

蒺藜皂苷对阿霉素损伤心肌细胞的保护作用

张 爽, 李 红, 徐 惠, 杨世杰*

(吉林大学基础医学院药理学教研室, 吉林 长春 130021)

摘要: 观察蒺藜皂苷 (gross saponins of *Tribulus terrestris*, GSTT) 对阿霉素 (adriamycin, ADR) 诱导大鼠乳鼠心肌细胞损伤的保护作用, 并初步探讨其作用机制。分离出生 1~3 d 大鼠心肌细胞, 培养 72 h 后随机分为正常对照组、ADR (终浓度为 $2.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 模型组和 GSTT (100 、 30 及 $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组, 继续培养 24 h 后, 应用 MTT 比色法检测细胞存活率, 测定培养液中肌酸激酶 (CK)、乳酸脱氢酶 (LDH)、天门冬氨酸氨基转移酶 (AST) 释放量, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性, 丙二醛 (MDA)、一氧化氮 (NO) 含量, 并采用流式细胞仪检测细胞凋亡及应用 Western blotting 检测 GSTT 对凋亡相关蛋白 caspase-3 的作用。结果表明, 与正常对照组比较, ADR 模型组心肌细胞存活数明显减少, 心肌细胞培养液中 CK、LDH、AST 释放量增加 ($P < 0.01$, $P < 0.001$), 同时 SOD 活力下降 ($P < 0.01$) 而 MDA、NO 含量升高 ($P < 0.001$); 与 ADR 模型组比较, GSTT (100 和 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组存活心肌细胞数增多 ($P < 0.05$, $P < 0.001$), 心肌细胞培养液中 CK、LDH、AST 含量明显降低, SOD 活力增加、MDA 和 NO 含量降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。流式细胞仪检测 GSTT (100 和 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 组心肌细胞凋亡数明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), caspase-3 含量下降 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。GSTT 对 ADR 损伤的心肌细胞具有保护作用, 可减轻心肌细胞损伤, 抑制心肌细胞凋亡, 其机制与抗自由基作用有关。

关键词: 蒺藜皂苷; 心肌细胞; 阿霉素; 细胞凋亡; 氧自由基

中图分类号: R285

文献标识码: A

文章编号: 0513-4870 (2010) 01-0031-06

Effect of gross saponins of *Tribulus terrestris* on cardiocytes impaired by adriamycin

ZHANG Shuang, LI Hong, XU Hui, YANG Shi-jie*

(Department of Pharmacology, College of Basic Medical Science, Jilin University, Changchun 130021, China)

Abstract: This study is to observe the protection of gross saponins of *Tribulus terrestris* (GSTT) on cardiocytes impaired by adriamycin (ADR) and approach its mechanism of action. Cardiocytes of neonate rat were cultivated for 72 hours and divided into normal control group, model (ADR $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) group, and GSTT (100 , 30 , and $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) groups. MTT colorimetric method was deployed to detect cardiocyte survival rate, activities of CK, LDH, AST, SOD, MDA and NO were detected, and apoptosis was detected with flow cytometry. Effect of GSTT on caspase-3 was detected with Western blotting. Compared with control group, contents of CK, LDH, AST, MDA and NO were increased, and activity of SOD was reduced ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$) by ADR. Numbers of survival cells were increased ($P < 0.05$, $P < 0.001$), contents of CK, LDH, AST, MDA and NO were decreased, and activity of SOD was increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$) by GSTT (100 and $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Apoptosis of cardiocytes and concentration of caspase-3 can be reduced by GSTT (100 and $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). GSTT can protect cardiocytes impaired by ADR, which are possible involved with its effect of resisting oxygen free radical.

Key words: gross saponins of *Tribulus terrestris*; cardiocyte; adriamycin; apoptosis; oxygen free radical

收稿日期: 2009-07-06.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30472020); 高校博士点基金资助项目 (2005183129).

