

基于血清代谢组学和网络药理学探究复方丹参软胶囊改善心肌缺血小鼠的作用及机制

廖戴源^{1,2}, 林润和^{1,2}, 向 姣^{1,2}, 陈 斌³, 李富来^{1,2}, 鲍颖霞⁴, 赖焯才⁴, 秦 飞^{4*}, 王玲邴^{1,2*}

1. 广州中医药大学, 中医药慢病防治广东省普通高校重点实验室, 广东 广州 510006

2. 广州中医药大学中药学院, 岭南中药资源教育部重点实验室, 广东 广州 510006

3. 广州采芝林药业有限公司, 广东 广州 510360

4. 广州白云山医药集团股份有限公司白云山制药总厂, 广东省化学药原料与制剂关键技术研究重点实验室, 广东 广州 510515

摘要: 目的 整合血清代谢组学和入血成分网络药理学探究复方丹参软胶囊 (Compound Danshen Soft Capsule, CDSC) 对异丙肾上腺素 (isoprenaline, ISO) 诱导的小鼠心肌缺血模型的改善作用及机制。方法 小鼠 ip ISO 建立心肌缺血模型, 给予 CDSC 干预后, 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 和 Masson 染色评估心肌组织病理学变化; 测定心肌组织能量代谢酶活力; ELISA 法测定心肌组织中心肌损伤标志物水平; 采用超高效液相色谱-飞行时间质谱 (UHPLC-TOF-MS) 对 CDSC 入血成分进行鉴定分析; 使用 CDSC 差异入血成分进行网络药理学分析探究潜在作用机制; 使用血清非靶向代谢组学分析 CDSC 对心肌缺血小鼠血清代谢水平的影响; 采用 Western blotting 验证相关通路的蛋白表达。结果 CDSC 显著减轻 ISO 诱导的心肌缺血小鼠心肌组织病理损伤, 升高心肌组织中能量代谢酶活力 ($P < 0.001$), 降低心肌损伤标志物水平 ($P < 0.001$)。共鉴定出 17 个差异入血成分, 网络药理学分析筛选出 187 个与心肌损伤相关的交集靶点。京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析表明, CDSC 改善心肌缺血的作用可能和表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)、晚期糖基化终产物及其受体 (advanced glycation end products-receptor for advanced glycation end products, AGE-RAGE) 等信号通路相关。血清代谢组学分析表明 CDSC 对心肌缺血小鼠的改善作用可能与胰高血糖素、碳代谢、丙酮酸代谢、嘌呤代谢等多个代谢途径有关。Western blotting 结果进一步证实, CDSC 可剂量相关性地调控 AMPK、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 蛋白的磷酸化水平 ($P < 0.01$ 、 0.001)。结论 CDSC 通过调控能量代谢等方式改善心肌缺血, 其作用机制可能与 AMPK/mTOR 信号通路有关。

关键词: 复方丹参软胶囊; 心肌缺血; 血清代谢组学; 网络药理学; AMPK/mTOR 信号通路; 能量代谢

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)09-3445-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.09.016

Effect and mechanism of Compound Danshen Soft Capsules on myocardial ischemia in mice based on serum metabolomics and network pharmacology

LIAO Daiyuan^{1,2}, LIN Runhe^{1,2}, XIANG Jiao^{1,2}, CHEN Bin³, LI Fulai^{1,2}, BAO Yingxia⁴, LAI Yecai⁴, QIN Fei⁴, WANG Lingli^{1,2}

1. Key Laboratory of Chronic disease Prevention and Control of Traditional Chinese Medicine of Guangdong Higher Education Institutes, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan, Ministry of Education, School of Pharmaceutical Sciences, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

3. Guangzhou Caizhilin Pharmaceutical Co., Ltd., Guangzhou 510360, China

4. Guangdong Key Laboratory for Core Technology of Chemical Raw Materials and Pharmaceutical Formulations, Baiyunshan

收稿日期: 2025-12-29

基金项目: 广东省科技计划项目 (2024A0505090009)

作者简介: 廖戴源, 男, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: 1649864153@qq.com

*通信作者: 秦 飞, 男, 硕士生导师, 高级制药工程师, 主要从事药物研究与开发。E-mail: 102536@byszc.com

王玲邴, 女, 硕士生导师, 副研究员, 主要从事中药药理学研究。E-mail: wlingli@gzucm.edu.cn

Pharmaceutical General Factory, Guangzhou Baiyunshan Pharmaceutical Holdings Co., Ltd., Guangzhou 510515, China

Abstract: Objective To investigate the ameliorative effect and underlying mechanism of Compound Danshen Soft Capsules (复方丹参软胶囊, CDSC) on isoproterenol (ISO)-induced myocardial ischemia in mice through the integration of serum metabolomics and network pharmacology of absorbed bioactive components. **Methods** A mouse model of myocardial ischemia was established by ip ISO. After CDSC intervention, the pathological changes in myocardial tissue were evaluated using hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining. The activity of energy metabolism enzymes in myocardial tissue were measured. ELISA was used to measure the levels of myocardial injury markers in myocardial tissue. Identification and analysis of CDSC blood components were performed using ultra-high performance liquid chromatography-time-of-flight mass spectrometry (UHPLC-TOF-MS). CDSC differential blood components for network pharmacology analysis was used to explore potential mechanisms. Serum untargeted metabolomics was used to analyze the effect of CDSC on serum metabolic levels in mice with myocardial ischemia. Western blotting was used to validate the protein expressions of related pathways. **Results** CDSC significantly alleviated the pathological damage of myocardial tissue in ISO-induced myocardial ischemia mice, increased the activities of energy metabolism enzymes in myocardial tissue ($P < 0.001$), and reduced the levels of myocardial injury markers ($P < 0.001$). A total of 17 differential blood components were identified, and network pharmacology analysis screened 187 intersecting targets related to myocardial injury. Kyoto encyclopedia of genes and genomes enrichment analysis suggested that the effect of CDSCs in improving myocardial ischemia may be related to signaling pathways such as resistance to epidermal growth factor receptor (EGFR) tyrosine kinase inhibitors, AMP-activated protein kinase (AMPK) and advanced glycation end products-receptor for advanced glycation end products (AGE-RAGE). Serum metabolomics analysis suggested that the improvement effect of CDSC on myocardial ischemia mice may be related to multiple metabolic pathways such as glucagon, carbon metabolism, pyruvate metabolism and purine metabolism. Western blotting results further confirmed that CDSC could dose-dependently regulate the phosphorylation levels of AMPK and mammalian target of rapamycin (mTOR) protein ($P < 0.01, 0.001$). **Conclusion** CDSC improves myocardial ischemia by regulating energy metabolism and other mechanisms, and its mechanism may be related to AMPK/mTOR signaling pathway.

Key words: Compound Danshen Soft Capsules; myocardial ischemia; serum metabolomics; network pharmacology; AMPK/mTOR signaling pathway; energy metabolism

心血管疾病是全球范围内严重威胁人类健康与寿命的主要疾病类型之一。心脏作为高代谢器官,血供丰富且依赖持续灌注,这一特点使其极易遭受缺血性损伤^[1-2]。当冠状动脉血流不足时,会引发心肌缺血,此病理状态将导致氧气供应减少,正常心肌能量代谢被扰乱,进而损害心脏正常功能。据统计,缺血性心脏病已成为全球范围内主要致死原因之一^[3]。

在心血管疾病防治领域,中医药凭借其独特的治疗理念积累了丰富的临床经验^[4]。复方丹参软胶囊(Compound Danshen Soft Capsule, CDSC)是依据传统中医药理论研制的中药复方制剂,其处方配伍遵循“君臣佐使”原则,以丹参为君药,配伍三七及冰片2味药组成^[5]。目前关于CDSC的直接药效研究较少,现有研究多针对复方丹参的其他剂型。研究发现复方丹参滴丸调控脂氧合酶(lipoxygenase, LOX)-核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)炎症途径治疗心肌缺血^[6],而复方丹参片剂可通过调控丝裂原活化蛋白激酶(mitogen-activated

protein kinase, MAPK)、ErbB 信号通路等疾病相关信号通路治疗心肌缺血再灌注损伤后心室重构^[7]。而CDSC作为经国内多年临床验证,用于缓解心绞痛与冠心病症状的中药制剂,目前国内外尚缺乏其治疗心肌缺血相关的机制研究。本研究通过建立盐酸异丙肾上腺素(isoprenaline, ISO)诱导的小鼠心肌缺血模型评价CDSC抗心肌缺血的药效作用,并整合CDSC入血成分网络药理学分析和血清非靶向代谢组学方法,探究其治疗心肌缺血损伤的作用机制,为深入探索CDSC的药效提供新的研究视角,为新药研发和中医药现代化提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF级雄性C57BL/6J小鼠66只,8周龄,体质量(23±2)g,购自广东维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(粤)2022-0063。小鼠饲养于广州中医药大学实验动物中心SPF级动物房,动物实验经广州中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号20240412001)。

