

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2014.10.005

## 曲美他嗪对大鼠放射性心肌损伤后 TNF- $\alpha$ 表达的影响 \*

周 游 陈绘颖 王江友 刘 涛 苏 强 刘阳春 李 浪 $\Delta$ 

(广西医科大学第一附属医院内科 广西心血管病研究所 广西南宁 530021)

**摘要 目的:**放射性心肌损伤是纵膈及胸腔等部位恶性肿瘤放射治疗后发生的严重并发症,目前尚无有效防治方法,而本实验拟探索曲美他嗪对放射性心肌损伤的保护作用。**方法:**将 45 只 SD 大鼠随机分为正常对照组(C 组)、单纯照射组(X 组)、曲美他嗪治疗组(T 组),每组 15 只,其中 X 组、T 组予以 10 Gy/d,共 3 天。大鼠照射完毕处死后测定血清 cTnI 浓度,心肌组织 TNF- $\alpha$ mRNA 及蛋白的表达。**结果:**1.X 组与 C 组相比,血清 cTnI 浓度,心肌组织 TNF- $\alpha$ mRNA 及蛋白的表达均明显升高( $P < 0.05$ );2. T 组与 C 组相比,血清 cTnI 浓度,心肌组织 TNF- $\alpha$ mRNA 及蛋白的表达均明显升高( $P < 0.05$ );3.T 组与 X 组相比,血清 cTnI 浓度,心肌组织 TNF- $\alpha$ mRNA 及蛋白的表达均明显降低( $P < 0.05$ )。**结论:**曲美他嗪能够通过减少心肌组织 TNF- $\alpha$  mRNA 及蛋白的表达,从而有效减轻大鼠放射后心脏炎症反应,以减轻心肌损伤。

**关键词:**放射性心脏损伤;曲美他嗪;TNF- $\alpha$ ;大鼠

**中图分类号:**Q95-3,R541.9 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2014)10-1821-04

## Effects of Trimetazidine on the Expression of TNF- $\alpha$ in Rats during radiogenic Myocardial Damage\*

ZHOU You, CHEN Hui-ying, WANG Jiang-you, LIU Tao, SU Qiang, LIU Yang-chun, LI Lang $\Delta$ 

(Department of cardiovascular internal medicine, the First Affiliated Hospital of Guangxi Medical University, Guangxi Research Institute for cardiovascular disease, NanNing City, Guangxi Zhuang Autonomous Region Committee, 530021, China)

**ABSTRACT Objective:** Radiogenic myocardial damage is a serious complication of mediastinal and pleural and other parts of malignant tumor after radiotherapy, there is no effective control methods, and in this study intends to explore the protective effect of trimetazidine on radiogenic myocardial damage. **Methods:** 45 SD rats were randomly divided into normal control group (group C), irradiation alone group (group X), trimetazidine treatment group (T group), 15 rats in each group, X group. T group were given 10 Gy/d, a total of 3 days, a total dose of 30 Gy X-ray irradiation. Irradiated rats were completed by measuring the concentration of serum cTnI, the expression of TNF- $\alpha$  protein and mRNA in myocardial tissue. **Results:** 1. Compared with X group and C group, the concentration of serum cTnI, the expression of TNF- $\alpha$  protein and mRNA in myocardial tissue were significantly increased ( $P < 0.05$ ); 2. Compared with T group and C group the concentration of serum cTnI, the expression of TNF- $\alpha$  protein and mRNA in myocardial tissue were significantly increased ( $P < 0.05$ ); 3. compared with T group and X group, the concentration of serum cTnI, the expression of TNF- $\alpha$  protein and mRNA in myocardial tissue were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). **Conclusions:** Trimetazidine can reduce the expression of TNF- mRNA and protein in cardiac tissue, so as to effectively reduce the inflammatory response in heart tissue in rats after radiation, to reduce myocardial injury.

