

本文引用: 何娜祯, 贝雪怡, 陈光宇, 李 亮, 瞿昊宇, 谢梦洲. 益气活血方对冠心病气虚血瘀证大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路及自噬的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(11): 2035–2043.

益气活血方对冠心病气虚血瘀证大鼠 PI3K/Akt/mTOR 信号通路及自噬的影响

何娜祯^{1,2,3,4}, 贝雪怡^{1,2,3,4}, 陈光宇^{1,2,3,4}, 李 亮^{1,2,3,4}, 瞿昊宇^{1,2,3,5}, 谢梦洲^{1,2,3,4*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南省药食同源功能性食品工程技术研究中心, 湖南 长沙 410208;

3. 湖南中医药大学中医心肺病证辨证与药膳食疗重点实验室, 湖南 长沙 410208; 4. 湖南中医药大学中医诊断学

湖南省重点实验室, 湖南 长沙 410208; 5. 湖南中医药大学信息科学与工程学院, 湖南 长沙 410208

〔摘要〕 **目的** 探讨益气活血方对冠心病气虚血瘀证大鼠自噬及磷脂酰肌醇 3 激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)信号通路的影响, 阐明其作用机制。 **方法** 48 只 SPF 级 SD 雄性大鼠, 随机分为假手术组、模型组、益气活血方组(17.1 g·kg⁻¹)、西药组(单硝酸异山梨酯 3.6 mg·kg⁻¹), 每组 12 只。除假手术组外, 其余各组均用结扎冠状动脉左前降支合并游泳力竭法制备冠心病气虚血瘀证大鼠模型, 而假手术组只穿线不结扎。灌胃给药 14 d 后取材, 观察各组大鼠一般情况、心电图变化情况, 超声心动图检测大鼠心功能, 血液流变学检测大鼠的全血黏度, HE 染色观察心肌组织病理形态, 透射电子显微镜观察心肌组织超微结构, RT-PCR 检测 Beclin-1、微管相关蛋白 1 轻链 3-II(LC3-II)、Akt、mTOR 的 mRNA 表达水平, Western blot 检测大鼠心肌组织中 Beclin-1、LC3-II、Akt、mTOR 的蛋白表达。 **结果** 与假手术组比较, 模型组大鼠一般状态变差; 心电图 ST 段抬高($P<0.01$); 射血分数(EF)、短轴缩短率(FS)值降低($P<0.01$), 左室舒张末期径(LVIDd)、左室收缩末期径(LVIDs)值升高($P<0.01$); 全血黏度升高($P<0.01$); 心肌组织排列紊乱, 心肌损伤严重; 心肌超微结构受损严重; Akt、mTOR 的 mRNA 及蛋白表达上调($P<0.01$), Beclin-1、LC3-II 的 mRNA 及蛋白表达下调($P<0.01$)。与模型组比较, 益气活血方组及西药组一般状态改善; 心电图 ST 段降低($P<0.01$); EF、FS 值升高($P<0.01$), LVIDd、LVIDs 值降低($P<0.05$, $P<0.01$); 全血黏度下降($P<0.01$); 心肌纤维排列整齐, 心肌细胞结构及形态改善; 心肌超微结构损伤改善; Akt、mTOR 的 mRNA 及蛋白表达下调($P<0.05$, $P<0.01$), Beclin-1、LC3-II 的 mRNA 及蛋白表达上调($P<0.05$, $P<0.01$)。 **结论** 益气活血方可改善冠心病气虚血瘀证大鼠心功能, 减轻心肌损伤, 有效治疗冠心病气虚血瘀证, 其作用机制可能与调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路, 激活自噬有关。

〔关键词〕 冠心病; 益气活血方; 气虚血瘀证; PI3K/Akt/mTOR 信号通路; 自噬

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.11.003

Effects of Yiqi Huoxue Formula on PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and autophagy in coronary heart disease rats with qi deficiency induced blood stasis pattern

HE Nazhen^{1,2,3,4}, BEI Xueyi^{1,2,3,4}, CHEN Guangyu^{1,2,3,4}, LI Liang^{1,2,3,4}, QU Haoyu^{1,2,3,5}, XIE Mengzhou^{1,2,3,4*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Hunan Engineering Technology Research Center

〔收稿日期〕 2025-06-19

〔基金项目〕 国家自然科学基金面上项目(82374323); 湖南省重点领域研发计划项目(2022SK2124); 湖南省教育厅科研项目(19A380); 湖南省中医药科研计划项目(202004)。

