

芒柄花黄素通过上调 GPER 激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路减轻心肌缺血再灌后无复流的作用及机制研究

刘海瑞, 叶麟晰, 林佳美慧, 刘倩, 彭雅旋, 陈婷*

(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芒柄花黄素 (formononetin, FMN) 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, 采用人乳腺癌细胞 (MCF-7) 和心肌 NR 大鼠证实 FMN 的雌激素活性和减轻 NR 的药效作用。将雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠分为 Sham、NR、FMN (20 mg·kg⁻¹) 和硝普钠 (sodium nitroprusside, SNP, 5.0 mg·kg⁻¹) 组, 给药 1 周, 每天 1 次, 本实验获得天津中医药大学伦理委员会批准 (TCM-LAEC2019095)。再整合药理学分析和 NR 大鼠体内研究, 揭示 FMN 改善 NR 的作用机制。结果发现, FMN 具有雌激素样作用, 且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, 起到减轻 NR 的作用。整合药理学预测 FMN 改善 NR 机制主要与磷脂酰肌醇-3-激酶-蛋白激酶 B (phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase B, PI3K-Akt) 信号通路有关。植物雌激素主要通过上调 G 蛋白偶联雌激素受体 (G protein-coupled estrogen receptor, GPER) 发挥保护心血管的作用, GPER 也作为 PI3K-Akt 信号通路上游的重要调节因子, 本研究发现 FMN 能显著上调 GPER、p-PI3K、p-Akt 和磷酸化内皮型一氧化氮合酶 (phospho-endothelial nitric oxide synthase, p-eNOS) 蛋白表达, 且与 GPER 及 eNOS 蛋白具有良好结合能力。本研究通过整合药理学和实验评估, 揭示 FMN 通过上调 GPER 激活 PI3K/Akt/eNOS 信号通路, 从而显著改善 NR 的机制。

关键词: 心脏保护作用; 分子机制; 整合药理学; 芒柄花黄素; G 蛋白偶联雌激素受体; PI3K/Akt/eNOS

中图分类号: R966 文献标识码: A 文章编号: 0513-4870(2023)06-1496-09

The effect and mechanism of formononetin on alleviating no-reflow after myocardial ischemia and reperfusion by up-regulating the PI3K/Akt/eNOS signal pathway activated by GPER

LIU Hai-rui, YE Lin-xi, LIN Jia-mei-hui, LIU Qian, PENG Ya-xuan, CHEN Ting*

(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: To investigate the cardioprotective effect of formononetin (FMN) on no-reflow (NR) after myocardial ischemia-reperfusion and its molecular mechanism based on integrated pharmacology and experimental verification, firstly, human breast cancer MCF-7 cells and myocardial NR rats were used to confirm the estrogenic activity and the effect of alleviating NR of FMN, respectively. Male SD rats were divided into Sham, NR, FMN (20 mg·kg⁻¹) and sodium nitroprusside (SNP, 5.0 mg·kg⁻¹) groups, which were administered once a day for one week, the experiment was approved by the Ethics Committee of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine (TCM-LAEC2019095). The pharmacological analysis and *in vivo* study of NR rats were integrated to reveal the mechanism of FMN improving NR. The results showed that FMN had estrogenic effect and reduced NR

收稿日期: 2022-12-30; 修回日期: 2023-04-26.

基金项目: 湖南省自然科学基金资助项目-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: chenting520@hnuocm.edu.cn

DOI: 10.16438/j.0513-4870.2022-1442

by improving cardiac structure and function, reducing NR, ischemic myocardial area and pathological injury of cardiomyocytes. Integrated pharmacology predicts that the mechanism of FMN improving NR is mainly related to phosphatidylinositol-3-kinase-protein kinase B (PI3K-Akt) signal pathway. Phytoestrogens play a role in cardiovascular protection mainly by activating G protein-coupled estrogen receptor (GPER). GPER is also an important regulator in the upstream of PI3K-Akt signaling pathway. This study found that FMN can significantly activate GPER, p-PI3K, p-Akt and phospho-endothelial nitric oxide synthase (p-eNOS). It has good binding ability with GPER and eNOS protein. In this study, through the integration of pharmacology and experimental evaluation, it is revealed that FMN activates PI3K/Akt/eNOS signal pathway by activating GPER, thus significantly improving NR.

Key words: cardioprotective effect; molecular mechanism; network pharmacology; formononetin; G protein-coupled estrogen receptor; PI3K/Akt/eNOS

无复流 (no-reflow, NR) 是急性心肌梗死 (AMI) 患者在经皮冠状动脉介入治疗 (PCI) 后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^[1]。临床上 AMI 患者 PCI 术后无复流发生率高达 30%^[2,3]。NR 是一个复杂的病理过程, 它起始于缺血期, 恶化于再灌注期, 并以心肌微循环障碍为病理核心^[4]。现有研究表明, 其主要机制与炎症反应、钙超载、线粒体损伤、氧化应激和细胞凋亡等有关^[5,6]。近年来, 虽在 NR 发病机制及病理变化等研究领域取得了显著进展, 然而在治疗上仍缺乏真正有效控制病情发展的药物。因此, 研究和探求治疗 NR 的新途径、新药物成为目前国内学者研究重点。

