

## 黄芪甲苷对高剂量 S-氯胺酮诱导 PC12 细胞损伤的保护作用

戴劲,宋仕廉,朱桂宁,陈楠,殷国平\*

南京中医药大学附属南京医院,南京 210003

**摘要:**以高剂量 S-氯胺酮(S-ketamine,SK)诱导 PC12 细胞构建体外神经损伤模型,探究黄芪甲苷(astragaloside IV, ASIV)对高剂量 SK 诱导 PC12 细胞损伤的保护作用及其机制。采用 CCK-8 法测定细胞活力,并以此确定 SK 的最佳造模浓度和 ASIV 的最佳治疗浓度;流式细胞术测定细胞凋亡率;DCFH-DA 荧光探针法检测细胞内活性氧(ROS)的含量;qPCR 法检测目的基因的表达;Western blot 技术检测目的蛋白的表达。结果显示,SK 的最佳造模浓度为 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ,ASIV 的最佳治疗浓度为 25  $\mu\text{mol}/\text{L}$ ;与对照组相比,SK 组细胞凋亡率、ROS 含量、Caspase-9 和 Cytochrome C mRNA 表达水平均显著升高( $P < 0.05$ ),Bax、Pro-Caspase-9、Cleaved-Caspase-9 和 Cytochrome C 蛋白表达量同样显著上升( $P < 0.05$ ),而 Bcl-2/Bax mRNA 表达水平比值、Bcl-2 蛋白表达量显著下降( $P < 0.05$ );ASIV 治疗后,明显逆转了高剂量 SK 诱导引起的各项指标变化( $P < 0.05$ )。这说明黄芪甲苷可以减轻高剂量 S-氯胺酮所致 PC12 细胞损伤,其机制可能与抑制线粒体凋亡途径有关。

**关键词:**黄芪甲苷;S-氯胺酮;神经损伤;线粒体凋亡途径

中图分类号:R285

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2024)4-0669-07

DOI:10.16333/j.1001-6880.2024.4.014

## Protective effect of astragaloside IV on PC12 cell injury induced by high dose of S-ketamine

DAI Jin, SONG Shi-lian, ZHU Gui-ning, CHEN Nan, YIN Guo-ping\*

Nanjing Hospital Affiliated to Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing 210003, China

**Abstract:** To investigate the protective effect of astragaloside IV (ASIV) against nerve injury caused by high doses of S-ketamine (SK), PC12 cells were used to construct an *in vitro* nerve injury model. The cell viability was measured by CCK-8 method, from which the optimal modeling concentration for SK and the optimal therapeutic concentration for ASIV were determined. Flow cytometry was used to determine the apoptosis rate. Reactive oxygen species (ROS) was detected by DCFH-DA fluorescent probe assay. Expressions of the target genes were measured by qPCR and the target proteins were detected by Western blot. The results showed that the optimal modeling concentration for SK was 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$  and the optimal therapeutic concentration for ASIV was 25  $\mu\text{mol}/\text{L}$ . Compared with the control group, the apoptosis rate, ROS content, Caspase-9 and Cytochrome C mRNA expression levels were significantly increased in the SK group ( $P < 0.05$ ). On the other hand, Bax, Pro-Caspase-9, Cleaved-Caspase-9 and Cytochrome C protein expression levels were similarly markedly increased ( $P < 0.05$ ), while the ratio of Bcl-2/Bax mRNA expression levels and Bcl-2 protein expression level were significantly decreased ( $P < 0.05$ ). After treatment with ASIV, the changes in all indices induced by high-dose SK were clearly reversed ( $P < 0.05$ ). Therefore, ASIV attenuates PC12 cell injury caused by high dose of SK through a mechanism that may be related to inhibition of the mitochondrial apoptotic pathway.

