

## • 药理与临床 •

## 丹红注射液通过 AMPK/Drp1 通路改善 H9c2 细胞线粒体动力学失衡并抑制细胞焦亡

叶嘉豪, 吴子政, 张 焱, 孟骊冲, 胡志希\*

湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208

**摘要:** 目的 基于腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) /动力相关蛋白 1 (dynamin-related protein 1, Drp1) 通路阐明丹红注射液 (Danhong Injection, DHI) 改善 H9c2 心肌细胞缺氧/缺糖模型线粒体动力学失衡并抑制 NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 介导焦亡的作用机制。方法 采用超高效液相色谱-质谱联用 (ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry, UHPLC-MS) 鉴定 DHI 核心活性成分, 利用 AutoDock Vina 软件对 AMPK、Drp1、视神经萎缩症蛋白 1 (optic atrophy 1, OPA1)、半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cysteine-aspartate protease-1, Caspase-1) 等靶蛋白与 DHI 核心活性成分进行分子对接。构建 H9c2 细胞缺氧/缺糖模型, 设置对照组、模型组、DHI 组、DHI+Compound C (AMPK 抑制剂) 组、AICAR (AMPK 激动剂) 组、MCC950 (NLRP3 抑制剂) 组和 Mdivi-1 (Drp1 抑制剂) 组, 采用 CCK-8 法筛选 DHI 最佳干预浓度; 用 JC-1 探针检测线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP); 运用 MitoSOX™ 测定线粒体活性氧 (mitochondrial reactive oxygen species, mtROS) 水平; 透射电镜观察线粒体超微结构; 免疫荧光检测 p-AMPK 与 p-Drp1 蛋白表达; Western blotting 检测 AMPK/Drp1 通路相关蛋白、线粒体动力学相关蛋白 [线粒体分裂蛋白 1 (mitochondrial fission 1 protein, FIS1)、线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2, MFN2)、OPA1] 以及焦亡相关蛋白 [NLRP3、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、Caspase-1、消皮素 D-N 端片段 (N-terminal fragment of gasdermin D, GSDMD-NT)] 表达; ELISA 测定白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-18、三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 水平。结果 UHPLC-MS 鉴定出 DHI 中 8 种活性成分 (丹酚酸、紫草酸 B、丹参素、咖啡酸、丹参素钠等); 分子对接结果显示, 各靶点和活性成分均具有较强亲和力。体外实验结果显示, 与模型组比较, DHI 组线粒体形态明显改善, 外膜连续, 嵴结构相对完整, 数量增加, 基质密度恢复接近正常, MMP 和 ATP 升高 ( $P<0.01$ ), mtROS 释放量减少 ( $P<0.01$ ), p-AMPK/AMPK 值升高 ( $P<0.01$ ), p-Drp1/Drp1 值下降 ( $P<0.01$ ), MFN2、OPA1 蛋白表达上调 ( $P<0.01$ ), FIS1、NLRP3、ASC、Caspase-1 和 GSDMD-NT 蛋白表达下调 ( $P<0.01$ ), IL-1 $\beta$ 、IL-18 水平显著降低 ( $P<0.01$ ), 与 AICAR、MCC950、Mdivi-1 作用一致。Compound C 能部分抑制 DHI 的上述作用。结论 DHI 通过激活 AMPK/Drp1 通路, 抑制线粒体过度分裂以及促进线粒体融合, 降低 NLRP3 炎性小体活化与焦亡, 从而减轻缺氧/缺糖诱导的 H9c2 细胞损伤。

**关键词:** 丹红注射液; AMPK/Drp1 通路; 线粒体动力学; 细胞焦亡; 线粒体融合; 线粒体分裂; 丹酚酸; 紫草酸 B; 丹参素; 咖啡酸; 丹参素钠; Boc-D-谷氨酰胺; D-半乳糖 1-[2-(2-叠氮乙氧基)乙氧基乙基]-2,3,4,6-四-O-乙酸酯; 鸟苷

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)11-4196-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.11.011

## Danhong Injection ameliorates mitochondrial dynamics imbalance and inhibits pyroptosis in H9c2 cells via AMPK/Drp1 pathway

YE Jiahao, WU Zizheng, ZHANG Yao, MENG Lichong, HU Zhixi

Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

**Abstract: Objective** To elucidate the mechanism by which Danhong Injection (DHI) ameliorates mitochondrial dynamics imbalance and inhibits NOD-like receptor family pyrin domain containing 3 (NLRP3)-mediated pyroptosis in H9c2 cells

收稿日期: 2025-11-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (82274412)

作者简介: 叶嘉豪 (1996—), 男, 博士研究生, 研究方向为心血管疾病证本质与诊治规律。E-mail: 1062940906@qq.com

\*通信作者: 胡志希 (1962—), 男, 博士, 教授, 研究方向为心血管疾病证本质与诊治规律。E-mail: 515800272@qq.com

subjected to oxygen-glucose deprivation based on AMP-activated protein kinase (AMPK)/dynamin-related protein 1 (Drp1) pathway.

**Methods** Ultra-high performance liquid chromatography-mass spectrometry (UHPLC-MS) was employed to identify the core active components of DHI. Molecular docking was performed using AutoDock Vina software to assess the affinity between DHI core components and target proteins, including AMPK, Drp1, optic atrophy 1 (OPA1) and cystein-aspartate protease-1 (Caspase-1). An H9c2 cell oxygen-glucose deprivation model was established, control group, model group, DHI group, DHI + Compound C (AMPK inhibitor) group, AICAR (AMPK agonist) group, MCC950 (NLRP3 inhibitor) group and Mdivi-1 (Drp1 inhibitor) group were set up. The optimal intervention concentration of DHI was screened using CCK-8 assay. Mitochondrial membrane potential (MMP) was measured using JC-1 probe, and mitochondrial reactive oxygen species (mtROS) level was determined using MitoSOX<sup>TM</sup>. Mitochondrial ultrastructure was observed via transmission electron microscopy. Immunofluorescence was used to detect the protein expressions of p-AMPK and p-Drp1. Western blotting was performed to detect the expressions of AMPK/Drp1 pathway-related proteins, mitochondrial dynamics-related proteins [mitochondrial fission 1 protein (FIS1), mitofusin 2 (MFN2) and OPA1] and pyroptosis-related proteins [NLRP3, apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD (ASC), Caspase-1 and N-terminal fragment of gasdermin D (GSDMD-NT)]. ELISA was used to determine the levels of interleukin-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), IL-18 and adenosine triphosphate (ATP). **Results** UHPLC-MS identified eight active components of DHI, including salvianolic acid, lithospermic acid B, danshensu, caffeic acid, sodium danshensu, etc. The molecular docking results showed that each target and active ingredient had strong affinity. The *in vitro* experimental results showed that compared with model group, mitochondrial morphology in DHI group was significantly improved, with continuous outer membrane and relatively intact cristae structure, increased quantity, and matrix density restored to near normal. MMP and ATP levels were increased ( $P < 0.01$ ), mtROS release was decreased ( $P < 0.01$ ), p-AMPK/AMPK value was increased ( $P < 0.01$ ), p-Drp1/Drp1 value was decreased ( $P < 0.01$ ), MFN2 and OPA1 protein expressions were upregulated ( $P < 0.01$ ), FIS1, NLRP3, ASC, Caspase-1 and GSDMD-NT protein expressions were downregulated ( $P < 0.01$ ), and IL-1 $\beta$  and IL-18 levels were significantly decreased ( $P < 0.01$ ), consistent with the effects of AICAR, MCC950 and Mdivi-1. Compound C could partially inhibit the above-mentioned effects of DHI. **Conclusion** DHI activates AMPK/Drp1 pathway, inhibits mitochondrial excessive division and promotes mitochondrial fusion, reduces NLRP3 inflammasome activation and pyroptosis, thereby alleviating hypoxia/hypoglycemia induced H9c2 cell damage.

**Key words:** Danhong Injection; AMPK/Drp1 pathway; mitochondrial dynamics; pyroptosis; mitochondrial fusion; mitochondrial fission; salvianolic acid; lithospermic acid B; danshensu; caffeic acid; sodium danshensu; Boc-*D*-glutamine; *D*-galactose 1-[2-(2-azidoethoxy)ethoxyethyl]-2,3,4,6-tetra-*O*-acetate; guanosine

心力衰竭是多种心血管疾病发展的终末阶段，是心脏结构或功能异常导致心室充盈或射血功能受损的一组复杂临床综合征<sup>[1]</sup>。随着全球人口老龄化趋势加剧，心力衰竭的疾病负担日益沉重，已成为 21 世纪最重要的心血管病症之一<sup>[2]</sup>。流行病学调查显示，我国成年人群慢性心力衰竭患病率约为 0.9%<sup>[3]</sup>，慢性心力衰竭以其高发病率、高死亡率、预后差的特点，给患者生命健康及社会医疗系统带来巨大挑战<sup>[4-5]</sup>。因此，深入探究其发病机制并开发有效的防治策略，是当前心血管领域研究的重点与难点。

慢性心力衰竭根本病理生理基础之一是心肌细胞的长期或反复缺血、缺氧<sup>[6-7]</sup>。在此病理过程中，心肌细胞持续的能量供应不足直接导致线粒体功能严重受损，而线粒体作为细胞的能量代谢中心，其动力学平衡（即线粒体融合与分裂的动态平衡）对于维持线粒体形态、功能及细胞存活至关重要<sup>[8-12]</sup>。研究表明，在心力衰竭等心血管疾病中，常出现以动力相关蛋白 1（dynamin-related protein 1, Drp1）介导的线粒体过度分裂，这种线粒体动力学失衡不

仅加剧线粒体片段化、破坏线粒体网络稳态，还会导致活性氧（reactive oxygen specie, ROS）过度生成、线粒体膜电位（mitochondrial membrane potential, MMP）下降及三磷酸腺苷（adenosine triphosphate, ATP）合成障碍，进而引发心肌细胞损伤和死亡<sup>[13-20]</sup>。本研究采用 H9c2 心肌细胞建立缺氧/缺糖模型，能够体外模拟慢性心力衰竭中心肌细胞缺血缺氧的病理环境，并有效诱导线粒体动力学失衡及相关功能损伤，是研究心力衰竭心肌线粒体机制的重要体外模型。

磷酸腺苷激活的蛋白激酶（AMP-activated protein kinase, AMPK）作为细胞的能量感受器，在调控线粒体动力学中扮演着核心角色。研究表明，AMPK/Drp1 通路是调控线粒体融合-分裂平衡的关键通路，适度的 AMPK 激活能够有效限制“失控的过度分裂”，纠正线粒体动力学紊乱，从而改善能量代谢，发挥心肌保护作用<sup>[21]</sup>。线粒体过度分裂会导致线粒体片段化，片段化的线粒体其呼吸链复合物效率降低，增加了电子在传递过程中的泄漏概率，

从而诱导大量线粒体活性氧 (mitochondrial reactive oxygen specie, mtROS) 的生成<sup>[22]</sup>。此外, mtROS 会进一步攻击线粒体膜脂质和蛋白质, 加剧膜通透性的改变, 最终导致 MMP 的降低。MMP 的降低意味着线粒体合成 ATP 的能力严重受损, 细胞能量供应下降。因此 mtROS 的过度积累和 MMP 的异常不仅是线粒体损伤的直接标志, 也是启动焦亡的关键上游事件, 进一步加剧了细胞损伤<sup>[23-24]</sup>。NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor family pyrin domain containing 3, NLRP3) 炎性小体能够感知缺血、线粒体功能障碍等多种危险信号, 进而激活半胱氨酸天冬氨酸蛋白酶-1 (cysteine-aspartate protease-1, Caspase-1), 促使消皮素 D (gasdermin D, GSDMD) 蛋白裂解并释放白细胞介素-1 $\beta$  (interleukin-1 $\beta$ , IL-1 $\beta$ )、IL-18 等促炎因子, 最终引发并放大心肌炎症与组织损伤<sup>[25-26]</sup>。

