

· 药理 ·

双参宁心胶囊对冠状动脉微循环障碍大鼠心脏功能及血流动力学的影响

李磊, 孟红旭, 辛高杰, 任建勋, 郭浩, 金龙, 史跃, 马彦雷, 刘建勋*
(中国中医科学院 西苑医院基础医学研究所, 国家中医心血管病临床医学研究中心,
中药药理北京市重点实验室, 北京 100091)

[摘要] 目的:研究益气活血中药双参宁心胶囊对冠状动脉微循环障碍大鼠心脏血流动力学及心功能的影响。方法:大鼠随机分为6组,分别为假手术组,模型组,尼可地尔组($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),双参宁心胶囊高、中、低剂量($180, 90, 45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)组。动物按分组先给予相应药物7 d,末次给药后2 h进行模型制备。采用左心室注射内注射栓塞微球($40\sim 120\ \mu\text{m}$,约1 000个微球)方法建立大鼠冠脉微循环障碍模型。造模术后24 h后超声心动图观察左室舒张末期内径(LVIDd),左室收缩末期内径(LVIDs),左室舒张末期容积(LVEDV),左室收缩末期容积(LVESV),每搏输出量(SV),心输出量(CO),左室射血分数(EF),左室缩短率(FS);心导管技术测定大鼠动脉收缩压(SBP),舒张压(DBP),左室峰压(LVSP),左室舒张末压(LVEDP),左室内压最大上升速率($\text{LV}+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$),左室内压最大下降速率($\text{LV}-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$),计算平均动脉(MAP),体表标准II导心电图计算心率(HR);生化分析法检测肌酸激酶(CK),肌酸激酶同工酶(CK-MB)和乳酸脱氢酶(LDH)活性;酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测血清心肌钙蛋白T(cTnT);蛋白免疫印迹法(Western blot)检测大鼠心肌组半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3),B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)及Bcl-2相关X蛋白(Bax)蛋白表达;2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色观察心肌梗死面积;苏木素-伊红(HE)染色观察心肌形态学改变。结果:与假手术组比较,模型组SV,CO,EF,FS显著降低($P<0.01$),LVIDs,LVEDV显著增加($P<0.01$);与模型组比较,双参宁心胶囊各剂量组可以增加EF($P<0.05, P<0.01$)和FS($P<0.01$); $180, 90\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 剂量组明显降低LVIDs,LVESV,增加LVEDV,SV和CO($P<0.05, P<0.01$)。与假手术组比较,模型组SBP,DBP,MAP,LVSP, $\text{LV}+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 及 $\text{LV}-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 均显著降低($P<0.01$),HR差异无统计学意义。双参宁心胶囊各剂量组对大鼠血流动力学具有一定程度改善,较模型组增加大鼠SBP,DBP,MAP,LVSP, $\text{LV}+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$, $\text{LV}-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ 及HR($P<0.05, P<0.01$)。与假手术组比较,模型组大鼠血清CK,LDH,CK-MB及cTnT明显升高($P<0.01$),与模型组比较,双参宁心胶囊有明显降低动物血清CK,LDH,CK-MB及cTnT的作用($P<0.05, P<0.01$)。与假手术组比较,模型组大鼠心肌Caspase-3蛋白表达显著升高($P<0.01$),Bcl-2蛋白表达明显降低($P<0.05$)。与模型组比较,双参宁心胶囊低剂量组心肌Caspase-3蛋白表达降低($P<0.05$);与模型组比较,双参宁心胶囊高剂量组显著增加大鼠心肌Bcl-2表达($P<0.01$)。心肌TTC染色显示,与模型组比较,双参宁心胶囊各剂量组均能显著减少心肌梗死面积($P<0.01$)。HE病理结果显示,双参宁心胶囊各剂量组心肌组织病理变化与模型组比较有不同程度的减轻。结论:益气活血中药双参宁心胶囊可以明显增加微球栓塞导致的冠脉微循环障碍的心脏功能,改善心脏血流动力学指标,减少心肌梗死面积,降低CK,LDH,CK-MB及cTnT等心肌损伤标志物水平,其作用机制与抑制心肌细胞凋亡起到保护心肌的作用有关。

[关键词] 双参宁心胶囊; 益气活血中药; 冠脉微循环障碍; 心脏功能; 血流动力学

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R33 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)22-0041-10

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20212105

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20210927.2239.007.html>

[网络出版日期] 2021-09-28 13:27

Effect of Shuangshen Ningxin Capsules on Cardiac Function and Hemodynamics in Rats with Coronary Microvascular Dysfunction

LI Lei, MENG Hong-xu, XIN Gao-jie, REN Jian-xun, GUO Hao, JIN Long,
SHI Yue, MA Yan-lei, LIU Jian-xun*

[收稿日期] 20210708(001)

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目(82030124);国家“重大新药创制”科技重大专项(2017ZX09301018)

[第一作者] 李磊,博士,副研究员,从事中药心血管药理研究,Tel:010-62835608,E-mail:lilei0502@126.com

[通信作者] *刘建勋,博士,研究员,从事中药心血管药理研究,Tel:010-62835601,E-mail:liujx0324@sina.com

(Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, National Clinical Research Center of Cardiovascular Diseases of Traditional Chinese Medicine, Institute of Basic Medical Sciences of Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China)

