生脉饮通过抑制MAPK信号通路与协同调控肠道菌群减轻心肌缺血损伤

游 宇[1#], 尹红雨[1#], 吴亿晗[1], 蔡梓航[1], 冯 熙[1], 焦 傲[1], 谢 恬[2,3], 胡慧玲[1*], 章津铭[1*]

(1. 成都中医药大学现代中药产业学院, 中药种质资源创新与高效利用四川省重点实验室, 中药材标准化教育部重点实验室 (成都中医药大学), 四川 成都 611137; 2. 成都中医药大学中西医融合创新药物研究院, 四川 成都 611137; 3. 杭州师范大学药学院, 浙江 杭州 311121)

摘要: 本研究拟探讨中药复方生脉饮 (Shengmai Yin, SMY) 通过调控肠道菌群及MAPK信号通路协同发挥抗心肌缺血 (myocardial ischemia, MI) 的作用机制。首先采用网络药理学结合GO和KEGG富集分析预测SMY抗MI潜在靶点及信号通路, 其次采用腹腔注射垂体后叶素 (25 U·kg^{-1}) 建立SD大鼠急性心肌缺血模型, 同时灌胃给予SMY干预7天, 每日记录体重, 随后检测心电图及心脏组织病理学变化, 测定心肌损伤标志物 [天冬氨酸氨基转移酶 (aspartate aminotransferase, AST)、肌酸激酶 (creatine kinase, CK)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、乳酸 (lactic acid, LD) 以及心肌肌钙蛋白I (cardiac troponin-I, cTn-I)]、氧化应激指标 [超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA)] 及炎症因子 [肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α)、白介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白介素-1β (interleukin-1β, IL-1β)] 的水平; 采用免疫组织化学法检测心肌组织中凋亡相关关键蛋白的表达, 包括Bcl-2关联X蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax)、胱天蛋白酶-3 (cysteinyl aspartate specific proteinase-3, Caspase-3) 及B细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2); 采用TUNEL染色法检测心肌细胞凋亡情况; 运用蛋白免疫印迹法 (Western blot) 检测丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路中关键蛋白的表达水平; 16S rRNA测序分析肠道微生物群结构变化。实验动物经成都中医药大学实验动物管理委员会伦理委员会批准 (批准号: 2014 DL-023)。网络药理学结果显示, 核心靶点包括TP53、TNF、MAPK1、MAPK3、CTNNB1等, 主要作用于MAPK、PI3K-AKT等信号通路。体内实验结果显示, SMY可缓解心电图异常及组织病理损伤, 降低心肌损伤标志物及炎症因子水平, 抑制MAPK通路关键蛋白p38磷酸化, 下调Bax、Caspase-3表达, 上调Bcl-2表达。16S rRNA测序显示SMY可调节肠道菌群多样性及组成。结果表明, SMY可能通过抑制炎症反应与心肌细胞凋亡发挥抗心肌缺血保护作用, 该效应与MAPK信号通路调控及肠道菌群组成改变相关, 具体机制及因果关系有待深入研究。

关键词: 生脉饮; 心肌缺血; 网络药理学; MAPK信号通路; 肠道菌群

中图分类号: R966 **文献标识码**: A **文章编号**: 0513-4870(2026)09-3390-12

收稿日期: 2026-05-07; 修回日期: 2026-07-13.

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (81904088); 中国博士后科学基金会 (2024MD763926); 四川省科技厅 (2025ZNSFSC1804); 四川省人力资源和社会保障厅 (TB2025092).

[#]共同第一作者.

*通讯作者 E-mail: cdutcmzjm@126.com; huhuiling@cdutcm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2026-0522

Shengmai Yin attenuates myocardial ischemia injury by inhibiting MAPK signaling pathway and coordinately regulating gut microbiota

YOU Yu[1#], YIN Hong-yu[1#], WU Yi-han[1], CAI Zi-hang[1], FENG Xi[1], JIAO Ao[1], XIE Tian[2,3], HU Hui-ling[1*], ZHANG Jin-ming[1*]

(*1. School of Modern Chinese Medicine Industry, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chinese Medicine Germplasm Resources Innovation and Effective Uses Key Laboratory of Sichuan Province, Key Laboratory of Standardization of Chinese Medicine (Chengdu University of Traditional Chinese Medicine), Ministry of Education, Chengdu 611137, China;　2. Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine & Innovative Drug Research, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 611137, China;　3. School of Pharmacy, Hangzhou Normal University, Hangzhou 311121, China*)

Abstract: This study aimed to investigate the mechanism of the traditional Chinese medicine compound Shengmai Yin (SMY) in exerting anti-myocardial ischemia (MI) effects through the synergistic regulation of the gut microbiota and the MAPK signaling pathway. First, network pharmacology combined with GO and KEGG enrichment analysis was used to predict the potential targets and signaling pathways of SMY against MI. Secondly, an acute myocardial ischemia model was established in SD rats by intraperitoneal injection of pituitrin (25 $U \cdot kg^{-1}$), while SMY was administered by intragastric gavage for intervention for 7 days, with daily body weight recording. Subsequently, electrocardiogram and cardiac histopathological changes were detected. The levels of myocardial injury markers [aspartate aminotransferase (AST), creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), lactic acid (LD), and cardiac troponin- I (cTn- I)], oxidative stress indicators [superoxide dismutase (SOD), glutathione peroxidase (GSH-Px), malondialdehyde (MDA)] and inflammatory factors [tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), interleukin-1β (IL-1β)] were measured. Immunohistochemistry was used to detect the expression of key apoptosis-related proteins in myocardial tissue, including Bcl-2 associated X protein (Bax), cysteinyl aspartate specific proteinase-3 (Caspase-3), and B-cell lymphoma-2 (Bcl-2). TUNEL staining was used to detect cardiomyocyte apoptosis. Western blot was used to detect the expression levels of key proteins in the mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway. 16S rRNA sequencing was used to analyze the structural changes of the gut microbiota. The experimental animals were approved by the Experimental Animal Management Committee Ethics Committee of Chengdu University of Traditional Chinese Medicine (Approval No.: 2014 DL-023). Network pharmacology analysis identified pivotal targets including TP53, TNF, MAPK1, MAPK3, and CTNNB1, which are predominantly involved in the MAPK and PI3K-AKT signaling pathways. *In vivo* studies demonstrated that SMY ameliorated electrocardiographic abnormalities and histopathological lesions, reduced serum levels of myocardial injury biomarkers and pro-inflammatory cytokines, suppressed the phosphorylation of the key MAPK protein p38, downregulated the expression of Bax and Caspase-3, and upregulated Bcl-2. Furthermore, 16S rRNA sequencing revealed that SMY modulated gut microbiota diversity and compositional structure. These findings suggest that SMY exerts cardioprotective effects against myocardial ischemia, potentially by suppressing inflammatory responses and cardiomyocyte apoptosis. This therapeutic effect is associated with the modulation of the MAPK signaling pathway and alterations in gut microbiota composition; however, the precise mechanisms and causal relationships warrant further investigation.

Key words: Shengmai Yin; myocardial ischemia; network pharmacology; MAPK signaling pathway; gut microbiota

心肌缺血 (myocardial ischemia, MI) 是导致心血管疾病发病和死亡的核心病理过程, 其导致的疾病负担持续加重。最新流行病学数据显示, 我国冠心病患病基数庞大, 由其引发的急性心肌缺血及心肌梗死等心血管事件发病率与死亡率仍居高不下, 防治形势严峻[1]。MI 的病理核心是心肌氧供不足与能量代谢紊乱, 进而引发氧化应激、钙超载、炎症风暴与心肌细胞凋亡等级联损伤, 最终可导致心力衰竭甚至猝死等严

重后果[2,3]。目前, 临床治疗以血运重建和药物治疗为主, 可快速恢复血供、缓解症状[4-8]。然而仍存在再灌注损伤、残余缺血、药物不良反应及远期预后欠佳等问题[9]。因此, 深入探索MI的病理机制并寻找新的干预策略具有重要临床意义。

