

白茅根提取物对多柔比星致心肌损伤的改善作用及分子机制^Δ

罗欢^{1*}, 王强², 朱佑君¹, 陶春容¹, 毛杨³, 李德峰^{3#} (1. 陆军军医大学第二附属医院心内科, 重庆 400037; 2. 陆军军医大学第二附属医院药剂科, 重庆 400037; 3. 陆军军医大学第二附属医院临床医学研究中心, 重庆 400037)

中图分类号 R965 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2026)12-1559-08
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2026.12.07



摘要 **目的** 探究白茅根(RI)提取物对多柔比星(DOX)致心肌损伤的改善作用及潜在分子机制。**方法** 借助网络药理学方法, 筛选RI活性成分的预测核心靶点与心肌损伤相关靶点的交集靶点, 并进行基因本体、京都基因和基因组数据库富集分析。基于网络药理学结果, 以雄性C57BL/6J小鼠为对象, 构建DOX诱导的心肌损伤小鼠模型, 观察RI提取物[1 g/(kg·d)]对小鼠生存率、体重、心脏损伤的影响; 以小鼠心肌细胞HL-1为对象, 构建DOX诱导的心肌细胞损伤模型, 观察不同质量浓度RI提取物(50、100、200 μg/mL)对线粒体膜电位、三磷酸腺苷(ATP)生成、活性氧(ROS)产生、细胞凋亡及相关靶蛋白表达的影响; 并通过转染雌激素受体1(ESR1)小干扰RNA(siRNA)进行初步机制验证。**结果** 共筛选出交集靶点58个, 富集于激素反应、缺氧反应等生物学过程, 以及细胞凋亡、三羧酸循环和丙酮酸代谢等通路; 同时, 筛选出ESR1等关键靶蛋白。动物实验证实, DOX+RI组小鼠的生存率明显高于DOX组, 体重下降速度较缓, 心脏挛缩和炎症细胞浸润等病理改变均较DOX组有所改善。细胞实验证实, 与DOX组比较, DOX+RI各质量浓度组细胞的线粒体膜电位, 相对ATP水平, 异柠檬酸脱氢酶3A(IDH3A)、琥珀酸脱氢酶A(SDHA)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ共激活因子1α(PGC-1α) mRNA的表达, ESR1 mRNA及蛋白的表达均显著升高或上调, 相对ROS水平和凋亡率均显著降低($P<0.05$); 敲减ESR1后, RI提取物抗心肌细胞凋亡的作用被显著减弱($P<0.05$)。**结论** RI提取物可能通过激活ESR1信号通路、改善线粒体功能、抑制ROS过量生成和心肌细胞凋亡来缓解DOX诱导的心肌损伤。

关键词 白茅根; 提取物; 多柔比星; 心肌损伤; 线粒体功能; 雌激素受体α; 网络药理学

Ameliorative effects of Imperatae Rhizoma extract against doxorubicin-induced myocardial injury and its molecular mechanisms

LUO Huan¹, WANG Qiang², ZHU Youjun¹, TAO Chunrong¹, MAO Yang³, LI Defeng³ (1. Dept. of Cardiology, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China; 2. Dept. of Pharmacy, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China; 3. Clinical Medical Research Center, the Second Affiliated Hospital of Army Medical University, Chongqing 400037, China)

ABSTRACT **OBJECTIVE** To investigate the ameliorative effects of Imperatae Rhizoma (RI) extract against doxorubicin (DOX)-induced myocardial injury and its potential molecular mechanisms. **METHODS** Network pharmacology was employed to screen for target overlap between the predicted core targets of RI's active components and targets associated with myocardial injury, followed by gene ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) enrichment analyses. Based on the network pharmacology results, a DOX-induced myocardial injury mouse model was established using male C57BL/6J mice to observe the effects of RI extract [1 g/(kg·d)] on the survival rate, body weight, and cardiac damage. A DOX-injured HL-1 cardiomyocyte model was established to assess the effects of different mass concentrations of RI extract (50, 100, 200 μg/mL) on mitochondrial membrane potential, adenosine triphosphate (ATP) production, reactive oxygen species (ROS) generation, apoptosis, and expression of the relevant target proteins. The mechanism was validated by transfecting with small interfering RNA of estrogen receptor 1 (ESR1). **RESULTS** A total of 58 overlapping targets were screened, which were enriched in biological processes such as hormone response and hypoxia response, as well as pathways including apoptosis, tricarboxylic acid cycle, and pyruvate metabolism. Key target proteins, such as ESR1, were also identified. Animal experiments confirmed that the survival rate of mice in the DOX+RI group was obviously higher than that in the DOX group, with a slower rate of weight loss and improved pathological changes, such as cardiac atrophy and inflammatory cell infiltration, compared to the DOX group. Cell experiments showed that, compared with the DOX group, the DOX+RI groups exhibited significantly increased or upregulated mitochondrial membrane potential, relative ATP

Δ 基金项目 重庆市卫生健康委重点药品战略腹地建设项目

* 第一作者 护师。研究方向: 心肌保护。E-mail: 494941588@qq.com

通信作者 主管技师, 硕士。研究方向: 基础药理学。E-mail: Ldf2014@tmmu.edu.cn

levels, and mRNA expressions of isocitrate dehydrogenase 3A (IDH3A), succinate dehydrogenase A (SDHA) and peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α), as well as mRNA and protein expressions of ESR1; conversely, relative ROS levels and apoptosis rates were significantly reduced ($P<0.05$). Following *ESR1* knockdown, the anti-apoptotic effect of the RI extract on cardiomyocytes was significantly attenuated ($P<0.05$). **CONCLUSIONS** The RI extract may alleviate DOX-induced myocardial injury by activating the ESR1 signaling pathway, improving mitochondrial function, and inhibiting excessive ROS production and cardiomyocyte apoptosis.

