

TRPV1 激动剂通过 MAPK 信号通路调节缺血/再灌注大鼠心肌自噬的作用研究*

吉岳萍 吴勇宏 潘婉

(武汉市第一医院·武汉市中西医结合医院心血管内科,湖北 武汉 430022)

【摘要】 目的 探讨瞬时受体电位香草素 1 型(TRPV1)介导的丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路对缺血/再灌注(I/R)大鼠心肌自噬的调控及其在损伤修复中的作用。方法 将 24 只成年雄性大鼠随机分为假手术组、I/R 组(模型)、I/R+Capsaicin(CS)组,每组 8 只。除假手术组外,其他组建立 I/R 模型。建模前 5 min,I/R+CS 组大鼠腹腔注射 CS(TRPV1 激动剂,剂量为 20 mg/kg)。通过超声心动图评估心脏功能。使用伊文思蓝(EB)/2,3,5-三苯基四氮唑染色(TTC)估计梗塞面积。定量免疫印迹分析自噬体和自噬体相关蛋白。将 H9c2 细胞分为对照(Con)组、缺氧/复氧(H/R)组、H/R+Capsaicin(CS)组、H/R+CS+Anisomycin(p38 激动剂)组,通过用 mCherry-GFP-LC3 腺病毒评估各组细胞的自噬通量。结果 与假手术组相比,I/R 组的射血分数和缩短分数均显著降低,并出现大面积心肌梗死($P<0.05$),而 I/R+CS 组的射血分数和缩短分数均较 I/R 组显著升高,心肌梗死面积较 I/R 组显著降低($P<0.05$)。与假手术组相比,I/R 组心肌组织中 IC3-II、LC3-I、Becl-1 和 P62、p-p38/p38、p-JNK/JNK 表达显著上调(均 $P<0.05$),而 TRPN、Atg5 和 Rab 7 表达显著降低(均 $P<0.05$);与 I/R 组相比,I/R+CS 组的 TRPV1、LC3-II/LC3-I、Atg5、Beclin-1、Rab 7 蛋白表达显著上调(均 $P<0.05$),P62、p-p38/p38、p-JNK/JNK 的表达显著降低(均 $P<0.05$)。与 Con 组相比,H/R 组自噬体和自噬溶酶体均显著增加($P<0.05$)。与 H/R 组相比,H/R+CS 组自噬体显著增加($P<0.05$)。此外,H/R+CS+Anisomycin 组自噬体较 H/R+CS 组显著减少($P<0.05$)。结论 Capsaicin 可以通过 MAPK 信号通路增强自噬通量以减轻心肌 I/R 损伤,这为 TRPV1 的心脏保护作用提供了新的见解。

【关键词】 瞬时受体电位香草素 1 型;丝裂原活化蛋白激酶信号通路;缺血/再灌注;大鼠心肌;自噬

【中图分类号】 R542.2 **【文献标志码】** A **DOI:**10.3969/j.issn.1672-3511.2024.10.007

Role of TRPV1 agonists in regulating I/R autophagy through MAPK signaling pathway

Ji Yueping, Wu Yonghong, Pan Wan

(Department of Cardiology, Wuhan First Hospital, Wuhan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Wuhan 430022, China)

【Abstract】 **Objective** To investigate the regulation of MAPK signaling pathway mediated by transient receptor potential vanilloid type 1 (TRPV1) on myocardial autophagy in ischemia/reperfusion (I/R) rats and its role in injury repair. **Methods** Rats were randomly divided into sham operation group, I/R group (model) and I/R+Capsaicin (CS) group, with 8 rats in each group. I/R models were established in other groups except sham operation group. Five minutes before modeling, rats in I/R+CS group were intraperitoneally injected with CS (TRPV1 agonist at a dose of 20 mg/kg). Cardiac function was evaluated by echocardiography. Evans blue (EB)/2,3,5-triphenyltetrazole staining (TTC) was used to estimate the infarct area. Quantitative western blot analysed autophagy and autophagy-related proteins. H9c2 cells were divided into control (Con) group, hypoxia/reoxygenation (H/R) group, H/R+Capsaicin (CS) group and H/R+CS+Anisomycin (p38 agonist) group. The autophagy flux of cells in each group was evaluated by using Machery-GFP-LC3 adenovirus. **Results** Compared with the sham operation group, the ejection fraction and shortening fraction of I/R group decreased significantly ($P<0.05$), and a large area of myocardial infarction occurred ($P<0.05$), while the ejection fraction and shortening fraction of I/R+CS group increased significantly ($P<0.05$), and the area of myocardial infarction de-

基金项目:湖北省卫生健康委员会科研项目(2021W288);武汉市卫健委科研课题(W211C39)

引用本文:吉岳萍,吴勇宏,潘婉. TRPV1 激动剂通过 MAPK 信号通路调节缺血/再灌注大鼠心肌自噬的作用研究[J]. 西部医学,2024,36(10): 1449-1455. DOI:10.3969/j.issn.1672-3511.2024.10.007

creased significantly ($P < 0.05$). Compared with I/R group, the protein expressions of TRPV1, LC3-II/LC3-I, Atg5, Beclin-1 and Rab7 in I/R+CS group were significantly up-regulated to about 3.8 times, 1.6 times, 1.3 times, 1.7 times and 1.9 times ($P < 0.05$), and the expressions of P62, p-p38/p38 and p-JNK/JNK decreased significantly by 36.1%, 55.9% and 37.4% ($P < 0.05$). Compared with con group, autophagy and autophagosome in H/R group increased significantly ($P < 0.05$). Compared with H/R group, autophagy in H/R+CS group increased significantly ($P < 0.05$). In addition, autophagy in H/R+Anisomycin group was lower than that in H/R+CS group ($P < 0.05$). **Conclusion** Capsaicin can enhance autophagy flux through MAPK signaling pathway to reduce myocardial I/R injury, which provides a new insight into the cardioprotective effect of TRPV1.

