

• 药理与临床 •

基于代谢组学和肠道菌群研究黄芪甲苷对心肌梗死大鼠的作用

闫俊元, 钟鑫勤, 赵玉翠, 王小莹*

天津中医药大学中药学院, 天津 301617

摘要: 目的 研究黄芪甲苷治疗心肌梗死的量-时-效关系、药效机制通路和改善肠道菌群作用。方法 采用左前降支冠状动脉结扎手术建立心肌梗死大鼠模型, 给予黄芪甲苷 14、28 d 后, 考察其量-时-效关系。利用非靶向代谢组学技术和 Ingenuity Pathway Analysis 数据库对效果最好的黄芪甲苷中剂量组大鼠血清进行相关代谢物分析, 并采用 Western blotting 进行通路验证。利用肠菌多样性分析, 探究黄芪甲苷对心肌梗死大鼠肠道菌群的改善作用, 并对部分有益菌进行体外验证。结果 黄芪甲苷可显著改善心肌梗死大鼠心功能指标 ($P < 0.05$ 、0.01、0.001), 调控心肌梗死大鼠心肌组织白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)/Janus 激酶 (Janus kinase, JAK)/信号传导和转录激活蛋白 6 (signal transducer and activator of transcription 6, STAT6) 通路 ($P < 0.05$ 、0.01)。黄芪甲苷可回调心肌梗死大鼠部分菌群丰度, 体外实验验证结果显示黄芪甲苷可上调有益菌 *Lactobacillus johnsonii* 丰度。结论 黄芪甲苷可改善心肌梗死大鼠心功能指标, 且给药 28 d、剂量为 20 mg/kg 时药效最为显著, 其机制可能与调控 IL-6/JAK/STAT6 通路有关。此外, 黄芪甲苷可通过改善肠道菌群辅助治疗心肌梗死。

关键词: 黄芪甲苷; 心肌梗死; 心功能; 肠道菌群; 白细胞介素-6/Janus 激酶/信号传导和转录激活蛋白 6 通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)06-1988-14

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.06.021

Effect of astragaloside IV on myocardial infarction in rats based on metabolomics and intestinal flora

YAN Junyuan, ZHONG Xinqin, ZHAO Yucui, WANG Xiaoying

School of Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To study the dose-time-effect relationship, pharmacodynamic mechanism pathway and improvement of intestinal flora of astragaloside IV in the treatment of myocardial infarction. **Methods** Rat model of myocardial infarction was established using left anterior descending coronary artery ligation surgery. Astragaloside IV were administered for 14, 28 d to investigate the dose-time-effect relationship. Untargeted metabolomics techniques and Ingenuity Pathway Analysis were used to analyze relevant metabolites in serum of the most effective astragaloside IV medium-dose group, and pathway validation was performed by Western blotting. The improvement effect of astragaloside IV on the intestinal flora of rats with myocardial infarction was explored by intestinal bacterial diversity analysis, and some beneficial bacteria were verified *in vitro*. **Results** Astragaloside IV significantly improved cardiac function indexes in rats ($P < 0.05$, 0.01, 0.001), regulated interleukin-6 (IL-6)/Janus kinase (JAK)/signal transducer and activator of transcription 6 (STAT6) pathway in myocardial tissue of rats with myocardial infarction ($P < 0.05$, 0.01). Astragaloside IV improved enterobacterial diversity, the results of *in vitro* experimental verification showed that astragaloside IV upregulated the abundance of beneficial bacterium *Lactobacillus johnsonii*. **Conclusion** Astragaloside IV improves cardiac function indexes in rats with myocardial infarction, and the most significant effect was observed after 28 d of administration at a dose of 20 mg/kg, which may be related to the regulation of IL-6/JAK/STAT6 pathway. In addition, astragaloside IV can assist in the treatment of myocardial infarction by improving gut microbiota.

Key words: astragaloside IV; myocardial infarction; cardiac function; intestinal flora; interleukin-6/Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 6 pathway

收稿日期: 2023-12-22

基金项目: 国家重点研发计划项目 (2022YFC3500300)

作者简介: 闫俊元, 硕士研究生, 从事中药药理研究。E-mail: 2015088669@qq.com

*通信作者: 王小莹, 博士生导师, 从事中药药理研究。E-mail: wxy@tjutcm.edu.cn

心肌梗死是指因冠状动脉出现阻塞, 心脏肌肉因缺乏血液供应出现坏死, 使心脏功能受损的一种病症。临床表现一般为胸痛为主、呼吸短促、心绞痛等^[1-2]。其主要发病原因为冠状动脉脂肪物质的堆积, 进而造成冠状动脉的堵塞^[3]。近些年, 心肌梗死因具有极高的患病率和死亡率, 已成为影响全球人类健康的重要因素之一^[4-5]。目前全球公认的治疗手段为服用阿司匹林、硝酸甘油和抗高血压药物, 治疗机制为分解血凝块、降低血压以及降低心脏需氧量^[3]。虽然这些药物具有较好的药效, 但也伴随着较多的不良反应。阿司匹林会伴随肠胃不适以及耐药性^[6], β 受体阻断剂的不良反应包括直立性低血压、心动过缓、诱发支气管痉挛、加重慢性支气管炎等^[7]。因此, 目前临床采用化学药物治疗心肌梗死的策略仍有改善空间。近些年, 中医药治疗逐渐得到大众认可^[8]。

黄芪始载于《神农本草经》, 性温味甘, 归肺脾经, 具有补气固表、利尿托毒、排脓、敛疮生肌的功效^[9-10]。中医临床中, 通常用黄芪与其他中药配伍进行心血管病治疗。研究发现, 黄芪桂枝五味加减小方在临床上可以改善心肌病患者的心功能^[11]; 防己黄芪汤加麻黄可以显著改善慢性心衰患者病情^[12]。黄芪甲苷是黄芪的主要活性成分, 具有抗炎、抗氧化、抗病毒、促进血管生成的药理作用^[13-14]。黄芪甲苷可以通过抑制 Toll 样受体 4 (Toll-like factor 4, TLR4) /髓样分化因子 88 (myeloid differentiation factor 88, MyD88) /核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 信号通路缓解心肌梗死导致的炎症反应, 改善心功能指标^[15]。此外, 黄芪甲苷能够通过抑制 miRNA-1 介导的炎症和自噬, 从而抑制脂多糖 (lipopolysaccharide, LPS) 导致的心功能不全^[16]。虽然目前关于黄芪甲苷对心肌梗死治疗效果的研究相对完善, 但是治疗机制以及量-时-效关系方面还有很多可以探究的空间。因此, 本研究旨在利用药效学指标探究黄芪甲苷量-时-效关系, 并且利用非靶向代谢组学探讨其治疗机制通路, 为今后临床用药提供理论依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 (220 $\pm$ 10) g, 购自北京维通利华动物实验中心, 动物许可证编号 SCXK (京) 2016-0011。动物饲养于 SPF 级动物房, 自由进水饮食。动物实验经天津中医药大学伦理委

员会批准 (批准号 TCM-LAEC2020089)。

1.2 药品与试剂

黄芪甲苷 (质量分数为 98%, 批号 AB0162-1000) 购自埃法生物有限公司; 10%多聚甲醛 (批号 3501) 购自北京益利精细化学品有限公司; 无水乙醇、二甲苯、苯胺蓝、盐酸、氨水、中性树脂、生理盐水 (批号 10009259、10023418、71003644、10011018、10002108、10004160、69900793) 购自国药集团化学试剂有限公司; 苏木素-伊红染液 (批号 G1076) 购自武汉谷歌生物科技; 磷钨酸、磷钼酸 (批号 3705、3790) 购自天津市大茂化学试剂厂; PBS 缓冲液、十二烷基硫酸钠、Tris、甘氨酸、过硫酸铵、聚山梨酯 20、MRS 肉汤 (批号 P1020、S8010、T8060、G8200、A1030、T8220、M8540) 购自北京索莱宝生物科技有限公司; 肌酸激酶 (creatine kinase, CK)、心肌钙蛋白 T (cardiac troponin-T, CTn-T)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) ELISA 试剂盒 (批号 MM-20460R1、MM-0795R1、MM-0873R1) 购自江苏酶免实业有限公司; 甲醇、乙腈、蛋白酶抑制剂 (批号 R40121、4340863、36978) 购自美国 Thermo Fisher Scientific 公司; 异丙醇、Immobilon Western 化学发光 HRP 底物、PVDF 膜 (批号 34863、WBKLS、IPVH00010) 购自 Merck 公司; 2-氯-L-苯丙氨酸 (批号 B25643) 购自上海源叶生物科技生物有限公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 AR1189) 购自博士德生物工程有限公司; RIPA 强裂解液、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (批号 P0013B、P0015L) 购自江苏碧云天生物技术公司; 磷酸酶抑制剂 (批号 K1015) 购自 APExBio 生物科技有限公司; 酪氨酸激酶 2 (Janus kinase2, JAK2)、p-JAK2、白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、JAK1 抗体 (批号 AF6022、AF3024、DF6087、AF5012) 购自 Affinity 公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、HRP 标记的山羊抗小鼠 IgG 二抗 (批号 ABS132004、ABS20163) 购自北京爱必信生物技术有限公司; 信号传导转录激活因子 6 (signal transducer and activator of transcription 6, STAT6)、p-STAT6 抗体 (批号 ab217998、ab263947) 购自英国 Abcam 公司; HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 14786) 购自美国 CST 公司; Stripping Buffer (批号 CW0056S) 购自北京康为世纪生物科技有限公司; DNA 抽提试剂盒 (批号 D6538) 购自美国 Bio-