KEYWORDS Imperatae Rhizoma; extract; doxorubicin; myocardial injury; mitochondrial function; estrogen receptor 1; network pharmacology

多柔比星(doxorubicin, DOX)是一种临床常用的蒽环类化疗药物,虽在多种恶性肿瘤的治疗中具有显著效果,但剂量相关性心脏毒性严重限制了该药的临床使用^[1]。研究表明,DOX可通过损伤线粒体功能、促进心肌细胞凋亡、增强氧化应激、激活炎症反应等多种途径导致心肌损伤^[2-3]。尽管相关分子机制已被广泛研究,但目前能够用于有效预防或逆转DOX致心肌损伤的药物有限且针对性较弱。因此,开发安全、有效且能够改善DOX致心肌损伤的新型干预策略具有重要的临床意义。

白茅根(Imperatae Rhizoma, RI)是中医常用药材,具有清热利尿、凉血解毒等功效^[4]。现代药理学研究指出,RI含有黄酮类、酚类、有机酸、甾醇及多糖等多种活性成分,如5-甲氧基黄酮、 β -谷甾醇、2-甲氧基-4-乙基苯酚等^[5]。已有研究提示,RI的主要活性成分具有抗氧化、抗炎及调节能量代谢等作用^[6-7];同时,有研究证实,RI提取物能通过激活沉默信息调节因子1(sirtuin 1, SIRT1)通路来改善心力衰竭大鼠的心肌纤维化及心功能^[8],这为RI用于缓解DOX心脏毒性奠定了理论基础。

鉴于RI含有多种结构及功能各异的活性成分,其作用机制具有典型的“多成分-多靶点-多通路”特征,仅通过传统实验难以全面解析^[4]。随着网络药理学、系统生物学和大数据分析的发展,上述方法已成为揭示中药复方及单味药作用机制的重要工具^[9]。其中,网络药理学能够整合化合物靶点、疾病相关基因与信号通路,预测关键靶点并构建“药物-靶点-通路”网络,已成为系统揭示中药作用机制的有效工具,在心血管药物研究中得以广泛应用^[10-11]。基于此,本研究拟采用网络药理学结合体内外实验验证的综合策略,系统筛选RI改善DOX致心肌损伤的潜在作用靶点;并基于网络药理学富集分析结果,重点验证RI提取物改善心肌细胞线粒体功能、缓解DOX诱导心肌损伤的潜在机制,以期为其心脏保护作用提供药理学证据。

1 材料

1.1 主要仪器

本研究所用主要仪器包括Spectramax M3型酶标仪(美国Molecular Devices公司)、ABI 7500型实时荧光定量聚合酶链式反应(PCR)仪(美国Applied Biosystems公司)、Accuri C6型流式细胞仪(美国BD公司)、BX53型

正置显微镜(日本Olympus公司)、Mini-PROTEAN[®] Tetra垂直电泳系统(美国Bio-Rad公司)、FluoChem HD2型凝胶成像系统(美国ProteinSimple公司)、Forma[™] II系列水套式CO₂型培养箱(美国Thermo Fisher Scientific公司)等。

1.2 主要药品与试剂

RI提取物(水提物,每1 g提取物相当于10 g RI生品,批号B16026)购自北京普西唐生物科技有限公司;DOX(原料药,批号D396221,纯度 $\geq 97\%$)购自上海阿拉丁生化科技股份有限公司;MEM培养基、胎牛血清(fetal bovine serum, FBS)(批号分别为E600102、E510008)均购自生工生物工程(上海)股份有限公司;兔抗雌激素受体1(estrogen receptor 1, ESR1)抗体、鼠抗 β -肌动蛋白(β -actin)抗体(批号分别为21244-1-AP、66009-1-Ig)均购自武汉三鹰生物技术有限公司;TRIzol试剂, RIPA裂解液, BCA蛋白定量试剂盒, 4', 6-二脒基-2-苯基吲哚(DAPI)染色液, 辣根过氧化物酶(HRP)标记的羊抗兔、羊抗鼠免疫球蛋白G(IgG)二抗, 腺苷三磷酸(adenosine triphosphate, ATP)检测试剂盒, JC-1线粒体膜电位检测试剂盒, 2', 7'-二氯荧光素二乙酸酯(DCFH-DA)荧光探针活性氧(reactive oxygen species, ROS)检测试剂盒(批号分别为R0016、P0013B、P0012、C1006、A0208、A0216、S0026、C2003S、S0036)均购自上海碧云天生物技术有限公司;逆转录试剂盒、SYBR Green PCR Mix试剂(批号分别为RK20400、RK21203)均购自武汉爱博泰克生物技术有限公司;CCK-8细胞活力检测试剂盒(批号HY-K0301)购自美国MedChemExpress公司;Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒(批号MA0220)购自大连美仑生物技术有限公司;Lipo3000转染试剂(批号L3000015)购自美国Thermo Fisher Scientific公司;PCR引物、ESR1干扰小RNA(small interfering RNA, siRNA)均由北京擎科生物股份有限公司设计、合成。

1.3 动物与细胞

本研究所用动物为8~10周龄的雄性C57BL/6J小鼠,共32只,购自陆军军医大学,动物生产许可证号为SCXK(渝)2022-0011。所有动物均在该校动物实验中心SPF条件(温度22~24℃,相对湿度40%~60%,每

12 h光照/黑暗循环)下饲养,自由摄食、饮水。本研究涉及的所有动物实验均符合动物伦理学操作要求,并经该校动物伦理委员会批准(批准号AMUWEC20255460)。

小鼠HL-1心肌细胞(批号JLSW0030)购自北京晶莱华科生物技术有限公司。

2 方法与结果

2.1 基于网络药理学的RI抗DOX致心肌损伤靶点筛选与富集分析

2.1.1 RI活性成分、核心靶点筛选及富集分析

以“白茅根”(对应本研究所用RI提取物的生药来源)为检索词,以口服生物利用度 $\geq 30\%$ 且药物相似性 ≥ 0.18 为标准^[12],在TCMSP数据库中筛选RI的活性成分。结果显示,共筛选到24种活性成分,包括4-甲氧基-2-甲基苯酚、6-甲氧基黄酮和 β -谷甾醇等。基于上述获得的24种活性成分,系统检索TCMSP、SwissTarget-Prediction、PharmMapper数据库,经去重、整合后,共得到RI活性成分的预测核心靶点210个。

将上述活性成分和预测核心靶点导入CytoScape 3.10.4软件,构建“成分-靶点-通路”网络,以可视化展示RI多成分、多靶点的相互作用关系(限于篇幅,具体图示可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图1)。利用R 4.2.1软件的“cluster profiler”包,对210个预测核心靶点进行基因本体(gene ontology, GO)、京都基因和基因组数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)富集分析(物种设为“Homo sapiens”,以 $P < 0.05$ 为标准)。结果显示,共富集到GO条目1 705个;上述靶点主要富集于氨基酸代谢和膜电位调节等生物学过程(biological process, BP),膜筏、离子通道复合物和线粒体基质等细胞成分(cellular component, CC),以及神经递质受体活性和维生素结合等分子功能(molecular function, MF)。共富集到KEGG通路57条;上述靶点主要富集于三羧酸循环、细胞凋亡、白细胞介素17(interleukin-17, IL-17)信号通路。此外,草酸、D-酒石酸、 β -谷甾醇、6-甲氧基黄酮和L-苹果酸富含大量靶点,是RI的高丰度活性成分(限于篇幅,具体图示可扫描本文首页二维码查看“增强出版”板块中的附图2)。

