

·基础研究·

## LRP6调控经典Wnt信号通路作用于阿霉素诱导的心肌细胞损伤

梁莉莹, 路静, 刘培庆

(中山大学药学院药理毒理实验室, 广东广州 510006)

**摘要:**【目的】探究LRP6和经典Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在阿霉素心肌病中的作用及其机制。【方法】采用阿霉素(Dox)刺激H9C2细胞12 h,在细胞水平上建立阿霉素心肌病模型;12只SD大鼠分为两组(各6只),腹腔分别注射生理盐水和Dox,在动物水平上建立阿霉素心肌病;Western blot和qPCR检测相应蛋白和mRNA表达水平变化;通过转染siRNA靶向沉默LRP6表达;采用罗丹明123、Hoechst和Mitotracker染色分别检测线粒体膜电位、细胞核固缩以及线粒体肿胀;通过流式细胞技术检测凋亡比率变化。【结果】在细胞及动物水平上,成功建立阿霉素心肌病模型;Dox引起LRP6的mRNA和蛋白水平下降;敲低LRP6加重阿霉素引起的心肌细胞凋亡和线粒体损伤;Dox和沉默LRP6均下调 $\beta$ -catenin,激活 $\beta$ -catenin可以逆转阿霉素造成的心肌损伤。【结论】Dox通过诱导LRP6表达下调,抑制了经典Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路,从而引起心肌细胞凋亡和线粒体损伤。

**关键词:**LRP6;阿霉素;心肌病;Wnt/ $\beta$ -catenin;凋亡;线粒体

中图分类号:R966 文献标志码:A 文章编号:1672-3554(2019)04-0503-07

## The Effect on LRP6 via Regulating Canonical Wnt/ $\beta$ -catenin Signaling in Doxorubicin-induced Cardiomyocyte Injury

LIANG Li-ying, LU Jing, LIU Pei-qing

(Laboratory of Pharmacology and Toxicology School of Pharmaceutical Sciences, Sun Yat-sen University, Guangzhou, 510006, China)

Correspondence to: LIU Pei-qing; E-mail: liupq@mail.sysu.edu.cn

**Abstract:**【Objective】To investigate the function of LRP6 and canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in Doxorubicin-induced cardiomyopathy. 【Methods】To establish the model of Dox cardiomyopathy in vitro and in vivo, H9C2 cells were treated with Dox (1  $\mu$ mol/L) for 12 h and twelve SD rats were divided into two groups equally, and intraperitoneally injected with normal saline and Dox respectively. The changes of protein and mRNA levels were detected by western blot and qPCR. Cardiomyocytes were transfected with siRNA to knockdown LRP6. Mitochondrial membrane potential, nuclear condensation and matrix swelling were determined by Rhodamine 123, Hoechst and Mitotracker staining respectively. The apoptosis rate of cells was measured by flow cytometric analysis. 【Results】The model of Dox cardiomyopathy was successfully established in vitro and in vivo. Dox downregulated the mRNA and protein levels of LRP6. Knockdown of LRP6 aggravated the cell apoptosis and mitochondrial damage induced by Dox. Both Dox and silencing LRP6 induced the downregulation of  $\beta$ -catenin, and activation of  $\beta$ -catenin reversed the cardiomyocytes apoptosis caused by Dox. 【Conclusions】Dox downregulated the expression of LRP6 and inhibited canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway, thus causing cardiomyocytes apoptosis and mitochondrial dysfunction.

**Key words:** LRP6; doxorubicin; cardiomyopathy; Wnt/ $\beta$ -catenin; apoptosis; mitochondria

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci), 2019, 40(4): 503-509]

收稿日期:2019-03-05

基金项目:国家自然科学基金(81803521, 81872860, 81673433);广东省医学科研基金(A2018078)

作者简介:梁莉莹,硕士研究生,研究方向:心血管药理学, E-mail: liangly6@mail2.sysu.edu.cn;刘培庆,通信作者,博士生导师,教授,研究方向:心血管药理学, E-mail: liupq@mail.sysu.edu.cn

