

本文引用: 李雨晴, 何苗, 肖阳, 任卫琼, 徐菲, 傅音睿, 王志琪. 乌头碱配伍甘草次酸前后对衰竭心肌细胞影响的比较研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(6): 1001-1008.

乌头碱配伍甘草次酸前后对衰竭心肌细胞影响的比较研究

李雨晴¹, 何苗¹, 肖阳², 任卫琼³, 徐菲⁴, 傅音睿⁴, 王志琪^{4,5*}

1. 湖南中医药大学研究生院, 湖南长沙 410208; 2. 四川大学华西药学院, 四川成都 610041;

3. 湖南中医药大学附属第一医院, 湖南长沙 410007; 4. 湖南中医药大学药学院, 湖南长沙 410208;

5. 湖南省中药饮片标准化及功能工程技术研究中心, 湖南长沙 410208

[摘要] **目的** 比较乌头碱配伍甘草次酸前后对衰竭心肌细胞的影响。**方法** 将 H9c2 细胞随机分为 9 组, 即空白组, 模型组, 甘草次酸组, 30、120、480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组 (30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱+30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘草次酸)、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组 (120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱+30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘草次酸)、480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组 (480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱+30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 甘草次酸)。除空白组外, 各组均以阿霉素法构建衰竭 H9c2 心肌细胞模型。造模成功后, 空白组和模型组给予 DMEM, 其余各组给予相应药物干预 24 h。显微镜观察细胞形态和线粒体微观结构, CCK-8 法测定细胞存活率, ELISA 检测乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)、过氧化氢酶 (catalase, CAT)、谷胱甘肽 (glutathione, GSH)、ATP, 荧光探针法测定活性氧 (reactive oxygen species, ROS)、膜电位、胞内及线粒体内 Ca^{2+} 浓度。蛋白免疫印迹法 (western blot, WB) 检测 AMPK 通路和 CaMK II 通路蛋白。**结果** 与模型组比较, 120、480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱降低细胞存活率, 升高 MDA 含量 ($P<0.01$); 480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱破坏线粒体结构; 30、120、480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱升高 ROS 含量, 降低 SOD、CAT、GSH 酶活性, 降低线粒体膜电位和 ATP 生成, 升高胞内及线粒体内钙离子浓度, 降低 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱抑制 AMPK 磷酸化, 降低 SERCA2a 和 PGC-1 α 蛋白表达, 促进 RyR2 蛋白表达 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与单用乌头碱比较, 配伍甘草次酸改善其线粒体结构损伤, 降低 ROS 含量, 升高 SOD、CAT、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性, 降低胞内及线粒体内的钙离子浓度 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 30、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组升高线粒体膜电位 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 120、480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组降低 MDA 含量, 提高 GSH、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATP}$ 酶活性, 升高 ATP 含量 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组可抑制 CaMK II 磷酸化, 升高 PGC-1 α 蛋白表达 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 甘草次酸可拮抗乌头碱对衰竭心肌细胞的线粒体毒性, 作用环节可能与缓解氧化应激和钙超载, 增加线粒体产能有关。

[关键词] 乌头碱; 甘草次酸; 衰竭心肌细胞; 线粒体; 钙超载; 氧化应激

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.06.010

Comparison of the effects of aconitine on failing cardiomyocytes before and after combined with glycyrrhetic acid

LI Yuqing¹, HE Miao¹, XIAO Yang², REN Weiqiong³, XU Fei⁴, FU Yinrui⁴, WANG Zhiqi^{4,5*}

1. Graduate School, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. West China School of Pharmacy, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610041, China; 3. The First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410007, China; 4. School of Pharmacy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 5. Hunan Engineering Technology Research Center for Standardization and Function of Chinese Herbal Decoction Pieces, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To compare the different effects of aconitine on failing cardiomyocytes before and after combined with

[收稿日期] 2024-01-05

[基金项目] 国家自然科学基金项目 (81503492); 湖南省自然科学基金项目 (2021JJ80059); 长沙市自然科学基金项目 (kq2014093); 湖南省教育厅重点项目 (23A0285); 湖南省大学生创新创业项目 (S202310541091); 校级研究生创新课题 (2022CX80)。

[通信作者] * 王志琪, 女, 教授, 硕士研究生导师, E-mail: wzqx2004@126.com。

glycyrrhetic acid. **Methods** H9c2 cells were randomized into nine groups, i.e., blank group, model group, glycyrrhetic acid group, 30, 120, and 480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ aconitine groups, 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ combination group (30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ aconitine+30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ glycyrrhetic acid), 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ combination group (120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ aconitine+30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ glycyrrhetic acid), and 480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ combination group (480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ aconitine+30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ glycyrrhetic acid). The model of failing H9c2 cardiomyocytes was established by an 24-hour intervention of 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ adriamycin in all groups except the blank group. After successful modeling, the blank and model groups were treated with DMEM, and the remaining groups with the corresponding drugs for 24 h. Cardiomyocyte morphology and mitochondrial microstructure were observed by microscopy, and cell viability was determined by CCK-8 assay. Enzyme immunoassay was used to examine the content of lactate dehydrogenase (LDH), $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), catalase (CAT), glutathione (GSH), and ATP. Fluorescent probe assay was employed to check the reactive oxygen species content (ROS), mitochondrial membrane potential, and intracellular and mitochondrial Ca^{2+} concentration. Proteins of AMPK pathway and CaMKII pathway were examined by Western blot. **Results** Compared with model group, 120 and 480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ aconitine decreased cell viability, increased MDA content ($P<0.05$ or $P<0.01$), 480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ aconitine disrupted the mitochondrial structure, 30, 120, and 480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ aconitine increased ROS content, decreased SOD, CAT, and GSH enzyme activities, decreased mitochondrial membrane potential and ATP production, and increased intracellular and mitochondrial Ca^{2+} concentration, decreased $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$, $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$, and $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$ activities ($P<0.05$ or $P<0.01$), and 480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ aconitine inhibited AMPK phosphorylation, decreased SERCA2a and PGC-1 α protein expression, and promoted RyR2 protein expression ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared with aconitine group, the combination of glycyrrhetic acid improved mitochondrial structural damage, reduced ROS content, elevated the activities of SOD, CAT, $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ and $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$, and reduced the intracellular and mitochondrial calcium ion concentration ($P<0.05$ or $P<0.01$), and 30, 120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ combination groups elevated the mitochondrial membrane potential ($P<0.05$ or $P<0.01$), the 120, 480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ combination groups decreased MDA content, increased GSH and $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ activities, and elevated ATP content ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the 480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ combination group inhibited CaMK II phosphorylation and elevated PGC-1 α protein expression ($P<0.05$ or $P<0.01$). **Conclusion** Glycyrrhetic acid antagonizes the mitochondrial toxicity of aconitine on the failing cardiomyocytes, which may be related to alleviating oxidative stress and calcium overload, as well as increasing mitochondrial energy production.