本课题组前期研究已证实, 丹红注射液 (Danhong Injection, DHI) 能够有效改善慢性心力衰竭大鼠的线粒体动力学失衡, 调节能量代谢, 从而发挥心脏保护作用<sup>[27]</sup>。然而, DHI 是否通过调控 AMPK/Drp1 通路重塑线粒体动力学稳态, 并进一步抑制 NLRP3 介导的细胞焦亡, 其深层机制仍有待阐明。因此, 本研究将在前期工作基础上, 系统探讨 DHI 对 AMPK/Drp1 信号线粒体动力学、能量代谢及细胞焦亡的调控作用, 旨在为 DHI 对心肌的保护机制提供更充分的实验依据和机制支持。

## 1 材料

### 1.1 细胞

H9c2 (2-1) 大鼠心肌细胞株 (货号 CL-0089) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司。

### 1.2 药品与试剂

丹红注射液 (国药准字 Z20026866, 批号 23042009) 购自山东丹红制药有限公司; AMPK、p-AMPK、Drp1、p-Drp1 (Ser616)、视神经萎缩症蛋白 1 (optic atrophy 1, OPA1)、线粒体融合蛋白 2 (mitofusin 2, MFN2)、线粒体分裂蛋白 1 (mitochondrial fission 1 protein, FIS1)、凋亡相关斑点样蛋白 (apoptosis-associated speck-like protein containing a CARD, ASC)、Caspase-1、GSDMD-N、NLRP3 一抗 (批号分别为 AF300361、AF300606、AF02064、AF01325、AF301461、AF02770、AF14176、AF04045、AF07185、AFRM9489、20250218) 及 ATP、IL-18、IL-1 $\beta$  ELISA 试剂盒 (批号分别为 AF08511-

A、AF040508-A、AF02923-A) 购自湖南艾方生物科技有限公司; 无水乙醇 (批号 10006818) 购自中国医药集团有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 一抗 (批号 B2901) 购自美国 Immunoway 公司; PBS (批号 G4202) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; H9c2 细胞专用培养基 (批号 CM-0089) 购自武汉普诺赛生命科技有限公司; 0.25% 胰酶消化液 (批号 BL512A) 购自 Biosharp 公司; 线粒体膜电位染色试剂盒 (批号 C2006) 购自上海碧云天生物技术有限公司; MitoSOX<sup>TM</sup> 线粒体超氧化物指示剂 (批号 M36007) 购自美国 Thermo 公司; DMSO (批号 67-68-5) 购自德国 Merck 公司; DMEM 低糖培养基 (批号 U21-265B) 购自攸碧艾 (上海) 生物技术有限公司; AMPK 激活剂 AICAR、AMPK 抑制剂 Compound C (批号分别为 HY-13417A、HY-13418) 购自美国 MCE 公司; Drp1 抑制剂 Mdivi-1、NLRP3 抑制剂 MCC950 (批号分别为 A252480、A110681) 购自美国 AmBeed 公司。

### 1.3 仪器

MP3035 型湿转电泳槽 (北京凯元信瑞仪器有限公司); 1645052 型电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 恒温水浴锅 (山东欧莱博仪器有限公司); H1650 型离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); NIB610-FL 型倒置光学显微镜 (宁波永新光学股份有限公司); EM ICE 型高压冷冻机 (德国 Leica 公司); HERACELL150i/240i 型细胞培养箱、Talos L120C 型透射电子显微镜、Forma<sup>TM</sup> II 型三气培养箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司)。

## 2 方法

### 2.1 DHI 成分分析

#### 2.1.1 DHI 成分检测

(1) 样品制备: 取 1 mL DHI 至 2 mL 量瓶中, 用含 2% 甲酸的 20% 甲醇水溶液稀释至刻度, 混匀, 10 000 r/min 离心 10 min, 取上清液, 并用 0.22  $\mu$ m 微孔滤膜滤过备用, 入液相小瓶中进行分析。

(2) 色谱条件: Acquity UPLC@BEH C<sub>18</sub> 色谱柱 (50 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7  $\mu$ m), 流动相为 0.05% 甲酸水溶液 (A)-50% 乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~21 min, 0~18% B; 21~27 min, 18%~25% B; 27~36 min, 25%~38% B; 36~39 min, 38%~48% B; 39~44 min, 48% B; 44~54 min, 48%~60% B; 54~60 min, 60%~100% B。检测波长为 0~37 min, 280

nm; 37~60 min, 326 nm; 柱温 25 °C; 体积流量 0.9 mL/min; 进样量 20 μL。

(3) 质谱条件: 电喷雾离子源, 正、负离子检测模式下扫描范围  $m/z$  100~1 500; 毛细管电压为正离子 3.0 kV、负离子 2.5 kV; 喷嘴电压 40 V; 干燥气体积流量 800 L/h; 离子源温度 120 °C; 碰撞气体为氩气, 碰撞能 20~50 eV。

**2.1.2 DHI 成分筛选** 运用 UNIFI 软件对 DHI 进行分析。通过整合 PubChem、SciFinder、Chemicalbook 及 UNIFI 中药数据库的化合物信息, 结合文献调研构建了标准化化合物数据库。采用 UNIFI 软件平台对 Masslynx 采集的“raw”格式原始数据进行系统分析。

## 2.2 DHI 活性成分与潜在靶点的分子对接

利用 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 查找并下载 AMPK、Drp1、FIS1、OPA1、MFN2、NLRP3、ASC、Caspase-1 和 GSMDM 的蛋白质三维结构。利用 PyMOL 软件去除水分子、不相关的蛋白链和原配体, PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获得核心有效成分结构, 利用 AutoDock Vina 进行分子对接, 用 Pymol 软件将结果进行可视化分析<sup>[28]</sup>。

## 2.3 体外实验

**2.3.1 细胞复苏、培养及传代** 将从液氮罐中取出的含 H9c2 细胞冻存管迅速置于 37 °C 水浴箱中解冻, 立即将细胞悬液转入含 5 mL H9c2 专用培养基的离心管中, 1 000 r/min 离心 5 min 后弃去上清液, 加入 5 mL H9c2 专用培养基轻轻吹打混匀后转入培养瓶, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中继续培养。细胞培养过程中使用 H9c2 专用培养基, 当细胞融合度达 70%~90%时, PBS 溶液振荡清洗 2 次, 弃去上清液, 加入 500 μL 胰蛋白酶进行消化; 当细胞完全悬浮后, 立即加入等体积 H9c2 专用培养基终止消化, 充分吹打混匀后, 1 000 r/min 离心 5 min, 弃去上清液。按 1:2 比例进行传代培养, 每 2 d 传代 1 次, 以保证细胞状态良好和实验稳定性。

**2.3.2 H9c2 细胞缺氧/缺糖模型建立与缺氧时间筛选** 为确定建立缺氧/缺糖模型的最佳缺氧时长, 设置不同的缺氧时间点进行筛选。取对数生长期的 H9c2 细胞, 用 H9c2 专用培养基重悬后, 以  $2 \times 10^3$  个/孔分别接种于 6 块 96 孔板中, 置于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 恒温培养箱中培养 24 h, 待细胞充分贴壁。培养结束后, 将用于 0 h 组的板继续置于常规培养箱

中作为对照, 其余 5 块板均弃去原培养液, 更换为低糖 DMEM 培养基, 并立即转移至三气培养箱 (37 °C、1% O<sub>2</sub>、5% CO<sub>2</sub>) 中培养以模拟缺氧状态。分别于培养 2、4、6、8、10 h 时间点取出对应的 96 孔板, 每组 (即每块板) 设立 6 个复孔, 采用 CCK-8 法检测细胞活力, 以评估不同缺氧时间对细胞活力的影响。以对照组细胞活力为基准, 将细胞存活率显著下降且维持在 50%~70%作为缺氧/缺糖损伤模型构建成功且稳定的判断标准。

**2.3.3 CCK-8 法检测细胞活力** 使用 CCK-8 法检测 H9c2 细胞活力。用酶标仪检测在 450 nm 波长处的吸光度 ( $A$ ) 值, 每组重复实验 3 次, 计算细胞相对活力。

$$\text{细胞相对活力} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

**2.3.4 DHI 最佳浓度的筛选** 用低糖培养基将 DHI 稀释成 10 个浓度梯度, 分别为 0、5、10、15、20、25、30、40、60、80 μL/L。取对数生长期的 H9c2 细胞接种到 96 孔板中, 用 H9c2 专用培养液将其重悬后, 以  $2 \times 10^3$  个/孔接种于 96 孔板中, 正常培养 24 h 至细胞充分贴壁后, 弃掉孔内培养液, 将 10 组含 DHI 的低糖培养基分别加到 96 孔板中, 每组设置 6 个复孔, 在三气培养箱培养, 用 CCK-8 法检测细胞活力。

**2.3.5 细胞分组和给药** 采用造模与给药同步进行的方式, 即细胞贴壁后, 吸弃原培养液, 除对照组外, 更换为含有相应药物的低糖 DMEM 培养基, 并转移至三气培养箱中培养, 以同步建立模型并进行药物干预。

根据实验目的不同, 线粒体动力学和功能检测涉及对照组、模型组、DHI 组、DHI+Compound C 组和 AICAR 组; 焦亡相关指标检测则在上述 5 组基础上增加 Mdivi-1 组和 MCC950 组, 共 7 个组。具体分组如下: ①对照组: 将细胞置于 H9c2 专用培养基中, 在含 20% O<sub>2</sub> 和 5% CO<sub>2</sub> 的常规培养箱中培养; ②模型组: 将细胞置于低糖 DMEM 培养基中, 在三气培养箱中培养; ③DHI 组: 将细胞置于含 20 μL/L DHI 的低糖 DMEM 培养基中, 于三气培养箱培养; ④DHI+Compound C 组: 将细胞置于含 20 μL/L DHI 和 25 μmol/L Compound C 的低糖 DMEM 培养基中, 于三气培养箱培养<sup>[29]</sup>; ⑤AICAR 组: 将细胞置于 1 mmol/L AICAR 的低糖 DMEM 培养基中, 于三气培养箱培养<sup>[30]</sup>; ⑥Mdivi-1 组: 将细胞置于 10 μmol/L Mdivi-1 的低糖 DMEM 培养基中, 于三气培养箱培养<sup>[31]</sup>; ⑦MCC950 组: 将细胞置于

含 1  $\mu\text{mol/L}$  MCC950 的低糖 DMEM 培养基中, 于三气培养箱培养<sup>[32]</sup>。其中 Compound C 是一种有效的 AMPK 选择性抑制剂, 用于阻断 AMPK 信号通路; AICAR 是一种 AMPK 激动剂, 用于激活 AMPK; Mdivi-1 是一种线粒体分裂抑制剂, 特异性抑制 Drp1 的三磷酸鸟苷水解酶 (guanosine triphosphate hydrolase, GTPase) 活性; MCC950 是一种特异性 NLRP3 炎性小体抑制剂。

**2.3.6 透射电镜观察** 将细胞培养于 3 mm 蓝宝石圆盘上, 将蓝宝石圆盘细胞面朝上置于平坦铝板上, 以另一块内部凹陷深度为 25  $\mu\text{m}$  的铝板作为盖片。两铝板之间的间隙用十六烷硫醇填充。采用高压冷冻机对样品进行冷冻, 冷冻后迅速转移到液氮中保存。将样品转移到冷冻替代培养基中, 采用 Leica AFS2 冷冻替代系统完成冷冻替代操作。具体程序如下: 样本置于  $-90\text{ }^{\circ}\text{C}$  条件下保温 48 h, 随后用 8 h 梯度升温至  $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 保持 24 h; 以 6 h 梯度升温至  $-30\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 保温 8 h; 以 4 h 梯度升温至  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$ , 保温 4 h; 以 8 h 梯度升温加热至  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 。样品经丙酮洗涤 3 次, 每次 15 min, 进行树脂浸润与包埋, 先于  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  下聚合 12 h, 再于  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  下聚合 48 h, 将聚合后的树脂块用超微切片进行切片, 收集 70 nm 厚的连续切片, 置于 150 目 formvar 膜包被的铜网上, 在 120 kV 加速电压下, 采用透射电子显微镜观察并拍照。

