



北京中醫藥大學

BEIJING UNIVERSITY OF CHINESE MEDICINE

博士研究生學位論文

THESIS OF DOCTOR'S DEGREE

題目：愈心痛膠囊改善穩定性冠心病
心肺運動耐量的研究

專 業：中西醫結合臨床

研究方向：中西醫結合心血管病

學位類型：專業型

博 士 生：宋 磊

導 師：史大卓 研究員

指導老師：薛 梅 研究員

二〇二三年五月

目 录

符号说明.....	7
第一部分 文献综述 运动耐量及心肺运动试验在冠心病临床研究中的应用	9
1 运动耐量评估方法.....	10
1.1 6 分钟步行试验.....	11
1.2 运动负荷试验.....	12
1.3 心肺运动试验.....	13
2 心肺运动试验的优势.....	14
3 心肺运动试验常见指标.....	16
3.1 峰值摄氧量(peak oxygen uptake, VO ₂ peak)	16
3.2 无氧阈值(anaerobic threshold, AT).....	16
3.3 分钟通气量(ventilation, VE)	16
3.4 氧脉搏(O ₂ pulse).....	17
3.5 代谢当量(metabolic equivalent of task, MET)	17
3.6 摄氧通气效率斜率(oxygen uptake efficiency slope, OUES)	17
3.7 呼吸交换率(respiratory exchange rate, RER).....	18
4 益气活血治疗改善冠心病患者运动耐量的研究进展	19
4.1 基于 6 分钟步行试验评估运动耐量的临床研究	20
4.2 基于心电图运动平板试验评估运动耐量的临床研究	20
4.3 基于心肺运动试验评估运动耐量的临床研究	21
5 以心肺运动试验作为冠心病运动耐量评价方法的临床研究进展	22
5.1 运动康复干预.....	22
5.2 药物干预.....	24
5.3 其他新型疗法干预.....	25
参考文献.....	26
第二部分 临床研究 愈心痛胶囊改善稳定性冠心病心肺运动耐量的临床研究	36
前言.....	36
1 研究对象.....	37
1.1 诊断标准.....	37
1.2 纳入标准.....	38
1.3 排除标准.....	38
2 研究方案.....	38

2.1 受试者来源.....	39
2.2 受试者干预.....	39
2.3 受试者退出.....	40
2.4 剔除病例.....	41
3 观测指标.....	41
3.1 主要疗效指标.....	41
3.2 次要疗效指标.....	41
3.3 其他疗效指标.....	42
3.4 安全性指标及评价时点.....	42
3.5 不良事件.....	43
4 统计分析.....	44
5 临床研究注册与质控.....	44
6 结果.....	45
6.1 试验完成情况.....	45
6.2 基线资料分析.....	46
6.3 峰值摄氧量、无氧阈值变化情况.....	48
6.4 心肺运动试验其他指标变化情况.....	49
6.5 西雅图心绞痛量表、SF-36 生活质量量表及气虚血瘀证候评分 变化情况.....	50
6.6 服药依从性分析.....	52
6.7 安全性分析.....	52
7 讨论.....	53
7.1 愈心痛胶囊对心肺运动功能的影响.....	54
7.2 愈心痛胶囊改善心肺运动功能的疗效分析.....	55
7.3 愈心痛干预对西雅图心绞痛量表、SF-36 生活质量量表及气虚 血瘀证候积分的影响.....	57
8 结论.....	57
参考文献.....	58
第三部分 实验研究 愈心痛胶囊改善线粒体能量代谢提高心肌缺血 大鼠运动耐量的机制研究.....	63
前言.....	63
1 材料与方法.....	65
1.1 实验材料.....	65
1.2 实验方法.....	69
2 结果.....	80
2.1 大鼠体重变化.....	80
2.2 急性心肌梗死模型构建的评估.....	81
2.3 TTC 染色.....	82

2.4 HE 染色	82
2.5 Tunel 染色.....	84
2.6 心脏超声	85
2.7 大鼠跑台实验.....	86
2.8 血清心肌损伤标记物.....	87
2.9 心肌透射电镜.....	88
2.10 心肌线粒体 DNA 表达	89
2.11 心肌线粒体复合物I-IV及柠檬酸合酶活性.....	90
2.12 心肌 AMP、ADP、ATP 表达.....	91
2.13 线粒体生物合成通路相关蛋白 mRNA 表达.....	92
2.14 线粒体生物合成通路相关蛋白表达	93
3 讨论.....	95
3.1 愈心痛胶囊干预降低心肌细胞凋亡率、心肌损伤标志物表达, 提高心功能	96
3.2 愈心痛胶囊干预提高大鼠运动耐量.....	96
3.3 愈心痛胶囊干预调控线粒体生物合成通路蛋白及 mtDNA 表 达	97
3.4 愈心痛胶囊干预增强心肌线粒体能量代谢,促进 ATP 合成 ...	98
4 结论.....	98
参考文献.....	99
结语.....	105
附录.....	106

摘 要

稳定性冠心病是冠心病一个常见临床类型,许多稳定性冠心病患者单纯西医常规治疗并不能有效改善生活质量。如何提高稳定性冠心病患者的运动耐量,为冠心病治疗领域的重要问题。益气活血中药联合西医常规治疗可进一步改善稳定性冠心病患者的症状、减少心绞痛发作,但是否可改善稳定性冠心病患者的运动耐量,目前尚缺乏高级别临床证据。愈心痛胶囊是陈可冀院士治疗冠心病的经验方,具有益气活血之效,广泛用于临床冠心病气虚血瘀证患者的治疗。冠心病患者运动耐量下降与心肌能量供应相关,线粒体生物合成在其中具有重要作用。愈心痛胶囊可否通过调控线粒体生物合成提高运动耐量,尚不清楚。因此,我们进行了如下研究:

研究一:愈心痛胶囊改善稳定性冠心病心肺运动耐量的临床研究

目的:观察愈心痛胶囊联合西医常规治疗对稳定性冠心病患者运动耐量的影响。

方法:采用多中心、随机、双盲、安慰剂对照临床研究设计,纳入来自全国 14 家医院的 404 例稳定性冠心病(气虚血瘀证)患者,随机分为试验组(常规西医治疗基础上+愈心痛胶囊)、对照组(常规西医治疗基础上+愈心痛胶囊模拟剂),干预 12 周。主要疗效指标为心肺运动试验中峰值摄氧量、无氧阈值;次要疗效指标为心肺运动试验的代谢当量、氧脉搏、每分钟最大通气量、心电图 ST 段下移 1 mm 开始及持续时间及西雅图心绞痛量表和 SF-36 生活质量量表的变化。同时观察中医气虚血瘀证候评分的变化。试验过程中,全程记录不良事件。

结果:与治疗前基线相比,愈心痛胶囊联合西医常规治疗 12 周可提高稳定性冠心病患者峰值摄氧量、无氧阈值、代谢当量,缩短心电图 ST 段下移 1 mm 的持续时间,改善西雅图心绞痛量表和 SF-36 生活质量各维度评分及气虚血瘀证候评分。与对照组相比,愈心痛胶囊联合西医常规治疗 12 周可显著改善稳定性冠心病患者无氧阈值(0.63 ± 2.63 VS. -0.08 ± 2.40 ml/kg/min, $P=0.01$),提高西雅图心绞痛量表躯体活动受限程度维度积分及 SF-36 量表总体健康、精力维度积分,降低中重度气虚血瘀证患者证候积分。无出血事件及严重不良反应发生。

结论：在西医常规治疗基础上联合应用愈心痛胶囊 12 周，可提高稳定性冠心病患者心肺运动试验的峰值摄氧量、无氧阈值、代谢当量，提高生活质量和降低气虚血瘀证候积分。

研究二：愈心痛胶囊改善心肌缺血大鼠线粒体能量代谢提高运动耐量的研究

目的：观察愈心痛胶囊对心肌缺血大鼠运动能力的改善作用，并通过线粒体生物合成通路探索其可能的分子机制。

方法：通过结扎大鼠冠脉左前降支，构建急性心肌梗死模型，随机分为假手术组、模型组、愈心痛胶囊低剂量组、愈心痛胶囊高剂量组、曲美他嗪组。每组 10 只，分别给予生理盐水、愈心痛胶囊、曲美他嗪干预。4 周后，TTC 染色评估心肌梗死面积，HE 染色观察心肌组织形态结构病理改变，Tunel 染色评估心肌细胞凋亡率，心脏超声评估心功能，大鼠跑台实验评估运动耐量，Elisa 法检测血清中心肌损伤标记物及心肌细胞中 ATP 水平、心肌细胞线粒体复合物 I-IV 及柠檬酸合酶活性，透射电镜观察心肌细胞结构及线粒体超微结构，qPCR 检测心肌细胞中线粒体 DNA 表达情况，Western-blot 及 qPCR 检测线粒体生物合成通路相关蛋白及 mRNA 表达情况。

结果：与模型组比较，愈心痛高剂量干预 4 周可明显减少心梗面积 ($P < 0.001$)、心肌细胞凋亡率 ($P < 0.001$)，降低血清肌酸肌酶、肌酸肌酶同工酶、乳酸、乳酸脱氢酶、心肌肌钙蛋白 I 及心房利钠肽水平 ($P < 0.001$)，提高心脏射血分数和短轴缩短率 ($P < 0.001$)，减少左室收缩及舒张末期容积 ($P < 0.05$)，提高大鼠跑台实验力竭运动总时长 ($P < 0.001$)。与模型组比较，愈心痛高剂量干预可明显增加心肌细胞中线粒体 DNA 表达 ($P < 0.001$) 和线粒体复合物 I-IV 及柠檬酸合酶活性 ($P < 0.001$)，促进心肌细胞中三磷酸腺苷生成 ($P < 0.001$)，升高 AMP 活化蛋白激酶磷酸化水平，促进 NAD-依赖性去乙酰化酶、过氧化物酶体增殖物激活受体伽马共激活因子-1 α 、线粒体转录因子 A 的蛋白及 mRNA 表达 ($P < 0.001$)。

结论：愈心痛胶囊可减轻急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡和心肌缺血损伤，提高运动耐量，其机制与保护心肌线粒体结构完整、增强线粒体 DNA 表达，促进线粒体氧化磷酸化和生物合成通路蛋白 AMPK/SIRT-1/PGC-1 α /Tfam 的表达有关。

关键词：稳定性冠心病；心肺运动试验；线粒体生物合成；益气活血；愈心痛胶囊；运动耐量；

ABSTRACT

Stable coronary artery disease is a common clinical type of coronary artery disease, and a substantial proportion of patients with stable coronary artery disease continue to experience limitation of daily activities based on conventional treatment of Western medicine. How to improve the exercise tolerance of patients with stable coronary heart disease is an important issue in the field of coronary heart disease. The combination of benefiting Qi and activating blood therapy of Chinese medicine with conventional Western treatment can further relieve the symptoms and reduce angina attacks in patients with stable coronary artery disease, but there is still a lack of high-level clinical evidence to prove whether the combination of benefiting Qi and activating blood therapy of Chinese medicine with conventional Western treatment can improve exercise tolerance in patients with stable coronary heart disease. Yuxintong capsule is an experienced formula of academicians Chen Keji for the treatment of coronary heart disease, which has the effect of benefiting Qi and activating blood circulation and is widely used in the treatment of patients with Qi deficiency and Blood stasis syndrome of coronary heart disease in clinical practice. Decreased exercise tolerance in patients with coronary heart disease is closely related to myocardial energy supply, in which mitochondrial biosynthesis plays an important role. There is a lack of research on whether Yuxintong capsule can improve exercise tolerance by regulating mitochondrial biosynthesis. Therefore, we conducted the following studies:

Part I: Clinical study on the improvement of cardiopulmonary exercise tolerance in stable coronary artery disease with Yuxintong capsule

Objective: To observe the effect of Yuxintong capsule combined with conventional Western medical treatment on exercise tolerance in patients with stable coronary artery disease.

Methods: A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical study was designed to enroll 404 patients with stable coronary heart disease (Qi deficiency and blood stasis syndrome) from 14 hospitals across China, who were randomly divided into the intervention group (Yuxintong capsule plus conventional Western medicine) and the control group (placebo plus conventional Western medical treatment) for 12 weeks of intervention. The

primary efficacy indexes were peak oxygen uptake and anaerobic threshold in cardiopulmonary exercise test; the secondary efficacy indexes were metabolic equivalent in cardiopulmonary exercise test, oxygen pulse, maximum minute ventilation, the onset and duration of a 1 mm downward shift of ST segment in ECG, changes in Seattle angina scale, SF-36 quality of life scale and the scores of Qi deficiency and blood stasis symptoms in Chinese medicine. Adverse events were recorded throughout the trial.

Results: Compared with the pre-treatment baseline value, 12 weeks of conventional Western medicine treatment with Yuxintong capsule improved peak oxygen uptake, anaerobic threshold and metabolic equivalent, shortened the duration of ST-segment downshift by 1 mm on the electrocardiogram, and improved the Seattle Angina Scale and SF-36 quality of life scores and the Qi deficiency and blood stagnation symptom scores in patients with stable coronary artery disease. Compared with the control group, Yuxintong capsule combined with conventional Western medicine treatment for 12 weeks significantly improved the anaerobic threshold in patients with stable coronary artery disease (0.63 ± 2.63 VS. -0.08 ± 2.40 ml/kg/min, $P=0.01$), increased the scores of physical limitation dimension of the Seattle Angina Scale and the general health and validity dimension of the SF-36 scale, and decreased the syndrome score in the patient with moderate to severe Qi deficiency and blood stasis syndrome. No bleeding events or serious adverse reactions occurred.

Conclusions: The combination of Yuxintong capsule with conventional Western medical treatment for 12 weeks can improve peak oxygen uptake, anaerobic threshold, and metabolic equivalence in cardiopulmonary exercise test, improve quality of life and reduce Qi deficiency and blood stasis syndrome score in patients with stable coronary artery disease.

Part II: Study on the improvement of mitochondrial energy metabolism and exercise tolerance in rats with myocardial ischemia by Yuxintong capsule

Objective: To observe the effect of Yuxintong capsule on the improvement of exercise capacity in rats with myocardial ischemia and to explore its possible molecular mechanism through the mitochondrial biosynthesis pathway.

Methods: Rats with acute myocardial infarction caused by ligation of the left anterior descending branch of coronary artery were randomly divided into the sham group, the model group, the Yuxintong capsule low-dose group, the Yuxintong capsule high-dose group and the

trimetazidine group after successful modeling (ten rats in each group). After 4 weeks of intervention with saline, Yuxintong capsule and trimetazidine, TTC staining was performed to assess the area of myocardial infarction, HE staining to observe the morphological and structural pathological changes of myocardial tissue, Tunel staining to assess the apoptosis rate of myocardial cells, cardiac ultrasound to assess cardiac function, small animal's running test to assess exercise tolerance, Elisa assay to detect myocardial injury markers in serum and ATP levels in cardiomyocytes, mitochondrial complex I-IV and citrate synthase activity in cardiomyocytes. The cardiomyocyte structure and mitochondrial ultrastructure were observed by transmission electron microscopy, mitochondrial DNA expression in cardiomyocytes was detected by qPCR, and mitochondrial biosynthetic pathway-related proteins and mRNA expression were detected by Western-blot and qPCR.

Results: Compared with the model group, Yuxintong high-dose intervention for 4 weeks significantly reduced infarct size ($P<0.001$), myocardial apoptosis rate ($P<0.001$), decreased serum creatine myokinase, creatine myokinase isoenzyme, lactate, lactate dehydrogenase, cardiac troponin I and atrial natriuretic peptide levels ($P<0.001$), increased cardiac ejection fraction and short-axis shortening rate ($P<0.001$), and reduced left ventricular end-systolic and end-diastolic volumes ($P<0.05$), increased the total duration of exhaustive exercise in the running test ($P<0.001$). Compared with the model group, Yuxintong high-dose intervention significantly increased mitochondrial DNA expression ($P<0.001$) and mitochondrial complex I-IV and citrate synthase activities ($P<0.001$) and promoted adenosine triphosphate production ($P<0.001$) in cardiac myocytes, elevated AMP-activated protein kinase phosphorylation levels promoted protein and mRNA expression of NAD-dependent deacetylase, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 α , and mitochondrial transcription factor A ($P<0.001$).

Conclusions: Yuxintong capsule can reduce myocardial apoptosis and myocardial ischemic injury and improve exercise tolerance in rats with acute myocardial infarction model, and the mechanism is related to the protection of myocardial mitochondrial structural integrity, enhancement of mitochondrial DNA expression, and promotion of mitochondrial oxidative phosphorylation and biosynthetic pathway protein AMPK/SIRT-1/PGC-1 α /Tfam expression.

KEYWORDS: stable coronary artery disease, cardiopulmonary exercise test, mitochondrial biosynthesis, benefiting Qi for activating blood circulation, Yuxintong capsule, exercise tolerance

符号说明

缩略词	英文全称	中文全称
ADP	adenosine diphosphate	二磷酸腺苷
AMP	adenosine monophosphate	单磷酸腺苷
AMPK	AMP-activated protein kinase	AMP 活化蛋白激酶
ANP	atrial natriuretic peptide	心房利钠肽
AT	anaerobic threshold	无氧阈值
ATP	adenosine triphosphate	三磷酸腺苷
BMI	body mass index	体重指数
CHD	coronary heart disease	冠状动脉性心脏病
CK	creatine kinase	肌酸激酶
CK-MB	creatine kinase-MB	肌酸激酶同工酶
CO	cardiac output	心输出量
CPET	cardiopulmonary exercise test	心肺运动试验
CRF	case report form	病例报告表
CS	citrate synthase	柠檬酸合酶
CTn-I	cardiac troponin I	心肌肌钙蛋白 I
EF	ejection fraction	射血分数
FS	fractional shortening	短轴缩短率
HE	Hematoxylin and Eosin	苏木精-伊红
LA	lactic acid	乳酸
LDH	lactate dehydrogenase	乳酸脱氢酶
LVAW;d	left ventricular anterior wall in diastole	左室舒张末期前壁厚度
LVAW;s	left ventricular anterior wall in systole	左室收缩末期前壁厚度
LVPW;d	left ventricular posterior wall in diastole	左室舒张末期后壁厚度

LVPW;s	left ventricular posterior wall in systole	左室收缩末期后壁厚度
MET	metabolic equivalent of task	代谢当量
mtDNA	mitochondrial DNA	线粒体 DNA
OUES	oxygen uptake efficiency slope	摄氧通气效率斜率
PCI	percutaneous coronary intervention	经皮冠状动脉介入治疗
PGC-1 α	peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha	过氧化物酶体增殖物激活受体伽马共激活因子-1 α
RER	respiratory exchange rate	呼吸交换率
SAQ	seattle angina questionnaire	西雅图心绞痛量表
SCAD	stable coronary artery disease	稳定性冠心病
SF-36	short form-36 health survey	简明健康调查量表
SIRT-1	Nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase sirtuin-1	NAD ⁺ 依赖性去乙酰化酶 Sirtuin-1
SV	stroke volume	每搏输出量
TET	treadmill exercise test	运动平板试验
Tfam	Mitochondrial transcription factor A	线粒体转录因子 A
TTC	triphenyl tetrazolium chloride	2,3,5-氯化三苯基四氮唑
TUNEL	terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling	末端脱氧核苷酸末端标记化的核酸断裂检测
VE	ventilation	分钟通气量
VO ₂ peak	peak oxygen uptake	峰值摄氧量
6MWT	6-minute walk test	6 分钟步行试验

第一部分 文献综述

运动耐量及心肺运动试验在冠心病临床研究中的应用

冠状动脉粥样硬化性心脏病是一种由于冠状动脉粥样硬化,管腔狭窄或堵塞或因冠脉功能改变导致心肌缺血、缺氧甚至坏死而引起的心脏病,统称为冠状动脉性心脏病(coronary heart disease, CHD),或缺血性心脏病,简称冠心病。CHD 主要临床分型为心绞痛和心肌梗死,以胸痛、胸闷、心前区压迫不适为主要临床症状。CHD 是全球范围内的最常见的慢性病之一,同时也是死亡率最高的疾病之一。来自美国心脏协会的相关统计数据表明 2020 年全球约有 2.44 亿冠心病患者^[1,2],2022 年发布的全球心血管疾病负担报告^[3]显示心血管疾病依然是全球死亡的主要原因,其中冠心病是导致心血管死亡的首要因素,2021 年全球因冠心病死亡人数约 944 万人。在中国,冠心病已成为一种普遍的慢性疾病。根据 2021 年国家心血管病中心发布的《中国心血管健康与疾病报告 2021》^[4],中国心血管病现患人数约 3.3 亿(其中冠心病 1139 万例),且患病率仍处于持续上升阶段。中国第五次卫生服务调查^[5]显示 15 岁以上群体中冠心病患病率为 10.2%,60 岁以上为 27.8%,与 2008 年的调查数据相比冠心病总患病率明显升高。《中国卫生健康统计年鉴 2020》^[6]指出 2019 年我国城乡居民冠心病死亡率分别为 121.59/10 万和 130.14/10 万。稳定性冠心病(stable coronary artery disease, SCAD)是冠心病最常见的临床类型^[7]。2018 年我国《稳定性冠心病诊断与治疗指南》^[8]中明确指出 SCAD 包括慢性稳定性劳力型心绞痛、缺血性心肌病和急性冠状动脉综合征后病情稳定的阶段。

中医古籍中并无“冠心病”、“稳定性冠心病”这些病名,依其“胸部闷痛、喘息不得平卧”等症状特点均被归属于中医学中“胸痹”、“心痹”、“真心痛”等范畴。最早有关冠心病的记载可追溯至《黄帝内经》^[9],主要体现在记载了“胸痹”、“心痹”、“心病”、“胸痛”、“心痛”、“真心痛”等关键词的原始条文中。

临床上被广泛应用的胸痹、真心痛病名均最早见于《黄帝内经》中^[10]。《灵枢·本藏》“肺小则少饮,不病喘喝;肺大则多饮,善病胸痹、喉痹、逆气”,率先指出了胸痹病的发病基础为饮邪痹阻胸肺。《素问·痹论篇》曰:“心痹者,脉不通”,则指出了血瘀脉内是心痹的病机。《素问·脏气法时论》曰:“心病者,胸中痛,肋支痛、肋下痛,膺背肩胛间痛,两臂内痛”,这些心病相关的症状描述与现代医学中冠心病的临床表现非常相似。

《素问·玉机真藏论篇第十九》云“帝曰:春脉太过与不及,其病皆何如?岐伯曰:太

过则令人善忘，忽忽眩冒而巅疾；其不及则令人胸痛引背，下则两胁满”；《素问·脉解篇第四十九》“所谓胸痛少气者，水气在脏腑也”，可见胸痛尚未作为一个病名，而是对胸部疼痛这一症状的描述。《灵枢·五邪》“邪在心，则病心痛喜悲”；《素问·标本病传论》“心病先心痛”；指出心痛既是病名且病位在心，也表示心痛的症状。《灵枢·厥病》曰“真心痛，手足青至节，心痛甚，旦发夕死，夕发旦死”，将病情严重且迅速造成死亡的这种心痛病称为真心痛。对胸痹的系统论述则最早可见于张仲景《金匮要略》中，《金匮要略·胸痹心痛短气病脉证治》云“胸痹之病，喘息咳唾，胸背痛，短气，寸口脉沉而迟，关上小紧数，栝楼薤白白酒汤主之”对胸痹症状、体征、脉象进行了描述并给出了主治方药；“夫脉当取太过不及，阳微阴弦，即胸痹而痛。所以然者，责其极虚也。今阳虚知在上焦，所以胸痹心痛者，以其阴弦故也”，将胸痹病的主要病机总结归纳为“阳微阴弦”，体现了古代医家对胸痹病更深入的认识。

1 运动耐量评估方法

运动耐量是指机体所能达到或承受的最大有氧运动能力，通常表征为一次剧烈运动中机体所能摄取利用的最大氧气量^[11]，可反映出机体在持续运动中心肺系统向骨骼肌输送氧气及肌肉组织从血液中提取利用氧气的的能力^[12,13]。运动耐量可通过测量最大摄氧量来评估，作为评价机体整体健康状况和体能水平的重要指标，它常被用于对某种干预措施进行疗效评定。研究表明，运动耐量水平下降与多种慢性疾病的发生密切相关^[14]，已成为心血管系统疾病的强有力预测因子^[15]。《柳叶刀》杂志发表的一项覆盖了全球 17 个国家的研究表明，较高的体力活动强度可降低心血管疾病和死亡风险，且与收入无关^[16]。另一项针对 272550 例老年人的队列研究发现，尽管不同类型体力活动的死亡风险之间存在较大差异，然而每周参加 7.5 至 15 代谢当量小时的任何类型的体力活动均可以有效降低死亡风险^[17]。《新英格兰医学杂志》的一项研究也表明：运动耐量每增加 1 代谢当量，生存率提高 12%^[18]。冠心病患者常伴随有运动耐量的下降^[19]，其可进一步影响到患者的日常生活质量，因此，如何有效提高冠心病患者的运动耐量值得临床上更多的关注。运动耐量的评估方法可大体分为静态评估和动态评估，其中静态评估通常使用反映肌肉力量和肌肉耐力的指标评估不同运动姿势下肌肉功能能力，如平板支撑、俯卧撑、深蹲等，临床上常用以评估肌肉骨骼疾病、关节炎、神经系统疾病等，以了解肌肉功能损伤或恢复情况。动态评估则多使用运动过程中的心率、血压、运动时长及距离、摄氧

量等体现不同运动强度下的心肺功能,如6分钟步行试验、Cooper12分钟步行跑步试验、运动负荷试验、心肺运动试验等,临床上常用于心血管系统、呼吸系统、康复医学等领域以明确心肺功能、机体整体运动能力及恢复情况。

1.1.6 6分钟步行试验

6分钟步行试验(6-minute walk test, 6MWT)是一种简单易行的体力活动测试方法,被广泛应用于评估心肺功能和运动功能^[20]。6MWT最早于1959年由B Balke和R W Ware发明^[21],以单位时间内的步行距离作为评估空军飞行员机体适能的一种试验性方法。之后,美国空军少校Kenneth H. Cooper于1968年发表了一篇研究论文,首次评估了将12分钟跑步试验用于评估最大摄氧量的可能性^[22],并用于评估飞行员健康和身体素质,其在1971年的著作*The New Aerobics*中明确提出了6MWT的概念。在此基础上,加拿大流行病学专家Guyatt等人进一步改进了这一方法,提出了现代意义上的6分钟步行试验^[23],并将其用于评估心力衰竭患者的功能状况。2002年美国胸科学会正式发布了*Guidelines for the Six-Minute Walk Test*临床指南^[24],其中详细论述了6MWT的标准化操作流程和规范。患者被要求在规定的走道上尽可能多地行走,时长为6分钟。在测试过程中,医务人员会记录患者的心率、血压、呼吸频率、血氧饱和度等指标,并在测试结束后计算出患者的步行距离。随着相关研究的不断深入,6MWT被逐渐引入应用于呼吸内科^[25]、康复医学科^[26]、心血管内科^[27]等学科领域中,在评估心力衰竭、冠心病、肺动脉高压、卒中患者的运动能力方面应用逐渐增多。因其操作简单且安全性强,6MWT已经成为评估临床患者运动能力和日常生活质量的一种临床最常用的方法。

6MWT最主要评价指标是步行距离^[28],它可以反映出患者的运动能力和日常生活质量。步行距离较短的患者可能存在运动能力受限的情况,需要进行进一步的诊断和治疗。除此之外,6MWT还可以评估患者的心率、血压、呼吸频率、血氧饱和度等指标的变化,辅助临床医生更全面地掌握患者的身体状况。基于我国人群所制定的《老年患者6分钟步行试验临床应用中国专家共识》中对运动耐量的评价标准^[29]定义为:步行距离<150米可视为重度异常,150~300米为中度异常,301~450米为轻度异常,>450米为正常水平。

1.2 运动负荷试验

运动负荷试验是一种非侵入性、低成本、操作简便的心脏检查方法,通过运动增加心脏负荷,增加受试者心肌耗氧量,并通过监测运动状态下的心电图变化,来诊断、鉴别、评估患者冠心病状态及运动能力^[30]。运动负荷试验的发展历史可以追溯到 20 世纪初。1908 年荷兰莱顿大学生理学家(心电图创始人)Willem Einthoven 观察到了运动对心电图 ST 段变化的影响。20 世纪 40 年代,运动负荷试验开始应用于心血管疾病的诊断和治疗,1941 年 Master 和 Jaffe 等人提出在运动负荷试验后描记心电图,描述了运动负荷试验后的心电图变化,提出将运动负荷试验用于评估运动相关的冠状动脉功能不全引起的心肌缺血^[31]。1942 年, Alexander C. Proudfit 和 Robert Briggs 等人首次使用体力活动试验来评估冠状动脉疾病患者的心血管功能,这被认为是现代运动负荷试验的开端^[32]。此后,人们开始尝试使用不同的运动试验方式,如踏车和跑步机等,来评估患者的心血管功能,但因该时期的技术限制和患者安全问题,运动负荷试验并没有被广泛应用。20 世纪 60 年代,随着电子技术和计算机技术的发展,运动负荷试验得到了快速发展,并开始广泛应用于心血管疾病的诊断和治疗中^[33]。此后,运动负荷试验成为了评估患者心血管功能的重要工具之一^[34]。

运动负荷试验的主要开展形式包括:运动平板试验(treadmill exercise test, TET)、运动踏车试验、Master 二级梯运动试验。运动负荷量的可分为极量和次极量两种。极量负荷是指让受试者在运动试验过程中达到身体生理极限,通常以基于统计数据各年龄阶段的预计最大心率(常用公式=220-年龄)为是否达到生理极限的判定标准;次极量负荷是指让受试者在运动试验过程中心率达到预计最大心率的 85%-90%。负荷功率递增方案根据功率递增方式、递增量、每一级做功量的持续时间、做功总量的不同而不同。常见的功率递增方案有: Bruce 方案, Naughton 方案、ACIP 方案。Bruce 方案为变速变斜率运动,具有氧耗量和功率递增量,更容易达到预定心率,判断速度更快的优点,但心功能较差或病情较严重的受试者不易耐受,也不易精确确定缺血阈值; Naughton 方案为恒速变斜率试验,完成试验的总做功量小,适用于病情较重的患者; ACIP 的方案特点是运动负荷量增加较为平缓,较其他方案可更精确测定缺血阈值,在了解已知冠心病患者的病情进展方面具有独特优势。临床上较广泛开展的运动负荷试验形式为运动平板试验,最常采用的运动负荷量为次极量运动,最常采用的功率递增方案为 Bruce 方案。

TET 最早由 Robert A. Bruce 于 1956 年提出用于评估心血管病患者的功能能力与运动耐量^[35]，并制定了详细的试验方案。1963 年，Robert A. Bruce 和他的同事在 1963 年提出^[36]TET 也用于评估冠心病患者的心血管功能和预后。其后，TET 相关的研究得以大量开展。美国国家心肺研究所在其研究中发现：TET 阳性与心血管疾病发生率的增加相关且可用于预测老年患者心血管疾病风险^[37]。1997 年美国心脏学会首次将 TET 列入临床心脏病学指南，标志着其在临床上的重要性得到了认可^[38,39]。此后，TET 被广泛应用于心血管科的疾病诊断和预后评估。目前，在临床上，TET 主要用于检测冠心病^[40]、心律失常^[41]、瓣膜疾病^[42]等心血管疾病，并用于评估患者的病情严重程度和预后。TET 的主要操作方式是让患者在平板上进行有规律的运动，如步行或跑步，同时通过监测心电图、血压等指标来评估患者的心脏健康状况和运动能力，最主要评价指标是运动耐量和运动状态下的心电图变化^[43]。运动耐量是指患者在运动平板试验中可以持续运动的时间和强度，一般以运动平板试验结束时的代谢当量值（代表能量消耗的单位）作为衡量标准。运动耐量较低的患者通常代表心脏功能受损或存在心血管疾病的风险较高，而运动耐量较高的患者通常代表心脏功能较好，心血管疾病风险较低。运动平板试验评价运动耐量的方法主要有两种：一种是通过定量测量患者在平板上运动的时间和速度，计算出患者的代谢当量值；另一种是通过评估患者在运动平板试验中的运动强度，例如可以根据代谢当量值将患者分为轻、中、重三个运动强度等级^[44]。正常情况下，患者在平板上运动时，心电图呈现出一定的变化，但这些变化是可逆的。如果心电图呈现出可疑的异常变化，如 ST 段压低或抬高等，表明存在心肌缺血或心肌损伤，需要进一步检查和治疗。一系列研究均表明^[45-47]，运动平板试验可以用于评价患者的心血管功能和预后，对冠心病和其他心血管疾病的诊断和预后评估具有重要意义。

1.3 心肺运动试验

心肺运动试验（cardiopulmonary exercise test, CPET）是一种结合心血管和呼吸系统功能评估的全面运动试验。CPET 的发展最早可追溯至 20 世纪 50 年代，当时称为运动代谢测定，主要用于研究肌肉代谢和运动能力^[48]。随着电子计算机和气体传感器技术的发展，运动负荷、心电图和气体代谢变化的测量有机结合产生了 CPET，也被称为运动负荷气体交换法，其包括运动气体代谢分析和运动心电负荷试验两部分，但受限于当时设备硬件及技术发展的限制，尚未得到全面推广应用。直到 20 世纪 70 年代，随着科技

的发展和运动生理学、代谢学研究的深入, CPET 才得以在临床实践中广泛应用。1973 年 Wasserman 等人首先提出借助乏氧运动负荷试验中的无氧阈和每分钟最大摄氧量评估患者运动能力的概念^[49]。20 世纪 80 年代后期和 90 年代初期, 随着计算机技术和气体分析技术的进一步发展, CPET 才真正成为能全面且精确评估心肺功能和运动能力的临床诊断工具^[50]。

目前, CPET 可以用于评估心血管和呼吸系统功能的生理、代谢和机械响应, 包括最大摄氧量、心率、呼吸频率、肺活量、动脉血气分析、气道阻力等以判断心血管疾病(如冠心病、心力衰竭)的严重程度、预测心血管事件的风险和指导康复训练等。CPET 通过分析运动期间循环、呼吸、血液、代谢等多系统功能的连续动态变化, 可客观定量全面评估患者的心肺运动耐量, 常用于指导冠心病患者运动处方的个体化定制, 对再发心血管事件有很高的预测价值^[51,52], 是目前公认的量化心肺功能的最佳手段^[53]。此外, CPET 还可广泛应用于其他疾病诊断和预后评估^[54], 如肺部疾病、肌肉疾病、慢性疲劳综合征等。

