[文章编号] 1671-587X(2026)04-0893-12 DOI:10.13481/j.1671-587X.20260402

# 基于落新妇苷对小鼠心肌梗死的治疗作用及其机制的网络药理学分析和实验验证

郭 杨，崔静蕾，蔡 萌，马莹芳，张云华，王 洋
（石河子大学医学院 新疆地方与民族高发病教育部重点实验室，新疆 石河子 832000）

[摘 要] **目的：**探讨落新妇苷（AST）对心肌梗死（MI）小鼠的治疗作用，并阐明其机制。**方法：**结扎雄性C57BL/6小鼠左前降支动脉（LAD）建立MI模型。将50只小鼠随机分为模型组、低剂量AST组（AST-L组）（12.5 mg·kg$^{-1}$）、高剂量AST组（AST-H组）（50 mg·kg$^{-1}$）、依那普利组（2 mg·kg$^{-1}$）和假手术组（仅开胸不结扎），每组10只。采用超声心动图检测各组小鼠左心室射血分数（LVEF）和左心室短轴缩短率（LVFS）以评估心脏功能，Masson三色染色、小麦胚芽凝集素（WGA）染色和TUNEL染色分别检测各组小鼠MI面积、心肌细胞大小及心肌细胞凋亡情况。体外采用氯化钴（$CoCl_2$）诱导H9C2细胞建立缺氧损伤模型。细胞分为对照组、$CoCl_2$+低剂量AST（AST-L）组、$CoCl_2$+中剂量AST（AST-M）组和$CoCl_2$+高剂量AST（AST-H）组。采用细胞计数试剂盒8（CCK-8）法检测各组细胞存活率，Western blotting法检测各组细胞中凋亡相关蛋白表达水平，免疫荧光法检测各组细胞中活性氧（ROS）水平。结合SwissTargetPrediction和PharmMapper等数据库预测AST及MI相关靶点，构建蛋白-蛋白相互作用（PPI）网络，筛选核心靶点，进行基因本体论（GO）功能富集分析和京都基因与基因组百科全书（KEGG）信号通路富集分析，并通过Autodock软件进行分子对接验证。**结果：**体内实验，与假手术组比较，模型组小鼠LVEF和LVFS均降低（$P<0.001$）；Masson染色，与假手术组比较，模型组小鼠心肌纤维化面积升高（$P<0.01$），心肌细胞横截面积增大（$P<0.05$），心肌细胞TUNEL阳性细胞增多。与模型组比较，AST-L组和AST-H组小鼠LVEF和LVFS均升高（$P<0.05$或$P<0.001$）；小鼠心肌纤维化面积均降低（$P<0.05$或$P<0.001$），心肌细胞横截面积降低（$P<0.001$）。体外实验，与对照组比较，$CoCl_2$组细胞存活率降低（$P<0.01$），细胞中B细胞淋巴瘤2（Bcl-2）表达水平降低（$P<0.01$），Bcl-2相关X蛋白（Bax）和裂解型含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶3（Cleaved-Caspase-3）表达水平升高（$P<0.05$或$P<0.01$），ROS水平升高（$P<0.001$）。与$CoCl_2$组比较，$CoCl_2$+AST-L组、$CoCl_2$+AST-M组和$CoCl_2$+AST-H组细胞中Bax及Cleaved-Caspase-3蛋白表达水平降低（$P<0.05$或$P<0.01$），Bcl-2蛋白表达水平升高（$P<0.05$或$P<0.01$），ROS水平降低（$P<0.001$）。网络药理学分析，AST有357个潜在作用靶点，与MI疾病靶点取交集后按Degree值排序筛选出核心靶点，其中表皮生长因子受体（EGFR）与AST的分子对接分数良好（结合能$<-8.0$ kcal·mol$^{-1}$）。KEGG信号通路富集分析，共同靶点主要富集于磷脂酰肌醇3-激酶（PI3K）/蛋白激酶B（AKT）信号通路和EGFR信号通路等。Western blotting法分析，与对照组比较，$CoCl_2$组细胞中EGFR、磷酸化PI3K（p-PI3K）和磷酸化AKT（p-AKT）蛋白表达水平降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；与$CoCl_2$组比较，$CoCl_2$+AST-H组细胞中EGFR、p-AKT和p-PI3K蛋白表达水平升高（$P<0.01$）。**结论：**AST可通过调控EGFR/PI3K/AKT

[收稿日期] 2025-10-29 [录用日期] 2025-12-23
[基金项目] 国家自然科学基金资助项目（82260126）；新疆生产建设兵团科技厅科技合作计划项目（2022BC006）；石河子大学国际科技合作计划项目（GJHZ2020002）
[作者简介] 郭 杨（1999－），女，河北省邢台市人，在读硕士研究生，主要从事心血管生理和临床方面的研究。
[通信作者] 王 洋，副教授，硕士研究生导师（E-mail：wangyang_shz@foxmail.com）

©《吉林大学学报（医学版）》编辑部，开放获取遵循CC BY-NC-ND协议。
© Editorial Board of Journal of Jilin University（Medicine Edition）. Open access under CC BY-NC-ND license.

信号通路，发挥抗氧化和抗凋亡作用，改善MI小鼠心功能及心肌病理损伤，其机制与调控该信号通路有关。

[关键词] 落新妇苷；心肌梗死；氯化钴；网络药理学；表皮生长因子受体信号通路
[中图分类号] R542.22 [文献标志码] A

# Network pharmacology analysis and experimental verification of therapeutic effect of astilbin on myocardial infarction in mice and its mechanism

GUO Yang, CUI Jinglei, CAI Meng, MA Yingfang, ZHANG Yunhua, WANG Yang
(Key Laboratory of Xinjiang Endemic and Ethnic High-Incidence Diseases, Ministry of Education, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

**ABSTRACT** **Objective**: To discuss the therapeutic effect of astilbin (AST) in the mice with myocardial infarction(MI), and to clarify its mechanism. **Methods**: The MI model was established by ligating the left anterior descending artery(LAD) in the male C57BL/6 mice. A total of 50 mice were randomly divided into model group, low dose of AST group(AST-L group) (12.5 $mg\cdot kg^{-1}$), high dose of AST group (AST-H group) (50 $mg\cdot kg^{-1}$), enalapril group (2 $mg\cdot kg^{-1}$), and sham operation group (only thoracotomy without ligation), and there were 10 mice in each group. Echocardiography was used to detect the left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (LVFS) of the mice in various groups to evaluate cardiac function; Masson trichrome staining, wheat germ agglutinin (WGA) staining and TUNEL staining were used to detect the MI areas, cardiomyocyte sizes and cardiomyocyte apoptosis in the mice in various groups, respectively. *In vitro*, cobalt chloride ($CoCl_2$) was used to induce the H9C2 cells to establish the hypoxia injury model. The cells were divided into control group, $CoCl_2$ group, $CoCl_2$+low dose of AST(AST-L) group, $CoCl_2$+medium dose of AST(AST-M) group, and $CoCl_2$+high dose of AST(AST-H) group. Cell counting kit-8(CCK-8) method was used to detect the survival rates of the cells in various groups; Western blotting method was used to detect the expression levels of apoptosis-related proteins in the cells in various group; immunofluorescence method was used to detect the levels of reactive oxygen species (ROS) in the cells in various groups. In addition, databases including SwissTargetPrediction and PharmMapper were used to predict the targets related to AST and MI; protein-protein interaction (PPI) network was constructed to screen the core targets; Gene Ontology (GO) functional enrichment analysis and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) signaling pathway enrichment analysis were performed; and molecular docking validation was conducted using Autodock software. **Results**: *In vivo*, compared with sham operation group, the LVEF and LVFS of the mice in model group were decreased ($P<0.001$), indicating impaired cardiac function; the Masson staining results showed severe myocardial fibrosis in the mice in model group; the cross sectional area of cardiomyocytes was increased ($P<0.05$), the number of TUNEL staining positive cells was increased. Compared with model group, the LVEF and LVFS of the mice in AST-L group and AST-H group were increased ($P<0.05$ or $P<0.001$); the myocardial fibrosis areas of the mice were decreased ($P<0.05$ or $P<0.001$), and the cardiomyocyte cross-sectional areas were decreased ($P<0.001$). *In vitro*, compared with control group, the survival rate of the cells in $CoCl_2$ group was decreased ($P<0.01$), the expression level of B cell lymphoma 2 (Bcl-2) was decreased ($P<0.01$), while the expression levels of Bcl-2-associated X protein (Bax) and cleaved cysteinyl aspartate-specific proteinase 3(Cleaved-Caspase-3) proteins were increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the ROS level was increased ($P<0.001$). Compared with $CoCl_2$ group, the