**2.3.7 MMP 检测** 取 25  $\mu\text{L}$  JC-1 (200 $\times$ ), 加入 4 mL 超纯水, 涡旋混匀, 再加入 1 mL JC-1 染色缓冲液 (5 $\times$ ), 充分混匀后即为 JC-1 染色工作液。弃去上清, 加入 PBS 清洗 2 次, 吸去 PBS, 加入上述配好的 JC-1 染色工作液,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  避光孵育 20 min。弃去染色液, 用 PBS 洗涤细胞 3 次。在荧光显微镜下观察并采集图像。JC-1 探针在线粒体基质中, 产生红色荧光; 当 MMP 降低时, JC-1 以单体形式存在于细胞质中, 产生绿色荧光。结果以红色荧光与绿色荧光强度的比值 (红/绿荧光比) 作为 MMP 的相对评价指标, 比值越高表示 MMP 越高。

**2.3.8 mtROS 水平检测** 取 MitoSOX<sup>TM</sup>, 加入 13  $\mu\text{L}$  DMSO, 混匀, 配制为 5 mmol/L 储备液。取 5 mL HBSS, 加入 1  $\mu\text{L}$  MitoSOX<sup>TM</sup> 储备液和 5  $\mu\text{L}$  Hoechst33342, 充分混匀后为染色工作液。弃去细胞培养液, HBSS 洗涤细胞 1~2 次; 加入 1 mL 配制好的染色工作液,  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  细胞培养箱内孵育 20 min。用 HBSS 洗涤细胞 2 次, 加入 1 mL HBSS,

于共聚焦显微镜下观察并拍照。

**2.3.9 Western blotting 检测相关蛋白表达** 于 25 mL 细胞培养瓶中培养 H9c2 细胞, 待细胞生长至对数期时, 按照组别予以相应处理 24 h 后, 收集细胞, 加入含 1% 蛋白酶抑制剂和 1% 磷酸化蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解混合液提取蛋白, BCA 法测定蛋白浓度。SDS-PAGE 电泳分离蛋白, 转膜, 封闭, 经一抗、二抗孵育, 显影成像, 通过 Image J 软件分析条带灰度值, 并计算蛋白相对表达水平。

**2.3.10 免疫荧光检测 DRP1 和 p-AMPK 蛋白表达** 按照组别予以相应处理 24 h 后, 吸出 6 孔板内的培养液, 加入多聚甲醛固定爬片 15 min, PBS 浸洗 3 次, 每次 5 min, 加入 0.1% TritonX-100 破膜 15 min, PBST 浸洗 3 次, 每次 5 min。滴加非免疫正常山羊血清 100~200  $\mu\text{L}$ , 室温孵育 30 min。甩去封闭液, 滴加 100~200  $\mu\text{L}$  p-DRP1 (1:200) 和 p-AMPK (1:3000) 一抗, 于  $4\text{ }^{\circ}\text{C}$  孵育过夜。PBST 浸洗 3 次, 每次 5 min, 滴加 Cy3 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (1:200), 室温孵育 50 min, PBST 浸洗 5 次, 每次 5 min。玻片置于 PBS (pH 7.4) 中, 在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍甩干后在圈内滴加 DAPI 染液, 室温避光孵育 10 min。玻片置于 PBS 中, 在脱色摇床上晃动洗涤 3 次, 每次 5 min。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片。切片于荧光显微镜下观察并采集图像。

**2.3.11 ELISA 检测 IL-1 $\beta$  和 IL-18 水平** 按照组别予以相应处理 24 h 后, 按照试剂盒说明书检测 ATP、IL-1 $\beta$  和 IL-18 水平。

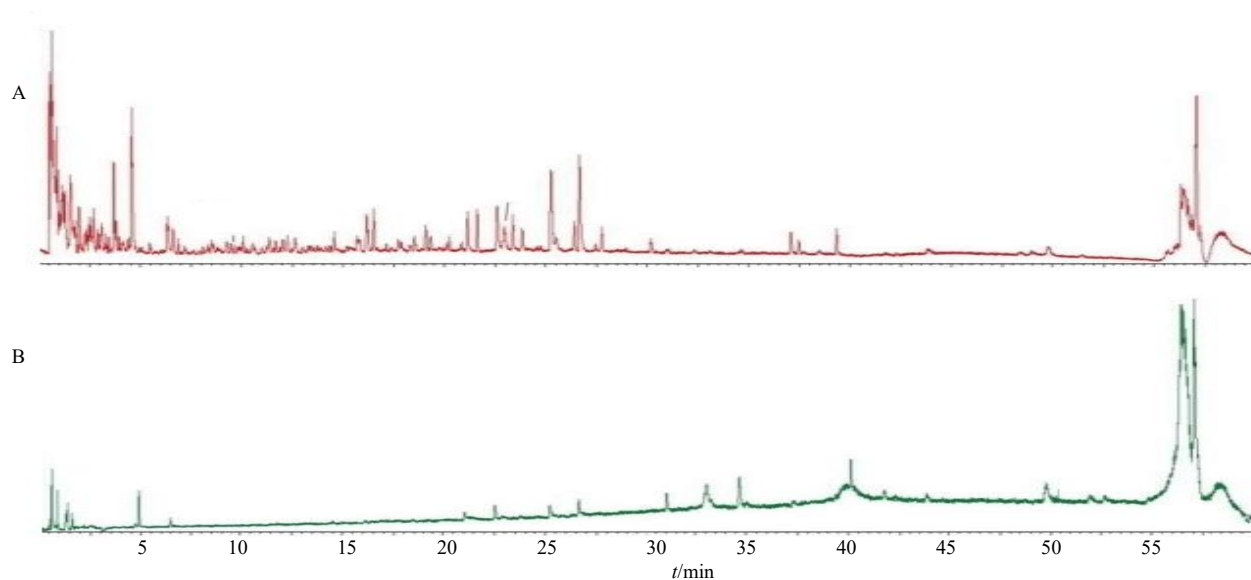
## 2.4 统计学分析

数据采用 SPSS 24.0 软件进行分析, 以  $\bar{x} \pm s$  表示。两组间比较若数据符合正态分布和满足方差齐性, 用独立样本  $t$  检验; 若不满足正态分布, 则用秩和检验。多组间比较, 采用单因素方差分析 (ANOVA) 评估组间差异, 采用 LSD 检验进行多重线性比较。

## 3 结果

### 3.1 DHI 成分分析

采用 UPLC-Q-TOF-MS 技术对 DHI 的化学成分进行分析。结果显示, 在正、负离子模式下共检测到多种主要成分 (图 1), 经二级质谱碎片信息与文献及数据库对照, 发现丹酚酸、紫草酸 B、丹参素、咖啡酸和丹参素钠等 8 种有效成分是 DHI 药效物质基础的重要组成部分 (表 1)。



A-正离子模式; B-负离子模式。  
A-positive ion mode; B-negative ion mode.

图 1 DHI 的代表性基峰色谱图

Fig. 1 Representative base peak chromatograms of DHI

表 1 DHI 主要化学成分

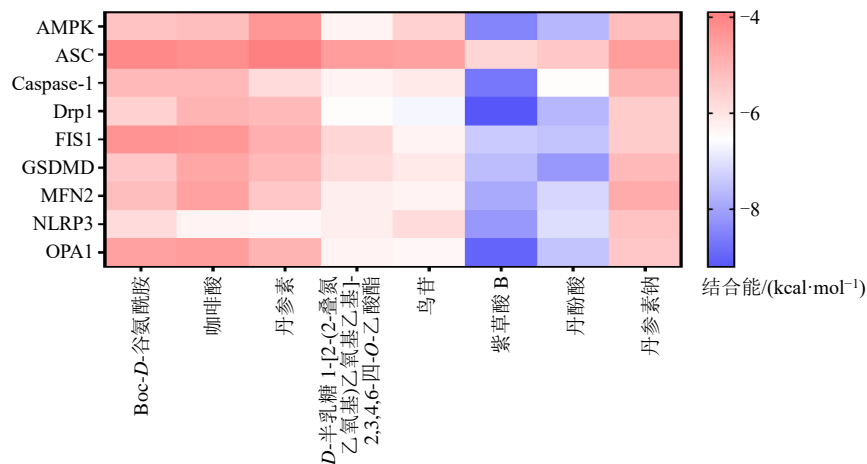
Table 1 Main chemical components of DHI

序号	$t_R$ /min	离子模式	加合物	理论值 ( $m/z$ )	实测值 ( $m/z$ )	误差 ( $\times 10^{-6}$ )	分子式	二级质谱碎片 ( $m/z$ )	化合物
1	9.6	$[M+H]^+$	+H, -OH	246.121 5	247.129 4	2.54	$C_{10}H_{18}N_2O_5$	147.050 5	Boc-D-谷氨酰胺
2	21.1	$[M+H]^+$	+Na	180.042 3	203.031 8	1.35	$C_9H_8O_4$	147.042 3	咖啡酸
3	22.6	$[M+H]^+$	-OH	198.052 8	181.047 8	-9.63	$C_9H_{10}O_5$	163.037 6	丹参素
4	14.5	$[M+H]^+$	+K	505.190 8	544.155 3	2.48	$C_{20}H_{31}N_3O_{12}$	149.103 2	D-半乳糖 1-[2-(2-叠氮乙氧基)乙氧基乙基]-2,3,4,6-四-O-乙酸酯
5	0.6	$[M+H]^+$	+Li	283.091 7	290.107 0	-0.32	$C_{10}H_{13}N_5O_5$	203.061 0, 85.030 6, 145.055 3	鸟苷
6	25.3	$[M+H]^+$	-e, +H, +NH <sub>4</sub> , -OH	718.153 4	718.151 8	-1.42	$C_{36}H_{30}O_{16}$	139.038 3, 295.259 3, 323.054 4	紫草酸 B
7	20.3	$[M+H]^+$	+H	494.121 3	495.127 6	-2.04	$C_{26}H_{22}O_{10}$	312.060 7	丹酚酸
8	21.1	$[M+H]^+$	+H, -OH	220.034 8	221.042 5	1.99	$C_9H_9NaO_5$	147.042 3	丹参素钠
9	26.6	$[M-H]^-$	-H, +e	494.121 3	493.113 6	-0.76	$C_{26}H_{22}O_{10}$	185.021 9, 295.058 9, 321.038 7	丹酚酸

### 3.2 分子对接结果

为进一步阐明 DHI 对 AMPK/Drp1 信号通路、线粒体动力学相关蛋白和细胞焦亡的潜在调控机制, 采用 AutoDock Vina 分子对接技术, 对质谱鉴定所得主要化学成分与 AMPK、Drp1、OPA1 及 Caspase-1 等靶蛋白的结合能力进行分析。结果如图 2 所示, DHI 中各有效成分与上述靶点均表现出较强的结合亲和力, 其中紫草酸 B 在多靶点上表现出最优的结合活性, 与 Drp1 的结合能最强 (-9.2

kcal/mol, 1 kcal/mol=4.182 kJ/mol), 其次为 OPA1 (-9.0 kcal/mol)、Caspase-1 (-8.7 kcal/mol) 及 AMPK (-8.5 kcal/mol)。从分子对接模式分析(图 3)可见, 紫草酸 B 在与 Drp1、OPA1、Caspase-1 及 AMPK 结合时, 均能通过氢键、疏水相互作用堆积等多种非共价键发生较强的相互作用, 提示其可能形成稳定的复合物。以上结果表明紫草酸 B 可能通过多靶点协同调控线粒体分裂-融合平衡、能量代谢稳态, 从而抑制细胞焦亡的发生。



1 kcal·mol<sup>-1</sup> = 4.182 kJ·mol<sup>-1</sup>.

