

基于网络药理学和细胞实验探讨栀子豉汤干预心肌梗死的作用

马 慷¹, 任 美¹, 任素娟¹, 周 瑞^{1*}, 宋忠兴^{1*}, 刘妍如¹, 唐志书^{1,2}

[1. 陕西中医药大学/陕西中药资源产业化省部共建协同创新中心/秦药特色资源研究开发国家重点实验室(培育)/陕西省创新药物研究中心, 陕西 咸阳 712083; 2. 中国中医科学院研究生院, 北京 100700]

摘要: **目的** 基于网络药理学、分子对接技术及体外细胞实验探究栀子豉汤干预心肌梗死(MI)的潜在分子机制。**方法** 根据TCMSP、SwissTargetPrediction和GeneCards等数据库以及相关文献,筛选栀子豉汤主要成分靶点和心肌梗死相关靶点。利用STRING 11.5数据库和Cytoscape 3.7.2软件构建蛋白互作网络,拓扑分析筛选核心靶点,对其进行GO和KEGG富集分析并构建“药物-成分-靶点-通路”网络。运用AutoDock Vina进行关键成分与核心靶点的分子对接。通过MTT法、DAPI染色法、罗丹明123染色法和蛋白免疫印迹法验证栀子豉汤对H9c2细胞的作用。**结果** 筛选得到栀子豉汤中槲皮素、藏花酸、藏红花素等51种活性成分调控IL10、Akt1、TNF、HIF1A等29个核心靶点,作用机制涉及信号转导过程、刺激反应和蛋白结合等基因功能以及肿瘤坏死因子、AGE-RAGE和PI3K-Akt等信号通路。分子对接显示,栀子豉汤中重要的活性成分槲皮素、青蒿素、黄豆苷和染料木素与Akt1靶点紧密结合。细胞实验证实,栀子豉汤能够恢复H8/R12诱导的H9c2细胞活力,升高线粒体膜电位,改善细胞氧化应激水平,以及调控p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、Bcl-2和caspase-3蛋白表达。**结论** 通过网络药理学与体外细胞实验验证了栀子豉汤可能通过调控PI3K/Akt信号通路,发挥保护心肌损伤的作用。

关键词: 栀子豉汤; 心肌梗死; 网络药理学; 分子对接技术; PI3K/Akt信号通路

中图分类号: R285.5; R966

文献标志码: B

文章编号: 1001-1528(2023)08-2752-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2023.08.052

心肌梗死在国内外都有着较高的发病率和死亡率,且呈逐年上升的趋势^[1]。目前心肌梗死的治疗主要包括药物治疗、溶栓治疗和冠状动脉搭桥术等,虽然疗效显著,但在治疗的同时容易发生一些不可预测的并发症,包括出血、缺血再灌注损伤和冠状动脉再狭窄等^[2-3]。

近年来中药复方在预防心血管疾病中发挥着重要的作用,例如四君子汤能够降低梗塞大鼠心肌酶的释放和心肌缺血损伤^[4];复方龙脉宁能改善大鼠急性心肌梗死的心肌损伤,降低大鼠血清中白介素1 β (IL-1 β)、白介素6(IL-6)等表达^[5]。栀子豉汤记载于《伤寒论》,具有镇静催眠、抗氧化和调节内分泌的作用^[6]。处方中栀子可发挥泻火除烦,清热利湿功效;淡豆豉可发挥解表除烦,宣发郁热功效,常用于寒热,头痛,烦躁胸闷,虚烦不眠等^[7]。在《伤寒论》^[8]第77、78条记载中,“发汗,若下之而烦热,胸中窒者,栀子豉汤主之。”“伤寒五六日,大下之后,身热不去,心中结痛者,未欲解也,栀子豉汤主之。”由此可见,栀子豉汤有可能发挥治疗心血管疾病的作用。因此,本研究拟采用网络药理学与细胞实验方法,预测栀子豉汤预防心肌梗死的作用机制。

1 材料

1.1 细胞 大鼠心肌细胞株H9c2细胞,购自中国科学院上海细胞库。将H9c2细胞复苏后于DMEM培养液(含10%胎牛血清、1%青链霉素溶液)中,置于37℃、5%CO₂培养箱中培养,观察细胞形态,每2d更换1次培养液,当生长密度达到80%左右时,进行传代,取对数生长期的细胞进行实验。

1.2 药物与试剂 栀子(批号PR0201805020004)、淡豆豉(批号PR0201805020004),均购自陕西兴盛德药业有限责任公司,药材由陕西中医药大学刘世军教授鉴定为茜草科植物栀子 *Gardenia jasminoides* Ellis 的干燥成熟果实,豆科植物大豆的成熟种子的发酵加工品。磷酸盐缓冲液(PBS,批号02B09A21,武汉博士德生物工程有限公司);胎牛血清(FBS)、高糖DMEM培养基(批号1552680、2030099,美国Biological Industries公司);RIPA裂解液、DAPI染色、MTT(批号P0013B、C1006、C0009S,上海碧云天生物技术有限公司);二甲亚砜(DMSO,批号D-5879,美国Sigma公司);超氧化物歧化酶(SOD)试剂盒、丙二醛(MDA)试剂盒、乳酸脱氢酶(LDH)试剂盒