1.2 药品与试剂

CDSC (国药准字 Z10920059, 批号 2230004) 由广州白云山医药集团股份有限公司白云山制药总厂提供; 盐酸普萘洛尔片 (批号 E181234) 购自江苏亚邦爱普森药业有限公司; 盐酸 ISO (批号 F2215417) 购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司; Masson 染液套装 (批号 GP1032)、苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染液套装 (批号 G1004) 购自武汉赛维尔生物科技有限公司; 肌酸激酶 MB 同工酶 (creatin kinase-MB, CK-MB) 试剂盒 (批号 8672)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH) 试剂盒 (批号 12240)、心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin-I, cTn-I) 试剂盒 (批号 10446) 购自江苏酶免实业有限公司; 总蛋白 (total protein, TP) 测定试剂盒 (批号 A045-2-2)、超微量三磷酸腺苷 (adenosine triphosphate, ATP) 酶测试盒 (Na^+ , K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶、总 ATP 酶, 批号 A070-6-2) 购自南京建成生物工程研究所; β -肌动蛋白 (β -actin) 抗体 (批号 AF7018)、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK) 抗体 (批号 AF6423)、p-AMPK 抗体 (批号 AF3423)、哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 抗体 (批号 AF6308)、p-mTOR 抗体 (批号 AF3308)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (peroxisome proliferator-activated receptor γ , PPAR γ) 抗体 (批号 AF6284)、HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗 (批号 S0001) 购自 Affinity 公司; BCA 蛋白定量试剂盒 (批号 BB21091)、无蛋白快速封闭液 (批号 3591285) 购自上海雅酶生物医药科技有限公司; SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (批号 31720201116)、SDS-PAGE 凝胶配制试剂盒 (批号 42521210826)、100 mmol/L PMSF (批号 St506-2) 购自上海碧云天生物技术有限公司。

1.3 仪器

CP214 型分析天平 [奥豪斯仪器 (上海) 有限公司]; Complex2000 型全自动化学发光成像系统 (南京奥普欣生物科技有限公司); Multiskan GO 型全波长酶标仪 (美国 Thermo 公司); BX53 型生物显微镜 (日本 Olympus 公司); D3024R 型高速冷冻离心机 (美国 SCIOLOGEX 公司); Vanquish 型超高效液相色谱仪、Q Exactive HF-X 型高分辨质谱 (美国 Thermo 公司); JXFSTPRP-48 型全自动样品快速研磨仪 (上海净信实业发展有限公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模与给药

C57BL/6J 小鼠随机分为对照组、模型组、普萘洛尔 (20 mg/kg) 组和 CDSC 低、中、高剂量 (0.42、0.84、1.68 g/kg, 分别相当于 0.5、1、2 倍临床等效剂量), 每组 10 只。各给药组连续 10 d ig 相应药物, 对照组和模型组 ig 等体积的水, 1 次/d。从第 7 天开始, 给药 1 h 后, 除对照组外, 其余各组小鼠 ip ISO (40 mg/kg), 1 次/d, 连续 4 d, 诱导建立小鼠心肌缺血模型, 对照组 ip 等体积的生理盐水。第 11 天, 小鼠用异氟烷麻醉后, 眼眶取血, 采用颈静脉脱臼法处死, 收集血清和心脏组织进一步分析。

2.2 心肌组织 HE 染色

将心脏组织灌洗分离, 固定在 4% 多聚甲醛中, 经过脱水、透明、石蜡包埋后, 切成 5 μm 厚的薄片, 将切片脱蜡、水化, 分别用苏木素染液和伊红染液进行染色, 染色结束后将切片脱水、透明, 使用中性的树胶将切片封固, 于显微镜下观察并拍照。

2.3 心肌组织 Masson 染色

心脏组织石蜡切片经脱蜡水化后, 依次进行苏木素染核、丽春红酸性复红染肌纤维与红细胞、磷钼酸分化并用苯胺蓝复染胶原纤维, 最后脱水封片, 于显微镜下观察并拍照。心肌纤维呈红色、胶原纤维呈蓝色。

2.4 心肌组织中能量代谢酶的检测

称取适量心脏组织制成 10% 匀浆置低温保存, 使用总蛋白测定试剂盒, 通过考马斯亮蓝法进行蛋白定量测定, 结合超微量 Na^+ , K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶、总 ATP 酶试剂盒的酶促反应和定磷反应来计算心肌组织 Na^+ , K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶、总 ATP 酶的活力。

2.5 心肌组织损伤性标志物的检测

按照 ELISA 试剂盒说明书检测心肌组织中 CK-MB、LDH 活性及 cTn-I 水平。

2.6 入血成分分析

2.6.1 色谱条件 Zorbax Eclipse C₁₈ 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μm); 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~7 min; 5%~30% B; 7~14 min, 30%~78% B; 14~20 min, 78%~95% B; 20~25 min, 95%~5% B。进样量 2 μL ; 体积流量 0.3 mL/min; 柱温 30 $^{\circ}\text{C}$ 。

2.6.2 质谱条件 采用正、负离子模式; 加热器温度 325 $^{\circ}\text{C}$; 鞘气体积流量 45 arb; 辅助气体积流量

15 arb; 吹扫气体积流量 1 arb; 电喷雾电压 3.5 KV; 毛细管温度 330 °C; S-Lens RF Level 为 55%。扫描模式为一级全扫描 (Full Scan, m/z 100~1 500) 与数据依赖性二级质谱扫描 (dd-MS², TopN=5); 分辨率 120 000 (一级质谱)、60 000 (二级质谱); 碰撞模式为高能量碰撞解离 (HCD)。

2.6.3 血清样品的制备 取 6 只雄性 C57BL/6J 小鼠, 随机分为对照组及给药组, 每组 3 只, 给予普通饮食适应性饲养 5 d。小鼠禁食 12 h (自由饮水) 后, 给药组 ig CDSC (0.84 g/kg), 2 次/d, 连续给药 3 d, 对照组 ig 等体积的生理盐水。根据现有复方丹参制剂研究现状及课题组前期研究结果^[8-10], 选择末次给药后 5 h 作为采血点, 进行眼眶取血。样本于 37 °C 静置 1 h 进行凝固分层, 于 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min 分离血清, 取上清液转至干净的离心管中, -80 °C 冰箱保存备用。分别取 100 μ L 含药血清或空白血清于 2 mL 离心管中, 加入 400 μ L 甲醇, 涡旋 10 min 混匀, 随后将混匀的样品溶液于 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 取上清液过 0.22 μ m 微孔滤膜后, 加入 100 μ g/mL 内标, 使其质量浓度为 1 mg/L, 上机检测。

2.6.4 数据处理 药效成分鉴定采用 Compound Discoverer 3.3 软件来执行保留时间的校正、色谱峰的识别以及峰信息的提取等任务。依据二级质谱数据, 充分利用 Thermo mzCloud 等在线网络数据库资源, 以及 Thermo mzVault 等本地数据库工具对检测到的物质进行准确鉴定, 并依据变量投影重要性 (variable importance in projection, VIP) ≥ 1 且 $|\log_2$ 差异倍数 (fold change, FC) $|\geq 1$ 的标准筛选组间差异成分。对于同时存在于空白血清中的成分 (如某些脂肪酸), 除非其在给药后含量发生统计学上的显著变化, 否则不予认定为药源性入血成分。

2.7 网络药理学

2.7.1 入血成分靶点筛选 在 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取化合物 SMILE ID, 采用 SwissTargetPrediction 平台 (<https://swisstargetprediction.ch/>) 对潜在作用靶点进行预测, 去除重复靶标。

2.7.2 心肌缺血潜在靶点的获得 以 “myocardial ischemia” 为关键词, 利用 GeneCards 数据库 (<https://www.genecards.org/>)、OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>) 筛选相关靶标, 去除重复靶标。

2.7.3 交集基因的获取 将 CDSC 入血成分的作用

靶点与心肌缺血疾病靶点输入微生信在线分析平台, 取两者交集, 获得共同作用靶点, 并绘制韦恩图直观展示。

2.7.4 “成分-靶点”网络的构建 利用微生信平台 (<https://bioinformatics.com.cn/>) 获取 17 个化合物和心肌缺血的交集靶点, 并绘制韦恩图进行直观显示。通过 Cytoscape 3.9.1 软件构建 “成分-靶点” 网络, 并可视化药物、成分、交集靶点和疾病之间的相互作用。

