

芜菁中性多糖对 PC12 细胞氧化损伤保护作用机制的初步研究

海力茜·陶尔大洪^{1*}, 李欢欢², 任国瑞¹, 顾园村¹, 王小静^{3*}¹新疆医科大学药学院; ²新疆医科大学第五附属医院, 乌鲁木齐 830011; ³新疆师范大学生命科学学院, 乌鲁木齐 830000

摘要:以 H₂O₂ 诱导 PC12 细胞建立氧化损伤模型, 研究芜菁中性多糖 (neutral polysaccharide from *Brassica rapa* L., BRNP) 对 PC12 细胞氧化损伤保护及初步作用机制。采用 CCK-8 法检测细胞存活率; 乳酸脱氢酶 (LDH) 检测 H₂O₂ 对 PC12 细胞氧化损伤的保护作用; JC-1 法检测 BRNP 对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞线粒体膜电位的影响; Western blot 法检测 BRNP 对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白表达水平。结果表明, BRNP 对 PC12 细胞无明显细胞毒性; H₂O₂ 的造模浓度和时间分别为 300 μmol/L、4 h; BRNP 在一定程度上可减轻 H₂O₂ 对 PC12 细胞的氧化损伤; BRNP 可降低 H₂O₂ 对 PC12 细胞线粒体膜电位的损伤; 以不同剂量 BRNP 干预 PC12 细胞后, Bax、Caspase-3 蛋白表达水平均有显著降低 ($P < 0.05$); 而 Bcl-2 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05$)。综上所述, BRNP 能够改善 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞氧化应激损伤及保护其细胞功能, 其作用机制可能与抑制细胞内 LDH 生成、提高抗氧化酶活性及其凋亡蛋白表达水平有关。

关键词: 芜菁中性多糖; 抗衰老; 氧化应激; 凋亡

中图分类号: R961.1

文献标识码: A

文章编号: 1001-6880(2023)5-0852-06

DOI: 10.16333/j.1001-6880.2023.5.013

Preliminary study on the protective mechanism of neutral polysaccharide from *Brassica rapa* L. on oxidative damage in PC12 cells

HAILIQIAN Tao-er-da-hong^{1*}, LI Huan-huan², REN Guo-rui¹, GU Yuan-cun¹, WANG Xiao-jing^{3*}¹College of Pharmacy, Xinjiang Medical University; ²The Fifth Affiliated Hospital, Xinjiang Medical University, Urumqi 830011, China;³School of Life Sciences, Xinjiang Normal University, Urumqi 830000, China

Abstract: The oxidative damage model of PC12 cells induced by H₂O₂ was established to study the protective effect of neutral polysaccharide from *Brassica rapa* L. (BRNP) on oxidative damage of PC12 cells and its primary mechanism. Cell survival rate was detected by CCK-8 method. Lactate dehydrogenase (LDH) was used to detect the protective effect of H₂O₂ on oxidative damage of PC12 cells. The effect of BRNP on mitochondrial membrane potential induced by H₂O₂ in PC12 cells was detected by JC-1 method. The expression levels of Bax, Bcl-2 and Caspase-3 in H₂O₂-induced PC12 cells were detected by Western blot. The results showed that BRNP had no obvious cytotoxicity to PC12 cells. The molding concentration and time of H₂O₂ were 300 μmol/L and 4 h, respectively. BRNP can alleviate the oxidative damage of PC12 cells induced by H₂O₂ to a certain extent. BRNP can reduce the damage of H₂O₂ on mitochondrial membrane potential of PC12 cells. The expression levels of Bax and Caspase-3 protein were significantly decreased after different doses of BRNP intervention in PC12 cells ($P < 0.05$). The expression level of Bcl-2 protein was significantly increased ($P < 0.05$). In conclusion, BRNP can improve the H₂O₂-induced oxidative stress damage of PC12 cells and protect their cell function, and its mechanism may be related to inhibiting the production of LDH in cells, increasing the activity of antioxidant enzymes and the expression level of apoptotic proteins.

