保元活络方改善心肌缺血再灌注损伤的作用机制预测及验证

许禄华[1,2]，周旭[1,2]，蒋峰[1,2]，李亮[1]，宋银枝[1]，曾志聪[1]，吴子君[1]，林丰夏[1*][1.广州中医药大学附属深圳市宝安中医院(集团)，广东 深圳 518133；2.广州中医药大学研究生院，广州 510405]

摘要：目的 探讨保元活络方改善心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury，MIRI)的可能作用和机制。**方法** 从 TCMSP 数据库获取保元活络方(丹参、三七、山楂、黄芪和西洋参)的成分和作用靶点，从 GeenCard、OMIM 数据库获取 MIRI 靶点，交集获得保元活络方改善 MIRI 的可能靶点；使用 Cytoscape 软件构建保元活络方作用 MIRI 的“成分-靶点”网络，拓扑分析得出关键化合物；使用 STRING 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用(protein protein interaction，PPI)网络，并导入 Cytoscape 软件进行优化，聚类分析得出关键靶标；使用 ClueGo 插件对核心靶标进行 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析。缺氧复氧(hypoxia and reoxygenation，H/R)处理大鼠心肌细胞(H9C2)建立 MIRI 模型，初步验证保元活络方含药血清调控 NF-κB 通路从线粒体途径抑制 H/R 诱导的心肌细胞凋亡的作用机制。**结果** 共筛选得到槲皮素、山柰酚、异鼠李素等 11 个关键化合物，作用靶标 51 个；PPI 网络聚类分析得到 2 个子网络，涉及 CASP3、NOS3、IL-6、ICAM1 等 16 个靶标；GO 分析得到体外凋亡信号通路、对活性氧的反应、血管内皮细胞迁移等 239 个生物学功能；KEGG 富集得到 TNF 信号通路、NF-κB 信号通路、VEGF 信号通路、PPAR 信号通路等 63 条通路。细胞试验显示，H/R 处理后，各组 H9C2 心肌细胞的细胞活力降低，细胞凋亡增加，caspase-3、caspase-9 活性增强，NF-κB p65、caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达水平增加，IκBα、Bcl-2 蛋白表达水平降低；而保元活络方含药血清干预可逆转 H/R 诱导的上述损伤。**结论** 保元活络方可以通过多成分-靶点-通路的途径，发挥抗炎、抗氧化应激、抗细胞凋亡和改善冠脉血管内皮功能等作用从而改善 MIRI，其中调控 NF-κB 通路，从线粒体途径抑制 H/R 诱导的心肌细胞凋亡可能是其关键机制。

关键词：保元活络方；心肌缺血再灌注损伤；缺氧复氧；网络药理学；细胞凋亡

中图分类号：R285.5　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**1007-7693(2022)03-0300-12

DOI: 10.13748/j.cnki.issn1007-7693.2022.03.003

引用本文：许禄华，周旭，蒋峰，等. 保元活络方改善心肌缺血再灌注损伤的作用机制预测及验证[J]. 中国现代应用药学，2022, 39(3): 300-311.

Prediction and Verification of the Effect and Mechanism of Baoyuan Huoluo Prescription on Myocardial Ischemia-reperfusion Injury

XU Luhua[1,2], ZHOU Xu[1,2], JIANG Feng[1,2], LI Liang[1], SONG Yinzhi[1], ZENG Zhicong[1], WU Zijun[1], LIN Fengxia[1*][*1.Shenzhen Bao'an Traditional Chinese Medicine Hospital(Group), the Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Shenzhen 518133, China; 2.Graduate School, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China*]

ABSTRACT: OBJECTIVE To explore the possible effect and mechanism of Baoyuan Huoluo prescription in improving myocardial ischemia-reperfusion injury(MIRI). **METHODS** The components and targets of Baoyuan Huoluo prescription (Salvia Miltiorrhizae Radix et Rhizoma, Notoginseng Radix et Rhizoma, Crataegi Fructus, Astragali Radix and Panacis Quinquefolii Radix) were obtained in the TCMSP database. Targets of MIRI were obtained from GeneCards and OMIM databases. The targets of Baoyuan Huoluo prescription improving MIRI were intersected. The “composition-target” network of Baoyuan Huoluo prescription in the treatment of MIRI was constructed by using Cytoscape software, and the key compounds were obtained by topological analysis. The protein protein interaction(PPI) network was constructed by using STRING database and optimized by importing into Cytoscape software, and the key targets were obtained by cluster analysis. GO function analysis and KEGG pathway enrichment analysis were performed by using the plug-in of “ClueGo” of Cytoscape. Rat cardiomyocytes(H9C2) were treated with hypoxia and reoxygenation(H/R) to establish MIRI model, which was used to verify that Baoyuan Huoluo prescription containing serum inhibited H/R-induced cardiomyocyte apoptosis from mitochondrial pathway by regulating NF-κB pathway. **RESULTS** A total of 11 key compounds such as quercetin, kaempferol and isorhamnetin were screened and 51 action targets were obtained. Two sub-networks, involving 16 targets such as CASP3, NOS3, IL-6 and ICAM1 were obtained by clustering analysis of PPI network. The 239 biological functions including *in vitro* apoptotic signaling pathway,

基金项目：深圳市科技计划项目(JCYJ20170306152620264)

作者简介：许禄华，男，硕士生，住院医师　E-mail: 619347785@qq.com　***通信作者：**林丰夏，男，硕士，主治医师　E-mail: szlinfx@163.com

response to reactive oxygen species and migration of vascular endothelial cells were revealed by GO function analysis. The 63 pathways including TNF signaling pathway, NF-κB signaling pathway, VEGF signaling pathway and PPAR signaling pathway were enriched by KEGG pathway enrichment analysis. Cell experiments showed that after H/R treatment, the cell viability of H9C2 cardiomyocytes decreased, the apoptosis rate increased, the activity of caspase-3 and caspase-9 increased, the protein expression levels of NF-κB P65, caspase-3 and caspase-9 increased, and the protein expression levels of IκBα and Bcl-2 decreased. Moreover, Baoyuan Huoluo prescription containing serum could reverse all of the above injuries induced by H/R. **CONCLUSION** Baoyuan Huoluo prescription can be used to treat MIRI because of its effects on anti-inflammatory, anti-oxidative stress, anti-apoptosis and improve coronary vascular endothelial function, which through a multi-component-target-pathway way. Among them inhibition of H/R induced apoptosis by regulating NF-κB pathway may be the key mechanism.
KEYWORDS: Baoyuan Huoluo prescription; myocardial ischemia-reperfusion injury; hypoxia reoxygenation; network pharmacology; cell apoptosis

心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury，MIRI)可引发心肌的二次伤害，是影响心肌梗死血运重建预后的重要因素[1]。MIRI 发生机制复杂，涉及氧自由基攻击、炎症反应浸润、血管内皮损伤等[2-3]。保元活络方(也称“丹芪散”“丹芪心脉康”)是深圳市名中医宋银枝教授的经验方，由丹参、三七、山楂、黄芪和西洋参 5 味中药组成，已被制作成科内制剂广泛应用于心绞痛、心肌梗死等并获得良好疗效[4-6]。本课题组前期临床研究[4]显示其能改善冠脉血管内皮功能，明显改善冠心病患者的生活质量及预后，并与氧化应激、炎症反应等密切相关，提示临床使用保元活络方治疗心肌梗死等冠心病患者获得良好疗效的可能机制为改善 MIRI，但其作用机制尚不明确。本研究拟使用网络药理学方法，探究保元活络方改善 MIRI 的可能机制，并利用缺氧/复氧模型(hypoxia/reoxygenation，H/R)设计相关试验对其作用及核心机制进行验证，可为后续保元活络方作用 MIRI 的动物实验研究设计提供思路，并为临床使用保元活络方治疗心肌梗死等冠心病提供基础依据。

1 方法

1.1 保元活络方的化学成分及靶点挖掘

使用 TCMSP 数据库(http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php)，以口服生物利用度(oral bioavailability，OB)>30%和类药性(drug likeness，DL)>0.18 为筛选条件，获取保元活络方(丹参、三七、山楂、黄芪、西洋参)的化学成分和对应靶点，使用 Uniprot 数据库(http://www.uniprot.org/)将获得的靶蛋白名称转换成 Gene Symbol。

1.2 MIRI 相关靶点获取

使用 GeneCards 数据库(http://www.genecards.org/，Version 4.14.0)(筛选条件：reference>1，其余保持默认设置)、OMIM 数据库(http://www.ncbi.nlm.nih.gov/omim, update in 2020-3-13)，以“myocardial ischemic reperfusion injury”为关键词，搜索 MIRI 相关靶标，去除重复后得到 MIRI 相关靶点。

1.3 “成分-靶点”网络的构建及关键化合物的筛选

将“1.1”与“1.2”项下步骤获取的靶点交集得到保元活络方改善 MIRI 的预测靶点，使用 Cytoscape 3.7.1 软件构建中药“成分-靶点”网络；使用“Network Analyzer”功能进行分析，根据化合物与靶点连接情况筛选保元活络方改善 MIRI 的关键化合物。

