

[文章编号] 1671-587X(2026)01-0125-10

DOI:10.13481/j.1671-587X.20260113

樱黄素对心肌梗死模型小鼠的治疗作用及其机制

蔡 萌, 郭 杨, 马莹芳, 崔静蕾, 罗 佳, 魏丽丽, 张云华, 王 洋

(石河子大学医学院 新疆地方与民族高发病教育部重点实验室, 新疆 石河子 832000)

[摘要] **目的:** 探讨樱黄素对心肌梗死 (MI) 小鼠的治疗作用, 并阐明樱黄素治疗 MI 的关键靶点及分子机制。**方法:** 从 50 只 c57 小鼠中随机选取 10 只小鼠作为假手术组; 另外 40 只小鼠采用心脏左前降支结扎建立小鼠 MI 模型, 将造模成功的 40 只小鼠随机分为模型组、低剂量樱黄素组 ($5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 樱黄素)、高剂量樱黄素组 ($10 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 樱黄素) 和阳性药物组 (依那普利组) ($2 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 依那普利), 每组 10 只。持续 21 d 腹腔注射给药, 每日 1 次。采用超声心动图检测各组小鼠心功能指标, 酶联免疫吸附试验 (ELISA) 法检测各组小鼠血清中肌酸激酶同工酶 (CK-MB) 和肌钙蛋白 I (cTn-I) 水平, HE 染色观察各组小鼠心肌组织病理形态表现, Masson 染色观察各组小鼠心肌组织纤维化情况, 免疫组织化学染色法和免疫荧光法检测各组小鼠 MI 边缘区心肌组织中 CD31 表达情况及新生血管数量。利用有机小分子生物活性数据库 (Pubchem) 获取樱黄素结构信息, 采用蛋白质序列数据库 (SWISS) 和定量构效关系数据库 (QSAR) 获取樱黄素的靶点, 采用疾病基因网络数据库 (GeneCards)、基因网络数据库 (Disgene) 和在线人类孟德尔遗传数据库 (OMIM) 获取 MI 疾病靶点, 搜索关键词“心肌梗死”, 获得与之相关的全部疾病靶点。将樱黄素的靶点与疾病的靶点进行交集匹配并寻找共同靶点。运用 String 数据库构建蛋白-蛋白相互作用 (PPI) 网络图。选取排名靠前的靶点与樱黄素进行分子对接, 分析樱黄素治疗 MI 的信号通路。**结果:** 与假手术组比较, 模型组小鼠左心室射血分数 (LVEF) 和左心室短轴缩短率 (LVFS) 明显降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 低和高剂量樱黄素组及依那普利组小鼠 LVEF 和 LVFS 均明显升高 ($P < 0.05$)。ELISA 法, 与假手术组比较, 模型组小鼠血清中 CK-MB 和 cTn-I 水平均明显升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 低和高剂量樱黄素组及依那普利组小鼠血清中 CK-MB 和 cTn-I 水平均明显降低 ($P < 0.01$)。HE 染色, 模型组小鼠心肌细胞形态改变, 组织排列紊乱并且有明显断裂, 炎性细胞浸润增多; 低剂量樱黄素组小鼠心肌细胞坏死程度有所减轻; 高剂量樱黄素组小鼠心肌细胞的肿胀、排列失序和肌纤维断裂的症状明显缓解。Masson 染色, 模型组小鼠心肌纤维化明显, 心室前壁变薄, 而低剂量樱黄素组小鼠心肌纤维化面积降低, 显著抑制纤维化的发展, 高剂量樱黄素组小鼠心肌纤维化面积明显减少, 纤维化导致的瘢痕样改变减轻。免疫组织化学染色法和免疫荧光法, 与模型组比较, 高剂量樱黄素组小鼠 MI 边缘区新生血管数量升高 ($P < 0.05$)。网络药理学, 樱黄素化合物靶点 100 个, 其中 68 个为樱黄素-MI 的共同靶点。与 MI 有关的关键基因包括表皮生长因子受体 (EGFR)、磷脂酰肌醇 3-激酶催化亚单位 α (PIK3CA) 和过氧化物酶体增生激活受体 γ (PPARG) 等。分子对接分析结果显示樱黄素与关键靶点 EGFR 和 PIK3CA 对接良好, 与 EGFR 的亲性更好。**结论:** 樱黄素可促进 MI 小鼠模型梗死边缘区毛细血管新生以减轻缺血缺氧损伤, 从而减轻 MI 后的小鼠心功能障碍。

[关键词] 心肌梗死; 樱黄素; 血管再生; 网络药理学; 分子对接

[中图分类号] R542.22 **[文献标志码]** A

[收稿日期] 2025-01-09 **[录用日期]** 2025-03-01

[基金项目] 新疆生产建设兵团科技厅科技合作计划项目 (2022BC006); 新疆生产建设兵团科技厅指导性科技计划项目 (2023ZD040, 2024ZD020)

[作者简介] 蔡 萌 (1999—), 女, 吉林省长春市人, 在读硕士研究生, 主要从事心脑血管疾病基础与临床方面的研究。

[通信作者] 王 洋, 副教授, 硕士研究生导师 (E-mail: wangyang_shz@foxmail.com)

© 《吉林大学学报 (医学版)》编辑部, 开放获取遵循 CC BY-NC-ND 协议。

© Editorial Board of Journal of Jilin University (Medicine Edition). Open access under CC BY-NC-ND license.

