

# 荭草花醇提物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用机制研究

刘 亭<sup>1</sup>, 吴 琼<sup>1,3</sup>, 刘香香<sup>1,3</sup>, 陆定艳<sup>1,3</sup>, 黄文炫<sup>1,3</sup>, 李月婷<sup>1</sup>, 李勇军<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>贵州医科大学 贵州省药物制剂重点实验室; <sup>2</sup>贵州医科大学 民族药与中药开发应用教育部工程研究中心, 贵阳 550004; <sup>3</sup>贵州医科大学 药学院, 贵州 贵阳 550025

**摘要:** 研究荭草花醇提物对 H9c2 心肌细胞氧化损伤的保护作用机制。采用 200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 H9c2 细胞 0.5 h, 建立 H9c2 细胞氧化损伤模型。将细胞分为正常对照组、H9c2 细胞氧化损伤模型组、不同浓度荭草花醇提物(20、40、80 μg/mL)预处理组。采用 MTS 法检测细胞存活率; 生化试剂盒检测细胞乳酸脱氢酶(LDH)释放量, 细胞内丙二醛(MDA)含量及超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)活力; Western blot 测定 cleaved-caspase-3、Bcl-2、Bax、p-AKT 和 AKT 的表达。与模型组比较, 荭草花醇提物能明显增加心肌细胞存活率, 降低 LDH 释放量和 MDA 含量, 提高 SOD 及 CAT 活性, 并呈剂量依赖性抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的氧化应激损伤。荭草花醇提物下调 cleaved caspase-3 和 Bax 的蛋白水平, 上调 Bcl-2 的表达, 减少心肌细胞凋亡; 增加细胞中 p-AKT 的表达, 且这种表达可被 PI3Ks 抑制剂 LY294002 抵消。表明荭草花醇提物可减轻 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 H9c2 心肌细胞氧化应激损伤, 其机制可能与减少细胞凋亡, 平衡氧化应激产物有关, 且部分依赖于磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K/Akt)通路。

**关键词:** 荭草花醇提物; 氧化应激损伤; H9c2 心肌细胞; PI3K/Akt

中图分类号: R96

文献标识码: A

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2018.2.021

## Protective Effect of Flowers of *Polygonum orientale* Flower Ethanol Extract on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-induced Oxidative Stress Injury in H9c2 Cells

LIU Ting<sup>1</sup>, WU Qiong<sup>1,3</sup>, LIU Xiang-xiang<sup>1,3</sup>, LU Ding-yan<sup>1,3</sup>, HUANG Wen-xuan<sup>1</sup>, LI Yue-ting<sup>1</sup>, LI Yong-jun<sup>2\*</sup>

<sup>1</sup>Provincial Key Laboratory of Pharmaceutics in Guizhou Province, Guizhou Medical University;

<sup>2</sup>Engineering Research Center for the Development and Application of Ethnic Medicine and TCM, Ministry of Education, Guizhou Medical University, Guiyang 550004, Guizhou; <sup>3</sup>College of Pharmacy, Guizhou Medical University, Guiyang 550025, Guizhou

**Abstract:** To investigate the protective effect of *Polygonum orientale* Flower Ethanol Extract on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced Oxidative damage in H9c2 Cells. 200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> was used to induce the oxidative stress damage model in H9c2 cells for 0.5 h in vitro. The H9c2 cells were randomly divided into control group, the model group(200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) and the *Polygonum orientale* Flower ethanol Extract different groups(20, 40, 80 μg/mL). Cell viability was determined by MTS assay. The content of lactate dehydrogenase (LDH), malondialdehyde (MDA) and the activities of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT) were detected by biochemical kits. The protein levels of caspase-3, Bax, Bcl-2, p-AKT and AKT were detected by Western blot. Compared with model group, *Polygonum orientale* Flower Ethanol Extract pre-treatment improved cell viability and the activities of SOD and CAT in a dose-dependent manner, and attenuated leakage of LDH and content of MDA. *Polygonum orientale* Flower Ethanol Extract depressed myocardial apoptosis by down-regulating pro-apoptotic protein cleaved caspase-3 and Bax, up-regulating apoptosis inhibitory protein Bcl-2 and increasing the protein level of p-AKT. LY294002 could offset such an effect of *Polygonum orientale* Flower Ethanol Extract. In summary, *Polygonum orientale* Flower Ethanol Extract showed a protective effect on H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced injury in H9c2 cells. This

protection may result from inhibiting myocardial oxidative apoptosis, balancing the oxidative stress and maybe related with the PI3K/Akt signaling pathway.

