

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2021.03.004

熊去氧胆酸对阿霉素诱导的 H9c2 心肌细胞的影响及机制研究 *

王 皓^{1,2} 夏薇薇^{1,2} 龙广凤^{1,2} 杨大恒^{1,2} 裴知音^{1,2} 陈红兵^{1,2Δ}

(1 南京医科大学附属儿童医院检验科 江苏 南京 210008; 2 南京医科大学江苏省儿科学重点实验室 江苏 南京 210008)

摘要 目的:探讨熊去氧胆酸(UDCA)对阿霉素(DOX)诱导的 H9c2 心肌细胞损伤的影响及机制。**方法:**体外培养 H9c2 细胞, 1 μ M DOX 和不同浓度 UDCA 处理 H9c2, CCK-8 法测定细胞活力; 实时定量聚合酶链反应检测心肌细胞凋亡分子 Bax 及炎症因子 IL-1 β 、IL-6 的表达; Western blotting 检测 UDCA 对 DOX 诱导的心肌细胞凋亡相关蛋白 Bax、Bcl2、Caspase3 表达水平变化。**结果:**与对照组相比, DOX 组心肌细胞活力减弱; 炎症因子 IL-1 β 、IL-6 表达上调; 促凋亡分子 Bax 和 cleaved Caspase3 表达增多; 抑制凋亡蛋白 Bcl2 下调($P<0.05$)。与 DOX 组相比, UDCA+DOX 组显著恢复心肌细胞活力; 炎症因子 IL-1 β 、IL-6 表达下调; 促凋亡分子 Bax、cleaved Caspase3 下调; 抑制凋亡蛋白 Bcl2 表达上调($P<0.05$)。**结论:**UDCA 能缓解 DOX 诱导的 H9c2 心肌细胞损伤, 其机制可能与抑制炎症及凋亡有关。本研究为阿霉素心肌毒性的防治提供新的实验基础及理论依据。

关键词:熊去氧胆酸; 阿霉素; 心肌保护; 炎症; 凋亡

中图分类号: R-33; Q813; R322.11 文献标识码: A 文章编号: 1673-6273(2021)03-418-06

Effects of Ursodeoxycholic Acid on Doxorubicin-induced Injury in H9c2 Cardiomyocytes and Its Mechanism*

WANG Hao^{1,2}, XIA Wei-wei^{1,2}, LONG Guang-feng^{1,2}, YANG Da-heng^{1,2}, PEI Zhi-yin^{1,2}, CHEN Hong-bing^{1,2Δ}

(1 Department of Clinical Laboratory, Children's Hospital of Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210008, China;

2 Key Laboratory of Pediatrics, Nanjing Medical University, Nanjing, Jiangsu, 210008, China)

ABSTRACT Objective: To investigate the effect of Ursodeoxycholic Acid (UDCA) on doxorubicin (DOX)-induced cardiotoxicity in H9c2 cardiomyocytes and the mechanisms. **Methods:** The H9c2 cardiomyocytes were treated with DOX with or without UDCA of different doses. The cell viability was measured by CCK-8 assay, and the inflammatory factors were examined by quantitative real-time polymerase chain reaction (qRT-PCR). As for apoptosis, Western blotting, qRT-PCR were used to analyze. **Results:** Compared with control group, the viability of H9c2 cells, the anti-apoptotic protein Bcl2 were decreased ($P<0.05$). Additionally, the release of inflammatory factors (IL-1 β , IL-6), apoptotic molecules (Bax and Cleaved Caspase3) was increased ($P<0.05$). Compared with DOX group, UDCA+DOX group restored the cell viability, ameliorated the release of inflammatory factors (IL-1 β , IL-6), inhibited pro-apoptotic molecules (Bax and Cleaved Caspase3), promoted anti-apoptotic molecules Bcl2 as well ($P<0.05$). **Conclusions:** UDCA suppresses DOX-induced injury in H9c2 cardiomyocytes by reducing inflammation and apoptosis, which provides a pivotal theoretical basis for the clinical application of UDCA in the prevention and treatment of DOX-induced cardiotoxicity.

Key words: Ursodeoxycholic Acid (UDCA); Doxorubicin (DOX); Myocardium protection; Inflammation; Apoptosis

Chinese Library Classification (CLC): R-33; Q813; R322.11 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2021)03-418-06

前言

阿霉素(doxorubicin, DOX)是蒽环类广谱抗肿瘤药物,广泛用于各类实体肿瘤、肉瘤、血液肿瘤等的化疗^[1]。但阿霉素的多器官毒性损伤各系统,包括心血管系统、消化系统、神经系统、泌尿以及生殖系统等^[2]。由于阿霉素的心肌亲和力高,阿霉素心肌损伤是最常见且致命的副作用,这严重限制了阿霉素的临床应用。阿霉素心脏毒性机制涉及氧化应激,炎症^[3],凋亡、坏

