

引用格式: 井瑞欣, 王若芬, 牛丕莲, 等. 芦丁抗心肌纤维化的作用机制[J]. 浙江农林大学学报, 2025, 43(X): 1-11. JING Ruixin, WANG Ruofen, NIU Pilian, et al. Mechanism of rutin in inhibiting myocardial fibrosis[J]. Journal of Zhejiang A&F University, 2025, 43(X): 1-11.

芦丁抗心肌纤维化的作用机制

井瑞欣¹, 王若芬¹, 牛丕莲¹, 张冠楠¹, 杨胜祥², 白明生¹

(1. 宁夏大学 生命科学院, 宁夏 银川 750021; 2. 浙江农林大学 化学与材料工程学院, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】基于网络药理学、分子对接和细胞实验探究芦丁(rutin)抗心肌纤维化(MF)的作用机制。【方法】基于药物与疾病数据库挖掘芦丁及心肌纤维化相关的疾病基因靶点。运用 Cytoscape 构建多维度“药物-靶点-疾病”互作网络模型, 采用 R 软件对核心靶点进行基因本体论(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。通过分子对接技术模拟芦丁与核心靶蛋白的相互作用。采用 CCK-8 法检测芦丁对心肌成纤维细胞(CFs)增殖的影响, 并通过体外细胞实验检测芦丁对纤维化转录因子、标志蛋白和网络药理学核心靶点表达的影响。【结果】网络药理学分析显示: 芦丁作用于 91 个心肌纤维化相关靶点, 其中 *IL-6*、*TNF*、*TP53* 及 *SRC* 等为核心靶点, 且富集于 PI3K-Akt、MAPK 及 IL-17 等信号通路。分子对接表明: 芦丁与核心靶蛋白之间均具有较好的结合活性。分子生物学实验结果显示: 芦丁可以逆转转化生长因子(TGF- β 1)诱导的小鼠 *Mus musculus* 心肌成纤维细胞纤维化标志物的表达, 并显著下调 MAPK-JNK/ERK 信号通路相关蛋白的表达($P < 0.05$)。【结论】芦丁可能通过抑制 MAPK-JNK/ERK 信号通路的激活, 减轻 TGF- β 1 诱导的小鼠心肌成纤维细胞纤维化的发生。图 7 表 2 参 31

关键词: 网络药理学; 心肌纤维化; 芦丁; MAPK 信号通路; 分子对接

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 2095-0756(2025)00-0001-11

Mechanism of rutin in inhibiting myocardial fibrosis

JING Ruixin¹, WANG Ruofen¹, NIU Pilian¹, ZHANG Guannan¹, YANG Shengxiang², BAI Mingsheng¹

(1. School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China; 2. College of Chemistry and Materials Engineering, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] The objective of this study is to explore the mechanism of rutin against myocardial fibrosis (MF) based on network pharmacology, molecular docking, and cellular experiments. [Method] Based on drug and disease databases, disease-associated gene targets related to rutin and MF were identified. A multidimensional “drug-target-disease” interaction network model was constructed using Cytoscape, and the core targets were subjected to Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis using R software. The interaction between rutin and the core target protein was simulated through molecular docking technology. The effect of rutin on the proliferation of cardiac fibroblasts (CFs) was detected by the CCK-8 method. [Result] Network pharmacology analysis revealed that rutin acted on 91 MF-related targets, among which *IL-6*, *TNF*, *TP53*, and *SRC* were the core targets, and they were enriched in signaling pathways such as PI3K-Akt, MAPK, and IL-17. Molecular docking demonstrated that rutin had a good binding activity with the core target protein. Molecular biology experiments showed that rutin

收稿日期: 2025-06-09; 修回日期: 2025-11-01

基金项目: 宁夏回族自治区重点研发计划项目(2025FRG05013); 国家自然科学基金地区科学基金资助项目(31860583); 2024 年大学生创新创业训练计划项目(S202410749069)

作者简介: 井瑞欣(ORCID: 0009-0006-0539-6253), 从事植物生物学方面的研究。E-mail: 15296926623@163.com。

通信作者: 白明生(ORCID: 0000-0002-6292-7237), 教授, 从事天然产物活性方面的研究。E-mail: baimingsheng@163.com

could reverse the expression of fibrotic biomarkers in TGF- β 1-induced CFs and significantly downregulate the expression of key proteins associated with the MAPK-JNK/ERK signaling pathway ($P < 0.05$). [Conclusion] Rutin may alleviate TGF- β 1-induced fibrosis in CFs by inhibiting the activation of the MAPK-JNK/ERK signaling pathway. [Ch, 7 fig. 2 tab. 31 ref.]

Key words: network pharmacology; myocardial fibrosis; rutin; MAPK signaling pathway; molecular docking

近年来,随着中国人口老龄化进程加速及生活方式转型,心血管疾病发病率与死亡率呈持续上升趋势。世界卫生组织研究显示:心血管疾病已连续 10 a 位居中国居民死因首位,对公共卫生系统构成了重大挑战^[1]。在众多心血管疾病的发生发展过程中,心肌纤维化(MF)作为关键病理基础通过胶原异常沉积和细胞外基质(ECM)重构,使心脏中纤维组织增加,正常心肌细胞减少,导致心脏收缩舒张功能受损^[2]。目前如卡托普利、达格列净等西药治疗在一定程度上可减慢心肌纤维化的进程,但其副作用明显,且患者需要长期服用。因此,寻找中药治疗心肌纤维化成为一种疾病防治的新思路。

芦丁(rutin)又称芸香苷,属于黄酮类物质,是一种广泛分布于茶叶、槐米、陈皮等中药以及柑橘 *Citrus reticulata*、藜麦 *Chenopodium quinoa*、野菜等食品中的天然化合物^[3-5],具有抗氧化、抗炎、治疗糖尿病、抗肿瘤和抗血管生成等作用^[6-7]。最近研究发现:芦丁还具有防治器官纤维化和心血管疾病的作用。如王斌等^[8]研究认为:芦丁可以通过抑制 TGF- β 1/Smad3 信号通路改善大鼠 *Rattus norvegicus* 肾间质纤维化;储金秀等^[9]研究表明:芦丁能拮抗血管紧张素 II (Ang II) 的作用,使大鼠心脏肥大程度降低,并且能抑制蛋白激酶 C (PKC) 活性,从而起到防治心血管疾病的作用。芦丁在心血管疾病防治方面表现出优良的效果,但其抗心肌纤维化相关分子机制研究较少,因此有必要探究芦丁防治心肌纤维化的潜在作用机制。本研究通过网络药理学探究芦丁抗心肌纤维化的作用机制,并通过分子对接和体外细胞学对核心靶点及关键信号通路进行初步验证,为芦丁心血管类疾病的临床治疗提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 网络药理学分析

1.1.1 芦丁作用靶点的获取 从有机小分子生物活性数据库 (Pub Chem) 获取芦丁分子结构,通过 Swiss Target Prediction 数据库、中药系统药理学数据库 (TCMSP)、中医药整合药理学研究平台 (TCMIP) 和中药百科全书数据库 (ETCM),合并筛选人类基因后得到芦丁的候选靶点。

1.1.2 心肌纤维化和芦丁交叉靶点获取 在人类基因数据库 (Gene Cards)、在线人类孟德尔遗传数据库 (OMIM)、药物数据库 (Drug Bank) 中检索“myocardial fibrosis”,将所得到的靶点信息进行整合去重后为心肌纤维化疾病靶点。将两者共同靶点作为芦丁抗心肌纤维化的靶点。

1.1.3 芦丁-心肌纤维化靶点蛋白互作网络 (PPI) 构建 为筛选核心靶点,在蛋白质互作数据库 (STRING) 中,构建人类 (*homo sapiens*) 蛋白互作网络图。利用 Cytoscape 3.10.1 软件中的 CytoNCA 插件计算网络的拓扑学性质,绘制蛋白互作网络图和柱状图,得到芦丁-心肌纤维化的核心靶点。