[Abstract] **Objective:** To investigate the effect of Shuangshen Ningxin capsules (SSNX) on cardiac hemodynamics and cardiac function in rats with coronary microvascular dysfunction. **Method:** Rats were randomly divided into a sham operation group, a model group, a nicorandil group ($5 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and high- ($180 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), medium- ($90 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$), and low-dose ($45 \text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$) SSNX groups. Rats received corresponding drugs for 7 days. Two hours after the last administration, the model of coronary microvascular dysfunction was induced by left ventricular injection of embolic microspheres ($40\text{-}120 \mu\text{m}$, about 1 000 microspheres). Twenty-four hours after modeling, left ventricular internal dimension in diastole (LVIDd), left ventricular internal dimension in systole (LVIDs), left ventricular end-diastolic volume (LVEDV), left ventricular end-systolic volume (LVESV), stroke volume (SV), cardiac output (CO), left ventricular ejection fraction (EF), and left ventricular shortening rate (FS) were detected by echocardiography. Cardiac catheterization was used to observe the arterial systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), left ventricular systolic pressure (LVSP), left ventricular end-diastolic pressure (LVEDP), maximum rate of increase in left ventricular pressure ($\text{LV}+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$), and maximum rate of decrease in left ventricular pressure ($\text{LV}-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$), and the mean arterial pressure (MAP) was calculated. Heart rate (HR) was calculated according to II lead ECG. Biochemical analysis was carried out to detect the activities of creatine kinase (CK), creatine kinase-MB (CK-MB), and lactate dehydrogenase (LDH). Enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was used to detect serum cardiac troponin T (cTnT). Western blot was used to detect the protein expression of Caspase-3, Bcl-2, and Bax, and 2, 3, 5-triphenyltetrazolium chloride (TTC) staining to observe the area of myocardial infarction. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe the morphological changes of the myocardium. **Result:** As revealed by echocardiography, compared with the sham operation group, the model group showed reduced SV, CO, EF, and FS ($P<0.01$), and increased LVIDs and LVEDV ($P<0.01$). Compared with the model group, the SSNX groups showed increased EF ($P<0.05$, $P<0.01$) and FS ($P<0.01$), and the high- and medium-dose SSNX groups displayed reduced LVIDs and LVESV, and increased LVEDV, SV, and CO ($P<0.05$, $P<0.01$). SBP, DBP, MAP, LVSP, $\text{LV}+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$, and $\text{LV}-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$ in the model group were lower than those in the sham operation group ($P<0.01$), while there was no significant difference in HR. SSNX improved hemodynamics of rats, and increased SBP, DBP, MAP, LVSP, $\text{LV}+\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$, $\text{LV}-\text{dp}/\text{dt}_{\text{max}}$, and HR as compared with the model group ($P<0.05$, $P<0.01$). The serum CK, LDH, CK-MB, and cTnT levels in the model group were higher than those in the sham operation group ($P<0.01$). Compared with the model group, SSNX groups reduced serum CK, LDH, CK-MB, and cTnT ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with the sham operation group, the model group displayed increased expression of Caspase-3 protein in the myocardium ($P<0.01$) and reduced expression of Bcl-2 protein ($P<0.05$). The expression of Caspase-3 protein in the myocardium of SSNX groups was lower than that in the model group, and statistical difference was observed between the low-dose SSNX group and the model group ($P<0.05$). Compared with the model group, the SSNX groups exhibited increased expression of Bcl-2 in the rat myocardium, and the statistical difference was observed in the high-dose SSNX group ($P<0.01$). As demonstrated by the TTC staining, compared with the model group, SSNX groups showed reduced areas of myocardial infarction ($P<0.01$). The HE staining indicated that the pathological injury in myocardial tissues of the SSNX groups was relieved as compared with that in the model group. **Conclusion:** SSNX can significantly enhance the cardiac function after coronary microvascular dysfunction caused by embolic microspheres, improve cardiac hemodynamics, reduce the area of myocardial infarction, and decrease CK, LDH, CK-MB, and cTnT levels. The mechanism may be related to the inhibition of cardiomyocyte apoptosis to protect the myocardium.

[Keywords] Shuangshen Ningxin capsule; Qi-benefiting and blood-activating Chinese medicine; coronary microvascular dysfunction; cardiac function; hemodynamics

冠状动脉微循环功能障碍(CMD)通常是指发生于直径小于300 μm 心脏血管的结构和功能改变,是心脏X综合征、经皮冠状动脉介入治疗(PCI)后无复流、冠脉微栓塞等微循环病变的共同发病机制^[1]。目前,CMD发病机制仍然没有完全被阐明,一般认为血管内皮损伤、血管平滑肌功能异常,机械性压迫、冠脉微栓塞及缺血再灌注损伤等与CMD的发生密切相关^[2-3]。不论何种原因导致的CMD,最终也会和心外膜冠脉狭窄一样导致心肌耗氧的供需失衡,引起临床症状并影响心血管疾病的诊疗和预后^[4-6]。

现代中医认为CMD的病机属心络受损,血瘀阻络,乃属本虚标实之为病。本虚则心气不足,心阳虚损,心络绌急,因气为血之帅,气虚则血行无力,血液运行不畅必滞留成瘀。其治疗应根据CMD的病情变化,采用益气、活血、通络、化痰和疏肝等治疗原则^[7]。双参宁心胶囊是由中国中医科学院西苑医院自主研发的创新组方中药,由人参、丹参和元胡药味中所含治疗缺血性心脏病有效部位及成分组成,具有益心补气、化瘀止痛之功效,用于冠心病、心绞痛及CMD气虚血瘀证。前期研究结果表明^[8-10],该药物具有明显改善急性心肌缺血和心肌梗死的作用,能显著增加缺血心脏的冠脉血流量;对心肌缺血及心肌梗死引起的血清乳酸脱氢酶(LDH)的释放,肌酸激酶(CK)活性升高及血浆内皮素(ET)的活性有明显抑制作用,对疲劳运动复合结扎冠脉方法建立的冠心病气虚血瘀证大鼠心脏功能、运动耐力、血管内皮功能等均有一定程度的改善,对心肌缺血/再灌注损伤大鼠心脏具有较好的保护作用,能通过保存缺血心肌三磷酸腺苷(ATP),维持心肌细胞能荷水平,减轻缺血/再灌注损伤,然而该药物对CMD的治疗效果尚不明确。本研究采用微栓塞导致的CMD大鼠模型上,观察双参宁心胶囊对动物模型的干预作用,为双参宁心胶囊的临床应用提供实验依据。

