

·数字中医药·

本文引用: 陈 铭, 陈 聪, 廖 菁, 余嗣澳, 覃浩昌. 基于网络药理学及实验验证探讨芎芪方治疗心肌缺血再灌注损伤的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(2): 266-277.

基于网络药理学及实验验证探讨芎芪方治疗 心肌缺血再灌注损伤的作用机制

陈 铭, 陈 聪*, 廖 菁, 余嗣澳, 覃浩昌
湖南中医药大学中医学院, 湖南 长沙 410208

〔摘要〕 目的 基于网络药理学初步预测芎芪方治疗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,通过动物实验验证其可能的作用机制。方法 通过 TCMS、UniProt 数据库获取芎芪方药理作用的活性成分及相关靶点;通过 GeneCards、OMIM 以及 DRUGBANK 数据库获取 MIRI 相关靶点;通过 STRING 平台进行 PPI 分析,构建 PPI 网络。通过 DAVID 数据库分析“芎芪方成分-靶点”及其参与的生物学过程及信号通路,采用 Cytoscape 3.9.1 软件构建“芎芪方-MIRI 靶点-通路”网络。36 只 SD 雄性大鼠随机均分为假手术组、模型组及芎芪方组,芎芪方组预防性灌胃给药(3.6 g·kg⁻¹),假手术组、模型组灌胃给予等量生理盐水,均灌胃 14 d。通过结扎大鼠冠状动脉左前降支的方法建立实验性 MIRI 大鼠模型。造模结束后,腹主动脉取血,ELISA 法检测大鼠血清肌酸激酶同工酶 MB(creatinase-MB,CK-MB)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor-α,TNF-α)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD);HE 染色观察心肌病理改变;Western blot 法检测心肌组织原癌基因(Jun proto-oncogene, JUN)蛋白表达。结果 初步筛选获得芎芪方活性成分 22 个,药物疾病交集基因 125 个,其中蛋白激酶 B1(akt serine/threonine kinase 1,AKT1)、白细胞介素-1β(interleukin-1β,IL-1β)、环氧合酶 2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2,PTGS2)等靶点可能与芎芪方预防 MIRI 密切相关,富集分析预测芎芪方预防 MIRI 主要涉及低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor,HIF-1)信号通路、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)信号通路、晚期糖基化终末产物(advanced glycosylation end product,AGE)-糖基化终末产物受体(receptor of advanced glycosylation end product,RAGE)信号通路及丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路等。动物模型验证结果提示,芎芪方可有效减轻 MIRI 大鼠心肌细胞损伤程度,降低 MIRI 大鼠血清 CK-MB、LDH、MDA、TNF-α、IL-6 水平($P<0.01$),提高 SOD 水平($P<0.01$),降低 MIRI 大鼠心肌组织 JUN 蛋白表达($P<0.01$)。结论 芎芪方可能通过抑制 TNF-α、IL-6、JUN 等靶点,减轻 MIRI 大鼠心肌炎性反应,发挥治疗 MIRI 的作用。

〔关键词〕 心肌缺血再灌注损伤;芎芪方;网络药理学;作用机制;益气活血法;炎性因子

〔中图分类号〕R285.5

〔文献标志码〕A

〔文章编号〕doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.02.014

Mechanism of action of Xiongqi Formula in treating myocardial ischemia-reperfusion injury based on network pharmacology and experimental verification

CHEN Ming, CHEN Cong*, LIAO Jing, YU Si'ao, QIN Haochang

School of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

〔收稿日期〕2023-08-04

〔基金项目〕国家自然科学基金项目(81704065);湖南省教育厅科学研究项目(22A0274,23C0172);湖南省中医药科研计划项目(A2023030,B2023022);湖南省卫生健康委员会科研计划项目(202202084742);湖南中医药大学科研基金重点项目(2021XJJ003);湖南中医药大学研究生创新课题(2022CX60,2023CX172)。

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

[Abstract] Objective To preliminarily predict the active ingredients, targets, and signal pathways of Xiongqi Formula (XQF) in treating myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) based on network pharmacology, and to verify the possible mechanism of action through animal experiments. **Methods** The active ingredients and related targets of XQF in its pharmacological action were obtained by TCMSPP and UniProt, and the related targets of MIRI were obtained from GeneCards, OMIM, and DRUGBANK. PPI analysis was performed on the STRING platform to construct the PPI network. The "XQF ingredients-targets" and their biological processes and signaling pathways involved were analyzed through DAVID. Then, the "XQF-MIRI targets-pathways" network was constructed using Cytoscape 3.9.1 software. Thirty-six male SD rats were averagely randomized into sham-operated group, model group, and XQF group. XQF group was given prophylactic administration of the corresponding medication by gavage ($3.6 \text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$), and the sham-operated and model groups were given the same amount of normal saline by gavage, for 14 d respectively. The rat model of MIRI was established by ligating the left anterior descending coronary artery in rats. After the modeling, the blood was collected from the abdominal aorta of the rats, and the serum creatine kinase-MB (CK-MB), malondialdehyde (MDA), lactate dehydrogenase (LDH), tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), and superoxide dismutase (SOD) were determined by ELISA. Myocardial pathological changes were observed by HE staining. Additionally, the protein expression of Jun proto-oncogene (JUN) in the myocardial tissue was examined by Western blot. **Results** A total of 22 active ingredients of XQF were obtained, as well as 125 XQF-MIRI intersection genes, among which akt serine/threonine kinase 1 (AKT1), interleukin-1 β (IL-1 β), prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2), and other targets may be closely related to the prevention of MIRI by XQF. Enrichment analysis predicted that the prevention of MIRI by XQF mainly involved hypoxia-inducible factor (HIF-1) signaling pathway, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, advanced glycosylation end product (AGE)-receptor of advanced glycosylation end product (RAGE) signaling pathway, mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway, etc. Animal experimental verification showed that XQF effectively alleviated the myocardial cell injury in MIRI rats, decreased the serum levels of CK-MB, LDH, MDA, TNF- α , and IL-6 ($P<0.01$), increased SOD level ($P<0.01$), and reduced JUN protein expression in the rat myocardial tissue ($P<0.01$). **Conclusion** Xiongqi Formula may play a role in treating MIRI by inhibiting TNF- α , IL-6, JUN, and other targets to reduce myocardial inflammatory response in MIRI rats.