[**Keywords**] aconitine; glycyrrhetic acid; failing cardiomyocyte; mitochondria; calcium overload; oxidative stress

附子是毛茛科植物乌头 *Aconitum carmichaelii* Debx. 的子根加工品,其性味辛热,为“回阳救逆第一品药”。然而,附子属于有毒中药,《神农本草经》中将其列为下品,历代医书及本草典籍中均描述了附子毒性^[1]。中医临床应用有毒中药时经过炮制、配伍等,以实现解毒甚至增效的目的^[2]。附子配甘草属于经典相畏相杀配伍。甘草号称“药中国老”,尤其善于缓解药物毒性,“中药方剂数据库”(http://www.tcm-doc.cn/)检索显示:附子相关方剂中超 30%含甘草^[3]。

实验研究证实,甘草可通过多途径缓解附子心脏毒性。附子主要毒性成分乌头碱心肌毒性机制与诱发细胞内氧化应激、线粒体结构损伤及能量代谢障碍、钙超载等有关^[4-5],而甘草中的甘草次酸则通过降低心肌细胞线粒体膜电位,调节细胞钙转运等,减轻附子对正常大鼠心功能和 H9c2 心肌细胞的损伤^[6-8]。课题组前期,通过离体蛙心、衰竭大鼠心脏及正常心肌细胞实验,证实了甘草次酸可以拮抗乌头碱的心肌毒性^[9-11]。检索现有文献发现,以衰竭心肌细胞为研究对象,探索附子、甘草活性成分配伍作用的报道较少。因此,本实验拟以附子毒性代表成分乌头碱和甘草主要解毒成分甘草次酸为对象,在衰竭心肌细胞上,比较乌头碱配伍甘草次酸前后,

对模型细胞内氧化应激、线粒体产能、钙稳态的作用,以期阐明附子甘草相畏相杀的科学内涵提供试验数据。

1 材料

1.1 细胞及主要试剂

大鼠心肌细胞(H9c2)(货号:CL-0089)购自于普诺赛生物公司;乌头碱(纯度>98%,批号:302-27-2),甘草次酸(纯度>98%,批号:471-53-4)均购自于成都埃法生物科技有有限公司;阿霉素(批号:HY-15142)、KN-93(批号:HY-15465B)、Dorsomorphin(批号:HY-13418A)均购自美国 MCE 公司;CCK-8 试剂盒(批号:E-CK-A362)、ATP 试剂盒(批号:E-BC-F002)均购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)试剂盒(批号:A020-2-2)、活性氧(reactive oxygen species, ROS)试剂盒(批号:E004-1-1)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号:A003-1-2)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)试剂盒(批号:A001-3-2)、过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒(批号:A007-1-1)、谷胱甘肽(glutathione, GSH)试剂盒(批号:A006-2-1)、 $\text{Na}^+\text{-K}^+\text{-ATPase}$ 酶试剂盒(批号:A070-2-2)、 $\text{Ca}^{2+}\text{-ATPase}$ 酶试剂盒(批号:A070-4-1)、 $\text{Ca}^{2+}\text{-Mg}^{2+}\text{-ATPase}$

Mg²⁺-ATP 酶试剂盒(批号:A070-3-2)均购自南京建成生物工程研究所有限公司;JC-1 试剂盒(批号:M8650,北京索莱宝科技有限公司);Fluo-4 钙离子检测试剂盒(批号:S1601S,上海碧云天生物技术有限公司);Rhod-2AM 钙离子荧光(批号:21060,美国 AAT Bioques 公司)。

1.2 主要仪器

3111 型 CO₂ 培养箱、1510 型全波长酶标仪(美国 Thermo 公司);BX51 型倒置显微镜、IX51 型荧光倒置显微镜(日本 OLYMPUS 公司);HT7800 透射电子显微镜(日本 HITACHI 公司);SynergyHT 多功能酶标仪(美国 Biotek 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养与分组处理

参考文献[12]的方法,在 5% CO₂、37 °C 条件下,用含 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素混合液的高糖 DMEM 培养基培养 H9c2 细胞,待细胞密度达 90%左右后,以 0.25%胰酶消化传代,取对数生长期细胞进行实验。实验组分为空白组,模型组,甘草次酸组,梯度浓度乌头碱组(30、120、480 μmol·L⁻¹),固定浓度甘草次酸(30 μmol·L⁻¹,预实验中最高安全浓度)配伍乌头碱组。除空白组外,其余组用 2 μmol·L⁻¹阿霉素干预 24 h,建立衰竭 H9c2 心肌细胞模型,然后各给药组给予相应药物处理 24 h。

2.2 指标检测

2.2.1 CCK-8 法检测细胞存活率 取对数生长期的 H9c2 心肌细胞制成单细胞悬液,以密度 5×10³ 个/孔接种至 96 孔板内,每组设 6 个复孔。细胞贴壁后,按照“2.1”项造模给药处理。待处理结束后,去除原培养基,每孔加入 100 μL CCK-8 溶液,孵育 2 h。孵育完成后使用酶联免疫检测仪,于 450 nm 波长下,检测各孔吸光度(OD)值,计算细胞存活率。

2.2.2 倒置显微镜观察细胞形态 取对数生长期的细胞接种于 6 孔板中,每孔 1×10⁶ 个细胞,在 5% CO₂、37 °C 条件下进行培养,按照“2.1”项处理,使用倒置显微镜观察乌头碱配伍甘草次酸前后衰竭 H9c2 心肌细胞形态学的变化。

