基础研究 DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003585

两种H9C2心肌细胞氧化损伤模型的比较

陈芸霞[1]，邓洪荣[1]，刘蕙文[1]，许　皓[2]，易　勤[1]，谭　彬[1]，田　杰[3]，朱　静[1]
（1.重庆医科大学附属儿童医院儿研所、国家儿童健康与疾病临床医学研究中心、儿童发育疾病研究教育部重点实验室、儿科学重庆市重点实验室，重庆　400014；2.重庆医科大学附属儿童医院检验科，重庆　400014；
3.重庆医科大学附属儿童医院心血管科（内科），重庆　400014）

【摘　要】**目的：**探讨低氧、低糖及血清剥夺（glucose and serum deprivation under hypoxia（1% O_2），GSDH）处理与H_2O_2处理在构建H9C2心肌细胞氧化损伤模型中的应用价值。**方法：**培养H9C2心肌细胞，当细胞生长状态良好时，用低氧（1% O_2）、低糖（1.0 g/L）及血清剥夺联合处理或200 μmol/L的H_2O_2作用于心肌细胞24 h。采用CCK8实验检测细胞增殖能力；通过细胞凋亡试剂（annexinV-FITC/PI）、Hoechst染色检测细胞凋亡；细胞活性氧（reactive oxygen species，ROS）检测细胞氧化应激水平；BODIPY检测细胞脂质过氧化水平；过碘酸雪夫（periodic acid-schiff stain，PAS）染色检测细胞糖原合成能力；线粒体膜电位检测试剂（mitochondrial membrane potential assay kit with JC-1，JC-1）染色检测线粒体膜电位水平；Western blot检测能量代谢相关分子AMP依赖的蛋白激酶（Adenosine 5'-monophosphate（AMP）-activated protein kinase，AMPK）及氧化应激相关分子NAD（P）H醌脱氢酶1（NAD（P）H quinone dehydrogenase 1，NQO-1）、血红素氧合酶1（heme oxygenase-1，HO-1）蛋白表达水平。**结果：**与空白组比较，GSDH处理组与H_2O_2处理组的心肌细胞存活率均降低，差异均有统计学意义（$P<0.05$）。与空白组相比，GSDH处理与H_2O_2处理都增加了心肌细胞的凋亡水平、ROS和脂滴堆积水平增高、糖原消耗量增加且线粒体膜电位降低。但相比于H_2O_2处理组，GSDH处理组的细胞糖原消耗增多更明显，脂滴堆积也更明显，并且AMPK磷酸化水平显著降低。**结论：**低氧、低糖及GSDH处理与H_2O_2处理均能造成H9C2心肌细胞氧化损伤，但相比于H_2O_2处理组，GSDH处理组的效果更符合体内心肌损伤时的能量代谢转变，有望作为一种更简单便捷的心肌氧化损伤模型应用于科研。

【关键词】低氧低糖血清剥夺；过氧化氢；氧化应激；能量代谢；免疫印迹法
【中图分类号】R331　　【文献标志码】A　　【收稿日期】2024-01-12

Comparison of two models of oxidative damage in H9C2 cardiomyocytes

Cheng Yunxia[1]，*Deng Hongrong*[1]，*Liu Huiwen*[1]，*Xu Hao*[2]，*Yi Qin*[1]，*Tan Bin*[1]，*Tian Jie*[3]，*Zhu Jin*[1]
（*1. Department of Pediatric Research Institute，Children's Hospital of Chongqing Medical University，National Clinical Research Center for Child Health and Disorders，Ministry of Education Key Laboratory of Child Development and Disorders，Chongqing Key Laboratory of Pediatrics；2. Department of Clinical Laboratory，Children's Hospital of Chongqing Medical University；3. Department of Cardiology（Internal Medicine），Children's Hospital of Chongqing Medical University*）

【**Abstract**】***Objective***：To investigate the value of glucose and serum deprivation under hypoxia（1% O_2）（GSDH）treatment and H_2O_2 treatment in establishing a model of oxidative injury in H9C2 cardiomyocytes. ***Methods***：H9C2 cardiomyocytes were cultured，and when the cardiomyocytes were in good growth conditions，they were treated with the combination of low oxygen（1% O_2），low glucose（1.0 g/L），and serum deprivation or H_2O_2 200 μmol/L alone for 24 hours. CCK8 assay was sued to measure the proliferation ability of cells；the apoptosis reagent（AnnexinV-FITC/PI）and Hoechst staining were used to measure cell apoptosis；reactive oxygen species（ROS）was used to measure the level of oxidative stress；BODIPY testing was used to measure the level of lipid peroxidation in cells；periodic acid-Schiff staining was used to measure the ability for glycogen synthesis；mitochondrial membrane potential assay kit with JC-1 staining was used to measure mitochondrial membrane potential；Western blot was used to measure the protein expression levels of the energy metabolism-related molecule AMP-activated protein kinase（AMPK）and the oxidative stress-related molecules NAD（P）H quinone dehydrogenase 1（NQO-1）and heme oxygenase-1（HO-1）. ***Results***：Compared with the blank group，both the GSDH treatment group and the H_2O_2 treatment group had a significant reduction in the viability of cardiomyocytes（$P<0.05$）. Compared with the

