

# 基于TRPV1对动脉血管平滑肌的自噬作用探讨人参汤治疗AS的作用机制

亓玉婕<sup>1</sup>, 何湛湛<sup>1</sup>, 杨桢<sup>2</sup>, 陶旭光<sup>1</sup>, 褚策<sup>1</sup>, 袁雨露<sup>1</sup>, 陈香云<sup>2</sup>, 丁薇<sup>2</sup>,  
赵培彰<sup>3</sup>, 赵红霞<sup>1\*</sup>, 汪文来<sup>1\*</sup>

(1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700;

2. 北京中医药大学, 北京 100029; 3. 四川大学华西临床医学院, 成都 610041)

**[摘要]** 目的: 基于香草酸受体亚型1(TRPV1)对动脉血管平滑肌的自噬作用探讨《金匱要略》人参汤治疗动脉粥样硬化(AS)的作用机制。方法: SPF级8周龄雄性C57BL/6J小鼠14只作为正常组, 8周龄载脂蛋白E基因敲除(ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠70只作为模型组。模型组采用高脂饲料喂食8周制备AS小鼠模型, 随后随机分为模型组、人参汤低、中、高剂量(2.715、5.43、10.68 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组和辛伐他汀(0.02 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>)组, 连续给药8周。8周后, 取血清, 采用检测试剂盒测定血清总胆固醇(CHO)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)水平, 观察小鼠血脂水平的变化; 取主动脉, 采用苏木素-伊红(HE)染色观察主动脉根部整体的病理情况, 采用油红O染色检测主动脉斑块内脂质沉积情况, 并计算主动脉根部面积占管腔面积百分比; 采用蛋白免疫印迹法(Western blot)检测小鼠主动脉组织中TRPV1、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶(p-AMPK)及自噬效应蛋白-1(Beclin-1)、微管相关蛋白1轻链3Ⅱ(LC3Ⅱ)、微管相关蛋白1轻链Ⅰ(LC3Ⅰ)的表达情况。结果: 与正常组比较, 模型组小鼠血清中CHO、TG、LDL-C水平显著升高, HDL-C水平显著降低, 主动脉根部斑块面积显著增多(P<0.01); 与模型组比较, 人参汤各剂量组可明显降低AS模型小鼠血清中CHO、TG、LDL-C水平(P<0.05, P<0.01), 人参汤低、中剂量组最为显著(P<0.01)。与正常组比较, 辛伐他汀组、人参汤低、中、高剂量组均能明显减少主动脉根部斑块面积(P<0.05, P<0.01), 其中人参汤高剂量组效果减轻斑块效果最为显著(P<0.01)。与正常组比较, 模型组小鼠的TRPV1、p-AMPK/AMPK、Beclin-1、LC3Ⅱ/LC3Ⅰ的相对表达量明显降低(P<0.05, P<0.01); 与模型组比较, 人参汤中、高剂量组TRPV1、p-AMPK/AMPK、Beclin-1、LC3Ⅱ/LC3Ⅰ的相对表达量均明显升高(P<0.05, P<0.01)。结论: 《金匱要略》人参汤具有抗AS作用, 其作用机制可能是通过调节TRPV1的表达上升, 进而恢复了由AMPK介导的自噬水平实现的。

**[关键词]** 《金匱要略》人参汤; 动脉粥样硬化; 香草酸受体亚型1; 自噬; 载脂蛋白E基因敲除小鼠

**[中图分类号]** R2-0; R22; R285.5; R289; R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)12-0055-08

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20230903

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20230406.1107.002.html>

**[网络出版日期]** 2023-04-06 14:59:03

## Mechanism of Renshentang in Treatment of Atherosclerosis Based on Autophagic Effect of TRPV1 on Arterial Smooth Muscle

QI Yujie<sup>1</sup>, HE Zhanzhan<sup>1</sup>, YANG Zhen<sup>2</sup>, TAO Xuguang<sup>1</sup>, CHU Ce<sup>1</sup>, YUAN Yulu<sup>1</sup>, CHEN Xiangyun<sup>2</sup>,  
DING Wei<sup>2</sup>, ZHAO Peizhang<sup>3</sup>, ZHAO Hongxia<sup>1\*</sup>, WANG Wenlai<sup>1\*</sup>

(1. Institute of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine, China Academy of Chinese Medical Sciences,

**[收稿日期]** 2023-03-15

**[基金项目]** 中国中医科学院科技创新工程黑地黄丸重大攻关项目(CI2021A00606); 中国中医科学院自主选题项目(YZX202237, YZX202241, YZX202246, YZ2020042, YZ202225, YZ2020019)

**[第一作者]** 亓玉婕, 在读硕士, 从事经典方中医理论诠释及热敏通道理论研究, E-mail: qiyujie96@163.com

**[通信作者]** \* 赵红霞, 研究员, 硕士生导师, 从事经典方中医理论现代研究与诠释、热敏通道理论及相关机制研究, E-mail: zhao-hongxia7000@163.com;

\* 汪文来, 研究员, 从事热敏通道理论及相关机制、中医药防治骨质疏松症等疑难杂症作用机制研究, E-mail: wagnwen-lai666@163.com

Beijing 100700, China; 2. Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China;  
3. West China Clinical Medical College, Sichuan University, Chengdu 610041, China)