1.4 蛋白质-蛋白质相互作用网络(protein protein interaction，PPI)的构建及关键靶点筛选

将保元活络方作用 MIRI 的预测靶点导入 STRING 数据库(https://string-db.org/，Version11.0)，限定物种为“Homo sapiens”，最低相互作用评分设置为“high confidence”，其余参数保持默认设置，结果保存成 TSV 格式导入 Cytoscape 软件进行网络优化，并使用“MCODE”插件进行聚类分析以筛选关键靶点。

1.5 GO 功能分析和 KEGG 通路富集分析

使用 Cytoscape 中的“ClueGO”插件对保元活络方改善 MIRI 的靶点分别进行 GO 分析和 KEGG 分析，设置条件为：$P \leqslant 0.01$，Genes number≥3，Genes%≥4%，Kappa score≥0.05。结果根据 log$P$ 值进行排序，筛选排名前 15 者，使用 R 软件进行可视化。

1.6 验证性试验

1.6.1 动物和试剂

1.6.1.1 动物 8 周龄 SPF 级 Wistar ♂大鼠 15 只(体质量约每只 200 g)，购自北京维通利华实验动物技术有限公司[动物生产许可证号：SCXK(京)2021-0011，动物合格证号：11400700344865]。实验通过广州中医药大学附属深圳市宝安中医院(集团)伦理委员会批准，严格按照相关条例执行。

1.6.1.2 药材与试剂　保元活络方道地药材(丹参、西洋参、黄芪、三七、山楂)购自深圳康美药业公司(批号分别为 2008151，C22010086，200601，202005127，S6820415)；大鼠心肌细胞株 H9C2(美国 ATCC 公司，批号：CRL-1446)；DMEM 高糖培养基、10%胎牛血清、细胞凋亡检测试剂盒、RIPA 缓冲液、ECL 试剂盒和 NF-κB p65、IκB-α、Bcl-2、β-actin 抗体均购自美国 Sigma-Aldrich 公司，批号分别为 SLM-220-M，F8687，APOAF，R0278，GEPA45012，AB1722，SAB4502609，13921-1，ZRB1312；caspase-9 抗体(美国 Thermo Fisher 公司，批号：PA5-16358)；CCK-8 细胞计数试剂盒(北京碧云天生物科技有限公司，批号：abs50003)；caspase-3、caspase-9 活性检测试剂盒和 caspase-3 抗体(美国 R&D 公司，批号分别为 K106-100，BF10100，AF-605-NA)。

1.6.2 保元活络方含药血清制备　保元活络方由丹参、西洋参、黄芪、三七、山楂组成，按 2∶1∶3∶2∶1 组方，上药混合，加三蒸水煮，制备成含生药 4 $g·mL^{-1}$ 药液，4 ℃保存备用。15 只 Wistar 大鼠随机均分为 3 组，分别予低、中、高浓度药液灌胃，连续给药 7 d，每天 1 次。给药剂量(按体表面积法换算)=临床常用剂量(0.5 $mg·kg^{-1}·d^{-1}$)×大鼠等效面积系数(0.018)×人与动物体质量比值(60 kg∶0.2 kg)=2.7 $mg·kg^{-1}·d^{-1}$，低、中、高浓度保元活络方含药血清组则分别予 2.7，5.4，10.8 $mg·kg^{-1}$ 药液灌胃。末次给药后 1 h 心脏取血，4 ℃静置 1 h，3 000 $r·min^{-1}$ 离心 15 min，分离含药血清，将同组大鼠血清混匀，56 ℃水浴 30 min 灭活血清，微孔滤膜过滤除菌，冻存管分装，–70 ℃保存备用。

1.6.3 MIRI 模型建立及分组　将大鼠 H9C2 心肌细胞培养于含 10% FBS、1%双抗的 DMEM 高糖培养基，于 37 ℃、5% CO_2 恒温培养箱中静置培养，取对数生长期细胞，随机分为 5 组：正常组(5% CO_2、37 ℃常规培养)、模型组(建立 MIRI 模型)和低、中、高剂量保元活络方组(H/R 处理前分别加入低、中、高浓度保元活络方含药血清预处理 24 h)。

目前 H/R 模型的建立方法包括混合气体培养法、液体石蜡封闭法等物理方法以及 $Na_2S_2O_4$ 耗氧法、氯化钴培养法等化学方法，其中混合气体法中的气箱法操作简单、可靠稳定、重复性好，是目前最佳的 H/R 模型建立方法[7-8]，且缺氧时间控制在 3 h 的效果最佳[9]。本研究采用气箱法建立 H/R 心肌细胞模型，并控制缺氧时间为 3 h，具体如下：弃原代心肌细胞的上清培养基，更换为无糖 DMEM 培养基，置入体积分数为 1% O_2、94% N_2 和 5% CO_2 的培养室缺氧处理 3 h；然后替换回高糖培养基，再置入体积分数为 95%空气、5%CO_2 的培养室复氧处理 6 h。

1.6.4 CCK-8 法检测细胞活性　采用 CCK-8 细胞计数试剂盒测定 H9C2 细胞存活率。胰蛋白酶消化后，细胞完全培养液重悬制成细胞悬液，以每孔 $1×10^4$ 个的细胞量接种于 96 孔板。根据不同分组条件加入不同的处理，其中每个处理设 3 个复孔和 1 个空白孔。在孵箱中用 10 μL CCK-8 溶液孵育 4 h 后加入 150 μL 双蒸水，低速震荡 5 min，于 450 nm 处测定每组吸光度，计算细胞存活率，重复 3 次。

1.6.5 Annexin V/PI 染色结合流式细胞术检测细胞凋亡　使用细胞凋亡检测试剂盒进行细胞凋亡检测。各组 H9C2 心肌细胞按不同分组条件处理后，胰蛋白酶消化，吹打成细胞悬液，离心(500×g，4 ℃，5 min)后弃上清，PBS 洗涤 2 次，离心(1 000 $r·min^{-1}$，5 min)吸取上清，沉淀细胞，加入 500 μL 的 1×Binding buffer 再悬，依次加入 5 μL AnnexinV-FITC 和 3 μL Propidium Iodide，混匀后分别室温避光孵育 15 min 和 5 min，流式细胞仪检测 H9C2 细胞凋亡情况。

1.6.6 caspase-3 和 caspase-9 活性测定　使用 caspase-3 和 caspase-9 活性检测试剂盒进行测定。裂解液及检测缓冲液溶解后混匀冰浴上备用，测定 pNA 标准曲线。各组 H9C2 心肌细胞按分组条件处理后，胰蛋白酶消化，离心(500×g，4 ℃，5 min)吸除上清，PBS 洗涤 1 次，加入 50 μL 细胞裂解液，冰上孵育 15 min 后再离心(500×g，4 ℃，15 min)，取上清液转移到冰浴预冷的离心管中。根据 pNA 吸光度的计算公式测定 caspase-3 和 caspase-9 的酶活性。

1.6.7 Western blotting 分析　使用 RIPA 缓冲液提取 H9C2 细胞的蛋白质样品，BCA 法测定蛋白质的浓度。等量蛋白质样品在 10% SDS-PAGE 凝胶上溶解，分离后转移到 PVDF 膜上，TBST 缓冲液洗涤 3×10 min 后，加入 2%牛血清白蛋白室温下孵化 1 h。然后与相应的稀释后一抗(caspase-3、caspase-9、Bcl-2、NF-κB p65、IκB-α 和 β-actin)4 ℃下过夜孵

化。TBST 缓冲液清洗 3×10 min 后，室温下与 HPR 标记的二抗孵育 2 min。以 β-Actin 为参照，使用 ECL 试剂盒显影，用 Image J 分析目标条带的光密度值。

1.6.8 统计分析 使用 IBM SPSS Statistics 26.0 进行统计分析，实验数据用 $\bar{x}\pm s$ 表示，多组间均数的比较采用单因素方差分析，以 Levene Statistic 行方差齐性检验，若方差齐，分别采用 F 检验、SNK 检验进行总体和组间均值比较；若方差不齐，分别采用 Welch 检验、Dunnett T3 检验进行总体和组间均值比较。以 P<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 保元活络方候选化合物及靶点

筛除重复后，得到保元活络方的 103 个候选化合物(丹参 65 个，三七 8 个，山楂 6 个，黄芪 20 个，西洋参 11 个)和 120 个对应靶点(丹参 61 个，三七 89 个，山楂 93 个，黄芪 97 个，西洋参 28 个)。

2.2 MIRI 相关靶点

检索 GeneCards、OMIM 数据库分别得到 904，40 个靶点，去除重复靶点后得到 937 个 MIRI 相关靶点。

2.3 “成分-靶点”网络构建及关键化合物

交集得到保元活络方作用 MIRI 的 57 个靶点，对应 72 个化合物。利用 Cytoscape 软件构建“成分-靶点”网络，网络中共有 129 个节点和 392 条边，见图 1。度值最高的化合物为槲皮素(quercetin)，其余依次为山柰酚(kaempferol)、异鼠李素(isorhamnetin)、木犀草素(luteolin)和 β-谷甾醇(beta-sitosterol)等，度值大于平均值(5.65)的化合物有 11 个，结果见表 1。这些度值较高的化合物可能是保元活络方改善 MIRI 的关键化合物。

