

曲美他嗪对缺氧诱导原代大鼠心肌细胞凋亡的影响

付尧, 汉雯, 白小涓

(中国医科大学附属盛京医院老年病科, 辽宁省沈阳市 110001)

[关键词] 缺氧; 曲美他嗪; 心肌细胞; 细胞凋亡; 线粒体能量代谢

[摘要] **目的** 研究曲美他嗪对缺氧诱导的心肌细胞凋亡及线粒体能量代谢改变的影响。**方法** 采用胰酶和胶原酶联合消化的方法, 提取大鼠原代心肌细胞, 三气培养箱模拟缺氧损伤。MTT 和 Hoechst 染色检测细胞活性和凋亡, TMRE 染色检测线粒体膜电位, Oxygraph-2k 细胞呼吸测量仪检测态 3、态 4 呼吸和呼吸控制率, Western blot 检测 Caspase-3、细胞色素 C 以及线粒体呼吸链复合酶 I、II、III、IV、V 蛋白表达水平的变化。**结果** 缺氧能够诱导心肌细胞凋亡、引起线粒体膜电位下降和促进细胞色素 C 的释放。此外, 缺氧能够显著下调态 3 呼吸和上调态 4 呼吸, 引起呼吸控制率的下降, 同时缺氧能够不同程度地下调线粒体呼吸链复合酶 I、II、III、IV、V 的蛋白表达水平。曲美他嗪能够显著降低缺氧诱导的心肌细胞凋亡、稳定线粒体膜电位和减少细胞色素 C 释放。此外, 曲美他嗪还能减轻缺氧对线粒体呼吸链复合酶体的损伤, 维持线粒体有氧呼吸。**结论** 曲美他嗪具有抵抗缺氧致心肌细胞凋亡的作用, 可能与其稳定线粒体膜和呼吸链复合酶体有关, 继而减少细胞色素 C 的释放和维持线粒体有氧呼吸。

[中图分类号] R541.4

[文献标识码] A

The influence of trimetazidine on the apoptosis induced by hypoxia in the rat cardiac myocytes

FU Yao, HAN Wen, BAI Xiao-Juan

(Department of Gerontology, Shengjing Hospital of China Medical University, Shenyang, Liaoning 110001, China)

[KEY WORDS] Hypoxia; Trimetazidine; Cardiac myocytes; Cell apoptosis; Mitochondrial energy metabolism

[ABSTRACT] **Aim** To study the protective effect of trimetazidine (TMZ) on hypoxia jury in the rat cardiac myocytes. **Methods** Primary myocardial cells of rat were cultured in incubator at 37°C with 94% N₂ + 5% CO₂ + 1% O₂. Cell viability was detected by MTT. Apoptosis was detected by Hoechst staining. Mitochondrial membrane potential (MMP) was detected by TMRE. Mitochondrial energy metabolism was detected by Oxygraph-2k. Caspase-3, cytochrome C and respiratory chain complex enzymes were detected by Western blot. **Results** Hypoxia could induce apoptosis in the rat cardiac myocytes, decrease of MMP, cytochrome C release to cytosol. Furthermore, hypoxia could decrease state 3 respiration and respiratory control rate, increase state 4 respiration and decrease the expression of respiratory chain complex enzymes. Meanwhile, TMZ could play a protective effect against the apoptosis induced by hypoxia in the rat cardiac myocytes. It may be related to its protective role on MMP and respiratory chain complex enzymes. **Conclusion** TMZ could inhibit the apoptosis of rat cardiac myocytes induced by hypoxia via the mitochondrial pathway.

近年来, 诸多研究表明心肌细胞能量代谢障碍在缺血再灌注损伤^[1]和左心室肥大致心力衰竭^[2]的发展过程中发挥着重要作用。目前普遍认为, 维持心肌细胞正常能量代谢所需的氧气主要由冠状动脉提供, 在病理状态下如冠心病, 冠状动脉血流减少致氧气供应不足, 心肌细胞有氧呼吸降低, 三

磷酸腺苷(ATP)合成减少, 最终导致心功能下降^[2]。在慢性缺血缺氧状态下, 心肌细胞对外界损伤刺激的抵御能力下降, 在应激情况下如交感神经兴奋、后负荷增加及血压升高等, 冠状动脉发生痉挛或闭塞, 导致心肌细胞缺血缺氧进一步加重, 生成 ATP 急剧减少, 导致心绞痛和心肌梗死等心血管