Key words: neutral polysaccharide from *Brassica rapa* L.; anti-aging; oxidative stress; apoptosis

收稿日期: 2022-07-04 接受日期: 2023-03-22

基金项目: 国家自然科学基金(81960765); 新疆特殊环境物种保护与调控生物学重点实验室招标课题项目(XJDX1414-2018-02)

* 通信作者 Tel: 86-991-2110356; E-mail: hailiqian2471@sina.com, wxjdy@163.com

芜菁 (*Brassica rapa* L.) 又名恰麻古、蔓菁, 属于十字花科 (Cruciferae) 芸薹属 (*Brassica*) 植物, 以块根入药, 营养丰富, 可以长期食用, 享有“长寿圣果”的美称^[1-3]。具有开胃消食、下气宽中、止咳平喘、利湿解毒等功效^[4]。近代药理学研究发现, 芜菁具有

降血糖^[5]、抗氧化^[6]、抗衰老^[7]、抗肿瘤^[8,9]、调节免疫力^[10]、抗炎^[11]等药理活性。课题组在前期研究中,测得芜菁多糖含量约为 11.53%^[12],对其脱脂、脱色纯化后得到水溶性良好的芜菁多糖 BRP^[13],将其进一步分离纯化得到芜菁中性多糖(neutral polysaccharide from *Brassica rapa* L., BRNP)和芜菁酸性多糖(acidic polysaccharides from *Brassica rapa* L., BRAP)并且结构已鉴定^[14,15]。初步实验已经证明芜菁多糖具有良好的抗氧化活性,该结论为芜菁多糖应用于抗氧化、抗衰老方面的研究奠定了实验基础。因此,本研究通过 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞建立细胞早衰模型来探讨 BRNP 对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞损伤后 Bax、Bcl-2 和 Caspase-3 蛋白的表达水平,进一步阐明 BRNP 的抗衰老作用机制。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验细胞系

PC12 细胞用 DMEM 高糖完全培养液(含 10% 胎牛血清和 1% 的双抗),在 CO₂ 浓度为 5%,温度为 37 ℃,100% 饱和温度的培养箱中培养。2 d 换液 1 次,至 70%~80% 融合度时进行传代消化。

1.1.2 试剂与仪器

CCK-8 试剂盒(Bioshap 公司,批号 BS350B);乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 A020-2-2);JC-1 试剂盒(碧云天公司,批号 A020-2-2);BCA 蛋白浓度检测试剂盒(Thermo,批号 A020-2-2);Bax(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,批号 E-AB-63606)、Bcl-2(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,批号 E-AB-22004)、Caspase-3(武汉伊莱瑞特生物科技有限公司,批号 E-AB-60646);无水乙醇、甲醇均为分析纯;酶标仪(Thermo,型号 MULTIGO);激光共聚焦显微镜(尼康,型号 C2);蛋白电泳仪(BIORAD,型号 PowerPac HC + Mini)。

1.2 实验方法

1.2.1 BRNP 对 PC12 细胞的影响

取对数期的 PC12 细胞以 1×10^5 个/mL,接种 96 孔板,其中 1 组为正常对照组(control, Con),1 组只含培养基作为空白调零组,其余组分别为 7.8、15.6、31.2、62.5、125、250、500、1000、2000 $\mu\text{g/mL}$ 的多糖药物干预组,作用 24 h 每孔加入 10 μL CCK-8 溶液,避光孵育 1 h,在 450 nm 检测各孔 OD 值。计算各组吸光度值的平均值,并按公式“细胞活力 = (给药组平均 OD 值 - 调零组平均 OD 值) / (对照

组平均 OD 值 - 调零组平均 OD 值) $\times 100\%$ ”计算细胞存活率,以 BRNP 浓度为横轴,细胞活力为纵轴绘制出曲线。

1.2.2 H₂O₂ 损伤 PC12 细胞模型的构建

取 PC12 细胞以 1×10^5 个/mL,接种于 96 孔板。设置正常对照组(control, Con)、模型组(Model, Mod)、调零组,模型组加入终浓度为 250、300、350、400、450 $\mu\text{mol/L}$ 的 H₂O₂ 稀释液 100 μL 每孔,培养 4 h 和 6 h。CCK-8 方法同“1.2.1”。

