

基于网络药理学和体外实验探讨附子-干姜 抗心肌缺血再灌注损伤的作用机制

谢 锋¹, 段广靖², 李 敏², 兰 卫^{1*}

¹新疆医科大学中医学院, 乌鲁木齐 830000; ²陕西中医药大学药学院, 咸阳 712046

摘要:运用网络药理学方法探讨附子-干姜(Aconiti Lateralis Radix Preparata-Zingiberis Rhizoma, AZ)抗心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MI/RI)的潜在机制。通过中药系统药理数据库TCMSP筛选AZ的活性成分;Disgenet数据库获得MI/RI靶点;STITCH数据库获得蛋白互作;用DAVID数据库获得GO功能富集与KEGG信号通路并利用Cytoscape 3.8.0进行绘图;细胞实验验证网络药理学预测的结果。结果共获得AZ活性成分16个、治疗靶点171个;作图分析发现AKT1、IL6、TNF为潜在靶点;GO富集分析发现AZ可能通过凋亡、炎症、血管舒张发挥治疗作用;KEGG分析发现AZ可能通过PI3K-AKT信号通路、TNF信号通路、HIF信号通路发挥治疗作用;体外研究发AZ可使缺氧复氧损伤的大鼠血管内皮细胞存活率提高,降低凋亡率、氧化损伤;提高HIF- α 、VEGF、eNOS蛋白的表达。附子-干姜激活HIF/VEGF/eNOS信号通路,降低血管内皮细胞氧化损伤、凋亡率发挥抗心肌缺血再灌注损伤的作用。

关键词:网络药理学;附子-干姜;血管舒张;心肌缺血再灌注损伤

中图分类号:R285.5

文献标识码:A

文章编号:1001-6880(2023)1-0151-08

DOI:10.16333/j.1001-6880.2023.1.016

Study on the mechanism of Aconiti Lateralis Radix Preparata-Zingiberis Rhizoma in treating myocardial ischemia-reperfusion injury based on network pharmacology and experimental verification

XIE Feng¹, DUAN Guang-jing², LI Min², LAN Wei^{1*}

¹School of Chinese Medicine, Xinjiang Medical University, Urumqi 830000, China;

²School of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xianyang 712046, China

Abstract: To explore the mechanism of Aconiti Lateralis Radix Preparata-Zingiberis Rhizome (AZ) against myocardial ischemia-reperfusion injury (MI/RI) by network pharmacology. To search the active components and corresponding targets of AZ through the TCMSP databases. MI/RI targets were obtained from Disgenet database. Constructed protein interaction network map by String online database. At the same time GO and KEGG enrichment analysis of key targets were carried out by using R language. The results of network pharmacologic prediction were verified by cell experiments. A total of 16 AZ active compounds and 171 targets were obtained. GO analysis showed that AZ may play a role in the treatment of MI/RI through apoptosis, inflammation and vasodilation. KEGG analysis showed that AZ may play a therapeutic role through PI3K-Akt signaling pathway, TNF signaling pathway and HIF signaling pathway. Experimental verification showed that AZ could improve the survival rate of vascular endothelial cells, reduce the apoptosis rate and oxidative damage of rats with hypoxia reoxygenation injury. Moreover, the expression of HIF- α , VEGF and eNOS protein was increased. AZ treatment of MI/RI can reduce the oxidative damage and apoptosis rate of vascular endothelial cells by activating the HIF/VEGF/eNOS signaling pathway.

Key words: network pharmacology; Aconiti Lateralis Radix Preparata-Zingiberis Rhizoma; vasodilation; myocardial ischemia-reperfusion injury

收稿日期:2022-06-01 接受日期:2022-09-19

基金项目:国家自然科学基金(81373988);新疆医科大学博士基金目(2019-1);国家重点研发计划(2017YFC1703901-3);国家重点研发计划(2017YFC1703902-3)

* 通信作者 E-mail:lanwei516@sina.com

缺血性心脏病(ischemic heart disease, IHD)是我国发病率、致残率、死亡率最高的心脏疾病。随着社会经济的快速发展和人口老龄化, IHD 出现年轻化且发病率呈逐年上升的趋势^[1-2]。其中心肌缺血再灌注损伤(myocardial ischemia-reperfusion injury, MI/RI)是在缺血性心脏病治疗期间不可避免的现象, MI/RI 期间导致心肌组织梗死面积扩大, 以及心律失常^[3]。MI/RI 是现代医学亟待解决的问题, 但尚无特效药。

