

·基础研究·

## 黄芪甲苷通过抑制STING通路减轻D-半乳糖诱导的 心肌细胞衰老和凋亡

郭文玉<sup>1</sup>, 高佳佳<sup>1</sup>, 段玮丽<sup>1</sup>, 阮焕钧<sup>1</sup>, 黄于朗<sup>2</sup>, 王珂妹<sup>1</sup>, 柯晓<sup>1</sup>

(1. 中国医学科学院阜外医院深圳医院心内科, 广东 深圳 518057; 2. 深圳市前海蛇口自贸区医院心内科, 广东 深圳 518067)

**摘要:**【目的】探讨黄芪甲苷(AS-IV)对D-半乳糖(D-gal)诱导的心肌细胞衰老的保护作用及其潜在机制。【方法】以心肌细胞H9C2为模型,采用D-gal诱导心肌细胞衰老,通过CCK-8法检测细胞活力, $\beta$ -半乳糖苷酶(SA- $\beta$ -Gal)染色评估细胞衰老程度,ROS检测细胞内活性氧水平,TUNEL检测细胞凋亡程度,qRT-PCR和Western blot检测衰老相关基因和蛋白(p21、p53)及干扰素基因刺激因子(STING)通路关键基因(STING、CXCL10和MX-1)和蛋白(STING、cGAS、p-IRF3/IRF3)的表达水平。【结果】50 g/L D-gal显著降低心肌细胞活力,增加SA- $\beta$ -Gal阳性率、细胞凋亡率和细胞内活性氧水平,并上调p16、p21及STING、cGAS、p-IRF3/IRF3通路蛋白表达( $P<0.05$ );200  $\mu$ mol/L AS-IV干预后,细胞活力显著增强,SA- $\beta$ -Gal阳性率下降,细胞内活性氧水平降低,氧化应激损伤减轻,心肌细胞凋亡被抑制,衰老相关p21、p53的mRNA及蛋白水平下调( $P<0.05$ )。进一步对STING通路相关分子进行检测,qRT-PCR和Western blot结果显示200  $\mu$ mol/L AS-IV可抑制D-gal诱导的STING的mRNA和蛋白表达,降低p-IRF3/IRF3的蛋白表达水平。而SA- $\beta$ -Gal阳性率、细胞内活性氧水平、DNA损伤结果和Western blot结果提示,STING激动剂(STING agonist-7)能够逆转AS-IV对D-gal诱导的心肌细胞衰老的改善效果。【结论】AS-IV可通过抑制STING通路激活,减轻D-gal诱导的心肌细胞衰老,为心血管衰老相关疾病的防治提供新策略。

**关键词:**黄芪甲苷;D-半乳糖;STING通路;心肌细胞;衰老

中图分类号:R542.2 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2026)01-0133-10

DOI: 10.11714/jysu.med.YX20250094

## Astragaloside IV alleviates D-galactose-induced cardiomyocytes senescence and apoptosis by inhibiting the STING pathway

GUO Wenyu<sup>1</sup>, GAO Jiajia<sup>1</sup>, DUAN Weili<sup>1</sup>, RUAN Huanjun<sup>1</sup>, HUANG Yulang<sup>2</sup>, WANG Kemei<sup>1</sup>, KE Xiao<sup>1</sup>

(1. Department of Cardiology, Fuwai Hospital, Chinese Academy of Medical Sciences, Shenzhen 518057, China;

2. Department of Cardiology, Shenzhen Qianhai Shekou Free Trade Zone Hospital, Shenzhen 518067, China)

Correspondence to: KE Xiao; E-mail: xiaokehospital@126.com

**Abstract:**【Objective】To investigate the protective effect of Astragaloside IV (AS-IV) on D-galactose (D-gal)-induced cardiomyocytes senescence and its potential mechanisms.【Methods】Using H9C2 cardiomyocytes as a model, D-gal was used to induce cardiomyocyte senescence. Cell viability was assessed using the CCK-8 assay, senescence extent was evaluated via  $\beta$ -galactosidase (SA- $\beta$ -Gal) staining, reactive oxygen species (ROS) levels were measured to assess

收稿日期:2025-07-29

录用日期:2025-12-08

基金项目:广东省自然科学基金面上项目(2021A1515010178);深圳市科技计划项目(JCYJ20220531091611026, JCYJ20230807150803007);深圳市南山区卫生科技计划项目(NSZD2025027)

作者简介:郭文玉,第一作者,研究方向:心血管疾病机制,E-mail: Guowenyu0720@163.com;柯晓,通信作者,主任医师,硕士生导师,研究方向:动脉粥样硬化性心血管疾病的分子调控,E-mail: xiaokehospital@126.com

intracellular oxidative stress, apoptosis extent was determined using the TUNEL assay, and qRT-PCR and Western blot analyses were conducted to examine the expression levels of senescence-related genes and proteins (*p21*, *p53*) and key genes (*STING*, *CXCL10*, and *MX-1*) and proteins (*STING*, *cGAS*, *p-IRF3/IRF3*) of the stimulator of interferon genes (*STING*) pathway. 【Results】 The 50 g/L D-gal significantly reduced myocardial cell viability, increased SA- $\beta$ -Gal positivity, apoptosis rate, and intracellular reactive oxygen species levels, and upregulated the expression of *p16*, *p21*, and *STING*, *cGAS*, *p-IRF3/IRF3* pathway proteins ( $P < 0.05$ ); After intervention with 200  $\mu\text{mol/L}$  of AS-IV, cell viability was significantly enhanced, the SA- $\beta$ -Gal-positive rate decreased, intracellular reactive oxygen species levels decreased, oxidative stress damage was alleviated, myocardial cell apoptosis was inhibited, and the mRNA and protein levels of aging-related *p21* and *p53* were downregulated ( $P < 0.05$ ). Further detection of *STING* pathway-related molecules showed that 200  $\mu\text{mol/L}$  of AS-IV inhibited D-galactose-induced *STING* mRNA and protein expression and reduced *p-IRF3/IRF3* protein expression levels, as demonstrated by qRT-PCR and Western blot results. However, the SA- $\beta$ -Gal positivity rate, intracellular reactive oxygen species (ROS) levels, DNA damage results, and Western blot findings suggested that the *STING* agonist (*STING* agonist-7) could reverse the ameliorative effects of AS-IV on D-galactose-induced cardiomyocytes senescence. 【Conclusion】 AS-IV may mitigate D-gal-induced cardiomyocytes senescence by inhibiting *STING* pathway activation, providing a new strategy for the prevention and treatment of cardiovascular senescence-related diseases.

