

• XXXX •

八味沉香丸激活磷脂酰肌醇3-激酶抑制铜死亡改善大鼠急性心肌缺血损伤

张晓英, 谢予荃, 张雨婵, 司 祺, 肖元糊, 郭毓祺, 邵夏瑀
(西藏民族大学医学院, 西藏民族大学藏药检测技术教育部工程研究中心, 陕西 咸阳 712082)

摘 要:【目的】为了研究藏药八味沉香丸(Bawei Chenxiang Wan, BCW)防治心肌缺血的有效活性部位及机制。【方法】建立异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)诱导大鼠在体心肌缺血模型、冠脉结扎离体心脏缺血模型, 评估BCW全方、醇提物及其不同极性萃取物对心电图ST段、心肌损伤、血流动力学及心肌梗死的影响。检测心肌组织磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)磷酸化水平、铜死亡相关蛋白的表达, 以及 Cu^{2+} 含量。利用氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)心肌细胞损伤模型联合PI3K激动剂和抑制剂验证通路调控关系。【结果】BCW全方可改善心肌缺血大鼠心电图ST段抬高($P<0.01$), 降低心肌损伤标志物含量, 改善血流动力学, 上调PI3K磷酸化水平($P<0.01$), 减少 Cu^{2+} 蓄积($P<0.01$), 缩小心肌梗死范围。BCW醇提物及各萃取物可改善离体大鼠离体心肌缺血, 减少 Cu^{2+} 蓄积, 其中BCW正丁醇萃取物效果较好($P<0.01$); 其可上调PI3K磷酸化水平($P<0.01$)、下调铁氧还蛋白还原酶(ferrodoxin reductase 1, FDX1)($P<0.05$)、硫辛酸合酶(lipoic acid synthetase, LIAS)、二氢硫辛酰胺乙酰转移酶(dihydrolipoamide S-acetyltransferase, DLAT)多聚体表达($P<0.05$)。在OGD诱导心肌细胞模型中, PI3K激动剂可抑制DLAT多聚体表达($P<0.05$), 而PI3K抑制剂可削弱正丁醇萃取物对DLAT多聚体的抑制作用($P<0.05$)。【结论】BCW正丁醇萃取物是改善大鼠心肌缺血的主要有效部位, 其机制可能与PI3K激活介导的铜死亡抑制有关。

关键词: 八味沉香丸; 心肌缺血; 正丁醇萃取物; 磷脂酰肌醇3-激酶; 铜死亡; 二氢硫辛酰胺乙酰转移酶

中图分类号: R29; R363

文献标志码: A

文章编号: 1672-3554(XXXX)XX-0001-15

DOI: 10.11714/jysu.med.YX20260105

Bawei Chenxiang Wan Protects Against Acute Myocardial Ischemia by Activating PI3K to Inhibit Cuproptosis in Rats

ZHANG Xiaoying, XIE yuquan, ZHANG yuchan, SI qi, XIAO yuanhu, GUO yuqi, SHAO xiayu
(School of Medicine, Xizang Minzu University, Engineering Research Center of Tibetan Medicine Detection Technology,
Xianyang 712082, China)

Correspondence to: ZHANG XiaoYing, E-mail: xyzhang@xзму.edu.cn

Abstract: 【Objective】To investigate the protective effect and underlying mechanisms of the Bawei Chenxiang Wan (BCW) against myocardial ischemic injury. 【Methods】Myocardial ischemia was induced in rats by subcutaneous injection of isoproterenol (ISO), and ex vivo ischemia was established by coronary artery ligation in isolated rat hearts. The effects of BCW and its polar extracts on electrocardiogram (ECG), myocardial histopathology, serum cardiac enzymes, hemodynamic parameters, and infarct size were evaluated. The expression of proteins related to the PI3K and cuproptosis

收稿日期: 2026-07-11

录用日期: 2026-08-24

基金项目: 西藏自治区科技计划项目(XZ202401ZY0107); 国家自然科学基金资助项目(82460334); 西藏民族大学2026年研究生科研创新与实践一般项目(Y2026176)

作者简介: 张晓英, 第一作者, 通信作者, 副教授, 藏药防治心血管疾病, E-mail: xyzhang@xзму.edu.cn

(FDX1, LIAS, DLAT) were detected. The levels of Cu^{2+} and glutathione in myocardial tissue were measured. In an oxygen-glucose deprivation (OGD) model of H9c2 cardiomyocyte injury, the effects of the n-butanol extract of BCW and the PI3K agonist and inhibitor were examined. 【Results】 BCW ameliorated ST-segment abnormalities on electrocardiograms, reduced serum levels of myocardial injury markers, improved hemodynamic parameters, upregulated PI3K phosphorylation ($P<0.01$), and decreased Cu^{2+} accumulation in rats with myocardial ischemia ($P<0.01$). Moreover, BCW reduced the myocardial infarct size. In the isolated rat heart model of ischemia, both the ethanol extract and various solvent fractions of BCW exerted protective effects and reduced Cu^{2+} content, among which the n-butanol fraction exhibited the most potent activity ($P<0.01$). Specifically, the n-butanol fraction upregulated PI3K phosphorylation ($P<0.01$) and downregulated the expression of cuproptosis-related proteins, including FDX1 ($P<0.05$), LIAS, and DLAT oligomerization ($P<0.05$). In the OGD-induced cardiomyocyte injury model, treatment with a PI3K agonist inhibited DLAT oligomerization ($P<0.05$), whereas co-administration of a PI3K inhibitor attenuated the inhibitory effect of the n-butanol fraction on DLAT oligomer formation ($P<0.05$). 【Conclusion】 BCW exerts a significant protective effect against myocardial ischemic injury, and its mechanism may involve activation of the PI3K and inhibition of cuproptosis.

Key words: Bawei Chenxiang Wan; myocardial ischemia; n-butanol extract; PI3K; cuproptosis; dihydrolipoamide S-acetyltransferase

[J SUN Yat-sen Univ (Med Sci)]

急性心肌缺血是冠心病的典型病理状态,其特征是心肌血液供应与氧需求失衡,从而导致心肌代谢紊乱、心肌梗死、心力衰竭甚至猝死,已成为全球范围内重大的公共卫生问题^[1-2]。目前临床治疗手段以溶栓、经皮冠状动脉介入治疗、抗血小板聚集等为主,虽能在一定程度上恢复心肌血供,但仍存在再灌注损伤、心肌细胞不可逆凋亡、心室重构等问题,难以从根本上逆转心肌损伤进程。心肌缺血性损伤与多种类型的心肌细胞死亡密切相关^[3-4],其中铜死亡作为一种新型程序性细胞死亡方式,因其独特的线粒体代谢调控机制备受关注。该过程由 Cu^{2+} 过载诱导脂酰化蛋白异常聚集,进而引发蛋白毒性应激和线粒体代谢衰竭^[5]。在心肌缺血/再灌注损伤中的研究显示,铜死亡通路的关键效应蛋白铁氧还蛋白还原酶(ferredoxin reductase 1, FDX1)上调,提示该死亡方式在心肌损伤中扮演着不可忽视的角色^[6]。此外,磷脂酰肌醇3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)作为调控细胞存活的关键枢纽,其在心肌缺血中的保护作用已被广泛证实^[7-8]。尽管铜死亡与PI3K在心肌缺血中均扮演关键角色,但二者是否存在交互调控,以及能否通过靶向该网络节点开发新型心肌保护药物仍值得深入研究。

藏药八味沉香丸(Bawei Chenxiang Wan, BCW)

始载于藏族医药古典巨著《四部医典》,可清心热、养心、安神、开窍,用于热病攻心、神昏谵语,心前区疼痛、心脏外伤、冠心病、心绞痛等。常见散剂和丸剂两种剂型,均由肉豆蔻、沉香、广枣、乳香、诃子、木香、木棉花和矿物药石灰华组成,两者处方相同但各药材配比存在差异。现代药理学研究多集中在散剂抗心肌缺血、缺血再灌注损伤等方面^[9-12],而八味沉香丸的药效学评价、药理作用机制、药效物质基础及临床适应证的系统研究均较为匮乏,严重制约了其现代化发展与临床推广应用。

本团队前期在BCW防治大鼠心肌梗厚^[13]、高原心脏病大鼠右心室肥厚^[14]方面开展了相关研究,但该复方在急性心肌缺血中的作用及机制尚不清楚。基于上述铜死亡/PI3K在心肌缺血损伤中的作用,本研究提出假说:BCW可能通过激活PI3K抑制 Cu^{2+} 蓄积及脂酰化蛋白聚集,发挥心肌保护作用。为验证这一假说,本研究拟通过构建大鼠心肌缺血整体模型、离体心脏灌流模型、心肌细胞氧糖剥夺(oxygen-glucose deprivation, OGD)模型,系统评价BCW防治心肌缺血的作用,并探讨其对铜死亡关键分子及PI3K通路的调控效应,以期为BCW的临床应用拓展及现代化开发提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

SD大鼠(雄性,体重:180~220 g,SPF级,许可证号:SCXK(川)2025-0030)购买自成都达硕实验动物有限公司。大鼠被饲养在西藏民族大学医学院动物房,空气湿度保持在 $(50 \pm 2)\%$,温度保持在 $(25 \pm 2)^\circ\text{C}$,12 h光/暗交替,并提供充足的食物及水。本研究所有动物实验操作符合动物伦理学准则,经由西藏民族大学伦理委员会审批(2023-08-003)同意后开展实验研究。

1.2 主要试剂和仪器

八味沉香丸由西藏昌都光宇利民药业有限责任公司提供(西藏昌都,中国),国药准字:Z20130021,生产批号:240803;美托洛尔(上海陶术生物科技有限公司,生产批号:H32025391);异丙肾上腺素(15627,默克化工技术上海有限公司)LY294002(154447-36-6,上海蓝木化工)、740Y-P(1236188-16-1,上海蓝木化工)甲醇、石油醚、乙酸乙酯、正丁醇(分析纯,天津市天力化学试剂有限公司);p-PI3K(GB150210-100),PI3K(GB11525-100),GADPH(GB15002-100),P53(GB114061-100),FDX1(GB150091-100),LIAS(GB150135-100)抗体购买于武汉赛维尔生物科技有限公司,DLAT(Bioss,bsm-62155R)抗体购买于北京博奥森生物技术有限公司;Power Lab生理记录仪(ADInstruments)、Langendorff离体系统Langendorff灌流装置(Analog Devices)、小动物B超(飞依诺VINNO6);小动物麻醉机R500IP(深圳市瑞沃德生命科技有限公司)

