

• 药理与临床 •

对香豆酸调控 TLR4/NF- κ B 炎症途径抗急性心肌缺血的作用机制

蔺虎琴¹, 林珀吏¹, 任萍¹, 陈家黎², 曹博雅¹, 何平³, 毛伯奕³, 曹俊岭^{1,4*}, 张 Jian^{3*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 100029
2. 中国中医科学院望京医院, 北京 100102
3. 北京中医药大学生命科学学院, 北京 100029
4. 北京中医药大学东方医院, 北京 100078

摘要:目的 探究对香豆酸抑制炎症途径改善急性心肌缺血 (acute myocardial ischemia, AMI) 的保护作用和分子机制。方法 应用 PubChem 等数据库预测筛选对香豆酸与 AMI 的共同靶点, 将获得的共同靶点导入 STRING 数据库构建蛋白相互作用网络 (protein-protein interaction, PPI), 并对 PPI 结果进行拓扑分析; 利用 DAVID 数据库和微生信平台进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能和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; 运用分子对接技术和分子动力学模拟分析对香豆酸与 Toll 样受体 4 (Toll-like receptor 4, TLR4) 共受体髓样分化因子 2 (myeloid differentiation 2, MD2) 的结合能力和稳定性。采用冠状动脉左前降支结扎法建立 AMI 小鼠模型, 设置假手术组、模型组、对香豆酸 (100 mg/kg) 组、卡维地洛 (7.6 mg/kg) 组及 TAK-242 (3 mg/kg) 组, 连续给药 7 d, 末次给药后采用超声心动评价对香豆酸对心功能的保护作用; 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 及 Masson 染色观察心肌组织病理学损伤; 检测血清中肌酸激酶同工酶 (creatinase kinase-MB, CK-MB) 活性、心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, cTnI) 水平和心肌组织炎症因子水平; 采用 Western blotting 检测心肌组织 TLR4/核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 炎症通路相关蛋白的表达。构建 H9c2 心肌细胞缺氧炎症复合损伤模型, 进一步探究对香豆酸对 TLR4/NF- κ B 炎症途径的调控机制。**结果** 网络药理学分析显示对香豆酸可作用于 TLR4 等核心靶点并调控 TLR 及 NF- κ B 通路治疗 AMI, 分子对接结果显示对香豆酸与 TLR4 共受体 MD2 具有较好的亲和力, 分子动力学模拟表明对香豆酸-MD2 具有良好的稳定性。动物实验结果显示, 对香豆酸能显著改善 AMI 小鼠心功能 ($P < 0.01$ 、 0.001), 减轻心肌组织炎症细胞浸润, 抑制胶原蛋白沉积及心肌纤维化, 降低血清中 CK-MB 活性及 cTnI 水平 ($P < 0.01$ 、 0.001), 下调心肌组织中 TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B、NOD 样受体热蛋白结构域相关蛋白 3 (NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、gasdermin D 蛋白 (gasdermin D, GSDMD) 和白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β) 蛋白表达以及 IL-6 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。细胞实验结果显示, 对香豆酸可显著抑制 TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B、NLRP3 蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。**结论** 对香豆酸可显著改善 AMI 小鼠心功能、抑制心肌组织炎症反应及心肌纤维化, 其作用机制与调控 TLR4/NF- κ B 炎症途径有关。

关键词: 对香豆酸; 心肌缺血; 网络药理学; 分子对接; 分子动力学模拟; TLR4; NF- κ B

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2026)09-3384-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.09.012

Mechanisms of *p*-coumaric acid in attenuating acute myocardial ischemia through regulation of TLR4/NF- κ B inflammatory pathway

LIN Huqin¹, LIN Poli¹, REN Ping¹, CHEN Jiali², CAO Boya¹, HE Ping³, MAO Boyan³, CAO Junling^{1,4}, ZHANG Jian³

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

收稿日期: 2025-11-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82004095); 中央高校基本科研业务费专项资助项目 (2023-JYB-JBQN-013, 2021-JYB-XJSJ031); 国家中医药管理局司便函 (国中医药科技中药便函[2022]59号); 国家中医药管理局科技司项目 (GZY-KJS-2022-057); 曹俊岭全国老药工传承工作室建设项目 (国中医药人教函 2024-255); 曹俊岭临方炮制中医药传统技能传承工作室 (2025-JNZS-13)

作者简介: 蔺虎琴, 硕士研究生, 研究方向为心血管药理学。E-mail: linhq107@163.com

***通信作者:** 张 Jian, 副研究员, 研究方向为中医药防治心血管疾病的基础研究。E-mail: zhangjian@bucm.edu.cn

曹俊岭, 主任药师, 博士生导师, 研究方向为药理学、医院药学。E-mail: caojunling72@163.com

2. Wangjing Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China
3. School of Life Sciences, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China
4. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China

Abstract: Objective To investigate the protective effects and underlying molecular mechanisms of *p*-coumaric acid (*p*-CA) against acute myocardial ischemia (AMI) through inhibition of inflammatory signaling. **Methods** Common targets of *p*-CA and AMI were predicted and screened using databases such as PubChem. These common targets were imported into the STRING database to construct a protein-protein interaction (PPI) network, followed by topological analysis. Gene ontology (GO) function and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) pathway enrichment analysis were performed using DAVID database and bioinformatics platform. The binding affinity and stability between *p*-CA and myeloid differentiation 2 (MD2), a co-receptor of Toll-like receptor 4 (TLR4), were analyzed using molecular docking and molecular dynamics simulations. An AMI mouse model was established by ligating the left anterior descending coronary artery. The mice were randomly assigned into sham group, model group, *p*-CA (100 mg/kg) group, carvedilol (7.6 mg/kg) group and TAK-242 (3 mg/kg) group. After seven consecutive days of treatment, echocardiography was performed to evaluate cardiac function. Myocardial histopathological damage was observed using hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. Activity of creatine kinase-MB, level of cardiac troponin I (cTnI) in serum and levels of inflammatory factors in myocardial tissue were detected. The expressions of proteins related to TLR4/nuclear factor- κ B (NF- κ B) inflammatory pathway in myocardial tissue were measured by Western blotting. A hypoxia-inflammatory complex injury model in H9c2 cardiomyocytes was constructed to further evaluate the regulatory mechanism of *p*-CA on TLR4/NF- κ B inflammatory signaling pathway. **Results** Network pharmacology analysis indicated that *p*-CA could act on core targets such as TLR4 and regulate TLR and NF- κ B pathways to treat AMI. Molecular docking results demonstrated that *p*-CA exhibited favorable binding affinity with MD2, a co-receptor of TLR4. Molecular dynamics simulations further verified that the *p*-CA-MD2 complex possessed good structural stability. The results of animal experiments showed that *p*-CA significantly improved cardiac function in AMI mice ($P < 0.01, 0.001$), alleviated inflammatory cell infiltration in myocardial tissue, inhibited collagen deposition and myocardial fibrosis, and reduced activity of CK-MB and level of cTnI in serum ($P < 0.01, 0.001$). Furthermore, *p*-CA downregulated TLR4, p-NF- κ B/NF- κ B, NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3 (NLRP3), gasdermin D (GSDMD), interleukin-1 β (IL-1 β) protein expressions and IL-6 level in myocardial tissue ($P < 0.05, 0.01, 0.001$). The results of cell experiments confirmed that *p*-CA significantly suppressed the protein expression levels of TLR4, p-NF- κ B/NF- κ B and NLRP3 ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** *p*-CA could improve cardiac function in AMI, inhibit myocardial inflammatory response and fibrosis, and its mechanism is associated with the regulation of TLR4/NF- κ B inflammatory pathway.

Key words: *p*-coumaric acid; myocardial ischemia; network pharmacology; molecular docking; molecular dynamics simulation; TLR4; NF- κ B

心血管疾病是一个备受全球关注的公共卫生问题,其中缺血性心脏病已成为人类的首要死亡原因^[1]。急性心肌缺血(acute myocardial ischemia, AMI)会引发心脏的代偿性改变和心肌损伤,导致心绞痛、心肌梗死及心力衰竭^[2]。研究发现炎症反应贯穿了AMI向心力衰竭发展的全过程,并直接调控着AMI后的心肌梗死面积和心室不良重构程度^[3]。局部持续的炎症反应会促进炎症因子的释放和胶原沉积,引发细胞凋亡、坏死等心肌损伤,诱导心肌纤维化^[4]。有研究表明抑制过度的炎症反应在改善心肌缺血方面有重要的作用^[5]。

对香豆酸是一种常见于多种植物及中药的酚酸类化合物,因具备多种药理活性而有着重要的研究价值。现代药理学研究表明其具有抗炎、抗氧化和免疫调节等作用^[6-7]。对香豆酸可以抑制血小板聚

集,减轻动脉粥样硬化程度,预防心肌梗死和降低药物的心脏毒性^[8-9]。另有研究发现对香豆酸可减少缺血再灌注早期心肌组织中M1型巨噬细胞的数量,促进M2型巨噬细胞极化,抑制巨噬细胞介导的炎症反应^[10]。然而,对香豆酸对AMI的治疗作用及具体分子机制尚不完全清楚,有待进一步系统探究。

网络药理学可用于揭示药物、靶点、疾病之间的复杂相互作用关系,阐释药物的潜在作用机制^[11-12]。本研究应用网络药理学筛选对香豆酸改善AMI的潜在作用靶点和通路,发现对香豆酸可作用于AMI核心靶点Toll样受体4(Toll-like receptor 4, TLR4),并调控TLR及核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)等炎症信号通路。TLR4是最早被发现的模式识别受体,也是心脏中表达最多的TLR^[13]。大量研究发现AMI后的炎症反应由先天免疫模式识别受