〔通信作者〕 * 谢梦洲, 女, 博士, 教授, 博士研究生导师, E-mail: xiemz64@163.com。

for Medicine & Food Homology of Functional Food, Changsha, Hunan 410208, China; 3. Key Laboratory of Chinese Medicine Heart and Lung Syndrom Differentiation, Medicated Diet & Dietotherapy, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 4. Hunan Key Laboratory of Chinese Medicine Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 5. School of Informatics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of the Yiqi Huoxue Formula (YQHXF) on autophagy and phosphatidylinositol 3-kinase/protein kinase B/mammalian target of rapamycin (PI3K/Akt/mTOR) signaling pathway in coronary heart disease (CHD) rats with qi deficiency induced blood stasis pattern, and to clarify its mechanism of action. **Methods** Forty-eight male SPF-grade SD rats were randomly divided into sham-operated group, model group, YQHXF group ($17.1 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$), and western medicine group (isosorbide mononitrate $3.6 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), with 12 rats in each group. Except the rats of the sham-operated group, models of CHD rats with qi deficiency induced blood stasis pattern were prepared by ligation of left anterior descending coronary artery combined with swimming exhaustion method in the other groups. For the sham-operated group, only threading without ligation was performed. After 14 days of gavage intervention, samples were collected. The general state and changes of electrocardiogram were observed among different groups of rats. The cardiac function was measured by echocardiography, whole blood viscosity by hemorheography, pathological morphology of myocardial tissue by HE staining, myocardial ultrastructure by transmission electron microscopy, mRNA expression levels of Beclin-1, LC3-II, Akt, and mTOR by RT-PCR, protein expressions of Beclin-1, LC3-II, Akt, and mTOR in myocardial tissue by Western blot. **Results** Compared with the sham-operated group, the model group exhibited worsened general state: elevated ST segment of electrocardiograms ($P < 0.01$), decreased ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) values ($P < 0.01$), increased left ventricular internal end-diastolic diameter (LVIDd) and left ventricular internal end-systolic diameter (LVIDs) ($P < 0.01$), increased whole blood viscosity ($P < 0.01$), disorganized myocardial tissue arrangement, severe myocardial injury, significantly impaired myocardial ultrastructure, up-regulated mRNA and protein expressions of Akt and mTOR ($P < 0.01$), and down-regulated mRNA and protein expressions of Beclin-1 and LC3-II ($P < 0.01$). Compared with the model group, the YQHXF group and western medicine group both showed improved general state: decreased ST segment of electrocardiogram ($P < 0.01$), increased EF and FS values ($P < 0.01$), decreased LVIDd and LVIDs ($P < 0.05$, $P < 0.01$), decreased whole blood viscosity ($P < 0.01$), aligned myocardial fibers, improved myocardial cell structure and morphology, ameliorated myocardial ultrastructure impairment, down-regulated mRNA and protein expressions of Akt and mTOR ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and up-regulated mRNA and protein expressions of Beclin-1 and LC3-II ($P < 0.05$, $P < 0.01$). **Conclusion** YQHXF can improve cardiac function and ameliorate myocardial injury in CHD rats with qi deficiency induced blood stasis pattern, effectively treating CHD with qi deficiency induced blood stasis pattern. Its mechanism of action may be related to the regulation of PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and the activation of autophagy.

[Keywords] coronary heart disease; Yiqi Huoxue Formula; qi deficiency induced blood stasis pattern; PI3K/Akt/mTOR signaling pathway; autophagy

冠心病是指冠状动脉发生粥样硬化引起管腔狭窄或闭塞,导致心肌缺血缺氧或坏死而引起的心脏病,具有高发病率和高死亡率的特点,且发病率与死亡率仍处于逐年上升的趋势,严重威胁居民健康^[1]。在我国的城乡居民疾病死亡构成比例中,心血管疾病处在第一位,我国心血管疾病现患人数高达 3.3 亿,其中冠心病占 1 139 万^[2]。冠心病归属于中医学“胸痹”“心痛”等范畴,病机为阳微阴弦,多属本虚标实,气虚血瘀证是冠心病的主要证型,贯穿疾病发生

发展的始终^[3-4]。

益气活血方是基于益气活血法组方,以补阳还五汤为基础化裁而来,是本课题组在前期针对冠心病气虚血瘀证的临床及基础研究上完善的处方,能有效改善冠心病心肌缺血,临床疗效明显^[5],但作用机制仍需进一步探究。细胞自噬是心肌缺血损伤的重要机制,在缺血的初期处理原本受损的细胞器,提供细胞代谢所需的营养物质,维持细胞内稳态,从而保护心肌细胞^[6-8]。自噬有助于维护心肌细胞的

能量代谢,减轻心肌细胞的损伤,保护心肌细胞的正常功能,对于改善心肌损伤和心肌纤维化具有潜在的治疗价值^[9-12]。自噬参与机体的新陈代谢和免疫等过程,与心血管疾病的关系密切,参与冠心病的发生、发展和预后^[7,13]。磷脂酰肌醇3-激酶(phosphoinositide 3-kinase, PI3K)/蛋白激酶B(protein kinase B, Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mammalian target of rapamycin, mTOR)信号通路是参与自噬诱导阶段的一条关键通路^[14-16]。有研究表明,中药单体及中药复方都有稳定动脉粥样硬化斑块的作用,其作用机制可能是影响 PI3K/Akt/mTOR 通路,调控心肌细胞的自噬^[14-16]。在自噬过程中,有很多自噬相关基因参与调控,其中自噬基因 Beclin-1 和自噬标志物微管相关蛋白1轻链3(microtubule-associated protein 1 light chain 3, LC3)-II 均与 PI3K/Akt/mTOR 信号通路关系密切^[17]。研究表明,可以通过调节 PI3K/Akt/mTOR 通路来调控细胞的自噬水平^[18]。本课题组前期研究发现,益气活血方可通过环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)/环磷酸腺苷调节鸟嘌呤核苷酸交换因子1(exchange protein directly activated by cAMP1, Epac1)/Ras-同源蛋白1(Ras-proximate-1, Rap1)、Toll样受体(Toll-like receptor, TLR)4/髓样分化因子88(myeloid differentiation primary response gene 88, MyD88)/核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、甲基化转移酶3(methyltransferase-like 3, METTL3)/心脏神经嵴衍生物表达蛋白2(heart and neural crest derivatives expressed 2, HAND2)/转化生长因子- β 1(transforming growth factor- β 1, TGF- β 1)等多个信号通路修复心肌损伤,改善冠心病大鼠心功能,通过抑制炎症反应、抗氧化应激等发挥作用^[19-21]。本研究在前期研究基础上,探讨益气活血方通过调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路改善冠心病气虚血瘀证大鼠心肌损伤的作用,为临床治疗用药进一步提供实验依据。

1 材料

1.1 实验动物

48只SPF级健康雄性SD大鼠,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,体质量(200±20)g,动物生产许可证号为SCXK(湘)2019-0004,质量合格证

号为430727221102772771,实验单位使用许可证号为SYXK(湘)2019-0009。大鼠饲养于湖南中医药大学实验动物中心,饲养环境:SPF级屏障环境,温度22~26℃,相对湿度40%~70%,每笼3只,自由进食和饮水。本实验经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审批通过,伦理编号为LLBH-202208300001。