生脉饮 (Shengmai Yin, SMY) 是益气复脉、养阴生津的经典名方[10]。现代药理学研究表明, SMY可通过激活Nrf2/ARE通路清除自由基、抑制氧化应激反应, 调控炎症因子与凋亡信号通路、改善心肌能量代谢等多重途径发挥心肌保护作用[11]。其主要活性成分如人参皂苷、麦冬多糖和五味子素已被证实可通过抗凋亡、抗炎、调节线粒体功能等方式参与调控相关信号通路[12-15], 然而目前还缺少从整体网络角度揭示SMY对MI的调控效应的研究。

近年来, “肠−心轴” (gut-heart axis) 理论为心血管疾病防治提供了全新视角, 肠道菌群及其代谢物在心血管疾病中发挥关键调控作用[16,17]。研究表明, 肠道菌群的组成及丰度变化与心血管疾病的发生发展密切相关[18-20]。不仅如此, 已有大量中药复方被证实可通过调控肠道菌群改善心肌损伤[21,22], 这些研究为中药复方通过“肠−心轴”治疗MI提供了有力证据, 然而SMY是否通过调控肠道菌群发挥心脏保护效应, 目前尚不清楚。

因此, 本研究拟整合网络药理学预测、动物模型验证及16S rRNA测序技术, 旨在系统揭示SMY通过调控“肠道菌群-MAPK信号轴”改善心肌缺血的作用机制, 以期为拓展其临床应用提供科学依据。

材料与方法

药品与试剂 红参饮片 (批号: 1611056, 产地: 吉林)、麦冬饮片 (批号: 1612057, 产地: 四川)、五味子饮片 (批号: 1611091, 产地: 辽宁) 购自成都新荷花中药饮片有限公司, 经成都中医药大学裴瑾教授鉴定。垂体后叶素 (批号: 250201) 购自康普药业股份有限公司; 复方丹参滴丸 (批号: 150427) 购自天士力制药集团股份有限公司; 乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH; 货号A020-2)、肌酸激酶 (creatine kinase, CK; 货号A032)、天冬氨酸转氨酶 (aspartate aminotransferase, AST; 货号C010-2)、超氧化物歧化酶 (superoxide dismutase, SOD; 货号A001-3)、谷胱甘肽过氧化物酶 (glutathione peroxidase, GSH-Px; 货号A005)、丙二醛 (malondialdehyde, MDA; 货号A003-1)、乳酸 (lactic acid, LD; 货号A019-2)、一氧化氮 (nitric oxide, NO; 货号A012)、心肌肌钙蛋白I (cardiac troponin I, cTn-I; 货号E-EL-R0151c) 检测试剂盒购自南京建成生物工程研究所; 白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、白细胞介素-1β (interleukin-1β, IL-1β)、肿瘤坏死因子-α (tumor necrosis factor-α, TNF-α) 酶联免疫试剂盒 (货号分别为E-EL-R0012、E-EL-R0015、E-EL-R2856) 购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司; β-actin抗体、胱天蛋白酶-3 (cysteinyl aspartate specific proteinase-3, Caspase-3) 抗体、c-Jun N末端激酶 (c-Jun N-terminal kinase, JNK) 抗体、p-JNK抗体 (货号分别为81115-1-RR、19677-1-AP、81629-1-RR、80024-1-RR) 均购自武汉三鹰生物技术有限公司; p38丝裂原活化蛋白激酶 (p38 mitogen-activated protein kinase, p38) 抗体 (GB154685) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; p-p38抗体 (4511)、Bcl-2关联X蛋白 (Bcl-2 associated X protein, Bax) 抗体 (14796S) 均购自美国Cell Signaling Technology (CST) 公司; B细胞淋巴瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2) 抗体、细胞外信号调节激酶 (extracellular signal-regulated kinase, ERK) 抗体、p-ERK抗体 (货号分别为ET1702-53、ET1601-29、ET1610-13) 购自杭州华安生物技术有限公司。

实验动物 SPF级SD大鼠, 7周龄, 体质量200～220 g, 雌雄各半, 由斯贝福 (北京) 生物科技有限公司提供 [合格证号: SCXK (京) 2024-0001]。大鼠适应性饲养1周后进行实验, 实验期间不限量摄食和饮水。本实验方案经成都中医药大学实验动物伦理委员会批准 (批准号: 2014 DL-023), 实验期间严格遵循国家和成都中医药大学动物中心动物使用管理条例进行。

SMY潜在靶点与心肌缺血疾病靶点收集 通过TCMSP数据库搜索SMY组方的有效成分, 根据口服生物利用度 (OB) ≥ 30%和类药性 (DL) ≥ 0.18进行筛选, 并获取相应靶点。利用BATMAN-TCM、HERB数据库补充有效成分, 在Swiss ADME平台中筛选活性成分, 需满足以下条件被筛选: 胃肠道吸收 (GI absorption) 为“High”; 5种类药性 (Lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge) 的结果中满足2个及2个以上“Yes”。此外, 获得的所有成分通过Swiss Target Prediction数据库, 以“Homo sapiens”作为物种限定前提、probability > 0筛选出潜在有效靶点。将数据库收集到的潜在靶点进行合并并删除重复值, 借助UniProt数据库校正靶点对应的标准化基因名。

PPI网络的构建与分析 对SMY成分靶点和疾病靶点进行交集计算, 获得共同作用靶点。将关键靶点导入到STRING数据库 (https://cn.string-db.org/) 的“multiple proteins”板块, 物种设定为“Homo sapiens”, 设定最低交互作用分数阈值为0.900, 得到PPI网络和TSV文件。使用Cytoscape3.9.1软件中的CytoHubba

插件对TSV文件进行分析, 根据度 (degree) 值大小筛选核心靶点。

SMY−成分−疾病−靶点网络图构建及SMY主要活性成分筛选　利用Cytoscape3.9.1软件构建SMY-成分−疾病−交集靶点网络图, CentiSpcaPe 2.2插件分析度值大小以筛选SMY主要活性成分。

GO与KEGG通路富集分析　将关键靶点导入Metascape数据库(https://metascape.org/gp/index.html), 物种设置为"Homo sapiens", 以$P < 0.01$为筛选标准, 进行GO生物学过程中的细胞成分 (cellular component, CC)、生物过程 (biological process, BP)、分子功能 (molecular function, MF) 分析和KEGG信号通路富集分析。为了更直观地展示富集分析结果, 本研究利用微生信 (http://www.bioinformatics.com.cn/) 平台绘制GO富集和KEGG通路富集的气泡图。

药物制备　称取红参饮片70 g, 麦冬140 g, 五味子70 g, 生药共计280 g。将所有饮片加入8倍量的蒸馏水, 浸泡30 min, 武火煮沸后文火煎煮30 min, 倒出药液, 纱布过滤, 滤渣加入8倍量的蒸馏水, 武火煮沸后文火煎煮30 min, 将两次所得溶液过滤合并, 减压浓缩至0.14 g·mL^{-1}, 即得SMY药液。

实验动物分组与造模　将SD大鼠随机分为6组 ($n = 8$): 空白对照组 (N)、模型组 (M)、阳性药复方丹参滴丸组 (P, 0.081 g·kg^{-1})、SMY低、中、高剂量组(SML, 0.70 g·kg^{-1}; SMM, 1.40 g·kg^{-1}; SMH, 2.80 g·kg^{-1})。N组和M组灌胃等体积生理盐水。SMY各剂量组按人与大鼠体表面积换算法折算临床等效剂量 (约0.74 g·kg^{-1}), 参考文献[23]及前期预实验设置低、中、高剂量; 复方丹参滴丸为临床常用抗心肌缺血药物, 用作阳性对照[24]。各组均连续灌胃相应药物或生理盐水7 d。于末次灌胃1 h后, 除N组外, 其余各组大鼠腹腔注射25 U·kg^{-1}垂体后叶素以制备急性心肌缺血模型。造模结束1 h后, 麻醉处死动物, 收集血清及心肌组织, 分别固定于多聚甲醛或保存于−80 ℃, 用于后续实验研究。

心电图检测　各组大鼠第7天末次灌胃后1 h, 气体麻醉大鼠, 用BL-420E生物功能测试系统检测和记录大鼠的II导联心电图。在10 min的稳定期后, 大鼠接受25 U·kg^{-1}的垂体后叶素腹腔注射, 分别于注射前10 min、注射后10、20、30 min等特定时间点测量并记录心电图, 分析注射垂体后叶素后S-T段波形态的变化情况, 评估注射垂体后叶素所致心肌缺血情况及心脏电活动的变化。