*通讯作者 Tel / Fax: 86-431-85619483, E-mail: jcyao@sina.com

蒺藜皂苷 (gross saponins of *Tribulus terrestris*, GSTT) 是从蒺藜科植物蒺藜地上全草中提取的有效组分之一, 是以甾体皂苷为主的总皂苷, 主要包括呋甾醇和螺甾醇两类皂苷。研究表明, GSTT 具有降低血压、舒张血管、降低胆固醇、抗动脉粥样硬化、抗氧化应激、保护大鼠心脏缺血再灌注损伤、保护大鼠脑缺血损伤、改善微循环、抗衰老、降血糖和明目等作用^[1-4], 其作用机制可能与抗自由基、降低细胞内钙超载等有关^[5, 6]。为进一步证实 GSTT 的心肌细胞保护作用, 本研究采用阿霉素 (adriamycin, ADR) 体外损伤心肌细胞的方法, 观察 GSTT 对心肌细胞的保护作用。

材料与方法

药物和试剂 GSTT 由洮南药业股份有限公司提供 (淡黄色粉末, 易溶于水, 纯度>90%, 用时以培养液稀释至所需浓度); ADR 购自汕头经济特区明治医药有限公司 (批号: 071002); CK、LDH、AST、SOD、MDA、NO 试剂盒 (南京建成生物科技有限公司); IMDM 培养基 (Gibco 公司生产); 胰蛋白酶 1:250 (宝泰克公司); 胎牛血清 (北京元亨金马生物技术开发有限公司, 批号: 090216); Annexin V-FITC 凋亡检测试剂盒 (批号: 6101337, biotechnology)。

实验动物 清洁级 Wistar 大鼠, 1~3 d 龄, 由吉林大学实验动物中心提供 (合格证号: SCXK(吉) 2007-0003)。

实验仪器 倒置显微镜 (日本 Olympus 公司); 超净工作台 (苏州净化设备厂); 恒温水浴箱 (北京医疗设备厂); 6010 紫外分光光度计 (安捷伦上海分析仪器厂); 酶标仪 TECAN A-5082 (奥地利); LDZ4-1.8 型低速自动平衡离心机 (北京雷勃尔离心机有限公司); BB5060UV 型 CO₂ 培养箱; 流式细胞仪 (美国 Coulter 公司, Elite)。

大鼠心肌细胞的培养 无菌取出大鼠心脏, 立即用 D-Hanks 液洗去残血, 剪成 1 mm³ 大小碎片, 加入 0.125% 胰酶, 于磁力搅拌器上 37 °C 水浴消化 8 min, 去上清液, 沉淀继续用 0.125% 胰酶分次消化 (37 °C, 6 min) 成单细胞悬液, 直至组织碎块消化完毕, 收集消化液至离心管中, 加入数滴血清终止消化, 1 000 r·min⁻¹ 离心 8 min, 弃上清液, 加入含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基, 轻轻吹打成单细胞悬液。利用非心肌细胞先贴壁的特点, 将心肌单细胞悬液差速贴壁 90 min, 弃去贴壁细胞, 未贴壁细胞计数后, 调

整细胞数为 5×10⁵/mL, 接种于培养瓶及 96 孔培养板上, 置于 37 °C、5% CO₂ 饱和湿度培养箱中继续培养, 培养前 48 h 加入 5-Brdu, 终浓度为 0.1 mmol·L⁻¹。于接种 48 h 后换液, 72 h 用于实验。

实验分组 实验共分为 5 组: ① 正常对照组 (control): 加入含 10% 胎牛血清的 IMDM 培养基; ② ADR 模型组 (model): 加入 ADR (以培养液配制, 终质量浓度为 2 mg·L⁻¹); ③ ADR+GSTT (终质量浓度 100 mg·L⁻¹); ④ ADR+GSTT (终质量浓度 30 mg·L⁻¹); ⑤ ADR+GSTT (终质量浓度 10 mg·L⁻¹), ADR 终质量浓度均为 2 mg·L⁻¹。继续于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h。

MTT 检测细胞存活率 ADR 损伤细胞 24 h, 弃上清液, 每孔加入 IMDM 培养基 180 μL, 0.5% MTT 20 μL, 共同培养 4 h, 去上清液, 加入 DMSO 150 μL 溶解细胞, 于 490 nm 酶标仪检测各孔的吸收度 (A) 值。

培养液中生化指标测定 采用试剂盒测定培养液 CK、LDH、AST、SOD、MDA 及 NO 水平。

流式细胞术检测细胞凋亡 0.25% 胰酶消化各组细胞, 用 4 °C 预冷的 PBS 洗涤 2 次, 2 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 用结合缓冲液重悬细胞, 调整细胞数为 1.0×10⁶/mL, 取细胞悬液 400 μL, 加入 Annexin V-FITC 5 μL 和碘化丙啶 (PI) 10 μL, 混匀后室温避光孵育 15 min, 上机检测。