Therapeutic effect of prunetin on myocardial infarction model mice and its mechanism

CAI Meng, GUO Yang, MA Yingfang, CUI Jinglei, LUO Jia, WEI Lili, ZHANG Yunhua, WANG Yang
(Key Laboratory of Xinjiang Local and Ethnic High incidence Diseases, Ministry of Education, School of Medicine, Shihezi University, Shihezi 832000, China)

ABSTRACT **Objective:** To discuss the therapeutic effect of prunetin on the mice with myocardial infarction (MI), and to clarify the key targets and molecular mechanism of prunetin in the treatment of MI. **Method:** Ten mice were randomly selected from 50 c57 mice as sham operation group; the other 40 mice were used to establish the MI mouse models by ligating the left anterior descending coronary artery. The 40 successfully modeled mice were randomly divided into model group, low dose of prunetin group ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ prunetin), high dose of prunetin group ($10 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ prunetin), and positive drug group ($2 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ enalapril), with 10 mice in each group. The drugs were administered by intraperitoneal injection once daily for 21 consecutive days. Echocardiography was used to detect the cardiac function indexes of the mice in various groups; enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect the levels of creatine kinase-MB (CK-MB) and cardiac troponin I (cTn-I) in serum of the mice in various groups; HE staining was used to observe the patho morphology of myocardium tissue of the mice in various groups; Masson staining was used to observe the fibrosis of myocardium tissue of the mice in various groups; immunohistochemistry and immunofluorescence methods were used to detect the expression of CD31 and the number of new blood vessels in myocardium tissue at the MI border zone of the mice in various groups. The Pubchem database was used to obtain the structural information of prunetin; the SWISS and QSAR databases were used to obtain the targets of prunetin; the The GeneCards Human Gene Database (GeneCards), Gene Web database (Disgene) and Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM) database were used to obtain the disease targets of MI; the targets of prunetin and the disease targets were intersected to identify common targets. The String database was used to construct the protein-protein interaction (PPI) network diagram. The top-ranked targets were selected for molecular docking with prunetin to analyze the signaling pathways of prunetin in the treatment of MI. **Result:** The echocardiography results showed that compared with sham operation group, the left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (LVFS) of the mice in model group were significantly decreased ($P < 0.001$); compared with model group, the LVEF and LVFS of the mice in low dose and high doses of prunetin groups and enalapril group were significantly increased ($P < 0.05$). The ELISA results showed that compared with sham operation group, the serum levels of CK-MB and cTn-I of the mice in model group were increased ($P < 0.001$); compared with model group, the levels of CK-MB and cTn-I in the serum of the mice in low and high doses of prunetin groups and enalapril group were significantly decreased ($P < 0.01$). The HE staining results showed that in model group, the morphology of myocardial cells was altered, the tissue arrangement was disordered with obvious rupture, and inflammatory cell infiltration was increased; in low dose of prunetin group, the degree of myocardial cell necrosis was alleviated; in high dose of prunetin group, the symptoms of myocardial cell swelling, disordered arrangement, and myofibril rupture were significantly relieved. The Masson staining results showed that in model group, myocardial fibrosis was obvious and the anterior ventricular wall was thinned, while in low dose of prunetin group, the myocardial fibrosis area was reduced, significantly inhibiting the development of fibrosis, and in high dose of prunetin group, the myocardial fibrosis area was significantly decreased, and the scar-like changes caused by fibrosis were alleviated. The immunohistochemistry and immunofluorescence results showed that compared with model

group, the number of new blood vessels in the MI border zone myocardium tissue of the mice in high dose of prunetin treatment group was increased ($P < 0.05$). The network pharmacology results showed that there were 100 compound targets of prunetin, among which 68 were common targets for prunetin-MI. The key genes related to MI included epidermal growth factor receptor (*EGFR*), phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit alpha (*PIK3CA*), and peroxisome proliferator-activated receptor gamma (*PPARG*), etc. The molecular docking analysis results showed that prunetin docked well with the key targets *EGFR* and *PIK3CA*, and had better affinity with *EGFR*. **Conclusion:** Prunetin can promote the angiogenesis of capillaries in the infarct border zone of the MI mouse models to alleviate ischemia-hypoxia injury, thereby alleviating cardiac dysfunction in mice after MI.

KEYWORDS Myocardial infarction; Prunetin; Angiogenesis; Network pharmacology; Molecular docking

目前心血管疾病在全球发病率和致死率仍在逐年上升, 心肌梗死 (myocardial infarction, MI) 是心血管疾病中最常见的死亡原因之一, 占心血管系统疾病发病率的 30%^[1]。目前常见的治疗方案包括冠状动脉介入术和溶栓治疗, 但会对心肌造成二次损伤^[2], 因此寻求更安全有效的治疗方法来减轻心功能损伤是目前亟待解决的问题。目前研究^[3-7]发现: 在 MI 发生时小鼠心脏能建立新生侧支动脉, 表明 MI 发生后会触发自发血管生成反应, 但这种保护性应答不足以恢复心肌的灌注损伤。AGHAJANIAN 等^[8] 研究显示: 低氧环境能刺激人心脏新生侧支形成。干细胞、细胞外泌体和人心包液内蛋白质已被证实可以改善 MI 后心脏功能, 并促进 MI 区域血管新生^[9-12]。丹参内包含多种活性成分可刺激多蛋白靶点, 各个靶点相互作用形成互作网络共同发挥调控作用促进毛细血管的新生^[13]。复方中药养心通脉方和活血益气方及单体活性成分黄芪甲苷等均被证实具有促进心肌缺血组织血管生成的功效^[14-16]。但目前研究的复方中药成分复杂, 药物不良反应大, 治疗周期长。若能寻找到高效单体化合物将有效降低不良反应并提高其利用率。樱黄素属于天然植物激素, 是异黄酮类化合物中的一种, 具有黄酮类化合物的多数药理作用, 包括抗氧化应激、抗炎、抗肥胖、保护软骨和骨诱导效应等^[17-19]。樱黄素既能显著增加大鼠成骨细胞的增殖和分化, 还能与 G 蛋白偶联受体结合, 提高成骨细胞中环磷酸腺苷 (cyclic adenosine monophosphate, cAMP) 的表达水平^[20]。最新研究^[21] 发现: 樱黄素对异丙肾上腺素诱导的心肌损伤有保护作用, 但樱黄素在其他心脏疾病中的心功能改善作用未能完全阐明。本研究利用超声心动图、HE 染色、Masson 染色、免疫组织化学染色法和免疫荧光法等方法结合网络药理学及分子对接探