MI/RI 属于中医学胸痹的范畴。中医药讲究整体观念, 在治疗胸痹方面有着独特的经验与优势。以往的研究表明中医药在治疗胸痹有很好的疗效比如: 四逆汤、益气活血汤、瓜蒌薤白汤^[4-6]。附子-干姜(Aconiti Lateralis Radix Preparata-Zingiberis Rhizoma, AZ)是四逆汤的核心药对, 本课题组以往的拆方研究表明, 四逆汤拆方后 AZ 组的疗效最好, 但其具体机制尚不清楚, 此外课题组也证明了 AZ 配伍可降低 MI/RI 期间心肌细胞的凋亡率, 但其具体机制尚未研究^[7]。AZ 因成分复杂, 作用机制不清楚, 严重阻碍了 AZ 临床应用以及新药开发, 对 AZ 抗 MI/RI 的机制研究刻不容缓。

网络药理学是分析中药复方的重要工具^[8]。网络药理学已广泛用于分析中药复方治疗疾病的生物过程和信号通路。为研究 AZ 抗 MI/RI 的作用机制, 本研究拟用网络药理学预测 AZ 抗 MI/RI 的作用机制, 并通过体外研究验证网络药理学的预测结果, 为 AZ 下一步开发奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 网络药理学预测 AZ 抗 MI/RI 的靶点、生物过程、信号通路

通过 TCMSP(<https://old.tcm-sp-e.com/tcm-sp.php>)数据库筛选附子、干姜的活性成分、靶点。以口服生物利用度(oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、药物相似性(drug-likeness, DL) ≥ 0.18 为筛选条件。将获得的靶点导入 UniProt 数据库(<https://www.uniprot.org/>)规范靶点名称, 利用 Cytoscape 3.8.0 制作 AZ 成分-靶点网络图。

通过 Disgenet 数据库(<https://www.disgenet.org/>)获得 MI/RI 靶点, 再利用 Venny 2.1 工具整合 AZ 治疗 MI/RI 的潜在靶点并绘图。

将 AZ 抗 MI/RI 靶点导入 STITCH 数据库(<http://stitch.embl.de>)获得蛋白互作图保存 TSV 格式导入 Cytoscape 3.8.0 软件绘图。

将 AZ 抗 MI/RI 靶点导入 DAVID 数据库(<https://david.ncifcrf.gov/>)获得 GO 富集信息以及 KEGG 信号通路信息。利用 Cytoscape 3.8.0 制作 AZ 成分-靶点-通路图, 利用 R 语言制作 KEGG 信号通路气泡图。

1.2 体外细胞实验研究

1.2.1 细胞及材料

大鼠血管内皮细胞(rat vascular endothelial cells, RVEC)、HIF α 、VEGF、eNOS、DMEM 培养基(武汉博士德生物科技有限公司, 批号: R0157, H202009、V202009、e202010、20201224); 附子、干姜(咸阳兴盛德药业有限公司, 批号: 20190912、20190915); 胎牛血清(杭州四季青公司, 批号: HQ202003); 超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD)、丙二醛(malondialdehyde, MDA)、凋亡试剂盒(南京建成生物科技有限公司, 批号: 20200612, 20200701、20200813); 流式细胞仪(赛默飞有限公司); 酶标仪(美国 BIO-TEK 公司); 小型垂直电泳槽、小型 Trans-Blot 转印槽(上海伯乐公司); Odyssey Fc 双色红外荧光成像系统(美国 LI-COR 公司)。

1.2.2 药物制备

AZ 水煎液: 按照中国药典记载的方法进行制备。称取附子 35 g(先煎 30 min), 干姜 20 g 完全浸泡在水中 0.5 h, 加入 8 倍量水, 煮沸 1.5 h, 重复该步骤一次后收集提取液。经纱布过滤浓缩至 0.5 g 生药材/mL, 将水煎液储存于冰箱 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

1.2.3 细胞分组及造模

RVEC 细胞用含 10% 胎牛血清、1% 青霉素链霉素的培养基在培养箱中培养至对数生长期后用于后续试验。实验分为五组: 空白组(control, Con)、模型组(hypoxia/reoxygenation, H/R)、AZ 低剂量组(AZ-L, 0.125 mg/mL)、AZ 中剂量组(AZ-M, 0.25 mg/mL)、AZ 高剂量组(AZ-H, 0.5 mg/mL)。除 Con 组正常培养外, 其余 4 组均参照文献造模方法建立 H/R 模型, 其中给药组预处理 24 h 后建立 H/R 模型^[9]。

1.2.4 细胞存活率检测

按“1.2.3”方法分组将 RVEC 在 96 孔板上铺板, 每组设置 6 个复孔, 按“1.2.3”中的方法造模给药。造模后每孔加入 10 μL CCK-8, 在酶标仪 450 nm 波长处记录每孔的吸光度。