1.2.3 BRNP 对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞的影响

依据细胞建模实验所得到的结果,选用 300 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 溶液作用 PC12 细胞 4 h 建模。PC12 细胞以 1×10^5 个/mL,100 μL 接种到 96 孔板中。实验组每组分别加入(7.8~2000 $\mu\text{g/mL}$)的多糖预处理,24 h 后模型组组和实验组再加入 300 $\mu\text{mol/L}$ H₂O₂ 稀释液共同孵育 4 h 和 6 h,CCK-8 方法同“1.2.1”。

1.2.4 BRNP 对 PC12 细胞内乳酸脱氢酶(LDH)的影响

按“1.2.3”方法接种并药物干预 PC12 细胞并同法处理细胞后按照试剂盒说明书操作。

1.2.5 BRNP 对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞线粒体膜电位的影响

按“1.2.3”方法接种并药物干预 PC12 细胞并同法处理细胞后,以 2 mL 每孔铺于激光共聚焦专用 20 mm² 皿,分组为正常对照组(control, Con)、模型组(model, Mod)、实验组(BRNP),刺激凋亡后,按试剂盒说明书操作。

1.2.6 Western blot 法检测 PC12 细胞凋亡蛋白

按“1.2.4”方法接种 PC12 细胞并药物干预后提取细胞总蛋白。BCA 法测定蛋白浓度,蛋白测定后,吸取 10 μL 进行 SDS-PAGE 电泳,300 mA 电转 45 min,PVDF 膜室温封闭 1 h。依次加入一抗孵育过夜后转移到二抗孵育盒中孵育 1 h;洗膜后用增强化学发光法检测阳性信号,分析各电泳条带的性质。

1.2.7 统计方法

所有实验重复操作 3 次,实验数据用 SPSS20.0 软件进行统计学处理,结果以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。

2 实验结果

2.1 BRNP 对 PC12 细胞的影响

结果如图 1 所示,不同浓度 BRNP 预处理 PC12 细胞 24 h 后对细胞无明显毒性作用。与正常对照组相比,随着 BRNP 浓度的增加,细胞存活率未见明显变

化,差异无统计学意义($P > 0.05$)。因此不同浓度的 BRNP 预处理 24 h 对 PC12 细胞存活率的影响不大。

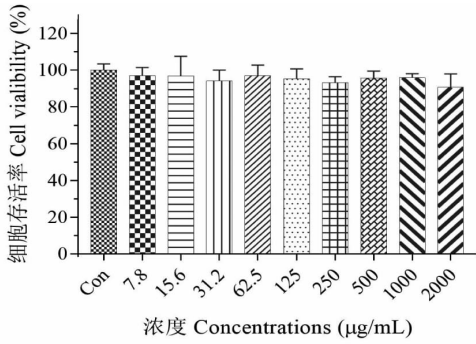


图1 不同浓度 BRNP 对 PC12 细胞的细胞毒性作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Cytotoxic effect of different concentrations of BRNP on PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with Con, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.2 H_2O_2 对 PC12 细胞活力的影响

结果如图 2 所示,给予 PC12 细胞不同剂量的 H_2O_2 分别处理 4 h 和 6 h 后细胞存活率显著下降,并呈剂量依赖性。当 H_2O_2 的浓度为 300 $\mu\text{mol/L}$ 处理 4 h 时细胞存活率约为 60%,且差异有统计学意义($P < 0.01$),此时细胞尚保留部分增殖和分化的能力,故选择 300 $\mu\text{mol/L}$ 作用 4 h 作为 PC12 细胞氧化损伤浓度。

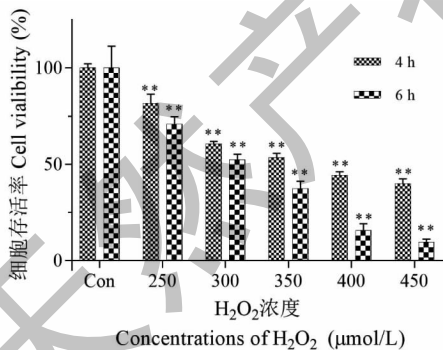


图2 不同浓度的 H_2O_2 处理 4 h 和 6 h 对 PC12 细胞活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of H_2O_2 on the viability of PC12 cells for 4 h and 6 h ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。Note: Compared with Con, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

