

## • 研究论文 •

# 通脉养心丸通过上调 GPER 激活 HIF-1 $\alpha$ /eNOS 信号通路减轻 心肌缺血再灌后无复流的作用机制研究

陈 婷, 刘海瑞, 张燕燕, 张 伟\*

(湖南中医药大学, 中西医结合心脑血管疾病防治湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208)

**摘要:** 基于整合药理学及实验验证探讨通脉养心丸 (Tongmai Yangxin pill, TMYX) 对心肌缺血再灌后无复流 (no-reflow, NR) 的心脏保护作用及其分子机制。首先采用心肌 NR 大鼠 (心肌缺血 2 h 后再灌注 2 h) 证实 TMYX 减轻 NR 的作用; 再通过整合药理学分析、NR 大鼠离体冠脉微血管体外研究和 NR 大鼠体内研究, 揭示 TMYX 改善 NR 的主要成分、靶点和途径。本实验获得湖南中医药大学伦理委员会批准 (LLBH-202212160001)。结果发现, TMYX 通过改善心脏结构和功能, 减少无复流、缺血心肌面积和心肌细胞病理损伤, 降低心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) 含量, 对 NR 有治疗作用。此外, 整合药理学预测 TMYX 改善 NR 机制与缺氧诱导因子-1 (hypoxia inducible factor-1, HIF-1)、核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF) 信号通路有关。在体内, TMYX 增加 G 蛋白偶联雌激素受体 (G protein-coupled estrogen receptor, GPER)、磷酸化细胞外信号调节激酶 (phospho-extracellular signal-regulated kinase, p-ERK) 和 HIF-1 $\alpha$  的表达。在体外, TMYX 增强冠脉微血管的舒张功能, 然而此作用被 GPER、内皮型一氧化氮合酶 (endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 及一氧化氮受体 (soluble guanylate cyclase, sGC) 阻断剂抑制。本研究通过整合药理学和实验评估, 揭示 TMYX 通过上调 GPER 激活 HIF-1 $\alpha$ /eNOS 信号通路, 舒张冠状动脉微血管, 从而显著改善 NR。

**关键词:** 心脏保护作用; 分子机制; 整合药理学; 冠脉微血管; GPER/HIF-1 $\alpha$ /eNOS

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)11-3311-10

## Mechanism of Tongmai Yangxin pill to reduce the no-reflow after myocardial ischemia and reperfusion by activating HIF-1 $\alpha$ /eNOS signaling pathway up-regulated by GPER

CHEN Ting, LIU Hai-ruì, ZHANG Yan-yan, ZHANG Wei\*

(Key Laboratory of Hunan Province for Integrated Traditional Chinese and Western Medicine on Prevention and Treatment of Cardio-cerebral Diseases, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

**Abstract:** The Tongmai Yangxin pill (TMYX) has potential clinical effects on no-reflow (NR); however, the effective substances and mechanisms by which this occurs remain unclear. This study evaluates the cardioprotective effects and molecular mechanisms of TMYX against NR. We used a myocardial NR rat model (2 h after myocardial ischemia and 2 h after reperfusion) to confirm the effect and mechanism of action of TMYX in alleviating NR. *In vitro* studies in isolated coronary microvasculature of NR rats and *in silico* network pharmacology analyses were performed to reveal the underlying mechanisms of TMYX and determine the main components, targets, and pathways of TMYX, respectively. The experiment was approved by the Ethics Committee of Hunan University of Chinese Medicine (LLBH-202212160001). TMYX showed therapeutic effects on NR by improving cardiac structure and function, reducing NR, ischemic areas, and cardiomyocyte injury, and decreasing

收稿日期: 2022-12-26; 修回日期: 2023-06-18.

基金项目: 湖南省自然科学基金-科药联合基金 (2022JJ80112); 湖南省教育厅科学研究优秀青年项目 (22B0367).

\*通讯作者 Tel: 86-731-88458862, E-mail: zhangwei1979@hnu.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1419

the content of cardiac troponin I (cTnI). Moreover, the mechanism of TMYX predicted by network pharmacology is related to the hypoxia inducible factor-1 (HIF-1), nuclear factor kappa-B (NF- $\kappa$ B), and tumor necrosis factor (TNF) signaling pathways. TMYX increased the expression of G protein-coupled estrogen receptor (GPER), phospho-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK), and HIF-1 $\alpha$ . *In vitro*, TMYX enhanced the diastolic function of coronary microvascular cells; however, this effect was inhibited by GPER inhibitor (G-15), eNOS inhibitor (L-NAME), and sGC inhibitor (ODQ). This study integrates pharmacology and experimental evaluation to reveal that TMYX activates HIF-1 $\alpha$ /eNOS signaling pathway by upregulating GPER to relax coronary microvessels, thereby significantly alleviating NR.

**Key words:** cardioprotective effect; molecular mechanism; network pharmacology; coronary microvasculature; GPER/HIF-1 $\alpha$ /eNOS

无复流 (no-reflow, NR) 是急性心肌梗死 (acute myocardial infarction, AMI) 患者在经皮冠状动脉介入治疗 (percutaneous coronary intervention, PCI) 或溶栓治疗后, 虽已解除心外膜冠状动脉的机械性阻塞, 但心肌组织再灌注并不完全, 甚至无再灌注的现象, 表现为冠脉血流减慢或无血流<sup>[1,2]</sup>。心肌组织灌注不良或无灌注会导致恶性心律失常、心力衰竭等, 严重影响患者预后, 甚至危及患者生命。临床上 AMI 患者 PCI 术后无复流发生率高达 30%<sup>[3,4]</sup>, 因此积极寻找有效的治疗药物和方法, 减少无复流现象的发生率具有重要意义。

通脉养心丸 (Tongmai Yangxin pill, TMYX) 由经典配方“炙甘草汤”和“生脉饮”组成, 组方由君药地黄、甘草, 臣药党参、制何首乌、麦冬、五味子, 佐药鸡血藤、醋龟甲、阿胶, 使药桂枝和大枣组成, 具有益气养阴、通脉止痛之功效, 达到通养结合、标本兼治的效果, 可用于 NR<sup>[5,6]</sup>。TMYX 的活性成分主要包括类黄酮、皂苷和木脂素<sup>[7]</sup>。临床试验表明, TMYX 能有效改善冠心病和房性心律失常患者的临床症状, 防止心脏重塑和功能障碍的发生<sup>[8]</sup>。TMYX 在冠心病治疗中的抗炎活性与雌激素受体和核因子  $\kappa$ B (nuclear factor kappa-B, NF- $\kappa$ B) 信号通路有关<sup>[9]</sup>。TMYX 通过改善心肌能量供应障碍和氨基酸功能障碍, 减轻氧化应激和炎症, 对稳定型心绞痛具有治疗作用<sup>[10]</sup>。此外, 前期研究证实, TMYX 可以显著改善 NR, 其作用与降低血清中的心肌酶活性、氧化应激、心脏后负荷和心肌病理损伤有关<sup>[5,6]</sup>。因此, TMYX 对 NR 具有潜在的治疗作用, 但其治疗 NR 的具体作用机制尚未研究清楚。