Western blotting 检测心肌细胞内 caspase-3 表达 弃培养液, 用预冷 PBS 洗涤 2 次, 各样本加入细胞裂解液 100 μL, 4 °C 裂解 30 min, 同温度 14 000×g 离心 5 min, 收集上清液, 与等体积 2×SDS 加样缓冲液混匀, 煮沸 8 min, 考马斯亮蓝定量。每孔上样量 20 μL, 10% SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳进行分离。电转移 2 h 将蛋白转至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温封闭 2 h, 加入 caspase-3 (1:1 000 稀释) 一抗过夜, 再与辣根过氧化物酶标记的二抗 (1:1 000 稀释) 室温孵育 2 h, 加入 DAB 显色, 以 β-Tubulin 作为内参, 采用 GIS 天能紫外凝胶成像分析仪测定蛋白质印迹条带灰度。

统计学分析 实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 组间比较采用方差分析及 *q* 检验。

结果

1 GSTT 对阿霉素损伤心肌细胞形态学的影响

倒置显微镜观察表明, ADR 损伤后, 心肌细胞的

形态发生变化。正常对照组心肌细胞呈半融合状态生长, 折光性好, 伪足饱满并相互连接, 搏动节律一致。ADR 模型组心肌细胞折光性降低, 体积缩小, 形态不规则, 细胞间隙变大, 搏动节律减慢, 伪足萎缩, 且细胞间连接减少; GSTT 组的心肌细胞形态较模型组规则, 伪足较饱满, 折光性较好, 搏动节律介于上述两者之间 (图 1)。

2 GSTT 对阿霉素损伤心肌细胞存活率的作用

ADR 损伤后心肌细胞存活数明显下降, 与正常对照组比较, 具有明显差异 ($P < 0.001$)。GSTT (100 和 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 组的心肌细胞存活数明显增加 ($P < 0.05$, $P < 0.001$), 且量效关系显著 (图 2)。

3 GSTT 对阿霉素损伤心肌细胞培养液中心肌酶的作用

与正常对照组比较, 阿霉素损伤后心肌细胞培养液中 CK、LDH、AST 的含量明显增多 ($P < 0.01$, $P < 0.001$); 而与 ADR 模型组比较, GSTT (100 和 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 组的心肌细胞培养液中 CK、LDH、AST 含量明显减少 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 量效关系明显 (表 1)。

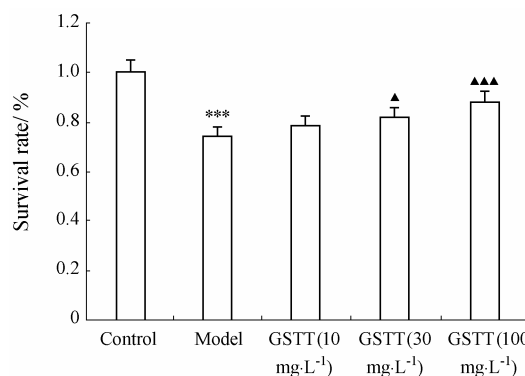


Figure 2 Effect of GSTT on survival ability of cardiocytes impaired by ADR ($2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group; ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.001$ vs model (ADR $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) group

4 GSTT 对阿霉素损伤心肌细胞培养液中 SOD、MDA 及 NO 的作用

与正常对照组比较, 阿霉素损伤后心肌细胞培养液中 SOD 活性明显下降 ($P < 0.01$), MDA 及 NO 含量明显增加 ($P < 0.001$); 而与 ADR 模型组比较, GSTT (100 和 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$) 组心肌细胞培养液中 SOD 活性明显增高, MDA 及 NO 水平明显减少 ($P < 0.001$,