expression levels of Bax and Cleaved-Caspase-3 in the cells in $CoCl_2$+AST-L, $CoCl_2$+AST-M and $CoCl_2$+AST-H groups were decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$), the expression levels of Bcl-2 were increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), and the ROS levels were decreased ($P<0.001$). The network pharmacology analysis results showed that AST had 357 potential targets; after intersecting with MI disease targets, core targets were screened by Degree value, among which epidermal growth factor receptor (EGFR) showed good molecular docking score with AST (binding energy $<-8.0$ kcal·mol$^{-1}$). The KEGG pathway enrichment analysis results showed that the common targets were mainly enriched in phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (AKT) signaling pathway and EGFR signaling pathway, etc. The Western blotting results showed that compared with control group, the expression levels of EFGR, phosphorylated PI3K (p-PI3K) and phosphorylated AKT (p-AKT) proteins in the cells in $CoCl_2$ group were decreased ($P<0.05$ or $P<0.01$); compared with $CoCl_2$ group, the expression levels of EGFR, p-AKT, and p-PI3K proteins in the cells in $CoCl_2$+AST-H group were increased ($P<0.01$). **Conclusion**: AST can exert anti-oxidative and anti-apoptotic effects through regulating EGFR/PI3K/AKT signaling pathway, improve cardiac function and myocardial pathological injury in MI mice, and its mechanism is related to regulating this signaling pathway.

**KEYWORDS**　Astilbin; Myocardial infarction; Cobalt chloride; Network pharmacology; Epidermal growth factor receptor signaling pathway

心肌梗死（myocardial infarction，MI）是心血管疾病死亡的主要原因，对临床治疗构成重大挑战[1-2]。MI由心肌缺氧及心肌细胞能量衰竭引发。冠状动脉阻塞会导致心肌缺血，加剧MI的病情[3-4]。MI后心脏重塑随之而来[5]，最终导致慢性心力衰竭[6]。心脏重塑通常发生在几周内，核心特征体现为心肌细胞肥大、细胞死亡现象以及弥漫性间质纤维化的形成[7]。迄今为止，经典的治疗药物有血管紧张素转化酶抑制剂（angiotensin converting enzyme inhibitor，ACEI）、血管紧张素Ⅱ受体阻滞剂（angiotensin Ⅱ receptor blocker，ARB）和血管紧张素受体脑白质溶解素抑制剂（angiotensin receptor-neprilysin inhibitor，ARNI）等[8]。上述药物虽可降低MI后心力衰竭患者的再入院率和心血管死亡率，但部分患者预后仍不佳，凸显了开发新型治疗药物的必要性[9]。天然产物因为其疗效广泛已经被用于多种疾病治疗尤其是心血管疾病。

落新妇苷（astilbin，AST）是黄杞的有效成分，研究[10]证实其具有多种生物学活性。CHEN等[11]研究显示：AST能够借助对转化生长因子β1（transforming growth factor-β1，TGF-β1）与结缔组织生长因子（connective tissue growth factor，CTGF）的调控，实现对前列腺素2（prostaglandin E2，PGE2）及白细胞介素（interleukin，IL）-1的抑制，进而缓解果糖诱导形成的高尿酸血症；可以通过降低活性氧（reactive oxygen species，ROS）水平改善顺铂诱导的肾毒性[11-12]；通过抑制Hedgehog信号通路改善肺纤维化[13]。有研究[14]表明AST改善了脏器的缺血再灌注损伤：AST通过抑制肿瘤坏死因子α（tumor necrosis factor-α，TNF-α）的表达，从而缓解小鼠肝脏血再灌注损伤引发的炎症反应和脂质过氧化损伤；AST通过抑制趋化因子（monocyte chemoattractant protein，MCP）-1和细胞因子IL-6和IL-1β的产生减轻大鼠肾脏的缺血再灌注损伤[15-16]。尽管AST在抗炎、抗氧化和多脏器损伤保护中的作用已被广泛报道，但目前关于其在MI治疗中的直接作用及分子机制尚未见系统研究。

因此，本研究通过体内模型结扎冠状动脉左前降支（left anterior descending，LAD）建立MI模型，体外模型观察氯化钴（cobalt chloride，$CoCl_2$）诱导H9C2大鼠心肌细胞缺氧损伤[16]，系统探讨AST对MI后心功能和心肌病理损伤的改善作用，同时借助网络药理学和分子对接技术探讨AST治疗MI的核心靶点及作用机制，为开发新型抗MI药物提供实验依据与理论支撑，也为天然产物在心血管疾病领域的转化应用拓展新方向。

## 1　材料与方法

**1.1　实验动物、细胞、主要试剂和仪器**　50只雄性6～8周龄C57BL/6小鼠，体质量（22±2）g，清洁级，购自斯贝福生物技术有限公司，动物生产许可证号：SCXK（京）2024-0001。所有小鼠于石

河子大学医学院实验动物中心饲养，饲养环境温度为（25±2）℃，光/暗周期按12 h循环，自由觅食和饮水。本实验所有动物处置均符合动物伦理要求，动物伦理证号：A2025-748。大鼠心肌H9C2细胞系购自上海赛柏慷生物股份有限公司。AST（纯度≥98%，货号：B20812）购自上海源叶生物科技有限公司，马来酸依那普利片（国药准字：H32026576）购自徐州奥萨制药有限公司，细胞计数试剂盒8（cell counting kit-8，CCK-8）溶液购自上海伟寰生物科技有限公司，4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（4′，6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）染液、改良Masson三色染色试剂盒、苯甲基磺酰氟（phenylmethylsulfonyl fluoride，PMSF）及ROS试剂盒购自北京索莱宝科技有限公司，Marker（2083）购自武汉赛维尔生物科技有限公司，小麦胚芽凝集素AlexaFluor594偶联物购自赛默飞世尔科技（中国）有限公司，末端脱氧核苷酸转移酶dUTP缺口末端标记法（terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling，TUNEL）试剂盒、抗裂解型含半胱氨酸的天冬氨酸蛋白酶3（cleaved cysteinyl aspartate-specific proteinase-3，Cleaved-Caspase-3）抗体和抗甘油醛-3-磷酸脱氢酶（anti-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体购自武汉三鹰生物技术有限公司，抗B细胞淋巴瘤2（B-cell lymphoma 2，Bcl-2）抗体、抗Bcl-2相关X蛋白（Bcl-2-associated X protein，Bax）抗体和抗表皮生长因子受体（epidermal growth factor receptor，EGFR）抗体购自英国Abcam公司，抗蛋白激酶B（protein kinase B，AKT）抗体、抗磷脂酰肌醇3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）抗体、抗磷酸化AKT（phosphorylated AKT，p-AKT）抗体和抗磷酸化PI3K（phosphorylated PI3K，p-PI3K）抗体购自上海Abmart公司，兔二抗购自美国Dynabeads公司，鼠二抗购自美国Jackson ImmunoResearch公司。光学显微镜购自日本Olympus公司，Western blotting电泳/电转仪购自美国BD公司，精密电子秤量仪购自德国赛多利斯公司，多功能全波长酶标仪、切片机和石蜡包埋机购自美国赛默飞公司，恒温手术加热垫购自中国DangerousJungle公司，小动物麻醉机购自上海益仁恒业公司，荧光显微镜购自美国尼康公司。