整合药理学方法是从生物网络的整体角度阐释疾病机制和药物作用机制的新兴方法<sup>[11,12]</sup>。本研究通过整合药理学和实验验证来阐明 TMYX 在心肌缺血再灌注后 NR 中的潜在机制。首先, 本研究采用 NR 大鼠验证 TMYX (4.0 g·kg<sup>-1</sup>)<sup>[13]</sup> 的心脏保护作用; 然后构建“潜在活性成分-关键靶点-通路”网络, 以预测 TMYX 的活性成分、潜在靶点和作用通路。最后, 采用 NR 大

鼠模型和体外冠状动脉微血管实验, 验证 TMYX 减轻 NR 的机制。

## 材料与方 法

**TMYX 活性成分与靶点获取** 在中药系统药理学数据库和分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP) (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 和 Batman-TCM (<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>)<sup>[14]</sup>, 对中药材“地黄”“鸡血藤”“麦冬”“甘草”“何首乌”“阿胶”“五味子”“党参”“大枣”“桂枝”“龟甲”进行检索, 对检索到的成分以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB)  $\geq 30\%$ <sup>[15]</sup> 和类药性 (drug-likeness, DL)  $\geq 0.18$ <sup>[16]</sup> 为标准进行筛选, 得到其潜在活性成分, 建立 TMYX 的化学成分数据库。从 TCMSP 和 Batman-TCM 数据库下载 TMYX 靶点信息, 获得 TMYX 作用靶点数据库。

**TMYX 治疗 NR 潜在靶点获取** 以“no reflow after myocardial ischemia and reperfusion”为关键词, 物种设置为“homo sapiens”, 从 GeneCard、OMIM、PharmGkb、TTD 数据库搜索 NR 靶点, 再将 NR 靶蛋白和 TMYX 靶蛋白名称在 UniProt 网站 (<http://www.uniprot.org>) 转换成相应的基因名称。最后, 采用韦恩图筛选 TMYX 的药物靶点与 NR 靶点的交集靶点, 即 TMYX 治疗 NR 的潜在靶点<sup>[17]</sup>。

**构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络** 为了阐明潜在靶点的相互作用并识别核心基因, 本研究将靶基因导入 STRING (version 11.0, <https://string-db.org/>) 数据库, 物种设置为“homo sapiens”, 并将参数设置为最高置信度 0.900, 以获得 PPI 数据, 并通过拓扑分析确定了核心基因。再使用 Cytoscape 软件进行 PPI 网络可视化<sup>[18]</sup>。

**潜在靶点基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析** 为深入了解 TMYX

治疗 NR 潜在靶点的功能及信号通路, 运用 R 4.0.0 软件中的 bioconductor 生物信息软件包对潜在靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析, 分析结果以  $P < 0.05$  作为筛选条件, 并通过微生信作图网站 (www.bioinformatics.com.cn) 进行可视化处理<sup>[19]</sup>。

**化合物-核心靶点相互作用验证** 核心蛋白的三维 (3D) 结构从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 下载。使用 AutoDockTools-1.5.6 通过去除配体、除水和加氢来处理核心蛋白。候选化合物的三维结构可从 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载。使用 AutoDockTools 将蛋白质受体和配体转换为 PDBQT 格式。最后, 使用 AutoDock Vina 软件进行分子对接, 并使用 PyMOL 和 Discovery Studio 2016 选择最低自由能模型进行可视化分析, 对接分数  $< -5$  表示具有良好的结合亲和力和<sup>[20]</sup>。

**实验动物** 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (250  $\pm$  10 g) 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [证书编号: SCXK(湘)2019-0004]。所有实验方案均按照湖南中医药大学动物护理委员会批准的指南进行 (LLBH-202212160001)。动物标准饲养, 自由摄食饮水, 实验前 12 h 禁食, 不禁水。

**大鼠 NR 模型制备** 适应性饲养大鼠 1 周, 术前禁食不禁水 12 h, 实验组大鼠腹腔内注射 0.3% 戊巴比妥钠 (10 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup>) 进行麻醉, 麻醉后胸前手术备皮 (用剃毛机将大鼠胸前区鼠毛脱去, 使手术视野充分暴露), 将大鼠用皮筋仰卧位固定四肢及头部于鼠板。在胸骨左缘 0.5 cm 处, 自胸骨左缘第 3~4 肋间开胸, 逐层钝性分离皮下组织、肌肉, 将心脏压出胸壁外。找到冠状动脉左前降支 (left anterior descending artery, LAD), 用 5/0 缝合线在左心耳根部下方 2 mm 处, 以深 1.5~2 mm、宽 2~3 mm 穿过心肌表层, 打一松结, 松结内放入 2/0 棉线。而后将冠脉及棉线一起进行结扎, 第二结为滑结, 造成心肌缺血。结扎后, 迅速将心脏送回胸腔, 并挤出胸腔内空气, 用一把直头止血钳夹闭皮肤及肌肉层, 造成假关胸。阻断冠状动脉左前降支 2 h 后<sup>[6]</sup>, 松开止血钳, 轻轻提起结扎的线头, 用一把显微镊顺势轻轻拔出棉线, 剪断胸腔外的结扎线, 恢复血流灌注并缝合, 其中假手术组只穿线不结扎。以结扎后 LAD 支配区域心肌颜色发绀或心尖变白、心脏搏动减弱且射血分数 (ejection fraction, EF) 值  $< 50\%$  为手术结扎成功的标志, 注射硫黄素 S 染色后心肌可见明显的荧光暗区为无复流模型成功的标志<sup>[21,22]</sup>。

**分组和给药** 再灌注 2 h 后, 根据大鼠 EF 值 ( $< 50\%$ ) 将大鼠随机分为: 假手术组 (Sham)、无复流组 (NR)、TMYX (4.0 g $\cdot$ kg<sup>-1</sup>) 和硝普钠 (sodium nitroprusside,

SNP, 5.0 mg $\cdot$ kg<sup>-1</sup>, 阳性对照组) ( $n = 16$ )。Sham 和 NR 组大鼠给予相同体积的 0.5% 羧甲基纤维素钠 (sodium carboxymethyl cellulose, CMC-Na) (批号 C8621, 北京索莱宝科技有限公司) 溶剂, SNP 组大鼠进行腹腔注射, 其余各组大鼠灌胃给药。每日 1 次, 连续给药 7 天, 给药体积为 10 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup>, 大鼠每隔 2 天称重 1 次, 根据体重变化及时调整给药体积。第一次给药时间为造模后 4 h。

**药物制备和成分测定** TMYX (批号 1070353) 由天津中新药业乐仁堂制药厂提供。实验前称取 25.6 g TMYX, 加 64 mL 含 0.5% CMC-Na 超纯水浸泡, 待其软化后进行震荡充分溶解, 配制成 0.4 g $\cdot$ mL<sup>-1</sup> 药液。采用 UPLC-Q-TOF-MS/MS 分析 TMYX 的化学成分<sup>[5]</sup>。根据分子片段峰、对照保留时间和二级光谱, 共鉴定出 32 种中药单体<sup>[6]</sup>。实验前称取 32 mg 硝普钠 (批号 71778-25G, Sigma-Aldrich 公司), 加 64 mL 超纯水配制 0.5 mg mL<sup>-1</sup> 药液。

