

基于 UHPLC-LTQ-Orbitrap MS、网络药理学和实验验证探讨豨薟草抗心肌缺氧损伤潜在有效成分及作用机制

王添钰^{1,2}, 白云绮², 许心蕊^{2,3}, 孙克寒^{1,4}, 张晴玥², 李佳彦¹, 商洪才², 聂波^{1,2*}

1. 北京中医药大学 中药学院, 北京 100029

2. 北京中医药大学 东直门医院 中医内科学教育部和北京市重点实验室, 北京 100700

3. 北京市东城区永定门外社区卫生服务中心, 北京 100075

4. 核工业北京化工冶金研究院, 北京 101121

摘要: **目的** 通过对豨薟草化学成分鉴定, 结合网络药理学和细胞实验验证, 探讨豨薟草治疗心肌缺氧损伤的药效成分和潜在的作用机制。 **方法** 采用超高效液相色谱-离子阱-静电场轨道阱质谱 (UHPLC-LTQ-Orbitrap MS) 技术对豨薟草醇提物的化学成分进行鉴定, 以鉴定出来的化学成分为研究对象, 采用网络药理学方法筛选豨薟草对心肌缺氧损伤具有保护作用的活性成分并预测治疗靶点。基于 H9c2 心肌细胞缺氧损伤模型, 验证豨薟草代表性活性成分豨薟精醇和奇壬醇的关键通路和靶点。 **结果** 豨薟草醇提物共鉴定出 43 个化学成分, 筛选豨薟精醇和奇壬醇可能是豨薟草治疗心肌缺氧损伤的关键活性成分, STAT3、SHBG、IL2、CYP19A1、HMGCR、PTPN1 和 AR 可能是关键靶点。豨薟精醇和奇壬醇能够提高 H9c2 细胞缺氧损伤模型超氧化物歧化酶 (SOD) 的活性, 降低乳酸脱氢酶 (LDH)、活性氧 (ROS) 和丙二醛 (MDA) 水平。豨薟精醇和奇壬醇上调了磷酸化 Janus 激酶 2/Janus 激酶 2 (p-JAK2/JAK2) 和磷酸化信号转导及转录激活蛋白 3/信号转导及转录激活蛋白 3 (p-STAT3/STAT3) 的值, 降低了 Bcl-2 相关 X 蛋白/B 淋巴瘤细胞瘤-2 (Bax/Bcl-2) 值, 下调了半胱天冬酶-9 (Caspase-9) 和半胱天冬酶-3 (Caspase-3) 的表达。 **结论** 筛选获得豨薟草活性成分豨薟精醇和奇壬醇, 可通过激活 JAK2/STAT3 信号通路抑制氧化应激和减少细胞凋亡, 发挥抗心肌缺氧损伤作用。

关键词: 豨薟草; 心肌缺氧损伤; 网络药理学; 超高效液相色谱-离子阱-静电场轨道阱质谱; 豨薟精醇; 奇壬醇; JAK2/STAT3
中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)05-1176-12

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.05.010

Exploring potential active ingredients and mechanism of *Siegesbeckiae Herba* in treating myocardial hypoxia injury based on UHPLC-LTQ Orbitrap MS, network pharmacology and experimental verification

WANG Tianyu^{1,2}, BAI Yunqi², XU Xinrui^{2,3}, SUN Kehan^{1,4}, ZHANG Qingyue², LI Jiayan¹, SHANG Hongcai², NIE Bo^{1,2}

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China

2. Key Laboratory of Chinese Internal Medicine of Ministry of Education and Beijing, Dongzhimen Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100700, China

3. Dongcheng District Yongdingmenwai Community Health Service Center, Beijing 100075, China

4. Beijing Research Institute of Chemical Engineering and Metallurgy, Beijing 101121, China

Abstract: Objective To explore the pharmacological components and potential mechanisms of *Siegesbeckiae Herba* in treating myocardial hypoxia injury by combining chemical component identification with network pharmacology and cell experiments. **Methods** Ultra high performance liquid chromatography ion trap electrostatic field orbital hydrazine mass spectrometry (UHPLC-LTQ Orbitrap MS) technology was used to identify the chemical components of the alcohol extract of *Siegesbeckiae Herba*. The

收稿日期: 2025-01-13

基金项目: 北京中医药大学东直门医院 2023 年度科技创新专项 (DZMKJCX-2023-025); 北京中医药大学 2022 年度基本科研业务费 (2022-JYB-SYS-005); 北京中医药大学重点实验室项目 (1000061222482)

作者简介: 王添钰 (2000—), 女, 汉族, 黑龙江省齐齐哈尔人, 硕士研究生, 主要从事中药分析与药物代谢研究。E-mail: wty511@163.com

*通信作者: 聂波, 博士, 研究员, 主要从事中医药防治心血管病和中药药物代谢研究。E-mail: nieboww_1977@163.com

identified chemical components were used as the research object, and network pharmacology was used to screen the active ingredients of *Siegesbeckiae Herba* that have protective effects on myocardial hypoxia injury and predict therapeutic targets. Key pathways and targets were validated through the treatment of H9c2 myocardial cell hypoxia injury model with darutigenol and kirenol, which are representative active ingredients of *Siegesbeckiae Herba*. **Results** A total of 43 chemical components were identified in *Siegesbeckiae Herba*. Among them, darutigenol and kirenol may be the active ingredients in *Siegesbeckiae Herba* for treating myocardial hypoxia injury, while STAT3, SHBG, IL2, CYP19A1, HMGCR, PTPN1, and AR may be key targets. Darutigenol and kirenol could elevate the activity of antioxidant enzymes SOD, reduced LDH, ROS, and MDA levels in hypoxia-exposed H9c2 cells. Moreover, darutigenol and kirenol upregulated the expression of p-JAK2/JAK2 and p-STAT3/STAT3, reduced Bax/Bcl-2 ratio and the expression of Caspase-9 and Caspase-3. **Conclusion** *Siegesbeckiae Herba* and its active ingredients can enhance antioxidant and anti apoptotic abilities by activating the JAK2/STAT3 signaling pathway, exerting anti myocardial hypoxia injury effects.

Key words: *Siegesbeckiae Herba*; myocardial hypoxia injury; network pharmacology; UHPLC-LTQ Orbitrap MS; darutigenol; kirenol; JAK2/STAT3

缺血性心脏病 (IHD) 因其死亡率和发病率较高, 对人类健康造成了重大危害。研究发现 IHD 不仅仅是动脉粥样硬化斑块导致的, 心肌缺氧损伤也是 IHD 的重要病理基础^[1]。心肌缺氧损伤涉及能量代谢障碍、钙离子调节失衡、氧化应激、细胞凋亡及炎症反应等多种机制, 尽管现有治疗方法多样, 但仍存在再灌注损伤、药物效果和特异性有限、术后并发症风险高等局限, 因此, 研究有效安全的防治心肌缺氧损伤的药物对减少 IHD 的发生具有重要意义。

豨莶草 *Siegesbeckiae Herba*, 味苦, 性寒, 归肝、肾经, 最早记载于唐代《新修本草》中, 具有祛风除湿、经络疏通、清热解毒的功效, 临床上用来治疗风湿痹痛、筋骨不利, 具有良好的抗炎镇痛作用^[2]。现代药理学研究表明: 豨莶草对心肌损伤有一定的保护作用^[3], 通过扩张血管、改善急性心肌缺血, 缓解心肌重构, 通过抑制血小板聚集, 抗血栓形成, 促进血管生成^[4]。但目前对于豨莶草化学成分的研究较少, 发挥药效的活性成分尚不明确。因此, 本研究采用液质联用技术鉴定豨莶草的化学成分, 结合网络药理学筛选豨莶草抗心肌缺氧损伤的潜在的有效成分和作用靶点, 通过细胞实验验证了豨莶草活性成分对心肌缺氧损伤的潜在作用机制, 为阐明豨莶草抗心肌缺氧损伤的药效物质和分子机制奠定基础。

