DOI: 10.14188/j.1671-8852.2025.0781　　**文章编号** 1671-8852(2026)10-1302-08

橙皮素通过AMPKα/SIRT1/PGC-1α通路改善高糖高脂诱导的AC16心肌细胞线粒体损伤与凋亡

徐飞雪　张　梦　李婉怡　郭莹莹　徐　蔓　唐其柱
武汉大学人民医院心血管内科/代谢与相关慢病湖北省重点实验室　湖北　武汉　430060

摘要　目的：研究橙皮素（HES）在高糖高脂诱导AC16心肌细胞氧化损伤中的影响及机制。方法：体外培养AC16心肌细胞，使用不同浓度橙皮素处理细胞24 h后通过CCK-8检测橙皮素对细胞活性的影响。使用300 μmol·L^{-1}棕榈酸与4.5 g·L^{-1} *D*-葡萄糖构建AC16细胞损伤模型。不同浓度橙皮素干预高糖高脂损伤细胞24 h后通过CCK-8试验及ELISA法检测细胞上清液乳酸脱氢酶(LDH)水平选取有效的干预浓度。随后细胞随机分为5组：对照组、橙皮素组、高糖高脂组、高糖高脂＋橙皮素组、高糖高脂＋橙皮素＋AMPK抑制剂Compound C（CC）组。通过DHE染色法检测细胞活性氧（ROS）蓄积，TUNEL染色法检测细胞凋亡率，JC-1荧光探针染色法检测细胞线粒体膜电位，MitoSOX RED荧光探针染色法检测线粒体氧化应激，ELISA法检测细胞上清液丙二醛（MDA）水平和超氧化物歧化酶（SOD）活性，ATP试剂盒检测细胞ATP水平，Western Blot检测B细胞淋巴瘤-2（Bcl-2）、Bcl-2相关X蛋白（Bax）、AMPK、p-AMPK、沉默信息调节因子1(SIRT1)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ共激活因子-1α(PGC-1α)、解偶联蛋白3(UCP3)蛋白表达变化。结果：和对照组比较，高糖高脂组心肌细胞活性显著降低，且心肌损伤标志物水平显著升高（$P<0.05$）；细胞凋亡增加，Bax水平升高而Bcl-2水平降低，活性氧增多、线粒体膜电位降低、线粒体氧化应激升高、MDA水平升高、SOD活性降低、ATP水平降低（$P<0.05$），AMPKα磷酸化水平、SIRT1、PGC-1α、UCP3表达降低（$P<0.05$）。与高糖高脂组比较，高糖高脂＋橙皮素组心肌细胞活性明显增加，且心肌损伤标志物水平降低（$P<0.05$）；细胞凋亡减少，Bax水平降低而Bcl-2水平升高，活性氧减少、线粒体膜电位升高、线粒体氧化应激降低、MDA水平降低、SOD活性升高、ATP水平升高（$P<0.05$），且AMPKα磷酸化水平、SIRT1、PGC-1α、UCP3表达升高（$P<0.05$），而使用AMPK抑制剂Compound C能削弱HES对上述通路蛋白的激活作用（$P<0.05$）。结论：橙皮素能够改善高糖高脂诱导的AC16心肌细胞线粒体损伤、氧化应激及细胞凋亡，其作用机制可能与激活AMPKα/SIRT1/PGC-1α/UCP3信号通路有关。

关键词　橙皮素；心肌细胞；线粒体损伤；氧化应激；凋亡；AMPK/SIRT1/PGC-1α信号通路；解偶联蛋白3
中图分类号　R54　　**文献标志码**　A

Hesperetin alleviates high glucose and high lipid induced mitochondrial damage and apoptosis in AC16 cardiomyocytes via the AMPKα/SIRT1/PGC-1α signaling pathway

XU Feixue, ZHANG Meng, LI Wanyi, GUO Yingying, XU Man, TANG Qizhu
Department of Cardiology, Renmin Hospital of Wuhan University & Hubei Key Laboratory of Metabolic and Related Chronic Diseases, Wuhan 430060, Hubei, China

Abstract

Objective: To investigate the effect and mechanism of hesperetin (HES) on oxidative damage induced by high glucose and high fat in AC16 cardiomyocytes. **Methods:** AC16 cardiomyocytes were

课题来源：国家自然科学基金区域创新发展联合基金项目（编号：U22A20269）。
作者简介：徐飞雪，女，2000—，医学硕士生，主要从事心血管疾病的研究，E-mail：xufeixue2022@163.com。
通信作者：唐其柱，E-mail：qztang@whu.edu.cn。

