

甘木通乙酸乙酯提取物对低糖缺氧诱导的神经细胞的保护作用

黄海潮¹, 何欣², 周捷^{2*}, 聂阳¹, 赵晋³, 徐单单¹

(1. 广东食品药品职业学院, 广东 广州 510520; 2. 中山大学肿瘤防治中心, 广东 广州 510060; 3. 广东医科大学, 广东 东莞 523808)

摘要: **目的** 研究甘木通乙酸乙酯提取物对低糖缺氧诱导神经细胞凋亡的保护作用。**方法** PC12 细胞结合物理缺氧方式建立缺血性中风的细胞模型, CCK-8 检测细胞活性, 测定乳酸脱氢酶 (LDH) 漏出分析细胞膜完整性, 流式细胞术和 Hoechst 33258 染色检测细胞凋亡, JC-1 法测定细胞内线粒体膜电位, Western blot 检测凋亡相关蛋白 Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3 蛋白表达, 检测 SOD、MDA 水平分析甘木通乙酸乙酯提取物的抗氧化能力。**结果** 与模型组比较, 甘木通乙酸乙酯提取物可以有效提高缺氧 PC12 细胞的存活率 ($P<0.01$), 降低 LDH 漏出量 ($P<0.01$), 提高线粒体膜电位, 增加细胞内 SOD 水平, 降低 MDA 水平, 增加 Bcl-2 蛋白表达, 减少 Bax, cleaved caspase-3 蛋白的表达 ($P<0.05$, $P<0.01$), 降低细胞凋亡率。**结论** 甘木通乙酸乙酯提取物可抑制低糖缺氧诱导 PC12 细胞凋亡, 该神经保护作用可能与细胞的线粒体凋亡途径有关。

关键词: 甘木通; 神经保护; Bcl-2; Bax; caspase-3

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1001-1528(2020)05-1163-06

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2020.05.011

Protective effects of ethyl acetate extract from *Clematis filamentosa* on nerve cells impaired by hypoglycemia and hypoxia

HUANG Hai-chao¹, HE Xin², ZHOU Jie^{2*}, NIE Yang¹, ZHAO Jin³, XU Dan-dan¹

(1. Guangdong Food and Drug Vocational College, Guangzhou 510520, China; 2. SUN YAT-SEN University Cancer Center, Guangzhou 510060, China; 3. Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China)

ABSTRACT: **AIM** To study the protective effects of ethyl acetate extract from *Clematis filamentosa* Dunn. (EAECFD) on nerve cells damaged by hypoglycemia and hypoxia. **METHODS** PC12 cell models of ischemic stroke were established with physical hypoxia. The cells were subjected to the detections of cellular activity by CCK-8, cell membrane integrity by lactate dehydrogenase (LDH) leakage, apoptosis by both flow cytometry and Hoechst 33258 staining, intracellular mitochondrial membrane potential by JC-1 method, apoptosis-related proteins Bcl-2, Bax, and cleaved caspase-3 protein expressions by Western blot, and SOD and MDA levels as well to analyze the antioxidant capacity of ethyl acetate extract from *C. filamentosa*. **RESULTS** Compared with the model group, the group intervened with ethyl acetate extract from *C. filamentosa* displayed improved survival of hypoxic PC12 cells ($P<0.01$), less LDH leakage ($P<0.01$), increased mitochondrial membrane potential and intracellular SOD levels, and reduced MDA, increased Bcl-2 protein expression, decreased Bax, cleaved caspase-3 protein expression ($P<0.05$, $P<0.01$), and inhibited apoptosis rate. **CONCLUSION** EAECFD can inhibit the apoptosis of PC12 cells damaged by hypoglycemia and hypoxia, and this neuroprotective effect may be related to the cellular mitochondrial apoptosis pathway.