**Key words:** *Polygonum orientale* Flower Ethanol Extract; oxidative stress injury; H9c2 cells; PI3K/Akt

收稿日期: 2017-10-11 接受日期: 2017-12-04

基金项目: 国家自然科学基金(81560630; 81760699); 贵州省科学技术厅人才团队项目(2016-5613-5677); 贵州省教育厅项目(2013-04)

\* 通信作者 Tel: 86-851-86908468; E-mail: 1838174671@qq.com

心血管疾病是一类严重威胁人类健康的常见病,具有发病率高,病死率高,并发症多等特点。由氧自由基增多引起的氧化应激与高血压、动脉粥样硬化、心肌缺血再灌注损伤、心肌病等心血管疾病密切相关<sup>[1]</sup>。荳草花为蓼科植物荳蓼的花序,又名狗尾巴花,水荳花,具有消积,止痛,行气活血的功效。课题组前期研究发现荳草花中含有黄酮、酚酸、生物碱等多种生物有效成分,具有明显的抗心肌缺血作用<sup>[2-6]</sup>。因此本研究利用过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)对大鼠心肌细胞(H9c2)进行氧化应激损伤,探讨荳草花预处理对H9c2心肌细胞氧化损伤的保护作用及可能的作用机制。

## 1 材料与仪器

### 1.1 细胞株

H9c2 大鼠心肌细胞株购自上海中科院细胞库。

### 1.2 药物与试剂

荳草花药材采自贵州省鹿关冲植物园,经贵州医科大学药用植物与生药学教研室龙庆德副教授鉴定为蓼科植物红蓼 *Polygonum orientale* 的干燥花序;高糖 DMEM 培养基、胎牛血清、胰蛋白酶(美国 Gibco 公司);磷酸盐缓冲液、BCA 蛋白定量试剂盒(北京索莱宝科技有限公司);乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、过氧化氢酶(CAT)试剂盒(南京建成生物工程研究所);CellTiter 96<sup>®</sup> Aqueous 单溶液细胞增殖检测试剂盒(上海普洛麦格生物技术有限公司);过氧化氢(成都金山化学试剂有限公司);PI3Ks 抑制剂 LY294002,二甲基亚砷 DMSO(美国 Sigma-Aldrich 公司); $\beta$ -actin、cleaved caspase-3、Bcl-2、Bax、Goat anti-Rabbit IgG、Goat anti-Mouse IgG 抗体(英国 abcam 公司);Akt、p-Akt(ImmunoWay Biotechnology 公司)。

### 1.3 主要仪器

二氧化碳细胞培养箱(Thermo,美国);TS110 型荧光显微镜(Nikon,日本);酶标仪(Bio-Rad,美国);小型垂直电泳系统(Bio-Rad,美国);蛋白转移系统(Bio-Rad,美国);高速冷冻离心机(Thermo,美国);凝胶成像仪(Syngene,英国)。

## 2 方法

### 2.1 荳草花醇提物的制备

荳草花提取工艺参照课题组前期方法<sup>[6]</sup>。荳

草花干燥花序经水提、醇沉后,水饱和正丁醇萃取 3 次,用 80% 乙醇溶解,溶液上聚酰胺柱,加 5 倍量 80% 乙醇进行洗脱,收集洗脱液,减压回收乙醇,残留物微波真空干燥得荳草花醇提取物,用于后续实验。

### 2.2 H9c2 细胞的培养

H9c2 细胞用含 10% 胎牛血清的高糖 DMEM 培养基培养于 37 °C、5% CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中。待细胞汇合至 85% 左右时进行传代,每 2~3 d 传一次。选择生长良好的细胞用于实验。

### 2.3 建立 H9c2 细胞氧化损伤模型

取对数生长期的 H9c2 细胞,以  $6 \times 10^4$  个/mL 接种于 96 孔板中,每孔 100  $\mu$ L。24 h 后,吸弃原培养液,设置正常对照组:加入 100  $\mu$ L 完全培养液;不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 浓度组:每组分别加入用完全培养液配置的、终浓度为 100,150,200,300,400  $\mu$ mol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 溶液,每组 6 个复孔。作用细胞 0.5 h 后,每孔 5  $\mu$ L MTS,继续孵育 3~4 h,酶标仪 490 nm 处测定各孔吸光度(A),计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{药物处理组}} / A_{\text{正常对照组}} \times 100\%$$

