

基于“心受气于脾”探讨心痛泰调控 p38 MAPK/AP-1 对动脉粥样硬化兔的中医证候和 VSMC 胶原纤维的影响

易琼^{1,2}, 李雅^{2*}, 郭志华², 唐云¹, 申思¹, 齐婧¹, 魏佳明²

(1. 湖南中医药大学第一附属医院, 长沙 410007; 2. 湖南中医药大学, 长沙 410208)

[摘要] 目的: 基于“心受气于脾”探讨心痛泰调控 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)/转录激活因子-1(AP-1)对动脉粥样硬化兔的中医证候积分和血管平滑肌细胞(VSMC)胶原纤维的影响。方法: 120 只清洁级兔随机分为假手术组, 痰瘀互结模型组, 心痛泰低剂量组、中剂量组、高剂量组和瑞舒伐他汀组。采用高脂喂养+球囊损伤法, 造成痰瘀互结病证结合动脉粥样硬化兔模型, 造模后予以相应药物灌胃 8 周(心痛泰低、中、高剂量组和瑞舒伐他汀组的给药量分别为 2.3, 4.6, 9.2 g·kg⁻¹ 和 0.55 mg·kg⁻¹)。给药周期结束时取腹主动脉, 苏木素-伊红(HE)染色观察易损斑块的情况; 免疫组化法(IHC)测定基质金属蛋白酶-9(MMP-9), 组织基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1); 马松(Masson)染色观察平滑肌细胞胶原纤维分解情况; 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定主动脉组织 p38 MAPK, AP-1 蛋白的表达; 采用中医证候评分表评价痰瘀互结证中医证候积分。结果: 与模型组比较, 心痛泰各剂量组、瑞舒伐他汀组 MMP-9 含量显著降低, TIMP-1 含量显著升高, p38 MAPK 蛋白的表达, AP-1 的核转位显著降低($P<0.01$); 与心痛泰低剂量组比较, 心痛泰中、高剂量组, 瑞舒伐他汀组 MMP-9 明显降低, TIMP-1 明显升高, p38 MAPK 蛋白的表达, AP-1 的核转位明显降低($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较, 心痛泰各剂量组、瑞舒伐他汀组的中医证候积分均明显改善($P<0.05, P<0.01$); 与心痛泰低剂量组比较, 心痛泰中、高剂量组, 瑞舒伐他汀组的中医证候积分均显著改善($P<0.01$)。Masson 染色显示, 模型组平滑肌纤维排列紊乱, 胶原分解增多, 纤维帽变薄, 斑块易损性增加; 与模型组比较, 心痛泰各组和瑞舒伐他汀组平滑肌细胞排列较为整齐, 胶原纤维分解减少, 斑块稳定性增加。结论: 心痛泰可下调 p38 MAPK, MMP-9 的表达, 提高 TIMP-1 的水平, 减少 AP-1 核转位, 减少平滑肌细胞胶原纤维的分解, 改善痰瘀互结证的中医证候评分。心痛泰可能通过调控 p38 MAPK/AP-1 信号通路及下游的细胞因子, 稳定易损斑块, 改善动脉粥样硬化之痰瘀互结证。

[关键词] 心受气于脾; 心痛泰; 动脉粥样硬化; p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)/转录激活因子-1(AP-1)信号通路; 中医证候积分

[中图分类号] R22; R242; R285.5; R2-031; R972+.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)19-0056-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20211799

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.r.20210806.1706.004.html>

[网络出版日期] 2021-08-09 11:29

Effect of Xintongtai Regulating p38 MAPK/AP-1 on Traditional Chinese Medicine Syndrome Score and Collagen Fibers in VSMCs of Rabbits with Atherosclerosis: An Exploraton Based on Theory of Heart Receiving Qi From Spleen

YI Qiong^{1,2}, LI Ya^{2*}, GUO Zhi-hua², TANG Yun¹, SHEN Si¹, QI Jing¹, WEI Jia-ming²

(1. *The First Affiliated Hospital, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410007, China;*

2. *Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China*)

[收稿日期] 20210421(014)

[基金项目] 湖南省中医药科研项目重点课题(2021029); 湖南省教育厅科学研究重点项目(20A384); 湖南省自然科学基金面上项目(2021JJ30492); 湖南省自然科学基金青年项目(2021JJ40426); 湖南中医药大学中医学一流学科开放基金一般项目(2021ZYX19); 湖南中医药大学中医学一流学科开放基金重点项目(2021ZYX14); 湖南中医药大学中医学国内一流建设学科项目(湘教通[2018]469号)

[第一作者] 易琼, 博士, 从事心血管疾病的防治研究, Tel: 0731-89669389, E-mail: ikkyo@sina.com

[通信作者] * 李雅, 博士, 副教授, 硕士生导师, 从事中药新药研究与开发, Tel: 0731-88458072, E-mail: liya112@163.com

[Abstract] **Objective:** To explore the effects of Xintongtai (XTT) on traditional Chinese medicine (TCM) syndrome score and collagen fibers in vascular smooth muscle cells (VSMCs) of rabbits with atherosclerosis in the regulation of p38 mitogen-activated protein kinase (p38 MAPK)/activator protein-1 (AP-1) signaling pathway. **Method:** A total of 120 rabbits of SPF grade were randomly divided into the sham operation group, combined phlegm and blood stasis model group, rosuvastatin group, and low-, middle-, and high-dose XTT groups. The rabbit model of atherosclerosis due to combined phlegm and blood stasis was established by exposing them to high-fat diet and balloon injury. Following modeling, the corresponding drugs were administered by gavage for eight weeks (2.3, 4.6, 9.2 g·kg⁻¹ for low-, middle-, and high-dose XTT groups and 0.55 mg·kg⁻¹ for rosuvastatin group). At the end of medication, the abdominal aorta was isolated and stained with hematoxylin-eosin (HE) for observing the vulnerable plaque. Matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 (TIMP-1) were detected by immunohistochemistry (IHC). The collagen fiber decomposition in VSMCs was observed after Masson staining. The protein expression levels of p38 MAPK and AP-1 in aorta was assayed by Western blotting. The combined phlegm and blood stasis syndrome was scored based on TCM syndrome scoring scale. **Result:** Compared with the model group, XTT at each dose and rosuvastatin significantly decreased MMP-9 content, increased TIMP-1, down-regulated p38 MAPK protein expression, and weakened the nuclear translocation of AP-1 ($P<0.01$). Compared with the low-dose XTT group, the middle- and high-dose XTT groups and rosuvastatin group exhibited obviously lowered MMP-9, elevated TIMP-1, down-regulated p38 MAPK protein expression, and diminished AP-1 nuclear translocation ($P<0.05$, $P<0.01$). The TCM syndrome scores of the middle- and high-dose XTT groups and rosuvastatin group were significantly improved as compared with that in the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). The comparison with the low-dose XTT group revealed a remarkable improvement in TCM syndrome score of the middle- and high-dose XTT groups and rosuvastatin group ($P<0.01$). As demonstrated by Masson staining, the smooth muscle fibers in the model group were arranged in disorder, accompanied by enhanced collagen decomposition, thinned fibrous cap, and increased plaque vulnerability. Compared with the model group, the VSMCs in each XTT group and rosuvastatin group were orderly arranged, manifested as decreased collagen fiber decomposition and increased plaque stability. **Conclusion:** XTT down-regulates the expression of p38 MAPK and MMP-9, increases the level of TIMP-1, reduces the nuclear translocation of AP-1, diminishes the decomposition of collagen fibers in VSMCs, and improves the score of combined phlegm and blood stasis syndrome. XTT alleviates arteriosclerosis due to combined phlegm and blood stasis by regulating p38 MAPK/AP-1 signaling pathway and downstream cytokines and stabilizing vulnerable plaques.

