

丹皮酚对高糖诱导心肌细胞 PI3K-Akt 信号通路的影响

武单单， 周晓慧*
(承德医学院, 河北 承德 067000)

摘要：目的 细胞水平观察丹皮酚对高糖诱导心肌细胞 PI3K-Akt 信号通路的影响，以探讨丹皮酚防治糖尿病心肌病的分子机制。**方法** 采用差速贴壁法培养乳鼠原代心肌细胞，MTT 法筛选丹皮酚药物的安全质量浓度。将心肌细胞随机分为正常组、高糖组、丹皮酚低剂量组、丹皮酚中剂量组、丹皮酚高剂量组。流式细胞术检测细胞的凋亡率，Western blot 法检测 Akt、Bcl-2、Bcl-xL、Bax、caspase3、cleaved-caspase3、CytC 的蛋白表达。**结果** 原代乳鼠心肌细胞提取成功。流式细胞术结果显示，与正常组比较，高糖组细胞凋亡率增加 ($P<0.01$)；与高糖组比较，丹皮酚低、中、高剂量组心肌细胞的凋亡率有不同程度的降低 ($P<0.01$)。Western blot 结果显示，与正常组比较，高糖组心肌细胞 Akt、Bcl-2、Bcl-xL 的蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，Bax、cleaved-caspase3、CytC 蛋白表达增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)，caspase3 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$)；与高糖组比较，丹皮酚低、中、高剂量组中 Akt、Bcl-2、Bcl-xL 蛋白表达有不同程度的增加 ($P<0.05$, $P<0.01$)，Bax、cleaved-caspase3、CytC 蛋白表达有不同程度下降 ($P<0.05$, $P<0.01$)，呈一定的剂量依赖性；caspase3 蛋白表达在各用药组中均无明显变化 ($P>0.05$)。**结论** 丹皮酚有效地抑制高糖诱导的心肌细胞凋亡，可能是通过激活 PI3K-Akt 信号通路，进而上调抗凋亡基因的表达和阻碍促凋亡基因的表达而实现的。

关键词：丹皮酚；糖尿病心肌病；心肌细胞；细胞凋亡；Akt

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**B **文章编号：**1001-1528(2022)02-0597-05

doi:10.3969/j.issn.1001-1528.2022.02.050

糖尿病心肌病 (diabetic cardiomyopathy) 是指糖尿病患者排除高血压和冠心病，单纯由高血糖引起的心肌疾病。其病理特征主要表现为左心室的肥大和早期舒张功能的损害，伴随心肌炎症、心肌纤维化、心肌细胞凋亡，晚期可能伴有收缩功能障碍^[1-2]。其心脏结构和功能的改变是糖尿病心肌病引起心力衰竭，发生死亡的主要因素之一^[3]。在引起糖尿病心肌病的因素中，心肌细胞凋亡是糖尿病心肌病的重要发病环节。因此抑制心肌细胞凋亡可缓解糖尿病心肌病发生发展。丹皮酚又称牡丹酚，是中药牡丹皮 (毛茛科植物牡丹的干燥根皮) 和徐长卿 (萝藦科植物徐长卿的干燥根及根茎) 的主要成分，丹皮酚是一种小分子酚类化合物，是一类天然活性物质，毒性极低。现代药理学研究表明丹皮酚具有广泛的药理作用，如抗氧化^[4]、抗炎^[5]、降血脂、降血糖^[6]等，本课题组前期通过体内实验已证实，丹皮酚对大鼠糖尿病心肌病起保护作用^[7]。本实验通过心肌细胞的原代培养，高糖刺激模拟临床糖尿病患者体内高血糖的内环境，在细胞水平上探讨丹皮酚防治糖尿病心肌病发挥作用的确切分子机制，为研发早期抑制糖尿病心肌病发生发展的新药提供有价值的理论和实验依据。