1.1.4 基因本体论 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析 通过 R 软件中的 clusterProfiler 包,设置 $P < 0.001$ 为筛选条件进行基因本体论和京都基因与基因组百科全书富集分析。

1.2 分子对接

从有机小分子生物活性数据库获取芦丁分子结构。从蛋白质结构数据库 (PDB) 下载核心靶蛋白 (IL-6、TNF、TP53、SRC、EGFR、IL1B、INS 等) 的 3 维结构,在 AutoDockTools 1.5.6 软件预处理后 AutoDock Vina 模拟分子对接^[10],Pymol 软件进行 3 维复合物可视化。

1.3 细胞实验材料与实验方法

1.3.1 细胞 小鼠 *Mus musculus* 心肌成纤维细胞 (CFs) 由德国哥廷根大学许惺博教授捐赠。

1.3.2 药物与试剂 芦丁 (上海普优文生物科技有限公司,纯度 98%, 153-18-4), 卡托普利 (上海源叶生物技术有限公司,纯度 98%, S30916), DMEM 培养基 (VivaCell 公司, 06-1055-57-1), 胎牛血清 (BI)、胰酶 (索莱宝公司, T1320-100), 全蛋白提取试剂盒 (中国南京凯基生物发展有限公司, KGP2100),

PAGE 凝胶快速制备试剂盒、电泳缓冲液、转膜缓冲液 (上海雅酶生物科技有限公司, PG113、PS105S、PS109S), 聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜 (Millipore 公司), CCK-8 试剂、质量分数为 4% 的多聚甲醛、DAPI 染色液、10×TBST (with Tween-20, 北京赛文创新生物科技有限公司, SC119-2、SL101-01、SL111-01、SW111-02), TRizol (Invitrogen 公司, 15596026), HiScript III All-in-one RT SuperMix Perfect for Qpcr (南京诺唯赞生物科技股份有限公司, R333-0)。

1.3.3 主要仪器 超低温冰箱 (上海申力科技有限公司), 恒温水浴锅 (金坛市仪器制造有限公司, HH-3A), 离心机 (Thermo 公司, 75002401), 酶标仪 (PerkinElmer 公司, TY2017011463), GE 化学发光检测仪 (GE 公司, Amersham ImageQuant 800)。

1.3.4 细胞培养 按照牛丕莲等^[1]的方法, 用含有体积分数为 10% 的胎牛血清和质量分数为 1% 的双抗高糖 DMEM, 在 37 ℃, 体积分数为 5% 的二氧化碳培养箱中培养小鼠心肌成纤维细胞。

1.3.5 细胞心肌纤维化模型建立及分组 小鼠心肌成纤维细胞纤维化模型建立^[1]: 用 10 ng·mL⁻¹ 转化生长因子 (TGF-β1) 处理 48 h, 建立心肌纤维化细胞模型。

取生长状态良好的小鼠心肌成纤维细胞, 按 1×10⁵ 个·mL⁻¹ 接种到 6 孔板中, 待贴壁后进行实验, 分为对照组 (ck)、TGF 组、阳性对照 (卡托普利, Captopril) 组、芦丁 (200 μg·mL⁻¹) 组, 每组设置 3 个复孔。其中对照组加入完全培养基; TGF 组加入 10 ng·mL⁻¹ 转化生长因子; 阳性组加入 10 ng·mL⁻¹ 转化生长因子+终质量浓度为 10 μmol·L⁻¹ 的卡托普利; 芦丁组加入 10 ng·mL⁻¹ 转化生长因子+终质量浓度为 200 μg·mL⁻¹ 的芦丁后培养 48 h 后进行后续实验。

1.3.6 细胞活性测定 采用 CCK-8 法测定细胞活性, 取对数生长期的小鼠心肌成纤维细胞, 按 5×10⁴ 个·mL⁻¹ 接种在 96 孔板中, 培养 12 h, 分别用 0、5、25、50、100、200、300、500 和 800 μg·mL⁻¹ 芦丁处理 48 h 后, 每孔加入 10 μL 的 CCK-8 试剂。将 CCK-8 和 DMEM 同时添加到没有细胞的孔中 (空白对照)。然后用酶标仪测量其在 450 nm 处的吸光度 [D(450)], 每组设置 6 个复孔。采用以下公式计算细胞活性: 细胞活性=(给药处理细胞的 D(450)-空白对照的 D(450))/[给药质量浓度为 0 的 D(450)-空白对照的 D(450)]。确认无毒药物浓度后, 相同细胞浓度铺板培养 12 h, 设置对照组、模型组 (10 ng·mL⁻¹ TGF-β1)、给药组 (10 ng·mL⁻¹ TGF-β1+25、50、100、200、300 μg·mL⁻¹ 芦丁) 处理 48 h 后按相同方法测试其在 450 nm 处吸光度 [D(450)]。

1.3.7 免疫荧光检测 将对数生长期的小鼠心肌成纤维细胞按 1×10⁵ 个·mL⁻¹ 接种于含有无菌载玻片的 6 孔板中, 分组给药后培养 48 h, 用质量分数为 4% 的多聚甲醛固定 10 min。体积分数为 0.1% 的 Triton X-100 渗透性小鼠心肌成纤维细胞阻断 10 min, 质量分数为 5% 的牛血清白蛋白 (BSA) 封闭 60 min。然后, α-平滑肌肌动蛋白 (α-SMA) 和纤连蛋白 (FN) 抗体 (体积比 1:500) 孵育过夜, 二抗 (体积比 1:500) 在黑暗中孵育 1 h。4',6-联脒-2-苯基吡啶二盐酸盐 (DAPI) 染色 10 min, 封片后在荧光显微镜下观察并拍照。

1.3.8 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测 为评估芦丁对于心肌纤维化相关基因表达情况的影响, 将对数生长期的小鼠心肌成纤维细胞按 1×10⁵ 个·mL⁻¹ 接种于 6 孔板中, 分组给药培养 48 h 后, 利用 TRizol 试剂收集细胞, 提取细胞总 RNA, 按照试剂盒说明书将其反转录为 cDNA, RT-qPCR 检测采用 ChamQ 通用 SYBR qPCR Master Mix, 反应条件按照牛丕莲等^[1]的研究。记录 C_t 值, 进一步分析 RNA 的表达情况。引物序列见表 1。

表 1 RT-qPCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for RT-qPCR			
基因	引物序列(5'→3')	基因	引物序列(5'→3')
GAPDH	F: GCAAAATCAACGGCACAGTCAAG	MMP-2	F: CCATGCGGAAGCCAAGATGTG
	R: TCGCTCCTGGAAGATGGTGATG		R: GGTTTCAGGGTCCAGGTCAGG
Colla1	F: AGGCGAACAAGGTGACAGAGG	Vim	F: CTGCTGGAAGGCGAGGAGAG
	R: GGAGAACCAGGAGAACCAGGAG		R: TCAACCGTCTTAATCAGGAGTGTC
MMP-9	F: AATAAAGACGACATAGACGGCATCC	Acta2	F: ATGACCCAGATTATGTTTGAGACCT
	R: AGTTGTGGTGGTGGCTGGAG		R: TCCAGAGTCCAGCACAAATACCAG