cultured *in vitro* and treated with different concentrations of hesperetin for 24 h. The effect of hesperetin on cell viability was detected by CCK-8. A cellular damage model was established using 300 μmol•L^{-1} palmitic acid and 4.5 g•L^{-1} *D*-glucose. After treating high glucose- and high fat-damaged cells with different concentrations of hesperetin for 24 h, effective concentrations were selected based on CCK-8 assay and ELISA measurement of lactate dehydrogenase (LDH) levels in the cell supernatant. Subsequently, cells were randomly divided into 5 groups: control group, hesperetin alone group, high glucose and high fat group, high glucose and high fat+hesperetin group, and high glucose and high fat+hesperetin+AMPK inhibitor Compound C (CC) group. Reactive oxygen species (ROS) accumulation was detected by DHE staining, apoptosis rate was detected by TUNEL staining, mitochondrial membrane potential was detected by JC-1 fluorescent probe staining, mitochondrial oxidative stress was detected by MitoSOX Red fluorescent probe staining, malondialdehyde (MDA) levels and superoxide dismutase (SOD) activity in the cell supernatant were detected by ELISA, cellular ATP levels were detected by an ATP assay kit, and protein expression of B-cell lymphoma 2 (Bcl-2), Bcl-2-associated X protein (Bax), AMPK, p-AMPK, silent information regulator 1 (SIRT1), peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha (PGC-1α), and uncoupling protein 3 (UCP3) was detected by Western Blot. **Results:** Compared with the control group, the high glucose and high fat group showed significantly reduced cardiomyocyte viability and increased levels of myocardial injury markers ($P<0.05$), as well as increased apoptosis, increased Bax but decreased Bcl-2 levels, increased reactive oxygen species, decreased mitochondrial membrane potential, increased mitochondrial oxidative stress, increased MDA levels, decreased SOD activity, decreased ATP levels ($P<0.05$), and decreased phosphorylation of AMPKα and expression of SIRT1, PGC-1α, and UCP3 ($P<0.05$). Compared with the high glucose and high fat group, the high glucose and high fat+hesperetin group showed significantly increased cardiomyocyte viability and decreased levels of myocardial injury markers ($P<0.05$), as well as decreased apoptosis, decreased Bax but increased Bcl-2 levels, decreased reactive oxygen species, increased mitochondrial membrane potential, decreased mitochondrial oxidative stress, decreased MDA levels, increased SOD activity, increased ATP levels ($P<0.05$), and increased phosphorylation of AMPKα and expression of SIRT1, PGC-1α, and UCP3 ($P<0.05$). Furthermore, the use of the AMPK inhibitor Compound C attenuated the activating effect of HES on the above pathway proteins ($P<0.05$). **Conclusion:** Hesperetin can ameliorate mitochondrial damage, oxidative stress, and apoptosis induced by high glucose and high fat in AC16 cardiomyocytes, and its mechanism may involve the activation of the AMPKα/SIRT1/PGC-1α/UCP3 signaling pathway.

Key Words　Hesperetin; Cardiomyocytes; Mitochondrial Damage; Oxidative Stress; Apoptosis; AMPK/SIRT1/PGC-1α Signaling Pathway; Uncoupling Protein 3

糖尿病心肌病(diabetic cardiomyopathy，DCM)是糖尿病最严重的并发症之一，以心肌肥厚、纤维化和心功能进行性恶化为特征，最终导致心力衰竭和高死亡率[1]。线粒体氧化应激损伤作为其核心发病机制之一，表现为活性氧(reactive oxygen species，ROS)过度积累及线粒体功能障碍，诱发心肌细胞凋亡[2]。因此，针对其核心机制，开发抑制氧化损伤的药物是治疗糖尿病心肌病的重点方向[3]。

橙皮素(hesperetin，HES)是一种主要存在于柑橘类水果中的黄酮类化合物，是橙皮苷的代谢产物。HES具有抗炎、抗糖尿病、抗微生物、神经保护及心脏保护等多效生物学功能，在食品添加剂与治疗药物开发领域均展现出广阔的应用前景[4-5]。研究[6]表明，橙皮素在体外可以改善过氧化氢(H_2O_2)、缺氧等有害刺激诱导的细胞凋亡、线粒体氧化应激，并经由腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)通路改善

胰岛素抵抗,对2型糖尿病具有保护效应[7]。现有研究[8-9]显示,橙皮素在糖尿病兔心肌缺血再灌注损伤及大鼠糖尿病心肌病模型中具有抑制氧化应激和细胞凋亡的心脏保护作用,但其具体分子机制尚未完全阐明。因此本研究构建了高糖棕榈酸诱导的AC16心肌细胞高糖高脂损伤模型,选择AMPK及下游通路探讨橙皮素对其影响及可能机制。

1 材料与方法

1.1 实验试剂及细胞培养

1.1.1 实验试剂 AC16心肌细胞购自中国科学院细胞库(中国上海);Dulbecco's Modified Eagle Medium/Nutrient Mixture F-12(DMEM/F12)培养基及胎牛血清(fetal bovine serum,FBS)购自美国GIBCO公司;橙皮素(hesperetin)购自上海Med-ChemExpress公司;CCK-8检测试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)检测试剂盒、DHE检测试剂盒、TUNEL检测试剂盒、丙二醛(malondialdehyde,MDA)检测试剂盒、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)检测试剂盒、ATP试剂盒、JC-1检测试剂盒、MitoSOX检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术公司;聚偏二氟乙烯(polyvinylidene fluoride,PVDF)膜购自美国Millipore公司,B细胞淋巴瘤-2(B-cell lymphoma 2,Bcl-2)、B细胞淋巴瘤-2相关X蛋白(Bcl-2-associated X protein,Bax)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ共激活因子-1α(peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha,PGC-1α)、解偶联蛋白3(uncoupling protein 3,UCP3)、β-微管蛋白(β-Tubulin)抗体购自武汉Abclonal公司,AMPKα及其抑制剂Compound C(CC)、磷酸化AMPKα(p-AMPKα)、沉默信息调节因子1(silent information regulator 1,SIRT1)抗体购自美国CST公司。

1.1.2 细胞培养 AC16心肌细胞使用含10% FBS的DMEM/F12培养基于37 ℃、5% CO_2培养箱中培养,待细胞密度达70%~90%时按照1:2的比例传代。