[Keywords] myocardial ischemia-reperfusion injury; Xiongqi Formula; network pharmacology; mechanism of action; the method of benefiting qi and circulating blood; inflammatory factor

随着人口老龄化加速,不健康饮食、身体活动不足和吸烟等与心血管疾病(cardiovascular disease, CVD)密切相关的不良生活方式流行,我国CVD发病率和死亡率仍在升高,其中缺血性心脏病、出血性脑卒中和缺血性脑卒中是中国CVD死亡的三大主要原因^[1]。目前,缺血性心脏病的主要治疗方法仍然是及时恢复血液灌注以挽救缺血性心肌,并采用溶栓治疗或经皮冠状动脉介入治疗快速恢复缺血性心肌的血液循环。但治疗后,可能出现心肌抑制、心律失常,甚至不可逆的心肌损伤等进展性加重病理现象,即心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI),其严重影响缺血性心脏病患者的治疗效果。因此,如何减轻MIRI成为CVD治疗亟须解决的重要问题^[1-3]。

MIRI是多种病理、生理因素及多通路、多机制

交互作用的结果,其发生发展机制目前尚未被完全阐明。临床常用策略在MIRI的长期预后及终端器官的保护方面获益甚微,而中药及其复方具有广泛的药理活性,可以通过多靶点、多途径预防和治疗MIRI^[4]。芎芪方原方名为川芎黄芪汤,源于《普济方·损胎》,主治“伤胎腹痛,下黄汁”,黄芪与川芎等比配伍。课题组在原方的基础上去秫米,用于临床防治CVD疗效显著。课题组前期研究加味丹参组分抗MIRI发现,黄芪与川芎发挥效益明显^[5],黄芪可能通过调节心肌细胞能量代谢、保护线粒体功能、减少细胞凋亡和钙超载等方式发挥抗MIRI的作用;川芎可能通过降低再灌注损伤后全血肌钙蛋白、肌酸激酶同工酶含量,减小大鼠心肌梗死面积,从而减轻MIRI^[6-7]。气虚血瘀证是MIRI临床常见证型之一^[8],而芎芪方中黄芪与川芎相配伍,气旺则血行,活

血而不伤正,共奏益气活血之功,在治疗 MIRI 方面具有一定潜力,但其多环节、多靶点作用的确切机制还未明确。

网络药理学结合医学、生物学等多学科理论与计算机科学技术对生物系统进行网络数据分析,能够系统、综合、整体地反映药物对疾病的干预机制^[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、多途径相互作用具有相同的特点,为进一步揭示中药复方的科学内涵提供了有效的技术支持^[5,11]。因此,本研究通过使用网络药理学技术方法,探究芎芪方调治 MIRI 的分子机制,并进行初步动物实验验证,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 芎芪方有效成分-靶点网络图的构建

通过 TCMSp 数据库(<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)检索黄芪、川芎药物的活性成分、靶点,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(oral bioavailability, OB) 阈值 $\geq 30\%$ 和类药性(drug-likeness, DL) 阈值 ≥ 0.18 为限定条件,得到芎芪方有效活性成分。使用 SwissTargetPrediction 数据库(<http://swisstargetprediction.ch/>)查找活性成分的靶点,得到芎芪方作用的蛋白靶点。再使用 UniProt 数据库(<http://www.uniprot.org/uniprot/>)规范靶点蛋白英文名,并统一为基因名称。将结果导入 Cytoscape 3.9.1,构建芎芪方组成药物-药物成分-靶点网络图。

以“myocardial ischemia reperfusion injury”为关键词,在 GeneCards 数据库(<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库(<http://www.omim.org/>)和 DRUG-BANK 数据库(<https://www.drugbank.ca/>)搜索 MIRI 的蛋白靶点,合并以上 3 个疾病数据库结果,并去除重复项后得到 MIRI 相关靶点。

1.2 芎芪方有效成分-MIRI 靶点网络构建及核心靶点筛选

为明确芎芪方的活性成分、靶点与 MIRI 之间的交互作用,使用 Venny 2.1 工具取两者交集靶点并绘制韦恩图。将交集靶点输入至 STRING 11.5 数据

库(<https://string-db.org>)构建 PPI 网络模型,并通过 Cytoscape 3.9.1 对数据进行可视化与数据分析,筛选核心靶点。

1.3 芎芪方有效成分-MIRI 靶点功能与通路的富集

在 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov>)中进行 GO 和 KEGG 信号通路富集分析,选择“Functional annotation tool”功能,物种设为“Homo sapiens”,将芎芪方调治 MIRI 的靶点输入,获取芎芪方治疗 MIRI 相关的主要信号通路与生物学过程,采用微生物信平台(<http://www.bioinformatics.com.cn/>)对数据结果进行可视化。

1.4 芎芪方有效成分-MIRI 靶点-通路网络图的构建

运用 Cytoscape 3.9.1 构建芎芪方-MIRI-通路网络图,利用 Cytoscape 3.9.1 内置分析工具计算有效成分及靶点的网络拓扑参数,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

芎芪方:黄芪 20 g(批号:CK22090503)、川芎 20 g(批号:CK22062708),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教授鉴定,均为正品。浸泡,煎煮,去渣,水煎浓缩至药液浓度为 $1.8 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (含生药),于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。

2.2 实验动物

于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:430727221102522415,许可证号:SCXK(湘)2019-0004。饲养于湖南中医药大学实验动物中心清洁级动物房(相对湿度 50%~70%,温度 23~25 $^{\circ}\text{C}$,昼夜交替),普通饲料,自由摄食饮水。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:LL2022080403。

2.3 主要试剂及仪器

4%多聚甲醛通用型组织固定液、JUN 抗体、GAPDH 抗体、ECL 化学发光试剂(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BL539A、BM4168、BM1623、AR1196);HE 染色液(珠海贝索生物技术有限公司,批号:C210904);

大鼠肌酸激酶同工酶 MB(creatine kinase-MB,CK-MB)、丙二醛(malondialdehyde,MDA)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α ,TNF- α)、白细胞介素-6(interleukin-6,IL-6)、超氧化物歧化酶(superoxide dismutase,SOD)ELISA 试剂盒(江苏菲亚生物科技有限公司,批号:2210R19、2210R26、2210R23、2210R06、2210R12、2210R11)。

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);DYY-7C 型电泳仪(北京六一生物科技有限公司);VE-180 型电泳槽、VE-60 微型垂直槽多板灌胶器、VE-186 型转移电泳槽、Tanon5200 型全自动化学发光成像分析系统(上海天能科技有限公司);SCIENTZ-1500F 型超声破碎仪、SCIENTZ-24 型组织匀浆器(宁波新芝生物科技股份有限公司)。

2.4 动物分组及给药

将 36 只雄性 SD 大鼠按照随机数字表法分为 3 组:假手术组、模型组、芍芪方组,每组 12 只。于实验室饲养,笼内适应性饲养 1 周后,芍芪方组按照成人与大鼠的体表面积换算等效剂量^[2],灌胃芍芪方 $3.6 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$,假手术组、模型组灌胃给予等量生理盐水,连续灌胃给药 14 d。末次给药 12 h 后,进行造模。

2.5 模型制备及取样

手术造模制备 MIRI 实验大鼠模型^[8],大鼠腹腔注射 3%浓度的戊巴比妥钠,按照 $40 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 进行麻醉,麻醉成功后,连接心电图,切开气管,于切口处接小动物呼吸机,沿左胸 4、5 肋间切开,暴露心脏,在左心耳与肺动脉圆锥之间下约 2 mm 处进针,用 6-0 缝合线结扎大鼠左冠状动脉前降支 30 min。左侧心肌壁发白,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 为结扎成功标志,结扎 30 min 后松开结扎线实现再灌注,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 120 min,心电图见图 1。假手术组仅穿线不结扎。腹主动脉取血, $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、3 000 r/min(离心半径 5.5 cm)离心 10 min 后取血清用于指标检测。完成腹主动脉取血后,立即取心脏组织,冲洗尽血液后,病理染色观察所用样本,用 4%多聚甲醛液进行固定。

