DOI:10.16016/j.1000-5404.202104138

槲皮素通过 MAPK/ERK1/2 信号途径对 H9C2 细胞抗缺氧损伤的作用

何依津,张鹏志,田海月,李 静,王育花 730050 兰州,中国人民解放军联勤保障部队第九四〇医院耳鼻咽喉头颈外科

[**摘要**] **目的** 研究槲皮素对 H9C2 心肌细胞抗缺氧损伤的作用及机制。**方法** 建立 H9C2 细胞缺氧模型,依次测定乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)和丙二醛(MDA)的含量,使用 MTT 法获得槲皮素作用 H9C2 细胞最适宜药物浓度。根据 H9C2 细胞不同处理分为对照组(C)、缺氧模型组(H)、SCH772984 组(S)、槲皮素组(Q)、槲皮素+缺氧模型组(Q+H)和槲皮素+SCH772984 组(Q+S)。各组处理完成后再依次检测 LDH、SOD 和 MDA 的含量,并观察 MAPK、ERK1/2 蛋白及其磷酸化后的表达水平。**结果** H9C2 细胞对缺氧培养条件具有一定时间的依赖性,缺氧培养 24 h 后出现显著的缺氧损伤,LDH 和 MDA 水平显著增加而 SOD 水平显著降低($P<0.05$);MTT 检测结果显示 10^{-6} mol/L 浓度的槲皮素显著促进 H9C2 细胞增殖($P<0.05$)。10^{-6} mol/L 槲皮素显著降低 Q 组和 S 组 H9C2 细胞培养中 LDH 和 MDA 的含量($P<0.05$),并显著提高 SOD 的含量($P<0.05$)。10^{-6} mol/L 浓度的槲皮素也提高了 H9C2 细胞 p-MAPK 和 p-ERK1/2 磷酸化水平。**结论** 槲皮素能有效抵抗缺氧引起的 H9C2 细胞损伤,提高细胞抗氧化能力,清除缺氧过程中产生的有害物质,激活 MAPK/ERK1/2 信号途径发挥抗缺氧化对 H9C2 细胞损伤的作用。

[**关键词**] 槲皮素;MAPK/ERK1/2;H9C2 细胞;缺氧

[**中图法分类号**] R282.71; R322.11; R594.3 [**文献标志码**] A

Quercetin protects H9C2 cells against hypoxia injury through MAPK/ERK1/2 signal pathway

HE Yijin, ZHANG Pengzhi, TIAN Haiyue, LI Jing, WANG Yuhua Department of Otolaryngology, Head and Neck Surgery, No. 940 Hospital of Joint Logistic Support Force of PLA, Lanzhou, Gansu Province, 730050, China

[**Abstract**] **Objective** To investigate the effect and mechanism of quercetin on H9C2 cells against hypoxia injury. **Methods** The contents of lactate dehydrogenase (LDH), superoxide dismutase (SOD) and malondialdehyde (MDA) were determined in a hypoxia model of H9C2 cells. MTT assay was used to measure the optimal concentration of quercetin to H9C2 cells. Then the H9C2 cells were divided into control group (C), hypoxia group (H), SCH772984 group (S), quercetin group (Q), quercetin+hypoxia group (Q+H), and quercetin+SCH772984 group (Q+S). After the treatment of each group was completed, the contents of LDH, SOD and MDA were successively detected, and the expression levels of MAPK, ERK1/2 proteins and their phosphorylation were observed. **Results** H9C2 cells were dependent on hypoxia culture conditions for a certain period of time. After 24 h of hypoxia culture, significant hypoxic damaged were observed. LDH and MDA contents were increased significantly while that of SOD was decreased significantly ($P<0.05$). The results of MTT assay showed quercetin at a concentration of 10^{-6} mol/L significantly promoted the proliferation

[**基金项目**] 甘肃省青年科技基金计划(20JR10RA011)

[**通信作者**] 王育花,E-mail:945519871@qq.com

1000-5404/Copyright © 2021, 陆军军医大学(第三军医大学)。这篇开放获取文章遵循 CC BY 许可协议(https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/)

of H9C2 cells ($P<0.05$), reduced the contents of LDH and MDA in the H9C2 cell of the Q and S groups ($P<0.05$), and significantly increased the content of SOD ($P<0.05$). In addition, the concentration also increased the phosphorylation levels of p-MAPK and p-ERK1/2 in H9C2 cells. **Conclusion** Quercetin can effectively resist the damage of H9C2 cells caused by hypoxia, improve antioxidant capacity, remove harmful substances produced during hypoxia, and activate the MAPK/ERK1/2 signal pathway to play an anti-hypoxic effect.