1.2 实验方法

1.2.1 CCK-8法检测AC16心肌细胞活性 接种100 μL的细胞悬液在96孔板中,培养24 h后,对各组细胞进行相应处理,24 h后每孔加入CCK-8溶液10 μL,孵育2 h后,用酶标仪测定在450 nm处的光密度(optical density,*OD*)。通过以下公式计算细胞的增殖活性:细胞活性=[(实验孔*OD*值-空白孔*OD*值)/(对照孔*OD*值-空白孔*OD*值)]×100%。

1.2.2 不同浓度橙皮素对高糖高脂诱导的AC16细胞活力的影响 采用0、25、50、75和100 μmol·L^{-1}的橙皮素与300 μmol·L^{-1}棕榈酸及4.5 g·L^{-1}*D*-葡萄糖共同干预细胞24 h后用CCK-8法检测细胞活性,后选定50 μmol·L^{-1}作为后续实验浓度。

1.2.3 实验分组 将AC16心肌细胞随机分为4组:对照组(Control组)正常培养,不作处理;橙皮素组(HES组)在对照组培养基基础上添加50 μmol·L^{-1}橙皮素;高糖高脂组(high glucose and high lipid,HGHL组)添加300 μmol·L^{-1}棕榈酸与4.5 g·L^{-1}*D*-葡萄糖;高糖高脂+橙皮素组(HGHL+HES组)用50 μmol·L^{-1}橙皮素加用300 μmol·L^{-1}棕榈酸与4.5 g·L^{-1}*D*-葡萄糖;高糖高脂+橙皮素+AMPK抑制剂组(HGHL+HES+CC组)用50 μmol·L^{-1}橙皮素加用300 μmol·L^{-1}棕榈酸与4.5 g·L^{-1}*D*-葡萄糖及CC。

1.2.4 细胞LDH检测 细胞接种于96孔板中,经过上述分组处理后,弃去细胞培养液,加入150 μL用磷酸盐缓冲溶液(phosphate buffer saline,PBS)稀释10倍的试剂盒提供的LDH释放试剂,孵育1 h,分别取各孔的上清液120 μL,加入到一新的96孔板中,每孔加入60 μL LDH检测工作液,混匀,室温避光孵育30 min,在490 nm处测定吸光度,根据标准曲线计算出样品中LDH活力。

1.2.5 TUNEL染色 用PBS将处理好的AC16细胞爬片洗涤1次,用4%多聚甲醛固定30 min,PBS洗涤3次,每次5 min,加入含0.3% Triton X-100的PBS缓冲液,室温孵育5 min,PBS洗涤3次,加入50 μL TUNEL检测液,37 ℃避光湿盒孵育1 h,PBS洗涤3次,DAPI封片后使用共聚焦显微镜拍摄图片并保存。

1.2.6 DHE探针染色 收集各组细胞,经过PBS洗涤后,加入5 μmol·L^{-1} DHE工作液,于37 ℃避光孵育30 min。PBS洗去细胞表面未结合的DHE,在560 nm波长处使用共聚焦显微镜观察并拍摄图片,通过Image J软件对其量化。

1.2.7 MDA、SOD活性检测 将处理好的细胞按MDA、SOD检测试剂盒说明书,将反应液与待测样品混合后测定各组样品吸光度值并计算含量或活力值。

1.2.8 ATP含量检测 将处理好的各组细胞按说明书配置工作液。每样用ATP检测裂解液处理后,转移至已加入工作液的不透光96孔板中测定分析。

1.2.9 JC-1探针染色 收集各组细胞,弃培养基,PBS

洗涤细胞1次，加入1 mL培养基1 mL JC-1染色工作液，充分混匀，于37 ℃、体积分数5%CO_2培养箱中孵育20 min。吸除上清液，JC-1染色缓冲液洗涤2次。加入2 mL培养基，在488 nm、560 nm波长处使用共聚焦显微镜下观察并拍照，通过Image J软件量化。

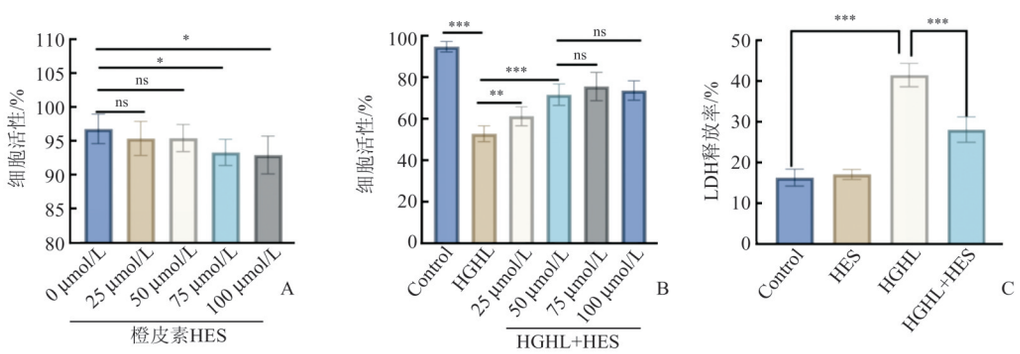
1.2.10　线粒体ROS染色　收集各组细胞，将细胞与5 μmol•L^{-1}的MitoSOX探针、5 μmol•L^{-1}的Mito-Tracker探针和5 μmol•L^{-1} Hoechst33342染液在37 ℃下避光孵育15 min，然后用无菌的PBS清洗2～3次，每次3～5 min。在405 nm、488 nm、560 nm波长处使用共聚焦显微镜实时观察并拍照，通过Image J软件量化。