作者介绍：陈芸霞，Email：1667655274@qq.com，研究方向：心肌损伤。
通信作者：朱　静，Email：jingzhu@cqmu.edu.cn。
基金项目：国家自然科学基金面上资助项目（编号：82270271）。
优先出版：https://link.cnki.net/urlid/50.1046.R.20240926.0939.014（2024-09-26）

blank group, both GSDH treatment and H_2O_2 treatment increased the levels of cardiomyocyte apoptosis, ROS and lipid droplet accumulation, and glycogen consumption, with a reduction in mitochondrial membrane potential in cardiomyocytes. However, compared with the H_2O_2 treatment group, the GSDH treatment group showed significantly greater increases in glycogen consumption and lipid droplet accumulation and a significant reduction in AMPK phosphorylation. ***Conclusion***: Both GSDH treatment and H_2O_2 treatment can cause oxidative injury to H9C2 cardiomyocytes, but compared with H_2O_2 treatment, the effect of GSDH treatment is more in line with the energy metabolism transition during myocardial injury *in vivo*, and therefore, it is expected to be used as a simpler and more convenient model of oxidative injury to cardiac myocardium for scientific research.

【Key words】glucose and serum deprivation under hypoxia; hydrogen peroxide; oxidative stress; energy metabolism; Western blot

心血管疾病是影响世界人口的重大因素，并且对临床和经济都产生影响[1]。心脏受损发生时心脏不能充分泵出足够的血液来满足身体对营养和氧气的需求，导致心脏受损患者出现明显的残疾和高死亡率[2-3]。心血管疾病有多种发展形式，例如心力衰竭、糖尿病心肌病和心肌梗死等，由多种不同的共病引起[4-5]。目前研究表明，能量代谢的改变是心脏发生损伤时的特征[6]，能量不足影响心肌损伤的严重程度。正常心肌细胞需要高代谢活性，心肌损伤时面临着能量不足，主要是因为线粒体氧化能力的下降。通常情况下，脂肪酸氧化代谢需氧量比糖代谢更多[7-8]。因此，心肌损伤发生时，由于心肌细胞缺血缺氧，能量代谢出现重构，表现为提高葡萄糖的摄取、增强糖酵解，同时下调脂肪酸氧化[6]，这些能量代谢变化导致受损的心脏变得效率降低。这些改变促使本研究进一步模拟这种能量代谢的改变，构建相应的损伤模型。

H_2O_2可以诱导ROS的高表达，常用于各类氧化应激研究，是经典的心肌细胞氧化损伤模型构建方式。GSDH处理心肌细胞构建心肌氧化损伤模型较少被报道。本研究在体外利用GSDH处理与H_2O_2处理两种方式建立H9C2心肌细胞氧化损伤模型，探究H9C2心肌细胞在2种损伤模型下的增殖、凋亡和氧化应激及能量代谢的改变，为后续进一步的研究提供更简单便捷的心肌氧化损伤模型。

1 材料与方法

1.1 试剂

DMEM培养基（葡萄糖：4.5 g/L）、DMEM低糖培养基（葡萄糖：1.0 g/L）（Gibco公司），H_2O_2溶液（美国SIGMA公司），细胞凋亡检测试剂（Annexin V-FITC/PI染色）（BD公司），结晶紫染色液、线粒体膜电位检测试剂盒（JC-1）、细胞活性氧（ROS）检测试剂盒、活细胞染液（Hoechst33342）（上海碧云天公司），CCK8试剂盒（日本同仁化学研究所）、细胞总蛋白提取试剂盒、BCA蛋白浓度检测试剂盒（江苏凯基公司），BODIPY荧光探针（中国AbMole公司），PAS染色液（细胞专用）（北京索莱宝科技有限公司）单克隆兔抗AMPKα、单克隆兔抗p-AMPKα（美国CST公司），单克隆兔抗醌氧化还原酶（NQO-1）、血红素氧化酶1（HO-1）（成都正能公司），单克隆鼠抗β-actin（Abcam公司），HRP-羊抗鼠/兔二抗（北京中杉金桥公司）。

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组 大鼠心肌细胞H9C2接种在培养皿中，待细胞汇合度达到80%～90%后，将其分为3组：空白对照组、GSDH处理组和不同浓度梯度H_2O_2处理组。GSDH组更换无血清低糖培养基，置于低氧培养（1% O_2，5%CO_2）中培养，H_2O_2处理组更换加入μmol/L含10%血清的DMEM完全培养基（H_2O_2 200 μmol/L）放于常规培养箱（21% O_2，5%CO_2）中继续培养，空白对照组则更换含10%血清的DMEM完全培养基放于常规培养箱（21%O_2，5% CO_2）中继续培养，24 h后收集细胞用于后续实验。