体介导,与心脏中的TLR4密切相关^[14]。心肌缺血缺氧状态会导致细胞膜的完整性被破坏,释放出损伤相关分子模式(damage-associated molecular patterns, DAMPs),通过模式识别受体TLR4启动相应的信号级联反应,激活NF- κ B、NOD样受体热蛋白结构域相关蛋白3(NOD-like receptor thermal protein domain associated protein 3, NLRP3)、gasdermin家族D蛋白(gasdermin D, GSDMD)及促炎因子白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)等下游蛋白,诱导炎症因子的大量表达和释放,引发强烈的炎症反应^[15-16]。炎症反应的加剧会恶化心肌缺血的病理进程,并直接影响其临床预后^[17]。因此,抑制TLR4/NF- κ B炎症信号通路是治疗心肌缺血的重要途径,且有研究报道对香豆酸可通过调节NF- κ B通路降低炎症因子的表达水平发挥抗炎特性^[18],本研究将聚焦TLR4/NF- κ B炎症途径探究对香豆酸治疗AMI的分子作用机制。髓样分化因子2(myeloid differentiation 2, MD2)作为受体蛋白,可参与到TLR4与配体的结合中,是抑制TLR4通路激活炎症的重要靶点^[19]。分子对接是一种可实现分子水平上预测配体-靶点相互作用的方法^[20]。分子动力学模拟可进一步评估配体与靶点结合模式的动态稳定性,并提供更为精确的相互作用信息^[21]。本研究运用分子对接技术分析TLR4共受体MD2与对香豆酸的结合能力,分子动力学模拟验证二者结合的稳定性,并通过构建小鼠AMI模型和H9c2心肌细胞缺氧炎症复合损伤模型,于在体和离体水平探究对香豆酸调控TLR4/NF- κ B炎症途径抗AMI的作用机制。

1 材料

1.1 动物和细胞

50只SPF级雄性ICR小鼠,8周龄,体质量(30 \pm 2)g,购自北京斯贝福生物技术有限公司,动物合格证号110324211102348127。动物饲养于标准环境中,温度(23 \pm 2) $^{\circ}$ C,相对湿度(60 \pm 5)%,12h光照和黑暗循环,标准饲料喂养,自由饮水,适应性喂养3d后进行实验。动物实验经北京中医药大学伦理委员会批准(批准号BUCM-4-2022031003-1043)。

H9c2细胞购自北京协和医学院细胞资源中心。

1.2 药品与试剂

对香豆酸(批号Y30A11C112277,质量分数 \geq 98%)购自上海源叶生物科技有限公司;卡维地洛

(国药准字H20000100,批号0K0254D26)购自齐鲁制药有限公司;TLR4抑制剂TAK-242(批号66229,质量分数为98.92%)购自美国MCE公司;肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB, CK-MB)试剂盒(批号L211017286)、心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTnI)试剂盒(批号202107)购自武汉华美生物工程有限公司;IL-6试剂盒(批号20211120)、肿瘤坏死因子 α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)试剂盒(批号20211120)购自武汉云克隆科技股份有限公司;苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色套装(批号CR2207111)、Masson染色套装(批号CR2210113)购自武汉赛维尔生物科技有限公司;胎牛血清(批号2059461RP)购自美国Corning公司;DMEM培养基(批号8121655)、0.25%胰酶(批号2188970)购自美国Invitrogen公司;MTT(批号20220301)购自北京百瑞极生物科技有限公司;TLR4抗体(批号GR3275547-5)、NF- κ B抗体(批号1006853-120)、p-NF- κ B抗体(批号6100007483)、NLRP3抗体(批号GR3347154-6)、GSDMD抗体(批号GR3281507-5)、IL-1 β 抗体(批号GR1134-51)购自英国Abcam公司;甘油醛-3-磷酸脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphatedehydrogenase, GAPDH)抗体(批号F071108)购自上海泊湾生物科技有限公司;羊抗兔IgG多克隆抗体(批号130963)购自北京拜尔迪生物技术有限公司;脂多糖(lipopolysaccharides, LPS, 批号20220320)购自美国Sigma公司。

1.3 仪器

VentStar R45型小动物呼吸机(深圳瑞沃德公司);ULP-302-SL型手术灯(江西倍特卡尔公司);Vevo 2100型小动物超声影像系统(加拿大Visual Sonics公司);5242R型冷冻离心机(德国Eppendorf公司);BPN-240CRH型CO₂培养箱(上海一恒科学仪器有限公司);SpectraMax i3x型酶标仪(美国Molecular Devices公司);LEICA DMIL LED倒置生物显微镜(德国Leica公司);ECLIPSE TE2000-S型倒置荧光显微镜(日本Nikon公司);Mini-PROTEAN Tetra电泳仪(美国Bio-Rad公司);O1600MF型成像系统(广州光仪生物科技有限公司)。

2 方法

2.1 网络药理学分析

从PubChem(<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)数据库中查找对香豆酸的分子结构、SMILES

号和分子式等信息,并导出其分子结构,随后将化合物的 SMILES 号提交至 Swiss Target Prediction (<https://www.swisstargetprediction.ch/>) 平台进行靶点查找。在 GeneCards (<https://www.genecards.org/>)、OMIM (<https://www.omim.org/>) 和 DisGeNET (<https://www.disgenet.org/home>) 数据库中,以“acute myocardial ischemia”为关键词进行疾病靶点的收集。利用 Venny 2.1.0 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 在线作图工具获得对香豆酸潜在靶点和 AMI 疾病靶点交集,使用 STRING (<https://cn.string-db.org/>) 数据库构建蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络图,隐藏网络中游离的节点,采用 Cytoscape 3.9.1 软件对 PPI 结果进行拓扑学分析。将交集靶点输入到 DAVID (<https://david-d.ncifcrf.gov>) 数据库^[22]进行基因本体 (gene ontology, GO) 和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,最终利用微生信平台 (<https://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行可视化。

2.2 分子对接验证

从 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 中下载获得 MD2 蛋白晶体结构 (PDB ID: 2E56), 利用 Discovery Studio 2019 对其进行预处理, 去除水分子和蛋白多构象、补充非完整氨基酸残基, 添加极性氢, 得到用于对接的蛋白结构。随后将取自 PubChem 数据库的小分子化合物对香豆酸的分子结构导入到 Discovery Studio 2019 中, 并对其进行预处理, 得到用于对接的小分子化合物。

利用配体扩张法划定活性位点, 该位点以原配体的三维构象为基准, 并记录了其中心坐标和作用半径, 随后运用 CDOCKER 模块将其与原配体对接, 并计算均方根偏差 (root-mean-square deviation, RMSD), 当 $RMSD \leq 0.2$ nm 时, 表明所采用的参数体系能够准确模拟原配体与靶蛋白之间的结合状态。最终运用 CDOCKER 模块将对香豆酸与 MD2 蛋白进行分子对接, 以 -CDOCKER_ENERGY 作为评价标准评估其潜在活性, 并进一步分析对香豆酸与受体关键氨基酸残基之间的相互作用。

2.3 分子动力学模拟

以分子对接筛选所得结合作用最优的对香豆酸-MD2 复合物为研究对象, 采用 GROMACS 2022.2 软件开展分子动力学模拟。蛋白质采用 Amber14sb 力场参数, 而小分子配体则采用 GAFF

通用力场参数。将蛋白质与配体的拓扑及坐标文件合并, 构建复合物体系, 并置于正十二面体盒子中心, 设定蛋白质原子与盒子边界的最小距离为 1.0 nm。溶剂化处理选用 TIP3P 水模型, 同时添加 Na^+ 和 Cl^- 以中和电荷。采用最速下降法对体系能量进行最小化。随后, 在恒温-恒容 (NVT) 和恒温-恒压 (NPT) 系综中进行平衡, 平衡时间为 200 ps, 在完成平衡模拟后, 设置时间步长为 2 fs。模拟过程中施加周期性边界条件, 并使用 Berendsen 耦合算法将系统温度维持在 300 K。共价键采用 LINCS 算法进行约束, 静电相互作用则通过粒子网格 Ewald (PME) 方法计算。完成平衡后, 对无任何位置约束的体系进行 100 ns 的分子动力学模拟, 每 10 ps 保存 1 次轨迹。

2.4 动物实验

2.4.1 AMI 小鼠模型的建立 小鼠 ip 0.7% 戊巴比妥钠 (70 mg/kg) 麻醉后, 仰位固定, 22 G 静脉留置针经口行气管插管, 并连接呼吸机辅助通气, 随后经左胸第 3~4 肋间开胸暴露心脏, 使用 7/0 带线缝合针在左心耳下缘 2 mm 处结扎冠状动脉左前降支。关胸操作采用 5/0 带线缝合针常规完成。术后将小鼠转移至电热毯, 自主呼吸恢复后拔管。假手术组仅穿线而不实施结扎, 其余操作同模型组。

2.4.2 分组与给药 50 只雄性 ICR 小鼠随机分为假手术组、模型组、对香豆酸 (100 mg/kg^[23]) 组、卡维地洛 (7.6 mg/kg, 临床等效剂量) 组及 TAK-242 (3 mg/kg^[24]) 组, 假手术组 8 只, 模型组 12 只, 其余各组 10 只。卡维地洛为阳性对照药, TAK-242 为 TLR4 靶点的抑制剂。造模 12 h 后对香豆酸组和卡维地洛 ig 给药, TAK-242 组 ip 给药, 假手术组和模型组 ig 生理盐水 (10 mL/kg), 1 次/d, 连续给药 7 d。