**Key words:** Radiogenic myocardial damage; Trimetazidine; TNF- $\alpha$ ; Rat

**Chinese Library Classification(CLC):** Q95-3, R541.9 **Document code:** A

**Article ID:** 1673-6273(2014)10-1821-04

### 前言

放射性心肌损伤(radiogenic myocardial damage)是纵膈及胸腔等部位恶性肿瘤放射治疗后发生的严重并发症,心脏常因过量的电离辐射发生放射性损伤,可表现为心律失常、冠心病、心包炎、心肌炎等,给患者带来了极大的痛苦<sup>[1-3]</sup>。近年来,随着心脏介入手术的广泛开展,患者单次或多次长时间接受大量 X

射线的次数增加,亦成为引起放射性心肌损伤的原因之一。虽然有报道称丹参、氟伐他汀、依那普利等能够减轻放射性心脏损伤,但除尽量做好患者的防护工作及糖皮质激素治疗外<sup>[4-6]</sup>,目前仍未找到更有效的防治放射性心肌损伤的方法。近年来,曲美他嗪 [Trimetazidine, TMZ, 商品名万爽力, 化学名为 1-(2,3,4-三甲氧苄基)哌嗪盐酸盐]引起了人们的重视,最初在临床上应用于改善冠心病患者的心肌供血,研究发现<sup>[7]</sup>其也具有

\* 基金项目:国家自然科学基金项目(81160046)

作者简介:周游(1988-),男,硕士研究生,主要研究方向:冠心病介入治疗,

电话:13517885176, E-mail:brucezhou@126.com

$\Delta$ 通讯作者:李浪, E-mail:drililang@163.com

(收稿日期:2013-11-15 接受日期:2013-12-10)

改善心肌代谢,增加心肌能量供应的功能,对心肌细胞具有保护作用。曲美他嗪对放射性心肌损伤的影响目前无相关研究报道,因此,本研究拟建立大鼠放射性心肌损伤模型,探索曲美他嗪对放射性损伤的心肌细胞的影响,旨在为放射性心肌损伤这一棘手临床问题的防治提供实验依据和新思路。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料及试剂

4MV-X 线直线加速器(英国),盐酸曲美他嗪(施维雅(天津)制药有限公司,国药准字 H20055465),cTnI ELISA 试剂盒(R&D,USA),ACS180 型全自动化学发光免疫分析仪(Bayer 公司,德国),TRNzol-A+ 总 RNA 提取试剂(天根,中国),Revert-Aid First Strand cDNA Synthesis kit(Fermentas,立陶宛),Fase Start Universal SYBR Green Master (Rox,USA),TNF- $\alpha$  mRNA、GAPDH mRNA 引物(生工,中国),兔抗鼠 TNF- $\alpha$  单抗(santa cruz,USA),羊抗兔荧光二抗(LI-COR,USA),GAPDH 单抗(碧云天,中国),荧光二抗(KPL,USA),蛋白 Marker(Fermentas,立陶宛),Step-one 荧光定量基因扩增仪(ABI,美国),Odyssey 双色红外激光成像系统扫描仪。

### 1.2 实验动物

1.2.1 动物分组 选择健康雄性 SD 大鼠 45 只,体重 200~250g(广西医科大学实验动物中心提供,合格证号:桂检证字(2000)第 001 号)。随机分为正常对照组(C 组)、单纯照射组(X 组)、曲美他嗪治疗组(T 组),每组 15 只。

1.2.2 照射方法 X 组、T 组腹腔内注射戊巴比妥钠 40 mg/kg,动物麻醉固定后直线加速器 10 Gy/d,分 3 天照射,总放射剂量为 30 Gy,面积 4 cm $\times$  4 cm(全胸),剂量率为 1.5Gy/min,距离 0.5 m。

1.2.3 给药方式 T 组大鼠于照射前予以曲美他嗪 10mg/kg/d 溶于生理盐水连续灌胃 3 天,照射期间以相同剂量曲美他嗪灌胃;X 组则以相同量的生理盐水灌胃处理。

