

[文章编号] 1671-587X(2026)01-0105-11

DOI:10.13481/j.1671-587X.20260111

恩格列净对阿霉素诱导大鼠心脏损伤模型的改善作用及其机制

李佳蔚¹, 阿地力江², 吴莉¹, 姜芸¹

(1. 新疆医科大学附属肿瘤医院肿瘤心脏病科, 新疆 乌鲁木齐 830000; 2. 克拉玛依中心医院呼吸科, 新疆 克拉玛依 834000)

[摘要] **目的:** 探讨恩格列净(EMPA)对阿霉素(DOX)诱导大鼠心脏损伤(HI)模型的改善作用, 并阐明其作用机制。**方法:** 24只6-7周龄雄性Wistar大鼠随机分为对照组(正常健康大鼠维持饲养)、HI组(建立DOX诱导的大鼠HI模型)和HI+EMPA组(在建立DOX诱导的大鼠HI模型6周后, 每日给予大鼠灌胃 $10\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ EMPA, 连续灌胃14 d), 每组8只。采用心脏超声心动图检测各组大鼠左室收缩末内径(LVIDs)、左室射血分数(LVEF)和左室短轴缩短率(LVFS), HE染色和Masson染色观察各组大鼠心肌组织病理形态表现和心肌组织中胶原纤维沉积情况, 脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的dUTP缺口末端标记(TUNEL)法分析各组大鼠心肌细胞凋亡情况, 酶联免疫吸附试验(ELISA)法检测各组大鼠血清中乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶(CK)水平。采用大鼠心肌细胞H9c2进行体外实验。体外建立DOX诱导的大鼠心肌细胞损伤模型(DOX组)。细胞实验分组-1分为对照组(H9c2细胞正常培养不做任何处理)、DOX组(H9c2细胞培养液中加入 $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX处理48 h, 诱导心肌细胞损伤)、DOX+EMPA组(H9c2细胞培养液中加入 $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX和 $500\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EMPA, 处理48 h)和DOX+EMPA+EX527[沉默信息调节因子相关酶1(SIRT1)抑制剂]组(H9c2细胞培养液中加入 $10\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EX527预处理1 h, 然后加入 $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX和 $500\text{ nmol}\cdot\text{L}^{-1}$ EMPA, 处理48 h)。细胞实验分组-2分为对照组(H9c2细胞正常培养不做任何处理)、DOX组(H9c2细胞培养液中加入 $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX处理48 h, 诱导心肌细胞损伤)和DOX+动力学相关蛋白1(Drp-1)抑制剂组(H9c2细胞培养液中加入 $75\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Drp-1抑制剂Mdivi-1预处理2 h, 然后 $0.1\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX处理48 h)。采用Western blotting法检测各组细胞中自噬相关蛋白微管相关蛋白1轻链3(LC3)、自噬关键分子酵母Atg6同系物BECLIN1、泛素结合蛋白P62、SIRT1、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活子 1α (PGC- 1α)、Drp-1、线粒体裂变1蛋白(Fis-1)和线粒体裂变因子(MFF)蛋白表达水平。**结果:** 对照组大鼠心脏心肌纤维排列整齐, 间质未见明显炎症细胞浸润和胶原纤维沉积; 与对照组比较, HI组大鼠心肌纤维排列紊乱, 心肌间质扩大, 可见炎症细胞浸润和胶原纤维沉积; 与HI组比较, HI+EMPA组大鼠心肌纤维排列较为规整, 间质未见明显炎症细胞浸润, 可见少量胶原纤维沉积。与对照组比较, HI组大鼠心肌组织TUNEL阳性细胞数和LVIDs升高($P<0.05$), LVEF和LVFS降低($P<0.05$), 血清中LDH和CK水平升高($P<0.05$)。与HI组比较, HI+EMPA组大鼠心肌组织TUNEL阳性细胞数和LVIDs降低($P<0.05$), LVEF和LVFS均升高($P<0.05$), 血清中LDH和CK水平降低($P<0.05$)。与对照组比较, DOX组H9c2细胞中BECLIN1蛋白表达水平和LC3-I/LC3-II比值升高($P<0.05$), P62、SIRT1和PGC- 1α 蛋白表达水平降低($P<0.05$), Drp-1蛋白表达水平升高($P<0.05$)。与DOX组比较, DOX+EMPA组H9c2细胞中BECLIN1蛋白表达水平和LC3-I/LC3-II比值降低($P<0.05$), P62、SIRT1和PGC- 1α 蛋白表达水

[收稿日期] 2025-03-31 [录用日期] 2025-06-03

[基金项目] 新疆维吾尔自治区科技厅自然科学基金项目(2022D01C537)

[作者简介] 李佳蔚(1987-), 女, 四川省广安市人, 主治医师, 医学硕士, 主要从事肿瘤心脏病诊治方面的研究。

[通信作者] 姜芸, 副主任医师, 硕士研究生导师(E-mail: 95379368@qq.com)

©《吉林大学学报(医学版)》编辑部, 开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

平升高 ($P < 0.05$), Drp-1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。与 DOX+EMPA 组比较, DOX+EMPA+EX527 组 H9c2 细胞中 BECLIN1 蛋白表达水平和 LC3-I/LC3-II 比值升高 ($P < 0.05$), P62 和 Drp-1 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。与对照组比较, DOX 组 H9c2 细胞中 Drp-1、Fis-1 和 MFF 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与 DOX 组比较, DOX+Drp-1 抑制剂组 H9c2 细胞中 Fis-1 和 MFF 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。**结论:** EMPA 可减轻 DOX 诱导的大鼠心肌病变和心脏功能异常, 降低心肌细胞凋亡和自噬, 其机制可能与 EMPA 上调 SIRT1 和 PGC-1 α 蛋白表达、降低 Drp1 蛋白表达有关。

[关键词] 阿霉素; 心脏毒性; 恩格列净; 线粒体裂变; 沉默信息调节因子相关酶 1; 过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活子 1 α ; 动力学相关蛋白 1

[中图分类号] R541; R730.5 **[文献标志码]** A

Improvement effect of empagliflozin on ameliorating doxorubicin-induced myocardial injury rat model and its mechanism

LI Jiawei¹, Adilijiang², WU Li¹, JIANG Yun¹

(1. Department of Oncology and Cardiology, Affiliated Cancer Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China; 2. Department of Respiratory Medicine, Karamay Central Hospital, Karamay 834000, China)

