匝迪-5味丸改善心肌缺血再灌注损伤的作用机制预测及验证Δ

乌日嘎*，威力斯，乌日拉嘎，苏斯，阿茹罕，佟立军，布图雅，呼日乐巴根#（内蒙古医科大学蒙医药学院，呼和浩特 010110）

中图分类号 R965；R29　　**文献标志码** A　　**文章编号** 1001-0408（2024）04-0442-07
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2024.04.11

摘　要　目的 探讨匝迪-5味丸改善心肌缺血再灌注损伤（MIRI）的作用机制。**方法** 通过网络药理学方法筛选匝迪-5味丸改善MIRI的潜在作用靶点和通路。将72只大鼠随机分为模型组、假手术组、丹参组[复方丹参滴丸80 mg/（kg·d）]和匝迪-5味丸高、中、低剂量组[1.6、0.8、0.4 g/（kg·d）]，每组12只。各组大鼠灌胃相应药物，每天1次，连续14 d。末次给药后，结扎大鼠左冠状动脉前降支建立MIRI模型，假手术组大鼠只穿线不结扎。检测建模后各组大鼠血清中肌酸激酶（CK）、乳酸脱氢酶（LDH）、天冬氨酸转氨酶（AST）、心肌肌钙蛋白T（CTn-T）的含量，心肌细胞凋亡率，心肌组织中磷脂酰肌醇3-激酶（PI3K）、蛋白激酶B（Akt）、B淋巴细胞瘤2（Bcl-2）及Bcl-2相关X蛋白（Bax）、胱天蛋白酶3（caspase-3）蛋白表达水平；观察心肌组织形态变化。**结果** 共获得匝迪-5味丸的活性成分177个，作用靶点220个，参与改善心肌缺血相关的靶点51个，其中核心靶点为*AKT1*，涉及PI3K-Akt、内质网、缺氧诱导因子-1等多个通路。与模型组比较，丹参组和匝迪-5味丸高剂量组大鼠血清中CK、LDH、AST、CTn-T含量和心肌细胞凋亡率，以及心肌组织中caspase-3、Bax蛋白表达水平均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），心肌组织中PI3K、Akt、Bcl-2蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$），心肌组织病理形态改变均明显改善；匝迪-5味丸低、中剂量组大鼠上述指标亦有不同程度改善。**结论** 匝迪-5味丸可能通过激活PI3K-Akt信号通路抑制细胞凋亡，从而发挥改善MIRI的作用。

关键词 匝迪-5味丸；心肌缺血再灌注损伤；作用机制；磷脂酰肌醇3-激酶/蛋白激酶B信号通路；凋亡

Prediction and validation of the mechanism of Zadi-5 pill in protecting myocardial ischemia-reperfusion injury

Wuriga, Weilisi, Wurilaga, Susi, Aruhan, TONG Lijun, Butuya, Hurilebagen (College of Mongolian Medicine, Inner Mongolian Medical University, Hohhot 010110, China)

ABSTRACT　OBJECTIVE To explore the mechanism of Zadi-5 pill in improving myocardial ischemia-reperfusion injury (MIRI). **METHODS** The targets and pathways of potential effects of Zadi-5 pill improving MIRI were screened based on the network pharmacology. Seventy-two rats were randomly divided into model group, sham operation group, Danshen group [Compound danshen dripping pills 80 mg/(kg·d)] and Zadi-5 pill high-dose, medium-dose and low-dose groups [1.6, 0.8, 0.4 g/(kg·d)], with 12 rats in each group. The rats in each group were given corresponding drugs intragastrically, once a day, for 14 consecutive days. After the last administration, MIRI model was established by ligating the anterior descending branch of left coronary artery in rats, while rats in the sham operation group were threaded without ligation. The contents of creatine kinase (CK), lactate dehydrogenase (LDH), aspartate transaminase (AST), cardiac troponin T (CTn-T), apoptotic rate of cardiomyocyte, phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K), protein kinase B (Akt), B-cell lymphoma-2 (Bcl-2), Bcl-2 related X protein (Bax) and caspase-3 in myocardial tissue were detected in each group after modeling; the morphological changes of myocardial tissue were observed. **RESULTS** A total of 177 active ingredients and 220 targets of Zadi-5 pill were obtained, including 51 targets involved in improving myocardial ischemia; the core target of Zadi-5 pill improving MIRI was *AKT1*, including PI3K-Akt, endoplasmic reticulum and hypoxia-inducible factor-1. Compared with model group, the contents of CK, LDH, AST and CTn-T, the apoptotic rate of cardiomyocyte as well as the protein expressions of caspase-3 and Bax were significantly decreased in Danshen group and Zadi-5 pill high-dose group ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the protein expressions of PI3K, Akt and Bcl-2 in myocardial tissue were significantly increased ($P<0.05$ or $P<0.01$), respectively; the myocardial histopathological changes were significantly improved. The above indicators were improved to varying degrees in Zadi-5 pill low-dose and medium-dose groups, too. **CONCLUSIONS** Zadi-5 pill may inhibit apoptosis by activating the PI3K-Akt signaling pathway, thus playing a role in improving MIRI.