**[Abstract]** **Objective:** To investigate the mechanism of Renshentang, recorded in *Synopsis of Golden Chamber*, in the treatment of atherosclerosis (AS) based on the autophagic effect of transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1) on arterial smooth muscle. **Method:** Fourteen SPF-grade 8-week-old male C57BL/6J mice were assigned to the normal group and 70 8-week-old apolipoprotein E knockout (ApoE<sup>-/-</sup>) mice were assigned to the experimental group. The AS model was induced by a high-fat diet in the mice in the experimental group for eight weeks. The model mice were then randomly divided into model group, low-, medium-, and high-dose Renshentang groups (2.715, 5.43, and 10.68 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>), and simvastatin group (0.02 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>). Drug treatment lasted eight weeks. Serum was taken and serum total cholesterol (CHO), triglyceride (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) levels were measured by assay kits to observe the changes in lipid levels in mice. The aorta was stained with hematoxylin-eosin (HE) to observe the overall pathology of the aortic root and oil red O staining was used to detect the lipid deposition in the aortic plaque and calculate the percentage of the aortic root area to the lumen area. The protein expression of TRPV1, adenylate-activated protein kinase (AMPK), phosphorylated AMPK (p-AMPK), autophagy effector-1 (Beclin-1), and microtubule-associated protein 1 light chain 3 (LC3 II) in mouse aortic tissues was determined by Western blot. **Result:** Compared with the normal group, the model group showed increased serum CHO, TG, and LDL-C levels, decreased HDL-C, and increased aortic root plaque area ( $P<0.01$ ). Compared with the model group, the Renshentang groups showed decreased levels of CHO, TG, and LDL-C in serum ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), especially in the low- and medium-dose Renshentang groups ( $P<0.01$ ). Compared with the normal group, the simvastatin group and the Renshentang groups showed reduced aortic root plaque area ( $P<0.05$ ), especially in the high-dose Renshentang group ( $P<0.01$ ). Compared with the normal group, the model group showed decreased relative expression levels of TRPV1, p-AMPK/AMPK, Beclin-1, and LC3 II/LC3 I ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Compared with the model group, the medium- and high-dose Renshentang groups showed increased relative expression levels of TRPV1, p-AMPK/AMPK, Beclin-1, and LC3 II/LC3 I ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** The anti-AS effect of Renshentang recorded in *Synopsis of Golden Chamber* may be achieved by up-regulating TRPV1 expression to restore the level of autophagy mediated by AMPK.

**[Keywords]** Renshentang recorded in *Synopsis of Golden Chamber*; atherosclerosis (AS); transient receptor potential vanilloid subtype 1 (TRPV1); autophagy; apolipoprotein E knockout (ApoE<sup>-/-</sup>) mice

目前,中国心血管病死亡占城乡居民总死亡原因的首位,农村为46.74%,城市为44.26%,心血管病给居民和社会带来的经济负担日渐加重,已成为重大的公共卫生问题<sup>[1]</sup>。动脉粥样硬化(AS)是冠脉病变的主要病理特征,其发生发展与发展过程密切相关。当前,西医治疗AS主要是以降低血脂、抗血小板凝集等为主要手段,其主要目标是稳定斑块,延缓疾病发展。但这类药物会对患者的肝脏和肾脏造成一定程度的损害。人参汤是《金匱要略》中治疗胸痹的经典方剂,临床研究表明《金匱要略》人参汤及其加减在该病的治疗上具有一定优势,但在治疗AS实验研究方面尚未见明确报道,也未见从

香草酸受体亚型1(TRPV1)提高血管平滑肌自噬水平治疗AS的相关研究报道<sup>[2-4]</sup>。目前有研究表明了TRPV1通道的抗AS的作用<sup>[5-11]</sup>。课题组前期研究发现,人参汤中人参、干姜<sup>[12]</sup>,均为TRPV1激动剂,因此阐明人参汤是否通过TRPV1发挥抗动脉硬化作用,将有可能为AS性疾病的防治提供新的方向和思路。

目前对于AS的中医治疗多聚焦于瘀血方面,辨证也常从活血化瘀角度入手,而从温阳的角度去治疗较少。张仲景在《金匱要略》中明确提出胸痹的病机为阳微阴弦<sup>[13]</sup>，“阳微”即心阳虚弱、上焦阳气不足，“阴弦”即阴寒、痰瘀等邪气，向上侵袭上焦

