

甘草素减轻大鼠离体心肌缺血再灌注损伤作用研究

张岩¹, 冯超², 韩吉春³, 陈萌^{4*}

¹ 齐河县人民医院, 德州 253000; ² 烟台山医院, 烟台 264003; ³ 中国药科大学, 南京 210009;

⁴ 烟台毓璜顶医院莱山分院, 烟台 264003

摘要: 研究甘草素的抗心肌缺血再灌注(I/R)损伤作用及其可能的作用机制。本研究通过 Langendorff 系统建立 SD 大鼠离体心肌 I/R 损伤模型, 并将实验分为 5 组: 正常组、模型组、低剂量甘草素预处理组(0.1 μg/mL)、中剂量甘草素预处理组(0.5 μg/mL)和高剂量甘草素预处理组(1.0 μg/mL)。利用生物多导记录仪连续测定血流动力学参数。通过 TTC 染色检测心肌梗死面积。并用 ELISA 法检测冠脉流出液中肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)的活力。ELISA 法检测心肌组织中超氧化物歧化酶(SOD)活性、丙二醛(MDA)含量、白介素 6(IL-6)和肿瘤坏死因子 α(TNF-α)的含量。利用 TUNEL 法检测心肌细胞凋亡。Western blot 检测心肌组织中 Bax 和 Bcl-2 的蛋白表达量。结果表明: 与正常组相比较, 模型组出现严重的心功能障碍和心肌梗死, 冠脉流出液中 LDH 和 CK 的含量也显著升高。并且模型组心肌组织中 MDA、IL-6 和 TNF-α 含量增加, SOD 的活性却显著降低。与此同时, 模型组心肌细胞发生严重的凋亡现象, 并且促凋亡蛋白(Bax)水平显著升高, 抑制凋亡蛋白(Bcl-2)水平显著下降。与模型组对比, 通过甘草素的预处理可以逆转这些 I/R 诱导的心肌损伤现象, 并且高剂量的效果最好, 呈现出一定的剂量依赖性。以上结果均表明, 甘草素具有显著的抗心肌缺血再灌注损伤作用, 其作用机制可能与其抗氧化、抗炎和抗凋亡作用相关。

关键词: 甘草素; 心脏保护; 抗氧化; 抗炎; 抗凋亡

中图分类号: R541.4

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2017.9.007

Protective Effect of Liquiritigenin Against Acute Ischemia/Reperfusion Induced Myocardial Injury in Isolated Rat Heart

ZHANG Yan¹, FENG Chao², HAN Ji-chun³, CHEN Meng^{4*}

¹ Qihe People's Hospital, Dezhou 253000, China; ² Yantai mountain hospital, Yantai 264003, China;

³ China Pharmaceutical University, Nanjing 210009, China;

⁴ Laishan Branch, Yantai Yuhuangding Hospital, Yantai 264003, China

Abstract: This study evaluated the cardioprotective effects of liquiritigenin on ischemia/reperfusion (I/R) injury using an isolated Langendorff rat heart model. Adult SD rats were randomly divided into five groups: control group, model group, low dose pretreatment group (0.1 μg/mL), middle dose pretreatment group (0.5 μg/mL) and high dose pretreatment group (1.0 μg/mL). The left ventricular developed pressure (LVDP) and the maximum up/down rate of the left ventricular pressure (dp/dtmax) were documented as the indices of myocardial function by a physiological recorder. TTC staining was performed to assess infarct size. Coronary effluent was analyzed for lactate dehydrogenase (LDH) and creatine kinase (CK) release to assess the degree of cardiac injury. Superoxide dismutase (SOD) activity and malondialdehyde (MDA) level were analyzed to determine the oxidative stress status of myocardial tissue. The levels of tumor necrosis factor-(TNF-) and interleukin-6 (IL-6) were analyzed to determine the inflammation status of myocardial tissue. Cardiomyocyte apoptosis analysis was performed using a TUNEL Kit. The proteins levels of Bax and Bcl-2 were measured by Western blot. The results showed that liquiritigenin (0.5 and 1.0 μg/mL) pretreatment decreased CK and LDH levels in coronary flow, and attenuated myocardial infarct size. This pretreatment with liquiritigenin also increased SOD activity, but decreased MDA, TNF-α and IL-6 activities. The cell apoptosis in the hearts from the liquiritigenin-treated

group were lower than those in the hearts from the model group. Meanwhile, the expression levels of bcl-2 expression was upregulated, the expression levels of bax was downregulated. Therefore, the cardioprotective effects of liquiritigenin may be

attributed to its antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptosis activities.