1 材料

1.1 动物 健康SPF级雄性SD大鼠90只,体质量 $310\pm 20\text{ g}$,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,合格证号SCXK(京)2016-002。动物饲养于中国中医科学院西苑医院SPF级实验动物中心,温度 $20\sim 25\text{ }^{\circ}\text{C}$,相对湿度40%~70%,明/暗周期为12 h/12 h,

大鼠自由饮水进食。本研究获得中国中医科学院西苑医院动物伦理委员会批准(2020XLC007-2)。

1.2 药物和试剂 实验用双参宁心胶囊提取物粉为人参总皂苷、丹参总酚酸、元胡总生物碱按照1:1:2.5配制而成,由中国中医科学院西苑医院基础医学研究所药理学室提供,批号20180714;尼可地尔片(喜格迈,中外制药株式会社,规格5 mg/片,批号17F020Z);戊巴比妥钠(德国进口分装,北京化学试剂公司提供,批号020402);肌酸激酶MB同工酶(CK-MB)测定试剂盒,乳酸脱氢酶(LDH)测定试剂盒[和光纯耀(上海)化学有限公司产品,批号分别为180108,803268];大鼠肌钙蛋白(cTnT)酶联免疫吸附测定(ELISA)试剂盒(北京安迪华泰科技有限公司,批号HT30068);大鼠B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2),Bcl-2相关X蛋白(Bax),半胱氨酸天冬氨酸蛋白水解酶-3(Caspase-3)抗体[艾博抗(上海)贸易有限公司产品,批号分别为ab196495, ab182733, ab13847];甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)抗体(美国CST公司,批号5174);2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC)染色剂(北京索莱宝科技有限公司,批号1101K031);S120GH型栓塞微粒球(美国Merit Medical公司,规格2 mL,40~120 μm ,批号X1086573-C);迈耶氏苏木素染色液和伊红染色液(北京益利精细化学品有限公司,批号分别为20191023,20191214)。

1.3 仪器 TSD104型血压换能器,经DA100C放大器与MP-150型多导生理记录仪连接,数据采集软件采用AcqKonwledge 4.1(美国BioPac公司);Visual Sonics Vevo2100系高分辨率小动物超声影像系统,配有MS-201高频线阵探头,其发射中心频率为9~18 MHz(日本Fujifilm公司);Mini-PROTEAN 3 Dodeca型电泳槽,VE 186型转移电泳槽(美国Bio-Rad公司);MPIAS-500型多媒体彩色病理图文分析系统(北京正恒博诚科技发展有限公司);DW-3000S型双通道小动物呼吸机(安徽正华生物仪器设备有限公司)。

2 方法

2.1 分组与给药 大鼠随机分为6组,每组15只动物,分别为假手术组,模型组,尼可地尔组($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$),双参宁心胶囊高、中、低(180, 90, $45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$)剂量组。按照体表面积换算法,根据临

床用药剂量折算实验动物给药剂量, $90 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$ 为临床等效剂量(双参宁心胶囊中剂量组)。动物按分组先给予相应药物 7 d, 按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 灌胃给药, 假手术组和模型组给予等体积生理盐水, 末次给药后 2 h 进行模型制备, 造模后 24 h 处死取材。

2.2 模型制备 参考文献造模方法^[11], 大鼠按 $10 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$ 剂量给予 0.3% 戊巴比妥钠溶液腹腔注射麻醉, 胸前区常规备皮。大鼠取仰卧位固定于手术板上, 气管插管与小动物呼吸机连结。于左前外侧沿胸骨左侧缘纵向切开皮肤, 钝性分离肌层, 打开大鼠胸腔, 暴露第 4 肋中部并纵向剪断, 以垂直肋骨方向放置大鼠开胸器, 轻轻剪开心包膜的胸部部位充分暴露。仔细分离主动脉弓, 并在其下穿一棉线, 令大鼠稳定 10 min 后, 将棉线两端提起并用血管夹夹闭主动脉, 迅速以注射器从心尖部直接向左心室注射 0.2 mL 的栓塞微球(取含微球的原液 0.02 mL, 生理盐水稀释至 2 mL, 约含 1 000 个微球), 注射前要回抽血以确保针尖在心腔中, 夹闭 20 s 后, 松开血管夹, 待呼吸心跳稳定后, 彻底止血、逐层缝合肌肉和皮肤, 最后关闭胸腔。拔除气管插管, 术毕腹腔注射 80 万 U 青霉素, 普通饲养。假手术组手术过程采用同样的操作, 区别仅在于心室内注射生理盐水 0.2 mL。术后 24 h 再次麻醉动物测定相关指标处死取材。每组动物取 3 只用于蛋白免疫印迹法(Western blot)检测和苏木素-伊红(HE)染色, 其余 12 只用于其他指标检测。

2.3 超声心动图检测心功能 动物术后 24 h, 再次麻醉大鼠, 对大鼠胸部左侧胸前区进行广泛备皮处理, 取仰卧位固定。当大鼠心律趋于持续性、稳定性时开始检测, 在进行超声心动图检查时要注意观察大鼠的呼吸状态, 如出现明显呼吸抑制应终止检查, 进行呼吸支持。以高频探头进行定位, 在左室长轴及胸骨旁短轴各切面应用 M 模式超声心动图观察心脏运动, 选用左室长轴切面计算左室舒张末期左室内径(LVIDd), 左室收缩末期左室内径(LVIDs), 左室舒张末期容积(LVEDV), 左室收缩末期容积(LVESV), 每搏输出量(SV), 心输出量(CO), 左室射血分数(EF), 左室缩短率(FS)。

2.4 血流动力学检测 将麻醉稳定的大鼠仰卧位固定于手术台上, 颈部备皮, 于颈部腹侧偏右纵向切开皮肤 2 cm 左右, 于胸锁乳突肌内侧缘分离右颈总动脉, 仔细分离血管外结缔组织和伴行神经, 结扎远心端, 动脉夹夹住近心端, 经右颈动脉穿刺插入 20 G(BD Intima II, 1.1 mm×30 mm) 静脉留置