【Key words】 Transient Receptor Potential Vanilloid type1; MAPK signal path; Ischemia/reperfusion; Rat myocardium; Autophagy

心脏缺血/再灌注(Ischemia/reperfusion, I/R)损伤是世界范围内严重的公共卫生威胁,具有很高的发病率和死亡率^[1-2]。目前,关于心肌 I/R 损伤的机制尚未完全阐明,但据报道,丝裂原活化蛋白激酶(Mitogen-activated protein kinase, MAPK)激活,包括 p38 MAPK、细胞外信号调节激酶(Extracellular signal-regulated kinase, ERK)和 c-Jun N-末端激酶(C-Jun N-terminal kinase, JNK)级联在 I/R 损伤中发挥关键作用^[3-4]。有研究^[5-6]表明,MAPK 信号通路介导的自噬可以迅速分解有害物质和受损的细胞器以减少再灌注期间心肌细胞的损伤。因此,自噬调控被认为是治疗 I/R 的有效策略。瞬时受体电位香草素 1 型(Transient Receptor Potential Vanilloid type1, TRPV1)是一种非选择性阳离子通道,允许 H^+ 、 Na^+ 、 Ca^{2+} 和 Mg^{2+} 离子通过^[7]。在心血管系统中,TRPV1 在心室、内皮细胞、血管平滑肌细胞和支配心脏的感觉神经元上表达^[8]。有研究^[8]证明了 TRPV1 在全身水平的激活产生心脏保护作用,防止 I/R 引起的损伤,其作用机制涉及激活自噬、减少氧化应激和微调炎症介质。然而,关于 TRPV1 介导的自噬参与 I/R 的报道仍较少,其机制尚未完全阐明。本研究旨在探讨 TRPV1 激动剂(Capsaicin, CS)通过 MAPK 信号通路调节 I/R 自噬的作用,从而为 I/R 病的治疗提供新的策略。

1 材料与方法

1.1 实验动物和分组 24 只成年雄性 Sprague-Dawley 大鼠(230 ± 20 g)购自北京维通利华实验动物技术有限公司[许可证号:SCXK(京)2021-0011]。大鼠被关在温度和湿度受控 40%~50%的动物房中,温度为 25 °C,光照/黑暗周期为 12 h。所有动物都可以无限制地获得新鲜食物和水。将大鼠随机分为假手术组、I/R 组(模型)、I/R+Capsaicin(CS)组,每组 8 只。本研究的实验动物方案经武汉市第一医院(武汉市中西医结合医院)伦理委员会批准同意。

1.2 I/R 模型的建立 通过腹腔注射硫喷妥钠 65 mg/kg 麻醉大鼠,然后将其连接到潮气量为 70 mL/

kg、呼吸速率为 60 次呼吸/min、吸气-呼气比为 1.5:1 的动物呼吸机上。之后开胸暴露大鼠心脏。结扎冠状动脉左前降支造成心肌缺血,可通过心电图显示心肌梗死(ST 段抬高或 T 波峰值)和心脏局部发绀判断。在心肌缺血 30 min 后,移除结扎线恢复血流 2 h 以模拟再灌注。除结扎外,假手术组大鼠进行相同的操作。手术前 5 min, I/R+CS 组大鼠腹腔注射 CS(剂量为 20 mg/kg)。CS 的应用剂量参照 Szabados 等^[9]报告的剂量。

1.3 细胞培养及分组处理 H9c2 细胞取自中国科学院上海细胞库。细胞在 DMEM(美国 Gibco 公司)培养,补充 10%胎牛血清(美国 Invitrogen 公司)和 100 μ g/mL 青霉素/链霉素。将 H9c2 细胞以 1×10^5 细胞/孔接种在 6 孔板中,将细胞分为对照(Con)组、缺氧/复氧(H/R)组、H/R+Capsaicin(CS)组、H/R+CS+Anisomycin(p38 激动剂)组。在 Con 组中,细胞在正常环境(5% CO_2 /95%空气)中培养。在其他组中, H9c2 细胞通过在缺氧条件下(1% O_2 /95% N_2)的非葡萄糖碱性 DMEM 中培养以诱导缺氧。缺氧 24 h 后,将细胞置于正常室中,再复氧 6 h。在 H/R+CS 组中, H9c2 细胞用 CS (3 μ mol/L, 美国 Sigma 公司)预处理 6 h,然后暴露于 H/R。在 H/R+CS+Anisomycin 组中,细胞用 CS (3 μ mol/L)和 Anisomycin (1 mmol/L^[10], 美国 Sigma 公司)预处理 6 h,然后暴露于 H/R。

1.4 心脏功能的超声心动图评估 I/R 后 24 h,采用与超声心动图系统(加拿大 FUJIFILM 公司)相连的 MS-250 成像传感器(16.0~21.0 MHz)评估心脏结构和功能。在麻醉状态下,大鼠的胸部被剃光,并捕获二维长轴图像用于舒张末期和收缩末期容积测量。由超声心动图系统自动计算并记录左心室射血分数和缩短分数。通过计算五个心动周期的平均值来评估每个参数。

1.5 肌钙蛋白 I、肌酸激酶同工酶、谷草转氨酶和乳酸脱氢酶的测定 通过测量心肌肌钙蛋白 I (cTnI)、肌酸激酶同工酶(CK-MB)、天冬氨酸转氨酶(AST)和

乳酸脱氢酶(LDH)的血浆浓度来评估心肌损伤。在再灌注期结束时,收集血液并以 1000 rpm 离心 15 min 以获得血浆。分别使用相应的 ELISA 试剂盒(中生北控生物科技股份有限公司)测量 CK-MB、AST、LDH、cTnI 活性。