**Key words:** Astragaloside IV; D-galactose; *STING* pathway; cardiomyocytes; senescence

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2026, 47(1): 133-142]

据统计,截止至2023年为止我国心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)现患人数3.3亿,占城乡居民疾病死亡构成比的首位,2021年分别占农村、城市死因的48.98%和47.35%,目前我国心血管疾病患病率仍处于持续上升阶段<sup>[1-2]</sup>。其中,老龄化是CVD增加的主要驱动因素之一,根据美国心脏协会报告统计数据 displays,美国人群中男性和女性的CVD患病率均随着年龄的增长而增加<sup>[3]</sup>,因此,衰老是CVD发生的独立危险因素<sup>[4]</sup>。D-半乳糖(D-galactose, D-gal)诱导的细胞衰老模型因能模拟自然衰老过程中糖代谢紊乱、氧化损伤及线粒体功能障碍等关键特征,已成为研究心肌衰老机制的重要工具。近期研究表明,D-gal可通过诱导线粒体DNA (mitochondrial DNA, mtDNA) 泄漏至胞质,激活环GMP-AMP合成酶(Cyclic GMP-AMP Synthase, cGAS)-干扰素基因刺激因子(stimulator of interferon genes, *STING*)通路,进而促进炎症衰老相关分泌表型(senescence-associated secretory phenotype, SASP)和细胞衰老,形成“线粒体损伤-炎症风暴-细胞死亡”的恶性循环<sup>[5]</sup>。这一发现为揭示心肌衰老的分子机制提供了新视角。*STING*通路作为细胞质双链DNA(double-stranded DNA,

dsDNA)的核心传感器,其激活依赖于cGAS对异常DNA的识别及2'3'-cGAMP的合成<sup>[6]</sup>。在心血管疾病中,*STING*过度激活已被证实与动脉粥样硬化、心肌梗死及心肌病进展密切相关<sup>[7]</sup>。例如,在脓毒症诱导的心肌病模型中,*STING*敲除可以通过抑制NLRP3介导的炎症、细胞凋亡和焦亡来减轻LPS诱导的心脏损伤<sup>[8]</sup>;而在动脉粥样硬化斑块中,*STING*驱动的干扰素反应可促进巨噬细胞极化失衡,加速斑块不稳定<sup>[9]</sup>。尽管*STING*的促炎作用已被广泛认可,但其是否参与黄芪甲苷(Astragaloside IV, AS-IV)抗心肌细胞衰老的作用尚未明确。AS-IV是中药黄芪的重要活性成分,具有抗氧化、抗炎及抗凋亡等多种药理作用<sup>[10-11]</sup>。最近的研究发现,AS-IV可能通过调节*STING*/NF- $\kappa$ B信号通路抑制巨噬细胞衰老并刺激骨髓间充质干细胞(bone mesenchymal stem cells, BMSCs)的成骨分化,从而发挥抗骨质疏松作用<sup>[12]</sup>。值得注意的是,AS-IV可能通过抑制*STING*通路激活从而发挥心肌保护作用,例如,丹参酮II A与AS-IV联合应用可通过下调*STING*磷酸化水平,减少心肌梗死面积并改善心功能<sup>[13]</sup>。然而,AS-IV是否能够通过靶向*STING*通路改善心肌细胞衰老尚未见报道。本

研究中,我们试图确定AS-IV是否通过抑制STING通路减轻心肌细胞衰老,从而改善心脏功能,为开发基于STING通路的心肌衰老靶向疗法提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

细胞:H9C2心肌细胞。

试剂:D-gal(索莱宝,D8310)、AS-IV(PERFEMIKER,CX163934)、STING agonist-7(MCE, HY-143896)、SA- $\beta$ -Gal染色试剂盒(Beyotime, C0602)、活性氧检测试剂盒(Beyotime, S0033S)、一步法TUNEL细胞凋亡检测试剂盒(Servicebio, G1501-50T)、兔抗p21(Invitrogen, PA1-30399)、兔抗p53(Invitrogen, PA5-27822)、兔抗STING(华安生物, HA722832)、兔抗cGAS(华安生物, HA500023)、兔抗p-IRF3(华安生物, HA722772)、IRF3(华安生物, ET1612-14)、GAPDH(Proteintech, 10494-1-AP)、Phospho-Histone H2A.X(Ser139)mAb(艾比玛特, MN88229S)、8-OHdG(DNA/RNA Damage)Rabbit pAb(艾比玛特, PC1278S)。

仪器:荧光定量PCR仪(thermo Quantstudio 7 pro)、流式细胞仪(BECKMAN Dx FLEX)、激光扫描共聚焦显微镜(Olympus FV3000)。

### 1.2 实验分组

对照组(NC组):含100 mL/L FBS的DMEM培养基(5.5 mmol/L);模型组(D-gal组):含50 g/L D-gal的培养基;黄芪甲苷组(AS-IV组):200  $\mu$ mol/L AS-IV处理24 h;D-半乳糖+黄芪甲苷组(D-gal+AS-IV组):50 g/L D-gal + 200  $\mu$ mol/L AS-IV处理24 h;D-半乳糖+黄芪甲苷+STING激动剂组(D-gal+AS-IV+STING agonist-7组)+:50 g/L D-gal + 200  $\mu$ mol/L AS-IV + 20  $\mu$ mol/L STING agonist-7处理24 h。

### 1.3 D-gal诱导心肌细胞(H9C2)衰老模型的构建

长势良好的H9C2细胞用胰酶消化后,按每孔约5 000个细胞密度接种于96孔板中,细胞贴壁后分别给予10、20、30、40、50、60、70、80 g/L的D-半乳糖(D-gal),培养24 h后进行CCK-8检测细胞活

力。 $N=3$ ,重复3次实验。

### 1.4 黄芪甲苷(AS-IV)对D-gal诱导的心肌细胞(H9C2)活性的影响

取对数生长期的H9C2细胞接种于96孔板中,5 000个/孔,培养过夜后分别加入40 g/L D-葡萄糖(D-gal组)、40 g/L D-葡萄糖液分别加入25  $\mu$ mol/L、50  $\mu$ mol/L、100  $\mu$ mol/L、200  $\mu$ mol/L、400  $\mu$ mol/L、800  $\mu$ mol/L AS-IV溶液100  $\mu$ L,于培养箱中孵育细胞24 h后使用CCK-8检测细胞活力。每组设7个复孔,重复3次实验。

### 1.5 $\beta$ -半乳糖苷酶(SA- $\beta$ -gal)染色观察心肌细胞(H9C2)衰老情况

根据制造商的说明,使用SA- $\beta$ -Gal染色试剂盒(Beyotime)测量SA- $\beta$ -gal活性。简而言之,将细胞在 $\beta$ -半乳糖苷酶染色固定液中室温固定15 min,然后加入1 mL染色工作液,在不含CO<sub>2</sub>的37  $^{\circ}$ C培养箱中染色过夜。随后,在光学显微镜下观察细胞染色情况。

