

# 竹节参总皂苷通过激活自噬抑制衰老大鼠 心肌细胞凋亡

王烙佩<sup>1</sup>, 郑杰<sup>1</sup>, 李思敏<sup>1</sup>, 张长城<sup>1</sup>, 王婷<sup>1</sup>, 袁丁<sup>2</sup>, 周志勇<sup>1</sup>

(1. 三峡大学医学院, 湖北宜昌 443002) (2. 三峡大学附属仁和医院, 湖北宜昌 443001)

**摘要:** 观察竹节参总皂苷 (total saponins of *Panax japonica*, TSPJ) 对自然衰老大鼠心肌细胞凋亡的保护作用, 并从自噬角度探讨其作用机制。取 18 月龄 SD 雄性大鼠随机分为模型组、TSPJ 低、高剂量组, 每组 10 只; TSPJ 低、高剂量组分别投食给予 TSPJ 10、30 mg/kg, 模型组每天投食等量正常饲料, 持续给药至 24 月龄; 同时取 10 只 6 月龄大鼠作为对照组。与青年对照组相比, 自然衰老组心肌细胞排列紊乱, 肌纤维断裂, 心肌细胞凋亡指数增加 3 倍。TSPJ 能有效改善衰老大鼠心脏组织的形态结构和心肌细胞凋亡下降 55%; 衰老模型组 Bax、Caspase-3、Caspase-9、p62 蛋白表达分别升高了 9.5、1.8、4.1、3.4 倍, Bcl-2、Bcl-2/Bax 及 LC3 II/LC3 I、Beclin1 分别下降了 98%、99%、70%、48%; TSPJ 组中 Bax、Caspase-3、Caspase-9 和 p62 分别下调 87%、65%、70% 和 65%, Bcl-2、Bcl-2/Bax 比值, LC3 II/LC3 I 和 Beclin1 表达分别升高了 12.75、138.5、5.68 和 2.6 倍。结果表明, 竹节参总皂苷能有效地改善衰老大鼠心肌细胞凋亡, 其作用机制可能与 TSPJ 激活衰老大鼠心肌细胞自噬相关。

**关键词:** 自然衰老大鼠; 心肌细胞凋亡; 竹节参总皂苷; 自噬

文章编号: 1673-9078(2018)12-1-6

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2018.12.001

## Inhibition of Cardiomyocyte Apoptosis in Aging Rats by Saponins of *Panax japonicus* via Activating Autophagy

WANG Luo-pei<sup>1</sup>, ZHENG Jie<sup>1</sup>, LI Si-min<sup>1</sup>, ZHANG Chang-cheng<sup>1</sup>, WANG Ting<sup>1</sup>, YUAN Ding<sup>2</sup>, ZHOU Zhi-yong<sup>1</sup>

(1. Medical College of Three Gorges University, Yichang 443002, China)

(2. Renhe Hospital of China Three Gorges University, Yichang 443001, China)

**Abstract:** The protective effects of total saponins extracted from *Panax japonicus* (TSPJ) on cardiomyocyte apoptosis in natural aging rats, as well as its underlying mechanism in terms of autophagy was investigated. Male SD rats aged 18 months were randomly divided into 3 groups (model group, low-dose TSPJ group and high-dose TSPJ group), 10 rats in each group. TSPJ groups were given TSPJ at different doses (10 and 30 mg/kg, p.o.), model group was treated with equal normal animal food for 6 months until 24 months old. Another 10 rats aged 6 month (6M) were used controlled group. Compared to young control group, the myocardial cells arranged in disorder, and the muscle fibers broke, and cardiomyocyte apoptosis increased by 3 times in the natural aging group. TSPJ significantly improved the morphology of heart tissue and decreased cardiomyocyte apoptosis by 55% in comparison with natural aging group. Protein expression levels of Bax, Caspase-3, Caspase-9 and p62 were increased by 9.5, 1.8, 4.1 and 3.4 times, the protein expression levels of Bcl-2, Bcl-2/Bax, LC3 II/LC3 I and Beclin1 was decreased by 98%, 99%, 70% and 48% in the aging group. TSPJ can effectively inhibit the protein expression of Bax, Caspase-3, Caspase-9 and p62 by 87%, 65%, 70% and 65%, and increase the expression of Bcl-2, Bcl-2/Bax, LC3 II/LC3 I and Beclin1 by 12.75, 138.5, 5.68 and 2.6 times in the natural aging heart tissues. The results suggest that TSPJ can effectively improve cardiomyocyte apoptosis in natural aging rats, and its mechanism may be related to regulation of autophagy.