Key words: Liquiritigenin; cardioprotective; antioxidant; anti-inflammatory; anti-apoptosis

随着社会的快速发展和人们生活习惯的变化, 心血管疾病的发病率也逐步升高, 并且心血管疾病也已经成为引起死亡的主要疾病原因之一^[1]。心脏病是众多心血管疾病中最为常见的一种, 其中缺血性心脏病最为常见。现今的医学已经有了很大的进步, 在治疗心脏病上也取得了令人瞩目的成就, 如心脏移植手术和心脏搭桥手术都大大的提高心脏病患者的寿命和生活质量, 但是这些手术的过程中均存在一个严重的问题——缺血再灌注(I/R)损伤^[2]。目前很多研究均认为, 减轻 I/R 损伤, 是保证心脏移植和搭桥等手术成功的重要环节。I/R 损伤过程是十分复杂的, 目前研究均认为氧化应激和炎症反应均在 I/R 过程中扮演着重要的作用, 并很多研究也确实发现一些抗氧化和抗炎的化合物可以很好的减轻心肌 I/R 损伤, 如黄酮类化合物^[3]。

甘草素(Liquiritigenin)是甘草中的主要成分之一, 属于二氢黄酮类化合物, 并且具有很好的抗氧化作用^[4]。目前关于甘草素的药理研究主要是其抗肿瘤的生物学活性^[5,6], 关于甘草素在心血管疾病方面的药理活性也有报道, 如甘草素可以抑制人脐静脉内皮细胞增殖和迁移^[7]。但是关于甘草素在心肌 I/R 损伤上的药理活性尚未报道, 故本研究主要通过大鼠离体心肌 I/R 损伤模型, 探究甘草素的抗心肌 I/R 损伤的作用及其可能的作用机制。

1 材料与仪器

1.1 实验动物

成年雄性 SD 大鼠(SPF 级), 体重 260 ± 20 g, 购自济南市朋悦实验动物繁育有限公司, 实验动物生产许可证号: SCXK(鲁)2014-0006。

1.2 药品与试剂

甘草素由武汉天植生物技术有限公司提供; SOD、MDA、CK、LDH、IL-6、TNF- α 试剂盒均购自美国 Tsz Biosciences 公司; In Situ Cell Death Detection Kit, POD 试剂盒购自瑞士 Roche 公司。其他试剂为国产分析纯。

1.3 主要仪器

Langendorff 离体心脏灌流装置(成都泰盟软件有限公司); 多道生理仪(成都泰盟软件有限公司); 多功能酶标仪(上海智理科学仪器有限公司)。

2 实验方法

2.1 动物建模、分组与给药

采用本实验以往的 Langendorff 造模方法建造模型^[8,9]。将 50 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组: 正常组、模型组、甘草素低、中、高浓度(0.1、0.5、1.0 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 预处理组。模型组灌注 30 min 后, 停灌 20 min 后, 再灌注 45 min。正常组不停灌, 只灌注 KH 液 95 min。三个给药组先灌注 20 min 后开始灌注含药 KH 液 10 min, 停灌 20 min 后, 再灌注 45 min。

2.2 生物多导记录仪检测血流动力学参数

用生物多导记录仪检测再灌注 45 min 时各个血流动力学参数: 左室的发展压(LVDP)、左室压力最大升高/下降速率($\pm \text{dp}/\text{dtmax}$) 并且同时采用计滴器实时对冠脉流量(CF)进行记录。采用 Chart5 记录软件对采集的数据进行自动分析。