1.2.2 CCK8实验和结晶紫染色实验检测细胞增殖能力 CCK8实验：将细胞培养基与CCK8试剂以9∶1的比例混匀配成检测试剂，每孔加入100 μL，放回培养箱中，分别在加入后0 h和2 h时检测450 nm处吸光度（absorbances，A）值。结晶紫染色实验：用PBS冲洗各组细胞后吸干，加入适量4%多聚甲醛，室温固定30 min。移除多聚甲醛，PBS冲洗3次吸干。加入结晶紫染液，常温下染色30 min后在显微镜下观察，并拍照。加入100 μL无水乙醇脱色，检测570 nm处A值。

1.2.3 Annexin V-FITC/PI、JC-1检测细胞凋亡水平 Annexin V-FITC/PI染色：收集细胞沉淀并加入100 μL 1×Binding Buffer重悬，分别加入5 μL 1×Annexin V-FITC和PI，轻微振荡混匀后置于室温避光孵育15 min；向细胞悬液中补加400 μL 1×Binding Bμffer，上机检测，FlowJo进行定量分析。JC-1染色：用PBS冲洗各组细胞后吸干，共聚焦皿中加入500 μL JC-1染色工作液，置于37 ℃培养箱中孵育20 min，用预先冰浴处理的JC-1染色缓冲液洗涤后再加入500 μL培养基置于显微镜下观察，并拍照，用Image J软件分析MFI。

1.2.4 过碘酸雪夫（PAS）染色检测细胞糖原合成能力 过

碘酸雪夫（PAS）染色：PBS 冲洗各组细胞后吸干，加入适量 4% 多聚甲醛，室温固定 30 min。移除多聚甲醛，PBS 洗 3 次吸干。加入 200 μL 高碘酸液体反应 15 min，移除高碘酸液，PBS 洗 3 次后吸干。加入 200 μL Schiff 染液染色 20 min。PBS 冲洗 3 次，于倒置显微镜下拍照，用 Image J 软件分析阳性细胞率。

1.2.5 活性氧（ROS）检测细胞氧化还原水平 活性氧检测：加入用 PBS 稀释（1∶1 000）后的荧光染料 DCFH-DA 于细胞悬液中，37 ℃避光孵育 30 min，流式上机检测，FlowJo 进行定量分析。

1.2.6 BODIPY 检测细胞脂质过氧化水平 BODIPY 脂滴染色：加入用 PBS 稀释（1∶1 000）后的荧光染料 BODIPY 于共聚焦皿中，37 ℃避光孵育 30 min，PBS 清洗后，置于共聚焦显微镜下观察拍照，用 Image J 软件分析 MFI。

1.2.7 Western blots 根据细胞全蛋白提取试剂盒说明书获得细胞蛋白，并用 BCA 法测得蛋白浓度；蛋白样本通过 SDS-PAGE 凝胶电泳后，400 mA 电转 30 min 至 PVDF 膜上，用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h；随后将膜置于稀释后的一抗溶液：鼠抗 β-actin（1∶1 000）、兔抗 AMPKα（1∶1 000）、p-AMPKα（1∶1 000）、HO-1（1∶800）、兔抗 NQO1（1∶800），4 ℃放置过夜；孵育完成后用 TBST 溶液漂洗膜 3 次，将其置于含有 HRP 标记的二抗（1∶5 000）稀释液中室温孵育 1 h，再用 TBST 漂洗 3 次后进行显影。Image Lab 软件分析灰度值。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism7.0 软件对数据资料进行统计分析。数据以均值 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示，对于 2 组之间比较采用 t 检验评估，多组间采用单因素方差分析。检验水准 α=0.05，以 P<0.05 为差异有统计学意义。

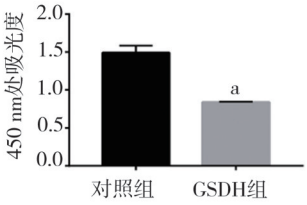
2 结 果

2.1 GSDH 处理和 H_2O_2 处理对 H9C2 增殖的影响

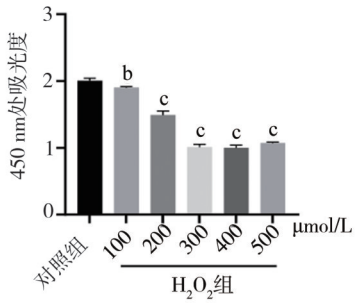
H9C2 经 GSDH 处理后，细胞活力（1.943 ± 1.088）（1.398 ± 0.027）显著性降低（F=0.172，P=0.000，图 1A）；经不同浓度梯度的 H_2O_2 处理后，细胞活力（2.004 ± 0.000；1.903 ± 0.014；1.488 ± 0.059；1.009 ± 0.043；0.998 ± 0.042；1.072 ± 0.013）也显著性降低（F=426.000，P=0.000，图 1B），后续选择 200 μmol/L 的 H_2O_2 处理细胞。结晶紫染色结果提示，相较于空白对照组（1.394 ± 0.142），GSDH 处理组（0.590 ± 0.031）和 H_2O_2 处理组（0.751 ± 0.058）细胞存活率明显降低（F=66.240，P=0.000，图 1C）。这些结果提示，与空白对照组相比较，GSDH 处理组和 H_2O_2 处理组的 H9C2 细胞增殖能力明显降低（P=0.000、P=0.000），并且 2 种处理方式对 H9C2 细胞增殖能力的影响没有统计学差异（P=0.154）。