**Key words:** natural aging rats; cardiomyocyte apoptosis; total saponins of *Panax japonicas*; autophagy

收稿日期: 2018-08-20

基金项目: 国家自然科学基金项目 (31570329)

作者简介: 王烙佩 (1993-), 女, 在读硕士, 研究方向: 衰老相关心血管疾病发病机制与中药药理。

通讯作者: 周志勇 (1982-), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 衰老相关心血管疾病发病机制及中药活性物质筛选。

心血管疾病已成为全世界第一位致死、致残原因, 年龄是心血管疾病发展的重要危险因素, 统计显示, 50 岁以上人群心血管疾病发病率显著升高, 其发病形式多样, 包括外周血管病变、冠状动脉疾病、心力衰竭、血脂异常和高血压等<sup>[1,2]</sup>。且大量研究表明, 衰老心脏呈现独特的组织学和生物化学特征, 主要包

括心肌细胞坏死增多,核增值、体积变大,结缔组织聚集,心肌细胞凋亡数量增多<sup>[3]</sup>,心肌纤维化程度加重,并伴有心脏舒张功能降低和心率失常增加等风险<sup>[4]</sup>。近期研究表明,自噬活性与心肌细胞凋亡密切相关,自噬增强能有效减轻左旋硝基精氨酸诱导高血压所致的心肌损伤,减轻心肌细胞凋亡<sup>[5]</sup>。且抑制自噬,加剧乌头碱诱导的心肌细胞凋亡<sup>[6]</sup>。

竹节参系五加科人参属植物竹节参 (*Panax japonicus* C. A. Mey.) 的干燥根茎,其主要化学成分为竹节参总皂苷 (total saponins of *Panax japonicus*, TSPJ), 具有补虚强壮, 散瘀止血、止痛的功效, 多用于素体羸弱, 跌扑损伤, 咳嗽咯血以及痰多<sup>[7,8]</sup>, 在我国少数民族土苗聚居地广泛使用, 在土家族称为“草药之王”, 具有极高的药用价值, 近几年成为研究和探索的热点。我们课题组前期研究证实, TSPJ 具有良好的心脏保护作用, 能有效减轻缺血导致的心肌损伤, 恢复心功能, 并可显著抑制急性缺血、心梗导致的心肌细胞凋亡<sup>[9]</sup>。近期研究显示, TSPJ 能有效改善衰老大鼠心肌形态, 减轻心肌纤维化, 抑制 H9c2 大鼠心肌细胞中促凋亡蛋白 Bax 的活性, 促进抑凋亡蛋白 Bcl-2 蛋白的活性、提高 Bcl-2/Bax 的比值, 有效改善心肌细胞凋亡<sup>[10]</sup>。体外研究也发现, 竹节参总皂苷对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 所致心肌细胞损伤具有保护作用, 可有效抑制心肌细胞凋亡<sup>[11]</sup>。但竹节参总皂苷改善衰老大鼠心肌细胞凋亡的确切机制目前尚不完全明确。本研究将利用自然衰老模型大鼠, 从心肌细胞自噬方面探讨竹节参总皂苷对自然衰老大鼠心肌细胞凋亡的保护作用及其可能的机制, 为临床应用提供实验依据和理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料与试剂

#### 1.1.1 动物及饲料

SPF 级 Sprague-Dawley 雄性大鼠 40 只购自三峡大学实验动物中心, 许可证号: SCXK (鄂) 2011-0012。动物饲养于温度为 20~23 °C, 湿度为 55%~65%, 12 h 明暗交替的饲养室。自由摄食和饮水, 并定期更换消毒垫料。

#### 1.1.2 药物及试剂

竹节参药材采购自恩施州椿木营, 经三峡大学生药学专家何毓敏博士鉴定为正品竹节参。TSPJ 由本研究团队提取分离, 其提取率为 23%。以竹节参 IVa 标准品为对照品, 香草醛-高氯酸显色后采用紫外分光光度法测得 TSPJ 的相对纯度为 80.3%<sup>[12]</sup>。BCA 蛋白浓度定量试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司;

Tunel-细胞凋亡原位检测试剂盒(10768100), 德国 Roche 公司; Bax (sc-7480) 购自美国 Santa Cruze 公司; Bcl-2 (#625509) 购自美国 R&D Systems 公司; Caspase-3 (ab44976)、Caspase-9 (ab52298)、p62 (ab56416)、Beclin1 (ab207612) 购自美国 Abcam 公司; LC3 I / II (#12741) 购自美国 cell signaling 公司; GAPDH (#5174) 购自美国 Cell Signaling 公司; 辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊 (111004)、山羊抗兔 (125510) 均购自武汉科瑞生物技术有限公司。BCA 蛋白浓度定量试剂盒购自北京普利莱基因技术有限公司; Bax (sc-7480) 购自美国 Santa Cruze 公司; Bcl-2 (#625509) 购自美国 R & D Systems 公司; Caspase-3 (ab44976)、Caspase-9 (ab52298)、p62 (ab56416)、Beclin1 (ab207612) 购自美国 Abcam 公司; LC3 I / II (#12741) 购自美国 cell signaling 公司; GAPDH (#5174) 购自美国 Cell Signaling 公司。辣根过氧化物酶标记的兔抗山羊 (111004)、山羊抗兔 (125510) 均购自武汉科瑞生物技术有限公司。