1.2.5 SOD、MDA、凋亡率检测

RVEC 细胞分组及造模后收集各组细胞按

SOD、MDA、凋亡率试剂盒说明书进行检测。

1.2.6 Western blot 检测相关蛋白表达

RVEC 细胞分组及造模后收集各组细胞后用含有鸡尾酒蛋白酶抑制剂(1:100)和蛋白磷酸酶抑制剂(1:50)的 RIPA 缓冲液冰溶 30 min。采用 BCA 法测定上清中的蛋白浓度,用 10% SDS-PAGE 分离等量蛋白(30 μg),然后电泳转移到 PVDF,用 5% 脱脂牛奶在 TBST 缓冲液中孵育 2 h。然后用一抗:anti-HIF1 α (1:1 000)、anti-VEGF(1:500)、anti-eNOS(1:500)、anti- β -actin(1:1 000)在 4 $^{\circ}\text{C}$ 孵育过夜。第二天洗膜 3 次后用 hrp 标记的 IgG 孵育膜,免疫印迹在增强化学发光(ECL)系统下成像。利用 AlphaEase FC 软件分析了目标带的分子量和净光密

度。每个样品的灰度值与 β -actin 灰度值之比用于反应 RVEC 的蛋白表达水平。

1.3 统计学方法

采用 GraphPad Prism 8.0 软件对数据进行方差分析,实验以均数 \pm 标准差($\bar{x} \pm s$)表示,两组间使用 t 检验,多组使用单因素方差分析(ANOVA)。 $P < 0.05$ 视为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 AZ 活性成分收集与筛选

通过 TCMSP 数据库和文献查找补充关键化合物,共获得 16 个活性成分附子 7 个、干姜 9 个(见表 1),靶点 171 个。

表 1 AZ 活性成分
Table 1 Active compounds of AZ

编号 No.	分子名称 Molecule name	生物利用度 OB(%)	类药性 DL
MOL002395	去氧穿心莲内酯 Deoxyandrographolide	56.3	0.31
MOL002398	水黄皮素 Karanjin	69.56	0.34
MOL002424	乌头碱 Aconitine	7.87	0.23
MOL000538	次乌头碱 Hypaconitine	31.39	0.26
MOL002089	新乌头碱 Mesaconitin	8.7	0.25
MOL002388	花翠素-3,5-二糖苷 Delphin_qt	57.76	0.28
MOL002392	德尔妥因 Deltoin	46.69	0.37
MOL002467	6-姜辣素 6-Gingerol	35.64	0.16
MOL002459	10-姜酚 10-Gingerol	19.14	0.28
MOL002495	6-姜酚 6-Shogaol	31	0.14
MOL002516	姜酮 Zingerone	25.23	0.05
MOL000359	谷甾醇 Sitosterol	36.91	0.75
MOL002464	单亚油酸甘油酯 1-Monolinolein	37.18	0.3
MOL002501	瓜菊酯 [(1S)-3-[(E)-but-2-enyl]-2-methyl-4-oxo-1-cyclopent-2-enyl] (1R,3R)-3-[(E)-3-methoxy-2-methyl-3-oxoprop-1-enyl]-2,2-dimethylcyclopropane-1-carboxylate	62.86	0.3
MOL002514	四羟基-8-甲氧基黄酮 Sexangularetin	35.64	0.16
MOL000358	β -谷甾醇 β -Sitosterol	36.91	0.75

2.2 AZ 活性成分-靶点网络

通过 Cytoscape 3.8.0 获得 AZ 活性成分-靶点网络(见图 1),红色三角形代表成分,绿色圆形代表靶点。

2.3 AZ 抗 MI/RI 靶点获取

在 Disgenet 数据库中获取 MI/RI 相关靶点 966 个,利用 Venny2.1 工具获得 AZ 抗 MI/RI 靶点 80 个(见图 2)。

2.4 AZ 抗 MI/RI 靶点的 PPI 网络构建

将共同靶点导入 STITCH 数据库获得蛋白互作

图,保存 TSV 格式利用 Cytoscape 3.8.0 可视化 PPI 网络(见图 3)。从图可看出 AKT1、IL6、TNF 可能是 AZ 抗 MI/RI 的关键靶点。

2.5 GO 富集和 KEGG 通路分析

将 AZ 抗 MI/RI 靶点导入 DAVID 数据库中获得 GO、KEGG 信息,利用 EXCEL 和 R 语言进行可视化。研究发现 AZ 抗 MI/RI 的生物过程主要与细胞凋亡、炎症、血管舒张有关(见图 4)。通过 KEGG 气泡图发现 AZ 抗 MI/RI 可能通过 PI3K-AKT 信号通路、TNF 信号通路、HIF 信号通路发挥治疗作用(见图 5)。