**1.2 实验动物模型制备、分组和处理** 50只6～8周龄雄性C57BL/6小鼠随机分为假手术组（0.9%氯化钠腹腔注射）、模型组（0.9%氯化钠腹腔注射）、低剂量AST组（AST-L组，12.5 mg·kg$^{-1}$ AST腹腔注射）、高剂量AST组（AST-H组，50 mg·kg$^{-1}$ AST腹腔注射）以及依那普利组（2 mg·kg$^{-1}$依那普利灌胃[17]），每组10只。除假手术组外，所有小鼠仰卧位通过面罩吸入4%异氟烷麻醉后，使用2%异氟烷进行维持麻醉，常规脱毛，在左胸上制备10 mm的皮肤切口，打开第3～4肋间间隙，挤出心脏，结扎冠状动脉LAD。假手术组小鼠只穿线不结扎。以心肌组织颜色变白及心电图ST段抬高为造模成功标准。

**1.3 心脏超声检测各组小鼠心功能指标** 术后28 d时，小鼠经异氟烷麻醉后行经胸超声心动图检测，评估左心室功能。采用气体麻醉的方式麻醉小鼠并固定，剃去小鼠前胸壁的毛发，采集胸骨旁长轴四腔心视图，检测左心室射血分数（left ventricular ejection fraction，LVEF）和左心室短轴缩短率（left ventricular fractional shortening，LVFS）。

**1.4 Masson染色检测各组小鼠心肌纤维化情况** 将包埋后的心脏组织切至6 μm厚切片。将切片置于62 ℃烘箱烤片30 min后脱蜡复水，依次按照天青蓝染色3 min、苏木素染色3 min、分化返蓝后品红染色7 min、纯水浸洗后磷钼酸染色10 min、苯胺蓝染色5 min后弱酸冲洗、95%乙醇、无水乙醇、环保脱蜡液处理，中性树胶封片后镜检。采用Image J软件计算心肌组织纤维化面积，以评估纤维化程度。心肌纤维程度＝心肌纤维化面积/心肌组织面积×100%。

**1.5 小麦胚芽凝集素（wheat germ agglutinin，WGA）染色检测各组小鼠心肌肥大程度** 将切片脱蜡复水后放入枸橼酸钠修复液（pH 6.0）中加热修复10 min，放置室温冷却。用PBST冲洗干净后擦干组织周围水分，使用免疫组织化学笔画圈后滴加封闭液（5%牛血清白蛋白）封闭2 h。封闭结束后滴加WGA染液（1∶200），每张切片滴加50 μL，避光于4 ℃冰箱过夜孵育。次日4′，6-二脒基-2-苯基吲哚（4′，6-diamidino-2-phenylindole，DAPI）（1∶200）孵育5 min，滴加抗荧光封片剂后通过荧光显微镜观察。采用Image J软件计算心肌细胞横截面积，以心肌细胞横截面积代表各组小鼠心肌细胞肥大程度。

**1.6　TUNEL染色检测各组小鼠心肌组织中TUNEL阳性细胞率**　将小鼠心脏组织的石蜡切片常规脱蜡复水后用滤纸轻轻擦干组织旁多余液体，使用蛋白酶K通透组织20 min，洗净后使用TUNEL反应液37 ℃避光孵育2 h，去掉反应液于荧光显微镜下镜检，计算TUNEL阳性细胞率。

**1.7　细胞培养和分组**　选用培养25代以内的H9C2细胞，置于37 ℃、5% $CO_2$的培养箱中培养，待细胞生长至80%左右融合时进行传代处理。细胞分为对照组、$CoCl_2$组（25 μmol·$L^{-1}$ $CoCl_2$，24 h）、$CoCl_2$＋低剂量AST组（$CoCl_2$＋AST-L组，25 μmol·$L^{-1}$ $CoCl_2$＋40 μmol·$L^{-1}$ AST，24 h）、$CoCl_2$＋中剂量AST组（$CoCl_2$＋AST-M组，25 μmol·$L^{-1}$ $CoCl_2$＋80 μmol·$L^{-1}$ AST，24 h）和$CoCl_2$＋高剂量AST组（$CoCl_2$＋AST-H组，25 μmol·$L^{-1}$ $CoCl_2$＋160 μmol·$L^{-1}$ AST，24 h）。

**1.8　CCK-8法确定$CoCl_2$缺氧模型最佳造模浓度**　细胞贴壁后弃去培养基，分别加入25、50、100、200、400和800 μmol·$L^{-1}$ $CoCl_2$干预24 h后，使用CCK-8法检测细胞存活率，以确定最佳缺氧浓度。采用酶标仪于波长450 nm处测定各组细胞吸光度（A）值，计算细胞存活率。细胞存活率＝（实验组A值－空白组A值）/（对照组A值－空白组A值）×100%。以细胞存活率接近50%的$CoCl_2$浓度为最佳造模浓度。

**1.9　CCK-8法检测各组H9C2细胞存活率**　细胞生长至对数生长期后，使用完全培养基重悬细胞接种于96孔细胞培养板中，每孔5 000个细胞（100 μL）。细胞贴壁后弃去完全培养基，分别加入10、20、40、80和160 μmol·$L^{-1}$AST干预24 h，或者先加入$CoCl_2$（25 μmol·$L^{-1}$）预干预24 h后，再加入40、80和160 μmol·$L^{-1}$ AST溶液孵育24 h，采用酶标仪于波长450 nm处测定各组细胞A值，计算细胞存活率。细胞存活率＝（实验组A值－空白组A值）/（对照组A值－空白组A值）×100%。

**1.10　Western blotting法检测各组细胞中目的蛋白表达水平**　各组细胞培养结束后，于冰上弃去培养基，使用预冷的磷酸盐缓冲液（phosphate-buffered saline，PBS）缓冲液轻轻冲洗细胞2次。配置好裂解液于冰上裂解细胞15 min后进行超声，随后离心，小心取出上清液。二辛可宁酸（bicinchoninic acid，BCA）法配平蛋白后，用蛋白上样缓冲液处理样品。取20 μg蛋白等量上样，行10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis，SDS-PAGE），电转至聚偏二氟乙烯（polyvinylidene fluoride，PVDF）膜上，5%脱脂奶粉室温封闭2 h。一抗（Bax 1∶2 000、Bcl-2 1∶2 000、EGFR 1∶2 000等）4 ℃摇床孵育过夜。含辣根过氧化物酶标记的二抗（1∶100 000）室温孵育2 h，洗膜3次后加入显影液曝光。采用Image J软件检测蛋白条带灰度值，计算目的蛋白表达水平。目的蛋白表达水平＝目的蛋白条带灰度值/GAPDH条带灰度值。

**1.11　试剂盒检测各组H9C2细胞中ROS水平**　各组细胞经过不同处理结束后，弃去培养基，按照1∶8 000稀释DCFH-DA，孵育0.5 h后于荧光显微镜下观察。采用Image J软件计算平均荧光强度，以平均荧光强度代表各组H9C2细胞中ROS水平。