[Keywords] heart receiving Qi from spleen; Xintongtai; atherosclerosis; p38 mitogen-activated protein kinase(p38 MAPK)/activator protein-1(AP-1) signaling pathway; traditional Chinese medicine syndrome score

《中国心血管健康与疾病报告2019》^[1]指出,我国心血管疾病患病人数约3.30亿,其中,冠心病患者高达1 100万。易损斑块是冠心病不稳定型心绞痛的主要病理因素,斑块的易损性是由于具有大的脂质核心、薄而趋于破裂的纤维帽以及斑块内的病理性新生血管^[2]。其中,斑块纤维帽的完整性影响斑块的稳定性,大量研究表明,纤维帽的完整性与血管平滑肌细胞(VSMC)中胶原纤维的含量密切相关^[3]。因此,稳定VSMC胶原纤维是易损斑块治疗的治疗重点。目前西医稳定易损斑块的治疗包括抗血小板聚集药物和调节血脂的他汀类药物,中药

复方具有多靶点、多层次、多通路干预的作用,因此具有强大的优势^[4]。中医学认为易损斑块是痰瘀互结于脉道所致,健脾化痰祛瘀之法具有较好的调控血脂、抑制炎症反应、保护血管内膜的作用,从而有助于稳定易损斑块^[5-6]。心痛泰是基于“心受气于脾”理论创立的中药复方,全方具有理气化痰、活血通络之功,适用于痰瘀互结型不稳定型心绞痛的患者。脾虚导致痰浊瘀阻脉道,从而发展为痰瘀互结的斑块,这是“心受气于脾”的理论基础,脾虚则水谷精微难以化生,脉道不利,血脉不畅,VSMC功能失调,从而导致易损斑块的形成。课题组前期研究

显示,心痛泰在减轻动脉粥样硬化炎症反应、改善血管重构、稳定易损斑块等方面发挥了重要作用^[7-9]。但是国内外缺乏采用动物证候模型来评价中药对中医证候变化的研究,为了实现从“基础研究”到“临床应用”的转化医学模式,本研究首次采用病证结合动物模型,制订中医证候评分量表评估用药前后动物的中医证型,并且前期已经采用预实验的方式评价中医证候评分量表,具有创新性和可行性。本研究采用过食膏粱厚味联合动脉内膜损伤的复合病因复制脾虚痰浊的易损斑块动物模型,从“心受气于脾”的理论出发,探索心痛泰对 p38 丝裂原活化蛋白激酶(p38 MAPK)/转录激活因子-1(AP-1)信号通路, VSMC 胶原纤维、动物中医证候评分的影响,阐明心痛泰稳定易损斑块、改善痰瘀互结证的作用和机制。

1 材料

1.1 动物 120只清洁级健康日本大耳白兔,雄性,10~12周龄,体质量(2.19±0.135)kg。由湖南中医药大学实验动物中心提供,合格证号SCXK(湘)2009-0012,许可证号湘医动字D20-006号。实验已通过湖南中医药大学动物实验伦理委员会标准审查。

1.2 药物 心痛泰药粉由丹参、川芎、三七、郁金、山楂、枳壳、葛根、木香、茯苓、白术等中药饮片,按比例经过标准工艺制成药粉,每克药粉的有效成分等于15g生药,由湖南中医药大学第一附属医院药剂科制备,批号20210125,所有中药饮片均由湖南中医药大学第一附属医院主任药师张志国鉴定,均符合2020年版《中国药典》要求。瑞舒伐他汀钙片(阿斯利康制药有限公司,进口药品注册证号H20110563);高脂饲料由15%蛋黄粉,2%胆固醇,5%猪油,0.5%胆酸钠,77.5%基础饲料组成,由湖南中医药大学动物实验中心制备,专用仓库保存。

1.3 试剂 基质金属蛋白酶-9(MMP-9),组织基质金属蛋白酶抑制剂-1(TIMP-1)试剂盒(武汉博士德生物工程有限公司,批号分别为EK0466, EK0520); AP-1抗体, p38 MAPK抗体(北京博奥森生物技术有限公司,批号分别为Bs-13638R, Bs-0636R);甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH), H3抗体(美国Cell Signaling Technology公司,批号分别为#5174, #4499S);羊抗兔辣根过氧化物酶(HRP)标记二抗,羊抗鼠HRP标记二抗,苏木素-伊红(HE)染色试剂(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为A0208, A0216, C0105S-1);马松(Masson)染色试剂(福州飞净生物科技有限公司,批号PH1427)。

1.4 仪器 YMT-2500型旋涡振荡器(上海熙扬仪器有限公司); F10型手握式电动匀浆机(德国Fluko公司); 1-14k型低温冷冻离心机(德国Sigma公司); 1704150型电泳仪(美国Bio-Rad公司); MK-3型全自动酶标仪(芬兰雷勃集团); TBA-120FR型全自动生化分析仪(日本东芝医疗系统株式会社); FACS Via型流式细胞仪(美国BD医疗器械公司); 820 Histo Stat型切片机(美国Reichert公司); KA-MIAS1型MIAS图像分析仪(南京奥康仪器分析有限公司); 便携式M-Turbo型超声机(9 MHz高频探头,美国SonoSite公司)。球囊导管与附件(球囊内径3.0 mm,球囊导管长度20 mm; 0.018/300 cm导引导丝;球囊扩张压力泵)均购自美国Cordis公司。