雌激素能显著改善 NR, 减少缺血再灌注后心肌微血管损伤^[7], 其主要通过膜受体和下游级联磷脂酰肌醇-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) 激活非基因组机制产生一氧化氮 (nitric oxide, NO), 从而促进血管舒张、调节血压、减少血管炎症和动脉粥样硬化并改善 NR^[8,9]。G 蛋白偶联雌激素受体 (G protein-coupled estrogen receptor, GPER) 可介导雌激素在体内快速反应, 其对于心血管系统的调节和保护作用已成为研究热点^[10]。前期研究也发现, GPER 能激活 PI3K/Akt/eNOS 和环磷酸腺苷/蛋白激酶 A (cyclic adenosine monophosphate/protein kinase A, cAMP/PKA) 途径, 活化 eNOS 产生 NO, 产生舒张血管效应, 从而改善 NR^[11]。

芒柄花黄素 (formononetin, FMN) 是异黄酮家族的植物雌激素成员, 具有抗氧化、抗高血压、抗肿瘤和抗感染等药理作用^[12]。主要存在于黄芪和红三叶等豆科植物中, 富含 FMN 的芪苈强心胶囊、芪参益气丸、脑心通胶囊, 已在临床上广泛用于治疗高血压和心肌缺血再灌注损伤^[13]; FMN 可以通过激活雌激素受体 α (ER α) 增强 ROCK-II 信号通路产生促血管生成作用^[14]; FMN 可以通过抑制 ROS-TXNIP-NLRP3 通路,

最终抑制 NLRP3 炎性小体的激活, 对心肌缺血再灌注损伤发挥有效的保护作用^[15]。值得关注的是, 富含 FMN 的通脉养心丸已被证实具有改善 NR 的作用^[11], 而 FMN 是否具有改善 NR 的作用及其作用机制尚不清楚。

网络药理学是通过构建“药物成分-药物作用靶点-疾病相关靶点”相互作用网络, 从系统生物学角度出发, 基于多组分、多靶点、多途径的整体观揭示中药复杂体系治疗疾病的相关机制, 近年来成为中药研究领域比较常用的研究技术^[16]。在本研究中, 通过整合药理学和实验验证来阐明 FMN 在心肌缺血再灌注后 NR 中的潜在机制。首先, 本研究采用人乳腺癌细胞 (MCF-7) 和 NR 大鼠验证 FMN 激素样作用和改善 NR 的作用; 然后构建“关键靶点-通路”网络, 以预测 FMN 治疗疾病的潜在靶点和作用通路; 最后, 采用 NR 大鼠体内实验, 揭示 FMN 减轻 NR 的机制。

材料与方法

FMN 的作用靶点收集 将“Formononetin”输入中药系统药理数据库 TCMSP (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>) 检索框, 限定词为“chemical name”, 得出 FMN 的 CAS 号并记录, 将所得 CAS 号输入 PubChem (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov>) 数据库得出 SMILE 号。将 SMILE 号导入 Swiss (Swiss target prediction.ch) 和 Sea (<https://sea.bkslab.org>) 数据库得到 FMN 的作用预测靶点, 删去重复值, 获得 FMN 作用靶点, 将获得的靶点导入 UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org/>) 转换成相应的基因名称。

NR 相关靶点收集 以“no reflow after myocardial ischemia and reperfusion”为关键词, 在 OMIM (<http://www.omim.org/>)、Gene Cards (<https://www.genecards.org/>)、Pharmgkb (<https://www.pharmgkb.org/>)、TTD (<https://db.idrblab.net/ttd/>) 及 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/>) 数据库进行检索, 删去重复值, 获得 NR

疾病靶点。将获得的靶点导入 UniProt 数据库 (<http://www.uniprot.org>) 转换成相应的基因名称。

FMN-NR 共同靶点筛选 在 Venny2.1.0 在线软件作图工具平台上输入 FMN 作用靶点与 NR 相关靶点, 进行交集处理后, 以韦恩图的形式展示 FMN-NR 共同靶点, 获得 FMN 治疗 NR 的潜在靶点^[17]。

FMN 治疗 NR 核心靶点的筛选 蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 是体现蛋白与蛋白之间相互关系的网络图, 将 FMN-NR 共同靶点上传至 String10.0 (<https://stringdb.org>) 数据库, 选择 multiple proteins 功能, 设置蛋白种类为“Homo sapiens”, 相互作用阈值为 0.4, 获取靶点相互作用的网络关系数据; 将分析得到的 PPI 结果保存为 tsv 文件格式, 进而导入 Cytoscape 3.9.1 软件选择网络拓扑分析功能进行可视化结果, 以节点的大小、颜色及深浅变化代表 degree 值的大小; degree 值越大, 点越大, 说明这个靶点在 FMN 治疗 NR 方面具有更重要的潜在作用, 选取 degree 值前 8 位的靶点, 作为 FMN 治疗 NR 的核心靶点^[18]。

FMN 治疗 NR 靶点的功能与通路富集分析 将 FMN-NR 共同靶点导入 David (<https://david.ncifcrf.gov>) 数据库, 通过功能分析模块进行基因本体 (GO) 和京都基因和基因组百科全书 (KEGG) 富集分析。GO 分析包括 3 个类别: 细胞组分 (cellular component, CC)、分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological process, BP), 3 组中选取具有统计学意义 ($P < 0.05$) 的通路, KEGG 结果选择具有统计学意义 ($P < 0.05$) 的通路, 应用微生信基因富集分析在线工具数据平台 (www.bioinformatics.com.cn) 绘制柱状图, 对上述所得 FMN-NR 共同靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析^[19]。

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 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 表示具有良好亲和力^[20]。

MCF-7 细胞增殖实验 以雌激素依赖性的 MCF-7 乳腺癌细胞为对象, 采用 CCK-8 实验检测 FMN 对 MCF-7 细胞增殖的影响, 并筛选有效浓度。实验开始前 3 天改为在无酚红高糖培养基 (Dulbecco's modified eagle medium, DMEM) (含 5% CDT-FBS) 条件下培养, 以耗尽细胞内源性雌激素。选用对数生长期细胞,

