

基于线粒体自噬-凋亡途径探讨人参皂苷 Rh₄ 拮抗顺铂致肠黏膜屏障功能损伤的作用机制

孙 盟¹, 查鑫宇¹, 牟能燕¹, 张 昊², 秦红梅¹, 王梦阳¹, 王春梅¹, 刘 伟^{1,2*}

1. 北华大学药学院, 吉林 吉林 132013

2. 吉林农业大学中药材学院, 吉林 长春 130118

摘要: 目的 探讨人参皂苷 Rh₄ 对顺铂致肠黏膜屏障功能损伤的作用机制。方法 ICR 小鼠 ig 给予人参皂苷 Rh₄ (10、20 mg/kg) 10 d, 给药第 7 天单次 ip 顺铂 (20 mg/kg) 诱导肠损伤, 对小鼠生化指标、肠组织病理变化进行观察, 利用 ELISA、免疫荧光染色和 Western blotting 探究血清中二胺氧化酶 (diamine oxidase, DAO) 活性、肠黏膜炎症反应、肠屏障功能和线粒体自噬相关蛋白的表达。利用顺铂致 IEC-6 细胞损伤筛选出最佳造模剂量, 并采用不同浓度的人参皂苷 Rh₄ 处理细胞, 采用线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 试剂盒、流式细胞术和 Western blotting 探究人参皂苷 Rh₄ 对顺铂致肠黏膜细胞凋亡、线粒体自噬相关蛋白表达的影响。结果 与对照组比较, 顺铂组小鼠血清中 DAO 活性、炎症因子水平和肠组织丙二醛水平显著升高 ($P < 0.01$ 、 0.001), 肠黏膜上皮紧密连接蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 肠组织谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px) 和过氧化氢酶 (catalase, CAT) 活性显著降低 ($P < 0.01$); 给予人参皂苷 Rh₄ 干预后能显著逆转上述指标的变化 ($P < 0.05$ 、 0.01), 并改善肠黏膜组织的病理学变化以及肠黏膜的通透性。与顺铂组比较, 人参皂苷 Rh₄ 能显著调控小鼠肠组织和 IEC-6 细胞中 p21/p53/过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α) 通路、线粒体自噬和凋亡相关蛋白表达 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著升高顺铂致 IEC-6 细胞中 MMP 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。结论 人参皂苷 Rh₄ 通过调控线粒体自噬和凋亡途径改善顺铂致肠黏膜屏障功能损伤。

关键词: 人参皂苷 Rh₄; 顺铂; 肠黏膜屏障; IEC-6 细胞; 线粒体自噬; 凋亡

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)10-3535-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.10.012

Mechanism of ginsenoside Rh₄ in antagonizing cisplatin-induced intestinal mucosal barrier damage based on mitochondrial autophagy and apoptosis pathway

SUN Meng¹, CHA Xinyu¹, MOU Nengyan¹, ZHANG Hao², QIN Hongmei¹, WANG Mengyang¹, WANG Chunmei¹, LIU Wei^{1,2}

1. College of Pharmacy, Beihua University, Jilin 132013, China

2. College of Chinese Medicinal Materials, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of ginsenoside Rh₄ on intestinal mucosal barrier damage induced by cisplatin. **Methods** ICR mice were orally administered with ginsenoside Rh₄ (10, 20 mg/kg) for 10 d. On the 7th day of administration, single ip cisplatin (20 mg/kg) was used to induce intestinal injury. Biochemical indicators and pathological changes in intestinal tissue were observed in mice. ELISA, immunofluorescence staining and Western blotting were used to explore the activity of diamine oxidase (DAO) in serum, intestinal mucosal inflammatory response, intestinal barrier function and expressions of mitochondrial autophagy related proteins. The optimal modeling dose was screened for cisplatin-induced IEC-6 cell damage, and cells were treated with different concentrations of ginsenoside Rh₄. The effects of ginsenoside Rh₄ on cisplatin-induced intestinal mucosal cell apoptosis and

收稿日期: 2024-10-19

基金项目: 吉林省科技发展规划项目 (YDZJ202401674ZYTS); 吉林省卫生健康委员会青年扶持项目 (2023JC031); 北华大学博士科研启动支持项目 (20220027); 吉林省大学生创新创业训练计划项目 (202310201257)

作者简介: 孙 盟 (2001—), 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础与作用机制。Tel: (0432)64608072 E-mail: 13624758081@163.com

*通信作者: 刘 伟 (1992—), 男, 博士, 硕士生导师, 从事中药药效物质基础研究。Tel: (0432)64608281 E-mail: liuweibh@beihua.edu.cn

mitochondrial autophagy related protein expressions were investigated using mitochondrial membrane potential (MMP) assay kit, flow cytometry and Western blotting. **Results** Compared with control group, DAO activity in serum, levels of inflammatory cytokines in serum and malondialdehyde level in intestinal tissue of mice in cisplatin group were significantly increased ($P < 0.01, 0.001$), while the expression levels of tight junction protein in intestinal mucosal epithelium were significantly decreased ($P < 0.01$), activities of glutathione peroxidase (GSH-Px) and catalase (CAT) in intestinal tissue were significantly decreased ($P < 0.01$); After intervention with ginsenoside Rh₄, the changes in the above indicators were significantly reversed ($P < 0.05, 0.01$), and the pathological changes of intestinal mucosal tissue and intestinal mucosal permeability were improved. Compared with cisplatin group, ginsenoside Rh₄ significantly regulated the p21/p53/peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α) pathway, mitochondrial autophagy, and apoptosis related protein expressions in intestinal tissue of mice and IEC-6 cells ($P < 0.05, 0.01$), and significantly increased MMP levels in cisplatin induced IEC-6 cells ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** Ginsenoside Rh₄ improves cisplatin-induced intestinal mucosal barrier dysfunction by regulating mitochondrial autophagy and apoptosis pathways.

Key words: ginsenoside Rh₄; cisplatin; intestinal mucosal barrier; IEC-6 cells; mitochondrial autophagy; apoptosis

顺铂是当前临床上用于治疗多种恶性肿瘤最有效的铂类药物之一^[1-3],但长期应用会产生较为严重的肝肾毒性、胃肠功能障碍以及听觉毒性等^[4]。由于小肠的解剖位置和生理特性具有宽表面积、高细胞周转率等特征,小肠对顺铂等化疗药物的不良反应高度敏感^[5],其中以十二指肠不良反应尤为明显,临床上以胃肠道黏膜损伤、胃肠动力延迟、恶心、呕吐和腹泻为主要症状^[6-7]。研究表明,顺铂诱发的胃肠毒性主要与肠机械屏障,氧化应激、炎症反应、细胞凋亡以及线粒体功能等机制有关^[8-9]。过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α)和腺苷酸活化蛋白激酶 (adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase, AMPK)是评价线粒体功能的主要调控因子,AMPK能促进PGC-1 α 的激活,进而调控线粒体自噬、凋亡及炎症反应的发生^[10],对维持细胞稳态和肠黏膜屏障功能有关键作用^[11]。PGC-1 α 能通过调节线粒体自噬,清除受损线粒体,从而维持线粒体的结构与功能完整性。当PGC-1 α 表达降低时,线粒体自噬作用减弱,线粒体功能受损,进而引起细胞凋亡和炎症反应的发生^[12]。

人参皂苷 Rh₄是三醇型人参皂苷 Rg₁经糖苷键断裂、异构化所产生的稀有皂苷,具有抗肿瘤、抗炎、调节免疫等作用^[13]。现代药理学研究表明,人参皂苷 Rh₄在清除炎症反应、抑制细胞凋亡、恢复线粒体功能等方面发挥独特功效^[14-15]。研究发现,人参活性成分人参皂苷和酚酸能显著抑制由 X 射线 (10 Gy)引起的肠隐窝细胞凋亡,促进肠隐窝细胞增殖,并激活 Wnt/ β -catenin 信号通路,从而改善肠道损伤^[16-17],初步揭示了人参皂苷的肠道保护活

性。本研究通过构建顺铂致肠道损伤模型,以小鼠十二指肠为研究对象,肠黏膜屏障损伤为切入点,深入探究人参皂苷 Rh₄改善顺铂致肠道损伤的药效作用以及修复肠黏膜屏障功能的作用机制。

1 材料

1.1 动物与细胞

SPF级雄性 ICR 小鼠 40 只,体质量 22~25 g,由长春亿斯实验动物有限公司提供,合格证号 SCXK(吉)2021-0012。动物饲养于恒温(22±2)°C、12 h 明暗循环的环境中,自由进食饮水。动物实验经北华大学实验动物伦理委员会批准(伦理批准号 BH-2023-009)。

