

天山花楸叶黄酮提取物抗心肌缺血再灌注损伤作用机制研究

李慧芳¹, 庞克坚², 李 乐¹, 姚新成¹, 唐 辉^{1*}

1. 石河子大学药学院 新疆植物药资源利用教育部重点实验室, 新疆 石河子 832000

2. 和田维吾尔药业有限责任公司, 新疆 和田 848200

摘要: 目的 采用网络药理学方法, 筛选天山花楸 *Sorbus tianschanica* 叶抗心肌缺血再灌注损伤 (MIRI) 的活性成分及主要靶点, 验证天山花楸叶黄酮化合物对离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用及其作用机制。方法 通过 TCMSP 等数据库辅助, 筛选出天山花楸叶中具有保护 MIRI 作用的化合物; 构建化合物-靶点-疾病网络及蛋白互作网络, 定位关键靶点; 建立 Langendorff 离体大鼠 MIRI 模型, 给予黄酮提取物高剂量组 (1.5 mg/L)、低剂量组 (0.5 mg/L) 与 4'-chlorodiazepam (CDZ, 1 μ mol/L) 预处理, 观察缺血再灌注过程中心功能指标的变化情况, 对新鲜的心肌组织进行 TTC 染色, 测定心肌梗死面积; 石蜡包埋切片 HE 染色; 心肌组织超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA)、过氧化氢酶 (CAT)、还原性谷胱甘肽/氧化型谷胱甘肽 (GSH/GSSG)、总抗氧化能力 (T-AOC) 和 mPTP 孔的开放程度。结果 网络药理学方法筛选得到天山花楸抗心肌缺血再灌注损伤活性成分主要为黄酮类化合物, 核心靶点为 TSPO, 与线粒体膜通透性转换孔 mPTP 密切相关; 各给药组均能显著增强心功能指标, 减小心肌梗死面积 ($P < 0.01$), 减轻心肌组织病理损伤, 增强心肌组织抗氧化能力 ($P < 0.01$), 抑制 mPTP 孔的开放 ($P < 0.01$), 减轻线粒体水肿; 其中, 高剂量组作用最强。结论 天山花楸叶黄酮提取物可增强心肌收缩功能, 减小心肌梗死面积, 减轻心肌组织氧化应激损伤, 通过作用于 TSPO 靶点, 抑制 mPTP 孔开放, 减轻心肌细胞线粒体水肿从而保护心肌组织。

关键词: 天山花楸黄酮提取物; 心肌缺血再灌注损伤; 网络药理学; 心肌梗死; 抗氧化损伤; 线粒体肿胀

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2020)20-5243-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.20.017

Effect of flavones of *Sorbus tianschanica* against myocardial ischemia reperfusion injury

LI Hui-fang¹, PANG Ke-jian², LI Le¹, YAO Xin-cheng¹, TANG Hui¹

1. Key Laboratory of Xinjiang Phytomedicine Resource and Utilization, Ministry of Education, School of Pharmacy, Shihezi University, Shihezi 832000, China

2. Xinjiang Uyghur Pharmaceutical Co., Ltd., Hetian 848200, China

Abstract: Objective To screen active components and main target molecules from *Sorbus tianschanica* for treatment of myocardial ischemia/reperfusion by network pharmacology methods, and verify its protective effects and mechanism of flavonoids in *S. tianschanica* (FST). **Methods** The compounds from *S. tianschanica* with protective effects against myocardial ischemia reperfusion injury (MIRI) were screened and the compound-target-disease network and protein interaction network were constructed, and the key targets were located through TCMSP database. Langendorff-reperfusion rat isolated-hearts were prepared to induce MIRI. The high dose (1.5 mg/L), low dose (0.5 mg/L) of FST, and 4'-chlorodiazepam (CDZ, 1 μ mol/L) were administrated for pretreatment respectively. Hemodynamic index, infarct size of myocardial tissue, and the pathological changes of myocardium were analyzed. Moreover, superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), glutathione/oxidized glutathione (GSH/GSSG), catalase (CAT), total antioxidant capacity (T-AOC) and the opening degree of mPTP were determined. **Results** The active components screened from *S. tianschanica* by network pharmacology in treatment of myocardial ischemia reperfusion were flavonoids; The core target was TSPO, which was closely related to mitochondrial permeability transition pore mPTP. Each treatment group significantly enhanced the

收稿日期: 2020-01-23

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81860614); 新疆维吾尔自治区重点研发专项 (2017B03013)

作者简介: 李慧芳 (1992—), 女, 实验师, 研究方向为药物分析。Tel: (0993)2057003 E-mail: 1085889605@qq.com

*通信作者 唐 辉, 教授, 研究方向为药物分析。Tel: (0993)2057878 E-mail: th_pha@shzu.edu.cn

cardiac function index, reduced infarct size of myocardial tissue, increased the activity of SOD and CAT ($P < 0.01$), increased GSH/GSSG and T-AOC of myocardial tissue ($P < 0.01$), and inhibited the opening of mPTP. High dose (1.5 mg/L) had the strongest effect by contrast. **Conclusion** Flavonoids of *S. tianschanica* can enhance the function of myocardial relaxation and contraction, reduce the area of myocardial infarction and the oxidative stress injury of myocardial tissue; It can inhibit the opening of mPTP by the main target TSPO to reduce the mitochondrial swelling of myocardial cells.

Key words: flavonoids in *Sorbus tianschanica* Rupr.; myocardial ischemia-reperfusion injury; network pharmacology; myocardial infarction; antioxidant damage; mitochondrial swelling

近年来, 心血管疾病严重威胁着人类生命健康和生存质量, 其中发病率和死亡率占首位的是冠心病 (coronary heart disease, CHD)。心肌缺血是导致冠心病根本原因, 缺血发生后, 尽快有效地恢复对缺血心肌的血供是防治心肌缺血损伤的根本方法。然而, 缺血一定时间的心肌组织再次恢复血液供应时, 无法恢复正常生理功能, 反而出现心肌细胞损伤加重或产生不可逆损伤的情况, 包括超微结构、功能、代谢及电生理方面的进一步损伤, 临床上表现有心律失常、梗死面积增大、出血性坏死等症状称作心肌缺血再灌注损伤 (myocardial ischemia reperfusion injury, MIRI) [1]。

天山花楸 *Sorbus tianschanica* Rupr. 在新疆主要分布在特克斯县域内的科桑景区, 是维吾尔族和哈萨克族民间常用药材; 具有平喘祛痰、止咳化痰的民间用药史[2-3], 研究表明, 其能够依赖性地抑制心肌收缩以及保护心肌缺血等药理作用[4]。有关黄酮类化合物有较强的抗氧化活性以及抗心肌缺血作用已有较多报道[5]。然而, 对天山花楸黄酮类化合物 (flavonoids of *Sorbus tianschanica* Rupr., FST) 抗 MIRI 作用机制尚不清楚。