2.4 PPI 网络构建及关键靶点

保元活络方改善 MIRI 的可能作用靶点的 PPI 网络见图 2A，图中节点大小与度值呈正相关，边的粗细和连接分值呈正相关，节点和边的颜色由橙色渐变蓝色的程度与节点和边的介数中心性呈正相关。拓扑分析显示各节点的平均连接度为 18.30，平均介数中心性为 6.27×10^{-3}，平均中心自由度为 0.42，结果见表 2。使用 MCODE 插件对 PPI 网络行聚类分析得到 2 个子网络。子网络 A 得分为 5.11，包含 10 个节点，分别为 RELA、HIF1A、NOS3、FOS、ESR1、IL-6、CRP、VCAM1、SELE 和 ICAM1，见图 2B；子网络 B 得分为 4.36，包含 6 个节点，分别为：CASP3、CASP7、CASP9、CCND1、MYC 和 MDM2，见图 2C。

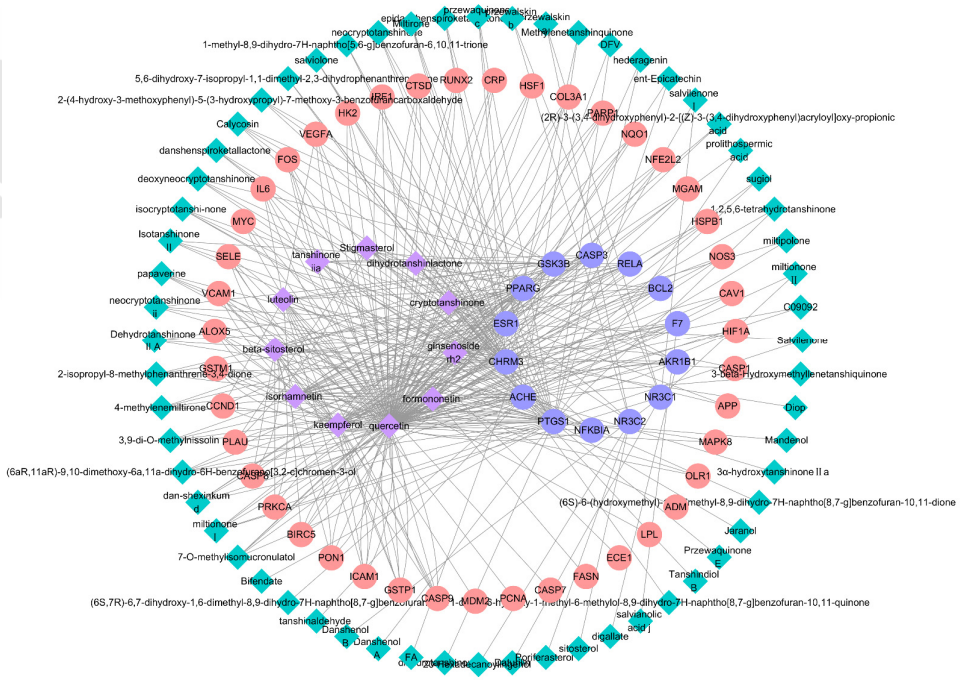

图 1 保元活络方改善 MIRI 的“成分-靶点”网络图

紫色菱形节点为度值>5 的化合物，绿色菱形节点为度值≤5 的化合物，蓝色圆形节点为度值>5 的靶点，红色菱形为度值≤6 的靶点。

Fig. 1 “Compound-Target” network of the treatment of Baoyuan Huoluo prescription in improving MIRI

Purple diamond node was a compound with a degree value>5, the green diamond node was a compound with a degree value≤5, the blue circular node was a target with a degree value>5, and the red diamond was a target with a degree value≤6.

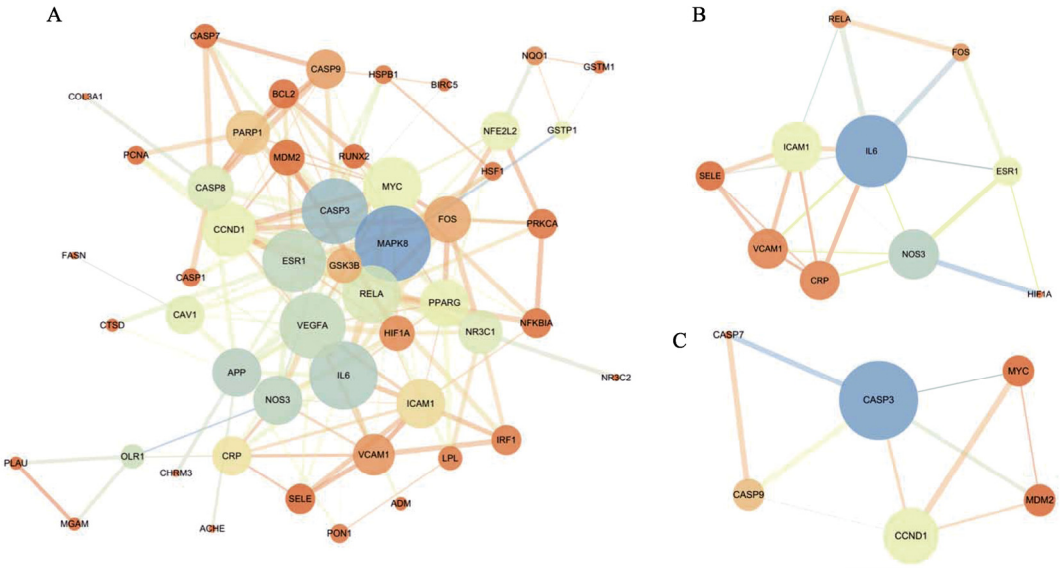

图 2　保元活络方改善 MIRI 的 PPI 网络

A–保元活络方改善 MIRI 的可能作用靶点的 PPI 网络；B、C–使用 MCODE 插件对上述 PPI 网络行聚类分析得到的 2 个子网络，分别为子网络 A 和子网络 B。

Fig. 2　PPI network of target protein of the treatment of Baoyuan Huoluo prescription in improving MIRI

A–Baoyuan Huoluo prescription improved the PPI network of possible targets of MIRI; B, C–the two sub networks obtained by cluster analysis of the above PPI network using the mcode plug-in are sub network A and sub network B respectively.

表 1　保元活络方改善 MIRI 的关键化合物

Tab. 1　Key compounds of the treatment of Baoyuan Huoluo prescription in improving MIRI

中药	MOL ID	化合物	OB/%	DL	Alg*P*	度值
三七、山楂、黄芪	MOL000098	槲皮素	46.43	0.28	1.50	126
山楂、黄芪	MOL000422	山柰酚	41.88	0.24	1.77	30
山楂、黄芪	MOL000354	异鼠李亭	49.60	0.31	1.76	18
丹参	MOL000006	毛地黄黄酮	36.16	0.25	2.07	16
三七、西洋参	MOL000358	β-谷甾醇	36.91	0.75	8.08	16
丹参	MOL007154	丹参酮 IIA	49.89	0.40	4.66	10
三七、山楂	MOL000449	豆甾醇	43.83	0.76	7.64	10
黄芪	MOL000392	芒柄花黄素	69.67	0.21	2.58	6
丹参	MOL007088	隐丹参酮	52.34	0.40	3.44	6
丹参	MOL007100	二氢丹参内酯	38.68	0.32	2.77	6
三七、西洋参	MOL005344	人参皂苷 rh2	36.32	0.56	4.04	6

表 2　保元活络方改善 MIRI 的关键靶点及其拓扑性质

Tab. 2　Key target and topological properties of the treatment of Baoyuan Huoluo prescription in improving MIRI

子网络	基因名称	蛋白名称	度值	介数中心性	中心自由度
子网络 A	*IL-6*	白介素-6	19	0.115	0.568
	ESR1	雌激素受体	17	0.096	0.549
	RELA	转录因子 p65	15	0.057	0.526
	NOS3	一氧化氮合酶	11	0.105	0.510
	ICAM1	细胞间黏附分子-1	11	0.022	0.481
	FOS	原癌基因 c-Fos	10	0.013	0.490
	VCAM1	血管细胞黏附蛋白-1	8	0.009	0.459
	HIF1A	缺氧诱导因子 1-α	6	0.007	0.442
	CRP	C 反应蛋白	7	0.023	0.416
	SELE	E 选择素	5	0.002	0.416
子网络 B	*CASP3*	半胱氨酸蛋白酶-3	18	0.144	0.568
	MYC	原癌基因蛋白	15	0.035	0.521
	CCND1	G1/S 特异性细胞周期蛋白 D1	13	0.035	0.510
	CASP9	半胱氨酸蛋白酶-9	7	0.010	0.446
	MDM2	E3 泛素蛋白连接酶 Mdm2	6	0.001	0.446
	CASP7	半胱氨酸蛋白酶-7	4	0.003	0.387