图 2 分子对接结果热图

Fig. 2 Molecular docking results heatmap

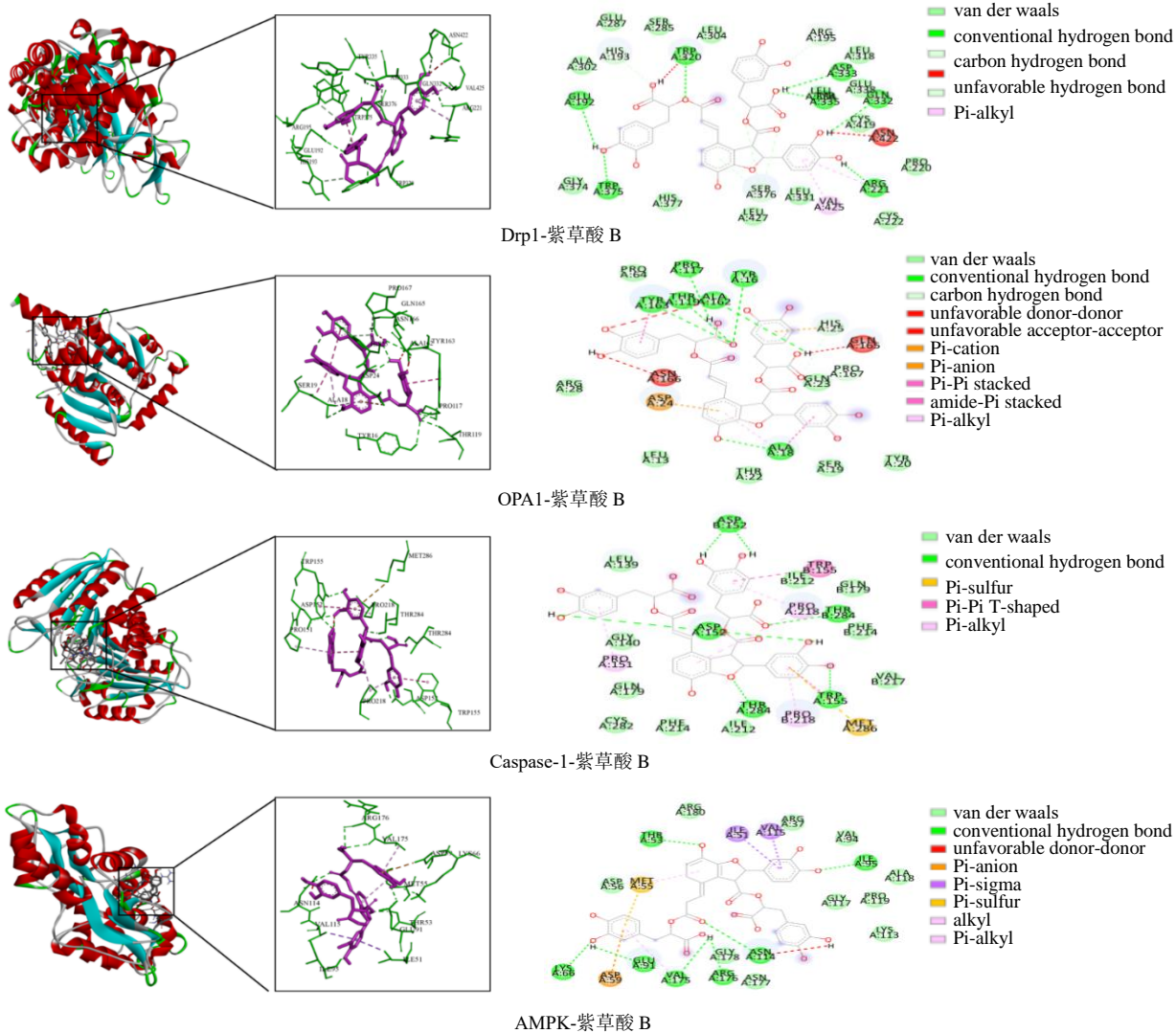


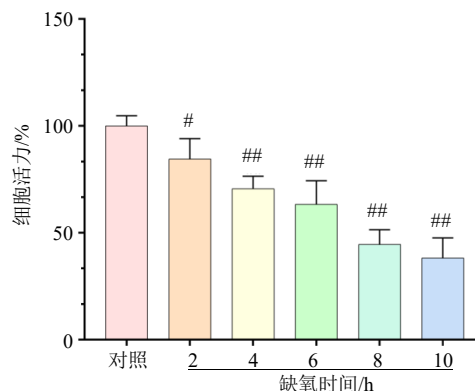
图 3 代表性分子对接图

Fig. 3 Representative molecular docking diagram

### 3.3 缺氧时间与 DHI 浓度的筛选

**3.3.1 不同缺氧时间对 H9c2 细胞活力的影响** 如图 4 所示, 与对照组比较, 随着缺氧时间的增加, 细胞活力逐渐降低 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 考虑到缺氧 8 h 对细胞造成的损伤较为明显, 而缺氧 6 h 细胞活力适中 (63.32%), 因此选用缺氧 6 h 构建细胞缺氧缺糖模型。

**3.3.2 不同浓度 DHI 对 H9c2 细胞活力的影响** H9c2 细胞在常规培养情况下培养 6 h 后, 与对照组比较, 5~80  $\mu\text{L/L}$  DHI 对 H9c2 细胞活力无显著影响, 表明 5~80  $\mu\text{L/L}$  DHI 对细胞无明显毒性作用。而 H9c2 细胞处于缺氧缺糖情况下培养 6 h 后, 与对照组比较, 10~30  $\mu\text{L/L}$  DHI 显著提高 H9c2 细胞活力 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 其中 20  $\mu\text{L/L}$  最为明显, 因此, 采用 20  $\mu\text{L/L}$  DHI 进行后续实验。



与对照组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ , 图 5 同。

# $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs control group, same as Fig. 5.

图 4 不同缺氧时间对 H9c2 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 4 Effect of different hypoxia times on viability of H9c2 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

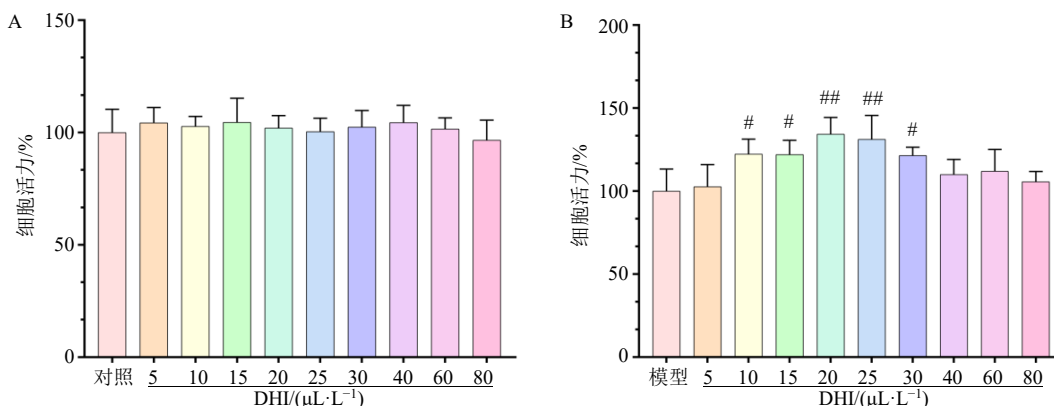


图 5 DHI 毒性 (A) 及最佳干预浓度筛选 (B) ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 5 Cytotoxicity (A) and optimal intervention concentration screening (B) of DHI ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 3.4 DHI 通过调控 AMPK/Drp1 通路保护线粒体功能

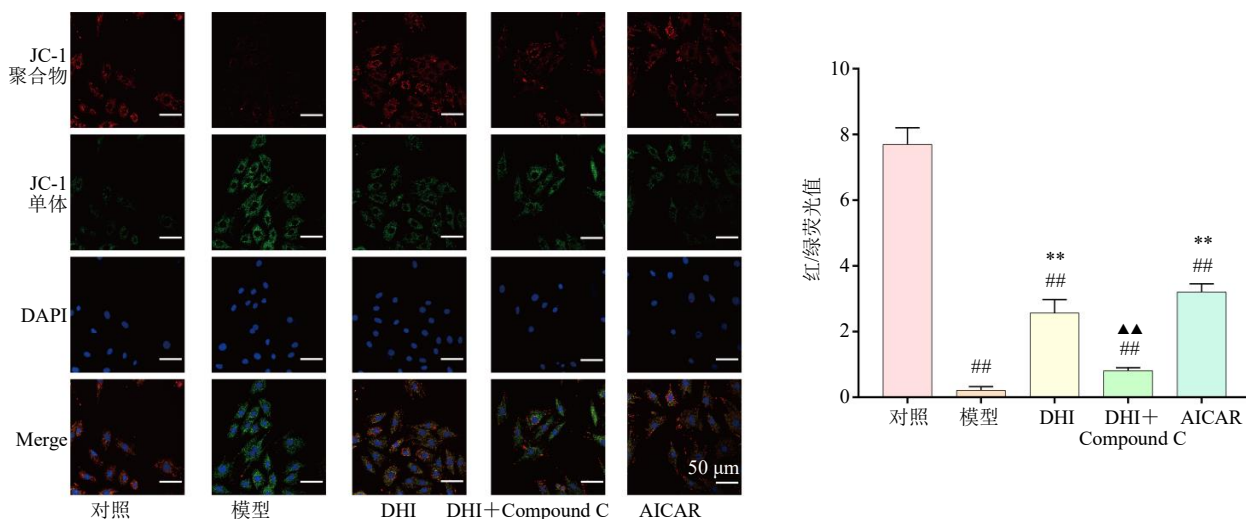
为了评价 DHI 对线粒体动力学及功能的影响, 设置对照组、模型组、DHI 组、DHI+Compound C 组和 AICAR 组进行分析。

**3.4.1 各组细胞 MMP 水平** 采用 JC-1 探针检测各组 H9c2 细胞 MMP 变化, 以反映线粒体功能状态。结果如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组细胞红色荧光明显减弱, 绿色荧光增强, 红/绿荧光值显著降低 ( $P < 0.01$ ), 提示缺氧缺糖条件导致线粒体去极化, MMP 水平明显下降。与模型组比较, DHI 干预后红色荧光增强、绿色荧光减弱, 红/绿荧光值显著升高 ( $P < 0.01$ ), 说明 DHI 能有效抑制缺氧缺糖诱导的线粒体膜电位丧失, 提示其具有明显的线粒体

保护作用。AMPK 激动剂 AICAR 组亦表现出类似趋势, 红色荧光增强、绿色荧光减弱, 红/绿荧光值显著升高 ( $P < 0.01$ ), 提示 DHI 与 AMPK 激活在功能效应上具有一致性。AMPK 抑制剂 Compound C 能明显削弱 DHI 对 MMP 的改善作用 ( $P < 0.01$ ), 表现为红色荧光减弱、红/绿荧光值下降。以上结果表明, DHI 改善线粒体功能的作用可能通过激活 AMPK/Drp1 信号通路实现。

**3.4.2 各组细胞 ATP 水平** 如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组 ATP 水平显著降低 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, DHI 组和 AICAR 组 ATP 水平显著升高 ( $P < 0.01$ ), AMPK 抑制剂 Compound C 能明显削弱 DHI 对 ATP 水平的改善作用 ( $P < 0.01$ )。

**3.4.3 各组细胞 mtROS 水平** 采用 MitoSOX™ 红



与对照组比较: # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$ ; 与模型组比较: \*\* $P < 0.01$ ; 与DHI组比较: ▲ $P < 0.05$  ▲▲ $P < 0.01$ , 下图同。  
 # $P < 0.05$  ## $P < 0.01$  vs control group; \*\* $P < 0.01$  vs model group; ▲ $P < 0.05$  ▲▲ $P < 0.01$  vs DHI group, same as below figures.

