕卡仪器有限公司); Seahorse XFe/XF96 型分析仪(美国安捷伦科技有限公司)。

## 2 方法

### 2.1 通脉养心丸 70%乙醇提取物的制备

将通脉养心丸粉碎过筛后,精密称取 50 g 溶于 500 mL 70%乙醇中,40 kHz 超声提取 30 min,重复 3 次并合并滤液。滤液减压浓缩至 60 mL,再经预冻及冷冻干燥制得冻干粉,避光密封保存于 4 °C 棕色玻璃瓶。临用前以无酚红 DMEM 培养基溶解,0.22  $\mu$ m 滤膜除菌,配制所需浓度的工作液用于实验。课题组前期研究表明,通脉养心丸主要成分为甘草次酸、甾五脂素、甘草查耳酮、五味子乙素等<sup>[7-8]</sup>。

### 2.2 细胞培养及处理

将复苏的 H9c2 细胞用含 10%热灭活胎牛血清的 DMEM 高糖培养基,置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中培养。当细胞密度达到 80%~85%时,建立

缺氧复氧(hypoxia-reoxygenation, H/R)模型。将培养基替换为不含胎牛血清的无糖培养基,以模拟缺血环境,并将细胞置于 37 °C、95% N<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub> 的密闭缺氧小室中处理 6 h。缺氧处理结束后,恢复胎牛血清和葡萄糖供应,将细胞转移至 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 的培养箱中并给予 100  $\mu$ g/mL 通脉养心丸溶液培养 24 h。

### 2.3 PGC-1 $\alpha$ siRNA 干扰实验

当细胞密度达到 30%~50%时,即可进行 PGC-1 $\alpha$  siRNA 转染。将稀释后的 PGC-1 $\alpha$  siRNA 与 Lipofectamine 2000 转染试剂混合后在室温下孵育 20 min,形成 siRNA-Lipofectamine 复合物。转染 6 h 后,将培养基更换为 10%热灭活胎牛血清的 DMEM 高糖培养基。12~24 h 后进行 H/R 模型的构建。通过 qRT-PCR 与 Western blotting 验证 PGC-1 $\alpha$  siRNA 的转染效率。

### 2.4 ROS 水平检测

用无血清 DMEM 培养液稀释 DCFH-DA 细胞内 ROS 探针及 MitoSOX™ Red 线粒体 ROS 探针。向每个细胞样本中加入 1 mL 稀释后的探针溶液,置于 37 °C 培养箱中孵育 20 min。使用无血清 DMEM 培养基洗涤 2 次,通过流式细胞仪进行检测。

### 2.5 透射电镜观察线粒体超微结构

弃去细胞培养液后,将细胞转移至离心管中,低速离心,弃去上清液,加入已恢复至室温的电镜固定液并将细胞团均匀吹散。固定后加入 PBS 溶液洗涤 2 次,于透射电子显微镜下观察并拍照。

### 2.6 Mito Tracker 探针标记的线粒体结构观察

H9c2 细胞接种在适用于共聚焦显微镜的小皿中,经过转染、造模和给药后,弃去培养液,用预冷的 PBS 溶液洗涤细胞 2 次,加入 0.1 mol/L 的 MitoTracker Green 探针工作液孵育 30 min。用 DAPI 在室温下避光孵育 5 min 以染色细胞核, PBS 溶液洗涤 2 次后,通过激光共聚焦显微镜进行观察和拍照。

### 2.7 线粒体 ATP 检测

收集细胞,加入 200  $\mu$ L 裂解液,利用超声破碎仪充分匀浆并完全裂解,离心取上清液,与 200  $\mu$ L ATP 检测缓冲液混合后,通过带有发光计功能的酶标仪检测生物发光强度,并依据标准曲线来计算 ATP 水平。

### 2.8 线粒体膜电位水平检测

根据试剂盒说明书,每个细胞样品加入 1 mL 稀释后的 JC-1 工作液。避光条件下,37 °C 孵育 20 min。使用 1 $\times$ JC-1 缓冲液清洗 2 次细胞,染色结束

后用流式细胞仪进行检测。

## 2.9 线粒体呼吸能力功能检测

通过测定氧气消耗速率 (oxygen consumption rate, OCR) 来反映线粒体呼吸能力。根据试剂盒说明书, 将  $1 \times$  多聚赖氨酸包被探针板置于烘箱中过夜风干, 细胞接种在特定的 96 孔板中进行转染和造模, 加入用 DMEM 按比例 (1:100) 配制的葡萄糖、丙酮酸盐、谷氨酸盐检测液, 置于无  $\text{CO}_2$  的培养箱中。取出排空  $\text{CO}_2$  的探针板, 加入寡霉素、FCCP 和鱼藤酮/抗霉素 A。仪器校准后将校准探针板替换为细胞探针板进行正式检测。

## 2.10 qRT-PCR 检测相关基因表达

按照超纯 RNA 试剂盒说明书, 使用 TRIzol 试剂处理细胞以提取总 RNA。使用 HiFiScript cDNA 合成试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA。反应后, 在冷却前将混合物短暂离心。根据 UltraSYBR 混合物 (低 ROX) 试剂盒说明书进行 RNA 扩增。以 *GAPDH* 为内参, 采用  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  法检测各目的基因的表达式。引物序列见表 1。