讨樱黄素能否促进血管生成进而改善心功能, 阐明樱黄素对 MI 的治疗作用及其具体机制, 为 MI 的治疗提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物、主要试剂和仪器 50 只 7 周龄雄性 c57 小鼠, 购自北京斯贝福生物技术有限公司, 动物生产许可证号: SCXK (京) 2024-0001, 小鼠自由进食进水, 12 h 明暗交替环境中适应性饲养 7 d 后用于实验。樱黄素 (纯度 $\geq 97\%$, 批号: B30453) 购自上海源叶生物科技有限公司, 马来酸依那普利片购自扬子江药业集团江苏制药股份有限公司, 酶联免疫吸附试验 (enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA) 试剂盒购自上海江莱生物公司, 大鼠抗小鼠血小板内皮细胞黏附分子-1 抗体购自美国碧迪药敏公司, Masson 改良试剂盒和 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚染液 (4', 6-diamidino-2-phenylindole, DAPI) 购自北京索莱宝有限公司, 异氟烷麻醉剂 (兽医药 153717015) 购自青岛欧博方医药科技有限公司, HE 染色试剂盒购自武汉塞维尔公司。飞依诺多普勒诊断仪 (型号: VINNO6) 购自苏州飞依诺有限公司, 酶标仪 (型号: Multiskan Fc) 和切片机 (型号: HM325) 购自美国赛默飞世尔公司, 荧光显微镜 (型号: ECLIPSE Ci-L plus) 购自日本尼康公司, 精密电子秤量仪 (型号: BSA124S) 购自德国赛多利斯公司, 恒温数显水浴锅 (型号: HH-2) 购自湖南比克曼公司, 朗米尼康 14 带剪持针钳购自上海金钟医疗器械有限公司, 生物安全柜 (型号: HFsafe) 购自美国力康公司, 石蜡包埋机 (型号: EG1160) 购自德国徕卡公司, 小动物麻醉剂挥发罐 (型号: OX143PH) 购自北京英康攀龙医疗设备有限公司。

1.2 小鼠 MI 模型的制备 选用 7 周龄雄性 c57 小

鼠, 50只小鼠中随机选取40只进行造模。打开小动物恒温垫调控温度 37°C , 预热10 min, 另外10只小鼠作为假手术组。各组c57小鼠用1%异氟烷维持麻醉, 麻醉后将小鼠以仰卧位固定于恒温垫上, 手术区域用脱毛膏去除鼠毛, 并用75%乙醇和碘伏消毒。在距胸骨旁皮肤处做斜向左肩长约1 cm纵向切口, 在切口处预留缝合线。止血钳钝性分离小鼠各层组织至肋骨清晰可见, 选择第三肋与第四肋间隙进入, 用止血钳撑开肋间隙, 配合心脏跳动左手轻微挤压使心脏从肋间隙中自然弹出。见左心耳与肺动脉圆锥, 二者之间轻微凹陷处向下1~3 mm后处, 采用6-0带线缝合针在该位置穿过结扎, 确保结扎松紧适宜。随后用止血钳轻轻扩大肋间隙将心脏送回胸腔, 排出空气, 同时快速收紧切口处预留缝合线。手术完成后调整异氟烷浓度至0, 确保体温正常1~3 min小鼠苏醒。假手术组小鼠只在相应位置穿手术线而不结扎, 其余手术流程与造模组小鼠相同。

1.3 实验动物分组和给药 将造模成功的40只小鼠随机分为模型组、低剂量樱黄素组、高剂量樱黄素组和阳性药物组(依那普利组), 每组10只, 从造模成功后次日开始, 低和高剂量樱黄素组小鼠分别腹腔注射5和10 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 樱黄素, 依那普利组小鼠连续3周灌胃给药2 $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 依那普利; 模型组和假手术组小鼠腹腔注射相同剂量的生理盐水, 每日1次, 连续3周。除假手术组外, 其余4组各死亡1只小鼠, 超声实验因模型组和假手术组小鼠各1只低温心率异常故去除, ELISA实验血液标本随机采集每组5只小鼠血液, 免疫荧光实验采集每组6只小鼠心脏, 其余小鼠心脏用于其他实验。

1.4 心脏超声检测各组小鼠心功能指标 各组小鼠仰卧位固定于采集板上进行超声检查, 测定各组小鼠左心室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)和左心室短轴缩短率(left ventricular fractional shortening, LVFS)。

1.5 ELISA实验检测各组小鼠血清中肌酸激酶同工酶(creatine kinase-MB, CK-MB)和心肌肌钙蛋白I(cardiac troponin I, cTn-I)水平 小鼠眼眶采血后将采集的样本放置于室温下2 h, 然后低温高速离心机 4°C 、1 000 g离心20 min后, 取上清液存放于 -80°C 低温冰箱中保存, 用于后续实验。从锡箔袋中取出板条, 设置标准曲线, 加入样本和标准品后 37°C 孵育1 h; 根据说明书依次加入生物

素化抗体、酶结合物工作液和底物。根据试剂盒说明书指定时间进行操作, 加入终止液后立即在波长450 nm处测定各孔的吸光度(A)值。将测得A值代入标准曲线, 计算CK-MB及cTn-I水平。

1.6 石蜡切片制作 小鼠心脏放入4%多聚甲醛中固定12 h。随后梯度脱水, 脱水完成后转移至二甲苯中透明。将脱水透明后的心脏浸蜡。将心脏置于包埋模具内放置于低温平台上凝固, 放于室温保存。将蜡块安装于蜡块槽上, 调整切片厚度为50 μm 开始修片, 直至可见组织停止修片, 然后调整厚度为5 μm , 将切下切片用毛笔展平于水面上, 轻轻捞起, 室温存储。

1.7 HE染色观察各组小鼠心肌组织病理形态表现 将石蜡切片置于烤片架上, 放入 65°C 烘箱内烤片2 h。石蜡切片脱蜡复水后将切片依次置于苏木精染液、盐酸乙醇、自来水、返蓝液、自来水、伊红、自来水。将染色完成的切片进行脱水透明。晾干切片后滴中性树胶, 盖玻片封片, 显微镜观察并采集图像。