因此, 本实验以天山花楸叶中化合物分子为研究对象, 运用网络药理学[6], 对化合物进行筛选, 确定具有抗 MIRI 作用的化合物成分, 通过 TCMSP 数据库得到其对应靶点及靶点所对应疾病, 运用 Cytoscape 3.6.1 构建化合物靶标-疾病网络图, 筛选出具有抗 MIRI 作用的化合物, 这些化合物主要为黄酮类化合物。根据药靶及病靶信息建立蛋白互作网络拓扑关系, 预测黄酮类化合物作用于心肌缺血的关键靶点蛋白。通过建立离体心脏缺血再灌注损伤模型, 对天山花楸黄酮类化合物康欣心肌缺血再灌注损伤进行药效学评价, 并深入作用机制研究。

1 仪器与材料

1.1 主要仪器

Radnoti 离体心脏灌流装置, 美国 Radnoti 公司; 4S AD Instruments 多道生理仪, 澳大利亚 Powerlab

公司; Peri-star 蠕动泵, 美国 WPI 公司; HHS 精密恒温水浴锅, 金坛市医疗器械厂; Sartorius BP211D 型电子分析天平, 德国 Sartorius 公司; AR-2140 型万分之一电子天平, 梅特勒-托利多仪器有限公司; 3001-1064 多功能酶标仪, Thermo 电子科技公司; KQ-500DE 超声波清洗器, 昆山市超声仪器有限公司; TGL-16G 低温冷冻离心机、超低温冰箱, 德国 Eppendorf 公司; TGL 16M 离心机, 湖南凯达科学仪器有限公司; ES 2255M-DR 十万分之一天平, 瑞士 Precisa 公司; 匀浆机, 德国 IKA T10; DB-09 石蜡包埋机, 湖北德立森科技有限公司; Leica RM2245 石蜡切片机, 德国莱卡公司。

1.2 试剂及材料

天山花楸总黄酮, 质量分数为 91%, 自制, 批号 20110408。

氯化钠、氯化钾、氯化钙、碳酸氢钠、磷酸二氢钾、氯化镁、盐酸均为国产试剂, 分析纯, 天津盛奥化学试剂有限公司; 葡萄糖、水合氯醛, 北京索莱宝科技有限公司, 批号分别为 20231219、081024; 肝素钠、4'-chlorodiazepam (CDZ), Sigma 公司, CDZ 为线粒体 mPTP 孔的抑制剂, 能够防止线粒体肿胀、膜电位紊乱, 保护心肌组织, 减轻缺血再灌注造成的心肌损伤, 在本实验中作为阳性对照使用。线粒体/胞浆制备试剂盒, 普利莱基因技术有限公司, 批号 C1260。

试验中所用到的主要试剂盒 SOD 试剂盒 (批号 20160919)、MDA 试剂盒 (批号 20160623)、CAT 试剂盒 (批号 20160804)、GSH/GSSG 试剂盒 (批号 20160608)、T-AOC 试剂盒 (批号 20160801)、考马斯亮蓝 (批号 20160906), 均购于南京建成生物工程研究所有限公司。

1.3 试验动物

健康的雄性 SD 大鼠, 体质量 220~300 g, 清洁 II 级, 由新疆地方病研究所动物中心提供, 许可证号 (SCXK 新 2011-0001), 符合动物实验标准。大鼠于实验前 1 周领取以使其适应环境, 并分进行

笼饲养, 给予自由进食饮水。

2 方法

2.1 溶液配制

K-H 灌流液用以模拟生理条件的体外营养液, pH 值 7.4 ± 0.5 。配制方法: 称取 NaCl 6.920 g, KCl 0.353 g, CaCl_2 0.138 g, NaHCO_3 2.091 g, KH_2PO_4 0.161 g, MgCl_2 0.114 g, 葡萄糖 2.000 g, HCl 69 μL , 加双蒸水至 1 000 mL。

肝素钠溶液配制方法: 2 mL (12 500 单位) 的肝素钠, 加入生理盐水至 100 mL, 37°C 水浴溶解。 4°C 冰箱保存。

水合氯醛配制方法: 1 g 水合氯醛, 加生理盐水溶解定容至 10 mL, 常温保存。

总黄酮溶液: 高剂量组, 精密称取 0.15 mg 总黄酮, 加入少量预温好的 K-H 液溶解, 后转移至 100 mL 量瓶中, K-H 液定容, 配成 1.5 mg/L 总黄酮溶液。低剂量组, 精密称取 5 mg 总黄酮, 加入少量预温好的 K-H 液溶解, 后转移至 100 mL 量瓶中, K-H 液定容, 配成 0.5 mg/L 总黄酮溶液。

CDZ 溶液配制方法: 精密称取 CDZ 0.32 mg, 加入 5 μL *N,N*-二甲基甲酰胺溶解, 转移至 10 mL 棕色量瓶中定容, 浓度为 100 $\mu\text{mol/L}$ 。实验时取 1 mL 至 100 mL 量瓶中, K-H 液定容, 浓度为 1 $\mu\text{mol/L}$ 。

2.2 化合物筛选

ADME/T 是进筛选有效化合物和关键靶标重要依据^[7]。ADME/T 是指机体对外源化学物质的吸收 (absorption)、分布 (distribution)、代谢 (metabolism)、排泄 (excretion) 过程, 以及化合物对机体产生的毒性作用 (toxicity)。20 世纪 90 年代末期, 药物发展中不良的药动学性质是导致药物价格昂贵并且研发失败的主要因素。因此, 运用 ADME/T 研究中药复方, 特别是早期的虚拟 (insilico) ADME/T 预测, 较为有利; 还可更深层优化药物配方从而合成疗效更好的药方, 根据 ADME 过筛标准 ($\text{OB} \geq 30\%$ 或 $\text{DL} \geq 0.18$)^[8] 筛选出活性化合物。这对增加中药新药研发的成功率, 获取安全、有效的治疗药物具有十分重要的意义。

2.3 药物靶标的获取

药物大多通过与机体“靶标”蛋白相互结合产生作用, 靶点的选择对药物治疗作用有着决定性的影响。药物靶点是指药物与机体产生相互作用结合位点, 主要有核离子通道、酸、酶、受体等生物大分子。药物分子通过调节这些靶点的功能, 进而调

控细胞内各信号因子完成一些生理过程, 来达到治疗疾病的目的^[9]。这些预测方法和手段, 都要依赖于多种突破性技术和靶点数据, 还有不断更新的各种数据数据库。其中包括治疗靶点数据库 (TTD)^[10] 和药物数据库 (DrugBank)^[11]。这些信息能够促使更多集成资源和计算方法的整合, 例如中药系统药理学数据库 (TCMSPTM) (<http://sm.nwsuaf.edu.cn/lsp/index.php>)^[12]。

通过数据库检索 (TCMSPTM), 查找出的候选化合物对应的靶标, 由于同 1 个化合物有对应多个靶标的现象, 去除重复靶标。根据各靶标拓扑参数“度” (degree) 值由大到小排列, 将度值过小的靶标删去, 最终获得和候选化合物具有很大相关性的靶标 (度 ≥ 4)。

