

香青兰总黄酮对阿霉素心肌毒性的保护机制研究

都研文^{1,2}, 郑瑞芳², 曾 诚^{1,2}, 杨 洁^{1,2}, 李海宁^{2,3}, 邢建国^{2*}

1. 新疆医科大学, 新疆 乌鲁木齐 830011

2. 新疆药物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830002

3. 石河子大学, 新疆 石河子 832000

摘要: **目的** 探讨香青兰总黄酮(TFDM)对阿霉素心脏毒性的保护作用及相关机制。**方法** 大鼠心肌细胞 H9c2 细胞随机分为对照组、模型组和 TFDM 治疗组(5、25、50、100 $\mu\text{g/mL}$)。药物干预后,除对照组外,其余各组细胞采用阿霉素 1 $\mu\text{mol/L}$ 作用 24 h 制备心脏毒性模型。采用 CCK-8 法测定 TFDM 干预后阿霉素损伤对 H9c2 细胞活力的影响;采用试剂盒法测定各组细胞乳酸脱氢酶(LDH)释放情况及细胞内超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)水平;采用 Annexin-V FITC/PI 双染法通过流式细胞仪检测各组细胞凋亡率;采用 DCFH-DA、JC-1 探针检测细胞内活性氧(ROS)和线粒体膜电位;采用 Western blotting 检测各组细胞中 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)、细胞外调节蛋白激酶 1/2(ERK1/2)、磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)通路相关蛋白表达。**结果** 与对照组比较,阿霉素诱导的模型组细胞活力下降,LDH、MDA 水平升高,SOD 活性降低,细胞凋亡率升高,ROS 释放显著增多,线粒体膜电位显著下降,而 TFDM 则剂量依赖性地使细胞活力升高,LDH、MDA 水平下降,SOD 活性升高,细胞凋亡率降低,ROS 释放显著减少,线粒体膜电位显著升高;Western blotting 结果显示,与对照组比较,模型组细胞 p-PI3K、p-Akt、p-ERK、Bcl-2 蛋白表达水平降低,p-p38MAPK、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平显著升高;与模型组比较,TFDM 使细胞中 p-PI3K、p-Akt、p-ERK、Bcl-2 蛋白表达水平升高,p-p38MAPK、Bax、Caspase-3 蛋白表达水平降低。**结论** TFDM 能够保护心肌细胞,可能通过抗氧化应激,保护心肌细胞线粒体,调节 MAPK、PI3K/Akt 凋亡通路及其下游凋亡分子的表达抑制细胞凋亡。

关键词: 香青兰总黄酮;阿霉素心脏毒性;线粒体;磷脂酰肌醇 3-激酶;丝裂原活化蛋白激酶;细胞外调节蛋白激酶 1/2

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2019)24-6045-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.24.019

Protective effect and mechanism of total flavonoids of *Dracocephalum moldevica* on doxorubicin myocardial toxicity

DU Yan-wen^{1,2}, ZHENG Rui-fang², ZENG Cheng^{1,2}, YANG Jie^{1,2}, LI Hai-ning^{2,3}, XING Jian-guo²

1. Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China

2. Xinjiang Institute of Materia Medica, Urumqi 830002, China

3. Shihezi University, Shihezi 832000, China

Abstract: **Objective** To explore the protective effect and mechanism of total flavonoids of *Dracocephalum moldevica* (TFDM) on doxorubicin-induced cardiotoxicity. **Methods** H9c2 cells were induced with 1 $\mu\text{mol/L}$ doxorubicin for 24 h to establish a cardiotoxicity model. H9c2 cells were randomly divided into control group, model group, and drug intervention group (four subgroups of 5, 25, 50, and 100 $\mu\text{g/mL}$). After the intervention of TFDM, the doxorubicin cardiotoxicity model was established in the other groups except the control group. The cell counting Kit-8 method was used to determine the viability of H9c2 cells induced by doxorubicin injury after the intervention of TFDM. The effects of lactate dehydrogenase release, intracellular superoxide dismutase and malondialdehyde in each group were determined by kit method. The apoptosis rate of each group was detected by flow cytometry using Annexin-V FITC/PI double staining method. Reactive oxygen species (ROS) and mitochondrial membrane potential in each group were detected by DCFH-DA and JC-1 probes. The expressions of p38MAPK, ERK1/2, and PI3K/Akt pathway-related

收稿日期: 2019-08-08

基金项目: 新疆维吾尔自治区资源共享平台基金(PT1901); 新疆维吾尔自治区天山雪松计划(2017XS10); 新疆维吾尔自治区自然科学基金资助项目(2019D01A80)

作者简介: 都研文(1992—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药学。Tel: 17599792038 E-mail: 617288846@qq.com