1.2.4 标本取材 实验期间无大鼠死亡,所有大鼠均于照射 3 天后处死。腹腔内注射戊巴比妥钠 40 mg/kg 麻醉后开胸,下腔静脉取血 5mL 离心取上清以备 ELISA 检测 cTnI;取出心脏组织快速置入液氮冻存,用于检测 TNF- $\alpha$  mRNA 及蛋白。

### 1.3 实验方法

1.3.1 血清 cTnI 检测 采用 Bayer 公司 ACS180 型全自动化学发光免疫分析系统及双抗体夹心法 cTnI 测定试剂盒,以免疫发光法检测小鼠血清肌钙蛋白 I(cTnI)水平。具体步骤如下:取待测血浆标本 100 $\mu$ L 装入反应杯,加入 100  $\mu$ L 吡啶酯标记抗 cTnI 抗体于 37 $^{\circ}$ C 温育 2.5 min 加入 200 $\mu$ L 总 cTnI 固相试剂

(与磁性颗粒共价结合的单克隆抗 cTnI 抗体)并温育 5 min 用去离子水洗涤以分离反应相,最后加入 300 $\mu$ L 试剂 1 与试剂 2(化学发光氧化剂)启动光化学反应测定结果。血清 cTnI 水平以小于 1.5ng/mL 为正常值范围。

1.3.2 荧光定量 PCR 检测 TNF- $\alpha$  mRNA 表达量 按照 Trizol 操作说明提取细胞的总 RNA,并用 Nanodrop 测量其浓度,同时用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 有无降解,调整 RNA 的量为 1000ng/ $\mu$ L,逆转录合成 cDNA。采用 SYBR GreenI 荧光标记法检测 PCR 产物,总反应体系为 20  $\mu$ L,TNF- $\alpha$  引物(460bp):上游:5'-TGGCCCAGACCCTCACA-3',下游:5'-TGCCCCGACTCCGTGAT-3',退火温度 55 $^{\circ}$ C,延伸 30 循环;GAPDH 引物(223bp):上游:5'-GGCATTGCTCTCAATGAC-AA-3',下游:5'-TGTGAGGGAGATGCTCAGTG-3',退火温度 55 $^{\circ}$ C,延伸 30 循环。按试剂盒说明设置反应体系及参数,每个样本均做复孔检测,同时每次反应均设置阴性孔。PCR 产物经过测序检测。结果采用 2- $\Delta\Delta$ CT 法比较。

1.3.3 Western blot 检测 TNF- $\alpha$  蛋白的表达 取 500mg 心脏组织用液氮研磨法将组织研成粉末转移至 EP 管,加入蛋白裂解液及蛋白酶抑制剂,然后在 4 $^{\circ}$ C 下 12000r/min 离心 20min,提取上清转移至新离心管中,然后用 BCA 法检测蛋白浓度,内参为 GAPDH。配置 10%分离胶和 5%浓缩胶,进行 SDS-PAGE 聚丙烯酰胺凝胶电泳,半干法转膜 40min,用 TBST 配置的 5%脱脂奶粉封闭 1h,1:1000 一抗 4 $^{\circ}$ C 敷育过夜,脱色摇床上用 TBST 洗膜 5min $\times$ 3 次,1:5000 红外荧光二抗室温敷育 2h 后在 Odyssey 双色红外激光成像系统扫描成像。

### 1.4 统计学方法

采用 SPSS13.0 统计软件对实验数据进行分析,计量资料以均数 $\pm$ 标准差( $\bar{x}\pm s$ )表示,两组间比较采用配对 t 检验,多组间比较采用方差分析(ANOVA 分析)。P<0.05 表示差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 经处理后各组大鼠血清 cTnI 水平的比较