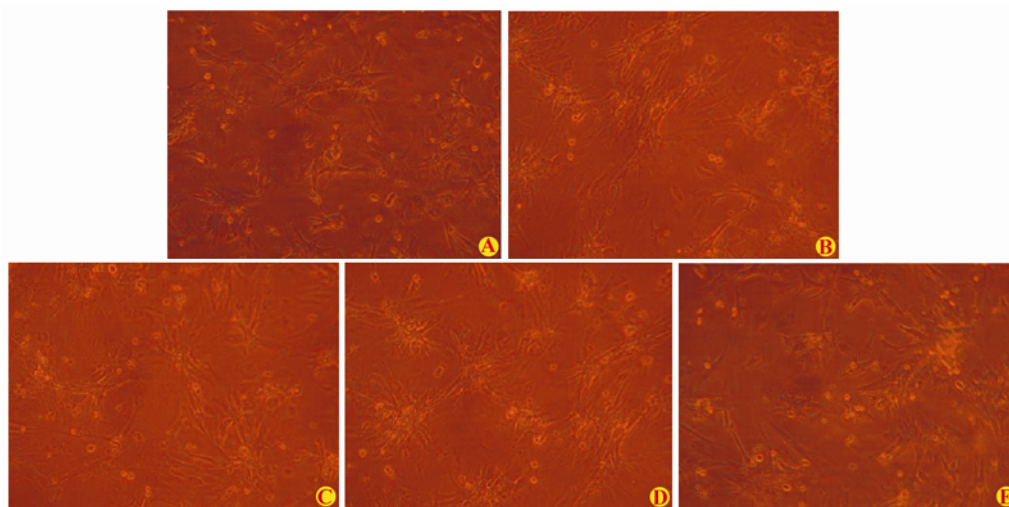


Figure 1 Effect of GSTT on morphology change of cardiocytes damaged by ADR ($2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) shown by the inverted microscope (200×). A: Control; B: Model (ADR $2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); C: GSTT ($10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); D: GSTT ($30 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$); E: GSTT ($100 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

Table 1 Effect of GSTT on activities of CK, LDH and AST of cardiocytes impaired by ADR ($2 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

Group	Dose / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	CK / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	LDH / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	AST / $\text{IU}\cdot\text{L}^{-1}$
Control		0.39 ± 0.20	1.05 ± 0.37	19.44 ± 2.33
Model (ADR)	2	$0.79 \pm 0.18^{**}$	$2.70 \pm 0.38^{***}$	$28.44 \pm 2.13^{***}$
GSTT	100	$0.42 \pm 0.18^{\Delta\Delta}$	$1.68 \pm 0.47^{\Delta\Delta}$	$22.57 \pm 2.29^{\Delta\Delta\Delta}$
	30	$0.43 \pm 0.29^{\Delta}$	$1.09 \pm 0.40^{\Delta\Delta}$	$25.14 \pm 1.54^{\Delta}$
	10	0.44 ± 0.37	$2.03 \pm 0.52^{\Delta}$	25.62 ± 3.36

$n=6$, $\bar{x} \pm s$. ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs control group; ▲ $P < 0.05$, ▲▲ $P < 0.01$, ▲▲▲ $P < 0.001$ vs model group

$P < 0.05$), 结果见表 2。

5 GSTT 对阿霉素损伤心肌细胞凋亡的作用

5.1 GSTT 对阿霉素损伤心肌细胞凋亡率的作用

流式细胞术检测结果 (图 3) 表明, 正常心肌细胞凋亡率小于 3%; ADR 损伤后, 心肌细胞模型组凋亡细胞百分率明显增高 ($P < 0.001$), 而 GSTT 可使心肌细胞凋亡率明显下降 ($P < 0.01$, $P < 0.05$)。

5.2 GSTT 对阿霉素损伤心肌细胞 caspase-3 的作用
与正常对照组比较, ADR 损伤 24 h 后, 心肌细胞 caspase-3 表达明显增加, 而 GSTT (100 和 30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

可明显降低心肌细胞内 caspase-3 的表达 (图 4)。

讨论

阿霉素属蒽醌类抗生素, 是一种周期非特异性抗癌药物, 可插入 DNA 的双螺旋链, 使后者裂解, 改变 DNA 的模板性质, 抑制 DNA 聚合酶, 从而抑制 DNA 及 RNA 合成。研究发现 ADR 对心肌组织具有较高的亲和力, 同时对心肌细胞具有损伤作用^[7]。ADR 可进入心肌细胞, 在肌浆网中的还原型辅酶 II (NADPH) 及细胞色素 P450 还原酶、线粒体中的还

Table 2 Effect of GSTT on activities of SOD, MDA and NO of cardiocytes impaired by ADR (2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$)