1.6 心肌梗塞面积的评估 使用伊文思蓝(EB)/2,3,5-三苯基四氮唑染色(TTC,北京 Solarbio 公司)估计梗塞面积。再灌注后,再次麻醉大鼠,再次结扎左前降支,并通过尾静脉注射 2 mL 2%伊文思蓝。当大鼠嘴唇和四肢末端的皮肤染成蓝色后,取出心脏,用 4 °C 磷酸盐缓冲盐水(PBS)冲洗,在 80 °C 冷冻 20 min,并切成 7~9 片。将切片在 37 °C 的 1% TTC 缓冲液(pH=7.4)中浸泡 30 min。危险区域(Hazardous areas, AAR)定义为未被伊文思蓝染色的区域,梗塞区域(Infarction area, IA)定义为未被 TTC 染色的区域。使用相机捕捉染色切片的图像,通过 Image J 量化并以百分比表示。

1.7 组织病理学变化 苏木精-伊红(H&E)染色和观察心肌组织的病理和形态学变化。心肌组织的福尔马林固定的石蜡包埋切片用苏木精染色 5 min,用伊红染色 2 min,然后在光学显微镜下进行检查。

1.8 透射电子显微镜法 将心肌小碎片(大小约 1 mm³)浸入 2.5% (w/v)戊二醛、0.01% 苦味酸、0.1 M 二甲胍酸盐缓冲液(pH 7.4)中固定过夜。在相同的缓冲液中冲洗后,将组织浸入 1% (v/v)四氧化锇中 1 h,随后与 2% (v/v)乙酸铀酰水溶液一起封闭孵育 2 h。在一系列丙酮洗涤中脱水后,将组织包埋在 Araldite 中用于冠状切片。用超薄切片机切割每个样品至少三块超薄切片(75~80 nm),收集在 200 目铜网上,并用 5% 乙酸铀酰乙醇溶液(10 min)和柠檬酸铅溶液(5 min)进行染色。通过 H-7100 透射电子显微镜(日本 Hitachi 公司)检查栅格。

1.9 蛋白质印迹分析 使用 RIPA 裂解缓冲液(上海 Beyotime 公司)对心脏组织进行匀浆,和使用 BCA 试

剂盒(上海 Beyotime 公司)测定蛋白质含量。将等量蛋白质以 50 μg/泳道进行 SDS-PAGE 电泳分离并转移至 PVDF 膜(美国 Millipore 公司)。印迹在 5% 脱脂奶粉-TBS-0.1% 吐温 20 中封闭 2 h,然后洗涤。初级抗体在 4 °C 下孵育过夜,然后用辣根过氧化物酶偶联的二级抗兔或小鼠抗体(1:10 000)室温孵育 2 h。最后用化学发光成像系统(美国 Bio-Rad Laboratories 公司)成像。所用的初级、二级抗体均购自美国 Abcam 公司。GAPDH 用作内部参照。

1.10 高通量 RNA 测序 使用 Trizol 试剂(美国 Invitrogen 公司)提取总 RNA。使用 Ion Total RNA-Seq Kit v2(美国 Invitrogen 公司)制备测序文库。然后使用高通量生命技术离子质子测序仪分析该文库。使用 DEseq 算法检测差异表达基因,并满足以下标准:① 错误发现率(False discovery rate, FDR) < 0.05。② 倍数变化 > 2。

1.11 自噬通量分析 评估不同干扰因素对细胞自噬流量的影响。将 H9c2 细胞接种到 24 孔板后,用 mCherry-GFP-LC3 腺病毒(MOI=50)转导它们,固定,并通过共 TCS-SP8 聚焦显微镜(德国 Leica 公司)观察细胞。

1.12 统计学分析 使用 SPSS 22.0 统计学软件处理并分析数据。所有数据以均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示。使用单向方差分析比较多组间差异的统计显著性。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 Capsaicin 改善心肌缺血 ELISA 结果显示,与假手术组相比,I/R 组血清 cTnI、CK-MB、AST 和 LDH 水平显著升高($P < 0.05$),表明 I/R 暴露大鼠出现心肌损伤。然而,Capsaicin 显著缓解这种升高趋势($P < 0.05$)(见表 1)。此外,与假手术组相比,I/R 组的射血分数和缩短分数均显著降低($P < 0.05$),而 I/R +CS 组的射血分数和缩短分数均较 I/R 组显著升高($P < 0.05$),见图 1、表 2。

表 1 ELISA 法测定 cTnI 含量和 CK-MB、AST 和 LDH 的活性($\bar{x} \pm s$, U/L, $n=8$)

Table 1 The content of cTnI and the activities of CK MB, AST and LDH were determined by ELISA

组别	cTnI	CK-MB	AST	LDH
假手术组	192.35±18.62	85.09±9.51	235.84±13.60	213.09±11.46
I/R 组	526.70±25.43 ^①	410.37±32.94 ^①	726.93±40.84 ^①	972.38±105.70 ^①
I/R+CS 组	280.92±22.64 ^②	162.40±15.23 ^②	389.07±20.65 ^②	360.71±40.33 ^②
F	8.62	10.75	16.80	11.24
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

注:与假手术组相比,① $P < 0.05$;与 I/R 组相比,② $P < 0.05$ 。

2.2 Capsaicin 抑制心肌细胞梗死 EB/TTC 染色结果显示,与假手术组相比,I/R 组未被伊文思蓝染色的 AAR 面积和未被 TTC 染色 IA 面积均显著增加($P <$

0.05)。Capsaicin 治疗显著减少了 I/R 诱导的大面积心肌梗死($P < 0.05$)(见图 2A、表 3)。H&E 染色用于评估大鼠心肌细胞的形态学和心肌纤维化。假手