#### 1.1.3 主要仪器

IX53 型光学倒置显微镜, 日本 Olympus 公司; LEICA EG 1150H 型石蜡包埋机、LEICA TP 1020 型自动脱水机、LEICA EG 1150C 型超薄切片机, 德国 Leica 公司; Power Pac TM Basic 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司; Bioshine Chemi Q 4800 化学发光凝胶成像自动显影仪, 上海欧翔科学仪器有限公司; JA2003 电子分析天平, 上海天平仪器厂。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 动物分组及给药

将 30 只 18 月龄 SD 雄性大鼠随机分为衰老模型组、TSPJ 低剂量组、TSPJ 高剂量组。衰老模型组给予等量正常饲料, TSPJ 低、高剂量组分别投食给予 TSPJ 10 mg/(kg·d)、30 mg/(kg·d), 连续给药 6 个月至 24 月龄, 每天 1 次。另取 10 只 6 月龄大鼠做青年对照组。动物处理前一晚禁食不禁水, 第二天腹腔注射 20% 乌拉坦 5 mL/kg 待麻醉后, 腹主动脉取血并快速取出心脏组织, 用预冷的生理盐水洗净擦干后, 存储于 -80 °C 冰箱以备使用。

### 1.2.2 大鼠心脏组织 HE 染色

待大鼠麻醉后腹主动脉取血, 快速取出心脏组织, 经生理盐水冲洗后, 沿垂直于纵轴中间靠心尖的位置将心脏切割成 2~3 cm 厚的组织块, 多聚甲醛固定 24 h 后, 再用 75% 乙醇再放置 24 h。经脱水机梯度酒精脱水, 二甲苯透明、石蜡包埋, 切片。根据 HE 染色步骤先经二甲苯脱蜡, 不同浓度酒精复水 (由高到低),

放入双蒸水中，苏木精染核和伊红染色后，再梯度酒精脱水、二甲苯透明，最后将组织置于通风处待残留的甲苯挥发干净后，滴加中性树胶封片。待片子略干后，于倒置光学显微镜下仔细观察大鼠心脏组织形态变化，并在不同视野随机取图。

### 1.2.3 TUNEL 试剂盒检测大鼠心肌细胞凋亡

石蜡切片经常规脱蜡脱苯入水处理后，按照 TUNEL 细胞凋亡原位检测试剂盒的操作步骤染色，光镜观察，正常心肌细胞核呈蓝色，凋亡心肌细胞核呈棕褐色。于 200 倍的光镜下每张切片随机选择 2~3 个视野，计算每个视野中凋亡细胞核数和总细胞核数，计算心肌细胞凋亡指数。凋亡指数=凋亡细胞核数/总细胞核数×100%。

### 1.2.4 Western blot 检测大鼠心脏组织中相关蛋白的表达

-80 °C 取组织样本，称取心脏组织约 40 mg，各组加入约 500 μL 裂解液，用匀浆机研磨，静置、离心后，吸取上清液。用 BCA 法蛋白定量。蛋白变性后，SDS-PAGE 跑胶，先 80 V 恒压约 30 min 后，110 V 恒压电泳直至 Marker 条带完全跑开；切下所需目的条带，250 mA 恒流转膜 100 min。5%脱脂牛奶室温封闭 1 h，加入一抗 4 °C 过夜；洗涤一抗后，加入相应标记的二抗，再清洗二抗，室温孵育 1 h，加入 ECL 显影液显色。

### 1.2.5 统计学处理

采用 GraphPad Prism 5、Image J 软件进行统计分析，实验数据采用均数±标准差 ( $\bar{x}\pm s$ ) 表示。采用单因素方差分析法比较各组间差异的显著性， $p<0.05$  为差异具有统计学意义。

## 2 结果与讨论

### 2.1 竹节参总皂苷对衰老大鼠心脏组织形态学的影响

光镜可见青年对照组中大鼠心肌纤维排列整齐紧凑，结构清晰，心肌细胞形态形态、胞质及间质均正常；与青年对照组相比，自然衰老模型组中大鼠心肌细胞排列紊乱，细胞间隙增大，心肌细胞变性增多，间质纤维增生，肌纤维断裂。与 24 月龄相比，TSPJ 低、高剂量组大鼠心肌纤维形态得到明显改善，纤维排列整齐，心肌细胞炎性浸润减轻，间质纤维增生减少。结果如图 1 所示。

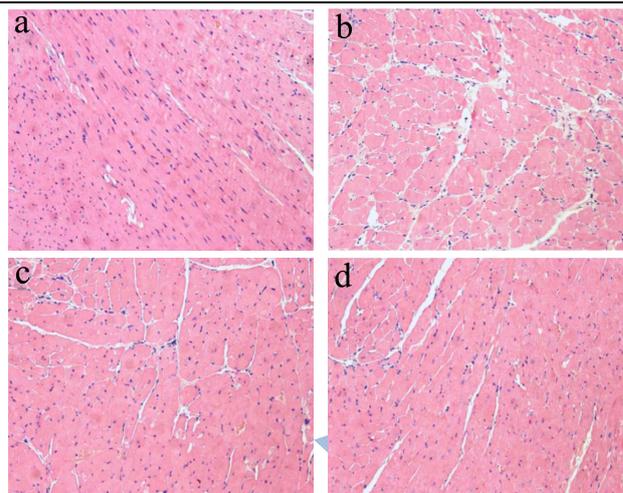


图 1 各组大鼠心肌组织病理形态学改变(×200)