2.2 GSDH 处理和 H_2O_2 处理诱发 H9C2 凋亡

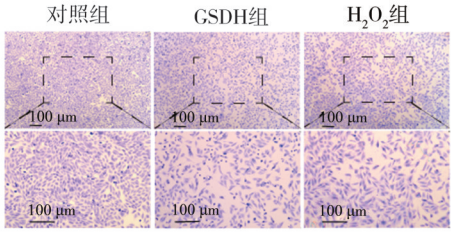
与空白对照组相比较，GSDH 处理后细胞凋亡比例（8.240 ± 0.494；19.750 ± 0.570）显著增加（P=0.000，图 2A），200 μmol/L 的 H_2O_2 处理后细胞凋亡比例（8.240 ± 0.494；27.400 ± 0.436）同样明显增加（F=1 038.000，P=0.000，图 2A）。本研究发现 H_2O_2 处理后细胞凋亡比例增加的程度显著高于用 GSDH 处理（P=0.000，图 2A）。通过 Hoechst 染色，本研究发现 GSDH 处理（23.030 ± 1.124）和 200 μmol/L H_2O_2（28.630 ± 1.350），处理可导致细胞核出现固缩、碎裂的数量增多，同样提示细胞凋亡增多（F=301.600，P=0.000，图 2B），并且 H_2O_2 处理后细胞核出现固缩、碎裂的数量增加的程度显著高于用 GSDH 处理（P=0.002，图 2B）。结果提示，2 种处

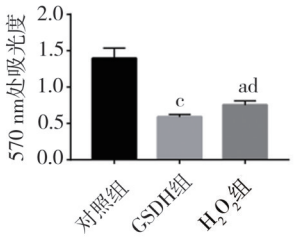


A. GSDH处理H9C2细胞24 h后的细胞活力



B. 不同浓度H_2O_2处理H9C2细胞24 h后的细胞活力





C. 结晶紫染色检测GSDH及H_2O_2处理H9C2细胞24 h后的细胞细胞增殖水平（200×）

注：a，与对照组比较，P=0.000；b，与对照组比较，P=0.028；c，与对照组比较，P=0.000；d，与 GSDH 组比较，P=0.154

图 1 GSDH 处理和 H_2O_2 处理对 H9C2 增殖的影响

理方式都会增加H9C2的凋亡水平，并且H_2O_2处理后细胞凋亡比例增加的程度显著高于用GSDH处理组。

2.3 GSDH处理和H_2O_2处理对H9C2氧化应激和脂质过氧化的影响

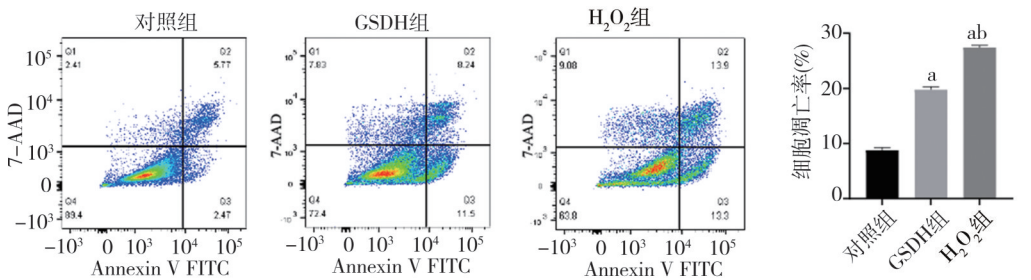
ROS是细胞内重要的第二信使，参与H9C2的氧化还原调节。通过流式细胞术检测细胞内ROS，结果提示，GSDH处理（1.860 ± 0.039）和200 μmol/L的H_2O_2处理（1.950 ± 0.032）下的细胞ROS水平显著增高（F=970.200，P=0.000，图3B），并且H_2O_2处理后细胞ROS增加的程度高于用GSDH处理（P=0.021，图3B）。脂滴累积除了增加氧化应激外，还对脂质过氧化过程有明显增强。通过BODIPY染色观察脂滴的数目，结果显示GSDH处理（2.943 ± 0.362）和200 μmol/L H_2O_2处理（2.502 ± 0.280）细胞后，脂滴含量增加，并且显著堆积在细胞内（P=0.000，图3A），并且GSDH处理后细胞脂滴堆积现象更明显。结果提示，2种处理方式都会增加H9C2的氧化应激和脂质过氧化水平，并且GSDH处理后细胞脂质过氧化的程度显著高于用H_2O_2处理组。