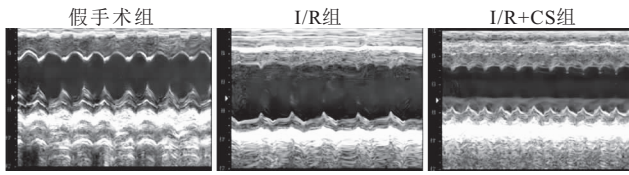


图 1 室壁运动的 2 维 M 型追踪

Figure 1 2D M-mode tracking of ventricular wall motion

表 2 各组大鼠心脏功能参数($\bar{x} \pm s, \%, n=8$)

Table 2 Cardiac function parameters of rats in each group

组别	射血分数	缩短分数
假手术组	80.14±1.12	51.26±1.30
I/R 组	39.47±5.90 ^①	18.94±2.06 ^①
I/R+CS 组	70.35±4.82 ^②	43.70±3.54 ^②
F	9.76	13.89
P	<0.001	<0.001

注:与假手术组比较,① $P<0.05$;与 I/R 组比较,② $P<0.05$ 。

术组心肌细胞排列规则,细胞核明显,无炎性细胞浸润。I/R 组心肌组织显示广泛的心肌细胞坏死、心肌纤维排列紊乱和大量炎性细胞浸润。I/R+CS 组心肌细胞排列更为有序,细胞坏死的程度和范围明显减少,见图 2B。

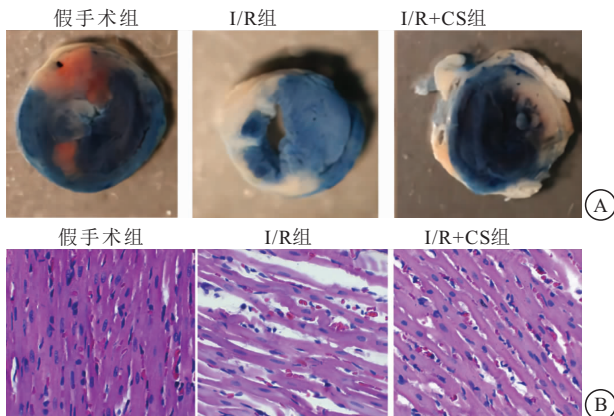


图 2 EB/TTC 染色和 H&E 染色用于检查心肌组织的病理和形态学变化

Figure 2 EB/TTC staining and H&E staining were used to examine the pathological and morphological changes of myocardial tissue

注:A. EB/TTC 染色;B. H&E 染色。

表 3 EB/TTC 染色结果($\bar{x} \pm s, \%, n=8$)

Table 3 EB/TTC staining results

组别	AAR	IA
假手术组	0.00±0.00	0.00±0.00
I/R 组	44.26±3.14 ^①	21.08±3.14 ^①
I/R+CS 组	29.13±2.08 ^②	6.54±1.17 ^②
F	15.42	20.37
P	<0.001	<0.001

注:与假手术组相比较,① $P<0.05$;与 I/R 组相比,② $P<0.05$ 。

2.3 RNA-seq 揭示自噬参与了 Capsaicin 的心肌保护作用 为了更好地了解 Capsaicin 在心肌 I/R 损伤中的作用, RNA-seq 被用来寻找参与 Capsaicin 心肌保护作用的生物学过程和途径。与假手术组相比, I/

R 组共有 2633 个基因差异表达($FDR<0.05$, 倍数变化 >2),与 I/R 组相比, I/R+CS 组有 852 个基因差异表达($FDR<0.05$, 倍数变化 >2)。在假手术组 vs I/R 组和 I/R 组 vs I/R+CS 组中有 270 个重叠的差异表达基因。重叠的差异表达基因用于随后的生物信息学分析,基因本体分析的生物学过程(GO 分析)的结果表明,自噬是可能参与 Capsaicin 心肌保护作用的最重要的生物学过程之一(见图 3A~B)。KEGG 途径富集分析显示,重叠差异表达基因主要涉及癌症、TNF 信号途径和 MAPK 信号途径等的转录错调(见图 3C)。因此, MAPK 信号通路和自噬可能参与了 Capsaicin 的心脏保护作用。

2.4 Capsaicin 体内调节受损的自噬通量和 MAPK 信号通路 为了确定 Capsaicin 是否调节自噬通量,通过 TEM 研究自噬体和自噬溶酶体(见图 4A)。结果显示,假手术组肌节和 Z 线清晰,线粒体形态正常。在 I/R 组中,心肌肌原纤维排列不规则,肌丝断裂、溶解,受损线粒体数量明显增加,肿胀变圆,甚至空泡和自噬体明显积聚,自噬流受阻。相比之下, I/R+CS 组肌纤维交织,肌丝断裂和溶解程度降低,线粒体肿胀,自噬体-溶酶体融合增多。

研究检测了自噬体和自噬体相关蛋白(见图 4B、表 4)。与假手术组相比, I/R 组心肌组织中 LC3-II/LC3-I、Beclin-1 和 P62 的表达分别显著上调至约 1.3 倍、1.2 倍、2.3 倍(均 $P<0.05$),而 TRPV1、Atg5 和 Rab7 的表达分别显著降低了 57.6%、33.3% 和 28.9%(均 $P<0.05$)。与 I/R 组相比, I/R+CS 组的 TRPV1、LC3-II/LC3-I、Atg5、Beclin-1、Rab 7 蛋白表达显著上调至约 3.8 倍、1.6 倍、1.3 倍、1.7 倍和 1.9 倍, P62 的表达显著降低 36.1%(均 $P<0.05$)。