2.4.3 超声心动检测 末次给药 24 h 后, 对小鼠进行胸部备皮, 异氟烷行气体麻醉。仰卧位固定在检测台上, 超声探头于胸骨左侧探查, 记录 30 s 动态影像, 获取二维及 M 型超声心动图, 使用 Vevo 2100 1.6.0 软件进行测量。每只小鼠选择 3 个心动周期进行测量, 获取舒张末期左室内径 (left ventricular end-diastolic dimension, LVEDD)、收缩末期左室内径 (left ventricular end-systole dimension, LVESD) 指标, 结果取平均值, 计算射血分数 (ejection fraction, EF) 和短轴缩短率 (fractional shortening, FS), 用以评价心脏收缩和舒张功能。

2.4.4 血清心肌酶及损伤标志物指标检测 小鼠麻醉后行腹主动脉取血, 室温静置 2 h, 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 收集上清并置于-80 °C 冰箱保存。按照 ELISA 试剂盒说明书检测 CK-MB 活性和 cTnI 水平。

2.4.5 心脏形态观察及心脏指数测定 摘取心脏, 置于预冷的生理盐水中待腔室内余血排出, 在冰上剔除连带的非心脏组织, 拍照记录心脏形态, 称定质量, 计算心脏指数, 即心脏质量与体质量的比值, 评估损伤心脏的心肌代偿性肥厚程度。

2.4.6 炎症因子指标检测 取小鼠心肌组织, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 使用手持匀浆器研磨破碎至无明显组织块, 呈粉红色匀浆。4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清。按照 ELISA 试剂盒说明书检测心肌组织中 TNF- α 和 IL-6 水平。

2.4.7 组织病理学检测 将小鼠心脏组织于结扎线下 2 mm 处用手术刀片横切, 留取以上部分, 置于 4%多聚甲醛中固定, 石蜡包埋, 切片, 进行 HE 染色和 Masson 染色, 于显微镜下观察病理变化。

2.4.8 Western blotting 检测心肌组织 TLR4/NF- κ B 通路相关蛋白表达 取小鼠心肌梗死边缘区组织, 加入含蛋白酶抑制剂的 RIPA 裂解液, 用手持匀浆器研磨破碎至无明显组织块, 呈粉红色匀浆。4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, BCA 法进行蛋白定量。蛋白样品经 SDS-PAGE 凝胶电泳分离, 并转到 PVDF 膜上, 随后置于 5%脱脂奶粉中, 室温摇床封闭 1 h, 加入一抗, 4 °C 孵育过夜。加入二抗, 室温孵育 1 h 后曝光显影, 并利用 Image J 软件分析目的条带的灰度值。

2.5 细胞实验

2.5.1 细胞培养 H9c2 细胞用含 10%胎牛血清和 1%青霉素/链霉素双抗的 DMEM 培养基, 于 37 °C、5% CO₂ 培养箱中培养, 待细胞生长至融合度为 90% 时传代。

2.5.2 MTT 法测定细胞活力 H9c2 细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 培养到实验所需密度, 弃去原有培养基, 用 PBS 清洗 2 次, 加入含不同质量浓度 (10、20、40、60、80 μ g/mL) 对香豆酸的 DMEM 培养基培养 24 h。另设置对照组加入不含药物的培养基。弃去上清液, 每孔加入 100 μ L PBS 配制的 MTT 溶液 (0.5 mg/mL) 继续孵育 4 h, 弃去 MTT 溶液, 每孔加入 150 μ L 二甲基亚砜, 于摇床上振荡 5 min 以充分溶解结晶, 使用酶标仪在 570 nm 波

下测定吸光度 (A) 值, 筛选对香豆酸对 H9c2 细胞的无毒性质量浓度范围。

2.5.3 缺氧及炎症复合损伤细胞模型的构建及对香豆酸保护浓度的筛选 设置对照组、模型组和不同质量浓度的对香豆酸组, H9c2 细胞以 5×10^3 个/孔接种于 96 孔板中, 培养到实验所需密度, 弃去原有培养基, 用 PBS 清洗 2 次, 对照组加入 DMEM 培养基, 模型组加入含 1 μ g/mL LPS 的 DMEM 培养基, 对香豆酸组分别加入含 1 μ g/mL LPS 与不同质量浓度 (10、20、40、60 μ g/mL) 对香豆酸的 DMEM 培养基, 置于缺氧小室内, 加入厌氧袋, 于培养箱中缺氧 8 h, MTT 法测定细胞活力, 筛选对香豆酸的最佳保护浓度。

2.5.4 对香豆酸对缺氧炎症复合损伤 H9c2 细胞形态的影响 H9c2 细胞以 2×10^5 个/孔接种于 6 孔板中, 培养到实验所需密度, 弃去原有培养基, 用 PBS 清洗 2 次, 对照组加入 DMEM, 模型组加入含 1 μ g/mL LPS 的 DMEM, 对香豆酸组加入含 1 μ g/mL LPS 与对香豆酸 (40 μ g/mL) 的 DMEM, TAK-242 组加入含 1 μ g/mL LPS 与 TAK-242 (1 μ g/mL) 的 DMEM, 置于缺氧小室内, 加入厌氧袋, 于培养箱中缺氧 8 h, 显微镜下拍照记录细胞形态。

2.5.5 Western blotting 检测 TLR4/NF- κ B 通路相关蛋白表达 按“2.5.4”项下方法进行处理后, 弃去上清液, 每孔加入 1 mL 预冷的 PBS 缓冲液清洗 1 次, 除去 PBS, 加入 80 μ L 预冷的 RIPA 裂解液, 在冰上裂解 30 min, 裂解时用枪头充分搅拌刮取细胞。裂解液收集到 1.5 mL 离心管中, 4 °C、12 000 r/min 离心 15 min, 收集上清。按照“2.4.8”项下方法检测 TLR4/NF- κ B 通路相关蛋白表达。

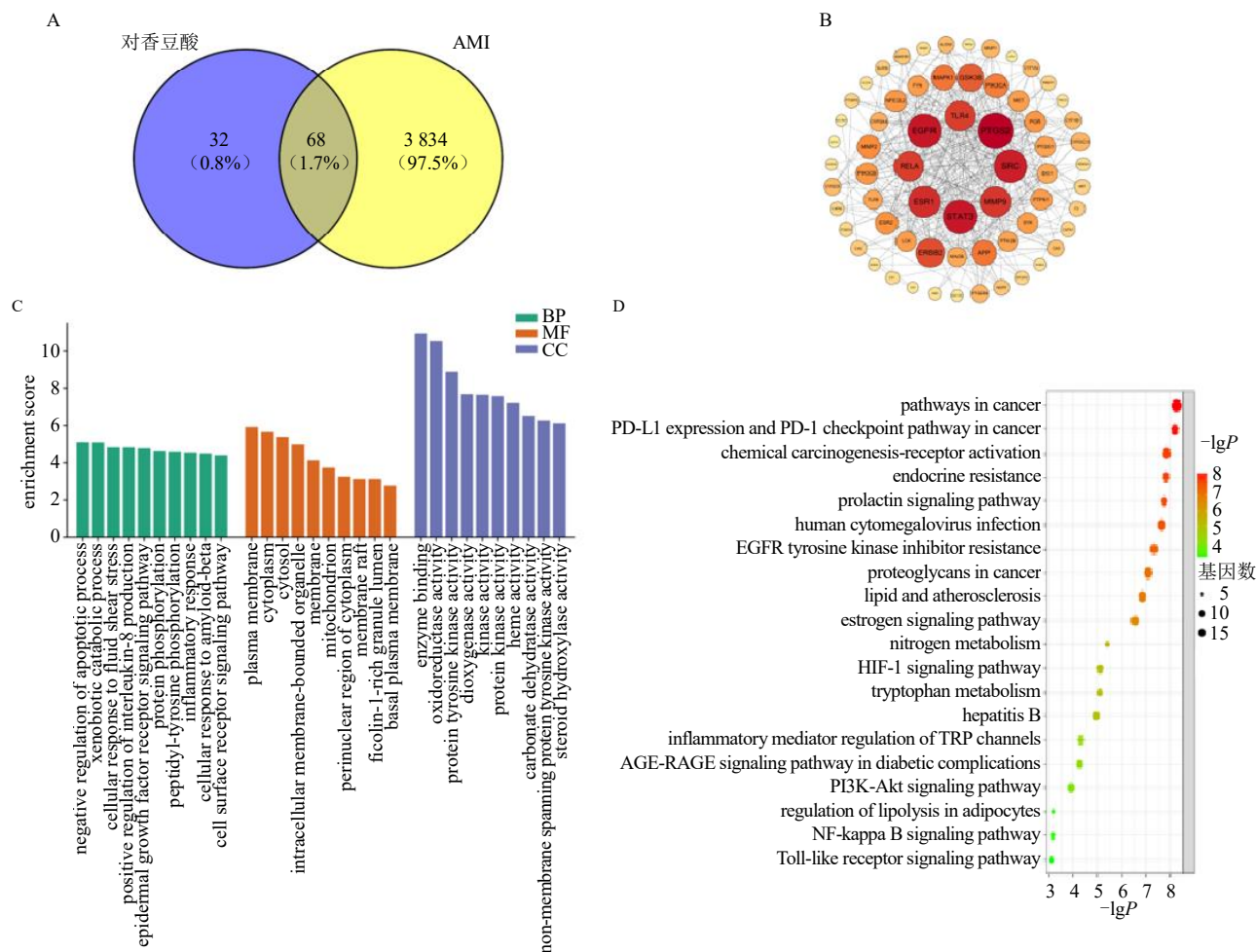
2.6 统计学分析

数据运用 Graphpad Prism 8.3.0 软件进行统计学并作图分析, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 多组间比较采用单因素方差分析。

3 结果

3.1 网络药理学分析结果

从 Swiss Target Prediction 平台获取对香豆酸潜在靶点 100 个, 从 GeneCards、OMIM 和 DisGeNET 数据库获得相关疾病靶点 3 902 个, 取交集后得到对香豆酸治疗 AMI 的潜在靶点共 68 个 (图 1-A)。PPI 网络由 64 个节点和 398 条边组成 (图 1-B), 其中节点代表基因, 两节点间的连线代表 2 个基因之间具有蛋白网络互作关系。度值代表与节点相关联



A-对香豆酸和 AMI 交集靶点的韦恩图; B-PPI 网络; C-GO 功能富集分析; D-KEGG 通路富集分析。

A-Venn diagram of intersection targets of *p*-coumaric acid and AMI; B-PPI network; C-GO function enrichment analysis; D-KEGG pathway enrichment analysis.