死^[4],自噬^[5]等。

熊去氧胆酸(ursodeoxycholic acid, UDCA)是毒性最低、亲水性最强的胆汁酸^[6]。UDCA 主要用于肝胆相关疾病治疗,但是目前大量研究表明 UDCA 在肝胆系统外也发挥一定生物学效应,尤其具有心脏保护作用^[7-9]。UDCA 是否能拮抗阿霉素心肌毒性尚不明确,缺乏相关研究。本文采用 DOX 刺激 H9C2 心肌细胞,从细胞活力、炎症、凋亡等方面探讨、验证 UDCA 对阿霉素心肌损伤的影响,为 DOX 心肌毒性治疗提供新的实验基础、

* 基金项目:江苏省博士后科研基金项目(2018K255C)

作者简介:王皓(1995-),女,硕士研究生,研究方向:心血管疾病的分子机制与临床,电话:18408260016, E-mail: wh@njmu.edu.cn

Δ 通讯作者:陈红兵(1971-),男,主任技师,硕士生导师,研究方向:心血管疾病的分子机制与临床,

E-mail: chenghb1999@126.com, 电话:18951769638

(收稿日期:2020-07-28 接受日期:2020-08-21)

理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 细胞系 大鼠心肌细胞系(H9c2)来源于大鼠胚胎期心脏组织,购于美国组织培养中心(American Tissue Culture Collection, ATCC)。

1.1.2 药物与试剂 DOX (美国 Sigma Aldrich 公司);UDCA (美国 MedChemExpress 公司);DMEM 培养基、磷酸盐缓冲液(PBS)、胰酶、胎牛血清(FBS)(美国 Gibco 公司);抗 Bax、Bcl2、Caspase3、GAPDH、 α -tubulin 抗体(Proteintech 公司);辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司);TRIZOL (日本 Takara 公司);qPCR SYBR Green Mix(南京诺唯赞生物科技有限公司)。

1.1.3 仪器 Multiskan FC 酶标仪(美国 Thermo Fisher 公司);超微量紫外分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司);QuantStudio 3 Real-time PCR 仪器(美国 Applied Biosystems 公司);蛋白电泳分离、转膜成像系统(美国 Bio-rad 公司);CO₂ 培养箱(美国 Thermo 公司)。

1.2 方法

1.2.1 细胞培养 H9c2 细胞培养于含 10%FBS 的 DMEM 培养基中,置于 37℃、5% CO₂、饱和湿度条件的细胞培养箱中,每 24 小时更换一次新鲜培养基。待细胞融合度达到 80%~90%时,用 0.25%胰酶(含 EDTA)消化细胞,进行传代及铺板。取对数生长期并且状态良好的细胞进行后续实验研究。

1.2.2 试剂配制 将 DOX 及 UDCA 分别溶于 DMSO 中制成储存液,避光储存于 -20℃。用 DMSO 稀释成对应工作液浓度进行后续实验。

1.2.3 实验分组 实验分为 4 组:(1)对照(control)组;(2)UD-

CA 组;UDCA 处理心肌细胞 26 h;(3)DOX (1 μ M DOX 处理 24 小时)组;(4)UDCA+DOX 组:UDCA 预处理心肌细胞 2 h 后,加入 1 μ M DOX 作用 24 h。

1.2.4 CCK-8 法测定 H9c2 细胞活力 将生长状态良好的 H9c2 细胞消化后接种于 96 孔培养板中,当细胞密度达到 70%培养孔底面积时,根据不同分组进行对应的实验处理,每组设 6 个复孔。不同浓度梯度(5、10、20、30、40、50、60、100 μ g/mL)UDCA 处理 H9c2 26 小时。终止培养后,每孔加入空培配置的 10% CCK-8 100 μ L,轻轻晃动培养板,继续 37℃孵育 2 h,用酶标仪检测 450 nm 的吸光度(OD)值。筛选出最佳的 UDCA 浓度范围(5、10、20、50 μ g/mL)后,再次接种心肌细胞,按上述浓度梯度分别加入 UDCA,预处理 2 h 后,加入 DOX(1 μ M)。继续培养 24 h 后,加入 10% CCK-8 100 μ L,再次测定 OD 值,计算细胞存活率。细胞存活率 = 实验组 OD 值 / 对照组 OD 值平均值 $\times$ 100%。

1.2.5 定量实时聚合酶链反应(qRT-PCR)法检测 IL-1 β 、IL-6 和 Bax 的表达水平 收集细胞样本,用 Trizol 提取细胞 RNA。步骤如下:收集样本,PBS 清洗 2 次,每个样本加入 0.5 mL Trizol 裂解细胞,吹打并吸入无酶 EP 管;加入 0.2 mL 三氯甲烷,上下倒置充分混匀,静置 10 min,4℃、12 000 r/min 离心 10 min;小心吸取上清液至另一无酶 EP 管中,加入等体积异丙醇,充分混匀,静置 10 min,离心 10 min;弃上清,加入 1 mL 75%乙醇,4℃、7 500 r/min 离心 10 min 洗涤沉淀;轻轻弃上清,每孔加入 20 μ L DEPC 溶解沉淀。测定各样本 RNA 浓度、纯度(OD260、OD260/OD280)。利用反转录试剂盒逆转录合成 cDNA。运用 SYBR Green 进行实时荧光定量检测。GAPDH 作为内参,采用 2^{- $\Delta\Delta$} 法计算 IL-1 β 、IL-6、Bax 的相对表达量。IL-1 β 、IL-6、Bax 和 GAPDH 引物序列见表 1。