1.2 主要药物

益气活血方组成:黄芪20g,丹参15g,当归12g,太子参10g,桂枝10g,红花8g,桃仁8g,水蛭6g,炙甘草6g。益气活血方颗粒剂(湖南省中医药研究院附属医院药剂科,规格:10g/袋,10袋/盒)。单硝酸异山梨酯片(鲁南贝特制药有限公司,规格:20mg/片,48片/盒,批号:H10940039)。

1.3 主要试剂

异氟烷(瑞普生物药业有限公司,批号:020037015);HE染色试剂盒(北京索莱宝科技股份有限公司,批号:G1120);RNA提取试剂盒(杭州新景生物试剂开发有限公司,批号:5003050);荧光定量PCR试剂盒、逆转录试剂盒(苏州近岸科技股份有限公司,批号:E096-01A、E047-01B);BCA蛋白浓度测定试剂盒、二抗山羊抗兔IgG、山羊抗鼠IgG、超敏化学发光ECL底物液(武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司,批号:E-BC-K318-M、E-AB-1003、E-AB-1001、E-IR-R308);GAPDH、Akt、mTOR、Beclin-1、LC3抗体(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:60004-1-Ig、60203-2-Ig、66888-1-Ig、66665-1-Ig、14600-1-AP)。

1.4 主要仪器

麻醉机(长沙临科仪器设备有限公司,型号:GOWE F680);小动物呼吸机(深圳市瑞沃德生命科技有限公司,型号:R407);数字心电图机(广州三锐电子科技有限公司,型号:EGG-2303B);数字化彩色超声仪(苏州飞依诺科技有限公司,型号:VIN-NO6);全自动血液流变仪(北京赛科希德科技发展有限公司,型号:SA-6600);全自动生物组织脱水机(湖北孝感耀楚医疗器械科技有限公司,型号:YT-12K);石蜡包埋机、半自动轮转式切片机(意大利DIAPATH公司,型号:39507、38355);摊片机(山东博科医疗器械有限公司,型号:BIODASE BT-1);实时荧光定量PCR仪(瑞士Roche公司,型号:Light-

Cycle480);酶标仪(美国 Thermo 公司,型号:Varioskan LUX);电泳仪(美国 Biorad 公司,型号:PowerPac™)。

2 方法

2.1 分组与造模

48 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后,按随机数字表法分成假手术组、模型组、益气活血方组和西药组,每组 12 只。采用结扎冠状动脉左前降支合并游泳力竭的方法建立冠心病气虚血瘀证大鼠模型。术前禁食 12 h,除假手术组外,其余组大鼠均行冠状动脉左前降支结扎术。具体方法如下:大鼠麻醉后仰卧位固定在鼠板上,切开气管,进行气管插管术,连接小动物呼吸机,呼吸频率先调为 35~45 次/min 维持大鼠呼吸;于第 3 至第 4 肋间隙打开胸腔,钝性分离胸部肌群,用拉钩扩大手术野,撕开心包膜,暴露心脏,调整呼吸机频率至 85 次/min,在左心耳下方用缝合线结扎冠状动脉左前降支,完成后依次紧密缝合肋间、肌肉和胸部皮肤,待大鼠恢复自主呼吸后,拔除气管插管并缝合颈部^[20]。连接心电图,记录术后心电图变化。假手术组大鼠只穿线不结扎。术后连续 3 d 予肌内注射 0.2 mL 青霉素钠以抗感染。模型建立成功的标志:心肌部位结扎处出现立刻发白现象,术后 II 导联心电图示心脏搏动减弱,且表现为 ST 段弓背抬高或 T 波高耸,或形成单向曲线^[21]。术后 7 d,除假手术组外,其余大鼠限制饮食,联合游泳力竭法,持续 28 d。每日控制大鼠的食量,自由饮水,将大鼠放入 40 cm×30 cm×50 cm 的大桶内,游泳条件:室温 24~25 ℃、水温 22~24 ℃、水深 30 cm,密切关注大鼠游泳状态,保证大鼠尾部无法接触到桶底,以大鼠沉入水中,在 10 s 内头面部不能浮出水面为标准,观察到大鼠完全沉入水中而无力浮出水面时,应快速捞出并擦干毛发,放回鼠笼^[20]。

2.2 干预方法

各组大鼠造模成功后予药物干预,连续灌胃给药 14 d,每日灌胃 1 次。根据团队前期研究结果,在改善冠心病气虚血瘀证的效果上,益气活血方的高剂量组明显优于低、中剂量组,因此,本实验直接取最佳剂量进行实验,即 17.1 g·kg⁻¹^[20];西药组选择单

硝酸异山梨酯,给药剂量为 3.6 mg·kg⁻¹^[22];假手术组、模型组给予等量的生理盐水灌胃。

2.3 一般情况观察

在造模及干预前后对大鼠的体质量变化、活跃程度和精神状态、舌象、爪甲颜色、毛发光泽等一般情况进行观察记录。

2.4 心电图采集

将大鼠呈仰卧位固定于鼠板上,连接数字心电图机,采集造模后及灌胃 14 d 后大鼠心电图,记录肢体 II 导联心电图 ST 段的变化幅度。

2.5 超声心动图检测

用异氟烷进行呼吸麻醉,将大鼠仰卧位固定于鼠板,脱毛备皮,在大鼠胸前涂抹适量耦合剂,调节探头垂直于大鼠左胸壁,探头指向 11 点方向,在超声长轴切面下,得到相应 M 型曲线。记录大鼠左室射血分数(ejection fraction, EF)和左心室短轴收缩率(fractional shortening, FS)。