收稿日期: 2023-01-10

基金项目: 中央本级重大增减支项目“名贵中药资源可持续利用能力建设项目”(2060302);2020年咸阳市重大科技专项(2020K01-20)

作者简介: 马 慷(1995—),男,硕士,从事中药药理研究。Tel: 19891032740, E-mail: 1870190355@qq.com

* **通信作者:** 周 瑞(1985—),女,博士,副教授,硕士生导师,从事中药药理作用机制研究。Tel: (029) 38182209, E-mail: zhouruiswg@126.com

宋忠兴(1974—),男,副主任药师,从事中药新产品研发与转化研究。E-mail: szx74816@sina.com

(批号 A1001-2-1、A003-4-1、A020-2-2, 南京建成生物工程研究所); 罗丹明 123 检测试剂盒 (批号 KGA217, 江苏凯基生物技术股份有限公司); Akt、p-Akt、Bcl-2、caspase-3 鼠单克隆抗体 (批号 4691S、4060S、9668T、03261556, 美国 Cell Signaling Technology 公司); PI3K 鼠单克隆抗体、羊抗鼠二抗 (批号 60225-1-Ig、20000144, 武汉三鹰生物技术有限公司); p-PI3K 鼠单克隆抗体 (批号 AF3241, 美国 Affinity 公司)。

1.3 仪器 Multiskan GO 1510 型全波长酶标仪、I50i/240i CO₂ 型细胞培养箱、Micro17R 型微量冷冻离心机、Forma 900 Series 型 -80 °C 超低温冰箱 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); PA-1-M 型配气式厌氧细胞培养箱 (无锡善禾生物医药技术有限公司); SW-CJ-2FD 型洁净工作台 (苏净集团苏州安泰空气技术有限公司); IX73 型倒置显微镜 (日本奥林巴斯公司); Power Pac™ 电泳分析仪、Gel Doc XR+ 型伯乐凝胶成像仪 (美国 Bio-Rad 公司); YC-1800 型干燥喷雾机 (上海雅程仪器设备有限公司); ME204/02 型电子天平 (瑞士 Mettler Toledo 公司)。

2 方法

2.1 网络药理学

2.1.1 药物活性成分筛选 检索中医药整合药理学网络计算研究平台 (TCMSP, <https://www.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>)、中医药百科全书 (ETCM, <http://www.tcmip.cn/ETCM/index.php>) 数据库, 并查阅相关文献^[9-12], 获取药物成分信息。

2.1.2 药物靶点筛选 运用 TCMSP、ETCM 和 SwissTargetPrediction (<http://www.swiss-target-prediction.ch/>) 数据库, 搜集栀子、淡豆豉活性成分靶点。

2.1.3 疾病相关靶点筛选 通过 OMIM (<http://www.omim.org/>)、TTD (<http://bidd.nus.edu.sg/group/cjtt/>)、GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和 NCBI-Gene (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>) 数据库, 以“myocardial infarction”为关键词搜索心肌梗死有关靶点, 将搜索得到的疾病靶点与药物成分靶点取交集。

2.1.4 PPI 网络构建及 GO、KEGG 富集分析 运用 STRING 11.5 数据库 (<https://string-db.org>), 将成分-疾病的共有靶点进行 PPI 网络构建; 通过京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 进行关键靶点的代谢通路富集分析。使用在线作图网站微生信将 GO 分析结果以柱状图输出, KEGG 通路富集结果以气泡图输出。

2.1.5 “药物-成分-靶点-通路”网络构建分析 筛选栀子豉汤成分靶点, 富集得到心肌梗死的主要信号通路以及各通路对应的相关靶点, 运用 Cytoscape 3.7.2 软件构建“药物-成分-靶点-通路”网络。利用 Network Analyzer 功能进行网络拓扑学分析, 根据 Degree 值分析主要活性成分与核心靶点。

2.1.6 分子对接虚拟筛选 将“药物-成分-靶点-通路”

网络中度值排名靠前的 4 个化学成分, 结合 PPI、KEGG 筛选出来的 Akt1 靶点进行分子对接。从 TCMSP 数据库下载上述有效成分的 MOL2 格式文件, 从 PDB (<http://www.rcsb.org/pdb>) 数据库中获得核心蛋白的 3D 结构, 使用 AutoDock Vina 进行分子对接, 并将结合能最低的模型运用 Chimera 1.15rc 软件进行可视化。

2.2 细胞实验

2.2.1 栀子豉汤提取物制备 取栀子 280 g 和淡豆豉 960 g, 加 10 倍量水, 水煎煮提取 3 次, 每次 1 h, 过滤, 合并滤液, 离心, 得水提液; 水提液经适当浓缩后, 采用喷雾干燥技术制备成干膏粉 (进风口温度 120 °C, 进料速度 5 mL/min)。实验时用 PBS 将栀子豉汤干膏粉溶解, 经 0.22 μm 水膜过滤后备用。