[收稿日期] 2017-04-21

[修回日期] 2017-06-18

[作者简介] 付尧, 博士研究生, 主治医师, 讲师, 主要研究方向为冠心病、高血压、心力衰竭的发病机制, E-mail 为 1329658018@qq.com。通讯作者白小涓, 主任医师, 教授, 博士研究生导师, 主要研究方向为衰老及老年心血管病、老年心肾综合征、老年共病综合评估及管理, E-mail 为 syx110001@126.com。

急症的发生。因此研究缺氧引起心肌细胞损伤的机制以及寻找保护心肌细胞的药物成为临床研究热点。目前普遍认为,凋亡在缺氧诱导心肌细胞损伤的过程中发挥重要作用^[3-4]。哺乳动物凋亡主要由外源性和内源性两种途径介导,其中内源性途径主要依赖线粒体完成^[4-5]。线粒体是心肌细胞产生能量的主要场所,通过有氧呼吸生成大量 ATP 以维持心肌细胞正常生理功能和代谢。当线粒体功能紊乱,合成 ATP 减少,促进心肌细胞凋亡。因此,维持线粒体功能有助于减轻心肌损伤。曲美他嗪因其能够显著改善心肌细胞代谢,在临床上广泛用于治疗心绞痛。其保护心肌细胞的机制主要为改变心肌细胞能量代谢方式,促进能量代谢从脂肪酸代谢向葡萄糖氧化转变,以生成更多 ATP 来维持心肌功能^[6-7]。但是其对缺氧条件下心肌细胞线粒体能量代谢紊乱有无保护作用尚有待于进一步研究。本研究通过缺氧建立心肌细胞凋亡模型,观察曲美他嗪对心肌细胞的保护作用以及对线粒体能量代谢的作用。

1 材料和方法

1.1 实验材料

DMEM 培养基和胎牛血清蛋白 (Sigma, USA); 0.25%胰蛋白酶和 0.05%胶原酶、Hoechst 33342 (Invitrogen, USA); Caspase-3 兔单抗 (Cell Signaling Technology, USA); GAPDH 兔单抗 (Sigma, USA); 线粒体复合酶体 I、II、III、IV、V、细胞色素 C 和 COXIV 兔单抗及生物素标记的羊抗兔二抗 (Santa Cruz, USA); 二氧化碳培养箱 (Thermo Fisher, USA); 免疫荧光显微镜 (Olympus, Japan); 蛋白凝胶电泳及转膜系统 (Bio-Rad, USA); 增强型化学发光试剂盒 (Amersham, USA); MTT 细胞增殖检测试剂盒 (南京凯基, 中国); Oxygraph-2k 细胞呼吸测量仪 (Oroboros, Austria); 曲美他嗪 (施维雅, 天津制药有限公司)。

1.2 原代大鼠心肌细胞提取

24 只雄性 Wistar 大鼠购自中国医科大学实验动物中心, 11~13 周龄, 体重 200 ± 20 g。适应性喂养 7 天后, 麻醉断头处死。将整只大鼠置于 75% 酒精中消毒约 15 min, 转移至超净台内。用剪刀剪开胸腔, 镊子钝性分离心脏周围脂肪及结缔组织等, 将心脏游离出来后剪断血管。剥离心外膜, 截取心室肌, 在预冷的 PBS 中充分漂洗, 去除血细胞。移

至 DMEM 溶液中, 将心室肌剪成 1 mm^3 大小的碎块。将心室肌碎块用酶 (0.1% 胰酶+0.05% 胶原酶) 消化 8 min, 然后 4°C 条件下以 1000 r/min 速度离心 10 min, 收集细胞沉淀, 置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 溶液中, 轻轻吹打制成细胞悬液。重复上述步骤, 直至将所有心室肌细胞收集于 10 cm 培养皿中。将细胞悬液置于 37°C 含 5% CO_2 的孵箱中培养 90 min。差速贴壁法分离纯化心肌细胞, 轻轻弃掉培养液去除死细胞及漂浮细胞, 更换新鲜培养液。重新悬浮细胞, 以 $3 \times 10^8/\text{L}$ 的密度种植于 6 孔板内, 待细胞贴壁后, 加入 5-BrdU (终末浓度 0.1 mol/L) 抑制非心肌细胞生长。24 h 后换液, 取生长状态良好的细胞, 用于后续实验。

1.3 分组及给药

心肌细胞置于含 10% 胎牛血清的 DMEM 中培养 2 天后, 分成四组。对照组: 正常培养; 缺氧组: 给与缺氧处理; 曲美他嗪组: 给予 1×10^{-4} mol/L 曲美他嗪; 曲美他嗪+缺氧组: 同时给予缺氧及 1×10^{-4} mol/L 曲美他嗪处理。

