



中国中医科学院

CHINA ACADEMY OF CHINESE MEDICAL SCIENCES

博士学位论文

DOCTORAL DISSERTATION

愈心痛胶囊干预稳定性冠心病血小板功能的临床研究和机制探讨

Clinical study and mechanism of intervention of
Yu-xin-tong Capsule on platelet function in stable
coronary heart disease

申请人：谭 令

专 业：中西医结合临床

研究方向：中西医结合防治心血管病

导师：付长庚 主任医师
马晓昌 主任医师

2023 年 5 月 24 日

密 级：_____

单位代码： 84502

分类号：_____

学 号： BX2001010

中国中医科学院

二〇二〇级博士研究生学位论文

愈心痛胶囊干预稳定性冠心病血小板功能的临床研究和机制探讨

**Clinical study and mechanism of intervention of
Yu-xin-tong Capsule on platelet function in stable
coronary heart disease**

申 请 人：谭令

专 业：中西医结合临床

研 究 方 向：中西医结合防治心血管病

导 师：付长庚 主任医师

马晓昌 主任医师

中国中医科学院西苑医院

2023 年 5 月 北京

目 录

英文缩略词表.....	21
文献综述.....	22
综述一 低剪切应力诱导血管内皮损伤介导 AS 发生的研究进展 ..	22
1 低剪切应力影响内皮细胞的结构.....	22
2 低剪切应力影响内皮细胞的死亡方式.....	23
3 低剪切应力致内皮-间质转化	25
4 低剪切应力影响内皮细胞的分泌功能.....	25
5 抗低剪切应力作用的药物研究.....	27
6 小结与展望.....	28
综述二 血小板-内皮黏附在 AS 中的发生机制及抗血小板治疗的研	
究进展	29
1 血小板-内皮黏附在 AS 中的发生机制	29
2 抗血小板治疗的药物研究.....	30
3 小结与展望.....	34
综述三 益气活血方药保护血管内皮损伤的研究进展	35
1 中医学对血管内皮损伤病变的认识.....	35
2 现代医学对血管内皮损伤的认识.....	36
3 益气活血方药对血管内皮的保护作用研究	37
4 小结.....	39
参考文献.....	40
前言.....	51
第一章 愈心痛胶囊改善稳定性冠心病患者血小板功能的多中心、随	
机、双盲、安慰剂对照的临床研究.....	53
研究方案.....	54
1 伦理与注册.....	54
2 研究设计	54
3 研究对象.....	55
4 研究方法.....	57
5 统计分析	59
6 技术路线图.....	61
研究结果.....	62
1 病例完成情况.....	62
2 受试者基线资料.....	62
3 疗效评价	71

4 安全性评价.....	86
5 讨论.....	90
6 小结.....	95
第二章 愈心痛胶囊对低剪切应力的影响	96
1 实验材料.....	96
1.1 实验动物.....	96
1.2 实验药物及配制.....	96
1.3 实验试剂及仪器.....	96
2 实验方法.....	97
2.1 实验分组与给药.....	97
2.2 动物模型的构建.....	98
2.3 血流动力学的测定.....	98
2.4 血液流变学的检测.....	98
2.5 血流剪切应力的计算.....	98
2.6 颈动脉的组织病理学评估.....	99
2.7 统计分析.....	100
3 实验结果.....	100
3.1 愈心痛胶囊对 LSS 模型大鼠左颈总动脉血流情况的影响 ..	100
3.2 愈心痛胶囊对 LSS 模型大鼠左颈总动脉内径的影响	102
3.3 愈心痛胶囊对 LSS 模型大鼠全血黏度的影响.....	103
3.4 愈心痛胶囊对 LSS 模型大鼠颈总动脉血流剪切应力的影响	104
3.5 愈心痛胶囊对 LSS 模型大鼠颈总动脉病理组织学的影响 ..	105
4 讨论.....	108
5 小结.....	110
第三章 愈心痛胶囊抑制低剪切应力诱导血小板-内皮黏附的药理作用研究	111
第一节 愈心痛胶囊对低剪切应力模型大鼠血小板-内皮黏附的抑制作用	111
1 实验材料.....	111
2 实验方法.....	112
3 实验结果.....	113
4 讨论.....	116
5 小结.....	117
第二节 愈心痛胶囊对低剪切应力诱导血小板与 RVECs 黏附的抑制作用	118
1 实验材料.....	118
2 实验方法.....	119

3 实验结果.....	123
4 讨论.....	126
5 小结.....	126
第四章 愈心痛胶囊抑制低剪切应力诱导血小板-内皮黏附的药理机制研究.....	127
第一节 愈心痛胶囊对 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路的调控作用.....	127
1 实验材料.....	127
2 实验方法.....	129
3 实验结果.....	134
4 讨论.....	138
5 小结.....	140
第二节 愈心痛胶囊抑制低剪切应力诱导的血小板-内皮黏附的作用机制与其调控 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 密切相关.....	141
1 实验材料.....	141
2 实验方法.....	142
3 实验结果.....	145
4 讨论.....	148
5 小结.....	150
第五章 愈心痛胶囊的化学成分及入血成分研究.....	151
1 实验材料.....	151
1.1 实验试剂.....	151
1.2 实验仪器.....	151
2 实验方法.....	152
2.1 样品制备.....	152
2.2 分析条件.....	152
2.3 统计分析.....	152
3 实验结果.....	153
3.1 愈心痛胶囊中化学成分鉴定.....	153
3.2 愈心痛胶囊入血成分鉴定.....	160
4 小结.....	161
全文总结.....	162
1 研究思路.....	162
2 全文结论.....	164
创新点与不足.....	165
1 研究创新点.....	165
2 研究的不足之处.....	165
参考文献.....	166

中文摘要

研究背景

流行病学研究表明心血管疾病的全球发病率仍逐年升高,其中冠心病在我国的患病率和死亡率仍居高不下,目前患病总人数已超过1100万。稳定性冠心病(Stable coronary artery disease, SCAD)是心血管事件发生可控的主要冠心病类型。积极的抗血小板治疗是延缓动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS),进而控制SCAD的关键。西医抗血小板药物能有效抑制血小板活化,显著改善SCAD患者的预后,但仍存在无法克服的剂量依赖性出血、药物抵抗、胃肠道不良反应等副作用,因此,如何充分发挥中医药的优势,深入挖掘抗血小板活化的中药已成为广大医务工作者和研究人员关注的焦点。

愈心痛胶囊是陈可冀院士团队研发的用于治疗冠心病的益气活血代表性方药,由红参、三七、延胡索组成,具有益气活血、通脉止痛的功效。前期开展的大量临床研究和基础研究已证实愈心痛胶囊能有效改善冠心病患者的心绞痛症状和心肌缺血再灌注损伤,全面改善血液流变学异常等,但愈心痛胶囊能否抗血小板活化及其作用机制尚未明确。近年来,越来越多学者关注到血流剪切应力对AS形成的影响,剪切应力可以通过影响血管内皮细胞和血小板的功能状态,进而影响AS的形成。因此,本研究将以血小板活化为核心,通过临床研究评价愈心痛胶囊对血小板聚集率和血栓弹力图的影响,进而通过基础研究探索愈心痛胶囊对血小板活化后AS形成的干预作用是否与影响血流剪切应力有关。

研究目的

1. 通过一项多中心、随机、双盲、安慰剂对照的临床试验明确愈心痛胶囊改善气虚血瘀证稳定性冠心病患者血小板功能的有效性和安全性,为愈心痛胶囊的推广应用提供循证依据。
2. 阐明愈心痛胶囊对血小板-内皮黏附诱导AS形成的干预作用是否与影响血流剪切应力有关。
3. 证实愈心痛胶囊对低剪切应力诱导血小板-内皮黏附的作用是否与其调控MMP-2/PAI-1/p38-MAPK信号通路有关。

研究方法

1. 愈心痛胶囊改善气虚血瘀证稳定性冠心病患者血小板功能的临床研究

方法：采用多中心、随机、双盲、安慰剂对照的临床研究设计方法。纳入 2021 年 3 月至 2021 年 11 月就诊于首都医科大学附属北京安贞医院、北京中医药大学东直门医院以及广州医科大学第三附属医院 80 例符合试验标准的稳定性冠心病且中医辨证为气虚血瘀的患者作为病例入组来源。由不参与本试验统计分析的统计师使用 SAS 统计软件按分组比例产生随机数字表，按 1:1 随机分为试验组和对照组，两组各 40 例。试验组患者的干预措施为常规西医治疗基础上+愈心痛胶囊，对照组患者的干预措施为常规西医治疗基础上+愈心痛胶囊模拟剂。两组患者的干预方法均为每次 4 粒，每日 3 次，连续干预 12 周。在 0 周，8 周和 12 周三个时间点进行访视。主要疗效指标为 AA 和 ADP 诱导的血小板聚集率，常规血栓弹力图、AA 诱导的血栓弹力图和 ADP 诱导的血栓弹力图；次要疗效指标为气虚血瘀证证候评分；安全性指标为血常规、尿常规、肝功能、肾功能、凝血常规、生命体征、心电图检查。

结果：（1）两组患者的基线资料比较：本试验共纳入受试者 80 例，试验组和对照组各 40 例。研究结束后共脱落 8 例，其中试验组 3 例，对照组 5 例。最终符合全分析集（Full analysis set, FAS）的病例共 72 例，其中试验组 37 例，对照组 35 例。试验组平均年龄为 56.68 ± 10.34 岁，对照组平均年龄为 55.14 ± 10.25 岁。两组患者的基线情况无统计学差异（ $P > 0.05$ ）。（2）两组患者的主要疗效指标比较：在血小板聚集率（AA）方面，试验组治疗前的血小板聚集率（AA）为 28.76 ± 30.96 ，12 周治疗末为 16.37 ± 19.67 ，治疗后较治疗前显著降低（ $P = 0.033 < 0.05$ ）；在血小板聚集率（ADP）方面，试验组治疗前的血小板聚集率（ADP）为 49.29 ± 20.96 ，治疗 12 周末的血小板聚集率（ADP）为 38.23 ± 18.27 ，治疗后较治疗前显著降低（ $P = 0.003 < 0.01$ ）；在血栓弹力图（AA 抑制效果）方面，试验组治疗前的凝血时间（R）值为 7.24 ± 1.67 ，治疗 12 周末的 R 值为 8.46 ± 1.13 ，治疗后的 R 值较治疗前显著延长（ $P < 0.001$ ），且治疗后试验组的 R 值明显大于对照组（ $P = 0.009 < 0.01$ ）；试验组治疗前的血凝块形成时间（K）值为 1.91 ± 0.47 ，治疗 12 周末的 K 值为 2.23 ± 0.53 ，治疗后的 K 值较治疗前显著延长（ $P = 0.030 < 0.05$ ）；试验组治疗 12 周末的纤维蛋白功能（Angle）为 63.77 ± 6.59 ，对照组的 Angle 值为 62.01 ± 7.56 ，两组无统计学差异（ $P = 0.429 > 0.05$ ）；试验组治疗前的血栓最大弹力度（MA）值为 62.34 ± 2.34 ，治疗 12 周末的 MA 值为 55.73

±7.68, 治疗后的 MA 值较治疗前显著降低 ($P=0.001<0.01$), 且治疗后试验组的 MA 值显著低于对照组 ($P=0.008<0.01$); 试验组治疗 12 周末的凝血幅度下降速率 (LY30)、预测纤溶指数 (EPL) 和血小板动力学指数 (TPI) 与对照组相比均无统计学差异 ($P>0.05$); 试验组治疗前的 AA 抑制率 (IR) 值为 77.78 ± 22.75 , 治疗 12 周末的 IR 值为 87.85 ± 9.52 , 治疗后的 IR 值较治疗前显著升高 ($P=0.034<0.05$); 在血栓弹力图 (ADP 抑制效果) 方面, 试验组治疗前的凝血时间 (R) 值为 0.60 ± 0.17 , 治疗 12 周末的 R 值为 0.82 ± 0.11 , 治疗后的 R 值较治疗前显著延长 ($P<0.001$), 且治疗后试验组的 R 值明显大于对照组 ($P<0.001$); 试验组治疗前的血凝块形成时间 (K) 值为 3.00 ± 1.21 , 治疗 12 周末的 K 值为 4.52 ± 2.19 , 治疗后的 K 值较治疗前明显增加 ($P<0.001$); 试验组治疗 12 周末的纤维蛋白功能 (Angle) 为 57.06 ± 17.26 , 对照组的 Angle 值为 54.9 ± 10.44 , 两组无统计学差异 ($P=0.139>0.05$); 试验组治疗前的血栓最大弹力度 (MA) 值为 43.7 ± 10.19 , 治疗 12 周末的 MA 值为 37.96 ± 8.49 , 治疗后的 MA 值较治疗前显著降低 ($P=0.001<0.01$); 试验组治疗 12 周末的凝血幅度下降速率 (LY30)、预测纤溶指数 (EPL) 和血小板动力学指数 (TPI) 与对照组相比均无统计学差异 ($P>0.05$); 试验组治疗前的 ADP 抑制率 (IR) 值为 33.95 ± 17.02 , 治疗 12 周末的 IR 值为 61.90 ± 27.12 , 治疗后的 IR 值较治疗前显著升高 ($P<0.001$), 且治疗后试验组的 IR 值明显高于对照组 ($t=3.237, P=0.002<0.01$)。在血栓弹力图 (常规凝血功能) 方面, 试验组治疗 12 周末的凝血指数 (CI) 值为 -0.75 ± 2.02 , 对照组为 -1.24 ± 3.54 , 两组无统计学差异 ($P=0.523>0.05$)。 (3) 两组患者的次要疗效指标比较: 试验组治疗前的气虚血瘀证证候评分为 8.27 ± 1.26 , 治疗 8 周末的评分为 4.76 ± 0.93 , 治疗 12 周末的评分为 2.41 ± 1.21 , 治疗 8 周末和治疗 12 周末的证候评分均较治疗前显著降低 ($P<0.001$)。试验组在治疗 8 周末和治疗 12 周末的评分均明显低于对照组 ($P<0.001$); (4) 安全性评价: 两组的血、尿常规, 心电图检查及四大生命体征均未见明显异常。

2. 愈心痛胶囊对低剪切应力的影响

方法: (1) 实验分组: 将 SD 大鼠随机分为 6 组: 假手术组 (Sham)、模型组 (Model)、愈心痛胶囊低剂量组 (YXTC-L)、愈心痛胶囊中剂量组

(YXTC-M)、愈心痛胶囊高剂量组(YXTC-H)和阿司匹林组(Aspirin)。(2)动物模型的构建:将 Model、YXTC-L、YXTC-M、YXTC-H 和 Aspirin 组通过部分左颈动脉结扎手术建立低剪切应力(Low shear stress, LSS)大鼠模型。Sham 组采用相同方法,不结扎动脉。(3)动物给药:YXTC-L、YXTC-M、YXTC-H 组分别给予 0.18g/kg、0.36g/kg、0.72g/kg 剂量灌胃给药。Aspirin 组给药剂量为 4.5mg/kg。Sham 组和 Model 组大鼠每日灌胃等量无菌蒸馏水。每日给药 1 次,连续 8 周。(4)小动物超声检测左颈总动脉(Left common carotid artery, LCCA),测量左心室舒张末期 LCCA 内径(Dr)和 LCCA 的收缩期峰值血流速度(Vm),取 3 个心动周期平均值。(5)全自动血液流变学分析仪测定全血黏度(η)。(6)根据血流剪切应力公式: $\tau_m = 4 \times \eta \times V_m / D_r$, D_r 为 LCCA 左室舒张末期内径, V_m 为收缩期峰值血流速度, η 为全血黏度,计算左颈动脉的血流剪切应力。(7)HE 染色观察颈总动脉组织的病理变化,并计算左颈总动脉的内-中膜厚度及管腔横截面积。(8)天狼星红染色观察颈动脉组织的胶原纤维组织变化情况,并计算胶原纤维面积及其占比。

结果:(1)在收缩期峰值血流速度(Vm)方面,与 Sham 组相比,Model 组左颈总动脉 Vm 明显降低($P < 0.01$),与 Model 组相比,YXTC-M($P < 0.05$)和 YXTC-H($P < 0.01$)及 Aspirin($P < 0.01$)均显著升高。(2)在左颈总动脉舒张末期内径(Dr)方面,与 Sham 组相比,Model 组的左颈总动脉 Dr 明显减小($P < 0.01$),与 Model 组相比,YXTC-M 组($P < 0.01$)和 YXTC-H 组($P < 0.01$)及 Aspirin 组($P < 0.01$)均显著增大。(3)在全血黏度(η)方面,与 Sham 组相比,Model 组的 η 无明显改变($P > 0.05$);与 Model 组相比,YXTC-L 组大鼠的 η 显著降低($P < 0.05$),然而 YXTC-M 组、YXTC-H 组和 Aspirin 组大鼠的 η 均无明显改变($P > 0.05$)。(4)在剪切应力方面,与 Sham 组相比,Model 组大鼠左颈总动脉的血流剪切应力显著降低($P < 0.01$);与 Model 组相比,YXTC-M 组、YXTC-H 组及 Aspirin 组大鼠的左颈总动脉血流剪切应力均明显升高($P < 0.01$)。(5)HE 染色结果显示:与 Sham 组相比,Model 组左颈总动脉低剪切应力部位的血管内皮细胞排列紊乱,炎性浸润明显。与 Model 组比较,YXTC-L 组和 YXTC-M 组的血管内皮炎性损伤减轻不明显,但形态结构稍有改善。YXTC-H 组和 Aspirin 组的血管内皮炎性浸润明显减轻。在左颈总动脉内-

中膜厚度方面,与 Sham 组相比,Model 组显著增厚 ($P<0.01$),与 Model 组相比,YXTC-L、YXTC-M、YXTC-H 和 Aspirin 组无明显改变 ($P>0.05$)。在左颈总动脉管腔横截面积方面,各组之间均无明显差异 ($P>0.05$)。(6) 天狼星红染色结果显示:与 Sham 组相比,Model 组的胶原纤维含量明显增多 ($P<0.01$),与 Model 组相比,YXTC-L 和 YXTC-H 以及 Aspirin 组的胶原纤维含量均显著降低 ($P<0.01$),YXTC-M 亦较模型组减少,差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

3. 愈心痛胶囊抑制低剪切应力诱导血小板-内皮黏附的药理作用研究

方法:(1) 免疫组织化学染色 (IHC) 检测颈总动脉血管组织中 GPIIb/IIIa 的表达。(2) ELISA 法测定血清中 vWF 和 GPIIb/IIIa 的表达水平。(3) 细胞分组与培养:将 RVECs 随机分为 4 组:正常组 (Control)、模型组 (Model)、愈心痛胶囊组 (YXTC) 和阿司匹林组 (Aspirin),然后在各组 RVECs 中加入 1×10^7 血小板,于 37°C 、5% CO_2 培养箱中共培养 24 h。Control 组以含空白血清的 DMEM 培养基灌流,加载 15 dyne/cm^2 的正常剪切应力,Model 组以含空白血清的 DMEM 培养基灌流,加载 4 dyne/cm^2 的低剪切应力;YXTC 组以加入 YXTC 含药血清的 DMEM 培养基灌流,加载 4 dyne/cm^2 的低剪切应力;Aspirin 组以含空白血清及加入阿司匹林溶液的 DMEM 培养基灌流,加载 4 dyne/cm^2 的低剪切应力。(4) 荧光显微镜观察血小板与内皮细胞的黏附情况。(5) ELISA 法检测细胞上清液中 vWF 和 E-selectin 的表达量。

结果:(1) 免疫组织化学染色法结果显示:与 Sham 组相比,Model 组阳性颗粒表达明显增多,阳性细胞数和积分光密度均显著增加 ($P<0.01$);与 Model 组相比,YXTC-L、YXTC-M 和 YXTC-H 以及 Aspirin 组的阳性细胞数显著降低 ($P<0.05$),其中 YXTC-L 和 YXTC-H 及 Aspirin 组的积分光密度亦明显降低 ($P<0.01$)。(2) 血清 ELISA 结果显示:与 Sham 组相比,Model 组血清中 GPIIb/IIIa 和 vWF 蛋白的含量均显著升高 ($P<0.01$);与 Model 组相比,YXTC-M 组的 vWF 蛋白表达量明显降低 ($P<0.05$),但 GPIIb/IIIa 的表达无明显改变 ($P>0.05$);YXTC-H 组和 Aspirin 组的血清 GPIIb/IIIa 和 vWF 蛋白含量均较 Model 组显著下降 ($P<0.01$)。

(3) 荧光染色观察结果显示:与 Control 组相比,Model 组 RVECs 和血小板的黏附数量显著增加 ($P<0.01$);与 Model 组相比,YXTC 组和 Aspirin 组的黏附数量均显著减少 ($P<0.01$)。(4) 细胞上清液 ELISA 结果显示:与 Control 组

相比, Model 组 E-selectin 和 vWF 的蛋白表达量均显著增加 ($P<0.01$); 与 Model 组相比 YXTC 组和 Aspirin 组 E-selectin 和 vWF 的蛋白表达量均显著下调 ($P<0.01$)。

4. 愈心痛胶囊抑制低剪切应力诱导血小板-内皮黏附的药理机制研究

方法: (1) 免疫荧光双染观察大鼠左颈动脉组织 MMP-2 和 PAR-1 的共定位表达情况。(2) 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 检测大鼠左颈动脉组织 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、ICAM1 和 VCAM1 的 mRNA 表达量。(3) Western-blot 法检测大鼠左颈动脉组织 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、ICAM1 和 VCAM1 的蛋白表达水平。(4) ELISA 法测定血清中 MMP-2 和 Fibronectin 蛋白的表达。

(5) 细胞分组与处理: 将 RVECs 随机分为 7 组: 正常对照组 (NSS+Vehicle)、PAR-1 抑制剂组 (NSS+RWJ56110)、模型组 (LSS+Vehicle)、愈心痛胶囊组 (LSS+YXTC)、模型+PAR-1 抑制剂组 (LSS+RWJ56110)、愈心痛胶囊+PAR-1 抑制剂组 (LSS+YXTC+RWJ56110) 和阿司匹林组 (LSS+Aspirin), 然后在各组 RVECs 中加入 1×10^7 血小板, 于 37°C 、 $5\% \text{CO}_2$ 培养箱中共培养 24 h。NSS+Vehicle 和 LSS+Vehicle 组以含空白血清的 DMEM 培养基灌流; NSS+RWJ56110 组以含空白血清及加入 RWJ56110 溶液的 DMEM 培养基灌流; LSS+YXTC 组以加入 YXTC 含药血清的 DMEM 培养基灌流; LSS+RWJ56110 组以含空白血清及加入 RWJ56110 溶液的 DMEM 培养基灌流; LSS+YXTC+RWJ56110 组以 YXTC 含药血清及加入 RWJ56110 溶液的 DMEM 培养基灌流; LSS+Aspirin 组以含空白血清及加入阿司匹林溶液的 DMEM 培养基灌流。NSS+Vehicle 和 NSS+RWJ56110 组加载 15 dyne/cm^2 的正常剪切应力, 而 LSS+Vehicle、LSS+YXTC、LSS+RWJ56110、LSS+YXTC+RWJ56110 和 LSS+Aspirin 等组别加载 4 dyne/cm^2 的低剪切应力。(6) RT-qPCR 检测各组细胞上清液中 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 GPIIb α 的 mRNA 水平。(7) Western-blot 法检测各组细胞上清液中 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 GPIIb α 等蛋白的表达。

结果: (1) 组织免疫荧光双染结果显示: 与 Sham 组相比, Model 组的 MMP-2 和 PAR-1 的荧光强度明显增加, 且两者的共定位表达量明显增多; 与 Model 组相比, YXTC-L 组 MMP-2 和 PAR-1 的荧光强度无明显改变, 且两者的共定位表

达量无明显减少 ($P>0.05$)，YXTC-M、YXTC-H 和 Aspirin 组 MMP-2 和 PAR-1 的共定位表达量均显著减少 ($P<0.01$)。

(2) 组织 RT-qPCR 结果显示：与 Sham 组相比，Model 组的 MMP-2、PAR-1、vWF、p38-MAPK、ICAM1 和 VCAM1 的 mRNA 表达量显著升高 ($P<0.01$)；与 Model 组相比，YXTC-L 组 vWF、ICAM1 和 VCAM1 的 mRNA 表达显著降低 ($P<0.01$)，YXTC-L 组的 MMP-2、PAR-1 和 p38-MAPK 的 mRNA 表达量有下降的趋势，但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。YXTC-M 组、YXTC-H 组和 Aspirin 组的 MMP-2、PAR-1、vWF、p38-MAPK、ICAM1 和 VCAM1 的 mRNA 表达量均显著降低 ($P<0.05$)。

(3) 组织 Western-blot 结果显示：与 Sham 组相比，Model 组 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、vWF、VCAM、ICAM1 等蛋白的表达量均显著升高 ($P<0.01$)，与 Model 组相比，YXTC-M 组的 VCAM1 和 vWF 蛋白表达较 Model 组明显减少 ($P<0.05$)。YXTC-H 组的 PAR-1、vWF、VCAM 和 ICAM1 等蛋白的表达量均显著降低 ($P<0.05$)。Aspirin 组的 PAR-1、P38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 vWF 等蛋白表达均较模型组明显减少 ($P<0.05$)。

(4) 血清 ELISA 结果显示：与 Sham 组相比，Model 组血清中 MMP-2 和 Fibronectin 蛋白的含量均显著升高 ($P<0.01$)。与 Model 组相比，YXTC-M 组 MMP-2 和 Fibronectin 蛋白的含量均明显降低 ($P<0.05$)；YXTC-H 组和 Aspirin 组血清 MMP-2 和 Fibronectin 蛋白均较 Model 组显著下降 ($P<0.01$)。

(5) 细胞上清液 RT-qPCR 结果显示：与 NSS+Vehicle 组相比，NSS+RWJ56110 组 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 GPIIb α 的 mRNA 水平均无明显变化 ($P>0.05$)，而 LSS+Vehicle 组 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 GPIIb α 的 mRNA 水平均显著升高 ($P<0.01$)；与 LSS+Vehicle 组相比，LSS+YXTC 组和 LSS+RWJ56110 组 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、ICAM1 和 VCAM1 的 mRNA 水平均显著降低 ($P<0.01$)，与 LSS+YXTC 组的变化一致，LSS+Aspirin 组 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、ICAM1 和 VCAM1 的 mRNA 表达量均显著下调 ($P<0.01$)；与 LSS+YXTC 组和 LSS+RWJ56110 组相比，LSS+YXTC+RWJ56110 组 MMP-2、PAR-1、ICAM1 和 VCAM1 的 mRNA 水平均显著降低 ($P<0.01$)；然而，p38-MAPK 的 mRNA 水平未发生明显变化 ($P>0.05$)。

(6) 细胞上清液 Western-blot 结果显示：与 NSS+Vehicle 组相比，NSS+RWJ56110 组 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 GPIIb α 等

蛋白的表达均无明显变化($P>0.05$), LSS+Vehicle 组 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 GPIIb α 等蛋白表达水平显著升高($P<0.01$); 与 LSS+Vehicle 组相比, LSS+YXTC 组和 LSS+RWJ56110 组 MMP-2、PAR-1 和 ICAM1 的表达显著下调($P<0.01$), p38-MAPK 的表达也明显降低($P<0.05$), 而 VCAM1 和 GPIIb α 的表达无明显变化($P>0.05$), LSS+Aspirin 组 ICAM1 表达显著下调($P<0.01$), 但 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1 和 GPIIb α 的表达量均无明显变化($P>0.05$); 与 LSS+YXTC 组或 LSS+RWJ56110 组相比, LSS+YXTC+RWJ56110 组 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1 和 GPIIb α 的表达量均显著降低($P<0.01$), 此外, LSS+YXTC+RWJ56110 组 ICAM1 的表达较 YXTC 组显著下调($P<0.01$), 但和 RWJ56110 组相比无统计学差异($P>0.05$)。

5. 愈心痛胶囊化学成分及入血成分研究

方法: 采用超高效液相色谱仪(ACQUITY UPLC H-Class)和四级杆飞行时间高分辨质谱仪(Xevo G2-S QTOF)检测愈心痛胶囊的化学成分及入血成分。

结果: (1) 愈心痛胶囊中鉴定的化学成分有 20 种: 包括 6 种生物碱类, 分别为 protopine (原阿片碱)、glaucine (海罂粟碱)、tetrahydropalmatine (延胡索乙素)、canadine (四氢小檗碱)、tetrahydrocoptisine (四氢黄连碱)和 corydaline (延胡索甲素), 以及 14 种人参皂苷类: notoginsenoside R1、ginsenoside Rg1、ginsenoside Re、ginsenoside Rf、notoginsenoside R2、ginsenoside Rb1、ginsenoside Rg2、ginsenoside Rc、ginsenoside Rb2、ginsenoside Rb3、ginsenoside Rd、ginsenoside Rd isomer、ginsenoside Ro、ginsenoside Rg3。(2) 愈心痛胶囊给药后大鼠含药血清中检测的成分是 ginsenoside Rb1。

研究结论

1. 愈心痛胶囊能抑制血小板聚集率, 控制血小板的凝血功能, 并降低气虚血瘀证证候评分。
2. 愈心痛胶囊能通过影响血流剪切应力抑制血小板-内皮黏附介导的 AS 形成。
3. 愈心痛胶囊抑制低剪切应力诱导的血小板-内皮黏附作用与其抑制 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路的激活有关。

关键词: 愈心痛胶囊; 血小板; 内皮细胞; 低剪切应力; 动脉粥样硬化; 稳定性冠心病; MMP-2/PAR-1/p38-MAPK

Abstract

Background

Epidemiological studies have shown that the global incidence of cardiovascular disease continues to increase year by year, with the prevalence and mortality of coronary heart disease remaining high in China, and the total number of patients has exceeded 11 million. Stable coronary artery disease (SCAD) is the main type of coronary heart disease that the occurrence of cardiovascular events can be controlled. Active anti-platelet therapy is the key to delaying atherosclerosis (AS) and thus controlling SCAD. Western anti-platelet drugs can effectively inhibit platelet activation and significantly improve the prognosis of SCAD patients, but there are still insurmountable side effects such as dose-dependent bleeding, drug resistance, and gastrointestinal adverse reactions. Herein, how to give full play to the advantages of traditional Chinese medicine and deeply explore the anti-platelet activation herbal medicine has become the focus of medical practitioners and researchers.

Yuxintong Capsule (YXTC) is a representative prescription for supplementing qi and promoting blood circulation developed by academician ChenKeji's team for treating coronary heart disease. YXTC is composed of Red ginseng, Panax notoginseng and Rhizoma corydus, with the efficacy of tonifying qi and promoting blood circulation to relieve pain. A large number of clinical and basic studies carried out in the early stage have confirmed that YXTC could effectively improve angina symptoms, myocardial ischemia-reperfusion injury, and blood rheology abnormalities, etc. in patients with SCAD. However, whether YXTC could inhibit platelet activation and its mechanisms are not yet clear. Recently, an increasing number of scholars have focused on the effect of blood flow shear stress on the formation of AS. The blood flow shear stress can affect the functional state of vascular endothelial cells and platelets, and then influence the formation of AS. Based on the above studies, this study will focus on platelet activation and evaluate the effects of YXTC on platelet aggregation rate and thromboelastogram through clinical studies, and then explore whether the effects of YXTC on AS after platelet activation is related to the effect of

blood flow shear stress through basic studies.

Objective

1. A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial was conducted to clarify the efficacy and safety of YXTC in improving platelet function in patients with SCAD with Qi deficiency and blood stasis, providing evidence-based basis for the promotion and application of YXTC.
2. To clarify whether the effects of YXTC on the development of AS induced by platelet-endothelial adhesion is related to the influence of blood flow shear stress.
3. To confirm whether the effects of YXTC on platelet-endothelial adhesion induced by low shear stress (LSS) is related to its regulation of MMP-2/PAR-1/p38-MAPK signaling pathway.

Methods and Results

1. Clinical study on improving platelet function of patients with SCAD with Qi deficiency and blood stasis syndrome

Methods: A multi-center, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study design method was adopted. Eighty patients with SCAD and syndrome differentiation of Qi deficiency and blood stasis who met the test criteria and were admitted to Beijing Anzhen Hospital Affiliated to Capital Medical University, Dongzhimen Hospital of Beijing University of Chinese Medicine and the Third Affiliated Hospital of Guangzhou Medical University from March 2021 to November 2021 were included as case enrollment. A statistician who was not involved in the statistical analysis of this trial used SAS statistical software to generate a random number table according to grouping ratio. The patients were randomly divided into the experimental group and the control group at a ratio of 1:1, with 40 cases in each group. The experimental group was treated with YXTC on the basis of conventional western medicine, and the control group was treated with YXTC simulator on the basis of conventional western medicine. The intervention methods of the two groups were 4 pills each time, 3 times a day for 12 weeks. Visits were conducted at weeks 0, 8 and 12. The main efficacy indicators were platelet aggregation rate induced by AA and ADP, conventional thromboelastography, AA-induced thromboelastography and

ADP-induced thromboelastography. The secondary efficacy index was Qi deficiency and blood stasis syndrome scores. The safety indicators included blood routine, urine routine, liver function, renal function, coagulation routine, vital signs, and electrocardiogram.

Results: (1) Comparison of baseline data between the two groups: 80 subjects were included in this trial, 40 in the experimental group and 40 in the control group. A total of 8 cases dropped out after the study, including 3 cases in the experimental group and 5 cases in the control group. Finally, a total of 72 cases met the full analysis set (FAS), including 37 cases in the experimental group and 35 cases in the control group. The average age was 56.68 ± 10.34 years in the experimental group and 55.14 ± 10.25 years in the control group. There were no significant differences in baseline characteristics between the two groups ($P > 0.05$). **(2) Comparison of the main efficacy indicators between the two groups:** the platelet aggregation rate (AA) of the experimental group was 28.76 ± 30.96 before treatment and 16.37 ± 19.67 at the end of 12 weeks of treatment, which was significantly lower than that before treatment ($P = 0.033 < 0.05$); The platelet aggregation rate (ADP) of the experimental group was 49.29 ± 20.96 before treatment and 38.23 ± 18.27 at the end of 12 weeks of treatment, which was significantly lower than that before treatment ($P < 0.001$). In terms of thromboelastography (AA inhibitory effect), the value of coagulation time (R) in the experimental group before treatment was 7.24 ± 1.67 , and 8.46 ± 1.13 at the end of 12 weeks of treatment, which was significantly longer than that before treatment ($P = 0.009 < 0.01$); The clot formation time (K) value before treatment in the experimental group was 1.91 ± 0.47 and at the end of 12 weeks of treatment was 2.23 ± 0.53 , which was significantly longer than that before treatment ($P = 0.030 < 0.05$); The function of fibrin (Angle) was 63.77 ± 6.59 in the experimental group and 62.01 ± 7.56 in the control group at the end of 12 weeks of treatment, and there was no significant difference between the two groups ($P = 0.429 > 0.05$); The maximum elastic force of thrombus (MA) value before treatment was 62.34 ± 2.34 in the experimental group, and 55.73 ± 7.68 at the end of 12 weeks of treatment, with a statistically significant difference in MA values before and after treatment ($P = 0.001 < 0.01$), and

the MA value at the end of treatment 12 in the control group was 61.61 ± 5.49 , with a statistically significant difference between the experimental and control groups after treatment ($P=0.008<0.01$); There were no significant differences in LY30, EPL and TPI between the experimental and control groups at the end of 12 weeks of treatment ($P>0.05$); The AA inhibition rate (IR) value before treatment was 77.78 ± 22.75 in the experimental group, and 87.85 ± 9.52 at the end of 12 weeks of treatment, which was significantly higher than that before treatment ($P=0.034<0.05$). In terms of thrombelastogram (ADP inhibitory effect), the value of coagulation time (R) in the experimental group before treatment was 0.60 ± 0.17 , and 0.82 ± 0.11 at the end of 12 weeks of treatment, which was significantly longer than that before treatment ($P<0.001$); The clot formation time (K) value before treatment in the experimental group was 3.00 ± 1.21 and at the end of 12 weeks of treatment was 4.52 ± 2.19 , which was significantly increased after treatment ($P<0.001$); At the end of 12 weeks of treatment, the function of fibrin (Angle) was 57.06 ± 17.26 in the experimental group and 54.9 ± 10.44 in the control group, and there was no significant difference between the two groups ($P=0.139>0.05$); The maximum elastic force of thrombus (MA) value before treatment was 43.7 ± 10.19 in the experimental group, and 37.96 ± 8.49 at the end of 12 weeks of treatment, which was significantly lower than that before treatment ($P=0.001<0.01$); There were no significant differences in LY30, EPL and TPI between the two groups at the end of 12 weeks of treatment ($P>0.05$); The ADP inhibition rate (IR) value of the experimental group was 33.95 ± 17.02 before treatment and 61.90 ± 27.12 at the end of 12 weeks of treatment, which was significantly higher than that before treatment ($P<0.001$). The IR value of the experimental group was significantly higher than that of the control group after treatment ($t=3.237$, $P=0.002<0.01$). In terms of thromboelastography (conventional coagulation function), the coagulation index (CI) value was -0.75 ± 2.02 in the experimental group and -1.24 ± 3.54 in the control group at the end of 12 weeks of treatment, with no statistical difference between the two groups ($P=0.52>0.05$). (3) Comparison of the secondary efficacy indicators between the two groups: the score of Qi deficiency and blood stasis syndrome in the experimental

group was 8.27 ± 1.26 before treatment, 4.76 ± 0.93 at the end of 8 weeks of treatment, and 2.41 ± 1.21 at the end of 12 weeks, which were significantly lower than those before treatment ($P < 0.001$). The scores of the experimental group were significantly lower than those of the control group at the end of 8 weeks and 12 weeks of treatment ($P < 0.001$). (4) **Safety evaluation:** there were no obvious abnormalities in blood, urine routine, electrocardiogram and four vital signs in the two groups.

2. Pharmacodynamic evaluation of YXTC on low shear stress model rats

Methods: (1) **Experimental grouping:** SD rats were randomly divided into 6 groups: sham-operated group (Sham), model group (Model), low-dose group of YXTC (YXTC-L), medium-dose group of YXTC (YXTC-M), high-dose group of YXTC (YXTC-H), and aspirin group (Aspirin). (2) **Establishment of animal model:** The low shear stress (LSS) rat model was established by partial ligation of the left carotid artery in Model, YXTC-L, YXTC-M, YXTC-H and Aspirin groups. The Sham group was treated with the same method without ligation of the artery. (3) **Animal administration:** rats in YXTC-L, YXTC-M and YXTC-H groups were treated with 0.18g/kg, 0.36g/kg and 0.72g/kg by gavage, respectively. The dose of Aspirin was 4.5mg/kg. The rats in Sham group and Model group were given the same amount of sterile distilled water by gavage every day. The drug was administered once daily for 8 weeks. (4) **The left common carotid artery (LCCA) was detected by ultrasound,** and the left ventricular end diastolic diameter (Dr) and peak systolic flow velocity (Vm) of LCCA were measured, and the average value of three cardiac cycles was taken. (5) **Whole blood viscosity (η)** was measured by automatic hemorheology analyzer. (6) **The flow shear stress of the LCCA** was calculated according to the formula: $\tau_m = 4 \times \eta \times V_m / D_r$. (7) **HE staining** was used to observe the pathological changes of the LCCA, and the intima-media thickness and lumen cross-sectional area of the LCCA were calculated. (8) **Sirius red staining** was performed to observe the changes of collagen fibers in the LCCA, and the area and proportion of collagen fibers were calculated.

Results: (1) **In terms of peak systolic flow velocity (Vm),** compared with the Sham group, the Vm of the LCCA in the Model group was significantly decreased

($P<0.01$), and the YXTC-M ($P<0.05$) and YXTC-H ($P<0.01$) and Aspirin ($P<0.01$) were significantly higher compared with the Model group. (2) **Regarding the end-diastolic diameter of the LCCA (Dr)**, compared with the Sham group, the Dr in the Model group was significantly reduced ($P<0.01$). Compared with the Model group, the Dr of YXTC-M, YXTC-H and Aspirin group was significantly increased ($P<0.01$). (3) **In terms of whole blood viscosity (η)**, compared with the Sham group, there was no significant change in η of the Model group ($P>0.05$); compared with the Model group, the η of the YXTC-L group was significantly decreased ($P<0.05$), while η of YXTC-M, YXTC-H and Aspirin groups did not change significantly ($P>0.05$). (4) **In terms of shear stress**, compared with the Sham group, the blood flow shear stress of the LCCA in the Model group decreased significantly ($P<0.01$); compared with the Model group, the blood flow shear stress in the YXTC-M, YXTC-H and Aspirin group was significantly increased ($P<0.01$). (5) **HE staining** showed that the vascular endothelial cells at the low shear stress (LSS) area of the LCCA were arranged disorderly and inflammatory infiltration was obvious in the Model group compared with the Sham group. Compared with the Model group, the endothelial inflammatory injury in the YXTC-L and YXTC-M groups was not significantly alleviated, but the morphological structure was slightly improved. The inflammatory infiltration was significantly attenuated in the YXTC-H and Aspirin groups. With regard to the intima-media thickness of the LCCA, the Model group was significantly thicker compared with the Sham group ($P<0.01$). Compared with the Model group, the YXTC-L, YXTC-H and Aspirin groups had a tendency to decrease, but there was no statistical significance ($P>0.05$). Regarding the luminal cross-sectional area of the LCCA, there was a tendency to increase the luminal cross-sectional area in the Model group compared with the Sham group, but the difference was not statistically significant ($P>0.05$), and the luminal cross-sectional area in the YXTC-L, YXTC-M, YXTC-H, and Aspirin groups were all decreased to different degrees compared with the Model group, but none of the differences were statistically significant ($P>0.05$). (6) **Sirius red staining** showed that the collagen fiber content in the Model group was significantly increased compared with the Sham group ($P<0.01$). Compared with the

Model group, the content of collagen fibers in YXTC-L, YXTC-H and Aspirin groups were significantly decreased ($P<0.01$), and YXTC-M also decreased compared with the model group ($P<0.05$).

3. Pharmacological study on the inhibition of YXTC to platelet-endothelial adhesion induced by LSS

Methods: (1) **Immunohistochemical staining (IHC)** was performed to detect the expression of GPIIb/IIIa in the vascular tissue of LCCA. (2) **ELISA** was used to determine the levels of vWF and GPIIb/IIIa in serum. (3) **Cell grouping and culture:** RVECs were randomly divided into 4 groups: Control group, Model group, YXTC group and Aspirin group, then 1×10^7 platelets were added to RVECs of each group, and cultured for 24 hours in 37°C and 5% CO₂ incubator. The Control group was perfused with DMEM medium containing blank serum and loaded with normal shear stress (NSS) of 15 dyne/cm². The Model group was perfused with DMEM medium containing blank serum and loaded with LSS of 4 dyne/cm². In YXTC group, DMEM medium containing YXTC drug serum was perfused and loaded with LSS of 4 dyne/cm². The Aspirin group was perfused with DMEM medium containing blank serum and aspirin solution, and loaded with LSS of 4 dyne/cm². (4) **Fluorescence microscopy** was performed to observe the adhesion of platelets to endothelial cells. (5) **ELISA** was conducted to detect the expression of vWF and E-selectin in the cell supernatant.

Results: (1) The results of immunohistochemical staining showed that compared with the Sham group, the expression of positive particles was significantly increased, and the number of positive cells and integral optical density were significantly increased in the Model group ($P<0.01$). Compared with the Model group, the positive particles in the vascular endothelium of the YXTC-L, YXTC-M, YXTC-H and Aspirin groups had different degrees of reduction, and the number of positive cells in the YXTC-L and YXTC-H and Aspirin groups was significantly lower ($P<0.01$), the integral optical density of YXTC-L and YXTC-H was significantly lower ($P<0.01$), the number of positive cells in YXTC-M was also significantly lower ($P<0.05$), and the integral optical density was slightly reduced compared with the model group, but

the differences were not statistically significant ($P>0.05$). (2) ELISA results of serum showed that the levels of GPIb α and vWF protein were significantly higher in the Model group compared with the Sham group, and the differences were statistically significant ($P<0.01$). Compared with the Model group, the levels of GPIb α and vWF protein in the YXTC-L group had a tendency to decrease, but the differences were not statistically significant ($P>0.05$). The expression of vWF protein was significantly lower in the YXTC-M group ($P<0.05$), but the expression of GPIb α was not significantly changed ($P>0.05$); the GPIb α and vWF protein contents were dramatically lower in the YXTC-H and Aspirin groups compared with the Model group ($P<0.01$). (3) The results of fluorescence staining showed that the number of RVECs and platelet adhesions were significantly increased in the Model group compared with the Control group ($P<0.01$); the number of RVECs and platelet adhesions were significantly decreased in the YXTC and Aspirin groups compared with the Model group ($P<0.01$). (4) ELISA results of cell supernatant showed that the protein expression of E-selectin and vWF were significantly increased in the Model group compared with the Control group ($P<0.01$); the protein expression of E-selectin and vWF were significantly down-regulated in the YXTC and Aspirin groups compared with the Model group ($P<0.01$).

4. Pharmacological mechanism of inhibition of YXTC to platelet-endothelial adhesion induced by LSS

Methods: (1) **Immunofluorescence double staining** was used to observe the co-localization of MMP-2 and PAR-1 in the LCCA of rats. (2) **Real-time fluorescent quantitative PCR (RT-qPCR)** was performed to detect the mRNA expression of MMP-2, PAR-1, p38-MAPK, ICAM1 and VCAM1 in the LCCA of rats. (3) **Western-blot assay** to detect the protein expression levels of MMP-2, PAR-1, p38-MAPK, ICAM1 and VCAM1 in the LCCA of rats. (4) **ELISA** to determine the expression of MMP-2 and Fibronectin protein in serum. (5) **Cell grouping and treatment:** RVECs were randomly divided into 7 groups: normal control group (NSS+Vehicle), PAR-1 inhibitor group (NSS+RWJ56110), model group (LSS+Vehicle), YXTC group (LSS+YXTC), LSS+PAR-1 inhibitor group

(LSS+RWJ56110), YXCT+PAR-1 inhibitor group (LSS+YXTC+RWJ56110) and aspirin group (LSS+Aspirin), and then 1×10^7 platelets were added to the RVECs of each group, and were co-cultured for 24 hours in a 5% CO₂ incubator at 37°C. NSS+Vehicle group was perfused with DMEM medium containing blank serum and loaded with NSS of 15 dyne/cm². In NSS+RWJ56110 group, DMEM medium containing blank serum and RWJ56110 solution was perfused, and NSS of 15 dyne/cm² was loaded. In LSS+Vehicle group, DMEM medium containing blank serum was perfused and loaded with LSS of 4 dyne/cm². LSS+YXTC group was perfused with DMEM medium containing YXTC drug serum and loaded with LSS of 4 dyne/cm². In LSS+RWJ56110 group, DMEM medium containing blank serum and RWJ56110 solution was perfused and loaded with LSS of 4 dyne/cm². In LSS+Aspirin group, DMEM medium containing blank serum and aspirin solution was perfused and loaded with LSS of 4 dyne/cm². (6) RT-qPCR was applied to detect the mRNA levels of MMP-2, PAR-1, p38-MAPK, VCAM1, ICAM1 and GPIIb/IIIa in the supernatant of each group. (7) Western-blot assay was performed to detect the expressions of MMP-2, PAR-1, p38-MAPK, VCAM1, ICAM1 and GPIIb/IIIa in the supernatant of each group of cells.

Results: (1) The results of LCCA tissue immunofluorescence double staining showed that the fluorescence intensity of MMP-2 and PAR-1 in the Model group was significantly higher than that in the Sham group, and the co-localization expression of MMP-2 and PAR-1 was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with the Model group, the fluorescence intensity of MMP-2 and PAR-1 in the YXTC-L group did not change significantly, and the co-localization expression of MMP-2 and PAR-1 did not decrease significantly ($P > 0.05$). The co-localization expression of MMP-2 and PAR-1 in YXTC-M, YXTC-H and Aspirin groups was significantly decreased ($P < 0.01$). (2) The results of RT-qPCR of LCCA tissues showed that the mRNA levels of MMP-2, PAR-1, vWF, p38-MAPK, ICAM1 and VCAM1 in the Model group were significantly higher than those in the Sham group ($P < 0.01$). Compared with the Model group, the levels of vWF, ICAM1 and VCAM1 mRNA in the YXTC-L group decreased, and the differences were statistically significant ($P < 0.01$). The mRNA of

MMP-2, PAR-1 and p38-MAPK in the YXTC-L group decreased, but the difference was not statistically significant ($P>0.05$). The mRNA levels of MMP-2, PAR-1, vWF, p38-MAPK, ICAM1 and VCAM1 in YXTC-M, YXTC-H and Aspirin groups were significantly decreased ($P<0.05$). (3) Western-blot results showed that compared with the Sham group, the expression levels of MMP-2, PAR-1, p38-MAPK, vWF, VCAM and ICAM1 proteins in the Model group were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the Model group, the protein levels of MMP-2, PAR-1, P38-MAPK, VCAM1, ICAM1 and vWF in the YXTC-L group were decreased, but the differences were not statistically significant ($P>0.05$). The expression of VCAM1 and vWF protein in the YXTC-M group was significantly lower than that in the Model group ($P<0.05$). The expression levels of PAR-1, vWF, VCAM and ICAM1 proteins in the YXTC-H group were significantly lower than those in the control group ($P<0.05$). The protein expression of PAR-1, P38-MAPK, VCAM1, ICAM1 and vWF in the Aspirin group was significantly lower than that in the model group ($P<0.05$). (4) ELISA results of serum showed that compared with the Sham group, the levels of MMP-2 and fibronectin protein in the Model group were significantly increased ($P<0.01$). Compared with the Model group, the levels of MMP-2 and fibronectin protein in the serum of the YXTC-L group were decreased, but the differences were not statistically significant ($P>0.05$). The contents of MMP-2 and fibronectin protein in YXTC-M group were decreased ($P<0.05$), while their contents in both YXTC-H and Aspirin groups were significantly lower than those in the Model group ($P<0.01$). (5) RT-qPCR results of cell supernatant showed that compared with the NSS+Vehicle group, the mRNA levels of MMP-2, PAR-1, p38-MAPK, VCAM1, ICAM1 and GPIIb in the NSS+RWJ56110 group did not change significantly ($P>0.05$), while the mRNA levels of MMP-2, PAR-1, p38-MAPK, VCAM1, ICAM1 and GPIIb were significantly increased in the LSS+Vehicle group ($P<0.01$). Compared with the LSS+Vehicle group, the mRNA levels of MMP-2, PAR-1, p38-MAPK, ICAM1 and VCAM1 in the LSS+YXTC and LSS+RWJ56110 groups were significantly decreased ($P<0.01$). Consistent with the changes in LSS+YXTC group, the mRNA expression of MMP-2, PAR-1, p38-MAPK, ICAM1 and VCAM1

in LSS+Asprin group was significantly down-regulated ($P<0.01$). Compared with LSS+YXTC group and LSS+RWJ56110 group, the mRNA levels of MMP-2, PAR-1, ICAM1 and VCAM1 in LSS+YXTC+RWJ56110 group were significantly decreased ($P<0.01$); However, the mRNA levels of p38-MAPK did not change significantly ($P>0.05$). (6) Western-blot results of cell supernatant showed that compared with the NSS+Vehicle group, the expressions of MMP-2, PAR-1, p38-MAPK, VCAM1, ICAM1 and GPIIb α in the NSS+RWJ56110 group did not change significantly ($P>0.05$). The protein expression levels of MMP-2, PAR-1, p38-MAPK, VCAM1, ICAM1 and GPIIb α in the LSS+Vehicle group were significantly increased ($P<0.01$); Compared with the LSS+Vehicle group, the expression of MMP-2, PAR-1 and ICAM1 was significantly down-regulated in the LSS+YXTC and LSS+RWJ56110 groups ($P<0.01$), and p38-MAPK expression was also significantly decreased ($P<0.05$), while the expression of VCAM1 and GPIIb α did not change significantly ($P>0.05$), and ICAM1 expression was significantly down-regulated in LSS+Asprin group ($P<0.01$), but the expression of MMP-2, PAR-1, p38-MAPK, VCAM1 and GPIIb α did not change significantly ($P>0.05$); Compared with LSS+YXTC group or LSS+RWJ56110 group, the expression levels of MMP-2, PAR-1, p38-MAPK, VCAM1 and GPIIb α in LSS+YXTC+RWJ56110 group were significantly decreased ($P<0.01$). In addition, ICAM1 expression was significantly down-regulated in the LSS+YXTC+RWJ56110 group compared with the YXTC group ($P<0.01$), but there was no significant difference compared with RWJ56110 group ($P>0.05$).

5. Study on chemical composition and constituents migrating to blood of YXTC

Methods: Ultra-high performance liquid chromatograph (ACQUITY UPLC H-Class) and four-pole time-of-flight high resolution mass spectrometer (Xevo G2-S QTOF) were used to detect the chemical composition and constituents migrating to blood of YXTC.

Results: (1) There were 20 chemical components identified in YXTC, including six alkaloids, namely protopine, glaucine, tetrahydropalmatine, canadine, tetrahydrocoptisine and corydaline, respectively, and 14 ginsenosides: notoginsenoside R1, ginsenoside Rg1, ginsenoside Re, ginsenoside Rf,

notoginsenoside R2, ginsenoside Rb1, ginsenoside Rg2, ginsenoside Rc, ginsenoside Rb2, ginsenoside Rb3, ginsenoside Rd, ginsenoside Rd isomer, ginsenoside Ro, ginsenoside Rg3. (2) Ginsenoside Rb1 was detected in the serum of rats after administration of YXTC.

Conclusions

1. YXTC could significantly improve the fibrinolytic activity and enhance the inhibitory effect of antiplatelet drugs on ADP channels in SCAD patients. However, there was no significant improvement in platelet aggregation rate, platelet coagulation function, and the total score of Qi deficiency and blood stasis syndrome.
2. YXTC inhibits platelet-endothelial adhesion mediated AS development by affecting blood flow shear stress.
3. YXTC inhibits platelet-endothelial adhesion induced by LSS through inhibiting the activation of MMP-2/PAR-1/p38-MAPK signaling pathway.

