

基于血小板代谢组学探讨冠心病血瘀证的潜在生物标志物及血小板代谢紊乱与心肌损伤的关联

赵彦禛, 白思杨, 简维雄*, 周曼丽*

(湖南中医药大学 中医学院, 中医诊断学湖南省重点实验室, 长沙 410208)

[摘要] 目的:采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS),探究冠心病(CHD)血瘀证(BSS)大鼠的血小板代谢组学特征,挖掘潜在生物标志物和代谢通路信息,阐释血小板代谢紊乱与心肌损伤的关联机制。方法:将12只大鼠随机分为正常组和模型组。采用持续高脂喂养,分次维生素D₃灌胃联合异丙肾上腺素皮下注射的方式建立CHD-BSS大鼠模型,观察两组大鼠标准Ⅱ导联心电图变化及心肌组织病理学改变,评价模型组大鼠心肌损伤情况。对两组大鼠血小板样本的非靶向代谢组学数据完成预处理后,依次开展多元统计分析 with 差异筛选,通过主成分分析(PCA)验证样本组间代谢轮廓的分离效果,再构建正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)模型,结合模型参数筛选潜在差异代谢物。联合代谢物表达倍数变化完成二次筛选,最终确定组间显著差异代谢物,并基于差异代谢物开展代谢通路富集分析,最后基于受试者工作特征(ROC)曲线确定潜在的血小板特异性生物标志物。结果:与正常组比较,模型组心电图J点上抬明显,S-T段升高>0.1 mV;模型组心肌组织出现纤维松散、细胞空泡变性等病理性损伤;模型组有370个差异代谢物水平紊乱,涉及嘌呤代谢、花生四烯酸代谢、氧化磷酸化、腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路等8条显著富集的代谢通路,富集于这些代谢通路上的9个差异代谢物的含量差异均具有统计学意义;ROC曲线分析显示,特征代谢物曲线下面积均>0.8,其中1-磷酸二氢鞘氨醇、1-磷酸鞘氨醇、12-酮基白三烯B₄和14,15-二羟基二十碳三烯酸这4种代谢物曲线下面积达1.0,可作为潜在生物标志物。结论:CHD-BSS大鼠血小板代谢特征发生显著改变,筛选出的潜在生物标志物具备良好的诊断效能,其介导的炎症反应、血栓形成、能量代谢紊乱等病理变化,是血小板异常活化并进一步诱发心肌损伤的重要机制,血小板代谢组学可为CHD-BSS的生物标志物筛选与病理机制研究提供新视角。

[关键词] 冠心病; 血瘀证; 血小板; 代谢组学; 生物标志物; 心肌损伤

[中图分类号] R242;R541;R256 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2026)17-0239-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20260661

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.r.20260603.1836.004>

[网络出版日期] 2026-06-04 11:33:25 **[增强出版附件]** 内容详见 <http://www.syfjxzz.com> 或 <http://cnki.net>



Exploring Potential Biomarkers of Blood Stasis Syndrome in Coronary Heart Disease and Association Between Platelet Metabolic Disorder and Myocardial Injury Based on Platelet Metabolomics

ZHAO Yanzhen, BAI Siyang, JIAN Weixiong*, ZHOU Manli*

(Hunan Provincial Key Laboratory of Traditional Chinese Medicine Diagnostics, College of Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the platelet metabolomic characteristics of the rat model of coronary heart disease (CHD) with blood stasis syndrome (BSS) based on ultra-high performance liquid chromatography coupled with quadrupole-Orbitrap high-resolution mass spectrometry (UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS), screen potential biomarkers and metabolic pathway information, and elucidate the association mechanism between platelet metabolic disorders and myocardial injury. **Methods:**

[收稿日期] 2026-01-27

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82374334);湖南省卫生健康科研课题(Z2023XJYB07)

[第一作者] 赵彦禛,在读博士,副主任医师,从事中医心病证治机制研究,E-mail:472903069@qq.com

[通信作者] * 简维雄,博士,教授,从事中医心病证治机制研究,Tel:0731-8845821,E-mail:daxiong20001977@163.com;

* 周曼丽,博士,主治医师,从事中医心病证治机制研究,E-mail:1378327198@qq.com。

A total of 12 rats were randomized into a normal group and a model group. The rat model of CHD-BSS was established by continuous high-fat feeding, intragastric administration of vitamin D3 in divided doses combined with subcutaneous injection of isoproterenol. Additionally, changes in standard lead II electrocardiogram (ECG) and myocardial histopathological alterations of rats in the two groups were observed to evaluate myocardial injury in the model group. After preprocessing of the untargeted metabolomic data of platelet samples from the two groups, multivariate statistical analysis and differential screening were performed sequentially. Principal component analysis (PCA) was performed to verify the separation of metabolic profiles of samples between groups. An orthogonal partial least squares-discriminant analysis (OPLS-DA) model was then constructed to preliminarily screen potential differential metabolites based on model parameters. Secondary screening was conducted with the fold change of metabolite expression to finally identify metabolites with significant intergroup differences, and metabolic pathway enrichment analysis was carried out based on these differential metabolites. Finally, potential platelet-specific biomarkers were identified based on receiver operating characteristic (ROC) curves. **Results:** Compared with the normal group, the model group presented obvious elevation of the J point and an ST-segment elevation greater than 0.1 mV on ECG, as well as pathological injuries such as loose arrangement of fibers and cellular vacuolar degeneration in the myocardial tissue. A total of 370 differentially expressed metabolites were dysregulated in the model group, involving 8 significantly enriched metabolic pathways, such as purine metabolism, arachidonic acid metabolism, oxidative phosphorylation and adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway. Nine differential metabolites enriched in these pathways showed statistically significant differences in content. ROC curve analysis revealed that the area under the curve (AUC) of all characteristic metabolites was higher than 0.8. Among them, the AUC values of four metabolites, including sphinganine 1-phosphate, sphingosine 1-phosphate, 12-ketoleukotriene B₄ and 14, 15-dihydroxyeicosatrienoic acid, reached 1.0, indicating their potential as biomarkers. **Conclusion:** Platelet metabolic characteristics are significantly altered in the rat model of CHD-BSS. The screened potential biomarkers possess favorable diagnostic performance. The pathological changes mediated by these metabolites, including inflammatory response, thrombosis, and energy metabolism disorders, serve as critical mechanisms for abnormal platelet activation and subsequent myocardial injury. Platelet metabolomics provides a new perspective for the screening of biomarkers and research on pathological mechanisms of CHD-BSS.