2 方法

2.1 造模、分组及给药 参照文献^[10-12]建立易损斑块痰瘀互结证的兔模型。120只兔适应性喂养1周后,随机抽取20只作为假手术组,其余组造模,采用高脂喂养联合腹主动脉内膜球囊损伤法,造成痰瘀互结证易损斑块的病证结合模型。具体方法为高脂喂养2周,再行腹主动脉球囊损伤,兔取仰卧位,固定于小动物手术台上,戊巴比妥钠(30 mg·kg⁻¹)耳缘静脉注射麻醉,右侧腹股沟区及腹部超声引导区备皮,分离右股动脉,局部利多卡因扩张血管,行右股动脉穿刺术,送入导丝,在超声机引导下将球囊导管沿右侧股动脉上行入置腹主动脉,深度约20 cm,注气7.5个标准大气压充盈球囊,超声机引导下,抗阻牵拉至腹主动脉-髂总动脉分叉处,反复回拉3次后退出导管,逐层缝合,碘伏消毒,术后连续3 d予以40万U青霉素肌肉注射预防感染。假手术组只进行右侧股动脉穿刺,不置入球囊拉伤。继续高脂喂养4周。造模后,每组随机抽取2只兔采血测定血脂,取胸主动脉,HE染色可见大的脂质核心及薄的纤维帽则提示易损斑块造模成功,采用自主研发的中医证候评分量表进行评分,模型组较假手术组评分明显升高,提示痰瘀互结证病证结合模型造模成功。将已造模的兔子随机分为模型组,心痛泰低、中、高剂量组和瑞舒伐他汀组。假手术组给予普通饲料,自由饮水。治疗组进行药物灌胃10 mL·kg⁻¹·d⁻¹,根据药理实验方法学取成人的5, 10, 20倍作为心痛泰低、中、高剂量组的灌胃剂量,心痛泰低、中、高剂量组和瑞舒伐他汀组的给药量分别是2.3, 4.6, 9.2 g·kg⁻¹和0.55 mg·kg⁻¹。假手术组和模型组给予同等体积超纯水灌胃。连

续给药8周。

2.2 组织病理学形态观察 给药周期结束时,所有兔子行耳缘静脉麻醉,予以安乐死,取球囊损伤段的腹主动脉2.5~4.0 cm,纵行剖开摊平,0.9%冰生理盐水冲洗后,10%中性甲醛固定,乙醇脱水,10%的甲醛甲酸脱钙液脱钙2周,切成4~5 μm厚的薄片,HE染色,光镜下观察组织结构。

2.3 免疫组化法(IHC)测定主动脉组织MMP-9和TIMP-1的表达 取球囊损伤段的主动脉组织,石蜡切片、脱水,缓冲液及3%过氧化氢清洗,滴加一抗(MMP-9 1:80, TIMP-1 1:80),磷酸盐缓冲液(PBS)冲洗,滴加二抗,加ABC复合物,DAB显色,制片后

置于400倍光镜下观察,在MIAS图像分析系统下,根据染色阳性细胞数所占比例行数据统计,染色分类分为0~3级,测定吸光度A,进行分析。

2.4 中医证候评分量表评价痰瘀互结证候模型
采用自主研发的痰瘀互结证中医证候评分量表(已进行预实验)对动脉粥样硬化兔进行中医证候评分,评分等级分为0~3分。分别从精神体质量、饮食饮水、毛发的色泽与脱落情况、粪便、舌象、眼球结膜充血情况、皮肤瘀斑情况等7方面的表征进行评估。证候的轻重程度与分值的高低呈正相关,即分值越高,痰瘀互结证候越显著。动脉粥样硬化兔痰瘀互结证中医证候评分量表见表1。

表1 动脉粥样硬化兔痰瘀互结证中医证候评分

Table 1 Chinese syndrome score scale of phlegm and blood stasis syndrome in atherosclerotic rabbits

| 评分 | 精神体质量 | 食水 | 毛发 | 粪便 | 舌象 | 眼部 | 皮肤 |
|----|---------------------|-----------|-------------------|---------------|--------------------|----------------|------|
| 0分 | 正常 | 正常 | 正常 | 正常 | 正常 | 正常 | 正常 |
| 1分 | 精神倦怠,自主活动减少,体质量轻度增加 | 轻度减少 | 毛发稍黯,<30% 毛发脱落 | <30%的大便不成形 | 舌暗红 | 球结膜淡红 | 轻度瘀斑 |
| 2分 | 精神倦怠,活动减少,体质量中度增加 | 中度减少 | 毛发黯淡,30%~50%毛发脱落 | 30%~50%的大便不成形 | 舌暗紫 | 球结膜深红 | 中度瘀斑 |
| 3分 | 精神萎靡,活动明显减少,体质量明显增加 | 重度减少或不进食水 | 毛发黯淡无光,全身脱毛>50% | >50%大便不成形或腹泻 | 舌暗红/暗紫,伴有瘀斑或皮下静脉曲张 | 球结膜暗红或伴有出血点或瘀斑 | 重度瘀斑 |

2.5 Masson染色检测对兔腹主动脉VSMC胶原的影响 取球囊损伤段的主动脉组织,制成石蜡切片,随即脱蜡至水,清洗后用Regaud苏木精染液对细胞核进行染色,染色时间为5~10 min。蒸馏水充分洗涤后,用Masson丽春红酸性复红液复染5~10 min,以2%冰乙酸水溶液浸洗片刻,1%磷钼酸水溶液分化3~5 min,置入苯胺蓝染液中染色5 min,再次予以0.2%冰乙酸水溶液浸洗,加入95%乙醇、无水乙醇、二甲苯透明、中性树胶封固。MIAS图像分析系统测定高倍镜视野下的平均A。

2.6 监测CD62P,纤维蛋白原,血液黏度和红细胞压积的变化情况 试验周期结束时,对所有兔子进行耳缘静脉采血,全自动生化分析仪检测纤维蛋白原,血液黏度和红细胞压积。流式细胞仪检测CD62P的水平。

2.7 蛋白免疫印迹法(Western blot)测定主动脉组织p38 MAPK,AP-1蛋白的表达 将球囊损伤段含有斑块的主动脉组织剪成细小碎片,每20 mg组织加入RIPA裂解液150~250 μL,匀浆后置于离心机(4℃ 12 000×g)离心15 min取上清,酶标板计算样品蛋白浓度,上样,电泳,25V转膜30 min,根据说明

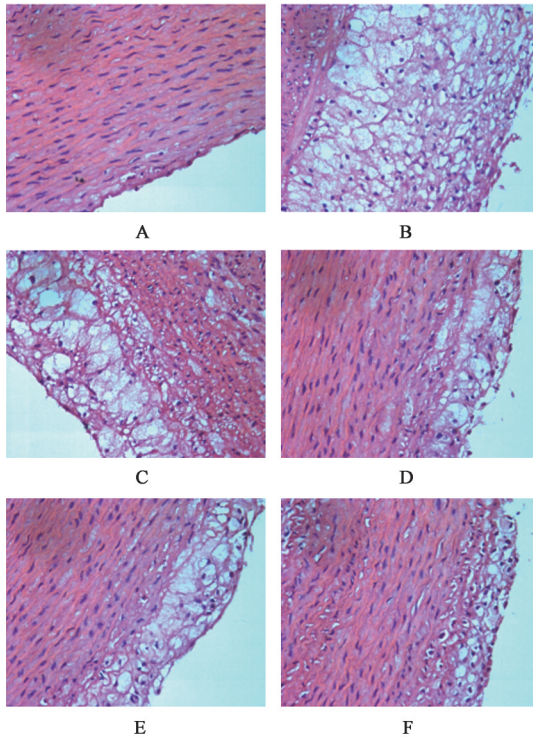
书(p38 MAPK,核内AP-1,核外AP-1均为1:1 000)封闭膜,孵育一抗的膜用TBST洗涤3次,按照1:1 000稀释HRP标记的二抗,与膜37℃孵育1 h,最后行ECL化学发光检测显影,曝光,扫描蛋白条带。Gel Image ststem ver4.0软件分析。