胸部,痹阻血脉,发为心痛。AS属于“痰饮”范畴,是阴盛阳虚的表现。因此,中医认为采用温阳法可以调整身体阴阳平衡,改善阳虚痰饮的状态。人参汤方为温中祛寒、补气健脾的经典方剂,现代医家任应秋就常用此方加味治疗心绞痛重症<sup>[14]</sup>。另有临床研究表明该方治疗AS有一定的优势,但是否通过TRPV1提高血管平滑肌自噬水平治疗AS的分子机制尚不明确。因此,本实验旨在前期研究基础上,以载脂蛋白E基因敲除(ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠喂食8周高脂饲料制备AS小鼠模型,观察人参汤是否通过TRPV1提高腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)介导的自噬作用来保护AS的发展,进一步揭示人参汤方的抗AS机制。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级8周龄雄性C57BL/6J小鼠14只、8周龄ApoE<sup>-/-</sup>小鼠70只,订购于斯贝福(北京)生物技术有限公司,动物生产合格证号SCXK(京)2019-0010。饲养于中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物中心动物房[合格证号SCXK(京)2021-0017]内,饲养温度(25±1)℃,湿度50%±5%,自由饮食饮水,12 h/12 h昼夜明暗交替。本实验通过中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物伦理委员会批准,伦理审查编号为ERCCACMS21-2106-7。

**1.2 药品与试剂** 人参汤(人参、白术、干姜、炙甘草,各41.7 g),按比例配制成中药免煎颗粒,购自北京康仁堂药业有限公司,并经北京康仁堂药业有限公司内控质量标准检验(批号分别为21006762、21025491、21010671、21025301,检验编号分别为C2104096、C2108862、C2106028-G、C2108854),以100℃蒸馏水充分溶解并进行超声,制备成含药量分别为0.054 3、0.054 3、0.013 6、0.054 3 g·mL<sup>-1</sup>的中药混悬液,4℃保存备用;辛伐他汀(杭州默沙东制药有限公司,生产批号U024517),以蒸馏水充分溶解,制备成0.001 g·mL<sup>-1</sup>混悬液,4℃保存。总胆固醇(CHO)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测定试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司,批号分别为211811、211121、221651、211601),BCA蛋白浓度测定试剂盒、高效RIPA组织/细胞裂解液(北京索莱宝科技有限公司,批号分别为PC0020、R0010),50×蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物(通用型,上海碧云天生物技术有限公司,批号P1045),鼠单克隆抗体TRPV1(美国Abcam公司,货号ab203103),兔单克

隆克隆抗体AMPK、兔单克隆抗体磷酸化(p)-AMPK、兔单克隆抗体自噬效应蛋白-1(Beclin-1)、兔多克隆抗体微管相关蛋白1轻链3(LC3)A/B(美国CST公司,货号分别为#5831、#50081、#3495、#4108),分离试剂盒(SM-W002,常温部分)、分离试剂盒(SM-W002,2~8℃部分)、抗鼠二抗、抗兔二抗检测试剂盒(北京拓普百奥科技有限公司,货号分别为00181、02236、95416、95417),油红O试剂、苏木素染色液、伊红染色液(武汉赛维尔生物科技有限公司,批号分别为G1015、G1004、G1001)。

**1.3 仪器** CM1950型冰冻切片仪(德国Leica公司),AU680型全自动生化分析仪(美国Beckman Counter公司),Synergy型全自动酶标仪(美国Bio Tek公司),3K15型高速冷冻离心机(美国Sigma公司),JESS型超微量多功能全自动蛋白表达定量分析系统(美国ProteinSimple公司)。

## 2 方法

**2.1 给药及分组** 按照体表面积法,将小鼠(20 g)与人(70 kg)的中药剂量进行换算后按比例配制成中药免煎颗粒,《金匱要略》人参汤方低、中、高剂量组给药剂量分别为2.715、5.43、10.68 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>,西药组按照成人等效剂量系数折算法计算给药剂量:辛伐他汀0.02 g·kg<sup>-1</sup>·d<sup>-1</sup>。连续给药8周。给予上述小鼠普通饲料适应性喂养1周后,14只C57BL/6J小鼠作为正常组,喂食普通饲料,70只ApoE<sup>-/-</sup>小鼠作为造模组,喂食高脂饲料<sup>[15-16]</sup>(1%胆固醇,10%猪油,10%蛋黄粉,79%基础饲料,饲料购自北京斯贝福科技有限公司),喂食8周后,将70只ApoE<sup>-/-</sup>小鼠随机分成模型组、辛伐他汀片组、人参汤低、中、高剂量组,每组14只。造模8周后,从模型组中随机抽取1只小鼠处死,取出主动脉进行油红O染色,观察小鼠斑块形成情况来判定以便于观察造模是否成功。

**2.2 小鼠血清指标检测** 采用全自动生化分析仪血脂试剂盒检测血清CHO、TG、LDL-C和HDL-C水平。

**2.3 小鼠主动脉根部苏木素-伊红(HE)染色** 将固定液中的小鼠主动脉组织进行OCT包埋、切片,将切片回温用磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,用苏木素染色液染细胞核、清洗后伊红染细胞质,清洗后晾干封片,平放过夜后置于显微镜下采集图像进行分析。

**2.4 小鼠主动脉大体油红O染色** 将充分固定后的主动脉从固定液中取出,将表面残留的固定液用

PBS清洗液清洗干净,放至载玻片上,然后将载玻片放入10 cm的培养皿中,加入油红O工作液,使其将血管完全浸没,置于37℃水浴锅中孵育30 min。弃去油红染液,加入75%乙醇溶液分化2次,每次5 min,最后加入磷酸盐缓冲液(PBS)洗去乙醇。然后用吸水纸擦干水分,置于黑色台面上拍照。