**1.12　AST和MI韦恩图的构建**　首先从有机小分子生物活性数据库（PubChem）（https：//pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）中获取AST的相关结构信息；以此为基础，采用瑞士靶点预测数据库（SwissTargetPrediction，SWISS）（http：//www.swisstargetprediction.ch/）和药效团匹配药物靶标预测平台（PharmMapper Server，PharmMapper）（https：//www.lilab-ecust.cn/）数据库获取AST的靶点。以“myocardial infarction”为关键词，运用DisGeNET（https：//www.disgenet.org/）、GeneCards（https：//www.genecards.org/）和人类孟德尔遗传联机系统（Online Mendelian Inheritance in Man，OMIM）（http：//www.omim.org/）数据库获取MI的靶点。将AST的靶点和MI的靶点进行匹配，取得交集，绘制韦恩图。

**1.13　AST治疗MI的蛋白质-蛋白质互相作用（protein-protein interaction，PPI）网络的构建**　将AST与MI的匹配靶点上传STRING数据库，将蛋白种属设置为“*Homo sapiens*”，隐藏游离节点，构建PPI网络图。将结果导入Cytoscape 3.9.1软件，按照Degree值筛选核心靶点。

**1.14　基因本体论（Gene Ontology，GO）功能富集分析和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）信号通路富集分析**　采用GO功能富集分析描述基因功能，通过KEGG信号通路富集分析获得显著富集的信号通路并绘制通路图，探讨AST治疗MI的生

物学过程及信号通路。

**1.15　AST与关键靶点的分子对接**　将AST与筛选出的关键靶点进行分子对接。从PubChem网站获取AST 3D结构文件，从蛋白质数据库中选择蛋白结构。使用Open Babel软件将sdf文件转为mol2文件，获得受体和配体文件。使用PyMOL软件对蛋白质受体进行去除水分子、离子和小分子配体处理。将AST和蛋白质的pdb文件存入工作目录。将蛋白质结构导入AutoDock软件加氢，受体格式转换保存为pdbqt文件。确定活性口袋并调整数值大小使整个盒子包裹蛋白分子。打开PyMOL导入文件进行图片绘制。检测AST与关键靶点的结合模式及亲和性。结合能越低，化合物与蛋白结合能力和稳定性越好。

**1.16　统计学分析**　采用GraphPad Prism 9.0统计软件进行统计学分析。各组小鼠心功能指标、心肌组织纤维化面积、心肌细胞横截面积、细胞存活率、细胞中目的蛋白表达水平及ROS水平均符合正态分布，以$\bar{x}\pm s$表示，多组间样本均数比较采用单因素方差分析，组间样本均数两两比较采用LSD-$t$检验。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

## 2　结　果

**2.1　各组小鼠心功能**　造模28 d后，超声心动图检测结果显示：与假手术组比较，模型组小鼠LVEF和LVFS均降低（$P<0.001$），表明MI小鼠心功能受损。与模型组比较，AST-L组、AST-H组和依那普利组小鼠LVEF及LVFS均升高（$P<0.05$或$P<0.001$）。见表1。

**表1　各组小鼠超声心动图结果**

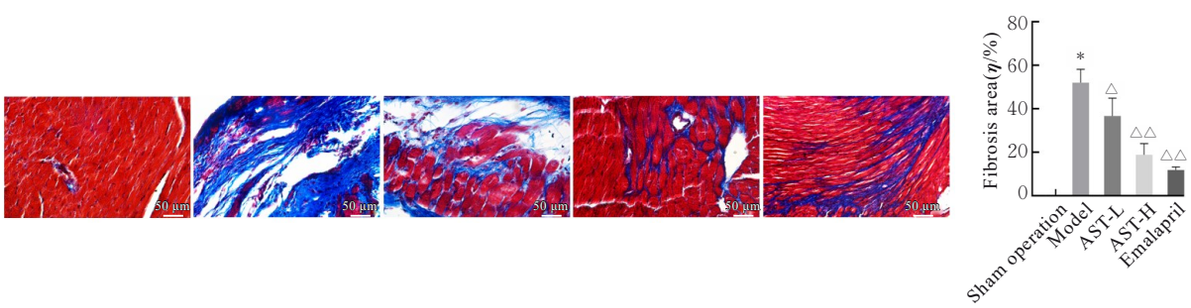
**Tab. 1　Echocardiographic results of mice in various groups**

（$n=6$，$\bar{x}\pm s$，$\eta$/%）

| Group | LVEF | LVFS |
|---|---|---|
| Sham operation | 64.33±3.32 | 35.92±3.25 |
| Model | 26.67±6.21* | 12.70±3.05* |
| AST-L | 36.17±3.43△ | 17.62±1.87△ |
| AST-H | 43.33±6.98△△ | 21.23±3.22△△ |
| Enalapril | 46.00±4.43△△ | 23.06±2.36△△ |

*$P<0.001$ *vs* sham operation group；△$P<0.05$，△△$P<0.001$ *vs* model group.

**2.2　Masson染色检测各组小鼠心脏纤维化面积**　Masson染色结果显示：与假手术组比较，模型组小鼠心肌纤维化面积升高（$P<0.001$），梗死区域形成大片亮蓝色胶原瘢痕组织取代原有心肌结构。与模型组比较，AST-L组小鼠、AST-H组和依那普利组小鼠纤维化面积降低（$P<0.05$或$P<0.001$）；且AST-L组和AST-H组小鼠心肌纤维化面积与依那普利组比较差异无统计学意义（$P>0.05$）。见图1。



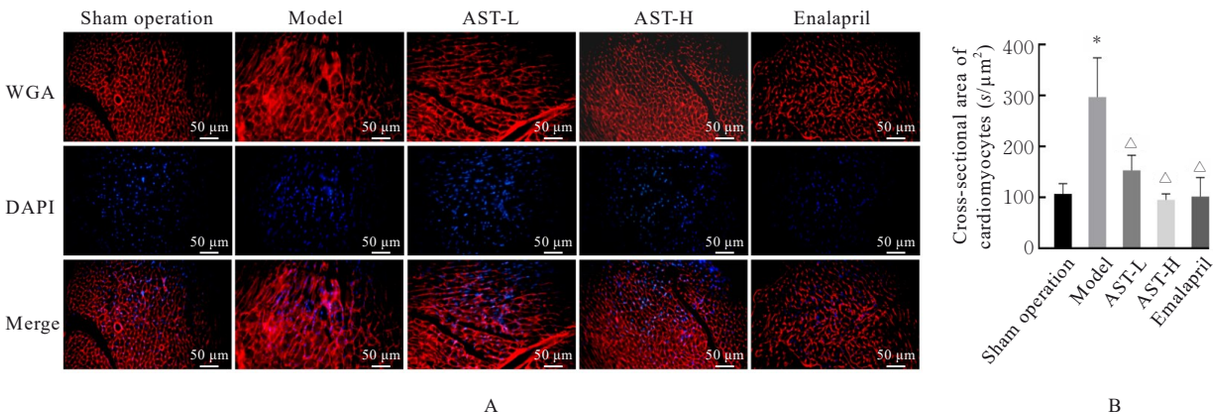

A：Sham operation group；B：Model group；C：AST-L group；D：AST-H group；E：Enalaprilat group；A－E：×400；F：Histogram.
*$P<0.001$ *vs* sham operation group；△$P<0.05$，△△$P<0.001$ *vs* model group.