Fig.1 Pathologic changes of myocardium tissues of rats in each group (×200)

注：a. 6 月龄青年对照组；b. 24 月龄衰老模型组；c. TSPJ 10 mg/(kg·d)；d. TSPJ 30 mg/(kg·d) (同图 2、3、4、5)。

### 2.2 TSPJ 对衰老大鼠心肌细胞凋亡的影响

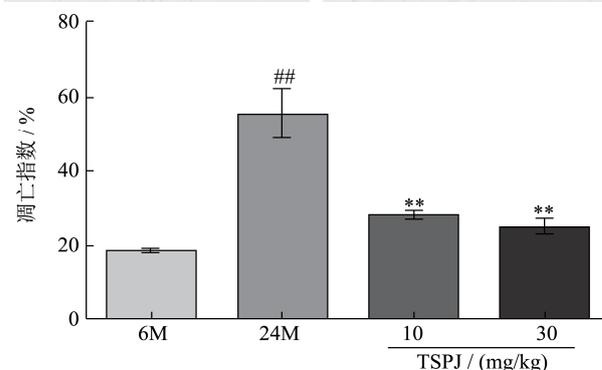
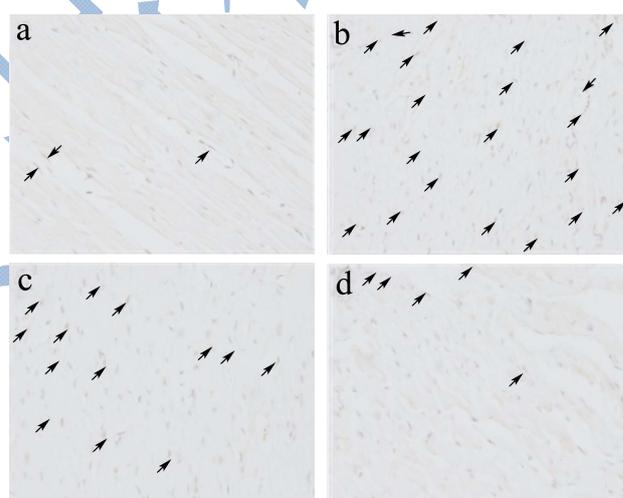


图 2 竹节参总皂苷对衰老大鼠心肌细胞凋亡的影响(×200)

Fig.2 The cardiomyocyte apoptosis of each group (×200)

注：与青年对照组相比<sup>##</sup> $p<0.01$ ，与衰老模型组相比<sup>\*\*</sup> $p<0.01$  (n=5)。

Tunel 法的原理是细胞凋亡过程中基因组 DNA 发生断裂,脱氧核糖核苷酸末端转移酶(TdT)可催化标记这些 DNA 链断裂和缺口处的 3'-OH 末端,进行后续识别,将正常细胞核染成蓝色,凋亡阳性细胞核染成棕褐色。结果显示,与 6 月龄相比,24 月龄大鼠细胞凋亡数显著增加;而 TSPJ 干预后心肌细胞凋亡数量明显减少,见图 2。统计结果表明,与 6 月龄大鼠相比较,24 月龄大鼠的心肌凋亡指数上升 3 倍;与 24 月龄大鼠比较,TSPJ 低、高剂量组大鼠的凋亡指数分别降低 49%和 55%,如图 2 所示。