**2.5 小鼠主动脉根部油红O染色** 将冰冻切片放入切片架回温,在固定液中固定15 min,自来水冲洗之后,晾干。油红O染色后苏木素染色液复染步骤同上,封片后显微镜下观察。

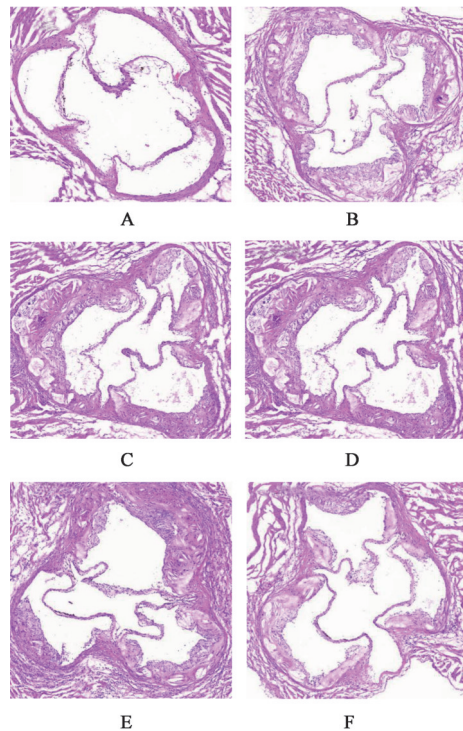
**2.6 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测关键蛋白TRPV1、p-AMPK/AMPK、Beclin-1、LC3 II、LC3 I的表达量** 低温高速研磨仪中加入含有高效RIPA裂解液的主动脉组织,离心取上清蛋白,按照BCA蛋白浓度测定试剂盒说明书检测蛋白浓度。使用JESS机器<sup>[8]</sup>检测相关蛋白;将终质量浓度为1 g·L<sup>-1</sup>主动脉组织蛋白原液加入至5×Master Mix(即Loading Buffer)中配置澄清的裂解物,并在95℃下煮沸5 min。主动脉组织原液3 μL,封闭溶液,一抗TRPV1(1:20)、AMPK(1:50)、p-AMPK(1:50)、Beclin-1(1:50)、LC3A/B(1:50)、HRP结合的羊抗兔/羊抗鼠二抗(1:20)和化学发光底物(仅用于HRP结合的二抗)和蛋白质归一化染色试剂均添加到毛细管电泳的指定孔中。然后将板和毛细管添加到JESS机器中并在其中成像。所有分析均使用Compass软件完成。

**2.7 统计学分析** 统计学处理数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,使用IBM SPSS Statistics 23、GrapPad Prism 9统计软件进行分析。利用单因素方差分析(One-way ANOVA)进行多组间比较,方差齐时采用最小显著性差异法(LSD)检验,方差不齐时采用非参数检验, $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对AS小鼠主动脉病理变化的影响** 正常组的主动脉血管是完整的,内膜和中膜是平滑的,没有发现斑块,而模型组的内膜则显著加厚,在管腔中可以看到大量的炎症细胞的渗入和胆固醇晶体形成的裂缝,且辛伐他汀组的管腔中的斑块也比模型组的小一些。人参汤低、中、高剂量组小鼠比模型组小鼠AS程度降低,弹性片层排列更加有序,而人参汤高剂量组小鼠AS程度较模型组小鼠降低的程度最为明显。见图1。

**3.2 对AS小鼠血脂的影响** 与正常组比较,模型组小鼠的CHO、TG、LDL-C水平显著上升



注:A.正常组;B.模型组;C.辛伐他汀组;D.人参汤低剂量组;E.人参汤中剂量组;F.人参汤高剂量组(图2-图4同)

图1 人参汤对AS小鼠主动脉病理变化的影响(HE,×51)

Fig. 1 Effect of Renshentang on pathological changes of aorta in AS mice (HE,×51)

( $P<0.01$ ),与模型组比较,辛伐他汀组、人参汤低、中剂量组均能降低小鼠的CHO、TG、LDL-C水平( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),其中人参汤中剂量组效果显著( $P<0.01$ )。与正常组比较,模型组的HDL-C显著降低( $P<0.01$ ),与模型组比较,辛伐他汀组、人参汤中、高剂量组HDL-C水平略有升高,但差异无统计学意义。见表1。

**3.3 对AS小鼠主动脉斑块的影响** 与正常组比较,高脂饮食喂养的模型组小鼠主动脉有大量的脂质沉积;与模型组比较,辛伐他汀组、人参汤低、中、高剂量组能明显减少主动脉内的斑块沉积。见图2。

**3.4 对AS小鼠主动脉根部斑块的影响** 与正常组比较,辛伐他汀组主动脉根部斑块面积显著增多( $P<0.01$ ),说明本实验造模成功。与模型组比较,辛伐他汀组、人参汤低、中、高剂量组均能明显减少主动脉根部斑块面积( $P<0.05$ , $P<0.01$ ),其中人参汤高剂量组减轻斑块效果最为显著( $P<0.01$ ),与模型组小鼠比较,斑块面积约减少了19%。见图3、表2。