2.3 心肌梗死面积检测

参考本实验室以往的方法^[8,9], 通过 TTC 染色法检测各组心肌梗死面积。大体操作如下: 再灌注实验结束后, 用冷的 PBS 冲洗干净心脏, 将心脏急速冷冻后, 并将心脏切成数片相等的 1~2 mm 厚度的小薄片。将切好的薄片放入标记编号的容器内, 加入预先配制好的 1% TTC 染液, 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 的水浴锅内恒温避光反应 15~30 min。反应完成后, 取出心肌切片用冷 PBS 清除多余染料, 可见非梗死区域呈现砖红色, 梗死区域呈现灰白色。将完成染色的心肌切片置于 10% 福尔马林溶液中固定 24 h 左右, 然后取出, 擦拭干净, 放在合适的背景上, 用数码相机以固定焦距拍照, 采用平面面积求积法计算梗死面积。然后以坏死面积与占总面积的百分比衡量心肌的梗死程度。

梗死面积百分比 = (梗死区面积/心室区总面积) $\times 100\%$

2.4 检测冠脉流出液中 LDH 个 CK 的含量

收集各组离体心脏再灌注后 45 min 的冠脉流出液 1 mL, 测定前储存于 4 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱内, 以防止酶的降解(均当天完成检测)。所以操作均严格按照 LDH 和 CK 测试盒说明书(美国 Tsz Biosciences 公司)逐步进行相关操作。

2.5 心肌组织中 SOD、MDA、IL-6 和 TNF- α 含量的检测

停灌后,用冷 PBS 冲洗心脏,将心脏冷冻储存在 -80 °C 冰箱中,已备检测各项指标。将各组心肌组织制成 10% 的匀浆,严格按照 SOD、MDA、IL-6 和 TNF- α 试剂盒的说明,测量每 1 mg 大鼠心肌蛋白 SOD 的活性、MDA 的含量、IL-6 的含量和 TNF- α 水平。

2.6 免疫组化方法检测心肌细胞凋亡

根据 In Situ Cell Death Detection Kit,POD 试剂盒(罗氏公司,德国)的说明,检测心肌细胞凋亡。脱蜡和水化后,将切片用蛋白酶 K 处理 10 min。将载玻片浸入 TUNEL 反应混合物在 37 °C 下避光温育 60 min。在 37 °C 下,用 POD 反应液避光温育 30 min。以显示蓝色的核染色为正常细胞,棕色核染色为凋亡细胞(阳性细胞)。将载玻片用光学显微镜进行分析。心肌细胞凋亡指数(%)为 TUNEL 阳性细胞的细胞总数除以数的比率,并用于评价心脏的 TUNEL 染色的组织中的细胞凋亡指数。对于每个样品,随机选择八个区域进行计数,并且计算平均值。

2.7 Western blot

将蛋白样品加入 5 × 上样缓冲液后煮沸变性,每孔加入 30 μ g 蛋白,70 V 恒压电泳至溴酚蓝指示剂至分离胶浓缩胶分界处,转为 90 V 恒压电泳至指示剂接近凝胶的底部。将电泳完毕的凝胶按照从正极到负极依次为海绵垫-滤纸-膜-凝胶-滤纸-海绵垫的顺序夹好,250 mA 恒流转膜,冰浴,转膜时间 1 h。采用 5% 脱脂牛奶封闭 1 h 后,加入事先稀释过的一抗,在室温下孵育 1~2 h 或 4 °C 过夜,缓慢摇动。15 mL TBS/T 洗 3 次(5 min/次);加入合适稀释度

的碱性磷酸酶(AP)或辣根过氧化物酶(HRP)标记的二抗,室温孵育 1 h,缓慢摇动。15 mL TBS/T 洗 3 次(5 min/次)。采用 ECL 化学发光底物显色,UVP 化学发光成像系统获取图像信息,Image J 软件分析条带光密度值,目的蛋白与其对应的内参比较后,再于正常组比较得出相对表达量(%)。

