

# 网络药理学预测四逆汤抗心肌缺血再灌注损伤机制及实验验证

赵博, 屈新亮, 王祁, 高璐, 董泰玮, 陈琳, 卫培峰, 王斌, 李敏\*  
(陕西中医药大学药学院, 陕西 咸阳 712046)

**[摘要]** 目的:基于网络药理学预测四逆汤抗心肌缺血/再灌注损伤(MI/RI)的作用机制及验证研究。方法:通过中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP)数据库筛选检索四逆汤的主要成分,并通过TCMSP平台筛选潜在的成分靶点,结合人类孟德尔遗传数据库(OMIM)和GeneCards数据库获取经人工确认的四逆汤抗MI/RI的作用靶点。应用蛋白互作网络分析数据库(String)构建蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络模型,应用DAVID数据库分别进行基因本体(GO)功能富集分析和京都基因和基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,利用细胞实验进行验证,以揭示四逆汤抗MI/RI的机制。结果:从四逆汤中共筛选得到105个活性成分,234个靶点,治疗MI/RI靶点116个。GO功能富集分析得到GO条目587个,其中生物过程条目417个、细胞组成条目101个和分子功能条目69个;KEGG通路富集分析筛选出125条信号通路,主要涉及细胞内皮生长因子(VEGF)、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)、叉头框转录因子O(FoxO)、缺氧诱导因子-1(HIF-1)、细胞凋亡等信号通路。细胞存活率检测结果表明四逆汤可增加缺氧/复氧(H/R)损伤的H9C2细胞存活率;试剂盒检测结果表明四逆汤可降低H/R损伤的H9C2细胞中肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6(IL-6)、肌酸磷酸化酶-同工酶(CK-MB)的水平;流式细胞仪检测结果表明四逆汤可降低H/R损伤的H9C2细胞凋亡率;蛋白免疫印迹法(Western blot)结果显示四逆汤可降低H/R损伤的H9C2细胞中B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)相关X蛋白(Bax)的表达,增加Bcl-2的表达。结论:四逆汤抗MI/RI呈现多靶点、多通路协同作用,治疗机制可能与细胞凋亡相关信号通路有关。

**[关键词]** 网络药理学; 四逆汤; 心肌缺血再灌注损伤; B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2); Bcl-2相关X蛋白(Bax)

**[中图分类号]** R2-0;R33;R289;R541 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2022)09-0168-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20220937

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20220228.1608.001.html>

**[网络出版日期]** 2022-03-02 20:17

## Mechanism of Sinitang against Myocardial Ischemia-reperfusion Injury: Prediction Based on Network Pharmacology and Verification by Cellular Experiments

ZHAO Bo, QU Xin-liang, WANG Qi, GAO Lu, DONG Tai-wei, CHEN Lin, WEI Pei-feng,  
WANG Bin, LI Min\*

(College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an 712046, China)

**[Abstract]** **Objective:** To predict the mechanism of Sinitang in treating myocardial ischemia-reperfusion injury (MI/RI) based on network pharmacology and verify the prediction results by cellular experiments. **Method:** The traditional Chinese medicine system pharmacology database and analysis platform (TCMSP) was employed for retrieval of the main components and potential targets of Sinitang. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) and GeneCards were employed to obtain the targets of Sinitang in treating MI/RI. STRING was employed to construct the protein-protein interaction (PPI) network, and DAVID to perform gene ontology (GO) annotation and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway

**[收稿日期]** 2021-09-26

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(81303243);陕西省教育厅项目(20JC012);陕西中医药大学创新团队项目(2019-QN02)

**[第一作者]** 赵博,在读硕士,从事中药基础理论研究,E-mail:1261521271@qq.com

**[通信作者]** \*李敏,教授,硕士生导师,从事中药基础理论研究,E-mail:413159921@qq.com

enrichment. Finally, cellular experiments were carried out to verify the predicted anti-MI/RI mechanism of Sinitang. **Result:** A total of 105 active ingredients and 234 targets of Sinitang were screened out, among which 116 targets were predicted to be involved in the treatment of MI/RI. The GO annotation gave 587 entries, including 417 biological process entries, 101 cell component entries, and 69 molecular function entries. The KEGG analysis enriched 125 signaling pathways, involving vascular endothelial growth factor (VEGF), phosphoinositide 3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt), forkhead box transcription factor O (FoxO), hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) apoptosis and other signaling pathways. The results of cell viability assay showed that Sinitang increased the survival rate of H9C2 cells damaged by hypoxia/reoxygenation (H/R). Sinitang decreased the levels of tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), interleukin-6 (IL-6), and creatine kinase-MB (CK-MB) in H9C2 cells damaged by H/R. The results of flow cytometry demonstrated that Sinitang decreased the apoptosis rate of H9C2 cells damaged by H/R. Western blot showed that Sinitang down-regulated the expression of Bcl-2 related X protein (Bax) and up-regulated that of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) in H/R-injured H9C2 cells. **Conclusion:** Sinitang treats MI/RI in a multi-target and multi-pathway manner, which involves the signaling pathways associated with apoptosis.