**3.5 对AS模型小鼠TRPV1、p-AMPK/AMPK、Beclin-1、LC3 II/LC3 I蛋白相对表达量的影响** 与正常组比较,模型组小鼠的TRPV1、p-AMPK/

表1 人参汤对AS小鼠血脂水平的影响( $\bar{x}\pm s, n=11$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	CHO	TG	HDL-C	LDL-C
正常组		1.74±0.13	0.70±0.09	2.01±0.17	0.24±0.02
模型组		13.35±1.32 <sup>2)</sup>	1.70±0.31 <sup>2)</sup>	0.48±0.08 <sup>2)</sup>	1.34±0.13 <sup>2)</sup>
辛伐他汀组	0.002	10.62±1.14 <sup>4)</sup>	0.73±0.06 <sup>4)</sup>	0.51±0.13	1.12±0.11 <sup>3)</sup>
人参汤低剂量组	2.715	9.68±0.75 <sup>4)</sup>	0.77±0.05 <sup>4)</sup>	0.46±0.11	1.04±0.09 <sup>4)</sup>
人参汤中剂量组	5.43	9.65±1.91 <sup>4)</sup>	0.75±0.18 <sup>4)</sup>	0.48±0.12	1.03±0.17 <sup>4)</sup>
人参汤高剂量组	10.68	11.51±1.13 <sup>3)</sup>	0.80±0.08 <sup>4)</sup>	0.63±0.14	1.26±0.10

注:与正常组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01;与模型组比较<sup>3)</sup>P<0.05,<sup>4)</sup>P<0.01(表2和表3同)

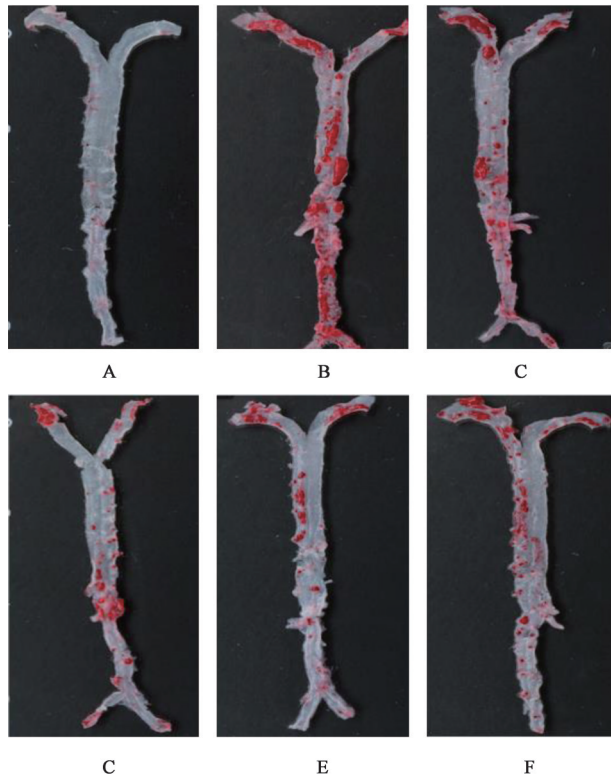


图2 人参汤对AS小鼠主动脉斑块的影响(油红O)

Fig. 2 Effect of Renshentang on aortic plaque in AS mice (oil red O)

AMPK、Beclin-1、LC3 II/LC3 I 的相对表达量明显降低,差异有统计学意义( $P<0.05, P<0.01$ )。与模型组比较,人参汤方中、高剂量组 TRPV1、p-AMPK/AMPK、Beclin-1、LC3 II/LC3 I 的相对表达量均明显升高,差异有统计学意义( $P<0.05, P<0.01$ )。见表3、图4。

#### 4 讨论

冠状AS可归属于中医中的“胸痹”范畴。胸痹是由于心肌缺血引起的胸部疼痛或不适感觉,而冠状AS是一种血管疾病,指动脉内壁出现脂质沉积、纤维蛋白增生及钙化,使血管管腔变窄或闭塞。两者之间有密切的关联,冠状AS是胸痹的主要病因

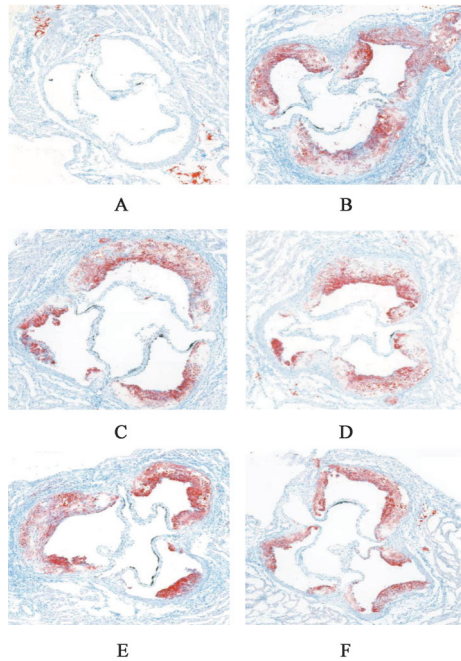


图3 人参汤对AS小鼠主动脉根部斑块的影响(油红O,×51)

