

引用:武文硕,付殷,张璐艳,谢蝶,张洋.基于网络药理学和实验验证探讨清营生脉汤对心肌缺血再灌注损伤的保护机制[J].中医药导报,2025,31(6):7-14.

实验

基于网络药理学和实验验证探讨清营生脉汤对心肌缺血再灌注损伤的保护机制^{*}

武文硕,付 殷,张璐艳,谢 蝶,张 洋
(黑龙江中医药大学,黑龙江 哈尔滨 150040)

[摘要] 目的:基于网络药理学和分子对接方法探究清营生脉汤对心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的保护机制,并通过体外实验对部分关键靶点及信号通路进行验证。方法:应用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)、BATM-TCM数据库获得清营生脉汤中药物相关活性成分及作用靶点,通过GeneCards数据库、OMIM数据库筛选MIRI的疾病靶点,将药物的作用靶点与疾病的靶点通过Venny平台取交集。基于String数据库构建清营生脉汤治疗MIRI的交集靶点PPI网络,获取药物与疾病的核心作用靶点。利用Metascape数据库构建进行富集研究,并利用微生物平台对基因本体(GO)富集分析、京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析的富集结果实现可视化,借助Cytoscape v3.9.1建立“成分-靶点-通路”互作网络。通过AutoDockTools和PyMol软件对核心成分进行分子对接。体外实验通过H₂O₂诱导H9c2心肌细胞构建氧化应激模型,通过CCK-8筛选最佳给药浓度,酶联免疫吸附试验(ELISA)检测乳酸脱氢酶(LDH)及心肌肌钙蛋白T(c-TnT)含量,激光共聚焦检测活性氧(ROS)及线粒体含量。Western blotting对预测通路进行验证,实时定量PCR技术检测核心靶点mRNA的水平。结果:清营生脉汤共有109个活性成分,对应1 002个作用靶点,其中122个作用靶点与治疗MIRI有关。GO富集分析共得到2 494个条目;KEGG富集分析共得到195条通路,主要涉及TNF信号通路、HIF-1信号通路、JAK-STAT信号通路等。分子对接结果显示槲皮素、木犀草素、山柰酚与TNF、IL-6、HIF-1 α 、JAK2、STAT3等关键靶点蛋白的分子对接结合力值均较稳定。细胞实验表明,清营生脉汤含药血清能降低LDH、c-TnT水平($P<0.05$),抑制ROS的生成、提高线粒体含量($P<0.05$),Western blotting和PCR结果显示含药血清能够下调HIF-1 α 、上调JAK2蛋白和mRNA的表达($P<0.05$)。结论:清营生脉汤可通过多成分、多靶点、多通路治疗心肌缺血再灌注损伤,其含药血清可能通过调控HIF-1 α 和JAK2信号路通缓解氧化应激对心肌细胞造成的损伤。

[关键词] 心肌缺血再灌注损伤;清营生脉汤;网络药理学;分子对接;氧化应激;H9c2细胞

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)06-0007-08

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.06.002

The Protective Mechanism of Qingying Shengmai Decoction (清营生脉汤) on Myocardial Ischemia Reperfusion Injury Based on Network Pharmacology and Experimental Verification

WU Wenshuo, FU Yin, ZHANG Luyan, XIE Die, ZHANG Yang

(Heilongjiang University of Traditional Chinese Medicine, Harbin Heilongjiang 150040, China)

[Abstract] Objective: To explore the protective mechanism of Qingying Shengmai decoction on myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI) based on network pharmacology and molecular docking methods, and to verify some key targets and signaling pathways through *in vitro* experiments. Methods: The active ingredients and targets of Qingying Shengmai decoction were obtained by traditional Chinese medicine pharmacology database and analysis platform (TCMSP) database and BATM-TCM database, and the disease targets of MIRI were screened by GeneCards database and OMIM database. The intersection of drug targets and disease targets was obtained through Venny platform. The intersection target PPI network of Qingying Shengmai decoction in the treatment of MIRI was constructed based on String database to obtain the core targets of drugs and diseases.

*基金项目:黑龙江省博士后资助项目(LBH-Q19058);黑龙江省中医药经典普及化专项课题项目(ZYW2023-019)

通信作者:张洋,男,研究员,研究方向为方剂配伍规律、数据挖掘的研究

The enrichment results of gene ontology (GO) enrichment analysis and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were visualized using the bioinformatic platform. The "components-target-pathway" interaction network was established with Cytoscape v3.9.1. Molecular docking of core components was performed by AutoDockTools and PyMol software. *In vitro*, H9c2 cardiomyocytes were induced with H₂O₂ to construct oxidative stress model, and the optimal drug concentration was screened by CCK-8. The content of lactate dehydrogenase (LDH) and cardiac troponin T (c-TnT) was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), and the content of reactive oxygen species (ROS) and mitochondria was detected by laser confocal microscopy. Western blotting was used to verify the predicted pathway, and real-time quantitative PCR was used to detect the mRNA levels of core targets. Results: There were 109 active ingredients in Qingying Shengmai decoction, corresponding to 1 002 targets, of which 122 targets were related to the treatment of MIRI. GO enrichment analysis obtained a total of 2 494 items. A total of 195 pathways were obtained by KEGG enrichment analysis, mainly involving TNF signaling pathway, HIF-1 signaling pathway, JAK-STAT signaling pathway, etc. The results of molecular docking showed that the binding forces of quercetin, luteolin, kaempferol with TNF, IL-6, HIF-1 α , JAK2, STAT3 and other key target proteins were stable. Cell experiments showed that the serum containing Qingying Shengmai decoction drug-containing serum could reduce the levels of LDH and c-TnT ($P<0.05$), inhibit the generation of ROS, and increase the content of mitochondria ($P<0.05$). The results of Western blotting and PCR showed that the Qingying Shengmai decoction drug-containing serum could down-regulate the expression of HIF-1 α and up-regulate the protein and mRNA expression of JAK2 ($P<0.05$). Conclusion: Qingying Shengmai decoction has a multi-component, multi-target and multi-pathway therapeutic effect on myocardial ischemia reperfusion injury. The Qingying Shengmai decoction drug-containing serum may alleviate oxidative stress-induced myocardial injury by regulating HIF-1 α and JAK2 signaling pathway.