[Keywords] coronary heart disease; blood stasis syndrome; platelets; metabolomics; biomarker; myocardial injury

冠心病(CHD)是全球心血管疾病致死的主要原因之一,以心肌缺血缺氧性损伤为核心病理特征,严重威胁人类生命健康^[1]。血瘀证(BSS)是CHD最核心、最常见的中医证型,其核心病机为血液循环异常,涉及凝血纤溶失衡、血液流变学异常、血流动力学紊乱等多个方面^[2],临床可见胸痛、胸闷、舌质紫暗、脉涩等典型表现,也是中医活血化瘀法治疗CHD的核心辨证依据^[3]。现代药理与病理研究证实,血小板功能异常与冠心病血瘀证(CHD-BSS)的发生发展存在紧密的因果关联,BSS可诱导血小板异常活化,而活化的血小板又会进一步加剧血栓形成与微循环障碍,形成“血瘀-血小板活化-心肌缺血”的病理循环^[4-5],当血小板聚集于冠脉斑块表面形成血栓时,可直接引发心肌缺血性坏死^[6]。因此,血小板成为探究CHD-BSS病理机制与生物标志物的关键靶点。

代谢组学作为系统生物学的重要分支,能够精准捕捉生物样本中内源性代谢物的整体变化,是揭示中医证型物质基础的重要技术手段^[7]。目前关于CHD-BSS的代谢组学研究多集中于血清、血浆、心肌组织、尿液等样本,已发现嘌呤代谢、脂代谢、能量代谢等通路紊乱与该证型密切相关^[8-9],但以血小板为研究对象的病证结合代谢组学研究仍处于空白阶段。血小板作为代谢活性极强的细胞,其代谢

轮廓的变化可直接反映自身活化状态及与血管内皮、炎症细胞的相互作用,相较于外周血液样本,血小板代谢组学更能精准揭示BSS“血行不畅、瘀阻脉道”的核心病理环节的分子机制。

近年来,诸多研究围绕CHD-BSS的生物标志物展开探索,发现血小板活化因子、炎症因子、脂质代谢物等可作为潜在诊断指标,但单一标志物的特异性与灵敏度均存在局限^[10-11],且尚未从血小板代谢整体层面筛选兼具诊断价值与病理意义的特征标志物。同时,现有研究多聚焦于代谢通路的单一紊乱,未明确血小板代谢异常引发心肌损伤的具体生物学链条,难以全面阐释CHD-BSS“血小板异常-代谢紊乱-心肌损伤”的病理关联。

本研究通过观察CHD-BSS模型大鼠的一般表型、心脏宏观形态等整体病理变化,再结合心电图、心肌组织病理学检测评价心肌损伤,最后采用非靶向代谢组学技术分析血小板代谢轮廓,筛选差异代谢物与核心通路,基于所得的代谢物表达数据与通路富集结果,分析核心差异代谢物与血小板活化、聚集的内在调控相关性,旨在筛选兼具诊断价值与病理意义的CHD-BSS血小板生物标志物,阐明血小板代谢紊乱介导心肌损伤的机制,从血小板代谢角度拓展CHD-BSS的生物学基础,为临床诊断提供新型候选标志物,同时为活血化瘀中药研发提示新靶点。

1 材料

1.1 动物 12只雄性SD大鼠,体质量200~220 g,购自湖南斯莱克景达动物有限公司,合格证号SCXK(湘)2019-0004。动物饲养于湖南中医药大学SPF级实验动物中心,平均每笼3只大鼠,内环境温度维持在22~26℃,相对湿度为50%~70%,自由饮食、饮水,适应性喂养1周后开始正式实验。

1.2 伦理 本研究已通过湖南中医药大学动物伦理委员会审查,审批号LL2020071702。

1.3 仪器 MP150-型16导联生理记录仪(美国Biopac公司),ACQMITY MPLC I-Class plus型高效液相色谱仪(美国Waters公司),Q Exactive型轨道阱高分辨质谱仪(美国赛默飞世尔科技公司),Moticam Pro 205A型生物显微镜(麦克奥迪实业集团有限公司),Scientz-II D型超声波细胞粉碎机(宁波新芝生物科技股份有限公司),TGL-16MS型台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司),LNG-T98型冷冻浓缩离心干燥器(太仓市华美生化仪器厂)。

1.4 试剂 4%多聚甲醛固定液(北京兰杰柯科技有限公司,货号BL539A);苏木素-伊红(HE)染色试剂盒(北京索莱宝科技有限公司,货号G1126);维生素D₃粉剂(湖北楚米生物科技有限公司,货号2022092101);盐酸异丙肾上腺素(合肥巴斯夫生物科技有限公司,货号Y0102-1Q);甲醇、L-2-氯苯丙氨酸、乙腈、三氯甲烷、甲酸均为色谱纯其余试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 实验分组与造模 12只雄性SD大鼠随机分为模型组和正常组,每组各6只。根据课题组前期已成熟的造模方式^[8],持续高脂喂养,分次维生素D₃灌胃联合异丙肾上腺素皮下注射建立CHD-BBS大鼠模型。造模结束后,利用MP150型16导联生理记录仪检测两组大鼠Ⅱ导联心电图变化,以心电图J点抬高≥0.1 mV为成模标准。