针, 撤去动脉夹, 将肝素化留置针送入大鼠颈总动脉, 注射适量肝素钠盐水保证留置针内通畅无凝血。留置针连接压力换能器, 经 MP-150 型多导生理记录仪连接电脑, 通过 AcqKnowledge 4.1 软件实时显示压力变化曲线。待大鼠状态稳定后, 测定动脉收缩压(SBP)和舒张压(SDP), 计算平均动脉压(MAP)。测定完动脉血压后, 轻柔将留置针插入右心室腔, 当留置针突然随心脏搏动抖动明显时, 应减缓推送速度。当软件显示由血压波变为下达 0 mmHg(1 mmHg≈0.133 kPa)附近时, 表明留置针已经通过主动脉瓣进入左心室腔内。记录心脏血流动力学指标为左室峰压(LVSP), 左室舒张末压(LVEDP), 左室内压最大上升速率(LV+dp/dt_{max}), 左室内压最大下降速率(LV-dp/dt_{max})。体表标准 II 导心电图计算心率(HR)。

2.5 心肌损伤生物标志物检测 大鼠测定完血流动力学指标及超声心动图之后, 腹主动脉取血, 室温静置 1 h 后, $2 500 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 10 min(离心半径 161 mm), 取上清, 采用生化分析法检测 CK, CK-MB 和 LDH 活性。按试剂盒说明书, ELISA 法检测血清 cTnT。

2.6 Western blot 检测大鼠心肌组 Caspase-3, Bcl-2 及 Bax 蛋白表达 取心室肌组织 100 mg 经过匀浆、裂解、超声破碎、高速离心($12 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min, 离心半径 84 mm)后, 取上清液, 采用 BCA 试剂盒在酶标仪上测定蛋白浓度。再取上述总蛋白提取液 50 μg 进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 采用湿转法将蛋白转移至 PVDF 膜上, 37 °C 封闭 1~2 h, 洗膜后分别加入 Caspase-3, Bcl-2 及 Bax(1:1 000) 及 GAPDH 抗体, 4 °C 慢摇孵育过夜, 洗膜后以相应的二抗(1:1 万) 37 °C 孵育 1 h, 加入化学发光检测试剂, 进行条带显色后, 置于凝胶成像系统中曝光检测。以 GAPDH 为内参, Image J v1.8.0 软件获得灰度值进行统计处理。

2.7 心肌 TTC 染色 实验结束快速取出心脏, 用生理盐水冲洗, 结扎线以下横切 5 片(2~3 mm), 在 TTC 中避光染色 15 min 左右, 采用 MPIAS-500 多媒体彩色病理图文分析系统, 以固定像距拍照。以 Image-Pro Plus 6.0 图像处理软件测定大鼠心肌梗死面积的改变, 计算心肌缺血梗死范围(心肌缺血梗死范围=梗死面积/心肌总面积×100%)。

2.8 HE 染色观察心肌组织病理组织学变化 实验结束时, 取心室肌组织, 10% 甲醛固定、乙醇脱水、石蜡包埋、切片及 HE 染色, 置于光镜下观察心肌组

织病理形态学变化情况。

2.9 统计学分析 采用SPSS 18.0统计软件处理数据,实验结果以 $\bar{x}\pm s$ 表示,组间差异比较采用单因素方差分析(one-way ANOVA)方法,组间两两比较采用最小显著性差异法(LSD)检验, $P<0.05$ 认为有统计学意义。

3 结果

3.1 对CMD大鼠超声心动图的影响 与假手术组

比较,模型组SV,EF,FS,CO显著降低($P<0.01$),LVIDs,LVEDV显著增加($P<0.01$)。与模型组比较,尼可地尔组大鼠EF和FS显著改善($P<0.01$),明显降低LVIDs,LVESV,增加LVEDV,SV和CO($P<0.05$, $P<0.01$);双参宁心胶囊各剂量组明显增加EF($P<0.05$, $P<0.01$),显著增加FS($P<0.01$);双参宁心胶囊高、中剂量组还可以明显降低LVIDs,LVESV,增加LVEDV,SV和CO($P<0.05$, $P<0.01$)。见表1。

表1 双参宁心胶囊对CMD大鼠超声心动图的影响($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Table 1 Effect of Shuangshen Ningxin capsule (SSNX) on echocardiogram in CMD rats ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	LVIDs/mm	LVIDd/mm	LVESV/ μ L	LVEDV/ μ L	SV/ μ L	EF/%	FS/%	CO/mL·min ⁻¹
假手术		2.71±0.67	6.86±0.66	29.92±17.63	274.9±49.4	217.9±42.2	88.26±5.83	60.76±7.95	98.53±19.89
模型		4.01±0.70 ²⁾	6.29±0.88	73.74±27.71 ²⁾	205.2±58.1	131.5±45.3 ²⁾	68.83±11.15 ²⁾	36.08±8.02 ²⁾	55.76±20.64 ²⁾
尼可地尔	5	3.31±0.58 ³⁾	6.94±0.69	47.12±19.73 ³⁾	253.8±53.6 ³⁾	206.7±43.3 ⁴⁾	81.69±5.66 ⁴⁾	52.43±6.12 ⁴⁾	91.85±17.63 ⁴⁾
双参宁心胶囊	180	3.03±0.66 ³⁾	6.68±0.47	38.61±20.96 ⁴⁾	231.7±35.8 ³⁾	193.1±36.2 ⁴⁾	83.39±8.30 ⁴⁾	54.63±9.16 ⁴⁾	88.20±19.13 ⁴⁾
	90	3.76±0.66	6.93±0.76	63.10±25.57	253.8±65.3 ³⁾	190.7±43.5 ³⁾	75.72±5.69 ⁴⁾	46.05±5.60 ⁴⁾	82.32±17.40 ⁴⁾
	45	3.20±0.89 ³⁾	6.10±0.72	45.93±31.82	190.2±50.2	144.3±42.8	76.65±12.89 ³⁾	47.76±11.63 ⁴⁾	65.56±20.14