2.7.5 蛋白质-蛋白质相互作用 (protein-protein interaction, PPI) 网络的构建 将共同靶点导入 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>), 构建 PPI。进一步将数据加载至 Cytoscape 软件, 通过分析网络拓扑参数 (包括中介中心性、紧密中心性、度中心性), 筛选关键核心靶点, 设定阈值为 \geq 各参数的中位数值。

2.7.6 富集分析 利用 David 数据库 (<https://davidbioinformatics.nih.gov/>) 导入交集靶点, 进行基因本体 (gene ontology, GO) 功能以及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, 利用微生信平台可视化。

2.8 血清代谢组学分析

2.8.1 血清样本处理 取对照组、模型组和 CDSC 高剂量组的血清样本于冰上解冻, 涡旋混匀。取 50 μ L 血清转移至 EP 管中, 加入 300 μ L 乙腈甲醇内标提取液, 涡旋振荡 3 min, 4 °C、12 000 r/min 离心 10 min, 随后 -20 °C 静置 30 min。4 °C、12 000 \times g 离心 3 min, 过 0.22 μ m 滤膜, 将其转移至相应的进样瓶之内衬管中, 以备进行后续的上机分析使用。吸取等体积所有样品并混匀, 均匀分为 8 个样本后, 分别插到分析序列中, 作为质控样本, 以监测代谢组学分析过程的稳定性。

2.8.2 色谱条件 Waters Acquity Premier HSS T3 色谱柱 (100 mm \times 2.1 mm, 1.8 μ m), 流动相为 0.1% 甲酸水溶液 (A) -0.1% 甲酸乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~5 min, 5%~20% B; 5~8 min, 20%~60% B; 8~9 min, 60%~99% B; 9~10.5 min, 99% B; 10.5~10.6 min, 99%~5% B; 10.6~13 min, 5% B。柱温 40 °C; 体积流量 0.4 mL/min; 进样量 4 μ L。

2.8.3 质谱条件 采用电喷雾离子源 (electro spray ion, ESI), 在正、负离子模式下进行全扫描分析, 扫描范围为 m/z 75~1 000, 分辨率设定为 35 000。

离子喷雾电压分别为正离子模式 3.5 kV 和负离子模式 3.2 kV; 鞘气体积流量为 30 arb; 辅助气体积流量为 5 arb; 离子传输管温度为 320 °C; 蒸发器温度为 300 °C; 碰撞能量分别为 30、40、50 V; Top N 与 Top Speed 设置为 10; 排除持续时间为 3 s。

2.8.4 数据处理 在代谢物鉴定过程中, 质谱下机原始数据经过 ProteoWizard 转换为 mzML 格式, 采用 XCMS 程序进行峰提取、对齐、保留时间校正。对各组样本中缺失率 > 50% 的峰进行过滤, 并对空白值进行 KNN 填充 + 1/5 最小值 (空白值 > 50% 采用 1/5 最小值填充, 空白值 < 50% 采用 KNN 填充), 采用 SVR 方法对峰面积进行校正。校正筛选后的峰通过检索数据库进行代谢物鉴定。

在差异代谢物筛选过程中, 差异代谢物的筛选标准为 $VIP > 1$ 且 $P < 0.05$ 。VIP 值来源于正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA), 该分析通过 R 软件包 Metabo Analyst R 完成, 同步生成得分图与置换检验图。在进行 OPLS-DA 前, 数据经过对数转换 (以 2 为底) 和均值中心化处理, 并执行 200 次置换检验以验证模型的可靠性。鉴定代谢物通过 KEGG 化合物数据库 (<http://www.kegg.jp/kegg/compound>) 进行注释, 随后将注释代谢物映射至 KEGG 通路数据库 (<http://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) 以实现通路富集分析。该流程采用 KEGG 官方提供的 API 接口进行批量数据检索与匹配, 确保注释结果的准确性和可追溯性。

2.9 Western blotting 检测心肌组织 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达

取各组心肌组织, 加入裂解液提取总蛋白, 使用 BCA 蛋白浓度测定试剂盒测定蛋白浓度, 加入上样缓冲液后煮沸 10 min 使蛋白变性。蛋白样品经 10% 十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 使用快速封闭液进行封闭处理 30 min。分别加入 p-AMPK (1:1 000)、AMPK (1:1 000)、p-mTOR (1:1 000)、mTOR (1:1 000)、PPAR γ (1:1 000)、 β -actin (1:5 000) 抗体, 4 °C 孵育过夜; 次日使用相应二抗 (1:7 000) 孵育 90 min, 通过化学发光法检测目标蛋白的表达, 运用 Image J 软件进行半定量分析。

2.10 统计学分析

实验数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 采用 SPSS 24.0 统计软件进行分析。首先对数据进行正态性检验 (Shapiro-

Wilk 法), 若数据符合正态分布则进行方差齐性检验 (Levene 法); 方差齐性者采用单因素方差分析 (One-way ANOVA), 并根据方差分析结果选择 LSD 法进行多重比较; 若数据不符合正态分布或方差不齐, 则采用非参数检验分析 (Nonparametric tests) 的 Mann-Whitney 法, 使用 GraphPad Prism 9.5.1 软件进行图表绘制。

3 结果

3.1 CDSC 对心肌缺血小鼠一般状态的影响

对照组小鼠精神状态良好, 毛发光泽, 活动饮食状况良好; 模型组小鼠出现精神萎靡, 畏寒蜷缩, 活动及纳食减少等现象; 与模型组比较, 各给药组小鼠精神状态良好, 活动与饮食增加, 各组均无小鼠死亡。

3.2 CDSC 对心肌缺血小鼠心肌组织病理变化的影响

HE 染色结果 (图 1) 显示, 对照组心肌细胞排列整齐, 无明显的炎性浸润; 模型组心肌细胞排列紊乱, 心肌细胞肥大, 炎性浸润严重; 与模型组比较, 各给药组心肌细胞排列趋于整齐, 心肌细胞肥大、炎性浸润情况得到明显改善。Masson 染色结果 (图 1) 显示, 对照组小鼠心肌纤维结构完整, 未见炎性细胞浸润; 模型组小鼠出现心肌纤维排列散乱, 出现大量纤维胶原, 且存在大量炎性细胞浸润现象; 与模型组比较, 各给药组小鼠心肌组织损伤呈现不同程度的好转, 心肌纤维化程度明显减轻。以上结果表明, CDSC 能减轻 ISO 所致的小鼠心肌缺血损伤。

3.3 CDSC 对心肌缺血小鼠心肌组织中能量代谢酶活性的影响

ATP 酶是生物膜上的一种蛋白酶, 在能量转换以及信息传递方面具有重要的作用。如图 2 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠心肌组织中 Na^+ , K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶和总 ATP 酶活力显著降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, CDSC 各给药组小鼠心肌组织中 Na^+ , K^+ -ATP 酶、 Ca^{2+} , Mg^{2+} -ATP 酶和总 ATP 酶活力显著升高 ($P < 0.001$), 且呈剂量相关性。表明 CDSC 可能通过影响 ATP 酶活力对小鼠心肌缺血损伤起保护作用。