Keywords: Yuxintong Capsule; Platelet; Endothelial cell; Low shear stress; Atherosclerosis; Stable coronary artery disease; MMP-2/PAR-1/p38-MAPK

英文缩略词表

英文缩略词	英文全称	中文全称
AS	Atherosclerosis	动脉粥样硬化
SCAD	Stable coronary artery disease	稳定性冠心病
LSS	Low shear stress	低剪切应力
ECs	Endothelial cells	内皮细胞
YXTC	Yuxintong Capsule	愈心痛胶囊
PAR-1	Protease activated receptor-1	蛋白酶激活受体 1
MMP-2	Matrix metalloproteinase-2	基质金属蛋白酶 2
MAPK	Mitogen activated protein kinase	丝裂原活化蛋白激酶
TXA ₂	Thromboxane A ₂	血栓素 A ₂
ADP	Adenosine diphosphate	二磷酸腺苷
GPIIb/IIIa	Glycoprotein IIb/IIIa receptor	糖蛋白 IIb/IIIa 受体
vWF	Von willebrand factor	血管性血友病因子
COX-1	Cyclooxygenase-1	环氧合酶 1
ICAM1	Intercellular adhesion molecule 1	细胞间黏附分子 1
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule1	血管内皮细胞黏附分子 1
CXCR6	Chemokine CXC receptor 6	家族趋化因子受体 6

文献综述

综述一 低剪切应力诱导血管内皮损伤介导 AS 发生的研究进展

心血管疾病仍是危害我国人民生命健康的第一杀手。根据《中国心血管健康与疾病报告 2021》数据,2020 年我国城市居民冠心病死亡率为 121.59/10 万^[1]。动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是冠心病的重要病理基础。AS 是一个慢性进展性的病理过程,内皮损伤、炎症反应、氧化应激和脂质沉积共同驱动 AS 的发生发展^[2],其典型特征是在血管壁上形成富含脂质(主要是胆固醇)的斑块,使动脉变硬变窄,导致局部血流状况发生显著变化。大量研究发现,动脉粥样硬化好发于动脉的分支处、狭窄部位以及冠状动脉的弯曲段,这些部位都存在明显的血流动力学异常^[3]。此外,越来越多的证据表明,血流模式由稳定的层流向不稳定的湍流转化会引起剪切应力变化,这是 AS 病变的起始原因^[4-5]。

血流剪切应力为血流与血管壁相互作用所产生的与管壁平行的切应力,主要由血液黏度(η)、最大血流速度(V_m)及血管内径(D_r)决定。在血流模式为生理层流处,血流为正常剪切应力,在血管几何形状急剧改变处层流变为紊流,产生异常血流剪切应力,如低剪切应力等^[6-7]。血管内皮细胞与血流直接接触,能感受血流剪切应力的变化,且其功能受血流剪切应力的调节。现有研究表明低剪切应力诱导的血管内皮细胞损伤是 AS 发生的关键环节之一^[8],随着研究的深入,目前已有部分学者阐述了低剪切应力引起血管内皮损伤致 AS 发生的可能机制。本文对此进行归纳、总结,以期从血流动力学角度治疗 AS 提供一定的参考。

1 低剪切应力影响内皮细胞的结构

低剪切应力(Low shear stress, LSS)可导致内皮细胞骨架重构、糖萼损伤、跨膜受体活化或黏附蛋白抑制等结构改变。LSS 可以通过 Ca^{2+} 依赖性(MLCK 通路)和非 Ca^{2+} 依赖性(ROCK 通路)两种途径引起内皮细胞骨架重构,导致血管内皮屏障功能损害,使血液中的脂质等物质更易通过内皮细胞,促进 AS 的形成^[9]。此外, LSS 还可通过激活整合素 $\alpha 5 \beta 1$ 及其下游的非受体酪氨酸激酶超家族

Abelson 成员 (c-Abl) 直接调控细胞骨架调节基因, c-Abl 可使 yes 相关蛋白 1 发生核易位, 进而与下游转录因子结合, 从而启动细胞骨架调节基因的表达, 这直接参与了细胞周期所需基因的表达^[10], 因此, 抑制 c-Abl 的基因表达可抑制 LSS 对细胞结构的影响, 从而延缓早期 AS 的发展。透明质酸酶 2 (Hyaluronidase 2, HYAL2) 是暴露于 LSS 的 HUVECs 中内皮细胞糖萼损伤的介质。LSS 诱导 AMPK 去磷酸化激活 NHE1 和 HYAL2, 促进 HA 降解和糖萼损伤, 这可能有助于内皮炎症反应和巨噬细胞募集^[11]。内皮细胞的 I 型跨膜受体 Notch1 可能是 LSS 诱导动脉粥样硬化炎症反应的潜在靶点, LSS 通过激活 Notch1 增加 IL-1 β 、IL-6 和 ICAM-1 等细胞因子的分泌, 介导内皮炎症反应^[12]。此外, 有研究认为异常剪切应力还能促进内皮细胞表达蛋白激酶 α (Protein kinase C, PKC α) 明显增多, PKC α 抑制 P120ctn、血管内皮钙黏蛋白 (Vascular endothelial cadherin, VE-cadherin) 表达, 导致血管内皮之间黏附连接受损, 使内皮细胞间隙增大, 且 PKC α 磷酸化 P120ctnS879 促进 NF- κ B 表达, 从而参与内皮炎症反应^[13], 因此, 低剪切应力可通过促进内皮炎症反应引起内皮结构损伤。此外, LSS 还可作用于内皮细胞膜表面的小凹蛋白 Caveolae 中的 Caveolin-1。一方面, Caveolin-1 直接感受剪切应力变化, 将一部分力学信号转导成生物学信号, 通过一系列下游活化通路级联放大反应促进一系列效应分子的表达或活化, 例如, Yamamoto^[14]等发现 LSS 可以通过 Caveolae 或 Caveolin-1 介导的机制激活线粒体 ATP 的生成, 并触发 ATP 释放和细胞内嘌呤受体介导的胞外 Ca²⁺ 内流; 另一方面, 与其他受体分子相互作用, 两者共同影响 AS 的发生发展。

2 低剪切应力影响内皮细胞的死亡方式

现有研究发现低剪切应力可造成内皮细胞的凋亡、自噬、焦亡等程序性细胞死亡方式异常而影响内皮功能, 进而导致 AS 的发生。

2.1 细胞凋亡

凋亡是 I 型程序性细胞死亡。最新研究发现 MiR-137 通过 c-Jun 氨基端激酶/活化蛋白-1 (JNK/AP-1) 信号通路调控低剪切应力诱导的内皮细胞凋亡^[15]。血管系统的低流速和低剪切应力可促进内皮细胞的凋亡, 且内皮细胞凋亡可能是斑块侵蚀和血栓形成的决定因素。

2.2 自噬

自噬是一种保护性和适应性机制。一般认为层流剪切应力上调血管内皮细胞自噬,而低剪切应力及振荡剪切应力抑制血管内皮细胞自噬^[16]。剪切应力可能通过下调 10-11 转位癌基因家族成员 2(the Ten-Eleven-Translocation oncogene family member 2, TET2)介导的 DNA 甲基化修饰抑制内皮细胞自噬过程^[17]。此外, LSS 还可通过抑制自噬介导的 eNOS 磷酸化,导致 eNOS 解耦联, NO 释放减少,并上调内皮素 1 (ET-1) 的表达,这与动脉粥样硬化形成的几何性质有关^[18-19]。然而,另有研究认为 LSS 能诱导自噬, Guo 等^[20]通过检测暴露于 LSS 的人脐静脉内皮细胞的自噬水平发现, LSS 增加了自噬体和 MAP1 轻链 3 样蛋白 (LC3) 斑点的形成,促进自噬标志性蛋白 Beclin-I 和 LC3II 的蛋白表达,而抑制了自噬障碍标志物 p62 的表达,说明 LSS 能诱导自噬的发生。LSS 诱导的自噬和凋亡之间还存在串扰关系:通过检测内皮凋亡率和凋亡调节因子 Bax、Bcl-2 的表达,发现 LSS 能促进内皮细胞凋亡,而自噬激活剂雷帕霉素能降低 Bax 的表达和增加 Bcl-2 的表达,从而抑制了 LSS 诱导的内皮凋亡,自噬抑制剂氯喹则相反,它能促进 LSS 诱导的内皮凋亡。说明 LSS 诱导自噬的发生可能与 Bax 表达增加和 Bcl-2 表达降低有关^[20]。

2.3 细胞焦亡

细胞焦亡是一种炎性程序性细胞死亡。Chen Jinna 等^[21]研究发现 LSS 能通过 TET2/SDHB/ROS 通路促进内皮细胞焦亡。LSS 可降低 10-11 转位 2 (TET2) 甲基胞嘧啶双加氧酶的表达,进而 TET2 的缺失减少组蛋白去乙酰化酶 2 的募集,导致线粒体呼吸复合体 II 亚基琥珀酸脱氢酶 B(SDHB)的表达和活性上调。SDHB 过表达介导线粒体损伤,增加活性氧 (ROS) 的产生,进而导致内皮细胞焦亡。有研究进一步发现低剪切应力可能通过影响内皮细胞的机械敏感型 miR-181b-5p 促进细胞焦亡在 AS 的形成中发挥重要作用^[22]。miR-181b-5p 能与信号转导和转录激活因子 3 (Signal transduction and transcription activator 3, STAT3) 基因的 3'-UTR 特异性结合,且 miR-181b-5p 在转录后水平上抑制 STAT3 基因的表达可减轻 NLRP3 炎症小体依赖性焦亡。而 LSS 可以抑制 miR-181b-5p 的表达,并伴有 NLRP3 炎症小体依赖性焦亡的表达升高。此外, LSS 既可通过 miR-181b-5p 间接作用于 STAT3,还可直接作用于 STAT 家族的另一成员——STAT1, LSS 能

磷酸化激活 STAT1, 继而促进 NF- κ B 等炎症因子的表达, 加重内皮炎症损伤反应^[23], 可见 STAT 家族在 LSS 诱导内皮细胞损伤中起关键作用。因此, 考虑到机械敏感 miR-181b-5p 和 STAT 家族在剪切应力诱导的焦亡中的作用, 调控它们的表达水平可能是控制 AS 的一种有前途的策略。

3 低剪切应力致内皮-间质转化

低剪切应力刺激内皮间质转化 (Endothelial-to-mesenchymal transition, End MT) 的发生, 使内皮细胞失去其特异性抗原表型 (如 CD31, VE-cadherin 等), 转化为间质细胞表型 (如 α -SMA, vimentin 等), 内皮细胞间的紧密连接被破坏, 细胞侵袭、迁移和增殖能力增强, 分泌细胞外基质 (如胶原纤维等) 及细胞黏附因子增加, 从而促进 AS^[24]。Mahmoud 发现转录因子 Snail 是 LSS 条件下 End MT 的重要驱动因子, 它可通过提高血管通透性促进动脉粥样硬化的早期形成^[25]。李阿芳^[26]认为 DNA 羟甲基化酶 TET2 为剪切应力敏感基因, 它通过下调 Wnt/ β -catenin 信号途径抑制 LSS 诱导的内皮间质转化, 从而抑制 AS。肖晨^[27]进一步深入研究发现, miR-320 在 LSS 诱导内皮间质转化中起关键作用, 其可能是通过 SOX4/ β -catenin 信号通路调节 LSS 诱导的内皮间质转化。

4 低剪切应力影响内皮细胞的分泌功能

4.1 致 NO 释放减少

肾素-血管紧张素系统 (Renin-angiotensin system, RAS) 和丝裂原活化蛋白激酶 (Mitogen-activated protein kinase, MAPK) 系统的激活是参与动脉粥样硬化斑块进展的重要组成部分。Wang 等^[28]研究结果显示 LSS 激活 MAPK/ERK 途径可诱导内皮细胞氧化损伤, 而 Chao 等^[29]发现 LSS 能通过 AT1R/ERK 信号通路诱导内皮细胞炎症反应, 其中 ERK/eNOS/NO 通路是 AT1R 和 MAPK 的共同路径, 综合可知, LSS 作用条件下, RAS 和 MAPK 同时被激活, 继而通过下游的 ERK/eNOS/NO 通路使内皮细胞的 ROS 分泌增加而 NO 释放减少, 从而介导内皮炎症和氧化损伤^[30]。

4.2 致核转录因子表达增加

内皮细胞上的机械感受器是将力学信号转变成生物学信号的起始信号转导

部位。LSS 通过刺激内皮细胞上的机械感受器, 激活胞内一系列下游信号通路, 进而促使转录因子入核并与基因启动子区的顺式作用元件结合, 最终调节促 AS 基因和蛋白的表达。Zhao^[31]等研究证明 LSS 作用能显著增强内皮细胞 CX3CR1 的表达, 其下游可激活核转录因子 NF- κ B, 随后又通过 NF- κ B 和去泛素化酶 Cezanne, 激活转录因子 HIF-1 α , HIF-1 α 继而通过诱导糖酵解引起内皮细胞过度增殖和炎症, 从而在这些部位启动 AS 的发生^[32]。

4.3 致蛋白酶释放增加

LSS 通过整合素-ERK1/2 或 p38-MAPK/NF- κ B 信号途径介导内皮细胞大量表达基质金属蛋白酶 9 (Matrix metalloproteinase 9, MMP-9), MMP-9 降解血管内膜细胞外基质, 导致白细胞渗透进入血管壁, 以及平滑肌细胞迁移至发展中的新生内膜, 迁移到内膜的平滑肌细胞进一步分泌细胞外基质, 引起内膜增生, 从而导致 AS 的发生发展^[33]。

4.4 致黏附、趋化因子表达升高

大量研究表明 LSS 诱导内皮细胞黏附分子和趋化因子表达增加, 继而捕获血液中单核细胞以及单核细胞跨内皮迁移或稳定黏附于内皮细胞以介导内皮炎症反应。LSS 增强黏附、趋化因子的表达在 AS 的发生机制中起重要作用。LSS 通过诱导 Akt 磷酸化促进 ICAM-1、VCAM-1 和 MCP-1 等黏附、趋化因子表达增加而介导内皮炎症^[34]。LSS 还能通过刺激内皮细胞释放趋化因子 CXCL12, 诱导整合素 LFA-1 活化, 使 LFA-1 由静息的低等亲和态跃迁到活化的高等亲和态, 活化的 LFA-1 与 ICAM-1 相互作用后才能感受血流剪切应力传递的力学刺激, 并开启随后的 Outside-in 信号通路的完全激活过程, 进而使白细胞稳定黏附于内皮细胞, 从而介导内皮炎症的发生^[35]。此外, LSS 还可诱导内皮细胞表达趋化因子——基质细胞衍生因子 1 (SDF-1) 明显增高, 进而通过其受体 CXCR4 来诱导血小板聚集和活化, 这一病理过程在 AS 的过程中发挥重要作用^[36]。近年来研究发现趋化因子分毒素 (Fractalkine, FKN, CX3CL1) 在生理流动条件下能诱导白细胞黏附于原代内皮细胞以介导炎症反应, 且有研究表明 LSS 可通过磷酸化激活细胞外信号调节激酶(ERK)1/2、p38 和 Jun N-末端激酶(JNK)丝裂原活化的蛋白激酶信号通路诱导 FKN 表达上调, 加剧内皮炎症反应, 从而促进 AS 的发生^[37]。赵一蔚^[38]进一步研究发现 LSS 还能增强 FKN 的受体 CX3CR1 的表达, 且具有时

间依赖性,由此可见在 LSS 诱导 AS 的发生发展过程中, FKN 及其受体起到了关键作用。

5 抗低剪切应力作用的药物研究

近年来,越来越多研究表明,中药复方或其单体成分在改善低剪切应力方面疗效显著。如黎宝留^[39]发现当归补血汤能够有效调节血脂,改善血液流变学变化,降低 ET-1 产生,提高血流速度,从而恢复低剪切应力区域的正常血流剪切应力。透明质酸(Hyaluronic Acid, HA)作为细胞外基质糖胺聚糖(Glycosaminoglycan, GAG)的一部分,不仅参与细胞的炎症、增殖、分化和组织重塑,而且通过防止血流引起的内皮层损伤,起到内皮屏障的作用。Yang 等^[40]研究发现 LSS 降低了 HA 的表达,而小檗碱处理可以通过增加 AMPK α 的磷酸化显著减弱 LSS 诱导的 HA 降解,进而降低 p47phox 和 Hyal2 的活性,同时上调透明质酸合成酶 2 (Hyaluronic acid synthase 2, HAS2) 的表达,以维持 HA 的代谢,从而防止血流低剪切应力引起的内皮损伤。此外, Wang 等^[41]观察到白藜芦醇能抑制 LSS 激活的 ERK/eNOS 通路,增强内皮型一氧化氮合酶(endothelial nitric oxide synthase, eNOS) 的活性,从而增加 NO 的释放以显著改善 LSS 所致的内皮细胞氧化损伤,因此,白藜芦醇能发挥抗氧化的内皮保护作用,这也为动脉粥样硬化的治疗提供了一个潜在的靶点。内皮-间质转化在心血管系统的发育过程中起着关键作用,而 LSS 诱导的内皮-间质转化是影响 AS 进程的重要因素。郝亚梦^[42]研究证实硫化氢可以通过抑制 TGF- β 1/TGF β RII/Smad2/3 信号通路,抑制低剪切力通过局部力学转导引起不同的信号通路激活导致的内皮-间质转化。张凯等^[43]通过观察 apoE(-/-)小鼠在低剪切应力状态下的内皮改变,发现苦瓜蛋白能通过抑制内皮炎症因子和黏附分子的表达,减轻低剪切应力下内皮-间充质转化及动脉粥样硬化病变。自噬具有抗 AS 作用,因此当 LSS 抑制血管内皮细胞的自噬作用时,会使血管内皮细胞受损而促进 AS 的发生发展。硫化氢(hydrogen sulfide, H₂S)是近年来被发现的第三个内源性气体信号分子,它具有抗内皮细胞凋亡、诱导保护性自噬、抗 AS 作用等多种生物学效应。唐蕊^[44]通过建立 LSS 诱导的 HUVECs 自噬障碍模型,发现 H₂S 可通过活化 AMPK 途径、降低细胞内 mTOR 水平,增加下游通路的自噬相关蛋白,拮抗 LSS 导致的内皮细胞自噬障碍。

中西医药物联用亦能有效对抗低剪切应力以治疗动脉粥样硬化。将当前临床常用的一类降脂药烟酸和姜黄素(中药姜科草本植物姜黄的根茎中提取的多酚类化合物)进行反应合成可得到的一种新型化学合成药物烟酸姜黄素酯(Curcumin nicotinate, CN), 研究表明 CN 对 AS 具有良好的防治作用^[45]。刘静^[46]进一步研究发现 CN 可通过上调 miR-224, 抑制内皮细胞中 PCSK9 表达, 达到抑制 LSS 诱导内皮细胞凋亡的作用, 从而减轻动脉粥样硬化过程中的内皮损伤。

6 小结与展望

综上所述, 内皮功能障碍是 AS 的初始阶段, 也是心血管疾病预后的重要指标, 而血流剪切应力是调节内皮功能的重要病理生理机制。低剪切应力可导致内皮功能的结构改变、程序性细胞死亡方式异常以及分泌功能异常, 进而启动 AS 的发生。随着关于低剪切应力与内皮之间相互作用的机制研究的深入, 越来越多学者开始探索改善低剪切应力诱导内皮损伤的药物, 且众多研究表明中西医药物联用能有效对抗低剪切应力以治疗 AS。此外, 随着系统生物学研究的不断深入, 进一步认识剪切应力调节内皮功能障碍信号转导的网络机制, 可以为延缓 AS 进展乃至预防 AS 的发生提供新的靶点。

综述二 血小板-内皮黏附在 AS 中的发生机制及抗血小板治疗的研究进展

流行病学研究表明心血管疾病的全球发病率仍逐年升高。《中国心血管健康与疾病报告 2021》显示心血管疾病是我国城乡居民死亡的首位原因。动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 是众多心血管疾病的病理基础,也是心血管疾病发生发展过程中的关键病理因素。血小板-内皮黏附在 AS 发生发展过程中的作用,近年来越来越受到重视。血小板活化并黏附于暴露的血管内皮下的基质,导致内皮细胞趋化因子、生长因子、黏附分子等分泌增加是 AS 发生发展和血栓形成的始动环节。此外,血小板-内皮黏附还可促进稳定斑块向不稳定性斑块转变^[47]。因此,抑制血小板-内皮黏附这一 AS 斑块破裂、血栓形成的关键始动环节,为心血管疾病的二级预防提供了新的重要靶向。

目前抗血小板药多针对血小板活化、聚集环节,缺少针对血小板-内皮黏附这一 AS 形成和血栓性事件发生的关键始动环节的药物,成为限制心血管疾病二级预防效果进一步提高的关键。本文主要就血小板-内皮黏附在 AS 中的发生机制及抗血小板的药物治疗最新进展进行了总结归纳,为 AS 的预防、诊治和药物研发提供了新的思路和方向。

1 血小板-内皮黏附在 AS 中的发生机制

1.1 炎症反应介导的血小板-内皮黏附

在动脉粥样硬化中,血小板与内皮细胞的相互作用与炎症激活和血栓前状态有关。当血管受损或内皮暴露时,靠近内皮部位的血小板可与内皮下基质直接接触并黏附于内皮细胞,引发血小板的活化、聚集。迅速激活的血小板可通过释放炎症因子和促有丝分裂底物进一步活化内皮细胞,改变内皮细胞的黏附、趋化和渗出活性,同时可介导白细胞黏附并转移到炎症组织,因此,血小板与内皮细胞以及与白细胞之间的相互作用促进了血栓和动脉粥样硬化过程中炎症网络的形成。目前认为,这三者之间的相互作用主要依赖于 P-选择素与配体 PSGL-1 的黏附介导^[48]。此外,临床研究发现血小板表面和血中 P-选择素增高可反映体内血小板活化程度,尤其是在血栓性疾病的早期阶段,这为动脉粥样硬化血栓性事件的早期诊断提供了有力的判断依据^[49]。除 P-选择素外,血小板在活化状态下还

可高表达炎性介质 CD40L, 进而通过 CD40L-CD40 配体-受体轴诱导血管内皮细胞表达黏附分子 ICAM-1、E-selectin 和炎性细胞趋化因子 IL-8。这种 CD40L-CD40 配体-受体轴介导的血小板-内皮黏附在动脉粥样硬化斑块局部炎症反应和血栓形成过程中发挥重要的调控作用^[50]。

1.2 内皮信号分子介导的血小板-内皮黏附

血小板活化后可引起鞘氨醇-1-磷酸在内皮细胞内的大量蓄积, 并使内皮细胞表面的鞘氨醇 1-磷酸受体 mRNA 水平表达上调, 从而通过鞘氨醇-1-磷酸途径增强血小板与内皮细胞的黏附作用^[51]。Tian 等^[52]运用超声分子成像观察活化血小板和内皮细胞的相互作用, 可见血管性血友病因子(vWF)-A1 结构域与血小板糖蛋白(GP) Ib/IX 之间的相互作用在介导血小板黏附于受损的内皮细胞中发挥重要作用。

1.3 自噬机制介导的血小板-内皮黏附

自噬依赖性的内皮细胞膜重构对于血小板与内皮细胞的黏附以及体内血栓形成至关重要^[53]。自噬的药理学抑制剂或必需自噬基因 Atg5 或 Atg7 的下调能抑制内皮细胞的自噬小体分泌 vWF, 从而减少血小板黏附于受损血管壁的内皮细胞^[54], 由此可见自噬机制是介导血小板-内皮黏附的原因之一。

1.4 低剪切应力作用介导的血小板-内皮黏附

血流剪切应力为血流与血管壁相互作用所产生的与管壁平行的切应力。低剪切应力 (Low shear stress, LSS) 是在血管几何形状急剧改变部位发生血流速度显著减小而产生的异常剪切应力。LSS 可损伤内皮细胞, 增加血小板活化分子和黏附分子的表达, 从而诱导血小板聚集在 LSS 区域。Meyer 等^[55]进一步研究发现, 在低剪切应力状态下, 固定的内皮趋化因子 CXC 基序配体 16 (Chemokine CXC motif ligand 16, CXCL16) 从流动的血液中捕获血小板, 并可促进 CXCR6 依赖的血小板在内皮细胞上的黏附。此外, 在剪切应力作用下, 血小板可通过 PECAM-1 与内皮细胞黏附^[56]。

2 抗血小板治疗的药物研究

抗血小板治疗是冠心病二级预防中的基本策略, 包括 Thromboxane A₂ (TXA₂) 抑制剂、Adenosine diphosphate (ADP) 受体 P2Y₁₂ 抑制剂、

Protease-activated receptors-1(PAR-1)受体拮抗剂及 Glycoprotein IIb/IIIa (GPIIb/IIIa)受体抑制剂等。其中 TXA₂抑制剂是一类以阿司匹林为代表的血栓素 A₂合成抑制剂,它能使血小板环氧化酶不可逆地发生乙酰化, TXA₂的合成被抑制,从而发挥抗血小板和抑制血栓生成作用^[57]。P2Y₁₂抑制剂能抑制 ADP 释放诱导 P2Y₁₂受体激活引起的血小板活化和聚集,临床上常将 P2Y₁₂抑制剂与阿司匹林合用的双联抗血小板疗法用于经皮冠状动脉介入后血栓形成的预防^[58]。PAR-1受体拮抗剂主要通过抑制凝血酶裂解 PAR-1 和 PAR-4,从而抑制血小板的活化^[59]。GPIIb/IIIa受体抑制剂对血小板聚集、活化的抑制作用主要通过抑制 GPIIb/IIIa与纤维蛋白原或其他配体的结合实现。阿昔单抗、依替巴肽(一种环状拟肽)和替罗非班(一种酪氨酸的非肽衍生物)等都是以 GPIIb/IIIa为靶点的抗血小板药物,均通过静脉注射给药,能预防 PCI术后的血栓形成,预防 PCI术后的血栓形成,尤其适用于 ST段抬高的心肌缺血患者^[60]。然而,上述抗血小板药虽可显著改善冠心病患者预后,但也存在如下诸多问题:(1)阿司匹林及氯吡格雷均存在剂量依赖性出血风险,两者联用出血风险显著增加^[61],第三代噻吩并吡啶类 P2Y₁₂受体抑制剂如普拉格雷引起的严重出血(颅内出血、胃大出血等)可达 2.4%^[62]。此外,阿司匹林或氯吡格雷对 COX-1(cyclooxygenase-1)或 ADP-P2Y₁₂受体均为不可逆阻断,停药后作用效应可持续整个血小板寿命周期(7~9d)^[63],因此冠脉搭桥患者应用双联抗血小板药物由于显著增高出血风险,获益甚微^[64];(2)10~20%服用阿司匹林的患者会在 5年内再发血栓性事件,且 5~10%的患者发生胃肠道不良反应^[65]。服用常规剂量氯吡格雷,25%~40%的患者的血小板可被 ADP诱导黏附聚集,产生“氯吡格雷抵抗”^[66];(3)阿司匹林、氯吡格雷等抗血小板药物可引起血管内皮细胞损伤、凋亡,使内皮下胶原暴露,vWF释放增加,促进血小板活化^[67];(4)PAR-1受体拮抗剂沃拉帕沙最主要的副作用依然是出血,约 25%的服用者会发生出血事件,尤其是颅内出血会明显增加^[68]。(5)虽然 GPIIb/IIIa受体拮抗剂是有效的抗血栓药物,但由于它们阻碍了所有循环血小板的产生,会导致多达 50%的病人出现出血并发症^[69]。因此,充分发挥中医药整体观念、辨证论治的优势,积极探索既能有效抑制血小板的活化、聚集、黏附和释放,又能避免出血风险及其他副作用的中药方剂是未来中医药研究的突破口。近年来,随着中医药研究的迅速发展,关于中药抗血小

板治疗的药效及机制研究亦逐渐深入。以下是对中医药抗血小板治疗的归纳梳理:

2.1 抗血小板活化

当血小板表面的受体与相应的配体结合时,血小板即被激活。目前研究已发现血小板的活化主要有 3 条途径,分别是 ADP 途径、PAF 途径和 AA 途径^[70]。其中关于中药抑制 ADP 活化途径的研究较多。如黄曼婷^[71]研究证实柚皮素具有显著的抗血小板、抗动脉血栓作用,且没有明显的出血副作用,其抗血小板活性作用的靶点可能是抑制 ADP 与血小板膜表面 P2Y₁₂ 受体的结合,进而抑制其下游的 PI3K 信号通路,并通过升高血小板内 cGMP 水平和 PKA 依赖的信号通路来介导血管扩张刺激磷蛋白(Vasodilator Stimulated Phosphoprotein, VASP)的磷酸化,从而发挥抗血小板活化的作用。最新多项研究亦证实 PI3K 信号转导通路是 ADP/P2Y₁₂ 结合下游信号转导的关键介质,参与血小板活化和稳定的血小板黏附过程,如马永洁等^[72]研究发现四氢姜黄素(Tetrahydrocurcumin, THC)能通过下调 PI3K/Akt 信号通路显著抑制血小板的活化和聚集。李俊等^[73]亦发现囊性纤维化跨膜转导调节子(Cystic Fibrosis Transmembrane Conductance Regulator, CFTR)可以通过调控血小板 P2Y₁₂ 蛋白表达影响血小板活化。此外,马璐璐等^[74]通过建立缺氧及氧化应激大鼠模型,发现疏血通注射液可能通过 ERK5/P70S6K 信号通路抑制血小板活化。

2.2 抗血小板聚集

血小板之间的相互黏附叫血小板聚集。刘蕾^[75]研究证实血栓通注射液可能通过抑制血小板机械力离子通道 Piezo1 蛋白的活化和 Ca²⁺内流,从而明显抑制剪切应力诱导的血小板聚集。尤星宇等^[76]通过结扎冠状动脉制备心肌缺血大鼠模型,研究结果显示脑心通胶囊可以抑制心肌缺血大鼠血小板的聚集率,延长凝血时间,改善血液高凝状态,保护缺血心肌组织。李振华^[77]研究表明补阳还五汤能降低血小板聚集率,增加血栓形成时间,减少血清中血栓素 B₂ (thromboxane B₂, TXB₂) 的含量,说明补阳还五汤能显著抑制血小板的聚集和凝血功能。吴忠勇等^[78]等通过观察急性肺栓塞大鼠模型,发现黄芩素能通过激活 Notch 信号通路显著抑制血小板聚集。周红辉等^[79]发现三七皂苷可通过抑制血小板聚集作用来实现其活血祛瘀、通脉活络的功效。丹参是中药活血化瘀药物的代表,而丹酚酸 A

是丹参中提取获得酚酸类化合物,其对心脑血管疾病具有广泛的防治作用,有研究证实丹酚酸 A 能抑制血小板聚集和血栓形成,且其在发挥抑制血小板过度活化聚集的同时不会增加出血事件发生的风险^[80]。薤白皂苷可能作用于 P2Y₁ 和 P2Y₁₂,通过降低胞浆内钙离子浓度和升高 cAMP 含量抑制 ADP 诱导的血小板聚集^[81]。万菡等^[82]采用兔体外血小板聚集实验方法,证实酸枣仁皂苷 A 能有效抑制花生四烯酸 (Arachidonic acid, AA)、二磷酸腺苷 (Adenosine diphosphate, ADP) 和血小板因子-4 (platelet factor-4, PF-4) 诱导的血小板聚集,并能显著降低 PAF、P-选择素和 PF-4 的含量,说明酸枣仁皂苷 A 具有明显的抗血小板聚集活性。

2.3 抗血小板黏附

血小板黏附是指血小板可黏附于其他异物表面的特性。正常完整的血管内皮细胞能抑制血小板的活化、聚集和黏附作用,当血管内皮受损时,血小板被激活,通过释放一系列活性分子介导血小板黏附于内皮下基质,进而稳定黏附于内皮细胞。商战平^[83]等发现蜂胶醇提液能降低血小板的黏附活性。亚麻籽可以通过降低血小板和内皮的黏附反应性延缓雌激素缺乏大鼠动脉粥样硬化病变的进展^[84]。三七总皂苷配可通过抑制内皮细胞 MAPK 通路的激活抑制血小板与内皮细胞的黏附^[85]。韩淑娟^[86]从血流、血管、血液相互作用的角度研究发现,血栓通胶囊能保护血管内皮细胞,抑制血小板黏附,从而抑制血栓形成,且研究发现病理低剪应力状态下,血栓通胶囊抗血栓形成的作用越强。

2.4 抗血小板释放

血小板释放反应是指储存在血小板中的颗粒或溶酶体内的物质在血小板受到刺激后,由血小板的开放管道系统被释放到血小板外的过程^[87]。这些物质包括 P-选择素、5-HT、ADP、Ca²⁺、 β -血小板球蛋白(β -thromboglobulin, β -TG)、血小板第 4 因子(platelet factor 4, PF4)等,中药亦能通过抑制血小板中活性物质的释放发挥良好的抗血小板作用。徐士欣等^[88]研究发现丹酚酸 B 能减少活化血小板释放产物造成的乳酸脱氢酶释放,明显抑制内皮细胞凋亡。此外,有研究报道甲磺酸胺银杏内酯 B 能显著抑制血小板活化因子诱导家兔血小板释放 Ca²⁺^[89]。卞敬琦等^[90]研究证明补阳还五汤能抑制血小板释放亢进的状态,使 β -TG 的释放量显著降低。

3 小结与展望

血小板-内皮黏附是启动动脉粥样硬化发生的关键环节，也是促进动脉粥样硬化进程中病理性血栓形成的关键，因此，抗血小板-内皮黏附对于抑制动脉粥样硬化的发生至关重要。针对目前缺少抗血小板-内皮黏附药物的问题，积极探索炎症反应、内皮信号分子、自噬和低剪切应力等促血小板-内皮黏附的病理因素对于开发靶向药物具有重要的药理依据，也是抑制 AS 发生或延缓 AS 进程的重要举措。

综述三 益气活血方药保护血管内皮损伤的研究进展

益气活血方药具有益气活血，化瘀止痛的功效，在临床上广泛应用于治疗心脑血管疾病。因气属阳，益气中药多为甘温药味，寓“大甘复阳”之意，使阳气充沛以鼓动血行，则血脉畅通，血行不滞；而活血中药则多为苦辛之品，主入心、肝二经，味苦则通泄，味辛则能散能行，且均入血分，故能行血活血，使血脉通畅，瘀滞消散。血管内皮损伤是包括稳定性冠心病、急性冠脉综合征、脑卒中等多种心脑血管疾病发生发展的重要病理基础和始动因素。中医学认为气虚血瘀是血管内皮损伤的基本病机，因机体正气不足，则心阳无力推动血行，则血行迟缓，久则致瘀血停滞而损伤脉道，因此，益气活血是治疗血管内皮损伤的有效治法。血管内皮损伤是贯穿许多严重心脑血管疾病始终的病理表现，近年来，如何改善血管内皮损伤一直是医学界重点关注的议题，本文就益气活血方药保护血管内皮损伤的研究进行了综述，以期对内皮损伤的治疗提供借鉴。

1 中医学对血管内皮损伤病变的认识

1.1 病因

《素问·脉要精微论》云：“夫脉者，血之府也。”，明确提出了血脉是血液运行的通道。血脉即相当于现代医学的血管，而血管内皮是血管壁最内层血管内膜的组成部分，内皮损伤后表现为血管壁弹性减弱，动脉管腔狭窄。根据其病变的临床表现，可归于中医“脉痹”范畴。“脉痹”一词首见于《素问·痹论》：“风寒湿三气杂至……以夏遇此者，为脉痹……痹在于脉则血凝而不流”，这也强调了脉痹的病因与风、寒、湿等外邪入侵有关。《济生方·痹》言：“皆因体虚，腠理空虚，受风寒湿气而成痹也”，进一步强调痹症成因总归素体正气亏虚，致风、寒、湿等外邪乘虚而入。综上所述，脉痹的外因为风、寒、湿等外邪内侵，阻滞血脉，内因为脏腑功能失调，正气不足，致血行不畅而瘀滞。

1.2 病机

1.2.1 外邪痹阻

《素问·四时刺逆从论》曰：“阳明有余，病脉痹，时身热”，阳明为多气多血之经，若阳明邪气盛，则正邪交争易化燥化热，燥热易灼伤津血，耗伤正气，

致气血不足，血行不畅，血液瘀滞而成脉痹。沈金鳌《杂病源流犀烛》曰：“风寒湿三气犯其经络之阴而成痹也……入于血，则凝而不流为脉痹”；顾靖远《顾松园医镜》亦强调“痹者闭也，三气杂至，则经络闭塞，血气不流，而痹斯作矣”。风、寒、湿等外邪侵入，致血脉瘀阻或邪气郁而化热，熏灼津血，致血行滞涩而成脉痹。

1.2.2 素体正虚

叶天士《临证指南医案》曰：“痹者，……皆由气血亏损，腠理疏松，风寒湿三气得以乘虚外袭，留滞于内以致湿痰、浊血流注凝涩而得之”。《太平圣惠方》云：“夫劳倦之人，表里多虚，血气衰弱，腠理疏泄，风邪易侵……随其所感，而众痹生焉”。以上均说明素体气血亏虚，易致风、寒、湿等外邪乘虚外袭，留滞于血脉，化生痰浊、瘀血阻塞脉道而发脉痹。此外，《灵枢·邪客》载：“五谷入于胃也……营气者，泌其津液，注之于脉，化以为血”。中焦脾胃为气血生化之源，气血充方能化生营气行于脉道以使脉管柔和而张弛有度。若素体脾胃亏虚，则气血生化乏源，营卫俱损，脉道失于濡养温煦，致血行不畅而得脉痹。

1.2.3 痰阻血瘀

《圣济总录》曰：“脉痹血道壅涩”；汪文绮《杂证会心录》云：“痹者闭也，乃络脉涩而少宣通之机，气血凝而少流动之势”，脉痹以气血不行、血脉壅塞为特征。恼怒激动，肝气郁滞，致血行不畅，瘀血阻滞而成脉痹；或思虑过度致脾失健运，水谷精微化生不利，而致痰湿内生，痰湿阻滞血脉，亦成脉痹，正如林佩琴《类证治裁》所言：“气血凝滞，久而成痹……在血则凝而不流”。

综上所述，归属于“脉痹”之血管内皮损伤的病因总归“邪、虚、瘀”三类。其病位在血脉，病理性质总属本虚标实，本虚为脏腑气血亏虚，标实为外邪、血瘀、痰浊，素体亏虚致外邪内侵以及痰浊、瘀血内生是脉痹的基本病机，而气虚血瘀是本病病机的最终转归。

2 现代医学对血管内皮损伤的认识

血管内皮是一种自分泌、旁分泌和内分泌器官，可分泌一氧化氮（NO）、内皮素-1（ET-1）、前列腺素₁₂（PGI₂）等血管活性物质，参与调节血管张力和维持血管稳态^[91]。吸烟、高血压、血脂异常、高血糖、肥胖等都是导致血管内皮

损伤的危险因素。血管内皮损伤是指血管内皮在病理因素持续影响作用下,血管内皮细胞为适应内外环境变化发生形态学和结构的改变,主要表现为细胞间连接发生断裂,导致局部血管内皮结构不完整,通透性增加^[92]。血管内皮损伤后血管舒张因子释放减少,而血管收缩因子分泌增多,导致内皮依赖的血管舒缩平衡稳态被打破,这是内皮功能障碍的主要特征^[93]。内皮功能障碍除引起血管舒缩功能失常外,还伴有一系列的促炎、氧化应激、血小板聚集、黏附以及血栓形成等病理过程,随后启动动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)和心血管事件的发生^[94],因此,内皮功能障碍是AS发生发展的一个关键早期步骤,也是预测心血管预后转归的重要标志。

3 益气活血方药对血管内皮的保护作用研究

《灵枢·口问》曰:“夫百病之始生也,皆生于……血气分离,阴阳破败,经络厥绝,脉道不通……经脉虚空……乃失其常”。血脉损伤则血不行经,脉道空虚,致气血阴阳失调,是产生各类疾病的重要原因。血脉损伤的始动环节是血管内皮的损伤,因此,积极防治血管内皮损伤对于防治血管相关疾病有重要临床意义。《素问·阴阳应象大论》云:“定其血气,各守其乡。血实宜决之,气虚宜掣引之”,指出了益气活血法是治疗气血不循常道的根本治则,即血瘀者当活血,气虚者当补气,使血气调和,各循其道,则脏腑得以充养,疾病乃愈。因此,应用益气活血方药是治疗血管内皮损伤的有效治法。

3.1 益气活血中药单体

黄芪是一味常用的补气药,现代药理研究发现黄芪具有抗氧化、清除自由基、抗炎等作用。黄芪甲苷是黄芪的主要活性成分,实验研究证实黄芪甲苷可有效缓解氧化应激诱导的人脐静脉内皮细胞损伤^[95-96]。人参是大补元气之品,其活性成分人参皂苷 Rb1 能通过抑制分泌内皮微粒及组织因子的表达来预防脐静脉内皮细胞损伤^[97]。丹参是广泛应用于心血管疾病的中药。丹参的药理作用包括有舒张血管,减少心肌细胞和血管内皮细胞的活性氧生成,抑制细胞凋亡,保护心脏免受缺血再灌注损伤等。其提取物丹参素可以增强血管内皮生长因子和碱性纤维细胞生长因子的表达,促进缺血区域新生血管的生成^[98]。三七总皂苷是三七的主要有效成分,三七总皂苷对内皮细胞炎症介质产生及黏附分子表达有抑制作用,从

而减轻血管内皮细胞的炎性损伤^[99]。川芎嗪是从川芎的根茎中提取的活性生物碱。董小莉等研究发现川芎嗪能改善大鼠血管内皮功能,从而提高冠心病大鼠的血管完整性^[100]。此外,有研究发现川芎嗪能够维持内皮细胞分泌内皮素和一氧化氮的动态平衡,从而维持血管正常的舒缩功能^[101-104];能抗氧化并减少内皮细胞凋亡^[105];能促进坏死部位的血管新生^[106-107];并抑制内皮细胞炎性反应^[108-111]。川芎的脂溶性成分川芎内脂能保护 TNF- α 诱导的脐静脉内皮细胞损伤,且川芎内脂的有效成分 Z-藁本内酯保护内皮细胞免受 TNF- α 损伤的作用机制与抑制核因子- κ B (NF- κ B) 介导的黏附分子的表达有关^[112]。阿魏酸是当归、川芎等活血中药中含量较高的有效成分。实验研究发现阿魏酸可以抑制内皮细胞释放 NF- κ B 信号和肿瘤坏死因子 α (TNF- α) 等炎症因子的表达,从而减轻内皮细胞的炎性损伤^[113]。

3.2 益气活血单味药

人参是益气药的最强代表,能大补五脏之气,味甘、微苦,性微温,归脾、肺经。许志威等发现人参能显著上调高同型半胱氨酸血症 (HHcy) 大鼠内源性血管活性肽 ghrelin 水平,从而减轻血管内皮损伤^[114]。丹参味苦,性微寒,归心、肝经,具有养血活血之效,其可部分通过激活腺苷酸活化蛋白激酶信号通路来改善内皮功能障碍^[115]。郁金味苦、辛,性寒,归心、肝、肺经,能活血止痛,行气解郁。何洁英等通过体外实验证实郁金醇提物能通过抗氧化应激以减轻内皮损伤^[116]。牛膝味酸、苦,性平,亦有活血祛瘀之效,采用牛膝含药血清进行体外实验发现牛膝能促进血管内皮细胞增殖,有效预防 LPS 诱导的内皮损伤^[117]。桃仁味苦性平,归心、肝、肺、大肠经,有活血祛瘀、润肠通便之功,实验研究发现桃仁提取物主要通过影响 NF- κ B 蛋白的表达来减轻内皮炎性损伤^[118]。除单味益气药或活血药能显著改善内皮细胞损伤之外,药理学研究也证实了益气活血药对组合也能有效减轻内皮细胞损伤。例如,黄芪-当归药对能有效改善血管内皮的损伤程度,调整血管内膜结构^[119]。西洋参和丹参配伍能够通过抑制 PI3K/Akt/NF- κ B 通路增强内皮细胞活性、减轻氧化应激水平和抑制炎症反应,从而减轻内皮细胞损伤^[120]。黄芪-丹参药对的活性成分毛蕊异黄酮、丹参酮IIA 能够降低肾动脉内皮的凋亡率,改善肾动脉内皮功能障碍^[121]。

3.3 益气活血中药复方

戴超南等研究发现具有活血作用的丹参通络解毒汤能够显著促进缺血再灌注损伤大鼠的心肌微血管内皮细胞 (CMECs) 增殖, 促进 CMECs 血管新生, 从而修复受损的 CMECs^[122]。既往临床研究亦证实由黄芪、党参、当归、川芎等益气活血中药组成的化纤胶囊 II 号方能修复和保护血管内皮细胞^[123]。林凡等通过血清药理学方法发现活血化瘀的代表方血府逐瘀汤可通过激活活性氧, 增强人脐静脉内皮细胞 (HUVEC) 的迁移能力, 从而发挥促血管新生作用^[124]。当归补血汤具有益气补血之功效, 研究表明当归补血汤可能通过改善血流动力学指标, 改善脂质代谢水平、全血黏度及外周血内皮祖细胞功能, 抑制血管内皮炎症损伤, 从而发挥抗 AS 的作用^[125]。补阳还五汤出自王清任·《医林改错》, 该方具有补气活血通络之功效, 现代药理研究发现补阳还五汤加减可以显著减轻氧化应激造成血管内皮细胞的损伤, 并抑制内皮细胞凋亡^[126-127]。桃红四物汤是祛瘀生新的代表方剂之一, 它是在四物汤的基础上衍化而来, 具有养血活血、祛瘀生新之功效。研究表明, 桃红四物汤能维持缺糖缺氧状态下内皮细胞的正常形态, 改善缺糖缺氧损伤所致的人脑微血管内皮细胞的生存活性, 提高了内皮细胞耐缺氧能力, 从而促进血管新生^[128]。苏菲等通过动物实验证实益气凉血生肌方能保护血管内皮的完整性, 能促进损伤性血管内皮细胞形态学的修复^[129]。王新洲等证实由黄芪、人参、赤芍、西红花四味药组成的益气活血方能通过抑制 NF- κ B 通路活性发挥抗 LPS 诱导小鼠炎症及内皮损伤的作用^[130]。由黄芪、当归、生晒参、三七和川芎组成的益气活血中药能通过改善受损内皮的功能, 上调 NO/ET-1, 以调节血管紧张度, 恢复血管的自稳态, 此外, 益气活血中药还能保护冠脉微循环的受损内皮细胞, 改善冠脉微循环障碍^[131]。

4 小结

益气活血方药主要通过抗氧化、抗炎、抑制细胞凋亡、促进细胞增殖和血管新生等方面发挥保护血管内皮细胞损伤的作用。在益气中药单体方面, 黄芪甲苷和人参皂苷是常用之剂, 在活血中药单体方面, 丹参素、三七总皂苷、川芎嗪等常用; 益气中药多为黄芪、人参等补气扶正之品, 活血中药则多用丹参、郁金、牛膝等活血养血之品; 此外, 黄芪-当归药对和西洋参-丹参药对也是以益气活血治法改善血管内皮损伤的有效措施; 在中药复方方面, 血府逐瘀汤、补阳还五汤、

桃红四物汤以及益气活血方等自拟方在改善血管内皮损伤方面疗效显著。益气活血方药组方灵活多变,因此,其涉及的药理机制复杂,仍需进一步深入研究以扩充其药理作用,为扩大临床疗效奠定科学依据。此外,我们仍需立足于中医基础理论,继续挖掘组方精简、疗效显著的益气活血方药,为临床治疗内皮损伤相关性疾病开拓思路。

参考文献

- [1]《中国心血管健康与疾病报告 2021》,心肺血管病杂志,2022,41(12):1205-1211.
- [2]傅馨莹,孙正骥,张伟.基于“内皮损伤学说”探讨动脉粥样硬化的中医药防治策略[J].世界中医药,2021,16(11):1759-1763.
- [3]沈美丽.具有活性氧和剪切应力双重响应药物递送系统及用于动脉粥样硬化治疗的研究[D].吉林大学,2021.
- [4]李立.EPCs 在低剪切应力下归巢机制及作为靶向 AS 的治疗载体研究[D].第三军医大学,2016.
- [5]刘莹.低剪切应力对小鼠腹主动脉重建的影响及其作用机制的研究[D].南方医科大学,2011.
- [6]李阿芳.TET2 抑制低剪切应力诱导的动脉粥样硬化及其机制研究[D].南华大学,2018.
- [7]Yin W, Shanmugavelayudam SK, Rubenstein DA. The effect of physiologically relevant dynamic shear stress on platelet and endothelial cell activation. *Thromb Res.* 2011 Mar;127(3):235-41. doi: 10.1016/j.thromres.2010.11.021.
- [8]首健,霍云龙.机械力信号与部分心血管疾病的发生[J].中国动脉硬化杂志,2023,31(01):34-40.
- [9]周淑媛.低切应力对血管内皮屏障功能的调控及 SL 提取物的干预机制[D].中国中医科学院,2013.
- [10]Totaro A, Panciera T, Piccolo S. YAP/TAZ upstream signals and downstream responses. *Nat Cell Biol.* 2018 Aug;20(8):888-899.
- [11]Zhang J, Kong X, Wang Z, et al. AMP-activated protein kinase regulates glycocalyx impairment and macrophage recruitment in response to low shear stress.

FASEB J. 2019 Jun;33(6):7202-7212.

[12]Qin WD, Zhang F, Qin XJ, et al. Notch1 inhibition reduces low shear stress-induced plaque formation. *Int J Biochem Cell Biol.* 2016 Mar; 72:63-72.

[13]赵业禹. PKC α -P120ctn-NF- κ B 信号通路参与流体剪切力作用下血管内皮损伤机制的研究[D].南昌大学,2020.

[14]Yamamoto K, Imamura H, Ando J. Shear stress augments mitochondrial ATP generation that triggers ATP release and Ca²⁺ signaling in vascular endothelial cells. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 2018 Nov 1;315(5):H1477-H1485.

[15]Li GJ, Yang QH, Yang GK, et al. MiR-137 regulates low-intensity shear stress-induced human aortic endothelial cell apoptosis via JNK/AP-1 signaling. *J Physiol Biochem.* 2021 Aug;77(3):451-460.

[16]郭凤霞. 自噬调节层流剪切应力下血管内皮细胞 eNOS 及 ET-1 表达的初步研究[D].南华大学,2014.

[17]Yang Q, Li X, Li R, et al. Low Shear Stress Inhibited Endothelial Cell Autophagy Through TET2 Downregulation. *Ann Biomed Eng.* 2016 Jul;44(7):2218-27.

[18]Zhang JX, Qu XL, Chu P, et al. Low shear stress induces vascular eNOS uncoupling via autophagy-mediated eNOS phosphorylation. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2018 May;1865(5):709-720.

[19]李小红,郭凤霞,杨沁,等.自噬干预对低剪切应力下血管内皮细胞 eNOS 和 ET-1 表达的影响[J].中国动脉硬化杂志,2014,22(09):875-880.

[20]Guo FX, Hu YW, Zheng L, et al. Shear Stress in Autophagy and Its Possible Mechanisms in the Process of Atherosclerosis. *DNA Cell Biol.* 2017 May;36(5):335-346.

[21]Chen J, Zhang J, Wu J, et al. Low shear stress induced vascular endothelial cell pyroptosis by TET2/SDHB/ROS pathway. *Free Radic Biol Med.* 2021 Jan; 162:582-591.

[22]Xu X, Yang Y, Wang G, et al. Low shear stress regulates vascular endothelial cell pyroptosis through miR-181b-5p/STAT-3 axis. *J Cell Physiol.* 2021 Jan;236(1):318-327.

[23]Zhu L, Wang F, Yang H, et al. Low shear stress damages endothelial function

- through STAT1 in endothelial cells (ECs). *J Physiol Biochem.* 2020 Feb;76(1):147-157.
- [24] Souilhol C, Harmsen MC, Evans PC, et al. Endothelial-mesenchymal transition in atherosclerosis. *Cardiovasc Res.* 2018 Mar 15;114(4):565-577.
- [25] Mahmoud MM, Serbanovic-Canic J, Feng S, et al. Shear stress induces endothelial-to-mesenchymal transition via the transcription factor Snail. *Sci Rep.* 2017 Jun 13;7(1):3375.
- [26] 李阿芳. TET2 抑制低剪切应力诱导的动脉粥样硬化及其机制研究[D].南华大学,2018.
- [27] 肖晨. miR-320 在低剪切应力诱导 EndMT 中的作用及机制研究[D].南华大学,2020.
- [28] Wang Z, Zhang J, Li B, et al. MAPK signaling mediates low shear stress-induced oxidative damage in human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2014 May;34(5):603-8.
- [29] Chao Y, Zhu L, Qu X, et al. Inhibition of angiotension II type 1 receptor reduced human endothelial inflammation induced by low shear stress. *Exp Cell Res.* 2017 Nov 15;360(2):94-104.
- [30] Wang Z, Zhang J, Li B, et al. MAPK signaling mediates low shear stress-induced oxidative damage in human umbilical vein endothelial cells in vitro. *Nan Fang Yi Ke Da Xue Xue Bao.* 2014 May;34(5):603-8.
- [31] Zhao Y, Ren P, Li Q, et al. Low Shear Stress Upregulates CX3CR1 Expression by Inducing VCAM-1 via the NF- κ B Pathway in Vascular Endothelial Cells. *Cell Biochem Biophys.* 2020 Sep;78(3):383-389.
- [32] Feng S, Bowden N, Fragiadaki M, et al. Mechanical Activation of Hypoxia-Inducible Factor 1 α Drives Endothelial Dysfunction at Atheroprone Sites. *Arterioscler Thromb Vasc Biol.* 2017 Nov;37(11):2087-2101.
- [33] 孙惠文. 剪切力介导血管内皮细胞表达基质金属蛋白酶 9 及其信号转导通路的研究[D].山东大学,2007.
- [34] Zhu L, Yang H, Chao Y, et al. Akt phosphorylation regulated by IKK ϵ in response to low shear stress leads to endothelial inflammation via activating IRF3. *Cell Signal.*

2021 Apr; 80:109900.

[35]陈岱琳. 剪应力作用下整合素 LFA-1 的激活[D].华南理工大学,2017.

[36]吴孟津,危当恒,王贵学,等. 低剪切应力促进基质细胞衍生因子 1 在动脉粥样硬化斑块中表达[J].中国动脉硬化杂志,2006(12):1028-1030+1048.

[37]Ruze A, Zhao Y, Li H, et al. Low shear stress upregulates the expression of fractalkine through the activation of mitogen-activated protein kinases in endothelial cells. Blood Coagul Fibrinolysis. 2018 Jun;29(4):361-368.

[38]赵一蔚. 剪切应力作用强度及时间对内皮细胞 CX3CR1 表达水平的影响[D].新疆医科大学,2017.

[39]黎宝留 (Le Bao Luu). 当归补血汤保护血管内皮改善剪切力复合高脂 As 兔模型的作用机制[D].广州中医药大学,2018.

[40]Yang H, Zhu L, Gu Y, et al. Berberine inhibits low shear stress-induced glycocalyx degradation via modulating AMPK and p47phox/Hyal2 signal pathway. Eur J Pharmacol. 2019 Aug 5; 856:172413.

[41]Wang Z, Zhang J, Li B, et al. Resveratrol ameliorates low shear stress-induced oxidative stress by suppressing ERK/eNOS-Thr495 in endothelial cells. Mol Med Rep. 2014 Oct;10(4):1964-72.

[42]郝亚梦. H₂S 对低剪切力下 HUVECs 内皮间质转化的影响及机制研究[D].南华大学,2019.

[43]张凯, 刘峰涛, 刘亚密, 等. 苦瓜蛋白对低剪切应力下 apoE^{-/-}小鼠内皮-间充质转化的影响[J].中国病理生理杂志,2021,37(03):443-449.

[44]唐蕙. 硫化氢拮抗低剪切应力致 HUVECs 自噬障碍及其机制[D].南华大学,2016.

[45]龚勇珍,姚海伦,孙少卫,等.SREBP-1/小凹蛋白 1 介导烟酸姜黄素酯对 ApoE^{-/-}小鼠的抗动脉粥样硬化作用 [J]. 中国动脉硬化杂志,2014,22(12):1189-1194.

[46]刘静,王媚媚,刘录山,等.烟酸姜黄素酯对低剪切应力诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的影响及相关机制[J].中国临床药理学与治疗学,2018,23(08):855-861.

[47]Meyer Dos Santos S, Blankenbach K, Scholich K, et al. Platelets from flowing blood attach to the inflammatory chemokine CXCL16 expressed in the endothelium

- of the human vessel wall. *Thromb Haemost.* 2015 Aug;114(2):297-312.
- [48]Nording HM, Seizer P, Langer HF. Platelets in inflammation and atherogenesis. *Front Immunol.* 2015 Mar 6; 6:98.
- [49]王琼. 血清 P-选择素、PIGF、MMP-9 在急性冠脉综合征患者中的临床意义[D]. 新疆医科大学,2015.
- [50]渠晶. 体内活化血小板表达 CD40L 及其对内皮细胞表达炎性因子的影响[D]. 山东大学,2014.
- [51]Aoki S, Osada M, Kaneko M, et al. Fluid shear stress enhances the sphingosine-1-phosphate responses in cell-cell interactions between platelets and endothelial cells[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007,358(4):1054-1057.
- [52]Tian J, Weng Y, Sun R, et al. Contrast-enhanced ultrasound molecular imaging of activated platelets in the progression of atherosclerosis using microbubbles bearing the von Willebrand factor A1 domain. *Exp Ther Med.* 2021 Jul;22(1):721.
- [53]Jiang P, Lan Y, Luo J, et al. Rapamycin promoted thrombosis and platelet adhesion to endothelial cells by inducing membrane remodeling. *BMC Cell Biol.* 2014 Feb 24; 15:7.
- [54] Torisu T, Torisu K, Lee IH, et al. Autophagy regulates endothelial cell processing, maturation and secretion of von Willebrand factor. *Nat Med.* 2013 Oct;19(10):1281-7.
- [55]Meyer Dos Santos S, Blankenbach K, Scholich K, et al. Platelets from flowing blood attach to the inflammatory chemokine CXCL16 expressed in the endothelium of the human vessel wall. *Thromb Haemost.* 2015 Aug;114(2):297-312.
- [56]Meza D, Shanmugavelayudam SK, Mendoza A, et al. Platelets modulate endothelial cell response to dynamic shear stress through PECAM-1. *Thromb Res.* 2017 Feb; 150:44-50.
- [57]王朝清. Picotamide 结构类似物的设计、合成及其药理活性研究[D].天津理工大学,2018.
- [58]韩常宝,贾宁,王海玲.新的 P2Y₁₂ 抑制剂在冠状动脉疾病中的应用[J].医学综述,2011,17(11):1705-1708.