KEY WORDS: *Clematis filamentosa* Dunn.; neuroprotective; Bcl-2; Bax; caspase-3

收稿日期: 2019-06-26

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金 (B2016083, B2018184); 广东省中医药局研究基金 (20161035, 20192063, 20201247); 广东食品药品职业学院自然科学基金 (2016YZ013, 2018ZR024); 惠州市科技计划项目 (2018Y277)

作者简介: 黄海潮 (1982—), 男, 硕士, 实验师, 从事神经药理学研究。Tel: (020) 28854990, E-mail: huanghac@gdyzy.edu.cn

* **通信作者:** 周捷 (1984—), 男, 硕士, 主管药师, 从事活性物质筛选研究。Tel: (020) 87343320, E-mail: 2398655683@qq.com

甘木通为毛茛科丝铁线莲 *Clematis filamentosa* Dunn. 属, 其叶及根入药, 有活血通脉降压、镇静安神之功效^[1]。甘木通主要分布于岭南地区, 为华南珍稀药材, 临床用于冠心病、心绞痛、心肌梗死等心血管疾病治疗。目前对于甘木通的研究报道集中于其成分提取以及其治疗心血管疾病作用及机制, 对其在神经退行性疾病中的作用鲜见报道。

缺血性脑卒中又称为脑梗死, 其患病率、死亡率、复发率、致残率高^[2]。中医学关于脑梗死主要病位证素分析结合肝阳上亢证、风火闭窍证、痰火闭窍证等病证分析^[3], 而甘木通可用于肝经有热、肝阳上亢、脉络瘀阻等相关疾病治疗前期实验研究^[4]表明, 甘木通能有效降低氧化应激引起的神经损伤, 提示其在神经退行性疾病中的潜在治疗作用, 设想其对于脑中风防治有一定的作用。

缺血性脑卒发病机制为血管堵塞造成脑血流量减少, 导致脑组织缺血缺氧, 引起组织损伤。本研究通过模拟脑缺血病理生理发展过程, 以 PC12 细胞建立体外缺血性中风的细胞模型, 研究甘木通乙酸乙酯提取物 (ethyl acetate extract from *Clematis filamentosa* Dunn. EAECFD) 对缺血性中风的影响及作用机制。

1 材料

1.1 细胞株 大鼠肾上腺嗜铬细胞瘤细胞 (PC12 细胞, 中国医学科学院上海细胞研究所)。

1.2 药物与试剂 甘木通 (批号 120618, 广东康美药业股份有限公司), 经广东食品药品职业学院聂阳副主任药师鉴定为正品; DMEM 培养基、马血清 (美国 Gibco 公司); 胎牛血清 (FBS, 批号 140313, 杭州四季青生物工程材料有限公司); 胰蛋白酶 (批号 2014B015, 美国 Amresco 公司); CCK-8 试剂盒 [批号 GH802, 东仁化学科技 (上海) 有限公司]; Triton-X、二甲基亚砷 (DMSO) (美国 Sigma 公司); PBS (pH=7. 2, 杭州吉诺生物医药技术有限公司); 超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA) 试剂盒 (南京建成生物工程研究所); BCA 法蛋白定量试剂盒、Annexin V-FITC/PI 细胞凋亡检测试剂盒、线粒体膜电位检测试剂盒 (JC- 1) (上海碧云天生物技术有限公司); B 淋巴细胞瘤-2 蛋白 (Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax)、 β -actin、活化型半胱天冬酶-3 (cleaved caspase-3) (美国 CST 公司); 其他试剂均为分析纯。

1.3 仪器 311 型细胞培养箱、Sorvall ST 40 台式

离心机 (美国 Thermo 公司); DMIL 荧光倒置显微镜 (德国 Leica 公司); Microplate Reader 酶标仪 (美国 Bio-Tek 公司); BD FACS Verse 流式细胞仪 (美国 BD 公司)。

2 方法

2.1 甘木通乙酸乙酯提取物制备 取甘木通干燥粉碎, 过 30 目筛, 参考文献 [5] 进行初提取, 得初提液, 蒸干; 用乙酸乙酯再提取, 大孔树脂纯化提取液, 得洗脱液并干燥至恒定质量, 提取物得率为 1.01%; 所得提取物用 DMEM 培养液超声溶解, 经无菌滤膜过滤备用。

2.2 细胞培养 PC12 细胞用含有 10% FBS 和 5% 马血清的 DMEM 培养基 (pH=7.4) 培养, 放置于培养条件为 95% 空气、5% CO₂、37 ℃ 细胞培养箱中。培养 24 h 换液 1 次, 待细胞生长覆盖约至 80%, 用胰酶消化传代, 培养于培养板或培养瓶内贴壁待用, 于实验前 12 h 更换成无血清低糖 DMEM 培养基。