2.2.2 细胞分组、造模及给药 预先进行不同时间的缺氧/复氧 (H/R) 处理, 以确定合适的造模条件。细胞分为对照组、模型组和栀子豉汤低、中、高剂量组 (0.1、0.5、1.0 mg/L), 栀子豉汤各剂量组在 37 °C、5% CO₂ 正常培养条件下加入栀子豉汤提取物预保护 2 h, 对照组和模型组不做任何处理。然后将模型组与栀子豉汤组在 37 °C、95% N₂、5% CO₂ 培养箱中缺氧 8 h, 之后在正常培养条件下复氧 12 h; 对照组细胞在正常培养条件下培养相同时间。

2.2.3 细胞活力检测 取对数生长期 H9c2 细胞接种于 96 孔板, 每孔约 5×10⁴ 个细胞, 每组设置 3 个复孔, 按“2.2.2”项下方法分组、造模及给药, 每孔加入 15 μL MTT 溶液, 37 °C 孵育 4 h, 弃培养基, 加入 150 μL 二甲亚砜充分溶解结晶, 通过酶标仪在 490 nm 波长处测定光密度 (OD)。

2.2.4 DAPI 染色观察细胞形态 H9c2 细胞以每孔 5×10⁴ 个的密度接种在 96 孔板中, 按“2.2.2”项下方法分组、造模及给药, 细胞使用 5 μg/mL DAPI 在 37 °C 环境中避光染色 15 min, 于荧光显微镜下观察细胞形态。

2.2.5 线粒体膜电位检测 H9c2 细胞以每孔 5×10⁴ 个的密度接种在 96 孔板中, 按“2.2.2”项下方法分组、造模及给药, 细胞使用 2 μmol/L 罗丹明 123 在 37 °C 中避光孵育 60 min, 于荧光显微镜下分析线粒体膜电位变化。

2.2.6 SOD、LDH 活性和 MDA 水平检测 H9c2 细胞以每孔 1×10⁶ 个的密度接种在 6 孔板中, 按“2.2.2”项下方法分组、造模及给药, 收集各组细胞, 加入 200 μL RIPA 裂解液, 冰上裂解 20 min, 离心取上清液, 测定蛋白浓度, 根据 SOD、LDH 和 MDA 试剂盒说明书检测细胞 SOD、LDH 活性和 MDA 水平。

2.2.7 蛋白免疫印迹法检测 PI3K、Akt、Bcl-2、caspase-3 蛋白表达 H9c2 细胞以每孔 5×10⁵ 个的密度接种在 6 孔板中, 按“2.2.2”项下方法分组、造模及给药, 收集各组细胞, 3 000×g 离心 5 min, 细胞沉淀加入 RIPA 裂解液于冰上裂解, 离心取上清液, 使用 BCA 法对蛋白质进行定量。蛋白经电泳、转膜、封闭、孵育一抗二抗后, ECL 法进行曝光, 用增强化学检测系统检测各蛋白表达。

2.2.8 统计学分析 通过 GraphPad Prism 8.0 软件进行处理, 数据以 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 t 检验。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 网络药理学

3.1.1 栀子豉汤活性成分与靶点筛选 经数据库及相关文献筛选, 剔除无靶点的成分, 共得到栀子化学成分 41 个, 淡豆豉 10 个, 见表 1。利用 Uniprot 数据库去除重复值, 得到 715 个靶点基因。

表 1 栀子豉汤主要成分

化合物	中文名称	来源
crocetin	藏花酸	栀子
3-epioleanolic acid	3-表油酸	栀子
ammidin	氨酰胺	栀子
sudan III	苏丹三	栀子
quercetin	槲皮素	栀子
beta-sitosterol	β -谷甾醇	栀子
kaempferol	山奈酚	栀子
stigmasterol	豆甾醇	栀子
mandenol	甘露醇	栀子
supraene	超烯	栀子
isoimperatorin	异欧前胡素	栀子
ethyl oleate (NF)	油酸甲酯	栀子
5-hydroxy-7-methoxy-2-(3,4,5-trimethoxyphenyl) chromone	5,7-二羟基-3-甲氧基-2-(3,4,5-三甲氧基苯基)-4H-色烯-4-酮	栀子
3-methylkempferol	3-甲基肯奈酚	栀子
GBGB	京尼平-1-龙胆二苷	栀子
dipentene	柠檬烯	栀子
rutin	芦丁	栀子
poriferasterol	茯苓甾醇	栀子
3,3,7-trimethylocta-1	3,3,7-三甲基辛烷-1	栀子
heriguard	绿原	栀子
oleanolic acid	齐墩果酸	栀子
2,3-dithiahexane	2,3-二噻己烷	栀子
benzyl acetate	乙酸苄酯	栀子
genipin	京尼平	栀子
artemisetin	青蒿素	栀子
deacetyl asperulosidic acid methyl ester	6A-羟基栀子苷	栀子
3,4-di-O-caffeoylquinic acid	3,4-二邻咖啡酰奎宁酸	栀子
gardenoside	栀子花	栀子
crocin	藏红花素	栀子
hederagenin	常春藤酚	栀子
neochlorogenic acid	对苯二甲醌	栀子
geniposide	栀子苷	栀子
secologanoside	芥子苷	栀子
sinapinic acid	芥子酸	栀子
caffeic acid	咖啡酸	栀子
methyl gallate	没食子酸甲酯	栀子
shanzhiside	山栀苷	栀子
gardenolic acid B	栀子酸 B	栀子
epijasminoside A	表茉莉苷 A	栀子
jasminodiol	茉莉二醇	栀子
6A-hydroxygeniposide	6A-羟基尼苷	栀子
glycitein	大豆黄素	淡豆豉
daidzein	黄豆苷元	淡豆豉
daidzin	黄豆苷	淡豆豉
genistin	染料木素	淡豆豉
glycitin	甘草素	淡豆豉
adenine	腺嘌呤	淡豆豉
uracil	尿嘧啶	淡豆豉
syringate	益母草碱	淡豆豉
prunin	普鲁宁	淡豆豉
tetramethylpyrazine	四甲基吡嗪	淡豆豉

