

芪参益气方对 H_2O_2 损伤的心肌细胞线粒体结构和功能的保护作用及机制探讨

于佳慧^{1,2}, 刘昕彦^{1,2}, 黄 凯^{1,2}, 樊官伟^{1,3}, 朱 彦^{1,2*}

1. 天津中医药大学, 天津市现代中药重点实验室, 天津 300193

2. 天津国际生物医药联合研究院 中药新药研发中心, 天津 300457

3. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

摘要: 目的 制备 H_2O_2 诱导的心肌 H9c2 细胞损伤模型, 通过线粒体结构、功能改变的多指标综合评价方法探讨芪参益气方对 H9c2 细胞的保护作用及作用机制。方法 体外培养 H9c2 细胞, 分为对照组、模型组 (H_2O_2)、模型阳性对照羰基-氰-对-三氟甲氧基苯胺组 ($5 \mu\text{mol/L}$)、芪参益气方组 (0.2 mg/mL), 每组 3 个复孔, 加入相应药物孵育 24 h, H_2O_2 诱导 2 h 制备心肌细胞损伤模型。采用 Operetta 高内涵成像系统评价 H9c2 细胞线粒体功能及形态纹理的改变; 海马生物能量测定仪检测线粒体能量代谢的变化; 流式细胞仪检测细胞的凋亡情况。结果 芪参益气方能够明显降低 H_2O_2 损伤的 H9c2 细胞线粒体质量, 增加线粒体膜电位和纹理的量化数值, 同时增加线粒体基础耗氧率、ATP 相关耗氧率、最大耗氧率以及储备能力, 明显降低细胞早期及晚期凋亡率, 增加活细胞率。结论 基于细胞的线粒体结构和功能评价, 证实芪参益气方通过改善线粒体功能及能量代谢减轻细胞凋亡保护 H9c2 细胞。

关键词: 芪参益气方; 线粒体功能; 细胞凋亡; H_2O_2 损伤; 线粒体膜电位

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2018)14-3343-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.14.021

Protective effect and mechanism of Qishen Yiqi Formula on mitochondrial structure and function of cardiomyocytes injured by H_2O_2

YU Jia-hui^{1,2}, LIU Xin-yan^{1,2}, HUANG Kai^{1,2}, FAN Guan-wei^{1,3}, ZHU Yan^{1,2}

1. Tianjin State Key Laboratory of Modern Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin International Joint Academy of Biomedicine, Tianjin 300457, China

3. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

Abstract: Objective To establish a cell-based multi-parameter mitochondrial structure and functional evaluation system for hydrogen peroxide (H_2O_2) injury in cardiomyocytes and investigate the protective effect of Qishen Yiqi Formula on H9c2 cells and its mechanism. **Methods** For the *in vitro* myocardial cell injury model, H9c2 cells were divided into control, model (H_2O_2), positive control (carbonyl cyanide-cyanomethoxy basic hydrazine, $5 \mu\text{mol/L}$), and Qishen Yiqi Formula (0.2 mg/mL) groups, with three duplicates in each group, and were cultured in triplicate for 24 h with corresponding drugs, followed by 2 h H_2O_2 induction. H_2O_2 injury model was established with H9c2 cell line. Mitochondrial function and morphological texture were evaluated by Operetta high content imaging system. Mitochondrial respiration and bioenergetic metabolism states were measured by Seahorse Bioscience XF extracellular flux analyzer. Cardiomyocyte apoptosis were quantified by flow cytometry. **Results** Qishen Yiqi Formula prevented the decrease of mitochondrial membrane potential and the increase of mitochondrial mass and improved mitochondrial morphological integrity. Functionally, Qishen Yiqi Formula increased basic oxygen consumption rate, ATP-linked oxygen consumption rate, maximum oxygen consumption, and the reserve capacity. It also reduced the apoptotic rate at early and end stage and increased the myocyte survival. **Conclusion** Based on the structure and functional evaluation of the mitochondria, results indicated that the compound Qishen Yiqi Formula protected the H9c2 cells by improving the mitochondrial function and energy

收稿日期: 2018-02-02

基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (81274128); 天津市高等学校创新团队 (TD12-5031)

作者简介: 于佳慧 (1989—), 女, 博士研究生, 研究方向为中药药理学。Tel: 13312095715 E-mail: yujiahui1989@126.com

*通信作者 朱 彦, 博士生导师, 主要从事中药药理学研究。E-mail: yanzhu.harvard@icloud.com

metabolism as well as reducing the apoptosis.