1.8 Masson染色观察各组小鼠心肌纤维化情况 将各组小鼠心脏组织石蜡切片于 60°C 烤箱中烤制1 h后, 脱蜡至水, 使用以I号染液对切片进行染色(约1 min), 待核染完成后, 冲洗切片30 s, 洗去I号染液; 然后使用II号染液染色30 s, 冲洗30 s洗去染液; 用III号分色液分色5 min, 最后用R4蓝色染液复染5 min, 使用无水乙醇将切片上多余的染液冲洗干净; 晾干切片后使用中性和树胶封片, 使用光学显微镜观察切片, 并采集图像。

1.9 免疫组织化学染色法检测各组小鼠MI边缘区心肌组织中CD31表达情况 取各组小鼠心肌组织, 常规脱水、包埋和切片、脱蜡、柠檬酸钠抗体修复、封闭, CD31抗体 4°C 过夜孵育。二抗孵育2 h滴加DAB显色剂, 显微镜下观察各组CD31表达情况。

1.10 免疫荧光法检测各组小鼠MI边缘区心肌组织中CD31表达情况 取小鼠心脏组织, 常规脱水、包埋和切片、脱蜡、抗原修复、阻断内源性过氧化氢酶、封闭。封闭结束后, PBS缓冲液冲洗, 滴加CD31抗体放于 4°C 冰箱孵育过夜。次日, PBS缓冲液洗涤后孵育二抗、洗涤后滴加DAPI、最后加抗荧光淬灭封片剂, 盖上盖玻片封片。荧光显微镜观察并采集图像, 在 $400\times$ 放大倍数视野下随机选取梗死边缘区图像。Image J软件进行分析,

绿色荧光为CD31标记的血管, 蓝色荧光为细胞核。在软件中统计绿色荧光数目, 再与心肌面积作比, 以每平方毫米中血管数量反映单位面积内血管数目。

1.11 构建樱黄素与MI韦恩图 利用疾病基因网络数据库 (The GeneCards Human Gene Database, GeneCards, <https://www.genecards.org/>) 搜索关键词“心肌梗死 (myocardial infarction)”获得与之相关的全部疾病靶点。利用有机小分子生物活性数据库 (Public Chemical Database, Pubchem) (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取樱黄素的相关结构信息, 以此为基础采用蛋白质序列数据库 (SWISS-PROT Protein Knowledgebase, SWISS) (<http://swisstargetprediction.ch/>) 和定量构效关系数据库 (Quantitative Structure Activity Relationships, QSAR) 获取樱黄素的靶点。将樱黄素与MI的疾病靶点通过韦恩数据库 (Venn diagram, Venny) (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>) 进行对照, 得到相应的韦恩图, 并下载交集靶点进行下一步分析。

1.12 构建樱黄素-MI-靶点网络图 将筛选出的靶点输入蛋白-蛋白相互作用 (Protein-Protein interaction, PPI) 数据库 String (<https://string-db.org/>), 并绘制PPI网络图, 之后将数据导入Cytoscape 3.9.1软件绘制网络图。其中圆点代表蛋白质, 节点的连接度代表单个蛋白与其他蛋白连接的数量。颜色越深代表相关度越大。

1.13 樱黄素与关键靶点分子对接 Pubchem数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中获取樱黄素3D结构文件, 从蛋白质结构数据库 (Protein Data Bank, PDB) (<http://www.rcsb.org/>) 中选择表皮生长因子受体 (epidermal growth factor receptor, EGFR) 和磷脂酰肌醇-3-激酶催化亚单位 α (phosphatidylinositol-3-kinase catalytic subunit α , PIK3CA) 蛋白结构, 获得受体和配体文件。对蛋白质受体进行修改, 放入Pymol软件中去除水分子、离子和小分子配体, 导入文件进行图片绘制。检测樱黄素与EGFR和PI3CA关键靶点的结合模式及其亲和性。结合系数越低, 小分子与蛋白结合能力和稳定性越好。

1.14 统计学分析 采用Graphpad Prism 9.0.0软件对数据进行统计学分析。各组小鼠心功能指标和MI边缘区新生血管数量均符合正态分布, 以 $\bar{x} \pm s$ 表

示, 多组间样本均数比较采用单因素方差分析, 组间样本均数两两比较采用LSD-*t*检验。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组小鼠LVEF和LVFS 与假手术组比较, 模型组小鼠LVEF和LVFS明显降低 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 低和高剂量樱黄素组及依那普利组小鼠LVEF和LVFS均明显升高 ($P < 0.05$)。见表1。

表1 各组小鼠LVEF和LVFS
Tab.1 LVEF and LVFS of mice in various groups
($\bar{x} \pm s, \eta/\%$)

Group	<i>n</i>	LVEF	LVFS
Sham operation	9	75.76 \pm 3.34	43.72 \pm 3.09
Model	8	36.15 \pm 11.33*	17.47 \pm 5.74*
Low dose of prunetin	8	46.75 \pm 4.26 Δ	23.20 \pm 4.08 Δ
High dose of prunetin	8	52.65 \pm 4.97 Δ	27.32 \pm 3.38 Δ
Enalaprilat	8	59.42 \pm 3.52 Δ	31.10 \pm 2.25 Δ

* $P < 0.001$ vs sham operation group; $\Delta P < 0.05$ vs model group.

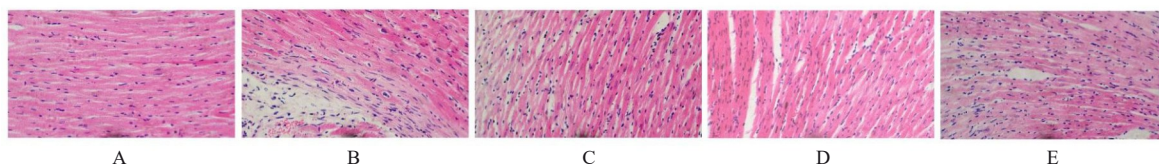
2.2 各组小鼠血清中CK-MB和cTn-I水平 与假手术组比较, 模型组小鼠血清中CK-MB和cTn-I水平明显升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 低和高剂量樱黄素组及依那普利组小鼠血清中CK-MB和cTn-I水平明显降低 ($P < 0.001$)。见表2。

表2 各组小鼠血清中CK-MB和cTn-I水平
Tab.2 Levels of serum CK-MB and cTn-I of in mice in various groups
($n=5, \bar{x} \pm s$)

Group	CK-MB [$\rho_B/(\mu\text{g}\cdot\text{L}^{-1})$]	cTn-I [$\rho_B/(\text{ng}\cdot\text{L}^{-1})$]
Sham operation	4.53 \pm 2.12	33.33 \pm 13.41
Model	23.44 \pm 9.53*	62.42 \pm 7.05*
Low dose of prunetin	7.00 \pm 2.30 Δ	32.46 \pm 14.85 Δ
High dose of prunetin	5.83 \pm 1.38 Δ	28.70 \pm 11.70 Δ
Enalaprilat	6.27 \pm 1.37 Δ	48.83 \pm 11.12 Δ

* $P < 0.001$ vs sham operation group; $\Delta P < 0.001$ vs model group.