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
<i>Mfn1</i>	F: TCAAGGAGGTACACGAGGAG R: GGTGCACCGATCAGCCAAAT
<i>Mfn2</i>	F: GGAGTGGTGTGGAAGGCAGTG R: GTCCAGGTACAGCCGCTCATAC
<i>Fis1</i>	F: AATACGCCTGGTGCCTGGTTC R: TAATCCCCTGCTCCTCTTTGC
<i>Drp1</i>	F: AAGAGAACTACCTCCGCTGTATCG R: TTCCTGACCACCATCTCCAATTTCG
<i>PGC-1<math>\alpha</math></i>	F: GATGGAGACGTGACCACTGACAAC R: GTGCTAAGACCGCTGCATTTCATTG
<i>TFAM</i>	F: GGAATGTGGGGCGTGTCTAAGAAC R: TAAGGCTGACAGGCGAGGGTATG
<i>Nrf1</i>	F: AGCAAGTTCAGCAGGTCCAT R: TTCCGAAGCAACCGTGTCT
<i>Beclin1</i>	F: CAGTGGCGGCTCCTATTCCA R: AGGACACCCAAGCAAGACCC
<i>PINK1</i>	F: TCGTCTCAAAGGGAGCAGATGG R: AGATGGCTTCGCTGGAGGATC
<i>Parkin</i>	F: CTCAGACAAGGACACATCAGTAGC R: GGCGTGGTTACATTGGAAGAC
<i>p62</i>	F: GGTGTCTGTGAGAGGACGAGGAG R: TCTGGTGATGGAGCCTCTTACTGG
<i>MT-ND1</i>	F: TAGAACGCAAAATCTTAGGGT R: ATAATTTTATGGCGTCTGCAA
<i>HBB</i>	F: CCTGGCTCACAAGTACCAC R: TCATTTTGCCAACAAGTACAGA
<i>GAPDH</i>	F: CCCTTAAGAGGGATGCTGCC R: TACGGCCAAATCCGTTCACA

## 2.11 线粒体 DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 拷贝数检测

将各组细胞置于匀浆管中, 加入 1 mL 预冷 Homogenization Buffer 于冰上匀浆。4 °C、1 000 r/min 离心 10 min, 取上清, 12 000~14 000 r/min 离心 30 min, 弃上清, 加入 High Salt Buffer、Detergent Buffer, 55 °C 孵育 60 min。加入 Super High Salt Buffer, 离心后收集上清, 加入 2 倍量无水乙醇再次离心。轻轻吸弃上清, 晾干重悬于 End Solution 中。使用酶标仪检测各组 DNA 样品的  $A_{260}/A_{280}$ , 评估 DNA 的纯度和浓度。以 *HBB* 为内参, 通过 qRT-PCR 法检测各组 MT-ND1 表达量。引物序列见表 1。

## 2.12 Western blotting 检测相关蛋白表达

使用含蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解细胞提取蛋白, 使用 BCA 蛋白检测试剂盒测定蛋白浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 分别加入 PGC-1 $\alpha$ 、Mfn1、Mfn2、Drp1、Fis1 和 GAPDH 抗体, 4 °C 孵育过夜; 洗涤后, 加入 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗, 室温孵育 1 h。采用增强型 ECL 试剂检测化学发光信号, 用 Image Lab 图像分析软件对目标条带进行灰度值分析。

## 2.13 统计学分析

采用 SPSS 24.0 软件进行统计分析, 数据以  $\bar{x} \pm s$  表示。多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 以 LSD 检验方法进行组间两两比较, 最后用 GraphPad Prism 9 软件绘图。

## 3 结果

### 3.1 沉默 PGC-1 $\alpha$ 后通脉养心丸对 H9c2 细胞 ROS 与线粒体膜电位水平的影响

为验证 PGC-1 $\alpha$  siRNA 的转染效率, 设置空白组、NC siRNA 组和 PGC-1 $\alpha$  siRNA 组, 分别检测 PGC-1 $\alpha$  的基因和蛋白表达水平。如图 1-A、B 所示, 与空白组比较, NC siRNA 组 PGC-1 $\alpha$  基因和蛋白表达水平无显著差异; 与 NC siRNA 组比较, PGC-1 $\alpha$  siRNA 组 PGC-1 $\alpha$  基因和蛋白水平显著降低 ( $P < 0.01$ ), 表明 PGC-1 $\alpha$  siRNA 能够有效降低 PGC-1 $\alpha$  的表达。前期研究表明, 在 25、50、100、200、300、400  $\mu\text{g/mL}$  的通脉养心丸处理下, 100  $\mu\text{g/mL}$  通脉养心丸对 H/R 的治疗效果最佳, 并且对 H9c2 细胞的活力没有影响, 因此选择 100  $\mu\text{g/mL}$  的通脉养心丸进行后续研究<sup>[7]</sup>。