2.8 统计处理

用统计学方法对所有实验数据进行处理,以 $\bar{x} \pm s$ 表示,采用 SPSS 10.0 软件进行方差分析,Origin 8.0 处理图片,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 甘草素对大鼠离体心脏功能和冠脉流出液中 CK 和 LDH 活性影响

如表 1 中所示,与正常组比较,模型组中心脏血流动力学系数(LVDP, $\pm dp/dt_{max}$ 和 CF)均有明显的下降,与正常组之间具有显著性差异($P < 0.01$)。通过甘草素预处理,我们发现三个剂量的甘草素均能升高心脏血流动力学系数,而且中剂量和高剂量的效果十分显著,与模型组之间具有显著性差异($P < 0.01$)。通过检测冠脉流出液中心肌同工酶(LDH 和 CK)的含量,我们发现,模型组冠脉流出液中 LDH 和 CK 的含量均显著升高,与正常组之间具有显著性差异($P < 0.01$)。通过中、高剂量甘草素的预处理,可以显著降低冠脉流出液中 CK 和 LDH 的含量($P < 0.01$)。通过观察各组大鼠心肌梗死面积(图 1),我们发现,模型组大鼠的心肌发生严重的梗死现象,与正常组之间具有显著性差异($P < 0.01$)。通过甘草素的治疗可以显著降低心肌梗死面积,并且中、高剂量甘草素降低心肌梗死面积的效果最好,与模型组之间具有显著性差异($P < 0.01$)。

表 1 甘草素对大鼠 I/R 心脏血流动力学系数和冠脉流出液中 LDH 和 CK 的影响($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Table 1 Effect of liquiritigenin on cardiac function, LDH levels and CK levels in rats subjected to I/R ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

组别 Group	血流动力学系数 Heart Hemodynamic Parameters (%)				心肌同工酶 Myocardial enzyme levels(U/L)	
	LVDP	+Dp/dt _{max}	-Dp/dt _{max}	CF	LDH	CK
正常组 Control	94.27 ± 5.85	93.49 ± 5.86	91.17 ± 6.94	93.41 ± 7.19	25.13 ± 1.30	36.18 ± 2.46
模型组 Model	55.23 ± 7.55 ^{##}	58.31 ± 4.86 ^{##}	59.45 ± 5.80 ^{##}	66.12 ± 2.53 ^{##}	121.48 ± 5.30 ^{##}	148.72 ± 6.53 ^{##}
低剂量 Low dose	61.23 ± 4.39	65.63 ± 5.90	67.26 ± 5.99	72.31 ± 5.79	110.49 ± 2.29	136.74 ± 2.02
中剂量 Middle dose	76.31 ± 4.01 ^{**}	78.28 ± 4.15 ^{**}	79.51 ± 4.11 ^{**}	79.78 ± 4.14 ^{**}	97.01 ± 2.35 ^{**}	104.12 ± 2.08 ^{**}
高剂量 High dose	84.50 ± 5.28 ^{**}	85.35 ± 4.65 ^{**}	85.76 ± 5.37 ^{**}	87.25 ± 5.64 ^{**}	77.72 ± 2.35 ^{**}	84.97 ± 2.08 ^{**}

注:与正常组相比,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$ 。

Note: compared with the control group,^{##} $P < 0.01$; compared with model group,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$.

