

doi: 10.13241/j.cnki.pmb.2015.19.003

罗布麻通过抑制氧化应激反应减轻心肌缺血再灌注损伤 *

屈小玲^{1,2} 王文清³ 梁向艳¹ 铁 茹¹ 刘芳娥¹ 李 榕^{4Δ} 张海锋^{1Δ}

(1 第四军医大学教学实验中心 陕西 西安 710032; 2 第四军医大学校直门诊部 陕西 西安 710032;

3 第四军医大学唐都医院血液科 陕西 西安 710038; 4 第四军医大学西京医院老年病科 陕西 西安 710032)

摘要 目的:观察罗布麻叶提取物(apocynum venetum leaf extract AVLE)预处理对心肌缺血再灌注(MI/R)损伤的影响。**方法:**采用SD大鼠MI/R模型,随机分为 sham(假手术)组、MI/R组、AVLE预处理+MI/R组,检测血流动力学,采用氯化三苯基四氮唑和伊文思蓝双染法检测心肌梗死面积、以血浆肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)活性检测心肌损伤情况、以超氧化物、丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)含量检测心肌氧化应激以及 Western blot 方法检测 gp91^{phox}的表达。**结果:**与 MI/R组相比,AVLE预处理组左室压上升、下降最大速率($\pm$ LVdp/dt_{max})升高($P<0.05$),心肌梗死面积减少,两组分别为 $41.5\pm 4.5\%$ 和 $32.0\pm 3.5\%$ ($P<0.05$),血浆 CK 和 LDH 活性分别降低到 1653 ± 62 U/L 和 2461 ± 152 U/L($P<0.05$),减少了心肌组织超氧化物的含量($P<0.05$)。AVLE 治疗显著降低 gp91^{phox}的表达($P<0.05$),使 SOD 活性增加($P<0.05$),MDA 水平显著降低($P<0.05$)。**结论:**AVLE 通过抑制 I/R 心肌的氧化应激发挥心脏保护作用。

关键词:罗布麻;氧化性应激;心肌缺血再灌注损伤

中图分类号:Q95-3;R541 **文献标识码:**A **文章编号:**1673-6273(2015)19-3609-04

Apocynum Venetum Attenuates Myocardial Ischemia/reperfusion Injury via Inhibiting Oxidative Stress*

QU Xiao-ling^{1,2}, WANG Wen-qing³, LIANG Xiang-yan¹, TIE Ru¹, LIU Fang-e¹, LI Rong^{4Δ}, ZHANG Hai-feng^{1Δ}

(1 Experiment Teaching Center, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 2 Outpatient Department, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 3 Department of Hematology, Tangdu Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China; 4 Department of Senile Disease, Xijing Hospital, Fourth Military Medical University, Xi'an, Shaanxi, 710032, China)

ABSTRACT Objective: To observe the effects of AVLE preconditioning on myocardial ischemia/reperfusion (MI/R) injury.

Methods: Male Sprague-Dawley rats were divided into 3 groups randomly: sham, ischemia reperfusion and AVLE preconditioned group. The model of myocardial I/R injury in vivo was made by ligating the left anterior descending artery for 30 min followed by 4 h of reperfusion in SD rats. The hemodynamics were measured. The myocardial infarct size was measured by Evans blue and 2,3,5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining. The level of hyperoxide superoxide, malondialdehyde (MDA) and plasma creatine kinase (CK) were measured. The activities of antioxidant enzyme superoxide dismutase (SOD) and lactate dehydrogenase (LDH) were detected. The gp91^{phox} were determined by Western Blot. **Results:** Compared with I/R group, the left ventricular $\pm$ dp/dt_{max} in AVLE preconditioned rats was increased ($P<0.05$). The percentage of area of necrosis was reduced ($32.0\pm 3.5\%$ vs. $41.5\pm 4.5\%$, $P<0.05$). The plasma CK and LDH levels were decreased to 1653 ± 62 U/L and 2461 ± 152 U/L ($P<0.05$ vs. MI/R group). AVLE preconditioning decreased superoxide accumulation ($P<0.05$ vs. MI/R group). AVLE treatment markedly decreased gp91^{phox} expression ($P<0.05$ vs. MI/R group). The activity of SOD was increased ($P<0.05$ vs. MI/R group). The level of MDA was decreased ($P<0.05$ vs. MI/R group).