此外, MAPK 信号通路相关蛋白分析显示(见图 4C、表 5),与假手术组相比, I/R 组心肌组织中 p-p38/p38、p-JNK/JNK 的表达分别显著上调至约 2.6 倍和约 2.0 倍(均 $P<0.05$)。与 I/R 组相比, I/R+CS 组的 p-p38/p38、p-JNK/JNK 蛋白表达显著降低 55.9%、37.4%(均 $P<0.05$)。

2.5 Capsaicin 体外调节 MAPK 信号通路改善受损的自噬通量 建立了 H/R 模型细胞,将 p38 激动剂 Anisomycin 和 CS 共同处理 H/R 模型细胞。结果显示,与 Con 组相比, H/R 组自噬体和自噬溶酶体均显著增加($P<0.05$)。与 H/R 组相比, H/R+CS 组自噬体显著增加($P<0.05$)。此外, H/R+CS+Anisomycin 组自噬体较 H/R+CS 组显著减少($P<0.05$)。这些数据表明, Capsaicin 通过 MAPK 信号通路改善 H/R 诱导的自噬通量受损,见图 5、表 6。

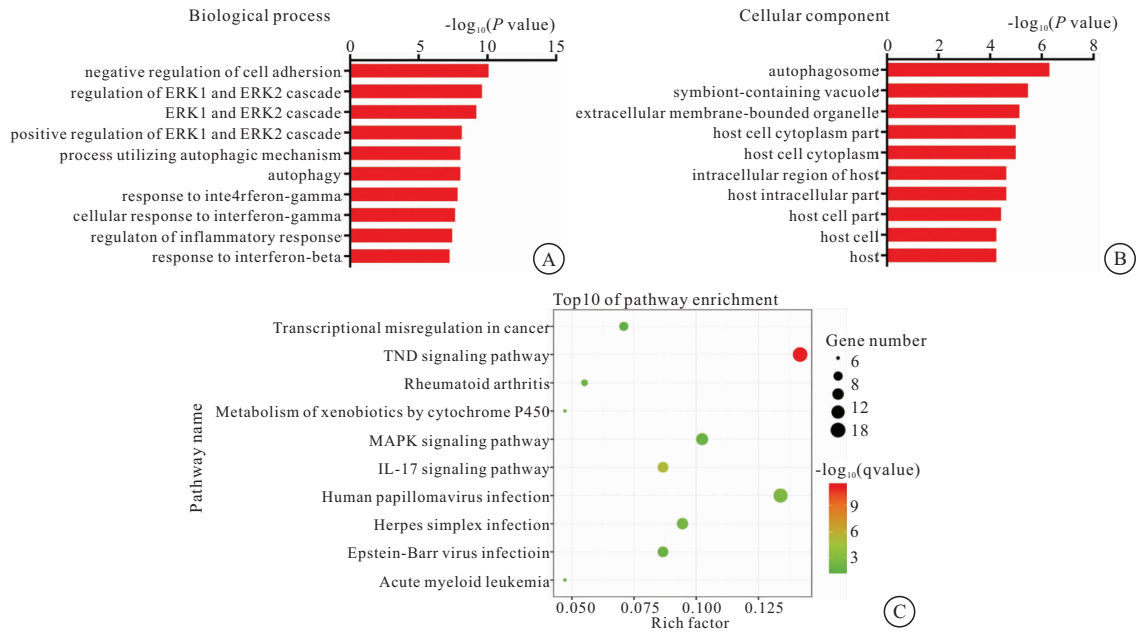


图 3 RNA-seq 揭示自噬参与了 Capsaicin 的心肌保护作用

Figure 3 RNA-seq revealed that autophagy was involved in the myocardial protection of Capsaicin

注:A. GO 分析生物学过程。B. GO 分析细胞组成部分。C. 丰富的 KEGG 途径散点图。Y 轴标签代表途径;X 轴标签代表富集因子(富集因子=途径中富集的差异表达基因的量/背景基因集中所有基因的量)。气泡大小和颜色分别代表在该途径中富集的差异表达基因的数量和富集显著性。

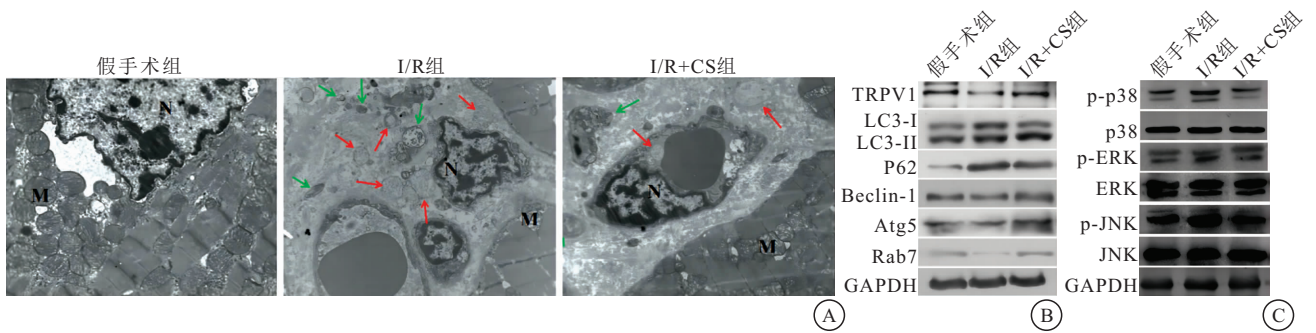


图 4 Capsaicin 体内调节受损的自噬通量

Figure 4 Capsaicin regulated impaired autophagy flux in vivo

注:A. 透射电镜观察心肌超微结构(7 000×);B. 免疫印迹分析自噬体和自噬体相关蛋白表达;C. 免疫印迹分析 MAPK 信号通路相关蛋白表达。红色箭头表示自噬体;绿色箭头表示自溶体。M. 线粒体;N. 细胞核。