KEYWORDS Zadi-5 pill; myocardial ischemic-reperfusion injury; mechanism of action; phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathway; apoptosis

Δ**基金项目** 内蒙古自治区科技计划项目（No.2021GG0384）；内蒙古自治区自然科学基金项目（No.2019MS08138）；内蒙古自治区蒙医药协同创新中心科学研究项目（No.MYYXTYB202105）

* **第一作者** 博士研究生。研究方向：蒙医方剂配伍规律与机制。E-mail：395527242@qq.com

\# **通信作者** 教授，博士生导师，博士。研究方向：蒙医药现代化。E-mail：hurile2009@163.com

心血管疾病是导致全球死亡和疾病负担的最主要原因之一。我国心血管病患病率仍处于持续上升阶段，其中缺血性心脏病是导致死亡的主要原因之一[1]。临床上急性心肌缺血的首选治疗策略为及时采取溶栓或介入等再灌注手段快速恢复冠脉血流，但再灌注也容易造成心肌的二次损伤，即心肌缺血再灌注损伤（myocardial ischemia-reperfusion injury，MIRI）。

蒙医学认为，心肌缺血引起的心肌梗死、心绞痛等冠心病均属于蒙医学“心刺痛”范畴，其蒙医病名为“朱日很·哈特勒嘎”，通过镇心“赫依”、改善血液“赫依与其苏”运行，可使病情发展得到控制[2]。匝迪-5味丸是蒙医临床常用的经典复方，主治心律失常、心肌梗死、心绞痛等病症，疗效显著[3]。该方出自蒙医经典著作《高氏梅林方》，由肉豆蔻50 g，木香、土木香各40 g，广枣25 g，荜茇5 g配伍而成，具有镇心、养心、安神的功效，主治心烦失眠、心神不安、心悸、胸闷气喘等病症[4]。已有研究发现，匝迪-5味丸可降低MIRI模型大鼠心肌肌钙蛋白T（cardiac troponin T，CTn-T）、肌酸激酶（creatine kinase，CK）、天冬氨酸转氨酶（aspartate aminotransferase，AST）、乳酸脱氢酶（lactate dehydrogenase，LDH）等心肌酶的含量，缩小心肌损伤面积[5-6]，但其改善MIRI的作用机制尚未明确。本研究利用网络药理学方法筛选匝迪-5味丸的活性成分及作用靶点，并预测其改善MIRI的潜在作用靶点及通路，又通过建立MIRI大鼠模型验证匝迪-5味丸改善MIRI的作用机制，旨在为阐明该方的药效机制提供参考。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Synergy H4型酶标仪（美国Bio-Tek公司）、RM2016型病理切片机（德国Leica公司）、XSP-C204型显微镜（重庆重光实业有限公司）、D1008E型离心机（武汉赛维尔生物科技有限公司）等。

1.2 药品与试剂

匝迪-5味丸（内药制字M13010062，规格为60丸/袋）由内蒙古国际蒙医医院国家蒙药制剂中心提供；复方丹参滴丸（国药准字Z10950111，规格为每丸重27 mg）购自天力士制药集团股份有限公司；CTn-T酶联免疫吸附试验（ELISA）试剂盒（货号CSB-E16443r）购自华美生物工程有限公司；CK、LDH、AST ELISA试剂盒（货号分别为C060-b、C018、C072）均购自长春汇力生物技术有限公司；磷脂酰肌醇3-激酶（phosphatidylinositol 3-kinase，PI3K）抗体（货号bsm-33219M）购自北京博奥森生物技术有限公司；辣根过氧化物酶（horseradish peroxidase，HRP）标记的山羊抗兔二抗、蛋白激酶B（又称Akt）抗体、HRP标记的驴抗山羊二抗、甘油醛-3-磷酸脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase，GAPDH）抗体、HRP标记的山羊抗大鼠二抗、B淋巴细胞瘤2（B-cell lymphoma-2，Bcl-2）相关X蛋白（Bcl-2 associated X protein，Bax）抗体、HRP标记的山羊抗小鼠二抗、TUNEL检测试剂盒、DAB显色剂、抗原修复液（货号分别为GB23303、GB11689、GB23404、GB12002、GB23302、GB11690、GB23301、GDP1041、G2111、G1202）均购自武汉赛维尔生物科技有限公司；Bcl-2抗体（货号BF9103）购自江苏亲科生物研究中心有限公司；胱天蛋白酶3（caspase-3）抗体（货号66470-2-Ig）购自武汉三鹰生物技术有限公司。

1.3 动物

8周龄SPF级SD雄性大鼠72只，体重（200±20）g，购自北京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（北京）2019-0010。所有大鼠饲养于温度（22±2）℃、相对湿度（50±5）%环境下，适应性饲养7 d。本实验经内蒙古医科大学医学伦理委员会审批通过，伦理批件编号为YKD202001055。

2 方法

2.1 网络药理学研究

检索中药系统药理学数据库和分析平台（TCMSP，http://tcmspw.com/）和BATMAN-TCM数据库（http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm/），并查阅文献，获取匝迪-5味丸的活性成分。以“肉豆蔻”“广枣”“荜茇”“木香”“土木香”为关键词，在TCMSP中设置口服生物利用度≥30%、类药性指数≥0.18进行检索，在BATMAN-TCM数据库中设置“药物-靶点参考值”中靶蛋白提取值≥0.90、$P<0.05$进行检索。利用UniProt数据库（https://www.uniprot.org/）对所得活性成分进行检索，找出匝迪-5味丸各活性成分的作用靶点。以“myocardial is-chemia”为关键词，从GeneCards数据库（https://genecards.org/）、DisGeNET数据库（https://www.disgenet.org/）和DrugBank数据库（https://go.drugbank.com/）中收集心肌缺血的相关靶基因。利用Venn Diagram软件对匝迪-5味丸活性成分的作用靶点和心肌缺血相关靶基因取交集，获得共同靶点。将共同靶点导入STRING数据库（https://string-db.org/），选择“multiple proteins”，将物种设置为“Homo sapiens”，置信度设置为0.7，进行蛋白相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络构建与数据分析。将分析结果导入Cytoscape 3.9.0软件，构建PPI网络图，分析节点（成分或靶点蛋白）和边（成分、靶点蛋白和疾

