

丁苯酞通过 RAS/PI3K 信号通路减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤

王 沂^{1,2}, 易 杰¹, 陈 明¹, 刘宝堂^{3*}, 侯文明^{3*}

1. 山东第二医科大学 重症医学实验室, 山东第二医科大学 麻醉学院, 山东 潍坊 261000

2. 山东省高校麻醉与重症医学实验室, 山东第二医科大学麻醉学院, 山东 潍坊 261000

3. 山东第二医科大学附属医院 心血管外科, 山东 潍坊 261000

摘要: **目的** 探讨丁苯酞(3-*N*-丁基苯酞, NBP)减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤(MIRI)的作用及机制。**方法** 综合网络药理学方法,预测 NBP 减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤的潜在分子靶点与通路。继而结扎心脏的左前降支冠状动脉法构建 SD 大鼠 MIRI 模型, NBP (80 mg·kg⁻¹) 预处理 7 d, 通过超声心动图量化心脏功能, TTC 染色法评估心肌梗死面积, ELISA 法检测心肌组织肌酸激酶-MB (CK-MB)、肌钙蛋白 T (cTnI)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 和乳酸脱氢酶 (LDH) 水平, 并借助 Western blotting 法分析心肌组织分子靶点的蛋白表达差异。最后体外培养 H9C2 大鼠心肌细胞, 细胞分为: 对照组, 正常培养; 模型组, 进行氧糖剥夺/再氧合 (OGD/R) 处理; NBP 组, 在 NBP (100 μmol·L⁻¹) 预处理 4 h 后进行 OGD/R; NBP+LY 组, 在 NBP 组的基础上额外给予 PI3K 特异性抑制剂 LY294002 15 μmol·L⁻¹ 预处理 1 h; FTS (RAS 抑制剂 Salirasib) 组, 在 OGD/R 的基础上以 FTS (39.36 μmol·L⁻¹) 预处理 12 h; FTS+NBP 组, 在 FTS 组的基础上以 100 μmol·L⁻¹ 的 NBP 预处理 4 h, 通过免疫荧光和 Western blotting 法进一步验证与探索 NBP 的作用通路。**结果** 网络药理学结果表明, NBP 发挥作用的信号通路可能包括: 脂质和动脉粥样硬化、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路、T 细胞受体信号通路、FoxO 信号通路、细胞凋亡、MAPK 信号通路和 Ras 信号通路。体内实验显示, 相较于对照组, NBP 预处理显著减轻 MIRI 诱导的 SD 大鼠心肌炎症反应与氧化应激, 缩小梗死率, 增强射血功能, 同时激活 PI3K 信号通路蛋白表达, 抑制凋亡通路蛋白表达, 差异均显著 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。体外实验证实, NBP 预处理通过 RAS/PI3K 信号通路调控凋亡蛋白, 并激活热休克蛋白 A12A (HSPA12A) 表达, LY294002 和 Salirasib 可以部分抵消其作用, 该调节方式可能呈单向性。体内外实验结果相互佐证。**结论** NBP 可有效缓解 MIRI 诱导的细胞凋亡, 发挥心脏保护作用, 机制可能与 RAS/PI3K 信号通路相关。

关键词: 心肌缺血再灌注损伤; 丁苯酞; 网络药理学; RAS; PI3K/Akt; 细胞凋亡

中图分类号: R285 **文献标志码:** A **文章编号:** 1674-6376(2025)11-3059-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-6376.2025.11.002

Butylphthalide attenuates myocardial ischemia-reperfusion injury in rats via RAS/PI3K signaling pathway

WANG Yi^{1,2}, YI Jie¹, CHEN Ming¹, LIU Baotang³, HOU Wenming³

1. School of Clinical Medicine, Shandong Second Medical University, Weifang 261000, China

2. Laboratory of Anesthesia and Critical Care Medicine in Colleges and Universities of Shandong Province, School of Anesthesiology, Shandong Second Medical University, Weifang 261000, China

3. Department of Cardiovascular Surgery, Affiliated Hospital of Shandong Second Medical University, Weifang 261000, China

Abstract: Objective The role and mechanism of 3-*N*-butylphthalide (NBP) in alleviating myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI) in rats were explored. **Methods** A comprehensive network pharmacology approach was used to predict the potential molecular targets and pathways of NBP in reducing MIRI in rats. Then, a MIRI model in SD rats was established by ligating the left anterior descending coronary artery. Rats were pretreated with NBP (80 mg·kg⁻¹) for seven days. Cardiac function was quantified by

收稿日期: 2025-04-21

基金项目: 山东省中医药科技项目 (M-2023061)

作者简介: 王 沂 (2000—), 男, 硕士研究生, 研究方向为心血管外科。E-mail: 1325159564@qq.com

*通信作者: 侯文明 (1966—), 男, 博士, 教授, 研究方向为心血管外科。E-mail: houdoc815@126.com

刘宝堂 (1982—), 男, 博士, 副主任医师, 研究方向为心血管外科。E-mail: wyfylbt@163.com

echocardiography, myocardial infarction area was evaluated by TTC staining, and levels of creatine kinase-MB (CK-MB), troponin T (cTnI), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and lactate dehydrogenase (LDH) in myocardial tissue were detected by ELISA. Western blotting was used to analyze the protein expression differences of molecular targets in myocardial tissue. In addition, H9C2 rat cardiomyocytes were cultured *in vitro*. The cells were divided into: control group, normal culture; model group, subjected to oxygen-glucose deprivation/reoxygenation (OGD/R) treatment; NBP group, pretreated with NBP ($100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 4 h before OGD/R; NBP + LY group, pretreated with PI3K-specific inhibitor LY294002 $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ for 1 h on the basis of the NBP group; FTS (RAS inhibitor Salirasib) group, pretreated with FTS ($39.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) for 12 h before OGD/R; FTS + NBP group, pretreated with $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ NBP for 4 h on the basis of the FTS group. Immunofluorescence and Western blotting were used to further verify and explore the action pathways of NBP. **Results** Network pharmacology results indicated that the possible signaling pathways involved in the action of NBP might include: lipid and atherosclerosis, PI3K/Akt signaling pathway, T-cell receptor signaling pathway, FoxO signaling pathway, apoptosis, MAPK signaling pathway, and Ras signaling pathway. *In vivo* experiments showed that compared with the control group, NBP pretreatment significantly reduced myocardial inflammatory response and oxidative stress induced by MIRI in SD rats, reduced infarction rate, enhanced ejection function, and activated PI3K signaling pathway protein expression while inhibiting apoptosis pathway protein expression, with significant differences ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). *In vitro* experiments confirmed that NBP pretreatment regulated apoptosis proteins through the RAS/PI3K signaling pathway and activated HSPA12A expression. LY294002 and Salirasib could partially cancel its effect, and this regulatory mode might be unidirectional. The results of *in vivo* and *in vitro* experiments were mutually supportive. **Conclusion** NBP can effectively alleviate MIRI-induced apoptosis and exert cardioprotective effects, and the mechanism may be related to the RAS/PI3K signaling pathway.

Key words: myocardial ischemia reperfusion injury; 3-*N*-butylphthalide; network pharmacology; RAS; PI3K/Akt; apoptosis

急性心肌梗死是心血管疾病中最严重的类型之一,及时恢复缺血心肌的血液灌注是挽救患者生命的关键措施^[1-2]。然而,缺血再灌注过程往往伴随着心肌细胞的进一步损伤,表现为心律失常、心肌填塞、心肌坏死等,严重影响患者的心脏功能和预后^[3-4]。这一现象被称为心肌缺血再灌注损伤(MIRI),其机制复杂,涉及多个方面。其中,氧自由基的产生、钙超载、炎症反应、细胞凋亡等被认为是主要的致病因素^[5-6]。

近年来,寻找有效的干预措施来减轻 MIRI 已成为心血管领域的热门研究课题。丁苯酞(3-*N*-丁基苯酞, NBP)预处理在减轻 MIRI 方面显示出巨大的潜力。NBP 是一种从芹菜种子中提取的化合物,通常用于治疗神经系统疾病^[7],被批准用于临床已有 20 多年,其疗效和安全性已在长期临床试验中得到证实^[8-12]。许多研究表明, NBP 能有效减轻铁死亡、细胞凋亡、炎症和氧化应激损伤^[13-16]。最近的研究还表明, NBP 有望成为一种保护心血管系统的新药。例如,其能减轻心肌肥大,减少动脉粥样硬化,减轻化疗药物对心肌的毒性^[17-19]。

传统的药物研究方法往往费时费力,成功率低,而网络药理学的兴起为药物靶点预测提供了一种新的思路和方法。大量的研究结果被构建成靶点数据库,通过各种数据库获得药物分子和疾病的潜在靶点,搜索两者之间的共同节点,然后进行富集