2.3 BRNP 对 H_2O_2 诱导的 PC12 细胞的保护作用

结果如图 3 所示,与正常对照组相比, H_2O_2 显

著降低了 PC12 细胞的存活率($P < 0.01$)。在 BRNP 浓度为 62.5 ~ 500 $\mu\text{g/mL}$ 时,对 PC12 细胞具有较好的增殖作用($P < 0.01, P < 0.05$)。当 BRNP 浓度为 250 $\mu\text{g/mL}$ 时,细胞存活率达到最高为 84%,差异显著有统计学意义($P < 0.01$)。因此,在后续实验中 BRNP 分别以 62.5 $\mu\text{g/mL}$ (BRNP-L 组)、125 $\mu\text{g/mL}$ (BRNP-M 组)、250 $\mu\text{g/mL}$ (BRNP-H 组)作为预保护给药剂量。

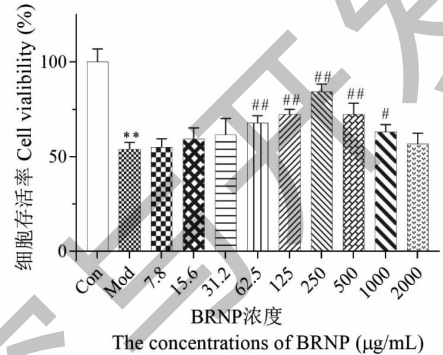


图3 BRNP 对 H_2O_2 诱导的 PC12 的保护作用 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 3 Protective effect of BRNP on PC12 induced by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

注:与正常对照组比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$;与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$,下同。Note: Compared with Con, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with Mod, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, the same below.

2.4 BRNP 对 PC12 细胞乳酸脱氢酶 (LDH) 的影响

结果如图 4 所示,与正常对照组相比,模型组细胞培养液中 LDH 明显升高,差异显著($P < 0.01$);与模型组相比,BRNP 明显降低 LDH 含量,有显著差异($P < 0.01$)。

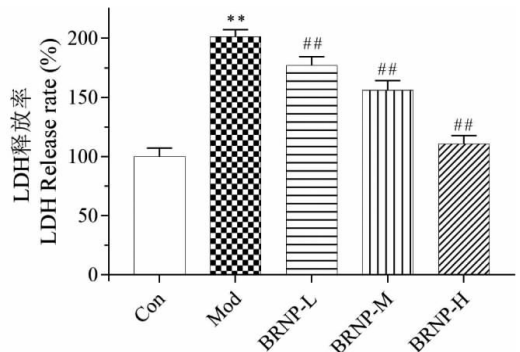


图4 BRNP 对 PC12 细胞中 LDH 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 4 The effect of BRNP on LDH content in PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.5 BRNP 对 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞线粒体膜电位的影响

如图 5 所示, 与正常对照组相比, 给予 H₂O₂ 处理, 细胞中红色荧光显著减少, 线粒体膜电位显著下降。与模型组相比, 预先给予的 BRNP 处理以后, 细胞的红色荧光显著增多, 线粒体膜电位显著上升。表明 BRNP 显著抑制 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞的早期凋亡而起到保护作用。