图6 各组细胞MMP水平 ( $\times 200$ ;  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 6 MMP level of cells in each group ( $\times 200$ ;  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

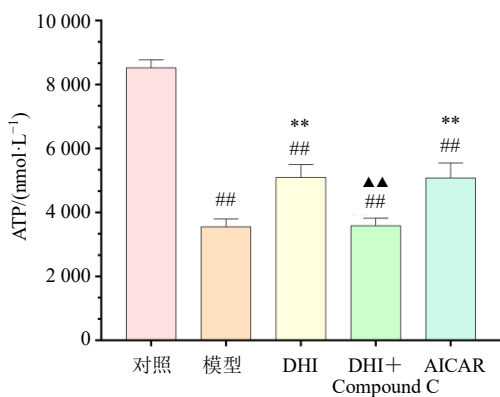


图7 各组细胞ATP水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Fig. 7 ATP level of cells in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

色荧光探针检测各组H9c2细胞mtROS生成情况。结果如图8所示,与对照组比较,模型组红色荧光显著增强,mtROS平均荧光强度显著升高( $P < 0.01$ ),提示缺氧缺糖处理导致线粒体氧化损伤及ROS过量积聚。与模型组比较,DHI组和AICAR组mtROS水平显著降低( $P < 0.01$ ),荧光强度明显减弱,表明DHI能够有效抑制缺氧缺糖条件下的mtROS生成,从而减轻氧化应激损伤。而Compound C可显著拮抗DHI对mtROS的抑制作用,表现为红色荧光增强、平均荧光强度升高。以上结果提示DHI减轻线粒体氧化应激的作用依赖于AMPK信号通路的激活。

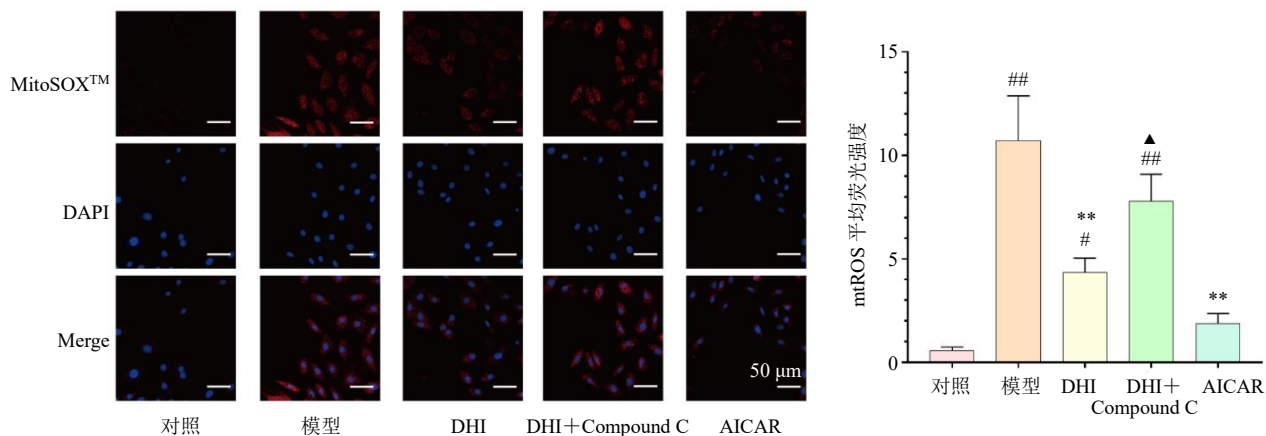
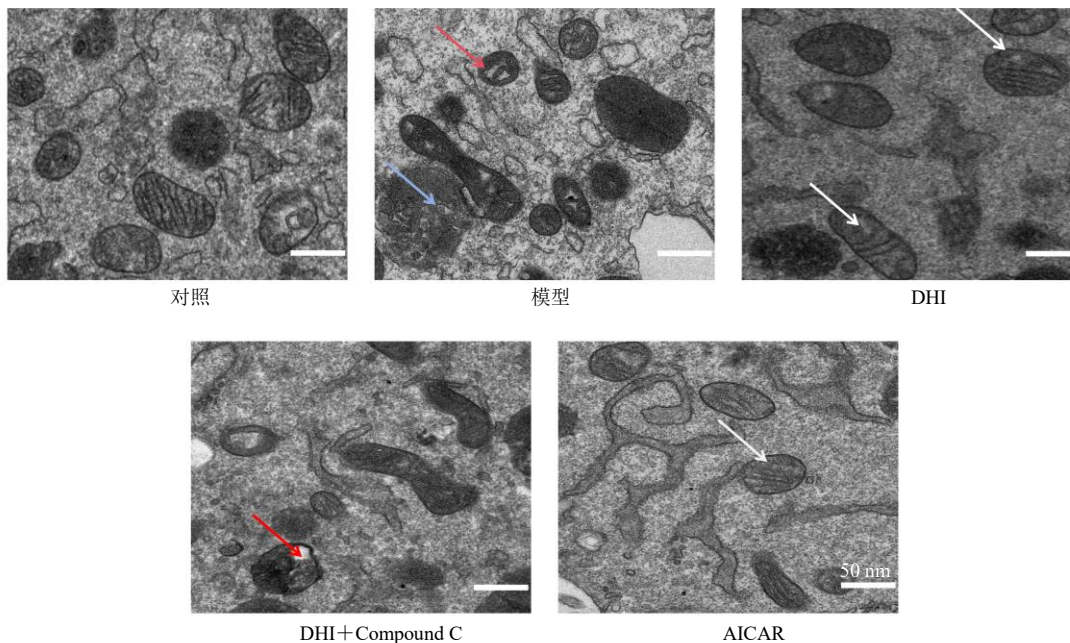


图8 各组细胞mtROS水平 ( $\times 200$ ;  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 8 mtROS level of cells in each group ( $\times 200$ ;  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

**3.4.4 各组细胞超微结构变化** 采用透射电子显微镜观察各组 H9c2 细胞线粒体的超微结构变化, 结果如图 9 所示。对照组线粒体形态完整, 数量丰富, 外膜连续光滑, 嵴结构清晰规则, 基质致密, 为正常线粒体形态。模型组细胞线粒体形态严重异常, 表现为明显肿胀、膜结构模糊、破裂、嵴断裂, 部分出现空泡样变, 提示缺氧缺糖处理导致线粒体

结构严重受损。与模型组相比, DHI 组线粒体形态明显改善, 外膜连续, 嵴结构相对完整, 数量增加, 基质密度恢复接近正常。AICAR 组表现出相似的形态改善, 线粒体结构接近对照组。DHI 与 Compound C 联合处理后, 线粒体损伤程度较 DHI 组加重, 部分嵴断裂及空泡化仍可见, 提示 AMPK 信号通路的抑制会削弱 DHI 的线粒体保护作用。



蓝色箭头表示肿胀的线粒体, 红色箭头表示线粒体空泡化, 白色箭头表示结构相对完整、功能改善的线粒体。

Blue arrow represents swollen mitochondria, red arrow represents mitochondrial vacuolization, white arrow represents mitochondria with relatively intact structure and improved function.

图 9 各组细胞超微结构变化 (×20 000)

Fig. 9 Changes in ultrastructure of cells in each group (×20 000)

**3.4.5 免疫荧光检测 AMPK/Drp1 通路相关蛋白表达** 为进一步验证 DHI 通过 AMPK/Drp1 信号通路调控线粒体功能的机制, 采用免疫荧光染色法检测各组 H9c2 细胞中 p-AMPK 与 p-Drp1 的表达水平。结果如图 10、11 所示, 与对照组比较, 模型组细胞内 p-AMPK 的荧光信号显著减弱 ( $P < 0.01$ ), 提示缺氧缺糖条件下 AMPK 磷酸化水平下降; 同时, p-Drp1 的荧光强度显著增强 ( $P < 0.01$ ), 表明 Drp1 过度磷酸化导致线粒体过度分裂。与模型组比较, DHI 处理后细胞内 p-AMPK 信号明显增强 ( $P < 0.01$ ), 而 p-Drp1 荧光强度显著降低 ( $P < 0.01$ ); AICAR 组表现出类似的趋势, 与 DHI 组作用效果相近, 提示 DHI 可有效激活 AMPK 信号并抑制 Drp1 过度磷酸化, 从而维持线粒体动力学平衡。此外, 当细胞同时接受 Compound C 与 DHI 联合处理时, p-AMPK

水平较 DHI 组下降, p-Drp1 表达再次升高, 表明 AMPK 信号阻断可部分拮抗 DHI 的保护作用。

**3.4.6 Western blotting 检测 AMPK/Drp1 通路以及线粒体动力学相关蛋白表达** 采用 Western blotting 法检测各组 H9c2 细胞中 AMPK/Drp1 信号通路及线粒体动力学相关蛋白 (OPA1、MFN2、FIS1) 的表达变化, 结果如图 12 和表 2 所示。与对照组比较, 模型组 p-AMPK/AMPK 值显著下降 ( $P < 0.01$ ), p-Drp1/Drp1 值明显升高 ( $P < 0.01$ ), 同时线粒体融合相关蛋白 OPA1 与 MFN2 表达显著降低 ( $P < 0.01$ ), 分裂相关蛋白 FIS1 表达明显升高 ( $P < 0.01$ ), 提示缺氧缺糖诱导下 AMPK 信号通路受到抑制, 线粒体动力学平衡被破坏, 表现为过度分裂状态。与模型组比较, DHI 干预后 p-AMPK/AMPK 值显著升高 ( $P < 0.01$ ), p-Drp1/Drp1 值及 FIS1 表达显著降

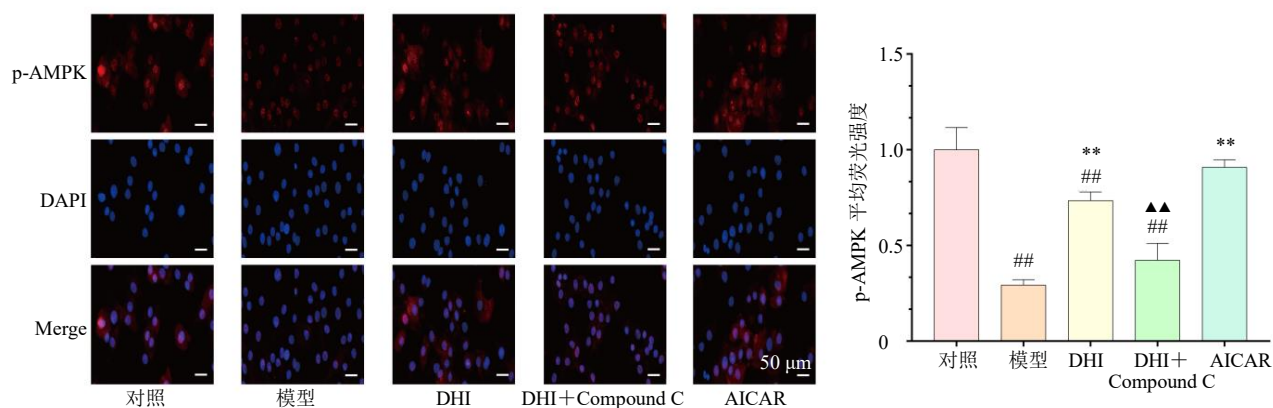


图 10 各组细胞 p-AMPK 蛋白表达 (×200;  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 10 Expression of p-AMPK protein of cells in each group (× 200;  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