1.4 缺氧模型的建立

参照以往文献^[8], 将缺氧组和曲美他嗪+缺氧组细胞放入三气培养箱 ($94\% \text{ N}_2 + 5\% \text{ CO}_2 + 1\% \text{ O}_2$) 中培养 24 h, 然后检测各指标变化。

1.5 细胞活性检测

外源性 MTT 可被活细胞线粒体中的琥珀酸脱氢酶还原成甲瓊沉淀在细胞中, 而死细胞没有这种功能。利用酶标仪测定吸光光度值 (OD 值), 能够间接反映活细胞数量。按照南京“凯基 MTT 细胞增殖及细胞毒性检测试剂盒”进行如下实验。按说明书: (1) 将 $5 \times \text{MTT}$ 用 Dilution Buffer 稀释成 $1 \times \text{MTT}$; (2) 每孔加入 50 μL 的 $1 \times \text{MTT}$, 置于 37°C 、5% CO_2 孵箱中继续培养 4 h, 使 MTT 还原为甲瓊; (3) 弃去上清液, 每孔加入二甲基亚砷 (DMSO) 150 μL , 使甲瓊溶解, 用振荡仪振荡 1 min; 使用多功能酶标仪在 490 nm 处检测每孔的 OD 值。

1.6 Hoechst 33342 染色观察细胞凋亡

细胞凋亡时细胞核发生核固缩及核碎裂等典型形态学改变。Hoechst 33342 能够与 DNA 特异结合, 紫外光激发后发出明亮的光。弃去旧培养基, PBS 洗 3 次。加入 1 mL 终浓度为 8 mg/L 的 Hoechst 33342 溶液, 置于 37°C 孵箱中孵育 15 min。弃去培养液, PBS 洗 3 次, 在荧光显微镜下用紫外光激发, 观察细胞形态。

1.7 Western blot 检测蛋白表达

收集细胞, 加入细胞蛋白裂解液, 冰点孵育

30 min; 涡旋振荡 3 min, 重复操作 3 次; 4℃ 12000 r/min 离心 20 min; 吸取上清, 即为细胞总蛋白。使用 BCA 法蛋白定量试剂盒进行蛋白定量。加入 5× buffer, 混匀后 95℃ 变性 5 min。制备 12% SDS-PAGE 分离胶, 用微量加样器每孔加入 10 μg 蛋白质样品。经电泳、转膜后用 5% 脱脂奶粉封闭 2 h; 充分漂洗后加入一抗稀释液 (1:1000 稀释), 4℃ 冰箱中过夜孵育。充分漂洗后加入二抗稀释液 (1:5000 稀释), 室温下摇床振荡 2 h。再次洗脱 3 次后, 使用美国 Amersham 增强型化学发光试剂盒发光显影, 用化学发光凝胶成像系统对其进行曝光及图像分析软件进行分析。使用 Image J 对条带进行量化。

1.8 线粒体膜电位检测

四甲基罗丹明乙酯 (tetramethylrhodamine ethyl ester, TMRE) 可以特异性地被活线粒体摄取, 摄取率和线粒体膜电位 (mitochondrial membrane potential, MMP) 正相关, 通过被动的线粒体跨膜电势驱动而聚集在线粒体, 线粒体内 TMRE 的荧光强度能反映 MMP 的高低。TMRE 染色步骤: (1) 取对数生长期细胞, 接种于 24 孔板中, 培养 24 h; (2) 弃旧培养液, 换成无血清培养基, 继续培养 24 h; (3) 每孔滴加 1 mL 50 nmol/L TMRE, 37℃、5% CO₂ 孵箱中孵育 15 min; (4) 荧光显微镜下进行观察, 拍照。

1.9 线粒体呼吸功能测定

使用 Oxygraph-2k 细胞呼吸测量仪测定线粒体呼吸功能^[9]。收集至少 3×10⁶ 个细胞, 重悬于 3 mL 呼吸介质中 (含有 80 mmol/L KCl, 10 mmol/L Tris-HCl, 3 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EDTA, 5 mmol/L KH₂PO₄, pH 7.4)。按照 3 μg/10⁶ 细胞的剂量, 使用洋地黄皂苷进行细胞膜透化。向 3 mL 呼吸介质中加入 1 mmol/L 的洋地黄皂苷 30 μL, 透化 3 min。为保证线粒体膜的稳定性以及氧耗不受影响, 加入适量外源性细胞色素 C。加入 5 mmol/L 苹果酸和 1 mmol/L 谷氨酸, 启动复合酶体 I 相关的呼吸。加入 5 mmol/L ADP 启动态 3 和态 4 呼吸。加入 10 mmol/L 琥珀酸和 1 μmol/L 鱼藤酮检测态 3 呼吸。