Key words: Qishen Yiqi Formula; mitochondrial function; apoptosis; H₂O₂ injury; mitochondrial membrane potential

芪参益气方(QSYQ)由黄芪、丹参、三七、降香 4 味中药组成,具有益气固表、活血化癥的功效,能改善心肌功能,减弱心肌肥厚和心肌纤维化,对心肌缺血、心肌缺血再灌注损伤有良好的预防及治疗效果^[1-3]。QSYQ 滴丸已被广泛用于治疗冠心病、心绞痛和心脏功能障碍^[4],但其有效成分相对复杂,分子水平的机制研究仍不够深入。

心肌细胞是心脏机动功能的提供者,也是心脏氧化应激损伤的主要承受者。由于心肌细胞自身的快速有氧代谢,致使其一旦遭受外界伤害,如心肌缺血再灌注、心梗、冠心病等急性心血管疾病,都会导致严重的氧化应激损伤。线粒体作为细胞能量代谢和信息传递的中心,参与调节细胞的基本生命活动,在应激条件下,介导细胞的分化、凋亡等过程。尽管线粒体在过氧化氢(H₂O₂)诱导的心肌细胞损伤中的作用已有广泛报道,但中药对其保护机制涉及较少。本实验采用 H₂O₂ 诱导制备心肌 H9c2 细胞氧化应激损伤模型,从改善线粒体功能及减少细胞凋亡 2 个方面探究 QSYQ 对 H9c2 细胞氧化损伤的保护作用及相关机制。

1 材料

1.1 药物与试剂

QSYQ 浸膏,批号 D20140412-0512,天士力制药集团股份有限公司提供,经检测浸膏中的丹参素和黄芪甲苷含量符合质量标准的相关规定;H9c2 细胞,中国科学院典型培养物保藏委员会上海细胞库;DMEM 高糖培养基、胰蛋白酶及胎牛血清,美国 Gibco 公司;青、链霉素,美国 HyClone 公司;过氧化氢(H₂O₂)、线粒体解偶剂羰基-氰-对-三氟甲氧基苯胺(FCCP)、Rhodamine 123 探针,美国 Sigma 公司;荧光探针 Hoechst 33342、Mitotracker Deep Red FM,美国 Invitrogen 公司;XF 细胞线粒体耗氧量检测试剂盒,美国 Seahorse bioscience 公司;Annexin V-FITC 细胞凋亡试剂盒,美国 BD 公司。

1.2 仪器

STIK 气套式 CO₂ 恒温培养箱,施都凯仪器设备有限公司;Operetta 高内涵筛选系统, Columbus 数据处理平台,美国 PerkinElmer 仪器有限公司;XF24 海马生物能量测定仪、XF 细胞培养板和探针敏感器,美国 Seahorse Bioscience 公司;Attune[®] NxT

声波聚焦流式细胞仪,美国 Thermo Fisher 公司。

2 方法

2.1 细胞培养

H9c2 细胞用含 10%胎牛血清、青霉素 100 kU/L、链霉素 100 mg/L, pH 7.2 的 DMEM 高糖培养基培养。细胞置于 37 ℃、5% CO₂ 恒温培养箱中,待 80%~90%融合时,弃去旧培养基, PBS 润洗,胰蛋白酶消化。在显微镜下观察细胞开始变圆时加入 DMEM 完全培养基终止消化,1 000 r/min 离心 5 min。弃去上清液,加入完全培养基重悬备用。

2.2 分组及模型制备

根据前期研究结果^[5]确定的给药时间和剂量将细胞分为对照组、模型组(H₂O₂)、模型阳性对照组(FCCP 5 μmol/L)、QSYQ 组(0.2 mg/mL),每组 3 个复孔。待心肌细胞贴壁培养 24 h 后,弃去完全培养基,加入 DMEM 高糖培养基及相应的药物,CO₂ 培养箱孵育 24 h。除对照组和 FCCP 组外,其余各组细胞加入 400 μmol/L H₂O₂ 溶液,置培养箱中孵育 2 h,制备细胞损伤模型。