CPET 的开展主要由静息测量和运动测量两个部分组成^[55]。静息测量包括静息心率、静息血压、动脉血气分析等指标的测量; 运动测量包括通过运动自行车等器械进行逐渐增加的负荷运动, 同时记录运动时心率、呼吸、代谢等多种参数。测试过程中, 医生会根据患者的身体状况和症状, 适时调整负荷强度。

CPET 的主要评价指标包括最大摄氧量, 它反映了机体在运动时最大摄取氧量的能力, 是评价身体的有氧代谢能力和心肺功能的重要指标。除此之外, 还有其他指标如无氧阈值、代谢当量、氧脉搏等。通过 CPET 的评估, 可以得到患者的最大运动能力、心肺耐量和呼吸系统功能等多方面的信息。此外, 还能发现一些潜在的心血管或呼吸系统疾病。

2 心肺运动试验的优势

传统的心肺功能检查手段如心电图、24h 动态心电图、超声心动图、静态肺功能、胸部 X 线、CT 等均是在静息状态下完成, 主要反映的是机体静息状态下的心肺功能, 但由于静息状态下可能存在储备功能代偿, 因此传统的心肺功能检查难以真实反映日常生活中患者心肺功能受限的程度。

6MWT 是临床常用的评估患者运动能力的试验,其具有成本低、患者耐受性好等优点,但其仅通过受试者 6 分钟步行距离这一指标进行患者运动能力的评估,难以精确反映患者最大有氧运动能力^[56]。心肺运动试验较 6MWT 相比,优势在于:(1)更全面的评估:心肺运动试验可以测量患者的最大氧耗量、心率、血压、肺功能和乳酸水平等多项指标,可以更全面地评估患者的运动能力和心肺功能;(2)更高的敏感性和特异性:相比 6 分钟步行试验,心肺运动试验的敏感性和特异性更高,可以更准确地检测出患者存在的心肺功能异常或运动耐受力下降;(3)更精确的结果:心肺运动试验可以根据患者的运动强度不断调整,以获得更精确的结果;(4)更好的预测价值:心肺运动试验可以预测患者的心血管病发作风险、死亡风险和手术风险等,具有更好的预测价值。

运动平板试验是通过运动增加心脏做功,提高心肌耗氧量,刺激心肌的最大血液供应,根据心电图 ST 段是否压低及 T 波是否改变,进而判断冠状动脉是否狭窄,甚至对于筛查隐匿性冠心病和评估心功能均具有一定作用^[57]。

CPET 较运动平板试验相比优势在于:(1)对心血管疾病的筛查更准确:心肺运动试验通过监测心率、血压、心电图等多种指标,可以更准确地判断患者是否存在心血管疾病,例如缺血性心脏病、心律失常等;(2)对运动强度的控制更精准:心肺运动试验可根据患者的年龄、性别、体重、身高、心肺功能等因素制定运动计划,并逐步增加运动强度,确保患者在安全的范围内进行运动;(3)能够评估最大摄氧量以定量评估受试者的心肺功能状况、身体代谢水平等;(4)可以更有效地检测出隐匿性心肌缺血:运动平板试验主要是通过心电图来评估心肌缺血情况,但有些隐匿性心肌缺血很难被心电图所检测出来。而心肺运动试验可以通过多种指标(例如血乳酸、负荷心电图)来评估心肌缺血情况,可以更准确地检测出隐匿性心肌缺血。有研究表明,心肺运动试验诊断心肌缺血的敏感性和特异性均明显大于运动平板试验^[58]。心肺运动试验可能独立于运动平板试验和心电图,这可能与冠脉狭窄导致心肌缺血患者运动耐力下降有关,在负荷运动期间心肌氧供需不平衡现象往往早于同步心电图 ST 异常改变,尤其适用于运动平板试验和心电图表现阴性的患者。

综上所述,CPET 可精确地量化受试者通气功能、气体代谢及运动功能并反映心肺整体功能,测定在运动负荷下机体氧的摄取量和二氧化碳的排出量,可用于评估慢性心力衰竭、冠心病患者病情严重程度及预后、鉴别呼吸受限原因、量化手术干预或临床治疗效果、指导手术方案及个体化运动处方的制定等,因此 CPET 成为目前评估心肺功能的“金标准”^[59]。

3 心肺运动试验常见指标

3.1 峰值摄氧量 (peak oxygen uptake, VO_{2peak})

峰值摄氧量是指在运动强度逐渐增加的情况下,受试者在单位时间内能摄取的最大氧气量,是评估有氧运动能力的金标准,可表征机体循环系统输送氧的能力^[60]。 VO_{2peak} 是 CPET 中最重要的指标参数之一,也是评估患者运动能力的最佳指标之一。一般情况下, VO_{2peak} 数值越高,表示受试者身体的体适应能力越强,心肺功能越好,运动耐量越高。 VO_{2peak} 的测量也被广泛应用于各种心血管疾病的临床评估中^[61],如心肌梗死^[62]、心力衰竭^[63]、心肌病^[64]等。

3.2 无氧阈值 (anaerobic threshold, AT)

无氧阈值是指受试者在运动过程中,机体由有氧供能转化为无氧供能的转折点,即机体还未发生将要开始进行无氧代谢时的最大摄氧量。在无氧阈值时,机体摄氧量剧增,血乳酸水平开始上升,呼出二氧化碳和呼吸频率增加,呼吸比下降。AT 的确定可以通过多种方法获得,包括直接测量血液中的乳酸浓度、气体交换法以及心率与 VO_2 之间的关系^[65]等。其中气体交换法是临床最常用的方法^[66],常用的气体交换法包括呼吸熵法(呼吸熵=1)、V-slope 斜率法(以 VCO_2 升拐点或 VE/VCO_2 降拐点为判断标准)和通气当量法(以 VCO_2/VE 升拐点为判断标准)。通过呼吸气体分析,可以测定氧摄取量、二氧化碳产生量以及呼吸通量等参数,并进而计算出 AT 的值。常用的 AT 计算方法包括经验公式法、非线性回归法以及阈值检测法等。AT 是一个较敏感的指标,也是辅助评估受试者心血管、肺功能、氧气摄取能力和运动耐量重要指标之一,特别是对于那些处于较早期心肺疾病的患者。AT 的测量可以更准确地确定适合受试者的运动强度,是指导制定未来康复锻炼计划中运动强度的重要参考指标。此外,AT 也可以预测未来的运动能力和疾病预后。

3.3 分钟通气量 (ventilation, VE)

VE 是指每分钟进入肺部和排出肺部的气体量,即呼吸频率与潮气量的乘积。在心肺运动试验中,VE 是一个非常重要的生理参数,反映了呼吸系统在运动过程中的调节

能力^[67]。在运动过程中,身体需要更多的氧气来满足肌肉的需求,因此呼吸系统需要增加呼吸频率和潮气量来提供更多的氧气。VE 的增加可以通过增加呼吸频率和潮气量来实现。VE 的峰值通常出现在运动负荷的峰值阶段,达到顶峰后,VE 开始逐渐下降,直到恢复到静息状态。在临床实践中,VE 是评估患者呼吸系统的重要指标之一^[68]。异常的 VE 响应可以提示患者存在呼吸系统疾病或心血管系统疾病。例如,肺部疾病、心衰和肺栓塞等疾病都可能导致 VE 的异常增加或减少。因此,VE 的测量可以为医生提供重要的生理信息,以指导患者的治疗和康复计划。

3.4 氧脉搏 (O₂ pulse)

氧脉搏是指每次心脏搏动射出的血液中所携带的氧气量,可通过每次心跳的摄氧量除以心跳数来计算。氧脉搏是反映心血管效率的重要指标^[69]。在心肺运动试验中,氧脉搏可用以间接评估心脏每搏输出量的变化。当机体剧烈运动时,心脏会增加每分钟的输出量,以满足肌肉代谢的氧气需求。因此,在运动时,氧脉搏会随着心脏输出量的增加而增加。如果氧脉搏不能随着运动强度的增加而增加,即表明心脏输出量不能很好地适应机体运动本身^[70],提示可能存在心脏疾病或肺部疾病。

3.5 代谢当量 (metabolic equivalent of task, MET)

代谢当量是指个体在安静状态下每千克体重每分钟机体的摄氧量,根据正常情况下休息时,40岁、70kg成年男性的平均摄氧量数值派生而来。1 Met 约等于 3.5 ml/kg/min^[71]。代谢当量可用来评估个体的日常活动水平和身体适应能力^[72]。在心肺运动试验中,代谢当量用于对活动进行定量评估及运动强度判断,可用来评估受试者的最大运动能力和身体适应能力^[73]。如果代谢当量高于正常水平,即代表机体适应能力强,身体活动水平高。如果代谢当量低于正常水平,那么就可能存在慢性疾病或体力不足的问题。

3.6 摄氧通气效率斜率 (oxygen uptake efficiency slope, OUES)

摄氧通气效率斜率定义为受试者摄氧量与通气量的比值^[74]。通常情况下,当肺通气量增加时,VO₂ 也会增加,但 OUES 可以反映出这种关系的斜率。OUES 可以评估患者

的氧气利用效率和心肺功能,也是评估心肺血管疾病预后的重要指标^[75,76]。此外,OUES也可被用于评估慢性阻塞性肺部疾病^[77],以预测该患者群体的运动能力和疾病预后。

3.7 呼吸交换率 (respiratory exchange rate, RER)

RER 是指肺内二氧化碳排出量 VCO_2 与摄氧量 VO_2 之比,通常用最后一分钟的呼吸气体浓度计算,是心肺运动试验中反映氧和二氧化碳代谢的一个指标^[78],也是评估确定无氧阈值的一项依据^[79]。在运动开始时,RER 通常在 0.8 左右,随着运动强度的增加而逐渐增加。当 RER 达到 1.0 时,表示机体完全依赖碳水化合物代谢。当 RER 大于 1.0 时,表示机体内乳酸开始积累。CPET 中,RER 大于 1.1 通常表示受试者已经尽力^[80],但并不是试验终止的标准。RER 的变化可以帮助评估运动时机体燃烧的主要能源,从而指导运动训练和调整营养摄入^[81]。

4 益气活血治疗改善冠心病患者运动耐量的研究进展

气虚血瘀证是我国冠心病患者群体的主要证型，益气活血为其主要治疗大法。自2018年国内《稳定性冠心病诊断与治疗指南》发布后，王传池等收集1992年至2020年公开发表于中国知网、万方、维普、Pubmed数据库中的我国冠心病中医证的流行病学调查文献，并基于该指南标准中对我国稳定性冠心病的定义进行疾病诊断名称规范校正后，开展统计分析，共筛选纳入95篇文献，合计16778例患者。其中稳定性冠心病患者4305例，频次排名前四的证型分别为：血瘀证（79.0%）、气虚证（58.6%）、痰浊证（58.2%）、阴虚证（28.7%）^[82]。为探索目前已经开展的益气活血治疗冠心病的临床研究关注的疗效评价指标，我们对近几年已发表的益气活血改善冠心病的meta分析进行了汇总分析：

陈颖等探索益气活血改善冠心病PCI术后的患者，结局指标包括：PCI术后6月内再狭窄率、血液流变学指标、超敏C反应蛋白、血管内皮功能相关指标^[83]。李丹丹等探索益气活血解毒方改善冠心病气虚血瘀证的患者，结局指标包括：临床疗效总有效率、中医证候疗效、心绞痛总有效率、心电图总有效率、硝酸甘油减停率、血脂、炎症、血液流变学相关指标^[84]。康瑕雪等探索益气活血改善冠心病心绞痛的患者，结局指标包括：临床疗效、心电图疗效、中医症状疗效^[85]。叶嘉豪等探索益气活血改善冠心病的患者，结局指标包括：心功能、中医证候疗效、心电图疗效、心脏超声指标、心绞痛症状、血脂相关指标^[86]。

通过对本领域近几年发表的meta分析进行汇总，可掌握国际、国内数据库相关数据库所收录的关于益气活血应用于冠心病已发表的大部分临床研究，以初步明晰各研究中所重点关注的疗效评价方向。以上的分析结果表明，本领域主要关注的结局指标仍是益气活血干预对冠心病患者临床总有效率改善、症状改善、及相关理化指标的改善情况（如：心电图、超声心动图、血脂、血液流变学、血清炎症相关指标）。

然而，这些理化指标的改善是否可以带来患者运动能力改善及日常生活质量的提高，仍不明晰。临床上经常可见部分冠心病患者症状长期稳定，理化指标基本正常，但患者运动能力较确诊之前明显下降，生活质量受到影响。在当前生理-心理-社会医学模式下，患者的自身感受及运动能力、日常生活工作能力的实际体现成为新的临床关注的焦点。

基于文献检索，目前尚无针对益气活血改善冠心病患者运动能力的相关meta分析。通过筛选中国知网数据库中研究人群为冠心病气虚血瘀证患者、干预措施为中药益气活

血类方药的原始文献可发现,针对本研究方向开展的原始临床研究仍相对较少,以下基于各研究中所采用的不同的运动能力评估方式分别论述。

4.1 基于 6 分钟步行试验评估运动耐量的临床研究

赵跃恒等^[87]纳入冠心病合并心衰患者合计 64 例,观察益气活血自拟方对纽约心功能分级、心脏超声指标、凝血功能、及 6 分钟步行试验。以 6 分钟步行距离作为患者运动能力的评估方法,发现益气活血自拟方干预 3 个月可提高 6 分钟步行距离(试验组 VS. 对照组: 471.29 ± 19.85 m VS. 471.29 ± 19.85 m, $P < 0.001$)。丁小龙^[88]等 106 例冠心病心绞痛患者,观察到冠心舒通胶囊(陕西步长制药有限公司)干预 2 个月后,试验组较对照组提高 6 分钟步行试验的步行距离更长(试验组 VS. 对照组: 440.19 ± 18.75 m VS. 408.13 ± 19.94 m),但原文中仅对试验组和对照组干预后较干预前均有明显改善且试验组较对照组步行距离有所延长进行了统计描述,并未对两组干预后的数据进行统计分析。陈庆斌等^[89]选取 80 例冠心病心绞痛患者,观察到益气活血自拟方干预 2 个月可提高 6 分钟步行试验的距离(试验组 VS. 对照组: 412.3 ± 12.5 m VS. 326.4 ± 11.8 m, $P < 0.05$),但是结果中并未呈现试验组和对照组干预之前两组间 6min 步行试验距离的比较。朱天翔^[90]等选取 60 例稳定性冠心病气虚血瘀证患者,试验组予参香丸穴位贴敷联合西医常规,对照组予西医常规治疗,均干预 4 周,结果表明在两组干预前基线齐平的情况下,试验组可显著提高干预后 6 分钟步行试验总距离(试验组 VS. 对照组: 410.3 ± 16.65 m VS. 370.70 ± 12.76 m, $P < 0.05$)。

4.2 基于心电图运动平板试验评估运动耐量的临床研究

周其刚^[91]选取冠心病患者 64 例,观察益气活血自拟方干预 1 个月对该患者群体心电图活动平板(Bruce 方案次极量运动)中运动能力的影响,发现两组治疗前后做功量、最大心率、运动时长均较治疗前显著提高($P < 0.05$),同时试验组治疗后与对照组治疗后比,以上指标均有统计学意义($P < 0.05$)。曲文白^[92]等纳入 108 例稳定性冠心病患者,观察比较芪参丹芍颗粒联合西医常规治疗与曲美他嗪联合西医常规治疗 4 周的疗效,以心电图运动平板试验(改良 Bruce 方案)作为患者运动能力的评估方法,结果表明在主要疗效指标(代谢当量的提高值)上,试验组不劣于对照组。刘婧等^[93]纳入 62 例稳定性冠心病患者,试验组予益气活血自拟方联合西医常规治疗,对照组仅西医常规治疗,

均干预 4 周,以心电图运动平板试验评估患者运动能力,结果表明:试验组较对照组可显著提高运动总时长及代谢当量,降低 ST 段压低 0.1 mv 的时间和 ST 段压低总和。

4.3 基于心肺运动试验评估运动耐量的临床研究

成青莲等^[94]选取 60 例稳定性冠心病患者,试验组益气活血自拟方联合西医常规治疗 8 周,对照组仅西医常规治疗,选用意大利科迈心肺运动测试系统(Ramp15 方案)评估患者运动能力。结果表明:试验组可显著提高代谢当量、峰值摄氧量及无氧阈值。张红丽^[95]等纳入稳定性冠心病气虚血瘀证患者共 80 例,以德国耶格心肺运动评估仪(型号:SN823316)评估运动耐量,结果表明自拟益气活血方干预 3 个月,试验组治疗后较治疗前:峰值摄氧量、最高氧脉搏、最高运动负荷量、最高代谢当量、最高分钟通气量、无氧阈时摄氧量、无氧阈时运动负荷量均有所提高,且治疗后试验组的峰值摄氧量、最高氧脉搏、最高代谢当量、最高运动负荷量均高于对照组。

然而,以上的研究仍存在一些不足:(1)大部分研究均未基于统计学角度进行严格的样本量估算;(2)临床患者样本量均为 100 例左右,相对较小;(3)运动能力的评估方式大多是基于传统的 6 分钟步行试验、心电图运动平板,这些评价方法仍不足以全面体现患者整体的运动能力,采用心肺运动试验这一金标准衡量运动耐量的研究仍相对缺乏;(4)以上研究多为单中心临床研究,循证效力相对不足;(5)以上研究中的干预措施大为益气活血自拟方,会限制结论的临床推广应用;(6)部分研究中统计方法的选择不规范。

5 以心肺运动试验作为冠心病运动耐量评价方法的临床研究进展

基于 Web of Science 数据库收录的 SCI 论文文献检索可知, 心肺运动试验已被广泛应用于心血管系统疾病临床研究的疗效评价中, 主要涉及的病种包括: 心力衰竭、冠心病、心肌性疾病、高血压、先天性心脏病、心律失常性疾病和心脏瓣膜性疾病等。针对本研究方向, 以下对冠心病群体, 以心肺运动试验作为主要疗效评价指标的随机对照临床研究展开汇总分析。根据干预措施的不同, 大体可将这些研究归属为三大类: 心脏康复中的运动康复干预、药物干预和其他新型疗法干预。

5.1 运动康复干预

5.1.1 针对是否开展运动康复的探索

Kristiansen 等^[96]在一项单中心的研究中纳入 142 例稳定性冠心病患者, 试验组予监督下的高强度间歇训练, 对照组被要求正常生活且不参考超过休闲活动强度的运动, 分别干预 12 周。结果表明: 试验组峰值摄氧量增加了 2.5 ml/kg/min (95%CI: 2.1-3.0), 而对照组峰值摄氧量无明显变化 (增加了 0.2 ml/kg/min, 95%CI: -0.2-0.6, $P < 0.001$)。

5.1.2 针对运动康复强度的探索

一项研究^[97]纳入了 49 例急性心梗后无并发症的患者, 随机分入试验组: 接受监督的医院中等强度运动训练和对照组: 未接受监督的家庭低强度运动训练, 干预 6 周, 结果表明: 试验组干预可显著提高 85%峰值摄氧量下强度下的运动持续时长 (15(12-25) VS. 7(3.5-12) min, $P < 0.01$), 但对峰值摄氧量的影响组间比较无显著差异 (23.7±1.4 VS. 21.7±1.4 ml/kg/min, $P = 0.20$)。Thimo Marcin 等^[98]在研究中探索基于自觉症状感受制定的运动强度对 ST 段抬高型心梗早期患者 (4 周内) 心肺适能的影响, 共纳入 69 例患者, 随机分为高强度间歇运动组和中等强度持续运动组, 结果表明两组干预前后峰值摄氧量均显著升高 (高强度间歇运动组 +1.9 ml/kg/min, $P < 0.001$; 中等强度持续运动组 +3.2 ml/kg/min, $P < 0.001$), 但两组间峰值摄氧量的变化值比较差异无统计学意义, 提示针对 ST 段抬高型心梗早期运动康复锻炼中, 基于患者自觉症状感受制定的高强度间歇运动虽然被证明是安全的, 但是与中强度持续运动相比, 在改善峰值摄氧量评估的心肺适能方面并没有显示出更佳的获益。McGregor 等^[99]在研究中从 6 家分中心纳入 382 稳定性例冠心病患者, 发现高强度间歇训练对比中等强度持续训练干预 8 周后, 受试者峰值摄

氧量的提高更显著（高强度间歇训练组+2.37 ml/kg/min；中等强度持续训练组+1.32 ml/kg/min），两组间峰值摄氧量变化值差异性比较 1.04 ml/kg/min（95%CI：0.38-1.69， $P=0.002$ ）。

5.1.3 针对运动康复环境的探索

一项研究中针对冠脉搭桥术后低风险的 196 例患者^[100]，随访评估了基于家庭和基于医院的康复运动训练对 6 年后峰值摄氧量的影响，结果表明：基于家庭运动训练的峰值摄氧量明显优于医院组（ 1506 ± 418 VS. 1393 ± 341 ml/min, $P=0.02$ ）。

5.1.4 针对运动康复形式的探索

近年来，针对运动康复形式的研究主要集中在对水上运动和陆地运动的探索。一项研究中^[101]纳入 89 例最近发生心血管事件的冠心病患者群体（2-4 周内发生心梗、接受介入或冠脉搭桥术者），分别给予 2 周水上耐力加健美操运动锻炼、陆地耐力加健美操运动锻炼或常规生活方式干预锻炼。结果表明：在校正基线峰值摄氧量及年龄后，干预前后的组内比较，水上运动锻炼与基线时比增加了 27.4%（ 18.6 ml/kg/min, 95%CI $17.9-19.3$ ml/kg/min, $P < 0.001$ ），陆地运动锻炼与基线时比增加了 15.3%（ 16.7 ml/kg/min, 95%CI $16.0-17.4$ ml/kg/min, $P < 0.001$ ），常规生活方式干预锻炼与基线时比增加了 0.6%，但无统计学差异（ 14.9 ml/kg/min, 95%CI $14.2-15.6$ ml/kg/min, $P=0.78$ ）。此外，与常规生活方式干预锻炼比，水基组和陆地组干预力竭时间和峰值功率均有显著性差异。本研究结果提示水上运动锻炼和陆地运动锻炼均可有效改善近期发生心血管事件的冠心病患者的运动耐力。

中医运动康复形式的繁多，常见的包括太极拳、八段锦、五禽戏等，大量研究表明这些不同的中医运动康复形式在心血管病康复锻炼中发挥了重要作用。

Rosane Maria Nery^[102]等纳入 61 例有近发心梗病史的患者，随机分为试验组：予每周 3 次太极拳锻炼，对照组：予每周 3 次全身伸展运动锻炼，均持续 12 周。结果表明：试验组峰值摄氧量较基线增高了 14%（ 21.6 ± 5.2 VS. 24.6 ± 5.2 ml/kg/min, $P < 0.05$ ），对照组较基线下降了 5%（ 20.4 ± 5.1 VS. 19.4 ± 4.4 ml/kg/min, $P > 0.05$ ），同时干预后两组间比较，试验组较对照组峰值摄氧量增加了（ 5.2 ml/kg/min, 95%CI $2.8-7.7$, $P < 0.01$ ）差异有统计学意义，且在通过协方差分析调整基线峰值摄氧量、年龄、性别、糖尿病史、吸烟史后，试验组较对照组比峰值摄氧量仍有所增加（ 4.1 ml/kg/min, 95%CI $2.6-5.6$, $P < 0.01$ ）。

5.2 药物干预

雷诺嗪是一款调节心肌细胞能量代谢的药物,已被证实可减少冠心病患者的心绞痛发作频率并增加运动能力。一项小样本单中心临床研究^[103]纳入 29 例稳定型心绞痛患者,随机分为试验组 14 例,对照组 15 例,分别予雷诺嗪或安慰剂干预 2 周加 12 周运动锻炼,并在运动锻炼前后开展心肺运动试验测定峰值摄氧量。结果表明:2 周雷诺嗪加 12 周运动锻炼后,试验组比对照组峰值摄氧量变化值增加了两倍(试验组 2.1 ± 3.4 ml/kg/min, 对照组 0.9 ± 1.5 ml/kg/min),且两组内均有显著性差异。但本研究中因选取的样本量 29 例较小,按严格的统计学样本量评估,需要 245 例患者才足以检测出峰值摄氧量的组间差异。因此本研究中的统计效能不足以评估组间的差异,限制了本研究结论的推广应用;但本研究结果可提示稳定型心绞痛患者在运动训练联合应用雷诺嗪较单纯运动训练相比,可能对改善心肺适能有益。

中药干预已经在很多临床研究中证实对运动耐量具有改善作用。然而,在冠心病患者群体中,以中药作为主要干预措施,以心肺运动试验作为运动耐量评价方法的 SCI 论文并不多见。本研究中通过 Web of Science 数据库的文献调研发现,中药干预对冠心病患者心肺运动试验相关指标的临床研究目前已发表一篇临床研究方案^[104],该研究是一项多中心、随机双盲安慰剂对照临床研究,拟纳入不完全血运重建的难治性心绞痛 250 例患者,观察复方丹参滴丸(天士力制药集团有限公司)强化治疗(每天 3 次,每次 20 粒)和(每天 3 次,每次复方丹参滴丸 10 粒+安慰剂 10 粒),以心肺运动试验的总运动时长作为主要疗效指标,心肺运动试验中峰值摄氧量、心绞痛频率等指标作为次要疗效指标。截至目前,该研究的后续结果还未正式发表。考虑到中药干预的特殊性,再次采用中国知网数据库进一步检索后,新增数篇相关临床研究:陈宜兰等^[105]将 90 例缺血性心肌病受试者随机平均分为三组,对照组予西医常规联合芪苈强心胶囊治疗,中负荷强度组在对照组基础上加中等负荷训练,高负荷强度组在对照组基础上加高负荷训练,干预 12 周后发现对照组干预前后峰值摄氧量 (19.65 ± 2.71 VS. 23.65 ± 3.38 ml/kg/min, $P < 0.05$)、无氧阈值 (11.35 ± 1.29 VS. 14.11 ± 2.35 ml/kg/min, $P < 0.05$)、峰值氧脉搏 (8.65 ± 1.04 VS. 9.95 ± 1.31 L/min, $P < 0.05$) 均有所提高,干预后的三组间比较显示:高负荷强度组和中负荷强度组较对照组比以上指标均有显著差异 ($P < 0.05$)。张璇等^[106]纳入 50 例患者,观察丹参片对冠心病介入术后痰瘀互结型患者的影响,两组均予心脏康复五大处方干预,试验组在对照组基础上加用丹参片干预 4 周后,结果表明:试验组和对照组比,

峰值摄氧量和无氧阈值在两组间并无统计学差异（峰值摄氧量：1129.37±100.23 VS. 1009.78±96.98 ml/min, $P=0.51$ ；无氧阈值：783.25±85.73 VS. 710.91±79.85 ml/min, $P=0.17$ ）。贺素媛等^[107]纳入 132 例老年性冠心病介入术后患者，对照组予西医常规治疗，试验组在此基础上加丹参多酚酸盐静滴及握球运动，干预 2 周后，结果表明试验组峰值摄氧量、最大通气量、代谢当量、氧脉搏均显著高于对照组，差异均有统计学意义（ $P<0.05$ ）。吴林林等^[108]在其研究中将 120 例急性冠脉综合征接受经皮冠脉介入治疗术后的患者随机分为两组，发现在西医常规治疗基础上联合服用益气活血院内经验方 8 周，可提高该患者群体心肺运动试验峰值摄氧量、无氧阈值及运动总时长。林超等^[109]纳入 80 例稳定性冠心病痰瘀互结型受试者，对照组予西医常规治疗，试验组予西医常规治疗联合双清消斑饮及八段锦，干预 8 周后发现试验组较对照组峰值摄氧量明显增高（19.76±1.02 VS. 17.56±1.12 ml/kg/min, $P<0.05$ ），无氧阈值明显增高（15.03±1.20 VS. 13.29±1.32 ml/kg/min, $P<0.05$ ），氧脉搏明显增高（10.78±1.27 VS. 9.52±1.07 L/min, $P<0.05$ ）。

5.3 其他新型疗法干预

Ketil Lunde 等^[110]对 109 例前壁 ST 段抬高型急性心梗 2-12h 内接受介入支架术后的患者，介入后 6 天开展左前降支冠脉内注射单核骨髓细胞治疗，在治疗后第 2-3 周和第 6 个月时通过症状限制性踏车心肺运动试验评估运动能力。结果表明：干预前后两组内比较，峰值摄氧量均有显著提高（试验组：19.8±6.4 VS. 22.4±7.2 ml/kg/min, $P<0.01$ ；对照组：18.8±6.5 VS. 20.9±6.3 ml/kg/min, $P<0.01$ ），但是基于协方差分析的两组间变化值的比较，无统计学差异（试验组 VS. 对照组：2.8±3.9 VS. 2.4±3.5 ml/kg/min, $P=0.62$ ），提示该疗法对峰值摄氧量的改善没有治疗效果。

参考文献

- [1] Murray C J L. The Global Burden of Disease Study at 30 years[J]. Nature Medicine, 2022, 28(10): 2019-2026.
- [2] Tsao C W, Aday A W, Almarazooq Z I, et al. Heart Disease and Stroke Statistics—2022 Update: A Report From the American Heart Association[J]. Circulation, 2022, 145(8): 153-639.
- [3] Vaduganathan M, Mensah G A, Turco J V, et al. The Global Burden of Cardiovascular Diseases and Risk[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2022, 80(25): 2361-2371.
- [4] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2021 概要[J]. 中国循环杂志, 2022, 37(06): 553-578.
- [5] 国家卫生计生委统计信息中心. 2013 第五次国家卫生服务调查分析报告[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 2015.
- [6] 国家卫生健康委员会. 中国卫生健康统计年鉴 2020[M]. 北京: 协和医科大学出版社, 2020.
- [7] Sundqvist P, Pikkarainen E, Rautava P, et al. Yield of elective coronary angiography; gender differences, patient history, risk factors and angiographic findings in a primary care population[J]. Scandinavian Journal of Primary Health Care, 2020, 38(4): 481-486.
- [8] 王斌, 李毅, 韩雅玲. 稳定性冠心病诊断与治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(9): 680-694.
- [9] 姚怡, 王庆其. 论《黄帝内经》“心主血脉”理论对冠心病诊治的启发[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(6): 2397-2401.
- [10] 宋建平. 胸痹概念的演变[J]. 中华医史杂志, 2006(3): 157-161.
- [11] Goulding R P, Rossiter H B, Marwood S, et al. Bioenergetic Mechanisms Linking V̇O₂ Kinetics and Exercise Tolerance[J]. Exercise and Sport Sciences Reviews, 2021, 49(4): 274-283.
- [12] Bassett D R, Howley E T. Maximal oxygen uptake: “classical” versus “contemporary” viewpoints[J]. Medicine and Science in Sports and Exercise, 1997, 29(5): 591-603.

- [13]Bassett D R, Howley E T. Limiting factors for maximum oxygen uptake and determinants of endurance performance[J]. *Medicine and Science in Sports and Exercise*, 2000, 32(1): 70-84.
- [14]Pate R R, Pratt M, Blair S N, et al. Physical activity and public health. A recommendation from the Centers for Disease Control and Prevention and the American College of Sports Medicine[J]. *JAMA*, 1995, 273(5): 402-407.
- [15]Chang J A, Froelicher V F. Clinical and exercise test markers of prognosis in patients with stable coronary artery disease[J]. *Current Problems in Cardiology*, 1994, 19(9): 533-587.
- [16]Lear S A, Hu W, Rangarajan S, et al. The effect of physical activity on mortality and cardiovascular disease in 130 000 people from 17 high-income, middle-income, and low-income countries: the PURE study[J]. *Lancet (London, England)*, 2017, 390(10113): 2643-2654.
- [17]Watts E L, Matthews C E, Freeman J R, et al. Association of Leisure Time Physical Activity Types and Risks of All-Cause, Cardiovascular, and Cancer Mortality Among Older Adults[J]. *JAMA network open*, 2022, 5(8): 2228510.
- [18]Myers J, Prakash M, Froelicher V, et al. Exercise Capacity and Mortality among Men Referred for Exercise Testing[J]. *New England Journal of Medicine*, 2002, 346(11): 793-801.
- [19]Stewart R, Held C, Brown R, et al. Physical activity in patients with stable coronary heart disease: an international perspective[J]. *European Heart Journal*, 2013, 34(42): 3286-3293.
- [20]Puente-Maestu L, Palange P, Casaburi R, et al. Use of exercise testing in the evaluation of interventional efficacy: an official ERS statement[J]. *European Respiratory Journal*, 2016, 47(2): 429-460.
- [21]Balke B, Ware R W. An experimental study of physical fitness of Air Force personnel[J]. *United States Armed Forces Medical Journal*, 1959, 10(6): 675-688.
- [22]Cooper K H. A means of assessing maximal oxygen intake. Correlation between field and treadmill testing[J]. *JAMA*, 1968, 203(3): 201-204.
- [23]Guyatt G H, Sullivan M J, Thompson P J, et al. The 6-minute walk: a new measure of exercise capacity in patients with chronic heart failure[J]. *Canadian Medical Association Journal*, 1985, 132(8): 919-923.