表 1 Real-time PCR 实验引物序列

Table 1 The primer sequences for real-time PCR

Gene	Forward primer (5'-3')	Reverse primer (5'-3')
Rat Bax	GGCTGGACACTGGACTTC	CAGATGGTGAGTGAGGCA
Rat IL-1 β	CTTTGAAGAAGAGCCCGTCC	CCAAGGCCACAGGGATTTTG
Rat IL-6	AGTTGCCTTCTTGGGACTGATGT	GGTCTGTTGTGGGTGGTATCCTC
Rat GAPDH	AACTTTGGCATCGTGAAGG	TACATTGGGGGTAGGAACAC

1.2.6 Western blotting 检测 Bax、Bcl2、Caspase3 的表达水平 将生长状态良好的 H9c2 心肌细胞接种于 6 孔培养板,根据实验分组分别给与不同处理。细胞贴壁且状态良好后,加入 UDCA 或 DMSO 预处理 2 h,再分别加入 1 μ M DOX 或 DMSO 处理 24 h。处理结束后收集细胞样本,用预冷的 PBS 洗涤 2 次,加入细胞裂解液(RIPA+PI),冰上静置 15 min,收集样本于 EP 管中,4℃、12 000 r/min 离心 15 min。取上清液,采用 BCA 法测定蛋白浓度,之后煮沸蛋白。各样本蛋白按每泳道 30 μ g 等质量上样,经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳分离后,转移到 PVDF 膜上。用 5%脱脂牛奶封闭 1 h。随后加入抗 Bax(1:1 000)、Bcl2(1:1 000)、Caspase3 抗体(1:1 000),4℃摇床孵育过夜;用 TBST 洗 3 次,10 min / 次;洗膜后加入

HRP 标记的二抗(1:2000)室温孵育 1 h,再次用 TBST 洗膜 3 次。将 PVDF 膜滴加化学发光试剂 ECL,用化学发光成像系统显影,采集图像。使用 Gel Image Analysis 系统进行灰度分析。以 GAPDH、 α -tubulin 作为内参,分析目的蛋白相对表达水平。

1.2.7 统计学分析 实验数据以均数 $\pm$ 标准差(mean $\pm$ SD)表示。采用 GraphPad Prism 5 软件进行数据分析及图形绘制。两组间比较采用非配对的 t 检验。以 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 UDCA 改善 DOX 刺激的 H9c2 心肌细胞活力下降

采用 CCK8 法检测心肌细胞活力变化,当不同浓度 UDCA (5、10、20、30、40、50、60、100 μ g/mL)处理 H9c2 心肌细胞 26 h

后,除 40 $\mu\text{g/mL}$ 组能促进细胞增殖($P<0.05$)外,其余各组与对照组相比不影响细胞增殖或抑制($P>0.05$)(图 1A)。后续实验中,进一步探究不同浓度 UDCA (5、10、20、50 $\mu\text{g/mL}$)对 DOX 诱导的 H9c2 心肌细胞存活率的影响。结果显示:与对照组相比,DOX 组 H9c2 心肌细胞活性明显降低 ($P<0.001$);与

DOX 组相比,各 UDCA+DOX 组明显抑制了 DOX 导致的心肌细胞活力下降($P<0.05$)(图 1B)。上述结果表明:UDCA 可以抑制 DOX 诱导的心肌细胞活力降低,可以减轻 DOX 刺激的细胞毒性。

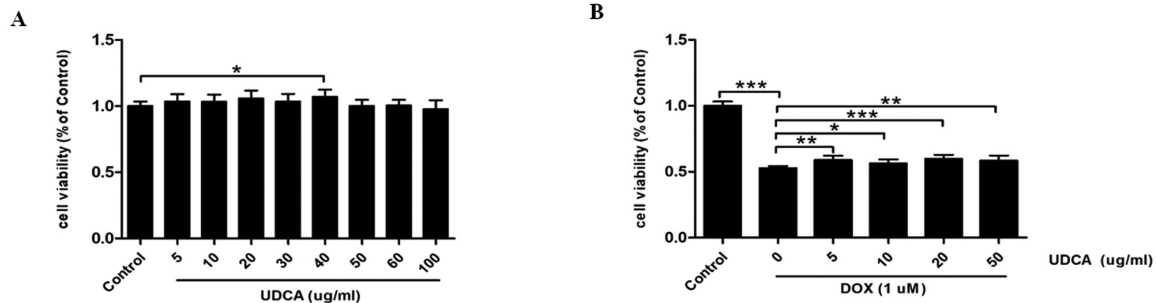


图 1 UDCA 对 DOX 诱导的 H9c2 心肌细胞活力的影响。A:不同浓度 UDCA 处理 H9c2 心肌细胞活力变化。B:UDCA 对 DOX 诱导的 H9c2 心肌细胞活力变化。

Fig.1 Effect of UDCA on DOX-induced cell viability in H9c2 was measured by CCK8 assay. A: Cell viability of H9c2 treated with different concentrations of UDCA from 5 to 100 $\mu\text{g/mL}$ for 26 h. B: Cell viability of H9c2 treated with UDCA (5-50 $\mu\text{g/mL}$) followed by DOX treatment for 24 h.