①与对照组(C 组)相比,X 线照射组(X 组)和曲美他嗪灌胃组(T 组)血清 cTnI 浓度均明显升高(P<0.05);②X 线照射组(X 组)与曲美他嗪灌胃组(T 组)相比,两者血清 cTnI 水平有统计学差异(P<0.05)。(见表 1)。

### 2.2 经处理后各组大鼠 TNF- $\alpha$ mRNA 相对表达量的比较

①与对照组(C 组)相比,X 线照射组(X 组)和曲美他嗪灌胃组(T 组)TNF- $\alpha$  mRNA 相对表达量均明显升高,且存在统计学差异(P<0.05);②X 线照射组(X 组)与曲美他嗪灌胃组(T

表 1 各组血清 cTnI 浓度(ng/mL $\pm$  s,n=15)

Table 1 SeruncTnI content in each group

| Group   | cTnI content(ng/mL) |
|---------|---------------------|
| C group | 0.67 $\pm$ 0.07     |
| X group | 2.56 $\pm$ 0.16*    |
| T group | 1.93 $\pm$ 0.12**   |

注:\*代表 X 组、T 组与 C 组相比,P<0.05;#代表 T 组与 X 组相比,P<0.05。

Note: \* P<0.05 X group and T group compared with C group; # P<0.05 Tgroup compared with X group.

组)相比,两者 TNF- $\alpha$ mRNA 相对表达量有统计学差异( $P < 0.05$ )。(见图 1)。

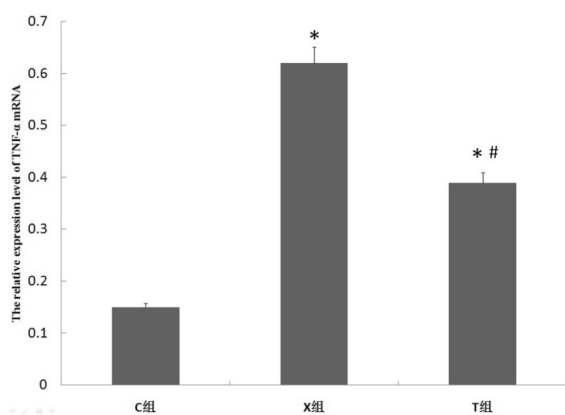


图 1 各组 TNF- $\alpha$ mRNA 相对表达量

Fig.1 The relative expression level of TNF- $\alpha$ mRNA in each group

注: \* 代表 X 组、T 组与 C 组相比,  $P < 0.05$ ; # 代表 T 组与 X 组相比,  $P < 0.05$ 。

Note: \*  $P < 0.05$  X group and T group compared with C group; #  $P < 0.05$  T group compared with X group.

### 2.3 经处理后各组大鼠 TNF- $\alpha$ 蛋白的表达结果

Western blot 定量分析显示(见图 2):①与对照组(C 组)相比,X 线照射组(X 组)和曲美他嗪灌胃组(T 组)TNF- $\alpha$  蛋白相对表达量均明显升高,且存在统计学差异( $P < 0.05$ );②X 线照射组(X 组)与曲美他嗪灌胃组(T 组)相比,两者 TNF- $\alpha$  蛋白相对表达量有统计学差异( $P < 0.05$ )。