1.10 统计学处理方法

各组数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS17.0 软件分析, 组间比较采用单因素方差分析进行统计检验, 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 曲美他嗪对缺氧诱导的心肌细胞凋亡的影响

MTT 结果 (图 1A) 表明, 与对照组相比, 缺氧

24 h 后, 心肌细胞活性明显下降 ($P < 0.05$); 加入曲美他嗪干预后, 与缺氧组相比, 心肌细胞活力显著恢复 ($P < 0.05$)。由于 MTT 主要由线粒体代谢, 故细胞活性下降主要是由于线粒体功能受损所致。Hoechst 染色结果发现, 与对照组相比, 缺氧 24 h 后, 心肌细胞凋亡增加 ($P < 0.05$), 出现明显的核固缩、核碎裂及染色质边集等凋亡典型的形态学改变; 加入曲美他嗪干预后, 与缺氧组相比, 心肌细胞凋亡数目减少 ($P < 0.05$), 形态学异常改变减轻 (图 1B)。Western blot 检测结果表明, 与对照组相比, 缺氧 24 h 后, 促凋亡蛋白 Caspase-3 (前体和活性体) 表达增加 ($P < 0.05$); 曲美他嗪干预后, 与缺氧组相比, 促凋亡蛋白表达减少 ($P < 0.05$) (图 1C、1D)。

2.2 曲美他嗪对缺氧诱导的心肌细胞线粒体膜电位及膜通透性的影响

TMRE 结果表明, 与对照组相比, 缺氧 24 h 后, 心肌细胞线粒体膜电位显著降低 ($P < 0.05$); 加入曲美他嗪干预后, 与缺氧组相比, 心肌细胞线粒体膜电位显著恢复 ($P < 0.05$; 图 2A 和 2B)。Western blot 结果发现, 与对照组相比, 缺氧 24 h 后, 细胞质内细胞色素 C 含量显著增加 ($P < 0.05$)。由于细胞色素 C 定位于线粒体内膜, 在细胞质内检测出细胞色素 C, 说明线粒体膜稳定性下降, 细胞色素 C 从线粒体内释放到细胞质中。加入曲美他嗪干预后, 与缺氧组相比, 细胞质内细胞色素 C 明显减少 ($P < 0.05$), 说明线粒体膜稳定性得到显著恢复 (图 2C 和 2D)。

2.3 曲美他嗪对缺氧诱导的心肌细胞线粒体能量代谢的影响

细胞呼吸测量仪结果表明, 与对照组相比, 缺氧 24 h 后, 心肌细胞线粒体呼吸功能明显受抑制, 态 3 呼吸和呼吸控制率显著低于对照组, 而态 4 呼吸显著高于对照组 ($P < 0.05$)。加入曲美他嗪干预后, 与缺氧组相比, 心肌细胞线粒体呼吸功能得到显著恢复 ($P < 0.05$; 图 3)。

2.4 曲美他嗪对缺氧诱导的心肌细胞线粒体呼吸链复合酶体的影响

Western blot 结果表明, 与对照组相比, 缺氧 24 h 后, 心肌细胞线粒体呼吸链复合酶体 I、II、III、IV、V 表达均有不同程度的下降 ($P < 0.05$)。加入曲美他嗪干预后, 与缺氧组相比, 心肌细胞线粒体链复合酶体 I、II、III、IV、V 表达得到显著恢复 ($P < 0.05$; 图 4)。