**[Keywords]** network pharmacology; Sinitang; myocardial ischemia -reperfusion injury (H/R); B-cell lymphoma-2 (Bcl-2); Bcl-2 related X protein (Bax)

心肌缺血/再灌注损伤(MI/RI)是指机体局部或全部的心肌冠状动脉阻塞后,短时间内再次恢复血液供给,造成心肌超微结构和心功能损伤进一步加重,甚至产生不可逆性损伤,主要包括心肌震颤、心肌梗死面积再扩大甚至心肌细胞死亡的病理状态<sup>[1]</sup>。目前钙超载、细胞凋亡、氧化损伤和炎症反应被普遍认为是MI/RI的发病机制,具体发病机制尚无定论。预防和减轻MI/RI是手术治疗缺血性心脏病的关键,溶栓早期再灌注或原发性经皮冠状动脉介入是临床治疗MI/RI的常见措施<sup>[2]</sup>。因此,研究更加安全有效的治疗干预手段为降低MI/RI临床风险和提供新的治疗策略是十分必要的。

中药复方治疗MI/RI历史悠久,效果显著,如瓜蒌薤白白酒汤、益气活血汤和四逆汤等。张仲景所著中医经典《伤寒杂病论》中所记载的四逆汤,组方精炼,由附子(制)、干姜、炙甘草配伍而成,具有回阳救逆、温中散寒之效。临床上对心肌梗塞或心力衰竭患者疗效显著,常用于治疗心衰及心肌梗死等属阴虚阳衰证者。前期研究证实四逆汤可舒张血管、增强心肌功能,抑制炎症反应,具有保护多种心肌细胞的生理功能,但其生物过程及具体机制尚不清楚<sup>[3]</sup>。对于中药复杂体系的物质基础及药效学机制研究,本研究采用网络药理学与细胞实验验证相结合的方法,预测并验证了四逆汤抗MI/RI的作用靶点和作用机制,为临床应用提供了理论基础。

## 1 材料

**1.1 细胞与药材** 大鼠心肌细胞株 H9C2 细胞(武

汉博士德生物工程有限公司,货号 CX0125);淡附片、干姜、炙甘草均购自亳州市京皖中药饮片厂,批号分别为 201102、200914、201011,经陕西中医药大学中药鉴定教研室沈霞教授鉴定均为正品。

**1.2 试剂** 胎牛血清(美国 Kirge 公司,批号 20200907);肿瘤坏死因子- $\alpha$ (TNF- $\alpha$ )试剂盒、白细胞介素-6(IL-6)试剂盒、肌酸磷化酶-同工酶(CK-MB)试剂盒(上海酶联生物科技有限公司,批号分别为 2020916、20201014、20201023);B 细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)抗体、Bcl-2 相关 X 蛋白(Bax)抗体(武汉博士德生物技术有限公司,批号分别为 A00040-2、BA0315-1);细胞凋亡检测试剂盒(南京建成生物工程研究所,批号 20200915);BCA 蛋白定量试剂盒(上海威奥生物科技有限公司,批号 WB0123)。

**1.3 仪器** ELX808 型全自动酶标仪、SE300 型转膜仪(美国 BioTek 公司);TGL-16B 型高速台式离心机(上海安亭科学仪器厂);165-8001 小型垂直电泳槽、Universal Hood II 型凝胶成像仪(美国 Bio-Rad 公司);FACSCanto II 型流式细胞仪(美国 Thermo Fisher 公司);AR0136-02 型 PVDF 膜(美国 Millipore 公司);Thermo 3111 型 CO<sub>2</sub> 培养箱(美国 Thermo 公司)。

## 2 方法

**2.1 四逆汤有效成分与靶点的收集** 以四逆汤中的附子、干姜和甘草为关键词在中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP, <http://tcmspw.com/tcmsp.php>)中检索附子、干姜和甘草潜在的生物活

性成分,依据筛选标准为口服生物利用度(OB) $\geq 30\%$ ,类药性(DL) $\geq 0.18^{[4]}$ 。附子、干姜和甘草的主要化学成分分别是生物碱、挥发油和甘草酸,考虑到上述化合物成分含量及药理作用,根据OB和DL筛选后对附子、干姜和甘草的化合物进行补充,加入脱氧乌头碱(deoxyaconitine)、乌头碱(aconitine)、6-姜酚(6-gingerol)、8-姜酚(8-gingerol)、10-姜酚(10-gingerol)、6-姜烯酚(6-shogaol)、姜油酮(zingerone)、甘油(glycerin)、光甘草内酯(glabrolide)、异光果甘草检酯(isoglabrolide)、新异甘草素(neoisoliquiritin)、 $18\beta$ -甘草次酸( $18\beta$ -glycyrrhetic acid)、 $\beta$ -甘草次酸( $\beta$ -Glycyrrhetic acid)13个化学成分<sup>[5]</sup>。在TCMSP数据库中收集上述获得化学成分的靶点,并使用UniPort(<https://www.uniprot.org/>)数据库对靶点名称标准化,利用Cytoscape 3.8.0绘制“四逆汤-活性成分-靶点”网络图。

**2.2 四逆汤抗MI/RI的靶点预测** 以心肌缺血再灌注损伤为关键词从人类孟德尔遗传数据库(OMIM, <https://omim.org/>)和GeneCards数据库中收集经人工确认的MI/RI靶点,后将四逆汤和MI/RI的靶点导入韦恩(Venn)图软件中获得四逆汤抗MI/RI的靶点。

**2.3 四逆汤抗MI/RI的PPI网络构建** 将四逆汤抗MI/RI的靶点导入到STRING(<https://string-db.org/>)数据库,用于蛋白互作(PPI)分析,选择Multiple proteins功能,将分析得到的PPI结果保存为tsv文件格式,进而导入Cytoscape 3.8.0软件选择网络拓扑分析功能进行可视化结果。

**2.4 基因本体(GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析** 将四逆汤抗MI/RI的靶点导入David(<https://david.ncifcrf.gov/>)数据库中选择Functional Annotation功能,以Homo sapiens为筛选条件进行GO功能富集分析和KEGG通路富集分析,以 $P < 0.05$ 为筛选条件运用R语言制作气泡图。

