

野蔷薇根总黄酮对 H₂O₂ 诱导损伤的 HUVEC 线粒体功能及凋亡通路的影响

李开言¹, 王军¹, 杨丹¹, 张留记¹, 屠万倩¹, 吴冰帆²(1. 河南省中医药研究院, 河南 郑州 450004; 2. 河南中医药大学, 河南 郑州 450008)

摘要: 目的 探讨野蔷薇根总黄酮(TF-RM)对 H₂O₂ 诱导损伤的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)线粒体功能及凋亡通路的影响。方法 将 SD 雄性大鼠随机分正常对照组、维生素 C 组(0.08 g·kg⁻¹)、TF-RM 组(2.5 g·kg⁻¹), 每组 10 只。灌胃给药, 每天 1 次, 连续 7 d, 制备含药血清。采用 H₂O₂(950 μmol·L⁻¹)诱导 HUVEC 损伤, 并分别与维生素 C 及 TF-RM 低、中、高剂量(5%、10%、15%)含药血清共培养 24 h。采用 DCFH-DA 荧光定量法检测 HUVEC 中活性氧(ROS)的含量; JC-1 染色法检测细胞线粒体膜电位的变化; Fluo-4 染色法检测细胞内 Ca²⁺浓度; Western Blot 法检测 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(Caspase)-9、Caspase-3 蛋白的表达情况。结果 与正常对照组比较, 模型组 HUVEC 内的 ROS 水平、线粒体膜电位下降率、Ca²⁺浓度以及 Bax 蛋白表达量显著升高, 差异均有统计学意义(P < 0.01)。与模型组比较, TF-RM 各剂量组细胞内的 ROS 水平、Ca²⁺浓度及 Bax 蛋白表达量均明显降低(P < 0.05, P < 0.01), Bcl-2 蛋白表达量升高(P < 0.05); TF-RM 高剂量组的线粒体膜电位下降率明显降低(P < 0.05); TF-RM 中剂量组的 Caspase 9 蛋白表达量明显降低(P < 0.05)。结论 TF-RM 能够改善 H₂O₂ 诱导的 HUVEC 线粒体功能损伤, 发挥对细胞凋亡的保护作用。

关键词: 野蔷薇根总黄酮; 人脐静脉内皮细胞; 凋亡; 线粒体功能; H₂O₂

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 1003-9783(2021)10-1431-06

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.10.003

Effect of Total Flavonoids from *Rosa multiflora* Thunb. on Mitochondrial Function and Apoptin Pathway of HUVEC Induced by Hydrogen Peroxide

LI Kaiyan¹, WANG Jun¹, YANG Dan¹, ZHANG Liuji¹, TU Wanqian¹, WU Bingfan²(1. Henan Provincial Academy of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450004 Henan, China; 2. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450008 Henan, China)

Abstract: Objective To study the effect of total flavonoids from *Rosa multiflora* Thunb.(TF-RM) on mitochondrial function and apoptosis pathway of HUVEC induced by hydrogen peroxide. **Methods** Male SD rats were randomly divided into normal control group, Vitamin C group(0.08 g·kg⁻¹) and TF-RM group(2.5 g·kg⁻¹), 10 in each group. After intragastric administration once a day for seven consecutive days, rats were anesthetized to prepare drug-containing serum. Hydrogen peroxide(950 μmol·L⁻¹) was used to induce damage in HUVEC; and Vitamin C, serum containing TF-RM of high, medium and low dosages(5%, 10%, 15%) were added to HUVEC respectively at the same time. Then intracellular reactive oxygen species(ROS) was detected by DCFH-DA fluorescence quantitative assay; mitochondrial membrane potential(JC-1) was detected by JC-1 staining; decrease rate of Ca²⁺ concentration was detected by Fluo-4 staining. The expressions of B-cell lymphoma-2(Bcl-2), Bcl-2 associated X

收稿日期: 2020-12-03

作者简介: 李开言, 女, 硕士, 助理研究员, 研究方向: 中药药理。Email: likaiyan_0917_2006@126.com。通信作者: 杨丹, 女, 硕士, 研究实习员, 研究方向: 中药药理。Email: 986662375@qq.com。

基金项目: 河南省中医药科学研究专项课题(2019ZY2013)。

Protein(Bax), Caspase-9 and Caspase-3 were detected by Western Blot. **Results** Compared with normal control group, the ROS, decrease rate of mitochondrial membrane potential, Ca^{2+} concentration and the expression of Bax were improved when treated with hydrogen peroxide, the differences were statistically significant($P < 0.01$). Compared with the model group, the ROS, Ca^{2+} concentration and the expression of Bax were decreased, the differences were statistically significant($P < 0.05$ or $P < 0.01$) while the expression of Bcl-2 was increased, the differences were statistically significant($P < 0.05$) when treated with TF-RM low, medium and high dosage, respectively. The decrease rate of mitochondrial membrane potential was decreased when treated with TF-RM high dosage, the difference was statistically significant($P < 0.05$). The expression of Caspase 9 was decreased when treated with TF-RM medium dosage, the difference was statistically significant($P < 0.05$). **Conclusion** TF-RM could improve the H_2O_2 -induced mitochondrial function damage of HUVEC and play a protective role in apoptosis.