2.6 血液流变学检测

大鼠腹主动脉取血,置于含肝素钠的采血管中,在全自动血液流变测试仪中检测大鼠的全血黏度低切、全血黏度中切和全血黏度高切。

2.7 HE 染色

剪下心脏,置于 4%多聚甲醛中固定,室温储存。经脱水、石蜡包埋后进行切片,用于 HE 染色。中性树胶封片,在光学显微镜下观察大鼠的心肌组织病理学改变,并拍照。

2.8 透射电镜观察

取大鼠的左心室前壁组织,切取约 1 mm×1 mm×3 mm 的小块,放入 2.5%戊二醛固定过夜,第 2 日用磷酸盐缓冲液洗涤 3 次,每次 15 min,放于 1%锇酸中固定 2 h,随后经过 50%、70%、90%、100%浓度梯度的丙酮脱水,经浸泡、包埋,再经固化和切片、染色等,最后将切片置于透射电镜下观察大鼠心肌组织超微结构变化,并采集图像。

2.9 RT-PCR 法检测

取出-80 ℃冻存的大鼠心肌组织,提取总 RNA,检测其浓度和纯度,将 RNA 反转录合成 cDNA 后扩增,扩增采用 20 μL 反应体系。以 GAPDH 为内参基

因,采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算大鼠心肌中Akt、mTOR、Beclin-1、LC3-II 的 mRNA 水平。引物序列详见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因名称	引物序列(5'-3')	长度/bp
GAPDH	正向:GACATGCCGCTGGAGAAAC	92
	反向:AGCCCAGGATGCCCTTTAGT	
Akt	正向:CACAGGTCGCTACTATGCCATGAAG	95
	反向:GCAGGACACGTTCTCAGTAAGC	
mTOR	正向:CATTCCGACCGTCTGCCTTCAC	136
	反向:GACCTCACCGCCACAGAAAGC	
Beclin-1	正向:TCAAGATCCTGGACCGAGTGACC	110
	反向:CTCCTCTCTGAGTTAGCCTCTTCC	
LC3-II	正向:CCAGGACAAGCAGGCAGATGAAG	149
	反向:CAGGCTTTCGTCTCTTCCACCATC	

2.10 Western blot 检测达

取出大鼠心肌组织,将组织裂解离心后取上清液,BCA 法测蛋白浓度,蛋白样品以每孔 10 μ L 的量上样。电泳分离、转膜、封闭后,对一抗 mTOR(1:10 000)、Akt(1:3 000)、Beclin-1(1:4 000)、LC3-II(1:4 000)、GAPDH(1:10 000)进行稀释,置于 4 $^{\circ}$ C 冰箱摇床,孵育过夜,TBST 液洗膜。用二抗(1:10 000)在室温下摇床孵育 1 h,TBST 液洗膜。将 ECL 中的溶液按 1:1 的比例混匀,取适量滴加于 PVDF 膜上,采用凝胶成像分析系统曝光显影,采集图像,使用 ImageJ 软件分析灰度值。

2.11 统计学方法

采用 SPSS 25.0 统计学软件进行实验数据的分析,计量资料用“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,均符合正态性和方差

齐性。采用单因素方差分析进行多组间比较,进行方差齐性检验时选用 LSD 检验。以 $P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠一般情况评价

假手术组大鼠精神状态良好,饮食、活动均正常,毛色光泽。与假手术组比较,造模各组大鼠逐渐出现体质量减轻、精神萎靡、活动减少、行动迟缓、毛色偏暗且易脱落等现象,蜷缩抱团、嗜睡的现象增加,口唇颜色变白,舌体发紫。与模型组比较,益气活血方组及西药组干预 7 d 后大鼠精神状态逐渐改善,体质量呈上升趋势,药物干预 14 d 后大鼠整体状态明显好转,精神状态良好,饮食正常,活动度增加,毛色有光泽,口唇颜色逐渐变红润,体质量增加。

3.2 益气活血方对大鼠心电图的影响

造模前,各组大鼠心电图显示正常,节律正常,QRS 波形规则,ST 段、T 波正常。灌胃 14 d 后,与假手术组比较,模型组大鼠心电图出现异常,ST 段呈弓背向上型抬高($P<0.01$);与模型组比较,益气活血方组和西药组大鼠心电图抬高的 ST 段出现回落($P<0.01$)。详见图 1、表 2。

3.3 益气活血方对大鼠心功能的影响

与假手术组比较,模型组 EF、FS 值降低($P<0.01$),LVIDd、LVIDs 值升高($P<0.01$)。与模型组比较,益气活血方组、西药组 EF、FS 值升高($P<0.01$),LVIDd、LVIDs 值降低($P<0.05$, $P<0.01$)。详见表 3、图 2。

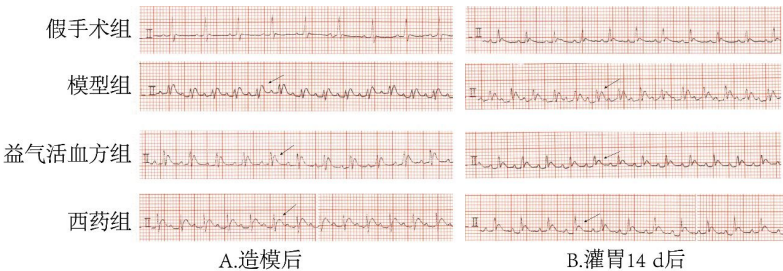


图 1 各组大鼠心电图比较

Fig.1 Comparison of electrocardiogram among different groups of rats

注: A 图中箭头处表示 ST 段显著抬高; B 图中益气活血方组、西药组箭头处表示 ST 段回落, 模型组箭头处表示 ST 段仍显著抬高。

表 2 各组大鼠心电图 ST 段比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 2 Comparison of ST segment in electrocardiogram among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	ST 段/mV
假手术组	0.02±0.07
模型组	0.30±0.44**
益气活血方组	0.17±0.02 ^{##}
西药组	0.16±0.02 ^{##}