[Keywords] myocardial ischemia reperfusion injury; Qingying sheng mai decoction; network pharmacology; molecular docking; oxidative stress; H9c2 cells

心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI)已成为严重威胁人类身心健康的疾病。该病是指急性心肌梗死(acute myocardial infarction, AMI)后,通过经皮冠状动脉介入治疗或者溶栓疗等方法,对心脏造成的二次损伤^[1]。MIRI的发病机制复杂,包括氧化应激、自噬、炎症、凋亡和线粒体功能障碍等因素。其中氧化应激至关重要,可使细胞活性氧(ROS)水平激增、细胞膜流动性降低,加重细胞内钙离子超载,最终导致心肌细胞线粒体损伤,诱导促凋亡因子的释放^[2]。目前临床使用的药物都只是针对MIRI的某一个病理环节进行干预,治疗效果较差,而中药可以通过多靶点、多方面协同治疗。清营生脉汤为清营汤和生脉饮的合方,由黄芪、麦冬、生地黄、苦参、玄参、西洋参、丹参、五味子、甘草、金银花、连翘组成,临床治疗MIRI及气阴两虚兼热毒证之病毒性心肌炎疗效确切^[3]。网络药理学符合中医药的整体观,分子对接可为中医药多成分、多靶点提供有力支撑^[4]。本实验通过网络药理学、分子对接方法,探究清营生脉汤治疗MIRI的作用机制,并通过细胞实验对部分机制加以验证,为后期研究提供依据。

1 材 料

1.1 实验动物 SPF级6周龄雄性SD大鼠,30只,体质量280~300 g,购自辽宁长生生物技术股份有限公司,动物生产许可证号:SCXK(辽)2020-0001。大鼠饲养于康泰医学检验服务河北有限公司,实验前适应性饲养1周。实验方案通过康泰医学检验服务河北有限公司实验动物伦理委员会审批(批件号:

MDL 2024-01-30-01)。

1.2 实验细胞 H9c2心肌细胞株(批号:20231001)购于上海富衡生物科技有限公司。

1.3 实验药物 清营生脉汤由西洋参10 g,黄芪30 g,麦冬15 g,五味子10 g,生地黄15 g,丹参10 g,苦参15 g,玄参15 g,金银花20 g,连翘20 g,甘草10 g组成,购于黑龙江中医药大学第一附属医院,各中药由张洋研究员鉴定为正品。将药煎煮后浓缩至每1 mL含2 g生药,4℃冰箱保存。

1.4 主要试剂 胎牛血清(Thermo公司,批号:2110875CP);DMEM高糖培养基(武汉普诺赛生命科技有限公司,批号:WHB823F261);胰酶(批号:20230925)、青链霉素(批号:20230907)、CCK-8试剂盒(批号:20230801)均购自苏州新赛美生物科技有限公司;cTnT试剂盒[罗氏(Roche)公司,批号:47493202];LDH试剂盒(批号:20230103)、BCA蛋白测定试剂盒(批号A045-3-2)均购自南京建成生物工程研究所;GAPDH抗体(武汉博士德生物工程有限公司,批号:BM3896);SDS-PAGE凝胶制备试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,批号:P20231203);HIF-1 α 抗体(批号:ab179483)、JAK2抗体(批号:ab108596)、山羊抗兔二抗(批号:ab205718)、山羊抗小鼠二抗(批号:ab205719)均购自英国Abcam公司。

1.5 主要仪器 EVOS全自动细胞成像系统(EVOS FLoid);CO₂恒温培养箱(ThermoFisher公司,型号:3111);低速离心机(常杰博森仪器有限公司,型号:LGR20-W);酶标仪(美国Bio-Rad公司,型号:iMark);电泳仪(北京六一生物科技有限

公司,型号:DYY-6C);转膜仪(上海天能科技有限公司,型号:VE-186);摇床(上海智城分析仪器制造有限公司,型号:QHZ-98B);超薄切片机(型号:Leica UC7)、染色机(型号:Autostainer XL)均购自德国徕卡仪器有限公司。

2 方 法

2.1 网络药理学及分子对接

2.1.1 清营生脉汤活性成分和靶点筛选 利用TCMSP数据库(<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)和BATM-AN-TCM数据库(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/>)以口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%、类药性(drug likeness, DL)≥0.18为标准检索清营生脉汤活性成分和靶点,采用UniProt数据库(<https://www.uniprot.org/>)对靶点名称进行校正,筛选清营生脉汤的活性成分和相关靶点。

2.1.2 MIRI疾病靶点筛选 以“Myocardial Ischemia Reperfusion Injury”为关键词,检索GeneCards数据库(<http://www.genecards.org/>)和OMIM数据库(<http://www.omim.org/>)中MIRI的相关靶点,合并后删除重复值,获得疾病相关靶点,通过UniProt数据库对预测靶点名称进行匹配规范。

2.1.3 筛选共同靶点及蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络构建 利用Venny平台(<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/>),得到药物与疾病共同靶点。将其导入String11.5数据库,选择“Homo sapiens”类型,构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络模型,根据CytoNCA插件得到核心靶点。

2.1.4 基因本体(GO)与京都基因和基因组百科全书(KEGG)富集分析 在Metascape平台(<https://metascape.org/gp/index.html#/main/step1>)输入“2.1.3”项中排名前25的靶点,对GO生物过程、细胞组件和分子功能以及KEGG路径进行分析,利用微生信平台(<https://www.bioinformatics.com.cn/>)的富集气泡图取排列在前20的结果进行可视化分析。

2.1.5 活性成分-交集靶点-关键通路作用网络构建 基于“2.1.1”项的活性成分、“2.1.2”项的靶点、“2.1.4”项前20关键通路,利用Cytoscape v3.9.1软件构建“成分-靶点-通路”网络关系图。