Keywords: Total flavonoids from *Rosa multiflora* Thunb.; human umbilical vein endothelial cell; apoptosis; mitochondrial function; H_2O_2

血管内皮细胞(Vascular endothelial cell, VEC)衬于整个心血管系统内表面,是形成心血管封闭系统的形态基础和血管通透性的主要屏障,与调节血管扩张与收缩、预防血栓形成以及维持血管壁内部稳态等密切相关^[1]。VEC损伤在动脉粥样硬化^[2]、高血压^[3]及其他脑血管疾病^[4]的病理过程中起重要作用。

野蔷薇根为蔷薇科植物野蔷薇 *Rosa multiflora* Thunb. 的干燥根,其味苦、涩,性寒,无毒,归脾、胃、肾经,具有清热解毒、祛风除湿、活血调经的功效。野蔷薇富含黄酮类成分^[5-7],其根皮中的含量最高($137.2 \text{ mg} \cdot \text{g}^{-1}$)^[8]。黄酮类成分具有抗氧化、降血脂、抑制血栓形成、抗动脉粥样硬化等药理作用^[9-10]。本课题组前期研究^[11]发现,野蔷薇根总黄酮(Total flavonoids from *Rosa multiflora* Thunb., TF-RM)对 H_2O_2 诱导损伤的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)具有明显保护作用,能显著提高细胞活力,降低细胞凋亡率。故本研究拟继续采用 H_2O_2 诱导损伤 HUVEC,探讨 TF-RM 对 HUVEC 的线粒体功能包括活性氧(ROS)、线粒体膜电位、 Ca^{2+} 释放水平,以及凋亡相关蛋白包括 B 淋巴细胞瘤-2(Bcl-2)、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)、半胱氨酸天冬氨酸特异性蛋白酶(Caspase)-9、Caspase-3 蛋白表达水平的影响。

1 材料与方法

1.1 动物及细胞 雄性 SD 大鼠,SPF 级,体质量(200 ± 20)g,购自济南朋悦实验动物繁育有限公司,生产许可证号:SCXK(鲁)20180007,质量合格证号:37009200005670。HUVEC 细胞株,购自江苏恩莫阿赛生物技术有限公司。

1.2 药物及试剂 野蔷薇根,购自安徽亳州药材市场,经河南省中医药研究院中药所马开副研究员鉴定为蔷薇科植物野蔷薇 *Rosa multiflora* Thunb. 的干燥根。按照本课题组前期研究^[12]方法提取纯化 TF-RM,含量为 54.209%。维生素 C,国药集团化学试剂有限公司,批号:20170615。

DMEM/F12 培养基(批号:08H17B0)、4×双色蛋白上样缓冲液(批号:13C27C98),均购自武汉博士德生物工程有限公司;0.25%胰蛋白酶消化液(批号:T5016)、活性氧(ROS)检测试剂盒(批号:20190321)、细胞裂解液(批号:P0100)、钙离子荧光探针(Fluo-4, AM, 批号:20190619)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒(批号:20171228),均购自北京索莱宝科技有限公司;澳洲新生胎牛血清(FBS),江苏恩莫阿赛生物技术有限公司,批号:S171204F;线粒体膜电位检测试剂盒,美国 Genview 公司,批号:9321010105;SDS-PAGE 凝胶制备试剂盒(批号:30310)、丽春红染色试剂(批号:03968/40316),均购自北京康为世纪生物科技有限公司;超敏 ECL 化学发光检测试剂盒(批号 B500022)、Caspase-3 Rabbit Polyclonal antibody(批号:19677-1-AP)、Bcl-2 Rabbit Polyclonal antibody(批号:12789-1-AP)、Bax Rabbit Polyclonal antibody(批号:50599-2-Ig)、Caspase-9 Rabbit Polyclonal antibody(批号:10380-1-AP)、 β -actin Mouse Monoclonal antibody(批号:60008-1-1g)、HRP-conjugated Affinipure Goat Anti-Rabbit IgG(批号:SA00001-2),均购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 主要仪器 ELX800 型多功能酶标仪,美国