2.3 各组小鼠心肌组织病理形态表现 假手术组小鼠心肌纤维形态正常, 排列整齐, 无炎性细胞浸润; 与假手术组比较, 模型组小鼠心肌细胞形态发生改变, 细胞间隙增宽, 排列紊乱, 可见心肌纤维断裂, 炎性细胞浸润; 与模型组比较, 低和高剂量樱黄素组及依那普利组小鼠心肌纤维排列相对规整, 心肌纤维断裂相对较少, 炎性细胞数减少。见图1。



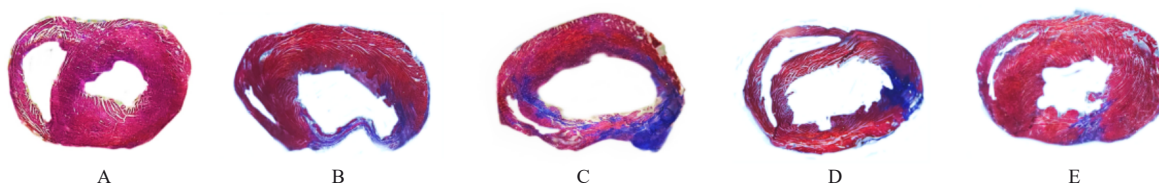
A: Sham operation group; B: Model group; C: Low dose of prunetin group; D: High dose of prunetin group; E: Enalaprilat group.

图1 各组小鼠心肌组织病理形态表现(HE, ×400)

Fig. 1 Pathomorphology of myocardium tissue of mice in various groups(HE, ×400)

2.4 各组小鼠心肌组织纤维化程度 Masson 染色结果显示:与假手术组比较,模型组小鼠心肌纤维化面积明显增大,心室前壁变薄;与模型组比较,低剂量樱黄素组小鼠心肌纤维化面积减小,高剂量樱黄素组小鼠心肌纤维化进程明显得到控制,抑制MI后的纤维化发展。依那普利组小鼠心肌纤维化面积减少但效果不及高剂量樱黄素组。见图2。

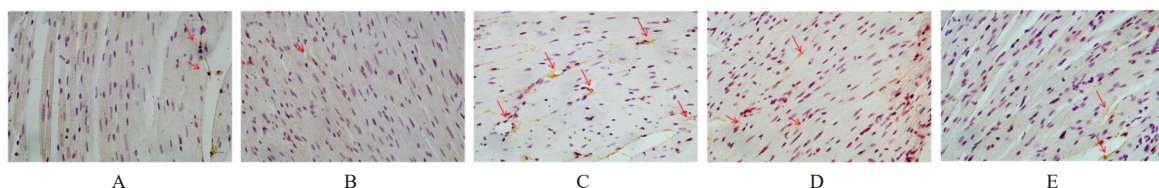
2.5 各组小鼠MI边缘区心肌组织中CD31蛋白表达情况与假手术组比较,模型组小鼠MI边缘区中CD31蛋白表达量无明显变化;与模型组比较,高剂量樱黄素组小鼠MI边缘区心肌组织中CD31蛋白表达量升高,依那普利组小鼠MI边缘区心肌组织中CD31蛋白表达量无明显变化。见图3。



A: Sham operation group; B: Model group; C: Low dose of prunetin group; D: High dose of prunetin group; E: Enalaprilat group.

图2 各组小鼠心肌组织纤维化程度(Masson, ×150)

Fig. 2 Fibrotic degrees of myocardium tissue of mice in various groups (Masson, ×150)



A: Sham operation group; B: Model group; C: Low dose of prunetin group; D: High dose of prunetin group; E: Enalaprilat group.

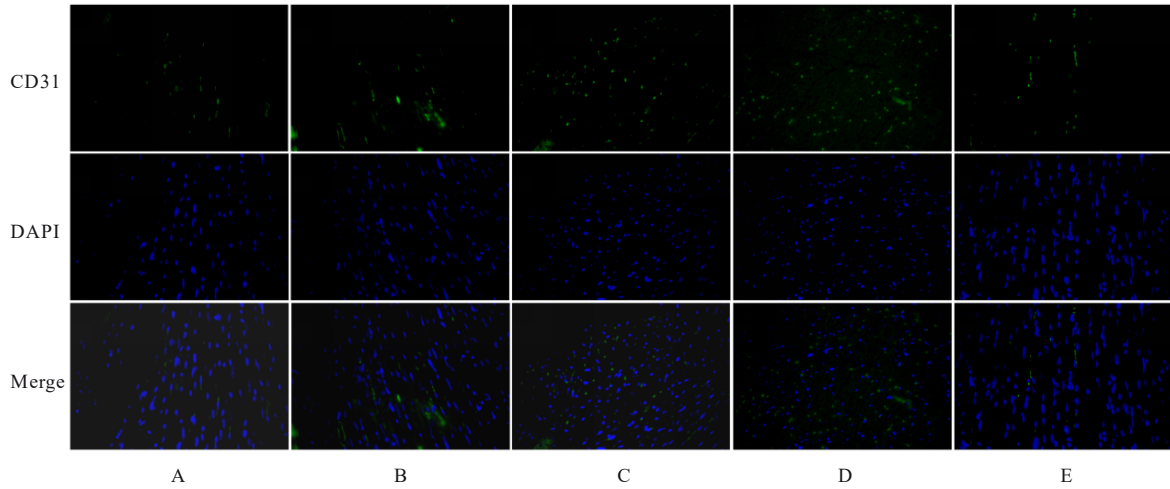
图3 各组小鼠MI边缘区心肌组织中CD31蛋白表达情况(免疫组织化学, ×400)