1 材料

1.1 仪器

线性离子阱-串联静电场轨道阱质谱仪 (LTQ-Orbitrap XL), DionexUltimate 3000 UHPLC 系统, Xcalibur 2.2 化学工作站 (美国 Thermo Fisher 公司); FW-200 型高速万能粉碎机 (北京科伟永兴仪器有限公司); XSE204 型电子天平 (瑞士 METTLER TOLEDO 公司); 98-1-B 型电子调温电热套 (天津市

泰斯特仪器有限公司); MCO-20AIC 型 37 °C 恒温 CO₂ 培养箱 (日本 SANYO 公司); C42 型三气培养箱 (美国 BioSpherix 公司); RT-6000 型酶标仪 (深圳 Rayto 公司); DY CZ-25D 型电泳仪、DY CZ-40D 型电转仪 (北京六一生物科技有限公司); Tanon4600 型凝胶成像仪 (北京原平皓生物技术有限公司)。

1.2 药品与试剂

豨莶草 (批号: 20190323, 购自河北省安国中药材专业市场), 由首都医科大学罗容教授鉴定为菊科植物腺梗豨莶 *Siegesbeckia pubescens* Makino 的干燥地上部分。质谱级甲酸、乙腈 (美国 Thermo Fisher 公司), 乙醇为国产分析纯试剂, 水为屈臣氏超纯水。豨莶精醇 (质量分数 ≥ 95%, CAS: 5940-00-1, 成都埃法生物科技有限公司), 奇壬醇 (质量分数 ≥ 95%, CAS: 52659-56-0, 成都埃法生物科技有限公司)。H9c2 细胞购自中国医学科学院基础医学研究所资源共享平台, 二甲基亚砜 (DMSO, 批号 D8370-100, 北京索莱宝公司), DMEM 高糖培养基 (批号 06-1055-57-1ACS-1, BI 公司), 胎牛血清 (FBS, 批号 2045677R, Gibco 公司), 胰蛋白酶 (批号 25200056, 美国 Invitrogen 公司), Cell Counting Kit-8 (CCK-8) 试剂盒 (批号 CK04-1, 日本同仁化学研究所); 乳酸脱氢酶 (LDH) 试剂盒、超氧化物歧化酶 (SOD) 试剂盒、活性氧 (ROS) 试剂盒和丙二醛 (MDA) 试剂盒 (批号分别为 A020-2-2、A001-3-2、E004、A003-4-1, 均购于南京建成生物研究所); B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 兔多克隆抗体、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 鼠单克隆抗体 (批号分别为 26593-1-AP、60267-1-Ig, 均购于美国 Proteintech 公司); β-肌动蛋白 (β-actin) 兔多克隆抗体、Janus 激酶 2 (JAK2) 兔单克隆抗体、磷酸化

Janus 激酶 2 (p-JAK2) 兔多克隆抗体、信号转导及转录激活蛋白 3 (STAT3) 兔单克隆抗体、磷酸化信号转导及转录激活蛋白 3 (p-STAT3) 兔单克隆抗体、半胱天冬酶-9 (Caspase-9) 兔单克隆抗体、半胱天冬酶-3 (Caspase-3) 兔单克隆抗体和甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 兔多克隆抗体 (批号分别为 ab66132、ab32101、ab195055、ab68153、ab76315、ab184786、ab184787、ab9485, 均购于美国 abcam 公司); 辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG 抗体、辣根过氧化物酶标记山羊抗鼠 IgG 抗体 (批号分别为 BST13L04A54、BST14J10A50, 均购于上海碧云天生物公司); ECL 化学发光试剂、RIPA 裂解液 (批号分别为 P1010、CI1053, 均购于北京普利莱基因技术公司)。

2 方法

2.1 豨莶草醇提液的制备

豨莶草药材用粉碎机粉碎至粒状, 使用电子天平称量豨莶草粉末 1 g, 放入圆底烧瓶中, 精密加入 50%乙醇 50 mL, 称定质量并记录, 回流提取 2 h, 提取液自然冷却至室温后称质量, 如有失重, 用 50%乙醇补足失重, 轻轻摇匀后滤过, 取续滤液过 0.22 μm 微孔滤膜除菌, 装入液相小瓶待测。

2.2 色谱质谱条件

色谱柱: Waters ACQUITY UPLC BEH C₁₈ 柱 (100 mm×2.1 mm, 1.7 μm); 流动相: 0.1%甲酸-水 (A) 和乙腈 (B), 梯度洗脱 (0~2 min, 20% B; 2~15 min, 20%~35% B; 15~20 min, 35%~55% B; 20~23 min, 55%~80% B; 23~24 min, 80%~95% B; 24~26 min, 95% B; 26~27 min, 95%~20% B; 27~30 min, 20% B); 柱温: 30 °C; 体积流量: 0.3 mL·min⁻¹; 进样量: 2 μL。

质谱条件: 加热电喷雾离子源, 正、负离子检出模式; 喷雾电压: 3 kV; 毛细管电压: -35 V; 管透镜电压: -110 V; 毛细管温度: 350 °C; 鞘气流速: 40 arb, 辅助气流速: 20 arb, 鞘气和辅助气均为高纯氮气 (质量分数>99.99%); 样品数据采集均使用傅里叶变换高分辨全扫方式, 扫描范围是 *m/z* 100~1 000。

采用 Xcalibur 2.2 工作站, 根据保留时间、相对分子质量、二级质谱碎片信息, 结合已经报道的文献数据, 对检测出的成分进行解析并确定化合物结构 (质量误差小于±5×10⁻⁶)。

2.3 基于网络药理学筛选豨莶草治疗心肌缺氧损伤的活性成分和作用靶点

2.3.1 豨莶草成分库的构建 基于豨莶草醇提液

中鉴定出来的化学成分, 形成豨莶草成分库, 用于进行豨莶草治疗心肌缺氧损伤的网络药理学研究。

2.3.2 药效靶点的筛选 将液质联用鉴定得到的豨莶草化合物分子的 Smiles 结构导入 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://www.swisstargetprediction.ch/>), 并限定研究物种为人类 (Homo sapiens), 点击 “submit”, 每个成分的预测靶点选取前 10 个作为豨莶草化学成分的潜在靶点, 构建豨莶草化学成分潜在的作用靶点数据集。

以 “Myocardial ischemia” 为关键词, 从 OMIM (<https://www.omim.org/>)、GeneCards (www.genecards.org) 等数据库进行检索, 获得心肌缺氧相关的疾病靶点, 并筛选 Relevance score>1 的靶点为疾病相关靶点。

将成分靶点和疾病靶点进行交集即为药效靶点, 使用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org>) 将靶点转换为标准化基因名, 使用 R 软件绘制韦恩图。

2.3.3 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络的构建 在 STRING 平台 (<https://string-db.org/>) 中, 导入豨莶草-心肌缺氧损伤药效靶点, 设置参数: 物种 (organism) 为 “Homo sapiens”、最大相互作用分数 (interaction score) 置信度为 0.70、最大相互作用数 (max number of interactors) 为 300, 将获得的蛋白互作信息导入 Cytoscape 3.8.0 软件, 可视化构建豨莶草治疗心肌缺氧损伤的 PPI 网络图。

2.3.4 构建“成分-靶点-疾病”相互作用网络图 将化学成分和药效靶点同时导入 Cytoscape 3.8.0 软件, 使用 BisoGenet 插件, 在 Identifiers 条目下选择 “Homo sapiens (Human)” “Gene identifiers only”, 在 Data Settings 条目下选择 “Protein Protein Interaction”, 绘制出 “成分-靶点-疾病” 相互作用网络图。对网络图进行度值 (degree) 分析, 按照度值高低筛选排名靠前的作为活性成分和核心靶点。