酶联免疫吸附实验　血清样本在4 ℃、3 000 r·min^{-1}下离心10 min取上清。根据试剂盒说明检测大鼠血清心肌损伤相关酶AST、CK、LDH、LD活性; 心肌损伤标志性蛋白cTn-I相对表达量; 心肌组织中氧化应激相关指标GSH-Px、MDA、SOD含量; 心肌细胞保护物质NO含量以及炎症因子TNF-α、IL-6和IL-1β的水平。

组织形态学分析　将心脏组织固定在10%甲醛溶液, 经过脱水, 石蜡包埋, 切片, 采用苏木精−伊红(HE) 对组织染色。染色切片用BA200数码显微镜 (德国徕卡), 放大100和400倍观察。

免疫组化　石蜡切片经抗原修复、3% H_2O_2灭活内源性酶及BSA封闭后, 依次进行一抗与二抗孵育, DAB显色, 苏木素复染。阳性信号为棕黄色, 采用ImageJ软件对目标蛋白表达进行半定量分析。

TUNEL心肌细胞凋亡检测　石蜡切片经常规脱蜡、水化及proteinase K处理后, 滴加TUNEL反应混合液, 于37 ℃湿盒中避光孵育1 h。PBS漂洗后, 滴加DAPI复染, 封片。荧光显微镜下观察, 凋亡细胞核呈绿色荧光, 正常细胞核呈蓝色。

蛋白免疫印痕分析　采用RIPA裂解缓冲液对心肌组织裂解提取蛋白。采用ERK、p-ERK、JNK、p-JNK、p38、p-p38、β-actin抗体在4 ℃下孵育16 h, 然后将二级抗体孵育1 h后显影成像, 蛋白条带使用ImageJ软件量化。

16S rRNA测序分析　大鼠末次给药1 h后腹腔注射垂体后叶素造模, 造模后约1 h, 麻醉取血同时无菌采集直肠内容物, 液氮速冻, −80 ℃保存。48例粪便样本, Illumina MiSeq平台 (PE250模式) 行16S rRNA基因V3-V4区扩增子测序。引物515F (5'-GTGCCAGC-MGCCGCGGTAA-3') 和806R (5'-GGACTACHVGGG-TWTCTAAT-3'), PCR扩增、琼脂糖凝胶回收、定量后等摩尔混样, TruSeq DNA PCR-Free试剂盒建库。原始数据经FLASH拼接、Trimmomatic质控、Uchime去嵌合体, UPARSE算法 (97%一致性) 聚类OUT, SILVA数据库注释; R语言进行α多样性、β多样性及LEfSe差异物种分析。

统计学分析　实验数据采用GraphPad Prism 10.1软件用于统计分析, 实验结果均以mean ± SEM表示, 多组间比较采用方差分析 (one way ANOVA), $P < 0.05$认为具有统计学意义。

结果

1　基于网络药理学预测SMY治疗MI的潜在机制

1.1　SMY治疗MI核心靶点的网络药理学预测　通过TCMSP、BATMAN-TCM、HERB数据库检索, 共获得SMY的活性成分111个 (麦冬23个、红参41个、北五味子47个), 去重后得到靶点617个。

1.2　PPI网络与SMY−成分−疾病−交集靶点网络图　将

交集靶点导入STRING数据库进行PPI网络分析, 得到PPI网络图。结果显示615个节点, 2 613条边, 平均节点度8.5。通过Cytoscape3.9.1软件中的CytoHubba插件进行拓扑学参数筛选, 以度值排序得到前10个核心靶点, 分别为: TP53、AKT1、SRC、STAT3、PRKACA、HSP90AA1、TNF、MAPK1、MAPK3、CTNNB1。利用Cytoscape3.9.1软件构建SMY−成分−疾病−交集靶点网络可视化分析图, 得到756个节点, 7 948条边。通过节点中心性分析, 按degree值排序筛选, 选取麦冬、红参、北五味子中排名前5位的核心活性成分, 即SMY中的主要活性成分 (表1)。

1.3 GO富集分析和KEGG通路富集分析 将交集靶点导入Metascape数据库, 在GO富集分析中得到8 141条BP条目, 822条CC条目, 1 854条MF条目, 331条KEGG通路。根据GO富集结果 (图1A), 对生物过程、细胞组分和分子功能按照*P*值由小到大排序, 分子功能主要包括protein kinase activity、phosphotransferase activity, alcohol group as acceptor、kinase activity、kinase binding、protein kinase binding, 生物过程主要包括circulatory system process、cancer pathways、pathways in cancer、blood circulation、cellular response to nitrogen compound, 细胞成分主要包括plasma membrane protein complex、membrane raft、membrane microdomain、receptor complex、side of membrane。KEGG通路富集结果显示 (图1B), SMY干预心肌缺血主要作用于pathways in cancer、lipid and atherosclerosis、PI3K-AKT signaling pathway、proteoglycans in cancer、cAMP signaling pathway、AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications、human cytomegalovirus infection、MAPK signaling pathway、calcium signaling pathway等信号通路。

2 SMY缓解心肌损伤的药效作用研究

本研究采用预保护给药方案, 于垂体后叶素诱导心肌缺血模型建立前, 给予大鼠不同剂量SMY进行干预。心电图分析结果显示 (图2A), 造模前各组大鼠基线心电图均未见明显异常, S-T段无显著偏移。垂体后叶素注射后, M组大鼠心电图S-T段较N组明显抬高 (> 0.1 mV), 提示急性心肌缺血模型成功建立。与M组相比, P组及SMM、SMH组S-T段抬高幅度显著降低, 表明SMY预处理可缓解急性心肌缺血所致心电图异常。心肌损伤血清标志物检测结果表明 (图2C～G), 与M组相比, P组及SMH组均能显著抑制心肌缺

Table 1 Major active constituents of Shengmai Yin

Serial number	PubChem CID	Ingredient	Degree value	Source
1	285342	Deoxyharringtonine	75	*Schisandrae Chinensis* Fructus
2	119307	Ginsenoside rh2	75	Red Ginseng
3	3001662	Gomisin-A	72	*Schisandrae Chinensis* Fructus
4	5318785	Schizandrer B	64	*Schisandrae Chinensis* Fructus
5	14992067	Gomisin G	63	*Schisandrae Chinensis* Fructus
6	443027	Wuweizisu C	63	*Schisandrae Chinensis* Fructus
7	53468064	Ophiopogonanone b	62	*Ophiopogonis* Radix
8	91864462	Angeloylgomisin O	61	*Schisandrae Chinensis* Fructus
9	102117144	Longikaurin A	59	*Schisandrae Chinensis* Fructus
10	222284	beta-Sitosterol	50	Red Ginseng

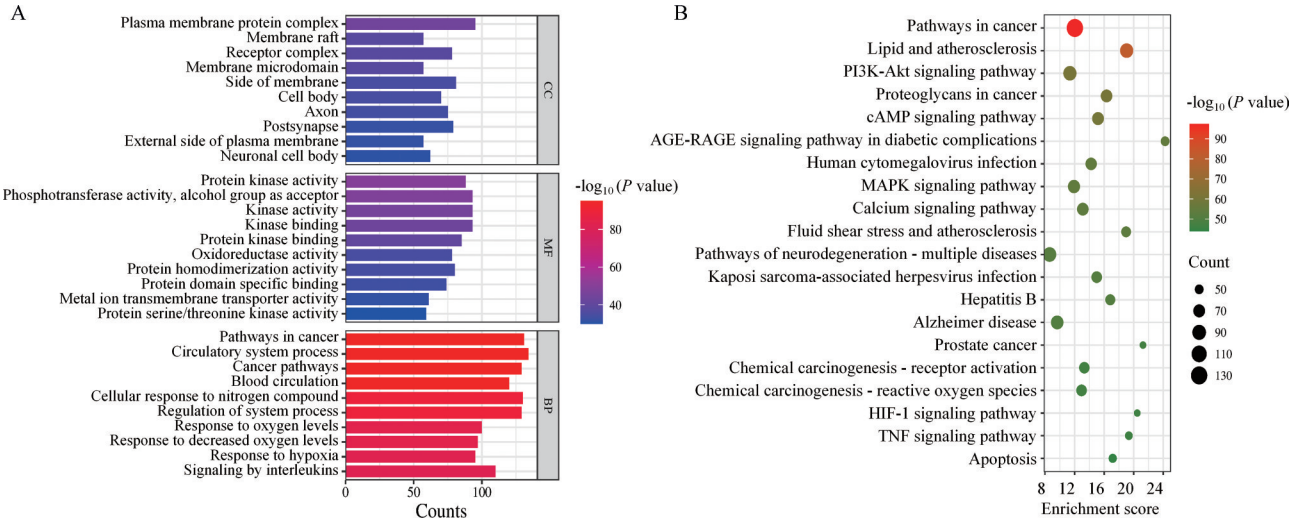


Figure 1 Network pharmacology prediction results. A: GO enrichment analysis results; B: KEGG pathway enrichment analysis results