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$ 。

表 3 各组大鼠心功能比较($\bar{x}\pm s, n=12$)

Table 3 Comparison of cardiac function among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=12$)

组别	EF/%	FS/%	LVIDd/mm	LVIDs/mm
假手术组	87.74±3.54	52.68±4.81	6.11±0.37	3.13±0.44
模型组	67.21±6.46**	33.16±4.33**	8.21±0.88**	4.99±0.98**
益气活血方组	82.26±5.17 ^{##}	46.32±5.51 ^{##}	6.85±0.78 [#]	3.83±0.61 ^{##}
西药组	80.71±4.52 ^{##}	44.67±4.77 ^{##}	7.03±0.56 [#]	4.19±0.38 [#]

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

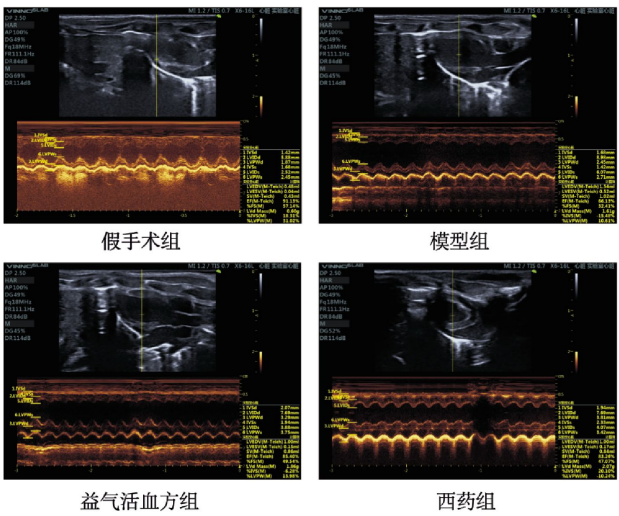


图 2 各组大鼠超声心动图

Fig.2 Echocardiograms in different groups of rats

3.4 益气活血方对大鼠血液流变学的影响

与假手术组比较,模型组低、中、高切黏度升高($P<0.01$)。与模型组比较,益气活血方组和西药组低、中、高切黏度下降($P<0.01$)。详见表 4。

3.5 益气活血方对大鼠心肌组织病理学的影响

假手术组大鼠的心肌纤维排列紧密、整齐,结构完整。与假手术组比较,模型组大鼠心肌纤维排列紊乱,甚至出现断裂现象,心肌细胞肿大,细胞核边缘模糊。与模型组比较,益气活血方组和西药组大

表 4 各组大鼠血液流变学比较($\bar{x}\pm s, n=6, \text{mPa}\cdot\text{s}$)

Table 4 Comparison of hemorheology among different groups of rats ($\bar{x}\pm s, n=6, \text{mPa}\cdot\text{s}$)

组别	低切黏度	中切黏度	高切黏度
假手术组	20.72±5.66	2.52±0.77	1.83±0.59
模型组	43.49±1.59**	7.18±0.27**	5.56±0.22**
益气活血方组	25.96±2.82 ^{##}	3.35±0.45 ^{##}	2.58±0.34 ^{##}
西药组	24.66±4.53 ^{##}	3.17±0.56 ^{##}	2.29±0.43 ^{##}

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$ 。

鼠心肌组织病理表现为不同程度的改善,心肌细胞形态和结构改善,心肌纤维排列较为整齐。详见图 3。

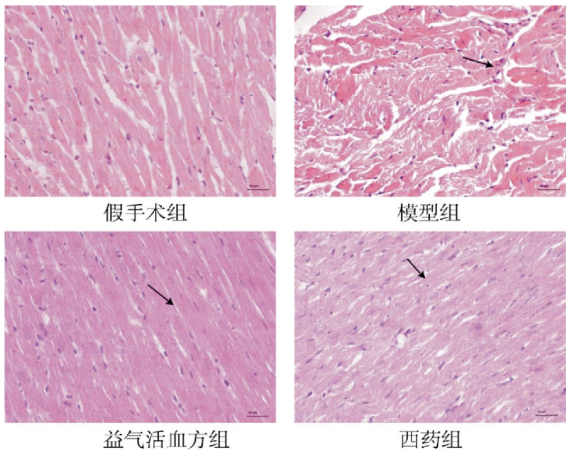


图 3 各组大鼠心肌组织 HE 染色图($\times 400$, 标尺=50 μm)

Fig.3 HE staining in different groups of rats ($\times 400$, bar=50 μm)

注:模型组的箭头处表示心肌纤维排列紊乱,心肌细胞变形;益气活血方组和西药组箭头处表示心肌纤维排列较整齐。

3.6 益气活血方对大鼠心肌组织超微结构的影响

假手术组大鼠心肌细胞结构正常,形态良好,心肌纤维排列整齐,肌丝清晰,线粒体分布均匀,线粒体膜完整,内嵴排列有序,且未见明显的自噬小体。与假手术组比较,模型组大鼠未见排列整齐的心肌纤维,结构出现破裂,肌节不完整,线粒体明显肿胀,形态出现扭曲,嵴排列无序、紊乱,断裂甚至消失,细胞损伤严重,可见少量自噬小体。与模型组比较,益气活血方组和西药组大鼠心肌纤维排列尚整齐,肌丝无明显的疏松现象,嵴排列也部分有序,结构尚清晰、完整,线粒体大小形态出现轻度肿胀变形,细胞损伤较轻,自噬溶酶体增多。详见图 4。