### 2.4 荳草花醇提物预处理对细胞活力的影响

H9c2 细胞按 2.3 的方法接种于 96 孔板中,培养 24 h 后加入 20,40,80  $\mu$ g/mL 荳草花醇提物预处理 24 h,加入 200  $\mu$ mol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 0.5 h 后,每孔 5  $\mu$ L MTS,继续孵育 3~4 h,酶标仪 490 nm 处测定各孔吸光度(A),计算细胞存活率。

### 2.5 生化指标检测

将各组细胞用 0.25% 胰酶消化收集,PBS 洗涤 2 次,超声粉碎得到细胞匀浆液。分别按检测试剂盒说明书步骤,检测细胞匀浆液中 MDA 含量,SOD、CAT 活力。分别收集各组细胞上清液,并按检测试剂盒说明书步骤,检测细胞上清液中 LDH 释放量。

### 2.6 Western blot 检测

cleaved caspase-3、Bax、Bcl-2、Akt 及 p-Akt 的蛋白水平各组细胞用预冷的 PBS 润洗 3 次,加入 RIPA 细胞快速裂解液(含蛋白酶抑制剂 PMSF),冰浴裂解细胞 10 min,离心收集上清液,BCA 试剂盒进行蛋白定量,蛋白变性后各组取等量总蛋白上样,经 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至 PVDF 膜,快速封闭液封闭 1 h,加入相应一抗,室温孵育 120 min,western 洗涤液洗膜 5 次,每次 5 min。加入二抗,室温孵育 120 min,western 洗涤液洗膜 5 次,每次 5 min,ECL 试剂盒曝光显色。凝胶成像系统拍照

保存, Quantity One 软件分析灰度值。

## 2.7 PI3Ks 抑制剂 LY294002 对荭草花醇提取物的 Akt 激活作用的影响

用 PI3Ks 抑制剂 LY294002 (LY) 来验证荭草花醇提取物的 Akt 激活作用, 实验分为正常对照组、模型组、LY + 模型组、LY + 醇提取物组、醇提取物组 (醇提取物浓度选择 80 μg/mL)。LY + 模型组、LY + 醇提取物组在造模前加入 25 μmol/L LY294002 预处理 20 min。各组细胞收集后, 用 Western blot 检测 Akt 及 P-Akt 的蛋白水平。

## 2.8 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计软件进行数据分析。所有数据以  $\bar{x} \pm s$  表示, 采用单因素方差分析进行组间比较, 以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 3 结果

### 3.1 不同浓度 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 H9c2 细胞存活率的影响

实验结果显示, 100 ~ 400 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 作用 H9c2 细胞 0.5 h 后, 可呈浓度依赖性地降低细胞存活率。200 μmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 可使 H9c2 细胞存活率下

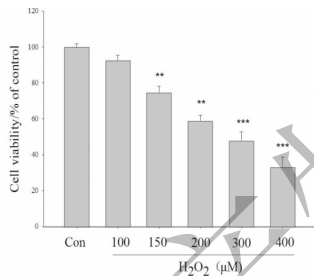


图1 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对 H9c2 心肌细胞存活率的影响

Fig. 1 Effects of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on H9c2 cells viability

注: 与正常对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

Note: Compared with control group, \*\*  $P < 0.01$ , \*\*\*  $P < 0.001$

表1 荭草花醇提取物对氧化损伤后 H9c2 细胞上清液中 LDH 释放量及细胞内 MDA、SOD、CAT 水平的影响 ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )  
Table 1 Effect of Polygonum orientale Flower Ethanol Extract on LDH, MDA, SOD and CAT activity in HUVEC injured by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> ( $n = 3, \bar{x} \pm s$ )