0.05% 胰酶消化后, 加入无酚红 DMEM, 以 3 000 个/孔的浓度接种于 96 孔板内, 每孔 200 μL 。待细胞贴壁生长至 60%~70% 融合度后, 约 24 h, 分别加入 FMN (10、20 和 30 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、雌二醇 (estradiol, E_2 , 10^{-8} $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), 置于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、5% CO_2 细胞培养箱内, 培养 48 h。每孔加入 20 μL 10% CCK-8, 继续孵育 4 h 后, 使用酶联免疫检测仪, 于 450 nm 下测定吸光度 (A) 值, 计算平均 A 值和增殖率。其中, 增殖率 $\% = (A_{\text{实验组}} - A_{\text{对照组}}) / A_{\text{对照组}} \times 100\%$ 。

实验动物 雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠 (250 \pm 10) g 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 (证书编号: 11401300051612; SCXK20160006)。所有实验方案均按照天津中医药大学动物伦理委员会批准的指南进行 (TCM-LAEC2019095)。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 模型的制备 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 (1 mL/100 g) 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 (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, 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。再灌注后 2 h 进行超声心动图检查, 射血分数 (ejection fraction, EF) 值 $< 50\%$ 和明显的心肌 NR^[7,21], 标志构造模型成功。

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 NR 组、FMN (20 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) 和 SNP (sodium nitroprusside, 5.0 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$, 阳性对照组) ($n = 16$)。假手术组 (Sham) 和 NR 组大鼠灌胃相同体积的 0.5% 羧甲基纤维素 (CMC-Na, 批号 C8621, 北京索莱宝科技有限公司) 溶剂, FMN 和 SNP 组大鼠是在 NR 模型基础上分别进行灌胃和腹腔注射。每日 1 次, 连续给药 7 天, 给药体积为 1 mL/100 g, 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。

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 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, 硫磺素 S 经过的区域 365 nm 波长光源下发紫色荧光, 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 $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ ^[22], 1 min 后立即取出心脏置于 -40°C 冰箱进行冷冻 15 min, 再从结扎线下 1 mm 平行均匀将心脏切成 5 片, 荧光显微镜 365 nm 拍照保存用于检测无复流心肌面积。心肌切片再于 1% TTC 溶液 37°C 水浴锅中孵化 15~30 min, 于普通光照下再次拍照保存用于检测缺血心肌面积。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, 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^[23] (Vevo 2100, VisualSonics, 加拿大)。大鼠麻醉后胸前备皮(用剃毛机将大鼠胸前区鼠毛脱去, 使超声视野充分暴露), 将大鼠用皮筋仰卧位固定四肢及头部于测量板。探头频率设置为 12 Mhz, 探头涂耦合剂并放置在胸骨左侧进行检查, 与胸骨中线形成 30° 角。M 型样本线垂直于室间隔和左心室后壁, 以获得 M 型超声心动图。测量包括左心室射血分数 (EF)、左室短轴收缩率 (FS)、左室质量 (LV 质量)、左室舒张末期容积 (LV Vold)、左室收缩末期容积 (LV Vols)、流出道峰值血流速度 (LVOT peak) 和每搏输出量 (LVSV)。所有测量值均为 3 个心脏周期的平均值。

HE 染色 对大鼠实施安乐死, 并取出心脏。采用常规 HE 染色^[23], 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 (WB) 实验 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^[23]。使用的抗体包括兔单克隆 GPER (1:1 000 稀释, bs-1380R, Bioss 公司); 兔单克隆 p-PI3K (Tyr 458) (1:1 000 稀释, PA5-17387, Thermo 公司); 兔单克隆 p-Akt (Thr308, 1:1 000 稀释, 13038)、兔单克隆 p-eNOS (Ser1177, 1:1 000 稀释, 9570S)、兔单克隆 GAPDH (1:1 000 稀释, 5174T) 和抗兔 IgG (1:5 000 稀释, 7074P2) 均购自 Cell Signaling Technology 公司。

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 $P < 0.05$ 时, 差异被认为具有统计学意义。

结果

1 “作用靶点-关键靶点-通路”网络的构建

通过 GeneCards、OMIM、PharmGkb、TTD、DisGeNET 5 个数据库进行检索, 得到不重复的 NR 相关靶点 1 622 个, 从 TCMSP、Swiss、Sea、UniProt 数据库得到不重复的 FMN 作用靶点 261 个。绘制韦恩图后得到 FMN-NR 共同靶点 93 个。FMN-NR 共同靶点的 PPI 图显示共得到 84 个节点, 505 条边。为筛选关键靶点中作用较大的靶点, 利用 Analyze Network 功能对网络进行拓扑分析, 根据关键靶点的度值 (degree) 进行排序, 排名前 8 位的靶点将用于后续的分子对接验证。93 个靶点中筛选出 8 个核心靶点, 其对应基因为 TNF、NOS3、MTOR、CCND1、PTGS2、PPARG、CASP3 和 HSP90AA1 (图 1)。