阿霉素(Doxorubicin, Dox)是一种有效的蒽环类抗肿瘤药物,具有作用强、抗瘤谱广的特点,但其对心脏的慢性、剂量依赖性的毒副作用限制了其在临床上的应用<sup>[1]</sup>。阿霉素心肌病是一类由多种因素引起的疾病,其中心肌细胞凋亡和线粒体损伤被认为是阿霉素诱导心肌病变进程中的主要因素,但是其确切的病理机制尚不明确<sup>[2-4]</sup>。目前针对这种疾病的药物主要在于减轻活性氧的积累,但是这些抗氧化剂并不能很好地逆转阿霉素的毒性<sup>[5]</sup>,这说明进一步研究其具体的病理机理仍然是十分必要的。低密度脂蛋白受体相关蛋白6(low density lipoprotein receptor related protein 6, LRP6)是一类细胞表面的跨膜蛋白,作为经典Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路中关键的共受体,它负责辅助Frizzled受体与配体Wnt蛋白结合,使胞内 $\beta$ -catenin稳定转位入核,从而激活Wnt信号通路<sup>[6]</sup>。研究表明LRP6与心脏发育密切相关,并且在许多心血管疾病中发挥重要作用,如冠状动脉疾病<sup>[7]</sup>、扩张性心肌炎<sup>[8]</sup>和心肌梗死<sup>[9]</sup>等,但是LRP6在阿霉素诱导的心肌损伤中的作用尚未有研究。经典Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路在细胞增殖、凋亡、迁移等生物学过程中发挥重要作用,其调控异常与许多心血管疾病息息相关<sup>[10]</sup>。 $\beta$ -catenin作为Wnt信号通路的关键调控因子,对心脏发育完善<sup>[11]</sup>、心肌缺血性损伤<sup>[12]</sup>和梗死后修复<sup>[13]</sup>等过程至关重要。本研究旨在探究在阿霉素心肌病模型下LRP6与Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的关系及其作用,为阐明阿霉素心肌病机制提供理论依据。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材 料

1.1.1 实验细胞与动物 本实验所用大鼠胚胎心室成肌细胞H9C2购自于中国科学院细胞库。Sprague-Dawley(SD)大鼠,雄性SPF级,7~8周龄,体质量180~220 g,动物质量合格编号为No.44008500015654,用于构建阿霉素诱导的心肌病模型,购自于中山大学实验动物中心。

1.1.2 试剂 阿霉素(Target Molecule Corp.,美国);胰酶(Sigma,美国);胎牛血清(Gibco,美国);OPTI-MEM培养基(Invitrogen,美国);Lipofectamine 2000(Invitrogen,美国);LRP6抗体(兔,Cell Signaling Technology,美国);Caspase3抗体(兔,Protein-

tech Group,美国);切割型Caspase3抗体(兔,Cell Signaling Technology,美国); $\beta$ -catenin抗体(兔,Cell Signaling Technology,美国); $\alpha$ -Tubulin抗体(鼠,Sigma-Aldrich,美国);罗丹明123(Invitrogen,美国);Hoechst(Sigma-Aldrich,美国);Mitotracker(Invitrogen,美国)。

### 1.2 方 法

1.2.1 免疫印迹检测(Western blot) 用适量RIPA裂解液提取细胞总蛋白,定量后变性制成样品。然后用适宜浓度的SDS-PAGE凝胶电泳分离,电转至PVDF膜上,在5%的脱脂牛奶中室温封闭1 h,用1×TBST洗膜后在4℃孵育一抗过夜,1×TBST洗膜后室温孵育相应的二抗1 h,洗涤后进行化学发光显影检测。

1.2.2 总RNA提取-逆转录-聚合酶链式反应(qRT-PCR) 用Trizol试剂提取总RNA并检测浓度和纯度,并根据美国Thermo逆转录试剂盒说明书逆转录成cDNA。qPCR所用的引物由上海生工生物公司合成,以 $\beta$ -actin作为内参基因,相关引物序列如下:LRP6上游5'-TACGTGTTTCACTGGGGACA-3'和下游5'-GGAAGTGAAGTCCGAGCAC-3'; $\beta$ -actin上游5'-ACAACCTTCTTG-CAGCTCCTC-3'和下游5'-CTGACCCATACCCAC-CATCAC-3'。根据美国Bio-Rad公司的SYBR-GreenqPCR试剂盒配制反应体系,PCR扩增反应条件设置为95℃15 min,95℃30 s,循环40次,55℃1 min,72℃30 s。

1.2.3 细胞瞬时转染 根据Lipofectamine 2000的操作说明书,将适宜浓度的siRNA-LRP6或siRNA-negative control转染到心肌细胞中,6 h后换液继续培养72 h。siRNA-LRP6的序列:sense 5'-GGUUGUUUCCCAUUUGUGUUTT-3'和 antisense 5'-AACACAAAUGGGAACAACCTT-3'; siRNA-negative control的序列:sense 5'-UUCUCCGAAC-GUGUCACGUTT-3'和 antisense 5'-ACGUGACAC-GUUCGGAGAATT-3'。

1.2.4 动物实验 经过检疫期后的SD大鼠随机分为生理盐水组和阿霉素组(每组6只)。在14 d的周期中,每隔4天对模型组的SD大鼠进行腹腔注射相同剂量的阿霉素,每次5 mg/kg,最终累积剂量为15 mg/kg。与此同时,对照组的SD大鼠平行腹腔注射同等体积的生理盐水。

1.2.5 罗丹明123法检测线粒体膜电位 细胞弃

去上清后用PBS缓冲液洗涤。用无酚红培养基稀释罗丹明123染料并加入培养板中,置于37℃孵育10 min。PBS洗涤后于细胞成像系统(EVOS FL Auto, Life Technologies, 美国)观察拍摄。