1.3 主要方法

1.3.1 异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血模型构建及实验分组 36只大鼠适应性饲养7天后,随机分为6组,每组6只,Control组,异丙肾上腺素诱导心肌缺血(ISO)模型组,ISO+八味沉香丸(BCW)高、中、低剂量组(0.2、0.4、0.8 g/kg),ISO+美托洛尔组(10 mg/kg)。BCW连续灌胃给药9 d。从第8天开始,对照组大鼠腹腔注射等体积生理盐水,其余各组大鼠均腹腔注射异丙肾上腺素(85 mg/kg),连续2 d。加水加饲料、更换垫料。

1.3.2 大鼠心电图检测 大鼠经鼻吸入2.5%异氟烷进行诱导麻醉,麻醉成功后仰卧固定于鼠板上,

并以1.0%异氟烷维持麻醉状态,同时记录心电图变化以评估心肌缺血相关心功能损伤。

1.3.3 八味沉香丸各部位提取与制备 精确称取60 g八味沉香丸粉末,置于500 mL烧杯中,加入1500 mL 90%甲醇(methanol, MeOH)溶液,涡旋混匀后置于超声波清洗仪中,室温超声提取30 min(功率200 W,频率40 kHz)。提取完成后,将锥形瓶密封置于4℃冰箱静置过夜,使有效成分充分溶出。次日采用抽滤法收集上清液,去除药渣;将收集的上清液转移至旋转蒸发仪中,在45℃、0.08 MPa条件下减压浓缩至约10 mL,随后将浓缩液转移至50 mL离心管中,置于60℃水浴锅中缓慢挥发至体积为7.5 mL。将浓缩液放入-20℃冰箱预冻4 h,之后转入冷冻干燥机中,在-50℃、0.01 MPa条件下冷冻干燥24 h,得到BCW醇提物粉末,密封后置于-20℃冰箱避光保存备用。

取上述BCW醇提物粉末,加入适量蒸馏水混悬,依次用等体积石油醚(petroleum ether, PE)、乙酸乙酯(ethyl acetate, EA)、正丁醇(n-butanol, BuOH)进行梯度萃取,每种溶剂重复萃取3次,合并各萃取液。分别将石油醚萃取液、乙酸乙酯萃取液、正丁醇萃取液置于旋转蒸发仪中,按上述相同条件减压浓缩至适宜体积,经预冻后冷冻干燥,分别得到石油醚萃取物、乙酸乙酯萃取物、正丁醇萃取物粉末,密封避光保存备用。

1.3.4 大鼠离体心脏缺血模型建立 大鼠经异氟烷吸入麻醉后快速开胸取心,心脏立即置入4℃预冷的KH灌流液中漂洗,去除心包及结缔组织,轻压心室排出残血。将心脏主动脉插管并固定于Langendorff逆灌装置,采用80~100 cm H₂O恒压模式,灌流37℃且持续通入95%O₂+5%CO₂混合气体的KH灌流液以维持氧供。心脏平衡灌流20 min,待搏动节律及血流动力学指标稳定后,于冠状动脉左前降支起始部下方2 mm处,以6-0无菌医用丝线结合聚乙烯小管结扎血管(控制力以完全阻断血流),持续结扎30 min构建心肌缺血模型。结扎期间实时监测心电图ST段、左心室发展压(LVDP)等指标,以ST段显著抬高、LVDP下降>30%作为模型构建成功的判定标准。

1.3.5 大鼠离体心肌缺血实验分组 30只SD大鼠,体重200±20 g,随机分为5组,每组6只,Control组:持续灌流KH液160 min,不结扎冠状动脉;

心肌缺血模型组(myocardial ischemia, MI):灌流KH液60 min后,结扎冠状动脉左前降支30 min,后续继续灌流KH液;BCW处理组,分别含100、150、300 $\mu\text{g/mL}$ BCW的KH液预处理20 min,其余同MI组。

30只SD大鼠,体重 200 ± 20 g,随机分为5组,每组6只,Control组:持续灌流KH液160 min,不结扎冠状动脉;心肌缺血模型组(MI):灌流KH液60 min后,结扎冠状动脉左前降支30 min,后续继续灌流KH液;MeOH提取物组:含BCW甲醇的KH液预处理20 min,其余同MI组;PE萃取组:含BCW石油醚萃取物的KH液预处理20 min,其余同MI组;EA萃取组:含BCW乙酸乙酯萃取物的KH液预处理20 min,其余同MI组;BuOH萃取组:含BCW正丁醇萃取物的KH液预处理20 min,其余同MI组。

1.3.6 心电图及血流动力学指标检测 全程通过生理信号记录分析系统同步监测心电图,动态记录ST段高度变化;于左心室心尖部剪取小口,将排空至无张力的微型球囊导管经切口缓慢置入左心室腔,以丝线轻扎固定导管,向球囊内微量注入无菌生理盐水,将左心室舒张末期压校准至5~10 mmHg,随后将球囊导管连接压力换能器,并与生理信号记录分析系统联动,实时记录左心室发展压(left ventricular developed pressure, LVDP)、左心室压力最大上升速率(maximum rate of left ventricular pressure rise, $+dp/dt_{\text{max}}$)、左心室压力最大下降速率(maximum rate of left ventricular pressure fall, $-dp/dt_{\text{max}}$)等血流动力学指标,于实验结束前5 min记录各指标的稳定数值,用于后续统计分析。

1.3.7 TTC染色检测心肌损伤面积 取新鲜心肌组织,沿心脏短轴切成2~3 mm厚的切片,置于10 g/L的TTC染色液中,37 $^{\circ}\text{C}$ 避光孵育30 min,期间每隔10 min轻轻翻动一次。染色结束后,用生理盐水漂洗去除残留染色液,正常心肌组织呈红色,缺血坏死区域呈白色。采用Image J软件分析心肌切片图像,计算心肌损伤面积占心肌总面积的百分比。

1.3.8 心肌细胞OGD模型构建及分组 不同浓度(200~1000 $\mu\text{g/mL}$)BCW正丁醇(BuOH)萃取物处理H9c2心肌细胞,CCK8法检测细胞活力,筛选药物安全范围。取对数生长期H9c2心肌细胞,无血清,1% O_2 ,5% CO_2 处理6、8、10、12 h,构建心肌细胞

OGD模型。实验设置空白组、OGD模型组、不同浓度BCW正丁醇(BuOH)萃取物干预组(200、400、600 $\mu\text{g/mL}$)检测细胞活力,筛选最佳药物浓度。

实验设置空白组、OGD模型组、OGD+PI3K激动剂740Y-P(先加入30 $\mu\text{mol/L}$ 740Y-P预处理)处理组,检测相关蛋白表达;实验设置空白组、OGD模型组、OGD+BuOH处理组、OGD+BuOH联合PI3K抑制剂LY294002组(先加入10 $\mu\text{mol/L}$ LY294002预处理,再加入BuOH共同孵育),各组处理结束后收集样本,用于后续分子生物学验证。

1.3.9 Western Blot检测 取适量心肌组织或者心肌细胞,加入RIPA,冰上裂解,匀浆机机械匀浆,以12000 rpm(转子半径 $r = 7.0$ cm)4 $^{\circ}\text{C}$ 离心15分钟。用BCA法进行蛋白质定量,加入5 $\times$ 示踪剂,高温变性,配制分离胶和浓缩胶、上样、电泳分离蛋白质后转移到PVDF膜上,用一抗稀释液稀释p-PI3K、PI3K、FDX1、LIAS、DLAT、DLAT Oligomer抗体后,4 $^{\circ}\text{C}$ 过夜,用TBST冲洗10 min $\times$ 3次,孵HRP标记二抗,室温下孵育1小时,TBST冲洗,最后加显影液,并用ChemiDocTM XRS+(Bio-Rad)检测,使用ImageJ进行定量分析。

1.3.10 统计分析 采用GraphPad Prism 10.1.1软件分析并作图,所有数据均以均数 $\pm$ 标准差(Mean $\pm$ SD)表示,多组间的均数经正态分布及方差齐性检验后使用单因素方差分析,方差齐时多重比较采用Dunnett法,方差不齐时多重比较采用Dunnett T3法,当 $P < 0.05$ 时,认为差异具有统计学意义。

【提示:使用方差分析以后,往往会需要进一步多重比较,即所谓的两两比较。一般经验是:方差齐,各组样本量相同,用Turkey法;方差齐,若多个实验组与对照组比较用Dunnett法;方差齐,样本量不同,用Scheffe法;组数较少,用Bonferroni法;方差不齐,样本量小,用Games-Howell法。】

2 结果

2.1 BCW对ISO诱导大鼠心肌缺血损伤的保护作用

与对照组相比,异丙肾上腺素(isoproterenol, ISO)组大鼠心电图ST段压低,具有统计学差异($P < 0.01$),0.2、0.4、0.8 g/kg BCW预处理后ST段回升,且呈剂量依赖性(图1A-B)。心肌组织HE和

Masson 染色结果显示:ISO 组心肌细胞排列紊乱,出现空泡变性,并伴有大量炎性细胞浸润;心肌间质及血管周围可见蓝色胶原纤维沉积。BCW 各剂量组心肌细胞排列规则,炎性细胞浸润程度减轻,心肌组织中胶原阳性沉积区域缩小,胶原纤维异常增生得到有效抑制(图 1C)。肌酸激酶 MB 同工酶(creatine kinase MB isoenzyme, CK-MB)与心肌肌钙蛋白(cardiac troponin T, cTnT)是临床评估心肌细胞损伤及坏死程度的重要指标。与对照组相比,ISO 组大鼠血清 CK-MB 活性及 cTnT 水平均升高($P<0.01$),而经 BCW 预处理后,两者的表达较 ISO 组均降低($P<0.01$)(图 1D-1E)。与此同时,Western Blot 检测了各组心肌组织中 PI3K 蛋白的磷酸化水平,与对照相比,ISO 组 p-PI3K/PI3K 水平降低($P<0.01$), Cu^{2+} 含量增加($P<0.01$),BCW 各剂量组磷酸化水平回升且 Cu^{2+} 含量减少,且具有统计学差异($P<0.01$)(图 1F-1G)。