3.4 CDSC 对心肌缺血小鼠心肌组织中损伤性标志物水平的影响

CK-MB、LDH、cTn-I 常被作为评价心肌受损程度的标志物。如图 3 所示, 与对照组比较, 模型

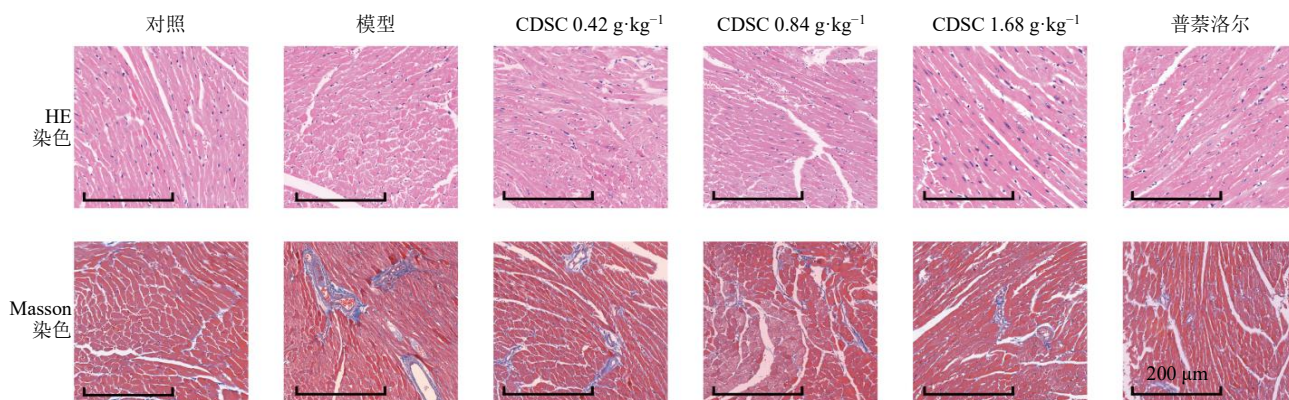
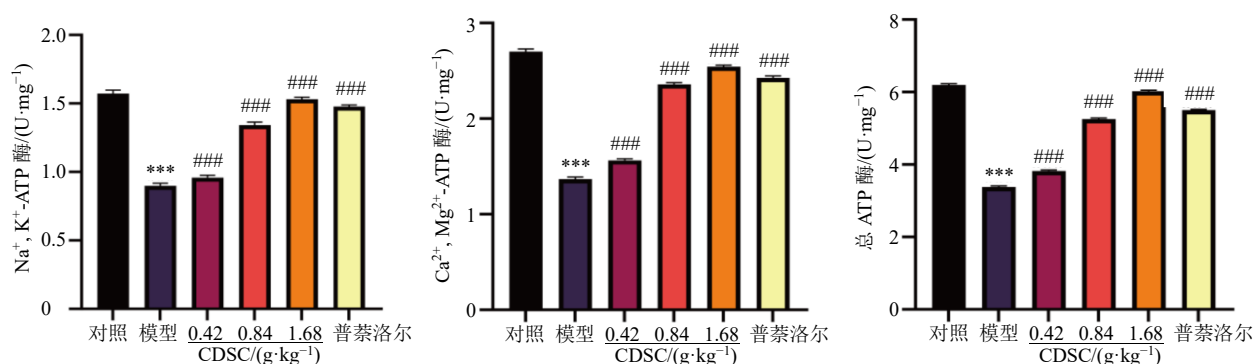


图1 CDSC对心肌缺血小鼠心肌组织病理变化的影响 (×200)

Fig. 1 Effect of CDSC on pathological changes of myocardial tissue in mice with myocardial ischemia (× 200)



与对照组比较: ### $P < 0.001$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$, 图3、10同。

$P < 0.001$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ *** $P < 0.001$ vs model group, same as below Figs. 3, 10.

图2 CDSC对心肌缺血小鼠心肌组织中能量代谢酶活性的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effect of CDSC on activity of energy metabolism enzymes in myocardial tissue of mice with myocardial ischemia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

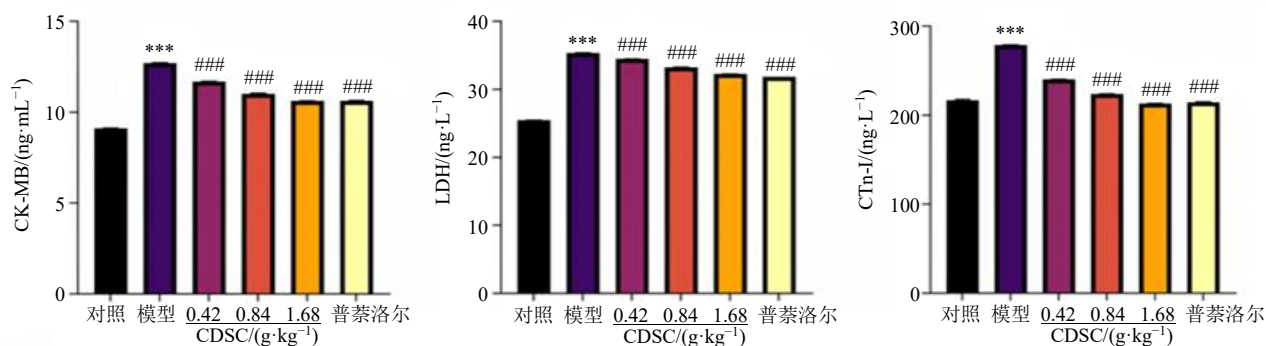


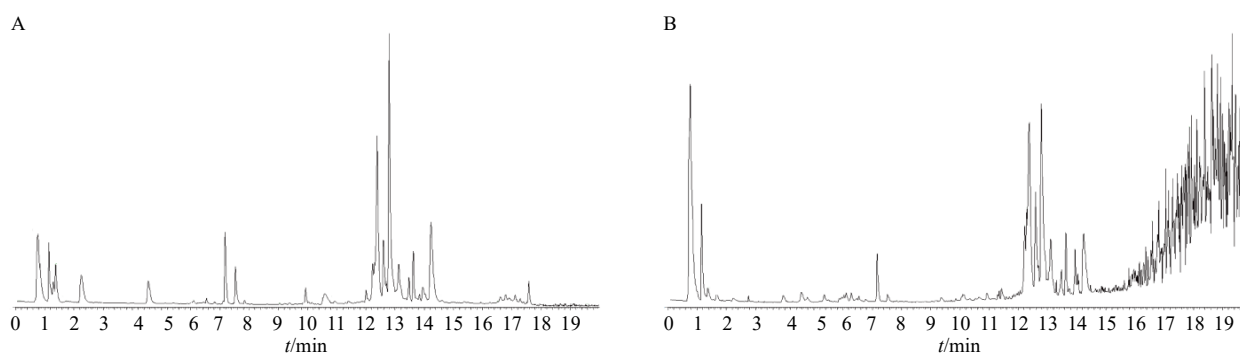
图3 CDSC对心肌缺血小鼠心肌组织中损伤性标志物水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effect of CDSC on levels of injury markers in myocardial tissue of mice with myocardial ischemia ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组小鼠心肌组织中 CK-MB、LDH 活性和 cTn-I 水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, CDSC 各给药组小鼠心肌组织中 CK-MB、LDH 活性和 cTn-I 水平均显著降低 ($P < 0.001$), 且呈剂量相关性。表明 CDSC 能够减轻 ISO 所致的小鼠心肌损伤。

3.5 CDSC 入血成分鉴定

在正、负离子模式下, 对 CDSC 含药血清进行 UPLC-Q-TOF-MS 分析 (图 4), 共鉴定出 17 个组间差异化学成分 (表 1), 主要包括甾体类、萜类、酚类、香豆素类等。



A-正离子模式; B-负离子模式。
A-positive ion mode; B-negative ion mode.

图4 CDSC 含药血清总离子流图

Fig. 4 Total ion current chromatogram of drug-containing serum of CDSC

表1 CDSC 的入血成分分析

Table 1 Analysis of blood components in CDSC

序号	<i>t_R</i> /min	成分	分子式	CAS	化合物类型
1	0.778	胆碱	C ₅ H ₁₃ NO	62-49-7	有机氮化合物
2	17.294	麝香酮	C ₁₆ H ₃₀ O	541-91-3	有机氧化合物
3	7.057	邻苯二甲醛	C ₈ H ₆ O ₂	643-79-8	苯及取代衍生物
4	10.014	赤霉素A7	C ₁₉ H ₂₂ O ₅	510-75-8	类异戊二烯脂质
5	11.421	6-姜酚	C ₁₇ H ₂₆ O ₄	23513-14-6	酚类
6	12.018	1-[(9Z)-hexadecenoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine	C ₂₄ H ₄₈ NO ₇ P	76790-27-7	甘油磷脂
7	11.386	癸酰胺	C ₁₀ H ₂₁ NO	2319-29-1	羧亚氨酸及其衍生物
8	9.687	丙戊酰胺	C ₈ H ₁₇ NO	2430-27-5	羧亚氨酸及其衍生物
9	6.167	methylhippuric acid	C ₁₀ H ₁₁ NO ₃	1205-08-9	羧酸及其衍生物
10	11.417	5,7-dihydroxy-4-methylcoumarin	C ₁₀ H ₈ O ₄	2107-76-8	香豆素及其衍生物
11	18.450	肾上腺酸	C ₂₂ H ₃₆ O ₂	28874-58-0	脂肪酰类
12	15.001	菝葜皂苷元	C ₂₇ H ₄₄ O ₃	126-19-2	类异戊二烯脂质
13	13.179	海柯皂苷元	C ₂₇ H ₄₂ O ₄	467-55-0	类异戊二烯脂质
14	13.634	臭椿酮	C ₂₀ H ₂₄ O ₇	981-15-7	类异戊二烯脂质
15	12.685	异甜菊醇	C ₂₀ H ₃₀ O ₃	27975-19-5	类异戊二烯脂质
16	9.449	皮质醇	C ₂₁ H ₃₀ O ₅	50-23-7	甾体及类固醇衍生物
17	16.225	薯蓣皂苷元	C ₂₇ H ₄₂ O ₃	512-04-9	类异戊二烯脂质