### 1.6 活性氧(ROS)的测量

根据制造商的说明,使用二氢乙锭(DCFH-DA)荧光染料(Beyotime)通过激光扫描共聚焦显微镜评估细胞内ROS的生成。简而言之,药物处理细胞24 h后,用无血清DMEM培养基洗涤H9C2细胞,并在37  $^{\circ}$ C和体积分数5% CO<sub>2</sub>下用DCFH-DA(10  $\mu$ mol/L)染色30 min。再用无血清DMEM洗涤3次后,在激光扫描共聚焦显微镜下拍照。

### 1.7 TUNEL检测细胞凋亡

使用TUNEL法评估细胞凋亡。将 $1 \times 10^5$ 个H9C2细胞接种到共聚焦小皿中并培养过夜,然后按照1.2进行分组处理。随后,根据制造商的推荐使用TUNEL细胞凋亡检测试剂盒测定细胞凋亡水平。最后使用激光扫描共聚焦显微镜评估细胞凋亡水平。

### 1.8 实时定量逆转录聚合酶链反应(qRT-PCR)

使用RNA提取试剂盒提取总RNA。使用试剂盒进行cDNA制备,最后采用实时荧光定量PCR检测p21、p53、STING、CXCL10和MX-1的相对表达量,引物序列如表1所示。作为内部对照同时测定GAPDH基因表达。使用2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup>方法测定基因相对表达。所有样品一式三份运行。

表1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

Gene name	Forward primer(5' - 3')	Reverse primer(5' - 3')
<i>p21</i>	GAGAACTGGGGAGGGCTTTC	TCCTGAGCCTGTTTCGTGTC
<i>p53</i>	CTGGACGACAGGCAGACTTT	GACAGGCACAAACACGAACC
<i>STING</i>	AGAATCCGAAGAGGGAAAC	CAGTAGGGAGGGACGAGGT
<i>CXCL10</i>	TGCAAGTCTATCCTGTCCGC	TCTTTGGCTCACCGCTTCA
<i>MX-1</i>	AGAGGCCCTGAAAATGGCTC	ACCACATCCACGACCTTGTC
<i>GAPDH</i>	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA

### 1.9 Western Blot 法检测衰老 (p16、p21) 及 STING 通路 (STING、cGAS、p-IRF3/IRF3) 相关蛋白表达

收集细胞后用强裂解液在冰上裂解细胞,之后在冰浴条件下用超声破碎仪破碎用以提取各组细胞蛋白。将样品与5×SDS样品缓冲液混合,并在95°C下孵育10 min。定量后取10 μg总蛋白上样、10% Tris-甘氨酸凝胶电泳分离蛋白质,之后将蛋白转到0.45 μm PVDF膜上,50 g/L脱脂奶粉封闭1 h后一抗4°C孵育过夜。第二天加入二抗孵育1 h,最后进行ECL显影。采用Image-J软件对蛋白条带进行灰度值分析,所有样品一式三份。

### 1.10 细胞免疫荧光法检测DNA损伤相关蛋白

H9C2细胞接种于共聚焦小皿内,各组处理后,用PBS清洗3次,用40 g/L的多聚甲醛的固定10 min,加入1 mL含1 mL/L Triton X-100室温通透15 min。再PBS清洗3次,分别加入p-γH2ax和8-OHdG抗体4°C过夜;次日PBS清洗3次,分别采用对应荧光二抗室温孵育1 h,PBS清洗3次,滴入DAPI后在荧光显微镜下观察并拍照记录。Image J软件分析各样品的平均荧光强度。

### 1.11 统计分析

使用GraphPad Prism 9.5软件对数据进行统计分析。数据采用单因素方差分析(ANOVA)模型配合Tukey多重比较(One-way ANOVA with Tukey's multiple comparisons)进行组间差异显著性判定。实验数据以平均值±标准差表示,统计学显著性水平为 $P<0.05$ 。