2.2 宏观生理病理观察 造模结束后,首先观察并记录两组大鼠的一般表型,包括精神状态、活动度、毛色、饮食饮水情况、耳廓与尾尖色泽等BSS相关表型

2.3 心电图检测 大鼠经麻醉后取仰卧位固定于操作台,将电极针分别插入左上肢/下肢、右上肢/下肢,待大鼠状态平稳后,通过MP150型16导联生理记录仪连接电脑,采集两组标准Ⅱ导联心电图波形,分析J点、S-T段、T波等指标变化。

2.4 样品采集 使用2 mL柠檬酸钠抗凝管采集大鼠经腹主动脉血液,经4℃、1 200 r·min⁻¹离心10 min(离心半径10 cm,下同),分离上层血浆后再3 000 r·min⁻¹离心10 min提取上清液,再对提取的上清液4℃、1 200×g离心10 min,留下血小板沉淀物,并以50~100 μL分装至离心管中置于-80℃超低温冰箱保存备用。取血后解剖大鼠,快速开胸取心脏,去除心包及结缔组织,观察并记录心脏的大小、形态、色泽、质地,测量心脏质量与左心室厚度,比较两组心脏宏观形态学差异。

2.5 HE染色观察心肌组织病理结构 取大鼠心肌组织,经4%多聚甲醛固定、梯度脱水、透明、浸蜡、包埋后制作石蜡切片,厚度5 μm;依次进行苏木素染色、分化、伊红染色,脱水、透明、中性树胶封片;在生物显微镜(×20)下观察心肌组织病理形态,记录心肌纤维排列、细胞形态、细胞核变化及炎症浸润情况。

2.6 血小板样本制备 在检测之前先对血小板样本进行预处理:①甲醇-水(4:1)1 mL将样本分次转移到玻璃小瓶中后加入三氯甲烷200 μL;②冰浴超声破碎3 min(功率500 W,频率20 kHz)后将液体转移到离心管中,加入内标20 μL(L-2-氯苯丙氨酸甲醇溶液,0.1 g·L⁻¹);③低温超声提取(频率20 kHz),4℃、13 000 r·min⁻¹离心10 min,再进行复溶、涡旋,然后使用注射器吸取上清液150 μL,经过滤后转移至进样瓶,-80℃超低温保存。所有提取试剂使用前均在-20℃进行预冷。

2.7 代谢组学简称条件 采用超高效液相色谱-四极杆-静电场轨道阱高分辨质谱法(UPLC-Q-Exactive Orbitrap-MS)检测。色谱条件为ACQUITY UPLC HSS T3色谱柱(2.1 mm×100 mm, 1.8 μm),柱温45℃,流速0.35 mL·min⁻¹,进样量5 μL,流动相A为0.1%甲酸水溶液,流动相B为乙腈,梯度洗脱(0~2 min, 95%A; 2~4 min, 95%~70%A; 4~8 min, 70%~50%A; 8~10 min, 50%~20%A; 10~15 min, 20%~0%A; 15~16 min, 0%~95%A)。质谱条件为电喷雾离子源(ESI),在正、负离子模式下进行全扫描及数据依赖性二级质谱(Full Scan/dd-MS²)采集。扫描范围均为m/z 100~1 200。正离子模式喷雾电压为3.8 kV,负离子模式为-3.0 kV;辅助加热器温度350℃,毛细管温度320℃。一级全扫描分辨率设为70 000,二级扫描分辨率设为17 500。

2.8 代谢组学数据分析 采用Progenesis QI v3.0

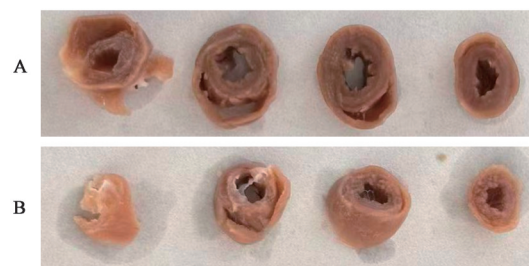
软件对原始质谱数据进行基线过滤、峰识别、积分、保留时间校正、峰对齐和归一化处理;基于精确质量数、二级碎片及同位素分布,结合 HMDB(<https://hmdb.ca>)、Lipidmaps(v2.3, <https://www.lipidmaps.org>)、METLIN(<https://metlin.scripps.edu>)、EMDB 2.0(<https://www.ebi.ac.uk/emdb>)数据库进行化合物定性,筛选标准为定性得分 ≥ 36 分(满分80分),低于36分者剔除。合并正、负离子数据得到数据矩阵表,通过鸥易生物2023版在线数据分析平台(<https://cloud.oebiotech.com>)进行多元统计分析,具体包括主成分分析(PCA),正交偏最小二乘法-判别分析(OPLS-DA)与单变量统计分析,差异代谢物筛选条件为变量重要性投影(VIP)值 ≥ 1 且差异倍数(FC) ≥ 1.20 或 ≤ 0.83 ,同时以 $P < 0.05$ 为标准进行代谢通路富集分析。

2.9 统计学分析 采用SPSS 21.0进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 t 检验;采用受试者工作特征(ROC)曲线评估差异代谢物的诊断效能,曲线下面积(AUC) > 0.8 提示具有较好诊断价值,AUC > 0.9 提示诊断准确性较高; $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 大鼠宏观生理病理特征分析 一般表型:正常组大鼠精神状态良好,活动度高,毛色光亮顺滑,饮食饮水正常,耳廓与尾尖色泽红润;模型组大鼠精神萎靡,活动迟缓,毛色枯黄卷曲无光泽,饮食饮水量显著减少,耳廓与尾尖色泽紫暗,符合中医BSS“瘀阻脉络、气血运行不畅”的表型特征。心脏形态:正常组心脏大小适中,形态规则,呈鲜红色,质地柔软有弹性,心腔无扩张,室壁厚度均匀;模型组心脏体积显著缩小,质量减轻,形态略瘦小,色泽暗沉呈暗红色,质地偏硬,室壁厚度稍增加,心内膜局部表面失去正常的光滑、平整形态,呈现凹凸不平、不规则状,直观反映心肌缺血、瘀血的病理改变。见图1。