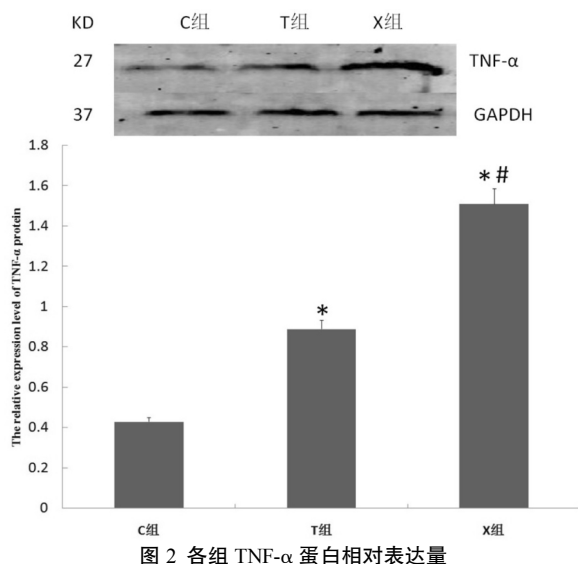


图 2 各组 TNF- $\alpha$  蛋白相对表达量

Fig.2 The relative expression level of TNF- $\alpha$ protein in each group

注: \* 代表 X 组、T 组与 C 组相比,  $P < 0.05$ ; # 代表 X 组与 T 组相比,  $P < 0.05$ 。

Note: \*  $P < 0.05$  X group and T group compared with C group; #  $P < 0.05$  X group compared with T group.

### 3 讨论

近年来,随着恶性肿瘤发病率的上升,接受肿瘤放疗的患者越来越多,随之发生的放射性治疗并发症也进入大众的视

野,放射性心肌损伤就是众多放射性损伤中的一种,尤其是纵膈及胸部恶性肿瘤放疗后引起的心肌放射性损伤较为常见。以往学者认为心脏对电离辐射具有较强的耐受及抵抗,但临床实践证明并非如此,临床上有约 20%-68% 的迟发性心脏损伤发生率<sup>[8]</sup>。大量研究表明<sup>[9-11]</sup>,放射性心肌损伤主要原因是射线的直接作用,与放射方法、放射剂量及心脏吸收剂量的大小相关,但产生损伤的具体机制研究尚不明确。根据目前的研究资料<sup>[12-14]</sup>,产生放射性心肌损伤的机制可能是:1.电离辐射后心肌细胞受损产生的破坏产物及早期炎症引起的免疫反应;2.电离辐射破坏淋巴管上皮引起淋巴回流障碍;3.放射线破坏微血管内皮细胞完整性,使肿胀,管腔变小,出现微循环障碍,进而导致心肌缺血,最终形成纤维化,影响心脏功能;4.放射线损伤冠状动脉内皮细胞,与高血压、高血糖、化疗药物等协同作用诱发或加重冠脉粥样硬化,引起心肌缺血性损伤。本研究中实验大鼠辐照 3 天后产生的放射性心肌损伤属于早期急性反应,发生机制可能与早期心肌细胞受损产生的炎症反应与免疫反应有关。

血清心肌肌钙蛋白(cTn)最早于 1987 年被英国 Cummins<sup>[15]</sup>等用于诊断急性心肌梗死(AMI),其中亚单位 cTnI 比 cTnT 更具敏感性,在血中出现时间较早,血清 CTnI 于 2~4 小时升高,其后肌原纤维不断崩解破坏,固定形式的不断释放,血清水平于 18~24 小时达高峰,10 天后降至正常水平<sup>[16]</sup>。故 CTnI 是近年来迅速发展起来的高度特异性,高度敏感地反映心肌细胞损伤坏死的标志物。且研究发现<sup>[6]</sup>,血清 cTnI 水平可反映心肌损伤程度。本研究发现,经过短期大量 X 线照射后,大鼠外周血 CTnI 浓度明显升高( $P < 0.05$ ),客观地说明了电离辐射对心肌组织的损伤作用,并且通过浓度对比可了解 X 线照射组(X 组)比曲美他嗪灌胃组(T 组)的心肌损伤更严重。

有研究表明<sup>[17]</sup>,炎症因子在放射线导致的心肌损伤中起到了重要作用。在应激状态下,心肌细胞可大量产生多种炎症细胞因子如 TNF- $\alpha$ 、IL-1 $\beta$ 、IL-10 等,这些炎症因子通过抑制心肌收缩功能、促进心肌细胞凋亡、促进黏附分子表达等多种途径,导致心肌损伤并影响心肌功能<sup>[18,19]</sup>,心脏组织 TNF- $\alpha$  表达的多少也反映了心肌细胞受损的严重程度。本实验中,X 射线照射后大鼠心肌组织中 TNF- $\alpha$ mRNA 及蛋白表达的明显升高也提示了心肌损伤的发生,并间接提示各组的损伤产生的炎症反应轻重程度。