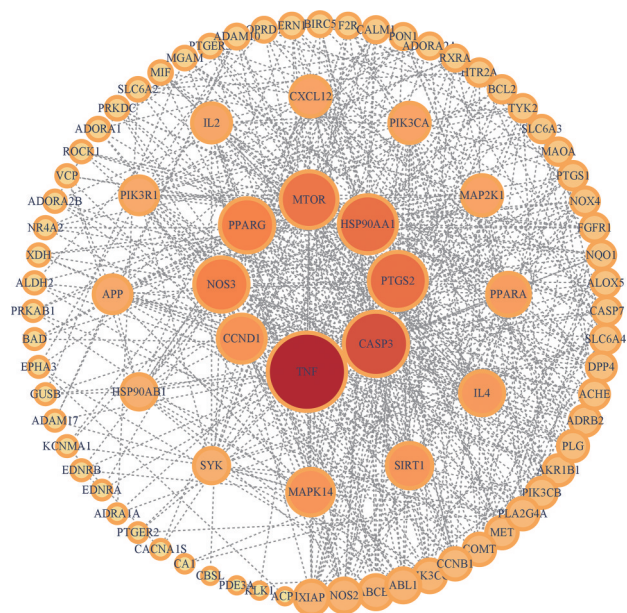


Figure 1 Cytoscape key target analysis chart

2 潜在靶点的 GO 富集分析和 KEGG 通路分析及分子对接验证

对交集靶点进行 GO 富集分析与 KEGG 通路分析, 得到 GO 条目共 2 526 条 ($P < 0.05$), 其中包括生物过程 (biological process, BP) 条目 517 条、细胞组成 (cell composition, CC) 条目 58 条、分子功能 (molecular function, MF) 条目 109 个。根据 P 值对条目排序, 将各类别前 10 名富集结果进行可视化分析, FMN-NR 共同靶点主要涉及的生物学过程包括药物反应、凋亡过程的负调控、缺氧反应、蛋白质磷酸化的正向调控等, 主要涉及的细胞成分包括细胞质膜、膜筏、胞溶质等, 主要涉及的分子功能包括酶结合、相同蛋白结合、蛋白激酶活性等。FMN-NR 共同靶点的 KEGG 富集通路有

153 条, 将富集结果按显著性排序取前 30 个进行展示, 其中主要包括 PI3K-Akt 信号通路、环磷酸鸟苷蛋白激酶通路 [NO-cyclic guanosine monophosphate (cGMP)-protein kinase G (PKG), cGMP-PKG]、晚期糖基化终末产物-糖基化终末产物受体 [the advanced glycation end product (AGE)-receptor of AGE (RAGE)]、表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR)、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) (图 2)。本文采用分子对接方法预测 FMN 与主要靶点的亲和力 (图 3), FMN 和主要靶点 (TNF、NOS3、MTOR、CCND1、CASP3 及 HSP90AA 1) 以及 GPER 构象表现出良好的结合作用, 结合能结果如表 1。

Table 1 Virtual docking of 8 hub targets and GPER of FMN for no reflow targets

Hub target	Binding affinity/ kcal·mol ⁻¹
Nitric oxide synthase 3 (NOS3)	-6.03
Tumor necrosis factor (TNF)	-5.9
Mammalian target of rapamycin (MTOR)	-5.99
Cyclin D1 (CCND1)	-5.69
Prostaglandin-endoperoxide synthase 2 (PTGS2)	-4.83
Caspase-3 (CASP3)	-5.19
Heat shock protein 90 alpha family class A member 1 (HSP90AA1)	-6.44
G protein-coupled estrogen receptors (GPER)	-5.42

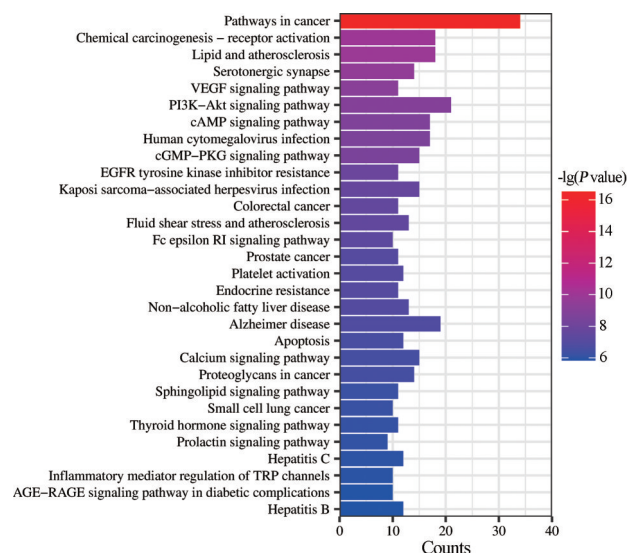


Figure 2 KEGG enrichment analysis of formononetin (FMN) targets in alleviating no-reflow (NR). The horizontal axis of the KEGG diagram represents the gene proportion enriched in each entry, and the color shows the enrichment degree according to the corrected *P* value

3 FMN 的雌激素样活性

采用 CCK-8 实验检测 FMN 对 MCF-7 细胞增殖的影响。如图 4 所示, FMN 显著促进 MCF-7 细胞的生长 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 提示 FMN 具有雌激素样作用。