**无复流心肌面积及缺血心肌面积评估** 给药 7 天后, 每组随机选择 5 只大鼠, 下腔静脉注入 6% 硫磺素 S (1 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup>), 硫磺素 S 经过的区域 365 nm 波长光源下发亮紫色荧光, 代表复流区范围, 无荧光区域为无复流区。硫磺素 S 注入完毕 1 min 后原位结扎 LAD, 下腔静脉注入 2% Evans Blue (1 mL $\cdot$ kg<sup>-1</sup>), 1 min 后取出心脏置于 -40  $^{\circ}$ C 冰箱冷冻 10~15 min, 再从结扎线下 1 mm 平行均匀将心脏切成 5 片, 于荧光显微镜 365 nm 拍照用于观察无复流心肌面积。心肌切片再于 1% TTC 溶液 37  $^{\circ}$ C 水浴锅中孵化 30 min, 于普通光照下拍照观察缺血心肌面积。普通光照下, 蓝染的区域为非缺血心肌区, 浅红色区域为缺血未梗死心肌区, 灰白色区域为梗死心肌区<sup>[23]</sup>, 用 Image-Pro Plus 6.0 软件测定各区面积。计算公式: 无复流心肌面积百分数 = 无复流心肌面积/心脏面积 $\times 100\%$ ; 缺血心肌面积百分数 = 缺血心肌面积/心脏面积 $\times 100\%$ 。

**大鼠心脏血流动力学及结构的超声测定** 使用小动物超声仪测量大鼠心脏的功能和结构<sup>[6]</sup> (Vevo 2100, VisualSonics, 加拿大)。测量指标包括左心室 EF、左室短轴缩窄率 (left ventricular fractional shortening, FS)、流出道峰值血流速度 (left ventricular outflow tract peak, LVOT peak) 和每搏输出量 (left ventricular stroke volume, LVSV)。所有测量值均为 3 个心脏周期的平均值。

**大鼠血清心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) 含量检测** 第 3 天给药 1 h 后, 每组大鼠进行目内眦取血, 采血 1.0 mL, 静置 30 min 后, 4  $^{\circ}$ C 离心机 3 500 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 离心 10 min, 分离血清并分装于 EP 管中, 采用大鼠 cTnI 检测试剂盒 (批号: SEA478Ra, 武汉云

克隆科技股份有限公司)检测血清cTnI含量,评估心肌损伤程度<sup>[24]</sup>。

**HE染色** 对大鼠实施安乐死,并取出心脏。采用常规HE染色<sup>[6]</sup>,于显微镜下对病理切片进行观察、选取合适视野拍照,然后进行专业描述与分析。

**Western blot** 如前所述,提取心脏左心室总蛋白,进行蛋白质印迹定量分析<sup>[6]</sup>。使用的抗体包括兔单克隆G蛋白偶联雌激素受体(G protein-coupled estrogen receptor, GPER)(1:1 000稀释;批号:bs-1380R)购自北京博奥森生物科技有限公司;兔单克隆磷酸化细胞外信号调节激酶(phospho extracellular signal-regulated kinase, p-ERK)(1:1 000稀释,批号:9106S)、兔单克隆GAPDH(1:1 000稀释,批号:5174T)、抗兔IgG(1:5 000稀释,批号:7074P2),均购自美国Cell Signaling Technology公司;兔多克隆缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ , HIF-1 $\alpha$ )(1:1 000稀释,批号:340462,湖南科航生物科技股份有限公司)。

**NR大鼠离体冠脉微血管舒张功能的检测** 将NR大鼠左前降支微血管环穿于两根直径40  $\mu\text{m}$ 、长2 cm的钨丝上,谨慎固定于浴槽内两个钳夹上。浴槽内提前放置5 mL 37  $^{\circ}\text{C}$ 预热的PSS缓冲液并持续通气(95%  $\text{O}_2$ 和5%  $\text{CO}_2$ ),温度控制在37  $^{\circ}\text{C}$ 。血管平衡后,调节螺旋测微器使血管张力达到1 mN,平衡后进行血管活性检测。先用5 mL KPSS溶液刺激血管环达坪台期后用PSS缓冲液换洗2次,每次10 min;反复2次KPSS刺激血管,收缩张力>2 mN,则认为该血管环活性良好。通过微血管张力传感器(DMT 620 M, Danish Myo Technology A/S)记录血管张力变化情况。在内皮存在的情况下,加入5-羟色胺(5-hydroxy tryptamine, 5-HT)( $10^{-6}$  mol·L $^{-1}$ )使血管环达最大收缩状态,平衡后采用每隔5 min累积给药法加入TMYX和阳性药乙酰胆碱(acetylcholine, Ach),观察不同浓度TMYX(25、50、100、200  $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ )对血管环的舒张作用,通过微血管张力信息采集系统(powerlab, AD instruments)记录血管张力变化。血管环通过内皮活性功能检测后,5-HT预处理使血管环达最大收缩状态,平衡后,每组血管环分别加入5  $\mu\text{L}$  GPER阻断剂(G-15, 1  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,批号1161002-05-6, MCE公司)、eNOS阻断剂(L-NAME,  $10^{-4}$  mol·L $^{-1}$ ,批号N5751, Sigma公司)和sGC抑制剂(ODQ, 3  $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ ,批号O3636, Sigma公司)平衡30 min,然后再每隔5 min累积加入不同浓度TMYX,观察TMYX在G-15、L-NAME和ODQ预处理的情况下对微血管舒张功能的影响,采用Labchart数据分析软件进行数据分析。

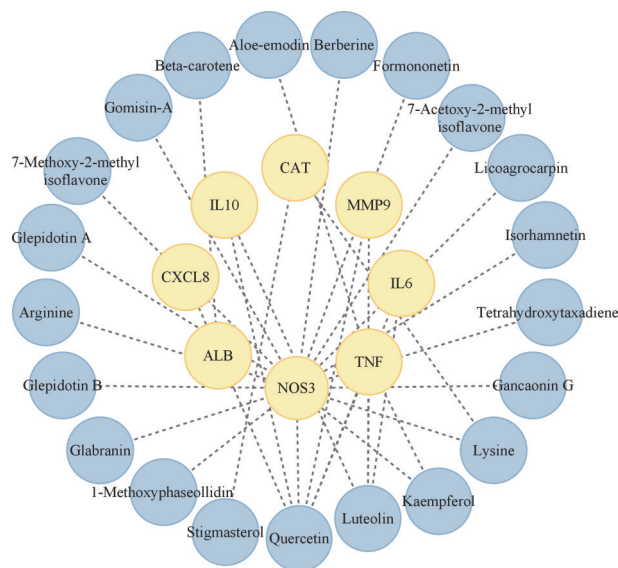
**统计学分析** 应用SPSS 21.0版进行数据统计分

析,所有数据以平均值 $\pm$ 标准差表示,数据符合正态分布时通过单因素方差分析(ANOVA)进行分析,数据不符合正态分布时使用非参数检验,当 $P$ 值小于0.05时,差异被认为具有统计学意义。

## 结果

### 1 “潜在活性成分-关键靶点-通路”网络的构建

从GeneCard、OMIM、PharmGkb和TTD数据库中总共获得了447个NR靶点。此外,TMYX和NR靶点的交集—69个重叠基因,即TMYX改善NR的潜在靶点。运用Cytoscape软件构建“潜在活性成分-关键靶点-通路”网络,网络包含162个节点(TMYX中的92个成分和69个潜在靶点)和230条边。在PPI网络中,利用拓扑分析计算了潜在靶点的度中心性(DC)和中间中心性(BC)。DC和BC反映了整个网络中相应节点的影响。DC和BC值的组合已被证实对筛选可靠靶点有效<sup>[11]</sup>。通过DC和BC值筛选后,69个靶点中筛选出8个核心靶点,其对应基因为NOS3、ALB、CXCL8、IL10、MMP9、IL6、CAT和TNF。不同的活性成分作用于这8个靶点(图1),反映了TMYX多成分、多靶点的特征。其中,槲皮素、木犀草素、山柰酚和赖氨酸的度值(degree)分别为6、4、2和2,表明它们是该网络中最重要的活性成分。