**Key words:** astragaloside IV; S-ketamine; nerve injury; mitochondrial apoptotic pathway

全球每年有数百万婴幼儿接受全身麻醉<sup>[1,2]</sup>。大量研究表明,单一和短期的麻醉对神经系统的发

育不会造成不良影响,但高剂量或反复多次暴露于麻醉药物中则会引起认知功能障碍和神经系统发育障碍<sup>[3-6]</sup>。麻醉药物对发育期大脑的影响引起了众多父母的广泛关注。

S-氯胺酮(S-ketamine, SK)是氯胺酮的 S 对映

收稿日期:2023-05-10

接受日期:2023-08-24

基金项目:江苏省研究生科研与实践创新计划(SJCX22\_0895)

\*通信作者 Tel:86-013801585795; E-mail:yinguoping0304@163.com

体,于2019年被FDA正式批准为治疗重度抑郁症的辅助药物<sup>[7]</sup>,同时它也是儿科与产科手术中使用较多的麻醉药物。令人担忧的是,人们似乎仅仅热衷于研究其抗抑郁作用,而并不会过多在意其可能造成的潜在风险。最近的一项研究分析了962例与SK有关的不良事件,结果显示女性患者、接受高剂量SK的患者以及接受多种药物治疗的患者出现不良反应的概率更高<sup>[8]</sup>。因此,无论是对于婴幼儿麻醉还是成年人麻醉,探究SK致神经损伤的机制以及寻找相应的应对措施具有重大意义。

黄芪甲苷(astragaloside IV, ASIV)是从中药黄芪中分离出的主要活性成分之一,研究表明它具有十分广泛的药理作用,包括抗肿瘤、抗炎、抗氧化、抗纤维化和抗凋亡<sup>[9-12]</sup>。此外,它还证实为一种天然的神经营养剂<sup>[13]</sup>。然而,关于ASIV是否能减轻麻醉药物所引起的神经损伤却鲜有报道。故本研究选取常用神经细胞株大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞即PC12细胞构建SK体外损伤模型,探讨ASIV的神经保护作用,为SK的合理使用以及ASIV的新药开发提供参考依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

PC12细胞(上海中乔新舟,批号ZQ0150);黄芪甲苷(上海源叶,纯度 $\geq 98\%$ ,批号B20564);S-氯胺酮(25 mg/mL,恒瑞医药,国药准字H20193336);CCK-8试剂(APE $\times$ BIO,批号K1018);Annexin V-FITC/PI凋亡检测试剂盒(南京诺唯赞,批号A211-01);活性氧检测试剂盒(碧云天,批号S0033S);总RNA提取试剂盒(南京诺唯赞,批号RC112-01);逆转录试剂盒(南京诺唯赞,批号R323-01);ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix(南京诺唯赞,批号Q711-02);Anti-Bax(Abcam,批号ab32503);Anti-Caspase-9(Abcam,批号ab184786);Anti-Cytochrome C(Abcam,批号ab133504);Anti-Bcl-2(成都正能,批号381702);Anti- $\beta$ -actin(成都正能,批号200200);HRP Goat Anti-Rabbit IgG(H+L)Antibody(APE $\times$ BIO,批号K1223)。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 细胞培养与分组给药

PC12细胞用含10%胎牛血清和1%青霉素-链霉素的RPMI 1640培养基,置于37 $^{\circ}$ C、5%CO<sub>2</sub>的恒温加湿培养箱中培养。使用CCK-8法测定出S-氯胺酮的最佳造模浓度和黄芪甲苷的最佳治疗浓度

后,将细胞分为对照组(Con组)、模型组(SK组)和实验组(ASIV组)3组。将生长密度达到85%~90%的细胞消化离心并计数,按CCK-8实验的接种比例将细胞接种到所需培养器皿中培养24 h。次日进行给药处理,具体为对照组细胞不给药,模型组细胞给药SK,实验组细胞先使用ASIV预处理30 min,再给药SK。药物处理24 h后,收集细胞进行各类检测,每一个独立实验重复3次。