Tek 公司。

1.3 仪器

MX-F 型涡旋混合器 (Servicebio Technology 公司); JA1003 型千分之一电子天平 (上海恒平科技仪器有限公司); MDF-F-682 型 -80 °C 低温冰箱 (Panasonic 电器有限公司); BCD-256KT 型 -20 °C 冰箱 (青岛海尔股份有限公司); PL6500 型 4 °C 冰箱; Legend Micri17R 型高速冷冻离心机、EVOS M7000 型细胞成像系统、UHPLC 液相色谱系统、质谱仪、NanoDrop2000 型超微量分光光度计 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); DK-98-11A 型电热恒温水浴锅 (天津泰斯特仪器有限公司); INFINIRE M200 型多功能酶标仪 (Nano Quant 公司); Vevo2100 型小动物超声实时影像系统 (加拿大 Visual Sonics 公司); CN6-180 型超声波清洗机 (宁波新芝生物科技公司); DNP-9082 型电热恒温培养箱 (苏州威尔实验有限公司); R500 型动物呼吸麻醉机 (瑞沃德生命科技有限公司); 台式快速离心浓缩干燥器 (太仓市华美生化仪器厂); 氮气吹扫仪 (上海净信实业发展有限公司); ES1000 型热盖金属浴 (杭州瑞诚仪器有限公司); 552BR070914 小型垂直电泳槽、基础电泳仪 (美国 Bio-Rad 公司); 组织研磨仪 (武汉赛维尔生物科技有限公司); 多功能成像分析系统 (美国 GE 公司); PCR 仪 (美国 ABI 公司); MISEQ 测序仪、HISEQ 测序仪、Illumina MiSeq Platform (美国 Illumina 公司); 微型荧光计 (美国 Turner Bio Systems 公司)。

2 方法

2.1 黄芪甲苷对心肌梗死大鼠的量-时-效关系考察

2.1.1 心肌梗死大鼠的模型建立及心功能评价 大鼠适应性饲养 1 周后, 术前禁食 12 h, 根据体质量腹腔麻醉后进行手术, 在心脏处从外皮依次分离至胸肌, 在左胸第 4 肋间处用止血钳撑开胸廓, 肉眼可见心脏; 将心包膜破开, 挤压右胸使心脏暴露于胸壁外; 持提前备好浸没于生理盐水的 5/0 无损伤丝线结扎冠状动脉左前降支。结扎后再次撑开胸廓令心脏跳回胸腔, 松开止血钳使胸肌和外皮恢复闭合, 排空空气后关闭胸腔, 以 2/0 无损伤丝线分别缝合肌层及皮肤。假手术组采用同样方法开胸腔挤出心脏, 以 5/0 丝线只穿过不结扎, 之后进行排气缝皮。手术操作后将大鼠仰面朝上平躺放至电热毯, 待其苏醒后放回鼠笼进行常规饲养。

所有大鼠造模 1 d 后进行心动超声检测。运用

超高分辨率小动物超声实时影像仪检测大鼠左心室功能, 将大鼠放置于小动物麻醉盒中进行气体麻醉, 麻醉后将大鼠用胶带绑于操作台, 操作台向右下倾斜 30°, 调整探头, 利用 B 型超声切面获得左心室、主动脉和二尖瓣瓣叶图像, 进一步切换至 M 超声界面, 并调整取样线的位置, 截取 M 界面超声图像, 通过对大鼠收缩期和舒张期进行测量, 获得左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室短轴缩短率 (left ventricular fraction shorting, LVFS)、左心室后壁 (left ventricular posterior wall, LVPW) 等。采用射血分数 (ejection fraction, EF) 数值 < 55% 作为造模成功评判标准, 予以保留分组, 不符合条件的大鼠予以剔除。

2.1.2 动物分组、给药及给药后心功能评价 取 8 只正常 SD 大鼠作为空白组, 经过假手术操作的 8 只大鼠作为假手术组, 将造模成功的大鼠分为模型组及黄芪甲苷低、中、高剂量 (10、20、40 mg/kg) 组和阿托伐他汀 (20 mg/kg) 组, 每组 8 只。各给药组 ig 相应药物 (5 mL/kg), 对照组、假手术组和模型组 ig 等体积的水, 1 次/d, 连续给药 14、28 d。给药后心功能评价方法同“2.1.1”项。

2.1.3 样品采集 各组大鼠分别于各组时间点取材。大鼠麻醉后腹主动脉取血, 分离血清, 放置于 -80 °C 冰箱。取血后迅速取下心、肺、肝、脾、肾, 每组随机取 3 只大鼠的心脏放入 10% 多聚甲醛固定, 用于病理染色。其余迅速放入冻存管, 置于液氮过夜, 放入 -80 °C 冰箱保存。分别于给药 14、28 d 采集各组大鼠粪便样本, 用 75% 乙醇消毒的镊子和无菌 EP 管取大鼠新鲜粪便 2~3 粒, 放于 -80 °C 冰箱保存。

2.1.4 ELISA 检测血清中 CK、CTn-T、LDH 水平 根据试剂盒说明书检测各组大鼠血清中 CK、CTn-T、LDH 水平。

2.1.5 心脏病理染色

(1) HE 染色: 取病理切片, 二甲苯脱蜡 2 次, 无水乙醇清洗 2 次, 梯度乙醇冲洗, 自来水洗, 然后用苏木素染色, 10% 盐酸乙醇分化, 再用稀氨水返蓝, 伊红染色, 脱水, 二甲苯处理后封片, 于显微镜下观察并拍照。

(2) Masson 染色: 与 HE 染色操作步骤相同, 直至稀氨水返蓝后用丽春红染色, 用冰醋酸水溶液浸洗, 用磷钼酸分化, 苯胺蓝染后脱水, 二甲苯浸洗后封片, 于显微镜下观察并拍照。

2.2 黄芪甲苷治疗心肌梗死的作用机制研究

2.2.1 样品预处理 根据结果,选取给药 28 d 后空白组、模型组、黄芪甲苷中剂量组大鼠血清进行后续实验。吸取 50 μ L 血清样品,加入 200 μ L 预冷的色谱纯乙腈,4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 10 min。吸取上清液,真空干燥,用含内标物(2-氯-L-苯丙氨酸)的 100 μ L 乙腈-水(3:1)复溶后,4 $^{\circ}$ C、13 000 r/min 离心 15 min,吸取上清液至进样瓶中,上机并进行分析。

2.2.2 LC-MS 检测

(1) 色谱条件: Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m),流动相 A 为 95% 水+5%乙腈(含 0.1%甲酸),流动相 B 为 47.5%乙腈+47.5%异丙醇+5%水(含 0.1%甲酸)。正离子梯度洗脱程序:0~3 min, 0~20% B; 3~4.5 min, 20%~35% B; 4.5~5 min, 35%~100% B; 5~6.3 min, 100% B; 6.3~6.4 min, 100% B~100% A; 6.4~8 min, 100% A。负离子梯度洗脱程序:0~1.5 min, 0~5% B; 1.5~2 min, 5%~10% B; 2~4.5 min, 10%~30% B; 4.5~5 min, 30%~100% B; 5~6.3 min, 100% B; 6.3~6.4 min, 100% B~100% A; 6.4~8 min, 100% A。体积流量 0.40 mL/min; 进样量 4 μ L; 柱温 40 $^{\circ}$ C。

