

本文引用: 胡旭东, 彭木子, 陈 铭, 廖 菁, 陈 聪. 加味丹参饮预防心肌缺血再灌注损伤作用机制的网络药理学分析与实验验证研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(3): 473-482.

加味丹参饮预防心肌缺血再灌注损伤作用机制的网络药理学分析与实验验证研究

胡旭东¹, 彭木子², 陈 铭¹, 廖 菁¹, 陈 聪^{1*}

1. 湖南中医药大学中医学院, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学科技创新中心, 湖南 长沙 410208

【摘要】目的 基于网络药理学预测加味丹参饮预防心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI)的活性成分、作用靶点及信号通路, 并进行实验验证研究。**方法** 通过 TC MSP、UniProt 等数据库搜集加味丹参饮相关成分及靶点; 通过 GeneCards、OMIM 以及 DRUGBANK 数据库获取 MIRI 疾病相关靶点; 利用 STRING 平台分析构建蛋白互作网络模型; 通过 Metascape 平台分析“药物-成分-靶点”及其参与的生物学过程及信号通路, 而后采用 Cytoscape 3.7.1 软件构建“加味丹参饮成分-MIRI 靶点-通路”网络。加味丹参饮预防性给药灌胃 1 周后, 采用结扎大鼠左前降支的方法, 建立实验性 MIRI 大鼠模型。通过 ELISA 观察 MIRI 大鼠血清丙二醛(malonic dialdehyde, MDA)、肌酸激酶同工酶 MB(creatine kinase-MB, CK-MB)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)水平, HE 染色观测心肌病理改变, qRT-PCR、Western blot 检测大鼠血清心肌组织环氧合酶 2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)、蛋白激酶 B1(akt serine/threonine kinase 1, Akt1)表达水平。**结果** 初步筛选获得加味丹参饮中的活性成分 102 个, 药物疾病交集基因 140 个, 核心靶点 54 个; 其中, Akt1、原癌基因 JUN (Jun proto-oncogene, JUN)、信号转导与转录激活因子 3(signal transducer and activator of transcription 3, STAT3)、PTGS2 等靶点可能与 MIRI 密切相关, 富集分析预测加味丹参饮预防 MIRI 主要涉及调节癌症相关通路等 20 条通路, 并且其中 5 条通路中 Akt1 处于 PTGS2 上游。动物实验结果显示, 加味丹参饮能够显著提高 MIRI 大鼠血清 MDA、CK-MB、LDH 水平($P < 0.05$), 同时降低 SOD 水平($P < 0.05$), 抑制心肌组织中 Akt1、PTGS2 表达水平($P < 0.05$), 减轻心肌组织坏死。**结论** 加味丹参饮可能同时抑制 Akt1、PTGS2 两个靶点, 缓解过度心肌损伤, 发挥预防 MIRI 作用。

【关键词】 心肌缺血再灌注损伤; 加味丹参饮; 网络药理学; MIRI 大鼠模型; 作用机制; 蛋白激酶 B1; 环氧合酶 2

【中图分类号】R285.5 **【文献标志码】**A **【文章编号】**doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.03.016

Network pharmacology analysis and experimental verification of mechanism of Jiawei Danshen Decoction in preventing myocardial ischemia-reperfusion injury

HU Xudong¹, PENG Muzi², CHEN Ming¹, LIAO Jing¹, CHEN Cong^{1*}

1. College of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Institute of Innovation and Applied Research in Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

【Abstract】Objective To predict active constituents, drug targets, and signaling pathways of Jiawei Danshen Decoction (JWSD) in the prevention of myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) based on network pharmacology and to perform

【收稿日期】2022-09-02

【基金项目】国家自然科学基金青年项目(81704065); 宁夏自治区重点研发项目(2020BFH02003); 湖南省教育厅科学研究项目(20C1392、20C1416、19B415); 湖南省卫生健康委科研计划项目(202202084742); 湖南中医药大学科研基金重点项目(2021XJJ003); 黄政德全国名老中医药专家传承工作室资助项目。

【第一作者】胡旭东, 男, 硕士研究生, 研究方向: 藏象理论与心血管。

【通信作者】* 陈 聪, 女, 硕士, 副教授, 硕士研究生导师, E-mail: 50634383@qq.com。

experimental validation. **Methods** The related constituents and targets of JWSD were obtained from the Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform (TCMSP) and UniProt; the MIRI-related targets were obtained from GeneCards, OMIM and DrugBank databases; the protein-protein interaction (PPI) network model was analyzed and constructed by String platform; the “drug-component-target” and the involved biological processes and signaling pathways were analyzed by the Metascape platform, and then the “JWSD component-MIRI target-pathway” network was constructed by Cytoscape 3.7.1 software. The MIRI rat model was established by ligating the left anterior descending artery of rats one week after preventive gavage administration of JWSD. The serum malonic dialdehyde (MDA), creatinekinase-MB (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH) and superoxide dismutase (SOD) level of MIRI rats were observed with ELISA, the pathological change of myocardium of the rats was observed by HE staining, and the serum prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2) of rats myocardium and the expression level of akt serine/threonine kinase 1 (Akt1) were detected by qRT-PCR and Western blot. **Results** The total of 102 active constituents in JWSD, 140 drug-disease intersection genes and 54 core targets were obtained by preliminary screening. Akt1, Jun proto-oncogene (JUN), signal transducer and activator of transcription 3 (STAT3), PTGS2 and other targets may be closely related to MIRI. KEGG enrichment analysis predicted that the prevention of MIRI by JWSD mainly by the regulation of 20 pathways, including cancer-related pathways, and Akt1 is upstream of PTGS2 in 5 pathways. Animal experiment showed: JWSD could significantly increase the serum levels of malondialdehyde (MDA), creatine kinase isoenzyme MB (CK-MB), and lactate dehydrogenase (LDH); meanwhile, it could decrease the level of superoxide dismutase (SOD) ($P<0.05$), inhibit the expression levels of Akt1 and PTGS2 in myocardial tissue and reduce myocardial tissue necrosis in MIRI rats ($P<0.05$). **Conclusion** JWSD may inhibit Akt1 and PTGS2 targets at the same time, thereby alleviating excessive myocardial damage and preventing MIRI.