**1.2.6 流式细胞技术检测细胞凋亡情况** 根据Annexin V-FITC细胞凋亡检测试剂盒说明书,收集细胞并用预冷PBS缓冲液洗涤,低速离心后用1×Binding Buffer轻柔重悬细胞,分别避光加入Annexin V和Propidium Iodide混匀,室温静置后用流式细胞仪(Ex488 nm, Em530 nm, EPICS XL, Beckman Coulter, 美国)检测处理后心肌细胞凋亡率的变化。

**1.3 统计学方法**

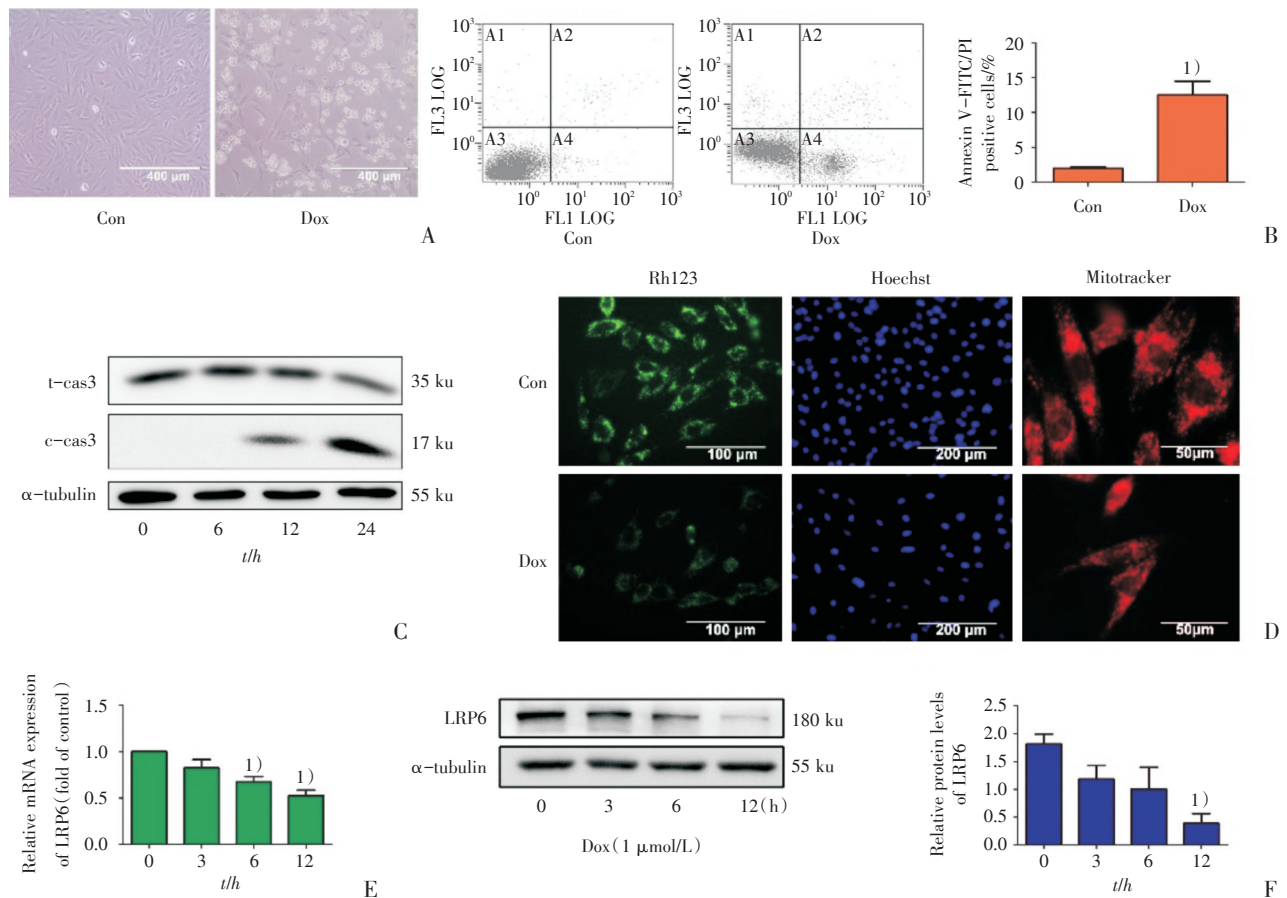
采用GraphPad Prism 5.0统计学软件,所有数

据均表示为均数±标准差(Mean±SD),两组间比较采用*t*检验,多组间比较采用单因素方差分析(ANOVA),并结合Bonferroni法进行多组间两两比较,*P*<0.05则认为差异具有统计学意义。

**2 结果**

**2.1 在阿霉素心肌病细胞模型下,LRP6的转录和蛋白水平下调**

如图1A、B所示,与对照组相比,H9C2细胞在1 μmol/L的Dox刺激12 h时,在显微镜下可以观察到细胞形态出现明显的损伤和凋亡,而流式细胞技术同样检测到心肌细胞在Dox处理12 h后凋亡比率明显增加[相当于对照组(6.38±2.03)倍],