[**Key words**] quercetin; MAPK/ERK1/2; H9C2; hypoxia

Supported by the Science and Technology Fund for Young Scholars of Gansu Province (20JR10RA011). Corresponding author: WANG Yuhua, E-mail: 945519871@qq.com

高原缺氧一直是人体健康的重大障碍,缺氧引起的心血管疾病是人类死亡的首要原因[1]。高原缺氧的病理机制与氧化应激和细胞凋亡密切相关,其预防和治疗一直面临很大压力[2]。由于高原的缺氧环境可导致水土不服,从而引起一系列其他疾病,因此,抗缺氧药物的寻找和研究迫在眉睫。近年来,有研究表明传统中药杜仲具有广泛药理活性如抗氧化作用[3],其主要成分为槲皮素、黄酮类等化合物[4-5]。也有实验研究表明杜仲主要单体成分槲皮素具有保护心肌细胞、抑制细胞凋亡的作用[6],但其作用机制尚不清楚。

本研究通过建立 H9C2 心肌细胞缺氧模型,筛选槲皮素对 H9C2 细胞抗缺氧损伤的最佳浓度,并探讨槲皮素发挥抗缺氧损伤作用与 MAPK/ERK1/2 信号途径的关系,为槲皮素中药的二次开发和机制研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

H9C2 细胞株购自商业化的公司。DMEM 培养基(美国 Gibco 公司);槲皮素(中国药品检定所,纯度含量 98%以上);胎牛血清(杭州四季青生物科技有限公司);胰蛋白酶、碘化丙啶(PI)、噻唑蓝(MTT)、二甲基亚砜(DMSO)均购自 Sigma 公司;乳酸脱氢酶(LDH)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)、检测试剂盒均购自南京建成生物工程研究所;兔抗 MAPK、p-MAPK、β-actin、ERK1/2 和 ERK1/2 一抗均购于 Abcam 公司;辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗购于中杉金桥公司;SCH772984 购于 Selleck 公司;青霉素钠、链霉素(华北制药有限公司);胰蛋白酶(上海生物工程有限公司),其他试剂均为国产分析纯。

1.2 仪器

酶标仪(BioTeK 公司,美国);倒置相差显微镜(日本 OLYMPUS);SW-CJ-1F 超净工作台(苏州安泰空气技术有限公司);三气细胞培养箱(美国赛默飞世尔科技);IX71 倒置荧光显微镜(日本 OLYMPUS 公司)。

1.3 实验方法

H9C2 心肌细胞培养条件 37 ℃ 5% CO_2,含 10%胎牛血清的 DMEM 培养液,待细胞融合至培养皿面积的 70%~80%时进行传代培养,每隔 3 天更换培养液 1 次,取对数生长期的细胞进行后续实验。

1.4 H9C2 细胞缺氧模型建立

细胞计数调整细胞浓度为 1×10^4 个/mL,接种于 24 孔板中,每孔接种量为 1 mL。37 ℃ 5% CO_2 培养的 H9C2 细胞融合生长达到 70%~80%时开始改变培养条件为 37 ℃ 95% $N_2$5% CO_2,缺氧培养时间依次为 0(Control)、6、12、24 和 48 h,测定 LDH 和 SOD 的含量,确定最适宜的缺氧培养时间。

1.5 槲皮素适宜药物浓度筛选

细胞计数,调整细胞密度为 1×10^4 个/mL,接种于 96 孔板中,每孔 200 μL。接种 24 h 后倒置相差显微镜下观察细胞贴壁生长达到 80%以上时,依次分别使用不同浓度槲皮素(10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}mol/L)对培养 37 ℃ 5% CO_2 的 H9C2 细胞进行干预。药物干预 24 h 弃掉培养液,37 ℃温浴的 PBS 漂洗 3 次后,依次加入 10 μL 5 mg/mL 的 MTT 继续培养 4 h,弃去上清液,加入 100 μL DMSO,置于摇床上震荡 10 min 使结晶充分溶解。酶标仪 490 nm 处测定光密度值。