*通信作者 邢建国, 男, 研究员, 从事中药民族药新制剂与新剂型研究。Tel: (0991)2828537 E-mail: xjguodd@163.com

proteins were detected by Western blotting. **Results** Compared with the control group, the cell viability of the model group induced by doxorubicin was decreased, the release of lactate dehydrogenase and the content of malondialdehyde were increased, the activity of superoxide dismutase was decreased, the apoptosis rate was increased, the release of reactive oxygen species was increased significantly, and the mitochondrial membrane potential was decreased significantly. However, TFDM increased H9c2 cell viability, decreased LDH and MDA levels, increased SOD activity, decreased apoptosis rate, significantly decreased ROS release, and significantly increased MMP in a dose-dependent manner. The difference was statistically significant. The results of Western blot showed that the expression levels of p-PI3K, p-Akt, p-ERK1/2, and Bcl-2 were decreased, and the expression levels of p-p38MAPK, Bax and Caspase-3 were significantly increased compared with the control group. However, in the TFDM-treated group, the expression of p-PI3K, p-Akt, p-ERK1/2, and Bcl-2 protein was increased, and the protein expression of p-p38MAPK, Bax, and Caspase-3 protein was decreased. **Conclusion** TFDM can protect cardiomyocytes, and its protective mechanism may be related to the resistance to oxidative stress, protection of cardiomyocyte mitochondria, and regulating MAPK enzyme family proteins, and PI3K/Akt signaling pathway and subsequent release of apoptotic cytokines to inhibit apoptosis.

Key words: total flavonoids of *Dracocephalum moldevica* L.; doxorubicin cardiotoxicity; mitochondria; PI3K; MAPK; ERK1/2

阿霉素 (doxorubicin, DOX) 是蒽环类广谱抗癌药物, 自 20 世纪 60 年代末被发现以来, 一直是治疗各种癌症最有效、最普遍的处方化疗药物之一^[1]。但其剂量依赖性的心脏毒性可导致心力衰竭, 并增加了患者心血管疾病的发病率和死亡率, 限制了其在化疗中的长期应用^[2-3]。因此, 寻找安全、有效的药物防治 DOX 心脏毒性意义重大。

香青兰 *Dracocephalum moldevica* L. 是新疆地方民族药, 常用于心、脑血管疾病的治疗且疗效确切^[4]。前期研究证实, 香青兰有效部位香青兰总黄酮 (total flavonoids of *Dracocephalum moldevica*, TFDM) 及其活性成分田蓟苷具有较好的心脏保护作用^[5-6]。体内、体外实验证实, 田蓟苷可以调节心肌细胞线粒体功能, 如增加线粒体膜电位、减少活性氧 (ROS) 的释放、减轻心肌缺血再灌注损伤, 经由 ROS 途径发挥心肌细胞保护作用^[7-9]。但对 TFDM 抗 DOX 心脏毒性的研究尚未见报道, 因此本研究构建 DOX 心肌损伤细胞模型, 从线粒体凋亡角度研究 TFDM 对 DOX 造成的心脏毒性的保护机制。

1 材料

1.1 药物与试剂

TFDM (新疆药物研究所自制^[10], 批号 201804, 质量分数为 60.60%~62.35%); 胎牛血清 (Gibco 公司); 0.25%胰酶、DMEM 低糖培养基 (Hyclone 公司); CCK-8 检测试剂盒 (博士德生物工程有限公司); 乳酸脱氢酶 (LDH)、丙二醛 (MDA)、超氧化物歧化酶 (SOD) 检测试剂盒 (南京建成生物工程研究所); 盐酸阿霉素、线粒体膜电位 (JC-1) 试剂盒、活性氧检测试剂盒均购于北京索莱宝科技有限公司; Annexin-V FITC/PI 凋亡试剂盒 (BD 公

司); 一抗 p38 丝裂原活化蛋白激酶 (p38MAPK)、磷酸化的 p38MAPK (p-p38MAPK)、磷酸化的细胞外调节蛋白激酶 1/2 (ERK1/2)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)、磷酸化的 PI3K (p-PI3K)、蛋白激酶 B (Akt)、磷酸化的 Akt (p-Akt)、Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 抗体均购自 CST 公司; GAPDH 抗体 (Abcam 公司); 其他试剂均为分析纯试剂。

1.2 仪器

细胞培养箱 (美国 Thermo 公司); 流式细胞仪 (美国 BD 公司); 多功能酶标仪 (美国 BioTek 仪器有限公司); 凝胶成像仪、电泳仪和电泳槽 (美国 Bio-Rad 公司); 低温高速离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司)。

1.3 细胞

大鼠心肌 H9c2 细胞来源于中国医学科学院基础医学研究所细胞资源中心。

2 方法

2.1 细胞培养

H9c2 细胞用含 10%胎牛血清的 DMEM 低糖培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 条件下培养, 当细胞融合度达到 85%~90%时, 0.25%胰蛋白酶消化传代, 约 2~3 d 传代 1 次, 在对数生长期进行实验。

2.2 分组、模型制备与给药

细胞随机分为对照组、模型组和 TFDM 各质量浓度组 (5、25、50、100 μg/mL)。TFDM 预处理 6 h 后用 1 μmol/L 的 DOX 诱导 24 h, 模拟 DOX 心脏毒性中心肌细胞损伤的病理变化。