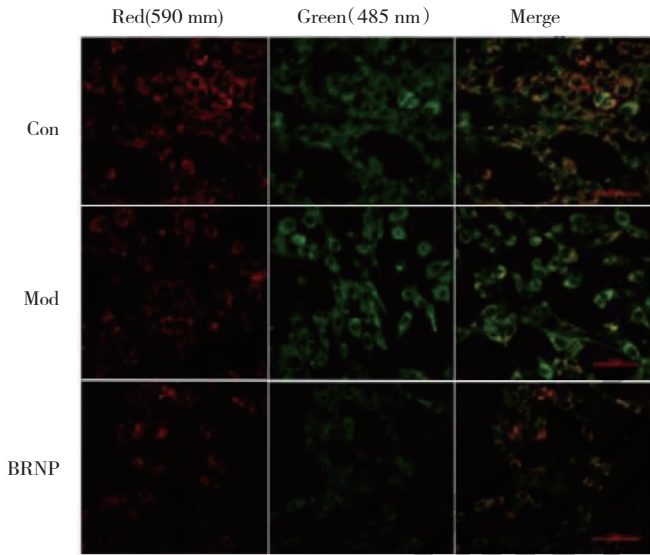


图 5 BRNP 对 PC12 细胞线粒体膜电位的影响

Fig. 5 Effect of BRNP on the mitochondrial membrane potential of PC12 cells

2.6 Western blot 法检测蛋白表达情况

通过 Western blot 检测各组 Bax、Bcl-2、Caspase-3 信号通路的表达, 分析 BRNP 保护氧化应激状态下 PC12 细胞功能的可能机制。如图 6、7 所示, H₂O₂ 处理后 PC12 细胞的 Bax、Caspase-3 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$), 而 Bcl-2 显著降低 ($P < 0.01$); 不同浓度的 BRNP 则可以下调 Bax、Caspase-3 并上调 Bcl-2 的水平 ($P < 0.05$), 提示 BRNP 可能通过调节 Bax、Caspase-3 和 Bcl-2 信号通路保护

PC12 细胞功能。

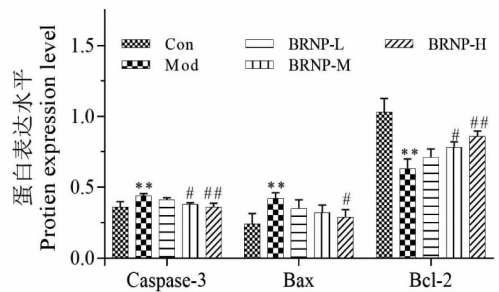


图 7 不同剂量芫菁中性多糖 BRNP 对

PC12 细胞内凋亡靶蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 7 Effect of different doses of BRNP on the expression of apoptosis target protein in PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

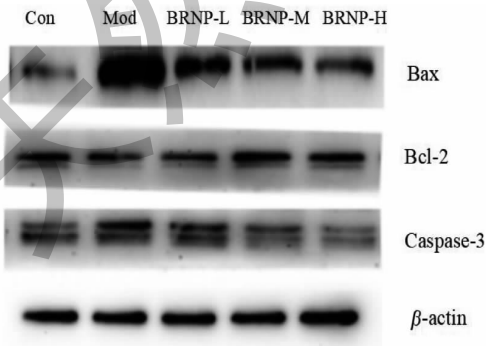


图 6 BRNP 对 PC12 细胞内凋亡靶蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 6 Effect of BRNP on the expression of apoptosis target protein in PC12 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

3 讨论与结论

H₂O₂ 是一种活性氧分子, 可以增加细胞内活性氧含量进而对细胞产生损伤作用, 广泛用于短时间内获得细胞衰老模型。细胞增殖活性是判断体外培养细胞在特定条件下能否正常增殖的重要指标。CCK-8 实验结果表明随着 H₂O₂ 浓度的增加 PC12 细胞存活率显著下降, 并呈剂量依赖性^[16]。当 300 μmol/L H₂O₂ 作用 4 h 时细胞存活率为 60.64%, 此时 PC12 细胞受到一定程度的损伤, 但尚未达到不

可逆转的状态。因此后续实验选择 300 $\mu\text{mol/L}$ 作用 4 h 作为 PC12 细胞氧化损伤的最佳浓度和最适时间。

为了验证 BRNP 是否对 PC12 细胞有细胞毒性作用,在没有 H_2O_2 损伤的情况下,单独使用 BRNP 处理 PC12 细胞。实验结果显示,在不同浓度(7.8 ~ 2 000 $\mu\text{g/mL}$) BRNP 处理后,PC12 细胞存活率无明显变化($P > 0.05$),此结果说明 BRNP 对 PC12 细胞活力无明显细胞毒性。本实验在研究 BRNP 对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤的影响时,结果显示,与 Model 组比较,随着 BRNP 浓度的增加,细胞存活率逐渐增加($P < 0.05$),当 BRNP 浓度达到 250 $\mu\text{g/mL}$ 时细胞存活率显著提高。基于实验结果说明,BRNP 对 H_2O_2 诱导 PC12 细胞损伤具有一定的保护作用。