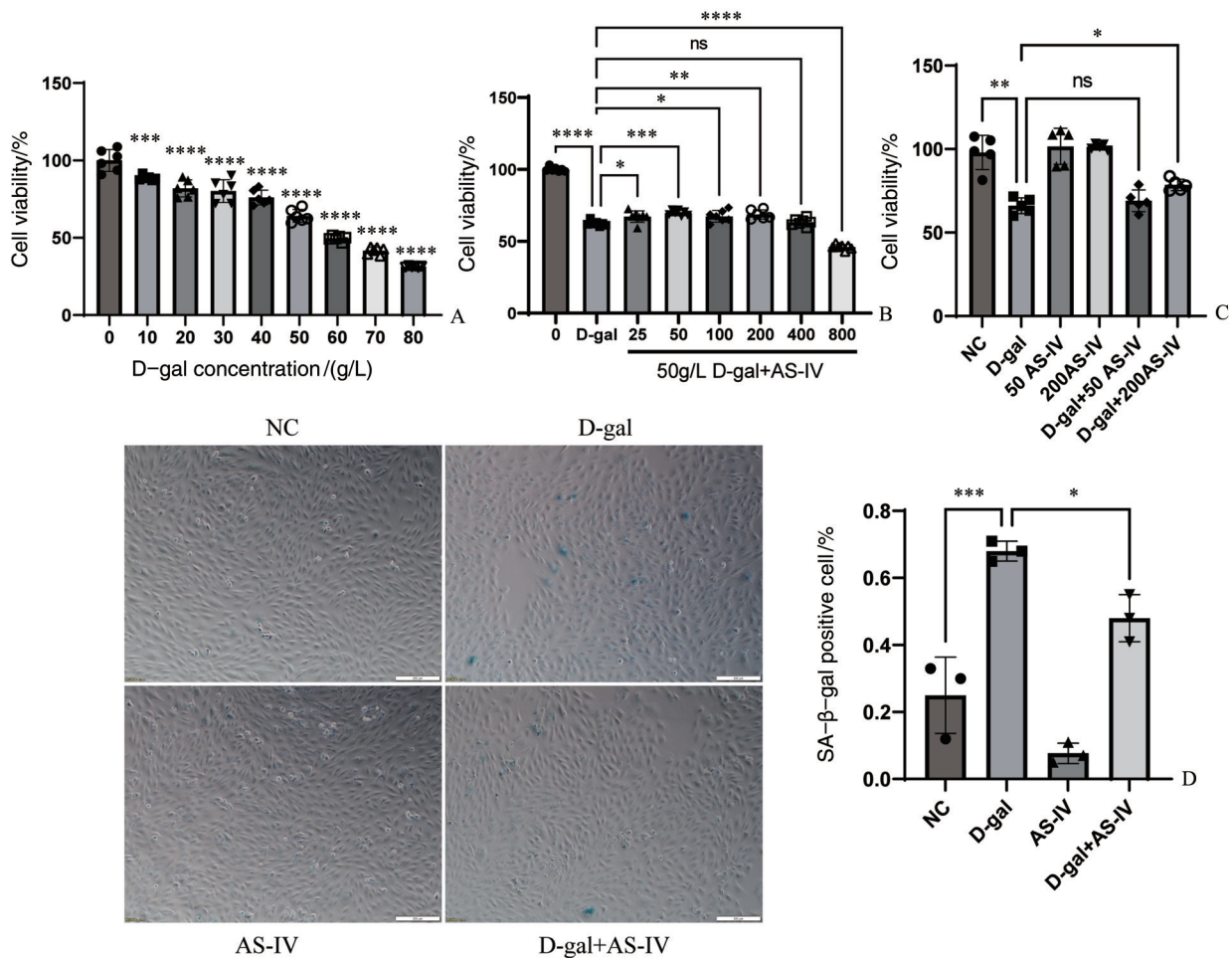
## 2 结果

### 2.1 AS-IV增强D-gal诱导的心肌细胞活力并且抑制细胞衰老

CCK-8结果显示,D-gal对H9C2细胞的细胞毒性呈浓度依赖性。在50 g/L暴露24 h时,活力保持在(64.17±4.104)%,与对照组相比显著降低( $P<0.0001$ ),将该条件确定为模拟内皮衰老的最佳条件(图1A)。AS-IV干预后,细胞活力随剂量升高显著恢复,但在800 μmol/L时,AS-IV表现出显著的细胞损伤作用( $P<0.0001$ ),然而50 μmol/L和200 μmol/L AS-IV干预后细胞活力均显著高于模型组( $P<0.01$ ;图1B)。因此我们进一步对干预浓度进行筛选,最终确定200 μmol/L AS-IV为后续给药浓度(图1C)。SA-β-Gal染色显示,D-gal组阳性细胞比例显著高于对照组( $P<0.001$ );AS-IV干预后,阳性率显著降低( $P<0.05$ ;图1D)。

### 2.2 AS-IV减轻D-gal诱导的心肌细胞氧化应激并且抑制细胞凋亡

ROS增加是细胞衰老的关键介质之一。与NC组比D-gal组的活性氧水平显著增加( $P<0.0001$ ),表明D-gal处理能够明显增加细胞内氧化应激水平,而AS-IV处理细胞能够显著减轻D-gal造成的细胞氧化应激损伤( $P<0.0001$ ;图2A)。与NC组比D-gal组的细胞凋亡率显著增加( $P<0.0001$ ),而AS-IV处理细胞能够显著减轻D-gal造成的细胞凋亡( $P<0.0001$ ;图2B)。



A: Using the CCK8 assay to determine the effect of different concentrations of D-gal on the viability of H9C2 cells after 24 hours of treatment ( $F=155.1, P < 0.0001$ ); B: CCK8 assay to determine the effect of different concentrations of AS-IV on the viability of H9C2 cells treated with D-gal ( $F=204.9, P < 0.0001$ ); C: Further screening of the effective concentration of AS-IV using the CCK8 assay ( $F=69.55, P < 0.0001$ ); D:  $\beta$ -galactosidase staining of cells in each group (scale bar: 200  $\mu$ m) ( $F=42.51, P < 0.0001$ ).  $N \geq 3, {}^{\text{ns}}P > 0.05, *P < 0.05, **P < 0.01, ***P < 0.001, ****P < 0.0001$ .

图1 AS-IV对衰老心肌细胞的影响

Fig. 1 Effects of AS-IV on senescent H9C2 cells

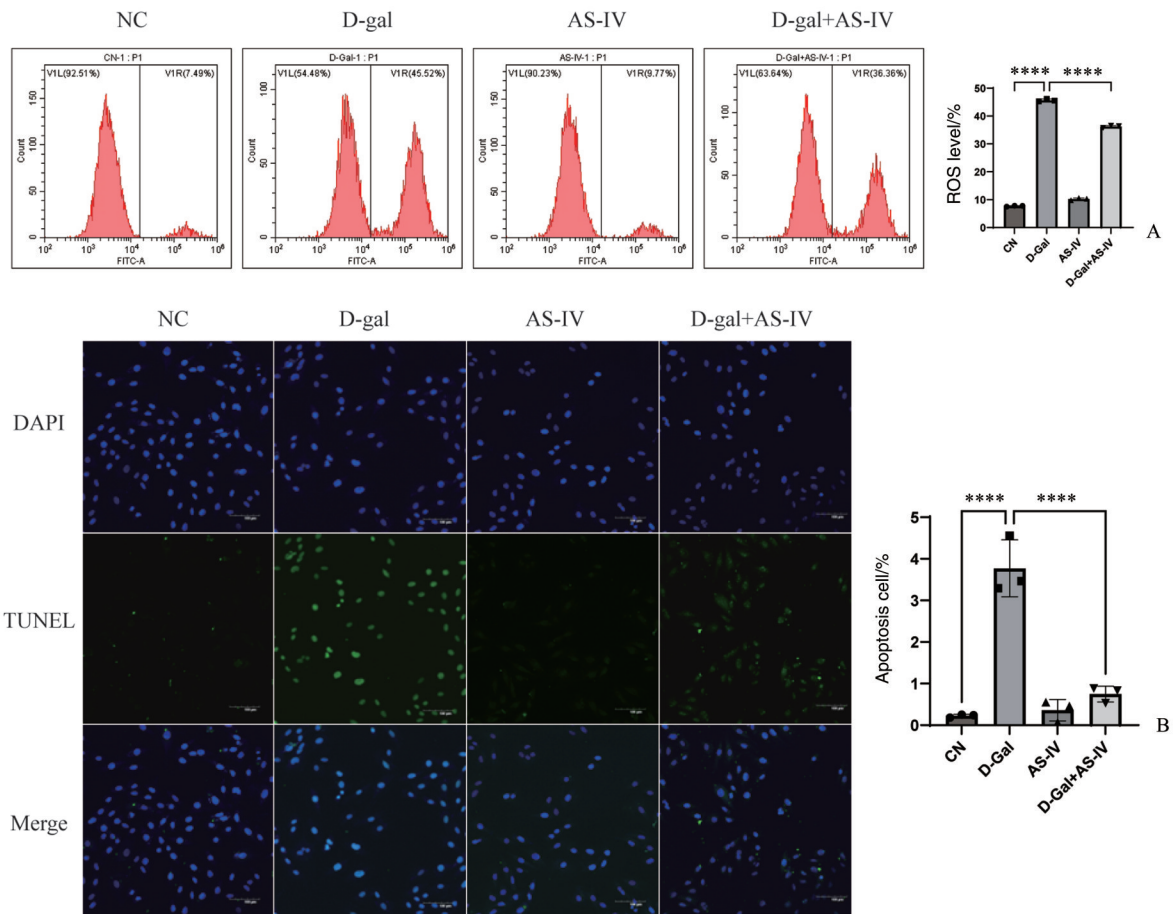
### 2.3 AS-IV对D-gal诱导的心肌细胞衰老和STING通路相关基因及蛋白表达水平的影响

qRT-PCR和Western blot检测显示,与NC组比D-gal组衰老和STING通路相关基因表达量均显著增加( $P < 0.05$ );p21、p53、STING、cGAS、p-IRF3/IRF3蛋白表达量也显著增加( $P < 0.05$ ;图3)。与NC组比,AS-IV组p-IRF3/IRF3蛋白表达水平明显下降,表明AS-IV能够抑制p-IRF3表达,从而发挥保护作用。AS-IV干预后,p21、p53、STING、CXCL10、MX-1基因表达水平均显著降低( $P < 0.05$ ),p21、p53、STING、cGAS、p-IRF3/IRF3蛋白表达水平也显著降