**2.5 四逆汤的制备** 依据《伤寒杂病论》中所记载的水提法制备四逆汤,将附子(制)、干姜、炙甘草按1:2:3比例混匀,室温下加8倍量纯净水浸泡30 min后煎煮1 h,提取2次<sup>[6]</sup>。用3层纱布滤过药渣,合并2次滤液,浓缩至含生药量 $1 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ , $2\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心10 min,离心半径40 cm,分离上清用 $0.22 \mu\text{m}$ 水相微孔滤膜灭菌后 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 保存备用。

**2.6 四逆汤质量控制** 根据2020年版《中华人民

共和国药典》(以下简称《中国药典》),采用质谱法对四逆汤主要成分进行质量控制<sup>[7]</sup>,测定四逆汤中6-gingerol、aconitine、mesaconitine、glycyrrhizic acid和hypaconitine 5种成分含量。

**2.7 分组与造模** 将H9C2细胞分为5组,分别为正常组、模型组、四逆汤高、中、低质量浓度组( $20$ 、 $10$ 、 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )。参考文献[8]实验方法利用原代心肌细胞建立缺氧/复氧(H/R)损伤模型来模拟心肌缺血/再灌注损伤。在6孔板中培养H9C2大鼠心肌细胞,待细胞生长至80%左右进行处理,四逆汤各质量浓度组给予不同浓度药物预处理4 h,正常组置于5%  $\text{CO}_2$ 的 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养箱中孵育15 h,模型组换成低糖DMEM培养基后置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、1%  $\text{O}_2$ 和99%  $\text{N}_2$ 的低氧孵箱培养12 h,再次换液成10%胎牛血清高糖DMEM培养,复氧置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、5%  $\text{CO}_2$ 、95%空气的孵箱培养3 h。

**2.8 检测四逆汤对H/R损伤的H9C2细胞存活率**

将密度为 $1 \times 10^5$ 个/mL的H9C2大鼠心肌细胞铺板,待细胞贴壁完全后不同剂量给药组给予 $100 \mu\text{L}$ 含药培养基干预,在含药培养基上设置对照孔,同时每组设6个复孔,模型组给予DMEM完全培养基。在培养基培养24 h后向每组加CCK-8  $10 \mu\text{L}$ ,孵育4 h,取出原液后每孔加DMSO溶液 $100 \mu\text{L}$ ,待完全溶解后用酶标仪测定吸光度 $A$ ,计算各组H9C2细胞的存活率<sup>[9]</sup>。

**2.9 测定各组H9C2细胞中TNF- $\alpha$ 、IL-6、CK-MB含量** 采用BCA蛋白定量试剂盒检测收集到的H9C2细胞,严格按照TNF- $\alpha$ 、IL-6、CK-MB试剂盒说明进行操作测定各指标含量。

**2.10 H9C2细胞凋亡率测定** 利用Annexin V-FITC/IP双染法进行H9C2细胞凋亡率检测<sup>[10]</sup>,按照细胞凋亡检测试剂盒说明书操作步骤进行,将分组并成功建立H/R损伤后的H9C2细胞,用流式细胞仪检测细胞凋亡率。

**2.11 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测H9C2细胞中Bax、Bcl-2的蛋白表达** 将H9C2细胞置于含有蛋白酶抑制剂的RIPA裂解液中裂解30 min后进行蛋白定量测定,各组用10% SDS-PAGE分离等量蛋白 $30 \mu\text{g}$ ,电泳转膜到PVDF后封闭,与一抗结合后洗膜,二抗结合,洗膜后在增强化学发光(ECL)系统下成像,利用AlphaEase FC软件分析目标蛋白分子量和灰度值<sup>[11]</sup>。

**2.12 统计学分析** 采用SPSS 24.0软件包进行统计学处理,实验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用单

因素方差分析,检验后多重比较用最小显著性差异法(LSD), $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

### 3 结果

#### 3.1 网络药理分析结果

##### 3.1.1 四逆汤有效成分及靶点筛选 通过TCMSP

平台及补充的化合物共收集到四逆汤中潜在的有效成分105个,其中附子6个、干姜10个、甘草89个,删除重复目标后获得的作用靶点为234个,四逆汤成分靶点网络图见图1(图中多边形代表四逆汤中药物,三角形代表活性成分,圆形代表靶点)。

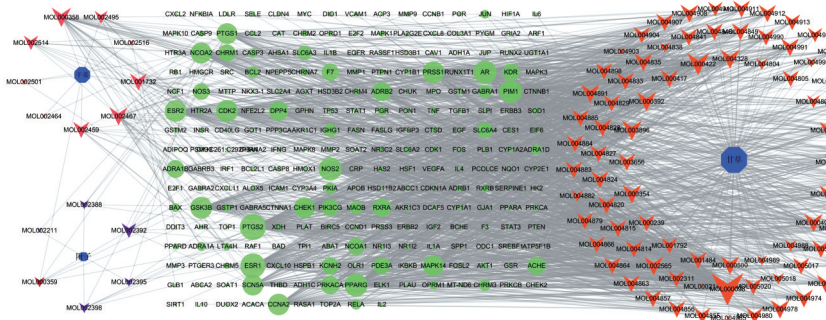


图1 四逆汤-有效成分-靶点网络

Fig. 1 Sinitang-active ingredients-target network diagram

3.1.2 四逆汤抗MI/RI靶点收集 从OMIM数据库和GeneCards数据库中获取MI/RI靶点707个,将四逆汤的靶点与MI/RI的靶点导入Venn图在线软件中,获取四逆汤抗MI/RI靶点116个。见图2。