组别 Group	剂量 (μg/mL)	LDH (U/L)	MDA (nmol/mg prot)	SOD (U/mg prot)	CAT (U/L)
正常对照组 Control group	-	213.23 ± 6.57	1.26 ± 0.29	32.64 ± 2.11	8.16 ± 0.32
模型组 Model group	-	315.17 ± 10.38 <sup>###</sup>	6.73 ± 0.66 <sup>###</sup>	16.24 ± 1.46 <sup>###</sup>	2.98 ± 0.45 <sup>###</sup>
荭草花醇提取物组 the Polygonum orientale Flower ethanol Extract group	20	287.10 ± 8.65 <sup>*</sup>	5.52 ± 0.35 <sup>*</sup>	20.18 ± 2.37 <sup>*</sup>	3.86 ± 0.31 <sup>*</sup>
	40	212.62 ± 7.28 <sup>**</sup>	3.78 ± 0.35 <sup>**</sup>	23.52 ± 2.66 <sup>**</sup>	5.53 ± 0.52 <sup>**</sup>
	80	177.13 ± 5.32 <sup>***</sup>	2.64 ± 0.34 <sup>***</sup>	26.12 ± 2.32 <sup>***</sup>	6.75 ± 0.50 <sup>***</sup>

注: 与正常对照组比较, <sup>###</sup>  $P < 0.001$ ; 与模型组比较, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup>  $P < 0.001$ 。

Note: Compared with control group, <sup>###</sup>  $P < 0.001$ ; Compared with model group, <sup>\*</sup>  $P < 0.05$ , <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup>  $P < 0.001$ 。

降至 55 ~ 60% ( $P < 0.01$ ), 降低程度适中, 重复性好, 因此确定 200 μmol/L 的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 建立氧化应激损伤模型。

### 3.2 荭草花醇提取物预处理对氧化损伤 H9c2 细胞存活率的影响

与模型组比较, H9c2 细胞经 20 ~ 80 μg/mL 荭草花醇提取物预处理, 细胞存活率显著上升 ( $P < 0.01$ ), 见图 2。

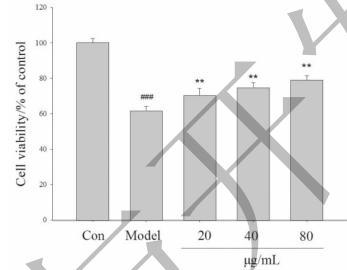


图2 荭草花醇提取物预处理对氧化损伤后 H9c2 细胞存活率的影响

Fig. 2 Survival rate of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> induced H9c2 cells with different concentrations of Polygonum orientale Flower Ethanol Extract

注: 与正常对照组比较, <sup>###</sup>  $P < 0.001$ ; 与模型组比较, <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$

Note: Compared with control group, <sup>###</sup>  $P < 0.001$ ; Compared with model group, <sup>\*\*</sup>  $P < 0.01$

### 3.3 荭草花醇提取物对氧化损伤 H9c2 细胞上清液中 LDH 释放量及细胞内 MDA 含量和 SOD、CAT 活性的影响

由表 1 结果可见, 与正常对照组相比, 模型组较 LDH 释放量和 MDA 含量明显增多 ( $P < 0.001$ ), SOD 和 CAT 活力显著降低; 与模型组相比, 给予荭草花醇提取物预处理后, LDH 释放量和 MDA 含量明显减少 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), SOD 和 CAT 活力显著升高, 且呈一定的剂量依赖性。

### 3.4 荜草花醇提取物下调 cleaved caspase-3 蛋白水平, 升高 Bcl-2/Bax 比值及 p-AKT/AKT 比值

与正常对照组比较, 模型组 cleaved caspase-3 蛋白水平明显升高, Bcl-2/Bax 及 p-AKT/AKT 比值明显降低 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ); 与模型组比较, 荜草花醇提取物能降低 cleaved caspase-3 蛋白水平 ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 升高 Bcl-2/Bax 及 p-AKT/AKT 比值 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 见图 3。与模型组比较, 荜草花醇提取物能明显升高 p-AKT/AKT 比值 ( $P < 0.01$ )。加入 LY294002 抑制剂后使得 p-AKT/AKT 比值降低 ( $P < 0.01$ ), 见图 4。

## 4 讨论

氧化应激 (oxidative stress, OS) 作为心血管疾病发生的机制之一, 直接或间接参与心力衰竭、高血压、动脉粥样硬化等多种心血管疾病的发生、发展过程。当机体处于氧化应激状态时, 体内氧化系统和抗氧化系统失衡, 导致组织损伤, 引发各种疾病。OS 的标志物包括如: 阴离子 ( $O_2^{\cdot -}$ )、羟自由基 (OH)