2.5　关键靶点的 GO 和 KEGG 分析结果

保元活络方改善 MIRI 的 GO 功能分析主要富集在体外凋亡信号通路、对活性氧(reactive oxygen species，ROS)的反应、凋亡信号通路的负调控、对皮质类固醇反应和半胱氨酸型内肽酶活性参与凋亡过程等 239 个生物学功能(P<0.01)，见图 3。保元活络方改善 MIRI 的 KEGG 通路富集分析主要富集在 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路、NF-κB 信号通路、p53 信号通路和 VEGF 信号通路等 63 条通路(P<0.01)，见图 4。

2.6　细胞试验验证结果

2.6.1　各组 H9C2 细胞活性和凋亡水平比较　与对照组比较，H/R 处理后，H9C2 细胞活性明显减弱，细胞凋亡水平明显增加(P<0.01)；与 H/R 组比较，保元活络方含药血清干预可以浓度依赖性地拮抗 H/R 处理引起的心肌损伤，包括增加 H9C2 的细胞活性，减少细胞凋亡水平(P<0.01)。结果见表 3，图 5。

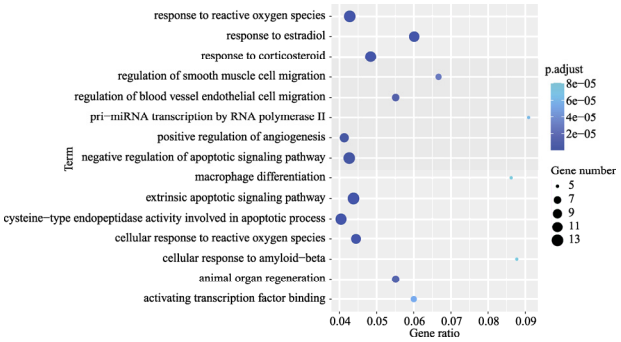

图 3 保元活络方改善 MIRI 作用靶点的 GO 功能分析结果

Fig. 3 GO function analysis results of the targets of the treatment of Baoyuan Huoluo prescription in improving MIRI

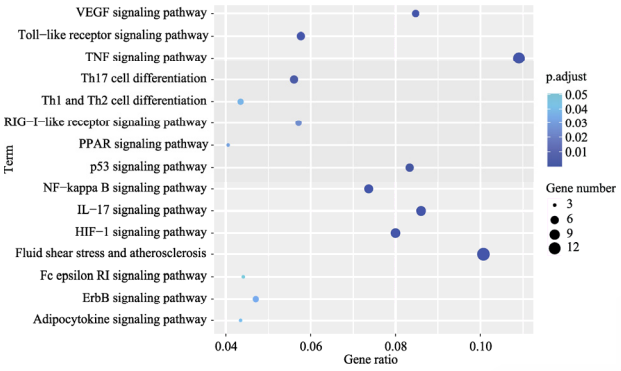

图 4 保元活络方改善 MIRI 作用靶点的 KEGG 通路分析结果

Fig. 4 KEGG pathway enrichment analysis results of the targets of the treatment of Baoyuan Huoluo prescription in improving MIRI

2.6.2 各组 H9C2 的 caspase-3、caspase-9 活性比较　与对照组比较，H/R 处理后，H9C2 的 caspase-3、caspase-9 活性明显增加(P<0.01)；与 H/R 组比较，经不同浓度保元活络方含药血清处理后的各组 H9C2 心肌细胞的 caspase-3 活性均明显下降(P<0.01)，低浓度含药血清处理后的 H9C2 心肌细胞的 caspase-9 活性轻度下降，但差异无显著意义，而中、高浓度保元活络方含药血清处理后各组 H9C2 心肌细胞的 caspase-9 活性均明显下降(P<0.01)。结果见表 4。

表 3 保元活络方含药血清对 H/R 诱导 H9C2 细胞活性和凋亡水平的影响($\bar{x}\pm s$，n=3)

Tab. 3 Effect of the treatment of Baoyuan Huoluo prescription medicated serum on the activity and apoptosis levels of H9C2 cardiomyocytes treated by H/R method($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	相对细胞活性/%	细胞凋亡率/%
对照组	100.00	11.00±3.51
模型组	55.21±6.68[1)]	39.16±3.65[1)]
低剂量保元活络方组	66.72±6.84	30.81±1.64[2)]
中剂量保元活络方组	80.50±6.67[2)]	21.57±2.21[2)]
高剂量保元活络方组	93.89±2.93[2)]	17.47±1.29[2)]

注：与对照组比较，[1)]P<0.01；与模型组比较，[2)]P<0.01。

Note: Compared with control group, [1)]P<0.01; compared with model group, [2)]P<0.01.

表 4 保元活络方含药血清对 H/R 诱导 H9C2 的 caspase-3、caspase-9 活性的影响($\bar{x}\pm s$，n=3)

Tab. 4 Effect of the treatment of Baoyuan Huoluo prescription medicated serum on the activity of caspase-3 and caspase-9 of H9C2 cardiomyocytes treated by H/R method($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	相对活性/%	
	caspase-3	caspase-9
对照组	100.00	100.00
模型组	223.95±5.81[1)]	198.02±11.70[1)]
低剂量保元活络方组	174.13±7.55[2)]	180.11±5.13
中剂量保元活络方组	153.62±7.59[2)]	148.59±6.29[2)]
高剂量保元活络方组	124.86±6.92[2)]	129.57±13.70[2)]

注：与对照组比较，[1)]P<0.01；与模型组比较，[2)]P<0.01。

Note: Compared with control group, [1)]P<0.01; compared with model group, [2)]P<0.01.

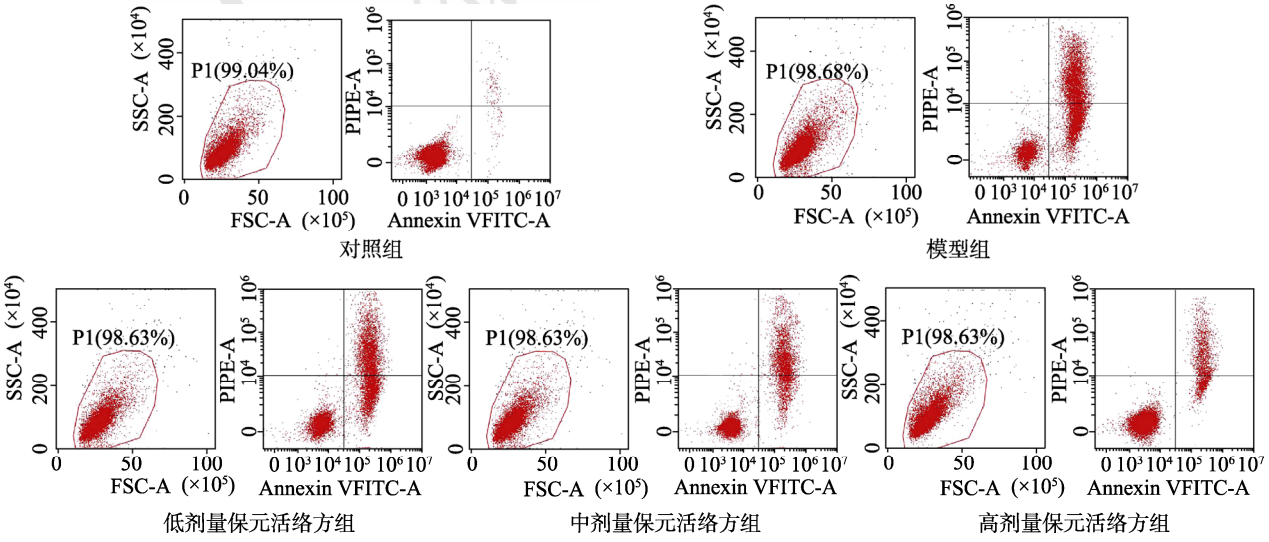

图 5 保元活络方含药血清作用后 H/R 诱导 H9C2 心肌细胞的细胞凋亡流式细胞图

Fig. 5 Flow cytometry of H/R-induced H9C2 cardiomyocytes after the action of Baoyuan Huoluo prescription medicated serum

2.6.3 各组 H9C2 的 NF-κB p65、IκBα、Bcl-2、caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达比较　与对照组比较，H/R 处理后，H9C2 心肌细胞 caspase-3、caspase-9 和 NF-κB 蛋白表达明显增加，IκBα、Bcl-2 蛋白表达明显降低(P<0.01)；保元活络方含药血清干预可以浓度依赖性地拮抗 H/R 诱导的 caspase-3、caspase-9、NF-κB 蛋白表达增加和 Bcl-2 蛋白表达降低(P<0.05 或 P<0.01)。结果见图 6。