Conclusions: AVLE alleviates I/R injury in myocardium by inhibition of excessive ERS.

Key words: Apocynum venetum; Oxidative stress; Myocardial ischemia/reperfusion injury

Chinese Library Classification(CLC): Q95-3; R541 **Document code:** A

Article ID: 1673-6273(2015)19-3609-04

前言

缺血心肌再灌注可以防止细胞凋亡和坏死。但是大量的研

究表明,再灌注本身可以加重和加速缺血心肌的损伤。尽管对心肌缺血再灌注(MI/R)损伤已经进行了深入的研究,但治疗对策还是很有限。到目前为止,仍未找到有效的、常规的和普遍被

* 基金项目:国家自然科学基金项目(81270330,81470413,81300190);陕西省科学技术研究发展计划项目(2013KJXX-89)

作者简介:屈小玲(1973-),女,本科,主治医师,电话:029-84774253, E-mail:quxiaoling9@163.com

Δ 通讯作者:张海锋, E-mail: hfzhang@fmmu.edu.cn; 李榕, E-mail: wwqlrrs@fmmu.edu.cn

(收稿日期:2015-02-19 接受日期:2015-03-12)

接受的方法。罗布麻生长在中国的中部和西北部地区,长期以来被作为中国的传统中药^[1]。有报道,罗布麻叶提取物(AVLE)具有降低胆固醇,抗高血压,抗低密度脂蛋白氧化,及抗脂质过氧化作用以及抑制胰天蛋白酶和抗焦虑的作用^[2-6]。此外,最新的研究结果表明,AVLE可防止氧和葡萄糖缺乏(OGD)诱导的大鼠大脑皮层神经元凋亡^[7]。这个结果提示,AVLE可能对缺血性中风具有治疗意义。然而迄今为止,AVLE对大鼠心肌缺血再灌注损伤的作用还不甚清楚。因此,本研究旨在探讨 AVLE 是否对 MI/R 损伤具有心肌保护作用。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物与试剂 健康 6 周龄雄性 SD 大鼠 50 只,体重 200-220 g,由第四军医大学动物中心提供。抗 gp91^{phox} 兔来源多克隆抗体,购自北京博奥森生物技术有限公司。从干的叶子获得罗布麻叶提取物。罗布麻叶子 100 g 浸泡于含水乙醇 1 h (70%, v/v, 60 mL),两次,将乙醇提取物蒸发至干。取 13.5 g 提取物溶解于热水 200 mL 中,用硫酸将 pH 值调整为 3.0 后过滤。将经过 Diaion HP20 层析柱的滤过液用 200 mL 超净水和 200 mL 含水乙醇(70%, v/v)洗脱。收集含水乙醇,蒸发至干,得到 AVLE 4.2 g。

1.1.2 实验分组和动物模型的复制 6 周龄雄性 SD 大鼠 50 只,体重 200-220 g,适应性饲养 2 周之后,将大鼠随机分为三个实验组:假手术组、心肌缺血再灌注(MI/R)组、AVLE 预处理+MI/R 组。根据文献^[7,8],AVLE 预处理+MI/R 组给予均匀溶解于水中的 AVLE [500 mg/(kg·d)],每日 1 次,共 1 周后建立 MI/R 模型;MI/R 组给予蒸馏水灌胃,每日 1 次,共 1 周后建立 MI/R 模型。大鼠禁食过夜,予以 2%戊巴比妥钠腹腔内注射麻醉(60 mg/kg),按参考文献^[9]建立心肌缺血模型:大鼠麻醉后,仰卧于实验台上,紧贴胸骨左缘开胸,切断左侧 2、3、4 肋软骨,剪开包,在左心耳下缘与肺动脉圆锥间可见冠脉左前降支起始部,用 6-0 号丝线在此处穿线备用,进针深度约 0.1 cm,宽度为 0.1-0.2 cm。除 sham 组外,其余各组以橡皮筋垫底,双线结扎冠脉左前降支,以心电图 S-T 段明显上抬、T 波高耸、结扎线以下心肌颜色变暗和收缩减弱为心肌缺血标志,30 min 后松开结扎线,恢复血流 4 h;按参考文献^[10]方法,分离左侧股静脉和右侧颈总动脉。左侧股静脉插管用于药物的注射,右侧颈总动脉插管至左心室内,记录左心室内压(LVSP)和左心室内压最大变化速率($\pm$ LV dp/dt_{max}),并同步记录肢体 II 导联心电图;实验过程中,每 30 min 记录一次 LVSP, $\pm$ LV dp/dt_{max} 和心电图。所有大鼠均在完成再灌注 4 h 后迅速处死。