1.3.9 Western blot 检测 将对数生长期的小鼠心肌成纤维细胞按 1×10^5 个 $\cdot \text{mL}^{-1}$ 接种于 6 孔板中分组给药培养 48 h 后, 用细胞全蛋白提取试剂盒提取细胞全蛋白, 通过二喹啉甲酸法 (BCA) 定量后 100°C 水浴至变性, 进行 SDS-PAGE 电泳, 然后将其转移至聚偏二氟乙烯 (PVDF) 膜。用含吐温的 Tris 缓冲盐溶液 (TBST) 配成质量分数为 5% 的脱脂牛奶, 在室温封闭 1 h 后, 一抗 4°C 孵育过夜后用 $1 \times \text{TBST}$ 洗涤, 对应二抗 (抗兔或抗小鼠, 体积比 1:10 000) 在室温孵育 1 h, $1 \times \text{TBST}$ 洗膜后用增强型化学发光试剂 (ECL) 于化学发光成像仪中显影。用 Image J 对蛋白条带灰度值进行定量分析。

1.4 统计学分析

每个实验进行 3 次重复, 得到的实验结果使用 GraphPad Prism 9.0 软件进行统计分析。数据结果以平均值 $\pm$ 标准差表示。数据比较采用单因素方差分析, 显著性水平为 0.05。

2 结果

2.1 网络药理学分析

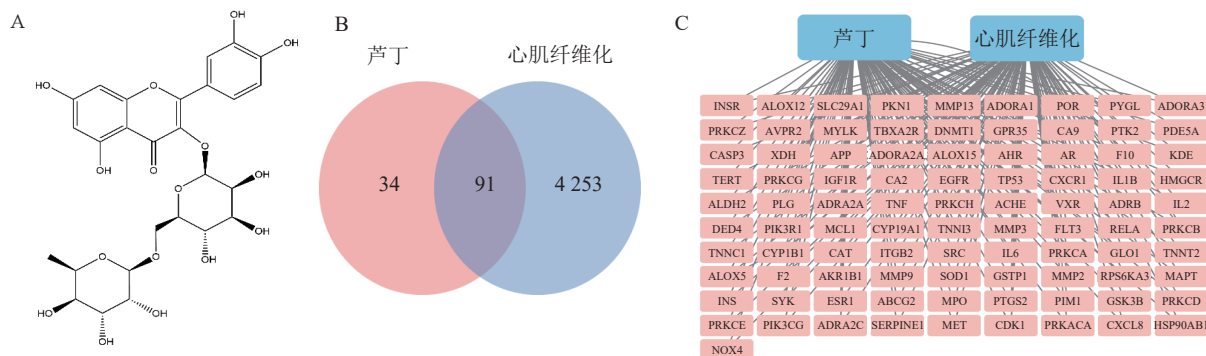
2.1.1 构建“药物靶点-药物-疾病靶点”网络 从有机小分子生物活性数据库获取芦丁的结构 (图 1A)。在中药系统药理学数据库、Swiss Target Prediction 数据库、中医药整合药理学研究平台和中药百科全书数据库中共得到芦丁 127 个作用靶点。在人类基因数据库、在线人类孟德尔遗传数据库、药物数据库中检索 “myocardial fibrosis”, 共得到 4 344 个心肌纤维化疾病靶点。图 1B 所示: 重叠靶点共有 91 个, 导入 Cytoscape 软件, 构建 “药物靶点-化合物-疾病” 网络 (图 1C)。

2.1.2 构建靶点蛋白互作网络 (PPI) 在蛋白质互作数据库中制作蛋白互作网络图 (附图), 共 90 个节点 1 818 条边。用 CytoNCA 插件, 对度值 (degree)、介度中心性 (betweenness centrality) 以及紧密度中心性 (closeness centrality) 进行计算, 并对这些靶点进行排序, 排名前 10 位的靶点为关键靶点 (图 2A)。绘制核心靶点互作网络图 (图 2B)。可见 IL6 等可能为芦丁防治心肌纤维化的主要作用靶点。

2.1.3 靶点 GO 与 KEGG 富集分析 以 $P < 0.05$ 为筛选条件, 对 91 个共同靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析, 以揭示关键候选靶点的作用功能与途径。其中分子功能 (MF) 91 条, 主要涉及蛋白丝氨酸/苏氨酸激酶活性; 生物过程 (BP) 1 178 条, 主要涉及正向调节 MAPK 级联反应等; 细胞组成 (CC) 38 条, 主要涉及囊泡腔等 1 307 个条目 (图 3A)。KEGG 细胞通路富集共得到 167 个条目, 选取 $P < 0.05$ 前 20 条进行条形图和气泡图的绘制 (图 3B、C)。芦丁抗心肌纤维化主要涉及 PI3K-AKT 和 MAPK 信号通路, 以及癌症、脂质和动脉粥样硬化以及神经退行性疾病等通路。其中核心靶点蛋白 TNF、TP53 与 MAPK 信号通路中的蛋白密切相关, 说明芦丁可能作用于 MAPK 信号通路起到治疗心肌纤维化的作用。为了研究 MAPK 通路中芦丁对心肌纤维化的特异性影响, 鉴定了参与 MAPK 信号通路的芦丁靶点基因, 包括 JNK、ERK。后续将通过体外细胞实验来证明。

2.2 分子对接

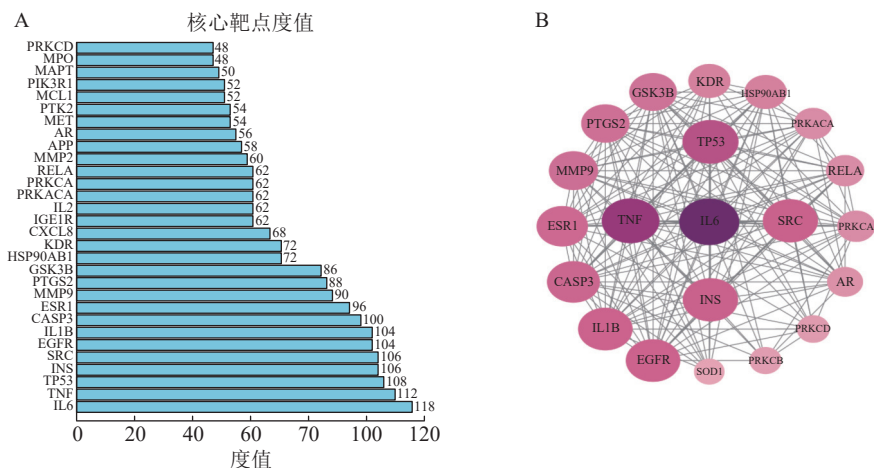
用分子对接技术模拟芦丁与核心靶蛋白的相互作用 (图 4)。根据分子对接理论, 结合自由能越小,