3　讨论

心肌梗死可导致心肌缺血、缺氧乃至坏死，已成为心血管疾病患者死亡的重要原因[10]。理论上，通过溶栓或冠脉介入或者搭桥等手段使梗死心肌恢复灌注后，心肌损害应被遏制乃至逆转。然而事实上，血运重建可能导致心肌组织损伤进行性加重，甚至出现不可逆损伤，即发生 MIRI。如何有效减轻乃至避免 MIRI 有重要的临床意义。祖国医学对心肌梗死的认识源远流长，《灵枢・经脉篇》曾言："手少阴(心)气绝则脉不通，脉不通则血不流"，意为心气不足，运血无力，血滞心脉而发胸痹，提示气虚血瘀乃胸痛的核心病机。而崔丽华等[11]基于文献检索方法分析中国 1999—2015 年的 9 326 例心肌梗死的中医证型分布规律，结果也显示气虚血瘀是心肌梗死的主要证型。基于心肌梗死气虚血瘀的核心病机，宋银枝教授开创保元活络方治疗胸痹患者。保元活络方全方短小精炼，由丹参、三七、山楂、黄芪和西洋参 5 味中药组成。方中丹参补血活血，《妇人良方》单用以"破宿血，补新血"，瘀滞活、经脉通则血运

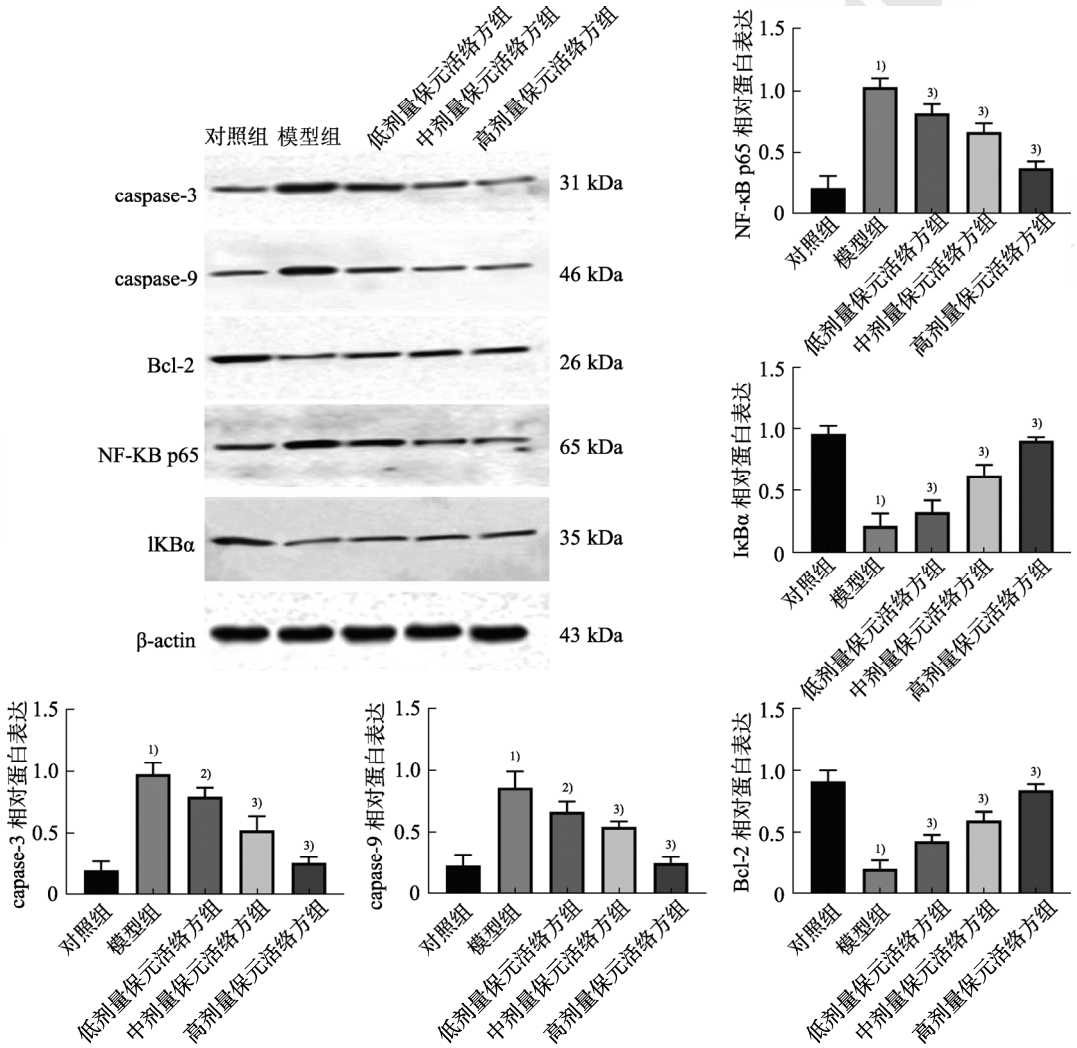

图 6　保元活络方含药血清作用后 H/R 诱导 H9C2 的 NF-κB p65、IκBα、Bcl-2、caspase-3 和 caspase-9 蛋白表达图

与对照组比较，[1)]P<0.01；与模型组比较，[2)]P<0.05，[3)]P<0.01。

Fig. 6　Protein expression of NF-κB p65, IκBα, Bcl-2, caspase-3 and caspase-9 in H9C2 cardiomyocytes treated by H/R method after the treatment of Baoyuan Huoluo prescription medicated serum

Compared with control group, [1)]P<0.01; compared with model group, [2)]P<0.05, [3)]P<0.01.

复；且丹参专入心与包络，是君药兼使药之用。三七化瘀止血，尤善止痛，合丹参行止兼顾，免出血之虞，为臣药。《医林改错》指出："元气既虚，必不能达于血管，血管无气，必停留而瘀"，心主血脉，心气充沛，则脉道通利，血流通畅，黄芪升补宗气以"贯心脉"，西洋参大补元气，勃发心气运血之力，使心气布而瘀滞行，兼治其本，亦为臣药。《灵枢·本神》云"脾藏营"，脾为气血生化之源，山楂健脾消积，开郁行滞，正本清源，其性平和，有运药之功，且如《医学衷中参西录》言，其乃"善入血分为化瘀血之要药"，是佐药兼使药之用。诸药相伍，益气活络，燮理脏腑，通补兼施，平调阴阳，正气充，气机畅，血运活，通则不痛也。

此前临床研究已经证明保元活络方能改善冠脉血管内皮功能，可有效改善心绞痛、心肌梗死等冠心病患者的临床疗效及效[4]，并减少冠心病合并室性心律失常的发生[6]，提示保元活络方很可能对 MIRI 有改善作用，但其作用机制尚不清楚。网络药理学作为多学科融合形成的新兴产物，主要通过各种数据库检索、高通量组学数据分析和计算机模拟等手段构建多层次网络，进而实现从整体性和系统性水平研究药物与机体相互作用规律等目的[12]。网络药理学研究策略整体性、系统性的特点，与中医学的整体观念、辨证论治思想不谋而合，因此本研究运用网络药理学方法从宏观角度对保元活络方治疗 MIRI 的作用机制进行了初步探讨。

通过构建"成分-靶标"网络，本研究筛选出保元活络方改善 MIRI 的关键化合物，包括槲皮素、山柰酚、异鼠李素、木犀草素和 β-谷甾醇等，这些化合物均已被证实对 MIRI 具有保护作用。其中，槲皮素、山柰酚和木犀草素均为黄酮类化合物。槲皮素为三七、山楂、黄芪中均包含的活性成分，已被证实在体内外均能明显改善 H/R 后心肌的氧化损伤和细胞凋亡，其机制可能与激活 PPARγ 抑制 NF-κB 通路有关[13]。而山柰酚可由山楂、黄芪中提取，类似的，其可通过减轻炎症反应和细胞凋亡减少 I/R 后心肌损伤，其机制与调控丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated protein kinase，MAPK)、P13k/Akt 等通路相关[14-15]。另外，Zhou 等[16]还证明山柰酚可以通过抗氧化活性和对糖原合酶激酶 3β 的抑制作用表现对 I/R 大鼠离体心脏的保护作用。而丹参的有效化学成分木犀草素不仅可通过抗氧化[17]和抗炎[18]作用改善 MIRI，还被证实可通过抑制 p38MAPK 通路，增强肌质网 Ca^{2+}-ATP 酶活性改善细胞内 Ca^{2+}超载，进而改善 I/R 后大鼠的心脏功能[19]。β-谷甾醇是植物甾醇类成分之一，同样被证实可通过增强细胞谷胱甘肽氧化还原循环减少 H/R 诱导的 H9C2 心肌细胞凋亡[20]。

