

金翠柳,柴钰,凌望,等. 多柔比星致小鼠慢性心脏毒性模型的构建及评估 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(4): 14-21.

Jin CL, Chai Y, Ling W, et al. Construction and evaluation of a doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity mouse model [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(4): 14-21.

doi: 10. 3969/j.issn.1671-7856. 2022. 04. 003

多柔比星致小鼠慢性心脏毒性模型的构建及评估

金翠柳¹,柴钰¹,凌望¹,吴美平¹,金素安^{2*}

(1.上海中医药大学附属市中医医院,上海 200071;2.上海中医药大学,上海 201203)

【摘要】 目的 基于病理变化评估不同浓度多柔比星致小鼠心脏毒性模型的成模效果。**方法** 采用 8 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠 36 只,随机分为生理盐水组(NS 组)、3 mg/kg 多柔比星组、4 mg/kg 多柔比星组、5 mg/kg 多柔比星组、6 mg/kg 多柔比星组、7 mg/kg 多柔比星组,每组 6 只。采用腹腔注射的给药方式,每 3 d 1 次,共 10 次,观察小鼠的状态,对小鼠心重、体重、心重比、心腔比、生存情况进行统计,并检测心脏组织中凋亡蛋白的表达情况以及心肌纤维化程度,心脏中段横截面积与单个心肌细胞横截面积大小等来评价多柔比星诱导的小鼠慢性心脏毒性模型。**结果** 统计整个实验周期中小鼠的生存情况,3~5 mg/kg 各给药组小鼠均存活 6 只,生存率为 100%,6 mg/kg 给药组小鼠存活 5 只,生存率为 83.3%,7 mg/kg 给药组小鼠存活 1 只,生存率约达 16.7%。与 NS 组相比,给药组小鼠的生存率呈下降趋势,且与多柔比星给药浓度呈负相关,而小鼠的心重、体重、心腔比则呈剂量依赖性下降。当多柔比星浓度达到 4 mg/kg 时,相较 NS 组,模型组小鼠心肌细胞凋亡比例增加,心肌纤维化面积增多,且发现心脏整体缩小,心肌细胞横截面积相应缩小,有统计学差异($P<0.05$)。**结论** 小鼠心脏纤维化、心肌细胞凋亡、萎缩及生存率等指标随着体内多柔比星蓄积量增加而恶化,造模时选用 4~6 mg/kg 浓度的多柔比星构建小鼠慢性心脏毒性模型较为合适,超过该剂量则小鼠死亡率较高,不利于后期实验。

【关键词】 多柔比星;动物模型;小鼠;慢性心脏毒性

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 04-0014-08

Construction and evaluation of a doxorubicin-induced chronic cardiotoxicity mouse model

JIN Cuiliu¹, CHAI Yu¹, LING Wang¹, WU Meiping¹, JIN Suan^{2*}

(1. Shanghai Municipal Hospital of Traditional Chinese Medicine, Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200071, China. 2. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203)

【Abstract】 Objective To evaluate the effect of different levels of doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice by examining pathological changes. **Methods** In total, 36 male C57BL/6J mice (8 weeks old, SPF grade) were randomly assigned to the normal saline group (NS group), 3 mg/kg doxorubicin group, 4 mg/kg doxorubicin group, 5 mg/kg doxorubicin group, 6 mg/kg doxorubicin group and 7 mg/kg doxorubicin group (6 mice in each group). Mice received intraperitoneal injection of saline or different concentrations of doxorubicin, 3 days/times, 10 times in total. We monitored heart weight, body weight, ratio of body weight with heart weight, tibia to heart weight ratio, survival rate and evaluated cardiomyocyte apoptosis and cardiac fibrosis, simultaneously measured the cross-sectional area of heart and single myocyte cross-sectional area size. **Results** All six mice in each of the 3~5 mg/kg groups survived, with a survival rate of 100%.

【基金项目】 国家自然科学基金(81973826);国家自然科学基金青年科学基金项目(81904167)。

【作者简介】 金翠柳(1995—),女,硕士研究生,研究方向:从事心血管领域研究。E-mail:954700668@qq.com

【通信作者】 金素安(1976—),女,副教授,博士,研究方向:从事中药学研究。E-mail:zhongyaojin@126.com

Five mice in the 6 mg/kg group survived, the survival rate was approximately 83.3%. One mouse in the 7 mg/kg group survived, the survival rate was approximately 16.7%. The survival rate of mice in the treatment groups decreased and was negatively correlated with doxorubicin concentration. The heart weight, body weight and heart to tibia ratio of mice in the treatment groups decreased in a dose-dependent manner. When the concentration of doxorubicin reached 4 mg/kg, the proportion of cardiomyocyte apoptosis increased, the area of myocardial fibrosis increased, and the cross-sectional area of the whole heart and cardiomyocyte decreased in the model groups compared with the NS group, and these differences were statistically significant ($P < 0.05$). **Conclusions** The indexes of cardiac fibrosis, cardiomyocyte apoptosis, atrophy and survival rate of mice worsen with the increase of doxorubicin accumulation *in vivo*. A concentration of 4 ~ 6 mg/kg doxorubicin is appropriate to build the model of chronic cardiotoxicity in mice, if doxorubicin exceeds this dose, the death rate of mice will be high, which is not conducive to the later experiment.