[**Keywords**] myocardial ischemia-reperfusion injury; Jiawei Danshen Decoction; network pharmacology; MIRI rat model; mechanism of action; akt serine/threonine kinase 1; prostaglandin-endoperoxide synthase 2

在心血管疾病中,急性心肌梗死致死率一直居高不下,目前,虽然可以通过扩张冠脉和溶栓等手段进行有效治疗,但血液重新灌注后进一步加剧心肌损伤,导致梗死面积扩大并引发严重的心律失常,这种梗死后再次灌注引起不可逆严重损伤的现象被称为心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI),是临床上常见且亟须解决的问题^[1-4]。

中药复方调治冠心病的优势日渐突出,加味丹参饮化裁于陈修园所著《时方歌括》中的丹参饮,由丹参、黄芪、檀香、赤芍、川芎、当归、红花和生地黄组成,具有益气健脾、活血化瘀的功效,临床应用疗效显著^[5-7]。研究证实,该方通过多环节、多靶点、多层次调控细胞凋亡、抗炎等途径减轻 MIRI,尤其是在改善症状方面潜力巨大,但其多环节、多靶点作用的确切机制尚未清晰^[5-8]。

网络药理学是医学、生物学、信息学等多学科理论与研究手段整合的结果,能够系统综合地反映药

物对疾病网络的干预机制^[9-10]。这与中医药论治的整体动态性原则及复方多成分、多靶点、多途径互相作用的特点有很强的趋同性。为此,网络药理学成为研究中药复方作用机制崭新而有效的技术支持,进一步帮助揭示中药复方科学内涵,传承、发展和完善中医药理论^[11-12]。

故本研究基于网络药理学技术方法,探究加味丹参饮预防 MIRI 的分子机制,并进行动物实验验证,为后续更进一步研究提供必要的理论与实验基础。

1 方法

1.1 加味丹参饮成分靶点搜集及药物-成分-靶点网络图的构建

使用 TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcm-sp.php>) 检索加味丹参饮复方组成药物的活性成分。根据中药成分药代动力学参数筛选活性成分,以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 和类药性 ≥ 0.18 为限定条件。从 TCMSP 数据库收集该药对的潜在作用靶点,通过

SWISS 数据库 (<http://www.gpmaw.com/html/swissprot.html>) 筛选 $P \geq 0.6$ 的靶点进行补充, 并通过文献检索补充, 全面搜集, 并使用 UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) 将靶点蛋白英文名统一规范为基因名称。

运用 Cytoscape 3.7.1 构建加味丹参饮组成药物-药物成分-靶点网络图, 利用 Cytoscape 3.7.1 内置分析工具计算有效成分及靶点的网络拓扑参数, 获取包括连接度、介度及紧密度等数据, 最终筛选获取重要靶点及发挥药效的主要活性成分。

1.2 MIRI 相关靶点获取

以“myocardial ischemia reperfusion injury”和“coronary heart disease”为关键词, 挖掘 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>)、OMIM 数据库 (<http://www.omim.org>) 中调治 MIRI 的潜在靶点, 进入 DRUGBANK 数据库 (<https://www.drugbank.ca>) 寻找调治 MIRI 的临床一线西药作用靶点予以补充。合并 3 个疾病数据库靶点后, 删除重复值得到 MIRI 相关靶点。

1.3 加味丹参饮成分-MIRI 靶点网络构建及核心靶点筛选

为明确加味丹参饮药物与 MIRI 两者靶点之间的交互作用, 取两者交集并绘制韦恩图。进而将交集靶点输入至 STRING 11.0 数据库 (<https://string-db.org>) 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络模型, 并通过 Cytoscape 3.7.1 对数据进行可视化与数据分析, 筛选核心靶点。

1.4 加味丹参饮成分-MIRI 靶点功能与通路的富集

Metascape 平台 (<http://metascape.org/gp/index.html>) 具有注释功能且能够及时更新基因数据资料。将加味丹参饮调治 MIRI 的靶点输入 Metascape 平台, 设置 $P < 0.01$, 富集分析获取与其相关的主要信号通路与生物学过程, 采用微生信对数据结果进行可视化。

1.5 加味丹参饮成分-MIRI 靶点-通路网络图的构建

运用 Cytoscape 3.7.1 构建加味丹参饮成分-MIRI 靶点-通路网络图, 利用 Cytoscape 3.7.1 内置分析工具计算有效成分及靶点参数, 并根据结果获取核心靶点及发挥药效的主要活性成分。

2 动物实验验证

2.1 实验药物

加味丹参饮: 黄芪 20 g (广州工业制药有限公司, 批号: 2106211); 丹参 20 g、川芎 6 g、红花 6 g、当归 6 g (安徽普仁中药饮片有限公司, 批号: 21072031B、2108221、2111253、2107122); 檀香 6 g (湖南仁上正元中药饮片有限公司, 批号: 2021092702); 赤芍 10 g (长沙新林制药有限公司, 批号: 220101); 生地黄 12 g (江苏龙凤堂中药有限公司, 批号: 21121441C), 饮片由湖南中医药大学第一附属医院提供, 经湖南中医药大学中药鉴定教研室龚力民主任鉴定均为正品。煎煮后去渣, 浓缩至药液浓度为 2 g/mL (含生药), 于 4 °C 冰箱保存备用。