2.3 缺氧细胞模型构建 取实验待用细胞, 根据参考文献 [6] 方法模拟脑中风缺氧复氧模型。将细胞置于 95% N₂、5% CO₂、37 ℃ 密闭容器中, 培养 0.5、1、2、4、8、12、24 h; 再将细胞置于 37 ℃、饱和湿度、95% 空气、5% CO₂ 细胞培养箱中继续培养 0.5 h; 然后加入 10 μ L CCK-8 检测试剂, 37 ℃ 温育 2 h, 同时设置正常细胞对照组, 酶标仪测定 450 nm 处吸光度 (OD)。细胞存活率 = (OD_{实验组} / OD_{对照组}) $\times$ 100%。根据试验结果选择合适的缺氧时间制作缺氧模型。

2.4 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞活性的影响 取实验待用细胞, 根据前期实验结果^[4]选择提取物浓度, 分为对照组, 模型组 (缺氧 4 h), 甘木通提取物高、中、低剂量组 (100、50、25 μ g/mL), 阳性对照组 (尼莫地平)。通过 CCK-8 检测细胞存活率, 酶标仪测定 450 nm 处吸光度 (OD), 计算细胞存活率。

2.5 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞 LDH 漏出的影响 根据“2.4”项下实验分组处理细胞, 根据 LDH 试剂盒操作说明处理细胞, 并测定各组细胞吸光度 (OD)。LDH 漏出率 = (OD_{实验组} / OD_{模型组}) $\times$ 100%。

2.6 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞凋亡的影响 将 PC12 细胞接种于 6 孔板中, 按“2.4”项下分组处理细胞, 小心吸去原培养液, 用 PBS 轻轻冲洗, 胰酶消化, 收集细胞悬液, 以

1 000 r/min离心 10 min，弃去上清，根据试剂盒提供的步骤进行 Annexin V-FITC/PI 染色，流式细胞仪检测不同分组 PC12 细胞的凋亡率。将 PC12 细胞接种于 6 孔板中，小心吸去原培养液后，用 PBS 洗涤后，加入 4% 多聚甲醛固定 15 min 后，PBS 冲洗，Hoechst 33258 染色，在荧光显微镜下观察细胞凋亡形态。

2.7 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞线粒体膜电位的影响 按“2.4”项下分组处理后，收集细胞制成细胞悬液，调节细胞数至 2×10^5 个，根据试剂盒说明操作，染色，采用流式细胞仪检测。

2.8 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞凋亡蛋白表达的影响 将 PC12 细胞接种于 6 孔板中，按“2.4”项下分组处理后，用冰冷的 PBS 冲洗 2 次，收集细胞并冰冻裂解，12 000 r/min 离心 15 min 去除杂质，吸取上清液，BCA 法测定蛋白量。用含 12% SDS-PAGE 胶分离总蛋白，然后转移 PVDF 膜上，5% BSA 封闭 90 min，加入一抗 (Bcl-2、Bax、cleaved caspase-3)，冰冻孵育过夜。洗膜后，加入二抗，37 ℃ 孵育 1 h，再洗 1 遍，观察各蛋白表达量并与内参 (β -actin) 作比较。

2.9 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞 SOD、MDA 水平的影响 将 PC12 细胞接种于 24 孔板中，按“2.4”项下分组处理后，去除原培养液，根据参考文献[7]方法处理后，按说明书测定细胞中 SOD 和 MDA 水平。

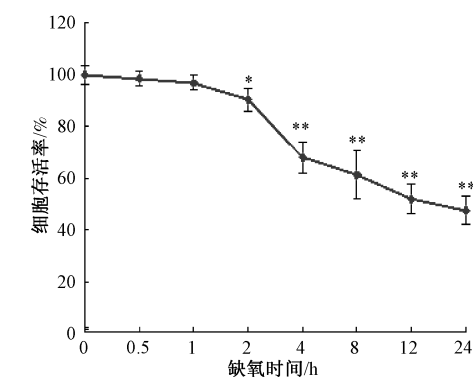
2.10 统计学分析 利用 SPSS 21.0 统计软件进行统计分析，数据以 ($\bar{x}\pm s$) 表示，多组间比较采用方差分析，以 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 不同缺氧时间对 PC12 细胞存活率的影响 随着缺氧时间的增加，PC12 细胞存活率逐渐下降。与对照组（缺氧 0 h）比较，PC12 细胞缺氧 2~24 h 细胞存活率降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 1。本实验缺氧造模时间设为 4 h。见图 1。

