

论著·基础研究 doi:10.3969/j.issn.1671-8348.2023.13.003
网络首发 https://kns.cnki.net/kcms/detail/50.1097.R.20230407.1722.004.html(2023-04-10)

淫羊藿苷对脑星形胶质细胞缺氧/复氧损伤的保护作用研究^{*}

李 伟¹,扶国学²,程 绩^{1△}
(1.陆军军医大学第二附属医院急诊科,重庆 400037;2.赣南医学院第一附属医院甲状腺癌外科,江西赣州 341000)

[摘要] **目的** 探讨淫羊藿苷对星形胶质细胞缺氧/复氧(H/R)损伤的保护作用。**方法** 利用 CCK-8 法测定 7 种不同浓度的淫羊藿苷培养液对正常培养星形胶质细胞 24 h 细胞活力的影响,筛选出安全浓度范围。将星形胶质细胞分为对照组、H/R 组和淫羊藿苷组。H/R 组和淫羊藿苷组采用无血清缺氧缺糖后恢复血清复氧复糖培养的方法构建 H/R 星形胶质细胞模型,淫羊藿苷组在此基础上使用安全浓度的淫羊藿苷进行干预。CCK-8 法测定各组细胞活力,筛选出淫羊藿苷最佳有效浓度。检测各组细胞中乳酸脱氢酶(LDH)、超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)及超氧化物歧化酶(SOD)水平,H2DCFDA 荧光探针检测各组细胞内活性氧(ROS)水平,JC-1 荧光探针测定各组细胞线粒体膜电位水平,流式细胞术检测各组细胞凋亡情况。**结果** 7 种浓度淫羊藿苷组中,3.8、7.5、15.0 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿苷组与对照组细胞活力比较,差异无统计学意义($P>0.05$)。与对照组比较,H/R 组细胞活力降低($P<0.05$);与 H/R 组比较,3.8、7.5、15.0 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿苷组细胞活力增强($P<0.05$),且呈现剂量依赖的趋势,确定 15.0 $\mu\text{mol/L}$ 为淫羊藿苷最佳有效浓度。与对照组比较,H/R 组 LDH、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、细胞内 ROS 水平明显增加,SOD 活性减弱,线粒体膜电位下降,细胞凋亡数目增多($P<0.05$)。与 H/R 组比较,淫羊藿苷组 LDH、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、细胞内 ROS 水平明显减少,SOD 活性增强,线粒体膜电位上升,细胞凋亡数目减少($P<0.05$)。**结论** 淫羊藿苷可减轻 H/R 引起的星形胶质细胞损伤和细胞氧化应激反应,减少细胞凋亡。

[关键词] 淫羊藿苷;星形胶质细胞;缺氧/复氧;氧化应激;凋亡
[中图法分类号] R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-8348(2023)13-1932-06

Study on protective effect of Icarin on hypoxia/reoxygenation injury of cerebral astrocytes^{*}

LI Wei¹,FU Guoxue²,CHENG Ji^{1△}
(1. Department of Emergency, Second Affiliated Hospital of Army Military Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Department of Thyroid and Hernia Surgery, First Affiliated Hospital of Gannan Medical University, Ganzhou, Jiangxi 341000, China)

[Abstract] **Objective** To investigate the protective effect of Icarin on hypoxia/reoxygenation(H/R) injury of astrocytes. **Methods** The effects of 7 different concentrations of Icarin culture solution on the 24 h cell activity of normally cultured astrocytes were determined by the CCK-8 method, and the safe concentration range was screened out. The astrocytes were divided into the control group, H/R group and Icarin group. The H/R group and Icarin group adopted the method of serum reoxygenation and reglucose culture method after serum-free hypoxia and glucose deficiency to construct the H/R astrocyte model, on this basis the Icarin group used the safe use concentration of Icarin to conduct the intervention. The cell activity in each group was detected by the CCK-8 method. The optimal Icarin effective concentration was screened out. The levels of lactate dehydrogenase (LDH), superoxide ($\cdot\text{O}_2^-$) and superoxide dismutase (SOD) in cells of each group was detected. The level of reactive oxygen species (ROS) in each group was detected by H2DCFDA fluorescence probe, the level of mitochondrial membrane potential was measured by JC-1 fluorescence probe, and the apoptosis of cells in each group was detected by flow cytometry. **Results** Among the 7 concentrations of Icarin groups, there was no statistically significant difference in cell activity between 3.8, 7.5, 15.0 $\mu\text{mol/L}$ Icarin groups and control group ($P>0.05$). Compared with the control group, the cell viability in the H/R group was decreased ($P<0.05$); compared with the H/R group, the cell viability in the 3.8, 7.5 and 15.0 $\mu\text{mol/L}$