2.2.3 ELISA 法检测 LDH、ATP、MDA、SOD、CAT、GSH 含量 取对数生长期的细胞以每孔 1×10⁶ 个细胞接种于 6 孔板,按照“2.2.2”项处理干预,收集细胞上清液,按照试剂盒说明书进行操作,应用酶标仪于不同波长下检测样本吸光度值,根据吸光度计算乌头碱配伍甘草次酸前后衰竭 H9c2 心肌细胞 LDH、ATP、MDA、SOD、CAT、GSH 含量。

2.2.4 免疫荧光法检测 ROS 含量 参照“2.2.2”项处理干预,按照 ROS 试剂盒说明书进行操作,在荧

光倒置显微镜下观察、拍照。DCFH-DA 探针被细胞内相关酯酶水解成 DCFH,DCFH 可被胞内 ROS 氧化为强绿色荧光物质 DCF,胞内 ROS 水平与 DCF 荧光强度成正比。

2.2.5 透射电子显微镜观察线粒体超微结构 参照“2.2.2”项处理干预细胞,离心收集细胞沉淀,去除培养基加入电镜固定液,进行固定、脱水、包埋、聚合、切片、染色操作,最后使用透射电子显微镜观察,并采集图像。

2.2.6 JC-1 染色法检测线粒体膜电位水平 参照“2.2.2”项处理干预,按照 JC-1 试剂盒说明书进行操作,在荧光倒置显微镜下观察、拍照。利用 JC-1 染料检测线粒体膜电位,当线粒体膜电位低时,JC-1 染料产生绿色荧光,线粒体膜电位高时,JC-1 染料产生红色荧光。

2.2.7 荧光探针法检测胞内及线粒体钙离子浓度 参照“2.2.2”项处理细胞,参照 Fluo-4 细胞内 Ca²⁺检测试剂盒及 Rhod-2 AM 线粒体内 Ca²⁺检测试剂说明书进行 Ca²⁺检测试剂配制、装载 Fluo-4 及 Rhod-2 AM 探针等步骤,通过荧光倒置显微镜观察、拍照。

2.2.8 ELISA 法检测 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶活性 参照“2.2.2”项处理干预,根据 Na⁺-K⁺-ATP 酶、Ca²⁺-ATP 酶、Ca²⁺-Mg²⁺-ATP 酶试剂盒说明测定指标活性,应用酶标仪于不同波长下检测样本吸光度,根据吸光度计算乌头碱配伍甘草次酸前后衰竭 H9c2 心肌细胞上述酶活性。

2.2.9 Western blot 法检测 CaMK II、RyR2、SERCA2a、AMPK、PGC-1α 蛋白表达水平 实验分组分为空白组、模型组、乌头碱组(480 μmol·L⁻¹ 乌头碱)、甘草次酸组(30 μmol·L⁻¹ 甘草次酸)、乌头碱+甘草次酸联用组(480 μmol·L⁻¹ 乌头碱+30 μmol·L⁻¹ 甘草次酸)、CaMK II 抑制剂组(KN-93)、AMPK 抑制剂组(Dorsomorphin)。除正常组外,其余各组参照“2.1”项造模。抑制剂组、抑制剂+乌头碱+甘草次酸组加入 5 μmol·L⁻¹ 抑制剂处理 2 h。之后参照分组给予相应药物培养 24 h,空白组、模型组、抑制剂组给予空白 DMEM。药物处理后,收集细胞,加入细胞裂解液,冰上裂解 30 min,以 12 000 r/min 离心 15 min 离心半径,取上清,-80 °C 冰箱内保存、备用。利用 BCA 试剂盒测定总蛋白含量。取适量蛋白样品进行电泳分离,电泳电压为 80 V,当样本到达分离胶位置后调高电压至 130 V;然后转膜 1 h,电流 250 mA,5%脱脂牛奶封闭 1 h,加一抗(1:1 000),4 °C 孵育过夜。次日,TBST 漂洗 5 次,二抗(1:5 000)室温孵育 1 h,TBST 漂洗 5 次,添加 ECL 发光液暗室曝光。用 ImageJ 分析各条带灰度。

2.3 统计学分析

使用 SPSS 21.0 统计软件处理实验数据,采用

GraphPad prism 8 软件绘图,实验结果以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。两组间数据通过 t 检验进行比较,多组比较采用单因素方差分析,组间数据比较采用 LSD 检验。以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 乌头碱配伍甘草次酸对衰竭心肌细胞毒性作用的影响

与空白组比较,模型组细胞存活率显著降低,LDH 含量升高($P<0.01$),且细胞形态多呈不规则多角形,间隙加宽,细胞表面粗糙,胞内易见较多细微颗粒物。与模型组比较,乌头碱组细胞存活率均降低,LDH 含量升高($P<0.01$),细胞形态不清晰,细胞损伤加剧,且随乌头碱浓度增加,损伤越严重。与乌头碱组比较,120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组细胞存活率无统计学差异($P>0.05$),LDH 含量降低($P<0.01$),细胞形态改善。详见表 1、图 1。

表 1 乌头碱配伍甘草次酸对衰竭心肌细胞 LDH 的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

分组	细胞存活率/%	LDH/(U·L ⁻¹)
空白组	100.00±9.65	265.32±10.98
模型组	68.29±6.64 ^{###}	313.13±10.30 ^{###}
甘草次酸组	67.71±6.94	309.09±13.50
30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组	61.74±5.28	362.29±5.04 ^{**}
30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组	64.72±5.35	317.85±9.08
120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组	54.74±5.36 ^{**}	411.45±9.38 ^{**}
120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组	60.05±6.10	366.33±3.43 ^{▲▲}
480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组	45.71±4.36 ^{**}	457.24±10.08 ^{**}
480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组	51.12±4.64	404.71±6.67 ^{▲▲}

注:与空白组比较,^{###} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与对应浓度乌头碱组比较,^{▲▲} $P<0.01$ 。

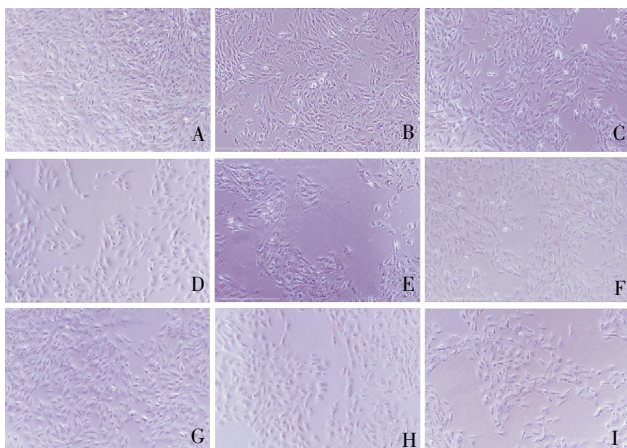


图 1 乌头碱配伍甘草次酸对衰竭心肌细胞的形态的影响($\times 100$)