分析,获得潜在的作用方式或通路^[20-21]。尽管网络药理学预测的靶点并不完全可靠,但基于这种方法的后续研究仍可大大降低实验研究的人力和物力成本。本研究综合网络药理学方法,预测介导 NBP 改善 MIRI 的潜在分子靶点与通路;继而构建 SD 大鼠 MIRI 模型开展体内验证,构建 H9C2 大鼠心肌细胞氧糖剥夺/再氧合(OGD/R)模型,探讨 NBP 减轻 MIRI 的作用机制。

1 材料

1.1 实验动物

健康 8 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠,体质量 220~240 g,购自济南鹏悦实验动物有限公司,饲养环境温度(24±1)℃,湿度(55±5)%。在进行所有干预前,大鼠均需进行为期 1 周的环境适应,期间无限制给予饮水和进食。实验前,通过随机数法对大鼠进行随机分组,实验的操作人员不参与动物分组。实验方案经山东第二医科大学动物实验委员会批准(2024SDL682)。

1.2 细胞

H9C2 大鼠心肌细胞(CL-0089),购自武汉普诺赛公司。

1.3 主要仪器

7.2 心电监测仪(LabChart 公司);RV0794 呼吸机(Kent Scientific 公司);S7 SCI 超声成像系统(Mindray 公司);SpectraMax i3x 酶标仪(Molecular

Devices 公司); BB15 细胞培养箱 (Thermo Scientific 公司); U-LH100-3 共聚焦显微镜 (OLYMPUS 公司); 5200 化学发光成像仪 (Tanon 公司); Light Cycle 480 II qPCR 仪器 (美国 Roche 公司)。

1.4 药物及主要试剂

为满足体内实验药物浓度需要, 体内实验所使用 NBP 购自 MedChemExpress 公司 (货号 HY-B0647), 质量分数 99.98%; 细胞实验所使用 NBP 购自石药集团恩必普药业有限公司 (货号 H20100041), 质量浓度 $250 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$; RAS 抑制剂 Salirasib (*S*-farnesylthiosalicylic acid, FTS, 货号 HY-14754, 质量分数 99.04%)、磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K) 抑制剂 LY294002 (货号 HY-10108, 质量分数 99.86%), 均购自 MedChemExpress 公司。

肌酸激酶-MB (CK-MB, 货号 SEKR-0059)、钙蛋白 T (cTnI, 货号 SEKR-0048)、超氧化物歧化酶 (SOD) 活性试剂盒 (货号 BC5165)、乳酸脱氢酶 (LDH) 活性检测试剂盒 (货号 BC0685)、细胞计数试剂 (CCK-8, 货号 CA1210)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (货号 PC0020), 均购自 Solarbio 公司; 丙二醛 (MDA) 检测试剂盒 (Beyotime 公司, 货号 S0131); HIScript III RT SuperMIX for qPCR (+qDNA wiper) 试剂盒 (Vazyme 公司, 货号 R323); $2 \times \text{ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix}$ (Vazyme 公司, 货号 Q711); 荧光二抗 (1:100, Proteintech 公司, 货号 SA00013-2); 2, 3, 5-三苯基氯化四氮唑 (TTC) 溶液 (BioSharp 公司, 货号 BL1215A); Trizol (CWBIO 公司, 货号 CW0590S)。使用的抗体包括: 抗-p-PI3K 抗体 (1:500, 货号 AF3241), Affinity 公司; 抗-蛋白激酶 B (Akt) 抗体 (1:2000, 货号 10176-2-AP)、抗-Bcl-2 抗体 (1:500, 货号 26593-1-AP)、抗-Bax 抗体 (1:2000, 货号 50599-2-Ig)、辣根过氧化物酶 (HRP) 耦联山羊抗兔 IgG 抗体 (1:5000, 货号 SA00001-2), Proteintech 公司; 抗-磷酸-Akt 抗体 (1:2000, 货号 4060)、抗-RhoA 抗体 (1:1000, 货号 2117), Cell Signaling Technology 公司; 抗热休克蛋白 A12A (HSPA12A) 抗体 (1:1000, 货号 A19825)、抗 β -actin 抗体 (1:80000, 货号 AC026), ABclonal 公司。

2 方法

2.1 网络药理学预测

2.1.1 药物和疾病相关靶点的筛选 NBP 的化学

结构数据来自 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)。然后由 Phymmapper (<http://www.lilab-ecust.cn/phymmapper/>) 进行靶标预测, 筛选出得分大于 0.6 (总分 1.0) 的靶标纳入后续研究。筛选出的靶标通过 UniProt (<http://www.Uniprot.org/>) 数据库^[22]转换成所有靶标名称的公认缩写名称。以“心肌缺血再灌注损伤/myocardial ischemia-reperfusion injury/MIRI”为关键词, 在 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org>)、Oline Mendeline Inheritance in Man (OMIM) 数据库 (<http://www.omim.org>)、中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>)、Therapeutic Target Database (TTD) 数据库 (<https://db.idrblab.net/ttd>) 中搜索与 MIRI 相关的靶点^[23-24]。对所有疾病靶点进行整合, 并删除重复的靶点。

2.1.2 蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络 通过 R 4.3.0 的 VennDiagram (1.7.3) 软件包获取药物和疾病的交集靶点。将交集基因上传到 STRING11.0 数据库 (<https://string-db.org>), 将物种设置为“智人 (*Homo sapiens*)”。其余选项均保持默认值^[25]。

2.1.3 富集分析 交集靶标被上传到 Metascape 数据库 (<http://metascape.org/gp/index.html>) 进行基因本体 (GO) 富集和京都基因组百科全书 (KEGG) 通路富集分析^[26]。用 R 4.3.0 进行可视化, 并选择适当的靶标或通路进行实验验证。

2.2 体内实验验证

2.2.1 动物实验方案 术前用 1%戊巴比妥钠 ($50 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 麻醉大鼠, 并连接电极针观察心电图变化。在气管软骨环处做切口建立机械通气, 呼吸机容量为 $15 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$, $72 \text{ 次} \cdot \text{min}^{-1}$ ^[27]。在第 4 和第 5 肋之间的肋间隙处暴露心脏, 然后用 7-0 号缝线在左心耳和肺动脉交界处下方 2~3 mm 处结扎心脏的左前降支冠状动脉, 结扎前放置软胶条以方便结扎后再灌注。通过肉眼观察心脏心尖-左心室部分变白和心电图 ST 段抬高来判断结扎是否成功。结扎 30 min 后, 松开结扎并再灌注 2 h^[27]。再灌注成功的标准是结扎解除后心尖和左心室区域的苍白色减弱并转红色, 且 ST 段抬高下降 50%以上。SD 雄性大鼠随机分为 4 组: 假手术组只穿线, 不结扎; 单给 NBP 组给予 NBP ($80 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$) 预处理, 手术操作同假手术组; 模型组接受 MIRI 手术; NBP 组

给予 NBP (80 mg·kg⁻¹) 预处理, 手术操作同模型组。末次给药在术前 2 h, 给药时间为 7 d, 每天给药 1 次, ip 给药, 该药物剂量及给药方法通过查阅相关文献拟定^[11, 17-19]。心脏功能评估操作结束后, 对大鼠进行二氧化碳过量吸入安乐死, 并在确认大鼠死亡后游离并获取完整大鼠心脏。使用 0.9%氯化钠溶液对大鼠心脏进行冲洗, 并冷冻保存。

2.2.2 心脏功能评估 进行超声心动图检查, 使用 Mindray (S7 SCI) 成像系统进行超声心动图 (UCG) 检查, 探头频率为 20 MHz, 轴向分辨率为 28~80 μmol·L⁻¹, 由机器动态调节。对大鼠进行麻醉, 剔除胸毛, 并将其固定于保温绝缘垫上。在麻醉后和再灌注后 2 个时间点收集 M 型超声数据。

2.2.3 梗死面积评估 大鼠处死后, 将心脏冷冻 20 min, 然后沿左心室长轴在结扎部位下方每隔 1~2 mm 处切片, 共获得 5 片心脏组织。将心脏组织浸泡在 2%的 TTC 溶液中, 37 °C 恒温避光孵育 30 min, 并每隔 5 min 轻轻摇动数次。培养结束后, 用磷酸盐缓冲液 (PBS) 冲洗组织切片 3 次, 在滤纸上晾干, 然后用 4%多聚甲醛固定 4 h。拍照成像。使用 Image J 软件分析梗死区 (A, 白色) 和非梗死区 (B, 红色), 计算梗死率。

2.2.4 CK-MB 和 cTnI 水平检测 CK-MB 和 cTnI 的水平使用酶联免疫吸附 (ELISA) 检测试剂盒进行测定, 检测样本为各组大鼠心脏组织提取液, 提取方法/处理依照各类试剂盒说明书进行。使用酶标仪测量样本在 450 nm 处的吸光度 (A) 值。