Values were expressed as the mean $\pm$ SD ($n \geq 3$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$ and *** $P<0.001$.

2.2 UDCA 抑制 DOX 诱导的心肌细胞炎症因子上调

采用 qRT-PCR 实验检测 DOX 诱导的心肌细胞炎症因子的变化,与对照组相比,UDCA 组(10/20/30 $\mu\text{g/mL}$)炎症因子(IL-1 β 、IL-6)表达无明显改变($P>0.05$),DOX 组炎症因子表达

量明显增加 ($P<0.01$);与 DOX 组比较,UDCA (10/20/30 $\mu\text{g/mL}$)+DOX 组炎症因子 IL-1 β 、IL-6 表达量明显下降,差异均有统计学意义($P<0.05$)(图 2A&B)。结果表明,UDCA 通过抑制炎症因子产生发挥心肌细胞保护作用。

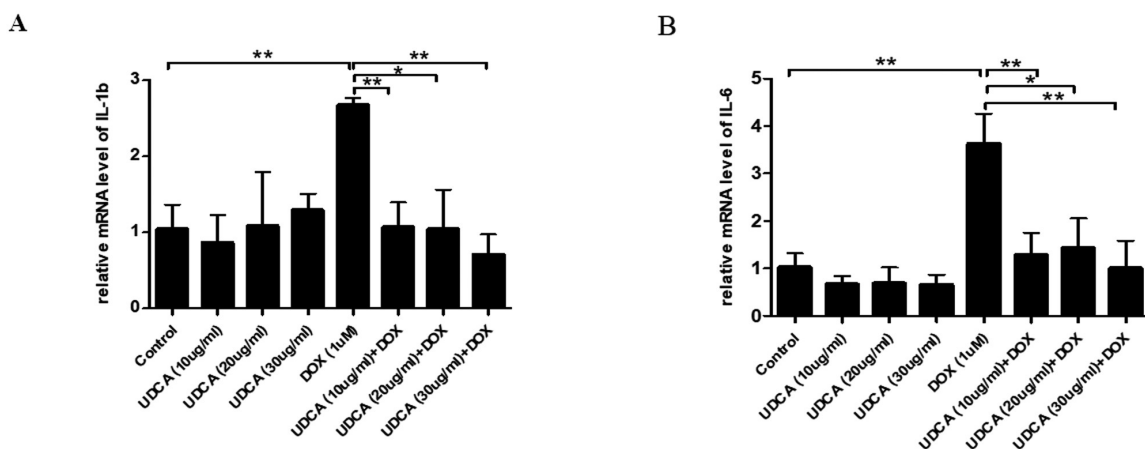


图 2 UDCA 对 DOX 刺激的 H9c2 心肌细胞炎症因子的影响。A: 10/20/30 $\mu\text{g/mL}$ UDCA 减轻了 DOX 诱导的炎症因子(IL-1 β)上调。

B: 10/20/30 $\mu\text{g/mL}$ UDCA 缓解了 DOX 诱导的炎症因子(IL-6)上调。

Fig.2 UDCA ameliorated inflammation on mRNA level under DOX treatment in H9c2 by qRT-PCR. A: UDCA (10/20/30 $\mu\text{g/mL}$) treatment weakened DOX-induced inflammation upregulation (IL-1 β). B: UDCA (10/20/30 $\mu\text{g/mL}$) treatment attenuated DOX-induced inflammation upregulation (IL-6).

Values were expressed as the mean $\pm$ SD ($n \geq 3$). * $P<0.05$, ** $P<0.01$.

2.3 UDCA 下调促凋亡相关分子表达

采用 qRT-PCR 及 Western blotting 检测 DOX 诱导的心肌细胞促凋亡分子的变化,与对照组相比,在 mRNA 水平,DOX 组凋亡相关分子 Bax 表达量明显增加($P<0.01$);UDCA (20/40 $\mu\text{g/mL}$)处理后,Bax 表达量明显下降($P<0.05$)(图 3A&B)。在蛋白水平,与对照组相比,DOX 组 cleaved Caspase3 蛋白水平明显上升($P<0.05$),且 cleaved caspase3 / Total Caspase-3 明显上升($P<0.05$);UDCA (20 $\mu\text{g/mL}$)处理后,cleaved Caspase3, cleaved caspase3 / Total Caspase-3 表达量明显下降 ($P<0.05$)

(图 4A-C)。结果表明,UDCA 在 mRNA 及蛋白水平通过抑制促凋亡分子 Bax 及 cleaved Caspase3 的产生发挥心肌细胞保护作用。

2.4 UDCA 促进抗凋亡相关蛋白表达

采用 Western blotting 实验检测 DOX 诱导的心肌细胞凋亡分子的变化,在蛋白水平,与对照组相比,DOX 组抗凋亡相关分子 Bcl2 表达量明显下降 ($P<0.05$);与 DOX 组相比,UDCA+DOX 组 Bcl2 表达量明显上升($P<0.01$)(图 5A-B)。与此类似,与对照组相比,DOX 组 Bcl2/Bax 明显降低($P<0.05$);