Bio-Tek 公司; HF160W 型 CO₂ 培养箱, 上海力申科学仪器有限公司; CKX53 型倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; 2K15 型冷冻离心机, 德国 Sigma 公司; Navios 流式细胞仪, 美国贝克曼-库尔特公司; DDY-7C 型电泳仪电源、DYCF-40 型转印电泳仪, 北京六一生物仪器厂; Fluorchem HD2 Western 成像系统, 美国 Alpha Innotech 公司。

1.4 动物分组、给药及含药血清制备 将 30 只 SD 雄性大鼠随机分为 3 组, 即正常对照组、维生素 C 组 (0.08 g·kg⁻¹)、TF-RM 组 (2.5 g·kg⁻¹); 灌胃给药, 给药体积为 10 mL·kg⁻¹, 每天 1 次, 连续 7 d; 正常对照组给予等量去离子水灌胃。第 7 天给药 1 h 后, 麻醉大鼠, 腹主动脉取血; 静置 2 h 后, 以 3 580×g 离心 10 min, 分离血清; 56 °C 水浴灭活 30 min, 0.22 μm 微孔滤膜过滤除菌、分装后, -80 °C 冰箱中保存备用。

1.5 细胞培养及分组 HUVEC 细胞用含有 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素的 DMEM/F12 培养基, 在 37 °C、5% CO₂ 及饱和湿度条件下培养, 待细胞生长至融合度达 80% 左右时进行实验。细胞分组: 正常对照组 (体积分数为 15% 的空白血清)、模型组 (15% 空白血清+950 μmol·L⁻¹ H₂O₂)、维生素 C 组 (15% 维生素 C 含药血清+950 μmol·L⁻¹ H₂O₂), 以及 TF-RM 低剂量组 (5% TF-RM 含药血清+10% 空白血清+950 μmol·L⁻¹ H₂O₂)、中剂量组 (10% TF-RM 血清+5% 空白血清+950 μmol·L⁻¹ H₂O₂)、高剂量组 (15% TF-RM 血清+950 μmol·L⁻¹ H₂O₂)。

1.6 DCFH-DA 荧光定量法检测 HUVEC 的 ROS 含量 HUVEC 以 1×10⁵·mL⁻¹ 的细胞密度接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h 后, 弃去培养液, PBS 冲洗 1 遍; 按照“1.5”项下分组、干预, 每孔 2 mL; 继续培养 24 h 后, 弃去培养液; 加入无血清培养液稀释的终浓度为 10 μmol·L⁻¹ 的 DCFH-DA 1 mL, 37 °C 孵育 20 min; 用无血清细胞培养液洗涤 3 次, 以 300×g 离心、重悬细胞于 400 μL 无血清培养基后, 采用流式细胞仪检测。

1.7 JC-1 染色法检测细胞线粒体膜电位 HUVEC 以 1×10⁵·mL⁻¹ 的细胞密度接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 弃去培养液, PBS 冲洗 1 遍; 按照“1.5”项下分组、干预, 每孔 2 mL, 继续培养 24 h, 弃去培养液, PBS 洗涤细胞; 先后加入细胞培养液、JC-1 染色工作液各 1 mL, 混匀, 37 °C 下孵育 20 min; 用 JC-1 染色缓冲液 (1×)

洗涤 2 次, 以 300×g 离心及用 400 μL 细胞培养液重悬细胞后, 采用流式细胞仪检测。

1.8 Fluo-4 染色法检测细胞内 Ca²⁺ 浓度 HUVEC 以 1×10⁵·mL⁻¹ 的细胞密度接种于 6 孔板, 每孔 2 mL, 在 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养 24 h, 弃去培养液, PBS 冲洗 1 遍; 按照“1.5”项下分组、干预, 每孔 2 mL, 继续培养 24 h, 弃去培养液; 加入 Fluo-4/AM 工作液 1 mL, 37 °C 下孵育 20 min; 加入 5 mL 含有 1% 胎牛血清的 HBSS, 继续培养 40 min; 以 HEPES buffer saline 洗涤 3 次, 以 300×g 离心、重悬细胞, 制成 1×10⁵·mL⁻¹ 密度的细胞溶液; 37 °C 下培养 10 min 后, 采用流式细胞仪进行荧光 Ca²⁺ 检测。