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⁾ $P<0.01$ (表2~5同)。

3.2 对CMD大鼠心脏血流动力学的影响 与假手术组比较,模型组大鼠HR差异无统计学意义,动脉SBP,DBP,MAP,LVSP,LV+dp/dt_{max}及LV-dp/dt_{max}均显著降低($P<0.01$)。与模型组比较,尼可地尔组明显升高SBP,DBP,MAP及LVSP,可升高LV+dp/

dt_{max}($P<0.05$, $P<0.01$),升高LV-dp/dt_{max}($P<0.01$);双参宁心胶囊各剂量组明显升高大鼠HR,SBP,DBP,MAP($P<0.05$, $P<0.01$),双参宁心胶囊升高LVSP,增加LV+dp/dt_{max}($P<0.05$, $P<0.01$),升高LV-dp/dt_{max}($P<0.01$)。见表2。

表2 双参宁心胶囊对CMD大鼠心脏血流动力学的影响($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

Table 2 Effect of SSNX on cardiac hemodynamics in CMD rats ($\bar{x}\pm s$, $n=12$)

组别	剂量 /mg·kg ⁻¹	HR/beat·min ⁻¹	SBP/mmHg	DBP/mmHg	MAP/mmHg	LVSP/mmHg	LVEDP/mmHg	LV+dp/dt _{max} /mmHg·s ⁻¹	LV-dp/dt _{max} /mmHg·s ⁻¹
假手术		418.6±28.0	108.2±7.2	79.5±6.5	91.7±6.8	116.8±9.5	-6.1±5.0	3 314.1±631.9	-2 961.3±415.2
模型		397.8±35.9	90.9±7.9 ²⁾	63.3±8.7 ²⁾	73.6±9.6 ²⁾	93.9±9.2 ²⁾	-3.7±5.6	2 288.8±420.8 ²⁾	-2 504.3±308.6 ²⁾
尼可地尔	5	409.2±30.6	104.8±7.0 ⁴⁾	78.1±7.0 ⁴⁾	89.3±7.2 ⁴⁾	107.7±9.9 ⁴⁾	-4.2±8.5	2 723.9±475.5 ³⁾	-2 644.8±417.8 ⁴⁾
双参宁心胶囊	180	428.3±24.3 ³⁾	105.0±10.3 ⁴⁾	80.2±11.3 ⁴⁾	87.1±15.9 ³⁾	106.1±16.1 ³⁾	-3.5±6.5	2 987.7±724.1 ³⁾	-2 665.1±559.5 ⁴⁾
	90	427.0±31.0 ³⁾	102.2±12.7 ³⁾	74.9±10.4 ⁴⁾	85.8±11.6 ³⁾	110.5±14.0 ⁴⁾	-4.2±3.5	3 022.3±665.5 ⁴⁾	-2 698.2±425.2 ⁴⁾
	45	432.8±14.4 ⁴⁾	100.6±9.9 ³⁾	73.9±6.9 ⁴⁾	84.9±7.9 ⁴⁾	107.3±11.6 ⁴⁾	-4.4±4.4	2 855.3±484.0 ⁴⁾	-2 633.8±426.8 ⁴⁾

3.3 对CMD大鼠血清心肌坏死标志物的影响 与假手术组比较,模型组大鼠血清CK,LDH,CK-MB及cTnT水平显著升高($P<0.01$)。与模型组比较,尼可地尔组大鼠血清LDH,CK-MB及cTnT水平显著下降($P<0.01$),对CK差异无统计学意义;双参宁心胶囊各剂量组明显降低CK,CK-MB($P<0.05$, $P<0.01$),显著降低LDH,cTnT($P<0.05$)。见表3。

3.4 对CMD大鼠心肌组织凋亡的影响 与假手术

组比较,模型组大鼠心肌组织Caspase-3蛋白表达显著升高($P<0.01$),Bcl-2蛋白表达明显降低($P<0.05$),Bax蛋白表达较假手术有升高趋势但未见统计学差异。与模型组比较,尼可地尔可以显著降低大鼠心肌组织Caspase-3蛋白表达($P<0.01$);双参宁心各剂量组大鼠心肌组织Caspase-3蛋白表达较模型组降低,其中双参宁心胶囊低剂量组与模型组比较有统计学差异($P<0.05$);双参宁心各剂量具有升高大鼠

表 3 双参宁心胶囊对 CMD 大鼠 CK, CK-MB, LDH 和 cTnT 的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 3 Effect of SSNX on serum CK, CK-MB, LDH and cTnT in CMD rats ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	CK/U·mL ⁻¹	CK-MB/U·mL ⁻¹	LDH/U·mL ⁻¹	cTnT/ng·L ⁻¹
假手术		610.0±311.5	758.8±131.4	402.0±136.1	24.39±1.72
模型		1 047.5±329.7 ²⁾	1 327.7±466.7 ²⁾	1 463.3±593.5 ²⁾	35.83±1.93 ²⁾
尼可地尔	5	1 008.6±474.7	600.0±215.0 ⁴⁾	625.4±236.7 ⁴⁾	31.16±1.53 ⁴⁾
双参宁心胶囊	180	661.6±218.1 ⁴⁾	867.4±341.2 ³⁾	1 009.7±533.4	28.03±1.74 ⁴⁾
	90	628.9±119.9 ⁴⁾	710.3±294.4 ⁴⁾	821.8±485.5 ³⁾	30.15±1.61 ⁴⁾
	45	734.3±185.2 ³⁾	803.5±251.0 ³⁾	961.1±347.9	32.69±1.50 ⁴⁾