3.1.2 心肌梗死靶点筛选 以“myocardial infarction”为检索词进行检索,收集心肌梗死靶点,其中 GeneCards 数据库 1 021 个, CBI-Gene 数据库 383 个, OMIM 数据库 200 个,删除重复靶点,得到 1 409 个疾病靶点,将疾病靶点与成分靶点取交集,共得交集靶点 280 个,见图 1。

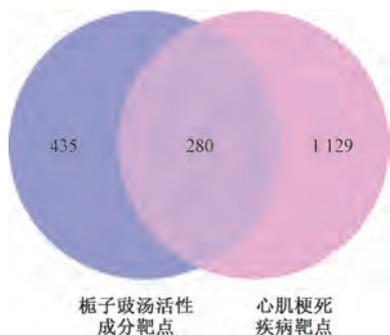


图 1 槲子豉汤活性成分靶点-心肌梗死疾病靶点韦恩图

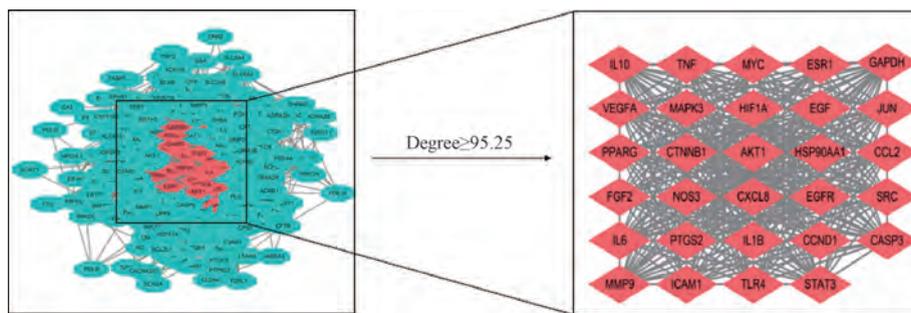


图 2 PPI 网络图

要活性成分有槲皮素、青蒿素、黄豆苷、染料木素等,核心靶点主要包括 PTGS2、MAPK3、Akt1、TNF 等,主要通过癌症通路、肿瘤坏死因子信号通路、AGE-RAGE 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等发挥作用。

3.1.6 分子对接验证 根据“药物-成分-靶点-通路”网络筛选得到 Degree 值排名靠前的 4 个成分,结合 KEGG 通路分析筛选得到靶点 Akt1,使用 AutoDock Vina 软件进行分子对接,获得结合能,结果见表 2。一般认为 score 值小于-7.0 kcal/mol 时,表明配体受体具有强烈的结合活性^[13]。槲子豉汤中主要成分槲皮素、青蒿素、黄豆苷、染料木素与 Akt1 均强烈结合,对接结果模型运用 Chimera1.15rc 进行可视化,见图 5。

表 2 槲子豉汤核心成分与 Akt1 对接结合能 (kcal/mol)

靶点	结合能			
	槲皮素	青蒿素	黄豆苷	染料木素
Akt1	-8.4	-8.1	-8.6	-7.4

3.2 细胞实验验证

3.2.1 槲子豉汤对 H/R 诱导的 H9c2 细胞活力的影响 图 6A 显示,不同 H/R 时间处理,细胞存活率逐渐降低 ($P < 0.01$),因此选取 H8/R12 作为后续造模条件。图 6B 显示,不同剂量槲子豉汤对 H9c2 细胞均有一定的促增殖作用 ($P < 0.01$)。图 6B 显示,与对照组比较,H/R 处理后 H9c2 细胞活力降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,不同剂量槲子

3.1.3 PPI 网络构建 将槲子豉汤预防心肌梗死病的 280 个靶点导入 Cytoscape 3.7.2 软件,将 PPI 网络进行拓扑分析,以 Degree ≥ 95.25 为条件,筛选得到 29 个核心靶点,见图 2,由此可知,IL10、Akt1、TNF、HIF1A 等可能为槲子豉汤干预心肌梗死的核心靶点。