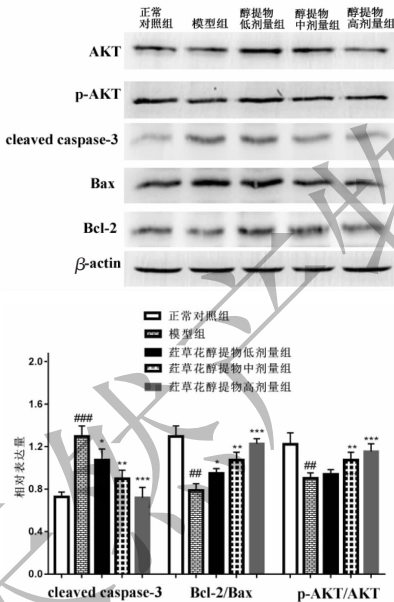


图 3 荜草花醇提取物对氧化损伤后 H9c2 心肌细胞中 cleaved caspase-3 蛋白水平及 Bcl-2/Bax、p-AKT/AKT 比值的影响

Fig. 3 Effects of flowers of Polygonum orientale Flower Ethanol Extract on levels of cleaved caspase-3, Bcl-2/Bax and p-AKT/AKT during oxidative damage

注: 与正常对照组比较,  $^{###} P < 0.01$ ,  $^{####} P < 0.001$ ; 与模型组比较,  $^* P < 0.05$ ,  $^{**} P < 0.01$ ,  $^{***} P < 0.001$

Note: Compared with control group,  $^{###} P < 0.01$ ,  $^{####} P < 0.001$ ; Compared with model group,  $^* P < 0.05$ ,  $^{**} P < 0.01$ ,  $^{***} P < 0.001$

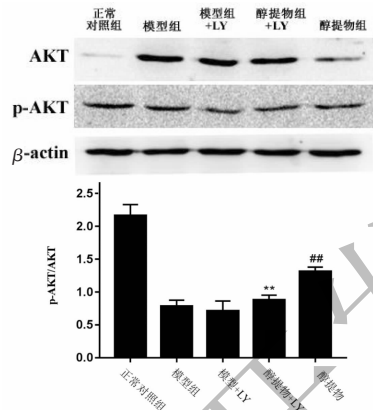


图 4 荜草花醇提取物及 LY294002 对氧化损伤后 H9c2 细胞中 AKT、p-AKT 蛋白水平的影响

Fig. 4 Effects of flowers of Polygonum orientale Flower Ethanol Extract and LY294002 on AKT, p-AKT protein levels of H9c2 cells during oxidative damage

注: 与模型组比较,  $^{###} P < 0.01$ ; 与醇提取物组比较,  $^{**} P < 0.01$

Note: Compared with model group,  $^{###} P < 0.01$ ; Compared with Ethanol Extract group,  $^{**} P < 0.01$

和过氧化氢 ( $H_2O_2$ ) 等活性氧自由基 (ROS)<sup>[7]</sup>。 $H_2O_2$  是一种重要的 ROS, 极易透过细胞膜, 导致一系列反应, 由于其易于获得且性质相对稳定, 现已成为研究细胞氧化损伤的重要工具。

实验结果显示, 与正常组比较, 模型组的 LDH 释放量与 MDA 的含量明显升高, 均有显著差异, 提示氧化应激导致心肌损伤时, 产生大量自由基, 造成心肌细胞膜脂质过氧化, 心肌氧化磷酸化过程障碍, 心肌受到损害。同时观察到 SOD、CAT 活性降低, 表明过氧化氢引起心肌细胞损伤后, 难以清除活性氧, 心肌细胞氧化与抗氧化失衡<sup>[8]</sup>。给药后, SOD 和 CAT 活力升高, 心肌抗氧化能力提高。

Bcl-2 是细胞凋亡过程中的一类调节因子, 包含促进和抑制细胞凋亡两类功能相反的基因。Bcl-2/Bax 的比值在细胞接受凋亡信号刺激后是否发生凋亡起着关键性作用, 这种比例的变化部分是由于特定的蛋白间竞争性的二聚化作用<sup>[9]</sup>。Bax 是 Bcl-2 家族的促凋亡蛋白, 细胞受到损伤时, 位于胞质中的 Bax 通过作用于线粒体通透性转换孔, 增加线粒体通透性, 位于膜间隙的线粒体促凋亡蛋白如 Cyto C 释放到胞质中, 引发促使细胞凋亡的 caspases 级联反应<sup>[10]</sup>。caspase-3 是最重要的凋亡执行者之一, 在凋亡的执行阶段, 负责对全部或部分关键性蛋白的酶切, 凋亡早期 caspase-3 活化 (active caspase-3), 裂