病之间的关系），突出关键靶点及相关蛋白。将共同靶点导入Metascape分析平台（https://www.metascape.org），对共同靶点进行基因本体（gene onto-logy，GO）和京都基因和基因组数据库（Kyoto encyclope-dia of genes and genomes，KEGG）信号通路富集分析。

2.2 动物实验研究

2.2.1 分组与给药

将72只SD大鼠随机分为模型组、假手术组、丹参组（阳性对照组）和匝迪-5味丸高、中、低剂量组，每组12只。模型组和假手术组大鼠灌胃等体积蒸馏水，丹参组大鼠给予复方丹参滴丸80 mg/（kg·d）灌胃，匝迪-5味丸高、中、低剂量组大鼠分别给予匝迪-5味丸药粉1.6、0.8、0.4 g/（kg·d）灌胃，给药剂量按前期预实验结果设置。各组大鼠均按10 mL/kg灌胃，每天1次，连续14 d。

2.2.2 模型建立

末次灌胃后2 h，将各组大鼠麻醉后取仰卧位固定，监测记录心电图；剖开左侧L_3～L_4肋间，暴露心脏，结扎左冠状动脉前降支，使其缺血30 min，再灌注2 h（其中假手术组只穿线不结扎），建模同时记录其心电图。当大鼠心肌或心尖苍白或发绀，心电图示ST段升高0.1 mV或QRS波提高增粗，则提示缺血建模成功；当大鼠心肌缺血部位充血变红或ST段缓慢下降约50%，则提示再灌注建模成功[7]。

2.2.3 采样

大鼠建模完成后，开腹，于腹主动脉采血，待血凝后，于4 ℃下以3 500 r/min离心15 min，取上清液保存待测。采血结束后，摘取各组大鼠结扎部位以下的心肌组织，每组取6只大鼠的心肌组织用磷酸盐缓冲液洗净后待测，另6只大鼠的心肌组织用福尔马林固定待测。

2.2.4 大鼠心肌酶含量检测

取各组大鼠血清，按照ELISA试剂盒说明书操作，检测血清中CK、LDH、AST、CTn-T的含量。

2.2.5 大鼠心肌组织形态观察

将福尔马林固定的心肌组织梯度脱水，常规石蜡包埋，切片（3.5 μm），用二甲苯脱蜡后进行苏木精-伊红（hematoxylin-eosin，HE）染色，中性树胶封片。应用Image-Pro Plus 6.0软件采集图像，观察大鼠心肌组织的形态变化。

2.2.6 大鼠心肌细胞凋亡检测

取“2.2.5”项下的心肌组织切片，按照TUNEL检测方法进行染色，使用光学显微镜观察，正常心肌细胞核呈蓝色，凋亡阳性心肌细胞核呈棕黄色。每张阳性切片选取6个阳性细胞最多的视野，计算阳性细胞百分比，即细胞凋亡指数（cell apoptotic index，CAI）。

2.2.7 大鼠关键通路和凋亡相关蛋白表达检测

采用Western blot法进行检测。取大鼠洗净的心肌组织，裂解，匀浆，以12 000 r/min离心10 min，取上清液，测定蛋白浓度，煮沸变性。取变性后的蛋白样品放入凝胶板，电泳，转膜，封闭，加入PI3K、Akt、Bcl-2、Bax、caspase-3、GAPDH一抗稀释液（稀释比例为1∶1 000、1∶1 000、1∶5 000、1∶5 000、1∶500、1∶1 000），4 ℃下孵育过夜；加入二抗稀释液（稀释比例为1∶3 000），室温下孵育30 min；暗室曝光、显影，将胶片进行扫描存档，用PhotoShop软件整理去色，采用AlphaEase FC软件测定灰度值。以目标蛋白与内参蛋白（GAPDH）的灰度值比值表示目标蛋白的表达水平。

2.2.8 统计学方法

采用SPSS 25.00软件对数据进行统计分析，数据均以$\bar{x}\pm s$表示，多组间比较采用单因素方差分析，组间两两比较采用LSD-t检验。检验水准$\alpha=0.05$。

3 结果

3.1 网络药理学分析结果

3.1.1 匝迪-5味丸的活性成分与心肌缺血的共同靶点

共检索获得177个匝迪-5味丸的活性成分及220个作用靶点，501个心肌缺血相关靶基因。将匝迪-5味丸的活性成分作用靶点与心肌缺血相关靶基因进行交叉，共获得51个共同靶点。所构建的PPI网络（图1）中，有51个节点和718条边，匝迪-5味丸改善MIRI主要以*AKT1*为核心靶点，协同*IL6*、*PTGS2*、*EGFR*、*IL1B*、*PPARA*、*PPARG*、*STAT3*、*MTOR*等多个靶点共同发挥作用。