**Figure 1** The active compounds of Tongmai Yangxin pill (TMYX) and major targets

### 2 潜在靶点的GO富集分析和KEGG通路分析及分子对接验证

GO富集分析结果表明,TMYX改善NR的靶点与主要的生物过程有着密切的关系,包括心脏收缩、氧化

应激、代谢过程和血液循环调节。KEGG 通路富集分析结果 (图 2) 表明, TMYX 可能通过调节 HIF-1、cGMP-PKG、NF- $\kappa$ B 和 TNF 信号通路对 NR 产生治疗作用。本文采用分子对接方法预测活性化合物与主要靶点 (NOS3 和 TNF) 的结合亲和力, 如图 3 所示, 活性化合物和主要靶点 (NOS3 和 TNF) 的构象表现出良好的结合相互作用。

### 3 TMYX 对 NR 大鼠 NR 心肌面积和缺血心肌面积的影响

为了研究 TMYX 是否具有减轻 NR 的作用, 本文采用硫黄素 S、伊文思蓝和 TTC 染色观察无复流心肌面积和缺血心肌面积。结果表明, NR 组无复流心肌面积和缺血心肌面积分别为 88.4% 和 52.9% ( $P < 0.001$ , 图 4)。与 NR 组相比, TMYX 组无复流心肌面积和缺

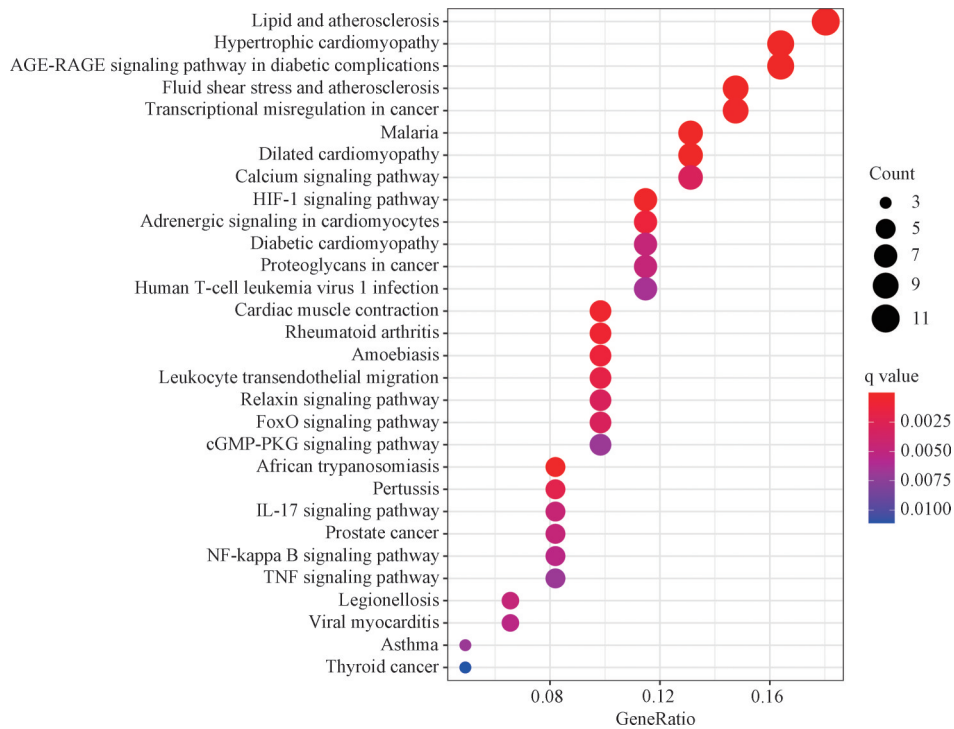
血心肌面积分别减少至 61.6% 和 31.1% ( $P < 0.001$ ), SNP 组无复流心肌面积和缺血心肌面积分别减少至 54.0% 和 19.8% ( $P < 0.001$ ), 表明 TMYX 具有减轻 NR 的作用。

### 4 TMYX 对 NR 大鼠心脏结构和功能的影响

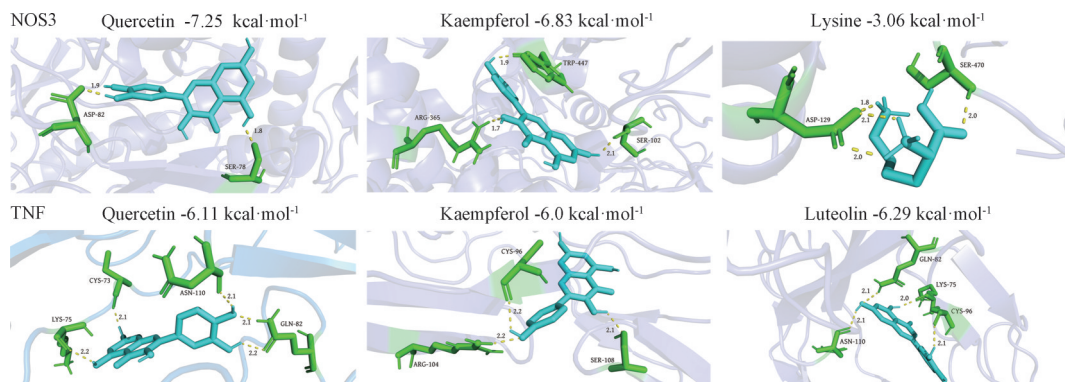
为了研究 TMYX 是否改善 NR 大鼠心脏结构和功能, 本文采用小动物超声仪测量大鼠心脏的功能和结构。如图 5 所示, 与 Sham 组相比, NR 组 EF、FS、LVOT 峰值和 LVSV 显著降低 ( $P < 0.001$ )。然而, TMYX 和 SNP 组的 EF、FS、LVOT 峰值和 LVSV 显著高于 NR 组 ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。结果表明, TMYX 可以改善 NR 大鼠的心脏结构和功能。