Fig. 3 Effect of Renshentang on aortic root plaque in AS mice (oil red O, ×51)

表2 人参汤对AS小鼠主动脉根部斑块的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of Renshentang on aortic root plaque in AS mice ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	主动脉根部斑块面积百分比/%
正常组		0.00±0.00
模型组		0.52±0.01 <sup>2)</sup>
辛伐他汀组	0.002	0.39±0.03 <sup>3)</sup>
人参汤低剂量组	2.715	0.44±0.02 <sup>3)</sup>
人参汤中剂量组	5.43	0.42±0.04 <sup>3)</sup>
人参汤高剂量组	10.68	0.33±0.05 <sup>4)</sup>

之一。当冠状动脉内壁出现粥样硬化斑块,血流通常会受到阻碍,导致心肌缺血和缺氧,进而引起胸痹症状。此外,冠状动脉内壁粥样硬化斑块破裂或出现血栓形成,也可能导致急性心肌梗死,症状包括

表3 人参汤对AS小鼠TRPV1、p-AMPK/AMPK、Beclin-1、LC3 II/LC3 I 蛋白相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of Renshentang on relative expression of TRPV1, p-AMPK/AMPK, Beclin-1, LC3 II/LC3 I proteins in AS mice ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	TRPV1	p-AMPK/AMPK	Beclin-1	LC3 II/LC3 I
正常组		1.01±0.01	1.05±0.44	1.01±0.01	1.14±0.13
模型组		0.82±0.03 <sup>2)</sup>	0.51±0.01 <sup>2)</sup>	0.59±0.02 <sup>2)</sup>	0.33±0.04 <sup>1)</sup>
辛伐他汀组	0.002	1.09±0.01 <sup>3)</sup>	0.83±0.22	1.07±0.09	0.91±0.09 <sup>3)</sup>
人参汤低剂量组	2.715	1.06±0.01 <sup>4)</sup>	1.39±0.32	0.99±0.21	0.75±0.11 <sup>3)</sup>
人参汤中剂量组	5.43	1.29±0.01 <sup>4)</sup>	1.44±0.10 <sup>3)</sup>	1.23±0.07 <sup>3)</sup>	0.96±0.10 <sup>4)</sup>
人参汤高剂量组	10.68	1.67±0.08 <sup>3)</sup>	1.54±0.10 <sup>3)</sup>	1.31±0.07 <sup>3)</sup>	0.92±0.11 <sup>3)</sup>

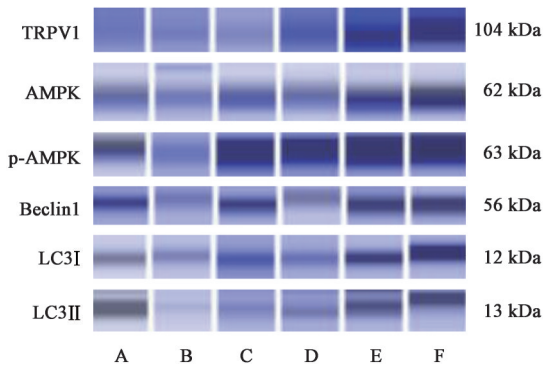


图4 各组小鼠TRPV1、p-AMPK/AMPK、Beclin-1、LC3 II/LC3 I 蛋白相对表达电泳

Fig. 4 Electrophoresis of TRPV1, p-AMPK/AMPK, Beclin-1, LC3 II/LC3 I proteins relative expression in various groups of mice

胸痛、气促、出汗等。因此,预防冠状AS是预防胸痹的关键。

自从王清任创立“瘀血致病”学说之后,中医治疗冠状AS大多着眼于活血化瘀,往往忽视了从“温阳”角度入手治疗。在《伤寒论·胸痹心痛短气病脉证并治第九》中张仲景认为阳微阴弦为胸痹的基本病机。“阳微”即心阳虚弱、上焦阳气不足,“阴弦”即阴寒、痰瘀等邪气,向上侵袭上焦胸部,痹阻血脉,发为心痛。《素问·生气通天论篇》<sup>[17]</sup>云:“阳气者,若天与日,失其所则折寿而不彰。”《类经附翼·求正录·大宝论》<sup>[18]</sup>云:“阴以阳为主”,“可见天之大宝,只此一丸红日,人之大宝,只此一息真阳”。以上均从生理角度阐述了阳气的重要性。AS是由于血管内膜发生病变,血流动力学改变,血管壁增厚,血管内层积聚多余的脂肪等原因造成的一种血管疾病,中医认为主要是由于阳虚、痰湿、气滞、血瘀等病理因素导致,因此应用温阳法治疗可消散痰湿,疏通气血,则活血化瘀的作用效果更佳。《金匮要略》人参汤方为温中祛寒、补气健脾的经典方剂,仲景之法,法在救阳,多用桂枝、干姜、附子等温里药来温阳益气,以助血行,心阳充盛,气血调畅,血瘀自去,