曲美他嗪为哌嗪类衍生物,最初作为一种新型的抗心肌缺血药出现于临床,主要通过抑制 3- 酮酰辅酶 A 硫解酶而抑制心肌脂肪酸 B 氧化,增加葡萄糖氧化,改善糖酵解与糖氧化耦联,优化心肌细胞能量代谢<sup>[6]</sup>。近年来许多动物和临床实验研究证明<sup>[20]</sup>,曲美他嗪能防止细胞内酸中毒和 Na<sup>+</sup>、Ca<sup>2+</sup> 积聚,减少氧自由基生成,稳定线粒体膜的功能状态,具有抗氧化、抗炎、抗凋亡等多种细胞保护作用,且不影响血流动力学,无负性肌力作用。本实验结果提示,曲美他嗪灌胃组(T 组)与 X 线照射组(X 组)相比,外周血 CTnI 浓度、心肌组织中 TNF- $\alpha$ mRNA 及蛋白表达量均有明显下降,说明了曲美他嗪对放射性心肌损伤具有保护作用,可能与其抗炎、抗氧化、减少氧自由基形成、稳定胞膜等功能有密切关系。

综上所述,曲美他嗪能通过减少心肌组织 TNF- $\alpha$  mRNA 及蛋白的表达,从而有效减轻大鼠放射后心脏炎症反应,以减

轻心肌损伤。该机制可能是曲美他嗪预防放射性治疗后心肌损伤的重要机制之一,并为放射性心肌损伤的防治提供新颖的思路。但预防放射性心肌损伤是一个系统工程,后期仍需进行大量动物及临床实验提供理论支持。