低( $P < 0.05$ ;图3)。表明AS-IV可能通过阻断STING-cGAS复合物的形成或抑制其下游信号传导,从而抑制IRF3的激活。IRF3作为STING通路的核心转录因子,其磷酸化可诱导促炎因子和衰老相关分泌表型(SASP)因子的表达,进而加剧细胞衰老。本研究中AS-IV对p-IRF3的抑制作用与其下调p21、p53表达的结果一致,提示STING通路可能是AS-IV抗心肌衰老的关键靶点。

### 2.4 WB实验验证AS-IV通过抑制STING通路的激活,改善细胞衰老

为进一步验证AS-IV对STING通路的抑制作用是否为其抗衰老效应的核心机制,本研究引入



A: Cell ROS levels ( $F=7578, P < 0.0001$ ). B: Apoptosis levels in each group of cells ( $F=58.99, P < 0.0001$ ). Scale bar: 100  $\mu\text{m}$ ,  $N=3$ , \*\*\*\*  $P < 0.0001$ .

图2 各组细胞氧化应激和凋亡水平

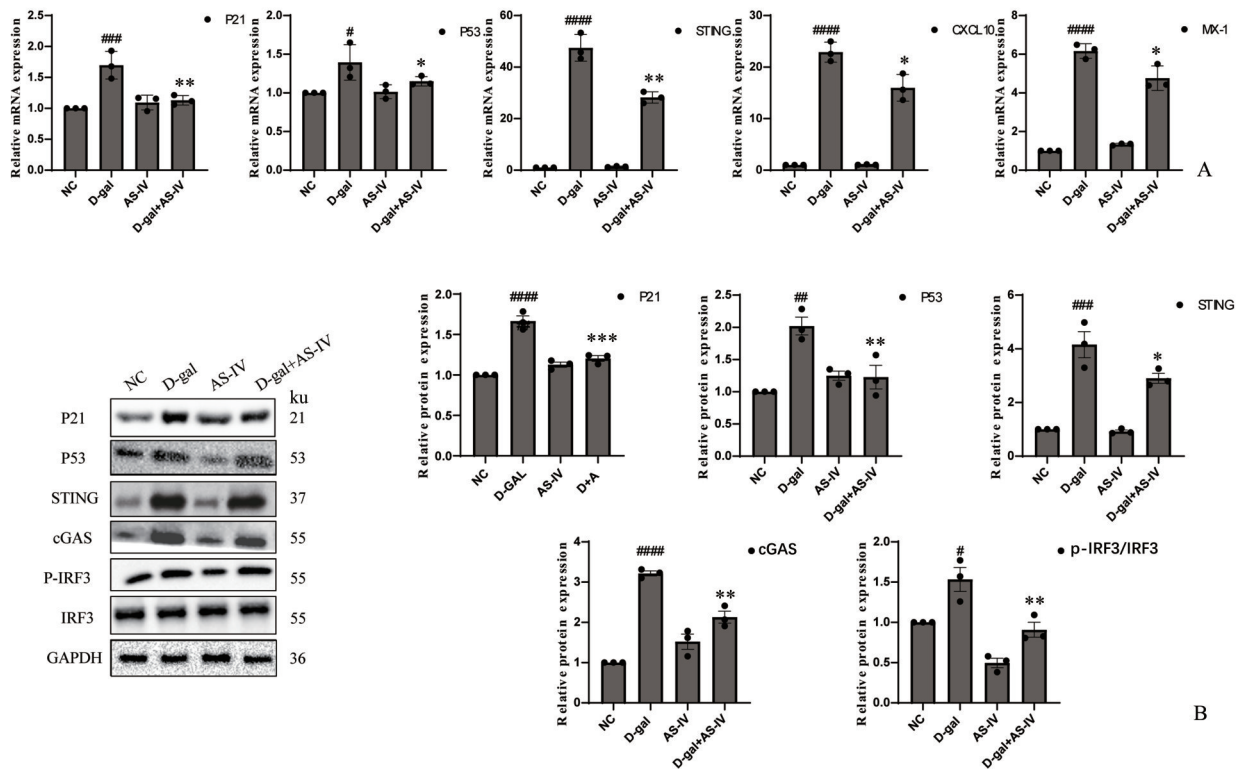
Fig. 2 Oxidative stress and apoptosis levels in each group of cells

STING 激动剂 (STING agonist-7) 进行反向干预。WB 和 qRT-PCR 结果提示, 当 STING agonist-7 浓度为 20  $\mu\text{mol/L}$  时, 能够显著激活该通路, 且激活效果最强 (图 4A), 因此我们选取 20  $\mu\text{mol/L}$  STING agonist-7 作为后续实验浓度。同时, WB 和 qRT-PCR 结果表明, 与 D-gal+ AS-IV 组相比 D-gal+ AS-IV + STING agonist-7 组衰老相关蛋白 p21、p53 和 STING 通路相关蛋白 STING、cGAS、p-IRF3/IRF3 显著上调 ( $P < 0.05$ ; 图 4B), 结果提示 STING 激动剂 (STING agonist-7) 能够拮抗 AS-IV 对 STING、cGAS 表达以及 p-IRF3/IRF3 磷酸化水平的抑制作用, 同时抵消 AS-IV 对 p21、p53 表达的下调效应。表明 AS-IV 的抗衰老作用依赖于其对 STING 通路的直接调控。

## 2.5 SA- $\beta$ -Gal、ROS 和 DNA 损伤进一步验证 AS-IV 通过抑制 STING 通路的激活, 改善细胞衰老

SA- $\beta$ -Gal 染色和 ROS 结果显示, 与 D-gal 组相比, D-gal+ AS-IV + STING agonist-7 组阳性细胞率显著下调 ( $P < 0.05$ ); 但与 D-gal+ AS-IV 组相比 D-gal+ AS-IV + STING agonist-7 组阳性细胞率显著上升 ( $P < 0.05$ ; 图 5A、B)。结果表明, STING 激动剂 (STING agonist-7) 部分抵消了 AS-IV 对衰老心肌细胞的改善作用。