1.6 槲皮素对 H9C2 细胞缺氧保护作用

根据实验设计要求进行分组,待 H9C2 细胞接种培养融合达到 80%以上时,将接种细胞依次分为对照组(37 ℃、95% $O_2$5% CO_2:C 组)、缺氧模型组(37 ℃ 95% $N_2$5% CO_2:H 组)、药物组(10^{-6} mol/L 槲皮素 37 ℃、95% $N_2$5% CO_2:Q 组)、SCH772984 组(37 ℃ 95% $O_2$5% CO_2 4 nmol/L 的 SCH772984:S 组)、药物+缺氧组(37 ℃ 95% $N_2$5% CO_2 10^{-6}mol/L 槲皮素:Q+H 组)、药物+SCH772984 组(37 ℃、5% CO_2 10^{-5}mol/L 槲皮素和 4 nmol/L SCH772984:Q+S 组),然后按照上述条件对 H9C2 细胞进行处理。

1.7 LDH、SOD 和 MDA 的含量分析

上述各组 H9C2 细胞处理后 24 h,分别测定 LDH、SOD 和 MDA 的含量,检测方法严格按照试剂盒说明书操作进行。

1.8 Western blot 检测

按照上述实验设计处理 H9C2 细胞 24 h 后取出培养细胞弃培养液,用 4 ℃预冷的 PBS 清洗 3 次;加入 300 μL 含 1%PMSF 的 RIPA 蛋白裂解液,于冰上静置 10 min 裂解细胞;收集细胞裂解液,4 ℃ 12 000 r/min 离心 30 min;收集上清,BCA 法测定蛋白质浓度,煮沸变性 10 min;取 20 μg 进行 SDS-PAGE 凝胶电泳,然后蛋白转移至 PVDF 膜上,5%脱脂奶粉室温封闭 2 h,加入一抗(p-ERK1/2、ERK1/2、p-MAPK、MAPK、β-actin)4 ℃孵育过夜,TBST 清洗 5 次,每次 5 min;加入二抗室温孵育 2 h,TBST 清洗 5 次,每次 8 min;ECLPlus 超敏发光液暗室发光显影,蛋白条带使用 ipp 软件扫描量化分析。

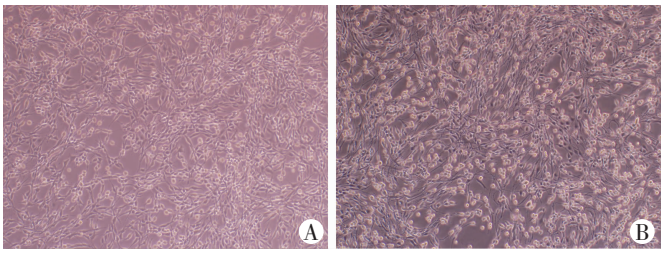
1.9 统计学分析

采用 SPSS 16.0 软件进行分析,计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD 检验,$P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 缺氧改变了 H9C2 细胞形态

正常和缺氧培养 H9C2 细胞 24 h 后,倒置显微镜下观察细胞形态,其中正常对照组 H9C2 细胞呈梭形,排列规整,大小均匀,胞核、胞质边缘界限清楚;缺氧培养组细胞呈不同程度收缩,细胞体积明显缩小、变圆,突起消失(图 1)。



A: 37 ℃ 5% CO_2 培养 24 h 后 H9C2 细胞;B: 37 ℃ 95% N_2 5% CO_2 培养 24 h 后 H9C2 细胞

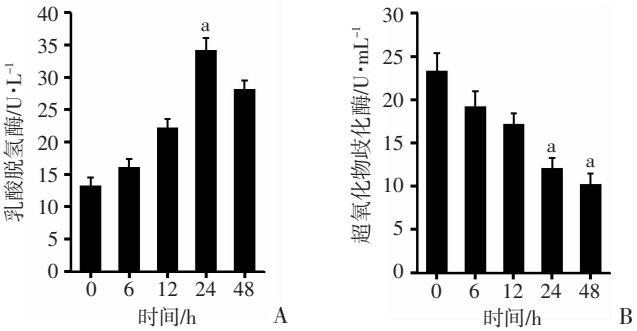
图 1 H9C2 细胞形态观察 (×40)

2.2 H9C2 细胞缺氧模型建立

H9C2 细胞采用 37 ℃ 95% $N_2$5% CO_2 条件分别培养 0、6、12、24、48 h,测定 LDH 和 SOD 含量。随着缺氧时间的延长,细胞培养液中 LDH 含量逐渐升高,SOD 含量逐渐降低,24 h 时与对照相比均有统计学差异($P<0.05$,图 2)。因此,确定 LDH 和 SOD 含量缺氧的最佳时间为 24 h。