#### 1.2.2 CCK-8实验测定细胞活力

将对数生长期的PC12细胞按8 000个/孔接种到96孔细胞培养板中,培养24 h之后进行给药处理。药物作用24 h后每孔加入10  $\mu$ L的CCK-8溶液并置于培养箱中孵育1 h,用酶标仪在450 nm处测定吸光度(OD)。细胞活力 =  $(OD_{\text{实验组}} - OD_{\text{空白组}}) / (OD_{\text{对照组}} - OD_{\text{空白组}}) \times 100\%$ 。

#### 1.2.3 流式细胞术测定细胞凋亡率

使用6孔细胞培养板培养细胞。按照“1.2.1”的方式给药处理24 h后,使用无EDTA胰酶消化收集各组细胞,并用预冷PBS重悬洗涤细胞两次。最后一次洗涤离心后,吸去上清,用100  $\mu$ L的1 $\times$  Binding Buffer重悬细胞。加入5  $\mu$ L Annexin V-FITC溶液和5  $\mu$ L PI溶液,用移液枪轻轻混匀。室温条件下避光孵育10~15 min,孵育完成后再加400  $\mu$ L 1 $\times$  Binding Buffer。染色完成后的样品在1 h内完成上机检测。

#### 1.2.4 DCFH-DA荧光探针法检测细胞活性氧的含量

使用6孔细胞培养板培养细胞。按照“1.2.1”的方式给药处理24 h后,使用PBS洗涤细胞两次。每孔加入按1:1 000比例稀释的DCFH-DA溶液1.5 mL,随后置于培养箱中孵育20 min。孵育完成后用RPMI 1640基础培养基洗涤细胞三次,再用荧光显微镜观察绿色荧光强度并拍照记录。

#### 1.2.5 qPCR技术检测目的基因的表达

使用60 mm细胞培养皿培养细胞并按“1.2.1”的方式给药。给药24 h后,按照试剂盒说明书进行总RNA的提取与逆转录。根据反应体系配制说明,将cDNA、引物、荧光染料SYBR green和RNase-free ddH<sub>2</sub>O按特定比例混合均匀后,即可上机进行qPCR反应。扩增产物长度均在80~150 bp之间,具体序列见表1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物 Primer	序列(5'→3') Sequence(5'→3')
$\beta$ -actin	F:CTGTGCTATGTTGCCCTAGACTTC R:GGAACCGCTCATTGCCGATAGTG
Bcl-2	F:TGGAGAGCGTCAACAGGGAGATG R:GGTGTGCAGATCCCGGTTCCAG
Bax	F:GAGCATCCACCAAGAAGCTGAG R:GCTGCCACACGGAAGAAGACC
Caspase-9	F:CAAGAAGAGCGGTTCTCTGGTACATC R:CAGCATTTGGCGACCCTGAGAAG
Cytochrome C	F:AAAGGAGGCAAGCATAAGACTGGAC R:ACCTTTGTTCTTGTGGCATCTGTG

### 1.2.6 Western blot 技术检测目的蛋白的表达

使用 100 mm 细胞培养皿培养细胞并按“1.2.1”的方式给药,药物作用 24 h 后利用 RIPA 裂解液裂解细胞,离心收集总蛋白。收集的蛋白使用 BCA 法进行定量并归一化。每组取制备好的蛋白样品 15  $\mu$ g 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,电泳条件统一为先 80 V (20 min)后 120 V (50 min)。电泳结束后使用 300 mA 恒流将目的蛋白转移至 PVDF 膜上,根据目的蛋白的大小选择合适的转膜时间,通常内参  $\beta$ -actin 的转膜时间为 50 min。转膜成功后,使用 5% 脱脂牛奶室温封闭 2 h,再在 4  $^{\circ}$ C 下孵育一抗过夜,次日室温孵育二抗 2 h 后,即可在显影仪中进行曝光。

### 1.2.7 统计学分析

使用 SPSS 25.0 软件分析数据,所有数据均以均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,Graphpad Prism 8.0 软件作图。多组间比较采用单因素方差分析法。 $P < 0.05$  表示差异具有统计学意义。