进一步的检测结果发现, 与对照组比较, 模型

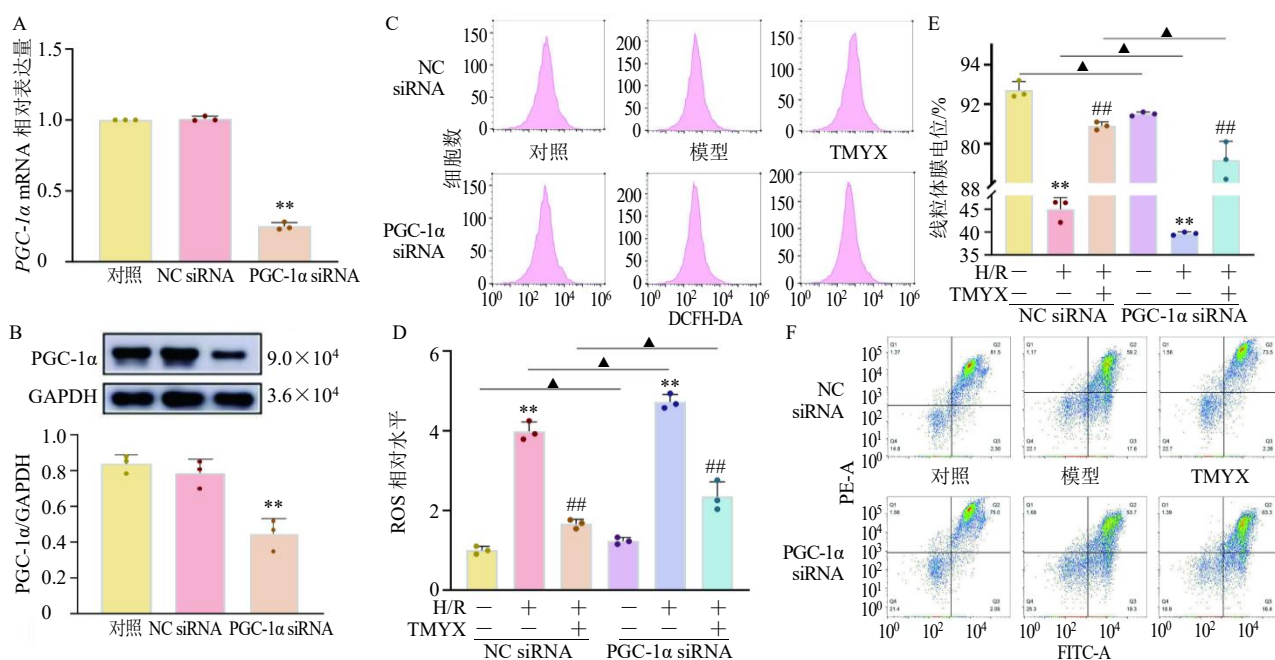


图 1 沉默 PGC-1α 后通脉养心丸对 H/R 心肌细胞 ROS 与线粒体膜电位水平的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 1 Effect of Tongmai Yangxin Pill (TMYX) on ROS and mitochondrial membrane potential levels in H/R cardiomyocytes after silencing PGC-1α ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

A、B-转染不同 siRNA 后 PGC-1α 基因和蛋白表达水平；C、D-DCFH-DA 探针检测 ROS 水平；E、F-线粒体膜电位水平；与对照组比较： $*P < 0.05$   $**P < 0.01$ ；与模型组比较： $\#P < 0.05$   $\#\#P < 0.01$ ；与转染不同 siRNA 的相同组别比较： $\blacktriangle P < 0.05$   $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$ ，下图同。

A, B-expression levels of PGC-1α gene and protein after transfection with different siRNAs; C, D-ROS level detected by DCFH-DA probe; E, F-mitochondrial membrane potential level;  $*P < 0.05$   $**P < 0.01$  vs control group;  $\#P < 0.05$   $\#\#P < 0.01$  vs model group;  $\blacktriangle P < 0.05$   $\blacktriangle\blacktriangle P < 0.01$  vs same group transfected with different siRNA, same as below figures.

组心肌细胞 ROS 水平显著升高，线粒体膜电位水平降低 ( $P < 0.01$ , 图 1-C~F); 给予通脉养心丸后，细胞内 ROS 与线粒体膜电位水平均显著回调 ( $P < 0.01$ )，但是这种效果随着 PGC-1α 的沉默而逆转 ( $P < 0.05$ )。表明通脉养心丸可以降低 H9c2 细胞 H/R 过程中的 ROS 并增加线粒体膜电位水平，这种保护效果需要 PGC-1α 的参与。

### 3.2 沉默 PGC-1α 后通脉养心丸对 H9c2 细胞 ATP 水平与线粒体呼吸功能的影响

通过酶标仪检测 ATP 水平，结果表明与对照组比较，模型组心肌细胞的 ATP 水平显著下降 ( $P < 0.01$ , 图 2-A); 经通脉养心丸治疗后，ATP 水平显著升高 ( $P < 0.01$ )。图 2-B 反映了通脉养心丸处理 H9c2 心肌细胞后线粒体呼吸功能的变化。海马分析仪的结果进一步证明，与对照组比较，模型组心肌细胞的基础呼吸、备用呼吸能力和 ATP 显著降低 ( $P < 0.01$ , 图 2-C~E); 与模型组比较，给予通脉养心丸后，线粒体呼吸功能显著恢复 ( $P < 0.01$ )。然而，通脉养心丸的这种治疗作用也会在沉默 PGC-1α 后削弱 ( $P < 0.01$ )。

### 3.3 沉默 PGC-1α 后通脉养心丸对 H9c2 细胞线粒体结构和功能的影响

Mitotracker 结果见图 3-A，当 H9c2 细胞受到 H/R 刺激时，线粒体长度缩短，碎片化水平升高；给予通脉养心丸治疗后，线粒体长度和线粒体完整性恢复。通过透射电镜观察也发现了相同的现象 (图 3-B)，对照组 H9c2 细胞线粒体数量丰富，分布均匀，嵴排列整齐，偶见肿胀；与对照组比较，模型组线粒体数量显著减少、分布不均，线粒体膜损伤严重，嵴断裂、变短或溶解，基质溶解、外溢，少数线粒体嵴髓样变，单层结构的自噬小体增多；给予通脉养心丸干预后，细胞线粒体数量增多、线粒体膜破损减少，嵴断裂、变短或溶解减少，少数线粒体嵴髓样变，偶有单层结构的自噬小体。然而在沉默 PGC-1α 后，H9c2 细胞中线粒体结构完整性变差，线粒体膜受损情况加重，嵴断裂、线粒体嵴髓样变增加，通脉养心丸维持线粒体长度和结构完整性的作用被抑制。以上结果提示通脉养心丸能改善 H/R 诱导的 H9c2 细胞线粒体结构和功能损伤，而 PGC-1α 的缺失会逆转这种作用。