2.4 GSDH处理和H_2O_2处理对H9C2能量代谢的影

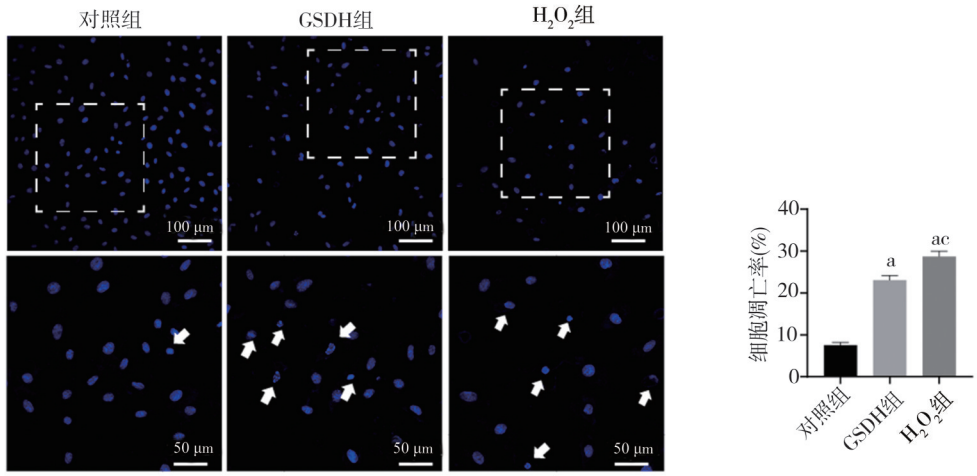
糖原是细胞的储能物质，本研究通过PAS染色检测细胞糖原合成能力的变化。PAS染色结果显示，GSDH处理（0.183 ± 0.021）和200 μmol/L的H_2O_2（0.455 ± 0.063）处理后细胞内糖原储存均明显减少（F=350.000，P=0.000，图4A）。线粒体是细胞产生能量的关键细胞器，本课题组通过JC-1染色检测线粒体膜电位变化，线粒体膜电位较高时，JC-1聚集并产生红色荧光；在线粒体膜电位较低时，JC-1单体呈现绿色荧光。根据红绿荧光的相对比例来评估线粒体去极化程度。结果提示，GSDH处理（0.502 ± 0.056）和200 μmol/L H_2O_2（0.636 ± 0.106）处理H9C2细胞后，细胞膜电位降低（F=503.500，P=0.000，图4B），并且GSDH处理后细胞膜电位降低更明显（P=0.002，图4B）。以上结果显示，2种处理方式都会对H9C2细胞能量代谢产生影响，但GSDH处理对细胞能量代谢的影响更明显。

2.5 GSDH处理和H_2O_2处理对H9C2中AMPK以及氧化应激信号通路的影响

GSDH处理（0.506 ± 0.130）下H9C2中磷酸化AMPK（p-AMPK）明显降低（P=0.022，图5A），而H_2O_2处理组（0.880 ± 0.062）的p-AMPK变化不明显（P=0.539，图5A），提示GSDH处理对H9C2细胞的能量代谢通路影响更明显。GSDH处理组（0.608 ± 0.033）和H_2O_2处理组（0.584 ± 0.025）氧化应激相关分子醌氧化还原酶（NQO-1）的表达都降低（F=54.350，P=0.000，图5B）、H_2O_2处理组的H9C2细胞的血红素氧化酶1（HO-1）的表达（0.875 ± 0.050）明显升高（P=0.000，图5B）。这些结果表明GSDH处理对H9C2细胞的能量代谢影响更明显，H_2O_2处理对H9C2细胞的氧化应激影响更明显。