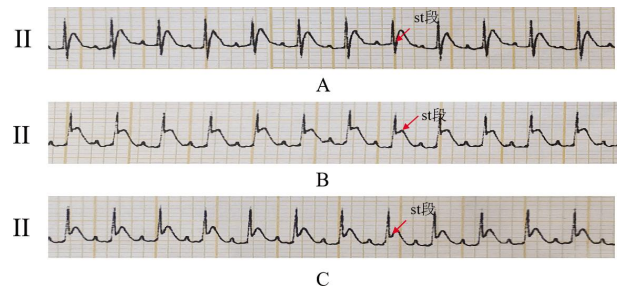


图 1 MIRI 大鼠 3 个阶段的心电图

注:A 为手术前;B 为结扎左冠状动脉前降支;C 为结扎后松开结扎线实现再灌注。

2.6 指标检测

2.6.1 ELISA 法检测大鼠血清 CK-MB、SOD、LDH、MDA、TNF- α 、IL-6 水平 采用 ELISA 法检测各组大鼠血清 CK-MB、SOD、LDH、MDA、TNF- α 、IL-6 水平,实验步骤按照试剂盒方法进行。

2.6.2 HE 染色观察大鼠心肌组织损伤情况 沿左心室冠状面中部切取固定后的心脏组织环状心肌组织块,使用 4%多聚甲醛固定,乙醇梯度脱水后进行石蜡包埋,切片烘干后再使用 HE 染色液染色,光学显微镜下观察结果并采集图像。

2.6.3 Western blot 法检测心肌组织 JUN 蛋白表达

取 100~200 mg 组织样本,切碎。取适当量的裂解液,在使用前数分钟内加入酶抑制剂,每 100 mg 样本加入 1 mL 的 RIPA 裂解液,用匀浆器充分研磨匀浆(在冰上进行),置冰上裂解 1 h,转至 1.5 mL 离心管,以 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、10 000 r/min 离心 10 min(离心半径 6 cm),取上清液。采用 BAC 法测定各样本蛋白浓度,并调整一致;加入等体积蛋白上样缓冲液,煮沸 5 min 使其变性。依次进行 SDS 凝胶电泳、转膜、抗原封闭,加入一抗 JUN(1:1 000)、GAPDH(1:2 000)孵育过夜。再加入羊抗兔二抗(1:5 000)室温孵育 2 h。最后,加 ECL 工作液于印迹膜上 30~60 s,吸干发光液,置印迹膜于成像分析仪自动成像。以 GAPDH 蛋白条带灰度值为内参,使用 Image J 软件分析蛋白条带灰度值。

2.7 统计学分析

数据结果导入 SPSS 25.0 软件进行分析,结果用“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,数据符合正态分布和方差齐性,组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 芎芪方有效活性成分及药物-成分-靶点网络图的构建

使用 TCMSp 数据库检索芎芪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 22 种(表 1)。通过 SwissTargetPrediction 数据库查找活性成分的靶点,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 458 个。

运用 Cytoscape 3.9.1 构建芎芪方药物-靶点网络图(图 2)。网络分析表明,槲皮素连接度为 146,介度为 0.735,紧密度为 0.631,预测槲皮素为复方的主要成分。其次为山柰酚,连接度为 58,介度为 0.132,紧密度为 0.421。环氧合酶 2(prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2)在网络中的连接度为 17,介度为 0.055,紧密度为 0.514,预测 PTGS2 为芎芪方的最主要靶点,核受体共激活因子 2 亦为相对重要的靶点。

3.2 芎芪方-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 2 039 个,从 OMIM 数据库与 DRUGBANK 数据库共补充获得靶点 51 个,合并后去除重复值,最终得到 1 807 个 MIRI 疾病靶点。

将检索处理后的芎芪方靶点与 MIRI 疾病靶点取交集,并绘制韦恩图,得到交集靶点 125 个(图 3)。随后将交集靶点输入至 STRING 11.5 平台,得到芎芪方-MIRI 靶点 PPI 网络(图 4),网络图包括 125 个

节点,2 552 条边。将在 STRING 11.5 平台获取的结果文件导入 Cytoscape 3.9.1 中,使用内置分析工具对内容进行分析(图 5),从图可看出蛋白激酶 B1(akt serine/threonine kinase 1, AKT1)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、PTGS2、原癌基因(Jun proto-oncogene, JUN)等在网络中连接程度较高,说明这些靶点可能是芎芪方预防 MIRI 的关键靶点。

3.3 芎芪方-MIRI 靶点功能与通路的富集

通过 DAVID 数据平台对芎芪方治疗 MIRI 的核心靶点进行富集分析,GO 功能分析结果显示,生物过程(biological process, BP)289 个,分子功能(molecular function, MF)61 个、细胞组成(cellular component, CC)27 个,KEGG 信号通路 111 条,将 $\log_{10}(P)$ 值排名前 15 的结果借助微生信平台进行可视化处理。结果表明,芎芪方主要参与的 BP 包括:RNA 聚合酶 II 启动子对 pri-miRNA 转录的正向调控、血管生成、基因表达的正向调控、缺氧应激反应、炎症反应等(图 6);其涉及的 CC 主要为大分子复合物、染色质、转录因子复合体、细胞质、细胞核、线粒体(图 7);其涉及的 MF 主要集中在酶结合、蛋白质结合、转录因子活性、一氧化氮合成酶活性、细胞活性因子(图 8);涉及的通路则包括低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)信号通路、肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)信号通路、晚期糖基化终末产物(advanced glycosylation end product, AGE)-糖基化终末产物受体(receptor of advanced glycosylation end product, RAGE)信号通路及丝裂原激活的蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase, MAPK)信号通路等(图 9)。

表 1 芎芪方有效活性成分

编号	分子英文名	编号	分子英文名	编号	分子英文名
HQ1	Mairin	HQ9	(6aR,11aR)-9,10-dimethoxy-6a,11a-dihydro-6H-benzofuran[3,2-c]chromen-3-ol	CX1	Mandenol
HQ2	Jaranol	HQ10	Bifendate	CX2	Myricanone
HQ3	hederagenin	HQ11	formononetin	CX3	Perolryrine
HQ4	(3S,8S,9S,10R,13R,14S,17R)-10,13-dimethyl-17-[(2R,5S)-5-propan-2-yl-octan-2-yl]-2,3,4,7,8,9,11,12,14,15,16,17-dodecahydro-1H-cyclopenta[a]phenanthren-3-ol	HQ12	Calycosin	CX4	wallichilide
HQ5	isorhamnetin	HQ13	kaempferol	CX5	sitosterol
HQ6	3,9-di-O-methylisolin	HQ14	isomucronulatol-7,2'-di-O-glucosiole	A1	FA
HQ7	7-O-methylisomucronulatol	HQ15	1,7-Dihydroxy-3,9-dimethoxy pterocarpene	—	—
HQ8	9,10-dimethoxypterocarpan-3-O- β -D-glucoside	HQ16	quercetin	—	—
		—	—	—	—