血所致血清中AST、CK、cTn-I、LD及LDH活性的异常升高。此外, 心肌组织病理学观察结果 (图2B) 直观显示, M组心肌纤维排列紊乱、断裂, 伴有明显的炎性细胞浸润。经SMY干预后, 心肌纤维结构完整性得到改善, 炎性细胞浸润减轻。上述结果综合表明, SMY预处理可显著减轻垂体后叶素诱导的大鼠急性心肌组织损伤, 发挥预防性保护作用。

3　SMY减轻心肌缺血损伤的炎症水平和氧化应激水平

本研究进一步探讨SMY对心肌缺血大鼠炎症水平和氧化应激水平的调节作用。如图3A～C所示, 与N组相比, M组大鼠血清炎症因子IL-6、IL-1β、TNF-α水平显著升高; 经SMY或复方丹参滴丸干预后, 三类炎症因子水平均显著降低, 且SMH组抗炎效应更显著。上述结果提示, SMY可通过抑制炎症反应减轻心肌损伤。在氧化应激方面 (图3D～F), 与N组相比, M组血清GSH-Px和SOD活性显著降低, MDA含量显著升高; SMM组、SMH组及P组的MDA含量均显著降低 ($P < 0.01$), GSH-Px、SOD活性显著升高。此外, 血清NO含量检测显示 (图3G), M组NO水平显著降低 ($P < 0.001$), 而SMH组与P组NO含量显著回升 ($P < 0.01$)。上述结果表明, SMY可通过抗炎和改善氧化应激发挥心肌保护作用。

4　SMY对心肌缺血大鼠心肌细胞凋亡的影响

为探究SMY抗心肌缺血的作用机制, 本研究检测了其对心肌细胞凋亡的影响, 并初步探讨了其与MAPK信号通路的关联。免疫组化结果显示 (图4A), 与N组相比, M组大鼠心肌组织中促凋亡蛋白Bax与Caspase-3的表达水平显著上调, 而抗凋亡蛋白Bcl-2

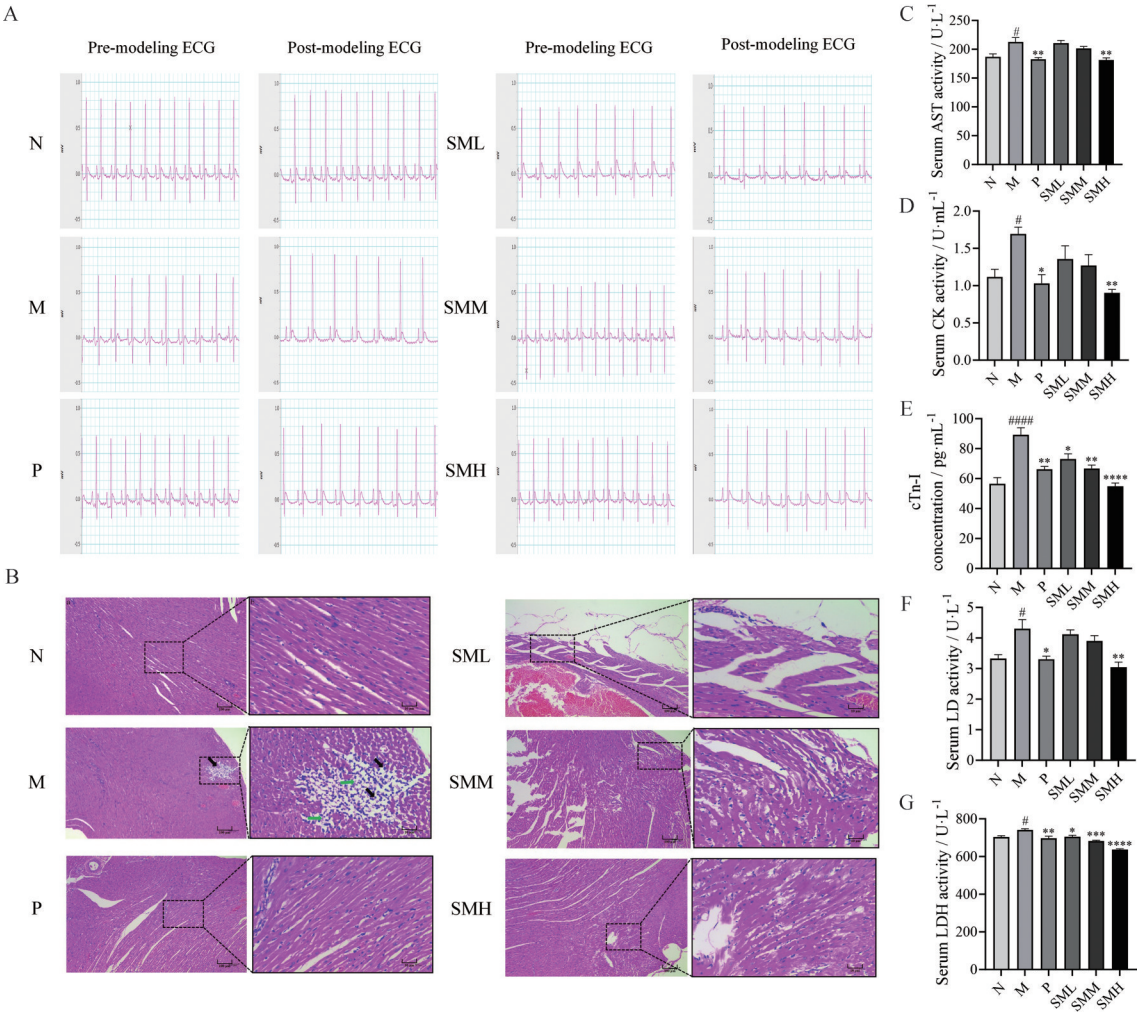


Figure 2　Protective effects of Shengmai Yin on acute myocardial ischemia induced by pituitrin in rats. A: Representative electrocardiogram at baseline and post-pituitrin injection. Group N represents the sham-operated control receiving intraperitoneal normal saline; B: Representative histopathological images of myocardial tissue stained with H&E. (scale bars: low-magnification images, 100 μm; high-magnification images, 10 μm); C－G: Serum biochemical analysis of myocardial injury markers: Aspartate aminotransferase (AST, C), creatine kinase (CK, D), cardiac troponin I (cTn-I, E), lactic acid (LD, F), and lactate dehydrogenase (LDH, G) activities. $n = 8$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#\#\#}P < 0.000\ 1$ *vs* N group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* M group