(2) 质谱条件: 样品质谱信号采集采用正负离子扫描模式,扫描范围为 m/z 70~1 050。鞘气体积流量为 50 arb,辅助气体积流量为 13 arb,辅助气加热温度为 425 $^{\circ}$ C,正模式离子喷雾电压设置为 3 500 V,负模式离子喷雾电压设置为-3 500 V,离子传输管温度为 325 $^{\circ}$ C,归一化的碰撞能为 20、40、60 V 循环碰撞能。一级质谱分辨率 60 000 Hz,二级质谱分辨率 7 500 Hz,采用 DDA 模式采集数据。

2.2.3 数据处理 采用代谢组学软件 Progenesis QI 进行峰提取、对齐、鉴定等,最终得到含保留时间、峰面积、质荷比以及鉴定信息的数据矩阵。并通过该软件特征峰进行搜库鉴定,将 MS 和 MS/MS 质谱信息与代谢数据库进行匹配,设定 MS 误差小于 1×10^{-5} ,同时根据二级质谱匹配得分鉴定代谢物。所用数据库包括 <http://www.hmdb.ca/>、<https://metlin.scripps.edu/>等主流公共数据库以及平台自建的数据库。将相关代谢物代入 Ingenuity Pathway Analysis 数据库进行分析。

2.2.4 Western blotting 检测心肌组织 IL-6、JAK1、JAK2、p-JAK2、STAT6、p-STAT6 蛋白表达 取给药 28 d 各组大鼠左心室样品加入裂解液破碎,4 $^{\circ}$ C、

12 000 r/min 离心 10 min,吸取上清液进行蛋白定量,100 $^{\circ}$ C加热 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,于 5%脱脂牛奶中封闭 90 min,分别加入一抗,4 $^{\circ}$ C摇床孵育过夜,TBST 洗涤 3 次,加入二抗孵育 2 h,TBST 洗涤 3 次,显色曝光。

2.3 黄芪甲苷对大鼠肠道微生物多样性的改善作用研究

2.3.1 DNA 抽提和 PCR 扩增 根据结果,取给药 28 d 后空白组、模型组、黄芪甲苷中剂量组大鼠粪便进行后续实验。根据 E.Z.N.A.[®] soil 试剂盒说明书进行操作提取 DNA,对 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增,扩增程序为 95 $^{\circ}$ C、3 min,随后 27 个循环(95 $^{\circ}$ C、30 s,55 $^{\circ}$ C、30 s,72 $^{\circ}$ C、30 s),最后 72 $^{\circ}$ C、10 min。扩增体系总体积为 20 μ L。

2.3.2 Illumina Miseq 测序 PCR 产物利用 Axy Prep DNA Gel Extraction Kit 进行纯化,Tris-HCl 洗脱,2%琼脂糖电泳检测。利用 Quanti Fluor[™]-ST 进行检测定量。PE 2 $\times$ 300 文库为上海美吉生物医药科技有限公司根据 Illumina MiSeq 平台标准操作规程将纯化后的扩增片段所构建。

2.3.3 生物信息学分析 基于 Illumina HiSeq 测序平台对扩增的 16S 区域特点构建相对应的小片段文库进行双末端测序。通过对 Reads 拼接滤过,使用 UPARSE 软件(version 7.1 <http://drive5.com/uparse/>),通过 97%的相似度对序列进行操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)聚类,且在聚类的过程中去除单序列和嵌合体。对序列进行注释并设定阈值为 70%根据数据库对其进行比对,同时采用 α 多样性分析、 β 多样性分析等比较各组之间的差异,挖掘心梗对肠道微生物的影响以及黄芪甲苷对心梗大鼠肠道微生物的改善作用。

2.3.4 益生菌丰度体外验证实验 黄芪甲苷用 MRS 肉汤配制 0.500 000、0.250 000、0.125 000、0.062 500、0.031 250、0.015 625 mg/mL 的给药溶液,在 96 孔板中分别加入 100 μ L 最佳稀释倍数的 *Lactobacillus johnsonii* 菌液以及 100 μ L 药液,放入酶标仪中,设置 25 个循环,每循环 2 h,波长 600 nm,温度 37 $^{\circ}$ C,测定吸光度(A)值。

2.4 统计学分析

使用 SPSS 17.0 软件进行统计分析,实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。

3 结果

3.1 黄芪甲苷对心梗大鼠的量-时-效关系

3.1.1 黄芪甲苷对心肌梗死大鼠心功能的影响 给

药 14 d 后, 如图 1 所示, 与空白组和假手术组比较, 模型组大鼠左心室容积明显扩张, 左室壁显著变窄, 收缩能力减弱。如表 1 所示, 与假手术组比

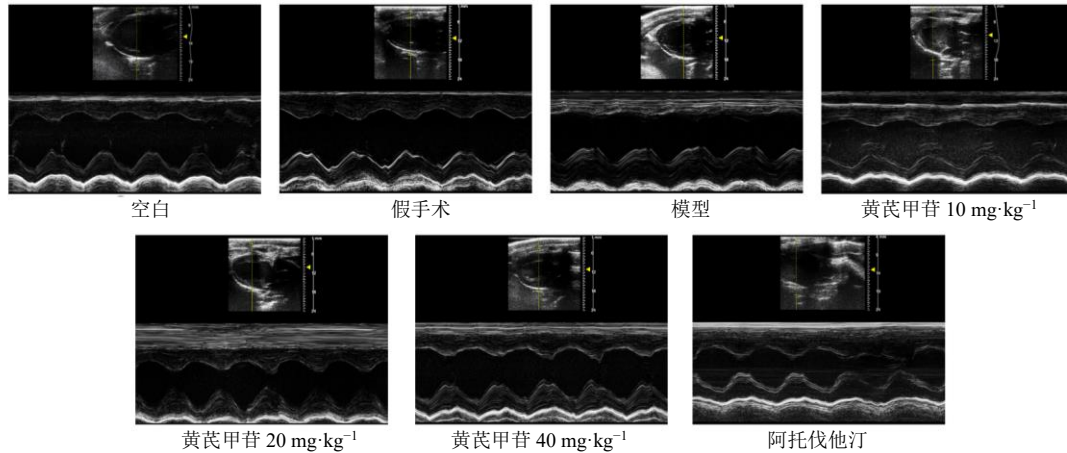


图 1 给药 14 d 各组大鼠超声 M 模式图

Fig. 1 Ultrasonic M-mode long axis section of rats in each group after 14 d of administration

表 1 给药 14 d 各组大鼠 EF 和 FS ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 EF and FS of rats in each group after 14 d of administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	n/只	EF/%	FS/%
空白	—	8	79.170 ± 5.705	49.723 ± 5.698
假手术	—	8	77.391 ± 4.226	47.730 ± 4.229
模型	—	8	35.900 ± 10.519***	18.121 ± 5.903***
黄芪甲苷	10	8	55.030 ± 12.162	30.261 ± 8.179##
	20	8	60.937 ± 10.254###	34.378 ± 7.619###
	40	8	58.798 ± 12.352#	32.609 ± 8.427###
阿托伐他汀	20	8	63.672 ± 11.047###	36.341 ± 7.842###

与假手术组比较: ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$, 下表同。

** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs model group, same as below tables.

较, 模型组大鼠 EF、FS 显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 黄芪甲苷中、高剂量组大鼠 EF、FS 均显著改善 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

给药 28 d 后, 如图 2 所示, 相比于给药 14 d 组, 模型组左心室损伤更加严重, 且各给药组可明显改善。由表 2 可知, 与假手术组相比, 模型组 EF、FS 显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组相比, 黄芪甲苷低、中、高剂量组的 EF、FS 均显著改善 ($P < 0.01$ 、 0.001)。

3.1.2 各组大鼠心脏形态及病理观察 如图 3、4 所示, 给药 14、28 d 的空白组、假手术组大鼠心脏形态正常, 而模型组大鼠心脏的左前降支冠状动脉区域明显有大面积的梗死, 心室部位变白梗死, 心室