3.1.4 GO 功能及 KEGG 通路富集分析 将 29 个交集靶点导入 STRING 11.5 数据库进行检索并导出数据,利用在线作图软件微生信绘制 GO 分析柱状图 (图 3A) 和 KEGG 通路分析气泡图 (图 3B)。槲子豉汤干预心肌梗死作用机制可能涉及信号转导过程、刺激反应和蛋白结合等基因功能,以及癌症、AGE-RAGE 和 PI3K-Akt 等信号通路。

3.1.5 “药物-成分-靶点-通路”网络构建 “药物-成分-靶点-通路”网络见图 4,由此可知,网络中共有 102 个节点,菱形代表药物,凹四边形代表通路,三角形代表成分,圆形代表活性靶点,得到槲子豉汤发挥保护心肌梗死的主

豉汤对 H/R 诱导的 H9c2 细胞具有一定的保护作用 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。

3.2.2 槲子豉汤对 H/R 诱导的 H9c2 细胞形态的影响 图 7 显示,明场下观察可见对照组细胞形态完整;模型组细胞出现明显的皱缩现象,细胞数量减少;而不同剂量槲子豉汤干预后,细胞形态逐渐恢复,细胞数量增多。荧光下观察可见模型组 DAPI 染色的细胞荧光强度减弱,表明细胞核数量减少;而槲子豉汤干预可以保护 H/R 诱导的细胞形态改变及数目减少,证实了槲子豉汤对 H/R 诱导的细胞形态改变及数目减少具有一定的保护作用。

3.2.3 槲子豉汤对 H/R 诱导的 H9c2 细胞膜电位变化的影响 图 8 显示,明场条件下观察到模型组细胞膜明显皱缩,荧光条件下可见模型组罗丹明 123 染色荧光强度减弱,说明 H/R 导致了细胞线粒体膜电位的下降;不同剂量槲子豉汤处理后,荧光强度逐渐升高,表明槲子豉汤可以减轻 H/R 诱导的细胞损伤导致的线粒体功能障碍。

3.2.4 槲子豉汤对 H/R 诱导的 H9c2 细胞 SOD、LDH 活性和 MDA 水平的影响 图 9 显示,与对照组比较,模型组细胞 SOD 活性降低 ($P < 0.01$),LDH 活性和 MDA 水平升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,槲子豉汤各剂量组 SOD 活性升高 ($P < 0.01$),LDH 活性和 MDA 水平降低 ($P < 0.01$)。以上结果表明,槲子豉汤可能通过升高 SOD 活性和抑制 LDH 活性、MDA 水平来改善 H/R 诱导的心肌细胞损伤。