^{*} 基金项目:重庆市科委技术创新与应用示范项目(cstc2018jscx-msybX0050)。 作者简介:李伟(1980—),主治医师,学士,主要从事急救医学研究。 △ 通信作者, E-mail:chengji3161@163.com。

Icariin groups was increased ($P < 0.05$), moreover showing the dose-dependent trend. Therefore, $15.0 \mu\text{mol/L}$ was determined as the best effective concentration. Compared with the control group, LDH, $\cdot\text{O}_2^-$ and intracellular ROS levels in the H/R group were increased significantly, the SOD activity was decreased, the mitochondrial membrane potential was decreased and the number of cell apoptosis was increased ($P < 0.05$). Compared with the H/R group, the levels of LDH, $\cdot\text{O}_2^-$ and intracellular ROS in the Icariin group were significantly decreased, the activity of SOD was increased, the mitochondrial membrane potential was increased and the number of cell apoptosis was decreased ($P < 0.05$). **Conclusion** Icariin could reduce the damage of astrocytes and the cellular oxidative stress response caused by H/R, and reduce the cell apoptosis.

[Key words] Icarrin; astrocyte; hypoxia/reoxygenation; oxidative stress; apoptosis

星形胶质细胞是人体脑组织中含量最多的脑细胞,对脑组织正常功能的维持发挥着重要作用^[1]。星形胶质细胞不仅在结构和功能上对神经元起着支持作用,还能合成分泌多种神经递质、激素及神经营养因子,调控神经元的生长、分化及凋亡^[2]。脑缺血再灌注损伤(ischemia-reperfusion injury, IRI)是临床常见脑损伤病理机制,多见于心肺复苏后自主循环恢复、缺血性卒中、休克等疾病^[3-4]。在脑 IRI 中,星形胶质细胞受损后不仅直接影响神经元的功能,还能够通过促进炎症反应杀伤周围神经元^[2],因此,寻找有效措施减轻星形胶质细胞的损伤是治疗脑 IRI 的关键。淫羊藿苷是中草药淫羊藿含量最丰富的单体化学成分之一,属于黄酮类多酚类化合物。淫羊藿苷由 15 个碳原子组成,其中两个芳环通过三碳桥相连,在 C-8 上含有戊烯基团,在体内具有抗炎、抗氧化、抗凋亡等广泛的生物学活性^[5-7],提示淫羊藿苷在脑 IRI 中有着较好的应用前景。本实验采用星形胶质细胞缺氧/复氧(hypoxia/reoxygenation, H/R)损伤模型模拟体内星形胶质细胞缺血再灌注环境,探索淫羊藿苷对 H/R 损伤星形胶质细胞的作用,为其应用于脑 IRI 治疗提供研究基础,现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

C8-S 小鼠星形胶质细胞系购自美国模式培养物集存库(American type culture collection, ATCC); DMEM 高糖与无糖培养基、0.25%胰酶细胞消化液购自大连美伦生物科技有限公司;青-链霉素溶液购自合肥白鲨生物科技有限公司;胎牛血清购自以色列 BioInd 公司;增强型 CCK-8 试剂盒、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)细胞毒性检测试剂盒、超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)检测试剂盒、总超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)活性检测试剂盒、JC-1 线粒体膜电位检测试剂盒、流式凋亡检测试剂盒均购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.2 方法

1.2.1 星形胶质细胞的培养

使用含 10%胎牛血清及 1%青-链霉素的高糖 DMEM 培养基,于 37℃、5% CO_2 常氧细胞培养箱中将 C8-S 细胞进行常规细胞培养及传代,待细胞密度达到 70%~80%融合度时进行后续实验,选取一部分细胞作为对照组。

1.2.2 不同浓度淫羊藿苷细胞毒性试验

将 C8-S 细胞接种于 96 孔板,分别使用含 0(对照组)、3.8、7.5、15.0、30.0、60.0、120.0 和 240.0 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿苷的常规 DMEM 培养基,于常氧培养箱培养 24 h,后采用 CCK-8 法检测对照组与各浓度淫羊藿苷组细胞活力,以筛选最佳实验浓度。

1.2.3 H/R 星形胶质细胞模型的建立及分组

将 C8-S 细胞分为对照组、H/R 组和淫羊藿苷组。对照组在常氧培养箱中使用高糖 DMEM 培养基正常培养 8 h。H/R 组和淫羊藿苷组在低氧工作站(氧浓度为 0.4%)中使用无血清无糖 DMEM 培养基培养 4 h,随后更换高糖 DMEM 培养基并将其放入常氧培养箱(氧浓度为 21%)继续培养 4 h,建立 H/R 星形胶质细胞模型。淫羊藿苷组在建立 H/R 星形胶质细胞模型的同时使用最佳实验浓度的淫羊藿苷进行干预。采用 CCK-8 法检测各组细胞活力。