2.4 网络的构建及分析

通过连接候选化合物与他们所有的潜在靶标得到化合物-靶标网络; 潜在靶标的疾病信息来自于 TCMSPTM 数据库。运用 Cytoscape 3.6.1 构建化合物-靶标和靶标-疾病网络。Cytoscape 是一个网络可视化和分析的软件, 它能够提供基础的功能布局 and 查询网络, 并根据基本的化合物、靶点或疾病数据结合成可视化的网络图, 并且联合大的蛋白质、DNA、疾病的数据库, 进行网络参数“度”或“中介性” (betweenness) 分析和生物功能的注释。在得到的网络中, 每 1 个节点代表 1 个化合物分子、靶标蛋白或疾病, 每 1 条边代表化合物与靶标蛋白或靶标与疾病之间的 1 种相互作用。通过拓扑参数度和中介性可以说明节点的重要性以及影响两个节点之间作用的因素, 每节点的度代表着化合物分子拥有的靶点数目, 或每个靶点所能产生作用的疾病数目。中介性为经过该节点的最短路径数占通过所有节点路径总数的比值。网络的所有拓扑性质分析运用的是 Cytoscape 的插件 Network Analysis 和 CentiScaPe 1.2^[13]。通过 String 数据库^[14] 平台, 构建蛋白质-蛋白质相互作用 (PPI) 网络, 并进行拓扑学分析后得到靶标互作网络, 找到关键靶点。

2.5 Langendorff 离体大鼠心肌缺血再灌注损伤模型^[15]

大鼠 ip 水合氯醛 (0.35 mL/kg) 麻醉后, 置于动物台上并固定, 提前排净 Langendorff 管路中气体。麻醉后舌下 iv 0.3 mL 肝素钠, 打开胸腔, 暴露主动脉弓, 夹紧主动脉, 迅速取出心脏置于预冷 (4°C) 的 K-H 缓冲液中, 然后迅速将心脏固定在

Langendorff 装置上,开始逆行灌注,灌注液为饱和 95% O₂+5% CO₂ 饱和的 K-H 液,灌注压为逆行恒压 5.86 kPa,灌注温度为 37 ℃。待心脏复跳且搏动良好,剪下左心耳,小心将自制心室内压乳胶水囊经左心耳破孔插入,经二尖瓣口进入左心室,水囊内压调制 10~15 mmHg 并维持整个试验过程。左心室内置乳胶水囊(自制)连接着换能器,可以通过 PowerLab/4 s 型生物信号采集处理系统监视并记录左心室内压力的变化。全程采用 K-H 营养液灌注,灌注温度保持在 37.5~38.0 ℃。

2.6 分组和给药

对照组: K-H 液恒压灌注 110 min; 模型组: K-H 液恒压灌注 20 min 以后,全心停灌 20 min, K-H 液复灌流 60 min; 总黄酮高剂量组^[5](FST-H): K-H 液恒压灌注 20 min 后,总黄酮(1.5 mg/L)灌流 10 min,全心停灌 20 min, K-H 液复灌 60 min; 总黄酮低剂量组(FST-L): K-H 液恒压灌注 20 min 后,用金丝桃苷(0.5 mg/L)灌流 10 min,全心停灌 20 min, K-H 液复灌 60 min; 抑制剂组(CDZ): K-H 液恒压灌注 20 min 后,用含有抑制剂(1 μmol/L)的 K-H 液灌流 10 min,全心停灌 20 min, K-H 液复灌 60 min。

2.7 血流动力学检测

所有血流动力学指标均由 4S AD Instruments 生物多导记录仪测定,与此同时采用 Chart 5 记录软件自动分析并记录,所需要的指标如下:左心室的舒张压(LVEDP)、左心室收缩压(LVSP)、计算左心室发展压(LVDP, LVDP=LVSP-LVEDP)、心率(HR),左心室压力最大升高速率(+dp/dt_{max})和左心室压力最大下降速率(-dp/dt_{max})并且以计滴器实时记录冠脉流量(CF)。在整个试验过程中以记录心脏插管灌流后 20 min 时的稳定的数据作为最初的指标值,而后分别记录给药后、停灌时及复灌后各个固定时间点(2、5、15、30、45 min)的相关指标值。

2.8 心肌梗死面积测定

实验结束后,快速取下大鼠心脏,用 4 ℃ PBS 冲洗干净后,去除心房、血管及脂肪组织,-20 ℃ 冰箱冰冻 10 min。快速将心室切成厚度约 2 mm 的薄片,放入 1% TTC 溶液中,于 37 ℃ 恒温箱中染色 30 min。再将染好的心脏薄片置入 10% 甲醛中固定 24 h。正常心肌呈深红色,缺血心肌呈苍白色。

用扫描仪采集图像,用 Image Pro plus 软件进

行分析,按下列公式计算心肌梗死面积占切片总面积的百分比:心肌梗死面积百分比=苍白心肌梗死面积/砖红色心肌梗死面积。

2.9 心肌组织病理形态检查

实验结束后,将心脏取下,用 PBS 清洗干净,将左心室切成 2 mm×2 mm×2 mm 的组织块,置于 10% 甲醛中固定 48 h。包埋蜡块切片,苏木素-伊红(HE)染色,光学显微镜下观察并拍摄。

2.10 FST 预处理对心肌氧化应激指标的影响

用生理盐水将刚取下来的新鲜心肌组织漂洗干净,用滤纸吸干心肌组织表面多余的水分。取整个心脏组织中合适的部位,准确称定质量,按质量体积比为 1:9 的比例进行组织匀浆制备,整个操作需要在冰浴中进行。最后,将组织匀浆 3 500 r/min 离心 10 min。吸取上清液,于-80 ℃ 冰箱中保存备用;按照试剂盒说明测定匀浆中 SOD 活性、MDA 含量、GSH/GSSG 比值、T-AOC、CAT 活性和 mPTP 孔的开放程度。

2.11 FST 预处理对心肌线粒体 mPTP 孔开放程度的影响

取新鲜心肌组织制备线粒体,4 ℃ 条件存放。线粒体悬液调整蛋白质量浓度为 0.5 mg/mL,终体积 2 mL。于紫外分光光度计上 520 nm 处测定吸光度(A₅₂₀)值,1 min 后加 200 μmol/L CaCl₂ 诱导 mPTP 开放,记录其在 6 min 内 A₅₂₀ 的变化情况,用 6 min 内 A₅₂₀ 下降幅度(ΔA)表示 mPTP 开放程度^[16]。反应条件保持 25 ℃ 恒温。

2.12 统计学分析

所有实验数据用 SPSS 统计软件(SPSS 17.0)处理,计算 $\bar{x} \pm s$,通过单因素方差分析计算组间差异是否具有统计学意义。

3 结果

3.1 活性化合物筛选

通过大量文献的查找和阅读,目前经文献报道的已从天山花楸叶中分离得到的化合物共有 62 个:常军民等^[17]分离得到苯甲酸(benzoic acid)、苄基-O-β-D-吡喃葡萄糖苷(benzyl-O-β-D-glucoside)、乌苏酸(ursolic acid)、2α-羟基乌苏酸(2α-hydroxyursolic acid)、槲皮素-3-O-葡萄糖苷(quercetin-3-O-glucopyranoside)、金丝桃苷(hyperin)、原儿茶酸(protocatechuic acid) 7 种化学成分;Gu 等^[18]得到了天山花楸叶中的芦丁、橙皮苷以及金丝桃苷 3 种成分;Ayupbek 等^[19]分离得