## 2 实验结果

### 2.1 S-氯胺酮造模浓度的结果

由图 1 可见,随着 SK 浓度的升高,PC12 细胞的活力逐渐下降。造模浓度通常选择药物对该细胞活力的半抑制浓度,即  $IC_{50}$  值。在 SK 浓度为 450  $\mu$ g/mL 时,细胞活力最接近 50%,故选择此浓度为造模浓度。

### 2.2 黄芪甲苷毒性实验结果

由图 2 所示,设定的 AS IV 浓度中最大浓度为 200  $\mu$ mol/L,200  $\mu$ mol/L 组的细胞活力与空白对照组相比无显著性差异 ( $P > 0.05$ )。说明 0 ~ 200  $\mu$ mol/L AS IV 未对 PC12 细胞产生毒性作用,是一个合理的浓度区间。

### 2.3 黄芪甲苷最佳治疗浓度的结果

在 450  $\mu$ g/mL SK 基础上,使用“2.2”中不同浓

度的 AS IV 进行治疗,以此确定最佳治疗浓度。如图 3 所示,PC12 细胞活力随着 AS IV 浓度的增加呈现先

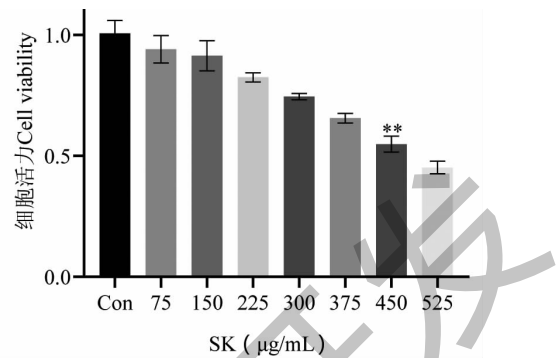
图 1 不同浓度 SK 对 PC12 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 1 Effects of different concentrations of SK on the viability of PC12 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

注:与空白对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ 。Note: Compared with Con, \*\*  $P < 0.01$ 。

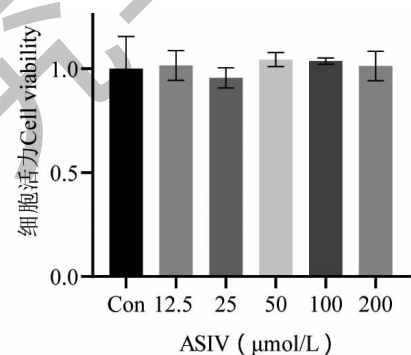
图 2 不同浓度 AS IV 对 PC12 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 2 Effects of different concentrations of AS IV on the viability of PC12 cells ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

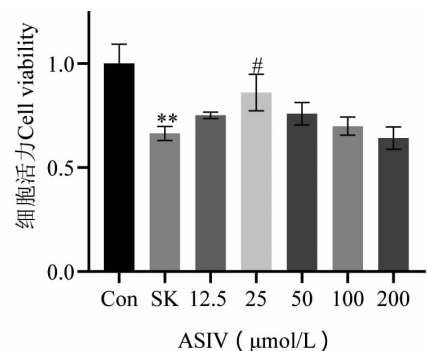
图 3 不同浓度 AS IV 对 450  $\mu$ g/mL SK 作用下的 PC12 细胞活力的影响 ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 3 Effects of different concentrations of AS IV on the viability of PC12 cells under the effects of 450  $\mu$ g/mL SK ( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

注:与对照组比较, \*\*  $P < 0.01$ ;与模型组比较, #  $P < 0.05$ 。Note: Compared with Con, \*\*  $P < 0.01$ ; Compared with Mod, #  $P < 0.05$ 。

升高后降低的趋势,在 25  $\mu\text{mol/L}$  时细胞活力达到峰值,与模型组相比具有显著性差异( $P < 0.05$ )。因此,25  $\mu\text{mol/L}$  为 ASIV 治疗 SK 致 PC12 细胞损伤的最佳治疗浓度。