对核心靶标 PPI 网络和 GO 生物功能的分析结果则提示，保元活络方可能通过抗炎、抗氧化应激、抗细胞凋亡和改善冠脉血管内皮功能的作用改善 MIRI，且抗细胞凋亡在 GO 分析中相关性最强，可能是保元活络方改善 MIRI 的最主要途径。靶标的 PPI 网络聚类分析结果中，子网络 A 中的 RELA、HIF1A、NOS3、FOS、IL-6、CRP、VCAM1、SELE 和 ICAM1 均参与炎症反应，其中 RELA、HIF1A、NOS3 和 IL-6 还参与细胞对氧化应激的反应，HIF1A、NOS3 和血管内皮功能密切相关。子网络 B 中的靶点 CASP3、CASP7、CASP9 和 MDM2 则主要参与细胞凋亡过程。上述大多靶点均已被大量研究证实，如心肌 H/R 发生时候，ROS 生成过多会导致中性粒细胞激活，炎性因子如 IL-6 等大量释放，继而在细胞黏附因子作用下，中性粒细胞和血小板被黏附在血管内皮导致内皮损伤，引起无复流等 MIRI 表现[21]。而保元活络方不仅可通过成分槲皮素抑制 H/R 诱导的 eNOS 表达增加[22]，改善 NO/ROS 平衡[23]，还可通过山柰酚降低 IL-6、TNF-α 等炎症因子水平[14]，进而通过抗炎、抗氧化功能改善冠脉血管内皮功能和冠脉微循环，表现出 MIRI 保护作用。又如半胱氨酸蛋白酶家族成员 CASP3、CASP7、CASP9 均是凋亡执行阶段的关键因子，可以通过蛋白水解方式切割聚合酶，进而促进心肌细胞程序性死亡，导致心肌损伤[24]。而保元活络方中无论是黄芪、山楂的活性成分山柰酚[25]，还是三七、西洋参的活性成分人参皂苷[26]均可以通过抑制 Bax、caspase-3 等促凋亡蛋白的表达，发挥抗细胞凋亡作用而改善 MIRI。

再看通路富集分析结果，保元活络方作用 MIRI 的各靶标主要富集在 TNF、IL-17、HIF-1、NF-κB、p53 信号通路、toll 样受体信号通路和 PPAR 信号通路等。其中，TNF 信号通路、IL-17 信号通路、NF-κB 信号通路和 toll 样受体信号通路均为目前 MIRI 炎症反应相关的热点通路。如 MIRI 发生时，损伤心肌细胞会释放大量的内源性损伤相关分子与心肌细胞表达的 toll 样受体结合，使得心脏

局部炎症反应加剧，进而加剧心肌损伤[27]。Oyama等[28]研究也显示，toll 样受体 4 缺陷型小鼠发生MIRI 后的梗死心肌面积和炎症反应水平均比正常小鼠低。此外，TNF 信号通路、NF-κB 信号通路和 p53 信号通路与 MIRI 的心肌细胞凋亡相关。如 TNF 信号通路是细胞凋亡的经典通路，TNF 是目前研究较多的促凋亡因子之一[29]，I/R 发生时 TNF 分泌增加，其与肿瘤坏死因子受体(tumor necrosis factor receptor，TLR)结合，可引导 caspase 级联反应的活化，进而通过介导死亡受体途径诱发心肌细胞凋亡[30]。而富集在 PPAR 信号通路则提示保元活络方可通过抗氧化作用改善 MIRI，富集在 VEGF 通路则提示保元活络方可能通过改善冠脉血管内皮功能而改善 H/R 心肌损伤。

进一步对保元活络方改善 MIRI 的可能作用通路进行深度解析，相关性最高的 3 个条目分别为 TNF 信号通路、HIF-1 信号通路和 NF-κB 信号通路。结合近年 MIRI 相关的基础研究[31]，NF-κB 信号通路已被证实可通过促进细胞凋亡、炎性反应、氧化应激、钙超载等多个病理过程参与 MIRI。而 HIF-1 通路、TNF 信号通路更多的是作为 NF-κB 信号通路的上游信号分子参与 MIRI，如 HIF-1 信号可以通过抑制 TLR4/NF-κB 信号通路抑制炎症风暴进而改善 MIRI 的心肌损伤[32]，而 TNF 本身就是 NF-κB 经典途径活化的启动因子。因此合理推测 NF-κB 信号通路在保元活络方改善 MIRI 的药理学作用机制上可能起核心作用，结果见图 7。

再结合 GO 功能分析，保元活络方改善 MIRI 的主要生物学功能的前 5 条“体外凋亡信号通路、对 ROS 的反应、凋亡信号通路的负调控、对皮质类固醇反应、半胱氨酸型内肽酶活性参与凋亡过程”中有多达 3 条生物学功能涉及细胞凋亡，即保元活络方改善 MIRI 的主要途径可能是通过抑制心肌细胞凋亡。与此同时，近年研究证实 NF-κB 信号通路是 MIRI 相关细胞凋亡的关键通路。因此推测保元活络方改善 MIRI 的关键作用机制可能

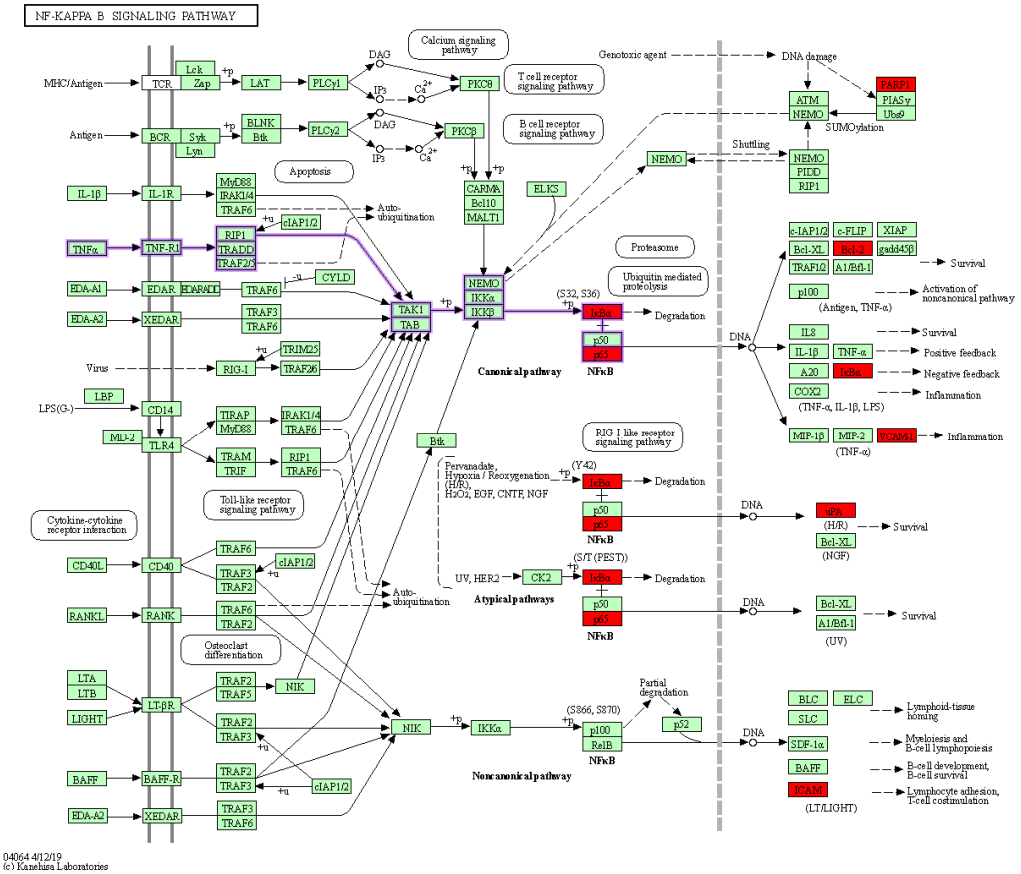

图 7　保元活络法调控 NF-κB(TNF)信号通路改善心肌缺血再灌注损伤的 KEGG 通路图[33]

红色节点为保元活络法通过 NF-κB 信号通路作用心肌缺血再灌注损伤的预测作用靶点；紫色路径为 TNF 作为启动因子活化 NF-κB 信号通路的路径。

Fig. 7　KEGG pathway diagram of Baoyuan Huoluo prescription in improving MIRI by regulating NF-κB(TNF) signaling pathway[33]

Red node in the figure showed that the element preserving and activating method passed through NF-κB signaling pathway was a target for predicting myocardial ischemia-reperfusion injury; the purple path was TNF as a promoter to activate NF-κB the path of the signal path.