- [59]张媛.抗血小板新药——PAR-1 受体拮抗剂[J].中华心脏与心律电子杂志,2014,2(01):51-53.
- [60]杨国雷.血小板膜糖蛋白IIb/IIIa 受体拮抗剂的研究与应用[J].临床医学工程,2010,17(01):149-151.
- [61]Steinhubl SR, Bhatt DL, Brennan DM, et al. Aspirin to Prevent Cardiovascular Disease: The Association of Aspirin Dose and Clopidogrel with Thrombosis and Bleeding. *Annals of Internal Medicine*. 2009; 150(6): 379-W368.
- [62]Cayla G, Cuisset T, Silvain J, et al. Prasugrel Monitoring and Bleeding in Real World Patients. *American Journal of Cardiology*. 2013; 111(1): 38-44.
- [63]郭一洁,邹晓,司全金.抗血小板药物研究进展[J].中华老年多器官疾病杂志,2017,16(09):699-702.
- [64]Lopez Menendez J, Avanzas P, Callejo F, et al Dual antiplatelet treatment after coronary artery bypass surgery. *Journal of Cardiothoracic Surgery*. 2015; 10.
- [65]Hankey GJ, Eikelboom J. Aspirin resistance. *Lancet*. 2006; 367(9510): 606-617.
- [66]De Miguel A, Ibanez B, Badimon JJ. Clinical implications of clopidogrel resistance. *Thrombosis and Haemostasis*. 2008; 100(2): 196-203.
- [67]Korybalska K, Rutkowski R, Luczak J, et al. THE ROLE OF PURINERGIC P2Y₁₂ RECEPTOR BLOCKERS ON THE ANGIOGENIC PROPERTIES OF ENDOTHELIAL CELLS: AN IN VITRO STUDY. *Journal of Physiology and Pharmacology*. 2018; 69(4).
- [68]李春杏,朱珠.抗血小板新药 vorapaxar[J].中国新药杂志,2015,24(06):601-604+643.
- [69]孙双勇,靳京,孔晓华,等.抗血小板药物研究进展及新靶点药物的发现[J].药物评价研究,2021,44(01):213-221.
- [70]乔文豪,王秀,王佳丽,等.抗血小板药物药理作用和临床应用的研究进展[J].安徽医药,2014,18(09):1621-1625.
- [71]黄曼婷.柚皮素通过P2Y₁₂受体信号通路抑制血小板活性和动脉血栓形成[D].广州中医药大学,2017.
- [72]马永洁,李玮琪,张春梅,等.四氢姜黄素经 PI3K/Akt 信号通路抑制人血小板活

- 化和聚集的影响[J].食品科学 2021,12(23):1-13.
- [73]李俊,杨涵滢,韩慧,等.CFTR 通过调控二磷酸腺苷受体 P2Y₁₂影响血小板活化[J].中山大学学报(医学科学版),2021,42(04):521-527.
- [74]马璐璐,张璐莎,李春晓,等.疏血通注射液抗血小板活化作用机制研究[J].中西医结合心脑血管病杂志,2021,19(02):247-252.
- [75]刘蕾.注射用血栓通抗血小板聚集及改善血流效应机制研究[D].中国中医科学院,2020.
- [76]尤星宇,陈璐,李春晓,等.脑心通胶囊对心肌缺血大鼠血小板聚集及其凝血功能的影响[J].中国临床药理学杂志,2018,34(15):1835-1838.
- [77]李振华.补阳还五汤对脑缺血再灌注模型大鼠血小板聚集及血栓形成的影响[J].中医学报,2018,33(03):422-425.
- [78]吴忠勇,王金忠,周森,等.基于 Notch 信号通路的黄芩素抑制急性肺栓塞模型大鼠血小板聚集及肺组织保护作用机制研究[J].中国药房,2020,31(09):1091-1097.
- [79]周红辉,吴玉婷,赵恒,等.三七皂苷对 SD 大鼠血小板聚集及人凝血酶时间影响的研究[J].实用中西医结合临床,2019,19(10):1-2+9.
- [80]杜冠华,王海港,宋俊科,等.心脑血管缺血的防治策略与丹参及丹酚酸 A 的作用与机制[J].中国药理学与毒理学杂志,2019,33(09):648-649.
- [81]邓可,封慧,王志鹏,等.薤白皂苷对冠心病寒痰阻滞证患者血小板聚集率的影响及机制研究[J].中国中医基础医学杂志,2019,25(06):783-786.
- [82]万蕊,易蕾,王红.酸枣仁皂苷 A 的抗血小板聚集活性研究[J].中国现代应用药学,2018,35(10):1514-1516.
- [83]商战平.蜂胶及其主要成分抗动脉粥样硬化作用机制的研究.山东省,泰山医学院,2013-07-27.
- [84]Haliga RE, Iancu RJ, Butcovan D, et al. Flaxseed prevents leukocyte and platelet adhesion to endothelial cells in experimental atherosclerosis by reducing sVCAM-1 and vWF. ScientificWorldJournal. 2013 Dec 30; 2013:303950.
- [85]吕佳杰,王真,李娥.三七总皂苷配合双联抗血小板药物对人脐静脉内皮细胞损伤和内皮血小板黏附的影响[J].中药药理与临床,2017,33(01): 99-102.
- [86]韩淑娟,陈影,张倩,等.流动条件下血栓通胶囊抗血小板黏附的分子药理学机

- 制研究[J].中国中药杂志,2017,42(02): 341-346.
- [87]徐士欣,张军平,李伟,等.活化血小板释放产物对内皮细胞的损伤及丹酚酸 B 的保护效应[J].中华老年心脑血管病杂志,2012,14(02):183-185.
- [88]刘洪,潘苏华,刘成鼎,等.甲磺酸胺银杏内酯 B 对 PAF 诱导家兔血小板聚集和释放产物的影响[J].中成药,2010,32(06):914-918.
- [89]卞敬琦,牛雯颖,冯月男,等.补阳还五汤对气虚血瘀模型血小板活化影响[J].辽宁中医药大学学报,2020,22(02):43-46.
- [91]王聪霞,范雅洁.冠心病血管内皮损伤与血管重构的研究进展[J].西安交通大学学报(医学版),2018,39(04):455-458.
- [92]Konukoglu Dildar, Uzun Hafize. Endothelial Dysfunction and Hypertension.[J]. Advances in experimental medicine and biology,2017,956.
- [93]顾丽娟,刘凯,刘国安,等.中医药防护血管内皮细胞损伤研究新进展[J].世界中西医结合杂志,2014,9(06):667-670.
- [94]Hooglugt A, Klatt O, Huveneers S. Vascular stiffening and endothelial dysfunction in atherosclerosis. Curr Opin Lipidol. 2022 Dec 1;33(6):353-363.
- [95]马海涛,王辉.黄芪甲苷对过氧化氢诱导损伤的人脐静脉内皮细胞的保护作用[J].郑州大学学报(医学版),2016,51(02):248-251.
- [96]许崇花,王洪新,唐富天,等.黄芪甲苷对过氧化氢诱导人脐静脉内皮细胞损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2015,21(16):101-104.
- [97]宋志明,余舒杰,焦洁,等.人参皂苷 Rb1 减轻人脐静脉内皮细胞氧化损伤[J].基础医学与临床,2020,40(08):1064-1067.
- [98]YIN Y, DUAN JL, GUO C, et al. Danshensu accelerates angiogenesis after myocardial infarction in rats and promotes the functions of endothelial progenitor cells through SDF-1a/CXCR4 axis[J]. Eur J Pharmacol,2017,814:274-282.
- [99]陈剑鸿,王碧江,刘松青,等.三七总皂苷对内毒素损伤血管内皮细胞炎症特性的影响[J].中国医院药学杂志,2004(03):14-15.
- [100]董小莉,马立宁,王苗.川芎嗪对冠心病大鼠的血管保护作用研究[J].中国医药,2021,16(03):340-344.
- [101] Smiljic S. The clinical significance of endocardial endothelial dysfunction. Medicina (Kaunas). 2017 Dec;53(5):295-302.

- [102] En-zhi FENG, Sheng-yue YANG, Ning-xia HUANG, et al. Plasma endothelin-1 and nitric oxide correlate with ligustrazine alleviation of pulmonary artery hypertension in patients of chronic cor pulmonale from high altitude plateau during acute exacerbation[J].中国应用生理学杂志,2014,30(06):532-537.
- [103]张国平,孙梅,杨洁红,等.川芎嗪对缺氧人脐静脉内皮细胞抗凝和纤溶功能的影响[J].中草药,2008(01):71-73.
- [104]方浩. 川芎嗪对妊娠高血压疾病患者血管内皮细胞功能和肾功能的影响[J].中国药师, 2010, 13(03):403-404.
- [105] Yang G, Qian C, Wang N, et al. Tetramethylpyrazine Protects Against Oxygen-Glucose Deprivation-Induced Brain Microvascular Endothelial Cells Injury via Rho/Rho-kinase Signaling Pathway. Cell Mol Neurobiol. 2017 May;37(4):619-633.
- [106] Jiang Y, Liu C, Chen W, et al. Tetramethylpyrazine enhances vascularization and prevents osteonecrosis in steroid-treated rats. Biomed Res Int. 2015; 2015:315850.
- [107] Yuan R, Shi W, Xin Q, at al. Tetramethylpyrazine and Paeoniflorin Inhibit Oxidized LDL-Induced Angiogenesis in Human Umbilical Vein Endothelial Cells via VEGF and Notch Pathways. Evid Based Complement Alternat Med. 2018 Nov 21; 2018:3082507.
- [108] Wang Y, Zhu H, Tong J, et al. Ligustrazine improves blood circulation by suppressing Platelet activation in a rat model of allergic asthma. Environ Toxicol Pharmacol. 2016 Jul; 45:334-9.
- [109] Zhu X, Wang K, Zhang K, et al. Tetramethylpyrazine Protects Retinal Capillary Endothelial Cells (TR-iBRB2) against IL-1 β -Induced Nitritative/Oxidative Stress. Int J Mol Sci. 2015 Sep 9;16(9):21775-90.
- [110] Sun MY, Zhang M, Chen SL, et al. The Influence of Hyperlipidemia on Endothelial Function of FPN1 Tek-Cre Mice and the Intervention Effect of Tetramethylpyrazine. Cell Physiol Biochem. 2018;47(1):119-128.
- [111] Wu X, Zhang F, Xiong X, et al. Tetramethylpyrazine reduces inflammation in liver fibrosis and inhibits inflammatory cytokine expression in hepatic stellate cells by

- modulating NLRP3 inflammasome pathway. IUBMB Life. 2015 Apr;67(4):312-21.
- [112]黄志勇,田广永,曹玲,等. 藁本内酯上调 miR-181b 减轻氧化低密度脂蛋白诱导人脐静脉内皮细胞炎症损伤[J].中国比较医学杂志,2018,28(07):18-23.
- [113]沈涛,朱玉萍,阮杨,等.阿魏酸通过抑制核因子- κ B 信号途径降低肿瘤坏死因子 α 诱导的人血管内皮细胞氧化应激及黏附分子表达[J].中国动脉硬化杂志,2013,21(05):385-390.
- [114]许志威,蓝涛华,吴伟康等. 人参皂甙 Rb1 对高同型半胱氨酸诱导的内皮损伤及 ghrelin 多肽表达的影响[C]//中华中医药学会,中国中西医结合学会.络病学基础与临床研究(5).络病学基础与临床研究(5),2009:127-130+646.
- [115]江小梨,邓波,刘彬,等.丹参对高血压病血瘀证血清诱导内皮功能障碍的影响[J].中华中医药学刊,2019,37(03):638-642.
- [116]何洁英,王汝上,何洁宝,等.郁金醇提取物对过氧化氢诱导的人脐静脉内皮细胞氧化应激损伤的保护作用[J].中国实验方剂学杂志,2013,19(03):223-225.
- [117]韦倩,盖国忠,伊鹏菲,等.牛膝药理血清对血管内皮细胞影响的实验研究[J].长春中医药大学学报,2008(03):244-245.
- [118]以敏,徐君毅,邓家刚,等.桃仁提取物对寒热不同血瘀证大鼠内皮细胞的损伤及 NF- κ B 表达的影响[J].广西中医药,2017,40(02):65-69.
- [119]刘珊,王文越,王永春,等.黄芪-当归药对益气活血作用的药效物质基础[J/OL].中国实验方剂学杂志:1-12[2023-03-11].
- [120]林泉. 西洋参丹参配伍调控 PI3K/Akt/NF- κ B 通路稳定动脉粥样硬化易损斑块的作用机制研究[D].中国中医科学院,2021.
- [121]刘瑶,韩聪,李伟.黄芪-丹参药对活性成分通过调控 miRNA-200c-3p/ZEB2 对大鼠肾动脉内皮细胞增殖和迁移的影响[J].时珍国医国药,2022,33(03):516-520.
- [122]戴超男,李鑫辉,王婷婷.丹参通络解毒汤联合 METTL3 对缺氧/复氧大鼠心肌微血管内皮细胞血管新生的影响[J/OL].中国中医药信息杂志:1-6.
- [123]刁冰冰,梁群.化纤胶囊Ⅱ号方治疗脓毒症急性肺损伤疗效及对患者血管内皮细胞功能、毛细血管渗漏指数的影响[J].陕西中医,2023,44(01):45-49+59.
- [124]林凡,郑跃文,陈斌玲,等.活性氧对血府逐瘀汤诱导人脐静脉内皮细胞迁移作用的影响[J].时珍国医国药,2014,25(02):257-259.

- [125]陈苑,黎宝留,许二巾,等. 基于血流剪切力与炎性反应探讨当归补血汤治疗动脉粥样硬化的作用机制[J].中药新药与临床药理,2022,33(06):786-793.
- [126]邵乐,夏相宜,王宇红,等.补阳还五汤精简方对氧化应激损伤血管内皮细胞的保护作用研究[J].湖南中医药大学学报,2019,39(02):163-167.
- [127]余颜,王宇红,邵乐,等.补阳还五汤精简方对大鼠脑缺血后血管新生及Nrf2/HO-1 信号途径的影响[J].中国药理学通报,2016,32(01):123-128.
- [128]季兆洁,韩岚,吴欢茹,等.桃红四物汤对人脑微血管内皮细胞 OGD 损伤的保护作用及机制[J].中国实验方剂学杂志,2018,24(07):95-100.
- [129]苏菲,孙娅楠,崔晓云,等.益气凉血生肌方对血管内皮细胞损伤后细胞形态学的影响[J].中医杂志,2015,56(19):1691-1694.
- [130]王新洲,高水波,代丽萍,等.益气活血方对内毒素诱导小鼠炎症及内皮损伤的影响[J].中国中西医结合杂志,2020,40(07):823-828.
- [131]郑乘龙. 益气活血药对心梗大鼠冠脉微血管内皮损伤活性分子的调控机制研究[D].北京中医药大学,2012.

前言

动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是一种以免疫炎性细胞浸润和脂质沉积于血管壁为特征的慢性炎症性病理变化^[1]。随着我国人口老龄化的进展,由 AS 引发的稳定性冠心病、急性冠脉综合征和脑卒中等心脑血管疾病的发病率和致死率逐年升高。AS 的发病风险因素复杂多样、难以控制,因此,深入探索 AS 的发病机制,并积极探求针对 AS 始动环节的治疗策略将对延缓甚至抑制 AS 的发生发展至关重要。多年来我国学者围绕 AS 机制,在内皮损伤、炎症反应、氧化应激、泡沫细胞形成和脂质沉积等方面取得了重大突破,然而,始终没有攻克抑制 AS 的初始发生这一技术难题。近年来越来越多学者关注到机械力学对 AS 形成的影响。血流剪切应力是机械力学的重要组成部分,它是血液流动时与血管壁摩擦产生的一种切向应力^[2]。剪切应力与血管的发育、功能以及血管相关疾病的发生有关。正常剪切应力($5\sim 25\text{ dyne/cm}^2$)和高剪切应力($>25\text{ dyne/cm}^2$)能维持血管内皮细胞结构和功能的完整发挥抗 AS 作用,而低剪切应力($<5\text{ dyne/cm}^2$)则会导致内皮结构受损,引起内皮功能障碍,从而启动并促进 AS 的发生发展^[3]。低剪切应力(Low shear stress, LSS)通常见于动脉的分支处、狭窄部位以及冠状动脉的弯曲段,因而这些部位也是形成 AS 斑块的常见区域^[4]。现有研究表明 LSS 介导 AS 发生发展的机制可能与内皮炎症、内皮间质转化和内皮细胞自噬等有关^[5-7],然而 LSS 介导内皮细胞损伤后引起血小板与内皮细胞相互作用的机制尚未完全阐明。

LSS 是导致血小板-内皮黏附进而启动 AS 发生的重要原因。LSS 可引起内皮细胞损伤,增加血小板活化分子和黏附分子的表达,进而诱导血小板与内皮细胞黏附。Meyer 等^[8]研究发现,在 LSS 状态下,固定的内皮趋化因子 CXC 基序配体 16 (Chemokine CXC motif ligand 16, CXCL16)从流动的血液中捕获血小板,并可促进家族趋化因子受体 6 (Chemokine CXC receptor 6, CXCR6)依赖的血小板在内皮细胞上的黏附。此外,Meza 等^[9]亦发现 LSS 引起血小板与 PECAM-1 共定位于内皮细胞交界处,当内皮细胞表达 PECAM-1 被抑制时,LSS 引起的血小板-内皮细胞黏附作用显著降低。以上研究均说明 LSS 是导致血小板-内皮黏附的关键因素之一。此外,Tian 等^[10]证实在 ApoE^{-/-}小鼠中血小板-内皮的黏附作用严格早于明显动脉粥样硬化病变的发生,且即使在完全没有早期血管改变的情况

下,黏附在颈动脉内皮上的血小板数量也随着年龄的增长而不断增加,说明血小板与内皮的黏附作用是 AS 的始动环节。在黏附过程中,血小板被激活并释放促炎细胞因子和趋化因子(如 IL-1 β 或 RANTES),并在膜表面表达 CD40 配体(CD40L),继而导致单核细胞的聚集和跨内皮单层向内膜的转移,从而启动 AS 的发生。

稳定性冠心病属于中医学“胸痹”范畴,《金匱要略·胸痹心痛短气病脉证治》云:“阳微阴弦,即胸痹而痛,所以然者,责其极虚也……所以胸痹、心痛者,以其阴弦故也”,且《诸病源候论·胸痹候》云:“胸痹之候,因虚而发”,可见胸痹的病机总归阳微阴弦,即胸中阳气虚损为本,瘀血、痰浊等阴邪内停为标。愈心痛胶囊正是针对冠心病气虚血瘀证而设的时方,由红参、三七和延胡索三味中药组成。红参甘温能补益胸中元气,三七化瘀生新,延胡索活血止痛,与三七相伍能增强化瘀止痛之功。三药相合,共奏益气活血,通脉止痛之功。既往临床研究证实愈心痛胶囊能够显著改善心绞痛,增加红细胞的变形能力,降低红细胞聚集指数以及血液黏度,从而全面改善血液流变学异常,改善心肌供氧^[11]。临床前动物试验结果证实愈心痛胶囊可减轻冠状动脉左前降支结扎犬的心肌缺血程度和范围,减小心肌梗死面积,增加麻醉犬冠状动脉血流量,且能降低大鼠血液黏度,抑制血小板黏附^[12]。人参皂苷和三七总皂苷分别是红参和三七的主要活性成分,最新实验研究发现含药人参皂苷 Rg1 和三七皂苷 RI 的复方丹参方能降低 LSS 诱导的血管内皮细胞功能障碍,从而减轻 AS^[13]。此外,人参皂苷 Rg1 能通过抑制 MAPK 通路抑制 LSS 诱导的炎症反应^[14]。

综上所述,愈心痛胶囊对冠心病患者的临床疗效确切,且其有效活性成分能通过改善血流剪切应力,减轻内皮细胞损伤,从而减轻 AS,但是愈心痛胶囊调控 LSS 抑制 AS 形成的具体机制仍不明确,因此,本研究拟以血小板为核心,通过临床研究与体内、体外实验研究的有机结合,系统阐述愈心痛胶囊对血小板功能的影响以及愈心痛胶囊调控 LSS 诱导的血小板-内皮黏附的作用机制,从而阐明愈心痛胶囊治疗 AS 可能的作用机制,为临床以抗血小板为核心的动脉粥样硬化防治提供新的理论支持,为方药的改良和二次开发提供新思路。

第一章 愈心痛胶囊改善稳定性冠心病患者血小板功能的多中心、随机、双盲、安慰剂对照的临床研究

根据《中国心血管健康与疾病 2021》，冠心病在我国的患病率和死亡率仍居高不下，目前患病总人数已超过 1100 万^[15]，给国家造成了严重的经济负担，因此，积极防治冠心病仍是心血管领域的当务之急。稳定性冠心病（Stable coronary artery disease, SCAD）是冠心病的主要类型，积极的抗血小板治疗是 SCAD 治疗的基石，能降低其发生心肌梗死和死亡的风险。西医抗血小板药物能有效抑制血小板活化，显著改善 SCAD 患者的预后，但仍存在剂量依赖性出血、药物抵抗、胃肠道不良反应等无法克服的副作用，且即使严格按照指南推荐规范服用抗血小板药，SCAD 患者 1 年内仍约 10% 左右的患者发生心血管事件^[16]，这可能与血小板高反应性密切相关。中药联合抗血小板药治疗 SCAD 能否进一步降低血小板高反应性，同时不增加出血风险，是冠心病治疗领域普遍关注的重大问题。

愈心痛胶囊是陈可冀院士团队研发的用于治疗冠心病的益气活血代表性方药，由延胡索、红参、三七组成，具有益气活血、通脉止痛的功效。既往临床研究证实愈心痛胶囊能降低血液黏度，降低红细胞聚集指数，增加红细胞的变形能力，从而全面改善血液流变学异常^[17]，但其能否改善血小板功能尚缺少研究。因此，本研究通过多中心、随机、双盲、安慰剂对照的临床试验，以血小板聚集率和血栓弹力图为主要疗效指标，进一步明确愈心痛胶囊对血小板功能的有效性和安全性，为愈心痛胶囊的推广应用提供循证依据。根据既往研究结果，计算得到本次研究样本量为 80 例，采用中心分层、区组随机方法，以中心为分层因素，在各中心内进行区组随机化，随机分为愈心痛胶囊试验组和愈心痛胶囊模拟剂对照组，连续服药 12 周。主要疗效指标为 AA 和 ADP 诱导的血小板聚集率，常规血栓弹力图、AA 诱导的血栓弹力图和 ADP 诱导的血栓弹力图；次要疗效指标为气虚血瘀证证候评分；安全性指标为血常规、尿常规、肝功能、肾功能、凝血常规、生命体征、心电图检查。

研究方案

1 伦理与注册

本研究已通过伦理审查并获得批件（批件号：中国中医科学院西苑医院医学伦理委员会 2020XLA041-1）。本研究伦理遵循国家人体试验委员会制订的伦理学标准及赫尔辛基宣言（2013 年修订版），且已在中国临床试验注册中心完成注册（注册号：ChiCTR2000041293）。

2 研究设计

2.1 总体设计

采用多中心、随机、双盲、安慰剂对照的临床研究设计方法。本试验设置筛选期 7 天，治疗期 12 周，分别于第-7~0 天、第 8 周末±3 天和第 12 周末±3 天进行访视 1，访视 2 和访视 3。

2.2 病例来源

纳入 2021 年 3 月至 2021 年 11 月就诊于首都医科大学附属北京安贞医院、北京中医药大学东直门医院以及广州医科大学第三附属医院符合试验标准的稳定性冠心病且中医辨证为气虚血瘀的患者作为病例入组来源。

2.3 随机分组方法

采用区组随机方法，在各中心内进行区组随机化，随机表由不参与本试验统计分析的统计师使用 SAS 统计软件按分层因素和分组比例产生。区组个数、区组长度、随机初值种子参数等作为保密数据与随机表一起密封在不透光的文件袋中，作为一级盲底。

2.4 盲法

研究采用盲法操作和盲法评价，即采用双盲、单模拟技术。双盲即研究者方（对受试者进行筛选的人员、终点评价人员以及对方案依从性进行评价的人员、与临床有关的课题承担单位人员等）和受试者方（或其家属、监护人或陪护人员等）对处理分组均应处于“盲态”。单模拟技术是指仅需制备一种与试验药物所对应的安慰剂，该安慰剂与试验药物的感观（剂型、形状、颜色、质地）、气味、用法用量完全一致，但不含试验药物的活性成分。

2.5 对照

本次试验采用安慰剂对照,同时为保证受试者安全性,试验过程中受试者均可使用以下药物作为基础治疗用药:缓解症状(硝酸酯类药物)、抗缺血(β 受体阻滞剂、钙离子拮抗剂)、抗血小板(阿司匹林或氯吡格雷)、降脂(他汀类药物)等。

2.6 样本量估计

样本量计算采用 PASS 15 软件。具体计算公式如下:

$$n_1 = \left[\frac{(u_{1-\alpha} + u_{1-\beta})\sigma}{\delta} \right]^2 \frac{(1+c)}{c}, n_2 = cn_1$$

其中, n 代表每组样本量, σ 为试验组和对照组的标准差, δ 为优效性界值, α 为第一类错误, β 为第二类错误, c 为两组样本量的比值。(吴圣贤、王成祥等, 临床研究样本含量估算, 人民卫生出版社)。

本研究以“血小板聚集率”为主要疗效指标进行样本量估计。参考已有的研究文献^[17], 预估治疗前后愈心痛胶囊试验组和安慰剂对照组的血小板聚集率变化的差值为 2%。两组血小板聚集率的组间差异有统计学意义, 且愈心痛胶囊组的变化值大于安慰剂组, 即认为优效性成立。基于优效性设计, 设定检验水准 $\alpha=0.05$ (双侧), 检验效能 $1-\beta=90\%$, 则 $u_{1-\alpha}=1.64$, $u_{1-\beta}=1.28$, 两组样本量比值 1:1, 优效性界值 (δ) 为 2^[18,19], 计算可得每组需要 34 例受试者, 两组共需要 68 例患者, 同时考虑 15% 的脱落率, 总共需要分配 80 例患者, 以达到进行疗效分析所需的患者数量。

3 研究对象

3.1 诊断标准

3.1.1 西医诊断标准

参考中华医学会心血管病学分会介入心脏病学组、中华医学会心血管病学分会动脉粥样硬化与冠心病学组、中国医师协会心血管内科医师分会血栓防治专业委员会、中华心血管病杂志编辑委员会公布的《稳定性冠心病诊断与治疗指南》^[20]。

3.1.2 中医诊断标准

参考《中药新药临床研究指导原则》制定气虚血瘀证诊断标准。

主症：胸痛、胸闷；

次症：心悸、气短、神疲乏力、唇色紫暗；

舌脉象：舌淡紫或紫暗，脉细弱或涩。

主症为必备，次症具备 1 项以上，结合舌脉象，可辨证为气虚血瘀证。

3.2 纳入标准

(1) 18 周岁<年龄<75 周岁；

(2) 符合稳定性冠心病诊断标准，冠状动脉造影或冠状动脉 CT 血管成像证实冠状动脉狭窄 $\geq 50\%$ ，或急性冠脉综合征患者经皮冠状动脉介入治疗(PCI)术后病情稳定 ≥ 3 个月，或表现为劳力性心绞痛，或有陈旧心梗病史，或临床诊断心衰(包括射血分数保留心衰)；

(3) 中医辨证符合气虚血瘀证；

(4) 自愿签署书面知情同意。

3.3 排除标准

凡符合下列任何一项者，均被排除：

(1) 左主干(5段)病变 $\geq 50\%$ 或左前降支近段(6段)直径狭窄 $>70\%$ 者；

(2) 合并严重主动脉狭窄、急性主动脉夹层、急性心肌炎或心包炎、动脉瘤、重度肺动脉高压、急性肺栓塞、肺梗死、肺大疱、肺气肿、呼吸衰竭等心肺疾病，或严重心力衰竭(心功能III级及以上)；

(3) 合并急性脑血管病者；

(4) 合并高血压控制不良(收缩压 $\geq 160\text{mmHg}$ 且舒张压 $\geq 100\text{mmHg}$)；

(5) 合并未控制的伴有临床症状或血流动力学障碍的心律失常；

(6) 合并肝、肾、造血系统等严重原发性疾病、急性感染性疾病、精神病患者，或合并其他疾病不适合进行心肺运动试验者；

(7) 妊娠、计划妊娠或哺乳期妇女；

(8) 近 4 周内做过头颅及胸腹部大手术及有出血倾向者；

(9) 近 1 个月内参加其它临床试验者；

(10) 对试验药物或其所含成分过敏者；

(11) 中医辨证为非气虚血瘀证；

(12) 研究者认为存在不适合参加本试验的其它情况。

3.4 剔除标准

(1) 研究开始后发现受试者不符合病例纳入标准或符合排除标准, 即本不应当进行随机化入组的病例。

(2) 在随机化之后没有记录任何数据。

(3) 使用了禁用的药物以致有效性和安全性无法判定的病例。

3.5 脱落标准

所有填写了知情同意书并筛选合格进入研究的受试者, 无论何时因退出, 没有完成方案所规定的观察周期的受试者, 均作为脱落病例。脱落的病例应说明原因, 同时保留研究病历备查。

(1) 脱落的原因可能有如下方面:

①受试者依从性差, 中途自行退出试验。

②观察中自然脱离、失访者, 包括治疗有效但不能完成整个疗程, 以致临床资料不全等影响疗效和安全性判断者。

(2) 脱落病例的处理

①受试者因各种原因退出本试验, 研究者需与受试者沟通, 在其决定退出试验当天提前完成本应下次进行的访视内容。

②若受试者拒绝进行相关访视, 以受试者退出前最后一次相关信息作为提前终止访视的信息, 进行安全性和有效性的评价。对于提前退出的受试者, 研究者应尽可能详细的记录其退出的原因, 并记录在 CRF 中。

4 研究方法

4.1 试验药品

4.1.1 药品来源

试验药品: 愈心痛胶囊、愈心痛胶囊模拟剂, 由大连胜光药业集团股份有限公司生产, 试验期间由中国中医科学院西苑医院统一提供给受试者。

4.1.2 药物基本信息

试验药: 愈心痛胶囊, 规格 0.33g/粒, 生产批号: 以实际情况为准, 有效期至: 以实际情况为准, 生产企业: 大连胜光药业集团股份有限公司。

对照药：愈心痛胶囊模拟剂，生产批号：以实际情况为准，有效期：以实际情况为准，生产企业：大连胜光药业集团股份有限公司。

4.2 给药方案

试验组：常规西医治疗基础上+愈心痛胶囊，4粒/次，3次/日；使用12周。

对照组：常规西医治疗基础上+愈心痛胶囊模拟剂，4粒/次，3次/日；使用12周。

基础治疗：根据2018年中华医学会发布的《稳定性冠心病诊断与治疗指南》，西医常规治疗用药作为基础治疗用药，包括缓解症状（硝酸酯类药物）、抗缺血（ β 受体阻滞剂、钙离子拮抗剂）、抗血小板（阿司匹林或氯吡格雷）、降脂（他汀类）药物等。

4.3 研究期间禁止的合并用药及治疗

（1）研究期间禁止使用具有活血化瘀功效的中药（包括口服制剂、汤剂、注射剂、中药代茶饮等），如复方丹参片、脑得生片、复方血栓通胶囊、消栓通络胶囊、血府逐瘀胶囊等；（2）研究期间禁止使用未上市的药物或者其他临床试验用药物。

4.4 观测指标

（1）主要疗效指标：治疗12周末AA和ADP诱导的血小板聚集率；AA和ADP诱导的血栓弹力图；凝血时间（R）、血凝块形成时间（K）、纤维蛋白功能（Angle）、血栓最大弹力度（MA）、凝血幅度下降速率（LY30）、预测纤溶指数（EPL）、血小板动力学指数（TPI）、AA抑制率和ADP抑制率；血栓弹力图（常规凝血功能）：凝血指数（CI）。

评价标准：试验组和对照组在治疗前和治疗12周末AA和ADP诱导的血小板聚集率、R、K、Angle、MA、LY30、EPL、TPI、AA抑制率和ADP抑制率的差异，以及试验组和对照组在治疗12周后AA和ADP诱导的血小板聚集率、R、K、Angle、MA、LY30、EPL、TPI、AA抑制率和ADP抑制率相对于各自治疗前的变化。

（2）次要疗效指标：气虚血瘀证候评分。

评价标准：试验组和对照组在治疗前、治疗8周末及治疗12周末的气虚血瘀证证候评分的差异，以及试验组和对照组在治疗8周末和治疗12周末的气虚

血瘀证证候评分相对于各自治疗前的变化。

(3) 安全性指标

① 生命体征：体温、脉搏、呼吸、血压。

② 血常规：红细胞(RBC)、血红蛋白(Hb)、白细胞(WBC)、中性粒细胞比例(NEUT%)、血小板(PLT)。

③ 尿常规：尿蛋白(PRO)、尿糖(GLU)、尿隐血(BLD)、尿白细胞(LEU)。

④ 肝功能：谷丙转氨酶(ALT)、谷草转氨酶(AST)。

⑤ 肾功能：尿素氮(BUN)、血肌酐(Scr)、尿酸(UA)、肾小球滤过率(e-GFR)。

⑥ 凝血功能：活化部分凝血活酶时间(APTT)、凝血酶原时间(PT)、纤维蛋白原(FIB)、凝血酶时间(TT)。

⑦ 不良事件：整个试验过程中随时记录发生的所有不良事件。

(4) 其它

主要不良心血管事件：包括全因死亡、心肌梗死、心律失常、急性心力衰竭、血运重建术(包括介入治疗、冠脉搭桥术)等。

5 统计分析

本研究采用 Excel 2019 和 SPSS Statistics 20.0 进行数据统计分析。计数资料采用卡方检验，计量资料用均值±标准差表示， $P < 0.05$ 认为具有统计学差异， $P < 0.01$ 认为具有显著统计学差异。

5.1 治疗 12 周末血小板聚集率情况

比较试验组和对照组在治疗前和治疗 12 周末的血小板聚集率，并分析试验组和对照组在治疗 12 周后血小板聚集率相对于各自治疗前的变化。采用独立样本 t 检验或者 Wilcoxon 秩和检验进行组间比较。对于治疗后相对治疗前的变化，采用配对 t 检验或 Wilcoxon 符号秩检验进行自身前后比较。

5.2 治疗 12 周末 AA 和 ADP 诱导的血栓弹力图指标变化情况

比较试验组和对照组在治疗前和治疗 12 周末的 AA 和 ADP 诱导的血栓弹力图测试中 R、K、Angle、MA、LY30、EPL、TPI、AA 抑制率和 ADP 抑制率，并分析试验组和对照组在治疗 12 周后 R、K、Angle、MA、LY30、EPL、TPI、

AA 抑制率和 ADP 抑制率相对于各自治疗前的变化。采用独立样本 t 检验或者 Wilcoxon 秩和检验进行组间比较。对于治疗后相对治疗前的变化,采用配对 t 检验或 Wilcoxon 符号秩检验进行自身前后比较。

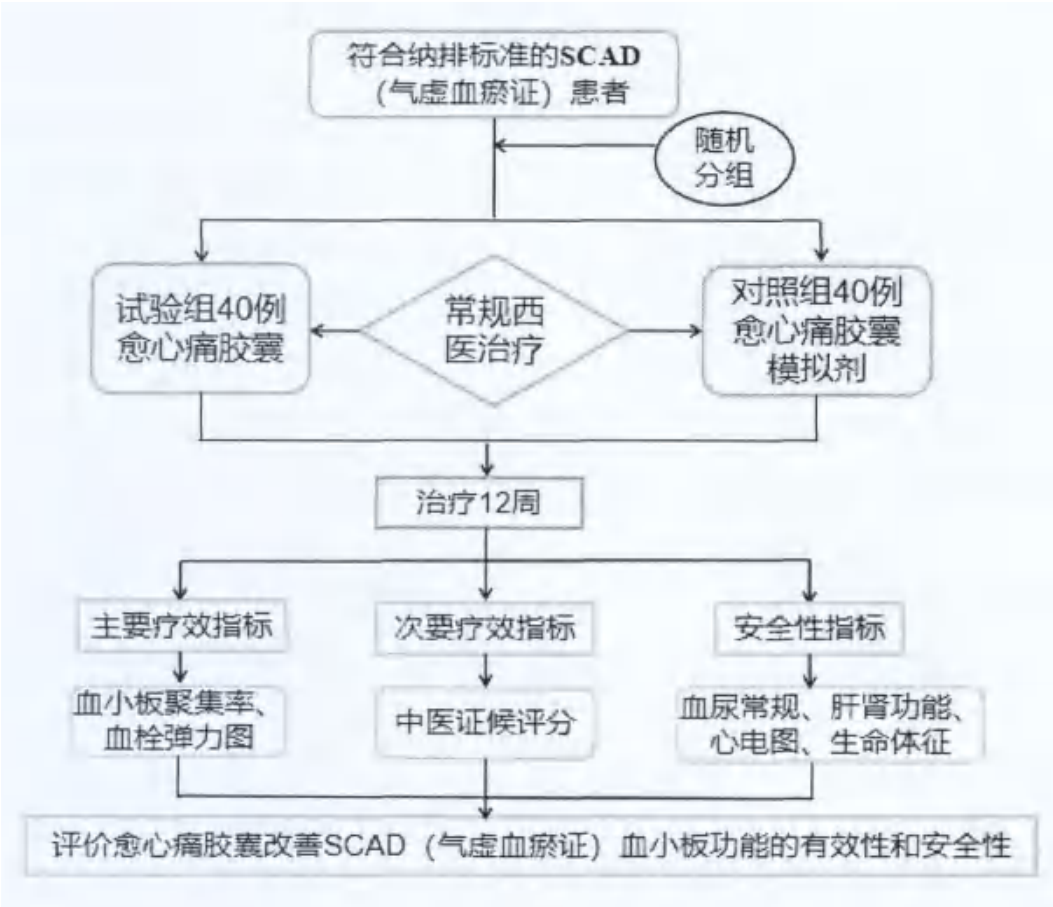
5.3 治疗 12 周末常规血栓弹力图凝血指数的变化情况

比较试验组和对照组在治疗前和治疗 12 周末的常规血栓弹力图测试中的凝血指数,并分析试验组和对照组在治疗 8 周末和治疗 12 周末的气虚血瘀证证候评分相对于各自治疗前的变化。采用独立样本 t 检验或者 Wilcoxon 秩和检验进行组间比较。对于治疗后相对治疗前的变化,采用配对 t 检验或 Wilcoxon 符号秩检验进行自身前后比较。

5.4 治疗 12 周末气虚血瘀证证候评分变化情况

比较试验组和对照组在治疗前、治疗 8 周末及治疗 12 周末的气虚血瘀证证候评分,并分析治疗 8 周末和治疗 12 周末的气虚血瘀证证候评分相对于各自治疗前的变化。采用独立样本 t 检验或者 Wilcoxon 秩和检验进行组间比较。采用配对 t 检验或 Wilcoxon 符号秩检验进行自身前后比较。

6 技术路线图



研究结果

1 病例完成情况

本研究于 2021 年 3 月至 2021 年 11 月共完成 80 例病例观察, 试验组和对照组各 40 例。脱落 8 例, 其中试验组脱落 3 例 (1 例因未规律服用愈心痛胶囊而退出, 2 例因同时服用别的活血化瘀类中成药而退出, 1 例因新冠疫情被隔离不能按时随访而退出), 对照组脱落 5 例 (1 例因感染新冠无法维持治疗而退出, 1 例因发生不良事件而退出, 1 例因新冠疫情被隔离不能按时随访而退出, 1 例因去外地而无法随访, 1 例因自行停药而退出)。最终纳入统计分析的试验组患者有 37 例, 对照组有 35 例。

2 受试者基线资料

本研究对全分析集 (Full Analysis Set, FAS) 进行意向性分析, 对安全集 (Safety Set, SS) 进行安全性分析, 对于因各种原因提前退出试验的受试者, 其疗效指标的缺失将采用最后一次观测结转 (Last Observation Carried Forward, LOCF) 的方法进行填补。

2.1 基线情况分析

试验组平均年龄为 56.68 ± 10.34 岁, 对照组平均年龄为 55.14 ± 10.25 岁, $t = 0.631$, $P = 0.53 > 0.05$, 差异无统计学意义; 试验组平均体重为 71.54 ± 11.27 kg, 对照组平均体重为 73.88 ± 11.13 kg, $t = -0.884$, $P = 0.38 > 0.05$, 差异无统计学意义; 试验组平均 BMI 为 25.22 ± 3.11 kg/m², 对照组平均 BMI 为 24.99 ± 2.73 kg/m², $t = 0.323$, $P = 0.748 > 0.05$, 差异无统计学意义; 两组受试者的性别构成无统计学差异, $\chi^2 = 1.345$, $P = 0.246 > 0.05$; 两组受试者的民族构成无统计学差异, $\chi^2 = 0.002$, $P = 0.968 > 0.05$; 两组受试者在吸烟史方面无显著差异, $\chi^2 = 0.025$, $P = 0.874 > 0.05$; 在饮酒史方面无统计学差异, $\chi^2 = 2.687$, $P = 0.101 > 0.05$ 。见表 1-1。

表 1-1 两组受试者的基线情况

变量	分组		χ^2	P
	试验组 (n = 37)	对照组 (n = 35)		
年龄 (岁)	56.68±10.34	55.14±10.25	0.631	0.53
体重 (kg)	71.54±11.27	73.88±11.13	-0.884	0.38
BMI (kg/m ²)	25.22±3.11	24.99±2.73	0.323	0.748
性别 (例)			1.345	0.246
男	29	31	-	-
女	8	4	-	-
民族 (例)			0.002	0.968
汉族	36	34	-	-
其它	1	1	-	-
吸烟史 (例)			0.025	0.874
是	20	13	-	-
否	17	12	-	-
饮酒史 (例)			2.687	0.101
是	11	17	-	-
否	26	18	-	-

2.2 现病史

试验组受试者 48.65% (18/37) 主诉乏力, 对照组受试者 54.29% (19/35) 主诉乏力, $\chi^2 = 0.229$, $P = 0.632 > 0.05$, 差异无统计学意义; 试验组受试者主诉气短的占 21.62% (8/37), 对照组受试者 17.14% (6/35) 主诉气短, $\chi^2 = 0.230$, $P = 0.631 > 0.05$, 差异无统计学意义; 试验组受试者 51.35% (19/37) 主诉劳力性心绞痛, 对照组 42.86% (15/35) 主诉劳力性心绞痛, $\chi^2 = 0.521$, $P = 0.471 > 0.05$, 差异无统计学意义; 试验组受试者 5.41% (2/37) 主诉其他临床症状, 对照组受试者 5.71% (2/35) 主诉其他临床症状, $\chi^2 = 0.003$, $P = 0.954 > 0.05$, 差异无统计学意义。见表 1-2。

试验组 59.46% (22/37) 的受试者合并心力衰竭, 其中 72.73% (16/22) NYHA 心功能分级为 I 级, 22.73% (5/22) 为 II 级, 4.55% (1/22) 为 III 级, 对照组 65.71% (23/35) 受试者合并心力衰竭, 其中 56.52% (13/22) NYHA 心功能分级为 I 级, 36.36% (8/22) 为 II 级, 9.09% (2/22) 为 III 级。两组受试者合并心力衰竭的总人数无统计学差异 ($\chi^2 = 0.300, P = 0.584 > 0.05$), 以及合并心力衰竭的心功能分级情况无统计学差异 ($\chi^2 = 1.314, P = 0.518 > 0.05$); 试验组 8.11% (3/37) 受试者合并心律失常, 对照组 5.71% (2/35) 受试者合并心律失常, 两组之间的差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.159, P = 0.690 > 0.05$), 且两组心律失常受试者均已得到控制并不伴有血流动力障碍; 试验组和对照组均无受试者合并急性脑血管疾病, 且无受试者有出血倾向; 试验组 67.57% (25/37) 受试者合并其他系统性疾病, 对照组 57.14% (20/35) 受试者合并其他系统性疾病, 组间比较差异无统计学意义 ($\chi^2 = 0.368, P = 0.544 > 0.05$)。见表 1-2。

表 1-2 两组受试者的现病史情况

现病史	分组		χ^2	<i>P</i>
	试验组 (%)	对照组 (%)		
乏力	18 (48.65)	19 (54.29)	0.229	0.632
气短	8 (21.62)	6 (17.14)	0.230	0.631
劳力性心绞痛	19 (51.35)	15 (42.86)	0.521	0.471
其他症状	2 (5.41)	2 (5.71)	0.003	0.954
合并心力衰竭	22 (59.46)	23 (65.71)	0.300	0.584
心功能 I 级	16 (72.73)	13 (56.52)		
心功能 II 级	5 (22.73)	8 (36.36)	1.314	0.518
心功能 III 级	1 (4.55)	2 (9.09)		
合并心律失常	3 (8.11)	2 (5.71)	0.159	0.690
合并其他系统性疾病	25 (67.57)	20 (57.14)	0.368	0.544

2.3 既往史

试验组受试者 27.03% (10/37) 有心梗病史, 对照组受试者 40.00% (14/35)

有心肌梗死病史, $\chi^2 = 1.362$, $P = 0.243 > 0.05$, 两组的差异无统计学意义; 试验组受试者 81.08% (30/37) 有高血压病史, 而对照组中 88.57% (31/35) 有高血压病史, $\chi^2 = 0.780$, $P = 0.377 > 0.05$, 两组的差异无统计学意义; 试验组和对照组分别有 89.19% (33/37) 和 91.43% (32/35) 的受试者有高脂血症病史, $\chi^2 = 0.103$, $P = 0.749 > 0.05$, 两组的差异无统计学意义; 试验组受试者 43.24% (16/37) 有糖尿病史, 对照组有糖尿病史的受试者占 28.57% (10/35), $\chi^2 = 1.678$, $P = 0.195 > 0.05$, 两组之间无统计学差异; 试验组受试者中仅 2.70% (1/37) 有脑卒中病史, 对照组受试者均无脑卒中病史, $\chi^2 = 0.959$, $P = 0.327 > 0.05$, 两组的差异无统计学意义; 试验组受试者中 10.81% (4/37) 有周围动脉粥样硬化病史, 而对照组中有周围动脉粥样硬化病史的受试者占 8.57% (3/35), $\chi^2 = 0.103$, $P = 0.749 > 0.05$, 两组的差异无统计学意义; 试验组和对照组分别有 10.81% (4/37) 和 11.43% (4/35) 的受试者有药物过敏史, $\chi^2 = 0.007$, $P = 0.934 > 0.05$, 两组之间无统计学差异; 最后, 所有受试者均无精神疾病史。见表 1-3。

表 1-3 两组受试者的既往史情况

既往史	分组		χ^2	P
	试验组 (%)	对照组 (%)		
心肌梗死	10 (27.03)	14 (40.00)	1.362	0.243
高血压	30 (81.08)	31 (88.57)	0.780	0.377
高脂血症	33 (89.19)	32 (91.43)	0.103	0.749
糖尿病	16 (43.24)	10 (28.57)	1.678	0.195
脑卒中	1 (2.70)	0	0.959	0.327
周围动脉粥样硬化	4 (10.81)	3 (8.57)	0.103	0.749
药物过敏史	4 (10.81)	4 (11.43)	0.007	0.934

2.4 诊断

试验组受试者 83.78% (31/37) 诊断为稳定性冠心病, 16.22% (6/37) 诊断为急性冠脉综合征(6 例受试者近 3 个月内均未行 PCI 术); 对照组受试者 71.43% (25/35) 诊断为稳定性冠心病, 28.57% (10/35) 诊断为急性冠脉综合征(10 例受试者近 3 个月内均未行 PCI 术), $\chi^2 = 1.589$, $P = 0.208 > 0.05$, 两组之间无统

计学差异。见表 1-4。

表 1-4 两组受试者的诊断情况

诊断	分组		χ^2	<i>P</i>
	试验组 (%)	对照组 (%)		
稳定性冠心病	31 (83.78)	25 (71.43)	1.589	0.208
急性冠脉综合征	6 (16.22)	10 (28.57)		

2.5 冠状动脉 CT 血管成像情况

试验组受试者 27.03% (10/37) 有冠状动脉 CT 血管成像, 72.97% (27/37) 无冠状动脉 CT 血管成像; 对照组受试者 40.00% (10/35) 有冠状动脉 CT 血管成像, 71.43% (25/35) 无冠状动脉 CT 血管成像, $\chi^2 = 0.021$, $P = 0.884 > 0.05$, 两组间差异无统计学意义。两组受试者的冠状动脉 CT 血管成像结果无统计学差异 ($P > 0.05$)。见表 1-5。

表 1-5 两组受试者的冠状动脉 CT 血管成像情况

分类		分组		χ^2/Z	<i>P</i>
		试验组 (%)	对照组 (%)		
冠状动脉 CT 血管成像(CTA)		10 (27.03)	10 (40.00)	0.021	0.884
LM (左主干)	轻度	2	1	-1	0.317
	中度	0	0		
	重度	0	1		
LAD 近段	轻度	2	1	-0.856	0.392
	中度	4	3		
	重度	0	1		
LAD 中段	轻度	1	2	0	1
	中度	1	0		
	重度	0	1		
LAD 远段	轻度	0	0	NA	NA
	中度	1	0		
	重度	1	0		
D1(第1对角支)	轻度	0	0	NA	NA
	中度	1	0		
	重度	0	0		
LCX 近段	轻度	1	3	-1.581	0.114
	中度	0	0		
	重度	2	0		
LCX 远段	轻度	0	0	NA	NA
	中度	1	0		
	重度	2	0		
RCA (右冠状动脉)	轻度	3	2	-0.707	0.48
	中度	0	0		
	重度	1	0		

2.6 冠状动脉造影情况

试验组受试者 94.59% (35/37) 有冠状动脉造影, 5.41% (2/37) 无冠状动脉造影; 对照组受试者 94.29% (33/35) 有冠状动脉造影, 5.71% (2/35) 无冠状动脉造影, $\chi^2 = 0.003$, $P = 0.954 > 0.05$, 两组之间无统计学差异。两组受试者的冠状动脉造影结果无统计学差异 ($P > 0.05$)。见表 1-6。

表 1-6 两组受试者的冠状动脉造影情况

分类		分组		χ^2/Z	<i>P</i>
		试验组 (%)	对照组 (%)		
冠状动脉造影		35 (94.59)	33 (94.29)	0.003	0.954
LM (左主干)	轻度	0	2	NA	NA
	中度	0	0		
	重度	0	0		
LAD 近段	轻度	2	2	-0.052	0.958
	中度	8	8		
	重度	10	10		
LAD 中段	轻度	3	0	-0.184	0.854
	中度	5	8		
	重度	8	6		
LAD 远段	轻度	0	1	-1.909	0.056
	中度	1	2		
	重度	3	0		
D1 (第 1 对角支)	轻度	0	1	-1.873	0.061
	中度	1	5		
	重度	4	2		
D2 (第 2 对角支)	轻度	0	0	-0.333	0.739
	中度	1	1		
	重度	2	1		
LCX 近段	轻度	1	2	-1.495	0.135
	中度	2	2		
	重度	5	1		
LCX 远段	轻度	0	2	-0.887	0.375
	中度	3	5		
	重度	4	5		
RCA(右冠状动脉)	轻度	3	5	-1.493	0.136
	中度	7	5		
	重度	8	3		
PLA (左室后支)	轻度	0	1	-0.577	0.564
	中度	0	0		
	重度	1	2		

2.7 治疗和干预情况

2.7.1 试验用药量、依从性

试验组用药总量为 984.11 ± 211.36 ，对照组用药总量为 981.94 ± 197.10 ， $t = 0.045$ ， $P = 0.964 > 0.05$ ，两组的用药总量差异无统计学意义。在用药依从性方面，

试验组 70.27% (26/37) 的受试者依从性好, 29.73% (11/37) 依从性差, 对照组受试者 74.29% (26/35) 依从性好, 25.71% (9/35) 依从性差, $\chi^2 = 0.145$, $P = 0.704 > 0.05$, 两组之间的依从性差异无统计学意义。

表 1-7 两组受试者的治疗和干预情况

治疗和干预情况	分组		χ^2	P
	试验组 (%)	对照组 (%)		
用药量 (粒)	984.11±211.36	981.94±197.10	0.045	0.964
用药依从性	依从性好 26 (70.27)	26 (74.29)	0.145	0.704
	依从性差 11 (29.73)	9 (25.71)		

2.7.2 合并用药

所有受试者在试验期间均有合并用药。在抗血小板治疗的合并用药方面, 有使用阿司匹林肠溶片、氯吡格雷、替格瑞洛、铝镁匹林、阿司匹林肠溶片联合氯吡格雷、阿司匹林肠溶片联合替格瑞洛、铝镁匹林联合替格瑞洛和未服用抗血小板药等 8 种形式, 其中单独使用阿司匹林肠溶片的受试者最多, 试验组占 48.65% (18/37), 对照组占 54.29% (19/35), 其次是使用阿司匹林肠溶片联合氯吡格雷的双抗疗法, 试验组占 24.32% (9/37), 对照组占 28.57% (10/35)。试验组与对照组在抗血小板治疗的合并用药方面无统计学差异 ($\chi^2=3.694$, $P = 0.814 > 0.05$)。见表 1-8。

表 1-8 两组受试者的抗血小板治疗的合并用药情况

抗血小板治疗	试验组(%)	对照组(%)	χ^2	P
阿司匹林	18 (48.65)	19 (54.29)	3.694	0.814
氯吡格雷	1 (2.70)	1 (2.86)		
替格瑞洛	1 (2.70)	0		
铝镁匹林	1 (2.70)	1 (2.86)		
阿司匹林联合氯吡格雷	9 (24.32)	10 (28.57)		
阿司匹林联合替格瑞洛	4 (10.81)	2 (5.71)		
铝镁匹林联合氯吡格雷	0	1 (2.86)		
未服用抗血小板药	3 (8.11)	1 (2.86)		

3 疗效评价

3.1 血小板聚集率

3.1.1 血小板聚集率 (AA)

试验组治疗前的血小板聚集率 (AA) 为 28.76 ± 30.96 , 治疗 12 周末的血小板聚集率 (AA) 为 16.37 ± 19.67 , 治疗前后血小板聚集率 (AA) 差值为 -12.38 ± 26.81 , 变化率为 $-9.63 \pm 49.02\%$, 治疗后试验组的血小板聚集率 (AA) 较治疗前显著降低, 差异有统计学意义 ($t = 2.263$, $P = 0.033 < 0.05$); 对照组治疗前的血小板聚集率 (AA) 为 22.01 ± 23.71 , 治疗 12 周末的血小板聚集率 (AA) 为 16.56 ± 19.51 , 治疗前后血小板聚集率 (AA) 差值为 -5.45 ± 12.96 , 变化率为 $-14.44 \pm 34.48\%$, 对照组治疗前后的血小板聚集率 (AA) 无统计学差异 ($t = 1.927$, $P = 0.068 > 0.05$)。试验组与对照组比较, 治疗前的血小板聚集率 (AA) 的差异无统计学意义 ($P = 0.422 > 0.05$); 治疗 12 周末的血小板聚集率 (AA) 的差异无统计学意义 ($P = 0.974 > 0.05$); 治疗前后血小板聚集率 (AA) 差值的差异无统计学意义 ($P = 0.287 > 0.05$); 治疗前后血小板聚集率 (AA) 变化率的差异无统计学意义 ($P = 0.709 > 0.05$)。详见表 1-9。

表 1-9 血小板聚集率 (AA) 变化情况

分组	血小板聚集率 (AA)			
	治疗前	治疗后	Δ 差值	变化率 (%)
试验组	28.76 ± 30.96	$16.37 \pm 19.67^{*}$	-12.38 ± 26.81	-9.63 ± 49.02
对照组	22.01 ± 23.71	16.56 ± 19.51	-5.45 ± 12.96	-14.44 ± 34.48
t	0.811	-0.032	-1.079	0.376
P	0.422	0.974	0.287	0.709

注: 经配对 t 检验, 与各自治疗前相比, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

3.1.2 血小板聚集率 (ADP)

试验组治疗前的血小板聚集率 (ADP) 为 49.29 ± 20.96 , 治疗 12 周末的血小板聚集率 (ADP) 为 38.23 ± 18.27 , 治疗前后血小板聚集率 (ADP) 差值为 -11.07 ± 16.60 , 变化率为 $-17.89 \pm 24.42\%$, 治疗前后试验组的血小板聚集率 (ADP) 有显著统计学差异 ($t = 3.266$, $P = 0.003 < 0.01$); 对照组治疗前的血小板聚集率

(ADP) 为 46.20 ± 19.26 , 治疗 12 周末的血小板聚集率 (ADP) 为 46.33 ± 17.02 , 治疗前后血小板聚集率 (ADP) 差值为 0.13 ± 13.81 , 变化率为 $158.24 \pm 720.45\%$, 治疗前后对照组的血小板聚集率 (ADP) 无统计学差异 ($t = -0.044$, $P = 0.966 > 0.05$)。试验组与对照组相比, 治疗前的血小板聚集率 (ADP) 的差异无统计学意义 ($P = 0.611 > 0.05$); 治疗 12 周末的血小板聚集率 (ADP) 的差异无统计学意义 ($P = 0.133 > 0.05$); 治疗前后血小板聚集率 (ADP) 差值的差异有统计学意义 ($P = 0.019 < 0.05$); 治疗前后血小板聚集率 (ADP) 变化率的差异无统计学意义 ($P = 0.237 > 0.05$)。见表 1-10。