- [24]ATS Committee On Proficiency Standards For Clinical Pulmonary Function Laboratories. ATS Statement[J]. American Journal of Respiratory and Critical Care Medicine, 2002, 166(1): 111-117.
- [25]Watson K, Winship P, Cavalheri V, et al. In adults with advanced lung disease, the 1-minute sit-to-stand test underestimates exertional desaturation compared with the 6-minute walk test: an observational study[J]. Journal of Physiotherapy, 2023,69(2):108-113.
- [26]Ch  h  re B, Bougault V, Cheniv  sse C, et al. Cardiorespiratory adaptation during 6-Minute Walk Test in fibrotic idiopathic interstitial pneumonia patients who did or did not respond to pulmonary rehabilitation[J]. European Journal of Physical and Rehabilitation Medicine, 2019, 55(1): 103-112.
- [27]Zugck C. Is the 6-minute walk test a reliable substitute for peak oxygen uptake in patients with dilated cardiomyopathy?[J]. European Heart Journal, 2000, 21(7): 540-549.
- [28]Holland A E, Spruit M A, Troosters T, et al. An official European Respiratory Society/American Thoracic Society technical standard: field walking tests in chronic respiratory disease[J]. European Respiratory Journal, 2014, 44(6): 1428-1446.
- [29]李慧英, 李延峰. 老年患者 6 分钟步行试验临床应用中国专家共识[J]. 中华老年医学杂志, 2020, 39(11): 4.
- [30]Kharabsheh S M, Al-Sugair A, Al-Buraiki J, et al. Overview of Exercise Stress Testing[J]. Annals of Saudi Medicine, 2006, 26(1): 1-6.
- [31]M M A. The electrocardiographic changes after exercise in angina pectoris[J]. J. Mt. Sinai. Hops., 1941, 7: 629.
- [32]Proudfit W L, Bruschke V G, Sones F M. Clinical course of patients with normal or slightly or moderately abnormal coronary arteriograms: 10-year follow-up of 521 patients.[J]. Circulation, 1980, 62(4): 712-717.
- [33]LEPESCHKIN E. Exercise Tests in the Diagnosis of Coronary Heart Disease[J]. Circulation, 1960, 22(5): 986-1001.
- [34]Levenson R M. Role of Exercise Test in Evaluation of Cardiac Patients[J]. JAMA, 1963, 183(6): 480.
- [35]Bruce R A. Evaluation of functional capacity and exercise tolerance of cardiac patients[J]. Modern Concepts of Cardiovascular Disease, 1956, 25(4): 321-326.

- [36] Bruce R A, Blackmon J R, Jones J W, et al. Exercise Testing in Adult Normal Subjects and Cardiac Patients [J]. *Pediatrics*, 1963, 32:742-756.
- [37] Soares-Miranda L, Siscovick D S, Psaty B M, et al. Physical Activity and Risk of Coronary Heart Disease and Stroke in Older Adults[J]. *Circulation*, 2016, 133(2): 147-155.
- [38] Gibbons R J, Balady G J, Beasley J W, et al. ACC/AHA Guidelines for Exercise Testing: Executive Summary[J]. *Circulation*, 1997, 96(1): 345-354.
- [39] Gibbons R J, Balady G J, Bricker J T, et al. ACC/AHA 2002 Guideline Update for Exercise Testing: Summary Article[J]. *Circulation*, 2002, 106(14): 1883-1892.
- [40] Yilmaz A, Hayiroğlu M İ, Saltürk S, et al. Machine Learning Approach on High Risk Treadmill Exercise Test to Predict Obstructive Coronary Artery Disease by using P, QRS, and T waves' Features[J]. *Current Problems in Cardiology*, 2023, 48(2): 101482.
- [41] Aker A, Saliba W, Hislop E, et al. Blood pressure measurements during treadmill exercise testing and the risk for the future development of atrial fibrillation[J]. *Hypertension Research*, 2022, 45(9): 1496-1504.
- [42] Kim D-B, Jung H O, Jeon D S, et al. Aortic Valve Sclerosis on Echocardiography is a Good Predictor of Coronary Artery Disease in Patients With an Inconclusive Treadmill Exercise Test[J]. *Korean Circulation Journal*, 2009, 39(7): 275-279.
- [43] Kligfield P, Lauer M S. Exercise Electrocardiogram Testing[J]. *Circulation*, 2006, 114(19): 2070-2082.
- [44] Jetté M, Sidney K, Blümchen G. Metabolic equivalents (METs) in exercise testing, exercise prescription, and evaluation of functional capacity[J]. *Clinical Cardiology*, 1990, 13(8): 555-565.
- [45] Sukpraphrute B, Drafts B C, Rerkpattanapipat P, et al. Prognostic utility of cardiovascular magnetic resonance upright maximal treadmill exercise testing[J]. *Journal of Cardiovascular Magnetic Resonance*, 2015, 17(1): 103.
- [46] Fine N M, Pellikka P A, Scott C G, et al. Characteristics and Outcomes of Patients Who Achieve High Workload (≥ 10 Metabolic Equivalents) During Treadmill Exercise Echocardiography[J]. *Mayo Clinic Proceedings*, 2013, 88(12): 1408-1419.
- [47] Shah R V, Murthy V L, Colangelo L A, et al. Association of Fitness in Young Adulthood With Survival and Cardiovascular Risk[J]. *JAMA Internal Medicine*, 2016, 176(1): 87.

- [48]Milani R V, Lavie C J, Mehra M R, et al. Understanding the Basics of Cardiopulmonary Exercise Testing[J]. Mayo Clinic Proceedings, 2006, 81(12): 1603-1611.
- [49]Dafoe W. Principles of Exercise Testing and Interpretation[J]. The Canadian Journal of Cardiology, 2007, 23(4): 274.
- [50]Beaver W L, Wasserman K, Whipp B J. A new method for detecting anaerobic threshold by gas exchange[J]. Journal of Applied Physiology, 1986, 60(6): 2020-2027.
- [51]Wasserman K, Sun X-G, Hansen J E. Effect of Biventricular Pacing on the Exercise Pathophysiology of Heart Failure[J]. Chest, 2007, 132(1): 250-261.
- [52]Sun X G, Hansen J E, Beshai J F, et al. Oscillatory Breathing and Exercise Gas Exchange Abnormalities Prognosticate Early Mortality and Morbidity in Heart Failure[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2010, 55(17): 1814-1823.
- [53]Guazzi M, Arena R, Halle M, et al. 2016 focused update: clinical recommendations for cardiopulmonary exercise testing data assessment in specific patient populations[J]. European Heart Journal, 2018, 39(14): 1144-1161.
- [54]Laveneziana P, Di Paolo M, Palange P. The clinical value of cardiopulmonary exercise testing in the modern era[J]. European Respiratory Review, 2021, 30(159): 200187.
- [55]Glaab T, Taube C. Practical guide to cardiopulmonary exercise testing in adults[J]. Respiratory Research, 2022, 23(1): 9.
- [56]Dourado V Z, Nishiaka R K, Simões M S M P, et al. Classification of cardiorespiratory fitness using the six-minute walk test in adults: Comparison with cardiopulmonary exercise testing[J]. Pulmonology, 2021, 27(6): 500-508.
- [57]Wang W, Zhang Q. Diagnostic value of scoring model of treadmill exercise test combined with dynamic electrocardiogram for latent coronary heart disease[J]. Journal of Electrocardiology, 2021, 69: 82-86.
- [58]Parasuraman S, Schwarz K, Singh S, et al. Cardiopulmonary exercise test in myocardial ischemia detection[J]. Future Cardiology, 2020, 16(2): 113-121.
- [59]Guazzi M, Bandera F, Ozemek C, et al. Cardiopulmonary Exercise Testing[J]. Journal of the American College of Cardiology, 2017, 70(13): 1618-1636.

- [60]Pardaens K, Van Cleemput J, Vanhaecke J, et al. Peak Oxygen Uptake Better Predicts Outcome Than Submaximal Respiratory Data in Heart Transplant Candidates[J]. Circulation, 2000, 101(10): 1152-1157.
- [61]Glaser S, Schaper C, Ewert R, et al. Peak oxygen uptake and exercise capacity: a reliable predictor of quality of life?[J]. European Heart Journal, 2009, 30(13): 1674-1674.
- [62]Letnes J M, Dalen H, Vesterbekkmo E K, et al. Peak oxygen uptake and incident coronary heart disease in a healthy population: the HUNT Fitness Study[J]. European Heart Journal, 2019, 40(20): 1633-1639.
- [63]Tabet J. Comparison of the prognostic value of left ventricular filling and peak oxygen uptake in patients with systolic heart failure[J]. European Heart Journal, 2000, 21(22): 1864-1871.
- [64]Giardini A, Fenton M, Andrews R E, et al. Peak Oxygen Uptake Correlates With Survival Without Clinical Deterioration in Ambulatory Children With Dilated Cardiomyopathy[J]. Circulation, 2011, 124(16): 1713-1718.
- [65]Abe M, Ushio K, Ishii Y, et al. A method of determining anaerobic threshold from percutaneous oxygen saturation[J]. Scientific Reports, 2022, 12(1): 20081.
- [66]Nishijima H, Kondo K, Yonezawa K, et al. Quantification and physiological significance of the rightward shift of the V-slope during incremental cardiopulmonary exercise testing[J]. BMC Sports Science, Medicine and Rehabilitation, 2017, 9(1): 9.
- [67]Guazzi M, Reina G, Tumminello G, et al. Exercise ventilation inefficiency and cardiovascular mortality in heart failure: the critical independent prognostic value of the arterial CO₂ partial pressure[J]. European Heart Journal, 2005, 26(5): 472-480.
- [68]Habdank D, Ewert R, Hummel M, et al. Changes in exercise capacity, ventilation, and body weight following heart transplantation[J]. European Journal of Heart Failure, 2007, 9(3): 310-316.
- [69]Van De Sande D A J P, Schoots T, Hoogsteen J, et al. O₂ Pulse Patterns in Male Master Athletes with Normal and Abnormal Exercise Tests[J]. Medicine & Science in Sports & Exercise, 2019, 51(1): 12-18.
- [70]Nikooie R. Determination of Anaerobic Threshold by Monitoring the O₂ Pulse Changes in Endurance Cyclists[J]. Journal of Strength and Conditioning Research, 2016, 30(6): 1700-1707.

- [71]Tompuri T T. Metabolic equivalents of task are confounded by adiposity, which disturbs objective measurement of physical activity[J]. *Frontiers in Physiology*, 2015, 6: 226.
- [72]Bourque J M, Holland B H, Watson D D, et al. Achieving an Exercise Workload of ≥ 10 Metabolic Equivalents Predicts a Very Low Risk of Inducible Ischemia[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2009, 54(6): 538-545.
- [73]Holtermann A, Stamatakis E. Do all daily metabolic equivalent task units (METs) bring the same health benefits?[J]. *British Journal of Sports Medicine*, 2019, 53(16): 991-992.
- [74]Hollenberg M, Tager I B. Oxygen uptake efficiency slope: an index of exercise performance and cardiopulmonary reserve requiring only submaximal exercise[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2000, 36(1): 194-201.
- [75]Ramos R P, Ota-Arakaki J S, Alencar M C, et al. Exercise oxygen uptake efficiency slope independently predicts poor outcome in pulmonary arterial hypertension[J]. *European Respiratory Journal*, 2014, 43(5): 1510-1512.
- [76]Davies L C, Wensel R, Georgiadou P, et al. Enhanced prognostic value from cardiopulmonary exercise testing in chronic heart failure by non-linear analysis: oxygen uptake efficiency slope[J]. *European Heart Journal*, 2006, 27(6): 684-690.
- [77]Barron A, Francis D P, Mayet J, et al. Oxygen Uptake Efficiency Slope and Breathing Reserve, Not Anaerobic Threshold, Discriminate Between Patients With Cardiovascular Disease Over Chronic Obstructive Pulmonary Disease[J]. *JACC: Heart Failure*, 2016, 4(4): 252-261.
- [78]Du Z, Lu W, Lang D. Comparison between 2,000 m and 3,000 m time trials to estimate the maximal aerobic speed for collegiate runners[J]. *Frontiers in Physiology*, 2022, 13: 1005259.
- [79]Camboni D, Lange T J, Ganslmeier P, et al. Left ventricular support adjustment to aortic valve opening with analysis of exercise capacity[J]. *Journal of Cardiothoracic Surgery*, 2014, 9(1): 93.
- [80]Wittink H, Blatter T, Outermans J, et al. Feasibility, reproducibility and validity of the 10 meter Shuttle Test in mild to moderately impaired people with stroke[J]. *PLOS ONE*, 2020, 15(10): 0239203.

- [81]Lee H S, Lee J. Influences of Ketogenic Diet on Body Fat Percentage, Respiratory Exchange Rate, and Total Cholesterol in Athletes: A Systematic Review and Meta-Analysis[J]. International Journal of Environmental Research and Public Health, 2021, 18(6): 2912.
- [82]王传池, 吴珊, 江丽杰, 等. 1990~2020 年我国冠心病中医证的流行病学调查研究概况[J]. 中国中医基础医学杂志, 2020, 26(12): 1883-1893.
- [83]陈颖, 薛崇祥, 杨德爽, 等. 基于 Meta 分析探讨益气活血类中药防治冠心病 PCI 术后再狭窄的优势[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2022, 20(14): 2497-2507.
- [84]李丹丹, 周庆兵, 张淼, 等. 益气活血解毒方药治疗冠心病气虚血瘀证有效性和安全性的 Meta 分析[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(24): 4209-4215.
- [85]康瑕雪, 王东海, 董波, 等. 益气活血类中药治疗冠心病心绞痛临床疗效的 Meta 分析[J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(12): 78-81+161-162.
- [86]叶嘉豪, 胡志希, 姚涛, 等. 益气活血方药联合西药对冠心病临床疗效的 Meta 分析[J]. 湖南中医杂志, 2021, 37(10): 141-147.
- [87]赵跃恒. 益气活血方加减辅助治疗对冠心病心力衰竭患者心功能的影响[J]. 医药论坛杂志, 2021, 42(16): 140-142.
- [88]丁小龙. 自拟益气活血方联合冠心舒通胶囊治疗冠心病心绞痛患者的临床疗效[J]. 药品评价, 2020, 17(6): 32-34.
- [89]陈庆斌. 益气活血汤联合瑞舒伐他汀治疗冠心病心绞痛的临床疗效及对血脂与运动耐力的影响[J]. 中国医学创新, 2019, 16(19): 127-130.
- [90]朱天翔. 中药特色制剂“参香丸”穴位贴敷对冠心病稳定型心绞痛及相关焦虑状态的干预研究[D]. 南京中医药大学, 2018.
- [91]周其刚. 益气活血汤联合常规治疗对冠心病患者运动耐量及心肌缺血的影响[J]. 浙江中医杂志, 2010, 45(11): 786-787.
- [92]曲文白. 芪参丹芍颗粒对慢性稳定性冠心病患者运动耐量影响的随机对照研究[D]. 北京中医药大学, 2021.
- [93]刘婧. 益气活血法治疗冠心病稳定型心绞痛的临床疗效观察[D]. 辽宁中医药大学, 2021.
- [94]成青莲. 益气活血方对冠心病稳定型心绞痛（气虚血瘀证）运动耐量的影响[D]. 河南中医药大学, 2018.

- [95]张红丽,姜红岩,耿敖,等. 益气活血方对气虚血瘀型稳定性冠心病康复期病人心肺功能及生活质量的影响[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(24): 4313-4316.
- [96]Kristiansen J, Sjørðarson T, Grove E L, et al. Feasibility and impact of whole-body high-intensity interval training in patients with stable coronary artery disease: a randomised controlled trial[J]. Scientific Reports, 2022, 12: 17295.
- [97]Leitch J W, Newling R P, Basta M, et al. Randomized Trial of a Hospital-Based Exercise Training Program After Acute Myocardial Infarction: Cardiac Autonomic Effects[J]. Journal of the American College of Cardiology, 1997, 29(6): 1263-1268.
- [98]Marcin T, Trachsel L D, Dysli M, et al. Effect of self-tailored high-intensity interval training versus moderate-intensity continuous exercise on cardiorespiratory fitness after myocardial infarction: A randomised controlled trial[J]. Annals of Physical and Rehabilitation Medicine, 2022, 65(1): 101490.
- [99]McGregor G, Powell R, Begg B, et al. High-intensity interval training in cardiac rehabilitation (HIIT or MISS UK): A multi-centre randomised controlled trial[J]. European Journal of Preventive Cardiology, 2023: zwad039.
- [100] Smith K M, McKelvie R S, Thorpe K E, et al. Six-year follow-up of a randomised controlled trial examining hospital versus home-based exercise training after coronary artery bypass graft surgery[J]. Heart, 2011, 97(14): 1169-1174.
- [101] Vasić D, Novaković M, Božić Mijovski M, et al. Short-Term Water- and Land-Based Exercise Training Comparably Improve Exercise Capacity and Vascular Function in Patients After a Recent Coronary Event: A Pilot Randomized Controlled Trial[J]. Frontiers in Physiology, 2019, 10: 903.
- [102] Nery R M, Zanini M, De Lima J B, et al. Tai Chi Chuan improves functional capacity after myocardial infarction: A randomized clinical trial[J]. American Heart Journal, 2015, 169(6): 854-860.
- [103] Willis L H, Slentz C A, Johnson J L, et al. Abstract 15350: Exercise Training With and Without Ranolazine in Chronic Stable Angina Patients: Effects on Peak Oxygen Consumption, Daily Physical Activity and Quality of Life: A Randomized, Placebo-Controlled, Double-Blind Pilot Study[J]. Circulation, 2017, 136: 15350-15350.

- [104] Wu Z, Xu D, Wu Z, et al. Efficacy of INtensive Treatment V/S. Standard Treatment of COmpound DanshEn Dripping Pills in Refractory Angina Patients With Incomplete Revascularization (INCODER Study): Study Protocol for a Multicenter, Double-Blind, Randomized Controlled, Superiority Trial[J]. *Frontiers in Cardiovascular Medicine*, 2022, 9: 860059.
- [105] 陈宜兰, 吴志勇, 鄢丽萍, 等. 芪蒴强心胶囊联合不同强度康复训练在缺血性心脏病患者中的应用效果[J]. *中国当代医药*, 2023, 30(1): 87-91.
- [106] 张璇, 杨惠民, 耿敖, 等. 丹葵片对经皮冠状动脉介入术后心脏康复病人生活质量的影响[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2020, 18(2): 203-206.
- [107] 贺素媛. 丹参多酚酸盐联合握球运动在老年冠心病 PCI 术后患者中的应用[J]. *中国老年保健医学*, 2020, 18(1): 55-59.
- [108] 吴林林, 高占义, 魏月娟, 等. 益气活血方对急性冠脉综合征患者 PCI 术后血小板功能、血管内皮功能和运动耐力的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2021, 30(8): 825-829.
- [109] 林超, 熊尚全, 唐岩, 等. 双清消斑饮加八段锦联合西药治疗稳定性冠心病痰瘀互结证 36 例[J]. *福建中医药*, 2022, 53(10): 4-6+9.
- [110] Lunde K, Solheim S, Aakhus S, et al. Exercise capacity and quality of life after intracoronary injection of autologous mononuclear bone marrow cells in acute myocardial infarction: Results from the Autologous Stem cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction (ASTAMI) randomized controlled trial[J]. *American Heart Journal*, 2007, 154(4): 710.

第二部分 临床研究

愈心痛胶囊改善稳定性冠心病心肺运动耐量的临床研究

前言

稳定性冠心病(stable coronary artery diseases, SCAD)包括慢性稳定性劳力型心绞痛、缺血性心肌病及急性冠脉综合征后病情稳定的阶段^[1]。基于指南推荐的 SCAD 治疗方案包括药物治疗:改善心肌缺血缓解症状,预防心血管事件改善预后;血运重建:常用于强化药物治疗症状仍有缺血症状或存在较大范围心肌缺血证据;控制危险因素:控制高血压、高血糖、高血脂、体重管理、戒烟限酒、心理干预、加强体育锻炼^[2]。基于指南的一、二级预防可在一定程度上缓解冠心病患者缺血症状,降低心血管事件的发生,但临床上在接受最佳药物治疗和介入治疗的冠心病患者中,一年后仍有 34% 的患者再次发生心绞痛,10 年死亡风险达 30%,同时研究表明接受冠心病药物治疗的患者中 30% 无法恢复正常工作,30% 活动受限^[3-5]。多数冠心病患者在二级预防及治疗基础上仍伴有日常生活运动能力下降,严重影响到患者的生活质量和长期预后^[6]。

心肺运动试验(cardiopulmonary exercise test, CPET)始于 20 世纪 50 年代。随着电子计算机和电子传感器技术的发展,运动负荷、心电图和气体代谢变化的测量有机结合产生了 CPET(运动负荷气体交换法),其包括运动气体代谢分析和运动心电负荷试验两部分。CPET 通过分析运动期间循环、呼吸、血液、代谢等多系统功能的连续动态变化,可客观定量全面评估患者的心肺运动耐量,常用于指导冠心病患者运动处方的个体化定制,对再发心血管事件有很高的预测价值^[7,8],是目前公认的量化心肺功能的最佳手段^[9]。CPET 可精确地量化受试者通气功能、气体代谢及运动功能并反映心肺整体功能,测定在运动负荷下机体氧的摄取量和二氧化碳的排出量,可用于评估慢性心力衰竭、冠心病患者病情严重程度及预后、鉴别呼吸受限原因、量化手术干预或临床治疗效果、指导手术方案及个体化运动处方的制定等,因此 CPET 成为目前评估心肺功能的“金标准”^[10]。

峰值摄氧量(peak oxygen uptake, VO_{2peak})指运动过程中受试者不能维持功率继续增加、达到峰值时的摄氧量,是评估运动能力的最精确指标,是定量运动能力的金标准^[11],但其易受受试者性别、年龄、运动习惯、功能状态等多种因素影响,凡是能影响血液系统携氧能力、心功能、组织摄氧能力等的因素均会导致 VO_{2peak} 下降。无氧阈值

(anaerobic threshold, AT)是指随着运动负荷增加、循环血液中氧气供应由于无法满足机体有氧代谢需求而由无氧代谢代替有氧代谢的临界点,是目前公认的制定运动强度的金标准^[12],反映了患者的亚极量运动负荷,避免了主观因素的干扰。VO₂peak、AT是目前临床心肺运动功能评估最经典、最常见的指标^[13]。

在优化的药物治疗基础上,血运重建可以改善冠状动脉事件高风险患者的临床预后和缓解药物治疗无效患者的心绞痛症状。ORBITA 研究表明^[14],针对单支冠状动脉狭窄 $\geq 70\%$ 的 SCAD 患者,经皮冠状动脉介入治疗(percutaneous coronary intervention, PCI)与单纯药物治疗相比,虽然可以改善患者的血流动力学和影像学指标,但对患者运动能力的提高和临床症状的改善方面,无明显优势。

益气活血中药能改善血管内皮功能、抑制血小板活化、抑制炎症反应、保护心肌细胞、改善心肌代谢、促进缺血心肌毛细血管新生^[15-17]。课题组前期多中心随机对照研究^[18],纳入 13 家医院的 805 例患者,采用益气活血中药(心悦胶囊和复方川芎胶囊)联合西医常规治疗 SCAD 患者 6 个月,结果显示心悦胶囊和复方川芎胶囊联合治疗较西医常规治疗可进一步降低心源性死亡、再发心梗及血运重建等心血管主要终点事件,且未增加出血风险。在最佳药物治疗基础上,联合益气活血中药是否可进一步改善该类患者运动能力?目前尚缺乏研究报道。

本研究选用陈可冀院士治疗冠心病心绞痛的益气活血经典方愈心痛胶囊(药物组成红参、三七、延胡索,国药准字 Z20020089)为观察药物,针对 SCAD 患者运动耐量降低这一普遍关注的问题,选择稳定性冠心病患者,通过多中心、随机、双盲、安慰剂对照临床研究,观察在西药常规治疗基础上加服愈心痛胶囊对患者心肺运动耐量(峰值摄氧量等)、西雅图心绞痛、SF36 生活质量的作用。

1 研究对象

1.1 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 2018 年《稳定性冠心病诊断与治疗指南》^[1],2019 年中华中医药学会心血管病分会公布的《冠心病稳定型心绞痛中医诊疗指南》。

1.2 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; 劳力性心绞痛, 或有陈旧性梗病史, 或临床诊断心衰(包括射血分数保留心衰);

(3) 具有乏力、动则气短的临床症状;

(4) 签署知情同意书。

1.3 排除标准

(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。

2 研究方案

本临床研究遵循伦理道德原则即《赫尔辛基宣言》, 符合科学性原则, 遵循 ICH-GCP 要求。本试验采用多中心、随机、双盲、安慰剂平行对照的临床研究设计: 采用分层、区组随机化方法, 以运动处方的运动强度为分层因素, 在各层内进行区组随机化, 各医

院竞争入组；采用双盲、单模拟技术，由大连胜光药业集团股份有限公司制备试验用药及安慰剂。设置筛选期 1 周，干预期 12 周。

2.1 受试者来源

所有受试者来自：且均采用统一运动心肺功能测试仪（品牌：德国耶格 JAEGER，型号：MasterScreen CPX）。

2.2 受试者干预

2.2.1 试验药品提供与管理

试验用药品愈心痛胶囊、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，试验期间由各医院提供给受试者。每例受试者在本试验中所需的试验用药品包装成 1 个大包装盒（每个大包装盒内包含足够受试者使用 12 周+6 天的试验用药品）内含有 2 个中包装盒，在访视 1、访视 2 分别发放相应试验用药（含足够受试者使用 8 周+3 天、4 周+3 天的试验用药品）。每个盒上印有“仅供临床研究使用”字样，标签内容包括药物名称、药物编号、功能主治、规格、用法用量、贮藏条件、生产批号、有效期、药物供应单位等信息。所有试验用药品使用统一标签。将检验合格的试验用药物交付于各中心，由各中心临床试验机构及参研科室协商指定专门的药物管理员进行药物及相关文件的接收、清点，并做好相关记录和管理。愈心痛胶囊及愈心痛胶囊模拟剂贮藏要求：密闭，置阴凉干燥处保存（不超过 20℃）。试验结束后回收试验药品。

2.2.2 用药方案

试验组：常规西医治疗基础上+愈心痛胶囊（大连胜光药业集团股份有限公司（国药准字：Z20020089），0.33g/粒，4 粒/次，3 次/日，连续口服 12 周）。

对照组：常规西医治疗基础上+愈心痛胶囊模拟剂（大连胜光药业集团股份有限公司，0.33g/粒，4 粒/次，3 次/日，连续口服 12 周）。

基础治疗：采用 2018 年中华医学会发布的《稳定性冠心病诊断与治疗指南》，除调节心肌能量药物（如曲美他嗪）以外的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；试验期间，基础治疗用药需保持用法用量基本不变。

2.2.3 合并治疗的规定

2.2.3.1 研究期间允许的合并用药

- (1) 受试者如果患有基础疾病需要长期服药，研究期间可继续使用；
- (2) 受试者如果出现不良反应，由研究者决定是否需要使用对症治疗药物；
- (3) 所有同时使用的药物均应在 CRF 表上详细记录，并予以说明。

2.2.3.2 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。

2.2.4 研究期间运动强度规定

参考中华医学会心血管病学分会于 2015 年发布的《冠心病患者运动治疗中国专家共识》^[19]、2016 年发布的《经皮冠状动脉介入治疗术后运动康复专家共识》制定《稳定性冠心病患者低、中强度运动处方建议》SOP，对主要研究者进行培训，试验期间，受试者均接受各分中心主要研究者的运动康复锻炼指导，随访时详细询问受试者康复训练情况并记录于病例报告表（case report form, CRF）中。

2.3 受试者退出

研究者决定的退出：在试验进行过程中，若出现下列情况，研究者可决定让该受试者退出试验，接受其他治疗。(1) 试验期间受试者发生了其它合并症、并发症或特殊生理变化，不宜继续接受试验。(2) 试验期间患者依从性差，使用药物达不到规定量的 80% 或超过规定量的 120%，或受试者自行中途换药或使用方案规定的禁用药物，特别是对试验药物影响较大的药物，影响有效性和安全性判断者。(3) 试验期间，受试者发生严重不良事件或重要不良事件等，不适宜继续参加试验。(4) 试验期间，发生不可预估，经研究者评估认为不宜继续参加试验者。

受试者自行退出：根据知情同意书的规定，受试者有权中途退出试验，或受试者虽未明确提出退出试验，但不再接受用药及检测而失访，也属于“退出”。研究者尽可能了解其退出的原因，并加以记录。

退出的处理：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。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。

2.4 剔除病例

剔除病例标准：所有筛选成功进入本试验的受试者均将按照统计学原则被纳入分析人群，相关数据同样遵循统计学原则进行分析。数据盲态审核会议时，由研究者、统计专家、数据管理员根据方案违背情况共同判断病例是否剔除。

3 观测指标

3.1 主要疗效指标

(1) 治疗 12 周末峰值摄氧量 (VO_{2peak}) 变化值：

评价标准：记录治疗 12 周末峰值摄氧量 (VO_{2peak}) 较用药前 (第 0 天) 的变化。

(2) 治疗 12 周末无氧阈值 (AT) 变化值：

评价标准：记录治疗 12 周末无氧阈值 (AT) 较用药前 (第 0 天) 的变化。

3.2 次要疗效指标

(1) 治疗 12 周末心肺运动试验其他指标：代谢当量 (Metabolic Equivalent of Task, MET), 氧脉搏 (Oxygen Pulse, VO_2/HR), 最大分钟通气量 (maximal ventilation, VE_{max}) 变化情况：

评价标准：记录治疗 12 周末心肺运动试验其他指标：代谢当量 METs, 氧脉搏 VO_2/HR , 最大分钟通气量 VE_{max} 较用药前 (第 0 天) 的变化。

(2) 治疗 12 周末心肺运动试验心电图 ST 段下移 1 mm 的开始时间和持续时间变化情况：

评价标准：记录治疗 12 周末心肺运动试验心电图 ST 段下移 1 mm 的开始时间、持续时间较用药前 (第 0 天) 的变化。

(3) 西雅图量表较用药前 (第 0 天) 的变化情况：

评价标准：记录治疗 8 周末、12 周末西雅图量表总分较用药前 (第 0 天) 的变化。

(4) SF36 生活质量量表较用药前 (第 0 天) 变化情况:

评价标准: 记录治疗 8 周末、12 周末 SF36 生活质量量表总分较用药前 (第 0 天) 的变化。

3.3 其他疗效指标

(1) 气虚血瘀证证候评分较用药前 (第 0 天) 变化情况:

评价标准: 记录治疗 8 周末、12 周末气虚血瘀证证候评分较用药前 (第 0 天) 的变化。

3.4 安全性指标及评价时点

对于随访时出现的任何生命体征异常、实验室检查异常或心电图检查异常, 无论其程度是否严重以及与药物是否有关, 研究者均详细记录, 嘱咐受试者及时回访至恢复正常或基线水平, 或研究者能对异常进行合理解释并认为无需回访为止。

- (1) 生命体征: 体温、脉搏、呼吸、血压。
- (2) 血常规: 红细胞、血红蛋白、白细胞、中性粒细胞比例、血小板。
- (3) 尿常规: 尿白细胞、尿蛋白、尿糖、尿隐血、。
- (4) 肝功能: 谷丙转氨酶、谷草转氨酶。
- (5) 肾功能: 血肌酐、尿素氮、肾小球滤过率、尿酸。
- (6) 凝血功能: 活化部分凝血活酶时间、凝血酶时间、凝血酶原时间、纤维蛋白原。
- (7) 尿妊娠试验: 仅育龄期女性进行检查。
- (8) 血糖
- (9) 血脂: 总胆固醇、甘油三酯、低密度脂蛋白胆固醇、高密度脂蛋白胆固醇。
- (10) 心电图检查: 采用标准的 12 导联心电图检查。

阶段	筛选期	治疗期	
访视点	访视 1	访视 2	访视 3
访视时间	-7~0 天	治疗 8 周末 $\pm$ 3 天	治疗 12 周末 $\pm$ 3 天
项目			
基本情况			
签署知情同意书	•		
基本信息采集	•		
核对入选、排除标准	•		

随机入组	●		
安全性观察			
生命体征	●	●	●
体格检查	●		
血常规	●		●
尿常规	●		●
肝功能	●		●
肾功能	●		●
凝血功能	●		●
血糖	●		●
血脂	●		●
尿妊娠试验	●		
12 导联心电图	●		●
冠状动脉造影 或冠状动脉 CT 血管成像	●		
疗效性观察			
心肺运动试验	●		●
西雅图心绞痛量表	●	●	●
SF36 生活质量量表	●	●	●
气虚血瘀证证候评分	●	●	●
运动处方制定	●		
康复运动锻炼		●	●
其他			
发放试验药物	●	●	
回收剩余药物		●	●
发放日记卡	●	●	
回收日记卡		●	●
记录合并用药/治疗	●	●	●
记录不良事件		●	●
依从性判断			●

3.5 不良事件

整个试验过程中及时记录发生的所有不良事件。当发生任何不良事件时（如受试者主观感受不适及实验室客观值检测异常），研究者均立即采取措施保护受试者安全，结合受试者情况分析可能的原因，同时将不良事件的详细情况记录于原始病历和电子版 CRF 中，并依据实际情况记录其持续、转归、消失等情况。本研究纳入的为稳定性冠心病患者，由于病情自身进展，或与疾病自身自然转归所发生的如心肌梗死、心律失常、

急性心力衰竭等，为可预期的严重不良反应，由各课题参与单位密切观察并妥善地采取处理措施或治疗，严格按照临床试验要求进行处理、上报和随访等。

4 统计分析

统计分析使用 SAS 9.4 软件进行计算。根据意向性治疗原则，所有经过随机化、至少使用一次试验药物并且至少有一次随访记录的受试者均将进入本试验的全分析集。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近一次观测结转的方法进行填补。所有随机化后至少接受一次治疗且有安全性评价的受试者纳入安全集进行分析。

基于本研究两个主要疗效指标的优效性试验设计，其中任一项主要疗效指标有统计学差异即统计学优效性成立。主要疗效指标的检验水准 $\alpha=0.0125$ （单侧），其余指标采用 $\alpha=0.05$ （双侧）。对于计量资料以均值±标准差或中位数（Q1，Q3）表示，计数资料以频数（百分比）表示。对于治疗后相对基线的变化，采用配对 t 检验或 Wilcoxon 符号秩检验进行自身前后比较。采用成组 t 检验或者 Wilcoxon 秩和检验进行组间差值的比较。

5 临床研究注册与质控

本研究已经通过伦理委员会审批（批准号：2020XLA041-1），且已经于中国临床试验注册中心完成临床试验注册（注册号：ChiCTR2000041293）。

本试验方案经由中国中医科学院西苑医院伦理委员会会议审批通过，再由各参与医院伦理委员会审核通过后实施，遵循受试者知情同意原则，研究方案对受试者完全告知，尊重和保护受试者个人权益，所有的本试验相关记录均予以严格保密。

试验中所涉及非实验室指标，如体格检查、体温测量、血压测量等，量表评价，均在临床试验实施前制定了统一的评价标准，对各中心参加临床试验的人员进行了统一培训；参与临床试验的医疗机构临床检查实验室均建立了质量管理标准和标准操作规范，以保证检测、诊断数据及结果的准确可靠；制定监查计划，定期进行课题各医院试验流程监查，记录并进行相应整改。本试验将采用纸质及电子病例报告表作为数据载体，纸质的病例报告表由研究者填写，研究者须保证数据真实、完整、准确。本研究原始资料

以纸版病例报告表的形式由各医院进行保存，同时所有 CRF 纸质版邮寄备份。所有电子数据由专人管理。所有资料保存期限为课题结束后 5 年。

6 结果

6.1 试验完成情况

本研究自 2021 年 3 月至 2021 年 11 月共筛选 422 例受试者，其中筛选失败 8 例，共入组 404 例受试者，随机分为试验组 202 例、对照组 202 例。试验脱落病例 60 例，脱落率 14.85%，其中试验组 32 例（15.84%），对照组 28 例（13.86%）。根据数据集分析规则，本研究共 369 例患者纳入 FAS 分析集，共 393 例受试者纳入 SS 分析集。图 1.