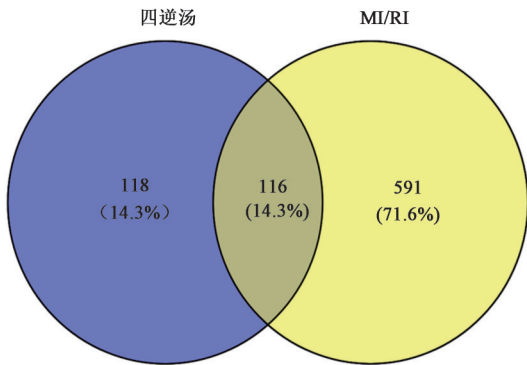


图2 四逆汤抗MI/RI目标

Fig. 2 Anti MI/RI targets of Sinitang

3.1.3 PPI网络图构建 进一步评估共同靶点的表达特性,将116个共同靶点导入STRING数据库完成相同靶点的PPI图,见图3,结果以TSV格式保存,导入Cytoscape 3.8.0选择MOCED函数完成网络拓扑分析。设定Degree>10和k-core=2来帮助识别网络中的关键节点。结果表明,从共同网络图中提取了7个核心网络,见图4。Bax、Bcl-2和Bad也形成了核心网络,而Bcl-2是抗凋亡靶点,Bax是促凋亡靶点<sup>[12]</sup>。因此,本研究选择Bax和Bcl-2这两个关键凋亡靶点进行实验验证。

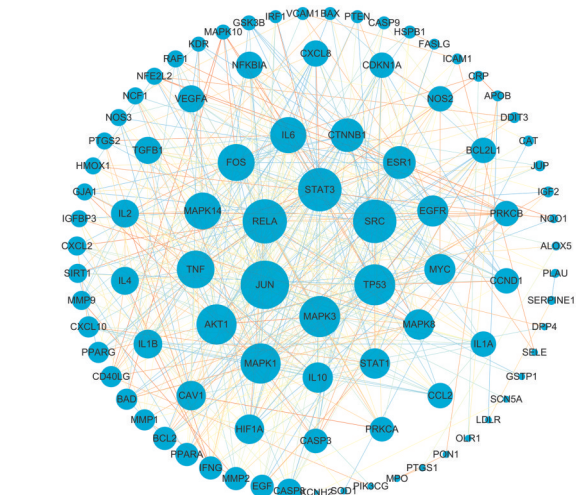


图3 四逆汤抗MI/RI共同靶点的PPI网络

Fig. 3 PPI network diagram of Sinitang against common targets of MI/RI

3.1.4 四逆汤抗MI/RI的GO功能富集分析和KEGG通路富集分析 GO功能富集分析得到587个条目,其中生物过程条目(BP)417个,主要涉及细

胞凋亡过程的负调控,调节线粒体膜电位<sup>[13]</sup>。分子功能条目(MF)69个,涉及蛋白质均二聚活性、蛋白质异二聚活性和过氧化物酶的活性等<sup>[14]</sup>。细胞组成条目(CC)101个,涉及细胞质溶胶、细胞外区域和血液微粒等<sup>[15]</sup>。以 $P < 0.05$ 为筛选条件,筛选出BP、MF、CC前10进行绘图分析,见图5。

DAVID数据库中获得125条KEGG路径,以 $P < 0.05$ 为筛选条件,筛选出前10进行绘图分析。细胞内皮生长因子(VEGF)、磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)、叉头框转录因子O(FoxO)、缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通道和细胞凋亡与MI/RI相关,其中PI3K/Akt和FoxO信号通道与细胞凋亡密切相关。

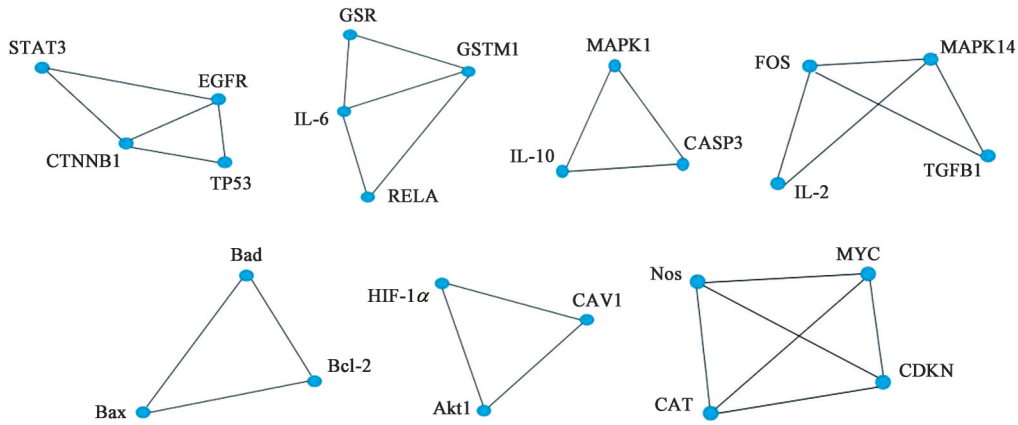
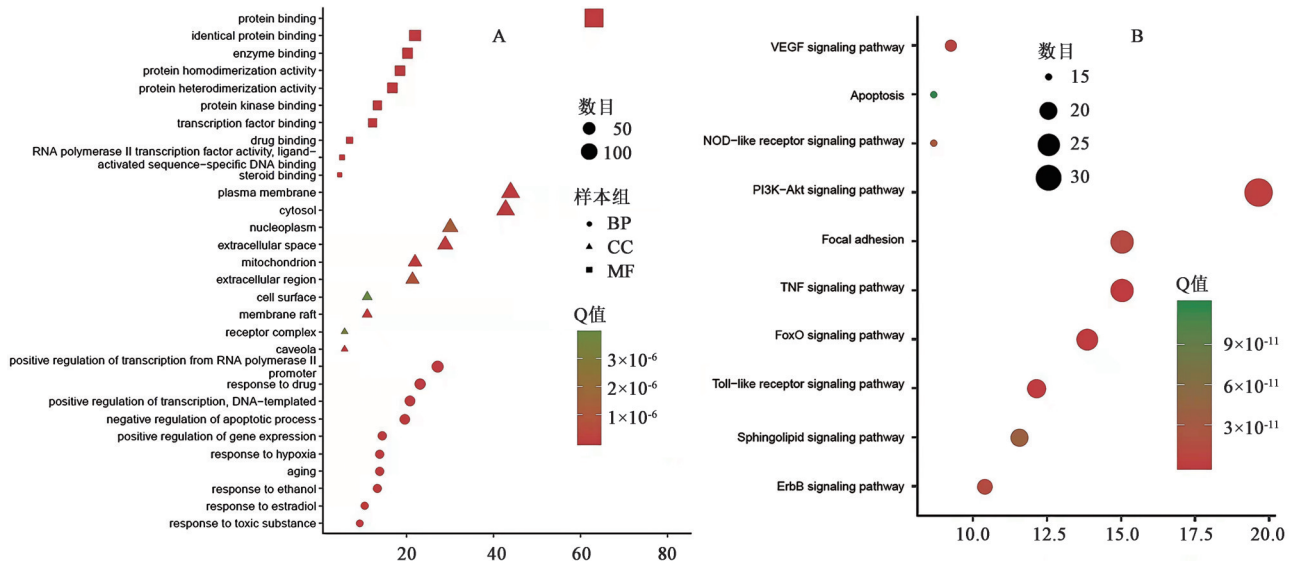