### 5 TMYX 对 NR 大鼠心肌酶活性的影响

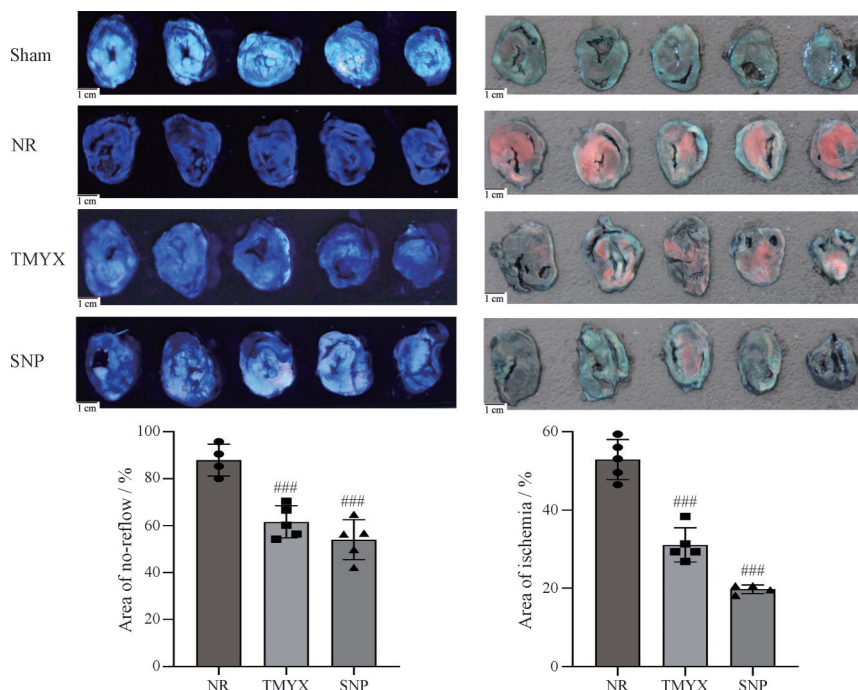
在 AMI 中, cTnI 是心肌细胞坏死的生物标志物,



**Figure 2** KEGG enrichment analysis of TMYX targets in alleviating no-reflow (NR). The horizontal axis of the KEGG diagram represents the gene proportion enriched in each entry, and the color shows the enrichment degree according to q value



**Figure 3** The conformations of main active compounds and major hub targets



**Figure 4** Effects of TMYX on NR myocardial area, ischemic myocardial area in NR rats.  $n = 5, \bar{x} \pm s$ . ### $P < 0.001$  vs NR group

可作为评估心肌损伤的指标。如图 6A 所示, NR 组的 cTnI 含量显著高于 Sham 组 ( $P < 0.05$ )。与 NR 组相比, TMYX 组和 SNP 组的 cTnI 含量显著降低 ( $P < 0.05$ )。数据表明, TMYX 可以减轻心肌损伤, 起到保护心肌组织的作用。

### 6 TMYX 对 NR 大鼠心肌组织病理损伤的影响

为了进一步观察 TMYX 对心肌组织病理损伤的影响, 本文进行了 HE 染色。Sham 组呈现完整的心肌细胞, 心肌纤维排列整齐且紧密 (图 6B)。NR 组心肌细胞紊乱, 核固缩溶解, 肌纤维肿胀, 大量炎性细胞浸润。TMYX 和 SNP 组心肌损伤程度明显减轻, 病变面积缩小, 水肿减轻, 可见少量炎性细胞浸润和间质水肿, 偶见空泡细胞。

### 7 TMYX 对 NR 大鼠心肌 GPER、ERK、HIF-1 $\alpha$ 蛋白表达的影响

如图 7 所示, 与 Sham 组相比, NR 组 GPER、p-ERK 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达显著降低 ( $P < 0.05, P < 0.01$ )。TMYX 治疗组 GPER、p-ERK 和 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达水

平增加 ( $P < 0.01$ )。结果表明, TMYX 可以活化 GPER 蛋白的表达, 以激活 HIF-1 $\alpha$  信号传导。

### 8 TMYX 通过激活 HIF-1 $\alpha$ /eNOS 通路对离体冠脉微血管舒张功能的影响

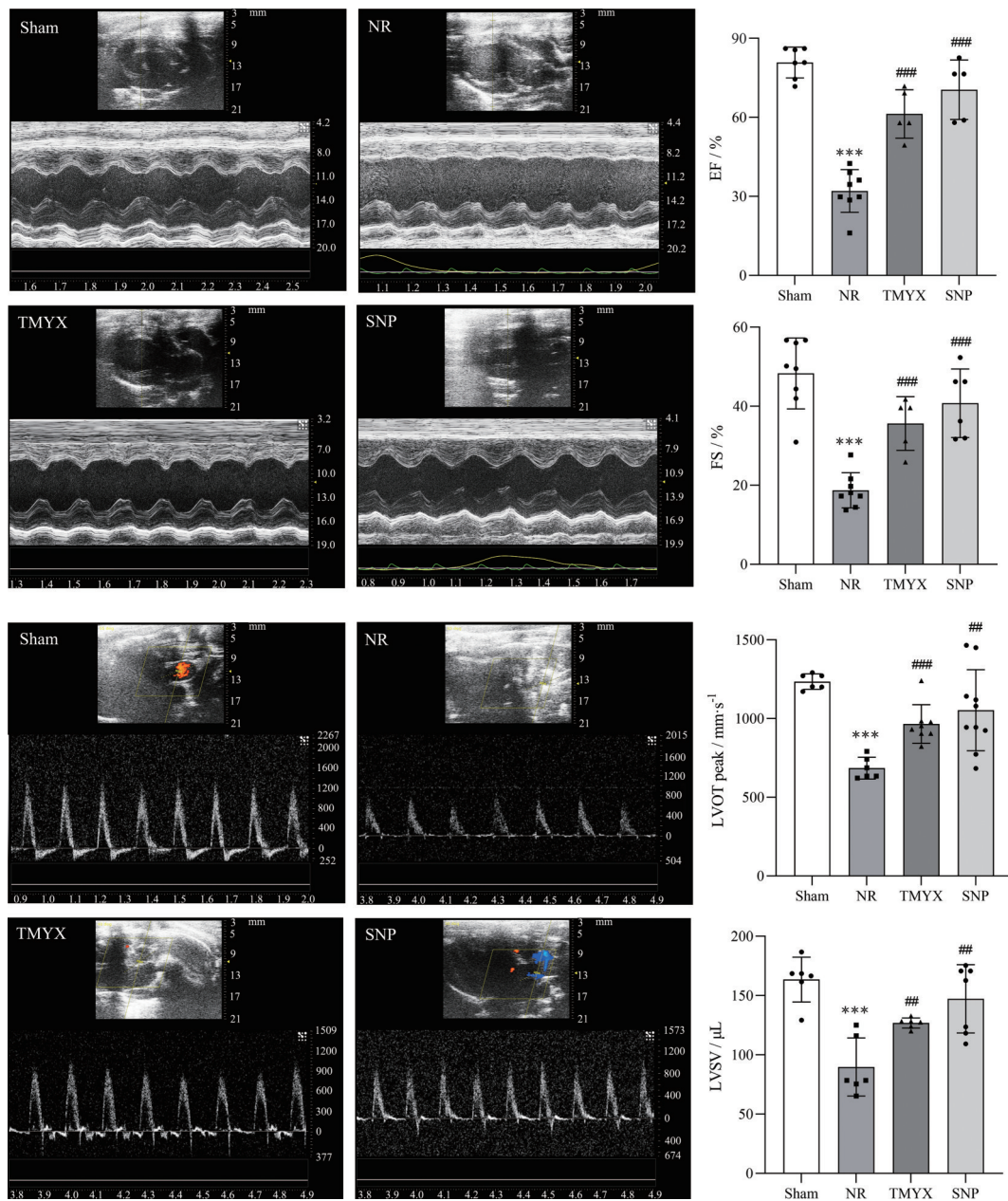
如表 1 所示, 与 DMSO 组相比, TMYX 在体外增强了冠脉微血管的舒张功能 ( $P < 0.01, P < 0.001$ ), 但这种作用被 G-15、L-NAME 和 ODQ 抑制 ( $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$ )。表明 TMYX 可以活化 GPER 激活 HIF-1 $\alpha$ /eNOS 通路, 舒张冠脉微血管功能达到缓解 NR 的作用。