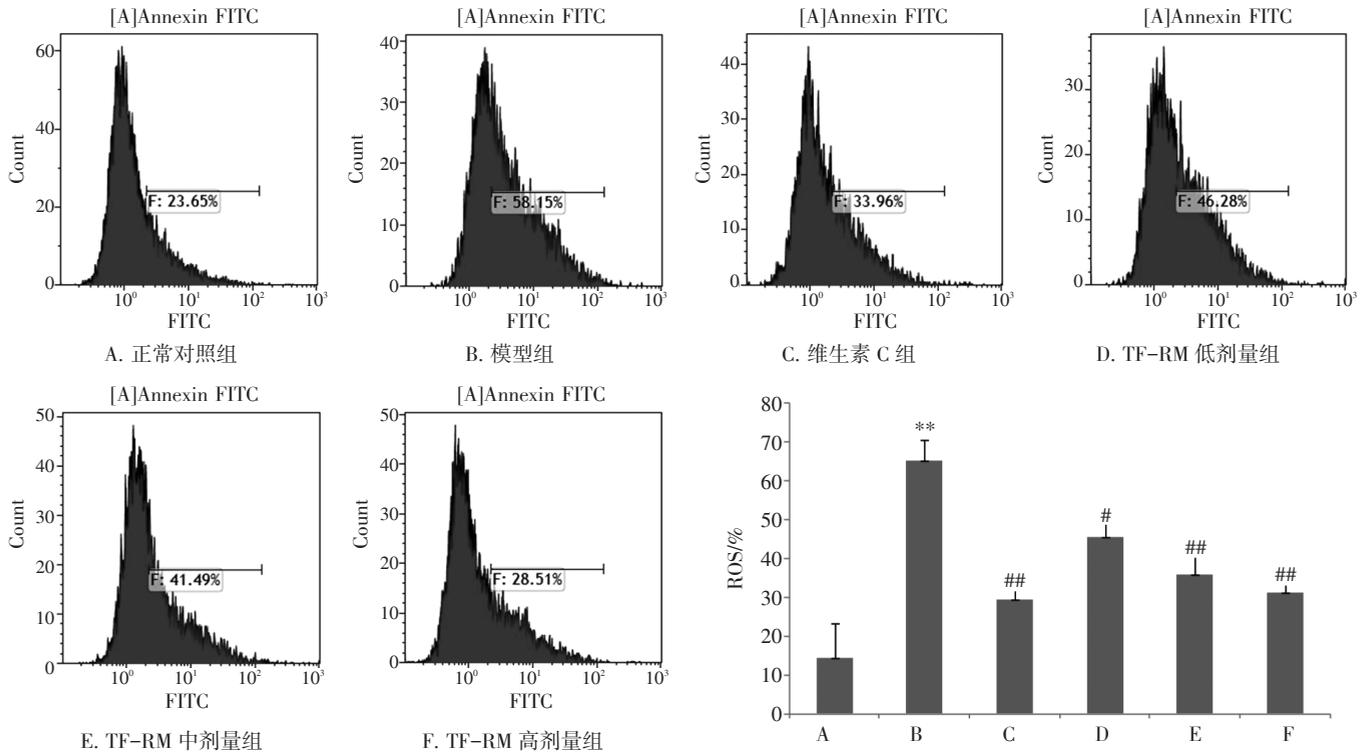
1.9 Western Blot 法检测 HUVEC 细胞中 Bax、Bcl-2、Caspase-3 及 Caspase-9 蛋白的表达 采用 RIPA 裂解细胞后, 以 BCA 法测定总蛋白含量; 蛋白样品制备完成后, 进行 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 随后转移目标蛋白至 PVDF 膜上。PVDF 膜用 5% 的脱脂牛奶室温下封闭 1 h 后, 在一抗溶液 [Bax (1:6 000)、Bcl-2 (1:1 000)、Caspase-3 (1:750)、Caspase-9 (1:500)、β-actin (1:5 000)] 中 4 °C 下孵育过夜; TBST 充分漂洗后, 用 HRP 标记的二抗 (1:5 000) 于室温下孵育 1 h; TBST 清洗后, 以 ECL 发光液进行显影, 拍照。以 β-actin 为内参, 采用 Image Studio 软件对目的蛋白进行半定量分析。

1.10 统计学处理方法 采用 SPSS 21.0 统计软件进行数据分析; 计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示; 多组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 两两比较采用 LSD 检验; 以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 TF-RM 对 H₂O₂ 诱导损伤的 HUVEC 中 ROS 水平的影响 结果见图 1。与正常对照组比较, 模型组 HUVEC 中 ROS 水平明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较, TF-RM 低、中、高剂量组 HUVEC 中 ROS 水平明显降低, 差异均有统计学意义 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。结果表明, TF-RM 能减少 H₂O₂ 诱导损伤的 HUVEC 中 ROS 的产生。