### 2.3 TSPJ 对衰老大鼠心脏组织 Bax、Bcl-2、Caspase-3、Caspase-9 蛋白表达的影响

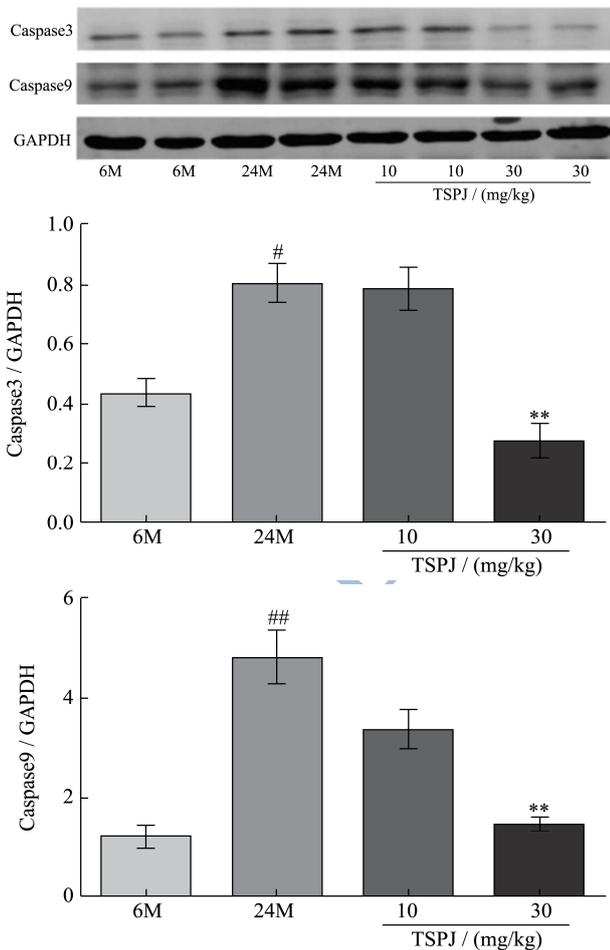


图3 各组大鼠心脏组织中 Caspase-3 和 Caspase-9 蛋白表达的变化

Fig.3 The protein expression of Caspase-3 and Caspase-9 in the cardiac tissues of each group

注:与青年对照组相比<sup>#</sup> $p < 0.05$ ,<sup>##</sup> $p < 0.01$ ;与衰老模型组相比<sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ 。

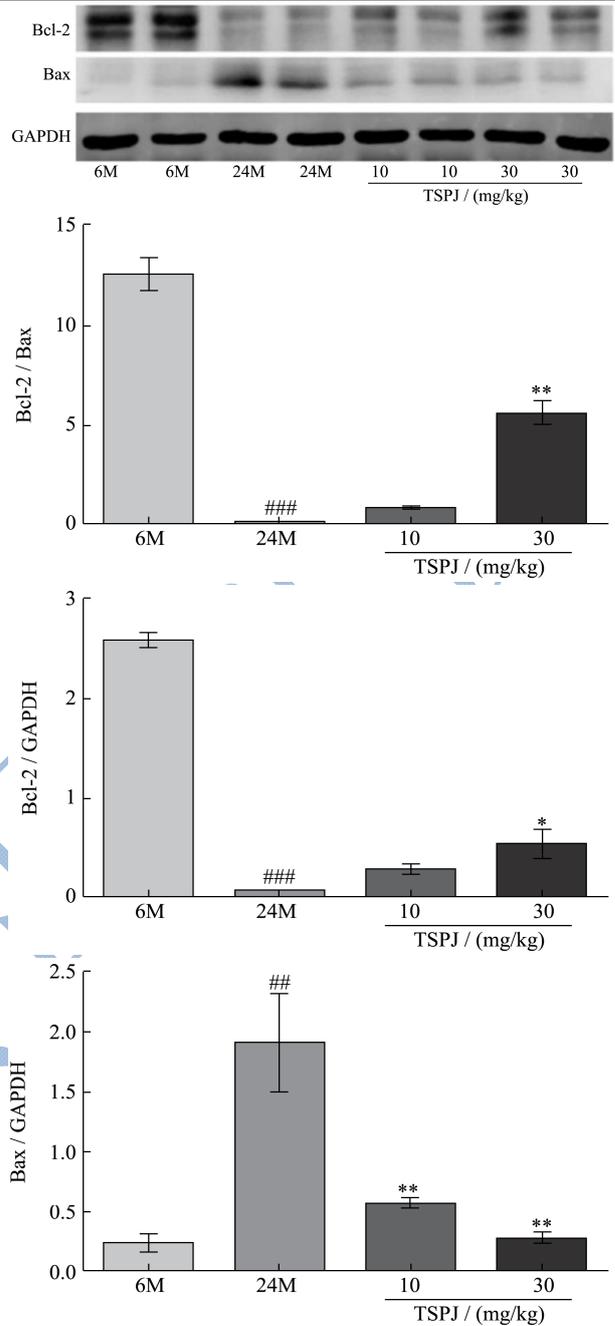


图4 各组大鼠心脏组织中 Bcl-2、Bcl-2/Bax、Bax 蛋白表达量的变化

Fig.4 The protein expression of Bcl-2、Bcl-2/Bax and Bax in the cardiac tissues of each group

注:与青年对照组相比<sup>###</sup> $p < 0.01$ ,<sup>##</sup> $p < 0.001$ ;与衰老模型组相比<sup>\*</sup> $p < 0.05$ ,<sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ 。

随着年龄增长,心脏的收缩舒张功能逐渐衰退、僵硬增加、顺应性降低,并伴随着心肌细胞凋亡增加、氧化应激及自噬功能障碍等,最终导致心血管疾病的发生。由死亡受体和线粒体细胞色素 C 途径介导,经过一系列级联反应激活 Caspase 家族 (cysteiny