**图1　各组小鼠心肌组织Masson染色结果和心肌纤维化面积**

**Fig. 1　Masson staining results of myocardium tissue and myocardial fibrosis areas of mice in various groups**

**2.3　WGA染色检测各组小鼠心肌肥大程度**　与假手术组比较，模型组小鼠心肌细胞横截面积增大（$P<0.001$）。与模型组比较，AST-L和AST-H组小鼠心肌细胞横截面积均降低（$P<0.001$）。见图2。

**2.4　TUNEL染色检测各组小鼠心肌细胞凋亡情况**　TUNEL染色结果显示：与假手术组比较，模型组小鼠心肌细胞中TUNEL阳性细胞数增多。与模型组比较，AST-L和AST-H组TUWEL阳性细胞数减少，凋亡水平改善。见图3。




*$P$<0.001 *vs* sham operation group；△△$P$<0.001 *vs* model group

**图2　各组小鼠心组织WGA染色结果(A)和心肌细胞横截面积(B)**

Fig. 2　Results of WGA staining of myocardial tissue (A) and cross-sectional area of cardiomyocytes (B) of mice in various groups

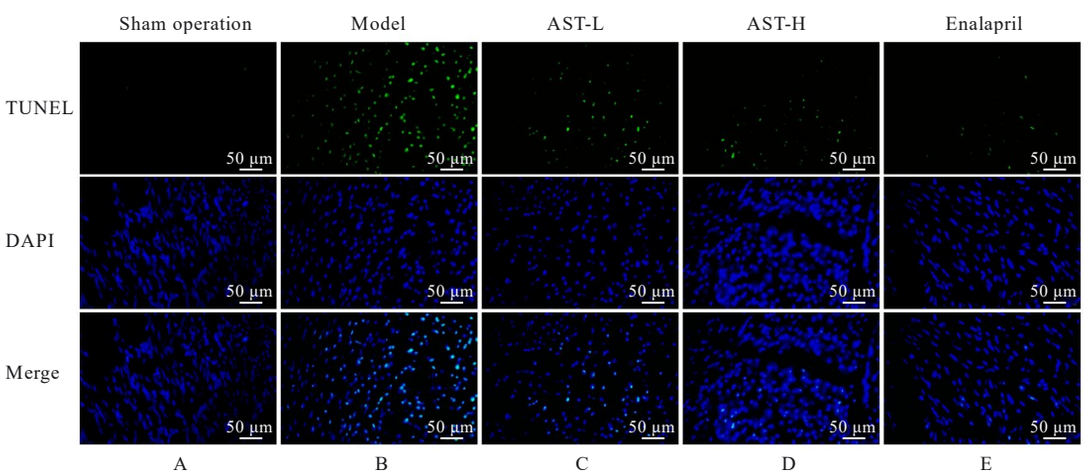



**图3　各组小鼠心肌细胞TUNEL染色结果**

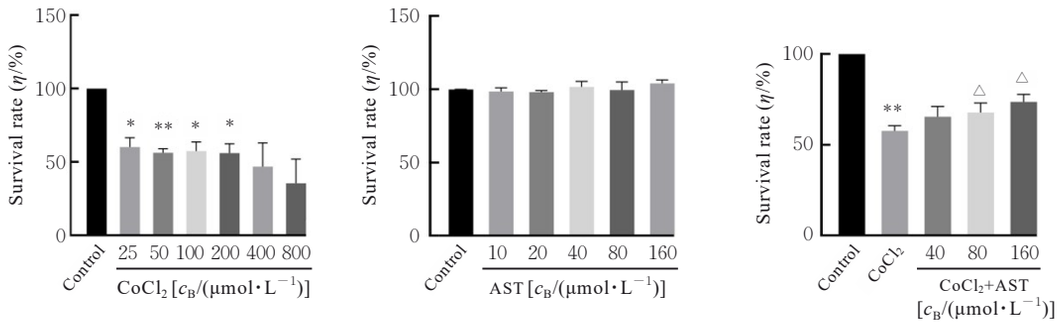
Fig. 3　TUNEL staining results of cardiomyocytes of mice in various groups

**2.5　各组H9C2细胞存活率**　CCK-8法检测结果显示：不同浓度$CoCl_2$干预H9C2细胞24 h后，25 μmol·L$^{-1}$ $CoCl_2$组细胞存活率接近50%（图4A），因此选择25 μmol·L$^{-1}$ $CoCl_2$干预24 h作为后续体外缺氧模型的建立条件。AST干预H9C2细胞24 h后，细胞存活率与对照组比较差异无统计学意义（$P$>0.05）（图4B）。与$CoCl_2$组比较，$CoCl_2$+AST-M和$CoCl_2$+AST-H组细胞存活率明显升高（$P$<0.05），且呈浓度依赖性（图4C）。

**2.6　各组H9C2细胞中凋亡相关蛋白表达水平**　与对照组比较，$CoCl_2$组H9C2细胞中Cleaved-Caspase-3和Bax蛋白表达水平升高（$P$<0.05或$P$<0.01），Bcl-2蛋白表达水平降低（$P$<0.05）。与$CoCl_2$组比较，$CoCl_2$+AST-L组、$CoCl_2$+AST-M组和$CoCl_2$+AST-H组细胞中Cleaved-Caspase-3和Bax蛋白表达水平降低（$P$<0.05或$P$<0.01），Bcl-2蛋白表达水平升高（$P$<0.05或$P$<0.01）。见图5。

**2.7　各组H9C2细胞中ROS水平**　与对照组比较，$CoCl_2$组细胞中ROS水平升高（$P$<0.001）；与$CoCl_2$组比较，$CoCl_2$+AST-L组、$CoCl_2$+AST-M组和$CoCl_2$+AST-H组细胞中ROS水平降低（$P$<0.001）。见图6。

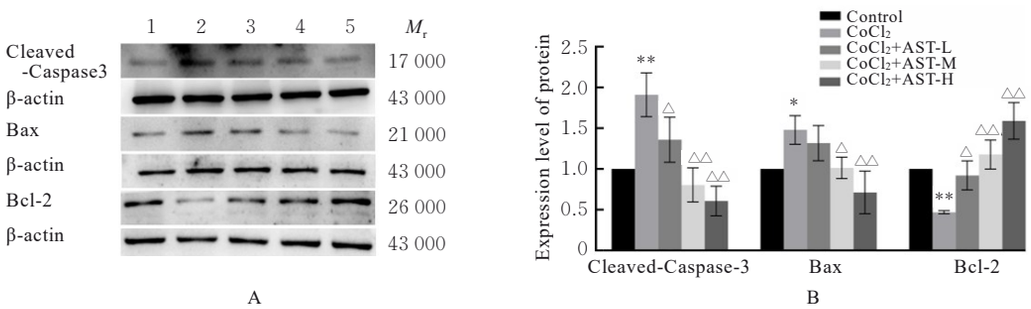
**2.8　AST与MI靶点的韦恩图**　首先从PubChem中获取AST的相关结构信息，以此为基础，用SWISS数据库获取AST的靶点，汇总去重后最终获取357个靶点。以“Myocardial Infarction”为关键词，运用Disgenet、OMIM数据库获取MI的靶点共计5 591个。将AST的靶点和MI的靶点进行匹配，取得交集靶点220个，绘制韦恩图。见图7。




A：Survival rates of H9C2 cells after treated with different concentrations of $CoCl_2$；B：Survival rates of H9C2 cells after treated with different concentrations of AST；C：Survival rates of H9C2 cells in various groups. $^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$ *vs* control group；$^{\triangle}P<0.05$ *vs* $CoCl_2$ group.