2.1.6 分子对接 将关键活性成分与目标靶点进行分子对接,在PubChem(<https://PubChem.ncbi.nlm.nih.gov/>)获取配体的2D结构,Chem3D软件(<https://library.bath.ac.uk/chemistry-software/chem3d>)优化结构,PDB数据库(<http://www.rcsb.org/>)获取蛋白质结构,使用Autodock(<http://autodock.scripps.edu/>)进行原蛋白质处理及分子对接,使用PyMOL(<https://pymol.org/>)软件做出3D结合模式图。

2.2 细胞实验研究

2.2.1 空白血清和含药血清的制备 大鼠适应性饲养1周,随机分为空白血清组10只和含药血清组20只。清营生脉汤剂量根据人和大鼠的体表面积进行换算,给予15.3 g/(kg·d)清营生脉汤灌胃,空白血清组予同等剂量生理盐水灌胃,2次/d,连续7d,最后一次灌胃1h后腹主动脉取血,静置2h后3 500 r/min离心15 min(离心半径为9.5 cm)取血清,56℃水浴30 min灭活补体,0.22 μmol/L过滤器过滤后分装,存储于-80℃超低温冰箱。

2.2.2 细胞培养与传代 H9c2细胞用含有10%胎牛血清、1%双抗的DMEM高糖培养基,在37℃、5%CO₂细胞培养箱中培养。

定期检查并更换培养液,待细胞培养至80%~90%融合,加入2 mL的0.25%胰酶消化,离心重悬后,传代备用。

2.2.3 H9c2细胞氧化应激模型构建 采用过氧化氢(H₂O₂)干预H9c2细胞构建氧化应激模型。取对数生长的H9c2细胞,调整密度为1×10⁴个/mL,接种于6孔板中,放于培养箱中培养24 h。取浓度为30%的H₂O₂原液10 μL,加入到9.78 mL无菌双蒸水中混匀,配制成浓度为10 mmol/L的H₂O₂溶液,在完全培养基中加入10 mmol/L的H₂O₂溶液配制成浓度为400 μmol/L的诱导剂,全程避光。取出6孔板,PBS清洗后,加入诱导剂,放入培养箱中培养2 h。

2.2.4 CCK-8法筛选清营生脉汤含药血清最佳干预浓度 将H9c2细胞按1×10⁴个/100 μL接种在96孔板中并培养24 h,采用不同稀释浓度(0%、5%、10%、20%、30%、40%、50%)的清营生脉汤含药血清处理细胞,每组重复3孔,分别孵育6 h、12 h、24 h,酶标仪检测450 nm处吸光度,计算H9c2细胞活性,细胞活性=OD_{实验孔-空白孔}/OD_{对照孔-空白孔}×100%,选取最佳干预浓度进行后续实验。

2.2.5 分组及干预 将H9c2细胞分为空白组、模型组、空白血清组、含药血清组。空白组用含10%胎牛血清的完全培养基进行常规培养。模型组使用完全培养基常规培养24 h后,按“2.2.3”方法进行造模。空白血清组和含药血清组分别根据“2.2.4”项下的结果加入最佳浓度的空白血清和清营生脉汤含药血清制备完全培养基,预处理12 h,按“2.2.3”方法造模。

2.2.6 检测各组细胞LDH及c-TnT 经孵育、造模后,收集细胞培养基上清,再利用LDH活性检测试剂盒和cTnT检测试剂盒处理样品,酶标仪在450 nm波长处测定吸光值来测定LDH和cTnT的释放量。

2.2.7 激光共聚焦检测ROS及线粒体能量 在避光的情况下,将MitoSOX及Mitotracker Green染剂用完全培养基稀释1 000倍,细胞核染剂(hoechst33342)稀释2 000倍。细胞在给药、造模、PBS清洗后,将两种染剂分别加入小皿中孵育30 min。孵育结束后用PBS清洗,加入细胞核染剂再孵育30 min,利用激光共聚焦荧光染色技术,测定各组H9c2细胞ROS水平及线粒体含量。

2.2.8 Western blotting检测细胞内HIF-1α、JAK2蛋白表达水平 收集各组细胞,PBS清洗,每孔加入100 μL RIPA裂解液,4℃裂解30 min后快速刮取细胞离心(12 500 r/min,离心半径为9.5 cm,离心15 min)取上清,收集细胞总蛋白,用BCA法测量总蛋白浓度。制胶,SDS-PAGE凝胶电泳分离后转到PVDF膜上,用含5%脱脂奶粉的TBST溶液进行封闭,加入一抗4℃过夜。各抗体稀释比例为单克隆抗体HIF-1α(1:1 000)、单克隆抗体JAK2(1:1 000)、单克隆抗体β-actin(1:5 000)。TBST溶液洗膜3次,10 min/次,加入二抗常温孵育1 h:山羊抗兔二抗(1:2 000)、山羊抗小鼠二抗(1:2 000),TBST溶液洗膜,最后用ECL发光法进行显影。以β-actin为内参计算HIF-1α、JAK2蛋白的相对表达量。

2.2.9 PCR检测HIF-1α mRNA及JAK2 mRNA的表达 收集各组细胞,加入1 mL trizol裂解液裂解,提取细胞RNA,用分光光度计检测其浓度和纯度,在37℃ 30 min、85℃ 1 min反应条件下进行反转录。根据PCR试剂盒要求,在“95℃ 30 s;95℃

5 s; 60 °C 30 s”下40个循环,进行检测PCR扩增,以GAPDH为内参,2^{-ΔΔCT}法计算细胞内HIF-1 α mRNA和JAK2 mRNA的相对表达量。各引物的序列见表1。

表1 各引物序列表

基因名称	引物序列(5'-3')	片段长度/bp
HIF-1 α	F: CAAACTCCCTCACC R: CAAACTCCCTCACC	156
JAK2	F: AGTGGAGGAGACAAGC R: TCAGATCACGGATGAC	175
GAPDH	F: CGGACGCCCTGGTTA R: TTGATGTTAGCGGGAT	216

2.2.10 统计学方法 全部的统计学处理均使用SPSS 23.0版本软件完成,数据以“均数±标准差”($\bar{x} \pm s$)表示。多组比较采用单因素方差分析,两两比较方差齐者采用LSD检验,方差不齐则采用Tamhane's T2检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 网络药理学及分子对接结果