到二十六烷酸、乌苏酸、槲皮素、山柰酚-3-*O*- β -D-葡萄糖苷、金丝桃苷、芦丁、苦杏仁苷以及野黑樱苷；Li 等^[20]在天山花楸叶中发现了棕榈酸、软木三萜酮、蔗糖、槲皮素、表儿茶素以及 3,4-二羟基苯甲酸；除此之外，兰雁等^[21]从天山花楸叶中分离出 35 种挥发油类成分。最终，根据 ADME 过筛标

准（OB $\geq$ 30%或 DL $\geq$ 0.18），共筛选出天山花楸叶中候选化合物 34 个（表 1）。这些化合物成分具有较好的口服生物利用度或类药性。虽然一些化合物如芦丁、金丝桃苷口服生物利用度较低，但是它们在天山花楸叶中含量丰富，并且都具有广泛的药理学活性。因此，通过筛选，将这 34 个化合物作为

表 1 候选化合物的化学信息和网络参数

Table 1 Chemical information and network parameters of 34 candidate compounds

序号	分子编号	中文名	英文名	OB/%	DL	度
1	MOL1	芦丁	rutin	3.20	0.68	13
2	MOL2	金丝桃苷	hyperin	6.94	0.77	19
3	MOL3	异槲皮苷	isoquercitrin	1.86	0.77	20
4	MOL7	苦杏仁苷	amygdalin	4.42	0.61	4
5	MOL8	2 α -羟基乌苏酸	2 α -hydroxyursolic acid	18.56	0.74	21
6	MOL9	乌苏酸	ursolic acid	16.77	0.75	21
7	MOL10	苯甲酸	benzoic acid	30.15	0.03	18
8	MOL12	绿原酸	chlorogenic acid	11.93	0.33	8
9	MOL13	齐墩果酸	oleanolic acid	29.02	0.76	21
10	MOL14	原儿茶酸	protocatechuic acid	25.37	0.04	18
11	MOL16	正二十八烷醇	1-octacosanol	10.70	0.41	11
12	MOL17	槲皮素-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷	quercetin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -malonyl)- β -D-glucopyranoside	14.03	0.74	12
13	MOL18	山柰素-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷	kaempferol-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -malonyl)- β -D-glucopyranoside	1.86	0.77	17
14	MOL20	野黑樱苷	prunasin	26.90	0.18	11
15	MOL22	软木三萜酮	friedelin	29.16	0.76	17
16	MOL23	蔗糖	saccharose	7.17	0.23	6
17	MOL24	表儿茶素	epicatechin	48.96	0.24	9
18	MOL25	橙皮苷	hesperidin	13.33	0.67	10
19	MOL26	二十六烷酸	hexacosanoic acid	14.24	0.40	17
20	MOL28	3-戊烯-2-酮	3-penten-2-one	50.20	0.00	13
21	MOL29	苯甲醛	benzaldehyde	32.63	0.01	17
22	MOL30	6-甲基-5-庚烯-2-醇	6-methylhept-5-en-2-one	26.36	0.01	24
23	MOL31	正壬醛	<i>n</i> -nonaldehyde	40.28	0.02	17
24	MOL32	水杨酸甲酯	methyl salicylate	42.55	0.03	21
25	MOL33	扁桃腈	mandelonitrile	48.26	0.02	21
26	MOL35	紫罗兰酮紫	β -ionone	20.63	0.05	18
27	MOL49	1-十七烯	1-heptadecene	20.03	0.08	15
28	MOL50	金合欢基丙酮	farnesylacetone	37.84	0.10	21
29	MOL54	植物醇	phytol	33.82	0.13	23
30	MOL55	亚油酸乙酯	ethyl linoleate	42.00	0.19	22
31	MOL56	油酸乙酯	ethyl oleate	32.40	0.19	24
32	MOL59	二十四烷	tetracosane	8.28	0.24	11
33	MOL60	四十四烷	tetratetracontane	7.82	0.25	6
34	MOL62	槲皮素	quercetin	46.43	0.28	17

候选化合物并对它们进行进一步的分析。由表 1 可得, 拥有较高度 (代表药物分子拥有的靶点数目) 的分子主要可以分为 3 类, 分别是金丝桃苷 (度=19)、异槲皮苷 (度=20)、槲皮素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷 (度=12)、山柰素-3-O-(6"-O-丙二酰基)- β -D-葡萄糖苷 (度=17) 等黄酮类成分; 2 α -羟基乌苏酸 (度=21)、乌苏酸 (度=21)、苯甲酸 (度=18)、齐墩果酸 (度=21)、原儿茶酸 (度=18)、二十六烷酸 (度=17) 等有机酸类成分; 以及苯甲醛 (度=17)、6-甲基-5-庚烯-2-醇 (度=24)、正壬醛 (度=17) 等挥发油类成分。拥有较高的度水平, 说明这些分子可以对多个靶点发挥作用, 可能具有多种药理活性。通过大量文献的查找在另一方面也证实了预测方法的可靠性。已有文献报道^[4], 天山花楸叶粗提物可提高小鼠急性心肌缺血的血清中超氧化物歧化酶的活力, 降低血清中乳酸脱氢酶和丙二醛的含量, 表明天山花楸粗提物能够保护由异丙肾上腺素 (ISO) 诱导的小鼠急性心肌缺血的作用; 通过小鼠 ISO 诱导的急性心肌缺血试及急性常压缺氧试验, 证实天山花楸具有抗 MIRI 作用, 其有效提取部位为醋酸乙酯提取物; 兰雁等^[21]在对天山花楸中挥发油成分的抑菌实验中证实, 挥发油能抑制 9 种供试菌。

3.2 化合物-靶标-疾病互作网络

通过数据库检索 (TCMSPTM), 查找出的 34 个候选化合物对应的靶标, 得到 839 个靶标, 由于同一个化合物有对应多个靶标的现象, 经去重后得到 265 个靶标。根据各靶标度值由大到小排列, 将度值过小的靶标删去, 最终获得 78 个和候选化合物具有很大相关性的靶标 (度 ≥ 4), 再次通过数据库对靶标进行疾病的筛选, 得到 443 种疾病, 运用 MESH 数据库对其分为 31 类。其中, 可以发现属于心血管类相关的疾病共有 32 种, 与其他类疾病相比属于很大一部分; 与心血管类疾病相关的靶标共有 29 个, 占到靶标总数的 37%。由图 1 可进一步得到与心肌缺血直接相关的靶点是 TSPO, 主要化合物为黄酮类化合物。

3.3 心血管疾病对应靶标蛋白互作网络

通过构建 34 个化合物靶标蛋白互作网络 (图 2) 可得, 该网络中心关键靶点为转运蛋白 (translocator proteins, TSPO)。同时, TSPO 亦与黄酮类化合物关联密切。TSPO 是位于线粒体膜的苯二氮卓类受体, 参与氧化应激和心血管疾病的发展