UDCA+DOX 组 Bcl2/Bax 表达量明显上升($P<0.05$)(图 5A&C)。 细胞保护作用。
结果表明,UDCA 通过促进抗凋亡分子 Bcl2 的产生发挥心肌

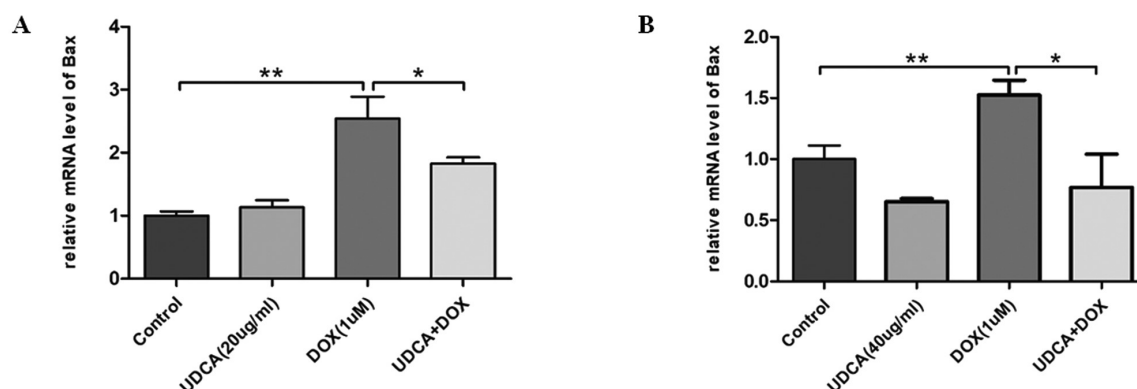


图3 UDCA对DOX诱导的H9c2心肌细胞促凋亡分子在mRNA水平的影响。A:在mRNA水平,20 µg/mL UDCA的处理下调了DOX诱导的Bax上调。B:在mRNA水平,40 µg/mL UDCA的处理下调了DOX诱导的Bax上调。

Fig.3 UDCA inhibited the mRNA level of pro-apoptotic molecule Bax caused by DOX in H9c2. A: UDCA (20 µg/mL) suppressed Bax in mRNA level in DOX-induced H9c2 cells. B: UDCA (40 µg/mL) inhibited Bax in mRNA level in DOX-induced H9c2 cells. Values were expressed as the mean $\pm$ SD ($n \geq 3$). * $P<0.05$ and ** $P<0.01$.

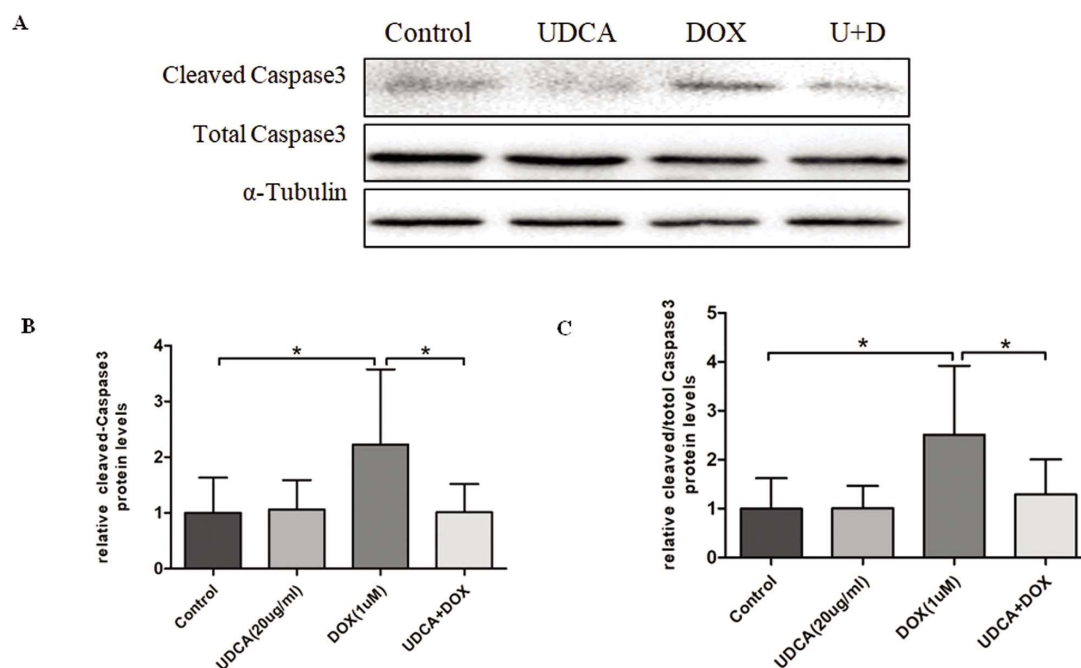


图4 UDCA对DOX刺激的H9c2心肌细胞促凋亡蛋白的影响。A: Cleaved Caspase3, Total Caspase3 蛋白免疫条带结果。B: UDCA处理下调了DOX刺激的Cleaved Caspase3表达水平。C: UDCA处理下调了DOX刺激的Cleaved Caspase3/Total Caspase3表达水平。

Fig.4 UDCA mitigated pro-apoptotic protein caused by DOX in H9c2 by Western blotting. A: Representative western blots of Cleaved and Total caspase-3 expression following treatment with DOX with or without UDCA. B: Cleaved caspase-3 was increased following treatment with DOX, and UDCA suppressed Cleaved caspase-3 expression. C: UDCA restored Cleaved / Total Caspase3 expression. Values were expressed as the mean $\pm$ SD ($n \geq 3$). * $P<0.05$.