1.2.4 酶标仪检测细胞 LDH、 $\cdot\text{O}_2^-$ 及 SOD 水平

针对 LDH、 $\cdot\text{O}_2^-$ 水平检测,将细胞接种于 96 孔板,待细胞密度达 70%~80%后按前述进行分组实验。根据厂家说明书,分别加入 LDH 检测工作液、超氧化物检测工作液,前者室温避光孵育 30 min,后者 37℃孵育 3 min,酶标仪分别测定 490、450 nm 处吸光度(A)值。检测 SOD 活性时,细胞接种于 6 孔板,加入 SOD 样品制备液充分裂解细胞,加入反应工作液后 37℃孵育 30 min,用酶标仪测定 450 nm 处 A 值, SOD 活性与 A 值呈负相关。

1.2.5 H2DCFDA 荧光探针检测细胞内 ROS 水平

星形胶质细胞接种于 6 孔板,按前述分组培养。后加入 1:1 000 无血清培养基稀释 H2DCFDA 探针, 37℃避光孵育 30 min,无血清培养基洗涤细胞 1~2 次,荧光显微镜下观察。针对流式细胞仪检测,则 H/R 过程结束后,使用不含乙二胺四乙酸(ethylene diamine tetraacetic acid, EDTA)的胰酶消化收集细胞,后加入稀释探针, 37℃避光孵育后选择激发光波长 488 nm,发射光波长 530 nm 用于流式细胞仪检测。

1.2.6 线粒体膜电位检测

6 孔板培养细胞,按前述分组进行实验。磷酸盐缓冲液(phosphate buffered solution, PBS)洗涤后,加入 1 mL 细胞培养基和 1 mL JC-1 染色工作液, 37℃孵育 20 min,染色缓冲液洗涤 2 次,加入 2 mL 细胞培

养液,于荧光显微镜下观察。针对流式细胞仪检测,则 H/R 过程结束后,不含 EDTA 的胰酶消化收集细胞,PBS 洗涤后,加入 0.5 mL 细胞培养基和 0.5 mL JC-1 染色工作液,37 ℃ 孵育 20 min,染色缓冲液洗涤 2 次后,选择激发光波长 490 nm,发射光波长 530 nm 用于检测 JC-1 单体;激发光波长 525 nm,发射光波长 590 nm 用于检测 JC-1 聚合物。

1.2.7 细胞凋亡检测

6 孔板培养细胞,按前述分组进行实验。PBS 洗涤后,依次加入膜联蛋白 V(Annexin V)-异硫氰酸荧光素 (fluorescein isothiocyanate, FITC) 结合液、Annexin V-FITC、碘化丙啶染色液,室温避光孵育 10~20 min,用流式细胞仪进行检测。

1.3 统计学处理

采用 Graphpad Prism 8 软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,两组间比较采用 *t* 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 不同浓度淫羊藿苷对星形胶质细胞活力的影响

星形胶质 C8-S 细胞在含不同浓度淫羊藿苷培养基培养 24 h 后,CCK-8 结果表明 30.0、60.0、120.0、240.0 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿苷组细胞活力较对照组降低 ($P < 0.05$)。而 3.8、7.5 和 15.0 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿苷组

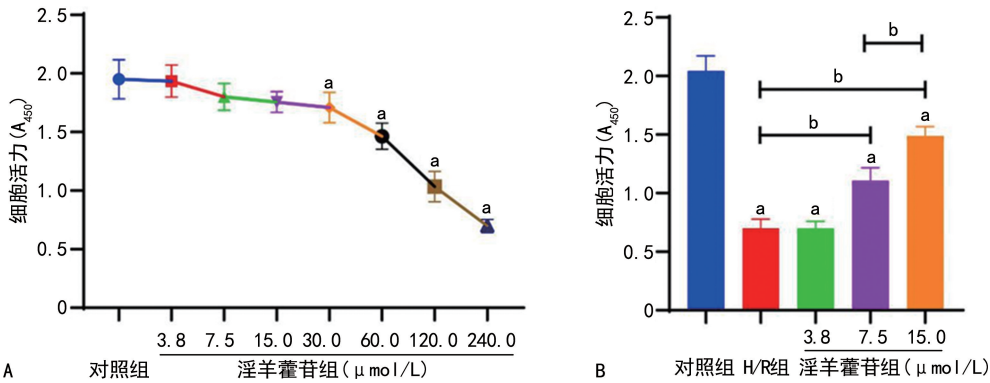
细胞活力与对照组比较,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。根据以上实验结果筛选 3.8、7.5 和 15.0 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿苷组进一步行 H/R 实验。与对照组比较,H/R 组细胞活力明显降低 ($P < 0.05$)。与 H/R 组比较,7.5、15.0 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿苷组细胞活力明显升高 ($P < 0.05$),而 3.8 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿苷组细胞活力无明显变化 ($P > 0.05$),15.0 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿苷组细胞活力高于 7.5 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿苷组 ($P < 0.05$),见图 1。