【Keywords】 doxorubicin; animal model; mouse; chronic cardiac toxicity

肿瘤心脏病是临床影响肿瘤患者生存率的一类重要疾病,尤其是放疗或化疗药物诱发的心脏毒性最为常见,其中化疗药物诱发心脏毒性在抗癌治疗中发病率高,常常影响肿瘤患者的预后,是妨碍肿瘤幸存者生命健康的一大挑战^[1-4]。目前针对化疗药物诱发的心脏毒性尚无明确的治疗措施,建立可靠的心脏毒性模型是进行药物研究的前提。构建心脏毒性模型多采用放疗或化疗药物进行干预,化疗药物干预常以多柔比星药物腹腔注射构建心脏毒性模型较为常见^[5-6]。且采用药物注射操作技术简便、易于大量重复,是目前探索肿瘤心脏病治疗方法的合适动物模型。

构建多柔比星诱导小鼠心脏毒性模型是心血管基础研究常用的动物模型之一^[7-8],也是探索肿瘤心脏病的病理发生、发展以及治疗方法的前提,然而通过查阅国内外相关文献发现,构建心脏毒性模型采用的多柔比星药物浓度差异较大,给药策略和评价指标不规范,给药浓度从 3 ~ 10 mg/kg 均有涉及,其中有采用多柔比星给药浓度 3 mg/kg,隔天给药 1 次,给药 2 周来构建该模型,以小鼠心超指标:左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS)下降为建模成功指标^[9]。也有采用 4 mg/kg 多柔比星药物浓度连续注射 4 周,以血清中肌钙蛋白 T(cTnT)、乳酸脱氢酶(LDH)和肌酸激酶-同工酶(CK-MB)等指标上升视为建模成功指标^[10]。更甚者提出在第 1、3、5 天给予多柔比星 10 mg/kg 腹腔注射,1 周后也可检测到小鼠心功能下降,心肌细胞凋亡^[11],综合上述发现该模型对于造模用药剂量、时间差异极大,且目前国内外研究对多柔比星构建心脏毒性模型以何种浓度诱导,以及诱导的时间长短均无定论^[12-14]。本研究通过参考临床多柔比星

化疗方案^[15-16],并结合多柔比星药代动力学特征,多柔比星血浆浓度呈多相衰减,终末相半衰期为 50 h^[17],探讨在同等的造模时长(4 周)、给药周期(每 3 d 1 次)下系统地探讨不同浓度多柔比星对小鼠心脏损伤、心脏组织结构变化的影响,以期构建出成模率高且死亡率低的多柔比星慢性心脏损伤模型,为后续开展多柔比星相关实验的广大研究者提供造模参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SPF 级别实验雄性小鼠 C57BL/6J, 36 只, 20 ~ 22 g, 6 ~ 8 周龄, 购自上海斯莱克实验动物有限责任公司[SCXK(沪)2017-0005], 在上海同济大学实验动物中心[SYXK(沪)2018-0034] SPF 屏障环境(室温 20℃ ~ 25℃, 湿度 60% ~ 70%)下饲养。实验经上海同济大学生物医学伦理委员会审批(TJHBLAC-2019-057)。实验过程遵循 3R 原则。

1.2 主要试剂

盐酸多柔比星(Med Chem Express, 美国; 批号: HY-15142); 活化后的半胱氨酸蛋白 3 (Cleaved-caspase-3) (CST, 美国; 批号: 9664S); 促凋亡蛋白(Bax) (CST, 美国; 批号: ab182734); 抑凋亡蛋白(Bcl2) (CST, 美国; 批号: ab182858); 抗-甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH) (CST, 美国; 批号: 5174S); 山羊抗兔 IgG (H + L) (Yeasten, 中国; 批号: 33101ES60); 天狼猩红染色试剂盒(索莱宝科技有限公司, 中国; 批号: S8060); 麦胚凝集素染色试剂盒(Thermo, 美国; 批号: L2785)。

1.3 实验方法

1.3.1 造模

8 周龄 SPF 级别雄性 C57BL/6J 小鼠 36 只, 将

其随机分为 NS 组、3 mg/kg 多柔比星剂量组、4 mg/kg 多柔比星剂量组、5 mg/kg 多柔比星剂量组、6 mg/kg 多柔比星剂量组、7 mg/kg 多柔比星剂量组, 每组各 6 只。实验小鼠根据分组腹腔注射不同浓度多柔比星和生理盐水, 每 3 d 1 次, 共 10 次。30 d 后, 处死小鼠, 取出心脏, 用于后续实验。

1.3.2 检测指标及方法

(1) HE 染色

参考文献^[18], 常规脱蜡至水后, 按说明书使用伊红-苏木素染料进行染色, 心脏组织常规脱水透明后进行封片处理, 在显微镜下观察组织显色效果并采集图像。

(2) 天狼猩红染色

参考文献^[19], 常规脱蜡至水后, 准备湿盒, 用免疫组化笔在组织周围画圈, 按说明书使用天狼猩红染料进行染色, 心脏组织常规脱水透明后进行封片处理, 在显微镜下观察组织显色效果并采集图像。