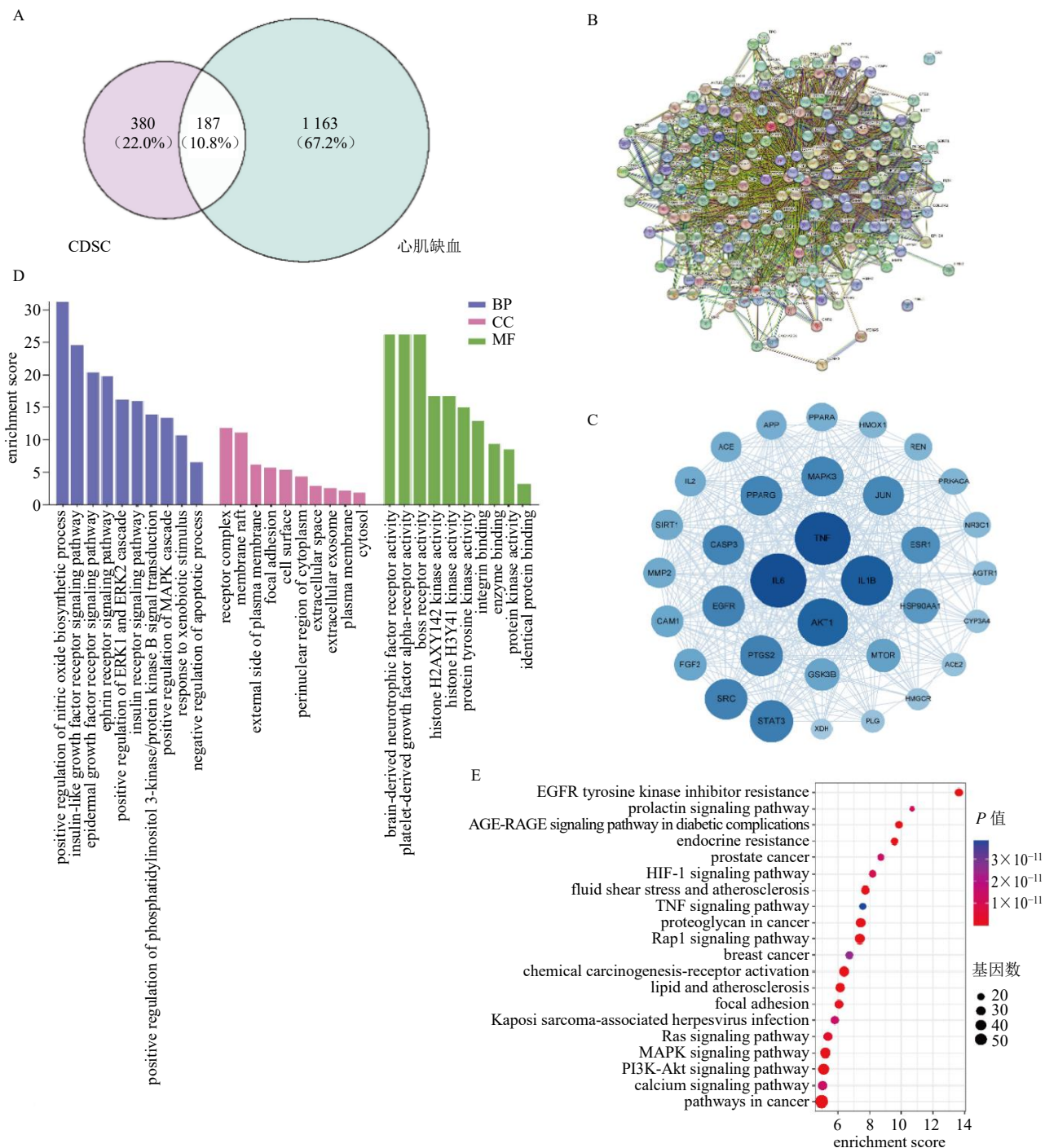
3.6 网络药理学分析

3.6.1 入血成分靶点及疾病靶点分析 利用 SwissTargetPrediction 数据库预测药物靶点, 获得 17 个化合物、567 个靶点。应用 GeneCards 数据库、OMIM 数据库, 以“myocardial ischemia”为关键词搜索心肌缺血相关靶点, GeneCards 数据库以 relevance score > 3 为条件卡值, 合并去重得到 1350 个疾病靶点。将 CDSC 的作用靶点与心肌缺血的靶点基因取交集后, 获得 187 个交集靶点基因 (图 5-A)。

3.6.2 PPI 网络分析 将 187 个交集靶点导入 STRING 数据库, 构建 PPI 网络 (图 5-B)。进一步利用 Cytoscape 软件进行网络拓扑分析, 设定中介

中心性、紧密中心性和基因度中心性均不低于各自中位值 (分别为 175.15、0.002 8 和 32.23) 作为筛选条件, 最终获得 1 个包含 34 个节点和 461 条相互作用边的核心靶点网络 (图 5-C)。

3.6.3 富集分析 将交集靶点进行富集分析, 发现 936 个 GO 条目, 其中与生物过程 (biological process, BP) 相关的条目有 661 个, 与细胞成分 (cellular component, CC) 相关的条目有 82 个, 与分子功能 (molecular function, MF) 相关的条目有 193 个; 选取各类别中富集程度最高的前 10 个条目进行可视化展示, 结果见图 5-D。KEGG 通路分析共筛选出 142 条信号通路, 选取 P 值前 20 的通路绘制气泡图进行展示, 结果见图 5-E, 主要涉及的



A-入血成分与疾病交集靶点 Venn 图; B-交集靶点 PPI 网络; C-核心靶点网络; D-GO 功能富集分析; E-KEGG 通路富集分析。
 A-Venn diagram of intersection targets of blood components and disease; B-PPI network of intersection targets; C-core target network; D-GO functional enrichment analysis; E-KEGG pathway enrichment analysis.

图 5 CDSC 入血成分网络药理学分析

Fig. 5 Network pharmacology analysis of CDSC blood components

通路有表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 酪氨酸激酶抑制剂耐药性、AMPK 信号通路、晚期糖基化终产物及其受体 (advanced glycation end products-receptor for advanced glycation end products, AGE-RAGE) 信号通路等, 提示 CDSC

可能通过上述通路发挥抗心肌缺血作用。

3.6.4 “成分-靶点”网络分析 利用成分、靶点数据, 构建 “network.xlsx” 文件以及 “type.xlsx” 文件, 将文件导入 Cytoscape 3.9.1 软件进行作图, 构建 “成分-靶点” 网络 (图 6)。

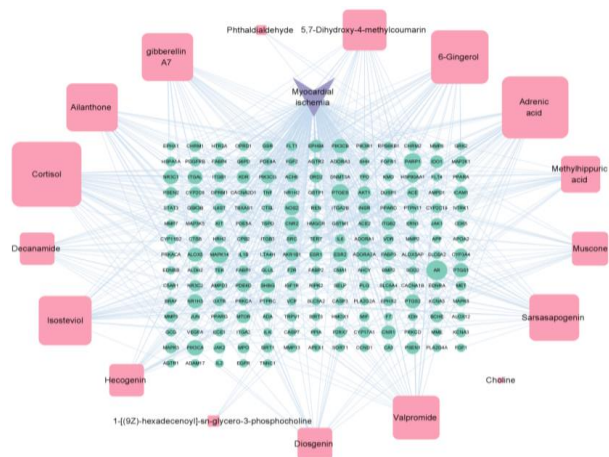
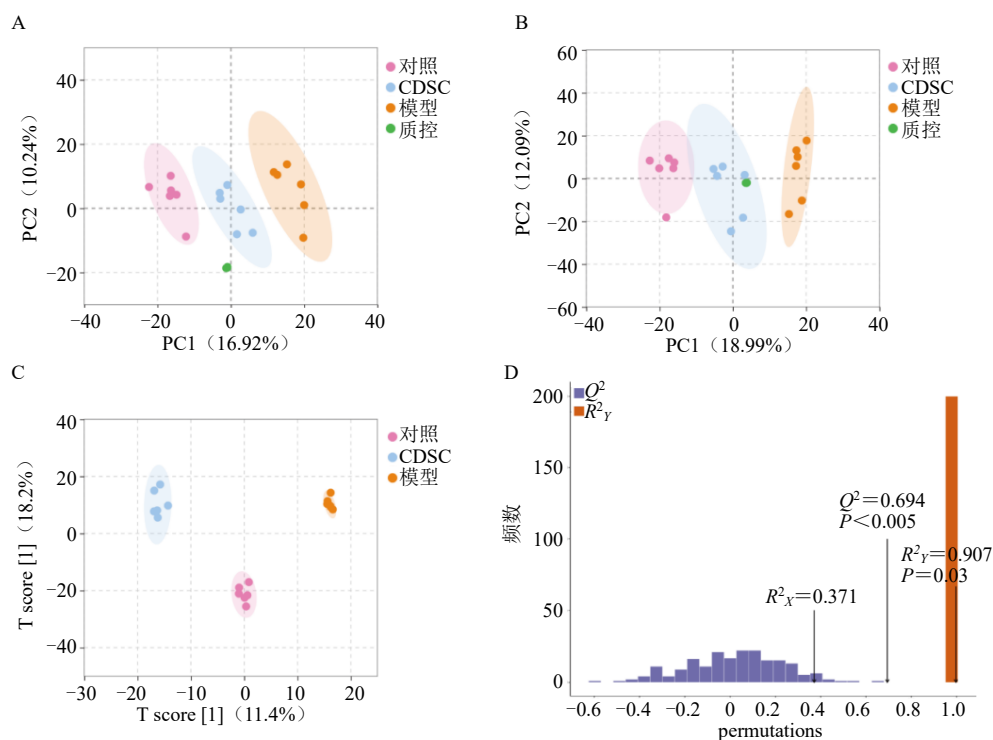