3.2 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞存活率的影响 与模型组比较，甘木通乙酸乙酯提取物提高细胞存活率 ($P<0.05$, $P<0.01$)，见图 2。

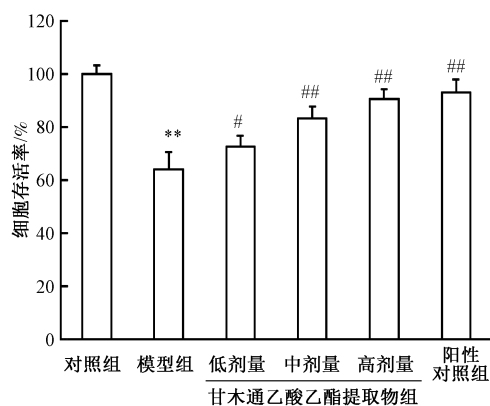
3.3 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞 LDH 漏出的影响 在缺氧条件下，细胞中 LDH 漏出率增加 ($P<0.01$)。与模型组比较，甘木通乙酸乙酯提取物能降低 LDH 漏出率 ($P<0.05$, $P<0.01$)，表明甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧诱导的细胞损伤有保护作用。见图 3。



注：与对照组（缺氧 0 h）比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

图 1 不同缺氧时间对 PC12 细胞存活率的影响 ($n=6$)

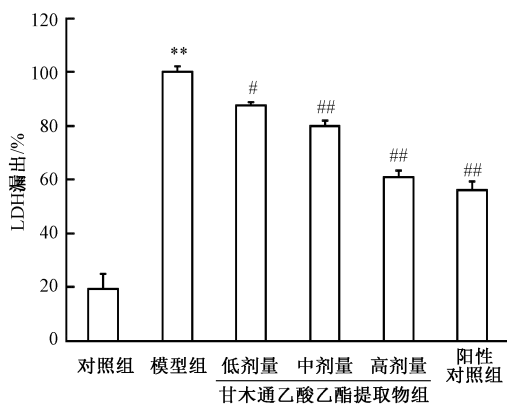
Fig. 1 Effects of different hypoxic time on PC12 cell survival rate ($n=6$)



注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，## $P<0.01$ 。

图 2 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞存活的影响 ($n=6$)

Fig. 2 Effects of EAECFD on the survival of hypoxic PC12 Cells ($n=6$)



注：与对照组比较，** $P<0.01$ ；与模型组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 3 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞 LDH 漏出的影响 ($n=6$)

Fig. 3 Effects of EAECFD on LDH leakage from hypoxia PC12 cells ($n=6$)

3.4 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞凋亡的影响 流式细胞术结果显示,对照组细胞凋亡很少,凋亡率为 6.8%;模型组细胞凋亡数量增多,凋亡率为 46.3%,并且有部分细胞坏死;阳性对照组细胞凋亡率为 11.3%;不同质量浓度甘木通乙酸乙酯提取物作用,凋亡细胞比例逐渐减

少,细胞凋亡率分别为 39.6%、27.8%、15.5%,见图 4。Hoechst 33258 染色结果显示,对照组细胞核形态完整,基本没有凋亡细胞少;模型组出现多处亮色荧光,表明细胞凋亡形态明显;阳性对照组细胞基本趋于正常;甘木通乙酸乙酯提取物组正常细胞增多,见图 5。