2.2 BCW 预处理对 Langendorff 离体大鼠心肌缺血模型的心脏保护作用

与对照组相比,离体大鼠心肌缺血模型组心电图 ST 段抬高且具有统计学差异($P<0.01$)。100、150、300 $\mu\text{g/mL}$ BCW 各组 ST 段抬高幅度下降,且呈剂量依赖性(图 2A-B)。同时,模型组大鼠心脏血流动力学指标 LVDP、+dp/dtmax 和 -dp/dtmax 降低,而 BCW 干预可剂量依赖性逆转上述指标(图 2C-E)。为进一步明确 BCW 中发挥保护大鼠心肌缺血作用的组分,本研究采用不同极性的溶剂分别提取 BCW,获得醇提取物(MeOH)、石油醚萃取物(PET)、乙酸乙酯萃取物(EAC)、正丁醇萃取物(BuOH)。与模型组相比,BCW 醇提取物及各萃取物可不同程度降低 ST 段抬高幅度,并提高 LVDP、+dp/dtmax 及 -dp/dtmax 水平(图 3A-E)。

采用 TTC 染色法检测各组大鼠心肌梗死面积,与对照组相比,模型组大鼠的心肌组织呈现较大面积梗死区域,而在预先给予 BCW 醇提取物及各萃取物处理后,心肌梗死面积减少,红色正常区域增加,其中 MeOH 组与模型组相比差异具有统计学意义($P<0.01$),各萃取物组中 BuOH 组改善效果显著($P<0.01$)(图 3F)。此外,模型组心肌组织中 Cu^{2+} 含量增加,BCW 醇提取物及各萃取物组 Cu^{2+} 含量减少,其中 MeOH 和 BuOH 具有统计学差异($P<0.01$)(图 3G)。

2.3 BCW 正丁醇萃取物通过激活 PI3K 抑制铜死亡相关蛋白改善 Langendorff 离体大鼠心肌缺血

为阐明 BCW 改善大鼠心肌缺血的分子机制,本研究采用 Western blot 技术检测了离体大鼠心肌缺血模型中 PI3K 及 Cu^{2+} 相关蛋白表达。结果显示,与对照组相比,模型组心肌组织中 PI3K 磷酸化水平(p-PI3K/PI3K)下降($P<0.01$),BCW-BuOH 组 PI3K 磷酸化水平回升,具有统计学差异($P<0.01$)(图 4A)。与对照组相比,模型组大鼠心肌组织中 FDX1、硫辛酸合酶(Lipoic Acid Synthetase, LIAS)蛋白表达,二氢硫辛酰胺乙酰转移酶(dihydrolipoamide S-acetyltransferase, DLAT)寡聚化水平均升高,具有统计学差异($P<0.01$);经 BCW-BuOH 预处理后,上述三个蛋白表达较模型组下调(图 4B-4D)。

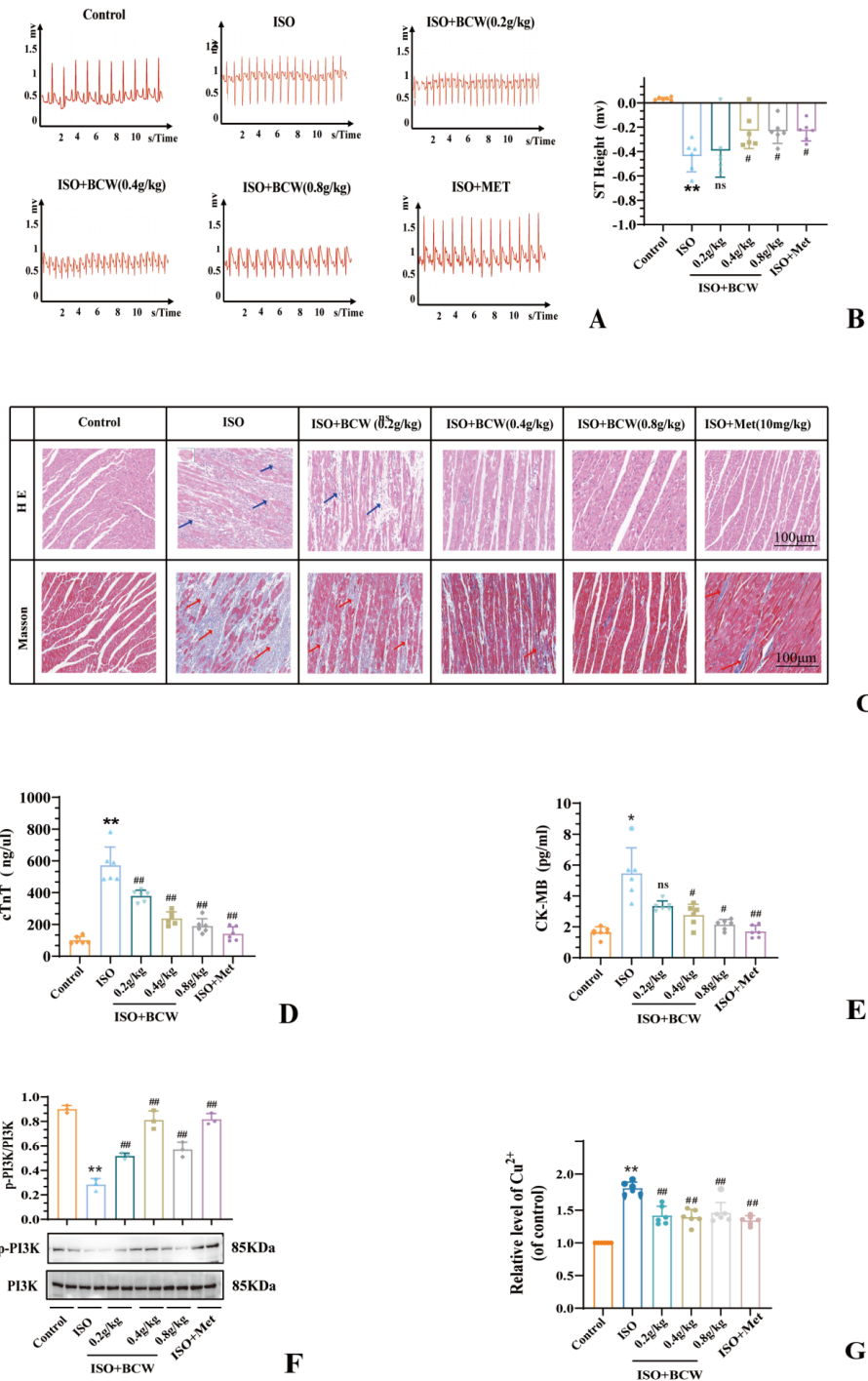
2.4 PI3K 介导的铜死亡调控在 BCW 正丁醇萃取物抗心肌细胞缺氧损伤中的作用

本研究用 200、400、600、800、1000 $\mu\text{g/mL}$ BCW 正丁醇萃取物处理 H9c2 心肌细胞 12 h,细胞活力检测发现 800、1000 $\mu\text{g/mL}$ 组细胞活力下降,具有统计学差异($P<0.01$)。OGD 分别处理 H9c2 心肌细胞 6、8、10、12 h 建立心肌细胞氧糖剥夺模型,其中 6 h 细胞活力接近 50%,用于后续机制研究。采用 200、400、600 $\mu\text{g/mL}$ BCW 正丁醇萃取物干预可呈剂量依赖性提高 OGD 模型的细胞存活率,其中 600 $\mu\text{g/mL}$ 处理组回升最显著, $P<0.01$ (图 5A-C)。

与空白组相比,OGD 处理组 PI3K 磷酸化水平(p-PI3K/PI3K)下调,而 DLAT 寡聚体(DLAT Oligomer/DLAT)水平升高,经 PI3K 激动剂 740Y-P 预处理后,PI3K 磷酸化水平回升($P<0.01$),DLAT 寡聚体水平下降($P<0.01$)(图 5D-E)。此外,经 BCW-BuOH 预处理可使 PI3K 磷酸化水平升高($P<0.01$),同时 DLAT 寡聚体水平下降($P<0.01$);进一步联合应用 PI3K 抑制剂 LY294002 后,BCW-BuOH 对 PI3K 的激活作用($P<0.05$)及对铜死亡蛋白的抑制效应均被削弱($P<0.05$)(图 5F-G)。