ABSTRACT Objective: To discuss the ameliorative effect of empagliflozin (EMPA) on the doxorubicin (DOX)-induced heart injury (HI) model in the rats, and to clarify its mechanism of action. **Methods:** Twenty-four 6-7-week-old male Wistar rats were randomly divided into control group (normal healthy rats were maintained), HI group (the DOX-induced rat HI model was established), and HI+EMPA group (after 6 weeks of establishing the DOX-induced rat HI model, the rats were given 10 mg·kg⁻¹ EMPA daily by gavage for 14 consecutive days), with 8 rats in each group. Echocardiography was used to detect the left ventricular internal diameter at end-systole (LVIDs), left ventricular ejection fraction (LVEF), and left ventricular fractional shortening (LVFS) of the rats in various groups; HE staining and Masson staining were used to detect the pathomorphology of myocardium tissue and collagen fibers in myocardium tissue of the rats in various groups; terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick end labeling (TUNEL) method was used to analyze the apoptosis in the left ventricular myocardium cells of the rats in various groups; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the serum levels of lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) of the rats in various groups. Rat myocardial H9c2 cells were used for *in vitro* experiments. A DOX-induced rat cardiomyocyte injury model was established in vitro (DOX group). Cell experiment grouping-1 was divided into control group (H9c2 cells were cultured normally without any treatment), DOX group (0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX was added to the H9c2 cell culture medium for 48 h to induce cardiomyocyte injury), DOX+EMPA group (0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX and 500 nmol·L⁻¹ EMPA were added to the H9c2 cell culture medium for 48 h), and DOX+EMPA+sirtuin 1 (SIRT1) inhibitor (EX527) group (H9c2 cells were pretreated with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EX527 for 1 h, then 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX and 500 nmol·L⁻¹ EMPA were added for 48 h). Cell experiment grouping-2 was divided into control group (H9c2 cells were cultured normally without any treatment), DOX group (0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX was added to the H9c2 cell culture medium for 48 h to induce cardiomyocyte injury), and DOX+dynamamin-related protein 1 (Drp-1) inhibitor group (H9c2 cells were pretreated with 75 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Drp-1 inhibitor Mdivi-1 for 2 h, then treated with 0.1 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ DOX for 48 h). Western blotting method was used to determine the expression levels of autophagy-related proteins microtubule-associated protein 1

light chain 3 (LC3), autophagy key molecule yeast Atg6 homolog BECLIN1, and ubiquitin-binding protein P62, SIRT1, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1 α), and Drp-1; mitochondrial fission 1 protein (Fis-1), and mitochondrial fission factor (MFF) proteins in the cells in various groups. **Results:** In control group, the myocardial fibers of the rat hearts were arranged neatly, and no obvious inflammatory cell infiltration or collagen fiber deposition was seen in the interstitium; compared with control group, in HI group, the myocardial fibers of the rats were disordered, the myocardial interstitium was enlarged, and inflammatory cell infiltration and collagen fiber deposition were observed; compared with HI group, in HI+EMPA group, the myocardial fibers of the rats were more regular, no obvious inflammatory cell infiltration was seen in the interstitium, and a small amount of collagen fiber deposition was observed. The TUNEL staining results showed that compared with control group, the number of TUNEL-positive cells in the myocardium tissue of the rats in HI group was increased ($P<0.05$). The echocardiography results showed that compared with control group, the LVIDs of the rats in HI group was increased ($P<0.05$), and the LVEF and LVFS were decreased ($P<0.05$); compared with HI group, the LVIDs of the rats in HI+EMPA group was decreased ($P<0.05$), and the LVEF and LVFS were increased ($P<0.05$). The ELISA results showed that compared with control group, the serum levels of LDH and CK of the rats in HI group were increased ($P<0.05$); compared with HI group, the serum levels of LDH and CK of the rats in HI+EMPA group were decreased ($P<0.05$). The Western blotting results showed that compared with control group, the BECLIN1 protein expression level and LC3-I / LC3-II ratio in the H9c2 cells in DOX group were increased ($P<0.05$), the expression levels of P62, SIRT1, and PGC-1 α proteins were decreased ($P<0.05$), and the expression level of Drp-1 protein was increased ($P<0.05$); compared with DOX group, the BECLIN1 protein expression level and LC3-I / LC3-II ratio in the H9c2 cells in DOX+EMPA group were decreased ($P<0.05$), the expression levels of P62, SIRT1, and PGC-1 α proteins were increased ($P<0.05$), and the expression level of Drp-1 protein was decreased ($P<0.05$); compared with DOX+EMPA group, the BECLIN1 protein expression level and LC3-I / LC3-II ratio in the H9c2 cells in DOX+EMPA+EX527 group were increased ($P<0.05$), and the expression levels of P62 and Drp-1 proteins were decreased ($P<0.05$). The Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of Drp-1, Fis-1, and MFF proteins in the H9c2 cells in DOX group were increased ($P<0.05$); compared with DOX group, the expression levels of Fis-1 and MFF proteins in the H9c2 cells in DOX+Drp-1 inhibitor group were decreased ($P<0.05$). **Conclusion:** EMPA can alleviate DOX-induced myocardial lesions and cardiac dysfunction in rats, and reduce cardiomyocyte apoptosis and autophagy, and its mechanism may be related to the up-regulation of SIRT1 and PGC-1 α protein expressions and the down-regulation of Drp1 protein expression by EMPA.

KEYWORDS Doxorubicin; Cardiotoxicity; Empagliflozin; Mitochondrial fission; Sirtuin 1; Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha; Dynamin-related protein 1

阿霉素 (doxorubicin, DOX)、柔红霉素、表红霉素和依甲红霉素是美国食品药品监督管理局 (Food and Drug Administration, FDA) 批准的用于临床癌症治疗的主要蒽环类化疗药物^[1]。蒽环类药物的使用与恶心、呕吐和最为严重的心脏毒性等不良反应有关^[2], 其中DOX对心脏毒性最大, 但也被认为对不同肿瘤最为有效^[3-4]。因此, 临床对深入研究和开发减轻DOX诱导的心脏毒性药物需求迫切。线粒体通常被认为是DOX的主要毒性作用靶点, 线粒体功能障碍是DOX诱导的心脏毒性

的标志, 可导致心肌细胞凋亡、坏死、铁死亡和细胞焦亡^[2, 5]。钠-葡萄糖共转运蛋白 (sodium-glucose cotransporters, SGLTs) 是存在于人体多种细胞质膜中的转运蛋白家族^[6]。其中SGLT2被认为与肾小管对原尿中过滤的葡萄糖的重吸收密切相关。部分糖尿病患者从使用SGLT2抑制剂 (inhibitors of SGLT2, iSGLTs) [卡格列净、达格列净或恩格列净 (empagliflozin, EMPA) 等] 药物治疗中获益, 其机制可能是iSGLTs能够抑制肾小管对葡萄糖的重吸收, 从而降低血糖水平^[6]。研究^[7-8]显