A. 芦丁二维结构图; B. 心肌纤维化与芦丁靶点的韦恩图; C. “药物靶点-化合物-疾病”网络图。

图 1 芦丁与心肌纤维化作用靶点筛选

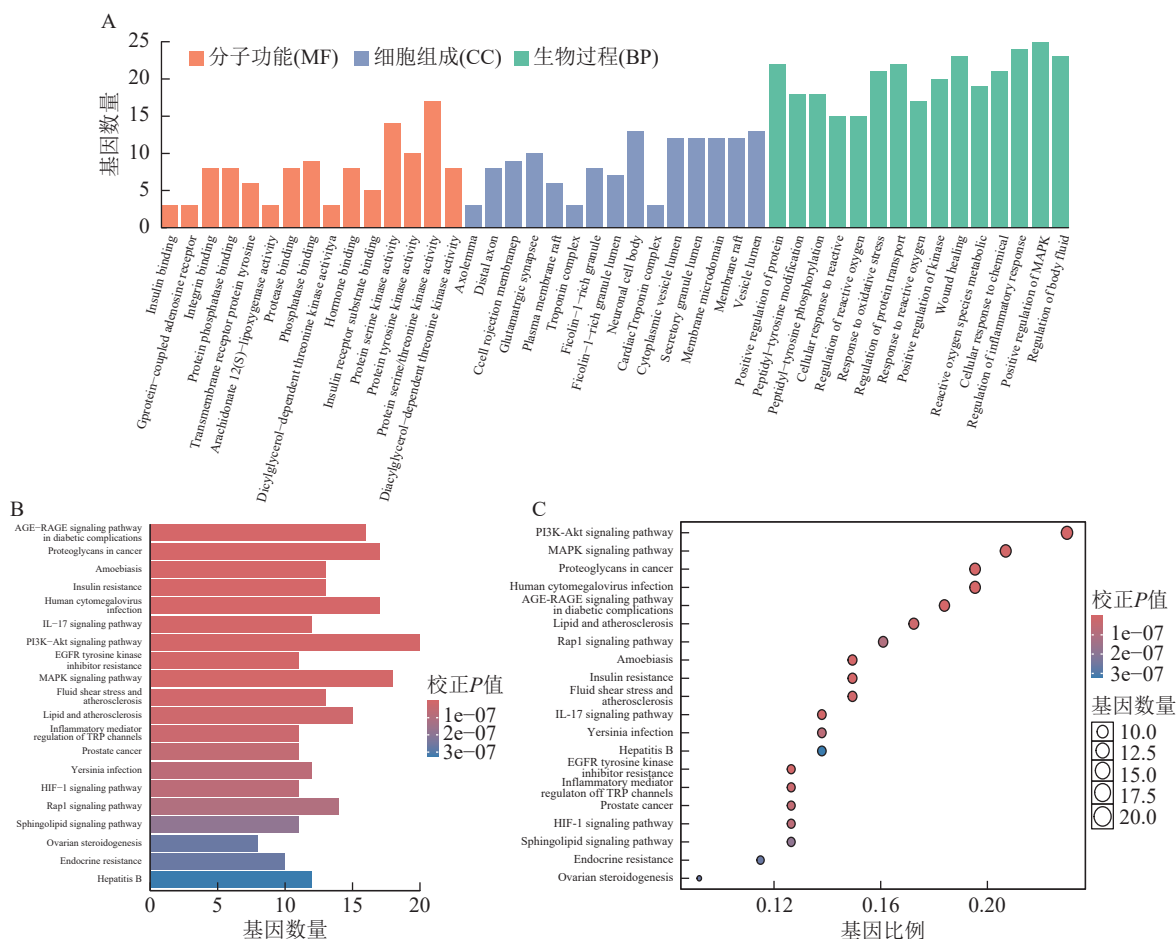
Figure 1 Target screening of the effects of rutin and myocardial fibrosis



A. 芦丁与心肌纤维化核心靶标度值条形图；B. 核心蛋白质相互作用核心网络图。

图 2 靶点蛋白互作及核心靶点筛选

Figure 2 Target protein interaction and core target screening



A. 芦丁候选靶点的GO富集分析图；B. 芦丁防治心肌纤维化的KEGG富集分析条形图；C. 芦丁防治心肌纤维化中KEGG通路富集分析的气泡图。

图 3 富集分析和基因通路网络分析

Figure 3 Enrichment analysis and gene pathway network analysis

配体与受体结合越稳定，相互作用的可能性越大。当配体与受体结合能小于 $-5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ 时，结合稳定。芦丁与排名前 10 个核心靶点对接结合能均小于 $-5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (表 2)，表明芦丁与核心靶点蛋白均结合稳定，芦丁可能会影响体内这些靶点蛋白的表达。

2.3 细胞实验验证

2.3.1 芦丁对转化生长因子刺激的小鼠心肌成纤维细胞活性的影响 图 5 A 验证了不同质量浓度的芦丁

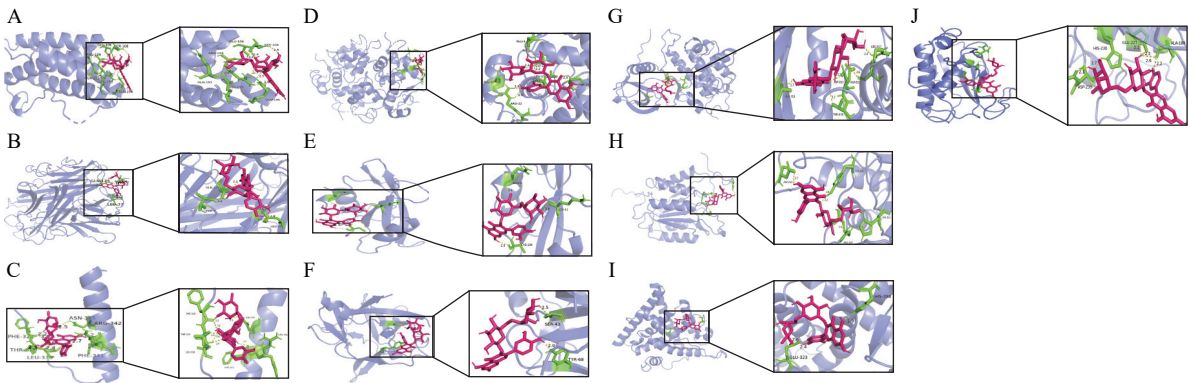
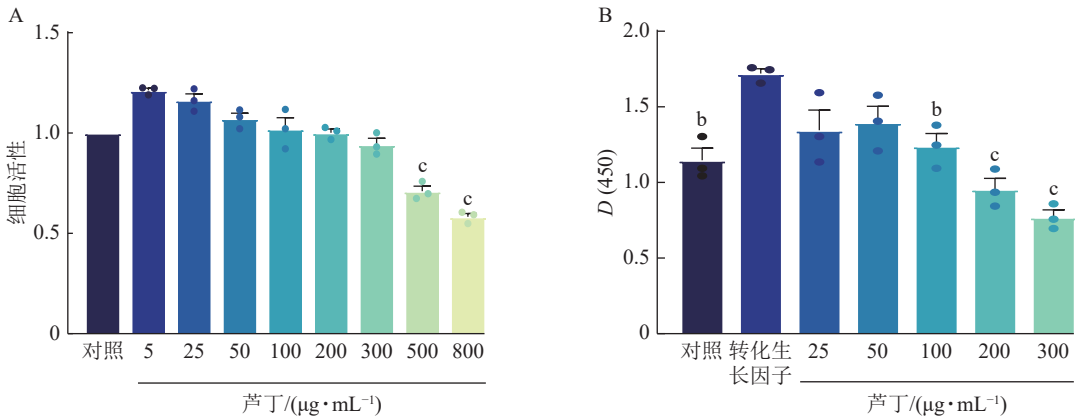


图 4 芦丁与前 10 个核心靶蛋白的分子对接模式
Figure 4 Molecular docking mode of rutin to the top 10 core target proteins

表 2 分子对接中芦丁与核心蛋白的结合能

Table 2 Energy of rutin to the core protein in the molecular docking					
靶点名称	靶点PDB-ID	对接结合能/(kcal·mol ⁻¹)	靶点名称	靶点PDB-ID	对接结合能/(kcal·mol ⁻¹)
IL6	1ALU	-8.0	TNF	1A8M	-7.5
P53	1AIE	-7.7	INS	6H3M	-7.5
SRC	1O43	-6.6	IL1B	6Y8M	-6.6
EGFR	1M17	-9.9	CASP3	3J30	-8.3
ESR1	1XPC	-7.2	MMP9	4XCT	-9.4

对小鼠心肌成纤维细胞的细胞活性的影响。当芦丁质量浓度大于 300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，对细胞产生一定程度的毒害作用。因此后续选用 5~300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 考察无毒性剂量下芦丁对于纤维化的小鼠心肌成纤维细胞活性的影响。加入转化生长因子 (10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 刺激小鼠心肌成纤维细胞 48 h。如图 5 B 所示：与对照组比，转化生长因子刺激后小鼠心肌成纤维细胞活性显著增加 ($P<0.01$)，表明小鼠心肌成纤维细胞增殖增加，25~300 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 芦丁处理后转化生长因子刺激的小鼠心肌成纤维细胞活性开始降低。当芦丁质量浓度为 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 时，10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 转化生长因子刺激后的小鼠心肌成纤维细胞活性显著降低 ($P<0.01$)。因此，在后续实验中，采用的芦丁质量浓度为 200 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 。