2.3 高内涵成像系统评价 H9c2 细胞线粒体功能

收集对数生长期 H9c2 细胞,以每孔 5 000 个细胞加入 96 孔黑色透明底的培养板中,每孔 100 μL,给药及造模方法同“2.2”项下,造模 2 h,换成含 0.1 μg/mL Hoechst 33342、0.1 μmol/L MitoTracker Deep Red FM 和 3 μmol/L 的 Rhodamine 123 的 DMEM 高糖培养基,避光孵育 30 min,DMEM 高糖培养基洗板 3 次后,设定相应的成像条件,进行全自动活细胞成像。上述荧光探针分别对细胞核和线粒体进行成像,分别表示细胞核个数、线粒体质量和线粒体膜电位(ΔΨ_m) 3 个指标。

2.4 SER Texture 分析 H9c2 细胞线粒体纹理

细胞处理同“2.3”项下方法。SER Texture 细胞纹理分析不同于荧光强度,是 Operetta 高内涵成像系统根据 MitoTracker Deep Red 标记的线粒体中的 spot 进行亚细胞结构的细胞纹理量化分析。将细胞纹理分为 Edge、Ridge、bright 等多种形态模型,综合纹理的尺寸、角度、相互关系、量化图像获得 SER spot、SER edge、SER ridge 以及 SER bright 等数据结果。

2.5 生物能量测定仪检测 H9c2 细胞线粒体能量代谢

将 H9c2 细胞以 1.5×10⁵ 个/mL,每孔 100 μL

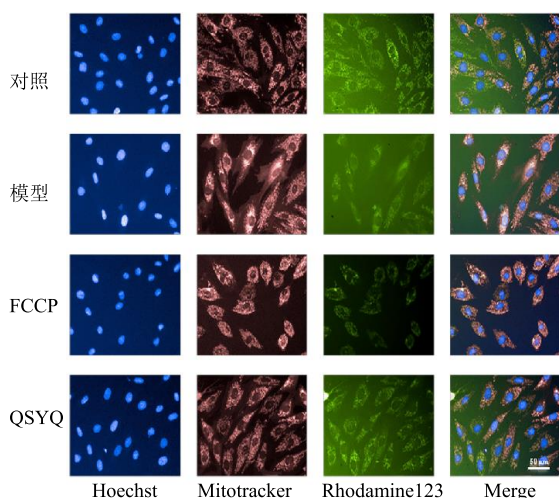
接种于 XF24 细胞培养板中, 移至 CO₂ 培养箱过夜培养。取 XF24 探针板, 向探针底托板中每孔加入 1 mL 探针水化液, 37 °C 无 CO₂ 的条件下使探针水化 24 h。给药及造模同“2.2”项下, 造模结束后用 XF 检测液清洗细胞 2 遍, 最终保留 XF 检测液 500 μL。将培养板置于 37 °C、无 CO₂ 环境下孵育 1 h。检测前, 将线粒体应激检测试剂盒中的寡霉素 (oligomycin)、FCCP、鱼藤酮/抗霉素 (R/A) 配制相应的母液。最终将 oligomycin 溶液 56 μL (终浓度为 1 μmol/L)、FCCP 溶液 62 μL (终浓度为 2 μmol/L) 和 R/A 溶液 69 μL (终浓度为 0.5 μmol/L) 加载到探针板的加药槽内。将探针板放入机器中, 平衡约 20 min。平衡结束后, 将底板换为种有细胞的培养板, 根据前期设置好的程序分不同时段加入对应的抑制剂进行上机检测。

检测 H9c2 细胞线粒体基础耗氧率 (basal OCR) 后, 通过加入上述不同的呼吸链复合物的抑制剂, 分别得出 oligomycin OCR、最大耗氧率 (maximal OCR)、非线粒体呼吸耗氧率 (no-mitochondrial OCR), 并通过计算得出 ATP 相关耗氧率 (ATP-linked OCR)、质子漏 (proton leak) 及储备能力 (reserve capacity)。储备能力的大小与细胞应激状态下自身的调节适应能力相关, 细胞储备能力越大, 则其对抗应激状态、维持细胞正常功能的能力越强。

ATP-linked OCR = basal OCR - oligomycin OCR

proton leak = oligomycin OCR - no-mitochondrial OCR

reserve capacity = maximal OCR - basal OCR



与对照组比较: ## $P < 0.01$; 与模型组比较: ** $P < 0.01$, 下同
$P < 0.01$ vs control group; ** $P < 0.01$ vs model group, same as below