2.8 统计学方法 使用SPSS 23.0软件进行统计分析,实验数据以 $\bar{x}\pm s$ 表示,若符合正态分布,多组间比较采用单因素方差分析,进一步两两比较,方差齐采用最小显著性差异(LSD)法,方差不齐采用Dunnett's法,以 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对兔腹主动脉斑块病理改变的影响 假手术组动脉内膜厚度均匀,VSMC排列有序,细胞核形态规整,未见泡沫细胞和易损斑块。模型组动脉内膜增厚,VSMC排列紊乱,部分泡沫化,内膜下大量脂肪细胞堆积并形成斑块,斑块的脂质核心核大,纤维帽薄。与模型组比较,心痛泰各组 and 瑞舒伐他汀组斑块的脂质沉积明显减轻,VSMC的排列改善,VSMC的泡沫化改善。说明心痛泰可以抑制斑块脂质核心的增大,改善VSMC排列,减少VSMC向泡沫细胞转化,从而达到稳定动脉粥样硬化易损

斑块的作用。见图1。



A. 假手术组; B. 模型组; C. 心痛泰低剂量组; D. 心痛泰中剂量组; E. 心痛泰高剂量组; F. 瑞舒伐他汀组(图2~5同)

图1 心痛泰对兔腹主动脉斑块病理改变的影响(HE, ×400)

Fig. 1 Effect of Xintongtai (XTT) on pathological changes of abdominal aortic plaque in rabbits (HE, ×400)

3.2 对兔腹主动脉组织 MMP-9, TIMP-1 的影响

与假手术组比较,模型组兔主动脉组织的 MMP-9 显著升高, TIMP-1 显著降低($P < 0.01$)。与模型组比较,心痛泰低剂量组主动脉组织中的 MMP-9 明显下降, TIMP-1 明显升高($P < 0.05$);心痛泰中、高剂量组和瑞舒伐他汀组的 MMP-9 显著下降, TIMP-1 显著升高($P < 0.01$)。与低剂量组比较,心痛泰中、高剂量组和瑞舒伐他汀组的 MMP-9 显著降低, TIMP-1 显著升高($P < 0.01$)。见表2。

免疫组化结果显示,假手术组动脉管壁厚度均匀,呈淡蓝色浅染, VSMC 排列整齐,动脉内膜清晰整齐, VSMC 胞外基质和 VSMC 周围胶原纤维结构稳定。模型组可见斑块呈棕黄色深染,泡沫细胞及 VSMC 中的 MMP-9 表达增加,细胞外基质降解增多, VSMC 胶原减少,导致 VSMC 排列紊乱甚至皱缩。与模型组比较,心痛泰各组 and 瑞舒伐他汀组动脉内膜泡沫细胞体积减小,细胞染色浅, MMP-9 表达降低, TIMP-1 表达增多, VSMC 细胞外基质的分解较少, VSMC 胶原增加,排列趋于稳定。见图2,3。

表2 心痛泰对兔腹主动脉组织 MMP-9, TIMP-1 表达水平的影响($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Effect of XTT on expression levels of MMP-9 and TIMP-1 in aorta of rabbits ($\bar{x} \pm s$)

| 组别 | n | 剂量/g·kg ⁻¹ | MMP-9 | TIMP-1 |
|-------|----|-----------------------|-----------------------------|-----------------------------|
| 假手术 | 18 | | 0.458±0.112 | 0.625±0.232 |
| 模型 | 15 | | 0.742±0.165 ²⁾ | 0.137±0.029 ²⁾ |
| 心痛泰 | 14 | 2.3 | 0.621±0.157 ³⁾ | 0.352±0.104 ³⁾ |
| | 16 | 4.6 | 0.537±0.143 ^{4,6)} | 0.548±0.151 ^{4,6)} |
| | 15 | 9.2 | 0.483±0.135 ^{4,6)} | 0.561±0.158 ^{4,6)} |
| 瑞舒伐他汀 | 14 | 5.5×10 ⁻⁴ | 0.496±0.128 ^{4,6)} | 0.575±0.163 ^{4,6)} |

注:与假手术组比较¹⁾ $P < 0.05$,²⁾ $P < 0.01$;与模型组比较³⁾ $P < 0.05$,⁴⁾ $P < 0.01$;与低剂量组比较⁵⁾ $P < 0.05$,⁶⁾ $P < 0.01$ (表3~5同)。

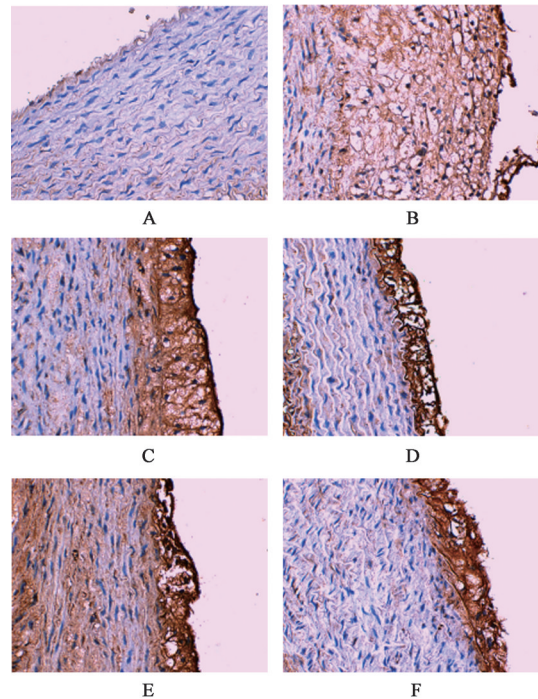


图2 心痛泰对兔腹主动脉 MMP-9 的影响(IHC, ×400)

Fig. 2 Effect of XTT on MMP-9 in abdominal aorta of rabbits (IHC, ×400)

3.3 对兔腹主动脉 VSMC 胶原的影响

假手术组动脉管壁厚度均匀, VSMC 整齐呈蓝染, VSMC 周围胶原纤维结构正常、呈红染,细胞核大小正常;模型组 VSMC 排列紊乱,胶原分解增多,管壁变薄,斑块易损性增加,管腔内可见血栓形成;与模型组比,心痛泰各组 and 瑞舒伐他汀组 VSMC 胶原纤维分解减少, VSMC 排列和管壁结构均有所改善,斑块稳定性增加,管腔内出血明显减轻。说明心痛泰和瑞舒伐他汀可减少 VSMC 周围胶原分解,改善动脉管壁结构,达到稳定易损斑块的作用。见图4,5。