图6 CDSC抗心肌缺血“成分-靶点”网络
Fig. 6 “Ingredient-target” network of CDSC against myocardial ischemia



A-正离子模式下PCA得分散点图; B-负离子模式下PCA得分散点图; C-各组OPLS-DA得分散点图; D-OPLS-DA模型相关参数检验。
A-PCA score scatter plot under positive ion mode; B-PCA score scatter plot under negative ion mode; C-OPLS-DA score scatter plot of each group; D-validation of parameters of OPLS-DA model.

图7 CDSC对心肌缺血小鼠血清代谢轮廓的影响

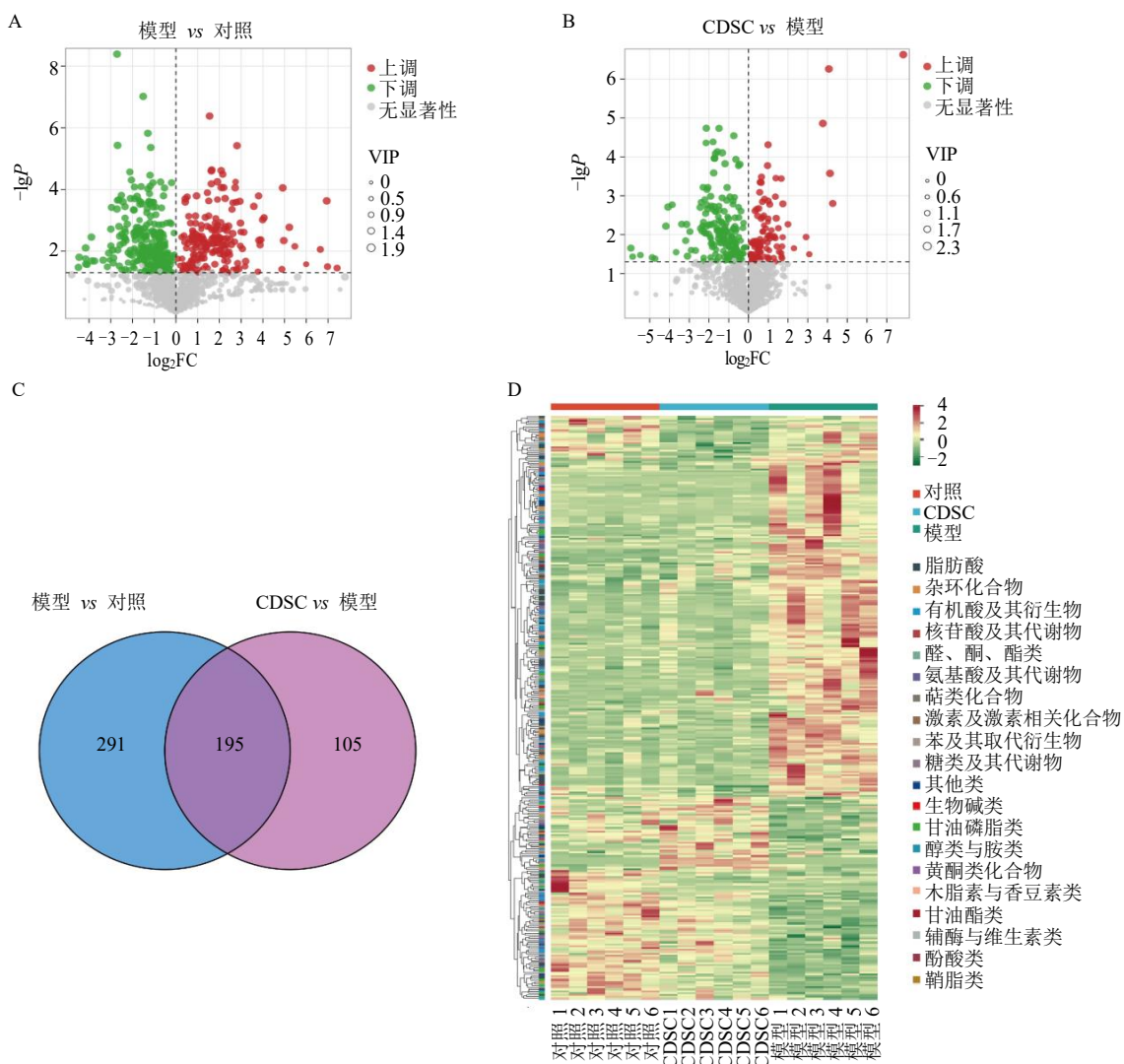
Fig. 7 Effect of CDSC on serum metabolic profile in mice with myocardial ischemia

3.7.2 差异代谢物筛选与热图分析 基于 OPLS-DA 模型进行不同组间差异代谢物筛选, 筛选标准为 $VIP > 1$ 且 $P < 0.05$ 。结果显示, 与对照组比较, 模型组共筛选出 486 个差异代谢物, 其中 195 个上调, 291 个下调 (图 8-A); 与模型组比较, CDSC 组共筛选出 300 个差异代谢物, 其中 107 个上调,

3.7 血清代谢组学分析

3.7.1 代谢轮廓分析 为探讨 CDSC 改善心肌缺血潜在的分子机制, 采用非靶向血清代谢组学从整体代谢水平阐释药物作用机制。通过主成分分析 (principal components analysis, PCA) 发现, 质控样本高度聚类, 表明所得数据可靠 (图 7-A、B)。各组样本均能清晰地分开, 模型组得分散点与对照组得分散点存在明显分离, 表明建模成功。此外, 相对于模型组, CDSC 组更趋向对照组, 表明心肌缺血小鼠在给予 CDSC 后代谢水平有所改善。OPLS-DA 通过建立代谢物表达量与分组关系之间的模型, 清晰地展示了各组间差异信息 (图 7-C)。所建模型 $R^2_Y = 1.000$, $Q^2 = 0.792$, 表明该模型具有良好的预测性和可靠性 (图 7-D)。

193 个下调 (图 8-B)。将 2 个集合进行合并分析, 共得出 195 个共有差异代谢物 (图 8-C), 代谢物种类主要有脂肪酸类、有机酸及其衍生物、苯及其衍生物等。对这些共有差异代谢物进行热图分析 (图 8-D), 结果显示 CDSC 能够显著恢复部分心肌缺血导致的代谢物水平异常变化。



A-模型组 vs 对照组差异代谢物的火山图；B-CDSC 组 vs 模型组差异代谢物的火山图；C-共有差异代谢物 Venn 图；D-差异代谢物聚类热图。
A-volcanic diagram of differential metabolites between model group and control group; B-volcanic map of differential metabolites between CDSC group and model group; C-Venn diagram of common differential metabolite; D-differential metabolite clustering heatmap.