3 讨论

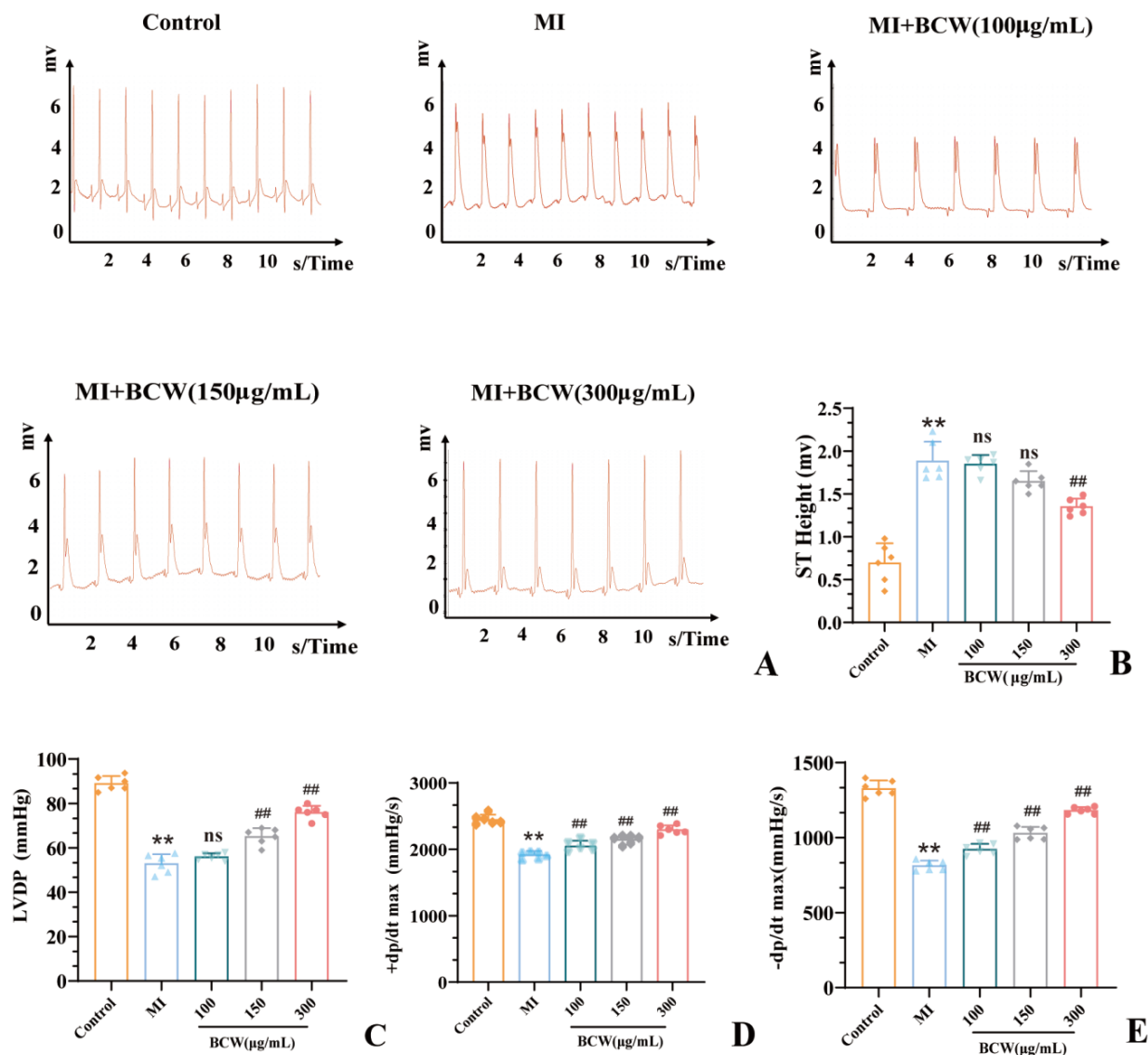
根据藏医经典理论,隆、赤巴、培根三因素乱是导致疾病的主要因素,其中“隆”主司气血运行与心



A: Representative electrocardiogram; B: Statistical chart of ST segment, $F(5,30) = 9.681$, $P < 0.0001$; ISO vs Control, $^{**}P < 0.0001$; 0.2 g/kg BCW vs ISO, $P = 0.9632$, ns; 0.4 g/kg BCW vs ISO, $^{#}P = 0.0388$; 0.8 g/kg BCW vs ISO, $^{*}P = 0.0434$; 10 mg/kg Met vs ISO, $^{*}P = 0.0420$; C: HE and Masson staining of rat myocardial tissue; D: c-TnT, $F(5,30) = 54.12$, $P < 0.0001$; ISO vs Control, $^{**}P < 0.0001$; 0.2, 0.4, and 0.8 g/kg BCW vs ISO, $^{##}P < 0.0001$; 10 mg/kg Met vs ISO, $^{##}P < 0.0001$; E: CK-MB, $F(5,30) = 19.8$, $P = 0.0001$; ISO vs Control, $^{*}P = 0.0111$; 0.2 g/kg BCW vs ISO, $P = 0.1076$, ns; 0.4 g/kg BCW vs ISO, $^{*}P = 0.0345$; 0.8 g/kg BCW vs ISO, $^{*}P = 0.0199$; 10 mg/kg Met vs ISO, $^{##}P = 0.0072$; F: Expression and statistical analysis of p-PI3K/PI3K protein, $F(5,12) = 63.35$, $P < 0.0001$; ISO vs Control, $^{**}P < 0.0001$; 0.2 g/kg BCW vs ISO, $^{##}P = 0.0005$; 0.4 and 0.8 g/kg BCW vs ISO, $^{##}P < 0.0001$; 10 mg/kg Met vs ISO, $^{##}P < 0.0001$; G: Relative Cu^{2+} content in myocardial tissue, $F(5,30) = 31.34$, $P < 0.0001$; ISO vs Control, $^{**}P < 0.0001$; 0.2, 0.4, and 0.8 g/kg BCW vs ISO, $^{##}P < 0.0001$; 10 mg/kg Met vs ISO, $^{##}P < 0.0001$. Data are presented as the (Mean $\pm$ SD, $n = 6$). $^{**}P < 0.01$ compared with Control group; $^{*}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ compared with ISO group; ns: not significant.

图1 BCW对ISO诱导大鼠心肌缺血损伤的保护作用

Fig.1 Protective effect of BCW on ISO-induced myocardial ischemic injury in rats



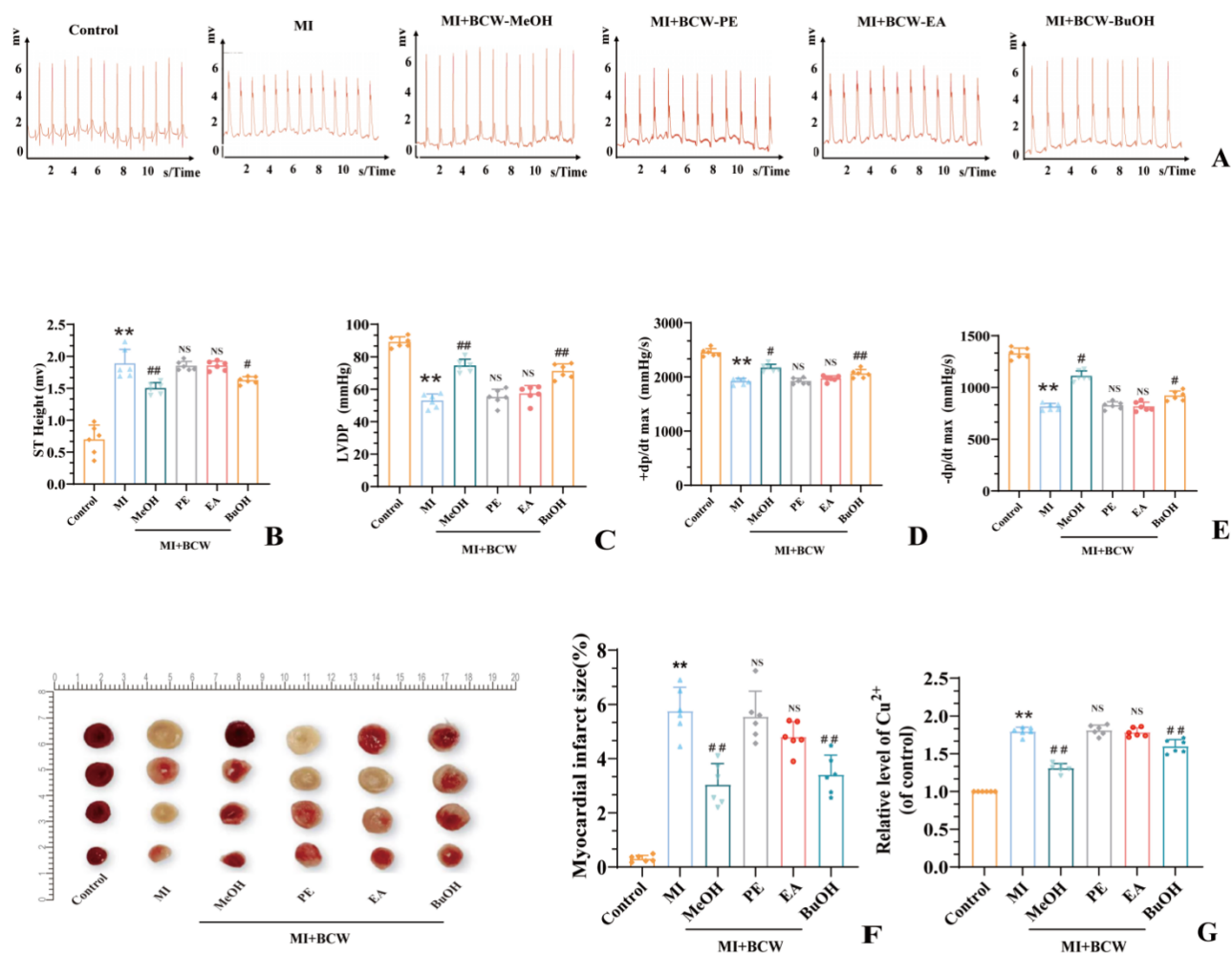
A: Representative electrocardiogram; B: Statistical chart of ST segment, $F(4, 25) = 52.50$, $P < 0.0001$; MI vs Control, $**P < 0.0001$; 100 $\mu\text{g/mL}$ BCW vs MI, $P = 0.9858$, ns; 150 $\mu\text{g/mL}$ BCW vs MI, $P = 0.0662$, ns; 300 $\mu\text{g/mL}$ BCW vs MI, $###P < 0.0001$; C: LVDP, $F(4, 25) = 123.1$, $P < 0.0001$; MI vs Control, $**P < 0.0001$; 100 $\mu\text{g/mL}$ BCW vs MI, $P = 0.3128$, ns; 150 $\mu\text{g/mL}$ BCW vs MI, $###P < 0.0001$; 300 $\mu\text{g/mL}$ BCW vs MI, $###P < 0.0001$; D: $+dp/dt_{\text{max}}$, $F(4, 25) = 55.60$, $P < 0.0001$; MI vs Control, $**P < 0.0001$; 100 $\mu\text{g/mL}$ BCW vs MI, $###P = 0.0081$; 150 $\mu\text{g/mL}$ BCW vs MI, $###P < 0.0001$; 300 $\mu\text{g/mL}$ BCW vs MI, $###P < 0.0001$; E: $-dp/dt_{\text{max}}$, $F(4, 25) = 168.6$, $P < 0.0001$; MI vs Control, $**P < 0.0001$; 100 $\mu\text{g/mL}$ BCW vs MI, $###P = 0.0002$; 150 $\mu\text{g/mL}$ BCW vs MI, $###P < 0.0001$; 300 $\mu\text{g/mL}$ BCW vs MI, $###P < 0.0001$. Data are presented as the (Mean $\pm$ SD, $n = 6$). $*P < 0.01$ compared with Control group; $^{\#}P < 0.05$, $###P < 0.01$ compared with MI group; ns: not significant.