2.2 实验动物

湖南斯莱克景达实验动物有限公司购进 36 只雄性 SD 大鼠, SPF 级, 体质量 (150±20) g, 动物合格证号 430727211102830068, 许可证号 SCXK (湘) 2019-0004。饲养于湖南中医药大学实验动物中心标准化动物房 (相对湿度 50%~70%, 温度 23~25 °C, 昼夜交替), 普通饲料, 自由饮水。本实验由湖南中医药大学伦理委员会批准, 动物实验伦理编号 LLBH202108250004。

2.3 试剂及仪器

PTGS2 抗体、Akt1 抗体、GAPDH 抗体、 β -actin (肌动蛋白) (武汉博士德生物工程有限公司, 批号分别为 A00084、BM1612、BM0627、BM1623); 三氯甲烷、异丙醇、无水乙醇 (上海国药集团化学试剂有限公司, 批号分别为 10006818、80109218、10009218); 大鼠肌酸激酶同工酶 MB、乳酸脱氢酶、丙二醛、超氧化物歧化酶 ELISA 试剂盒 (江苏菲亚生物科技有限公司, 批号分别为 FY3500、FY3480、FY8503、FY3262)。352 型酶标仪、AC8 型洗板机 (Thermo LabSystems); TGL-16 型台式高速冷冻离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); TC-XP 型基因扩增仪 (杭州博日科技有限公司); DYY-7C 型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); VE-180 型电泳槽 (上海天能科技有限公司); SH01D 型高速离心机 (上海知信实验仪器有限公司); SCIENTZ-24 型组织匀浆器、SCIENTZ-1500F 型超声破碎仪 (宁波新芝生物科技有限公司)。

2.4 动物分组、模型制备及给药

将所购 SPF 级雄性 SD 大鼠,于实验室饲养笼内适应性饲养 1 周,按照随机数字表法分为空白组、假手术组、模型组、加味丹参饮组,每组 9 只大鼠。空白组动物术前连续 7 日给予生理盐水灌胃,每天 1 次;假手术组动物术前同空白组,术中绕冠状动脉左前降支穿线,但不结扎;模型组动物术前同空白组,术中绕冠状动脉左前降支穿线,结扎 30 min 后进行再灌注 90 min;加味丹参饮组动物术前连续 7 日给予加味丹参饮 6.19 g/kg 生药量灌胃,缺血再灌注时间同模型组。参照本课题组前期造模方案^[6]制备 MIRI 实验大鼠模型,手术造模前,禁食 12 h,禁水 4 h,进行称重,3%浓度的戊巴比妥钠按照 0.04 g/kg 体质质量对大鼠进行腹腔注射麻醉,麻醉成功后,固定,气管切开,于切口处接小动物呼吸机,暴露胸腔,在左心耳根部 1~2 mm 处进针,结扎大鼠左冠状动脉前降支。心电图显示 ST 段弓背向上抬高,QRS 波群改变,J 点偏移超过 0.1 mV,缺血区心肌组织颜色变为结扎成功标志。结扎一段时间后松开扎线实现再灌注,ST 段出现回落,可见梗死区心肌充血,表明再灌注成功,再灌注 90 min 后,腹主动脉取血,离心机分离上清用于指标检测;完成腹主动脉取血后,立即取心,冲洗净血液后,每组 6 只切取左半心,放入冻存管中后快速放置于液氮罐内,后转移至-80 °C 冰箱冻存用于 qRT-PCR、Western blot 检测,再将每组剩余 3 只大鼠取全心,用 4%的多聚甲醛液进行固定,用于病理染色观察。

2.5 指标检测

2.5.1 ELISA 检测大鼠血清 MDA、SOD、CK-MB、LDH 水平 采用 ELISA 法检测各组大鼠血清中 MDA、SOD、CK-MB、LDH 表达水平,实验步骤按照试剂盒方法进行。

2.5.2 HE 染色观察大鼠心肌病理变化 沿左心室冠状面中部切取环状心肌组织块,使用 4%多聚甲醛固定,乙醇梯度脱水后进行石蜡包埋,进行 HE 染色,光学显微镜下拍照。

2.5.3 qRT-PCR 检测心肌组织 PTGS2、Akt1 基因表达 收集各组心肌组织,取适量冻存大鼠左心室心肌组织,采用 Trizol 法提取心肌组织中总 RNA。将总 RNA 逆转录为 cDNA 后,进行 qRT-PCR 扩增,反应结束后,观察扩增曲线、溶解曲线及 CT 值,

以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 数据分析法对各基因表达进行相对定量计算,再将结果用于统计分析。引物序列为 PTGS2 正向 5'-CTGATGACTGCCCACTCCC-3',反向 5'-CTGGCAAAGAATGCGAACA-3',长度 143 bp;Akt1 正向 5'-CGACGTAGCCATTGTGAAGGAG-3',反向 5'-ATTGTGCCACTGAGAAGTTGTTG-3',长度 173 bp;GAPDH 正向 5'-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3',反向 5'-GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT-3',长度 138 bp。PCR 扩增条件为:95 °C 预变性 5 min,95 °C 5 s,56 °C 10 s,72 °C 25 s 循环 40 次。