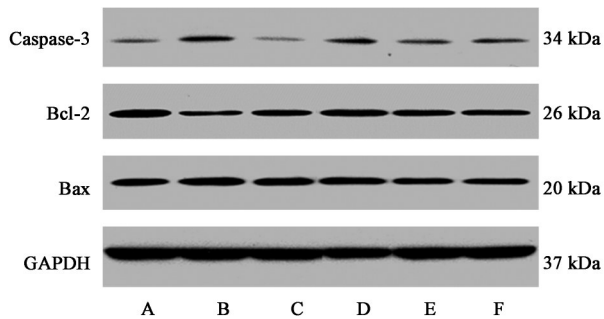
心肌 Bcl-2 表达的作用,其中双参宁心 180 mg·kg⁻¹ 组显著升高 ($P<0.01$)。模型组心肌 Bcl-2/Bax, 较假手

术组有一定降低,但差异无统计学意义,各给药组与模型组未见明显统计学差异。见表 4, 图 1。

表 4 双参宁心胶囊对 CMD 大鼠心室 Caspase-3, Bcl-2, Bax 表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Effect of SSNX on expression of Caspase-3, Bcl-2 and Bax in ventricle of CMD rats ($\bar{x} \pm s, n=3$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Caspase-3/GAPDH	Bcl-2/GAPDH	Bax/GAPDH	Bcl-2/Bax
假手术		0.151±0.044	0.661±0.106	0.442±0.047	1.494±0.138
模型		0.467±0.029 ²⁾	0.355±0.108 ¹⁾	0.518±0.209	0.824±0.525
尼可地尔	5	0.180±0.039 ⁴⁾	0.461±0.140	0.523±0.077	0.902±0.322
双参宁心胶囊	180	0.407±0.095	0.559±0.018	0.476±0.165	1.297±0.538
	90	0.328±0.187	0.496±0.113 ³⁾	0.394±0.102	1.391±0.563
	45	0.348±0.048 ³⁾	0.455±0.110	0.359±0.135	1.449±0.847



A. 假手术组; B. 模型组; C. 尼可地尔组; D~F. 双参宁心胶囊 180, 90, 45 mg·kg⁻¹ 组 (图 2, 3 同)

图 1 各组大鼠心室组织 Caspase-3, Bcl-2 及 Bax 表达电泳

Fig. 1 Electrophoresis of Caspase-3, Bcl-2 and Bax protein expression in rat ventricle

3.5 对 CMD 大鼠心肌梗死面积的影响 心肌 TTC 染色显示,假手术未见明显梗死区,模型组动物可见明显的梗死区。与模型组比较,尼可地尔可显著减少左心室梗死面积 ($P<0.01$),双参宁心胶囊各剂量组均有不同程度减少心肌梗死面积的作用 ($P<0.05, P<0.01$)。与模型组比较,参宁心胶囊 180 mg·kg⁻¹ 组可减少梗死面积约 53%, 90 mg·kg⁻¹ 组可减少梗死面积约 59%, 45 mg·kg⁻¹ 组可减少梗死面积约 42%。见表 5, 图 2。

表 5 双参宁心胶囊对 CMD 大鼠心室梗死面积的影响 ($\bar{x} \pm s, n=12$)

Table 5 Effect of SSNX on infarct area of left ventricle in CMD rats ($\bar{x} \pm s, n=12$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	左室梗死面积/左室面积/%
模型		23.19±9.91
尼可地尔	5	11.29±4.96 ⁴⁾
双参宁心胶囊	180	10.89±6.75 ⁴⁾
	90	9.36±5.47 ⁴⁾
	45	13.42±5.21 ³⁾

3.6 对 CMD 大鼠心室肌病理形态学影响 假手术组大鼠心肌细胞排列规则,紧密、整齐,大小正常,未见变性、出血、水肿和中性粒细胞浸润。模型组大鼠可见栓塞微球存在,多量小灶心肌细胞溶解、断裂,排列紊乱,间隙增宽;心肌间可见炎细胞浸润;心外膜下可见少量淋巴细胞和中性粒细胞浸润。尼可地尔组大鼠心肌 HE 染色可见散在小灶心肌细胞溶解,小灶心肌细胞间隙增宽,少量淋巴细胞和中性粒细胞浸润。双参宁心胶囊各剂量组病理性改变与模型组类似,但病变的范围和程度比模型组明显减小。见图 3。