图 1 对香豆酸改善 AMI 的网络药理学分析

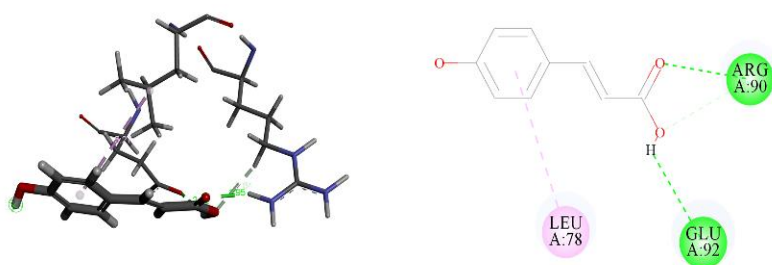
Fig. 1 Network pharmacological analysis of *p*-coumaric acid in improving AMI

的边的数量, 度值越大, 节点的颜色越深, 面积越大, 表明该节点在互作网络中越重要, 对 AMI 的影响越大。在图 1-B 中最内圈为度值最大的 8 个核心靶点, 其中 TLR4、前列腺素内过氧化物合酶 2 (prostaglandin-endoperoxide synthase 2, PTGS2) 和信号转导-转录活化因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 是与炎症相关的核心靶点。GO 分析获得生物过程 (biological process, BP)、细胞组分 (cell composition, CC) 和分子功能 (molecular function, MF) 各 277、50 和 91 个条目, 选择前 10 条进行可视化。BP 条目主要包括炎症反应、凋亡过程的负向调节、蛋白质磷酸化等; CC 条目主要包括细胞膜、细胞质及细胞质基质等; MF 条目主要包括酶结合、氧化还原酶活性、蛋白酪氨酸激酶活性等 (图 1-C)。KEGG 通路富集

分析结果显示, 对香豆酸可通过调节 TLR、NF-κB、磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)-蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 等与炎症相关的信号通路改善 AMI (图 1-D)。

3.2 对香豆酸与 TLR4 共受体 MD2 的分子对接结果

通过配体扩张法定义活性位点, 口袋半径为 0.997 414 14 nm, 位点的三维坐标为 (-3.361 222 0, 19.544 149 0, 16.433 330 9), 且受体与 2 个原配体对接的 RMSD 均 < 0.2 nm, 表明该活性位点可用于后续对接研究。将对香豆酸与 MD2 进行分子对接后得到 -CDOCKER_ENERGY 值为 -18.285 1 kcal/mol (1 kcal/mol = 4.182 kJ/mol), 根据二维及三维相互作用模式可知, 对香豆酸与 MD2 的 GLU92、ARG90 氨基酸残基处形成氢键, 与 LEU78 氨基酸残基形成疏水作用 (图 2)。



绿色代表氢键，粉紫色代表疏水。

Green represents hydrogen bonds, pink purple represents hydrophobic interactions.

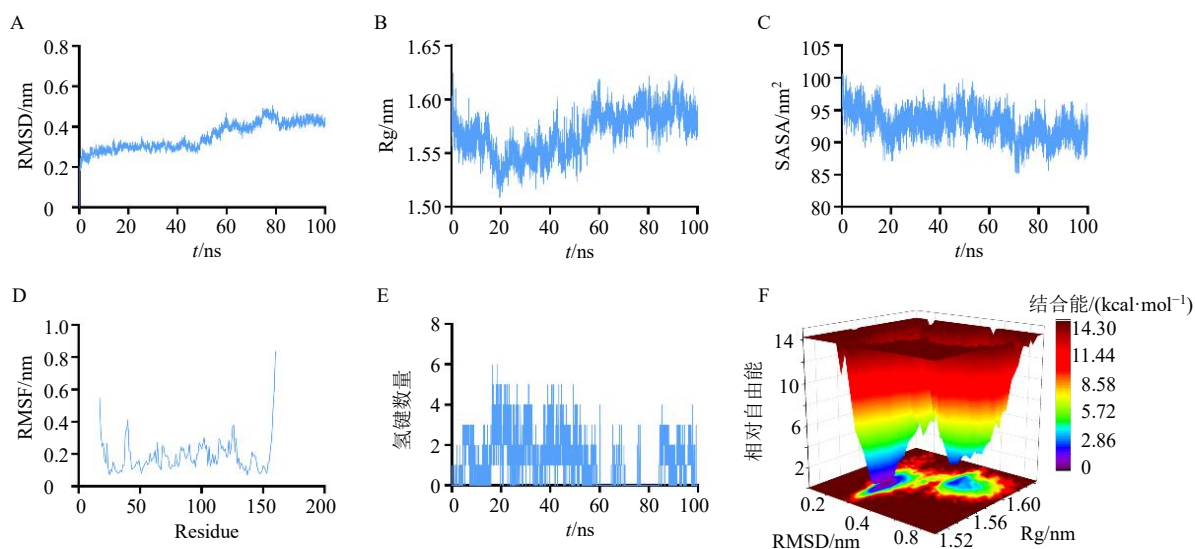
图2 对香豆酸与 MD2 活性位点对接结果

Fig. 2 Docking results between *p*-coumaric acid and active site of MD2

3.3 分子动力学模拟结果

为验证对香豆酸-MD2 复合物的结合稳定性，进行分子动力学模拟，其中 RMSD 用于衡量模拟过程中原子位置相对于初始结构的偏差程度，偏差程度越低，构象稳定性越高，如图 3-A 所示，对香豆酸-MD2 复合物的 RMSD 值在 60 ns 后出现一定幅度的波动，提示复合物在模拟后期可能存在构象重排，但整体未发生明显偏离。回转半径值（radius of gyration, Rg）反映复合物整体结构的紧凑性和蛋白质折叠的程度，如图 3-B 所示，复合物的 Rg 值在 60 ns 后有上升趋势，提示蛋白质的骨架可能有轻微的舒展迹象。溶剂可及表面积（solvent accessible surface area, SASA）反映蛋白质疏水核心的包埋程度，如图 3-C 所示，对香豆酸-MD2 复合物的 SASA 主要在 95 nm²，整体波动较小，提示复合物未发生明显的构象变化。均方根

波动（root mean square fluctuation, RMSF）反映蛋白质中氨基酸残基的局部柔性和动态特性，如图 3-D 所示，对香豆酸-MD2 复合物中的大多数残基的 RMSF 低于 0.6 nm，表明整体结构刚性较强，稳定性更好，而在第 150 个残基时出现了显著的波动。氢键数量反映配体与蛋白质结合的相互作用强度，如图 3-E 所示，对香豆酸-MD2 复合物中的氢键数量主要维持在 4 个左右，最高可达到 6 个，表明蛋白质与配体间的相互作用网络较为稳定。自由能景观图（free energy landscape, FEL）用于描述复合物在模拟过程中构象空间的能量分布，如图 3-F 所示，对香豆酸-MD2 复合物主要分布于 2 个能量低谷区（蓝色区域），表明小分子有更多的构象去适应结合蛋白。以上分析结果表明对香豆酸-MD2 复合物在模拟过程中整体结构稳定，氢键相互作用维持良好。



A-RMSD 值；B-Rg 值；C-SASA 值；D-RMSF 值；E-氢键数量；F-FEL (1 kcal·mol⁻¹ = 4.182 kJ·mol⁻¹)。

A-RMSD value; B-Rg value; C-SASA value; D-RMSF value; E-number of H-bond; F-FEL (1 kcal·mol⁻¹ = 4.182 kJ·mol⁻¹).

