

本文引用: 买买提明·买合木提, 乃比江·阿不拉, 海白尔·火加艾合买提, 马强强, 乃比江·麦图荪. 基于 UHPLC-Q-Orbitrap-MS 的爱维心口服液化学成分鉴定及其抗心肌缺血再灌注损伤的作用机制研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(7): 1210-1220.

基于 UHPLC-Q-Orbitrap-MS 的爱维心口服液化学成分鉴定及其抗心肌缺血再灌注损伤的作用机制研究

买买提明·买合木提^{1,3}, 乃比江·阿不拉¹, 海白尔·火加艾合买提^{1,2}, 马强强^{1,2}, 乃比江·麦图荪^{1,2,3*}

1.新疆和田学院新疆和田特色中医药研究重点实验室,新疆和田 848000;2.新疆和田学院新疆和田中药民族医药工程技术研究中心,新疆和田 848000;3.新疆和田学院基础医学院,新疆和田 848000

[摘要] **目的** 探讨爱维心口服液(AWX)缓解大鼠缺血再灌注心肌损伤的药效物质及保护作用。**方法** 采用 UHPLC-Q-Orbitrap-MS 对 AWX 的化学成分进行鉴定,并从 ETCM 数据库中获得其作用靶点;通过 GeneCards,OMIM 等数据查询库中筛选 MIRI 相关靶点;通过 STRING 数据库进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)分析,构建 PPI 网络。通过 David 数据库分析“AWX 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“AWX 成分-疾病-靶点”网络。75 只雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组以及 AWX 低(2 mL/kg)、中(4 mL/kg)、高剂量(8 mL/kg)组,连续药物干预 7 d 后采用左冠状动脉前降支结扎的方式建立大鼠模型,并继续灌胃 14 d 后腹主动脉取血。ELISA 检测大鼠血清乳酸脱氢酶(LDH)、肌酸激酶(CK)变化、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-6(IL-6)水平的变化;检测心肌组织丙二醛(MDA)、谷胱甘肽过氧化物酶(GPX)含量;HE 染色观察心肌病理改变;Western blot 和 TUNEL 等方法检测心肌细胞凋亡及相关蛋白表达水平。**结果** 从 AWX 中共推断鉴定出 52 个化学成分,其中筛选活性成分 22 个,药物疾病交集基因 109 个,其中蛋白激酶 B1(AKT1)、 β -胞质肌动蛋白(ACTB)、雌激素受体 1(ESR1)等靶点 AWX 治疗 MIRI 密切相关,富集分析预测 AWX 治疗 MIRI 主要涉及三羧酸循环等信号通路等。动物实验验证结果显示,与模型组相比,AWX 各剂量组 MIRI 大鼠心肌组织损伤程度减轻,线粒体形态改善,凋亡信号降低;AWX 中、高剂量组血清 LDH、CK、心肌组织 MDA 含量降低($P<0.05$, $P<0.01$),心肌组织 GPX 水平升高($P<0.05$, $P<0.01$);AWX 高剂量组血清 IL-6 水平明显降低($P<0.05$);AWX 中、高剂量组 MIRI 大鼠心肌组织 p-Akt/Akt1、BCL2/BAX 蛋白比值提高($P<0.05$)。**结论** AWX 通过多成分、多靶点、多通路发挥防治缺血再灌注大鼠心肌保护作用,尤其是可通过激活 AKT1,抑制心肌细胞凋亡,从而减少心肌细胞的丢失而发挥保护心肌作用。

[关键词] 心肌缺血再灌注损伤;爱维心口服液;化学成分;线粒体功能;细胞凋亡;心肌保护作用

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.07.003

Chemical components identification of Aiweixin oral liquid by UHPLC-Q-Orbitrap-MS and its protective mechanism of action against myocardial injury in ischemia-reperfusion rats

Maimaitiming Maimemuti^{1,3}, Naibijiang Abula¹, Haibai'er Huojia'ahemaiti^{1,2}, MA Qiangqiang^{1,2},
Naibijiang Maitusun^{1,2,3*}

1. Xinjiang Key Laboratory of Hetian Characteristic Chinese Medicine Research, Xinjiang Hetian College, Hetian, Xinjiang 848000, China; 2. Hetian Chinese Medicine and Ethnic Medicine Engineering Technology Research Center, Xinjiang Hetian College, Hetian, Xinjiang 848000, China; 3. School of Basic Medicine, Xinjiang Hetian College, Hetian, Xinjiang 848000, China

[Abstract] **Objective** To explore the pharmacodynamic substances and protective effects of Aiweixin (AWX) oral liquid in

[收稿日期]2025-03-04

[基金项目]和田地区本级技术与开发计划项目(202113);新疆和田学院校企合作项目(2024JSFW-08);新疆和田学院校级课题重点项目(2021XK12)。

[通信作者]* 乃比江·麦图荪,男,博士,副教授,E-mail:nabijanm@126.com。

alleviating myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in rats. **Methods** The chemical components of AWX were identified using UHPLC-Q-Orbitrap-MS, and its potential targets were obtained from the ETCM database. MIRI-related targets were screened from databases such as GeneCards and OMIM. Protein-protein interaction (PPI) analysis was conducted using the STRING database to construct a PPI network. The "AWX component-target" interactions, along with their involved biological processes and signaling pathways, were analyzed using the David database. An "AWX component-disease-target" network was constructed using Cytoscape 3.9.1 software. Seventy-five male SD rats were randomly divided into normal group, model group, and low- (2 mL/kg), medium- (4 mL/kg), and high-dose (8 mL/kg) AWX groups. After seven days of continuous drug intervention, a rat model was established by ligating the left anterior descending coronary artery, followed by another 14 days of intragastric administration. Blood samples were collected from the abdominal aorta. ELISA was used to determine changes in serum lactate dehydrogenase (LDH), creatine kinase (CK), interleukin-1 β (IL-1 β), and interleukin-6 (IL-6) levels in rats. The content of malondialdehyde (MDA) and glutathione peroxidase (GPX) in myocardial tissue was measured. HE staining was used to observe myocardial pathological changes, and Western blot and TUNEL methods were used to check myocardial cell apoptosis and related protein expression levels. **Results** A total of 52 chemical components were identified from AWX, of which 22 active components were screened. There were 109 intersecting genes between drug and disease targets. Targets such as Akt1, ACTB, and ESR1 were closely related to AWX treatment for MIRI. Enrichment analysis predicted that AWX treatment for MIRI mainly involved signaling pathways such as the tricarboxylic acid cycle. Animal experimental validation results showed that compared with the model group, the degree of myocardial tissue damage was reduced, the mitochondrial morphology was improved, and the apoptotic signals were reduced in the AWX groups at all doses. The levels of serum LDH, CK, and MDA content in myocardial tissue decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the level of GPX in myocardial tissue increased in the medium- and high-dose AWX groups ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Compared with the model group, the serum IL-6 level significantly decreased in the high-dose AWX group ($P < 0.05$). The protein expression ratios of p-Akt/Akt1 and BCL2/BAX in the myocardial tissue of MIRI rats increased in the medium- and high-dose AWX groups compared with the model group ($P < 0.05$). **Conclusion** AWX exhibits myocardial protective effects against ischemia-reperfusion injury through multiple components, targets, and pathways. In particular, it can activate Akt1 and inhibit myocardial cell apoptosis, thereby reducing the loss of myocardial cells and exerting protective effects on the myocardium.