2.1.2 RI与心肌损伤的关键靶点预测及相关网络构建

为进一步明确RI与心肌损伤的关系,本研究通过检索GeneCards数据库,获得心肌损伤相关靶点1 189个。利用维恩图工具筛选RI预测核心靶点与心肌损伤相关靶点的交集,共获得潜在关键靶点58个。同法对这58个关键靶点进行GO、KEGG富集分析,结果显示,上述靶点主要参与激素反应、缺氧反应等与心肌损伤高度相关的BP(图1A);主要富集于细胞凋亡、三羧酸循环和丙酮酸代谢等通路(图1B)。基于上述58个关键靶点,进一步通过STRING数据库构建蛋白-蛋白相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络,并依据STRING评分筛选出排名前10位的关键靶蛋白,如ESR1等(图1C)。

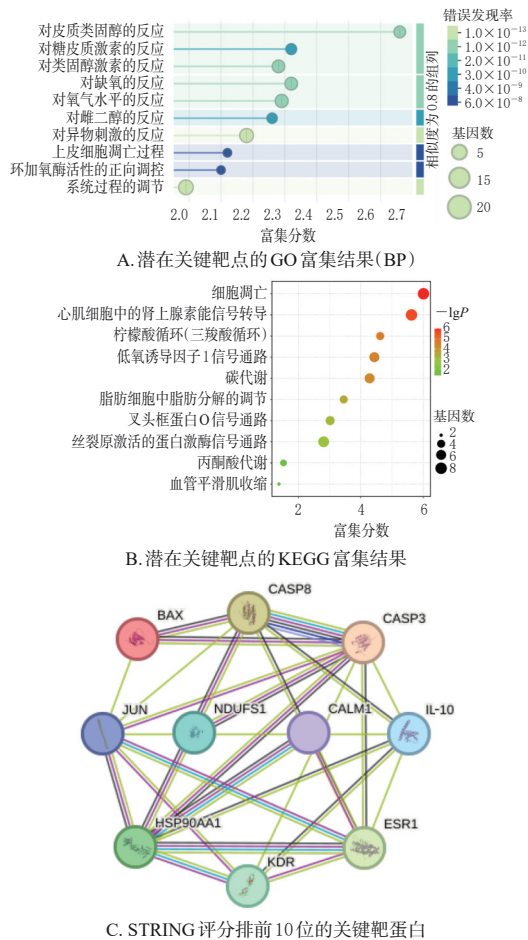


图1 RI与心肌损伤相关的关键靶点预测及PPI网络分析结果

2.2 RI提取物抗DOX致心肌损伤的体内效果验证

2.2.1 造模、分组与给药

将小鼠随机分为对照组(生理盐水)、RI组(单独给予RI提取物)、DOX组(单次腹腔注射DOX)、DOX+RI组(DOX注射后给予RI提取物干预),每组8只。其中,DOX组和DOX+RI组小鼠以单次腹腔注射DOX(15 mg/kg)的方法构建心脏毒性模型^[13]。于DOX注射后第1天起,RI组和DOX+RI组小鼠灌胃RI提取物(以生理盐水为溶剂)1 g/(kg·d)^[6],对照组和DOX组灌胃等体积生理盐水,每天1次,连续7 d。

2.2.2 小鼠生存情况及体重变化观察

实验期间,于每天上午9:00—10:00观察各组小鼠的生存情况并记录其体重。结果显示,DOX组小鼠在实验过程中的生存率逐渐下降,其第5天的死亡率达到40%;而RI组小鼠在实验期间全部存活,生存率为100%;截至第7天实验结束,DOX+RI组小鼠的生存率明显高于DOX组(图2A)。同时,DOX组小鼠体重自给药后逐渐下降,而DOX+RI组的体重下降速度较缓,整体较为稳定,与生存率比较结果相吻合(图2B,体重百分比=某天的体重/实验第1天该小鼠的体重 $\times 100\%$)。

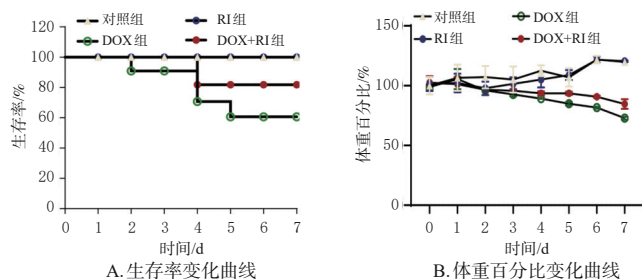


图2 各组小鼠生存率及体重的变化情况比较

2.2.3 心脏组织病理学分析

于末次给药后,将各组小鼠以异氟烷麻醉后处死,采集其血液及主要脏器(心脏、肝脏、脾脏、肺脏、肾脏)用于后续实验分析。取各组小鼠心脏组织,观察其外观,结果(图3)显示,与对照组比较,DOX组小鼠的心脏体积挛缩,RI组小鼠的心脏体积变化不大;经RI提取物干预后,DOX+RI组小鼠心脏挛缩现象有所改善。

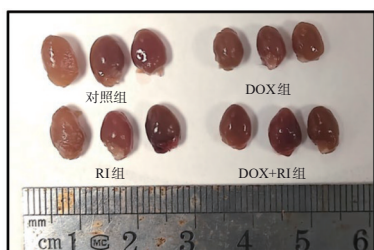
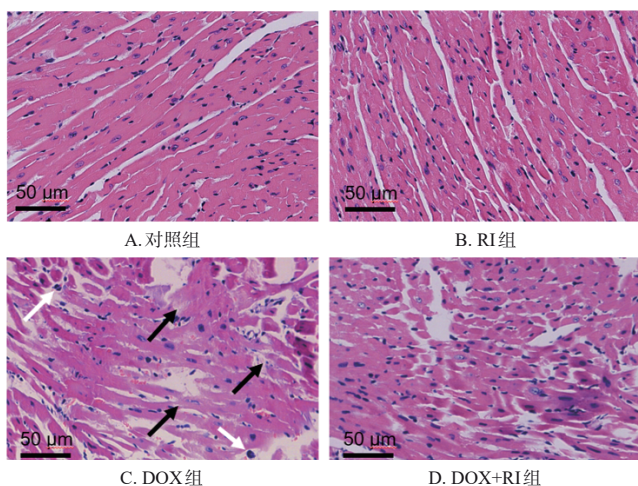