过程^[22]。目前已有研究表明, TSPO 在线粒体功能的调控中起重要作用, 包括线粒体膜电位的调节和呼吸链的调节, 影响 ATP 合成和水解, 以及促凋亡蛋白释放和 ROS 的形成。抑制 TSPO, 可抑制 mPTP 孔的开放。当心肌在缺氧、缺血或再灌注等条件下时, 能量代谢障碍, 导致 ATP 依赖型质子泵功能的降低, 导致线粒体跨膜电位下降, 紊乱。另外, 由于各种原因引起的 mPTP 开放增加, 可以进一步引起线粒体膜通透性增大, 线粒体跨膜电位进一步降低甚至消失。而跨膜电位的降低又可以进一步对 mPTP 开放产生促进作用, 导致一种恶性循环。因此, 通过抑制 TSPO 来抑制 mPTP 的开放, 从而减少氧化应激, 维持线粒体膜电位稳定, 稳定细胞内 Ca^{2+} 水平, 防止钙超载, 保证线粒体 ATP 供应, 抑制 ROS 的产生, 因而能够有效预防缺血再灌注导致的损伤^[23-24]。抑制 TSPO 的配体有 1-(2-氯苯基)-N-(1-甲基丙基)-异喹啉-3-基甲酰基 (PK11195)、4'-氯地西洋 (4'-CIDZP) 等。

3.4 Langendorff 离体大鼠 MIRI 模型血流动力学变化检测结果

如表 2 所示, 与对照组相比, 缺血再灌注结束后, 模型组心肌细胞的舒缩功能显著性下降 ($P < 0.01$)。与模型组相比, FST 高、低剂量组和 CDZ 组心肌舒缩功能都得到恢复和提高 ($P < 0.01$)。

3.5 TTC 染色心肌梗死面积结果

TTC 染色心肌梗死面积结果见图 3、4。对照组的心肌梗死面积百分比 (2.23 ± 0.11)%, 模型组的心肌梗死面积百分比 (72.05 ± 6.78)%, 与对照组相比, 显著增大 ($P < 0.01$)。高剂量组心肌梗死面积百分比 (46.22 ± 4.62)%, 低剂量组心肌梗死面积百分比 (62.68 ± 5.35)%, 抑制剂组心肌梗死面积百分比 (50.26 ± 4.77)%, 与模型组相比, 均有显著性差异 ($P < 0.01$)。说明各给药组均一定程度保护心脏组织。减少梗死面积, 其中, 高剂量组效果最佳。

3.6 HE 染色结果

HE 染色结果见图 5 和表 3。HE 染色后, 光学显微镜下观察拍摄各组心肌组织病理切片, 由图可见, 对照组: 细胞形态基本正常, 心肌细胞排列整齐, 细胞结构较完整, 肌纤维横纹清晰, 核形态完整, 呈长椭圆形, 无炎症肿胀及坏死, 无萎缩或肥大。细胞间质、外膜和血管无显著异常。模型组: 心肌病理改变显著, 细胞排列稀疏、不规则紊乱,

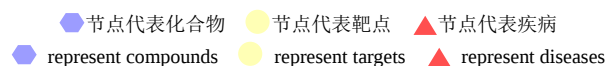


Fig. 1 Compound-target-disease interaction network



Fig. 2 Interaction network of 34 compound targeting proteins

表 2 FST 对大鼠离体心脏功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 2 Effect of each component on cardiac function in rats subjected to I/R ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	LVDP/mmHg			(+dp/dt _{max})/(mmHg·s ⁻¹)		
		再灌注 15 min	再灌注 30 min	再灌注 45 min	再灌注 15 min	再灌注 30 min	再灌注 45 min
对照	—	94.63 ± 1.28	92.36 ± 1.67	90.43 ± 1.92	102.18 ± 9.79	101.12 ± 10.02	101.03 ± 8.39
模型	—	40.35 ± 3.56 ^{##}	48.79 ± 4.41 ^{##}	54.00 ± 5.64 ^{##}	43.90 ± 3.52 ^{##}	54.54 ± 3.72 ^{##}	54.17 ± 4.21 ^{##}
FTF-H	1.5 mg·L ⁻¹	89.28 ± 1.57 ^{**}	88.35 ± 2.43 ^{**}	85.25 ± 4.35 ^{**}	77.96 ± 4.25 ^{**}	80.62 ± 7.51 ^{**}	79.38 ± 5.09 ^{**}
FST-L	0.5 mg·L ⁻¹	63.57 ± 2.65 ^{**}	64.45 ± 3.29 ^{**}	63.58 ± 5.72 ^{**}	56.56 ± 5.15 ^{**}	62.58 ± 6.51 ^{**}	59.89 ± 4.28
CDZ	1 μmol·L ⁻¹	77.35 ± 2.18 ^{**}	78.36 ± 3.62 ^{**}	76.54 ± 4.82 ^{**}	68.66 ± 5.85 ^{**}	66.62 ± 6.51 ^{**}	65.38 ± 5.08 [*]

组别	剂量	(-dp/dt _{max})/(mmHg·s ⁻¹)			CF/(mL·min ⁻¹)		
		再灌注 15 min	再灌注 30 min	再灌注 45 min	再灌注 15 min	再灌注 30 min	再灌注 45 min
对照	—	96.73 ± 2.56	93.86 ± 2.08	94.25 ± 0.66	106.78 ± 2.97	107.63 ± 2.85	106.37 ± 4.98
模型	—	52.74 ± 5.21 ^{##}	59.78 ± 3.66 ^{##}	59.26 ± 5.13 ^{##}	59.79 ± 4.52 ^{##}	60.87 ± 3.53 ^{##}	59.68 ± 2.66 ^{##}
FTF-H	1.5 mg·L ⁻¹	80.36 ± 4.32 ^{**}	82.25 ± 2.14 ^{**}	80.96 ± 5.46 ^{**}	101.56 ± 5.73 ^{**}	102.12 ± 2.34 ^{**}	101.62 ± 3.55 ^{**}
FST-L	0.5 mg·L ⁻¹	59.35 ± 4.22 [*]	61.28 ± 2.56 [*]	59.57 ± 5.82 [*]	72.65 ± 7.56 ^{**}	70.22 ± 2.68 ^{**}	70.31 ± 3.42 ^{**}
CDZ	1 μmol·L ⁻¹	70.69 ± 3.72 ^{**}	74.62 ± 2.53 ^{**}	71.86 ± 5.46 ^{**}	82.59 ± 6.80 ^{**}	85.79 ± 2.63 ^{**}	83.62 ± 4.05 ^{**}

组别	剂量	HR/(次·min ⁻¹)		
		再灌注 15 min	再灌注 30 min	再灌注 45 min
对照	—	97.12 ± 1.65	97.52 ± 2.93	99.24 ± 1.75
模型	—	72.23 ± 4.85	63.91 ± 3.57 ^{##}	59.65 ± 3.49 ^{##}
FTF-H	1.5 mg·L ⁻¹	91.01 ± 6.85	92.88 ± 5.62 ^{**}	89.72 ± 4.63 ^{**}
FST-L	0.5 mg·L ⁻¹	84.28 ± 5.24	80.14 ± 5.21 ^{**}	76.08 ± 3.11 ^{**}
CDZ	1 μmol·L ⁻¹	86.12 ± 4.89	81.76 ± 5.25 ^{**}	79.47 ± 3.65 ^{**}