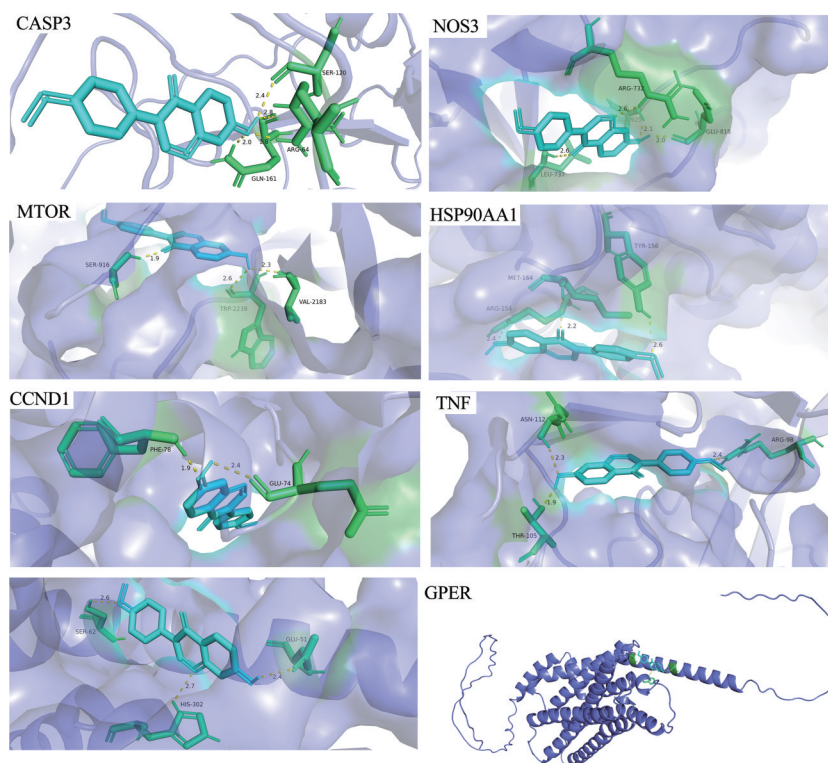


Figure 3 The conformations of FMN and major hub targets

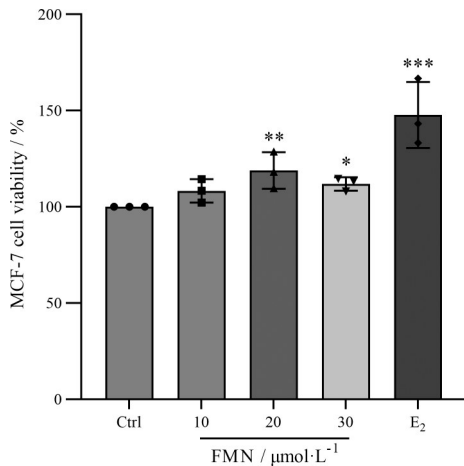


Figure 4 Effects of FMN on proliferation of MCF-7 cell. $n = 3$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Ctrl group. E₂: Estradiol

4 FMN 对 NR 大鼠 NR 心肌面积和缺血心肌面积的影响

为了研究 FMN 是否具有减轻 NR 的作用, 本文采用硫磺素 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。如图 5A 所示, 采用硫磺素 S 染色, 发现 FMN 明显降低心肌无复流面积 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 伊文思蓝/TTC 染色结果显示, FMN 可以显著降低心肌缺血面积 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表明 FMN 具有减轻 NR 的作用。

5 FMN 对 NR 大鼠心肌组织病理损伤的影响

为了进一步观察 FMN 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。NR 组与 Sham 组相比, 心肌细胞紊乱, 核固缩溶解, 肌纤维肿胀, 大量炎性细

胞浸润。然而, 与 NR 组相比, FMN 组和 SNP 组心肌损伤程度明显减轻, 病变面积明显缩小, 水肿明显减轻, 可见少量炎性细胞浸润和间质水肿, 偶见空泡细胞, 心肌细胞较为完整, 心肌组织损伤程度明显改善 (图 5B)。以上结果表明, FMN 对于心肌组织具有较为显著的改善作用。

6 FMN 对 NR 大鼠心脏结构和功能的影响

为了研究 FMN 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 6 所示, 与 Sham 组相比, NR 组 EF、FS、LVOT 峰值和 LVSV 均显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.001$)。与 NR 组相比, FMN 和 SNP 组的 EF、FS 和 LVOT 峰值显著高于 NR 组 ($P < 0.01$)。超声结果显示, FMN 能增加射血分数、左室短轴缩窄率和峰值血流速度, 有增加每搏输出量的趋势, 提示 FMN 有潜在改善心肌缺血再灌注后无复流大鼠心脏结构和功能的作用。

7 FMN 对 NR 大鼠心肌 GPER、p-PI3K、p-Akt 和 p-eNOS 蛋白表达的影响

如图 7 所示, 与 Sham 组相比, NR 组 GPER、p-PI3K、p-Akt 和 p-eNOS 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$), 与 NR 组相比, FMN 治疗组和 SNP 治疗组 GPER、p-PI3K、p-Akt 和 p-eNOS 蛋白表达水平增加 ($P < 0.05$, $P < 0.01$, $P < 0.001$)。这些结果表明, FMN 可以上调 GPER 蛋白的表达, 以激活 PI3K/Akt/eNOS 信号传导。