图 1 QSYQ 对 H9c2 细胞线粒体功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 1 Effects of QSYQ on mitochondrial function in H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

2.6 流式细胞仪检测 H9c2 细胞凋亡

将 H9c2 细胞以 1×10^5 个/mL 接种于 25 cm² 培养瓶中, 给药及造模情况同“2.2”项下。造模结束后, 回收培养液, 用 PBS 缓冲液清洗后加入胰酶消化, DMEM 完全培养基终止消化并轻柔吹打促进细胞消化脱壁。将所得消化液与回收的培养液合并于离心管中, 1 000 r/min 离心 10 min 收集细胞沉淀。每管加入 Binding Buffer 500 μL 重悬细胞, 轻轻吹匀。最后加入 Annexin V-FITC 和 PI 溶液各 5 μL, 混匀, 室温避光染色 15 min。用流式细胞仪检测 H9c2 细胞凋亡。

2.7 统计学方法

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 17.0 数据统计软件, 对数据进行正态性检验, 采用单因素方差分析, 多组间比较的分析方法为 LSD。

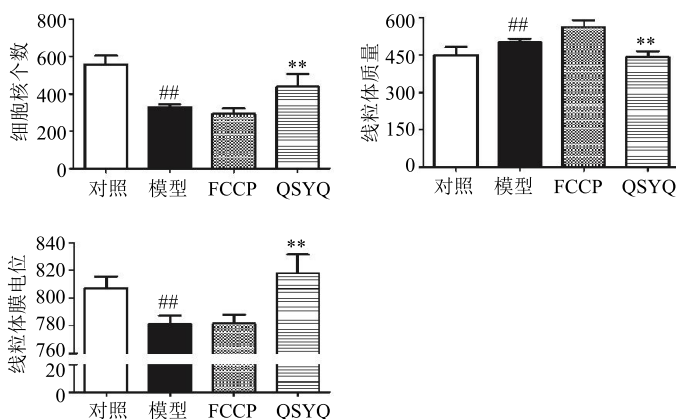
3 结果

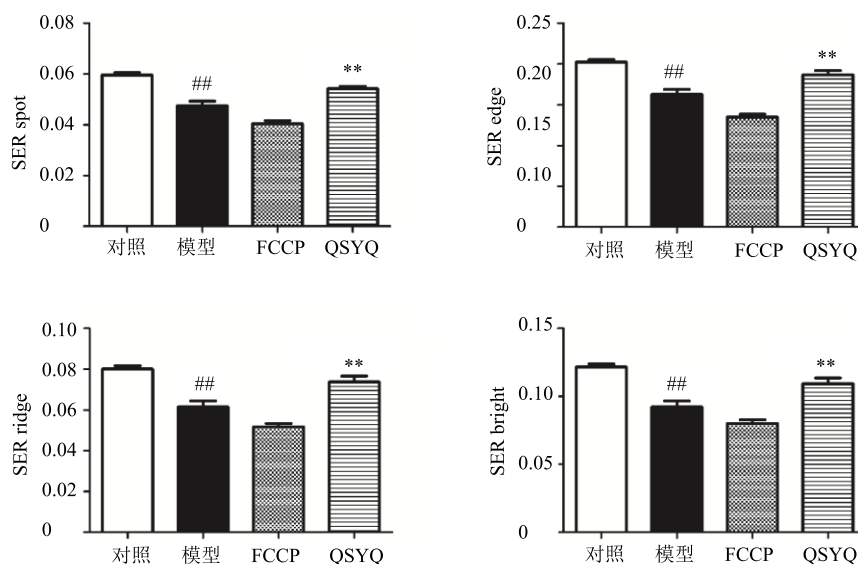
3.1 QSYQ 对 H9c2 细胞线粒体功能的影响

由图 1 可知, 与对照组比较, 模型组 H9c2 细胞经 H₂O₂ 损伤后, 细胞核个数和线粒体膜电位显著降低, 线粒体呼吸增强使其质量明显增加 ($P < 0.01$), 且与 FCCP 组作用趋势一致。与模型组比较, 0.2 mg/mL QSYQ 预处理后, 可明显增加 H9c2 细胞的细胞核个数和线粒体膜电位, 减弱线粒体呼吸, 降低线粒体质量 ($P < 0.01$)。提示 QSYQ 能够通过改善线粒体功能减轻 H₂O₂ 诱导的心肌细胞氧化损伤。