2.5.4 Western blot 检测心肌组织 PTGS2、Akt1 蛋白表达 大鼠心肌组织约 100 mg,剪碎后置入盛有 2.0 mL RIPA 蛋白裂解液(含磷酸酶抑制剂)的匀浆器中充分匀浆;于冰上静置 60 min,使其充分裂解。将裂解后的组织匀浆转移至 1.5 mL 的离心管中,以 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min(离心半径 6 cm);取上清,采用 BCA 法测定各样本蛋白浓度,并调整至一致;加入等体积蛋白上样缓冲液,煮沸 5 min 使其变性。取 10 μ L 蛋白样品上样,依次进行 SDS 凝胶电泳、转膜、抗原封闭、加入一抗 PTGS2(1:500)、Akt1(1:500)、GAPDH(1:1000)孵育过夜、加入羊抗兔二抗(1:2000)室温孵育 2 h 等步骤。最后,采用 ECL 显色液显色,于凝胶成像仪下显影、拍照;以 GAPDH 蛋白条带灰度值为内参,采用 Quantity One 软件分析目的蛋白的相对表达水平。

2.6 统计学分析

所有数据以 SPSS 13.0 进行统计,Graphpad Prism 7 软件进行分析。结果以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,组间比较以 *one-way ANOVA* 单因素方差分析及 *q* 检验,以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 加味丹参饮成分靶点筛选及药物-成分-靶点网络图的构建

使用 TCMSP 数据库检索加味丹参饮复方组成药物的活性成分,根据中药成分药代动力学参数筛选活性成分,获得活性成分 102 种。通过 TCMSP 数据库和 SWISS 数据库收集该药对的潜在作用靶点,并使用 UniProt 数据库将靶点蛋白英文名统一规范为基因名称,获得对应靶点 279 个。

运用 Cytoscape 3.7.1 构建加味丹参饮药物-

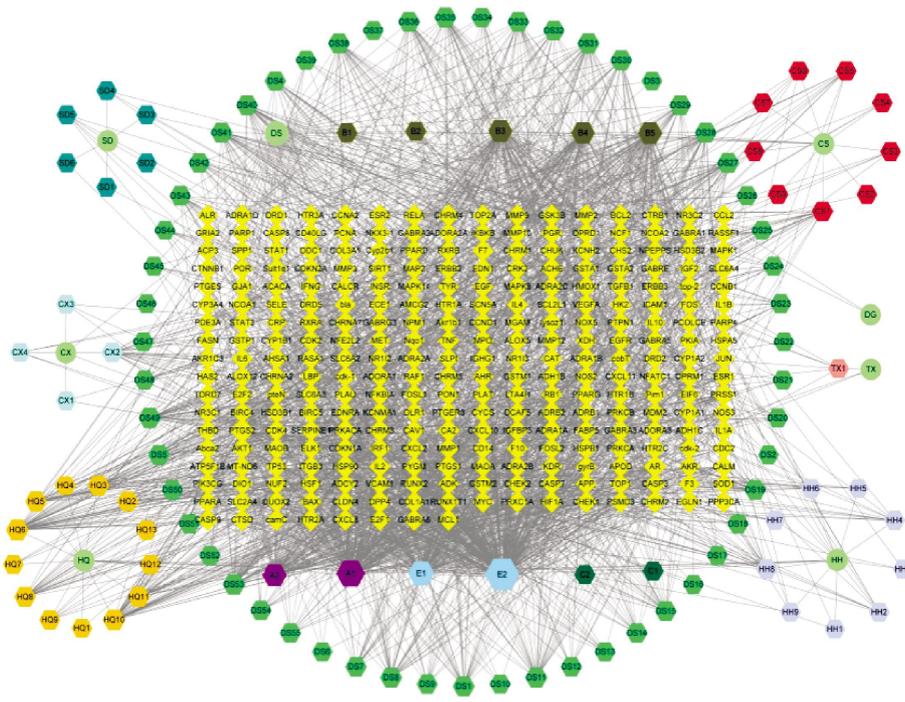


图1 加味丹参饮“药物-成分-靶点”网络

注:不同颜色的圆形节点为不同中药,六边形为活性成分,黄色菱形为靶点;节点的面积代表其度数,面积越大说明该节点越重要。

成分-靶点网络图,见图1。网络分析表明,槲皮素 Degree 为306,介度为 0.429 0,紧密度为 0.509 0,预测槲皮素为复方的主要活性成分,其次为木犀草素(连接度为 174,介度为 0.097 9,紧密度为 0.404 7)、山柰酚(连接度为 124,介度为 0.079 2,紧密度为 0.409 7)、β-谷甾醇(连接度为 79,介度为 0.042 3,紧密度为0.388 0)。PTGS2 在网络中的连接度为89,介度为 0.118 9,紧密度为 0.519 7,预测 PTGS2 为加味丹参饮复方的最主要靶点,PTGS1 与 NOCA2 亦为相对重要的靶点。

3.2 加味丹参饮成分-MIRI 靶点 PPI 网络构建及核心靶点筛选

通过 GeneCards 数据库获得 MIRI 靶点 1454 个,从 OMIM 数据库与 DRUGBANK 数据库分别补充获得靶点 226 个和 97 个,合并后删除重复值,最终得到 1591 个 MIRI 疾病靶点。

将筛选的加味丹参饮靶点与 MIRI 疾病靶点取交集,并绘制韦恩图,得到交集靶点 140 个,见图2。随后将交集靶点输入至 STRING 11.0 平台,得到加味丹参饮-MIRI 靶点 PPI 网络,网络图包括 128 个节点,635 条边。为进一步筛选获取核心靶点,将 STRING 数据库获得的结果文件导入 Cytoscape 3.7.1 中的内置分析工具,对网络进行分析,筛选条件按