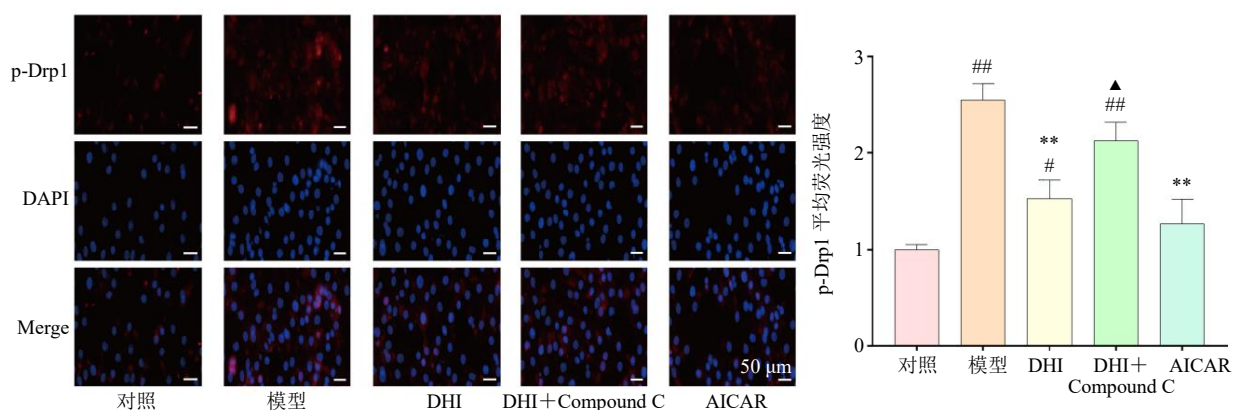


图 11 各组细胞 p-Drp1 蛋白表达 (×200;  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 11 Expression of p-Drp1 protein of cells in each group (× 200;  $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

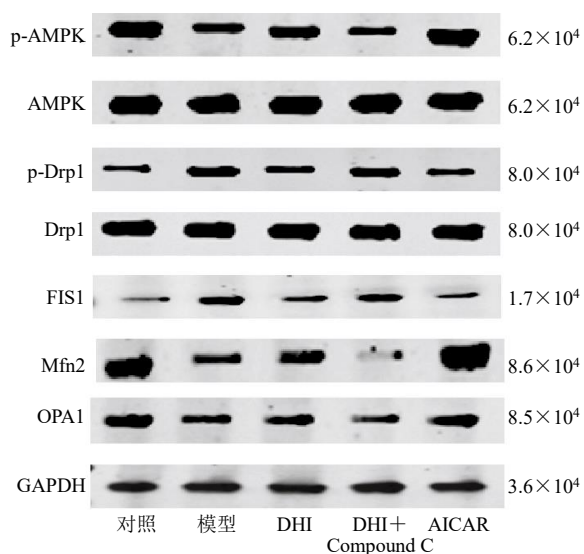


图 12 各组细胞 AMPK/Drp1 通路及线粒体动力学相关蛋白表达

Fig. 12 AMPK/Drp1 pathway and mitochondrial dynamics-related protein expressions of cells in each group

低 ( $P < 0.01$ ), 而 OPA1 与 MFN2 的表达显著上调 ( $P < 0.01$ ); AICAR 组亦表现出类似结果, 与 DHI 组变化趋势一致, 表明 DHI 可有效激活 AMPK 信号通路, 促进线粒体融合、抑制过度分裂, 从而维持线粒体动力学稳态。然而使用 Compound C 后, 以上指标结果均有所逆转, 表明 DHI 通过激活 AMPK/Drp1 信号通路, 促进线粒体融合蛋白 (OPA1、MFN2) 上调, 抑制分裂蛋白 (p-Drp1、FIS1) 过度表达, 从而改善线粒体动力学失衡, 发挥细胞保护作用。

### 3.5 DHI 通过调控 AMPK/Drp1 通路抑制 NLRP3 介导的 H9c2 细胞焦亡

为了进一步验证 DHI 抑制焦亡的机制, 设置对照组、模型组、DHI 组、DHI+Compound C 组、AICAR 组、Mdivi-1 组和 MCC950 组进行分析。

3.5.1 Western blotting 检测 NLRP3、ASC、Caspase-1 和 GSDMD-NT 蛋白表达 如图 13 和表 3 所示,

表 2 各组细胞 AMPK/Drp1 通路及线粒体动力学相关蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 2 AMPK/Drp1 pathway and mitochondrial dynamics-related protein expressions of cells in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量	p-AMPK/AMPK	p-Drp1/Drp1	FIS1/GAPDH	MFN2/GAPDH	OPA1/GAPDH
对照	—	0.92 ± 0.07	0.32 ± 0.09	0.32 ± 0.13	1.11 ± 0.22	1.03 ± 0.09
模型	—	0.41 ± 0.07 <sup>##</sup>	0.76 ± 0.04 <sup>##</sup>	0.94 ± 0.21 <sup>##</sup>	0.28 ± 0.07 <sup>##</sup>	0.29 ± 0.09 <sup>##</sup>
DHI	20 μL·L <sup>-1</sup>	0.71 ± 0.05 <sup>**</sup>	0.49 ± 0.04 <sup>**</sup>	0.57 ± 0.15 <sup>**</sup>	0.64 ± 0.13 <sup>***</sup>	0.55 ± 0.08 <sup>****</sup>
DHI+Compound C	20 μL·L <sup>-1</sup> +25 μmol·L <sup>-1</sup>	0.38 ± 0.11 <sup>##▲</sup>	0.67 ± 0.08 <sup>##▲</sup>	0.81 ± 0.10 <sup>#</sup>	0.13 ± 0.03 <sup>##▲▲</sup>	0.24 ± 0.06 <sup>##▲▲</sup>
AICAR	1 mmol·L <sup>-1</sup>	0.90 ± 0.10 <sup>**</sup>	0.42 ± 0.03 <sup>**</sup>	0.32 ± 0.09 <sup>**</sup>	1.44 ± 0.21 <sup>**</sup>	0.87 ± 0.08 <sup>**</sup>

与对照组比较: #P<0.05 ##P<0.01; 与模型组比较: \*\*P<0.01; 与 DHI 组比较: ▲P<0.05 ▲▲P<0.01, 表 3、4 同。

#P<0.05 ##P<0.01 vs control group; \*\*P<0.01 vs model group; ▲P<0.05 ▲▲P<0.01 vs DHI group, same as tables 3, 4.

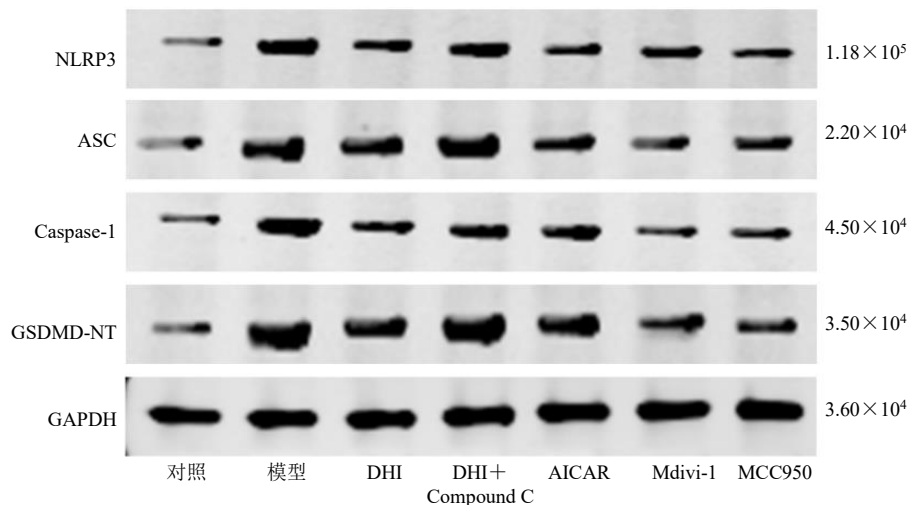


图 13 各组细胞 AMPK/Drp1 通路及线粒体动力学相关蛋白表达

Fig. 13 AMPK/Drp1 pathway and mitochondrial dynamics-related protein expressions of cells in each group

表 3 各组细胞 AMPK/Drp1 通路及线粒体动力学相关蛋白表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 3 AMPK/Drp1 pathway and mitochondrial dynamics-related protein expressions of cells in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

组别	剂量	NLRP3/GAPDH	ASC/GADPH	Caspase-1/GAPDH	GSDMD-NT/GAPDH
对照	—	0.23 ± 0.09	0.18 ± 0.05	0.16 ± 0.04	0.13 ± 0.01
模型	—	0.78 ± 0.04 <sup>##</sup>	0.85 ± 0.07 <sup>##</sup>	0.82 ± 0.05 <sup>##</sup>	0.83 ± 0.07 <sup>##</sup>
DHI	20 μL·L <sup>-1</sup>	0.43 ± 0.02 <sup>###</sup>	0.58 ± 0.16 <sup>###</sup>	0.38 ± 0.06 <sup>###</sup>	0.50 ± 0.09 <sup>###</sup>
DHI+Compound C	20 μL·L <sup>-1</sup> +25 μmol·L <sup>-1</sup>	0.60 ± 0.05 <sup>###▲▲</sup>	0.84 ± 0.10 <sup>##▲</sup>	0.61 ± 0.04 <sup>###▲▲</sup>	0.81 ± 0.12 <sup>##▲▲</sup>
AICAR	1 mmol·L <sup>-1</sup>	0.42 ± 0.02 <sup>###</sup>	0.46 ± 0.10 <sup>###</sup>	0.47 ± 0.01 <sup>###</sup>	0.52 ± 0.04 <sup>###</sup>
Mdivi-1	10 μmol·L <sup>-1</sup>	0.43 ± 0.01 <sup>###</sup>	0.34 ± 0.05 <sup>**</sup>	0.29 ± 0.01 <sup>**</sup>	0.30 ± 0.02 <sup>**</sup>
MCC950	1 μmol·L <sup>-1</sup>	0.24 ± 0.07 <sup>**</sup>	0.30 ± 0.05 <sup>**</sup>	0.28 ± 0.02 <sup>**</sup>	0.18 ± 0.02 <sup>**</sup>

与对照组比较, 模型组 NLRP3、ASC、Caspase-1 和 GSDMD-NT 蛋白表达显著上调 ( $P < 0.01$ ); 与模型组比较, DHI 处理后 NLRP3、ASC、Caspase-1 和 GSDMD-NT 的蛋白表达显著下调 ( $P < 0.01$ ), 与 AICAR (AMPK 激动剂)、MCC950 (NLRP3 抑制剂)、Mdivi-1 (Drp1 抑制剂) 的抑制作用一致。然而, 用 Compound C 预处理后抑制了 DHI 的上述作用。以上结果表明 DHI 能通过调控 AMPK/Drp1 通路抑制 NLRP3 介导的细胞焦亡。

### 3.5.2 ELISA 检测炎症因子水平 采用 ELISA 检

测各组 H9c2 细胞 IL-1 $\beta$  和 IL-18 水平, 以评估焦亡相关炎症水平。结果见表 4, 与对照组比较, 模型组 IL-1 $\beta$  与 IL-18 水平均显著升高 ( $P < 0.01$ ), 提示缺氧缺糖处理诱导了明显的炎症反应与焦亡介导的细胞因子释放。与模型组比较, DHI 显著抑制 IL-1 $\beta$  与 IL-18 的释放 ( $P < 0.01$ ); AICAR 与 Mdivi-1 表现出与 DHI 相似的抑制效果 ( $P < 0.01$ ), MCC950 作为阳性对照同样显著下调二者水平 ( $P < 0.01$ )。相反, 用 AMPK 抑制剂 Compound C 可以部分减少 DHI 对于炎症的抑制作用。