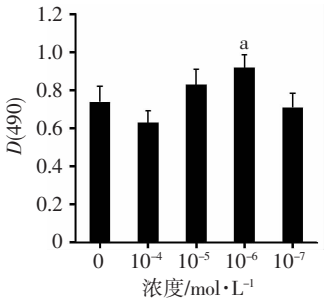
2.3 槲皮素最适浓度的筛选

H9C2 细胞接种培养 24 h 后,分别使用含有 10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7} mol/L 的槲皮素处理 H9C2 细胞 24 h,分析槲皮素对 H9C2 增殖的影响。结果显示,从 10^{-4} mol/L 开始,随着药物浓度的下降细胞活性升高,10^{-6} mol/L 时达到最高,从 10^{-7} mol/L 时细胞活性开始下降,其中 10^{-6} mol/L 与对照比较差异有统计学意义($P<0.05$),因此槲皮素作用 H9C2 细胞最佳浓度为 10^{-6} mol/L(图 3)。



A: 37 ℃ 95% N_2 5% CO_2 培养 H9C2 细胞不同时间后 LDH 含量测定结果;B: 37 ℃ 95% N_2 5% CO_2 培养 H9C2 细胞不同时间后 SOD 含量测定结果 a:$P<0.05$,与对照(0 h)比较

图 2 H9C2 细胞缺氧模型建立 ($n=3$)



a:$P<0.05$,与对照(0 mol/L)比较

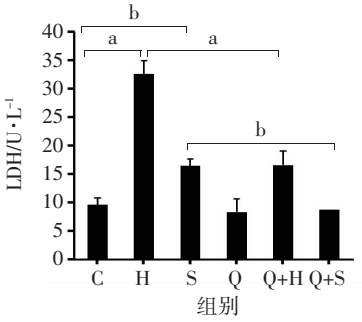
图 3 不同浓度槲皮素对 H9C2 细胞增殖的影响 ($n=6$)

2.4 H9C2 细胞中 LDH 的含量

与对照组比较,H 组和 S 组显著提高了 H9C2 细胞培养液中 LDH 的含量($P<0.01$,$P<0.05$),缺氧加速了 H9C2 细胞损伤,ERK1/2 阻断剂同时也能加速细胞损伤,分别与 H 组和 S 组比较,Q+H 组和 Q+S 组均显著降低细胞培养液中 LDH 的含量($P<0.05$,$P<0.01$),说明槲皮素对缺氧造成的损伤和 ERK1/2 信号被阻断造成的细胞损伤具有一定的保护作用(图 4)。

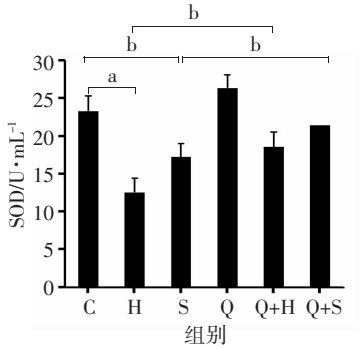
2.5　H9C2 细胞中 SOD 含量

与对照组比较,H 组和 S 组显著降低了 H9C2 细胞内 SOD 含量($P<0.05$,$P<0.01$)。分别与 H 组和 S 组比较,Q+H 组和 Q+S 组显著提高 H9C2 细胞 SOD 含量($P<0.05$)。结果表明槲皮素能有效抵抗缺氧造成的 H9C2 细胞内 SOD 含量下降(图 5)。



a:$P<0.01$,b:$P<0.05$

图 4　槲皮素对 H9C2 细胞内 LDH 含量的影响　($n=3$)

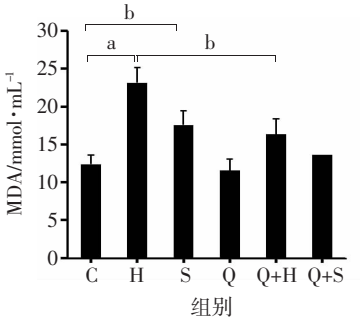


a:$P<0.01$,b:$P<0.05$

图 5　槲皮素对 H9C2 细胞内 SOD 含量的影响　($n=3$)