1.2.11　Western Blot实验　细胞弃掉培养基后用PBS洗涤2次后，吸干液体加入RIPA裂解液，用细胞刮刮下细胞，收集细胞残液后在冰上进行超声裂解15次。裂解后进行高速离心（12 000 r•min^{-1}，10 min），收集上清液。使用BCA蛋白定量试剂盒测定并校正蛋白浓度。样本蛋白经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）后转至PVDF膜上，脱脂牛奶封闭1 h，加入一抗（1∶1 000）4 ℃孵育过夜。次日充分洗涤后二抗（1∶10 000）室温孵育1 h后，采用化学发光显影仪显影。ImageJ软件分析蛋白条带，以β-Tubulin为内参。

1.3　统计学分析　用SPSS软件进行统计分析和GraphPad Prism 10软件作图，图中数据均以独立实验均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。在进一步的统计分析前，通过单样本*K*-S检验检测数据的正态性。两组间数据的差异性比较使用*t*检验，多组间数据的比较通过单因素方差分析（One-way ANOVA），采用Tukey的后置检验。$P<0.05$表示差异具有统计学意义。

2　结果

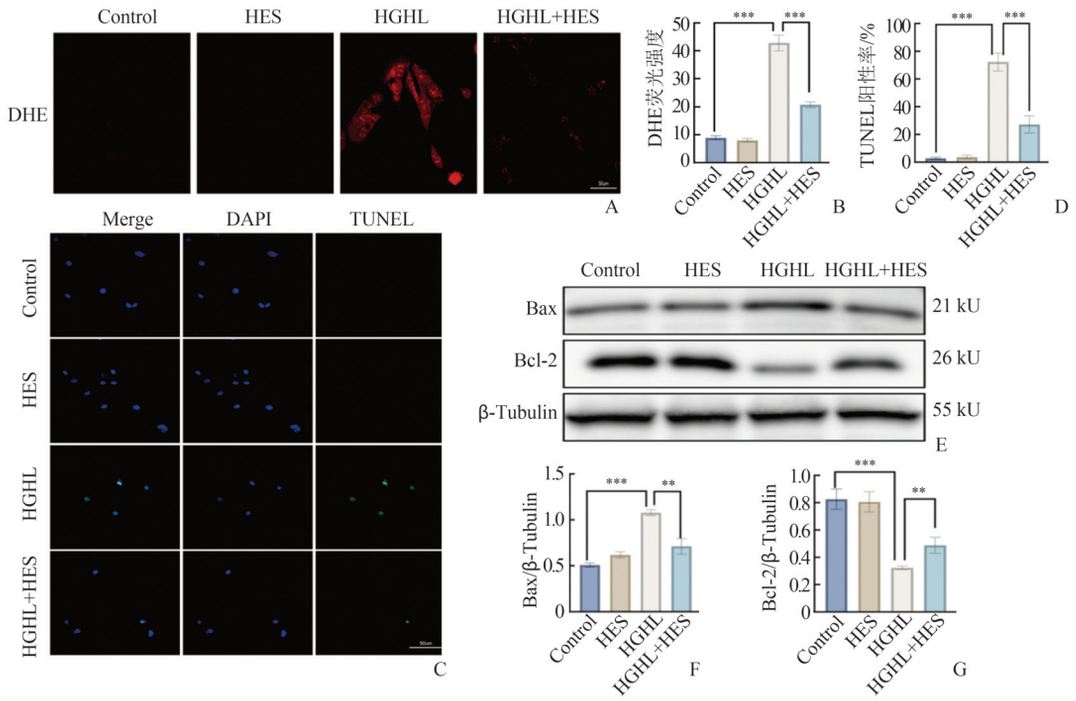
2.1　不同浓度橙皮素对高糖高脂诱导的心肌细胞活力的影响　CCK-8结果提示，4组不同浓度梯度的橙皮素干预AC16细胞24 h后，25 μmol•L^{-1}和50 μmol•L^{-1}橙皮素与不加橙皮素的对照组细胞活性差异无统计学意义（$P>0.05$），75 μmol•L^{-1}和100 μmol•L^{-1}橙皮素与对照组相比细胞活性稍低（$P<0.05$）（图1A）。基于文献及课题组前期实验结果，本研究采用300 μmol•L^{-1}棕榈酸联合4.5 g•L^{-1}*D*-葡萄糖构建AC16细胞2型糖尿病模型[10]。结果表明，与高糖高脂处理组相比，25～100 μmol•L^{-1}橙皮素干预组均能显著提高细胞活性（$P<0.01$）。进一步分析显示，50、75和100 μmol•L^{-1}橙皮素处理组间的细胞活性差异无统计学意义（$P>0.05$）（图1B），因此选择50 μmol•L^{-1}作为后续实验的干预浓度。酶联免疫吸附实验检测发现，高糖高脂处理显著增加了细胞培养上清中LDH的释放（$P<0.001$）；而50 μmol•L^{-1}橙皮素共处理可显著降低高糖高脂诱导的LDH水平升高（$P<0.001$）（图1C）。



A. 不同浓度梯度的橙皮素（HES）干预AC16细胞24 h后细胞活性；B. 不同浓度的HES对高糖高脂（HGHL）诱导的AC16细胞损伤的影响；C. 4组AC16细胞LDH的表达情况。$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$，ns. 无统计学意义，$n=6$。