1 材料

1.1 动物 1~3 d 新生 SD 乳鼠 10~16 只，雌雄不限，由北京维通利华实验动物技术有限公司提供，动物生产许可证号 SCXK (京) 2016-0006，本研究获得承德医学院动物伦理委员会批准 (编号 20190101)。

1.2 试剂与药物 丹皮酚磺酸钠注射液 (金陵药业股份有限公司南京金陵制药厂，主要成分为丹皮酚磺酸钠，辅料为依地酸二钠、亚硫酸氢钠、甘油，规格 2 mL: 0.1 g，批号 180202)。胰酶、细胞裂解液、BCA 蛋白浓度测定试剂盒、台盼蓝染色液 (北京索莱宝科技有限公司)；DMEM 培养基 (美国 Gibco 公司)；胎牛血清 (美国 Excell Bio 公司，批号 11H059)；5-溴脱氧尿嘧啶核苷 (5-bromo-2-deoxyuridine, BrdU)、噻唑蓝 (methylthiazolyldiphenyl-tetrazolium bromide, MTT) (美国 Sigma 公司)；AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒 (美国 BD 公司，批号 556547)；细胞计数板 (美国 Thermo 公司)；兔抗 Akt (武汉爱博泰克生物科技有限公司，批号 3515345201)；兔抗 Bcl-2 (美国 Santa Cruze 公司，批号 k1918)；兔抗 Bcl-xL、Bax、caspase3、cleaved-caspase3、CytC (美国 CST 公司，

收稿日期：2020-06-20

基金项目：河北省自然科学基金项目 (H2018406061)

作者简介：武单单 (1992—)，女，硕士，从事心血管药理学研究。Tel: 18713800707, E-mail: 1907163551@qq.com

* 通信作者：周晓慧 (1957—)，女，硕士，教授，从事心血管药理学研究。Tel: (0314) 2290632, E-mail: zzh5055@sina.com

网络出版日期：2021-04-01

网络出版地址：https://kns.cnki.net/kcms/detail/31.1368.R.20210401.1345.002.html

批号 2764、2772、9662、9661、11940)；兔抗 β -actin (北京博奥森生物技术有限公司)；辣根酶标记山羊抗兔 IgG (北京义翘神州科技股份有限公司)。

1.3 仪器 超净工作台 (上海博讯实业有限公司)；细胞培养箱 (美国 Thermo 公司)；倒置相差显微镜 (日本 Olympus 公司)；流式细胞仪 [碧迪医疗器械 (上海) 有限公司]；200 目细胞滤网 (北京索莱宝科技有限公司)；Countess II 自动细胞计数仪 (美国 Life 公司)；立式蒸汽高压锅 (日本 Tomy 公司)；低温高速离心机 (澳大利亚 Dynamica 公司)；酶标仪 (美国 BioTek 公司)；DYY-BC 型电泳仪 (北京市六一仪器厂)；全自动快速凝胶成像系统 (美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 新生乳鼠原代心肌细胞的制备 取新生 1~3 d 新生 SD 乳鼠，不分雌雄，用 75% 乙醇消毒 3 次后，置于超净台上，取心尖部分前，将乳鼠胸骨部分用 75% 乙醇进行第 4 次消毒，在剑突上一肋剪开胸骨，挤出心脏，用灭菌的眼科弯剪，剪去心脏前 1/3 的心室部分，放入盛有 4 ℃ 预冷 PBS 液的 1 号培养皿中，再次用灭菌好的眼科弯镊放入盛有 4 ℃ 预冷 PBS 液的 2 号培养皿中，依次清洗，去掉血污。将清洗好的心肌组织用直剪和直镊剪成 0.5~1 mm³ 体积的小组织块，用 1 号吸管将心肌组织吸入 15 mL 离心管中，用吸管将 PBS 吸出。用 2 号吸管吸取 2 mL 0.25% 胰蛋白酶清洗 1 min，匀速摇晃离心管，将胰酶弃除。用 2 号吸管吸取 2 mL 0.25% 胰蛋白酶消化，匀速摇晃离心管，待观察到胰酶浑浊后，吸出单细胞悬液，放入提前装有 30 mL 12% 低糖 DMEM 培养基中终止消化。多次重复上一步，直至胰酶不再浑浊，且心肌组织由红色变成透明状的絮状物。将收集到的所有心肌细胞，经 200 目细胞网筛过滤。将滤完的心肌细胞离心，1 500 r/min 离心 10 min，弃上清，加入新的培养基，吹打、混匀，接种于大皿中。将大皿放入 5% CO₂、37 ℃ 细胞培养箱中，用差速贴壁法培养细胞 90 min。先贴壁的成纤维细胞，未贴壁的心肌细胞悬液。按照心肌细胞悬液：台盼蓝染液 = 9：1 的比例，将细胞密度调整为 1 × 10⁶/mL，并接种于 6 孔板中，并加入 BrdU (0.1 mmol/L) 以抑制成纤维细胞分裂增生。