示: iSGLT2具有脱靶心脏的机制,能够降低心力衰竭的发生率并减少心血管损伤。动力学相关蛋白1(dynamin-related protein-1, Drp-1)是一种介导(心肌细胞)线粒体裂变的关键蛋白,其还在心肌细胞的自噬、线粒体自噬、凋亡和坏死中发挥关键作用^[9]。哺乳动物沉默信息调节因子相关酶(silent information regulator, SIRT)家族,成员包括SIRT1~7,均属于一组依赖烟酰胺腺嘌呤二核苷酸(nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺)的Ⅲ类组蛋白去乙酰化酶(histone deacetylases, HDACs),分布于细胞核、细胞质和线粒体中^[10]。此类HDACs的所有同分异构体成员整体结构相似,每个异构体都有1个用于结合NAD⁺的大的Rossmann折叠结构域^[10]。其中关于SIRT1的研究最为深入,其可能通过调节活性氧(reactive oxygen species, ROS)的水平、转录共激活因子过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活子1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha, PGC-1 α)、信号转导与转录激活因子3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、甾醇调节元件结合蛋白1c(sterol regulatory element-binding protein-1c, SREBP-1c)、叉头盒转录因子O 1/3(forkhead box O 1/3, FoxO 1/3)和腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)来恢复线粒体功能,并在调节线粒体生物发生中发挥重要作用^[11-12]。激活SIRT1后可通过作用于嵌入盘蛋白,参与缓解DOX诱导的心脏毒性^[13]。本研究通过在体建立DOX诱导的大鼠心脏损伤(heart injury, HI)模型,探讨EMPA通过上调SIRT1和PGC-1 α 蛋白的表达,下调Drp-1蛋白的表达,增强心肌线粒体功能,减少心肌细胞凋亡和自噬,保护心肌,改善DOX诱导的心脏毒性分子机制。本研究旨在为临床上进一步利用EMPA保护心肌免受DOX诱导的心脏毒性提供更为深入的药理学作用机制和理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物、细胞、主要试剂和仪器 24只6-7周龄雄性Wistar大鼠,体质量210~240 g,购自斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010。大鼠心肌细胞系H9c2细胞购自武汉普诺赛生命科技有限公司。Masson三色染色液购自武汉赛维尔生物科技有限

公司,苏木精染色液购自北京中衫金桥生物技术有限公司,伊红染色液购自广州索莱宝生物科技有限公司,脱氧核糖核苷酸末端转移酶介导的dUTP缺口末端标记法(TdT-mediated dUTP nick end labeling, TUNEL)检测液购自上海碧云天生物技术股份有限公司,微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein light chain 3, LC3)、自噬关键分子酵母Atg6同系物BECLIN1、泛素结合蛋白P62、SIRT1、PGC-1 α 、Drp-1、线粒体裂变1蛋白(mitochondrial fission protein 1, Fis-1)、线粒体裂变因子(mitochondrial fission factor, MFF)、TUBULIN和HRP-标记IgG二抗购自艾博抗(上海)贸易有限公司。便携式数字化彩色超声诊断仪(型号:VINNO6LAB)购自飞依诺科技(苏州)股份有限公司,光学显微镜(型号:BX43)和荧光显微镜(型号:BX53)均购自奥林巴斯(中国)有限公司。

1.2 DOX诱导大鼠HI模型的制备和实验分组 所有大鼠饲养于恒温(21℃~25℃)、恒湿(55%~70%)、配备12 h/12 h光照/黑暗循环的SPF级鼠房,4只大鼠1个鼠笼。大鼠饲喂标准啮齿类动物饲料,可自由采食和饮水。大鼠适应性饲养1周后,接受造模手术。24只大鼠随机分为对照组、HI组和HI+EMPA组,每组8只。对照组大鼠正常维持饲养。HI组大鼠建立DOX诱导的大鼠HI模型,大鼠每周一和周四分别进行1次腹腔注射,给予剂量为1.25 mg·kg⁻¹的DOX,连续给药6周,诱导建立HI大鼠模型。6周后进行动物心脏超声检测,观察心脏功能变化。HI+EMPA组大鼠在诱导建立HI模型6周后,每日灌胃10 mg·kg⁻¹ EMPA,连续灌胃14 d。所有处理结束后,于次日对大鼠进行心脏超声检测,然后采集大鼠尾静脉血,并采用颈椎脱臼法处死大鼠,采集其心脏,备用。本研究的动物实验获得新疆医科大学附属肿瘤医院伦理委员会审核批准(审批号:LL-202309110001),严格按照《实验动物管理条例》进行,遵循3R原则。

1.3 心脏超声心动图检测各组大鼠心脏功能 采用乙醚对动物进行呼吸麻醉后,大鼠胸部备毛,涂上超声耦合剂,使用便携式数字化彩色超声诊断仪对其进行左心室胸骨旁长轴切面和左心室胸骨旁短轴切面超声心动图检测,选择M-mode超声图像,测量大鼠左室收缩末内径(end-systolic left ventricular internal dimension, LVIDs)、左室射血

分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF) 和左室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS) 等指标。

1.4 HE染色和Masson染色观察各组大鼠心肌组织病理形态表现和心肌组织中胶原纤维沉积情况

HE染色: 采集各组大鼠心脏左心室, 立即浸没于4%多聚甲醛中, 在4℃下固定超过48 h。制备石蜡组织切片 (厚度5 μm)。切片经烤片、脱蜡、水化后, 采用苏木精染液染色3~5 min, 流水冲洗; 用1%盐酸酒精分化约1 min, 返蓝液返蓝约1 min; 伊红染液染色3~5 min; 最后二甲苯透明化处理, 中性树胶封片, 在光学显微镜下镜检、观察和采集图像。Masson三色染色液染色: 将切片浸没于Masson A液室温浸泡过夜 (约15 h), 然后继续将切片浸泡于Masson A液内65℃烤箱孵育30 min, 流水洗至组织黄色褪去; 切片浸入Masson B液与Masson C液等体积混合液内, 浸染1 min, 流水冲洗; 切片浸入Masson D液浸染6 min, Masson E液浸泡约1 min, 不经水洗, 直接入Masson F液染色20~30 s。最后经二甲苯透明化处理, 中性树胶封片, 在光学显微镜下镜检、观察和采集图像。

1.5 TUNEL法检测各组大鼠心肌细胞凋亡情况

取大鼠左室心肌组织切片, 经烤片、脱蜡和水化后, 滴加Proteinase K工作液进行修复, 滴加足够的TUNEL检测液, 37℃避光孵育2 h, 4, 6-二氨基-2-苯基吲哚 (4, 6-diamino-2-phenylindole, DAPI) 染液染细胞核30 min。荧光显微镜下镜检、观察和采集图像。结果计数为每个视野下TUNEL染色阳性细胞数以代表心肌细胞凋亡情况。每个视野下TUNEL染色阳性细胞数为每个视野下TUNEL红色荧光细胞数。