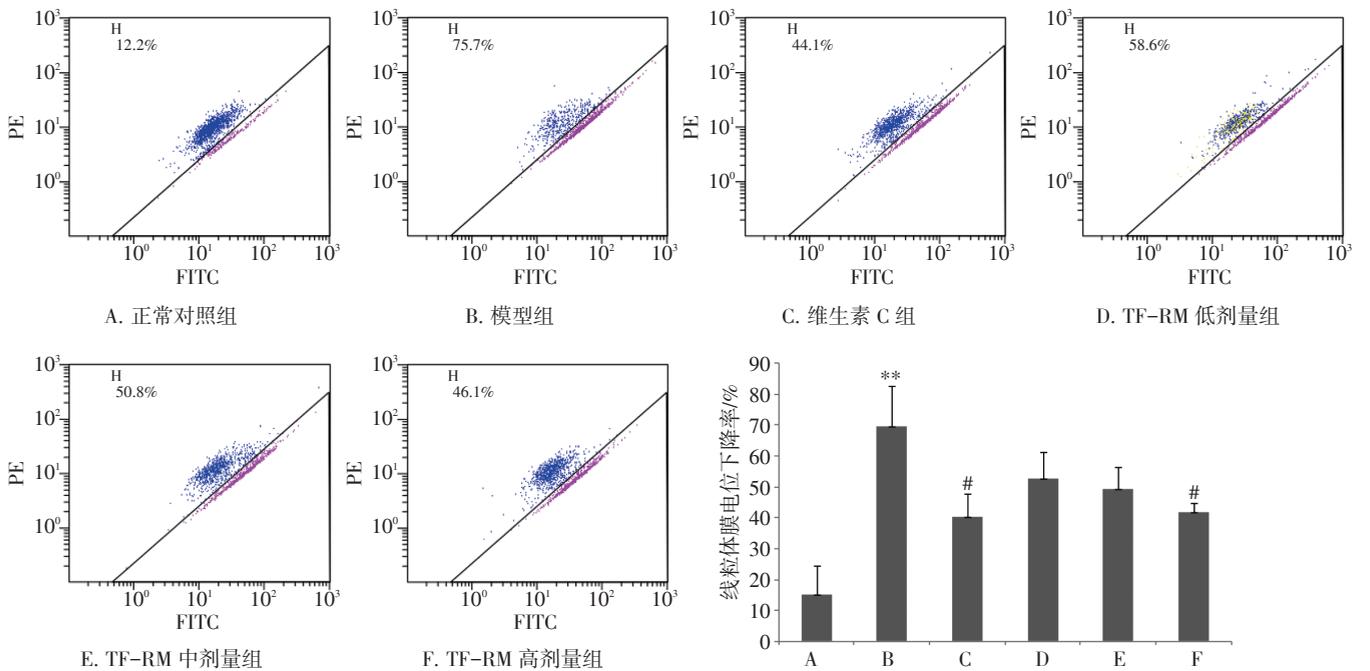
2.2 TF-RM 对 H₂O₂ 诱导损伤的 HUVEC 线粒体膜电位的影响 结果见图 2。与正常对照组比较, 模型组细胞的线粒体膜电位下降率明显升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与模型组比较, TF-RM 高剂量组的线粒体膜电位下降率明显降低, 差异有统计学



注: A. 正常对照组; B. 模型组; C. 维生素 C 组; D. TF-RM 低剂量组; E. TF-RM 中剂量组; F. TF-RM 高剂量组。与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$

图 1 野蔷薇根总黄酮(TF-RM)对 H_2O_2 诱导损伤的 HUVEC 中活性氧(ROS)水平的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 1 Effect of total flavonoids from *Rosa multiflora* Thunb. on ROS in HUVEC induced by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, n=3$)



注: A. 正常对照组; B. 模型组; C. 维生素 C 组; D. TF-RM 低剂量组; E. TF-RM 中剂量组; F. TF-RM 高剂量组。与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$

图 2 野蔷薇根总黄酮(TF-RM)对 H_2O_2 诱导损伤的 HUVEC 线粒体膜电位的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 2 Effect of total flavonoids from *Rosa multiflora* Thunb. on mitochondrial membrane potential in HUVEC induced by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