2.2 淫羊藿苷对 H/R 星形胶质细胞 LDH、 $\cdot\text{O}_2^-$ 水平及 SOD 活性的影响

选取 15.0 $\mu\text{mol/L}$ 淫羊藿苷组进行实验。与对照组比较,H/R 组 LDH 及 $\cdot\text{O}_2^-$ 水平明显增加,SOD 活性明显减弱 ($P < 0.05$)。而与 H/R 组比较,淫羊藿苷组 LDH、 $\cdot\text{O}_2^-$ 水平明显减少,SOD 活性明显增强 ($P < 0.05$),见图 2。

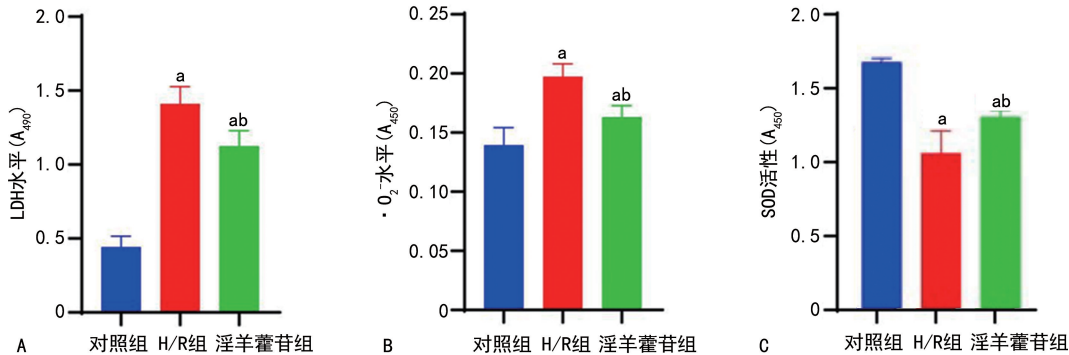
2.3 淫羊藿苷对 H/R 星形胶质细胞内 ROS 水平的影响

荧光显微镜图像及流式细胞术对细胞内 ROS 水平分别进行定性定量分析,结果表明,与对照组比较,H/R 组细胞内 ROS 水平明显增加 ($P < 0.05$)。与 H/R 组比较,淫羊藿苷组 ROS 水平明显减少 ($P < 0.05$),见图 3。



A:不同浓度淫羊藿苷对星形胶质细胞活力的影响;B:淫羊藿苷对 H/R 星形胶质细胞活力的影响;^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$ 。

图 1 不同浓度淫羊藿苷对星形胶质细胞活力的影响



A:LDH 水平;B: $\cdot\text{O}_2^-$ 水平;C:SOD 活性;^a: $P < 0.05$,与对照组比较;^b: $P < 0.05$,与 H/R 组比较。