Group	Dose / $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$	SOD / $\text{U}\cdot\text{mL}^{-1}$	MDA / $\text{nmol}\cdot\text{mL}^{-1}$	NO / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$
Control		108.22 ± 8.33	1.00 ± 0.09	0.43 ± 0.27
Model (ADR)	2	$78.82 \pm 16.20^{**}$	$1.94 \pm 0.15^{***}$	$1.67 \pm 0.58^{***}$
GSTT	100	$101.15 \pm 9.58^{\Delta}$	$1.20 \pm 0.20^{\Delta\Delta\Delta}$	$0.43 \pm 0.30^{\Delta}$
	30	$99.16 \pm 14.49^{\Delta}$	$1.48 \pm 0.33^{\Delta}$	$0.88 \pm 0.45^{\Delta}$
	10	90.94 ± 11.86	1.83 ± 0.24	0.85 ± 0.52

$n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ vs control group; $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta\Delta}P < 0.001$ vs model group

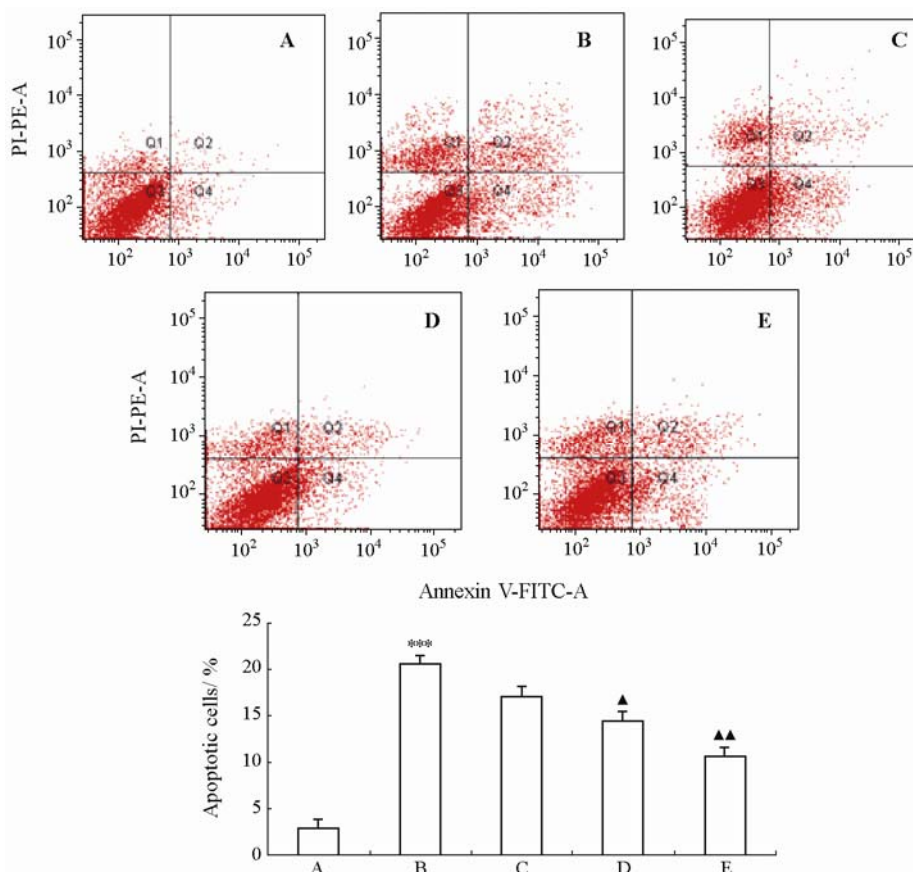


Figure 3 Effect of GSTT on apoptosis of cardiocytes impaired by ADR shown with flow cytometry following Annexin V and PI double-staining. Horizontal axis shows Annexin V intensity and vertical axis represents PI staining. The lines divide each plot in four quadrants; lower left quadrant: living cells, lower right quadrant: early apoptotic cells, upper left quadrant: necrotic cells, upper right quadrant: late apoptotic cells. Except for control group, ADR at 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ was added and the incubation continued for another 24 h. A: Control; B: Model (ADR 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); C: GSTT (10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); D: GSTT (30 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$); E: GSTT (100 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Graph demonstrates the mean ratio of cells in apoptosis. $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. $^{***}P < 0.001$ vs control group; $^{\Delta}P < 0.05$, $^{\Delta\Delta}P < 0.01$ vs model group