(3) 麦胚凝集素染色

参考文献^[20], 烤片, 脱蜡至水, 使用微波炉将组织用柠檬酸钠修复液进行抗原热修复, 甘氨酸室温孵育 20 min, 用 PBS 洗 1 次。准备湿盒, 用免疫组化笔在组织周围画圈, 按说明书要求进行麦胚凝集素染色, 染色完成后使用荧光显微镜观察组织显色效果并采集图像, 后续使用 Image J 软件统计心肌细胞横截面积。

(4) 蛋白免疫印迹 (Western blot)

称取并研磨相同重量的心脏组织, 裂解并提取蛋白, 测定蛋白浓度。蛋白样品进行电泳、转膜、封闭, 后续加入一抗 GAPDH、Bax、Bcl2、Cleaved-caspase3 和相应二抗孵育, Bio-Rad 凝胶成像分析仪曝光, Image J 统计各组灰度值。

1.4 统计学方法

采用 Graph Pad Prism 6.0 统计软件进行统计学分析, 实验数据以平均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 对各项指标数据进行正态性检验, 其中多组间比较用 One-Way ANOVA 分析法, 多组间两两比较采用 Dunnett-*t* 检验, 两组间均值差异采用两独立样本 *t* 检验, 以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 不同浓度多柔比星对小鼠一般情况及生存率的影响

与 NS 组相比, 6 mg/kg 多柔比星模型组小鼠存

活 5 只, 7 mg/kg 多柔比星模型组小鼠存活 1 只, 其余浓度模型组小鼠均存活, 提示小鼠生存率随着多柔比星的浓度增加而同步下降, 见图 1A。取材后对各组小鼠心脏拍照观察, 发现随着多柔比星浓度的上升, 小鼠心脏呈剂量依赖性的缩小, 见图 1B。同时对小鼠心脏中段横截面进行 HE 染色, 从图 1C 可见, 与生理盐水组相比, 多柔比星组小鼠心脏整体缩小, 心室内径扩大, 与肉眼观察相符。后期对小鼠的体重、心脏重量、心重比及其心腔比进行统计, 发现与 NS 组相比, 多柔比星组小鼠的体重、心脏重量、心腔比均下降, 且随着多柔比星浓度的增加而同步下降 ($P<0.05$), 但在小鼠心重比参数上无统计学差异 ($P>0.05$), 可能与多柔比星注射后体重同步下降有关, 见图 1D~1G。

2.2 不同浓度多柔比星对心肌细胞凋亡的影响

心肌细胞凋亡是多柔比星诱导心肌细胞死亡的方式之一, 同时也是多柔比星诱导慢性心脏损伤的病理表现之一^[21]。实验结果显示, 与 NS 组相比, 多柔比星药物浓度为 3 mg/kg 时心脏组织中凋亡蛋白 Cleaved-caspase3 的表达量未见明显增高, Bax/Bcl2 比值也无明显上升 ($P>0.05$)。而当药物浓度达到 4 mg/kg 后, 与 NS 组相比, Bax/Bcl2 比值明显增加, 有统计学差异, Cleaved-caspase3 的表达量增加, 但无统计学意义 ($P>0.05$)。当给药浓度为 5~6 mg/kg 时, Bax/Bcl2 比值与 Cleaved-caspase3 表达均明显增加, 见图 2A~2F。