laspartate specific proteinase) 最终导致细胞凋亡。凋亡抑制基因 Bcl-2 可调节线粒体膜通透性, 以阻止细胞色素 C 释放进入胞质, 且对下游 Caspase 也有抑制作用, 从而减少细胞凋亡。Bax 与 Bcl-2 为同源分子, 但其功能相反, 是促细胞凋亡的代表<sup>[13,14]</sup>。Western Blot 结果显示, 与 6 月龄相比, 24 月龄组大鼠心脏中 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 的蛋白表达量分别提高了 9.5 倍, 1.8 倍和 4.1 倍, Bcl-2 蛋白表达量及 Bcl-2/Bax 比值下降 98% 和 99%, 给予 TSPJ 干预后, 与 24 月龄大鼠相比, TSPJ 低剂量组中 Bax 蛋白水平下降 87%, Bcl-2 的表达以及 Bcl-2/Bax 比值分别上升 6.5 倍和 19.75 倍; 竹节参高剂量组中 Bax、Caspase-3、Caspase-9 分别下调 87%、65%、70%, Bcl-2 的表达以及 Bcl-2/Bax 比值分别升高了 12.75 倍和 138.5 倍。Tunel 和 Western blot 结果显示, TSPJ 能有效干预自然衰老过程中心肌细胞凋亡指数以及促凋亡蛋白 Bax 和 Caspase3 等蛋白的表达, 提高 Bcl-2 蛋白表达和 Bcl-2/Bax 比值。说明大鼠心脏组织在衰老过程中心肌细胞凋亡增多, 而 TSPJ 能显著改善自然衰老大鼠的心肌细胞凋亡, 且呈剂量依赖性。如图 3、4 所示。

#### 2.4 TSPJ 对衰老大鼠心脏组织 LC3 II/LC3 I、p62 和 Beclin1 蛋白表达的影响

自噬诱导细胞发生凋亡抵抗, 当细胞自噬受阻, 凋亡进程明显加速<sup>[15]</sup>。而自噬功能障碍是心脏衰老的重要特征之一, 心肌细胞终末分化的特性使得难以清除细胞内受损的大分子和细胞器, 导致细胞稳态下降<sup>[16]</sup>。增强自噬活性有助于心肌细胞存活, 并在对严重损伤(如心肌梗死、缺血和暴露于晚期糖基化终末产物)的反应时, 可保护心脏免受病理性重塑和功能障碍<sup>[17]</sup>。有研究表明, 自噬相关基因 ATG5 敲除小鼠在衰老过程中会发展为扩张型心肌病, 并伴有严重的收缩功能障碍<sup>[18]</sup>; 长期服用自噬激活剂雷帕霉素可以延长小鼠的寿命<sup>[19]</sup>。本实验结果也显示, 与 6 月龄大鼠青年对照组比较, 24 月龄自然衰老组大鼠中 LC3 II/LC3 I 和 Beclin1 蛋白表达水平分别下降了 70% 和 48%, p62 表达显著增加 3.4 倍, 而 TSPJ 低剂量组衰老大鼠心脏组织中 LC3 II/LC3 I 和 Beclin1 表达分别升高了 5.68 倍和 2.6 倍, p62 表达减少了 57%; 竹节参高剂量组衰老大鼠心脏组织中 LC3 II/LC3 I 和 Beclin1 表达分别升高了 5.68 倍和 2.6 倍, p62 表达减少了 65%。从 Western Blot 结果显示, TSPJ 能有效提高自然衰老过程中心肌细胞自噬相关蛋白 LC3 II/LC3 I 和 Beclin1 表达, 减少 p62 表达。说明大