2.4 基于 H9c2 细胞的豨莶精醇和奇壬醇抗心肌缺氧损伤实验验证

2.4.1 H9c2 细胞培养 H9c2 细胞在含有 10%FBS 的 DMEM 培养基中培养, 用 0.25%胰蛋白酶消化细胞并传代, 取处于对数生长期的细胞用于后续实验。

2.4.2 CCK-8 法检测不同质量浓度豨莶精醇和奇壬醇对细胞活力的影响 将 H9c2 细胞 (每孔 8×10³ 个) 接种在 96 孔板中, 分别给予 200、100、50、10、1、0 (对照) μg·mL⁻¹ 质量浓度的豨莶精醇或奇壬醇在正常培养条件下干预 24 h 后, 每孔加入

CCK-8 溶液孵育 2 h, 用酶标仪测定 450 nm 处的吸光度 (A) 值, 并计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = A_{\text{实验}} / A_{\text{对照}}$$

2.4.3 缺氧细胞模型构建及分组与给药干预 准确称量豨莶精醇和奇壬醇, 溶解于 DMSO 中, 配制质量浓度为 $10 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的储备液。将 H9c2 细胞以 8×10^4 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 密度接种在 6 孔板上, 置于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 细胞培养箱中孵育 48 h, 弃去细胞上清液, 加入 $10 \text{ } \mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 豨莶精醇或奇壬醇的无血清 DMEM 培养基, 转移到三气培养箱 ($94\% \text{N}_2$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 和 $1\% \text{O}_2$) 中培养 16 h^[5], 即为缺氧损伤模型。对照组细胞用无血清 DMEM 培养基在 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 的培养箱中培养相应的时间, 模型组细胞用无血清 DMEM 培养基在三气培养箱 ($94\% \text{N}_2$ 、 $5\% \text{CO}_2$ 和 $1\% \text{O}_2$) 培养相应的时间。

2.4.4 心肌损伤和氧化应激指标检测 H9c2 细胞接种于 6 孔板, 按“2.4.3”项方法造模给药后, 收集细胞上清液, 使用 LDH 试剂盒检测细胞上清液中 LDH 漏出量。

胰酶消化并收集细胞, 采用 2,7-二氯荧光素二乙酸酯 (DCFH-DA) 探针避光孵育 1 h, 荧光酶标仪检测细胞荧光强度, 并通过 ROS 试剂盒测定细胞内 ROS 含量。采用 MDA 试剂盒 (TBA 法) 测定细胞 MDA 水平, 采用 SOD 试剂盒 (WST-1 法) 检测细胞中 SOD 活性。

2.4.5 蛋白免疫印迹法 (Western blotting) 检测机制相关靶点及通路蛋白表达 细胞按“2.4.3”项方法造模并给药干预后, 弃培养基, 加入含有蛋白酶抑制剂的 RIPA 缓冲液裂解, 收集细胞于 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 、 $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 收集上清液进行 BCA 蛋白定量, 取蛋白样本进行检测, 依次进行电泳、电转、封闭、一抗 [JAK2 ($1:1\,000$)、p-JAK2 ($1:1\,000$)、

STAT3 ($1:1\,000$)、p-STAT3 ($1:2\,000$)、Bcl-2 ($1:1\,000$)、Bax ($1:5\,000$)、Caspase-9 ($1:1\,000$)、Caspase-3 ($1:2\,000$)、GAPDH ($1:10\,000$)]、 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 孵育过夜, 次日洗膜后加入二抗 ($1:5\,000$), 室温摇床 1 h, 洗膜后使用 ECL 发光液显色, 使用 Image J 软件对蛋白条带进行灰度值分析。

2.4.6 统计分析 采用 SPSS 22.0 软件对数据进行分析, 以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析 (ANOVA), 组间两两比较采用 LSD 法。 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 豨莶草化学成分鉴定结果

根据保留时间、相对分子量、质谱碎片信息及相关文献信息对豨莶草醇提液的化学成分进行鉴定, 共鉴定得到 43 个化学成分, 包括对映松烷型二萜 25 个、对映贝壳杉烷型二萜 7 个、黄酮类 7 个、其他类化合物 4 个。豨莶草醇提液在正、负离子模式下的总离子流图见图 1, 化学成分鉴定结果见表 1。

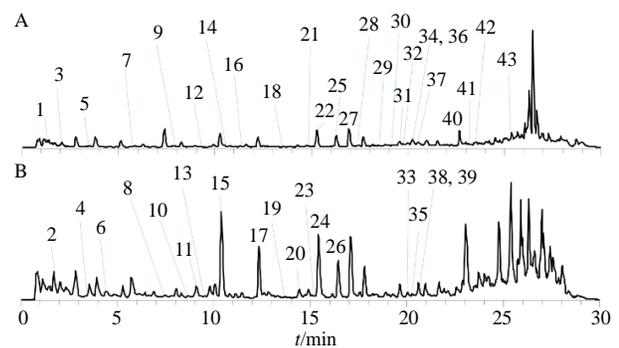


图 1 豨莶草醇提液正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 的总离子流图

Fig. 1 Total ion chromatograms of *Siegesbeckiae Herba* alcohol extract in positive (A) and negative (B) ion modes

表 1 豨莶草醇提液化学成分信息

Table 1 Chemical compositions of *Siegesbeckiae Herba* alcohol extract

序号	t_R / min	加和物	分子式	m/z		误差/ ($\times 10^{-6}$)	多级质谱碎片	结构 类型	成分	网药 编号
				理论值	实测值					
1	1.40	+Na	$\text{C}_{19}\text{H}_{30}\text{O}_8$	409.183 3	409.183 6	0.301	246.969 3	d	(6S, 9R)-长寿花糖苷	D3
2	1.71	-H	$\text{C}_{27}\text{H}_{30}\text{O}_{16}$	609.145 0	609.145 7	0.739	301.064 1	c	芦丁	C7
3	2.01	+Na	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{12}$	487.084 7	487.084 1	-0.587	303.050 1、324.987 1	c	异槲皮苷	C5
4	3.33	-H	$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$	447.092 2	447.093 6	1.412	285.013 4	c	山柰酚-3-O- β -D-葡萄糖苷	C4
5	3.49	+Na	$\text{C}_{21}\text{H}_{26}\text{O}_8$	429.152 0	429.152 2	0.261	398.065 3	d	orientalide	D1
6	4.41	-H	$\text{C}_{20}\text{H}_{32}\text{O}_5$	351.216 6	351.217 4	0.809	289.158 4、333.101 8、 321.112 2、271.125 9	b	对映-16 β , 17, 18-三羟基-B6 贝壳杉烷-19-羧酸	

表 1 (续)