图 8 代谢组学差异代谢物筛选与热图分析

Fig. 8 Screening and heatmap analysis of differential metabolites in metabolomics

3.7.3 差异代谢物相关性网络构建与富集分析
将 VIP 值排名前 50 的差异代谢物构建相关性网络，见图 9-A。随后将筛选及鉴定所得 195 个共有差异代谢物数据进行通路富集分析，并列出排名前 20 显著富集的通路，见图 9-B。结果显示，心肌缺血小鼠出现显著的能量代谢紊乱现象。而经 CDSC 干预后，能够显著回调胰高血糖素、碳代谢、丙酮酸代谢等能量与物质代谢途径，这些途径与 AMPK 作为能量代谢枢纽的生物学功能具有高度相关性。

研究显示，作为“节能开关”的 AMPK 在心肌缺血状况下能够发挥极为关键的保护效用^[11]。激活 AMPK 可促使葡萄糖摄入增加，降低心肌细胞的死

亡率^[12]。在心肌缺血时，AMPK/mTOR 信号通路呈现上调状态，并与多个信号通路相互作用以抑制氧化反应，这属于一种保护心肌细胞免受氧化应激损伤的代偿性反应。表明 CDSC 可能通过 AMPK/mTOR 信号通路对能量和物质代谢进行调控，进而改善 ISO 诱导的小鼠心肌缺血，进一步采用 Western blotting 检测 CDSC 对心肌缺血小鼠心肌组织中 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达的影响。

3.8 CDSC 对心肌缺血小鼠心肌组织中 AMPK/mTOR 通路相关蛋白表达的影响

如图 10 所示，与对照组比较，模型组小鼠心肌组织 p-AMPK/AMPK 和 PPAR γ 蛋白表达水平显

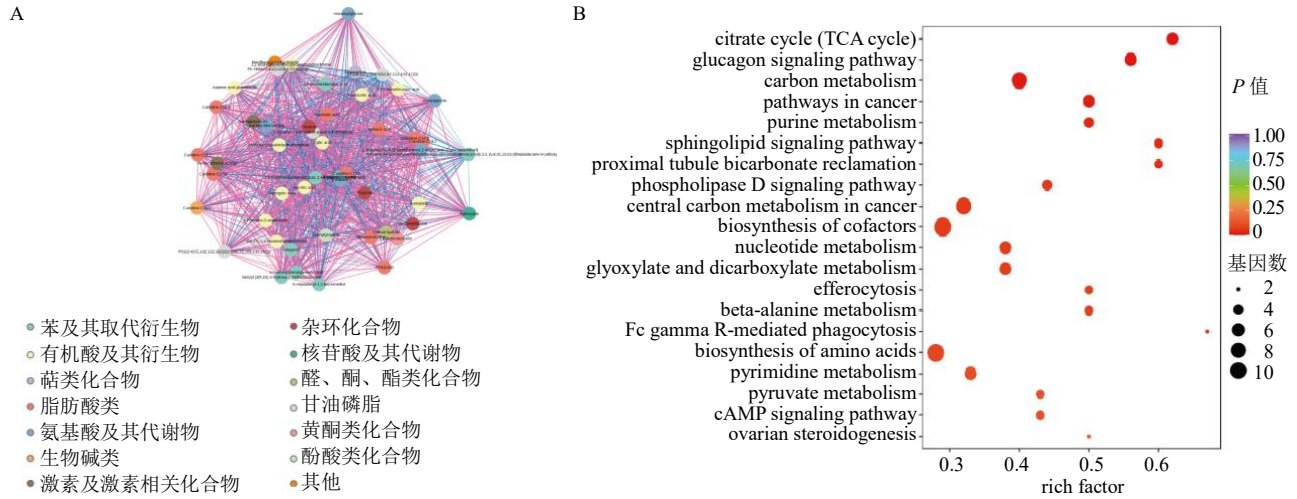


图9 代谢组学差异代谢物相关性网络 (A) 与通路富集分析 (B)

Fig. 9 Correlation networks of differential metabolites in metabolomics (A) and pathway enrichment analysis (B)

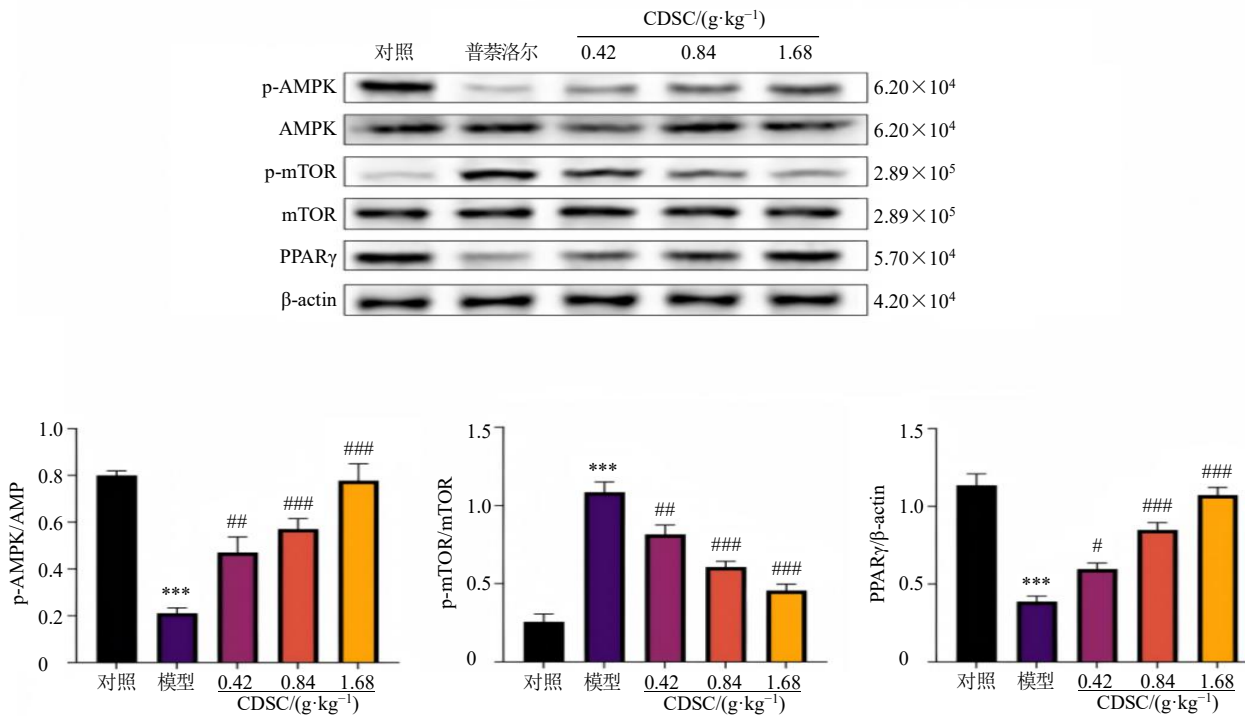


图10 CDSC对心肌缺血小鼠心肌组织中AMPK/mTOR通路相关蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 10 Effect of CDSC on expressions of AMPK/mTOR pathway related proteins in myocardial tissue of mice with myocardial ischemia ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

著降低 ($P < 0.001$), p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, CDSC 各给药组小鼠心肌组织 p-AMPK/AMPK 和 PPAR γ 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01, 0.001$), p-mTOR/mTOR 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01, 0.001$)。

4 讨论

当前, 中国面临着人口老龄化与代谢危险因素

持续流行的双重挑战, 心血管疾病的患病率呈持续上升趋势^[13]。心血管疾病导致死亡的原因具有多样性, 其中, 心肌缺血是致使患者死亡的主要因素^[14]。CDSC 是依据传统中医药理论研制的中药复方制剂, 具有活血化瘀、理气止痛的功效^[15]。方中丹参为君药, 具有活血化瘀、清心除烦、凉血消痈之功效, 现代药理学研究发现, 丹参具有血管生成和心脏保护作用^[16]; 而三七为臣药, 能散瘀止血、消肿

定痛^[17]，研究发现，三七总皂苷能够优化心肌的组织结构，有效遏制心力衰竭的进一步发展进程^[18]；冰片作为佐使之药，芳香走窜，可开窍醒神、引药上行，与丹参、三七等活血化瘀药物相结合后，显著改善血管的血液流变学特性，调节血管中红细胞的变形能力，进而促进血液循环^[19]。3药合用，形成了以活血化瘀为核心，兼以行气止痛、芳香开窍的治法，使得 CDSC 得以作为临床治疗心血管疾病的常用药物。然而，对于其在心肌缺血等疾病的机制研究并不清晰。本研究通过整合 CDSC 入血成分网络药理学和血清代谢组学，探究 CDSC 对心肌缺血小鼠的保护效应与分子机制。通过建立 ISO 诱导的小鼠心肌缺血模型，发现 CDSC 能显著改善心肌缺血损伤小鼠心肌组织形态、能量代谢酶（Na⁺, K⁺-ATP 酶、Ca²⁺, Mg²⁺-ATP 酶、总 ATP 酶）活力、心肌细胞损伤性标志物（CK-MB、LDH、cTn-I）等指标。

AMPK 作为细胞内的能量感受器，在维持能量稳态方面发挥着关键作用。其通过调控多种代谢途径，涵盖脂肪酸氧化、葡萄糖代谢和氨基酸代谢等，对心血管功能和疾病进程产生影响^[20-22]。mTOR 作为非典型丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶，通过调控多条信号通路参与细胞周期进程、细胞骨架重构、生长调控及增殖促进等生理活动。在心血管疾病中，AMPK/mTOR 的激活可通过 SIRT1 信号通路改善心肌肥厚，增加脂肪酸氧化和葡萄糖摄取，同时减少葡萄糖氧化^[23]。本研究中，CDSC 能够显著上调 AMPK 的磷酸化水平并下调 mTOR 蛋白表达，且呈剂量相关性，表明 CDSC 可能通过调控 AMPK/mTOR 信号通路发挥改善心肌缺血的作用。