图3 各组小鼠心脏外观的观察图

将各组小鼠心脏组织置于4%多聚甲醛溶液中,于4℃下固定过夜;取出组织,经梯度乙醇脱水、二甲苯透明后进行石蜡包埋,并连续切片(厚度约4 μm);取切片,经脱蜡复水后,进行常规苏木精-伊红(HE)染色,使用显微镜观察各组大鼠的心肌纤维排列、结构完整性及炎症细胞浸润等病理学特征。结果(图4)显示,对照组和RI组小鼠的心肌纤维排列整齐,结构完整;而DOX组小鼠的心肌纤维呈明显断裂、紊乱并伴有炎症细胞浸润;经RI提取物干预后,DOX+RI组小鼠上述病理学改变均明显改善,组织损伤程度明显减轻。



黑色箭头:心肌纤维断裂、紊乱;白色箭头:炎症细胞浸润。

图4 各组小鼠心脏组织病理学观察的显微图(HE染色)

2.3 RI提取物抗DOX心肌损伤的体外机制验证

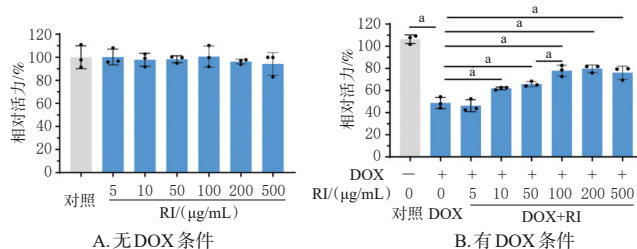
2.3.1 细胞培养

取小鼠心肌细胞 HL-1,接种于含 10%FBS、100 U/mL 青霉素-链霉素的 MEM 培养基中,于 37℃、5%CO₂条件下常规培养。

2.3.2 RI提取物作用浓度筛选

取处于对数生长期的 HL-1 细胞,将其分为对照组和不同质量浓度 RI 组(5、10、50、100、200、500 μg/mL RI 提取物),并设置不含细胞、不含药物的空白组,每组设置 3 个复孔。不同质量浓度 RI 组细胞经相应浓度的 RI 提取物处理 24 h 后,加入 CCK-8 试剂 10 μL,于 37℃下孵育 2 h 后,使用酶标仪于 450 nm 波长处检测各孔的光密度(OD)值,并计算细胞相对活力[相对活力=(实验组 OD 值-空白组 OD 值)/(对照组 OD 值-空白组 OD 值)×100%]。另取处于对数生长期的 HL-1 细胞,随机分为对照组、DOX 组和 DOX+不同质量浓度 RI 组(5、10、50、100、200、500 μg/mL RI 提取物),并设置不含细胞、不含药物的空白组,每组设置 3 个复孔。除对照组外,其余各组细胞均以 1 μmol/L 的 DOX 处理 24 h 构建心肌细胞损伤模型^[13];随后,DOX+不同质量浓度 RI 组细胞经相应浓度的 RI 提取物处理 24 h 后,同法检测各组细胞的相对活力。采用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行统计分析;数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较采用 LSD-*t* 检验;检验水准 $\alpha=0.05$ (统计学方法下同)。

结果(图5)显示,在无 DOX 的条件下,不同质量浓度 RI 提取物(5~500 μg/mL)对细胞的相对活力均无显著影响($P>0.05$)。在 DOX 诱导的心肌细胞损伤模型中,与对照组比较,DOX 组细胞的相对活力显著降低($P<0.05$);与 DOX 组比较,各质量浓度 RI 提取物(10、50、100、200、500 μg/mL)均能显著逆转细胞相对活力活性的下降($P<0.05$)。进一步的组间比较分析发现,DOX+100 μg/mL RI 组细胞的相对活力显著高于 DOX+50 μg/mL RI 组($P<0.05$);但当 RI 提取物质量浓度继续增加至 200、500 μg/mL 时,细胞相对活力并未随之增加,其与 DOX+100 μg/mL RI 组比较的差异均无统计学意义($P>0.05$)。根据上述结果,选取 50、100、200 μg/mL 作为后续研究中 RI 提取物的干预浓度。



a:组间比较, $P<0.05$ 。

图5 RI提取物干预浓度的筛选结果($\bar{x} \pm s, n=3$)

2.3.3 RI提取物对DOX诱导损伤心肌细胞中线粒体相关mRNA表达影响的检测

由网络药理学分析可知,58个潜在关键靶点富集于三羧酸循环。考虑到心脏是线粒体含量最丰富的器官,线粒体功能障碍是DOX致心肌损伤的核心病理机制^[2-3],而三羧酸循环直接与线粒体功能密切相关(三羧酸循环是发生在线粒体基质中的核心代谢过程,其正常运转对维持线粒体正常能量代谢功能至关重要^[14])。基于此,本研究首先检测了各组细胞中三羧酸循环关键因子异柠檬酸脱氢酶3A(isocitrate dehydrogenase 3A, IDH3A)、琥珀酸脱氢酶A(succinate dehydrogenase A, SDHA)mRNA的表达情况。具体操作如下:取对数生长期细胞,按 2×10^5 个/孔接种于6孔板中,培养24 h后,将其分为对照组、DOX组、DOX+不同质量浓度RI组(DOX+RI-50、DOX+RI-100、DOX+RI-200组,RI提取物质量浓度分别为50、100、200 $\mu\text{g/mL}$,参照“2.3.2”项下结果设置),每组设置3个复孔。按“2.3.2”项下方法造模、处理。培养24 h后,以TRIzol试剂提取各组细胞的总RNA,待测定浓度、纯度后,将其逆转录成cDNA。以该cDNA为模板,进行PCR扩增。反应体系包括 $2\times$ SYBR Green PCR Master Mix试剂10 μL 、正/反向引物(10 $\mu\text{mol/L}$,具体序列及产物长度见表1)各0.8 μL 、cDNA模板2 μL ,用无核酸酶水补足至20 μL 。反应条件为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性30 s;95 $^{\circ}\text{C}$ 变性5 s,60 $^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸30 s,共40个循环。以 β -actin为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计算IDH3A、SDHA mRNA的表达情况,结果以对照组为参照进行归一化处理。