3.1.1 清营生脉汤的活性成分和靶点 结合两个数据库,共筛选出133个清营生脉汤化学成分,其中12个黄芪化学成分、9个麦冬化学成分、15个生地黄化学成分、13个苦参化学成分、4个玄参化学成分、7个西洋参化学成分、19个丹参化学成分、8个五味子化学成分、19个甘草化学成分、12个金银花化学成分、15个连翘化学成分。删除重复成分后共获得109个化学成分,进行人源基因转换去重后得到1 002个靶点。(见图1)

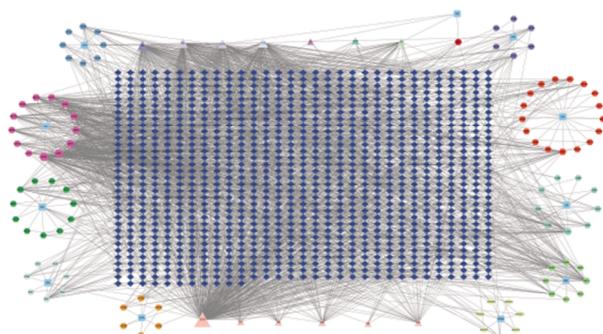


图1 成分-靶点图

3.1.2 MIRI疾病靶点筛选 利用“Myocardial Ischemia Reperfusion Injury”为关键词进行查询,分别检索GeneCards数据库和OMIM数据库中MIRI的相关靶点,匹配规范后发现疾病靶点1 074个。

3.1.3 共同靶点及PPI网络构建 利用Venny得到清营生脉汤-MIRI共同靶点122个,为清营生脉汤治疗MIRI的潜在作用靶点。(见图2)将122个交集靶点导入String平台,设置交互因子设为0.9,隐藏游离靶点,保存蛋白交互信息文件并将其导入Cytoscape 3.9.1软件,构建PPI网络图。(见图3)

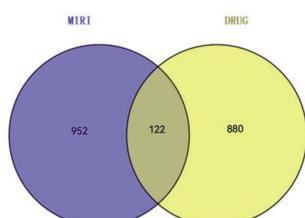


图2 交集靶点 Venn 图

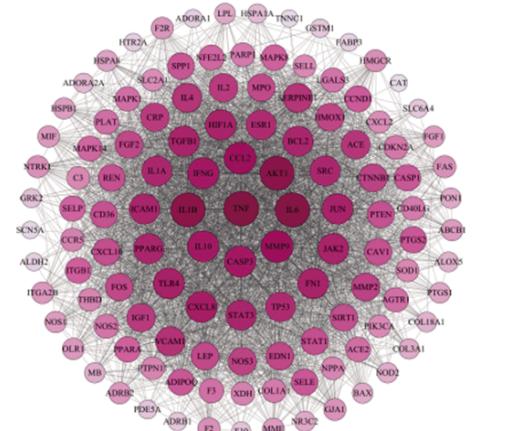


图3 交集靶点 PPI 网络图

3.1.4 清营生脉汤治疗MIRI的GO与KEGG富集分析 将清营生脉汤-MIRI共同靶点输入Metascape网站,进行富集分析,将P值的截断值设置为0.01。找出清营生脉汤治疗MIRI的作用机制和潜在靶点。最终GO功能富集分析获得2 494个条目,其中包括生物过程(biological process, BP)2 037个条目、细胞组分(cellular component, CC)101个条目、分子功能(molecular function, MF)161个条目。KEGG富集分析获得195个通路。利用lgP值,分别取前20位进行可视化分析。清营生脉汤主要参与的BP包括血液循环、细胞迁移、对脂多糖的反应、对氧气水平反应、炎症反应等(见图4);其涉及的CC主要是细胞活性,尤其是配体与受体之间的结合能力通常介导细胞内的生物反应(见图5);其涉及的MF主要集中在酶结合、蛋白质结合、转录因子结合、受体配体活性等。(见图6)KEGG涉及的通路则包括肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)信号通路、低氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor-1, HIF-1)信号通路、蛋白酪氨酸激酶(Janus Kinase, JAK)-信号转导及转录激活因子(signal transducer and activator of transcription, STAT)信号通路。(见图7)