### 讨论

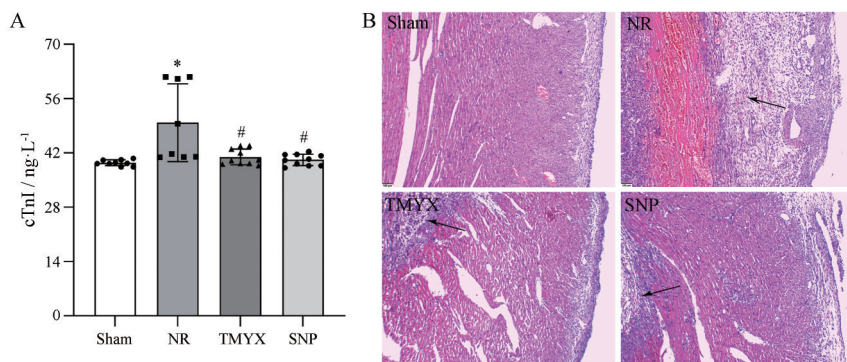
NR 现象是一个复杂的病理过程, 始于缺血阶段, 恶化于再灌注阶段, 以心肌微循环障碍为病理核心。临床上, NR 由 4 种致病因素的可变组合引起: 远端动脉粥样硬化血栓栓塞、缺血损伤、再灌注损伤和冠状动脉微循环障碍<sup>[2]</sup>。目前, NR 的预防和治疗方法主要包括药物和器械疗法<sup>[25,26]</sup>。然而, 临床治疗 NR 的有效药

**Table 1** Effect of GPER, eNOS and sGC inhibitor on diastolic function of isolated coronary microvasculature of TMYX.  $n = 3, \bar{x} \pm s$ . \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$  vs DMSO group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs TMYX group. Ach: Acetylcholine

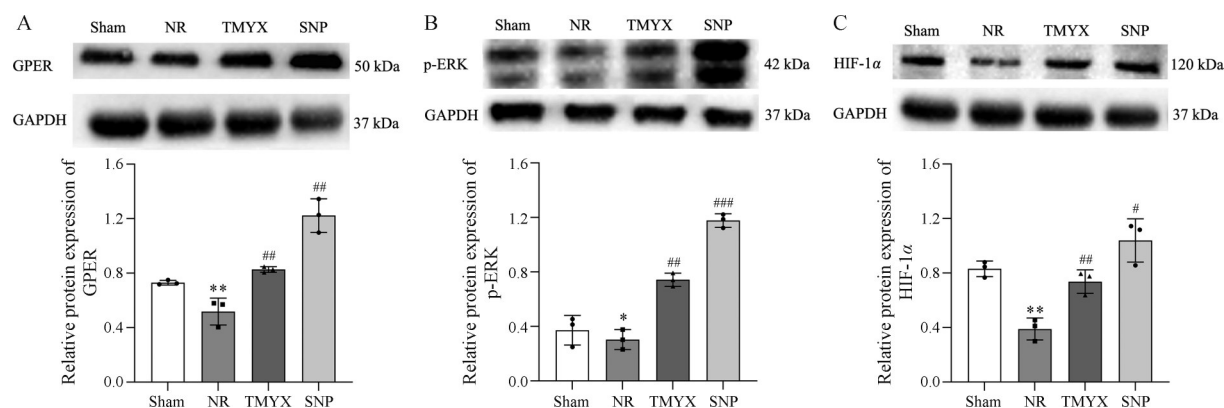
Group	Diastolic percentage/%			
	-	G-15	L-NAME	ODQ
DMSO	1.97 ± 2.45	-13.03 ± 6.84	3.03 ± 4.58	0.30 ± 1.77
Ach	67.81 ± 5.41***	-8.93 ± 4.75	5.20 ± 4.12	7.09 ± 11.01
TMYX 25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	10.67 ± 4.92**	-16.18 ± 7.93###	5.86 ± 6.38	2.91 ± 0.63
TMYX 50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	17.44 ± 7.16**	-11.16 ± 9.07###	3.82 ± 6.65#	7.55 ± 5.94
TMYX 100 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	20.17 ± 7.17***	-13.19 ± 8.83###	3.88 ± 5.40##	10.48 ± 4.12
TMYX 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$	24.39 ± 6.17***	-15.96 ± 10.35###	3.53 ± 4.61###	16.40 ± 2.81#



**Figure 5** Effect of TMYX on the cardiac structure, function and hemodynamics of NR rats.  $n = 10$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \*\*\* $P < 0.001$  vs Sham group; ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs NR group



**Figure 6** Effects of TMYX on myocardial enzyme activity (A,  $n = 10$ ) and the pathological changes (B,  $\times 100$ ,  $n = 3$ ) in NR rats.  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$  vs Sham group; # $P < 0.05$  vs NR group. cTnI: Cardiac troponin I



**Figure 7** Effect of TMYX on the expression of the G protein-coupled estrogen receptors (GPER), phospho-extracellular signal-regulated kinase (p-ERK) and hypoxia inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein of NR rats.  $n = 3$ ,  $\bar{x} \pm s$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Sham group; # $P < 0.05$ , ## $P < 0.01$ , ### $P < 0.001$  vs NR group

物很少。

前期研究表明, TMYX 通过激活磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B/内皮型一氧化氮合酶 (phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B/endothelial nitric oxide synthase, PI3K/Akt/eNOS)、环磷酸腺苷/蛋白激酶 A (cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, cAMP/PKA) 和一氧化氮/环磷酸鸟苷酸蛋白酶 (nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate, NO/cGMP) 通路, 调节细胞凋亡, 进一步上调 NO 活性, 舒张冠状微血管, 从而改善 NR。这一结果表明, TMYX 具有通过多成分、多靶点和多途径降低 NR 的作用。整合药理学是一门基于系统生物学的新兴学科, 用于分析生物系统网络以选择特定的信号节点, 从而可以准确确定药物和靶点之间的潜在相互作用<sup>[17]</sup>。本研究通过整合药理学确定了 TMYX 的活性成分、潜在靶点和信号通路, 并通过实验验证了 TMYX 对 NR 的改善作用及机制。

在本研究中, 通过整合药理学分析最终得出 TMYX 中含有 92 个活性成分和 69 个潜在靶点, 表明 TMYX 通过多成分和多靶点在 NR 治疗中发挥作用。槲皮素、木犀草素、山柰酚和赖氨酸被评估为活性最高的成分。现有研究表明, 槲皮素通过下调高迁移率族蛋白 B1-Toll 样受体 4-核因子  $\kappa$ B (high-mobility group box 1-Toll-like receptor 4-nuclear factor- $\kappa$ B, HMGB1-TLR4-NF- $\kappa$ B) 信号通路来减轻心肌缺血再灌注损伤<sup>[27]</sup>, 通过沉默信息调节因子 1-过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  辅激活因子 1 $\alpha$  (silent information regulator 1-peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\alpha$ , Sirt1/PGC-1 $\alpha$ ) 信号通路在体内外改善缺血/再灌注诱导的心肌细胞凋亡<sup>[28]</sup>。此外, 槲皮素处理后通过 PI3K/Akt 通路减轻大鼠心肌缺血/再灌注损伤<sup>[29]</sup>。木犀草素通过 Sirt1/NLRP3/NF- $\kappa$ B 通路和过氧