[**Keywords**] myocardial ischemia-reperfusion injury; aiweixin oral liquid; chemical component; mitochondrial function; apoptosis; cardioprotective effect

心肌缺血-再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)是缺血心肌得到血液再灌注后,功能未得到恢复,反而使心肌损伤加重,出现心律失常、梗死面积扩大等一系列病情恶化的现象^[1]。缺血再灌注一般在包括创伤、血栓溶解治疗、血管收缩后再流、经皮冠状动脉腔内成形术、器官移植、低容量休克和复苏等多种情况下都会发生^[2-3]。MIRI是全球人类死亡的主要原因之一,其原因是冠状动脉阻塞的关键时期后血液的恢复,而这与心脏功能异常密切相关,尤其是心肌梗死、左心室重塑和心力衰竭^[4]。MIRI发病机制包括氧自由基、心肌细胞能量代谢障碍、炎症、钙超载、蛋白激酶活化和细胞凋亡等多种因素有关^[5-6]。

中药通过其所含多靶点生物活性成分所介导的系统性效应,长期以来在控制再灌注损伤及相关病理方面展现出了有效性^[7-8]。爱维心口服液(AWX)是根据新疆民族医药名医著作记载内容改进研制的制剂,具有调节气质、生津祛邪、平衡体液、强心醒脑、通络行血、滋补五脏的作用,临床上广泛应用于治疗冠心病、心律失常、失眠、神经衰弱等疾病^[9-10]。

有研究报道,AWX保护缺血再灌注大鼠模型心肌损伤的作用^[11],但其化学成分不明,作用机制不清。因此,本研究采用UHPLC-Q-Orbitrap-MS技术系统鉴定AWX的化学成分,运用网络药理学技术预测其潜在作用靶点并通过动物实验对相关靶点进行实验验证。在此基础上,进一步观察AWX对MIRI模型大鼠心肌的保护作用,以阐明其防治MIRI的作用机制,为该制剂的临床应用提供科学依据。

1 材料

1.1 试药与试剂

甲酸、甲醇、乙腈(美国赛默飞世尔科技公司,批号:A452-4、A998-4、A117-50);绿原酸(上海纯优生物科技有限公司,批号:13062403);异槲皮苷、原儿茶酸(中国食品药品检定研究院、批号分别为:111809-201804、111520-200504);新绿原酸、隐绿原酸、对香豆酸、咖啡酸对照品(北京北纳创联生物技术研究院,批号分别为:18031001、18032403、130316、130305,纯度 $\geq 98\%$);木犀草苷(成都普菲德生物技术有限公司,批号:151111,纯度 $\geq 98\%$);AWX(新疆新

维制药厂,批号:20240309);BCA 蛋白浓度测定试剂盒(沈阳万类生物,货号:WLA006),重组抗 Bax 抗体(Abcam 公司,货号:ab32503),重组抗 Bcl-2 抗体(Abcam 公司,货号:ab185002), β -actin 一抗(翌圣生物科技有限公司,批号:20240729);肌酸激酶同工酶(creatine kinase isoenzyme-MB, CK-MB)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)(上海酶联生物科技有限公司,批号:ml076417、ml076593);脂质过氧化检测试剂盒、大鼠 IL-1 β ELISA 试剂盒、大鼠 IL-6 ELISA 试剂盒、谷胱甘肽过氧化物酶(BioTNT 公司,货号:BR5000276、A1010A0301b、A1010A0306、A3010S0408);氯仿(AR 级,中国医药集团公司);TUNEL 细胞凋亡检测试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司,货号:C1086)。

1.2 主要仪器

UltiMate 3000 型超高效液相色谱仪(美国戴安公司);Q-Exactive 高分辨质谱仪(美国赛默飞世尔公司);ELX-800 酶标仪(美国 BIOTEK 公司);H-2050R 超速冷冻离心机(湖南湘仪)。

2 方法

2.1 基于 UHPLC-Q-Orbitrap-MS 的 AWX 化学成分分析

2.1.1 色谱条件 Waters SunFire C₁₈ 色谱柱(4.6 mm \times 250 mm;5 μ m),流速 1.0 mL/min;柱温 35 $^{\circ}$ C;进样量 10 μ L。流动相:乙腈(A);0.1%甲酸水溶液(B)。梯度洗脱:0~10 min,15%~30%A;10~25 min,30%~70%A;25~30 min,70%~90%A。

2.1.2 质谱条件 采用电喷雾离子源(ESI),辅助气和离子传输管温度分别为 300、350 $^{\circ}$ C,辅助气体积流量 10 arb;正离子模式下鞘气体积流量 40 arb,喷雾电压 3.5 kV;负离子模式下喷雾电压 2.8 kV,鞘气体积流量 38 arb。采用正、负离子同时扫描的 Full MS/dd-MS² 模式,其中包括 Full MS 分辨率 70 000,dd-MS² 分辨率 17 500,碰撞能量 20、40、60 eV,扫描范围 m/z 100~1 500。

2.1.3 溶液制备 将新疆新维制药厂生产的 AWX 精密吸取 1.0 mL,加 9.0 mL 纯甲醇,用 0.22 μ m 的滤膜过滤,置于液相瓶,备用。称取各对照品化合物 1.0 mg,加入 1 mL 甲醇超声 1 min,利用甲醇将样品稀释至 1 μ g/mL,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

2.1.4 质谱数据分析 基于 ChemSpider、PubChem 和 ChemicalBook 数据库中的化合物信息,本研究根据 AWX 的高分辨质谱数据中的准分子离子和加合离子信息,推测高分辨质谱的精确相对分子质量。通过选择相对分子质量误差(δ)在 5 ppm 以内的化

合物,利用 Xcalibur 4.2 软件拟合计算分子式,从而实现对其化学成分分子式的初步推测。在此基础上,结合对照品和相关文献数据,对色谱峰进行指认。

2.2 基于网络药理学的 AWX 治疗 MIRI 的作用机制研究

2.2.1 AWX 主要活性成分和靶标蛋白筛选 根据成分鉴定结果,将鉴定出来的 AWX 化学成分导入 ETCM(<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/Index/index.html>)数据库,获得各有效成分的药物相关靶点(活性成分与候选药物靶点 the prediction confidence index>0.8)。建立 AWX 的主要有效成分数据库,并通过 Swiss target(<http://www.swisstarget prediction.ch>)对 AWX 化学成分的作用靶点进行预测,规范名称,去除重复靶点)得到 AWX 的活性成分靶点。

2.2.2 AWX 治疗 MIRI 的潜在作用靶点预测 在 GeneCards(<https://www.genecards.org>)和 OMIM(<https://omim.org>)依次检索关键词“Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury”和“Coronary heart disease”,得到 MIRI 及冠心病相关的疾病靶点,并对数据进行过滤,GeneCards 数据库得到的靶点设置参数 Category 为 Protein Coding。得到疾病相关的作用靶点,并与预测得到的 AWX 活性成分的作用靶点取交集,在 Venny 2.1.0 制图平台绘制心肌缺血和 AWX 的交集靶点。

2.2.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI)网络的构建 将 AWX 治疗 MIRI 的潜在作用靶点导入 STRING 12.0(<https://cn.string-db.org>)限定物种为“Homo sapiens”将筛选后的结果保存为 TSV 格式。为了进一步更好地理解 AWX、成分与其相应靶点之间的相互作用关系,选择 degree 值高的靶点导入 Cytoscape 3.9.1 软件,构建 PPI 网络图,进行可视化分析。

2.2.4 富集分析 利用 R 语言包“clusterProfiler”对收集的关键靶点进行 GO 注释和 KEGG 功能富集,设定 $P<0.05$ 为显著富集条目/通路,利用 R 语言包“ggplot2”对富集结果可视化,分析得到 AWX 治疗 MIRI 的作用机制。

2.3 动物实验

2.3.1 动物分组及干预 SD 大鼠,体质量(200 \pm 20) g,购于新疆医科大学实验动物中心[动物许可证号:SYSK(新)2020-003]。本实验经新疆医科大学实验动物伦理委员会批准(伦理批号:IACUC-JT-20230424-24)。将 75 只大鼠按照随机数字表法分为正常组、MIRI 组、AWX 低剂量(2 mL/kg)、AWX 中剂量(4 mL/kg)、AWX 高剂量(8 mL/kg)组,每组 15 只。按照先给药干预,再进行造模同时继续给药干预的方式进行实验。AWX 组分别灌胃 2、4、8 mL/kg AWX;正常组和

MIRI 组灌胃等体积生理盐水,每天1次,连续干预7 d。从第8天用2%戊巴比妥麻醉,仰卧固定在手术台上,气管插管并连接小动物呼吸机,打开胸腔并显露左冠状动脉前降支,结扎30 min使心肌缺血。观察左侧心肌壁颜色变化,并连接心电图机进行检测。当心电图显示ST段出现弓背型抬高,QRS波群发生变化,以及J点偏移超过0.1 mV时,可作为结扎的标志。在结扎操作进行30 min后,放松扎线,心电图上ST段回落至原始高度的一半,是再灌注成功的一个标志。在再灌注持续120 min后,形成再灌注模型,模型成功后连续给药14 d。