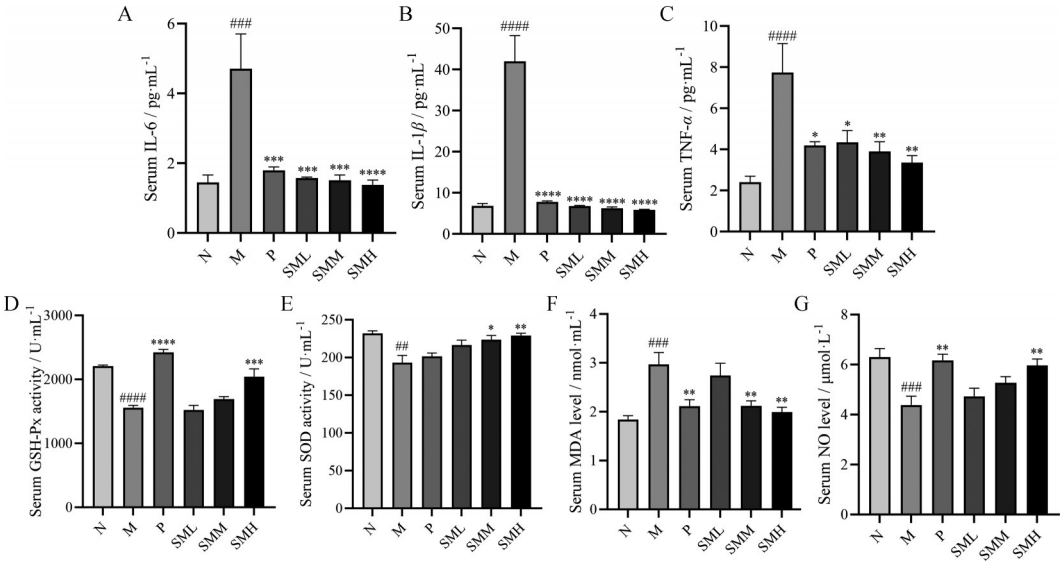


Figure 3 Effect of Shengmai Yin on inflammatory cytokines and oxidative stress in rats with acute myocardial ischemia induced by pituitrin. A−C: Serum concentrations of pro-inflammatory cytokines, interleukin-6 (IL-6, A), interleukin-1β (IL-1β, B), and tumor necrosis factor-α (TNF-α, C); D: Serum glutathione peroxidase (GSH-Px) activity; E: Serum superoxide dismutase (SOD) activity; F: Serum malondialdehyde (MDA) level; G: Serum nitric oxide (NO) concentration. n = 6, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#}P < 0.01$, $^{\#\#\#}P < 0.001$, $^{\#\#\#\#}P < 0.000\ 1$ *vs* N group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* M group

的表达显著下调 ($P < 0.000\ 1$)。经SMY干预后, 各剂量组及P组均能剂量依赖性地逆转上述蛋白的表达变化, 即显著抑制Bax与Caspase-3的表达, 同时促进Bcl-2的表达 (图4B～D)。TUNEL染色结果进一步证实 (图4E), M组心肌细胞凋亡率较N组显著升高, 而SMY各剂量治疗可显著降低凋亡细胞比例。上述结果提示, SMY能有效调控Bax/Bcl-2/Caspase-3凋亡信号轴, 抑制心肌细胞凋亡。结合前期网络药理学预测结果, 此凋亡抑制效应可能与调节MAPK信号通路有关, 为其抗心肌缺血作用提供了重要的机制依据。

5 SMY对心肌缺血大鼠MAPK通路的影响

为进一步探究SMY抗心肌缺血的分子机制, 本研究检测了其对MAPK信号通路关键蛋白 (ERK、JNK、p38) 磷酸化水平的影响。Western blot结果显示 (图5A), 与N组相比, M组心肌组织中p-p38、p-JNK蛋白水平明显升高, 而p-ERK水平虽呈升高趋势, 但差异无统计学意义 (图5B～D)。上述结果提示, 心肌缺血可激活MAPK通路的JNK、p38核心亚家族。经SMY干预后, SMH组的p-ERK、p-JNK、p-p38水平均明显降低。上述结果表明, SMY可通过抑制MAPK通路关键蛋白 (ERK、JNK、p38) 的过度磷酸化, 阻断其介导的心肌细胞炎症、氧化应激及凋亡等损伤过程, 从而发挥抗心肌缺血作用。

6 SMY对心肌缺血大鼠肠道菌群的影响

6.1 SMY对肠道菌群物种组成及多样性的影响 稀释曲线在测序量达到一定深度后趋于平缓, 表明测序数据量充分, 可反映样本中绝大多数微生物信息, 满足后续分析要求 (图6A)。Rank-Abundance曲线分析显示 (图6B), 与N相比, M组曲线跨度更短且陡峭, 提示其物种丰度与均匀度均下降; 而SMY干预后, 曲线形态向正常组回转, 表明菌群结构得到改善。Alpha多样性分析表明 (图6C), 反映物种丰富度的Chao1指数和反映物种多样性及均匀度的Shannon指数, 在M组中均显著低于N组, SMY各剂量治疗可显著提升这两个指数。Beta多样性分析用于评估组间微生物群落结构的差异。PCoA分析显示M组与N组明显分离, 群落结构整体偏移; SMY干预后各给药组向N组聚拢, 呈剂量依赖性回调 (图6D)。在物种组成上, 门水平和属水平的相对丰度分布图 (图6E) 进一步揭示, M组的菌群结构发生明显紊乱。给予SMY干预后, 各剂量组的菌群结构呈现剂量依赖性回调, 其中SMH组在厚壁菌门、拟杆菌门比值和有益菌属的相对丰度上恢复最为显著。因此, SMY能够逆转心肌缺血导致的肠道菌群物种丰富度与多样性下降, 并显著改善菌群结构的整体紊乱, 提示调节肠道微生态可能是其发挥心肌保护作用的机制之一。