肠隐窝上皮细胞(IEC-6)购自中国科学院上海细胞库。

1.2 药品与试剂

人参皂苷 Rh₄从红参中分离纯化得到,为实验室自制,质量分数为 96.5%;顺铂(批号 B24464,质量分数≥98%)购自上海源叶生物科技有限公司;二胺氧化酶(diamine oxidase, DAO)ELISA 试剂盒(批号 TW9514)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)ELISA 试剂盒(批号 TW56961)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)ELISA 试剂盒(批号 TW47851)购自上海通蔚实业有限公司;丙二醛(malondialdehyde, MDA)试剂盒(批号 A003-1-2)、谷胱甘肽过氧化物酶(glutathione peroxidase, GSH-Px)试剂盒(批号 A005-1-2)、过氧化氢酶(catalase, CAT)试剂盒(批号 A007-2-1)、苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色试剂盒购自南京建成生物研究所;AnnexinV-FITC 细胞凋亡检测试剂盒(批号 C1062M)、JC-1 线粒体膜电位测定试剂盒(批号

C2005)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号 P0010)、Hoechst 33258 染色试剂盒(批号 C1011)购自上海碧云天生物技术有限公司;免疫荧光染色 SABC-DyLight44 染液试剂盒购自武汉博士德生物工程技术有限公司;胎牛血清(批号 PWL217-4)、DMEM 高糖培养基(批号 MA0212-2)、胰酶(批号 MA0232)、青霉素-链霉素溶液(批号 PWL062)购自大连美仑生物技术有限公司;闭锁小带蛋白 1(zonula occludens-1, ZO-1)抗体(批号 HL1185)、Occludin 抗体(批号 EPR20992)、PGC-1 α 抗体(批号 EPR25162-281)、p21 抗体(批号 EPR3993)、p53 抗体(批号 PAb240)、p-AMPK 抗体(批号 EPR3051)、微管相关蛋白 1 轻链 3-I/II(microtubule-associated protein light chain 3-I/II, LC3-I/II)抗体(批号 EPR18709)、 β -actin 抗体(批号 1A4)购自英国 Abcam 公司;自噬蛋白 3 (autophagy-related protein 3, Atg3)抗体(批号 3415)、Atg5 抗体(批号 12994)、Atg7 抗体(批号 2631)、Atg14 抗体(批号 5504)、Beclin-1 抗体(批号 3495)、p-Beclin-1 抗体(批号 8496)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)抗体(批号 2983)、Unc-51 样激酶 1(Unc-51-like autophagy activating kinase 1, ULK1)抗体(批号 8654)、p-mTOR 抗体(批号 5536)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-3(cystein-aspartate protease-3, Caspase-3)抗体(批号 9662)、Caspase-9 抗体(批号 9508)、cleaved Caspase-3 抗体(批号 9664)、cleaved Caspase-9 抗体(批号 9509)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bcl-2 associated X protein, Bax)抗体(批号 2772)、B 细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma-2, Bcl-2)抗体(批号 15071)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)抗体(批号 2118)、p-ULK1 抗体(批号 14202)、Parkin 抗体(批号 2135)、AMPK 抗体(批号 2532)、细胞色素 C(cytochrome C, Cyt-C)抗体(批号 4280)购自美国 CST 公司。

1.3 仪器

BP211D 型分析天平(德国 Sartorius 公司); Heraeus Multifuge X3R 型高速冷冻离心机、VLBLATGD2 型 Varioskan™ LUX 多功能酶标仪(美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DL-820E 型智能超声波提取器(上海之信仪器有限公司); IKAT10 型手持匀浆机(德国 IKA 公司); TB-718E 型生物组织自动包埋机(湖北泰维科技实业有限公司);

RM2235 型石蜡切片机、DM750 型光学显微镜、TCSSP8 型荧光显微镜(德国 Leica 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模、给药与取材

小鼠适应性喂养 1 周后,随机分为对照组、顺铂组和顺铂+人参皂苷 Rh₄ 低、高剂量(10、20 mg/kg)组,每组 10 只。由于目前临床上尚无针对顺铂致肠道损伤的特效药物,故本研究未设置阳性对照药物。各给药组 ig 相应药物,对照组和顺铂组 ig 等体积的生理盐水,1 次/d,连续给药 9 d。第 7 天给药 1 h 后,除对照组外,其余小鼠单次 ip 顺铂(20 mg/kg)诱发肠损伤模型。于第 10 天取材,造模及取材前禁食不禁水,每天记录小鼠体质量。小鼠 ip 3%戊巴比妥钠(1 mL/kg)麻醉,腹主动脉采血,4 °C、3 500 r/min 离心 10 min,分离血清,用于 DAO 活性及 TNF- α 、IL-1 β 水平的测定。分离出与胃相连的十二指肠,观察其病理形态;切断与胃相连约 2 cm 处的十二指肠,取一小段于 4%多聚甲醛溶液中固定,用于后续组织病理学染色,其余部分用生理盐水洗净后迅速冷冻于-80 °C,用于后续组织匀浆以及 Western blotting 实验。

2.2 细胞培养

IEC-6 细胞用含 10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素的 DMEM 培养基,于 37 °C、5% CO₂ 的培养箱中培养。每隔 48 h 更换 1 次培养液,细胞融合度达到 80%~90%时用于后续实验。

2.3 细胞活力测定

IEC-6 细胞以 5×10^4 个/孔接种于 96 孔板中,培养过夜,待其生长形态饱满、密度约 80%开始实验,加入不同浓度(0.25、0.50、1.00、2.00、4.00、8.00、16.00、32.00 $\mu\text{mol/L}$)的顺铂或不同浓度(0.625、1.250、2.500、5.000、10.000、20.000 $\mu\text{mol/L}$)的人参皂苷 Rh₄ 处理 24 h,另设置不含药物的对照组。PBS 洗涤 2 次,加入 MTT 溶液(5 mg/mL),采用酶标仪测定 490 nm 处的吸光度(A)值,计算细胞活力。

$$\text{细胞活力} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

为考察人参皂苷 Rh₄ 对顺铂诱导 IEC-6 细胞活力的影响,设置对照组、顺铂组和顺铂+人参皂苷 Rh₄ (0.625、1.250、2.500、5.000、10.000、20.000 $\mu\text{mol/L}$)组。各给药组加入不同浓度的人参皂苷 Rh₄ 处理 24 h,弃去上清液,再加入顺铂(1 $\mu\text{mol/L}$)处理 24 h,对照组加入不含药物的培养基,测定细

胞活力。在确定最佳给药剂量后,再探究人参皂苷 Rh₄ (10 μmol/L) 在不同处理时间 (1、3、6、12、24 h) 下对顺铂诱导 IEC-6 细胞活力的影响。

2.4 细胞分组和处理

设置对照组、人参皂苷 Rh₄ (10 μmol/L)、顺铂组和顺铂+人参皂苷 Rh₄ (2.5、5.0、10.0 μmol/L) 组。各给药组加入不同浓度的人参皂苷 Rh₄ 处理 24 h, 弃去上清液, 再加入顺铂 (1 μmol/L) 处理 24 h, 对照组加入不含药物的培养基。

2.5 生化指标测定

取“2.1”项下小鼠十二指肠组织, 制备组织匀浆液, 按照试剂盒说明书测定氧化应激指标 MDA 水平和 CAT、GSH-Px 活性。取“2.1”项下小鼠血清, 按照 ELISA 试剂盒说明书测定血清中 DAO 活性和 TNF-α、IL-1β 水平。

2.6 HE 染色观察十二指肠病理变化

取“2.1”项下小鼠十二指肠组织, 于 4% 多聚甲醛溶液中固定, 每组随机取出 3 个十二指肠组织进行石蜡包埋, 切成 5 μm 厚的组织切片, 置于载玻片上, 经二甲苯、梯度乙醇脱蜡和水化处理, 进行 HE 染色, 于光学显微镜下观察十二指肠的绒毛断裂以及隐窝深度改变等病理学情况, 并对十二指肠病理学变化进行评分^[18]。

2.7 Hoechst 33258 染色检测十二指肠组织细胞凋亡情况

取“2.1”项下小鼠十二指肠组织切片, 经二甲苯、梯度乙醇脱蜡和水化处理, 加入 Hoechst 33258 染液 (10 μg/mL) 避光染色 5 min, PBS 洗涤 3 次, 利用抗荧光猝灭封片剂封片, 于荧光显微镜下检测十二指肠细胞凋亡情况^[19]。