1.2 方法

1.2.1 氯化三苯基四氮唑(TTC)和伊文思蓝双染法检测心肌梗死面积 参考文献^[11]方法实验结束后,原位结扎左冠状动脉前降支,经主动脉逆行灌注 1%伊文思蓝 2 mL,将非缺血区蓝染,显示出缺血区心肌。取出心脏,去除左右心房,置于 -20 °C 冷冻 20 min,垂直其长轴横切为 5 片厚约 2 mm 的心肌片,按顺序置入 2% TTC 磷酸缓冲液中,避光 37 °C 孵育 10 min,此时梗死区为灰白色,即坏死面积(area of necrosis, AN);缺血非梗死区呈砖红色,缺血区面积(area at risk, AAR)为灰白区与砖红色区之和,正常区为蓝色。扫描仪扫描成像,以 Image-Pro Plus 图像分析软件(Version 4.1)分别计算各部分面积,缺血心肌用 AAR 与左心室(left ventricle, LV)面积之比表示,梗死范围以 AN 与 AAR 之比表示。

1.2.2 血浆肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)活性的测定 参考文献^[12,13]方法,再灌注末期,采血 1 mL;置于抗凝试管中,高速离心后用分光光度计以酶偶联法检测肌酸激酶(CK)、乳酸脱氢酶(LDH)含量。

1.2.3 心肌组织超氧化物定量 根据文献^[14],通过 LEC 法测定心肌组织产生的超氧化物,并用 RLU/(mg·s)表示。

1.2.4 Western Blot 测定心肌组织中抗 gp91^{phox} 的表达 参考文献^[15]方法,组织匀浆,BCA 法蛋白定量,蛋白制样,配制 SDS-PAGE 凝胶,通过电泳将蛋白质样品(含蛋白 150 μ g)在 SDS-PAGE 上进行分离。转膜、封闭,加入抗 gp91^{phox} 多克隆抗体(1:500),加二抗杂交、化学发光显色, β -肌动蛋白作为内参对照。采用 Image-Pro Plus(Version 4.1)软件分析蛋白条带的积分吸光度值(integrated absorbance, IA=A $\times$ 面积),以靶蛋白 IA 值/ β -肌动蛋白 IA 值的比值反映靶蛋白水平。

1.2.5 心肌组织丙二醛(MDA)和超氧化物歧化酶(SOD)的测定 参考文献^[16,17]方法,摘取心脏,生理盐水漂洗后拭干,并取部分心肌组织按 1:9 加入预冷的生理盐水,以 3500 r·min⁻¹ 4 °C 离心 15 min,上清即为 10%心肌组织匀浆液,参照试剂盒说明书测定 SOD 活性和 MDA 含量。

1.3 统计学分析

数据采用 SPSS 5.0 统计学软件进行分析。计量资料以表示。两组间比较用 Student-t 检验进行分析,多组间比较用 One-Way ANOVA 分析。以 P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 罗布麻叶提取物缓解 MI/R 引起的心脏功能不全

图 1 中,再灌注后 4 h,MI/R 组大鼠左室收缩压(LVSP)和左室压上升、下降最大速率($\pm$ LV dp/dt_{max})降低和左室舒张末期压(LVEDP)升高;AVLE 预处理虽然没有改变心肌 I/R 大鼠的 LVSP 和 LVEDP,但显著改善 $\pm$ LVdp/dt_{max}(P<0.05),表明 AVLE 预处理显著增强 MI/R 心脏的功能。

