

木犀草素通过 MIEF1 抗 H9c2 心肌细胞损伤的机制研究

史有阳,杨 瑞,张 洋,孙霏平*,刘 胜

上海中医药大学附属龙华医院中西医结合乳腺科,上海 200032

摘要:研究木犀草素(luteolin,Lut)抗 H9c2 心肌细胞损伤的作用及其机制。采用大鼠 H9c2 心肌细胞株,以 1 μM 阿霉素(doxorubicin,Dox)建立心肌细胞损伤模型,不同浓度 Lut(5、10、20 μM)进行干预。细胞增殖法(MTT)检测细胞活力。通过高通量转录组测序筛选 Lut(20 μM)改善 H9c2 心肌细胞损伤的靶点基因。利用分子克隆技术,将心肌细胞中线粒体延长因子 1(mitochondrial elongation factor 1,MIEF1)表达抑制,蛋白免疫印迹法(Western blot)检测 Lut 对低表达 MIEF1 心肌细胞中 MIEF1,Ser637 位点磷酸化-Drp1(p-Drp1,Ser637),Caspase-3 蛋白表达水平。与模型 Dox 组比较,Lut 显著改善 H9c2 细胞活力($P < 0.05$)。Dox 组与正常组进行比较得到 3 582 个差异基因;Lut 加 Dox 组与 Dox 组进行比较得到 1 981 个差异基因。利用小干扰 RNA(siRNA)技术成功构建低表达 MIEF1 心肌细胞,Western blot 结果显示,Lut 能够增加低表达 MIEF1 心肌细胞中 MIEF1、p-Drp1(Ser637)蛋白表达水平($P < 0.05$),降低 Caspase-3 蛋白表达水平($P < 0.05$)。总之,Lut 对 H9c2 心肌细胞的保护作用可能与促进 MIEF1 表达有关,本实验结果为 Lut 治疗阿霉素导致的心肌细胞损伤提供理论依据。

关键词:木犀草素;转录组学;心肌细胞;线粒体延长因子 1

中图分类号:R966

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2020)5-0820-06

DOI:10.16333/j.1001-6880.2020.5.014

Research on the mechanism of luteolin against H9c2 cardiomyocyte injury through MIEF1

SHI You-yang, YANG Rui, ZHANG Yang, SUN Chen-ping*, LIU Sheng

Department of Breast Surgery (Integrated Traditional and Western Medicine), Longhua hospital affiliated to Shanghai university of traditional Chinese medicine, Shanghai 200032, China

Abstract: To study the effect and mechanism of luteolin (Lut) on H9c2 myocardial cell injury. The rat H9c2 myocardial cell line was used to establish a myocardial cell injury model with 1 μM doxorubicin (Dox). Different concentrations of Lut (5, 10, 20 μM) were used for intervention. Cell viability was measured by MTT assay. High-throughput transcriptome sequencing was used to screen the target genes of Lut (20 μM) for improving H9c2 myocardial cell injury. The extend myocardial cell mitochondria Factor 1 (mitochondrial elongation factor 1, MIEF1) expression was suppressed by use molecular cloning technology. Western blot was performed to detect the expression levels of MIEF1, phosphorylated-Drp1 (p-Drp1, Ser637), and Caspase-3 in myocytes with low MIEF1 expression by Lut. Compared with Dox group, Lut significantly improved the cell viability of H9c2 ($P < 0.05$). 3 582 differentially expressed genes were found in Dox group compared with the normal group. 1 981 differentially expressed genes were obtained in Lut plus Dox group compared with Dox group. Small interfering RNA (siRNA) was used to interfere with the construction of MIEF1 low expression cardiomyocytes. Western blot results showed that, Lut increased the expression level of MIEF1 and p-Drp1 (Ser637) protein in myocytes with low expression of MIEF1 ($P < 0.05$) and decreased the expression level of Caspase-3 ($P < 0.05$). In conclusion, the protective effect of Lut on H9c2 cardiomyocytes may be related to the promotion of MIEF1 expression, the results of this experiment provide a theoretical basis for the treatment of doxorubicin induced cardiomyocyte injury.