2.8 免疫荧光染色检测十二指肠 NF-κB 表达

取“2.1”项下小鼠十二指肠组织切片, 经脱蜡和脱水处理后, 滴加 NF-κB 抗体 (1:400), 4 °C 孵育过夜; PBS 洗涤, 滴加荧光标记的二抗, 37 °C 孵育 30 min 后, 用 SABC-CY3 (1:100) 再次标记。采用 DAPI 染色细胞核, 于荧光显微镜下观察 NF-κB 蛋白表达情况, 采用 Image-Pro Plus 6.0 软件分析荧光强度^[20]。

2.9 线粒体膜电位的测定

按“2.4”项下方法进行分组和处理, 每孔加入 500 μL JC-1 工作液, 37 °C 孵育 20 min; 弃去上清液, 用预冷的 JC-1 染色缓冲液洗涤细胞 2 次, 于荧光显微镜下观察并拍照^[21]。

2.10 流式细胞术测定细胞凋亡情况

按“2.4”项下方法进行分组和处理, 收集对照组、顺铂组、顺铂+人参皂苷 Rh₄ 组 IEC-6 细胞, 采用磷酸盐缓冲液洗 4 次, 每组加入 450 μL 结合缓冲液混悬; 加入 9.0 μL AnnexinV-FITC 试剂, 混匀, 26 °C 避光孵育 30 min; 加入 9 μL PI 试剂, 26 °C 避光孵育 30 min。采用流式细胞仪上机检测各组 IEC-6 细胞的凋亡情况^[22]。

2.11 Western blotting 检测紧密连接蛋白、线粒体自噬及凋亡相关蛋白表达

取“2.1”项下小鼠十二指肠组织和“2.4”项下处理的 IEC-6 细胞, 加入 RIPA 裂解液, 于冰上提取总蛋白, 4 °C、3 500 r/min 离心后, 采用 BCA 试剂盒测定蛋白浓度, 加入上样缓冲液, 沸水浴加热使蛋白变性。蛋白样品经 12% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 加入 5% 脱脂牛奶封闭 2 h, 分别加入 ZO-1、Occludin、PGC-1α、p21、p53、p-AMPK、LC3-I/II、Atg3、Atg5、Atg7、Atg14、Beclin-1、p-Beclin-1、mTOR、ULK1、p-mTOR、Caspase-3、Caspase-9、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9、Bax、Bcl-2、β-actin 和 GADPH 抗体 (一抗稀释比例 1:1 000, 内参稀释比例 1:5 000), 4 °C 孵育过夜; TBST 洗涤 3 次后, 加入二抗, 室温孵育 2 h; 加入 ECL 发光液显影, 用凝胶成像仪曝光, 并使用 Quantity One 软件分析条带灰度值。

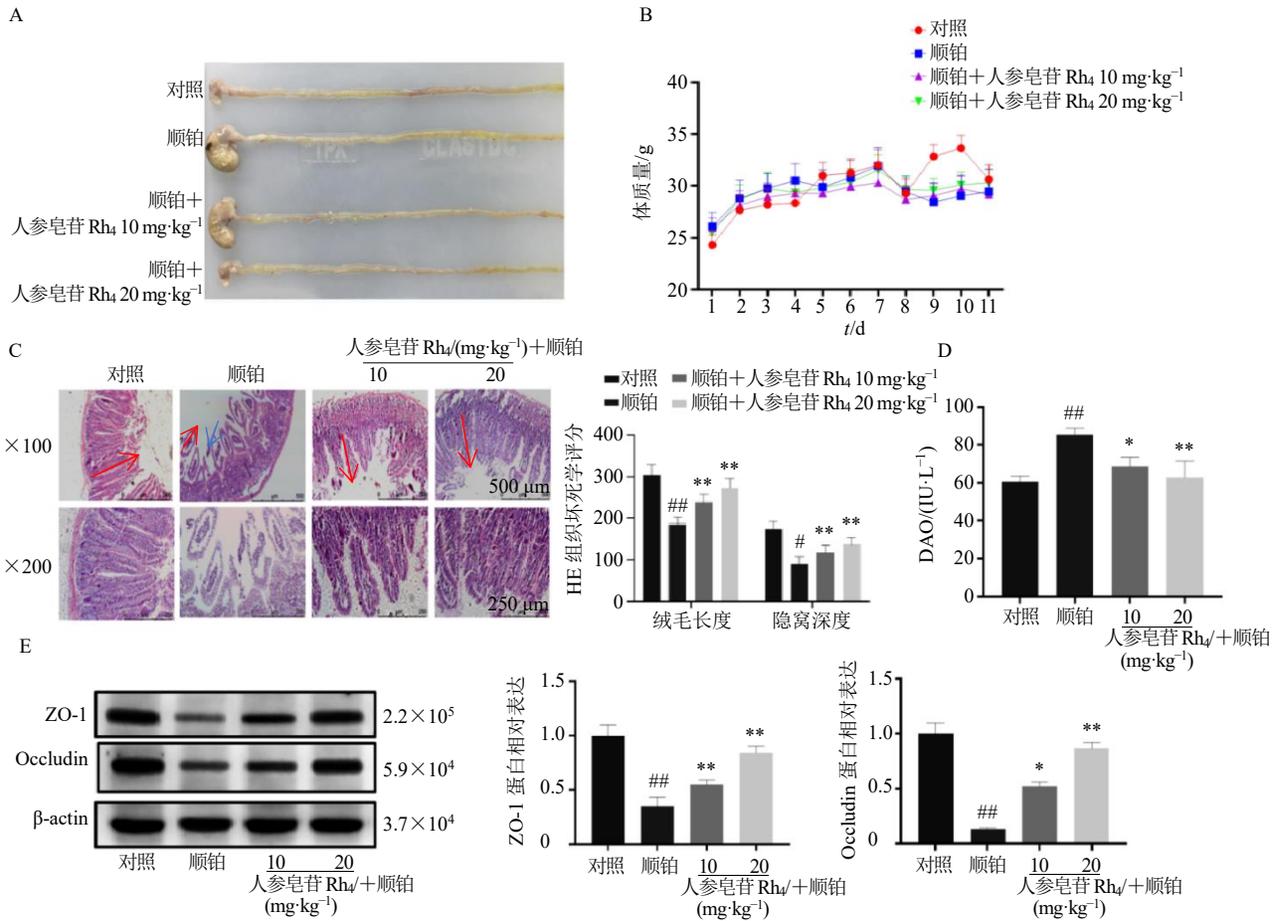
2.12 统计学分析

所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素方差分析 (One-way ANOVA) 进行统计学分析, 使用 GraphPad Prism 8.0 软件绘图。

3 结果

3.1 人参皂苷 Rh₄ 对顺铂致小鼠肠损伤模型体重、肠组织形态变化以及肠黏膜屏障功能的影响

如图 1-A 所示, 小鼠 ip 顺铂后, 胃内食物残留量明显增多, 十二指肠部位的肠壁明显变白、变薄, 同时伴有较为明显的充血症状, 表明顺铂对小肠的损伤部位主要体现在十二指肠。如图 1-B 所示, 与对照组比较, 小鼠于第 7 天 ip 顺铂后, 体质量明显下降, 而人参皂苷 Rh₄ (10、20 mg/kg) 能不同程度地缓解顺铂致小鼠体质量的下降。十二指肠组织 HE 染色 (图 1-C) 结果显示, 对照组小鼠肠绒毛结构清晰, 隐窝排列整齐且深度较高; 顺铂组十二指肠组织显现出明显的病理性损伤, 如隐窝损伤严重



A-各组肠组织形态; B-各组小鼠体重变化; C-各组肠组织病理变化及病理量化评分, 红色箭头表示肠绒毛长度, 蓝色箭头表示炎性细胞浸润; D-各组血清中 DAO 活性; E-各组肠组织 ZO-1、Occludin 蛋白表达; 与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$; 与顺铂组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 下图同。

A-morphology of intestinal tissue in each group; B-changes in body weight of mice in each group; C-pathological changes and quantitative scoring of intestinal tissues in each group, red arrow represents length of intestinal villi, and blue arrow represents inflammatory cell infiltration; D-DAO activity in serum of each group; E-expressions of ZO-1 and Occludin proteins in intestinal tissues of each group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs cisplatin group, same as below figures.