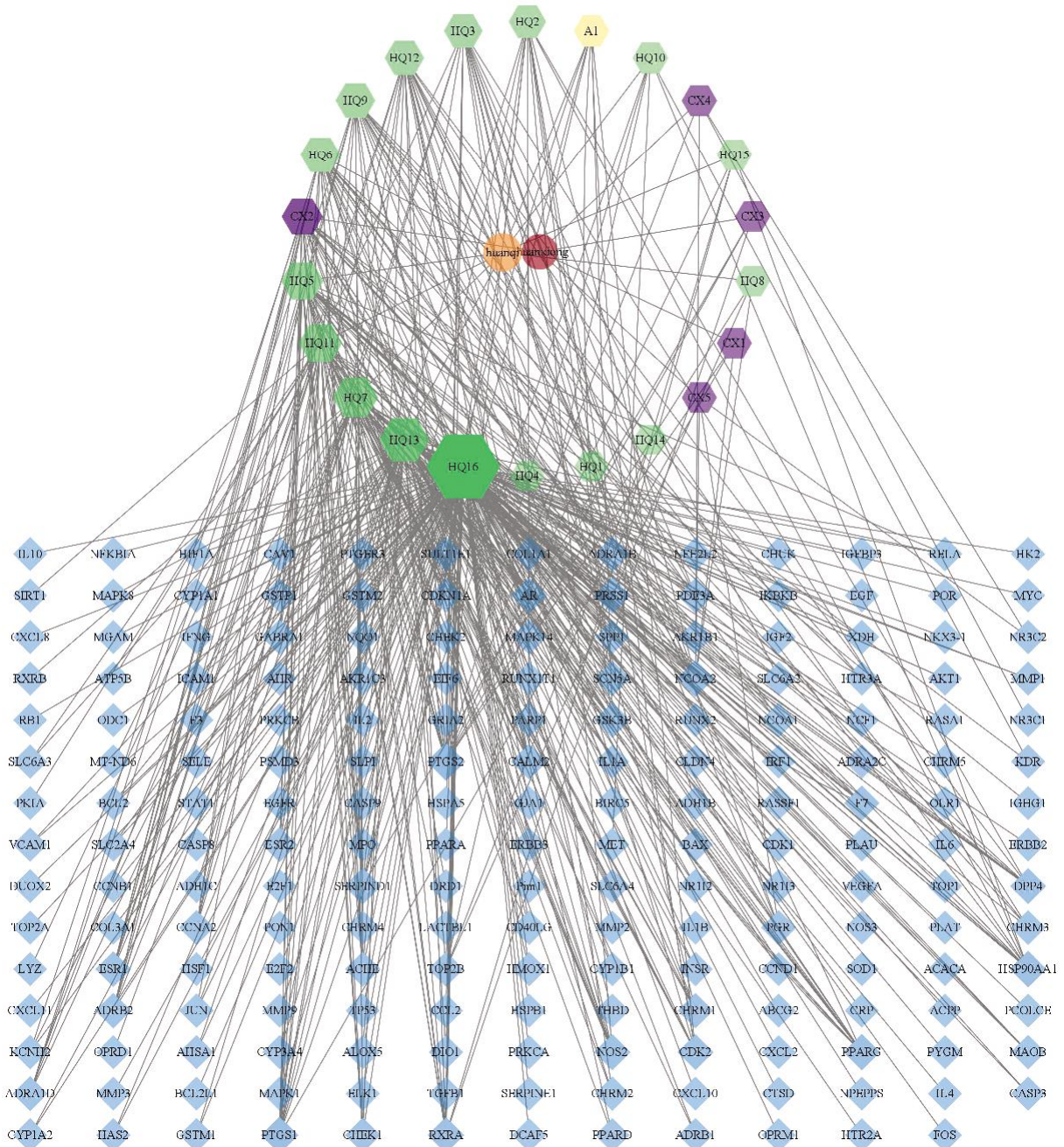


图 2 芎芪方药物-靶点网络

注:蓝色菱形节点代表作用靶点;绿色六边形节点代表黄芪的活性成分;紫色六边形节点代表川芎的活性成分;黄色圆形节点代表共同的活性成分;橘色圆形节点代表黄芪;红色圆形节点代表川芎;灰色线条代表相互作用关系。

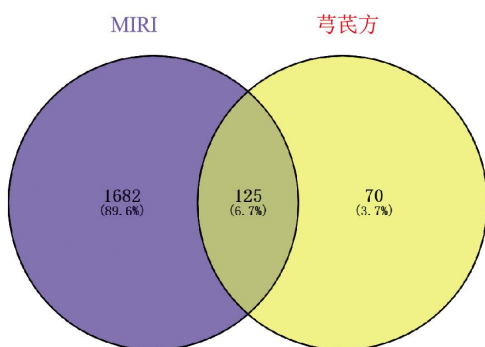


图 3 芎芪方与 MIRI 交集靶点基因韦恩图

3.4 芎芪方有效成分-MIRI 靶点-通路网络图的构建

运用 Cytoscape 3.9.1 构建芎芪方有效成分-MIRI 靶点-通路网络(图 10)。通过 Cytoscape 3.9.1 内置的 NetworkAnalyzer 分析芎芪方治疗 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 22,介度为 0.058,紧密度为 0.502,预测 PTGS2 为芎芪方治疗 MIRI 的重要靶点。