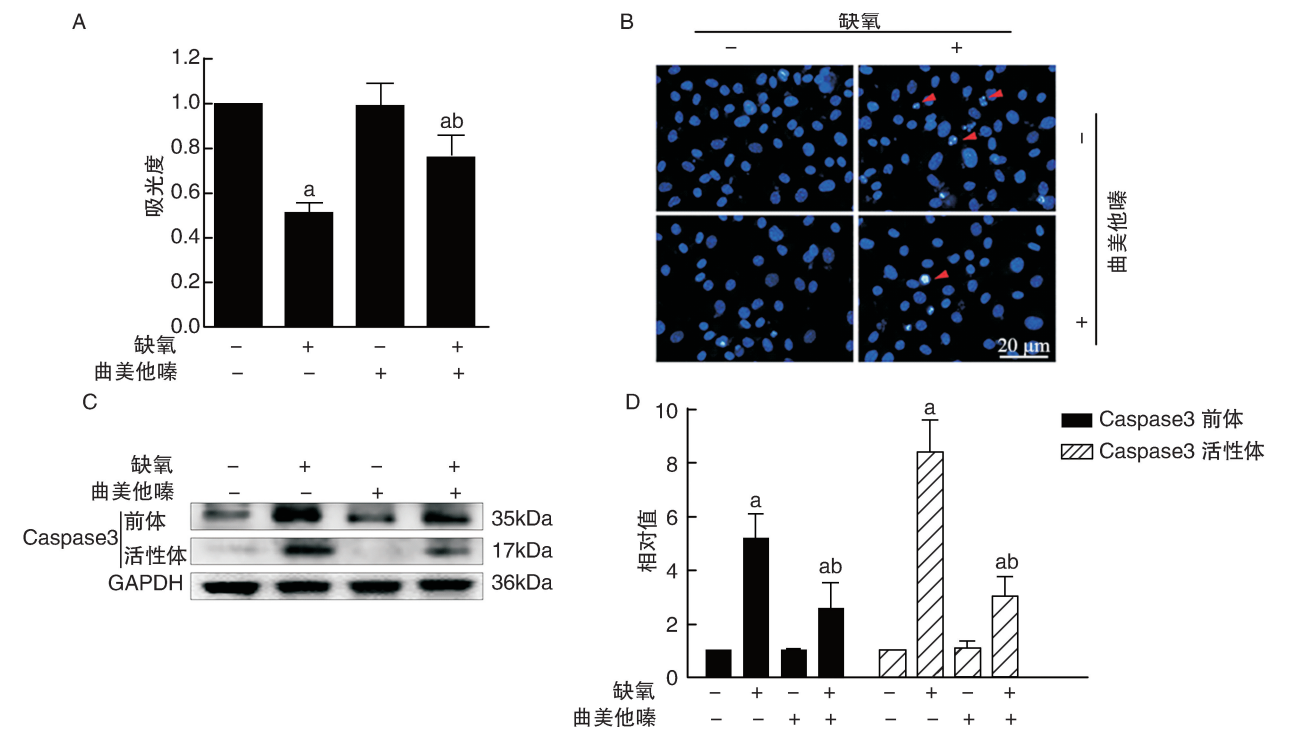


图 1. 曲美他嗪对缺氧诱导的心肌细胞凋亡的影响($n\geq 3$) A 为 MTT 法检测细胞活力;B 为 Hoechst 染色检测细胞凋亡;C 为 Western blot 检测 Caspase-3 蛋白表达水平;D 为 Image J 对 Western blot 条带量化,以对照组为参考值。a 为 $P<0.05$,与对照组相比;b 为 $P<0.05$,与缺氧组相比。

Figure 1. The influence of trimetazidine on the apoptosis of myocardial cells induced by hypoxia($n\geq 3$)