AMPK/mTOR 与多种代谢途径密切相关。在碳代谢方面，AMPK/mTOR 信号通路通过调节糖酵解和脂肪酸氧化等途径，维持细胞的能量平衡和代谢稳态^[24-26]。AMPK 的激活可通过促进脂肪酸氧化和抑制脂质合成来调控肝脏脂质代谢，进而影响非酒精性脂肪肝病的进程^[27-28]。丙酮酸代谢同样受到 AMPK/mTOR 信号通路的调控。研究发现，丙酮酸激酶在 β 细胞对胰岛素分泌起着关键调控作用，这一过程与 AMPK 信号通路的调控紧密相关^[29]。而在嘧啶代谢方面，研究发现谷胱甘肽过氧化物酶 3（glutathione peroxidase 3, GPX3）通过 AMPK/mTOR 通路调节嘧啶代谢水平，与胃腺癌的进展密切相关^[30]。上述研究均强调了 AMPK/mTOR 通路

与多种代谢途径的相互作用在心血管疾病的发生和发展中具有重要意义。在本研究中，通过血清非靶向代谢组学与多元统计学差异分析，发现 CDSC 给药后心肌缺血小鼠的胰高血糖素、碳代谢、丙酮酸代谢、嘧啶代谢途径得到显著改善。提示这些通路参与 CDSC 对心肌缺血的改善过程，并可能与 AMPK/mTOR 信号通路的激活有关。本研究的入血成分分析基于正常动物展开，未来的研究可在心肌缺血模型动物中同步进行药理学分析，以比较病理与生理状态下入血成分的差异，从而更精确地锁定在疾病治疗中起关键作用的药效物质。

综上，本研究发现 CDSC 能有效改善 ISO 诱导的小鼠心肌缺血模型病理指标并显著影响 AMPK/mTOR 信号通路的表达。血清代谢组学发现，CDSC 有效改善了心肌缺血小鼠的代谢水平，其中胰高血糖素、碳代谢、丙酮酸代谢等多个与 AMPK/mTOR 信号通路高度相关的代谢途径显著富集。上述结果提示 CDSC 可能通过调控 AMPK/mTOR 信号通路改善代谢水平从而发挥抗心肌缺血的作用。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Jumeau C, Rupin A, Chieng-Yane P, *et al.* Direct thrombin inhibitors prevent left atrial remodeling associated with heart failure in rats [J]. *JACC Basic Transl Sci*, 2016, 1(5): 328-339.
- [2] McDougal A D, Dewey C F Jr. Modeling oxygen requirements in ischemic cardiomyocytes [J]. *J Biol Chem*, 2017, 292(28): 11760-11776.
- [3] Vos T, Lim S S, Abbafati C, *et al.* Global burden of 369 diseases and injuries in 204 countries and territories, 1990—2019: A systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2019 [J]. *Lancet*, 2020, 396(10258): 1204-1222.
- [4] 吴明先, 杨曦, 廖蔚林, 等. 黄芩苷治疗心血管疾病的药理作用研究进展 [J]. *现代药物与临床*, 2025, 40(9): 2406-2412.
- [5] 李玥. 浅谈复方丹参方的组成及药理药效研究 [J]. *药品评价*, 2020, 17(4): 25-26.
- [6] 曹博雅, 陈家黎, 石晓溪, 等. 复方丹参滴丸调控 LOX-NF-κB 炎症途径治疗心肌缺血的机制研究 [J]. *中草药*, 2023, 54(1): 151-159.
- [7] 李乔羽. 复方丹参片治疗心肌缺血再灌注损伤后心室重构的作用及机制研究 [D]. 北京: 北京协和医学院, 2023.
- [8] 孙晶晶, 殷玮, 凌珊, 等. 复方丹参制剂中 7 种成分在

- 大鼠血浆中的药动学研究 [J]. 中成药, 2021, 43(8): 1983-1988.
- [9] 陈斌, 莫尊汇, 颜榕, 等. 基于液质联用技术和生物信息学对复方丹参制剂体内外成分与作用特点的初步对比研究 [J]. 中南药学, 2025, 23(12): 3534-3543.
- [10] 游燕, 张启云, 郑琴, 等. 丹参和三七多种有效成分在大鼠体内的药物动力学研究 [J]. 中药新药与临床药理, 2010, 21(6): 614-618.
- [11] 钱晨曦, 徐洁晨, 张琳. AMPK 对缺血心肌保护机制的研究进展 [J]. 心脏杂志, 2015, 27(3): 344-347.
- [12] Ji L L, Zhang X, Liu W C, *et al.* AMPK-regulated and Akt-dependent enhancement of glucose uptake is essential in ischemic preconditioning-alleviated reperfusion injury [J]. *PLoS One*, 2013, 8(7): e69910.
- [13] 周娇, 王长福, 曾元宁, 等. 中药有效成分治疗心肌缺血损伤的研究进展 [J]. 中国现代应用药学, 2025, 42(5): 820-829.
- [14] 赵江峰, 徐江林, 何佳乐, 等. 基于数据挖掘、网络药理学及实验验证探究清毒稳心方治疗扩张型心肌病的用药规律及作用机制 [J]. 中草药, 2025, 56(19): 7118-7129.
- [15] 束云, 李贻奎, 李连达. 复方丹参制剂药理作用的比较研究 [J]. 中药药理与临床, 2012, 28(1): 132-134.
- [16] Chang C C, Chang Y C, Hu W L, *et al.* Oxidative stress and *Salvia miltiorrhiza* in aging-associated cardiovascular diseases [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016: 4797102.
- [17] 雷玮华, 蔡金勇, 张梦莹, 等. 基于网络药理学探究复方丹参滴丸治疗双心疾病的作用机制 [J]. 世界科学技术—中医药现代化, 2025, 27(4): 1188-1200.
- [18] Chen X, Ma L, Shao M Y, *et al.* Exploring the protective effects of PNS on acute myocardial ischaemia-induced heart failure by Transcriptome analysis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2021, 271: 113823.
- [19] 刘原, 凡永杰, 苏坤莲, 等. 冰片在心血管疾病治疗中的佐使作用中西医研究概况 [J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(4): 64-66.
- [20] Wu S N, Zou M H. AMPK, mitochondrial function, and cardiovascular disease [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(14): 4987.
- [21] Rodríguez C, Muñoz M, Contreras C, *et al.* AMPK, metabolism, and vascular function [J]. *FEBS J*, 2021, 288(12): 3746-3771.
- [22] Bernardi P, Gerle C, Halestrap A P, *et al.* Identity, structure, and function of the mitochondrial permeability transition pore: Controversies, consensus, recent advances, and future directions [J]. *Cell Death Differ*, 2023, 30(8): 1869-1885.
- [23] Dong H W, Zhang L F, Bao S L. AMPK regulates energy metabolism through the SIRT1 signaling pathway to improve myocardial hypertrophy [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2018, 22(9): 2757-2766.
- [24] He L Q, Zhou X H, Huang N, *et al.* AMPK regulation of glucose, lipid and protein metabolism: Mechanisms and nutritional significance [J]. *Curr Protein Pept Sci*, 2017, 18(6): 562-570.
- [25] Inoki K, Kim J, Guan K L. AMPK and mTOR in cellular energy homeostasis and drug targets [J]. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2012, 52: 381-400.
- [26] Wang R Y, Wang M, Liu B, *et al.* Calendulose E protects against myocardial ischemia-reperfusion injury induced calcium overload by enhancing autophagy and inhibiting L-type Ca^{2+} channels through BAG3 [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 145: 112432.
- [27] Yu P, Xu X, Zhang J, *et al.* Liraglutide attenuates nonalcoholic fatty liver disease through adjusting lipid metabolism via SHP1/AMPK signaling pathway [J]. *Int J Endocrinol*, 2019, 2019: 1567095.
- [28] Song H Z, Lu J, Deng R. Polysaccharides from *Tremella Fuciformis* enhance glucose and lipid metabolism in HepG2 cells through activating the AMPK signaling pathway [J]. *Chem Biodivers*, 2025, 22(2): e202401926.
- [29] Murao N, Morikawa R, Seino Y, *et al.* Pyruvate kinase modulates the link between β -cell fructose metabolism and insulin secretion [J]. *FASEB J*, 2025, 39(7): e70500.
- [30] Zhang Y W, Yang Y X, Kuang S S, *et al.* GPX3-mediated oxidative stress affects pyrimidine metabolism levels in stomach adenocarcinoma via the AMPK/mTOR pathway [J]. *Int J Clin Pract*, 2024, 2024(1): 6875417.

[责任编辑 李亚楠]