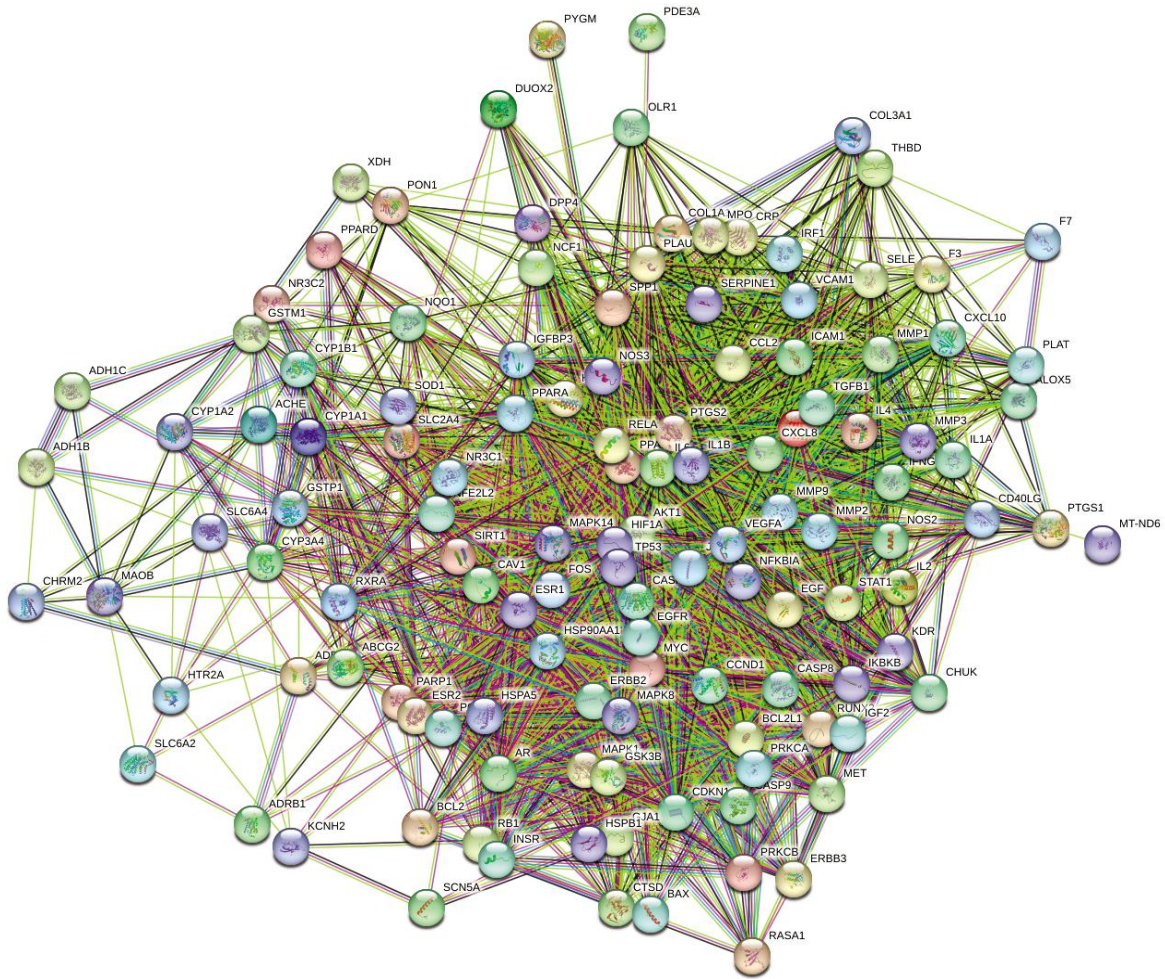


图 4 芎芪方与 MIRI 交集靶点基因 PPI 网络图

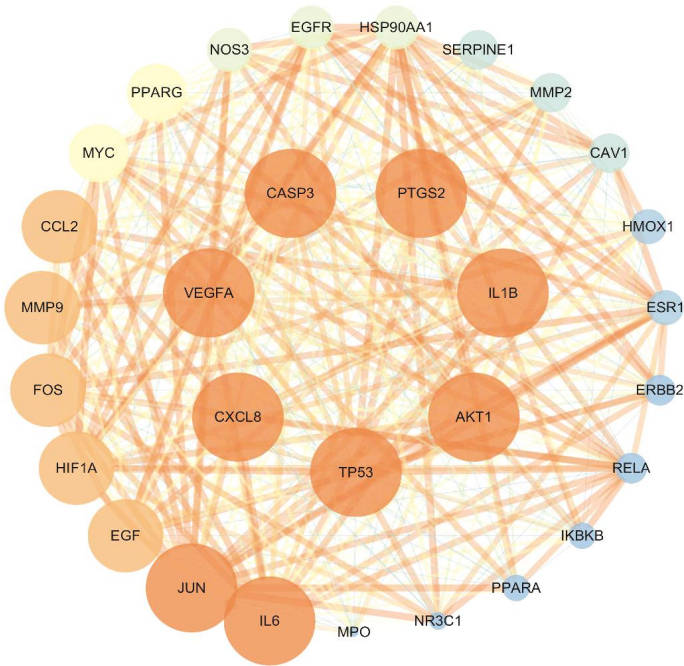


图 5 芎芪方治疗 MIRI 的核心靶点网络图

3.5 动物实验验证结果

3.5.1 芎芪方对 MIRI 大鼠心肌病理变化的影响 假手术组大鼠的心肌组织无明显异常;模型组血管充

血严重,心肌纤维排列紊乱且间隙扩大,局部呈波纹状或部分断裂,伴有炎性细胞点状浸润,心肌细胞结构模糊且排列紊乱;与模型组相比,芎芪方组大鼠心

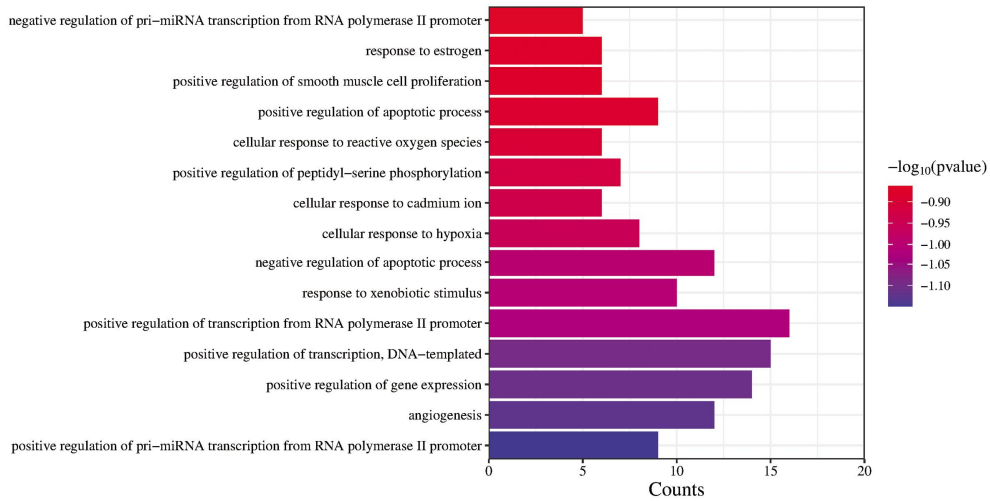


图 6 BP 功能富集分析结果

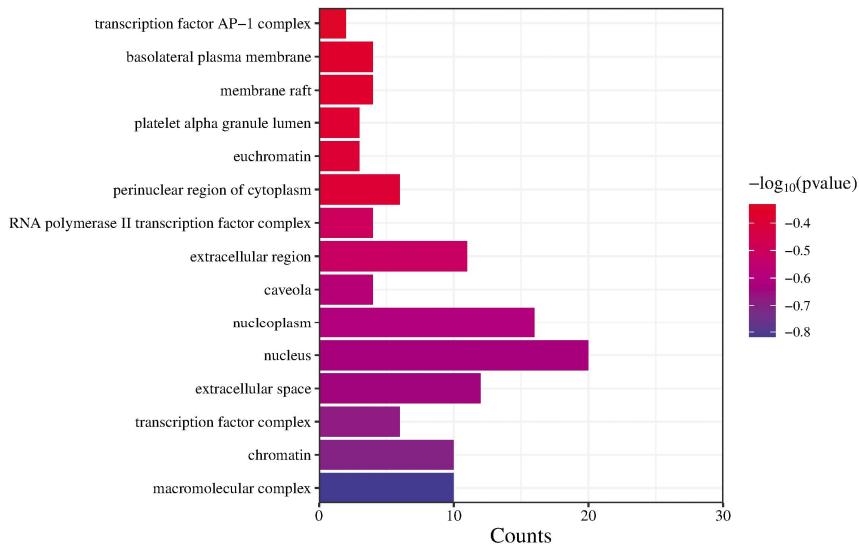


图 7 CC 功能富集分析结果

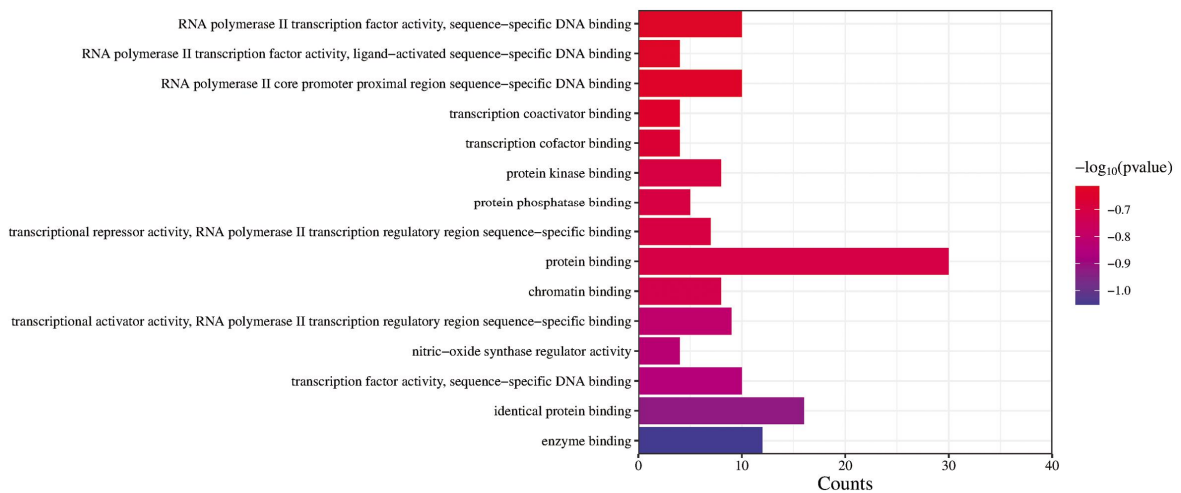


图 8 MF 功能富集分析结果

肌纤维紊乱、炎性细胞浸润、心肌细胞走形及血管充血情况有一定程度减轻。详见图 11。

3.5.2 芎芪方对 MIRI 大鼠血清 CK-MB、SOD、LDH、

MDA 表达的影响 与假手术组相比,模型组大鼠血清 CK-MB、LDH、MDA、TNF- α 、IL-6 含量均明显升高($P<0.01$),SOD 含量明显降低($P<0.01$);与模型组