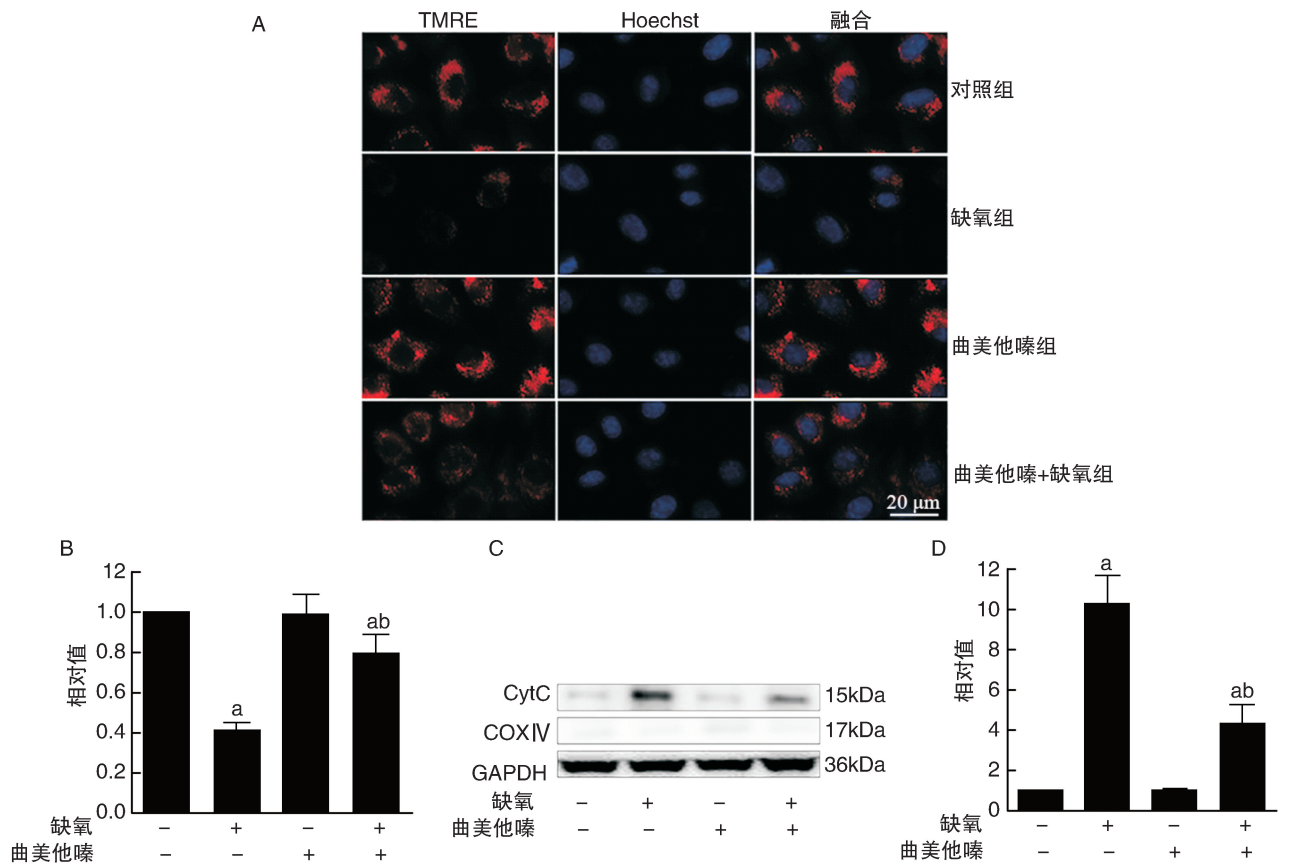


图 2. 曲美他嗪对缺氧诱导的心肌细胞线粒体膜电位及膜通透性的影响($n\geq 3$) A 为 TMRE 染色,荧光显微镜下观察细胞线粒体膜电位;B 为 TMRE 染色,酶标仪读数,对线粒体膜电位进行量化;C 为 Western blot 检测细胞质内细胞色素 C 蛋白表达水平;D 为 Image J 对 Western blot 条带量化,以对照组为参考值。a 为 $P<0.05$,与对照组相比;b 为 $P<0.05$,与缺氧组相比。

Figure 2. The influence of trimetazidine on the mitochondrial membrane potential in hypoxia-treated myocardial cells($n\geq 3$)

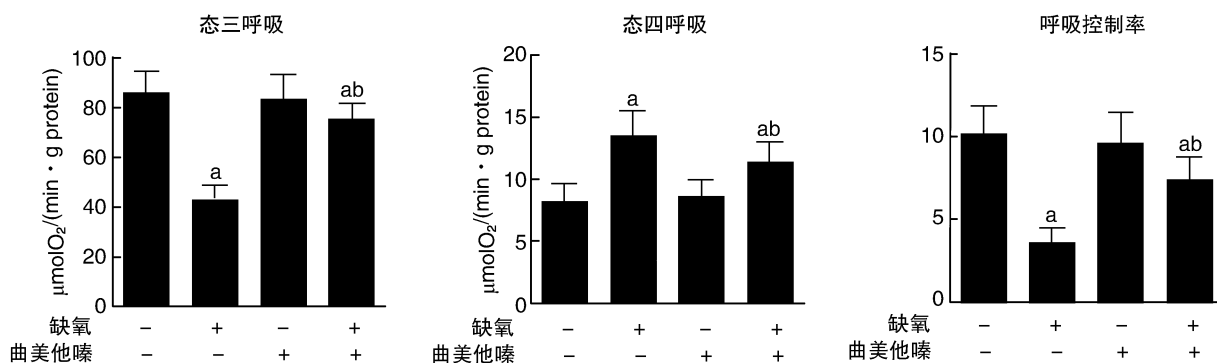


图 3. 曲美他嗪对缺氧诱导的心肌细胞线粒体能量代谢的影响 ($n \geq 3$) a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与缺氧组相比。