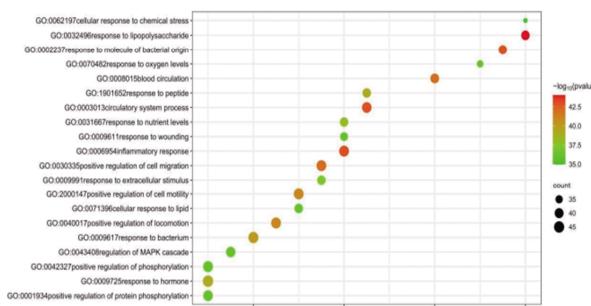


图4 BP 功能富集分析结果

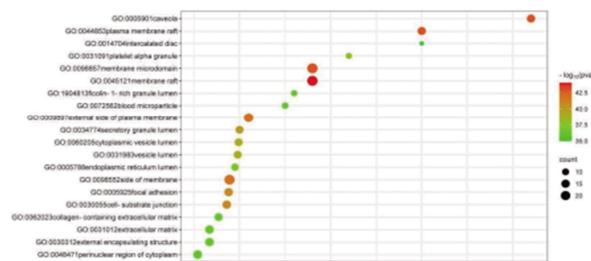


图5 CC 功能富集分析结果

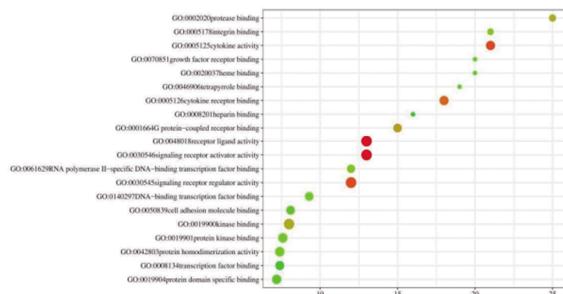


图6 MF功能富集分析结果

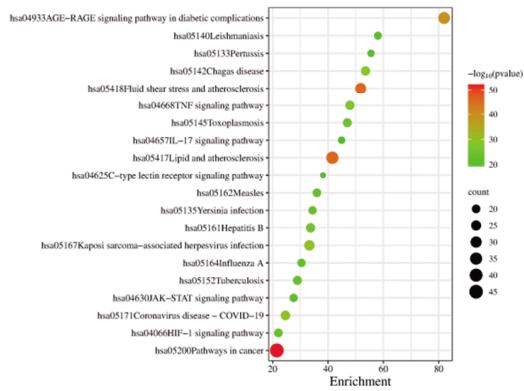


图7 KEGG通路分析结果

3.1.5 “药物成分-靶点-通路”网络构建 运用Cytoscape v3.9.1构建“药物成分-MIRI靶点-通路”网络。(见图8)黄色六边形代表药物活性成分,橙色六边形代表药物共有成分,粉色三角形代表信号通路,紫色菱形代表靶点。通过NetworkAnalyzer分析得出1132个节点。根据degree、closeness和betweenness参数大于阈值筛选关键靶点。将成分、靶点、通路进行Degree排序,节点越大则Degree越高,说明参与生物过程越多。按照Degree值取前5的作用靶点作为清营生脉汤治疗MIRI中发挥主要作用的活性成分及作用靶点。(见表2~3)

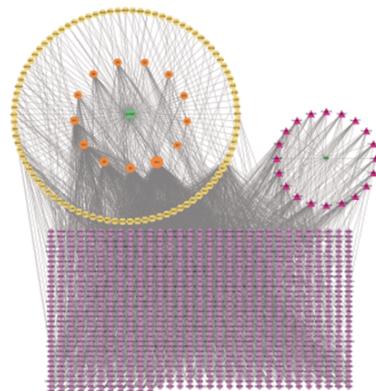


图8 清营生脉汤治疗MIRI的KEGG信号通路关系网络

表2 药物活性成分网络拓扑分析结果

活性成分	Degree值	介度	接近中心性
槲皮素	406	0.128 193 234	0.373 800 860
木犀草素	153	0.032 219 957	0.357 255 770
山柰酚	139	0.028 941 072	0.356 129 846
豆甾醇	132	0.185 908 827	0.374 296 125
地黄素C	113	0.148 589 752	0.370 370 370

表3 主要作用靶点网络拓扑分析结果

靶点	Degree值	靶点	Degree值
TNF	109	TLR4	87
IL-6	108	JUN	86
IL-1B	106	FN1	86
AKT1	105	TGFB1	85
MMP9	94	HIF-1 α	85
CCL2	93	JAK2	85
IL10	89	ICAM1	84
IFNG	89	PPARG	83
CASP3	89	BCL2	83
CXCL8	88	STAT3	83

3.1.6 分子对接结果 本研究通过评估结合能以确认网络药理学的有效性。药物成分与核心靶点结合能低于-4.25 kcal/mol,则分子与靶点有一定的结合活性^[5]。根据清营生脉汤主要活性成分及靶点的网络拓扑分析结果,选用前三名有效成分作为配体:槲皮素、木犀草素、山柰酚。根据PPI结果、GO功能和KEGG富集分析及相关文献,最终选取TNF、IL-6、HIF-1 α 、JAK2、STAT3靶点进行分子对接。(见表4、图9)

表4 分子对接结果/(kcal/mol)

活性成分	TNF	IL-6	HIF-1 α	JAK2	STAT3
槲皮素	-8.80	-7.50	-5.40	-5.31	-4.47
木犀草素	-7.10	-7.40	-7.50	-6.29	-5.27
山柰酚	-8.60	-7.40	-5.59	-5.83	-5.81

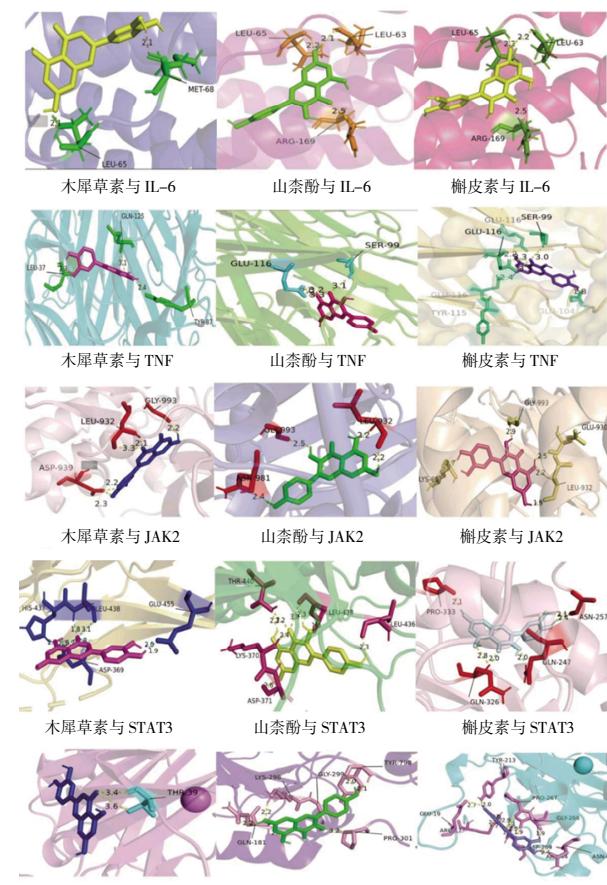


图9 分子对接可视化结果

3.2 细胞实验结果

3.2.1 清营生脉汤含药血清最佳浓度及时间筛选 对比不同浓度及不同时间作用后的细胞活力,发现当含药血清浓度为40%、作用时间为12 h时,细胞活力不低于50%且最接近50%。(见图10) 故选用浓度为40%的清营生脉汤含药血清作用12 h作为最优浓度及时间。