Key words: luteolin; transcriptome; cardiomyocytes; mitochondrial elongation factor 1

收稿日期:2019-11-13 接受日期:2020-04-24

基金项目:国家自然科学基金(81603629);上海中医药大学研究生创新能力培养专项(201812017053)

*通信作者 Tel:86-21-64385700; E-mail:scptem@126.com

阿霉素(doxorubicin,Dox)为乳腺癌常用的化疗药物,是目前治疗乳腺癌的一线药物,也是术后辅助

治疗和姑息治疗中重要的组成部分^[1]。心脏毒性是阿霉素临床应用主要不良反应之一,随着剂量的增加,心脏毒性的发生率升高^[2],因此寻找减轻阿霉素心脏毒性的有效药物具有重要意义。

中药桔梗辛、苦、平,具有宣肺祛痰、利咽排脓的功效。神农本草经有云:“主胸胁痛如刀刺,腹满肠鸣幽幽,惊恐悸气”^[3]。课题组前期研究发现,桔梗能够提高阿霉素化疗后乳腺癌病人的左心室射血分数,减轻阿霉素带来的心脏毒副作用^[4]。桔梗与阿霉素联合应用可提升乳腺癌肺转移小鼠左心室射血分数水平,增强心脏泵血功能,促进阿霉素在肺部的聚集,降低其在心脏的分布^[5]。但具体药物活性成分及作用机制并不明确。木犀草素(luteolin, Lut)是一种分布广泛的类黄酮,常以糖苷类形式大量存在于包括桔梗在内的多种中药中^[6]。现代药理学研究表明, Lut 具有抗肿瘤^[7]、抗氧化^[8]、心血管保护的功能^[9],但对心肌细胞保护的具体机制并不明确。本研究拟用阿霉素建立心肌细胞损伤模型,通过转录组学测序筛选出 Lut 作用靶点,并运用分子生物学技术,对潜在靶点线粒体延长因子 1 (mitochondrial elongation factor 1, MIEF1) 进行抑制,探究 Lut 对人心肌细胞损伤的保护作用及机制,为进一步治疗阿霉素化疗后心脏毒性提供依据。

1 材料

1.1 细胞

野生型大鼠 H9c2 心肌细胞购自中国科学院上海细胞库。低表达 MIEF1 大鼠 H9c2 心肌细胞由本实验室构建。

1.2 药物及试剂

木犀草素(成都曼思特生物科技有限公司,批号: MUST-17102605,纯度 $\geq 98\%$); MTT 粉剂(美国 Sigma 公司);阿霉素(碧云天生物技术有限公司,批号: SC0159); RPMI-1640 培养基(美国 Hyclone 公司);磷酸盐缓冲液(PBS)、胎牛血清(FBS)、青链霉素双抗、胰蛋白酶(美国 Gibico 公司); Qubit2.0 DNA 检测试剂盒(Life Q10212); MIEF1 抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号: bs-12634R); p-Drp1 (Ser637), Caspase-3 抗体(美国 Cell Signaling 公司,批号分别为 4867, 9662); Trizol, GAPDH, HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗(上海生工生物有限公司,批号 B511311、D110016、D110058); siRNA 转染试剂盒(苏州吉玛生物有限公司,批号 G04003)。

1.3 仪器

细胞培养箱(美国 Thermo 公司); Qubit2.0 荧光计 Q32866 Invitrogen; RT-PCR 仪(美国 Thermo 公司);电泳仪及酶标仪(美国 BIO-RAD 公司);倒置显微镜(日本 Olympus 公司); HiSeqTM 测序仪(美国 Illumina 公司)。

2 方法

2.1 细胞培养

大鼠 H9c2 心肌细胞接种于含 10% 胎牛血清, 1% 青链霉素混合液的 1640 完全培养基, 于 37 °C, 5% CO₂ 培养箱中培养, 每 3 天以 0.25% 胰酶消化传代。

2.2 增殖抑制率测定

取 5×10^3 对数生长期 H9c2 细胞接种于 96 孔板中, 置于培养箱中继续培养。24 h 后, 弃去培养基, 每孔加入 Dox (1 μ M) 及不同浓度的 Lut (5、10、20 μ M) 作用 24 h。每孔加入 15 μ L MTT 反应 4 h, 加入 DMSO 150 μ L, 振荡 5 min, 用酶标仪测定波长为 490 nm 处的光密度值(OD 值), 按下式计算:

$$\text{细胞增殖抑制率} = (\text{对照组 OD 值} - \text{实验组 OD 值}) / \text{对照组 OD 值} \times 100\%$$