化物酶原 II 的激活减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤<sup>[30,31]</sup>, 还可以改善受损的线粒体形态, 调节丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 通路<sup>[32]</sup>, 下调 TLR4 介导的 NF- $\kappa$ B/NLRP3 炎症小体, 以缓解心肌缺血再灌注损伤<sup>[33]</sup>。山柰酚可以通过激活 PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  通路<sup>[34,35]</sup>来减轻心肌缺血/再灌注损伤。赖氨酸抑制含有赖氨酸甲基转移酶 7 的蛋白 SET 结构域, 通过下调 Kelch 样 ECH 相关蛋白 1 (Kelch-like ECH-associated protein 1, Keap1) 和促进核转录因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2 related factor 2, Nrf2) 介导的抗氧化信号通路, 减轻心肌细胞缺氧/复氧诱导的损伤<sup>[36]</sup>。数据表明, SIRT1 介导的赖氨酸脱乙酰化在急性缺血预处理中起重要作用<sup>[37]</sup>。心肌缺血再灌注损伤可导致 3 种严重并发症: 恶性心律失常、心肌顿抑和 NR。总的来说, TMYX 通过多成分和多靶点在 NR 治疗中发挥重要作用。

PPI 网络分析表明, TMYX 改善 NR 的核心靶点是: NOS3、ALB、CXCL8、IL10、MMP9、IL6、CAT 和 TNF; 在分子对接验证中, 与 NR 密切相关的靶点 (NOS3、TNF) 与主要活性成分表现出良好的亲和力。KEGG 通路分析的结果表明, TMYX 改善 NR 作用可能与 HIF-1 $\alpha$ 、cGMP-PKG、NF- $\kappa$ B 和 TNF- $\alpha$  信号通路有关。前期研究表明, TMYX 通过激活 cGMP-PKG 信号通路减轻 NR<sup>[6]</sup>, 这也证实了整合药理学预测方法的准确性。

HIF-1 $\alpha$  作为缺氧诱导因子家族中的关键一员, 在血管生成中起着关键作用<sup>[38]</sup>, 参与缺血性心脏的心肌重塑和梗死周围血管形成<sup>[39]</sup>。HIF-1 $\alpha$  活性已被证明受蛋白激酶 Akt 和 ERK 磷酸化调节<sup>[40]</sup>, 值得注意的是, Akt 和 ERK 都被认为是心脏保护的介质<sup>[41]</sup>。激活 GPER 在缺血再灌注模型中发挥保护作用, 并可在体外舒张血管。GPER 诱导的猪冠状动脉舒张由 cAMP/PKA 信号介

导<sup>[42]</sup>。PKA 增强 HeLa 细胞和大鼠心肌细胞中 HIF-1 $\alpha$  转录活性和靶基因表达<sup>[43]</sup>。大量研究证明, HIF-1 $\alpha$  可以通过激活 eNOS, 产生 NO<sup>[44]</sup>。作为 NO 的主要受体 sGC 催化 GTP 转化为 cGMP 以调节 PKG, PKG 调节血管平滑肌细胞中的 K<sup>+</sup> 通道, 从而调节血管张力, 在心肌缺血/再灌注损伤和 NR 过程中发挥重要作用<sup>[45,46]</sup>。体内实验表明, TMYX 促进 HIF-1 $\alpha$  蛋白的表达, 提示激活 HIF-1 $\alpha$  通路是 TMYX 改善 NR 的作用机制。体外实验表明, TMYX 可以增强冠脉微血管舒张功能, 但这种作用被 G-15、L-NAME 和 ODQ 抑制, 提示 TMYX 可以通过活化 GPER 来调节 HIF-1 $\alpha$ /eNOS 信号通路, 并最终达到舒张冠脉微血管和缓解 NR 的作用。

综上, 本研究通过整合药理学和实验验证, 揭示了 TMYX 改善 NR 的作用及机制。此外, 由于数据库信息不完整, 一些关键靶点和活性化合物可能会被忽略。本研究目前的实验和整合药理学结果证实, TMYX 通过活化 GPER 激活 HIF-1 $\alpha$ /eNOS 信号通路, 舒张冠状动脉微血管, 从而显著改善 NR, 为 TMYX 的进一步临床应用提供科学依据。

**作者贡献:** 张伟提出整体研究思路, 负责论文撰写的指导与修改; 陈婷负责动物实验和体外实验及文章书写; 刘海瑞负责网络药理学分析; 张燕燕负责整理数据和文献调研。

**利益冲突:** 所有作者均声明没有利益冲突。

## References

- [1] Li S, Chen J, Liu M, et al. Protective effect of HINT2 on mitochondrial function *via* repressing MCU complex activation attenuates cardiac microvascular ischemia-reperfusion injury [J]. *Basic Res Cardiol*, 2021, 116: 65.
- [2] Annibali G, Scrocca I, Aranzulla TC, et al. "No-reflow" phenomenon: a contemporary review [J]. *J Clin Med*, 2022, 11: 2233.
- [3] Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, et al. Myocardial no-reflow in humans [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54: 281-292.
- [4] Xenogiannis I, Zenati M, Bhatt DL, et al. Saphenous vein graft failure: from pathophysiology to prevention and treatment strategies [J]. *Circulation*, 2021, 144: 728-745.
- [5] Chen R, Chen T, Wang T, et al. Tongmai Yangxin pill reduces myocardial no-reflow by regulating apoptosis and activating PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 261: 113069.
- [6] Chen R, Chen T, Wang T, et al. Tongmai Yangxin pill reduces myocardial no-reflow *via* endothelium-dependent NO-cGMP signaling by activation of the cAMP/PKA pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 267: 113462.
- [7] Fan Y, Man S, Li H, et al. Analysis of bioactive components and pharmacokinetic study of herb-herb interactions in the traditional Chinese patent medicine Tongmai Yangxin pill [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2016, 120: 364-373.
- [8] Wang Y, Wang X, Wang J, et al. Tongmai Yangxin intervening in myocardial remodeling after PCI for coronary heart disease: study protocol for a double-blind, randomized controlled trial [J]. *Trials*, 2020, 21: 287.
- [9] Fan Y, Liu J, Miao J, et al. Anti-inflammatory activity of the Tongmai Yangxin pill in the treatment of coronary heart disease is associated with estrogen receptor and NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 276: 114106.
- [10] Cai X, Du J, Li L, et al. Clinical metabolomics analysis of therapeutic mechanism of Tongmai Yangxin pill on stable angina [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2018, 1100-1101: 106-112.
- [11] Kibble M, Saarinen N, Tang J, et al. Network pharmacology applications to map the unexplored target space and therapeutic potential of natural products [J]. *Nat Prod Rep*, 2015, 32: 1249-1266.
- [12] Li R, Li Y, Liang X, et al. Network pharmacology and bioinformatics analyses identify intersection genes of niacin and COVID-19 as potential therapeutic targets [J]. *Brief Bioinform*, 2021, 22: 1279-1290.
- [13] Wang Y, Zhang L, Xiao Y, et al. The effect of Tongmai Yangxin pill on the inflammatory factors and oxidative stress induced by hypoxia-induced myocardial cells [J]. *J Tradit Chin Med (中医杂志)*, 2011, 52: 326-328.
- [14] Chen Z, Lin T, Liao X, et al. Network pharmacology based research into the effect and mechanism of Yinchenhao decoction against cholangiocarcinoma [J]. *Chin Med*, 2021, 16: 13.
- [15] Su D, Liao L, Zeng Q, et al. Study on the new anti-atherosclerosis activity of different herba patriniae through down-regulating lysophosphatidylcholine of the glycerophospholipid metabolism pathway [J]. *Phytomedicine*, 2022, 94: 153833.
- [16] Hu P, Sun N, Khan A, et al. Network pharmacology-based study on the mechanism of scutellarin against zearalenone-induced ovarian granulosa cell injury [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2021, 227: 112865.
- [17] Li S. Network pharmacology evaluation method guidance-draft [J]. *World J Tradit Chin Med*, 2021, 7: 146-154.
- [18] Hou F, Yu Z, Cheng Y, et al. Deciphering the pharmacological mechanisms of *Scutellaria baicalensis* Georgi on oral leukoplakia by combining network pharmacology, molecular docking and experimental evaluations [J]. *Phytomedicine*, 2022, 103: 154195.
- [19] Wei M, Li H, Li Q, et al. Based on network pharmacology to explore the molecular targets and mechanisms of Gegen Qinlian decoction for the treatment of ulcerative colitis [J]. *Biomed Res Int*, 2020, 2020: 5217405.
- [20] Yan Y, Zhang D, Zhou P, et al. HDOCK: a web server for protein-protein and protein-DNA/RNA docking based on a hybrid strategy [J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45: W365-W373.