与 NC 组比较, D-gal 组细胞 p- $\gamma$ H2ax、8-OHdG 表达显著增加 ( $P < 0.05$ ), 而 D-gal+ AS-IV 组细胞 p- $\gamma$ H2ax、8-OHdG 表达显著降低 ( $P < 0.05$ )。加入 STING 激动剂后与 D-gal+ AS-IV 比, p- $\gamma$ H2ax、8-OHdG 表达显著增加 ( $P < 0.05$ ; 图 5C)。



A: Expression levels of senescence- and STING pathway-related mRNAs ( $F_{p21}=17.02, P < 0.0001$ ;  $F_{p53}=6.196, P < 0.05$ ;  $F_{STING}=190.7, P < 0.0001$ ;  $F_{CXCL10}=138.3, P < 0.0001$ ;  $F_{MX-1}=142.9, P < 0.0001$ ). B: Expression levels of proteins related to senescence and the STING pathway ( $F_{p21}=52.58, P < 0.0001$ ;  $F_{p53}=13.72, P < 0.01$ ;  $F_{STING}=35.92, P < 0.0001$ ;  $F_{cGAS}=59.37, P < 0.0001$ ;  $F_{p-IRF3/IRF3}=21.33, P < 0.001$ ).  $N = 3$ ; # indicates comparison with the NC group, # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$ , #### $P < 0.0001$ ; \* indicates comparison with the D-gal group, \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ .

图3 AS-IV抑制STING通路

Fig. 3 AS-IV inhibits the STING pathway

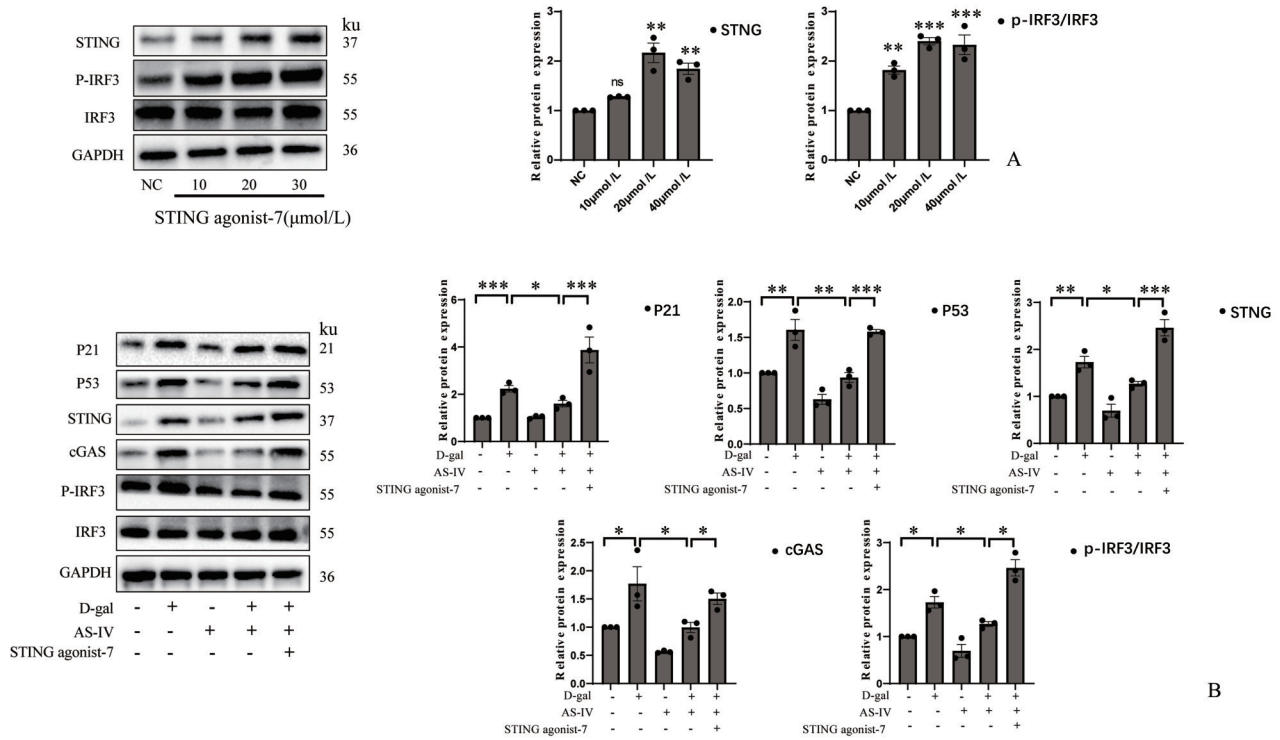
DNA损伤的结果进一步验证了AS-IV通过抑制STING通路,减轻D-半乳糖诱导的心肌细胞衰老。

### 3 讨论

生物衰老会引发心脏和脉管系统结构与功能改变,从而破坏心血管系统,导致左心室肥大、舒张功能降低、细胞外基质重塑、心肌纤维化增多及传导阻滞等病理改变,进而增加个体患冠状动脉疾病、高血压、动脉粥样硬化、心房颤动和心力衰竭等心血管疾病的风险<sup>[14]</sup>。心脏衰老源于心肌细胞、成纤维细胞、内皮细胞和免疫细胞等主要组成细胞的老化,随年龄增长,SA-β-gal活性及主动脉根、心房、心室肌细胞和平滑肌细胞中p21、p16蛋白表达上升,最终导致心脏衰老和心脏功能下降<sup>[15]</sup>。虽然心肌细胞属于终末分化细胞,但多项研究表明衰老

型心肌细胞参与心血管疾病的形成。如Liu等<sup>[16]</sup>发现干扰NLRP3炎性小体的形成和激活可以抑制心肌细胞的细胞焦亡从而缓解心肌衰老;同时,Huang等<sup>[17]</sup>的研究表明Redd1作为p38 MAPK的下游效应分子,通过促进p65磷酸化和核转位来促进NF-κB信号传导,从而促进心肌细胞衰老。因此,抑制或延缓心肌细胞衰老可能是治疗老年人心血管疾病的重要策略。

AS-IV作为黄芪的有效的活性成分,具有安全性高、多靶点调控的优势,在心血管疾病的预防和治疗中发挥重要作用。海军军医大学张卫东团队发现,黄芪甲苷衍生物HHQ16可通过降解lncRNA4012/9456抑制NF-κB信号,改善心肌梗死后心衰<sup>[18]</sup>。最近的研究表明,AS-IV可通过调控PINK1/Parkin线粒体自噬信号通路抑制Ang II诱导的心肌纤维化<sup>[19]</sup>。为了明确AS-IV在调控心肌细胞衰老中的作用,本课题采用AS-IV处理D-gal



A: STING agonist STING agonist-7 concentration screening ( $F_{STING}=22.03, P < 0.001$ ;  $F_{p-IRF3/IRF3}=32.40, P < 0.001$ ). B: Expression levels of senescence and STING pathway-related proteins ( $F_{p21}=21.00, P < 0.000 1$ ;  $F_{p53}=28.58, P < 0.000 1$ ;  $F_{STING}=35.94, P < 0.000 1$ ;  $F_{cGAS}=10.11, P < 0.01$ ;  $F_{p-IRF3/IRF3}=35.94, P < 0.000 1$ ).  $N=3, ns P > 0.05, * P < 0.05, ** P < 0.01, *** P < 0.001$ .