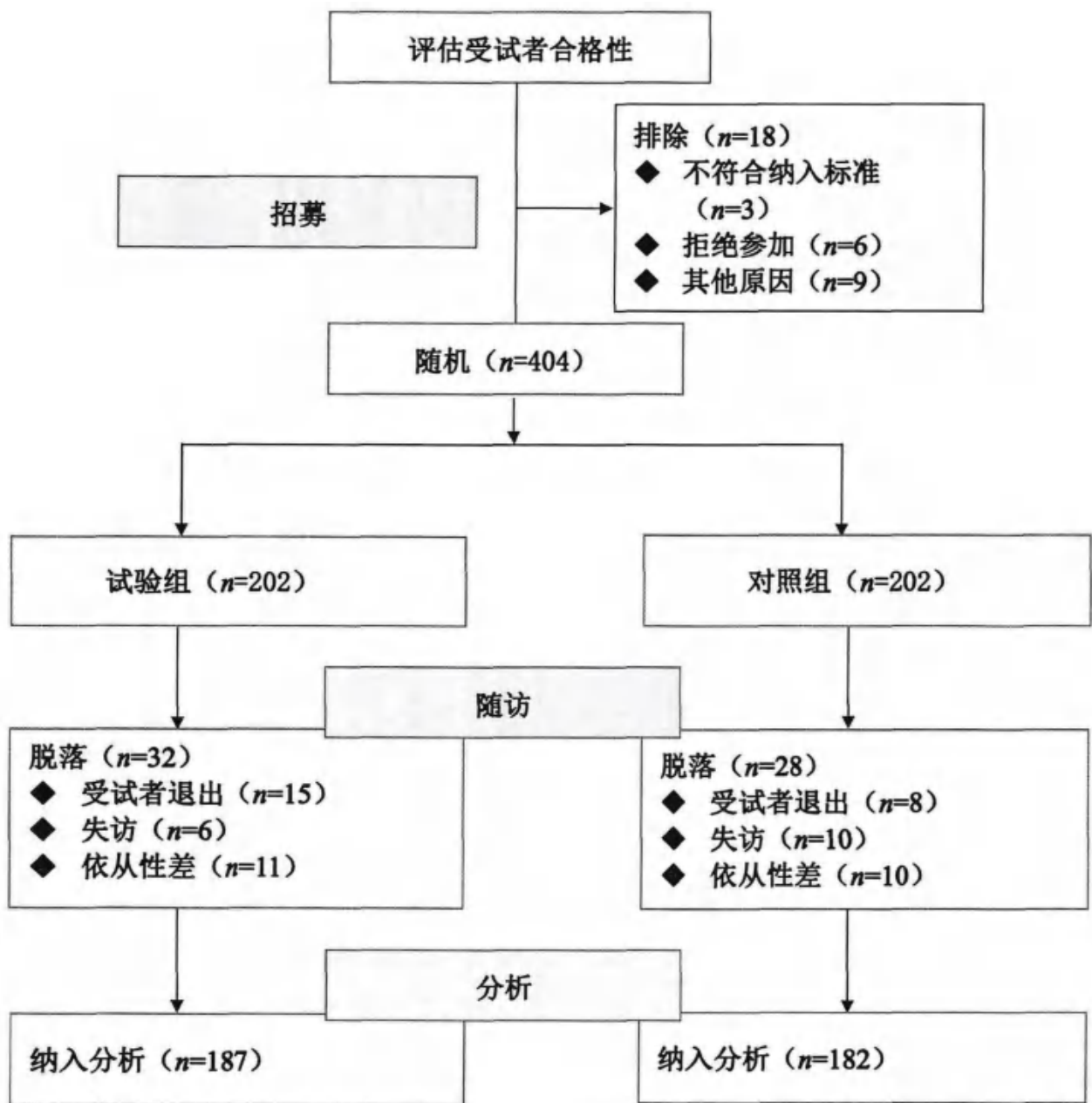


图 1. 受试者筛选流程图

6.2 基线资料分析

试验组和对照组在性别、年龄、民族、身高、体重、体重指数 (body mass index, BMI)、基线血压、吸烟饮酒情况、合并疾病史 (心梗、高血压、心衰、心律失常、糖尿病、高脂血症、卒中)、 β 受体阻滞剂使用情况方面比较, 差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。表 1。

表 1. 两组受试者间基线情况比较

	试验组	对照组	P 值
男性	137 (73.26%)	144 (79.12%)	0.19
年龄(岁)	58.83±9.51	57.92±9.85	0.37
汉族	179 (95.72%)	174 (95.60%)	0.96
身高(cm)	1.66.81±8.33	167.95±7.69	0.17
体重(kg)	70.81±11.60	71.88±11.29	0.37
BMI(kg/m ²)	25.34±3.13	25.41±3.10	0.84
收缩压(mmHg)	123.22±13.25	123.80±13.58	0.68
舒张压(mmHg)	75.33±9.37	76.35±9.05	0.29
吸烟	75 (40.11%)	85 (46.70%)	0.20
饮酒	50 (26.74%)	65 (35.71%)	0.06
合并疾病史			
心肌梗死	53 (28.34%)	53 (29.12%)	0.87
高血压	122 (65.24%)	116 (63.74%)	0.76
心衰	40 (21.39%)	39 (21.43%)	0.99
心衰 NYHA 分级			0.55
NYHA I 级	24 (60.00%)	21 (53.85%)	
NYHA II 级	14 (35.00%)	15 (38.46%)	
NYHA III 级	2 (5.00%)	3 (7.69%)	
心律失常	14 (7.49%)	15 (8.24%)	0.79
糖尿病	55 (29.41%)	54 (29.67%)	0.96
高脂血症	116 (62.03%)	111 (60.99%)	0.84
脑卒中	3 (1.60%)	5 (2.75%)	0.50
β 受体阻滞剂	105 (56.1%)	99 (54.4%)	0.74
冠脉 CTA	42 (22.46%)	33 (18.13%)	0.30
冠脉造影	150 (80.21%)	150 (82.42%)	0.59
运动强度			0.67
低强度	73 (39.04%)	75 (41.21%)	

中强度	114 (60.96%)	107 (58.79%)
疾病诊断	0.86	
稳定性心绞痛	164 (89.30%)	161 (88.46%)
ACS 术后稳定期	8 (4.28%)	10 (5.49%)
其他	12 (6.42%)	11 (6.04%)

注：计量资料以均值±标准差或中位数 (Q1, Q3) 表示，分类资料以频数 (百分比) 表示。

6.3 峰值摄氧量、无氧阈值变化情况

试验组在常规西医治疗基础上联合愈心痛胶囊，干预前后峰值摄氧量升高 (19.23 ± 4.97 VS. 19.78 ± 4.92 ml/kg/min)，差异有统计学意义 ($P=0.01$)；对照组干预前后峰值摄氧量无明显差异 (19.67 ± 4.43 VS. 19.73 ± 5.03 ml/kg/min, $P=0.75$)；试验组和对照组干预前后峰值摄氧量变化值比较未达到统计学差异 ($P=0.11$)。表 2。

试验组干预前后无氧阈值升高 (12.47 ± 3.80 VS. 13.10 ± 3.72 ml/kg/min)，差异有统计学意义 ($P=0.002$)；对照组干预前后无氧阈值无明显差异 (12.78 ± 3.30 VS. 12.70 ± 3.45 ml/kg/min, $P=0.65$)；试验组和对照组干预前后无氧阈值变化值比较有统计学差异 ($P=0.01$)。表 2。

表 2. 峰值摄氧量、无氧阈值干预前后变化情况比较

	试验组			对照组		
	基线	12 周	差值	基线	12 周	差值
峰值摄氧 量 (ml/kg/min)	19.23 ± 4.97	$19.78 \pm 4.92^{\#}$	0.55 ± 2.98	19.67 ± 4.43	19.73 ± 5.03	0.07 ± 2.80
无氧阈值 (ml/kg/min)	12.47 ± 3.80	$13.10 \pm 3.72^{\#}$	$0.63 \pm 2.63^{**}$	12.78 ± 3.30	12.70 ± 3.45	-0.08 ± 2.40

注：计量资料以均值±标准差表示，计数资料以频数 (百分比) 表示。 $^{\#}P<0.05$ 组内差异比较； $^{**}P<0.025$ 两组间差异比较。

6.4 心肺运动试验其他指标变化情况

试验组干预前后代谢当量升高 (5.32 ± 1.62 VS. 5.48 ± 1.55 MET), 差异有统计学意义 ($P=0.01$); 对照组干预前后代谢当量无明显差异 (5.33 ± 1.53 VS. 5.47 ± 1.55 MET, $P=0.07$); 试验组和对照组干预前后代谢当量变化值比较未达到统计学差异 ($P=0.76$)。表 3。

试验组干预前后氧脉搏无明显差异 (10.83 ± 2.96 VS. 11.41 ± 4.73 ml/次, $P=0.07$); 对照组干预前后氧脉搏无明显差异 (11.65 ± 4.99 VS. 12.15 ± 8.90 ml/次, $P=0.38$); 试验组和对照组干预前后代谢当量变化值比较未达到统计学差异 ($P=0.90$)。表 3。

试验组干预前后分钟通气量无明显差异 (53.38 ± 17.71 VS. 54.29 ± 17.59 L/min, $P=0.22$); 对照组干预前后分钟通气量无明显差异 (54.87 ± 15.24 VS. 54.84 ± 16.22 L/min, $P=0.97$); 试验组和对照组干预前后分钟通气量变化值比较未达到统计学差异 ($P=0.38$)。表 3。

表 3. 心肺运动其他指标干预前后变化情况比较

	试验组			对照组		
	基线	12 周	差值	基线	12 周	差值
代谢当量 (MET)	5.32 ± 1.62	5.48 ± 1.55^a	0.16 ± 0.90	5.33 ± 1.53	5.47 ± 1.55	0.13 ± 0.99
氧脉搏(ml/ 次)	10.83 ± 2.96	11.41 ± 4.73	0.58 ± 4.40	11.65 ± 4.99	12.15 ± 8.90	0.50 ± 7.70
分钟通气量 (L/min)	53.38 ± 17.71	54.29 ± 17.59	0.91 ± 10.18	54.87 ± 15.24	54.84 ± 16.22	-0.03 ± 10.41

注: 计量资料以均值±标准差表示, 计数资料以频数(百分比)表示。^a $P<0.05$ 组内差异比较。

试验组干预前后 ST 段下移 1 mm 开始时间无明显差异 (6.23 ± 3.89 VS. 6.21 ± 4.15 min, $P=0.94$); 对照组干预前后 ST 段下移 1 mm 开始时间无明显差异 (6.89 ± 2.89 VS. 6.75 ± 3.48 min, $P=0.55$); 试验组和对照组干预前后 ST 段下移 1 mm 开始时间变化值比较未达到统计学差异 ($P=0.78$)。试验组干预后 ST 段下移 1 mm 持续时间较前缩短 (4.68 ± 7.38 VS. 4.49 ± 7.44 min), 但未达到统计学差异 ($P=0.55$); 对照组干预后 ST 段下移 1 mm 持续时间较前略有增长 (3.82 ± 3.44 VS. 3.97 ± 3.45 min, $P=0.66$); 组间比较无统计学差异 ($P=0.48$)。表 4。

表 4. 心肺运动试验中 ST 段下移 1 mm 开始及持续时间干预前后变化情况比较

	试验组 (n=25)			对照组 (n=32)		
	基线	12 周	差值	基线	12 周	差值
ST-T mm						
开始时间 (min)	6.23±3.89	6.21±4.15	-0.03±1.68	6.89±2.89	6.75±3.48	-0.14±1.31
ST-T mm						
持续时间 (min)	4.68±7.38	4.49±7.44	-0.19±1.54	3.82±3.44	3.97±3.45	0.16±2.00

注：计量资料以均值±标准差表示，计数资料以频数（百分比）表示。

6.5 西雅图心绞痛量表、SF-36 生活质量量表及气虚血瘀证候评分变化情况

西雅图心绞痛量表中躯体活动受限程度、心绞痛稳定状态、心绞痛发作情况、治疗满意程度、疾病认知程度五大维度得分试验组和对照组治疗前后比较均有所升高 ($P < 0.05$)，试验组干预前后躯体活动受限程度较对照组明显改善 ($P < 0.05$)，与对照组比，试验组干预可提高其他四个维度变化值，但未达到统计学差异。表 5。

SF-36 生活质量量表中总体健康、生理机能、生理职能、情感职能、社会功能、躯体疼痛、精力、精神健康八大维度得分试验组和对照组治疗前后比较均有所升高 ($P < 0.05$)，试验组干预前后总体健康、精力较对照组明显改善 ($P < 0.05$)，与对照组相比，试验组干预可提高其他六个维度变化值，但未达到统计学差异。表 6。

试验组干预前后气虚血瘀证候评分降低 (5.19 ± 1.88 VS. 2.59 ± 1.84)，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；对照组干预前后气虚血瘀证候评分降低 (5.10 ± 1.63 VS. 2.65 ± 1.70)，差异有统计学意义 ($P < 0.05$)；试验组和对照组干预前后气虚血瘀证候评分变化值比较未达到统计学差异。表 7。

对中重度气虚血瘀证的患者进行中医证候评分的疗效分析结果表明，试验组和对照组干预前后气虚血瘀证候评分皆有明显降低 (10.15 ± 1.81 VS. 4.82 ± 2.53 , $P < 0.05$; 9.74 ± 1.07 VS. 7.74 ± 2.17 , $P < 0.05$)。与对照组相比，试验组干预后可明显降低气虚血瘀证候评分 (-5.33 ± 2.54 VS. -2.00 ± 2.35 , $P < 0.05$)。表 8。

表 5. 西雅图心绞痛量表干预前后变化情况比较

试验组	对照组
-----	-----

愈心痛胶囊改善稳定性冠心病心肺运动耐量的研究

	基线	12 周	差值	基线	12 周	差值
躯体活动受限程度	69.64±10.54	80.92±9.96 [#]	10.28±7.24 [*]	69.24±10.45	72.85±9.29 [#]	3.61±7.29
心绞痛稳定状态	54.95±20.09	64.01±23.42 [#]	9.07±28.91	56.28±21.31	63.37±23.80 [#]	7.09±26.06
心绞痛发作情况	87.64±17.00	96.04±9.79 [#]	8.41±16.02	88.88±15.00	95.35±9.17 [#]	6.47±13.25
治疗满意程度	76.60±17.11	81.67±13.82 [#]	5.07±15.36	76.12±17.35	80.40±14.90 [#]	4.28±14.16
疾病认知程度	57.83±18.19	63.92±14.92 [#]	6.09±15.91	57.04±18.56	62.57±18.48 [#]	5.53±16.69

注：计量资料以均值±标准差表示，计数资料以频数（百分比）表示。[#] $P<0.05$ 组内差异比较，^{*} $P<0.05$ 组间差异比较。

表 6.SF-36 生活质量量表干预前后变化情况比较

	试验组			对照组		
	基线	12 周	差值	基线	12 周	差值
总体健康	59.44±20.07	73.05±20.23 [#]	13.61±15.13	58.15±19.38	66.44±18.56 [#]	8.29±14.14
生理机能	89.09±11.14	95.83±9.89 [#]	6.74±6.64	88.57±11.68	94.18±7.86 [#]	5.61±9.50
生理职能	68.05±38.52	74.73±35.45 [#]	6.68±34.03	66.90±37.99	70.94±36.40 [#]	4.04±33.52
情感职能	73.80±37.98	81.46±33.52 [#]	7.66±35.17	73.81±37.14	80.95±33.29 [#]	7.14±36.47
社会功能	82.07±17.39	92.32±16.73 [#]	10.25±13.25	80.04±21.07	89.80±17.68 [#]	9.76±17.49
躯体疼痛	81.25±19.19	91.27±17.32 [#]	10.02±16.08	79.55±19.97	89.12±15.79 [#]	9.56±18.28
精力	76.60±15.08	89.06±13.87 [#]	12.46±11.32	74.81±14.53	80.82±13.57 [#]	6.01±11.41
精神健康	79.14±13.71	86.74±13.24 [#]	7.60±10.82	77.29±17.02	84.16±14.62 [#]	6.87±12.90

注：计量资料以均值±标准差表示，计数资料以频数（百分比）表示。[#] $P<0.05$ 组内差异比较，^{*} $P<0.05$ 组间差异比较。

表 7.气虚血瘀证候评分干预前后变化情况比较

	试验组			对照组		
	基线	12 周	差值	基线	12 周	差值
气虚血瘀 证候评分	5.19±1.88	2.59±1.84 [#]	-2.60±1.98	5.10±1.63	2.65±1.70 [#]	-2.45±2.05

注：计量资料以均值±标准差表示，计数资料以频数（百分比）表示。[#] $P<0.05$ 组内差异比较。

表 8. 中重度气虚血瘀证患者干预前后变化情况比较

	试验组 ($n=61$)			对照组 ($n=65$)		
	基线	12 周	差值	基线	12 周	差值
气虚血瘀 证候评分	10.15±1.81	4.82±2.53 [#]	-5.33±2.54 [*]	9.74±1.07	7.74±2.17 [#]	-2.00±2.35

注：计量资料以均值±标准差表示，计数资料以频数（百分比）表示。[#] $P<0.05$ 组内差异比较，^{*} $P<0.05$ 组间差异比较。

6.6 服药依从性分析

根据入组时药物发放情况记录表及回收情况表计算试验期间各受试者的用药量，并依此对受试者服药依从性进行判定，规定标准用药量(粒)的 80%-120%为用药依从性好，否则为依从性差。两组间试验用药量及用药依从性好的受试者数均无统计学差异 ($P>0.05$)。两组间服药依从性均达 85%以上。表 9。

表 9. 两组间服药依从性比较

	试验组	对照组	P 值
试验用药量	970.24±206.32	980.29±191.41	0.6295
依从性好(%)	161(86.56)	156(86.67)	0.9759

注：计量资料以均值±标准差表示，计数资料以频数（百分比）表示。

6.7 安全性分析

揭盲之前进行不良事件判定。12 周干预期内，共发生不良事件 56 例，其中试验组 32 例（胃肠系统 10 例，代谢及营养系统 6 例，肝胆系统 5 例，呼吸系统 4 例，神经系统 5 例，肌肉骨骼系统 1 例，免疫系统及感染 1 例，全身整体疾病 2 例，尿路疾病 2 例，

皮肤及皮肤附件 2 例,视觉系统 1 例,心血管系统 2 例),对照组 24 例(胃肠系统 4 例,代谢及营养系统 5 例,肝胆系统 3 例,呼吸系统 3 例,神经系统 7 例,肌肉骨骼系统 4 例,免疫系统及感染 2 例,全身整体疾病 1 例,视觉系统 1 例,精神疾病 1 例,胃肠疾病/呼吸系统疾病 1 例,血管出血及凝血疾病 1 例)。

共发生严重不良事件 3 例,其中试验组 0 例,对照组 3 例(肝胆疾病中:胆囊炎 1 例,全身整体疾病中:猝死 1 例,视觉疾病中:白内障 1 例)。无出血事件及严重不良反应发生。表 10。

表 10.两组间不良事件及不良反应发生情况比较

	试验组 (n=198)		对照组 (n=195)		P 值
	例数	发生率(%)	例数	发生率(%)	
不良事件	32	16.16	24	12.31	0.27
严重不良事件	0	0.00	3	1.54	0.12
严重不良反应	0	0.00	0	0.00	-

实验室检查异常判定为:两组间干预前后临床意义判定为正常或异常但无临床意义转变异常且有临床意义。其中血常规异常 4 例,均发生于试验组;尿常规异常 14 例,其中试验组 7 例,对照组 7 例;肝肾功能异常 50 例,其中 31 例,对照组 19 例;血糖血脂异常 66 例,其中试验组 32 例,对照组 34 例;凝血功能无异常。

7 讨论

本研究选用的试验用药物愈心痛胶囊(国药准字 Z20020089)为已上市中药,其组方来源于岳美中名老中医、陈可冀院士治疗心绞痛的益气活血止痛经验方^[20]。愈心痛胶囊主要成分为三七、延胡索、红参。红参大补元气,配伍三七活血化瘀,延胡索以止痛,共奏益气活血通脉止痛之功,高效液相色谱技术检测显示其主要药效成分为人参二醇、人参三醇、三七皂苷 R1^[21]、延胡索乙素等。愈心痛胶囊被指南推荐用于临床治疗冠心病稳定型心绞痛气虚血瘀证^[22,23]。一系列临床研究均表明^[24-26],愈心痛胶囊联合西医常规治疗可进一步缓解心绞痛症状、减少发作次数及持续时间,提高冠心病治疗的总有效率,且安全性良好。基础研究表明,愈心痛胶囊可明显抑制实验性犬心肌损伤时肌酸磷酸激酶的溢出和血浆内皮素的过量释放,同时促进一氧化氮的生成和释放;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,增加冠脉血流量;提高

缺血心肌中一氧化氮合酶 mRNA 表达水平, 削弱缺血心肌中内皮素转化酶 mRNA 的异常表达, 显著增强缺血心肌组织中铜锌-超氧化物歧化酶阳性反应程度提高其活性, 从而发挥保护心肌缺血损伤的作用^[27-29]。此外, 愈心痛胶囊显著降低犬缺血心肌细胞中线粒体的体密度, 同时增加面数密度和比表面, 可减轻缺血造成的心肌线粒体水肿, 阻止缺血心肌膜损伤, 在一定程度上维持心肌细胞膜结构的完整性, 从而保护心肌超微结构, 改善心肌缺血性损伤^[30]。针对愈心痛胶囊药物组成的现代药理学研究表明, 三七总皂苷能增加骨骼肌对葡萄糖的摄取和吸收, 提高心肌中血氧含量, 降低心肌耗氧量^[31,32]; 延胡索具有抗心肌缺血, 减少心肌细胞凋亡, 发挥保护心肌的作用^[33]; 红参具有增强大鼠骨骼肌和心肌抗氧化能力, 其提取物可改善运动时骨骼肌收缩力和收缩速度, 发挥抗疲劳作用^[34]。

7.1 愈心痛胶囊对心肺运动功能的影响

本研究共纳入 404 例稳定性冠心病患者, 愈心痛胶囊联合西医常规治疗 12 周后, 与基线相比可显著提高稳定性冠心病患者的峰值摄氧量 $[19.23 \pm 4.97 \text{ VS. } 19.78 \pm 4.92 \text{ ml/kg/min, } 97.5\% \text{ CI } (0.060-1.047), P=0.01]$, 和无氧阈值 $[12.47 \pm 3.80 \text{ VS. } 13.10 \pm 3.72 \text{ ml/kg/min, } 97.5\% \text{ CI } (0.187-1.070), P=0.002]$ 。而安慰剂联合西医常规治疗 12 周后, 峰值摄氧量 $[19.67 \pm 4.43 \text{ VS. } 19.73 \pm 5.03 \text{ ml/kg/min, } 97.5\% \text{ CI } (-0.404-0.535), P=0.75]$ 、无氧阈值 $[12.78 \pm 3.30 \text{ VS. } 12.70 \pm 3.45 \text{ ml/kg/min, } 97.5\% \text{ CI } (-0.490-0.327), P=0.65]$, 与基线相比均无显著性差异。

试验组用药 12 周后差值较对照组可明显提高稳定性冠心病患者的无氧阈值 $[0.63 \pm 2.63 \text{ VS. } -0.08 \pm 2.42 \text{ ml/kg/min, } 97.5\% \text{ CI } (0.111-1.309), P=0.01]$, 差异有统计学意义, 表明愈心痛胶囊可明显改善稳定性冠心病患者的无氧阈值, 提高患者运动耐量。试验组用药 12 周后峰值摄氧量的差值较对照组相比无统计学意义 $[0.55 \pm 2.98 \text{ VS. } 0.07 \pm 2.80 \text{ ml/kg/min, } 97.5\% \text{ CI } (-0.190-1.167), P=0.11]$ 。

心肺运动试验的代谢当量试验组干预前后有明显提高 $[5.32 \pm 1.62 \text{ VS. } 5.48 \pm 1.55 \text{ Met, } 95\% \text{ CI } (0.034-0.294), P=0.01]$, 对照组无明显改善 $[5.33 \pm 1.53 \text{ VS. } 5.47 \pm 1.55 \text{ Met, } 95\% \text{ CI } (-0.011-0.280), P=0.07]$ 。试验组和对照组心肺运动其他相关指标氧脉搏、最大通气量、ST 段下降 1 mm 的开始及持续时间等组内及组间均无明显改善。

7.2 愈心痛胶囊改善心肺运动功能的疗效分析

2016 年美国心脏学会在一项科学声明中推荐将“心肺适能”作为一项重要临床“生命体征”，呼吁临床医生应给予更多的重视与关注^[35]。心肺运动试验被认为是评估心肺适能的金标准，其中以峰值摄氧量，无氧阈值作为重要指标^[36]。HF-ACTION^[37]研究对 2331 例慢性射血分数降低型心力衰竭的患者开展了为期 3 个月的心脏运动康复，并进行了 4 年的随访，研究结果表明：峰值摄氧量每增加 6%，心血管主要终点事件的风险降低了 5%，次要终点事件的风险降低了 4%，心血管死亡率或因心衰住院率的风险降低 8%，全因死亡率降低了 7%。Terence 等对 12169 例男性冠心病患者平均随访 7.9 年，发现峰值摄氧量是心源性死亡和全因死亡风险的独立预测因子^[38]。我国《稳定性冠心病中西医结合康复治疗专家共识》^[39]中也指出，对无禁忌症的患者应开展运动负荷试验以指导日常康复锻炼，提高运动耐量，改善生活质量及预后。

无氧阈值，也称为“乳酸阈值”或“通气阈值”，反应机体做功由有氧代谢转化为利用乳酸作为燃料的无氧代谢时的最大摄氧量，无氧阈值的增加可反应机体对氧的利用能力及对缺氧的耐受能力的增加，被认为是确定运动处方的金标准^[40]，以保障患者在合适的心肺适能范围内进行安全的有氧运动。无氧阈值一般为最大摄氧量的 49%-63%，根据美国的流行病学数据表明，34-74 岁中年非体力劳动者无氧阈值应>最大摄氧量的 40%。冠心病患者人群较健康人群相比，运动量过大常诱发心绞痛症状，因此日常活动相对受限，机体骨骼肌肉系统相对缺乏锻炼。此外，在功率递增症状限制的心肺运动试验测试中，受试者常出于自身安全性考虑，无氧阈值较峰值摄氧量在量化心肺适能方面更为敏感，排除了主观因素的影响^[41]。

本研究结果表明，试验组干预 12 周后，无氧阈值较基线值有显著提高，同时两组间比较差异具有统计学意义，表明愈心痛胶囊联合西医常规治疗较单纯西医常规治疗相比可提高稳定性冠心病患者无氧阈值水平，改善患者的心肺运动耐量。

研究表明，急性冠脉综合征介入术后患者的整体运动耐量明显下降，主要表现为：峰值摄氧量和无氧阈值的下降^[42]。本研究结果表明，在常规西医治疗的基础上联合应用愈心痛胶囊干预 3 月，无氧阈值得以显著提高，且组间比较差异也具有统计学意义，表明机体由有氧代谢转为无氧代谢时的有效摄氧量得以增强。而在运动过程中乳酸刚刚生成时，即达到无氧阈值时，机体线粒体内尚未缺氧，线粒体本身最大氧化输出功率的限制导致了有氧代谢向高功率无氧代谢供能的转变^[43]。因此，机体有氧代谢能力与线粒体

功能密切相关。基础研究表明,红参中的人参皂苷可增强降低心肌氧耗,增加心肌收缩力,减慢心率从而增加缺血心肌的耐受力,清除氧自由基,抑制脂质过氧化反应,抗线粒体氧化应激损伤^[44],此外,人参皂苷 Rb1 还可通过促进线粒体氧化磷酸化^[45],增强琥珀酸脱氢酶、细胞色素氧化酶的活性,进而使糖的有氧代谢加快,使葡萄糖在体内的分解加速进行,从而改善线粒体氧化供能能力^[46]。此外,研究证实三七可提高组织细胞的摄氧能力,三七总皂苷可通过调控 SIRT-1/PGC-1 通路发挥抗心肌细胞氧化应激损伤的作用^[47,48]。作为主要药物组成的人参和三七是益气活血中药愈心痛胶囊提高运动耐量作用的可能物质基础。

最大摄氧量为在开展力竭运动中,达到运动极限时,单位时间内机体组织能从肺泡或毛细血管中提取的最大氧气体积,可反应机体摄取利用氧气进行有氧代谢的能力。在功率递增心肺运动试验中,表现为运动末期受试者竭尽全力呼吸循环发挥最大作用时每分钟所能摄取的氧量,即使功率继续增加,摄氧量也不再增加而形成的一个平台期。大多数情况下,受试者尽最大努力时往往仍无法维持功率达运动上限极量,未能观察到摄氧量-功率平台时的摄氧量称为峰值摄氧量^[35]。峰值摄氧量越高,运动耐量越好,预后更佳。在不同患者中,通常用公斤体重摄氧量来平衡不同个体体重差异对相同功率负荷的摄氧能力,因此,更有利于比较不同受试者的运动耐量。本研究结果表明试验组愈心痛胶囊治疗前后可明显提高稳定性冠心病患者的峰值摄氧量,但其改善作用与对照组相比未达到统计学差异。峰值摄氧量与最大心排血量及外周骨骼肌功能密切相关。本研究纳入的稳定性冠心病患者平均年龄为 58 岁,高龄及冠心病的基础病史使患者在功率递增的心肺运动试验中表现出主观运动意愿相对不强,对试验结果存在一定影响。

本研究结果表明对照组和试验组治疗后代谢当量、氧脉搏、分钟通气量、ST 段下移 1 mm 开始及持续时间干预前后差值的两组间比较均未达到统计学差异;试验组治疗后 ST 段下移持续时间较前缩短 0.19 ± 1.54 min,但未达到统计学差异。代谢当量用于衡量日常生活活动中的相对能量代谢水平^[49];氧脉搏反映心脏每搏的摄氧量,是评估冠心病心肌缺血的敏感指标^[50-52];运动过程中分钟通气量的增加是机体代谢需求增加的表现,与潮气量和呼吸频率密切相关,机体在低强度运动时,首先驱动潮气量的增加来提高分钟通气量,当运动达峰值 70%-80% 时,则通过增加呼吸频率来提高分钟通气量。代谢当量、分钟通气量等与患者基础能量代谢及呼吸功能密切相关,其改善需要较长时间持续作用,并受患者运动强度影响;氧脉搏与患者心肌缺血情况密切相关,本研究观察患者均为稳定性冠心病患者,缺血情况不显著;试验组治疗后 ST 段下移持续时间较前缩短,提示

对患者运动诱发的心肌缺血有一定改善倾向。考虑疫情期间不同地区患者面对不同封控管理措施对其随访、日常运动强度的维持、访视超窗等都有一定影响，超窗患者未能继续服用中药，这也一定程度削弱了药物的改善作用，有待于今后进一步增加疗程观察其临床疗效。

7.3 愈心痛干预对西雅图心绞痛量表、SF-36 生活质量量表及气虚血瘀证候积分的影响

干预 12 周前后，西雅图心绞痛量表及 SF-36 生活质量量表总分在试验组和对照组各自组内治疗前后均有显著性提高，差异有统计学意义。组间比较中，SAQ 量表中躯体活动受限程度、SF-36 生活质量量表中总体健康和精力这几大维度中变化值差异具有统计学意义，其他维度中试验组变化值较对照组相比显示出更好的改善趋势，但差异无统计学意义。干预 12 周前后，中医气虚血瘀证候评分在试验组和对照组各自组内治疗前后均有显著下降，试验组较对照组有显著下降趋势，组间比较未达到统计学差异。本研究中接受介入治疗的患者超过 50%，入组时病情稳定，气虚血瘀证候表现不典型，入组时基线气虚血瘀证候评分较低，同时本研究给药干预疗程相对较短，这也可能是其未达到统计学差异的主要原因。进一步通过亚组分析，对中重度气虚血瘀证患者证候评分进行疗效评估，结果显示愈心痛胶囊可显著降低中重度气虚血瘀证患者的证候积分，且差值两组间比较具有统计学差异。愈心痛胶囊由三七、延胡索、红参组成，红参大补元气、益气摄血，三七活血止血、化瘀止痛，延胡索活血止痛，数药合用共奏益气活血、通脉止痛之功。现代药理学研究表明三七具有增强心功能、抗疲劳，延胡索提高机体耐氧，红参增强心肌耐氧、抗疲劳等功效。在本研究中体现于对稳定性冠心病患者西雅图量表中躯体活动受限程度的改善及对 SF-36 生活质量量表中总体健康及精力的改善，同时可较好改善稳定性冠心病中重度气虚血瘀证患者胸痛胸闷、心悸气短、神疲乏力、唇色紫暗等临床表现。以上结果共同表明愈心痛胶囊可有效提高稳定性冠心病患者的生活质量，改善中重度气虚血瘀证患者的临床症状。

8 结论

在西医常规治疗基础上联合应用愈心痛胶囊 12 周，可提高稳定性冠心病患者心肺运动试验的峰值摄氧量、无氧阈值、代谢当量，提高生活质量和降低气虚血瘀证候积分。

参考文献

- [1] 王斌, 李毅, 韩雅玲. 稳定性冠心病诊断与治疗指南[J]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(9):680-694.
- [2] Fihn SD, Gardin JM, Abrams J, et al. 2012 ACCF/AHA/ACP/AATS/PCNA/SCAI/STS Guideline for the Diagnosis and Management of Patients With Stable Ischemic Heart Disease[J]. Circulation, 2012, 126(25):354-471.
- [3] Rezende PC, Hueb W, Garzillo CL, et al. Ten-year outcomes of patients randomized to surgery, angioplasty, or medical treatment for stable multivessel coronary disease: effect of age in the Medicine, Angioplasty, or Surgery Study II trial[J]. J Thorac Cardiovasc Surg, 2013, 146(5):1105-1112.
- [4] Boden WE, O'Rourke RA, Teo KK, et al. Optimal medical therapy with or without PCI for stable coronary disease[J]. N Engl J Med, 2007, 356(15):1503-1516.
- [5] Five-year clinical and functional outcome comparing bypass surgery and angioplasty in patients with multivessel coronary disease. A multicenter randomized trial. Writing Group for the Bypass Angioplasty Revascularization Investigation (BARI) Investigators[J]. JAMA, 1997, 277(9):715-721.
- [6] 丁荣晶. 稳定性冠心病心脏康复药物处方管理专家共识[J]. 中华心血管病杂志, 2016, 44(1):7-11.
- [7] Sun XG, Hansen JE, Beshai JF, et al. Oscillatory breathing and exercise gas exchange abnormalities prognosticate early mortality and morbidity in heart failure[J]. J Am Coll Cardiol, 2010, 55(17):1814-1823.
- [8] Wasserman K, Sun XG, Hansen JE. Effect of biventricular pacing on the exercise pathophysiology of heart failure[J]. Chest, 2007, 132(1):250-261.
- [9] Guazzi M, Adams V, Conraads V, et al. Clinical Recommendations for Cardiopulmonary Exercise Testing Data Assessment in Specific Patient Populations[J]. Circulation, 2012, 126(18):2261-2274.
- [10] Guazzi M, Bandera F, Ozemek C, et al. Cardiopulmonary Exercise Testing: What Is its Value?[J]. J Am Coll Cardiol, 2017, 70(13):1618-1636.