序号	t_R / min	加和物	分子式	m/z		误差/ ($\times 10^{-6}$)	多级质谱碎片	结构 类型	成分	网药 编号
				理论值	实测值					
7	5.63	+H	C ₂₂ H ₃₄ O ₅	379.247 9	379.246 1	-1.811	361.194 7、349.245 2	b	18-乙酰基-豨莶酸	B4
8	7.55	-H	C ₁₅ H ₁₀ O ₇	301.034 3	301.035 4	1.091	178.902 4、150.877 3、 272.964 4	c	槲皮素	C1
9	7.93	+Na	C ₃₂ H ₅₄ O ₁₃	669.345 7	669.345 9	0.227	489.336 2、459.325 5、 202.997 5	a	豨莶新苷	A3
10	8.45	+COOH	C ₂₆ H ₄₂ O ₉	543.279 9	543.281 2	2.322	497.243 6、305.199 4、 245.083 7、160.920 2	a	腺梗豨莶丁苷	A9
11	9.06	-H	C ₁₆ H ₁₂ O ₇	315.049 9	315.050 8	0.881	299.905 8、70.984 0、 255.064 3、243.064 8	c	鼠李素	C6
12	9.20	+Na	C ₂₆ H ₄₄ O ₉	523.287 7	523.287 3	-0.464	202.993 0、343.245 9、 505.303 3	a	对映-2 β ,15,16,19-四羟基 A14 海松烷-8(14)-烯-19-O- β -吡喃葡萄糖苷	
13	9.49	+COOH	C ₂₆ H ₄₂ O ₉	543.279 9	543.281 2	2.212	335.198 6、497.071 7	a	对映-2-酮基-3 β 、15,16-三 A13 羟基海松烷-8(14)-烯-3- O- β -吡喃葡萄糖苷	
14	10.38	+Na	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	361.234 9	361.235 2	0.299	343.149 1、275.025 3	a	7 β -羟基豨莶精醇	A15
15	10.40	+COOH	C ₂₆ H ₄₄ O ₈	529.300 7	529.301 6	0.916	483.332 3、160.917 1、 423.348 6	a	豨莶苷	A2
16	11.35	+Na	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	361.234 9	361.235 6	0.639	331.068 2、343.090 0	a	奇壬醇	A5
17	12.36	+COOH	C ₂₈ H ₄₆ O ₉	571.311 3	571.312 9	1.581	525.292 5、553.481 6	a	15-乙氧基-豨莶苷-16-羧酸 A10	
18	13.54	+Na	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	361.234 9	361.235 5	0.569	343.029 0、291.149 0	a	对映-2 α ,15,16,19-四羟基 A11 海松烷-8(14)-烯	
19	13.70	+COOH	C ₂₆ H ₄₂ O ₈	527.285 1	527.286 3	1.246	481.320 9、319.290 1	a	对映-2-酮基-15,16-二羟 A12 基海松烷-8(14)-烯-16- O- β -吡喃葡萄糖苷	
20	14.43	+COOH	C ₂₆ H ₄₄ O ₈	529.300 7	529.302 0	1.276	483.272 0、160.932 5、 423.173 4、321.299 3	a	腺梗豨莶甲苷	A8
21	14.89	+Na	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	361.234 9	361.235 4	0.479	343.371 7、331.307 6、 216.981 2	a	ent-2 α ,15R,16,19-tetra- A24 hydroxypimar-8(14)-ene	
22	15.08	+Na	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	361.234 9	361.235 6	0.639	275.083 8、343.233 7	a	9 β -羟基豨莶精醇	A16
23	15.19	-H	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	335.221 7	335.222 3	0.634	317.124 4、290.927 4、 262.946 4	b	对映-16 β ,17-二羟基 B2 壳杉烷-19-羧酸	
24	15.45	+COOH	C ₂₈ H ₄₆ O ₉	571.311 3	571.311 6	0.291	525.346 2、465.228 4、 160.941 8	a	16-O-乙酰基豨莶苷	A18
25	16.13	+Na	C ₂₂ H ₃₆ O ₅	403.245 5	403.245 7	0.507	343.219 5、325.136 8、 313.085 3	a	豨莶乙素	A7
26	16.46	+COOH	C ₂₈ H ₄₆ O ₉	571.311 3	571.311 7	0.361	525.343 7、465.288 6	a	Hythiemoside B	A19
27	16.96	+H	C ₁₇ H ₁₄ O ₇	331.081 2	331.081 4	0.131	316.015 8	c	3,7-二甲基槲皮素	C2
28	17.37	+Na	C ₂₂ H ₃₆ O ₅	403.245 5	403.245 8	0.731	343.186 2、313.193 8	a	对映-15-O-乙酰基-2 α ,16,19-A25 三羟基海松烷-8(14)-烯	
29	18.46	+Na	C ₂₂ H ₃₆ O ₅	403.245 5	403.245 3	-0.559	343.198 1、313.262 5	a	对映-16-O-乙酰基-2 α , A23 16,19-三羟基海松烷- 8(14)-烯	

表 1 (续)

序号	t_R / min	加和物	分子式	m/z		误差/ ($\times 10^{-6}$)	多级质谱碎片	结构 类型	成分	网药 编号
				理论值	实测值					
30	19.00	+Na	C ₂₂ H ₃₄ O ₅	401.229 8	401.229 9	0.075	341.158 1、311.214 1、 323.311 0	a	2-酮基-16-乙酰基奇壬醇A4	
31	19.29	+Na	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	345.240 0	345.240 3	0.822	327.140 5、275.070 1	b	对映贝壳杉烷-16 β , 17, 18-三醇	B1
32	19.68	+Na	C ₂₂ H ₃₆ O ₅	403.245 5	403.245 1	-0.113	343.194 9、325.243 6、 313.130 4、275.114 7、 189.009 9	d	19-乙酰基-15-羟基-12- 酮基-13, 14E-去氢-10, 11, 14, 15-四氢椴牛儿 基橙花醇	D2
33	20.11	-H	C ₁₈ H ₁₆ O ₇	343.081 2	343.082 0	0.741	328.007 8	c	3, 7, 4'-O-三甲基槲皮素	C3
34	20.20	+Na	C ₂₀ H ₃₄ O ₃	345.240 0	345.240 2	0.184	330.020 5	a	豨莶精醇	A1
35	20.29	-H	C ₂₀ H ₃₂ O ₄	335.221 7	335.222 3	0.604	255.136 7、187.111 6	a	对映-12 α , 16-环氧-2 β , 15 α , 19-三羟基海松烷-8-烯	A21
36	20.29	+Na	C ₂₂ H ₃₆ O ₅	403.245 5	403.245 6	0.284	343.185 3、313.250 7	a	豨莶甲素	A6
37	20.61	+Na	C ₂₀ H ₃₂ O ₃	343.224 4	343.224 4	0.034	325.161 8、274.986 7	b	对映-16 α H, 17-羟基贝壳 杉烷-19-羧酸	B5
38	20.99	-H	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	333.206 0	333.206 7	0.634	289.078 0、315.231 2、 271.154 4	b	对映-16 α H-贝壳杉烷-17, 19-二羧酸	B3
39	20.99	+COOH	C ₁₉ H ₂₈ O ₂	333.206 0	333.206 7	1.903	289.078 0、315.231 2、 287.228 4	a	对映-16-去甲-3-酮基-海 松烷-8(14)-烯-15-醛	A22
40	22.68	+Na	C ₂₂ H ₃₆ O ₄	387.250 6	387.250 6	-0.431	327.186 4	a	16-O-乙酰基豨莶精醇	A17
41	23.13	+Na	C ₂₃ H ₃₈ O ₄	401.266 2	401.266 1	-0.451	317.083 4	a	奇壬醇丙酮合物	A20
42	23.68	+Na	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	341.208 7	341.206 6	-2.146	323.129 4	b	大花酸	B7
43	25.68	+Na	C ₂₆ H ₄₀ O ₆	471.271 7	471.271 4	-0.260	411.246 1、351.289 7	d	豨莶酸 I	D4

结构类型: a-对映海松烷型二萜; b-对映贝壳杉烷型二萜; c-黄酮; d-其他。

Structure type: a-*p*-Enantiopyrine diterpene; b-enantiogenickaurane diterpenoid; c-flavonoid; d-other components.