是通过调控 NF-κB 信号通路抑制细胞凋亡，但仍需进一步设计细胞或动物实验验证。

MIRI 引起的心肌细胞凋亡是导致心梗后心功能不全最关键的病理过程[34]。研究还发现再灌注期间凋亡细胞往往分布在坏死心肌的周围区域，提示心肌凋亡可能很大程度决定再灌注后期心肌梗死扩大的范围[35]，如 Zhao 等[36]研究显示，通过抑制凋亡可以明显减轻 I/R 犬模型的心梗面积。因此，有效抑制由 MIRI 引起的凋亡是心梗防治领域重要的研究方向之一，对于预防心肌重塑和改善心肌梗死后的心功能具有重要意义。本研究通过 CCK-8 法检测细胞活性，Annexin V/PI 染色结合流式细胞术检测细胞凋亡，结果显示 H/R 处理后细胞凋亡明显增减，细胞活性降低，而保元活络方干预可以有效改善 H9C2 心肌细胞活性，并降低其凋亡水平，提示保元活络方改善 MIRI 的可能机制是通过减少心肌细胞凋亡。

细胞凋亡的经典途径包括线粒体途径、死亡受体以及内质网途径，三者均终通过激活 caspase 级联反应进而促发凋亡[29]。其中线粒体途径主要是由 Bcl-2 蛋白家族，包括凋亡抑制因子 Bcl-2 和促进因子 Bax 等通过调控改变线粒体外膜的通透性，活化 caspase-9 前体进而激活 caspase-3 激发凋亡[37]。死亡受体途径则主要是由肿瘤坏死因子受体等与 TNF 等配体结合，通过在细胞膜上形成凋亡诱导复合物，活化 caspase-8 前体进而激活 caspase-3 诱发凋亡[38]。本研究保元活络方改善 MIRI 的网络药理研究结果中，无论是 GO 功能分析还是 KEGG 通路分析均强烈富集到“细胞凋亡”(其中 KEGG 通路图见图 8)，可见保元活络方对 Bcl-2、CASP9、CASP3、CASP3 均有潜在作用，提示保元活络方通过抑制细胞达明显减少，而保元活络方干预可以有效逆转上述改变，进一步验证了保元活络方改善 MIRI 心肌细胞凋亡凋亡改善 MIRI 的途径可能包括线粒体途径和死亡受体途径促，并且以线粒体途径为主，因此在进一步的体外试验中，笔者着重对线粒体途径进行了验证。结果显示 H/R 处理后，caspase-3 和 caspase-9 活性及其蛋白表达均明显增加，而 Bcl-2 蛋白表水平的机制可能是通过抑制细胞凋亡线粒体途径实现。

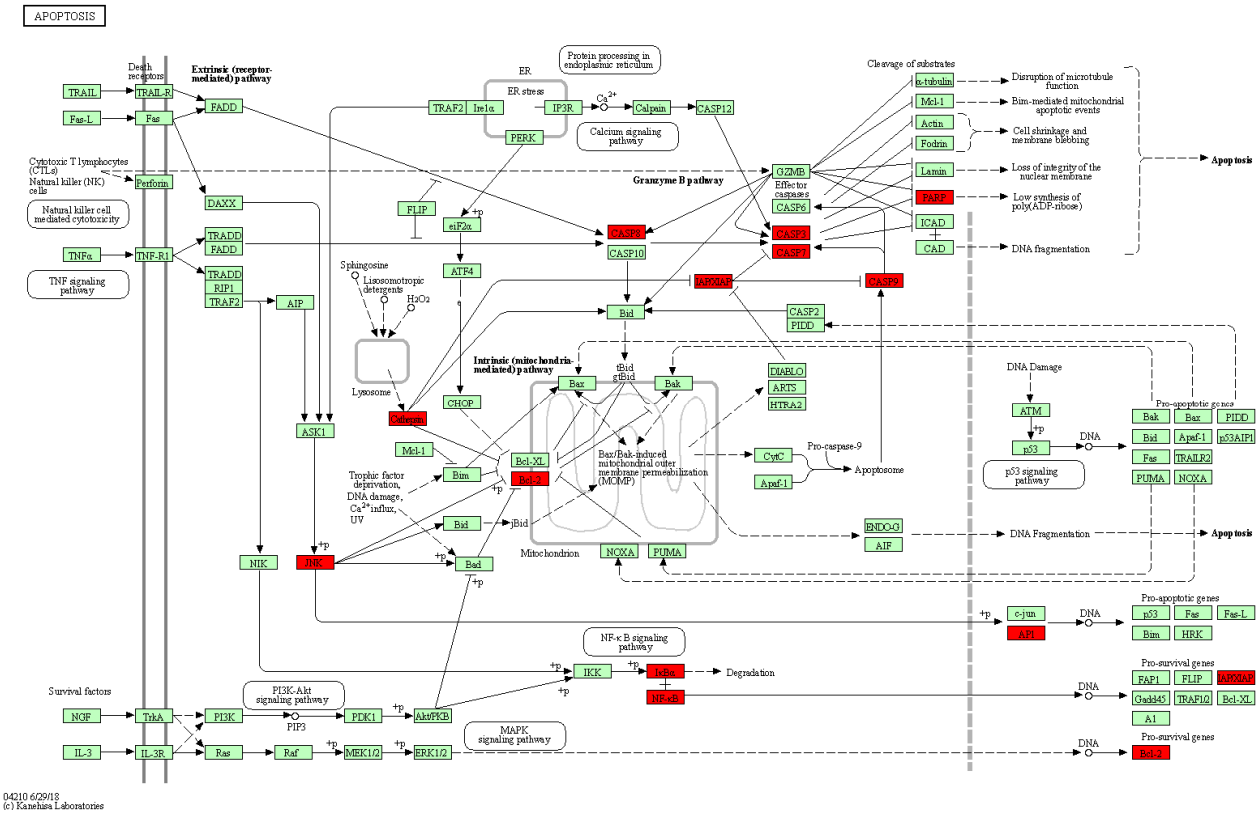

图 8　保元活络法通过抑制细胞凋亡改善心肌缺血再灌注的 KEGG 通路图[33]

红色节点为保元活络法细胞凋亡途径改善心肌缺血再灌注损伤的预测作用靶点。

Fig. 8　KEGG pathway diagram of Baoyuan Huoluo prescription in improving MIRI by inhibiting apoptosis[33]

Red node in the figure was the prediction target of cell apoptosis pathway of Baoyuan Huoluo method to improve myocardial ischemia-reperfusion injury.

NF-κB 信号通路最初是由于其在炎症反应方面的重要作用[39]引起研究人员的关注，而近年研究发现，NF-κB 信号通路在 MIRI 相关细胞凋亡中同样扮演着重要角色[40]。NF-κB 多以各不同亚单位组合形成的二聚体的形式存在，而由 p50 与 p65 组成的二聚体被证实和心血管系统疾病的关系最为密切[41]。静息状态下 NF-κB 与其抑制蛋白 IκB 结合，并不表现活性，而 MIRI 发生时通过多种细胞因子作用使得 IκB 激酶活化，IκB 磷酸化，进而 NF-κB 与 IκB 解体并活化，最终通过调控凋亡相关基因的转录促发心肌细胞凋亡[42]。本研究对各组 H9C2 心肌细胞 NF-κB 和 IκBα 蛋白的表达水平进行了检测，结果显示 H/R 处理后 NF-κB 蛋白表达水平明显增加，IκBα 水平则明显下降，而加予不同浓度保元活络方处理后 NF-κB 表达水平均明显降低，并且与保元活络方含药血清浓度呈负相关，而 IκBα 水平同样有显著意义的增加，提示保元活络方抑制心肌细胞凋亡改善 MIRI 的作用很可能是通过调控 NF-κB 通路实现。

综上，本研究首先使用网络药理学方法，预测保元活络方改善 MIRI 的可能机制为保元活络方中的槲皮素、山柰酚、异鼠李素、木犀草素和 β-谷甾醇等关键化合物，作用于 CASP3、CASP9、NOS3、IL-6、ICAM1、VCAM1 等关键靶点，通过 TNF 信号通路、IL-17 信号通路、NF-κB 信号通路、p53 信号通路、toll 样受体信号通路和 PPAR 信号通路等信号通路，发挥抗炎、抗氧化应激、抗细胞凋亡和改善冠脉血管内皮功能等作用，从而改善 MIRI。进而通过细胞试验，初步验证了保元活络方对 H/R 诱导 H9C2 心肌细胞的保护作用，并证明其机制可能与调控 NF-κB 信号通路，抑制线粒体途径介导的心肌细胞凋亡有关，但保元活络方改善 MIRI 的具体作用和机制仍需进一步的体内外试验证明。

REFERENCES

[1] PAPAGEORGIOU N, BRIASOULIS A, TOUSOULIS D. Ischemia-reperfusion injury: Complex pathophysiology with elusive treatment[J]. Hellenic J Cardiol, 2018, 59(6): 329-330.

[2] KONG Q Y, DAI L Y, WANG Y N, et al. HSPA12B attenuated acute myocardial ischemia/reperfusion injury via maintaining endothelial integrity in a PI3K/Akt/mTOR-dependent mechanism[J]. Sci Rep, 2016(6): 33636. Doi: 10.1038/srep33636.

[3] LU Y Y, FENG Y D, LIU D, et al. Thymoquinone attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of SIRT1 signaling[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 47(3): 1193-1206.

[4] ZHANG Y G, LI L, LIN F X, et al. A study of preventive function and mechanism of 'Dan qi San' to CHD patients with stable angina pectoris[J]. Jiangsu J Tradit Chin Med(江苏中医药), 2019, 51(10): 29-32.