胸痹得缓<sup>[19]</sup>。

在本实验中,从药效水平上来说,《金匮要略》人参汤方全方组成为人参、干姜、炙甘草、白术,全方无一味活血化瘀药物,却起到了显著的降脂效果,尤其是显著降低了AS模型小鼠的CHO、TG、LDL-C水平,该方的低、中剂量组都显示出了明显优势;从降低斑块面积来看,辛伐他汀组、人参汤低、中、高剂量组均能明显减少主动脉根部斑块面积,其中人参汤高剂量组效果减轻斑块效果最为显著。

从作用机制来讲,目前已有研究显示TRPV1通道的激活能降低心血管疾病的发生、发展,并能提高病人的预后效果,且可保护心血管系统<sup>[20]</sup>。TRPV1有可能成为抑制高脂饮食后形成的血管粥样硬化发生的一个治疗目标,而对TRPV1的激活会抑制氧化低密度脂蛋白诱导的血管平滑肌细胞(oxLDL VSMC)来源的泡沫细胞的生成,其中间环节可能是由于AMPK磷酸化后恢复了由oxLDL导致的受损的自噬水平<sup>[21-23]</sup>。TRPV1在血管内皮细胞和平滑肌细胞中都有表达,TRPV1的激活挽救了AMPK信号通路介导受损的自噬水平。人参的主要成分人参皂甙Rb<sub>1</sub>,干姜的主要成分6-姜酚,均为TRPV1激动剂,除此之外,人参皂甙Rb<sub>1</sub>是人参中含量最丰富的活性成分之一,Rb<sub>1</sub>对AS的发生和发展具有良好的治疗作用,特别是在提高血管壁的顺应性、降低内皮细胞的炎症反应、稳定斑块和减弱斑块的形成方面<sup>[24]</sup>。人参、干姜是本研究对象人参汤的主要组成药物,也是本研究以TRPV1对自噬作用为切入点研究人参汤治疗AS的作用机制的依据之一。自噬是一种细胞代谢过程,是维持细胞稳态的重要途径之一。其中,AMPK是自噬过程中的重要调控分子<sup>[25-26]</sup>。AMPK的激活可以促进多种代谢产物的分解和细胞内能量代谢的调节,同时也能够通过调节其他信号蛋白的活性来参与细胞内的自噬

过程。磷酸化后,AMPK可通过将下游自噬相关蛋白招募到自噬体形成位点并控制自噬体的形成来启动自噬过程<sup>[27-28]</sup>。Beclin-1与LC3是自噬过程中的两个非常重要的蛋白质。Beclin-1是自噬过程中最早被发现的蛋白质,其被认为是自噬体形成的关键<sup>[29]</sup>。Beclin-1可以形成复合体,与类囊体膜蛋白相互作用,从而胞膜上形成膜囊泡,最终形成自噬体。LC3是自噬过程中形成的另一个重要蛋白质。LC3最初存在于细胞质中的LC3 I形式,通过自噬相关基因4(Atg4)介导的切割后被改变,变成LC3 II形式。LC3 II能够结合到自噬体膜上,并通过在膜上随时间逐渐表达的方式参与到自噬体的延伸、包覆及合并等过程中<sup>[30-31]</sup>。因此,LC3 II的相对含量被广泛用来评估自噬的水平 and 程度<sup>[32-33]</sup>。本实验研究结果发现,相较于模型组,《金匱要略》人参汤中剂量和高剂量TRPV1、p-AMPK/AMPK、Beclin-1、LC3 II/LC3 I的相对表达量均显著升高,差异均有统计学意义。说明了《金匱要略》人参汤方可能是通过调节TRPV1的表达上升,进而恢复了由AMPK介导的自噬水平,从而起到了稳定及减少AS斑块的效果。

综上所述,《金匱要略》人参汤通过提高TRPV1蛋白的表达水平,诱导自噬从而抑制AS的形成可能是其治疗AS的分子机制之一。后续课题组将从肝脏与脂代谢角度开展进一步研究,以深入探讨该方治疗AS的分子机制。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] 《中国心血管健康与疾病报告2021》编写组.《中国心血管健康与疾病报告2021》要点解读[J]. 中国心血管杂志,2022,27(4):305-318.

[2] 朱德建,陈伟,王奇,等. 人参汤治疗心肾阳虚型不稳定性心绞痛患者的临床研究[J]. 中医药信息,2019,36(4):70-73.

[3] 黄干初. 人参汤对冠状动脉粥样硬化性心脏病稳定型心绞痛的疗效分析[J]. 中医临床研究,2011,3(10):52-53.

[4] 郭宏杰. 人参汤治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病稳定型心绞痛49例[J]. 河北中医,2009,31(9):1332-1333.

[5] LUO D, LI W, XIE C, et al. Capsaicin attenuates arterial calcification through promoting SIRT6-mediated deacetylation and degradation of Hif1 $\alpha$  (hypoxic-inducible factor-1 alpha) [J]. Hypertension, 2022,79(5):906-917.

[6] SZABADOS T, GÖMÖRI K, PÁLVÖLGYI L. Capsaicin-sensitive sensory nerves and the TRPV1 ion channel in cardiac physiology and pathologies[J]. Int J Mol Sci,2020,21(12):4472.