2.3 细胞活力检测

将 H9c2 细胞 (1×10⁴ 个/孔) 接种于 96 孔板中, 每组 6 个复孔, 按照 “2.2” 项下分组及处理, 按照

CCK-8 试剂盒说明书测定细胞活力, 酶标仪 450 nm 检测吸光度 (A) 值。

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

2.4 细胞毒性和氧化应激指标检测

将 H9c2 细胞 (1×10^4 个/孔) 接种于 96 孔板中, 每组 6 个复孔, 按照“2.2”项下分组及处理, 按照试剂盒说明书测定各组细胞培养液中 LDH 及细胞内 MDA、SOD 水平。

2.5 细胞凋亡检测

取对数生长期细胞, 按 1.6×10^6 个/mL 的密度接种于 6 孔培养板中, 细胞长至 70%~80%, 按“2.2”项下方法分组和处理, 弃去各组上清液, 加入预冷的 PBS 洗涤 2 遍, 胰酶 (不含 EDTA) 消化后, 每孔加 0.5 mL 含血清培养液终止消化, PBS 洗涤 2 遍, 弃上清, 加入 100 μ L 预先配制的 $1 \times$ 缓冲液重悬细胞, 混匀后, 避光条件下各加入 5 μ L 的 Annexin-V FITC 试剂和 PI 试剂, 混匀后, 加入 400 μ L 的 $1 \times$ 缓冲液, 避光处孵育 20 min, 300 目细胞筛滤过, 上流式机检测细胞凋亡率。总凋亡率为 Annexin-V FITC 阳性和 Annexin-V FITC/PI 双阳性细胞率总和。

2.6 细胞内 ROS 检测

细胞铺板和处理方法同“2.5”项下, 按照 $1 : 1\ 000$ 用无血清培养液稀释 2',7'-二氯荧光黄双乙酸盐 (DCFH-DA), 使终浓度为 10 μ mol/L。收集各组细胞后悬浮于稀释好的 DCFH-DA 中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 孵育 20 min。用无血清细胞培养液洗涤细胞 3 次, 500 μ L 培养基重悬细胞, 流式细胞仪检测细胞内 2',7'-二氯荧光素 (DCF) 水平。

2.7 线粒体膜电位 ($\Delta\Psi_m$) 检测

细胞铺板和处理方法同“2.5”项下, 按试剂盒说明书配制 $1 \times$ JC-1 染色缓冲液, 每管分别加入 0.5

mL 染色缓冲液, 混匀, 37 $^{\circ}\text{C}$ 培养箱孵育 30 min, 1 000 r/min 离心 4 min, 弃上清液, 加入预冷的缓冲液 1 mL, 混匀后, 以 1 000 r/min 离心 3 min, 洗涤细胞 2~3 次, 最后加入 0.5 mL $1 \times$ JC-1 缓冲液混匀后, 300 目细胞筛滤过, 上流式机检测, 红色荧光到绿色荧光的转变 (比值的下降) 表示细胞膜电位的下降。

2.8 免疫印迹法检测蛋白表达

H9c2 细胞在冰上完成蛋白提取工作, 裂解液按比例加蛋白磷酸酶抑制剂。蛋白样品经 BCA 法测定浓度, 按比例加入蛋白上样缓冲液, 金属浴 95 $^{\circ}\text{C}$ 煮 5 min 变性。经 SDS-多聚丙烯酰胺凝胶电泳后电转至 PVDF 膜上。5% 脱脂奶粉封闭, 加入一抗 p38MAKP、p-p38MAKP、p-ERK1/2、PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Bax、Bcl-2、Caspase-3 (稀释比例均为 $1 : 1\ 000$) 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱孵育过夜, 次日洗膜, 室温用辣根酶偶联的二抗孵育 1~2 h, 洗膜, 使用灵敏型发光液试剂盒在化学发光成像系统采图, Image J 软件分析条带灰度。

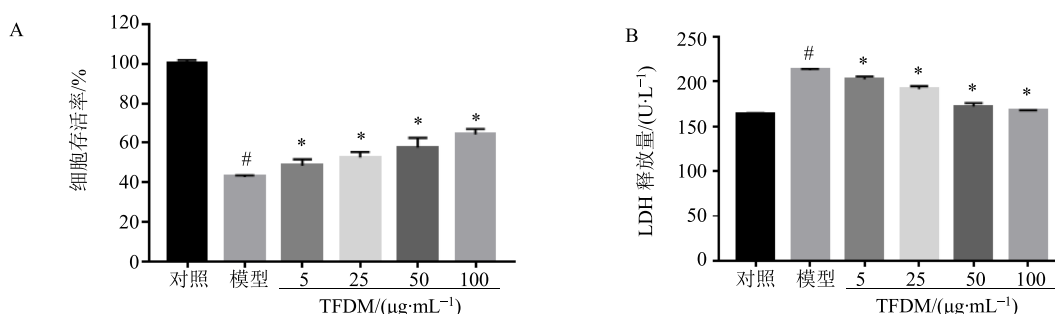
2.9 数据处理

所有实验进行 3 次独立平行实验, 采用 Graphpad prism7 进行数据分析和作图, 结果均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用单因素 ANOVA 进行多组间比较, 非配对 t 检验进行两组间比较, Bonferroni 法进行校正。