图 2 淫羊藿苷对 H/R 星形胶质细胞 LDH、 $\cdot\text{O}_2^-$ 、SOD 水平的影响

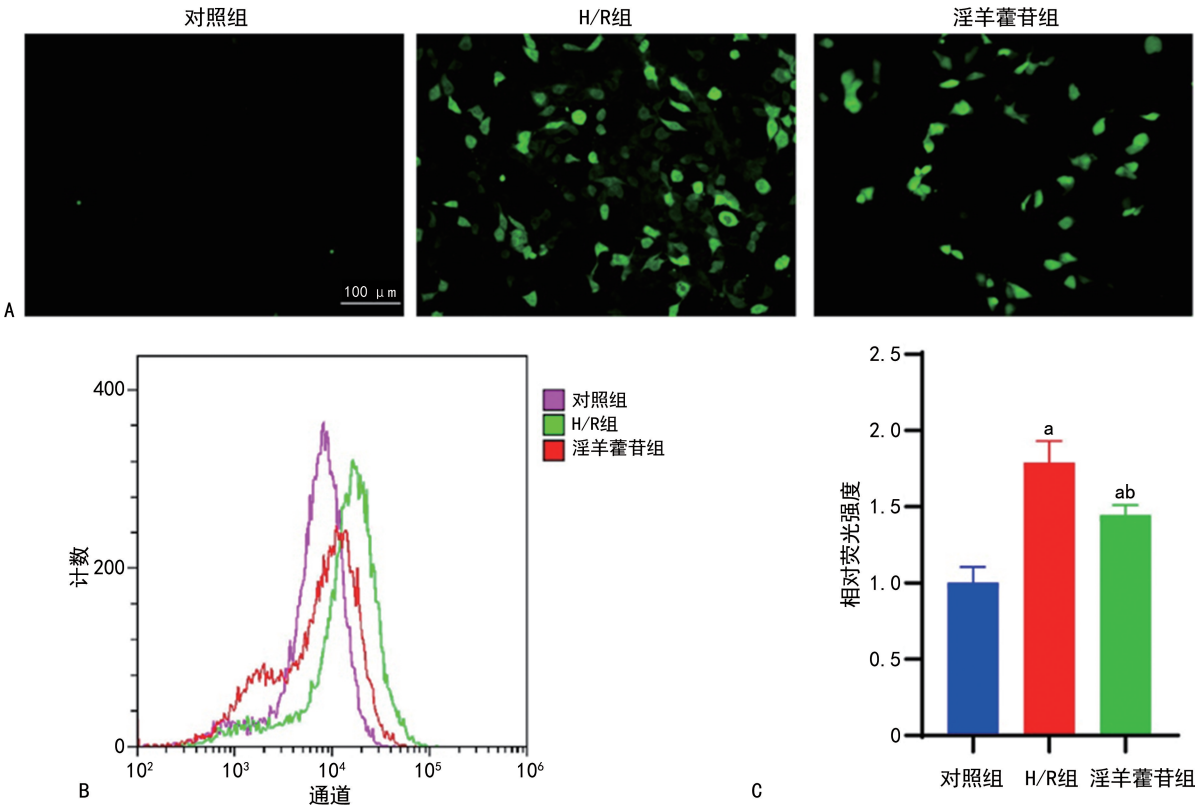
2.4 淫羊藿苷对 H/R 星形胶质细胞线粒体膜电位的影响

与对照组比较,H/R 组线粒体膜电位下降 ($P < 0.05$)。与 H/R 组比较,淫羊藿苷组线粒体膜电位上

升($P<0.05$),见图4。

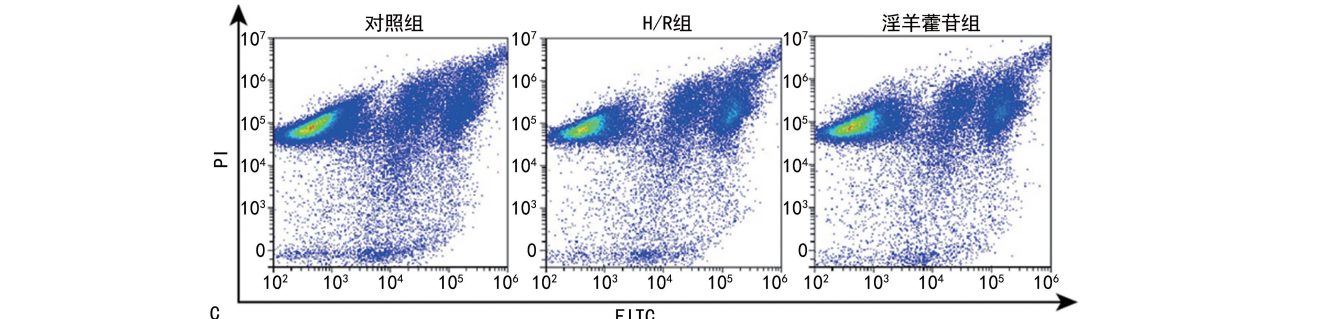
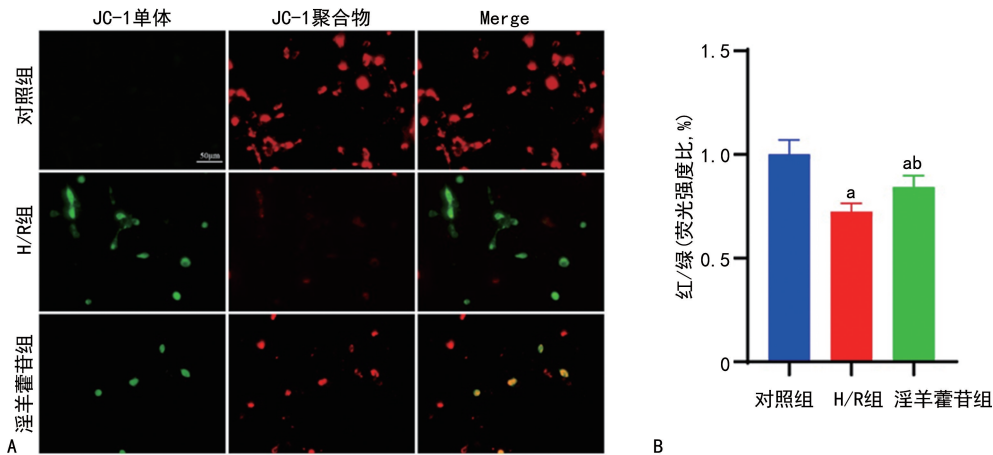
2.5 淫羊藿苷对H/R星形胶质细胞凋亡的影响