#### 参考文献(References)

- [1] Borca V C, Franco P, Catuzzo P, et al. Does TomoDirect 3DCRT represent a suitable option for post-operative whole breast irradiation? A hypothesis-generating pilot study [J]. Radiation Oncology, 2012, 7(1): 211
- [2] Giraud P, Cosset J M. Radiation toxicity to the heart: physiopathology and clinical data[J]. Bulletin ducancer, 2004, 91: 147
- [3] Gustavsson A, Osterman B, Cavallin-ståhl E. A systematic overview of radiation therapy effects in Hodgkin's lymphoma [J]. Acta oncologica, 2003, 42(5-6): 589-604
- [4] Schultz-Hector S, Trott K R. Radiation-induced cardiovascular diseases: is the epidemiologic evidence compatible with the radiobiologic data?[J]. International Journal of Radiation Oncology Biology Physics, 2007, 67(1): 10-18
- [5] Liu H, Xiong M, Xia Y F, et al. Studies on pentoxifylline and tocopherol combination for radiation-induced heart disease in rats[J]. International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics, 2009, 73 (5): 1552-1559
- [6] 陈小平, 郑新萍, 薛伟珍, 等. 依那普利对放射性心肌损伤 cTnT 的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2005, 3(2): 104-106
- [7] Dedkova E N, Seidlmayer L K, Blatter L A. Mitochondria-mediated cardioprotection by trimetazidine in rabbit heart failure [J]. Journal of molecular and cellular cardiology, 2013
- [8] Soloviev A I, Tishkin S M, Parshikov A V, et al. Mechanisms of endothelial dysfunction after ionized radiation: selective impairment of the nitric oxide component of endothelium-dependent vasodilation[J]. British journal of pharmacology, 2003, 138(5): 837-844
- [9] Heidenreich P A, Kapoor J R. Radiation induced heart disease [J]. Heart, 2009, 95(3): 252-258
- [10] Adams M J, Lipshultz S E, Schwartz C, et al. Radiation-associated cardiovascular disease: manifestations and management[C]//Seminars in radiation oncology. WB Saunders, 2003, 13(3): 346-356
- [11] Gagliardi G, Constine L S, Moiseenko V, et al. Radiation dose-volume effects in the heart[J]. International Journal of Radiation Oncology\* Biology\* Physics, 2010, 76(3): S77-S85
- [12] Garot J. Radiation-Induced Heart Disease [J]. Circulation: Heart Failure, 2011, 4(1): e1-e2
- [13] Mousavi N, Nohria A. Radiation-Induced Cardiovascular Disease[J]. Current treatment options in cardiovascular medicine, 2013, 15(5): 507-517
- [14] Brosius F C, Waller B F, Roberts W C. Radiation heart disease: analysis of 16 young (aged 15 to 33 years) necropsy patients who received over 3,500 rads to the heart[J]. The American journal of medicine, 1981, 70(3): 519-530
- [15] Cummins B, Auckland M L, Cummins P. Cardiac-specific troponin-I radioimmunoassay in the diagnosis of acute myocardial infarction[J]. American heart journal, 1987, 113(6): 1333-1344
- [16] Ilva T, Lund J, Porela P, et al. Early markers of myocardial injury: cTnI is enough[J]. Clinica Chimica Acta, 2009, 400(1): 82-85
- [17] Xiaoping C, Xinping Z, Weizhen X. Effect of Enalapril on cTnT in Radiogenic Myocardial Damage[J]. 2005
- [17] Boerma M. Experimental Radiation-Induced Heart Disease: Past, Present, and Future[J]. Radiation research, 2012, 178(1): 1-6
- [18] Drabek T, Janata A, Wilson C D, et al. Minocycline attenuates brain tissue levels of TNF- $\alpha$  produced by neurons after prolonged hypothermic cardiac arrest in rats[J]. Resuscitation, 2013
- [19] Curato C, Slavic S, Dong J, et al. Identification of noncytotoxic and IL-10 – producing CD8<sup>+</sup> AT2R<sup>+</sup> T cell population in response to ischemic heart injury[J]. The Journal of Immunology, 2010, 185(10): 6286-6293
- [20] Cera M, Salerno A, Fragasso G, et al. Beneficial electrophysiological effects of trimetazidine in patients with postischemic chronic heart failure [J]. Journal of cardiovascular pharmacology and therapeutics, 2010, 15(1): 24-30
- (上接第 1817 页)
- [13] Erik procko, Megan L.O'Mara, W.F. Drew Bennett, et al. The mechanism of ABC transporters: general lessons from structural and functional studies of an antigenic peptide transporter [J]. FASEB, 2009, 23: 1287-1302
- [14] A Dreiseitel, B Oosterhuis, KV Vukman, et al. Berry anthocyanins and anthocyanidins exhibit distinct affinities for the efflux transporters BCRP and MDR1 [J]. British Journal of Pharmacology, 2009, 158: 1912-1950
- [15] Tip W.Loo, M, Claire Bartlett, David M. Clarke. Processing Mutation Disrupt Interactions between the Nucleotide Binding and Transmembrane Domains of P-glycoprotein and the Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator (CFTR) \* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2008, 283(42): 28190-28197
- [16] 兰珂. P-糖蛋白在醋柳黄酮组分口服吸收中的作用与调控研究[D]. 四川: 四川大学, 2007
- Lan Ke. The role and modulation of P-glycoprotein in the absorption of components in the Total Flavones of Hippophae Rhamnoides L [D]. Si Chuan: Si Chuan University, 2007
- [17] Enoche F, Oga, Shuichi Sekine, Yoshihisa Shitara, et al. P-glycoprotein mediated efflux in Caco-2 cell monolayers: The influence of herbals on digoxin transport[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2012, 144: 612-617