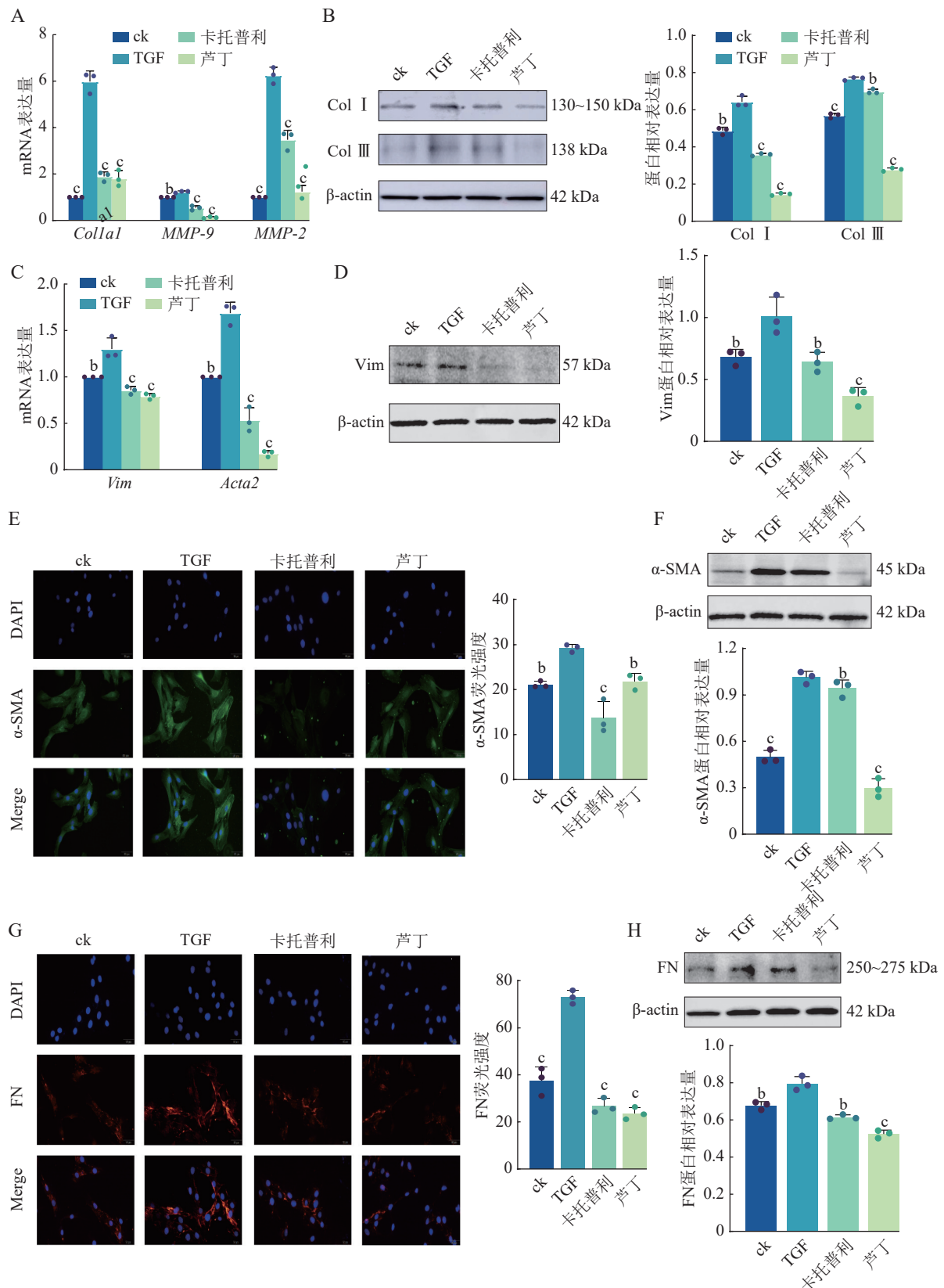


A. 不同质量浓度的芦丁对于小鼠心肌成纤维细胞的毒害作用。字母c表示与对照组比较差异极显著($P<0.01$)。B. 芦丁对转化生长因子刺激的小鼠心肌成纤维细胞增殖能力的影响。字母b表示与TGF组比较差异显著($P<0.05$)，字母c表示与TGF组比较差异极显著($P<0.01$)。数据为平均值±标准差；每个数据点代表1次独立的重复实验($n=3$)。

图 5 芦丁对于小鼠心肌成纤维细胞的活性影响

Figure 5 Effect of rutin on the vitality of CFs

2.3.2 芦丁对转化生长因子诱导的小鼠心肌成纤维细胞中纤维化相关细胞因子的作用 通过 RT-qPCR 检测发现：经过转化生长因子处理后，小鼠心肌成纤维细胞中 *Colla1*、*MMP-9* 和 *MMP-2* 的 mRNA 表达增加，而卡托普利和芦丁处理后的小鼠心肌成纤维细胞中 mRNA 表达均下降 (图 6A)。同样，转化生长因子诱导后小鼠心肌成纤维细胞的 I 型胶原 (Col I) 和 III 型胶原 (Col III) 表达量较对照组升高，而芦



A. *Colla1*、*MMP-9*和*MMP-2* mRNA表达的影响；B. Col I 和Col III 蛋白表达的影响；C. *Acta2*和*Vim* mRNA表达的影响；D. Vim 蛋白表达的影响；E. 免疫荧光检测 α -SMA蛋白表达影响，绿色为 α -SMA蛋白表达，柱状图为绿色荧光强度分析；F. α -SMA的蛋白表达；G. 免疫荧光检测FN蛋白表达，FN表达荧光为红色，柱状图为红色荧光强度分析；H. FN蛋白表达的影响。免疫荧光图像中更强的荧光强度代表更高的细胞内蛋白表达。字母b表示与TGF组比较差异显著($P < 0.05$)，字母c表示差异极显著($P < 0.01$)。ck. 对照组；TGF. 模型组。数据为平均值 $\pm$ 标准差；每个数据点代表1次独立的重复实验($n=3$)。

图 6 芦丁对转化生长因子刺激小鼠心肌成纤维细胞的影响

Figure 6 Effect of rutin on TGF- β 1 stimulation of CFs

丁和卡托普利处理后,表达量均下降(图 6B)。此外,卡托普利和芦丁降低了由转化生长因子刺激的小鼠心肌成纤维细胞中 *Acta2* 和 *Vim* mRNA 的升高(图 6C),也降低了 *Vim* 蛋白的表达(图 6D)。免疫荧光与蛋白免疫印迹结果表明:经卡托普利和芦丁处理后, α -SMA 的荧光强度(图 6E)及蛋白表达水平(图 6F)均有所降低,同时,也使 FN 的荧光强度(图 6G)和蛋白表达量(图 6H)下降。