2.3 总 RNA 提取与测序

取对数生长期 5×10^4 个 H9c2 心肌细胞, 种入 6 孔板。设置为正常组、Dox (1 μ M) 组、Dox (1 μ M) 加 Lut (20 μ M) 组, 每组 3 个样本重复, 药物处理 24 h 后, 加入氯仿, 离心, 异丙醇萃取后乙醇洗涤沉淀。干燥后, 加入 ddH₂O 溶解 RNA, 琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 完整性。以短片段 RNA 为模板, 合成一链 cDNA, 加入缓冲液、dNTP、RNase 和 DNA polymerase I 合成二链 cDNA; 将双链 cDNA 修复、加 A 尾并连接测序接头, PCR 扩增, 按照 1:1 的比例等量混合后, 采用 HiSeqTM 测序仪进行测序, Trimmomatic, HISAT2 及 StringTie 软件分析测序数据^[10]。

2.4 差异表达基因靶点筛选

采用 DESeq 进行显著差异的基因分析, 用 Fold Change 值表示基因表达的差异倍数, 按 $|\log_2(\text{Fold Change})| > 1$ 且 $P < 0.05$, $q < 0.05$ 的原则筛选差异表达靶点基因(differentially expressed gene, DEG)。

2.5 低表达 MIEF1 基因 H9c2 细胞的构建及验证

为了进一步明确 MIEF1 与 Lut 改善心肌细胞损伤的关系, 利用分子生物学技术构建 siRNA-MIEF1 抑制 H9c2 细胞中 MIEF1 的表达。取对数生长期野生型大鼠 H9c2 心肌细胞, 以 5×10^4 每孔种于 6 孔板内, 待细胞贴壁后分为 5 组, 正常组加入常规培养

基,其余4组分别加入空载体 siRNA、siRNA-MIEF1 1号、2号、3号 Mate 转染试剂复合物,轻轻摇晃培养基均匀后放置 37℃,CO₂ 培养箱内转染 24 h, Western blot 验证 MIEF1 蛋白的抑制效果。

2.6 RT-PCR 法验证细胞 MIEF1 mRNA 表达情况

取对数生长期野生型大鼠 H9c2 心肌细胞,以 5 × 10⁴ 每孔种于 6 孔板内,分组及处理同“2.5”项,提取总 RNA。MIEF1 及 GAPDH 基因引物由苏州吉玛生物有限公司设计。MIEF1 基因上游引物 F5'-GGGAGGAACCAACUGGAUTT-3',下游引物 R5'-AUCCAGUUUGGUCCUCCCTT-3',GAPDH 基因上游引物 F5'-GGTGCTGAGTATGTCGTGGAG-3',下游引物 R5'-TTGCTGACAATCTTGAGGGAG-3'。两步法进行扩增,45 个循环。

2.7 蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测蛋白表达水平

取对数生长期 H9c2 心肌细胞,以每孔 5 × 10⁴ 个接种于 6 孔板,每孔 2 mL,设置为正常组,低表达 MIEF1 加 Dox (1 μM) 组,Dox (1 μM) 组,低表达 MIEF1 加 Dox (1 μM) 加 Lut (20 μM) 组。收集细胞,冰上裂解细胞 30 min 后,15 000 转离心 15 min,取上清,BCA 法测定蛋白浓度,电泳、转膜后,5% BSA 封闭 2 h。一抗根据说明书按 1:1 000 稀释,抗体加入封闭液中稀释到所需浓度,4℃ 孵育过夜。二抗根据说明书 1:2 000 稀释,加入二抗室温孵育 2 h 后 ECL 化学发光显色剂显色,用凝胶分析系统扫描出图像。

2.8 统计方法

运用 SPSS 21.0 进行统计学分析,实验数据以

均数 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较用 *t* 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 Lut 对 Dox 诱导后 H9c2 细胞活力的影响

与正常组比较,Dox 组 H9c2 细胞活力显著降低 ($P < 0.05$);与 Dox 组比较,不用浓度 Lut 处理后,H9c2 细胞活力明显提升,细胞的存活率较 Dox 组有显著差异 ($P < 0.05$)。20 μM Lut 效果最好,因此后续选择 20 μM 进行转录组测序(见表 1)。