## 2.4 细胞凋亡率的变化

如图 4 所示,SK 组细胞凋亡率与对照组相比显著上升( $P < 0.01$ ),ASIV 组细胞凋亡率与 SK 组相比显著下降( $P < 0.01$ )。

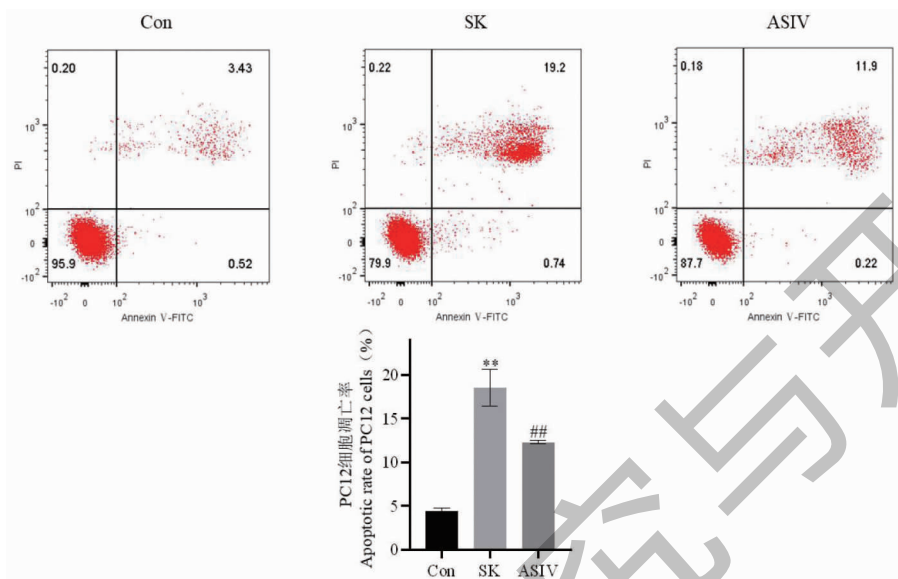


图 4 流式细胞术检测各组细胞凋亡率( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 4 Flow cytometry detection of apoptosis rate in each group( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

注:与对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。Note:Compared with Con,\*\* $P < 0.01$ ;Compared with Mod,## $P < 0.01$ 。

## 2.5 细胞内活性氧含量的变化

如图 5 所示,对照组细胞活性氧含量极低,使用 SK 处理后,细胞内活性氧含量极显著上升( $P <$

0.01)。使用 ASIV 治疗后,与 SK 组相比活性氧含量极显著下降( $P < 0.01$ )。

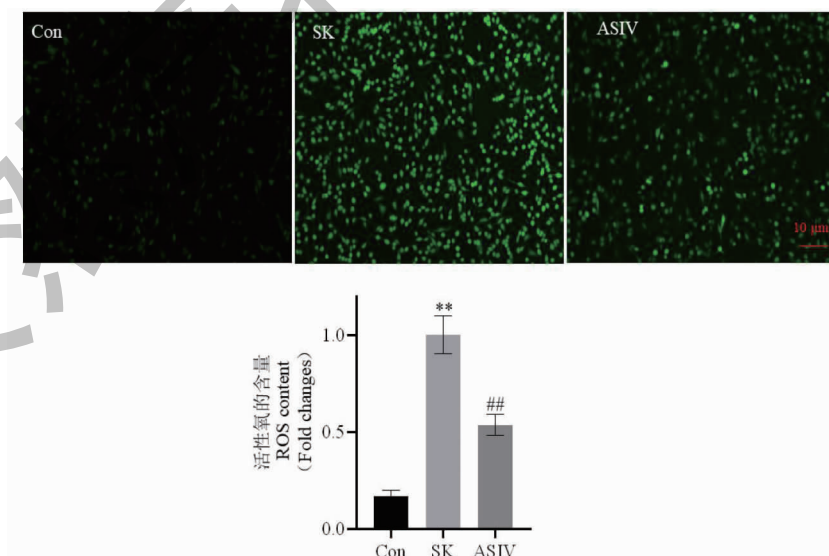


图 5 DCFH-DA 荧光探针法检测各组细胞活性氧的含量( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 5 Detection of ROS in each group of cells by DCFH-DA fluorescent probe method( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