3.2 心肌缺血损伤情况分析 心电图显示,正常组窦性心律,P波、QRS波规律,S-T段无偏移,T波正常;模型组心率减缓,J点显著上抬,S-T段升高 > 0.1 mV,T波高耸,提示心肌存在明显缺血性损伤。HE染色显示,正常组大鼠心肌纤维排列整齐、间隙狭小,无明显水肿及炎症细胞浸润,心肌细胞呈长梭形,细胞核位于中央、染色质分布均匀、核膜清晰;模型组大鼠心肌纤维排列松散、间隙明显增大,心肌细胞出现不同程度的病理性损伤,表现为细胞肿胀、空泡变性,细胞核淡染甚至出现核溶解,



注:A.正常组;B.模型组(图2、图3同)

图1 两组大鼠心肌宏观横切面比较

Fig. 1 Comparison of macroscopic transverse sections of rat myocardium between two groups

未见明显炎症细胞浸润,提示CHD-BSS模型大鼠存在显著的心肌细胞损伤。见图2、图3。



图2 两组大鼠心电图比较

Fig. 2 Comparison of electrocardiograms of rats between two groups

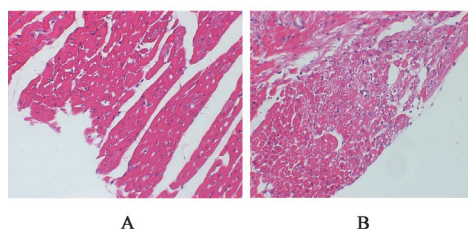


图3 两组大鼠心肌组织病理学形态比较(HE,×200)

Fig. 3 Comparison of histopathological morphology of myocardial tissue in rats between two groups (HE,×200)

3.3 血小板代谢轮廓与差异代谢物筛选 PCA结果显示,两组样本点均位于95%置信区间内,无异常样本需剔除;正常组样本点集中于得分图第一、二象限,模型组样本点集中于第三、四象限, $R^2X=0.703$,两组呈现初步分离趋势。OPLS-DA显示两组样本点在空间分布上完全区分,模型 $R^2Y=0.998$ 、 $Q^2=0.920$,置换检验显示 Q^2 与Y轴截距值为-0.408,证明模型无过拟合,稳定性良好。按筛选条件最终得到370个组间差异代谢物。与正常组比较,模型组表达上调的有200个,表达下调的有170个。为了更直观地展示不同代谢物在这两组之间的表达差异,对VIP值排序前50的显著差异代谢物的表达量进行层次聚类。结果

显示,模型组与正常组代谢模式有较大差异,同组内代谢模式高度一致,组间差异显著,提示造模成功诱导血小板代谢系统性重编程。见增强出版附加材料。

3.4 差异代谢物通路富集与核心代谢物筛选 通路富集分析显示,差异代谢物显著富集于8条代谢通路($P<0.05$),分别为嘌呤代谢,花生四烯酸代谢,氧化磷酸化,腺苷酸活化蛋白激酶(AMPK)信号通路,鞘脂代谢,丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢,溶酶体,叉头框蛋白O(FoxO)信号通路。从富集通路

中筛选出9个具有统计学意义的核心差异代谢物,分别为腺苷二磷酸(ADP)、琥珀酸、尿酸、鸟苷、1-磷酸二氢鞘氨醇、1-磷酸鞘氨醇(S1P)、D-天冬氨酸、12-酮基白三烯B₄、14,15-二羟基二十碳三烯酸;与正常组比较,模型组大鼠血小板中ADP、尿酸、1-磷酸二氢鞘氨醇、S1P、D-天冬氨酸、12-酮基白三烯B₄、14,15-二羟基二十碳三烯酸上调($P<0.05$);琥珀酸、鸟苷下调($P<0.05$)。见增强出版附加材料及表1。

表1 差异代谢通路富集代谢产物的基本信息

Table 1 Basic information of metabolites enriched in differential metabolic pathways

代谢物名称	化学式	HMDB ID	VIP 值	FC	变化趋势(模型组/正常组)	涉及代谢通路
ADR	C ₁₀ H ₁₅ N ₅ O ₁₀ P ₂	HMDB0001341	7.822	1.489	↑	氧化磷酸化、嘌呤代谢、AMPK 信号通路、溶酶体、FoxO 信号通路
琥珀酸	C ₄ H ₆ O ₄	HMDB0000254	1.002	0.631	↓	氧化磷酸化、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢
尿酸	C ₅ H ₄ N ₄ O ₃	HMDB0000289	1.960	1.798	↑	嘌呤代谢
鸟苷	C ₁₀ H ₁₃ N ₅ O ₅	HMDB0000133	2.640	0.463	↓	嘌呤代谢
1-磷酸二氢鞘氨醇	C ₁₈ H ₄₀ NO ₅ P	HMDB0001383	12.080	3.837	↑	鞘脂代谢
S1P	C ₁₈ H ₃₈ NO ₅ P	HMDB0000277	12.135	3.074	↑	鞘脂代谢
D-天冬氨酸	C ₄ H ₇ NO ₄	HMDB0006483	1.251	1.433	↑	丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢
12-酮基白三烯B ₄	C ₂₀ H ₃₀ O ₄	HMDB0004234	1.928	3.045	↑	花生四烯酸代谢
14,15-二羟基二十碳三烯酸	C ₂₀ H ₃₄ O ₄	HMDB0002265	3.434	5.774	↑	花生四烯酸代谢

注:表中差异代谢物均为一级确证,鉴定结果可靠;↑.上调;↓.下调

3.5 核心差异代谢物诊断效能分析 ROC 曲线分析显示,9个核心差异代谢物的AUC值均>0.8,均具有良好的诊断效能^[9]。其中ADP、鸟苷、1-磷酸二氢鞘氨醇、S1P、12-酮基白三烯B₄、14,15-二羟基二十碳三烯酸的AUC值均>0.9,而1-磷酸二氢鞘氨醇、S1P、12-酮基白三烯B₄、14,15-二羟基二十碳三烯酸的AUC值达1.0,提示这4种代谢物兼具极高的灵敏度与特异性,可作为CHD-BSS潜在的血小板特异性生物标志物。见增强出版附加材料。