2.2 MTT 法筛选药物质量浓度 实验分为空白组 (无细胞，只有培养液)、正常对照组 (有细胞，葡萄糖浓度为 5.5 mmol/L)、丹皮酚给药组 (25、30、35、40、45、50 μ g/mL)，每组设置 6 个复孔，按照 1 × 10⁵/mL 的密度接种在 96 孔板，每孔 100 μ L，放入 5% CO₂、37 ℃ 细胞培养箱中，加药培养 48 h 后，每孔加入 10 μ L 质量浓度为 5 mg/mL 的 MTT，在培养箱中孵育 4 h。将上清吸除以后，每孔中加入二甲基亚砷溶液 150 μ L，避光，室温反应 10 min。用酶标仪检测每孔 490 nm 的吸光度 (A) 值。实验重复 3 次，取均值。

2.3 高糖诱导心肌细胞损伤模型的制备 心肌细胞培养 48 h 后，用无 FBS 的高糖 DMEM (35 mmol/L) 培养基处

理 48 h。

2.4 实验分组及给药 将原代心肌细胞分离培养后的第 3 天，随机分为以下 5 组，正常对照组加入不含 FBS 的低糖 DMEM 培养基；高糖组加入不含 FBS、葡萄糖终浓度为 35 mmol/L 的 DMEM 培养基；丹皮酚低剂量组加入不含 FBS、葡萄糖终浓度为 35 mmol/L 的 DMEM 培养基、终质量浓度 10 μ g/mL 的丹皮酚；丹皮酚中剂量组加入不含 FBS、葡萄糖终浓度为 35 mmol/L 的 DMEM 培养基、终质量浓度 20 μ g/mL 的丹皮酚；丹皮酚高剂量组加入不含 FBS、葡萄糖终浓度为 35 mmol/L 的 DMEM 培养基、终质量浓度 40 μ g/mL 的丹皮酚。

2.5 流式细胞术检测心肌细胞凋亡率 细胞凋亡检测使用 AnnexinV-FITC/PI 细胞凋亡双染试剂盒，4 ℃ 预冷的 PBS 洗涤细胞 2 次，收集细胞后加入 1 × Binding Buffer 重悬细胞，在加入 AnnexinV-FITC 混匀后，避光，室温孵育 15 min，上机前 5 min 再加入 PI 染色。