2.6　H9C2 细胞中 MDA 含量

与对照组比较,H 和 S 组显著提高了 H9C2 细胞内 MDA 的含量($P<0.05$,$P<0.01$),与 H 组比较,Q+H 组显著降低了细胞内 MDA 的含量($P<0.05$)。结果表明槲皮素能显著降低细胞中因缺氧和 ERK1/2 信号通路被阻断引起的 MDA 含量升高(图 6)。

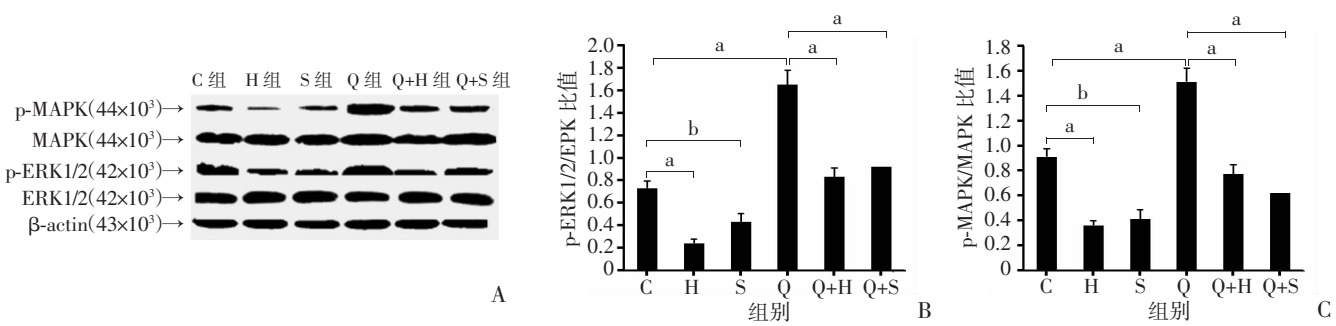


a:$P<0.01$,b:$P<0.05$

图 6　槲皮素对 H9C2 细胞内 MDA 含量的影响　($n=3$)

2.7　H9C2 细胞中 MAPK/ERK1/2 蛋白表达

与对照比较,缺氧处理和 ERK1/2 信号通路被阻断后显著抑制了 H9C2 细胞内 p-MAPK 磷酸化的表达水平($P<0.05$,$P<0.01$),而槲皮素显著提高了 p-MAPK 蛋白表达水平($P<0.01$),缺氧和 ERK1/2 阻断剂显著抑制槲皮素提高 p-MAPK 蛋白的表达水平($P<0.01$)。同时对 p-ERK1/2 和 ERK1/2 蛋白表达进行检测,结果显示 p-ERK1/2 蛋白表达水平与 p-MAPK 水平趋势基本一致。缺氧和 ERK1/2 阻断剂显著抑制槲皮素提高 p-MAPK、p-ERK1/2 蛋白的表达水平,缺氧显著降低槲皮素提高 p-MAPK、p-ERK1/2 蛋白的表达水平(图 7)。



A: Western blot 检测 MAPK/ERK1/2 蛋白表达;B: p-MAPK/MAPK 比值;C: p-ERK1/2/ERK 比值　a:$P<0.01$,b:$P<0.05$

图 7　槲皮素对 H9C2 细胞内 MAPK/ERK1/2 信号通路的影响　($n=3$)

3 讨论

随着人类活动范围的不断扩大,高原地区活动与人们生活关系越来越密切,但是高原低氧环境给生理活动带来极大挑战。目前低氧环境的调节药物如红景天等中药,均存在主要成分不清楚和作用机制不明等原因。研究表明,中药杜仲具有抗氧化等多种药理作用[7],其主要成分为槲皮素、黄酮类化合物。有研究观察了槲皮素对 H9C2 细胞氧化损伤的保护机制[8],但对抗缺氧损伤的作用机制尚未报道。本研究首先通过 95% N_2 5% CO_2 的培养条件造成缺氧模型,H9C2 细胞对缺氧损伤具有一定的时间依赖性。同时 H9C2 细胞对槲皮素的作用存在一定浓度剂量的依赖性,实验结果进一步表明 MAPK/ERK1/2 信号通路参与了槲皮素对 H9C2 缺氧损伤的保护作用。