图 2 BCW 对 Langendorff 离体大鼠心肌缺血模型的心脏保护作用

Fig. 2 Cardioprotective effect of BCW on the Langendorff isolated rat myocardial ischemia model

脉通畅,其功能失调直接导致心脉瘀阻,是心肌缺血发生发展的关键病理环节^[15]。藏医治疗心脏疾病的方剂中多配有辛、甘味药物,甘味药物具有滋补、缓和之效,擅长调治“隆”病所致心悸,辛味药物能行气散滞,可平衡“隆”的失衡^[16]。八味沉香常见

丸剂组方中融合辛甘两味,其中广枣、诃子为甘味药、肉豆蔻、沉香为辛味药协同调和“隆”病^[17-18]。为系统验证该药的抗心肌缺血效应并明确其药效物质基础,本研究分别采用整体和离体心肌缺血模型开展研究:前者以 ISO 诱导大鼠急性心肌缺



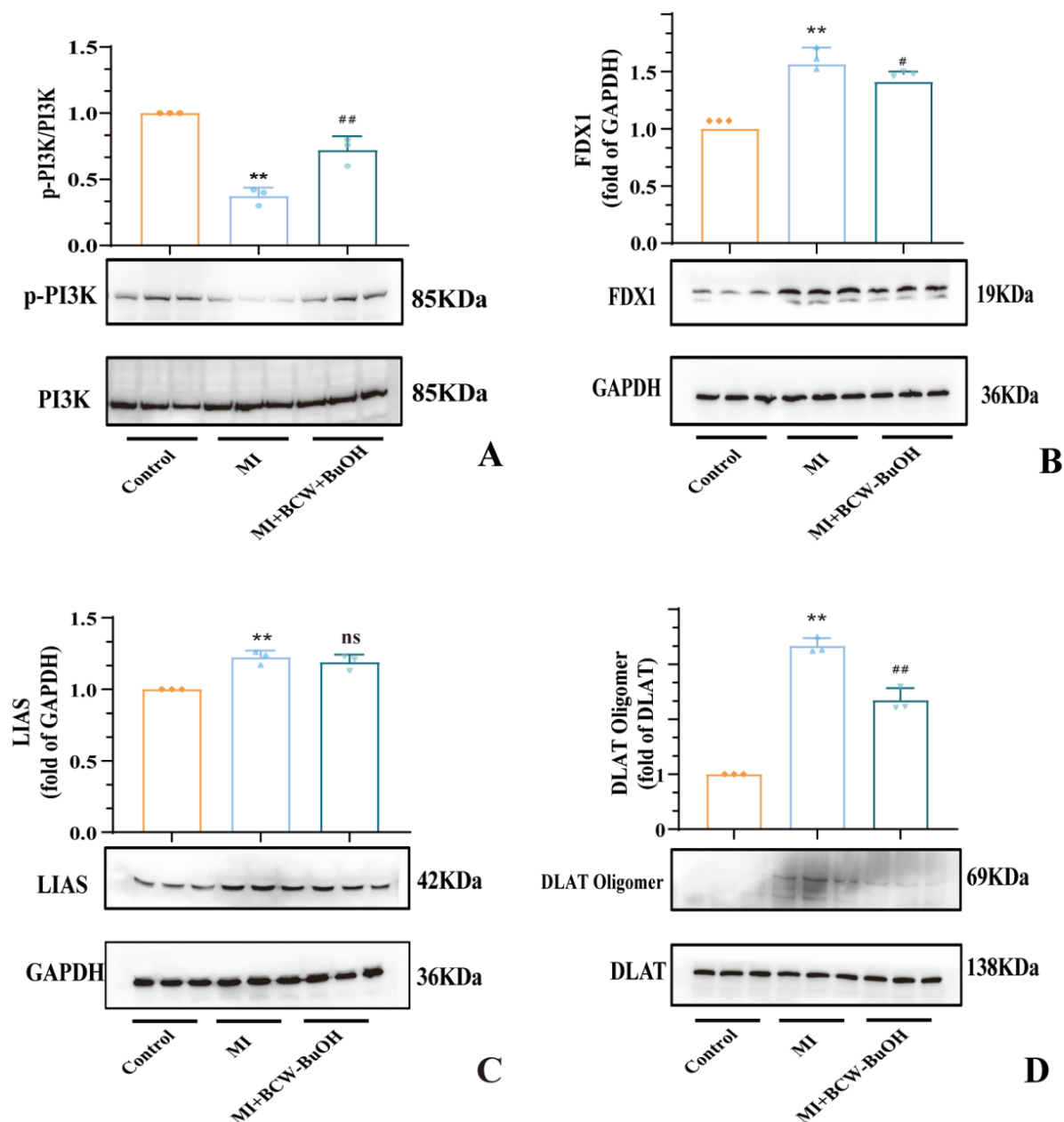
A: Representative electrocardiogram; B: Statistical chart of ST segment, $F(5,30) = 59.3$, $P < 0.0001$; MI vs Control, $**P < 0.0001$; MeOH vs MI, $^{##}P = 0.0003$; PE vs MI, $P = 0.9897$, ns; EA vs MI, $P = 0.9947$, ns; BuOH vs MI, $^{#}P = 0.0172$; C: LVDP, $F(5,30) = 62.39$, $**P < 0.0001$; MI vs Control, $**P < 0.0001$; MeOH vs MI, $^{##}P < 0.0001$; PE vs MI, $P = 0.8474$, ns; EA vs MI, $P = 0.3004$, ns; BuOH vs MI, $^{##}P < 0.0001$; D: +dp/dt max, $F(5,30) = 59.56$, $P < 0.0001$; MI vs Control, $**P < 0.0001$; MeOH vs MI, $^{##}P < 0.0001$; PE vs MI, $P > 0.9990$, ns; EA vs MI, $P = 0.5440$, ns; BuOH vs MI, $^{##}P = 0.0032$; E: -dp/dt max, $F(5,30) = 135.3$, $P < 0.0001$; MI vs Control, $**P < 0.0001$; MeOH vs MI, $^{##}P < 0.0001$; PE vs MI, $P = 0.9845$, ns; EA vs MI, $P > 0.9999$, ns; BuOH vs MI, $^{##}P = 0.0011$; F: Myocardial infarction area of the heart, $F(5,30) = 48.91$, $P < 0.0001$; MI vs Control, $**P < 0.0001$; MeOH vs MI, $**P < 0.0001$; PE vs MI, $P = 0.9825$, ns; EA vs MI, $P = 0.1065$, ns; BuOH vs MI, $^{##}P < 0.0001$; G: Relative Cu²⁺ content in myocardial tissue, $F(5,30) = 169.9$, $P < 0.0001$; MI vs Control, $**P < 0.0001$; MeOH vs MI, $^{##}P < 0.0001$; PE vs MI, $P = 0.9890$, ns; EA vs MI, $P = 0.9991$, ns; BuOH vs MI, $^{##}P = 0.0070$. $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ compared with Control group; $^{#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ compared with MI group; ns: not significant (Mean $\pm$ SD, $n = 6$).

图3 BCW醇提取物及各萃取物改善Langendorff离体大鼠心肌缺血损伤

Fig. 3 Improvement of Langendorff isolated rat myocardial ischemia injury by each component of BCW

血^[19-20],后者以Langendorff离体心脏灌流系统结扎大鼠冠脉左前降支建立心肌缺血模型^[21]。在整体动物模型中,BCW全方可改善急性心肌缺血大鼠心电图ST段压低,减轻心肌组织病理损伤及胶原沉积,降低血清心肌损伤标志物含量;在离体心脏模型中,BCW全方亦呈剂量依赖性地改善血流动力学参数。依次为基础,本研究进一步借助Langendorff离体心脏灌流系统可控灌注、排除神经

体液干扰的技术优势,对醇提取物及不同极性萃取物的抗缺血作用进行系统筛选,以明确BCW的核心药效物质基础。结果显示:BCW醇提取物及各萃取物能不同程度降低ST段抬高、改善血流动力学参数,缩小心肌缺血梗死面积。这一结果与王嘉童等^[22]在小鼠急性心肌缺血模型中证实BCW醇提取物及醇水提取物具有抗急性心肌缺血活性的研究结论相一致。