乳酸脱氢酶(LDH)存在于细胞内,能催化丙酮酸生成乳酸,当细胞受损时 LDH 将大量释放,导致细胞外 LDH 水平的显著升高,其 LDH 释放量与损伤程度成正比,因此 LDH 漏出率能够反映细胞损伤程度^[15]。本实验结果提示 BRNP 可以预防或减缓细胞膜受损程度,阻止细胞内 LDH 外漏。

细胞内线粒体内膜两侧质子分布并不是均一的,这样的分布形成电化学梯度即线粒体膜电位。大量研究表明,任何凋亡诱导因素刺激细胞发生凋亡时,均会出现线粒体膜电位的下降,且这种膜电位下降早于细胞形态学改变。线粒体膜电位的大幅度下降将导致细胞进入不可逆的凋亡过程,故而线粒体膜电位的下降可被视为细胞凋亡早期的经典现象^[17,18]。目前研究已经证实线粒体功能障碍与衰老进程存在密切联系,如线粒体能量(MMP 和 ATP)供应不足可降低机体代谢能力,进而引起一系列衰老变化,其中线粒体膜电位的降低是细胞凋亡的特异性标志之一^[19]。研究结果显示, H_2O_2 处理后 PC12 细胞的线粒体膜电位显著降低,而 BRNP 预处理可阻止 H_2O_2 导致的膜电位降低。

凋亡是细胞程序性死亡过程,包括外源性的 Fas/FasL 介导的死亡受体途径以及内源性的线粒体途径和内质网途径,其中线粒体介导的内源性凋亡途径是哺乳动物细胞程序性死亡的主要途径^[20]。以 Bax 为代表促进凋亡蛋白和以 Bcl-2 为代表的抑制凋亡蛋白是调节线粒体凋亡因子释放的主要蛋白。Caspase 蛋白水解酶是哺乳动物体内关键的凋亡效应因子,其中 Caspase-3 是 Caspase 家族中激活

各种凋亡刺激因子的关键蛋白酶,被称为细胞凋亡重要的执行者^[21,22]。BRNP 作用被 H_2O_2 氧化损伤的 PC12 细胞中 Caspase-3 表达有一定程度的减少,可以推测 BRNP 可能降低了 Caspase-3 的表达量,减少细胞的凋亡,从而延缓机体衰老。氧化损伤的 PC12 细胞经 BRNP 干预后,Bcl-2 的表达量提高,Bax、Caspase-3 的表达量均有不同程度的减少。这些研究结果可以表明 BRNP 通过协助细胞抵御氧化应激对线粒体和 DNA 的损伤,降低细胞氧化损伤和提高机体抗氧化应激的调控能力。

参考文献

- 1 Wang WN. Study on nutrient composition analysis and improvement of intestinal microflora in mice [D]. Zhengzhou: Zhengzhou University(郑州大学),2018.
- 2 Huerxidan Y, Li YT, Hiliqian T. Optimization of protein extraction process and evaluation of protein antioxidant activity from Turnips by response surface methodology [J]. J Food Saf Qual(食品安全质量检测学报),2020,11:4482-4488.
- 3 Qiao LJ, Cheng YF, Ayixiaguli B, et al. Extraction, identification and content determination of *Brassica rapa* L. refined polysaccharides [J]. J Food Saf Qual(食品安全质量检测学报),2020,11:4115-4120.
- 4 Liu Z, Sheng PF. Advances in studies on the ancient active constituents of *Brassica rapa* L. and its antitumor mechanism in Xinjiang native plants [J]. Oncol Prog(癌症进展),2019,17:2361-2363.
- 5 Hairenguli · M, Zulipiyani A, Hailiqian T. Preliminary study on the hypoglycemic effect of neutral polysaccharide from *Brassica rapa* L. [J]. J Food Saf Qual(食品安全质量检测学报),2020,11:387-392.
- 6 Yao J, Wu Y, Hailiqian T, et al. Study on antioxidant activity of *Brassica rapa* L. polysaccharide *in vitro* [J]. West China J Pharm Sci(华西药学杂志),2014,29:606-607.
- 7 Li HH, Chen CL, Hailiqian T, et al. Antioxidant effect of turnip neutral polysaccharide on *D*-galactose-induced aging mice [J]. Food Sci Technol(食品科技),2021,46:168-172.
- 8 Chen ZE, Gunana D, Wu Y, et al. Study on the anti-tumor effect of aqueous extract from *Brassica rapa* L. [J]. Northwest Pharm J(西北药学杂志),2016,31:264-267.
- 9 Ayixiaguli B, Hu S, Chen L, et al. Study on the anti-Lewis lung cancer activity of *Brassica rapa* L. acid polysaccharide-2 *in vivo* [J]. J Food Saf Qual(食品安全质量检测学报),2019,10:5111-5116.
- 10 Reziyamu W, Li YH, Hailiqian T. Immunomodulatory effects of *Brassica rapa* L. polysaccharides on macrophage RAW