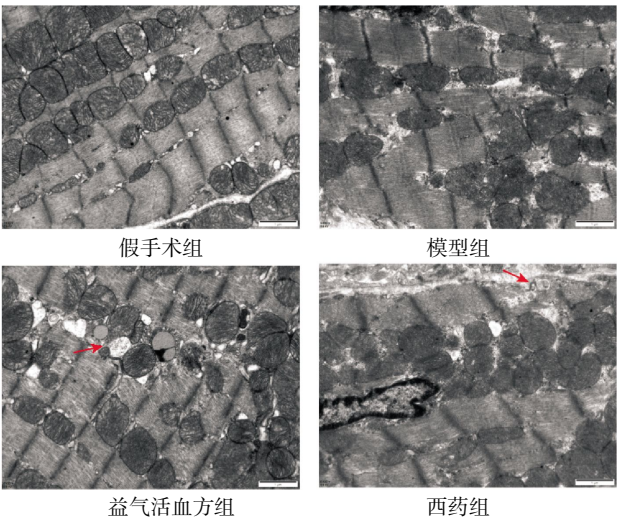


图 4 各组大鼠心肌细胞电镜图($\times 6\ 000$, 标尺=1 μm)

Fig.4 Electron microscopic images of myocardial cells in different groups of rats ($\times 6\ 000$, scale bar=1 μm)

注:箭头处显示自噬溶酶体增多。

3.7 益气活血方对大鼠 Akt、mTOR、Beclin-1、LC3-II mRNA 表达的影响

与假手术组比较,模型组 Akt、mTOR 的 mRNA 表达上调($P<0.01$),Beclin-1、LC3-II 的 mRNA 表达下调($P<0.01$)。与模型组比较,益气活血方组及西药组 Akt、mTOR 的 mRNA 表达均下调($P<0.05$, $P<0.01$),Beclin-1、LC3-II 的 mRNA 表达均上调($P<0.05$, $P<0.01$)。详见表 5。

表 5 各组大鼠心肌组织 Akt、mTOR、Beclin-1、LC3-II mRNA 表达比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 5 Comparison of mRNA expressions of Akt, mTOR, Beclin-1, and LC3-II in myocardial tissue among different groups of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	Akt	mTOR	Beclin-1	LC3-II
假手术组	1.00 $\pm$ 0.49	1.00 $\pm$ 0.17	1.00 $\pm$ 0.11	1.00 $\pm$ 0.16
模型组	1.95 $\pm$ 0.33**	2.00 $\pm$ 0.18**	0.40 $\pm$ 0.07**	0.50 $\pm$ 0.16**
益气活血方组	1.22 $\pm$ 0.12 ^{##}	1.55 $\pm$ 0.17 ^{##}	0.78 $\pm$ 0.12 ^{##}	0.73 $\pm$ 0.08 [#]
西药组	1.37 $\pm$ 0.28 [#]	1.63 $\pm$ 0.21 [#]	0.91 $\pm$ 0.18 ^{##}	0.75 $\pm$ 0.04 [#]

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

3.8 益气活血方对大鼠 Akt、mTOR、Beclin-1、LC3-II 蛋白表达的影响

与假手术组比较,模型组 Akt、mTOR 的蛋白表达上调($P<0.01$),Beclin-1、LC3-II 的蛋白表达下调($P<0.01$)。与模型组比较,益气活血方组及西药组 Akt、mTOR 的蛋白表达下调($P<0.05$, $P<0.01$),Beclin-1、

LC3-II 的蛋白表达上调($P<0.05$, $P<0.01$)。详见图 5、表 6。

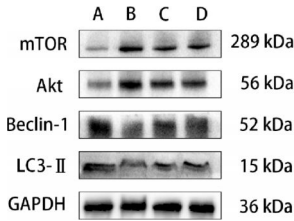


图 5 各组大鼠心肌组织 Akt、mTOR、Beclin-1、LC3-II 蛋白电泳图

Fig.5 Electrophoresis of Akt, mTOR, Beclin-1, and LC3-II proteins in myocardial tissue among different groups of rats

注:A.假手术组;B.模型组;C.益气活血方组;D.西药组。

表 6 各组大鼠心肌组织 Akt、mTOR、Beclin-1、LC3-II 蛋白表达比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

Table 6 Comparison of Akt, mTOR, Beclin-1, and LC3-II protein expressions in myocardial tissue among different groups of rats ($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	Akt	mTOR	Beclin-1	LC3-II
假手术组	1.00 $\pm$ 0.17	1.00 $\pm$ 0.08	1.00 $\pm$ 0.09	1.00 $\pm$ 0.05
模型组	2.13 $\pm$ 0.24**	3.29 $\pm$ 0.46**	0.57 $\pm$ 0.09**	0.64 $\pm$ 0.03**
益气活血方组	1.64 $\pm$ 0.12 ^{##}	2.29 $\pm$ 0.53 [#]	0.86 $\pm$ 0.08 ^{##}	0.80 $\pm$ 0.02 [#]
西药组	1.35 $\pm$ 0.16 ^{##}	2.22 $\pm$ 0.56 ^{##}	0.85 $\pm$ 0.09 ^{##}	0.88 $\pm$ 0.08 ^{##}

注:与假手术组比较,** $P<0.01$;与模型组比较,[#] $P<0.05$,^{##} $P<0.01$ 。

4 讨论

《冠心病稳定型心绞痛中医诊疗指南》^[23]中明确提出,气虚血瘀证是冠心病的主要证型。本课题研究的益气活血方由黄芪、丹参、当归、太子参、桂枝、红花、桃仁、水蛭、炙甘草组成,是在前期针对冠心病气虚血瘀证的临床及基础研究上进一步完善的处方,具有益气活血、化瘀通络的功效,用于治疗冠心病气虚血瘀证的临床疗效明显,毒副作用小,受到诸多患者的认可^[5]。通过结扎冠状动脉左前降支合并游泳力竭的方法,构建冠心病气虚血瘀证的大鼠模型,用益气活血方干预后,发现其可明显改善冠心病大鼠的一般状态,改善血液流变学指标,减轻心肌组织损伤,增强心功能。前期研究证明,益气活血方治疗冠心病气虚血瘀证疗效明显,证实了益气活血方可能通过调节 cAMP/Epac1/Rap1 信号通路,改善冠心病气虚血瘀证大鼠的心肌损伤^[20]。研究发现,TLR4/