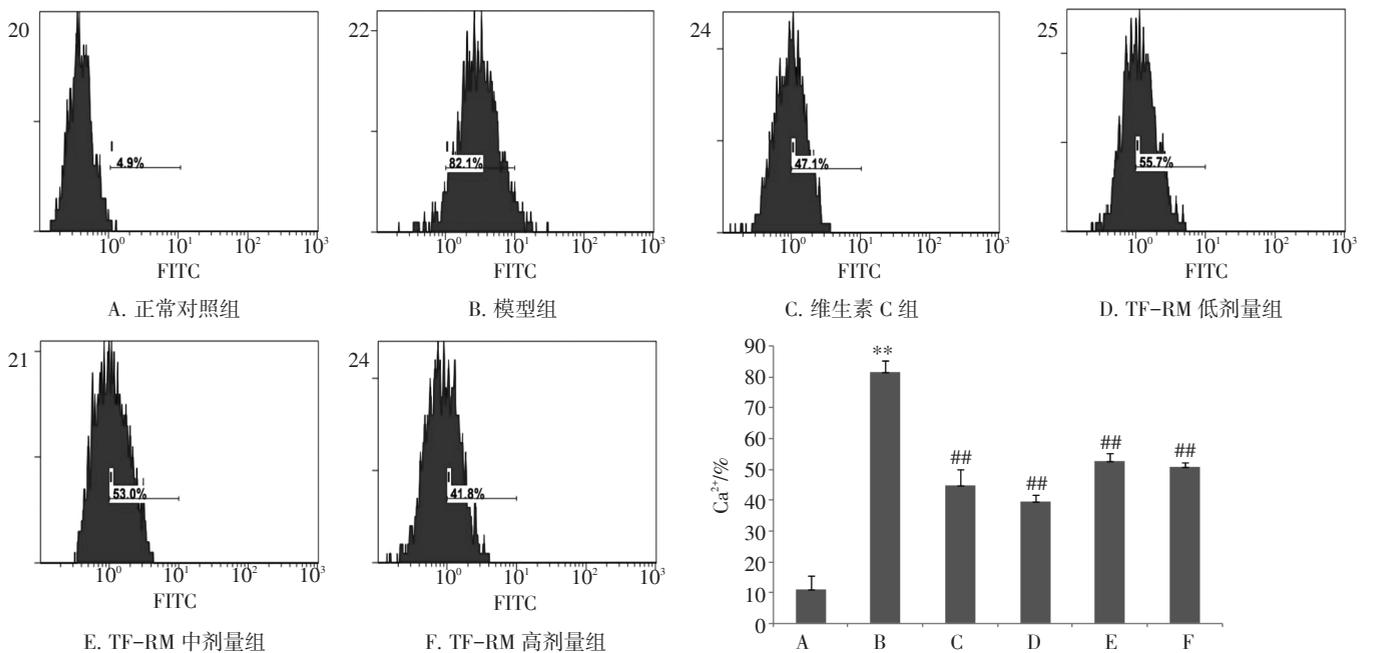
意义($P < 0.05$); TF-RM 低、中剂量组的细胞线粒体膜电位下降率有降低趋势, 但差异无统计学意义($P > 0.05$)。结果表明, 随着浓度升高, TF-RM 可逆转 H_2O_2 诱导损伤的 HUVEC 细胞线粒体膜电位降低。

2.3 TF-RM 对 H_2O_2 诱导损伤的 HUVEC 中 Ca^{2+} 浓度的影响 结果见图 3。与正常对照组比较, 模型组 HUVEC 中的 Ca^{2+} 浓度明显升高, 差异有统计学意义($P < 0.01$)。与模型组比较, TF-RM 低、中、高剂量组 HUVEC 中的 Ca^{2+} 浓度明显降低, 差异均有统计