A: The morphology of H9C2 cells was shown after 12 h Dox (1 μmol/L) treatment. B: Flow cytometric analysis was used to measure the apoptosis ratio of H9C2 cells. C: The protein levels of c-cas3/t-cas3 were detected by Western blotting. D: Mitochondrial membrane potential, nuclear condensation and mitochondrial morphology were observed by Rh123 (bar = 100 μm), Hoechst (bar = 200 μm) and Mitotracker staining (bar = 50 μm) respectively. E-F: qPCR and Western blot analysis showed the mRNA and protein levels of LRP6. Data were shown as mean±SD. 1) *P*<0.05 vs. control group. *n* = 3 (c-cas3: cleaved-caspase3, t-cas3: total-caspase3).

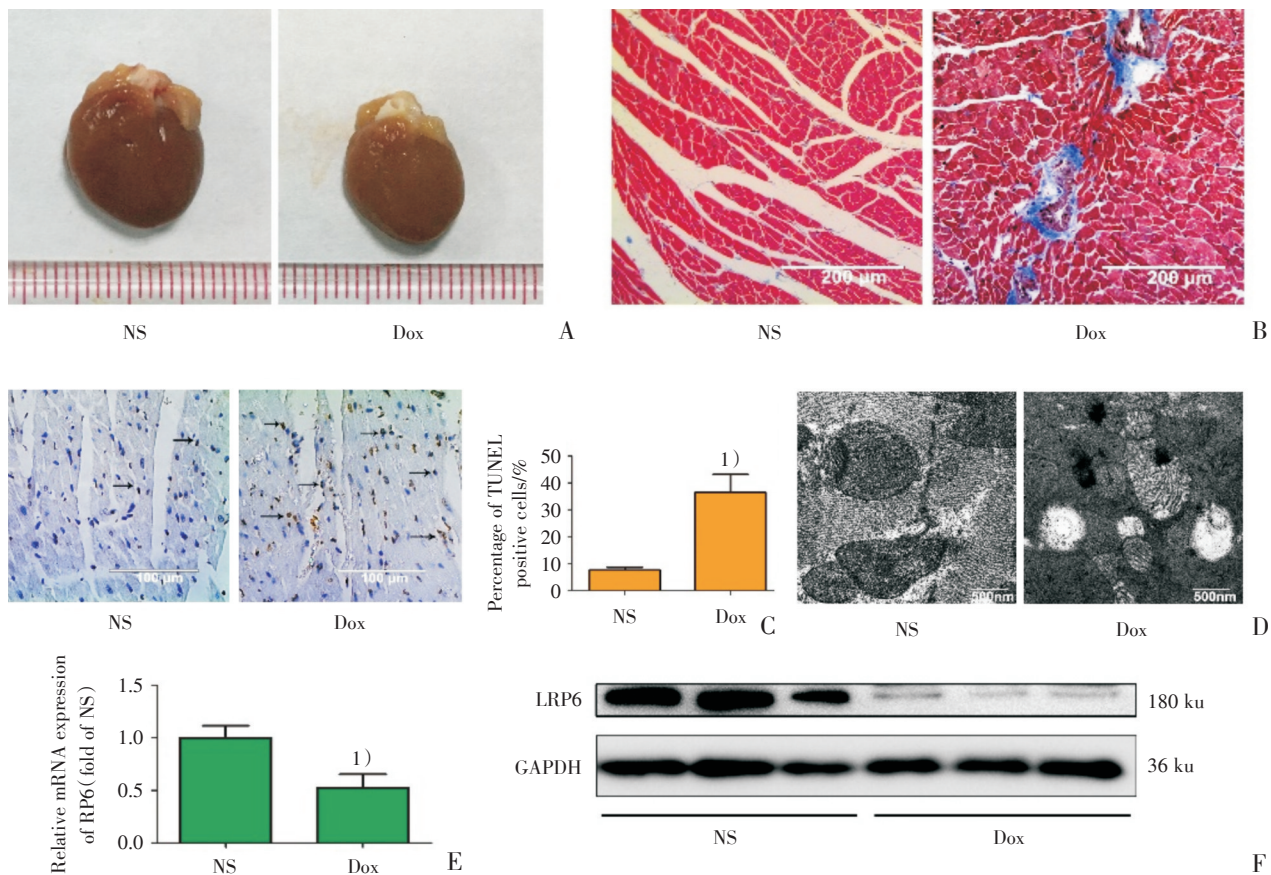
**图1 阿霉素心肌病细胞模型中LRP6的转录和蛋白水平下降**  
**Fig.1 LRP6 was downregulated in doxorubicin treatment in vitro**