表 1-10 血小板聚集率 (ADP) 变化情况

分组	血小板聚集率 (ADP)			
	治疗前	治疗后	Δ差值	变化率 (%)
试验组	49.29 ± 20.96	$38.23 \pm 18.27^{**}$	-11.07 ± 16.60	-17.89 ± 24.42
对照组	46.20 ± 19.26	46.33 ± 17.02	0.13 ± 13.81	158.24 ± 720.45
t	0.513	-1.532	-2.439	-1.199
P	0.611	0.133	0.019	0.237

注: 经配对 t 检验, 与各自治疗前相比, $^{*}P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

3.2 血栓弹力图

3.2.1 血栓弹力图 (AA 抑制效果)

(1) 凝血时间 (R)

试验组治疗前血栓弹力图 (AA 抑制效果) 的凝血时间 (R) 值为 7.24 ± 1.67 , 治疗 12 周末的 R 值为 8.46 ± 1.13 , 治疗前后 R 值的差值为 1.22 ± 1.01 , 变化率为 $20.88 \pm 21.53\%$, 治疗前后试验组的 R 值有显著统计学差异 ($t = -5.673$, $P < 0.001$); 对照组治疗前的 R 值为 7.69 ± 1.66 , 治疗 12 周末的 R 值为 7.46 ± 1.20 , 治疗前后 R 值的差值为 -0.23 ± 1.09 , 变化率为 $-0.87 \pm 15.09\%$, 治疗前后对照组的 R 值无显著统计学差异 ($t = 0.924$, $P = 0.367 > 0.05$)。试验组与对照组相比, 治疗前的 R 值的差异无统计学意义 ($t = -0.872$, $P = 0.388 > 0.05$); 治疗 12 周末两组的 R 值有显著统计学差异 ($t = 2.752$, $P = 0.009 < 0.01$); 治疗前后 R 值差值的差异有统计学意义 ($t = 4.426$, $P < 0.001$); 治疗前后 R 值变化率的差异有统计学意义 ($t =$

3.687, $P<0.001$)。见表 1-11。

表 1-11 凝血时间 (R) 变化情况

分组	凝血时间 (R)			
	治疗前	治疗后	Δ 差值	变化率 (%)
试验组	7.24±1.67	8.46±1.13 ^{##}	1.22±1.01	20.88±21.53
对照组	7.69±1.66	7.46±1.20	-0.23±1.09	-0.87±15.09
t	-0.872	2.752	4.426	3.687
P	0.388	0.009	<0.001	0.001

注：经配对 t 检验，与各自治疗前相比，^{*} $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

(2) 血凝块形成时间 (K)

试验组治疗前血栓弹力图 (AA 抑制效果) 的血凝块形成时间 (K) 值为 1.91±0.47，治疗 12 周末的 K 值为 2.23±0.53，治疗前后 K 值的差值为 0.32±0.64，变化率为 23.78±43.84%，治疗前后试验组的 K 值有显著统计学差异 ($t=-2.333$, $P=0.030<0.05$)；对照组治疗前的 K 值为 1.93±0.23，治疗 12 周末的 K 值为 1.98±0.30，治疗前后 K 值的差值为 0.05±0.27，变化率为 3.27±14.55%，治疗前后对照组的 K 值无显著统计学差异 ($t=-0.845$, $P=0.409>0.05$)。试验组与对照组相比，治疗前的 K 值的差异无统计学意义 ($t=-0.151$, $P=0.881>0.05$)；治疗 12 周末的 K 值的差异无统计学意义 ($t=1.809$, $P=0.078>0.05$)；治疗前后 K 值差值的差异无统计学意义 ($t=1.681$, $P=0.101>0.05$)；治疗前后 K 值变化率的差异无统计学意义 ($t=1.945$, $P=0.059>0.05$)。见表 1-12。

表 1-12 血凝块形成时间 (K) 变化情况

分组	血凝块形成时间 (K)			
	治疗前	治疗后	Δ 差值	变化率 (%)
试验组	1.91±0.47	2.23±0.53 [*]	0.32±0.64	23.78±43.84
对照组	1.93±0.23	1.98±0.30	0.05±0.27	3.27±14.55
t	-0.151	1.809	1.681	1.945
P	0.881	0.078	0.101	0.059

注：经配对 t 检验，与各自治疗前相比，^{*} $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

(3) 纤维蛋白功能 (Angle)

如表 1-13 所示, 试验组治疗前血栓弹力图 (AA 抑制效果) 的纤维蛋白功能 (Angle) 值为 62.13 ± 7.08 , 治疗 12 周末的 Angle 值为 63.77 ± 6.59 , 治疗前后 Angle 值的差值为 1.64 ± 4.25 , 变化率为 $3.03 \pm 7.61\%$, 治疗前后试验组的 Angle 值无统计学差异 ($t = -1.809$, $P = 0.085 > 0.05$); 对照组治疗前的 Angle 值为 60.36 ± 7.48 , 治疗 12 周末的 Angle 值为 62.01 ± 7.56 , 治疗前后 Angle 值的差值为 1.64 ± 8.89 , 变化率为 $3.93 \pm 16.01\%$, 治疗前后对照组的 Angle 值无显著统计学差异 ($t = -0.805$, $P = 0.431 > 0.05$)。试验组与对照组相比, 治疗前的 Angle 值的差异无统计学意义 ($t = 0.778$, $P = 0.442 > 0.05$); 治疗 12 周末的 Angle 值的差异无统计学意义 ($t = 0.800$, $P = 0.429 > 0.05$); 治疗前后 Angle 值差值的差异无统计学意义 ($t = -0.001$, $P = 1 > 0.05$); 治疗前后 Angle 值变化率的差异无统计学意义 ($t = -0.234$, $P = 0.816 > 0.05$)。

表 1-13 纤维蛋白功能 (Angle) 变化情况

分组	纤维蛋白功能 (Angle)			
	治疗前	治疗后	Δ差值	变化率 (%)
试验组	62.13 ± 7.08	63.77 ± 6.59	1.64 ± 4.25	3.03 ± 7.61
对照组	60.36 ± 7.48	62.01 ± 7.56	1.64 ± 8.89	3.93 ± 16.01
t	0.778	0.800	-0.001	-0.234
P	0.442	0.429	1	0.816

注: 经配对 t 检验, 与各自治疗前相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

(4) 血栓最大弹力度 (MA)

试验组治疗前血栓弹力图 (AA 抑制效果) 的血栓最大弹力度 (MA) 值为 62.34 ± 2.34 , 治疗 12 周末的 MA 值为 55.73 ± 7.68 , 治疗前后 MA 值的差值为 -6.61 ± 8.22 , 变化率为 $-10.45 \pm 12.91\%$, 治疗前后试验组的 MA 值有显著统计学差异 ($t = 3.773$, $P = 0.001 < 0.01$); 对照组治疗前的 MA 值为 61.97 ± 4.96 , 治疗 12 周末的 MA 值为 61.61 ± 5.49 , 治疗前后 MA 值的差值为 -0.36 ± 2.81 , 变化率为 $-0.56 \pm 4.70\%$, 治疗前后对照组的 MA 值无显著统计学差异 ($t = 0.564$, $P = 0.580 > 0.05$)。试验组与对照组相比, 治疗前的 MA 值的差异无统计学意义 ($t = 314$,

$P = 0.755 > 0.05$) ; 治疗 12 周末的 MA 值的差异有统计学意义 ($t = -2.776$, $P = 0.008 < 0.01$) ; 治疗前后 MA 值差值的差异有统计学意义 ($t = -3.154$, $P = 0.003 < 0.01$) ; 治疗前后 MA 值变化率的差异有统计学意义 ($t = -3.160$, $P = 0.003 < 0.01$) 。见表 1-14。

表 1-14 血栓最大弹力度 (MA) 变化情况

分组	血栓最大弹力度 (MA)			
	治疗前	治疗后	Δ 差值	变化率 (%)
试验组	62.34 $\pm$ 2.34	55.73 $\pm$ 7.68 ^{##}	-6.61 $\pm$ 8.22	-10.45 $\pm$ 12.91
对照组	61.97 $\pm$ 4.96	61.61 $\pm$ 5.49	-0.36 $\pm$ 2.81	-0.56 $\pm$ 4.70
t	0.314	-2.776	-3.154	-3.160
P	0.755	0.008	0.003	0.003

注：经配对 t 检验，与各自治疗前相比，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ 。

(5) 凝血幅度下降速率 (LY30)

试验组治疗前血栓弹力图 (AA 抑制效果) 的凝血幅度下降速率 (LY30) 值为 0.40 ± 1.40 ，治疗 12 周末的 LY30 值为 0.39 ± 1.40 ，治疗前后 LY30 值的差值为 -0.005 ± 0.02 ，变化率为 $-0.57 \pm 2.67\%$ ，治疗前后试验组的 LY30 值无统计学差异 ($t = 1$, $P = 0.329 > 0.05$) ; 对照组治疗前的 LY30 值为 0.54 ± 2.10 ，治疗 12 周末的 LY30 值为 0.04 ± 0.08 ，治疗前后 LY30 值的差值为 0.49 ± 2.09 ，变化率为 $-16.61 \pm 38.21\%$ ，治疗前后对照组的 LY30 值无显著统计学差异 ($t = 1.033$, $P = 0.315 > 0.05$) 。试验组与对照组相比，治疗前的 LY30 值的差异无统计学意义 ($t = -0.257$, $P = 0.799 > 0.05$) ; 治疗 12 周末的 LY30 值的差异无统计学意义 ($t = 1.083$, $P = 0.285 > 0.05$) ; 治疗前后 LY30 值差值的差异无统计学意义 ($t = 1.104$, $P = 0.277 > 0.05$) ; 治疗前后 LY30 值变化率的差异无统计学意义 ($t = 1.969$, $P = 0.056 > 0.05$) 。见表 1-15。

表 1-15 凝血幅度下降速率 (LY30) 变化情况

分组	凝血幅度下降速率 (LY30)			
	治疗前	治疗后	Δ 差值	变化率 (%)
试验组	0.40 $\pm$ 1.40	0.39 $\pm$ 1.40	-0.005 $\pm$ 0.02	-0.57 $\pm$ 2.67
对照组	0.54 $\pm$ 2.10	0.04 $\pm$ 0.08	0.49 $\pm$ 2.09	-16.61 $\pm$ 38.21
t	-0.257	1.083	1.104	1.969
P	0.799	0.285	0.277	0.056

注：经配对 t 检验，与各自治疗前相比，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

(6) 预测纤溶指数 (EPL)

试验组治疗前血栓弹力图 (AA 抑制效果) 的预测纤溶指数 (EPL) 值为 0.34 $\pm$ 1.40，治疗 12 周末的 EPL 值为 0.34 $\pm$ 1.40，治疗前后 EPL 值的差值为 0，变化率为 0；对照组治疗前的 EPL 值为 1.83 $\pm$ 7.67，治疗 12 周末的 EPL 值为 0.04 $\pm$ 0.08，治疗前后 EPL 值的差值为 1.78 $\pm$ 7.66，变化率为 -22.21 $\pm$ 42.75%，治疗前后对照组的 EPL 值无显著统计学差异 ($t = 1.016$ ， $P = 0.323 > 0.05$)。试验组与对照组相比，治疗前的 EPL 值的差异无统计学意义 ($t = -0.896$ ， $P = 0.376 > 0.05$)；治疗 12 周末的 EPL 值的差异无统计学意义 ($t = 0.913$ ， $P = 0.367 > 0.05$)；治疗前后 EPL 值差值的差异无统计学意义 ($t = 1.095$ ， $P = 0.28 > 0.05$)；治疗前后 EPL 值变化率的差异有统计学意义 ($t = 2.444$ ， $P = 0.019 < 0.05$)。见表 1-16。

表 1-16 预测纤溶指数 (EPL) 变化情况

分组	预测纤溶指数 (EPL)			
	治疗前	治疗后	Δ 差值	变化率 (%)
试验组	0.34 $\pm$ 1.40	0.34 $\pm$ 1.40	0	0
对照组	1.83 $\pm$ 7.67	0.04 $\pm$ 0.08	1.78 $\pm$ 7.66	-22.21 $\pm$ 42.75
t	-0.896	0.913	1.095	2.444
P	0.376	0.367	0.28	0.019

注：经配对 t 检验，与各自治疗前相比，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

(7) 血小板动力学指数 (TPI)

试验组治疗前血栓弹力图 (AA 抑制效果) 的血小板动力学指数 (TPI) 值为 11.10 ± 13.09 , 治疗 12 周末的 TPI 值为 12.27 ± 10.73 , 治疗前后 TPI 值的差值为 1.17 ± 8.06 , 变化率为 $162.12 \pm 519.18\%$, 治疗前后试验组的 TPI 值无统计学差异 ($t = -0.68$, $P = 0.504 > 0.05$); 对照组治疗前的 TPI 值为 14.36 ± 13.00 , 治疗 12 周末的 TPI 值为 13.41 ± 9.73 , 治疗前后 TPI 值的差值为 -0.95 ± 6.78 , 变化率为 $26.83 \pm 133.23\%$, 治疗前后对照组的 TPI 值无显著统计学差异 ($t = 0.613$, $P = 0.548 > 0.05$)。试验组与对照组相比, 治疗前的 TPI 值的差异无统计学意义 ($t = -0.797$, $P = 0.43 > 0.05$); 治疗 12 周末的 TPI 值的差异无统计学意义 ($t = -0.353$, $P = 0.726 > 0.05$); 治疗前后 TPI 值差值的差异无统计学意义 ($t = 0.903$, $P = 0.372 > 0.05$); 治疗前后 TPI 值变化率的差异无统计学意义 ($t = 1.101$, $P = 0.278 > 0.05$)。见表 1-17。

表 1-17 血小板动力学指数 (TPI) 变化情况

分组	血小板动力学指数 (TPI)			
	治疗前	治疗后	Δ差值	变化率 (%)
试验组	11.10 ± 13.09	12.27 ± 10.73	1.17 ± 8.06	162.12 ± 519.18
对照组	14.36 ± 13.00	13.41 ± 9.73	-0.95 ± 6.78	26.83 ± 133.23
t	-0.797	-0.353	0.903	1.101
P	0.43	0.726	0.372	0.278

注: 经配对 t 检验, 与各自治疗前相比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

(8) AA 抑制率 (inhibition ratio, IR)

试验组治疗前血栓弹力图 (AA 抑制效果) 的 AA 抑制率 (IR) 值为 77.78 ± 22.75 , 治疗 12 周末的 IR 值为 87.85 ± 9.52 , 治疗前后 IR 值的差值为 10.08 ± 20.89 , 变化率为 $37.55 \pm 107.43\%$, 治疗前后试验组的 IR 值有统计学差异 ($t = -2.263$, $P = 0.034 < 0.05$); 对照组治疗前的 IR 值为 78.76 ± 21.73 , 治疗 12 周末的 IR 值为 79.32 ± 20.17 , 治疗前后 IR 值的差值为 0.56 ± 10.02 , 变化率为 $1.87 \pm 16.73\%$, 治疗前后对照组的 IR 值无显著统计学差异 ($t = -0.245$, $P = 0.809 > 0.05$)。试验组与对照组相比, 治疗前的 IR 值的差异无统计学意义 ($t = -0.141$, $P = 0.889 > 0.05$); 治疗 12 周末的 IR 值的差异无统计学意义 ($t = 1.772$,

$P=0.084>0.05$)；治疗前后 IR 值差值的差异无统计学意义 ($t=1.811$, $P=0.078>0.05$)；治疗前后 IR 值变化率的差异无统计学意义 ($t=1.430$, $P=0.161>0.05$)。见表 1-18。

表 1-18 AA 抑制率变化情况

分组	AA 抑制率			
	治疗前	治疗后	Δ差值	变化率 (%)
试验组	77.78±22.75	87.85±9.52 [#]	10.08±20.89	37.55±107.43
对照组	78.76±21.73	79.32±20.17	0.56±10.02	1.87±16.73
t	-0.141	1.772	1.811	1.430
P	0.889	0.084	0.078	0.161

注：经配对 t 检验，与各自治疗前相比，[#] $P<0.05$ ，^{##} $P<0.01$ 。

3.1.2 血栓弹力图 (ADP 抑制效果)

(1) 凝血时间 (R)

试验组治疗前血栓弹力图 (ADP 抑制效果) 的凝血时间 (R) 值为 0.60 ± 0.17 ，治疗 12 周末的 R 值为 0.82 ± 0.11 ，治疗前后 R 值的差值为 -0.21 ± 0.18 ，变化率为 $-25.14\pm21.47\%$ ，治疗前后试验组的 R 值有显著统计学差异 ($t=-5.465$, $P<0.001$)；对照组治疗前的 R 值为 0.64 ± 0.23 ，治疗 12 周末的 R 值为 0.65 ± 0.15 ，治疗前后 R 值的差值为 0.02 ± 0.20 ，变化率为 $20.39\pm76.39\%$ ，治疗前后对照组的 R 值无显著统计学差异 ($t=-0.353$, $P=0.728>0.05$)。试验组与对照组相比，治疗前的 R 值的差异无统计学意义 ($t=-0.523$, $P=0.604>0.05$)；治疗 12 周末的 R 值的差异有统计学意义 ($t=4.063$, $P<0.001$)；治疗前后 R 值差值的差异有统计学意义 ($t=-3.879$, $P<0.001$)；治疗前后 R 值变化率的差异有统计学意义 ($t=-2.681$, $P=0.011<0.05$)。见表 1-19。

表 1-19 凝血时间 (R) 变化情况

分组	凝血时间 (R)			
	治疗前	治疗后	Δ差值	变化率 (%)
试验组	0.60±0.17	0.82±0.11**	-0.21±0.18	-25.14±21.47
对照组	0.64±0.23	0.65±0.15	0.02±0.20	20.39±76.39
t	-0.523	4.063	-3.879	-2.681
P	0.604	<0.001	<0.001	0.011

注：经配对 t 检验，与各自治疗前相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

(2) 血凝块形成时间 K

试验组治疗前血栓弹力图 (ADP 抑制效果) 的血凝块形成时间 (K) 值为 3.00 ± 1.21 ，治疗 12 周末的 K 值为 4.52 ± 2.19 ，治疗前后 K 值的差值为 1.52 ± 1.67 ，变化率为 $67.95\pm88.36\%$ ，试验组治疗后的 K 值较治疗前明显增加 ($t=-4.273$ ， $P<0.001$)；对照组治疗前的 K 值为 3.19 ± 1.71 ，治疗 12 周末的 K 值为 3.36 ± 1.37 ，治疗前后 K 值的差值为 0.17 ± 0.94 ，变化率为 $18.38\pm48.54\%$ ，治疗前后对照组的 K 值无显著统计学差异 ($t=-0.781$ ， $P=0.445>0.05$)。试验组与对照组相比，治疗前的 K 值的无统计学差异 ($t=-0.415$ ， $P=0.681>0.05$)；治疗 12 周末的 K 值的差异无统计学意义 ($t=1.996$ ， $P=0.053>0.05$)；治疗前后 K 值的差值有显著统计学差异 ($t=3.123$ ， $P=0.003<0.01$)；治疗前后 K 值变化率的差异无统计学意义 ($t=2.176$ ， $P=0.036<0.05$)。见表 1-20。

表 1-20 血凝块形成时间 (K) 变化情况

分组	血凝块形成时间 (K)			
	治疗前	治疗后	Δ差值	变化率 (%)
试验组	3.00±1.21	4.52±2.19**	1.52±1.67	67.95±88.36
对照组	3.19±1.71	3.36±1.37	0.17±0.94	18.38±48.54
t	-0.415	1.996	3.123	2.176
P	0.681	0.053	0.003	0.036

注：经配对 t 检验，与各自治疗前相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

(3) 纤维蛋白功能 (Angle)

试验组治疗前血栓弹力图 (ADP 抑制效果) 的纤维蛋白功能 (Angle) 值为 62.43 ± 11.34 , 治疗 12 周末的 Angle 值为 57.06 ± 17.26 , 治疗前后 Angle 值的差值为 5.36 ± 13.02 , 变化率为 $-8.78 \pm 21.02\%$, 治疗前后试验组的 Angle 值无统计学差异 ($t = 1.933$, $P = 0.067 > 0.05$); 对照组治疗前的 Angle 值为 56.95 ± 11.79 , 治疗 12 周末的 Angle 值为 54.9 ± 10.44 , 治疗前后 Angle 值的差值为 2.05 ± 10.37 , 变化率为 $-1.1 \pm 22.40\%$, 治疗前后对照组的 Angle 值无显著统计学差异 ($t = -0.861$, $P = 0.401 > 0.05$)。试验组与对照组相比, 治疗前的 Angle 值的差异无统计学意义 ($t = 1.515$, $P = 0.138 > 0.05$); 治疗 12 周末的 Angle 值的差异无统计学意义 ($t = 1.51$, $P = 0.139 > 0.05$); 治疗前后 Angle 值差值的差异无统计学意义 ($t = -0.892$, $P = 0.378 > 0.05$); 治疗前后 Angle 值变化率的差异无统计学意义 ($t = -1.132$, $P = 0.265 > 0.05$)。见表 1-21。

表 1-21 纤维蛋白功能 (Angle) 变化情况

分组	纤维蛋白功能 (Angle)			
	治疗前	治疗后	Δ 差值	变化率 (%)
试验组	62.43 ± 11.34	57.06 ± 17.26	5.36 ± 13.02	-8.78 ± 21.02
对照组	56.95 ± 11.79	54.9 ± 10.44	2.05 ± 10.37	-1.1 ± 22.40
t	1.515	1.51	-0.892	-1.132
P	0.138	0.139	0.378	0.265

注: 经配对 t 检验, 与各自治疗前相比, $^*P < 0.05$, $^{**}P < 0.01$ 。

(4) 血栓最大弹力度 (MA)

如表 1-22 所示, 试验组治疗前血栓弹力图 (ADP 抑制效果) 的血栓最大弹力度 (MA) 值为 43.7 ± 10.19 , 治疗 12 周末的 MA 值为 37.96 ± 8.49 , 治疗前后 MA 值的差值为 -5.74 ± 7.16 , 变化率为 $-11.51 \pm 15.37\%$, 治疗前后试验组的 MA 值有显著统计学差异 ($t = 3.758$, $P = 0.001 < 0.01$); 对照组治疗前的 MA 值为 39.16 ± 17.51 , 治疗 12 周末的 MA 值为 41.89 ± 15.32 , 治疗前后 MA 值的差值为 2.73 ± 14.70 , 变化率为 $36.28 \pm 133.99\%$, 治疗前后对照组的 MA 值无显著统计学差异 ($t = -0.81$, $P = 0.428 > 0.05$)。试验组与对照组相比, 治疗前的 MA 值的差异

无统计学意义 ($t=1.031$, $P=0.309>0.05$)；治疗 12 周末的 MA 值的差异无统计学意义 ($t=-1.036$, $P=0.307>0.05$)；治疗前后 MA 值差值的差异有统计学意义 ($t=-2.397$, $P=0.021<0.05$)；治疗前后 MA 值变化率的差异无统计学意义 ($t=-1.663$, $P=0.104>0.05$)。

表 1-22 血栓最大弹力度 (MA) 变化情况

分组	血栓最大弹力度 (MA)			
	治疗前	治疗后	Δ差值	变化率 (%)
试验组	43.70±10.19	37.96±8.49 ^{##}	-5.74±7.16	-11.51±15.37
对照组	39.16±17.51	41.89±15.32	2.73±14.70	36.28±133.99
t	1.031	-1.036	-2.397	-1.663
P	0.309	0.307	0.021	0.104

注：经配对 t 检验，与各自治疗前相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

(5) 凝血幅度下降速率 (LY30)

试验组治疗前血栓弹力图 (ADP 抑制效果) 的凝血幅度下降速率 (LY30) 值为 0.05 ± 0.06 ，治疗 12 周末的 LY30 值为 0.08 ± 0.13 ，治疗前后 LY30 值的差值为 0.03 ± 0.13 ，变化率为 0，治疗前后试验组的 LY30 值无统计学差异 ($t=-1$, $P=0.329>0.05$)；对照组治疗前的 LY30 值为 0.03 ± 0.06 ，治疗 12 周末的 LY30 值为 0.07 ± 0.14 ，治疗前后 LY30 值的差值为 0.04 ± 0.14 ，变化率为 0，治疗前后对照组的 LY30 值无显著统计学差异 ($t=-1.161$, $P=0.261>0.05$)。试验组与对照组相比，治疗前的 LY30 值的差异无统计学意义 ($t=0.996$, $P=0.325>0.05$)；治疗 12 周末的 LY30 值的差异无统计学意义 ($t=0.208$, $P=0.836>0.05$)；治疗前后 LY30 值差值的差异无统计学意义 ($t=-0.23$, $P=0.819>0.05$)。见表 1-23。

表 1-23 凝血幅度下降速率 (LY30) 变化情况

分组	凝血幅度下降速率 (LY30)			
	治疗前	治疗后	Δ 差值	变化率 (%)
试验组	0.05 $\pm$ 0.06	0.08 $\pm$ 0.13	0.03 $\pm$ 0.13	0
对照组	0.03 $\pm$ 0.06	0.07 $\pm$ 0.14	0.04 $\pm$ 0.14	0
t	0.996	0.208	-0.23	-
P	0.325	0.836	0.819	-

注：经配对 t 检验，与各自治疗前相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

(6) 预测纤溶指数 (EPL)

试验组治疗前血栓弹力图 (ADP 抑制效果) 的预测纤溶指数 (EPL) 值为 0.04 ± 0.05 ，治疗 12 周末的 EPL 值为 0.04 ± 0.05 ，治疗前后 EPL 值的差值为 0，变化率为 0；对照组治疗前的 EPL 值为 0.06 ± 0.14 ，治疗 12 周末的 EPL 值为 0.09 ± 0.30 ，治疗前后 EPL 值的差值为 0.04 ± 0.34 ，变化率为 $-5.56 \pm 23.57\%$ ，治疗前后对照组的 EPL 值无显著统计学差异 ($t = -0.479$, $P = 0.638 > 0.05$)。试验组与对照组相比，治疗前的 EPL 值的差异无统计学意义 ($t = -0.536$, $P = 0.595 > 0.05$)；治疗 12 周末的 EPL 值的差异无统计学意义 ($t = -0.843$, $P = 0.405 > 0.05$)；治疗前后 EPL 值差值的差异无统计学意义 ($t = -0.516$, $P = 0.609 > 0.05$)；治疗前后 EPL 值变化率的差异无统计学意义 ($t = 1.109$, $P = 0.274 > 0.05$)。见表 1-24。

表 1-24 预测纤溶指数 (EPL) 变化情况

分组	预测纤溶指数 (EPL)			
	治疗前	治疗后	Δ 差值	变化率 (%)
试验组	0.04 $\pm$ 0.05	0.04 $\pm$ 0.05	0	0
对照组	0.06 $\pm$ 0.14	0.09 $\pm$ 0.30	0.04 $\pm$ 0.34	-5.56 $\pm$ 23.57
t	-0.536	-0.843	-0.516	1.109
P	0.595	0.405	0.609	0.274

注：经配对 t 检验，与各自治疗前相比，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

(7) 血小板动力学指数 (TPI)

如表 1-25 所示, 试验组治疗前血栓弹力图 (ADP 抑制效果) 的血小板动力学指数 (TPI) 值为 19.05 ± 11.65 , 治疗 12 周末的 TPI 值为 19.75 ± 9.15 , 治疗前后 TPI 值的差值为 0.70 ± 6.55 , 变化率为 $28.71 \pm 130.45\%$, 治疗前后试验组的 TPI 值无统计学差异 ($t = -0.504, P = 0.619 > 0.05$); 对照组治疗前的 TPI 值为 18.84 ± 11.24 , 治疗 12 周末的 TPI 值为 18.02 ± 8.94 , 治疗前后 TPI 值的差值为 -0.82 ± 8.68 , 变化率为 $32.93 \pm 7.99\%$, 治疗前后对照组的 TPI 值无显著统计学差异 ($t = 0.412, P = 0.685 > 0.05$)。试验组与对照组相比, 治疗前的 TPI 值的差异无统计学意义 ($t = 0.059, P = 0.953 > 0.05$); 治疗 12 周末的 TPI 值的差异无统计学意义 ($t = 0.613, P = 0.543 > 0.05$); 治疗前后 TPI 值差值的差异无统计学意义 ($t = 0.64, P = 0.526 > 0.05$); 治疗前后 TPI 值变化率的差异无统计学意义 ($t = 1.017, P = 0.316 > 0.05$)。

表 1-25 血小板动力学指数 (TPI) 变化情况

分组	血小板动力学指数 (TPI)			
	治疗前	治疗后	Δ差值	变化率 (%)
试验组	19.05 ± 11.65	19.75 ± 9.15	0.70 ± 6.55	28.71 ± 130.45
对照组	18.84 ± 11.24	18.02 ± 8.94	-0.82 ± 8.68	32.93 ± 7.99
t	0.059	0.613	0.64	1.017
P	0.953	0.543	0.526	0.316

注: 经配对 t 检验, 与各自治疗前相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。

(8) ADP 抑制率 (inhibition ratio, IR)

试验组治疗前血栓弹力图 (ADP 抑制效果) 的 ADP 抑制率 (IR) 值为 33.95 ± 17.02 , 治疗 12 周末的 IR 值为 61.90 ± 27.12 , 治疗前后 IR 值的差值为 27.95 ± 24.91 , 变化率为 $104.44 \pm 126.30\%$, 治疗前后试验组的 IR 值有显著统计学差异 ($t = -5.263, P < 0.001$); 对照组治疗前的 IR 值为 43.85 ± 33.65 , 治疗 12 周末的 IR 值为 34.26 ± 27.44 , 治疗前后 IR 值的差值为 -9.59 ± 29.37 , 变化率为 $-4.92 \pm 77.28\%$, 治疗前后对照组的 IR 值无显著统计学差异 ($t = 1.424, P = 0.172 > 0.05$)。试验组与对照组相比, 治疗前的 IR 值的差异无统计学意义

($t=-1.213$, $P=0.232>0.05$); 治疗 12 周末的 IR 值的差异有统计学意义($t=3.237$, $P=0.002<0.01$); 治疗前后 IR 值差值的差异有统计学意义($t=4.430$, $P<0.001$); 治疗前后 IR 值变化率的差异有统计学意义($t=3.278$, $P=0.002<0.01$)。见表 1-26。

表 1-26 ADP 抑制率变化情况

分组	ADP 抑制率			
	治疗前	治疗后	Δ 差值	变化率(%)
试验组	33.95 $\pm$ 17.02	61.90 $\pm$ 27.12**	27.95 $\pm$ 24.91	104.44 $\pm$ 126.30
对照组	43.85 $\pm$ 33.65	34.26 $\pm$ 27.44	-9.59 $\pm$ 29.37	-4.92 $\pm$ 77.28
t	-1.213	3.237	4.430	3.278
P	0.232	0.002	<0.001	0.002

注: 经配对 t 检验, 与各自治疗前相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

3.2.3 血栓弹力图(常规凝血功能)

试验组治疗前血栓弹力图(常规凝血功能)的凝血指数(CI)为-0.50 $\pm$ 2.18, 治疗 12 周末的 CI 值为-0.75 $\pm$ 2.02, 治疗前后 CI 值的差值为-0.25 $\pm$ 1.28, 变化率为-41.14 $\pm$ 106.46%, 治疗前后试验组的 CI 值无统计学差异($t=1.032$, $P=0.311>0.05$); 对照组治疗前的 CI 值为-1.28 $\pm$ 3.44, 治疗 12 周末的 CI 值为-1.24 $\pm$ 3.54, 治疗前后 CI 值的差值为 0.03 $\pm$ 2.43, 变化率为-47.69 $\pm$ 162.61%, 治疗前后对照组的 CI 值无显著统计学差异($t=-0.071$, $P=0.944>0.05$)。试验组与对照组相比, 治疗前的 CI 值的差异无统计学意义($t=1.01$, $P=0.317>0.05$); 治疗 12 周末的 CI 值的差异无统计学意义($t=0.643$, $P=0.523>0.05$); 治疗前后 CI 值差值的差异无统计学意义($t=-0.543$, $P=0.589>0.05$); 治疗前后 CI 值变化率的差异无统计学意义($t=0.174$, $P=0.862>0.05$)。见表 1-27。

表 1-27 凝血指数 (CI) 变化情况

分组	凝血指数 (CI)			
	治疗前	治疗后	Δ差值	变化率 (%)
试验组	-0.50±2.18	-0.75±2.02	-0.25±1.28	-41.14±106.46
对照组	-1.28±3.44	-1.24±3.54	0.03±2.43	-47.69±162.61
t	1.01	0.643	-0.543	0.174
P	0.317	0.523	0.589	0.862

注：经配对 t 检验，与各自治疗前相比，*P<0.05，**P<0.01。

3.3 气虚血瘀证证候评分

如表 1-28 和表 1-29 所示，试验组治疗前（访视 1）的气虚血瘀证证候评分为 8.27±1.26，对照组评分为 8.34±1.00，两组的评分无统计学差异（P=0.79>0.05）；试验组治疗 8 周末（访视 2）的评分为 4.76±0.93，对照组评分为 8.00±0.87，两组的差异有统计学意义（P<0.001）；治疗 12 周末（访视 3），试验组评分为 2.46±1.07，对照组评分为 8.03±1.27，两组结果有显著统计学差异（P<0.001）；访视 2 与访视 1 的试验组评分差值为-3.51±1.45，差异有显著统计学意义（P<0.001）。访视 3 与访视 1 的试验组评分差值为-5.81±1.52，差异有显著统计学意义（P<0.001）；访视 2 与访视 1 的对照组评分差值为-0.34±1.21，差异无统计学意义（P=0.10>0.05）。访视 3 与访视 1 的对照组评分差值为-0.31±1.60，差异无统计学意义（P=0.26>0.05）；此外，访视 2 与访视 1 的试验组评分差值与对照组评分差值比较，差异有显著统计学意义（P<0.001），访视 3 与访视 1 的试验组评分差值与对照组评分差值比较，亦有显著统计学差异（P<0.001）。

表 1-28 两组受试者的气虚血瘀证证候评分比较

分组	气虚血瘀证证候评分			差值	
	访视 1	访视 2	访视 3	访视 2-访视 1	访视 3-访视 1
试验组	8.27±1.26	4.76±0.93	2.46±1.07	-3.51±1.45	-5.81±1.52
对照组	8.34±1.00	8.00±0.87	8.03±1.27	-0.34±1.21	-0.31±1.60
t	-0.27	-15.27	-20.15	-10.06	-14.91
P	0.79	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

表 1-29 两组受试者的气虚血瘀证证候评分变化情况

分组	试验组	对照组	分组	试验组	对照组
访视 1	8.27±1.26	8.34±1.00	访视 1	8.27±1.26	8.34±1.00
访视 2	4.76±0.93	8.00±0.87	访视 3	2.46±1.07	8.03±1.27
t	14.78	1.68	t	23.18	1.16
P	<0.001	0.10	P	<0.001	0.26

4 安全性评价

4.1 不良事件

在为期 12 周的干预时间内，试验组共 6 例受试者发生 7 例次不良事件，不良事件发生率为 16.22% (6/37)，无严重不良事件和不良反应；对照组共 3 例受试者发生 4 例次不良事件，不良事件发生率为 8.57% (3/35)，其中 1 例次为严重不良事件，无不良反应。组间比较，试验组和对照组的不良事件 ($P = 0.327 > 0.05$) 和严重不良事件 ($P = 0.300 > 0.05$) 发生情况的差异均无统计学意义。见表 1-30。

试验组发生的不良事件中，2 例次与肝胆疾病相关，发生率为 5.41% (2/37)，这两例次均出现谷丙转氨酶 (ALT) 和谷草转氨酶 (AST) 升高，给予治疗后仍未痊愈，考虑与研究药物可能有关。2 例次与免疫疾病相关，发生率为 5.41% (2/37)，其中 1 例次发生过敏反应，经治疗后痊愈，考虑与研究药物可能有关；另 1 例次表现为过敏性皮炎，经治疗后痊愈，与研究药物无关。2 例次与代谢性疾病相关，发生率为 5.41% (2/37)，其中 1 例次表现为血糖升高，给予降糖药物治疗后痊愈，与研究药物无关；另 1 例次为血脂异常，给予降脂药治疗后血脂降至正常，与研究药物无关。1 例次发生咽痛，发生率为 2.70% (1/37)，经治疗后痊愈，与研究药物无关。

对照组发生的不良事件中，1 例次为严重不良事件，发生率为 2.86% (1/35)，为右眼老年性白内障，经治疗后痊愈，与试验药物无关。1 例次与神经系统疾病有关，发生率为 2.86% (1/35)，为用药 2 个月左右出现头晕，未采取其他措施，

转归为痊愈，考虑与研究药物可能有关。2 例次与代谢性疾病相关，发生率为 5.71% (2/35)，其中 1 例次为高尿酸血症，最终转归是未愈，考虑与研究用药可能有关；另 1 例次是血脂升高，经饮食、运动调理后痊愈，与研究药物无关。

表 1-30 不良事件发生情况

项目	试验组 (n = 37)			对照组 (n = 35)			χ^2	P
	例数	发生率 (%)	例次	例数	发生率 (%)	例次		
不良事件	6	16.22	7	3	8.57	4	0.961	0.327
严重不良事件	0	0	0	1	2.86	1	1.072	0.300

4.2 实验室检查

在 12 周的干预周期内，两组受试者出现实验室指标异常共有 18 例次，其中试验组 10 例次，包括 4 例次尿酸升高、2 例次谷草转氨酶升高、2 例次谷丙转氨酶升高和 2 例次尿糖 (+++); 对照组 8 例次，包括 2 例次肾小球滤过率降低、2 例次尿酸升高、1 例次谷草转氨酶升高、1 例次肌酐升高、1 例次尿隐血 (+) 和 1 例次尿糖 (+++)

4.3 心电图检查

治疗前 (访视 1) 和治疗 12 周末 (访视 3) 的心电图检查结果显示：所有受试者在治疗前后均为窦性心律。

治疗前试验组受试者 5.41% (2/37) 有心律失常，5.41% (2/37) 有 ST 改变，对照组受试者均无 ST 改变，5.71% (2/35) 有心律失常，组间比较，试验组与对照组在心律失常发生方面 ($P = 0.954 > 0.05$) 和 ST 改变方面 ($P = 0.163 > 0.05$) 均无统计学差异。

治疗 12 周末，试验组受试者 5.41% (2/37) 有心律失常，10.81% (4/37) 有 ST 改变，对照组受试者 8.57% (3/35) 有心律失常，2.86% (1/35) 出现 ST 改变；组间比较，试验组与对照组在心律失常发生方面无统计学差异 ($P = 0.597 > 0.05$)，在 ST 改变方面，两组之间亦无统计学差异 ($P = 0.589 > 0.05$)。见表 1-31。

表 1-31 心电图检查情况

访视	心律失常				ST 改变			
	试验组 (%)	对照组 (%)	χ^2	P	试验组 (%)	对照组 (%)	χ^2	P
访视 1	2 (5.41)	2 (5.71)	0.003	0.954	2 (5.41)	0	1.946	0.163
访视 3	2 (5.41)	3 (8.57)	0.279	0.597	2 (5.71)	1 (2.86)	0.292	0.589

4.4 生命体征

4.4.1 体温

试验组访视 1 的体温为 $36.26 \pm 0.22^\circ\text{C}$ ，访视 2 的体温为 $36.35 \pm 0.17^\circ\text{C}$ ，访视 3 的体温为 $36.39 \pm 0.19^\circ\text{C}$ ；对照组访视 1 的体温为 $36.3 \pm 0.22^\circ\text{C}$ ，访视 2 的体温为 $36.41 \pm 0.17^\circ\text{C}$ ，访视 3 的体温为 $36.40 \pm 0.15^\circ\text{C}$ 。试验组与对照组相比，访视 1 时体温无统计学差异 ($P = 0.432 > 0.05$)，访视 2 时体温无统计学差异 ($P = 0.158 > 0.05$)，访视 3 时体温无统计学差异 ($P = 0.899 > 0.05$)。见表 1-32。

表 1-32 试验期间体温变化

访视	分组		t	P
	试验组 ($^\circ\text{C}$)	对照组 ($^\circ\text{C}$)		
访视 1	36.26 ± 0.22	36.3 ± 0.22	-0.791	0.432
访视 2	36.35 ± 0.17	36.41 ± 0.17	-1.429	0.158
访视 3	36.39 ± 0.19	36.40 ± 0.15	-0.127	0.899

4.4.2 心率

试验组访视 1 的心率为 70.14 ± 9.56 次/分，访视 2 的心率为 68.46 ± 6.88 次/分，访视 3 的心率为 68.24 ± 8.77 次/分；对照组访视 1 的心率为 70.37 ± 8.67 次/分，访视 2 的心率为 71.09 ± 9.28 次/分，访视 3 的心率为 69.14 ± 7.18 次/分。试验组与对照组比较，访视 1 时心率无统计学差异 ($P = 0.913 > 0.05$)，访视 2 时心率无统计学差异 ($P = 0.175 > 0.05$)，访视 3 时心率无统计学差异 ($P = 0.637 > 0.05$)。见表 1-33。

表 1-33 试验期间心率变化

访视	分组		t	P
	试验组 (次/分)	对照组 (次/分)		
访视 1	70.14±9.56	70.37±8.67	-0.11	0.913
访视 2	68.46±6.88	71.09±9.28	-1.369	0.175
访视 3	68.24±8.77	69.14±7.18	-0.475	0.637

4.4.3 呼吸

试验组访视 1 的呼吸为 17.32±1.18 次/分, 访视 2 的呼吸为 17.11±0.66 次/分, 访视 3 的呼吸为 17.19±0.84 次/分; 对照组访视 1 的呼吸为 17.06±1.30 次/分, 访视 2 的呼吸为 17.20±0.76 次/分, 访视 3 的呼吸为 17.34±0.73 次/分。试验组与对照组相比, 访视 1 时呼吸频率的差异无统计学意义 ($P = 0.365 > 0.05$), 访视 2 时呼吸频率的差异无统计学意义 ($P = 0.584 > 0.05$), 访视 3 时呼吸频率的差异无统计学意义 ($P = 0.412 > 0.05$)。见表 1-34。

表 1-34 试验期间呼吸频率变化

访视	分组		t	P
	试验组 (次/分)	对照组 (次/分)		
访视 1	17.32±1.18	17.06±1.30	0.912	0.365
访视 2	17.11±0.66	17.20±0.76	-0.55	0.584
访视 3	17.19±0.84	17.34±0.73	-0.826	0.412

4.4.4 血压

试验组访视 1 的舒张压为 76.05±8.79mmHg, 访视 2 的舒张压为 75.57±6.87mmHg, 访视 3 的舒张压为 75.32±8.44mmHg; 对照组访视 1 的舒张压为 78.91±9.58mmHg, 访视 2 的舒张压为 76.91±7.41mmHg, 访视 3 的舒张压为 77.37±7.16mmHg。试验组与对照组比较, 访视 1 时舒张压的差异无统计学意义

($P = 0.191 > 0.05$)，访视 2 时舒张压的差异无统计学意义 ($P = 0.426 > 0.05$)，访视 3 时舒张压的差异无统计学意义 ($P = 0.272 > 0.05$)。见表 1-35。

试验组访视 1 的收缩压为 $126.49 \pm 13.67 \text{ mmHg}$ ，访视 2 的收缩压为 $124.68 \pm 11.38 \text{ mmHg}$ ，访视 3 的收缩压为 $124.49 \pm 13.15 \text{ mmHg}$ ；对照组治疗前的收缩压为 $122.77 \pm 16.91 \text{ mmHg}$ ，访视 2 的收缩压为 $124.09 \pm 11.70 \text{ mmHg}$ ，访视 3 的收缩压为 $120.83 \pm 12.01 \text{ mmHg}$ 。试验组与对照组比较，访视 1 时收缩压的差异无统计学意义 ($P = 0.308 > 0.05$)，访视 2 时两组的收缩压亦无统计学差异 ($P = 0.829 > 0.05$)，访视 3 时收缩压的差异无统计学意义 ($P = 0.223 > 0.05$)。见表 1-36。

表 1-35 试验期间舒张压变化

访视	分组		t	P
	试验组 (mmHg)	对照组 (mmHg)		
访视 1	76.05 ± 8.79	78.91 ± 9.58	-1.321	0.191
访视 2	75.57 ± 6.87	76.91 ± 7.41	-0.8	0.426
访视 3	75.32 ± 8.44	77.37 ± 7.16	-1.107	0.272

表 1-36 试验期间收缩压变化

访视	分组		t	P
	试验组 (mmHg)	对照组 (mmHg)		
访视 1	126.49 ± 13.67	122.77 ± 16.91	1.028	0.308
访视 2	124.68 ± 11.38	124.09 ± 11.70	0.217	0.829
访视 3	124.49 ± 13.15	120.83 ± 12.01	1.231	0.223

5 讨论

血小板活化在 SCAD 的发生发展过程中起关键作用，也是影响其预后的重要因素之一^[21]。因此，抗血小板治疗是 SCAD 二级预防的基本策略。目前临床常用的抗血小板药物包括 TXA₂ (Thromboxane A₂) 抑制剂、ADP (Adenosine diphosphate) 受体 P2Y₁₂ 抑制剂、GPIIb/IIIa 拮抗剂、PAR-1(Protease-activated receptors-1)受体拮抗剂等^[22]。抗血小板药可显著改善冠心病患者预后，但也存在

剂量依赖性出血风险、再发血栓性事件、胃肠道不良反应及药物抵抗等问题^[23-25]，这极大地限制了它的临床应用，且易导致患者依从性差，使得患者无法最终获益。因此，充分发挥中医药多靶点、毒副作用小等优势，挖掘能有效抑制血小板活性的中药，对于改善冠心病预后至关重要。

稳定性冠心病是由于冠状动脉粥样硬化导致管腔狭窄或冠状动脉痉挛引起心肌供氧不足，供血能力下降而引发的心脏病，可归属于中医“胸痹”、“心痹”、“心痛”等范畴。“胸痹”一词最早见于《黄帝内经·灵枢》：“肺大则多饮，善病胸痹，喉痹，逆气”。《素问·脏气法时论》曰：“心病者，胸中痛……胁下痛，膺背肩胛间痛，两臂内痛”。《金匱要略·胸痹心痛短气病脉证治》云：“胸痹之病，喘息咳唾，胸背痛，短气……关上小紧数”，可见胸痹是以胸中痛、痛引肩背、短气、甚则喘息不能平卧为主症。《金匱要略·胸痹心痛短气病脉证治》云：“阳微阴弦，即胸痹而痛，所以然者，责其极虚也……所以胸痹、心痛者，以其阴弦故也”，医圣张仲景强调胸痹的病机为阳微阴弦，即胸痹的发生责之胸中阳气不足而阴邪偏盛，是属本虚标实。后世医家也多强调胸痹的病机当属本虚标实，以气虚为本，血瘀为标。正如《灵枢·经脉》所云：“手少阴气绝，则脉不通，脉不通则血不流”。清代王清任《医林改错》云：“元气即虚，必不能达于血管……血管无气，必停留而瘀”，他正式提出气虚致瘀的病机理论，即气虚不能鼓动血脉，以致血运迟缓，聚而生瘀。

益气活血法是中医治疗 SCAD 的主要治法。有研究表明，益气活血方药能有效抑制冠心病患者的血小板聚集，改善心功能，抑制心室重构，降低 MACE 发生率^[26]。愈心痛胶囊是由陈可冀院士团队研发的用于治疗 SCAD 的益气活血代表性方药，由红参、三七、延胡索组成，具有益气活血、通脉止痛的功效，用于劳累型冠心病心绞痛证属气虚血瘀的患者，症见胸部刺痛或绞痛，痛有定处，胸闷气短，倦怠乏力。方中红参味甘、微苦，性微温，归脾、肺经，能大补元气以固本，使气旺以促血行，祛瘀而不伤正，《神农本草经》云：“主补五脏，安精神，定魂魄，止惊悸”；三七味甘、微苦，性温，归肝、胃经，可活血化瘀，祛瘀生新，黄元御《玉楸药解》言：“和营止血，通脉行瘀”；延胡索味辛、苦，性温，归心、肝、脾经，能通脉止痛，李中梓《雷公炮制药性解》言其“一切因血作痛之证并治”。三味温药合用，能益气温阳治其本，活血化瘀祛其标，标本

兼顾，攻补兼施，相得益彰。现代中药药理研究结果显示：红参、三七、延胡索等均有明显的扩张冠状动脉，降低冠脉阻力，解除血管痉挛，增加冠脉血流量，改善微循环的作用^[27-29]。此外，红参还具有强心作用，能增加心肌糖原的核糖、核酸的含量，改善缺血心肌的合成代谢，从而为缺血性心肌提供物质基础^[30]。人参皂苷、红参总皂苷均为红参的主要活性成分，其中人参皂苷的粗皂苷部分（Crude saponin fraction, CSF）具有较强的抗血小板活性，它以浓度依赖的方式强烈抑制胶原诱导的血小板聚集和 ATP 释放，其机制可能是通过抑制 ERK1/2、p38、JNK、PI3K、Akt 和 M1/2 的磷酸化^[31]。红参总皂苷（Total saponin from Korean red ginseng, TSKRG）通过抑制血小板微粒体中环氧化酶（COX-1）和 TXA₂ 合酶（TXAS）的活性，抑制血栓素 A₂（TXA₂）的产生，从而减轻血小板活化、聚集介导的血栓性疾病^[32]。三七总皂苷（Panax notoginseng saponins, PNS）是三七的有效活性成分之一，PNS 含有多种单体成分，如人参皂苷 Rg1、Rb1、Rb2、Rb3、Rd、Re、Rc 以及三七皂苷 R1、R2、R3、R6 等，有研究证实 PNS 及其主要成分 Rg1 和 Rd 能直接抑制血小板聚集，且能显著增强心肌梗死损伤中内皮细胞的迁移和血管生成^[33]。延胡索作为活血止痛药的典型代表，在治疗血栓相关疾病方面的研究越来越受到人们重视。其中脱氢紫堇碱、四氢小檗碱、延胡索甲素、延胡索乙素、四氢黄连碱和海罂粟碱是延胡索抗血小板聚集的主要活性成分^[34]。谭程宁^[35]通过差异蛋白质组学研究发现脱氢紫堇碱可能通过与 ADP 受体 P2Y₁ 和 P2Y₁₂ 的结合发挥作用，且最有可能通过 RHO 介导的细胞骨架相关通路抑制血小板聚集；四氢小檗碱则可能通过影响 PAR1 的表达并介导其下游信号传导来调节血小板聚集活性。杨娟^[36]证明延胡索乙素能通过抑制内皮细胞凋亡，有效延长 PT 和 APTT，并较好地抑制凝血酶和 ADP 诱导的血小板聚集，从而抑制血栓形成。上述基础研究表明，愈心痛胶囊的有效活性成分能通过扩张冠状动脉、改善心肌代谢、抑制血小板活化和聚集等方面有效治疗 SCAD，且多项临床研究亦证实愈心痛胶囊能明显 SCAD 患者的症状和心电图结果，并能降低血液黏度以改善血液流变学^[11, 37]。上市 10 余年来，多个随机对照试验研究亦证实其在缓解冠心病患者临床症状、改善预后方面疗效显著。

血小板聚集是由钙（Ca²⁺）、纤维蛋白原与血小板膜糖蛋白 IIb/IIIa（Glycoprotein IIb/IIIa, GPIIb/IIIa）等物质介导的血小板相互黏着的生理反应^[38]。

在生理情况下,血小板聚集可介导凝血过程,有利于维持血管内皮的完整性,但在血管内皮损伤,应激反应,血压、血脂升高等病理状态下,血小板聚集率则会异常升高,即出现血小板反应性异常增高,这是导致冠心病血栓事件形成的主要危险因素之一,也是一项重要而独立的预测因素^[39]。一项纳入 219 例冠心病行择期经皮冠脉介入术(PCI)患者的前瞻性队列研究应用多种方法检测血小板聚集率来评价阿司匹林和氯吡格雷双联抗血小板治疗期间的血小板反应性,研究结果显示存在血小板高反应的患者的缺血性卒中、支架血栓、非致死性急性心肌梗死和全因死亡的复合终点事件发生率较血小板低反应的患者明显升高^[40]。Marcucci 等进一步证实急性冠状动脉综合征患者用阿司匹林和氯吡格雷双联抗血小板治疗期间 ADP 残余血小板反应性的升高与心血管死亡和非致死性心肌梗死风险独立相关^[41]。以上研究结果说明即使积极给予双联抗血小板药物治疗,部分患者的血小板反应性仍可能较高,说明心血管事件的发生风险仍较大。因此,积极探索具有抗血小板聚集作用的中药对解决这一临床难题意义重大。

血小板聚集率通常采用光学比浊法测定,检测的原理是在富血小板血浆中加入诱导剂(AA 或 ADP)诱导血小板聚集,浊度变低,透光度增高,前后浊度的变化通过电脑软件转换为电信号并且记录、计算血小板聚集率,测定值反映血小板在体内对抗血小板药物的反应性,测定值越低说明药物对血小板聚集功能的抑制作用越强^[42]。

血栓弹力图(TEG)是血栓弹力图仪描绘出的特殊曲线,工作原理是置于血样标本检测杯中的金属针由于血凝块形成和溶解过程中的应切力作用而摆动,金属针旋转产生的信号经电脑软件处理,绘出血块强度随时间变化的曲线,反映血液凝固动态变化的指标,能较快、直观地体现血液系统的功能状态^[43]。TEG 是一种新型的床旁血小板功能检测方法,可得到的主要指标有凝血时间(R)、血凝块形成时间(K)、纤维蛋白功能(Angle)、血栓最大弹力度(MA)、凝血幅度下降速率(LY30)、预测纤溶指数(EPL)、血小板动力学指数(TPI)、凝血指数(CI)、AA 抑制率以及 ADP 抑制率。其中 R 值反映的是内源性凝血过程第一期,是指凝血过程启动到纤维蛋白凝块形成的时间,正常范围为 5~10 min, R 值越小说明凝血因子活性越高,血液呈高凝状态; K 值反映的是内源性凝血过程第二期,是指纤维蛋白形成和交叉连接致血栓形成达到固定弹性黏度

(20 mm 的振幅)所需的时间, K 值越小说明纤维蛋白的含量越高, 血小板的功能越强, SCAD 患者血液中纤维蛋白水平升高则凝血速度加快, 因此 K 值可以作为其发生 MACE 的预测因子之一^[44]; Angle 是指从血凝块形成点至 TEG 最大曲线弧度作切线与水平线的夹角, 反映在血凝块形成过程中的动力学变化, 与血栓形成速度和纤维蛋白含量成正比; MA 值是指 TEG 两条曲线之间的最宽距离, 反映血液的凝固状态, 即血栓的绝对强度, MA 值升高说明机体内血小板的功能不断强化, 血小板的凝集作用加速, 同时血栓形成加速, 因此 MA 值可作为评估患者血栓负荷的有效指标^[45]; LY30 是最大振幅后 30 分钟的振幅衰减率, 即凝血幅度下降速率, 反映纤维蛋白溶解的速度, 若 LY30>7.5%, 提示纤溶功能亢进; EPL 值是预测最大振幅后 30 min 内血栓将要溶解的百分率, 反映纤维蛋白溶解速率, 若 EPL>15%, 提示纤溶功能亢进; TPI 是相对弹性切应力除以血凝块形成时间的动力学特性, 反映血小板的凝血功能情况; CI 反映凝血的综合状态, 其正常范围是-3.0~3.0, CI>3.0, 提示血液处于高凝状态; CI<-3.0, 提示血液处于低凝状态^[44]。AA 抑制率、ADP 抑制率分别指的是抗血小板药物对花生四烯酸和二磷酸腺苷通道的血小板抑制率, 可用于指导用药方案的选择。

本研究结果显示: 与治疗前相比, 治疗 12 周后试验组 AA 诱导的血小板聚集率和 ADP 诱导的血小板聚集率均明显降低, 差异有统计学意义, 而对照组在 AA 和 ADP 诱导的血小板聚集率方面均无统计学差异, 这说明在愈心痛胶囊有较强的血小板聚集抑制作用。在 AA 和 ADP 诱导的两种血栓弹力图测试方面, 治疗 12 周末试验组的凝血时间(R)均较对照组显著延长, 且与治疗前相比也显著延长, 差异均有显著统计学意义, 说明愈心痛胶囊能显著抑制凝血因子活性, 改善 SCAD 患者血液的高凝状态。此外, 两种血栓弹力图测试结果均显示治疗 12 周后试验组的血凝块形成时间(K)较治疗前显著延长, 差异有统计学意义, 其中 ADP 诱导的血栓弹力图还显示治疗 12 周后试验组的 K 值较对照组显著增大, 差异临近统计学意义, 且试验组 K 值治疗前后的变化量和变化率均较对照组显著增加, 差异均有统计学意义, 这提示愈心痛胶囊能显著延长血凝块形成时间, 说明其能有效降低纤维蛋白含量, 从而抑制血小板的凝血功能, 对预防 MACE 事件的发生有重要意义。AA 和 ADP 诱导的两种血栓弹力图测试结果均显示治疗 12 周末试验组的血栓最大弹力度(MA)较治疗前显著降低, 差异有统计学