学意义($P < 0.01$)。结果表明, TF-RM 能降低 H_2O_2 诱导损伤的 HUVEC 中的 Ca^{2+} 浓度。

2.4 TF-RM 对 H_2O_2 诱导损伤的 HUVEC 中 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达的影响

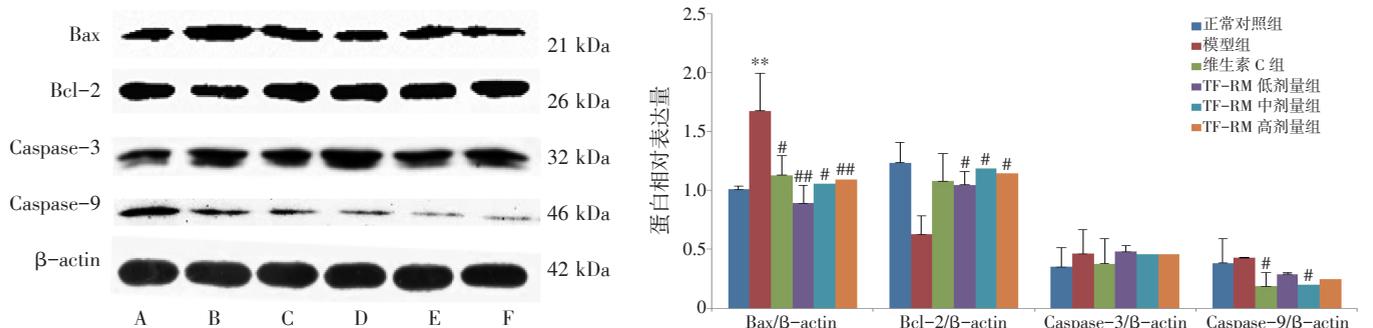
结果见图 4。与正常对照组比较, 模型组 HUVEC 中的 Bax 蛋白表达明显上调($P < 0.01$), 而 Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达有一定上调趋势, Bcl-2 蛋白表达有下调趋势, 但差异均无统计学意义($P > 0.05$)。与模型组比较, TF-RM 低、中、高剂量组 HUVEC 中的 Bax 蛋白表达明显下调($P < 0.05, P < 0.01$),



注: A. 正常对照组; B. 模型组; C. 维生素 C 组; D. TF-RM 低剂量组; E. TF-RM 中剂量组; F. TF-RM 高剂量组。与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, ## $P < 0.01$

图 3 野蔷薇根总黄酮(TF-RM)对 H_2O_2 诱导损伤的 HUVEC 中 Ca^{2+} 浓度的影响($\bar{x} \pm s, n=3$)

Figure 3 Effect of total flavonoids from *Rosa multiflora* Thunb on Ca^{2+} in HUVEC induced by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, n=3$)



注: A. 正常对照组; B. 模型组; C. 维生素 C 组; D. TF-RM 低剂量组; E. TF-RM 中剂量组; F. TF-RM 高剂量组。与正常对照组比较, ** $P < 0.01$; 与模型组比较, # $P < 0.05$, ### $P < 0.01$

图 4 野蔷薇根总黄酮(TF-RM)对 H_2O_2 诱导损伤的 HUVEC 中 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达的影响($\bar{x} \pm s, n=4$)

Figure 4 Effect of total flavonoids from *Rosa multiflora* Thunb. on protein expression of Bax, Bcl-2, Caspase-3 and Caspase-9 in HUVEC induced by H_2O_2 ($\bar{x} \pm s, n=4$)

Bcl-2 蛋白表达明显上调($P < 0.05$); TF-RM 中剂量组 HUVEC 中的 Caspase-9 蛋白表达明显下调, 差异有统计学意义($P < 0.05$)。

3 讨论

线粒体是真核细胞能量产生的主要场所, 在细胞信号调控中起重要作用。线粒体也是产生活性氧(ROS)的主要场所, 同时也是 ROS 的主要作用部位。当线粒体 ROS 生成增多时, 会导致氧化应激。而氧化应激不仅会抑制线粒体呼吸酶活性, 减慢呼吸链的电子传递, 使 ROS 产生增多, 还会上调解耦联蛋白表达, 降低线粒体膜电位, 使氧化-磷酸化解耦联, 减少三磷酸腺苷(ATP)合成^[13-14]。

线粒体膜电位的形成与线粒体结构密切相关。质子泵位于线粒体内膜中, 可将线粒体基质中产生的质子泵入膜间隙, 在线粒体内膜两侧形成质子浓度梯度, 由此形成线粒体膜电位^[15]。正常的线粒体膜电位是维持线粒体及细胞机制正常运转, 功能正常发挥的前提。线粒体膜电位有利于线粒体对 Ca^{2+} 的摄取。当线粒体膜电位降低时, 线粒体对 Ca^{2+} 摄取减少或线粒体 Ca^{2+} 外流增加, 引起细胞 Ca^{2+} 紊乱, 影响 Ca^{2+} 相关酶活性的调节和信号转导, 进而导致线粒体功能障碍。同时, 线粒体膜电位下降也是细胞凋亡早期的一个标志性事件。

线粒体在细胞凋亡中处于凋亡调控的重要位置, 当细胞受到外部凋亡信号(如紫外线、药物、一氧化氮、ROS 等)的刺激时, 都可以引起线粒体的损伤和膜通透性的改变。Bcl-2、Bax 定位于线粒体膜上, Bcl-2 通过阻止细胞色素 C(CytC)从线粒体释放来抑制细胞凋亡; 而 Bax 则通过与线粒体上的膜通道结合, 促使 CytC 的释放而促进细胞凋亡。进入胞质的 CytC 可以活化 Caspase-9, 进而激活 Caspase-3, 最终导致细胞凋亡。