表 4 TRPV1 蛋白、自噬体和自噬体相关蛋白表达($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 4 Expression of Trpv1 protein, autophagy and autophagy-related proteins

组别	TRPV1	LC3-II/LC3-I	P62	Beclin-1	Atg5	Rab7
假手术组	1.00±0.03	1.00±0.02	1.00±0.02	1.00±0.03	1.00±0.03	1.00±0.02
I/R 组	0.42±0.05 ^①	1.27±0.09 ^①	2.28±0.14 ^①	1.25±0.11 ^①	0.70±0.06 ^①	0.74±0.08 ^①
I/R+CS 组	1.50±0.12 ^②	1.62±0.11 ^②	1.42±0.08 ^②	1.51±0.14 ^②	1.28±0.08 ^②	1.35±0.11 ^②
F	8.62	4.82	7.56	4.71	6.12	6.38
P	<0.001	0.014	<0.001	0.016	<0.001	<0.001

注:与假手术组相比,①P<0.05;与 I/R 组相比,②P<0.05。

表 5 MAPK 信号通路相关蛋白表达($\bar{x} \pm s, n=8$)

Table 5 Expression of MAPK Signal Pathway Related Proteins

组别	p-p38/p38	p-ERK/ERK	p-JNK/JNK
假手术组	1.00±0.03	1.00±0.03	1.00±0.03
I/R 组	2.58±0.12 ^①	1.29±0.09	2.03±0.12 ^①
I/R+CS 组	1.14±0.08 ^②	1.13±0.07	1.25±0.07 ^②
F	9.05	4.94	5.44
P	<0.001	0.012	0.008

注:与假手术组相比,①P<0.05;与 I/R 组相比,②P<0.05。

3 讨论

心血管疾病占有所有死亡疾病的三分之一,缺血性心脏病是死亡的主要原因。I/R 损伤通常发生在病理条件下,机制复杂^[11]。近年来,研究^[9]发现 TRPV1 参与了 I/R 的治疗。目前这项研究的主要焦点是检测 Capsaicin 对大鼠 I/R 的影响,并探索其潜在的分子机制,结果表明,Capsaicin 治疗可以通过抑制

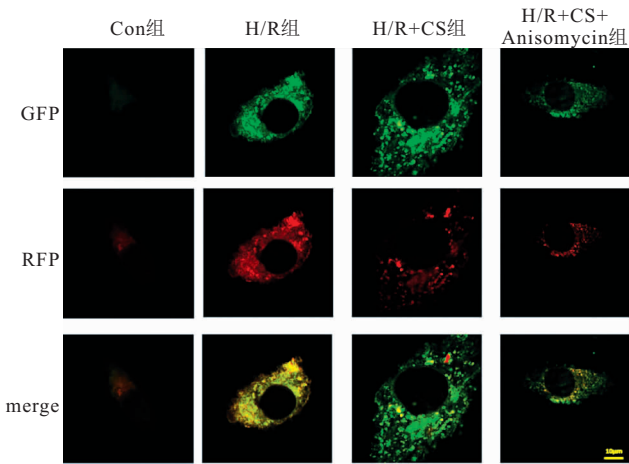


图 5 Cherry 红色荧光蛋白 (RFP)-黄色荧光蛋白 (GFP)-LC3 腺病毒转染到 H9c2 细胞中的自噬通量变化

Figure 5 Cherry red fluorescent protein (RFP)- yellow fluorescent protein (GFP)-LC3 adenovirus was transfected into H9c2 cells to observe the change of autophagy flux

注:对代表自噬体的黄色点和代表自噬溶酶体的红色点进行计数。

表 6 各组细胞自噬通量的变化($\bar{x} \pm s$)

Table 6 Changes of autophagy flux in each group

组别	自噬体数目	自噬溶数目
Con 组	2.46±0.32	3.24±0.48
H/R 组	41.54±3.85 ^①	29.35±2.75 ^②
H/R+CS 组	55.41±2.53 ^③	23.72±1.04
H/R+CS+Anisomycin 组	23.67±2.25 ^③	21.84±2.31
F	28.72	24.19
P	<0.001	<0.001

注:与 Con 组相比,① $P < 0.05$;与 H/R 组相比,② $P < 0.05$;与 H/R+CS 组相比,③ $P < 0.05$ 。

MAPK 信号通路介导的自噬来改善 I/R。

近年来,有研究^[12]证实 TRPV1 通道激活与减轻包括心脏、肾脏、肺和大脑在内的几个器官的缺血-再灌注诱导的损伤有关。Capsaicin 作为强效 TRPV1 通道激动剂,在持续缺血前 5 min 采用 Capsaicin 预处理(剂量为 10^{-6} mol/L),显著消除了正常小鼠的缺血-再灌注损伤^[13]。此外,还有学者^[14]发现缺血前 5 min 在灌注液中加入外源性低剂量 Capsaicin (10^{-6} mol/L),显著改善糖尿病心脏缺血后的功能恢复,表明 TRPV1 通道激活具有心脏保护作用。本研究的体内和体外实验均表明,Capsaicin 可减轻心肌损伤。此外,RNA-seq 被用于发现参与 Capsaicin 心肌保护作用的生物学过程和途径。将假手术组 vs I/R 组和 I/R 组 vs I/R +CS 组的重叠差异表达基因用于随后的生物信息学分析,结果表明 MAPK 信号通路介导的自噬可能参与 Capsaicin 心肌保护作用的最重要的生物学过程之一。Atg5 在自噬体组装中起重要作用^[15]。在与自噬相关的重叠差异表达基因中,Atg5 在 I/R 组显著上调,而且在使用 Capsaicin 处理心肌细胞后,Atg5