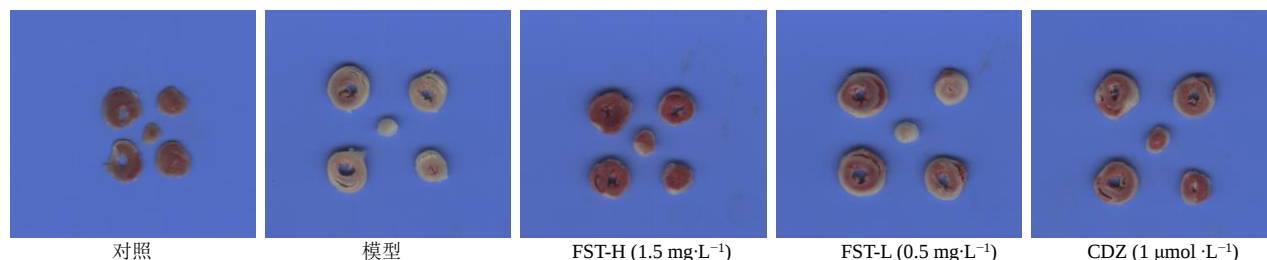
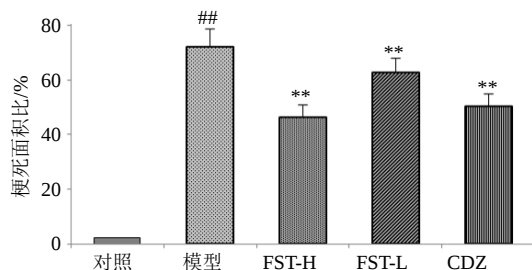
与对照组比较: ^{*}P < 0.05 ^{##}P < 0.01; 与模型组比较: ^{*}P < 0.05 ^{**}P < 0.01, 1 mmHg = 133.322 Pa, 下表同^{*}P < 0.05 ^{##}P < 0.01 vs control group; ^{*}P < 0.05 ^{**}P < 0.01 vs model group, 1 mmHg = 133.322 Pa, same as below

图 3 FST 预处理对离体大鼠心肌梗死面积的影响 (TTC 染色)

Fig. 3 Effects of FST on TTC in ischemia/reperfusion rat hearts

与对照组比较: ^{##}P < 0.01; 与模型组比较: ^{**}P < 0.01^{##}P < 0.01 vs control group; ^{**}P < 0.01 vs model group图 4 TTC 染色各组心脏梗死面积比 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 4 Effects of FST on TTC in ischemia/reperfusion rat hearts ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

心肌细胞肿胀, 肌纤维间隙明显增宽, 横纹消失或断裂, 一些区域心肌细胞可见局灶性坏死、崩解; 心肌细胞间质充血, 炎性细胞浸润。高剂量组: 心肌病理改变明显减轻, 肌纤维排列整齐, 稍稀疏, 肿胀较轻, 无局灶性脂肪变性及水肿, 也无心肌纤维断裂情况, 炎性细胞浸润较少。低剂量组: 心肌病理改变较模型组减轻, 心肌纤维排列稀疏、稍有紊乱, 细胞水肿较模型组减轻; 少有心肌纤维横纹消失或断裂, 少量的炎细胞浸润。抑制剂组: 心肌病理性改变明显减轻, 心肌细胞排列整齐, 肌纤维排列稍稀疏, 细胞轻微的肿胀, 无局灶性心肌细胞

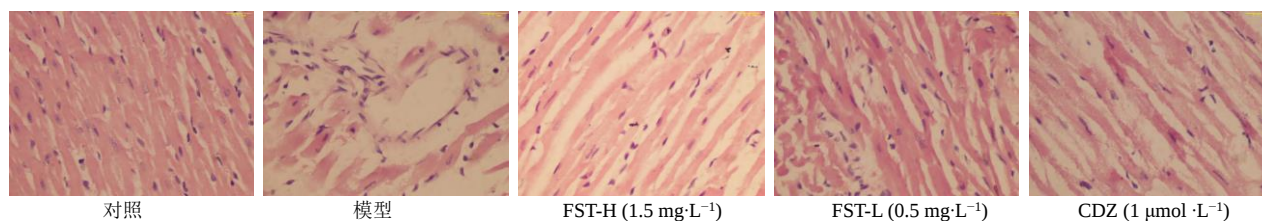


图 5 各组 HE 染色结果 (×400)

Fig. 5 Effects of FST on HE in ischemia/reperfusion rat hearts (× 400)

表 3 HE 染色各组心脏病理学变化 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Statistical analysis of cardiac pathology in HE stained groups ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	梗死面积/%	细胞水肿/%	心肌纤维断裂
对照	—	2.23 ± 0.11	8 (散在)	——
模型	—	72.05 ± 6.78 ^{##}	89	+++
FTF-H	1.5 mg·L ⁻¹	46.22 ± 4.62 ^{**}	23	——
FST-L	0.5 mg·L ⁻¹	62.68 ± 5.35 ^{**}	41	++
CDZ	1 μmol·L ⁻¹	50.26 ± 4.77 ^{**}	36	+

根据细胞水肿及心肌纤维断裂程度,依次为轻度“+”、中度“++”、重度“+++”,无病变组织标记为“——”

According to the degree of cell edema and myocardial fiber rupture, the order was mild “+”, moderate “++”, and severe “+++”, and the non lesion tissue was marked as “——”

脂肪变性,无心肌纤维断裂情况炎性细胞浸润较少。

3.7 FST 对心肌氧化应激指标的影响

SOD、MDA 和 GSH/GSSG、T-AOC、CAT 是

反映心肌氧自由基损伤的指标,由统计结果可知,与对照组相比,模型组 SOD 活性显著下降,MDA 含量显著升高,GSH/GSSG 比值、CAT 活性、T-AOC 显著降低 ($P < 0.01$);与模型组相比,给予 FTF 干预的高、低剂量及 CDZ 组测得心肌组织中 SOD 的活性显著升高,MDA 含量明显低于模型组;GSH/GSSG 明显升高,CAT 活性显著高 ($P < 0.01$);高剂量组的 T-AOC 显著高于模型组 ($P < 0.01$);低剂量组和 CDZ 组与模型组相比稍有升高 ($P < 0.05$)。由此表明,FST 能显著增强心肌组织抗氧化能力,减轻缺血再灌注对心肌造成的损伤,结果见表 4。

3.8 天山花楸黄酮提取物对 MIRI 大鼠 mPTP 孔开放程度的影响 (线粒体膜肿胀度)

统计结果 (表 5) 表明,200 μmol/L CaCl₂ 能够引起 mPTP 的开放 ($P < 0.01$),导致线粒体 A₅₂₀ 降低。与模型组相比,FST 高、低剂量组和 CDZ 组均