图1　不同浓度药物橙皮素对高糖高脂诱导的心肌细胞活力的影响

2.2　橙皮素减轻高糖高脂诱导的心肌细胞氧化应激和凋亡　DHE染色显示，与对照组相比，HGHL组细胞内ROS水平显著升高，即红色荧光增强，而HGHL+HES组ROS荧光强度较HGHL组明显减弱（图2A、2B）；同时，TUNEL染色结果显示，Control组与HES组的细胞凋亡率差异无统计学意义，但HGHL组凋亡细胞比例显著增加（$P<0.001$），而HGHL+HES组凋亡率较HGHL组显著降低（$P<0.001$）（图2C、2D）；此外，Western Blot分析表明，HGHL组促凋亡蛋白Bax水平较对照组显著升高（$P<0.001$）而抗凋亡蛋白Bcl-2水平明显降低（$P<0.001$），但HGHL+HES组Bax蛋白水平较HGHL组显著下调（$P<0.01$）且Bcl-2蛋白水平明显回升（$P<0.01$）（图2E～2G）。



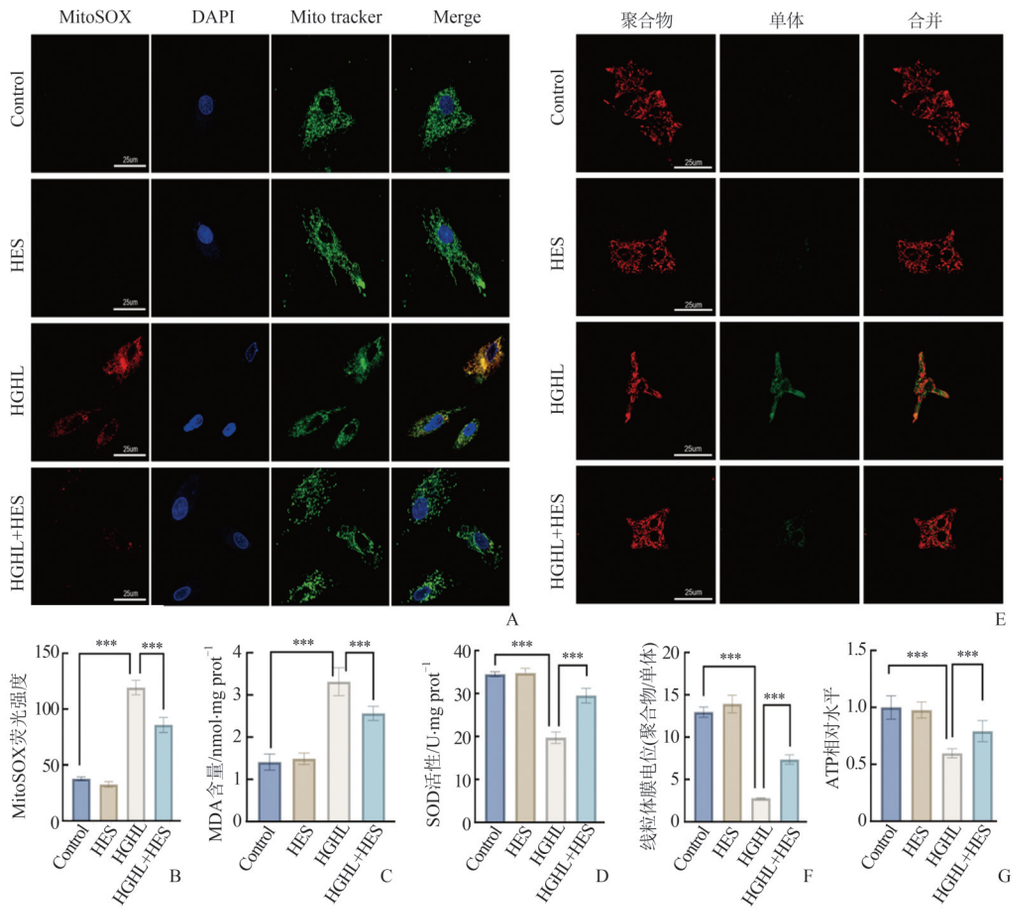
A. 4组AC16细胞DHE探针染色(标尺:50 μm);B. 4组AC16细胞DHE荧光强度;C. 4组AC16细胞TUNEL染色(标尺:50 μm);D. 4组AC16细胞TUNEL阳性率;E. 4组AC16细胞Bax、Bcl-2蛋白的Western Blot检测结果;F. 4组AC16细胞Bax相对蛋白表达水平;G. 4组AC16细胞Bcl-2相对蛋白表达水平。DHE、TUNEL染色结果,$n=6$;Western Blot结果,$n=3$;$^{**}P<0.01$,$^{***}P<0.001$。

图2 各组心肌细胞氧化应激和凋亡情况

2.3 橙皮素减轻高糖高脂诱导的心肌细胞线粒体氧化应激、线粒体膜电位损伤及ATP减少 使用线粒体超氧化物荧光探针MitoSOX检测发现,与Control组相比,HGHL组的AC16细胞MitoSOX红色荧光强度增强($P<0.001$);而HGHL+HES组MitoSOX红色荧光强度显著减少($P<0.001$)(图3A、3B)。氧化应激指标分析显示,HGHL组MDA含量较Control组显著升高($P<0.001$),SOD活性显著降低($P<0.001$);而HGHL+HES组MDA含量较HGHL组显著降低($P<0.001$),SOD活性部分回升($P<0.001$)(图3C、3D)。JC-1染色评估线粒体膜电位变化的结果显示,HGHL组AC16细胞的红色荧光(JC-1聚合物,膜电位正常标志)与绿色荧光(JC-1单体,膜电位降低标志)强度比值较Control组显著下降($P<0.001$);HGHL+HES组该比值较HGHL组明显上升($P<0.001$)(图3E、3F)。对各组细胞ATP水平检测显示,与Control组相比,HGHL组ATP水平下降;与HGHL组比较,HGHL+HES组ATP水平升高($P<0.001$)(图3G)。