2.3.2 动物样本取材 通过腹主动脉采集血液样本,以3 000 r/min离心10 min,收集上层血清用于后续的指标检测。使用生理盐水对心脏进行冲洗,随后取出完整的心脏,解剖缺血部位的心肌组织,用生理盐水清洗后分为两份,将一部分用4%的多聚甲醛溶液进行固定处理,另一部分立即放在液氮,1 h后于-80 °C保存。

2.3.3 HE染色观察心肌组织病理变化 将固定后的心肌组织依次在不同浓度的乙醇溶液中进行梯度脱水处理,随后在二甲苯中进行透明化处理,最终进行浸蜡包埋以形成组织块。对形成的组织块进行连续切片,并将切片平铺后使用载玻片进行捞取。切片烘干后进行脱蜡和复水处理,接着进行HE染色,最后进行封片处理。在光学显微镜下对处理后的组织切片进行观察分析。

2.3.4 扫描电镜观察心肌组织超微结构变化 大鼠处理1~3 min内从新鲜的心肌组织中取样,心肌组织切成2 mm×2 mm大小,用2.5%戊二醛固定液内固定。并电镜观察心肌组织超微结构变化。

2.3.5 TUNEL法测定细胞凋亡 将包埋好的大鼠心肌组织蜡块进行切片、烤片和脱蜡处理后,用去离子水轻轻润洗切片,用滤纸吸干玻片上样本周围多余液体,接着进行荧光素和原位细胞死亡检测试剂盒说明进行TUNEL染色,在荧光显微镜下观察采集图像。

2.3.6 ELISA检测大鼠血清LDH、CK-MB、IL-6、IL-1 β 水平 从-80 °C冰箱中提取保存的大鼠血清样本,并依照特定ELISA试剂盒的操作规程,精确测定大鼠血清中的CK-MB、LDH、IL-6和IL-1 β 等指标水平。

2.3.7 检测心肌组织中MDA、GPX水平 称取100 mg动物组织,加入1 mL生理盐水,制成组织匀浆。将匀浆液置于8 000 g、4 °C离心10 min,取上清液,置冰上待测,检测方法按试剂盒说明书进行。

2.3.8 Western blot检测心肌组织中蛋白表达水平 MIRI心肌组织用液氮冷冻后加入RIPA裂解液,

提取组织中的蛋白后采用BCA试剂盒检测总蛋白含量,按照总蛋白20 μ g取蛋白样本进行Western blot检测。蛋白样本与上样缓冲液混合后进行电泳及电转膜,PVDF膜在5%脱脂牛奶中室温封闭2 h后放入1:1 000稀释的Bax、Bcl-2、Akt1、一抗,4 °C孵育过夜;第2天,洗膜3遍后放入1:3 000稀释的二抗、室温孵育1 h,最后在化学发光成像仪中曝光得到蛋白条带,采用ImageJ2X软件扫描条带灰度值,根据蛋白灰度值与 β -actin灰度值的比值计算蛋白表达量。

2.3.9 统计学分析 数据分析采用GraphPad prism 7.0软件进行数据资料的统计学处理,服从正态分布的计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,各组间计量资料比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 基于UHPLC-Q-Orbitrap-MS的AWX化学成分分析

通过与对照品对比保留时间(t_R),一级和二级碎片信息,并结合现有文献资料以及质谱裂解规律进行综合分析,从AWX中共推断鉴定出52个化合物,按照化合物结构特征进行分类,包括11个有机酸、30个黄酮、2个香豆素类和9个其他成分。详见表1和图1。

3.2 基于网络药理学的AWX治疗MIRI的作用机制研究

3.2.1 AWX活性成分靶点的筛选 利用ETCM数据库(<http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php/Home/Index/index.html>)依次检索活性成分的药物靶点,其中有27种活性成分获得药物靶点176个(活性成分与候选药物靶点the prediction confidence index>0.8),在GeneCards(<https://www.genecards.org>)和OMIM(<https://omim.org>)依次检索心肌缺血再灌注和冠心病等关键词,得到疾病相关的靶点,两个数据库的并集共得到7 585个疾病靶点。根据检索出的AWX中各活性成分靶点和疾病靶点,取交集靶点,获得共有靶点109个(图2A)。利用Cytoscape 3.9.1软件构建AWX“成分-作用靶点-疾病”互动网络。图中红色正方形代表疾病,绿色三角形代表27个化学成分,蓝色圆形代表为交集靶点(图2B)。

3.2.2 PPI网络构建及核心靶点筛选 将交集靶点导入STRING数据库(<https://string-db.org>)进行PPI分析,预测AWX治疗MIRI的PPI预测见图3A。以上网络中选择有互作关系102个靶点,TSV文件导入Cytoscape 3.9.1软件绘制PPI网络,102个关键靶点存在互作关系,置信度为0.4 (medium confidence=

表 1 AWX 正、负离子模式下的化学成分鉴定

Table 1 Chemical component identification of AWX in positive and negative ion modes