2.3.3 芦丁对 MAPK-ERK/JNK 信号通路关键蛋白表达水平的影响 核心靶点基因及 GO 和 KEGG 富集分析提示:MAPK-ERK/JNK 通路可能介导芦丁抗心肌纤维化作用。Western blot 定量显示:与对照组相比,转化生长因子刺激显著上调小鼠心肌成纤维细胞中 ERK 和 p-ERK 水平,而卡托普利和芦丁处理抑制了 ERK、p-ERK 蛋白的表达水平(图 7A)。分子对接结果显示:芦丁与 ERK 结合稳定(结合能: $-8.1 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$),关键结合位点涉及 THR112、ASN155、LYS152 和 GLY37 残基(图 B)。与此同时,转化生长因子诱导的小鼠心肌成纤维细胞中的 JNK 和 p-JNK 蛋白较对照组表达提高,经卡托普利和芦丁处理后能逆转这一趋势(图 7C),芦丁与 JNK 结合能达 $-9.8 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$ (图 7D)。这些数据共同表明:芦丁可能通过下调 MAPK-ERK/JNK 信号通路相关蛋白起到抗心肌纤维化作用。

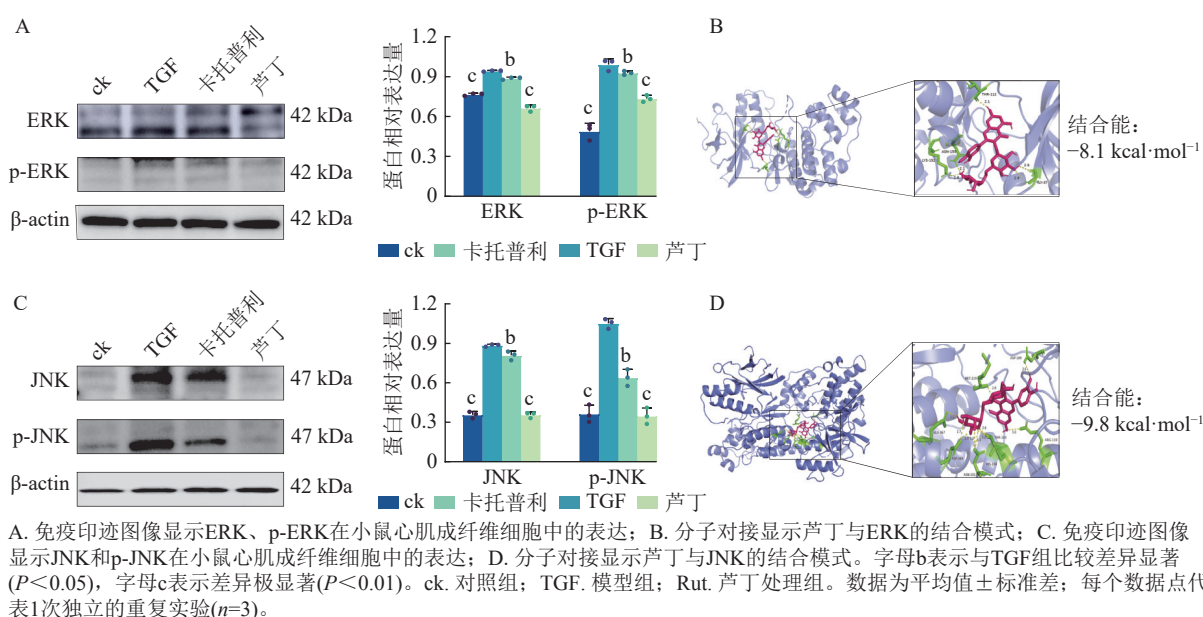


图 7 芦丁对 MAPK 通路蛋白表达影响。

Figure 7 Effect of rutin on MAPK pathway protein expression.

3 讨论

心肌纤维化是多种心血管疾病的共同病理表现,通过破坏心肌细胞外机制稳态,显著损害心脏的正常功能。对心肌纤维化进行早期干预已成为心血管疾病防治的战略重点^[12]。氧化应激在心肌纤维化的发生发展中起着关键作用^[13]。芦丁作为一种天然的生物活性物质,近年来其抗器官纤维化的作用机制备受关注:芦丁具有极强的抗氧化活性,能够减轻氧化应激损伤^[14],可以通过抑制氧化应激反应,减少心肌细胞的损伤和凋亡,从而减缓心肌纤维化的进程。此外在多种动物模型中,芦丁抗心肌纤维化作用已获得实验证据支持。建立大鼠心肌纤维化模型,给予芦丁灌胃后,大鼠的心肌纤维化程度明显减轻,胶原蛋白表达显著减少^[15]。在糖尿病小鼠模型中,芦丁能够降低小鼠血清心肌酶含量,改善病变心肌细胞形态,降低纤维化程度,减轻心肌损伤^[16]。尽管已有研究证实了芦丁在抗心肌纤维化中的作用,但尚未深入探讨芦丁抗心肌纤维化的具体作用机制。因此,本研究通过生物信息学手段,进一步挖掘芦丁抗心肌纤维化的分子机制,探索其核心靶点,并为后续的实验提供更有价值的指导方向。

中药活性成分的复杂性和多样性使得其作用机制和作用靶点尚不完全清楚,而网络药理学通过整合和分析大量的生物信息数据,揭示药物与靶点之间的相互作用,为药物研发提供了新的思路和方法^[17]。该方法在抗器官纤维化研究中取得进展:丹参 *Salvia miltiorrhiza*-黄芪 *Astragalus membranaceus* 配伍通过槲皮素、山奈酚等成分靶向 NF- κ B 和 VEGF 通路抑制炎症及肾纤维化^[18];当归 *Angelica sinensis*-红芪

Hedysarum polybotrys 对经 IL-17 与 TNF 信号网络抑制心肌纤维化^[19]。本研究整合网络药理学与分子对接技术系统解析芦丁抗心肌纤维化的多靶点调控机制。分析筛选出 91 个潜在作用靶点, 其中 IL-6 是核心枢纽靶点。研究表明: IL-6 通过激活转化生长因子-MMP2/MMP9 轴促进肌成纤维细胞转分化^[20], 其高盐诱导的高血压大鼠模型中表达显著增加, 与心肌间质纤维化程度呈正相关^[21]。而分子对接结果显示: 芦丁与 IL6、TNF 等核心靶点结合能均 $< -5 \text{ kcal} \cdot \text{mol}^{-1}$, 符合稳定结合标准。

研究结果证实: 芦丁在体外能有效逆转转化生长因子诱导的小鼠心肌成纤维细胞活化, 其抗心肌纤维化主要通过干预细胞外基质的代谢和抑制 MAPK 信号通路来实现。在器官纤维化的过程中 MMP-9 蛋白和 MMP-2 蛋白过度活化会促进细胞外基质异常重塑^[22]; 胶原 (Col I/Ⅲ) 和 FN 的过度沉积可形成纤维化疤痕, 限制心肌细胞的正常功能^[23], α -SMA 作为肌成纤维细胞标志物, 其表达增加, 会产生胶原和其他细胞外基质成分, 导致器官组织的纤维化^[24]。本研究观察到芦丁能同步下调包括 Col I/Ⅲ、FN 在内的细胞外基质主要成分的合成和沉积, 并同时抑制 MMP-9、MMP-2 的过度活化。这提示芦丁可以多靶点调控协同阻断心肌纤维化疤痕的形成, 抑制心肌纤维化。更重要的是, 本研究深入揭示了其抗心肌纤维化核心分子机制。分子对接结果表明: 芦丁能够与 MAPK 信号通路中关键激酶 ERK 和 JNK 稳定结合。进一步 Western blot 验证发现: 转化生长因子刺激使 ERK、JNK、p-ERK 和 p-JNK 的蛋白表达增高可被芦丁显著抑制。现有研究已经证实: MAPK 信号通路可以通过调控炎症反应、胶原代谢及细胞凋亡等生物学过程参与器官纤维化^[25], 其中 ERK 磷酸化介导的细胞因子调控及 JNK/P53 介导的氧化应激-铁死亡级联已被证实是心肌纤维化进展的关键机制^[26-28]。多种植物提取物, 如龙胆草素^[29]、氧化苦参碱^[30]、肉桂提取物^[31] 等可通过该通路发挥心脏保护效应。本研究在此基础上进一步阐明, 芦丁能够通过直接结合并抑制 ERK/JNK 的磷酸化活化, 从而干预下游纤维化信号的转导抑制心肌纤维化, 进一步验证了该通路作为心肌纤维化治疗靶点的重要性。