3.2 豨莶草化学成分及靶点筛选

UHPLC-LTQ-Orbitrap MS 鉴定的豨莶草 43 个化

学成分中, 化合物 A12、D1 未得到预测靶点, 其余潜在靶点删掉重复值后, 共得到 125 个靶点。见图 2。

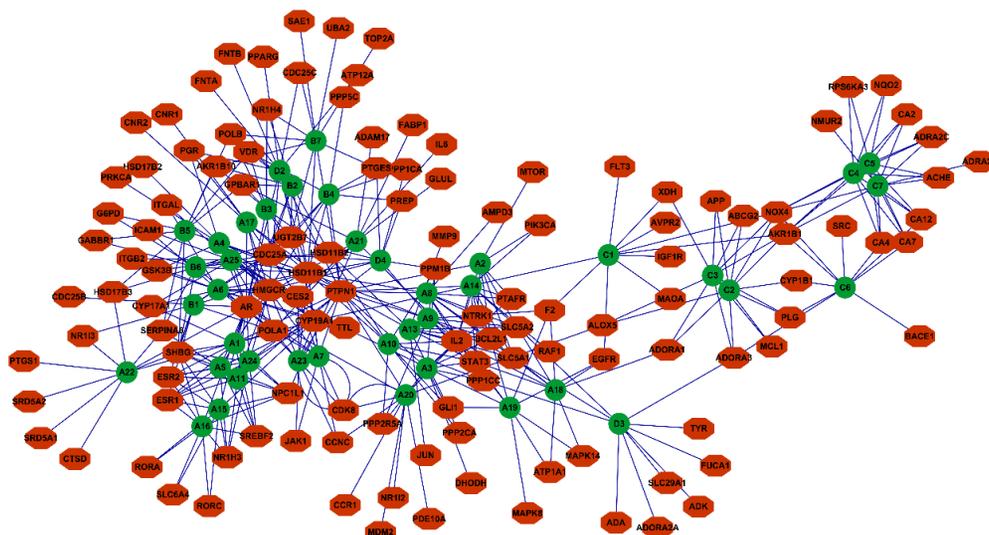


图 2 豨莶草化学成分-潜在靶点网络

Fig. 2 Chemical composition of *Siegesbeckiae Herba*-potential target network

3.3 心肌缺氧损伤疾病靶点筛选和 PPI 网络的构建

筛选得到心肌缺氧损伤相关的疾病靶点共 1 985 个, 通过构建韦恩图, 获得与化学成分靶点的共同靶点 80 个。将 STRING 数据库获取的蛋白互作信息导入至 Cytoscape 3.8.0 可视化分析, 绘制得到豨薟草治疗心肌缺氧损伤的靶点 PPI 互作图, 共 80 个节点、554 条边, 见图 3。

3.4 构建“成分-靶点-疾病”相互作用网络

将筛选出的 80 个共同靶点和对应化学成分构建“成分-靶点-疾病”相互作用网络图, 共得到 121 个节点, 274 条边, 见图 4。根据结果, 筛选了度值大于 9 的 10 个成分, 分别为豨薟精醇、奇壬醇、对映-2 α , 15, 16, 19-四羟基海松烷-8(14)-烯、7 β -羟基豨薟精醇、9 β -羟基豨薟精醇、16-O-乙酰基豨薟苷、ent-2 α , 15R, 16, 19-tetrahydroxypimar-8(14)-ene、槲皮素、3, 7-二甲基槲皮素和 3, 7, 4'-O-三甲基槲皮素; 以及度值大于 9 的 7 个靶点, 分别为 STAT3、SHBG、IL2、CYP19A1、HMGR、PTPN1 和 AR。以上成分和靶点可能是豨薟草治疗心肌缺氧损伤的活性成分和核心靶点。

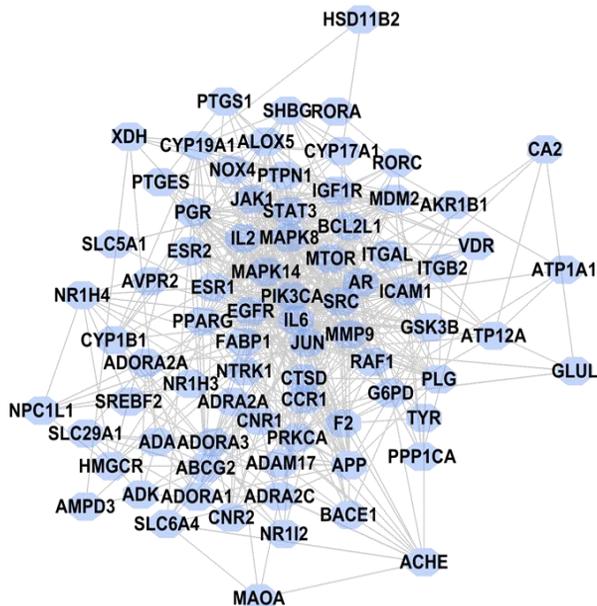


图 3 豨薟草化学成分-疾病交叉靶点 PPI 网络
Fig. 3 PPI network diagram of intersecting targets between *Siegesbeckiae Herba* chemical components and diseases

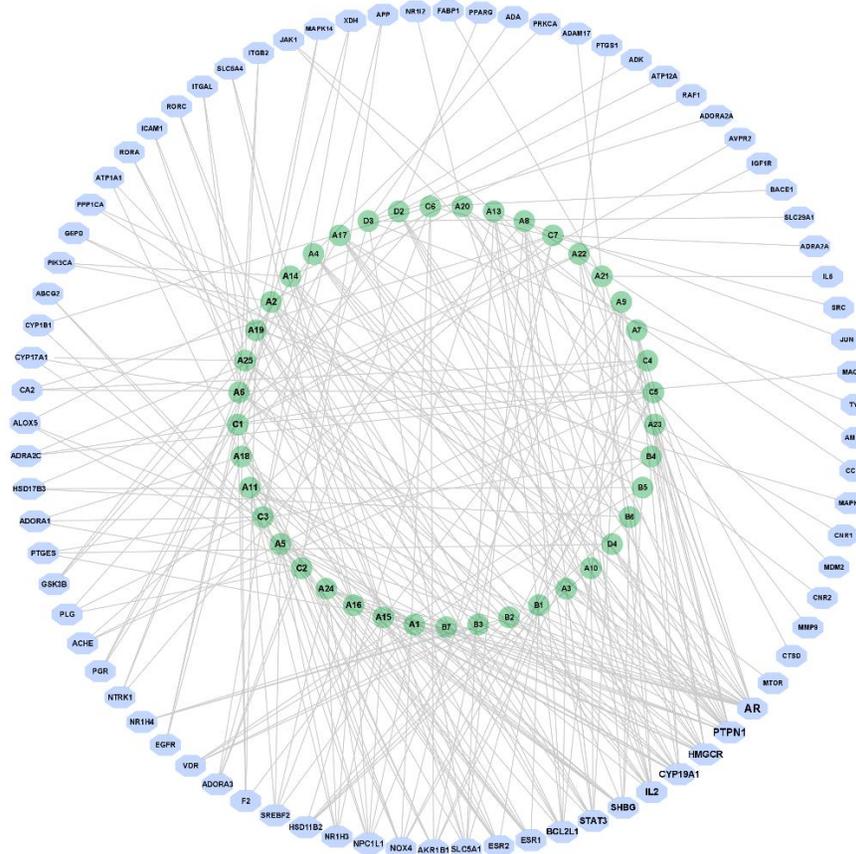


图 4 心肌缺氧损伤的“成分-靶点-疾病”相互作用网络
Fig. 4 The “Component-Target-Disease” interaction network of myocardial hypoxia injury

3.5 不同浓度豨莶精醇和奇壬醇对 H9c2 细胞活力的影响

如表 2 所示, 与对照组相比, 豨莶精醇和奇壬醇给药质量浓度在 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时细胞存活率最高, 因此后续实验中豨莶精醇和奇壬醇的药物干预质量浓度为 $10 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

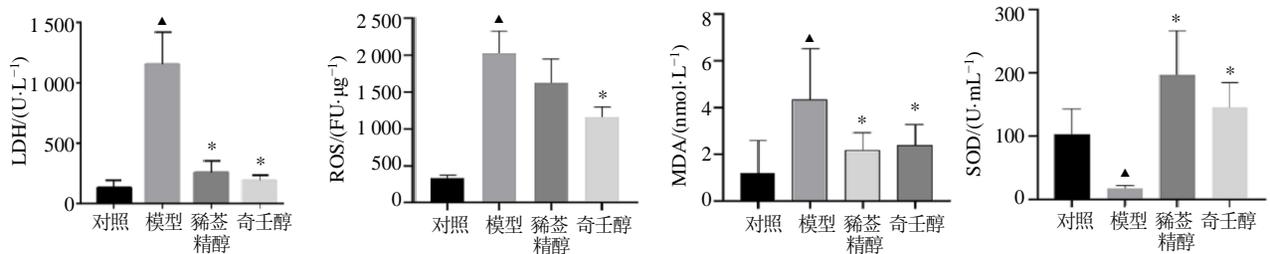
3.6 豨莶精醇和奇壬醇对缺氧诱导的 H9c2 细胞 LDH 漏出量、ROS 水平、MDA 水平、SOD 活性的影响