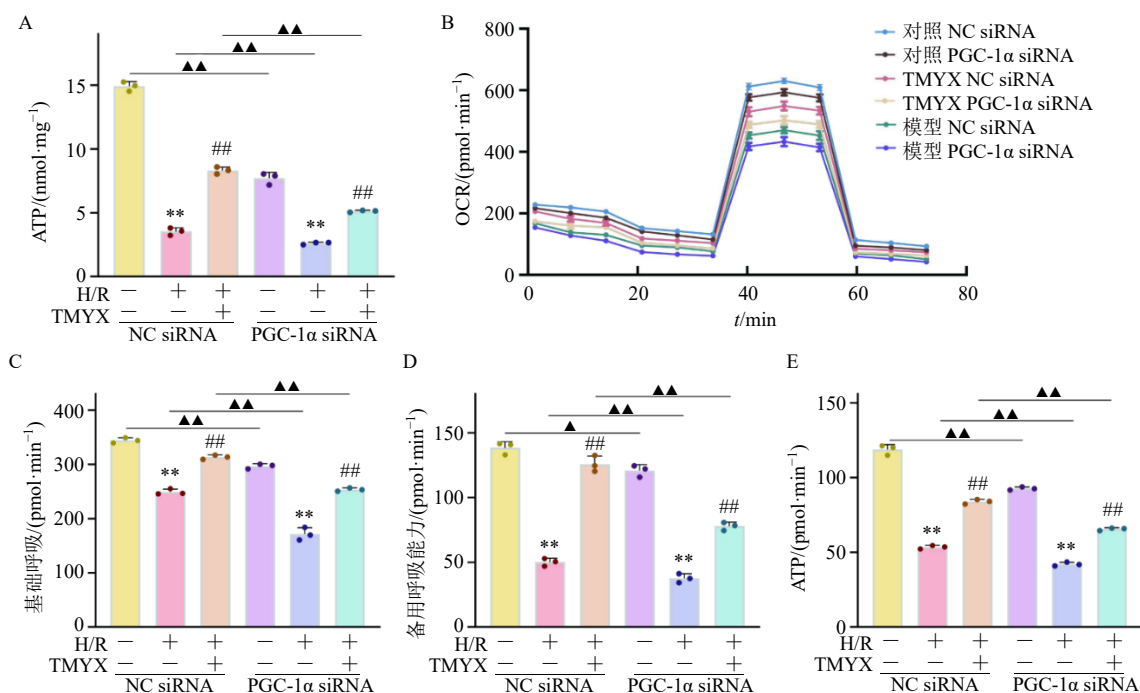
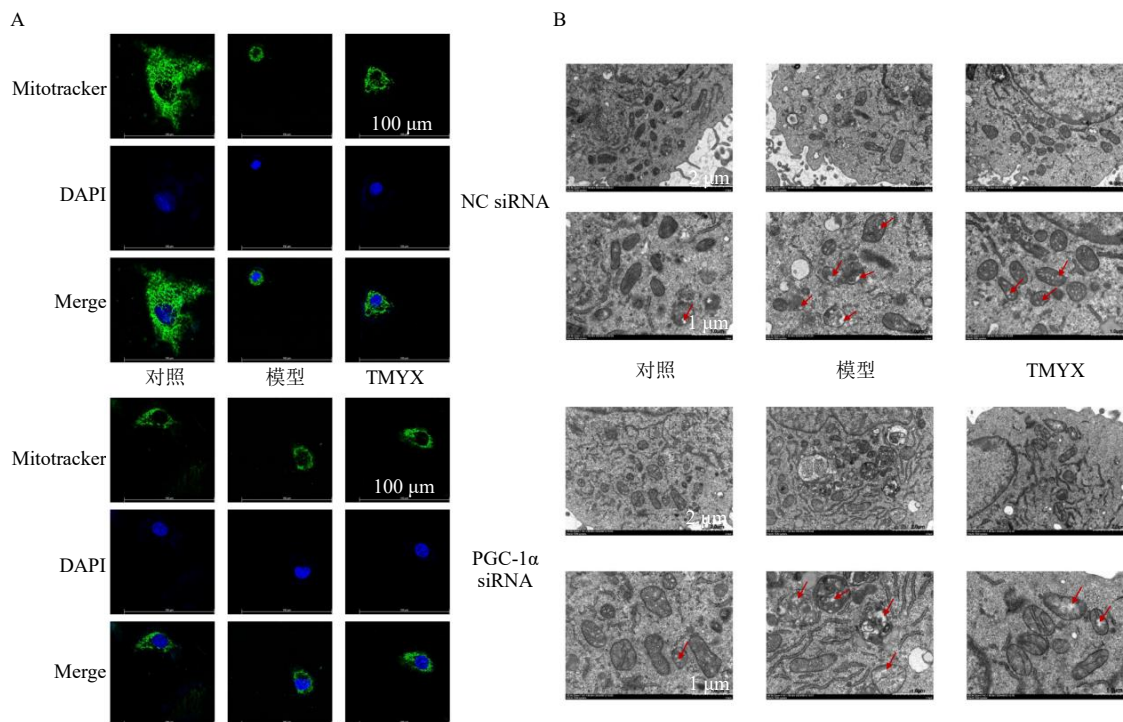


图 2 沉默 PGC-1 $\alpha$  后通脉养心丸对 H/R 心肌细胞 ATP 水平 (A) 与线粒体呼吸功能 (B—E) 的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )  
 Fig. 2 Effect of TMYX on ATP level (A) and mitochondrial respiratory function (B—E) in H/R cardiomyocytes after silencing PGC-1 $\alpha$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



A-Mitotracker 观察通脉养心丸对 H/R 心肌细胞线粒体形态变化的影响；B-透射电镜观察通脉养心丸对 H/R 心肌细胞线粒体结构的影响，箭头表示细胞损伤部位。

A-effect of TMTX on morphological changes of mitochondria in H/R cardiomyocytes observed by MitoTracker; B-effect of TMTX on mitochondrial structure in H/R cardiomyocytes observed by transmission electron microscopy, arrows indicate site of cellular damage.