表 1 Lut 对 Dox 诱导后 H9c2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 1 Effect of Lut on H9c2 cells activity treated with Dox ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别 Group	浓度 Concentration (μM)	存活率 Survival rate (%)
正常 Normal	-	100.00
Dox	1	60.00 ± 3.69*
Dox + Lut	1 + 5	64.46 ± 6.16 [#]
	1 + 10	83.60 ± 2.90 [#]
	1 + 20	87.77 ± 6.09 [#]

注:与正常组比较,* $P < 0.05$;与阿霉素组比,[#] $P < 0.05$ 。
Note:Compared with normal,* $P < 0.05$;Compared with Dox,[#] $P < 0.05$ 。

3.2 细胞差异基因表达情况

将 H9c2 细胞转录组测序获得的基因表达量进行标准化处理,两组分别进行比较,筛选出 $P < 0.05$ 且 $q < 0.05$,和 Fold Change 大于 2 倍及小于 0.5 倍的差异基因。如图 1 和表 2 所示,Dox 组与正常组进行比较得到 3 582 个差异基因,其中上调基因 647

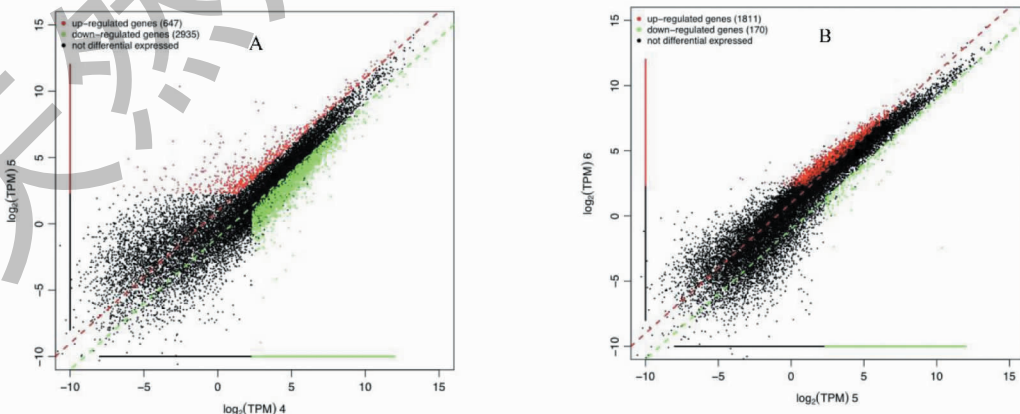


图 1 细胞差异基因散点图

Fig. 1 Scatter plot of differentially expressed genes in cells

注:A:Dox 组 vs 正常组;B:Dox + Lut 组 vs Dox 组。Note:A:Dox group vs normal group;B:Dox + Lut group vs Dox group。

表 2 细胞差异表达基因

Table 2 Differentially expressed genes in cells

样品对比方式 Sample comparison mode	差异表达基因总数 Total number of differentially expressed genes	上调基因总数 Total number of up-regulated genes	下调基因总数 Total number of down-regulated genes
Dox vs Control	3 582	647	2 935
Dox + Lut vs Dox	1 981	1 811	170

个,下调基因 2 935 个;Lut 加 Dox 组与 Dox 组进行比较得到 1 981 个差异基因,其中上调基因 1 811 个,下调基因 170 个。为了找到与用药相关的差异基因,选取 Dox 组对比正常组中上调且 Dox 加 Lut 组对比 Dox 组下调的 123 个基因;选取 Dox 组对比正常组中下调且 Dox 加 Lut 组对比 Dox 组上调的

814 个基因(图 2)对以上的交集基因进行分析。分析后发现,与正常组相比,Dox 组 MIEF1 基因被显著下调;而经过 Lut 治疗后,与 Dox 组相比,MIEF1 基因表达水平得到恢复。因此,后期实验选择 MIEF1 作为 Lut 改善 H9c2 心肌细胞损伤的靶点基因。