2.2.5 SOD、MDA 和 LDH 水平检测 试剂盒法测定各组大鼠心脏组织提取液中 SOD、MDA 和 LDH 水平。

2.2.6 RNA 分离和实时荧光定量 PCR(qRT-PCR) 用 Trizol 法提取心脏组织中的 RNA, 用 H1Script III RT SuperMIX for qPCR (+qDNA wiper) 试剂盒去除基因组 DNA, 进行反转录生成 cDNA。构建 10 μL 扩增反应体系: 2×ChamQ Universal SYBR qPCR Master Mix 5 μL 和前引物和后引物各 0.1 μL。加入样品后, 使用 qPCR 仪器进行扩增反应。扩增方案如下预变性: 95 °C、30 s; 循环反应 (40 次): 95 °C、10 s, 然后 60 °C、30 s; 熔化曲线。引物序列见表 1。

2.2.7 Western blotting 提取心脏组织中总蛋白, 用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白质浓度。定量后, 加入 5×SDS-PAGE 蛋白取样缓冲液, 100 °C

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'→3')
<i>TNF-α</i>	F-TGATCGGTCCCAACAAGGA R-TGCTTGGTGGTTTGCTACGA
<i>IL-1β</i>	F-AAGATGAAGGGCTGCTTCCAAACC R-ATACTGCCTGCCTGAAGCTCTTGT
<i>β-actin</i>	F-CATGTACGTTGCTATCCAGGC R-CTCCTTAATGTCACGCACGAT

加热 5 min 使蛋白质变性。蛋白质样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 在 80 V 恒压下分离, 并以 300 mA 恒流转移到聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜上。室温下用 5%脱脂奶粉封闭 PVDF 膜 2 h, 然后用一抗在 4 °C 孵育过夜。室温下用辣根过氧化物酶 (HRP) 耦联山羊抗兔 IgG 抗体与 PVDF 膜孵育 1 h, 充分浸润增强化学发光 (ECL) 试剂后用化学发光成像仪对条带成像。接触试剂更换试剂时, 所有 PVDF 膜均用 TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min。

2.3 体外实验

2.3.1 细胞培养 H9C2 细胞在含有 10%胎牛血清和 1%青霉素-链霉素的 DMEM 培养基中培养。培养条件为 37 °C 恒温和 5% CO₂。所有细胞模型均使用 6~9 代 H9C2 细胞。

2.3.2 细胞活力分析 为筛选合适浓度的 NBP, 将 H9C2 细胞接种于 96 孔板, 每孔接种 5×10³ 个细胞, 培养 24 h 后干预。通过梯度稀释法将细胞暴露于一系列浓度的 NBP (3.125、6.250、12.500、25.000、50.000、100.000、200.000、400.000 μmol·L⁻¹) 中, 预处理 4 h, 对照组不加药, 空白孔不接种细胞。随后进行 OGD/R 实验: 将培养基换成无糖培养基, 在缺氧条件下培养 4 h (O₂ 2%、CO₂ 5%、N₂ 93%), 然后换成正常培养基和正常环境培养 4 h。加入细胞计数试剂 (CCK-8) 避光孵育 1 h。最后, 在 450 nm 波长处测定 A 值, 计算细胞存活率。

$$\text{细胞存活率} = (A_{\text{实验}} - A_{\text{空白}}) / (A_{\text{对照}} - A_{\text{空白}})$$

同法检测 FTS (0、6.25、12.50、25.00、50.00、100.00、200.00 μmol·L⁻¹) 处理 H9C2 细胞 12 h 的半数抑制浓度 (IC₅₀)。

2.3.3 细胞处理 (1) 分为 4 组: 对照组, 正常培养; 模型组, 进行 OGD/R 处理; NBP 组, 在进行 NBP (100 μmol·L⁻¹) 预处理 4 h 后进行 OGD/R 干预; NBP+LY 组, 在 NBP 组的基础上额外给予

PI3K 特异性抑制剂 LY294002 $15 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 预处理 1 h^[28-29]。除添加不同的抑制剂和特殊处理外, 各组细胞的培养和处理方法与“2.3.2”项相同。

(2) 分为 4 组: 对照组, 正常培养; 模型组, 进行 OGD/R 处理; FTS 组, 在 OGD/R 的基础上以 FTS ($39.36 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 预处理 12 h; FTS+NBP, 在 FTS 组的基础上以 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 NBP 预处理 4 h。

(3) 分为 5 组: 对照组、模型组、NBP 组、NBP+LY 组、FTS+NBP 组, 各组处理同上。

2.3.4 免疫荧光 提前 1 d 将细胞接种到盖玻片上, 同“2.3.3 (1)”项处理结束后, 用 4% 多聚甲醛固定 H9C2 细胞 15 min, 然后用 Triton X-100 渗透 15 min。细胞用 5% 山羊血清阻断 30 min, 然后用相应的抗体在 4°C 孵育过夜。荧光二抗避光孵育 1 h, DAPI 孵育 10 min。在更换不同试剂之间, 均用 PBS 清洗 3 次, 每次 5 min。最后, 在共聚焦显微镜下拍摄图像。使用 Image J 软件计算图像的平均荧光亮度。

2.3.5 Western blotting 将 H9C2 细胞接种于 6 孔板, 每孔接种 8×10^4 个细胞, 同“2.3.3”项处理结束后, 用裂解液充分匀浆后裂解样品 30 min, 然后以 $12\,000 \text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min 吸取上清液。后续方法同“2.2.7”项。

2.4 分子对接

药物结构 (sdf) 通过 OpenBabel (3.1.1) (<https://open-babel.readthedocs.io/>) 转换为可识别格式 (mol2)^[30]。可能与 NBP 发生相互作用的蛋白质根据网络药理学和细胞实验结果筛选。蛋白质结构从蛋白质数据库 (PDB) 下载 (<https://www.rcsb.org/>)^[31]。将蛋白质结构导入 PyMol (2.6) (<https://PyMol.org/PyMol>) 软件, 去除水分子和原始配体。然后用 AutoDockTools (1.5.7) 进行氢化, 并计算 GridBox 的空间信息^[32]。通过 AutoDock Vina 计算结合能, 并使用结合能最低的位点进行分子对接。最后, 使用 PyMol 对分子对接进行可视化。

2.5 统计分析

数据均用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用 GraphPad Prism 9 软件进行统计分析。组间统计比较采用单因素方差分析 (ANOVA): 所有组内的数据均符合正态分布, 根据是否存在方差齐性检验, 使用普通方差分析检验/布朗-福尔赛方差分析检验 (Brown-Forsythe) 和韦尔奇方差分析 (Welch ANOVA) 检验。两组之间

的差异采用独立样本 t 检验进行分析。

3 结果

3.1 网络药理学

3.1.1 NBP 和 MIRI 的靶标预测和 PPI 网络 通过 Pharmmapper 数据库预测了 49 个 NBP 靶点。通过 OMIM 数据库获得了 43 个 MIRI 潜在靶点, 通过 GeneCards 数据库获得了 815 个 MIRI 潜在靶点, 通过 TCMSP 和 TTD 数据库分别获得了 3 个和 5 个 MIRI 潜在靶点。结合这 2 个数据集, 共鉴定出 19 个交叉靶标 (图 1-A)。通过 STRING 数据库对交叉靶标进行分析, 得到了 PPI 网络 (图 1-B)。

3.1.2 GO 富集和 KEGG 富集 为了获得更多的富集信息, 对 19 个交叉基因进行了富集分析。根据 $P<0.05$ 的显著性, 共筛选出 170 个生物过程 (BP) 项、8 个细胞组分 (CC) 项、13 个分子功能 (MF) 项和 89 个 KEGG 富集项。部分项目见图 1-C、D。其中, KEGG 通路富集表明, NBP 发挥作用的信号通路可能包括: 脂质和动脉粥样硬化、PI3K/Akt 信号通路、T 细胞受体信号通路、FoxO 信号通路、细胞凋亡、MAPK 信号通路和 Ras 信号通路。