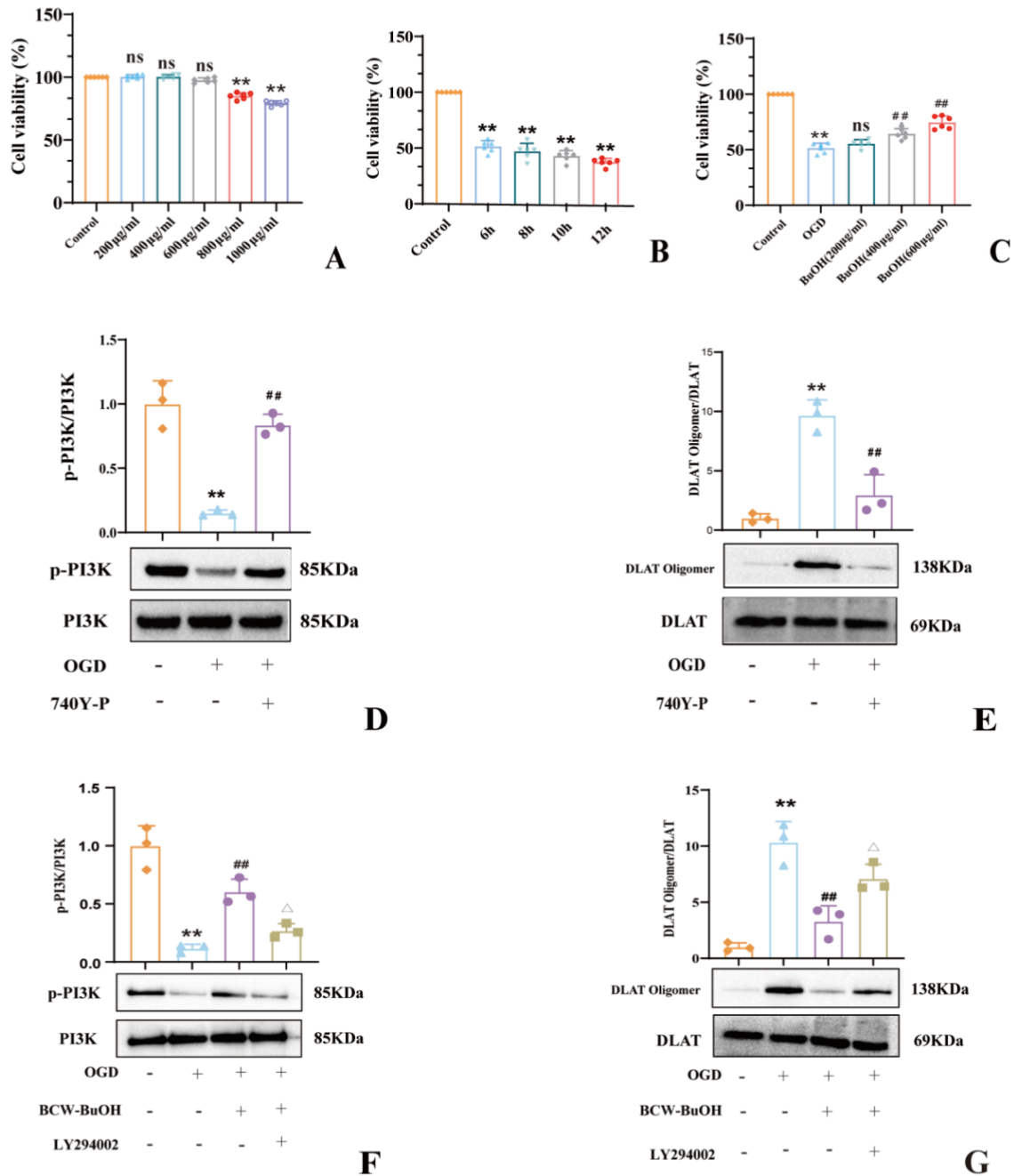
A: Expression and statistical analysis of p-PI3K/PI3K protein, $F(2,6) = 57.84$, $P < 0.0001$; MI vs Control, $^{**}P < 0.0001$; BuOH vs MI, $^{##}P = 0.0018$; B: Expression and statistical analysis of FDX1, $F(2,6) = 80.93$, $P < 0.0001$; MI vs Control, $^{**}P < 0.0001$; BuOH vs MI, $^{#}P = 0.0272$; C: Expression and statistical analysis of LIAS, $F(2,6) = 25.95$, $P = 0.0011$; MI vs Control, $^{**}P = 0.0010$; BuOH vs MI, $P = 0.5403$, ns; D: Expression and statistical analysis of DLAT oligomer/DLAT, $F(2,6) = 178.5$, $P < 0.0001$; MI vs Control, $^{**}P < 0.0001$; BuOH vs MI, $^{##}P = 0.0004$. $^{**}P < 0.01$ compared with Control group; $^{#}P < 0.05$, $^{##}P < 0.01$ compared with MI group; ns: not significant (Mean $\pm$ SD, $n = 3$).

图4 BCW正丁醇萃取物通过激活PI3K抑制铜死亡相关蛋白改善Langendorff离体大鼠心肌缺血损伤

Fig. 4 BCW-BuOH Ameliorates Langendorff Ischemic Rat Heart Injury by Activating PI3K to Inhibit Cuproptosis-related Protein

值得关注的是,在BCW各萃取物中,正丁醇萃取物(BCW-BuOH)表现出显著的药效学优势,具体体现为:改善血流动力学指标(与MI组相比, $P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)、促进ST段回落(与MI组相比, $P < 0.05$),并缩小心肌梗死面积(与MI组相比, $P <$

0.01)。为明确其物质基础,本研究采用超高效液相色谱-串联四极杆飞行时间质谱对BCW-BuOH进行成分鉴定,经过结构解析、数据库比对,口服生物利用度及类药性预测,并辅以文献佐证,共鉴定出20个核心特征化合物(见附件图+表)。其中槲



A: Safe concentration of BCW n-butanol, $F(5,30) = 159.1$, $P < 0.0001$; 200 $\mu\text{g/mL}$ vs Control, $P = 0.9847$, ns; 400 $\mu\text{g/mL}$ vs Control, $P = 0.9847$, ns; 600 $\mu\text{g/mL}$ vs Control, $P = 0.0870$, ns; 800 $\mu\text{g/mL}$ vs Control, $**P = 0.0001$; 1000 $\mu\text{g/mL}$ vs Control, $**P < 0.0001$; B: Time condition for OGD, $F(4, 25) = 165.8$, $P < 0.0001$; 6 h vs Control, $**P < 0.0001$; 8 h vs Control, $**P < 0.0001$; 10 h vs Control, $**P < 0.0001$; 12 h vs Control, $**P < 0.0001$; C: BCW n-butanol extract can improve cell survival rate, $F(4,25) = 125.0$, $P < 0.0001$; OGD vs Control, $**P < 0.0001$; 200 $\mu\text{g/mL}$ vs OGD, $P = 0.3861$, ns; 400 $\mu\text{g/mL}$ vs OGD, $^{##}P = 0.0024$; 600 $\mu\text{g/mL}$ vs OGD, $^{##}P = 0.0001$; D: Expression and statistical analysis of p-PI3K/PI3K, $F(2,6) = 46.19$, $P = 0.0002$; OGD vs Control, $**P = 0.0002$; BCW-BuOH vs OGD, $^{##}P = 0.0006$; E: Expression and statistical analysis of DLAT oligomer/DLAT, $F(2,6) = 38.77$, $P = 0.0004$; OGD vs Control, $**P = 0.0003$; BCW-BuOH vs OGD, $^{##}P = 0.0011$; F: Expression and statistical analysis of p-PI3K/PI3K, $F(3,8) = 37.59$, $P < 0.0001$; OGD vs Control, $**P < 0.0001$; BCW-BuOH vs OGD, $^{##}P = 0.0017$; LY294002 vs BCW-BuOH, $^{\Delta}P = 0.0149$; G: Expression and statistical analysis of DLAT oligomer/DLAT, $F(3,8) = 28.40$, $P = 0.0001$; OGD vs Control, $**P < 0.0001$; BCW-BuOH vs OGD, $^{##}P = 0.0005$; LY294002 vs BCW-BuOH, $^{\Delta}P = 0.0210$. * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ compared with Control group; $^{##}P < 0.01$, compared with OGD group; $^{\Delta}P < 0.05$ compared with BCW-BuOH group; ns: not significant. A-C (Mean $\pm$ SD, $n = 6$); D-G (Mean $\pm$ SD, $n = 3$).

图5 BCW-BuOH通过激活PI3K抑制铜死亡减轻OGD诱导的H9c2心肌细胞损伤

Fig. 5 BCW-BuOH attenuates OGD-induced injury in H9c2 cardiomyocytes by Activating PI3K to Inhibit Cuproptosis

皮素、熊竹素、橙皮素、杜鹃黄素为黄酮类化合物,且经药材归属溯源分析表明,上述核心成分主要来源于八味沉香丸中的广枣、木棉花、肉豆蔻等药味。已有关于八味沉香散的化学研究多集中于挥发油成分分析及总多糖、总黄酮的含量测定^[23],对其非挥发性中小极性成分的系统鉴定尚不充分。植物化学研究表明,复方中的广枣、诃子及木棉花等药味是黄酮和酚酸的主要来源,此类成分极性适中,在溶剂萃取过程中易富集于正丁醇部位^[24-25]。进一步文献调研表明,广枣总黄酮(如槲皮素等)及诃子中的没食子酸等酚酸类化合物具有抗氧化活性,能够通过清除 ROS、稳定线粒体膜电位以及调节 PI3K/Akt 等信号通路,有效抑制心肌细胞凋亡并改善微循环障碍^[26-27]。橙皮素在心肌缺血及心肌缺血再灌注损伤中发挥保护作用,其机制涉及抗炎、抑制氧化应激、抗凋亡及自噬调节等多途径^[28]。此外,山柰酚可通过调控心肌细胞内 HDAC3 介导的 Nr2 信号通路,降低氧化应激水平减轻心肌缺血^[29],表没食子儿茶素没食子酸酯则通过靶向铁死亡通路减轻心肌缺血损伤^[30]。鉴于藏药成分具有多靶点相互作用的特点,推测 BCW-BuOH 防治心肌缺血的作用是其多种活性成分协同整合的综合结果。

铜死亡作为近年来发现的一种细胞死亡新机制,与动脉粥样硬化、心力衰竭以及心肌缺血再灌注损伤等心血管疾病密切相关。临床证据显示,不同颈动脉粥样硬化斑块形态的患者血清铜浓度存在差异,其中出血斑块患者的血清铜浓度高于钙化斑块患者^[31]。此外,Cu²⁺浓度与心力衰竭严重程度成正比,已被视为心力衰竭的独立危险指标^[32]。在分子机制层面,铜死亡的核心驱动因素在于 Cu²⁺在线粒体内蓄积,通过 FDX1 介导的脂酰化蛋白寡聚化及三羧酸循环崩溃导致细胞能量代谢衰竭^[33]。在心肌缺血再灌注损伤中,缺血可触发心肌内 Cu²⁺大量动员与释放,且 Cu²⁺与同型半胱氨酸协同作用时会进一步加剧氧化应激损伤,而干预铜死亡通路则可减少心肌梗死面积,进一步支持铜死亡在缺血性心脏病中的致病作用^[34]。本研究在大鼠离体心肌缺血模型和 OGD 心肌细胞模型中观察到一致现象:缺血损伤后心肌组织及细胞内 Cu²⁺浓度升高,铜死亡相关蛋白 FDX1、LIAS 表达上调,同时 DLAT 异常寡聚化(DLAT oligomer/DLAT)增加。而给予