注:与对照组比较,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,## $P < 0.01$ 。Note:Compared with Con,\*\* $P < 0.01$ ;Compared with Mod,## $P < 0.01$ 。

## 2.6 线粒体凋亡途径主要基因的表达情况

如图 6 所示,SK 组与对照组相比,目的基因 Bcl-2/Bax 极显著降低( $P < 0.01$ ),Caspase-9 极显著升高( $P < 0.01$ ),Cytochrome C 显著升高( $P < 0.05$ )。使用 ASIV 治疗后逆转了这些变化,ASIV 组与 SK 组相比,Bcl-2/Bax 极显著升高( $P < 0.01$ ),Caspase-9 与 Cytochrome C 显著降低( $P < 0.05$ )。

## 2.7 线粒体凋亡途径主要蛋白的表达情况

如图 7 所示,SK 组与对照组相比,线粒体凋亡途径中抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著下降( $P < 0.05$ ),促凋亡蛋白 Bax、Pro-Caspase-9、Cleaved-Caspase-9 表达显著上升( $P < 0.05$ )以及 Cytochrome C 表达极显著上升( $P < 0.01$ )。ASIV 组与 SK 组相比,抗凋亡蛋白 Bcl-2 表达显著上升( $P < 0.05$ ),促凋亡蛋白 Bax、Pro-Caspase-9、Cleaved-Caspase-9 表达显著下降( $P < 0.05$ ),Cytochrome C 表达极显著下降( $P < 0.01$ )。

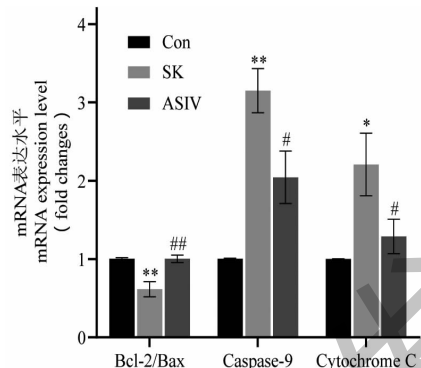


图 6 qPCR 技术检测各组细胞

线粒体凋亡途径主要基因的表达( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 6 Detection of the expression of major genes in the mitochondrial apoptosis pathway with qPCR( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ 。Note:Compared with Con,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;Compared with Mod,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ 。

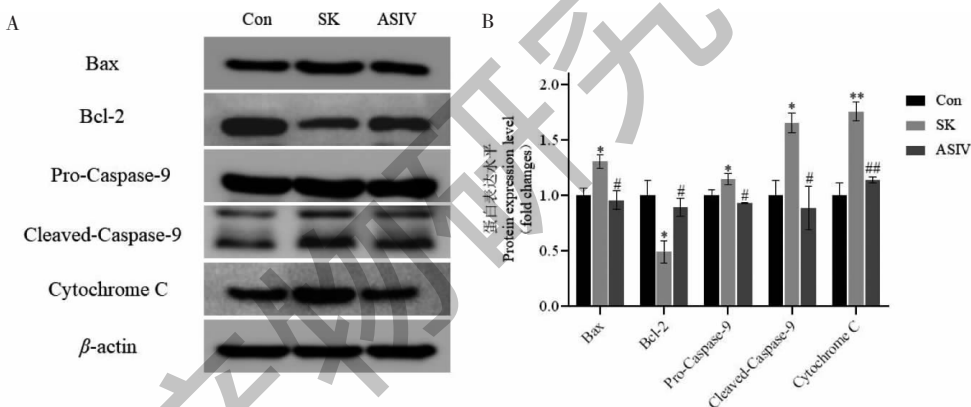


图 7 Western blot 检测各组细胞线粒体凋亡途径主要蛋白的表达( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