[7] ZHAO J F, CHING L C, KOU Y R, et al. Activation of TRPV1 prevents oxLDL-induced lipid accumulation and TNF- $\alpha$ -induced inflammation in macrophages: Role of liver X receptor  $\alpha$  [J]. Mediators Inflamm, 2013,2013:925171.

[8] RANDHAWA P K, JAGGI A S. TRPV(1) channels in cardiovascular system: A double edged sword? [J]. Int J Cardiol,2017,228:103-113.

[9] ZHOU Y, WANG X, GUO L, et al. TRPV1 activation inhibits phenotypic switching and oxidative stress in vascular smooth muscle cells by upregulating PPAR $\alpha$  [J]. Biochem Biophys Res Commun, 2021, 545: 157-163.

[10] WANG C, LU J, SHA X, et al. TRPV1 regulates ApoE4-disrupted intracellular lipid homeostasis and decreases synaptic phagocytosis by microglia [J]. Exp Mol Med,2023,55(2):347-363.

[11] LIU Z, WANG P, LU S, et al. Liquiritin, a novel inhibitor of TRPV1 and TRPA1, protects against LPS-induced acute lung injury [J]. Cell Calcium, 2020, 88: 102198.

[12] 杨桢. 基于热敏通道TRPV1的理中丸标志性成分之间的配伍研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学,2015.

[13] 张仲景. 金匱要略[M]. 北京:中医古籍出版社,1997:23.

[14] 沈绍功,王承德,韩学杰主编. 中医心病治法大全[M]. 北京:中国中医药出版社,2005:83.

[15] GUMINA D L, JI S, FLOCKTON A, et al. Dysregulation of integrin  $\alpha\beta3$  and  $\alpha5\beta1$  impedes migration of placental endothelial cells in fetal growth restriction [J]. Development, 2022, 149 (19) : dev200717.

[16] 王鑫玉,赵一慕,高云,等. 普洱茶素II改善高脂血症ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化作用机制研究[J]. 中草药,2023,54(4):1157-1163.

[17] 王冰. 黄帝内经素问[M]. 南宁:广西科学技术出版社,2016:4.

[18] 张介宾. 类经图翼·类经附翼评注[M]. 西安:陕西科学技术出版社,1996:395-396.

[19] 白云绮,李慧,宋珂,等. ApoE<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化模型的中医证型[J]. 世界中医药,2021,16(1):71-76.

[20] GAO W, SUN Y, CAI M, et al. Copper sulfide nanoparticles as a photothermal switch for TRPV1

- signaling to attenuate atherosclerosis [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):231.
- [21] LI B H, YIN Y W, LIU Y, et al. TRPV1 activation impedes foam cell formation by inducing autophagy in oxLDL-treated vascular smooth muscle cells [J]. *Cell Death Dis*, 2014, 5(4):e1182.
- [22] 韦劲宇. TRPV1在缺氧小鼠心肌细胞自噬中的作用及其机制研究[D]. 重庆:中国人民解放军陆军军医大学, 2019.
- [23] MAIESE K. Warming up to new possibilities with the capsaicin receptor TRPV1: mTOR, AMPK, and erythropoietin [J]. *Curr Neurovasc Res*, 2017, 14(2): 184-189.
- [24] XUE Q, HE N, WANG Z, et al. Functional roles and mechanisms of ginsenosides from *Panax ginseng* in atherosclerosis [J]. *J Ginseng Res*, 2021, 45(1):22-31.
- [25] HOLCZER M, HAJDÚ B, LÖRINCZ T, et al. A double negative feedback loop between mTORC1 and AMPK kinases guarantees precise autophagy induction upon cellular stress [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(22): 5543.
- [26] LIU X, TANG Y, CUI Y, et al. Autophagy is associated with cell fate in the process of macrophage-derived foam cells formation and progress [J]. *J Biomed Sci*, 2016, 23(1):57.
- [27] 但俊,王小梅. 基于AMPK-mTOR信号通路探讨通心络胶囊通过调节自噬改善高糖环境下H9c2心肌细胞损伤的机制 [J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 34(3):322-327.
- [28] 史默怡,王明珠,周训杰. 祛风养心方通过SIRT3-AMPK介导自噬抑制Ang II诱导H9c2心肌细胞肥大机制研究 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2023, 25(2): 53-58.
- [29] PRERNA K, DUBEY V K. Beclin1-mediated interplay between autophagy and apoptosis: New understanding [J]. *Int J Biol Macromol*, 2022, 204:258-273.
- [30] HECKMANN B L, GREEN D R. LC3-associated phagocytosis at a glance [J]. *J Cell Sci*, 2019, 132(5): 22984.
- [31] 石宗华,王新军,张兰玉,等. 红景天苷对脑出血后自噬蛋白Beclin-1、LC3-II、p62的作用研究 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(12):61-64,后插8.
- [32] 孙梦捷,余虹霓,韩广卉,等. 地黄饮子改善AD小鼠脑星形胶质细胞能量代谢障碍及自噬损伤的作用机制 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(8):19-26.
- [33] 赵敏菡,储心乔,曹晓慧,等. 基于JNK信号通路调控细胞自噬探讨化浊解毒活血通络方对脑缺血再灌注损伤的保护作用 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(7):115-125.

[责任编辑 周冰冰]