图3 对香豆酸与 MD2 活性位点的分子动力学模拟

Fig. 3 Molecular dynamics simulation of *p*-coumaric acid and active site of MD2

3.4 对香豆酸对AMI小鼠心功能的影响

各组小鼠超声心动参数分析结果见图4,与假手术组比较,模型组小鼠的EF和FS显著下降($P < 0.001$),LVEDD和LVESD显著上升($P < 0.001$),表明模型组小鼠左心室收缩和舒张功能减弱;与模型组比较,对香豆酸组EF显著上升($P < 0.01$),LVEDD和LVESD显著降低($P < 0.001$);卡维地洛和TLR4抑制剂TAK-242作用相似,EF和FS显著上升($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001),LVEDD和LVESD显著降低($P < 0.001$)。

3.5 对香豆酸对血清心肌酶及损伤标志物的影响

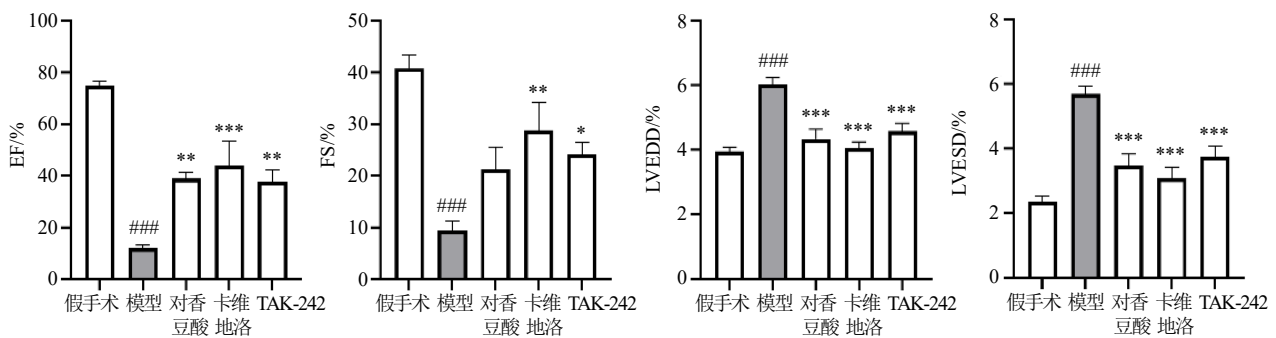
如图5所示,与假手术组比较,模型组小鼠血清中CK-MB活性和cTnI水平显著升高($P < 0.001$);与模型组比较,对香豆酸组、卡维地洛组和TAK-242组小鼠血清中CK-MB和cTnI水平均显著降低($P < 0.01$ 、 0.001),表明对香豆酸与卡维地洛和TAK-242的作用效果相似。

3.6 对香豆酸对AMI小鼠心脏形态和心脏指数的影响

如图6所示,假手术组小鼠心脏形态大小正常;模型组小鼠心脏明显增大,左心室梗死区域心室壁严重塌陷;对香豆酸、卡维地洛和TAK-242可抑制心脏增大程度,减轻左心室的室壁损伤,缩小心肌梗死区域。与假手术组比较,模型组小鼠的心脏指数显著升高($P < 0.001$);给予对香豆酸和TAK-242治疗后,AMI小鼠的心脏指数均显著降低($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.7 对香豆酸对AMI小鼠心肌组织病理变化的影响

如图7所示,假手术组的心肌细胞结构正常,表现为心肌纤维排列整齐,胞核形态完整且染色均匀,未见明显炎症细胞浸润;与假手术组比较,模型组呈现典型的心肌损伤病理特征,包括心肌纤维排列紊乱、横纹结构模糊或消失、细胞核出现固缩或碎裂,并伴有大量炎症细胞浸润。给药干预后,



与假手术组(对照组)比较: * $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$;与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$,下同。
$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ### $P < 0.001$ vs sham (control) group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below figures.

图4 各组小鼠超声心动参数比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Comparison of echocardiographic parameters of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

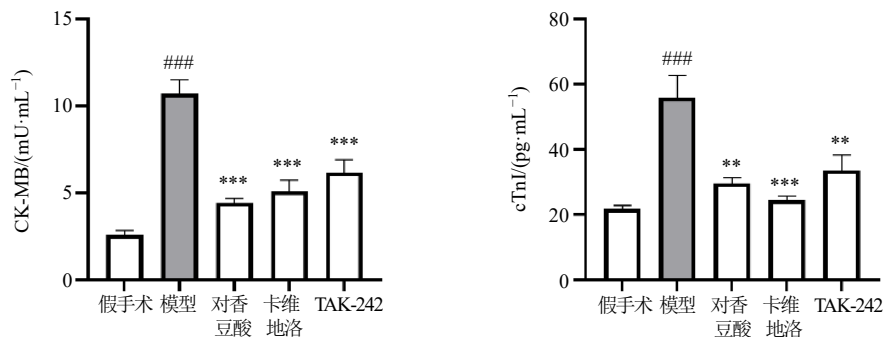


图5 各组小鼠血清心肌酶活性及损伤标志物水平 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 5 Activity of serum cardiac enzymes and level of injury markers of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

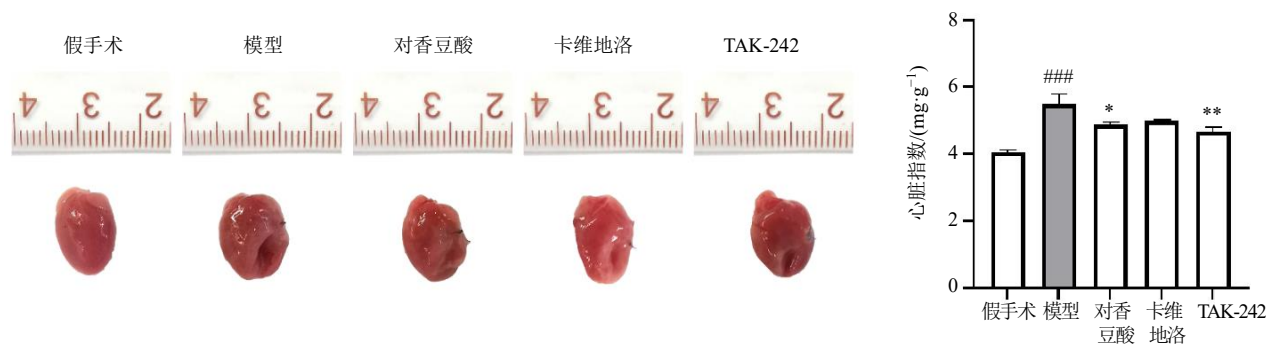


图 6 各组小鼠心脏形态和心脏指数 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Cardiac morphology images and cardiac index of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

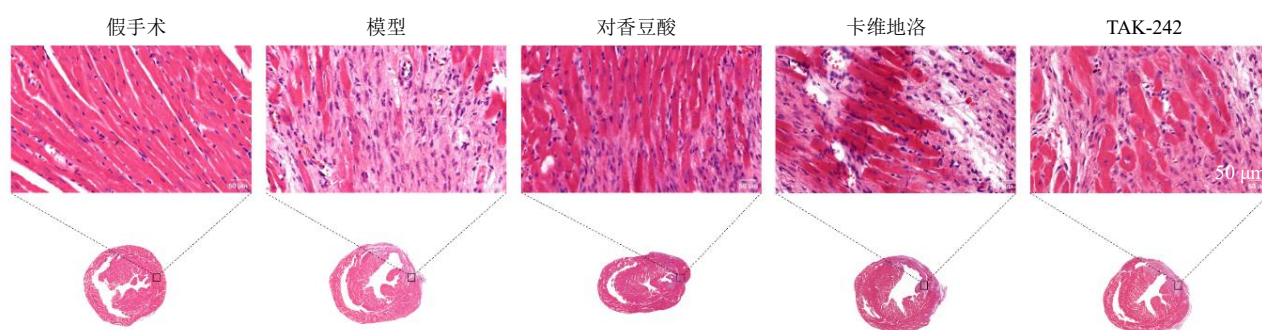


图 7 各组小鼠心肌组织 HE 染色 (×400)

Fig. 7 HE staining of myocardial tissue of mice in each group (× 400)

对香豆酸组的心肌病理损伤得到显著改善, 表现为细胞排列紊乱程度减轻及炎性细胞浸润减少, 其改善效果与卡维地洛和 TAK-242 组相似。

3.8 对香豆酸对 AMI 小鼠心肌组织 TNF- α 和 IL-6 水平的影响

如图 8 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠心肌组织 TNF- α 水平上升但无显著性差异, IL-6 水平显著上升 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 对香豆酸组

心肌组织 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$); 卡维地洛和 TAK-242 组 TNF- α 和 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.9 对香豆酸对 AMI 小鼠心肌组织纤维化的影响

如图 9 所示, 假手术组未见明显胶原沉积; 模型组心肌纤维紊乱, 胶原沉积严重; 与模型组比较, 对香豆酸能够显著减轻胶原沉积, 与卡维地洛和 TAK-242 作用效果相似。使用 Image J 软件计算心

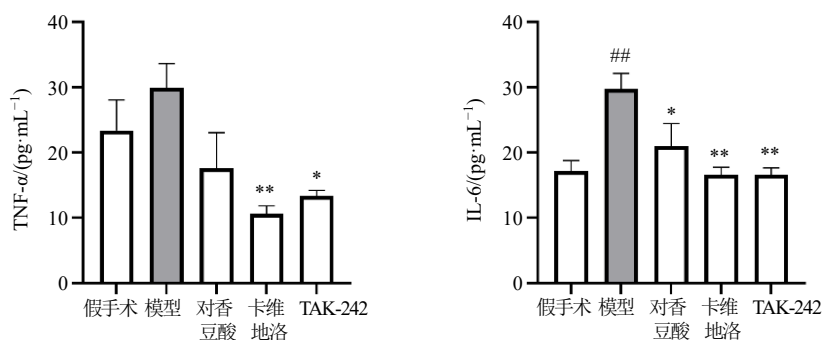


图 8 各组小鼠心肌组织炎症因子水平 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 8 Levels of inflammatory factors in myocardial tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