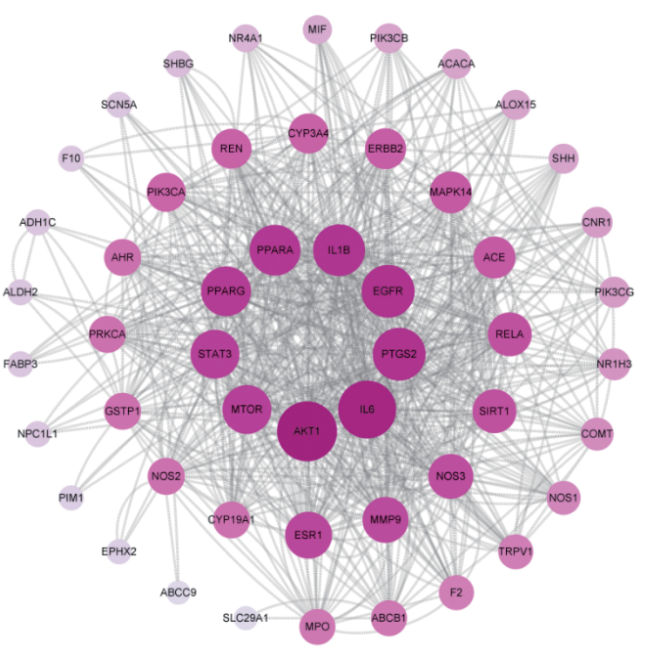


图1 匝迪-5味丸改善MIRI的PPI网络图

3.1.2 关键通路及其相互作用靶点

GO富集分析结果（图2）显示，以$P \leqslant 0.05$为筛选条件，共获得48个条目，其中生物过程条目20个，主要涉及激素调节、内毒素调节、循环系统、脂质定位调节、蛋白磷酸化等；细胞组分条目11个，主要涉及PI3K复合酶、细胞膜、转录调节复合酶等；分子功能条目17个，主要涉及核受体激活、脂质合成、亚铁血红素合成、一氧化氮合酶调节等。KEGG通路富集分析共得到20条通路（图3），与心肌缺血有关的主要涉及PI3K-Akt、内质网、缺氧诱导因子1（hypoxia-inducible factor-1，HIF-1）等信号通路。通过匝迪-5味丸活性成分与PI3K-Akt信号通路网络分析发现，君药肉豆蔻的MF10、MF5、MF9和使药荜茇的PL1、PL2等活性成分作用显著，因此，笔者推测匝迪-5味丸的作用机制可能与PI3K-Akt信号通路密切相关（图4）。

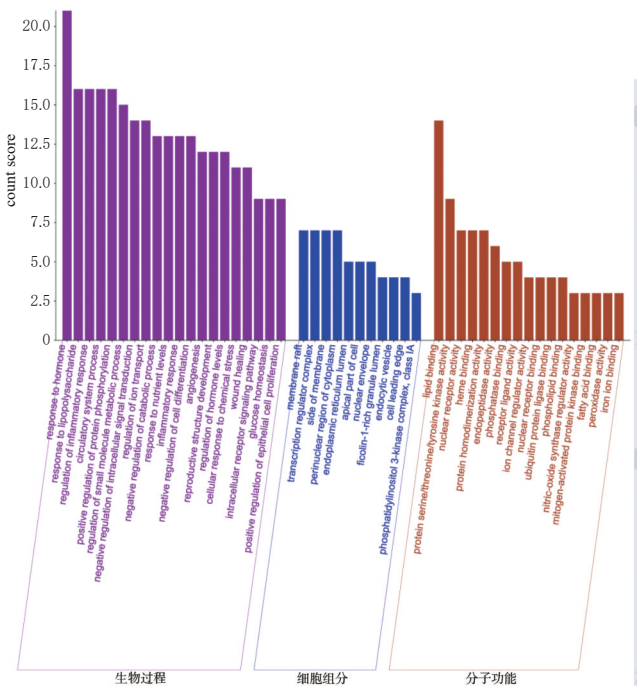


图2 匝迪-5味丸改善MIRI的GO富集分析结果

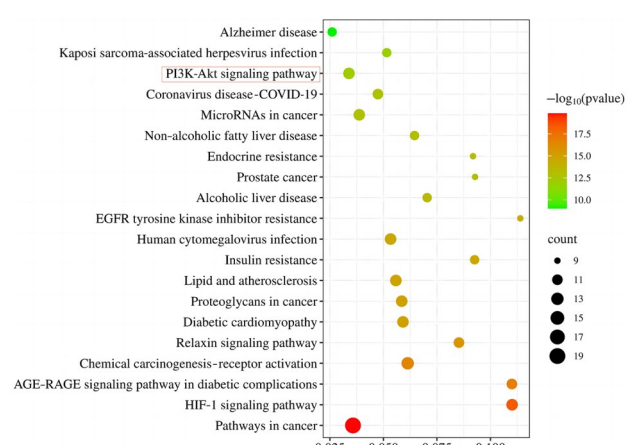
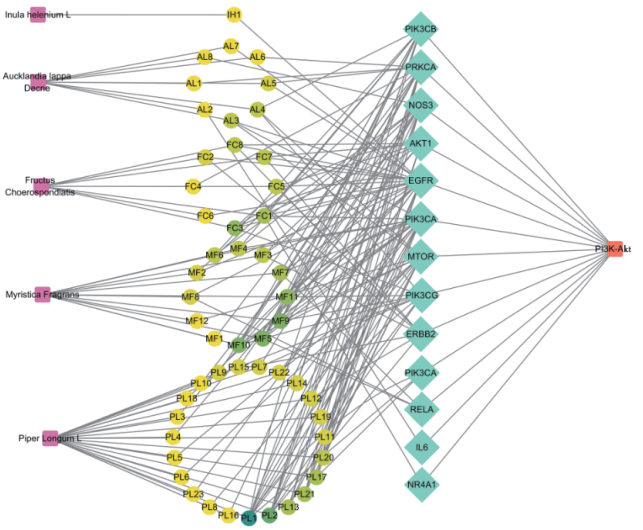