图 1 人参皂苷 Rh₄ 对顺铂致小鼠肠损伤模型体重、肠组织形态变化以及肠黏膜屏障功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

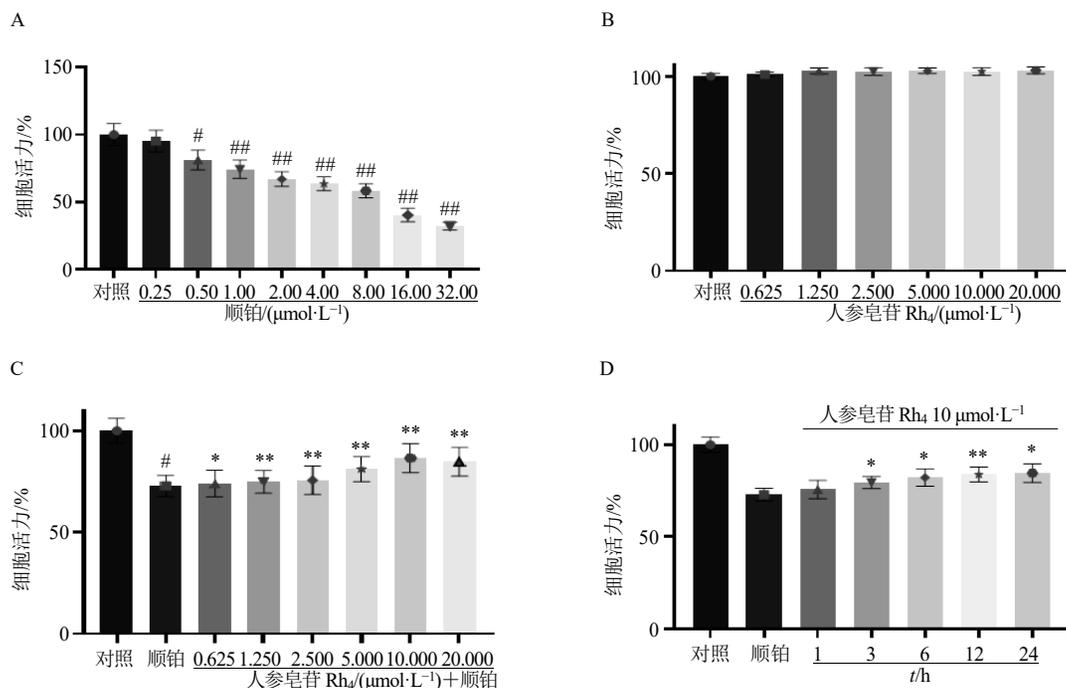
Fig. 1 Effect of ginsenoside Rh₄ on body weight, intestinal tissue morphology and intestinal mucosal barrier function in cisplatin-induced intestinal injury model in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

及炎症反应导致绒毛长度减少 ($P < 0.05, 0.01$); 人参皂苷 Rh₄ 预处理能明显减轻隐窝损伤数目, 且绒毛长度较顺铂组保留较好 ($P < 0.01$)。肠黏膜屏障功能是顺铂诱导肠损伤的主要特征, DAO 以及肠黏膜机械屏障相关蛋白 (ZO-1 和 Occludin) 是评价其功能的主要指标, 是体现肠黏膜损伤重要依据。如图 1-D、E 所示, 与对照组比较, 顺铂组小鼠血清中 DAO 活性显著升高 ($P < 0.01$), 紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 表明顺铂能诱发肠黏膜损伤, 破坏肠黏膜屏障功能; 与顺铂组比较, 人参皂苷 Rh₄ 预处理后小鼠血清中 DAO 活性显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), ZO-1 和

Occludin 表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 表明人参皂苷 Rh₄ 能改善顺铂诱导的肠黏膜损伤。

3.2 人参皂苷 Rh₄ 对顺铂诱导的 IEC-6 细胞活力的影响

通过构建顺铂致 IEC-6 细胞损伤模型, 从体外角度进一步探究人参皂苷 Rh₄ 对 IEC-6 细胞的保护作用, 根据文献报道, 顺铂在造模时间为 24 h 时对细胞损伤程度最佳^[23]。利用 MTT 法筛选顺铂对 IEC-6 细胞损伤的最佳剂量, 结果如图 2-A 所示, 0.50~32.00 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂对细胞活力有不同程度的抑制作用, 顺铂为 1 $\mu\text{mol/L}$ 时细胞活力达到 75.2%, 故选用 1 $\mu\text{mol/L}$ 顺铂为后续造模剂量。如图 2-B 所



A-顺铂对 IEC-6 细胞活力的影响; B-人参皂苷 Rh₄ 对 IEC-6 细胞活力的影响; C-人参皂苷 Rh₄ 对顺铂诱导的 IEC-6 细胞活力的影响; D-人参皂苷 Rh₄ 作用不同时间对顺铂诱导的 IEC-6 细胞活力的影响。

A-effect of cisplatin on viability of IEC-6 cells; B-effect of ginsenoside Rh₄ on viability of IEC-6 cells; C-effect of ginsenoside Rh₄ on viability of cisplatin-induced IEC-6 cells; D-effect of ginsenoside Rh₄ on viability of cisplatin-induced IEC-6 cells at different time points.

图 2 人参皂苷 Rh₄ 对顺铂诱导的 IEC-6 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 2 Effect of ginsenoside Rh₄ on viability of cisplatin-induced IEC-6 cells ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

示, 0.625~20.000 μmol/L 人参皂苷 Rh₄ 对 IEC-6 细胞活力无明显影响, 表明人参皂苷 Rh₄ 在该剂量范围内无细胞毒作用。如图 2-C 所示, 与顺铂组比较, 0.625~20.000 μmol/L 人参皂苷 Rh₄ 处理 IEC-6 细胞 24 h 后, 细胞活力均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); 如图 2-D 所示, 10 μmol/L 人参皂苷 Rh₄ 处理 IEC-6 细胞 3~24 h 后, 细胞活力显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。故选用 2.5、5.0、10.0 μmol/L 人参皂苷 Rh₄ 用于后续体外实验。

3.3 人参皂苷 Rh₄ 对顺铂致小鼠肠损伤模型氧化应激和炎症反应的影响

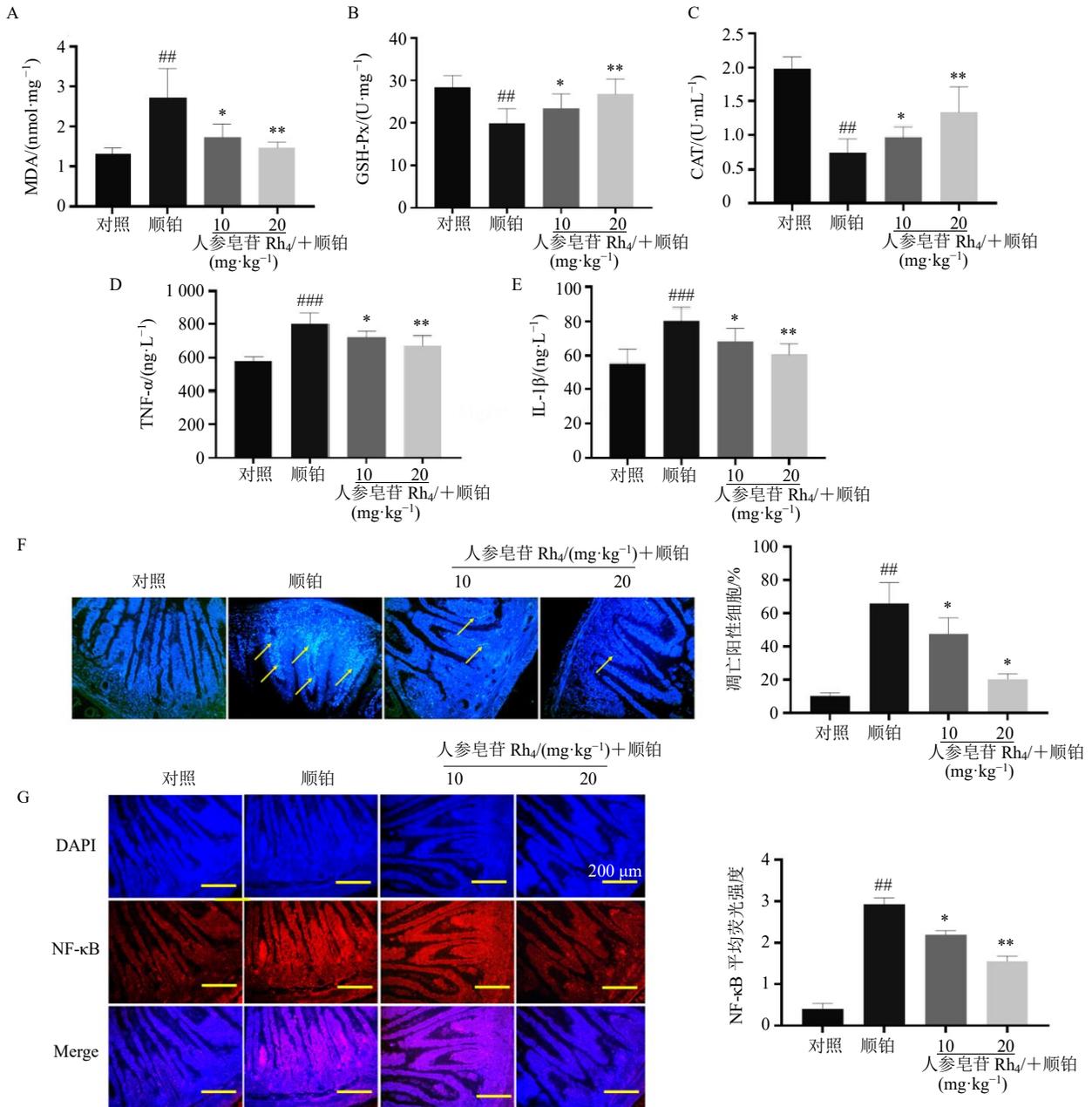
通过测定小鼠肠道组织中氧化应激相关指标和血清中炎症因子水平, 进一步探究人参皂苷 Rh₄ 发挥肠道保护活性的分子机制。如图 3-A~E 所示, 与对照组比较, 顺铂组肠组织中 MDA 水平显著升高 ($P < 0.01$), GSH-Px 和 CAT 活性显著降低 ($P < 0.01$), 血清中 TNF-α 和 IL-1β 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与顺铂组比较, 人参皂苷 Rh₄ 各剂量组 MDA 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), GSH-Px 和 CAT 活性显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 血清中 TNF-α 和 IL-