序号	t_R /min	质荷比/(m/z)	分子式	离子化模式	误差/ppm	化合物	种类
1	2.02	136.061 46	C ₅ H ₅ N ₅	[M+H] ⁺	-2.29	腺嘌呤	其他
2	2.56	123.055 17	C ₆ H ₆ N ₂ O	[M+H] ⁺	-0.99	烟酰胺	其他
3	2.62	341.109 13	C ₁₂ H ₂₂ O ₁₁	[M-H] ⁻	0.57	蔗糖	其他
4	2.86	137.045 49	C ₅ H ₄ N ₄ O	[M+H] ⁺	-2.21	次黄嘌呤	其他
5	2.94	124.039 17	C ₆ H ₅ NO ₂	[M+H] ⁺	-1.1	烟酸	其他
6	3.97	169.014 28	C ₇ H ₆ O ₅	[M-H] ⁻	0.21	没食子酸	有机酸
7	4.78	167.034 99	C ₈ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	0.04	羟基扁桃酸	有机酸
8	5.51	153.019 35	C ₇ H ₆ O ₄	[M-H] ⁻	0.11	龙胆酸	有机酸
9	5.53	109.029 47	C ₆ H ₆ O ₂	[M-H] ⁻	-0.28	邻苯二酚	其他
10	6.52	353.088 29	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	4.47	绿原酸 [▲]	有机酸
11	6.86	353.088 26	C ₁₆ H ₁₈ O ₉	[M-H] ⁻	4.38	隐绿原酸 [▲]	有机酸
12	7.24	137.024 46	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	0.31	二羟基苯甲醛	其他
13	7.91	179.034 97	C ₉ H ₈ O ₄	[M-H] ⁻	-0.05	咖啡酸 [▲]	有机酸
14	9.32	609.147 28	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	3.72	芦丁 [▲]	黄酮
15	9.59	431.099 03	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	-0.14	芹菜素-C-己糖苷	黄酮
16	9.96	609.147 34	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	3.82	木犀草素-O-二己糖苷	黄酮
17	10.04	173.081 91	C ₈ H ₁₄ O ₄	[M-H] ⁻	-0.13	辛二酸	有机酸
18	10.21	463.088 71	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₂	[M-H] ⁻	0.63	异槲皮素 [▲]	黄酮
19	10.29	447.094 09	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	0.02	木犀草素 [▲]	黄酮
20	10.58	163.040 07	C ₉ H ₈ O ₃	[M-H] ⁻	-0.55	香豆酸	有机酸
21	10.73	593.152 11	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	3.37	山柰酚-O-脱氧己糖苷-己糖苷或同分异构体 1	黄酮
22	11.13	609.147 09	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₆	[M-H] ⁻	1.62	槲皮素-O-脱氧己糖苷-己糖苷	黄酮
23	11.21	447.094 06	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	1.72	山柰酚-O-己糖苷	黄酮
24	11.59	161.024 46	C ₉ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	-0.72	羟基香豆素	香豆素
25	11.68	447.093 72	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	0.58	紫云英苷 [▲]	黄酮
26	11.94	447.093 66	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₁	[M-H] ⁻	3.28	槲皮素-O-脱氧己糖苷	黄酮
27	11.96	479.104 11	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₂	[M+H] ⁺	-2.09	异鼠李素-O-己糖苷	黄酮
28	12.18	431.098 72	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	-0.14	芹菜素-O-己糖苷	黄酮
29	12.45	435.130 07	C ₂₁ H ₂₄ O ₁₀	[M-H] ⁻	3.43	根皮苷	黄酮
30	12.68	593.152 16	C ₂₇ H ₃₀ O ₁₅	[M-H] ⁻	3.48	山柰酚-O-脱氧己糖苷-己糖苷或同分异构体 2	黄酮
31	12.83	417.083 47	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	[M-H] ⁻	1.78	山柰酚-O-脱氧己糖苷或同分异构体 1	黄酮
32	13.33	417.083 22	C ₂₀ H ₁₈ O ₁₀	[M-H] ⁻	1.2	山柰酚-O-脱氧己糖苷或同分异构体 2	黄酮
33	13.42	187.097 53	C ₉ H ₆ O ₂	[M-H] ⁻	-0.42	壬二酸	有机酸
34	13.78	431.098 82	C ₂₁ H ₂₀ O ₁₀	[M-H] ⁻	1.03	阿福豆苷	黄酮
35	15.18	593.185 79	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	-1.16	刺槐素-O-脱氧己糖苷-己糖苷或同分异构体 1	黄酮
36	15.35	317.064 73	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	[M+H] ⁺	-2.69	异鼠李素 [▲]	黄酮
37	15.44	593.185 85	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₄	[M-H] ⁻	-1.06	刺槐素-O-脱氧己糖苷-己糖苷或同分异构体 2	黄酮
38	15.95	303.049 13	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	[M+H] ⁺	-2.63	槲皮素 [▲]	黄酮
39	16.15	263.129 09	C ₁₅ H ₂₀ O ₄	[M-H] ⁻	0.78	脱落酸	其他
40	16.28	147.043 82	C ₉ H ₆ O ₂	[M+H] ⁺	-1.58	香豆素	香豆素
41	16.47	445.114 38	C ₂₂ H ₂₂ O ₁₀	[M-H] ⁻	1.63	金合欢素-O-己糖苷	黄酮
42	16.64	285.040 62	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M-H] ⁻	-0.52	木犀草素 [▲]	黄酮
43	16.82	257.080 38	C ₁₅ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	-1.75	松属素	黄酮
44	17.98	137.024 41	C ₇ H ₆ O ₃	[M-H] ⁻	-0.02	水杨酸	有机酸
45	18.77	269.045 87	C ₁₅ H ₁₀ O ₅	[M-H] ⁻	0.12	芹菜素 [▲]	黄酮
46	19.17	287.054 29	C ₁₅ H ₁₀ O ₆	[M+H] ⁺	-2.53	山柰酚 [▲]	黄酮
47	19.28	301.070 19	C ₁₆ H ₁₂ O ₆	[M+H] ⁺	-1.57	香叶木素	黄酮
48	20.17	287.221 71	C ₁₆ H ₃₂ O ₄	[M-H] ⁻	0.08	二羟基棕榈酸	有机酸
49	20.50	229.144 71	C ₁₂ H ₂₂ O ₄	[M-H] ⁻	0.79	十二烷二酸	其他
50	21.04	269.080 41	C ₁₆ H ₁₂ O ₄	[M+H] ⁺	-1.57	芒柄花黄素	黄酮
51	23.41	403.138 55	C ₂₁ H ₂₂ O ₈	[M+H] ⁺	-0.48	川陈皮素	黄酮
52	23.58	283.061 37	C ₁₆ H ₁₂ O ₅	[M-H] ⁻	-1.26	金合欢素	黄酮