图 3 沉默 PGC-1 $\alpha$  后通脉养心丸对 H/R 心肌细胞线粒体结构和功能的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 3 Effect of TMYX on mitochondrial structure and function in H/R cardiomyocytes after silencing PGC-1 $\alpha$  ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )



### 3.4 沉默 PGC-1 $\alpha$ 后通脉养心丸对 H9c2 细胞线粒体融合分裂的影响

如图 4 所示, qRT-PCR 与 Western blotting 结果均表明, 与对照组比较, 模型组代表线粒体融合功能的 Mfn1 和 Mfn2 的基因和蛋白表达水平均显著降低 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 代表线粒体分裂功能的 Fis1 和 Drp1 的基因和蛋白表达水平均显著升高 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 表明 H9c2 细胞的线粒体融合分裂功能因 H/R 处理受到损伤。给予通脉养心丸后, Mfn1 和 Mfn2 的基因和蛋白表达水平显著升高 ( $P<0.05$ 、

$0.01$ ), Fis1 和 Drp1 的基因和蛋白表达水平显著降低 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ ), 表明通脉养心丸能调控 H/R 心肌细胞中的线粒体融合分裂从而维持线粒体功能。沉默 PGC-1 $\alpha$  后, 通脉养心丸对线粒体融合分裂的调控作用被明显抑制 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。

### 3.5 沉默 PGC-1 $\alpha$ 后通脉养心丸对 H9c2 细胞线粒体生物合成与自噬功能的影响

TFAM 与 Nrf1 在 mtDNA 复制和转录过程中协同作用, 从而促进线粒体生物发生及功能。如图 5-A~C 所示, 通脉养心丸能恢复 H/R 诱导的 H9c2 细

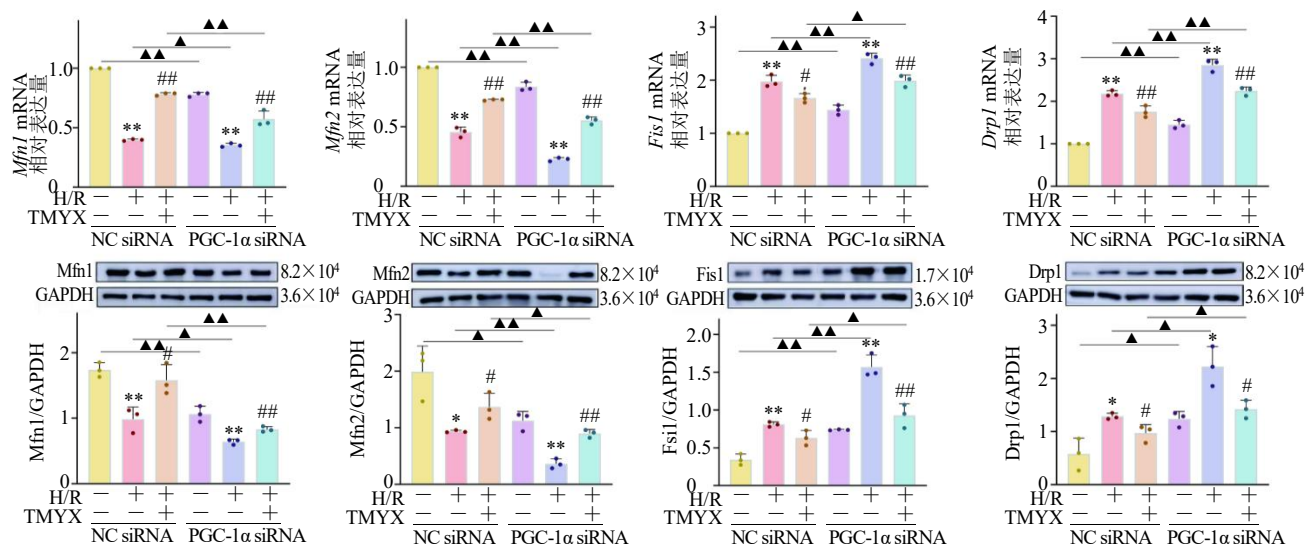


图 4 沉默 PGC-1 $\alpha$  后通脉养心丸对 H/R 心肌细胞线粒体融合分裂的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 4 Effect of TMYX on mitochondrial fusion and fission in H/R cardiomyocytes after silencing PGC-1 $\alpha$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

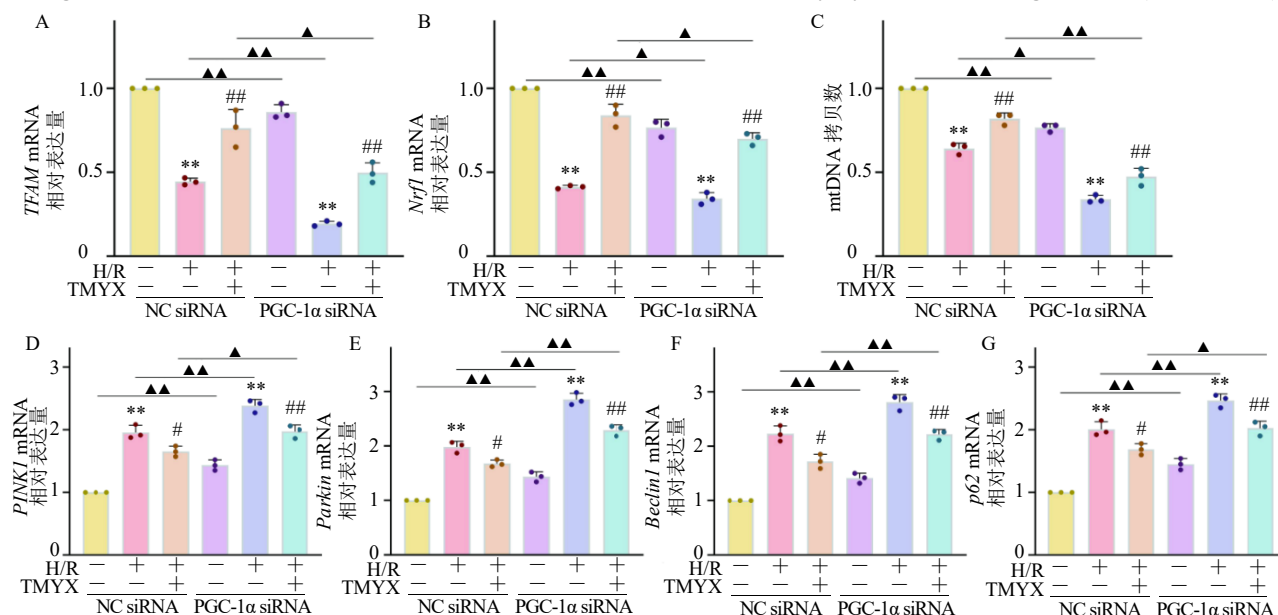


图 5 沉默 PGC-1 $\alpha$  后通脉养心丸对 H/R 心肌细胞线粒体生物合成 (A~C) 与自噬功能 (D~G) 的影响 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 5 Effect of TMYX on mitochondrial biogenesis (A—C) and autophagic function (D—G) in H/R cardiomyocytes after silencing PGC-1 $\alpha$  ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