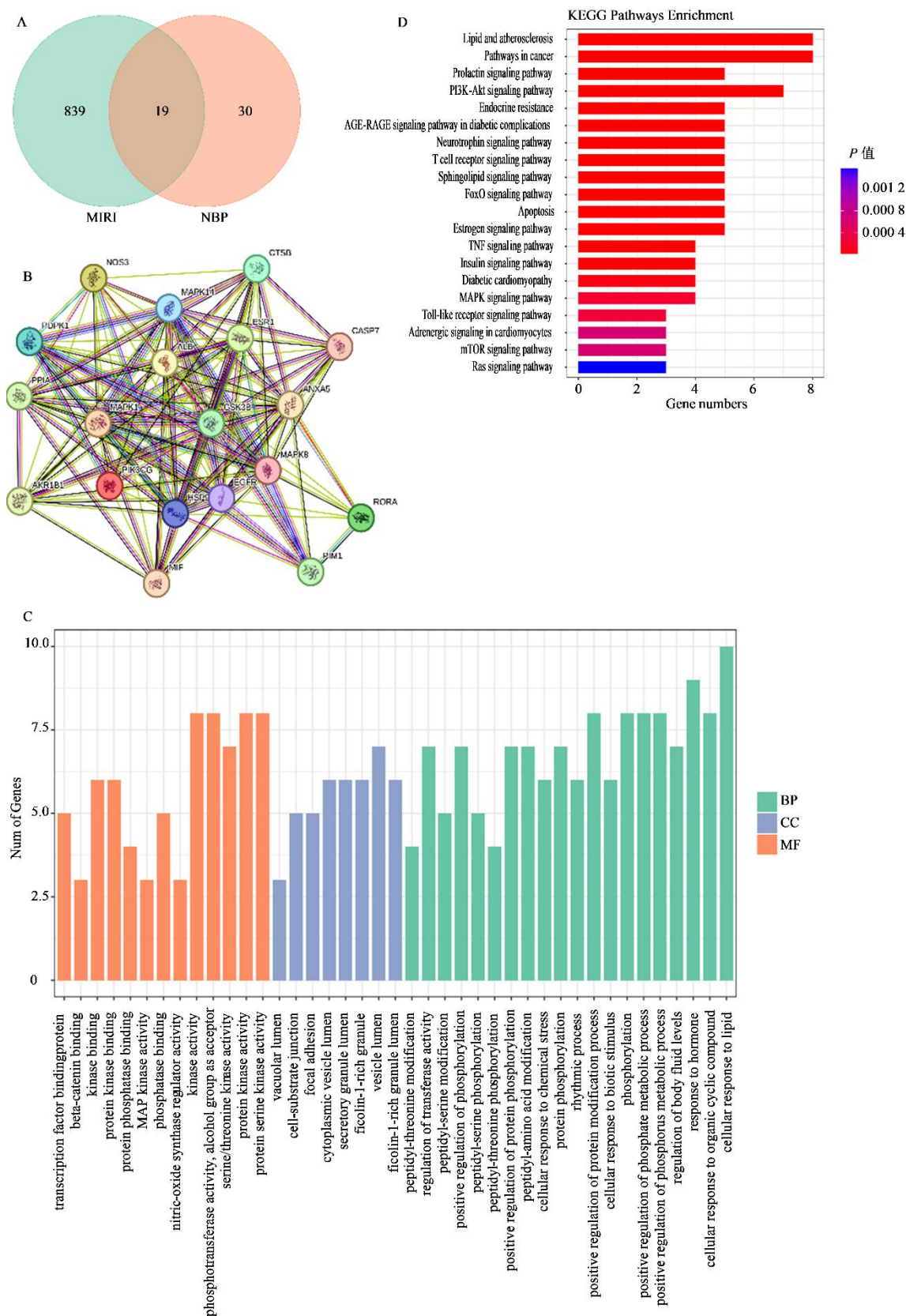
3.2 体内实验

3.2.1 NBP 预处理减轻 MIRI 诱导的大鼠心脏损伤 如图 2 所示, NBP 对 MIRI 的保护作用通过测量左室射血分数 (LVEF)、左室缩短分数 (FS)、梗死率和各种损伤指标来评估。与对照组比较, 模型组的 EF、FS、SOD 显著降低, CK-MB、cTnI、*IL-1 β* 和 *TNF- α* mRNA 水平显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, NBP 组的 EF、FS、SOD 显著升高, 梗死率、CK-MB、cTnI、*IL-1 β* 和 *TNF- α* mRNA 水平显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

3.2.2 NBP 预处理提高 PI3K 蛋白表达和 p-Akt 磷酸化水平、抑制细胞凋亡 如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白水平显著降低 ($P<0.001$), Bax 蛋白表达显著升高 ($P<0.001$); 与模型组比较, NBP 组 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白水平显著升高 ($P<0.05$ 、 0.01), Bax 蛋白表达显著降低 ($P<0.01$)。

3.3 体外实验

3.3.1 NBP 发挥细胞保护作用的适宜浓度 用 CCK-8 检测细胞活力 (图 4) 表明, 与对照组比较, 6.250、12.500、25.000、50.000、100.000、

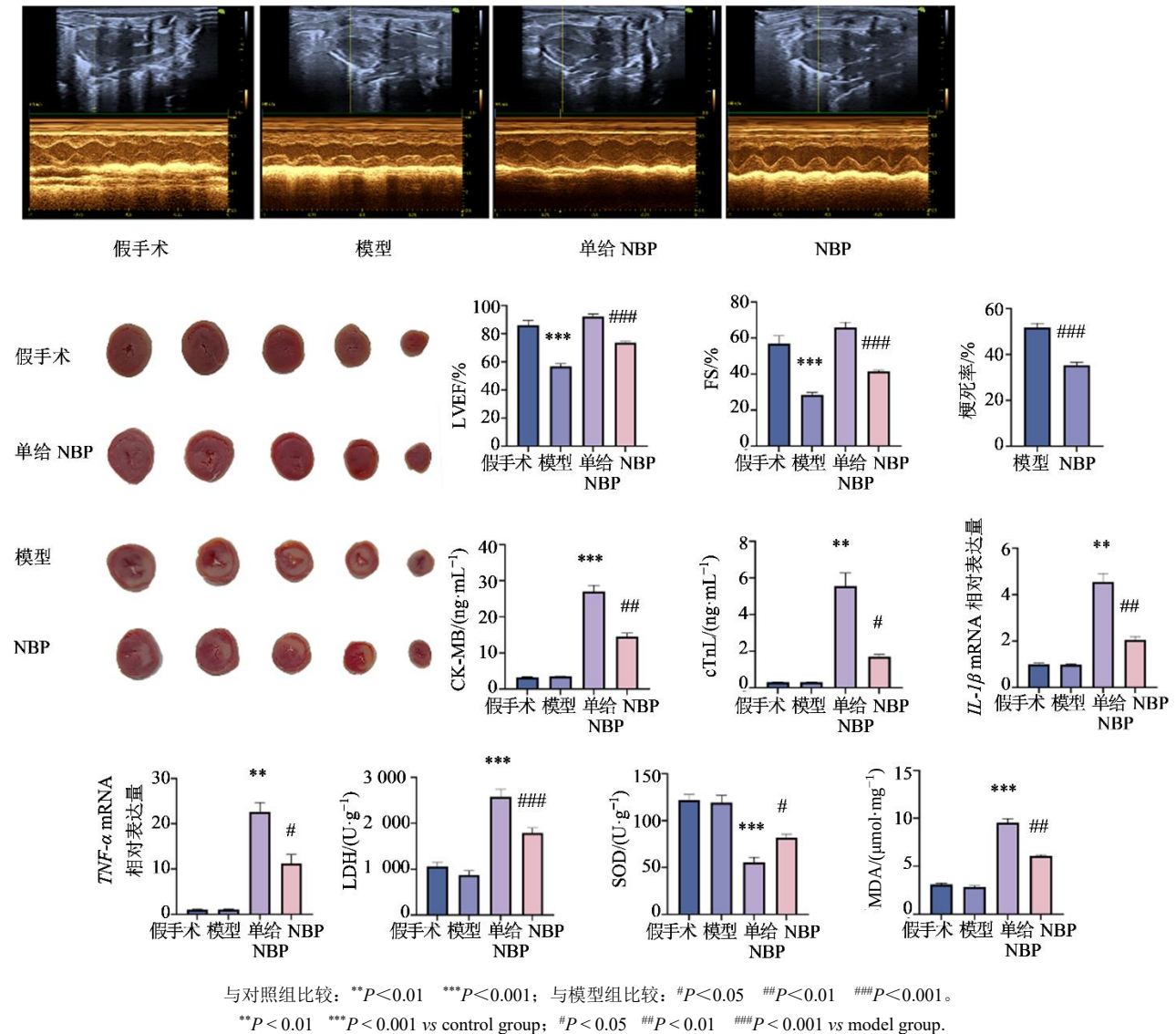


A-交叉基因韦恩图; B-PPI 网络; C-GO 富集; D-KEGG 通路富集。

A-Venn diagram of crossover genes; B-PPI network; C-GO enrichment; D-KEGG pathway enrichment.