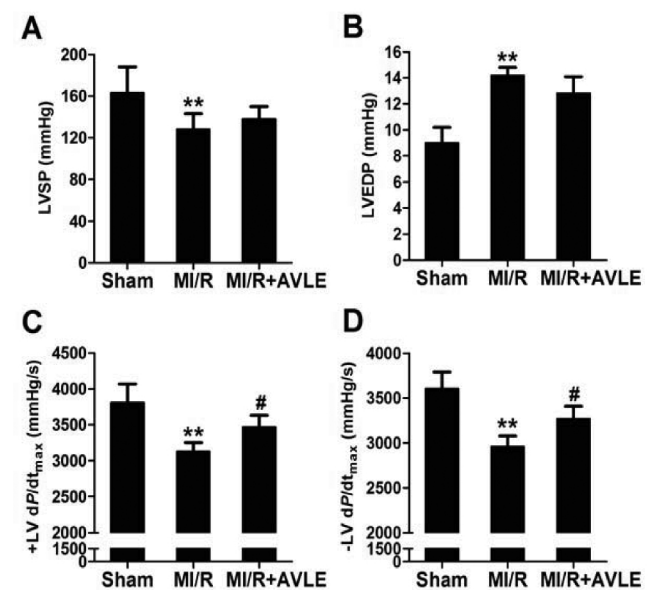


图 1 罗布麻叶提取物(AVLE)预处理增强大鼠心肌缺血/再灌注心脏功能

Fig. 1 Apocynum venetum leaf extract (AVLE) preconditioning increased cardiac function in rats subjected to myocardial ischemia/reperfusion
Note: Data are expressed as SD, n = 8. ** P<0.01 compared with group Sham, #P<0.05 compared with group MI/R.

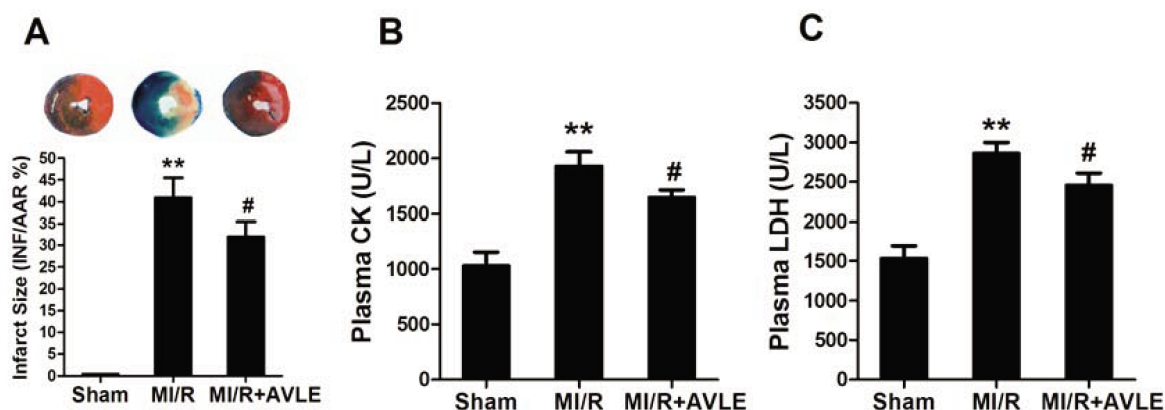


图2 罗布麻叶提取物(AVLE)预处理减少心肌缺血/再灌注大鼠心肌梗死面积、血浆肌酸激酶(CK)和乳酸脱氢酶(LDH)活性

Fig. 2 Apocynum venetum leaf extract (AVLE) preconditioning reduced infarct size, plasma creatine kinase (CK) and lactate dehydrogenase activities (LDH) in rats subjected to myocardial ischemia/reperfusion

Note: Data are expressed as SD, n = 8. **P<0.01 compared with group Sham, # P<0.05 compared with group MI/R.

2.2 罗布麻叶提取物减轻心肌 I/R 诱导的心肌损伤

缺血 30 min 再灌注 4 h 导致梗死面积增加,证明其可造成心肌损伤(图 2A)。与 MI/R 组相比,AVLE 预处理可显著减少心肌梗死面积(AVLE 预处理组为 $32.0 \pm 3.5\%$, 心肌 I/R 组为 $41.5 \pm 4.5\%$, $P < 0.05$)。检测血浆 LDH 和 CK 活性,以评估大鼠心肌 I/R 的心肌坏死。在 MI/R 组,大鼠血浆 CK 和 LDH 活性分别提高到 1930 ± 128 U/L 和 2867 ± 132 U/L ($P < 0.01$, 与 sham 组比较 图 2B, 2C)。AVLE 预处理组,MI/R 大鼠血浆 CK 和 LDH 活性分别降低到 1653 ± 62 U/L 和 2461 ± 152 U/L ($P < 0.05$, 与 MI/R 组比较)。这些结果表明,AVLE 预处理可减少 MI/R 大鼠的心肌坏死。