注: t_R 为保留时间;▲与对照品比对后确定。

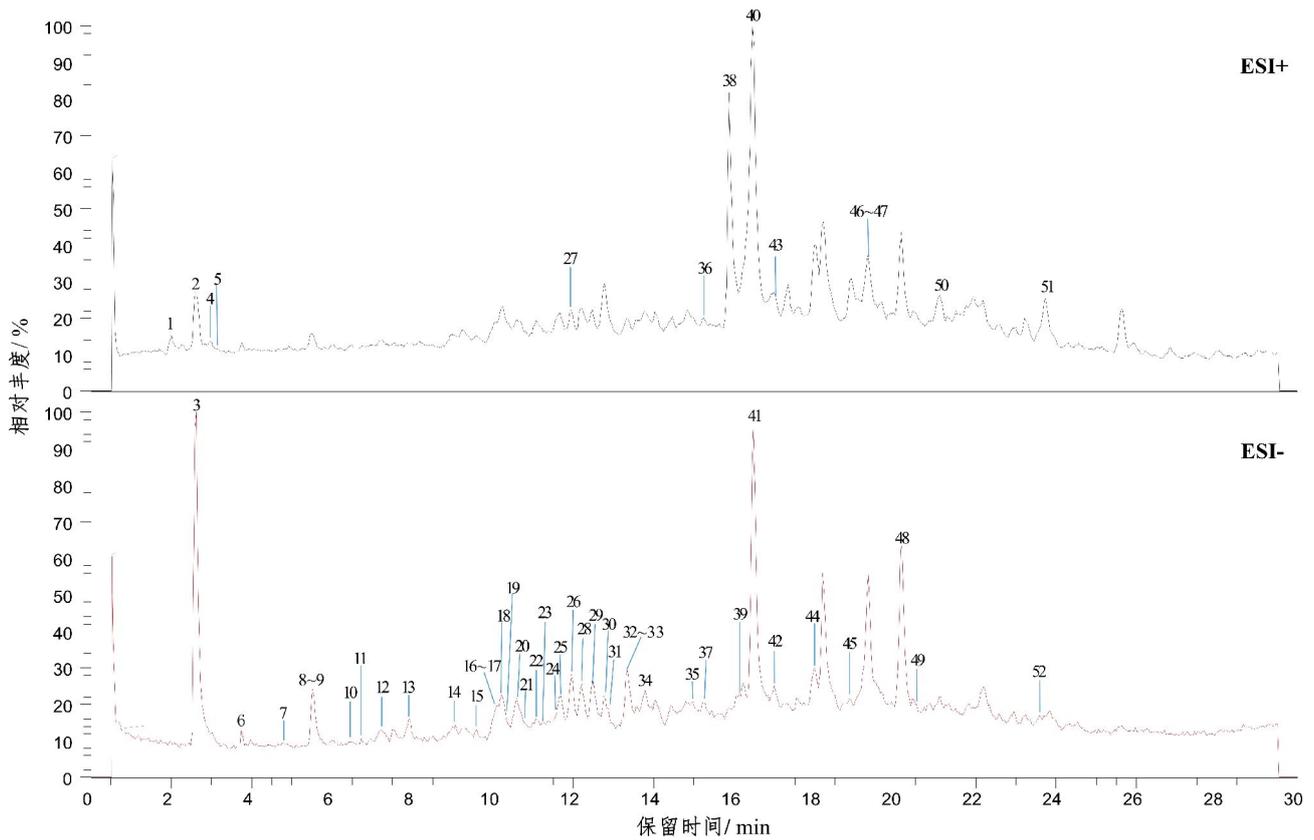


图 1 AWX 在正、负离子模式下总离子流图

Fig.1 Total ion chromatograms of AWX in positive and negative ion modes

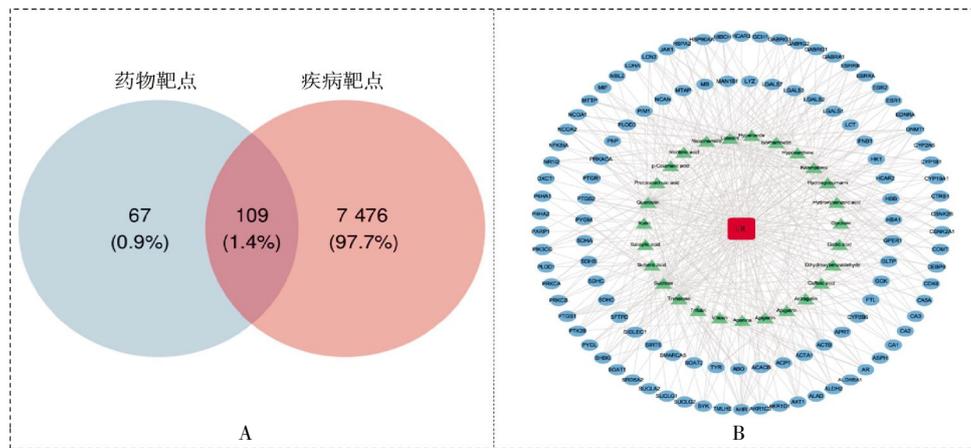


图 2 AWX 网络药理分析图

Fig.2 Network pharmacology analysis diagram of AWX

注:A.AWX-疾病靶点韦恩图;B.成分-疾病-靶点网络图。

0.4), 去除离散蛋白, 得到 PPI 网络图(图 3B), 该网络一共包含 102 个节点, 438 条边, 其中 AKT1、ACTB、ESR1、HSP90AA1 是核心靶点, 4 个核心靶点互作网络图和各关键靶点蛋白的 Alpha Fold 模型如图 4。

3.2.3 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析 在 GO 富集分析中, 富集到 547 条生物过程(biological process, BP)、34 条细胞组分(cellular component, CC)、121 条分子功能(molecular function, MF)。以 $P < 0.05$

为筛选条件, 取前 10 个 GO 条目绘制图, 结果见图 5。GO 功能分析结果显示, 主要生物过程包括细胞对肽的响应、一氧化氮生物合成过程、花生四烯酸代谢过程、细胞内受体信号传导途径、三羧酸循环等, 主要涉及的细胞组分包括氧化还原酶复合体、神经元投射、GABA 受体复合体等, 主要分子功能包括核受体活性、雌激素反应元件结合、氧化还原酶活性、碳水化合物结合、血红素结合、类固醇结合、铁离子结合和氧化还原酶活性、涉及分子氧的结合或还原等。

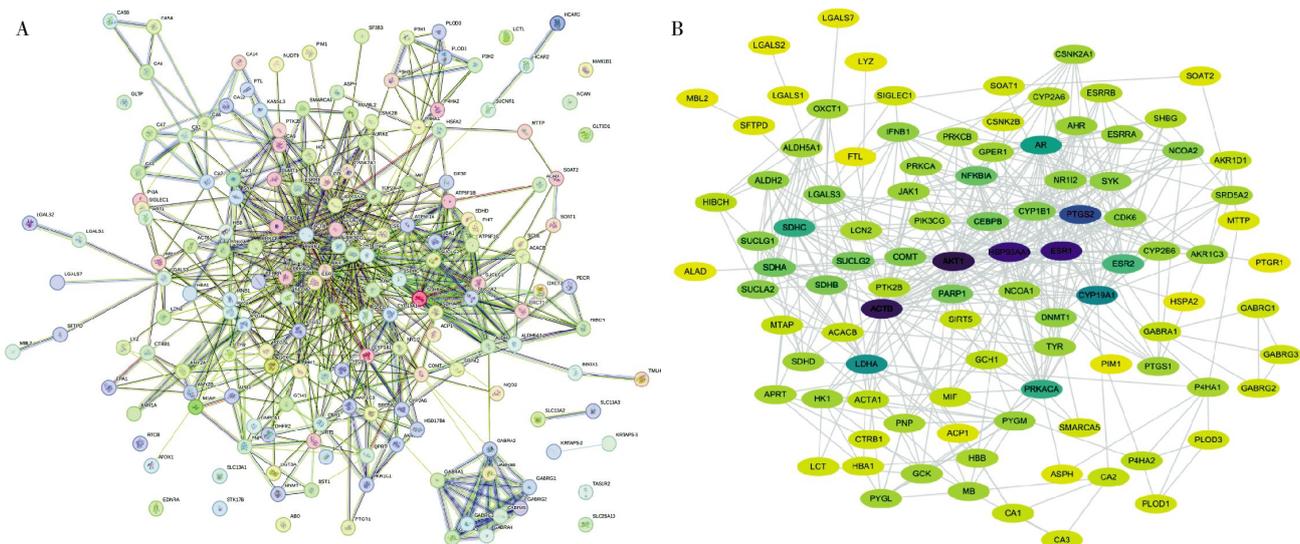


图 3 AWX 的 PPI 网络图

Fig.3 PPI network diagram of AWX

注:A.AWX 成分干预靶点的 PPI 图;B.交集靶点 PPI 网络图,节点颜色从黄到紫表示连接度(Degree)逐渐变大。

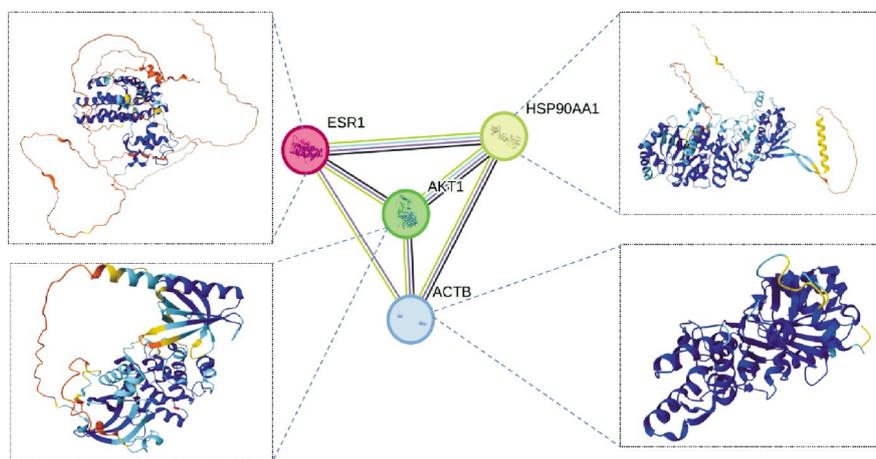


图 4 AWX 的关键靶点蛋白 PPI 网络及各蛋白 AlphaFold 结构

Fig.4 PPI network of key target proteins and AlphaFold structures of each protein

根据 $P < 0.05$, 筛选出 AWX 治疗 MIRI 的通路 48 条, 根据 P 值排序绘制排名前 10 位的 KEGG 气泡图, 详见图 6。可预测其 AWX 治疗 MIRI 主要通路涉及与氮代谢、类固醇激素生物合成、丙酸代谢、吗啡成瘾、GABA 能突触、三羧酸循环、雌激素信号通路、甲状腺激素信号通路、碳代谢和化学致癌-受体激活等通路相关。

3.3 动物实验结果

3.3.1 各组大鼠心脏组织病理变化的情况 经 HE 染色, 正常组心肌纤维整齐地排列、没有明显炎症细胞浸润; 模型组大鼠心肌组织纤维排列不规整、肥大; AWX 低、中、高剂量组大鼠心肌组织纤维肥大、排列不规整、炎症细胞浸润等情况较模型组明显改善, 尤其是中、高剂量组大鼠心肌组织相关的病理现象明显得到恢复。详见图 7。

透射电镜对心肌组织超微结构进行了观察, 正

常组大鼠心肌组织线粒体结构完整, 具有完整的嵴, 而模型组大鼠线粒体嵴的结构基本破坏, 大部分线粒体不完整。而 AWX 各剂量组线粒体数目增多, 部分线粒体嵴的结构破坏, 且随着剂量的增高线粒体结构比较完整。详见图 8。

3.3.2 各组大鼠血清心肌酶的水平比较 与正常组比较, 模型组及 AWX 低、中、高剂量组大鼠血清中 LDH、CK 的水平明显增加 ($P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$); 与模型组比较, AWX 中、高剂量组大鼠血清中 LDH、CK 的水平明显降低 ($P < 0.05, P < 0.001$)。详见表 2。