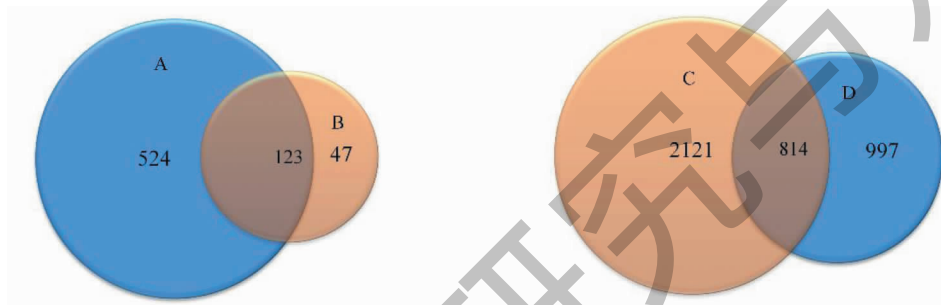


图 2 细胞交集基因韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of intersection gene

3.3 低表达 MIEF1 的 H9c2 细胞的验证

MIEF1-siRNA 转染 H9c2 细胞 24 h 后,Western blot 检测细胞 MIEF1 蛋白表达水平。MIEF1 siRNA 转染后,与野生型及空载体 siRNA 细胞相比,siRNA-MIEF1 1 号细胞 MIEF1 蛋白的表达水平降低最为明显,转染效率最高($P < 0.05$)。RT-PCR 实验证明,与正常组细胞相比,siRNA-MIEF1 1 号转染后的细胞 MIEF1 mRNA 水平明显降低($P < 0.05$)。说明低表达 MIEF1 的 H9c2 细胞构建成功(见表 3、表 4、图 3)。

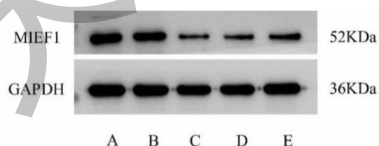


图 3 转染后细胞中 MIEF1 蛋白表达电泳

Fig. 3 Electrophoresis of MIEF1

protein expression after transfection

注:A:正常组;B:siRNA-空白;C:siRNA-MIEF1 #1;D:siRNA-MIEF1 #2;E:siRNA-MIEF1 #3。Note:A:Normal group;B:siRNA-control;C:siRNA-MIEF1 #1;D:siRNA-MIEF1 #2;E:siRNA-MIEF1 #3.

表 3 转染后细胞中 MIEF1 蛋白表达($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 3 Expression of MIEF1 protein after transfection ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	蛋白表达量 Protein expression
正常 Normal	1.33 ± 0.01
siRNA- control	1.29 ± 0.04
siRNA-MIEF1#1	0.69 ± 0.03 *
siRNA-MIEF1#2	0.93 ± 0.05 *
siRNA-MIEF1#3	0.98 ± 0.05 *

注:与正常组比较, * $P < 0.05$ 。

Note:Compared with the normal group, * $P < 0.05$.

表 4 转染后细胞中 MIEF1 mRNA 表达($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 4 Expression of MIEF1 mRNA in cells after transfection ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	mRNA 表达量 mRNA expression
正常 Normal	1.08 ± 0.08
siRNA- MIEF1#1	0.51 ± 0.02 *

注:与正常组比较, * $P < 0.05$ 。

Note:Compared with the normal group, * $P < 0.05$.

3.4 Lut 对 H9c2 细胞 MIEF1、p-Drp1 (Ser637)、Caspase-3 蛋白影响

与 Dox 组相比, siRNA + Dox 组 MIEF1、p-Drp1 (Ser637) 蛋白水平降低 ($P < 0.05$), Caspase-3 蛋白的表达水平增加 ($P < 0.05$)。Lut + siRNA + Dox 组与 siRNA + Dox 组相比, MIEF1、p-Drp1 (Ser637) 蛋白水平上升 ($P < 0.05$), Caspase-3 蛋白的表达水平降低 ($P < 0.05$) (见表 5 和图 4)。

4 讨论

阿霉素 (doxorubicin, Dox) 又称多柔比星, 属蒽环类抗生素, 被应用于多种恶性肿瘤的治疗, 但因其出现剂量依赖性心脏毒性, 限制了其临床应用。蒽

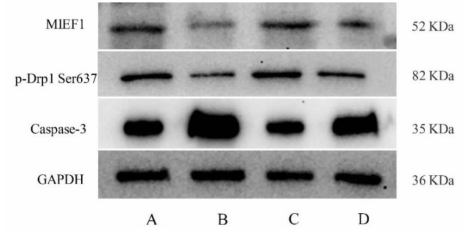


图 4 细胞中 MIEF1、p-Drp1 (Ser637)、Caspase-3 蛋白表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of MIEF1, p-Drp1 (Ser637), Caspase-3 protein expression in cells

注: A: 正常组; B: siRNA + Dox 组; C: Dox 组; D: Lut + siRNA + Dox 组。Note: A: Normal group; B: siRNA + Dox group; C: Dox group; D: Lut + siRNA + Dox group.