$t = 5.28, P = 0.0019, P < 0.01$ 。Western blot 的结果显示,随着 Dox 刺激时间的增加, c-caspase3/t-caspase3 的蛋白水平显著上调(图 1C)。经罗丹明 123、Hoechst 和 mitotracker 染色,在荧光显微镜下观察到, H9C2 细胞在 Dox 刺激 12 h 下会出现线粒体膜电位下降、细胞核固缩以及线粒体基质肿胀/瓦解(图 1D)。以上结果确定 Dox 诱导心肌病的细胞模型建立成功。qPCR 和 Western blot 的结果显示, LRP6 的 mRNA [6 h、12 h 组分别相当于对照组 ( $0.67 \pm 0.14$ )、( $0.53 \pm 0.13$ ) 倍,  $F = 15.39, P < 0.0001$ , 图 1E] 和蛋白 [12 h 组相当于对照组 ( $0.21 \pm 0.20$ ) 倍,  $F = 6.64, P = 0.0096, P < 0.01$ , 图 1F] 水平均随着 Dox 刺激时长的增加而显著下调。

### 2.2 在阿霉素心肌病动物模型下, LRP6 的转录和蛋白水平下调

为了进一步检测 LRP6 在阿霉素心肌病中的

变化,采用分次腹腔注射 Dox (累积剂量 15 mg/kg) 的方法建立体内阿霉素心肌病的动物模型。如图 2A 所示,与生理盐水(NS)对照组相比, Dox 心肌病组大鼠的心脏明显缩小,同时由图 2B 的 Masson 染色病理切片可以看到, Dox 引起大鼠心肌细胞排列紊乱以及心肌纤维化增加。TUNEL 染色法检测到 Dox 组心肌细胞核 DNA 断裂明显增加 [相当于 NS 组 ( $4.77 \pm 1.73$ ) 倍,  $t = 4.29, P = 0.0051, P < 0.01$ , 图 2C], 在电镜下可以观察到 Dox 使大鼠心脏组织的线粒体排列紊乱、肿胀并形成空泡(图 2D)。然后我们检测心脏组织的 LRP6 的转录和翻译水平在阿霉素刺激下是否发生变化,与细胞实验的结果一致, Dox 可以明显下调 LRP6 的 mRNA [相当于 NS 组 ( $0.53 \pm 0.25$ ) 倍,  $t = 2.67, P = 0.0441, P < 0.05$ , 图 2E] 和蛋白表达(图 2F)。



A, B: The gross hearts and Masson staining of heart tissues in two groups were shown. C: TUNEL staining (bar = 100  $\mu\text{m}$ ) was conducted to detect the DNA fragmentation of apoptotic cardiomyocytes. D: The structural changes of mitochondria (bar = 500 nm) were photographed by transmission electron microscopy. E, F: The mRNA and protein levels of LRP6 were analyzed by qPCR and Western blotting. Data were shown as mean  $\pm$  SD. 1)  $P < 0.05$  vs. NS group.  $n = 6$ .