讨论

NR 是心肌梗死缺血后 PCI 治疗的一个主要临床表现, 由于微循环再灌注不足导致内皮细胞受损, 继发

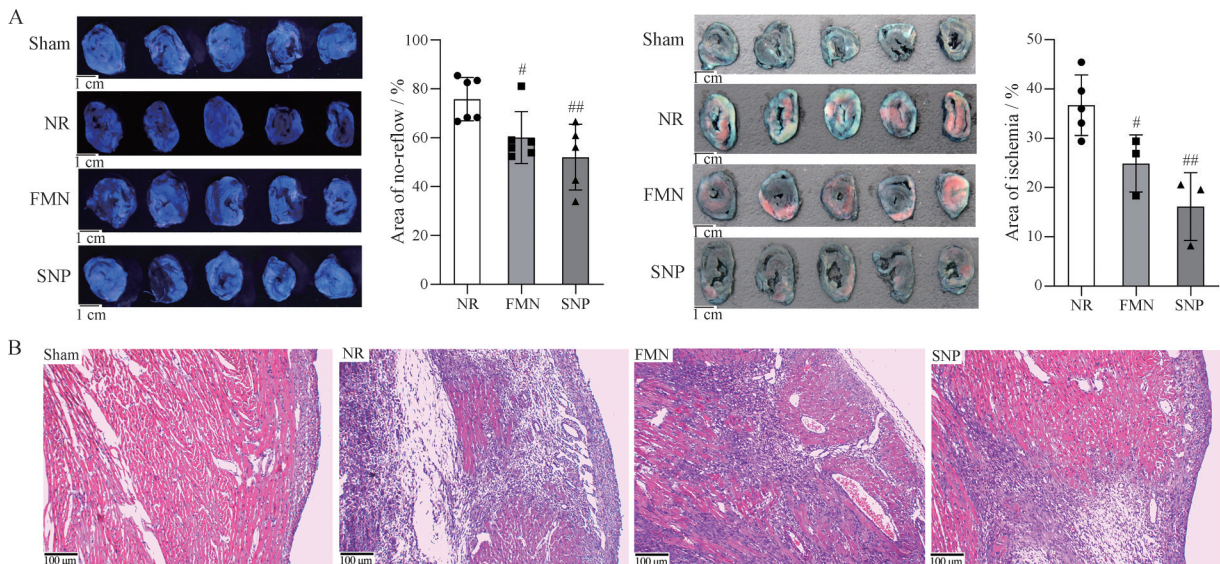


Figure 5 Effects of FMN on NR myocardial area, ischemic myocardial area (A, $n = 5$) and the pathological changes (B, $\times 100$, $n = 3$) in NR rats. $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ vs NR group. SNP: Sodium nitroprusside

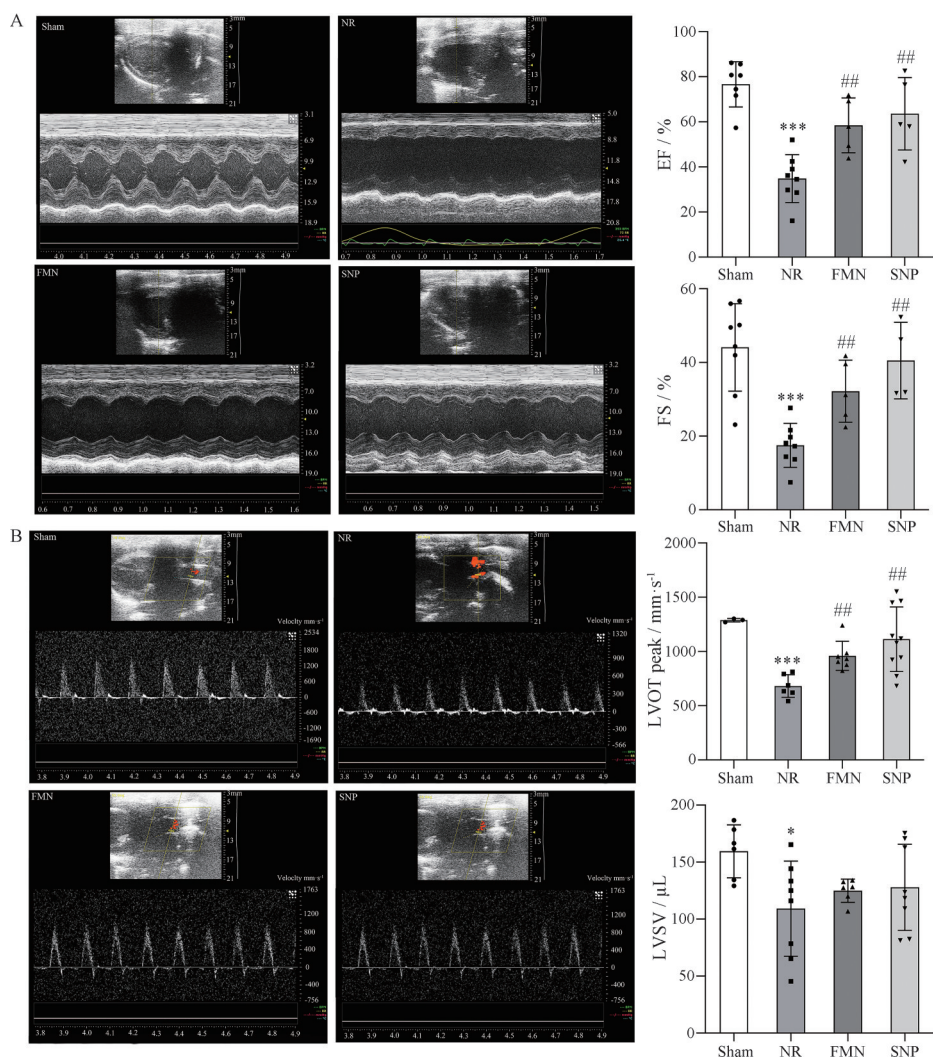


Figure 6 Effect of FMN on the cardiac structure, function (A) and hemodynamics (B) of NR rats. $n = 10$, $\bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, *** $P < 0.001$ vs Sham group; ## $P < 0.01$ vs NR group

性缺血进而导致NR。临床上, NR有4种致病因素: 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^[24]。目前对于NR的改善, 已有药物干预和器械治疗等, 但由于作用环节单一、操作复杂或费用昂贵等不足, 均未能获得理想效果^[25,26]。流行病学和实验研究结果提示, 雌激素具有潜在心血管保护作用, 然而雌激素作为心脏保护剂的使用受到女性致癌作用和男性女性化作用的限制^[27,28]。如果非致癌和非女性化的雌激素样化合物, 如天然植物雌激素(PE), 能够提供心脏保护, 这将为预防心血管疾病提供一种安全的方法。因此, 更多的研究转向作用更为温和的植物雌激素。