表 4 FST 预处理对大鼠心肌组织氧化应激指标的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Effect of FST on levels of oxidative stress indicators in coronary flow of ischemic-reperfusion injury ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	SOD/(U·mg ⁻¹)	MDA/(U·mg ⁻¹)	GSH/GSSG	T-AOC/(U·mg ⁻¹)	CAT/(U·mg ⁻¹)
对照	—	144.00 ± 10.53	4.05 ± 0.51	13.91 ± 2.70	1.60 ± 0.36	68.59 ± 8.46
模型	—	61.43 ± 14.24 ^{##}	8.28 ± 1.30 ^{##}	3.53 ± 3.53 ^{##}	0.85 ± 0.15 ^{##}	13.90 ± 13.90 ^{##}
FTF-H	1.5 mg·L ⁻¹	119.36 ± 15.75 ^{**}	4.35 ± 0.43 ^{**}	8.07 ± 8.07 ^{**}	1.32 ± 0.29 ^{**}	58.41 ± 2.15 ^{**}
FST-L	0.5 mg·L ⁻¹	119.36 ± 15.75 ^{**}	6.25 ± 0.49 ^{**}	7.73 ± 2.77 ^{**}	1.12 ± 0.18 [*]	26.92 ± 7.02 ^{**}
CDZ	1 μmol·L ⁻¹	105.63 ± 16.35 ^{**}	4.69 ± 0.80 ^{**}	7.74 ± 2.76 ^{**}	1.29 ± 0.20 [*]	25.47 ± 4.90 ^{**}

表 5 FST 预处理对大鼠线粒体通透性转换孔开放的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 5 Effect of FST pretreatment on opening of mitochondrial permeability transition pore in rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量	线粒体肿胀度 (ΔA/min × 1 000)
对照	—	11.98 ± 1.54
模型	—	29.06 ± 1.25 ^{##}
FTF-H	1.5 mg·L ⁻¹	15.13 ± 1.62 ^{**}
FST-L	0.5 mg·L ⁻¹	18.43 ± 1.21 ^{**}
CDZ	1 μmol·L ⁻¹	17.01 ± 1.62 ^{**}

能够明显抑制 mPTP 的开放 ($P < 0.01$),减轻线粒体肿胀度。

4 讨论

心血管疾病是影响人类生活质量,危害人类生命健康以至死亡的主要原因,《中国心血管病报告 2018》概要表明,我国心血管现患病人数为 2.9 亿,死亡率居首位,占居民疾病死亡构成的 40% 以上^[25]。心血管类疾病的预防和治疗是我国如今所面临的重大的医疗问题。预防主要依靠居民个人的饮食及生活习惯,治疗则是要运用新型高效低毒的药物。我国是中草药资源的自然储库,许多天然产物中含有

丰富的抗心血管类疾病的化合物成分。

无论在发达国家亦或发展中国家,缺血性心脏病(ishemic heart disease, IHD)均为主要的致死性疾病,严重威胁人类健康,影响人类的期望寿命和生存质量。目前的治疗方法有多种:如药物治疗、介入治疗、超声治疗以及基因治疗等,其中药物治疗始终处于首要位置。因此寻找有效的治疗药物最为关键。缺血缺氧可导致心肌细胞结构、细胞器和酶的结构及功能产生损伤^[26]。其主要机制为缺氧引起自由基增加、细胞内钙超载及线粒体能量合成障碍^[27-28]。线粒体在缺血缺氧时,产生一定程度的损伤后,又会扩大损伤效应,影响整个细胞的功能。治疗缺血性损伤的主要策略为恢复血流供应,然而研究表明, Sewell 等^[29]发现,当狗的冠状动脉被结扎达一段时间后,突然恢复其冠脉血液灌流,动物随即发生室颤,最终导致死亡;1966 年, Jennings^[30]首先提出了心肌缺血再灌注损伤的概念(myocardial ischemia-reperfusion injury, MIRI),即短时间内,当心肌组织缺血后获得血液再供时,原缺血心肌组织细胞在结构、代谢和功能等方面发生的比缺血时更为严重甚至转为不可逆的损伤。研究证明,黄酮类化合物具有抗心脑血管组织缺血、抗衰老、抗氧化,抗炎,抗肿瘤,清除氧自由基^[31]以及增强免疫能力等多种药理作用^[32-33]。大量文献研究表明,黄酮类化合物对 MIRI 有一定的预保护作用^[34-35]。

本研究通过网络药理学,对天山花楸叶中的化合物进行筛选,运用 Cytoscape 3.6.1 构建化合物-靶标-疾病互作网络,得到与心血管类疾病相关的靶标共有 29 个,其中与心肌缺血直接相关的关键靶标为 TSPO,主要化合物分子为黄酮类化合物;通过构建心血管疾病对应靶标蛋白互作网络,进一步验证了关键靶点为 TSPO;TSPO 调控线粒体功能,影响线粒体膜电位及能量代谢,通过抑制 TSPO 可以抑制线粒体膜 mPTP 孔的开放,从而维持线粒体膜电位的稳定性,防止钙超载,抑制氧自由基的产生,减轻心肌缺血缺氧再灌注后造成的能量代谢障碍和心肌损伤。建立 Langendorff 离体大鼠 MIRI 模型,通过对再灌注前后血流动力学指标进行监测,与模型组相比较,天山花楸黄酮提取物预处理高剂量组能有效改善缺血再灌注后的心脏功能,提高心肌收缩力;通过 TTC 染色结果可以看出,高剂量预处理组可显著降低缺血再灌注造成的心肌梗死面积;通过对心肌组织病理切片观察,高剂量预处理组可明

显改善缺血再灌注造成的心肌细胞肿胀、心肌纤维断裂及炎性细胞浸润。心肌组织病理结果是最直接反映缺血再灌注对心肌组织损伤的证据。缺血再灌注过程中,由于线粒体氧化磷酸化功能障碍、大量中性粒细胞吸附聚集以及黄嘌呤水解等产生大量的活性氧自由基,增强膜脂过氧化及通透性,破化蛋白质和酶,引起其结构和功能异常,攻击核酸和染色引发细胞凋亡。因而测定 SOD、MDA、GSH/GSSG、CAT、等指标可反应心肌组织氧自由基对心肌细胞的损伤程度。T-AOC 反映整体的抗氧化能力。 Ca^{2+} 超载可以导致线粒体膜上的 mPTP 开放,使得大量相对分子质量小于 1 500 的粒子透过 mPTP 进入线粒体基质,引起线粒体渗透压升高,导致线粒体水肿,线粒体肿胀,进一步加重细胞能量代谢障碍,损伤心肌组织。与模型组相比, FST 预处理高、低剂量组及 CDZ 组能显著减轻 mPTP 孔的开放程度,减轻细胞肿胀和钙超载对细胞造成的损伤,保护心肌细胞。