图 1 网络药理学结果

Fig. 1 Network pharmacological results

图 2 NBP 抗 MIRI 作用的体内实验 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)Fig. 2 *In vivo* experiments to verify anti-MIRI effect of NBP ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

200.000、400.000 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ NBP 处理后细胞活力显著增加 ($P < 0.05$ 、0.001), 选择 100 $\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 浓度作为 NBP 后续预处理浓度。

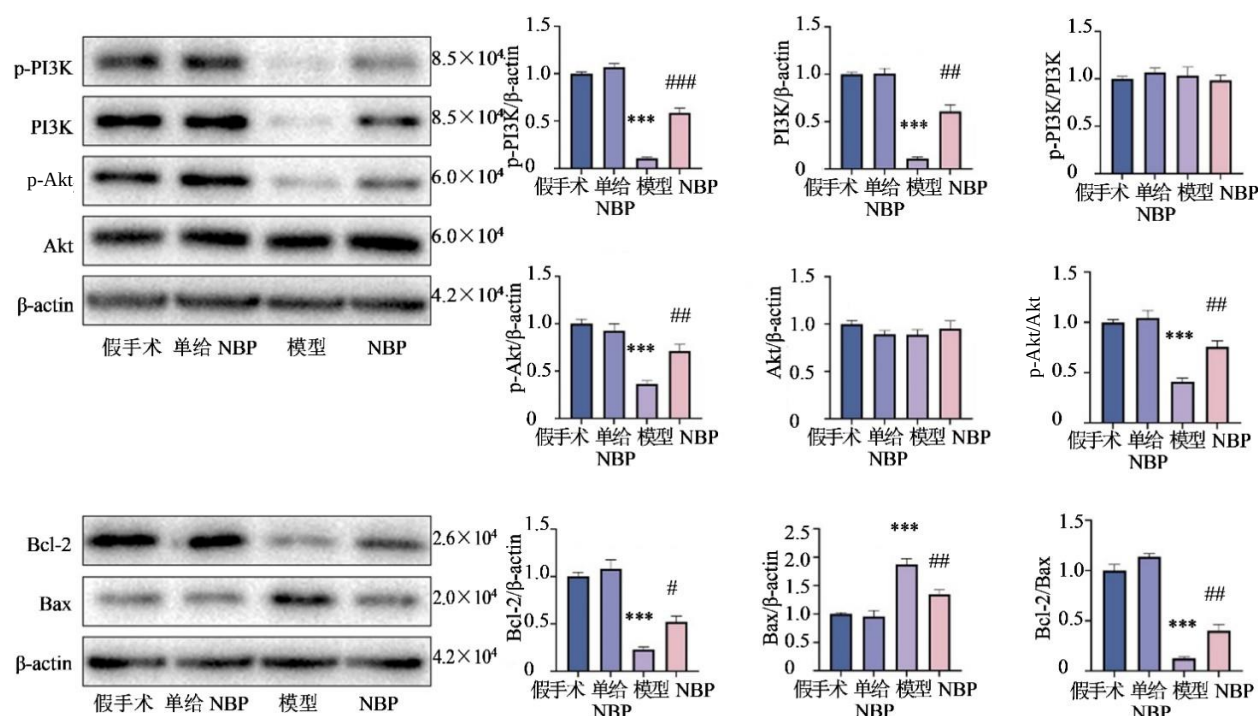
3.3.2 NBP 预处理对 PI3K/Akt、凋亡信号通路蛋白表达的影响 如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白水平显著降低 ($P < 0.001$), Bax 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, NBP 组 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白水平显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001), Bax 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); 与 NBP 组比较, NBP+LY 组 p-PI3K、p-Akt、Bcl-2 蛋白水平显著降低 ($P < 0.01$ 、0.001), Bax 蛋白表达显著升高 ($P < 0.01$)。

3.3.3 免疫荧光结果 如图 6 所示, 与对照组比较,

模型组 p-PI3K、p-Akt 荧光强度显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, NBP 组 p-PI3K、p-Akt 荧光强度显著升高 ($P < 0.01$ 、0.001); 与 NBP 组比较, NBP+LY 组 p-PI3K、p-Akt 荧光强度显著降低 ($P < 0.05$ 、0.001)。

3.4 NBP 作用的上下游调控探索

3.4.1 RAS 信号通路的上下游关系 KEGG 富集分析表明, RAS 信号通路是 NBP 作用的潜在通路之一。RhoA 是 RAS 家族的成员之一, 该蛋白已被证实病理性的发生发展过程中起负面作用, 但也有研究认为该蛋白具有一定心肌保护作用^[33]。如图 7 所示, 进一步的实验首先通过 CCK-8 验证了 RAS 蛋白特异性抑制剂 FTS 的合适使用

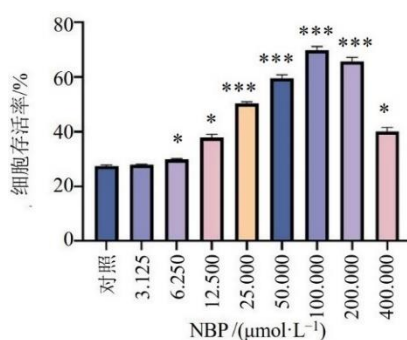


与对照组比较: *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ 。

*** $P < 0.001$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group.

图 3 体内实验 NBP 预处理对 PI3K/Akt 信号通路及凋亡相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 3 Effect of NBP pretreatment on PI3K/Akt signaling pathway and apoptosis related protein expression *in vivo* experiments ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)



与对照组比较: * $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ 。

* $P < 0.05$ *** $P < 0.001$ vs control group.

图 4 NBP 预处理对细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 4 Effect of NBP pretreatment on cell viability ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

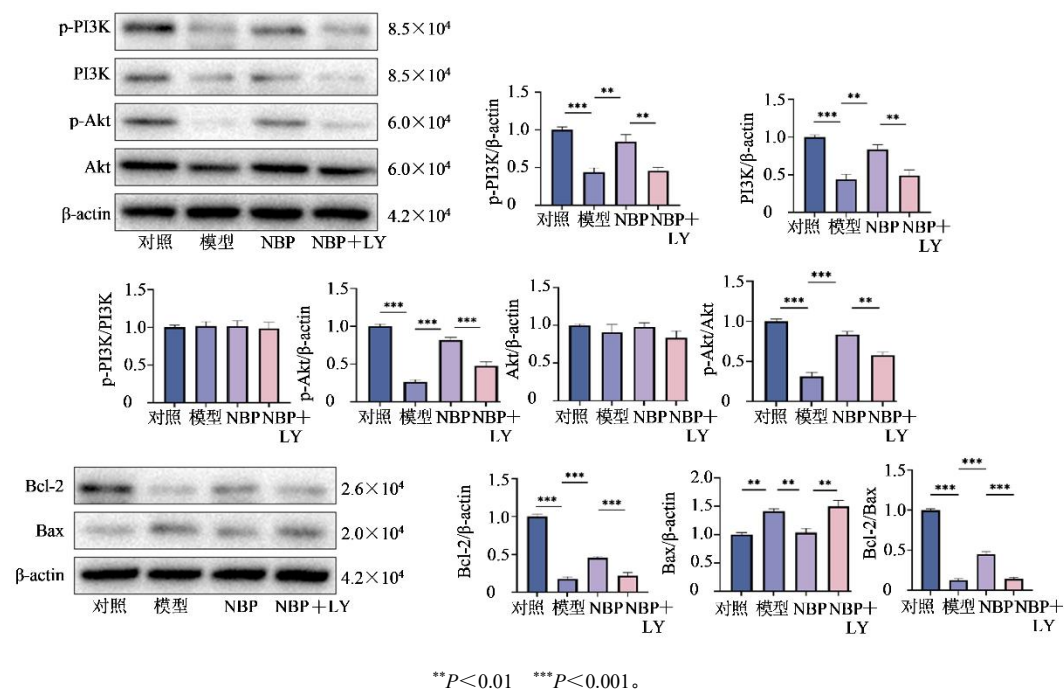
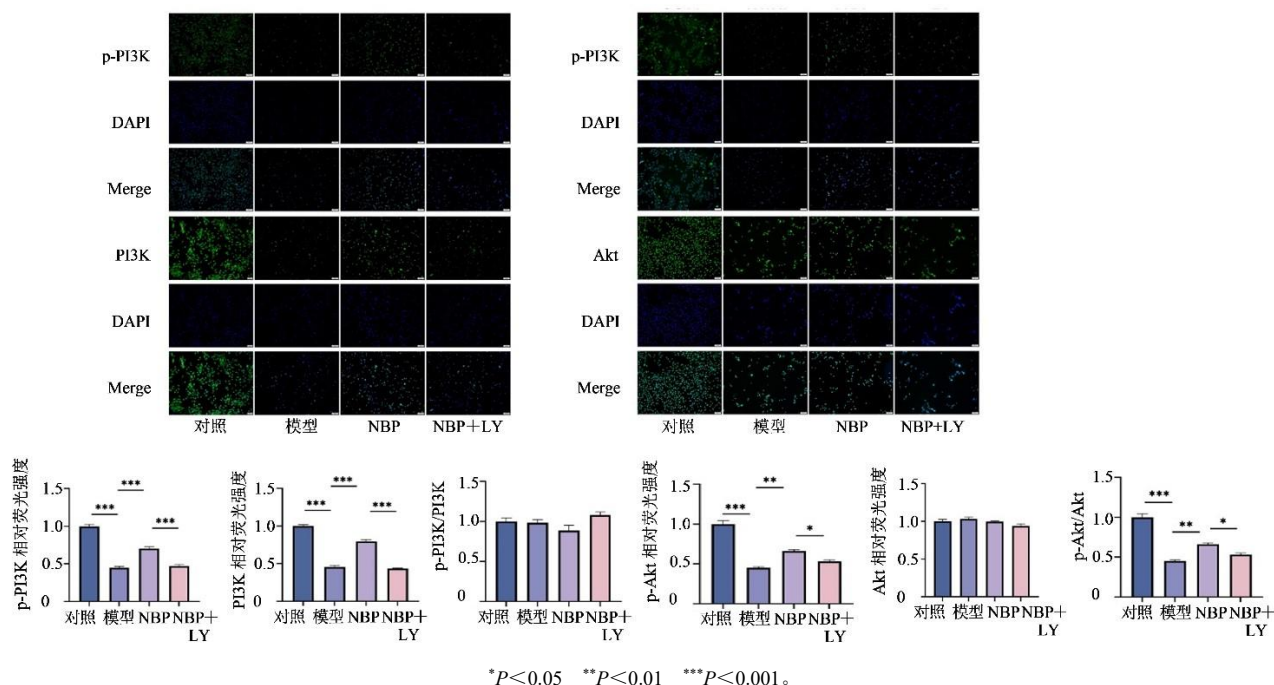
浓度, 后续采用其 IC_{50} 为 $36.355 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 进行实验。后续实验分为两部分, 第一部分实验分为 4 组: 对照组、模型组、NBP 组、NBP+LY 组, 结果显示, 与对照组比较, 模型组 RhoA 蛋白的表达显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, NBP 预处理显著降低了 RhoA 蛋白的表达 ($P < 0.001$); 与 NBP 组比较, NBP+LY 组的 RhoA 表达没有明显变化。