3.3.3 各组大鼠血清 IL-6 和 IL-1 β 含量的比较 与正常组比较, 模型组大鼠血清中 IL-6、IL-1 β 的含量均显著升高 ($P < 0.01, P < 0.001$)。与模型组比较, AWX 高剂量组中 IL-6 含量明显降低 ($P < 0.01$), 但 IL-1 β 含量变化差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。详见表 3。

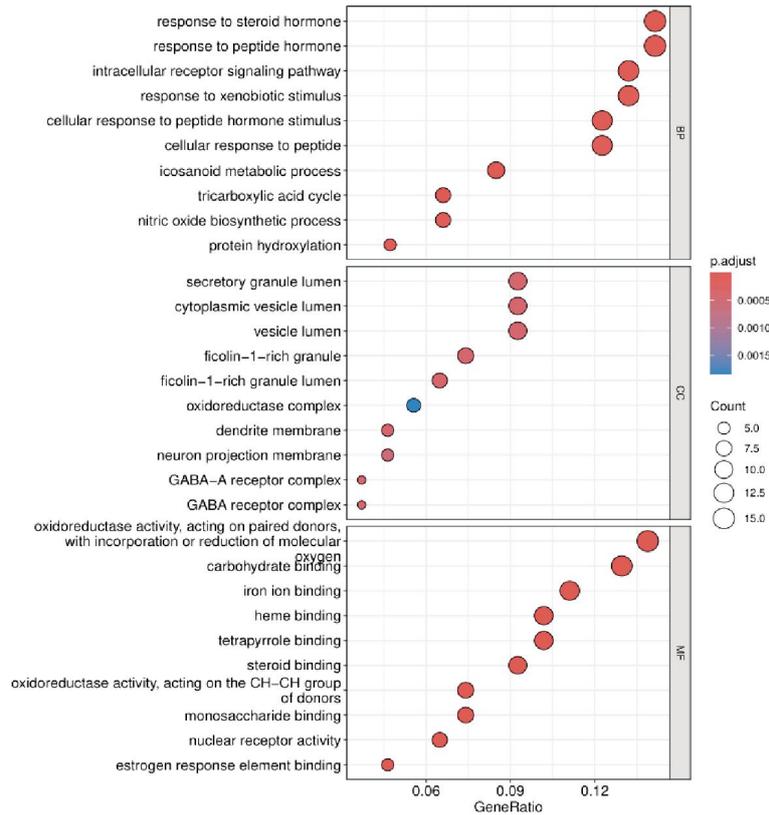


图 5 GO 富集结果(Top10)

Fig.5 GO enrichment results (Top 10)

注:图中圆大小对应基因数量,颜色代表 P.adjust 值,从蓝到红,显著程度递增。

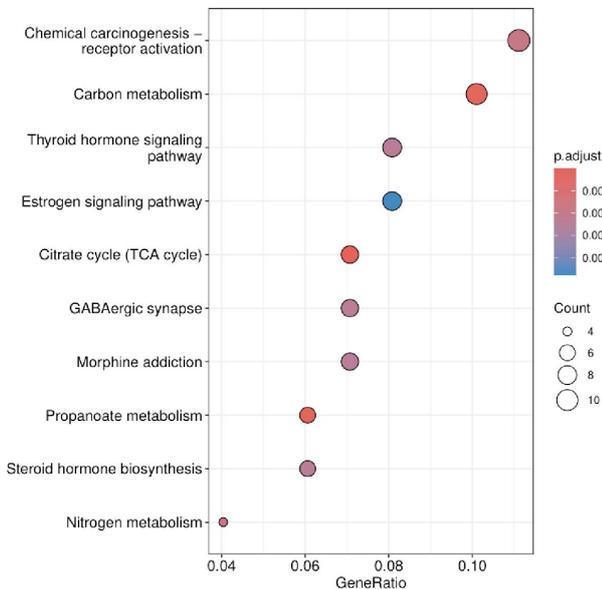


图 6 KEGG 富集结果(Top10)

Fig.6 KEGG enrichment results (Top 10)

3.3.4 各组大鼠心脏组织 MDA 和 GPX 含量的影响

与正常组比较,模型组大鼠心肌组织中 MDA 含量明显升高($P<0.01$),而 GPX 含量明显降低($P<0.001$)。与模型组比较,AWX 中、高剂量组 MDA 含量明显降低($P<0.05, P<0.001$),GPX 含量明显升高($P<0.05$)。详见表 4。

3.3.5 各组大鼠心肌组织 Akt1 蛋白表达的情况 与正常组比较,模型组大鼠心肌组织中 p-Akt1/Akt1 蛋白比值降低($P<0.001$);与模型组比较,AWX 中、高剂量组大鼠心肌组织中 p-Akt1/Akt1 比值明显上调($P<0.05, P<0.01$)。详见图 9、表 5。

3.3.6 各组大鼠心肌细胞凋亡的情况 TUNEL 实验结果显示:与正常组比较,模型组大鼠中心肌组织中凋亡信号明显升高;与模型组比较,AWX 各剂量组在不同程度地减少凋亡信号。Western blot 结果显示,与正常组比较,Bcl-2/Bax 比值明显降低($P<0.01$),说明 MIRI 诱导的心肌组织促凋亡/抗凋亡失衡。与模型组比较,AWX 中、高剂量组 Bcl-2/Bax 比值升高($P<0.05$)。详见图 10—11、表 5。

4 讨论

AWX 是一种在长期临床实践中被证实具有心血管保护作用、疗效显著的优质中成药。然而其药效物质基础不明,作用机制研究尚存不足,且临床研究证据相对匮乏,一定程度上制约了其市场份额的进一步拓展。针对以上问题,本研究基于 UHPLC-Q-Orbitrap-MS 技术结合网络药理与实验验证,深入探究其防治 MIRI 损伤的药效物质及心肌保护机制。

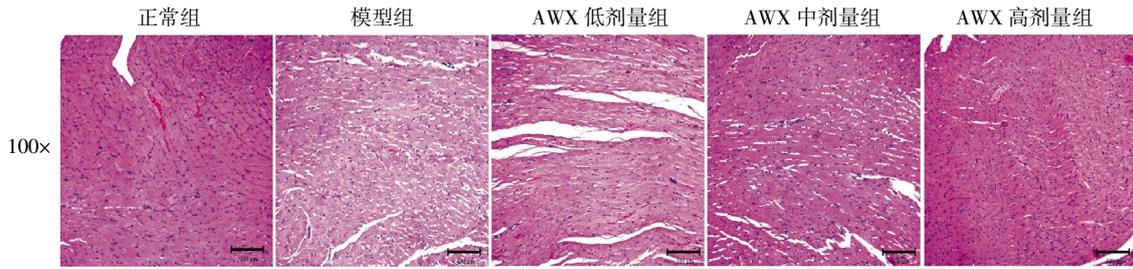


图 7 HE 染色观察各组大鼠心肌组织病理变化(HE,×100)

Fig.7 HE staining of histopathological examination in myocardial tissue in each group of rats (HE, ×100)

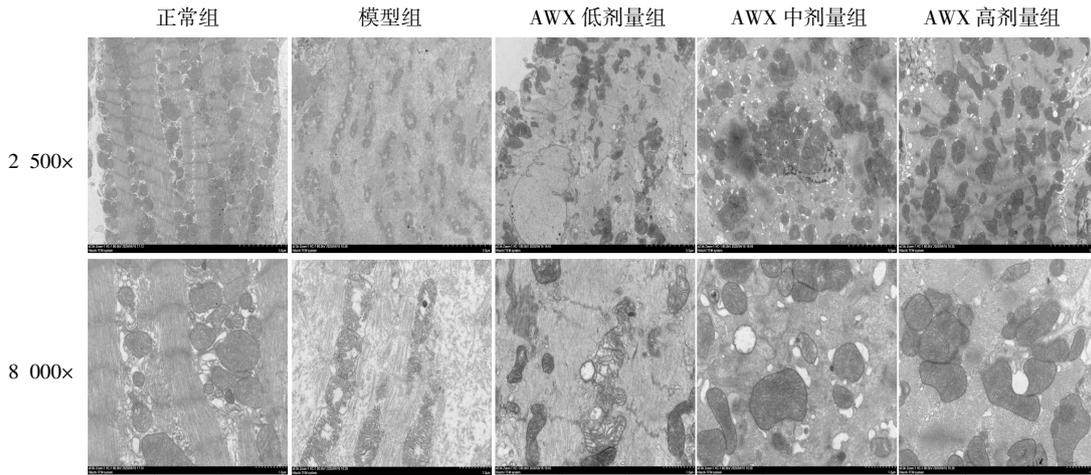


图 8 透射电子显微镜观察各组大鼠心肌组织线粒体形态变化

Fig.8 Transmission electron microscopy observation of mitochondrial morphological changes in myocardial tissue in each group of rats