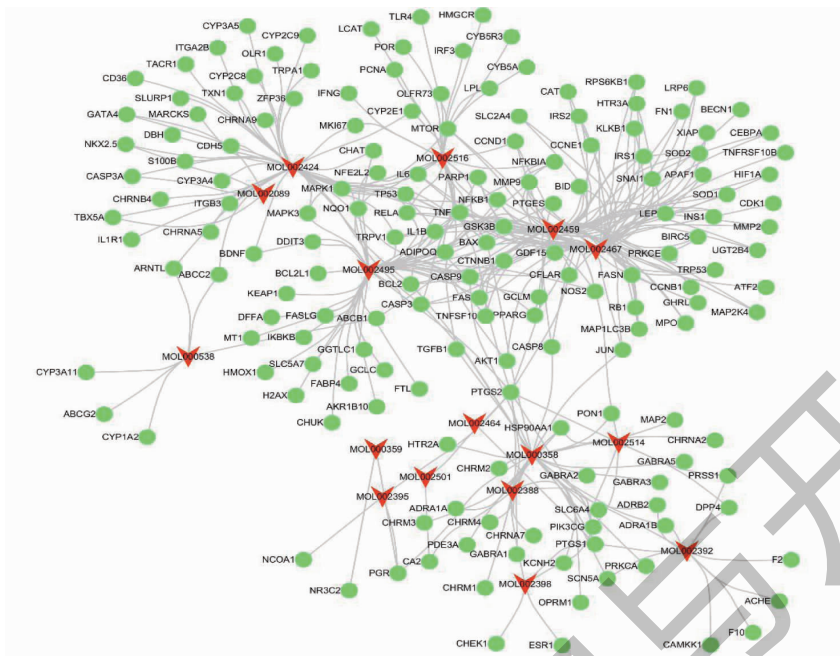


图 1 活性成分-靶点网络

Fig. 1 The target network of active compounds

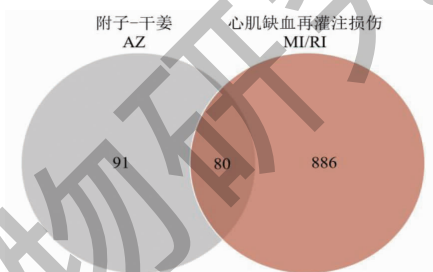


图 2 成分靶点-疾病靶点韦恩图

Fig. 2 Venn diagram of component target-disease target

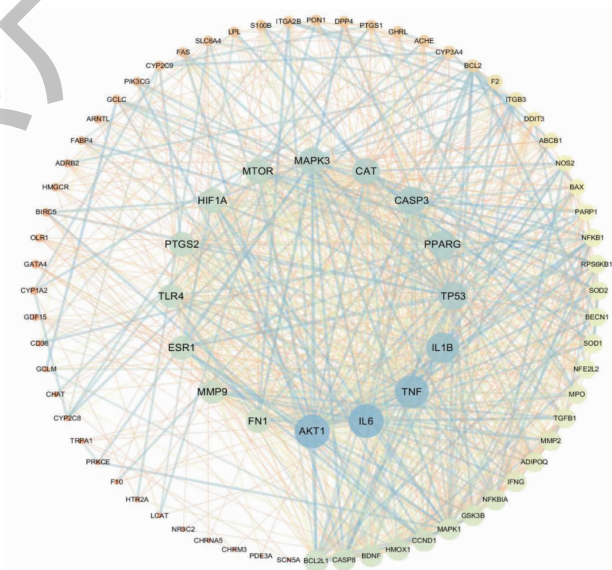


图 3 靶点 PPI 网络

Fig. 3 PPI network of targets

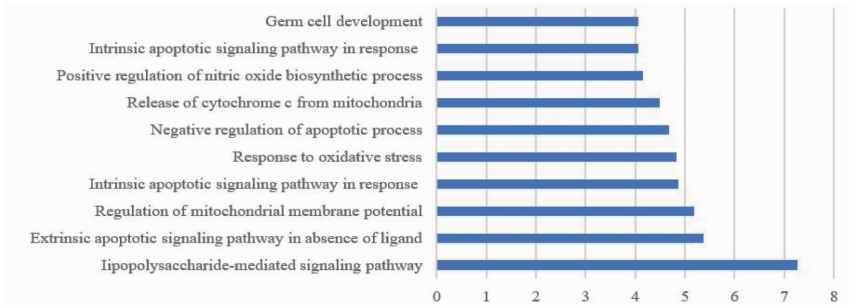


图4 生物过程

Fig. 4 Biological process

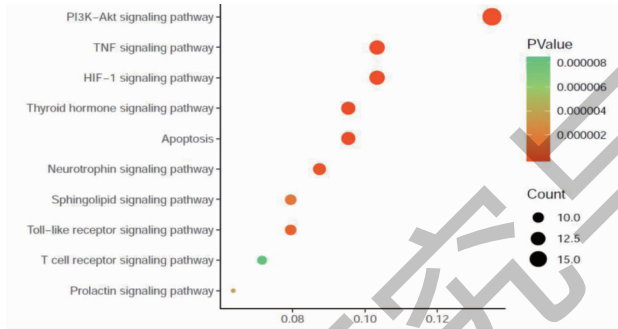


图5 前10个AZ抗MI/RI的通路

Fig. 5 The top 10 AZ anti-MI/RI signaling pathways

2.6 AZ对RVEC细胞存活率的影响

显微镜下观察(100×)正常组细胞状态良好,细胞米粒状。造模后与Con组相比H/R组细胞数