鼠心脏组织在衰老过程中自噬能力下降, 而 TSPJ 能显著增强自噬从而保护衰老大鼠心脏组织, 如图 5 所示。

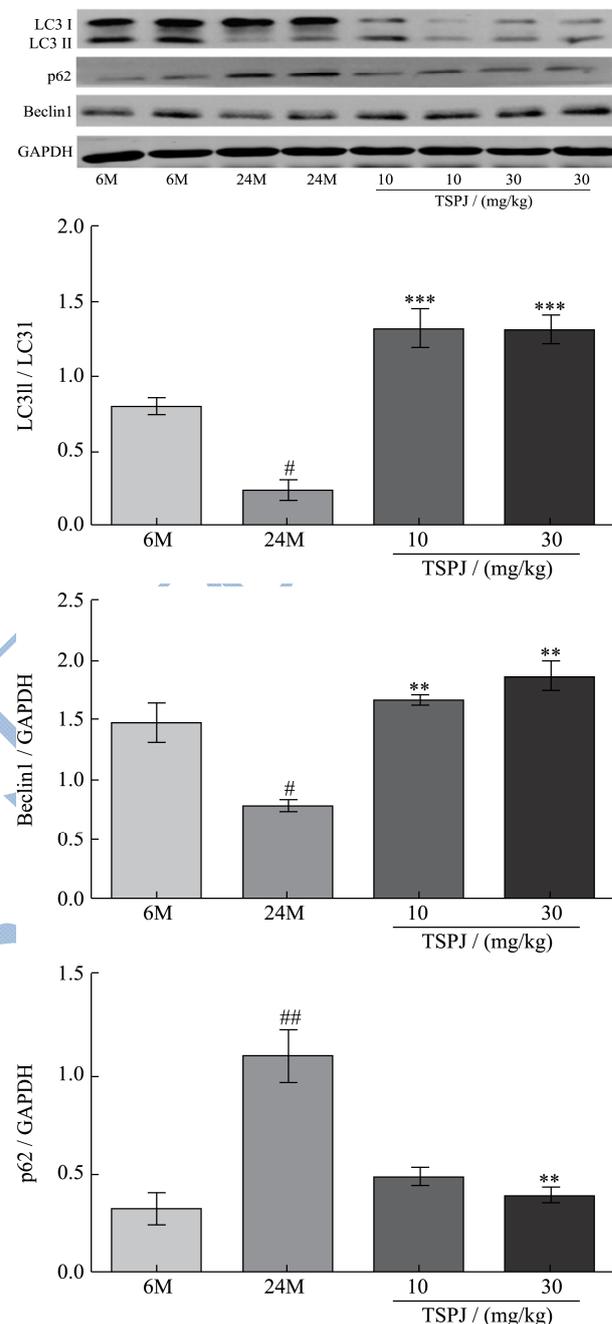


图5 各组大鼠心脏组织中 LC3 II/LC3 I、p62、Beclin1 蛋白表达的变化

Fig.5 The protein expression of LC3 II/LC3 I, p62, Beclin1 in the cardiac tissues of each group

注: 与青年对照组相比<sup>#</sup> $p < 0.05$ , <sup>##</sup> $p < 0.01$ ; 与衰老模型组相比<sup>\*\*</sup> $p < 0.01$ , <sup>\*\*\*</sup> $p < 0.001$ 。

### 3 结论

3.1 HE 和 Tunel 染色结果显示衰老大鼠心脏组织中心肌纤维排列疏松紊乱, 心肌细胞变性, 间质纤维增

生, 心肌细胞凋亡指数上调 3 倍。经 TSPJ 干预后, 自然衰老大鼠心肌形态得到明显改善, 纤维排列整齐, 心肌细胞炎性浸润减轻, 间质纤维增生减少, 低、高剂量竹节参组心肌细胞凋亡指数分别下降 49% 和 55%。Western Blot 结果也显示在衰老过程中, 促凋亡相关蛋白 Bax、Caspase-3 和 Caspase-9 表达水平分别增加 9.5 倍、1.8 倍和 4.1 倍, p62 表达显著增加 3.4 倍, 抑凋亡蛋白 Bcl-2 表达和 Bcl-2/Bax 比值分别下降 98% 和 99%, 且自噬相关蛋白 LC3 II/LC3 I 和 Beclin1 蛋白表达水平分别下降了 70% 和 48%; 与 24 月龄衰老大鼠相比, TSPJ 能激活自噬且抑制大鼠在自然衰老过程中凋亡相关蛋白表达水平。在 TSPJ 低剂量组中, 促凋亡蛋白 Bax 和 P62 分别下降了 87% 和 57%, 抑凋亡蛋白 Bcl-2、Bcl-2/Bax 比值及自噬相关蛋白 LC3 II/LC3 I、Beclin1 分别上调 6.5 倍、19.75 倍、5.68 倍、2.6 倍; TSPJ 高剂量组促凋亡蛋白 Bax、Caspase-3、Caspase-9 和 p62 分别下调 87%、65%、70% 和 65%, Bcl-2、Bcl-2/Bax 比值、LC3 II/LC3 I、Beclin1 表达分别升高了 12.75 倍、138.5 倍、5.68 倍、2.6 倍。

3.2 本研究的结果证实了在衰老大鼠模型中, 心肌细胞自噬活性下降, 凋亡指数增高, 经竹节参总皂苷干预后, 凋亡指数明显下降, 上调 Bcl-2 蛋白, LC3 II/LC3 I 和 Beclin1 表达量, 下调凋亡相关蛋白 Bax、Caspase-3、Caspase-9 和 p62 表达量。因此我们得出结论: 竹节参总皂苷对自然衰老大鼠心脏具有较好的保护作用, 其机制可能是通过激活自噬过程, 抑制心肌细胞凋亡, 本研究为进一步阐明竹节参总皂苷延缓衰老作用提供实验室基础。