BCW-BuOH 干预后,上述铜死亡相关指标被有效逆转,提示其抗心肌缺血效应可能与负向调控铜死亡通路有关。

PI3K-AKT 信号通路作为调控心肌细胞存活、抑制细胞凋亡的核心通路,其磷酸化水平降低是心肌缺血状态下心肌细胞损伤、心脏功能下降的关键分子机制^[35-37]。与文献报道一致,本研究的体内外心肌缺血模型中,PI3K 磷酸化水平下降,BCW 干预后则可恢复。为了进一步明确 PI3K 信号通路与铜死亡在八味沉香丸心肌保护效应中的上下游调控关系,本研究在 H9c2 心肌细胞氧糖剥夺(OGD)模型中引入了干预策略。实验结果显示,PI3K 激动剂 740Y-P 预处理能抑制 OGD 诱导的 DLAT 异常寡聚化,说明 PI3K 通路的激活可以阻断铜死亡。更重要的是,当联合使用 PI3K 抑制剂 LY294002 后,BCW-BuOH 诱导的 PI3K 磷酸化水平被阻断,且其对 DLAT 寡聚化的抑制作用也被随之削弱。上述激动剂正向验证与抑制剂反向阻断的双向实验结果表明,PI3K 通路的激活可能位于 BCW-BuOH 调控铜死亡的上游,八味沉香丸正丁醇萃取可能通过激活 PI3K 进而负向调控铜死亡通路,从而发挥抗心肌缺血损伤的作用。而关于八味沉香散的研究主要围绕抗氧化应激^[11]、抗炎^[38]、抗细胞凋亡^[39]及改善能量代谢^[40]等经典途径展开,尚未涉及铜死亡这一新型细胞死亡方式的调控。

尽管本研究从整体动物、离体心脏及细胞水平验证了 BCW 通过激活 PI3K 抑制铜死亡发挥抗心肌缺血损伤作用,但仍存在以下局限:缺乏反向遗传学因果验证,药效物质基础及活性单体尚未阐明,PI3K 下游效应分子网络亦不清晰。针对上述问题,后续研究拟从三方面展开:构建心肌特异性 FDX1 条件性敲除小鼠,结合心肌缺血模型评估心脏功能、铜死亡标志物变化,从基因缺失层面验证其特异性;对正丁醇部位进行活性导向分离获取主要单体,采用离体灌注心脏缺血模型验证保护效应,并采用表面等离子体共振评估其与 FDX1 或 PI3K 的直接结合力;细胞层面采用 FDX1 siRNA 敲低联合 PI3K 抑制剂(LY294002)干预/回补实验,明确 BCW 调控铜死亡对 FDX1 的依赖性及 PI3K-FDX1 上下游关系,为八味沉香丸的临床应用与新药开发提供理论依据。

表 1 液相色谱-质谱联用技术鉴定出的 20 种化合物

Peak	T _R (s)	Ionizationmode	MS (m/z)	MS ² (m/z)	Detect- ederror	PeakArea	InchKEY	Identification	OD	DL	SWISS
1	344.2	[M+H] ⁺	303.0493	303; 285.1; 302.1	2.1	896934.03	REFJWTPED - VJJIY-UHFF - FAOYSA-N	槲皮素	46.43	0.27	
2	260.5	[M-H] ⁻	457.0772	169; 125; 305.1	1	16443515.81	WMBWREPUV - VBILR-WIYY - LYMNSA-N	表没食子儿 茶素没食子 酸酯	55.08	0.77	
3	534.2	[M+H] ⁺	301.2155	62.1; 300.3; 301.2	2.4	268586.8705	SHGAZHPCJJ - PHSC-YC - NIQYBTSA-N	维生素 A 酸 (视黄酸)			好
4	486.3	[M+H] ⁺	295.1321	295.1; 277.2; 277.1	2.6	108631.9133	HYXITZLLTY - IPOF-UHFF - FAOYSA-N	丹参酮 IIA	49.88	0.39	
5	390.6	[M-H] ⁻	301.0714	81; 301; 301.1	1	7093915.118	AIONOLUJ - ZLIMTK- AWEZNQCL - SA-N	橙皮素	70.31	0.27	
6	412.6	[M+H] ⁺	329.1014	329.1; 313.1; 314.1	1.8	135118.1175	WSQWAMGRH - JQANC-UHFF - FAOYSA-N	山柰酚 3,7, 4'-三甲醚			好
7	361.4	[M+H] ⁺	331.0804	91.1; 271.1; 285.1	2.7	1937312.123	DDNPCXHB - FYJXBJ- UHFFFAOY SA-N	4',5,7-三 羟基-3,6- 二甲氧基黄 酮			好
8	402	[M-H] ⁻	313.0713	298; 313.1; 283	1.3	3184294.714	BJBUTJQYZDY RMJ-UHFF - FAOYSA-N	熊竹素	50.82	0.29	
9	361.4	[M+H] ⁺	331.0804	91.1; 271.1; 285.1	2.7	1937312.123	JWOKGWICZP- PYPX-UHFF - FAOYSA-N	5,7,2'-三 羟基-6,8- 二甲氧基黄 酮			好
10	317.4	[M+H] ⁺	317.065	317.1; 302; 121.1	2	1185931.476	RJBAXROZAX- AEEM-UHFF - FAOYSA-N	杜鹃黄素	54.27	0.3	
11	356.2	[M+H] ⁺	271.0959	271.1; 211.1; 183.1	2.2	389872.0011	NSRJSISNDPO - JOP-BBRMV - ZONSA-N	美迪紫檀素	49.21	0.33	
12	314.5	[M-H] ⁻	271.0609	135; 135; 271.1	1	2353823.559	MJB - PUQUGJNA - PAZ-UHFF - FAOYSA-N	3',4',7-三 羟基黄烷酮			好

续表

Peak	T _R (s)	Ionizationmode	MS (m/z)	MS ² (m/z)	Detect- ederror	PeakArea	InchKEY	Identification	OD	DL	SWISS
13	390.6	[M-H] ⁻	301.0714	81; 301; 301.1	1	7093915.118	AIONOLUJ ZLIMTK- UHFFFAOY SA-N	- 3',5,7-三羟 基-4-甲氧 基黄酮			好
14	347.2	[M-H] ⁻	275.0927	275; 275.1; 231.1	0.7	5257446.369	VOTLUFSY IRHICX-LB PRGKRZSA-N	- - 亥茅酚			好
15	372	[M+H] ⁺	313.1064	121.1; 313.1; 122.1	2.2	2441926.709	YHXIO AVHEXKZCQ- UHFFFAOY SA-N	- 4',6,7-三 甲氧基异黄 酮			好
16	266.1	[M+H] ⁺	368.1122	368.1; 307.1; 277	1.9	596271.5021	IYGYMKDQC DOMRE- ZWKOTPCH SA-N	- - 荷包牡丹碱	69.66	0.88	
17	444.9	[M+H] ⁺	327.1583	203.1; 327.2; 137.1	2.4	5128541.27	QBFYQVZGID UNIY-UHFF FAOYSA-N	- - 齿叶黄皮素			好
18	98.1	[M-H ₂ O-H] ⁻	164.0714	147; 164.1; 135	1.2	45919225.86	UCT WMZQNUQWS LP-UHFF FAOYSA-N	- - 肾上腺素			好
19	389.5	[M-H ₂ O-H] ⁻	413.1633	81; 413.2; 331.2	6.6	2835886.669	VDGOFN MYZYBUDT- VAFVZNMK SA-N	- - 土荆皮乙酸			好
20	379.9	[M-H ₂ O+H] ⁺	283.0957	283.1; 192; 91.1	2.6	12060660.33	WKNXOKHAE DTQCX-UHFF- FAOYSA-N	- 甘茶酚H			好

参考文献

- [1] Abdelalim PA, Abedi A, Abiodun PO, et al. Global, regional, and national burden of cardiovascular diseases and risk factors in 204 countries and territories, 1990 - 2023[J]. J Am Coll Cardiol, 2025, 86(22): 2167-2243.
- [2] Liu B, Chang Y, Heng Yang YW, et al. Global, regional, and national burden of ischemic heart disease attributable to metabolic risks: a systematic analysis of global burden of disease[J]. J Geriatr Cardiol, 2025, 22(3): 361-368.
- [3] Davidson SM, Adameovú A, Barile L, et al. Mitochondrial and mitochondrial-independent pathways of myocardial cell death during ischaemia and reperfusion injury[J]. J Cell Mol Med, 2020, 24(7): 3795-3806.
- [4] Du B, Fu Q, Yang Q, et al. Different types of cell death and their interactions in myocardial ischaemia-reperfusion injury