- [11] Lewis GD, Malhotra R, Hernandez AF, et al. Effect of Oral Iron Repletion on Exercise Capacity in Patients With Heart Failure With Reduced Ejection Fraction and Iron Deficiency: The IRONOUT HF Randomized Clinical Trial[J]. JAMA, 2017, 317(19):1958-1966.
- [12] Fletcher GF, Ades PA, Kligfield P, et al. Exercise Standards for Testing and Training[J]. Circulation, 2013, 128(8):873-934.
- [13] 陈伟, 范秋季. 心肺运动试验在心肺康复中的应用现状及展望[J]. 实用心脑血管病杂志, 2019, 27(11):1-5.
- [14] Al-Lamee R, Thompson D, Dehbi HM, et al. Percutaneous coronary intervention in stable angina (ORBITA): a double-blind, randomised controlled trial[J]. The Lancet, 2018, 391(10115):31-40.
- [15] Li FH, Guo SW, Zhan TW, et al. Integrating network pharmacology and experimental evidence to decipher the cardioprotective mechanism of Yiqihuoxue decoction in rats after myocardial infarction[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2021, 279:114062.
- [16] LI FH, HUANG XL, WANG H, et al. Protective effect of Yi-Qi-Huo-Xue Decoction against ischemic heart disease by regulating cardiac lipid metabolism[J]. Chinese Journal of Natural Medicines, 2020, 18(10):779-792.
- [17] Gao H, Peng C, Wu L, et al. Yiqi-Huoxue granule promotes angiogenesis of ischemic myocardium through miR-126/PI3K/Akt axis in endothelial cells[J]. Phytomedicine, 2021, 92:153713.
- [18] 史大卓, 高铸焯, 付长庚, 等. 益气活血中药干预介入治疗后 ACS 的多中心、随机对照的临床研究[C]. 世界中医药学会联合会心血管病专业委员会第五届学术大会论文集. 2011:104-109.
- [19] 丁荣晶, 胡大一, 马依彤. 冠心病患者运动治疗中国专家共识[J]. 中华心血管病杂志, 2015, 43(7):575-588.
- [20] 雷燕, 陈可冀, 柯元南, 等. 愈心痛胶囊治疗不稳定性心绞痛临床研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1996(10):580-584.
- [21] 李虹. 愈心痛胶囊质量标准的研究及确定[J]. 药物分析杂志, 2010, 30(7):1301-1304.
- [22] 冠心病稳定型心绞痛中医诊疗指南[J]. 中医杂志, 2019, 60(21):1880-1890.
- [23] 基层心血管病综合管理实践指南 2020[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2020, 12(8):1-73.

- [24] 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[J]. 现代药物与临床, 2018, 33(11):2787-2790.
- [25] 马桂兰, 朱士达, 阚建英, 等. 愈心痛胶囊联合开搏通防治急性心肌梗死缺血再灌注损伤疗效观察[J]. 河北中医, 2000(4):291-293.
- [26] 魏玲玲. 愈心痛胶囊治疗不稳定性心绞痛的临床观察[J]. 中华中医药杂志, 2009, 24(11):1532-1533.
- [27] 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[J]. 中国中西医结合杂志, 1996(5):289-291.
- [28] 雷燕, 刘建勋, 尚晓泓, 等. 愈心痛胶囊对急性心肌缺血犬血浆内皮素和血液流变性的影响[J]. 中国中医药科技, 1996(4):23-25.
- [29] 雷燕, 史大卓, 钟蓓, 等. 愈心痛对犬急性缺血心肌 ECE、NOS 基因表达的影响及铜锌-SOD 免疫组织化学研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1997(10):607-610.
- [30] 雷燕, 陈可冀, 尚晓泓, 等. 愈心痛对犬缺血心肌细胞线粒体超微结构损伤保护作用的体视学研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 1997(3):23-25+64.
- [31] Yuan HD, Kim JT, Kim SH, et al. Ginseng and Diabetes: The Evidences from In Vitro, Animal and Human Studies[J]. Journal of Ginseng Research, 2012, 36(1):27-39.
- [32] Kitamura K, Takamura Y, Iwamoto T, et al. Dammarane-type triterpene extracts of Panax notoginseng root ameliorates hyperglycemia and insulin sensitivity by enhancing glucose uptake in skeletal muscle[J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2017, 81(2):335-342.
- [33] Li Q, Guan H, Wang X, et al. Fingerprint-efficacy study of the quaternary alkaloids in Corydalis yanhusuo[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2017, 207:108-117.
- [34] Shin EJ, Jo S, Choi S, et al. Red Ginseng Improves Exercise Endurance by Promoting Mitochondrial Biogenesis and Myoblast Differentiation[J]. Molecules, 2020, 25(4):865.
- [35] Ross R, Blair SN, Arena R, et al. Importance of Assessing Cardiorespiratory Fitness in Clinical Practice: A Case for Fitness as a Clinical Vital Sign: A Scientific Statement From the American Heart Association[J]. Circulation, 2016, 134(24):653-699.
- [36] American Thoracic Society, American College of Chest Physicians. ATS/ACCP Statement on Cardiopulmonary Exercise Testing[J]. Am J Respir Crit Care Med, 2003, 167(2):211-277.
- [37] O'Connor CM, Wheilan DJ, Lee KL, et al. Efficacy and Safety of Exercise Training in Patients With Chronic Heart Failure[J]. JAMA, 2009, 301(14):1439.

- [38]Swank AM, Horton J, Fleg JL, et al. Prediction of Long-Term Prognosis in 12 169 Men Referred for Cardiac Rehabilitation[J]. Circulation, 2002, 106(6):666-671.
- [39]稳定性冠心病中西医结合康复治疗专家共识[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(3):321-329.
- [40]Gibbons ES. The significance of anaerobic threshold in exercise prescription[J]. J Sports Med Phys Fitness, 1987, 27(3):357-361.
- [41]丁荣晶, 胡大一, 马依彤. 冠心病患者运动治疗中国专家共识[J]. 中华心血管病杂志, 2015, 43(7):575-588.
- [42]孙毅, 张剑, 梁延春, 等. 急性心肌梗死接受经皮冠状动脉介入治疗术后患者早期心肺运动试验的特点[J]. 中华保健医学杂志, 2016, 18(5):371-373.
- [43]Chance B, Williams GR. Respiratory enzymes in oxidative phosphorylation. I. Kinetics of oxygen utilization[J]. J Biol Chem, 1955, 217(1):383-393.
- [44]Piao MJ, Kang KA, Zhen AX, et al. Particulate Matter 2.5 Mediates Cutaneous Cellular Injury by Inducing Mitochondria-Associated Endoplasmic Reticulum Stress: Protective Effects of Ginsenoside Rb1[J]. Antioxidants, 2019, 8(9):383.
- [45]Jiang L, Yin X, Chen YH, et al. Proteomic analysis reveals ginsenoside Rb1 attenuates myocardial ischemia/reperfusion injury through inhibiting ROS production from mitochondrial complex I[J]. Theranostics, 2021, 11(4):1703-1720.
- [46]黄清霞, 高嵩, 赵大庆, 等. 人参调控线粒体稳态抗心肌缺血再灌注损伤的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(8):4584-4588.
- [47]李靳, 邓丽丽, 周志勇, 等. 三七总皂苷联合淫羊藿总黄酮改善 D-gal 致 H9c2 大鼠心肌细胞衰老的保护作用[J]. 中国中药杂志, 2017, 42(3):555-561.
- [48]黄凯, 高佳明, 贺爽, 等. 线粒体作为中药治疗心力衰竭靶点的研究进展[J]. 中国中药杂志, 2020, 45(9):2082-2090.
- [49]Jetté M, Sidney K, Blümchen G. Metabolic equivalents (METs) in exercise testing, exercise prescription, and evaluation of functional capacity[J]. Clin Cardiol, 1990, 13(8):555-565.
- [50]Belardinelli R. Exercise-induced myocardial ischaemia detected by cardiopulmonary exercise testing[J]. European Heart Journal, 2003, 24(14):1304-1313.

- [51]De Lorenzo A., Da Silva CL, Castro Souza, et al. Value of the Oxygen Pulse Curve for the Diagnosis of Coronary Artery Disease[J]. *Physiol Res*, 2018, 67(5):679-686.
- [52]Munhoz EC, Hollanda R, Vargas JP, et al. Flattening of Oxygen Pulse during Exercise May Detect Extensive Myocardial Ischemia[J]. *Med Sci Sports Exerc*, 2007, 39(8):1221-1226.

第三部分 实验研究

愈心痛胶囊改善线粒体能量代谢提高心肌缺血大鼠运动耐量的机制研究

前言

冠心病患者运动耐量下降与线粒体功能障碍密切相关,线粒体功能受损会导致心肌能量代谢障碍,进而导致心脏功能下降和整体运动能力的下降^[1]。线粒体是一种存在于大多数细胞中的由两层膜包被的细胞器,是细胞中制造能量的结构,是细胞进行有氧呼吸,糖类、脂肪和氨基酸最终氧化释放能量的场所,在维持机体能量供应中起着至关重要的作用^[2]。研究表明,线粒体生物合成功能障碍与冠心病的发生发展密切相关,心肌线粒体氧化磷酸化产生的三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)占据成年人心脏 ATP 供应的 95%以上^[3]。因此,心脏需要强大的线粒体生物合成能力来应对其对能量供应的高需求^[4]。线粒体生物合成能力下降是导致运动功能障碍,运动耐量下降的关键原因^[5]。

中医理论认为“心主血脉”,心主宰人体的全身气血运行,若心脏气血不足,则会影响身体的能量代谢和氧气输送,从而导致运动能力下降。此外,气血运行受阻也会影响运动能力。冠心病核心病机为气虚血瘀,气血亏虚或血瘀脉内可能导致气血运动不畅、运动能力下降。一系列临床研究均表明^[6],益气活血中医治法可提高患者运动耐量。基础研究表明,常用的益气活血中药材如黄芪、党参、人参、三七等,都具有明显的抗氧化、抗炎、抗疲劳等功效,对线粒体的功能调节具有积极的影响。例如,黄芪中的黄酮类化合物可以促进线粒体呼吸链复合物活性^[7],提高线粒体的能量转换效率;党参中的人参皂苷可以促进线粒体膜通透性^[8],改善细胞内外物质交换;人参中的人参皂苷 Rg1 可以提高线粒体氧化酶活性^[9],增强能量合成过程的效率;三七药效活性成分三七总皂苷也被证明可在缺血时显著提高 ATP 酶活性从而促进线粒体能量转换及生成^[10],此外它还被证实可通过抑制线粒体内活性氧的生成与积累从而降低线粒体氧化应激损伤^[11]。因此,中医的益气活血治法可能与调控线粒体的功能密切相关。

本研究的临床研究结果显示,益气活血中药愈心痛胶囊可提高稳定性冠心病患者的运动耐量,但其机制尚不明确。愈心痛胶囊既往基础研究结果显示,愈心痛胶囊十二指肠给药可降低急性心肌缺血模型犬的血液粘度和血浆纤维蛋白原浓度,增加血液流动性,

抗血小板黏附和聚集,抑制血浆内皮素的过量释放^[12];可明显抑制实验性犬心肌损伤时肌酸磷酸激酶的溢出和血浆内皮素的过量释放,同时促进血清一氧化氮的生成和释放,从而保护心肌免受缺血性损伤,其作用效果与剂量呈正相关^[13];还可提高缺血心肌中一氧化氮合酶 mRNA 表达水平,削弱心肌组织内皮素转化酶 mRNA 的异常表达,从而保护缺血心肌,显著增强缺血心肌组织中铜锌超氧化物歧化酶阳性反应程度,提高超氧化物歧化酶的活性^[14]。

针对线粒体研究方面,愈心痛对犬缺血心肌细胞线粒体超微结构损伤保护作用的体视学研究结果提示愈心痛可阻止缺血心肌肌酸磷酸激酶的漏出,使其活性显著低于生理盐水对照组;电镜体视学研究表明:缺血心肌细胞线粒体的体密度明显增加,面数密度和比表面却降低,提示线粒体高度水肿,而给予愈心痛后可显著降低缺血心肌线粒体的体密度,同时增加面数密度和比表面,表明愈心痛胶囊可减轻缺血造成的心肌线粒体水肿,阻止缺血心肌膜损伤,有稳膜作用,在一定程度上维持膜结构的完整性,从而保护心肌超微结构^[15],防治心肌缺血性损伤。

既往研究发现愈心痛胶囊能够调节血液流变学、改善内皮功能,在线粒体层面上目前仅从形态、结构影响功能的角度进行了初步探索,并未开展线粒体相关生物学通路的机制研究。

基于此,我们提出假说:益气活血中药愈心痛胶囊可通过调节线粒体生物合成提高心肌缺血大鼠运动耐量。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

SPF 级 SD 大鼠 50 只 (雄性, 200-210g), 购自北京维通利华实验动物技术有限公司 (实验动物生产许可证: SCXK (京) 2021-0006)。所有动物饲养于 SPF 级动物房 (实验动物使用许可证: SYXK (京) 2020-0050), 环境温度为 20-25℃, 相对湿度 60%, 采用明暗各 12h 交替的动物照明光循环照明交替时间为 12h/12h, 大鼠饮用水及笼具经灭菌处理, 饲料及垫料均经辐照处理, 自由饮水, 每天更换一次垫料。动物的操作参考北京市实验动物管理委员会执行, 已通过伦理审查并符合规定的伦理要求。

1.1.2 实验设备

表 1. 主要实验设备

仪器	厂家	型号
动物心脏超声仪	Visual Sonics	Vevo 3100
小动物跑步机	北京众实迪创科技有限公司	ZS-PT-III
手术刀片	腾瑞保健器械	51983739799
恒温水浴锅	上海精宏实验设备有限公司	DK-500
移液枪	Eppendorf	Research@plus 单道系列
酶标仪	Thermo	muLISKANMK3
4℃离心机	Eppendorf	Centrifuge 5415R
恒温水浴锅	上海精宏实验设备有限公司	DK-500
超纯水机	Millipore	MILLI-QB
脱水机	武汉俊杰电子有限公司	JJ-12J
包埋机	武汉俊杰电子有限公司	JB-P5
病理切片机	上海徠卡仪器有限公司	RM2016
冻台	武汉俊杰电子有限公司	JB-L5
组织摊片机	金华科迪仪器设备有限公司	KD-P
烤箱	天津市莱玻璃仪器设备有限公司	GFL-230
正置光学显微镜	日本尼康	Nikon Eclipse E100

倒置荧光显微镜	日本尼康	Nikon Eclipse Ti-SR
成像系统	日本尼康	Nikon DS-U3
正置白光拍照显微镜	Nikon (Japan)	Eclipse Ci-L
扫描浏览软件	3DHISTECH (Hungary)	CaseViewer2.5
全景切片扫描仪	3DHISTECH (Hungary)	PANNORAMIC DESK/MIDI/250/1000
载玻片及盖玻片	江苏世泰实验器材有限公司	10212432C
水浴锅	天力医疗器械有限公司	TL-420D
脱色摇床	北京市六一仪器厂	WD-9405A
涡旋混合器	天悦电子	TYXH-II
组化笔	Gene tech	GT1001
水平摇床	SCIOLOGEX	SLK-O3000-S
PH 计	德国 Metter-Toledo GmbH 公司	LP115
电子天平	北京赛多利斯仪器系统有限公司	CPA
磁力搅拌器	江苏省金坛市中大仪器厂	T8-1
微型垂直电泳槽	天能	VE-180
全自动化学发光分析仪	天能	5260Muti
转移电泳槽	天能	VE-586
电泳仪	天能	EPS-200
离心机	Eppendorf	centrifuge 5415R
PCR 仪	BIO-RAD	C1000
实时荧光定量 PCR 仪	ABI	7500

1.1.3 实验材料

表 2. 主要实验材料

试剂名称	厂家	货号
无水乙醇	国药集团化学试剂有限公司	100092683
二甲苯	国药集团化学试剂有限公司	10023418
中性树脂	国药集团化学试剂有限公司	10004160

PBS 缓冲液	武汉市皮诺飞生物科技有限公司	PN0001
蛋白酶 K	Roche	39450-01-6
破膜液	武汉市皮诺飞生物科技有限公司	PN0135
Tunel 试剂盒	Roche	11684817910
DAPI	碧云天	C1002
抗荧光淬灭封片剂	碧云天	P0126
PMSF	上海碧云天	ST505
脱脂奶粉	伊利	66196131T
TEMED	上海碧云天	ST728
三硫叔糖醇 (DTT)	Biosharp	Amresco0281
溴酚蓝	Amresco	BO449-5G
甘油	国药集团化学试剂有限公司	10010618
丙烯酰胺/甲叉 29:1,30%溶液	Biosharp	BL513B
Tris-base	Biosharp	BS083
SDS	Biosharp	BS088
甘氨酸	Biosharp	BS082
甲醇	国药集团化学试剂有限公司	10014118
NaCl	国药集团化学试剂有限公司	10016318
KCl	国药集团化学试剂有限公司	10020318
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$	国药集团化学试剂有限公司	10017618
KH_2PO_4	国药集团化学试剂有限公司	10019718
蛋白 marker	Tanon	180-6003
PVDF 膜(0.45um)	Millipore	IPVH00010
ECL 底物液 (高敏)	Tanon	180-501
辣根过氧化物酶标记山羊抗兔 IgG(H+L)	上海碧云天生物技术有限公司	A0208
辣根过氧化物酶标记山羊抗小鼠 IgG(H+L)	上海碧云天生物技术有限公司	A0216

Western 及 IP 细胞裂解液	上海碧云天生物技术有限公司	P0013
BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (增强型)	上海碧云天生物技术有限公司	P0010
AMPK	Proteintech	10929-2-AP
p-AMPK	CST	4185s
P38	Proteintech	66234-1-Ig
Sirt-1	CST	2493
PGC-1	Proteintech	66369-1-Ig
Tfam	Proteintech	22586-1-AP
GAPDH	Proteintech	60004-1-Ig
Real-time PCR 试剂盒	全式金	AQ131-01
TRIZOL	全式金	H10318
氯仿	国药集团化学试剂有限公司	10006818
异丙醇	国药集团化学试剂有限公司	40049962
RNA 溶解液	全式金	H10323
总 RNA 提取试剂盒	上海羽朵生物科技有限公司	00266
FastKing cDNA 第一链合成 试剂盒	天根生化科技(北京)有限公司	KR118-02
TTC 染液	Solarbio	G3005
大鼠肌酸激酶(CK)酶联免疫 分析试剂盒	武汉华联科生物技术有限公司	DRE20781
大鼠肌酸激酶同工酶 MB(CK-MB)酶联免疫分析 试剂盒	武汉华联科生物技术有限公司	DRE20043
大鼠乳酸(LA)酶联免疫分析 试剂盒	武汉华联科生物技术有限公司	DRE21096
大鼠乳酸脱氢酶(LDH)酶联 免疫分析试剂盒	武汉华联科生物技术有限公司	DRE20042

大鼠心肌肌钙蛋白I(CTn-I) 酶联免疫分析试剂盒	武汉华联科生物技术有限公司	DRE20446
大鼠心钠肽(ANP)酶联免疫 分析试剂盒	武汉华联科生物技术有限公司	DRE20928
大鼠一磷酸腺苷(AMP)检测 试剂盒	武汉华联科生物技术有限公司	DRE20936
大鼠二磷酸腺苷(ADP)检测 试剂盒	武汉华联科生物技术有限公司	DRE20937
大鼠三磷酸腺苷(ATP)检测 试剂盒	武汉华联科生物技术有限公司	DRE20126
线粒体复合体I活性检测试 剂盒	Beijing Solarbio Science & Technology Co.,Ltd.	BC0515
线粒体复合体II活性检测试 剂盒	Beijing Solarbio Science & Technology Co.,Ltd.	BC3235
线粒体复合体III活性检测试 剂盒	Beijing Solarbio Science & Technology Co.,Ltd.	BC3245

1.2 实验方法

1.2.1 实验分组

按照随机数字表法将大鼠随机分为假手术组；模型组；愈心痛低剂量组；愈心痛高剂量组；曲美他嗪组。每组 10 只。

1.2.2 给药方法

购得上市中成药愈心痛胶囊（0.33g/粒，大连胜光药业有限公司生产，国药准字 Z20020089）及上市阳性对照西药盐酸曲美他嗪片（20mg/片，施维雅（天津）制药有限公司生产，国药准字 H20055465）。给药浓度按正常大鼠-人体体表面积换算，具体如下：

愈心痛胶囊的成人每天常规临床剂量（按体重 70kg 算，每次 4 粒，每天 3 次）： $0.33\text{g} \times 12 \text{ 粒} / 70\text{kg} = 3.96\text{g} / 70\text{kg} = 3960\text{mg} / 70\text{kg} = 56.57\text{mg/kg/d}$ ，换算成大鼠使用剂量（按体重 200mg 计算）： $6.3 \times 56.57\text{mg/kg/d} = 356.39\text{mg/kg/d}$ ，临时配置成悬浊液备用。愈心痛低浓度组按人体每日常规临床剂量换算予 356.39mg/kg/d ，高浓度组为低浓度的 2 倍，予

712.78mg/kg/d。曲美他嗪规格为每片 20mg，成人每日剂量（每次 1 片，每日 3 次，共 60mg/d），即 0.86mg/kg/d，按体表面积转化后得大鼠剂量 $6.3 \times 0.86 \text{mg/kg/d} = 5.42 \text{mg/kg/d}$ 。予灌胃给药 30 天。表 3。

表 3. 实验分组及给药

组别	数量	给药
假手术组 (Sham)	10	等量生理盐水
模型组 (Model)	10	等量生理盐水
愈心痛低剂量组 (YXTL)	10	愈心痛 356.39mg/kg/d
愈心痛高剂量组 (YXTH)	10	愈心痛 712.78mg/kg/d
曲美他嗪组 (TMZ)	10	曲美他嗪 5.42mg/kg/d

动物在动物房内预适应喂养 1 周后进行实验造模，造模成功后连续给药 30 天，假手术组和模型组给予等量生理盐水，每天 1 次。实验前禁食不禁水 12h，末次给药后，各组大鼠麻醉后进行取材。

1.2.3 统计方法

(1) 统计描述：计数资料采用频数、百分率、构成比描述；计量资料符合正态分布的采用均数±标准差描述，不满足正态分布时采用最大值、最小值、中位数、四分位间距描述；(2) 组间比较：计量资料若符合正态分布，通过单因素方差分析进行组间比较，方差齐时进一步通过 LSD 检验法进行两两比较；方差不齐时则通过 Tamhane's T2 检验法进行两两比较。若不符合正态分布，组间比较采用 Kruskal-Wallis H 秩和检验。计数资料采用卡方检验。等级资料采用 Kruskal-Wallis H 秩和检验；(3) $P < 0.05$ 为有统计学差异， $P < 0.01$ 为具有显著性统计学差异，采用 SPSS 22.0 统计软件包及 GraphPad Prism 6.0 软件进行统计绘图。

1.2.4 指标检测方法

(1) 大鼠体重变化：每周称重 1 次，评估各组大鼠体重变化

各组大鼠分别于购入当天及第 7、14、21、28、35 天上午九点进行称重，称重后添加当日饲料。具体操作步骤：平稳放置电子称；插上电源，开机，待电子天平准备好后，放上大小适宜的称量盒，调零；按《实验动物的抓取与固定操作规程》从饲养盒中抓取大鼠，放入称量盒中待数值稳定后，读取读数；将大鼠放回笼中，盖上笼盖，放回笼架，

插上饮水瓶；称量完后，将鼠笼摆放整齐，关上天平，断开电源，电子天平擦拭干净后放回原位。

（2）大鼠心肌梗死模型评估：通过心电图变化评估模型构建效果

采用左冠状动脉前降支结扎的手术方法复制心肌梗死大鼠模型：术前禁食 12 小时，术前称重，以 1%戊巴比妥钠（40mg/kg）腹腔注射麻醉后，使大鼠背位固定于鼠板；上起左胸第二肋，下至第五肋，以胸骨为界去毛备皮；将鼠板置于 45 度倾斜的手术台上（大鼠头朝上），光源照射鼠颈部，用纱布包被鼠舌，尽量向上提拉，暴露声门，在动物吸气瞬间行气管插管，用棉丝放置于管口，检查插管是否在气道，胶布固定气管插管；调整呼吸机通气量，频率 85 次/min，潮气量 0.7-0.8mL，吸呼比 1:2，吸入氧浓度 1.0，呼气末正压 2cmH₂O；75%酒精局部消毒术野区，铺洞巾，以眼科剪左侧 3-4 肋间横向切开皮肤，钝性分离肌层，连接呼吸机，沿 3-4 肋间打开胸腔，用长条形无菌湿棉球向下压迫左肺以保护肺脏，提拉胸腺，撕开心包膜，充分暴露心脏，以平行于肋间方向摆放开胸器，扩大手术视野；在左心耳下缘可见左冠状静脉主干及分支，冠状动脉左前降支与之伴行，用 5/0 带线缝合针在左心耳下 2mm 处，平行于左心耳，将冠状动脉左前降支连同少量心肌一同结扎，以结扎部位及以下心肌变白，心电图肢体导联 ST 段弓背向上抬高为造模成功标志；假手术组与上述手术操作相同，但只穿线，不进行结扎。

（3）心脏 2,3,5-氯化三苯基四氮唑（triphenyl tetrazolium chloride, TTC）染色评估心肌梗死面积

取材：动物麻醉后立即取心脏组织，不经固定液固定，将组织放入-20℃冰箱中速冻 20-30min；切片：取出冻好的组织，用刀片手动切片，厚度为 2-3mm，保证切面整齐；TTC 染色：将切片放入提前预热好的 TTC 孵育液中，放入 37℃水浴锅中避光孵育 15-30min，间隔 5-8min 轻轻摇动组织，使其均匀接触到染色液，并观察染色结果；拍照：组织成色后，加入固定液终止反应后进行拍照，正常心肌组织区域呈红色，梗死区域呈苍白色。采用 Image-Pro Plus 6.0 软件对梗死区域进行定量分析。

（4）比色法进行心肌组织苏木精-伊红（hematoxylin and eosin, HE）染色及病理检测

方法步骤：石蜡切片脱蜡至水：依次将切片放入二甲苯I20min-二甲苯II20min-无水乙醇I5min-无水乙醇II5min-75%酒精 5min，自来水洗；苏木素染色：切片入苏木素染液染 3-5min，自来水洗，分化液分化，自来水洗，返蓝液返蓝，流水冲洗；伊红染色：切片依次入 85%、95%的梯度酒精脱水各 5min，入伊红染液中染色 5min；脱水封片：切片依次放入无水乙醇 I5min-无水乙醇 II5min-无水乙醇III5min-二甲I5min-二甲苯II5min

透明,中性树脂封片;显微镜镜检,图像采集分析。细胞核呈蓝色至蓝紫色,细胞质呈红色。

HE 病理检测方法步骤:样片制备:待测样本经 4%多聚甲醛固定,固定状态良好后,严格按照病理实验检测 SOP 程序进行修剪、脱水、包埋、切片、染色、封片最后镜检合格的样片;图像采集;病理分析方法:对切片进行镜检/全景扫描分析,包括但不限于充血、淤血、出血、水肿、变形、坏死、增生、纤维化、损伤修复程度等情况进行文字描述,对典型病变部位成像并在报告中用箭头标识。

(5) 末端脱氧核苷酸末端标记化的核酸断裂检测 (terminal deoxynucleotidyl transferase dUTP nick end labeling, TUNEL) 染色法评估心肌细胞凋亡率

方法步骤:石蜡切片脱蜡至水:依次将切片放入二甲苯I20min-二甲苯II20min-无水乙醇I10min-无水乙醇II10min-95%酒精 5min-90%酒精 5min-80%酒精 5min-70%酒精 5min-蒸馏水洗;修复:切片稍甩干后用组化笔在组织周围画圈(防止液体流走),在圈内滴加蛋白酶 K 工作液覆盖组织,室温孵育 15min。将玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5min;破膜:切片稍甩干后在圈内滴加破膜工作液覆盖组织,常温下孵育 10min,将玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上晃动洗涤 3 次,每次 5min;加试剂 1,2:按片子数量和组织大小取 tunel 试剂盒内适量试剂 1 (TdT) 和试剂 2(dUTP)按 1:9 混合,加到圈内覆盖组织,切片平放于湿盒内,37°C水浴锅孵育 60min,湿盒内加少量水保持湿度(试剂 2 有 FITC 标记可以直接在荧光显微镜下观察);DAPI 复染细胞核:玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上避光晃动洗涤 3 次,每次 5min。切片稍甩干后在圈内滴加 DAPI 染液,避光室温孵育 10min;封片:玻片置于 PBS (PH7.4) 中在脱色摇床上避光晃动洗涤 3 次,每次 5min。切片稍甩干后用抗荧光淬灭封片剂封片;镜检拍照:切片于尼康倒置荧光显微镜下观察并采集图像。

(6) 心脏超声评估心功能

超声心动采用 MX250 探头,频率为 21MHz,受检大鼠采用异氟烷吸入麻醉,固定,剃除胸部毛发,涂耦合剂,于左胸骨旁获取心脏长轴 B 超及 M 超图像;探头旋转 90 度,于乳头肌水平获取短轴 B 超及 M 超图像。于左室短轴 M 超分别测量左室舒张末期前壁厚度 (left ventricular anterior wall in diastole, LVAW;d) 和左室收缩末期前壁厚度 (left ventricular anterior wall in systole, LVAW;s)、左室舒张末期后壁厚度 (left ventricular posterior wall in diastole, LVPW;d) 和左室收缩末期后壁厚度 (left ventricular posterior wall in systole, LVPW;s)、左室舒张末期内径 (Diameter;d) 和左室收缩末期内径 (Diameter;s)。

左室舒张末期容积 (Volume;d) 和左室收缩末期容积 (Volume;s)、左室射血分数 (ejection fraction, EF)、左室短轴缩短率 (fractional shortening, FS)、左室每搏输出量 (stroke volume, SV)、左心室心输出量 (cardiac output, CO) 等参数, 所有超声测值均取 3 个连续心动周期的平均值。

(7) Elisa 法检测血清和心脏中肌酸激酶 (creatin kinase, CK)、肌酸激酶同工酶 (creatin kinase-MB, CK-MB)、乳酸 (lactic acid, LA)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、心肌肌钙蛋白 I (cardiac troponin I, CTn-I)、心房利钠肽 (atrial natriuretic peptide, ANP) 水平以评估心肌损伤情况

方法步骤: 参考对应指标 Elisa 试剂盒说明书。

(8) 小动物跑台实验评估运动耐量

小动物跑台试验评估运动能力原理: 利用跑步机通过声、光、电刺激大鼠在跑台上不停地跑动, 通过力竭跑步运动总时长大鼠术前、术后与药后的运动能力。

小动物跑台试验设备组成: 主要部分是一个滚动的传送带, 表面的材质有利于动物抓地, 通道的后壁安装有刺激电极、发声装置及发光的小灯泡, 各个通道的刺激装置是彼此独立的。当动物拒绝跑动或者跑速低于实验要求时, 就会在传送带上退行而碰触到后壁的刺激装置, 较强的电刺激或声音刺激将迫使动物按照跑台的速度奔跑。

小动物跑台实验操作步骤: 打开跑台机器及其相应软件, 将大鼠放入相应跑道, 盖上盖子; 设置参数为速度 25m/min、打开电刺激, 点击开始, 记录力竭时间; 训练结束, 将大鼠取出, 换下一组动物, 其他步骤同上。力竭的判断标准: 动物从跑台履带上落到跑台后部电击和木棒驱赶无效, 动物身体蜷缩、背部弓起, 呼吸急促等, 顽固拒跑。