解相应胞质核底物,切割核小体间的 DNA,引起细胞凋亡。caspase-3 一旦被激活,细胞凋亡的发生将不可逆转。

Western blot 实验结果显示,荳草花醇提物预处理能够下调氧化应激环境下 H9c2 心肌细胞促凋亡蛋白 Bax 和 cleaved caspase-3 的蛋白水平,上调 Bcl-2/Bax 的比值,起到抗心肌细胞凋亡作用。

PI3K/Akt 信号通路是细胞内重要的信号转导通路,在调控心肌细胞的生存和凋亡过程中发挥着重要作用。Akt 是 PI3K 下游重要的靶蛋白,可经 PI3K/Akt 信号途径的磷酸化作用生成 p-Akt 而被激活,抵抗心肌细胞的氧化应激损伤<sup>[11]</sup>。Western Blot 结果显示 H9c2 细胞经 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理后,Akt 磷酸化水平明显降低。而荳草花醇提物预处理后可以显著升高氧化应激损伤后的 Akt 磷酸化水平,且这种上调作用可以被 PI3K 抑制剂 LY294002 所阻断。因此我们推测荳草花醇提物的保护作用可能部分依赖于 PI3K/Akt 通路来抑制 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡。

综上所述,荳草花醇提物对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 诱导 H9c2 心肌细胞氧化损伤具有保护作用,其作用机制可能与 PI3K/Akt 通路相关,但其确切的作用机制尚需进一步研究。

#### 参考文献

- 1 Bai YT (白玉婷), Zhou BL (周白丽). Progress of Studies on the Correlation between Oxidation Stress and Cardiovascular Diseases [J]. *Med Recapitulate* (医学综述), 2012, 18: 192-194.
- 2 Li YT (李月婷), Hu J (胡杰), Xie YM (谢玉敏), et al. Protective Effect of Polygonum orientale Flower Extract with Different Preparation Methods on Acute Myocardial Ischemia in Mongrel Dogs [J]. *Chin Med Mat* (中药材), 2015, 38:

- 115-118.
- 3 Li YJ (李勇军), He X (何迅), Liu ZB (刘志宝), et al. Chemical constituents of flowers from *Polygonum orientale* [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2009, 34: 2613-2615.
- 4 Wang AM (王爱民), Yan Y (鄢艳), Zheng L (郑林), et al. Simultaneous determination of seven compounds in flowers of *Polygonum Orientale* by ultra performance liquid chromatography coupled with photo diode array detection [J]. *Chin J Chin Mater Med* (中国中药杂志), 2011, 36: 3141-3145.
- 5 Li YJ (李勇军), He X (何迅), Liu ZB (刘志宝), et al. Chemical constituents of Flowers of *Polygonum orientale* [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res* (时珍国医国药), 2010, 21: 14-15.
- 6 Xiang WY (向文英), Mei CY (梅朝叶), Sun HY (孙慧园), et al. Identification of effective substances from Polygonum orientale flower extract in H9c2 Myocardial Cells by UHPLC-Q-TOF-MS [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2017, 23: 90-95.
- 7 Ye JX (叶锦霞), Liang RX (梁日欣), Wang L (王岚). Progress of studies on the oxidative stress in cardiovascular diseases [J]. *Chin J Exp Tradit Med Form* (中国实验方剂学杂志), 2008, 14: 68-70.
- 8 Murray TV, Ahmad A, Brewer A C. Reactive oxygen at the heart of metabolism [J]. *Trends Cardiovasc Med*, 2014, 24: 113-20.
- 9 Galluzzi L, Blomgren K, Kroemer G. Mitochondrial membrane permeabilization in neuronal injury [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2009, 10: 481-494.
- 10 Zou XF (邹循锋), Yan YH (鄢业鸿). Study progress of mitochondria or cytochrome C-mediated apoptosis pathway [J]. *Med Recapitulate* (医学综述), 2007, (01): 16-19.
- 11 Zhu MX (朱美霞), Hao XL (郝旭亮). Progresses on Correlation of PI3K/Akt with mitochondrial apoptosis-related factors. *Life Sci Res* (生命科学研究), 2015, 19: 432-436.