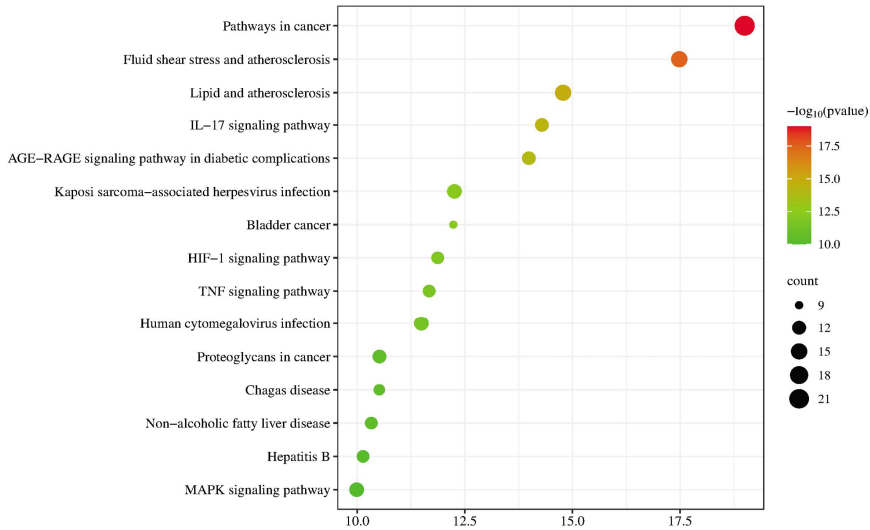


图 9 KEGG 通路分析结果

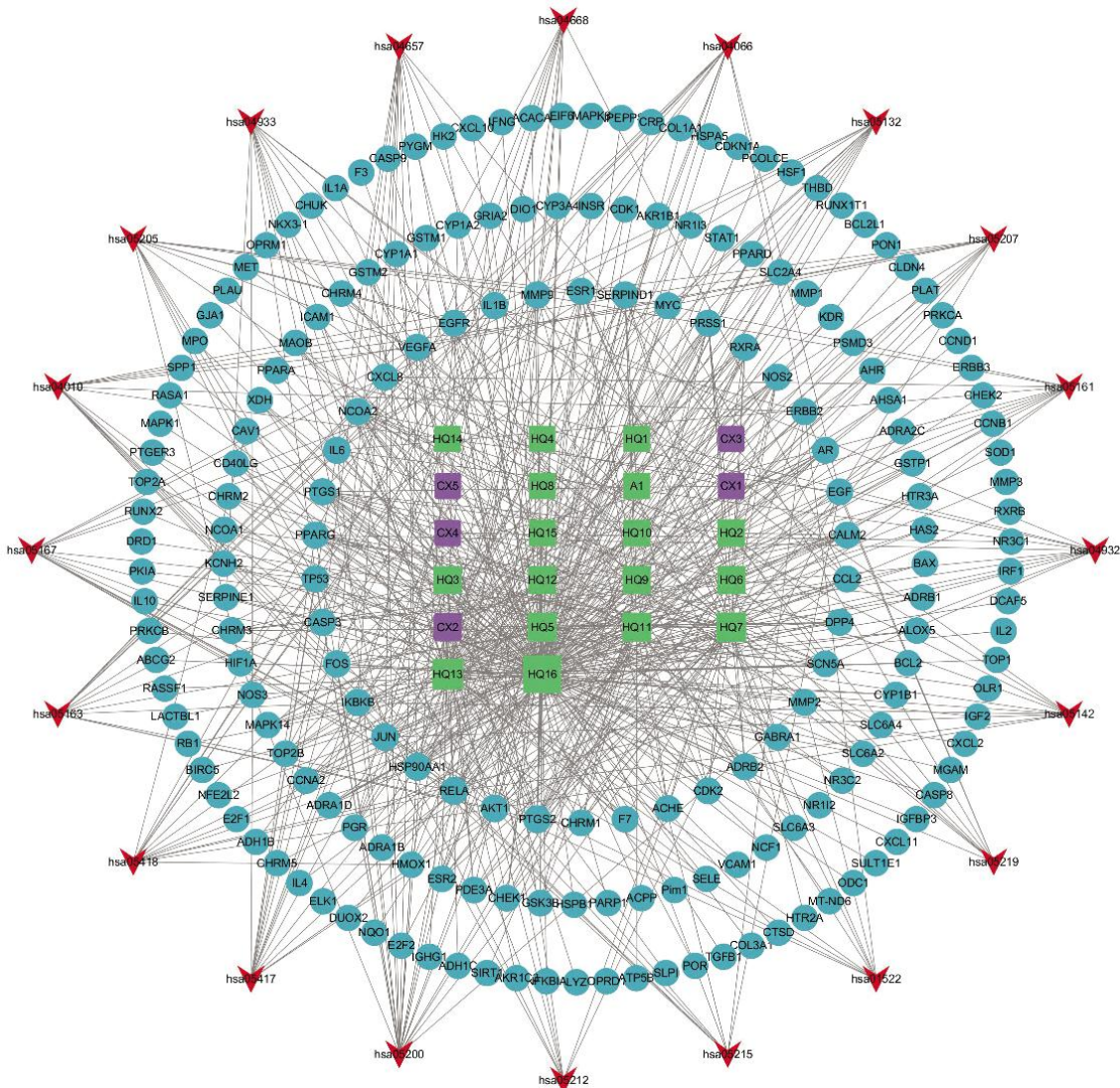


图 10 芎芪方治疗 MIRI 的 KEGG 信号通路关系网络

注:紫色正方形节点代表芎芪的活性成分;绿色正方形节点代表黄芪的活性成分;蓝色圆形节点代表作用靶点;红色倒三角节点代表疾病的作用通路;灰色线条代表相互作用关系。

相比,芎芪方组大鼠血清 CK-MB、LDH、MDA、TNF- α 、IL-6 含量明显下降($P<0.01$),SOD 含量明显升高

($P<0.01$)。详见表 2、图 12。

3.5.3 芎芪方对 MIRI 大鼠心肌组织 JUN 蛋白表达

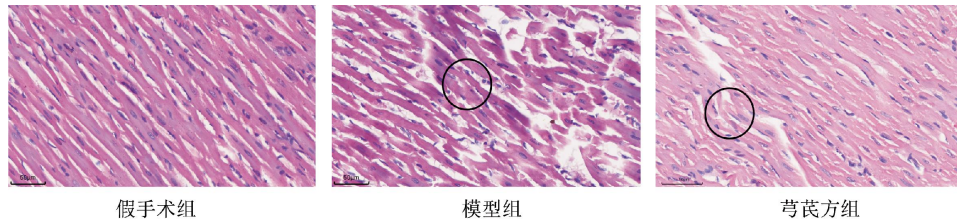
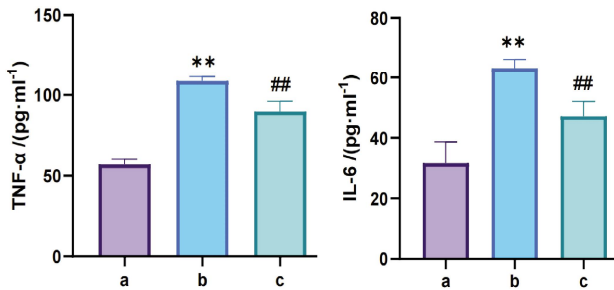


图 11 各组大鼠心肌组织损伤情况(HE,×400)

注:黑色圆圈部分为病理明显改变部位。

表 2 各组大鼠血清 CK-MB、SOD、LDH、MDA 水平比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	CK-MB/(U·L ⁻¹)	SOD/(U·L ⁻¹)	LDH/(U·L ⁻¹)	MDA/(nmol·L ⁻¹)
假手术组	76.56±4.13	653.90±10.22	134.49±22.06	6.17±0.11
模型组	228.71±20.25**	423.85±14.52**	486.45±14.19**	10.09±0.41**
芎芪方组	123.67±2.34 [#]	579.15±18.22 [#]	234.23±13.68 [#]	8.26±0.16 [#]

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。图 12 芎芪方对 MIRI 大鼠血清 TNF- α 、IL-6 表达的影响注:a.假手术组;b.模型组;c.芎芪方组。与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

的影响 与假手术组比较,模型组大鼠 JUN 蛋白表达显著上调($P<0.01$);与模型组比较,芎芪方组大鼠 JUN 蛋白表达明显减少($P<0.01$)。详见图 13。

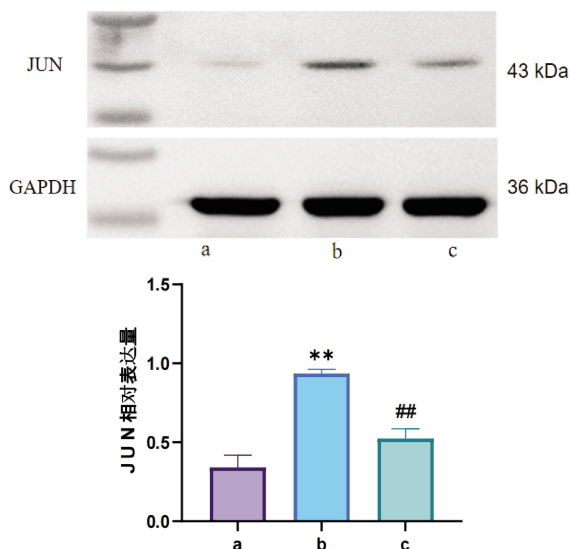


图 13 各组大鼠心肌组织 JUN 蛋白表达比较

注:a.假手术组;b.模型组;c.芎芪方组。与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.01$ 。

4 讨论

中医学根据 MIRI 的临床症状将其归为“胸痹”“真心痛”“心悸”范畴,“血脉痹阻”为其基本病机,其病理性质为本虚标实,以气虚为本,以血瘀为标。电子医疗数据分析、横断面调查等研究提示气虚血瘀为冠心病临床主要证型^[13]。清代王清任《医林改错·论抽风不是风》记载:“元气既虚,必不能达于血管,血管无气必停留为瘀。”临床常以益气活血法治疗气虚血瘀证,芎芪方中黄芪与川芎相配,气旺则血行,活血而不伤正,共奏益气活血之功。