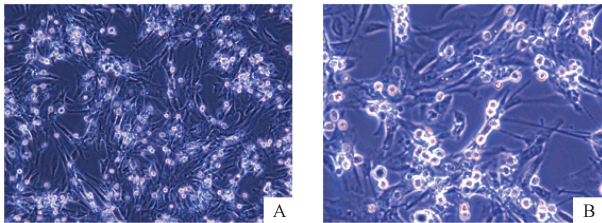
2.6 蛋白质免疫印迹 (Western blot) 检测 Akt、Bcl-2、Bcl-xL、Bax、caspase3、cleaved-caspase3、CytC 蛋白表达 实验分为正常组 (5.5 mmol/L)、高糖组 (35 mmol/L)、丹皮酚低剂量组 (10 μ g/mL)、丹皮酚中剂量组 (20 μ g/mL)、丹皮酚高剂量组 (40 μ g/mL)。48 h 后弃去原培养液，用 PBS 洗 3 遍，每孔加入 50 μ L 裂解液 (RIPA：PMSF = 100：1)，冰上裂解 30 min，4 ℃、13 500 r/min 离心 15 min，取上清液。BCA 法进行蛋白浓度检测，绘制出标准曲线，取总蛋白 30 μ g 上样。按 4：1 混合蛋白液与 5 × Buffer 上样缓冲液，100 ℃ 孵育 10 min 至蛋白变性。10% SDS-PAGE 稳压电泳，冰中 150 mA 稳流转膜，5% 脱脂奶粉 4 ℃ 封闭过夜。次日孵育抗体，将膜放于 1：2 000 一抗稀释液中室温摇床上孵育 2 h，每次用 TBST 洗膜 15 min，共洗 3 次；加入 1：8 000 二抗稀释液，室温摇床上孵育 90 min，每次用 TBST 洗膜 10 min，共洗 3 次；显影暗室中将 ECL 发光液滴加到载有蛋白的膜上，避光显影。Image J 分析条带灰度值，以目的条带灰度值/ β -actin 灰度值表示蛋白表达。实验重复 3 次，取均值。

2.7 统计学分析 通过 SPSS 19.0 软件进行处理，实验数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示，组间比较采用单因素方差分析，组间多重比较采用 LSD-*t* 检验。*P* < 0.05 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 新生乳鼠原代心肌细胞形态学观察 显微镜下观察心肌细胞刚分离时呈圆形，折光性好，悬浮于培养基中，大概 5~6 h 后，开始贴壁生长，由圆形逐渐变成梭形；24 h 后可见自发搏动，但节律和强度不同，伸出伪足，成梭形或多边形，且胞核清晰；48 h 后互相交织成网，形成细胞簇；72 h 后收缩力明显且搏动呈现同步性，心肌细胞增殖和分裂甚少。见图 1。