表 5 Lut 对 H9c2 细胞 MIEF1、p-Drp1 (Ser637)、Caspase-3 蛋白影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Table 5 Effect of Luteolin on MIEF1, p-Drp1 (Ser637), Caspase-3 protein expression in H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

组别 Group	浓度 Concentration (μM)	MIEF1 表达量 MIEF1 expression	p-Drp1 (Ser637) 表达量 p-Drp1 (Ser637) expression	Caspase-3 表达量 Caspase-3 expression
正常 Normal	-	0.89 \pm 0.07	1.02 \pm 0.01	0.85 \pm 0.08
siRNA + Dox	1	0.44 \pm 0.00*	0.59 \pm 0.03*	1.36 \pm 0.10*
Dox	1	0.81 \pm 0.08	0.93 \pm 0.01	0.71 \pm 0.08
Lut + siRNA + Dox	20 + 1	0.56 \pm 0.01#	0.75 \pm 0.03#	1.05 \pm 0.03#

注: 与 Dox 组比较, * $P < 0.05$; 与 siRNA + Dox 组比, # $P < 0.05$ 。

Note: Compared with the Dox group, * $P < 0.05$; Compared with the siRNA + Dox group, # $P < 0.05$.

环类药物致心脏损伤的确切机制目前尚不清楚^[11,12], 因此寻找阿霉素心脏毒性的分子靶标, 研发有效的抗阿霉素心脏毒性的药物尤为重要。

目前, 越来越多的学者发现, 中药复方及所含活性成分能有效保护蒽环类药物对心脏的损伤^[13,14]。线粒体是细胞的“能量工厂”, 在所有细胞中心肌细胞是含线粒体最多的细胞。线粒体形态和功能对于维持正常的心脏生理功能至关重要^[15]。研究表明, 线粒体是一个动态变化的细胞器, 其通过不断地融合与分裂以维持自身稳态。当心肌细胞线粒体融合或分裂过程失衡时, 则会引起自身形态及功能紊乱, 进而导致心脏功能损害^[16]。研究报道, 在细胞凋亡早期, 线粒体出现了断裂以及嵴重构, 线粒体融合、分裂调控蛋白也积极参与了细胞凋亡过程。同时, Tang 等^[17]研究发现, 阿霉素可导致心肌细胞线粒体过度分裂从而导致细胞发生凋亡。MIEF1, 又称 MiD51, 是一种参与调控线粒体融合分裂的重要分子, 位于线粒体外膜上^[18], 其作用是通过招募下游动力相关蛋白 1 (Drp1) 到线粒体上, 使得 Drp1 在 Ser637 位点发生磷酸化^[19], 从而抑制细胞线粒体过

度分裂, 减少细胞凋亡^[20]。研究报道, 在利用 CRISPR/cas9 技术敲除 MIEF1 的 293T 细胞中, 线粒体过度分裂, 细胞线粒体功能遭到破坏^[21]。由此可见, MIEF1 在调控线粒体融合分裂方面发挥了举足轻重的作用。

本研究发现, Lut 作用阿霉素诱导的心肌细胞后, 细胞活力得到明显提升。转录组学结果提示, 阿霉素作用细胞后, MIEF1 表达水平明显下调, 而经过 Lut 干预后, MIEF1 水平又得到了恢复提升, 因此确定 MIEF1 可能是木犀草素发挥抗心脏毒性作用的潜在靶点。利用分子生物学技术降低 MIEF1 蛋白及 mRNA 水平, 通过 Western blot 检测下游 p-Drp1 (Ser637) 及细胞凋亡经典通路蛋白 Caspase-3 水平后发现, 1 μM 阿霉素作用心肌细胞时, 与正常组相比, 并未引起 Caspase-3 及其他蛋白显著的变化。而 Lut 能够提高低表达 MIEF1 细胞线粒体 MIEF1 蛋白的表达, 促进 Drp1 蛋白在 Ser637 位点的磷酸化, 进而阻止线粒体的过度分裂, 抑制线粒体 Caspase-3 凋亡信号通路的激活。以上实验阐释了木犀草素心肌保护的部分作用机制, 但其在降低线粒体过度分裂