4 讨论

CHD-BSS的核心病理环节涉及血小板活化、炎症反应与血栓形成,但血小板代谢重编程在该进程中的作用尚不明确^[4-5]。本研究发现CHD-BSS大鼠血小板代谢特征呈现显著的系统性重编程,整体代谢轮廓与正常组存在明确区分,提示血小板代谢紊乱是其核心的微观病理特征,且这些代谢改变直接参与血小板异常活化与聚集的调控过程,为阐释CHD-BSS“血瘀-血小板活化”的病理关联提供了代谢层面的直接依据^[5,12]。

血小板代谢轮廓的系统性重塑是CHD-BSS的

关键微观特征,这种整体代谢改变并非随机波动,而是与血小板活化、黏附、聚集等功能表型高度耦合,直接参与并驱动BSS核心病理环节的发生发展。胡文娟等^[5]早期研究仅观察到不同BSS亚型血小板活化标志物表达升高,但未能揭示其内在代谢驱动机制,而本研究通过非靶向代谢组学技术,首次在全代谢物层面证实BSS状态下血小板并非仅发生表面分子改变,而是发生了涉及数百种代谢物的全局性代谢重构。张国瑗等^[13]在气虚BSS血小板代谢组学研究中也观察到类似的代谢轮廓分离现象,结合本研究结果可进一步推论,代谢重编程是不同亚型BSS血小板的共性微观特征,而非某一特定证型的偶然表现。关键差异代谢物富集的多条通路形成复杂的交互调控网络,从炎症激活、血栓形成、能量障碍等多个维度共同推动CHD-BSS进展。

鞘脂代谢通路的异常激活使其成为连接自噬、炎症与血栓的核心枢纽。S1P及其异构体是血小板储存并释放的关键炎症介质,可通过结合S1PR1/S1PR4受体促进淋巴细胞归巢、内皮活化及血小板

聚集,进而促进微血栓的形成^[14-15]。LEE等^[16]提出血小板自噬通过AMPK-哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)-鞘脂代谢轴调控血栓形成,但其研究主要基于基因敲除模型从分子生物学角度验证了该轴的存在,而本研究则从代谢组学层面提供了该轴在疾病状态下激活的直接证据。血小板是循环中相关鞘脂代谢物的主要来源,其释放的代谢物可通过旁分泌作用调节免疫细胞和内皮细胞功能,CHD-BSS状态下AMPK信号通路的激活会进一步促进鞘脂代谢向S1P生成方向偏移,而S1P又能反过来抑制自噬流的正常进行,导致血小板和心肌细胞内受损线粒体和蛋白质的堆积,加重氧化应激和细胞损伤^[14]。这种代谢通路间的正反馈调节,使得鞘脂代谢物成为连接血小板功能异常、能量代谢紊乱和心肌损伤的核心枢纽,这也解释了为何单纯抑制血小板聚集不能完全阻断疾病进展。

花生四烯酸代谢向促炎促栓方向偏移,证实血小板不仅是炎症的靶细胞,更是炎症介质的重要产生者。肖雪等^[7]曾提出炎症介质是BSS生物学基础核心要素的观点,但未能明确具体的炎症介质种类及其来源,本研究首次在血小板层面证实,花生四烯酸代谢产生的脂类炎症介质是BSS炎症反应的重要组成部分。12-酮基白三烯B₄是白三烯B₄的氧化代谢产物,具有趋化中性粒细胞、抑制其凋亡、延长炎症反应时相的作用^[17];14,15-二羟基二十碳三烯酸则为环氧酶途径代谢物,可介导血管痉挛与血小板聚集^[18]。二者同步升高提示花生四烯酸代谢通路向促炎/促栓方向偏移,与胡文娟等^[5]报道的“BSS亚型血小板活化及炎症反应增强”相符,亦与肖雪等^[7]提出的“炎症介质是BSS生物学基础核心要素”观点相互印证。可见,花生四烯酸代谢紊乱是连接血小板活化与炎症反应的关键分子桥梁,血小板活化后释放的花生四烯酸代谢产物可趋化中性粒细胞、延长炎症时相,而炎症反应又可进一步增强血小板的反应性,二者相互促进,共同推动BSS的进展,这也为活血化瘀中药抗炎抗栓双重作用机制提供了代谢层面的解释。

嘌呤代谢紊乱通过影响血小板聚集关键诱导物与炎症相关代谢物的水平,驱动血栓正反馈放大并参与血管壁炎症微环境构建。ADP是血小板聚集的关键诱导剂,通过激活P2Y₁/P2Y₁₂受体触发整合素 α IIb β 3构象激活与血栓正反馈放大^[19-21]。本研究从代谢组学角度证实,CHD-BSS状态下血小板内ADP的蓄积是这一正反馈机制过度激活的直

接原因,这也为P2Y₁₂受体抑制剂的临床疗效提供了机制支撑,同时提示血小板内相关代谢物水平可作为评估抗血小板药物疗效的潜在指标。尿酸可通过磷脂酰肌醇3-激酶(PI3K)/蛋白激酶B(Akt)/核转录因子- κ B(NF- κ B)信号通路诱导血管内皮炎症^[22]。SAITO等^[23]发现血清尿酸水平与冠状动脉脂质斑块负荷正相关,但血清尿酸易受多种因素影响,其特异性有限,本研究在血小板层面发现尿酸水平显著升高,说明血小板不仅是高尿酸血症的受害者,更是尿酸代谢紊乱的主动参与者。CRIŞAN等^[24]证实尿酸可通过抑制抗炎因子增强炎症反应,结合本研究结果可进一步推论,血小板内尿酸蓄积可通过增强血小板自身的炎症反应和促进血小板聚集双重机制促进CHD-BSS的进展,为高尿酸血症与CHD-BSS的关联提供了新的机制解释。