MyD88/NF- κ B 信号通路在冠心病中发挥重要作用,证实了益气活血方可降低 TLR4/MyD88/NF- κ B 信号通路中白细胞介素-1 β 、白细胞介素-6、肿瘤坏死因子- α 等促炎性细胞因子表达,从而抑制炎症反应^[19]。益气活血方可能通过调控 METTL3/HAND2/TGF- β 1 信号轴,抑制炎症反应^[21]。前期通过使用不同剂量对大鼠进行干预,发现高剂量组的治疗效果最佳^[21]。因此,本研究直接选择高剂量益气活血方探讨其对自噬及 PI3K/Akt/mTOR 信号通路的影响。经干预后,益气活血方组大鼠精神状态良好,饮食正常,活动度增加,毛色有光泽,口唇颜色逐渐变红润,体质量增加,表明冠心病大鼠的整体状态得到明显改善;心电图显示抬高的 ST 段出现回落,趋于正常,超声心动图显示 EF 值和 FS 值显著回升,提示心功能得到明显改善;全血黏度明显降低,提示血瘀症状得到改善;心肌细胞形态和结构改善,心肌纤维排列较为整齐。以上结果表明,经益气活血方干预后,冠心病大鼠心肌损伤减轻,心肌缺血状态改善。

细胞自噬是参与心肌缺血损伤的重要机制,在缺血的初期能处理原本受损的细胞器,提供细胞代谢所需的营养物质,维持细胞内稳态,起到保护心肌细胞的作用^[6]。研究证实,中药能干预心肌细胞自噬的发生与发展,保护心肌^[24-25]。丹参作为活血化瘀之要药,是临床上用于心血管疾病的常见中药,其有效成分丹参酮 II 有抗动脉粥样硬化的作用。曹慧敏等^[26]通过体外实验证明,丹参酮 II 可防治冠心病,其作用机制可能为改变 PI3K/Akt/mTOR 信号通路上的基因,通过激活细胞自噬,发挥对内皮细胞的保护作用。研究表明,丹参酮 II A 对心力衰竭大鼠心室重构保护作用的机制可能与抑制 PI3K/Akt 信号通路激活及心肌纤维化有关^[27]。人参皂苷 Rb1 对心血管系统有保护作用,可通过 PI3K/Akt/mTOR 信号通路抑制心肌细胞自噬并减少心肌缺血损伤^[18]。Akt 是 PI3K/Akt/mTOR 通路上的中心分子,由 Akt 激活的下游基因 mTOR 是哺乳动物自噬信号通路的主要靶点,主要参与细胞自噬的过程,在心血管系统中 mTOR 信号整合细胞内外的信号,是生理和病理过程中的一种中枢调节剂^[28]。Beclin-1 和 LC3-II 是反映细胞自噬的两个重要指标。LC3 是第一个被发现的自噬体标记蛋白,与自噬泡的数量呈正比关系^[29-30]。Beclin-1

是自噬进程中不可或缺的调节因子,与自噬小体的形成有关,抑制 PI3K/Akt/mTOR 信号通路可以诱导 Beclin-1 的激活,最终调控巨噬细胞发生自噬^[31]。LC3-II 作为自噬关键蛋白,在调控细胞自噬中发挥重要作用,在心血管疾病的发生与发展中也扮演着重要的角色。

本研究通过结扎冠状动脉左前降支合并游泳力竭法成功构建了冠心病气虚血瘀证大鼠模型。病理学染色结果提示,与假手术组比较,模型组大鼠出现明显的心肌损伤,心肌组织中 Akt、mTOR 的 mRNA 及蛋白表达上调,表明 PI3K/Akt/mTOR 信号通路被激活;Beclin-1、LC3-II 的 mRNA 及蛋白表达均明显下调,说明自噬水平被抑制。而在益气活血方组和西药组大鼠的心肌组织中,Akt、mTOR 的 mRNA 及蛋白表达较模型组下调,表明益气活血方组和西药组心肌组织中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路被抑制;Beclin-1、LC3-II 的 mRNA 及蛋白表达较模型组上调,说明自噬水平被激活。本实验中,益气活血方组显著改善了大鼠心肌组织的损伤程度,上调了心肌组织 Beclin-1、LC3-II 的 mRNA 及蛋白表达,下调了 Akt、mTOR 的 mRNA 及蛋白表达,表明其治疗冠心病的作用可能与调控 Beclin-1、LC3-II、Akt 和 mTOR 的表达,从而激活细胞自噬有关。

综上所述,益气活血方可能通过调节 PI3K/Akt/mTOR 信号通路,调控细胞自噬,从而改善冠心病气虚血瘀证大鼠心肌损伤。冠心病的发病机制复杂,中医药对该病的治疗涉及多种机制、多条通路、多个靶点,因此,各机制之间的作用关系有待深入挖掘。

参考文献

- [1] KIM S J, MESQUITA F C P, HOCHMAN-MENDEZ C. New biomarkers for cardiovascular disease[J]. Texas Heart Institute Journal, 2023, 50(5): e238178.
- [2] 马丽媛,王增武,樊静,等.《中国心血管健康与疾病报告 2022》要点解读[J].中国全科医学,2023,26(32): 3975-3994.
- [3] 万彩云,范婷婷,卢青青,等.基于 CiteSpace 可视化分析气虚血瘀证研究热点趋势[J].世界科学技术-中医药现代化,2021,23(8): 2849-2857.
- [4] 杨秀娟,朱瑞萱,谢冉,等.活心丸防治气虚血瘀证冠心病分子机制及方义和疗效解析[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(9): 205-213.
- [5] 潘继兴,邓文祥,曾光,等.加味生脉补心丹对冠心病气虚血