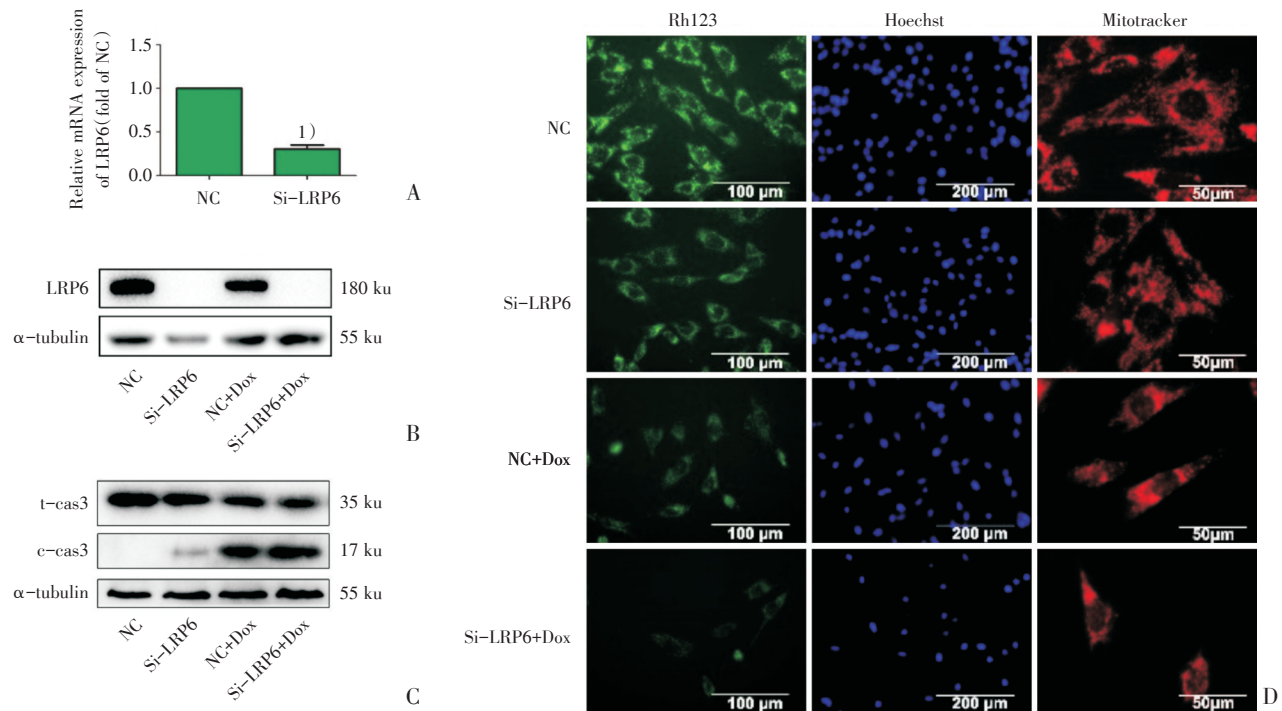
图2 动物模型中 Dox 下调 LRP6 的表达水平

Fig.2 The downregulation of LRP6 in doxorubicin-induced cardiomyopathy in vivo

### 2.3 敲低LRP6加重阿霉素引起的心肌细胞凋亡和线粒体损伤

为了探讨LRP6是否在阿霉素心肌病中发挥重要作用,我们通过瞬时转染靶向LRP6的siRNA进行干预实验。图3A、B的结果显示,转染siRNA 72 h成功敲低了LRP6的mRNA [相当于NC组

( $0.31 \pm 0.08$ )倍,  $t = 16.03$ ,  $P = 0.0039$ ,  $P < 0.01$ ]和蛋白表达。LRP6基因沉默可以导致心肌细胞凋亡和线粒体损伤,并且可以进一步加重Dox诱导的心肌损伤,包括增加凋亡相关蛋白c-caspase3/t-caspase3的表达(图3C),促进线粒体膜去极化、核固缩以及线粒体肿胀(图3D)。



A、B: The mRNA and protein expression of LRP6 were presented by qPCR and Western blotting. C: The change of c-cas3/t-cas3 was determined by Western blot analysis. D: Rh123 (bar = 100  $\mu\text{m}$ ), Hoechst (bar = 200  $\mu\text{m}$ ) and Mitotracker staining (bar = 50  $\mu\text{m}$ ) were used to measure  $\Delta\psi\text{m}$ , nuclear condensation and mitochondrial swelling. Data were shown as mean  $\pm$  SD. 1)  $P < 0.05$  vs. NC group.  $n = 3$ . (c-cas3: cleaved-caspase3, t-cas3: total-caspase3).

图3 LRP6在Dox诱导的心肌细胞凋亡和线粒体损伤中发挥重要作用。

Fig.3 The involvement of LRP6 in doxorubicin-induced cardiomyocyte apoptosis and mitochondria dysfunction

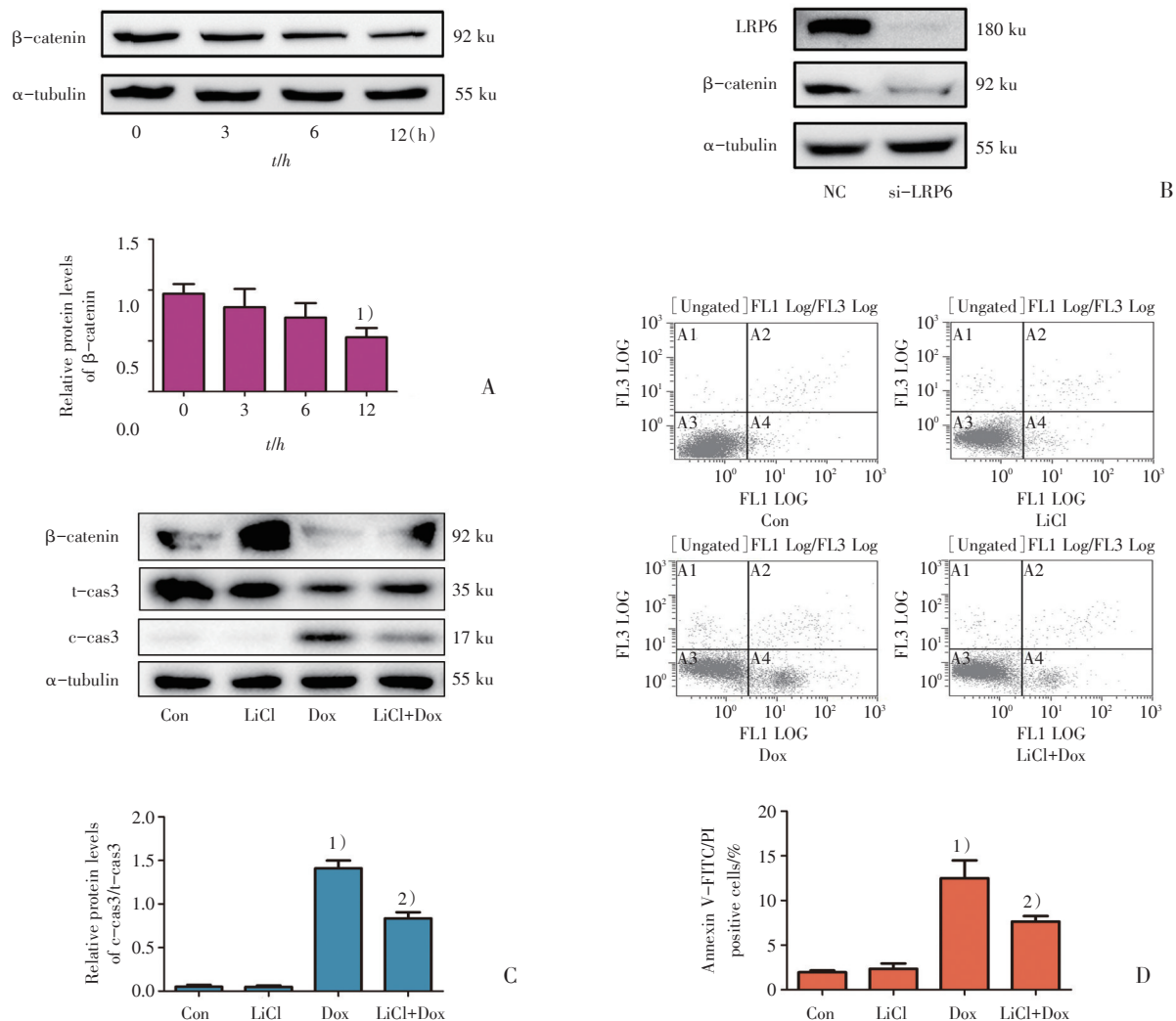
### 2.4 敲低LRP6下调 $\beta$ -catenin,激活 $\beta$ -catenin可以减轻阿霉素引起的心肌损伤