2.3 罗布麻叶提取物降低 I/R 心肌的氧化应激

如图 3A 所示,与 sham 组相比,MI/R 组大鼠心肌超氧化物含量显著增加($P < 0.01$),AVLE 预处理减少了超氧化物的蓄积($P < 0.05$,与 MI/R 组相比)。之后,我们确定 gp91^{phox}(为 I/R 心脏中最重要的超氧化物生成酶-NADPH 氧化酶的主要成分)的表达。正如所料,AVLE 治疗显著降低 MI/R 刺激 gp91^{phox} 的表达($P < 0.05$),如图 3B。此外,对作为氧化应激水平的生物标志物-丙二醛(MDA)进行测量。MI/R 组与假手术组相比,MDA 显著增加。用 AVLE 预处理可使 MDA 显著减少(图 3C)。相反,AVLE 预处理(图 3D)使 I/R 大鼠心脏组织中的抗氧化酶-超氧化物歧化酶(SOD)活性增加。这些结果表明,AVLE 可抑制 I/R 心脏中超氧化物的产生过剩和氧化应激。

3 讨论

在本研究中,我们首先证明了 AVLE 预处理对大鼠 I/R 心脏具有保护作用。其次证明了 AVLE 预处理直接抑制 I/R 心脏的氧化应激。

有实验证明,AVLE 具有抑制天冬氨酸特异性半胱氨酸蛋白酶活性^[9]。Xiang 等^[18]发现,AVLE 通过下调 caspase-3 活性和调节 Bcl-2/Bax 的比值抑制大鼠皮层神经元细胞凋亡,防止氧气和葡萄糖剥夺(OGD)诱导的伤害。后来他们发现,AVLE 通过减轻血-脑屏障(BBB)的破坏,防止脑缺血/再灌注诱导的损伤,这可能是由于其对基质金属蛋白酶(MMP)-9/-2 表达和活性的抑制作用^[1]。因此,AVLE 作为神经保护物质,是被广泛接受的。然而,AVLE 在心脏中的作用尚不明确。在我们的研

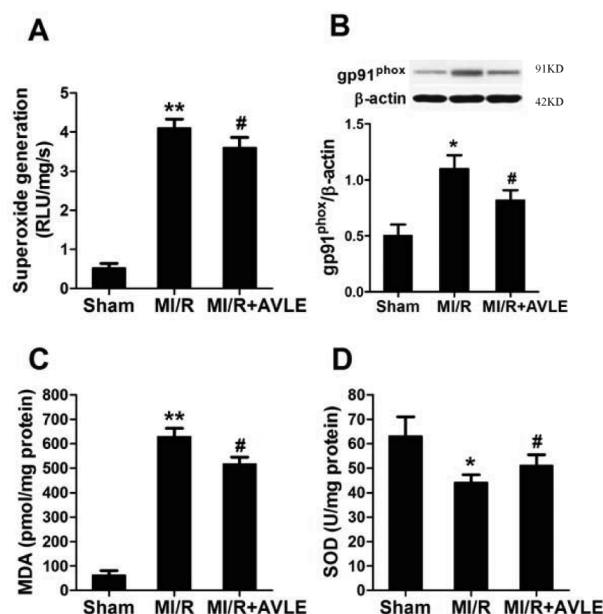


图3 罗布麻叶提取物(AVLE)预处理降低缺血/再灌注大鼠心脏的氧化应激反应

Fig. 3 Apocynum venetum leaf extract (AVLE) preconditioning reduced oxidative stress in rats subjected to myocardial ischemia/reperfusion

Note: Data are expressed as SD. n=8. *P<0.05, **P<0.01 compared with group Sham, #P<0.05 compared with group MI/R.