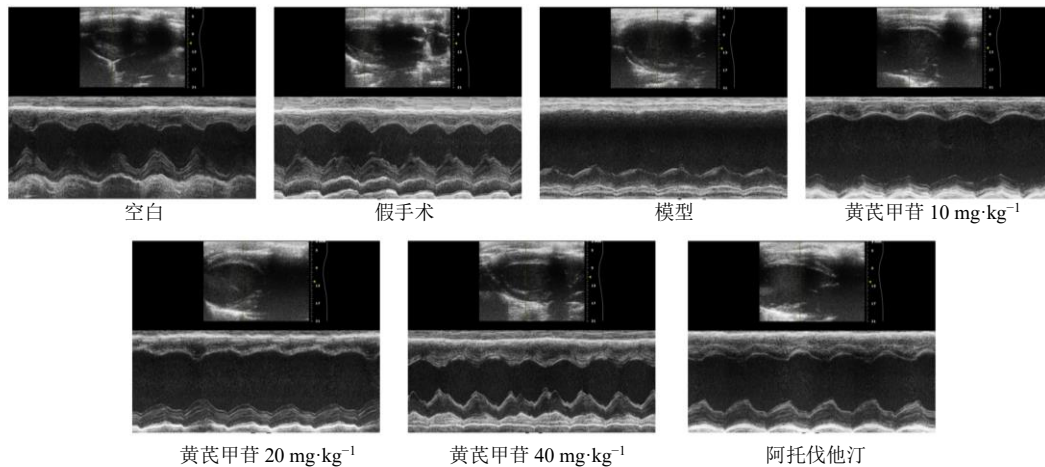


图 2 给药 28 d 各组大鼠超声 M 模式图

Fig. 2 Ultrasonic M-mode long axis section of rats in each group after 28 d of administration

表 2 给药 28 d 各组大鼠 EF 和 FS ($\bar{x} \pm s$)

Table 2 EF and FS of rats in each group after 28 d of administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/ (mg·kg ⁻¹)	n/只	EF/%	FS/%
空白	—	8	82.280±4.603	52.947±5.191
假手术	—	8	81.628±5.544	52.242±6.262
模型	—	8	34.486±7.032***	17.456±3.941***
黄芪甲苷	10	7	51.176±10.003##	27.604±6.153##
	20	6	58.390±10.871###	32.681±7.613###
	40	7	52.452±13.357###	29.021±10.069##
阿托伐他汀	20	8	50.888±10.315##	27.516±6.677##

壁显著变薄，心脏结构松散；各给药组大鼠心脏结构趋近正常，心室壁厚度也有明显改善。

HE 染色结果显示，空白组、假手术组心脏形态规整，心肌细胞形态正常，无严重细胞破损情况；模型组心室部位有大面积梗死，并有心室腔扩大、心室壁变薄的现象，梗死区域心肌细胞坏死现象严重，大部分细胞发生炎性浸润、水肿，细胞形态不整齐；与给药 14 d 模型组比较，给药 28 d 模型组更加严重；给药 14 d 黄芪甲苷低、中剂量组相比模型组改善作用不明显；给药 14 d 黄芪甲苷高剂量组恢

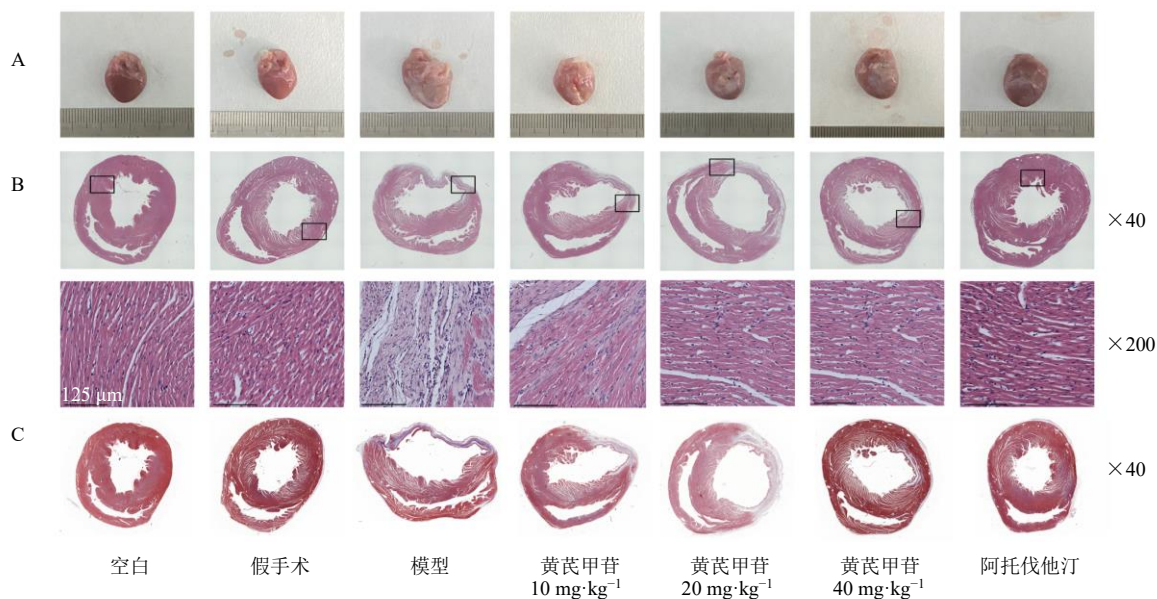


图 3 给药 14 d 各组大鼠心脏形态 (A)、HE 染色 (B) 和 Masson 染色 (C)

Fig. 3 Cardiac morphology (A), HE staining (B) and Masson staining (C) of rats in each group after 14 d of administration

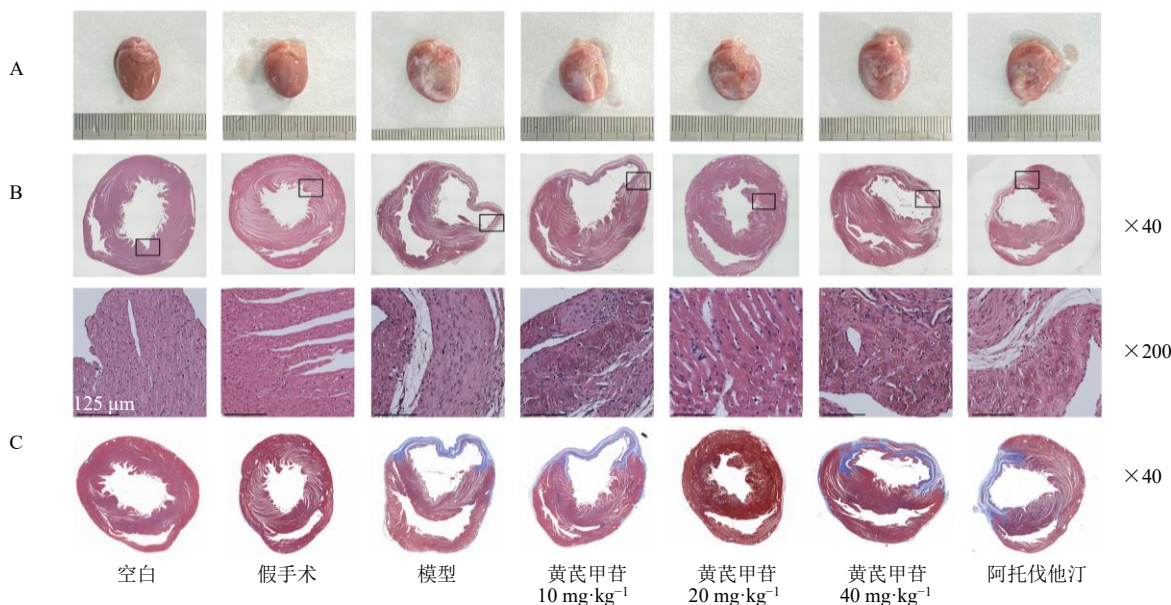


图 4 给药 28 d 各组大鼠心脏形态 (A)、HE 染色 (B) 和 Masson 染色 (C)

Fig. 4 Cardiac morphology (A), HE staining (B) and Masson staining (C) of rats in each group after 28 d of administration

复较明显, 心室壁变厚, 梗死面积缩小, 炎性浸润减少; 给药 28 d 黄芪甲苷低剂量组改善效果不明显, 而给药 28 d 黄芪甲苷中、高剂量组改善效果较好, 炎性浸润明显减少。