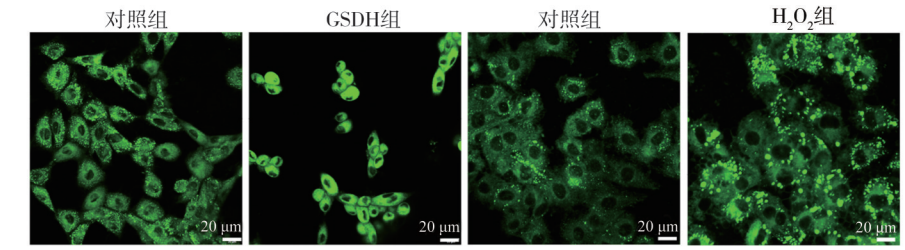
A. 流式细胞术检测细胞凋亡率



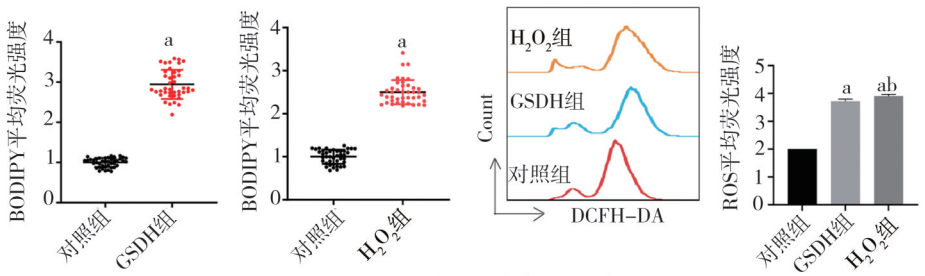
B. Hoechst染色检测细胞凋亡率（200×）

注：a，与对照组比较，P=0.000；b，与GSDH组比较，P=0.000；c，与GSDH组比较，P=0.002

图2 GSDH处理和H_2O_2处理诱发H9C2凋亡



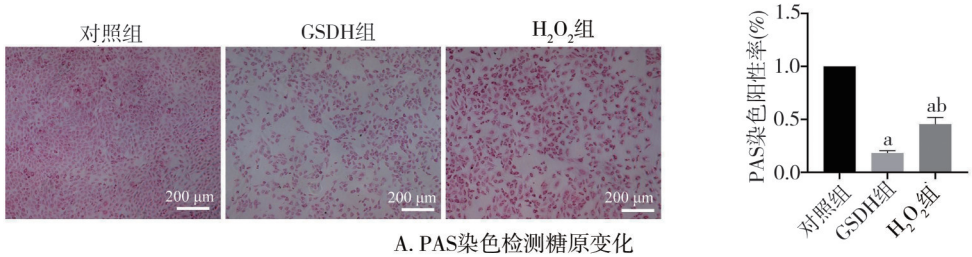
A. BODIPY染色检测脂滴变化（600×）



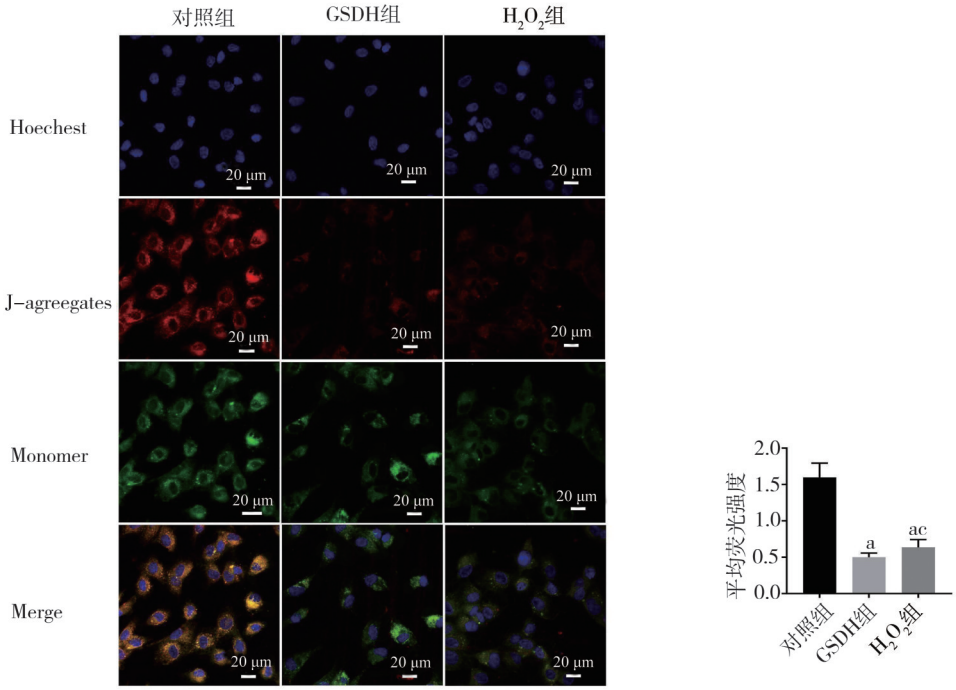
B. 流式细胞术检测ROS变化

注：a，与对照组比较，P=0.000；b，与GSDH组比较，P=0.021

图3　GSDH处理和H_2O_2处理对H9C2氧化应激和脂质过氧化的影响



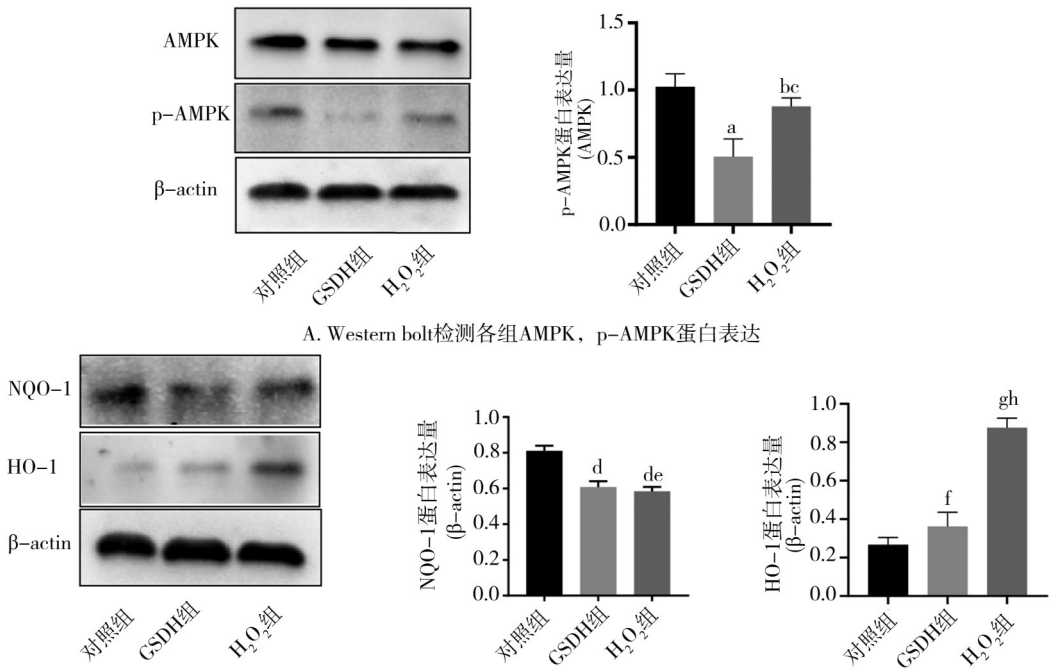
A. PAS染色检测糖原变化



B. JC-1检测线粒体膜电位的变化

注：a，与对照组比较，P=0.000；b，与GSDH组比较，P=0.000；c，与GSDH组比较，P=0.002

图4　GSDH处理和H_2O_2处理对H9C2能量代谢的影响



A. Western bolt检测各组AMPK，p-AMPK蛋白表达

B. Western bolt检测各组NQO-1, HO-1蛋白表达

注：a，与对照组比较，P=0.022；b，与GSDH组比较，P=0.539；c，与GSDH组比较，P=0.539；d，与对照组比较，P=0.000；e，与GSDH组比较，P=0.598；f：与GSDH组比较，P=0.175；g，与对照组比较，P=0.000；h，与GSDH组比较，P=0.000

图5　GSDH处理和H_2O_2处理对H9C2中AMPK以及氧化应激信号通路的影响

3　讨　论

本研究采用低氧、低糖及血清剥夺（GSDH）处理与H_2O_2处理H9C2心肌细胞，在体外模拟心肌氧化损伤，2种处理方式均能造成H9C2心肌细胞出现增殖能力下降、线粒体膜电位降低、凋亡增多、氧化应激及脂质过氧化增强。但相比于H_2O_2处理组，GSDH处理组的H9C2心肌细胞糖原利用增多以及脂滴堆积更显著，能量代谢相关因子AMPK的蛋白表达量降低更显著。本研究结果显示，与H_2O_2处理H9C2心肌细胞相比较，GSDH处理后对H9C2心肌细胞的能量代谢影响更显著，更符合心脏受损发生时心肌细胞能量代谢重构的现象，在构建心肌细胞能量代谢重构的氧化损伤模型时，可以选择使用GSDH处理。并且体外模型具有方便快捷的优点，可以更加快速简便地展示实验处理的结果，为进一步研究提供方向。