本研究通过 95% N_2 5% CO_2 的培养条件建立 H9C2 细胞缺氧模型。H9C2 细胞缺氧培养不同时间(0、6、12、24、48 h)后细胞形态发生明显变化,其中随着缺氧时间的延长,低氧条件对 H9C2 细胞造成的损伤加重。乳酸脱氢酶(LDH)为细胞内酶,当细胞受到各种损伤后,细胞膜发生破损导致 LDH 外漏至细胞培养液中,因此细胞培养液中 LDH 含量的高低反映细胞受损伤的程度。实验结果发现随着缺氧时间的延长 LDH 逐渐增加,24 h 达到最高,24~48 h 时 LDH 下降,其原因是由于随着缺氧时间的延长,细胞出现了大量的凋亡最终导致 LDH 含量的下降。超氧化物歧化酶(SOD)能清除细胞缺氧过程中产生的大量自由基等有害物质,结果显示,随着缺氧时间的延长,SOD 的含量逐渐降低,推测缺氧过程中,细胞产生大量的有害物质消耗 SOD 以及缺氧造成 SOD 的表达降低等。本研究结果表明,H9C2 细胞缺氧培养 24 h 为其指标检测的最佳时间点。

前期的研究表明杜仲具有很好的抗缺氧保护功效,槲皮素为其主要的有效成分[8],但其是否具有抗缺氧保护作用尚不清楚。本研究观察了不同浓度槲皮素对 H9C2 细胞活性作用,结果显示槲皮素作用于 H9C2 细胞具有一定的浓度依赖性,其中 10^{-6}mol/L 的槲皮素对 H9C2 细胞具有一定活性。前期的研究报道细胞和机体在缺氧环境中会发生一系列的缺氧应激反应,尤其是心脏系统抗缺氧过程中产生过多的活性氧,最终导致抗氧化能力的减弱,引起心肌细胞功能障碍及结构破坏、凋亡、坏死、心肌细胞大量缺失等[9-11]。目前判断缺氧损伤基本依据是自由基的清除和抗氧化物和氧化过程中的一些代谢产物,如丙二醛(MDA)、超氧化物歧化酶(SOD)、LDH 含量等。缺氧环境造成了 H9C2 细胞培养液中 LDH 含量的大量升高,而槲皮素处理 H9C2 细胞后显著抑制缺氧造成的培养液中 LDH 的升高[12]。然而使用 ERK1/2 阻断剂 SCH772984 处理 H9C2 细胞后 LDH 含量升高,槲皮素可以逆转这一过程,因此推测槲皮素对缺氧造成的 H9C2 细胞损伤具有一定的保护作用。SOD 具有清除这些有害物质的功能,SOD 的高低直接反映细胞抗氧化水平[13],本研究结果显示缺氧和 ERK1/2 信号通路被阻断后,显著抑制了 SOD 含量,然而槲皮素预处理后 SOD 含量有所升高,因此推断槲皮素具有提高 H9C2 细胞的抗氧化水平。MDA 具有细胞毒性,能引起细胞的损伤[14],槲皮素具有清除缺氧和 ERK1/2 信号通路被阻断后造成 MDA 升高的能力。同时研究发现槲皮素也能提高 p-MAPK 和 p-ERK1/2 蛋白的表达水平,但是缺氧和 ERK1/2 阻断剂均抑制了其表达水平。本研究推测槲皮素通过 ERK1/2 信号通路提高 H9C2 细胞抗氧化能力,减少缺氧对细胞的损伤。

综上所述,槲皮素能有效提高 H9C2 细胞的抗氧化能力,减少缺氧对 H9C2 细胞过程中的损伤作用。本研究为槲皮素的抗缺氧保护作用的药理活性,以及为富含槲皮素的中药的开发奠定了基础。

参考文献:

[1] SAVLA J J, LEVINE B D, SADEK H A. The effect of hypoxia on cardiovascular disease: friend or foe? [J]. High Alt Med Biol, 2018, 19(2): 124-130. DOI: 10.1089/ham.2018.0044.

[2] 赵敏, 陈垚, 李文华. 高原低氧影响学习记忆功能的机制研究进展[J]. 西北国防医学杂志, 2019, 40(9): 536-541. DOI: 10.16021/j.cnki.1007-8622.2019.09.002.
ZHAO M, CHEN Y, LI W H. Research progress on mechanism of altitude hypoxia affecting learning and memory function[J]. Med J Natl Defend Forces Northwest China, 2019, 40(9): 536-541. DOI: 10.16021/j.cnki.1007-8622.2019.09.002.