胞 TFAM 和 Nrf1 的表达水平下降 ( $P < 0.01$ ), 进而增加 H9c2 细胞的 mtDNA 拷贝数 ( $P < 0.01$ ), 恢复线粒体生物合成; 沉默 PGC-1 $\alpha$  会加剧 H9c2 细胞中 TFAM、Nrf1 及 mtDNA 拷贝数的下降 ( $P < 0.05$ 、0.01)。此外, 通过 qRT-PCR 对通脉养心丸影响线粒体自噬相关基因进行了生物学验证。结果见图 5-D~G, 与对照组比较, 模型组 *PINK1*、*Parkin*、

*Beclin1* 及 *p62* mRNA 表达水平显著升高 ( $P < 0.01$ ); 给予通脉养心丸干预后, *PINK1*、*Parkin*、*Beclin1* 及 *p62* mRNA 表达水平显著降低 ( $P < 0.05$ 、0.01); 转染 PGC-1 $\alpha$  siRNA 后, 通脉养心丸的作用被显著逆转 ( $P < 0.05$ 、0.01)。以上结果表明通脉养心丸能通过 PGC-1 $\alpha$  调控线粒体生物合成与自噬功能来缓解 MI/RI (图 6)。

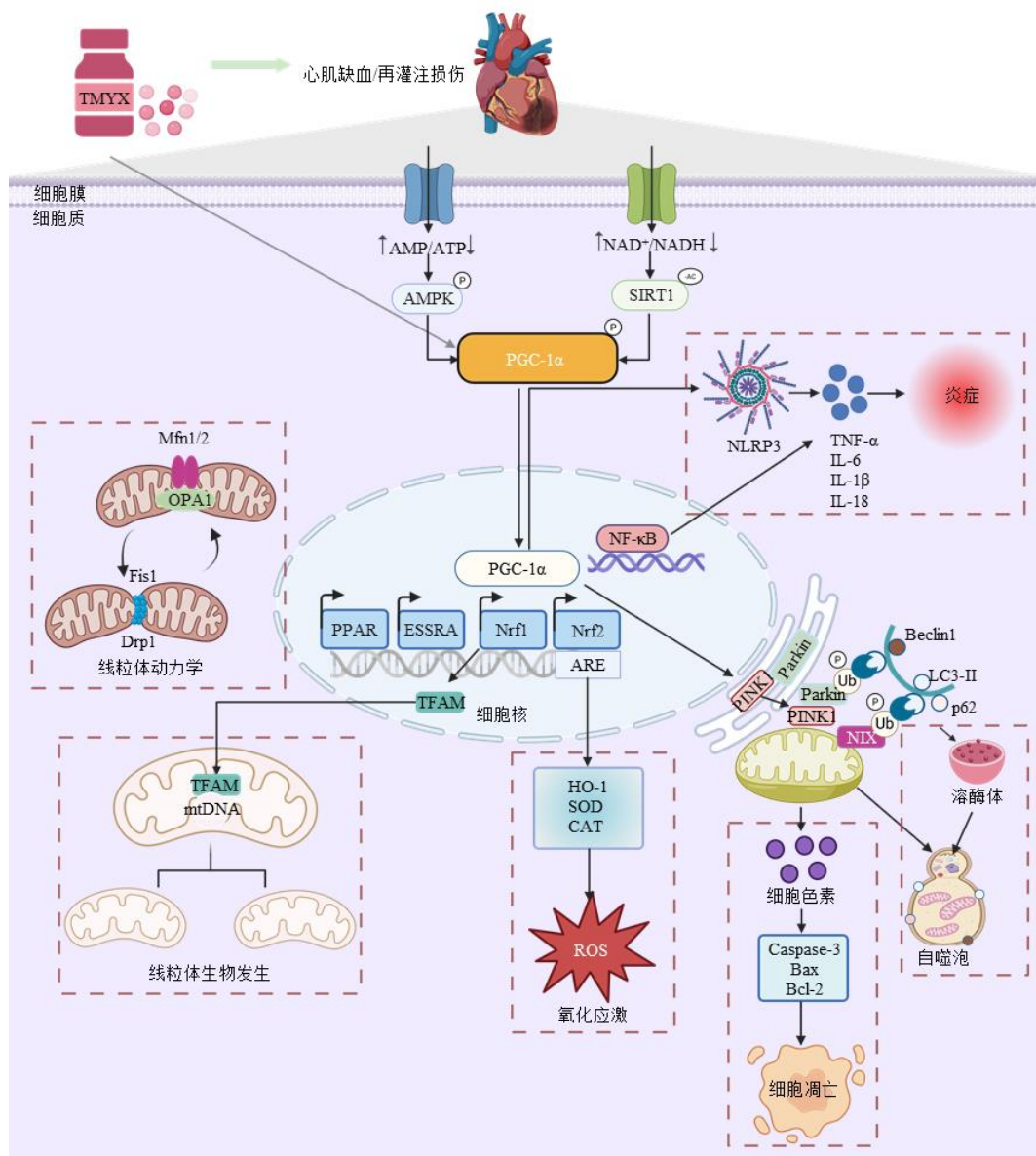


图 6 通脉养心丸通过增强 PGC-1 $\alpha$  介导的线粒体功能减轻 MI/RI

Fig. 6 TMYX alleviates MI/RI by enhancing PGC-1 $\alpha$ -mediated mitochondrial function

#### 4 讨论

MI/RI 损伤是心脏急性事件中的重要病理环节, 涉及线粒体功能的失调, 表现为 ATP 合成受损、氧化应激水平升高及细胞死亡通路的激活。再灌注虽然恢复血流, 但同时也通过 ROS 的过度积累和