2.3 不同浓度多柔比星对小鼠心肌纤维化的影响

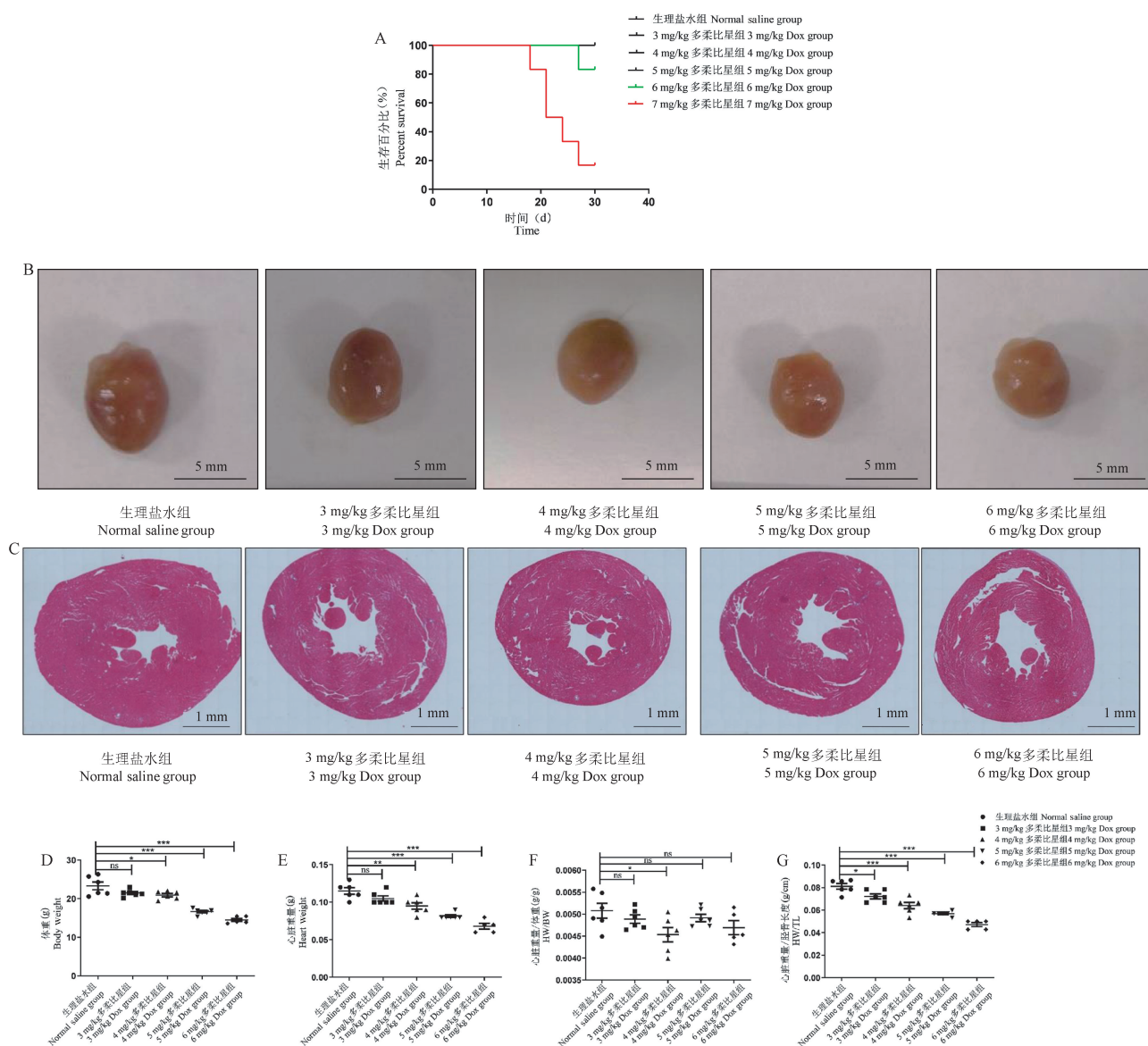
通过对心脏组织进行天狼猩红染色, 结果显示: 3 mg/kg 多柔比星组与 NS 组相比, 胶原纤维沉积较少, 心肌纤维化程度不明显, 无统计学差异 ($P>0.05$), 见图 3A、3B。当多柔比星剂量达到 4 mg/kg 以上时, 与 NS 组相比, 心脏组织中可见明显的胶原纤维沉积, 心肌纤维化程度加重, 有统计学差异 ($P<0.05$), 图 3A、3B。横向比较不同浓度多柔比星给药组间差异发现, 小鼠心脏心肌纤维化程度并未随着多柔比星给药浓度的增加而上升, 可能是小鼠心脏纤维化程度不具备明显的剂量依赖性特征, 或者是给药后观察时长不够导致。

2.4 不同浓度多柔比星对小鼠心肌细胞萎缩的影响

前期通过对小鼠的一般情况进行统计, 发现

多柔比星呈剂量依赖性降低小鼠的心脏重量,说明多柔比星可能导致心脏萎缩。通过对小鼠心脏组织进行 WGA 染色发现,3 mg/kg 浓度造模组与 NS 组相比,小鼠单个心肌细胞大小未见明显

缩小,无统计学差异($P>0.05$)。而当多柔比星浓度达到 4 mg/kg 以上时,小鼠单个心肌细胞可见明显缩小,差异具有统计学意义($P<0.05$),见图 4。