如图 5 所示, 与对照组相比, 缺氧诱导的 H9c2 细胞 LDH 漏出量、ROS、MDA 水平增加 ($P < 0.05$), SOD 活性降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 豨莶精醇和奇壬醇显著降低了 H9c2 细胞的 LDH 漏出量 ($P < 0.05$), 降低了 ROS 和 MDA 水平 ($P < 0.05$), 提高了 SOD 活性 ($P < 0.05$)。

表 2 不同质量浓度豨莶精醇和奇壬醇对 H9c2 细胞存活率的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Table 2 Effects of different concentrations of darutigenol and kirenol on survival rate of H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	质量浓度/ $(\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1})$	存活率/%
对照	—	100.00 ± 5.01
奇壬醇	200	49.61 ± 3.86
	100	81.79 ± 2.88
	50	90.34 ± 0.47
	10	94.22 ± 3.24
	1	89.73 ± 4.31
豨莶精醇	200	11.90 ± 1.07
	100	11.52 ± 0.48
	50	91.48 ± 3.37
	10	114.34 ± 2.86
	1	101.56 ± 2.74



与对照组比较: ▲ $P < 0.05$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ 。
▲ $P < 0.05$ vs control group; * $P < 0.05$ vs model group.

图 5 豨莶精醇和奇壬醇对缺氧诱导的 H9c2 细胞 LDH 漏出量、ROS 水平、MDA 水平和 SOD 活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 5 Effects of darutigenol and kirenol on LDH leakage, ROS levels, MDA levels, and SOD activity in hypoxia-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n=6$)

3.7 豨莶精醇和奇壬醇对缺氧诱导的 H9c2 细胞中 Bax、Bcl-2、Bax/Bcl-2、Caspase-9、Caspase-3 蛋白表达的影响

如图 6 所示, 与对照组相比, 模型组 H9c2 细胞的促凋亡蛋白 Bax、Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白水平升高 ($P < 0.05$), 抗凋亡蛋白 Bcl-2 的表达降低 ($P < 0.05$)。同时, 与模型组相比, 豨莶精醇和奇壬醇上调 Bcl-2 表达、抑制 Bax 表达、降低 Bax/Bcl-2 值 ($P < 0.05$), 抑制 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白表达 ($P < 0.05$)。

3.8 豨莶精醇和奇壬醇对缺氧诱导的 H9c2 细胞 JAK2、STAT3 蛋白表达的影响

如图 7 所示, 与对照组相比, 模型组 H9c2 细胞中 p-JAK2 和 p-STAT3 水平显著降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 豨莶精醇和奇壬醇增加了 p-JAK2

和 p-STAT3 的表达 ($P < 0.05$), 说明激活了 JAK2/STAT3 通路。

4 讨论

心肌组织因缺氧、缺血引起心肌缺氧损伤甚至结构和功能病变导致缺血性心脏病, 是心血管疾病中最普遍的死亡原因, 即使是非致命性的 IHD 患者其生活质量也会显著下降, 对人类健康和社会经济产生严重危害^[6]。中药具有多成分、多靶点、多通路的特点, 越来越多中药及单体被证明可改善心肌缺氧损伤。研究表明, 豨莶草提取物具有舒张血管、降压、抗血栓、抗炎镇痛、抗氧化和免疫抑制等药理作用, 常用于痛风性关节炎、心脑血管疾病的临床治疗^[7-8], 但其具体的作用机制和药效成分尚不明确。二萜类化合物普遍认为是豨莶草的主要成分且具有广泛的药理活性, 《中国药典》2020 年版以二

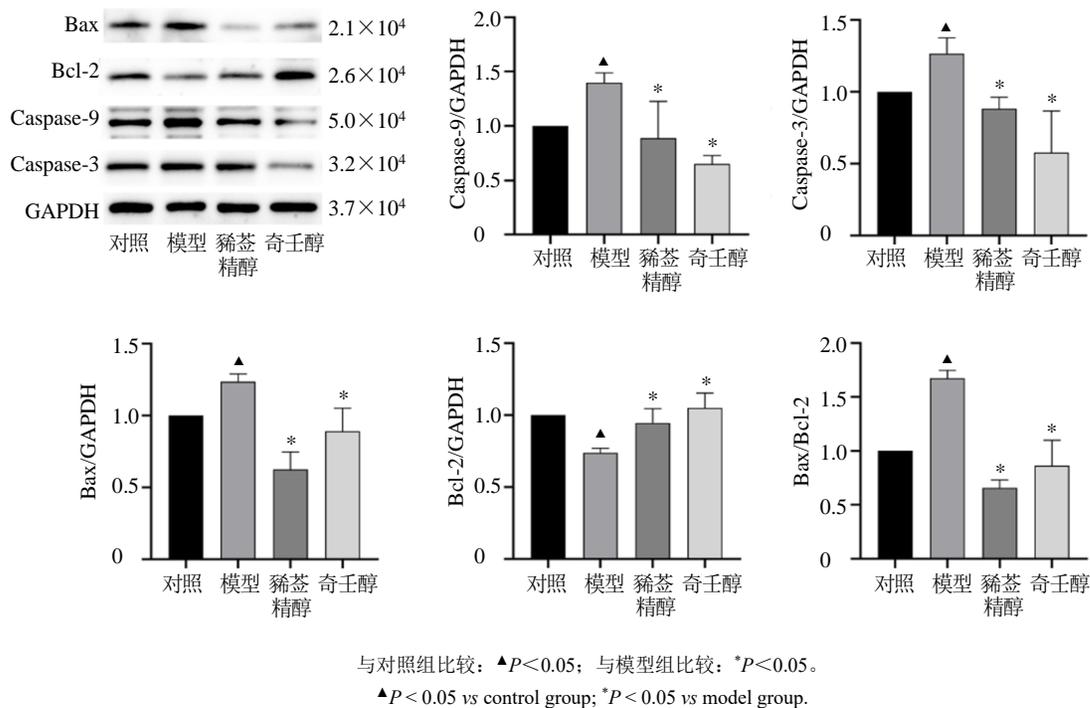


图 6 豨莶精醇和奇壬醇对缺氧诱导的 H9c2 细胞中 Bax、Bcl-2、Caspase-9、Caspase-3 蛋白表达和 Bax/Bcl-2 值的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 6 Effects of darutigenol and kirenol on the protein expression of Bax, Bcl-2, Caspase-9, Caspase-3, and Bax/Bcl-2 ratio in hypoxia-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

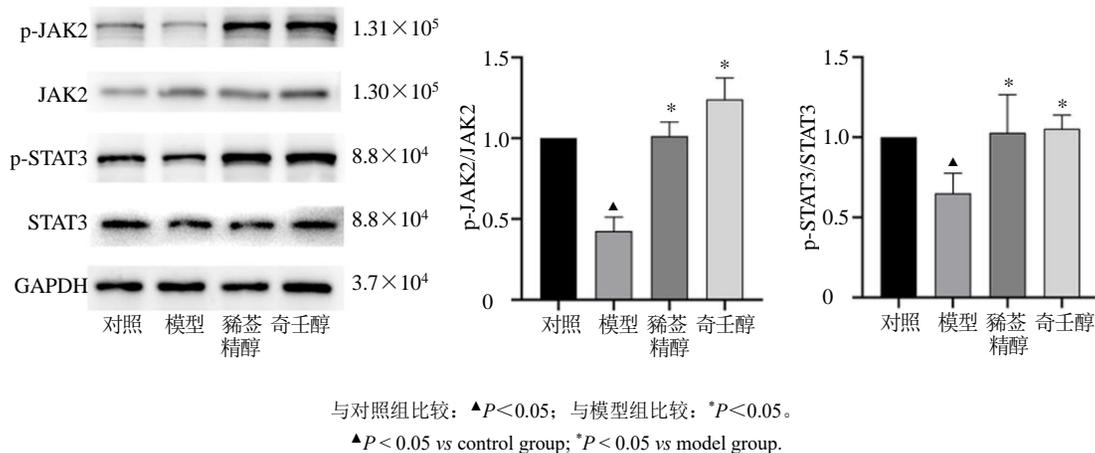


图 7 豨莶精醇和奇壬醇对缺氧诱导的 H9c2 细胞 JAK2、STAT3 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Fig. 7 Effects of darutigenol and kirenol on the protein expression of JAK2 and STAT3 in hypoxia-induced H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n=3$)