**图4 CCK-8法检测各组H9C2细胞存活率**

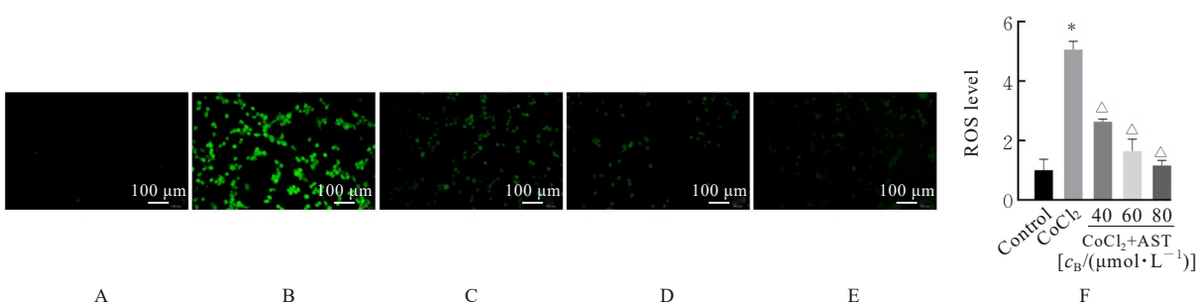
**Fig. 4 Survival rates of H9C2 cells in various groups detected by CCK-8 method**




Lane 1：Control group；Lane 2：$CoCl_2$ group；Lane 3：$CoCl_2$+AST-L group；Lane 4：$CoCl_2$+AST-M group；Lane 5：$CoCl_2$+AST-H group. $^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$ *vs* control group；$^{\triangle}P<0.05$，$^{\triangle\triangle}P<0.01$ *vs* $CoCl_2$ group.

**图5 各组H9C2细胞凋亡相关蛋白表达电泳图(A)及直条图(B)**

**Fig. 5 Electropherogram (A) and histogram (B) of expressions of apoptosis-related proteins in H9C2 cells in various groups**




A：Control group；B：$CoCl_2$ group；C：$CoCl_2$+AST-L group；D：$CoCl_2$+AST-M group；E：$CoCl_2$+AST-H group. F：Histogram. $^{*}P<0.001$ *vs* control group；$^{\triangle}P<0.001$ *vs* $CoCl_2$ group.

**图6 各组H9C2细胞中ROS水平**

**Fig. 6 ROS levels of H9C2 cells in various groups**

**2.9 AST与MI靶点的网络图** 将AST与MI的220个共同靶点输入进STRING数据库进行分析，得到不同靶点之间相互作用的网络图（图8A）。再将STRING得到的数据输入到Cytoscape 3.9.1软件进行分析，按照Degree值降序排序，由外向内，由小到大提示degree值越来越大。以此来确定其核心靶点，前几位的靶点分别是ALB、TNF、AKT1和EGFR（图8B）。

**2.10 AST与MI靶点的富集分析** GO功能富集和KEGG信号通路富集分析结果表明：AST治疗

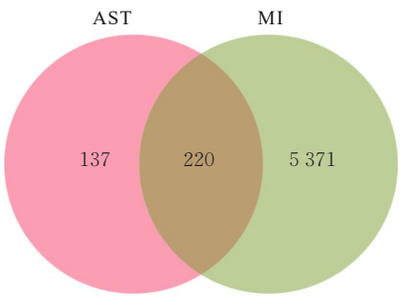



**图7　AST和MI相关靶点的韦恩图**

Fig. 7　Venn diagram of AST and MI-related targets

MI可能涉及蛋白磷酸化调节、EGFR和PI3K-AKT信号通路等。这些通路共同作用于细胞凋亡和氧化应激。见图9。

**2.11　AST与EGFR的分子对接**　将核心靶点与AST进行对接。一般认为结合能小于－5.0 kcal·mol$^{-1}$具有良好的结合力，EGFR结合能为－8.0 kcal·mol$^{-1}$显示二者具有良好的结合力。见图10。

**2.12　各组H9C2细胞中EGFR、PI3K、AKT、p-PI3K和p-AKT蛋白表达水平**　与对照组比较，$CoCl_2$组H9C2细胞中EGFR、p-AKT和p-PI3K蛋

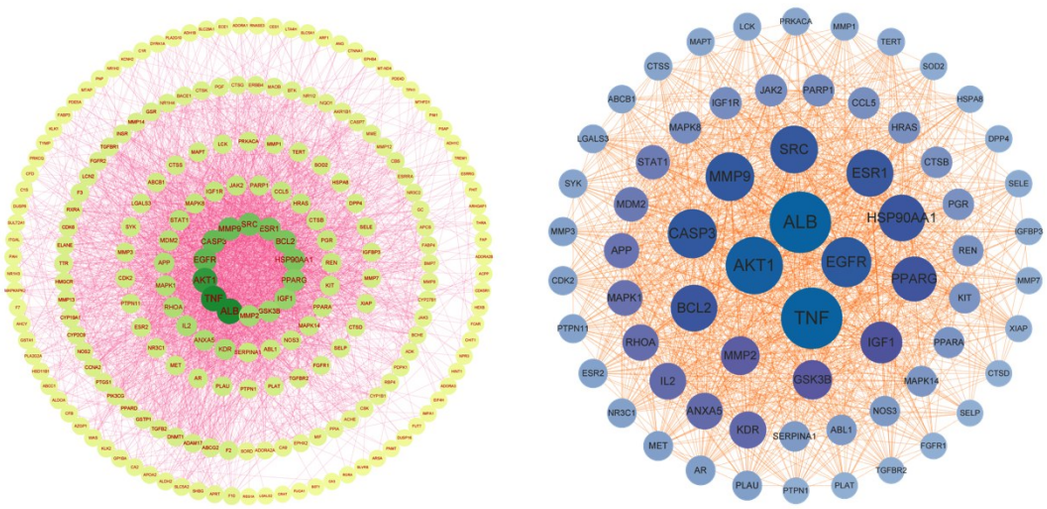



**图8　PPI网络图(A)和核心靶点(B)**

Fig. 8　PPI network diagram (A) and core targets (B)

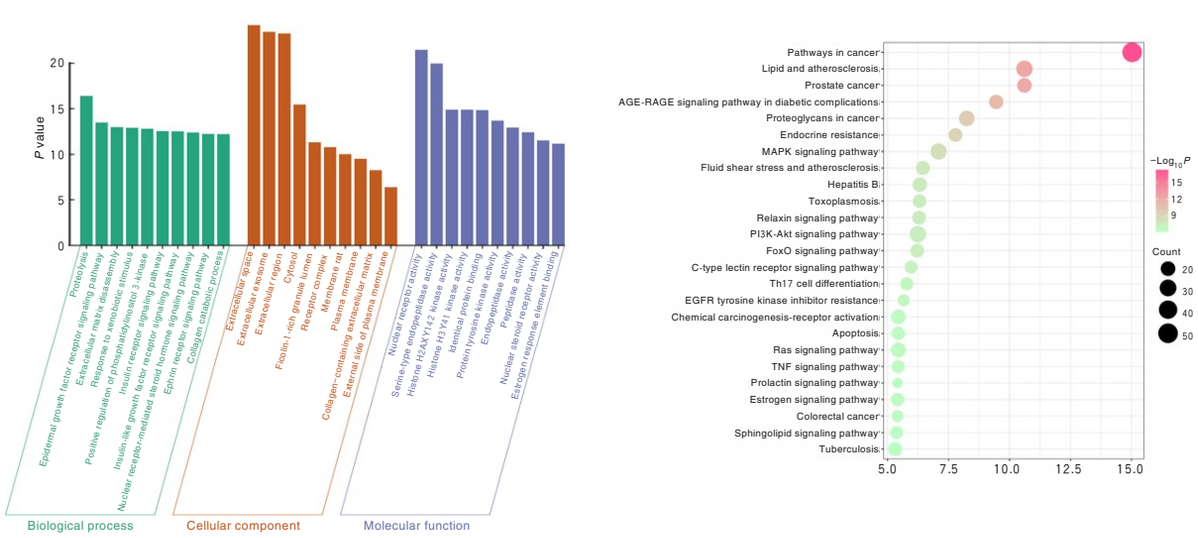



**图9　GO功能富集分析(A)和KEGG信号通路富集分析(B)**

Fig. 9　GO functional enrichment analysis (A) and KEGG signaling pathway enrichment analysis (B)