表1 PCR所用引物序列及产物长度

目的基因	序列(5'-3')	产物长度/bp
IDH3A	正向:CTCTAAGGTCTCTCGGCTGC	111
	反向:GGGCCAATACCATCTCCTGG	
SDHA	正向:ACTGTTGCAGCACAGCTAGA	108
	反向:GCCCTTTCCAACTTGAGGC	
ESR1	正向:CTAACCTCGGCTGTGCTC	124
	反向:GCTTTGGTGTGGAGGGTCAT	
PGC-1 α	正向:TGAAGGTACTTTTCTGCCCC	98
	反向:GCACAACTGGATTGCCAG	
β -actin	正向:ACTGGAACGGTGAAGGTGAC	70
	反向:TCTCGGCCACATTTGTGAA	

PGC-1 α :过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子1 α 。

结果(表2)显示,与对照组比较,DOX组细胞中IDH3A、SDHA mRNA的表达均显著下调($P<0.05$);与DOX组比较,DOX+RI-50、DOX+RI-100、DOX+RI-200组上述mRNA的表达均显著上调,且DOX+RI-100组、DOX+RI-200组均显著高于DOX+RI-50组($P<0.05$)。

2.3.4 RI提取物对DOX诱导损伤心肌细胞线粒体功能障碍影响的观察

考虑到线粒体是细胞三羧酸循环的重要场所^[14],本研究进一步考察了RI提取物对DOX致损伤心肌细胞线

表2 各组细胞中IDH3A、SDHA mRNA表达和线粒体膜电位、相对ATP水平、相对ROS水平比较($\bar{x}\pm s, n=3$)

组别	IDH3A mRNA	SDHA mRNA	线粒体膜电位	相对ATP水平	相对ROS水平
对照组	1.000 $\pm$ 0.086	1.000 $\pm$ 0.133	11.293 $\pm$ 0.923	1.000 $\pm$ 0.092	1.000 $\pm$ 0.081
DOX组	0.376 $\pm$ 0.023 ^a	0.500 $\pm$ 0.033 ^a	2.700 $\pm$ 0.304 ^a	0.432 $\pm$ 0.029 ^a	3.505 $\pm$ 0.407 ^a
DOX+RI-50组	0.544 $\pm$ 0.034 ^b	0.622 $\pm$ 0.010 ^b	3.613 $\pm$ 0.139 ^b	0.592 $\pm$ 0.031 ^b	2.640 $\pm$ 0.113 ^b
DOX+RI-100组	0.689 $\pm$ 0.033 ^{bc}	0.783 $\pm$ 0.047 ^{bc}	4.943 $\pm$ 0.480 ^{bc}	0.753 $\pm$ 0.019 ^{bc}	1.984 $\pm$ 0.099 ^{bc}
DOX+RI-200组	0.672 $\pm$ 0.037 ^{bc}	0.761 $\pm$ 0.040 ^{bc}	4.830 $\pm$ 0.392 ^{bc}	0.723 $\pm$ 0.013 ^{bc}	2.028 $\pm$ 0.038 ^{bc}

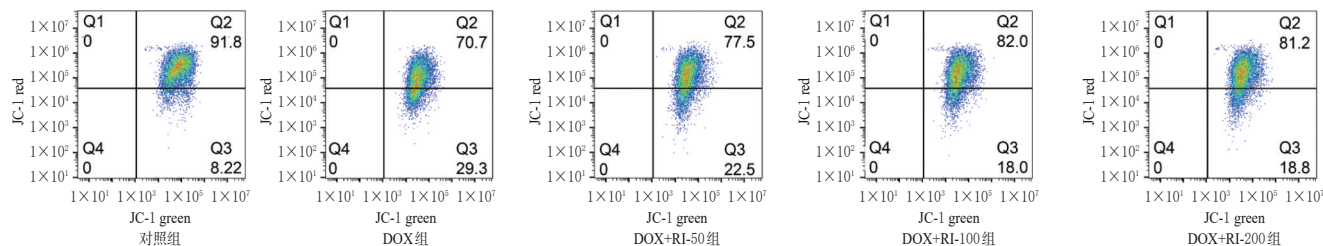
a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与DOX组比较, $P<0.05$;c:与DOX+RI-50组比较, $P<0.05$ 。

粒体功能障碍的影响。具体操作如下:取对数生长期细胞,按“2.3.3”项下方法分组、造模、处理。培养24 h后,收集细胞,按JC-1试剂盒说明书操作,以流式细胞仪检测各组细胞的线粒体膜电位(以红/绿荧光强度比值来反映膜电位变化,两者成正比);按ATP检测试剂盒说明书操作,以酶标仪检测各组细胞的ATP发光强度,结果以对照组为参照进行归一化处理,用以评估细胞相对ATP水平;按DCFH-DA荧光探针试剂盒说明书操作,使用显微镜观察并检测探针阳性(绿色)荧光强度,结果以对照组为参照进行归一化处理,用以表示细胞相对ROS水平。

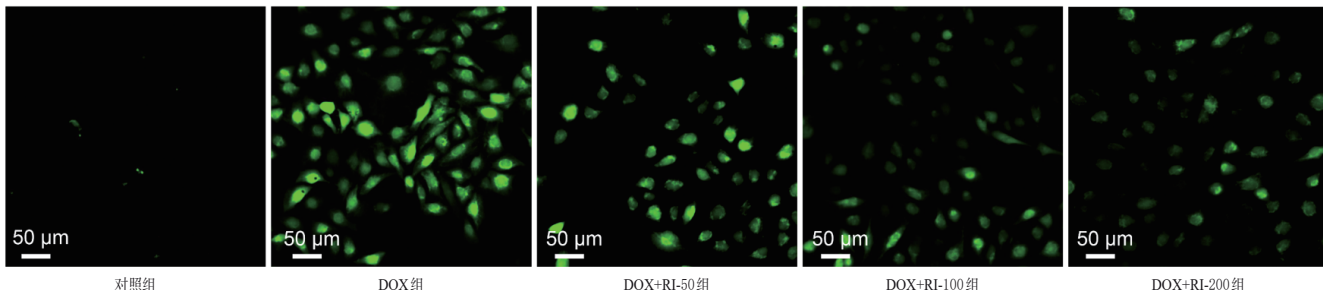
结果(表2、图6)显示,与对照组比较,DOX组细胞线粒体膜电位、相对ATP水平均显著降低,相对ROS水平显著升高($P<0.05$);与DOX组比较,50、100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的RI提取物均能显著逆转线粒体膜电位的下降、恢复相对ATP水平,并抑制ROS的过量产生($P<0.05$),且100、200 $\mu\text{g/mL}$ 的RI提取物对上述指标的改善作用显著优于50 $\mu\text{g/mL}$ 的RI提取物($P<0.05$)。