[5] XU L H, LIN F X, SONG Y Z, et al. Effects of danqi San on vascular endothelial function in patients with coronary artery disease of qi-deficiency and blood-stasis type and prediction of network pharmacological mechanism[J]. J Guangzhou Univ Tradit Chin Med(广州中医药大学学报), 2021, 38(1): 147-158.

[6] 张元贵, 李亮, 林丰夏, 等. 丹芪散治疗气虚血瘀型冠心病室性心律失常临床观察[J]. 黑龙江中医药, 2019, 48(4): 77-78.

[7] DU Y J, XU Y X, WANG Z X, et al. Establishment methods and applications of hypoxia/reoxygenation models[J]. J Nanchang Univ: Med Sci(南昌大学学报：医学版), 2015, 55(2): 88-91.

[8] NING X W, SU H, ZHANG R F. Hypoxia/reoxygenation models of cardiomyocytes constructed by different methods[J]. World Latest Med Inf(世界最新医学信息文摘), 2019, 19(93): 93-94.

[9] DU F, LIU W, LIU M, et al. Construction of hypoxia/reoxygenation injury model in primary neonatal rat myocytes[J]. Ningxia Med J(宁夏医学杂志), 2017, 39(7): 577-579, 576.

[10] 陈伟伟, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2018》概要[J]. 中国循环杂志, 2019, 34(3): 209-220.

[11] CUI L H, GUO S W. TCM syndrome characteristics of AMI: Study of 9326 cases[J]. Acta Chin Med Pharmacol(中医药学报), 2018, 46(1): 23-27.

[12] LI S, ZHANG B. Traditional Chinese medicine network pharmacology: Theory, methodology and application[J]. Chin J Nat Med, 2013, 11(2): 110-120.

[13] LIU X Y, YU Z J, HUANG X, et al. Peroxisome proliferator-activated receptor γ(PPARγ) mediates the protective effect of quercetin against myocardial ischemia-reperfusion injury via suppressing the NF-κB pathway[J]. Am J Transl Res, 2016, 8(12): 5169-5186.

[14] SUCHAL K, MALIK S, GAMAD N, et al. Kaempferol attenuates myocardial ischemic injury via inhibition of MAPK signaling pathway in experimental model of myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Oxid Med Cell Longev, 2016(2016): 7580731. Doi: 10.1155/2016/7580731.

[15] WANG D, ZHANG X J, LI D F, et al. Kaempferide protects against myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of the PI3K/Akt/GSK-3β pathway[J]. Mediat Inflamm, 2017, 2017(7): 1-11.

[16] ZHOU M J, REN H H, HAN J C, et al. Protective effects of kaempferol against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart via antioxidant activity and inhibition of glycogen synthase kinase-3β[J]. Oxid Med Cell Longev, 2015(2015): 481405. Doi: 10.1155/2015/481405.

[17] XIAO C, XIA M L, WANG J, et al. Luteolin attenuates

cardiac ischemia/reperfusion injury in diabetic rats by modulating Nrf2 antioxidative function[J]. Oxidative Med Cell Longev, 2019(2019): 2719252. Doi:10.1155/2019/2719252.
[18] ZHANG X, DU Q, YANG Y, et al. The protective effect of Luteolin on myocardial ischemia/reperfusion(I/R) injury through TLR4/NF-κB/NLRP3 inflammasome pathway[J]. Biomed Pharmacother, 2017(91): 1042-1052.
[19] ZHU S S, XU T D, LUO Y Y, et al. Luteolin enhances sarcoplasmic reticulum Ca^{2+}-ATPase activity through p38 MAPK signaling thus improving rat cardiac function after ischemia/reperfusion[J]. Cell Physiol Biochem, 2017, 41(3): 999-1010.
[20] WONG H S, CHEN N, LEONG P K, et al. B-Sitosterol enhances cellular glutathione redox cycling by reactive oxygen species generated from mitochondrial respiration: Protection against oxidant injury in H9c2 cells and rat hearts[J]. Phytother Res, 2014, 28(7): 999-1006.
[21] ZHANG H C, XU L, RUI H M, et al. Role of aloperine on ischemia-reperfusion-induced injury and inflammatory response in H9c2 cardiomyocytes[J]. Chin J Pathophysiol(中国病理生理杂志), 2018, 34(2): 281-286.
[22] WAN L L, XIA J H, YE D Y, et al. Effects of quercetin on gene and protein expression of NOX and NOS after myocardial ischemia and reperfusion in rabbit[J]. Cardiovasc Ther, 2009, 27(1): 28-33.
[23] FOLINO A, LOSANO G, RASTALDO R. Balance of nitric oxide and reactive oxygen species in myocardial reperfusion injury and protection[J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2013, 62(6): 567-575.
[24] STENNICKE H R, SALVESEN G S. Caspases-controlling intracellular signals by protease zymogen activation[J]. Biochim et Biophys Acta BBA-Protein Struct Mol Enzymol, 2000, 1477(1/2): 299-306.
[25] ZHAO X S. Effect of kaempferol on apoptosis of rat cardiomyocyte H9c2[D]. Zhengzhou: Zhengzhou University, 2019.
[26] ZHANG L P, JIANG Y C, YU X F, et al. Ginsenoside Rg3 improves cardiac function after myocardial ischemia/ reperfusion via attenuating apoptosis and inflammation[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2016(2016): 6967853. Doi: 10.1155/2016/6967853.
[27] ZHANG X Y, TU R H. Protective effects of toll-like receptors on myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. Adv Cardiovasc Dis(心血管病学进展), 2020, 41(2): 172-175.
[28] OYAMA J I, BLAIS C Jr, LIU X L, et al. Reduced myocardial ischemia-reperfusion injury in toll-like receptor 4-deficient mice[J]. Circulation, 2004, 109(6): 784-789.
[29] CAO X, LU X H, CUI X M, et al. Advance research on apoptosis in myocardial ischemia reperfusion injury and its signal transduction pathways[J]. J Jilin Univ: Med Ed(吉林大学学报: 医学版), 2009, 35(5): 964-966.
[30] NAM Y J, MANI K, ASHTON A W, et al. Inhibition of both the extrinsic and intrinsic death pathways through nonhomotypic death-fold interactions[J]. Mol Cell, 2004, 15(6): 901-912.
[31] BODIGA V L, INAPURAPU S P, VEMURI P K, et al. Intracellular zinc status influences cisplatin-induced endothelial permeability through modulation of PKCα, NF-κB and ICAM-1 expression[J]. Eur J Pharmacol, 2016(791): 355-368.
[32] WEI H, XU Y X, QIN L, et al. Protective mechanism of HIF-1α on myocardial injury in rats with myocardial ischemia-reperfusion by TLR4/NF-κB signaling pathway[J]. J Clin Exp Med(临床和实验医学杂志), 2019, 18(10): 1017-1020.
[33] KANEHISA M, GOTO S. Kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1): 27-30.
[34] LIU L F, ZHANG G M, LIANG Z, et al. MicroRNA-15b enhances hypoxia/reoxygenation-induced apoptosis of cardiomyocytes via a mitochondrial apoptotic pathway[J]. Apoptosis, 2014, 19(1): 19-29.
[35] ZHAO Z. Reperfusion induces myocardial apoptotic cell death[J]. Cardiovasc Res, 2000, 45(3): 651-660.
[36] ZHAO Z Q, VELEZ D A, WANG N P, et al. Progressively developed myocardial apoptotic cell death during late phase of reperfusion[J]. Apoptosis, 2001, 6(4): 279-290.
[37] YIN R X, LIANG W W, AL-GHAZALI R. Trimetazidine inhibits cardiomyocyte apoptosis in a rabbit model of ischemia-reperfusion[J]. Transl Res, 2007, 149(3): 152-160.
[38] GUO R, LI G. Tanshinone modulates the expression of Bcl-2 and Bax in cardiomyocytes and has a protective effect in a rat model of myocardial ischemia-reperfusion[J]. Hellenic J Cardiol, 2018, 59(6): 323-328.
[39] XU W P, ZHANG K, ZHANG Y, et al. Downregulation of DEC1 by RNA interference attenuates ischemia/reperfusion-induced myocardial inflammation by inhibiting the TLR4/NF-κB signaling pathway[J]. Exp Ther Med, 2020, 20(1): 343-350.
[40] ZHU X D, YU Z J, SUN B F, et al. The effect of NF-κB signaling pathway on apoptosis in cerebral ischemia reperfusion injury in mice[J]. J Apoplexy Nerv Dis(中风与神经疾病杂志), 2016, 33(6): 484-488.
[41] ZHAO G F, ZHANG Y J, TANG G Y. Research progress of prevention and treatment of MIRI by traditional Chinese medicine based on NF-κB signaling pathway[J]. Tianjin J Tradit Chin Med(天津中医药), 2018, 35(9): 714-717.
[42] ZHANG J, XIAO F, ZHANG L L, et al. Alpha-lipoic acid preconditioning and ischaemic postconditioning synergistically protect rats from cerebral injury induced by ischemia and reperfusion partly via inhibition TLR4/MyD88/ NF-κB signaling pathway[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 51(3): 1448-1460.

收稿日期：2020-12-19
(本文责编：李艳芳)