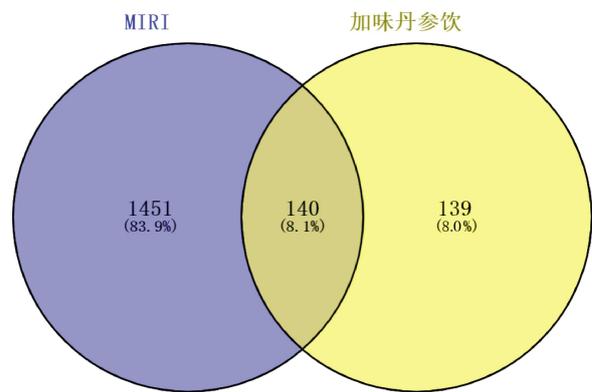


图2 加味丹参饮与 MIRI 交集靶点基因韦恩图

degree 排列,degree 中位数为 9.9,筛选大于中位数的靶点进行可视化处理,见图3,其中 Akt1、JUN、STAT3、MAPK1、TNF 等在网络中连接程度较高,说明这些靶点属于核心靶点。

3.3 加味丹参饮成分-MIRI 靶点功能与通路的富集

通过 Metascape 数据平台对加味丹参饮调治 MIRI 核心靶点进行富集分析,借助微生信平台对结果可视化。结果表明,加味丹参饮主要参与的生物学过程包括生物对创伤反应(response to wounding)、炎症反应(inflammatory response)、对无机物的反应(response to inorganic substance)等;相关靶点调治冠心病的功能主要富集于蛋白结构域特异性结合