2.3.5 RI提取物对DOX诱导损伤心肌细胞中ESR1信号通路影响的检测

由网络药理学分析可知,58个潜在关键靶点还富集于细胞凋亡通路(图1A),这与DOX心肌毒性的核心病理特征相符^[2-3]。值得注意的是,与凋亡调控密切相关的ESR1是关键靶蛋白之一(图1C)。为此,本研究考察了RI提取物对DOX诱导损伤心肌细胞中ESR1 mRNA及其蛋白、PGC-1 α mRNA(ESR1下游与线粒体功能密切相关的关键分子^[15])表达的影响。具体操作如下:取对数生长期细胞,按“2.3.3”项下方法分组、造模、处理。培养24 h后,收集细胞,按“2.3.3”项下方法检测各组细胞中ESR1、PGC-1 α mRNA的表达情况(两者引物具体序列及产物长度见表1)。同时,收集细胞,以RIPA裂解液裂解并提取其总蛋白,以BCA法测定蛋白浓度后进行变性处理;取变性蛋白适量,经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳分离后转移至聚偏二氟乙烯膜上,以5%脱脂奶粉于室温下封闭1 h;洗膜后,加入ESR1、



A. 线粒体膜电位(流式细胞仪法)



B. 相对ROS水平(DCFH-DA荧光探针法)

图6 RI提取物对DOX诱导损伤心肌细胞线粒体膜电位及相对ROS水平的影响

β -actin一抗(稀释比例分别为1:1 000、1:3 000),于4℃下孵育过夜;洗膜后,加入相应二抗(稀释比例均为1:2 000),于室温下孵育1 h;以增强化学发光试剂显影后成像;利用Image J软件对蛋白条带灰度值进行分析,以ESR1与内参蛋白(β -actin)的灰度值比值表示ESR1蛋白的表达水平,结果以对照组为参照进行归一化处理。

结果(表3、图7)显示,与对照组比较,DOX组细胞中PGC-1 α mRNA、ESR1 mRNA及其蛋白的表达均显著下调;与DOX组比较,DOX+RI-50、DOX+RI-100、DOX+RI-200组细胞中上述指标均显著恢复($P<0.05$),且100、200 μ g/mL的RI提取物对PGC-1 α mRNA、ESR1 mRNA及其蛋白表达的改善作用均显著优于50 μ g/mL的RI提取物($P<0.05$)。

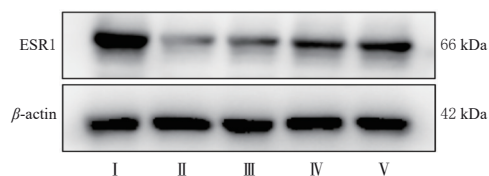
表3 各组细胞中PGC-1 α mRNA、ESR1 mRNA及其蛋白表达和凋亡率比较($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	PGC-1 α mRNA	ESR1 mRNA	ESR1蛋白	凋亡率/%
对照组	1.000 $\pm$ 0.021	1.000 $\pm$ 0.095	1.000 $\pm$ 0.075	3.960 $\pm$ 0.475
DOX组	0.335 $\pm$ 0.047 ^a	0.342 $\pm$ 0.039 ^a	0.280 $\pm$ 0.020 ^a	20.270 $\pm$ 1.082 ^a
DOX+RI-50组	0.608 $\pm$ 0.051 ^b	0.540 $\pm$ 0.031 ^b	0.404 $\pm$ 0.010 ^b	15.310 $\pm$ 0.516 ^b
DOX+RI-100组	0.797 $\pm$ 0.059 ^c	0.730 $\pm$ 0.042 ^c	0.765 $\pm$ 0.029 ^c	8.067 $\pm$ 0.421 ^c
DOX+RI-200组	0.748 $\pm$ 0.044 ^c	0.724 $\pm$ 0.026 ^c	0.731 $\pm$ 0.007 ^c	8.067 $\pm$ 0.733 ^c

a:与对照组比较, $P<0.05$;b:与DOX组比较, $P<0.05$;c:与DOX+RI-50组比较, $P<0.05$ 。

2.3.6 RI提取物对DOX诱导心肌细胞凋亡影响的检测

本研究进一步考察了RI提取物对DOX诱导心肌细胞凋亡的影响。具体操作如下:收集“2.3.5”项下各组细胞,按Annexin V-FITC/PI细胞凋亡检测试剂盒说明书进行染色后,使用流式细胞仪检测各组细胞凋亡情况,并采用FlowJo软件进行数据采集、分析。



I:对照组;II:DOX组;III:DOX+RI-50组;IV:DOX+RI-100组;V:DOX+RI-200组。

图7 RI提取物对DOX诱导损伤心肌细胞中ESR1蛋白表达影响的电泳图

结果(表3、图8)显示,与对照组比较,DOX组细胞的凋亡率显著升高($P<0.05$);与DOX组比较,DOX+RI-50、DOX+RI-100、DOX+RI-200组细胞的凋亡率均显著降低($P<0.05$),且DOX+RI-100、DOX+RI-200组均显著低于DOX+RI-50组($P<0.05$)。

2.3.7 基于ESR1敲低实验的机制验证

取对数生长期细胞,以 2×10^5 个/孔接种于6孔板中,培养24 h后,将其分为对照组、DOX组、DOX+RI组、DOX+RI-siESR1组(后两组RI提取物质量浓度均为100 μ g/mL,参考“2.3.6”项下结果设置),每组设置3个复孔。对照组、DOX组、DOX+RI组细胞按“2.3.3”项下方法造模、处理;DOX+RI-siESR1组细胞转染ESR1 siRNA(通过Western blot实验验证,若转染48 h后细胞中ESR1蛋白的表达水平显著降低,则表示转染成功)后,再按“2.3.3”项下方法造模、处理。培养24 h后,收集细胞,按前述Annexin V-FITC/PI染色实验方法检测凋亡率。