Fig. 7 Detection of the expression of major proteins in the mitochondrial apoptosis pathway by Western blot( $\bar{x} \pm s, n = 4$ )

注:与对照组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ 。Note:Compared with Con,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ;Compared with Mod,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ 。

## 3 讨论与结论

麻醉药物的神经毒性问题一直受到国际社会的重视。美国食品和药物管理局与国际麻醉研究协会曾举办联合会议,就关于严格化临床前研究以及建立麻醉围产期神经毒性领域报告标准的重要性进行讨论,并提示应该使用新颖的方法来解决该领域的一些重大问题<sup>[14]</sup>。就氯胺酮而言,与大多数麻醉药物不同,它是一种 NMDA 受体拮抗剂。药物阻断 NMDA 受体可以改变大脑发育所必需的兴奋-抑制平衡,进而引起神经毒性<sup>[15]</sup>。有研究显示,氯胺酮能通过线粒体凋亡途径以时间依赖和剂量依赖的方式诱导人的神经毒性<sup>[16]</sup>,而其对映体 S-氯胺酮尚未

被报道会产生类似的副作用,因此推测,当达到某一浓度阈值时,SK 也会激活线粒体凋亡途径引起细胞凋亡。

线粒体作为细胞代谢的中心和氧化还原平衡的主要调节因子,在疾病的发生和发展中起着至关重要的作用<sup>[17]</sup>。在线粒体介导的诸多生理反应中,氧化应激是激活线粒体凋亡途径的关键因素之一,过量的 ROS 则是发生氧化应激的物质基础<sup>[18]</sup>。临床常用麻醉药物已被证明可以促进或减轻氧化应激的程度。例如,吸入麻醉药七氟醚可以通过增强细胞内  $Ca^{2+}$  浓度,提高 ROS 水平,增加线粒体凋亡途径相关蛋白 Cleaved-Caspase-9、Cytochrome C、Bax/Bcl-

2 的表达来诱导神经元凋亡<sup>[19]</sup>。局麻药布比卡因激活了 ROS 介导的自噬,导致自噬通量受阻,细胞活力下降,而使用活性氧清除剂可以明显逆转这种自噬损伤<sup>[20]</sup>。在线粒体途径中,ROS 含量的上升促使 Bax 与 Bcl-2 的相对表达量发生变化。Bax 在线粒体外膜处被激活并寡聚,随后与特定的分子结合而改变线粒体膜通透性<sup>[21]</sup>。Cytochrome C 因此从线粒体释放到细胞质中,与 Apaf-1 等因子结合形成凋亡小体,并激活 Pro-Caspase-9 发生切割,切割的 Caspase-9 进一步激活下游的相关凋亡因子,促使细胞发生凋亡。

黄芪甲苷是一种具有强抗氧化性的天然活性物质,研究显示其某些功效与线粒体之间存在密不可分的联系。例如,ASIV 能促进线粒体自噬,减少受损线粒体的积累与线粒体活性氧的生成<sup>[22]</sup>。Liu 等<sup>[23]</sup>也发现,ASIV 能通过靶向  $\alpha$ -突触核蛋白发挥神经保护作用,这是一种位于线粒体内膜,在人脑中高度表达的蛋白质。由此可见,ASIV 具有治疗麻醉药物致神经损伤的潜力。