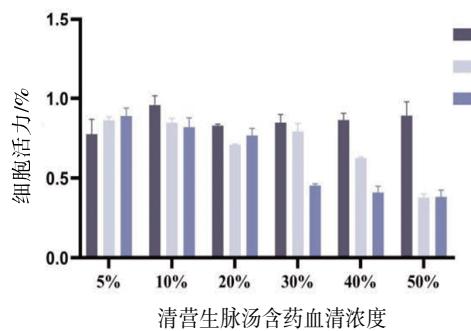


图 10 CCK-8 法筛选最佳浓度及时间 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

3.2.2 清营生脉汤含药血清对 H_2O_2 诱导 H9c2 心肌细胞损伤 LDH 的影响 与空白组比较,模型组、含药血清组、空白血清组 LDH 浓度显著升高 ($P<0.05$),说明 H_2O_2 能够诱导 H9c2 心肌细胞产生心肌损伤;而模型组与空白血清组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$),说明空白血清不能降低 LDH 浓度;与模型组比较,含药血清组 LDH 浓度降低 ($P<0.05$);与空白血清组比较,含药血清组 LDH 浓度降低 ($P<0.05$)。(见表5)

表 5 各组细胞培养基中 LDH、c-TnT 浓度 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	LDH/(U/mL)	c-TnT/(pg/mL)
空白组	3	0.45±0.006	104.23±0.920
模型组	3	1.48±0.024 ^a	152.46±0.811 ^a
空白血清组	3	1.42±0.097 ^a	144.03±2.117 ^a
含药血清组	3	0.79±0.049 ^{abc}	112.20±1.329 ^{abc}

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与空白血清组比较,^c $P<0.05$ 。

3.2.3 清营生脉汤含药血清对 H_2O_2 诱导 H9c2 心肌细胞损伤 c-TnT 的影响 与空白组比较,模型组、空白血清组、含药血清组 c-TnT 浓度显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,含药血清组 c-TnT 浓度降低 ($P<0.05$);与空白血清组比较,含药血清组 c-TnT 浓度降低 ($P<0.05$)。(见表5)

3.2.4 清营生脉汤含药血清对 H_2O_2 诱导 H9c2 心肌细胞损伤 ROS 水平的影响 与空白组比较,模型组、空白血清组、含药血清组 ROS 水平均显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,含药血清组和空白血清组的 ROS 水平均降低 ($P<0.05$);与空白血清组比较,含药血清组的 ROS 水平更低 ($P<0.05$)。(见图11、表6)

3.2.5 清营生脉汤含药血清对 H_2O_2 诱导 H9c2 心肌细胞损伤线粒体的影响 与空白组比较,模型组细胞内线粒体水平显著降低,空白血清组线粒体水平升高,含药血清组线粒体水平显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,含药血清组线粒体水平表达升高 ($P<0.05$);与空白血清组比较,含药血清组线粒体表达显著升高 ($P<0.01$)。(见图11、表6)

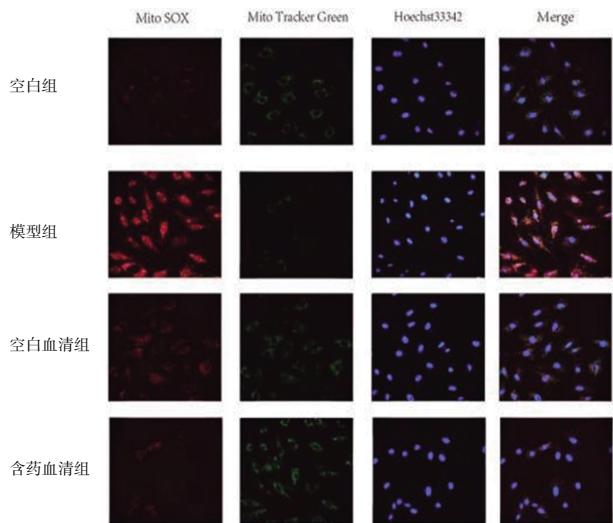


图 11 各组 H9c2 细胞 ROS、线粒体水平

表 6 各组 H9c2 细胞 ROS、线粒体含量 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	SOX	Green
空白组	81	11.17±1.33	9.12±3.48
模型组	81	49.36±17.15 ^a	5.17±2.31 ^a
空白血清组	81	22.20±7.47 ^{ab}	9.27±2.14 ^{ab}
含药血清组	81	17.14±5.69 ^{abc}	17.51±6.47 ^{abc}

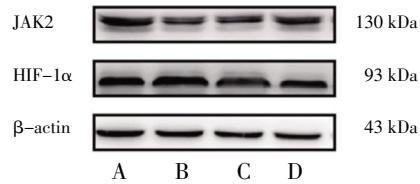
注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与空白血清组比较,^c $P<0.05$ 。

3.2.6 Western blotting 检测 HIF-1 α 、JAK2 蛋白表达水平 与空白组比较,模型组细胞中 HIF-1 α 表达显著升高 ($P<0.05$);与模型组比较,空白血清组和含药血清组 HIF-1 α 蛋白表达均下降 ($P<0.05$);空白组 HIF-1 α 蛋白表达与含药血清组比较,差异无统计学意义 ($P>0.05$)。与空白组比较,模型组细胞中 JAK2 蛋白表达显著降低 ($P<0.05$);与模型组比较,空白血清组差异无统计学意义 ($P>0.05$),含药血清组 JAK2 蛋白表达升高 ($P<0.05$);与空白血清组比较,含药血清组 JAK2 蛋白表达显著升高 ($P<0.05$)。(见表7、图12)

表 7 各组 HIF-1 α 、JAK2 蛋白表达情况 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	HIF-1 α	JAK2
空白组	3	1.00±0.000	1.00±0.000
模型组	3	1.48±0.020 ^a	0.64±0.035 ^a
空白血清组	3	1.16±0.080 ^{ab}	0.66±0.042 ^a
含药血清组	3	1.00±0.040 ^{bc}	0.88±0.038 ^{abc}