[3] 张帅男, 李煦照. 杜仲化学成分及药理作用研究进展[J]. 中国民族民间医药, 2017, 26(10): 56-61.
ZHANG S N, LI X Z. The research review of the components and pharmacological action of the bark of Eucommia ulmoides oliv[J]. Chin J Ethnomed Ethnopharmacy, 2017, 26(10): 56-61.

[4] FOROUZANFAR F, ASADPOUR E, HOSSEINZADEH H, *et al*. Safranal protects against ischemia-induced PC12 cell

injury through inhibiting oxidative stress and apoptosis[J]. Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol, 2021, 394(4): 707-716. DOI: 10.1007/s00210-020-01999-8.

[5] LI S T, JIANG J, YANG Z C, *et al*. Cardiac progenitor cell-derived exosomes promote H9C2 cell growth *via* Akt/mTOR activation[J]. Int J Mol Med, 2018, 42(3): 1517-1525. DOI: 10.3892/ijmm.2018.3699.

[6] CAO W Q, ZHAI X Q, MA J W, *et al*. Natural borneol sensitizes human glioma cells to cisplatin-induced apoptosis by triggering ROS-mediated oxidative damage and regulation of MAPKs and PI3K/AKT pathway[J]. Pharm Biol, 2020, 58(1): 72-79. DOI: 10.1080/13880209.2019.1703756.

[7] HU Q L, WANG H, HE C, *et al*. Polystyrene nanoparticles trigger the activation of p38MAPK and apoptosis *via* inducing oxidative stress in zebrafish and macrophage cells[J]. Environ Pollut, 2021, 269: 116075. DOI: 10.1016/j.envpol.2020.116075.

[8] JIANG C S, ZHUANG C L, ZHU K K, *et al*. Identification of a novel small-molecule Keap1-Nrf2 PPI inhibitor with cytoprotective effects on LPS-induced cardiomyopathy[J]. J Enzyme Inhib Med Chem, 2018, 33(1): 833-841. DOI: 10.1080/14756366.2018.1461856.

[9] WANG H, ZHOU X M, WU L Y, *et al*. Aucubin alleviates oxidative stress and inflammation *via* Nrf2-mediated signaling activity in experimental traumatic brain injury[J]. J Neuroinflamm, 2020, 17(1): 188. DOI: 10.1186/s12974-020-01863-9.

[10] SHI Y Y, TIAN C M, YU X F, *et al*. Protective effects of Smilax glabraroxb. against lead-induced renal oxidative stress, inflammation and apoptosis in weaning rats and HEK-293 cells[J]. Front Pharmacol, 2020, 11: 556248. DOI: 10.3389/fphar.2020.556248.

[11] 蒋瑞彬, 朱学鑫, 邢丽婉,等. 山核桃叶总黄酮对 H9C2 心肌细胞缺氧复氧损伤的保护作用[J]. 中药材, 2016, 18(2): 378-382. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2016.02.036.
JIANG R B, ZHU X X, XING L W, *et al*. Protective effect of total flavonoids from Caryacathayensis leaf on cultured H9C2 cardiomyocytes during hypoxia/reoxygenationinjury[J]. J Chin Med Mater, 2016, 18(2): 378-382. DOI: 10.13863/j.issn1001-4454.2016.02.036.

[12] 关钧声, 郭海玲, 张紫佳,等. 杜仲总提物对大鼠成骨细胞增殖、分化及Ⅰ型胶原蛋白表达的影响[J]. 上海中医药杂志, 2014, 48(7): 95-98. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2014.07.029.
GUAN J S, GUO H L, ZHANG Z J, *et al*. Effects of Du-Zhong cortex extract on osteoblast cell proliferation, differentiation and Col1αⅠexpression[J]. Shanghai J Tradit Chin Med, 2014, 48(7): 95-98. DOI: 10.16305/j.1007-1334.2014.07.029.

[13] FAN R F, LIU J X, YAN Y X, *et al*. Selenium relieves oxidative stress, inflammation, and apoptosis within spleen of chicken exposed to mercuric chloride[J]. Poult Sci, 2020, 99(11): 5430-5439. DOI: 10.1016/j.psj.2020.08.031.

[14] OTHMÈNE Y B, HAMDI H, SALEM I B, *et al*. Oxidative stress, DNA damage and apoptosis induced by tebuconazole in the kidney of male Wistar rat[J]. Chem Biol Interact, 2020, 330: 109114. DOI: 10.1016/j.cbi.2020.109114.

(**收稿**:2021-04-21;**修回**:2021-05-29)

(编辑 张 维)