本课题组前期研究^[11]表明, 野蔷薇根总黄酮(TF-RM)对 H_2O_2 诱导损伤的人脐静脉内皮细胞(HUVEC)具有保护作用, 其机制与提高 HUVEC 存活率, 降低早晚期细胞凋亡率, 增加正常细胞数量, 降低乳酸脱氢酶(LDH)、内皮素-1(ET-1)含量, 升高一氧化氮(NO)释放量有关。通过观察 TF-RM 对氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)诱导 HUVEC 损伤的影响^[16], 发现其作用于凝集素样氧化低密度脂蛋白受体, 通过减少细胞氧化损伤, 调节血管活性物质、降低黏附分子及炎症级联反应, 从而发挥对血管内皮细胞的保

护作用。

本研究结果表明, H_2O_2 能诱导上调 HUVEC 中的 ROS 浓度, 降低线粒体膜电位, 并提高 Ca^{2+} 浓度及上调 Bax 蛋白表达。而 TF-RM 含药血清能显著减少 HUVEC 内的 ROS 产生, 逆转线粒体膜电位的下降, 降低 Ca^{2+} 浓度, 下调 Bax、Caspase-9 蛋白表达, 上调 Bcl-2 蛋白表达。进一步证明了 TF-RM 能够改善 H_2O_2 诱导的 HUVEC 线粒体功能损伤, 发挥对血管内皮细胞凋亡的保护作用。

参考文献:

- [1] VITA J A, KEANEY J F. Endothelial function: a barometer for cardiovascular risk[J]. *Circulation*, 2002, 106(6): 640-642.
- [2] 蒋娟娟, 刘爱东, 杨杰. 动脉粥样硬化中CARHSP1基因的表达对缺氧诱导的血管内皮细胞活力凋亡及免疫因子的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(1): 126-132.
- [3] 陈云, 叶鹏. 内皮细胞活化与高血压患者的认知功能有关[J]. *中华高血压杂志*, 2016, 6(24): 598-599.
- [4] 陈丽斌, 纪立金. 基于取象比类探讨缺血性脑卒中脉证诊治规律[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 12(34): 5592-5595.
- [5] 米丽班·霍加艾合买提, 迪丽菲嘎尔·阿布都热一木, 迪丽努尔·马里克. HPLC法测定野蔷薇中金丝桃苷的含量[J]. *食品研究与开发*, 2011, 32(7): 114-116.
- [6] 迪丽努尔·马力克, 毛居代·亚尔买买提, 阿孜古丽·木阿赛力木, 等. 反相液相色谱法测定新疆野蔷薇果中的黄酮类化合物[J]. *食品科学*, 2010, 31(12): 156-158.
- [7] 李敏. 川滇蔷薇根、叶化学成分研究[D]. 成都: 四川师范大学, 2013.
- [8] 王玲, 康俊丽, 尚路遥, 等. 野蔷薇不同部位总黄酮含量比较研究[J]. *中医学报*, 2015, 30(9): 1332-1334.
- [9] 程艳刚, 李国艳, 谭金燕, 等. 黄酮类化合物抗心肌缺血作用机制研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2018, 20(6): 82-85.
- [10] 曹纬国, 刘志勤, 邵云, 等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展[J]. *西北植物学报*, 2003, 23(12): 2241-2247.
- [11] 杨丹, 王军, 李开言, 等. 野蔷薇根总黄酮对 H_2O_2 诱导损伤的人脐静脉内皮细胞的影响[J]. *中药新药与临床药理*, 2019, 30(9): 1093-1097.
- [12] 李开言, 张飞, 田萍, 等. 野蔷薇根总黄酮的提取及纯化工艺[J]. *中国现代中药*, 2018, 20(5): 593-598.
- [13] 周越. 乙醇作用大鼠海马神经元后线粒体膜电位及钙离子浓度变化的研究[D]. 郑州: 郑州大学, 2019.
- [14] 熊燕, 张梅, 陈菲, 等. 线粒体功能障碍与心血管疾病[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(2): 364-370.
- [15] 石静, 卿晨. 线粒体膜电位改变与细胞凋亡[J]. *中国民族民间医药杂志*, 2011, 20(7): 20-21.
- [16] 杨丹, 王军, 李开言. 野蔷薇根总黄酮含药血清对 ox-LDL 诱导 HUVEC 损伤的保护作用研究[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(5): 1211-1216.

(编辑: 邹元平)