1β 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

采用免疫荧光和 Hoechst 33258 染色研究肠组织的炎症损伤程度和肠黏膜上皮细胞凋亡程度, 结果如图 3-F、G 所示, 与对照组比较, 顺铂组肠组织细胞凋亡率和 NF-κB 阳性表达显著升高 ($P < 0.01$); 与顺铂组比较, 人参皂苷 Rh₄ 各剂量组肠组织细胞凋亡率和 NF-κB 阳性表达显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 表明人参皂苷 Rh₄ 能有效改善顺铂致肠黏膜损伤的炎症反应。

3.4 人参皂苷 Rh₄ 对顺铂致小鼠肠损伤模型和 IEC-6 细胞损伤模型 p21/p53/PGC-1α 通路的影响

PGC-1α 的表达与线粒体 ROS 以及线粒体功能密切相关。通过 Western blotting 考察 p53/PGC-1α 通路在维持线粒体稳态中的作用, 如图 4 所示, 体内外实验结果一致, 与对照组比较, 顺铂组 p21 和 p53 蛋白表达水平明显升高 ($P < 0.01$), PGC-1α 和 p-AMPK 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与顺铂组比较, 人参皂苷 Rh₄ 各剂量组 p21 和 p53 蛋白表达水平明显降低 ($P < 0.05, 0.01$), PGC-1α 和 p-AMPK 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。



A~C-各组肠组织中氧化应激相关指标水平; D、E-各组血清中炎症因子水平; F-Hoechst 33258 染色检测各组小鼠肠组织细胞凋亡情况(×200), 箭头表示肠组织中凋亡阳性细胞; G-免疫荧光检测各组小鼠肠组织 NF-κB 蛋白表达(×200)。

A—C-levels of oxidative stress indicates in intestinal tissues of each group; D, E-levels of inflammatory factors in serum of each group; F-apoptosis of intestinal tissue cells in each group of mice detected by Hoechst 33258 staining (× 200), arrows indicate apoptotic positive cells in intestinal tissue; G- NF-κB protein expression in intestinal tissues of mice in each group detected by immunofluorescence (× 200).

图3 人参皂苷 Rh₄对顺铂致小鼠肠损伤模型氧化应激和炎症反应的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 3 Effect of ginsenoside Rh₄ on oxidative stress and inflammatory responses in cisplatin-induced intestinal injury model in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

3.5 人参皂苷 Rh₄对顺铂致小鼠肠损伤模型和 IEC-6 细胞损伤模型自噬及线粒体相关蛋白表达的影响

为深入揭示人参皂苷 Rh₄改善肠黏膜屏障功能与调节线粒体功能之间的关系,通过 Western

blotting 检测线粒体自噬相关蛋白的表达水平,进一步证明 PGC-1α 途径对线粒体自噬通量的重要作用。如图 5 所示,与对照组比较,顺铂组小鼠肠组织 p-mTOR、p62、p-Beclin-1 蛋白表达水平显著升高($P < 0.01$),p-ULK1、Parkin、Atg14、Atg7、Atg5、

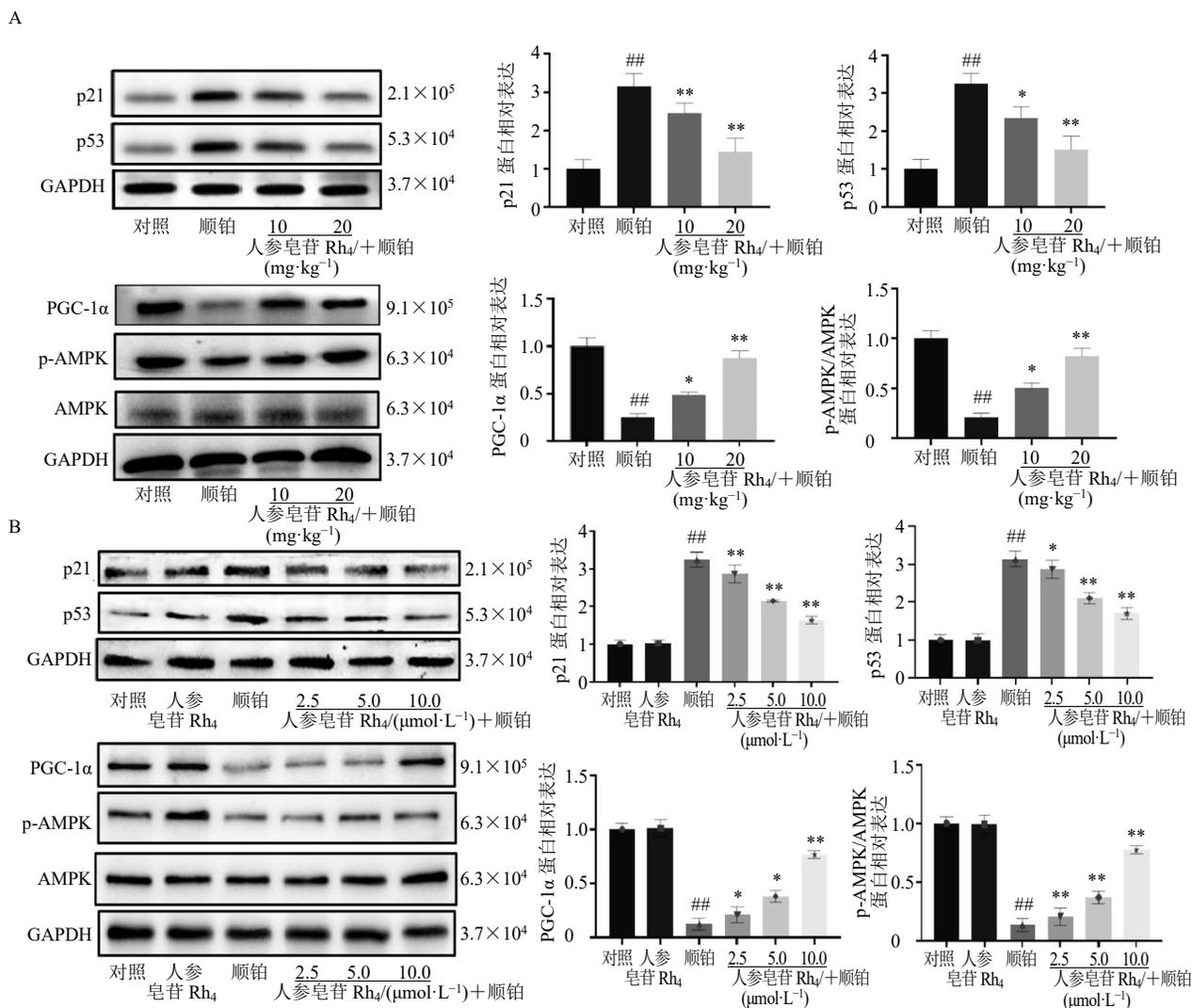


图4 人参皂苷 Rh₄对顺铂致小鼠肠损伤模型 (A) 和 IEC-6 细胞损伤模型 (B) p21/p53/PGC-1α 通路的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)
 Fig. 4 Effect of ginsenoside Rh₄ on p21/p53/PGC-1α pathway in cisplatin-induced intestinal injury model in mice (A) and IEC-6 cells damage model (B) ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Atg3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$); 与顺铂组比较, 人参皂苷 Rh₄ 各剂量组 p-mTOR、p62、p-Beclin-1 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), p-ULK1、Parkin、Atg14、Atg7、Atg5、Atg3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 表明人参皂苷 Rh₄ 通过 PGC-1α 促进线粒体自噬通量。