注:A.正常组;B.模型组;C.甘草次酸组;D.30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组;E.30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组;F.120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组;G.120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组;H.480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组;I.480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组。

3.2 乌头碱配伍甘草次酸对衰竭心肌细胞线粒体结构与功能的影响

与空白组比较,模型组线粒体整体呈现水肿、崩解状、数量减少,超微结构出现膜肿胀、嵴断裂溶解、间隙增大等病变;乌头碱组加重上述病变;配伍甘草次酸后,细胞线粒体膜相对完整、边界较清晰,嵴结构完整,空泡化情况较少。与模型组比较,乌头碱单用 ATP 含量和线粒体膜电位降低($P<0.01$);与乌头碱组比较,120、480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组的 ATP 含量均升高($P<0.01$),30、120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组线粒体膜电位均升高($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。详见表 2 及图 2—3。

表 2 乌头碱配伍甘草次酸对衰竭心肌细胞线粒体功能的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

分组	ATP/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)	线粒体膜电位/荧光度值
空白组	3.59±0.02	113.53±4.51
模型组	2.94±0.01 ^{###}	42.51±0.70 ^{###}
甘草次酸组	2.91±0.04	34.65±1.70
30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组	2.88±0.06 ^{**}	18.33±0.63 ^{**}
30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组	2.93±0.04	29.83±1.70 ^{▲▲}
120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组	2.57±0.05 ^{**}	9.45±0.64 ^{**}
120 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组	2.71±0.01 ^{▲▲}	13.20±0.63 [▲]
480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组	2.09±0.03 ^{**}	2.79±0.18 ^{**}
480 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组	2.33±0.02 ^{▲▲}	3.94±0.20

注:与空白组比较,^{###} $P<0.01$;与模型组比较,^{**} $P<0.01$;与对应浓度乌头碱组比较,[▲] $P<0.05$,^{▲▲} $P<0.01$ 。

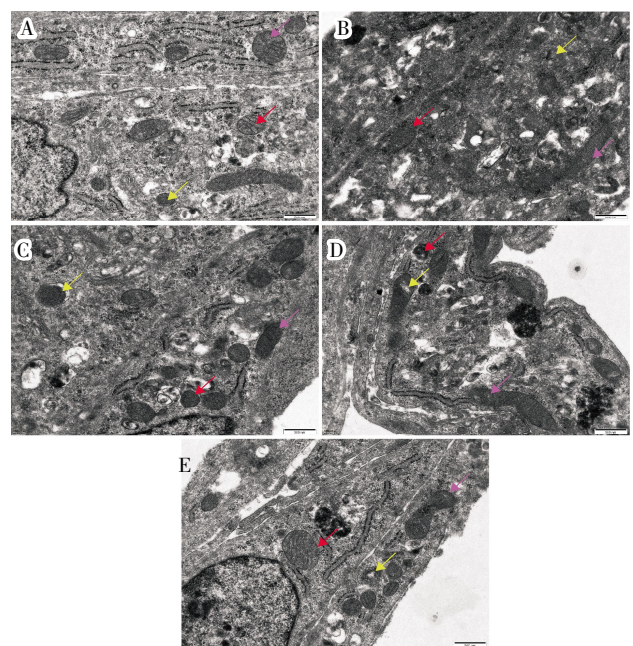


图 2 乌头碱配伍甘草次酸对衰竭心肌细胞的线粒体超微结构的影响($\times 10\ 000$)

注:A.空白组;B.模型组;C.甘草次酸组;D.乌头碱组;E.联用组。红色箭头:线粒体嵴形态;黄色箭头:空泡化现象;紫色箭头:线粒体膜肿胀情况。

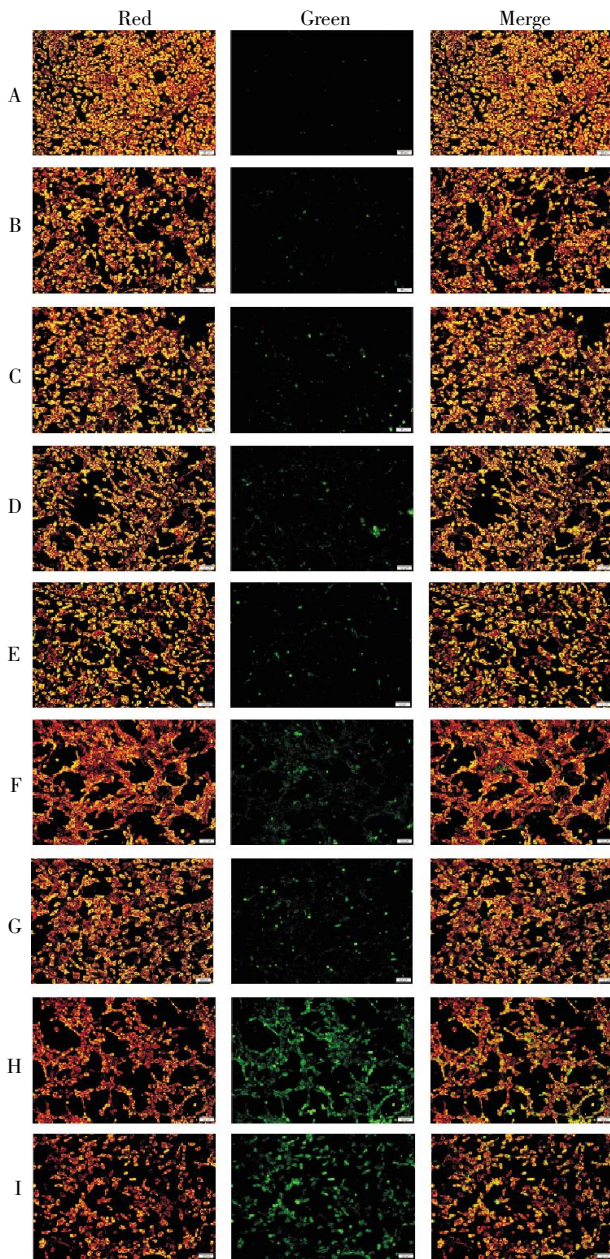


图3 乌头碱配伍甘草次酸前后对衰竭心肌细胞线粒体膜电位的影响($\times 100$)