意义,且 AA 诱导的血栓弹力图结果还表明治疗后试验组的 MA 值较对照组显著降低,这说明愈心痛胶囊抑制了血小板的凝集作用,从而减慢了血栓形成,减轻了患者的血栓负荷。AA 诱导的血栓弹力图测试表明治疗 12 周后试验组 AA 抑制率较治疗前显著增加,而对照组与治疗前相比无明显变化,说明愈心痛胶囊可能通过作用于花生四烯酸通道发挥抗血小板作用,并能增强血栓素 A_2 (TXA_2) 抑制剂的抗血小板作用。ADP 诱导的血栓弹力图测试结果显示在 ADP 抑制率方面,在治疗 12 周末,试验组较对照组明显增加,且试验组 ADP 抑制率的变化量和变化率均较对照组增加,差异有统计学意义,此外,试验组治疗后的 ADP 抑制率较治疗前亦显著增加,说明愈心痛胶囊能通过作用于二磷酸腺苷通道发挥抗血小板作用,且能增强 P2Y₁₂ 受体抑制剂的抗血小板作用。

在中医证候评分方面,与治疗前相比,治疗 8 周末和治疗 12 周末试验组的气虚血瘀证证候评分均明显降低,差异均有统计学意义,而对照组无明显改变。此外,在治疗 8 周末和治疗 12 周末,试验组的评分显著低于对照组,差异有统计学意义,以上结果显示愈心痛胶囊能显著降低 SCAD 患者的气虚血瘀证证候评分,说明愈心痛胶囊在改善 SCAD 症状方面疗效显著。

6 小结

本研究从探索中成药制剂愈心痛胶囊对 SCAD 患者血小板功能影响的临床实践出发,研究结果显示愈心痛胶囊能显著降低 SCAD 患者的血小板聚集率,并可延长患者的凝血时间和血凝块形成时间,降低血栓最大弹力度,以及增加 AA 抑制率和 ADP 抑制率,这些结果说明愈心痛胶囊能通过抑制血小板的活化和聚集,从而抑制血小板的凝血功能,改善患者的高凝状态和血栓负荷。此外,愈心痛胶囊与 P2Y₁₂ 受体抑制剂或 TXA_2 抑制剂联用时能增强其抗血小板疗效,这为克服临床上使用阿司匹林、氯吡格雷、普拉格雷等抗血小板药物带来的剂量依赖性出血、药物抵抗、胃肠道不良反应等副作用提供了中西医结合诊疗思路。在中医证候评分方面,愈心痛胶囊能显著降低气虚血瘀证证候评分,说明愈心痛胶囊对 SCAD 患者的胸痛、胸闷、心悸、气短等症状的改善疗效明显。

综上所述,愈心痛胶囊能够调节 SCAD 患者血小板的活性,抑制血小板凝血功能的过度增强。

第二章 愈心痛胶囊对低剪切应力的影响

近年来,随着我国社会经济的发展 and 人口结构的变化,冠心病的发病率和死亡率在逐年攀升。动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)是冠心病的重要病理基础,而低剪切应力(Low shear stress, LSS)导致 AS 形成的关键原因。剪切应力是血液在血管内流动时与管壁摩擦产生的一种平行于血流方向的切向应力。剪切应力的大小主要由最大血流速度(V_m)、血管内径(D_r)和血液黏度(η)决定,其正常范围通常为 $5\sim 25\text{ dyne/cm}^2$ 。本研究采用部分左颈动脉结扎的方法构建低剪切应力大鼠模型,从低剪切应力部位的血流速度、血管内径和血液黏度三个方面,评价愈心痛胶囊对 LSS 的药效作用。

1 实验材料

1.1 实验动物

健康成年 SD 大鼠 60 只, SPF 级, 体重 200~220 克, 8~9 周龄, 购自北京斯贝福实验动物科技有限公司, 许可证号: SYXK(京)2018-0018。饲养于中国中医科学院西苑医院 SPF 级实验动物中心, 自由进食、饮水, 昼夜交替 12 小时(早 8 点开灯, 晚 8 点关灯)。饲养温度为 $22\pm 2^\circ\text{C}$, 湿度为 $50\%\pm 10\%$ 。动物实验由中国中医科学院西苑医院医学伦理委员会批准(2022XLC050-1)。

1.2 实验药物及配制

愈心痛胶囊(国药准字 Z20020089, 生产企业: 大连胜光药业集团有限公司, 规格: $0.33\text{g}\times 24$ 粒), 由人参、三七、延胡索组成。阿司匹林肠溶片(国药准字 HJ20160685, 生产企业: Bayer HealthCare Manufacturing S.r.l, 规格: $100\text{mg}\times 30$ 片)。

配制愈心痛胶囊药液: 精密称取愈心痛胶囊粉末 20 mg, 加入 20 mL 蒸馏水中, 用超声处理 20 分钟后置于室温下静置 10 分钟, 通过 $0.22\text{ }\mu\text{m}$ 滤膜得到愈心痛胶囊提取物的试验溶液, 4°C 冰箱保存。

配制阿司匹林药液: 取阿司匹林肠溶片(100mg)置于研钵中研碎, 加入 100 mL 蒸馏水中, 用超声处理 30 min 后即得到阿司匹林混悬液, 4°C 冰箱保存。

1.3 实验试剂及仪器

1) 戊巴比妥钠: 武汉金诺化工有限责任公司;

- 2) 4%多聚甲醛固定液: 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 3) 肝素: 华润博雅生物制药集团股份有限公司;
- 4) 苏木精伊红染色试剂盒: 中国碧云天生物技术有限公司;
- 5) 天狼星红染液: 中国碧云天生物技术有限公司;
- 6) Mayer 苏木素染液: 中国碧云天生物技术有限公司;
- 7) 柠檬酸钠: 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 8) GPIIb/IIIa抗体: 美国 Proteintech 公司;
- 9) 高分辨率小动物超声影像系统: Vevo 1100 TM 型, 加拿大 Visual sonics 公司;
- 10) 全自动血液流变学分析仪: 上海普利生机电科技有限公司;
- 11) XL 自动染色机: 德国 Leica 公司;
- 12) 光学显微镜: Olympus BX53 型, 日本 Olympus 公司;
- 13) 低温离心机: 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;
- 14) 切片机: 德国 Leica 公司;
- 15) 数字病理图像分析平台: HALO, 美国 Lndica Labs 公司;
- 16) 酶标仪: 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;
- 17) -80℃超低温冰箱: 中国海尔公司;
- 18) 电热鼓风干燥箱: 陕西瑞铨星仪器制造有限公司;
- 19) 电子分析天平: 上海花潮实业有限公司。

2 实验方法

2.1 实验分组与给药

所有大鼠适应性喂养 1 周后, 按随机数字表法将其分为 6 组: 假手术组 (Sham)、模型组 (Model)、愈心痛胶囊低剂量组 (YXTC-L)、愈心痛胶囊中剂量组 (YXTC-M)、愈心痛胶囊高剂量组 (YXTC-H) 和阿司匹林组 (Aspirin)。愈心痛胶囊临床用量为每次 4 粒 ($4 \times 0.33\text{g}$), 每日 3 次, 计算得每日总用药量为 3.96g 。愈心痛胶囊低、中、高剂量组大鼠按临床等效剂量^[46]分别给予 YXTC 低 (0.18g/kg)、中 (0.36g/kg)、高 (0.72g/kg) 剂量。阿司匹林肠溶片临床用量为 100mg/日 , 换算成大鼠的等效给药剂量为 4.5mg/kg 。假手术组和模型组大鼠每日灌胃等量无菌蒸馏水。所有大鼠均持续给药治疗 8 周。

2.2 动物模型的构建

本研究通过部分左颈动脉结扎手术建立低剪切应力 (Low shear stress, LSS) 大鼠模型。术前一周, 使用普通饲料进行适应性喂养, 自由饮水。术前 12 小时禁食、不禁水。手术当天进行大鼠腹腔注射麻醉 (1.5%戊巴比妥钠, 30 mg/kg), 待完全麻醉后将大鼠腹侧朝上固定于手术操作台上, 使用 3 号缝合线套于大鼠上门齿并向上收紧以保证颈部的完全暴露, 然后用脱毛膏脱去颈部绒毛并进行消毒。沿颈部中线剪开颈部皮肤, 小心剥离颈部肌肉及结缔组织并暴露气管, 避免损伤血管或喉返神经。沿气管左侧找到左颈总动脉及伴行迷走神经, 分离左颈总动脉 (Left common carotid artery, LCCA), 然后沿血管朝头部方向分离左颈动脉各分支, 包括颈内动脉 (Internal carotid artery, ICA)、颈外动脉 (External carotid artery, ECA)、枕动脉 (Occipital artery, OA) 及甲状腺上动脉 (Superior thyroid artery, STA)。保留靠近气管的 STA, 以保证仍有少量血液流通, 其余 3 个分支用 9-0 号手术线结扎, 同时, 分离对侧右颈总动脉 (Right common artery, RCA) 及其分支, 但不进行后续结扎操作。结扎完成后使用少量庆大霉素注射液清理伤口, 然后进行连续缝合并清理创面。假手术组采用相同方法, 不结扎动脉。术后将大鼠放回鼠笼, 注意保暖并观察大鼠体征直至其苏醒。

2.3 血流动力学的测定

治疗 8 周后, 所有大鼠使用加拿大 Visual Sonic 公司的 Vevo 1100 高分辨率多普勒超声仪对 LCCA 进行超声检测。用异氟烷气体麻醉大鼠, 并放置在恒温加热板上。用 3 号缝线将上门牙置于大鼠上方, 向上收紧, 确保颈部完全暴露, 用脱毛膏去除颈部毛发并消毒。然后充分涂抹耦合剂, 待大鼠心率稳定后, 用小动物超声 MS250 探头沿左颈动脉走行观察, 获得 LCCA 血管长轴后, 测量 LCCA 血流, 得到左心室舒张末期左颈总动脉内径 (Dr) 和 LCCA 的收缩期峰值血流速度 (Vm), 取 3 个心动周期平均值。

2.4 血液流变学的检测

治疗 8 周后, 腹腔注射 1.5%戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉大鼠。每只大鼠经腹主动脉取 3mL 血, 置于肝素抗凝管中充分混合, 用全自动血液流变学分析仪测定全血黏度 (η)。

2.5 血流剪切应力的计算

根据血流剪切应力公式: $\tau_m = 4 \times \eta \times V_m / D_r$, D_r 为 LCCA 左室舒张末期内径, V_m 为收缩期峰值血流速度, η 为全血黏度, 计算左颈动脉的血流剪切应力。

2.6 颈动脉的组织病理学评估

2.6.1 标本的获取

六组大鼠在连续灌胃 8 周后分别取 3 只大鼠, 腹腔注射 1.5% 戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉大鼠, 然后进行腹主动脉法采血。采血后从大鼠心尖处注射 PBS 液体灌洗血管和组织, 继而用 4% 多聚甲醛固定液充分灌注。随后立即剥离结扎处下游的 LCCA, 置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 小时, 石蜡块包埋。将组织切成 4 μ m 切片, 脱蜡后进行苏木精-伊红 (HE) 染色和天狼星红 (Sirius red) 染色。

2.6.2 HE 染色

由 Leica XL 自动染色机自动染色, 具体步骤如下:

- (1) 烤片: 将石蜡切片置于烘箱中以 60°C 烘烤 60 min;
- (2) 脱蜡: 二甲苯 I 和二甲苯 II, 各 10 min;
- (3) 至水: 依次于无水乙醇 I, 无水乙醇 II, 95% 乙醇, 80% 乙醇和 70% 乙醇中各浸泡 5 min, 自来水冲洗 2 min;
- (4) 染核: 苏木素染液, 10 min, 自来水冲洗 10 min;
- (5) 分化: 95% 酒精, 5 s, 自来水冲洗 5 min;
- (6) 返蓝: 0.2% 氨水, 自来水冲洗 5 min;
- (7) 染色: 伊红染液, 1~3 min;
- (8) 脱水: 70% 乙醇、80% 乙醇、95% 乙醇和无水乙醇, 各 2 min;
- (9) 透明: 二甲苯 I 和二甲苯 II, 各 5 min;
- (10) 封片: 中性树胶封片。

2.6.3 天狼星红染色

具体操作步骤如下:

- (1) 烤片: 将石蜡切片置于烘箱中以 60°C 烘烤 60 min;
- (2) 脱蜡: 二甲苯 I 和二甲苯 II, 各 10 min;
- (3) 至水: 依次于无水乙醇 I, 无水乙醇 II, 95% 乙醇, 80% 乙醇和 70% 乙醇中各浸泡 5 min, 自来水冲洗 2 min;
- (4) 染色: 天狼星红饱和苦味酸染液染色 1 h, 自来水冲洗 5 min $\times$ 2 次;

- (5) 染核: Mayer 苏木素染液复染 1 min, 自来水冲 10 min;
- (6) 脱水: 70%乙醇、80%乙醇、95%乙醇和无水乙醇, 各 2 min;
- (7) 透明: 二甲苯I和二甲苯II, 各 5 min;
- (8) 封片: 中性树胶封片。

2.6.4 图像采集和分析

在光镜下观察颈动脉组织的病理变化, 并获得图像。最后用 HALO 数字病理图像分析平台分析图像并进行统计分析。通过 HE 染色计算左颈总动脉的内-中膜厚度 (Inner-media thickness, IMT) 及其管腔横截面积 (Sectional area, S)。通过天狼星红染色观察颈动脉组织的胶原纤维组织变化情况, 并计算胶原纤维面积及其占比。

2.7 统计分析

所有数据均采用均值±标准差 ($\bar{X} \pm S$) 表示。多组间比较, 若符合正态分布采用单因素方差分析, 若不符合正态分布, 采用非参数的秩和检验。所有统计分析均采用 IBM SPSS 统计软件 20.0 版 (IBM 公司, Armonk, NY, USA) 进行。 $P < 0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 愈心痛胶囊对 LSS 模型大鼠左颈总动脉血流情况的影响

如图 2-1 所示, 与 Sham 组相比, Model 组大鼠左侧颈总动脉血流速度明显降低, 且血流方向呈双向紊乱; 与模型组相比, 愈心痛低、中、高剂量组的左颈总动脉血流速度均有改善, 血流方向呈正常的单向血流。图 2-2 关于各组大鼠收缩期峰值血流速度的比较结果显示, 与 Sham 组相比, Model 组的左颈总动脉最大血流速度明显降低 ($P < 0.01$), 与 Model 组相比, YXTC-M ($P < 0.05$) 和 YXTC-H ($P < 0.01$) 及 Aspirin ($P < 0.01$) 的左颈总动脉最大血流速度均显著升高。

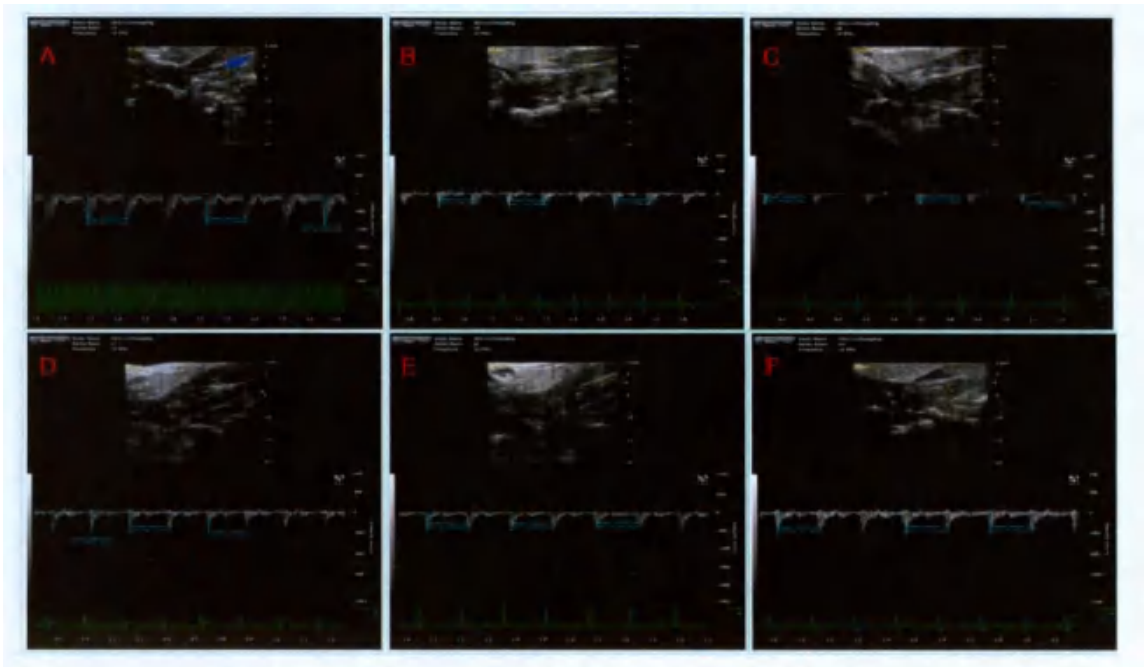


图 2-1 各组大鼠左颈总动脉血流速度超声图

A, Sham; B, Model; C, YXTC-L; D, YXTC-M; E, YXTC-H; F, Aspirin.

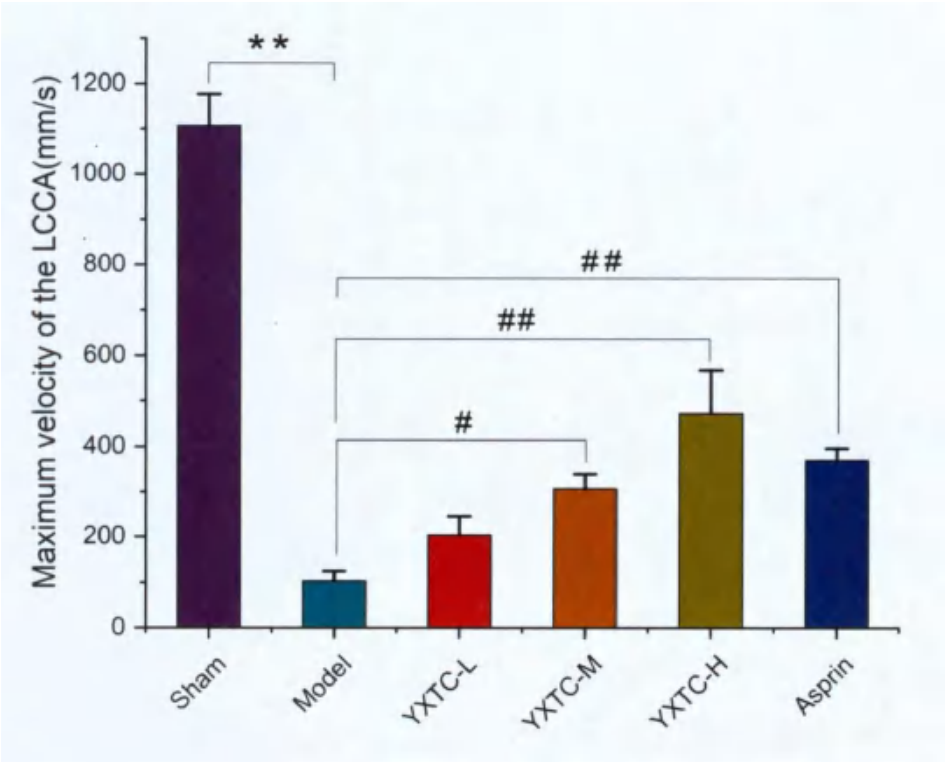


图 2-2 各组大鼠左颈总动脉收缩期峰值血流速度比较
与 Sham 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Model 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

3.2 愈心痛胶囊对 LSS 模型大鼠左颈总动脉内径的影响

如图 2-3~图 2-4 所示, 与 Sham 组相比, Model 组的左颈总动脉舒张末期内径减小 ($P<0.01$); 与 Model 组相比, YXTC-H 组 ($P<0.01$) 大鼠的左颈总动脉舒张末期内径显著增大, 而 YXTC-L、YXTC-M 和 Aspirin 组均无明显改变。

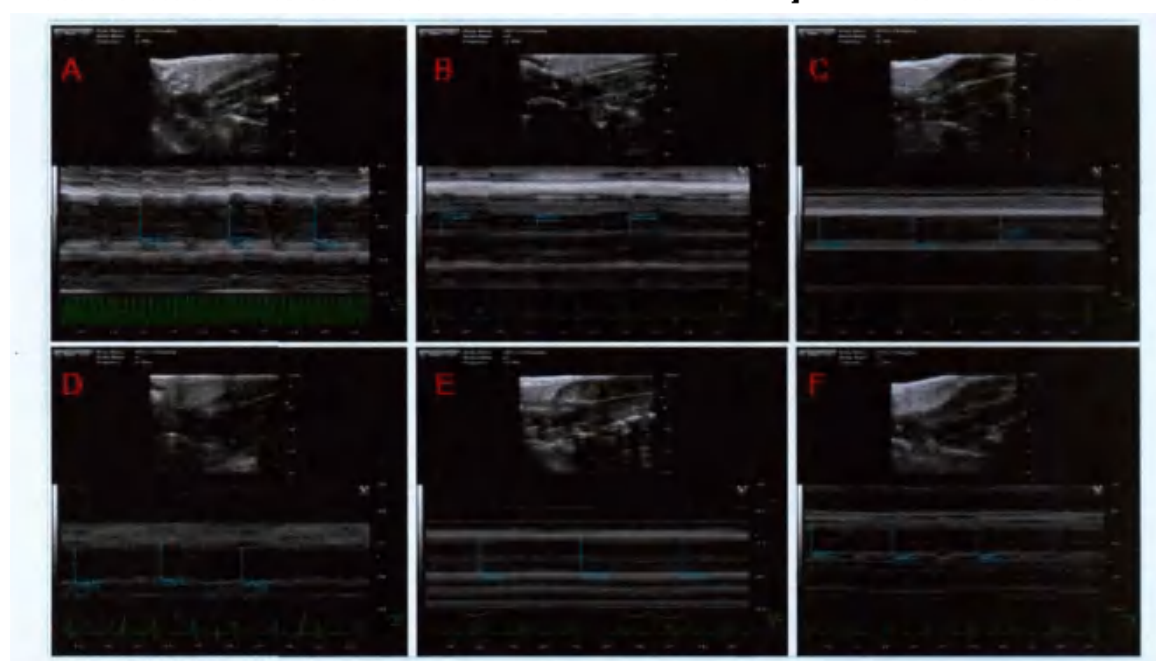


图 2-3 各组大鼠左颈总动脉舒张末期内径超声图

A, Sham; B, Model; C, YXTC-L; D, YXTC-M; E, YXTC-H; F, Aspirin

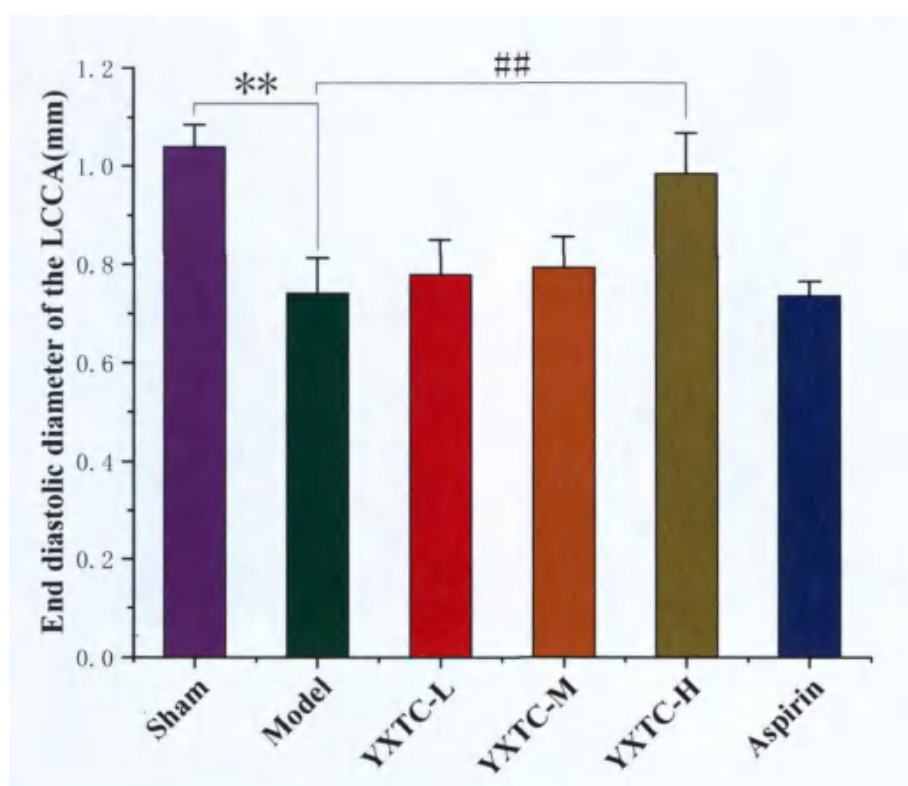


图 2-4 各组大鼠左颈总动脉舒张末期内径比较
与 Sham 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Model 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

3.3 愈心痛胶囊对 LSS 模型大鼠全血黏度的影响

如图 2-5 所示, 与 Sham 组相比, Model 组的全血黏度无明显改变 ($P>0.05$); 与 Model 组相比, YXTC-L 组大鼠的全血黏度显著降低 ($P<0.05$), 然而 YXTC-M 组、YXTC-H 组和 Aspirin 组大鼠的全血黏度均无明显改变 ($P>0.05$)。

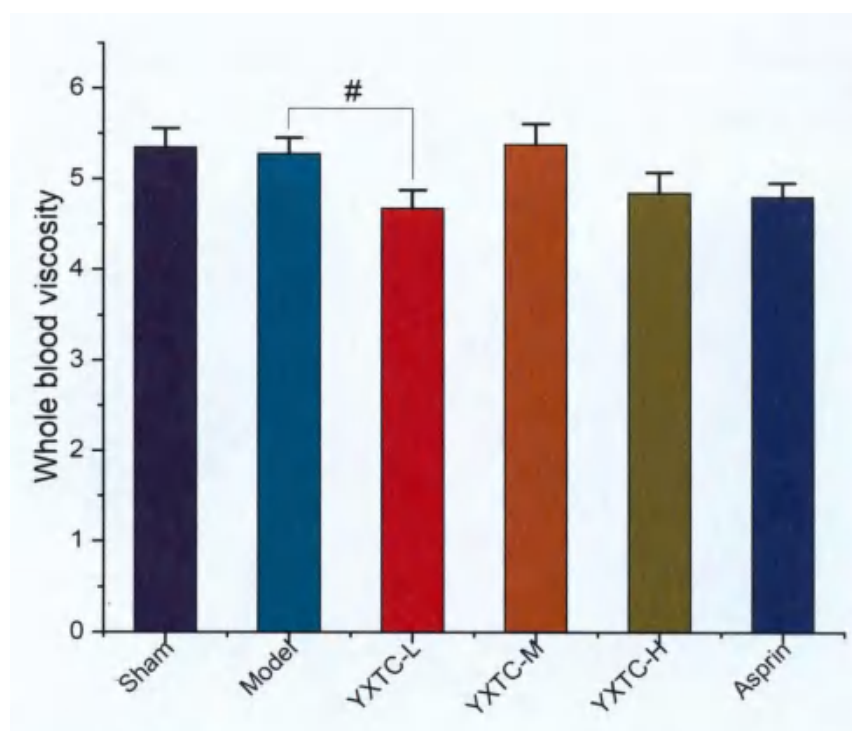


图 2-5 各组大鼠全血黏度比较

与 Sham 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Model 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

3.4 愈心痛胶囊对 LSS 模型大鼠颈总动脉血流剪切应力的影响

如图 2-6 所示, 与 Sham 组相比, Model 组大鼠左颈总动脉的血流剪切应力显著降低 ($P<0.01$); 与 Model 组相比, YXTC-M 组 ($P<0.01$) 和 YXTC-H 组 ($P<0.01$) 及 Aspirin 组 ($P<0.01$) 大鼠的左颈总动脉血流剪切应力均明显升高。

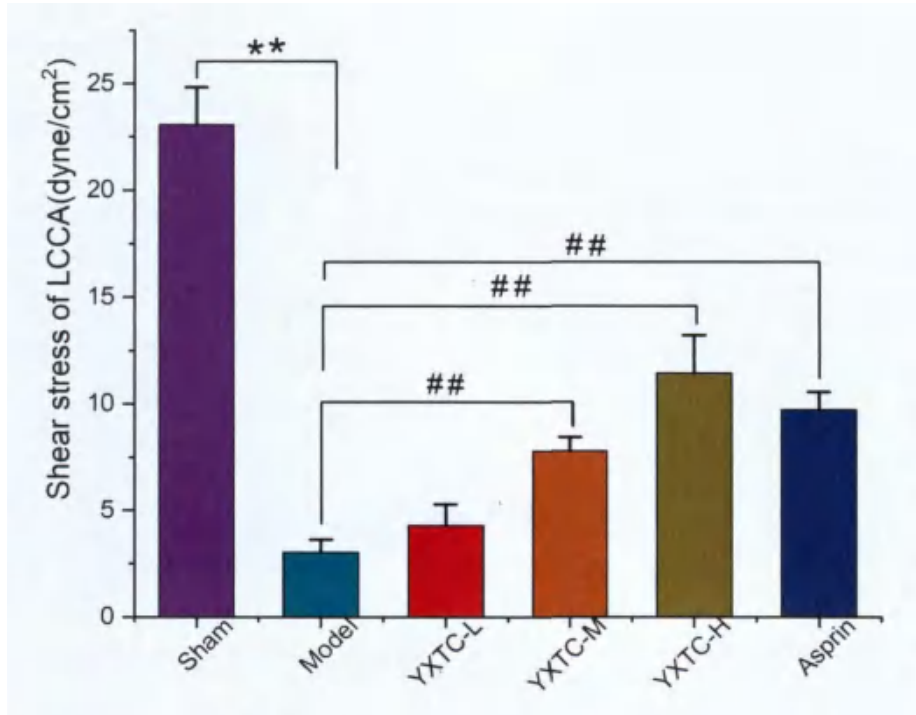


图 2-6 各组大鼠左颈总动脉血流剪切应力比较

与 Sham 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Model 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

3.5 愈心痛胶囊对 LSS 模型大鼠颈总动脉病理组织学的影响

(1) HE 染色

如图 2-7 所示, Sham 组颈总动脉内皮细胞排列整齐、形态结构完整、细胞大小正常、核仁清晰;与 Sham 组相比, Model 组左颈总动脉低剪切应力部位的血管内皮细胞排列紊乱、边界模糊,且炎性浸润明显,平滑肌层排列紊乱,外膜结缔组织层也伴大量炎性细胞浸润。与 Model 组比较, YXTC-L 组和 YXTC-M 组的血管内皮炎性损伤减轻不明显,形态结构稍有改善,但平滑肌层仍排列较紊乱。YXTC-H 组和 Aspirin 组的血管内皮炎性浸润明显减轻,核仁清晰,平滑肌层排列整齐,胶原纤维增生显著减少。如图 2-8 和表 2-1 所示,在左颈总动脉管壁厚度方面,与 Sham 组相比, Model 组显著增厚 ($P<0.01$),可能系内皮细胞损伤后,炎性浸润增多或血液中血小板黏附于内皮细胞增加所致;与 Model 组相比, YXTC-L、YXTC-H 和 Aspirin 组均有降低趋势,但无统计学意义 ($P>0.05$)。

在左颈总动脉管腔横截面积方面，与 Sham 组相比，Model 组管腔横截面积有增大的趋势，差异无统计学意义 ($P>0.05$)，与 Model 组相比，YXTC-L 组、YXTC-M 组、YXTC-H 组和 Aspirin 组的管腔横截面积均有不同程度的减少，但差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

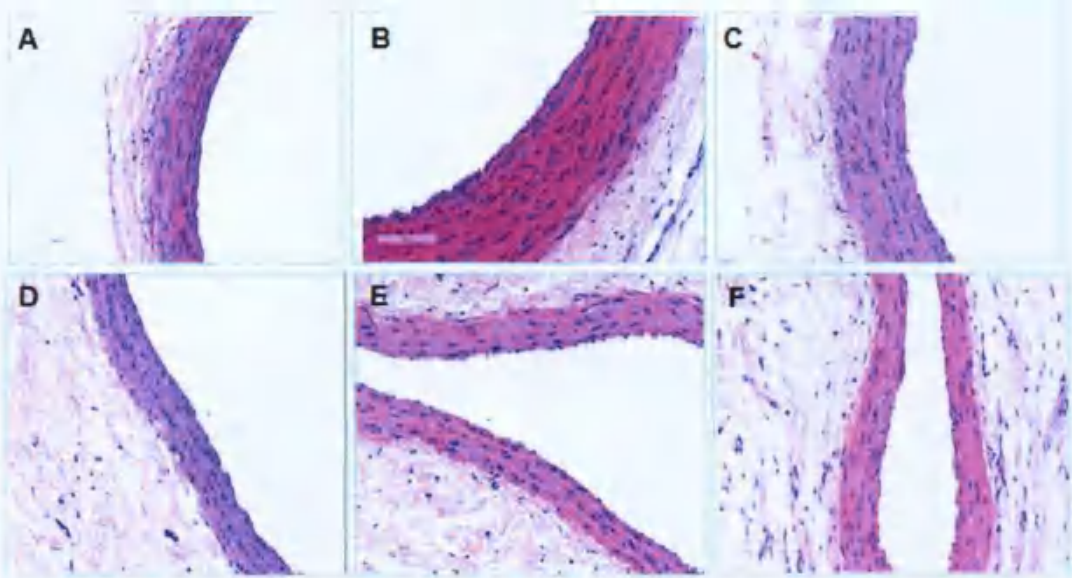


图 2-7 各组大鼠左颈总动脉 HE 染色 ($\times 200$)

A, Sham; B, Model; C, YXTC-L; D, YXTC-M; E, YXTC-H; F, Aspirin

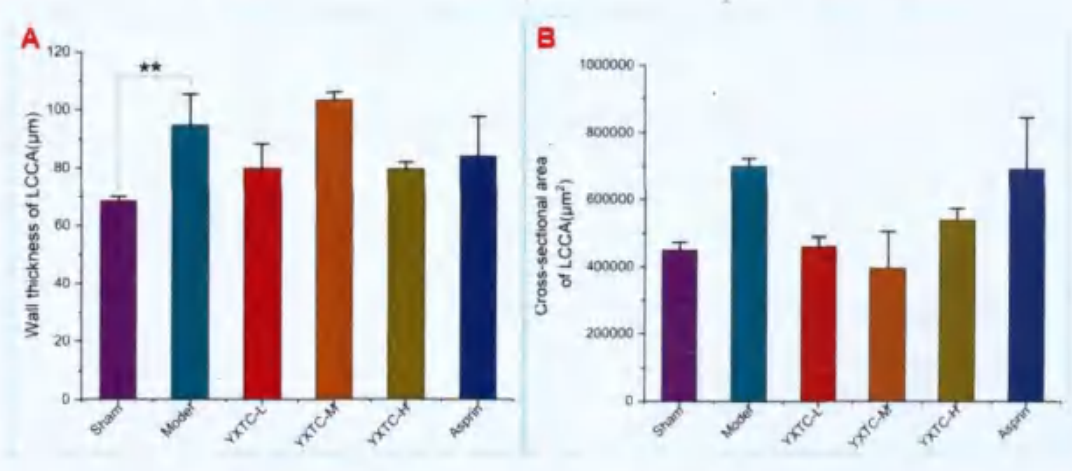


图 2-8 各组大鼠左颈总动脉管壁厚度和管腔横截面积比较

与 Sham 组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与 Model 组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

表 2-1 各组大鼠左颈总动脉管壁厚度和管腔横截面积比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

组别	左颈总动脉管壁厚度 (μm)	左颈总动脉管腔横截面积 (μm^2)
假手术组 (Sham)	68.23 $\pm$ 1.66	450360.74 $\pm$ 23714.06
模型组 (Model)	94.74 $\pm$ 10.35**	698838.63 $\pm$ 23714.06
愈心痛低剂量 (YXTC-L)	79.65 $\pm$ 8.52	459993.17 $\pm$ 29604.92
愈心痛中剂量 (YXTC-M)	103.10 $\pm$ 2.72	395338.97 $\pm$ 108429.51
愈心痛高剂量 (YXTC-H)	79.41 $\pm$ 2.35	537161.05 $\pm$ 35999.96
阳性药组 (Aspirin)	83.80 $\pm$ 13.72	690485.85 $\pm$ 153974.00

注: 与 Sham 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Model 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

(2) 天狼星红染色

图 2-9 为左颈总动脉的天狼星红染色, 结果显示, 与 Sham 组相比, Model 组胶原纤维组织分布疏松、广泛, 遍布于颈总动脉血管的平滑肌层和内皮细胞层。与 Model 组相比, YXTC-L 组, YXTC-M 组, YXTC-H 组和 Aspirin 组的胶原纤维水平均有一定程度的减轻, 其中 YXTC-H 组和 Aspirin 组改善最明显, 血管壁胶原纤维含量明显减少。表 2-2 为各组大鼠胶原纤维半定量分析, 与 Sham 组相比, Model 组的胶原纤维含量明显增多 ($P<0.01$), 与 Model 组相比, YXTC-L 和 YXTC-H 以及 Aspirin 组的胶原纤维含量均显著降低 ($P<0.01$), YXTC-M 亦较模型组减少, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

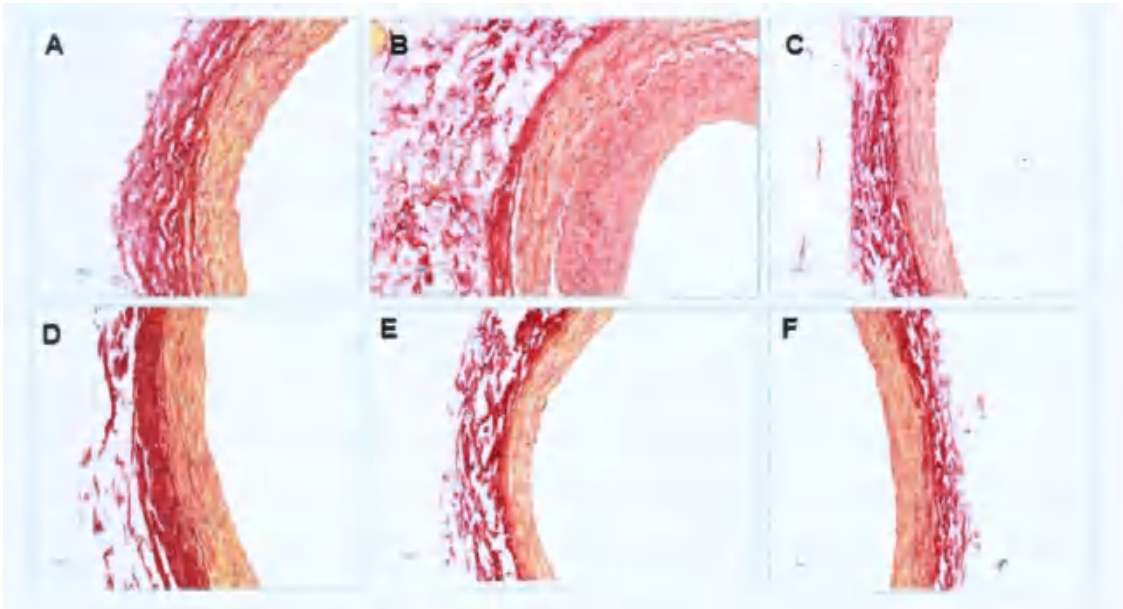


图 2-9 各组大鼠左颈总动脉天狼星红染色 ($\times 400$)

A, Sham; B, Model; C, YXTC-L; D, YXTC-M; E, YXTC-H; F, Aspirin

表 2-2 各组大鼠左颈总动脉天狼星红染色的胶原纤维面积及其占比 ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

组别	胶原纤维面积 (μm^2)	胶原纤维面积占比 (%)
假手术组 (Sham)	753533.49 $\pm$ 251419.96	28.86 $\pm$ 6.48
模型组 (Model)	3900734.71 $\pm$ 925163.37**	32.52 $\pm$ 3.35
愈心痛低剂量 (YXTC-L)	597794.52 $\pm$ 123982.30**	29.87 $\pm$ 1.12
愈心痛中剂量 (YXTC-M)	1866114.08 $\pm$ 372793.80*	31.57 $\pm$ 1.30
愈心痛高剂量 (YXTC-H)	492596.38 $\pm$ 72910.99**	35.63 $\pm$ 0.81
阳性药组 (Aspirin)	1039380.25 $\pm$ 285830.63**	36.61 $\pm$ 3.00

注: 与 Sham 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Model 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

4 讨论

动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 是稳定性冠心病 (Stable coronary artery disease, SCAD) 的重要病理基础, 占心血管疾病死亡人数的 61%^[47]。AS 是一个慢性进行性的病理过程, 内皮损伤、炎症反应、氧化应激和脂质沉积共同驱动 AS 的发生发展, 其典型特征是在血管壁上形成富含脂质 (主要是胆固醇) 的斑块, 使动脉变硬变窄, 导致局部血流状况发生显著变化^[48]。大量研究发现, 动脉粥样硬化好发于动脉的分支处、狭窄部位以及冠状动脉的弯曲段, 这些部位都存在明显的血流动力学异常, 这与动脉粥样硬化斑块形成和内膜壁增厚有关。在大动脉分叉处血流模式由稳定的层流向不稳定的湍流转化会导致局部形成低剪切应力和振荡剪切应力^[49-51]。稳定的层流处产生的正常血流剪切应力范围为 15~70 dynes/cm², 这些部位内皮细胞完整, 能保障 NO、前列环素生成和内皮生长等功能的正常表达, 维持内皮的稳态, 使内皮细胞沿着血流方向拉长, 并抑制血小板的聚集和黏附。湍流等非层流状态下产生的异常剪切应力低于 4 dynes/cm², 当内皮长期暴露于这种低剪切应力 (Low shear stress, LSS) 时, 内皮细胞的排列方向会发生改变, 导致内皮活性增强, NO 产生减少, 多种信号通路被激活, ROS、内皮生长因子、促炎因子以及血小板活化分子和黏附分子等表达增多, 促进血小板黏附于受损内皮细胞及细胞外基质, 从而导致血栓形成和动脉粥样硬化的发生^[52]。

临床研究已证实局部血流动力学因素是动脉粥样硬化斑块进展、血管重构和 SCAD 患者临床表现的重要决定因素。一项基于 SCAD 患者的在体研究表明, 血管的低剪切应力部位往往出现冠状动脉斑块进展和血管重构的发生^[53]。采用二维

冠状动脉造影和血管内超声重建左前降支的三维解剖结构,评价 65 例非阻塞性冠状动脉粥样硬化(管腔直径狭窄<30%)患者冠状动脉段的内皮剪切应力(Endothelial shear stress, ESS),结果显示微血管功能异常的冠状动脉段 ESS 较微血管功能正常动脉段低,心外膜内皮功能异常的动脉冠状动脉段的 ESS 也明显低于心外膜功能正常的动脉段,且无论患者的心外膜内皮功能正常与否,若伴有微血管内皮功能异常则冠状动脉段的平均 ESS 和 LSS 呈进行性下降^[54]。以上研究结果说明低剪切应力导致内皮损伤是动脉粥样硬化发生的关键始动环节。

愈心痛胶囊(Yuxintong Capsule, YXTC)是临床治疗 SCAD 的有效方剂,由红参、三七、延胡索三味中药组成。网络药理学研究分析发现红参、延胡索和三七总皂苷(PNS)等均能调控流体剪切应力通路,抑制动脉粥样硬化的发生^[55-57]。此外,PNS 能通过改善 LSS 抑制血小板聚集。早在上世纪末,廖福龙等^[58]运用激光测定剪切应力诱导血小板聚集的实验装置,筛选出 PNS 具有抗剪切力诱导血小板聚集的体外效应。血栓通胶囊是以 PNS 为主要成分的中成药制剂,Han 等^[59]研究发现血栓通胶囊能以剂量和剪切应力依赖的方式抑制 ADP 诱导的血小板活化,且在低剪切应力的病理流动条件下,血栓通胶囊抑制血小板活化的效应较强,主要通过拮抗 VCAM-1 的表达显著抑制血小板黏附于受损的内皮细胞。

颈动脉部分结扎术是一种稳定可靠的建立低剪切应力诱导的 AS 动物模型的方法。一方面,大鼠颈总动脉为直行,手术容易探查。另一方面,直行部位的血液流动基本为层流,这有利于我们将血液作为牛顿流体进行估计,并计算剪切应力^[60]。Simon 等^[61]已验证了剪切应力计算公式 $\tau_m = 4 \times \eta \times V_m / D_r$ 的有效性(η , 全血黏度; V_m , 收缩期峰值血流速度; D_r , 舒张末期颈总动脉内径)。因此,本研究通过左颈动脉部分结扎术建立 LSS 大鼠模型,并采用彩色多普勒超声测量 V_m 和 D_r ,并用全自动血液流变学分析仪测定 η 。研究结果显示 YXTC-M 和 YXTC-H 组能增加 V_m , D_r 和剪切应力,但只有 YXTC 能降低 η ,YXTC 改善 LSS 的作用随着剂量的增加逐渐增强,说明 YXTC 能显著改善 LSS,且呈剂量依赖性。病理染色结果进一步证实 YXTC 能明显减轻血管内皮的炎性浸润,减少内皮胶原纤维的沉积,从而减轻 AS。综上所述,YXTC 具有调节血流剪切应力的作用。

5 小结

愈心痛胶囊能显著改善 LSS 大鼠的血流速度和舒张末期血管内径，从而使血流剪切应力恢复至正常状态，并显著改善 LSS 对血管组织的病理损伤。

第三章 愈心痛胶囊抑制低剪切应力诱导血小板-内皮黏附的药理作用研究

血管内皮细胞是与血流直接接触的单层细胞,可通过位于其表面的各种机械传感器感知血流引起的流体机械力,从而对血流动力学的微小变化做出敏感反应,因此,血流剪切应力是调节血管内皮功能的重要病理生理机制^[62]。低剪切应力(Low shear stress, LSS)可产生致动脉粥样硬化(Atherosclerosis, AS)性流动,内皮细胞的机械传感器感知到 LSS 信号后,可引起胞内机械传导通路异常,从而导致内皮功能紊乱,表现为内皮损伤,血小板的活化、黏附和聚集,白细胞的黏附以及炎症反应等,从而启动 AS 的发生^[63],因此, LSS 引起的内皮功能障碍是 AS 的始动环节。

LSS 导致血小板-内皮黏附介导 AS 形成的中医病机主要是气虚血瘀。气虚无力推动血行,导致血行迟缓、血液瘀滞,瘀血阻滞部位则易形成湍流,进而产生异常的血流剪切应力,表现为血小板的活化和聚集、全血黏度增高、纤溶活性降低,此外,由于机体正气不足则血管内皮难以耐受 LSS,则进一步导致内皮损伤,并加剧血小板的活化、黏附和聚集。因此,气虚血瘀证是促进 LSS 诱导血小板-内皮黏附的主要证候。愈心痛胶囊由红参、三七、延胡索组成,是益气活血的代表方,能有效改善辨证为气虚血瘀的冠心病心绞痛,但愈心痛胶囊能否改善 LSS 及其诱导的血小板-内皮黏附尚缺少研究。基于此,本章节将通过体内和体外实验明确愈心痛胶囊对 LSS 诱导的血小板-内皮黏附是否有抑制作用。

第一节 愈心痛胶囊对低剪切应力模型大鼠血小板-内皮黏附的抑制作用

1 实验材料

1.1 实验动物

同第二章 1.1。

1.2 实验药物及配制

同第二章 1.2。

1.3 实验试剂与仪器

- 1) 戊巴比妥钠: 武汉金诺化工有限责任公司;
- 2) 4%多聚甲醛固定液: 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 3) 柠檬酸钠: 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 4) GPIIb α 抗体: 美国 Proteintech 公司;
- 5) vWF ELISA 试剂盒: 美国 Abcam 公司;
- 6) GPIIb α ELISA 试剂盒: 美国 Abcam 公司;
- 7) 光学显微镜: Olympus BX53 型, 日本 Olympus 公司;
- 8) 低温离心机: 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;
- 9) 切片机: 德国 Leica 公司;
- 10) 数字病理图像分析平台: HALO, 美国 Indica Labs 公司;
- 11) 全景扫描光学显微镜: 德国 Zeiss 公司;
- 12) 多功能酶标仪: 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;
- 13) -80℃超低温冰箱: 中国海尔公司;
- 14) 电热鼓风干燥箱: 陕西瑞铨星仪器制造有限公司;
- 15) 电子分析天平: 上海花潮实业有限公司。

2 实验方法

2.1 实验分组及给药

同第二章 2.1。

2.2 动物模型的构建

同第二章 2.2。

2.3 免疫组织化学染色

采用免疫组织化学染色 (IHC) 检测颈总动脉血管组织中 GPIIb α 的表达。具体操作步骤如下:

- (1) 获取标本并制备切片: 同第二章 2.6.1;
- (2) 烤片: 将石蜡切片置于烘箱中以 60℃烘烤 60 min;
- (3) 脱蜡: 二甲苯I 和二甲苯II, 各 10 min;
- (4) 至水: 依次于无水乙醇I, 无水乙醇II, 95%乙醇, 80%乙醇和 70%乙醇中各浸泡 5 min, 自来水冲洗 2 min;
- (5) 抗原修复: 首先配置柠檬酸钠抗原修复液于微波中煮沸, 然后在高压锅内

放入自来水煮沸（不盖锅盖，将装有煮沸的抗原修复液的烧杯置于高压锅内，并将水化后的切片放入煮沸的抗原修复液中，盖上锅盖，待其压力达到最大时维持三分钟；

（6）灭活内源酶活性：将切片放入湿盒中，滴加 50 μ L 3%过氧化氢，室温孵育 10 分钟，随后用 PBS 冲洗 3 次，每次 3 min；

（7）封闭：甩干切片上的水分，然后滴加 50 μ L 5%山羊血清，室温孵育 5 min；

（8）孵育一抗：甩掉切片上的封闭液，滴加 20 μ L 一抗 GPIb α （1:200, 12860-1-AP, Proteintech, 中国），4 $^{\circ}$ C 孵育过夜；

（9）孵育二抗：一抗孵育结束后用 PBS 冲洗 3 次，每次 3 min，然后甩干水分，再滴加 50 μ L IgG 二抗，室温孵育 10 min，随后用 PBS 冲洗 3 次，每次 3 min；

（10）染色：滴加 50 μ L 链霉菌抗生物素-过氧化物酶溶液，室温孵育 10 min，PBS 冲洗 3 次，每次 3 min，然后滴加 100 μ L DAB 溶液，置于显微镜下，染色 3~10 min，染色合适即可终止染色，自来水冲洗；

（11）复染：Mayer 苏木素复染 1~2 min，待细胞核染成蓝色时即可终止，自来水冲洗 3 min；

（12）分化：1%盐酸酒精分化 3 s，自来水冲洗 3 min；

（13）脱水：70%乙醇 1 min、80%乙醇 1 min、95%乙醇 2 min、无水乙醇 I 4 min、二甲苯 I 3 min、二甲苯 II 3 min。

（14）封片：中性树脂胶封片。

2.4 酶联免疫吸附测定（ELISA）

从腹主动脉取血，静置，离心收集上清血清。根据厂家的试剂盒说明书，用 ELISA 法测定血清中 vWF 和 GPIb α 的表达水平。用微孔板分光光度法测定 492 nm 处的光密度，并根据标准曲线计算最终结果。

2.5 统计分析

所有数据均采用均值 $\pm$ 标准差（ $\bar{X}\pm S$ ）表示。多组间比较，若符合正态分布采用单因素方差分析，若不符合正态分布，采用非参数的秩和检验。所有统计分析均采用 IBM SPSS 统计软件 20.0 版（IBM 公司，Armonk, NY, USA）进行。 $P<0.05$ 认为差异有统计学意义。

3 实验结果

3.1 愈心痛胶囊对低剪切应力诱导血小板-内皮细胞黏附的影响

血管内皮细胞损伤、活化后释放的 vWF 与血小板膜糖蛋白受体 GPIIb/IIIa 结合可介导血小板-内皮细胞黏附。因此,通过检测血清中 vWF 的表达量以及左颈总动脉组织中 vWF 和 GPIIb/IIIa 的表达可以评估愈心痛胶囊对 LSS 诱导血小板-内皮细胞黏附的影响。由图 3-1 及表 3-1 可见,与 Sham 组相比,Model 组血清中 GPIIb/IIIa 和 vWF 蛋白的含量均显著升高,差异有统计学意义 ($P<0.01$)。与 Model 组相比,YXTC-L 组血清中 GPIIb/IIIa 和 vWF 的蛋白含量均有下降的趋势,但差异无统计学意义 ($P>0.05$);YXTC-M 组的 vWF 蛋白表达量明显降低 ($P<0.05$),但 GPIIb/IIIa 的表达无明显改变 ($P>0.05$);YXTC-H 组和 Aspirin 组的血清 GPIIb/IIIa 和 vWF 蛋白含量均较 Model 组显著下降 ($P<0.01$)。如图 3-2 所示,免疫组织化学染色法结果显示,Sham 组几乎没有阳性颗粒,与 Sham 组相比,Model 组阳性颗粒表达明显增多,遍布血管壁的内皮细胞层、中膜层和外膜层。与 Model 组相比,YXTC-L 组的内皮细胞层阳性颗粒表达相对减少,但中膜层和外膜层仍表达较多;YXTC-M 组血管壁全层均有一定的阳性颗粒表达,但其数量较 Model 组明显减少;YXTC-H 组和 Aspirin 组的血管内皮层阳性表达显著降低,但中膜平滑肌层和外膜结缔组织层仍有一定量的阳性颗粒表达。如表 3-2 所示,分析各组大鼠左颈总动脉 GPIIb/IIIa 的阳性细胞数和积分光密度结果显示,与 Sham 组相比,Model 组的阳性细胞数和积分光密度均显著增加 ($P<0.01$);与 Model 组相比,YXTC-L 组和 YXTC-H 以及 Aspirin 组的阳性细胞数显著降低 ($P<0.01$),且 YXTC-L 和 YXTC-H 的积分光密度明显降低 ($P<0.01$),YXTC-M 的阳性细胞数较模型组亦明显减少 ($P<0.05$),但积分光密度较模型组稍减少,但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。上述结果说明低剪切应力可诱导血管内皮细胞损伤后释放 vWF 入血,并引起血小板活化,活化的血小板通过其表面的膜糖蛋白 GPIIb/IIIa 黏附于内皮细胞。给予 YXTC 干预后,vWF 和 GPIIb/IIIa 的表达量均减少,说明 YXTC 能抑制血小板-内皮细胞黏附。

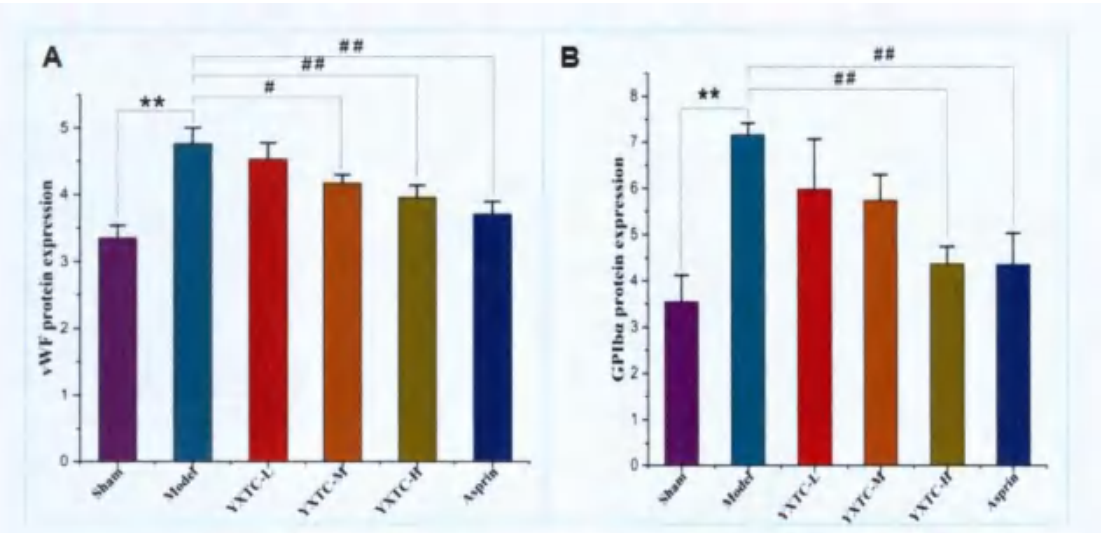


图 3-1 各组大鼠血清 vWF 和 GPIIb/IIIa 蛋白含量的变化
与 Sham 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Model 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