明显减少,细胞皱缩成圆形($P < 0.01$);给药组与H/R组相比细胞数明显增加($P < 0.01$),在给药组中AZ-M组治疗效果最好(见图6)。

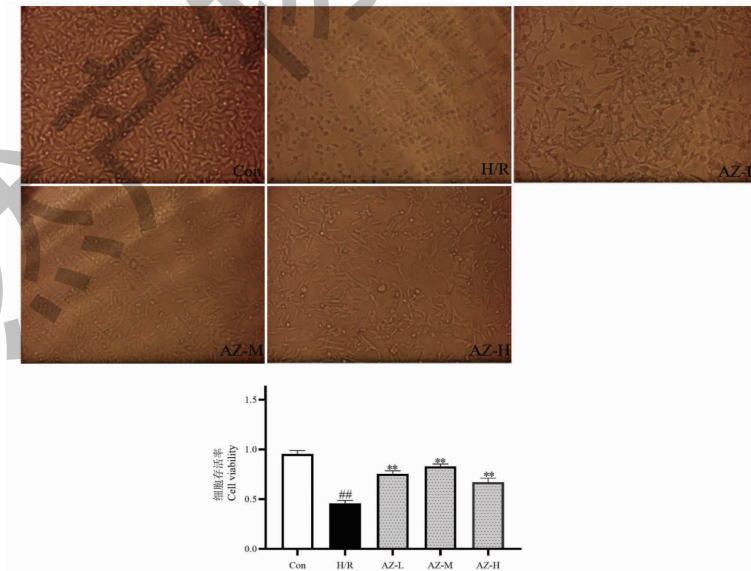


图6 AZ对RVEC细胞存活率的影响($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 6 Effects of AZ on the survival rate of RVEC cells($\bar{x} \pm s, n = 5$)

注:与Con组对比, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$;与H/R组对比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$,下同。Note: Compared with Con group, # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$; Compared with H/R group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$, the same below.