3.4 对兔痰瘀互结证中医证候积分的影响

与假

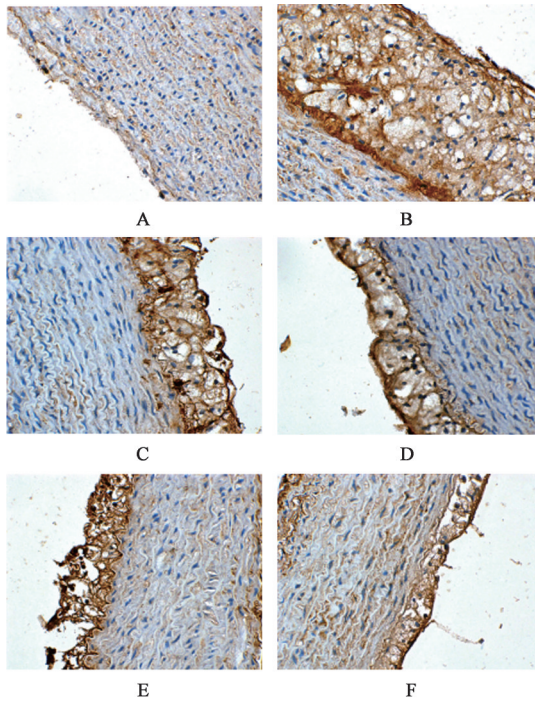


图3 心痛泰对兔腹主动脉TIMP-1的影响(IHC,×400)

Fig. 3 Effect of XTT on TIMP-1 in abdominal aorta of rabbits (IHC,×400)

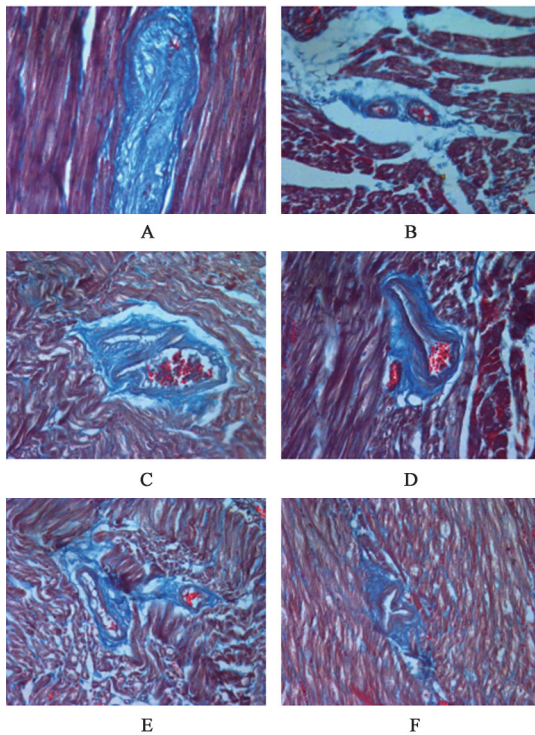


图4 心痛泰对兔腹主动脉VSMC胶原的影响横切(Masson,×400)

Fig. 4 Effect of XTT on collagen of VSMC in rabbit abdominal aorta crosscut graph (Masson,×400)

手术组比较,模型组兔痰瘀互结证的中医证候积分显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,心痛泰低剂量组的中医证候积分明显下降($P<0.05$);心痛泰中、高

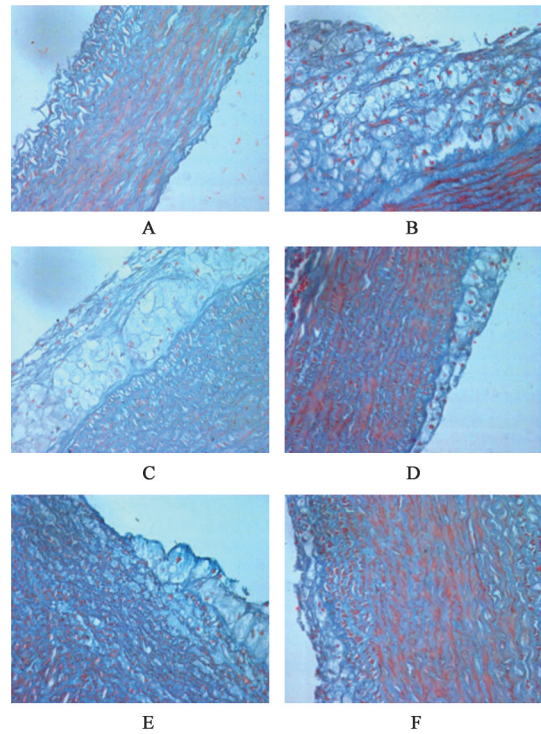


图5 心痛泰对兔腹主动脉VSMC胶原的影响纵切(Masson,×400)

Fig. 5 Effect of XTT on collagen of VSMC in rabbit abdominal aorta slitting graph (Masson,×400)

剂量组和瑞舒伐他汀组的中医证候积分显著降低($P<0.01$)。与低剂量组比较,心痛泰中、高剂量组和瑞舒伐他汀组的中医证候积分显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)。见表3。

3.5 对兔CD62P,纤维蛋白原,血液黏度和红细胞压积的影响 与假手术组比较,模型组兔的CD62P,纤维蛋白原,血液黏度和红细胞压积显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,心痛泰低剂量组的CD62P,纤维蛋白原,血液黏度和红细胞压积明显下降($P<0.05$);心痛泰中、高剂量组和瑞舒伐他汀组的CD62P,纤维蛋白原,血液黏度和红细胞压积显著降低($P<0.01$)。与低剂量组比较,心痛泰中、高剂量组和瑞舒伐他汀组的CD62P,纤维蛋白原,血液黏度和红细胞压积显著降低,差异具有统计学意义($P<0.01$)。上述指标提示心痛泰干预后,血瘀证型有所改善。见表4。

3.6 对兔主动脉p38 MAPK及细胞核、细胞质AP-1蛋白的表达的影响 与假手术组比较,模型组兔主动脉组织的p38 MAPK蛋白的表达显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,心痛泰低剂量组的p38 MAPK蛋白的表达明显降低($P<0.05$);心痛泰中、高剂量组和瑞舒伐他汀组的p38 MAPK蛋白的表达显著降低, ($P<0.01$)。与低剂量组比较,心痛泰中、高

表3 心痛泰对痰瘀互结证中医证候积分的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 3 Effect of XTT on Chinese syndrome integral of phlegm and blood stasis syndrome in rabbits ($\bar{x}\pm s$)