表 3-1 各组大鼠血清 vWF 和 GPIIb/IIIa 蛋白的含量 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	GPIIb/IIIa	vWF
假手术组 (Sham)	3.54±0.59	3.35±0.19
模型组 (Model)	7.17±0.25**	4.76±0.25**
愈心痛低剂量 (YXTC-L)	5.98±1.09	4.52±0.25
愈心痛中剂量 (YXTC-M)	5.74±0.56	4.17±0.13 [#]
愈心痛高剂量 (YXTC-H)	4.38±0.37 ^{##}	3.96±0.18 ^{##}
阳性药组 (Aspirin)	4.36±0.68 ^{##}	3.70±0.19 ^{##}

注: 与 Sham 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Model 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

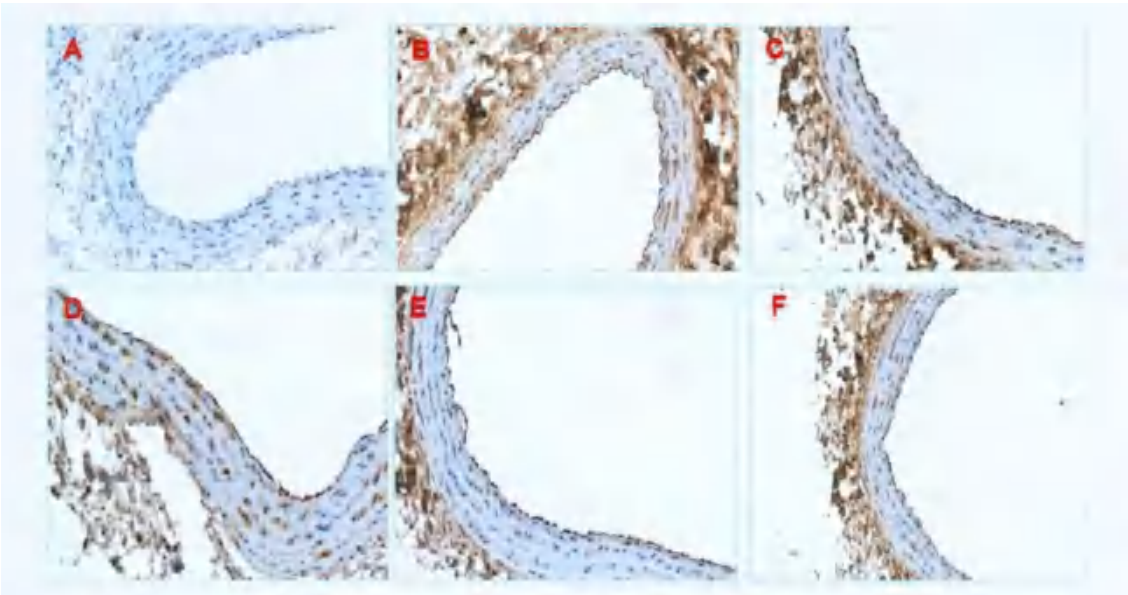


图 3-2 各组大鼠左颈总动脉 GPIIb/IIIa 的表达 (免疫组化, $\times 400$)

A, Sham; B, Model; C, YXTC-L; D, YXTC-M; E, YXTC-H; F, Aspirin

表 3-2 各组大鼠左颈总动脉 GPIba 的阳性细胞数、积分光密度和 H-评分比较 ($\bar{x}\pm s$, n=4)

组别	阳性细胞数	积分光密度 (IOD)	H-评分
假手术组 (Sham)	6002.67±1689.82	1759.83±412.93	210.17±3.52
模型组 (Model)	42695.67±9853.47**	14822.93±4390.17**	197.78±37.60
愈心痛低剂量 (YXTC-L)	11687±5280.88**	3999.47±1753.42**	231.66±12.39
愈心痛中剂量 (YXTC-M)	22732±5935.62*	8643.75±3380.86	232.55±20.36
愈心痛高剂量 (YXTC-H)	6009.67±1261.28**	2082.06±410.93**	240.55±6.94
阳性药组 (Aspirin)	11146.33±2547.67**	4617.19±1131.72*	256.31±11.70

注: 与 Sham 组相比, *P<0.05, **P<0.01; 与 Model 组相比, #P<0.05, **P<0.01。

4 讨论

低剪切应力等力学刺激是导致心血管疾病的重要因素之一^[64]。血管内皮细胞 (Endothelial cells, ECs) 位于血管壁的内表面, 与血流直接接触, 能感知力学刺激并将其转化为生物化学信号, 引发内皮细胞的适应性反馈, 通过这种反馈机制进而调节内皮细胞增殖、分化、凋亡等生物学功能。血小板流动的位置较靠近血管壁, 低剪切应力导致血管内皮结构损伤和功能障碍时, 可激活血液中的血小板。血小板被激活后, 首先与内皮下细胞外基质相互作用, 然后通过其表面的糖蛋白与受损内皮细胞表面的相应受体结合, 进而黏附在内皮细胞上, 随着血小板黏附增多, 引起血小板聚集和继发血栓形成, 这是血管壁对机械损伤的初始反应^[65]。血管性血友病因子 (vWF) 是血管内皮细胞和骨髓巨核细胞合成的具有黏附功能的多聚糖蛋白, 成熟的 vWF 由 2050 个残基亚单位组成, 包括 A1、A2、A3 三个主要结构区域^[66]。低剪切应力介导内皮损伤后释放大量 vWF, vWF 与暴露的皮下基质结合后, 胶原结合位点发生构象变化, 其 A1 区与血小板表面特异性表达的糖蛋白 GPIba 的 N-末端结构域结合, 引起血小板活化并释放促凝微粒, 血小板开始经历黏附、缓慢滚动、进而稳定黏附到受损的内皮细胞上^[67]。

在高血脂兔和 ApoE^{-/-}小鼠中, AS 斑块发生部位的血小板与内皮黏附明显增多, 且先于斑块形成, 说明 AS 斑块的初始形成与内皮细胞和血小板的活化有关^[68,69], 且抑制 vWF 的表达或阻断 vWF 与血小板的结合, 都可抑制 AS 斑块的形成, 这提示 vWF 介导的血小板黏附在 AS 的发生发展中具有关键作用^[70]。多项临床研究也证实 vWF 水平与 AS 斑块负担成正相关, 且高水平的 vWF 是心血管事件的高危因素^[71-73]。GPIb-IX-V 复合物是血小板表面介导黏附作用最重要的受

体,由以二硫键相连的 GPIb α 和 GPIb β 与 GPIX 和 GPV 非共价连接组成。GPIb α 的 N-末端胞外域是血栓形成所必需的,因为这一结构域能感知血流剪切应力的变化并影响 vWF 与 GPIb α 的结合^[74],因此 vWF 与 GPIb α 之间的结合是判断血流剪切应力的变化介导血小板-内皮细胞黏附的敏感指标。

本研究通过 ELISA 法检测 LSS 模型大鼠血清中 vWF 和 GPIb α 的含量,发现 LSS 显著增加了血清中 vWF 和 GPIb α 的含量。免疫组化染色结果表明 LSS 状态下,黏附在内皮细胞上的 GPIb α 也显著增加,这些结果提示 LSS 促进了血小板-内皮细胞的黏附。此外,通过观察愈心痛胶囊给药组与模型组的差异,我们发现愈心痛胶囊可以剂量依赖的方式抑制 vWF 与 GPIb α 的结合,其剂量越大,对 vWF 与 GPIb α 结合的抑制作用越明显,说明对血小板-内皮细胞黏附的抑制作用越大。

5 小结

愈心痛胶囊可以剂量依赖的方式抑制 LSS 诱导的血小板-内皮细胞黏附,其剂量越大,对血小板-内皮细胞黏附的抑制作用越明显。

第二节 愈心痛胶囊对低剪切应力诱导血小板与 RVECs 黏附的抑制作用

1 实验材料

1.1 实验动物

健康成年 SD 大鼠 20 只, SPF 级, 体重 200~220 克, 8~9 周龄, 购自北京斯贝福实验动物科技有限公司, 许可证号: SYXK(京)2018-0018。饲养于中国中医科学院西苑医院 SPF 实验动物中心, 自由进食、饮水, 昼夜交替 12 小时(早 8 点开灯, 晚 8 点关灯)。饲养温度为 $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, 湿度为 $50\%\pm 10\%$ 。动物实验由中国中医科学院西苑医院医学伦理委员会批准(2022XLC050-1)。

1.2 实验细胞

大鼠血管内皮细胞系(RVECs)购自北京北纳创联生物科技有限公司。

1.3 实验药物及试剂

- 1) 愈心痛胶囊(Yuxintong capsule, YXTC), 大连胜光药业集团有限公司;
- 2) 阿司匹林肠溶片, 美国 Bayer 公司;
- 3) DMEM 培养基, 美国 Gibco 公司;
- 4) 胎牛血清(FBS), 美国 Gibco 公司;
- 5) 细胞计数试剂盒(CCK-8), 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 6) 磷酸盐缓冲液(PBS), 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 7) 青霉素/链霉素溶液, 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 8) vWF ELISA 试剂盒, 美国 Abcam 公司;
- 9) E-selectin ELISA 试剂盒, 美国 Abcam 公司;

1.4 实验仪器

- 1) 超净工作台, 苏州净化设备有限公司;
- 2) CO_2 恒温培养箱, 德国 Eppendorf 公司;
- 2) 超纯水仪, 美国 Millipore 公司;
- 3) 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司;
- 4) 电转仪, 美国 Bio-Rad 公司;
- 5) 酶标仪, 美国 BioTek 公司;
- 6) 全自动化学发光图像分析系统, 上海天能科技有限公司;

- 7) 台式低速离心机, 上海医疗器械公司;
- 8) 实时荧光定量 PCR 仪, 加拿大 Molararray 公司;
- 9) 荧光显微镜, 德国 Leica 公司;
- 10) 细胞计数仪, 美国 Count Star 公司;
- 11) 精密天平, 德国 Sartorius 公司;
- 12) 超低温冰箱, 中国海尔公司。

2 实验方法

2.1 药物配制

2.1.1 制备 YXTC 含药血清和空白血清

20 只 SD 大鼠适应性饲养 7 天, 随机分为 YXTC 组和空白对照组, 每组 10 只。空白对照组给予蒸馏水灌胃, 愈心痛胶囊组按 1.44 g/kg/d 灌胃。每天上午 10 点灌胃 1 次, 连续 7 天。最后一天灌胃 2 次, 间隔 2 小时。采血前需禁食 12 小时。最后一次灌胃 2 小时后从腹主动脉采集血液样本, 每只动物采集约 8 mL 的血液。样品在室温下静置 2 小时, 然后在 37°C 水浴中静置 20 分钟。抽吸上清液, 使用 0.22 μm 的一次性无菌过滤器过滤除菌, -20°C 保存备用。

2.1.2 配制阿司匹林溶液

将拜阿司匹林肠溶片用研钵研碎至粉末, 然后精密称取阿司匹林粉末 540.6 mg, 以 PBS 溶液溶于 50 mL 规格的离心管中, 配成浓度为 180.2 mg/mL 的阿司匹林溶液, 使用 0.22 μm 的一次性无菌过滤器过滤除菌, 4°C 保存备用。

2.1.3 配制 PAR-1 抑制剂 (RWJ56110) 溶液

精密称取 RWJ56110 粉末 5 mg 溶于 1.1579 mL 二甲基亚砜 (Dimethyl sulfoxide, DMSO) 中, 配制成 4.32 mg/mL 的实验用母液, 0.22 μm 的一次性无菌过滤器过滤除菌, -20°C 保存备用。

2.2 细胞培养

2.2.1 细胞复苏

从液氮中取出冻存的 RVECs, 将其置于 37°C 恒温水浴箱中, 迅速摇晃使其快速解冻。用 75% 酒精消毒冻存管表面后立即置于超净台内进行细胞复苏操作。小心旋开冻存管, 用移液枪将完全融化的细胞悬液轻轻混匀, 然后吸取到细胞培

养瓶中,再加入4 mL的完全培养基,充分吹打混匀后,将培养瓶放入于37℃、5% CO₂及饱和湿度的恒温细胞培养箱中继续培养。

2.2.2 细胞换液

细胞换液前,先打开超净台内的紫外灯光源,照射30分钟。从37℃恒温培养箱内取出装有RVECs的细胞培养瓶,用75%酒精消毒培养瓶表面后放入超净台中,用无菌巴氏管吸出培养瓶内的原培养基,然后用PBS溶液漂洗培养瓶2-3次,清除杂质和死细胞。加入5 mL完全培养基后继续放入培养箱中培养,定期观察细胞状态。

2.2.3 细胞传代

细胞传代前,先打开紫外灯照射超净台30分钟。于显微镜下观察到细胞单层生长到80~90%融合时,弃掉瓶内原培养基,以PBS冲洗2遍,清除杂质和死细胞,然后加入1 mL 0.25%的胰蛋白酶消化1 min,发现细胞变圆,且大部分细胞呈漂浮状态时,立即吸出胰蛋白酶,并加入DMEM培养基终止消化。用无菌巴氏管轻柔地将RVECs从瓶壁上吹打下来,制成细胞悬液,混匀后吸出,按1:3比例分装到新的培养瓶中,然后将培养瓶中加入完全培养基至5 mL。然后继续置于培养箱中培养,3~7代用于后续实验。

2.2.4 细胞冻存

细胞冻存前,先打开超净台的紫外灯灭菌30分钟,然后于超净台内配制细胞冻存液(100 μ L DMSO+900 μ L FBS),静置备用。从培养箱中取出装有RVECs的培养瓶,首先置于显微镜下观察其生长状态是否良好。若RVECs的生长状态良好,且处于对数生长期,便可进行以下细胞冻存操作:弃掉培养瓶内原培养基,以PBS冲洗2遍,清除杂质和死细胞。加入1 mL胰蛋白酶消化1分钟,显微镜下见细胞呈悬浮状态时,即置于超净台内,吸出胰蛋白酶溶液,并加入4 mL DMEM培养基终止消化。用无菌巴氏管动作轻柔,将RVECs从瓶壁吹打下来,制成细胞悬液。用移液枪将细胞悬液转移至10 mL离心管中,以1000 r/min离心5分钟。然后弃去上清液,加入1 mL细胞冻存液,用移液枪将冻存液与细胞充分混匀后,将其转移至细胞冻存管中,在管身记录好冻存时间、细胞类型及操作人员等信息。采用梯度冻存的方法,依次是4℃:30分钟,-20℃:2小时,-80℃:过夜,最后置于液氮中保存。

2.3 分离和提取血小板

颈动脉穿刺麻醉雄性 SD 大鼠后采血 8 ml, 注射于柠檬酸钠抗凝管中。严格按照大鼠外周血血小板分离试剂盒的说明: 将血液与样品稀释液按 1:1 的比例混合, 得到稀释后的血样, 将等体积的分离液加入 15 mL 离心管中, 18~22℃重新加热。将血样小心地加入分离液表面, 500g 离心 30 分钟, 18~22℃。离心后, 从上到下分为四层: 血小板血浆层、环状乳白色细胞层、透明分离液层和红细胞层。小心地将第一个血小板血浆层吸收到另一个 15ml 离心管中。加入 10ml 洗涤液, 搅拌均匀, 250 r/min 离心 10 分钟, 弃去上清。用移液管将产生的细胞与 5ml 洗涤液重新悬吊, 以 250 r/min 离心 10 分钟, 并弃去上清液。用 0.5 mL 完全培养基将细胞重悬, 用于后续实验。

2.4 CCK-8 检测 YXTC 对 RVECs 的最大无毒浓度

将对数生长期的 RVECs 分别以 3×10^4 cells/mL (200 μ L/孔) 的密度接种于 96 孔板中, 在 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 24 h。弃去上清液, 然后加入含不同体积分数 YXTC 药物血清 (2%, 4%, 6%, 8%, 10%) 的完全培养基, 孵育 24 h。去除细胞上清, 每孔加入 100 μ L CCK-8 试剂, 置于 37℃、5% CO₂ 培养箱中孵育 2 h。最后, 使用酶标仪测定各孔在波长为 450 nm 时的吸光度值 (Optical Density, OD)。

2.5 剪切应力加载实验

2.5.1 平行平板流动腔仪器介绍

平行平板流动腔装置系统由平行平板流动小室和循环灌流系统两部分组成。平行平板流动小室由上下两块板组成, 下板中央的凹槽是放置玻片的位置。循环灌流系统由储液瓶、蠕动泵、空气过滤器组成。储液瓶的瓶盖上有三个接口, 其中一个接口是与空气过滤器相连, 以保持储液瓶内 CO₂ 的正常供应; 另外两个接口由蠕动泵管分别连接流动小室和蠕动泵, 构成一个单向的循环流动系统。通过蠕动泵设置流动小室的高度和循环液体流速可以调节剪切应力的大小。

2.5.2 剪切应力加载

当 RVECs 单层生长到 80~90% 时, 用胰蛋白酶消化后制成细胞悬液。吸取 1 mL 细胞悬液置于流动腔小室的腔体底板上, 然后再加入 400 μ L (约 3×10^5 cells/mL) 大鼠血小板悬液。实验开始时, 将流动腔腔体装置放置于 37℃、5% CO₂

细胞培养箱中,以维持恒定的温度和 pH 值,然后用透明蠕动泵管连接好储液瓶和蠕动泵。蠕动泵置于培养箱外,通过调节液体流速控制剪切应力大小,记录血小板的黏附过程,记录时间为 12 h。黏附结束后,以 PBS 溶液施加 2 dyne/cm² 剪切应力冲洗流动腔腔体 5 min。

2.6 细胞分组与处理

取对数生长期的 RVECs 随机分为 4 组:

①正常组(Control):RVECs+血小板,以含空白血清的 DMEM 培养基灌流,加载 15 dyne/cm² 的正常剪切应力;

②模型组(Model):RVECs+血小板,以含空白血清的 DMEM 培养基灌流,加载 4 dyne/cm² 的低剪切应力;

③愈心痛胶囊组(YXTC):RVECs+血小板,以加入 YXTC 含药血清的 DMEM 培养基灌流,加载 4 dyne/cm² 的低剪切应力;

④阿司匹林组(Aspirin):RVECs+血小板,以含空白血清及加入阿司匹林溶液的 DMEM 培养基灌流,加载 4 dyne/cm² 的低剪切应力。

2.7 荧光显微镜观察血小板与内皮细胞的黏附情况

将 RVECs 进行 PKH67 细胞膜染色:先用稀释液将探针稀释 10 倍,再用无血清的 DMEM 培养基将 PKH67 母液稀释 25 倍,配制成染色工作液。取 500 μ L 染色工作液加入 RVECs 培养瓶中,覆盖所有细胞,然后将培养瓶放入 37℃ 的细胞培养箱中孵育 5 min,再于 4℃ 冰箱孵育 15 min。孵育完成后去上清,用 PBS 溶液洗涤细胞 1~2 次。将血小板进行 DiI 染色:将分离的血小板分别悬于无血清的 DMEM 培养基中,密度为 1×10^6 /mL,加荧光染料 DiI (终浓度 5 μ g/mL),于 37℃ 培养箱中孵育 20 min,孵育完成后以 1500 rpm 离心 5 分钟后去上清,然后以 DMEM 培养基洗涤 3 次,悬于 DMEM 培养基中备用。将染色后的血小板和 RVECs 共同加入流动腔小室的腔体底板上,按照 2.5.2 完成剪切应力加载后,最后置于荧光显微镜下直接观察,紫外光激发拍照。

2.8 酶联免疫吸附试验(ELISA)检测 vWF 和 E-selectin

检测前准备工作:首先是样品准备,收集完成剪切应力加载后流动腔底板培养皿中的细胞悬液在室温下离心(500 rpm,离心 5 min)。然后将试剂盒从冰箱中拿出,置于室温下平衡 60 min。将 20 $\times$ 洗涤缓冲液稀释至 1 $\times$ 。根据说明书进

行标准品的溶解以及梯度稀释（80、40、20、10、5、2.5 ng/mL）。

实验操作：打开包被有抗体的 96 孔板，设置标准品孔、空白孔和样本孔。标准品孔分别加入不同浓度的标准品 50 μ L。样本孔中加入待测样本 50 μ L，空白孔加入标准品稀释液 50 μ L。用封板膜封住反应孔，在室温下孵育 2 h。孵育结束后洗板 5 次，最后一次洗完后在吸水纸上用力拍干。然后每孔加入辣根过氧化物酶（Horse radish peroxidase, HRP）标记的检测抗体 100 μ L，用封板膜封住反应孔，37℃孵育 60 min。洗板 5 次，最后一次洗完后在吸水纸上用力拍干。将底物 A 和 B 按 1:1 体积充分混合，所有孔中加入底物混合液 100 μ L，用封板膜封住反应孔，37℃避光孵育 15 min。每孔加入终止液 50 μ L，在 15 min 内，在 450 nm 波长处检测各孔的 OD 值。

绘制标准曲线：在 Excel 工作表中，以标准品浓度作横坐标，对应 OD 值作纵坐标，绘制出标准品线性回归曲线，按曲线方程计算各样本浓度值。

2.9 统计分析

所有数据的表达形式采用均数 $\pm$ 标准差形式，所有实验至少重复 3 次。对所有数据进行正态性检验，若符合正态分布，多组间的比较采用 ANOVA 分析。若不符合正态分布，则采用秩和检验。数据录入和统计分析采用 SPSS 20.0，图形绘制采用 Origin 2018 软件， $P<0.05$ 说明差异存在统计学显著性。

3 实验结果

3.1 YXTC 对 RVECs 增殖活力的影响

如图 3-3 所示，用不同体积分数的 YXTC 处理 RVECs，24 h 后检测 RVECs 增殖活力的改变，CCK-8 法检测结果显示：在体积分数为 2%、4%、6%、8% 和 10% 的 YXTC 含药血清干预下，OD 值分别为 2.31 ± 0.09 、 2.32 ± 0.04 、 2.33 ± 0.14 、 2.70 ± 0.10 和 2.49 ± 0.09 ，细胞存活率分别增加 2.48%、3.08%、3.33%、19.84% 和 10.38%。与 YXTC 为 0 相比，8% 和 10% 的 OD 值具有显著统计学差异（ $P<0.01$ ），且以 8% 的 YXTC 的细胞存活率增加量为最大，因此，选择 8% 的 YXTC 含药血清进行后续实验。

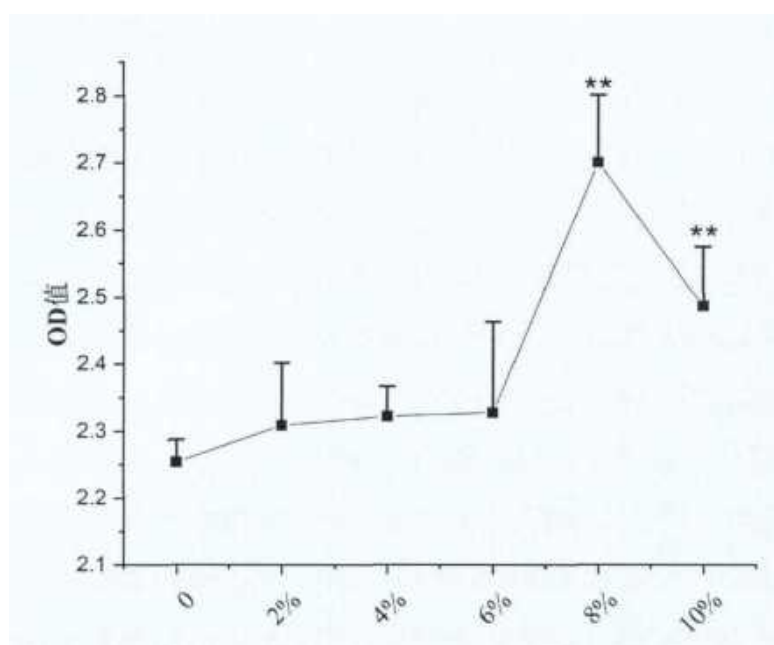


图 3-3 不同体积分数 YXTC 干预 RVECs 的 OD 值

注: ** $P < 0.01$ vs 0

3.2 YXTC 对低剪切应力诱导血小板与 RVECs 黏附的影响

采用荧光染色观察 YXTC 对 LSS 诱导的血小板-内皮黏附的影响。实验分为正常对照组 (Control)、模型组 (Model)、愈心痛胶囊组 (YXTC)、阿司匹林组 (Aspirin)。分别用 PKH67 染色工作液将 RVECs 的细胞膜染成绿色和 DiI 荧光染料将血小板 (Platelets, PLTs) 染成橙红色, 在荧光显微镜下观察 YXTC 对 LSS 诱导 RVECs 和 PLTs 黏附的影响。结果显示, 与 Control 组相比, Model 组 RVECs 和 PLTs 的黏附数量显著增加 ($P < 0.01$); 与 Model 组相比, YXTC 组和 Aspirin 组的 RVECs 和 PLTs 的黏附数量均显著减少 ($P < 0.01$)。

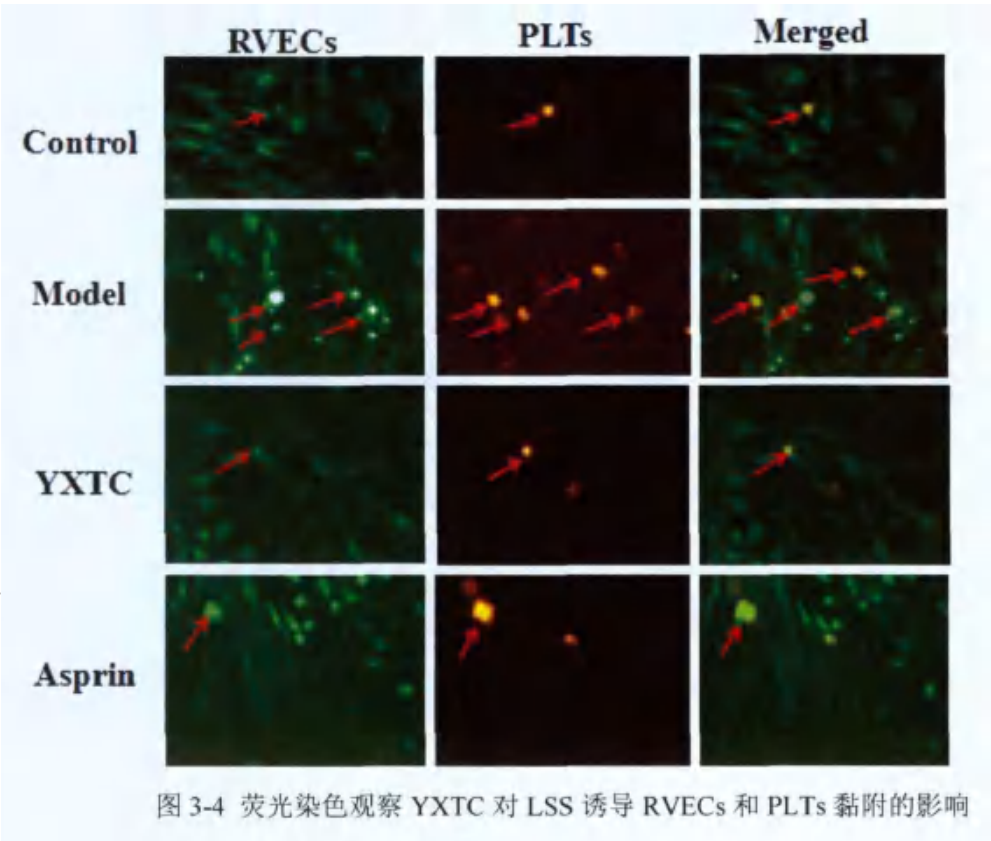


图 3-4 荧光染色观察 YXTC 对 LSS 诱导 RVECs 和 PLTs 黏附的影响

3.3 YXTC 对 E-selectin 和 vWF 蛋白表达的调节作用

采用 ELISA 法测定 YXTC 对 E-selectin 和 vWF 蛋白表达的影响。如图 3-5 及表 3-3 所示，在 E-selectin 蛋白表达方面，与 Control 组相比，Model 组的表达量显著增加 ($P<0.01$)；与 Model 组相比 YXTC 组和 Aspirin 组的蛋白表达量均显著下调 ($P<0.01$)；在 vWF 蛋白表达方面，与 Control 组相比，Model 组的表达量显著增加 ($P<0.01$)；与 Model 组相比 YXTC 组和 Aspirin 组的蛋白表达量均显著下调 ($P<0.01$)。上述结果表明，YXTC 能显著抑制低剪切应力诱导的 RVECs 的活化，从而减少 E-selectin 和 vWF 的释放。

表 3-3 YXTC 对 E-selectin 和 vWF 蛋白表达的影响 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

组别	E-selectin	vWF
正常对照组 (Control)	10.03±0.27	866.64±28.87
模型组 (Model)	29.82±0.62**	2002.36±14.29**
愈心痛胶囊组 (YXTC)	24.80±0.45**	1588.07±32.73**
阳性药组 (Aspirin)	13.62±0.91**	1176.17±23.45**

注：与 Sham 组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与 Model 组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

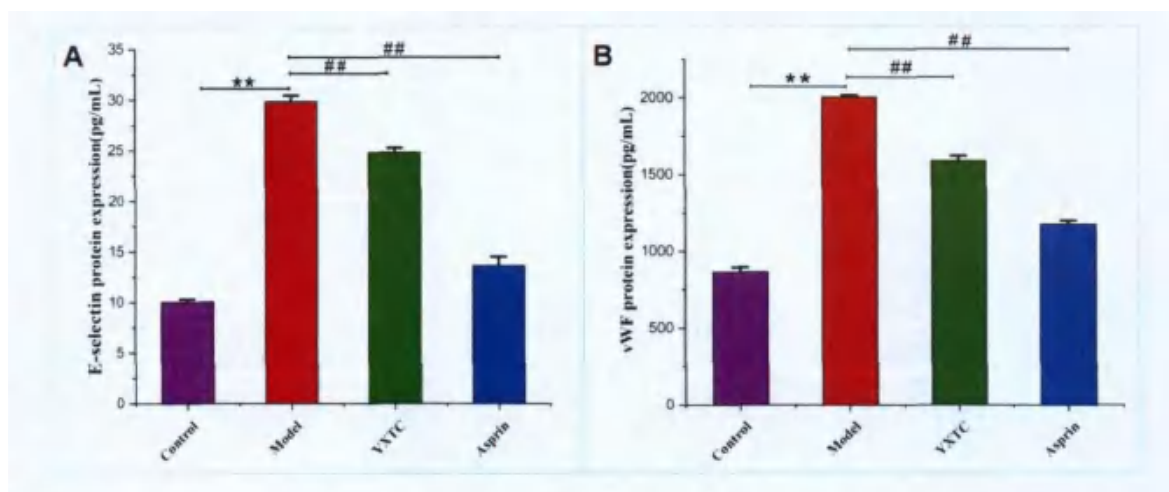


图 3-5 YXTC 对 E-selectin (A) 和 vWF (B) 蛋白表达的影响

与 Control 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Model 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

4 讨论

在体外,我们采用平行平板流动腔系统加载低剪切应力,进一步观察愈心痛胶囊(YXTC)对低剪切应力(LSS)诱导的血小板-内皮细胞黏附的影响。结果表明 YXTC 含药血清的浓度为 8% 和 10% 时能显著提高 LSS 诱导的 RVECs 和血小板的存活率,且 8% 浓度呈现出最好的药效作用,因此,后续实验选择以 8% 浓度进一步研究其药效与机制。本研究用绿色荧光染料 PKH67 和红色荧光染料 DiI 分别标记 RVECs 和血小板,并采用荧光显微镜观察血小板与内皮细胞的黏附情况。研究结果显示 YXTC 组能显著减少 RVECs 和血小板的黏附数量。

E-selectin 和 vWF 都是内皮损伤后释放的活性分子,能反映内皮细胞损伤程度。其中 E-selectin 是唯一仅限于在活化的内皮细胞表面表达的黏附分子,因而它是内皮细胞活化的一个特异性标志^[75]。vWF 是连接活化内皮细胞和血小板的桥梁,能与血小板受体 GPIIb α 结合,诱导血小板的黏附和聚集^[76]。本研究发现 LSS 状态下, RVECs 和血小板的共培养体系中 E-selectin 和 vWF 含量均较正常剪切应力组明显升高,经 YXTC 含药血清干预后, E-selectin 和 vWF 含量均较 LSS 组显著降低,说明 YXTC 能减轻 RVECs 损伤并减少血小板的黏附。

5 小结

愈心痛胶囊能通过减轻 LSS 对内皮细胞的损伤抑制血小板与内皮细胞黏附。

第四章 愈心痛胶囊抑制低剪切应力诱导血小板-内皮黏附的药理机制研究

最新研究发现 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路在动脉粥样硬化斑块进展中对血小板-内皮细胞的黏附至关重要^[77]。低剪切应力 (Low shear stress, LSS) 能直接作用于血管内皮细胞促进蛋白酶激活受体 1 (Protease activated receptor-1, PAR-1) 的表达^[78]，此外，LSS 介导内皮细胞损伤后可以募集循环血小板到受损位点，促进血小板活化，活化的血小板能释放基质金属蛋白酶 2 (Matrix metalloproteinase 2, MMP-2)^[79]，MMP-2 酶切特定的、非典型的内皮细胞外位点的 PAR-1 胞外结构域的 N 末端，促进 PAR-1 活化，活化的 PAR-1 继而激活下游的 p38-MAPK 信号通路，引起血管内皮细胞炎性损伤和黏附分子的表达，从而介导血小板-内皮细胞黏附^[77]。上一章研究结果已明确愈心痛胶囊能抑制 LSS 诱导的血小板-内皮黏附，本章内容将进一步研究愈心痛胶囊能抑制 LSS 诱导的血小板-内皮黏附的可能机制，并采用 PAR-1 抑制剂 (RWJ56110) 来验证愈心痛胶囊抑制 LSS 诱导血小板-内皮黏附的机制是否与抑制 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路的激活有关。

第一节 愈心痛胶囊对 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路的调控作用

1 实验材料

1.1 实验动物

同第二章 1.1。

1.2 实验药物

同第二章 1.2。

1.3 实验试剂

- 1) 戊巴比妥钠：武汉金诺化工有限责任公司；
- 2) 无水乙醇，赛默飞世尔科技（中国）有限公司；
- 3) 二甲苯，中国碧云天生物技术公司；
- 4) 中性树胶，上海阿拉丁生化科技股份有限公司；

- 5) 盖玻片, 中国碧云天生物技术公司;
- 6) 载玻片, 中国碧云天生物技术公司;
- 7) PKH67 绿色细胞膜染色试剂盒, 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 8) 细胞膜红色荧光探针, 南京凯基生物科技发展有限公司;
- 9) 3% H_2O_2 溶液, 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 10) PBS 缓冲液, 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 11) RIPA 裂解液, 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 12) 蛋白酶抑制剂, 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 13) 总 RNA 提取试剂盒, 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 14) 通用逆转录试剂盒, 上海翊圣生物科技有限公司;
- 15) Realtime PCR 荧光定量试剂盒, 上海翊圣生物科技有限公司;
- 16) BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 17) 蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物, 中国碧云天生物技术有限公司;
- 18) ECL 化学发光试剂盒, 中国碧云天生物技术有限公司;
- 19) MMP-2 抗体, 美国 Proteintech 公司;
- 20) PAR-1 抗体, 美国 Proteintech 公司;
- 21) p38-MAPK 抗体, 美国 Proteintech 公司;
- 22) GPIIb α 抗体, 美国 Proteintech 公司;
- 23) VCAM1 抗体, 美国 Proteintech 公司;
- 24) ICAM1 抗体, 美国 Proteintech 公司;
- 25) GAPDH 抗体, 美国 Proteintech 公司;

1.4 实验仪器

- 1) 倒置荧光显微镜, 德国 Leica 公司;
- 2) 生化培养箱, 德国 Binder 公司;
- 3) 微波炉, 广东格兰仕集团有限公司;
- 4) 生物组织摊烤片机, 卓的仪器设备(上海)有限公司;
- 5) 光学显微镜: Olympus BX53 型, 日本 Olympus 公司;
- 6) 低温离心机: 美国 Thermo Fisher Scientific 公司;
- 7) 切片机: 德国 Leica 公司;

8) 数字病理图像分析平台: HALO, 美国 Lndica Labs 公司;

9) -80℃超低温冰箱: 中国海尔公司;

10) 电子分析天平: 上海花潮实业有限公司

2 实验方法

2.1 实验分组和给药

同第二章 2.1。

2.2 动物模型的构建

同第二章 2.2。

2.3 免疫荧光双染

具体操作步骤如下:

(1) 制备切片: 六组大鼠在连续灌胃 8 周后分别取 3 只大鼠, 腹腔注射 1.5%戊巴比妥钠 (30 mg/kg) 麻醉大鼠, 然后进行腹主动脉法采血。随后迅速剥离出左颈总动脉组织, 将组织置于 20%-30%蔗糖溶液 1~3 天沉底, 利用高渗吸收组织中水分, 减少组织含水量。取出组织, 预冷 PBS 清洗后平放于软塑瓶盖或特制小盒内 (比如用铝箔纸折成有口的方盒), 加入适量 OCT 包埋剂浸没组织, 然后将特制小盒缓缓平放入盛有液氮的小杯内, 当盒底部接触液氮时即开始气化沸腾, 此时小盒保持原位切勿浸入液氮中, 大约 10~20s 组织即迅速冰结成块。取出组织冰块立即置入恒冷箱切片机进行冰冻切片。

(2) 固定: 完成切片后用预冷的 4%多聚甲醛室温固定 20~30min, 冷水清洗 3~5 次。

(3) 抗原修复: 将切片浸入柠檬酸盐修复缓冲液, 用微波炉加热至沸腾后断电, 间隔 5~10 min 后, 反复 1~2 次。室温自然冷却后水洗一次。

(4) 荧光淬灭: 待切片自然晾干后, 在切片上组织的外围用组化笔画圈, 然后滴加自发荧光淬灭剂至圈内, 作用 5 min 后用自来水冲洗 10 min。

(5) 封闭: 滴加山羊血清进行封闭, 于 37℃恒温箱中孵育 30 min。甩去多余液体, 不洗。

(6) 孵育一抗: 滴加适量一抗, 于 4℃孵育过夜后 37℃复温 30 min。随后用 PBS 溶液洗 3 次, 每次 5min。

(7) 孵育二抗: 滴加生物素化山羊抗大鼠 IgG, 37°C 孵育 30 min。随后用 PBS 溶液洗 3 次, 每次 5 min。

(8) 复染细胞核: 将切片甩干后, 滴加数滴 DAPI 染液至圈内, 室温避光孵育 10 min。

(9) 封片: 将切片用 PBS 缓冲液洗涤 3 次, 每次 5 min, 随后将切片甩干后用抗荧光淬灭封片剂进行封片。

(10) 镜检拍照: 用倒置荧光显微镜观察切片, 同时采集图像用于后续分析。

2.4 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

2.4.1 RNA 提取

将大鼠左颈总动脉组织在液氮中研磨至碎块, 再以 50~100 mg 组织加入 1 mL Trizol 裂解液进行研磨。随后室温静置 5 min, 使得核酸蛋白复合物完全分离, 之后反复吹打 Trizol 裂解液并用移液枪将其转移至 1.5 mL 的 EP 管中。然后向 EP 管中加 0.2 mL 氯仿, 盖好管盖, 剧烈振荡 15 s, 冰盒内静置 5 min。随后将 EP 管置于低温高速离心机中以 4°C 12000 rpm 离心 10 min。离心后液体分为三层: 上层为水相 (含有 RNA, 少量 DNA); 中间层为白色薄层 (含有蛋白质和 DNA); 下层有机相 (含有氯仿、蛋白质、多糖、脂肪酸、DNA 等)。RNA 主要在上层无色的水相中, 用移液枪小心吸取上层水相并转移到新的 1.5 mL EP 管中, 注意不要吸到沉淀。然后向新的 EP 管中加入 200 μ L 无水乙醇, 混匀 10 s。准备 RNA 吸附柱: 在 RNA 柱中加入 500 μ L 洗注液, 室温放置 2 min, 4°C 12000 rpm 离心 2 min, 弃废液。将准备好的 RNA 柱加入上述混合溶液中, 静置 2 min, 4°C 12000 rpm 离心 2 min, 弃废液。然后向 RNA 柱中加入 600 μ L 漂洗液, 4°C 12000 rpm 离心 2 min, 弃废液。再次向 RNA 中加入 600 μ L 漂洗液, 4°C 12000 rpm 离心 2 min, 弃废液。然后 4°C 12000 rpm 离心 2 min, 弃掉收集管, 将 RNA 柱置于室温放置 10 min, 将 RNA 柱中残余的漂洗液去除。将 RNA 柱放入新的 1.5 mL EP 管中, 向膜中央滴加 50 μ L RNase Free ddH₂O (DEPC 水), 室温放置 5 min, 12000 rpm 室温离心 2 min 得到 RNA。

2.4.2 逆转录反应

(1) 去除残留基因组 DNA: 在 RNase free 离心管中配制如下混合液: 1000 ng 模板 RNA, 3 μ L 5 $\times$ gDNA digester Mix, 之后用 DEPC 水稀释至 15 μ L。用移液

器将上述混合液体轻轻吹打混匀, 42℃孵育 2 min。

(2) 配制逆转录反应体系: 在第(1)步获得的混合液中加入 4 μL 4×Hifair® III SuperMix plus, 用移液器轻轻吹打混匀。

(3) 进行逆转录反应: 具体参数为: 25℃*5 min, 55℃*15 min, 85℃*5 min。逆转录后得到 cDNA, 稀释 10 倍, -20℃保存备用。

2.4.3 PCR 扩增反应

取逆转录反应得到的模板链 cDNA 5 μL, 再加入 1×Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix 10 μL、上游引物(10 μM) 0.5 μL 和下游引物(10 μM) 0.5 μL, 最后加入 DEPC 水将反应体系补充至 20 μL。具体扩增程序为: 预变性 95℃ 5 min; 变性 95℃ 10 s; 退火 60℃ 20 s; 延伸 72℃ 20 s。熔解曲线阶段: 95℃ 15 s, 60℃ 60 s, 95℃ 15 s。所用引物信息如表 4-1 所示:

表 4-1 具体的引物序列及其大小

基因		引物序列	引物片段大小 (bp)	扩增片段大小 (bp)
GAPDH	F	GGCAAGTTCAACGGCACAG	19	142
	R	CGCCAGTAGACTCCACGACA	20	
p38-MAPK	F	CCTCGCTGTGAATGAAGACTGTGA	24	294
	R	TGGCTTGGCATCCTGTTAATGAGA	24	
PAR-1	F	CCGCCGTGTTCTGCATCTTCAT	22	188
	R	GCACTCGGAGGAGGCATAGTAGT	23	
ICAM1	F	AGATGGTGTCCCGCTGCCTATC	22	267
	R	GCCTCCTCCTGAGCCTTCTGTAA	23	
VCAM1	F	GCTGCTGTTGGCTGTGACTCTC	22	100
	R	GCTCAGCGTCAGTGTGGATGTAG	23	
MMP-2	F	GCAACCACAACCACTACGATGATG	25	249
	R	TCCAGTACCAGTGTCAGTATCAGCAT	26	

2.5 免疫印迹 (Western-blot)

2.5.1 总蛋白的提取

将大鼠颈总动脉剥离后, 用预冷的 PBS 溶液漂洗 3 次。将漂洗后的血管用滤纸吸干水分, 随后置于电子天平上称重。然后将组织收集至玻璃匀浆器中, 加入 RIPA 裂解液 (含蛋白酶抑制剂), 在冰上将组织研磨至无明显团块的碎屑状, 然后将研碎的组织转移至离心管中, 置于冰上裂解 30 min, 最后于离心机中以 4℃, 12000 rpm 离心 20 min, 取上清。

2.5.2 蛋白浓度测定

采用 BCA 法测定蛋白浓度，根据试剂盒说明书进行操作，在 570 nm 波长处检测标准品的吸光度值，根据标准品的吸光度值绘制标准曲线，并根据标准曲线计算出样品的总蛋白浓度，然后根据浓度测定结果加入 5×loading buffer 和 PBS 溶液对蛋白浓度进行调整，保证不同组别之间蛋白浓度一致。随后将样本置于 100℃沸水中煮 5 min 进行蛋白变性。煮样结束后冷却至室温再上样，剩余样本于-80℃保存。

2.5.3 实验操作

(1) 制备电泳胶：将玻璃板洗净擦干后，固定在制胶器上后，开始配分离胶，将分离胶灌入玻璃板空隙内到适当的高度，用无水乙醇覆盖分离胶，直至胶完全聚合。倒出无水乙醇，用双蒸水轻轻冲洗后用滤纸吸干。然后加入浓缩胶到合适的高度，插入梳齿。浓缩胶完全聚合后取出梳齿。本实验根据目的蛋白分子量大小选用 10%分离胶和 5%浓缩胶，具体组分如下表 4-2 和表 4-3：

表 4-2 10%分离胶各组分所需体积 (mL)

纯水	30%制胶液	1.5M Tris-HCl (PH8.8)	10% SDS	10%APS	TEMED
4	3.3	2.5	0.1	0.1	0.004

表 4-3 5%浓缩胶各组分所需体积 (mL)

纯水	30%制胶液	1M Tris-HCl (PH6.8)	10% SDS	10%APS	TEMED
6.8	1.66	1.26	0.1	0.1	0.01

(2) 电泳：将处理好的样本以每孔 7 μL 的总量进行上样。以恒压电源进行电泳，浓缩胶 80V，30 min，到达分离胶页面后，将电压调至 120V，开始分离胶的电泳。根据预染 Marker 和目的蛋白的分子量大小的相对位置判断目的蛋白位置，当目的蛋白处于分离胶面的下 1/3 的最佳分辨位置时停止电泳分离。

(3) 转膜：转膜前先将 0.45μm PVDF 膜放到甲醇中浸泡 10 s，然后放入新的转膜液中待用；取出凝胶，根据 Marker 切下目的条带，用蒸馏水冲洗，裁剪出与 PAGE 凝胶相同大小的 PVDF 膜和滤纸，PVDF 膜和滤纸一同浸泡于电转缓冲液中。按照黑色板-纤维垫-滤纸-凝胶-PVDF 膜-滤纸-纤维垫-白色板依次放好，

夹紧板后放入转膜仪内,黑色板的一面正对黑色负极,白色板正对红色正极。在转膜槽中加满电转液开始转膜。转膜过程在 4℃ 进行(冰浴),转膜条件为恒流 200 mA、90 min。

(4) 封闭:用含 5%脱脂奶粉的 TBST 溶液对 PVDF 膜进行封闭,室温摇床封闭 2 h。

(5) 孵育一抗:用含 2% BSA 的 TBST 稀释相应的一抗,稀释比例分别为: MMP-2: 1:800, PAR-1: 1:1000, p38-MAPK: 1:4000, VCAM1: 1:1000, ICAM1: 1:800, GPIIb α : 1:1000, 使 PVDF 膜浸泡于一抗孵育液中, 4℃ 孵育过夜。一抗孵育结束后,洗去多余一抗:用 TBST 溶液充分洗涤 PVDF 膜 3 次, 10 min/次。

(6) 孵育二抗:用 TBST 溶液以 1:5000 比例稀释 HRP 标记的二抗,使 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中,摇床室温孵育 1 h。二抗孵育结束后,洗去多余二抗:用 TBST 溶液充分洗涤 PVDF 膜 3 次, 10 min/次。

(7) 显色曝光:将 ECL 试剂中增强液与稳定的过氧化物酶溶液按 1:1 比例混匀配制成工作液,滴加适量工作液于 PVDF 膜上,采用全自动化学发光图像分析系统进行曝光。

(8) 膜洗脱再生:曝光结束后,用 TBST 充分洗涤 PVDF 膜 3 次, 5 min/次。加入适量的膜再生液,使 PVDF 膜浸泡于膜再生液中,室温摇床 20 min 进行洗脱。结束后,洗去多余膜再生液:TBST 充分洗涤 PVDF 膜 3 次, 5 min/次。

(9) 再次进行封闭,依次孵育内参(GAPDH: 1:5000)一抗、二抗,最后显色曝光。

(10) 曝光结果使用 Image J 软件分析灰度值。

2.6 酶联免疫吸附测定(ELISA)

从腹主动脉取血,静置,离心收集上清血清。根据厂家的试剂盒说明书,用 ELISA 法测定血清中 MMP-2 和 Fibronectin 蛋白的表达水平。用微孔板分光光度法测定 492 nm 处的光密度,并根据标准曲线计算最终结果。

2.7 统计分析

所有数据的表达形式采用均值 $\pm$ 标准差形式,所有实验至少重复 3 次。对所有数据进行正态性检验,若符合正态分布,多组间的比较采用 ANOVA 分析。若不符合正态分布,则采用秩和检验。数据录入和统计分析采用 SPSS 20.0,图

形绘制采用 Origin 2018 软件, $P<0.05$ 说明差异存在统计学显著性。

3 实验结果

3.1 愈心痛胶囊对 MMP-2 和 PAR-1 共表达的影响

如图 4-1 所示, 大鼠左颈动脉组织免疫荧光双染结果显示, 细胞核呈蓝色, MMP-2 阳性表达呈荧光红色, PAR-1 呈荧光绿色。以 MMP-2 和 PAR-1 共表达作为血小板与内皮细胞黏附的标志。与 Sham 组相比, Model 组的 MMP-2 和 PAR-1 的荧光强度明显增加, 且两者的共定位表达量明显增多, 表明 Model 组的小血小板与内皮细胞黏附增多; 与 Model 组相比, YXTC-L 组 MMP-2 和 PAR-1 的荧光强度无明显改变, 且两者的共定位表达量无明显减少 ($P>0.05$), YXTC-M、YXTC-H 和 Aspirin 组 MMP-2 和 PAR-1 的共定位表达量均显著减少 ($P<0.01$)。

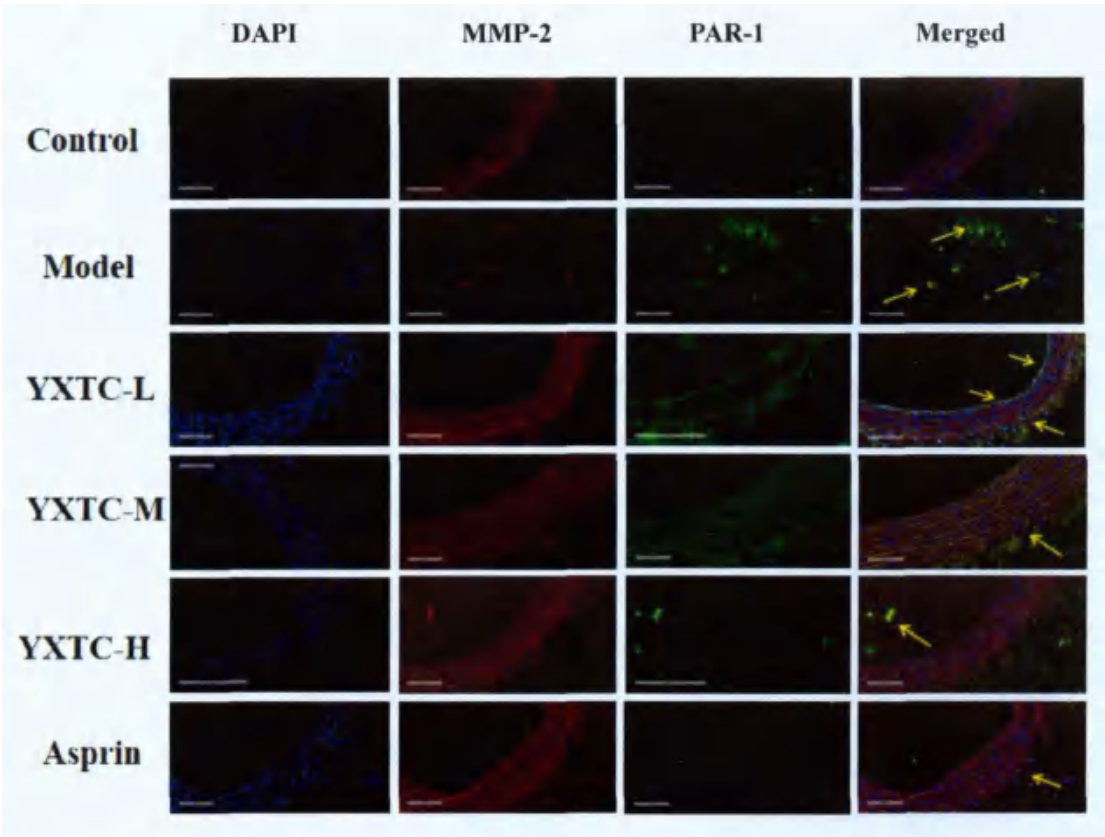


图 4-1 免疫荧光染色检测左颈动脉组织中 MMP-2 和 PAR-1 蛋白共表达 (放大倍数:200 ×, 比例尺:100 μm)

3.2 愈心痛胶囊对 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路基因表达的影响

如图 4-2 及表 4-4 所示, 与 Sham 组相比, Model 组的 MMP-2、PAR-1、vWF、

p38-MAPK、ICAM1 和 VCAM1 的 mRNA 表达量显著升高，差异有统计学意义（ $P<0.01$ ）；与 Model 组相比，YXTC-L 组 vWF、ICAM1 和 VCAM1 的 mRNA 表达降低，差异有统计学意义（ $P<0.01$ ），YXTC-L 组的 MMP-2、PAR-1 和 p38-MAPK 的 mRNA 表达量有下降的趋势，但差异无统计学意义（ $P>0.05$ ）。YXTC-M 组、YXTC-H 组和 Aspirin 组的 MMP-2、PAR-1、vWF、p38-MAPK、ICAM1 和 VCAM1 的 mRNA 表达量均显著降低，差异有统计学意义（ $P<0.05$ ）。

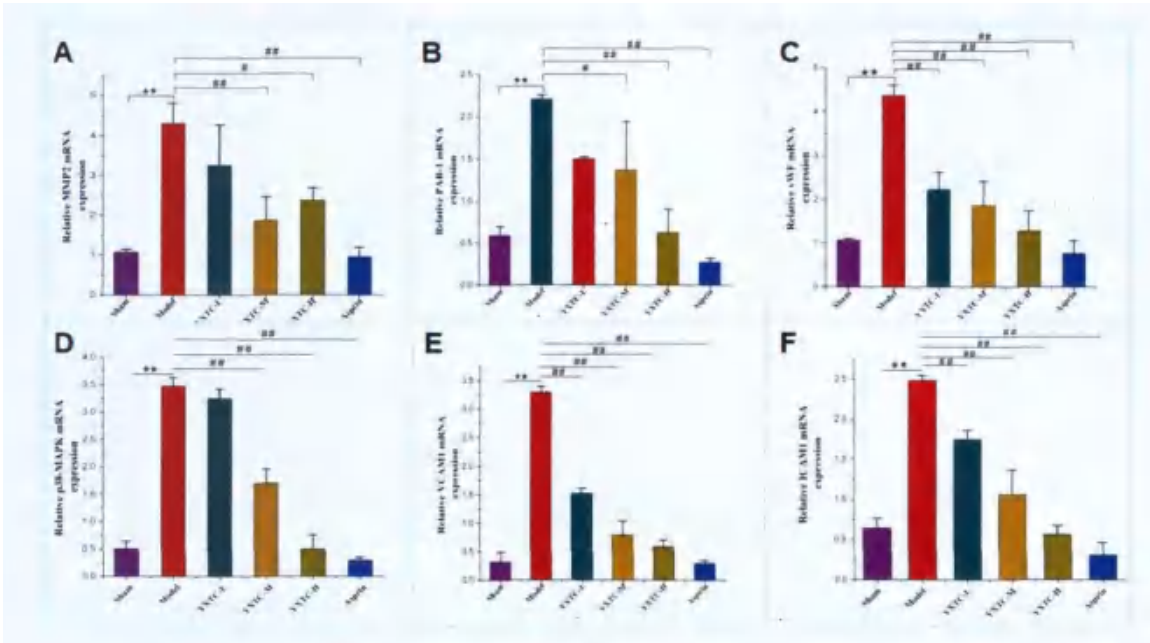


图 4-2 各组大鼠左颈总动脉组织中 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路基因的表达变化
A: MMP-2; B: PAR-1; C: p38-MAPK; D: VCAM1; E: ICAM1。注：与 Sham 组相比， $^*P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ ；与 Model 组相比， $^#P<0.05$ ， $^{##}P<0.01$ 。

表 4-4 愈心痛胶囊对 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路基因表达的影响（ $\bar{x}\pm s$ ， $n=3$ ）