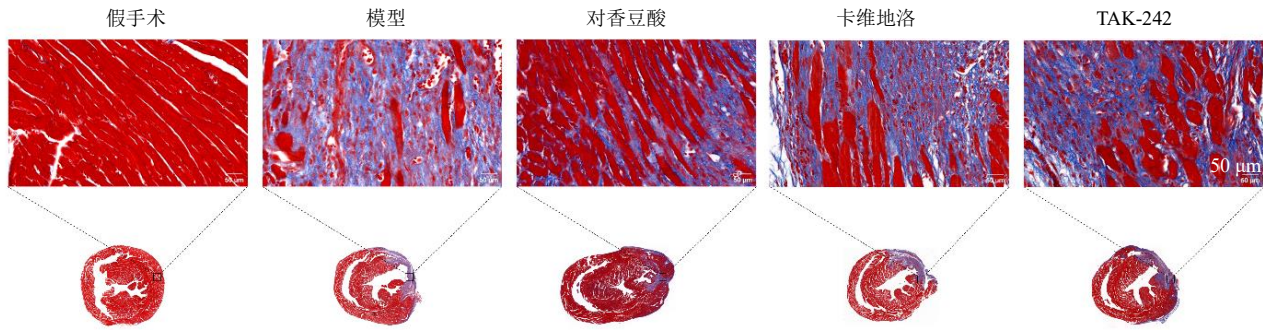


图9 各组小鼠心肌组织 Masson 染色 (×400)

Fig. 9 Masson staining of myocardial tissue of mice in each group (× 400)

肌组织中的胶原容积分数, 结果见图 10。与假手术组比较, 模型组小鼠胶原容积分数显著上升 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 对香豆酸组、卡维地洛组和 TAK-242 组小鼠胶原容积分数均显著降低 ($P < 0.001$)。

3.10 对香豆酸对 AMI 小鼠心肌组织 TLR4/NF-κB 通路相关蛋白表达的影响

如图 11 所示, 与假手术组比较, 模型组小鼠心肌组织中 TLR4、p-NF-κB/NF-κB、NLRP3、GSDMD、IL-1β 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.001$), 表明 AMI 后 TLR4/NF-κB 信号通路激活, 参与心肌炎症级联反应。给予对香豆酸干预后, 心肌组织 TLR4、

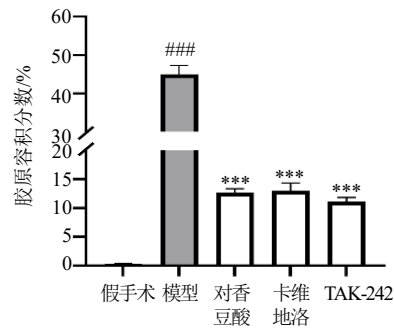


图 10 各组小鼠胶原容积分数 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

Fig. 10 Collagen volume fraction of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

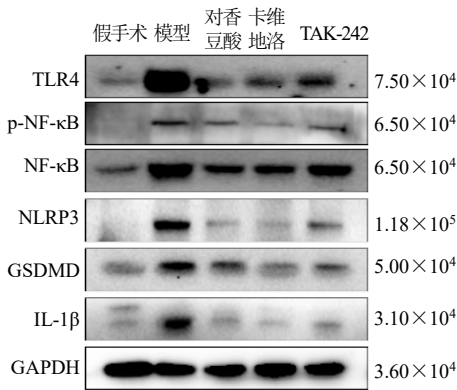


图 11 各组小鼠心肌组织 TLR4/NF-κB 通路相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 TLR4/NF-κB pathway-related protein expressions in myocardial tissue of mice in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

p-NF-κB/NF-κB、NLRP3、GSDMD、IL-1β蛋白表达水平均显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)；与模型组比较，卡维地洛组和 TAK-242 组心肌组织中 TLR4、p-NF-κB/NF-κB、NLRP3、GSDMD、IL-1β蛋白表达水平均显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.01 、 0.001)。

3.11 对香豆酸对 H9c2 细胞活力的影响

H9c2 细胞给予不同质量浓度的对香豆酸干预后，检测细胞活力。如图 12 所示，与对照组比较，对香豆酸质量浓度为 80 μg/mL 时，可显著抑制 H9c2 细胞活力 ($P < 0.001$)。因此后续实验选取 10、20、40、60 μg/mL 进行对香豆酸对 H9c2 细胞缺氧炎症复合损伤模型保护作用的浓度筛选。

3.12 对香豆酸对缺氧炎症复合损伤模型 H9c2 细胞活力的影响

如图 13 所示，与对照组比较，模型组细胞活力显著降低 ($P < 0.001$)；与模型组比较，对香豆酸质量浓度为 40、60 μg/mL 时，可显著提高 H9c2 细胞活力 ($P < 0.01$ 、 0.001)，且前者细胞活力高于后者，因此选取 40 μg/mL 对香豆酸进行后续研究。

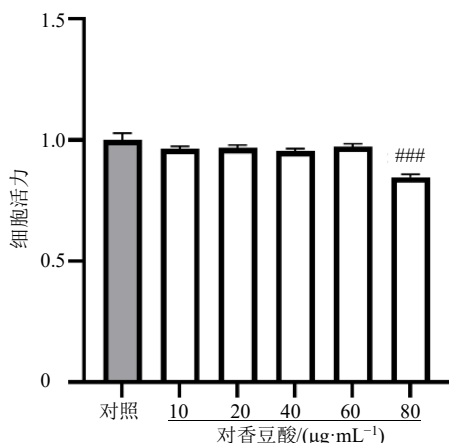


图 12 不同质量浓度对香豆酸对 H9c2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 12 Effect of different concentrations of p-coumaric acid on viability of H9c2 cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

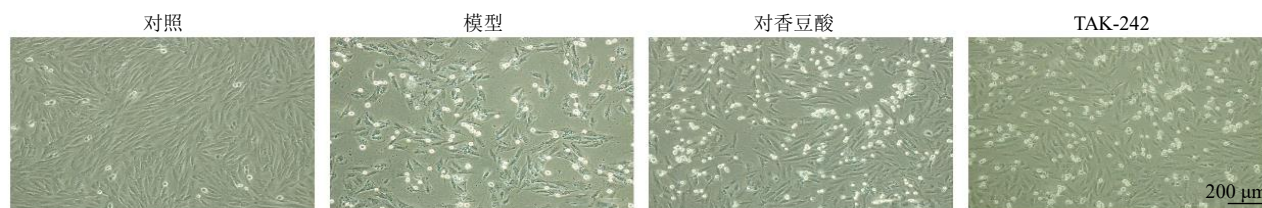


图 14 各组 H9c2 细胞形态 (×100)

Fig. 14 Morphology of H9c2 cells in each group (× 100)

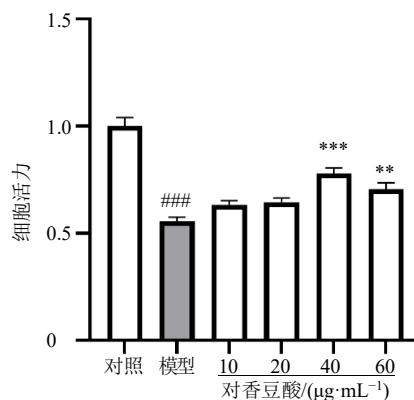


图 13 不同质量浓度对香豆酸对缺氧炎症复合损伤模型 H9c2 细胞活力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 13 Effect of different concentrations of p-coumaric acid on viability of H9c2 cells injured by hypoxia and inflammation ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3.13 对香豆酸对 H9c2 细胞缺氧炎症复合损伤模型细胞形态的影响

于荧光倒置显微镜下观察各组 H9c2 细胞的形态变化，结果见图 14。对照组细胞呈长梭形，形态均一且伸展良好，边界清晰，胞质透亮饱满，细胞间紧密排列，贴壁状态良好，增长速度正常；模型组细胞皱缩，边界模糊，漂浮细胞数量显著增加，贴壁细胞数量减少，细胞间隙变大；经对香豆酸干预后，其与 TLR4 抑制剂组的效果相似，大部分细胞形态可呈完整的梭形轮廓，贴壁细胞数量较模型组明显增加，细胞增长速度优于模型组，且细胞间隙减小。

3.14 对香豆酸对 H9c2 细胞 TLR4/NF-κB 通路相关蛋白表达的影响

如图 15 所示，与对照组比较，模型组 TLR4、p-NF-κB/NF-κB、NLRP3、GSDMD 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.001)；对香豆酸干预后，TLR4、p-NF-κB/NF-κB、NLRP3 蛋白表达水平显著下调 ($P < 0.05$ 、 0.01)，GSDMD 蛋白表达水平呈下调趋势但无显著性差异；TAK-242 组 TLR4、p-NF-κB/NF-κB、NLRP3、GSDMD 蛋白表达水平均显著降低