究中,预处理 AVLE 显著改善心功能,减轻大鼠心肌 I/R 损伤,表现为减少心肌梗死面积,降低血浆 CK/LDH 活性,这表明 AVLE 对心肌细胞具有广泛的细胞保护作用。

实验证明,心肌缺血再灌注期间会引起活性氧爆发(reactive oxygen species ROS)^[19,20]。大量产生的活性氧能抵消组织原有的抗氧化剂,造成各种细胞结构的氧化损伤;给予氧自由基清除剂,例如超氧化物歧化酶(superoxide dismutase SOD),可以阻止超氧负离子爆发^[34]。有报道,罗布麻叶提取物(AVLE)具有降低胆固醇,抗高血压,抗低密度脂蛋白氧化,及抗脂质过氧化作用以及抑制胱天蛋白酶和抗焦虑的作用^[6-8,14,18]。最新的研究结果表明,AVLE 可防止氧和葡萄糖缺乏

(OGD)诱导的大鼠大脑皮层神经元凋亡^[9]。提示 AVLE 可能对缺血性中风具有治疗意义。在本研究,我们发现 AVLE 的治疗直接抑制过氧化物的产生。NADPH 氧化酶是超氧阴离子产生的重要来源。AVLE 处理显著减少 NADPH 氧化酶的重要组成部分 -gp91^{phx} 的表达。氧化应激在组织中的水平通常与 MDA 的浓度有关。AVLE 治疗也可降低 I/R 大鼠心脏 MDA 的形成。同时,AVLE 治疗显著提高 I/R 心脏组织中抗氧化酶 SOD 的活性。基于这些观察,AVLE 可对抗氧化应激,保护大鼠心脏的 I/R 心肌。

本研究首次证明,AVLE 通过抑制 I/R 心肌的氧化应激发挥心脏保护作用,这表明 AVLE 在治疗心血管疾病,尤其是在疾病的预防和保健方面可能是一个有效的补充和替代的药物。

参考文献(References)