本研究结果显示,槲皮素、山柰酚、芒柄花素等活性成分与 MIRI 蛋白靶点相互作用最多,提示可能在防治 MIRI 过程中起到关键作用。有研究发现,槲皮素可通过抑制核因子 κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)通路,减轻 MIRI 过程中的炎症反应;下调细胞间黏附分子-1 表达,减少中性粒细胞浸润和上调蛋白激酶 C ϵ 的表达,减轻氧化应激反应^[14-15]。山柰酚可抑制张力蛋白同系物,提高 Akt 通路信号表达,降低细胞凋亡,进而保护 MIRI^[16]。芒柄花素可能通过上调核因子 E2 相关因子 2 与血红素氧合酶 1 的表达,减轻 MIRI 过程中的炎症反应和氧化应激水平^[17]。

PPI 网络显示,AKT1、IL-6、PTGS2、JUN 等可能是治疗 MIRI 的核心靶点。AKT1 是影响心肌细胞生理功能的核心靶点之一,激活 AKT1 可以调控相关通路,影响细胞的增殖、凋亡、自噬等过程^[18]。IL-6 与

炎症反应有关,可使中性粒细胞与血管内皮细胞发生黏附反应,诱导中性粒细胞渗出、浸润,损伤心肌细胞^[9]。PTGS2是前列腺素内源性过氧化物合酶(post-transcriptional gene silencing, PTGS)的两个异构酶之一,PTGS及其产物参与血压调节、炎症反应、凝血平衡等多种生理病理过程^[20]。JUN是激活蛋白-1(activator protein-1, AP-1)的组成部分,AP-1与炎症性疾病的发病进展有密切关系,多种生长因子、细胞因子可激活AP-1,活化的AP-1通过与含有佛波酯反应元件识别序列的靶基因结合,调控基因转录和蛋白质合成,参与调节细胞增殖、凋亡等生理病理过程^[21-22]。

GO及KEGG通路富集分析结果显示,芎芪方通过酶结合、蛋白质结合、转录因子活性、一氧化氮合成酶活性、细胞活性因子等过程参与MIRI的炎症和免疫反应,主要涉及HIF-1、TNF、AGE-RAGE及MAPK等信号通路。HIF-1信号通路中的HIF-1 α 在MIRI中有重要的作用,降低HIF-1 α 过表达可下调NF- κ B和胱天蛋白酶3表达,抑制炎症因子IL-6、IL-1 β 、TNF- α 的释放,抑制机体炎症反应和心肌细胞凋亡,而HIF-1 α 沉默会加重心肌细胞的损伤^[23]。TNF信号通路上的TNF- α 主要由巨噬细胞和T淋巴细胞产生,TNF- α 诱导大量中性粒细胞黏附心肌细胞,释放细胞毒性物质损害心肌细胞,参与缺血后的多种病理反应,包括心肌细胞水肿、炎症反应、细胞凋亡等^[24]。MAPK信号通路中的p38丝裂原活化蛋白激酶(p38 mitogen-activated protein kinase, p38MAPK)在细胞增殖、凋亡和炎症反应中起重要作用,心肌缺氧时产生的活性氧激活p38MAPK,与心肌细胞损伤密切相关,抑制p38MAPK蛋白磷酸化可减轻受损心肌组织细胞氧化应激和炎症反应^[25-26]。