1.6 采用试剂盒检测各组大鼠血清中乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 和肌酸激酶 (creatine kinase, CK) 水平 收集大鼠血清, 使用大鼠血清LDH和CK酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 法检测试剂盒进行测定。具体步骤按照试剂盒说明书操作, 最后在波长450 nm下检测各孔吸光度 (A) 值。根据试剂盒自带的标准品建立的标准曲线和测得各孔A值计算LDH和CK水平。LDH标准曲线计算公式: 血清LDH水平=1 009×各孔A值+211;

CK标准曲线计算公式: 血清CK水平=1 486×各孔A值+324。

1.7 细胞培养 大鼠心肌细胞系H9c2细胞培养于含有10%胎牛血清和1%青-链霉素的完全杜氏改良Eagle培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) 培养液中, 置于5% CO₂、37℃恒温湿润的细胞孵育箱中维持培养。

1.8 细胞实验分组和处理方式 体外建立DOX诱导的大鼠心肌细胞损伤模型。细胞实验分组-1: 对照组 (H9c2细胞正常培养不做任何处理)、DOX组 (H9c2细胞培养液中加入0.1 μmol·L⁻¹ DOX处理48 h, 诱导心肌细胞损伤^[14])、DOX+EMPA组 (H9c2细胞培养液中加入0.1 μmol·L⁻¹ DOX和500 nmol·L⁻¹ EMPA, 处理48 h^[15]) 和DOX+EMPA+EX527 (SIRT1抑制剂) 组 (H9c2细胞培养液中加入10 μmol·L⁻¹ EX527预处理1 h, 然后加入0.1 μmol·L⁻¹ DOX和500 nmol·L⁻¹ EMPA, 处理48 h^[16])。细胞实验分组-2: 对照组 (H9c2细胞正常培养不做任何处理)、DOX组 (H9c2细胞培养液中加入0.1 μmol·L⁻¹ DOX处理48 h, 诱导心肌细胞损伤) 和DOX+Drp-1抑制剂组 [H9c2细胞培养液中加入75 μmol·L⁻¹ Mdivi-1 (Drp-1抑制剂) 预处理2 h^[17], 然后加入0.1 μmol·L⁻¹ DOX处理48 h]。

1.9 Western blotting法检测各组细胞中自噬相关蛋白LC3、BECLIN1、P62、SIRT1和PGC-1α以及线粒体裂变相关因子Drp-1、Fis-1和MFF蛋白表达水平 分别按照细胞实验分组-1和细胞实验分组-2处理细胞。每皿6孔板细胞培养物加入1 mL添加有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液裂解细胞。提取总蛋白, 进行常规十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE), 4℃采用300 mA恒流转膜1 h。将PAGE上的总蛋白电转印至PVDF膜上。用5%脱脂奶粉室温封闭1 h。向膜上滴加一抗工作液, 4℃孵育过夜; 次日向膜上滴加二抗工作液, 室温孵育1 h。用超敏化学发光底物 (enhanced chemiluminescence, ECL) 对目的条带进行显影。抗体工作液稀释度: LC3 (1:1 500)、BECLIN1 (1:2 000)、P62 (1:1 500)、SIRT1 (1:1 500)、PGC-1α (1:1 500)、Drp-1 (1:1 500)、Fis-1 (1:1 500)、MFF (1:1 500)、TUBULIN (1:2 000) 和HRP-标记IgG二抗 (1:5 000)。细胞

实验分组-1: 检测在各组细胞中 LC3、BECLIN1、P62、SIRT1、PGC-1 α 和 Drp-1 蛋白的表达水平; 细胞实验分组-2: 检测在各组细胞中 Drp-1、Fis-1 和 MF1 蛋白表达水平。采用内参 TUBULIN 的灰度值对目的蛋白的灰度值进行标准化处理, 标准化后的目的蛋白条带灰度值=目的蛋白条带灰度值/内参 TUBULIN 蛋白条带灰度值; 以标准化处理后的对照组目的蛋白灰度值均值进行归一化, 对照组蛋白表达水平为 1.00; 其他分组标准化处理后的目的蛋白表达水平=其他分组标准化处理后的目的蛋白灰度值/对照组目的蛋白灰度值。

1.10 统计学分析 采用 GraphPad v8 软件进行统计学分析。各组大鼠心脏超声检测相关指标 LVIDs、LVEF 和 LVFS, 大鼠心肌组织 TUNEL 染色每视野 TUNEL 阳性细胞数, 各组大鼠血清中 LDH 和 CK 水平, 各组大鼠心肌 H9c2 细胞中 BECLIN1 和 P62 蛋白表达水平, LC3-I/LC3-II 比值以及 SIRT1、PGC-1 α 、Drp-1、Fis-1 和 MF1 蛋白表达水平均服从正态性分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 两两组间样本均数事后比较采用 Turkey's 检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 心脏超声检测各组大鼠的心脏功能 与对照

组比较, HI 组大鼠 LVIDs 升高 ($P < 0.05$), LVEF 和 LVFS 降低 ($P < 0.05$); 与 HI 组比较, HI+EMPA 组大鼠 LVIDs 降低 ($P < 0.05$), LVEF 和 LVFS 均升高 ($P < 0.05$)。见表 1。

表1 各组大鼠LVIDs、LVEF和LVFS

Tab. 1 LVIDs, LVEF, and LVFS of rats in various groups ($n=8, \bar{x} \pm s$)

Group	LVIDs	LVEF ($\eta/\%$)	LVFS ($\eta/\%$)
Control	4.06 \pm 1.11	82.4 \pm 1.3	53.2 \pm 2.6
HI	5.82 \pm 0.83*	43.1 \pm 1.7*	22.6 \pm 1.4*
HI+EMPA	4.24 \pm 1.77 Δ	66.7 \pm 2.2 Δ	51.4 \pm 2.1 Δ
F	4.45	997.00	538.90
P	<0.05	<0.05	<0.05

* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with HI group.

2.2 各组大鼠心肌组织病理形态表现和心肌组织中胶原纤维沉积情况

大鼠心肌组织 HE 和 Masson 染色结果显示: 对照组大鼠心脏心肌纤维排列整齐, 间质未见明显炎症细胞浸润和胶原纤维沉积; 与对照组比较, HI 组大鼠心肌纤维排列紊乱, 心肌间质扩大, 可见炎症细胞浸润和胶原纤维沉积; 与 HI 组比较, HI+EMPA 组大鼠心肌纤维排列较为规整, 间质未见明显炎症细胞浸润, 可见少量胶原纤维沉积, 见图 1。