2.7 AZ 对 RVEC 细胞凋亡率及氧化损伤的影响

与 Con 组相比, H/R 组凋亡率增加、氧化损伤增加 ($P < 0.01$); 与 H/R 组相比, 给药组凋亡率降

低、氧化损伤降低 ($P < 0.01$), 在给药组中 AZ-M 组的治疗效果最好 (见图 7)。

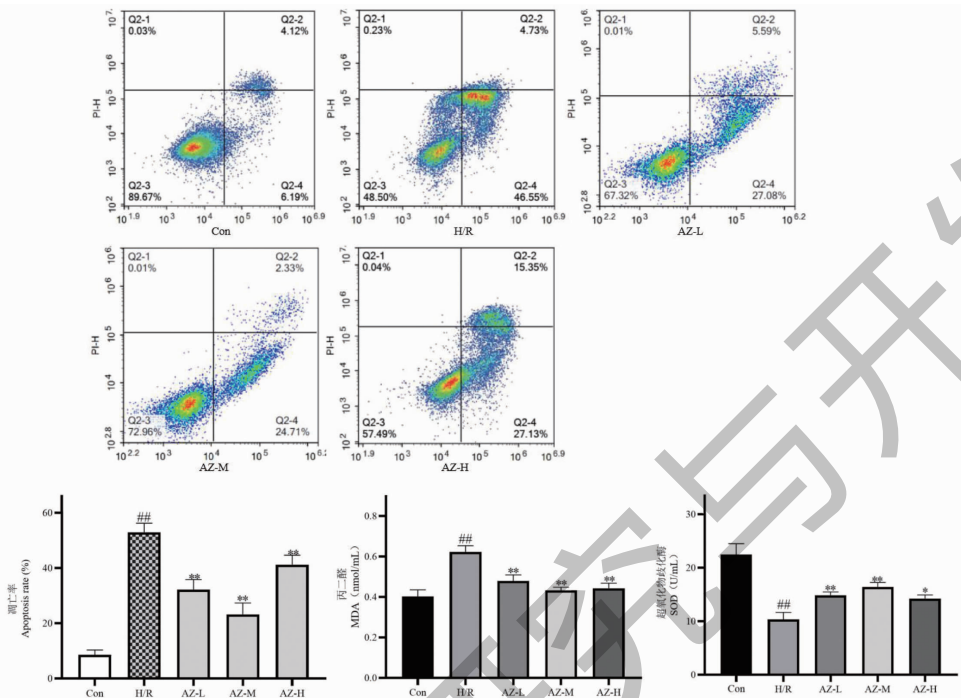


图 7 AZ 对 RVEC 细胞凋亡、氧化损伤的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 7 Effects of AZ on apoptosis and oxidative damage of RVEC cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

2.8 AZ 对 H/R 损伤的 RVEC 细胞 HIF α 、VEGF、eNOS 蛋白表达的影响

与 Con 组相比, H/R 组 HIF α 、VEGF、eNOS 蛋白表达显著降低 ($P < 0.01$); 与 H/R 组相比给药组

HIF α 、VEGF、eNOS 蛋白表达显著增加 ($P < 0.01$), 综合来看在给药组中 AZ-M 组的治疗效果最好 (见图 8)。

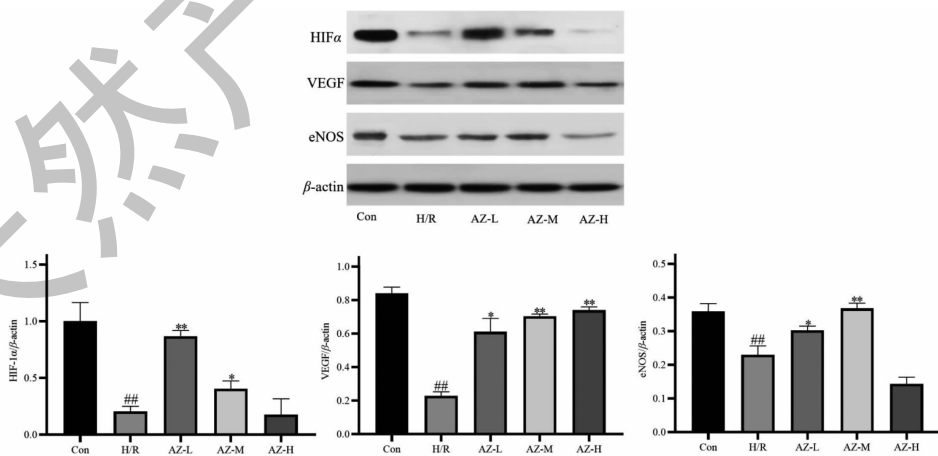


图 8 AZ 对 RVEC 细胞 HIF α 、VEGF、eNOS 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

Fig. 8 Effects of AZ on the expression of HIF α , VEGF and eNOS proteins in RVEC cells ($\bar{x} \pm s, n = 5$)

3 讨论与结论

心肌缺血再灌注损伤在中医中属于胸痹、心

痛的范围, 胸痹的发生多与寒邪内侵、情志失节、年迈体虚等因素有关^[10]。附子和干姜药性热, 是温里

药的代表药,附子无干姜不热,AZ 配伍温里疗效更好^[11]。同时 AZ 用于治疗胸痹是因为它具有温阳通脉的功效,温阳是指改善心肌细胞能量代谢,通脉是指舒张血管,AZ 可改善能量代谢和舒张血管发挥治疗作用^[12]。为了验证 AZ 是否通过改善能量代谢和舒张血管治疗 MI/RI,我们选择了网络药理学来预测 AZ 抗 MI/RI 的生物过程与具体机制。

利用网络药理学对 AZ 中活性成分进行分析,构建活性成分-靶点网络,得到网络中关键成分排名前几的是附子中的乌头碱,干姜中的 β -谷甾醇、10-姜酚。现代药理研究表明乌头碱具有强心、抗心律失常等功效^[13]; β -谷甾醇具有抗氧化、抗肿瘤等作用^[14]; 10-姜酚具有抗炎,改善 H/R 损伤的心肌细胞活力^[15]。这些结果表明预测的成分很有可能是 AZ 抗 MI/RI 的关键活性成分。