3 讨论

近年来,肿瘤的高发病率促进了抗癌药物DOX广泛的临床应用,但是长期大量使用DOX将产生一系列副作用,其中心脏毒性是最常见且最严重的副作用,其具体机制涉及炎症、氧化应激、凋亡、钙离子失调^[1]、自噬等。为改善阿霉素心肌毒性,目前的心脏保护策略有阿霉素衍生物米托蒽醌、表阿霉素的替代治疗;载阿霉素-聚乳酸-羟基乙酸共聚物纳米微球^[12]等新

型制剂增加阿霉素作用缓释性;心脏保护药物如右雷佐生、他汀类、血管紧张素转换酶抑制剂、钙离子通道阻滞剂等^[13];改变阿霉素药物作用形式如脂质体阿霉素^[14,15]、超声波控制的DOX-SiO₂纳米复合材料^[16]等。右雷佐生是最常见,临床应用最普遍的阿霉素心脏毒性保护药物,是美国食品药品监督管理局(FDA)批准使用的阿霉素心脏保护药物,然而其伴随的副作用使右雷佐生的临床应用存在争议^[17,18]。

UDCA主要用于原发性胆汁性胆管炎、妊娠期胆汁淤积

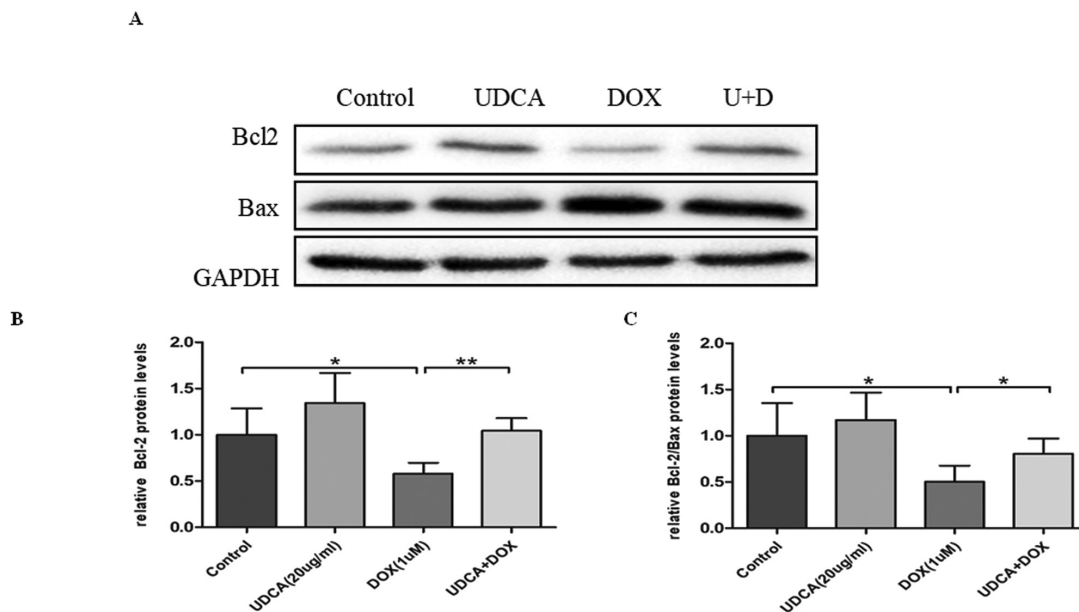


图5 UDCA对DOX诱导的H9c2心肌细胞抗凋亡蛋白的影响。A: Bcl2, Bax 蛋白免疫条带结果。B: UDCA上调了DOX刺激的Bcl2蛋白表达水平。C: UDCA上调了DOX刺激的Bcl2/Bax水平。

Fig.5 UDCA upregulated anti-apoptotic protein in DOX-induced decline in H9c2 by Western blotting. A: Representative western blots of Bcl2 and Bax expression following treatment with DOX with or without UDCA. B: Bcl2 was decreased following treatment with DOX, and UDCA countered Bcl2 downregulation. C: UDCA restored Bcl2 / Bax expression. Values were expressed as the mean $\pm$ SD (n $\geq$ 3). * P <0.05 and ** P <0.01.