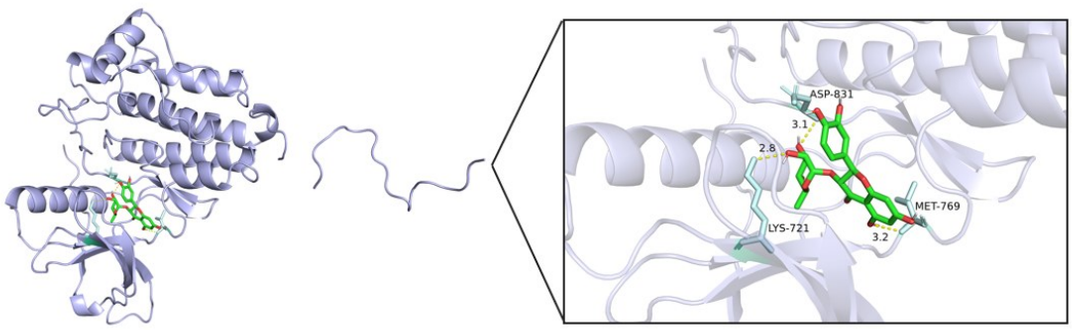
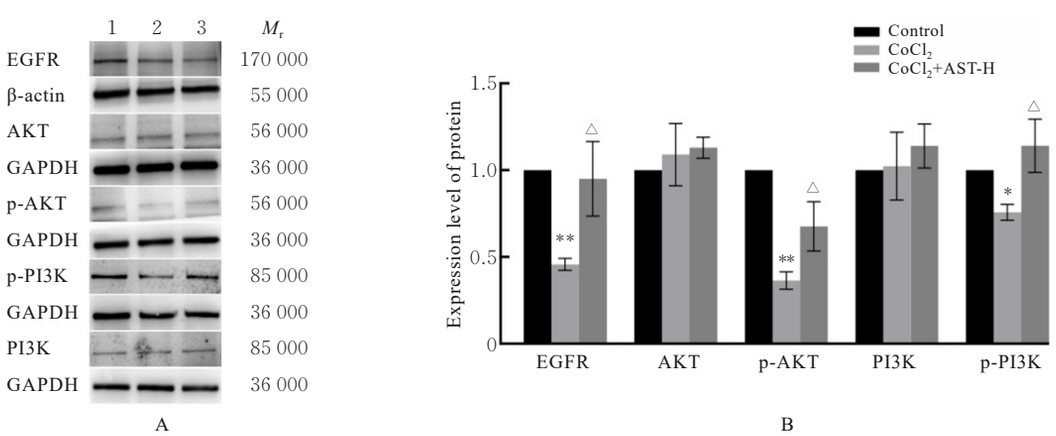



**图 10　AST-EGFR 分子对接可视化**

Fig. 10　Visualization of AST-EGFR molecular docking

白表达水平降低（$P<0.05$ 或 $P<0.01$）；与 $CoCl_2$ 组比较，$CoCl_2$+AST-H 组细胞中 EGFR、p-AKT 和 p-PI3K 蛋白表达水平升高（$P<0.01$）。见图 11。




Lane 1: Control group; Lane 2: $CoCl_2$ group; Lane 3: $CoCl_2$+AST-H group. $^*P<0.05$, $^{**}P<0.01$ *vs* control group; $^\triangle P<0.01$ *vs* $CoCl_2$ group.

**图 11　各组 H9C2 细胞中 EGFR 和 PI3K/AKT 信号通路相关蛋白表达电泳图（A）和直条图（B）**

Fig. 11　Electropherogram (A) and histogram (B) of expressions of EGFR and PI3K/AKT signaling pathway related proteins in H9C2 cells in various groups

## 3　讨　论

从传统中医药理论来看，MI 的发生与“心脉痹阻、气血亏虚”密切相关。心主血脉，若机体长期受情志失调、饮食不节和劳逸失度等因素影响，易致气血运行不畅，瘀血内生，痹阻心脉，引发心肌缺血坏死[17]；同时，心气虚损则推动血液运行无力，进一步加重瘀血沉积，形成“气虚血瘀”的病理循环，最终导致心功能受损，增加 MI 发病风险[18]。AST 是传统中药黄芪的活性成分[19-21]。黄芪本身具有清热止痛、行气导滞之效，可通过“行气活血”疏通瘀阻的心脉，“清热”缓解心脉瘀滞引发的局部热象[22-23]，而 AST 作为其发挥药效的物质基础，推测其可继承黄芪“通脉护心”的作用特性，为 MI 后心室重构的干预提供了传统医药理论依据。不过，目前关于 AST 调控 MI 后心室重构的具体作用机制、核心作用靶点及相关信号通路尚未明确，难以支撑其临床精准应用，因此本研究通过体内动物实验、体外细胞实验与网络药理学相结合的方式，系统探讨 AST 抑制 MI 后心室病理性重构的作用效果、分子机制及物质基础，为其临床转化提供科学依据。

网络药理学研究结果表明：从 PubChem 获取 AST 的结构信息后，经数据库筛选，共得到 357 个 AST 潜在作用靶点；以“myocardial infarction”为关键词，通过数据库收集 MI 相关靶点 5 591 个，两者交集获得 220 个共同作用靶点。将共同靶点导入

STRING构建PPI网络，经Cytoscape分析发现：TNF、AKT1、ALB和EGFR等为AST抑制MI核心靶点。这些靶点多参与“蛋白磷酸化”等生物学过程，细胞组分集中在“细胞膜”，分子功能以“丝氨酸型内肽酶”等为主；其主要富集在EGFR信号通路和PI3K/AKT信号通路等与心肌重构关联紧密的通路中。其中EGFR信号通路可调控心肌纤维化相关因子表达，PI3K/AKT信号通路影响心肌细胞存活，两者共同构成AST发挥作用的核心通路网络。分子对接结果进一步验证：AST与EGFR、ALB和TNF等核心靶点具有良好的结合能力，结合能较低，为AST通过“多靶点-多通路”协同发挥抗MI作用提供了结构基础。

动物实验通过结扎小鼠冠状动脉LAD建立MI模型，评价AST治疗MI药效，并对网络药理学预测结果进行验证。该模型通过结扎冠状动脉造成心肌缺血坏死，能够模拟MI后出现的心肌纤维化、心肌细胞肥大及凋亡等病理改变，且模型稳定性高、重复性好，是研究MI的经典动物模型。造模后，模型组小鼠出现心功能下降，超声心动图检测显示小鼠LVEF和LVFS降低；Masson染色可见梗死区域大量胶原纤维沉积，心肌纤维化程度严重；WGA染色显示心肌细胞横截面积增大，心肌肥大；TUNEL染色发现小鼠心肌组织中凋亡细胞数量增多。经AST干预28 d后，上述病理改变均得到改善：AST-L组小鼠LVEF和LVFS升高，心肌纤维化程度、心肌细胞肥大及凋亡水平有所缓解；AST-H组小鼠上述改善效果更为明显，且LVEF和LVFS等心功能指标与依那普利组比较差异无统计学意义，提示AST在改善MI后心功能、抑制MI方面具有与经典药物相当的潜力。同时，AST-H对小鼠心肌纤维化、心肌细胞肥大及凋亡的抑制效果也与依那普利组相近，进一步证实了AST的抗MI作用。