通过对关键靶点进行 GO-BP 分析筛选出 10 个关键生物学过程。其中一氧化氮生物合成过程的正调控、凋亡过程的负调控、对氧化应激的反应、在凋亡信号通路对 DNA 损伤的影响、脂多糖介导的信号通路等生物学过程与血管舒张、凋亡、炎症、氧化损伤相互关联。研究表明减少细胞凋亡、炎症反应、氧化损伤、促进血管舒张可减轻 MI/RI^[16]。网络药理学预测的 GO-BP 结果与已知 MI/RI 相关文献报道基本吻合,说明其结果具有一定的可行性。同时,本研究也发现 AZ 可提高 H/R 损伤的 RVEC 细胞存活率、降低凋亡率、氧化损伤。

为了进一步探究 AZ 抗 MI/RI 的机制,通过 KEGG 信号通路分析发现 AZ 抗 MI/RI 主要通过 HIF 信号通路、PI3K-AKT 信号通路、TNF 信号通路发挥治疗作用,这三个信号通路被认为是 AZ 抗 MI/RI 的潜在作用信号通路。HIF 信号通路在 MI/RI 期间发挥着重要的作用^[17]。缺氧诱导因子 HIF α 感知到机体缺氧时被激活,激活的 HIF α 提高下游的 VEGF、eNOS 表达。VEGF 是血管新生诱导剂可促进血管内皮细胞增殖,改善血管稳态。一氧化氮合成酶 eNOS 可促进 NO 的释放使血管舒张增加动脉血流量^[18]。VEGF、eNOS 在心肌组织缺氧期间被激活可促进血管组织舒张与血管生成,为心肌组织提供充足的氧气^[19]。PI3K-AKT 信号通路在 MI/RI 期间减少心肌细胞凋亡^[20]。TNF 信号通路在 MI/RI 期间减少炎症反应^[21]。已有的研究也表明通过 HIF 信号通路促进血管舒张、PI3K-AKT 信号通路改善心肌细胞能量代谢、TNF 信号通路减少炎症反应

是治疗 MI/RI 的重要信号通路^[22,23]。AZ 具有温阳通脉的功效,其中温阳是指改善心肌能量代谢减少心肌细胞凋亡已被证实^[24],是否促进血管舒张发挥治疗作用尚不清楚。而在本研究中证实了 AZ 可激活 HIF α /VEGF/eNOS 通路,提高 H/R 损伤的 RVEC 细胞 HIF α 、VEGF、NOS 蛋白的表达,促进血管舒张/血管内皮细胞增殖。值得注意的是在 WB 指标中高剂量组的治疗效果并不明显,这可能是我们设置的剂量梯度不合理以及附子的有效成分也是有毒成分影响,在后面的研究中课题组将关注这方面的问题。

综上所述,本研究获得 AZ 活性成分 16 个、治疗靶点 171 个;作图分析发现 AKT1、IL6、TNF 为潜在靶点;GO 富集分析发现 AZ 可能通过凋亡、炎症、血管舒张发挥治疗作用;KEGG 分析发现 AZ 可能通过 PI3K-AKT 信号通路、TNF 信号通路、HIF 信号通路发挥治疗作用;体外研究发现 AZ 可使 H/R 损伤的 RVEC 细胞存活率提高、降低凋亡率、氧化损伤;提高 HIF- α 、VEGF、eNOS 蛋白的表达。AZ 激活 HIF/VEGF/eNOS 信号通路降低血管内皮细胞氧化损伤、凋亡、促进血管舒张/血管内皮细胞增殖发挥抗心肌缺血再灌注损伤的作用,这与网络药理学预测的结果是相符合的。AZ 可通过 HIF 信号通路促进血管舒张与血管内皮细胞增殖发挥治疗作用,这为 AZ 进一步地开发提供了研究基础。

参考文献

- 1 Tian GX, Sun Z, Wu XT, et al. Analysis of the disease burden of ischemic heart disease attributable to dietary factors in China from 1990 to 2017[J]. *New Med* (医学新知), 2020, 30:227-232.
- 2 Zhang GS, Yu CH, Luo LS, et al. Trend analysis of ischemic heart disease burden in China from 1990 to 2015[J]. *Chin J Prev Med* (中华预防医学杂志), 2017, 51:71-75.
- 3 Wang Y, Qin X. Protective effect of oleuropein on myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Nat Prod Res Dev* (天然产物研究与开发), 2016, 28:1643-1646.
- 4 Liu GB. Experimental study on the treatment of Yiqi Huoxue decoction on model rats with acute myocardial ischemia[J]. *Strait Pharm J* (海峡药学), 2010, 22:30-33.
- 5 Li X, Zhang HM, Cui HF, et al. Effects of Gualou Xiebai Banjui Decoction on autophagy and pink1/parkin pathway in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Chin J Basic Med Tradit Chin Med* (中国中医基础医学杂志), 2020, 26:1626-1630.
- 6 Cheng LF, Wang HL, Li M. Protective effects of Sini decoc-