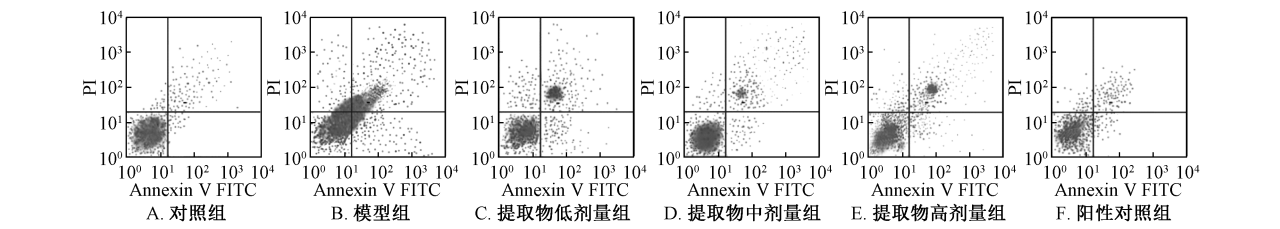
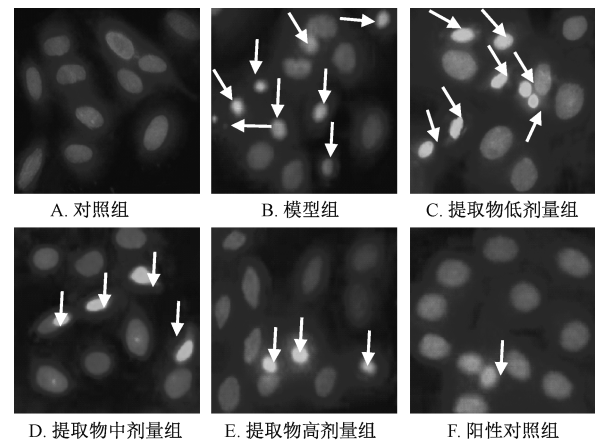


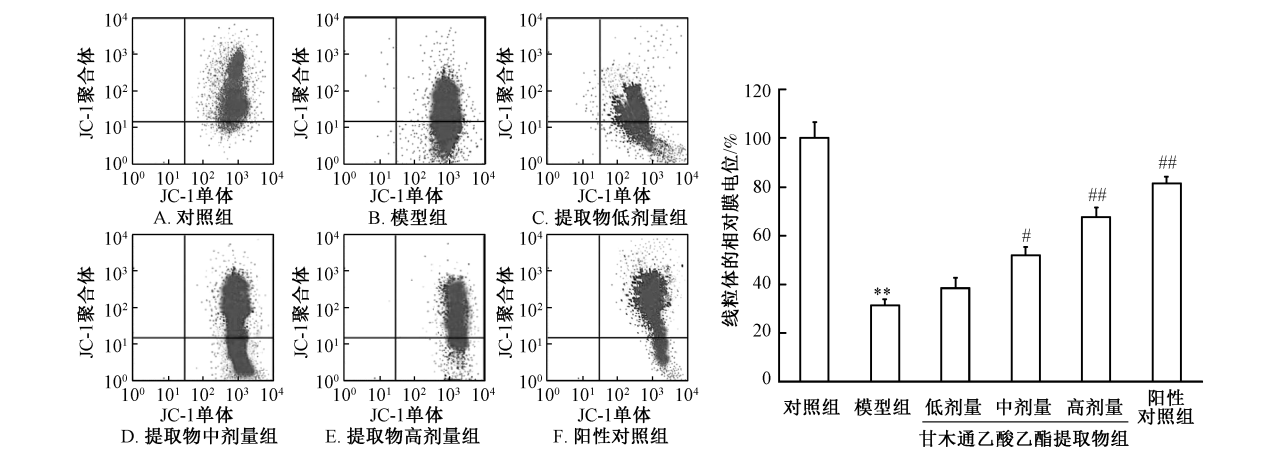
图 4 流式细胞术检测细胞凋亡
Fig. 4 Detection of apoptosis by flow cytometry



注:图中箭头所示为凋亡的细胞。
图 5 Hoechst 33258 染色观察各组细胞凋亡细胞形态(×400)
Fig. 5 Apoptotic cell morphology by Hoechst 33258 staining (×400)

3.5 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞线粒体膜电位的影响 与对照组比较,模型组细胞的线粒体膜电位下降 ($P<0.01$);与模型组比较,甘木通乙酸乙酯提取物中、高剂量组及阳性对照组线粒体膜电位升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。见图 6。