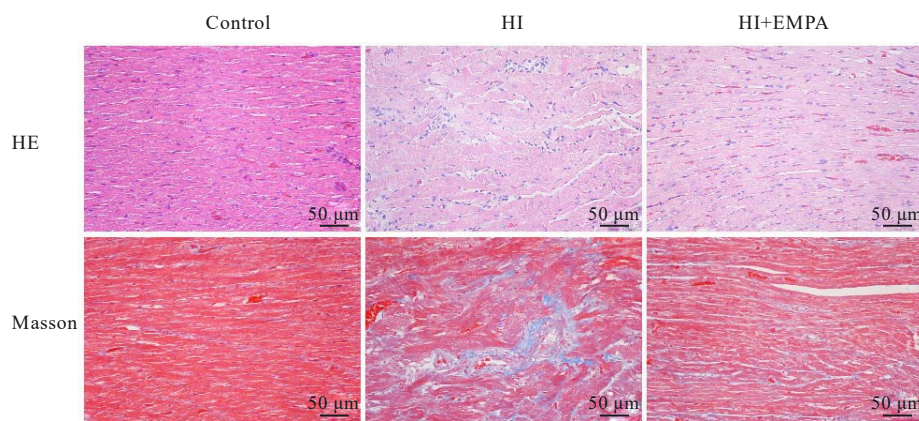


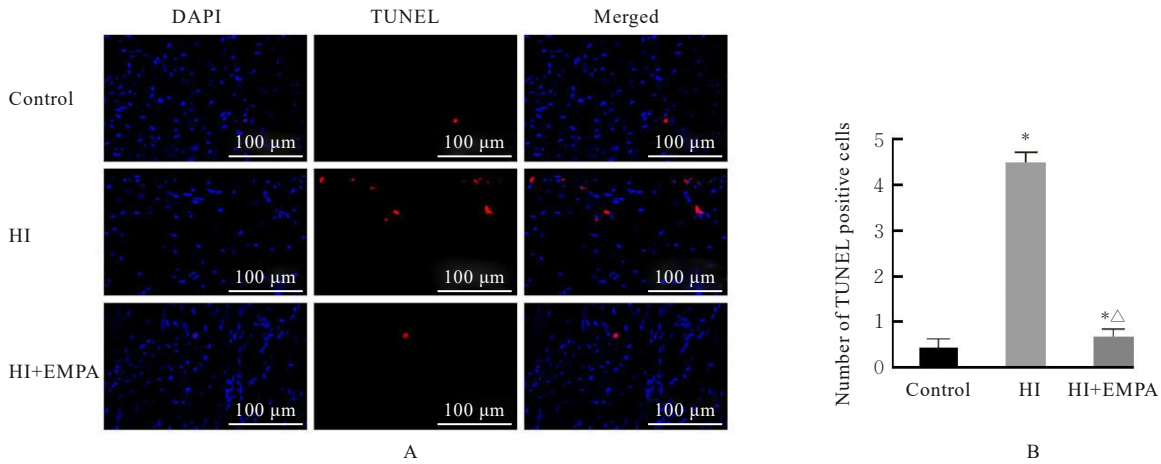
图1 各组大鼠心肌组织病理形态表现和心肌组织中胶原纤维沉积情况

Fig. 1 Pathomorphology of myocardium tissue and deposition of collagen fibers in myocardium tissue of rats in various groups

2.3 各组大鼠心肌细胞凋亡情况 与对照组比较, HI 组大鼠心肌组织 TUNEL 阳性细胞数升高 ($P < 0.05$); 与 HI 组比较, HI+EMPA 组大鼠心肌组

织 TUNEL 阳性细胞数降低 ($P < 0.05$)。见图 2。

2.4 各组大鼠血清中 LDH 和 CK 水平 与对照组比较, HI 组大鼠血清中 LDH 和 CK 水平升高 ($P <$



* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with HI group.

图2 各组大鼠心肌组织细胞凋亡情况(A)和心肌组织TUNEL阳性细胞数(B)

Fig. 2 Apoptosis of myocardium tissue cells (A) and number of TUNEL positive cells(B) of rats in various groups

0.05); 与HI组比较, HI+EMPA组大鼠血清中LDH和CK水平降低 ($P < 0.05$)。见表2。

表2 各组大鼠血清中LDH和CK水平

Tab. 2 Levels of serum LDH and CK of rats in various groups [$n=8, \bar{x} \pm s, \lambda_B / (U \cdot L^{-1})$]

Group	Serum LDH	Serum CK
Control	1 967 ± 213	1 233 ± 239
HI	3 056 ± 261*	4 136 ± 312*
HI+EMPA	1 745 ± 188 Δ	875 ± 178 Δ
F	79.39	412.40
P	<0.001	<0.001

* $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with HI group.

2.5 各组大鼠心肌H9c2细胞中BECLIN1和P62蛋白表达水平以及LC3-I/LC3-II比值 与对照组比较, DOX组和DOX+EMPA+EX527组大鼠H9c2细胞中BECLIN1蛋白表达水平和LC3-I/LC3-II比值升高 ($P < 0.05$), DOX组、DOX+EMPA组和DOX+EMPA+EX527组H9c2细胞中P62蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与DOX组比较, DOX+EMPA组大鼠H9c2细胞中BECLIN1蛋白表达水平和LC3-I/LC3-II比值降低 ($P < 0.05$), P62蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), DOX+EMPA+EX527组H9c2细胞中LC3-I/LC3-II比值降低 ($P < 0.05$); 与DOX+EMPA组比较, DOX+EMPA+EX527组大鼠H9c2细胞中BECLIN1蛋白表达水平和LC3-I/LC3-II比值升高 ($P < 0.05$),

P62蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。见图3。

2.6 各组大鼠心肌H9c2细胞中SIRT1、PGC-1 α 和Drp-1蛋白表达水平

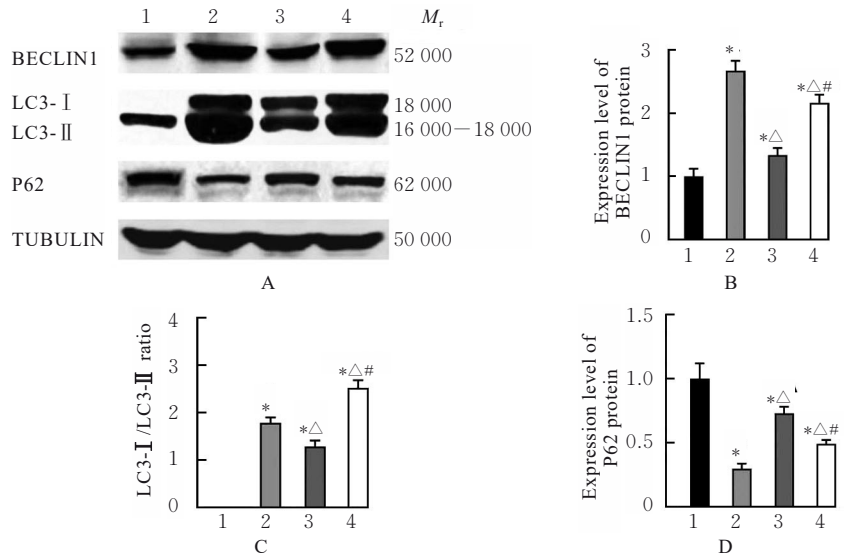
与对照组比较, DOX组大鼠心肌H9c2细胞中SIRT1和PGC-1 α 蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$), DOX组和DOX+EMPA+EX527组H9c2细胞中Drp-1蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与DOX组比较, DOX+EMPA组和DOX+EMPA+EX527组大鼠心肌H9c2细胞中SIRT1及PGC-1 α 蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$), Drp-1蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$); 与DOX+EMPA组比较, DOX+EMPA+EX527组大鼠心肌H9c2细胞中Drp-1蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。见图4。