体外实验结果如图 6 所示, 与对照组比较, 顺铂组 IEC-6 细胞 p-mTOR、p62、LC3-I/II 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), p-ULK1、Atg14、Atg7、Atg5、Atg3 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$); 与顺铂组比较, 人参皂苷 Rh₄ 各剂量组 p-mTOR、p62、LC3-I/II 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), p-ULK1、Atg14、Atg7、Atg5、Atg3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 表明顺铂可抑制

IEC-6 细胞线粒体自噬, 而人参皂苷 Rh₄ 预处理能有效促进细胞的线粒体自噬, 进一步充分佐证了体内实验结果。

3.6 人参皂苷 Rh₄ 对顺铂致 IEC-6 细胞损伤模型细胞凋亡的影响

线粒体细胞膜电位是评价线粒体正常功能的重要指标之一, 不仅反映了线粒体功能的完整性, 对肠黏膜屏障功能、细胞凋亡的调控方面都具有重要作用。此外, 线粒体细胞膜电位变化是细胞凋亡最早期的变化, 亦是影响线粒体 ROS 产生以及肠黏膜通透性的重要指标。为进一步探究细胞凋亡在顺铂致肠黏膜损伤的作用, 通过 JC-1 染色以及流式细胞术检测顺铂诱导的 IEC-6 细胞凋亡情况, 结果见图 7-A、B, 与对照组比较, 顺铂组线粒体细胞膜

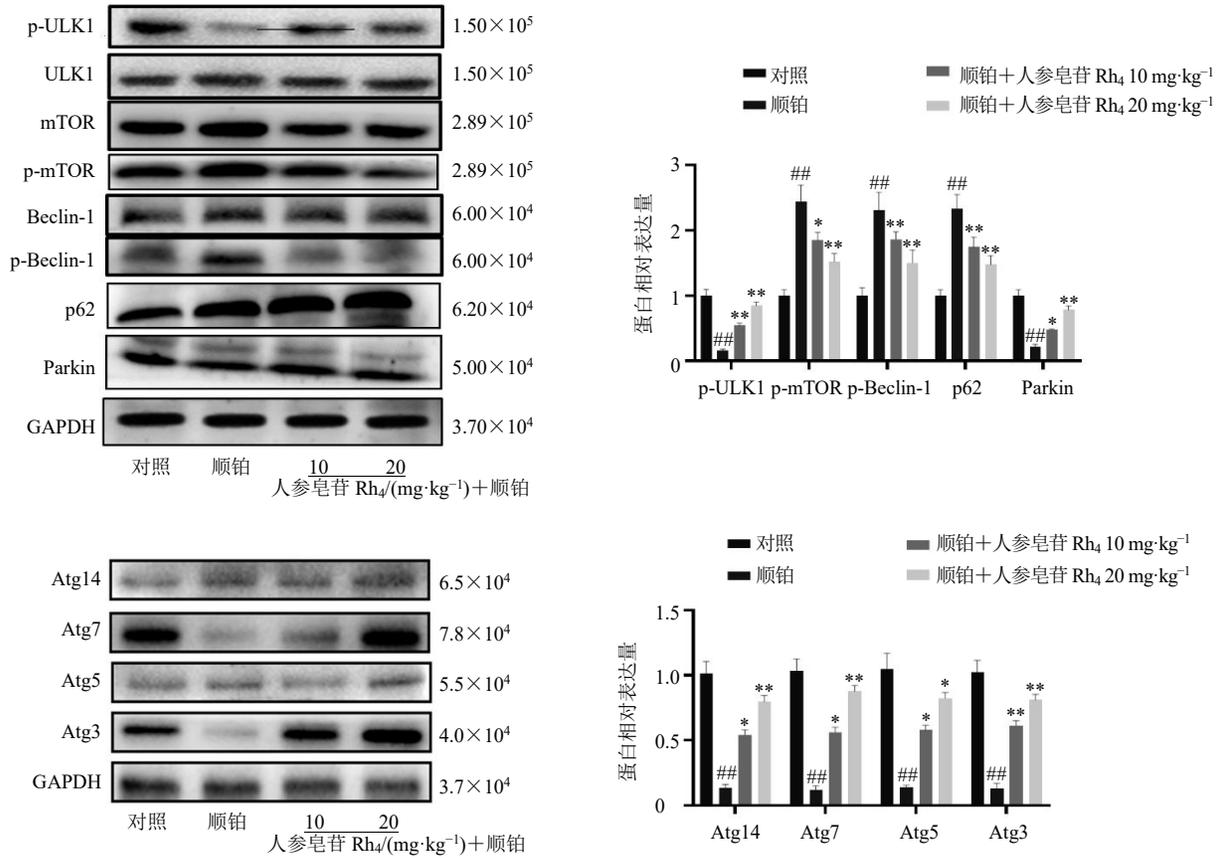


图5 人参皂苷 Rh₄对顺铂致小鼠肠损伤模型肠组织中线粒体自噬相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 5 Effect of ginsenoside Rh₄ on mitochondria autophagy related protein expressions in intestinal tissues of cisplatin-induced intestinal injury model in mice ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

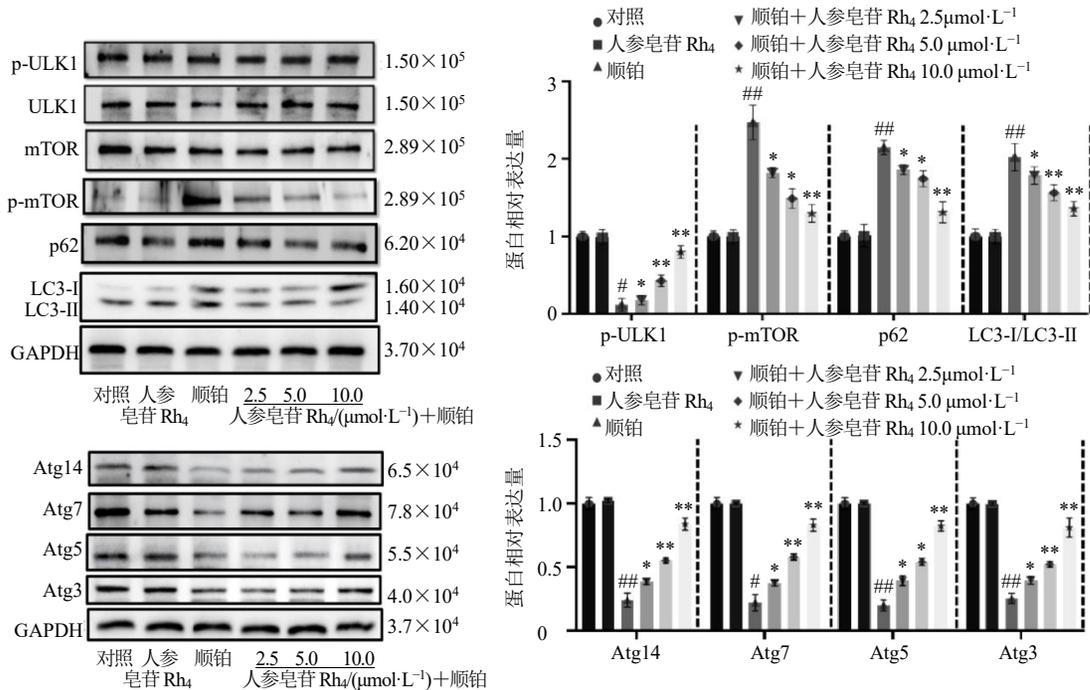
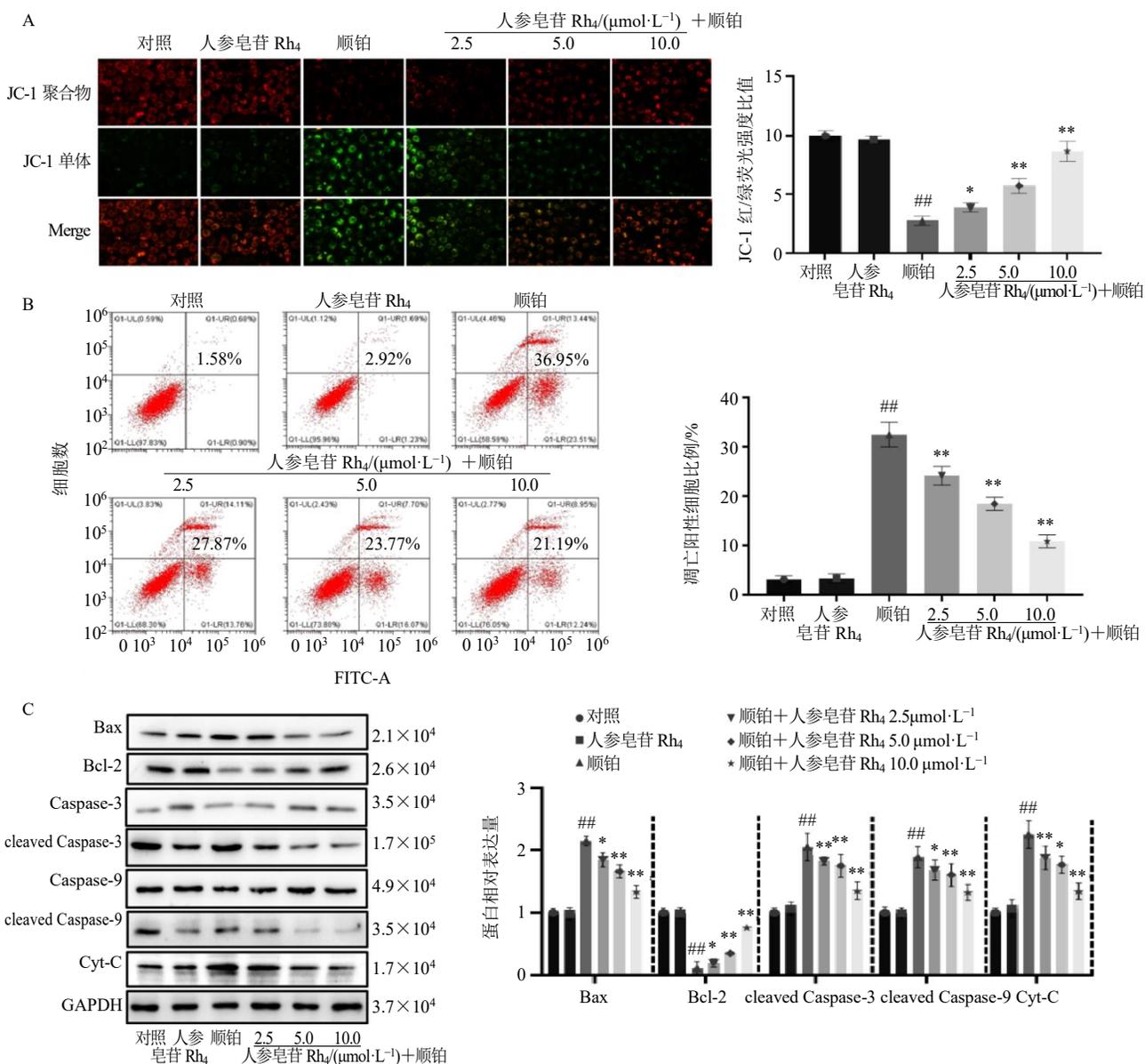