Masson 染色结果显示, 模型组胶原纤维沉积最严重, 且给药 28 d 的模型组更严重。给药 14 d 黄芪甲苷低剂量组胶原纤维沉积略有减少, 心室腔以及心室壁有所改善; 给药 14 d 黄芪甲苷中、高剂量组和阿托伐他汀组改善效果非常明显, 胶原纤维沉淀明显减少。与给药 28 d 模型组比较, 黄芪甲苷低剂量组和阿托伐他汀组的改善效果并不明显; 而黄芪甲苷中、高剂量组改善明显。

3.1.3 各组大鼠心梗标志物水平 如表 3 所示, 给药 28 d, 与假手术组比较, 模型组大鼠血清中心梗标志物 CK、CTn-T、LDH 水平显著升高 ($P<0.01$ 、 0.001); 与模型组比较, 黄芪甲苷各剂量组心梗标志物水平均显著降低 ($P<0.05$ 、 0.01 、 0.001)。综合结果可知, 给药 28 d 治疗效果优于给药 14 d, 且给药 28 d 黄芪甲苷中剂量组效果最优, 因此后续代谢组学和肠道菌群研究采用给药 28 d 空白组、模型组、黄芪甲苷中剂量组的样品进行实验。

3.2 黄芪甲苷治疗心肌梗死的作用机制研究

3.2.1 总离子色谱 正、负离子模式下, 质控样品的总离子色谱图见图 5。表明该检测条件下, 峰形良好, 分布相对均匀。

3.2.2 差异代谢物鉴定与筛选 通过数据库的对比与分析, 鉴定得到化合物, 进一步筛选给药后回调代谢物。通过比较筛选找出给药后回调的代谢物共有 48 个差异代谢物 (表 4)。

3.2.3 差异代谢物影响的相关基因 利用 IPA 对 48 个回调差异代谢物进行网络分析, 构建“代谢物-靶点”网络 (图 6), 可知代谢物参与的相关靶点及通路。其中, STAT6 经过磷酸化发挥调控免疫、炎症反应的作用, 且其他靶点也多与炎症相关, 如 IL-6、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 等。

3.2.4 黄芪甲苷对心肌梗死大鼠心脏组织中 IL-6/JAK/STAT6 通路相关蛋白表达的影响 如图 7 所示, 与假手术组比较, 模型组大鼠心脏组织 IL-6、p-JAK2/JAK2、p-STAT6/STAT6 和 JAK1 蛋白表达水平均显著升高 ($P<0.05$ 、 0.001); 与模型组比较, 黄芪甲苷中剂量组 IL-6 和 JAK1 蛋白表达水平显著

表 3 给药 28 d 各组大鼠血清中 CK、CTn-T 和 LDH 水平 ($\bar{x} \pm s$)

Table 3 CK, CTn-T and LDH levels in serum of rats in each group after 28 d of administration ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	n/只	CK/(ng·L ⁻¹)	CTn-T/(ng·L ⁻¹)	LDH/(ng·L ⁻¹)
空白	—	8	148.533±8.769	39.434±3.008	26.381±0.306
假手术	—	8	157.700±5.602	38.524±1.893	25.153±0.981
模型	—	8	170.890±6.211**	47.475±4.482***	29.296±1.468***
黄芪甲苷	10	7	150.895±3.732###	41.229±2.100###	26.788±1.284###
	20	6	151.295±9.257###	39.032±3.297###	26.495±0.708###
	40	7	154.723±3.157##	42.188±3.687#	26.474±0.710###
阿托伐他汀	20	8	169.804±8.639	46.336±5.329	28.391±0.333

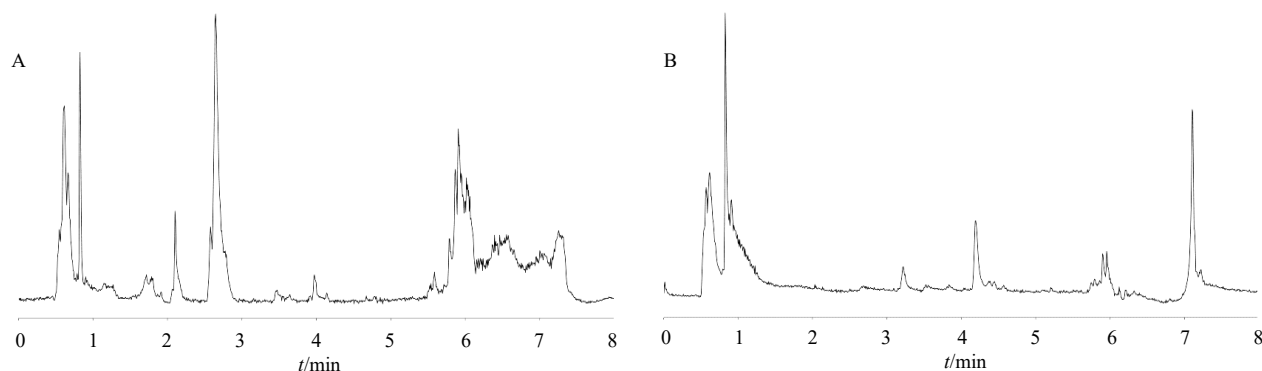


图 5 正 (A)、负 (B) 离子模式下质控样品的总离子流图

Fig. 5 Total ion flow of quality control sample under positive (A) and negative (B) ion modes

表 4 黄芪甲苷给药后回调差异代谢物

Table 4 Callback of differential metabolites after administration of astragaloside IV