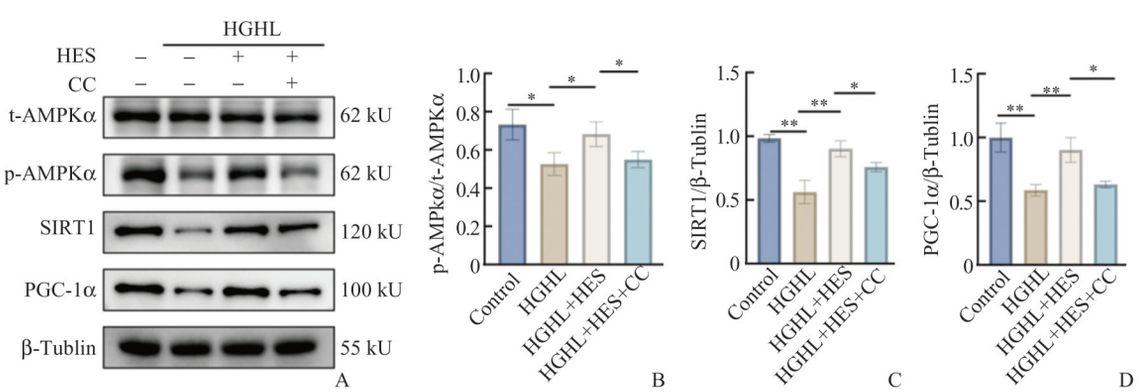
2.4 橙皮素上调高糖高脂诱导的心肌细胞AMPK/SIRT1/PGC-1α通路相关蛋白 既往研究[11-13]表明,橙皮素可通过激活AMPKα减轻细胞氧化应激反应。基于此,本研究通过Western Blot实验检测橙皮素在高糖高脂诱导的AC16细胞中减轻氧化应激的信号通路。结果显示,与对照组相比,HGHL组的磷酸化AMPKα(p-AMPKα)/总AMPKα(t-AMPKα)比值降低、SIRT1及PGC-1α蛋白表达水平均显著下降($P<0.05$);与HGHL组相比,HGHL+HES组的p-AMPKα/t-AMPKα升高、SIRT1和PGC-1α蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);同时,添加AMPK抑制剂后,与HGHL+HES组相比,HGHL+HES+CC组p-AMPKα/t-AMPKα降低、SIRT1和PGC-1α蛋白表达水平均降低($P<0.05$)(图4)。

2.5 橙皮素上调高糖高脂诱导的心肌细胞UCP3水平 据报道[14-15],UCP3与AMPK/SIRT1/PGC-1α信号通路密切相关。为进一步探究橙皮素缓解高糖高脂诱导的心肌细胞氧化应激的机制,本研究通过Western Blot检测了UCP3的表达水平。结果显示,与对照组相比,HGHL组的UCP3蛋白表达水平显著下降($P<0.05$);与HGHL组相比,HGHL+HES组的UCP3蛋白表达水平显著升高($P<0.05$);而HGHL+HES+CC组的UCP3水平较HGHL+HES组降低($P<0.05$)(图5A、5B)。



A. 各组细胞 MitoSOX 探针染色（标尺：25 μm）；B. 各组细胞 MitoSOX 荧光强度；C. 各组细胞 MDA 水平；D. 各组细胞 SOD 活性；E. 各组细胞 JC-1 探针染色（标尺：25 μm）；F. 各组细胞线粒体膜电位（聚合物/单体）；G. 各组细胞 ATP 相对水平。$^{***}P<0.001$，$n=6$。

图 3　各组心肌细胞线粒体氧化应激、线粒体膜电位损伤情况及 ATP 水平

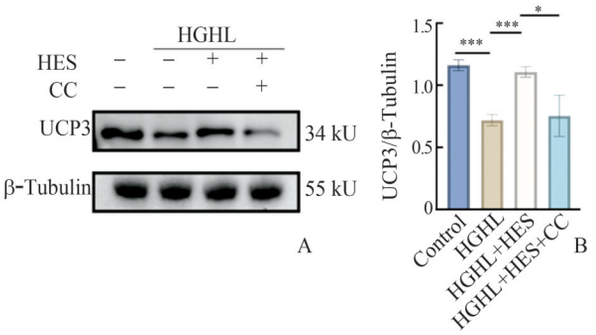


A. 4 组 AC16 细胞 t-AMPKα、p-AMPKα、SIRT1、PGC-1α 蛋白的 Western Blot 检测结果；B. 4 组 AC16 细胞 p-AMPKα/t-AMPKα 比值；C. 4 组 AC16 细胞 SIRT1 相对蛋白表达水平；D. 4 组 AC16 细胞 PGC-1α 相对蛋白表达水平；$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$n=3$。

图 4　各组心肌细胞 AMPK/SIRT1/PGC-1α 通路相关蛋白表达水平

3　讨论

糖尿病性心肌病是涉及心肌代谢异常、氧化应激、细胞凋亡、线粒体功能障碍等方面的疾病[16]。氧化应激可通过多种信号通路影响糖尿病心肌病的发生、发展，靶向线粒体抗氧化通路已成为干预 DCM 的潜在策略[2]。本研究通过实验室已有经验构建高脂高糖 AC16 细胞损伤模型[10]探究橙皮素在糖尿病心肌病中的影响作用及机制，结果发现，橙皮素减轻高糖高脂诱导的心肌细胞氧化应激及凋亡，其机制可能是通过