Fig. 3 Expressions of CD31 protein in myocardium tissue of MI border zone of mice in various groups (Immunohistochemistry, ×400)

2.6 免疫荧光法检测各组小鼠MI边缘区心肌组织中CD31蛋白表达和新生血管数量与假手术组比较,模型组小鼠MI边缘区心肌组织中CD31蛋白表达量无明显改变,新生血管数量差异无统计学意义($P>0.05$);与模型组比较,高剂量樱黄素组小鼠MI边缘区心肌组织中CD31蛋白表达量升高,新生血管数量升高($P<0.05$);依那普利组小鼠MI边缘区心肌组织中CD31蛋白表达量无明显改变,新生血管数量差异无统计学意义($P>0.05$)。见图4和表3。

2.7 樱黄素与MI靶点的韦恩图将樱黄素输入Pubchem数据库中,获取樱黄素的相关结构信息,再将樱黄素的结构信息输入SWISS数据库共检索到100个潜在靶点,以“myocardial infarction”为关键词在GeneCard数据库获取MI疾病靶点,并将物种聚焦于人共获取4 067个疾病靶点,将樱黄素的靶点与疾病的靶点进行匹配整合取得交集,共获取共同靶点68个,构建韦恩图。见图5。

2.8 樱黄素与MI靶点的网络图将樱黄素靶点与MI靶点同时录入STRING数据库,并绘制出PPI



A: Sham operation group; B: Model group; C: Low dose of prunetin group; D: High dose of prunetin group; E: Enalaprilat group.

图4 各组小鼠MI边缘区心肌组织中CD31蛋白表达情况(免疫荧光法, ×400)

Fig. 4 Expressions of CD31 protein in MI marginal zone of mice in various groups (Immunofluorescence, ×400)

表3 各组小鼠MI边缘区新生血管数量

Tab. 3 Number of new vessels in MI marginal zone of mice in various groups (n=6, $\bar{x} \pm s$)

Group	Number of new vessels
Sham operation	12.24 ± 5.62
Model	10.67 ± 3.74
Low dose of prunetin	18.22 ± 5.26
High dose of prunetin	22.06 ± 8.65*
Enalaprilat	12.11 ± 6.50

*P < 0.05 vs model group.

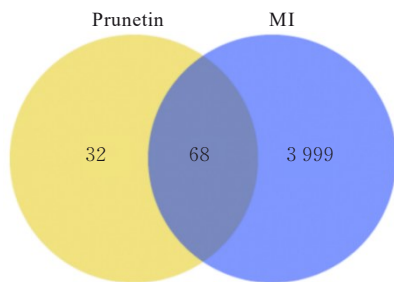


图5 樱黄素与MI的靶点交集图

Fig. 5 Intersection diagram of target points of prunetin and MI

网络图 (图6A), 再将其导入 Cytoscape 软件依据得到的樱黄素-MI 靶点数据绘制樱黄素与MI靶点互作图 (图6B), 结果显示: EGFR、肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)、过氧化物酶体增殖激活受体 γ (peroxisome proliferative activated receptor γ , PPAR γ) 和 PIK3CA 等在靶蛋白间具有较高的相关度。在上述蛋白中, EGFR 和

PIK3CA 在磷脂酰肌醇 3-激酶 (phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K) /蛋白激酶 B (protein kinase B, AKT) 信号通路中对细胞增殖迁移以及血管生成起到关键作用。

2.9 樱黄素与 EGFR 和 PIK3CA 的分子对接 为了预测樱黄素与关键靶点 EGFR 和 PIK3CA 之间的亲和性, 通过分子对接检测樱黄素与上述 2 个关键靶点的结合系数。樱黄素与 EGFR 的对接分数为 $-6.58 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 樱黄素与 PIK3CA 的对接分数为 $-6.25 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 樱黄素与 EGFR 对接分数更为良好, 提示樱黄素与 EGFR 亲和性高。利用 Pymol 3.0 软件基于对接结果进行可视化处理, 采用 3D 效果图展示 (图7), 结果显示: 樱黄素与二者均具有较高亲和力, 提示樱黄素可能通过 EGFR 调控 PI3K/AKT 信号通路。

3 讨论

MI 发生后心肌组织因缺血缺氧导致心肌细胞损伤坏死。虽然近些年对 MI 的治疗取得了巨大进展, 但仅暂时减轻了损伤。继发的心力衰竭、心肌肥大、缺血再灌注损伤和冠状动脉狭窄对患者生存时间和生存质量有巨大影响, 因此需要开发其他安全有效的新型治疗药物来解决目前的问题。樱黄素能有效改善异丙肾肾上腺素造成的心脏毒性损伤, 并激活下游丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 信号通路, 促进核因子 E2 相关因子 2 (nuclear factor erythroid 2-related factor 2, Nrf2) 激活多巴胺受体 D2 (dopamine receptor D2,