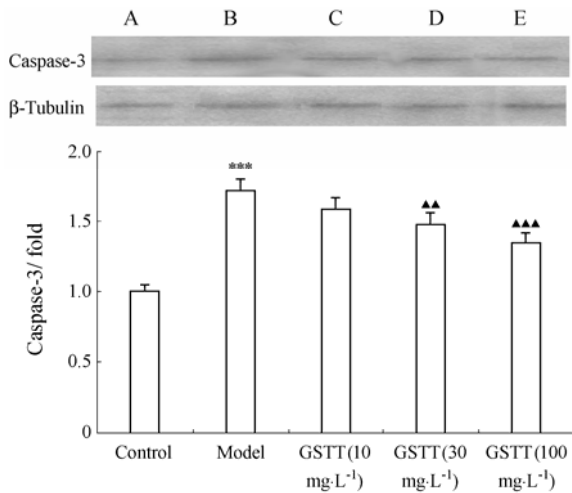


Figure 4 Effect of GSTT on caspase-3 of cardiocytes impaired by ADR ($2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). Cardiocytes were placed on 100 mL-culture flask and cultured for 72 h. Except for control group, ADR at $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ was added. Bands of caspase-3 were measured by Western blotting analysis. Equal loading was verified with an β -Tubulin antibody. A: Control; B: Model (ADR $2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); C: GSTT ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); D: GSTT ($30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$); E: GSTT ($10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$). $n = 6$, $\bar{x} \pm s$. *** $P < 0.001$ vs control group; ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs model group

原型辅酶 I (NADH) 及胞液中的黄嘌呤氧化酶等作用下可以形成自由基, 最终可使活性氧 (ROS) 产生增加。ROS 攻击富含多价不饱和脂肪酸的心肌细胞的生物膜系统而引发脂质过氧化反应, 导致细胞膜功能蛋白质的位置及构型改变, 膜完整性破坏, 引起心肌损伤^[8, 9]。另有研究认为, 在 ADR 所致心肌损伤发生发展过程中, 细胞凋亡可能是重要的环节^[10]。ADR 可通过多种途径诱导心肌细胞凋亡, 自由基、钙超载、铁代谢失衡、线粒体损伤等多因素共同作用^[11, 12], 且互为因果。

本实验中采用 ADR 损伤心肌细胞, 细胞形态发生改变, 细胞活力显著降低, 大量存在于心肌细胞中的 LDH、CK、AST 漏出增多, 并伴有 MDA 生成增多, SOD 活性下降, 表明 ADR 引起明显心肌细胞脂质过氧化反应, 导致心肌细胞损伤, 与文献报道一致。GSTT (100 和 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 细胞培养液中心肌酶明显减少, SOD 活性增高, MDA 生成下降, 表明 GSTT 可减轻 ADR 所致的心肌细胞生物膜系统的脂质过氧化反应, 减轻细胞损伤, 减少心肌酶的漏出。

NO 由一氧化氮合成酶 (NOS) 催化, 该酶在体内有两种类型, 即结构型一氧化氮合成酶 (cNOS) 和诱导型一氧化氮合成酶 (iNOS)。在生理状态下, 心肌细胞内只表达 cNOS, 不表达 iNOS。当机体内过量产生 NO 时, NO 与 O_2 反应形成的过氧化超氧阴离子

(peroxynitrite, ONOO^-) 具有强效细胞毒性, 且性质极不稳定, 可迅速分解为高活性的 $\text{OH} \cdot$ 和 NO_2^- 等自由基, 参与脂质过氧化作用, 损伤心肌细胞^[13, 14]。Weinstein 等^[15]和刘宝刚等^[16]的研究证实, ADR 可诱导心肌细胞生成诱导型一氧化氮合酶 (iNOS), 使心肌细胞产生 NO 增加而致心肌损伤。本实验中, ADR 损伤后使 NO 生成增多, 与文献报道一致; 应用 GSTT 后, NO 含量也明显下降, 表明 GSTT 可以抑制病理性的 NO 升高, 从而抑制 NO 引起的过氧化反应。