图4 四逆汤抗MI/RI共同作用靶点的核心网络

Fig. 4 Sinitang anti-MI/RI core target network



注:A. GO功能富集分析;B. KEGG通路富集分析

图5 四逆汤抗MI/RI预测靶点的GO和KEGG富集分析

Fig. 5 GO and KEGG analysis of Sinitang anti-MI/RI targets

**3.2 四逆汤质量控制** 借助质谱(MS)鉴定了四逆汤中的有效成分,均符合2020年版《中国药典》规定,测定四逆汤中6-gingerol、aconitine、mesaconitine、glycyrrhizic acid和hypaconitine 5种成分的相对分子质量分别为259、646、631、615、822。与此同时,这些成分也包含在的网络药理学中。见图6。

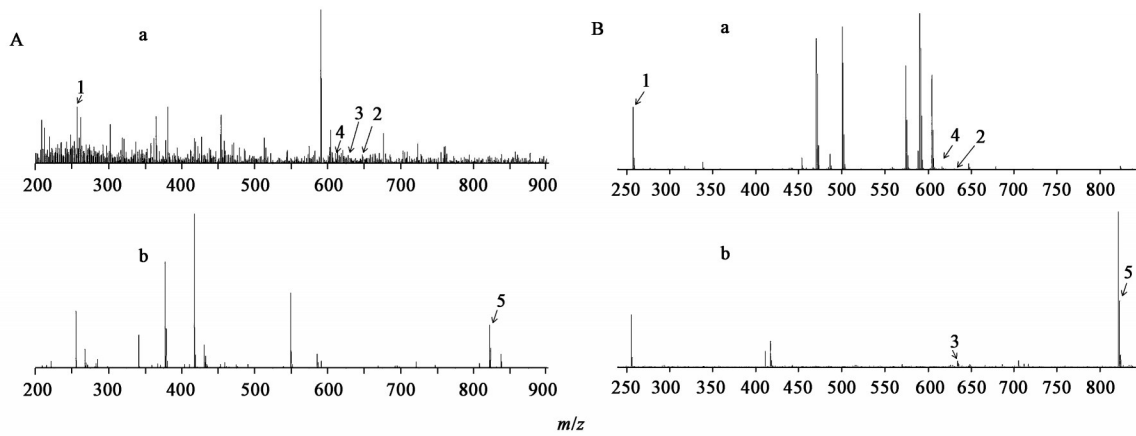
### 3.3 细胞实验

**3.3.1 四逆汤对H9C2细胞存活率的影响** 与正常组比较,模型组H9C2细胞存活率显著降低( $P < 0.01$ ),为45.64%;与模型组比较,四逆汤各质量浓度组干预的H9C2细胞存活率显著性增加( $P < 0.01$ ),其中四逆汤 $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度组细胞存活率为65.54%,四逆汤 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 质量浓度组细胞存活率为79.22%,且在四逆汤预给药浓度为 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,H9C2细胞存活率最高,为85.35%。见图7。

**3.3.2 四逆汤对H9C2细胞中CK-MB、TNF- $\alpha$ 和IL-6水平的影响** 与正常组比较,模型组H9C2细胞中CK-MB、TNF- $\alpha$ 和IL-6的表达均显著升高( $P < 0.01$ );与模型组比较,四逆汤各质量浓度组中CK-MB、TNF- $\alpha$ 和IL-6表达明显降低( $P < 0.05, P < 0.01$ )。四逆汤高质量浓度组( $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )抗MI/RI损伤H9C2细胞CK-MB、TNF- $\alpha$ 和IL-6最明显。见表1。

**3.3.3 四逆汤对H9C2细胞凋亡率的影响** H9C2细胞凋亡检测结果表明,与正常组比较,模型组细胞凋亡显著增加( $P < 0.01$ );与模型组比较,四逆汤各质量浓度组细胞凋亡率显著降低( $P < 0.01$ ),其中当干预浓度为四逆汤高质量浓度组( $20 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ )时细胞凋亡率降低最显著。见表2。