3.2 药物筛选 丹皮酚终质量浓度为 40 μ g/mL 时，与正常组比较差异有统计学意义 (*P* < 0.05)，故以其为最大安全质量浓度。见表 1。



注：A 为 200 倍，B 为 400 倍。

图 1 72 h 不同倍数下心肌细胞形态学观察

3.3 心肌细胞凋亡率检测 与正常组比较，高糖组细胞的凋亡率升高 ($P<0.01$)；与高糖组比较，丹皮酚低、中、

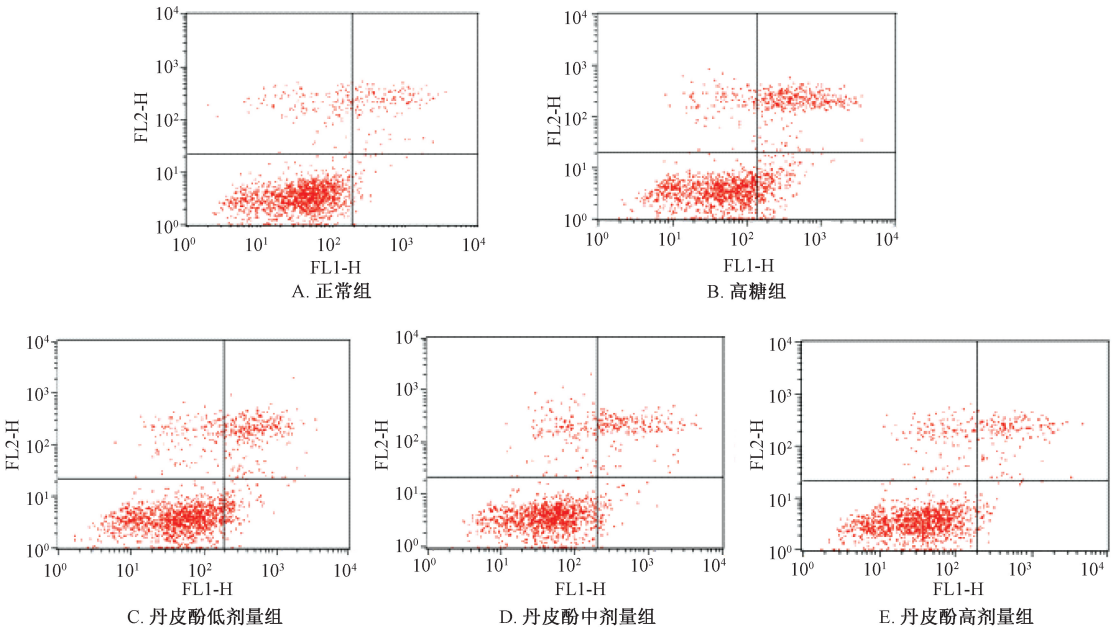


图 2 流式细胞术检测各组细胞凋亡率

表 2 各组细胞凋亡率比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	剂量/($\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)	细胞的凋亡率/%
正常组	—	9.946±0.529
高糖组	—	31.140±2.352**
丹皮酚低剂量组	10	23.580±1.774##
丹皮酚中剂量组	20	15.680±1.130##△△
丹皮酚高剂量组	40	13.770±1.955##△△▲▲

注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与高糖组比较，## $P<0.01$ ；与丹皮酚低剂量组比较，△△ $P<0.01$ ；与丹皮酚中剂量组比较，▲▲ $P<0.01$ 。

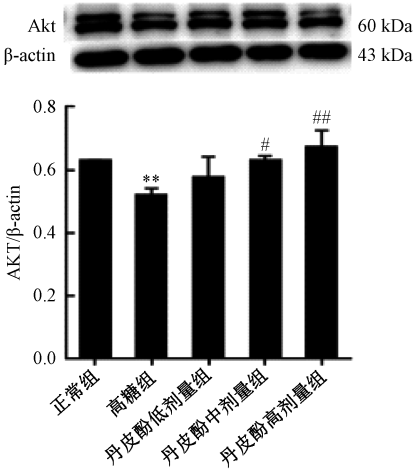
3.4 Akt、Bcl-2、Bcl-xL、Bax、caspase3、cleaved-caspase3、CytC 蛋白表达检测 与正常组比较，高糖组细胞 Akt、Bcl-2、Bcl-xL 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，Bax、cleaved-caspase3、CytC 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，caspase3 蛋白表达无明显变化 ($P>0.05$)；与高糖组比较，丹皮酚低、中、高剂量组细胞 Akt、Bcl-2、Bcl-xL 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，Bax、cleaved-caspase3、CytC 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，呈一定的剂量依赖性；caspase3 的蛋白表达在各用药组中均无明显变化 ($P>0.05$)。见图 3~8。

表 1 丹皮酚安全用药浓度筛选结果 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	A(490 nm)
正常组	0.334±0.004
25 $\mu\text{g/mL}$ 丹皮酚组	0.326±0.001
30 $\mu\text{g/mL}$ 丹皮酚组	0.324±0.010
35 $\mu\text{g/mL}$ 丹皮酚组	0.310±0.007
40 $\mu\text{g/mL}$ 丹皮酚组	0.283±0.012*
45 $\mu\text{g/mL}$ 丹皮酚组	0.281±0.008*
50 $\mu\text{g/mL}$ 丹皮酚组	0.280±0.006*