序号	离子模式	代谢物	<i>m/z</i>	分子式	黄芪甲苷中剂量组 vs 模型组
1	正离子	8-deoxy-11-hydroxy-13-chlorogrosheimin	263.084 6	C ₁₅ H ₁₉ ClO ₄	↓
2	正离子	DL-间酪氨酸	164.070 5	C ₉ H ₁₁ NO ₃	↓
3	正离子	肾上腺素红	162.054 9	C ₉ H ₉ NO ₃	↓
4	正离子	2-甲基-4-(吡啶-3-基)丁酸	148.075 6	C ₉ H ₁₁ NO ₂	↓
5	正离子	DL-二氢鞘氨醇	302.305 1	C ₁₈ H ₃₉ NO ₂	↑
6	正离子	二十烷酰基-EA	356.351 7	C ₂₂ H ₄₅ NO ₂	↑
7	正离子	PC(16 : 0/0 : 0)	518.321 7	C ₂₄ H ₅₀ NO ₇ P	↑
8	正离子	PC(20 : 1/0 : 0)	572.368 6	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	↑
9	正离子	LysoPC(20 : 1(11Z)/0 : 0)	550.386 4	C ₂₈ H ₅₆ NO ₇ P	↑
10	正离子	Leu Ser Pro Lys Lys	572.371 1	C ₂₆ H ₄₉ N ₇ O ₇	↓
11	正离子	5-甲基脱氧胞苷	242.113 3	C ₁₀ H ₁₅ N ₃ O ₄	↓
12	正离子	culmorin	256.226 9	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	↑
13	正离子	2-戊基-3-苯基-2-丙烯醛	443.233 3	C ₁₄ H ₁₈ O	↓
14	正离子	7,3'-二羟基黄酮	255.065 0	C ₁₅ H ₁₀ O ₄	↓
15	正离子	马尿酸	180.065 5	C ₉ H ₉ NO ₃	↓
16	正离子	L-次甘氨酸 A	174.112 4	C ₇ H ₁₁ NO ₂	↑
17	正离子	Asp Leu	247.128 8	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₅	↓
18	正离子	N,N-二甲基鸟嘌呤核苷	312.129 5	C ₁₂ H ₁₇ N ₅ O ₅	↓
19	正离子	R-138727	367.149 8	C ₁₈ H ₂₀ FNO ₃ S	↓
20	正离子	N-去氯苯甲酰吡啶美辛	202.086 2	C ₁₂ H ₁₃ NO ₃	↑
21	正离子	苯甲酸	105.033 8	C ₇ H ₆ O ₂	↓
22	负离子	邻苯三酚-2-O-葡萄糖苷酸	301.056 5	C ₁₂ H ₁₄ O ₉	↓
23	负离子	aspartyl-Isoleucine	245.114 2	C ₁₀ H ₁₈ N ₂ O ₅	↓
24	负离子	吡啶-3-甲酸-O-硫酸盐	239.997 1	C ₉ H ₇ NO ₅ S	↓
25	负离子	isoferuloyl C ₁ -glucuronide	369.082 8	C ₁₆ H ₁₈ O ₁₀	↓
26	负离子	二氢阿魏酸 4-O-葡萄糖醛酸	371.098 4	C ₁₆ H ₂₀ O ₁₀	↓
27	负离子	2-苯乙醇葡萄糖醛酸	297.098 0	C ₁₄ H ₁₈ O ₇	↓
28	负离子	3'-肠内酯硫酸盐	377.070 2	C ₁₈ H ₁₈ O ₇ S	↑
29	负离子	3-烯丙基苯酚硫酸盐	213.022 3	C ₉ H ₁₀ O ₄ S	↓
30	负离子	菖蒲烯酮	265.181 1	C ₁₅ H ₂₄ O	↑
31	负离子	12-羟基十七烷酸	285.243 6	C ₁₇ H ₃₄ O ₃	↑
32	负离子	葎草酮	361.202 3	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	↑
33	负离子	aubergenone	281.175 9	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	↑
34	负离子	异间甲酚	267.196 6	C ₁₅ H ₂₆ O	↑
35	负离子	hernandulcin	281.175 9	C ₁₅ H ₂₄ O ₂	↑
36	负离子	吉马酮	237.185 9	C ₁₅ H ₂₆ O ₂	↑
37	负离子	3-羧基-4-甲基-5-丙基-2-呋喃丙酸	239.092 4	C ₁₂ H ₁₆ O ₅	↑
38	负离子	5-(3',4'-二羟基苯基)-γ-戊内酯-4'-O-葡萄糖苷酸	365.085 5	C ₁₇ H ₂₀ O ₁₀	↓
39	负离子	4-乙基苯硫酸盐	201.022 2	C ₈ H ₁₀ O ₄ S	↓
40	负离子	根皮素 2'-O-葡萄糖苷酸	431.098 4	C ₂₁ H ₂₂ O ₁₁	↓
41	负离子	大豆苷元-7-O-葡萄糖醛酸苷	429.082 5	C ₂₁ H ₁₈ O ₁₀	↓
42	负离子	4-乙烯基苯酚硫酸盐	245.012 4	C ₈ H ₈ O ₄ S	↓
43	负离子	N-乙酰基对氨基苯甲酸	178.050 3	C ₉ H ₉ NO ₃	↓
44	负离子	3-(3,5-二羟基苯基)-1-丙酸硫酸盐	242.996 8	C ₉ H ₁₀ O ₇ S	↓
45	负离子	赤式羟基安非他酮	278.070 4	C ₁₃ H ₂₀ ClNO	↑
46	负离子	tetranor-PGFM	365.135 5	C ₁₆ H ₂₆ O ₇	↓
47	负离子	6'-唾液乳糖	632.204 7	C ₂₃ H ₃₉ NO ₁₉	↓
48	负离子	去氢吐叶醇	267.124 0	C ₁₃ H ₁₈ O ₃	↑

“↑”表示上调，“↓”表示下调。

“↑” indicates up-regulation, “↓” indicates down-regulation.

与空白组比较，模型组 *unclassified_f_Oscillospiraceae*、*uncultured_bacterium_g_Adlercreutzia* 等菌种水平丰度显著下调 ($P < 0.05$)，*uncultured_bacterium_g_Dubosiella* 、 *uncultured_bacterium_g_Dorea* 等菌种水平丰度显著上调 ($P < 0.05$)；与模型组比较，黄芪甲苷中剂量组 *unclassified_f_Oscillospiraceae* 、 *uncultured_bacterium_g_Adlercreutzia* 等菌种水平丰度显著上调 ($P < 0.05$)，*uncultured_bacterium_g_Dubosiella* 、 *uncultured_bacterium_g_Dorea* 等菌丰度显著降低 ($P < 0.05$)。

3.3.3 益生菌体外验证 0~12 h, 各质量浓度的黄芪甲苷可在体外上调益生菌 *Lactobacillus_johnsonii* 种水平丰度, 且 0.062 500 mg/mL 的黄芪甲苷促进益生菌生长程度最明显 (图 10)。

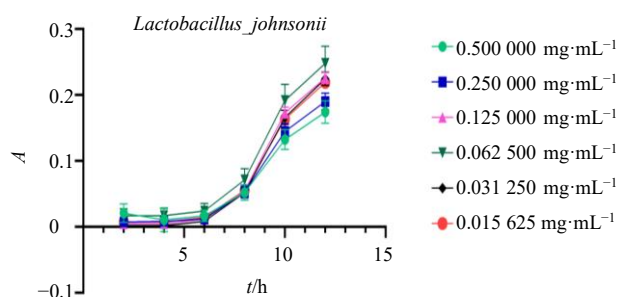


图 10 0~12 h 内 *Lactobacillus_johnsonii* 生长程度

Fig. 10 Degree of *Lactobacillus_johnsonii* growth in 0—12 h

4 讨论

目前临床中治疗心肌梗死的常用药为 β 受体阻滞剂^[17-18], 可通过降低心肌细胞收缩力的负性肌力等作用, 减少心肌耗氧量^[19]。但此类药物的临床治疗需要在患者发病短时间内使用小剂量治疗并长期使用才可降低患者发病率及死亡率^[20], 且在停药之后会出现心绞痛等严重不良反应^[21]。中医药治疗因具有多成分、多靶点且不良反应较小的特点, 逐渐得到大众认可。防己黄芪汤是中医临床治疗心血管疾病的常用方之一, 课题组前期已探讨防己黄芪汤加减方对心血管疾病的治疗作用, 本研究拟探究其君药黄芪的主要有效成分的量-时-效关系及作用机制, 为新药开发及组分中药开发提供理论依据。

在体内实验中, 通过检测超声心动图, 发现相比给药 14 d 模型组, 给药 28 d 模型组更严重; 且给药 14 d 黄芪甲苷中、高剂量组 EF、FS 有明显改善, 给药 28 d 黄芪甲苷各剂量组均可显著改善 EF、FS, 由此证明黄芪甲苷可以改善左前降支结扎手术所致心肌梗死的心脏收缩能力, 且给药 28 d 效果优于给药 14 d。根据病理染色发现, 模型组大鼠心脏左心室腔明显扩张, 炎性浸润严重, 正常区域也伴随着细胞水肿的现象, 且给药 28 d 模型组比给药 14 d 更严重; 给药 14 d 仅黄芪甲苷高剂量组改善较明显, 炎性浸润显著减少, 梗死面积变小; 而给药 28 d 黄芪甲苷中、高剂量组均可明显改善, 梗死面积明显减少, 且心肌纤维化明显改善。研究表明, 心肌梗死过程中, 早期的炎症是诱导坏死心肌修复的必然条件, 但坏死细胞诱导的过度且长时间炎症会导致不可逆的持续性损伤和坏死区域扩大, 甚至导致心

肌纤维化, 造成心衰^[22]。据报道, 黄芪甲苷可通过促进损伤细胞自噬, 从而抑制其诱导炎症反应, 防止进一步加重病情^[16]。CK、CTn-T 和 LDH 在临床中通常可作为预测心肌梗死的指标^[23-26]。黄芪甲苷可以显著减少给药 28 d 大鼠血清中心梗标志物, 且中剂量组效果最优。综合结果判断量-时-效关系, 认为给药 28 d 治疗效果优于给药 14 d。