图3 匝迪-5味丸改善MIRI的KEGG通路富集分析结果



粉色：匝迪-5味丸配伍药材；黄绿色：各配伍药材的化学成分；蓝色：靶点蛋白；红色：PI3K-Akt信号通路。

图4 匝迪-5味丸的MIRI改善作用与PI3K-Akt信号通路的关系网络图

3.2 动物实验验证结果

3.2.1 大鼠心电图变化

与大鼠麻醉状态比较，大鼠心肌缺血时ST段显著升高（ST段抬高0.1 mV以上）；与心肌缺血时比较，大鼠心肌缺血再灌注时ST段下降约50%，表明MIRI模型复制成功。

3.2.2 大鼠血清中心肌酶含量变化

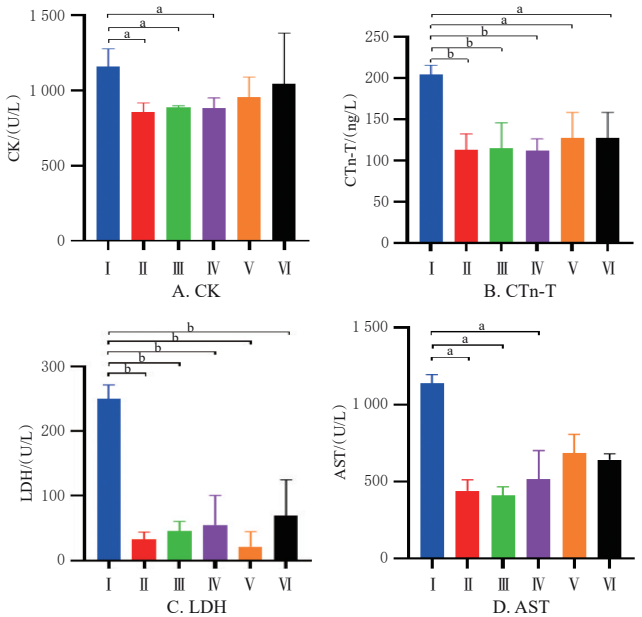
与假手术组比较，模型组大鼠血清中CK、CTn-T、LDH、AST含量均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。与模型组比较，丹参组和匝迪-5味丸高剂量组大鼠血清中CK、CTn-T、AST、LDH含量均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$）；匝迪-5味丸低、中剂量组大鼠血清中CTn-T和LDH含量均显著降低（$P<0.05$或$P<0.01$），CK和AST含量变化差异无统计学意义（$P>0.05$）。结果见图5。

3.2.3 大鼠心肌组织形态变化

假手术组大鼠心肌组织染色均匀，形态结构正常，心肌纤维排列整齐，细胞分界清晰，纹理清晰，间质未见明显异常，局部可见少量肥大细胞浸润；与假手术组比较，模型组大鼠心肌组织形态结构紊乱，排列疏松，细胞分界不清，间质可见水肿，心肌纤维断裂、溶解，伴大量炎症细胞浸润；与模型组比较，丹参组和匝迪-5味丸各剂量组大鼠心肌组织病理形态均有不同程度改善，细胞分界相对清晰，心肌纤维排列相对规则，炎症细胞浸润相对减少。结果见图6。

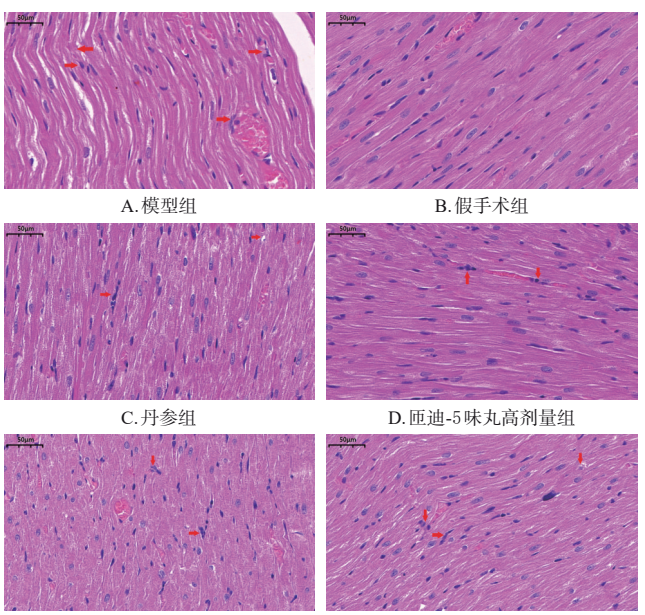
3.2.4 大鼠心肌细胞凋亡情况

与假手术组比较，模型组大鼠心肌细胞凋亡率显著升高（$P<0.01$）；与模型组比较，丹参组和匝迪-5味丸各剂量组大鼠心肌细胞凋亡率均显著降低（$P<0.01$）。结果见图7和图8。