内源性线粒体功能障碍加重心肌损伤, 从而妨碍其恢复<sup>[9-10]</sup>。本研究通过构建 PGC-1 $\alpha$  沉默模型, 系统揭示了通脉养心丸在恢复线粒体功能中的作用。通过透射电镜观察、ATP 测定、线粒体膜电位分析及线粒体呼吸功能评估等多维度实验设计, 验证了通



脉养心丸通过 PGC-1 $\alpha$  调节线粒体生物合成、动态平衡及自噬过程从而有效缓解 MI/RI 引发的线粒体功能失调的作用,较以往单通路研究更具有系统性与可重复性<sup>[11]</sup>。本研究首次揭示了 PGC-1 $\alpha$  在通脉养心丸调节线粒体功能过程中的核心作用,强调了其在 MI/RI 中的潜在治疗作用。

通脉养心丸来源于汉代张仲景的炙甘草方,由国医大师阮士怡与张伯礼院士根据现代临床加減而成。通脉养心丸由地黄、鸡血藤、麦冬、甘草、制何首乌、阿胶、五味子、党参、龟甲、大枣、桂枝 11 种中药组成,具有益气养阴、通脉止痛的功效<sup>[12]</sup>。既往研究表明,通脉养心丸中含有五味子素 B、异甘草素、甘草查耳酮 A 等活性成分,能增强 PPAR $\gamma$  的表达,促使核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor E2 related factor 2, Nrf2) 表达上调,改善线粒体功能<sup>[13]</sup>。甘草酸可以通过改善溶酶体功能来调节自噬以治疗 MI/RI<sup>[14]</sup>。通脉养心丸中的麦冬多糖以及鸡血藤中的活性类黄酮成分和类黄酮化合物对缺血性心肌损伤、心肌重塑及心律失常等心脏疾病具有显著的改善效果<sup>[15-16]</sup>,可能通过调节氧化应激、改善钙稳态与能量代谢、抑制细胞凋亡及维持内皮功能等机制发挥作用<sup>[7,17-20]</sup>。

本研究通过透射电镜和荧光探针分析线粒体的超微结构和功能,评估 MI/RI 模型中线粒体的形态变化与功能紊乱<sup>[21]</sup>。其次,针对线粒体动态平衡,采用 qRT-PCR 和 Western blotting 检测 Mfn1/Mfn2、Fis1/Drp1 等关键分子,分析线粒体融合与分裂的失衡。通过评估 Nrf1、TFAM、mtDNA 拷贝数等标志物,探讨线粒体生物合成能力的变化。同时,Beclin1、PINK1/Parkin 和 p62 的检测揭示了线粒体自噬水平,增强了结果的可靠性与可重复性<sup>[22]</sup>。PGC-1 $\alpha$  是线粒体功能和能量代谢的关键调节因子,广泛参与线粒体生物合成、动态平衡及自噬等过程。PGC-1 $\alpha$  一方面通过 Nrf1-TFAM 通路促进线粒体生物合成与 mtDNA 复制<sup>[23]</sup>,另一方面与动态学通路交互,维持 Mfn1/Mfn2 介导的线粒体融合与 Drp1/Fis1 介导的分裂平衡,并平衡 PINK1/Parkin 依赖的受损线粒体选择性清除,多方面稳定 MI/RI 过程中的线粒体功能完整性<sup>[24-25]</sup>。在 MI/RI 应激下,PGC-1 $\alpha$  下调与线粒体膜电位崩解、ATP 下降、呼吸抑制与 ROS 累积并行出现,通脉养心丸干预可提升 PGC-1 $\alpha$  相关轴活性,推进融合、抑制过度分裂、增强生物合成与线粒体自噬协同<sup>[26]</sup>,从而实现

线粒体功能的整体恢复<sup>[27-28]</sup>。沉默 PGC-1 $\alpha$  后能够逆转通脉养心丸的上述有益改变,提示 PGC-1 $\alpha$  在通脉养心丸线粒体保护效应中的枢纽性与必要性,并为其作为潜在治疗靶点提供了机制学支撑。

MI/RI 损伤仍是急性冠脉综合征和心脏手术中的主要致死因素之一。尽管目前已有多种干预策略试图缓解 MI/RI 带来的损害,但多数疗法未能有效修复线粒体功能,且未能从根本上解决 MI/RI 中的多因素失衡问题<sup>[29]</sup>。本研究表明,通脉养心丸通过 PGC-1 $\alpha$  轴调节线粒体功能,能够多维度地修复线粒体的形态和功能,从而为 MI/RI 的防治提供了一种新策略。然而,本研究仅限于细胞水平,并且涉及自噬通路及靶点的研究以基因层面的验证结果为主,未来的动物实验和临床研究可以进行进一步的实验补充并挖掘通脉养心丸在围手术期的潜在应用,评估其在急性冠脉综合征患者中的效果,特别是结合缺血预适应、呼吸链保护剂等其他治疗手段的联合应用。通过更深入的临床前与临床研究,可以进一步确立通脉养心丸作为心脏疾病辅助治疗药物的应用价值,推动其从实验室研究向临床转化。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Du B X, Fu Q, Yang Q, *et al.* Different types of cell death and their interactions in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11(1): 87.
- [2] Lei P, Mwangi C N, Cao Y L, *et al.* Investigating the mechanism of action of Danhong Injection and its components against myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Acupunct Herb Med*, 2023, 3(3): 213-226.
- [3] Chen R, Meng K, Wang C J, *et al.* Effects of Tongmai Yangxin Pills on ventricular remodeling in myocardial ischemia-reperfusion rats [J]. *Acupunct Herb Med*, 2023, 3(2): 126-136.
- [4] Zhao F, Cheng W, Wu D, *et al.* Hydroxysafflor yellow A ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury by promoting MDH1-mediated mitochondrial metabolic homeostasis [J]. *Phytomedicine*, 2025, 144: 156868.
- [5] Kuznetsov A V, Javadov S, Margreiter R, *et al.* The role of mitochondria in the mechanisms of cardiac ischemia-reperfusion injury [J]. *Antioxidants*, 2019, 8(10): 454.
- [6] Qian L, Zhu Y L, Deng C, *et al.* Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 (PGC-1) family in physiological and pathophysiological process and diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2024, 9(1): 50.
- [7] Yu L, Wang X, Lei Q N, *et al.* Tongmai Yangxin Pill alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating mitochondrial fusion and fission through the