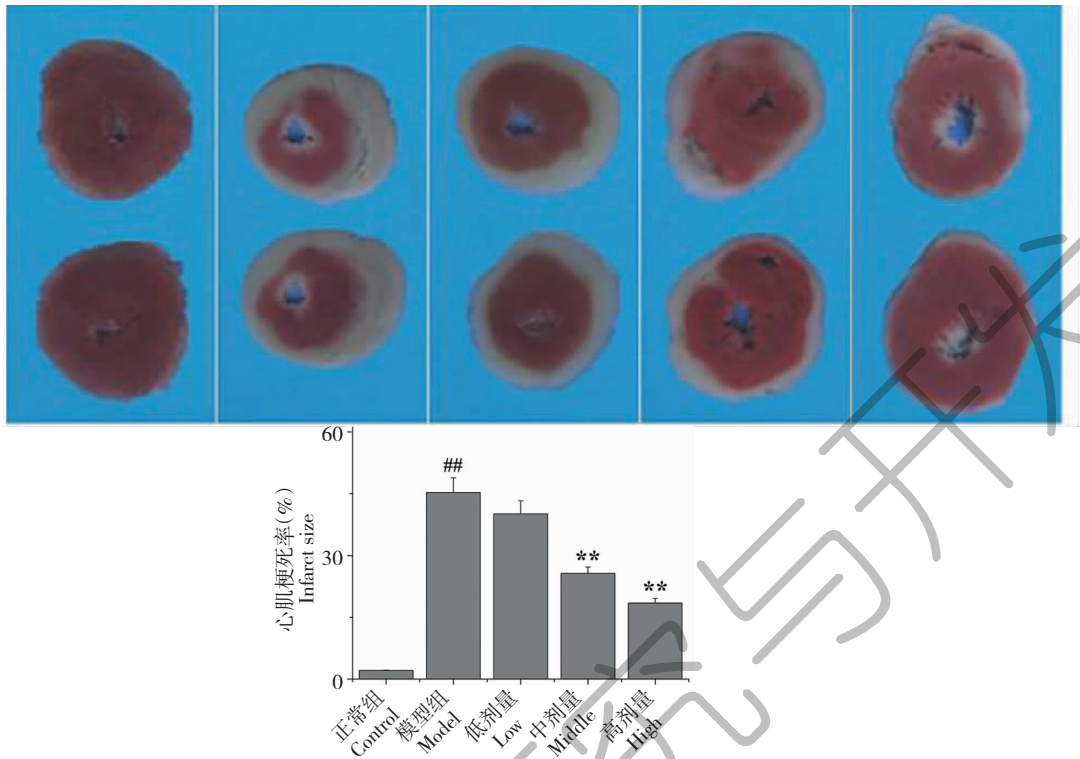


图 1 甘草素对大鼠 I/R 心肌梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Fig. 1 Effect of liquiritigenin on the reduction of I/R-induced infarct size ($\bar{x} \pm s, n=8$)

注:与正常组相比,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比,^{*} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$

Note:compared with the control group,^{##} $P < 0.01$;compared with model group,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$

3.2 甘草素对 I/R 心肌组织中氧化应激状态和炎症反应的影响

如表 2 所示,I/R 可以诱导心肌组织发生严重的氧化应激状态和炎症反应,主要表现为心肌组织中抗氧化酶(SOD)的活性显著降低,膜脂过氧化产物(MDA)和炎症因子(TNF- α 和 IL-6)的含量显著

性升高,与正常组之间具有显著性差异($P < 0.01$)。通过甘草素的预处理,我们发现,甘草素可以有效的逆转 I/R 诱导的这些反应,并且具有一定的剂量依赖性,其中中、高剂量甘草素的这种抗氧化和抗炎作用极为显著,与模型组之间具有显著性差异($P < 0.01$)。

表 2 甘草素对心肌组织中 SOD 活性、MDA 含量、IL-6 水平和 TNF- α 水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 2 Effect of liquiritigenin on the cardiac contents of MDA,SOD,IL-6 and TNF- α in rats subjected to I/R ($\bar{x} \pm s, n=8$)

组别 Group	SOD (U/mg. prot)	MDA (nmol/mg. prot)	IL-6 (pg/mL)	TNF- α (pg/mL)
正常组 Control	264.52 \pm 12.46	60.21 \pm 3.29	50.88 \pm 2.32	68.27 \pm 3.21
模型组 Model	134.97 \pm 8.23 ^{##}	161.54 \pm 7.34 ^{##}	180.02 \pm 9.02 ^{##}	205.65 \pm 10.83 ^{##}
低剂量 Low dose	152.56 \pm 8.93 [*]	149.87 \pm 6.36 [*]	167.43 \pm 8.06 [*]	181.89 \pm 9.87 [*]
中剂量 Middle dose	187.68 \pm 10.13 ^{**}	121.05 \pm 6.19 ^{**}	138.37 \pm 6.82 ^{**}	157.76 \pm 7.58 ^{**}
高剂量 High dose	227.68 \pm 11.23 ^{**}	95.05 \pm 4.97 ^{**}	108.37 \pm 4.82 ^{**}	127.76 \pm 5.65 ^{**}