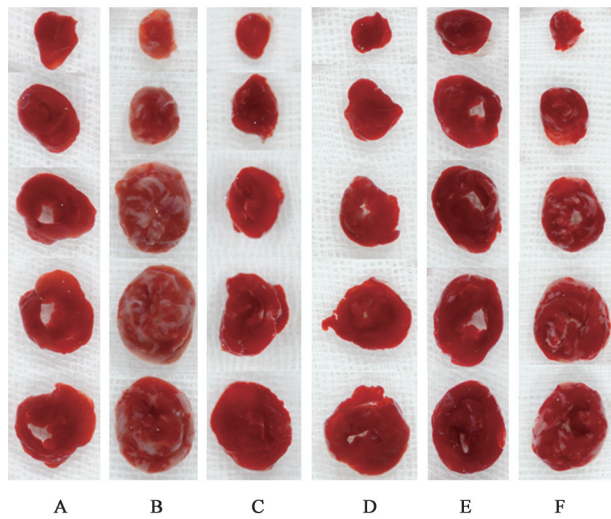


图2 双参宁心胶囊对CMD大鼠心室梗死面积的影响

Fig. 2 Effect of SSNX on infarcted area of ventricle in CMD rats

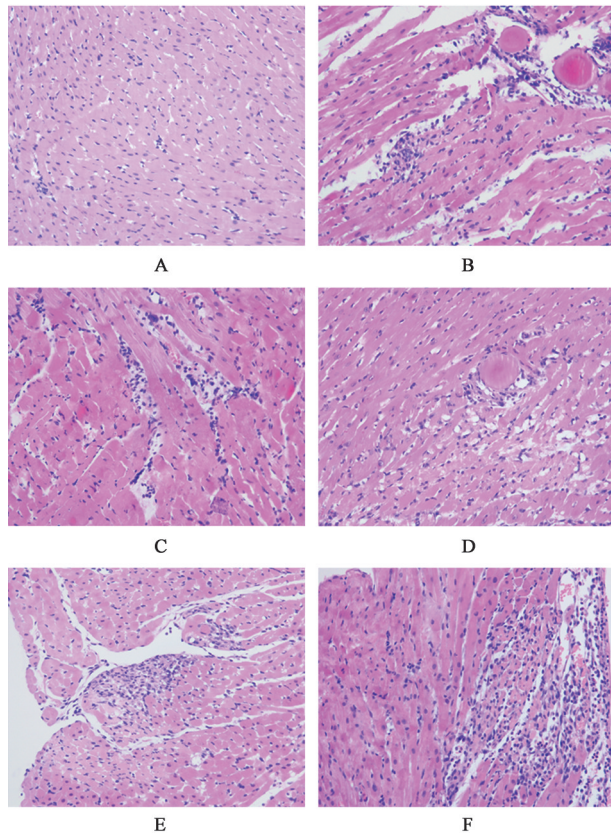


图3 双参宁心胶囊对CMD大鼠心室肌病理变化的影响(HE, ×200)

Fig. 3 Effect of SSNX on ventricle pathology changes in CMD rats (HE, ×200)

4 讨论

冠脉微循环是保障心肌有效灌注供应的重要组成部分,当冠脉微血管结构、功能异常也会和心外膜冠脉狭窄一样导致心肌耗氧的供需失衡,引起临床症状并影响心血管疾病的诊疗和预后。CMD

患者常常伴随更显著的心血管不良事件的发生率,包括心力衰竭住院、心肌梗死、心源性猝死等^[12]。目前,CMD的发病机制尚未达成一致,较为认可的说法是其发病与血管内皮损伤、冠脉痉挛、微血栓形成、机械性压迫及缺血再灌注损伤等密切相关。虽然小样本、短期的临床试验显示,针对血管内皮、微血管以及动脉粥样硬化的治疗可以改善CMD患者的症状、缺血和血管功能,但大样本随机、对照结果试验测试支持的治疗策略尚未形成,如何改善冠脉微循环保护心脏成为治疗CMD新的研究方向^[13-14]。

现代中医认为CMD可归为中医学“真心痛”“胸痹”的范畴,其病机属心络受损、血瘀阻络^[15]。中医学里的“经脉”多认为是大、中、小血管,而小微动脉、毛细血管及微静脉脉多属于“络脉”的范畴。《黄帝内经·灵枢·脉度》认为“经脉为里,支而横者为络,络之别者为孙络”。络有阴阳之分,阳络循行于体表,阴络循行体内。叶天士《临证指南医案》记载:“阴络即脏腑隶下之络”,阴络随不同脏腑分布,分为心络、肾络、肝络、肺络等。因此,CMD类似传统中医理论中的心络病,属本虚标实之为病,本虚则心气不足,心阳虚损,气血推动无力,不能充实于心络,心络失养而受损,血液运行不畅必滞留成瘀^[16-18]。益气活血法在CMD疾病的中医临床治疗中运用广泛,并获得了一定的研究证据支持^[19-20]。然而相关研究多为临床观察研究并未对作用机制进行深入研究,实验研究也多采用传统心肌梗死模型并未使用具有CMD特点的动物模型开展研究^[21]。

大动物CMD模型通常是应用心导管、冠脉介入技术,经冠脉内注射栓塞微球等方法,其形成栓塞的病理机制与临床上冠脉血运重建术后微血栓、内皮细胞内皮脱落、动脉粥样硬化斑块破裂碎片脱落后,随血流至冠脉微血管致栓塞原理类似^[22-23]。然而,大鼠等小动物由于心脏较小、跳动速度较快,目前尚无法使用临床心导管介入技术将栓塞微球超选择注射到冠脉里,通常使用心室内注射栓塞微球,暂短夹闭主动脉的方法建立冠脉微栓塞导致的CMD模型^[24-25]。采用向心室内或冠状动脉内注射栓塞微球机械性阻塞微血管,是建立CMD动物模型的常用方法,为研究CMD病理及药物治疗干预提供了重要平台。本研究采用大鼠心室内注射栓塞微球的方法建立CMD动物模型,观察了益气活血中药双参宁心胶囊的干预作用。

心脏的基本任务是通过收缩舒张活动为全身组织提供血氧供应,心脏功能的实现需要多种因素的相互作用,包括心肌特性、神经体液因素的影响、循环血容量和外周血管顺应性等。决定心脏功能的重要因素之一就是左心室收缩功能,通过无创或有创的测定左室收缩与舒张相关指标可以反映和评价心脏功能。经心导管测定血流动力学检测是经典的评价心脏泵血功能的方法,一般认为LVSP和 $LV+dp/dt_{max}$ 反映左室收缩功能,LVEDP和 $LV-dp/dt_{max}$ 反映左室舒张功能^[26-27]。随着检测技术的进步,非侵入性的技术越来越广泛的应用在心功能的评价上,彩色超声心动图检查是定量分析心室功能的有效手段。通过M型超声心动图,可以得到心脏收缩和舒张不同时间的室壁厚度、腔室内径等线性指标,通过计算可以得到EF和FS用来反映心室功能^[28]。本课题组前期研究显示,在疲劳符合冠脉结扎方法建立的冠心病气虚血瘀证大鼠上,模型动物除了出现舌象、脉象出现明显改变外,也伴随着心脏EF和FS值降低,给予双参宁心胶囊干预后上述指标具有一定改善^[8-9]。本研究显示,心室内注射栓塞微球后大鼠心脏血流动力学及超声心动图检测显示大鼠左室心功能明显降低,LVDP, $LV+dp/dt_{max}$, $LV-dp/dt_{max}$,EF和FS值均出现了明显下降。益气活血中药复方双参宁心胶囊各剂量具有明显改善CMD大鼠心功能的作用,可以升高大鼠LVDP, $LV+dp/dt_{max}$,EF和FS值,改善心室收缩功能;同时还可以升高 $LV-dp/dt_{max}$,对心室舒张功能有一定改善作用。