实验的第 2 部分分为 4 组: 对照组、模型组、FTS 组、FTS+NBP 组, 结果显示, 使用 RAS 特异性抑制剂 FTS 后, FTS 组 p-Akt 水平相对于模型组有所下降 ($P < 0.01$); 而在额外使用 NBP 后, p-Akt 水平相对于 FTS 组有所升高 ($P < 0.001$)。

3.4.2 HSPA12A 蛋白的上下游关系 PPI 网络提示了热休克蛋白 (HSP) 在 MIRI 过程中发挥潜在作用, 最近的研究揭示了热休克蛋白家族成员 HSPA12A 可调节巨噬细胞信号传导, 改善心室重塑, 还能保护线粒体功能, 减少糖尿病心肌病的发生和发展^[34]。因此, 探究 NBP 是否对 HSPA12A 的表达造成影响是进一步研究的目的。如图 7 所示, 相对于对照组, 模型组的 HSPA12A 表达水平明显降低 ($P < 0.001$); 而 NBP 预处理组相对于模型组能明显增加 HSPA12A 的表达 ($P < 0.05$), 联用 FTS 和 LY 后逆转 NBP 作用。

3.5 分子对接

结合网络药理学和细胞实验的验证结果, 选择关键的上游蛋白进行分子对接: RAS 蛋白 (RhoA、KRAS、HRAS、NRAS) 和 PI3K 蛋白 (PI3K α 、PI3K β 、

图 5 NBP 预处理对 PI3K/Akt、凋亡信号通路蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)Fig. 5 Effect of NBP pretreatment on protein expression of PI3K/Akt and apoptosis signalling pathway ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)图 6 PI3K/Akt 免疫荧光 ($\times 40$, $\bar{x} \pm s$, $n=5$)Fig. 6 PI3K/Akt immunofluorescence ($\times 40$, $\bar{x} \pm s$, $n=5$)

PI3K γ 、PI3K δ)。分子间结合能小于 0 表示分子能自发结合, 结合能越小, 分子结合越稳定。分子对接结果如图 (图 8) 所示。分子对接结果表明, NBP 与这些上游蛋白的结合能力良好, 所有分子对接结合能均小于 $-20.92 \text{ kJ} \cdot \text{mol}^{-1}$ 。分子对接结果也为进一步的相关研究提供了帮助。

4 讨论

心肌梗死后再灌注治疗虽可恢复血流, 但 MIRI 引发的细胞凋亡仍是临床难题, 针对 MIRI 的有效治疗方法一直是心血管疾病领域的一个热门方向。MIRI 的发生进展过程伴随着多种病理生理变化, 细胞凋亡的增加是公认的过程。因此, 开发针对细胞

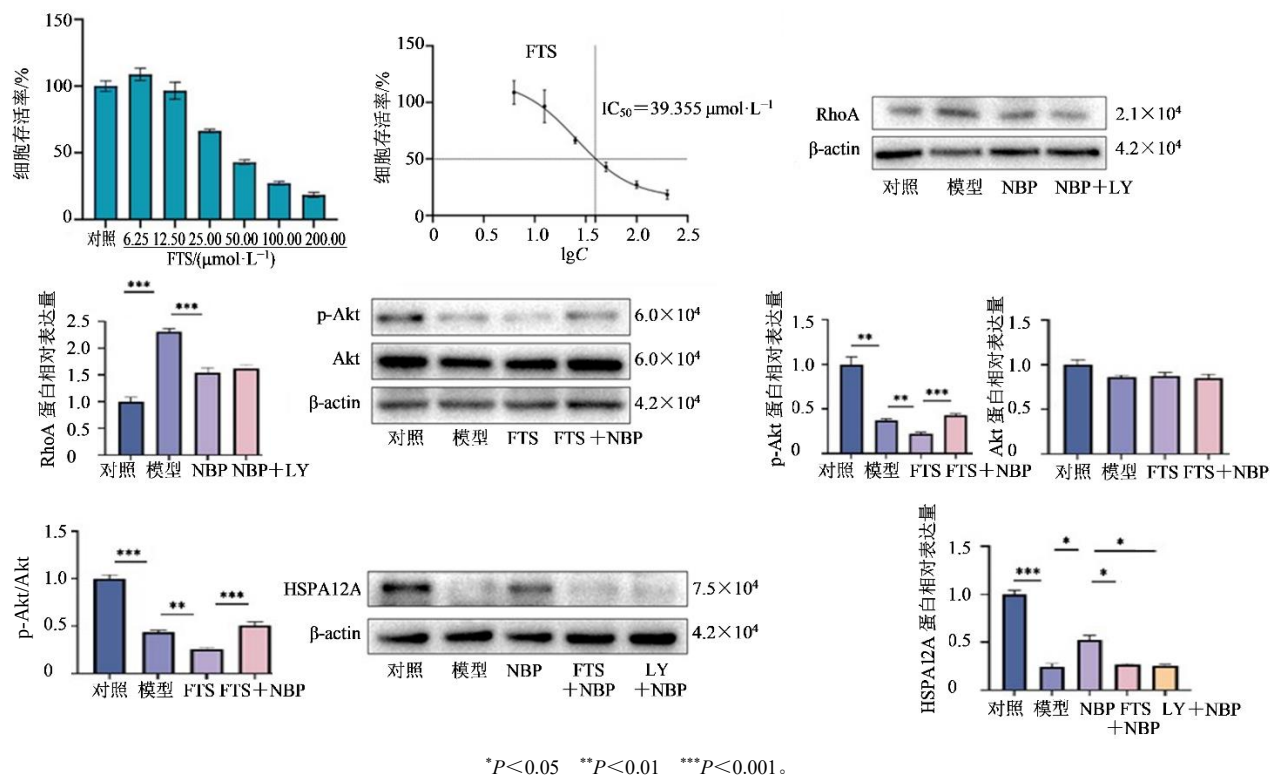


图 7 NBP 对 RAS 上下游信号通路和 HSPA12A 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

Fig. 7 Effect of NBP on upstream and downstream signaling pathways of RAS and expression of HSPA12A protein ($\bar{x} \pm s$, $n=5$)