根据非靶向代谢组学结果可知, 黄芪甲苷给药后可回调血清内 48 种回调代谢物水平, 而其中部分代谢物的作用已有文献记载, 例如吉马酮代谢物在给予黄芪甲苷后相比模型组显著升高, 此类代谢物具有抗炎、抗氧化应激、抗肿瘤等药理作用, 可以抑制模型大鼠 IL-6、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 的表达, 并且上调 TGF- β 1 和 IL-10 水平发挥抗炎活性^[27]。模型组肾上腺素红代谢物含量显著升高, 给予黄芪甲苷后降低, 研究表明肾上腺素红会显著降低大鼠心率和冠状动脉血流量^[28]。将 48 个回调代谢物进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 通路富集分析, 结果表明主要与苯丙氨酸代谢、抗坏血酸和醛酸代谢等相关。其中, 苯丙氨酸代谢与心血管疾病有密切联系。血浆中苯丙氨酸水平升高也是预测临床心衰患者死亡率的重要标准之一^[29]。通过 IPA 数据库分析出的靶点图发现, STAT6、整合素 α M (integrin alpha M, ITGAM)、IL-6、IL-1 β 等靶点多与炎症相关。且据报道, 重要代谢物吉马酮可以通过调控 JAK/STAT 通路诱导人肝癌 HepG2 细胞凋亡^[30], 而且还可以通过抑制 IL-6、NF- κ B 等通路上游细胞因子发挥抗炎作用^[27,31]。此外, JAK/STAT 通路和苯丙氨酸代谢密切相关^[32], 可通过 STAT 酪氨酸突变为苯丙氨酸来抑制 IL-6 的信号传导, 密切参与炎症反应^[33]。因此, 下一阶段实验针对 IL-6/JAK/STAT6 这一通路进行验证。Western blotting 结果显示, 黄芪甲苷可以显著抑制心脏组织 IL-6 表达, 进而导致抑制 JAK2 和 STAT6 的磷酸化。在筛选 JAK 其他亚型时, 发现心脏组织中 JAK1 表达有显著的变化趋势。与假手术组比较, 模型组 JAK1 蛋白表达水平显著升高, 黄芪甲苷中剂量组 JAK1 蛋白表达水平显著降低。研究表明, JAK1 总蛋白的激活会诱导 JAK2 的磷酸化^[34-35]。此外, Chen 等^[36]研究发现, JAK1 总蛋白表达量与细胞自噬程度呈正相关, 而黄芪甲苷具有调控自噬作用, 可以通过抑制过度自噬, 从而达到减少损伤的

效果^[37-39]。推测黄芪甲苷不仅通过 IL-6/JAK2/STAT6 信号通路抑制心梗炎症反应, 还可通过抑制 JAK1 总蛋白表达, 抑制对 JAK2 蛋白的促磷酸化作用, 并且调控细胞自噬, 减缓病情加重。

肠道菌群与心血管疾病之间有密切联系, 心肌梗死的发生会导致肠道菌群组成改变, 而菌群多样性的改善也会调节体内代谢物水平, 辅助治疗心肌梗死^[40]。结果表明, 黄芪甲苷可以回调部分菌群丰度, 且文献记载部分属水平菌群有明确作用。研究表明, 在给予预防肥胖的药物后小鼠肠道微生物菌群中 unclassified_f_Oscillospiraceae 丰度显著上调^[41]。并且在谷维素缓解高脂肪高胆固醇饮食导致的高胆固醇血症实验中, unclassified_f_Oscillospiraceae 的丰度也会因高脂血症减轻而上调^[42], 而高脂肪饮食是导致心肌梗死、动脉粥样硬化等心血管疾病的重要因素^[43], 由此预测此属菌群的上调会发挥预防肥胖的作用。*g_Adlercreutzia* 可化学吸收 IL-1 β 、IL-6, 证明 *g_Adlercreutzia* 菌属水平增加可以减轻机体的炎症, 缓解病情^[44-46]。表明黄芪甲苷通过上调 *g_Adlercreutzia* 丰度发挥抗炎作用, 改善心肌梗死。丁酸盐是 *g_Papillibacter* 的代谢产物^[47], 而丁酸盐可以抑制机体炎症和氧化应激^[48]。表明黄芪甲苷通过上调 *g_Papillibacter* 丰度增加代谢产物丁酸盐, 从而抑制心肌梗死炎症及氧化应激。*g_Dubosiella* 属丰度上升通常伴随着肠道炎症^[49], 抑制产生短链脂肪酸的细菌生长, 短链脂肪酸可维持肠道稳态和缓解炎症反应, 增强肠道屏障完整性^[50], 因此抑制这类细菌生长可发挥抗炎反应。*g_Dorea* 的丰度与肥胖程度呈正相关^[51], 而肥胖是导致动脉粥样硬化的重要因素之一。此外, 将这 48 种回调代谢物与肠道菌群属水平结果进行联合分析, 发现 unclassified_f_Oscillospiraceae 和 *g_Dubosiella* 菌群不仅与部分回调代谢物呈相关性, 而且在给与黄芪甲苷后属水平丰度有明显改善。因此推测黄芪甲苷可通过改善肠道菌群, 调节体内代谢物水平。在种水平菌群结果中发现, 黄芪甲苷组体内 *Lactobacillus_johnsonii* 水平丰度有上调趋势, 而 *Lactobacillus_johnsonii* 在体内具有抗炎、抗菌作用^[52]。体外验证实验结果表明, 黄芪甲苷可以显著促进 *Lactobacillus_johnsonii* 生长。综合量-时-效关系、作用机制以及肠道菌群结果推测, 黄芪甲苷具有促进部分益生菌生长、改善肠道菌群的作用, 回调体内代谢物水平, 通过调控心肌 IL-6/JAK/STAT6 信号通

路, 发挥抗炎以及调控自噬作用, 从而改善心功能。

本研究探究了黄芪甲苷对心肌梗死大鼠的量-时-效关系, 利用非靶向代谢组学和 IPA 数据库分析其作用靶点, 采用 Western blotting 方法进行 IL-6/JAK/STAT6 通路验证, 并且探究黄芪甲苷对心梗大鼠肠道菌群的改善作用, 为黄芪治疗心血管疾病提供理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 刘璇, 杨丰文, 王婷, 等. 复方丹参滴丸联合三种他汀类药物治疗冠心病心绞痛的系统评价 [J]. 天津中医药大学学报, 2019, 38(1): 46-52.
- [2] Kosuge M, Kimura K, Ishikawa T, *et al.* Differences between men and women in terms of clinical features of ST-segment elevation acute myocardial infarction [J]. *Circ J*, 2006, 70(3): 222-226.
- [3] Lu L, Liu M, Sun R R, *et al.* Myocardial infarction: Symptoms and treatments [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 72(3): 865-867.
- [4] 胡月华, 陈强, 邢海生, 等. 丹参酮 II_A 通过抑制 miR-376b-5p 降低急性心肌梗死大鼠致炎细胞因子分泌并减轻心肌损伤研究 [J]. 中草药, 2023, 54(12): 3887-3894.
- [5] 杨毓秀, 贾镭, 张峻, 等. 急性心肌梗死并发慢性心律失常的研究进展及其心脏起搏治疗现状 [J]. 心血管病学进展, 2022, 43(12): 1057-1062.
- [6] Cortellini G, Caruso C, Romano A. Aspirin challenge and desensitization: How, when and why [J]. *Curr Opin Allergy Clin Immunol*, 2017, 17(4): 247-254.
- [7] 吕露. β 受体阻断剂的临床应用及不良反应 [J]. 实用医技杂志, 2006, 13(9): 1603-1604.
- [8] 杨立蓉, 许勇. 丹参制剂治疗缺血性心脏病的实验与临床研究进展 [J]. 湖南中医杂志, 2023, 39(11): 211-214.
- [9] 邵长鑫, 林欢欢, 靳晓杰, 等. 黄芪的炮制历史沿革及现代研究进展 [J]. 中草药, 2023, 54(15): 5057-5074.
- [10] 郑文, 曹兰秀, 杜旭辉. 黄芪常用对药配伍机制研究进展 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2023, 25(10): 205-209.
- [11] 王斌. 黄芪桂枝五物加减汤对心阳不足型扩张型心脏病患者 sST₂ 及心功能的影响 [D]. 杭州: 浙江中医药大学, 2020.
- [12] 赵志幸. 防己黄芪汤加麻黄治疗阳虚水泛型慢性心力衰竭的临床观察 [D]. 南宁: 广西中医药大学, 2018.
- [13] 王绍鹏, 杨光远, 林鸿扬, 等. 黄芪甲苷的药理作用研究进展 [J]. 广东化工, 2021, 48(24): 48-49.
- [14] Li D, Liu Y T, Qin X M. Rapid quantitative analysis of 12 chemical constituents in wild-simulated and cultivated