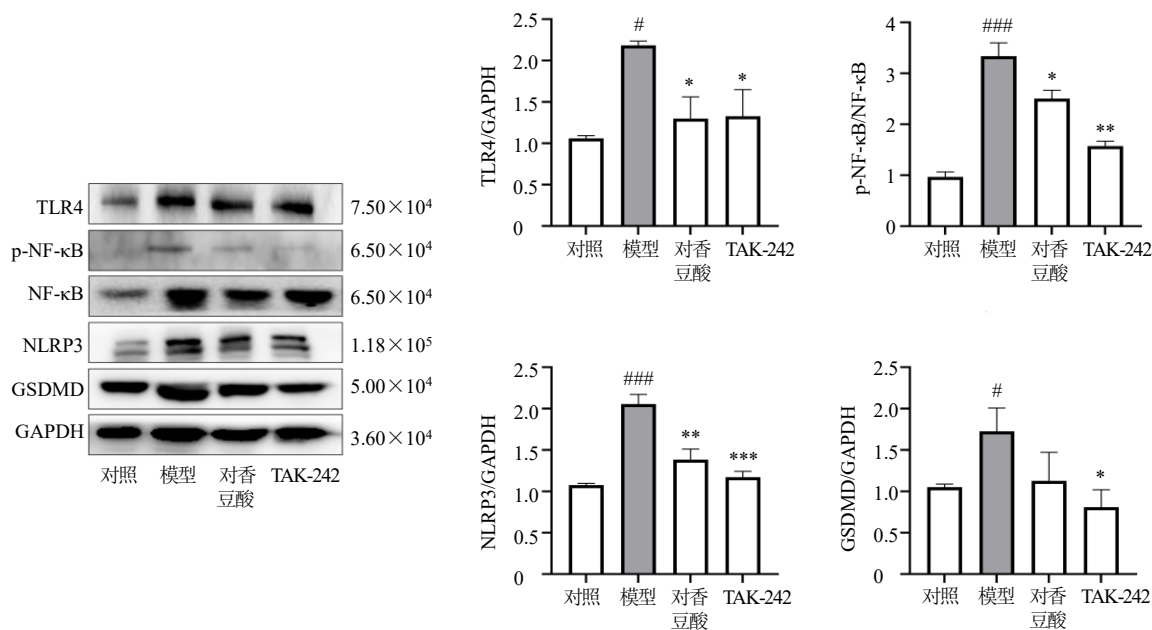


图 15 各组 H9c2 细胞 TLR4/NF-κB 通路相关蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 15 TLR4/NF-κB pathway-related protein expressions in H9c2 cells in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

($P < 0.05, 0.01, 0.001$), 表明对香豆酸对 TLR4/NF-κB 通路的抑制作用与 TAK-242 效果相似。

4 讨论

本研究首先应用网络药理学初步预测了对香豆酸治疗 AMI 的潜在作用机制, PPI 网络可视化显示 TLR4、PTGS2 和 STAT3 是与炎症相关的核心靶点, KEGG 通路富集分析结果显示对香豆酸可潜在调控 TLR 及 NF-κB 炎症信号通路治疗 AMI, 同时 GO 富集分析亦揭示对香豆酸与免疫炎症反应具有紧密关联, 由此表明靶向 TLR4/NF-κB 炎症通路可能是对香豆酸治疗 AMI 的潜在药理作用机制。

有研究者从中药或植物中发现了可与 TLR4 结合, 或与其共受体蛋白结合的天然 TLR4 拮抗分子, 其中包括了肉桂醛和肉桂酰胺衍生物, 如阿魏酸等^[25-27]。对香豆酸和阿魏酸同为肉桂酸衍生物, 因此从结构上分析, 对香豆酸很可能亦作用于 TLR4 信号通路。有研究表明 TLR4 的辅助受体 MD2 可作为心肌纤维化的有效靶点, 靶向 MD2 可抑制心肌成纤维细胞中纤维化相关基因的表达, 进而抑制缺血再灌注损伤后心肌纤维化程度^[28]。本研究运用分子对接技术和分子动力学模拟证实对香豆酸与 TLR4 共受体 MD2 具有较好的结合强度和良好的稳定性, 由此进一步佐证了对香豆酸可潜在调控 TLR4 炎症信号通路减轻 AMI 损伤。

在正常状态下, 心肌对氧的需求几乎是由冠状

动脉血流来满足的, 当冠状动脉血流不能满足心肌区域对氧气的需求时, 就会出现心肌缺血。本研究通过结扎冠状动脉左前降支成功建立 AMI 小鼠模型, 结果表明对香豆酸可以显著改善 AMI 小鼠心功能, 降低血清心肌酶 CK-MB 和心肌损伤标志物 cTnI 水平, 抑制损伤心脏的心肌代偿性肥厚程度。组织病理学分析结果显示对香豆酸可减轻心肌组织炎性细胞浸润, 维持细胞形态, 减少胶原蛋白过度沉积, 进而抑制心肌纤维化。

缺血刺激导致细胞坏死, 释放 DAMPs 激活先天免疫系统, 诱导炎症反应的发生^[29]。DAMPs 与 TLR4 结合后可启动相应的信号级联, 在激活心脏炎症中发挥着重要的作用^[30]。本研究发现 AMI 小鼠心肌组织 TLR4、p-NF-κB/NF-κB、NLRP3、GSDMD 蛋白表达和促炎因子 IL-1β、IL-6 水平均显著升高, 证实 AMI 时 TLR4 通路被激活, 启动了下游信号级联反应, 通过激活 NF-κB 促使 NLRP3 和 pro-IL-1β 转录及表达水平增加。NLRP3 组装成 NLRP3 炎症小体后可激活半胱氨酸蛋白酶-1 (cysteine-requiring aspartate protease-1, Caspase-1), 活化成熟的 Caspase-1 一方面剪切 GSDMD 生成其 N 端结构域 (gasdermin D N-terminal fragment, GSDMD-NT), 一方面介导 IL-1β 的成熟和分泌^[31]。GSDMD-NT 可以与质膜中的脂质结合并形成细胞膜孔, 破坏细胞膜的完整性, 使细胞内渗透压升高,

释放促炎因子 IL-1 β ^[32]。促炎因子的释放作为促炎信号，可募集更多的炎症细胞，促进若干炎症因子的表达，如 TNF- α 、IL-6 等，进而引起强烈的炎症反应，致使更为严重的心肌细胞死亡，最终导致心肌纤维化瘢痕形成和心室不良重构^[33]。

对香豆酸可抑制 TLR4/NF- κ B 信号通路介导的炎症反应（图 16），表现为其可降低 AMI 小鼠心肌组织 TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B、NLRP3、GSDMD 蛋白表达及促炎因子 IL-1 β 、IL-6 水平。有研究报道 TLR4 基因敲除小鼠心功能受心肌缺血影响较小，且心肌组织炎性细胞浸润减少，炎症因子 TNF- α 和

IL-1 β 水平均显著降低^[34]。另有研究表明 TLR4 炎症信号通路的激活可诱导成纤维细胞增殖并产生大量胶原蛋白，其过度沉积会促使心肌纤维化的形成^[35]；TLR4 基因敲除小鼠肌成纤维细胞标志物 α -平滑肌肌动蛋白（ α -smooth muscle actin, α -SMA）的表达水平以及心肌组织纤维化程度均低于野生型小鼠^[36]，表明抑制 TLR4 炎症信号通路可减轻心肌纤维化程度。本研究中对香豆酸通过抑制 TLR4/NF- κ B 炎症途径的激活，降低 AMI 小鼠心肌组织炎症因子水平减轻心肌炎症反应，减少胶原过度沉积进而抑制心肌纤维及心室不良重构。

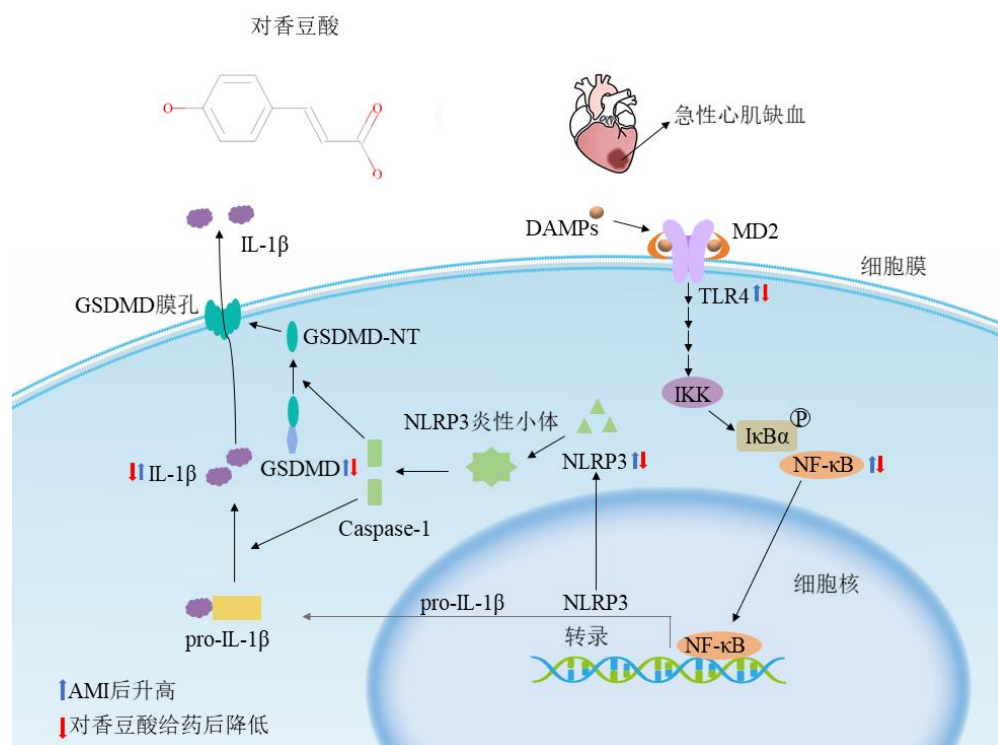


图 16 对香豆酸抑制 TLR4/NF- κ B 炎症途径改善 AMI

Fig. 16 *p*-Coumaric acid ameliorates AMI by inhibiting TLR4/NF- κ B inflammatory pathway