3.6 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞凋亡蛋白表达的影响 Bcl-2、Bax 蛋白表达影响线粒体膜的通透性,从而启动线粒体凋亡信号通路^[8]。cleaved caspase-3 是 caspase-3 的活化形式,其决定细胞凋亡程度^[9]。与对照组比较,模型组 Bcl-2 蛋白表达降低, Bax/Bcl-2 比例及 Bax、cleaved caspase-3 蛋白表达增加 ($P<0.05$, $P<0.01$);与模型组比较,甘木通乙酸乙酯提取物组(中、高剂量) Bcl-2 蛋白表达增加, Bax/Bcl-2 比例及 Bax、cleaved caspase-3 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),见表 1、图 7。



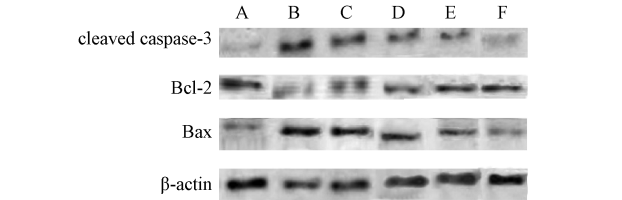
注:与对照组比较, ** $P<0.01$;与模型组比较, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。
图 6 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞线粒体膜电位的影响 ($n=3$)
Fig. 6 Effects of EAECFD on mitochondrial membrane potential in hypoxic PC12 cells ($n=3$)

表 1 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞凋亡蛋白表达的影响 (%, $\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Tab. 1 Effects of EAECFD on the expression of Bax, Bcl-2 and cleaved caspase-3 in hypoxic PC12 cells (%, $\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	Bcl-2	Bax	cleaved caspase-3	Bax/Bcl-2
对照组	60.7±2.4	26.7±2.3	23.8±2.7	44.1±5.5
模型组	28.1±3.4**	71.9±4.1**	64.5±3.1**	258.9±42.0*
提取物低剂量组	36.0±4.1	61.5±2.9	53.9±2.6	172.8±25.7
提取物中剂量组	41.8±2.6 [#]	50.0±4.2 [#]	45.8±3.8 [#]	120.1±13.1 [#]
提取物高剂量组	49.0±1.5 ^{##}	43.7±2.7 ^{##}	39.6±4.4 [#]	89.3±7.2 [#]
阳性对照组	57.3±3.0 [#]	31.8±3.3 ^{##}	27.8±3.1 ^{##}	55.8±8.7 [#]

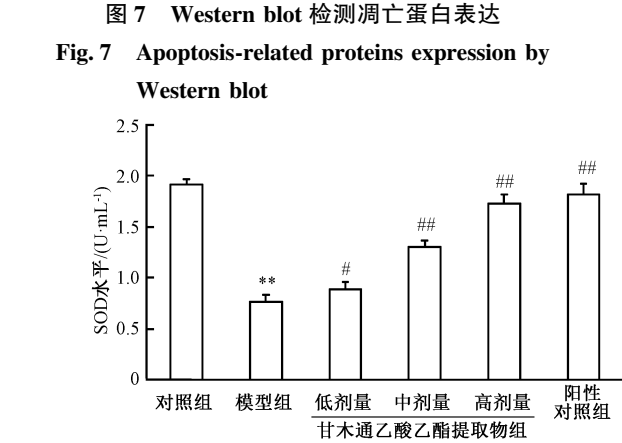
注:与对照组相比,* $P<0.05$,** $P<0.01$;与模型组相比,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。



注: A~F 分别为对照组、模型组、提取物低剂量组、提取物中剂量组、提取物高剂量组、阳性对照组。

图 7 Western blot 检测凋亡蛋白表达

Fig. 7 Apoptosis-related proteins expression by Western blot



注:与对照组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

图 8 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞 SOD、MDA 水平的影响 ($n=6$)

Fig. 8 Effects of EAECFD on SOD, MDA levels of hypoxic PC12 cells ($n=6$)