体外实验采用$CoCl_2$诱导H9C2大鼠心肌细胞建立缺氧模型，模拟MI后心肌细胞的缺氧微环境，深入探讨AST的作用机制。通过CCK-8法筛选出25 μmol·$L^{-1}$ $CoCl_2$干预24 h为最佳造模条件，此时细胞存活率约为50%，能有效模拟心肌缺氧损伤状态。造模后，模型组细胞活性降低，Western blotting检测显示：与对照组比较，$CoCl_2$组细胞中促凋亡蛋白Bax、Cleaved-Caspase-3表达水平升高，抗凋亡蛋白Bcl-2表达水平降低，ROS水平升高，氧化应激水平升高。经不同浓度AST干预后，细胞活性呈浓度依赖性升高，细胞中Bax和Cleaved-Caspase-3蛋白表达水平随AST浓度增加逐渐降低，Bcl-2表达水平逐渐升高；ROS水平也随AST浓度增加减少，氧化应激水平降低；EGFR、p-AKT及p-PI3K蛋白水平在干预后上调。上述结果与网络药理学预测的“AST通过调控细胞凋亡、氧化应激相关靶点及通路发挥作用”相印证，表明AST可通过抑制心肌细胞缺氧凋亡、减轻氧化应激损伤，改善心肌细胞功能，进而抑制MI。

综上所述，AST能够抑制MI小鼠梗死后心室病理性重构，改善心功能，其作用与其调控EGFR等核心靶点、干预PI3K/AKT信号通路，进而抑制炎症反应、减轻氧化应激、减少心肌细胞凋亡及抑制心肌纤维化密切相关。本研究初步阐明了AST抑制MI后心室病理性重构的作用机制和物质基础，为其临床应用提供了理论支撑，但AST调控体内代谢过程及长期用药安全性等仍需进一步研究，后续可结合基因编辑技术及药代动力学实验等深入探讨，为AST的临床转化奠定更坚实的基础。

**利益冲突声明：**

所有作者声明不存在利益冲突。

**作者贡献说明：**

郭杨参与实验设计、实验操作和论文撰写，崔静蕾、蔡萌和马莹芳参与查阅文献及数据分析，张云华和王洋参与实验可行性分析及论文审阅。

## [参考文献]

[1] VADUGANATHAN M, MENSAH G A, TURCO J V, et al. The global burden of cardiovascular diseases and risk: a compass for future health[J]. J Am Coll Cardiol, 2022, 80(25): 2361-2371.

[2] WRITING GROUP MEMBERS, MOZAFFARIAN D, BENJAMIN E J, et al. Executive summary: heart disease and stroke statistics: 2016 update: a report from the American heart association[J]. Circulation, 2016, 133(4): 447-454.

[3] GUO H H, QU Q, LV J C. Serum nitric oxide, endothelin-1 correlates post-procedural major adverse cardiovascular events among patients with acute STEMI[J]. Arq Bras Cardiol, 2025, 122(1): e20240248.

[4] ZHAO W, LI J, CHEN H W, et al. Efficacy and safety of traditional Chinese medicine injections in the treatment of acute myocardial infarction: a protocol for systematic

review and network meta-analysis[J]. Medicine, 2020, 99(32): e21590.

[5] VIOLA M, DE JAGER S C A, SLUIJTER J P G. Targeting inflammation after myocardial infarction: a therapeutic opportunity for extracellular vesicles?[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(15): 7831.

[6] XIE Y F, LIU J D, QIAN L. Direct cardiac reprogramming comes of age: Recent advance and remaining challenges[J]. Semin Cell Dev Biol, 2022, 122: 37-43.

[7] YALTA K, YILMAZ M B, YALTA T, et al. Late versus early myocardial remodeling after acute myocardial infarction: a comparative review on mechanistic insights and clinical implications[J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2020, 25(1): 15-26.

[8] TRIMARCHI G, TERESI L, LICORDARI R, et al. Transient left ventricular dysfunction from cardiomyopathies to myocardial viability: when and why cardiac function recovers[J]. Biomedicines, 2024, 12(5): 1051.

[9] HARRINGTON J, PETRIE M C, ANKER S D, et al. Evaluating the application of chronic heart failure therapies and developing treatments in individuals with recent myocardial infarction: a review [J]. JAMA Cardiol, 2022, 7(10): 1067-1075.

[10] HUANG H Q, CHENG Z H, SHI H M, et al. Isolation and characterization of two flavonoids, engeletin and astilbin, from the leaves of Engelhardia roxburghiana and their potential anti-inflammatory properties[J]. J Agric Food Chem, 2011, 59(9): 4562-4569.

[11] WANG S W, XU Y, WENG Y Y, et al. Astilbin ameliorates cisplatin-induced nephrotoxicity through reducing oxidative stress and inflammation [J]. Food Chem Toxicol, 2018, 114: 227-236.

[12] CHEN L Y, LAN Z, ZHOU Y Q, et al. Astilbin attenuates hyperuricemia and ameliorates nephropathy in fructose-induced hyperuricemic rats [J]. Planta Med, 2011, 77(16): 1769-1773.

[13] ZHANG J, LIU H C, SONG C G, et al. Astilbin ameliorates pulmonary fibrosis *via* blockade of Hedgehog signaling pathway[J]. Pulm Pharmacol Ther, 2018, 50: 19-27.

[14] 慕 宁, 江 艺, 张绍庚, 等. 落新妇甙对肝缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 中国组织工程研究与临床康复, 2011, 15(5): 865-869.

[15] 谷慧敏, 孟庆良, 苗喜云, 等. 降尿酸茶对高尿酸血症大鼠的保护作用[J]. 郑州大学学报(医学版), 2025, 60(6): 792-796.

[16] GAO A R, LI S, TAN X C, et al. Xinyang Tablet attenuates chronic hypoxia-induced right ventricular remodeling *via* inhibiting cardiomyocytes apoptosis[J]. Chin Med, 2022, 17(1): 134.

[17] AO C, HU S, ZHAN L. Exercise rehabilitation based on medical care-family integration in older patients with chronic heart failure and psychological problems [J]. World J Psychiatry, 2025, 15(6): 105855.

[18] ZHANG Z Y, XU Z, WANG S, et al. Optimized New Shengmai Powder modulation of cAMP/Rap1A signaling pathway attenuates myocardial fibrosis in heart failure[J]. Chin Med, 2024, 19(1): 30.

[19] 李玉琪, 袁婷婷, 茅风燕, 等. 落新妇苷的药理活性及植物来源研究进展[J]. 中国药房, 2017, 28(19): 2718-2723.

[20] 方京梅. 黄杞叶抗菌活性组分的分离、组合及抗菌机制研究[D]. 成都: 成都大学, 2025.

[21] YANG D, ZHANG Q F. The natural source, physicochemical properties, biological activities and metabolism of astilbin [J]. Crit Rev Food Sci Nutr, 2023, 63(28): 9506-9518.

[22] GUO X Q, ZHOU T, XING H X, et al. Antioxidant and *in vivo* hypoglycemic activities of ethanol extract from the leaves of *Engelhardia roxburghiana* wall, a comparative study of the extract and astilbin[J]. Foods, 2023, 12(5): 927.

[23] WEI J, HUANG L L, LI D M, et al. Total flavonoids of *Engelhardia roxburghiana* wall. leaves alleviated foam cells formation through AKT/mTOR-mediated autophagy in the progression of atherosclerosis[J]. Chem Biodivers, 2021, 18(9): e2100308.