的过程中是否有其他信号途径参与,有待进一步研究。

参考文献

- Rivankar S. An overview of doxorubicin formulations in cancer therapy[J]. J Cancer Res Ther, 2014, 10(4):853-858.
- Silva EF, Bazoni RF, Ramos EB, et al. DNA-doxorubicin interaction: new insights and peculiarities [J]. Biopolymers, 2016, 107(3):e22998.
- Liu LL, Liu S. Discussion on application of *Platycodon* root in breast cancer[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm(中华中医药杂志), 2010, 25:2115-2117.
- Hao W, Liu S, Qin Y, et al. Cardioprotective effect of *Platycodon grandiflorum* in patients with early breast cancer receiving anthracycline-based chemotherapy: study protocol for a randomized controlled trial[J]. Trials, 2017, 18:386.
- Shen M, Shi YY, Wang GF, et al. Pharmacokinetics of Platycodonis Radix combined with adriamycin in treating mice with lung metastasis of breast cancer[J]. Acad J Shanghai Univ Tradit Chin Med(上海中医药大学学报), 2019, 33(5):54-60.
- Liu JC. HPLC determination of luteolin and apigenin in *Herba Scutellariae barbatae* [J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2012, 18(20):72-74.
- Lin Y, Shi R, Wang X, et al. Luteolin, a flavonoid with potential for cancer prevention and therapy[J]. Curr Cancer Drug Tar, 2008, 8:634-646.
- Yasuda MT, Fujita K, Hosoya T, et al. Absorption and metabolism of luteolin and its glycosides from the extract of *chrysanthemum morifolium* flowers in rats and Caco-2 cells[J]. J Agr Food Chem, 2015, 63:7693-7699.
- Lin TY, Lu CW, Wang SJ. Luteolin protects the hippocampus against neuron impairments induced by kainic acid in rats [J]. Neurotoxicology, 2016, 55:48-57.
- Jia P, Chen W, Jia XF, et al. Comparison of transcriptome characteristics of human tumor cell lines with identical backgrounds from different sources[J]. Int J Pharm Res(国际药理学研究杂志), 2018, 45:686-696.
- Shabalala S, Louw J, Muller CJF, et al. Polyphenols, autophagy and doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. Life Sci, 2017, 180:160-170.
- 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, 57:367-380.
- Sun HB, Yu CN, Xu D et al. Ginseng Aconite and its small complex prescription Shenfu Decoction inhibiting doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats[J]. Liaoning J Tradit Chin Med(辽宁中医杂志), 2012, 39:754-756.
- Liu JT, Li Z, Zhang YH, et al. Effects of qishenyiqi decoction on cardiac function and miR133a expression in adriamycin induced heart failure rats[J]. Chin J Int Med Cardio-Cerebrovasc Dis(中西医结合心脑血管杂志), 2019, 17:2282-2287.
- Wang Z, Wang J, Bao ST, et al. Protective effect and mechanism of baicalin on lipopolysaccharide-induced AC16 cardiomyocytes[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发), 2019, 31:428-433.
- Lisa T, Shun N, Vincent P, et al. Mitochondrial dynamics: overview of molecular mechanisms [J]. Essays Biochem, 2018, 62:341-360.
- Tang H, Tao A, Song J, et al. Doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis: role of mitofusin 2[J]. Int J Biochem Cell B, 2017, 88:55-59.
- Zhao J, Liu T, Jin S, et al. Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission [J]. EMBO J, 2011, 30:2762-2778.
- Xian H, Liou YC. Loss of MIEF1/MiD51 confers susceptibility to BAX-mediated cell death and PINK1-PRKN-dependent mitophagy[J]. Autophagy, 2019, 15:2107-2125.
- Ji WK, Chakrabarti R, Fan X, et al. Receptor-mediated Drp1 oligomerization on endoplasmic reticulum [J]. Am J Resp Cell Mol, 2017, 216:4123-4139.
- Yu R, Liu T, Jin SB, et al. MIEF1/2 function as adaptors to recruit Drp1 to mitochondria and regulate the association of Drp1 with Mff[J]. Sci Rep, 2017, 7:880.