症、胆固醇结石等肝胆疾病治疗^[19]。研究表明,UDCA通过抑制氧化应激、抗炎、抗凋亡在代谢综合征、糖尿病^[20],阿尔兹海默病^[21],帕金森病^[22]等疾病中具有保护作用。更重要的是,UDCA具有心脏保护效应,能改善低氧状态下心肌细胞损伤^[7],能抑制心肌纤维化^[9],能抑制心室传导减慢及心律失常^[8]。研究表明UDCA结合阿霉素疗法能有效改善甲状腺转运蛋白相关心肌淀粉样变^[23]。但是尚无文献报道UDCA改善DOX诱导的心肌细胞毒性的相关研究。

本研究利用DOX诱导的H9c2心肌细胞损伤模型,探讨UDCA对DOX心肌毒性的保护作用。首先,CCK8实验证明:5-100 μ g/mL UDCA处理H9c2心肌细胞26小时,细胞活力与对照组相比无下降;不同浓度UDCA(5-50 μ g/mL)处理均能显著改善DOX刺激的心肌细胞活力下降。

文献报道DOX诱导的心肌毒性与炎症因子(IL-1 β , IL-6, TNF- α 等)上调相关,我们的实验结果也表明DOX刺激促进H9c2细胞炎症因子上调(IL-1 β , IL-6);已有研究表明富氢液通过抑制炎症改善DOX心脏、肝脏损伤^[24];白杨素能下调炎症因子的表达^[25]从而改善DOX诱导的心肌毒性。在本研究中,我们观察到UDCA干预可下调炎症因子IL-1 β 、IL-6表达,进而改善心肌细胞活力。

有文献报导,DOX诱导的心肌毒性除与炎症有关外,凋亡^[26]同样发挥了重要且主要的作用。DOX促进凋亡相关蛋白Bax及cleaved Caspase3表达,抑制抗凋亡蛋白Bcl-2表达。白藜芦醇^[27]、大蒜素^[28]、还原性谷胱甘肽^[29]等通过抑制凋亡改善DOX的心肌毒性。与此相似,我们的实验结果表明:DOX处理后,Bax及cleaved Caspase3表达增加,Bcl-2表达下降;并且UDCA的处理可抑制Bax及cleaved Caspase3表达,上调Bcl-2表达,表现为cleaved Caspase3/cleaved/total Caspase3下调及

Bcl-2、Bcl-2/Bax上调,进而发挥H9c2心肌细胞保护作用。

综上所述,在本研究中,UDCA通过抑制炎症及凋亡发挥心肌细胞保护作用,干预DOX诱导的心肌细胞毒性。目前,血管紧张素转化酶抑制剂如美托洛尔、依那普利等进入临床试验^[30,31],虽有降低心肌损伤标志物的作用,但其拮抗心肌毒性有效性仍需深入验证,故还未批准用作药物所致心肌病的特异性药物。本研究中,UDCA的心肌保护作用将为临床上DOX心肌毒性的防治提供新的理论依据及治疗靶点。

参考文献(References)

- [1] Carvalho C, Santos RX, Cardoso S, et al. Doxorubicin: the good, the bad and the ugly effect[J]. *Curr Med Chem*, 2009, 16(25): 3267-3285
- [2] Pugazhendhi A, Edison T, Velmurugan BK, et al. Toxicity of Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems [J]. *Life Sci*, 2018, 200: 26-30
- [3] Yu J, Wang C, Kong Q, et al. Recent progress in doxorubicin-induced cardiotoxicity and protective potential of natural products [J]. *Phytomedicine*, 2018, 40: 125-139
- [4] Tacar O, Sriamornsak P, Dass CRJJoP, et al. Doxorubicin: an update on anticancer molecular action, toxicity and novel drug delivery systems[J]. *J Pharm Pharmacol*, 2013, 65(2): 157-170
- [5] Bartlett JJ, Trivedi PC, Pulinilkunnil TJJoM, et al. Autophagic dysregulation in doxorubicin cardiomyopathy [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2017, 104: 1-8
- [6] Hanafi NI, Mohamed AS, Sheikh Abdul Kadir SH, et al. Overview of Bile Acids Signaling and Perspective on the Signal of Ursodeoxycholic Acid, the Most Hydrophilic Bile Acid, in the Heart [J]. *Biomolecules*, 2018, 8(4): 159
- [7] Hanafi NI, Mohamed AS, Noor JM, et al. Ursodeoxycholic acid upregulates ERK and Akt in the protection of cardiomyocytes against Co-C12[J]. *Genet Mol Res*, 2016, 15(2)