4 结论

本研究阐明芦丁通过抑制 MAPK-ERK/JNK 信号通路, 显著下调小鼠心肌成纤维细胞中 MMP-2/9、 α -SMA 及 Col I/Ⅲ 等纤维化标志物的表达, 有效阻断心肌纤维化进程中异常细胞外基质重塑和肌成纤维细胞活化。该发现不仅系统揭示了黄酮类化合物多靶点抗纤维化的分子机制, 更为重要的是, 基于网络药理学-分子对接-体外实验研究, 为开发靶向心肌基质稳态调节的新型抗纤维化药物提供了候选分子及作用靶标。但本研究结果仍存在一定局限性, 主要为缺乏功能缺失实验的证据。为确立靶点与表型间的直接因果关系, 后续研究将在细胞层面利用针对核心靶点的特异性 siRNA 进行敲低验证, 并进一步构建基因敲除动物模型, 以期在整体动物水平上确认药效并加速其临床转化进程。

5 参考文献

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2020 概要[J]. 中国循环杂志, 2021, 36(6): 521-545. The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Report on cardiovascular health and diseases burden in China: an updated summary of 2020 [J]. *Chinese Circulation Journal*, 2021, 36(6): 521-545. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2021.06.001.
- [2] GYÖNGYÖSI M, WINKLER J, RAMOS I, *et al.* Myocardial fibrosis: biomedical research from bench to bedside [J]. *European Journal of Heart Failure*, 2017, 19(2): 177-191. DOI: 10.1002/ehf.696.
- [3] MBOKOU FOUKMENIOK S, ILBOUDO O, KARANGA Y, *et al.* Direct and simultaneous quantification of rutin and quercetin in natural fruits base on purified arabic gum modified carbon paste electrode[J]. *SN Applied Sciences*, 2019, 1(5): 385. DOI: 10.1007/s42452-019-0413-8.
- [4] 陆敏佳, 蒋玉蓉, 陈国林, 等. 藜麦叶片黄酮类物质的提取及基因型差异[J]. 浙江农林大学学报, 2014, 31(4): 534-540. LU Minjia, JIANG Yurong, CHEN Guolin, *et al.* Flavonoid extraction and flavonoid content with genotypic variation from *Chenopodium quinoa* leaves [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2014, 31(4): 534-540. DOI: 10.11833/j.issn.2095-0756.2014.04.007.
- [5] 李瑶晨, 范紫佩, 杨静, 等. 野生蔬菜功能性成分及其生物活性研究进展[J]. 浙江农林大学学报, 2022, 39(4): 913-922.

- LI Yaochen, FAN Zipei, YANG Jing, *et al.* Research progress on functional components and biological activities of wild edible vegetables [J]. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2022, **39**(4): 913–922. DOI: 10.11833/j.issn.2095-0756.20210550.
- [6] WU Liang, LI Luqian, WANG Xue, *et al.* The inhibition of rutin on Src kinase blocks high glucose-induced EGFR/ERK transactivation in diabetic nephropathy by integrative approach of network pharmacology and experimental verification[J]. *Phytomedicine*, 2024, **135**: 156220. DOI: [10.1016/j.phymed.2024.156220](https://doi.org/10.1016/j.phymed.2024.156220).
- [7] WANG Lei, ZHAO Jiali, MAO Yuanbin, *et al.* Tartary buckwheat rutin: accumulation, metabolic pathways, regulation mechanisms, and biofortification strategies[J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2024, **208**: 108503. DOI: [10.1016/j.plaphy.2024.108503](https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2024.108503).
- [8] 王斌, 赵明, 陈志勇, 等. 芦丁对单侧输尿管梗阻大鼠肾间质纤维化的作用研究[J]. 时珍国医国药, 2018, **29**(8): 1796–1800. WANG Bin, ZHAO Ming, CHEN Zhiyong, *et al.* Effect of rutin on tubulointerstitial fibrosis in unilateral ureteral obstruction rats [J]. *Lishizhen Medicine and Materia Medica Research*, 2018, **29**(8): 1796–1800. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2018.08.002.
- [9] 储金秀, 李光民, 韩淑英, 等. 荞麦花叶中芦丁对血管紧张素 II 诱导的新生大鼠心肌细胞肥大的体外抑制作用[J]. 华西药理学杂志, 2010, **25**(4): 428–430. CHU Jinxiu, LI Guangmin, HAN Shuying, *et al.* *In vitro* inhibitory effects of rutin from buckwheat flowers and leaves on angiotensin II induced cardiomyocytes hypertrophy of neonatal rat[J]. *West China Journal of Pharmaceutical Sciences*, 2010, **25**(4): 428–430. DOI: 10.13375/j.cnki.wcjps.2010.04.013.
- [10] EBERHARDT J, SANTOS-MARTINS D, TILLACK A F, *et al.* AutoDock vina 1.2.0: new docking methods, expanded force field, and Python bindings [J]. *Journal of Chemical Information and Modeling*, 2021, **61**(8): 3891–3898. DOI: [10.1021/acs.jcim.1c00203](https://doi.org/10.1021/acs.jcim.1c00203).
- [11] 牛丕莲, 范永鑫, 路富瑞, 等. 甘草提取物对 TGF- β 1 诱导心肌成纤维细胞纤维化的影响[J]. 中国临床药理学与治疗学, 2022, **27**(2): 129–135. NIU Pilian, FAN Yongxin, LU Furui, *et al.* Effects of liquorice extract on cardiac fibroblasts fibrosis induced by TGF- β 1 [J]. *Chinese Journal of Clinical Pharmacology and Therapeutics*, 2022, **27**(2): 129–135. DOI: 10.12092/j.issn.1009-2501.2022.02.002.
- [12] CLELAND J G F, PELLICORI P, GONZÁLEZ A. A novel treatment for heart failure targets myocardial fibrosis [J]. *Nature Medicine*, 2021, **27**(8): 1343–1344. DOI: [10.1038/s41591-021-01457-9](https://doi.org/10.1038/s41591-021-01457-9).
- [13] WILSON A J, GILL E K, ABUDALO R A, *et al.* Reactive oxygen species signalling in the diabetic heart: emerging prospect for therapeutic targeting [J]. *Heart*, 2018, **104**(4): 293–299. DOI: [10.1136/heartjnl-2017-311448](https://doi.org/10.1136/heartjnl-2017-311448).
- [14] YI Tongtong, ZHANG Wei, HUA Ying, *et al.* Rutin alleviates lupus nephritis by inhibiting T cell oxidative stress through PPAR γ [J]. *Chemico-Biological Interactions*, 2024, **394**: 110972. DOI: [10.1016/j.cbi.2024.110972](https://doi.org/10.1016/j.cbi.2024.110972).
- [15] 李阳, 黄彬龙, 林琳, 等. 芦丁对心肌纤维化大鼠 Col I、Col III、TGF- β 1 的调控作用[J]. 热带医学杂志, 2017, **17**(2): 174–176. LI Yang, HUANG Binlong, LIN Lin, *et al.* Effects of rutin on the regulation of Col I, Col III, TGF- β 1 expression in myocardial fibrosis rats [J]. *Journal of Tropical Medicine*, 2017, **17**(2): 174–176. DOI: 10.3969/j.issn.1672-3619.2017.02.009.
- [16] 曹皓轩, 孙竹梅, 勾向博, 等. 芦丁对 1 型糖尿病小鼠心肌酶及心肌组织形态学影响[J]. 四川大学学报(医学版), 2018, **49**(4): 570–574. CAO Haoxuan, SUN Zhumei, GOU Xiangbo, *et al.* Effects of rutin on myocardial enzyme and cardiac morphology in diabetic mice [J]. *Journal of Sichuan University (Medical Sciences)*, 2018, **49**(4): 570–574. DOI: [10.13464/j.scuxbyxb.2018.04.013](https://doi.org/10.13464/j.scuxbyxb.2018.04.013).
- [17] ZHU Mingyang, HE Qingmin, WANG Yanan, *et al.* Exploring the mechanism of Aloe-emodin in the treatment of liver cancer through network pharmacology and cell experiments[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2023, **14**: 1238841. DOI: [10.3389/fphar.2023.1238841](https://doi.org/10.3389/fphar.2023.1238841).
- [18] 石晓冬, 卢登勇, 吴慧敏, 等. 基于网络药理学探讨黄芪-丹参干预肾纤维化的作用机制[J]. 西部中医药, 2025, **38**(4): 53–58. SHI Xiaodong, LU Dengyong, WU Huimin, *et al.* Network pharmacology-based discussion on the mechanism of intervention of renal fibrosis with Huangqi-Danshen couplet medicines [J]. *Western Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2025, **38**(4): 53–58. DOI: 10.12174/j.issn.2096-9600.2025.04.11.
- [19] 杨开燕, 李淑玲, 魏惠平, 等. 当归-红芪药对抗心肌纤维化作用的机制分: 基于生物信息学技术[J/OL]. 中国全科医学, 2024-11-08[2025-06-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/13.1222.R.20241108.0909.002.html>. YANG Kaiyan, LI Shuling,