2.7 各组大鼠心肌H9c2细胞中Drp-1、Fis-1和MFF蛋白表达水平

与对照组比较, DOX组大鼠心肌H9c2细胞中Drp-1、Fis-1和MFF蛋白表达水平升高 ($P < 0.05$); 与DOX组比较, DOX+Drp-1抑制剂组大鼠心肌H9c2细胞中Fis-1和MFF蛋白表达水平降低 ($P < 0.05$)。见图5。

3 讨论

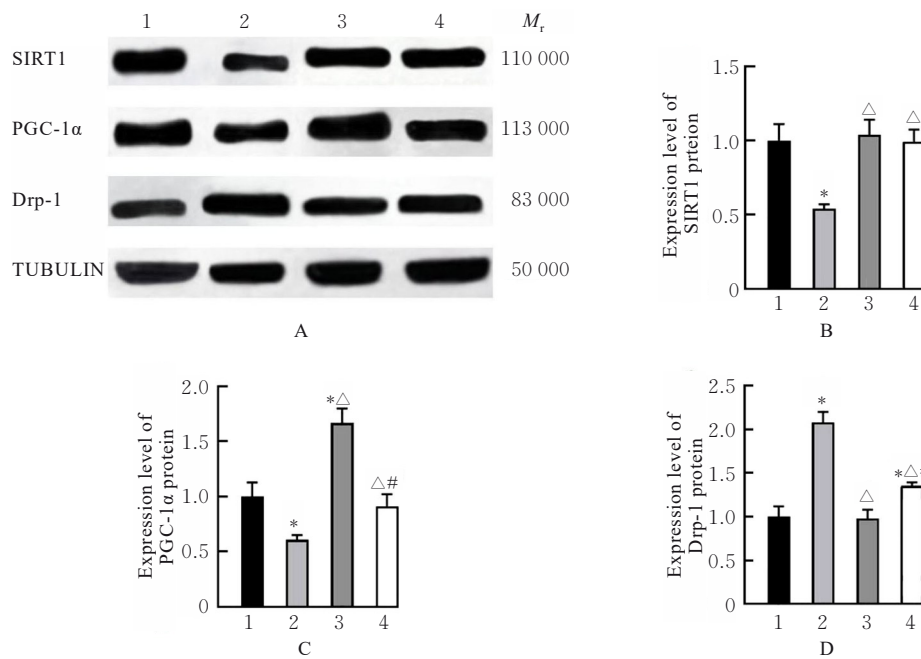
接受DOX治疗的癌症幸存者患心血管疾病的风险大大增加。DOX可诱导剂量依赖性、进行性和潜在致死性心肌损伤。心脏毒性通常在抗癌治疗1年内以LVEF降低的形式出现; 心肌病可能发展为充血性心力衰竭, 一旦出现上述情况, 约50%的患者会在2年内死亡^[18]。DOX的心脏毒性机制具有复杂性, 涉及多种机制: DOX可抑制线粒体



Lane 1: Control group; Lane 2: DOX group; Lane 3: DOX+EMPA group; Lane 4: DOX+EMPA+EX527 group. 1: Control group; 2: DOX group; 3: DOX+EMPA group; 4: DOX+EMPA+EX527 group. * $P < 0.05$ compared with control group; $\triangle P < 0.05$ compared with DOX group; # $P < 0.05$ compared with DOX+EMPA group.

图3 各组大鼠心肌H9c2细胞中BECLIN1、LC3-I、LC3-II和P62蛋白表达电泳图(A)及直条图(B~D)

Fig. 3 Electrophoregram(A) and histograms(B~D) of expressions of BECLIN1, LC3-I, LC3-II, and P62 protein in myocardial H9c2 cells of rats in various groups



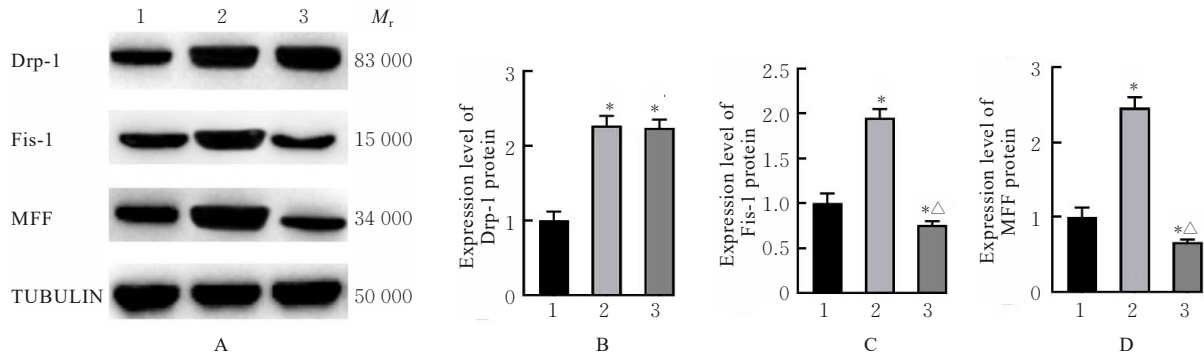
Lane 1: Control group; Lane 2: DOX group; Lane 3: DOX+EMPA group; Lane 4: DOX+EMPA+EX527 group. 1: Control group; 2: DOX group; 3: DOX+EMPA group; 4: DOX+EMPA+EX527 group. * $P < 0.05$ compared with control group; $\triangle P < 0.05$ compared with DOX group; # $P < 0.05$ compared with DOX+EMPA group.

图4 各组大鼠H9c2细胞中SIRT1、PGC-1α和Drp-1蛋白表达电泳图(A)及直条图(B~D)

Fig. 4 Electrophoregram(A) and histograms(B~D) of expressions of SIRT1, PGC-1α and Drp-1 proteins in myocardial H9c2 cells of rats in various groups

电子传递链的功能, 诱导线粒体通透性转换孔开放以及促凋亡蛋白的释放, 诱导细胞凋亡^[19]。本研

究结果显示: 与对照组比较, HI组大鼠LVIDs升高, LVEF和LVFS降低; 心脏心肌组织可见炎性



Lane 1: Control group; Lane 2: DOX group; Lane 3: DOX+Drp-1 inhibitor group. * $P < 0.05$ compared with control group; $\Delta P < 0.05$ compared with DOX group.