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与空白血清组比较,^c $P<0.05$ 。



注: A. 空白组; B. 模型组; C. 空白血清组; D. 含药血清组。

图 12 各组大鼠心肌细胞内 JAK2、HIF-1 α 的蛋白表达

3.2.7 PCR 检测 HIF-1 α mRNA 及 JAK2 mRNA 的表达 与空白组比较,模型组与空白血清组细胞 HIF-1 α mRNA 相对表

达量显著增加($P<0.05$),含药血清组HIF-1 α mRNA相对表达量差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,空白血清组HIF-1 α mRNA差异无统计学意义($P>0.05$),含药血清组HIF-1 α mRNA相对表达量显著下降($P<0.05$)。与空白组比较,模型组、空白血清组、含药血清组JAK2 mRNA相对表达量显著降低($P<0.05$);与模型组比较,空白血清组中JAK2 mRNA差异无统计学意义($P>0.05$),含药血清组中JAK2 mRNA相对表达量显著增加($P<0.05$)。(见表8)

表8 各组HIF-1 α mRNA、JAK2 mRNA相对表达情况($\bar{x}\pm s$)

组别	n	HIF-1 α mRNA	JAK2 mRNA
空白组	3	0.77 \pm 0.10	1.17 \pm 0.13
模型组	3	1.21 \pm 0.15 ^a	0.35 \pm 0.03 ^a
空白血清组	3	1.18 \pm 0.14 ^a	0.32 \pm 0.05 ^a
含药血清组	3	0.91 \pm 0.18 ^{b,c}	0.99 \pm 0.07 ^{a,b,c}

注:与空白组比较,^a $P<0.05$;与模型组比较,^b $P<0.05$;与空白血清组比较,^c $P<0.05$ 。

4 讨 论

中医学中没有“心肌缺血再灌注损伤”这一名称,可归为“胸痹”“真心痛”“心悸”的范畴。其基本病机为心脉痹阻,病理性质为本虚标实,本虚为气血阴阳不足,标实为痰浊血瘀热毒,治疗则先治其标,后治其本^[6]。基于MIRI气阴两虚、瘀血阻络的病机特点,治疗要从活血化瘀、益气养阴入手。清营生脉汤由清营汤和生脉饮加减而成。清营汤出自温病大家吴鞠通的《温病条辨》,源于叶天士的《临证指南医案》,此方治证为温热病之热邪由气分转入营分之症;生脉饮源于《千金方》,用于治疗气阴两虚证。清营生脉汤组方中西洋参善补气养阴,又善清热生津;黄芪健脾补中、活血化瘀;二者共为君药。麦冬善治心肺阴虚;生地黄可清热凉血,养阴生津;金银花、连翘有轻清透泄之性,可使营分热邪向外从气分透泄而解,共为臣药。苦参可去心经火热,丹参可活血祛瘀、清心除烦,玄参滋阴降火、解毒凉血,配以五味子敛阴生津,四者共为佐药。甘草调和诸药,为使药。诸药合用达活血祛瘀、益气养阴、通络止痛之功效^[7]。

该研究根据网络药理学方法,筛选出清营生脉汤中槲皮素、木犀草素、山柰酚等活性成分与MIRI蛋白靶点相互作用较多,说明这3种活性成分在治疗MIRI过程中起到关键作用。研究^[8-9]发现,槲皮素能减轻心肌梗死面积和心肌凋亡率,降低ROS水平和减少氧化应激,有效减轻心肌缺氧损伤,并上调JAK2和STAT3的磷酸化水平,促进内源性能量的生成,改善心肌缺血后线粒体功能。木犀草素能通过激活并调控AKT/mTOR/STAT3信号通路,抑制氧化损伤、细胞凋亡和自噬而在IR中起到心脏保护作用^[10]。山柰酚能够降低ROS和NADPH氧化酶活性,使GSH显著升高,说明山柰酚可能通过抑制氧化应激刺激在心肌保护中发挥作用^[11]。PPI网络显示,MIRI与TNF、IL-6、JAK2、STAT3、HIF-1 α 等靶点关系密切。这些蛋白被认为是Hub靶点,可能在清营生脉汤治疗MIRI的过程中起着重要作用。为了预测清营生脉汤治疗MIRI的潜在分子机制,同时对靶蛋白进行了GO和KEGG通路富集分析。GO分析的结果显示,这些靶点主要涉及细胞膜筏、调控细胞传导的膜微区、

细胞活性、信号激活与信号传导等生物功能。KEGG通路分析结果显示清营生脉汤通过干预多条信号通路干预MIRI,其中TNF信号通路、HIF-1信号通路、JAK-STAT信号通路是具有代表性的通路。TNF包括TNF- α 和TNF- β 。TNF- α 和TNF- β 的产生虽有不同,但是二者可共用受体。TNF主要由活化的巨噬细胞、NK细胞及T淋巴细胞产生,目前多指TNF- α ^[12]。TNF- α 能抑制心肌收缩力和诱导心肌细胞凋亡。TNF- α 表达增加可诱导炎性信号转导通路激活,促进炎症细胞浸润,最终导致心功能障碍^[13]。IL-6为常见炎性因子,能够提高心肌细胞黏附作用,导致心肌纤维化、形成血栓、抑制心肌收缩力,损伤心肌细胞^[14]。JAK2和STAT3分别属于JAK和STAT家族成员。JAK2-STAT3信号通路主要通过调控生存素基因、增殖基因、血管内皮生长因子等的表达,促进细胞生长、增殖、分化、转移等^[15]。JAK蛋白是一类非受体型酪氨酸激酶,对于细胞生长、增殖和分化具有重要的调控作用。在氧化应激条件下,JAK2的激活对于改善左室重构和增强心肌收缩功能具有积极的作用,同时JAK2还能抑制ROS的产生。这表明JAK2在细胞的应激反应和保护中扮演着重要的角色^[16]。HIF-1是在氧平衡调节中起关键作用的转录因子,通过调控多种靶基因的转录活性来介导细胞对缺血和/或缺氧的适应性反应。HIF-1 α 是一种内源性抗氧化应激调节剂。当局部组织发生氧化应激时HIF-1 α 通路激活,活性氧水平也随之升高^[17],同时HIF-1 α 的降解途径被抑制,导致其稳定化。这种稳定的形式会转移到细胞核,并与HIF-1 β 形成活性复合物。活性复合物通过与缺氧反应元件的特定DNA序列结合来调节转录活性,从而调控基因表达^[18]。降低HIF-1 α 的表达能够下调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^[19]。本研究的分子对接结果显示,清营生脉汤中的主要活性成分木犀草素、山柰酚、槲皮素与关键核心靶点的结合活性良好,提示其在治疗过程中起关键作用。综上所述,氧化应激与炎症反应是MIRI发生发展过程中心肌损伤的重要机制,TNF、IL-6是炎症反应的关键信号分子,而HIF-1 α 、JAK2参与MIRI氧化应激整个过程。本课题组前期已经对清营生脉汤能够减轻MIRI的炎症反应进行了验证^[7],故本次选用HIF-1 α 、JAK2作为氧化应激的关键靶点进行实验验证。