注:与正常组相比,^{##} $P < 0.01$;与模型组相比,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$ 。

Note:compared with the control group,^{##} $P < 0.01$;compared with model group,^{**} $P < 0.01$,^{*} $P < 0.05$ 。

3.3 甘草素降低 I/R 诱导的心肌细胞凋亡率

通过 TUNEL 染色,观察甘草素对 I/R 诱导的心

肌细胞凋亡影响。如图 2 所示,正常组中心肌细胞几乎没有发生凋亡。与正常组比较,模型组出现显

著的心肌细胞凋亡。与模型组比较,低剂量甘草素可以轻微降低心肌细胞凋亡率,但是与模型组之间没有显著性差异;中剂量和高剂量甘草素均能显

著降低心肌细胞凋亡率,与模型组之间均有显著性差异($P < 0.01$),而且高剂量的效果更好。

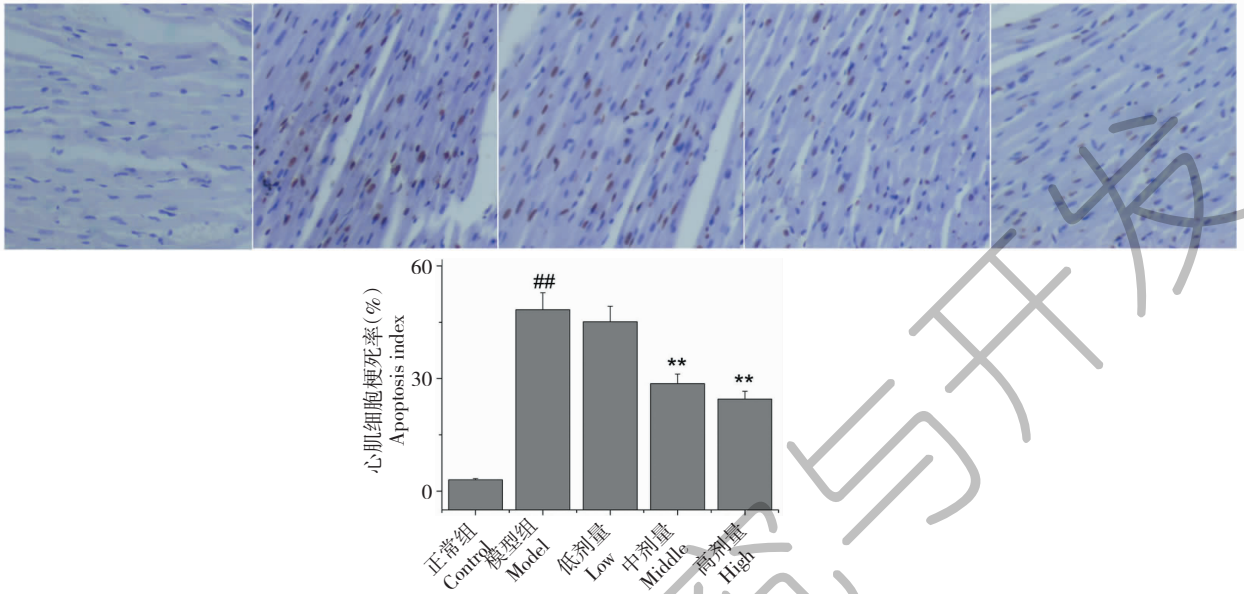


图2 甘草素对心肌凋亡的影响

Fig. 2 Effects of liquiritigenin suppression on cardiomyocyte apoptosis

注:与正常组相比,## $P < 0.01$,# $P < 0.05$;与模型组相比,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$

Note:compared with the control group,## $P < 0.01$,# $P < 0.05$;compared with model group,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$