3 结果

3.1 TFDM 对 DOX 损伤的 H9c2 细胞活力和 LDH 释放量的影响

与对照组比较, 模型组细胞存活率显著降低, LDH 释放显著升高, 提示造模成功。与模型组比较, 各质量浓度 TFDM 干预后均可提高 H9c2 细胞活力, 减少 DOX 损伤细胞的 LDH 释放, 并呈剂量依赖性 (图 1, $P < 0.05$)。



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

图 1 TFDM 对 DOX 损伤的 H9c2 细胞存活率 (A) 和 LDH 释放量 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 1 Effects of TFDM on cell viability (A) and LDH release (B) in DOX-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

3.2 TFDM 对 DOX 损伤的 H9c2 细胞 SOD 活性、MDA 水平的影响

与对照组比较, 模型组细胞 SOD 活性降低, MDA 水平升高 (图 2, $P < 0.05$)。而 TFDM 剂量依赖性地升高了 DOX 损伤细胞内 SOD 活性 ($P < 0.05$), 显著降低 MDA 水平 ($P < 0.05$)。

3.3 TFDM 对 DOX 损伤的 H9c2 细胞凋亡的影响

结果显示, 与对照组比较, 模型组细胞凋亡率显著升高 (图 3, $P < 0.05$)。与模型组比较, TFDM 在 25~100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 可剂量依赖性地减少 H9c2 细胞凋亡 ($P < 0.05$)。

3.4 TFDM 对 DOX 损伤的 H9c2 细胞线粒体的影响

为了评价线粒体功能, 对线粒体 ROS 和线粒体膜电位进行定量分析发现, 与对照组比较, DOX 诱导的模型组细胞 DCF 的荧光强度显著增加, 且膜电

位降低 (图 4、5, $P < 0.05$), 表明线粒体内 ROS 产生过量。与模型组比较, TFDM 可剂量依赖性地降低 DCF 的荧光强度, 升高膜电位 ($P < 0.05$)。

3.5 TFDM 对 DOX 损伤的 H9c2 细胞 MAPKs、PI3K/Akt 通路相关蛋白表达的影响

结果显示, 与对照组比较, DOX 损伤后 H9c2 细胞 p38MAPK 蛋白磷酸化水平升高, ERK1/2、PI3K 与 Akt 的磷酸化水平降低, Bcl-2 表达水平降低, 线粒体介导的凋亡蛋白 Bax 和 Caspase-3 表达水平升高。而 TFDM 干预后使 p-p38MAPK、Bax 和 Caspase-3 蛋白表达水平升高, p-ERK1/2、p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白表达水平升高 (图 6, $P < 0.05$)。

4 讨论

关于 DOX 的心脏毒性机制问题, 国内外开展

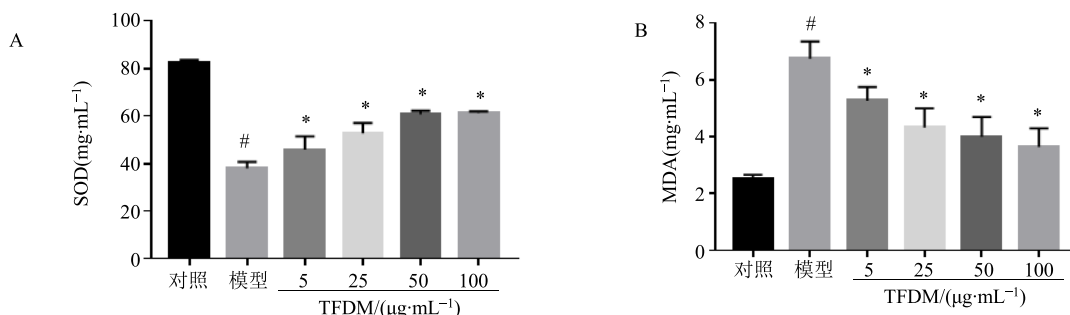


图 2 TFDM 对 DOX 损伤的 H9c2 细胞 SOD 活性 (A) 和 MDA 水平 (B) 的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 2 Effect of TFDM on SOD activity (A) and MDA content (B) in DOX-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