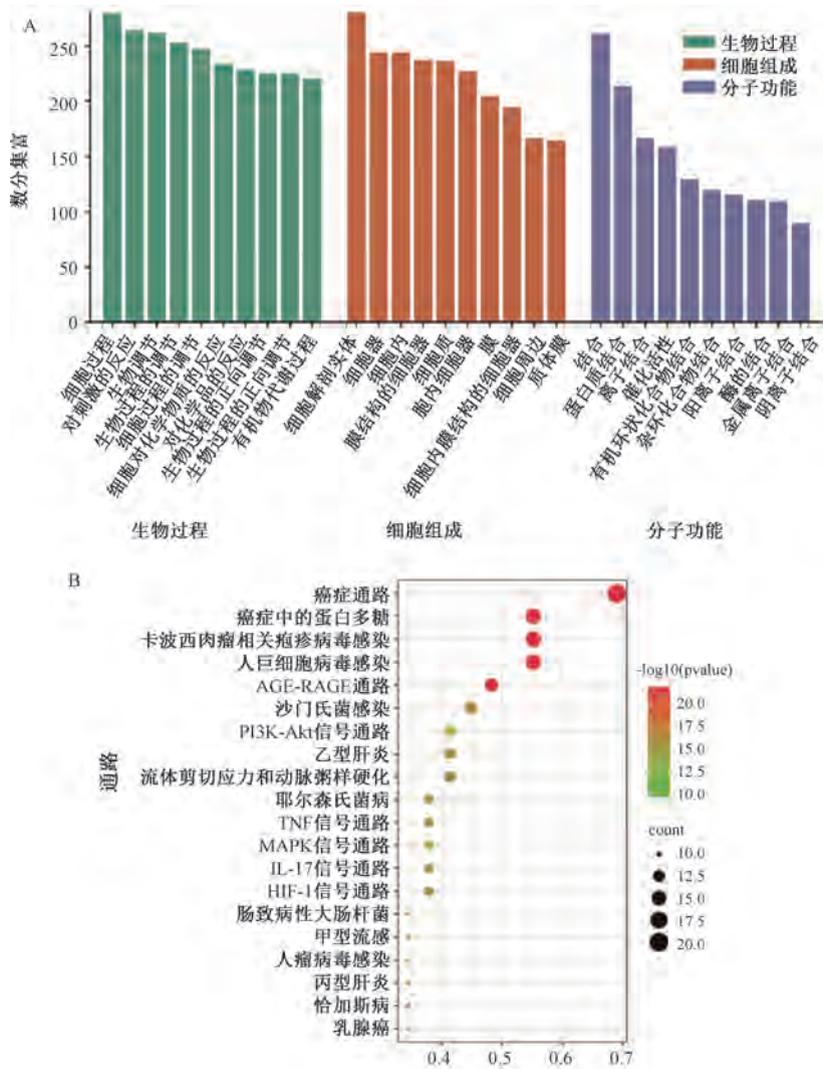


图3 GO功能(A)和KEGG通路(B)富集分析

3.2.5 栀子豉汤对 H/R 诱导的 H9c2 细胞 PI3K/Akt 信号通路蛋白表达的影响 分子对接结果发现栀子豉汤中的活性成分与 Akt1 靶点具有较强的结合力，而 Akt1 是 PI3K/Akt 信号通路中的重要靶点^[14]。图 10 显示，与对照组比较，模型组细胞 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt 和 caspase-3 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，栀子豉汤中、高剂量组细胞 p-Akt/Akt 和 caspase-3 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)，Bcl-2 蛋白表达升高 ($P < 0.01$)，栀子豉汤中剂量组细胞 p-PI3K/PI3K 蛋白表达降低 ($P < 0.01$)。

4 讨论

心肌梗死是临床常见的心血管类疾病，临床上多表现为心前区持续的压榨性疼痛^[15]。正常情况下，氧化还原反应处于平衡的状态，而氧化应激是机体内氧化还原反应失去平衡后产生的不利因素，心肌缺血再灌注早期产生的大量 ROS 会造成严重的心肌损伤，降低心肌细胞的存活率^[16]。心肌严重而持续缺血、心肌供氧量失衡等多种因素均可诱发心肌梗死^[17]。本研究采用网络药理学预测了栀子豉汤中主要活性成分为槲皮素、青蒿素、

黄豆苷、染料木素等，可能通过作用于 EGFR、MAPK3、Akt1 等靶点，调控 PI3K/Akt、流体剪切应力和动脉粥样硬化、肿瘤坏死因子等信号通路实现对心肌梗死的干预作用。

PI3K/Akt 通路是参与调控细胞的分化、增殖和凋亡等功能的重要信号通路^[18]。Yu 等^[19]研究发现，伊伐布雷定可通过抑制 PI3K/Akt/mTOR 通路预防心肌损伤小鼠心脏肥大和纤维化。Dai 等^[20]研究发现，PI3K/Akt/mTOR 途径在心肌梗死期间被激活，而伊伐布雷定可有效地抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号传导。Qin 等^[21]研究发现，人参皂苷 Rb1 通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制心肌细胞自噬，保护急性心肌梗死后的心肌缺血/再灌注细胞损伤。本研究发现，H/R 可诱导细胞 p-PI3K/PI3K、p-Akt/Akt、caspase-3 蛋白表达升高，推测 PI3K/Akt 通路可能被激活，证实 H/R 条件造成的心肌细胞损伤与 PI3K/Akt 通路和凋亡有关。

槲皮素、青蒿素、黄豆苷和染料木素具有保护心肌作用。槲皮素可通过调控 PI3K/Akt/mTOR 通路，降低 TNF- α 、IL-6、MDA 水平^[22]。青蒿素可剂量依赖性地抑制

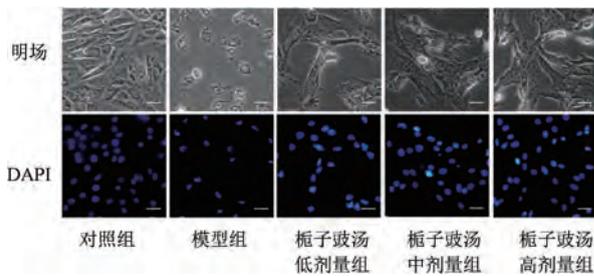


图7 栀子豉汤对H/R诱导的H9c2细胞形态的影响 (×400)