结果(图9)显示,与对照组比较,DOX组细胞的凋亡率显著升高($P<0.05$);与DOX组比较,DOX+RI组细胞的凋亡率显著降低($P<0.05$),而DOX+RI-siESR1组细胞凋亡率的差异则无统计学意义($P>0.05$),提示RI提取物对DOX诱导心肌细胞凋亡的抑制作用在很大程度上依赖于ESR1信号通路。

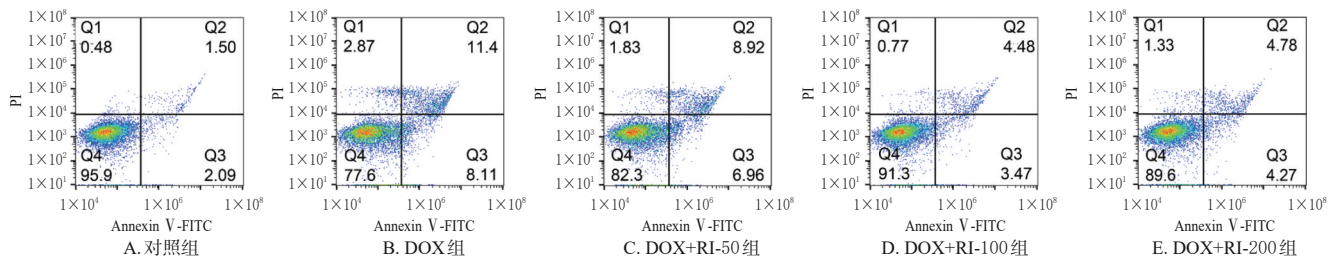
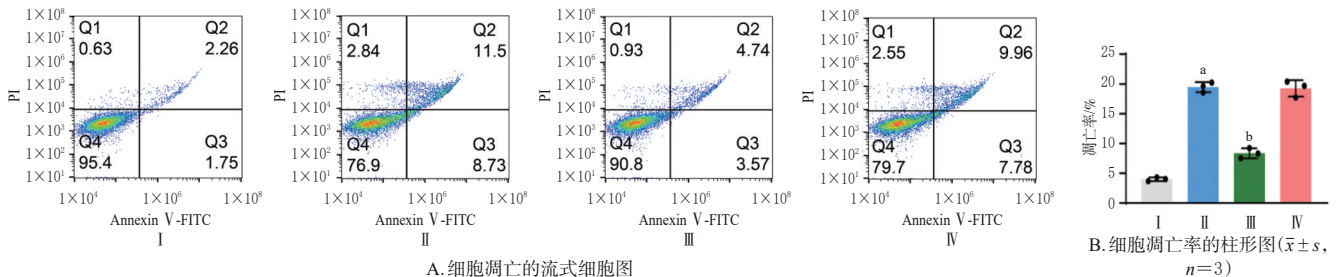


图8 RI提取物对DOX诱导心肌细胞凋亡影响的流式细胞图



I: 对照组; II: DOX组; III: DOX+RI组; IV: DOX+RI-siESR1组; a: 与对照组比较, $P < 0.05$; b: 与DOX组比较, $P < 0.05$ 。

图9 RI提取物通过ESR1信号通路改善DOX诱导的心肌细胞凋亡

3 讨论

RI是临床常用的传统中药材,具有清热利尿、凉血解毒等功效^[4]。基于现有研究,RI具有改善DOX心脏毒性的药理基础^[5-8],但具体作用机制尚有待进一步阐明。本研究采用网络药理学预测结合体内外实验验证的策略,系统评估RI提取物对DOX致心肌损伤的改善作用及潜在机制。

网络药理学分析揭示,RI的心脏保护作用可能来源于多种活性成分的协同调控效应。在预测的关键活性化合物中, β -谷甾醇、6-甲氧基黄酮、L-苹果酸、草酸和D-酒石酸富含作用靶点,提示这些成分可能是RI及其提取物发挥抗心肌损伤作用的关键活性物质。部分研究为此提供了具体的机制佐证:首先,在心肌缺血再灌注损伤SD大鼠模型中, β -谷甾醇可通过激活过氧化物酶体增殖物激活受体、抑制核因子 κ B信号通路来抑制心肌细胞凋亡及炎症反应,从而缩小心肌梗死面积并发挥心肌保护作用,这为RI及其提取物抗炎、抗程序性细胞死亡的作用提供了直接依据^[16]。其次,黄酮类成分的甲氧基化修饰被认为是增强RI提取物活性的关键^[17];与6-甲氧基黄酮结构相似的高良姜素被证实可通过上调谷胱甘肽硫转移酶P1、抑制Jun激酶/c-Jun信号通路,从而对DOX诱导的损伤心肌细胞模型发挥保护作用^[18]。这提示富含甲氧基的黄酮类成分可能通过类似的抗氧化应激、抑制凋亡相关信号通路等途径来改善心肌损伤。此外,L-苹果酸作为三羧酸循环的重要代谢中间体,在维持细胞能量代谢稳态和降低氧化应激方面具有积极作用^[19]。上述证据共同表明,RI及其提取物能以“成分-多

靶点-多通路”模式协同发挥心脏保护作用,为其整体药效的合理阐释奠定了基础。

富集分析结果显示,58个潜在关键靶点富集于细胞凋亡、三羧酸循环等通路。既往研究表明,DOX心脏毒性涉及多种病理机制,其中细胞凋亡、能量代谢障碍、氧化应激被认为是重要的病理环节,而线粒体功能异常在上述环节中发挥了关键的调控作用^[20-21]。本研究的动物实验初步证实,RI提取物能有效改善DOX诱导的小鼠心脏结构损伤,提高生存率并抑制体重下降;细胞实验结果表明,RI提取物能显著改善DOX诱导损伤心肌细胞的线粒体膜电位丢失、ATP生成减少和ROS过度产生,提示其可在一定程度上缓解DOX致损伤心肌细胞的代谢紊乱。