- [21] Hernández-Reséndiz S, Palma-Flores C, De Los Santos S, et al. Reduction of no-reflow and reperfusion injury with the synthetic  $17\beta$ -aminoestrogen compound prolame is associated with PI3K/Akt/eNOS signaling cascade [J]. *Basic Res Cardiol*, 2015, 110: 1.
- [22] Quan X, Liu X, Qin X, et al. The role of LR-TIMAP/PP1c complex in the occurrence and development of no-reflow [J]. *EbioMedicine*, 2021, 65: 103251.
- [23] Li Q, Guo Z, Wu C, et al. Ischemia preconditioning alleviates ischemia/reperfusion injury-induced coronary no-reflow and contraction of microvascular pericytes in rats [J]. *Microvasc Res*, 2022, 142: 104349.
- [24] Bai S, Wang X, Wu H, et al. Cardioprotective effect of anisodamine against ischemia/reperfusion injury through the mitochondrial ATP-sensitive potassium channel [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 901: 174095.
- [25] Zhang Q, Hu M, Ma S. Association of soluble suppression of tumorigenicity with no-reflow phenomenon and long-term prognosis in patients with non-ST-segment elevation acute coronary syndrome after percutaneous coronary intervention [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2021, 28: 1289-1297.
- [26] Khan KA, Qamar N, Saghir T, et al. Comparison of intracoronary epinephrine and adenosine for no-reflow in normotensive patients with acute coronary syndrome (Coar Trial) [J]. *Circ Cardiovasc Interv*, 2022, 15: e011408.
- [27] Dong LY, Chen F, Xu M, et al. Quercetin attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury *via* downregulation of the HMGB1-TLR4-NF- $\kappa$ B signaling pathway [J]. *Am J Transl Res*, 2018, 10: 1273-1283.
- [28] Tang J, Lu L, Liu Y, et al. Quercetin improve ischemia/reperfusion-induced cardiomyocyte apoptosis *in vitro* and *in vivo* study *via* SIRT1/PGC-1 $\alpha$  signaling [J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120: 9747-9757.
- [29] Wang Y, Zhang ZZ, Wu Y, et al. Quercetin postconditioning attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through the PI3K/Akt pathway [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2013, 46: 861-867.
- [30] Zhao L, Zhou Z, Zhu C, et al. Luteolin alleviates myocardial ischemia reperfusion injury in rats *via* Sirt1/NLRP3/NF- $\kappa$ B pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 85: 106680.
- [31] Wei B, Lin Q, Ji YG, et al. Luteolin ameliorates rat myocardial ischaemia-reperfusion injury through activation of peroxiredoxin II [J]. *Br J Pharmacol*, 2018, 175: 3315-3332.
- [32] Yu D, Li M, Tian Y, et al. Luteolin inhibits ROS-activated MAPK pathway in myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Life Sci*, 2015, 122: 15-25.
- [33] Zhang X, Du Q, Yang Y, et al. The protective effect of luteolin on myocardial ischemia/reperfusion (I/R) injury through TLR4/NF- $\kappa$ B/NLRP3 inflammasome pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 91: 1042-1052.
- [34] Wang D, Zhang X, Li D, et al. Kaempferide protects against myocardial ischemia/reperfusion injury through activation of the PI3K/Akt/GSK-3 $\beta$  pathway [J]. *Mediators Inflamm*, 2017, 2017: 5278218.
- [35] Zhou M, Ren H, Han J, et al. Protective effects of kaempferol against myocardial ischemia/reperfusion injury in isolated rat heart *via* antioxidant activity and inhibition of glycogen synthase kinase-3 $\beta$  [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 481405.
- [36] Dang Y, Ma X, Li Y, et al. Inhibition of SETD7 protects cardiomyocytes against hypoxia/reoxygenation-induced injury through regulating Keap1/Nrf2 signaling [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 106: 842-849.
- [37] Nadtochiy SM, Redman E, Rahman I, et al. Lysine deacetylation in ischaemic preconditioning: the role of SIRT1 [J]. *Cardiovasc Res*, 2011, 89: 643-649.
- [38] Datta Chaudhuri R, Banik A, Mandal B, et al. Cardiac-specific overexpression of HIF-1 $\alpha$  during acute myocardial infarction ameliorates cardiomyocyte apoptosis *via* differential regulation of hypoxia-inducible pro-apoptotic and anti-oxidative genes [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2021, 537: 100-108.
- [39] Kido M, Du L, Sullivan CC, et al. Hypoxia-inducible factor 1-alpha reduces infarction and attenuates progression of cardiac dysfunction after myocardial infarction in the mouse [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2005, 46: 2116-2124.
- [40] Lv K, Kong L, Yang M, et al. An ApoA-I mimic peptide of 4F promotes SDF-1 $\alpha$  expression in endothelial cells through PI3K/Akt/ERK/HIF-1 $\alpha$  signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 760908.
- [41] Sumida A, Horiba M, Ishiguro H, et al. Midkine gene transfer after myocardial infarction in rats prevents remodelling and ameliorates cardiac dysfunction [J]. *Cardiovasc Res*, 2010, 86: 113-121.
- [42] Yu X, Li F, Klussmann E, et al. G protein-coupled estrogen receptor 1 mediates relaxation of coronary arteries *via* cAMP/PKA-dependent activation of MLCP [J]. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 2014, 307: E398-E407.
- [43] Bullen JW, Tchernyshyov I, Holewinski RJ, et al. Protein kinase A-dependent phosphorylation stimulates the transcriptional activity of hypoxia-inducible factor 1 [J]. *Sci Signal*, 2016, 9: ra56.
- [44] Rajendran S, Sundaresan L, Venkatachalam G, et al. Temporal dynamics of nitric oxide wave in early vasculogenesis [J]. *Vasc Med*, 2022, 27: 3-12.
- [45] Cohen MV, Yang XM, Downey JM. Nitric oxide is a preconditioning mimetic and cardioprotectant and is the basis of many available infarct-sparing strategies [J]. *Cardiovasc Res*, 2006, 70: 231-239.
- [46] Hansen FB, Esteves GV, Mogensen S, et al. Increased cerebral endothelium-dependent vasodilation in rats in the postcardiac arrest period [J]. *J Appl Physiol*, 2021, 131: 1311-1327.