注：与正常组比较，* $P<0.05$ 。

高剂量组细胞凋亡率降低 ($P<0.01$)，其中丹皮酚中、高剂量组细胞凋亡率下降明显 ($P<0.01$)，见图 2、表 2。

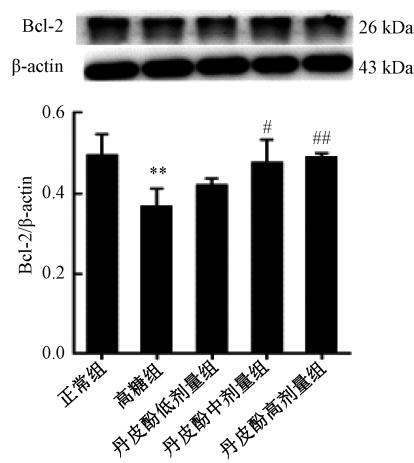


注：与正常组比较，** $P<0.01$ ；与高糖组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ 。

图 3 心肌细胞 Akt 的蛋白表达 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

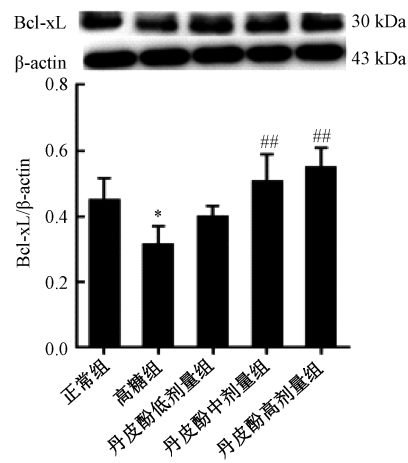
4 讨论

糖尿病心肌病已经成为糖尿病致死的主要原因^[8]。心



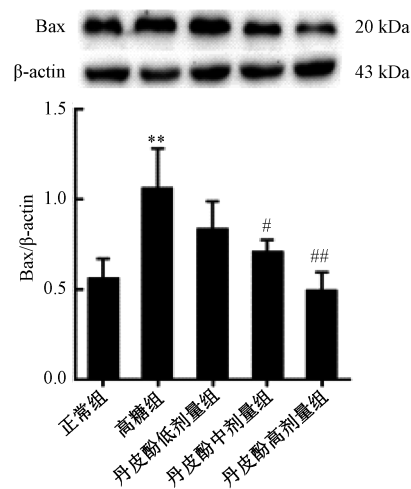
注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与高糖组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图 4 心肌细胞 Bcl-2 的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



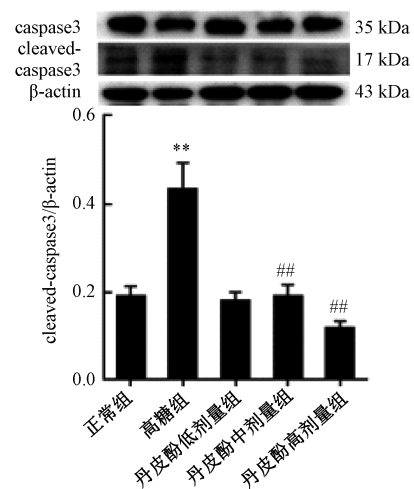
注：与正常组比较，* $P < 0.05$ ；与高糖组比较，## $P < 0.01$ 。

图 5 心肌细胞 Bcl-xL 的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



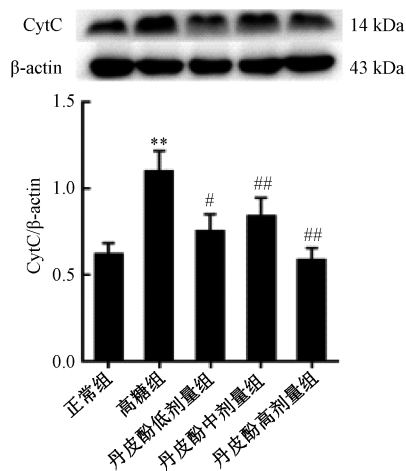
注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与高糖组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图 6 心肌细胞 Bax 的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与高糖组比较，## $P < 0.01$ 。