3.2 QSYQ 对 H9c2 细胞线粒体纹理的影响

由图 2 可知, 与对照组比较, 模型组 H9c2 细胞 SER spot、SER edge、SER ridge 及 SER bright

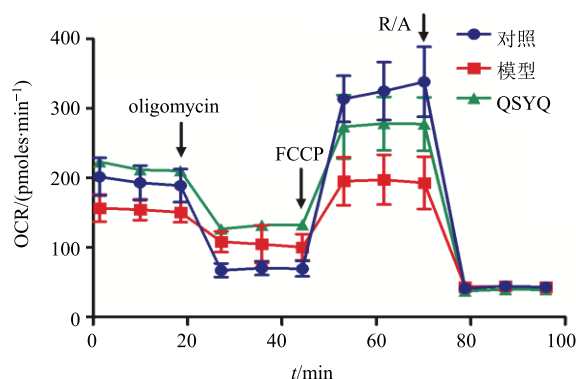
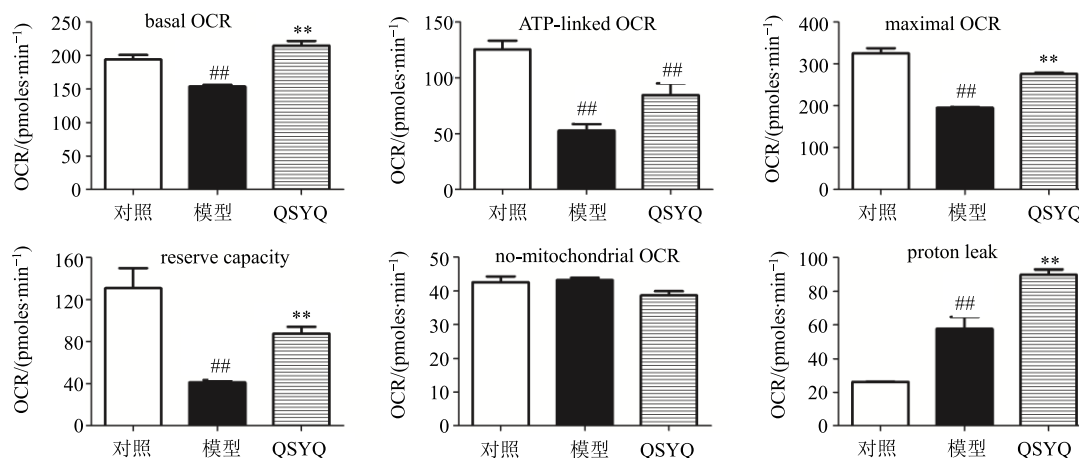


图 2 QSYQ 对 H9c2 细胞线粒体纹理的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 2 Effects of QSYQ on mitochondrial SER texture in H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

指标均显著降低 ($P < 0.01$), 且与 FCCP 组趋势一致。与模型组比较, 0.2 mg/mL QSYQ 预处理后, 可显著增加线粒体纹理各量化数值 ($P < 0.01$)。通过高内涵成像系统对线粒体亚细胞结构的纹理分析可以看出 QSYQ 对 H_2O_2 诱导的心肌细胞线粒体形态损伤有一定的保护作用。

3.3 QSYQ 对 H9c2 细胞线粒体能量代谢的影响

图 3 为各组细胞线粒体 OCR 随时间的变化。分别计算出线粒体能量代谢相关指标并进行比较 (图 4), 结果发现, 与模型组比较, 0.2 mg/mL QSYQ 预处理后, H9c2 细胞线粒体 basal OCR、ATP-linked OCR、maximal OCR、reserve capacity 及 proton leak

图 3 QSYQ 对 H9c2 细胞线粒体 OCR 的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 3 Effects of QSYQ on mitochondrial OCR in H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)图 4 QSYQ 对 H9c2 细胞线粒体能量代谢的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 4 Effects of QSYQ on mitochondrial energy metabolism in H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

均显著增加 ($P < 0.01$)。提示 QSYQ 能够改善 H9c2 细胞氧化损伤后线粒体能量代谢状态, 抑制线粒体储备能力的下降, 对心肌细胞线粒体有一定的保护作用。