的表达进一步显著增加。其他众所周知的自噬相关基因,如 Rab7 等,具有与 Atg5 相同的表达模式,这与 I/R+CS 组比其他两组自噬活性更强相一致。此外,I/R+CS 组中 MAPK 信号通路相关蛋白均受到抑制,表明 MAPK 信号通路介导的自噬相关基因可能参与了 Capsaicin 的心脏保护作用。

自噬是保持细胞内环境动态平衡的重要机制。它进行细胞内细胞器和蛋白质的降解和再循环,以及细胞内物质的分泌和运输,使细胞能够通过回收营养物和 ATP 在应激条件下生存^[16]。目前的研究^[11]表明,自噬似乎在缺血和再灌注期间发挥明显不同的作用。普遍认为缺血时的自噬对于维持心脏功能的稳定和减轻心肌损伤至关重要^[17]。在缺血期,由于缺氧和营养缺乏而激活的自噬可以迅速分解有害物质和受损的细胞器。本研究结果表明 Capsaicin 的保护作用可能与适度增强的自噬通量有关。有研究^[18-19]报道自噬通量在再灌注阶段部分受损,增强的自噬通量可促进心肌细胞在 I/R 损伤中存活。本研究显示 Capsaicin 处理可以逆转 H/R 诱导的自噬通量降低。自噬受到多种信号通路的精确调控,包括 MAPK 和 Ras/Raf/MEK/ERK1/2^[20]。因此,我们在体外实验中使用 p38 激动剂 Anisomycin 来检验了这一途径;证实了 MAPK 信号通路的激活逆转 Capsaicin 的保护作用,表明 Capsaicin 可通过抑制 MAPK 信号通路提高了自噬通量。

4 结论

本研究结果提示,Capsaicin 可以通过 MAPK 信号通路增强自噬通量以减轻心肌 I/R 损伤,这为 TRPV1 的心脏保护作用提供了新的见解。但需更深入的机制研究和相关的临床研究来阐明 Capsaicin 减轻心肌 I/R 损伤的临床有效性和安全性。

【参考文献】

- [1] WANG W, HU M, LIU H, *et al.* Global Burden of Disease Study 2019 suggests that metabolic risk factors are the leading drivers of the burden of ischemic heart disease[J]. *Cell Metab*, 2021, 33(10): 1943-1956. e2.
- [2] 穆彦,刘新燕,齐胜娟.电针辅助全身麻醉对大鼠心肌缺血再灌注损伤的保护作用及其机制[J]. *西部医学*, 2022, 34(3): 335-339, 346.
- [3] SUN W, WANG Z, SUN M, *et al.* Aloin antagonizes stimulated ischemia/reperfusion-induced damage and inflammatory response in cardiomyocytes by activating the Nrf2/HO-1 defense pathway[J]. *Cell Tissue Res*, 2021, 384(3): 735-744.
- [4] CHEN H Y, XIAO Z Z, LING X, *et al.* ELAVL1 is transcriptionally activated by FOXO1 and promotes ferroptosis in myocardial ischemia/reperfusion injury by regulating autophagy[J]. *Mol Med*, 2021, 27(1): 14.

- [5] XU D, KONG T, ZHANG S, *et al.* Orexin-A protects against cerebral ischemia-reperfusion injury by inhibiting excessive autophagy through OX1R-mediated MAPK/ERK/mTOR pathway [J]. *Cellular Signalling*, 2021, 79: 109839.
- [6] BOUROUTI K E, KONSTANTAROS C, GAITANAKI C, *et al.* Severe Hyperosmotic Stress Issues an ER Stress-Mediated "Death Sentence" in H9c2 Cells, with p38-MAPK and Autophagy "Coming to the Rescue"[J]. *Biomedicines*, 2022, 10(6): 1421.
- [7] LUO J, CHEN J, YANG C, *et al.* 6-Gingerol protects against cerebral ischemia/reperfusion injury by inhibiting NLRP3 inflammasome and apoptosis via TRPV1/FAF1 complex dissociation-mediated autophagy[J]. *Int Immunopharmacol*, 2021, 100: 108146.
- [8] CASTREJÓN-TÉLLEZ V, DEL VALLE-MONDRAGÓN L, PÉREZ-TORRES I, *et al.* TRPV1 contributes to modulate the nitric oxide pathway and oxidative stress in the isolated and perfused rat heart during ischemia and reperfusion[J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 1031.
- [9] SZABADOS T, GÖMÖRI K, PÁLVÖLGYI L, *et al.* Capsaicin-sensitive sensory nerves and the TRPV1 ion channel in cardiac physiology and pathologies[J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(12): 4472.
- [10] XIONG Y, LIU T, CHEN J. Anisomycin has the potential to induce human ovarian cancer stem cell ferroptosis by influencing glutathione metabolism and autophagy signal transduction pathways[J]. *J Cancer*, 2023, 14(7): 1202-1215.
- [11] MOKHTARI B, BADALZADEH R. Protective and deleterious effects of autophagy in the setting of myocardial ischemia/reperfusion injury: an overview[J]. *Mol Biol Rep*, 2022, 49(11): 11081-11099.
- [12] RANDHAWA P K, JAGGI A S. A review on potential involvement of TRPV1 channels in ischemia-reperfusion injury[J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2018, 23(1): 38-45.
- [13] CASTREJÓN-TÉLLEZ V, DEL VALLE-MONDRAGÓN L, PÉREZ-TORRES I, *et al.* Transient Receptor Potential Vanilloid Type 1 Contributes to Modulate the Nitric Oxide Pathway and Oxidative Stress in the Isolated and Perfused Rat Heart during Ischemia and Reperfusion[J]. *Molecules*, 2022, 27(3): 1031.
- [14] MUNJULURI S, WILKERSON D A, SOOCH G, *et al.* Capsaicin and TRPV1 channels in the cardiovascular system; the role of inflammation[J]. *Cells*, 2022, 11(1): 18.
- [15] YIN Q, YAN R, WANG Y, *et al.* Gastrodin from *Gastrodia elata* attenuates acute myocardial infarction by suppressing autophagy: Key role of the miR-30a-5p/ATG5 pathway[J]. *J Func Foods*, 2023, 102: 105429.
- [16] 严一杰,魏丽娟,孙建红,等. ROCK2 在 ARC 中的表达及对晶状体上皮细胞的自噬及氧化损伤的影响[J]. *西部医学*, 2023, 35(2): 188-194.
- [17] 张春祥,刘屿畅,李春红,等. 心肌梗死后心肌细胞来源的外泌体对心脏的影响[J]. *西南医科大学学报*, 2023, 40(4): 277-280.
- [18] RAO P, LI C, WANG L, *et al.* ZNF143 regulates autophagic flux to alleviate myocardial ischemia/reperfusion injury through Raptor[J]. *Cell Signal*, 2022, 99: 110444.
- [19] YANG J, TONG T, ZHU C, *et al.* Pel1 contributes to myocardial ischemia/reperfusion injury by impairing autophagy flux via its E3 ligase mediated ubiquitination of P62[J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2022, 173: 30-46.
- [20] XIE M, CHO G W, KONG Y, *et al.* Activation of autophagic flux blunts cardiac ischemia/reperfusion injury[J]. *Circ Res*, 2021, 129(3): 435-450.