对照组细胞凋亡细胞数目较少。与对照组比较，H/R组凋亡细胞数目增多($P<0.05$)。与H/R组比较，淫羊藿苷组细胞凋亡数目减少($P<0.05$)，见图5。



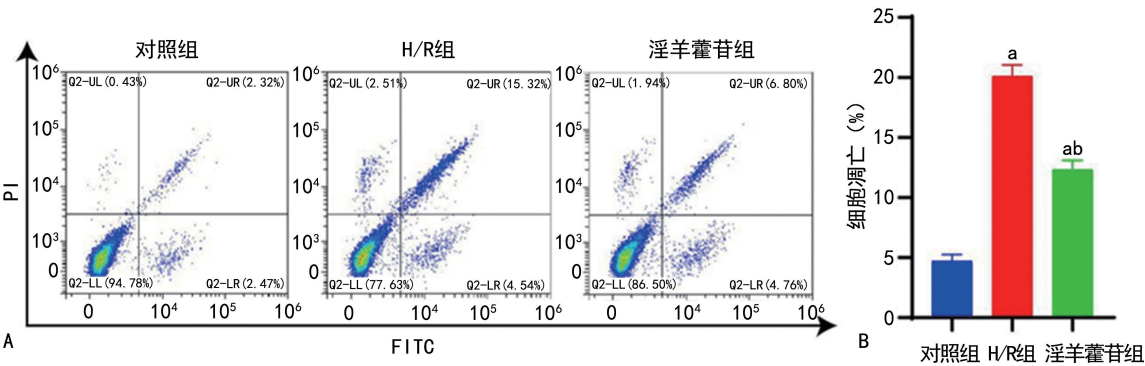
A: 荧光显微镜观察细胞内 ROS 水平; B, C: 流式细胞术分析细胞内 ROS 水平; ^a: $P<0.05$, 与对照组比较; ^b: $P<0.05$, 与 H/R 组比较。

图3 淫羊藿苷对H/R星形胶质细胞内ROS水平的影响



A: 荧光显微镜观察各组细胞线粒体膜电位水平; B, C: 流式细胞术分析各组细胞线粒体膜电位水平; ^a: $P<0.05$, 与对照组比较; ^b: $P<0.05$, 与 H/R 组比较。

图4 淫羊藿苷对H/R损伤星形胶质细胞线粒体膜电位水平的影响



A:流式细胞术分析各组细胞凋亡情况;B:各组细胞死亡率比较;^a: $P<0.05$,与对照组比较;^b: $P<0.05$,与 H/R 组比较。

图 5 淫羊藿苷对 H/R 星形胶质细胞凋亡的影响

3 讨 论

脑 IRI 的机制较为复杂,主要与炎症反应、氧化应激和细胞凋亡相关^[8-9]。星形胶质细胞作为脑组织中最丰富的神经胶质细胞,参与电解质稳态维持、脑血流调节,血脑屏障维持、神经可塑性调节及神经营养、保护因子分泌等过程,支持并调节大脑正常功能的维持^[10-11],对脑组织正常功能的维持起着重要作用。在脑缺血后再灌注期间,星形胶质细胞是最先受影响的细胞,而星形胶质细胞受损可促进周围细胞凋亡和炎症的发生,降低脑缺血后再灌注期星形胶质细胞的损伤可作为治疗脑 IRI 的关键^[12]。细胞 H/R 是体外模拟组织器官缺血再灌注损伤的常用办法^[13]。本研究通过建立 H/R 星形胶质细胞模型,评价了淫羊藿苷对 H/R 损伤的星形胶质细胞的保护作用。本研究表明淫羊藿苷可增强星形胶质细胞 H/R 后的细胞活性,减少 LDH 释放,减轻氧化应激损伤,增强 SOD 活性,抑制线粒体膜电位的降低及减少细胞凋亡。