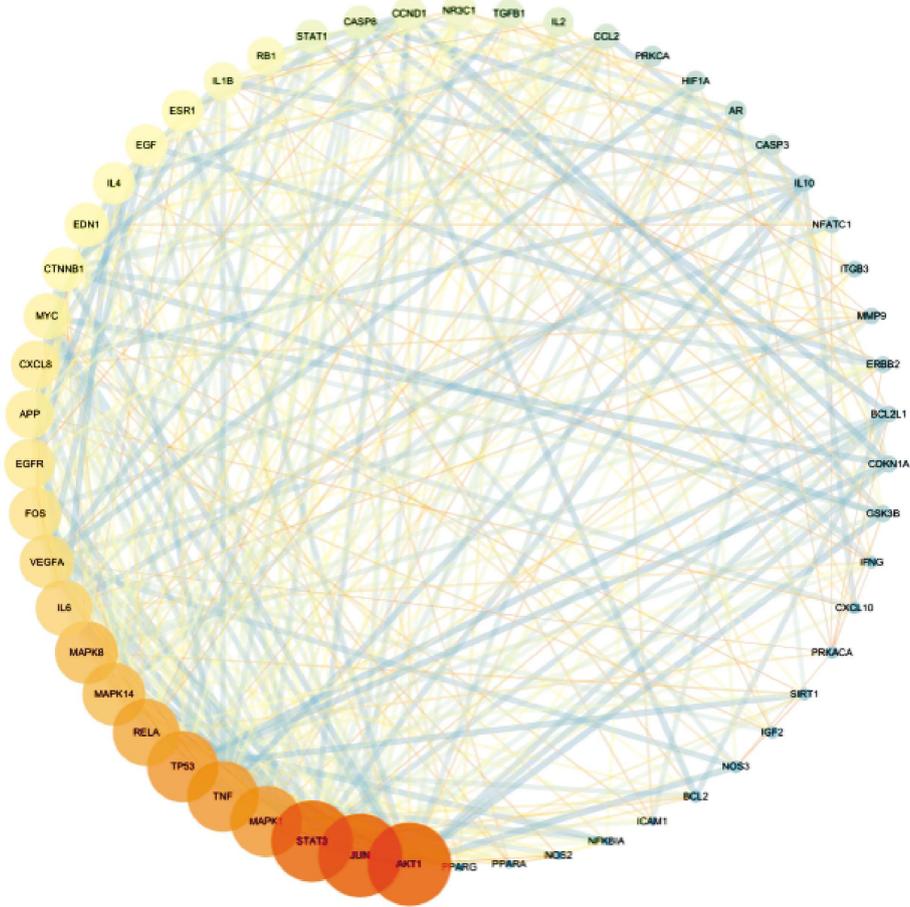


图 3 加味丹参饮预防 MIRI 核心靶点

注:圆形节点为不同靶点;节点的面积及颜色深度代表其度数,面积越大、颜色越深说明该节点越重要。

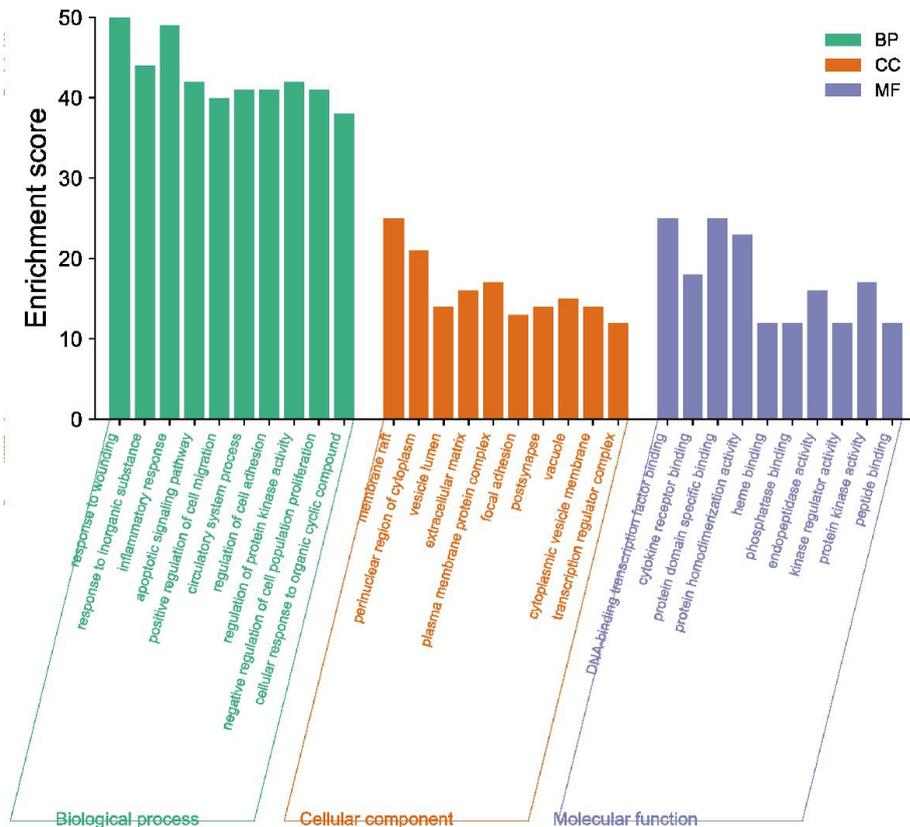


图 4 GO 功能富集分析柱状图

表 1 加味丹参饮对 MIRI 大鼠血清 MDA、SOD、CK-MB 及 LDH 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=9$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	MDA/(nmol·L ⁻¹)	SOD/(U·L ⁻¹)	CK-MB/(U·L ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)
空白组		8.215±0.248	2870±453.7	22.35±0.601	37.54±1.654
假手术组		8.334±0.328 [#]	2934±55.59 [#]	22.37±0.516 [#]	38.77±1.303 [#]
模型组		10.70±0.180 ^{**}	1881±55.59 ^{**}	28.57±0.875 ^{**}	47.25±0.660 ^{**}
加味丹参饮组	6.19	9.142±0.285 [#]	2524±55.59 [#]	25.52±0.488 [#]	41.17±1.362 [#]

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

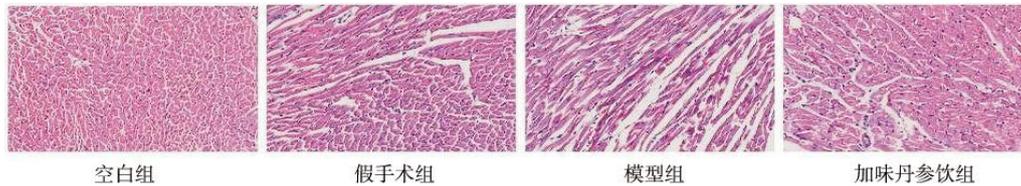


图 7 大鼠心肌组织病理变化(HE,×400)

(protein domain specific binding)、DNA 结合转录因子结合(DNA-binding transcription factor binding)、蛋白同源二聚体化活性 (protein homodimerization activity)、蛋白激酶活性(protein kinase activity)等,见图 4。相关通路主要有 pathways in cancer 信号通路、AGE-RAGE 信号通路、proteoglycans in cancer 信号通路以及 PI3K-AKT 通路等。详见图 5。

3.4 加味丹参饮成分-MIRI 靶点-通路网络图的构建

运用 Cytoscape 3.7.1 构建加味丹参饮成分-MIRI 靶点-通路网络,见图 6。通过 Cytoscape 3.7.1 内置的 NetworkAnalyzer 分析加味丹参饮预防 MIRI 网络拓扑学参数,得到核心成分及作用靶点。Cytoscape 网络分析表明,PTGS2 在网络中的连接度为 86,介度为 0.267 8,紧密度为 0.550 1,预测 PTGS2 为加味丹参饮调治 MIRI 的重要靶点。与此同时,结果显示 PTGS2 与 Akt1 同时在排名 20 条通路网络中的 pathways in cancer 等 5 条通路中同时出现,Akt1 均处于 PTGS2 上游。

3.5 动物实验验证

3.5.1 大鼠血清 MDA、SOD、CK-MB、LDH 表达水平

与空白组相比,模型组大鼠血清中 MDA、CK-MB、LDH 含量明显升高,SOD 含量明显降低($P<0.01$);与模型组相比,加味丹参饮组大鼠血清中 MDA、CK-MB、LDH 明显含量下降($P<0.01$),其中加味丹参饮组表达高于假手术组;与模型组相比,加味丹参饮组与假手术组大鼠血清中 SOD 含量明显升高($P<0.01$)。详见表 1。

3.5.2 HE 染色观察大鼠心肌病理变化 HE 染色结果显示,与空白组相比,模型组大鼠心肌组织局部

坏死,细胞结构模糊,心肌细胞走形紊乱。与模型组相比,加味丹参饮组大鼠心肌组织结构明显改善,细胞走形规律,轮廓完整,坏死减少。详见图 7。

3.5.3 心肌组织 PTGS2、Akt1 基因表达 与空白组大鼠相比,模型组大鼠 PTGS2、Akt1 mRNA 表达增强($P<0.01$);与模型组大鼠相比,加味丹参饮组与假手术组大鼠 Akt1、PTGS2 mRNA 表达显著减弱($P<0.01$)。详见表 2。

表 2 加味丹参饮对 MIRI 大鼠心肌组织中 PTGS2 mRNA、Akt1 mRNA 表达的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	PTGS2	Akt1
空白组	0.944±0.022	0.721±0.458
假手术组	0.963±0.019 [#]	1.169±0.213 [#]
模型组	1.066±0.048 ^{**}	2.627±0.422 ^{**}
加味丹参饮组	0.966±0.018 [#]	1.313±0.193 [#]

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

3.5.4 心肌组织 PTGS2、Akt1 蛋白表达 与空白组大鼠比较,模型组大鼠 PTGS2 蛋白表达显著上调,Akt1 蛋白表达显著下调($P<0.01$);与模型组大鼠比较,加味丹参饮组大鼠 PTGS2 蛋白表达明显减少($P<0.01$),其中加味丹参饮组蛋白表达高于假手术组;与模型组大鼠比较,加味丹参饮组大鼠 Akt1 蛋白表达显著上调($P<0.01$),其中加味丹参饮组蛋白表达高于假手术组。详见图 8 和表 3。