6.2 SMY对肠道菌群群落结构及差异物种的影响 为筛选组间差异显著的关键物种, 本研究采用随机森林 (random forest) 分析与差异检验相结合的方法寻找潜在生物标志物。在不同分类的属水平上, 各组间有显

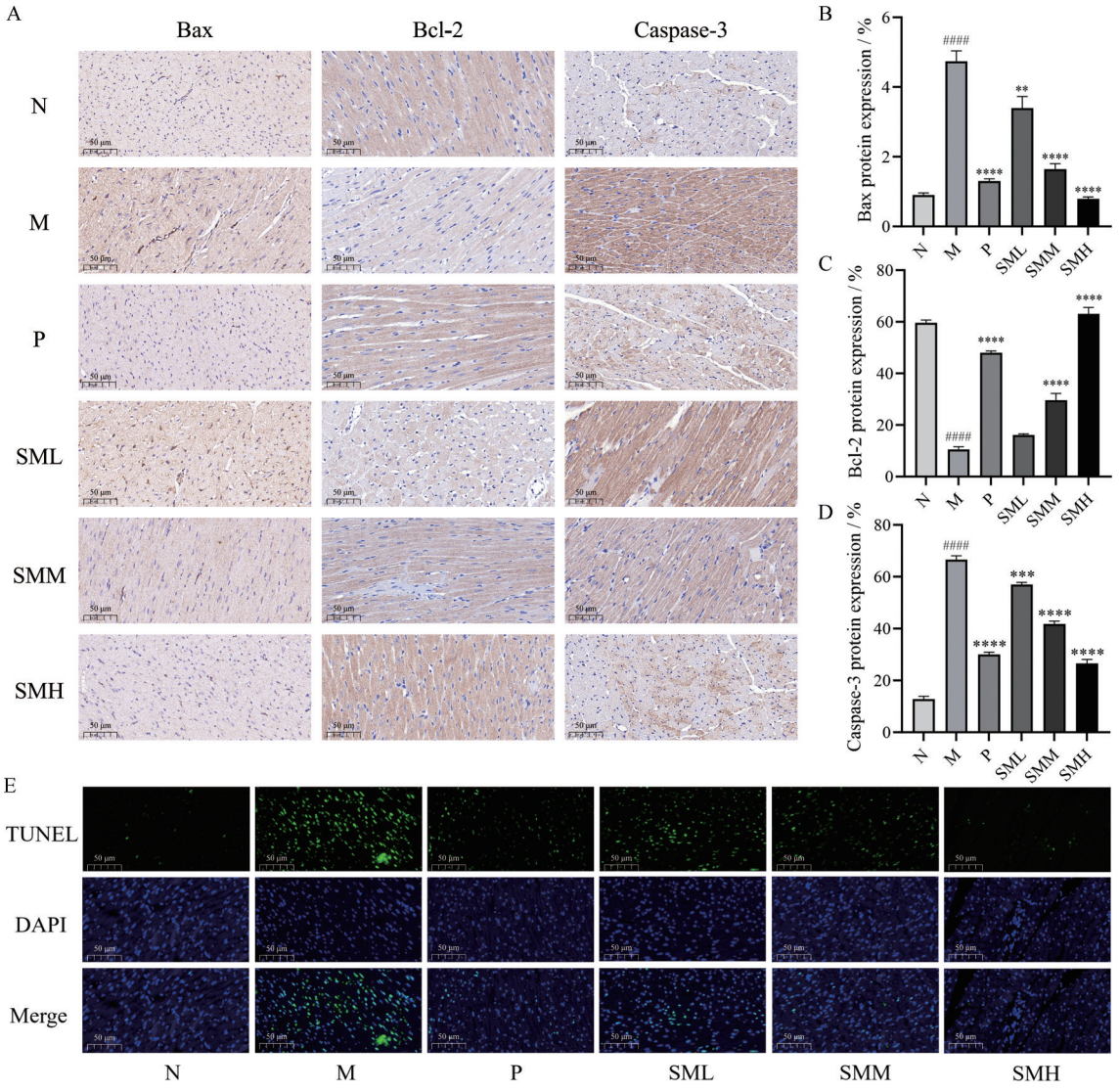


Figure 4　Effects of Shengmai Yin on cardiomyocyte apoptosis in myocardial tissue of rats with acute myocardial ischemia. A－D: Representative immunohistochemical (IHC) staining images (scale bar = 50 μm) and quantitative analysis of the expression levels of apoptosis-related proteins (Bax, Bcl-2, and Caspase-3) in myocardial tissues; E: Representative images of TUNEL staining (green, apoptotic cells), DAPI counterstaining (blue, nuclei), merged images (scale bar = 50 μm), and quantitative analysis of the cardiomyocyte apoptosis rate. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#\#\#\#}P < 0.000\ 1$ *vs* N group; $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$, $^{****}P < 0.000\ 1$ *vs* M group

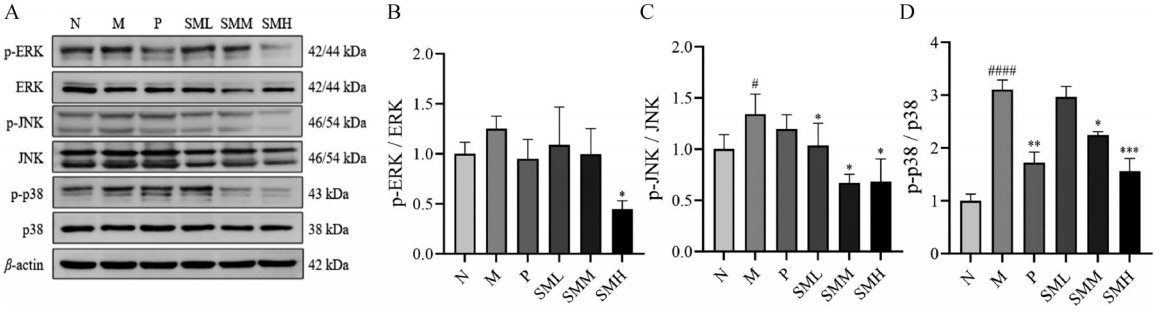


Figure 5　Effects of Shengmai Yin on the phosphorylation of MAPK signaling pathway key proteins in myocardial tissues of rats with myocardial ischemia. A: Representative Western blot bands of phosphorylated ERK (p-ERK), total ERK, phosphorylated JNK (p-JNK), total JNK, phosphorylated p38 (p-p38), total p38, and *β*-actin (loading control) in myocardial tissues; B－D: Quantitative statistical analysis of the relative protein expression levels of p-ERK/ERK (B), p-JNK/JNK (C), and p-p38/p38 (D). $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#\#\#}P < 0.000\ 1$ *vs* N group; $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$, $^{***}P < 0.001$ *vs* M group

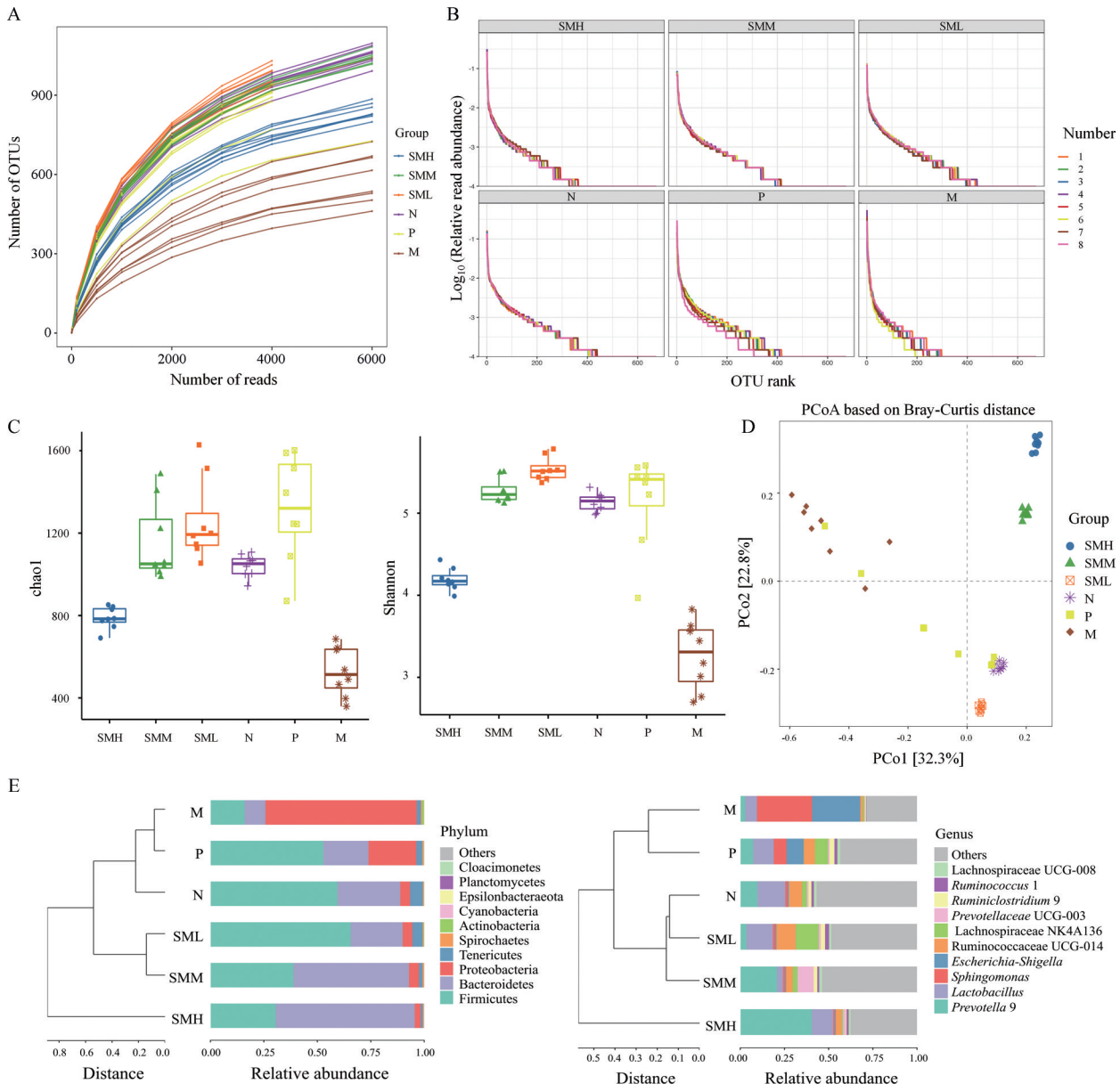


Figure 6 Effects of Shengmai Yin on gut microbiota in rats with myocardial ischemia. A: Rarefaction curves, followed by Dunn's post-hoc test for multiple pairwise comparisons. $^{***}P < 0.001$.; B: Rank-abundance curves; C: Alpha diversity indices; D: PCoA analysis; E: Taxonomic composition

著性标识菌群20个, 分别是瘤胃菌UCG-014属、瘤胃菌UCG-005属、毛螺菌NK4A136属、链杆菌属(*Catenibacterium*)、普雷沃菌9属、瘤胃球菌1属、瘤胃梭菌6属、普雷沃菌UCG-001属(Prevotellaceae UCG-001)、普雷沃菌UCG-003属(Prevotellaceae UCG-003)、瘤胃梭菌5属、丹毒菌UCG-003属(Erysipelotrichaceae UCG-003)、克里斯滕森菌科R-7群、瘤胃球菌2属、理研菌科RC9肠道群、脱硫弧菌属(*Desulfovibrio*)、瘤胃梭菌9属、链球菌属(*Streptococcus*)、毛螺菌UCG-008属(Lachnospiraceae UCG-008)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、粪球菌2属(*Coprococcus* 2), 分析发现瘤胃菌UCG-014属、瘤胃菌UCG-005属、毛螺菌NK4A136属、链杆菌属(*Streptobacillus*)、普雷沃菌9属, 对N组、M组、P组、SMY各剂量组的分类贡献度较高, 是排在前五位的显著性差异物种, 可能是SMY调节心肌缺血肠道微生物的潜在标志性菌群(图7A)。