- 瘀证大鼠动脉粥样硬化的影响[J]. 中国中医急症, 2016, 25(7): 1303-1306.
- [6] KALUDERCIC N, MAIURI M C, KAUSHIK S, et al. Comprehensive autophagy evaluation in cardiac disease models[J]. Cardiovascular Research, 2020, 116(3): 483-504.
- [7] PAN J N, ZHANG H, LIN H, et al. Irisin ameliorates doxorubicin-induced cardiac perivascular fibrosis through inhibiting endothelial-to-mesenchymal transition by regulating ROS accumulation and autophagy disorder in endothelial cells[J]. Redox Biology, 2021, 46: 102120.
- [8] WU S Y, CHANG G L, GAO L, et al. Trimetazidine protects against myocardial ischemia/reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy[J]. Journal of Molecular Medicine, 2018, 96(8): 791-806.
- [9] LIN D S, LUO H, DONG B, et al. FOXO3a induces myocardial fibrosis by upregulating mitophagy[J]. Frontiers in Bioscience, 2024, 29(2): 56.
- [10] 尹磊, 王剑, 金静, 等. 肌醇需求酶1信号通路在自噬改善大鼠冠心病心肌缺血损伤中的作用[J]. 中国循环杂志, 2024, 39(5): 503-510.
- [11] 苑锡哲, 朱稳文, 王汝霞, 等. 哺乳动物雷帕霉素靶蛋白相关信号通路介导的自噬通路在冠心病中的研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2025, 27(2): 235-237.
- [12] 朱子一, 何贵新, 秦伟彬, 等. 线粒体自噬改善心肌梗死后心肌纤维化及其中医药干预的研究进展[J]. 中国全科医学, 2025, 28(18): 2294-2300.
- [13] CAI C, GUO Z Z, CHANG X, et al. Empagliflozin attenuates cardiac microvascular ischemia/reperfusion through activating the AMPK α 1/ULK1/FUNDC1/mitophagy pathway[J]. Redox Biology, 2022, 52: 102288.
- [14] GROOTAERT M O J, ROTH L, SCHRIJVERS D M, et al. Defective autophagy in atherosclerosis: To die or to senesce?[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2018, 2018: 7687083.
- [15] LIU C P, CHEN G L, CHEN Y F, et al. Danlou tablets inhibit atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice by inducing macrophage autophagy: The role of the PI3K-Akt-mTOR pathway[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 724670.
- [16] 王斌驿, 李菲菲, 吴东方, 等. 巨噬细胞自噬在动脉粥样硬化中作用的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(5): 439-444.
- [17] DERETIC V. Autophagy in inflammation, infection, and immunometabolism[J]. Immunity, 2021, 54(3): 437-453.
- [18] QIN G W, LU P, PENG L, et al. Ginsenoside Rb1 inhibits cardiomyocyte autophagy via PI3K/Akt/mTOR signaling pathway and reduces myocardial ischemia/reperfusion injury[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2021, 49(8): 1913-1927.
- [19] 陈善达, 汪顺伟, 欧颖, 等. 益气活血方对冠心病气虚血瘀证大鼠TLR4/MyD88/NF- κ B信号通路的影响[J]. 中国中医基础医学杂志, 2024, 30(2): 226-231.
- [20] 吴华英, 邓凯, 李静, 等. 益气活血方调控cAMP/Epac1/Rap1信号改善冠心病气虚血瘀证大鼠的验证[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(18): 107-116.
- [21] 荆晓朔, 张少辉, 汪顺伟, 等. 益气活血方调控METTL3/HAND2/TGF- β 1信号轴对冠心病气虚血瘀证大鼠的影响[J]. 中国中医药信息杂志, 2025, 32(1): 98-105.
- [22] 荆晓朔, 汪顺伟, 欧颖, 等. 益气活血自拟方对冠心病气虚血瘀证大鼠心功能的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(2): 211-217.
- [23] 中华中医药学会心血管病分会. 冠心病稳定型心绞痛中医诊疗指南[J]. 中医杂志, 2019, 60(21): 1880-1890.
- [24] WANG D W, YU W Q, LIU Y T, et al. Roles of autophagy in ischemic heart diseases and the modulatory effects of Chinese herbal medicine[J]. The American Journal of Chinese Medicine, 2017, 45(7): 1401-1419.
- [25] 李欢, 陈炜, 何乾超, 等. 中医药通过Wnt/ β -catenin途径调节细胞凋亡与自噬的研究进展[J]. 西部中医药, 2022, 35(7): 130-134.
- [26] 曹慧敏, 宋囡, 张妮, 等. 丹参酮IIA通过PI3K/Akt/mTOR信号通路调控自噬抗内皮细胞氧化应激损伤研究[J]. 北京中医药大学学报, 2017, 40(11): 933-939.
- [27] 宋媛媛, 史朋晓, 闫洪娟. 丹参酮IIA对心力衰竭大鼠心室重构和PI3K/Akt信号通路的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(4): 638-642.
- [28] SCIARRETTA S, FORTE M, FRATI G, et al. The complex network of mTOR signalling in the heart[J]. Cardiovascular Research, 2022, 118(2): 424-439.
- [29] TRAN S, DOUGLAS FAIRLIE W, LEE E F. BECLIN1: Protein structure, function and regulation[J]. Cells, 2021, 10(6): 1522.
- [30] PEÑA-MARTINEZ C, RICKMAN A D, HECKMANN B L. Beyond autophagy: LC3-associated phagocytosis and endocytosis[J]. Science Advances, 2022, 8(43): eabn1702.
- [31] KAUR S, CHANGOTRA H. The beclin 1 interactome: Modification and roles in the pathology of autophagy-related disorders[J]. Biochimie, 2020, 175: 34-49.

(本文编辑 周旦)