本实验根据缺血性中风导致神经系统的缺氧/复氧的病理机制,建立缺血性中风的细胞模型。该模型更能真实的模拟缺血缺氧的病理生理特征,减少实验的影响因素^[6]。

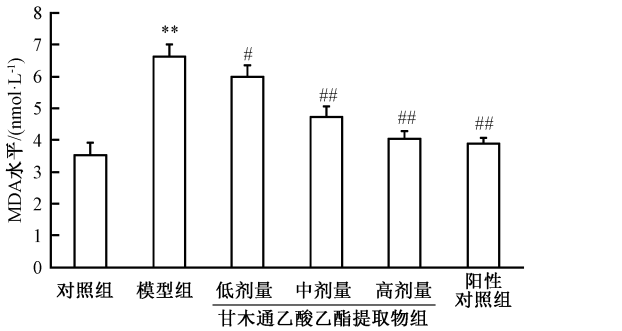
流式细胞仪检查细胞凋亡,对 PC12 细胞凋亡进行分析。在甘木通乙酸乙酯提取物的作用下,细胞凋亡数明显减少,表明甘木通乙酸乙酯提取物可以有效抑制缺氧引起的细胞凋亡。并且 Hoechst 33258 染色结果进一步证明甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧细胞的保护作用。

JC-1 在细胞中以单体和聚合体形式存在,在正常细胞,由于线粒体的极性,JC-1 被摄入进入线粒体形成多聚体,发出红色荧光;而在凋亡的细胞中,细胞线粒体极性下降,JC-1 从线粒体释放

3.7 甘木通乙酸乙酯提取物对缺氧 PC12 细胞 SOD、MDA 水平的影响 与对照组比较,模型组 SOD 水平降低,MDA 水平升高 ($P<0.01$);与模型组比较,甘木通乙酸乙酯提取物组 SOD 水平升高,MDA 水平降低 ($P<0.05$, $P<0.01$),见图 8。

4 讨论

近年来研究^[10]表明,脑中风的病理生理机制为各种因素引起的神经元的凋亡以及坏死,导致神经系统出现不可逆的损伤,从而使中风加深加重。



至胞质,以单体形式存在,呈绿色荧光;通过不同荧光比值,检测线粒体的相对膜电位。本实验中,模型组中的线粒体膜电位明显下降,而甘木通乙酸乙酯提取物可以明显提高线粒体膜电位 ($P<0.05$),提示甘木通乙酸乙酯提取物的保护作用可能与影响线粒体膜电位相关。

研究显示 Bcl-2 和 caspase 蛋白家族均参与了脑缺血线粒体凋亡途径^[11]。2 种蛋白直接参与释放细胞色素 C (CytC) 的线粒体膜通透性转换孔的调节。Bcl-2 蛋白家族分为促凋亡蛋白 (Bax、Bad 等) 和抑制凋亡蛋白 (Bcl-2),2 种功能相反的蛋白主要通过影响线粒体的膜电位以及 CytC 水平影响细胞凋亡进程,2 者表达高低直接反映细胞凋亡情况^[12]。caspase 蛋白家族在脑缺血活化明显^[13]。

细胞中 Bcl-2 低表达,可引起线粒体相关的细胞核固缩和 DNA 裂解以及 Cyt C 从线粒体释放,导致活化型 caspase-3 (cleaved caspase-3) 出现,表明细胞处于凋亡状态。蛋白印迹结果显示,模型组 Bax、cleaved caspase-3 表达增加,Bcl-2 表达明显减少,说明细胞凋亡损伤明显;甘木通乙酸乙酯提取物作用后,Bcl-2 表达增加,Bax、cleaved caspase-3 表达逐渐减少,说明甘木通乙酸乙酯提取物可以抑制缺氧诱导的细胞凋亡,并且其作用可能与线粒体凋亡途径相关。

细胞凋亡开始时,细胞内的谷胱甘肽水平下降以及活性氧 (ROS) 的升高,可引起烟酰胺腺嘌呤二核苷酸的还原态 NADH 和烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸水平下降,并引起胞内 O²⁻聚集,影响线粒体膜电位,最终导致细胞凋亡^[14]。MDA 是 O²⁻引起的脂质过氧化产物,其可以反映 O²⁻对细胞的损失;而 SOD 可有效清除细胞内 O²⁻,保护细胞。本研究结果显示甘木通乙酸乙酯提取物可有效降低缺氧诱导 PC12 细胞 MDA 水平,提高 SOD 水平,表明甘木通乙酸乙酯提取物能有效减少 PC12 细胞氧化损伤,起到保护细胞的作用。