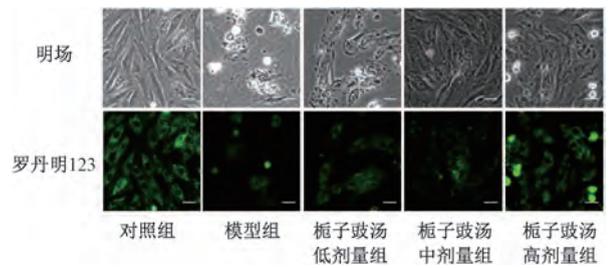
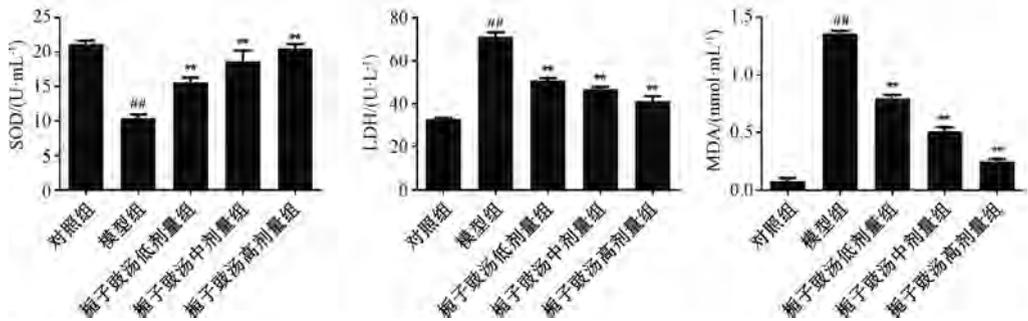
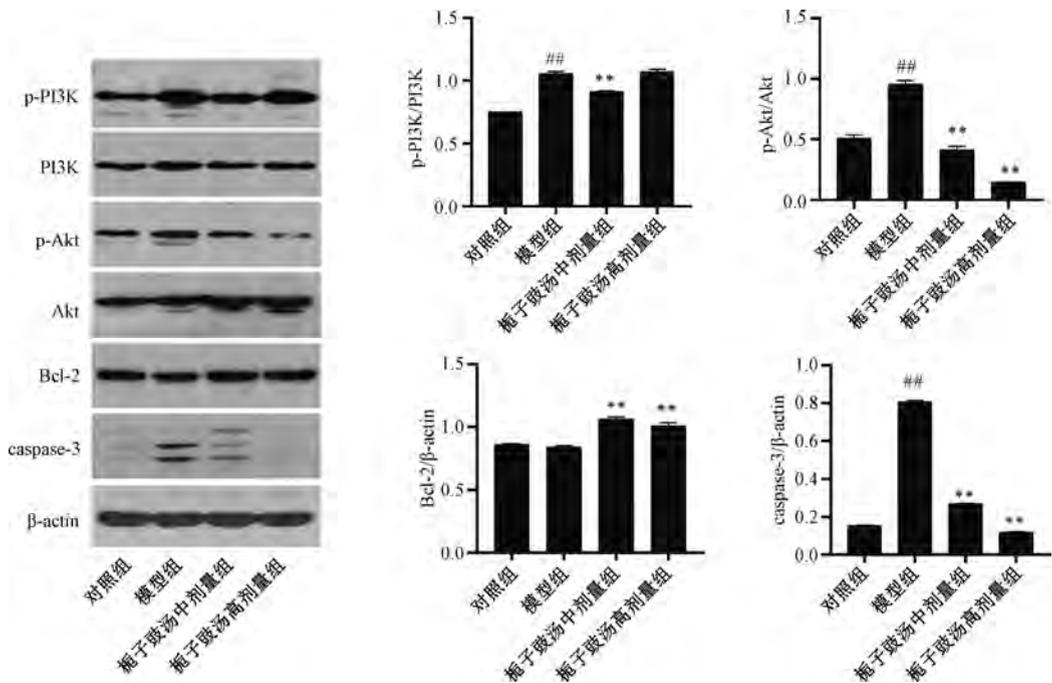


图8 栀子豉汤对H/R诱导的H9c2细胞线粒体膜电位的影响 (×400)



注：与对照组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

图9 栀子豉汤对H/R诱导的H9c2细胞SOD、LDH活性和MDA水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)



注：与对照组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

图10 栀子豉汤对H/R诱导的H9c2细胞PI3K/Akt信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

PI3K/Akt信号通路的活化是由PI3K激活开始，PI3K活化使质膜上产生第二信使与细胞内含有PH结构域的信号蛋白Akt和PDK1结合，促使PDK1磷酸化Akt蛋白，进而激活mTOR，被激活的mTOR提高RNA的翻译效率，从而调节细胞生长的功能^[26]。丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶Akt由Akt1、Akt2和Akt3这3个独立基因编码，是PI3K信号通路的中心，是调节细胞存活信号通路的关键节点。本研究

结果说明栀子豉汤可恢复受损心肌细胞活力，改善线粒体功能和细胞氧化应激反应，抑制H/R诱导的p-Akt/Akt、caspase-3表达升高，表明栀子豉汤可能通过抑制PI3K/Akt途径的激活发挥保护H9c2细胞的作用。

综上所述，本研究利用网络药理学建立了栀子豉汤预防心肌梗死的“药物-成分-靶点-通路”网络，通过分析其对心肌梗死的可能靶点及作用通路，运用分子对接技术和

细胞实验验证,表明栀子豉汤可能通过调控 PI3K/Akt 信号通路,恢复心肌受损细胞活力从而保护心肌梗死。

参考文献:

[1] Sajid A, Ahmad T, Ikram M, *et al.* Cardioprotective potential of aqueous extract of *Fumaria indica* on isoproterenol-induced myocardial infarction in SD rats [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2022, 2022: 2112956.