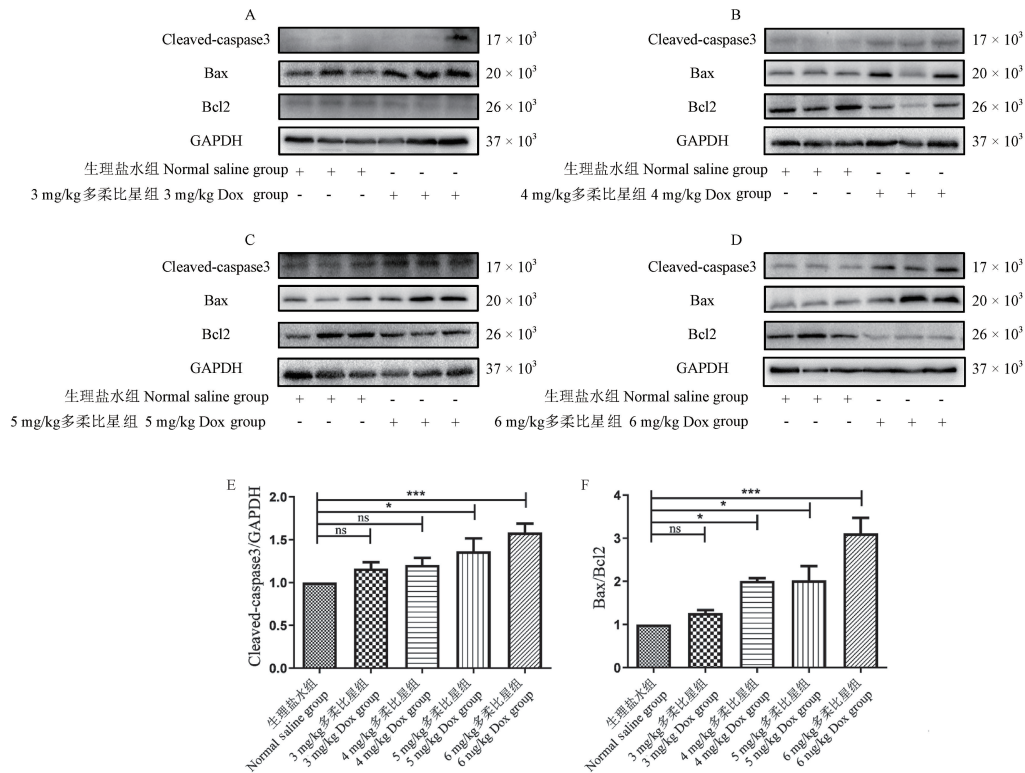


注:A:小鼠生存曲线;B:各组小鼠具有代表性的心脏图片;C:各组小鼠 HE 染色示意图;D:各组小鼠体重统计;E:各组小鼠心脏重量统计;F:各组小鼠心重比统计;G:各组小鼠心腔比统计。与生理盐水组比, **** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$, ns $P>0.05$ 。

图 1 不同浓度多柔比星对小鼠一般情况及生存率的影响($n=6$)

Note. A, Mouse survival curve. B, Pictures of representative hearts of mice in each group. C, Schematic diagram of HE staining of mice in each group. D, Body weight statistics of mice in each group. E, Heart weight statistics of mice in each group. F, Statistics of the ratio of heart to body weight in each group. G, Statistics of the tibia heart weight ratio of mice in each group. Compared with normal saline group, **** $P<0.001$, ** $P<0.01$, * $P<0.05$, ns $P>0.05$.

Figure 1 Effects of different concentrations of doxorubicin on general condition and survival rate of mice

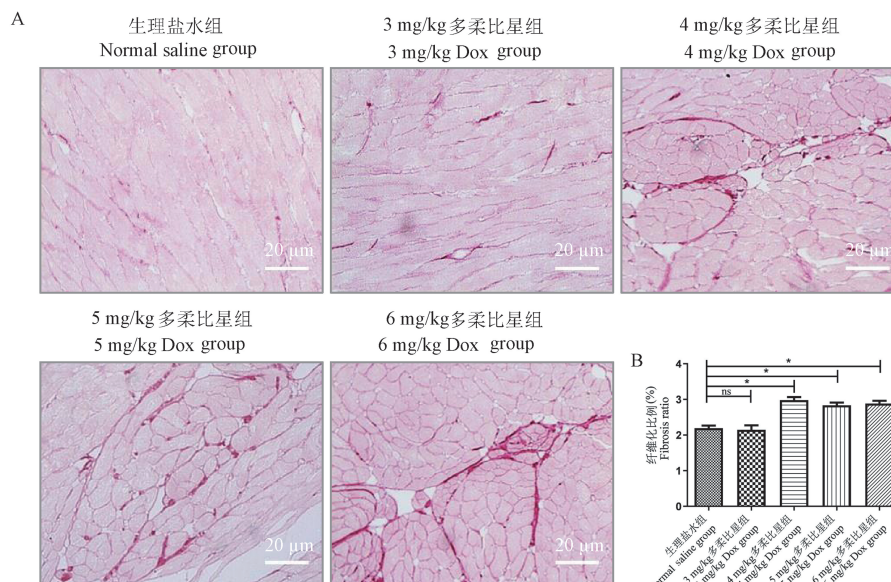


注: A~D: 蛋白免疫印迹检测 Cleaved-caspase3、Bax、Bcl2、GAPDH 的表达; E: Cleaved-caspase3 蛋白相对表达水平的统计图; F: Bax 蛋白相对水平表达与 Bcl2 蛋白相对表达的比值统计图。与生理盐水组比, *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$, ^{ns} $P > 0.05$ 。

图 2 不同浓度多柔比星对心肌细胞凋亡的影响 ($n = 6$)

Note. A~D, Representative Western blot of Cleaved-caspase3, Bax, Bcl2 and GAPDH protein expression. E, A statistical chart of Cleaved-caspase3 relative expression levels. F, Statistical diagram of the ratio of Bax protein relative level expression to Bcl2 protein relative level expression. Compared with normal saline group, *** $P < 0.001$, * $P < 0.05$, ^{ns} $P > 0.05$.