图 7 心肌细胞 cleaved-caspase3 的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



注：与正常组比较，** $P < 0.01$ ；与高糖组比较，# $P < 0.05$ ，## $P < 0.01$ 。

图 8 心肌细胞 CytC 的蛋白表达 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

肌细胞凋亡是重要发病环节。研究提示，高血糖可通过影响线粒体功能诱导程序性细胞死亡^[9-10]。因此，抑制心肌细胞凋亡可减轻糖尿病心肌病对心肌组织的破坏。本研究经流式细胞术法检测，结果显示，与正常组比较，高糖组心肌细胞凋亡率升高 ($P < 0.01$)；与高糖组比较，丹皮酚各剂量组心肌细胞凋亡率降低 ($P < 0.01$)，且呈现一定的剂量依赖性，表明丹皮酚能够通过抑制心肌细胞凋亡而对高糖损伤的心肌细胞产生保护作用。

高糖环境下，会产生大量的糖期终末化产物、聚腺苷酸二磷酸核糖转移酶等激活细胞的凋亡机制，诱导细胞的异常凋亡。细胞凋亡包括凋亡抑制蛋白和凋亡诱导蛋白等多种蛋白联合作用^[11]。目前，多种因子被证明与心肌细胞的凋亡有关，其中 Akt 是其中之一^[12]。以 Akt 基因敲除小鼠为研究对象，发现胰岛素 β 细胞数目减少，且外周组织中出现了胰岛素抵抗，早期出现心肌细胞的凋亡，导致 2 型糖尿病的发生^[13-14]。在 2 型糖尿病胰岛素严重抵抗的患

者体内，也检测出了 Akt 基因的突变，说明激活 PI3K-Akt 信号通路将成为防治糖尿病心肌病心肌细胞凋亡的一个关键环节^[13]。

线粒体凋亡通路是最主要的凋亡通路^[14]，Bax 在细胞质中以一种非活化的形式存在，在接收到凋亡信号后 Bax 移位到线粒体表面，破坏线粒体膜，增加线粒体通透性，致使细胞色素 C 外泄，线粒体凋亡途径被激活，此凋亡途径也可被 Bcl-2、Bcl-xL 等凋亡抑制蛋白所调控^[15]，Bax 与 Bcl-2 结合形成异源二聚体，可以阻止 Bax 向膜外移位，从而抑制其促凋亡的作用。caspase3 作为凋亡的最终执行者，正常情况下以无活性的酶原形式存在，Akt 一旦被激活发生凋亡级联反应，caspase3 被剪切活化成为 cleaved-caspase3，故抑制 cleaved-caspase3 的活化也能抑制细胞凋亡^[16-18]。

本实验经 Western blot 检测，结果显示，丹皮酚可抑制心肌细胞凋亡，增强 Akt 表达，激活 PI3K-Akt 信号通路，通过上调抗凋亡蛋白 Akt、Bcl-2、Bcl-xL 的表达，抑制促凋亡蛋白 ERK1/2、p-ERK1/2、Bax、cleaved-caspase3、CytC 的表达而实现，且呈现一定的剂量依赖性。

高糖环境下的心肌细胞，Akt 激活障碍，PI3K-Akt 信号通路传导受限，致使促凋亡基因 Bax、CtyC 表达上调，抗凋亡基因 Bcl-2、Bcl-xL 表达受到抑制，诱导心肌细胞凋亡增强。经丹皮酚干预后，Akt 表达增强，抑制了其下游促凋亡蛋白 Bax、CtyC 的表达，阻碍了 caspase3 的活化，同时促进抗凋亡基因 Bcl-2、Bcl-xL 表达，心肌细胞凋亡程度明显减轻，使高糖损伤的心肌细胞得到了保护。

综上所述，丹皮酚有效抑制高糖诱导的心肌细胞凋亡，可能是通过激活 PI3K-Akt 信号通路，促进抗凋亡基因蛋白的表达，抑制促凋亡基因蛋白表达，阻碍 caspase-3 的活化，显著降低心肌细胞凋亡程度，从而保护高糖损伤的心肌细胞。

参考文献：

[1] Sasso F C, Rambaldi P F, Carbonara O, *et al.* Perspectives of nuclear diagnostic imaging in diabetic cardiomyopathy[J]. *Nutr Metab Cardiovasc Dis*, 2010, 20(3): 208-216.