心脏有非常高的能量需求，必须不断地产生大量的ATP来维持收缩功能[6,9-10]。ATP主要是通过线粒体氧化磷酸化产生，这个过程需要消耗大量的氧气，导致心脏的单位耗氧量远远高于身体中的任何其他器官[11-12]。任何产生ATP的能量代谢途径或心脏氧气供应的中断，都可能对心脏功能产生灾难性的后果[12]。因此，心脏产生的能量受损是导致大多数心脏病的一个重要因素，受损的心脏由于ROS的积累以及ATP产生不足[13]，能量代谢会发生剧烈的变化。与本研究结果相符，在GSDH环境下，本课题组观察到H9C2心肌细胞发生氧化应激，并且能量代谢方式发生转换，糖原利用增多以及脂滴堆积更显著，能量代谢相关因子AMPK的蛋白表达量降低更显著。AMPK是一种能量敏感蛋白激酶，在调节细胞能量代谢中发挥关键作用[14-15]。AMPK在正常情况下通常是静止的，但在激素信号和压力下产生足以增加AMP/ATP比率时被激活[16]，如低血糖[17]、剧烈运动[18]、缺氧和缺血[19]。一旦活跃，肌肉AMPK增强脂肪酸的摄取和氧化代谢[20]，并增加葡萄糖运输和糖酵解[21-22]。本研究发现GSDH处理使AMPK的蛋白表达量显著降低，提示GSDH模型下，心肌细胞能量代谢转变与AMPK有关。AMPK的激活可以通过调节脂肪酸的摄取和氧化磷酸化来影响心脏代谢，脂肪酸是正常心肌ATP的主要来源。

然而，在受损心脏中发生的能量代谢变化是复杂的，随着受损心脏对脂肪酸和葡萄糖的能力逐渐

降低[23]，酮体也可以作为一种潜在替代底物来维持有限的能量供应[24]。酮体氧化除了有助于产生能量外，耗氧量也更少。在灌注葡萄糖缓冲液的工作大鼠心脏中加入酮体后，可以显著增加了心输出量和效率。然而，酮体等次要底物的代谢转变是否属于适应性反应，有待进一步地探讨。后续对心肌氧化损伤的研究可以选用GSDH处理为模型，进一步深入研究心肌发生氧化损伤时能量代谢发生转变的具体机制，以及相关药物应用效果，更好地服务于临床应用。

参 考 文 献

[1] Townsend N, Kazakiewicz D, Lucy Wright F, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in Europe[J]. Nat Rev Cardiol, 2022, 19(2): 133-143.