4 讨论

急性心肌梗死是危害广大人民群众生命健康的主要疾病之一,再灌注治疗是标准治疗方案。然而,在强化内科治疗基础上,无论采用介入治疗还是外

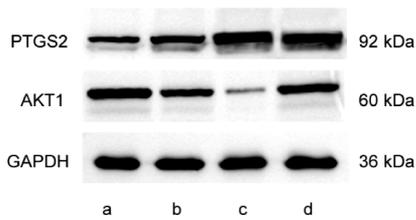


图8 加味丹参饮对大鼠心肌组织 PTGS2、Akt1 蛋白表达

注:a.空白组;b.假手术组;c.模型组;d.加味丹参饮组。

表3 加味丹参饮对 MIRI 大鼠心肌组织中 PTGS2、Akt1 蛋白的表达($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	PTGS2	Akt1
空白组	0.505±0.134	1.150±0.338
假手术组	0.637±0.155 [#]	0.752±0.232 [#]
模型组	0.987±0.376 ^{**}	0.685±0.112 ^{**}
加味丹参饮组	0.839±0.115 [#]	0.950±0.213 [#]

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

科血运重建策略,仍然有相当一部分患者无法从中完全获益,中医药的介入为临床诊治 MIRI 提供了广阔空间^[13-14]。陈欣等^[15]使用丹参通络解毒汤干预 MIRI 模型大鼠,证明该方可通过抑制自噬减轻损伤,其作用机制可能与下调肺癌转移相关转录本 1 (MALAT1)基因表达和抑制 Toll 样受体 4/核转录因子- κ (BTLR4/NF- κ B)信号通路有关。李泽华等^[16]发现黄芪的主要成分黄芪甲苷,可通过上调核因子 E2 相关因子 2/血红素加氧酶 1(NRF2/HO-1)信号通路缓解心肌损伤和抑制细胞凋亡。萧闵等^[17]观察金香丹预处理对 MIRI 大鼠模型的影响,结果表明 NOD 样受体热蛋白结构域 3(NLRP3)表达受到抑制,白细胞介素-1 β (IL-1 β)表达降低,从而保护心肌细胞,缓解 MIRI。

MIRI 与冠心病同属于中医学“胸痹”的范畴^[18],而近年来我国冠心病患病人群中,中医辨证以气虚血瘀型最常见^[19],其病理性质为本虚标实,以气虚为本,以血瘀为标。益气活血法在胸痹治疗上即补已虚之心气,化停滞之瘀血,是针对气虚血瘀病因病机特有的治疗法则。加味丹参饮全方由丹参、黄芪、檀香、赤芍、川芎、当归、红花、生地黄组成,具有益气活血、通络止痛的功效。丹参、黄芪为君药,益气活血;臣以赤芍、红花活血祛瘀;佐以当归、生地黄养血活血通经;川芎活血行气止痛,檀香能理气止痛,兼散寒共为佐使。加味丹参饮预处理可通过抑制 P38 丝裂原活化蛋白激酶(p38MAPK)信号通路,降低其下游基因环氧合酶-2(COX-2)和细胞间黏附分子-1

(ICAM-1)的表达,减轻心肌损伤^[7]。亦有研究显示其减轻心肌损伤的机制与其促进内源性硫化氢生成,上调心肌组织胱硫醚- γ -裂解酶(CSE)mRNA 及蛋白表达有关^[6]。亦或通过下调 Beclin1、LC3A/B、p62 和 ATG5 等基因的表达,抑制自噬信号通路,发挥缓解 MIRI 的作用^[8]。

本研究通过网络药理学初步筛选出加味丹参饮调治 MIRI 的主要靶点为 Akt1、PTGS2 等,Akt1 是影响心肌细胞活性与功能的主要决定因素之一,激活 Akt1 可以调控下游的因子影响细胞的增殖、凋亡、自噬等过程^[20-21]。研究表明^[22],治疗高胆固醇血症的药物阿托伐他汀可以保护高糖环境下心肌微血管内皮细胞免受氧化应激和凋亡,这种保护作用部分可能与 Akt1 相关。转染 Akt1 基因能够减轻心肌 I/R 损伤,其作用机制可能与 Akt1 抑制心肌缺血再灌注诱导的线粒体膜通透性转换,从而具有保护线粒体的功能相关^[23]。COX-2 由基因 PTGS2 表达而产生,在正常生理条件下表达量极低,而在心血管疾病过程中,其过度表达与炎症反应的发生密切相关^[24];郑妮媚等^[25]研究表明,COX-2 的高表达可引发过度炎症反应,在诱导心肌损伤的过程中起到重要作用。本研究证明,网络药理学预测的 PTGS2、Akt1 确实为加味丹参饮调节 MIRI 的作用靶点,KEGG 分析显示在相关性靠前的 pathways in cancer 等 5 条通路中,Akt1 均处于 PTGS2 上游。

本研究网络药理学预测 Akt1 与 PTGS2 为加味丹参饮预防 MIRI 重要靶点,且 Akt1 作用于 PTGS2 上游。动物实验结果表明,加味丹参饮干预 MIRI 大鼠与模型组大鼠相比,血清中 MDA、CK-MB、LDH 含量明显升高,SOD 含量明显降低,Akt1 和 PTGS2 mRNA 表达下降,Akt1 蛋白表达提升,并且心肌细胞坏死和纤维化程度较低。以上结果证实,加味丹参饮可能同时抑制 Akt1、PTGS2 两个靶点,进而缓解过度心肌损伤,发挥预防 MIRI 作用。