- estrogen receptor alpha/ peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2025, 345: 119639.
- [8] Fan Y D, Liu J W, Miao J, *et al.* Anti-inflammatory activity of the Tongmai Yangxin Pill in the treatment of coronary heart disease is associated with estrogen receptor and NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 276: 114106.
- [9] Ghanta S N, Kattamuri L P V, Oduke A, *et al.* Molecular insights into ischemia-reperfusion injury in coronary artery disease: Mechanisms and therapeutic implications: A comprehensive review [J]. *Antioxidants*, 2025, 14(2): 213.
- [10] Heusch G. Myocardial ischemia/reperfusion: Translational pathophysiology of ischemic heart disease [J]. *Med*, 2024, 5(1): 10-31.
- [11] Praharaj P P, Patra S, Singh A, *et al.* CLU (clusterin) and PPARGC1A/PGC1 $\alpha$  coordinately control mitophagy and mitochondrial biogenesis for oral cancer cell survival [J]. *Autophagy*, 2024, 20(6): 1359-1382.
- [12] Guo R, Liu N N, Liu H, *et al.* High content screening identifies licoisoflavone A as a bioactive compound of Tongmai yangxin Pills to restrain cardiomyocyte hypertrophy via activating Sirt3 [J]. *Phytomedicine*, 2020, 68: 153171.
- [13] Tao S, Huang Y, Chen Z, *et al.* Rapid identification of anti-inflammatory compounds from Tongmai Yangxin Pills by liquid chromatography with high-resolution mass spectrometry and chemometric analysis [J]. *J Sep Sci*, 2015, 38(11): 1881-1893.
- [14] 苗冬青, 李霞, 李媛, 等. 甘草酸抑制 O-GlcNAc 糖基化修饰对高糖诱导的小鼠肾系膜细胞和足细胞线粒体自噬的影响 [J/OL]. 西安交通大学学报: 医学版, (2025-10-28) [2025-11-03]. <https://link.cnki.net/urlid/61.1399.R.20251028.1409.003>
- [15] Wang Y X, Wang X L, Wang J R, *et al.* A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial to evaluate the effect of Tongmai Yangxin Pill on ventricular remodeling in acute anterior STEMI patients after primary PCI [J]. *Phytomedicine*, 2024, 135: 156133.
- [16] Wang Y X, Wang X L, Wang J R, *et al.* Tongmai Yangxin intervening in myocardial remodeling after PCI for coronary heart disease: Study protocol for a double-blind, randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2020, 21(1): 287.
- [17] Cai X M, Du J, Li L, *et al.* Clinical metabolomics analysis of therapeutic mechanism of Tongmai Yangxin Pill on stable angina [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1100/1101: 106-112.
- [18] Liu L J, Zhu G H, Luo H Y, *et al.* Tongmai Yangxin Pill combined with metoprolol or metoprolol alone for the treatment of symptomatic premature ventricular complex: A multicenter, randomized, parallel-controlled clinical study [J]. *J Geriatr Cardiol*, 2022, 19(4): 284-291.
- [19] Chen R, Chen T, Wang T Q, *et al.* Tongmai Yangxin Pill reduces myocardial no-reflow by regulating apoptosis and activating PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 261: 113069.
- [20] 廖佳伟, 金晨, 陈志, 等. 鸡血藤化学成分、药理作用研究进展及其质量标志物 (Q-Marker) 预测 [J]. 中草药, 2023, 54(20): 6866-6877.
- [21] Liu X, Wang P Y, Tang S Q, *et al.* Mechanistic insights into myricetin-regulated autophagy via the PI3K/Akt and PINK1/Parkin pathway in diabetic kidney disease treatment [J]. *J Ethnopharmacol*, 2026, 355(Pt A): 120613.
- [22] Liu B H, Xu C Z, Liu Y, *et al.* Mitochondrial quality control in human health and disease [J]. *Mil Med Res*, 2024, 11(1): 32.
- [23] Callender L A, Schroth J, Carroll E C, *et al.* GATA3 induces mitochondrial biogenesis in primary human CD4<sup>+</sup> T cells during DNA damage [J]. *Nat Commun*, 2021, 12: 3379.
- [24] Wang S L, Long H J, Hou L J, *et al.* The mitophagy pathway and its implications in human diseases [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1): 304.
- [25] Lin Y Y, Zhan M Z, Chen X Q, *et al.* Biological function of EPHB4 in the aging process of vascular endothelial cells: MtDNA molecular mechanism and MAPK/PGC-1/TFAM signaling pathway [J]. *Int J Biol Macromol*, 2025, 293: 138536.
- [26] Bekhite M, González-Delgado A, Hübner S, *et al.* The role of ceramide accumulation in human induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes on mitochondrial oxidative stress and mitophagy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2021, 167: 66-80.
- [27] Rawat P S, Jaiswal A, Khurana A, *et al.* Doxorubicin-induced cardiotoxicity: An update on the molecular mechanism and novel therapeutic strategies for effective management [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 139: 111708.
- [28] Tian L, Cao W J, Yue R J, *et al.* Pretreatment with Tilianin improves mitochondrial energy metabolism and oxidative stress in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury via AMPK/SIRT1/PGC-1 alpha signaling pathway [J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, 139(4): 352-360.
- [29] Ramachandra C J A, Hernandez-Resendiz S, Crespo-Avilan G E, *et al.* Mitochondria in acute myocardial infarction and cardioprotection [J]. *EBio Med*, 2020, 57: 102884.

[责任编辑 李亚楠]