基于以上的研究结果和分析,本文以线粒体凋亡途径为线索,进行 ASIV 治疗高剂量 SK 诱导神经损伤的体外实验,用 CCK-8 实验确定了 SK 与 ASIV 的最终实验浓度分别为 450  $\mu\text{g}/\text{mL}$  与 25  $\mu\text{mol}/\text{L}$ 。另外实验发现,暴露于高剂量 SK 下的 PC12 细胞不仅凋亡率、ROS 含量明显上升,而且线粒体凋亡途径中的主要上游分子 Bax、Bcl-2、Caspase-9、Cytochrome C 均被激活。这说明高剂量 SK 诱导 PC12 细胞凋亡是通过激活 ROS 介导的线粒体凋亡途径实现的。在使用 ASIV 处理后,SK 诱导的这些变化受到了明显的抑制,证明了 ASIV 在此进程中对 PC12 细胞具有一定的保护作用。

综上所述,黄芪甲苷可以减轻高剂量 S-氯胺酮诱导的 PC12 细胞损伤,其机制可能与抑制线粒体凋亡途径有关。

#### 参考文献

- 1 Vutskits L, Xie Z. Lasting impact of general anaesthesia on the brain: mechanisms and relevance [J]. *Nat Rev Neurosci*, 2016, 17: 705-717.
- 2 McCann ME, Soriano SG. General anesthetics in pediatric anesthesia: influences on the developing brain [J]. *Curr Drug Targets*, 2012, 13: 944-951.
- 3 Xiao A, Feng Y, Yu S, et al. General anesthesia in children and long-term neurodevelopmental deficits: a systematic re-

- view [J]. *Front Mol Neurosci*, 2022, 15: 972025.
- 4 Useinovic N, Maksimovic S, Liechty C, et al. Systemic inflammation exacerbates developmental neurotoxicity induced by sevoflurane in neonatal rats [J]. *Br J Anaesth*, 2022, 129: 555-566.
- 5 Hu X, Hu X, Huang G. LncRNA MALAT1 is involved in sevoflurane-induced neurotoxicity in developing rats [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120: 18209-18218.
- 6 Flick RP, Katusic SK, Colligan RC, et al. Cognitive and behavioral outcomes after early exposure to anesthesia and surgery [J]. *Pediatrics*, 2011, 128: e1053-1061.
- 7 Nikayin S, Murphy E, Krystal JH, et al. Long-term safety of ketamine and esketamine in treatment of depression [J]. *Expert Opin Drug Saf*, 2022, 21: 777-787.
- 8 Gastaldon C, Raschi E, Kane JM, et al. Post-marketing safety concerns with esketamine: a disproportionality analysis of spontaneous reports submitted to the FDA adverse event reporting system [J]. *Psychother Psychosom*, 2021, 90: 41-48.
- 9 Jiang M, Ni J, Cao Y, et al. Astragaloside IV attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury from oxidative stress by regulating succinate, lysophospholipid metabolism, and ROS scavenging system [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 9137654.
- 10 Lin J, Fang L, Li H, et al. Astragaloside IV alleviates doxorubicin induced cardiomyopathy by inhibiting NADPH oxidase derived oxidative stress [J]. *Eur J Pharmacol*, 2019, 859: 172490.
- 11 Yin B, Hou XW, Lu ML. Astragaloside IV attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats via inhibition of calcium-sensing receptor-mediated apoptotic signaling pathways [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2019, 40: 599-607.
- 12 Shi Y, Liu W, Wang YL, et al. Study on the difference of astragaloside IV distribution between normal mice and db/db mice with type 2 diabetic nephropathy [J]. *Nat Prod Res Dev (天然产物研究与开发)*, 2019, 31: 1712-1718.
- 13 Yao M, Zhang L, Wang L. Astragaloside IV: A promising natural neuroprotective agent for neurological disorders [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 159: 114229.
- 14 Chinn GA, Pearn ML, Vutskits L, et al. Standards for preclinical research and publications in developmental anaesthetic neurotoxicity: expert opinion statement from the SmartTots preclinical working group [J]. *Br J Anaesth*, 2020, 124: 585-593.
- 15 Eizaga Rebollar R, García Palacios MV, Morales Guerrero J, et al. Neurotoxicity versus neuroprotection of anesthetics: young children on the ropes? [J]. *Paediatr Drugs*, 2017, 19: 271-275.