能量代谢相关通路的异常提示血小板线粒体功能受损,这不仅是血小板功能异常的重要原因,还可能通过减少循环中保护性代谢物的释放间接加剧心肌损伤。RICHMAN等^[25]最新研究证实,线粒体基因表达障碍可导致血小板氧化磷酸化功能受损、氧消耗降低及活性氧生成增加,最终引起血小板功能异常,本研究结果与这一发现高度一致,并进一步将血小板线粒体功能障碍与心肌损伤联系起来。汤喜兰^[26]发现琥珀酸对心肌细胞缺氧复氧损伤具有直接保护作用,本研究中血小板琥珀酸水平的降低提示,血小板线粒体功能障碍不仅影响血小板自身功能,还可能通过减少循环中保护性代谢物的释放,间接加剧心肌损伤。MILLS等^[27]在巨噬细胞研究中发现,琥珀酸脱氢酶介导的线粒体代谢重编程是炎症细胞活化的关键机制,本研究将这一理论延伸到血小板领域,提示线粒体代谢重编程可能是多种炎症细胞活化的共性机制,而在CHD-BSS中,血小板线粒体功能障碍是连接能量代谢紊乱、炎症反应和血栓形成的核心环节。

FoxO信号通路和溶酶体通路的显著富集拓展了BSS机制研究的维度。BARRETO等^[28]证实FoxO信号通路介导氧化型低密度脂蛋白诱导的内皮细胞损伤,本研究结果提示,FoxO通路可能同时作用于血小板和内皮细胞,形成“血小板活化-内皮损伤-进一步血小板活化”的交互损伤机制。LEE等^[16]提出血小板自噬通过AMPK-mTOR-鞘脂代谢轴调控血栓形成,而溶酶体是自噬通路的终端降解场所,本研究同时观察到溶酶体、AMPK和鞘脂代谢通路的显著富集,为这一理论提供了完整的代谢

组学证据链。张国媛等^[13]在气虚BSS血小板代谢组学研究中也发现溶酶体相关代谢物的改变,结合本研究结果可推测,溶酶体功能紊乱导致的自噬流异常是不同亚型BSS血小板活化的共同机制之一,这一发现将BSS的机制研究从传统的“凝血-纤溶失衡”拓展到了“细胞自噬”这一全新领域。

丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢是连接三羧酸循环与氨基酸代谢的关键枢纽。*D*-天冬氨酸是哺乳动物中枢神经系统及外周组织中重要的信号分子,可激活*N*-甲基-*D*-天冬氨酸(NMDA)受体,参与 Ca^{2+} 稳态调控及线粒体功能调节。血小板表面功能性NMDA受体的表达已被证实,其激活可促进血小板聚集与颗粒释放。本研究首次在血小板代谢组学层面发现CHD-BSS大鼠*D*-天冬氨酸水平上调,结合琥珀酸下降所提示的三羧酸循环障碍,推测氨基酸代谢紊乱与能量代谢障碍相互交织,共同加剧血小板线粒体功能障碍。汤喜兰^[26]研究证实琥珀酸对心肌细胞缺氧复氧损伤具有直接保护作用,本研究中血小板琥珀酸含量的下降可能也削弱了血小板自身的抗氧化防御能力,使血小板在氧化应激环境下更易发生异常活化,从而形成“代谢紊乱-线粒体损伤-血小板活化”的恶性循环,推动CHD-BSS的病理进程。

因此,本研究筛选的9条显著富集代谢通路可归纳为三大功能模块:①炎症免疫模块(花生四烯酸代谢、鞘脂代谢、溶酶体),以12-酮基白三烯 B_4 、S1P、1-磷酸二氢鞘氨醇升高为特征,介导血小板活化与血管炎症;②能量代谢模块(氧化磷酸化、AMPK信号通路、FoxO信号通路、丙氨酸/天冬氨酸/谷氨酸代谢),以琥珀酸下降、AMPK激活为核心,反映线粒体功能障碍与氧化应激;③血栓形成模块(嘌呤代谢、鞘脂代谢),以ADP蓄积、S1P释放为驱动,放大整合素 $\alpha\text{IIb}\beta_3$ 介导的血小板聚集。3条模块通过“炎症-能量-血栓”交互网络,共同构成CHD-BSS血小板代谢重编程的分子基础。

同时,本研究筛选的核心差异代谢物均具备良好的诊断效能,部分代谢物展现出极高的灵敏度与特异性,能够有效区分CHD-BSS与正常状态。SWETS^[9]提出的诊断系统准确性评价标准认为,较高的曲线下面积提示诊断准确性较高,本研究中多个代谢物的诊断效能远超这一标准,说明血小板代谢标志物在CHD-BSS诊断中具有巨大的应用潜力。与传统血清代谢标志物比较,血小板代谢标志物具有更高的特异性和病理指向性,周曼丽等^[8]在

CHD-BSS心肌代谢组学研究中筛选出了一系列差异代谢物,但心肌组织样本难以在临床常规获取,而血小板样本采集简便创伤小,更适合临床推广应用。QIU等^[29]发现血浆代谢组学可用于心力衰竭中医证型的演变研究,但血浆作为全身代谢物的“混合池”,易受多种因素干扰,而血小板作为CHD-BSS的核心效应细胞,其代谢变化更能直接反映疾病的核心病理进程。将血小板代谢标志物与传统血清标志物联合检测,可实现全身代谢状态与局部效应细胞功能的双重评估,显著提高了诊断的准确性和特异性,为中医证型客观化诊断提供了新的解决方案,有望推动中医辨证从经验医学向精准医学转变。