[2] 董 丽, 杨思进, 石建军, 等. 糖尿病心肌病心室重塑的研究进展[J]. 中国医药导刊, 2020, 22(1): 11-14.

[3] 范亮亮, 马立宁, 彭元亮, 等. PI3K/AKT 信号通路与心理衰竭[J]. 生命科学研究, 2015, 19(1): 85-90.

[4] 王亚萍. 丹皮酚降低自发性高血压大鼠血压的血管相关机制研究[D]. 石家庄: 河北医科大学, 2017.

[5] 翟春梅, 孟祥瑛, 付敬菊, 等. 牡丹皮的现代药学研究进展[J]. 中医药信息, 2020, 37(1): 109-114.

[6] Yin M, Silljé H H, Meissner M, *et al.* Early and late effects of the DPP-4 inhibitor vildagliptin in a rat model of post-myocardial infarction heart failure [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2011, 10 (1): 85.

[7] 赵亚男. 丹皮酚对大鼠糖尿病心肌病的保护作用及其氧化应激信号转导机制研究[D]. 承德: 承德医学院, 2019.

[8] Hutchinson K R, Lord C K, West T A, *et al.* Cardiac fibroblast-dependent extracellular matrix accumulation is associated with diastolic stiffness in type 2 diabetes[J]. *PLoS One*, 2013, 8 (8): e72080.

[9] Pappachan J M, Varughese G I, Sriraman R, *et al.* Diabetic cardiomyopathy: pathophysiology, diagnostic evaluation and management[J]. *World J Diabetes*, 2013, 4(5): 177.

[10] Chavali V, Tyagi S C, Mishra P K. Predictors and prevention of diabetic cardiomyopathy [J]. *Diabetes Metab Syndr Obes*, 2013, 6(1): 151-160.

[11] Garofalo T, Manganelli V, Grasso M, *et al.* Role of mitochondrial raft-like microdomains in the regulation of cell apoptosis[J]. *Apoptosis*, 2015, 20(5): 621-634.

[12] Wang S, Cheng Z Y, Chen X J. Promotion of PTEN on apoptosis through PI3K/Akt signal in vascular smooth muscle cells of mice model of coronary heart disease [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(9): 14636-14644.

[13] Cho H, Mu J, Kim J K, *et al.* Insulin resistance and a diabetes mellitus-like syndrome in mice lacking the protein kinase Akt2 (PKBβ) [J]. *Science*, 2001, 292 (5522): 1728-1731.

[14] George S, Rochford J J, Wolfrum C, *et al.* A family with severe insulin resistance and diabetes due to a mutation in AKT2 [J]. *Science*, 2004, 304(5675): 1325-1328.

[15] Zhang Q, Huang W D, Lu X Y, *et al.* Puerarin protects differentiated PC12 cells from H₂O₂-induced apoptosis through the PI3K/Akt signalling pathway[J]. *Cell Biol Int*, 2012, 36 (5): 419-426.

[16] Xie R H, Yin M, Yin C, *et al.* Effect of *N*-acetyl-*L*-cysteine on protection research in H₂O₂-Induced mesenchymal stem cells apoptosis[J]. *Chin Pharmacol Bull*, 2014, 30(1): 54-59.

[17] Wen H L, Wu Z, Hu H D, *et al.* The anti-tumor effect of pachymic acid on osteosarcoma cells by inducing PTEN and caspase 3/7-dependent apoptosis [J]. *J Nat Med*, 2018, 72 (1): 57-63.

[18] Selvam S P, Roth B M, Nganga R, *et al.* Balance between senescence and apoptosis is regulated by telomere damage-induced association between p16 and caspase-3 [J]. *J Biol Chem*, 2018, 293(25): 9784-9800.