氧化应激反应激活是 H/R 损伤过程中重要的病理生理学环节,处于缺氧状态的组织和细胞,获得含氧血液再灌注后,在一系列细胞液酶、细胞膜酶及线粒体电子传输链作用下,会造成 ROS 大量产生^[14-15]。在 I/R 过程中最初产生的 ROS 主要是由分子氧单价还原而成的 $\cdot O_2^-$,其为主要的氧化剂,其他所有的 ROS 最终都来自该物质的歧化或与其他活性物种的相互作用^[16]。 $\cdot O_2^-$ 可自发或在酶催化作用下快速转变为 H_2O_2 , H_2O_2 在过度金属存在条件下可产生高活性 $\cdot OH$;在低 pH 条件下, $\cdot O_2^-$ 还可迅速自发产生更强氧化剂 $HOO\cdot$ 及与 NO 反应最终生成强氧化剂 $ONOOH$ ^[16]。本研究通过 WST-1 法和 H2DCFDA 荧光探针对 H/R 后细胞中不同 ROS ($\cdot O_2^-$ 、 $\cdot OH$)水平,与既往研究一致^[17-18],H/R 组细胞 ROS 水平明显高于对照组,提示 H/R 激活星形胶质细胞应激反应,导致 ROS 生成增加。而淫羊藿苷处理后可以明显减少星形胶质细胞内 ROS 的产生,与 REN 等^[19]报道的淫羊藿苷可减少 H/R 损伤的 H9C2 细胞的 ROS 产生这一结果一致。

氧化应激产生的强氧化剂可直接对生物大分子,如 DNA、蛋白质及脂质分子和碳水化合物分子造成破坏,继而可直接引起细胞膜损伤通透性增加,线粒

体膜损伤通透性转化^[20-21],复合体损伤,膜电位改变;还能通过改变细胞信号转导造成细胞功能障碍、细胞损伤及启动死亡程序^[22],如激活细胞凋亡通路,引发细胞凋亡。还有研究认为,ROS 损伤还源于抗氧化能力减弱,如 SOD 酶活性降低^[23-24],导致 ROS 清除减慢,导致损伤增加。本研究对 H/R 后细胞活力、LDH 释放、线粒体膜电位、细胞凋亡及 SOD 活性分析发现,H/R 组细胞相对于对照组细胞活力明显下降,LDH 释放增多,线粒体膜电位降低,细胞凋亡增加。提示 H/R 后细胞膜受损,通透性增加,线粒体膜功能受损,细胞死亡增加,细胞对抗氧化应激的能力减弱,与既往研究一致^[25-26]。相对于 H/R 组,淫羊藿苷组的星形胶质细胞活力明显改善,LDH 释放减少,SOD 活性增加,膜电位上升,细胞凋亡减少。提示淫羊藿苷通过减少 H/R 损伤星形胶质细胞 ROS 产生、增加细胞抗氧化能力、减少细胞损伤与凋亡,发挥星形胶质细胞保护作用。

综上所述,淫羊藿苷具有减轻 H/R 星形胶质细胞损伤的作用,可以增强星形胶质细胞 H/R 后的细胞活性,减少 LDH 释放,增加 SOD 活性,减轻氧化应激损伤,抑制线粒体膜电位的降低及减少细胞凋亡,表明淫羊藿苷可研究成为治疗脑 IRI 的药物,对于临床脑 IRI 相关疾病的治疗具有重要意义。

参考文献

[1] CHEN Z,YUAN Z,YANG S,et al. Brain energy metabolism; astrocytes in neurodegenerative diseases[J]. CNS Neurosci Ther, 2023, 29(1): 24-36.

[2] LINNERBAUER M,WHEELER M A,QUINTANA F J. Astrocyte crosstalk in CNS inflammation[J]. Neuron, 2020, 108(4): 608-622.

[3] SANDRONI C,CRONBERG T,SEKHON M. Brain injury after cardiac arrest: pathophysiology, treatment, and prognosis[J]. Intensive Care Med, 2021, 47(12): 1393-1414.

[4] PERKINS G D,CALLAWAY C W,KIRSTIE H,et al. Brain injury after cardiac arrest[J].