- [J]. *Cell Death Discov*, 2025, 11(1): 19–87.
- [5] Tsvetkov P, Coy S, Petrova B, et al. Copper induces cell death by targeting lipoylated TCA cycle proteins[J]. *Science*, 2022, 375(6586): 1254–1261.
- [6] Hu J, Bao X, Ting M, et al. Precision targeting of FDX1-mediated cuproptosis by a ROS-responsive hydrogel for myocardial ischaemia-reperfusion injury treatment [J]. *Theranostics*, 2026, 16(3): 1281–1294.
- [7] Zhang Y, Gui Y, Belke D, et al. Monomethyl fumarate confers cardioprotection after myocardial infarction via HCAR2-dependent activation of PI3K/Akt signalling [J]. *Cell Death Discov*, 2025, 12(1): 18–63.
- [8] Zhang H, Wang H, Kang K, et al. 1,3-butanediol enhances autophagy via PI3K/Akt/FOXO3 pathway to ameliorate cardiac remodelling post-myocardial infarction [J]. *Eur J Pharmacol*, 2026, 1015: 178539.
- [9] 官敏, 岳栋芳, 李彩霞, 等. 基于网络药理学与动物实验探究八味沉香散对阿霉素心脏损伤的保护作用及机制[J]. *中国高原医学与生物学杂志*, 2024, 45(3): 179–189.
- Guan M, Yue DF, Li CX, et al. Research on the protective effects and mechanism of Bawei Chenxiang Powder on the cardiac injury induced by adriamycin based on network pharmacology and animal experiments [J]. *Zhongguo Gaoyuan Yixue Yu Shengwuxue Zazhi*, 2024, 45(3): 179–189.
- [10] 岳栋芳, 李彩霞, 官敏, 等. 基于网络药理学从线粒体自噬途径探讨八味沉香散抗缺血性心脏病的作用机制[J]. *中国药理学通报*, 2023, 39(10): 1957–1965.
- Yue DF, Li CX, Guan M, et al. Mechanism of Bawei Chenxiang powder in treatment of ischemic heart disease through mitophagy based on network pharmacology [J]. *Zhongguo Yaolixue Tongbao*, 2023, 39(10): 1957–1965.
- [11] 李永芳, 杨梅, 寇毅英, 等. 八味沉香散对异丙肾上腺素诱导大鼠心肌缺血损伤的保护作用[J]. *中药药理与临床*, 2008, 24(2): 63–65.
- Li YF, Yang M, Kou YY, et al. Cardioprotective effects of Baweichenxiang Powder on myocardial injury induced by isoproterenol in rats [J]. *Zhongyao Yaoli Yu Linchuang*, 2008, 24(2): 63–65.
- [12] 李莹环, 祁雅琼, 李永芳. 基于网络药理学及实验验证探究八味沉香散治疗冠心病的药效物质基础[J]. *中国中医药信息杂志*, 2025, 32(1): 69–77.
- Li YH, Qi YQ, Li YF. Exploration on the pharmacodynamic material basis of Bawei Chenxiang Powder in treating coronary heart disease based on network pharmacology and experimental verification [J]. *Zhongguo Zhongyiyao Xinxi Zazhi*, 2025, 32(1): 69–77.
- [13] Zhang XY, Zhang ZY, Wang PX, et al. Bawei chenxiang wan ameliorates cardiac hypertrophy by activating AMPK/PPAR- α signalling pathway improving energy metabolism [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 653901.
- [14] Han YW, Li SD, Zhang ZY, et al. Bawei chenxiang wan ameliorates right ventricular hypertrophy in rats with high altitude heart disease by SIRT3-HIF1 α -PDK/PDH signalling pathway improving fatty acid and glucose metabolism [J]. *BMC Complement Med Ther*, 2024, 24(1): 190.
- [15] 多布杰. 藏医内科学[M]. 北京: 民族出版社, 2004: 111.
- Du BJ. Internal medicine of Tibetan medicine [M]. Beijing: The Ethnic Publishing House, 2004: 111–118.
- [16] 才让南加, 周则, 仁增多杰, 等. 《四部医典》治疗心脏疾病方剂内在配伍规律研究[J]. *时珍国医国药*, 2015, 26(12): 2982–2983.
- Cai RNJ, Zhou Z, Ren ZDJ, et al. Study on the inherent compatibility rules of prescriptions for heart diseases in Four Medical Classics [J]. *Shizhen Guoyi Guoyao*, 2015, 26(12): 2982–2983.
- [17] 徐季轩, 马晓静, 陈泓颖, 等. 我国主要少数民族医药防治缺血性心脏病研究概述[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(17): 235–247.
- Xu JX, Ma XJ, Chen HY, et al. Overview of research on prevention and treatment of ischemic heart disease by major ethnic minority medicines in China [J]. *Zhongguo Shiyan Fangjixue Zazhi*, 2022, 28(17): 235–247.
- [18] 尕藏扎西, 才让措, 贡却坚赞, 等. 藏药安神丸治疗心隆病的机理初探[J]. *时珍国医国药*, 2017, 28(8): 1961–1962.
- Ga ZZ, Cai RC, Gong QJZ, et al. Preliminary study on the mechanism of Tibetan medicine Anshen Pill in the treatment of heart lung disease [J]. *Shizhen Guoyi Guoyao*, 2017, 28(8): 1961–1962.
- [19] Yue Z, Zhang Y, Zhang W, et al. Kaempferol alleviates myocardial ischaemia injury by reducing oxidative stress via the HDAC3-mediated Nrf2 signalling pathway [J]. *J Adv Res*, 2025, 75: 755–764.
- [20] Chen X, Yu X, Zhong S, et al. ALDH2/eIF3E interaction modulates protein translation critical for cardiomyocyte ferroptosis in acute myocardial ischaemia injury [J]. *Circulation*, 2026, 153(3): 164–184.
- [21] Bell RM, Mocanu MM, Yellon DM. Retrograde heart perfusion: the Langendorff technique of isolated heart perfusion [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2011, 50(6): 940–950.
- [22] 王嘉童, 康露璐, 周凤, 等. 八味沉香丸不同提取物的药效比较与成分研究[J]. *中国中药杂志*, 2025, 50(11): 3035–3042. DOI:10.19540/j.cnki.cjmm.20250313.303.
- Wang JT, Kang LL, Zhou F, et al. Studies on pharmacological effects and chemical components of different extracts from Bawei Chenxiang Pills [J]. *Zhongguo Zhongyao Zazhi*, 2025, 50(11): 3035–3042.

- [23] 苏玫匀,王佩,刘艳萍. GC法同时测定藏药八味沉香散中挥发性指标成分含量[J]. 药物流行病学杂志, 2024, 33(11):1247-1253.
- Su MY, Wang P, Liu YP. Simultaneous determination of volatile index components in Tibetan medicine Bawei Chenxiang Powder by GC[J]. Yaowu Liuxingbingxue Zazhi, 2024, 33(11): 1247-1253.
- [24] 黄艳菲,叶琪,田一凡,等. 南酸枣的化学成分研究及其心血管治疗潜力分析(英文)[J]. Acupuncture and Herbal Medicine, 2025, 5(2):246-269.
- Huang YF, Ye Q, Tian YF, et al. Study on chemical constituents of Choerospondias axillaris and its therapeutic potential for cardiovascular diseases [J]. Acupunct Herb Med, 2025, 5(2): 246-269.
- [25] 李晓雅,次旺仁增,罗亚敏. 藏药八味沉香丸化学成分的超高效液相色谱-线性离子阱/静电场轨道阱组合式高分辨质谱分析及不同厂家成分差异的研究[J]. 西北药学杂志, 2026, 41(3):49-70.
- Li XY, Ciwang RZ, Luo YM. UHPLC-LTQ/Orbitrap MS analysis of chemical constituents of Tibetan medicine Bawei Chenxiang Pills and component differences among different manufacturers [J]. Xibei Yaoxue Zazhi, 2026, 41(3): 49-70.
- [26] Hu S, Lv L, Hu W, et al. Quercetin improves myocardial ischaemia-reperfusion injury by regulating macrophage M2 polarization through Be1-2/Beclin-1 complex [J]. Eur J Med Res, 2025, 30(1): 780.
- [27] 李华爽,刘永建,杨洪柳,等. 诃子化学成分、药理作用机制、质量控制及炮制研究进展[J]. 天然产物研究与开发, 2022, 34(12): 2130-2141. DOI: 10.16333/j. 1001-6880.2022.12.017.
- Li HS, Liu YJ, Yang HL, et al. Research progress on chemical constituents, pharmacological mechanism, quality control and processing of Terminalia chebula Retz. [J]. Tianran Chanwu Yanjiu Yu Kaifa, 2022, 34(12): 2130-2141.
- [28] Liu P, Chen J, Qi J, et al. Hesperetin ameliorates ischemia/hypoxia-induced myocardium injury via inhibition of oxidative stress, apoptosis, and regulation of Ca²⁺ homeostasis [J]. Phytother Res, 2023, 37(5): 1787-1805.
- [29] Yue Z, Zhang Y, Zhang W, et al. Kaempferol alleviates myocardial ischemia injury by reducing oxidative stress via the HDAC3-mediated Nrf2 signaling pathway[J]. J Adv Res, 2010, 75(10): 10.
- [30] Yu QT, Zhang N, Gan XW, et al. EGCG attenuated acute myocardial infarction by inhibiting ferroptosis via miR-450b-5p/ACSL4 axis[J]. Phytomedicine, 2023, 119: 154999.
- [31] Nebojša MT, Tasic D, Petar O, et al. Copper and zinc concentrations in atherosclerotic plaque and serum in relation to lipid metabolism in patients with carotid atherosclerosis [J]. Vojnosanit Pregl, 2015, 72(9): 801-806.
- [32] Liu RX, Yao JL, Chen KX, et al. Association between biomarkers of zinc and copper status and heart failure: a meta-analysis[J]. ESC Heart Fail, 2024, 11(5): 2546-2556
- [33] Liu S, Xie K, Tong R, et al. Integrated multi-omics and experimental validation reveal FDX1/LIAS-mediated cuproptosis as a potential driver of diabetic disease [J]. Biol Trace Elem Res, 2026, 204(3): 1969-1982.
- [34] Liu XM, Liu HP, Wang N, et al. The interactive toxic effect of homocysteine and copper on cardiac microvascular endothelial cells during ischemia-reperfusion injury [J]. Chem Biol Interact, 2025, 408: 111387.
- [35] Deng R, Zhou J. The role of PI3K/AKT signalling pathway in myocardial ischaemia-reperfusion injury [J]. Int Immunopharmacol, 2023, 123: 110714.
- [36] Liu S, He Y, Shi J, et al. STAT1-activated LINC00961 regulates myocardial infarction by the PI3K/AKT/GSK3 β signalling pathway [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(8): 13226-13236.
- [37] Wang W, Zhang Z, Liu R, et al. Exploration of the potential bioactive compounds and functional mechanism of Chaihu Sanshen capsule in ameliorating myocardial ischaemia-reperfusion injury: a serum pharmaco-chemistry with network pharmacology analysis[J]. J Cell Mol Med, 2025, 29(14): e70666.
- [38] 陈宏,杨梅,李永芳,等. 八味沉香散50%醇提液对急性心肌缺血大鼠心电图及形态学的影响[J]. 陕西中医, 2010, 31(3):365-367.
- Chen H, Yang M, Li YF, et al. Effects of 50% Alcohol Extract of Bawei Chenxiang Powder on ECG and Morphology in Rats with Acute Myocardial Ischemia [J]. Shaanxi Zhongyi, 2010, 31(3): 365-367.
- [39] 宫佰会,岳栋芳,李彩霞,等. 八味沉香散含药血清对H9c2细胞氧糖剥夺损伤的保护机制研究[J]. 中国药房, 2023, 34(1):40-46.
- Gong BH, Yue DF, Li CX, et al. Study on the protective mechanism of Bawei chenxiang powder containing serum on H9c2 cells injured by oxygen-glucose deprivation [J]. Zhongguo Yaofang, 2023, 34(1): 40-46.
- [40] 杨梅,李永芳,寇毅英,等. 藏药八味沉香散50%醇提部位对急性心肌缺血大鼠作用的研究[J]. 新中医, 2011, 43(9): 97-99.
- Yang M, Li YF, Kou YY, et al. Effects of 50% Ethanol-extract from Bawei Chenxiang Powder on Acute Myocardium Ischemia Rats[J]. Xin Zhongyi, 2011, 43(9): 97-99.

(编辑 孙慧兰)