综上所述,甘木通乙酸乙酯提取物具有神经保护作用并且其作用方式可能是通过提高细胞内 SOD 水平,减少氧自由基对细胞的损害,影响线粒体凋亡途径,从而抑制缺氧诱导的细胞凋亡,保护细胞。研究表明,甘木通主要药效成分为多种黄酮苷^[15],其神经保护作用可能与甘木通提取物中的黄酮苷密切相关,本课题进一步的研究将基于此,寻找突破口,全面深入探讨甘木通对缺血性中风的作用以及作用机制研究。

参考文献:

[1] 聂 阳, 李 博, 朱俊访, 等. 甘木通总黄酮对乳鼠原代心肌细胞缺氧/复氧损伤的保护作用[J]. 中华中医药学刊, 2017, 35(7): 1876-1878; 1939.

[2] 王晓平, 倪京满. 脑缺血再灌注损伤的研究及药物治疗进

展[J]. 中国新药杂志, 2016, 25(6): 659-663; 691.

[3] 季梦漂, 周德生, 李 中, 等. 脑梗死中医证素分布与组合规律研究[J]. 辽宁中医杂志, 2017, 44(1): 9-11.

[4] 黄海潮, 聂 阳, 张小红, 等. 甘木通总黄酮保护 H₂O₂ 诱导的 PC12 细胞损伤 [J]. 中成药, 2015, 37 (12): 2585-2589.

[5] 聂 阳, 黄勇红, 李 博, 等. 表面活性剂-超声协同提取甘木通总黄酮工艺的研究[J]. 中成药, 2013, 35(9): 2040-2042.

[6] 臧林泉, 苏兴文, 邱鹏新, 等. 一种神经元体外缺氧诱导凋亡模型的建立 [J]. 中国病理生理杂志, 2007, 23(6): 1244-1245; 1248.

[7] 黄海潮, 巫 玮, 张小红, 等. 布南色林对 H₂O₂ 引起的 PC12 细胞损伤的神经保护作用研究[J]. 天津医药, 2016, 44(3): 311-313; 389.

[8] Tan C, Dlugosz P J, Peng J, *et al.* Auto-activation of the apoptosis protein bax increases mitochondrial membrane permeability and is inhibited by Bcl-2[J]. *J Biol Chem*, 2006, 281(21): 14764-14775.

[9] 王李俊, 杨 琴, 王 飞, 等. 桦褐孔菌醇诱导人乳腺癌 MCF-7 细胞凋亡的分子机制研究[J]. 中草药, 2016, 47(6): 970-973.

[10] Škec L, Alfano G, Jelenic G, *et al.* On *Gc*, *Jc* and the characterisation of the mode-I fracture resistance in delamination or adhesive debonding with an accurate and industry-friendly data-reduction method[J]. *Biochem J*, 2018, 384(1): 47-58.

[11] Wang G H, Lan R, Zhen X D, *et al.* An-Gong-Niu-Huang Wan protects against cerebral ischemia induced apoptosis in rats: up-regulation of Bcl-2 and down-regulation of Bax and caspase-3 [J]. *J Ethnopharmacol*, 2014, 154(1): 156-162.

[12] 霍金凤, 季 彬, 杨 滨. 杜鹃兰乙醇提取物对谷氨酸诱导的 PC12 细胞损伤的保护作用[J]. 中国新药杂志, 2018, 27(5): 560-565.

[13] 张蒨珊, 吴春云. 脑缺血性损伤的分子机制和信号通路研究进展[J]. 中国临床解剖学杂志, 2015, 33(6): 728-731.

[14] Lagoa R, Gañán C, López-Sánchez C, *et al.* The decrease of NAD (P) H: quinone oxidoreductase 1 activity and increase of ROS production by NADPH oxidases are early biomarkers in doxorubicin cardiotoxicity [J]. *Biomarkers*, 2014, 19 (2): 142-153.

[15] 胡宗礼, 黄晓萍, 陈珺霞. 甘木通抗心肌缺血的有效部位与作用研究[J]. 中国药学杂志, 2011, 46(9): 668-670.