Group	MMP-2	PAR-1	vWF	p38-MAPK	ICAM1	VCAM1
Sham	1.07±0.07	0.59±0.11	1.06±0.04	0.50±0.14	0.64±0.12	0.32±0.17
Model	4.31±0.50 ^{**}	2.20±0.05 ^{**}	4.36±0.24 ^{**}	3.47±0.15 ^{**}	2.48±0.07 ^{**}	3.30±0.11 ^{**}
YXTC-L	3.26±1.02	1.50±0.02	2.23±0.39 ^{##}	3.25±0.18	1.74±0.12 ^{##}	1.52±0.09 ^{##}
YXTC-M	1.87±0.60 ^{##}	1.37±0.58 [#]	1.86±0.55 ^{##}	1.70±0.26 ^{##}	1.06±0.31 ^{##}	0.79±0.25 ^{##}
YXTC-H	2.38±0.32 [#]	0.62±0.28 ^{##}	1.27±0.46 ^{##}	0.49±0.27 ^{##}	0.56±0.11 ^{##}	0.59±0.12 ^{##}
Aspirin	0.96±0.23 ^{##}	0.27±0.05 ^{##}	0.76±0.29 ^{##}	1.62±0.06 ^{##}	0.31±0.16 ^{##}	0.29±0.05 ^{##}

注：与 Sham 组相比， $^*P<0.05$ ， $^{**}P<0.01$ ；与 Model 组相比， $^#P<0.05$ ， $^{##}P<0.01$ 。

3.3 愈心痛胶囊对 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路蛋白表达的影响

如图 4-3、图 4-4 及表 4-5 所示, 与 Sham 组相比, Model 组 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、vWF、VCAM、ICAM1 等蛋白的表达量均显著升高 ($P<0.01$), 与 Model 组相比, YXTC-L 组的 MMP-2、PAR-1、P38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 vWF 等蛋白含量均有所下降, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$)。YXTC-M 组的 VCAM1 和 vWF 蛋白表达较 Model 组下降, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。YXTC-H 组的 PAR-1、vWF、VCAM 和 ICAM1 等蛋白的表达量均显著降低, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。Aspirin 组的 PAR-1、P38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 vWF 等蛋白表达均较模型组明显减少, 差异有统计学意义 ($P<0.05$)。

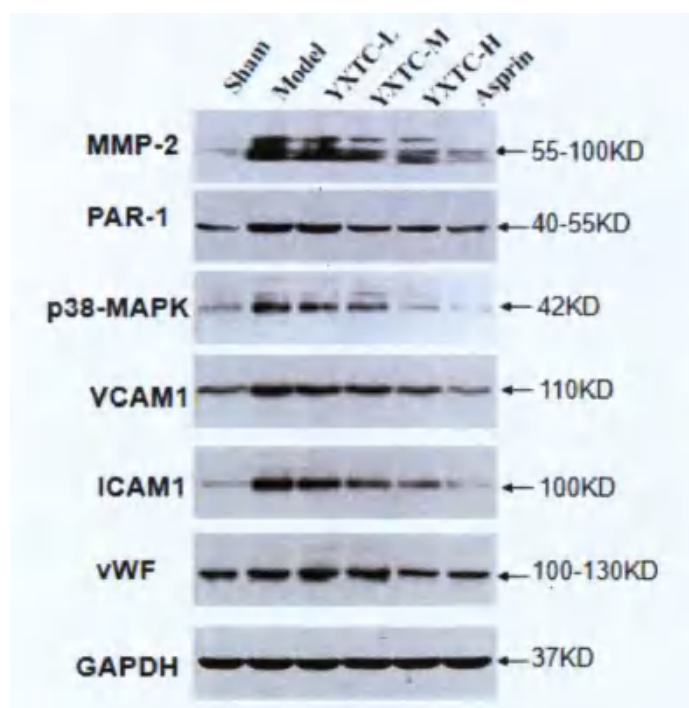


图 4-3 各组大鼠左颈总动脉组织 MMP2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路相关蛋白的表达条带

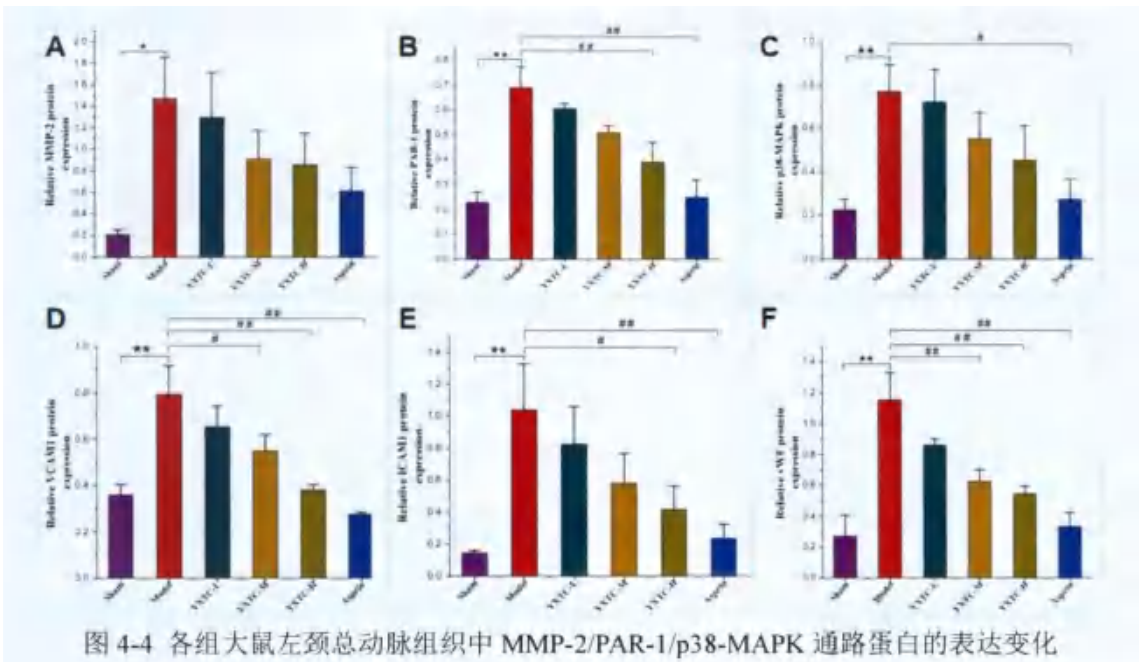


图 4-4 各组大鼠左颈总动脉组织中 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路蛋白的表达变化
A: MMP-2; B: PAR-1; C: p38-MAPK; D: VCAM1; E: ICAM1。注: 与 Sham 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Model 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

表 4-5 各组大鼠左颈动脉组织 MMP2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路相关蛋白的相对表达量
($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Group	MMP2	PAR-1	p38-MAPK	VCAM1	ICAM1	vWF
Sham	0.20±0.05	0.23±0.04	0.22±0.05	0.36±0.05	0.14±0.02	0.27±0.14
Model	1.47±0.39	0.69±0.08**	0.77±0.12**	0.79±0.12**	1.04±0.29**	1.15±0.18**
YXTC-L	1.30±0.41	0.60±0.02	0.72±0.15	0.65±0.09	0.83±0.23	0.86±0.04
YXTC-M	0.90±0.27	0.51±0.03	0.55±0.12	0.55±0.07#	0.58±0.19	0.62±0.08##
YXTC-H	0.85±0.29	0.39±0.08##	0.45±0.16	0.38±0.02##	0.42±0.14#	0.54±0.05##
Aspirin	0.61±0.22	0.25±0.07##	0.27±0.09#	0.28±0.01##	0.23±0.09##	0.33±0.09##

注: 与 Sham 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Model 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

3.4 愈心痛胶囊对血清中 MMP-2 和 Fibronectin 蛋白表达的影响

由图 4-5 及表 4-6 可见, 与 Sham 组相比, Model 组血清中 MMP-2 和 Fibronectin 蛋白的含量均显著升高, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。与 Model 组相比, YXTC-L 组血清中 MMP-2 和 Fibronectin 蛋白的含量均有所下降, 但差异无统计学意义 ($P>0.05$) ; YXTC-M 组能明显降低 MMP-2 蛋白的含量, 差异有统计学意义 ($P<0.05$) ; YXTC-H 组和 Aspirin 组血清 MMP-2 和 Fibronectin 蛋白均较 Model 组显著下降 ($P<0.01$) 。

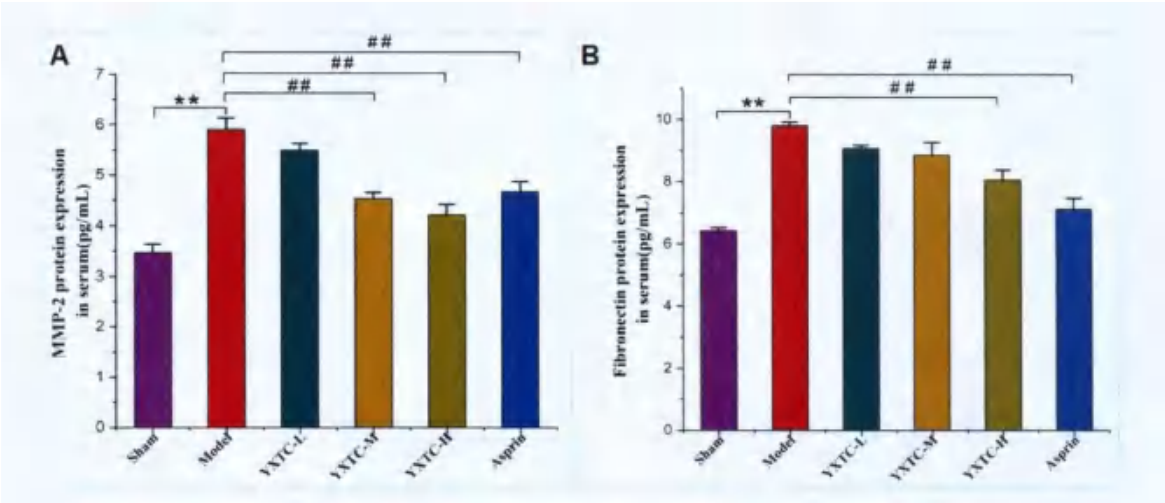


图 4-5 各组大鼠血清中 MMP-2 和 Fibronectin 蛋白表达的变化
A: MMP-2; B: Fibronectin。与 Sham 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Model 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

表 4-6 各组大鼠血清中 MMP-2 和 Fibronectin 蛋白的含量 ($\bar{x}\pm s$, $n=10$)

Group	MMP-2	Fibronectin
Sham	3.47±0.17	6.42±0.10
Model	5.91±0.22**	9.79±0.12**
YXTC-L	5.49±0.14	9.07±0.10
YXTC-M	4.52±0.13##	8.85±0.41*
YXTC-H	4.22±0.21##	8.04±0.33##
Aspirin	4.66±0.20##	7.13±0.33##

注: 与 Sham 组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$; 与 Model 组相比, # $P<0.05$, ## $P<0.01$ 。

4 讨论

血小板活化后释放 MMP-2 是血小板参与 AS 形成的关键^[77]。基质金属蛋白酶 (Matrix metalloproteinase, MMP) 家族是一类金属离子依赖性肽内切酶, 其功能是特异性地降解细胞外基质 (胶原、明胶、弹性蛋白、纤维连接蛋白等)。根据 MMPs 降解产物的不同分为 4 类: 胶原酶、明胶酶、基质溶解酶和模型基质金属蛋白酶。其中明胶酶的变化与动脉粥样硬化的发生发展密切相关, 明胶酶的典型代表是 MMP-2, 它可特异性地将 I、II 型胶原降解成更小的肽段, 这种肽段通过加速 LDL 氧化和血管壁钙化参与动脉粥样硬化进程^[80]。此外, MMP-2 可通过增强 LSS 诱导的血小板激活来增强血栓形成, LSS 诱导不稳定斑块中 MMP-2 活性显著增加^[79]。活性 MMP-2 释放后, 一方面与整合素 $\alpha IIb\beta 3$ 相互作用于活化的血小板, 并上调 GPIIb α 受体的表达, 从而增强其与 vWF 结合介导的血小板-内皮黏附。另一方面, 通过酶切特定的、非典型的内皮细胞外位点的 PAR-1 胞外

结构域的 N 末端,被切割的 PAR-1 受体释放出新的 N-末端序列,后者作为一个拴系配体与受体结合,从而引发跨膜信号传导,引起细胞内 Ca^{2+} 的增加和蛋白质磷酸化, Ca^{2+} 是细胞信号传导中重要的第二信使,在接收到激活 PAR 启动信号后可进一步传递信号,激活下游的 p38-MAPK 信号通路,引起血管内皮细胞炎症损伤和随后暴露的黏附分子的表达,从而介导血小板-内皮细胞黏附^[81]。PAR-1 属于蛋白酶激活受体 (Protease-activated receptor, PAR) 家族, PAR 是一组广泛存在于全身各组织细胞中、具有七个跨膜单位的 G 蛋白偶联受体, PAR-1 作为 G 蛋白偶联受体家族第一个被发现的成员,具有 7 个疏水的螺旋状跨膜区域,形成 3 个胞外环状结构,1 个胞内 C 端和胞外 N 端的结构,主要表达于血管组织的内皮细胞、平滑肌细胞等部位,是凝血酶 (Thrombin, IIa) 的主要受体^[82],在再狭窄和动脉粥样硬化形成中起着至关重要的作用^[83, 84]。既往研究表明,正常剪切应力 (Normal shear stress, NSS) 和高剪切应力 (High shear stress, HSS) 状态下, PAR-1 的激活被抑制,导致凝血酶原反应中 ET-1 分泌减少,且 NSS 通过快速促进 H_2O_2 的瞬时生成激活蛋白激酶 p38-MAPK,进而激活内皮型一氧化氮合酶 (eNOS),产生一氧化氮,发挥内皮保护功能^[85, 86],从而抑制动脉粥样硬化过程中的炎症反应和血栓形成。本研究发现 LSS 的作用与 NSS 和 HSS 相反,它介导了血管内皮损伤后 PAR-1 表达的增加。p38-MAPK 是由 PAR-1 激活的下游通路,多项研究证实, p38-MAPK 信号通路的激活能诱导内皮细胞释放 $\text{TNF-}\alpha$ 、IL-1、IL-8、ICAM1、VCAM1 等炎症因子和黏附分子,促进内皮细胞损伤或凋亡,继而诱导血小板黏附,诱发血管炎症反应和血栓形成,从而启动 AS 的发生^[87-89]。因此, LSS 可能通过激活 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路介导血小板和内皮细胞的活化,进而导致血小板-内皮细胞黏附。

本研究初步探究了 YXTC 抑制 LSS 模型大鼠血小板-内皮黏附的机制是否与调节 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路有关。首先,我们通过免疫组织荧光染色证实了 MMP-2 和 PAR-1 在内皮细胞的质膜上共定位,且愈心痛胶囊高、中剂量组的 MMP-2 和 PAR-1 共定位表达量较模型组均明显降低,说明 YXTC 能有效抑制 LSS 诱导的 MMP-2 与 PAR-1 的相互作用。然后,我们进一步检测了 LSS 模型大鼠内皮组织中 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1、ICAM1 以及血清中 MMP-2 和 Fibronectin 蛋白的表达量,发现模型组左颈总动脉内皮组织中 MMP-2、

PAR-1 和 p38-MAPK 的 mRNA 和蛋白表达明显高于假手术组。YXTC 高剂量组疗效最佳,能有效逆转内皮组织中 PAR-1、vWF、VCAM1 和 ICAM1 在 mRNA 和蛋白层面的升高,且能显著降低血清中 MMP-2 和 Fibronectin 蛋白的含量。YXTC 中剂量组仅降低了 ICAM1 和 vWF 的蛋白含量,对 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK 和 VCAM1 等蛋白的表达无明显影响,而 YXTC 低剂量组对 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路相关蛋白表达的升高均无明显降低作用。由此可见,YXTC 可能通过降低 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路相关蛋白的表达抑制 LSS 介导的血小板-内皮细胞黏附,且呈剂量依赖性。Fibronectin 是介导血小板黏附的主要蛋白受体^[90],本研究结果显示 YXTC 高剂量组降低了 Fibronectin 蛋白的表达量,进一步说明 YXTC 能抑制血小板的黏附作用。

5 小结

愈心痛胶囊可能通过降低 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路相关蛋白的表达抑制低剪切应力介导的血小板-内皮细胞黏附,且呈剂量依赖性。

第二节 愈心痛胶囊抑制低剪切应力诱导的血小板-内皮黏附的作用机制与其调控 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 密切相关

1 实验材料

1.1 实验动物

同第三章第二节 1.1。

1.2 实验细胞

同第三章第二节 1.2。

1.3 实验试剂

- 1) 愈心痛胶囊 (Yuxintong Capsule, YXTC), 大连胜光药业集团有限公司;
- 2) 阿司匹林肠溶片, 美国 Bayer 公司;
- 3) DMEM 培养基, 美国 Gibco 公司;
- 4) 胎牛血清(FBS), 美国 Gibco 公司;
- 5) 细胞计数试剂盒 (CCK-8), 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 6) 磷酸盐缓冲液 (PBS), 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 7) 青霉素/链霉素溶液, 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 8) PBS 缓冲液, 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 9) RIPA 裂解液, 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 10) 蛋白酶抑制剂, 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 11) 总 RNA 提取试剂盒, 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 12) 通用逆转录试剂盒, 上海翊圣生物科技有限公司;
- 13) Realtime PCR 荧光定量试剂盒, 上海翊圣生物科技有限公司;
- 14) BCA 蛋白浓度测定试剂盒, 北京索莱宝生物科技有限公司;
- 15) 蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物, 中国碧云天生物技术有限公司;
- 16) ECL 化学发光试剂盒, 中国碧云天生物技术有限公司;
- 17) MMP-2 抗体, 美国 Proteintech 公司;
- 18) PAR-1 抗体, 美国 Proteintech 公司;
- 19) p38-MAPK 抗体, 美国 Proteintech 公司;
- 20) GPIIb/IIIa 抗体, 美国 Proteintech 公司;

- 21) VCAMI 抗体, 美国 Proteintech 公司;
- 22) ICAM1 抗体, 美国 Proteintech 公司;
- 23) GAPDH 抗体, 美国 Proteintech 公司;
- 24) PAR-1 抑制剂 (RWJ56110), 美国 MedChemExpress 公司。

1.4 实验仪器

- 1) 超净工作台, 苏州净化设备有限公司;
- 2) CO₂ 恒温培养箱, 德国 Eppendorf 公司;
- 3) 超纯水仪, 美国 Millipore 公司;
- 4) 电泳仪, 美国 Bio-Rad 公司;
- 5) 电转仪, 美国 Bio-Rad 公司;
- 6) 酶标仪, 美国 BioTek 公司;
- 7) 全自动化学发光图像分析系统, 上海天能科技有限公司;
- 8) 台式低速离心机, 上海医疗器械公司;
- 9) 实时荧光定量 PCR 仪, 加拿大 Molarray 公司;
- 10) 荧光显微镜, 德国 Leica 公司;
- 11) 细胞计数仪, 美国 Count Star 公司;
- 12) 精密天平, 德国 Sartorius 公司;
- 13) 超低温冰箱, 中国海尔公司。

2 实验方法

2.1 药物配制

同第三章第二节 2.1。

2.2 细胞培养

同第三章第二节 2.2。

2.3 分离和提取血小板

同第三章第二节 2.3。

2.4 剪切应力加载实验

同第三章第二节 2.5。

2.5 细胞分组与处理

取对数生长期的 RVECs 随机分为 7 组:

①正常对照组 (NSS+Vehicle): RVECs+血小板, 以含空白血清的 DMEM 培养基灌流, 加载 15 dyne/cm^2 的正常剪切应力 (Normal shear stress, NSS);

②PAR-1 抑制剂组 (NSS+RWJ56110): RVECs+血小板, 以含空白血清及加入 RWJ56110 溶液的 DMEM 培养基灌流, 加载 15 dyne/cm^2 的正常剪切应力;

③模型组 (LSS+Vehicle): RVECs+血小板, 以含空白血清的 DMEM 培养基灌流, 加载 4 dyne/cm^2 的低剪切应力;

④愈心痛胶囊组 (LSS+YXTC): RVECs+血小板, 以加入 YXTC 含药血清的 DMEM 培养基灌流, 加载 4 dyne/cm^2 的低剪切应力;

⑤模型+PAR-1 抑制剂组 (LSS+RWJ56110): RVECs+血小板, 以含空白血清及加入 RWJ56110 溶液的 DMEM 培养基灌流, 加载 4 dyne/cm^2 的低剪切应力;

⑥愈心痛胶囊+PAR-1 抑制剂组 (LSS+YXTC+RWJ56110): RVECs+血小板, 以加入 YXTC 含药血清及 RWJ56110 溶液的 DMEM 培养基灌流, 加载 4 dyne/cm^2 的低剪切应力;

⑦阿司匹林组 (LSS+Aspirin): RVECs+血小板, 以含空白血清及加入阿司匹林溶液的 DMEM 培养基灌流, 加载 4 dyne/cm^2 的低剪切应力。

2.6 实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)

2.6.1 RNA 提取

将各组分别进行规定的剪切应力加载实验后, 将流动腔底板中 RVECs 和血小板共培养的细胞悬液置于 10 mm 培养皿中, PBS 清洗一次。均匀滴加 1 mL Trizol 裂解液至培养皿中使细胞充分裂解, 并室温静置 5 min , 使得核酸蛋白复合物完全分离。之后反复吹打 Trizol 裂解液并用移液枪将其转移至 1.5 mL 的 EP 管中。然后向 EP 管中加 0.2 mL 氯仿, 盖好管盖, 剧烈振荡 15 s , 冰盒内静置 5 min 。随后将 EP 管置于低温高速离心机中以 4°C 12000 rpm 离心 10 min 。离心后液体分为三层: 上层为水相 (含有 RNA, 少量 DNA); 中间层为白色薄层 (含有蛋白质和 DNA); 下层有机相 (含有氯仿、蛋白质、多糖、脂肪酸、DNA 等)。RNA 主要在上层无色的水相中, 用移液枪小心吸取上层水相并转移到新的 1.5 mL EP 管中, 注意不要吸到沉淀。然后向新的 EP 管中加入 $200 \mu\text{L}$ 无水乙醇, 混匀 10 s 。准备 RNA 吸附柱: 在 RNA 柱中加入 $500 \mu\text{L}$ 洗注液, 室温放置 2 min ,

4℃ 12000 rpm 离心 2 min, 弃废液。将准备好的 RNA 柱加入上述混合溶液中, 静置 2 min, 4℃ 12000 rpm 离心 2 min, 弃废液。然后向 RNA 柱中加入 600 μL 漂洗液, 4℃ 12000 rpm 离心 2 min, 弃废液。再次向 RNA 柱中加入 600 μL 漂洗液, 4℃ 12000 rpm 离心 2 min, 弃废液。然后 4℃ 12000 rpm 离心 2 min, 弃掉收集管, 将 RNA 柱置于室温放置 10 min, 将 RNA 柱中残余的漂洗液去除。将 RNA 柱放入新的 1.5 mL EP 管中, 向膜中央滴加 50 μL RNase Free ddH₂O(DEPC 水), 室温放置 5 min, 12000 rpm 室温离心 2 min 得到 RNA。

2.6.2 逆转录反应

同第四章第一节 2.4.2。

2.6.3 PCR 扩增反应

同第四章第一节 2.4.3。

2.7 免疫印迹法 (Western blot)

2.7.1 总蛋白的提取

收集完成剪切应力加载后流动腔底板培养皿中的细胞悬液, 用预冷的 PBS 溶液漂洗 3 次, 然后收集至 1.5 mL 的 EP 管中, 4℃, 3000 rpm, 离心 1 min。加入 RIPA 细胞裂解液 (含蛋白酶抑制剂), 反复吹打细胞使其充分混匀, 并置于冰上裂解 20 min, 4℃, 12000 rpm 离心 20 min, 取上清。

2.7.2 蛋白浓度测定

同第四章第一节 2.5.2。

2.7.3 实验操作

同第四章第一节 2.5.3。

2.8 统计分析

所有数据的表达形式采用均数±标准差形式, 所有实验至少重复 3 次。对所有数据进行正态性检验, 若符合正态分布, 多组间的比较采用 ANOVA 分析。若不符合正态分布, 则采用秩和检验。数据录入和统计分析采用 SPSS 20.0, 图形绘制采用 Origin 2018 软件, $P < 0.05$ 说明差异存在统计学显著性。

3 实验结果

3.1 RWJ56110 能够增强愈心痛胶囊对 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路相关基因表达的调控作用

采用实时荧光定量 PCR 法探究 PAR-1 抑制剂 (RWJ56110) 对愈心痛胶囊调控 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路相关基因表达的影响。如图 4-6 及表 4-7 所示, 与正常对照组 (NSS+Vehicle) 相比, PAR-1 抑制剂组 (NSS+RWJ56110) 的 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 GPIIb α 的 mRNA 水平均无明显变化 ($P>0.05$), 而模型组 (LSS+Vehicle) 的 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 GPIIb α 的 mRNA 水平均显著升高 ($P<0.01$); 与模型组相比, 愈心痛胶囊组 (LSS+YXTC) 和模型+PAR-1 抑制剂组 (LSS+RWJ56110) MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、ICAM1 和 VCAM1 的 mRNA 水平均显著降低 ($P<0.01$), 与愈心痛胶囊组的变化一致, 阿司匹林组 (LSS+Aspirin) 的 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、ICAM1 和 VCAM1 的 mRNA 表达量均显著下调 ($P<0.01$); 与 LSS+YXTC 组和 LSS+RWJ56110 组相比, 愈心痛胶囊+PAR-1 抑制剂组 (LSS+YXTC+RWJ56110) 的 MMP-2、PAR-1、ICAM1 和 VCAM1 的 mRNA 水平均显著降低 ($P<0.01$); 然而, p38-MAPK 的 mRNA 水平未发生明显变化 ($P>0.05$)。

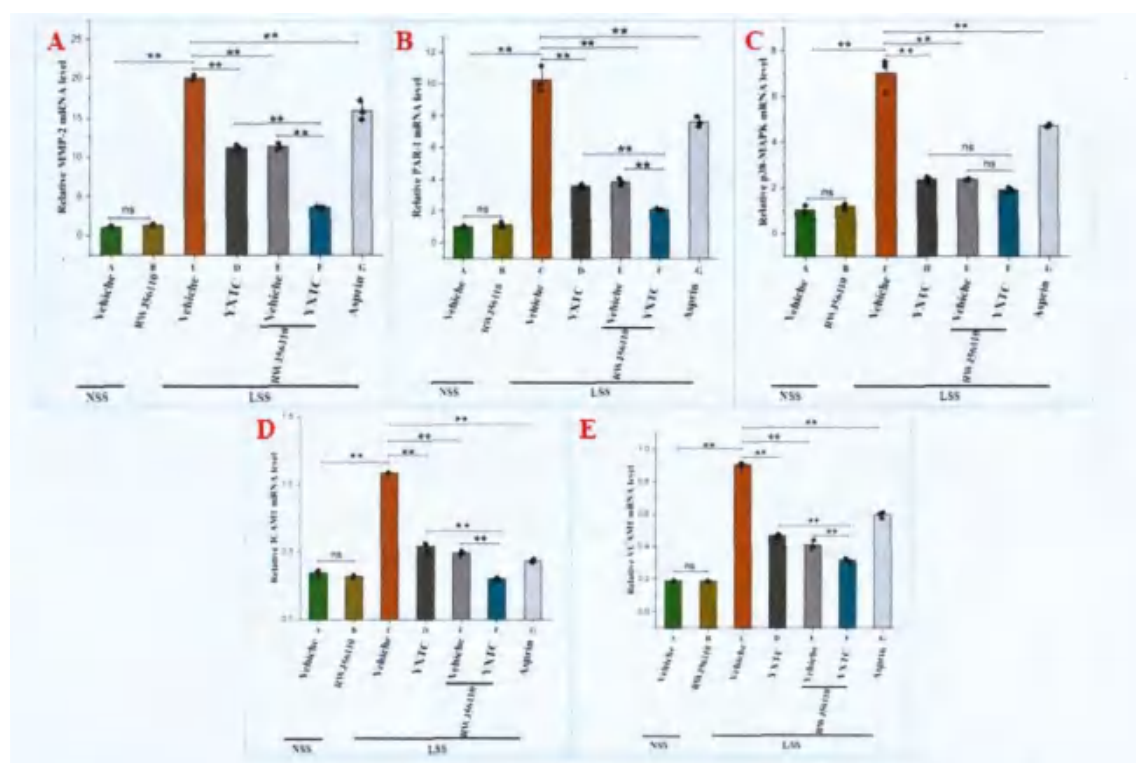


图 4-6 RWJ56110 对愈心痛胶囊调控 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路相关基因表达的影响
A: MMP-2; B: PAR-1; C: p38-MAPK; D: VCAM1; E: ICAM1。注: ns, 差异无统计学意义; * $P<0.05$, ** $P<0.01$ 。

表 4-7 各组细胞悬液中 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路相关基因的表达量 ($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Group	MMP-2	PAR-1	p38-MAPK	VCAM1	ICAM1
NSS+Vehicle	1.01±0.08	1.00±0.03	1.01±0.11	0.19±0.00	0.34±0.02
NSS+RWJ56110	1.22±0.08	1.13±0.10	1.19±0.07	0.19±0.00	0.32±0.01
LSS+Vehicle	19.93±0.21**	10.24±0.47**	7.01±0.43**	0.91±0.01**	1.09±0.00**
LSS+YXTC	11.16±0.22***	3.61±0.06***	2.37±0.09**	0.47±0.01***	0.54±0.03***
LSS+RWJ56110	11.24±0.23***	3.84±0.23***	2.37±0.01**	0.41±0.03***	0.49±0.02***
LSS+YXTC+ RWJ56110	3.54±0.08	2.09±0.04	1.91±0.07	0.31±0.01	0.30±0.01
LSS+Aspirin	15.92±0.71**	7.64±0.19**	4.74±0.06**	0.60±0.02**	0.43±0.01**

注：与 NSS+Vehicle 组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；与 LSS+Vehicle 组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ；
与 LSS+YXTC+ RWJ56110 组相比，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ 。

3.2 RWJ56110 能够增强愈心痛胶囊对 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路相关蛋白表达的调控作用

采用免疫印迹法 (Western-blot) 探究 RWJ56110 对愈心痛胶囊调控 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路相关蛋白表达的影响。结果如图 4-7、图 4-8 及表 4-8 所示，与正常对照组 (NSS+Vehicle) 相比，PAR-1 抑制剂组 (NSS+RWJ56110) MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 GPIIb α 等蛋白的表达均无明显变化 ($P>0.05$)，模型组 (LSS+Vehicle) 的 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 GPIIb α 等蛋白表达水平显著升高 ($P<0.01$)；与模型组相比，愈心痛胶囊组 (LSS+YXTC) 和模型+PAR-1 抑制剂组 (LSS+RWJ56110) 的 MMP-2、PAR-1 和 ICAM1 的表达显著下调 ($P<0.01$)，p38-MAPK 的表达也明显降低 ($P<0.05$)，而 VCAM1 和 GPIIb α 的表达无明显变化 ($P>0.05$)，阿司匹林组 (LSS+Aspirin) 的 ICAM1 表达显著下调 ($P<0.01$)，但 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1 和 GPIIb α 的表达量均无明显变化 ($P>0.05$)；与 LSS+YXTC 组或 LSS+RWJ56110 组相比，LSS+YXTC+RWJ56110 组 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1 和 GPIIb α 的表达量均显著降低 ($P<0.01$)，此外，LSS+YXTC+RWJ56110 组 ICAM1 的表达较 YXTC 组显著下调 ($P<0.01$)，但和

RWJ56110 组相比无统计学差异 ($P>0.05$)。结果表明,愈心痛胶囊抑制低剪切应力诱导的血小板-内皮黏附可能与抑制 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路的激活有关。

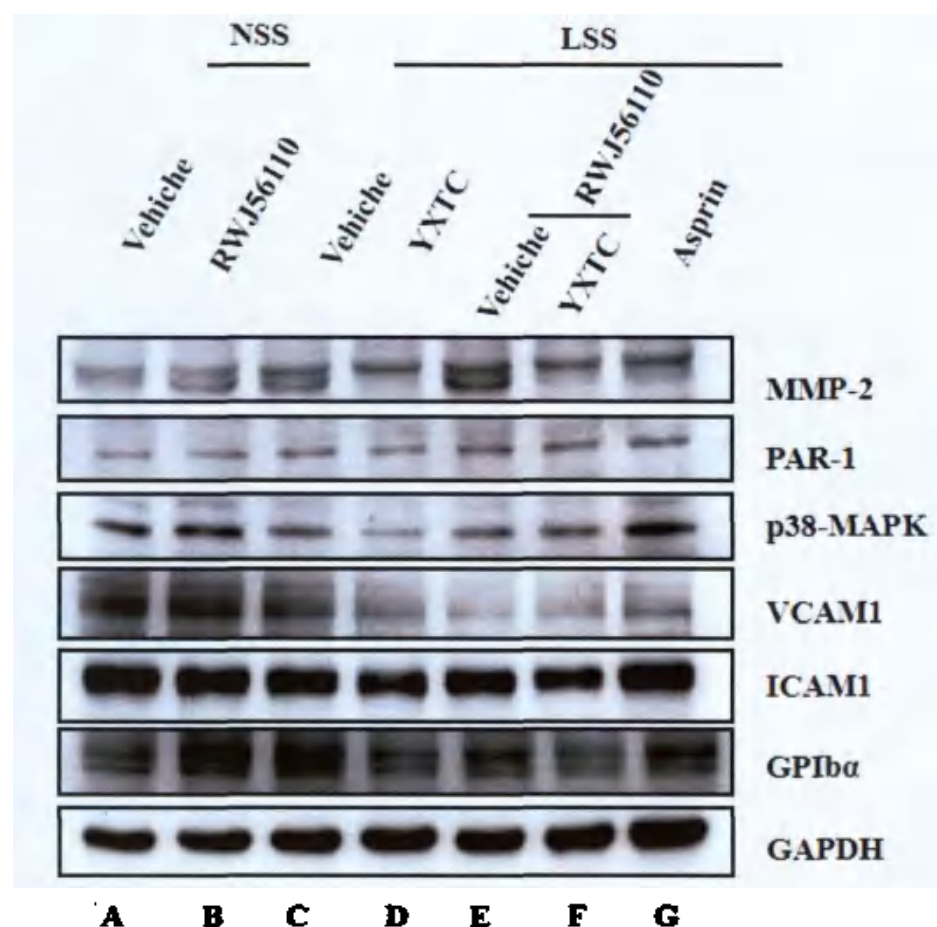


图 4-7 RWJ56110 影响愈心痛胶囊调控 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路相关蛋白的表达条带

A: NSS+Vehicle; B: NSS+RWJ56110; C: LSS+Vehicle; D: LSS+YXTC; E: LSS+Vehicle+RWJ56110; F: LSS+YXTC+RWJ56110; G: LSS+Aspirin。

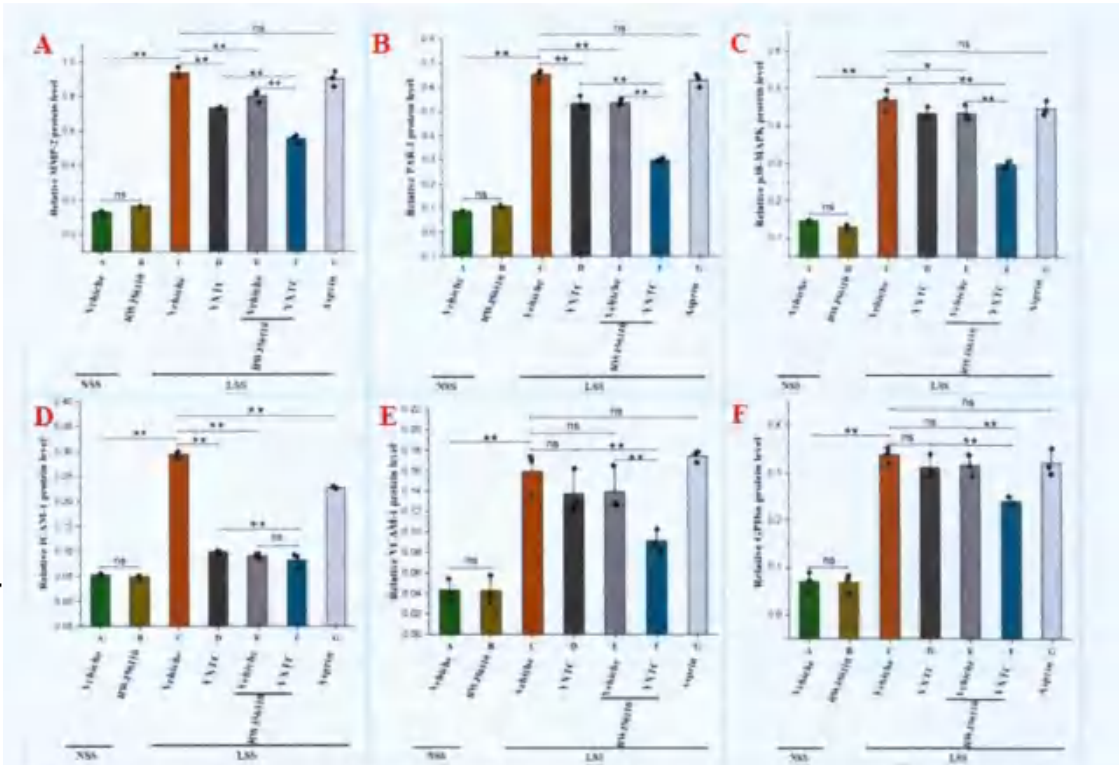


图 4-8 RWJ56110 对愈心痛胶囊调控 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路相关蛋白表达的影响
A: MMP-2; B: PAR-1; C: p38-MAPK; D: VCAM1; E: ICAM1; F: GPIIb/IIIa。注: *P<0.05, **P<0.01。

表 4-8 各组细胞悬液中 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 通路相关蛋白的表达量 ($\bar{x} \pm s$, n=3)

Group	MMP2	PAR-1	P38-MAPK	VCAM1	ICAM1	GPIIb
NSS+Vehicle	0.13±0.00	0.09±0.00	0.15±0.00	0.04±0.01	0.05±0.00	0.07±0.01
NSS+RWJ56110	0.16±0.00	0.11±0.01	0.13±0.00	0.04±0.01	0.05±0.00	0.07±0.01
LSS+Vehicle	0.94±0.02**	0.65±0.01**	0.47±0.02**	0.16±0.01**	0.30±0.00**	0.34±0.01**
LSS+YXTC	0.73±0.00***	0.53±0.02***	0.43±0.01***	0.14±0.01**	0.10±0.00***	0.31±0.01**
LSS+RWJ56110	0.80±0.02***	0.54±0.01***	0.43±0.01***	0.14±0.01**	0.09±0.00**	0.32±0.01**
LSS+YXTC+ RWJ56110	0.56±0.50	0.30±0.01	0.30±0.01	0.09±0.01	0.08±0.01	0.24±0.01
LSS+Aspirin	0.90±0.03	0.63±0.02	0.45±0.01	0.17±0.00	0.23±0.00**	0.32±0.02

注: 与 NSS+Vehicle 组相比, *P<0.05, **P<0.01; 与 LSS+Vehicle 组相比, *P<0.05, **P<0.01;
与 LSS+YXTC+ RWJ56110 组相比, ^P<0.05, ^^P<0.01。

4 讨论

本章的第一节实验已初步明确了 YXTC 抑制 LSS 诱导的血小板-内皮黏附作

用可能与抑制 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路的激活有关,此外, YXTC 还可进一步抑制该通路活化后引发的炎症反应。既往研究表明炎症反应贯穿低剪切应力介导血小板-内皮细胞黏附,进而导致 AS 发生发展的全过程^[91]。MAPKs 是炎症反应过程中一种重要的激酶,在炎症反应周期的调控以及细胞生长及分化的调节等方面起到关键作用。其中, p38-MAPK 是 MAPKs 家族中最重要的一员,其活化后可以触发和放大炎症反应,而阻断 p38-MAPK 的活化则可以减轻炎症反应^[92]。p38-MAPK 活化后可以激活下游血管细胞黏附分子 (VCAM1)、细胞间黏附分子 (ICAM1) 等黏附分子的释放,介导血小板和白细胞与内皮细胞的黏附,从而引起免疫炎症反应的发生^[93]。低剪切应力介导内皮细胞炎性损伤后,血小板对受损内皮的识别和黏附在动脉粥样硬化斑块的形成过程中起着关键性作用^[94]。血小板表面的糖蛋白 GPIb α 是启动血小板-内皮细胞黏附的关键受体。GPIb α 与受损内皮细胞表面暴露的 vWF 识别并结合,启动血小板在内皮表面的滚动黏附,进而稳定黏附到活化的内皮细胞上^[67]。因此, GPIb α 是反映血小板-内皮细胞黏附的核心标志。

本研究进一步通过体外实验验证了 YXTC 抑制 LSS 状态下血小板与 RVECs 黏附的机制是否与调节 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路有关。我们采用 PAR-1 抑制剂 RWJ-56110 阻断 PAR-1 受体的活化,从而抑制 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路的激活,借助 RT-qPCR 和 Western blotting 技术检测 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路中核心靶点 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK 及其下游炎症因子 VCAM1、ICAM1 的基因和蛋白的表达,评价 YXTC 对该通路的影响。此外,还检测了 GPIb α 的蛋白表达量以明确 YXTC 对血小板与 RVECs 黏附程度的影响。研究结果显示在正常剪切应力 (NSS) 状态下, RWJ-56110 不能降低 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 GPIb α 等蛋白的表达,说明 NSS 未导致血小板和 RVECs 活化,因而 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路未被激活,所以该通路相关蛋白的表达水平均较低。在低剪切应力 (LSS) 条件下, MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 GPIb α 等蛋白的表达均较正常对照组 (NSS+Vehicle) 显著升高,运用 RWJ-56110 阻断活性 PAR-1 的表达后,与模型组 (LSS+Vehicle) 相比, MMP-2、PAR-1、p38-MAPK 和 ICAM1 的蛋白表达水平显著降低,但 VCAM1 和 GPIb α

的表达量无明显变化。YXTC 干预的效应与 RWJ-56110 一致, 且 YXTC 与 RWJ-56110 联合干预作用较 YXTC 或 RWJ-5611 单独干预更能显著降低 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 GPIb α 的表达量, 说明 YXTC 可能是通过阻断 PAR-1, 进而抑制 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路的激活介导抗血小板-内皮细胞黏附作用。

5 小结

愈心痛胶囊抑制低剪切应力诱导的血小板-内皮黏附可能与抑制 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路的激活有关。

第五章 愈心痛胶囊的化学成分及入血成分研究

愈心痛胶囊由红参、三七和延胡索三味中药组成。方中红参甘温能大补元气，三七化瘀生新，延胡索活血止痛，与三七相伍能增强化瘀止痛之功。三味药相辅相成，标本兼顾，使愈心痛胶囊有益气活血、通脉止痛之效。现代药理学研究表明愈心痛胶囊能扩张冠状动脉、改善心肌代谢、抑制血小板活化、聚集和黏附，改善血液流变学，从而有效延缓动脉粥样硬化（Atherosclerosis, AS）的进展，并改善冠心病症状^[1]。临床主要用于治疗辨证为气虚血瘀证的冠心病心绞痛患者，但愈心痛胶囊的药效成分尚不明确，且目前缺乏关于愈心痛胶囊的化学成分及入血成分分析，因此，本研究将采用超高效液相色谱-四极杆-飞行时间-高分辨质谱仪进一步分析该药所含的化学成分和入血成分，明确其药效物质基础，为正确用药和质量控制标准提供科学的依据。

1 实验材料

1.1 实验试剂

（1）愈心痛胶囊（国药准字 Z20020089，生产企业：大连胜光药业集团有限公司，规格：0.33g*24 粒）；

（2）甲醇：LC-MS 级，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；

（3）乙腈：LC-MS 级，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；

（4）无水乙醇：色谱纯，美国 Thermo Fisher Scientific 公司；

（5）蒸馏水：屈臣氏商标有限公司。

1.2 实验仪器

（1）ACQUITY UPLC H-Class 超高效液相色谱仪：沃特世科技（上海）有限公司（Waters）；

（2）Xevo G2-S QTOF 四级杆飞行时间高分辨质谱仪：沃特世科技（上海）有限公司（Waters）；

（3）Kinetex EVO C18 100（100×2.1 mm, 2.6μm）色谱柱及保护柱：沃特世科技（上海）有限公司（Waters）；

（4）Waters Oasis HLB SPE 小柱（30mg）：沃特世科技（上海）有限公司（Waters）。

2 实验方法

2.1 样品制备

2.1.1 愈心痛胶囊提取物制备

精密称取愈心痛胶囊(0.33g/粒)内容物 20 mg, 准确加入 20 mL 稀乙醇溶液, 超声提取 30 min, 静置冷却至室温, 过 0.22 μm 滤膜, 即得到愈心痛胶囊提取物的供试品溶液, 置于-20℃冰箱保存。

2.1.2 愈心痛胶囊含药血清样品制备

(1) 制备含药血清: 同第三章第二节 2.1.1。

(2) 血清样本处理: 精密吸取大鼠含药血清样品 1.5 mL, 过 SPE 小柱, 依次采用水和甲醇各 1mL 洗脱, 收集甲醇洗脱液, 40℃氮气吹干, 加 500 μL 50%甲醇复溶, 涡旋, 离心, 上清液作为血清样本供试品溶液。空白对照组取未给药的空白大鼠血清同法处理。

2.2 分析条件

(1) 色谱条件: 流动相: 水(A)-乙腈(B)梯度洗脱, 流速 0.4 mL/min, 柱温 40℃, 进样体积 1 μL 。见表 1。

(2) 质谱条件: ESI 源, 正、负离子扫描, 扫描范围 m/z : 50~1200 Da。

表 5-1 梯度洗脱条件

min	乙腈 (%)	水溶 液(%)	流速 (mL/min)	柱温 (℃)	进样量 (μL)
initial	15	85	0.4	40	1
5	25	75			
11	98	2			
13	98	2			
13.1	15	85			
15	15	85			

2.3 统计分析

数据采集使用 Masslynx V4.1 软件。得到的数据使用 Progenesis Q1 软件进行处理, 经过峰顶检测和校准处理算法进行校准和峰对齐, 同时将可能的目标化合物的化学式导入软件, 通过精确分子量比对对成分进行定性分析。

3 实验结果

3.1 愈心痛胶囊中化学成分鉴定

采用上述色谱及质谱方法分别对提取溶剂、愈心痛胶囊供试品溶液进行分析,通过精确分子量比对、二级质谱碎片离子分析,从愈心痛胶囊提取物中共鉴定出 20 个化合物。成分鉴定结果见图 5-1、图 5-2 和表 5-2。

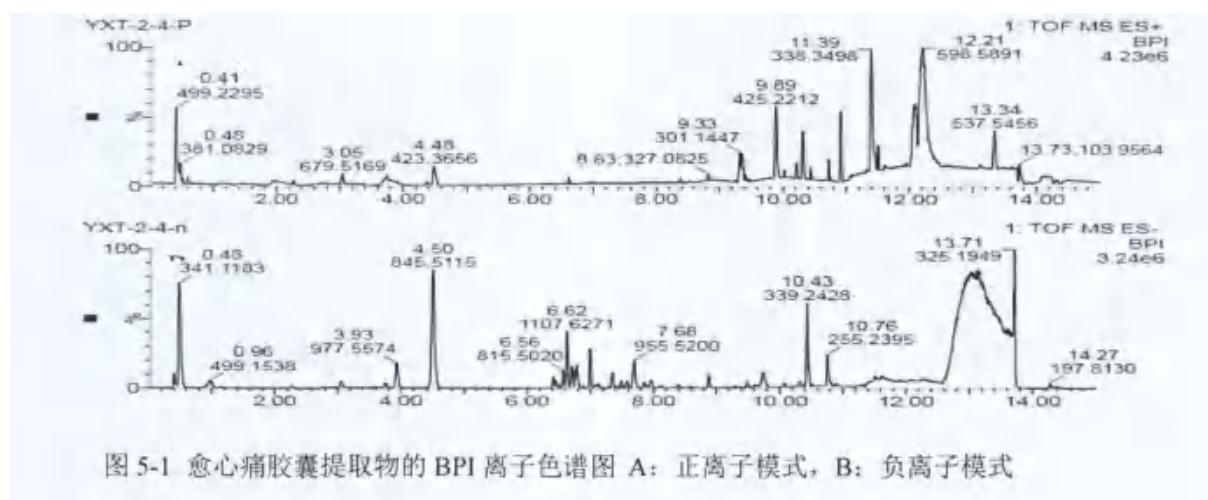
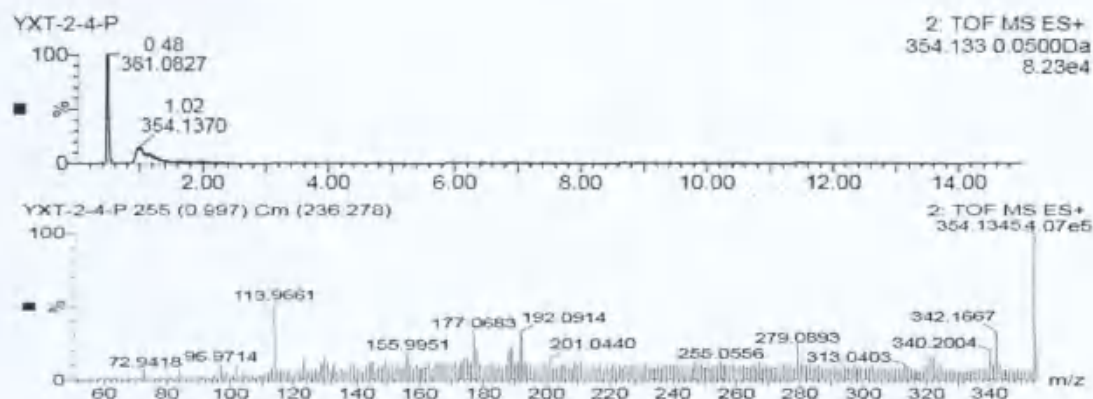


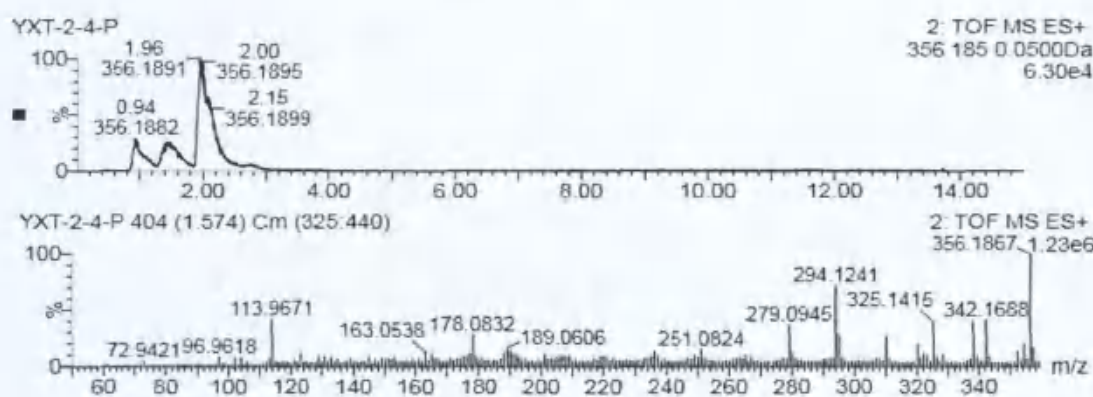
图 5-1 愈心痛胶囊提取物的 BPI 离子色谱图 A: 正离子模式, B: 负离子模式

表 5-2 愈心痛胶囊中鉴定成分的 UPLC/Q-TOF-MS/MS 数据

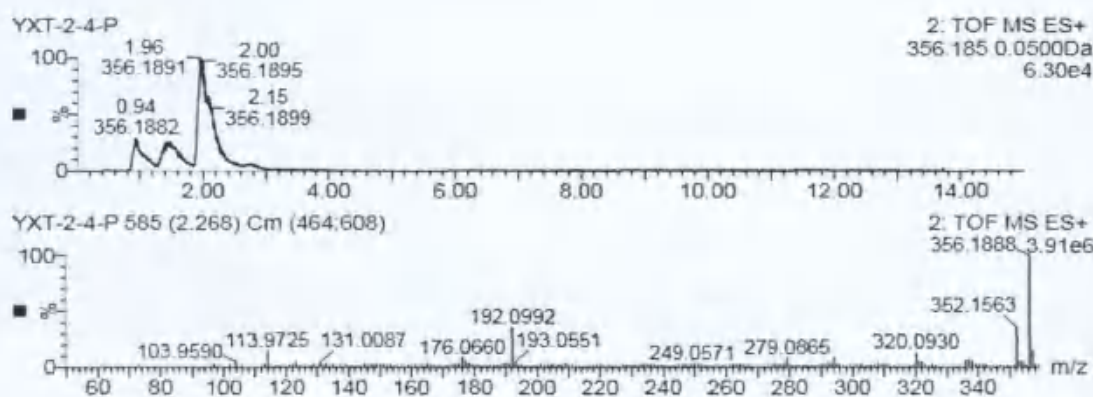
保留时间 min	相对分子量 m/z	离子类型	偏差	分子式	鉴定化合物
1.01	354.1327	$[M+H]^+$	-2.5117	$C_{20}H_{19}NO_3$	Protopine (原阿片碱)
1.44	356.1851	$[M+H]^+$	-1.4469	$C_{21}H_{23}NO_4$	Glaucine (海罂粟碱)
1.98	356.1850	$[M+H]^+$	-1.6558	$C_{21}H_{23}NO_4$	Tetrahydropalmatine (延胡索乙素)
2.78	340.1538	$[M+H]^+$	-1.4603	$C_{20}H_{21}NO_4$	Tetrahydroberberine /canadine (四氢小檗碱)
3.62	324.1227	$[M+H]^+$	-1.0649	$C_{19}H_{17}NO_4$	Tetrahydrocoptisine (四氢黄连碱)
3.73	370.2009	$[M+H]^+$	-1.1089	$C_{22}H_{27}NO_4$	Corydaline (延胡索甲素)
3.92	977.5328	$[M+HCOO]^-$	0.4975	$C_{47}H_{70}O_{14}$	notoginsenoside R1
	955.5202	$[M+Na]^+$			(三七皂苷 R1)
4.48	845.4906	$[M+HCOO]^-$	0.5497	$C_{42}H_{72}O_{14}$	ginsenoside Rg1
	823.4793	$[M+Na]^+$	-2.6409		(人参皂苷 Rg1)
4.52	991.5492	$[M+HCOO]^-$	0.9025	$C_{48}H_{72}O_{18}$	ginsenoside Re
	969.5352	$[M+Na]^+$	-4.3820		(人参皂苷 Re)
6.4	845.4903	$[M+HCOO]^-$	-0.0557	$C_{42}H_{72}O_{14}$	ginsenoside Rf
	823.4797	$[M+Na]^+$	-2.1970		(人参皂苷 Rf)
6.56	815.4800	$[M+HCOO]^-$	-0.5237	$C_{41}H_{70}O_{13}$	notoginsenoside R2
	793.4698	$[M+Na]^+$	-1.4253		(三七皂苷 R2)
	1107.5981	$[M-H]^-$	2.8823		ginsenoside Rb1
6.61	1131.5895	$[M+Na]^+$	-2.4384	$C_{54}H_{90}O_{23}$	(人参皂苷 Rb1)
	1109.6087	$[M+H]^+$	-1.3766		
6.62	785.5059	$[M+H]^+$	1.6357	$C_{42}H_{72}O_{13}$	ginsenoside Rg2
	829.4969	$[M+HCOO]^-$	2.5385		(人参皂苷 Rg2)
6.7	1079.5971	$[M+H]^+$	-1.4977	$C_{53}H_{90}O_{22}$	ginsenoside Rc
	1101.5800	$[M+Na]^+$			(人参皂苷 Rc)
6.78	1101.5809	$[M+Na]^+$	-0.6628	$C_{53}H_{90}O_{22}$	ginsenoside Rb2
	1077.5895	$[M-H]^-$	4.1699		(人参皂苷 Rb2)
6.78	1101.5809	$[M+Na]^+$	-0.6628	$C_{53}H_{90}O_{22}$	ginsenoside Rb3
	1077.5888	$[M-H]^-$	3.4541		(人参皂苷 Rb3)
6.99	969.5383	$[M+Na]^+$	-1.1052	$C_{48}H_{72}O_{18}$	ginsenoside Rd
	991.5500	$[M+HCOO]^-$	2.9665		(人参皂苷 Rd)
7.12	969.5383	$[M+Na]^+$	-1.0939	$C_{48}H_{72}O_{18}$	ginsenoside Rd isomer (人参皂苷 Rd)
7.65	979.4859	$[M+Na]^+$	-1.4262	$C_{48}H_{76}O_{19}$	ginsenoside Ro
	955.4939	$[M-H]^-$	3.2618		(人参皂苷 Ro)
7.85	807.4863	$[M+Na]^+$	-0.2493	$C_{42}H_{72}O_{13}$	ginsenoside Rg3
	783.4917	$[M-H]^-$	2.2204		(人参皂苷 Rg3)