图4 STING激动剂(STING agonist-7)抵消黄芪甲苷(AS-IV)对心肌细胞衰老的改善效果

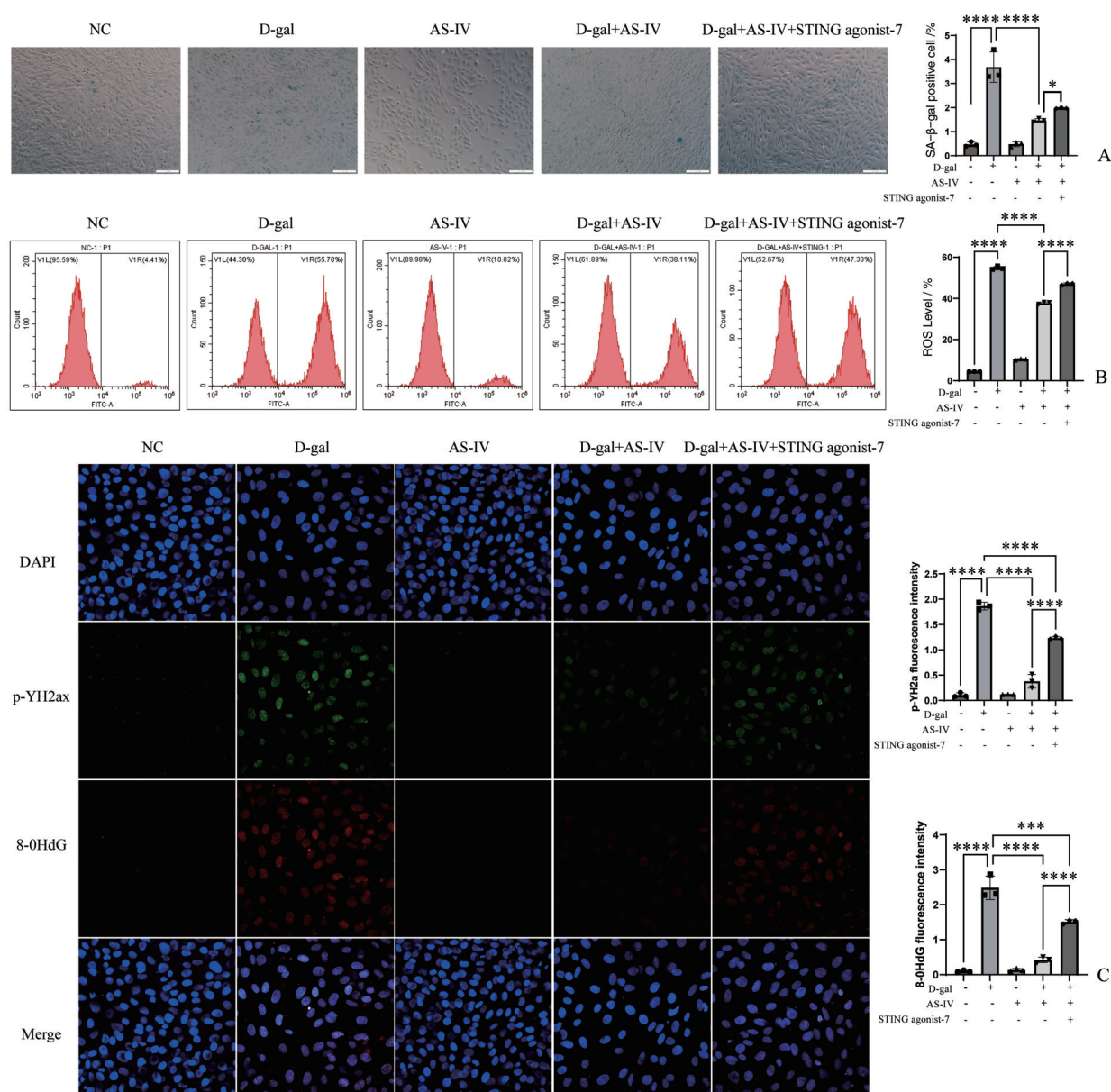
Fig. 4 STING agonist (STING agonist-7) counteracts the improvement effect of astragaloside IV (AS-IV) on myocardial cell senescence

诱导的H9C2细胞进行衰老实验探究。本研究表明,AS-IV干预后SA-β-gal阳性率降低,细胞内ROS减少,STING及cGAS、p-IRF3/IRF3表达被抑制,表明其可能通过阻断STING通路,抑制SASP分泌及炎症反应,从而延缓心肌衰老。这与谢利亚等<sup>[20]</sup>发现的AS-IV在高糖条件通过其抗氧化活性和SIRT1途径延缓HUVECs衰老的结果一致。

STING是胞质DNA感应通路的核心分子,初步研究表明,STING对细胞衰老并非必需,然而有研究发现,STING通过激活IRF3和NF-κB来上调SASP,从而对cGAS介导的细胞衰老至关重要<sup>[21]</sup>。本研究发现,D-gal组STING及cGAS、p-IRF3/IRF3表达上调(图3),提示STING通路参与D-gal诱导的心肌细胞衰老过程。这与既往的研究报道结果一致,即STING通过激活IRF3和NF-κB来上调SASP参与cGAS介导的细胞衰老<sup>[22-24]</sup>。此外,使用

STING激动剂(STING agonist-7)能够逆转AS-IV对STING、cGAS表达以及p-IRF3/IRF3磷酸化水平的抑制作用,同时抵消AS-IV对p21、p53表达的下调效果(图4)。同时,SA-β-Gal阳性率、ROS水平、DNA损伤结果进一步证实了STING激动剂(STING agonist-7)对AS-IV减轻D-半乳糖诱导的心肌细胞衰老的逆转作用。总之,这些证据表明,AS-IV能够通过抑制STING通路改善心肌细胞衰老,从而发挥心脏保护作用。

本研究通过体外实验首次揭示了AS-IV通过抑制STING通路减轻D-gal诱导的心肌细胞衰老的分子机制,为中药单体干预心脏衰老提供了新策略和新思路。然而,本研究需在动物水平进一步验证AS-IV的心肌保护作用。未来还可以通过多组学技术,深入研究AS-IV对心肌微环境中衰老细胞及免疫细胞的调控网络,为其临床转化提供更坚实的理论依据。



A:  $\beta$ -galactosidase staining of cells in each group (scale bar: 200  $\mu$ m) ( $F=61.72, P < 0.0001$ ). B: Cell ROS levels ( $F=5693, P < 0.0001$ ). C: Cellular immunofluorescence validation of DNA damage in each group of cells (40 $\times$ ) ( $F=339.6, P < 0.0001$ ;  $F=132.7, P < 0.001$ ).  $N = 3, ^{ns}P > 0.05, *P < 0.05, ***P < 0.001, ****P < 0.0001$ .