图5 各组大鼠H9c2细胞中Drp-1、Fis-1和MFf蛋白表达电泳图(A)及直条图(B~D)

Fig. 5 Electrophoregram (A) and histograms (B-D) of expressions of Drp-1, Fis-1 and MFf proteins in myocardial H9c2 cells of rats in various groups

细胞浸润和胶原纤维增生, 心肌纤维排列紊乱, 结构异常; 心肌组织 TUNEL 阳性细胞数升高; 血清中 LDH 和 CK 水平升高; 自噬相关蛋白 LC3-I / LC3-II 比值和 BECLIN1 蛋白表达水平升高, P62 蛋白表达水平降低, 表明 DOX 诱导的大鼠 HI 模型造模成功。

EMPA 已被部分心衰治疗指南推荐为常规治疗药物, 与其他 iSGLT2 比较, EMPA 对 SGLT2 具有更高的选择性, 利尿作用更强, 在降低心衰患者心血管事件和死亡风险方面有更充分的证据, 如名为“EMPRISE”的临床试验的第 I 期中期分析结果显示: 与西他列汀比较, 在有或没有心血管病史的 2 型糖尿病患者中, 接受 EMPA 作为常规治疗与患者因心衰住院的风险降低存在关联^[20]。EMPULSE 临床试验结果显示: 对于因急性心衰住院的患者, 开始使用 EMPA 最早可在第 15 天观察到临床获益; 而且可改善患者症状、身体限制和生活质量并持续到 90 d^[21]。这与 EMPA 保护心肌细胞线粒体功能和线粒体生物发生有关。EMPA 可稳定线粒体内 Ca^{2+} 水平以调节细胞内氧化应激和炎症水平, 稳定线粒体功能; 还可稳定线粒体动力学, 调节线粒体自噬、融合和裂变以及提高 mtDNA 数量和质量的稳定性等^[22]。临床前动物模型研究^[23-24]显示: EMPA 通过激活线粒体自噬通路, 促进线粒体稳态的维持, 减轻小鼠心脏微血管缺血/再灌注损伤。EMPA 还可通过激活 Wnt/ β -连环蛋白 (β -catenin) 信号通路刺激自噬受体 FUN14 域包含蛋白 1 (FUN14 domain containing 1, FUNDC1) 依赖性线粒体质量控制, 以有效改善

3 型心肾综合征小鼠模型的心脏线粒体功能以及心脏和肾脏功能^[25]。EMPA 抑制线粒体 ROS 的产生, 减轻糖尿病大鼠模型的诱发性心房颤动^[26]。本研究结果显示: 与 HI 组比较, HI+EMPA 组大鼠 LVIDs 降低, LVEF 和 LVFS 均升高; 心肌组织间质仅可见少量出血, 心脏心肌组织趋于正常; 心肌组织 TUNEL 阳性细胞数降低; 血清中 LDH 和 CK 水平降低; 自噬相关蛋白 LC3-I / LC3-II 比值和 BECLIN1 蛋白表达水平降低, P62 蛋白表达水平升高, 表明 EMPA 治疗后, HI 组大鼠 HI 得到明显改善, 心肌自噬水平降低, 心肌死亡减少。

SIRT1/PGC-1 α 促进线粒体生物发生, 提高线粒体功能, 糖尿病治疗药物坎格列净通过 SIRT1/PGC-1 α 介导促进脂肪细胞的线粒体重塑^[27]。给予重症急性胰腺炎小鼠模型 SIRT1 激活剂白藜芦醇治疗, 可通过激活 SIRT1/PGC-1 α 介导的线粒体生物发生, 降低氧化应激, 抑制胰腺细胞 NLR 家族 pyrin 域蛋白 3 (NLR family pyrin domain containing protein 3, NLRP3) 炎性小体-细胞焦亡信号轴的激活和微循环功能障碍^[28]。在心肌细胞中抑制 SIRT1 的泛素化降解可通过增强线粒体功能, 降低因氧-葡萄糖剥夺/氧再灌注引起的心肌功能障碍^[29]。SIRT1 的另一种激活剂——人参皂苷 Rc 可通过增强线粒体能量代谢和生物发生, 改善因缺氧/再灌注引起的心肌和神经元损伤^[30]。Drp-1 是介导线粒体裂变的关键蛋白, Drp-1 水平上调可促进线粒体裂变。过表达 Drp-1 可导致线粒体自噬后线粒体融合失败, 引起内皮细胞凋亡和冠状动脉损伤^[31]。在衰老心脏发生缺血/再灌注后血栓反应蛋

白-1介导增强 Drp-1 信号, 诱导因氧化应激引起的线粒体裂变和心肌损伤^[32]。在本研究中, 与对照组比较, 体外 DOX 诱导的大鼠心肌细胞损伤模型(DOX 组) 中 SIRT1 和 PGC-1 α 蛋白表达水平降低, Drp-1 蛋白表达水平升高。向体外 DOX 诱导的大鼠心肌细胞损伤模型给予 EMPA 处理后, 与 DOX 组比较, DOX+EMPA 组大鼠 H9c2 细胞 SIRT1 和 PGC-1 α 蛋白表达水平上调, Drp-1 蛋白表达水平被抑制; 而加入 SIRT1 抑制剂 EX527 预处理后, 与 DOX+EMPA 组比较, DOX+EMPA+EX527 组大鼠 H9c2 细胞中 Drp-1 蛋白表达水平降低。与对照组比较, DOX 组大鼠 H9c2 细胞中 Drp-1、Fis-1 和 MFF 蛋白表达水平升高, 提示线粒体裂变水平升高; 与 DOX 组比较, DOX+Drp-1 抑制剂组大鼠 H9c2 细胞中 Fis-1 和 MFF 蛋白表达水平降低, 提示线粒体裂变水平降低。

综上所述, EMPA 可减轻 DOX 诱导大鼠心肌病变和心脏功能异常, 降低心肌细胞凋亡和自噬, 其机制可能与 EMPA 上调 SIRT1 和 PGC-1 α 蛋白表达水平, 降低 Drp1 蛋白表达水平有关。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

李佳蔚参与实验操作和论文撰写, 阿地力江和吴莉参与实验数据的统计学处理及分析, 姜芸参与论文审阅和修改。

[参考文献]