综合网络药理学研究结果,发现炎症反应可能是MIRI过程中心肌损伤的主要机制之一,心肌细胞的正常生理功能依赖于促炎因子和抗炎因子之间的相互制约,在缺血心肌恢复灌注时,促炎因子IL-6、TNF- α 会过度表达,促进白细胞黏附、聚集、浸润,进而导致心肌细胞损伤^[27-28]。动物实验验证芎芪方与炎症反应靶点。实验结果显示,芎芪方能减轻MIRI大鼠心肌纤维紊乱损伤、炎性细胞浸润、心肌

细胞走形及血管充血情况;芎芪方能降低MIRI大鼠血清CK-MB、LDH、MDA的含量,升高SOD含量,提示芎芪方能有效抗MIRI;芎芪方能降低MIRI大鼠血清TNF- α 、IL-6的表达水平,提示芎芪方可能通过调控TNF- α 、IL-6等核心蛋白靶点,减轻血清炎症反应,从而保护缺血再灌注损伤心肌。芎芪方能降低MIRI大鼠心肌组织JUN蛋白的表达,可能通过影响AP-1抑制心肌炎性反应^[21-22]。

综上所述,本研究采用网络药理学方法探究芎芪方的有效活性成分及其治疗MIRI的潜在靶点和信号通路,并针对两者间的炎症反应靶点进行实验验证,发现芎芪方可能通过槲皮素、山柰酚、芒柄花素等活性成分作用于IL-6、TNF- α 、JUN等核心蛋白靶点,改善MIRI大鼠心室结构和功能,其机制可能与下调心肌炎性反应有关。课题组后续将进行芎芪方药物黄芪、川芎的配比研究,并进一步完善动物实验及细胞实验对关键信号通路加以验证。本研究体现了中医药防治MIRI的多靶点、多途径的治疗特点,为临床应用提供了新的理论支撑,为阐明芎芪方防治MIRI的潜在作用机制提供了新的方向和思路。

参考文献

- [1] 马丽媛,王增武,樊静,等.《中国心血管健康与疾病报告2022》要点解读[J].中国全科医学,2023,26(32):3975-3994.
- [2] JIA X J, SHAO W, TIAN S Q. Berberine alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting inflammatory response and oxidative stress: The key function of miR-26b-5p-mediated PTGS2/MAPK signal transduction[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2022, 60(1): 652-663.
- [3] NERI M, RIEZZO I, PASCALE N, et al. Ischemia/reperfusion injury following acute myocardial infarction: A critical issue for clinicians and forensic pathologists[J]. *Mediators of Inflammation*, 2017, 2017: 7018393.
- [4] 岳栋芳,李永芳.中药及其复方抗心肌缺血再灌注损伤的作用机制研究进展[J].*中药药理与临床*, 2022, 38(6): 224-239.
- [5] 胡旭东,彭木子,陈铭,等.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.
- [6] YIN B, HOU X W, LU M L. Astragaloside IV attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats via inhibition of calcium-sensing receptor-mediated apoptotic signaling pathways[J]. *Acta Pharmacologica Sinica*, 2019, 40(5): 599-607.

- [7] ZHANG D W, LIU J G, FENG J T, et al. Effects of effective components compatibility of aqueous extracts of *Salviae Miltiorrhizae* and *Rhizoma Chuanxiong* on rat myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Chinese Critical Care Medicine*, 2010, 22(2): 109–112.
- [8] 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.
- [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] 张月圆, 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] 陈 奇. *中药药理研究方法学*[M]. 3 版. 北京: 人民卫生出版社, 2011: 1261–1263.
- [13] 张婉勤, 吕仕超, 朱亚萍, 等. 冠心病气虚血瘀证的证候学研究现状[J]. *中医杂志*, 2021, 62(12): 1092–1096.
- [14] 李冬梅, 张元媛, 徐 丽, 等. 槲皮素对心肌缺血再灌注损伤的保护作用及机制研究[J]. *实用药物与临床*, 2016, 19(4): 410–413.
- [15] 汤 蕾, 彭易安, 胥甜甜, 等. PKC ϵ 信号通路介导槲皮素拮抗心肌细胞缺氧/复氧损伤[J]. *中国病理生理杂志*, 2013, 29(9): 1567–1572.
- [16] 邹小艳, 范香成, 田友清, 等. 木犀草素等抗心肌缺血/再灌注损伤及抑制脂代谢和细胞凋亡作用研究[J]. *南京中医药大学学报*, 2020, 36(3): 380–386.
- [17] 卢迎宏, 王 丹, 井海云, 等. 芒柄花素对大鼠心肌缺血再灌注损伤的影响及其机制[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(5): 1147–1151.
- [18] ZHENG Y J, GU S S, LI X X, et al. Berberine postconditioning protects the heart from ischemia/reperfusion injury through modulation of autophagy[J]. *Cell Death & Disease*, 2017, 8(2): e2577.
- [19] 李尧锋, 杨 欣, 朱 璨, 等. 基于网络药理学和分子对接分析薤白治疗心肌缺血再灌注损伤的作用机制[J]. *中国医院药学杂志*, 2020, 40(8): 885–891.
- [20] 杨 倩, 吕莉莉, 孙 蓉. 基于网络药理学的丹参川芎嗪注射液作用机制分析[J]. *中草药*, 2018, 49(11): 2606–2613.
- [21] 胡丽超, 周 红, 武 标, 等. c-Jun/AP-1 在因子 VIIa 促进 SW620 细胞增殖和迁移中的激活及其调控作用[J]. *江苏医药*, 2013, 39(7): 764–767.
- [22] 刘彦吉, 蒙光敏, 李贵雪, 等. 苗药“杆努尽烟”对慢性支气管炎大鼠肺组织 AP-1 因子表达的影响[J]. *中国医药科学*, 2023, 13(9): 18–21.
- [23] 韦 皓, 许玉霞, 秦 莉, 等. HIF-1 α 通过 TLR4/NF- κ B 信号通路对心肌缺血-再灌注大鼠心肌损伤的保护机制分析[J]. *临床和实验医学杂志*, 2019, 18(10): 1017–1020.
- [24] 刘媛媛, 田学峰, 霍 红, 等. 心肌缺血再灌注损伤患者血清 TNF- α 和 IL-10 水平变化及意义[J]. *中国医学前沿杂志(电子版)*, 2018, 10(1): 79–82.
- [25] YU D S, LI M W, TIAN Y Q, et al. Luteolin inhibits ROS-activated MAPK pathway in myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Life Sciences*, 2015, 122: 15–25.
- [26] 于 华, 曲 莉. 基于 p38MAPK/SERCA2 α 通路观察羟基红花黄色素 A 对大鼠心肌缺血/再灌注损伤的保护作用[J]. *中国免疫学杂志*, 2023, 39(7): 1395–1401, 1408.
- [27] 胡雅琪, 刘建和. 中医药调控 AMPK 信号通路治疗心肌缺血再灌注损伤研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(13): 213–221.
- [28] 张曾宇, 侯佳豪, 吴玲玲, 等. JAK2-STAT3 信号通路在心肌缺血再灌注损伤中的作用机制及其中医药防治机制进展[J]. *实用心脑血管病杂志*, 2023, 31(2): 135–140.

(本文编辑 周 旦)