图6 人参皂苷 Rh₄对顺铂致 IEC-6 细胞损伤模型线粒体自噬相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 6 Effect of ginsenoside Rh₄ on mitochondria autophagy related protein expressions in intestinal tissues of cisplatin-induced IEC-6 cells damage model ($\bar{x} \pm s, n = 8$)



A-JC-1 染色检测线粒体膜电位变化 ($\times 100$); B-流式细胞术检测细胞凋亡率; C-Western blotting 检测凋亡相关蛋白表达。

A-changes in mitochondrial membrane potential detected by JC-1 staining ($\times 100$); B-apoptosis rate of cells detected by flow cytometry; C-expressions of apoptosis related proteins detected by Western blotting.

图 7 人参皂苷 Rh₄ 对顺铂致 IEC-6 细胞损伤模型细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 7 Effect of ginsenoside Rh₄ on apoptosis of cisplatin-induced IEC-6 cells damage model ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

电位显著降低 ($P < 0.01$), 细胞凋亡率显著升高 ($P < 0.01$); 与顺铂组比较, 人参皂苷 Rh₄ 各剂量组线粒体细胞膜电位显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 细胞凋亡率显著降低 ($P < 0.01$)。通过 Western blotting 检测凋亡相关蛋白的表达, 结果见图 7-C, 与对照组比较, 顺铂组 Bcl-2 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05$), Bax、cleaved Caspase-3、cleaved Caspase-9 和 Cyt-C 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与顺铂组比较, 人参皂苷 Rh₄ 各剂量组 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), Bax、cleaved Caspase-3、

cleaved Caspase-9 和 Cyt-C 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 表明人参皂苷 Rh₄ 能有效改善顺铂诱导的 IEC-6 细胞凋亡。

4 讨论

铂类药物引发的胃肠道不良反应严重降低患者的生活质量, 目前临床尚无治疗顺铂引起的肠道毒性的特异性药物^[5,24-25]。因此, 研究者致力于开发和利用天然药物来减轻顺铂在治疗过程中所产生的不良反应, 为患者愈后提供更多可能性。人参皂苷 Rh₄ 是红参中较为重要的一种稀有皂苷, 在增强

机体免疫力、恢复线粒体功能、抗炎以及抗氧化方面具有显著的药理作用^[14-15]。据此,本研究通过免疫荧光染色、线粒体膜电位以及 Western blotting 等方法,从胃肠道机械屏障、炎症反应、线粒体自噬和细胞凋亡等角度阐明人参皂苷 Rh₄ 缓解顺铂致肠黏膜损伤的作用机制。

研究表明,顺铂引起肠黏膜破坏和肠屏障功能减弱,与线粒体功能密切相关^[26]。血液中 DAO 活性是早期诊断肠黏膜损伤的敏感指标^[27],机体血清中 DAO 活性可以初步体现肠黏膜的受损程度。此外,肠道机械屏障还与肠黏膜上皮细胞上的紧密连接密切相关,其胞质跨膜蛋白与衔接子蛋白之间的关系网络是紧密连接蛋白的重要组成部分,主要包括 Occludin、claudin-1 和 ZO-1 等蛋白^[28]。本研究结果显示,小鼠 ip 顺铂后血清 DAO 活性显著升高,肠黏膜严重损伤,绒毛断裂,隐窝损伤变形,杯状细胞减少,ZO-1 和 Occludin 蛋白表达明显降低;而人参皂苷 Rh₄ 预处理可显著降低血清中 DAO 活性,上调肠组织 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达,表明人参皂苷 Rh₄ 可通过促进紧密相关蛋白的表达,恢复肠黏膜屏障功能。

此外,线粒体自噬与细胞凋亡对于维持肠黏膜屏障功能以及细胞稳态至关重要^[29]。线粒体自噬可选择性地去除多余和受损的线粒体,并与线粒体生物发生、线粒体的数量和质量密切相关^[30]。在外界环境因素的刺激下,细胞内线粒体会出现去极化损伤并导致线粒体膜电位消散,加重线粒体功能障碍,这与许多疾病的发病机制均有一定的联系^[31]。Scott 等^[32]研究发现,过表达的 PGC-1 α 可以激活溶酶体的合成,维持线粒体合成与线粒体自噬的平衡。Palikaras 等^[33]研究发现,AMPK 通过 PGC-1 α 维持线粒体生物合成与线粒体自噬之间的能量代谢平衡。以上研究从不同角度证明了 PGC-1 α 在协同调节线粒体生物发生和线粒体自噬中的关键作用。Han 等^[34]在敲除 p21WAF1/CIP1 的结肠癌 HCT-116 细胞中发现,p21 可通过 AMPK/PGC-1 α 途径增加线粒体生物合成的水平。在本研究中,顺铂能导致线粒体功能受损,线粒体自噬和凋亡水平显著升高,与先前研究结果一致。人参皂苷 Rh₄ 通过调节线粒体 PGC-1 α 途径,有效抑制了自噬相关蛋白 p21、p53 蛋白的表达,并缓解细胞凋亡的发生。这充分表明人参皂苷 Rh₄ 能明显恢复线粒体功能,激活 PGC-1 α 途径,调控线粒体自噬和细胞凋亡,改

善肠黏膜损伤,进一步彰显了中医药临床诊疗的优势,也为人参皂苷 Rh₄ 深度开发奠定基础。然而,顺铂致肠黏膜损伤的机制复杂,本研究尚未阐明 PGC-1 α 通路在顺铂诱导肠道损伤和炎症性肠病及相关疾病中的作用的具体关系,而且人参皂苷 Rh₄ 改善线粒体功能是否与线粒体生物发生有关还有待进一步探究。