总之,血小板代谢紊乱并非单纯的疾病伴随现象,而是推动疾病进展、诱发心肌损伤的关键驱动因素。异常代谢物通过促进血小板聚集形成冠脉微血栓、诱导血管内皮炎症破坏心肌微循环、加剧线粒体氧化应激损伤心肌细胞等途径,形成完整的病理链条,与CHD-BSS瘀阻脉道、心肌失养的中医病机高度契合。研究发现线粒体质量控制障碍是心肌缺血再灌注损伤的核心机制,本研究结果提示,血小板线粒体功能障碍与心肌线粒体功能障碍可能存在协同作用,血小板释放的活性氧和促炎介质可损伤心肌线粒体,而心肌损伤释放的细胞因子又可进一步激活血小板,形成“血小板-心肌”交互损伤的恶性循环,进一步放大了心肌缺血程度^[6,30]。FUENTES等^[31]指出血小板活化和氧化应激在心肌梗死进展中发挥关键作用,但未能明确二者的代谢基础,本研究将血小板活化、氧化应激与具体的代谢物变化联系起来,阐明了相关代谢物如何通过不同途径共同导致心肌损伤。这一机制的阐明为活血化瘀中药的作用机制研究提供了新的视角,提示活血化瘀中药可能不仅通过抑制血小板聚集发挥作用,还可能通过调节血小板代谢、改善线粒体功能、减轻炎症反应等多靶点途径保护心肌。李伟霞等^[14]基于血浆代谢组学研究了脑心通胶囊的活血化瘀作用机制,未来采用血小板代谢组学技术,能够更精准地揭示活血化瘀中药的作用靶点和代谢调控机制。

最后,本研究结果仍需在大样本临床患者中进一步验证,未来可通过靶向干预实验明确关键通路的调控作用,构建血小板与外周血联合的诊断模型,并结合血小板代谢组学技术更精准地揭示活血化瘀中药的作用靶点和代谢调控机制。可将血小

板代谢组学与菌群研究结合,探索“菌群-血小板代谢-心肌损伤”的完整机制链条,进一步丰富CHD-BSS的生物学基础理论,推动相关研究成果向临床转化应用。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] LI Y, LIN M, WANG K, et al. A module of multifactor-mediated dysfunction guides the molecular typing of coronary heart disease[J]. *Mol Genet Genomic Med*, 2020, 8(10): e1415.
- [2] 李杰,袁肇凯. 冠心病血瘀证的病机研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2006, 4(7): 613-615.
- LI J, YUAN Z K. Study on pathogenesis of blood stasis syndrome in coronary heart disease[J]. *Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovasc Dis*, 2006, 4(7): 613-615.
- [3] 付长庚,高铸烨,杨巧宁,等. 冠心病血瘀证病证结合诊断标准的相关研究[J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2018, 16(11): 1473-1475.
- FU C G, GAO Z Y, YANG Q N, et al. Research on the diagnostic criteria for coronary heart disease with blood stasis syndrome based on combination of disease and syndrome[J]. *Chin J Integr Med Cardio-Cerebrovasc Dis*, 2018, 16(11): 1473-1475.
- [4] 李逸雯. 基于口-肠菌群探讨糖尿病冠心病血瘀证实质及活血化瘀疗效机制[D]. 北京:中国中医科学院, 2024.
- LI Y W. Explore the essence of blood-stasis syndrome of diabetic coronary heart disease and the therapeutic mechanism of activating blood circulation herbs based on oral-gut microbiota[D]. Beijing: China Academy of Chinese Medical Sciences, 2024.
- [5] 胡文娟,赵凤达,张秉韬,等. 不同血瘀证亚型血小板活化及炎症反应改变的实验研究[J]. *世界中西医结合杂志*, 2011, 6(11): 931-934.
- HU W J, ZHAO F D, ZHANG B T, et al. Experimental research on platelet activation and inflammatory reaction in the different subtypes of blood stasis pattern[J]. *World J Integr Tradit West Med*, 2011, 6(11): 931-934.
- [6] ZHENG M, BAI Y, SUN X, et al. Resveratrol reestablishes mitochondrial quality control in myocardial ischemia/reperfusion injury through Sirt1/Sirt3-Mfn2-Parkin-PGC-1 α pathway[J]. *Molecules*, 2022, 27(17): 5545.
- [7] 肖雪,王乐琪,谢志茹,等. 炎症介质:探讨血瘀证生物学基础新思路[J]. *中华中医药杂志*, 2021, 36(1): 32-36.
- XIAO X, WANG L Q, XIE Z R, et al. Inflammatory mediators: A new way to reveal the biological basis of blood stasis syndrome[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2021, 36(1): 32-36.
- [8] 周曼丽,钱舒乐,胡伊蕾,等. 冠心病心血瘀阻证大鼠心肌代谢组学研究[J]. *中医杂志*, 2022, 63(10): 968-975.
- ZHOU M L, QIAN S L, HU Y L, et al. Myocardial