## 参考文献

- [1] Adams S C, Segal R J, McKenzie D C, et al. Impact of resistance and aerobic exercise on sarcopenia and dynapenia in breast cancer patients receiving adjuvant chemotherapy: A multicenter randomized controlled trial [J]. *Breast Cancer Res Treat*, 2016, 158(3): 497-507
- [2] Franco R D, Ravo V, Nieddu V, et al. Detection of a numeric value predictive of increased dose to left anterior descending coronary artery (LAD) in radiotherapy of breast cancer [J]. *Springer Plus*, 2016, 5(1): 1-8
- [3] Liu M, Zhang P, Chen M, et al. Aging might increase myocardial ischemia/reperfusion-induced apoptosis in humans and rats [J]. *AGE*, 2012, 34(3): 621-632
- [4] Taneike M, Yamaguchi O, Nakai A, et al. Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy [J]. *Autophagy*, 2010, 6(5): 600-606
- [5] 杨丽芳. 金属硫蛋白的心肌保护机制研究-自噬和凋亡的作用[D]. 西安: 第四军医大学, 2014  
YANG Li-fang. Study of the mechanism of heavy metal scavenger metallothionein in myocardial protection-effects of autophagy and apoptosis [D]. Xi'an: Fourth Military Medical University, 2014
- [6] 胡婷婷, 唐欣, 文欢, 等. 自噬在乌头碱诱导 H9C2 心肌细胞凋亡中的作用及机制研究[J]. *中药材*, 2018, 41(5): 1192-1197  
HU Ting-ting, TANG Xin, WEN Huan, et al. Study the effects and mechanism of autophagy in H9C2 cardiomyocytes apoptosis induced by aconitine [J]. *Journal of Chinese Medicinal Materials*, 2018, 41(5): 1192-1197
- [7] 欧阳丽娜, 向大位, 吴雪, 等. 竹节参化学成分及药理活性研究进展[J]. *中草药*, 2010, 41(6): 1023-1027  
OUYANG Li-na, XIANG Da-wei, WU Xue, et al. Advances in research on chemical constituents and pharmacological activities of saponins of *Panax japonicas* [J]. *Chinese Traditional and Herbal Drugs*, 2010, 41(6): 1023-1027
- [8] 邹海艳, 赵晖, 邱葵, 等. 竹节参皂苷类化学成分的研究[J]. *世界中医药*, 2012, 7(6): 565-566  
ZOU Hai-yan, ZHAO Hui, QIU Kui, et al. Study on saponins of *Panax japonicus* rhizome [J]. *World Chinese Medicine*, 2012, 7(6): 565-566
- [9] Wei N, Zhang C, He H, et al. Protective effect of saponins extract from *Panax japonicus* on myocardial infarction: Involvement of NF- $\kappa$ B, Sirt1 and mitogen-activated protein kinase signalling pathways and inhibition of inflammation [J]. *Pharm Pharmacol*, 2014, 66(11): 1641
- [10] 宋亚男, 袁丁, 张长城, 等. 竹节参总皂苷通过调节 AMPK/Sirt1/NF- $\kappa$ B 通路抑制衰老大鼠心肌细胞凋亡的作用研究[J]. *中国中药杂志*, 2017, 23: 4656-4660  
SONG Ya-nan, YUAN Ding, ZHANG Chang-cheng, et al. Effect of saponins extracted from *Panax japonicus* on inhibiting cardiomyocyte apoptosis by AMPK/Sirt1/NF- $\kappa$ B signaling pathway in aging rats [J]. *China Journal of Chinese Material Medica*, 2017(23): 4656-4660
- [11] 魏娜, 袁丁, 徐媛青, 等. 竹节参总皂苷对大鼠心肌梗死的保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2013, 3: 75-78  
WEI Na, YUAN Ding, XU Yuan-qing, et al. Protective effect of total saponins of *Panax japonicus* on myocardial infarction in rats [J]. *Pharmacology and Clinics of Chinese Materia Medica*, 2013, 3: 75-78
- [12] 何春喜, 余泽义, 何毓敏, 等. 竹节参总皂苷的大孔吸附树脂纯化与离子交换树脂脱色工艺研究[J]. *中草药*, 2017, 48(6): 1146-1152

- HE Chun-xi, YU Ze-yi, HE Yu-min, et al. Purification of macroporous adsorption resin and decolorization of ion exchange resin of total saponins of *Panax japonicas* [J]. Chinese Traditional and Herbal Drugs, 2017, 48(6): 1146-1152
- [13] Rupinder S K, Gurpreet A K, Manjeet S. Cell suicide and caspases [J]. Vascul Pharmacol, 2007, 46(6): 383-393
- [14] 刘伟,李庆军,卢绮萍. Caspase 与细胞凋亡[J]. 新乡医学院学报, 2005, 22(1): 67-70
- LIU Wei, LI Qing-jun, LU Qi-ping. Caspase family and apoptosis [J]. Journal of Xinxiang Medical College, 2005, 22(1): 67-70
- [15] Cuervo A M. Autophagy and aging: Eeping that old broom working [J]. Trends in Genetics, 2008, 24(12): 604-612
- [16] Shirakabe A, Ikeda Y, Sciarretta S, et al. Aging and autophagy in the heart [J]. Circulation Research, 2016, 118(10): 1563-1576
- [17] Li X, Zeng Z, Li Q, et al. Inhibition of microRNA-497 ameliorates anoxia/reoxygenation injury in cardiomyocytes by suppressing cell apoptosis and enhancing autophagy [J]. Oncotarget, 2015, 6(22): 18829-18844
- [18] Taneike M, Yamaguchi O, Nakai A, et al. Inhibition of autophagy in the heart induces age-related cardiomyopathy [J]. Autophagy, 2010, 6(5): 600-606
- [19] Neff F, Floresdominguez D, Ryan D P, et al. Rapamycin extends murine lifespan but has limited effects on aging [J]. Journal of Clinical Investigation, 2013, 123(8): 3272-3291