3.4 甘草素对心肌组织中 Bax 和 Bcl-2 蛋白表达的影响

本研究发现甘草素可以降低 I/R 诱导的心肌细

胞凋亡率,故我们检测与凋亡相关的蛋白(Bax 和 Bcl-2)表达量变化。如图3所示,与正常组比较,模型组心肌组织中的促凋亡蛋白(Bax)的表达量显著

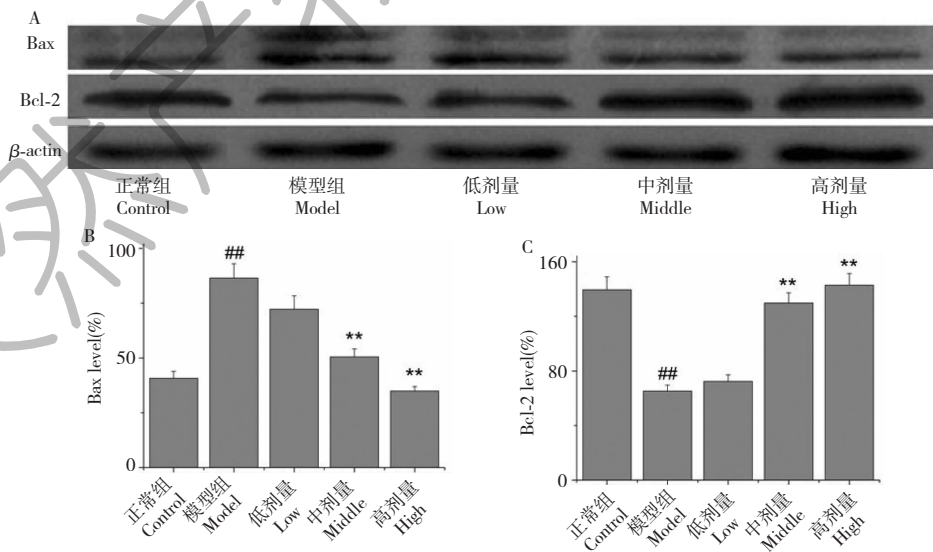


图3 心肌组织中 Bax 和 Bcl-2 的蛋白表达变化

Fig. 3 Effect of liquiritigenin on Bax and Bcl-2 protein levels in rat myocardial tissue

注:与正常组相比,## $P < 0.01$,# $P < 0.05$;与模型组相比,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$

Note:compared with the control group,## $P < 0.01$,# $P < 0.05$;compared with model group,** $P < 0.01$,* $P < 0.05$

性升高($P < 0.01$),而抑制凋亡蛋白(Bcl-2)的表达量显著性降低($P < 0.01$)。通过甘草素的预处理,我们发现,中、高剂量甘草素可以显著的逆转 I/R 诱导的这些变化,并且高剂量的效果要优于中剂量。

4 讨论

心肌 I/R 损伤的主要表现是心脏功能障碍和心肌梗死等现象^[10]。并且 I/R 可以诱导心肌细胞发生损伤,致使心肌细胞膜的通透性变大,从而使大量的心肌同工酶释(如 LDH 和 CK)放到血液中^[11]。在本研究中,我们发现 I/R 诱导心脏出现功能障碍,并导致心肌细胞释放大量的心肌酶(主要是 LDH 和 CK),同时还诱导心肌发生严重的心肌梗死现象。然而甘草素可以显著改善血液动力学参数,提高心肌收缩力,降低 I/R 诱导的心肌同工酶的释放,并减轻心肌梗死面积,具有很好的抗心肌缺血再灌注损伤作用。

目前,大量的研究均已经表明 I/R 损伤过程中伴随着炎症反应和氧化应激的发生,会对心肌造成炎症的氧化性损伤和炎症性损伤^[12,13]。在本研究中,我们确实发现,I/R 可以诱导心肌组织发生氧化应激和炎症反应,主要表现为:降低 SOD 的活性,升高 MDA、IL-6 水平和 TNF- α 的含量。有趣的是,通过甘草素的预处理治疗可以显著减轻 I/R 诱导的这些现象,这表明,甘草素的心肌保护作用可能与其抗氧化和抗炎作用有关。