注:A.正常组;B.模型组;C.甘草次酸组;D. $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组;E. $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组;F. $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组;G. $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组;H. $480 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组;I. $480 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组。

3.3 乌头碱配伍甘草次酸对衰竭心肌细胞氧化应激的影响

与空白组比较,模型组 ROS 含量显著升高, SOD、CAT、GSH 活性降低($P<0.01$)。与模型组比较,乌头碱组 ROS、MDA 含量升高, SOD、CAT、GSH 活性降低($P<0.01$)。与乌头碱组比较,各浓度联用组 ROS 含量均降低, SOD、CAT 活性提高($P<0.05$ 或 $P<0.01$), $120, 480 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组 MDA 含量显著降低, GSH 活性显著升高($P<0.05$)。详见表 3、图 4。

3.4 乌头碱配伍甘草次酸对衰竭心肌细胞钙超载的影响

与空白组比较,模型组胞内及线粒体钙离子浓度增高, $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}-\text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP}$ 酶活性降低($P<0.01$)；与模型组比较,乌头碱组胞内及线粒体钙离子浓度增高, $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}-\text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP}$ 酶活性降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；各浓度联用组胞内钙离子浓度较乌头碱组显著降低, $\text{Na}^+-\text{K}^+-\text{ATP}$ 酶、 $\text{Ca}^{2+}-\text{Mg}^{2+}-\text{ATP}$ 酶活性升高, $120, 480 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组线粒体内钙离子浓度显著降低, $\text{Ca}^{2+}-\text{ATP}$ 酶活性显著提高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。详见表 4 及图 5—6。

3.5 乌头碱配伍甘草次酸对衰竭心肌细胞钙通道蛋白的影响

与空白组比较,模型组的 SERCA2a 蛋白表达水平降低, CaMK II 磷酸化水平升高, RyR2 蛋白表达水平升高($P<0.01$)；与模型组比较,乌头碱组降低 SERCA2a 蛋白表达水平,提高 RyR2 蛋白表达水平 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与乌头碱组比较,联用组抑制 CaMKII 磷酸化($P<0.05$)。详见图 7。

3.6 乌头碱配伍甘草次酸对衰竭心肌细胞 AMPK 通路蛋白的影响

与空白组比较,模型组的 AMPK 磷酸化水平和 PGC-1 α 蛋白表达水平降低($P<0.05$)；与模型组比

表 3 乌头碱配伍甘草次酸对衰竭心肌细胞氧化应激指标的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

分组	MDA/($\text{nmol}\cdot\text{L}^{-1}$)	SOD/($\text{U}\cdot\text{mgprot}^{-1}$)	CAT/($\text{U}\cdot\text{mgprot}^{-1}$)	GSH/($\text{U}\cdot\text{mgprot}^{-1}$)
空白组	1.53 ± 0.62	30.98 ± 0.40	46.05 ± 2.04	0.62 ± 0.02
模型组	1.94 ± 0.56	$25.47\pm 0.37^{\#\#}$	$41.45\pm 2.34^{\#\#}$	$0.40\pm 0.20^{\#\#}$
甘草次酸组	1.93 ± 0.56	25.27 ± 0.32	40.26 ± 0.64	0.39 ± 0.01
$30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组	4.56 ± 1.16	$17.08\pm 0.33^{**}$	$31.07\pm 0.87^{**}$	$0.33\pm 0.01^{**}$
$30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组	2.73 ± 1.39	$20.11\pm 0.24^{\#\#\#}$	$35.66\pm 0.37^{\#\#\#}$	0.35 ± 0.01
$120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组	$7.70\pm 1.86^{**}$	$14.75\pm 0.33^{**}$	$21.77\pm 0.49^{**}$	$0.23\pm 0.00^{**}$
$120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组	$4.63\pm 1.33^{\#}$	$16.74\pm 0.53^{\#\#\#}$	$24.53\pm 0.66^{\#\#\#}$	$0.25\pm 0.01^{\#}$
$480 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组	$11.46\pm 0.97^{**}$	$6.35\pm 0.88^{**}$	$13.29\pm 0.81^{**}$	$0.17\pm 0.01^{**}$
$480 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组	$8.08\pm 0.52^{\#}$	$10.56\pm 0.13^{\#\#\#}$	$19.75\pm 0.94^{\#\#\#}$	$0.19\pm 0.00^{\#}$

注:与空白组比较, $\#\#P<0.01$;与模型组比较, $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$;与对应浓度乌头碱组比较, $^{\#}P<0.05$, $^{\#\#\#}P<0.01$ 。

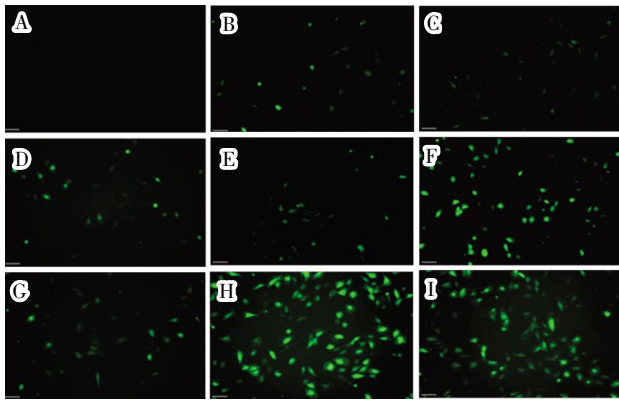


图 4 乌头碱配伍甘草次酸前后对衰竭心肌细胞 ROS 含量的影响($\times 100$)

注: A. 正常组; B. 模型组; C. 甘草次酸组; D. $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组; E. $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组; F. $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组; G. $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组; H. $480 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组; I. $480 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组。