萜类化合物奇壬醇作为豨莶草的含量测定成分，同时也常作为其质量控制的指标成分，但尚未将质控指标关联药效。在 1 项基于液质联用技术鉴定豨莶草水提取物化学成分的研究中，共鉴定了 30 个化学成分，其中二萜类成分仅有 8 个^[9]，分析其原因，该研究以水为溶剂提取，而豨莶草主要含有二萜类

成分，该类化合物相对分子质量较大，一般难溶于水，更易溶于甲醇等有机溶剂，因此对该类成分提取的效率不高。本研究选用了 50% 甲醇作为回流提取溶剂，兼顾了水溶性和脂溶性成分的溶解，采用 UHPLC-LTQ-Orbitrap MS 技术对豨莶草醇提液的化学成分进行了鉴定，共鉴定出 43 个化学成分，其

中有 32 个二萜类化合物、7 个黄酮类化合物和 4 个其他类型化合物，丰富了豨莶草的化学成分库。

基于上述已鉴定的成分，本研究采用网络药理学方法，通过“成分-靶点-疾病”互作分析，筛选与治疗心肌缺氧损伤相关的活性成分 10 个，主要是豨莶精醇、奇壬醇等二萜类成分。Wei 等^[9]的研究表明，豨莶草提取物可以通过抑制氧化应激改善心肌损伤。前期研究也表明，豨莶草通过抵抗氧化应激，抑制心肌细胞凋亡的机制对缺氧损伤的 H9c2 心肌细胞具有保护作用^[5]。以上研究表明豨莶草具有较好的心肌缺氧保护作用，但中药成分复杂，药效物质及作用机制不明确，质量控制难度大，因此本研究通过筛选潜在的活性成分并探索其作用机制，进一步明确豨莶草的药效物质基础。研究报道：豨莶精醇可通过抑制血小板聚集和黏附，延长大鼠体内血栓形成时间，有显著的抗血栓作用^[10]；奇壬醇能够减少内皮细胞中 ROS 的产生，防止血管内皮中氧化还原失衡^[11]，并通过抑制氧化应激，上调抗凋亡蛋白的表达，抑制心肌细胞凋亡^[12]。综上，选择豨莶精醇和奇壬醇作为豨莶草的代表性活性成分，探讨二者治疗心肌缺氧损伤的药理作用及其机制，并探讨二者是否作为豨莶草的活性成分代表。

抑制氧化应激反应、减少心肌细胞凋亡是减轻心肌缺氧损伤的重要途径^[13]。网络药理学结果筛选了 7 个关键靶点，分别为 STAT3、SHBG、IL-2、CYP19A1、HMGCR、PTPN1 和 AR。缺氧诱导的 ROS 产生和氧化抗氧化失调是心肌损伤的重要原因^[14]。过度的氧化应激会破坏抗凋亡和促凋亡蛋白之间的平衡，并诱导心肌细胞凋亡^[15]。STAT3 是心肌细胞出现氧化应激时的关键蛋白^[16]，STAT3 磷酸化通过减少 ROS 产生和上调 Bcl-2 的表达在心脏保护中起着重要作用^[17-18]。STAT3 同时是“成分-靶点-疾病”相互作用网络筛选出的有价值的靶点之一，可作为心肌缺氧损伤的潜在治疗靶点。

心肌缺氧损伤导致细胞膜和线粒体膜受损，膜通透性增加，LDH 随后释放到细胞外，被认为是细胞损伤的重要指标^[19]。ROS 是线粒体分子氧代谢的产物^[20]，MDA 是脂质过氧化的降解产物^[21]，ROS 和 MDA 的水平反映了氧化应激的水平^[22-23]。SOD 是清除 ROS 的主要抗氧化酶^[24]。在缺氧条件下，细胞内氧化应激增强，SOD 活性降低^[25]，ROS 过量产生，引起细胞缺氧损伤，扰乱机体的氧化还原反应^[26]。本研究发现，H9c2 细胞在缺氧条件下，LDH 的

漏出增加，导致心肌细胞受损，豨莶精醇和奇壬醇的干预可有效降低 LDH 水平。缺氧诱导使 H9c2 细胞中 ROS 和 MDA 的含量增加，SOD 活性降低，细胞的抗氧化能力减弱，豨莶精醇和奇壬醇的干预提高了 H9c2 细胞 SOD 的活性，降低了 ROS 和 MDA 的水平，减轻了缺氧诱导的氧化应激。

氧化应激是心肌损伤中心肌细胞凋亡的主要原因。细胞凋亡取决于抗凋亡和促凋亡蛋白之间的平衡。Bcl-2 是 BCL2 家族的关键蛋白，负责抗凋亡过程并促进细胞存活^[27]。Bax 是促凋亡蛋白，受 Bcl-2 负调控，两者都参与线粒体介导的凋亡^[28]。Caspase-9 和 Caspase-3 是启动凋亡程序的关键蛋白酶。本研究发现缺氧处理可诱导 H9c2 启动细胞凋亡，促进 Caspase-9 和 Caspase-3 蛋白的表达，下调 Bcl-2 的表达，上调 Bax 的表达。豨莶精醇和奇壬醇可以降低 Caspase-9 和 Caspase-3 凋亡关键蛋白的表达，上调 Bcl-2 的表达，降低 Bax 的表达，从而抑制缺氧诱导的 H9c2 心肌细胞凋亡。

STAT3 是 JAK2/STAT3 信号通路的重要组成部分，在心肌损伤中起着核心调节作用^[29]。JAK2/STAT3 信号通路的激活可以上调线粒体抗氧化酶的合成，增加 Bcl-2 的合成，抑制 Bax 的表达，并减少心肌细胞的氧化应激和凋亡^[30-31]，这对心脏保护有积极作用。本研究发现，豨莶草的活性成分豨莶精醇和奇壬醇可以通过上调 p-JAK2/JAK2 和 p-STAT3/STAT3 的表达，激活 JAK2/STAT3 信号通路，抑制缺氧诱导的 H9c2 细胞的氧化应激和凋亡，发挥心肌保护作用。