分

| 组别 | n | 剂量/g·kg ⁻¹ | 精神 | 食水 | 毛发 | 粪便 | 舌象 | 眼部 | 皮肤 | 痰瘀互结证候积分 |
|-------|----|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 模型 | 15 | | 2.45±0.62 ²⁾ | 2.17±0.83 ²⁾ | 1.63±0.55 ²⁾ | 1.48±0.53 ²⁾ | 2.75±0.91 ²⁾ | 1.94±0.37 ²⁾ | 2.16±0.48 ²⁾ | 14.58±3.14 ²⁾ |
| 心痛泰 | 14 | 2.3 | 1.93±0.74 ³⁾ | 1.85±0.76 ³⁾ | 1.24±0.41 ³⁾ | 0.95±0.45 ³⁾ | 1.76±0.63 ³⁾ | 1.28±0.57 ³⁾ | 1.73±0.61 ³⁾ | 10.74±2.65 ³⁾ |
| | 16 | 4.6 | 1.25±0.56 ^{4,6)} | 1.54±0.59 ^{4,6)} | 0.71±0.34 ^{4,6)} | 0.79±0.38 ^{4,6)} | 1.52±0.63 ^{4,6)} | 0.83±0.26 ^{4,6)} | 1.43±0.52 ^{4,6)} | 8.03±2.36 ^{4,6)} |
| | 15 | 9.2 | 0.94±0.42 ^{4,6)} | 1.32±0.61 ^{4,6)} | 0.75±0.37 ^{4,6)} | 0.82±0.46 ^{4,6)} | 1.65±0.58 ^{4,6)} | 0.92±0.35 ^{4,6)} | 1.39±0.47 ^{4,6)} | 7.79±2.15 ^{4,6)} |
| 瑞舒伐他汀 | 14 | 5.5×10 ⁻⁴ | 1.05±0.48 ^{4,6)} | 1.27±0.53 ^{4,6)} | 0.81±0.42 ^{4,6)} | 0.72±0.35 ^{4,6)} | 1.41±0.43 ^{4,6)} | 0.94±0.38 ^{4,6)} | 1.25±0.34 ^{4,6)} | 7.45±1.83 ^{4,6)} |

注:假手术组的中医证候积分均为0分。

表4 心痛泰对AS痰瘀互结证模型兔CD62P,纤维蛋白原,血液黏度和红细胞压积的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 4 Effect of XTT on CD62P, fibrinogen, blood viscosity and hematocrit in rabbits with phlegm and blood stasis syndrome ($\bar{x}\pm s$)

| 组别 | n | 剂量/g·kg ⁻¹ | CD62P/μg·L ⁻¹ | 纤维蛋白原/g·L ⁻¹ | 血液黏度/mPa·s ⁻¹ | 红细胞压积/% |
|-------|----|-----------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 假手术 | 18 | | 12.35±2.47 | 2.19±0.63 | 1.25±0.58 | 0.43±0.05 |
| 模型 | 15 | | 23.64±5.12 ²⁾ | 8.35±3.24 ²⁾ | 2.17±0.73 ²⁾ | 0.62±0.08 ²⁾ |
| 心痛泰 | 14 | 2.3 | 17.28±3.15 ³⁾ | 4.62±1.51 ³⁾ | 1.84±0.36 ³⁾ | 0.48±0.06 ³⁾ |
| | 16 | 4.6 | 15.41±2.92 ^{4,6)} | 3.57±0.83 ^{4,6)} | 1.39±0.59 ^{4,6)} | 0.45±0.04 ^{4,6)} |
| | 15 | 9.2 | 14.36±2.48 ^{4,6)} | 3.39±0.86 ^{4,6)} | 1.45±0.51 ^{4,6)} | 0.44±0.05 ^{4,6)} |
| 瑞舒伐他汀 | 14 | 5.5×10 ⁻⁴ | 13.97±2.52 ^{4,6)} | 3.43±0.75 ^{4,6)} | 1.32±0.45 ^{4,6)} | 0.41±0.02 ^{4,6)} |

剂量组和瑞舒伐他汀组的p38 MAPK蛋白表达显著降低($P<0.01$)。

主动脉VSMC中的细胞质AP-1降低伴细胞核AP-1升高,提示AP-1核转位。与正常组比较,模型组主动脉AP-1核转位显著增加($P<0.01$)。与模型

组比较,心痛泰低剂量组AP-1的核转位明显减少($P<0.05$);心痛泰中、高剂量组和瑞舒伐他汀组AP-1核转位显著减少($P<0.01$)。与低剂量组比较,中、高剂量组和瑞舒伐他汀组AP-1核转位显著减少($P<0.01$)。见表5,图6。

表5 心痛泰对各组兔主动脉p38 MAPK,细胞核AP-1,细胞质AP-1蛋白定量的影响 ($\bar{x}\pm s$)

Table 5 Effect of XTT on protein quantity of p38 MAPK, AP-1 in nucleus and cytoplasm rabbit aorta ($\bar{x}\pm s$)

mmol·L⁻¹

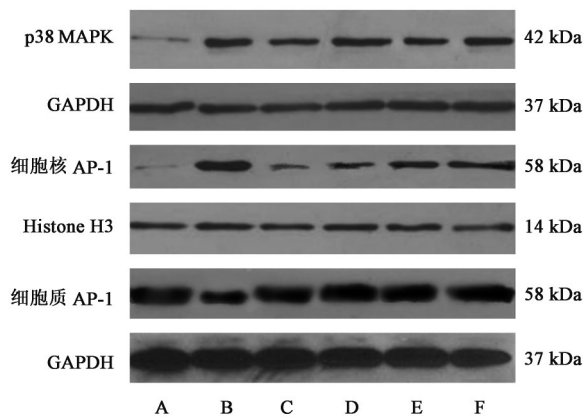
| 组别 | n | 剂量/g·kg ⁻¹ | p38 MAPK | 细胞核AP-1 | 细胞质AP-1 |
|-------|----|-----------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| 假手术 | 18 | | 0.23±0.07 | 0.07±0.02 | 0.82±0.01 |
| 模型 | 15 | | 0.89±0.10 ²⁾ | 1.24±0.09 ²⁾ | 0.17±0.01 ²⁾ |
| 心痛泰 | 14 | 2.3 | 0.79±0.03 ³⁾ | 1.09±0.14 ³⁾ | 0.30±0.01 ³⁾ |
| | 16 | 4.6 | 0.43±0.07 ^{4,6)} | 0.57±0.13 ^{4,6)} | 0.64±0.01 ^{4,6)} |
| | 15 | 9.2 | 0.42±0.08 ^{4,6)} | 0.44±0.07 ^{4,6)} | 0.60±0.02 ^{4,6)} |
| 瑞舒伐他汀 | 14 | 5.5×10 ⁻⁴ | 0.38±0.06 ^{4,6)} | 0.15±0.04 ^{4,6)} | 0.59±0.01 ^{4,6)} |

4 讨论

急性心肌梗死的主要致病因素动脉易损斑块破裂出血^[13]。因此,预防急性心肌梗塞发生的首要任务稳定易损斑块。易损斑块破裂的重要原因之一是纤维帽在MMP的作用下分解,最终斑块内的脂质核心及坏死内容物漏出,引起管腔闭塞^[14]。VSMC是参与斑块纤维帽形成的重要细胞,对于已经形成的斑块,VSMC的凋亡、钙化、表型转化过程中分泌的细胞因子,例如MMP,转化生长因子-β(TGF-β)等,可促进细胞外基质降解,引起纤维帽中

的胶原纤维分解增多,纤维帽变薄,最终导致易损斑块破裂^[15]。

中医没有确切的对应易损斑块的病名,但根据发病部位,可将易损斑块归属于“胸痹”“真心痛”“中风”。其病位在“脉”,病性属本虚标实,本虚是肝、脾、肾亏虚,标实以痰浊、血瘀为主,其中,脾虚生痰是痰瘀互结病机的根源^[16]。高脂血症与“痰浊”形成的病理过程相对应。《黄帝内经·素问·阴阳应象大论》云:“饮食入胃,游溢精气,上输于脾,脾气散精,上归于肺,通调水道,下输膀胱,水津四布,