- [1] MATTIOLI R, ILARI A, COLOTTI B, et al. Doxorubicin and other anthracyclines in cancers: activity, chemoresistance and its overcoming [J]. *Mol Aspects Med*, 2023, 93:101205.
- [2] CHRISTIDI E, BRUNHAM L R. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Cell death Dis*, 2021, 12(4):339.
- [3] WALLACE K B, SARDÃO V A, OLIVEIRA P J. Mitochondrial determinants of doxorubicin-induced cardiomyopathy [J]. *Circ Res*, 2020, 126(7):926-941.
- [4] SHEIBANI M, AZIZI Y, SHAYAN M, et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: an overview on pre-clinical therapeutic approaches [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2022, 22(4):292-310.
- [5] 刘诗瑶, 张梦晓, 刘浩. 线粒体质量控制和阿霉素心肌损伤中的作用研究进展[J]. *中国药理学通报*, 2024, 40(10):1814-1818.
- [6] SANO R, SHINOZAKI Y, OHTA T. Sodium-glucose cotransporters: functional properties and pharmaceutical potential[J]. *J Diabetes Investig*, 2020, 11(4):770-782.
- [7] GARCÍA-ROPERO Á, VARGAS-DELGADO A P, SANTOS-GALLEGO C G, et al. Inhibition of sodium glucose cotransporters improves cardiac performance [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(13):3289.
- [8] LUCONI M, RAIMONDI L, DI FRANCO A, et al. Which is the main molecular target responsible for the cardiovascular benefits in the EMPA-REG OUTCOME trial? A journey through the kidney, the heart and other interesting places [J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2020, 26(12):1071-1078.
- [9] KAUR S, KHULLAR N, NAVIK U, et al. Multifaceted role of dynamin-related protein 1 in cardiovascular disease: from mitochondrial fission to therapeutic interventions [J]. *Mitochondrion*, 2024, 78:101904.
- [10] KANE A E, SINCLAIR D A. Sirtuins and NAD⁺ in the development and treatment of metabolic and cardiovascular diseases [J]. *Circ Res*, 2018, 123(7):868-885.
- [11] RAKSHE P S, DUTTA B J, CHIB S, et al. Unveiling the interplay of AMPK/SIRT1/PGC-1 α axis in brain health: promising targets against aging and NDDs [J]. *Ageing Res Rev*, 2024, 96:102255.
- [12] ZHANG J, REN D, FEDOROVA J, et al. SIRT1/SIRT3 Modulates redox homeostasis during ischemia/reperfusion in the aging heart [J]. *Antioxidants (Basel)*, 2020, 9(9):858.
- [13] 李登科, 张伟, 黄从新. SIRT1介导的信号通路在阿霉素诱导心脏毒性中的作用机制[J]. *心血管病学进展*, 2024, 45(3):257-260.
- [14] HUANG P, BAI L, LIU L, et al. Redd1 knockdown prevents doxorubicin-induced cardiac senescence [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(10):13788-13806.
- [15] ABDULRAHMAN N, IBRAHIM M, JOSEPH J M, et al. Empagliflozin inhibits angiotensin II-induced hypertrophy in H9c2 cardiomyoblasts through inhibition of NHE1 expression [J]. *Mol Cell Biochem*, 2022, 477(6):1865-1872.
- [16] GUAN S, XIN Y, DING Y, et al. Ginsenoside Rg1 protects against cardiac remodeling in heart failure via SIRT1/PINK1/parkin-mediated mitophagy [J]. *Chem Biodivers*, 2023, 20(2):e202200730.
- [17] SU Z D, LI C Q, WANG H W, et al. Inhibition of DRP1-dependent mitochondrial fission by Mdivi-1 alleviates atherosclerosis through the modulation of M1 polarization [J]. *J Transl Med*, 2023, 21(1):427.

- [18] LINDERS A N, DIAS I B, LÓPEZ FERNÁNDEZ T, et al. A review of the pathophysiological mechanisms of doxorubicin-induced cardiotoxicity and aging [J]. *NPJ Aging*, 2024, 10(1):9.
- [19] WU B B, LEUNG K T, POON E N. Mitochondrial-Targeted therapy for doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(3):1912.
- [20] PATORNO E, PAWAR A, FRANKLIN J M, et al. Empagliflozin and the risk of heart failure hospitalization in routine clinical care[J]. *Circulation*, 2019, 139(25): 2822-2830.
- [21] KOSIBOROD M N, ANGERMANN C E, COLLINS S P, et al. Effects of empagliflozin on symptoms, physical limitations, and quality of life in patients hospitalized for acute heart failure: results from the EMPULSE trial [J]. *Circulation*, 2022, 146(4):279-288.
- [22] LI Y, ZHANG Z, ZHANG Z, et al. Empagliflozin, a sodium-glucose cotransporter inhibitor enhancing mitochondrial action and cardioprotection in metabolic syndrome [J]. *J Cell Physiol*, 2024, 239(6):e31264.
- [23] CAI C, GUO Z, CHANG X, et al. Empagliflozin attenuates cardiac microvascular ischemia/reperfusion through activating the AMPK α 1/ULK1/FUNDC1/mitophagy pathway [J]. *Redox Biol*, 2022, 52:102288.
- [24] ZOU R, SHI W, QIU J, et al. Empagliflozin attenuates cardiac microvascular ischemia/reperfusion injury through improving mitochondrial homeostasis [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2022, 21(1):106.
- [25] CAI C, WU F, ZHUANG B, et al. Empagliflozin activates Wnt/ β -catenin to stimulate FUNDC1-dependent mitochondrial quality surveillance against type-3 cardiorenal syndrome [J]. *Mol Metab*, 2022, 64: 101553.
- [26] KOIZUMI T, WATANABE M, YOKOTA T, et al. Empagliflozin suppresses mitochondrial reactive oxygen species generation and mitigates the inducibility of atrial fibrillation in diabetic rats [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10:1005408.
- [27] YANG X, LIU Q, LI Y, et al. The diabetes medication canagliflozin promotes mitochondrial remodelling of adipocyte via the AMPK-SIRT1-PGC-1 α signalling pathway [J]. *Adipocyte*, 2020, 9(1):484-494.
- [28] WU S K, WANG L, WANG F, et al. Resveratrol improved mitochondrial biogenesis by activating SIRT1/PGC-1 α signal pathway in SAP [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1):26216.
- [29] YANG T T, ZHOU L H, GU L F, et al. CHK1 attenuates cardiac dysfunction via suppressing SIRT1-ubiquitination [J]. *Metabolism*, 2025, 162:156048.
- [30] HUANG Q, SU H, QI B, et al. A SIRT1 activator, ginsenoside Rc, promotes energy metabolism in cardiomyocytes and neurons [J]. *J Am Chem Soc*, 2021, 143(3):1416-1427.
- [31] AN X, MA X, LIU H, et al. Inhibition of PDGFR β alleviates endothelial cell apoptotic injury caused by DRP-1 overexpression and mitochondria fusion failure after mitophagy [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(11):756.
- [32] KELM N Q, BEARE J E, WEBER G J, et al. Thrombospondin-1 mediates DRP-1 signaling following ischemia reperfusion in the aging heart [J]. *FASEB Bioadv*, 2020, 2(5):304-314.