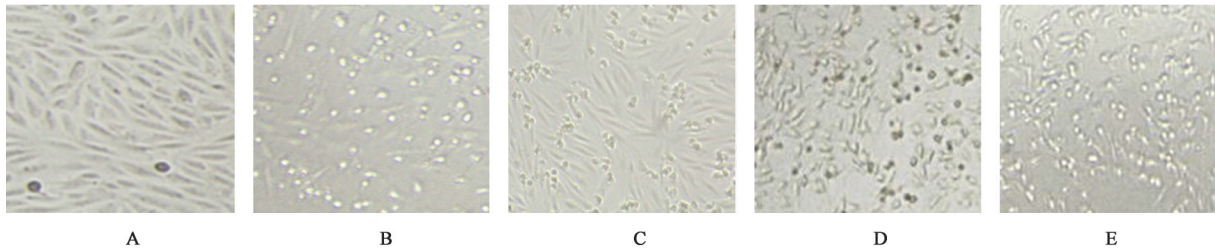
**3.3.4 四逆汤对H9C2细胞中Bax和Bcl-2蛋白表达的影响** 与正常组比较,模型组H9C2细胞中Bax



注: A. 四逆汤; B. 对照品; a. 四逆汤成分质量谱图; b. 成分补充谱图; 1. 6-gingerol; 2. aconitine; 3. mesaconitine; 4. glycyrrhizic acid; 5. hypaconitine

图6 四逆汤质量控制

Fig. 6 Quality control of Sinitang



注: A. 正常组; B. 模型组; C. 四逆汤高质量浓度组; D. 四逆汤中质量浓度组; E. 四逆汤低质量浓度组(图8同)

图7 四逆汤对H9C2细胞存活率的影响

Fig. 7 Effect of Sinitang on viability of H9C2

表1 四逆汤对H9C2细胞中CK-MB、TNF- $\alpha$ 和IL-6水平的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 1 Effect of Sinitang on levels of CK-MB, TNF- $\alpha$  and IL-6 in H9C2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

ng·L<sup>-1</sup>

组别	剂量/g·L <sup>-1</sup>	CK-MB	TNF- $\alpha$	IL-6
正常组		75.36 $\pm$ 4.16	78.22 $\pm$ 3.75	52.36 $\pm$ 4.37
模型组		151.21 $\pm$ 5.27 <sup>2)</sup>	148.86 $\pm$ 2.13 <sup>2)</sup>	82.15 $\pm$ 3.93 <sup>2)</sup>
四逆汤高质量浓度组	20	85.92 $\pm$ 2.63 <sup>4)</sup>	82.45 $\pm$ 2.07 <sup>4)</sup>	67.54 $\pm$ 2.85 <sup>4)</sup>
四逆汤中质量浓度组	10	91.34 $\pm$ 6.28 <sup>4)</sup>	96.37 $\pm$ 9.61 <sup>4)</sup>	74.86 $\pm$ 3.11 <sup>3)</sup>
四逆汤低质量浓度组	5	135.64 $\pm$ 13.11 <sup>3)</sup>	103.15 $\pm$ 5.24 <sup>4)</sup>	79.73 $\pm$ 1.62

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>P<0.05,<sup>4)</sup>P<0.01(表2和表3同)

表2 四逆汤对H9C2细胞凋亡率的影响( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

Table 2 Effect of Sinitang on apoptosis rate of H9C2 cells ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

组别	剂量/g·L <sup>-1</sup>	细胞凋亡率/%
正常组		4.12 $\pm$ 1.59
模型组		57.36 $\pm$ 4.15 <sup>2)</sup>
四逆汤高质量浓度组	20	24.83 $\pm$ 4.31 <sup>4)</sup>
四逆汤中质量浓度组	10	29.74 $\pm$ 2.86 <sup>4)</sup>
四逆汤低质量浓度组	5	38.62 $\pm$ 3.17 <sup>4)</sup>

蛋白表达显著升高(P<0.01);相较于模型组四逆汤各质量浓度组中H9C2细胞中Bax蛋白表达均显著

降低(P<0.01),当干预浓度为四逆汤高质量浓度组(20 g·L<sup>-1</sup>)时效果最佳。与正常组比较,模型组H9C2细胞中Bcl-2蛋白表达显著降低(P<0.01);相较于模型组四逆汤各质量浓度组中H9C2细胞中Bcl-2蛋白表达均明显升高(P<0.05, P<0.01),当干预浓度为四逆汤高质量浓度组(20 g·L<sup>-1</sup>)时效果最佳(P<0.01)。见图8、表3。

#### 4 讨论

中药方剂治疗缺血性心脏病大都是多成分、多靶点、多路径协同作用的结果,对缺血区域进行早期再灌注,虽对受损心肌有积极作用,但仍会进一

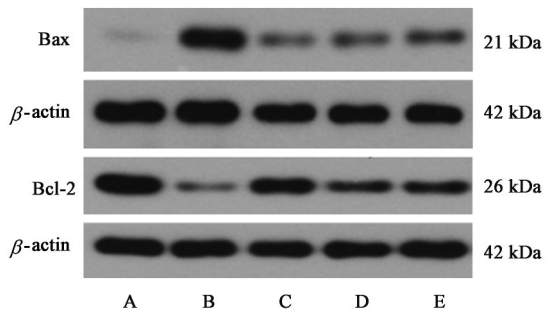


图8 H9C2细胞中Bax和Bcl-2蛋白表达电泳

Fig. 8 Electrophoresis of Bax and Bcl-2 protein expression in H9C2 cells

表3 四逆汤对H9C2细胞中Bax和Bcl-2蛋白表达的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

Table 3 Effect of Sinitang on Bax and Bcl-2 protein expression in H9C2 cells ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=6$ )