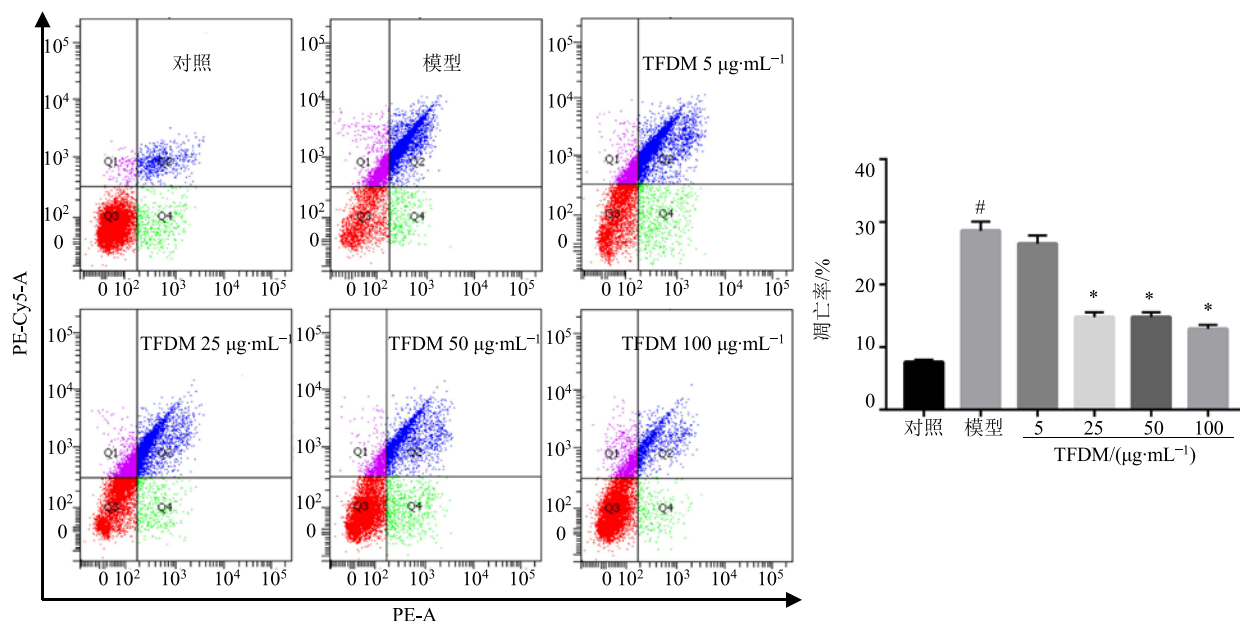


图 3 TFDM 对 DOX 损伤的 H9c2 细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Effect of TFDM on apoptosis in DOX-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

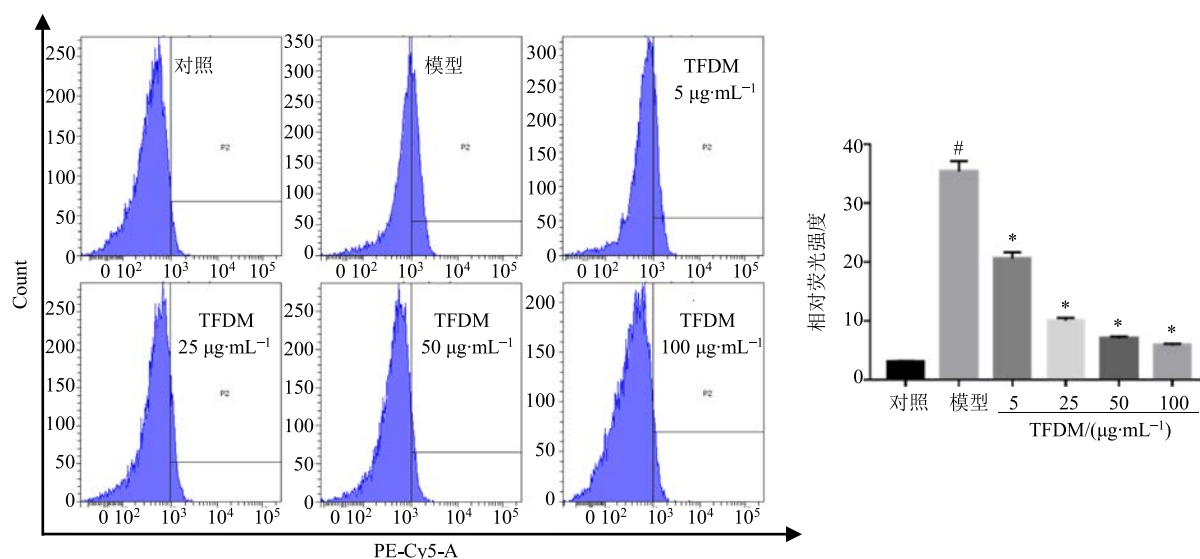


图 4 TFDM 对 DOX 损伤的 H9c2 细胞 ROS 释放的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 Effect of TFDM on ROS release in DOX-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