Figure 2 Effects of different concentrations of doxorubicin on myocardial apoptosis

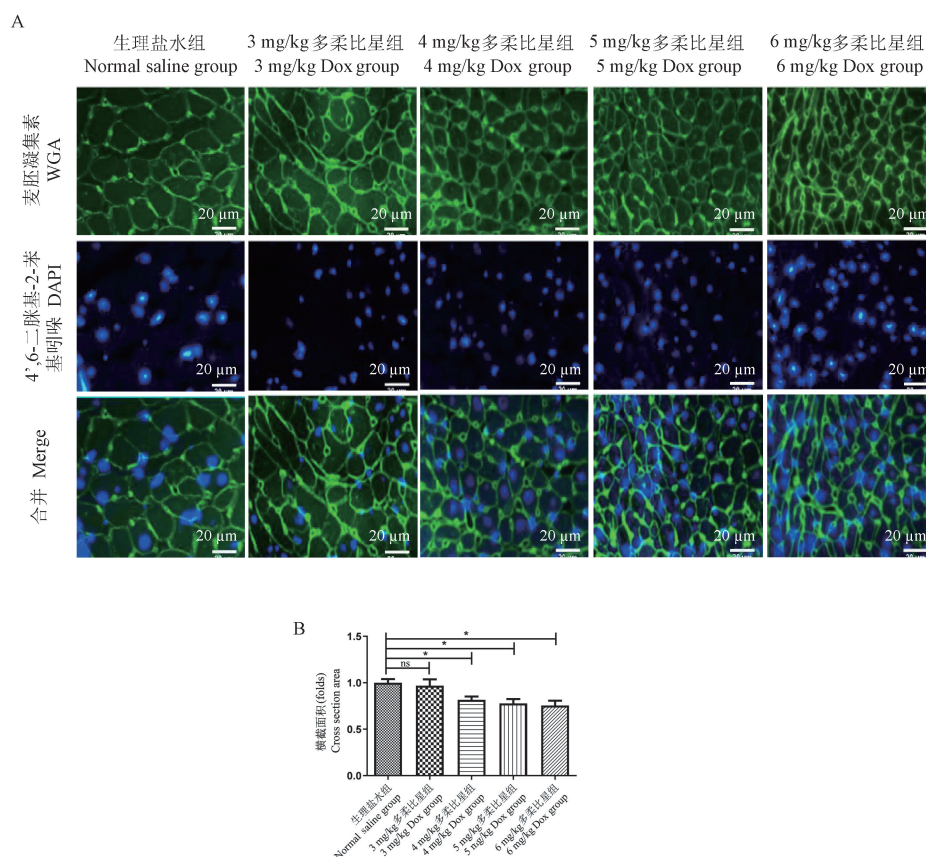


注: A: 小鼠心肌细胞天狼猩红染色; B: 小鼠心脏纤维化比例统计图。与生理盐水组比, * $P < 0.05$, ^{ns} $P > 0.05$ 。

图 3 不同浓度多柔比星对小鼠心肌纤维化的影响 ($n = 6$)

Note. A, Mice cardiomyocytes Sirius scarlet dye. B, Statistical map of the proportion of cardiac fibrosis in mice. Compared with normal saline group, * $P < 0.05$, ^{ns} $P > 0.05$.

Figure 3 Effects of different concentrations of doxorubicin on myocardial fibrosis in mice



注:A:小鼠心肌细胞麦胚凝集素染色;B:不同浓度多柔比星对小鼠心肌细胞横截面积影响的统计图。与生理盐水组比, $*P<0.05$, $^{ns}P>0.05$ 。

图4 不同浓度多柔比星对小鼠心肌细胞萎缩的影响($n=6$)

Note. A, Mice cardiomyocytes wheat germ lectin staining. B, Statistical diagram of the effect of doxorubicin at different concentrations on the cross-sectional area of myocardial cells in mice. Compared with normal saline group, $*P<0.05$, $^{ns}P>0.05$.

Figure 4 Effects of different concentrations of doxorubicin on myocardial cell atrophy in mice

3 讨论

多柔比星为临床上治疗实体肿瘤的经典药物,临床研究发现长期使用多柔比星会增加肿瘤病人患心血管疾病的风险,以心律失常、左室功能障碍、充血性心力衰竭等为主,其原因多数认为是多柔比星随剂量及时间累积对心肌细胞损伤导致的凋亡、萎缩以及对心肌纤维化的促进作用共同导致的心室重构^[3],在基础病理生理学以及药理学研究中,小鼠腹腔注射多柔比星是常用的体内模型^[5],可以很好地模拟临床患者化疗后诱发的心脏毒性。

多柔比星除了急性大剂量心脏损伤外,小剂量随时间和剂量蓄积是目前模型使用非常多的造模方式,但因为国内外文献中对多柔比星诱导心脏模型的给药浓度与给药时长不同,且未有统一定论^[13,22],前期课题组研究发现多柔比星损伤剂量与致死量窗口非常窄,导致模型难以重复,本研究观