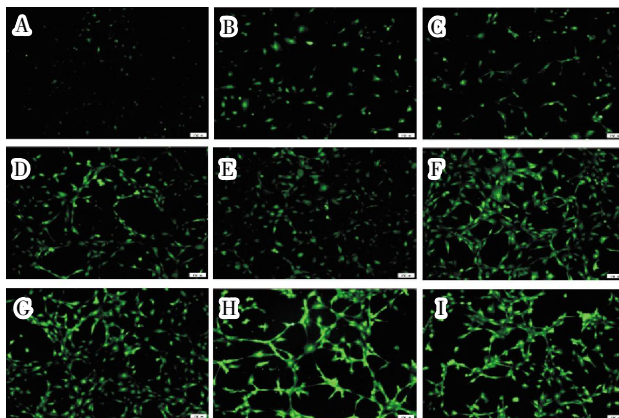


图 5 乌头碱配伍甘草次酸对衰竭心肌细胞胞内钙离子浓度的影响($\times 100$)

注: A. 正常组; B. 模型组; C. 甘草次酸组; D. $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组; E. $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组; F. $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组; G. $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组; H. $480 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组; I. $480 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组。

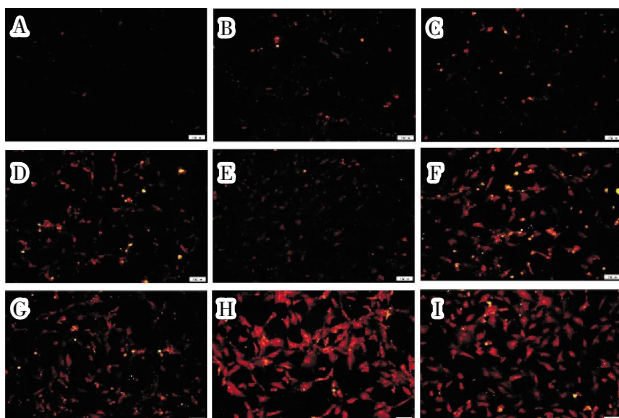


图 6 乌头碱配伍甘草次酸对衰竭心肌细胞线粒体内钙离子浓度的影响($\times 100$)

注: A. 正常组; B. 模型组; C. 甘草次酸组; D. $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组; E. $30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组; F. $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组; G. $120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组; H. $480 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组; I. $480 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组。

表 4 乌头碱配伍甘草次酸对衰竭心肌细胞膜部分离子转运体的影响($\bar{x}\pm s, n=3, U\cdot\text{mg}\cdot\text{prot}^{-1}$)

分组	Na ⁺ -K ⁺ -ATP 酶	Ca ²⁺ -ATP 酶	Ca ²⁺ -Mg ²⁺ -ATP 酶
空白组	4.13±0.12	4.57±0.07	2.40±0.12
模型组	3.36±0.07 ^{##}	2.46±0.09 ^{##}	1.72±0.09 ^{##}
甘草次酸组	3.31±0.11	2.36±0.22	1.68±0.10
$30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组	2.76±0.07 ^{**}	2.05±0.05 ^{**}	1.52±0.10 ^{**}
$30 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组	3.16±0.08 ^{▲▲}	2.17±0.16	1.68±0.07 [▲]
$120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组	2.42±0.09 ^{**}	1.95±0.07 ^{**}	1.30±0.02 ^{**}
$120 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组	2.85±0.13 ^{▲▲}	1.89±0.15 [▲]	1.44±0.08 [▲]
$480 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乌头碱组	0.72±0.07 ^{**}	0.72±0.06 ^{**}	0.56±0.08 ^{**}
$480 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 联用组	1.13±0.18 ^{▲▲}	1.01±0.07 ^{▲▲}	0.88±0.03 ^{▲▲}

注: 与空白组比较, ^{##} $P<0.01$; 与模型组比较, ^{*} $P<0.05$, ^{**} $P<0.01$; 与对应浓度乌头碱组比较, [▲] $P<0.05$, ^{▲▲} $P<0.01$ 。

较, 乌头碱组抑制 AMPK 磷酸化, 降低 PGC-1 α 蛋白表达水平($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与乌头碱组比较, 联用组升高 PGC-1 α 蛋白表达水平($P<0.01$)。详见图 8。

4 讨论

附子是典型毒效并存中药, 其毒性靶器官以心脏为主^[13], 所含毒性成分乌头碱可导致心肌细胞出现氧化损伤, 破坏线粒体结构, 并降低线粒体的 ATP 产量, 诱发钙超载, 进而影响心肌细胞兴奋-收缩耦联过程^[14-15]; 同时, 也有研究发现, 附子可保护线粒体结构、增加线粒体产能^[16-17], 对线粒体的上述作用提示附子对心肌细胞线粒体结构与功能具有双向调节作用, 但其“毒-量-效”关系尚未明确。另一方面, 现有研究主要聚焦甘草可减轻附子对正常心脏的毒性作用^[18], 但其对衰竭心脏是否具有类似的减毒作用、减毒作用环节、机制等则鲜有报道。

氧化应激是乌头碱诱导心肌毒性的重要环节之一。研究发现, 乌头碱可升高大鼠心肌组织 ROS 含量以及血清中 MDA 含量, 降低 SOD 活性^[19]。ROS 的蓄积可导致线粒体膨大、肿胀、破裂等造成线粒体结构损伤, 还可诱导线粒体内膜脂质过氧化, 促进线粒体通透性转换孔的开放, 降低线粒体膜电位降低, 最终导致 ATP 产量减少^[20]。本实验证实, 乌头碱配伍甘草次酸后, 细胞 GSH、CAT、SOD 酶活性升高, MDA、ROS 含量下降, 细胞线粒体膜相对完整、边界较清晰, 嵴结构完整, 空泡化情况较少, 线粒体膜电位升高, 且 ATP 含量上升。提示甘草次酸通过调节胞内氧化/抗氧化系统平衡, 清除多余 ROS, 缓解氧化应激, 改善线粒体能量代谢功能, 拮抗乌头碱毒性。