(9) 透射电镜观察心肌组织中线粒体形态结构

动物透射电镜标本制备: 灌注与取材: 将动物麻醉、开胸, 经腹主动脉取血后, 在心脏左心室穿针, 剪开右心耳以 4% 的多聚甲醛进行灌注。以所灌注的心脏组织白而硬为灌注成功的标志。灌注后, 将心脏梗死边缘区切成 3-4 个小于 1 立方毫米的组织标本; 固定: 将 1 立方毫米的组织标本迅速放入 2.5% 戊二醛, 磷酸缓冲液配置的固定液中固定两小时以上, 用 0.1M 磷酸漂洗液漂洗 15 分钟, 3 次, 1% 锇酸固定液固定 2 小时, 0.1M 磷酸漂洗液漂洗 15 分钟, 3 次; 脱水: 在 4 度冰箱内, 予 50% 乙醇脱水 20 分钟, 70% 乙醇脱水 20 分钟, 90% 乙醇脱水 20 分钟, 90% 乙醇与 90% 丙酮 1:1 脱水 20 分钟, 90% 丙酮脱水 20 分钟, 在室温下 100% 丙酮脱水 15 分钟, 分三次进行; 渗透包埋: 纯丙酮: 包埋液 2:1 室温 3 小时, 纯丙酮: 包埋液 1:2 室温过夜, 纯包埋液 37 度

2 小时；固化：37 度烘箱内过夜，45 度烘箱内 12 小时，60 度烘箱内 48 小时；切片：超薄切片机莱卡 EMUC7 切片 70 nm；染色：2%醋酸铀-枸橼酸铅双染色；观察：透射电镜 HT7800（80KV）观察，拍片。

（10）qPCR 检测心肌组织中线粒体 DNA（mitochondrial DNA，mtDNA）的表达

PCR 检测步骤：RNA 提取：从-80℃冰箱取出组织样品剪碎后，加入 1ml 裂解液。用涡旋器震荡混匀；将处理后的样品在室温放置 5min，使得核酸蛋白复合物完全分离；向匀浆样品中加入 0.2ml 氯仿，盖好管盖，剧烈振荡 15s，室温放置 3-5min；2-8℃ 12000rpm 离心 10min。RNA 主要在上层无色的水相中，把水相转移到新管中，不要吸到沉淀；吸附柱前处理：吸附柱中加入 500ul 洗柱液，室温放置 2min，2-8℃ 12000rpm 离心 2min，弃废液；上步收集的上清中加入 200ul 无水乙醇混匀，加入吸附柱静置 2min，2-8℃ 12000rpm 离心 2min，弃废液；向吸附柱中加入 600ul 漂洗液，2-8℃ 12000rpm 离心 2min，弃废液；重复上步；2-8℃ 12000rpm 离心 2min，弃废液，将吸附柱置于室温放置数分钟将吸附柱中的残留漂洗液去除；将吸附柱放入新管中，向膜中央滴加 50-100ul RNase free ddH₂O，室温放置 5min，室温 12000rpm 离心 2min 即得 RNA。

总 RNA 逆转录及 RT-PCR：RNA 逆转录：使用 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂合成第一链 cDNA，50ng-2ug 的总 RNA 可建立 20ul 反应体系；将模板 RNA 在冰上解冻；5*FastKing-RTSuperMix 和 RNase-Free ddH₂O 在室温（15-25℃）解冻，解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀，简短离心以收集残留在管壁的液体；在冰上开展如下操作，为了保证反应液配制的准确性，进行反应体系配制时，先配制成 Mix，然后再分装到每个反应管中。

按照表 4 所示配制反转录反应体系：

表 4. 配制反转录反应体系

组成成分	使用量
5*FastKing-RT SuperMix	4μL
Total RNA	50ng-2μg
RNase-Free ddH ₂ O	补足到 20μL

按照表 5 所示进行反转录反应：

表 5. 处理反应条件

反应温度	反应时间	说明
------	------	----

42°C	15min	去除基因组及反转录反应
95°C	3min	酶灭活过程

Real-time PCR 采用两步法:

体系:

引物 F	0.4μL
引物 R	0.4μL
2*supermix	10μL
PASSIVE DYE	0.4μL
模板	2μL
水	6.8μL
	20μL

程序:

95°C	3min
95°C	30s
55°C	20s
72°C	20s

} 40*

溶解曲线步骤:

95°C	15s
60°C	15s
20min	升温
95°C	15s

引物序列:

表 6. 引物序列表

引物	序列
Rat ACTB_F	ATGTTGCCCTAGACTTCGAG
Rat ACTB_R	GATGCCACAGGATTCCATAC
Rat mtDNA_F	TTACGAGCACATGGGATCC
Rat mtDNA_R	GGTCATGCAGAGAAAGTGTCC

(11) 检测心肌中线粒体复合物I、II、III、IV的活性变化和柠檬酸合酶(citrate synthase, CS)活性变化

方法步骤: 参考相应指标试剂盒说明书。

(12) 比色法检测心肌组织中单磷酸腺苷(adenosine monophosphate, AMP)、二磷酸腺苷(adenosine diphosphate, ADP)、三磷酸腺苷(adenosine triphosphate, ATP)变化

方法步骤: 参考相关指标试剂盒说明书。

(13) Western-blot 及 qPCR 检测 AMP 活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)(WB 检测其磷酸化水平)、NAD-依赖性去乙酰化酶 Sirtuin1(nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase sirtuin-1, Sirt-1)、过氧化物酶体增殖物激活受体伽马共激活因子-1 α (peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 alpha, PGC-1 α)和线粒体转录因子 A(mitochondrial transcription factor A, Tfam)蛋白及 mRNA 表达水平

蛋白检测方法步骤:

蛋白样本制备: 从-80 度冰箱中取出组织置于冰上, 剪取小块组织于 EP 管中并剪碎, 每管加 250ul 裂解液, 于冰上裂解 45min, 为使组织充分裂解要经常来回摇动; 裂解完后, 于 4℃下 12000rpm 离心 15min; 测定蛋白质浓度: 采用碧云天 BCA 蛋白浓度测定试剂盒。根据浓度测定结果对蛋白浓度进行计算。加 5*loading buffer 煮沸 5min, 然后放于-80℃保存。

SDS-PAGE 电泳:

电泳胶制备: 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。

各种浓度分离胶的配制:

表 7. 各浓度分离胶配制

12%分离胶(总体系 20 mL)(单位: mL)	
水	6.6
30%丙烯酰胺	8.0
1.5M tris-HCl (PH8.8)	5.0

10%SDS	0.2
APS	0.2
TEMED	0.008
浓缩胶 5% (总体系 6 mL) (单位: mL)	
水	4.1
30%丙烯酰胺	1.0
1.0M tris-HCl (PH6.8)	0.75
10%SDS	0.06
APS	0.06
TEMED	0.006

上样电泳: 将蛋白样品与 5×loading buffer 混合后于 100℃处理 5 min, 每孔上样 100 μg 总蛋白。90V 恒压电泳至泳道中的蛋白平齐后 (浓缩, 约 10min) 调节电压为 100V 至溴酚蓝条带移动至板底部时停止电泳 (分离, 约 120min) (压线定压和分离电压视具体情况调整); 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。

转膜: 将剪切好的 PVDF 膜放到甲醇中浸泡 2min; 取出凝胶根据 Marker 切下目的条带, 用蒸馏水冲洗, 剪与 PAGE 凝胶相同大小的 PVDF 膜和滤纸, PVDF 膜用甲醇浸泡数秒后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, 黑色板的一面对照黑色负极。在转膜槽中加满电转液开始转膜。转膜过程在 4℃进行, 转膜条件为 100V/100mA。

免疫印迹显色 (ECL 显色系统):

- 1) 封闭: 用含 5%脱脂奶粉的 TBST (封闭液) 浸泡 PVDF 膜, 室温摇床封闭 2h。
- 2) 一抗: 用封闭液稀释相应的一抗, 使 PVDF 膜浸泡于一抗孵育液中, 4℃孵育过夜。

GAPDH---1:5000 稀释

AMPK---1:1000 稀释

P-AMPK---1:1000 稀释

P38---1:1000 稀释

Sirt-1---1:1000 稀释

PGC-1---1:5000 稀释

Tfam---1:5000 稀释

3) 洗去多余一抗: TBST 充分洗涤 PVDF 膜 3-4 次, 15 min/次。

4) 二抗: 用封闭液稀释 HRP 标记二抗—1:1000 稀释, 使 PVDF 膜浸泡于二抗孵育液中, 37°C 摇床孵育 2 h。

5) 洗去多余二抗: TBST 充分洗涤 PVDF 膜 3-4 次, 15 min/次。

6) 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, 滴加工作液于 PVDF 膜上, 反应数分钟待荧光带明显后, 用滤纸吸去多余的底物液, 放入天能全自动化学发光分析仪中曝光, 拍照。

mRNA 检测方法步骤:

PCR 检测步骤

RNA 提取: 从-80°C 冰箱取出组织样品剪碎后, 加入 1ml 裂解液。用涡旋器震荡混匀; 将处理后的样品在室温放置 5min, 使得核酸蛋白复合物完全分离; 向匀浆样品中加入 0.2ml 氯仿, 盖好管盖, 剧烈振荡 15s, 室温放置 3-5min; 2-8°C 12000rpm 离心 10min。RNA 主要在上层无色的水相中, 把水相转移到新管中, 不要吸到沉淀; 吸附柱前处理: 吸附柱中加入 500ul 洗柱液, 室温放置 2min, 2-8°C 12000rpm 离心 2min, 弃废液; 第 4 步收集的上清中加入 200ul 无水乙醇混匀, 加入吸附柱静置 2min, 2-8°C 12000rpm 离心 2min, 弃废液; 向吸附柱中加入 600ul 漂洗液, 2-8°C 12000rpm 离心 2min, 弃废液; 重复第 7 步; 2-8°C 12000rpm 离心 2min, 弃废液, 将吸附柱置于室温放置数分钟将吸附柱中的残留漂洗液去除; 将吸附柱放入新管中, 向膜中央滴加 50-100ul RNase free ddH₂O, 室温放置 5min, 室温 12000rpm 离心 2min 即得 RNA。

总 RNA 逆转录及 RT-PCR

RNA 逆转录: 使用 FastKing 一步法除基因组 cDNA 第一链合成预混试剂合成第一链 cDNA, 50ng-2ug 的总 RNA 可建立 20ul 反应体系; 将模板 RNA 在冰上解冻; 5*FastKing-RTSuperMix 和 RNase-Free ddH₂O 在室温 (15-25°C) 解冻, 解冻后迅速置于冰上。使用前将每种溶液涡旋振荡混匀, 简短离心以收集残留在管壁的液体; 在冰上开展如下操作, 为了保证反应液配制的准确性, 进行反应体系配制时, 先配制成 Mix, 然后再分装到每个反应管中。

按照表 8 所示配制反转录反应体系:

表 8. 配制反转录反应体系

组成成分	使用量
5*FastKing-RT SuperMix	4 μ L
Total RNA	50ng-2 μ g
RNase-Free ddH ₂ O	补足到 20 μ L

按照表 9 所示进行反转录反应:

表 9. 处理反应条件

反应温度	反应时间	说明
42°C	15min	去除基因组及反转录反应
95°C	3min	酶灭活过程

Real-time PCR 采用两步法:

体系:

引物 F	0.4 μ L
引物 R	0.4 μ L
2*supermix	10 μ L
PASSIVE DYE	0.4 μ L
模板	2 μ L
水	6.8 μ L
	20 μ L

程序:

95°C	3min
95°C	30s
55°C	20s
72°C	20s

} 40*

溶解曲线步骤:

95°C	15s
60°C	15s
20min	升温
95°C	15s

引物序列:

表 10. 引物序列表

引物	序列
Rattus GAPDH_F	GCTGAGTATGTCGTGGAGTC
Rattus GAPDH_R	GATGCATTGCTGACAATCTT
Rattus SIRT1_F	GCTGGCCTAATAGACTTGCAA
Rattus SIRT1_R	TCCGTCAGCTCCAGATCCT
Rattus PGC-1 α _F	TTGATGCACTGACAGATGGA
Rattus PGC-1 α _R	CTGAGCAGGGACGTCTTTG
Rattus TFAM_F	CCAGATGCAAAAGTTTCAGAA
Rattus TFAM_R	CCAGATGCAAAAGTTTCAGAA
Rattus AMPK α _F	CAGAAGATTCTGAAGCCTGG
Rattus AMPK α _R	CAGGTTTCAAATCTCTGTGGA

2 结果

2.1 大鼠体重变化

与假手术组比较,模型组实验鼠体重显著降低($P<0.001$);与模型组比较,愈心痛低剂量组、愈心痛高剂量组和曲美他嗪组的实验鼠体重均有不同程度增加($P<0.001$)。结果表明:大鼠心肌梗死后,体重增长缓慢,给予愈心痛胶囊和曲美他嗪灌胃后,对心肌梗死后体重增长缓慢有所改善。图 1。

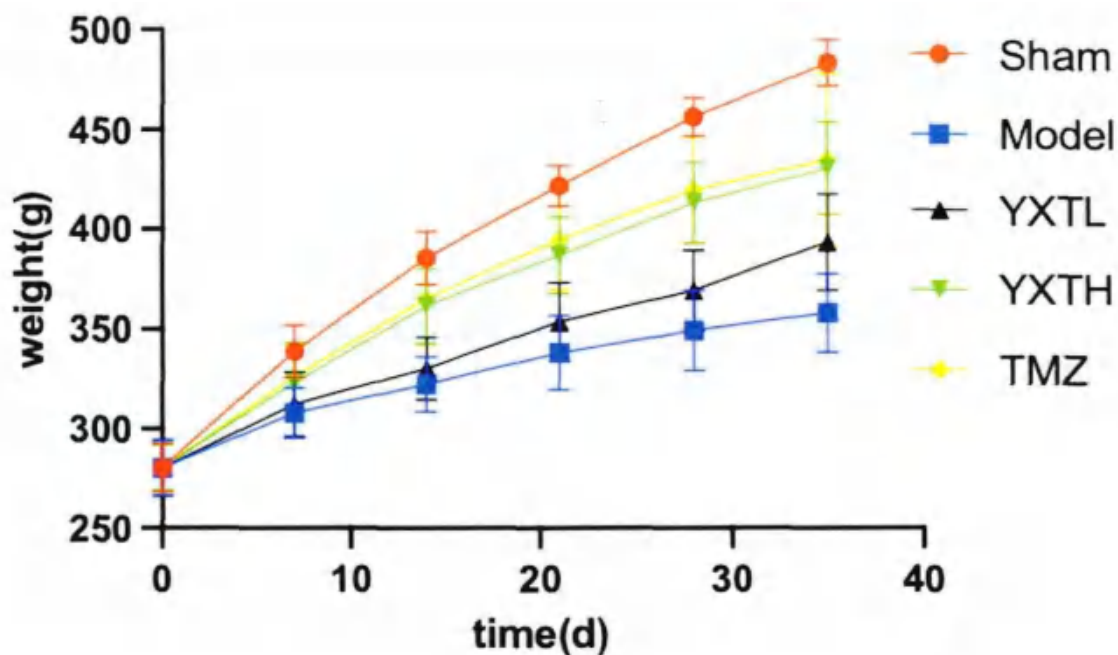


图 1.大鼠体重随时间变化趋势

2.2 急性心肌梗死模型构建的评估

实验鼠麻醉后测量心电图，假手术组实验鼠的心电图未见明显的 ST 段弓背抬高的表现。模型组及各药物组实验鼠心电图出现典型 ST 段弓背上抬、病理性 Q 波的表现，符合急性心肌梗死心电图特征。结果表明：与假手术组心电图结果比较，模型组和各药物组大鼠造模成功。图 2。

造模前心电图：



造模后心电图：



图 2.造模前后心电图变化

2.3 TTC 染色

心脏组织 TTC 染色后,梗死区域组织呈现苍白色,未梗死区域组织呈现红色。对心肌梗死面积进行定量分析后可知:与假手术组相比,各组造模后大鼠左室前壁梗死区明显更大 ($P<0.001$),染色后呈现为苍白色;与模型组比较,愈心痛低剂量组、愈心痛高剂量组和曲美他嗪组大鼠心脏组织梗死区域均有不同程度减少,但仅愈心痛高剂量组和曲美他嗪组与模型组比较差异有统计学意义 ($P<0.001$)。结果表明:大鼠心肌梗死后,心脏组织梗死区域明显增多,给予愈心痛胶囊和曲美他嗪灌胃后,心脏组织梗死区域有所减少,其中愈心痛高剂量组和曲美他嗪组效果更好。图 3。

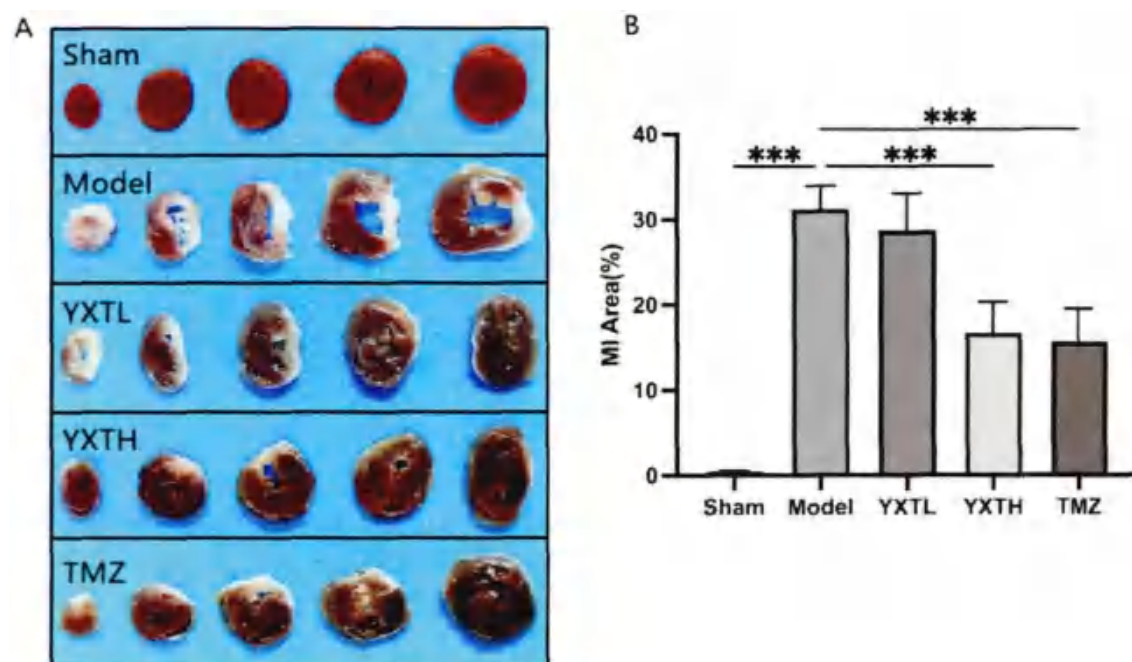


图 3.各组大鼠心肌 TTC 染色情况

注: Sham: 假手术组; Model: 模型组; YXTL: 愈心痛低剂量组; YXTH: 愈心痛高剂量组; TMZ: 曲美他嗪组。*** $P<0.001$ 。A: 各组心脏 TTC 染色病理切片图; B: 各组心脏 TTC 染色后心梗面积占比分数。

2.4 HE 染色

心肌 HE 染色及组织病理检测可见:假手术组心脏组织心内膜、心肌膜及心外膜结构清晰,心腔未见明显异常,心肌纤维着色均匀,细胞分界清楚,走形一致,间质无明显异常,未见明显的炎性细胞浸润;模型组心脏组织可见局部心外膜增生(蓝色箭头),左心室壁可见小范围心肌细胞坏死溶解,被增生的结缔组织所取代(黑色箭头),可见较

多的新生毛细血管（黄色箭头），伴有大量的炎性细胞浸润（红色箭头）；愈心痛低剂量组心脏组织可见大范围的心外膜增生（蓝色箭头），左心室壁可见局灶性心肌细胞坏死溶解，被增生的结缔组织所取代（黑色箭头），可见较多新生毛细血管（黄色箭头），伴随较多炎性细胞浸润（红色箭头）；愈心痛高剂量组心脏组织可见小范围的心外膜增生（蓝色箭头），左心室壁可见局灶性心肌细胞坏死溶解，被增生的结缔组织所取代（黑色箭头），可见较多新生毛细血管（黄色箭头），伴有散在的炎性细胞浸润（红色箭头）；曲美他嗪组心脏组织可见小范围的心外膜增生（蓝色箭头），左心室壁可见小范围的心肌细胞坏死溶解，被增生的结缔组织所取代（黑色箭头），可见少量新生毛细血管（黄色箭头），伴有散在的炎性细胞浸润（红色箭头），局部可见间质内轻微出血（绿色箭头）。结果表明：大鼠心肌梗死后，大部分心脏组织可见局部心外膜增生，左心室壁可见小范围心肌细胞坏死溶解，被增生的结缔组织所取代，并可见较多的新生毛细血管，伴有大量的炎性细胞浸润，给与愈心痛胶囊和曲美他嗪灌胃后，可见心脏组织小范围的心外膜增生，左心室壁可见局灶性心肌细胞坏死溶解，伴有散在的炎性细胞浸润，可以改善心肌梗死对心脏组织的损害。图 4。

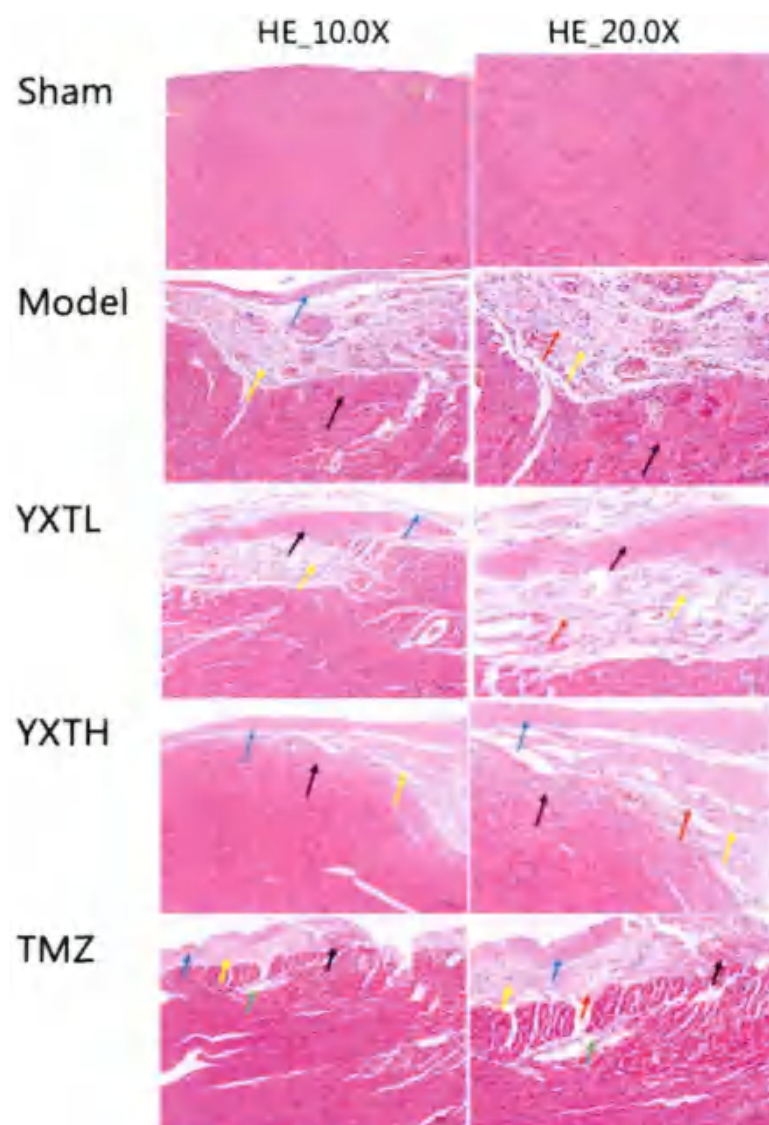


图 4.各组大鼠心肌 HE 染色情况

注: Sham: 假手术组; Model: 模型组; YXTL: 愈心痛低剂量组; YXTH: 愈心痛高剂量组; TMZ: 曲美他嗪组。HE_10.0X: 100 倍镜下观察; HE_20.0X: 200 倍镜下观察。

2.5Tunel 染色

心肌 Tunel 染色显示与假手术组相比, 模型组大鼠心脏组织中凋亡颗粒明显升高, 具有显著性统计学意义 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 愈心痛低剂量组大鼠心脏组织中凋亡颗粒有所下降, 具有统计学意义 ($P < 0.05$), 愈心痛高剂量组和曲美他嗪组大鼠心脏组织中凋亡颗粒均下降明显, 具有显著性统计学意义 (P 值均 < 0.001)。结果表明: 大鼠心肌梗死后, 心脏组织细胞凋亡率有所增加, 给予愈心痛胶囊和曲美他嗪灌胃后, 一定程度上可以减少心肌细胞的凋亡率。图 5。

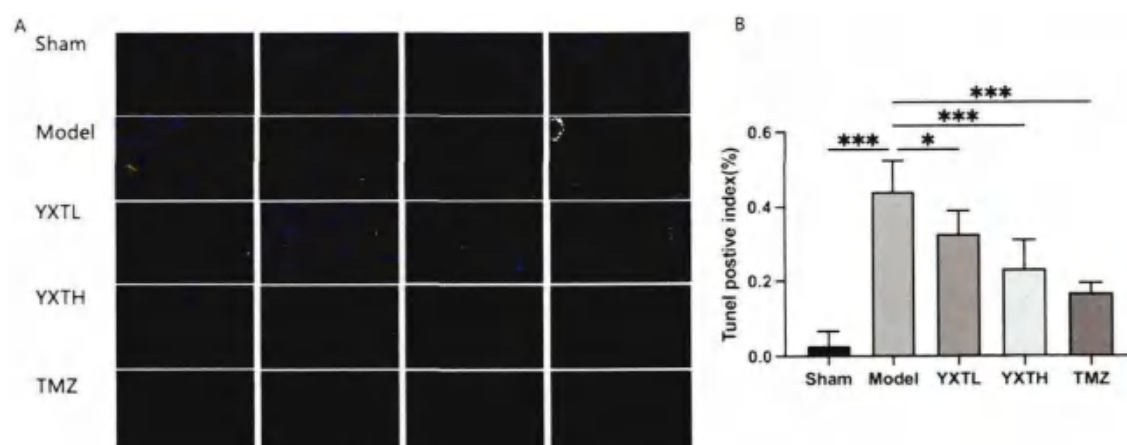


图 5.各组大鼠心肌 TUNEL 染色情况

注: Sham: 假手术组; Model: 模型组; YXTL: 愈心痛低剂量组; YXTH: 愈心痛高剂量组; TMZ: 曲美他嗪组。* $P<0.05$; *** $P<0.001$ 。A: 各组心脏 TUNEL 染色结果; B: 各组心脏 TUNEL 染色后心肌细胞凋亡率占比分数。

2.6 心脏超声

与假手术组相比, 模型组大鼠 EF 和 FS 均明显降低, 具有显著性统计学意义 ($P<0.001$); CO 及 SV 显著下降, 左室舒张末期及收缩末期内径均显著升高, 差异均有统计学意义 ($P<0.05$); 心率无显著性差异 ($P>0.05$)。与模型组比较, 愈心痛低剂量组、愈心痛高剂量组和曲美他嗪组大鼠 EF 均明显升高, 具有显著性统计学意义 (P 值均 <0.01); 愈心痛低剂量组大鼠 FS 有所上升, 具有统计学意义 ($P<0.05$), 愈心痛高剂量组和曲美他嗪组大鼠 FS 均明显升高, 具有显著性统计学意义 ($P<0.001$); 仅曲美他嗪组 CO 及 SV 显著升高 ($P<0.01$), 愈心痛高剂量组、低剂量组和曲美他嗪组的左室收缩末期容积均显著降低 ($P<0.001$), 左室舒张末期容积均有所降低 ($P<0.05$), 心率均无显著性差异 ($P>0.05$)。结果表明: 大鼠心肌梗死后, EF 和 FS 均明显降低, 左室收缩及舒张末期容积均明显升高, 给予愈心痛胶囊和曲美他嗪灌胃后, 可以有效升高大鼠 EF 和 FS, 同时降低左室收缩及舒张末期容积, 其中愈心痛高剂量组和曲美他嗪组可以更好的逆转心肌梗死导致的心功能损伤。图 6。

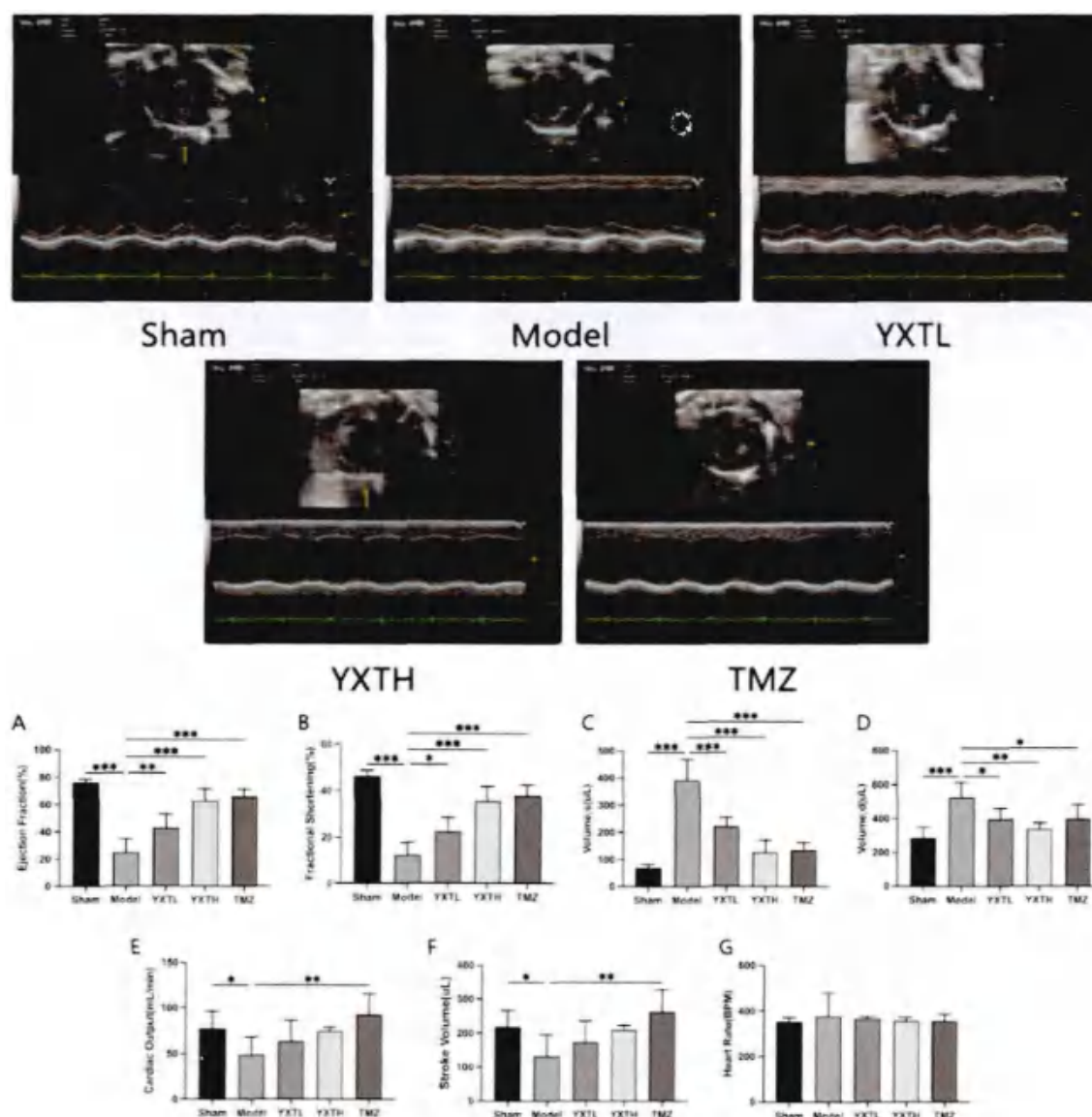


图 6.各组大鼠心脏超声情况

注: Sham: 假手术组; Model: 模型组; YXTL: 愈心痛低剂量组; YXTH: 愈心痛高剂量组; TMZ: 曲美他嗪组。* $P < 0.05$; ** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。A: 各组间射血分数的比较; B: 各组间短轴缩短率的比较; C: 各组间左室收缩末期容积的比较; D: 各组间左室舒张末期容积的比较; E: 各组间心输出量的比较; F: 各组间每搏输出量的比较; G: 各组间心率的比较。

2.7 大鼠跑台实验

术前各组实验鼠运动能力基本无差异, 无统计学意义; 术后假手术组实验鼠运动能力有大幅度下降, 各组模型组实验鼠运动能力显著下降, 与假手术组比较, 具有统计学意义 ($P < 0.001$); 给药干预后愈心痛低剂量组、愈心痛高剂量组和曲美他嗪组的实验鼠

的运动能力都有所提升,与模型组比较,愈心痛高剂量组和曲美他嗪组的实验鼠的运动能力具有统计学意义($P<0.001$)。结果表明:大鼠心肌梗死后,运动能力明显下降,力竭时间较短,给予愈心痛胶囊和曲美他嗪灌胃后,跑步实验中力竭时间有所增加,运动能力得到增强,其中愈心痛高剂量组和曲美他嗪组改善效果更好。图 7。