Ⅰ：模型组；Ⅱ：假手术组；Ⅲ：丹参组；Ⅳ：匝迪-5味丸高剂量组；Ⅴ：匝迪-5味丸中剂量组；Ⅵ：匝迪-5味丸低剂量组；a：$P<0.05$；b：$P<0.01$。

图5　匝迪-5味丸对MIRI模型大鼠血清中心肌酶CK、CTn-T、LDH、AST的影响（$\bar{x}\pm s$，$n=12$）



箭头：病变部位。

图6　匝迪-5味丸对MIRI模型大鼠心肌组织形态的影响（HE染色，×200）

3.2.5　大鼠心肌组织中关键通路和凋亡相关蛋白的表达变化

与假手术组比较，模型组大鼠心肌组织中PI3K、Akt、Bcl-2蛋白表达水平均显著降低，Bax、caspase-3蛋白表达水平均显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。与模型组比较，丹参组和匝迪-5味丸各剂量组大鼠心肌组织中Bcl-2蛋白表达水平均显著升高，Bax、caspase-3蛋白表达水平显著降低（$P<0.01$）；丹参组和匝迪-5味丸高、中剂量组PI3K、Akt蛋白表达显著升高（$P<0.05$或$P<0.01$）。结果见图9和图10。

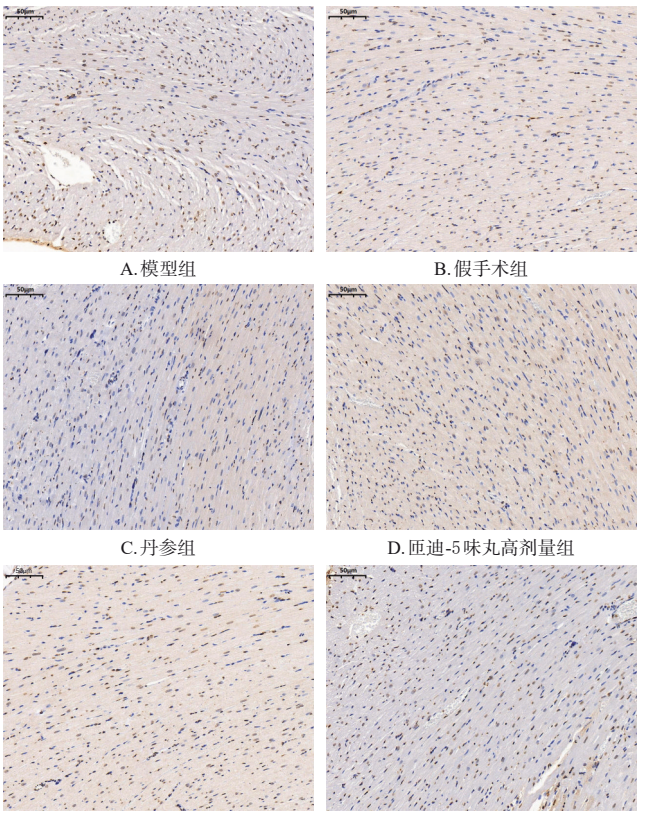
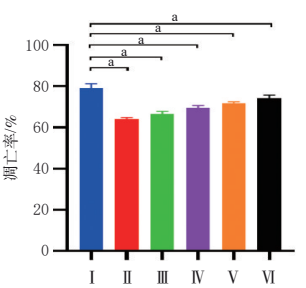