- metabolomics in rats with coronary heart disease and blood stasis obstruction syndrome[J]. *J Tradit Chin Med*, 2022, 63(10): 968-975.
- [9] SWETS J A. Measuring the accuracy of diagnostic systems[J]. *Science*, 1988, 240(4857): 1285-1293.
- [10] ZHAO L L, QIU X J, WANG W B, et al. NMR metabolomics and random forests models to identify potential plasma biomarkers of blood stasis syndrome with coronary heart disease patients[J]. *Front Physiol*, 2019, 10: 1109.
- [11] 郝剑,邸研博,魏蔚. 血瘀证动物模型客观化评价方法概述[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(6): 3323-3329.
- HAO J, DI Y B, WEI W. Objective evaluation of blood-stasis syndrome animal models[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 37(6): 3323-3329.
- [12] 胡元会,贾秋蕾,孟昊,等. 冠心病不稳定型心绞痛患者血瘀证与外周血小板微粒膜蛋白表达的相关性[J]. *中医杂志*, 2017, 58(4): 321-324.
- HU Y H, JIA Q L, MENG H, et al. Correlation of syndrome of blood stasis and the expressions of peripheral blood platelet microparticle membrane protein in patients with coronary heart disease unstable angina pectoris[J]. *J Tradit Chin Med*, 2017, 58(4): 321-324.
- [13] 张国媛,李瑛,王紫艳,等. 基于血小板代谢组学探究补阳还五汤对气虚血瘀证的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2025, 43(7): 126-134, 300-301.
- ZHANG G Y, LI Y, WANG Z Y, et al. Effect of Buyang Huanwu decoction on qi deficiency and blood stasis syndrome based on platelet metabolomics[J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2025, 43(7): 126-134, 300-301.
- [14] 李伟霞,李曼曼,牛璐,等. 基于血浆代谢组学和网络药理学研究脑心通胶囊活血化瘀作用机制[J]. *中国中西医结合杂志*, 2023, 43(4): 441-448.
- LI W X, LI M M, NIU L, et al. Study on the mechanism of activating blood and removing stasis of Naixintong capsule based on plasma metabolomics and network pharmacology[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2023, 43(4): 441-448.
- [15] TOLKSDORF C, MORITZ E, WOLF R, et al. Platelet-derived S1P and its relevance for the communication with immune cells in multiple human diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10278.
- [16] LEE T Y, LU W J, CHANGGUO C A, et al. Platelet autophagic machinery involved in thrombosis through a novel linkage of AMPK-mTOR to sphingolipid metabolism[J]. *Autophagy*, 2021, 17(12): 4141-4158.
- [17] 韩彦琪,姚鹏飞,卜睿臻,等. 基于代谢组学的痹祺胶囊治疗类风湿性关节炎作用机制研究[J]. *中草药*, 2023, 54(23): 7662-7672.
- HAN Y Q, YAO P F, BU R Z, et al. Mechanism of Biqi capsules against rheumatoid arthritis based on metabolomics[J]. *Chin Tradit Herb Drugs*, 2023, 54(23): 7662-7672.
- [18] LI P L, SUN H G, HUA Y L, et al. Metabolomics study of hematopoietic function of *Angelica sinensis* on blood

- deficiency mice model [J]. J Ethnopharmacol, 2015, 166: 261-269.
- [19] ZHANG Q C, ZHAO Y, BIAN H M. Anti-thrombotic effect of a novel formula from *Corni fructus* with malic acid, succinic acid and citric acid [J]. Phytother Res, 2014, 28(5): 722-727.
- [20] HUANG W C, LIN K C, HSIA C W, et al. The antithrombotic agent pterostilbene interferes with integrin $\alpha\text{IIb}\beta 3$ -mediated inside-out and outside-in signals in human platelets [J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(7):3643
- [21] JANUS-BELL E, MANGIN P H. The relative importance of platelet integrins in hemostasis, thrombosis and beyond [J]. Haematologica, 2023, 108(7):1734-1747.
- [22] 张博, 梁玉宁, 鲍友利, 等. 基于网络药理学和实验验证探究经典药对“瓜蒌-薤白”治疗痰瘀互结心血管疾病的作用机制 [J]. 药学报, 2023, 58(6):1452-1463.
- ZHANG B, LIANG Y N, BAO Y L, et al. Exploration on the mechanism of classic herb pair *Trichosanthis Fructus*-*Allii Macrostemi Bulbus* in the treatment of cardiovascular diseases with intermingled phlegm and blood stasis based on network pharmacology and experimental verification [J]. Acta Pharm Sin, 2023, 58(6):1452-1463.
- [23] SAITO Y, MORI N, MURASE T, et al. Greater coronary lipid core plaque assessed by near-infrared spectroscopy intravascular ultrasound in patients with elevated xanthine oxidoreductase: A mechanistic insight [J]. Heart Vessels, 2021, 36(5):597-604.
- [24] CRISAN T O, CLEOPHAS M C, OOSTING M, et al. Soluble uric acid primes TLR-induced proinflammatory cytokine production by human primary cells via inhibition of IL-1Ra [J]. Ann Rheum Dis, 2016, 75(4):755-762.
- [25] RICHMAN T R, ERMER J A, BAKER J, et al. Mitochondrial gene expression is required for platelet function and blood clotting [J]. Cell Rep, 2023, 42(11):113312.
- [26] 汤喜兰. 广枣抗心肌缺血再灌注损伤的物质基础及作用机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2013.
- TANG X L. Study on material basis and mechanism of *Fructus Choerospondiatis* against myocardial ischemia-reperfusion injury [D]. Beijing: Beijing University of Chinese Medicine, 2013.
- [27] MILLS E L, KELLY B, LOGAN A, et al. Succinate dehydrogenase supports metabolic repurposing of mitochondria to drive inflammatory macrophages [J]. Cell, 2016, 167(2):457-470.
- [28] BARRETO J, KARATHANASIS S K, REMALEY A, et al. Role of LOX-1 (lectin-like oxidized low-density lipoprotein receptor 1) as a cardiovascular risk predictor: Mechanistic insight and potential clinical use [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2021, 41(1):153-166.
- [29] QIU Q, LI C, WANG Y, et al. Plasma metabolomics study on Chinese medicine syndrome evolution of heart failure rats caused by LAD ligation [J]. BMC Complement Altern Med, 2014, 14:232.
- [30] 辛高杰, 陈原原, 刘子馨, 等. 双参宁心胶囊调控线粒体分裂、融合减轻大鼠心肌缺血再灌注损伤 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(7):87-94.
- XIN G J, CHEN Y Y, LIU Z X, et al. Regulation of mitochondrial fission and fusion by Shuangshen Ningxin capsule alleviates myocardial ischemia/reperfusion injury in rats [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2024, 30(7):87-94.
- [31] FUENTES E, MOORE-CARRASCO R, DE ANDRADE PAES A M, et al. Role of platelet activation and oxidative stress in the evolution of myocardial infarction [J]. J Cardiovasc Pharmacol Ther, 2019, 24(6):509-520.

[责任编辑 王鑫]