表4 各组细胞 IL-1 $\beta$  和 IL-18 水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )  
Table 4 IL-1 $\beta$  and IL-18 levels of cells in each group ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	剂量	IL-1 $\beta$ /(pg·mL <sup>-1</sup> )	IL-18/(pg·mL <sup>-1</sup> )
对照	—	78.31 ± 6.65	307.70 ± 17.70
模型	—	116.00 ± 11.35 <sup>##</sup>	592.41 ± 41.12 <sup>##</sup>
DHI	20 $\mu$ L·L <sup>-1</sup>	92.70 ± 8.08 <sup>***</sup>	386.11 ± 18.55 <sup>***</sup>
DHI+Compound C	20 $\mu$ L·L <sup>-1</sup> +25 $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	108.50 ± 10.33 <sup>##▲▲</sup>	496.32 ± 34.03 <sup>***▲▲</sup>
AICAR	1 mmol·L <sup>-1</sup>	85.35 ± 6.86 <sup>**</sup>	389.02 ± 62.79 <sup>***</sup>
Mdivi-1	10 $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	87.80 ± 6.03 <sup>**</sup>	417.99 ± 35.18 <sup>***</sup>
MCC950	1 $\mu$ mol·L <sup>-1</sup>	82.65 ± 6.11 <sup>**</sup>	343.20 ± 31.09 <sup>**</sup>

#### 4 讨论

DHI 是由丹参和红花提取而成的一种中药制剂, 具有活血化痰、通脉舒络的效果<sup>[33]</sup>。现代药理学研究表明, DHI 能有效改善血脂相关指标, 清除氧自由基, 抑制血小板聚集, 调节内皮细胞生成, 减轻心脏前后负荷, 改善心室重构, 从而提高心功能<sup>[34-36]</sup>。本研究通过 UHPLC-MS 技术鉴定出 DHI 含有丹酚酸、紫草酸 B、丹参素、咖啡酸和丹参素钠等 8 种活性成分。分子对接结果显示, 上述活性成分与 AMPK、Drp1、OPA1 及 Caspase-1 等关键靶蛋白均具有较强的结合亲和力。其中紫草酸 B 与多靶点的结合活性最强, 结合 UHPLC-MS 获得的色谱峰相对丰度信息, 紫草酸 B 的相对丰度较高, 进一步说明紫草酸 B 为 DHI 潜在关键药效成分。而相关研究表明, 紫草酸 B 具有显著的抗氧化活性, 能够清除过量活性氧, 减轻心肌细胞氧化应激损伤, 提高超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD) 和过氧化氢酶活性, 降低心肌缺血/再灌注损伤后的丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 水平, 降低 c-Jun 氨基末端激酶 3 (c-Jun N-terminal kinase 3, JNK3) 活性, 减少心肌细胞凋亡, 维持心肌细胞 MMP, 改善 ATP 合成, 减轻缺氧/缺血条件下的能量代谢障碍等作用<sup>[37-39]</sup>。综上, DHI 可能主要通过紫草酸 B 发挥调控线粒体动力学平衡及 NLRP3 炎性小体活化, 从而发挥心肌保护作用。

AMPK 是一种关键的能量感应酶, 广泛存在于真核生物中, 在细胞能量代谢的调节中起着至关重要的作用<sup>[40-41]</sup>。AMPK 是一个异源三聚体复合物, 由 3 个亚单位组成, 分别为  $\alpha$  亚单位 (C 端催化域)、 $\beta$  亚单位 (中间结构域) 和  $\gamma$  亚单位 (N 端调节域), 其中  $\alpha$ -亚基 N 端包含 1 个保守的丝氨酸/苏氨酸 (Ser/Thr) 激酶区, 具有 1 个保守的苏氨酸 (Thr-172) 位点, 负责 AMPK 的磷酸化和激酶活性。 $\beta$  亚单位含有保守的糖原结合域, 参与 AMPK 与糖原的

结合, 可能还涉及 AMPK 的激活。 $\gamma$  亚单位含有 4 个串联重复的钙调蛋白 (calmodulin, CaM) 结构域, 这些结构域可以结合 AMP 和 ATP, 而 AMP 的结合是 AMPK 激活的关键步骤<sup>[42-44]</sup>。AMPK 可参与线粒体动力学的调控中<sup>[45-48]</sup>, 通过调节 Drp1 的表达, 发挥改善线粒体功能障碍的作用, Ser616 是 Drp1 上的重要丝氨酸磷酸化位点, 当 Ser616 磷酸化时能增加 Drp1 活性。因此当 AMPK 上的 Thr172 位点磷酸化后, 引起 AMPK 活化, 抑制下游 Drp1 上的 Ser616 位点磷酸化, 从而纠正过度的线粒体分裂, 维持线粒体动力学的稳定<sup>[49-50]</sup>。维持线粒体动力学的稳态是保障线粒体正常生理功能的基础。融合过程有助于混合线粒体内容物, 稀释受损组分; 而分裂则负责清除受损部分并促进线粒体增殖<sup>[51]</sup>。一旦这一动态平衡失调, 如 Drp1 介导的分裂持续增强, 将导致线粒体网络过度片段化。片段化的线粒体其呼吸链复合物效率降低, 增加了电子在传递过程中的泄漏概率, 从而诱导大量 mtROS 的生成<sup>[22]</sup>。此外, mtROS 本身会进一步攻击线粒体膜脂质和蛋白质, 加剧膜通透性的改变, 最终导致 MMP 的降低。MMP 的降低意味着线粒体合成 ATP 的能力严重受损, 细胞能量供应出现危机。mtROS 的过度积累和 MMP 的异常不仅是线粒体损伤的直接标志, 也是启动焦亡的关键上游事件, 进一步加剧了细胞损伤<sup>[52]</sup>。

本研究发现, 模型组 H9c2 细胞线粒体超微结构明显损伤, 功能学检测表明, 与对照组相比, 模型组 MMP 水平降低, mtROS 水平显著增加, 表明线粒体存在氧化磷酸化偶联障碍。Western blotting 结果表明, 线粒体分裂相关蛋白 p-Drp1、FIS1 蛋白表达显著上调, p-AMPK 和融合相关蛋白 OPA1、MFN2 表达显著下调, 表明缺氧缺糖微环境可触发线粒体分裂-融合稳态失衡, 线粒体结构和功能发生异常, 导致能量代谢紊乱。DHI 干预后, 线粒体形

态明显改善, MMP 水平显著提高、mtROS 释放量减少, 其结果与 AICAR (AMPK 激动剂) 一致, 表明 DHI 对线粒体具有保护作用, 而用 AMPK 抑制剂 (Compound C) 处理后削弱 DHI 对线粒体的保护作用, 表明 DHI 对线粒体的形态和功能改善作用与 AMPK 的激活有关。免疫荧光结果也说明, DHI 干预后 p-AMPK 表达上升、p-Drp1 表达降低, 其结果与 AICAR 作用效果相近, 表明 DHI 对线粒体动力学的调控可能与 AMPK 激活有关, AMPK 抑制剂与 DHI 联合作用于细胞后, p-AMPK 的活化受到抑制, 而下游的 Drp1 表达升高, 对线粒体动力学的改善作用减弱, 进一步说明了 DHI 通过激活 AMPK/Drp1 通路从而纠正线粒体动力学紊乱。

线粒体动力学失衡导致的片段化, 会通过多种机制激活 NLRP3 炎性小体。首先, 片段化的线粒体产生的大量 mtROS, 可直接作为第二信号促进 NLRP3 寡聚化<sup>[53]</sup>。其次, MMP 的崩溃和线粒体通透性转换孔的开放, 会促使 mtDNA 泄漏到细胞质中。mtDNA 作为一种强大的损伤相关分子模式 (damage-associated molecular patterns, DAMPs), 能被胞内的环磷酸鸟苷-腺苷合成酶-干扰素基因刺激因子 (cyclic GMP-AMP synthase-stimulator of interferon genes, cGAS-STING) 通路或直接被 NLRP3 识别, 从而为炎性小体的组装和激活提供强有力的刺激<sup>[54-55]</sup>。NLRP3 炎性小体被激活后, 会与接头蛋白 ASC 与 pro-Caspase-1 共同组装成炎性复合体, 该复合体负责剪切并激活 Caspase-1<sup>[56-57]</sup>。一旦被激活, Caspase-1 便发挥双重效应: 它不仅促使前体细胞因子 pro-IL-1 $\beta$  和 pro-IL-18 成熟, 还会直接切割焦亡的效应蛋白 GSDMD。GSDMD 被切割后释放出的 N 端结构域, 凭借其成孔活性, 可迅速插入细胞膜, 形成孔道并扰乱渗透压稳态<sup>[58-60]</sup>。这种对膜结构的破坏最终导致细胞裂解, 释放成熟的 IL-1 $\beta$  和 IL-18, 从而放大局部乃至全身的炎症反应。有研究在心肌细胞中证实<sup>[61]</sup>, Drp1 的过度激活正是通过诱导线粒体分裂和功能障碍, 进而激活 NLRP3 炎性小体介导的焦亡, 最终导致心肌损伤。由此可见, AMPK 通过抑制 Drp1 活性来维持线粒体动力学稳定, 其意义不仅在于保护能量代谢, 更在于通过阻断“线粒体损伤-炎性小体激活-焦亡”这一致命通路, 发挥了关键的细胞保护作用。

本研究结果表明, 与对照组比较, 模型组 NLRP3、ASC 和 Caspase-1 蛋白表达上调, IL-18 和

IL-1 $\beta$  水平升高。与模型组比较, DHI 组 NLRP3、ASC、Caspase-1 的蛋白表达下调, IL-18 和 IL-1 $\beta$  水平降低, 表明 DHI 能有效改善炎症和焦亡, 其机制与抑制 NLRP3 炎性小体活化密切相关, 从而减轻缺氧缺糖诱导的心肌细胞损伤。使用 AICAR 处理后, 由 NLRP3、ASC、Caspase-1 和 GSDMD-NT 组成的焦亡相关蛋白的表达水平也得以下调, 这与 DHI 或 Mdivi-1 的作用效果相近。然而, 使用 AMPK 抑制剂处理后抑制了 DHI 的上述作用。以上结果提示 AMPK/Drp1 途径参与了炎症诱导下 DHI 对 NLRP3 介导的细胞焦亡的抑制作用。

综上, DHI 能通过调控 AMPK/Drp1 通路, 改善线粒体动力学, 提高 MMP, 降低 mtROS 生成和炎症因子的激活, 继而抑制了 NLRP3 活化和焦亡, 发挥保护心肌细胞的作用。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] Ahmed R, Botezatu B, Nanthakumar M, *et al.* Surgery for heart failure: Treatment options and implications [J]. *J Card Surg*, 2021, 36(4): 1511-1519.
- [2] McDonagh T, Metra M. 2021 ESC Guidelines for the diagnosis and treatment of acute and chronic heart failure [J]. *Russ J Cardiol*, 2023, 28(1): 5168.
- [3] Mosterd A, Hoes A W. Clinical epidemiology of heart failure [J]. *Heart*, 2007, 93(9): 1137-1146.
- [4] Ostrominski J W, DeFilippis E M, Bansal K, *et al.* Contemporary American and European guidelines for heart failure management JACC: Heart failure guideline comparison [J]. *JACC Heart Fail*, 2024, 12(5): 810-825.
- [5] Savarese G, Becher P M, Lund L H, *et al.* Global burden of heart failure: A comprehensive and updated review of epidemiology [J]. *Cardiovasc Res*, 2023, 118(17): 3272-3287.
- [6] Brown D A, Perry J B, Allen M E, *et al.* Mitochondrial function as a therapeutic target in heart failure [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2017, 14(4): 238-250.
- [7] Du J, Li H, Song J, *et al.* AMPK activation alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by regulating Drp1-mediated mitochondrial dynamics [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 862204.
- [8] Danial N N, Korsmeyer S J. Cell death: Critical control points [J]. *Cell*, 2004, 116(2): 205-219.
- [9] Ong S B, Kalkhoran S B, Cabrera-Fuentes H A, *et al.* Mitochondrial fusion and fission proteins as novel therapeutic targets for treating cardiovascular disease [J]. *Eur J Pharmacol*, 2015, 763: 104-114.