此外,由网络药理学分析结果可知,ESR1位于PPI网络的关键位置,是关键靶蛋白之一。研究指出,ESR1可参与心肌细胞存活、能量代谢及抗凋亡调控,在心脏保护中具有不可忽视的作用^[22-23]。此外,研究还指出,ESR1可通过上调去乙酰化酶(SIRT3)的表达,改善心肌缺血再灌注损伤中线粒体融合与分裂的失衡,从而增强心脏功能并抑制心室重构^[23]。另有研究发现,在心肌梗死小鼠模型中,植物来源的秋水仙碱可通过激活ESR1/磷脂酰肌醇3激酶/蛋白激酶B/核因子 κ B信号通路来抑制心肌细胞焦亡、减轻炎症反应,从而显著改善小鼠心功能并减少心肌纤维化^[22]。本研究结果显示,RI提取物可显著上调DOX诱导心肌损伤细胞中ESR1 mRNA及蛋白、ESR1下游因子PGC-1 α mRNA和三羧酸循环关键因子IDH3A、SDHA mRNA的表达,并可显著抑制心肌

细胞凋亡;而转染 ESR1 的 siRNA 后,RI 提取物抗心肌细胞凋亡的作用被明显减弱,提示 ESR1 可能是该提取物发挥心脏保护效应的重要分子基础。

综上所述,RI 提取物可能通过激活 ESR1 信号通路、改善线粒体功能、抑制 ROS 过量生成和心肌细胞凋亡来缓解 DOX 诱导的心肌损伤。

参考文献

- [1] KCIUK M, GIELECINŚKA A, MUJWAR S, et al. Doxorubicin: an agent with multiple mechanisms of anticancer activity[J]. *Cells*, 2023, 12(4):659.
- [2] KONG C Y, GUO Z, SONG P, et al. Underlying the mechanisms of doxorubicin-induced acute cardiotoxicity: oxidative stress and cell death[J]. *Int J Biol Sci*, 2022, 18(2):760-770.
- [3] SHEIBANI M, AZIZI Y, SHAYAN M, et al. Doxorubicin-induced cardiotoxicity: an overview on pre-clinical therapeutic approaches[J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2022, 22(4):292-310.
- [4] 马成勇,王元花,杨敏,等.白茅根及其提取物的药理作用机制及临床应用[J].*医学综述*, 2019, 25(2):370-374.
- [5] 李帅印,杨萍,蒯慧荣,等.白茅根化学成分与药理作用研究进展及其质量标志物预测[J].*中国新药杂志*, 2025, 34(13):1406-1416.
- [6] ZOU W, DONG Y Q, YANG S C, et al. Imperatae Rhizoma-*Hedyotis diffusa* Willd. herbal pair alleviates nephrotic syndrome by integrating anti-inflammatory and hypolipidaemic effects[J]. *Phytomedicine*, 2021, 90:153644.
- [7] ZHOU X, WANG J, JIANG B, et al. A study of extraction process and *in vitro* antioxidant activity of total phenols from Rhizoma Imperatae[J]. *Afr J Trad Compl Alt Med*, 2013, 10(4):175-178.
- [8] 柳丽,梅葵,柳建.基于 Sirt1 通路研究白茅根提取物对心力衰竭大鼠心肌纤维化的干预作用[J].*中国老年学杂志*, 2023, 43(16):4026-4029.
- [9] ZHANG P, ZHANG D F, ZHOU W A, et al. Network pharmacology: towards the artificial intelligence-based precision traditional Chinese medicine[J]. *Brief Bioinform*, 2023, 25:bbad518.
- [10] ZHAO L, ZHANG H, LI N, et al. Network pharmacology, a promising approach to reveal the pharmacology mechanism of Chinese medicine formula[J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 309:116306.
- [11] WANG Z Y, LI M Z, LI W J, et al. Mechanism of action of Daqinjiao decoction in treating cerebral small vessel disease explored using network pharmacology and molecular docking technology[J]. *Phytomedicine*, 2023, 108:154538.
- [12] ZHAO M, FENG L X, LI W H. Network pharmacology and experimental verification: Sanqi-danshen treats coronary heart disease by inhibiting the PI3K/AKT signaling pathway[J]. *Drug Des Dev Ther*, 2024, 18:4529-4550.
- [13] QIU H L, HUANG S H, LIU Y T, et al. Idebenone alleviates doxorubicin-induced cardiotoxicity by stabilizing FSP1 to inhibit ferroptosis[J]. *Acta Pharm Sin B*, 2024, 14(6):2581-2597.
- [14] MARTÍNEZ-REYES I, CHANDEL N S. Mitochondrial TCA cycle metabolites control physiology and disease[J]. *Nat Commun*, 2020, 11:102.
- [15] SHAO M, ZHAO C, PAN Z J, et al. Oxyphylla A exerts antiparkinsonian effects by ameliorating 6-OHDA-induced mitochondrial dysfunction and dyskinesia *in vitro* and *in vivo*[J]. *Chem Biol Interact*, 2024, 403:111224.
- [16] LIN F, XU L, HUANG M, et al. β -sitosterol protects against myocardial ischemia/reperfusion injury via targeting PPAR γ /NF- κ B signalling[J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2020, 2020:2679409.
- [17] WANG Y, XIE Z S, JIANG N, et al. Hispidulin attenuates cardiac hypertrophy by improving mitochondrial dysfunction[J]. *Front Cardiovasc Med*, 2020, 7:582890.
- [18] SHU G J, CHEN K, LI J Y, et al. Galangin alleviated Doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting ferroptosis through GSTP1/JNK pathway[J]. *Phytomedicine*, 2024, 134:155989.
- [19] LU J D, ZHANG S, WU S Q, et al. L-malic acid: a multifunctional metabolite at the crossroads of redox signaling, microbial symbiosis, and therapeutic innovation[J]. *Arch Biochem Biophys*, 2025, 772:110554.
- [20] CHRISTIDI E, BRUNHAM L R. Regulated cell death pathways in doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Cell Death Dis*, 2021, 12(4):339.
- [21] WU L, WANG L T, DU Y X, et al. Mitochondrial quality control mechanisms as therapeutic targets in doxorubicin-induced cardiotoxicity[J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2023, 44(1):34-49.
- [22] CHEN Y, BAO S Q, DING Y J, et al. Colchicine inhibits myocardial pyroptosis and reduces myocardial cell injury after myocardial infarction through the ESR1-PI3K-Akt-NF- κ B signaling pathway[J]. *Int Immunopharmacol*, 2025, 156:114732.
- [23] CAI W W, QIN Y Y, GE F, et al. Xin-ji-er-kang balances mitochondrial fusion and fission to protect cardiomyocytes in mice with heart failure by regulating the ER α /SIRT3 pathway[J]. *Phytomedicine*, 2025, 139:156420.

(收稿日期:2025-12-29 修回日期:2026-05-14)

(本文责编:张元媛)