图5 SA- $\beta$ -Gal、ROS和DNA损伤显示STING激动剂(STING agonist-7)部分抵消黄芪甲苷(AS-IV)对心肌细胞衰老的改善效果

Fig. 5 SA- $\beta$ -Gal, ROS, and DNA damage indicate that the STING agonist (STING agonist-7) partially counteracts the ameliorative effects of astragaloside IV (AS-IV) on myocardial cell senescence

参考文献

[1] 国家心血管病中心, 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告2024概要[J]. 中国循环杂志, 2025,40(6):521-559.  
National Center for Cardiovascular Diseases, The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and

Diseases in China. Report on Cardiovascular Health and Diseases in China 2024: an Updated Summary [J]. Chin Circ J, 2025,40(6):521-559.  
[2] 刘明波, 何新叶, 杨晓红, 等. 《中国心血管健康与疾病报告2023》概要(心血管疾病流行及介入诊疗状况)[J]. 中国

- 介入心脏病学杂志, 2024, 32(10):541-550.
- Liu MB, He XY, Yang XH, et al. Interpretation of report on cardiovascular health and diseases in China 2023 [J]. *Chin J Interv Cardiol*, 2024, 32(10):541-550.
- [3] Salim SV, Alvaro A, Hugo JA, et al. Heart disease and stroke statistics-2021 update: a report from the American Heart Association [J]. *Circulation*, 2021, 143(8):e254-e743.
- [4] Jennifer LR, Jarrod J, Samuel IB, et al. Cardiovascular risks associated with gender and aging [J]. *J Cardiovasc Dev Dis*, 2019, 6(2):19.
- [5] Li HY, Wei TT, Zhuang M, et al. Iron derived from NCOA4-mediated ferritinophagy causes cellular senescence via the cGAS-STING pathway [J]. *Cell Death Discov*, 2023, 9(1):419.
- [6] Chen C, Xu P. Cellular functions of cGAS-STING signaling [J]. *Trends Cell Biol*, 2023, 33(8):630-648.
- [7] Patrick KO, Zheng X, Wei J, et al. The cGAS-STING signaling in cardiovascular and metabolic diseases: future novel target option for pharmacotherapy [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2022, 12(1):50-75.
- [8] Li N, Zhou H, Wu H, et al. STING-IRF3 contributes to lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction, inflammation, apoptosis and pyroptosis by activating NLRP3 [J]. *Redox Biol*, 2019, 24:101215.
- [9] Phuong TP, Daiju F, Sachiko N, et al. STING, a cytosolic DNA sensor, plays a critical role in atherogenesis: a link between innate immunity and chronic inflammation caused by lifestyle-related diseases [J]. *Eur Heart J*, 2021, 42(42):4336-4348.
- [10] Liang Y, Chen B, Liang D, et al. Pharmacological effects of astragaloside IV: a review [J]. *Molecules*, 2023, 28(16):6118.
- [11] 贺秋兰, 温鲁平, 李贵明, 等. 基于血清代谢组学研究黄芪甲苷抑制高脂喂养的 Apc Min/+ 小鼠结肠腺瘤性息肉形成 [J]. *中山大学学报(医学科学版)*, 2022, 43(6):916-927.
- He QL, Wen LP, Li GM, et al. Astragaloside IV inhibits colonic adenomatous polyps formation in high-fat diet-fed Apc Min/+ mice by regulating serum metabolomics [J]. *J Sun Yat-Sen Univ (Med Sci)*, 2022, 43(6):916-927.
- [12] Li M, Niu Y, Tian L, et al. Astragaloside IV alleviates macrophage senescence and D-galactose-induced bone loss in mice through STING/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 129:111588.
- [13] Zhai P, Chen Q, Wang X, et al. The combination of Tanshinone IIA and Astragaloside IV attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting the STING pathway [J]. *Chin Med*, 2024, 19(1):34.
- [14] Thassio M, Lin YN, Ahmed I. Chronic low-grade inflammation in heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Aging Cell*, 2021, 20(9):e13453.
- [15] Chen MS, Richard TL, Jessica CG. Senescence mechanisms and targets in the heart [J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(5):1173-1187.
- [16] Liu WB, Wang SS, Zhang X, et al. Enhanced cardiomyocyte NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis promotes D-galactose-induced cardiac aging [J]. *J Am Heart Assoc*, 2024, 13(14):e032904.
- [17] Huang P, Bai L, Liu L, et al. Redd1 knockdown prevents doxorubicin-induced cardiac senescence [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(10):13788-13806.
- [18] Wan J, Zhang Z, Wu C, et al. Astragaloside IV derivative HHQ16 ameliorates infarction-induced hypertrophy and heart failure through degradation of lncRNA4012/9456 [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2023, 8(1):414.
- [19] 聂佩, 顾崇怀, 乔锐, 等. 黄芪甲苷通过调控线粒体自噬抑制血管紧张素 II 诱导的心肌纤维化 [J]. *中药药理与临床*, doi:10.13412/j.cnki.zyyl.20250511.005
- Nie P, Gu CH, Qiao R, et al. Inhibition of angiotensin II-induced myocardial fibrosis by astragaloside IV via regulation of mitochondrial autophagy [J]. *Pharmacol Clin Chin Mater Med*, doi:10.13412/j.cnki.zyyl.20250511.005
- [20] 谢利亚, 张虹, 陆吴霞, 等. 黄芪甲苷通过 SIRT1/AMPK 抑制高糖诱导人脐静脉内皮细胞衰老 [J]. *浙江中西医结合杂志*, 2023, 33(3):225-229.
- Xie LY, Zhang H, Lu WX, et al. Astragaloside IV inhibits high glucose-induced human umbilical vein endothelial cell senescence through activation of the SIRT1/AMPK signaling [J]. *Zhejiang J Integr Tradit Chin West Med*, 2023, 33(3):225-229.
- [21] Steve D, Stephanie C, Hannah EV, et al. New frontiers in the cGAS-STING intracellular DNA-sensing pathway [J]. *Immunity*, 2024, 57(4):718-730.
- [22] Hanna LS-M, Alberto G, Giulia B, et al. YAP/TAZ activity in stromal cells prevents ageing by controlling cGAS-STING [J]. *Nature*, 2022, 607(7920):790-798.
- [23] Marco DC, Takahiro I, Anna PP, et al. L1 drives IFN in senescent cells and promotes age-associated inflammation [J]. *Nature*, 2019, 566(7742):73-78.
- [24] Liang C, Ke Q, Liu Z, et al. BMAL1 moonlighting as a gatekeeper for LINE1 repression and cellular senescence in primates [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(6):3323-3347.