- [8] Adeyemi O, Alvarez-Laviada A, Schultz F, et al. Ursodeoxycholic acid prevents ventricular conduction slowing and arrhythmia by restoring T-type calcium current in fetuses during cholestasis [J]. *PLoS One*, 2017, 12(9): e0183167
- [9] Li X, Han KQ, Shi YN, et al. Effects and mechanisms of ursodeoxycholic acid on isoprenaline-Induced myocardial fibrosis in mice [J]. *Zhonghua Yi Xue Za Zhi*, 2017, 97(5): 387-391
- [10] Pickens SR, Chamberlain ND, Volin MV, et al. Characterization of interleukin-7 and interleukin-7 receptor in the pathogenesis of rheumatoid arthritis [J]. *Arthritis Rheum*, 2011, 63(10): 2884-2893
- [11] Octavia Y, Tocchetti CG, Gabrielson KL, et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy: from molecular mechanisms to therapeutic strategies [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2012, 52(6): 1213-1225
- [12] 刘杰, 徐伟华, 金成, 等. 载阿霉素 PLGA 纳米微球的制备及性质研究 [J]. *现代生物医学进展*, 2010, 10(24): 4661-4663
- [13] Liu H, Wang H, Xiang D, et al. Pharmaceutical Measures to Prevent Doxorubicin-Induced Cardiotoxicity [J]. *Mini Rev Med Chem*, 2017, 17(1): 44-50
- [14] Rivankar SJJ, CR, Therapeutics. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy [J]. *J Cancer Res Ther*, 2014, 10(4): 853-858
- [15] Sesarman A, Muntean D, Abrudan B, et al. Improved pharmacokinetics and reduced side effects of doxorubicin therapy by liposomal co-encapsulation with curcumin [J]. *J Liposome Res*, 2019: 1-10
- [16] Wang Y, Bi K, Shu J, et al. Ultrasound-controlled DOX-SiO₂ nanocomposites enhance the antitumour efficacy and attenuate the toxicity of doxorubicin [J]. *Nanoscale*, 2019, 11(10): 4210-4218
- [17] Reichardt P, Tabone M-D, Mora J, et al. Risk-benefit of dexrazoxane for preventing anthracycline-related cardiotoxicity: re-evaluating the European labeling [J]. *Future Oncol*, 2018, 14(25): 2663-2676
- [18] Furqan S, Lee DL, Sarah A, et al. Cardioprotection and Second Malignant Neoplasms Associated With Dexrazoxane in Children Receiving Anthracycline Chemotherapy: A Systematic Review and Meta-Analysis [J]. *J Natl Cancer Inst*, 2015, 108(4): 4
- [19] Cabrera D, Arab JP, Arrese M. UDCA, NorUDCA, and TUDCA in Liver Diseases: A Review of Their Mechanisms of Action and Clinical Applications [J]. *Handb Exp Pharmacol*, 2019, 256: 237-264
- [20] Lefebvre P, Cariou B, Lien F, et al. Role of bile acids and bile acid receptors in metabolic regulation [J]. *Physiol Rev*, 2009, 89 (1): 147-191
- [21] Bell SM, Barnes K, Clemmens H, et al. Ursodeoxycholic Acid Improves Mitochondrial Function and Redistributes Drp1 in Fibroblasts from Patients with Either Sporadic or Familial Alzheimer's Disease [J]. *J Mol Biol*, 2018, 430(21): 3942-3953
- [22] Abdelkader NF, Safar MM, Salem HA. Ursodeoxycholic Acid Ameliorates Apoptotic Cascade in the Rotenone Model of Parkinson's Disease: Modulation of Mitochondrial Perturbations [J]. *Mol Neurobiol*, 2016, 53(2): 810-817
- [23] Karlstedt E, Jimenez-Zepeda V, Howlett JG, et al. Clinical Experience With the Use of Doxycycline and Ursodeoxycholic Acid for the Treatment of Transthyretin Cardiac Amyloidosis [J]. *J Card Fail*, 2019, 25(3): 147-153
- [24] Gao Y, Yang H, Fan Y, et al. Hydrogen-Rich Saline Attenuates Cardiac and Hepatic Injury in Doxorubicin Rat Model by Inhibiting Inflammation and Apoptosis [J]. *Mediators of Inflammation*, 2016, 2016: 1-10
- [25] Mantawy EM, El-Bakly WM, Esmat A, et al. Chrysin alleviates acute doxorubicin cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2014, 728: 107-118
- [26] Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, et al. Doxorubicin-induced apoptosis: Implications in cardiotoxicity [J]. *Mol Cell Biochem*, 2002, 234-235(1): 119-124
- [27] Gu J, Fan YQ, Zhang HL, et al. Resveratrol suppresses doxorubicin-induced cardiotoxicity by disrupting E2F1 mediated autophagy inhibition and apoptosis promotion [J]. *Biochem Pharmacol*, 2018, 150: 202-213
- [28] Abdel-Daim MM, Kilany OE, Khalifa HA, et al. Allicin ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats via suppression of oxidative stress, inflammation and apoptosis [J]. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2017, 80(4): 745-753
- [29] 张红欣, 韩鲁军, 安召伟, 等. 还原型谷胱甘肽对阿霉素致大鼠心脏毒性的保护作用及其机制 [J]. *现代生物医学进展*, 2015, 15(30): 5854-5857
- [30] Georgakopoulos P, Kyriakidis M, Perpinia A, et al. The Role of Metoprolol and Enalapril in the Prevention of Doxorubicin-induced Cardiotoxicity in Lymphoma Patients [J]. *Anticancer Res*, 2019, 39 (10): 5703-5707
- [31] Gupta V, Kumar Singh S, Agrawal V, et al. Role of ACE inhibitors in anthracycline-induced cardiotoxicity: A randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Pediatr Blood Cancer*, 2018, 65 (11): e27308