3.4 QSYQ 对 H9c2 细胞凋亡的影响

由图 5 可知, 与对照组比较, H_2O_2 显著增加了 H9c2 细胞的凋亡及坏死 ($P < 0.01$)。与模型组比较,

0.2 mg/mL QSYQ 预处理后则显著降低 H_2O_2 引起的细胞早期及晚期凋亡率, 增加细胞存活率 ($P < 0.01$)。提示 QSYQ 通过抑制细胞凋亡减轻 H_2O_2 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤。

4 讨论

心血管疾病是当今社会危害人类健康和生命的主要疾病, 有着发病率高、致残率高、并发症多等

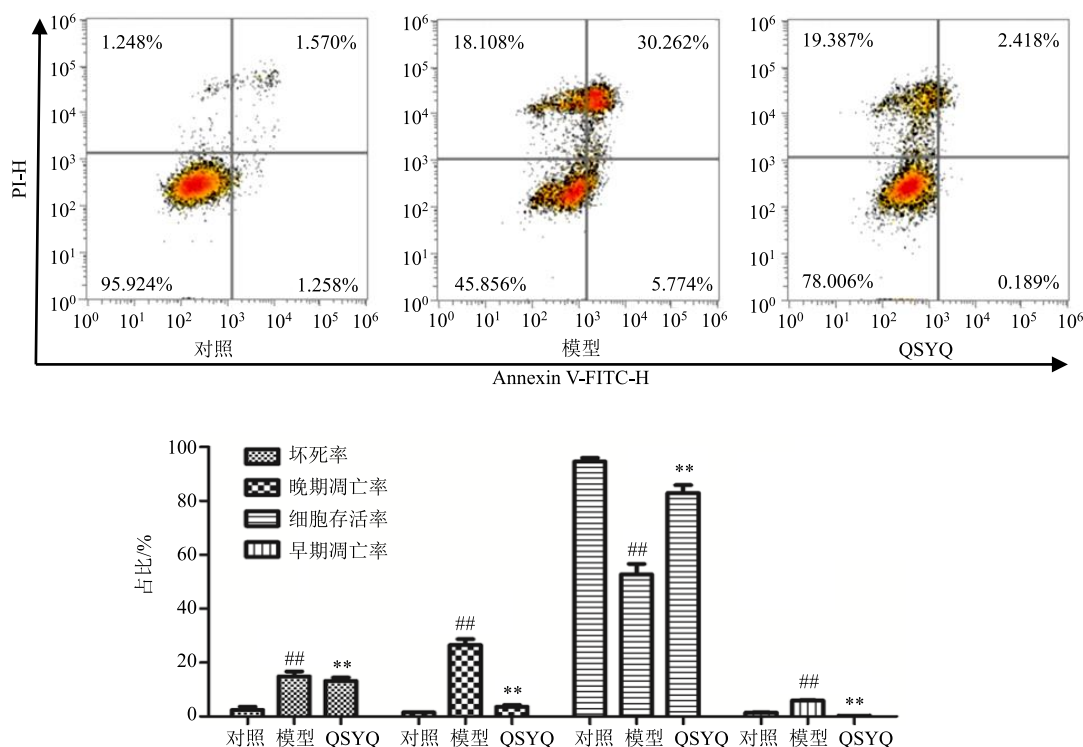


图 5 QSYQ 对心肌细胞凋亡的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 5 Effects of QSYQ on apoptosis in H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

特点。氧化应激是指机体组织或细胞内氧自由基增多和(或)清除能力降低导致活性氧(ROS)在体内或细胞内蓄积而引起的氧化损伤过程, 在许多心血管疾病的发病机制中起着关键作用, 如缺血性心脏病、心力衰竭和动脉粥样硬化等^[6]。本实验采用 H_2O_2 诱导 H9c2 细胞氧化应激损伤模型, 其特点是细胞活力降低和细胞核数量减少。而 QSYQ 预处理后可显著增加受损 H9c2 细胞的细胞核数量, 对心肌细胞具有保护作用。

线粒体在心肌细胞的能量代谢和生物发生过程中起着关键的作用。越来越多的研究表明, 线粒体功能障碍与心血管疾病密切相关^[7], 其主要表现为线粒体三磷酸腺苷(ATP)合成减少、ROS 生成增加、 Ca^{2+} 超载以及线粒体膜通透性转换孔(mPTP)开放导致细胞凋亡等^[8-9]。因此, 线粒体功能正常在生命活动中至关重要。有文献报道^[10-11] H_2O_2 诱导的