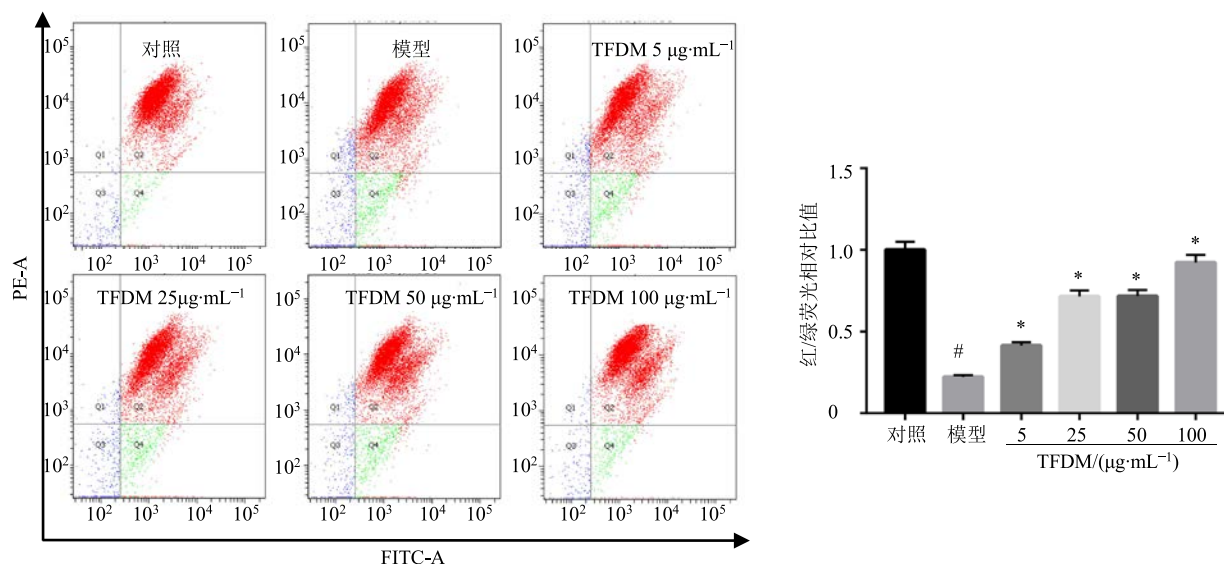
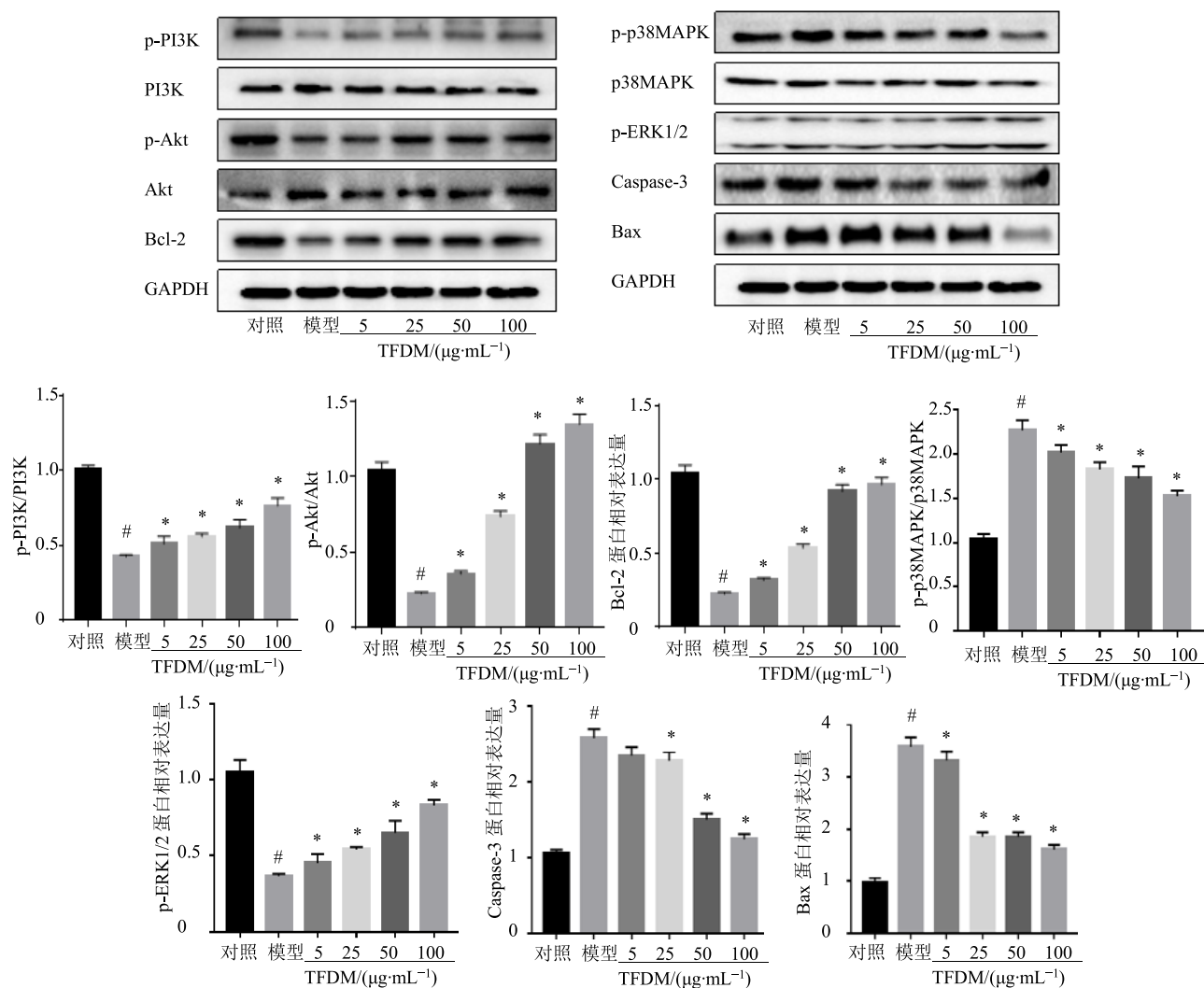