(收稿日期:2023-06-03;修回日期:2023-08-10;编辑:王小菊)

(上接第 1448 页)

- [3] 毕颖斐,王贤良,赵志强,等. 冠心病现代中医证候特征的临床流行病学调查[J]. *中医杂志*, 2017, 58(23): 2013-2019.
- [4] 胡瑞玲. 虎杖苷联合双抗血小板治疗老年冠心病的效果观察[J]. *内蒙古医学杂志*, 2020, 52(9): 1109-1110.
- [5] NIU J, LI Y, SONG X, *et al.* Cardioprotective Effect of Echinatin Against Ischemia/Reperfusion Injury: Involvement of Hippo/Yes-Associated Protein Signaling [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 11(1): 593225-593234.
- [6] 张世田,鹿路路,唐汉庆,等. 壮通饮对冠心病模型大鼠心功能及血管舒缩功能的影响[J]. *中国药房*, 2019, 30(18): 2480-2484.
- [7] 雷斌,唐玲,张亮,等. 虎杖苷通过激活 Nrf2/HO-1 信号通路减轻大鼠急性心肌梗死后心肌细胞损伤[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2019, 27(9): 757-763.
- [8] SHALHOUT S Z, YANG P Y, GRZELAK E M, *et al.* YAP-dependent proliferation by a small molecule targeting annexin A2 [J]. *Nat Chem Biol*, 2021, 17(7): 767-775.
- [9] ZHAO L, QIU X, WANG R, *et al.* 1H NMR-based metabolomics study of the dynamic effect of Xue-Fu-Zhu-Yu capsules on coronary heart disease rats induced by high-fat diet, coronary artery ligation [J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2021, 195(1): 113869-113878.
- [10] 毕静,白晓雪,王超. 虎杖苷通过激活 Nrf2/HO-1 信号抑制氧化应激诱导的心肌细胞损伤[J]. *中国老年学杂志*, 2020, 40(2): 407-409.
- [11] CHEN G, LIU G, CAO D, *et al.* Polydatin protects against acute myocardial infarction-induced cardiac damage by activation of Nrf2/HO-1 signaling[J]. *J Nat Med*, 2019, 73(1): 85-92.
- [12] 陈瑞敏,陈伟,李建耿,等. 虎杖苷对糖尿病小鼠心肌纤维化的保护作用及机制[J]. *山东医药*, 2021, 61(22): 47-50.
- [13] 邵岩,尹璐,王杰,等. β_3 肾上腺素能受体阻滞剂对老年冠心病大鼠心功能的影响[J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43(11): 2770-2774.
- [14] 毛小冬. 瑞舒伐他汀联合曲美他嗪治疗冠心病合并心衰患者对其心功能的影响[J]. *现代诊断与治疗*, 2023, 34(5): 706-708.
- [15] 谭子富,李家权,于颖,等. 基于 AKT/FOXO1 信号通路探讨豨莶草提取物对冠心病大鼠心肌损伤的保护作用[J]. *中医药导报*, 2023, 29(7): 35-40.
- [16] 张伟,杨龙,崔聪,等. 三七总皂苷对冠心病大鼠心肌的保护作用[J]. *西北药学杂志*, 2022, 37(6): 49-54.
- [17] 李明,乔晨晖,张伟华,等. miR-301 通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路改善冠心病大鼠心肌细胞凋亡[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2022, 30(11): 949-954.
- [18] 汪泽,杨学文,张莹,等. Hippo-YAP 信号通路研究与心血管疾病研究进展[J]. *中国医药科学*, 2020, 10(22): 26-29.
- [19] LIU J, XU L, ZHAN X. LncRNA MALAT1 regulates diabetic cardiac fibroblasts through the Hippo-YAP signaling pathway [J]. *Biochem Cell Biol*, 2020, 98(5): 537-547.
- [20] ZHENG X H, WANG L L, ZHENG M Z, *et al.* RGFP966 inactivation of the YAP pathway attenuates cardiac dysfunction induced by prolonged hypothermic preservation [J]. *J Zhejiang Univ Sci B*, 2020, 21(9): 703-715.

(收稿日期:2024-02-29;修回日期:2024-05-08;编辑:王小菊)