察不同剂量多柔比星在一定时间(4周)内蓄积后体重、心脏重量、生存率及病理学指标如凋亡、萎缩、纤维化等指标,寻找比较合适的造模剂量。从实验结果可以看出,随着多柔比星药物浓度增加,小鼠体重和心脏重量下降,生存率下降,但给药浓度低于4 mg/kg则指标恶化不明显,高于6 mg/kg后小鼠大量死亡,提示4~6 mg/kg的给药浓度是较合适的造模方法。

多柔比星导致心室重构的主流观点是引起心脏萎缩^[23-24],在本研究中,我们使用了不同剂量的多柔比星对小鼠心肌质量的影响进行评估。研究发现当多柔比星给药浓度达4 mg/kg,且体内药物累积剂量达40 mg/kg时,小鼠的心脏指数显著下降,与目前的临床给药方案范围接近,且与临床实验中发现的当人体内多柔比星的累积剂量接近为30 mg/m²,会发生亚急性心肌萎缩的结论一致^[25]。对心肌细胞横截面积统计,进一步发现当多柔比星

药物浓度达 4 mg/kg 是心肌细胞萎缩的开始,显微镜下可见心脏中段横截面积与心肌细胞横截面积明显缩小。既往有观点认为心肌细胞凋亡亦可能导致了心脏萎缩^[26-27],本次课题组对心肌组织的凋亡标志蛋白 Cleaved-caspase3、Bax、Bcl2 的观察佐证了此观点:3 mg/kg 浓度的多柔比星组凋亡蛋白 Cleaved-caspase3 表达及 Bax/Bcl2 比值相较 NS 组未见明显上升,而当多柔比星浓度达到 4 mg/kg 后,心脏中凋亡蛋白 Cleaved-caspase3 的表达及 Bax/Bcl2 的比值均明显上升。在 4~6 mg/kg 给药浓度范围内可见凋亡蛋白 Cleaved-caspase3 的表达及 Bax/Bcl2 的比值呈剂量依赖性上升,课题组不同剂量多柔比星对乳鼠心肌细胞凋亡的体外研究(数据未发布)亦佐证了体内的趋势。

除了心肌细胞萎缩、凋亡外,心肌纤维化也是导致心室重构的另一中病理表现^[28]。为了探讨不同浓度多柔比星对小鼠心脏纤维化程度的影响,课题组对不同剂量多柔比星处理后小鼠的心脏石蜡切片采用天狼猩红染色,结果显示 3 mg/kg 多柔比星组小鼠相较 NS 组心肌纤维化比例未见明显增加,当多柔比星浓度达到 4 mg/kg 时,可见明显的胶原沉积在心脏间质中,心肌纤维化加重,4~6 mg/kg 模型组小鼠心肌纤维化程度明显比 3 mg/kg 模型组严重,但 3 组模型组组间两两比较发现,小鼠心肌纤维化程度大约一致,并未随着多柔比星浓度与剂量的进一步增多而加重,可能是由于多柔比星剂量累积到一定程度后,小鼠心脏纤维化程度不具备明显的剂量依赖性特征,或者是给药后观察时长不够导致。

本研究尚存一些不足之处,未对小鼠心功能、血流动力学等指标进行检测,但是本研究通过心脏重量、心腔比、心重比、心脏组织 HE 染色、WGA 染色、天狼猩红染色及凋亡蛋白检测等指标从侧面反映了多柔比星可诱导小鼠心室重构,相较心超更具说服力。本研究也未从药物时间依赖性角度对多柔比星诱导小鼠心脏损伤进行研究,有待后续更进一步深入探讨。

综上所述,当多柔比星给药浓度达到 4 mg/kg 时,小鼠心脏结构发生改变,可见心脏缩小,心肌细胞萎缩,心肌细胞凋亡及心肌纤维化等,当给药浓度达到 7 mg/kg 时,小鼠多数死亡,反应出多柔比星造模小鼠心脏损伤窗口比较窄,4~6 mg/kg 可作为多柔比星诱导小鼠慢性心脏损伤模型的参考浓度。

本实验从整体上对不同浓度给药剂量的多柔比星模型组的诱导的心脏损伤加以全面地评价、分析并提供安全、可靠的给药剂量。

参考文献:

- [1] Lipshultz SE, Franco VI, Miller TL, et al. Cardiovascular disease in adult survivors of childhood cancer [J]. *Annu Rev Med*, 2015, 66: 161-176.
- [2] Fornaro A, Olivetto I, Rigacci L, et al. Comparison of long-term outcome in anthracycline-related versus idiopathic dilated cardiomyopathy: a single centre experience [J]. *Eur J Heart Fail*, 2018, 20(5): 898-906.
- [3] Zamorano JL, Lancellotti P, Rodriguez Muñoz D, et al. 2016 ESC position paper on cancer treatments and cardiovascular toxicity developed under the auspices of the ESC committee for practice guidelines: the task force for cancer treatments and cardiovascular toxicity of the European Society of Cardiology (ESC) [J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(36): 2768-2801.
- [4] Moke DJ, Schubert LE, Sun HY, et al. Utility of echocardiography as screening for late-onset anthracycline-induced cardiotoxicity in pediatric cancer survivors: observations from the first decade after end of therapy [J]. *J Pediatr Hematol Oncol*, 2018, 40(5): e283-e288.
- [5] Riehle C, Bauersachs J. Small animal models of heart failure [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(13): 1838-1849.
- [6] 张颖, 马玉奎, 戴晓莉. 多柔比星脂质体注射液与多柔比星注射液大鼠重复给药毒性的比较 [J]. *中国比较医学杂志*, 2016, 26(6): 23-27.
- [7] Qi W, Boliang W, Xiaoxi T, et al. Cardamonin protects against doxorubicin-induced cardiotoxicity in mice by restraining oxidative stress and inflammation associated with Nrf2 signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 122: 109547.
- [8] Hole LD, Larsen TH, Fossan KO, et al. A short-time model to study relevant indices of cardiotoxicity of doxorubicin in the rat [J]. *Toxicol Mech Methods*, 2013, 23(6): 412-418.
- [9] Ma Y, Yang L, Ma J, et al. Rutin attenuates doxorubicin-induced cardiotoxicity via regulating autophagy and apoptosis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(8): 1904-1911.
- [10] Hu C, Zhang X, Wei W, et al. Matrine attenuates oxidative stress and cardiomyocyte apoptosis in doxorubicin-induced cardiotoxicity via maintaining AMPK α /UCP2 pathway [J]. *Acta Pharm Sin B*, 2019, 9(4): 690-701.
- [11] Yu X, Ruan Y, Huang X, et al. Dexrazoxane ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting both apoptosis and necroptosis in cardiomyocytes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 523(1): 140-146.
- [12] Yi X, Bekerjian R, DeFilippis NJ, et al. Transcriptional analysis of doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2006, 290(3): H1098-H1102.
- [13] Pugazhendhi A, Edison T, Velmurugan BK, et al. Toxicity of

- Doxorubicin (Dox) to different experimental organ systems [J]. Life Sci, 2018, 200: 26-30.
- [14] 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.
- [15] 王海江, 乔丽莉, 乔恩奇. 含脂质体多柔比星的联合化疗方案治疗晚期乳腺癌的临床观察 [J]. 中国高等医学教育, 2020, 1: 140-145.
- [16] 张松. 多柔比星脂质体、吡柔比星相关化疗后不良反应的临床观察 [D]. 唐山: 华北理工大学, 2020.
- [17] 方罗, 林能明. 多柔比星药动学研究进展 [J]. 肿瘤学杂志, 2007, 13(5): 424-429.
- [18] Borucki R, Perry DM, Lopez-Garcia DR, et al. Fluorescence microscopy for the evaluation of elastic tissue patterns within fibrous proliferations of the skin on hematoxylin-eosin-stained slides [J]. J Am Acad Dermatol, 2021, 85(2): 419-422.
- [19] Favero G, Paini A, De Ciuceis C, et al. Changes in extracellular matrix in subcutaneous small resistance arteries of patients with essential hypertension [J]. Blood Press, 2018, 27(4): 231-239.
- [20] Weissenbacher A, Oberhuber R, Hermann M, et al. Live confocal tissue assessment with SYTO16/PI and WGA staining visualizes acute organ damage and predicts delayed graft function in kidney transplantation [J]. Ann Surg, 2019, 270(5): 915-922.
- [21] Renu K, Abilash VG, Pichiah PT, et al. Molecular mechanism of doxorubicin-induced cardiomyopathy-An update [J]. Eur J Pharmacol, 2018, 818: 241-253.
- [22] 牛欢, 陈曼丽, 杨波, 等. 基于 TGF- β 1/Smad3 信号通路观察促血小板生成素对阿霉素致心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡的影响 [J]. 中国比较医学杂志, 2020, 30(3): 63-70.
- [23] Kazemi-Bajestani SMR, Becher H, Butts C, et al. Rapid atrophy of cardiac left ventricular mass in patients with non-small cell carcinoma of the lung [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle, 2019, 10(5): 1070-1082.
- [24] Willis MS, Parry TL, Brown DI, et al. Doxorubicin exposure causes subacute cardiac atrophy dependent on the striated muscle-specific ubiquitin ligase MuRF1 [J]. Circ Heart Fail, 2019, 12(3): e005234.
- [25] Nair AB, Jacob S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human [J]. J Basic Clin Pharm, 2016, 7(2): 27-31.
- [26] Campbell TL, Quadrilatero J. Data on skeletal muscle apoptosis, autophagy, and morphology in mice treated with doxorubicin [J]. Data Brief, 2016, 7: 786-793.
- [27] Xia P, Chen J, Liu Y, et al. Doxorubicin induces cardiomyocyte apoptosis and atrophy through cyclin-dependent kinase 2-mediated activation of forkhead box O1 [J]. J Biol Chem, 2020, 295(13): 4265-4276.
- [28] Levick SP, Soto-Pantoja DR, Bi J, et al. Doxorubicin-induced myocardial fibrosis involves the neurokinin-1 receptor and direct effects on cardiac fibroblasts [J]. Heart Lung Circ, 2019, 28(10): 1598-1605.

[收稿日期]2021-03-06