图7　匝迪-5味丸对MIRI模型大鼠心肌细胞凋亡的影响（TUNEL染色，×200）

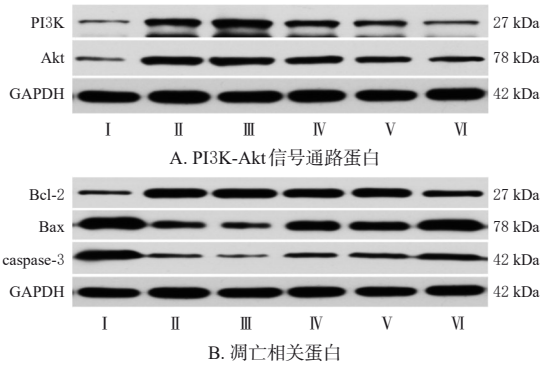


Ⅰ：模型组；Ⅱ：假手术组；Ⅲ：丹参组；Ⅳ：匝迪-5味丸高剂量组；Ⅴ：匝迪-5味丸中剂量组；Ⅵ：匝迪-5味丸低剂量组；a：$P<0.01$。

图8　匝迪-5味丸对MIRI模型大鼠心肌细胞凋亡率的影响（$n=6$）

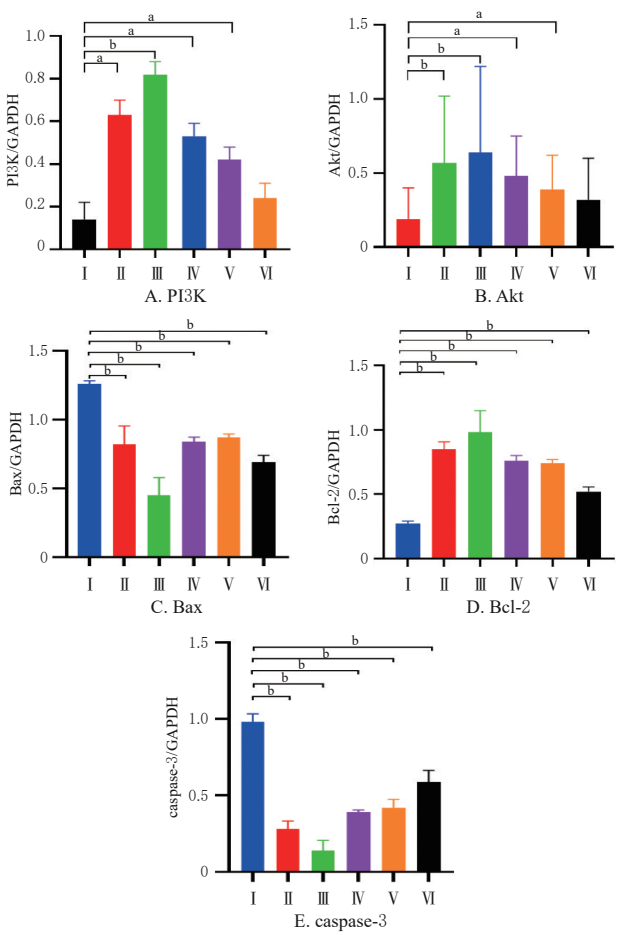
4　讨论

心肌缺血的病理过程复杂，具体病理机制尚未明确。但已有研究表明，抑制心肌细胞凋亡是治疗MIRI的重要措施[8]。本课题组前期研究发现，匝迪-5味丸能有效缩小MIRI模型大鼠的心肌梗死面积[6]，但具体作用机制尚不明确。本研究利用网络药理学方法筛选了匝迪-5味丸的活性成分及作用靶点，以及心肌缺血的相关靶基因，预测了匝迪-5味丸改善MIRI的潜在作用靶点和通路。结果，共获得匝迪-5味丸的活性成分177个，作



Ⅰ：模型组；Ⅱ：假手术组；Ⅲ：丹参组；Ⅳ：匝迪-5味丸高剂量组；Ⅴ：匝迪-5味丸中剂量组；Ⅵ：匝迪-5味丸低剂量组。

图9　匝迪-5味丸对MIRI模型大鼠心肌组织中关键通路蛋白和凋亡相关蛋白表达影响的电泳图



Ⅰ：模型组；Ⅱ：假手术组；Ⅲ：丹参组；Ⅳ：匝迪-5味丸高剂量组；Ⅴ：匝迪-5味丸中剂量组；Ⅵ：匝迪-5味丸低剂量组。a：$P<0.05$；b：$P<0.01$。

图10　匝迪-5味丸对MIRI模型大鼠心肌组织中关键通路蛋白和凋亡相关蛋白表达的影响（$n=6$）

用靶点220个，参与改善心肌缺血的靶点51个，其中核心靶点为*AKT1*，涉及PI3K-Akt、内质网、HIF-1等多个通路。结合本课题组前期研究，推测匝迪-5味丸改善MIRI可能与PI3K-Akt通路有关。

本研究建立了MIRI大鼠模型，在蛋白水平上进一步探讨了匝迪-5味丸的心肌保护作用机制。在建模过程中，大鼠心肌缺血时，心电图ST段显著抬高（ST段抬高0.1 mV以上），再灌注时ST段下降约50%，表明MIRI模型复制成功。已有研究证实，血清中LDH、CK、AST、CTn-T等心肌酶含量异常升高程度可反映心肌受损程度[9]。本实验结果显示，与模型组比较，复方丹参滴丸和匝迪-5味丸可不同程度地降低模型大鼠血清中CK、CTn-T、LDH、AST含量，同时改善心肌组织病理形态。

PI3K-Akt是再灌注损伤补救激酶信号通路。研究表明，PI3K-Akt信号通路与心血管疾病关系密切，在MIRI的复杂病理过程中处于核心地位，可减轻心肌细胞凋亡损伤，发挥心肌保护作用[10]。Akt是PI3K-Akt信号通路发挥生物学效应的关键分子，具有3种同源性亚型（Akt1、Akt2、Akt3），其中Akt1高表达于心、脑、肺等组织，参与细胞增殖、生长、细胞凋亡[11]。本实验结果显示，与模型组比较，复方丹参滴丸和高、中剂量匝迪-5味丸可显著升高大鼠心肌组织中PI3K、Akt蛋白表达水平，可见匝迪-5味丸改善MIRI的作用机制可能与PI3K-Akt信号通路有关。

MIRI病理机制复杂，涉及通路、途径众多，而凋亡是其中最为重要的病理机制之一。本研究TUNEL检测结果显示，MIRI会引起心肌细胞凋亡，而匝迪-5味丸可显著抑制大鼠心肌细胞凋亡率。在分子水平上，抗凋亡蛋白Bcl-2和促凋亡蛋白Bax以相对稳定的比例存在于细胞中，二者的表达失衡是造成细胞凋亡的关键因素[12]。在内源性凋亡途径中，Bax作用于线粒体外膜可促进细胞色素C释放到细胞质中并活化caspase-3，进而诱导细胞凋亡；在外源性凋亡途径中，跨膜受体与配体结合形成死亡信号复合物，可激活caspase-3诱导细胞凋亡，因此caspase-3是介导细胞凋亡的关键调控因子[13]。而Bcl-2可减少线粒体细胞色素C释放，从而阻止细胞凋亡[14]。本实验结果显示，与模型组比较，匝迪-5味丸可显著降低大鼠心肌组织中Bax、caspase-3蛋白表达水平，显著升高Bcl-2蛋白表达水平，表明匝迪-5味丸可能通过PI3K-Akt信号通路调节细胞凋亡相关蛋白，保护心肌损伤。

综上所述，匝迪-5味丸可能通过激活PI3K-Akt信号通路抑制细胞凋亡，从而发挥改善MIRI的作用。然而，MIRI机制复杂，且匝迪-5味丸具有多成分、多靶点、多通路协同作用特点，作用机制也不只涉及PI3K-Akt信号通路，其他机制有待今后进一步探究。

参考文献

[1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告2021概要[J]. 中国循环杂志，2022，37（6）：553-578.