在本研究 H9c2 心肌细胞缺氧及炎症复合模型中，LPS 被用于刺激心肌细胞诱导炎症损伤。LPS 借助 2 种辅助蛋白被转递到 TLR4-MD2 复合物上，MD2 为配体结合提供了大疏水口袋，随后启动并激活 TLR4 通路^[37]。模型组 TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B、NLRP3 和 GSDMD 蛋白表达水平显著升高，由此表明在心肌细胞缺氧及炎症复合损伤模型中，TLR4/NF- κ B 信号通路被激活并启动了相应的信号级联反应。对香豆酸可维持缺氧及 LPS 刺激条件下心肌细胞的正常形态，提高心肌细胞活力，并降低 TLR4、p-NF- κ B/NF- κ B 和 NLRP3 蛋白表达水平，表明其

可通过抑制 TLR4/NF- κ B 通路减轻缺氧及炎症诱导的心肌细胞损伤。

综上，本研究基于网络药理学、分子对接技术和分子动力学模拟发现对香豆酸可潜在调控 TLR4/NF- κ B 炎症信号通路治疗 AMI，进一步体内外研究结果表明对香豆酸可显著改善 AMI 小鼠心功能、抑制心肌组织炎症反应及心肌纤维化，其作用机制是通过抑制 TLR4/NF- κ B 炎症途径中的关键分子进而减轻促炎因子介导的心肌损伤。本研究为对香豆酸治疗 AMI 提供了重要的理论依据，同时也为 TLR4 拮抗剂药物的研发提供新方向。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Vaduganathan M, Mensah G A, Turco J V, *et al.* The global burden of cardiovascular diseases and risk a compass for future health [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2022, 80(25): 2361-2371.
- [2] Pagliaro B R, Cannata F, Stefanini G G, *et al.* Myocardial ischemia and coronary disease in heart failure [J]. *Heart Fail Rev*, 2020, 25(1): 53-65.
- [3] Lian Y J, Zhang H Y, Liu H X, *et al.* Shen Yuan Yi Qi Huo Xue Capsules inhibit neutrophil NETosis by regulating the PAD4/NLRP3 signaling pathway to prevent heart failure after myocardial infarction [J]. *Phytomedicine*, 2025, 148: 157462.
- [4] Liu J Q, Wang H J, Li J. Inflammation and inflammatory cells in myocardial infarction and reperfusion injury: A double-edged sword [J]. *Clin Med Insights Cardiol*, 2016, 10: CMC.S33164.
- [5] Imbesi A, Greco A, Spagnolo M, *et al.* Targeting inflammation after acute myocardial infarction [J]. *JACC*, 2025, 86(15): 1146-1169.
- [6] 周成如, 姚志刚, 杨维维. 对香豆酸通过 Akt/TSC/mTOR 通路对食管癌细胞增殖、凋亡及内质网应激分子信号表达的影响 [J]. *现代中西医结合杂志*, 2025, 34(3): 318-324.
- [7] Chen F X, Zhang X X, Wang J X, *et al.* *p*-Coumaric acid: Advances in pharmacological research based on oxidative stress [J]. *Curr Top Med Chem*, 2024, 24(5): 416-436.
- [8] 管西芹, 毛近隆, 唐迎雪, 等. 对香豆酸的药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2018, 49(17): 4162-4170.
- [9] Shiromwar S, Chidrawar V. Combined effects of *p*-coumaric acid and naringenin against doxorubicin-induced cardiotoxicity in rats [J]. *Phcog Res*, 2011, 3(3): 214.
- [10] Li N, Guo X Y, Li R, *et al.* *p*-Coumaric acid regulates macrophage polarization in myocardial ischemia/reperfusion by promoting the expression of indoleamine 2,3-dioxygenase [J]. *Bioengineered*, 2021, 12(2): 10971-10981.
- [11] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的应用与挑战 [J]. *中草药*, 2024, 55(12): 4204-4213.
- [12] Zhao W B, Wang B Y, Li S. Network pharmacology for traditional Chinese medicine in era of artificial intelligence [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 558-560.
- [13] Nishimura M, Naito S. Tissue-specific mRNA expression profiles of human Toll-like receptors and related genes [J]. *Biol Pharm Bull*, 2005, 28(5): 886-892.
- [14] Chong A J, Shimamoto A, Hampton C R, *et al.* Toll-like receptor 4 mediates ischemia/reperfusion injury of the heart [J]. *J Thorac Cardiovasc Surg*, 2004, 128(2): 170-179.
- [15] Bachar O, Adner M, Uddman R, *et al.* Toll-like receptor stimulation induces airway hyper-responsiveness to bradykinin, an effect mediated by JNK and NF- κ B signaling pathways [J]. *Eur J Immunol*, 2004, 34(4): 1196-1207.
- [16] Zhang C L, Teng X D, Cao Q H, *et al.* Gut microbiota dysbiosis exacerbates heart failure by the LPS-TLR4/NF- κ B signalling axis: Mechanistic insights and therapeutic potential of TLR4 inhibition [J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 762.
- [17] Kawaguchi M, Takahashi M, Hata T, *et al.* Inflammasome activation of cardiac fibroblasts is essential for myocardial ischemia/reperfusion injury [J]. *Circulation*, 2011, 123(6): 594-604.
- [18] Roychoudhury S, Sinha B, Choudhury B P, *et al.* Scavenging properties of plant-derived natural biomolecule para-coumaric acid in the prevention of oxidative stress-induced diseases [J]. *Antioxidants*, 2021, 10(8): 1205.
- [19] Chen L F, Fu W T, Zheng L L, *et al.* Recent progress in the discovery of myeloid differentiation 2 (MD2) modulators for inflammatory diseases [J]. *Drug Discov Today*, 2018, 23(6): 1187-1202.
- [20] Pinzi L, Rastelli G. Molecular docking: Shifting paradigms in drug discovery [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4331.
- [21] Liu X W, Shi D F, Zhou S Y, *et al.* Molecular dynamics simulations and novel drug discovery [J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2018, 13(1): 23-37.
- [22] Sherman B T, Hao M, Qiu J, *et al.* DAVID a web server for functional enrichment analysis and functional annotation of gene lists (2021 update) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2022, 50(W1): W216-W221.
- [23] Zhang Y L, Sha R, Wang K G, *et al.* Protective effects of tetrahydropalmatine against ketamine-induced learning and memory injury via antioxidative, anti-inflammatory and anti-apoptotic mechanisms in mice [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 6873-6880.
- [24] Ono Y, Maejima Y, Saito M, *et al.* TAK-242, a specific inhibitor of Toll-like receptor 4 signalling, prevents endotoxemia-induced skeletal muscle wasting in mice [J]. *Sci Rep*, 2020, 10: 694.
- [25] Gao J, Yan J, Zu X W, *et al.* Ferulic acid ameliorates TLR4-mediated macrophage activation by irreversibly binding to peroxiredoxin 1 to inhibit its dimerization and secretion

- [J]. *Phytomedicine*, 2025, 148: 157254.
- [26] Rehman S U, Ali T, Alam S I, *et al.* Ferulic acid rescues LPS-induced neurotoxicity via modulation of the TLR4 receptor in the mouse hippocampus [J]. *Mol Neurobiol*, 2019, 56(4): 2774-2790.
- [27] Shu C, Li C, Liu H M, *et al.* 10-Hydroxy-2-decenoic acid ameliorates LPS-induced acute lung injury through targeting MD2-mediated inflammatory signaling pathways [J]. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2025, 505: 117589.
- [28] Zhang H, Thai P N, Shivnaraine R V, *et al.* Multiscale drug screening for cardiac fibrosis identifies MD2 as a therapeutic target [J]. *Cell*, 2024, 187(25): 7143-7163.
- [29] Hansson G K. Inflammation, atherosclerosis, and coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(16): 1685-1695.
- [30] Feng M, Chen X X, Huang F, *et al.* Alpinetin alleviates cardiac inflammation and remodeling via TLR4/MyD88/NF- κ B signaling pathway in rats with acute myocardial infarction [J]. *Int J Mol Sci*, 2025, 26(20): 10073.
- [31] Nguyen T U, Kwon S J, Hurh S, *et al.* LMT2368 (1-(4-chlorophenyl)-3-(3-fluoro-5-(trifluoromethyl) phenyl) urea) negatively regulates inflammation by inhibiting NLRP3 inflammasome activation [J]. *Pharmaceutics*, 2025, 17(10): 1241.
- [32] Liu X, Zhang Z B, Ruan J B, *et al.* Inflammasome-activated gasdermin D causes pyroptosis by forming membrane pores [J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 153-158.
- [33] Xu H, Yang J L, Gao W Q, *et al.* Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pypin inflammasome [J]. *Nature*, 2014, 513(7517): 237-241.
- [34] Avlas O, Fallach R, Shainberg A, *et al.* Toll-like receptor 4 stimulation initiates an inflammatory response that decreases cardiomyocyte contractility [J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 15(7): 1895-1909.
- [35] Wang Z, Chu R, Ge H, *et al.* GRK2-facilitated TLR4 signaling promotes cardiac fibrosis in rheumatic mice [J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 157: 114709.
- [36] Yang R H, Song Z X, Wu S Q, *et al.* Toll-like receptor 4 contributes to a myofibroblast phenotype in cardiac fibroblasts and is associated with autophagy after myocardial infarction in a mouse model [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 279: 23-31.
- [37] Ryu J K, Kim S J, Rah S H, *et al.* Reconstruction of LPS transfer cascade reveals structural determinants within LBP, CD14, and TLR4-MD2 for efficient LPS recognition and transfer [J]. *Immunity*, 2017, 46(1): 38-50.

[责任编辑 李亚楠]