细胞凋亡是由基因控制的细胞程序性死亡, 是细胞生命活动过程中不可缺少的组成部分。Caspase-3 是参与调节和执行凋亡最重要的蛋白酶之一。本实验中流式细胞仪检测结果显示, ADR 模型组心肌细胞凋亡率明显增加, Western blotting 结果显示 caspase-3 表达亦明显增多, 表明 ADR 可通过激活 caspase-3 从而诱导心肌细胞凋亡; 而应用 GSTT 后, 心肌细胞凋亡率明显降低, 同时 caspase-3 的表达亦减少, 表明 GSTT 可以抑制 caspase-3 的激活, 从而抑制心肌细胞凋亡。

由实验中可见, GSTT 可减轻阿霉素所致的心肌细胞损伤, 其保护作用与其抗自由基、减轻脂质过氧化反应有关。

References

- [1] Li H, Wang XH, Cui JL, et al. Antithrombosis of gross saponin of *Tribulus terrestris* injection [J]. J Jilin Univ (Med Ed) (吉林大学学报 医学版), 2005, 31: 14-16.
- [2] Jiang EP, Su XJ, Li H, et al. Protective effect and its molecular mechanism of gross saponin *Tribulus terrestris* on PC12 cells apoptosis induced by H_2O_2 [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2009, 39: 1368-1371.
- [3] Huang LN, Wang LC, Ying FW, et al. The protective effect of gross saponin of *Tribulus terrestris* on rat retinal ganglion cells *in vitro* [J]. China J Chin Ophthalmol (中国中医眼科杂志), 2008, 18: 89-91.
- [4] Liu XM, Huang QF, Zhang YL, et al. Effects of *Tribulus terrestris* L. saponin on apoptosis of cortical neurons induced by hypoxia-reoxygenation in rats [J]. J Chin Integr Med (中西医结合学报), 2008, 6: 45-50.
- [5] Hou JY, Wang XH, Li H, et al. Protective effect of GSTT on myocardium injured by ischemia reperfusion [J]. Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报), 2004, 20: 418-420.
- [6] Wang SS, Ji YS, Li H, et al. Mechanisms of gross saponins of *Tribulus terrestris* via activating PKC ϵ against myocardial apoptosis induced by oxidative stress [J]. Acta Pharm Sin (药学报), 2009, 44: 134-139.

- [7] Muraoka S, Miura T. Free radicals mediate cardiac toxicity induced by adriamycin [J]. *Yakugaku Zasshi*, 2003, 123: 855–866.
- [8] Brookins Danz ED, Skramsted J, Henry N, et al. Resveratrol prevents oxorubicin cardiotoxicity through mitochondrial stabilization and the Sirt1 pathway [J]. *Free Radic Biol Med*, 2009, 46: 1589–1597.
- [9] Wallace KB. Doxorubicin induced cardiac mitochondriopathy [J]. *Pharmacol Toxicol*, 2003, 93: 105–115.
- [10] Kalyanaraman B, Joseph J, Kalivendi S, et al. Doxorubicin-induced apoptosis: implications in cardiotoxicity [J]. *Mol Cell Biochem*, 2002, 234–235: 119–124.
- [11] Wu S, Ko YS, Teng MS, et al. Adriamycin induced cardiomyocyte and endothelial cell apoptosis: *in vitro* and *in vivo* studies [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2002, 34: 1595–1607.
- [12] Yang GM, Sun ST, Li SQ, et al. Effect of beta-carotene on adriamycin induced changes of expression of mRNA of superoxide dismutase and glutathione peroxidase in myocardial tissue of rats [J]. *Chin Pharmacol Bull (中国药理学通报)*, 2006, 22: 465–470.
- [13] Xin YF, Zhang LL, Xuan YX. Diphasic action of nitric oxide in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther (中国临床药理学与治疗学)*, 2009, 14: 117–120.
- [14] Yang GM, Li SQ, Ye SY, et al. Inhibitory effect of fructose-1, 6-diphosphate on adriamycin-induced cardiomyocyte apoptosis in rats [J]. *Chin J Pathophysiol (中国病理生理杂志)*, 2003, 19: 386–390.
- [15] Weinstein DM, Mihm MJ, Bauer JA. Cardiac peroxynitrite formation and left ventricular dysfunction following doxorubicin treatment in mice [J]. *J Pharmacol Exp Ther*, 2000, 294: 396–401.
- [16] Liu BG, Liu HL, Qu HY, et al. Nitric oxide synthase expressions in ADR-induced cardiomyopathy in rats [J]. *J Biochem Mol Biol*, 2006, 39: 759–765.