6.3 差异菌属与心肌损伤指标的相关性分析 为探究肠道菌群变化与心肌损伤进程的潜在关联, 对上述关键差异菌属与血清心肌损伤及氧化应激指标进行了Spearman相关性分析, 并绘制热图(图7B)。分析结果显示, 多种菌属与心肌损伤及氧化应激指标存在显著相关性。如拟杆菌属的丰度与心肌损伤标志物AST、

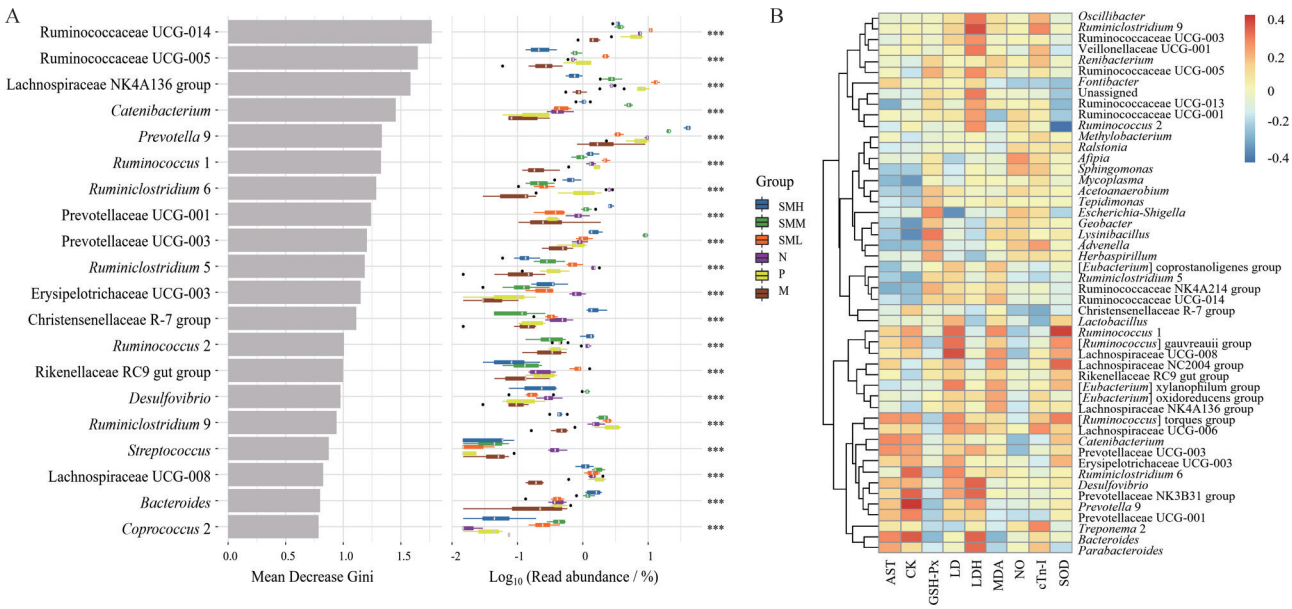


Figure 7　Shengmai Yin modulates gut microbiota and correlates with myocardial injury indices in rats with myocardial ischemia. A: Identification of differential taxa among groups using the Random Forest method. The left *x*-axis represents the mean decrease in Gini index, and the *y*-axis lists the taxa at the genus level. The right panel shows box plots of taxon abundance across different groups. Statistical significance was determined using the Kruskal-Wallis rank-sum test, followed by Dunn's post-hoc test for multiple pairwise comparisons. $^{***}P < 0.001$; B: Bivariate Spearman correlation analysis between biological indicators and gut microbiota

CK水平呈显著正相关, 而与GSH-Px活性呈显著负相关。瘤胃球菌1属的丰度与NO、SOD水平呈显著正相关。相反, 大肠杆菌志贺氏菌属的丰度与LD水平呈显著负相关。瘤胃梭菌9属的丰度与LDH活性呈正相关趋势。这些结果表明, SMY调节的特定差异菌属与心肌损伤及氧化应激状态存在统计学关联。

讨论

心肌缺血仍是全球范围内导致死亡和残疾的首要原因, 其起病急骤、预后凶险, 往往导致不可逆的心肌细胞坏死和心室重构[25,26]。尽管再灌注治疗和支架植入术极大地挽救了急性患者的生命, 但对于慢性缺血及再灌注后的二次损伤, 目前仍缺乏有效的药物防护手段[27]。正是在这一临床痛点上, 中医“治未病”思想在治疗心血管疾病中展现出独特的价值[28]。SMY作为益气复脉的经典方剂, 临床常用于冠心病患者的长期调理。本研究模拟这一临床场景, 设计了7天预给药方案, 证实SMY能显著缓解垂体后叶素诱导的心电图S-T段抬高、减轻氧化损伤和抑制炎症反应。当然, 这种基于急性痉挛模型的保护效应, 尚需在未来结合超声心动图等功能学指标, 进一步系统评价SMY对心脏结构与功能的长期影响。

在复杂的病理网络中, 寻找关键的治疗靶点至关重要。网络药理学预测提供了多个潜在通路, 其中MAPK信号级联 (p38/JNK/ERK) 作为本研究的重点方向。急性缺血损伤后, 细胞的存亡可能受到应激信号传导的速率与强度、抗氧化防御储备及能量代谢状态等多重因素的整合调控。MAPK级联作为承接上游缺血缺氧信号的核心枢纽, 直接调控着下游促炎因子的爆发与线粒体凋亡程序的启动, 是阻断心肌细胞坏死向不可逆转化的关键闸门[29,30]。基于此, 我们认为在急性预保护场景下, 抑制MAPK介导的“炎症–凋亡”风暴比单纯提升抗氧化酶活性更为紧迫且关键。实验数据证实了这一推断: SMY预处理显著抑制了p-p38的磷酸化水平, 表明其能够有效截断这一核心病理信号的传导。当然, 除了MAPK, Nrf2/ARE等通路也可能协同参与抗氧化应激过程, 由于本研究未直接检测核转位及HO-1等分子, 它们在SMY整体调控网络中的具体权重, 仍有待后续通过多组学联用来精细区分。

本研究最具启发性的发现是SMY对肠道菌群的重塑作用。在短短7天的预干预后, 我们观察到SMY能有效逆转缺血导致的菌群紊乱, 提升拟杆菌属等有益菌丰度。这并非偶然, 文献证据表明肠道菌群对药物扰动的反应极为迅速, 抗生素或膳食干预在3～7天内即可引发显著的结构偏移[31,32]。更重要的是, 这7天的时间窗似乎刚好足够建立起“菌群–代谢物–宿主”的初步稳态, 为即将到来的缺血打击筑起一道微生态

防线。我们发现关键菌属与心肌保护指标存在显著的相关性, 且这种关联呈现剂量依赖性。本研究仅在造模后 1 h 单一时间点评估了菌群与表型, 目前的 16S rRNA 测序尚无法区分这种变化是药物对菌群的直接塑造, 还是机体应激后的继发反应, 未能解析二者的动态演化规律, 以及菌群与 MAPK 通路之间是否通过短链脂肪酸等代谢物实现远程对话, 也需要通过后续的粪便移植实验来验证猜想。

本研究提示, SMY 的心肌保护效应可能不仅涉及传统认知中有效成分吸收入血后直接作用于心肌细胞的途径, 还可能与肠道菌群介导的间接调控有关。尽管前期研究已证实 SMY 富含人参皂苷、五味子木脂素等成分[33], 但其调控菌群的关键药效物质基础及下游代谢信使仍不明确。值得注意的是, 这些未解之谜恰恰指向了一种全新的药理机制: 中药复方或许可通过精准重塑菌群生态, 显著提升机体的缺血应激耐受力。这一发现突破了传统“成分−靶点”的研究范式, 为理解 SMY“益气复脉”提供了微生态学视角, 同时也为靶向肠−心轴的心血管药物研发奠定了实证基础。

作者贡献: 游宇主要负责课题构思、实验设计、基金支持与完成论文指导工作; 尹红雨主要负责实验操作、论文撰写、统计学分析及完成数据汇总工作; 吴亿晗主要负责论文逻辑梳理与稿件统筹修订; 蔡梓航参与部分动物实验操作; 冯熙协助样本检测与数据整理; 焦傲参与文献调研与资料收集; 谢恬提供技术支持与学术指导; 胡慧玲负责项目整体指导与论文修改; 章津铭负责研究思路的指导、论文润色及终稿审定。

利益冲突: 本文所有作者声明不存在利益冲突关系。

References

[1] National Center for Cardiovascular Diseases, The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on cardiovascular health and diseases in China 2025: An updated summary [J]. Chin Circ J (中国循环杂志), 2026, 41: 527-563.