氧化应激损伤会表现出线粒体功能障碍, 主要体现在线粒体膜电位和细胞内 ATP 的损失产生不可逆转的心肌损伤。本研究结果提示 QSYQ 能够显著降低 H9c2 细胞线粒体质量, 增加线粒体膜电位和线粒体纹理的量化数值, 改善线粒体损伤程度, 对心肌细胞线粒体形态和功能具有保护作用, 这与前期报道的研究结果一致^[12-13]。

Operetta 高内涵筛选技术 (high-content screening, HCS) 是一种在保持细胞结构和功能完整的前提下, 在一次实验内对某被筛样品影响细胞的多种属性及生理状态的改变进行同步检测的高通量筛选手段^[14], 其主要特点就是多指标、多靶点的共同作用^[15]。SER Texture 线粒体纹理分析是根据线粒体染料标记的 spot 进行亚细胞结构的细胞纹理量化分析。既能直观观察到线粒体形态和功能的改变, 又便于对其亚细胞结构的纹理变化进行

定量分析。

线粒体是细胞能量代谢的中心,通过呼吸链上电子的传递偶联磷酸化产生 ATP,满足细胞生命活动所需的能量。线粒体呼吸链的状态或能量代谢水平是线粒体功能最直接的体现^[16]。生物能量代谢检测系统可以无损伤检测细胞线粒体的能量代谢,实时动态监测培养环境中氧分子浓度,从而反映线粒体耗氧情况,以了解线粒体能量代谢的变化。寡霉素可抑制线粒体 ATP 的合成,从而得出线粒体合成 ATP 相关的耗氧率。FCCP 为解偶联剂,加入 FCCP 后线粒体不生成 ATP 但电子传递持续进行,电子传递链处于最大激活状态,使 OCR 达到最大,即线粒体最大 OCR。抗霉素和鱼藤酮同时加入可完全抑制线粒体氧化磷酸过程。储备能力的大小与细胞应激状态下自身的调节适应能力相关,储备能力的损伤或丧失将最终导致细胞死亡。本研究运用生物能量检测仪检测结果显示,QSYQ 通过增加细胞基础耗氧率及最大耗氧率,增加线粒体储备能力,从而增强 H9c2 细胞抗应激能力,改善 H9c2 细胞氧化损伤后线粒体能量代谢的状态。

细胞凋亡是细胞程序性死亡的一种形式,以细胞收缩、DNA 程序化降解、细胞色素 C 释放增多、Caspases 激活为特点^[17]。众所周知,氧化应激损伤会导致心肌细胞发生凋亡^[18],细胞凋亡是导致多种心血管疾病发生、发展的重要因素^[19-20]。线粒体不仅是高耗能心肌细胞 ATP 的主要来源,更具有参与调控细胞内钙稳态、氧自由基产生、细胞凋亡和自噬及细胞信号转导等重要的生物学功能,在应激条件下,介导细胞发生凋亡。本研究发现 QSYQ 能够降低 H₂O₂ 引起的 H9c2 细胞早期及晚期凋亡率,增加活细胞率,提示 QSYQ 通过抑制细胞凋亡减轻 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤。

综上所述,本研究首次整合了基于高内涵成像的线粒体功能及形态纹理分析、基于生物能量测定的线粒体能量代谢检测和基于流式细胞仪的细胞凋亡检测技术,综合评价 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞损伤及 QSYD 对其的保护作用。发现 QSYQ 通过改善 H9c2 细胞线粒体形态及功能、调节线粒体能量代谢、抑制心肌细胞凋亡,从而减轻 H₂O₂ 诱导的 H9c2 细胞氧化损伤。但其中发挥线粒体保护作用、抑制细胞凋亡的有效成分及物质基础仍需进一步研究。