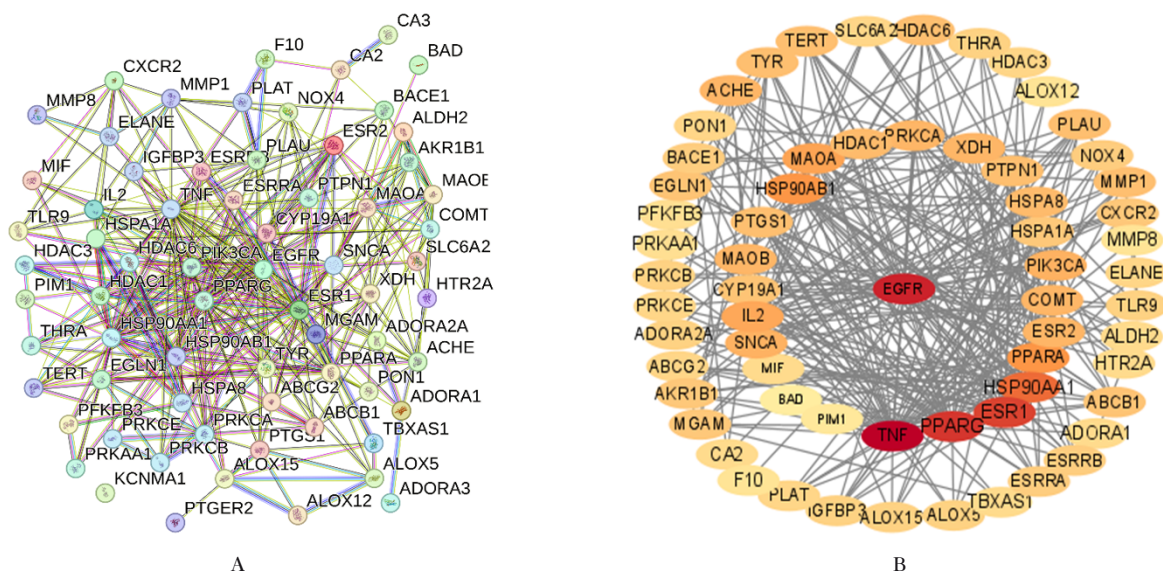


图6 樱黄素与MI的PPI网络图(A)和靶点网络(B)

Fig. 6 PPI network diagram(A) and target network (B) of prunetin and MI

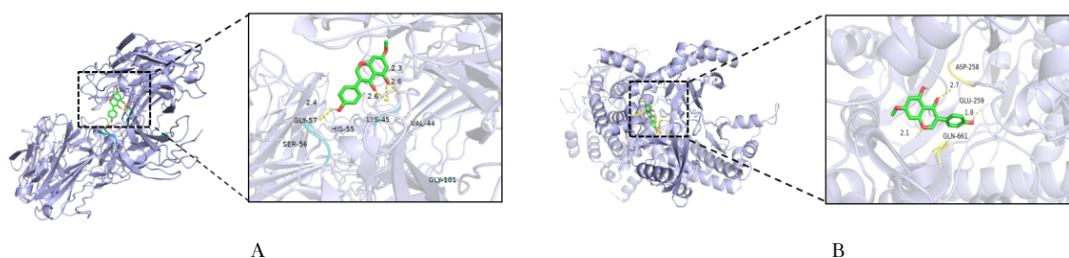


图7 樱黄素与EGFR(A)和PIK3CA(B)分子对接图

Fig. 7 Molecule docking diagram of prunetin with EGFR(A) and prunetin with PIK3CA(B)

DRD2) 以减轻炎症反应等^[22]。樱黄素对心脏功能有积极的作用,但在MI方面的相关研究较少,因此探究樱黄素对MI的治疗作用和具体机制具有重要意义。

为了证实樱黄素对MI的具有保护作用,本研究通过建立小鼠急性MI模型来模拟人心血管狭窄造成的急性MI,结果显示:造模21 d后小鼠心功能明显衰退,而樱黄素干预显著改善其心功能。心肌损伤相关酶CK-MB和cTn-I水平在MI后明显升高,低和高剂量樱黄素组小鼠血清中CK-MB和cTn-I水平明显降低。HE和Masson染色结果显示:樱黄素可改善MI后小鼠心肌缺血状况,并可减轻心肌细胞损伤。免疫组织化学染色法和免疫荧光法检测结果显示:与模型组比较,小鼠MI边缘区CD31蛋白表达量升高,小鼠心肌组织中新生血管数量升高。

网络药理学核心靶点富集分析结果显示:

EGFR明显富集,既往研究表明多种血管生成生长因子通过EGFR信号调节上调而增加,包括血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)和碱性成纤维细胞生长因子(basic fibroblast growth factor, bFGF)。进一步检测EGFR与樱黄素分子对接情况,结果显示:二者对接良好,表明樱黄素与关键靶点具有高亲和力,预测其通过EGFR蛋白调控下游PI3K。EGFR通过与配体结合并形成同源或异源二聚体来激活PI3K信号转导。PI3K参与多种生理过程,是血管生成的重要信号蛋白,能调控细胞的存活、转移与新陈代谢,并且在血管生成与炎症因子的募集过程中发挥作用。PI3K磷酸化磷脂酰肌醇二磷酸[phosphatidylinositol (4, 5) bisphosphate, PIP₂]以产生三磷酸磷脂酰肌醇[phosphatidylinositol (3, 4, 5)-trisphosphate, PIP₃],然后PIP₃募集下游信号蛋白蛋白激酶B(protein kinase B,

AKT)。激活的AKT能磷酸化许多底物,哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)是AKT最常见的下游效应因子之一^[23-25]。根据网络药理学与分子对接检测樱黄素能够与EGFR结合,推测其通过激活下游PI3K/AKT信号通路促进MI后小鼠血管再生,改善小鼠心功能^[26-27]。

综上所述,樱黄素可减轻小鼠心肌损伤,改善心功能,并且观察到新生血管数量升高。樱黄素与EGFR亲和力高,稳定性良好。樱黄素通过刺激EGFR,激活EGFR信号轴,引发PI3K/AKT信号通路磷酸化水平上调,促进DNA合成转录,从而促进血管生成作用并减轻MI损伤,改善心功能。

利益冲突声明:

所有作者声明不存在利益冲突。

作者贡献声明:

蔡萌参与实验方案设计、实验操作和论文撰写,郭杨、马莹芳、崔静蕾和罗佳参与组织取材及数据分析,魏丽丽、张云华和王洋参与实验设计指导及论文审校。

[参考文献]