- tion and the decoction of the constituent drugs on ischemic myocardial cells[J]. *Wes J Tradit Chin Med*(西部中医药), 2019, 32:9-12.
- 7 Xie F, Duan GJ, Wan B. Effect of dried ginger-aconite decoction on myocardial ischemia-reperfusion injury and related mechanism based on network pharmacology[J]. *Cent South Pharm*(中南药学), 2021, 19:30-38.
 - 8 Zhang XW, Liu AM, Zhao JJ, et al. Mechanism of Mahuang Lianqiao Chixiaodou decoction in treating eczema by network pharmacology and molecular docking technology[J]. *China J Chin Mater Med*(中国中药杂志), 2021, 46:894-901.
 - 9 Yan L, Hao WD, Shang LQ, et al. Protective effect of Sini decoction water extract on myocardial cells from hypoxia-reoxygenation injury[J]. *Chin J Tradit Chin Med Pharm*(中华中医药杂志), 2005, 20:23-26.
 - 10 He XL, Lin XH, Huang YC, et al. Application of "Yang Wei Yin Xuan" pathogenesis in the treatment of myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Mod J Integr Tradit Chin West Med*(现代中西医结合杂志), 2021, 30:734-737.
 - 11 Sun XJ. Based on biothermodynamics study on the difference of cold and heat medicinal properties/attributes of aconite and dried ginger with different compatibility levels [D]. Chengdu: Chengdu University of Traditional Chinese Medicine(成都中医药大学), 2014.
 - 12 Ye Q, Guo YP, Peng C, et al. Component research about Aconiti Lateralis Radix Prepapata compatible with fresh ginger, dried ginger, sand-fried ginger[J]. *Chin Tradit Pat Med*(中成药), 2013, 35:1035-1039.
 - 13 Yan N, Yang CX, Ma J, et al. Effects of β -sitosterol on myocardial ischemia-reperfusion injury and ERK1/2 signaling pathway in rats[J]. *J Cardiovasc Pulmon Dis*(心血管病学进展), 2020, 41:321-325.
 - 14 Chu XQ, Chu XL, Qin J. Protective effect and mechanism of 10-gingerol on hypoxia/reoxygenation-induced injury of neonatal rat cardiomyocytes[J]. *J Pharm Clin Res*(药学与临床研究), 2017, 25:469-472.
 - 15 Jiang XX, Zhang K, Zhang Y. Effects of diosgenin on apoptosis in rats with myocardial ischemia-reperfusion injury and analysis of related mechanisms[J]. *Chin Circ J*(中国循环杂志), 2022, 37:526-532.
 - 16 Jin K, Kan WH, Shi JL, et al. Effects of shuangdan components on isolated blood vessels and acute myocardial ischemia-reperfusion injury in rats[J]. *Chin J Exp Med Form*(中国实验方剂学杂志), 2010, 16:197-201.
 - 17 Yang Y, Han ZX. Research progress on the mechanism of vascular endothelial cells in tissue ischemia-reperfusion injury[J]. *Beijing J Stomatol*(北京口腔医学), 2017, 25:294-296.
 - 18 Xu W, Chen J, Chen E, et al. RASA4 inhibits the HIF α signaling pathway to suppress proliferation of cervical cancer cells[J]. *Bioengineered*, 2021, 12:10723-10733.
 - 19 Oguzoglu AS, Senol N, Asci H, et al. Pregabalin protects brain tissue from subarachnoid hemorrhage by enhancing HIF-1 α /eNOS signaling and VEGF production[J]. *World Neurosurg*, 2021, 152:e713-e720.
 - 20 Lv L, Kong Q, Li Z, et al. Honokiol Provides cardioprotection from myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting mitochondrial apoptosis via the PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Cardiovasc Ther*, 2022, 2022:1001692.
 - 21 Zhao XK, Wang M, Qiu YY, et al. Effect of Danggui Buxue decoction on the apoptosis of radiation-induced myocardial injury based on FasL/TNF- α signaling pathway [J]. *Lishizhen Med Mater Med Res*(时珍国医国药), 2020, 31:1312-1314.
 - 22 Zhang Y, Liu D, Hu H, et al. HIF-1 α /BNIP3 signaling pathway-induced-autophagy plays protective role during myocardial ischemia-reperfusion injury[J]. *Biomed Pharmacother*, 2019, 120:109464.
 - 23 Xing X, Guo S, Zhang G, et al. miR-26a-5p protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating the PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2020, 53:e9106.
 - 24 Xie F, Wu YY, Duan GJ, et al. Anti-myocardial ischemia reperfusion injury mechanism of dried ginger-aconite decoction based on network pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:609702.