图 5 TFDM 对 DOX 损伤的 H9c2 细胞膜电位的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effect of TFDM on membrane potential in DOX-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

了大量的研究,已经取得了明显的进展,但是 DOX 诱导的心肌病的确切机制仍然不清楚^[10]。目前研究认为,DOX 心肌毒性是多种因素共同作用的结果,其中,因素之一是 DOX 进入体内后可产生大量活性氧自由基,引发脂质过氧化,造成心肌细胞损伤^[11]。本研究中以 LDH 的释放量为指标反映细胞毒性,以 SOD 活力的高低反映机体清除氧自由基的能力,以 MDA 水平反映机体细胞受自由基攻击的严重程度。结果表明,TFDM 可通过减轻细胞毒性、清除氧自由基、减少机体过氧化的程度来减少细胞损伤。大量研究表明,DOX 也可以引起钙超载,继而导致

能量代谢障碍、损伤线粒体,加重心肌细胞损伤^[12]。DOX 进入细胞后,导致心肌线粒体膜通透性转运孔开放、线粒体膜电位降低,从而释放大量细胞色素 C,后者参与凋亡级联反应,诱导心肌细胞凋亡,这些因素之间相互联系、互为因果,形成恶性循环网络,共同导致心脏毒性的发生^[13]。线粒体功能障碍是 DOX 所致心脏毒性的重要特征之一,其中包括呼吸链/氧化磷酸化(OXPHOS)系统的缺陷^[14]、三磷酸腺苷(ATP)生成减少^[15]、代谢底物利用的开关、线粒体脱氧核糖核酸(DNA)损伤、线粒体去乙酰化酶活性的调节和自由基形成的恶性循环等^[16]。根据

图 6 TFDM 对 DOX 损伤的 H9c2 细胞蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 6 Effect of TFDM on protein expression in DOX-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

文献报道^[17], 其机制主要是特异地靶向作用于线粒体, 以比血浆高 100 倍的浓度积聚在线粒体内, 从而抑制氧化和磷酸化导致生物能量下降, 最终导致心肌细胞凋亡。根据实验结果推测, TFDM 可能通过减少线粒体内 ROS 的产生, 增加 MMP, 改善线粒体功能障碍, 抑制细胞凋亡, 使细胞环境趋于稳定, 对心肌细胞起到了一定的保护作用。

有研究表明, PI3K/Akt 信号通路在心肌细胞中提供了必需的细胞存活信号^[18], 当心肌细胞受到 DOX 毒性损伤后, PI3K/Akt 信号通路的表达受到抑制, 从而影响促凋亡和抑凋亡蛋白, 最终导致细胞凋亡^[19], 而 PI3K/Akt 通路被激活后, 线粒体膜通透性转换孔 (mPTP) 开放减少, 并维持钙离子稳态, 调控线粒体能量的生成, 清除细胞内 ROS、抑制细胞凋亡^[20]。有报道称 DOX 可以诱导 p38MAPK

的激活, 导致炎症反应和细胞损伤^[21], 当心肌细胞受到 DOX 毒性损伤后, 磷酸化的 p38MAPK 被激活, 从而激活心肌细胞凋亡机制, 引起心肌细胞凋亡^[22], 而 ERK1/2 的磷酸化可以保护心肌细胞免受 DOX 心脏毒性的影响^[23]。通过本实验结果推断, TFDM 对 DOX 心脏毒性的线粒体保护机制可能是通过激活 PI3K/Akt 及其下游 Bcl-2 家族蛋白, 抑制线粒体 MMP 下降, 并磷酸化 ERK1/2, 抑制 p38MAPK 的磷酸化, 从而抑制心肌细胞凋亡, 保护细胞免受 DOX 损伤。

综上, TFDM 预处理可以降低 DOX 诱导的 H9c2 细胞毒性, 提高细胞活力, 清除氧自由基, 升高 MMP, 减少细胞凋亡, 保护心肌细胞。其作用机制可能与保护心肌细胞线粒体, 调节 MAPK 酶家族蛋白、PI3K/Akt 及其下游凋亡分子的表达有关。但是 TFDM