综上所述,天山花楸黄酮提取物可改善心肌收缩功能,减少心肌梗死面积,减轻心肌细胞肿胀程度与心肌氧化应激损伤;通过作用于 TSPO 靶标蛋白,抑制线粒体 mPTP 孔的开放,减轻线粒体肿胀,改善能量代谢障碍,从而发挥对大鼠离体心脏缺血再灌注损伤的保护作用。为今后进一步探究天山花楸黄酮提取物保护 MIRI 作用机制奠定基础。

参考文献

- [1] Oshiro Y, Shimabukuro M, Takasu N, et al. Triiodothyronine concomitantly inhibits calcium overload and postischemic myocardial stunning in diabetic rats [J]. *Life Sci*, 2001, 69(16): 1907-1918.
- [2] 新疆部队后勤部卫生部. 新疆中草药手册 [M]. 乌鲁木齐: 新疆人民出版社, 1970.
- [3] 新疆自治区卫生标准 [S]. 1987.
- [4] 张 芹, 李 根, 唐 辉, 等. 天山花楸不同的提取部分对心肌缺血性保护作用的筛选 [J]. *中国药理学通报*, 2009, 25(2): 277-278.
- [5] Pradeep S R, Guha M. Effect of processing methods on the nutraceutical and antioxidant properties of little millet (*Panicum sumatrense*) extracts [J]. *Food Chem*, 2011, 126(4): 1643-1647.
- [6] Hopkins, Andrew L. Network pharmacology: The next paradigm in drug discovery [J]. *Nat Chem Biol*, 2008, 4(11): 682-690.
- [7] Wu C R, Lin W H, Hseu Y C, et al. Ching H: Evaluation of the antioxidant activity of five endemic *Ligustrum*

- species leaves from Taiwan flora *in vitro* [J]. *Food Chem*, 2011, 127(2): 564-571.
- [8] 汝锦龙. 中药系统药理学数据库和分析平台的构建和应用 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2015.
- [9] 姚瑶. 基于系统药理学的中药复方配伍及作用机制研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2014.
- [10] Liu X, Zhu F, Ma X, *et al.* The therapeutic target database: An internet resource for the primary targets of approved, clinical trial and experimental drugs [J]. *Expert Opin Ther Tar*, 2011, 15(8): 903-912.
- [11] Wishart D S, Knox C, Guo A C, *et al.* DrugBank: A knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, 36(Database issue): D901-D906.
- [12] 陈季武. 天然黄酮类化合物清除 DPPH 的构效关系 [J]. *发光学报*, 2005, 26(5): 664-668.
- [13] 周伟. 心血管疾病中医分型、治疗以及外源物毒性的系统药理学研究 [D]. 咸阳: 西北农林科技大学, 2014.
- [14] Damian S, Andrea F, Stefan W, *et al.* STRING v10: Protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life [J]. *Nucleic Acids Res* 2015, 43(D47): D52.
- [15] 陈高勇, 张艳美, 石刚刚. ERK 信号转导通路在心肌缺血再灌注损伤中的作用 [J]. *中国临床药理学与治疗学*, 2012, 17(2): 234-240.
- [16] 孔羽. 刺五加苷预适应对心肌缺血再灌注损伤的保护作用 [D]. 衡阳: 南华大学, 2007.
- [17] 常军民, 杨玲玲, 热娜·卡斯木. 天山花楸乙酸乙酯位化学成分研究 [J]. *中国中药杂志*, 2009, 34(2): 175-176.
- [18] Gu H Y, Chen F, Zhang Q, *et al.* Application of ionic liquids in vacuum microwave-assisted extraction followed by macroporous resin isolation of three flavonoids rutin, hyperoside and hesperidin from *Sorbus tianschanica* leaves [J]. *J Chromatogr B*, 2016, 1014: 45-55.
- [19] Ayupbek A, Hu K L, Aisa H A. Chemical constituents from the leaves of *Sorbus tianschanica* [J]. *Chem Nat Compd*, 2012, 48(1): 133-134.
- [20] Li L, Tang H, Wu T, *et al.* Chemical composition of *Sorbus tianschanica* leaves [J]. *Chem Nat Compd*, 2010, 46(5): 811-812.
- [21] 兰雁, 帕提古丽·马合木提. 天山花楸叶的挥发油化学成分及其抑菌作用研究 [J]. *食品科学*, 2008, 29(12): 107-109.
- [22] Dimitrova-Shumkovska J, Veenman L, Ristoski T, *et al.* Dimethylbenz [α] anthracene induces oxidative stress and reduces the binding capacity of the mitochondrial 18-kDa translocator protein in rat aorta [J]. *Drug Chem Toxicol*, 2010, 33(4): 337-47.
- [23] 孙岩, 许浩博, 田野. 线粒体转位蛋白与心血管疾病 [J]. *国际心血管病杂志*, 2014, 41(4): 227-229.
- [24] Thompson M M, Manning H C, Ellacott K L. Translocator protein 18 kDa (TSPO) is regulated in white and brown adipose tissue by obesity [J]. *PLoS One*, 2013, 8(11): e79980.
- [25] 胡盛寿, 高润霖, 刘力生, 等. 《中国心血管病报告 2018》概要 [J]. *中国循环杂志*, 2019, 34(3): 209-220.
- [26] Varga T, Somogyi E, J Soós, *et al.* Anoxic myocardial lesions in man, developed during extracorporeal circulation, studied by electron microscopy [J]. *Morphologiai és igazságügyi orvosi szemle*, 1975, 15(1): 23-29.
- [27] 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.
- [28] Bueno O F, Windt L J D, Tymitz K M, *et al.* The MEK1-ERK1/2 signaling pathway promotes compensated cardiac hypertrophy in transgenic mice [J]. *Embo J*, 2000, 19(23): 6341-6350.
- [29] 王迪浚, 金惠铭. 病理生理学 [M]. 北京: 人民卫生出版社, 1996.
- [30] Jennings R B, Sommers H M, Smyth G A, *et al.* Myocardial necrosis induced by temporary occlusion of a coronary artery in the dog [J]. *Arch Pathol Lab Med*, 1960, 70(1): 68-78.
- [31] Guler A, Sahin M A, Yucel O, *et al.* Proanthocyanidin prevents myocardial ischemic injury in adult rats [J]. *Med Sci Monitor: Int Med J Exp Clin Cancer Res*, 2011, 17(11): BR326-331.
- [32] 陈锐, 孔繁智. 黄酮类化合物的临床运用概况 [J]. *浙江中医杂志*, 2011, 46(12): 918-920.
- [33] Chiyomaru T, Yamamura S, Zaman M S, *et al.* Genistein suppresses prostate cancer growth through inhibition of oncogenic microRNA-151 [J]. *J Urol*, 2012, 7(8): e43812.
- [34] 王先宝. 黄芩苷预处理通过抑制线粒体损伤介导的凋亡保护心肌缺血再灌注损伤 [D]. 广州: 南方医科大学, 2013.
- [35] Testai L, Martelli A, Cristofaro M, *et al.* Cardioprotective effects of different flavonoids against myocardial ischaemia/reperfusion injury in Langendorff-perfused rat hearts [J]. *J Pharm Pharmacol*, 2013, 65(5): 750-756.