作为Wnt蛋白的共受体,LRP6的异常表达与经典Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的活化密切相关。由图4A的Western blot结果可以看到,在Dox的刺激下, $\beta$ -catenin的蛋白表达明显降低[相当于对照组( $0.56 \pm 0.39$ )倍,  $F = 2.98$ ,  $P = 0.0415$ ,  $P < 0.05$ ]。为了进一步探究LRP6和 $\beta$ -catenin以及阿霉素心肌病的关系,我们检测了LRP6基因沉默时 $\beta$ -catenin的表达变化。实验结果表明,敲低LRP6可以使 $\beta$ -catenin显著下调(图4B),而Dox诱导的心肌细胞凋亡[c-cas3/t-cas3、凋亡比率相当于对照组( $28.86 \pm 2.00$ )、( $6.38 \pm 2.03$ )倍]可以被特异性

激活剂LiCl激活 $\beta$ -catenin所逆转,包括减少切割型caspase3 [相当于对照组( $16.67 \pm 2.53$ )倍,  $F = 193.3$ ,  $P < 0.0001$ ,  $t = 8.87$ ,  $P < 0.001$  vs. Dox组,图4C]和下调心肌细胞凋亡比率[相当于对照组( $3.91 \pm 0.63$ )倍,  $F = 21.04$ ,  $P < 0.0001$ ,  $t = 3.15$ ,  $P < 0.05$  vs. Dox组,图4D],提示Dox通过下调LRP6抑制经典Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路,而激活Wnt信号对阿霉素心肌病起到保护作用。

## 3 讨论

阿霉素在临床上抗肿瘤的应用受严重的心脏毒副作用所限制<sup>[1]</sup>,其复杂的发病机制仍是研究



A, B: The changes of  $\beta$ -catenin were showed by Western blotting after Dox ( $1 \mu\text{mol/L}$ ) stimulation or siRNA transfection. C: Western blot analysis presented the changes of  $\beta$ -catenin and c-cas3/t-cas3 after 20 mmol/L LiCl treatment. D: The apoptosis ratio of H9C2 cells was measured by flow cytometric analysis. Data were shown as mean $\pm$ SD. 1)  $P < 0.05$  vs. control group; 2)  $P < 0.05$  vs. Dox group.  $n = 3$ . (c-cas3: cleaved-caspase3, t-cas3: total-caspase3).

#### 图4 敲低LRP6通过抑制经典Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路从而调控阿霉素心肌病

Fig.4 The function of LRP6 downregulation in doxorubicin cardiotoxicity by inhibiting canonical Wnt/ $\beta$ -catenin signaling

的热点<sup>[14-15]</sup>。目前尚未有很好的治疗手段,因此明确其心脏毒副作用机制以及寻找新的潜在靶点仍然非常重要。在本研究中,我们分别建立阿霉素心肌病的细胞和动物模型,发现 Dox 刺激下 LRP6 的 mRNA 和蛋白水平都出现了明显的下调。这些都提示 LRP6 可能影响阿霉素心肌病的病理进程。

LRP6 作为经典 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路的重要调控因子,其异常表达影响许多心血管疾病的病理进程<sup>[16]</sup>。有研究报道,LRP6 突变会抑制 Wnt