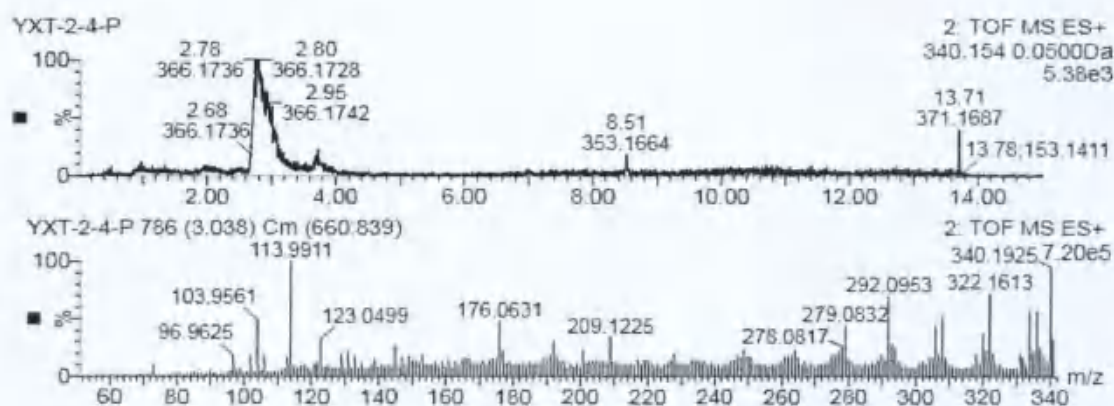
(1) protopine (原阿片碱)



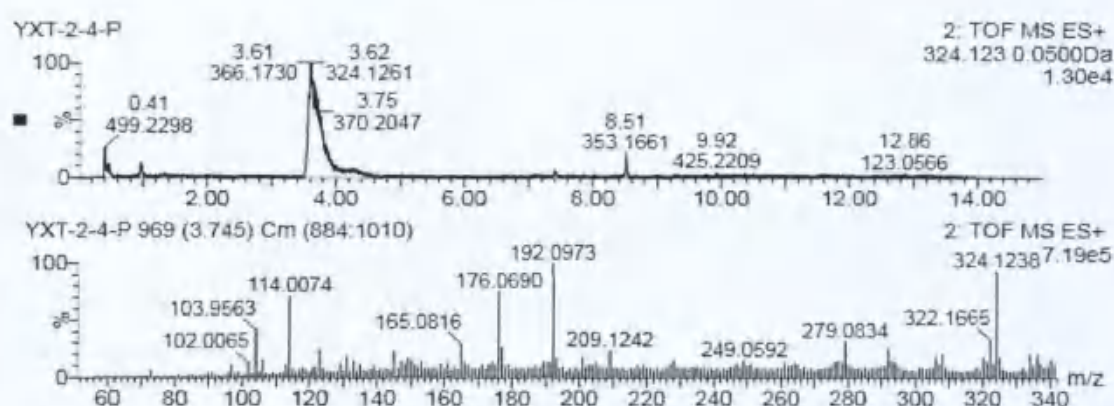
(2) glaucine (海罂粟碱)



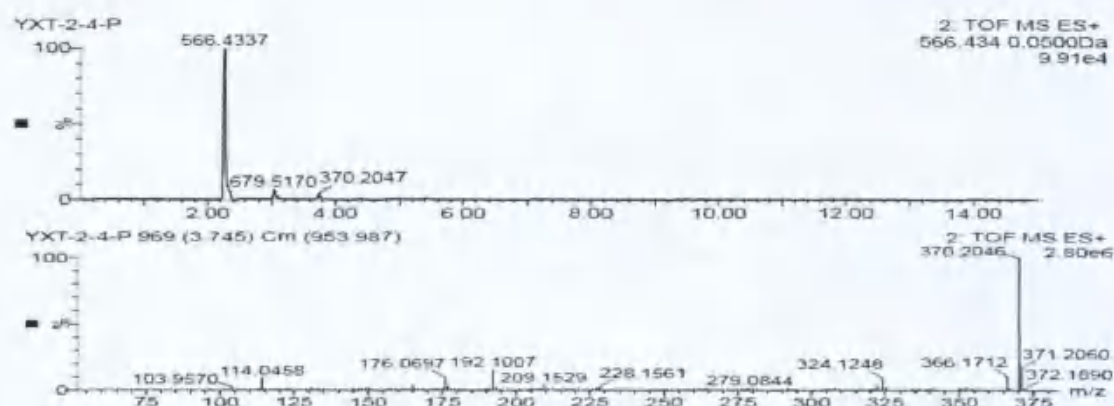
(3) tetrahydropalmatine (延胡索乙素)



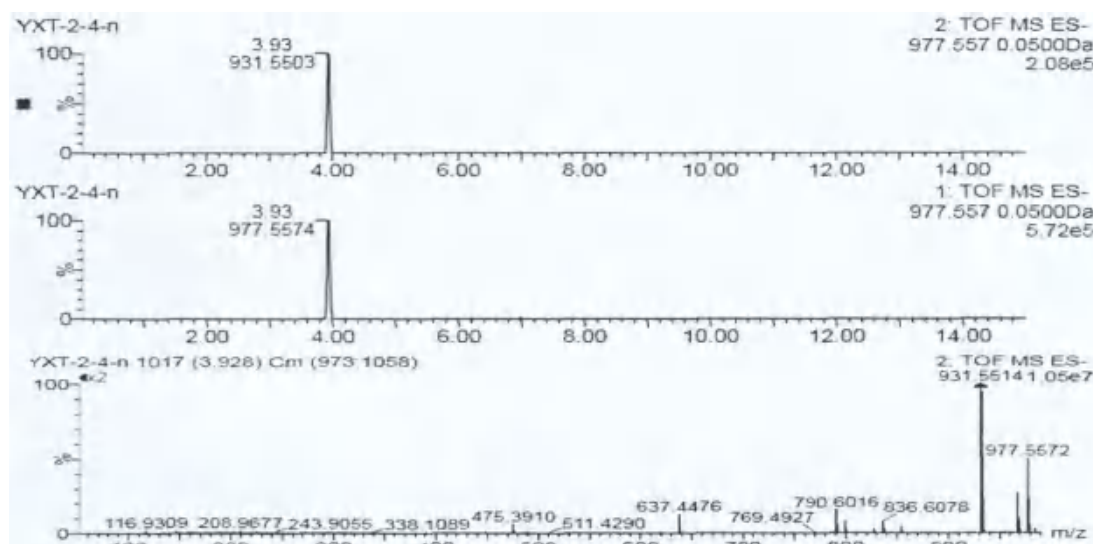
(4) tetrahydroberberine (四氢小檗碱)



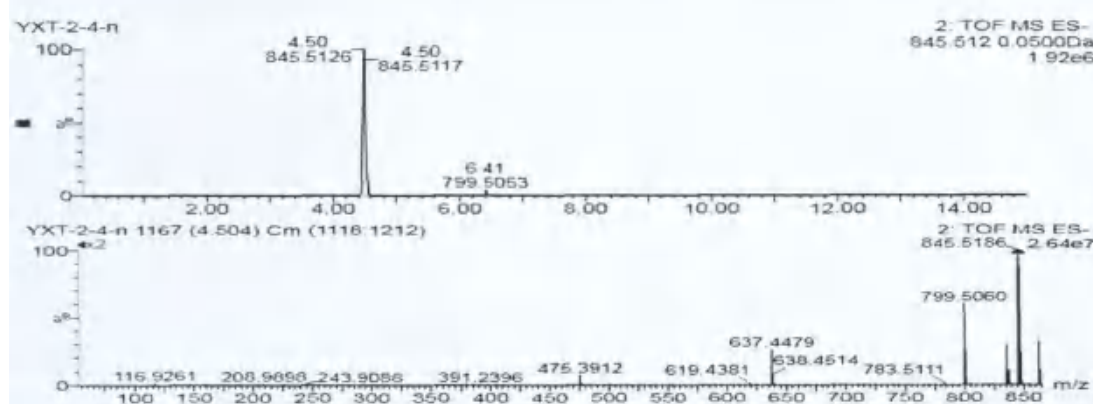
(5) Tetrahydrocoptisine (四氢黄连碱)



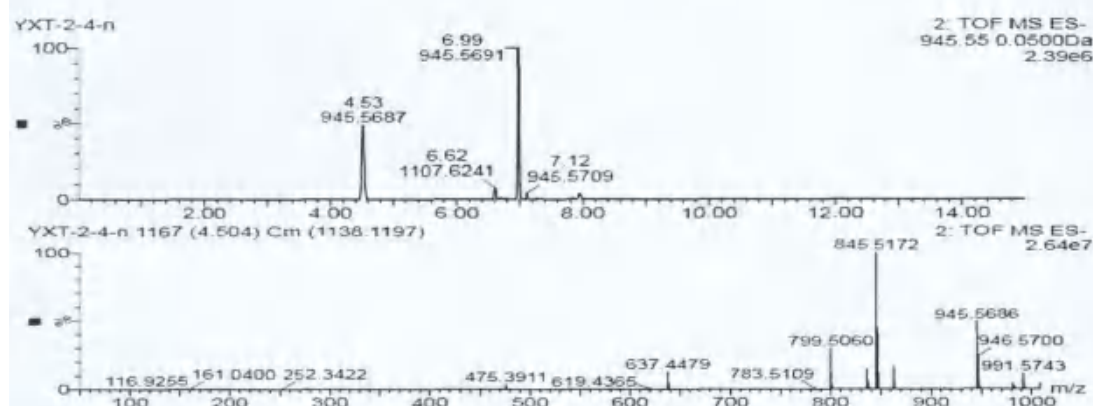
(6) corydaline (延胡索甲素)



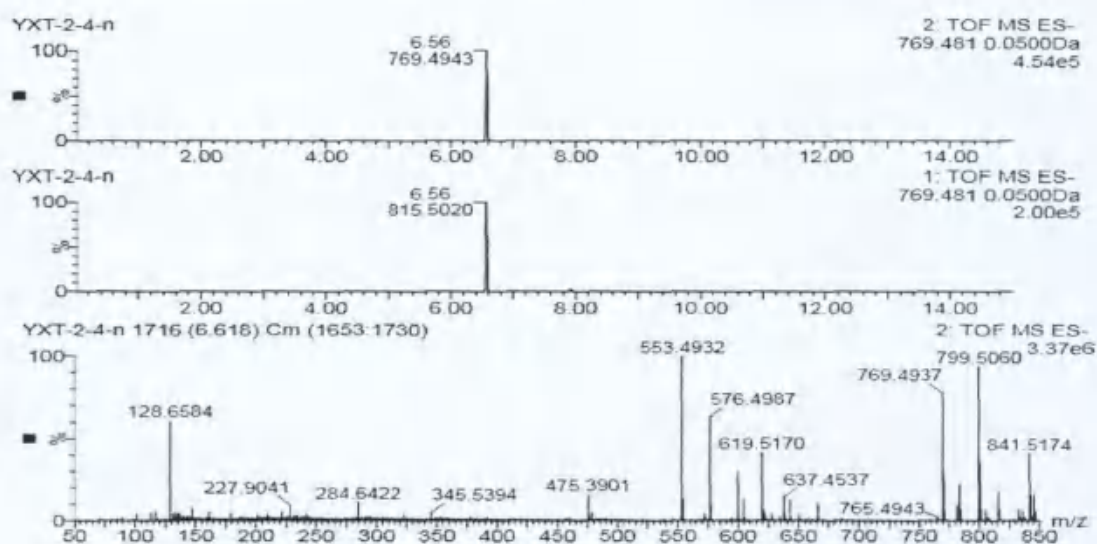
(7) notoginsenoside R1 (三七皂苷 R1)



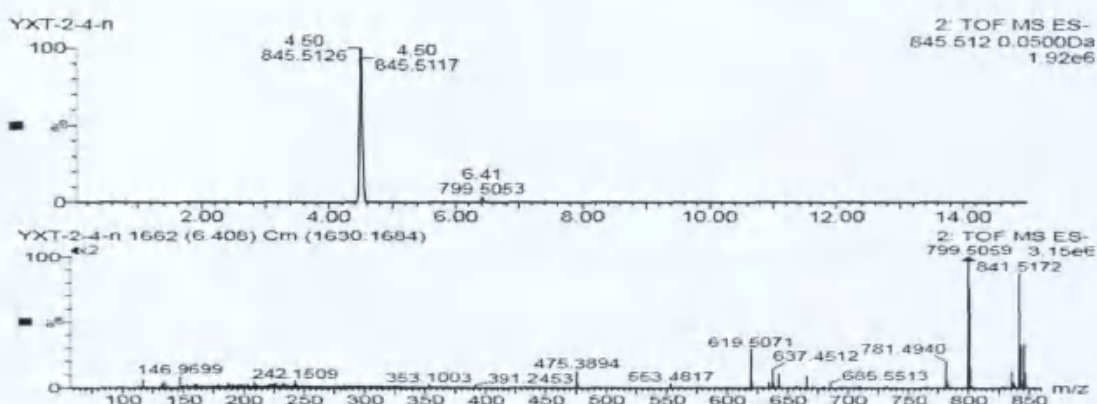
(8) ginsenoside Rg1 (人参皂苷 Rg1)



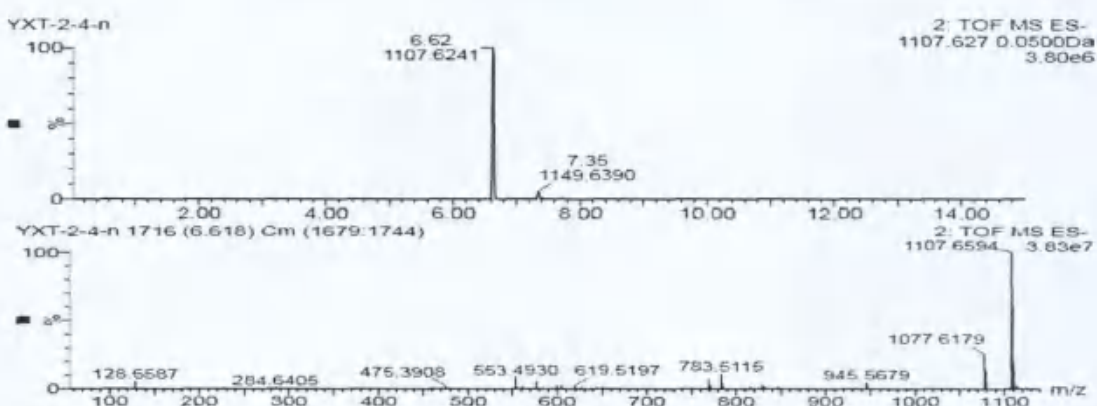
(9) ginsenoside Re (人参皂苷 Re)



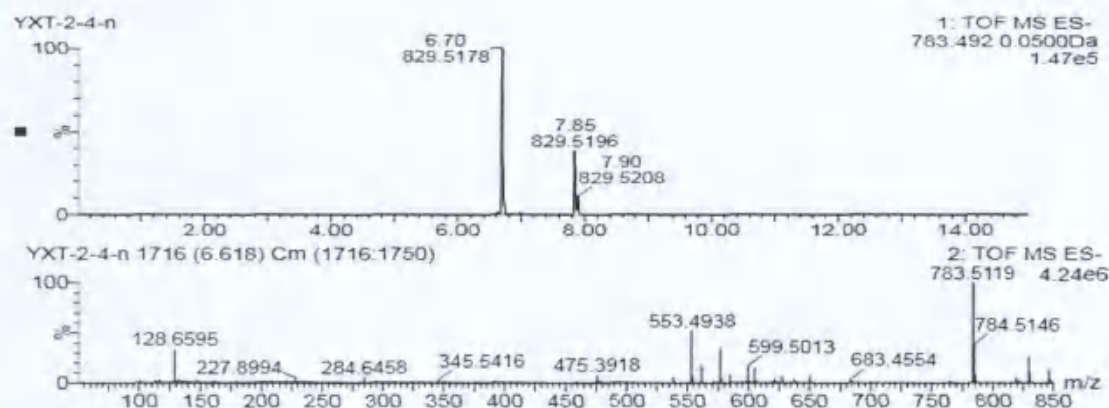
(10) ginsenoside Rf (人參皂苷 Rf)



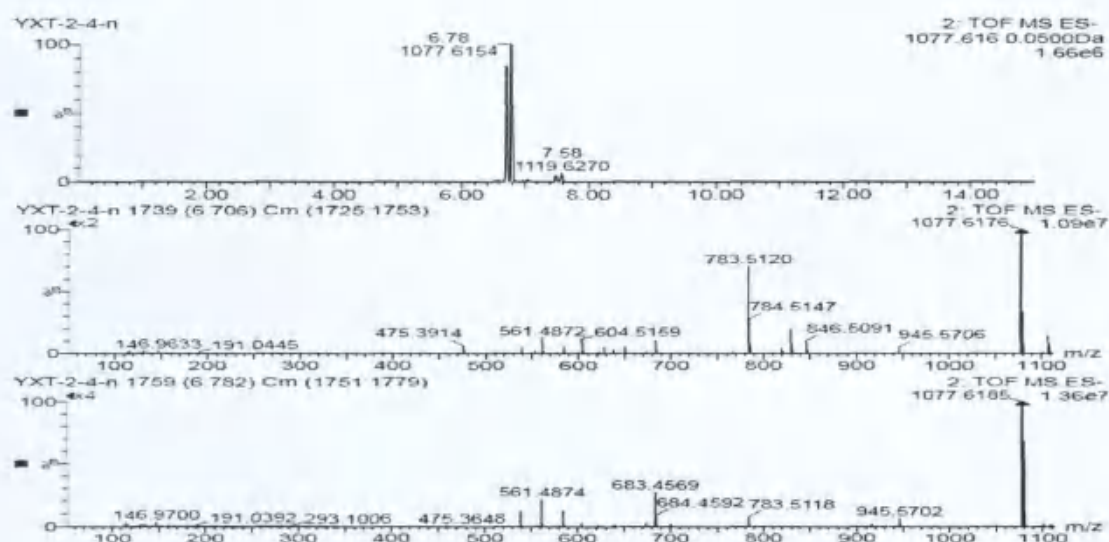
(11) notoginsenoside R2 (三七皂苷 R2)



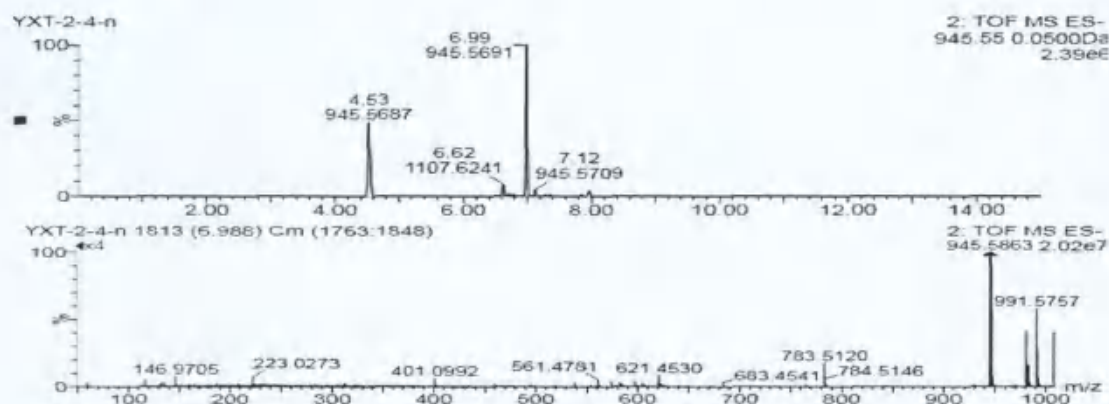
(12) ginsenoside Rb1 (人參皂苷 Rb1)



(13) ginsenoside Rg2 (人参皂苷 Rg2)



(14) ginsenoside Rb2 & Rb3 (人参皂苷 Rb2 & Rb3)



(15) ginsenoside Rd (人参皂苷 Rd)

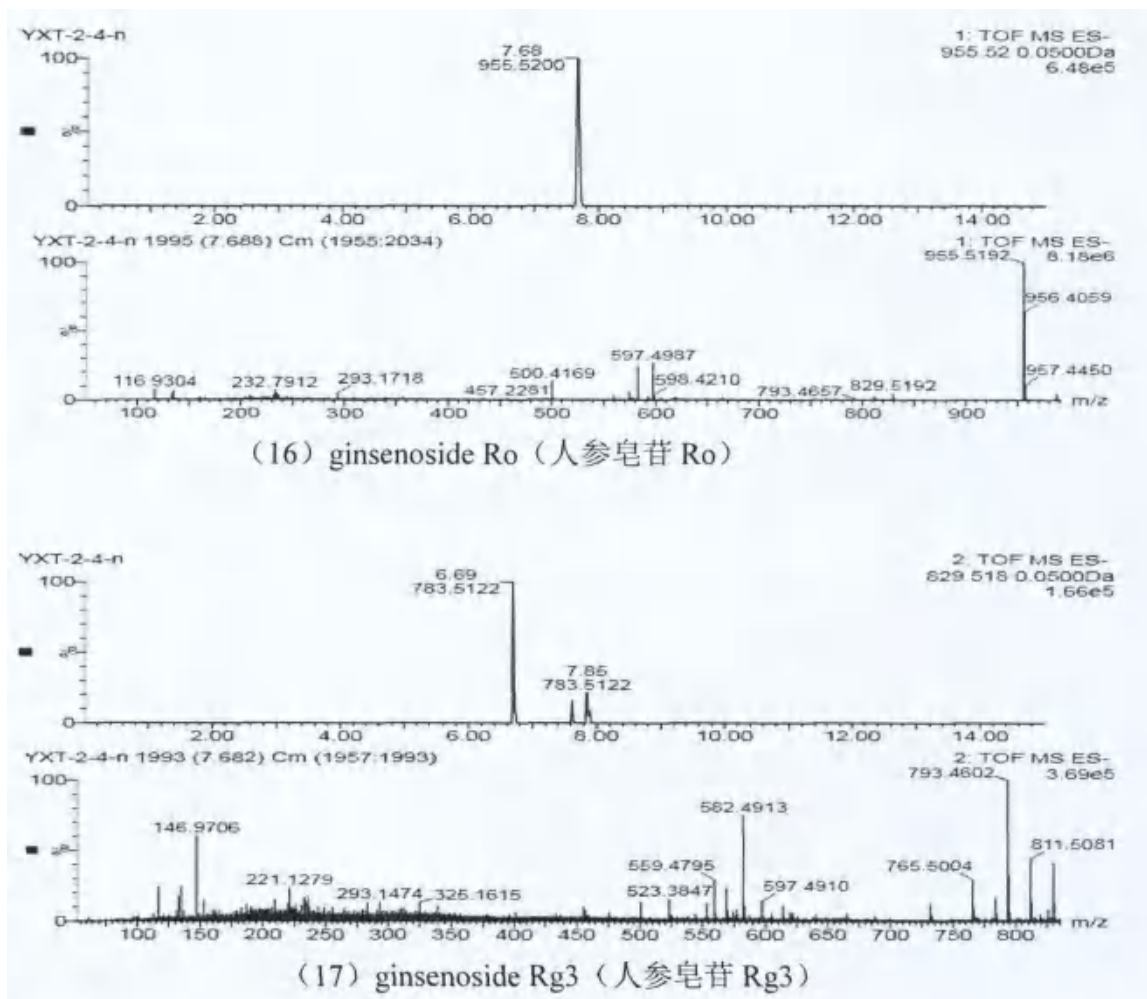


图 5-2 愈心痛胶囊中各成分的提取离子流色谱图和二级质谱裂解图

3.2 愈心痛胶囊入血成分鉴定

采用上述色谱及质谱方法分别对愈心痛胶囊供试品溶液、愈心痛胶囊给药后大鼠血清样品及空白大鼠血清样品进行分析,通过精确分子量比对、二级质谱碎片离子分析,从愈心痛胶囊给药后大鼠含药血清中检测到 ginsenoside Rb1。成分鉴定结果见图 5-3。

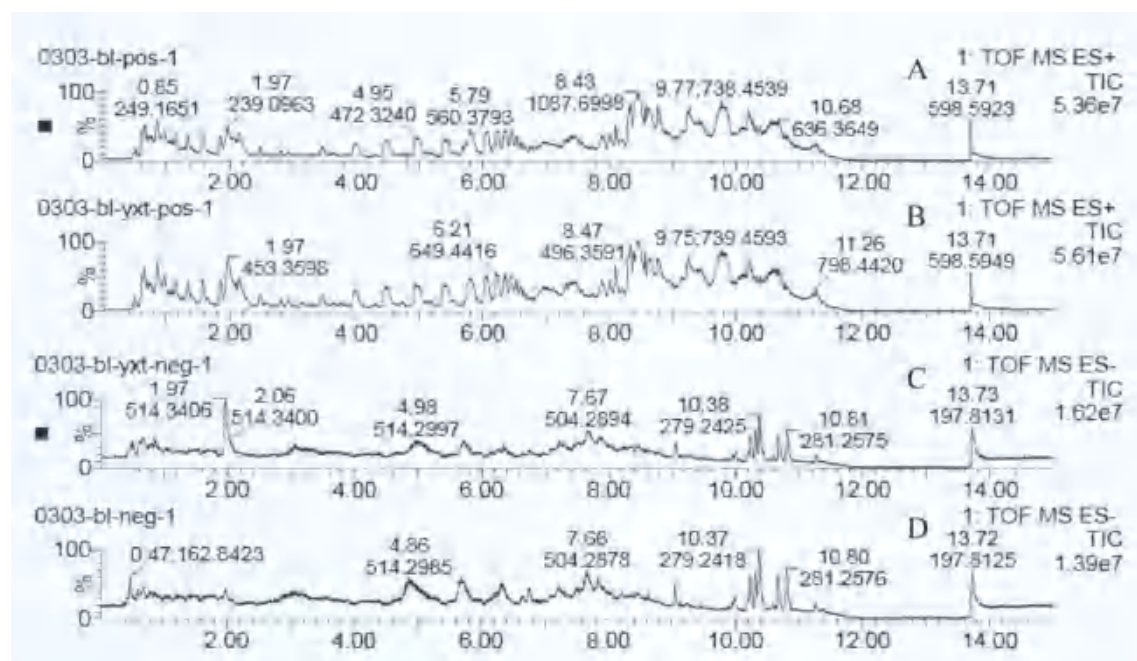


图 5-3 愈心痛胶囊给药后含药血清的 BPI 离子色谱图

A: 空白血浆 (正离子模式); B: 含药血清 (正离子模式); C: 空白血浆 (负离子模式); D: 含药血清 (负离子模式)

4 小结

采用 UPLC-QTOF 高分辨质谱, 通过精准分子量分析、二级质谱碎片裂解分析, 同时与文献比对, 从愈心痛胶囊中鉴定了 20 种主要成分, 其中生物碱类 6 种, 分别为 protopine (原阿片碱)、glaucine (海罂粟碱)、tetrahydropalmatine (延胡索乙素)、canadine (四氢小檗碱)、tetrahydrocoptisine (四氢黄连碱) 和 corydaline (延胡索甲素); 人参皂苷类成分 14 种, 分别为 notoginsenoside R1、ginsenoside Rg1、ginsenoside Re、ginsenoside Rf、notoginsenoside R2、ginsenoside Rb1、ginsenoside Rg2、ginsenoside Rc、ginsenoside Rb2、ginsenoside Rb3、ginsenoside Rd、ginsenoside Rd isomer、ginsenoside Ro、ginsenoside Rg3。同时采用该方法, 分析了愈心痛胶囊给药后在大鼠血清中的入血成分, 通过谱图比对和质谱数据比对, 最终从大鼠含药血清中鉴定出 1 种入血成分, 即人参皂苷 Rb1。检测出的入血成分种类较少, 考虑与药物进入体内后被转化代谢有关。

本研究鉴定出愈心痛胶囊的主要活性成分及其入血成分, 有利于明确愈心痛胶囊抗血小板作用的物质基础。从研究结果可知人参皂苷类占愈心痛胶囊总成分的 70%, 其中人参皂苷 Rb1 在血液中存留时间最长, 我们今后的研究将进一步以人参皂苷类单体为研究对象, 深入挖掘愈心痛胶囊抗血小板作用的药理机制。

全文总结

1 研究思路

冠心病是位居我国居民死因前列的心血管疾病,且随着生活方式的改变和人口老龄化的进展,冠心病的患病人数仍将持续上升,这将带来沉重的社会和经济负担,因此,积极防治冠心病仍是一项严峻的公共卫生挑战^[5]。抗血小板治疗是冠心病二级预防中的基本策略,包括 TXA₂ 抑制剂、ADP 受体 P2Y₁₂ 抑制剂、PAR-1 受体拮抗剂、血栓素受体拮抗剂及 GPIIb/IIIa 受体抑制剂等。抗血小板药可显著改善冠心病患者预后,但仍存在剂量依赖性出血、再发血栓性事件、药物抵抗等风险。例如,第三代噻吩并吡啶类 P2Y₁₂ 受体抑制剂普拉格雷引起颅内出血、胃大出血等严重出血的概率高达 2.4%^[95];服用阿司匹林后在 5 年内再发血栓性事件的患者占 10~20%^[24];服用常规剂量氯吡格雷,25%~40% 的患者由于血小板被 ADP 诱导黏附聚集,会产生“氯吡格雷抵抗”^[96]。因此,寻找能有效抗血小板且出血风险少的药物是提高冠心病预防效果的关键。冠心病相当于中医“胸痹”、“心痛”等范畴,中医药在治疗胸痹方面已有几千年的历史,尤其是中医的“辨证论治”思想在治疗胸痹方面优势显著。此外,随着现代科学技术的发展,关于中药单体和复方治疗冠心病的研究也已深入到分子生物学层面。

陈可冀院士认为“血瘀”是贯穿冠心病始终的病理状态,因此,“活血化瘀”是冠心病的核心治法。本课题组在这一指导思想下进一步扩展,以血瘀日久则新血不生,必然导致气血不足,因此,我们认为气虚血瘀是冠心病的基本病机。愈心痛胶囊是益气活血法的代表方药,由红参、三七、延胡索组成,具有益气活血,通脉止痛之效,全方扶正祛邪,攻补兼施。既往临床研究提示愈心痛胶囊能够显著降低血液黏度,降低红细胞聚集指数,增加红细胞的变形能力,从而全面改善血液流变学异常。考虑到血流剪切应力与血液流变学密切相关,且血流剪切应力可影响血小板和内皮细胞的活化,进而介导 AS 的形成,因此,本研究将临床实验与基础研究有机结合,首先通过临床研究观察愈心痛胶囊对 SCAD(气虚血瘀证)患者血小板功能的有效性和安全性,进一步通过基础实验探究其改善 AS 的药理作用及机制是否与剪切应力有关。

在临床研究方面,我们采用多中心、随机、双盲、安慰剂对照的临床设计方法,纳入 80 例符合试验标准的稳定性冠心病且中医辨证为气虚血瘀的患者作为病例入组来源。采用随机数字表法按 1:1 将其随机分为试验组和对照组。观察的主要疗效指标为 AA 和 ADP 诱导的血小板聚集率,常规血栓弹力图、AA 诱导的血栓弹力图和 ADP 诱导的血栓弹力图,次要疗效指标为气虚血瘀证证候评分。研究结果表明愈心痛胶囊能抑制 AA 和 ADP 诱导的血小板聚集率,延长凝血时间和血凝块形成时间,降低凝血因子活性,从而控制血小板的凝血功能,改善患者的高凝状态和血栓负荷,并能显著降低 SCAD 患者的气虚血瘀证证候评分。

血小板活化、黏附、聚集引发的 AS 形成是贯穿 SCAD 始终的病理状态,AS 斑块糜烂、破裂继发血栓形成是导致心血管事件的病理基础。目前抗血小板药多针对血小板活化、聚集环节,缺少针对血小板与内皮细胞黏附这一 AS 形成和血栓性事件发生的关键始动环节的药物,成为限制冠心病二级预防效果进一步提高的关键。因此,在基础实验方面,本研究以血小板-内皮黏附为核心,以剪切应力为切入点,探索了愈心痛胶囊抗 AS 的作用机制是否与影响血流剪切应力诱导的血小板-内皮黏附有关。首先,我们通过部分左颈动脉结扎的方法建立低剪切应力的体内模型和平行平板流动腔系统建立低剪切应力的体外模型,明确愈心痛胶囊对低剪切应力及其诱导的血小板-内皮黏附的药理作用。然后,我们通过测定与血小板-内皮黏附密切相关的 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路的基因和蛋白表达,并采用 PAR-1 抑制剂(RWJ56110),检测 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、VCAM1、ICAM1 和 GPIIb α 等蛋白的变化情况,证实愈心痛胶囊对低剪切应力诱导的血小板-内皮黏附作用是否与其抑制 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路的激活有关。

E-selectin 和 vWF 是内皮损伤后释放的活性分子,能反映内皮细胞损伤程度。其中 vWF 是连接受损内皮细胞和血小板的桥梁,能与血小板受体 GPIIb α 结合,诱导血小板的黏附和聚集,且 vWF 与 GPIIb α 之间的结合是判断血流剪切应力的变化介导血小板-内皮细胞黏附的敏感指标。我们的基础实验研究结果显示:愈心痛胶囊能降低 vWF 和 GPIIb α 的表达,且体外实验亦证实愈心痛胶囊能抑制低剪切应力诱导内皮损伤后 vWF 和 E-selectin 的释放,说明愈心痛胶囊能减轻低剪切应力诱导的血小板-内皮黏附作用。在药理机制方面,我们发现愈心痛胶囊能

显著降低 MMP-2、PAR-1、p38-MAPK、ICAM1 和 VCAM1 等基因和蛋白的表达，愈心痛胶囊与 PAR-1 抑制剂联合使用与单独使用愈心痛胶囊或 PAR-1 抑制剂相比，两者联合使用能进一步降低上述分子的表达，说明愈心痛胶囊可能通过调节 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路抑制低剪切应力诱导的血小板-内皮黏附作用。

2 全文结论

本研究在稳定性冠心病“气虚血瘀”病机理论指导下，以抗血小板作用为切入点，围绕“愈心痛胶囊可以改善气虚血瘀型稳定性冠心病患者的血小板功能，并通过调节 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路抑制低剪切应力诱导的血小板-内皮黏附，从而发挥抗动脉粥样硬化作用”这一科学假说开展相关研究，主要结论如下：

（1）愈心痛胶囊能抑制血小板聚集率，控制血小板的凝血功能，改善患者的高凝状态和血栓负荷，并降低气虚血瘀证证候评分。

（2）愈心痛胶囊能通过影响血流剪切应力抑制血小板-内皮黏附介导的 AS 形成。

（3）愈心痛胶囊抑制低剪切应力诱导的血小板-内皮黏附作用与其抑制 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路的激活有关。

创新点与不足

1 研究创新点

(1) 思路创新: 本研究围绕血小板活化这个核心, 以低剪切应力介导 AS 形成这一病理机制为切入点, 探究愈心痛胶囊是否通过抑制低剪切应力诱导的血小板-内皮黏附来发挥抗 AS 作用, 为预防冠心病血栓事件的发生提供了新思路。

(2) 机理创新: 本研究首次基于最新发现的与血小板-内皮黏附密切相关的 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路探讨愈心痛胶囊抑制低剪切应力诱导血小板-内皮黏附的分子机制, 为临床开发抗血小板-内皮黏附的药物提供研究基础。

2 研究的不足之处

(1) 本研究的临床试验未检测 SCAD 患者血清中反映与血小板活化、内皮损伤以及介导血小板-内皮黏附相关的指标, 如 vWF、CD62P、GPIIb α 等, 后续实验可以进一步完善检测指标以更全面地反映愈心痛胶囊对 SCAD 患者血小板及内皮功能的影响。

(2) 本研究发现愈心痛胶囊抑制低剪切应力诱导的血小板-内皮黏附作用与其抑制 MMP-2/PAR-1/p38-MAPK 信号通路的激活有关, 但尚未明确低剪切应力介导该信号通路激活的具体机制, 后续实验可以进一步明确低剪切应力激活该信号通路的上下游机制, 从而更全面地探讨愈心痛胶囊改善血小板-内皮黏附的作用机制。

(3) 本研究采用 UPLC/Q-TOF-MS/MS 技术测定了愈心痛胶囊的化学成分和入血成分, 但检测出的入血成分较少, 仅有人参皂苷 Rb1 这一种入血成分。今后将采用更精准的仪器设备及更有效的方法对愈心痛胶囊的入血成分进行检测, 以明确其药效物质基础。

参考文献

1. Hong J, Salazar L, Acevedo J, et al. The Role of Monoclonal Antibodies in the Treatment of Atherosclerosis. *Curr Probl Cardiol*, 2023. **48**(4): p. 101585.
2. 谭利兰, 罗勇, 肖晨, 等. 低剪切应力与动脉粥样硬化形成研究新进展. *中国动脉硬化杂志*, 2019. **27**(05): p. 432-438.
3. 唐蕙. 硫化氢拮抗低剪切应力致 HUVECs 自噬障碍及其机制. 2016. 南华大学.
4. 首健, 霍云龙. 机械力信号与部分心血管疾病的发生. *中国动脉硬化杂志*, 2023. **31**(01): p. 34-40.
5. 黎宝留 (Le Bao Luu). 当归补血汤保护血管内皮改善剪切力复合高脂 As 兔模型的作用机制. 2018, 广州中医药大学.
6. 罗雯. H₂S 抗 As 的新机制: 抑制低剪切应力诱导的血管内皮细胞中 MEST 表达及其介导的内皮间质转化. 2021, 南华大学.
7. 王涵. PDCD4 介导病理性震荡剪切力对血管内皮细胞自噬和炎性小体的作用. 2019, 山东大学.
8. Meyer Dos Santos S, Blankenbach K, Scholich K, et al. Platelets from flowing blood attach to the inflammatory chemokine CXCL16 expressed in the endothelium of the human vessel wall. *Thromb Haemost*, 2015. **114**(2): p. 297-312.
9. Meza D, Shanmugavelayudam SK, Mendoza A, et al. Platelets modulate endothelial cell response to dynamic shear stress through PECAM-1. *Thromb Res*, 2017. **150**: p. 44-50.
10. Tian J, Weng Y, Sun R, et al. Contrast-enhanced ultrasound molecular imaging of activated platelets in the progression of atherosclerosis using microbubbles bearing the von Willebrand factor A1 domain. *Exp Ther Med*, 2021. **22**(1): p. 721.
11. 魏玲玲. 愈心痛胶囊治疗不稳定性心绞痛的临床观察. *中华中医药杂志*, 2009. **24**(11): p. 1532-1533.
12. 雷燕, 刘建勋, 周亚伟, 等. 愈心痛胶囊对急性心肌缺血犬血浆内皮素和血清一氧化氮的影响. *中国中西医结合杂志*, 1996(05): p. 289-291.
13. Zhang L, Li Y, Ma X, et al. Ginsenoside Rg1-Notoginsenoside R1-Protocatechuic Aldehyde Reduces Atherosclerosis and Attenuates Low-Shear Stress-Induced Vascular Endothelial Cell Dysfunction. *Front Pharmacol*, 2020. **11**: p. 588259.
14. He J, Li YL. Ginsenoside Rg1 downregulates the shear stress induced MCP-1 expression by inhibiting MAPK signaling pathway. *Am J Chin Med*, 2015. **43**(2): p. 305-17.
15. 《中国心血管健康与疾病报告 2021》. *心肺血管病杂志*, 2022. **41**(12): p. 1205-1211.
16. Johns A, Fisher M, and Knappertz V. Aspirin and clopidogrel resistance: an emerging clinical entity. *Eur Heart J*, 2006. **27**(14): p. 1754; author reply 1754-5.

17. Zheng YY, Wu TT, Yang Y, et al., Personalized antiplatelet therapy guided by a novel detection of platelet aggregation function in stable coronary artery disease patients undergoing percutaneous coronary intervention: a randomized controlled clinical trial. *Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother*, 2020. 6(4): p. 211-221.
18. 吴兴, 李婵娟, 丁伯福, 等. 两均数比较的优效性临床试验样本量估计. *数理医药学杂志*, 2013. 26(05): p. 517-519.
19. 黄钦, 赵明. 对临床试验统计学假设检验中非劣效、等效和优效性设计的认识. *中国临床药理学杂志*, 2007. 23(01): p. 63-67.
20. 中华医学会心血管病学分会介入心脏病学组, 中华医学会心血管病学分会动脉粥样硬化与冠心病学组, 中国医师协会心血管内科医师分会血栓防治专业委员会, 等. 稳定性冠心病诊断与治疗指南. *中华心血管病杂志*, 2018. 46(09): p. 680-694.
21. Gillette M., Morneau K, Hoang V, et al., Antiplatelet Management for Coronary Heart Disease: Advances and Challenges. *Curr Atheroscler Rep*, 2016. 18(6): p. 35.
22. 张杰, 麻旭州, 李慧慧, 等. 抗血栓形成药物的研究进展. *基础医学与临床*, 2023. 43(01): p. 183-187.
23. Steinhubl SR, Bhatt DL, Brennan DM, et al., Aspirin to prevent cardiovascular disease: the association of aspirin dose and clopidogrel with thrombosis and bleeding. *Ann Intern Med*, 2009. 150(6): p. 379-86.
24. Violi F, Pignatelli P. Aspirin resistance. *Lancet*, 2006. 367(9528): p. 2059-60.
25. Guirgis M, Thompson P, Jansen S. Review of aspirin and clopidogrel resistance in peripheral arterial disease. *J Vasc Surg*, 2017. 66(5): p. 1576-1586.
26. 李宁, 陈晓杰, 李金宝, 等. 益气活血方对急性心肌梗死术后气虚血瘀证患者血小板聚集及心室重构的影响. *现代中西医结合杂志*, 2022. 31(11): p. 1554-1557.
27. Jung YH, Park KY, Jeon JH, et al. Red ginseng saponin fraction a isolated from korean red ginseng by ultrafiltration on the porcine coronary artery. *J Ginseng Res*, 2011. 35(3): p. 325-30.
28. Du XJ, Lei Y, Yang J. [Effects of Radix Ginseng and Radix Notoginseng formula on expressions of vascular endothelial growth factor receptor-2 and hypoxia-inducible factor-1alpha in ischemic myocardium of rats with acute myocardial infarction]. *Zhong Xi Yi Jie He Xue Bao*, 2010. 8(6): p. 548-53.
29. Tian B, Tian M, Huang SM. Advances in phytochemical and modern pharmacological research of Rhizoma Corydalis. *Pharm Biol*, 2020. 58(1): p. 265-275.
30. 万思琦. 三七红参粉治疗稳定型心绞痛(心血瘀阻证)的疗效观察. 2020, 黑龙江中医药大学.
31. Irfan M, Kim M, Rhee MH. Anti-platelet role of Korean ginseng and ginsenosides in cardiovascular diseases. *J Ginseng Res*, 2020. 44(1): p. 24-32.
32. Lee DH, Cho HJ, Kang HY, et al. Total saponin from korean red ginseng inhibits thromboxane A2 production associated microsomal enzyme activity in

- platelets. *J Ginseng Res*, 2012. 36(1): p. 40-6.
33. Wang D, Lv L, Xu Y, et al. Cardioprotection of *Panax Notoginseng* saponins against acute myocardial infarction and heart failure through inducing autophagy. *Biomed Pharmacother*, 2021. 136: p. 111287.
34. Chen C, Wang F, Xiao W, et al. Effect on platelet aggregation activity: extracts from 31 Traditional Chinese Medicines with the property of activating blood and resolving stasis. *J Tradit Chin Med*, 2017. 37(1): p. 64-75.
35. 谭程宁. 差异蛋白质组研究延胡索活性单体的抗血小板聚集作用机制. 2018, 重庆大学.
36. 杨娟. 延胡索乙素抗血栓作用及机制研究. 2013, 郑州大学.
37. 吴有华, 李楠, 徐宝华. 愈心痛胶囊联合尼可地尔治疗微血管性心绞痛的临床研究. *现代药物与临床*. 2018. 33(11): p. 2787-2790.
38. 聂珂, 赵嫦娇. 双联强化抗血小板对急性冠脉综合征合并糖尿病患者的血小板活性及预后影响. *标记免疫分析与临床*, 2019. 26(03): p. 380-384+388.
39. 曾鹏, 马应旭, 李向平. 血小板聚集率在心血管疾病及抗血小板治疗中的作用与意义 %J *中南药学*. 2016. 14(09): p. 971-976.
40. Zhang L, Lv Y, Dong J, et al. Assessment of Risk Factors for Drug Resistance of Dual Anti Platelet Therapy After PCI. *Clin Appl Thromb Hemost*, 2022. 28: p. 10760296221083674.
41. Carrabba N, Bellandi B, Parodi G, et al., APpropriateness Assessment in Antiplatelet THERapY (APATHY) registry: Insight from current clinical practice. *Int J Cardiol*, 2017. 244: p. 13-16.
42. 肖文琦, 吴永健. 血栓弹力图法与比浊法在冠心病患者血小板功能检测中的比较. *中国循环杂志*, 2013. 28(04): p. 318-320.
43. 徐维维, 张戟, 滕宏飞. 血栓弹力图在冠心病抗血小板治疗监测中的应用及研究进展. *实用医药杂志*. 2018. 35(12): p. 1142-1145.
44. 黄容海, 蒋力, 赫嵘, 等. 血栓弹力图在脾切除断流术凝血功能监测中的应用. *实用医学杂志*, 2012. 28(19): p. 3210-3213.
45. 姜倩, 王侠. 血栓弹力图在恶性肿瘤中的临床应用价值 %J *现代肿瘤医学*. 2018. 26(07): p. 1125-1128.
46. Yuan Y, Su M, Liu J, et al. Four-week intravenous repeated dose toxicity study of vitacamphorae injection in rats. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 2020. 393(10): p. 2001-2007.
47. Zhao D, Liu J, Wang M, et al. Epidemiology of cardiovascular disease in China: current features and implications. *Nat Rev Cardiol*, 2019. 16(4): p. 203-212.
48. Wang T, Wang Y, Zhang X, et al. Mechanism of oxidized phospholipid-related inflammatory response in vascular ageing. *Ageing Res Rev*, 2023. 86: p. 101888.
49. Kong X, Chen S, Luo S, et al. Shear-Induced ITGB4 Promotes Endothelial Cell Inflammation and Atherosclerosis. *Oxid Med Cell Longev*, 2022. 2022: p. 5842677.
50. Jiang M, Ding H, Huang Y, et al. Shear Stress and Metabolic Disorders-Two Sides of the Same Plaque. *Antioxid Redox Signal*, 2022. 37(10-12): p.

- 820-841.
51. Luo S, Wang F, Chen S, et al. NRP2 promotes atherosclerosis by upregulating PARP1 expression and enhancing low shear stress-induced endothelial cell apoptosis. *Faseb j*, 2022. 36(2): p. e22079.
52. 刘静. 烟酸姜黄素酯对低剪切应力诱导人脐静脉内皮细胞凋亡的抑制作用及机制研究. 2018, 湖南中医药大学.
53. Stone PH, Coskun AU, Kinlay S, et al. 内皮剪切应力低的部位即冠状动脉斑块进展和血管重构发生的区域:一项在体连续研究. 世界核心医学期刊文摘(心脏病学分册). 2007(08): p. 43.
54. Siasos G, Sara JD, Zaromytidou M, et al. Local Low Shear Stress and Endothelial Dysfunction in Patients With Nonobstructive Coronary Atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol*, 2018. 71(19): p. 2092-2102.
55. 陈宏雨, 刘琳琳, 窦德强. 基于网络药理学的人参、红参及黑参抗肺气虚的作用机制与物质基础研究. *人参研究*, 2022. 34(01): p. 2-10.
56. 董艳, 冯岚岚, 刘咏梅, 等. 基于网络药理学的三七总皂苷治疗冠心病作用靶点研究. *世界中西医结合杂志*, 2019. 14(12): p. 1707-1711+1723.
57. 赵嘉静, 黄文玲, 于妍妍, 等. 基于网络药理学探讨“延胡索-没药”治疗慢性盆腔痛的作用机制. *世界中西医结合杂志*, 2021. 16(08): p. 1457-1463.
58. 廖福龙, 李斌. 三种活血化瘀成分抗剪切应力诱导血小板聚集作用的实验研究. *世界中西医结合大会*. 1997. 中国北京.
59. Han S, Chen Y, Wang J, et al. Anti-thrombosis Effects and Mechanisms by Xueshuantong Capsule Under Different Flow Conditions. *Front Pharmacol*, 2019. 10: p. 35.
60. 郑重. 找动流对动脉血栓形成的影响及机制研究. 2021, 苏州大学.
61. Simon B, Mani SE, Keshava SN, et al. Role of Noninvasive Imaging of Cerebral Arterial System in Ischemic Stroke: Comparison of Transcranial Color-coded Doppler Sonography with Magnetic Resonance Angiography. *J Clin Imaging Sci*, 2018. 8: p. 19.
62. 卜倩爽, 吴健忠, 董国, 等. 剪切应力调节内皮功能的研究进展. *国际心血管病杂志*. 2022. 49(04): p. 206-209.
63. 刘莹. 低剪切应力对小鼠腹主动脉重建的影响及其作用机制的研究. 2011, 南方医科大学.
64. 支晨曦, 谢忠成, 李靓, 等. 中国动脉粥样硬化近三年基础研究进展. *中国动脉硬化杂志*, 2022. 30(09): p. 744-752.
65. Holinstat M. Normal platelet function. *Cancer Metastasis Rev*, 2017. 36(2): p. 195-198.
66. Kremer Hovinga JA, Coppo P, Lämmle B, et al. Thrombotic thrombocytopenic purpura. *Nat Rev Dis Primers*, 2017. 3: p. 17020.
67. Kawecki C., Lenting PJ, Denis CV. von Willebrand factor and inflammation. *J Thromb Haemost*, 2017. 15(7): p. 1285-1294.
68. Massberg S, Brand K, Grüner S, et al. A critical role of platelet adhesion in the initiation of atherosclerotic lesion formation. *J Exp Med*, 2002. 196(7): p. 887-96.

69. Theilmeyer G, Michiels C, Spaepen E, et al. Endothelial von Willebrand factor recruits platelets to atherosclerosis-prone sites in response to hypercholesterolemia. *Blood*, 2002. **99**(12): p. 4486-93.
70. van Galen KP, Tuinenburg A, Smeets EM, et al. Von Willebrand factor deficiency and atherosclerosis. *Blood Rev*, 2012. **26**(5): p. 189-96.
71. Ristić GG, Subota V, Lepić T, et al. Subclinical Atherosclerosis in Patients with Rheumatoid Arthritis and Low Cardiovascular Risk: The Role of von Willebrand Factor Activity. *PLoS One*, 2015. **10**(8): p. e0130462.
72. Kato Y, Iwata A, Futami M, et al. Impact of von Willebrand factor on coronary plaque burden in coronary artery disease patients treated with statins. *Medicine (Baltimore)*, 2018. **97**(17): p. e0589.
73. Sonneveld MA, Cheng JM, Oemrawsingh RM, et al. Von Willebrand factor in relation to coronary plaque characteristics and cardiovascular outcome. Results of the ATHEROREMO-IVUS study. *Thromb Haemost*, 2015. **113**(3): p. 577-84.
74. 陈用. 流场下 VWF-A1/GPIb 介导的血小板整合素活化以及 A1 突变导致 A 结构域功能失调的内在机制. 2020, 华南理工大学.
75. Yu GH, Fang Y. Resveratrol attenuates atherosclerotic endothelial injury through the Pin1/Notch1 pathway. *Toxicol Appl Pharmacol*, 2022. **446**: p. 116047.
76. Kanaji S, Morodomi Y, Weiler H, et al. The impact of aberrant von Willebrand factor-GPIIb interaction on megakaryopoiesis and platelets in humanized type 2B von Willebrand disease model mouse. *Haematologica*, 2022. **107**(9): p. 2133-2143.
77. Momi S, Falcinelli E, Petito E, et al. Matrix metalloproteinase-2 on activated platelets triggers endothelial PAR-1 initiating atherosclerosis. *Eur Heart J*, 2022. **43**(6): p. 504-514.
78. Li M, Liu X, Zhang Y, et al. Upregulation of Dickkopf1 by oscillatory shear stress accelerates atherogenesis. *J Mol Med (Berl)*, 2016. **94**(4): p. 431-41.
79. Guglielmini G, Appolloni V, Momi S, et al. Matrix metalloproteinase-2 enhances platelet deposition on collagen under flow conditions. *Thromb Haemost*, 2016. **115**(2): p. 333-43.
80. 李涯南. 基质金属蛋白酶-2(MMP-2)、基质金属蛋白酶-9(MMP-9)对人颈内动脉粥样硬化斑块稳定性影响的研究. 2016, 河北医科大学.
81. Sebastiano M, Momi S, Falcinelli E, et al. A novel mechanism regulating human platelet activation by MMP-2-mediated PAR1 biased signaling. *Blood*, 2017. **129**(7): p. 883-895.
82. 石桂良. 阿哌沙班保护小鼠缺血诱导性心肌纤维化的机制研究. 2018, 苏州大学.
83. Kamato D, Gabr M, Kumarapperuma H, et al. Gαq Is the Specific Mediator of PAR-1 Transactivation of Kinase Receptors in Vascular Smooth Muscle Cells. *Int J Mol Sci*, 2022. **23**(22).
84. Gremmel T, Koppensteiner R, Ay C, et al. Residual thrombin generation potential is inversely linked to the occurrence of atherothrombotic events in

- patients with peripheral arterial disease. *Eur J Clin Invest*, 2014, 44(3): p. 319-24.
85. Hara T, Fukuda D, Tanaka K, et al. Rivaroxaban, a novel oral anticoagulant, attenuates atherosclerotic plaque progression and destabilization in ApoE-deficient mice. *Atherosclerosis*, 2015, 242(2): p. 639-46.
86. Nguyen KT, Eskin SG, Patterson C, et al. Shear stress reduces protease activated receptor-1 expression in human endothelial cells. *Ann Biomed Eng*, 2001, 29(2): p. 145-52.
87. 万强, 周凤华, 贾钰华, 等. 小檗碱抑制 p38 MAPK 通路降低 visfatin 诱导 HUVEC 损伤的研究 %J 中药新药与临床药理. 2015, 26(05): p. 586-590.
88. Choi H, Nguyen HN, Lamb FS. Inhibition of endocytosis exacerbates TNF- α -induced endothelial dysfunction via enhanced JNK and p38 activation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2014, 306(8): p. H1154-63.
89. Niwa K, Inanami O, Ohta T, et al. p38 MAPK and Ca²⁺ contribute to hydrogen peroxide-induced increase of permeability in vascular endothelial cells but ERK does not. *Free Radic Res*. 2001, 35(5): p. 519-27.
90. Irfan M, Kwon TH, Kwon HW, et al. Pharmacological actions of dieckol on modulation of platelet functions and thrombus formation via integrin $\alpha(IIb)\beta(3)$ and cAMP signaling. *Pharmacol Res*, 2022, 177: p. 106088.
91. Theofilis P, Sagris M, Oikonomou E, et al. Inflammatory Mechanisms Contributing to Endothelial Dysfunction. *Biomedicines*. 2021, 9(7).
92. Lei L, Wan G, Geng X, et al. The total iridoid glycoside extract of *Lamiophlomis rotata* Kudo induces M2 macrophage polarization to accelerate wound healing by RAS/ p38 MAPK/NF- κ B pathway. *J Ethnopharmacol*, 2023, 307: p. 116193.
93. Xie W, Zhu T, Dong X, et al. HMGB1-triggered inflammation inhibition of notoginseng leaf triterpenes against cerebral ischemia and reperfusion injury via MAPK and NF- κ B signaling pathways. *Biomolecules*, 2019, 9(10).
94. Huang H, Ren P, Zhao Y, et al. Low shear stress induces inflammatory response via CX3CR1/NF- κ B signal pathway in human umbilical vein endothelial cells. *Tissue Cell*, 2023, 82: p. 102043.
95. Cayla G, Cuisset T, Silvain J, et al. Prasugrel monitoring and bleeding in real world patients. *Am J Cardiol*. 2013, 111(1): p. 38-44.
96. De Miguel A, Ibanez B, Badimón JJ. Clinical implications of clopidogrel resistance. *Thromb Haemost*, 2008, 100(2): p. 196-203.