越来越多的研究发现,凋亡在心肌 I/R 损伤过程中也起着重要的作用^[14,15]。在本研究中,我们发现 I/R 可以诱导心肌细胞发生显著性的凋亡现象。而且通过检测心肌组织中与凋亡相关的蛋白,我们也发现,I/R 可以诱导心肌组织中促凋亡蛋白(Bax)水平显著升高,降低抑制凋亡蛋白(Bcl-2)水平。通过甘草素预处理,可以显著升高心肌组织中 Bcl-2 的蛋白表达量,降低 Bax 的蛋白表达量,并且显著性降低心肌细胞凋亡率。这表明,甘草素的心肌保护作用可能与其抗凋亡作用有关。

本研究结果表明:甘草素具有显著的抗心肌 I/R 损伤的作用。这种心肌保护作用主要表现在:减轻心肌梗死面积,降低心肌细胞凋亡率,减少心肌同工酶 LDH 和 CK 的释放,降低细胞炎症因子和氧化应激水平,并且升高 Bcl-2 水平,降低 Bax 蛋白表达量,恢复心脏功能。所以,甘草素对心脏保护作用可能与其抗氧化、抗细胞凋亡和抗炎作用有关。本研究对甘草素在心血管方面的作用值得做进一步的试

验和临床研究。

参考文献

- Salie R, Huisamen B, Lochner A. High carbohydrate and high fat diets protect the heart against ischaemia/reperfusion injury. *Cardiovasc Diabetol*, 2014, 13:109.
- Shahzad T, Kasseckert SA, Iraqi W, et al. Mechanisms involved in postconditioning protection of cardiomyocytes against acute reperfusion injury. *J Mol Cell Cardiol*, 2013, 58:209-216.
- Hou X, Han J, Yuan C, et al. Cardioprotective effects of total flavonoids extracted from Xinjiang sprig *Rosa rugosa* against acute ischemia/reperfusion-induced myocardial injury in isolated rat heart. *Cardiovasc Toxicol*, 2016, 16:54-66.
- Cui YR(崔誉蓉), Chen P(陈朋), Liu JH(刘军花), et al. Structure-activity relationship of four flavones from Radix Glycyrrhizae. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2010, 21:3041-3043.
- Shi H(石惠), Wu YC(吴雨晨), Yan S(严淑), et al. Inhibition of liquiritigenin on invasion and metastasis of BF16F10 melanoma cells and the related mechanism. *Acta Nutr Sin* (营养学报), 2014, 36:486-490.
- Hu K(胡昆), Yang ZH(杨泽华), Liu XH(刘显华), et al. Synthesis and antitumor activities of liquiritigenin. *Chin J Synth Chem* (合成化学), 2010, 18:513-516.
- Xie SR(谢思柔), Wang Y(王宇), Liu CW(刘长伟), et al. Studies on inhibition of liquiritigenin on human umbilical venous endothelial cell and its mechanism. *Acta Nutr Sin* (营养学报), 2011, 33:389-392.
- Han J, Wang D, Yu B, et al. Cardioprotection against ischemia/reperfusion by licochalcone B in isolated rat hearts. *Oxid Med Cell Longev*, 2014, 2014:134862.
- Chen M(陈萌), Han JC(韩吉春), Wang D(王东), et al. Improvement effects of baicalein against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats. *China Pharm* (中国药房), 2016, 27:23-26.
- Zhou M, Ren H, Han J, et al. Protective effects of kaempferol against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart via antioxidant activity and inhibition of glycogen synthase kinase- β . *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015:481405.
- Qu D, Han J, Ren H, et al. Cardioprotective effects of astragaloside against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016:8194690.
- Jian J, Xuan F, Qin F, et al. The antioxidant, anti-inflammatory and anti-apoptotic activities of the *Bauhinia championii* flavone are connected with protection against myocardial ischemia/reperfusion injury. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38:1365-1375.