信号的传递,损伤内皮细胞并导致常脂性家族性冠状动脉疾病<sup>[7]</sup>。LRP6 基因沉默可以激活 Drp1 从而在糖饥饿的情况下抑制心肌细胞生长<sup>[17]</sup>。我们的研究发现,敲低 LRP6 会引起心肌细胞凋亡和线粒体损伤,并且可以进一步激活 Dox 诱导的线粒体凋亡信号通路的活化,从而加重心肌损伤。此外,已有研究表明激活  $\beta$ -catenin 可以对抗阿霉素引起的心肌衰老作用<sup>[18]</sup>,本实验也发现 Dox 和沉默 LRP6 均会引起  $\beta$ -catenin 的蛋白表达下降,特异性激活  $\beta$ -catenin 可以抑制阿霉素引起的心

肌细胞凋亡。这提示在Dox心肌病中,LRP6表达水平下调,抑制下游经典Wnt/ $\beta$ -catenin信号通路的活化,导致心肌细胞凋亡和线粒体损伤。

综上所述,本研究发现LRP6-Wnt/ $\beta$ -catenin信号轴在阿霉素引起的心脏毒性中发挥着重要的作用。我们推测,阿霉素的刺激使经典Wnt信号通路的关键辅助受体LRP6表达下调,抑制了

Wnt蛋白与Frizzled受体的正常结合以及胞内 $\beta$ -catenin的积累和转位入核,导致经典Wnt信号通路失调而引起心肌损伤。这不仅有利于我们进一步深入了解阿霉素心肌病的发病机制,也为预防和治疗临床上应用阿霉素引起的心脏毒副作用提供新策略。

#### 参考文献

- [1] Chatterjee K, Zhang J, Honbo N, et al. Doxorubicin cardiomyopathy [J]. *Cardiology*, 2010, 115(2): 155-162.
- [2] 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.
- [3] Takemura G and Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2007, 49(5): 330-352.
- [4] Zhou S, Starkov A, Froberg MK, et al. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin [J]. *Cancer Res*, 2001, 61(2): 771-777.
- [5] Gianni L, Herman EH, Lipshultz SE, et al. Anthracycline cardiotoxicity: from bench to bedside [J]. *J Clin Oncol*, 2008, 26(22): 3777-3784.
- [6] Nusse R, Clevers H. Wnt/ $\beta$ -catenin signaling, disease, and emerging therapeutic modalities [J]. *Cell*, 2017, 169(6): 985-999.
- [7] Guo J, Li Y, Ren YH, et al. Mutant LRP6 impairs endothelial cell functions associated with familial normolipidemic coronary artery disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2016, 17(7): 1173.
- [8] Zhidan C, Yang L, Ying W, et al. Cardiomyocyte-restricted low density lipoprotein receptor-related protein 6 (LRP6) deletion leads to lethal dilated cardiomyopathy partly through Drp1 signaling [J]. *Theranostics*, 2018, 8(3): 627-643.
- [9] Xu S, Cheng J, Chen YN, et al. The LRP6 rs2302685 polymorphism is associated with increased risk of myocardial infarction [J]. *Lipids Health Dis*, 2014, 13: 94.
- [10] Kahn M. Can we safely target the WNT pathway? [J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2014, 13(7): 513-532.
- [11] Foulquier S, Daskalopoulos EP, Lluri G, et al. WNT signaling in cardiac and vascular disease [J]. *Pharmacol Rev*, 2018, 70(1): 68-141.
- [12] Duan J, Gherghe C, Liu D, et al. Wnt1/ $\beta$  catenin injury response activates the epicardium and cardiac fibroblasts to promote cardiac repair [J]. *EMBO J*, 2012, 31(2): 429-442.
- [13] Dawson K, Aflaki M, Nattel S. Role of the Wnt-frizzled system in cardiac pathophysiology: a rapidly developing, poorly understood area with enormous potential [J]. *J Physiol*, 2013, 591(6): 1409-1432.
- [14] Mei SB, Hong L, Cai XY, et al. Oxidative stress injury in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Toxicology Letters*, 2019, 307: 41-48.
- [15] Du J, Hang P, Pan Y, et al. Inhibition of miR-23a attenuates doxorubicin-induced mitochondria-dependent cardiomyocyte apoptosis by targeting the PGC-1 $\alpha$ /Drp1 pathway [J]. *Toxicol Appl Pharm*, 2019, 369: 73-81.
- [16] Song L, Li Y, Wang K, et al. Cardiac neural crest and outflow tract defects in Lrp6 mutant mice [J]. *Dev Dynam*, 2010, 239(1): 200-210.
- [17] Chen Z, Li Y, Jiang G, et al. Knockdown of LRP6 activates Drp1 to inhibit survival of cardiomyocytes during glucose deprivation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 103: 1408-1414.
- [18] Xie ZD, Xia WZ and Hou M. Long intergenic non-coding RNA-p21 mediates cardiac senescence via the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway in doxorubicin-induced cardiotoxicity [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2): 2695-2704.

(编辑 孙慧兰)