钙超载是乌头碱引起心肌毒性的另一诱因。钙超载是指各种原因所致的 Ca²⁺浓度异常升高现象,

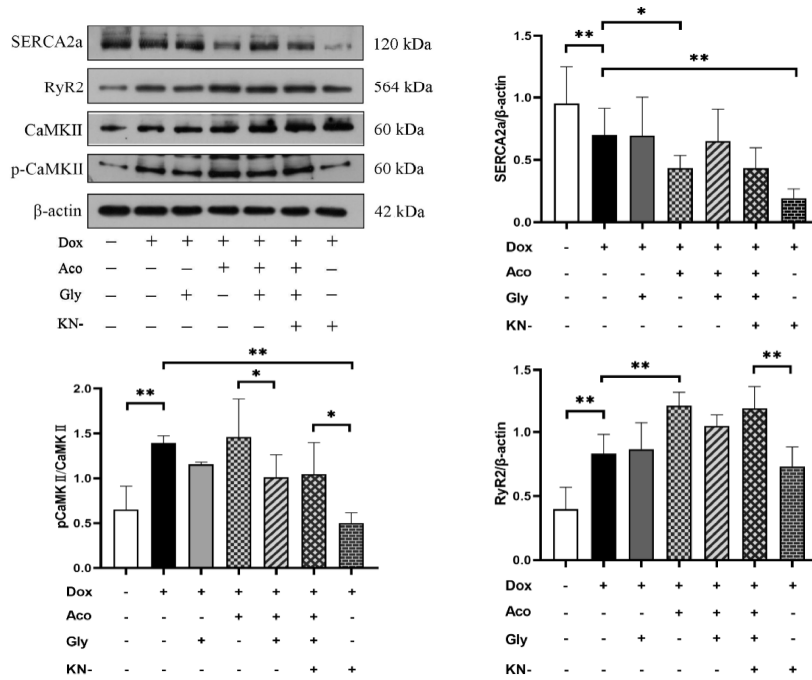


图 7 乌头碱配伍甘草次酸前后对衰竭心肌细胞钙通道蛋白的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

注:Dox 为阿霉素;Aco 为乌头碱;Gly 为甘草次酸;KN-为 CaMK II 抑制剂;从左至右分别为空白组、模型组、甘草次酸组、乌头碱组、联用组、CaMK II 抑制剂组;与对应组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

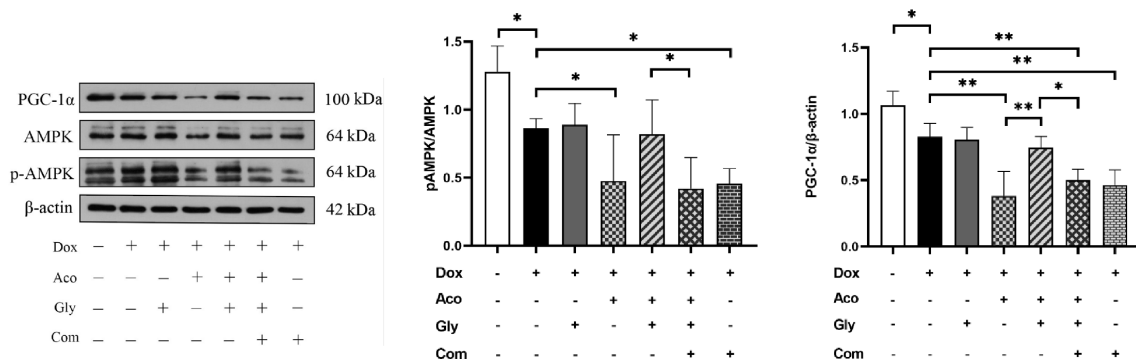


图 8 乌头碱配伍甘草次酸前后对衰竭心肌细胞 AMPK 通路蛋白的影响($\bar{x}\pm s, n=3$)

注:Dox 为阿霉素;Aco 为乌头碱;Gly 为甘草次酸;Com 为 AMPK 抑制剂;从左至右分别为空白组、模型组、甘草次酸组、乌头碱组、联用组、AMPK 抑制剂组;与对应组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

钙超载与细胞膜 Ca^{2+} 等 ATP 依赖性转运酶活性降低、线粒体钙离子转运通道变化等有关^[21-22]。 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶位于肌浆网,使肌浆网释放 Ca^{2+} ,泵出细胞外; Ca^{2+} -ATP 酶位于细胞膜和线粒体膜上,负责将细胞内游离的 Ca^{2+} 转运至胞外或者摄入肌浆网内,二者均可维持细胞内低钙环境。CaMK II 是心肌细胞 Ca^{2+} 信号通路及下游各种离子通道的核心调控蛋白,其磷酸化影响 Ca^{2+} 转运蛋白,可引起胞内钙超载^[23-24]。RyR2 是心肌细胞肌浆网主要的 Ca^{2+} 释放通道, SERCA2a 则主要负责肌浆网 Ca^{2+} 摄入,两者表达受到 CaMK II 的调控,前者过度表达,后者抑制表达均会诱导胞内钙超载。实验结果显示,乌头碱配伍甘草次酸后胞内及线粒体钙离子浓度降低, Ca^{2+} -ATP 酶、 Ca^{2+} - Mg^{2+} -ATP 酶活性均显著升高,

CaMK II 磷酸化降低和 RyR2 表达降低, SERCA2a 表达升高,本研究提示,影响 Ca^{2+} 转运蛋白可能是甘草次酸缓解乌头碱所致模型细胞钙超载的主要途径。

AMPK 是广泛存在于真核细胞生物的一种能量传感器,参与能量代谢的调节^[25]。一方面,AMPK 通过调节物质代谢促进线粒体产能^[26-27];另一方面,AMPK 激活或抑制多种下游因子参与能量代谢的调节。AMPK 通路下游蛋白 PGC-1 α 为线粒体生物合成的关键因子,PGC-1 α 被 AMPK 激活后直接或间接激活核呼吸转录因子,促进线粒体 DNA 转录和复制,增加线粒体生物合成,进而改善线粒体能量代谢^[28]。本实验结果发现乌头碱可抑制 AMPK 及 PGC-1 α 表达,配伍甘草次酸后 AMPK 及 PGC-1 α 表达升高;而预先经 AMPK 抑制剂干预后,乌头碱配伍甘

草次酸后 AMPK 及 PGC-1 α 表达均未升高。提示甘草次酸可能通过拮抗乌头碱对衰竭心肌细胞 AMPK 的磷酸化的抑制, 激活 PGC-1 α , 进而促进线粒体生物合成, 提高线粒体产能效率。

本实验在衰竭心肌细胞水平进行乌头碱配伍甘草次酸减毒研究。研究结果发现, 甘草次酸可拮抗乌头碱诱导衰竭心肌细胞毒性作用, 作用环节可能与激活 AMPK 信号通路, 改善线粒体产能, 缓解氧化应激和钙超载相关, 其具体作用机制仍需进一步证实。