A. 假手术组; B. 模型组; C. 瑞舒伐他汀组; D. 心痛泰高剂量组; E. 心痛泰中剂量组; F. 心痛泰低剂量组

图6 兔腹主动脉VSMC中p38 MAPK, 细胞核AP-1, 细胞质内AP-1蛋白电泳

Fig. 6 Electrophoresis of p38 MAPK, nuclear AP-1 and cytoplasm AP-1 expression in VSMC of rabbit abdominal aorta

五经并行。”脾胃化生的精微物质滋养脉道、荣养全身脏器,过食肥甘厚味则体内易生湿浊,湿气困脾,脾胃虚弱,水谷难以化生精微,清浊不分、脉道失养,导致痰浊、瘀血等有形实邪沉积脉道,因此痰瘀互结是形成易损斑块的病理基础^[17]。“心受气于脾”理论来源于《黄帝内经·素问·玉机真藏论》:“心受气于脾,传之于肺,气舍于肝,至肾而死。”心属火,脾属土,二者在五行中为母子关系,子病可及母,脾病可及心。“心受气于脾”的具体是指,心脏遭受病气于其所生之脏(脾),即子(脾)病传母(心),为脾病逆行传变至心脏。王佳楠等^[18]的实验研究表明,基于“心受气于脾”理论,高脂喂养及活动受限可造成巴马猪冠心病脾虚痰浊的中医证候模型,模型组心肌纤维萎缩、变性、断裂、伴随炎症浸润。课题组的前期研究已证实心痛泰可改善动脉粥样硬化兔的血脂水平,减轻斑块内脂质沉积^[8]。痰浊日久阻滞气机,气滞血瘀导致瘀血阻络,易损斑块中的新生血管易于破裂出血,与“瘀血”的形成过程相对应,血瘀证型可反映在血液流变学的指标上。斑块的稳定性与血液流变学中的血小板膜糖蛋白CD62P,纤维蛋白原,血液黏度和红细胞压积相关^[19],因此本研究采用上述血液流变学指标评价血瘀证型。综上所述,脾虚是易损斑块痰瘀互结证形成的根本原因,脾虚生痰、因痰致瘀,痰瘀互结是易损斑块的核心病机,治疗当以健脾理气、化痰祛瘀为纲要。从现代医学的角度来说,脾虚与斑块的易损性密切相关,脾虚则气血生化无源,脾虚会影响血清脂质转运、加速脂质沉积。李权等^[20]的研究表

明,化痰祛浊方可改善患者动脉粥样硬化斑块程度,增强调脂功能、降低炎症反应程度和氧化应激程度,从而治疗脾虚痰浊阻遏型颈动脉粥样硬化斑块。脾虚会影响冠脉细胞中凋亡相关基因B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)基因,Bcl-2相关X蛋白(Bax),半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)的表达,增加TGF- β 和MMP-1的表达^[21],直接影响胶原纤维的再生和纤维帽的厚度,从而导致易损斑块的破裂。徐跃等^[22]对冠脉细胞凋亡相关基因差异性表达的研究发现,易损斑块的发生机制可能与冠状动脉内Bax, Bcl-2, 细胞趋化因子2(CCL2), TGF- β_1 , 肿瘤坏死因子(TNF), B淋巴细胞瘤-2基因样蛋白1(BCL2L1), 激活集落刺激因子-2(CSF-2)等基因改变有关, TGF- β_1 下调了BCL2L1/Bax编码蛋白的比率,与上调的TNF, γ 干扰素(IFN- γ)和下调的BIRC3共同作用,导致细胞内整体凋亡水平的上调,从而促进动脉易损斑块的形成。

心痛泰是基于“心受气于脾”中医理论基础进行组方的,心痛泰可助脾运气,助心行血,通过理气化痰、活血通络,减少或消除“痰浊”“瘀血”等病理产物,稳定易损斑块。心痛泰组方为丹参、川芎、茯苓、白术、陈皮、木香、枳壳、葛根、三七、郁金、炙甘草等中药组成。其中,丹参、川芎共为君药,共奏理气活血通络之功;茯苓、白术、陈皮等共为臣药,可补气健脾、燥湿化痰;佐以枳壳、木香、葛根,升降相因、助脾运气;三七、郁金活血止痛、行气解郁;炙甘草和中缓急,调和诸药。因此全方有健脾理气、活血化痰之效,可用于痰瘀互结之冠心病的治疗。目前国内外的动物实验研究中,并无统一的动物模型痰瘀互结证评分量表,为了促使从“临床”到“实验”到“临床”的转化医学的研究,动物的中医证候模型的研究和中药复方对中医证候的干预作用的研究具有很高的临床应用价值,研究者前期进行了预实验对动物的中医证候进行评分,本研究将评分量表应用于正式实验,具备方法上的原创性和可操作性。

目前不稳定斑块在炎症反应领域的研究较多,但针对斑块纤维帽中VSMC细胞和胶原纤维的研究较少。本研究从动脉粥样硬化易损斑块的痰瘀互结病证结合动物模型出发,采用现代科学方法,验证“心受气于脾”的中医理论与p38 MAPK/AP-1通路和VSMC周围胶原纤维的影响。本研究以p38 MAPK/AP-1通路为基础,探讨该通路及其下游MMPs的改变与易损斑块稳定性的关联。

p38 MAPK/AP-1 信号通路是参与易损斑块形成的重要信号通路,其中 p38 MAPK 是丝裂原活化蛋白激酶通路,主要作用将细胞外刺激信号转导至细胞及其核内,促进细胞内的分子生物学反应,p38 MAPK 可促进 VSMC 的凋亡导致动脉粥样硬化斑块的形成^[23]。AP-1 是细胞内一类转录激活因子,接收 p38 MAPK 传递而来的信号,磷酸化后从胞质进入细胞核,与相应的 DNA 序列结合,从而调控包括 MMP-9、TIMP-1 在内的细胞因子的表达,AP-1 通路可促进 VSMC 的增殖和迁移,导致动脉粥样硬化易损斑块的形成^[24]。MMP-9 的过表达会促使易损斑块纤维帽中的基质降解,胶原纤维分解增加,纤维帽变薄甚至破裂,促进易损斑块的破裂,最终导致急性心肌梗塞的发生^[25]。