- 264.7 *in vivo*[J]. Nat Prod Res Dev(天然产物研究与开发),2018,30:15-20.
- 11 Reziyamu W, Bai J, Liu Z, et al. Biological activity of *Brassica rapa* L. polysaccharides on RAW 264.7 macrophages and on tumor cells[J]. Bioorg Med Chem, 2020, 1:115330.
- 12 Hou BL, Wang Q, Hailiqian T. Research on polysaccharide extraction and the content of *Brassica rapa* L. [J]. Lishizhen Med Mater Med Res(时珍国医国药), 2009, 20: 2759-2761.
- 13 Chen ZE, Li M, Wang XJ, et al. Study on decolorization process of macroporous adsorption resin of crude polysaccharides from Xinjiang *Brassica rapa* L. [J]. Appl Chem Ind(应用化工), 2017, 46:230-233.
- 14 Chen ZR. Study on the isolation, structural characterization and preliminary immunological activity of polysaccharides from *Brassica rapa* L. [D]. Urumqi: Xinjiang Medical University(新疆医科大学), 2017.
- 15 Chen ZE, Reziyamu W, Ji JH, et al. Structural characterization and immunostimulatory activity of polysaccharides from *Brassica rapa* L. [J]. Agric Food Chem, 2017, 65: 9685-9692.
- 16 Zhao Y, Qu W, Liu W, et al. YGS40, an active fraction of Yi-Gan San, reduces hydrogen peroxide-induced apoptosis in PC12 cells[J]. Chin J Nat Med, 2015, 13:438-444.
- 17 Emma PKY, Johannes RJ, Yu HX, et al. Mitochondrial respiration is reduced in atherosclerosis, promoting necrotic core formation and reducing relative fibrous cap thickness[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37:2322-2332.
- 18 David S, Manuel P, Antonio Z. Mitochondrial dynamics: coupling mitochondrial fitness with healthy aging [J]. Trends Mol Med, 2017, 23:201-215.
- 19 Wang X, Xiu CK, Yang J, et al. Interventional effect and mechanism of extract of Ginseng Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma and Chuanxiong Rhizoma on vascular endothelial cellular senescence induced by high glucose and high fat[J]. Chin J Exp Tradit Med Form(中国实验方剂学杂志), 2019, 25:124-129.
- 20 Huang ZR, Lin H, Lin JP, et al. Study on the extract of Tong-guanteng (*Marsdenia tenacissima*) inducing apoptosis of hepatocarcinoma HepG2 cells through mitochondrial pathway [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm(中医药导报), 2021, 27:28-31.
- 21 Wang Y, Yang F, Jia FZ, et al. Modulations of histone deacetylase 2 offer a protective effect through the mitochondrial apoptosis pathway in acute liver failure[J]. Oxid Med Cell Longev, 2019, 2019:8173016.
- 22 Liu HZ, Li S, Jing W, et al. MiR-484 protects rat myocardial cells from ischemia-reperfusion injury by inhibiting Caspase-3 and Caspase-9 during apoptosis[J]. Korean Circ J, 2020, 50:250-263.