参考文献

- [1] LI L, WANG Y, GUO R, et al. Ginsenoside Rg3-loaded, reactive oxygen species-responsive polymeric nanoparticles for alleviating myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Journal of Controlled Release, 2020, 317: 259-272.
- [2] GUO X, HU S, LIU J J, et al. Piperine protects against pyroptosis in myocardial ischaemia/reperfusion injury by regulating the

- miR-383/RP105/AKT signalling pathway[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2021, 25(1): 244-258.
- [3] ZHU N, LI J, LI Y L, et al. Berberine protects against simulated ischemia/reperfusion injury -induced H9C2 cardiomyocytes apoptosis in vitro and myocardial ischemia/reperfusion -induced apoptosis in vivo by regulating the mitophagy-mediated HIF-1 α /BNIP3 pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 367.
- [4] YUAN X X, JUAN Z D, ZHANG R, et al. Clemastine fumarate protects against myocardial ischemia reperfusion injury by activating the TLR4/PI3K/Akt signaling pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 28.
- [5] 陈 聪,黄政德,廖 菁,等.加味丹参饮不同组方对心肌缺血再灌注损伤 COX-2、ICAM-2、P38 MAPK 蛋白表达的影响[J]. *辽宁中医杂志*, 2016, 43(12): 2636-2638, 2703.
- [6] 陈 聪,成细华,任 婷,等.加味丹参饮作用内源性 H₂S 合成途径保护心肌缺血/再灌注损伤的实验研究[J]. *湖南中医药大学学报*, 2019, 39(10): 1183-1188.
- [7] 陈 聪,任 婷,胡 华,等.加味丹参饮预处理对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用[J]. *湖南中医药大学学报*, 2016, 36(6): 11-15.
- [8] 陈 聪,刘 洋,童巧珍,等.加味丹参饮通过抑制 H₂S 介导的自噬信号通路对心肌缺血再灌注损伤的治疗作用[J]. *数字中医药*, 2021, 4(3): 241-250.
- [9] 但文超,何庆勇,曲 艺,等.基于网络药理学的枳术丸调治血脂异常的分子机制研究[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2019, 21(11): 2396-2405.
- [10] 张圆圆,靳培培,顾 悦,等.基于网络药理学、分子对接及实验验证探讨加味升降散治疗 IgA 肾病的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(7): 162-171.
- [11] 张丰荣,祝 娜,李志勇,等.基于网络药理学角度探讨清瘟败毒饮对细胞因子风暴的干预机制[J]. *中国中药杂志*, 2020, 45(7): 1499-1508.
- [12] 邵 珺,朱思思,黄 瑶,等.基于网络药理学探讨血府逐瘀汤治疗失眠的作用机制[J]. *世界科学技术-中医药现代化*, 2021, 23(9): 3326-3336.
- [13] ZHENG S, HUANG H, LI Y, et al. Yin-Xing-Tong-Mai Decoction attenuates atherosclerosis via activating PPAR γ -LXR α -ABCA1/ABCG1 pathway[J]. *Pharmacological Research*, 2021, 169: 105639.
- [14] SHEN Y C, SHEN Y J, LEE W S, et al. Two benzene rings with a boron atom comprise the core structure of 2-APB responsible for the anti-oxidative and protective effect on the ischemia/reperfusion-induced rat heart injury[J]. *Antioxidants*, 2021, 10(11): 1667.
- [15] 陈 欣,李鑫辉,王静雯,等.丹参通络解毒汤对 IRI 模型大鼠心肌细胞自噬的调控机制[J]. *中医学报*, 2020, 35(6): 1252-1257.
- [16] 李泽华,关贤颂,蒋路平,黄芪甲苷通过 NRF2/HO-1 信号通路减轻小鼠心肌缺血再灌注损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2021, 37(12): 2147-2153.
- [17] 萧 闯,向晶晶,王 威,等.金香丹抑制 NLRP3/IL-1 β /Caspase-1 信号通路缓解大鼠心肌缺血再灌注损伤[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2021, 27(20): 87-94.
- [18] 王士超,吴 伟,刘 芳,等.国医大师邓铁涛教授治疗心血管病学术思想和冠心病治疗经验初探[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2016, 14(10): 1167-1170.
- [19] 陈贵珺,王恒和.近 5 年我国冠心病中医证型地域分布规律研究[J]. *辽宁中医杂志*, 2018, 45(6): 1142-1146.
- [20] 王兴红,郑亚萍,李海霞,槲皮素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2013, 19(4): 266-270.
- [21] 徐启丽,邹常超,莫丽莉,等.网络药理学分析及实验验证银丹心脑通保护 MIR1 的作用机制[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(1): 131-138.
- [22] 葛广豪,候月梅,阿托伐他汀保护高糖环境下心肌微血管内皮细胞损伤的机制研究[J]. *中华老年医学杂志*, 2018, 37(9): 1026-1030.
- [23] 王 静,李东野,夏 勇,等.转染 Akt1 基因对缺血再灌注大鼠心肌线粒体通透性转换的影响[J]. *中国病理生理杂志*, 2010, 26(1): 80-85.
- [24] 李 杨,周 岚,汪 典,等.不同剂量活血、破血中药对动脉粥样硬化小鼠主动脉 PTGS2、PADI4、ITGAM 基因表达的影响[J]. *疑难病杂志*, 2016, 15(11): 1182-1186.
- [25] 郑妮媚,初海平,王 燕,等.力竭运动后不同时相大鼠心肌 p-p38MAPK、NF-kB、COX-2 表达的动态变化[J]. *中国应用生理学杂志*, 2016, 32(1): 88-91.

(本文编辑 苏 维)