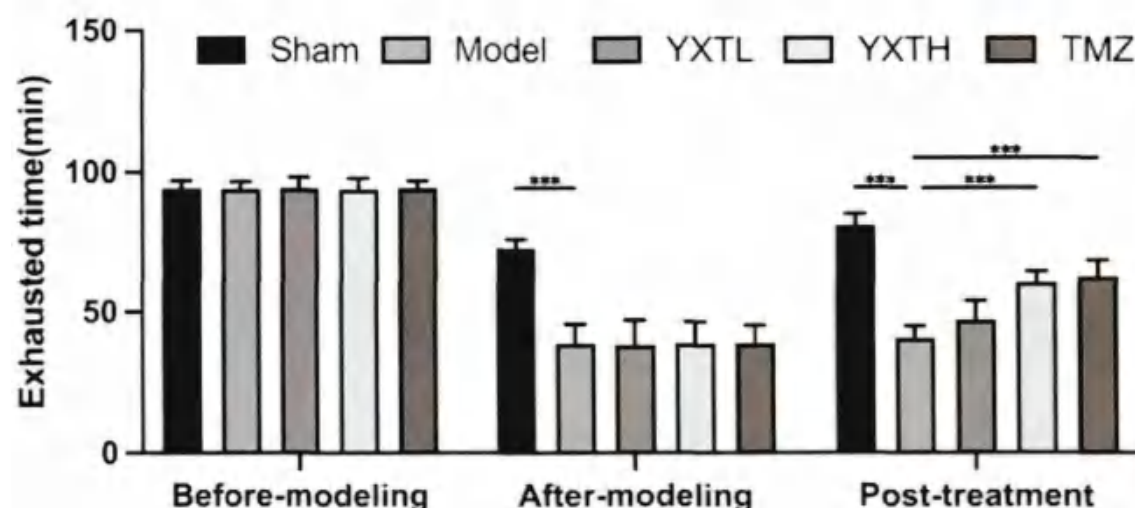


图 7.各组造模前、造模后、干预后力竭总时长情况

注: Sham: 假手术组; Model: 模型组; YXTL: 愈心痛低剂量组; YXTH: 愈心痛高剂量组; TMZ: 曲美他嗪组。Before-modeling: 造模前; After-modeling: 造模后; Post-treatment: 干预后。

*** $P<0.001$ 。

2.8 血清心肌损伤标记物

血清 Elisa 心功能指标检测显示与假手术组相比,模型组大鼠血清中 CK、CK-MB、LA、LDH、CTn-I、ANP 均有所升高,具有统计学意义($P<0.001$),与模型组比较,愈心痛低剂量组大鼠血清中 CK、CK-MB、LDH 均有所下降,具有显著性统计学意义($P<0.001$),CTn-I、ANP 的变化具有统计学意义($P<0.05$),LA 的变化无统计学差异($P>0.05$),愈心痛高剂量组和曲美他嗪组大鼠血清中 CK、CK-MB、LA、LDH、CTn-I、ANP 均有所下降,具有显著性统计学意义($P<0.001$)。结果表明:大鼠心肌梗死后,血清中 CK、CK-MB、LA、LDH、CTn-I、ANP 的含量均有所升高,给与愈心痛胶囊和曲美他嗪灌胃后,可以有效降低血清中 CK、CK-MB、LA、LDH、CTn-I、ANP 的含量,其中愈心痛高剂量组和曲美他嗪组改善效果更好。图 8。

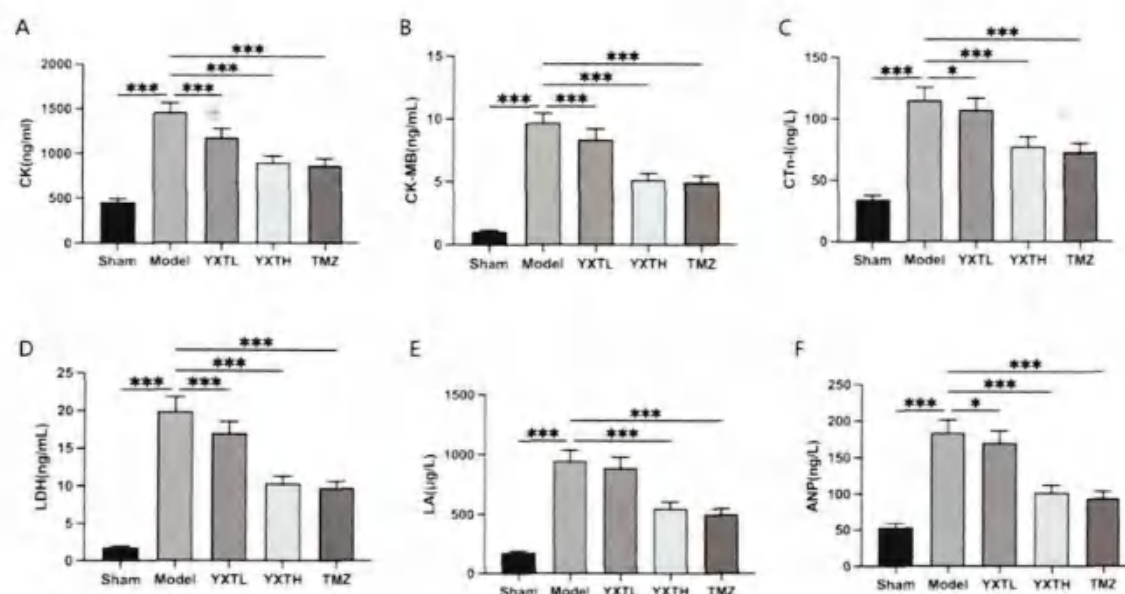


图 8.各组大鼠血清心肌损伤相关酶学的表达情况

注: Sham: 假手术组; Model: 模型组; YXTL: 愈心痛低剂量组; YXTH: 愈心痛高剂量组; TMZ: 曲美他嗪组。* $P < 0.05$; *** $P < 0.001$ 。A: 各组 CK 表达情况; B: 各组 CK-MB 表达情况; C: 各组 CTn-I 表达情况; D: 各组 LDH 表达情况; E: 各组 LA 表达情况; F: 各组 ANP 表达情况。

2.9 心肌透射电镜

透射电镜观察心肌及线粒体结构显示假手术组可见肌细胞及肌原纤维排列规则, 肌原纤维间可见丰富的线粒体 (图中标注为 M), 线粒体呈椭圆形或短杆状, 线粒体内脊清晰, 结构完整; 模型组可见肌细胞肿胀, 肌原纤维排列欠规则, 肌原纤维间可见丰富的线粒体, 线粒体大多呈椭圆形, 线粒体肿胀, 内脊大多断裂, 部分线粒体出现空泡变; 愈心痛低剂量组可见肌细胞肿胀, 肌原纤维排列欠规则, 肌原纤维间可见丰富的线粒体, 线粒体大多呈椭圆形, 线粒体肿胀, 部分内脊断裂, 少数线粒体空泡变; 愈心痛高剂量组可见肌细胞轻度肿胀, 肌原纤维排列基本规则, 肌原纤维间可见丰富的线粒体, 线粒体呈椭圆形或短杆状, 线粒体轻度肿胀、少数线粒体内脊断裂; 曲美他嗪组可见肌细胞排列规则, 肌原纤维排列规则, 肌原间可见丰富的线粒体, 线粒体呈椭圆形或短杆状, 线粒体内脊清晰、结构完整。结果表明: 大鼠心肌梗死后, 心脏心肌细胞出现肿胀, 肌原纤维排列欠规则, 线粒体肿胀、部分内脊断裂, 少数线粒体空泡变, 给予愈心痛胶囊和曲美他嗪灌胃给药后, 可有效逆转由心肌梗死导致的心脏心肌细胞肿胀, 肌原纤维排列规则, 线粒体内脊清晰、结构完整。图 9。

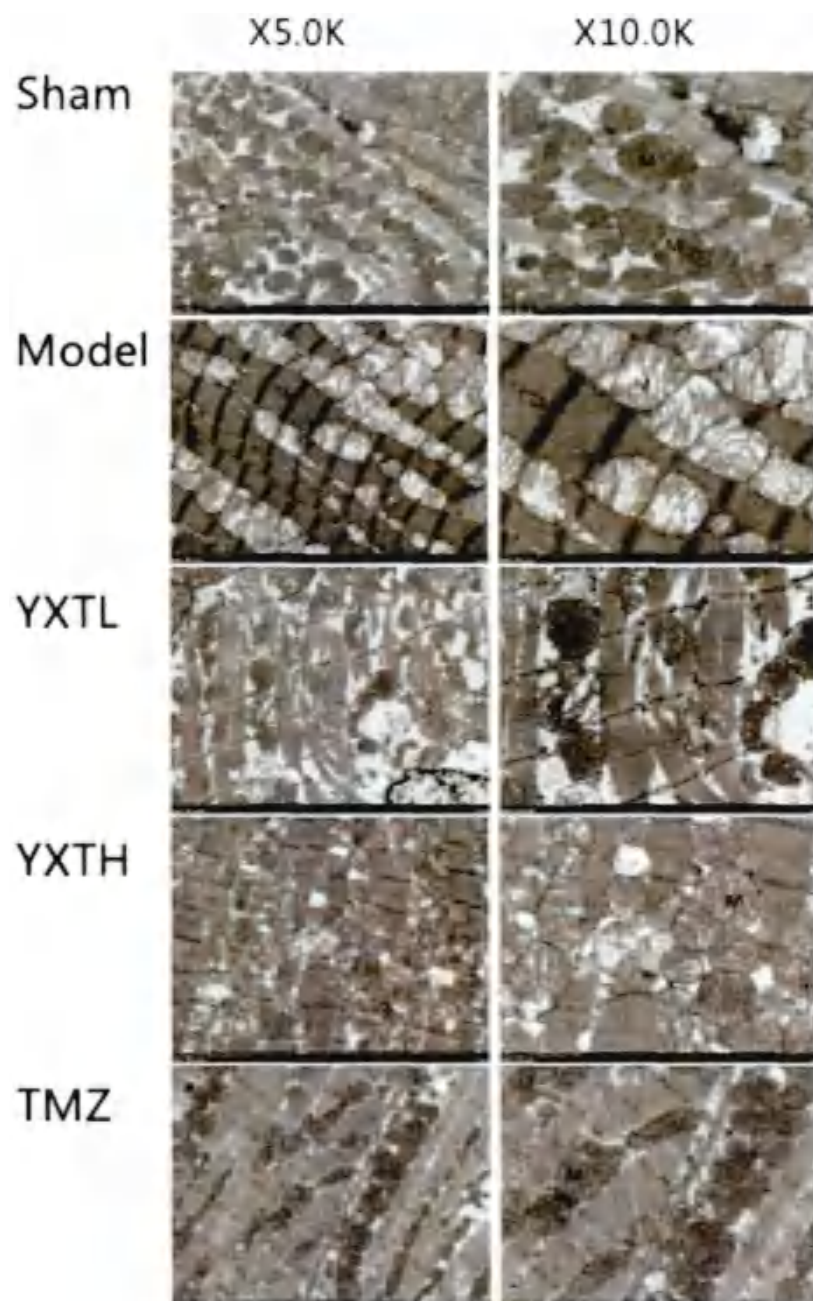


图 9.各组大鼠心肌透射电镜情况

注: Sham: 假手术组; Model: 模型组; YXTL: 愈心痛低剂量组; YXTH: 愈心痛高剂量组; TMZ: 曲美他嗪组。M: 线粒体。X5.0K:5000 倍镜下; X10.0K:10000 倍镜下。

2.10 心肌线粒体 DNA 表达

与假手术组相比,模型组大鼠心脏组织中 mtDNA 表达量明显降低,具有显著性统计学意义 ($P < 0.001$);与模型组比较,愈心痛低剂量组、愈心痛高剂量组和曲美他嗪组大鼠心脏组织中 mtDNA 表达量均明显升高,具有显著性统计学意义 ($P < 0.001$)。结果

表明：大鼠心肌梗死后，心脏组织中 mtDNA 表达量明显降低，给予愈心痛胶囊和曲美他嗪灌胃后，可以有效逆转心脏组织中 mtDNA 表达量的降低。图 10。

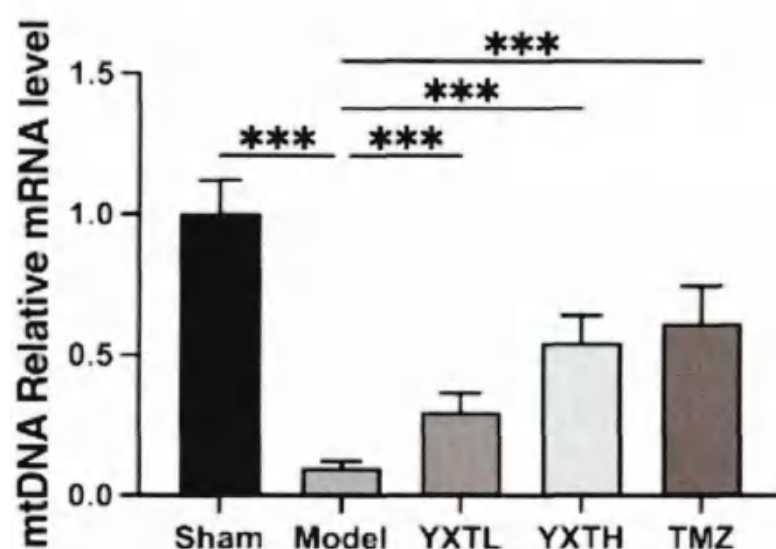


图 10.各组大鼠心肌 mtDNA 表达情况

注：Sham：假手术组；Model：模型组；YXTL：愈心痛低剂量组；YXTH：愈心痛高剂量组；TMZ：曲美他嗪组。*** $P < 0.001$ 。

2.11 心肌线粒体复合物 I-IV 及柠檬酸合酶活性

与假手术组相比，模型组大鼠心脏组织中线粒体复合物I、II、III、IV的活性和柠檬酸合酶活性均有所下降，具有显著性统计学意义 ($P < 0.001$)；与模型组比较，愈心痛低剂量组大鼠心脏组织中线粒体复合物III的活性和柠檬酸合酶活性有所升高，具有统计学意义 ($P < 0.05$)，愈心痛高剂量组和曲美他嗪组大鼠心脏组织中线粒体复合物I、II、III、IV的活性和柠檬酸合酶活性均升高明显，具有显著性统计学意义 ($P < 0.001$)。结果表明：大鼠心肌梗死后，心脏组织中的线粒体复合物I、II、III、IV的活性和柠檬酸合酶活性均有所下降，给予愈心痛胶囊和曲美他嗪灌胃后，可逆转由心肌梗死造成的线粒体复合物I、II、III、IV活性和柠檬酸合酶活性的下降，其中愈心痛高剂量组和曲美他嗪组效果更好。图 11。

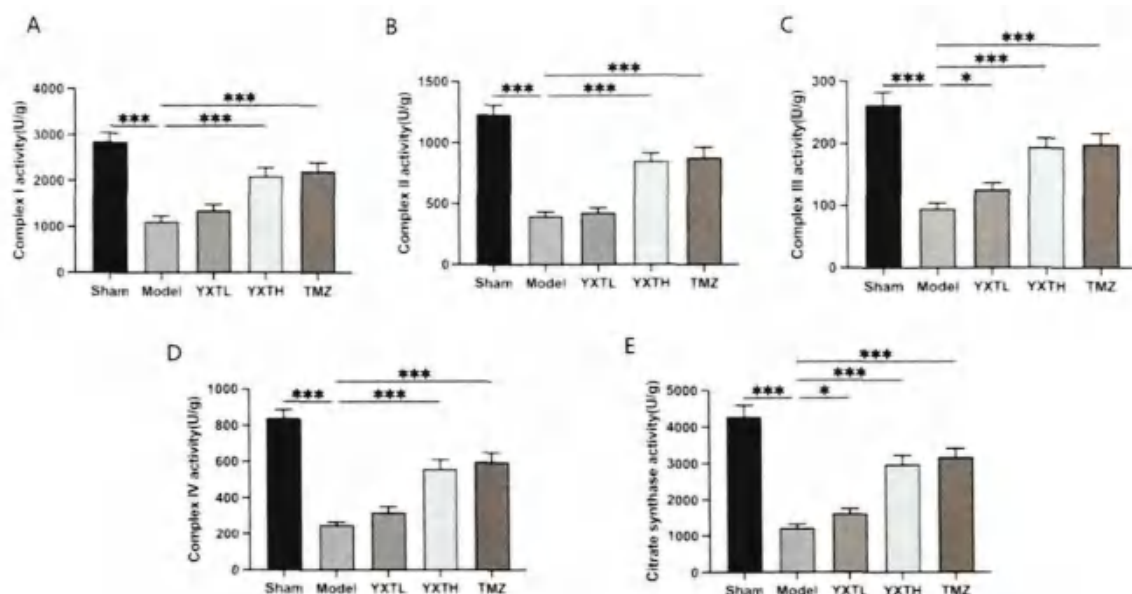


图 11.各组大鼠心肌线粒体复合物及柠檬酸合酶活性表达情况

注: Sham: 假手术组; Model: 模型组; YXTL: 愈心痛低剂量组; YXTH: 愈心痛高剂量组; TMZ: 曲美他嗪组。* $P<0.05$; *** $P<0.001$ 。A: 各组线粒体复合物 I 表达; B: 各组线粒体复合物 II 表达; C: 各组线粒体复合物 III 表达; D 各组线粒体复合物 IV 表达; E: 各组柠檬酸合酶表达。

2.12 心肌 AMP、ADP、ATP 表达

与假手术组相比,模型组大鼠心脏组织中 AMP、ADP、ATP 均变化明显,具有显著性统计学意义 ($P<0.001$);与模型组比较,愈心痛低剂量组大鼠心脏组织中 AMP 有所下降,具有统计学意义 ($P<0.01$),愈心痛高剂量组和曲美他嗪组大鼠心脏组织中 AMP 下降明显,具有统计学意义 ($P<0.001$)。与模型组相比,愈心痛低剂量组 ADP 变化不明显,差异无统计学意义 ($P>0.05$),而愈心痛高剂量组和曲美他嗪组 ADP 下降显著,具有统计学意义 ($P<0.001$)。与模型组相比,愈心痛低剂量组 ATP 表达轻度上升,差异无统计学意义 ($P>0.05$),而愈心痛高剂量组和曲美他嗪组 ATP 表达显著上升,具有显著性统计学意义 ($P<0.001$)。结果表明:大鼠心肌梗死后,心脏组织中 AMP、ADP 的含量均有所升高,ATP 的含量降低,给予愈心痛胶囊和曲美他嗪灌胃后,可以有效降低心脏组织中 AMP、ADP 的含量,提升 ATP 的含量,其中愈心痛高剂量组和曲美他嗪组效果更好。图 12。

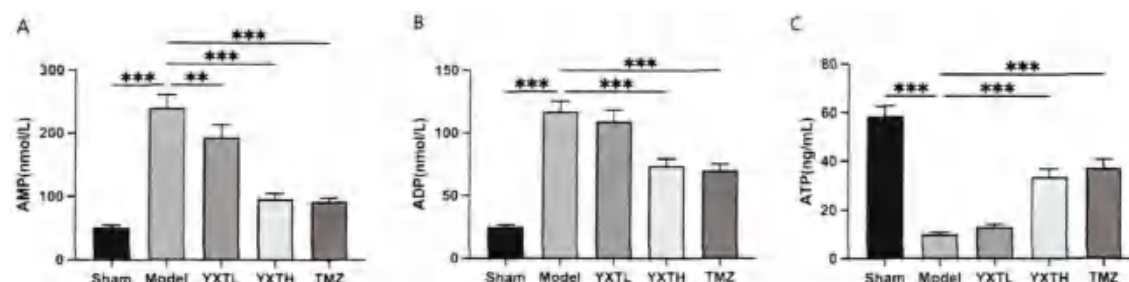


图 12.各组大鼠心肌 AMP、ADP、ATP 表达情况

注: Sham: 假手术组; Model: 模型组; YXTL: 愈心痛低剂量组; YXTH: 愈心痛高剂量组; TMZ: 曲美他嗪组。** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。A: 各组 AMP 表达; B: 各组 ADP 表达; C: 各组 ATP 表达。

2.13 线粒体生物合成通路相关蛋白 mRNA 表达

与假手术组相比,模型组大鼠心脏组织中 AMPK α 、PGC-1 α 、SIRT-1、Tfam 的 mRNA 表达明显降低,具有显著性统计学意义 ($P < 0.001$);与模型组比较,愈心痛高剂量组和曲美他嗪组大鼠心脏组织中 AMPK α 、SIRT-1、PGC-1 α 、Tfam 的 mRNA 表达明显升高,具有显著性统计学意义 ($P < 0.001$),而愈心痛低剂量组 PGC-1 α 的 mRNA 表达升高,差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。结果表明:大鼠心肌梗死后,AMPK α 、PGC-1 α 、SIRT-1、Tfam 的基因表达明显降低,给予愈心痛胶囊和曲美他嗪灌胃后,可以有效逆转由心肌梗死导致的 AMPK α 、PGC-1 α 、SIRT-1、Tfam 的 mRNA 表达的降低。图 13。

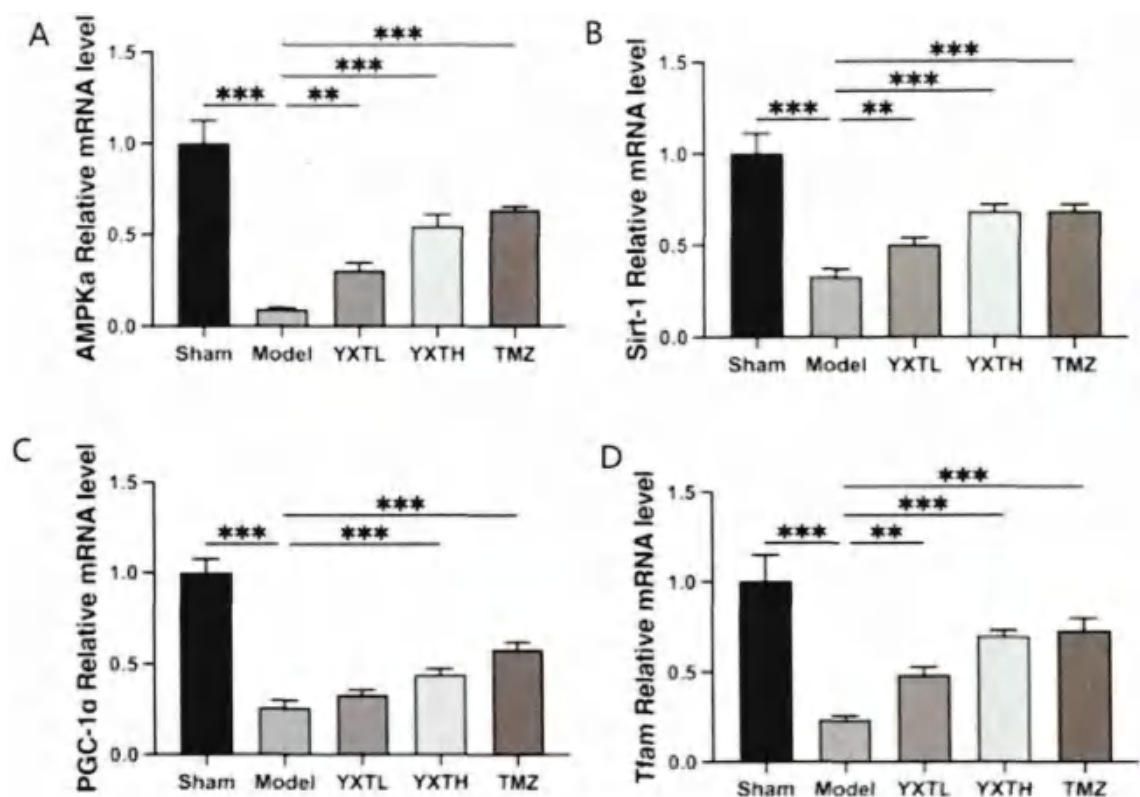


图 13.各组线粒体生物合成通路相关蛋白的 mRNA 表达情况

注: Sham: 假手术组; Model: 模型组; YXTL: 愈心痛低剂量组; YXTH: 愈心痛高剂量组; TMZ: 曲美他嗪组。** $P < 0.01$; *** $P < 0.001$ 。A: 各组 AMPK 活化 mRNA 表达; B: 各组 SIRT-1 的 mRNA 表达; C: 各组 PGC-1 α 的 mRNA 表达; D: 各组 Tfam 的 mRNA 表达。

2.14 线粒体生物合成通路相关蛋白表达

与假手术组相比,模型组大鼠心脏组织中 SIRT-1、PGC-1 α 、Tfam 的蛋白明显降低,具有显著性统计学意义 ($P < 0.001$), p-AMPK 的蛋白明显升高,具有显著性统计学意义 ($P < 0.001$); 与模型组比较,愈心痛低剂量组、愈心痛高剂量组和曲美他嗪组大鼠心脏组织中 SIRT-1、PGC-1 α 、Tfam 的蛋白明显升高,具有显著性统计学意义 ($P < 0.001$); 愈心痛低剂量组、愈心痛高剂量组和曲美他嗪组大鼠心脏组织中的 p-AMPK 蛋白进一步升高,具有显著性统计学意义 ($P < 0.001$)。结果表明:大鼠心肌梗死后, SIRT-1、PGC-1 α 、Tfam 的蛋白表达明显降低, p-AMPK、蛋白表达明显升高,给予愈心痛胶囊和曲美他嗪灌胃后,可以有效逆转 SIRT-1、PGC-1 α 、Tfam 的蛋白降低,进一步增强 AMPK 磷酸化。图 14。

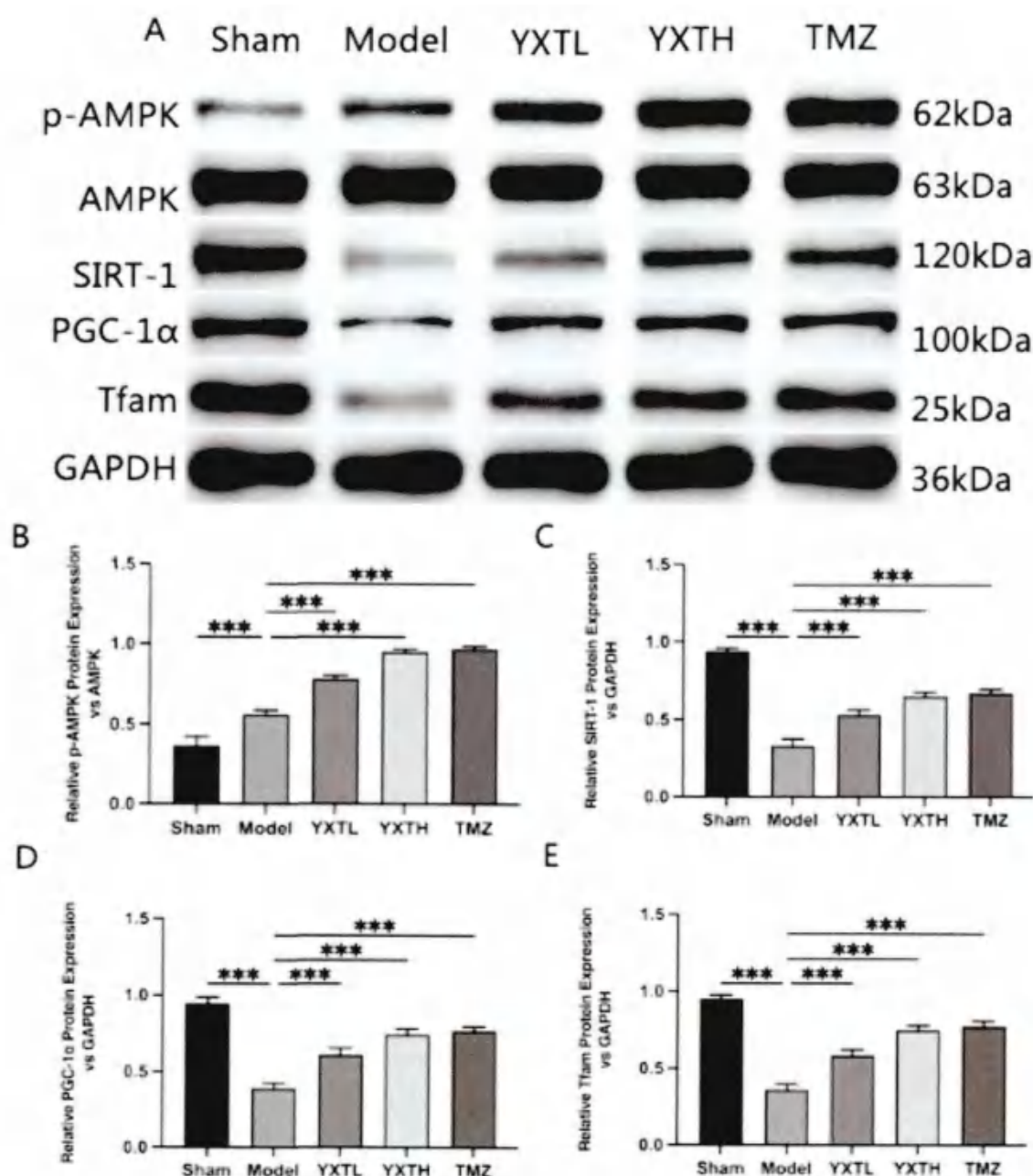


图 14. 各组线粒体生物合成通路相关蛋白表达情况

注: Sham: 假手术组; Model: 模型组; YXTL: 愈心痛低剂量组; YXTH: 愈心痛高剂量组; TMZ: 曲美他嗪组。*** $P < 0.001$ 。A: 各组线粒体生物合成通路相关蛋白 Western Blot 结果; B: 各组 AMPK 磷酸化蛋白表达; C: 各组 SIRT-1 蛋白表达; D: 各组 PGC-1 α 蛋白表达; E: 各组 Tfam 蛋白表达。

3 讨论

本研究通过冠脉左前降支结扎的手术方式构建大鼠急性心肌梗死模型,观察益气活血中药愈心痛胶囊对 AMI 大鼠运动能力及线粒体生物功能的影响。研究表明:(1)与模型组相比,愈心痛胶囊干预可抑制心梗后心肌细胞凋亡,降低心肌梗死面积从而发挥保护心肌组织的作用;(2)与模型组相比,愈心痛胶囊干预可降低心梗后血清中心肌损伤酶学指标 CK、CK-MB、CTn-I、LDH、LA、ANP 的表达,缓解心肌损伤,提高射血分数和短轴缩短率,降低心梗后左室舒张及收缩末期容积,从而提高心肌细胞射血功能,缓解心肌梗死导致的心功能受损;(3)基于小动物跑台实验,与模型组相比,愈心痛胶囊干预可提高心肌缺血大鼠力竭运动总时长,从而提高运动耐量;(4)与模型组相比,愈心痛胶囊干预可有效逆转由心梗导致的心肌细胞肿胀,肌原纤维排列不规则等病理改变,维持线粒体结构完整,增加心肌组织中 mtDNA 表达,增强线粒体复合物 I、II、III、IV 及柠檬酸合酶的活性,降低心肌组织中 AMP、ADP 的含量,提升 ATP 的表达,从而提高心肌线粒体含量及 ATP 表达,增强心肌代谢所需的能量供应;(5)与模型组相比,愈心痛胶囊干预可提高心肌组织中线粒体生物合成相关上下游通路中 AMPK、Sirt-1、PGC-1 α 、Tfam 的蛋白及 mRNA 表达,表明其可能通过调控线粒体生物合成通路 AMPK/Sirt-1/PGC-1 α /Tfam 蛋白表达,发挥改善心肌缺血大鼠运动耐量的作用。

左冠状动脉结扎是目前最常用的大鼠心肌缺血造模方法^[16],能有效模拟人类心肌梗死冠脉血运不足的病理过程。本研究采用此方法构建心肌缺血模型,并通过观察造模后是否出现心肌梗死的典型心电图表现对模型进行评估,以保障模型的可靠稳定。冠心病治疗中,曲美他嗪常被作为心肌能量代谢调节剂用于冠心病的临床防治,其可通过抑制脂肪酸 β 氧化关键酶的活性^[17],从而调节心肌能量代谢,提高冠心病患者的运动耐量,作用机制为使心肌细胞的代谢途径由脂肪酸氧化转变为对葡萄糖的氧化利用^[18],从而提高心肌细胞 ATP 合成效率,保证缺血缺氧状态下心肌细胞的能量供应。此外,它还被证明对线粒体具有保护作用^[19],当心肌细胞缺氧时,有氧供能不足,启动无氧酵解,导致钠离子泵功能障碍,钠钙交换增强,造成线粒体内钙离子过载发生肿胀死亡,研究表明曲美他嗪可使细胞钙离子通道蛋白失活从而抑制钙离子内流^[20],减轻钙过载对线粒体造成的损伤。因此,本研究选取曲美他嗪作为阳性对照药,与益气活血中药愈心痛胶囊进行对比探索。

3.1 愈心痛胶囊干预降低心肌细胞凋亡率、心肌损伤标志物表达, 提高心功能

冠心病心肌缺血性损伤过程中, 缺血心肌进行性心室重构^[21], 其中包括细胞外基质增生^[22]、炎性细胞浸润^[23]、心肌细胞的凋亡坏死溶解^[24]等病理过程, 最终导致心功能受损。心肌细胞凋亡是心肌损伤的一种形式^[25], 其可导致心肌细胞死亡, 数量减少, 使心肌损伤范围扩大, 导致心梗面积增加。研究表明, 通过控制心肌细胞凋亡可减少心肌损伤和心梗面积^[26], 抗凋亡干预可减少心肌缺血再损伤的程度, 抑制心肌细胞凋亡可减少心肌肥大和心室重构, 改善心功能^[27,28]。本研究通过心脏 TTC 染色、HE 染色及病理检查、心肌 Tunel 染色探索愈心痛胶囊干预对心肌缺血大鼠心脏及心肌组织形态结构的改变, 结果发现愈心痛胶囊干预可通过抑制心肌细胞凋亡, 降低心肌梗死面积, 减少炎性细胞浸润缓解心肌细胞损伤, 发挥保护心肌的作用。心肌缺血会导致心功能下降, 严重时可诱发心衰。本研究结果提示愈心痛胶囊干预可提高左室射血分数、短轴缩短率, 降低左室舒张末期容积等提高心肌细胞的收缩能力, 增强心功能。此外, 愈心痛胶囊可降低心肌梗死后血清中心肌损伤标志物 CK、CK-MB、LA、LDH、CTn-I、ANP 的表达, 表明其对心肌细胞具有保护作用。