组别	剂量 /g·L <sup>-1</sup>	Bax /β-actin	Bcl-2 /β-actin
正常组		0.94±0.11	0.98±0.13
模型组		4.63±0.25 <sup>2)</sup>	0.29±0.18 <sup>2)</sup>
四逆汤高质量浓度组	20	1.20±0.33 <sup>4)</sup>	0.81±0.06 <sup>4)</sup>
四逆汤中质量浓度组	10	1.42±0.19 <sup>4)</sup>	0.50±0.01 <sup>3)</sup>
四逆汤低质量浓度组	5	1.85±0.24 <sup>4)</sup>	0.56±0.02 <sup>3)</sup>

步的损伤心肌,表现为心肌震颤、心律不齐和心肌细胞死亡等<sup>[16]</sup>。为此,改善急性心肌梗死的临床现状,探究安全有效的治疗MI/RI损伤的干预措施较为迫切。本研究基于网络药理学的方法预测四逆汤在抗MI/RI中的作用机制,并予以细胞实验进行验证。利用网络药理学分析结果发现四逆汤中BP主要与细胞凋亡有关,除肿瘤通路外,PI3K/Akt是典型的细胞凋亡信号通路。前期研究表明,抑制心肌细胞凋亡是治疗MI/RI的重要措施<sup>[17]</sup>。进行共同靶点的网络拓扑分析后找出了Bax、Bcl-2和Bad组成的核心网络。

四逆汤组方精炼,由附子(制)、干姜、炙甘草配伍而成,方中附子与干姜两者相须为用,温里回阳之力大增,具有回阳救逆、温中散寒的功效。临床上对心肌梗死或心力衰竭患者疗效显著,常用于治疗心衰及心肌梗死等属阴虚阳衰患者。在心肌细胞损伤过程中,多种细胞因子通过细胞内信号转导机制参与到验证过程中。H/R可引起机体的应激反应,释放多种物质。CK-MB是判断心肌损伤的指标之一,主要分布于心肌的肌酸激酶同工酶,CK-MB的释放量用来衡量细胞的损伤程度<sup>[18]</sup>。TNF-α导致细胞死亡的机制是与细胞膜上的受体特异性结合,通过激活下游Caspase-8凋亡蛋白有关<sup>[19]</sup>。IL-6

是由TNF-α特异性激活的继发性炎症因子,可激活炎症的相关细胞,促进黏附分子等物质的产生,进而愈发加重炎症反应<sup>[20]</sup>。研究证实心肌细胞细胞膜通透性的改变和心肌酶释放的增加与TNF-α和IL-6的释放密切相关<sup>[21]</sup>。在本研究中,采用大鼠心肌H9C2细胞进行体外验证,不同于体内口服给药设计,实验对四逆汤主要有效成分含量未能定量给出,但证实了四逆汤可降低H/R损伤的H9C2细胞中CK-MB、TNF-α和IL-6的含量。有研究表明Bcl-2家族是细胞凋亡信号转导通路中重要的调控蛋白<sup>[21]</sup>,在线粒体介导的凋亡通路中,Bcl-2家族蛋白与其他凋亡蛋白之间相互作用,通过调控线粒体的结构和功能进而发挥细胞凋亡的中枢调控作用<sup>[22]</sup>。Bcl-2家族包含有以Bcl-2、Bcl-XL和Bcl-W为代表的抗凋亡和以Bax、Bak为代表的促凋亡蛋白,在凋亡过程中,Bax亚家族成员进行蛋白加工修饰,导致线粒体细胞色素C、凋亡诱导因子等促凋亡因子释放,从而导致细胞凋亡<sup>[23]</sup>。抗凋亡蛋白Bcl-2发挥抗凋亡作用与下述5点机制有关:①自身的抗氧化作用;②线粒体对促凋亡蛋白Cytoto-c、凋亡诱导因子AIF释放表现出的抑制作用<sup>[24]</sup>;③促凋亡调节蛋白Bax和Bak对细胞增殖抑制作用<sup>[25]</sup>;④抑制凋亡蛋白酶的激活;⑤维持细胞内钙平衡<sup>[26]</sup>。研究结果表明,从四逆汤中通过网络药理学共筛选得到治疗MI/RI靶点116个,涉及血管内皮生长因子(VEGF)、PI3K/Akt、叉头框转录因子O(FoxO)、缺氧诱导因子-1(HIF-1)和细胞凋亡等信号通路。试剂盒检测结果表明四逆汤可降低H/R损伤的H9C2细胞中TNF-α、IL-6、CK-MB的水平,流式细胞仪检测结果表明四逆汤可降低H/R损伤的H9C2细胞凋亡率,Western blot结果显示四逆汤可降低H/R损伤的H9C2细胞中Bax的表达,增加Bcl-2的表达。

综上,四逆汤抗MI/RI呈现多靶点、多路径协同作用,且对心肌细胞MI/RI损伤具有保护作用,作用机制可能与细胞凋亡Bax和Bcl-2信号通路有关,本研究为四逆汤临床治疗MI/RI提供了理论依据,但也存在一定的局限性,具体机制还有待进一步研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LIU X W, LU M K, ZHONG H T, et al. *Panax notoginseng* saponins attenuate myocardial ischemia-reperfusion injury through the HIF-1α/BNIP3 pathway