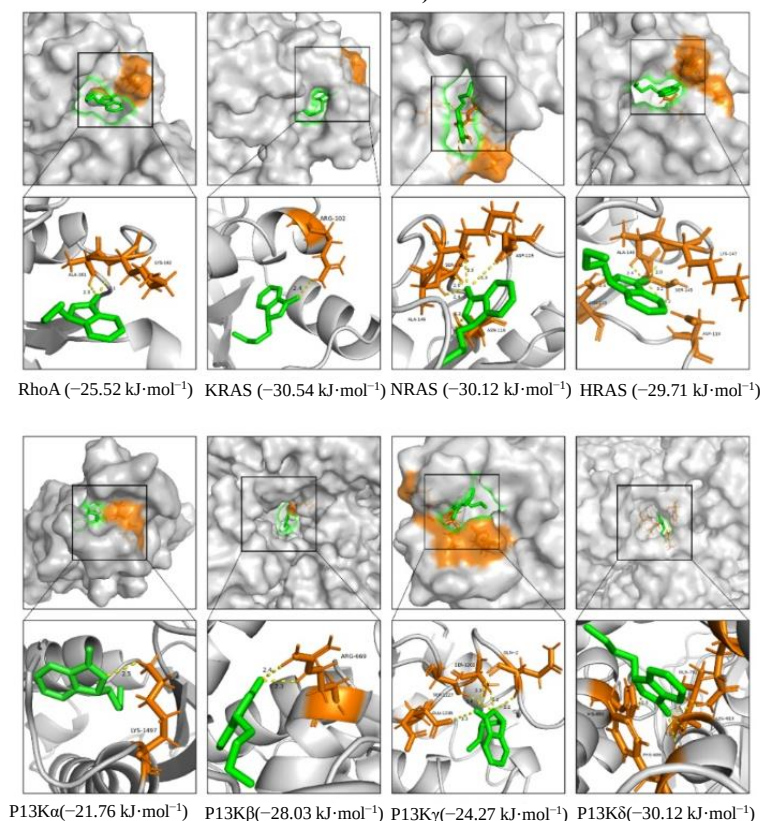


图 8 NBP 与关键蛋白最低结合能位置的分子对接模式

Fig. 8 Molecular docking patterns at lowest binding energy positions of NBP and key proteins

凋亡的新治疗策略是缓解 MIRI 的一个重要研究方向。

心脏射血分数是反映心脏功能的重要指标,也是适应心脏手术重要参考依据。在这项研究中,通过超声心动图发现对 SD 大鼠的 NBP 预处理能有效缓解 MIRI 造成的射血分数下降,可以初步判断 NBP 具有有效的心脏保护作用。此外,心肌酶及炎症因子的变化是判断心肌细胞损伤的参考依据,可以观察到 NBP 预处理相对于模型组能够有效缓解这些指标的变化。本研究结果与之前关于 NBP 抗炎和抗凋亡特性的相关研究结果一致^[35-38]。表明 NBP 能够有效抑制 MIRI 引起的氧化应激和炎症损伤。

同时,体内和体外实验的蛋白表达检测说明 NBP 的保护作用依赖于 RAS 信号通路和 PI3K/Akt 信号通路。其过程应当是抑制 RhoA 蛋白表达进而激活 PI3K 信号通路,并促进 HSPA12A 蛋白的表达和抑制凋亡发生。PI3K/Akt 信号通路是一种关键的细胞存活机制,其在维持细胞的正常功能中发挥不可或缺的作用,该信号通路可协调细胞凋亡、自噬和新陈代谢等过程^[39-40]。最新的研究证据证实了该通路在减轻心房颤动、心室重构,尤其是在 MIRI 期间减轻心肌细胞凋亡方面的心脏保护作用^[41-42]。这项研究中,无论体内还是体外实验均发现 NBP 处理可显著上调 PI3K 总蛋白的表达并增强 p-Akt 的表达水平。通过对凋亡蛋白的检测也可以发现 NBP 预处理相对于模型组的 Bcl-2 水平明显增加,而 Bax 水平显著减少,说明 NBP 通过激活 PI3K 信号通路调节凋亡蛋白的比值关系,反映为体内实验的梗死面积显著减少。

RAS 蛋白是包含上百种不同结构的蛋白超家族,其功能也被认为参与调节细胞的凋亡。RhoA 是该家族的成员之一,该蛋白已被证明在心脏重塑和心肌病中发挥重要作用,但由于体外和体内实验经常出现隐性或相反实验结果,对心脏中 RhoA 信号网络的基本机制仍然知之甚少^[43]。在这项研究中,NBP 给药大大降低了损伤后 RhoA 的表达,同时提高了 p-Akt 水平。通过施加不同蛋白的特异性抑制剂,可以发现 RhoA 对 PI3K 信号通路的调节具有单向关系。有研究发现,RhoA 还通过诱导细胞存活信号转导而具有保护心脏的特性^[43]。结合本研究结果,NBP 能够抑制 RhoA 表达进而激活 PI3K 信号通路,最终抑制凋亡蛋白的表达。进一步的分子

对接分析表明,NBP 与关键的 RAS/PI3K 通路蛋白之间有很强的结合能力,侧面论证了 RAS 信号通路在心肌保护中的重要作用。因此,本研究对 RhoA 在心脏疾病中的争议性角色提供了支持性证据。

HSPA12A 是新发现的 HSP70 家族成员之一,在哺乳动物脑组织中含丰富,已被证实参与脑的缺血-再灌注的修复过程,而该蛋白在心脏领域的研究较少^[44]。最近研究表明,HSPA12A 可调节巨噬细胞信号传导,改善心室重塑,还能保护线粒体功能,减少糖尿病心肌病的发生和发展^[45-46]。在本研究中,NBP 预处理抑制 RhoA,并作为上游通路激活 HSPA12A 的表达。尽管这项研究观察到 HSPA12A 可能是一种保护性下游蛋白,但有研究发现 HSPA12A 可以作为一种始动因素影响细胞凋亡的过程^[47]。对于 NBP 预处理对 HSPA12A 的表达具有影响,抑或是 HSPA12A 本身具有反馈调节功能,有待进一步研究。

本研究仍存在一些局限性。例如,只解释了 NBP 通过 RAS 信号通路和 PI3K/Akt 信号通路对 MIRI 的调节作用,但网络药理学结果仍提示了众多其他信号途径。并且,这项研究主要探讨预处理给药对 MIRI 的影响,基于临床工作中药物治疗伴随围手术期前后多段时间,术中给药及术后给药的情况未进行进一步探讨。本研究药物作为一种脑卒中用药,考虑心脏大血管手术患者往往伴随脑卒中风险,药物处理对脑组织、心脏及其他器官的综合影响是进一步研究的目标。

本研究通过网络药理学和实验验证,证明了 NBP 通过 RAS 和 PI3K/Akt 信号通路对 MIRI 的保护作用,并揭示了 NBP 调控心肌细胞凋亡的机制,为 NBP 在 MIRI 临床治疗中的应用提供了参考。

志谢: 山东第二医科大学麻醉学院山东省高校麻醉与重症医学实验室为实验研究提供设备和技术支持。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Chen S X, Yao H J, Lou Y M, et al. Pharmacological upregulation of macrophage-derived itaconic acid by pubescenoside C attenuated myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. J Adv Res, 2025, 74: 571-587.
- [2] Chen J, Wang B Y, Meng T W, et al. Oxidative stress and