本研究表明,高脂喂养联合腹主动脉球囊损伤可造成痰瘀互结证易损斑块的动物模型,模型兔的动脉形成明显的易损斑块,脂质核心大、泡沫细胞堆积、纤维帽薄。与模型组比较,心痛泰各组 and 瑞舒伐他汀组斑块内 p38 MAPK 蛋白的表达降低,AP-1 的核转位减少,其下游的细胞因子 MMP-9 的表达明显下降,TIMP-1 的表达明显增加。Masson 染色提示模型组的动脉弹力纤维明显破坏,胶原纤维减少且排列紊乱,斑块易损性增加,并出现了管腔内出血;与模型组比较,心痛泰各组 and 瑞舒伐他汀组弹力纤维的破坏减轻,VSMC 排列较模型组整齐,胶原纤维显著改善,管腔内出血减轻,且心痛泰中、高剂量组的疗效优于低剂量组。痰瘀互结中医证候积分表明,模型组的中医证候积分明显升高,血瘀相关的血液流变学指标 CD62P,纤维蛋白原,血液黏度和红细胞压积也显著升高;与模型组比较,心痛泰各组 and 瑞舒伐他汀组的痰瘀互结证候积分,CD62P,纤维蛋白原,血液黏度和红细胞压积明显下降,且心痛泰中、高剂量组的下降的程度明显多于低剂量组。上述结果提示心痛泰一方面通过抑制 p38 MAPK/AP-1 通路及下游 MMP-9,增加 TIMP-1,减轻 VSMC 周围胶原纤维的分解,稳定纤维帽,从而稳定易损斑块;另一方面,心痛泰通过减轻兔的中医证候评分,改善了易损斑块兔模型的痰瘀互结证。

综上所述,具有理气化痰、活血通络功效的心痛泰可以有效防治易损斑块的破裂和改善痰瘀互结证型,其机制可能是通过抑制 p38 MAPK/AP-1 通路,减少斑块纤维帽中胶原分解有关。本研究初步阐释了“心受气于脾”理论的科学内涵,探索了心痛

泰通过从脾治心,痰瘀同治的治则来稳定易损斑块的分子机制。发掘心痛泰如何调整 VSMC 生物学特性来稳定斑块的纤维帽,以及 VSMC 的病理生理改变与“心受气于脾”的关联,将成为课题组下一步的研究方向,以期为中心痛泰稳定动脉粥样硬化斑块和“心受气于脾”理论提供更深层次的实验依据。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

- [1] 国家心血管病中心. 中国心血管健康与疾病报告 2019[M]. 北京:科学出版社,2020.
- [2] 贺佳琪,王琳鑫,曹阳,等. 动脉粥样硬化斑块内出血影像学检查技术进展[J]. 心血管病学进展,2020,41(11):1148-1151.
- [3] 王竞悟,于杨,王大新,等. 血管平滑肌细胞与动脉粥样硬化关系的研究新进展[J]. 实用医学杂志,2017,33(21):3661-3663.
- [4] 邵伟华,吕彩霞,王晓曦,等. 维生素 D 联合阿托伐他汀钙对老年高血压患者颈动脉粥样硬化的干预研究[J]. 中国心血管病研究,2020,18(12):1110-1114.
- [5] 靳宏光,朱星,李铁,等. 痰瘀同治法对动脉粥样硬化大鼠易损斑块的影响[J]. 中国老年学杂志,2021,41(10):2150-2153.
- [6] 武亚田,刘育硕,武娜,等. 健脾祛湿化浊汤治疗脾虚湿阻型颈动脉斑块的临床疗效观察[J]. 中医临床研究,2020,12(22):95-98.
- [7] 易琼,李雅,郭志华,等. 基于 TLR4/p38MAPK/AP-1 信号通路探讨心痛泰对兔动脉粥样硬化和血管重构的机制[J]. 中华中医药杂志,2020,35(8):3878-3884.
- [8] 易琼,李雅,郭志华,等. 心痛泰对动脉粥样硬化兔血脂及主动脉 ox-LDL、IL-1 β 的影响[J]. 中国动脉硬化杂志,2016,24(1):39-43.
- [9] 易琼,李雅,郭志华,等. 心痛泰通过降低 Lp-PLA2、IL-6、hs-CRP、LOX-1 水平减轻兔动脉粥样硬化炎症反应[J]. 中国动脉硬化杂志,2017,25(8):796-799.
- [10] 孙敬方. 动物实验方法学[M]. 北京:人民卫生出版社,2001:87.
- [11] 李萍,惠晶晶,金琳,等. 抗 ICAM-1 纳米靶向超声泡识别兔腹主动脉粥样硬化早期炎症的实验研究[J]. 中国动脉硬化杂志,2020,28(12):1042-1047.
- [12] 王婷,叶小汉,吴锦波,等. 心脉康方对兔动脉粥样硬化及 NF- κ B p65 表达的影响[J]. 广州中医药大学学报,2020,37(10):1963-1968.
- [13] 杨亚攀,董淑娟,李静超,等. 不同类型急性冠脉综合征患者罪犯病变的形态学特点[J]. 中国动脉硬化杂志,2021,29(4):322-326.
- [14] 陈威宇,肖晗,郭丽君. 易损斑块的病理组织学特征

- 和机制研究现状[J]. 中国心血管杂志, 2021, 26(1): 74-77.
- [15] GROOTAERT M O J, MOULIS M, ROTH L, et al. Vascular smooth muscle cell death, autophagy and senescence in atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2018, 114(4): 622-634.
- [16] 漆仲文, 李萌, 朱科, 等. 中医药干预动脉粥样硬化易损斑块的机制研究述评[J]. 中国中医基础医学杂志, 2021, 27(1): 166-169.
- [17] 王群, 贾连群, 郑思成, 等. 基于文献计量学的动脉粥样硬化中西医研究进展可视化分析[J]. 世界中医药, 2019, 14(8): 2166-2176.
- [18] 王佳楠, 英哲铭, 徐宁阳, 等. 基于“心受气于脾”探讨脾虚痰浊巴马猪冠脉内皮免疫炎症研究[J]. 中华中医药学刊, 2021, 39(5): 157-161, 288.
- [19] 杨佳音, 简蓉蓉, 许雅丽, 等. CD73对动脉粥样硬化中血管平滑肌细胞的作用[J]. 复旦学报: 医学版, 2015, 42(3): 300-306.
- [20] 李权, 张学新, 刘艳军. 化痰祛浊方治疗脾虚痰浊阻遏型颈动脉粥样硬化斑块的临床观察[J]. 河北中医, 2019, 41(1): 42-46.
- [21] 刘悦, 张帆, 王洋, 等. 基于“心受气于脾”理论探讨冠心病的发病机制[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(7): 1675-1677.
- [22] 徐跃, 姜钧文, 宋囡, 等. 脾虚痰浊巴马小型猪冠脉细胞凋亡与细胞生长和增殖相关基因差异性表达研究[J]. 辽宁中医杂志, 2016, 43(10): 2197-2199, 2240.
- [23] WU J K, YANG Q, LI Y Y, et al. Effect of leech on VSMCs in early atherosclerosis rats via p38MAPK signaling pathway[J]. *Chin J Chin Mater Med*, 2017, 42(16): 3191-3197.
- [24] JI R, GU Y, ZHANG J, et al. TRIM7 promotes proliferation and migration of vascular smooth muscle cells in atherosclerosis through activating c-Jun/AP-1 [J]. *IUBMB Life*, 2020, 72(2): 247-258.
- [25] LI T, LI X, FENG Y, et al. The role of matrix metalloproteinase-9 in atherosclerotic plaque instability [J]. *Mediators Inflamm*, 2020, doi: 10.1155/2020/3872367.

[责任编辑 王鑫]