- WEI Huiping, *et al.* Exploring the effective components and mechanism of action of Danggui-Hongqi in the treatment of myocardial fibrosis based on bioinformatics technology[J/OL]. *Chinese General Practice*, 2024-11-08[2025-06-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/13.1222.R.20241108.0909.002.html>.
- [20] WANG Jiahong, ZHAO Lan, PAN Xin, *et al.* Hypoxia-stimulated cardiac fibroblast production of IL-6 promotes myocardial fibrosis *via* the TGF- β 1 signaling pathway[J]. *Laboratory Investigation; a Journal of Technical Methods and Pathology*, 2016, **96**(9): 1035. DOI: [10.1038/labinvest.2016.84](https://doi.org/10.1038/labinvest.2016.84).
- [21] 曾清清, 高忠兰, 陈务贤, 等. 高盐诱导高血压大鼠心肌间质重构及 SHIP-1 和 IL-6 的表达研究[J]. *广西医科大学学报*, 2023, **40**(1): 54–58. ZENG Qingqing, GAO Zhonglan, CHEN Wuxian, *et al.* Myocardial interstitial remodeling and expressions of SHIP-1 and IL-6 in high-salt-induced hypertensive rats [J]. *Journal of Guangxi Medical University*, 2023, **40**(1): 54–58. DOI: [10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.01.009](https://doi.org/10.16190/j.cnki.45-1211/r.2023.01.009).
- [22] 王文婷, 徐寒梅, 李梦玮, 等. 基质金属蛋白酶及整合素在肺纤维化中的作用[J]. *药物生物技术*, 2023, **30**(2): 180–185. WANG Wenting, XU Hanmei, LI Mengwei, *et al.* Important roles of matrix metalloproteinases and integrins in pulmonary fibrosis [J]. *Pharmaceutical Biotechnology*, 2023, **30**(2): 180–185. DOI: [10.19526/j.cnki.1005-8915.20230214](https://doi.org/10.19526/j.cnki.1005-8915.20230214).
- [23] CHANDA D, OTROUPALOVA E, SMITH S R, *et al.* Developmental pathways in the pathogenesis of lung fibrosis [J]. *Molecular Aspects of Medicine*, 2019, **65**: 56–69. DOI: [10.1016/j.mam.2018.08.004](https://doi.org/10.1016/j.mam.2018.08.004).
- [24] GONZÁLEZ A, LÓPEZ B, RAVASSA S, *et al.* The complex dynamics of myocardial interstitial fibrosis in heart failure. Focus on collagen cross-linking [J]. *Biochimica et Biophysica Acta. Molecular Cell Research*, 2019, **1866**(9): 1421–1432. DOI: [10.1016/j.bbamcr.2019.06.001](https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2019.06.001).
- [25] ZHANG Zeyu, YANG Zhihua, WANG Shuai, *et al.* Targeting MAPK-ERK/JNK pathway: a potential intervention mechanism of myocardial fibrosis in heart failure[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapie*, 2024, **173**: 116413. DOI: [10.1016/j.biopha.2024.116413](https://doi.org/10.1016/j.biopha.2024.116413).
- [26] VIEDT C, SOTO U, KRIEGER-BRAUER H I, *et al.* Differential activation of mitogen-activated protein kinases in smooth muscle cells by angiotensin II: involvement of p22phox and reactive oxygen species [J]. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology*, 2000, **20**(4): 940–948. DOI: [10.1161/01.ATV.20.4.940](https://doi.org/10.1161/01.ATV.20.4.940).
- [27] 张金丽, 苏飞, 张焕婷, 等. 化浊解毒调肝方对乙型肝炎大鼠肝纤维化、免疫功能及 Ras/ERK 信号通路的影响[J]. *中西医结合肝病杂志*, 2024, **34**(5): 409–413. ZHANG Jinli, SU Fei, ZHANG Huanling, *et al.* Study of Huozhujiadu Tiaogan prescription on liver fibrosis, immune function and Ras/ERK signaling pathway in rats with hepatitis B [J]. *Chinese Journal of Integrated Traditional and Western Medicine on Liver Diseases*, 2024, **34**(5): 409–413. DOI: [10.3969/j.issn.1005-0264.2024.005.007](https://doi.org/10.3969/j.issn.1005-0264.2024.005.007).
- [28] WANG Junyan, DENG Bo, LIU Qing, *et al.* Pyroptosis and ferroptosis induced by mixed lineage kinase 3 (MLK3) signaling in cardiomyocytes are essential for myocardial fibrosis in response to pressure overload[J]. *Cell Death & Disease*, 2020, **11**(7): 574. DOI: [10.1038/s41419-020-02777-3](https://doi.org/10.1038/s41419-020-02777-3).
- [29] 王文化. 地胆草活性成分去氧地胆草素通过抑制 p38 MAPK 信号通路改善力竭运动诱导的心肌损伤[J]. *分子植物育种*, 2025, **23**(16): 5530–5537. WANG Wenhua. Deoxyelephantopin, the active ingredient of *Elephantopus scaber* L., improves myocardium injury induced by exhaustive exercise by inhibiting p38 MAPK signaling pathway[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2025, **23**(16): 5530–5537. DOI: [10.13271/j.mpb.023.005530](https://doi.org/10.13271/j.mpb.023.005530).
- [30] SUN Haijuan, BAI Jingjing, SUN Yuting, *et al.* Oxymatrine attenuated isoproterenol-induced heart failure *via* the TLR4/NF- κ B and MAPK pathways *in vivo* and *in vitro*[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2023, **941**: 175500. DOI: [10.1016/j.ejphar.2023.175500](https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2023.175500).
- [31] 朱凯, 秦小鹏. 肉桂提取物与抗阻运动对肥胖大鼠心肌线粒体功能的保护作用[J]. *分子植物育种*, 2024, **22**(21): 7206–7214. ZHU Kai, QIN Xiaopeng. Protective effects of cinnamon extract and resistance exercise on myocardial mitochondrial function in obese rats [J]. *Molecular Plant Breeding*, 2024, **22**(21): 7206–7214. DOI: [10.13271/j.mpb.022.007206](https://doi.org/10.13271/j.mpb.022.007206).