表 2 AWX 对各组大鼠 LDH、CK 活性的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)

Table 2 Effects of AWX on LDH and CK activity in each group of rats ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组名	LDH(U/L)	CK 活性/(U/mL)
正常组	135.4±38.7	0.14±0.04
模型组	553.4±63.1***	0.70±0.09***
AWX 低剂量组	461.3±69.2***	0.58±0.09***
AWX 中剂量组	358.0±61.4**△△	0.54±0.06***△
AWX 高剂量组	283.1±78.3*△△△	0.50±0.06***△△

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$,△△△ $P<0.001$ 。

表 3 AWX 对各组大鼠血清 IL-6、IL-1β 含量变化的影响 ($n=5, \bar{x} \pm s$)

Table 3 Effects on the changes in serum IL-6 and IL-1β content in each group of rats ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组名	IL-6(pg/mL)	IL-1β(pg/mL)
正常组	31.2±8.99	76.8±19.1
模型组	90.6±10.5***	152±39.9**
AWX 低剂量组	76.7±10.6	122±30.4
AWX 中剂量组	74.6±11.8	115±23.8
AWX 高剂量组	63.0±12.4△△	107.8±18.1

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$,△△△ $P<0.001$ 。

表 4 AWX 对各组大鼠心肌组织 MDA、GPX 含量变化的影响($n=5, \bar{x} \pm s$)

Table 4 Effects on the changes in MDA and GPX content in myocardial tissue in each group of rats ($n=5, \bar{x} \pm s$)

组名	MDA/(nmol/mL)	GPX/(U/mL)
正常组	1.46±0.51	102.0±11.9
模型组	6.28±0.78***	32.8±8.01***
AWX 低剂量组	5.38±1.06	43.0±9.77
AWX 中剂量组	4.76±0.96△	55.3±14.8△
AWX 高剂量组	3.86±0.42△△△	59.3±14.8△

注:与正常组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组比较,△ $P<0.05$,△△ $P<0.01$,△△△ $P<0.001$ 。

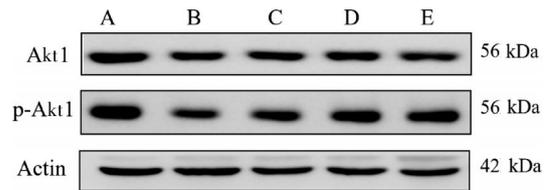


图 9 各组大鼠心肌组织 Akt1、p-Akt1 蛋白表达水平比较

Fig.9 Comparison of protein expression levels of Akt1 and p-Akt1 in myocardial tissue among different groups of rats

注:A.正常组;B.模型组;C.AWX 低剂量组;D.AWX 中剂量组;E.AWX 高剂量组。

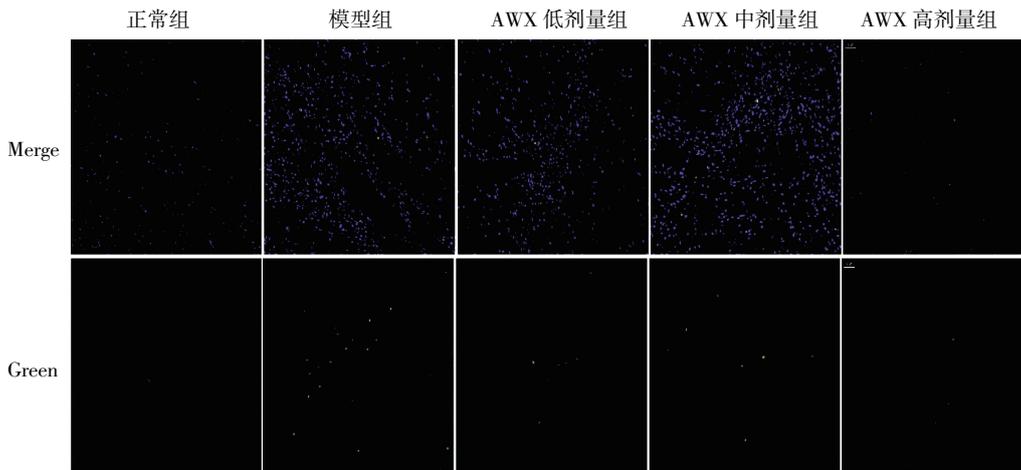


图 10 AWX 对大鼠心肌组织中细胞凋亡的影响(TUNEL 染色)

Fig.10 Effects of AWX on apoptosis in myocardial tissue of rats (TUNEL staining)

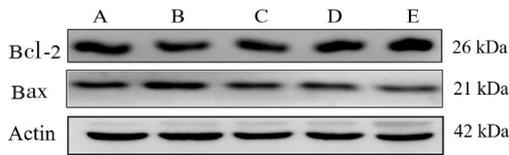


图 11 AWX 对心肌组织中 Bcl-2 和 Bax 蛋白表达的影响

Fig.11 Effects of AWX on the expression of Bcl-2 and

Bax proteins in myocardial tissue

注: A.正常组; B.模型组; C.低剂量 AWX 组; D.中剂量 AWX 组; E.高剂量 AWX 组。

表 5 各组大鼠心肌组织中 Bcl-2/Bax、p-Akt1/Akt1 蛋白表达的影响(n=3, $\bar{x}\pm s$)

Table 5 Effects of AWX on protein expressions of Bcl-2/Bax and p-Akt1/Akt1 in myocardial tissue in each group of rats (n=3, $\bar{x}\pm s$)

组名	Bcl-2/Bax	p-AKT1/AKT1
正常组	2.12±0.14	2.31±0.04
模型组	0.81±0.17**	0.60±0.07***
AWX 低剂量组	1.19±0.17*	0.78±0.06***
AWX 中剂量组	1.64±0.20 [△]	0.95±0.11*** ^{△△}
AWX 高剂量组	1.65±0.26 [△]	1.21±0.09*** ^{△△△}

注: 与正常组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$; 与模型组比较, [△] $P<0.05$, ^{△△} $P<0.01$, ^{△△△} $P<0.001$ 。

研究结果显示,爱维心口服液具有多种活性成分,能够作用于多个靶点,调控多条通路发挥心肌保护作用。其核心成分山柰酚、槲皮素、木犀草素、芹菜素、异鼠李素具有抗氧化、抗炎、抗凋亡、改善内皮功能等作用,可减轻心肌缺血再灌注损伤,可以抑制细胞凋亡,改善心肌功能,发挥心肌保护作用^[12-16]。

网络药理学作为一种新兴的研究方法,能够通过构建“药物成分-靶点-疾病”的多维网络,揭示中药复方制剂的多成分、多靶点作用机制^[17]。本研究通过网络药理学方法预测了爱维心口服液治疗 MIRI 大鼠模型的潜在作用机制,KEGG 通路分析结果显

示,AWX 干预 MIRI 与三羧酸循环和碳代谢(carbon metabolism)等能量代谢通路相关。三羧酸循环是细胞有氧呼吸的重要环节,为心肌细胞提供能量,研究表明,心肌缺血缺氧可导致三羧酸循环功能障碍,能量代谢障碍,进而加重心肌损伤^[18]。本研究网络药理学结果显示,AWX 干预可影响三羧酸循环。线粒体是三羧酸循环的主要场所,其形态和功能直接调控细胞能量代谢及氧化应激水平。AWX 可能通过调控三羧酸循环和碳代谢通路,改善心肌能量代谢,缓解心肌缺血缺氧,从而发挥治疗 MIRI 的作用。