- of autophagy [J]. *J Cardiovasc Pharm*, 2019, 73(2): 92-99.
- [ 2 ] DENG S, DAI G, CHEN S, et al. Dexamethasone induces osteoblast apoptosis through ROS-PI3K/Akt/GSK3 $\beta$  signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 110: 602-608.
- [ 3 ] 邹田田, 杨龙, 陈春玲. 盐酸右美托咪定调控 HIF-1 $\alpha$  对高糖诱导心肌线粒体损伤与细胞凋亡的影响 [J]. *临床和实验医学杂志*, 2020, 19(9): 902-906.
- [ 4 ] 谢锋, 段广靖, 王斌, 等. 基于网络药理学探讨干姜附子汤抗心肌缺血再灌注损伤的作用机制 [J]. *中南药学*, 2021, 19(1): 30-38.
- [ 5 ] 张欢欢, 李敏, 王斌, 等. 基于网络药理学的四逆汤抗心肌缺血损伤的分子机制研究 [J]. *中国现代中药*, 2018, 20(3): 265-277.
- [ 6 ] YAO L, SONG J, MENG X W, et al. Periostin aggravates NLRP3 inflammasome-mediated pyroptosis in myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Mol Cell Probes*, 2020, 53: 101596.
- [ 7 ] 邹纯才, 洪国君, 鄢海燕. 网络药理学预测瓜蒌抗心肌缺血再灌注损伤作用机制及验证研究 [J]. *药学报*, 2019, 54(7): 1234-1240.
- [ 8 ] 曾先燕, 张妞妞, 吉晔楠, 等. 橙皮素通过抑制钙超载减轻低氧/复氧诱导的心肌 H9C2 细胞凋亡 [J]. *中国病理生理杂志*, 2019, 35(5): 873-880.
- [ 9 ] 徐炜棉, 郭金莲, 王燕琴, 等. 苦参碱对阿霉素所致 H9C2 心肌细胞损伤的保护作用及与线粒体 Na<sup>+</sup>-K<sup>+</sup>-ATP 酶、Ca<sup>2+</sup>-ATP 酶关系的研究 [J]. *中国医院药学杂志*, 2019, 39(9): 941-944.
- [ 10 ] ZHANG Y, WANG Y, XU J, et al. Melatonin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury via improving mitochondrial fusion/mitophagy and activating the AMPK-OPA1 signaling pathways [J]. *J Pineal Res*, 2019, 66(2): e12542.
- [ 11 ] 霍礼超, 李梦丽, 乔成栋. 当归多糖对缺氧-复氧损害导致的 H9C2 心肌细胞能量代谢障碍的保护作用 [J]. *河北医学*, 2019, 25(3): 568-572.
- [ 12 ] 杨禹晗, 陈超英, 袁占鹏. 玉竹提取物对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌细胞线粒体损伤及凋亡的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(16): 136-140.
- [ 13 ] 李翔子, 孙晓宇, 王赞, 等. 富氢水对大鼠离体心肌缺血再灌注损伤细胞凋亡的影响 [J]. *实用医学杂志*, 2018, 34(20): 3356-3361.
- [ 14 ] 谢亚芹, 李浩, 赵娟, 等. 瑞舒伐他汀对心肌缺血再灌注损伤大鼠心肌凋亡及相关基因表达的影响 [J]. *中国现代医学杂志*, 2018, 28(27): 10-14.
- [ 15 ] 黄艳平, 杨天华, 金植炎, 等. 线粒体通透性转换孔在内啡肽-1 后处理减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤中的作用 [J]. *南方医科大学学报*, 2018, 38(5): 547-553.
- [ 16 ] 胡越, 沈扬, 王康, 等. 探讨白头翁汤治疗溃疡性结肠炎的作用机制 [J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(1): 55-60.
- [ 17 ] 马清林, 臧凯宏, 杜丽东, 等. 乌梅丸治疗溃疡性结肠炎的网络药理学研究 [J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(2): 11-16.
- [ 18 ] 官扬, 曾文雪, 胡慧明, 等. 基于网络药理学探讨甘草-枳壳活性成分抗乳腺癌作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(8): 219-227.
- [ 19 ] 吴杰, 向净匀, 孙彦杰, 等. 基于网络药理学的附子-干姜抗心肌缺血损伤的分子机制 [J]. *中南药学*, 2019, 17(4): 481-488.
- [ 20 ] 王用华, 杨凌. 基于系统药理学的现代中药研究体系 [J]. *世界中医药*, 2013, 8(7): 801-808.
- [ 21 ] 邓晓红, 黄建华, 董竞成. 附子药理作用的分子机制研究进展 [J]. *江西中医药大学学报*, 2018, 30(1): 121-124.
- [ 22 ] 张璐, 王建, 赵艳玲. 附子与干姜配伍的药理学研究进展 [J]. *中国医院用药评价与分析*, 2018, 18(11): 1441-1443, 1446.
- [ 23 ] HUANG D W, SHERMAN B T, LEMPICKI R A. Systematic and integrative analysis of large gene lists using DAVID bioinformatics resources [J]. *Nat Protoc*, 2009, 4(1): 44-57.
- [ 24 ] ZHAO D, ZHANG M, YUAN H, et al. Ginsenoside Rb<sub>1</sub> protects against spinal cord ischemia-reperfusion injury in rats by downregulating the Bax/Bcl-2 ratio and Caspase-3 and p-Ask-1 levels [J]. *Exp Mol Pathol*, 2018, 105(3): 229-235.
- [ 25 ] 张容超, 王瑞辉, 杜旭, 等. 电针对颅脑损伤大鼠脑组织中促凋亡蛋白 Bad、Bak、Bax 的影响 [J]. *时珍国医国药*, 2021, 32(7): 1776-1779.
- [ 26 ] TOLDO S, MARCHETTI C, MAURO A G, et al. Inhibition of the NLRP3 inflammasome limits the inflammatory injury following myocardial ischemia-reperfusion in the mouse [J]. *Int J Cardiol*, 2016, 209: 215-220.

[责任编辑 孙丛丛]