FMN是异黄酮家族的植物雌激素成员, 具有抗氧化、抗高血压、抗肿瘤和抗感染等药理作用^[12]。FMN也能够抑制炎症因子的分泌, 对心血管疾病有一定的保护作用, 其作用机制主要与抑制TLR4-NF/κB和

JNK-NF/κB信号通路有关^[29]。FMN还能通过调控线粒体稳态有效地发挥心脏保护作用, 其机制主要通过激活SIRT1通路抑制线粒体氧化应激, 通过抑制RohA通路促进线粒体复合物的活性, 通过与雌激素受体的相互作用维持线粒体稳态, 促进NO产生^[30]。FMN亦可通过促进过氧化物酶体增殖物激活受体γ(PPAR-γ)表达保护血管内皮细胞^[31]。富含FMN的通脉养心丸已被证实具有改善NR的作用^[11], 提示FMN可能具有改善NR的作用。

本研究通过整合药理学分析预测FMN改善NR作用主要与PI3K-Akt信号通路有关。研究报道, GPER介导的PI3K/Akt/eNOS和cAMP/PKA通路在改善心肌缺血再灌后无复流中发挥必不可少的作用^[7,32], 前期研究也发现GPER能激活PI3K/Akt/eNOS和cAMP/PKA途径, 活化eNOS产生NO, 产生舒张血管效应, 从而改善NR^[11,23]。本研究发现, FMN可以促进

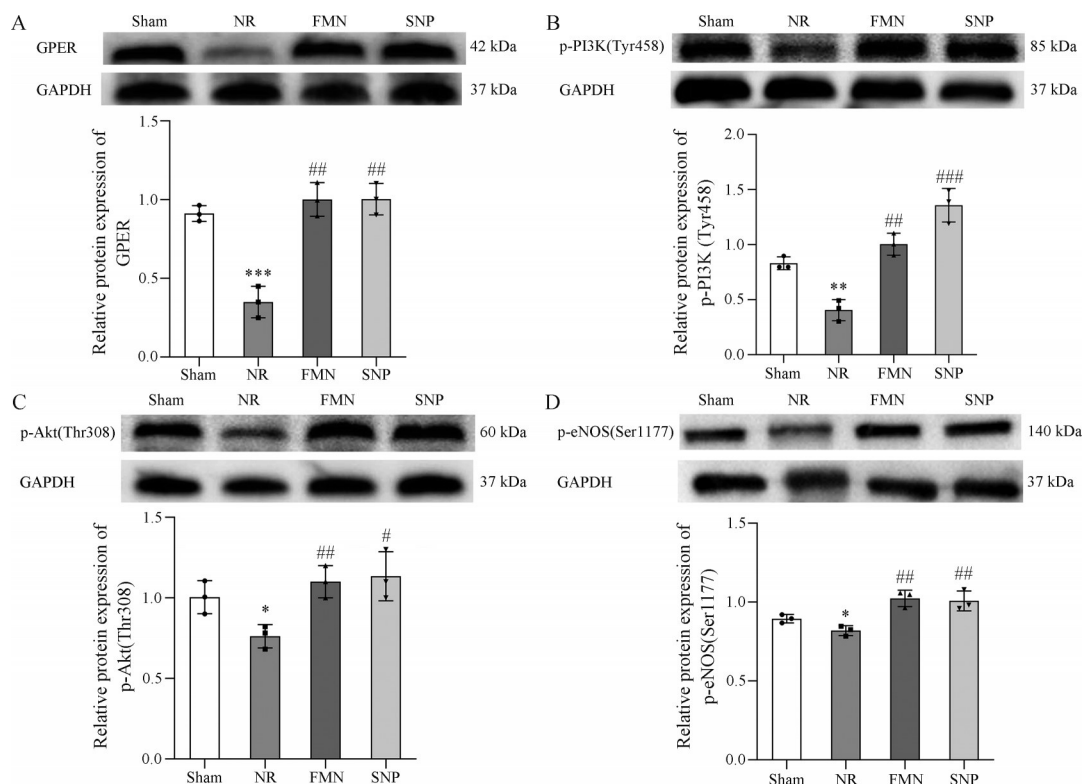


Figure 7 Effect of FMN on the expression of the GPER gene and protein in the myocardial GPER/PI3K/Akt/eNOS pathway of NR rats. $n = 3, \bar{x} \pm s$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$, ### $P < 0.001$ vs NR group

MCF-7细胞的生长,提示FMN具有雌激素样作用。体内实验显示,FMN能减轻NR,其通过增加射血分数、左室短轴缩窄率和峰值血流速度改善心脏结构和功能的作用。炎症反应是心肌缺血/再灌注(myocardial ischemia/reperfusion, I/R)损伤的重要组成部分,已被认为与NR有关^[33]。病理损伤结果表明,FMN能改善炎性细胞浸润和间质水肿情况,心肌损伤程度明显减轻。WB实验证实,FMN促进GPER、p-PI3K、p-Akt和p-eNOS蛋白表达,通过分子对接验证FMN与GPER及eNOS具有良好结合能力,提示FMN可能通过上调GPER激活PI3K/Akt/eNOS信号通路,产生舒张血管效应,从而改善NR。