综上,本研究通过阐明人参皂苷 Rh₄ 可显著恢复肠道内源性抗氧化防御系统,改善肠道黏膜屏障功能拮抗顺铂诱导小鼠肠道毒性,其分子机制可能与激活 PGC-1 α 、促进线粒体自噬、抑制细胞凋亡途径有关。本研究明确了人参皂苷 Rh₄ 具有维持线粒体功能的作用,促进人参皂苷 Rh₄ 在临床治疗顺铂致肠道损伤的应用和发展,为深入探究顺铂诱导肠道损伤的分子机制提供新的思路,也为揭示人参皂苷 Rh₄ 在临床诊治肠黏膜屏障方面的应用提供新策略;而且本研究阐述的 PGC-1 α 与线粒体自噬途径之间的关系,为临床探究顺铂不良反应的潜在靶点提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 丁叶屏,季维雪,肖兰,等. 肿瘤相关成纤维细胞中微小 RNA-214-3p 表达对卵巢癌细胞顺铂敏感性的影响 [J]. 实用临床医药杂志, 2024, 28(10): 5-12.
- [2] Li M, Zhang H Y, Zhang R G. MFAP2 enhances cisplatin resistance in gastric cancer cells by regulating autophagy [J]. *PeerJ*, 2023, 11: e15441.
- [3] 崔伯阳,尺宝进,张赫岩,等. miR-101-3p 与膀胱癌细胞增殖、迁移、侵袭和顺铂敏感性的关系研究 [J]. 中国实验诊断学, 2024, 28(1): 76-80.
- [4] 宋玉芳,张前,刘英杰,等. miR-425-5p 调节 PTEN/PI3K/AKT 轴对卵巢癌细胞顺铂敏感性的影响 [J]. 中国细胞生物学学报, 2023, 45(8): 1182-1192.
- [5] Dasari S, Tchounwou P B. Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 740: 364-378.
- [6] 陶素素,彭志兰,陈晖,等. 方格星虫酶解超滤组分对顺铂所致 HK-2 人肾小管上皮细胞损伤的保护作用研究 [J]. 中国海洋药物, 2024, 43(2): 41-52.
- [7] 唐寅博,刘福宇,单凯欣,等. 基于网络药理学与实验验证探讨茯苓对化疗性肠黏膜炎小鼠的作用及机制 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2024, 30(5): 814-820.
- [8] Xia J, Hu J N, Wang Z, et al. Based on network pharmacology and molecular docking to explore the protective effect of *Epimedii Folium* extract on cisplatin-induced intestinal injury in mice [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1040504.

- [9] Karimi S, Jonsson H, Lundh T, *et al.* *Lactobacillus reuteri* strains protect epithelial barrier integrity of IPEC-J2 monolayers from the detrimental effect of enterotoxigenic *Escherichia coli* [J]. *Physiol Rep*, 2018, 6(2): e13514.
- [10] Lin Q S, Li S, Jin H J, *et al.* Mitophagy alleviates cisplatin-induced renal tubular epithelial cell ferroptosis through ROS/HO-1/GPX4 axis [J]. *Int J Biol Sci*, 2023, 19(4): 1192-1210.
- [11] Ullrich E, Vogler M, von Metzler I. Mitochondrial apoptosis: Facilitator of NK cell-mediated immunotherapy [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 291.
- [12] Gong N Q, Ma X W, Ye X X, *et al.* Carbon-dot-supported atomically dispersed gold as a mitochondrial oxidative stress amplifier for cancer treatment [J]. *Nat Nanotechnol*, 2019, 14(4): 379-387.
- [13] Peng X J, Hao M Q, Zhao Y C, *et al.* Red ginseng has stronger anti-aging effects compared to ginseng possibly due to its regulation of oxidative stress and the gut microbiota [J]. *Phytomedicine*, 2021, 93: 153772.
- [14] Bai X, Deng J J, Duan Z G, *et al.* Ginsenoside Rh₄ alleviates gastrointestinal mucositis and enhances chemotherapy efficacy through modulating gut microbiota [J]. *Phytomedicine*, 2024, 128: 155577.
- [15] Bai X, Duan Z G, Deng J J, *et al.* Ginsenoside Rh₄ inhibits colorectal cancer via the modulation of gut microbiota-mediated bile acid metabolism [J]. *J Adv Res*, 2024, doi: 10.1016/j.jare.2024.06.028.
- [16] 李响, 石凯, 梁臣, 等. 人参酚酸和人参皂苷对辐射引起小鼠肠隐窝细胞损伤的保护作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2024, 40(3): 408-412.
- [17] Geng X Y, Wang J, Liu Y W, *et al.* Research progress on chemical diversity of saponins in *Panax ginseng* [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 529-547.
- [18] Ma J, Zhang J Q, Wang Y F, *et al.* Modified Gegen Qinlian decoction ameliorates DSS-induced chronic colitis in mice by restoring the intestinal mucus barrier and inhibiting the activation of $\gamma\delta T17$ cells. *Phytomedicine*, 2023: 111: 154660-154671.
- [19] Jiang R Y, Luo S J, Zhang M, *et al.* Ginsenoside Rh₄ inhibits inflammation-related hepatocellular carcinoma progression by targeting HDAC4/IL-6/STAT3 signaling [J]. *Mol Genet Genomics*, 2023, 298(6): 1479-1492.
- [20] 刘绍庭, 李忠俊, 陈立, 等. 食品添加剂羧甲基纤维素钠通过破坏肠内环境加剧辐射对小鼠肠道的损伤 [J]. *陆军军医大学学报*, 2024, 46(6): 522-534.
- [21] 图拉妮萨·喀迪尔, 罗杰, 廖师师, 等. 线粒体钙离子单向转运蛋白在 Caco-2 细胞缺氧复氧损伤中的作用及机制 [J]. *武汉大学学报: 医学版*, 2024, 45(5): 515-519.
- [22] 王凯, 高宗跃, 左振魁, 等. 葫芦素 B 通过 ENPP2 影响铁死亡在结直肠癌耐药中的机制研究 [J]. *中草药*, 2025, 56(6): 2009-2016.
- [23] Hu J N, Wang Y M, Zhang H, *et al.* Schisandra B, a representative lignan from *Schisandra chinensis*, improves cisplatin-induced toxicity: An *in vitro* study [J]. *Phytother Res*, 2023, 37(2): 658-671.
- [24] Wei L, Wen X S, Xian C J. Chemotherapy-induced intestinal microbiota dysbiosis impairs mucosal homeostasis by modulating Toll-like receptor signaling pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(17): 9474.
- [25] Buyana B, Naki T, Alven S, *et al.* Nanoparticles loaded with platinum drugs for colorectal cancer therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11261.
- [26] 仇先明, 代文, 王全珍, 等. 小檗碱调节 Nrf2/HO-1 信号通路改善脓毒症肠道损伤 [J]. *中国新药与临床杂志*, 2024, 43(7): 535-540.
- [27] Woodby B, Schiavone M L, Pambianchi E, *et al.* Particulate matter decreases intestinal barrier-associated proteins levels in 3D human intestinal model [J]. *Int J Environ Res Public Health*, 2020, 17(9): 3234.
- [28] 程小玲, 蒲玲玲, 徐洪宝, 等. 补中益气汤对高原低氧大鼠肠道屏障的保护作用研究 [J]. *环球中医药*, 2024, 17(8): 1484-1491.
- [29] Zhang J J, Wang J Q, Xu X Y, *et al.* Red ginseng protects against cisplatin-induced intestinal toxicity by inhibiting apoptosis and autophagy via the PI3K/AKT and MAPK signaling pathways [J]. *Food Funct*, 2020, 11(5): 4236-4248.
- [30] Lenin R R, Koh Y H, Zhang Z T, *et al.* Dysfunctional autophagy, proteostasis, and mitochondria as a prelude to age-related macular degeneration [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(10): 8763.
- [31] Zhang M, Chu Y, Mowery J, *et al.* Pgc-1 α repression and high-fat diet induce age-related macular degeneration-like phenotypes in mice [J]. *Dis Model Mech*, 2018, 11(9): dmm032698.
- [32] Scott I, Webster B R, Chan C K, *et al.* GCN5-like protein 1 (GCN5L1) controls mitochondrial content through coordinated regulation of mitochondrial biogenesis and mitophagy [J]. *J Biol Chem*, 2014, 289(5): 2864-2872.
- [33] Palikaras K, Lionaki E, Tavernarakis N. Balancing mitochondrial biogenesis and mitophagy to maintain energy metabolism homeostasis [J]. *Cell Death Differ*, 2015, 22(9): 1399-1401.
- [34] Han Y T, Liu Y, Zhen J H, *et al.* P53 regulates mitochondrial biogenesis via transcriptionally induction of mitochondrial ribosomal protein L12 [J]. *Exp Cell Res*, 2022, 418(1): 113249.