Figure 3. The influence of trimetazidine on the mitochondria energy metabolism in hypoxia-treated myocardial cells ($n \geq 3$)

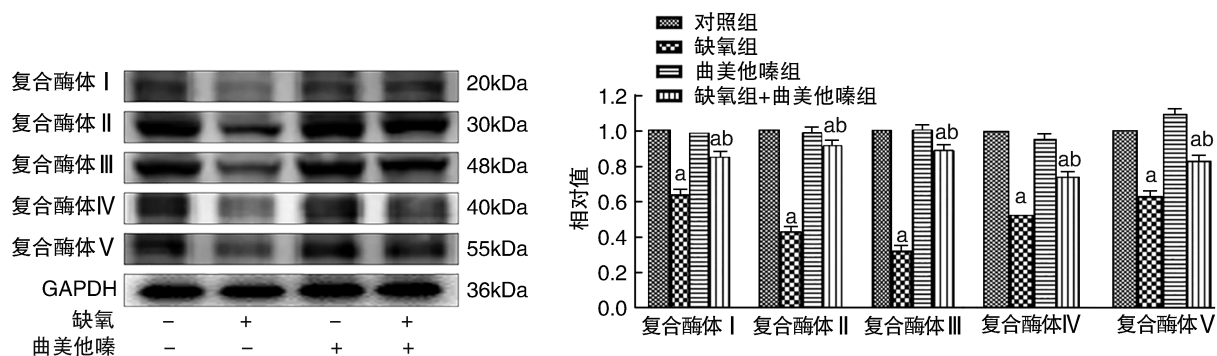


图 4. 曲美他嗪对缺氧诱导的心肌细胞线粒体呼吸链复合酶体的影响 ($n \geq 3$) a 为 $P < 0.05$, 与对照组相比; b 为 $P < 0.05$, 与缺氧组相比。

Figure 4. The influence of trimetazidine on the expression of respiratory chain complex enzymes in hypoxia-treated myocardial cells ($n \geq 3$)

3 讨论

线粒体能量代谢目前已成为基础研究和寻求临床新药物治疗靶点的热点。本研究发现,缺氧能够通过损伤线粒体呼吸链复合酶体,促进态 3 呼吸向态 4 呼吸转化,使线粒体氧化磷酸化功能降低,减少 ATP 的合成。同时能够引起线粒体膜电位降低,线粒体膜稳定性下降,上调促凋亡蛋白,促进心肌细胞凋亡。与此同时,曲美他嗪能够保护线粒体呼吸链复合酶体,恢复有氧呼吸,维持 ATP 合成,稳定线粒体膜稳定,从而减少心肌细胞凋亡。

许多因素能够引起凋亡,研究表明引起心肌细胞凋亡的因素主要有缺氧、持续缺血和缺血后再灌注^[10]。周舟等^[11]人研究发现,缺氧可致心肌细胞线粒体细胞色素 C 释放至胞浆,导致 Caspase 途径激活,从而导致细胞凋亡。本实验结果与其完全一致。在此基础上,我们进一步研究发现,缺氧除引起线粒体膜不稳定之外,还能够损伤呼吸链复合酶体 I、II、III、IV、V,下调态 3 呼吸,上调态 4 呼吸,最终使线粒体氧化磷酸化功能受损,ATP 合成减

少。态 3 呼吸是指作为底物的 ADP 充分时,电子能够沿着线粒体呼吸链顺畅传递,氧气快速消耗同时伴有大量 ATP 生成,是底物对线粒体有氧呼吸刺激效应的指标;态 4 呼吸表示 ADP 耗竭时的基础氧耗,此时有氧耗但是没有 ATP 合成,态 4 呼吸增加进一步说明线粒体呼吸链传递电子速率受影响,不能将氧化与磷酸化偶联;呼吸控制率又叫呼吸调节比,是指态 3 呼吸与态 4 呼吸的比值,其下降表明线粒体有氧呼吸能力下降,代谢速度减慢^[12]。我们的结果表明缺氧处理心肌细胞 24 h 后,态 3 呼吸和呼吸控制率均下降,表明 ADP 对线粒体呼吸链电子传递的刺激作用下降。同时 Western blot 结果显示,缺氧处理心肌细胞后,线粒体呼吸链的五个复合酶体表达量均有不同程度的下调,进一步表明电子传递受阻,氧化与磷酸化不能偶联,使无效氧耗增加,ATP 合成减少。