在缺血期间,组织缺氧,导致能量代谢方式由脂肪酸氧化转变为糖酵解^[20]。缺血区域的血流供应重新建立时,产生大量的ROS,打破了原有的氧化还原平衡状态,使心肌细胞膜的收缩性和脂质过氧化降低,通过凋亡途径、自噬途径及炎症反应导致心肌细胞坏死^[21-22]。细胞实验结果显示,清营生脉汤浓度、时间为40%、12 h时对H₂O₂诱导的H9c2氧化应激模型作用效果最佳。清营生脉汤能降低LDH、cTnT的浓度,降低ROS水平,提高线粒体水平,并通过下调HIF-1 α 、上调JAK2蛋白和mRNA的表达,保护细胞免受氧化应激的损伤。

综上所述,清营生脉汤可能通过槲皮素、木犀草素、山柰酚等活性成分作用于HIF-1 α 、JAK2等核心蛋白靶点,抑制H₂O₂诱导的H9c2心肌细胞凋亡,提高细胞抗氧化应激能力,保护线粒体。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,为阐明清营生脉汤防治MIRI的潜在作用机制提供了新的方向和思路。

参考文献

[1] LI S, LI F, WANG Y, et al. Multiple delivery strategies of nanocarriers for myocardial ischemia-reperfusion injury: Current strategies and future prospective [J]. *Drug Deliv*, 2024, 31(1):2298514.

[2] 邓婷婷,皮锦婵,彭小平,等.茶多酚基于活性氧-线粒体途径发挥心血管保护作用的研究进展[J].食品工业科技,2025,46(4):434-442.

[3] 谢蝶,付殷,赵东,等.清营生脉汤激活Akt信号通路保护H9c2心肌细胞缺氧复氧损伤的作用研究[J].中国中医急症,2024,33(5):804-808.

[4] 杜海涛,王琳,丁洁,等.分子对接在中药开发的应用现状与挑战[J].中国中药杂志,2024,49(3):671-680.

[5] 柳思洋,冷雪娇,李新亮,等.基于网络药理学和细胞实验探讨草乌治疗关节炎的作用机制[J].中成药,2024,46(6):2095-2101.

[6] 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.

[7] 赵东,付殷,李睿如,等.清营生脉汤对心肌缺血再灌注损伤大鼠炎症因子的影响[J].中国中医急症,2023,32(2):204-207,237.

[8] 王盼盼,杨赞,刘冬兰,等.槲皮素对心肌缺血后线粒体能量代谢功能的影响[J].中国药房,2024,35(4):401-406.

[9] LIUC J, YAO L, HUY M, et al. Effect of quercetin-loaded mesoporous silica nanoparticles on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats and its mechanism[J]. *Int J Nanomedicine*, 2021, 16:741-752.

[10] 赵思宇,邵珣.木犀草素通过减少心肌细胞凋亡和自噬减轻缺血再灌注大鼠心肌损伤[J].解剖学杂志,2022,45(6):509-514.

[11] SUN C, WANG T T, WANG C Y, et al. The protective effect of kaempferol against ischemia/reperfusion injury through activating SIRT3 to inhibit oxidative stress [J]. *Braz J Cardiovasc Surg*, 2022, 37(3):335-342.

[12] 袁剑,孔令俊,丁海霞,等.肿瘤坏死因子- α 调控骨质疏松症作用机制研究[J].中国骨质疏松杂志,2023,29(3):426-430,436.

[13] 蔡振璇,张城炼,许卫攀.TRAF5通过调控IL-17A/NF- κ B信号通路减轻氧-糖剥夺/再灌注引起的心肌细胞炎症和细胞凋亡[J].岭南心血管病杂志,2024,30(1):97-104.

[14] 岳磊.血清CK-MB、IL-6、LDH水平联合检测在慢性心力衰竭诊断中的效能[J].中国民康医学,2024,36(11):108-111.

[15] 马立庆,张军.JAK2-STAT3信号通路与心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J].心脏杂志,2024,36(6):686-689,696.

[16] 王咏,王震,王成,等.基于网络药理学和动物实验研究红花-葶苈子药对通过改善心脏微环境抑制心肌纤维化的机制[J].中国中药杂志,2022,47(3):753-763.

[17] 李泽铭,张云涛,王茂林,等.缺氧诱导因子1 α 调节骨稳态在口腔颌面部疾病治疗中的作用与机制[J].中国组织工程研究,2025,29(26):5680-5687.

[18] 谌治安,袁颢,孙晗,等.参附注射液调控HIF-1 α /BNIP3通路介导线粒体自噬抗心肌缺血再灌注损伤作用[J].中国中西医结合杂志,2024,44(9):1086-1093.

[19] 陈铭,陈聪,廖菁,等.基于网络药理学及实验证探讨芎藭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.

[20] 孙丽阳,张艳,曾彬.PKM2对心肌缺血保护作用的研究进展[J].中国心血管杂志,2024,29(2):178-182.

[21] 王毓,彭建业,朱明燕.MOTS-c肽对心肌缺血再灌注大鼠心肌损伤的保护作用[J].安徽医科大学学报,2024,59(8):1405-1410.

[22] 宋鉴书,曹策,李浩然,等.心肌缺血再灌注损伤氧化应激机制及中药的保护作用[J].中国中药杂志,2024,49(13):3452-3461.

(收稿日期:2024-11-09 编辑:罗英姣)