- 2021,398(10307):1269-1278.
- [5] WANG S, MA J, ZENG Y, et al. Icariin, an up-and-coming bioactive compound against neurological diseases: network pharmacology-based study and literature review[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15:3619-3641.
- [6] WANG M, GAO H, LI W, et al. Icariin and its metabolites regulate lipid metabolism: from effects to molecular mechanisms[J]. *Biomed Pharmacother*, 2020, 131:110675.
- [7] HE C, WANG Z, SHI J. Pharmacological effects of icariin[J]. *Adv Pharmacol*, 2020, 87:179-203.
- [8] CUI R, LIU S, WANG C, et al. Methane-rich saline alleviates CA/CPR brain injury by inhibiting oxidative stress, microglial activation-induced inflammatory responses, and ER stress-mediated apoptosis[J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020:8829328.
- [9] YUAN Q, YUAN Y, ZHENG Y, et al. Anti-cerebral ischemia reperfusion injury of polysaccharides: a review of the mechanisms[J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 137:111303.
- [10] 韩宏, 刘文洁, 陈芳, 等. 铁皮石斛多糖对缺氧/复氧诱导星形胶质细胞 AMPK/ULK1 通路相关自噬的影响[J]. *中国现代应用药学*, 2021, 38(17):2110-2115.
- [11] ENDO F, KASAI A, SOTO J S, et al. Molecular basis of astrocyte diversity and morphology across the CNS in health and disease[J]. *Science*, 2022, 378(6619):eadc9020.
- [12] 符瑾, 文立, 陈丽丽. 槐定碱对缺氧复氧星形胶质细胞炎症因子释放和细胞凋亡的影响[J]. *中国药师*, 2021, 24(11):2012-2017.
- [13] QUINTANA D D, GARCIA J A, SARKAR S N, et al. Hypoxia-reoxygenation of primary astrocytes results in a redistribution of mitochondrial size and mitophagy[J]. *Mitochondrion*, 2019, 47:244-255.
- [14] ZENG X, ZHANG Y D, MA R Y, et al. Activated Drp1 regulates p62-mediated autophagic flux and aggravates inflammation in cerebral ischemia-reperfusion via the ROS-RIP1/RIP3-exosome axis[J]. *Mil Med Res*, 2022, 9(1):25.
- [15] RAEDSCHELDERS K, ANSLEY D M, CHEN D D. The cellular and molecular origin of reactive oxygen species generation during myocardial ischemia and reperfusion[J]. *Pharmacol Ther*, 2012, 133(2):230-255.
- [16] KALOGERIS T, BAINES C P, KRENZ M, et al. Cell biology of ischemia/reperfusion injury[J]. *Int Rev Cell Mol Biol*, 2012, 298:229-317.
- [17] LI C X, WANG X Q, CHENG F F, et al. Hydoxycholeic acid protects the neurovascular unit against oxygen-glucose deprivation and reoxygenation-induced injury in vitro[J]. *Neural Regen Res*, 2019, 14(11):1941-1949.
- [18] HALURKAR M S, WANG J, CHEN S, et al. EPC-EXs improve astrocyte survival and oxidative stress through different uptaking pathways in diabetic hypoxia condition[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1):91.
- [19] REN Z H, KE Z P, LUO M, et al. Icariin protects against ischemia-reperfusion injury in H9C2 cells by upregulating heat shock protein 20[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(2):3336-3343.
- [20] FARZAEI M H, RAMEZANI-ALIAKBARI F, RAMEZANI-ALIAKBARI M, et al. Regulatory effects of trimetazidine in cardiac ischemia/reperfusion injury[J/OL]. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/36971866/>.
- [21] MACHADO I F, PALMEIRA C M, ROLO A P. Preservation of mitochondrial health in liver ischemia/reperfusion injury[J]. *Biomedicines*, 2023, 11(3):948.
- [22] SHEN Q, FANG J, GUO H, et al. Astragaloside IV attenuates podocyte apoptosis through ameliorating mitochondrial dysfunction by up-regulated Nrf2-ARE/TFAM signaling in diabetic kidney disease[J/OL]. *Free Radic Biol Med*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37030337/>.
- [23] NOFAL A E, OKDAH Y A, RADY M I, et al. Gum acacia attenuates cisplatin toxic effect spermatogenesis dysfunction and infertility in rats[J/OL]. *Int J Biol Macromol*, <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/37030465/>.
- [24] 李卓, 陈梦璇, 汪苇杭, 等. Mn-SOD 通过 GSK-3 β 影响 HO-1 和 Drp1 的抗氧化应激减轻 MTX 相关肝细胞损伤[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2022, 47(9):1191-1199.
- [25] 王洁, 谭小红, 张正艳. 腺苷对大鼠缺氧/复氧星形胶质细胞的保护作用[J]. *解剖学杂志*, 2017, 40(5):539-541.
- [26] 王涛, 汪凯, 李亚强, 等. 白藜芦醇对神经元缺氧复氧过程中细胞凋亡与氧化应激反应的影响[J]. *医药导报*, 2020, 39(7):914-917.