参考文献

- [1] Chen J X, Xu X, Li Z F, *et al.* Qishen Yiqi Drop Pill improves cardiac function after myocardial ischemia [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep24383.
- [2] Wang J, Lu L, Wang Y, *et al.* Qishenyiqi Dropping Pill attenuates myocardial fibrosis in rats by inhibiting RAAS-mediated arachidonic acid inflammation [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, doi: 10.1016/j.jep.2015.11.023.
- [3] Chen Y Y, Li Q, Pan C S, *et al.* QiShenYiQi Pills, a compound in Chinese medicine, protects against pressure overload-induced cardiac hypertrophy through a multi-component and multi-target mode [J]. *Sci Rep*, 2015, doi: 10.1038/srep11802.
- [4] Tang D X, Zhao H P, Pan C S, *et al.* QiShenYiQi Pills, a compound Chinese medicine, ameliorates doxorubicin-induced myocardial structure damage and cardiac dysfunction in rats [J]. *Evid-Based Compl Alt*, 2013, doi: 10.1155/2013/480597.
- [5] Yu J, Zhang W, Zhang Y, *et al.* A critical courier role of volatile oils from *Dalbergia odorifera* for cardiac protection *in vivo* by QiShenYiQi [J]. *Sci Rep*, 2017, doi: 10.1038/s41598-017-07659-x.
- [6] Robin E, Guzy R D, Loor G, *et al.* Oxidant stress during simulated ischemia primes cardiomyocytes for cell death during reperfusion [J]. *J Biol Chem*, 2007, 282(26): 19133-19143.
- [7] Dai D F, Rabinovitch P S, Ungvari Z. Mitochondria and cardiovascular aging [J]. *Circul Res*, 2012, 110(8): 1109-1124.
- [8] Marzetti E, Csiszar A, Dutta D, *et al.* Role of mitochondrial dysfunction and altered autophagy in cardiovascular aging and disease: From mechanisms to therapeutics [J]. *Am J Physiol-Heart C*, 2013, 305(4): 459-476.
- [9] Ren J, Pulakat L, Whaley-Connell A, *et al.* Mitochondrial biogenesis in the metabolic syndrome and cardiovascular disease [J]. *J Mol Med*, 2010, 88(10): 993-1001.
- [10] Akao M, O'Rourke B, Teshima Y, *et al.* Mechanistically distinct steps in the mitochondrial death pathway triggered by oxidative stress in cardiac myocytes [J]. *Circul Res*, 2003, 92(2): 186-194.
- [11] Mao C Y, Lu H B, Kong N, *et al.* Levocarnitine protects H9c2 rat cardiomyocytes from H₂O₂-induced mitochondrial dysfunction and apoptosis [J]. *Inter J Med Sci*, 2014, 11(11): 1107-1115.
- [12] Chen J R, Wei J, Wang L Y, *et al.* Cardioprotection against ischemia/reperfusion injury by QiShenYiQi Pill (R) via ameliorate of multiple mitochondrial dysfunctions [J]. *Drug Des Dev Ther*, 2015, 9: 3051-3066.

- [13] Lin S Q, Wei X H, Huang P, *et al.* QiShenYiQi Pills(R) prevent cardiac ischemia-reperfusion injury via energy modulation [J]. *Inter J Cardiol*, 2013, 168(2): 967-974.
- [14] Zock J M. Applications of high content screening in life science research [J]. *Comb Chem High T Scr*, 2009, 12(9): 870-876.
- [15] 韩 闯, 杨盛昌. 高通量筛选技术及其应用 [J]. 生物技术通报, 2005(2): 22-25.
- [16] Brand M D, Goncalves R L, Orr A L, *et al.* Suppressors of Superoxide-H₂O₂ production at site IQ of mitochondrial complex I protect against stem cell hyperplasia and ischemia-reperfusion injury [J]. *Cell Metab*, 2016, 24(4): 582-592.
- [17] Movassagh M, Foo R S. Simplified apoptotic cascades [J]. *Heart Fail Rev*, 2008, 13(2): 111-119.
- [18] Marinho H S, Real C, Cyrne L, *et al.* Hydrogen peroxide sensing, signaling and regulation of transcription factors [J]. *Redox Bio*, 2014, doi: 10.1016/j.redox.2014.02.006.
- [19] Chakraborti T, Ghosh S K, Michael J R, *et al.* Targets of oxidative stress in cardiovascular system [J]. *Mol Cell Biochem*, 1998, 187(1/2): 1-10.
- [20] Buja L M, Entman M L. Modes of myocardial cell injury and cell death in ischemic heart disease [J]. *Circulation*, 1998, 98(14): 1355-1357.