综上,本研究进行了整合药理学和实验验证,揭示了FMN改善NR的作用及机制。结果证实,FMN具有改善NR的作用,其作用可能是通过上调GPER激活PI3K/Akt/eNOS信号通路来实现的。后期本课题组会运用心肌细胞GPER基因敲除小鼠和缺氧/复氧微血管内皮细胞和心肌细胞模拟体内外NR模型实验进行深入的机制研究。本研究为NR的临床诊断及治疗提供理论依据和实验基础,进一步为中药新药开发探索新的研究模式。

作者贡献: 陈婷提出整体研究思路,负责论文撰写的指导与修改;刘海瑞负责动物实验和体外实验,以及文章书写;

刘海瑞、叶麟晰、林佳美慧、刘倩和彭雅旋负责网络药理学分析。

利益冲突: 所有作者均声明没有利益冲突。

References

- [1] Hillani A, Potter BJ. Intracoronary thrombus and no-reflow: one size to fit all? [J]. *Can J Cardiol*, 2021, 37: 202-205.
- [2] Niccoli G, Burzotta F, Galiuto L, et al. Myocardial no-reflow in humans [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2009, 54: 281-292.
- [3] 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.
- [4] Konijnenberg LSF, Damman P, Duncker DJ, et al. Pathophysiology and diagnosis of coronary microvascular dysfunction in ST-elevation myocardial infarction [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116: 787-805.
- [5] Hausenloy DJ, Chilian W, Crea F, et al. The coronary circulation in acute myocardial ischaemia/reperfusion injury: a target for cardioprotection [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115: 1143-1155.
- [6] Hou Q, Cui W. Research advances in coronary no-reflow phenomenon after ischemia-reperfusion [J]. *Adv Cardiovasc Dis (心血管病学进展)*, 2013, 34: 631-636.
- [7] Hernández-Reséndiz S, Palma-Flores C, De Los Santos S, et al. Reduction of no-reflow and reperfusion injury with the synthetic 17β -aminoestrogen compound prolame is associated with PI3K/

- Akt/eNOS signaling cascade [J]. *Basic Res Cardiol*, 2015, 110: 1.
- [8] Aryan L, Younessi D, Zargari M, et al. The role of estrogen receptors in cardiovascular disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21: 4314.
- [9] Tunc E, Eve AA, Madak-Erdogan Z. Coronary microvascular dysfunction and estrogen receptor signaling [J]. *Trends Endocrin Met*, 2020, 31: 228-238.
- [10] Wang J, Aisa A, Ma HR, et al. GPER: a novel target in treatment of estrogen-related diseases [J]. *J Shanghai Jiao Tong Univ (上海交通大学学报)*, 2013, 33: 225-230.
- [11] 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.
- [12] Ma X, Wang J. Formononetin: a pathway to protect neurons [J]. *Front Integr Neurosci*, 2022, 16: 908378.
- [13] Sun T, Wang J, Huang LH, et al. Antihypertensive effect of formononetin through regulating the expressions of eNOS, 5-HT_{2A/1B} receptors and α 1-adrenoceptors in spontaneously rat arteries [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 699: 241-249.
- [14] Li S, Dang Y, Zhou X, et al. Formononetin promotes angiogenesis through the estrogen receptor alpha-enhanced ROCK pathway [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 16815.
- [15] Wang DS, Yan LY, Yang DZ, et al. Formononetin ameliorates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats by suppressing the ROS-TXNIP-NLRP3 pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2020, 525: 759-766.
- [16] Zhong RX, Ding ZH, Yang YN, et al. Study on the pharmacodynamic material basis and mechanisms of Ju-Hong Tan-Ke liquid for the treatment of "phlegm, cough, and asthma" based on network pharmacology [J]. *Acta Pharm Sin (药学报)*, 2020, 55: 2134-2144.
- [17] Li S. Network pharmacology evaluation method guidance-draft [J]. *World J Tradit Chin Med*, 2021, 7: 46-54, 165-166.
- [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] 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.
- [22] 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.
- [23] 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.
- [24] Jiang X, Wu D, Jiang Z, et al. Protective effect of nicorandil on cardiac microvascular injury: role of mitochondrial integrity [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 4665632.
- [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] Li P, Guo Y, Jin L, et al. ESR1 mediates estrogen-induced feminization of genetic male Chinese soft-shelled turtle [J]. *Biol Reprod*, 2022, 107: 779-789.
- [28] Russo J, Russo IH. The role of estrogen in the initiation of breast cancer [J]. *J Steroid Biochem*, 2006, 102: 89-96.
- [29] Bai Y, Wang HF, Huang HP. Advance on pharmacological action of formononetin [J]. *Drugs Clin (现代药物与临床)*, 2022, 37: 425-432.
- [30] Wang Y, Shou X, Fan Z, et al. A systematic review and meta-analysis of phytoestrogen protects against myocardial ischemia/reperfusion injury: pre-clinical evidence from small animal studies [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 847748.
- [31] Zhang B, Hao Z, Zhou W, et al. Formononetin protects against ox-LDL-induced endothelial dysfunction by activating PPAR- γ signaling based on network pharmacology and experimental validation [J]. *Bioengineered*, 2021, 12: 4887-4898.
- [32] Xia T, Guan W, Fu J, et al. Tirofiban induces vasorelaxation of the coronary artery via an endothelium-dependent NO-cGMP signaling by activating the PI3K/Akt/eNOS pathway [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2016, 474: 599-605.
- [33] Liu B, Wei H, Lan M, et al. MicroRNA-21 mediates the protective effects of salidroside against hypoxia/reoxygenation-induced myocardial oxidative stress and inflammatory response [J]. *Eep Ther Med*, 2020, 19: 1655-1664.