[2] Algoet M, Janssens S, Himmelreich U, et al. Myocardial ischemia-reperfusion injury and the influence of inflammation [J]. Trends Cardiovasc Med, 2023, 33: 357-366.

[3] Hu Q, Zhang J, Luo X, et al. Intracellular *L*-PGDS-derived 15d-PGJ2 inhibits CaMKII through lipoxidation to alleviate cardiac ischemia/reperfusion injury [J]. Circulation, 2025, 152: 41-57.

[4] Wang ZM, Zeng H, Han FJ, et al. Myocardial protective effect of nicorandil combined with remote ischemic post-conditioning on acute ST-segment elevation myocardial infarction after emergency percutaneous coronary intervention [J]. Chin J Cardiovasc Med (中国心血管杂志), 2023, 28: 417-422.

[5] Gaudino M, Taggart D, Suma H, et al. The choice of conduits in coronary artery bypass surgery [J]. J Am Coll Cardiol, 2015, 66: 1729-1737.

[6] Beydon M, Hajage D, Guédon AF, et al. Low-dose aspirin for cardiovascular disease primary prevention in patients with giant cell arteritis [J]. JAMA Netw Open, 2026, 9: e266579.

[7] Wen XS, Liu H. Role of β-blocker in cardiovascular disease [J]. Adv Cardiovasc Dis (心血管病学进展), 2024, 45: 632-635, 653.

[8] Xia Y, Leung K, Zhao JV. Cost-effectiveness of statins, berberine, and combination for primary cardiovascular disease prevention in Scotland [J]. NPJ Cardiovasc Health, 2026, 3: 22.

[9] Zheng LR, Bao ARH, Zhang RF, et al. Research progress in mechanism and drug therapy of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. Chin J Clin Res (中国临床研究), 2023, 36: 1580-1584, 1588.

[10] Committee of the Pharmacopoeia of the People′s Republic of China. Pharmacopoeia of the People′s Republic of China, Part I (中华人民共和国药典: 一部) [M]. Beijing: China Medical Science Press, 2025.

[11] Liu X, Wang JY, Zhan ZL, et al. Research progress on the mechanism of myocardial protection by Shengmai Yin [J]. China Med Her (中国医药导报), 2024, 21: 33-38.

[12] Liu B, Xu B, Kong LH, et al. Determination of 6 marker components and 2 *Liriope spicata* specific components in Shengmai Yin by ultra-high performance liquid chromatography-tandem mass spectrometry and its chemical pattern recognition analysis [J]. Phys Test Chem Anal Part B (理化检验−化学分册), 2025, 61: 1277-1284.

[13] Wang C, Sun HD, Wei FF, et al. Research progress on ginsenoside Rb_1 in improving heart failure [J]. Drugs Clin (现代药物与临床), 2023, 38: 731-737.

[14] Fan S, Zhang J, Xiao Q, et al. Cardioprotective effect of the polysaccharide from *Ophiopogon japonicus* on isoproterenol-induced myocardial ischemia in rats [J]. Int J Biol Macromol, 2020, 147: 233-240.

[15] Li YY, Zheng BW, Ma CY, et al. Novel strategy in Dengzhan Shengmai capsule metabolites analysis based on the prediction database [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2023, 58: 2468-2475.

[16] Ning B, Dang SJ, Lv CQ, et al. Exploring causal association between gut microbiota and myocardial infarction from perspective of "gut-heart axis" based on theory of "heart-small intestine relationship" and predicting intervention with traditional Chinese medicine [J]. Chin Tradit Herb Drugs (中草药), 2026, 57: 2622-2639.

[17] Liang ZT, Chen NN, Sun Y. Advances in Chinese ethnomedicine for the treatment of atherosclerosis [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2026, 61: 1471-1483.

[18] Jin L, Shi X, Yang J, et al. Gut microbes in cardiovascular diseases and their potential therapeutic applications [J]. Protein Cell, 2021, 12: 346-359.

[19] Qi Z, Zhang W, Zhang P, et al. The gut microbiota-bile acid-TGR5 axis orchestrates platelet activation and atherothrombosis [J]. Nat Cardiovasc Res, 2025, 4: 584-601.

[20] Jie Z, Xia H, Zhong SL, et al. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease [J]. Nat Commun, 2017, 8: 845.

[21] Cui Y, Zhang F, Xu W, et al. Effects of Si-Miao-Yong-An decoction on myocardial I/R rats by regulating gut microbiota to inhibit LPS-induced TLR4/NF-κB signaling pathway [J]. BMC Complement Med Ther, 2023, 23: 180.

[22] Zhao Z, Hu Z, Li L. Cardiac energy metabolic disorder and gut microbiota imbalance: A study on the therapeutic potential of Shenfu Injection in rats with heart failure [J]. Front Microbiol, 2025, 16: 1509548.

[23] Cai XJ, Xu HQ, Fang TH, et al. Counterevidence study on rat models of Qi-Yin deficiency with acute myocardial ischemia [J]. Pharmacol Clin Chin Mater Med (中药药理与临床), 2011, 27: 3-6.

[24] Li Q. Research progress and clinical application of Compound Danshen Dripping Pills [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药杂志), 2018, 33: 2989-2991.

[25] Wang ZH, Cheng LX, Huang DM, et al. Preventive effects of *Morinda officinalis* oligose on myocardial energy metabolism disorder and cell structure injury in ovariectomized rats after myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. J Zhengzhou Univ Med Sci (郑州大学学报(医学版)), 2022, 57: 472-476.

[26] Chen T, Liu HR, Zhang YY, et al. Mechanism of Tongmai Yangxin Pill to reduce the no-reflow after myocardial ischemia and reperfusion by activating HIF-1α/eNOS signaling pathway up-regulated by GPER [J]. Acta Pharm Sin (药学学报), 2023, 58: 3311-3320.

[27] Trinei M, Carpi A, Menabo R, et al. Dietary intake of cyanidin-3-glucoside induces a long-lasting cardioprotection from ischemia/reperfusion injury by altering the microbiota [J]. J Nutr Biochem, 2022, 101: 108921.

[28] Dong GJ, Huang LQ. Paradigm exploration on the full cycle and all-round prevention and treatment of HFpEF based on the preventive thoughts of TCM [J]. China J Tradit Chin Med Pharm (中华中医药学刊), 2025, 43: 1-5.

[29] Takata T, Araki S, Tsuchiya Y, et al. Oxidative stress orchestrates MAPK and nitric-oxide synthase signal [J]. Int J Mol Sci, 2020, 21: 8750.

[30] Zheng LR, Li GW, Su H. Research progress on the prevention and treatment of myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating the MAPK signaling pathway with traditional Chinese medicine monomers and compound formulas [J]. Chin J Mod Appl Pharm (中国现代应用药学), 2026, 43: 498-507.

[31] Patangia DV, Anthony Ryan C, Dempsey E, et al. Impact of antibiotics on the human microbiome and consequences for host health [J]. Microbiologyopen, 2022, 11: e1260.

[32] Leeming ER, Johnson AJ, Spector TD, et al. Effect of diet on the gut microbiota: Rethinking intervention duration [J]. Nutrients, 2019, 11: 2862.

[33] You Y, Luo L, You Y, et al. Shengmai Yin formula modulates the gut microbiota of spleen-deficiency rats [J]. Chin Med, 2020, 15: 114.