- [1] O'DONNELL A, YUTZEY K E. Mechanisms of heart valve development and disease[J]. *Development*, 2020, 147(13): dev183020.
- [2] SU M X, CUI J M, ZHAO J, et al. Skimmin ameliorates cardiac function *via* the regulation of M2 macrophages in a myocardial infarction mouse model[J]. *Perfusion*, 2023, 38(6): 1298-1307.
- [3] ZHANG H, FABER J E. De-novo collateral formation following acute myocardial infarction: Dependence on CCR2⁺ bone marrow cells[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2015, 87: 4-16.
- [4] ZHANG H, PRABHAKAR P, SEALOCK R, et al. Wide genetic variation in the native pial collateral circulation is a major determinant of variation in severity of stroke[J]. *J Cereb Blood Flow Metab*, 2010, 30(5): 923-934.
- [5] 张 淳, 湛 疆. 敲除组蛋白脱乙酰酶6对心肌缺血再灌注损伤小鼠心脏功能的保护作用[J]. *郑州大学学报(医学版)*, 2025, 60(6): 785-788.
- [6] GOUIN K H 3rd, HELLSTROM S K, CLEGG L E, et al. Arterialized collateral capillaries progress from nonreactive to capable of increasing perfusion in an ischemic arteriolar tree[J]. *Microcirculation*, 2018, 25(3): e12438.
- [7] BRITTEN M B, ABOLMAALI N D, ASSMUS B, et al. Infarct remodeling after intracoronary progenitor cell treatment in patients with acute myocardial infarction (TOPCARE-AMI): mechanistic insights from serial contrast-enhanced magnetic resonance imaging [J]. *Circulation*, 2003, 108(18): 2212-2218.
- [8] AGHAJANIAN A, ZHANG H, BUCKLEY B K, et al. Decreased inspired oxygen stimulates *de novo* formation of coronary collaterals in adult heart [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2021, 150: 1-11.
- [9] WANG N, CHEN C Y, YANG D Z, et al. Mesenchymal stem cells-derived extracellular vesicles, via miR-210, improve infarcted cardiac function by promotion of angiogenesis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2017, 1863(8): 2085-2092.
- [10] NASSER M I, MASOOD M, ADLAT S, et al. Mesenchymal stem cell-derived exosome microRNA as therapy for cardiac ischemic injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 143: 112118.
- [11] GALLET R, DAWKINS J, VALLE J, et al. Exosomes secreted by cardiosphere-derived cells reduce scarring, attenuate adverse remodelling, and improve function in acute and chronic porcine myocardial infarction[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(3): 201-211.
- [12] KERVADEC A, BELLAMY V, HARANE N E L, et al. Cardiovascular progenitor-derived extracellular vesicles recapitulate the beneficial effects of their parent cells in the treatment of chronic heart failure[J]. *J Heart Lung Transplant*, 2016, 35(6): 795-807.
- [13] JUN P, RAHMAT E, HAN C H, et al. Traditional Chinese medicine and traditional Indonesian medicine: a comparative review of herbal medicines restricted in pregnancy[J]. *Chin J Integr Med*, 2021, 27(10): 794-800.
- [14] 杨清华, 王庆高, 潘朝锌, 等. 养心通脉方促心肌梗死后大鼠缺血心肌血管生成作用及对VEGF、bFGFmRNA表达的影响 [J]. *实用中医内科杂志*, 2019, 33(12): 70-72.
- [15] 程嵩奕. 黄芪甲苷调控PTEN/PI3K/Akt信号通路介导心肌梗死后血管新生与心肌保护的实验研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2018.
- [16] 陈岩岩. 从“心主血脉”思想探讨益气通阳逐瘀生新法组方促心肌缺血再灌注大鼠血管新生机理[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2021.
- [17] LIU R, MENG F, BAI H, et al. Inhibitory effect of quercetin, rutin and puerarin on LDL oxidation induced by Cu²⁺ [J]. *Zhongguo Zhong Yao Za Zhi*, 2007, 32(19): 2058-2062.
- [18] AHN T G, YANG G, LEE H M, et al. Molecular

- mechanisms underlying the anti-obesity potential of prunetin, an O-methylated isoflavone [J]. *Biochem Pharmacol*, 2013, 85(10): 1525-1533.
- [19] WONG S L, CHANG H S, WANG G J, et al. Secondary metabolites from the roots of *Neolitsea daibuensis* and their anti-inflammatory activity[J]. *J Nat Prod*, 2011, 74(12): 2489-2496.
- [20] KHAN K, PAL S, YADAV M, et al. Prunetin signals *via* G-protein-coupled receptor, GPR30(GPER1): Stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated activation of MAPK signaling induces Runx2 expression in osteoblasts to promote bone regeneration [J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(12): 1491-1501.
- [21] LIU R, HUSSAIN S, MADDU N, et al. Protective effect of prunetin on isoproterenol-induced myocardial infarction in wistar rats *via* biochemical characterization [J]. *Comb Chem High Throughput Screen*, 2025, 28(7):1170-1180.
- [22] HAN J X, ZHENG S T, JIN J, et al. Polydopamine-loaded prunetin nanomaterials activate DRD2 to reduce UV-induced inflammation by stabilizing and promoting Nrf2 nuclear translocation [J]. *Acta Biomater*, 2023, 169: 556-565.
- [23] MIRZA-AGHAZADEH-ATTARI M, EKRAMI E M, MOUSAVI AGHDAS S A L I, et al. Targeting PI3K/Akt/mTOR signaling pathway by polyphenols: Implication for cancer therapy[J]. *Life Sci*, 2020, 255: 117481.
- [24] BURKE J E, TRISCOTT J, EMERLING B M, et al. Beyond PI3Ks: targeting phosphoinositide kinases in disease[J]. *Nat Rev Drug Discov*, 2023, 22(5): 357-386.
- [25] 王鑫宇, 刘 滢, 隋 昕, 等. 短期饮食限制对小鼠肝脏胰岛素信号通路及线粒体的影响[J]. *中国兽医学报*, 2024, 44(4): 719-727.
- [26] YAN C P, WANG X Z, WANG Q, et al. A novel conductive polypyrrole-chitosan hydrogel containing human endometrial mesenchymal stem cell-derived exosomes facilitated sustained release for cardiac repair[J]. *Adv Healthc Mater*, 2024, 13(10): e2304207.
- [27] 毛丽斯, 朱晓红. 网络药理学在中药领域的应用进展[J]. *中医药管理杂志*, 2021, 29(13): 98-102.