[2] 曹康迪, 胡帅航, 王 烁, 等. 栀子豉汤的研究进展[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(6): 182-185.

[3] Sabatine M S, Bergmark B A, Murphy S A, *et al.* Percutaneous coronary intervention with drug-eluting stents versus coronary artery bypass grafting in left main coronary artery disease; an individual patient data meta-analysis [J]. *Lancet*, 2021, 398(10318): 2247-2257.

[4] 曾振兴, 黄勇其, 钱海兵. 四君子汤预处理对急性心肌梗死大鼠的保护作用研究[J]. 时珍国医国药, 2010, 21(8): 1940-1941.

[5] 卜雕雕, 苏 卓, 柏希慧, 等. 复方龙脉宁对急性心肌梗死模型大鼠 TLR4/MyD88/NF- κ B p65 信号通路的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(9): 67-73.

[6] 滕 俊, 张永生, 唐卓然. 《伤寒论》栀子豉汤治湿热证议[J]. 河南中医, 2020, 40(3): 325-328.

[7] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 2020 年版[S]. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 259.

[8] 成无己. 《注解伤寒论》[M]. 北京: 人民卫生出版社, 2018.

[9] 周新新, 崔 悦, 朱鹤云, 等. 栀子的化学成分、药理作用及提取工艺的研究进展[J]. 吉林医药学院学报, 2021, 42(5): 374-376.

[10] 李海波, 马金凤, 庞倩倩, 等. 栀子的化学成分研究[J]. 中草药, 2020, 51(22): 5687-5697.

[11] 胡 斌, 王秋红, 姜 海, 等. 淡豆豉抗菌活性及化学成分分析[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(6): 163-167.

[12] 胡钟姣, 郑露露, 许光亚, 等. 基于网络药理学和质量源于设计理念的栀子豉汤提取工艺研究[J]. 中草药, 2022, 53(7): 1973-1982.

[13] 苏 洁, 周 瑞, 王 梅, 等. 基于网络药理学的秦七风湿方干预骨性关节炎活性成分及作用机制预测[J]. 中国现代中药, 2022, 24(3): 476-487.

[14] Karar J, Maity A. PI3K/Akt/mTOR pathway in angiogenesis [J]. *Front Mol Neurosci*, 2011, 4: 51.

[15] Abbasi J. Highlights from the American college of cardiology's scientific sessions—New heart failure management guidelines, alirocumab after a myocardial infarction, and treating mild chronic hypertension in pregnancy[J]. *J Am Med Assoc*, 2022, 327(18): 1745-1747.

[16] Spirito A, Mehran R. Elderly patients with acute myocardial infarction: Targeted or complete revascularization? [J]. *Catheter Cardiovasc Interv*, 2022, 99(4): 979-980.

[17] Camaj A, Fuster V, Giustino G, *et al.* Left ventricular thrombus following acute myocardial infarction: JACC state-of-the-art review [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2022, 79(10): 1010-1022.

[18] Zeng L, Xiao Q, Chen M, *et al.* Vascular endothelial cell growth-activated XBP1 splicing in endothelial cells is crucial for angiogenesis[J]. *Circulation*, 2013, 127(16): 1712-1722.

[19] Yu Y, Hu Z, Li B, *et al.* Ivabradine improved left ventricular function and pressure overload-induced cardiomyocyte apoptosis in a transverse aortic constriction mouse model [J]. *Mol Cell Biochem*, 2019, 450(1-2): 25-34.

[20] Dai Y, Chen Y, Wei G, *et al.* Ivabradine protects rats against myocardial infarction through reinforcing autophagy via inhibiting PI3K/Akt/mTOR/p70S6K pathway[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 1826-1837.

[21] Qin G W, Lu P, Peng L, *et al.* Ginsenoside Rb1 inhibits cardiomyocyte autophagy via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and reduces myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. *Am J Chin Med*, 2021, 49(8): 1913-1927.

[22] Ashrafizadeh M, Samarghandian S, Hushmandi K, *et al.* Quercetin in attenuation of ischemic/reperfusion injury: A review[J]. *Curr Mol Pharmacol*, 2021, 14(4): 537-558.

[23] 李亚云, 宗刚军, 黄月皎. 青蒿素对心肌梗死大鼠心肌损伤及 TLR4/MyD88/NF- κ B p65 信号通路的影响[J]. 中国煤炭工业医学杂志, 2021, 24(3): 225-230.

[24] 刘亚辉. 黄豆苷元对过氧化氢诱导大鼠 H9c2 细胞衰老的延缓作用[D]. 延吉: 延边大学, 2021.

[25] Shi Y N, Zhang X Q, Hu Z Y, *et al.* Genistein protects H9c2 cardiomyocytes against chemical hypoxia-induced injury via inhibition of apoptosis[J]. *Pharmacology*, 2019, 103(5-6): 282-290.

[26] Wang X, Liu Y, Hou H, *et al.* miRNA-29 aggravates myocardial infarction via inhibiting the PI3K/mTOR/HIF1 α /VEGF pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14(7): 3129-3142.