- Astragali Radix* based on UHPLC-MS [J]. *Chin Herb Med*, 2022, 14(3): 464-469.
- [15] Shi H, Zhou P, Gao G, *et al.* Astragaloside IV prevents acute myocardial infarction by inhibiting the TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway [J]. *J Food Biochem*, 2021, 45(7): e13757.
- [16] Wang Q N, Chen W Y, Yang X F, *et al.* Inhibition of miRNA-1-mediated inflammation and autophagy by astragaloside IV improves lipopolysaccharide-induced cardiac dysfunction in rats [J]. *J Inflamm Res*, 2022, 15: 2617-2629.
- [17] A randomized trial of propranolol in patients with acute myocardial infarction. I. Mortality results [J]. *JAMA*, 1982, 247(12): 1707-1714.
- [18] Norwegian Multicenter Study Group. Timolol-induced reduction in mortality and reinfarction in patients surviving acute myocardial infarction [J]. *N Engl J Med*, 1981, 304(14): 801-807.
- [19] Giannakopoulos G, Noble S. Should we be using upstream beta-blocker therapy for acute myocardial infarction? [J]. *Curr Cardiol Rep*, 2021, 23(6): 66.
- [20] Bahit M C, Kochar A, Granger C B. Post-myocardial infarction heart failure [J]. *JACC Heart Fail*, 2018, 6(3): 179-186.
- [21] Frishman W H. Beta-adrenergic blocker withdrawal [J]. *Am J Cardiol*, 1987, 59(13): 26-32.
- [22] Kain V, Prabhu S D, Halade G V. Inflammation revisited: Inflammation versus resolution of inflammation following myocardial infarction [J]. *Basic Res Cardiol*, 2014, 109(6): 444.
- [23] Ndrepepa G, Kastrati A. Creatine kinase myocardial band-a biomarker to assess prognostically relevant periprocedural myocardial infarction [J]. *Int J Cardiol*, 2018, 270: 118-119.
- [24] 马丽, 谢基明. 肌酸激酶同工酶在心肌损伤中的研究进展 [J]. 内蒙古医学杂志, 2017, 49(8): 923-926.
- [25] Roos A, Edgren G. Using historical cardiac troponins to identify patients at a high risk of myocardial infarction [J]. *Heart*, 2022, 109(2): 127-133.
- [26] Ramakrishna K, Krishnamurthy S. Indole-3-carbinol ameliorated the isoproterenol-induced myocardial infarction via multimodal mechanisms in Wistar rats [J]. *Nat Prod Res*, 2022, 36(23): 6044-6049.
- [27] An J F, Sun Y, Zhang Q L, *et al.* The effects of germacrone on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in neonatal rats [J]. *Cell Mol Biol*, 2014, 60(4): 8-12.
- [28] Yates J C, Beamish R E, Dhalla N S. Ventricular dysfunction and necrosis produced by adrenochrome metabolite of epinephrine: Relation to pathogenesis of catecholamine cardiomyopathy [J]. *Am Heart J*, 1981, 102(2): 210-221.
- [29] Chen W S, Wang C H, Cheng C W, *et al.* Elevated plasma phenylalanine predicts mortality in critical patients with heart failure [J]. *ESC Heart Fail*, 2020, 7(5): 2884-2893.
- [30] Liu Y Y, Zheng Q, Fang B, *et al.* Germacrone induces apoptosis in human hepatoma HepG2 cells through inhibition of the JAK2/STAT3 signalling pathway [J]. *J Huazhong Univ Sci Technol Med Sci*, 2013, 33(3): 339-345.
- [31] Zhuang S J, Liu B G, Guo S F, *et al.* Germacrone alleviates neurological deficits following traumatic brain injury by modulating neuroinflammation and oxidative stress [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2021, 21(1): 6.
- [32] Watanabe S, Itoh T, Arai K. Roles of JAK kinase in human GM-CSF receptor signals [J]. *Leukemia*, 1997, 11(Suppl 3): 76-78.
- [33] Kaptein A, Paillard V, Saunders M. Dominant negative stat3 mutant inhibits interleukin-6-induced Jak-STAT signal transduction [J]. *J Biol Chem*, 1996, 271(11): 5961-5964.
- [34] Zhang Y, Liang R F, Chen C W, *et al.* JAK1-dependent transphosphorylation of JAK2 limits the antifibrotic effects of selective JAK2 inhibitors on long-term treatment [J]. *Ann Rheum Dis*, 2017, 76(8): 1467-1475.
- [35] Koppikar P, Bhagwat N, Kilpivaara O, *et al.* Heterodimeric JAK-STAT activation as a mechanism of persistence to JAK2 inhibitor therapy [J]. *Nature*, 2012, 489(7414): 155-159.
- [36] Chen D D, Liu Y Y, Chen J Q, *et al.* JAK/STAT pathway promotes the progression of diabetic kidney disease via autophagy in podocytes [J]. *Eur J Pharmacol*, 2021, 902: 174121.
- [37] Wang X W, Guo Z K, Ding Z F, *et al.* Inflammation, autophagy, and apoptosis after myocardial infarction [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(9): e008024.
- [38] Li L Q, Huang T J, Yang J, *et al.* PINK1/Parkin pathway-mediated mitophagy by AS-IV to explore the molecular mechanism of muscle cell damage [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 161: 114533.
- [39] Zhu Y B, Qian X, Li J J, *et al.* Astragaloside-IV protects H9C2(2-1) cardiomyocytes from high glucose-induced injury via miR-34a-mediated autophagy pathway [J]. *Artif Cells Nanomed Biotechnol*, 2019, 47(1): 4172-4181.
- [40] Zhao X, Zhong X Q, Liu X, *et al.* Therapeutic and improving function of lactobacilli in the prevention and treatment of cardiovascular-related diseases: A novel

- perspective from gut microbiota [J]. *Front Nutr*, 2021, 8: 693412.
- [41] Li M J, Zhao Y H, Wang Y N, *et al.* Eugenol, A major component of clove oil, attenuates adiposity, and modulates gut microbiota in high-fat diet-fed mice [J]. *Mol Nutr Food Res*, 2022, 66(20): e2200387.
- [42] Yan S S, Chen J H, Zhu L F, *et al.* Oryzanol alleviates high fat and cholesterol diet-induced hypercholesterolemia associated with the modulation of the gut microbiota in hamsters [J]. *Food Funct*, 2022, 13(8): 4486-4501.
- [43] Lu L, Liu M, Sun R R, *et al.* Myocardial infarction: Symptoms and treatments [J]. *Cell Biochem Biophys*, 2015, 72(3): 865-867.
- [44] Schepici G, Silvestro S, Bramanti P, *et al.* The gut microbiota in multiple sclerosis: An overview of clinical trials [J]. *Cell Transplant*, 2019, 28(12): 1507-1527.
- [45] Jantaratnotai N, Utaisinchaoen P, Sanvarinda P, *et al.* Phytoestrogens mediated anti-inflammatory effect through suppression of IRF-1 and pSTAT1 expressions in lipopolysaccharide-activated microglia [J]. *Int Immunopharmacol*, 2013, 17(2): 483-488.
- [46] Jie Z Y, Xia H H, Zhong S L, *et al.* The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease [J]. *Nat Commun*, 2017, 8(1): 845.
- [47] Hao Y S, Ji Z Q, Shen Z J, *et al.* Increase dietary fiber intake ameliorates cecal morphology and drives cecal species-specific of short-chain fatty acids in white Pekin ducks [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 853797.
- [48] Hu C H, Xiao K, Luan Z S, *et al.* Early weaning increases intestinal permeability, alters expression of cytokine and tight junction proteins, and activates mitogen-activated protein kinases in pigs [J]. *J Anim Sci*, 2013, 91(3): 1094-1101.
- [49] Qiu X X, Macchietto M G, Liu X T, *et al.* Identification of gut microbiota and microbial metabolites regulated by an antimicrobial peptide lipocalin 2 in high fat diet-induced obesity [J]. *Int J Obes*, 2021, 45(1): 143-154.
- [50] Alsharairi N A. Therapeutic potential of gut microbiota and its metabolite short-chain fatty acids in neonatal necrotizing enterocolitis [J]. *Life*, 2023, 13(2): 561.
- [51] Cao Y, Tian B M, Zhang Z G, *et al.* Positive effects of dietary fiber from sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam.] peels by different extraction methods on human fecal microbiota *in vitro* fermentation [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 986667.
- [52] Vazquez-Munoz R, Thompson A, Russell J T, *et al.* Insights from the *Lactobacillus johnsonii* genome suggest the production of metabolites with antibiofilm activity against the pathobiont *Candida albicans* [J]. *Front Microbiol*, 2022, 13: 853762.

[责任编辑 李亚楠]