参考文献

- [1] 董思含, 孟江, 吴孟华, 等. 附子历史沿革考辨[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(22): 5567-5575.
- [2] LIU Y, WEI M, YUE K, et al. Non-target metabolomic method provided new insights on the therapeutical mechanism of Gancao Fuzi decoction on rheumatoid arthritis rats[J]. Journal of Chromatography B, Analytical Technologies in the Biomedical and Life Sciences, 2019, 1105: 93-103.
- [3] 刘曾晶, 张梦林, 康前前, 等. 基于数据挖掘的抗肿瘤中药方剂用药规律分析[J]. 亚太传统医药, 2020, 16(8): 143-146.
- [4] HE G, WANG X, LIU W, et al. Chemical constituents, pharmacological effects, toxicology, processing and compatibility of Fuzi (lateral root of *Aconitum carmichaelii* Debx): A review[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 307: 116160.
- [5] CHAN Y T, WANG N, FENG Y B. The toxicology and detoxification of Aconitum: traditional and modern views[J]. Chinese Medicine, 2021, 16(1): 61-75.
- [6] 姜波, 常晶晶, 张春蕾, 等. 附子心脏毒性及配伍减毒增效机制研究进展[J]. 药物评价研究, 2021, 44(6): 1346-1353.
- [7] HAN J, SU GH, WANG YH, et al. 18beta-Glycyrrhetic Acid Improves Cardiac Diastolic Function by Attenuating Intracellular Calcium Overload[J]. Current Medical Science, 2020, 40(4): 654-661.
- [8] CIGANOVIC P, JAKIMIUK K, TOMCZYK M, et al. Glycerolic licorice extracts as active cosmeceutical ingredients: extraction optimization, chemical characterization, and biological activity[J]. Antioxidants, 2019, 8(10): 445-459.
- [9] 张序晴, 彭兰, 李赛, 等. 附子-甘草对离体蛙心的影响及其指纹图谱研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2019, 39(2): 184-189.
- [10] 彭兰, 张序晴, 王志琪, 等. 附子-甘草对离体大鼠衰竭心脏的影响及其指纹图谱研究[J]. 中南药学, 2019, 17(3): 379-383.
- [11] 何苗, 李耀伟, 王志琪, 等. 基于细胞线粒体能量代谢研究甘草次酸拮抗乌头碱的心肌毒性作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2021, 41(11): 1650-1656.
- [12] 金娟, 岑璐, 李洋, 等. 参芪益心方干预阿霉素诱导的心肌细胞凋亡机制研究[J]. 时珍国医国药, 2021, 32(5): 1083-1085.
- [13] 潘美辰, 周小伟, 刘艳, 等. 乙醇-乌头碱致心律失常的毒理分子机制研究进展[J]. 法医学杂志, 2020, 36(1): 115-119.
- [14] ZHAO Y, WANG H H, HE C Y, et al. Protopanaxadiol and protopanaxatriol ginsenosides can protect against aconitine-induced injury in h9c2 cells by maintaining calcium homeostasis and activating the akt pathway[J]. Journal of Cardiovascular Pharmacology, 2021, 78(5): 690-702.
- [15] GAO Y, FAN H, NIE A, et al. Aconitine: A review of its pharmacokinetics, pharmacology, toxicology and detoxification[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2022, 293: 115270.
- [16] WEN J, ZHANG L, WANG J, et al. Therapeutic effects of higenamine combined with [6]-gingerol on chronic heart failure induced by doxorubicin via ameliorating mitochondrial function[J]. Journal of Cellular and Molecular Medicine, 2020, 24(7): 4036-4050.
- [17] WEN J, ZHANG L, LIU H, et al. Salsolinol attenuates doxorubicin-induced chronic heart failure in rats and improves mitochondrial function in h9c2 cardiomyocytes[J]. Frontiers in Pharmacology, 2019, 10(11): 1135-1152.
- [18] SUN B, WANG X, CAO R, et al. NMR-based metabolomics study on the effect of Gancao in the attenuation of toxicity in rats induced by Fuzi[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2016, 193: 617-626.
- [19] 司徒莹, 程婉秋, 沈志滨, 等. 滇乌碱通过线粒体凋亡途径致大鼠心肌损伤的研究[J]. 中国药房, 2022, 33(23): 2864-2868.
- [20] ZHOU B, TIAN R. Mitochondrial dysfunction in pathophysiology of heart failure[J]. The Journal of Clinical Investigation, 2018, 128(9): 3716-3726.
- [21] KANNURPATTI S S. Mitochondrial calcium homeostasis: Implications for neurovascular and neurometabolic coupling[J]. Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism, 2017, 37(2): 381-395.
- [22] GARBINCUS J F, ELROD J W. Mitochondrial calcium exchange in physiology and disease[J]. Physiological Reviews, 2022, 102(2): 893-992.
- [23] FISCHER T H, HERTING J, TIRILOMIS T, et al. Ca²⁺/calmodulin-dependent protein kinase II and protein kinase A differentially regulate sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ leak in human cardiac pathology[J]. Circulation, 2013, 128(9): 970-981.
- [24] LU X, ZHANG L, LI P, et al. The protective effects of compatibility of Aconiti Lateralis Radix Praeparata and Zingiberis Rhizoma on rats with heart failure by enhancing mitochondrial biogenesis via Sirt1/PGC-1 α pathway[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2017, 92: 651-660.
- [25] STEINBERG G R, HARDIE D G. New insights into activation and function of the AMPK[J]. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2023, 24(4): 255-272.
- [26] HERMAN R, KRAVOS N A, JENSTERLE M, et al. Metformin and insulin resistance: A review of the underlying mechanisms behind changes in glut4-mediated glucose transport[J]. International Journal of Molecular Sciences, 2022, 23(3): 1264.
- [27] WU W, WANG S, LIU Q, et al. AMPK facilitates intestinal long-chain fatty acid uptake by manipulating CD36 expression and translocation[J]. FASEB Journal, 2020, 34(4): 4852-4869.
- [28] KONG S, CAI B, NIE Q. PGC-1 α affects skeletal muscle and adipose tissue development by regulating mitochondrial biogenesis[J]. Molecular Genetics and Genomics, 2022, 297(3): 621-633.