综上所述，本研究采用 UHPLC-LTQ-Orbitrap MS 技术结合网络药理学方法^[32]筛选了豨莶草的主要活性成分，预测了抗心肌缺氧损伤的潜在药效靶点。采用细胞水平验证了豨莶草中的活性成分豨莶精醇和奇壬醇可以通过激活 JAK2/STAT3 信号通路抑制氧化应激，防止心肌细胞凋亡，从而发挥 H9c2 细胞缺氧损伤保护的作用机制。该研究结果显示二者与豨莶草均具有抗心肌缺氧损伤作用，可作为豨莶草核心活性成分，为豨莶草的药效物质研究和质量控制指标选择提供实验依据。本研究仍存在一些不足，未进行体内实验验证以及与其他信号通路的交互作用探讨，这也将是未来的研究重点。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Severino P, D'Amato A, Pucci M, et al. Ischemic heart disease pathophysiology paradigms overview: From plaque activation to microvascular dysfunction [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(21): 8118.
- [2] Wang Q, Liang Y Y, Li K W, et al. *Herba Siegesbeckiae*: A review on its traditional uses, chemical constituents, pharmacological activities and clinical studies [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 275: 114117.
- [3] 于静, 苏素文, 杨继章, 等. 豨莶草醇提取物对多柔比星致小鼠慢性心肌损伤的保护作用 [J]. *中国药房*, 2017, 28(10): 1320-1323.
Yu J, Su S W, Yang J Z, et al. Protective effects of ethanol extracts from siegesbeckiae herba on doxorubicin-induced chronic myocardial injury in mice [J]. *China Pharm*, 2017, 28(10): 1320-1323.
- [4] 赵帅, 吴东雪, 陈茜, 等. 基于网络药理学的豨莶草治疗缺血性脑卒中作用机制研究 [J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(13): 2727-2735.
Zhao S, Wu D X, Chen X, et al. Study on mechanism for treating ischemic stroke of *Siegesbeckiae Herba* based on network pharmacology [J]. *China J Chin Mater Med*, 2019, 44(13): 2727-2735.
- [5] 白云绮, 李慧, 高照, 等. 酒制豨莶草和生豨莶草对缺氧损伤的 H9c2 心肌细胞保护作用的比较研究 [J]. *世界中医药*, 2022, 17(6): 779-783, 789.
Bai Y Q, Li H, Gao Z, et al. Protective effects of wine-processed and raw *Siegesbeckiae Herba* on H9c2 myocardial cells induced by hypoxia: A comparative analysis [J]. *World Chin Med*, 2022, 17(6): 779-783, 789.
- [6] Khan M A, Hashim M J, Mustafa H, et al. Global epidemiology of ischemic heart disease: Results from the global burden of disease study [J]. *Cureus*, 2020, 12(7): e9349.
- [7] 徐丽伟, 徐帅, 王菁, 等. 豨莶草药理作用研究进展 [J]. *长春中医药大学学报*, 2021, 37(3): 704-708.
Xu L W, Xu S, Wang J, et al. Research progress on the pharmacological actions of *Herba Siegesbeckia* [J]. *J Changchun Univ Chin Med*, 2021, 37(3): 704-708.
- [8] 范帅帅, 高乐, 田伟, 等. 豨莶草化学成分和药理作用及质量标志物(Q-Marker)的预测分析 [J]. *中草药*, 2021, 52(23): 7389-7400.
Fan S S, Gao L, Tian W, et al. Chemical components and pharmacological action for *Siegesbeckiae Herba* and predictive analysis on its Q-Marker [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2021, 52(23): 7389-7400.
- [9] Wei X H, Wu Y Z, Pan H E, et al. Proteomics revealed that mitochondrial function contributed to the protective effect of *Herba Siegesbeckiae* against cardiac ischemia/reperfusion injury [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 895797.
- [10] 张殿文, 李木石, 王清, 等. 豨莶精醇对大鼠的抗栓作用及机制 [J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(17): 4157-4158.
Zhang D W, Li M S, Wang Q, et al. Anti-thrombotic effect and mechanism of stilbene alcohol in rats [J]. *Chin J Gerontol*, 2016, 36(17): 4157-4158.
- [11] Rajendran P, Alzahrani A M, Ahmed E A, et al. Kirenol inhibits B[a]P-induced oxidative stress and apoptosis in endothelial cells via modulation of the Nrf2 signaling pathway [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2021, 2021: 5585303.
- [12] Alzahrani A M, Rajendran P, Veerarahavan V P, et al. Cardiac protective effect of kirenol against doxorubicin-induced cardiac hypertrophy in H9c2 cells through Nrf2 signaling via PI3K/AKT pathways [J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(6): 3269.
- [13] 郑婉, 杨珊珊, 林云, 等. 南瓜多糖调控 Nrf2/ γ -GCS 通路对缺氧/复氧心肌细胞损伤的影响 [J]. *中国免疫学杂志*, 2024, 40(9): 1871-1875.
Zheng W, Yang S S, Lin Y, et al. Impact of pumpkin polysaccharides on hypoxia/reoxygenation-induced myocardial cell injury by regulating Nrf2/ γ -GCS pathway [J]. *Chin J Immunol*, 2024, 40(9): 1871-1875.
- [14] Giordano F J. Oxygen, oxidative stress, hypoxia, and heart failure [J]. *J Clin Invest*, 2005, 115(3): 500-508.
- [15] Seko Y, Fujimura T, Yao T, et al. Secreted tyrosine sulfated-eIF5A mediates oxidative stress-induced apoptosis [J]. *Sci Rep*, 2015, 5: 13737.
- [16] Barry S P, Townsend P A, McCormick J, et al. STAT3 deletion sensitizes cells to oxidative stress [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2009, 385(3): 324-329.
- [17] Boengler K, Hilfiker-Kleiner D, Drexler H, et al. The myocardial JAK/STAT pathway: From protection to failure [J]. *Pharmacol Ther*, 2008, 120(2): 172-185.
- [18] Bolli R, Stein A B, Guo Y R, et al. A murine model of inducible, cardiac-specific deletion of STAT3: Its use to determine the role of STAT3 in the upregulation of cardioprotective proteins by ischemic preconditioning [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(4): 589-597.
- [19] Zhang D M, Cao Q L, Jing L L, et al. Establishment of a hypobaric hypoxia-induced cell injury model in PC12 cells [J]. *Zhejiang Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban*, 2021, 50(5): 614-620.
- [20] Fariás J G, Molina V M, Carrasco R A, et al. Antioxidant therapeutic strategies for cardiovascular conditions associated with oxidative stress [J]. *Nutrients*, 2017, 9(9):

- 966.
- [21] Lykkesfeldt J. Malondialdehyde as biomarker of oxidative damage to lipids caused by smoking [J]. *Clin Chim Acta*, 2007, 380(1/2): 50-58.
- [22] Ho E, Karimi Galoughi K, Liu C C, et al. Biological markers of oxidative stress: Applications to cardiovascular research and practice [J]. *Redox Biol*, 2013, 1(1): 483-491.
- [23] Tsikas D. Assessment of lipid peroxidation by measuring malondialdehyde (MDA) and relatives in biological samples: Analytical and biological challenges [J]. *Anal Biochem*, 2017, 524: 13-30.
- [24] Ali S S, Ahsan H, Zia M K, et al. Understanding oxidants and antioxidants: Classical team with new players [J]. *J Food Biochem*, 2020, 44(3): e13145.
- [25] Hess M L, Manson N H. Molecular oxygen: Friend and foe. The role of the oxygen free radical system in the calcium paradox, the oxygen paradox and ischemia/reperfusion injury [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 1984, 16(11): 969-985.
- [26] Sies H, Cadenas E. Oxidative stress: Damage to intact cells and organs [J]. *Phil Trans R Soc Lond B*, 1985, 311(1152): 617-631.
- [27] Korshunova A Y, Blagonravov M L, Neborak E V, et al. BCL2-regulated apoptotic process in myocardial ischemia-reperfusion injury (Review) [J]. *Int J Mol Med*, 2021, 47(1): 23-36.
- [28] Liu L, Zhang Z Z, Xing D. Cell death via mitochondrial apoptotic pathway due to activation of Bax by lysosomal photodamage [J]. *Free Radic Biol Med*, 2011, 51(1): 53-68.
- [29] Mahdiani S, Omidkhoda N, Rezaee R, et al. Induction of JAK2/STAT3 pathway contributes to protective effects of different therapeutics against myocardial ischemia/reperfusion [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155: 113751.
- [30] Duan W X, Yang Y, Yan J J, et al. The effects of curcumin post-treatment against myocardial ischemia and reperfusion by activation of the JAK2/STAT3 signaling pathway [J]. *Basic Res Cardiol*, 2012, 107(3): 263.
- [31] Yang Y, Duan W X, Jin Z X, et al. JAK2/STAT3 activation by melatonin attenuates the mitochondrial oxidative damage induced by myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *J Pineal Res*, 2013, 55(3): 275-286.
- [32] 田海涛, 蔡春颖, 赵东升, 等. 基于 UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS 技术与网络药理学研究赶黄草保肝潜在药效物质基础和作用机制 [J]. *中草药*, 2024, 55(5): 1477-1492.
- Tian H T, Cai C y, Zhao D S, et al. Potential pharmacodynamic substances basis and mechanism of *Penthorum chinense* in liver protection based on UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS and network pharmacology [J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2024, 55(5): 1477-1492.

[责任编辑 刘东博]