近年来,曲美他嗪作为新型抗心肌缺血药被广泛应用于临床。曲美他嗪通过抑制线粒体内的 3-酮酰辅酶 A 硫解酶,促进心肌细胞的能量代谢方式从脂肪酸氧化向葡萄糖氧化转变,在相同氧耗条件

下,葡萄糖氧化能够生成更多的 ATP,进而发挥保护心肌细胞和抗心肌缺血的作用^[6-7]。曲美他嗪除直接参与调节心肌细胞能量代谢外,还能够间接维持细胞内环境稳定、抑制细胞溶解进而发挥抗凋亡的作用,这些均归因于对能量代谢的保护作用^[13]。我们研究结果显示,曲美他嗪干预后,能够显著降低缺氧诱导的心肌细胞凋亡,其抗凋亡作用与其能够稳定线粒体膜、保护线粒体呼吸链复合酶体有关。当然,曲美他嗪具体的抗凋亡机制有待于进一步研究。

综上所述,曲美他嗪具有抵抗缺氧致心肌细胞凋亡的作用,可能与其稳定线粒体膜和呼吸链复合酶体有关,继而减少细胞色素 C 的释放和维持线粒体有氧呼吸。综合文献报道和本研究结果,曲美他嗪作为一种抗心肌缺血的药物,具有广阔的研发前景。

[参考文献]

- [1] Wende AR, Abel ED. Lipotoxicity in the heart [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1801(3): 311-319.
- [2] Hugel S, Horn M, Remkes H, et al. Preservation of cardiac function and energy reserve by the angiotensin-converting enzyme inhibitor quinapril during postmyocardial infarction remodeling in the rat [J]. *J Cardiovasc Magn Reson*, 2001, 3(3): 215-225.
- [3] Hauck L, Hansmann G, Dietz R, et al. Inhibition of hypoxia-induced apoptosis by modulation of retinoblastoma protein-dependent signaling in cardiomyocytes [J]. *Circ Res*, 2002, 91(9): 782-789.
- [4] Kanazawa H, Imoto K, Okada M, et al. Canstatin inhibits hypoxia-induced apoptosis through activation of integrin/focal adhesion kinase/Akt signaling pathway in H9c2 cardiomyoblasts [J]. *PLoS One*, 2017, 12(2): e0173 051.
- [5] Pan MH, Hsieh MC, Kuo JM, et al. 6-Shogaol induces apoptosis in human colorectal carcinoma cells via ROS production, caspase activation, and GADD 153 expression [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2008, 52(5): 527-537.
- [6] Liu Z, Chen JM, Huang H, et al. The protective effect of trimetazidine on myocardial ischemia/reperfusion injury through activating AMPK and ERK signaling pathway [J]. *Metabolism*, 2016, 65(3): 122-130.
- [7] Kuzmich J, Parra V, Verdejo HE, et al. Trimetazidine prevents palmitate-induced mitochondrial fission and dysfunction in cultured cardiomyocytes [J]. *Biochem Pharmacol*, 2014, 91(3): 323-336.
- [8] Kacimi R, Long CS, Karliner JS. Chronic hypoxia modulates the interleukin-1beta-stimulated inducible nitric oxide synthase pathway in cardiac myocytes [J]. *Circulation*, 1997, 96(6): 1 937-943.
- [9] Comelli M, Domenis R, Bisetto E, et al. Cardiac differentiation promotes mitochondria development and ameliorates oxidative capacity in H9c2 cardiomyoblasts [J]. *Mitochondrion*, 2011, 11(2): 315-326.
- [10] Ruixing Y, Wenwu L, Al-Ghazali R. Trimetazidine inhibits cardiomyocyte apoptosis in a rabbit model of ischemia-reperfusion [J]. *Transl Res*, 2007, 149(3): 152-160.
- [11] 周 舟,王小华,朱光旭,等. 缺氧诱导心肌细胞凋亡与 Caspase 3 激活及细胞内钙超载的关系 [J]. *中国应用生理学杂志*, 2005, 21(1): 11-15.
- [12] Onukwufor JO, Kibenge F, Stevens D, et al. Hypoxia-reoxygenation differentially alters the thermal sensitivity of complex I basal and maximal mitochondrial oxidative capacity [J]. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 2016, 201: 87-94.
- [13] Pascale C, Fornengo P, Epifani G, et al. Cardioprotection of trimetazidine and anthracycline-induced acute cardiotoxic effects [J]. *Lancet*, 2002, 359(9312): 1 153-154.

(此文编辑 许雪梅)