- inflammation in myocardial ischemia-reperfusion injury: Protective effects of plant-derived natural active compounds [J]. *J Appl Toxicol*, 2025, 45(7): 1103-1123.
- [3] Verma V K, Bhardwaj P, Prajapati V, et al. Flavonoids as therapeutics for myocardial ischemia-reperfusion injury: A comprehensive review on preclinical studies [J]. *Lab Anim Res*, 2024, 40(1): 32.
- [4] Jin B W, Zhang Z M, Zhang Y, et al. Ferroptosis and myocardial ischemia-reperfusion: Mechanistic insights and new therapeutic perspectives [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1482986.
- [5] Davidson S M, Ferdinandy P, Andreadou I, et al. Multitarget strategies to reduce myocardial ischemia/reperfusion injury: JACC review topic of the week [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2019, 73(1): 89-99.
- [6] Ji Y W, Wen X Y, Tang H P, et al. DJ-1: Potential target for treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 179: 117383.
- [7] Tan T Y C, Lim X Y, Norahmad N A, et al. Neurological applications of celery (*Apium graveolens*): A scoping review [J]. *Molecules*, 2023, 28(15): 5824.
- [8] Tan S W, Xie T, Malik T H, et al. Advances of neurovascular protective potential of 3-*N*-butylphthalide and its derivatives in diabetic related diseases [J]. *J Diabetes Complications*, 2022, 36(11): 108335.
- [9] Xu S L, Li X W, Li Y T, et al. Neuroprotective effect of DL-3-*n*-butylphthalide against ischemia-reperfusion injury is mediated by ferroptosis regulation via the SLC7A11/GSH/GPX4 pathway and the attenuation of blood-brain barrier disruption [J]. *Front Aging Neurosci*, 2023, 15: 1028178.
- [10] Wang P, Sun W X, Gong J, et al. Efficacy and safety of butylphthalide in patients with mild cognitive impairment: A multicentre, randomised, double-blind, placebo-controlled trial (EBMCI study) [J]. *BMJ Open*, 2024, 14(7): e082404.
- [11] Wang Z, Wang J H, Yun J J, et al. Effectiveness of DL-3-*N*-butylphthalide in the treatment of poststroke cognitive impairment and its associated predictive cytokines: A systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Pharmacol Toxicol*, 2024, 25(1): 65.
- [12] Wang A X, Jia B X, Zhang X L, et al. Efficacy and safety of butylphthalide in patients with acute ischemic stroke: A randomized clinical trial [J]. *JAMA Neurol*, 2023, 80(8): 851-859.
- [13] Sun M L, Chen J M, Liu F, et al. Butylphthalide inhibits ferroptosis and ameliorates cerebral ischaemia-reperfusion injury in rats by activating the Nrf2/HO-1 signalling pathway [J]. *Neurotherapeutics*, 2024, 21(5): e00444.
- [14] Sun K Y, Guo L. Influences of butylphthalide injection in combination with edaravone on clinical efficacy and cytokines in elderly acute cerebral infarction patients [J]. *Altern Ther Health Med*, 2024: AT10523.
- [15] Cui Y H, Hu Z L, Wang L F, et al. DL-3-*N*-butylphthalide ameliorates post-stroke emotional disorders by suppressing neuroinflammation and PANoptosis [J]. *Neurochem Res*, 2024, 49(8): 2215-2227.
- [16] Chen X Q, Qiu K, Liu H, et al. Application and prospects of butylphthalide for the treatment of neurologic diseases [J]. *Chin Med J (Engl)*, 2019, 132(12): 1467-1477.
- [17] Li D K, Zhang W, Fu H, et al. DL-3-*N*-butylphthalide attenuates doxorubicin-induced acute cardiotoxicity via Nrf2/HO-1 signaling pathway [J]. *Heliyon*, 2024, 10(5): e27644.
- [18] Han B J, Xu J J, Shi X W, et al. DL-3-*N*-butylphthalide attenuates myocardial hypertrophy by targeting gasdermin D and inhibiting gasdermin D mediated inflammation [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 688140.
- [19] Lu L Q, Li N S, Li M R, et al. DL-3-*N*-butylphthalide improves the endothelium-dependent vasodilation in high-fat diet-fed ApoE^{-/-} mice via suppressing inflammation, endothelial necroptosis and apoptosis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 956: 175938.
- [20] Han X R, Zhang A J, Meng Z Q, et al. Bioinformatics analysis based on extracted ingredients combined with network pharmacology, molecular docking and molecular dynamics simulation to explore the mechanism of Jinbei oral liquid in the therapy of idiopathic pulmonary fibrosis [J]. *Heliyon*, 2024, 10(18): e38173.
- [21] Liu Y S, Li X, Chen C, et al. Exploration of compatibility rules and discovery of active ingredients in TCM formulas by network pharmacology [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 572-588.
- [22] Souday M, Anwar A M, Ahmed E A, et al. UniprotR: Retrieving and visualizing protein sequence and functional information from Universal Protein Resource (UniProt knowledgebase) [J]. *J Proteomics*, 2020, 213: 103613.
- [23] Amberger J S, Bocchini C A, Schiettecatte F, et al.

- OMIM.org: Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM®), an online catalog of human genes and genetic disorders [J]. *Nucleic Acids Res*, 2015, 43(Database issue): D789-D798.
- [24] Safran M, Dalah I, Alexander J, et al. GeneCards Version 3: The human gene integrator [J]. *Database (Oxford)*, 2010, 2010: baq020.
- [25] Szklarczyk D, Gable A L, Lyon D, et al. STRING v11: Protein-protein association networks with increased coverage, supporting functional discovery in genome-wide experimental datasets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2019, 47(D1): D607-D613.
- [26] Zhou Y Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets [J]. *Nat Commun*, 2019, 10(1): 1523.
- [27] Sun F, He Y L, Yang Z Q, et al. Propofol pretreatment inhibits ferroptosis and alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury through the SLC16A13-AMPK-GPX4 pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 179: 117345.
- [28] Zhou G, Wu H, Yang J, et al. Liraglutide attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through the inhibition of necroptosis by activating GLP-1R/PI3K/Akt pathway [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2023, 23(3/4): 161-175.
- [29] Lu H P, Gong J R, Zhang T T, et al. Leonurine pretreatment protects the heart from myocardial ischemia-reperfusion injury [J]. *Exp Biol Med (Maywood)*, 2023, 248(18): 1566-1578.
- [30] O'Boyle N M, Banck M, James C A, et al. Open Babel: An open chemical toolbox [J]. *J Cheminform*, 2011, 3: 33.
- [31] Burley S K, Bhikadiya C, Bi C X, et al. RCSB Protein Data Bank: Powerful new tools for exploring 3D structures of biological macromolecules for basic and applied research and education in fundamental biology, biomedicine, biotechnology, bioengineering and energy sciences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2021, 49(D1): D437-D451.
- [32] Forli S, Huey R, Pique M E, et al. Computational protein-ligand docking and virtual drug screening with the AutoDock suite [J]. *Nat Protoc*, 2016, 11(5): 905-919.
- [33] Wang Y Y, Wang B, Ling H, et al. Navigating the landscape of coronary microvascular research: Trends, triumphs, and challenges ahead [J]. *Rev Cardiovasc Med*, 2024, 25(8): 288.
- [34] Mao Q, Zhang X J, Yang J N, et al. HSPA12A acts as a scaffolding protein to inhibit cardiac fibroblast activation and cardiac fibrosis [J]. *J Adv Res*, 2025, 67: 217-229.
- [35] Wang X X, Mao G H, Li Q Q, et al. Neuroprotection of NAD⁺ and NBP against ischemia/reperfusion brain injury is associated with restoration of sirtuin-regulated metabolic homeostasis [J]. *Front Pharmacol*, 2023, 14: 1096533.
- [36] Jia Y, Xiao H Y, Wang X L, et al. Design, synthesis, and evaluation of n-butylphthalide and ligustrazine hybrids as potent neuroprotective agents for the treatment of ischemic stroke *in vitro* and *in vivo* [J]. *Bioorg Chem*, 2024, 142: 106961.
- [37] Wang Z G, Sharma A, Feng L Y, et al. Co-administration of dl-3-*N*-butylphthalide and neprilysin is neuroprotective in Alzheimer disease associated with mild traumatic brain injury [J]. *Int Rev Neurobiol*, 2023, 172: 145-185.
- [38] Fang M, Hou H L, Feng B, et al. The neuroprotective effect of dl-3-*N*-butylphthalide on the brain with experimental intracerebral hemorrhage [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 959: 176105.
- [39] Elmalky M I, Alvarez-Bolado G, Younsi A, et al. Axonal regeneration after spinal cord injury: Molecular mechanisms, regulatory pathways, and novel strategies [J]. *Biology (Basel)*, 2024, 13(9): 703.
- [40] Wang X Y, Zhang R H, Zeng N L, et al. *Panax notoginseng* saponins dually modulates autophagy in gastric precancerous lesions complicated with myocardial ischemia-reperfusion injury model through the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2024, 178: 117268.
- [41] Zhang F, Geng L, Zhang J, et al. miR-486-5p diagnosed atrial fibrillation, predicted the risk of left atrial fibrosis, and regulated angiotensin II-induced cardiac fibrosis via modulating PI3K/Akt signaling through targeting FOXO1 [J]. *Mol Cell Biochem*, 2025, 480(2): 1077-1087.
- [42] Zhao X P, Yang F, Wu H, et al. Zhilong Huoxue Tongyu Capsule improves myocardial ischemia/reperfusion injury via the PI3K/Akt/Nrf2 axis [J]. *PLoS One*, 2024, 19(4): e0302650.
- [43] Kilian L S, Voran J, Frank D, et al. RhoA: A dubious molecule in cardiac pathophysiology [J]. *J Biomed Sci*, 2021, 28(1): 33.
- [44] Li J, Shen S Y, Shen H Y. Heat-shock protein A12A

- attenuates oxygen-glucose deprivation/reoxygenation-induced human brain microvascular endothelial cell dysfunction via PGC-1 α /SIRT3 pathway [J]. *Drug Dev Res*, 2024, 85(1): e22130.
- [45] Du S Y, Zhang X J, Jia Y X, et al. Hepatocyte HSPA12A inhibits macrophage chemotaxis and activation to attenuate liver ischemia/reperfusion injury via suppressing glycolysis-mediated HMGB1 lactylation and secretion of hepatocytes [J]. *Theranostics*, 2023, 13(11): 3856-3871.
- [46] Jia Y X, Yu Y H, Gao C X, et al. Roles of heat shock protein A12A in the development of diabetic cardiomyopathy [J]. *Cell Stress Chaperones*, 2024, 29(2): 272-284.
- [47] Dai Y, Liu J L, Zhang X J, et al. HSPA12A improves endothelial integrity to attenuate lung injury during endotoxemia through activating ERKs and Akt-dependent signaling [J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 99: 107987.
- [责任编辑 兰新新]