[2] Lolley R, Forman DE. Cardiac rehabilitation and survival for ischemic heart disease[J]. Curr Cardiol Rep, 2021, 23(12): 184.

[3] Karwi QG, Sun QY, Lopaschuk GD. The contribution of cardiac fatty acid oxidation to diabetic cardiomyopathy severity[J]. Cells, 2021, 10(11): 3259.

[4] Masoli JAH, Mensah E, Rajkumar C. Age and ageing cardiovascular collection: blood pressure, coronary heart disease and heart failure [J]. Age Ageing, 2022, 51(8): afac179.

[5] Carley AN, Maurya SK, Fasano M, et al. Short-chain fatty acids outpace ketone oxidation in the failing heart[J]. Circulation, 2021, 143(18): 1797-1808.

[6] Lopaschuk GD, Karwi QG, Tian R, et al. Cardiac energy metabolism in heart failure[J]. Circ Res, 2021, 128(10): 1487-1513.

[7] Ranjbarvaziri S, Kooiker KB, Ellenberger M, et al. Altered cardiac energetics and mitochondrial dysfunction in hypertrophic cardiomyopathy[J]. Circulation, 2021, 144(21): 1714-1731.

[8] Zhao MM, Wei HR, Li CZ, et al. Gut microbiota production of trimethyl-5-aminovaleric acid reduces fatty acid oxidation and accelerates cardiac hypertrophy[J]. Nat Commun, 2022, 13(1): 1757.

[9] Chen Z, Jin ZX, Cai JJ, et al. Energy substrate metabolism and oxidative stress in metabolic cardiomyopathy[J]. J Mol Med, 2022, 100(12): 1721-1739.

[10] Zhuang LF, Jia KN, Chen C, et al. DYRK1B-STAT3 drives cardiac hypertrophy and heart failure by impairing mitochondrial bioenergetics[J]. Circulation, 2022, 145(11): 829-846.

[11] Murashige D, Jang C, Neinast M, et al. Comprehensive quantification of fuel use by the failing and nonfailing human heart[J]. Science, 2020, 370(6514): 364-368.

[12] Dambrova M, Zuurbier CJ, Borutaite V, et al. Energy substrate metabolism and mitochondrial oxidative stress in cardiac ischemia/reperfusion injury[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 165: 24-37.

[13] Li Y, Ma Y, Dang QY, et al. Assessment of mitochondrial dysfunction and implications in cardiovascular disorders[J]. Life Sci, 2022, 306: 120834.

[14] Wang X, Chen XX, Zhou WQ, et al. Ferroptosis is essential for diabetic cardiomyopathy and is prevented by sulforaphane *via* AMPK/NRF2 pathways[J]. Acta Pharm Sin B, 2022, 12(2): 708-722.

[15] Feng YN, Zhang YY, Xiao H. AMPK and cardiac remodelling[J]. Sci China Life Sci, 2018, 61(1): 14-23.

[16] Steinberg GR, Hardie DG. New insights into activation and function of the AMPK[J]. Nat Rev Mol Cell Biol, 2023, 24(4): 255-272.

[17] Cruz AM, Partridge KM, Malekizadeh Y, et al. Brain permeable AMP-activated protein kinase activator R481 raises glycaemia by autonomic nervous system activation and amplifies the counterregulatory response to hypoglycaemia in rats[J]. Front Endocrinol, 2021, 12: 697445.

[18] Spaulding HR, Yan Z. AMPK and the adaptation to exercise[J]. Annu Rev Physiol, 2022, 84: 209-227.

[19] Popov SV, Mukhomedzyanov AV, Voronkov NS, et al. Regulation of autophagy of the heart in ischemia and reperfusion[J]. Apoptosis, 2023, 28(1/2): 55-80.

[20] Yao MR, Wang ZR, Jiang LY, et al. Oxytocin ameliorates high glucose- and ischemia/reperfusion-induced myocardial injury by suppressing pyroptosis via AMPK signaling pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 153: 113498.

[21] Fouqueray P, Bolze S, Dubourg J, et al. Pharmacodynamic effects of direct AMP kinase activation in humans with insulin resistance and non-alcoholic fatty liver disease: a phase 1b study[J]. Cell Rep Med, 2021, 2(12): 100474.

[22] Zhang Q, Liu SD, Zhang CS, et al. AMPK directly phosphorylates TBK1 to integrate glucose sensing into innate immunity[J]. Mol Cell, 2022, 82(23): 4519-4536.

[23] Midha AD, Zhou YY, Queliconi BB, et al. Organ-specific fuel rewiring in acute and chronic hypoxia redistributes glucose and fatty acid metabolism[J]. Cell Metab, 2023, 35(3): 504-516.

[24] Nielsen R, Møller N, Gormsen LC, et al. Cardiovascular effects of treatment with the ketone body 3-hydroxybutyrate in chronic heart failure patients[J]. Circulation, 2019, 139(18): 2129-2141.

（责任编辑：李青颖）