- [10] Grel H, Woznica D, Ratajczak K, *et al.* Mitochondrial dynamics in neurodegenerative diseases: Unraveling the role of fusion and fission processes [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(17): 13033.
- [11] Westermann B. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2010, 11(12): 872-884.
- [12] G W D. Mitochondrial fission/fusion and cardiomyopathy [J]. *Curr Opin Genet Dev*, 2016, 38: 38-44.
- [13] Rosdah A A, K Holien J, Delbridge L M D, *et al.* Mitochondrial fission - a drug target for cytoprotection or cytodestruction? [J]. *Pharmacol Res Perspect*, 2016, 4(3): e00235.
- [14] Zhou H, Wang J, Zhu P J, *et al.* Retraction note to: NR4A1 aggravates the cardiac microvascular ischemia reperfusion injury through suppressing FUNDC1-mediated mitophagy and promoting Mff-required mitochondrial fission by CK2 $\alpha$  [J]. *Basic Res Cardiol*, 2023, 118(1): 24.
- [15] Qi J, Wang F, Yang P, *et al.* Mitochondrial fission is required for angiotensin II-induced cardiomyocyte apoptosis mediated by a Sirt1-p53 signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9: 176.
- [16] Hasan P, Saotome M, Ikoma T, *et al.* Mitochondrial fission protein, dynamin-related protein 1, contributes to the promotion of hypertensive cardiac hypertrophy and fibrosis in Dahl-salt sensitive rats [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2018, 121: 103-106.
- [17] 王波, 沈松林, 李丹. Drp1 在心肌梗死后不良重塑中的变化及作用 [J]. *西部医学*, 2019, 31(10): 1517-1521.
- [18] Chang Y W, Chang Y T, Wang Q C, *et al.* Quantitative phosphoproteomic study of pressure-overloaded mouse heart reveals dynamin-related protein 1 as a modulator of cardiac hypertrophy [J]. *Mol Cell Proteom*, 2013, 12(11): 3094-3107.
- [19] Sharp W W. Dynamin-related protein 1 as a therapeutic target in cardiac arrest [J]. *J Mol Med*, 2015, 93(3): 243-252.
- [20] 赵强, 刘芬, 杨毅宁. 心力衰竭中心肌细胞线粒体融合与分裂 [J]. *中国组织化学与细胞化学杂志*, 2018, 27(3): 273-279.
- [21] Hoffman N J, Parker B L, Chaudhuri R, *et al.* Global phosphoproteomic analysis of human skeletal muscle reveals a network of exercise-regulated kinases and AMPK substrates [J]. *Cell Metab*, 2015, 22(5): 922-935.
- [22] Wang D D, Jin S, Liu H Y, *et al.* Celastrol alleviates atopic dermatitis by regulating Ezrin-mediated mitochondrial fission and fusion [J]. *J Cell Mol Med*, 2024, 28(14): e18375.
- [23] Sakamuru S, Zhao J H, Attene-Ramos M S, *et al.* Mitochondrial membrane potential assay [J]. *Methods Mol Biol*, 2022, 2474: 11-19.
- [24] Ding P, Song Y M, Yang Y, *et al.* NLRP3 inflammasome and pyroptosis in cardiovascular diseases and exercise intervention [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1368835.
- [25] Zheng Y D, Xu L, Dong N G, *et al.* NLRP3 inflammasome: The rising star in cardiovascular diseases [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 927061.
- [26] Forte M, Schirone L, Ameri P, *et al.* The role of mitochondrial dynamics in cardiovascular diseases [J]. *Br J Pharmacol*, 2021, 178(10): 2060-2076.
- [27] 叶嘉豪, 吴子政, 张垚, 等. 基于 AMPK/Drp1 通路探讨丹红注射液对慢性心力衰竭大鼠线粒体动力学的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(16): 126-135.
- [28] Trott O, Olson A J. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. *J Comput Chem*, 2010, 31(2): 455-461.
- [29] 孙聪, 郭帅, 宁娜, 等. 脂联素抑制  $\beta$ 1-肾上腺素受体自身抗体诱导的大鼠 H9c2 心肌细胞自噬流下降 [J]. *中国病理生理杂志*, 2020, 36(5): 796-802.
- [30] 郑君毅, 张莹莹, 刘园园, 等. FUNDC1 通过调控线粒体分裂影响高糖损伤 H9c2 心肌细胞凋亡的机制研究 [J]. *天津医药*, 2022, 50(8): 791-795.
- [31] 常红波, 王振涛, 吴鸿, 等. 抗纤益心方通过调节 Drp1 活性抑制去甲肾上腺素诱导大鼠 H9c2 细胞肥大 [J]. *中药药理与临床*, 2022, 38(5): 53-57.
- [32] 王佳慧, 梁欢, 方典, 等. 抑制线粒体活性氧自由基可减轻高糖诱导的心肌细胞焦亡和铁死亡 [J]. *南方医科大学学报*, 2021, 41(7): 980-987.
- [33] 顾宇重, 周晓兰, 常波. 丹红注射液联合环磷腺苷葡胺治疗老年人心力衰竭的临床观察 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2014, 12(12): 1481-1483.
- [34] 熊霞军, 胡思远, 钟森杰, 等. 基于 miR-378 探讨丹红注射液干预压力超负荷心力衰竭大鼠心肌纤维化机制 [J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(3): 383-390.
- [35] 黄成龙, 张红. 丹红注射液治疗不稳定型心绞痛的疗效及对超敏 C 反应蛋白的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2012, 21(25): 2778-2779.
- [36] 马红, 冯一平, 薛素芳, 等. 丹红注射液联合去乙酰毛花苷治疗急性左心衰竭的临床研究 [J]. *现代药物与临床*, 2025, 40(12): 3095-3099.
- [37] 杨丽敏, 肖耀龙, 欧阳家惠. 紫草酸镁 B 抑制缺血/再灌注心肌细胞 c-Jun N-末端激酶 3 mRNA 的表达 [J]. *药学报*, 2003, 38(7): 487-491.
- [38] 侯林华. 紫草酸和原儿茶酸抗心肌损伤作用机制研究 [D]. 保定: 河北大学, 2024.
- [39] Fan C M, Qin K L, Iroegbu C D, *et al.* Magnesium

- lithospermate B enhances the potential of human-induced pluripotent stem cell-derived cardiomyocytes for myocardial repair [J]. *Chin Med J*, 2024, 137(15): 1857-1869.
- [40] Luo Z J, Zang M W, Guo W. AMPK as a metabolic tumor suppressor: Control of metabolism and cell growth [J]. *Future Oncol*, 2010, 6(3): 457-470.
- [41] 苏岩, 季宇彬, 郭鹏. AMPK 与心血管疾病 [J]. 黑龙江医药, 2013, 26(1): 20-24.
- [42] Sakamoto K, Göransson O, Hardie D G, *et al.* Activity of LKB1 and AMPK-related kinases in skeletal muscle: Effects of contraction, phenformin, and AICAR [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2004, 287(2): E310-E317.
- [43] Woods A, Johnstone S R, Dickerson K, *et al.* LKB1 is the upstream kinase in the AMP-activated protein kinase cascade [J]. *Curr Biol*, 2003, 13(22): 2004-2008.
- [44] Li C Y, Keaney J F. AMP-activated protein kinase: A stress-responsive kinase with implications for cardiovascular disease [J]. *Curr Opin Pharmacol*, 2010, 10(2): 111-115.
- [45] 毛治尉, 张涛, 武永新, 等. 基于 AMPK/SIRT1/PGC1 $\alpha$  信号通路探究灯盏花素联合有氧运动对冠心病大鼠心功能障碍的改善作用及机制研究 [J]. 中国康复医学杂志, 2023, 38(9): 1185-1191.
- [46] 王江侠, 杨丽霞, 米登海, 等. 当归多糖对糖尿病肾病 KK-Ay 小鼠肾脏 AMPK 信号通路及线粒体自噬的影响 [J]. 中草药, 2023, 54(10): 3189-3196.
- [47] 方舟. 丹蛭降糖胶囊对糖尿病心肌病患者临床疗效及大鼠心肌 AMPK/SIRT1 通路的影响 [D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2023.
- [48] 余思仪. 苓桂术甘汤通过干预线粒体改善心肌梗死后慢性心衰大鼠心功能 [D]. 十堰: 湖北医药学院, 2022.
- [49] Wikstrom J D, Israeli T, Bachar-Wikstrom E, *et al.* AMPK regulates ER morphology and function in stressed pancreatic  $\beta$ -cells via phosphorylation of DRP1 [J]. *Mol Endocrinol*, 2013, 27(10): 1706-1723.
- [50] Zhang Y, Wang Y, Xu J N, *et al.* Melatonin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via improving mitochondrial fusion/mitophagy and activating the AMPK-OPA1 signaling pathways [J]. *J Pineal Res*, 2019, 66(2): e12542.
- [51] Tábara L C, Burr S P, Frison M, *et al.* MTFP1 controls mitochondrial fusion to regulate inner membrane quality control and maintain mtDNA levels [J]. *Cell*, 2024, 187(14): 3619-3637.e27.
- [52] Sakamuru S, Zhao J H, Attene-Ramos M S, *et al.* Mitochondrial membrane potential assay [A] // *High-Throughput Screening Assays in Toxicology* [M]. New York: Springer US, 2022: 11-19.
- [53] Yu J W, Lee M S. Mitochondria and the NLRP3 inflammasome: Physiological and pathological relevance [J]. *Arch Pharm Res*, 2016, 39(11): 1503-1518.
- [54] Bu W J, Li S S, Liu C, *et al.* Nepetin limits NLRP3 inflammasome activation and alleviates NLRP3-driven inflammatory diseases via PINK1-dependent mitophagy [J]. *Free Radic Biol Med*, 2025, 227: 420-433.
- [55] Zhang Y F, Zhou L, Mao H Q, *et al.* Mitochondrial DNA leakage exacerbates odontoblast inflammation through gasdermin D-mediated pyroptosis [J]. *Cell Death Discov*, 2021, 7: 381.
- [56] Huang Y, Xu W, Zhou R B. NLRP3 inflammasome activation and cell death [J]. *Cell Mol Immunol*, 2021, 18(9): 2114-2127.
- [57] Xu Y J, Zheng L, Hu Y W, *et al.* Pyroptosis and its relationship to atherosclerosis [J]. *Clin Chim Acta*, 2018, 476: 28-37.
- [58] Xu B, Jiang M Z, Chu Y, *et al.* Gasdermin D plays a key role as a pyroptosis executor of non-alcoholic steatohepatitis in humans and mice [J]. *J Hepatol*, 2018, 68(4): 773-782.
- [59] Ding J J, Shao F. Growing a gasdermin pore in membranes of pyroptotic cells [J]. *EMBO J*, 2018, 37(15): EMBJ2018100067.
- [60] Ding J J, Wang K, Liu W, *et al.* Pore-forming activity and structural autoinhibition of the gasdermin family [J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 111-116.
- [61] Zeng C, Duan F Q, Hu J, *et al.* NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis contributes to the pathogenesis of non-ischemic dilated cardiomyopathy [J]. *Redox Biol*, 2020, 34: 101523.

[责任编辑 李亚楠]