A. 4组AC16细胞UCP3蛋白的Western Blot检测结果;B. 4组AC16细胞UCP3相对表达水平。$^{*}P<0.05$,$^{***}P<0.001$,$n=3$。

图5 各组心肌细胞UCP3表达水平

促进AMPKα磷酸化,改善线粒体功能障碍。

氧化应激在糖尿病心肌病的发生发展中具有核心作用,其通过线粒体功能障碍,生成ROS增多,触发炎症反应与细胞凋亡,诱发心肌细胞氧化损伤[17-18]。本研究通过高糖高脂处理成功建立心肌细胞损伤模型,并伴随显著氧化应激,包括MDA水平升高、SOD活性降低及ROS蓄积,ATP水平下降,膜电位下降,线粒体ROS水平升高,细胞凋亡增多。

AMPK/SIRT1/PGC-1α是改善线粒体功能和抵抗氧化应激的核心通路[19-20],是药物研发的重要靶标。以往研究[21]认为,糖尿病性心肌病AMPK/SIRT1/PGC-1α通路活性显著降低进而导致氧化损伤。因此,靶向激活该通路已成为缓解糖尿病心肌氧化损伤的重要策略。例如,心脉安片可通过介导AMPK/SIRT1/PGC-1α信号通路减轻线粒体氧化应激损伤,减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤[20]。在一项糖尿病心肌病的研究中[22],恢复SIRT1活性可改善心功能和减轻心肌纤维化。本研究发现在加入橙皮素处理后,高糖高脂诱导的AC16细胞凋亡及线粒体氧化应激情况得到显著改善,基于此进行机制探索发现橙皮素可逆转高糖高脂诱导后的AMPKα磷酸化水平降低及SIRT1、PGC-1α等蛋白表达的下调,且橙皮素对于该通路的激活作用可以被AMPK抑制剂削弱。同时,现有研究[14]显示,AMPK/SIRT1/PGC-1α信号通路与UCP3表达存在调控关系且UCP3在线粒体功能中起着重要作用,如在HMGB1敲除研究中显示PGC-1α影响UCP3的表达。LANCL1/2的研究[15]表明,通路激活可显著上调骨骼肌UCP3表达并改善线粒体功能。这些证据表明,UCP3为该通路的关键下游效应分子。本研究因此进行进一步机制探索,结果显示橙皮素可能通过AMPK/SIRT1/PGC-1α信号通路上调UCP3蛋白表达水平,缓解高糖高脂引起的AC16细胞氧化应激。

橙皮素可能通过多个通路在改善2型糖尿病[23]、心血管疾病[11]、神经退行性疾病[24]及肝脏损伤[25]中发挥重要作用。例如,橙皮素通过激活SIRT3促进糖尿病大鼠伤口愈合[23];橙皮苷通过抑制MAPK信号通路,保护SH-SY5Y神经元免受高糖诱导的氧化损伤和细胞凋亡[24]。橙皮素还可通过促进SIRT1的活化,减轻异丙肾上腺素所致小鼠心肌缺血引起的氧化应激及凋亡[11]。本研究不仅验证了橙皮素对高糖高脂诱导的心肌细胞损伤的保护作用,同时初步揭示了其通过激活AMPKα/SIRT1/PGC-1α/UCP3信号轴改善氧化应激的机制,为橙皮素治疗糖尿病心肌病提供了新证据。

综上,本研究结果提示,橙皮素能够改善高糖高脂诱导的AC16心肌细胞线粒体损伤、氧化应激及细胞凋亡,其部分作用机制可能与激活AMPKα/SIRT1/PGC-1α/UCP3信号通路有关。以上结果表明,橙皮素治疗可能是糖尿病性心肌病有前途的治疗策略之一,但本研究存在一定的局限性,即尚未在糖尿病动物模型上进行验证,以及与其他天然化合物或AMPK激动剂的治疗效果比较仍需在以后的研究中进一步探讨。

参考文献

[1] TAN Y, ZHANG Z G, ZHENG C, et al. Mechanisms of diabetic cardiomyopathy and potential therapeutic strategies: Preclinical and clinical evidence[J]. Nat Rev Cardiol, 2020, 17(9): 585-607.

[2] BYRNE N J, RAJASEKARAN N S, ABEL E D, et al. Therapeutic potential of targeting oxidative stress in diabetic cardiomyopathy[J]. Free Radic Biol Med, 2021, 169: 317-342.

[3] LIN Q R, JIA L Q, LEI M, et al. Natural products as pharmacological modulators of mitochondrial dysfunctions for the treatment of diabetes and its complications: An update since 2010[J]. Pharmacol Res, 2024, 200: 107054.

[4] SHAERNEJAD S, NOSRAT A, BAEERI M, et al. Role of hesperidin/hesperetin against chemotherapy-induced cardiotoxicity: A systematic review of non-clinical studies[J]. Cancer Cell Int, 2025, 25(1): 186.

[5] AKHTER S, ARMAN M S I, ABU TAYAB M, et al. Recent advances in the biosynthesis, bioavailability, toxicology, pharmacology, and controlled release of citrus neohesperidin[J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2024, 64(15): 5073-5092.

[6] LIU P P, CHEN J, QI J Y, et al. Hesperetin ameliorates ischemia/hypoxia-induced myocardium injury *via* inhibition of oxidative stress, apoptosis, and regulation of Ca^{2+} homeostasis[J]. Phytother Res, 2023, 37(5): 1787-1805.

[7] ABDOU H M, HAMAAD F A, ALI E Y, et al. Antidiabetic efficacy of *Trifolium alexandrinum* extracts hesperetin and quercetin in ameliorating carbohydrate metabolism and activating IR and AMPK signaling in the pancreatic tissues of diabetic rats[J]. Biomed Pharmacother, 2022, 149: 112838.