The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on cardiovascular health and diseases in China 2021: an updated summary [J]. Chin Circ J, 2022, 37(6): 553-578.

[2] 吉格木德丹僧扎木苏. 通瓦嘎吉德[M]. 呼和浩特: 内蒙古人民出版社, 1999: 65.
Jigmudanzenjamsu. Tongwagajid[M]. Hohhot: Inner Mongolia People's Publishing House, 1999: 65.

[3] 苏德. 蒙药治疗冠心病心绞痛的疗效观察[J/OL]. 中西医结合心血管病电子杂志, 2016, 4(10): 13-14[2023-07-13]. https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&filename=ZXJH201610007.
SU D. Observation on therapeutic effect of Mongolian medicine on angina pectoris of coronary heart disease[J/OL]. Cardiovasc Dis J Integr Tradit Chin West Med, 2016, 4(10): 13-14[2023-07-13]. https://kns.cnki.net/KCMS/detail/detail.aspx?dbcode=CJFD&filename=ZXJH201610007.

[4] 段·贡布扎布. 高氏梅林方[M]. 赤峰: 内蒙古科学技术出版社, 1999: 6, 106.
DUAN G. Gaoshimeilin prescription[M]. Chifeng: Inner Mongolia Science and Technology Press, 1999: 6, 106.

[5] 威力斯, 苏斯, 苏尼尔, 等. 匝迪-5味丸对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的心肌保护作用研究[J]. 中国民族医药杂志, 2021, 27(12): 50-53.
Weilisi, Susi, Sunier, et al. Protective effect of Zadi-5 pill on myocardial ischemia-reperfusion injury model rats[J]. J Med Pharm Chin Minor, 2021, 27(12): 50-53.

[6] 额尼日乐. 蒙药匝迪-5对缺血再灌注损伤模型大鼠的心肌保护作用机制研究[D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
Enirile. Mechanism of myocardial protection of Mongolian medicine Zadi-5 in myocardial ischemia-reperfusion injury model rats[D]. Beijing: Beijing University of Traditional Chinese Medicine, 2021.

[7] 翁锦龙, 熊尚全, 江澍, 等. 瓜蒌薤白半夏汤预处理对心肌缺血再灌注损伤模型大鼠的心肌保护作用及机制研究[J]. 实用心脑肺血管病杂志, 2023, 31(12): 43-48, 53.
WENG J L, XIONG S Q, JIANG S, et al. Protective effect and mechanism of pretreatment of Gualou xiebai banxia decoction on myocardial ischemia-reperfusion injury model rats[J]. Pract J Card Cereb Pneumal Vasc Dis, 2023, 31(12): 43-48, 53.

[8] CHEN X Y, ZHABYEYEV P, AZAD A K, et al. Endothelial and cardiomyocyte PI3Kβ divergently regulate cardiac remodeling in response to ischemic injury[J]. Cardiovasc Res, 2019, 115(8): 1343-1356.

[9] 宋焰桃, 胡安群. 非酶类生物标志物在心肌损伤中的应用进展[J]. 国际检验医学杂志, 2023, 44(8): 1007-1012, 1024.
SONG Y T, HU A Q. Application progress on non-enzymatic biomarkers in myocardial injury[J]. Int J Lab Med, 2023, 44(8): 1007-1012, 1024.

[10] 赵博, 屈新亮, 王祁, 等. 网络药理学预测四逆汤抗心肌缺血再灌注损伤机制及实验验证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(9): 168-175.
ZHAO B, QU X L, WANG Q, et al. Mechanism of Sinitang against myocardial ischemia-reperfusion injury: prediction based on network pharmacology and verification by cellular experiments[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2022, 28(9): 168-175.

[11] 谢延峥, 马金, 邹旭. PI3K/Akt信号通路串扰在心肌缺血再灌注损伤中的作用及中医药防治进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(24): 201-210.
XIE Y Z, MA J, ZOU X. Effect of PI3K/Akt signal pathway crosstalk in myocardial ischemia reperfusion injury and prevention and treatment with traditional Chinese medicine therapy[J]. Chin J Exp Tradit Med Formulae, 2020, 26(24): 201-210.

[12] YI C L, SONG M J, SUN L F, et al. Asiatic acid alleviates myocardial ischemia-reperfusion injury by inhibiting the ROS-mediated mitochondria-dependent apoptosis pathway [J]. Oxid Med Cell Longev, 2022, 2022: 3267450.

[13] ZHANG Y, ZHANG J Q, ZHANG T, et al. Calycosin induces gastric cancer cell apoptosis via the ROS-mediated MAPK/STAT3/NF-κB pathway[J]. Onco Targets Ther, 2021, 14: 2505-2517.

[14] 程安然, 王钰滢, 华健, 等. 黄芪-葛根药对治疗糖尿病心肌病的理论探讨[J]. 中草药, 2023, 54(23): 7853-7861.
CHENG A R, WANG Y Y, HUA J, et al. Theoretical discussion on treatment of diabetic cardiomyopathy by Astragali Radix-Puerariae Lobatae Radix herb pair[J]. Chin Tradit Herbal Drugs, 2023, 54(23): 7853-7861.

（收稿日期：2023-08-13　修回日期：2024-01-26）
（编辑：邹丽娟）