- [1] Xiang J, Lan R, Tang YP, et al. Apocynum venetum leaf extract attenuates disruption of the blood-brain barrier and upregulation of matrix metalloproteinase-9/-2 in a rat model of cerebral ischemia-reperfusion injury[J]. *Neurochem Res*, 2012, 37(8): 1820-1828
- [2] Kim DW, Yokozawa T, Hattori M, et al. Inhibitory effects of an aqueous extract of Apocynum venetum leaves and its constituents on Cu²⁺-induced oxidative modification of low density lipoprotein [J]. *Phytother Res*, 2000, 14(7): 501-504
- [3] Kwan CY, Zhang WB, Nishibe S, et al. A novel in vitro endothelium-dependent vascular relaxant effect of Apocynum venetum leaf extract [J]. *Clin Exp Pharmacol Physiol*, 2005, 32(9): 789-795
- [4] Fattorusso R, Frutos S, Sun X, et al. Traditional Chinese medicines with caspase-inhibitory activity [J]. *Phytomedicine*, 2006, 13 (1-2): 16-22
- [5] Grundmann O, Nakajima J, Seo S, et al. Anti-anxiety effects of Apocynum venetum L. in the elevated plus maze test [J]. *J Ethnopharmacol*, 2007, 110(3): 406-411
- [6] Grundmann O, Nakajima J, Kamata K, et al. Kaempferol from the leaves of Apocynum venetum possesses anxiolytic activities in the elevated plus maze test in mice [J]. *Phytomedicine*, 2009, 16 (4): 295-302
- [7] Xiang J, Tang YP, Zhou ZY, et al. Apocynum venetum leaf extract protects rat cortical neurons from injury induced by oxygen and glucose deprivation in vitro [J]. *Can J Physiol. Pharmacol*, 2010, 88 (9): 907-917
- [8] Butterweck V, Nishibe S, Sasaki T, et al. Antidepressant effects of apocynum venetum leaves in a forced swimming test [J]. *Biol Pharm Bull*, 2001, 24(7): 848-851
- [9] 赵秀梅, 孙胜, 刘秀华. 垫扎球囊法复制大鼠在体心肌缺血/再灌注模型[J]. *中国微循环*, 2007, 11(3): 206-208
Zhao Xiu-mei, Sun Sheng, Liu Xiu-hua. Experimental Model of Myocardial Ischemia/reperfusion in Rat Established by Ligating Coronary Artery with Capsule [J]. *J Chin Microcirc*, 2007, 11 (3): 206-208
- [10] 刘爱华, 石孟琼, 杨文雁, 等. 珠子参总皂甙对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用及机制研究 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2013, 18(11): 1224-1232
Liu Ai-hua, Shi Meng-qiong, Yang Wen-yan, et al. Cardioprotective effect and its mechanism of total saponin from Panacis majoris rhizome on myocardium ischemia/reperfusion injury in rats[J]. *Chin J Clin Pharmacol Ther*. 2013, 18 (11): 1224-1232
- [11] Liu XH, Grund F, Kanellopoulos GK, et al. Myocardial extracellular signal regulatory kinases are activated by laser treatment [J]. *J Cardiovasc Surg(Torino)*, 2003, 44 (1): 1-7
- [12] 吴红彦, 王虎平, 车敏, 等. 参麦康心滴丸对实验性心肌缺血大鼠心电图 ST 段抬高动态变化及血清 CK、LDH 与血浆 TXB₂、6-Keto-PGF_{1α} 含量的影响[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2010, 16(8): 665-667
Wu Hong-yan, Wang Hu-ping, Che Min, et al. Effects of Shenshen Kangxin Pill on Dynamic Changes in ECG ST Segment Elevation and Expressions of Serum CK, LDH and Plasma TXB₂, 6-Keto-PGF in Rats with Experimental Myocardial Ischemia [J]. *Chinese Journal of Basic Medicine in Traditional Chinese Medicine*, 2010, 16 (8): 665-667
- [13] 刘宏亮, 凌琳. 丹参酮 II A 对一次性力竭运动大鼠血清炎症因子水平的影响[J]. *中国运动医学杂志*, 2012, 31(11): 999-1020
Liu Hong-liang, Ling Lin. The Change in Serum Inflammatory Cytokines Level after Exhaustive Exercise Based on Administration of Tanshinone II A[J]. *Chin J Sports Med*, 2012, 31(11): 999-1020
- [14] Su H, Ji L, Xing W, et al. Acute hyperglycaemia enhances oxidative stress and aggravates myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of thioredoxin-interacting protein [J]. *J Cell Mol Med*, 2013, 17 (1): 181-191
- [15] 王雅丹, 胡豫, 张璐, 等. 脑源性神经营养因子通过 AKT 和 ERK1/2 信号通路诱导内皮细胞血管生成[J]. *中国实验血液学杂志*, 2008, 16 (1): 175-180
Wang Ya-Dan, Hu Yu, Zhang Lu, et al. Brain Derived Neurotrophic Factor Induces Endothelial Cells Angiogenesis through AKT and ERK1/2 Signal Pathway [J]. *Journal of Experimental Hematology*, 2008, 16(1): 175-180
- [16] 陈恒星. 舒芬太尼对大鼠心肌缺血再灌注心肌组织超氧化物歧化酶活性及丙二醛水平的影响 [J]. *新乡医学院学报*, 2012, 29(3): 180-181
Chen Heng-xing. Influence of sufentanyl on the activity of superoxide dismutase and the level of malondialdehyde of Myocardium in myocardial ischemic reperfusion rats[J]. *Journal of Xinxiang Medical College* 2012, 29(3): 180-181
- [17] 樊荣, 卢园园, 黄晓颖, 等. 知母宁对低氧高二氧化碳肺心病大鼠心肌、肝组织丙二醛和 SOD 含量的影响[J]. *中国新药杂志*, 2012, 21(7): 804-807
Fan Rong, Lu Yuan-yuan, Huang Xiao-ying, et al. The effects of chimonin on superoxide dismutase and malondialdehyde in heart and liver tissues in chronic hypoxia- hypercapnia rats [J]. *Chinese Journal of New Drugs*, 2012, 21(7): 804-807
- [18] Xiang J, Tang YP, Zhou ZY, et al. Apocynum venetum leaf extract protects rat cortical neurons from injury induced by oxygen and glucose deprivation in vitro[J]. *Can J Physiol Pharmacol*, 2010, 88(9): 907-917
- [19] Moens AL, Claeys MJ, Timmermans JP, et al. Myocardial ischemia/reperfusion-injury, a clinical view on a complex pathophysiological process[J]. *Int J Cardiol*, 2005, 100(2): 179-190
- [20] Saeed SA, Waqar MA, Zubairi AJ, et al. Myocardial ischaemia and reperfusion injury: reactive oxygen species and the role of neutrophil [J]. *J Coll Physicians Surg Pak*, 2005, 15(8): 507-514