[8] 杨丽，张俊峰 . 橙皮素对糖尿病兔心肌缺血再灌注损伤氧化应激及凋亡作用的研究[J]. 重庆医学，2022，51(22): 3781-3785.
YANG L, ZHANG J F. Effects of hesperidin on oxidative stress and apoptosis of ischemic-reperfusion injury in diabetic rabbit myocardium[J]. Chongqing Med, 2022, 51(22): 3781-3785.

[9] 叶若雷，蔡征远，骆松梅 . 橙皮素纳米粒对大鼠糖尿病心肌病的预防作用[J]. 解剖学杂志，2022，45(2): 111-115.
YE R L, CAI Z Y, LUO S M. The preventive effect of hesperidin nanoparticles on diabetic cardiomyopathy in rats [J]. Chin J Anat, 2022, 45(2): 111-115.

[10] 刘颖，余嘉彬，姚琪，等 . 乳酸钠通过调控铁死亡改善高糖高脂诱导的AC16心肌细胞损伤[J]. 武汉大学学报(医学版)，2026，47(3):285-293.
LIU Y, YU J B, YAO Q, et al. Lactate sodium regulates ferroptosis to ameliorate high glucose andhigh-fat-induced damage in AC16 cardiomyocytes [J]. Med J Wuhan Univ, 2026, 47(3):285-293.

[11] LIU P P, LI J H, LIU M M, et al. Hesperetin modulates the Sirt1/Nrf2 signaling pathway in counteracting myocardial ischemia through suppression of oxidative stress, inflammation, and apoptosis[J]. Biomed Pharmacother, 2021, 139: 111552.

[12] 左新华，朱光旭，刘岩 . 橙皮素通过调控SIRT1/PGC-1α信号通路保护急性心肌梗死大鼠[J]. 中国病理生理杂志，2021，37(5): 928-933.
ZUO X H, ZHU G X, LIU Y. Hesperetin protects against acute myocardial infarction in rats by regulating SIRT1/PGC-1α signaling pathway[J]. Chin J Pathophysiol, 2021, 37(5): 928-933.

[13] LI J J, JIANG H C, WANG A, et al. Hesperetin derivative-16 attenuates CCl_4-induced inflammation and liver fibrosis by activating AMPK/SIRT3 pathway[J]. Eur J Pharmacol, 2022, 915: 174530.

[14] YU P, LIU M, ZHANG B L, et al. Cardiomyocyte-restricted high-mobility group box 1 (HMGB1) deletion leads to small heart and glycolipid metabolic disorder through GR/PGC-1α signalling[J]. Cell Death Discov, 2020, 6: 106.

[15] SPINELLI S, BEGANI G, GUIDA L, et al. LANCL1 binds abscisic acid and stimulates glucose transport and mitochondrial respiration in muscle cells via the AMPK/PGC-1α/Sirt1 pathway[J]. Mol Metab, 2021, 53:101263.

[16] CHANG X, LI Y K, CAI C, et al. Mitochondrial quality control mechanisms as molecular targets in diabetic heart [J]. Metabolism, 2022, 137: 155313.

[17] FILLMORE N, MORI J, LOPASCHUK G D. Mitochondrial fatty acid oxidation alterations in heart failure, ischaemic heart disease and diabetic cardiomyopathy[J]. Br J Pharmacol, 2014, 171(8): 2080-2090.

[18] QI B C, HE L J, ZHAO Y, et al. Akap1 deficiency exacerbates diabetic cardiomyopathy in mice by NDUFS1-mediated mitochondrial dysfunction and apoptosis[J]. Diabetologia, 2020, 63(5): 1072-1087.

[19] XU J W, XU X, LING Y, et al. Vincamine as an agonist of G-protein-coupled receptor 40 effectively ameliorates diabetic peripheral neuropathy in mice[J]. Acta Pharmacol Sin, 2023, 44(12): 2388-2403.

[20] ZHANG W, CHEN R C, XU K Y, et al. Protective effect of Xinmai'an tablets *via* mediation of the AMPK/SIRT1/PGC-1α signaling pathway on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. Phytomedicine, 2023, 120: 155034.

[21] KARBASFOROOSHAN H, KARIMI G. The role of SIRT1 in diabetic cardiomyopathy[J]. Biomed Pharmacother, 2017, 90: 386-392.

[22] ZENG F F, ZHOU P, WANG M, et al. ACMSD mediated *de novo* NAD^+ biosynthetic impairment in cardiac endothelial cells as a potential therapeutic target for diabetic cardiomyopathy[J]. Diabetes Res Clin Pract, 2023, 206: 111014.

[23] YU X B, LIU Z X, YU Y T, et al. Hesperetin promotes diabetic wound healing by inhibiting ferroptosis through the activation of SIRT3[J]. Phytother Res, 2024, 38(3): 1478-1493.

[24] LIM C, ZHEN A X, OK S, et al. Hesperidin protects SH-SY5Y neuronal cells against high glucose-induced apoptosis *via* regulation of MAPK signaling[J]. Antioxidants, 2022, 11(9): 1707.

[25] CHEN S W, LU H F, YIN G L, et al. Hesperitin prevents non-alcoholic steatohepatitis by modulating mitochondrial dynamics and mitophagy via the AMPKα-Drp1/PINK1-Parkin signaling pathway[J]. Biochim Biophys Acta BBA Mol Cell Biol Lipids, 2025, 1870(1): 159570.

（2025-07-15 收稿）
编辑　袁　靓