AWX 与 GABA 能突触、雌激素信号通路(estrogen signaling pathway)和甲状腺激素信号通路(thyroid hormone signaling pathway)等神经内分泌相关通路相关。GABA 是中枢神经系统重要的抑制性神经递质,具有抗焦虑、抗抑郁、保护神经元等作用^[19]。雌激素和甲状腺激素对心血管系统具有保护作用,可抑制心肌细胞凋亡,改善心肌功能^[20-21]。AWX 可能通过调控 GABA 能突触、雌激素信号通路和甲状腺激素信号通路,调节神经内分泌系统,保护心肌细胞,从而发挥治疗心肌缺血保护的作用。

研究表明,心肌细胞凋亡是 MIRI 的重要病理特征,干预凋亡过程可以防止心肌细胞丢失,减少心脏损伤,甚至预防 MIRI 的发生和进展^[22-23]。MIRI 可诱导细胞凋亡、PI3K/Akt1 信号通路紊乱及线粒体膜电位紊乱等病理过程^[24]。Akt1 的激活可以保护心肌细胞免受 MIRI 损伤诱导的凋亡,其机制是 Akt1 可以磷酸化并抑制 BAD,阻止其与 Bcl-2 结合,从而防止线粒体通路的激活,减少细胞凋亡。此外, Akt1 还能通过促进抗凋亡基因的表达,增强细胞的存活能力^[25]。线粒体功能障碍是 MIRI 诱导的心肌细胞凋亡的主要原因^[26-27]。本研究结果显示,AWX 明显增强 MIRI 大鼠心肌组织中 Akt1 蛋白激活水平,提高

Bcl-2 的表达,降低 Bax 蛋白的表达水平,AWX 干预后线粒体形态相对完整,展现出良好的线粒体保护及抗氧化应激效果。说明 AWX 通过激活 Akt1 蛋白表达水平,改善线粒体功能,抑制心肌细胞凋亡,减少心肌细胞丢失而发挥心肌保护作用。

本研究综合运用 UHPLC-Q-Orbitrap-MS 技术、网络药理学等方法,深入探究了 AWX 预防和治疗 MIRI 的化学物质基础及作用机制。研究结果揭示,AWX 中的山柰酚、芹菜素、木犀草素等活性成分能够与 Akt1、ACTB、ESR1、HSP90AA1 等关键靶标蛋白发生相互作用,显示出潜在的药理活性。这些活性成分通过增强 Akt1 的磷酸化水平,抑制心肌细胞凋亡,保护线粒体功能,从而发挥显著的心肌保护作用。本研究不仅初步阐明了 AWX 在保护心肌缺血再灌注损伤中的有效成分和作用机制,还为其临床合理应用提供了理论依据,对推动民族药在心血管疾病治疗领域的发展具有重要意义。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 覃浩昌, 杨 漾, 张慧卿, 等. 芎芪方调控氧化三甲胺对心肌缺血再灌注损伤的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2025, 45(5): 803-809.
- [3] 罗宙红, 王 蕊, 王 鹿, 等. 维药爱维心口服液对大鼠缺血再灌注心肌 ATP 敏感性钾通道的影响[J]. *同济大学学报(医学版)*, 2012, 33(6): 64-67.
- [4] CHI H J, CHEN M L, YANG X C, et al. Progress in therapies for myocardial ischemia reperfusion injury[J]. *Current Drug Targets*, 2017, 18(15): 1712-1721.
- [5] ALGOET M, JANSSENS S, HIMMELREICH U, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation[J]. *Trends in Cardiovascular Medicine*, 2023, 33(6): 357-366.
- [6] LI J, ZHANG H R, ZHANG C H. Role of inflammation in the regulation of coronary blood flow in ischemia and reperfusion: Mechanisms and therapeutic implications [J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2012, 52(4): 865-872.
- [7] DONG L Y, FAN Y F, SHAO X, et al. Vitexin protects against myocardial ischemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts by attenuating inflammatory response and apoptosis[J]. *Food and Chemical Toxicology*, 2011, 49(12): 3211-3216.
- [8] LI F, ZHENG X J, FAN X X, et al. YiQiFuMai powder injection attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial apoptosis through AMPK activation[J]. *Rejuvenation Research*, 2016, 19(6): 495-508.
- [9] 马 毅, 晋 玲, 王振恒, 等. 维药爱维心口服液对犬急性心肌梗死的保护作用[J]. *中药材*, 2013, 36(1): 112-114.
- [10] 海拉提·玉山, 吾甫尔江·吾布力. 维吾尔医药爱维心口服液治疗冠心病的临床研究[J]. *中国中医药咨讯*, 2010, 2(30): 214.
- [11] 李俊红, 马丽娟, 吴燕倪, 等. 维药爱维心对离体大鼠心肌缺血/再灌注损伤作用机制研究[J]. *新疆医科大学学报*, 2012, 35(8): 1022-1026, 1030.
- [12] YANG L, GAO Y C, BAJPAI V K, et al. Advance toward isolation, extraction, metabolism and health benefits of kaempferol, a major dietary flavonoid with future perspectives[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2023, 63(16): 2773-2789.
- [13] LI Y, YAO J Y, HAN C Y, et al. Quercetin, inflammation and immunity[J]. *Nutrients*, 2016, 8(3): 167.
- [14] IMRAN M, RAUF A, ABU-IZNEID T, et al. Luteolin, a flavonoid, as an anticancer agent: A review[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 112: 108612.
- [15] ABUTAYEH R F, ALTAH M, MEHDAWI A, et al. Chemopreventive agents from nature: A review of apigenin, rosmarinic acid, and thymoquinone[J]. *Current Issues in Molecular Biology*, 2024, 46(7): 6600-6619.
- [16] KIM J H, JIN Y R, PARK B S, et al. Isorhamnetin inhibits platelet aggregation and thrombus formation by suppressing the PI3K/Akt pathway[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2014, 452(3): 669-675.
- [17] 李天舒, 杨 洁, 杨传华. 基于网络药理学及分子对接分析芎归饮治疗冠心病稳定型心绞痛的作用机制[J]. *中西医结合心血管病杂志*, 2024, 22(24): 4438-4445.
- [18] STANLEY W C, RECCHIA F A, LOPASCHUK G D. Myocardial substrate metabolism in the normal and failing heart[J]. *Physiological Reviews*, 2005, 85(3): 1093-1129.
- [19] WATANABE M, MAEMURA K, KANBARA K, et al. GABA and GABA receptors in the central nervous system and other organs[J]. *International Review of Cytology*, 2002, 213: 1-47.
- [20] MENDELSON M E, KARAS R H. The protective effects of estrogen on the cardiovascular system[J]. *The New England Journal of Medicine*, 1999, 340(23): 1801-1811.
- [21] KLEIN I. Thyroid hormone and the cardiovascular system[J]. *The American Journal of Medicine*, 1990, 88(6): 631-637.
- [22] KUMAR D, KIRSHENBAUM L A, LI T, et al. Apoptosis in adriamycin cardiomyopathy and its modulation by probucol[J]. *Antioxidants & Redox Signaling*, 2001, 3(1): 135-145.
- [23] FU J J, HUANG H Q, LIU J J, et al. Tanshinone IIA protects cardiac myocytes against oxidative stress-triggered damage and apoptosis[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2007, 568(1/2/3): 213-221.
- [24] 刘 红, 张玲燕, 薛 杨. 血府逐瘀汤通过 PI3K/Akt 通路缓解大鼠心肌缺血再灌注损伤的实验研究[J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(5): 11-15.
- [25] 詹家仪, 杨媛媛, 詹家国, 等. 中药单体及复方通过调控 PI3K/Akt 信号通路防治心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(6): 1124-1132.
- [26] MA L N, KERR B A, NAGA PRASAD S V, et al. Differential effects of Akt1 signaling on short-versus long-term consequences of myocardial infarction and reperfusion injury[J]. *Laboratory Investigation*, 2014, 94(10): 1083-1091.
- [27] SARKEY J P, CHU M, MCSHANE M, et al. Nogo-a knock-down inhibits hypoxia/reoxygenation-induced activation of mitochondrial-dependent apoptosis in cardiomyocytes[J]. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 2011, 50(6): 1044-1055.