对线粒体的保护机制及 PI3K/Akt 下游靶标分子的具体分子机制尚未阐明,需要做进一步探讨。

参考文献

- [1] Hajra S, Patra A R, Basu A, *et al.* Prevention of doxorubicin (DOX)-induced genotoxicity and cardiotoxicity: Effect of plant derived small molecule indole-3-carbinol (I3C) on oxidative stress and inflammation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, doi: 10.1016/j.biopha.2018.02.088.
- [2] Yin J, Guo J, Zhang Q. Doxorubicin-induced mitophagy and mitochondrial damage is associated with dysregulation of the PINK1/parkin pathway [J]. *Toxicol Vitro*, 2018, doi: 10.1016/j.tiv.2018.05.001.
- [3] 黄杉, 杨迪, 郭应坤. MRI 对肿瘤化疗所致心脏毒性的评价 [J]. 中华放射学杂志, 2019, 53(3): 237-240.
- [4] 吐尼沙古力·买买提, 阿依尼沙·塞提瓦力地. 维吾尔医治心血管疾病药材香青兰饮片的临床用药探析 [J]. 世界最新医学信息文摘, 2017, 17(25): 205.
- [5] 信盼, 王新春, 黄川生, 等. 香青兰总黄酮对 ApoE 基因敲除小鼠动脉粥样硬化及 TGF- β 1/Smad 通路的影响 [J]. 石河子大学学报: 自然科学版, 2018, 36(4): 492-497.
- [6] 马丽月, 曾诚, 郑瑞芳, 等. 田蓟苷对脑缺血再灌注损伤模型大鼠脑组织的保护作用研究 [J]. 中国药房, 2018, 29(20): 2805-2810.
- [7] Tian L, Cao W J, Yue R J, *et al.* Pretreatment with tilianin improves mitochondrial energy metabolism and oxidative stress in rats with myocardial ischemia/reperfusion injury via AMPK/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway [J]. *J Pharmacol Sci*, 2019, doi: 10.1016/j.jphs.2019.02.008.
- [8] Jiang H L, Fang J S, Xing J G, *et al.* Tilianin mediates neuroprotection against ischemic injury by attenuating CaMKII-dependent mitochondrion-mediated apoptosis and MAPK/NF- κ B signaling [J]. *Life Sci*, 2019, doi: 10.1016/j.lfs.2018.11.035.
- [9] Akanda M R, Uddin M N, Kim I S, *et al.* The biological and pharmacological roles of polyphenol flavonoid tilianin [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, doi: 10.1016/j.ejphar.2018.10.044.
- [10] 邢建国, 何承辉, 于宁, 等. 香青兰提取物及其制备方法和用途: 中国, CN105250366A [P]. 2016-01-20.
- [11] 施洋, 樊登峰, 侯宝林, 等. DOX 致心脏毒性的作用机制及其中药防治的研究进展 [J]. 新疆中医药, 2019, 37(1): 113-116.
- [12] Carvalho F S, Burgeiro A, Garcia R, *et al.* Doxorubicin-induced cardiotoxicity: From bioenergetic failure and cell death to cardiomyopathy [J]. *Med Res Rev*, 2013, 34(1): 106-135.
- [13] 郝刚, 俞蕴莉. 阿霉素心肌毒性机制研究进展 [J]. 中南药学, 2014, 12(10): 993-997.
- [14] Childs A C, Phaneuf S L, Dirks A J, *et al.* Doxorubicin treatment *in vivo* causes cytochrome C release and cardiomyocyte apoptosis, as well as increased mitochondrial efficiency, superoxide dismutase activity, and Bcl-2: Bax ratio [J]. *Cancer Res*, 2002, 62(16): 4592-4598.
- [15] Liu D, Ma Z Q, Di S Y, *et al.* AMPK/PGC1 α activation by melatonin attenuates acute doxorubicin cardiotoxicity via alleviating mitochondrial oxidative damage and apoptosis [J]. *Free Radical Bio Med*, 2018, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2018.08.032.
- [16] Theresa S, Martin K. Boosting mitochondrial biogenesis in white adipocytes: A route towards improved insulin sensitivity? [J]. *Mol Metab*, 2013, 2(3): 128-129.
- [17] Govender J, Loos B, Marais E, *et al.* Mitochondrial catastrophe during doxorubicin-induced cardiotoxicity: A review of the protective role of melatonin [J]. *J Pineal Res*, 2014, 57(4): 367-380.
- [18] Kluza J, Marchetti P, Gallego M A, *et al.* Mitochondrial proliferation during apoptosis induced by anticancer agents: Effects of doxorubicin and mitoxantrone on cancer and cardiac cells [J]. *Oncogene*, 2004, 23(42): 7018-7030.
- [19] Walsh K. Akt signaling and growth of the heart [J]. *Circulation*, 2006, 113(17): 2032-2034.
- [20] 安涛, 张宇辉, 张健. NRG-1 通过激活 PI3K-Akt 信号通路抑制阿霉素引起的心肌细胞凋亡 [J]. 中国循环杂志, 2013(增刊 1): 56.
- [21] 韩军, 宣佳利, 胡浩然, 等. 金丝桃苷预处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤作用与 PI3K/Akt 信号通路的关系 [J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 118-123.
- [22] Guo R, Wu K, Chen J, *et al.* Exogenous hydrogen sulfide protects against doxorubicin-induced inflammation and cytotoxicity by inhibiting p38MAPK/NF κ B pathway in H9c2 cardiac cells [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2013, 32(6): 1668-1680.
- [23] Cao Y, Ruan Y, Shen T, *et al.* Astragalus polysaccharide suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity by regulating the PI3k/Akt and p38MAPK pathways [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, doi: 10.1155/2014/674219.