3.2 愈心痛胶囊干预提高大鼠运动耐量

心肌缺血导致心肌受损, 会直接影响心脏收缩能力和血液供应, 导致机体运动能力的下降^[29]。本研究采用小动物跑台实验中运动总时长评估心肌缺血大鼠的整体运动能力, 结果表明造模前组间运动能力无差异, 造模后模型组大鼠运动能力明显下降, 干预治疗后, 模型中愈心痛和曲美他嗪药物干预均表现为运动能力的提高。曲美他嗪在多项临床研究中证实可提高冠心病患者的运动能力^[30,31], 此外在基础研究中曲美他嗪也被证明可通过调控心肌能量代谢, 调节线粒体生物合成功能增强大鼠的运动能力^[32,33]。本研究中曲美他嗪对心肌缺血大鼠运动能力的改善作用与其他研究中结果一致。运动能力表现与机体能量代谢密切相关, 而线粒体提供心肌 95% 的能量供应^[34,35]。故本研究中进一步从线粒体形态结构、数量、生物学功能的角度探索愈心痛干预后运动能力增强的可能原因。

3.3 愈心痛胶囊干预调控线粒体生物合成通路蛋白及 mtDNA 表达

本研究结果表明,愈心痛胶囊干预可保护线粒体结构完整性,减少线粒体肿胀,抑制线粒体内脊受损,降低线粒体空泡变。线粒体生物合成指机体原有线粒体增殖、生长、分裂合成新线粒体的过程^[36],主要涉及线粒体内外膜及线粒体基因组和核基因组编码蛋白的合成与转入,线粒体 DNA 复制,最终使得线粒体数量增多^[37,38]。线粒体生物合成是生物体内线粒体数量和质量的重要调节机制。当机体能量需求增高时,线粒体生物合成通路会被激活以满足能量供应的需要。线粒体生物合成是一个复杂的过程,需要依赖核基因组和线粒体基因组的双重转录来共同调控,以促进线粒体相关蛋白的合成^[39],最终实现线粒体内膜复合物的组装,从而维持机体线粒体的正常代谢。线粒体生物合成过程涉及线粒体核基因表达一系列蛋白协调作用,是维持线粒体 DNA 复制的必须过程^[40]。研究表明,“AMPK/SIRT-1/PGC-1 α /Tfam”通路是调控线粒体生物合成的关键通路^[41]。

AMPK 是一种能量敏感的信号传导分子,被誉为“细胞内的能量传感器”,主要调控细胞内外的能量平衡^[42]。AMPK 主要通过磷酸化被激活,且受到多种因素的影响,包括细胞内能量状态,机体营养供能状态和外界压力刺激等^[43]。心肌缺血缺氧时,细胞内 ATP 水平下降,AMPK 被活化,可通过促进糖原分解、脂肪酸氧化、线粒体生物合成、抑制能量消耗等途径增加细胞内 ATP 供应,而 AMPK 基因敲除小鼠则不存在这种效应^[44,45]。AMPK 可以直接磷酸化 PGC-1 α 进而增加 PGC-1 α 的转录活性促进其蛋白表达^[46,47]。此外,AMPK 还可以通过促进其下游信号调控分子 SIRT-1 的表达^[48],通过 SIRT-1 的脱乙酰作用上调 PGC-1 α 。PGC-1 α 已被证明是调控线粒体生物合成的核心因子,广泛参与到线粒体生物合成等多条代谢途径,被视为控制线粒体功能及能量的动态平衡的效应器^[49,50]。研究表明 PGC-1 α 基因敲除小鼠运动耐量明显下降,线粒体生物合成功能减弱^[51]。PGC-1 α 可与雌激素相关受体 α 、NRF-1 相互作用进一步调控下游 Tfam 等信号分子的表达^[52]。大多数线粒体蛋白质是由核基因编码的,因此,刺激线粒体生物合成的信号需要通过 NRF-1 等转录因子传递到细胞核^[53]。其中 NRF-1 是参与线粒体核基因转录编码线粒体相关蛋白的关键因子,其可结合到核基因的启动子上,激活核基因,靶向调控促进 Tfam 的转录合成^[54],有利于 Tfam 进入线粒体内,调控线粒体基因组的转录,提高了线粒体呼吸链相关蛋白的合成,同时提高了线粒体 DNA 的转录和复制,增强了线粒体生物合成。此外,其还可对抗机体氧化应激造成的线粒体损伤发挥保护线

粒体的作用^[55]。研究表明, NRF-1 基因敲除大鼠可出现线粒体 DNA 的不稳定^[56], NRF-1 的敲除已被证明可以降低 Tfam 表达和 ATP 水平^[57]。

3.4 愈心痛胶囊干预增强心肌线粒体能量代谢, 促进 ATP 合成

细胞内三大能量代谢通路包括^[58]: 氧化磷酸化、三羧酸循环以及 β -氧化, 其中氧化磷酸化是产生 ATP 的最主要方式^[59]。线粒体复合物 I、II、III、IV 和柠檬酸合酶在细胞能量代谢中发挥着重要作用, 它们相互关联并共同参与着三大能量通路的调节与执行。研究表明, 线粒体复合物 I、II、III、IV 的表达与柠檬酸合酶活性存在正相关性^[60]。

线粒体复合物是呼吸链电子传递链中的四个复合物, 由多种亚基组成, 是线粒体内氧化磷酸化产生 ATP 的关键酶群, 共同参与三大能量通路, 其中复合物 I、III、IV 还参与线粒体的电子传递过程, 将氧气与质子结合形成水, 并产生跨膜电势和 ATP。线粒体复合物 I、II、III、IV 的表达和活性受到多种因素及线粒体生物合成的影响。PGC-1 α 过表达可致线粒体复合物 II、IV、V 的 mRNA 以及复合物 I 和 IV 蛋白的表达增加^[61]。此外, 有研究表明, PGC-1 α 过表达也可增强柠檬酸合酶的表达和活性增加, 且被证明与线粒体生物合成相关^[62]。柠檬酸合酶是三羧酸循环中的重要酶类之一, 它在产生能量的过程中起到了关键作用。柠檬酸合酶的主要作用是催化柠檬酸与乙酰辅酶 A 结合形成柠檬酸, 进而参与三羧酸循环生成 ATP^[63]。

我们的研究表明愈心痛胶囊干预增强了 AMPK、SIRT-1、PGC-1 α 、Tfam 的蛋白及 mRNA 的表达, 从而提高了线粒体生物合成。此外, mtDNA 及线粒体复合物 I、II、III、IV、柠檬酸合酶活性也得以增强, 进一步促进线粒体氧化磷酸化进程, 增加了心肌细胞 ATP 的表达。

4 结论

愈心痛胶囊可减轻急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡和心肌缺血损伤, 提高运动耐量, 其机制与其保护心肌线粒体结构完整、增强线粒体 DNA 表达, 促进线粒体氧化磷酸化和生物合成通路蛋白 AMPK/SIRT-1/PGC-1 α /Tfam 的表达有关。

参考文献

- [1] Ait-Aissa K, Blaszkak S C, Beutner G, et al. Mitochondrial Oxidative Phosphorylation defect in the Heart of Subjects with Coronary Artery Disease[J]. Scientific Reports, 2019, 9(1):7623.
- [2] Vidali S, Aminzadeh S, Lambert B, et al. Mitochondria: The ketogenic diet—A metabolism-based therapy[J]. The International Journal of Biochemistry & Cell Biology, 2015, 63: 55-59.
- [3] Ashrafian H, Frenneaux M P, Opie L H. Metabolic Mechanisms in Heart Failure[J]. Circulation, 2007, 116(4): 434-448.
- [4] Dorn G W, Vega R B, Kelly D P. Mitochondrial biogenesis and dynamics in the developing and diseased heart[J]. Genes & Development, 2015, 29(19): 1981-1991.
- [5] MacInnis M J, Zacharewicz E, Martin B J, et al. Superior mitochondrial adaptations in human skeletal muscle after interval compared to continuous single-leg cycling matched for total work[J]. The Journal of Physiology, 2017, 595(9): 2955-2968.
- [6] 王辉, 郭彩杰, 刘万亭, 等. 益气活血中成药提高冠心病病人运动耐量的研究进展[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2019, 17(5): 714-719.
- [7] Li X, Zhao T, Gu J, et al. Intake of flavonoids from Astragalus membranaceus ameliorated brain impairment in diabetic mice via modulating brain-gut axis[J]. Chinese Medicine, 2022, 17(1):22.
- [8] Yu Y, Ding S, Xu X, et al. Integrating Network Pharmacology and Bioinformatics to Explore the Effects of Dangshen (*Codonopsis pilosula*) Against Hepatocellular Carcinoma: Validation Based on the Active Compound Luteolin[J]. Drug Design, Development and Therapy, 2023, 17: 659-673.
- [9] Huang T, Fang F, Chen L, et al. Ginsenoside Rg1 Attenuates Oligomeric A β ₁₋₄₂-Induced Mitochondrial Dysfunction[J]. Current Alzheimer Research, 2012, 9(3): 388-395.
- [10] Ning K, Jiang L, Hu T, et al. ATP-Sensitive Potassium Channels Mediate the Cardioprotective Effect of Panax notoginseng Saponins against Myocardial Ischaemia-Reperfusion Injury and Inflammatory Reaction[J]. BioMed Research International, 2020, 2020: 1-12.

- [11]Li Q, Liang X, Yang Y, et al. Panax notoginseng saponins ameliorate cisplatin-induced mitochondrial injury via the HIF-1 α /mitochondria/ROS pathway[J]. FEBS Open Bio, 2020, 10(1): 118-126.
- [12]雷燕, 刘建勋, 尚晓泓, 等. 愈心痛胶囊对急性心肌缺血犬血浆内皮素和血液流变性的影响[J]. 中国中医药科技, 1996(4): 23-25.
- [13]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[J]. 中国中西医结合杂志, 1996(5): 289-291.
- [14]雷燕, 史大卓, 钟蓓, 等. 愈心痛对犬急性缺血心肌 ECE、NOS 基因表达的影响及铜锌-SOD 免疫组织化学研究[J]. 中国中西医结合杂志, 1997(10): 607-610.
- [15]雷燕, 陈可冀, 尚晓泓, 等. 愈心痛对犬缺血心肌细胞线粒体超微结构损伤保护作用的体视学研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 1997(3): 23-25+64.
- [16]Ku H-C, Chien D-K, Chao C-L, et al. Left Anterior Descending Coronary Artery Ligation for Ischemia-reperfusion Research: Model Improvement via Technical Modifications and Quality Control[J]. Journal of Visualized Experiments, 2022(190):63921.
- [17]Ciapponi A, Pizarro R, Harrison J. Trimetazidine for stable angina[J]. Cochrane Database of Systematic Reviews, 2017, 3(3):CD003614.
- [18]Kantor P F, Lucien A, Kozak R, et al. The Antianginal Drug Trimetazidine Shifts Cardiac Energy Metabolism From Fatty Acid Oxidation to Glucose Oxidation by Inhibiting Mitochondrial Long-Chain 3-Ketoacyl Coenzyme A Thiolase[J]. Circulation Research, 2000, 86(5): 580-588.
- [19]Al-Shorbagy M Y, Wadie W, El-Tanbouly D M. Trimetazidine Modulates Mitochondrial Redox Status and Disrupted Glutamate Homeostasis in a Rat Model of Epilepsy[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 735165.
- [20]Morin D, Sapena R, Elimadi A, et al. [3H]-Trimetazidine mitochondrial binding sites: regulation by cations, effect of trimetazidine derivatives and other agents and interaction with an endogenous substance[J]. British Journal of Pharmacology, 2000, 130(3): 655-663.
- [21]Zhao W, Zhao J, Rong J. Pharmacological Modulation of Cardiac Remodeling after Myocardial Infarction[J]. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2020, 2020: 1-11.
- [22]Frangogiannis N G. The extracellular matrix in ischemic and non-ischemic heart failure[J]. Circulation Research, 2019, 125(1): 117-146.

- [23] Hofmann U, Frantz S. Role of Lymphocytes in Myocardial Injury, Healing, and Remodeling After Myocardial Infarction[J]. *Circulation Research*, 2015, 116(2): 354-367.
- [24] Wu X, He L, Chen F, et al. Impaired Autophagy Contributes to Adverse Cardiac Remodeling in Acute Myocardial Infarction[J]. *PLoS ONE*, 2014, 9(11): 112891.
- [25] Mishra P K, Adameova A, Hill J A, et al. Guidelines for evaluating myocardial cell death[J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2019, 317(5): 891-922.
- [26] Wang T, Li T, Niu X, et al. ADSC-derived exosomes attenuate myocardial infarction injury by promoting miR-205-mediated cardiac angiogenesis[J]. *Biology Direct*, 2023, 18(1): 6.
- [27] Qian W, Wang Z, Xu T, et al. Anti-apoptotic effects and mechanisms of salvianolic acid A on cardiomyocytes in ischemia-reperfusion injury[J]. *Histology and Histopathology*, 2019, 34(3): 223-231.
- [28] Chen Z, Wu J, Li S, et al. Inhibition of Myocardial Cell Apoptosis Is Important Mechanism for Ginsenoside in the Limitation of Myocardial Ischemia/Reperfusion Injury[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2022, 13:806216.
- [29] Shimokawa H, Yasuda S. Myocardial ischemia: Current concepts and future perspectives[J]. *Journal of Cardiology*, 2008, 52(2): 67-78.
- [30] Coats C J, Pavlou M, Watkinson O T, et al. Effect of Trimetazidine Dihydrochloride Therapy on Exercise Capacity in Patients With Nonobstructive Hypertrophic Cardiomyopathy[J]. *JAMA Cardiology*, 2019, 4(3): 230.
- [31] Ajabnoor A, Mukhtar A. Effect of trimetazidine on the functional capacity of ischemic heart disease patients not suitable for revascularization: Meta-analysis of randomized controlled trials[J]. *PLOS ONE*, 2022, 17(2): 0263932.
- [32] Zhang H, Liu M, Zhang Y, et al. Trimetazidine Attenuates Exhaustive Exercise-Induced Myocardial Injury in Rats via Regulation of the Nrf2/NF- κ B Signaling Pathway[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10: 175.
- [33] Xie M, Jiang L, Dun Y, et al. Trimetazidine combined with exercise improves exercise capacity and anti-fatal stress ability through enhancing mitochondrial quality control[J]. *Life Sciences*, 2019, 224: 157-168.
- [34] Heden T D, Johnson J M, Ferrara P J, et al. Mitochondrial PE potentiates respiratory enzymes to amplify skeletal muscle aerobic capacity[J]. *Science Advances*, 2019, 5(9): 8352.

- [35]Hargreaves M, Spriet L L. Skeletal muscle energy metabolism during exercise[J]. *Nature Metabolism*, 2020, 2(9): 817-828.
- [36]Popov L. Mitochondrial biogenesis: An update[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2020, 24(9): 4892-4899.
- [37]Wenz T. Regulation of mitochondrial biogenesis and PGC-1 α under cellular stress[J]. *Mitochondrion*, 2013, 13(2): 134-142.
- [38]Scarpulla R C. Transcriptional Paradigms in Mammalian Mitochondrial Biogenesis and Function[J]. *Physiological Reviews*, 2008, 88(2): 611-638.
- [39]Kummer E, Ban N. Mechanisms and regulation of protein synthesis in mitochondria[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2021, 22(5): 307-325.
- [40]Uittenbogaard M, Chiaramello A. Mitochondrial Biogenesis: A Therapeutic Target for Neurodevelopmental Disorders and Neurodegenerative Diseases[J]. *Current Pharmaceutical Design*, 2014, 20(35): 5574-5593.
- [41]Finck B N, Kelly D P. Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Coactivator-1 (PGC-1) Regulatory Cascade in Cardiac Physiology and Disease[J]. *Circulation*, 2007, 115(19): 2540-2548.
- [42]Hardie D G, Schaffer B E, Brunet A. AMPK: An Energy-Sensing Pathway with Multiple Inputs and Outputs[J]. *Trends in Cell Biology*, 2016, 26(3): 190-201.
- [43]Lee H, Zandkarimi F, Zhang Y, et al. Energy-stress-mediated AMPK activation inhibits ferroptosis[J]. *Nature Cell Biology*, 2020, 22(2): 225-234.
- [44]Zarrinpashneh E, Carjaval K, Beauloye C, et al. Role of the $\alpha 2$ -isoform of AMP-activated protein kinase in the metabolic response of the heart to no-flow ischemia[J]. *American Journal of Physiology-Heart and Circulatory Physiology*, 2006, 291(6): 2875-2883.
- [45]Jørgensen S B, Wojtaszewski J F P, Viollet B, et al. Effects of α -AMPK knockout on exercise-induced gene activation in mouse skeletal muscle[J]. *The FASEB Journal*, 2005, 19(9): 1146-1148.
- [46]Wu J, Li J, Feng B, et al. Activation of AMPK-PGC-1 α pathway ameliorates peritoneal dialysis related peritoneal fibrosis in mice by enhancing mitochondrial biogenesis[J]. *Renal Failure*, 2022, 44(1): 1546-1558.

- [47] Jäger S, Handschin C, St.-Pierre J, et al. AMP-activated protein kinase (AMPK) action in skeletal muscle via direct phosphorylation of PGC-1 α [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2007, 104(29): 12017-12022.
- [48] Cantó C, Gerhart-Hines Z, Feige J N, et al. AMPK regulates energy expenditure by modulating NAD⁺ metabolism and SIRT1 activity[J]. *Nature*, 2009, 458(7241): 1056-1060.
- [49] Austin S, St-Pierre J. PGC1 α and mitochondrial metabolism – emerging concepts and relevance in ageing and neurodegenerative disorders[J]. *Journal of Cell Science*, 2012, 125(21): 4963-4971.
- [50] Halling J F, Pilegaard H. PGC-1 α -mediated regulation of mitochondrial function and physiological implications[J]. *Applied Physiology, Nutrition, and Metabolism*, 2020, 45(9): 927-936.
- [51] Arany Z, He H, Lin J, et al. Transcriptional coactivator PGC-1 α controls the energy state and contractile function of cardiac muscle[J]. *Cell Metabolism*, 2005, 1(4): 259-271.
- [52] Jornayvaz F R, Shulman G I. Regulation of mitochondrial biogenesis[J]. *Essays in Biochemistry*, 2010, 47: 69-84.
- [53] Leigh-Brown S, Enriquez J, Odom D T. Nuclear transcription factors in mammalian mitochondria[J]. *Genome Biology*, 2010, 11(7): 215.
- [54] Li Z, Cogswell M, Hixson K, et al. Nuclear Respiratory Factor 1 (NRF-1) Controls the Activity Dependent Transcription of the GABA-A Receptor Beta 1 Subunit Gene in Neurons[J]. *Frontiers in Molecular Neuroscience*, 2018, 11: 285.
- [55] Li P A, Hou X, Hao S. Mitochondrial biogenesis in neurodegeneration[J]. *Journal of Neuroscience Research*, 2017, 95(10): 2025-2029.
- [56] Nanjaiah H, Vallikannan B. Lutein upregulates the PGC-1 α , NRF1, and TFAM expression by AMPK activation and downregulates ROS to maintain mtDNA integrity and mitochondrial biogenesis in hyperglycemic ARPE-19 cells and rat retina[J]. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 2019, 66(6): 999-1009.
- [57] Piantadosi C A, Suliman H B. Mitochondrial Transcription Factor A Induction by Redox Activation of Nuclear Respiratory Factor 1[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281(1): 324-333.

- [58]Rigoulet M, Bouchez C L, Paumard P, et al. Cell energy metabolism: An update[J]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 2020, 1861(11): 148276.
- [59]Fan J, Kamphorst J J, Mathew R, et al. Glutamine-driven oxidative phosphorylation is a major ATP source in transformed mammalian cells in both normoxia and hypoxia[J]. *Molecular Systems Biology*, 2013, 9(1): 712.
- [60]Singh N, Hroudová J, Fišar Z. Cannabinoid-Induced Changes in the Activity of Electron Transport Chain Complexes of Brain Mitochondria[J]. *Journal of Molecular Neuroscience*, 2015, 56(4): 926-931.
- [61]Miura S, Tomitsuka E, Kamei Y, et al. Overexpression of Peroxisome Proliferator-Activated Receptor γ Co-Activator-1 α Leads to Muscle Atrophy with Depletion of ATP[J]. *The American Journal of Pathology*, 2006, 169(4): 1129-1139.
- [62]Little J P, Safdar A, Wilkin G P, et al. A practical model of low-volume high-intensity interval training induces mitochondrial biogenesis in human skeletal muscle: potential mechanisms[J]. *The Journal of Physiology*, 2010, 588(6): 1011-1022.
- [63]Steffens L, Pettinato E, Steiner T M, et al. High CO₂ levels drive the TCA cycle backwards towards autotrophy[J]. *Nature*, 2021, 592(7856): 784-788.

结语

本研究通过多中心、随机双盲、安慰剂对照临床研究和动物研究，对愈心痛胶囊改善运动能力的疗效及安全性进行了观察，并基于线粒体生物合成代谢通路进行了机制探索。

结论

1.在西医常规治疗基础上联合应用愈心痛胶囊 12 周，可提高稳定性冠心病患者心肺运动试验的峰值摄氧量、无氧阈值、代谢当量，提高生活质量和降低气虚血瘀证候积分。

2.愈心痛胶囊可减轻急性心肌梗死大鼠心肌细胞凋亡和心肌缺血损伤，提高运动耐量，其机制与其保护心肌线粒体结构完整、增强线粒体 DNA 的表达，促进线粒体氧化磷酸化和生物合成通路蛋白 AMPK/SIRT-1/PGC-1 α /Tfam 的表达有关。

创新点

1.本研究是首个基于多中心、随机双盲安慰剂对照研究设计评价益气活血方愈心痛胶囊对稳定性冠心病患者运动耐量改善的临床研究。本研究采用最新国际指南推荐的心肺运动试验（指标包括峰值摄氧量、无氧阈值等）为受试者运动耐量的主要评价方法，基于循证医学方法客观评价西药常规治疗联合益气活血方药改善 SCAD 运动耐量及生活质量的疗效优势，以为 SCAD 中医药诊疗规范、指南的建立提供高级别证据。

2.基于大鼠左冠脉结扎构建的心肌缺血模型，通过大鼠跑台实验，结合透射电镜、免疫印迹、实时荧光定量 PCR 等技术，从线粒体生物合成通路角度，结合 ATP 生成各环节蛋白及关键酶学的表达情况，探索阐释了益气活血中药愈心痛胶囊增加心肌缺血大鼠的运动能力的可能作用机制。

不足与展望

本研究开展期内，因新型冠状病毒肺炎区域性管控，部分医院患者的随访受到严重影响，导致部分受试者在访视窗内未能如期开展随访。因此受试者未能在最佳药物疗效访视窗内开展相应的疗效评价。本研究仅干预 3 个月，对药物干预的远期疗效未能展开评价。动物实验中，本研究证实愈心痛胶囊可从线粒体生物合成方向提供了心肌能量供应，改善大鼠运动能力，但是否影响心肌能量供应的其他代谢途径如糖脂代谢通路等。这些都值得进一步的深入研究。

附录

附录 1 西雅图心绞痛量表

1.过去 4 周内, 由于胸痛、胸部紧榨感和心绞痛所致下列各项受限程度:						
评价项目	重度受限 (1 分)	中度受限 (2 分)	轻度受限 (3 分)	稍受限 (4 分)	不受限 (5 分)	因其它原因受限(6 分)
自己穿衣	☐	☐	☐	☐	☐	
室内走路	☐	☐	☐	☐	☐	
淋 浴	☐	☐	☐	☐	☐	
爬坡或楼梯(三层, 不停)	☐	☐	☐	☐	☐	
户外活动或提杂物	☐	☐	☐	☐	☐	
轻快步行一段路(一公里)	☐	☐	☐	☐	☐	
慢跑(一公里)	☐	☐	☐	☐	☐	
提起或移动重物	☐	☐	☐	☐	☐	
剧烈运动(如游泳或打球)	☐	☐	☐	☐	☐	
2.与 4 周前比较, 做最大强度的活动时, 胸痛、胸部紧榨感和心绞痛的发作情况:						
☐ 明显增加(1 分) ☐ 轻微增加(2 分) ☐ 相同(3 分) ☐ 轻微减少(4 分) ☐ 明显减少(5 分)						
3.过去 4 周内, 胸痛、胸部紧榨感和心绞痛的平均发作次数:						
☐ ≥4 次/天(1 分) ☐ 1-3 次/天(2 分) ☐ ≥3 次/周(3 分) ☐ 1-2 次/周(4 分) ☐ <1 次/周(5 分) ☐ 无发作(6 分)						
4.过去 4 周内, 因胸痛、胸部紧榨感和心绞痛服用硝基药物(如硝酸甘油)平均次数:						
☐ ≥4 次/天(1 分) ☐ 1-3 次/天(2 分) ☐ ≥3 次/周(3 分) ☐ 1-2 次/周(4 分) ☐ <1 次/周(5 分) ☐ 没使用(6 分)						
5.因胸痛、胸部紧榨感和心绞痛遵守医嘱服药带来的烦恼:						

☐ 严重 (1 分)	☐ 中度 (2 分)	☐ 轻微 (3 分)
☐ 极少 (4 分)	☐ 无 (5 分)	☐ 医生未给药 (6 分)

6. 对治疗胸痛、胸部紧榨感和心绞痛的各种措施的满意程度:

☐ 不满意 (1 分)	☐ 大部分不满意 (2 分)	☐ 部分满意 (3 分)
☐ 大部分满意 (4 分)	☐ 高度满意 (5 分)	

7. 对医生就胸痛、胸部紧榨感和心绞痛的解释满意程度:

☐ 不满意 (1 分)	☐ 大部分不满意 (2 分)	☐ 部分满意 (3 分)
☐ 大部分满意 (4 分)	☐ 高度满意 (5 分)	

8. 总的来说, 对目前胸痛、胸部紧榨感和心绞痛的治疗满意程度:

☐ 不满意 (1 分)	☐ 大部分不满意 (2 分)	☐ 部分满意 (3 分)
☐ 大部分满意 (4 分)	☐ 高度满意 (5 分)	

9. 过去 4 周内, 因胸痛、胸部紧榨感和心绞痛影响生活乐趣的程度:

☐ 严重 (1 分)	☐ 中度 (2 分)	☐ 轻微 (3 分)
☐ 极少 (4 分)	☐ 无影响 (5 分)	

10. 在您的未来生活中如果还有胸痛、胸部紧榨感和心绞痛, 您会感觉怎样:

☐ 不满意 (1 分)	☐ 大部分不满意 (2 分)	☐ 部分满意 (3 分)
☐ 大部分满意 (4 分)	☐ 高度满意 (5 分)	

11. 心脏病发作和突然死亡的担心程度:

☐ 一直担心 (1 分)	☐ 经常担心 (2 分)	☐ 有时担心 (3 分)
☐ 很少担心 (4 分)	☐ 绝不担心 (5 分)	

附录 2 SF-36 生活质量量表

1、总体来讲，您的健康状况是：			
□非常好（5 分） □很好（4.4 分） □好（3.4 分） □一般（2 分） □差（1 分）			
2、跟一年前相比，您觉得您现在的健康状况是：			
□比 1 年前好多了（5 分） □比 1 年前好一些（4 分） □跟 1 年前差不多（3 分）			
□比 1 年前差一些（2 分） □比 1 年前差多了（1 分）			
3、以下这些问题都和日常活动有关。请您想一想，您的健康状况是否限制了这些活动？如果有限制，程度如何？	限制很大 (1 分)	有一点限制 (2 分)	毫无限制 (3 分)
(1) 重体力活动。如跑步、举重、参加剧烈运动等	☐	☐	☐
(2) 适度的活动。如移动一张桌子、扫地、打太极拳、做简单体操等	☐	☐	☐
(3) 手提日用品。如买菜、购物等	☐	☐	☐
(4) 上几层楼梯	☐	☐	☐
(5) 上一层楼梯	☐	☐	☐
(6) 弯腰、屈膝、下蹲	☐	☐	☐
(7) 步行 1500 米左右的路程	☐	☐	☐
(8) 步行 800 米左右的路程	☐	☐	☐
(9) 步行约 100 米的路程	☐	☐	☐
(10) 自己洗澡、穿衣	☐	☐	☐
4、在过去 4 个星期里，您的工作和日常活动有无因为身体健康的原因而出现以下这些问题？	是 (1 分)		不是 (2 分)
(1) 减少了工作或其他活动的时间	☐		☐
(2) 本来想要做的事情只能完成一部分	☐		☐
(3) 想要做的工作或活动的种类受到限制	☐		☐
(4) 完成工作或其他活动有困难（比如，需要额外的努力）	☐		☐
5、在过去 4 个星期里，您的工作和日常活动有无因为情绪的原因（如压抑或忧虑）而出现以下这些问题？	是 (1 分)		不是 (2 分)
(1) 减少了工作或其它活动的时间	☐		☐
(2) 本来想要做的事情只能完成一部分	☐		☐

(3) 做事情不如平时仔细	☐	☐
6、在过去 4 个星期里，您的健康或情绪不好在多大程度上影响了您与家人、朋友、邻居或集体的正常社会交往？ ☐有极大影响（1 分）☐有较大影响（2 分）☐有中度影响（3 分） ☐很少有影响（4 分）☐根本没有影响（5 分）		
7、在过去 4 个星期里，您有身体疼痛吗？ ☐①完全没疼痛（6 分）☐②有很轻微疼痛（5.4 分）☐③有轻微疼痛（4.2 分） ☐④有中度疼痛（3.1 分）☐⑤有严重疼痛（2.2 分）☐⑥有很严重疼痛（1 分）		
8、在过去 4 个星期里，您的身体疼痛影响了您的工作和家务吗？： ☐①完全没有影响☐②有一点影响☐③中等影响☐④影响很大☐⑤影响非常大 评分说明： 若条目 7 未作回答，则条目 8 得分依次为 6，4.75，3.5，2.25，1.0； 若条目 7 与条目 8 选项均为“①”，则条目 8 得分为 6； 若条目 7 选项为“②～⑥”任意一项，而条目 8 选项为“①”时，则条目 8 得分为 5； 若条目 7 选项为“②～⑥”任意一项时，条目 8 选项②～⑤得分依次为 4，3，2，1		
您的感觉		
9、以下这些问题有关过去 1 个月里您的感觉如何以及您的情况如何		
(1) 您觉得生活充实吗 ☐所有的时间（6 分）☐大部分时间（5 分）☐比较多时间（4 分） ☐一部分时间（3 分）☐小部分时间（2 分）☐没有这种感觉（1 分）		
(2) 您是一个敏感的人吗 ☐所有的时间（1 分）☐大部分时间（2 分）☐比较多时间（3 分） ☐一部分时间（4 分）☐小部分时间（5 分）☐没有这种感觉（6 分）		
(3) 您的情绪非常不好，什么事都不能使您高兴起来 ☐所有的时间（1 分）☐大部分时间（2 分）☐比较多时间（3 分） ☐一部分时间（4 分）☐小部分时间（5 分）☐没有这种感觉（6 分）		
(4) 您的心理很平静吗 ☐所有的时间（1 分）☐大部分时间（2 分）☐比较多时间（3 分） ☐一部分时间（4 分）☐小部分时间（5 分）☐没有这种感觉（6 分）		

(5) 您做事精力充沛吗 ☐所有的时间 (6 分) ☐大部分时间 (5 分) ☐比较多时间 (4 分) ☐一部分时间 (3 分) ☐小部分时间 (2 分) ☐没有这种感觉 (1 分)
(6) 您的情绪低落吗 ☐所有的时间 (1 分) ☐大部分时间 (2 分) ☐比较多时间 (3 分) ☐一部分时间 (4 分) ☐小部分时间 (5 分) ☐没有这种感觉 (6 分)
(7) 您觉得筋疲力尽吗 ☐所有的时间 (1 分) ☐大部分时间 (2 分) ☐比较多时间 (3 分) ☐一部分时间 (4 分) ☐小部分时间 (5 分) ☐没有这种感觉 (6 分)
(8) 您是个快乐的人吗 ☐所有的时间 (6 分) ☐大部分时间 (5 分) ☐比较多时间 (4 分) ☐一部分时间 (3 分) ☐小部分时间 (2 分) ☐没有这种感觉 (1 分)
(9) 您感觉厌烦 ☐所有的时间 (1 分) ☐大部分时间 (2 分) ☐比较多时间 (3 分) ☐一部分时间 (4 分) ☐小部分时间 (5 分) ☐没有这种感觉 (6 分)
(10) 您的健康限制了您的社交活动吗 (如走亲访友) ☐所有的时间 (1 分) ☐大部分时间 (2 分) ☐比较多时间 (3 分) ☐一部分时间 (4 分) ☐小部分时间 (5 分) ☐没有这种感觉 (6 分)
10、请看下列每一条问题, 哪一种答案最符合您的情况?
(1) 我好像比别人容易生病 ☐绝对正确 (1 分) ☐大部分正确 (2 分) ☐不能肯定 (3 分) ☐大部分错误 (4 分) ☐绝对错误 (5 分)
(2) 我跟周围人一样健康 ☐绝对正确 (5 分) ☐大部分正确 (4 分) ☐不能肯定 (3 分) ☐大部分错误 (2 分) ☐绝对错误 (1 分)
(3) 我认为我的健康状况在变坏 ☐绝对正确 (1 分) ☐大部分正确 (2 分) ☐不能肯定 (3 分) ☐大部分错误 (4 分) ☐绝对错误 (5 分)
(4) 我的健康状况非常好

☐绝对正确（5分）☐大部分正确（4分）☐不能肯定（3分）

☐大部分错误（2分）☐绝对错误（1分）

附录3 气虚血瘀症状疗效评分量表

主症	症状	评分
胸痛		
正常:	无	0 分
轻度:	发作时经休息即缓解	1 分
中度:	发作时需药物缓解, 可进行正常活动	2 分
重度:	发作频繁, 影响日常生活	3 分
胸闷		
正常:	无	0 分
轻度:	偶感胸闷, 可自行缓解	1 分
中度:	频繁发作, 但不影响生活和工作	2 分
重度:	频繁发作, 影响生活和工作	3 分
次症	症状	评分
心悸		
正常:	无	0 分
轻度:	偶发心悸, 可自行缓解	1 分
中度:	频繁发作, 但能坚持工作	2 分
重度:	频繁发作, 影响生活和工作	3 分
气短		
正常:	无	0 分
轻度:	快步行走后气短	1 分
中度:	缓慢行走即气短	2 分
重度:	不活动亦气短	3 分
神疲乏力		
正常:	无	0 分
轻度:	劳则即乏	1 分
中度:	轻微劳动即乏	2 分
重度:	影响生活和工作	3 分
唇色紫暗		

无:	无	0 分
有:	唇色紫或暗	1 分