心肌细胞损伤或坏死时肌纤维的完整性被破坏,细胞膜通透性增加,细胞内大分子物质如CK,LDH等开始弥散进入循环血中,经过半个多世纪的临床应用,这些心肌损伤标志物在心肌梗死、心肌炎和急性冠脉综合征等疾病的诊断和治疗效果评价中发挥了重要作用^[29]。临床上,当心肌梗死发生后4~9 h CK时活性超过正常范围,未经再灌注治疗下24 h时达到平均峰值,并在48~72 h内下降到正常水平^[30]。在机械性血管再通术或溶栓治疗后,CK峰值可以出现较早。CK具有3种同工酶:MM, BB, MB主要存在于心肌细胞,尽管CK-MB可以在心脏之外的其他组织中少量测出,但从临床实用角度出发,一般把CK-MB升高看做是心肌梗死的结果。LDH也是一种非特异性的心肌酶,存在于骨骼肌、肝脏、红细胞等组织细胞的胞浆和线粒体中。一般认为LDH在诊断心肌梗死方面敏感性要低于

CK-MB和CK,但LDH对于心肌梗死病程观察以及就诊较晚的患者具有重要意义。心肌钙蛋白(Tn)包含3种亚型,即肌钙蛋白T(TnT),肌钙蛋白I(TnI)和肌钙蛋白C(TnC)。发生急性心肌损伤时,cTnT于损伤最初几小时首先进入血清释放入血,cTnT同广泛应用的CK-MB不同,与骨骼肌TnT无交叉反应,所受干扰小,所以cTnT的特异性抗体常用于临床检测^[28]。本研究显示,通过心室内注射栓塞微球可以造成大鼠心肌损伤,术后24 h血清CK,LDH,CK-MB及cTnT水平明显升高。与模型组比较,双参宁心胶囊各剂量组具有明显降低动物血清CK,LDH,CK-MB及cTnT的作用,说明双参宁心胶囊可以有效的改善CMD时心肌损伤。

细胞凋亡是与细胞坏死不同的一种程序性细胞死亡,是有核细胞下一定条件下,通过启动内源性DNA内切酶活性而发生的细胞自然死亡过程。在心肌细胞缺血、梗死和再灌注损伤时会导致心肌细胞坏死,同时也存在着心肌细胞凋亡的发生^[31]。触发细胞凋亡途径有3种:外部死亡受体途径、线粒体途径和内质网途径。Caspase家族是引发细胞凋亡的级联反应过程的中心环节,主要激活线粒体依赖途径和死亡受体介导途径,其中Caspase-3被认为是凋亡的关键蛋白酶,一旦被激活发生下游的级联反应,使凋亡不可避免,因而Caspase-3也被称为“死亡蛋白酶”^[32]。Bcl-2家族蛋白是一类重要的细胞凋亡调节蛋白,根据他们在细胞凋亡中的作用可以分为两类:一类是抑制凋亡蛋白,包括Bcl-2,Bcl-XL,Bcl-w,Mcl和A1等,另一类是促进凋亡蛋白:Bax,Bak,Bok,Bcl-xS,Bad,Bid等。有研究报道,经冠脉内注射微球栓塞导致的CMD小型猪模型中也会出现心肌细胞凋亡^[33]。本研究显示,经心室内注射栓塞微球导致CMD模型大鼠可以检测到心肌组织Caspase-3,Bax蛋白表达升高,Bcl-2蛋白表达明显降低,提示模型动物心肌细胞发生凋亡,而双参宁心胶囊可以通过抑制心肌细胞凋亡起到保护心肌的作用。双参宁心胶囊具有降低大鼠Caspase-3蛋白表达的作用,其中 $45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组有统计学差异,而 $180,90\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 未见统计学差异,这可能与Western blot检测动物数较少、标准差较大有关。双参宁心胶囊具有升高Bcl-2表达的作用,其中 $90\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 组与模型组有统计学差异, $180,45\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ 未见统计学差异,可能同样与检测动物数较少、标准差较大有关。

在实验研究中,心肌梗死面积是评价心肌损伤

程度和药物治疗效果的一个重要指标^[34]。本研究显示,经心室内注射栓塞微球并短期夹闭主动脉可以造成大鼠心脏出现心肌损伤和梗死,TTC大体染色显示心室和心房区域出现多灶性梗死区。左心室梗死区面积的定量分析发现,双参宁心胶囊具有明显降低动物心肌梗死面积的作用。经心室内注射栓塞微球导致CMD模型大鼠心肌HE染色可见栓塞微球阻塞血管,可见散在的心肌缺血坏死区域,伴随炎性细胞、淋巴细胞核中性粒细胞浸润。双参宁心胶囊可以明显改善大鼠心肌HE染色所示的心肌损伤,说明其对CMD引起的缺血和梗死也有较好的保护作用。

综上,双参宁心胶囊可以明显改善微球栓塞导致的CMD大鼠心脏血流动力学指标,增加大鼠心脏功能,减少心肌梗死面积、降低CK,LDH,CK-MB及cTnT等心肌损伤标志物水平,其作用机制与抑制心肌细胞凋亡起到保护心肌的作用有关,但仍需进一步实验对具体的分子机制进行深入研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] PRIES A R, REGLIN B. Coronary microcirculatory pathophysiology: can we afford it to remain a black box?[J]. *Eur Heart J*, 2017, 38(7):478-488.

[2] VANCHERI F, LONGO G, VANCHERI S, et al. Coronary microvascular dysfunction[J]. *J Clin Med*, 2020, 9(9):2880.

[3] HEUSCH G, SKYSCHALLY A, KLEINBONGARD P. Coronary microembolization and microvascular dysfunction[J]. *Int J Cardiol*, 2018, 258:17-23.

[4] KONST R E, GUZIK T J, KASKI J C, et al. The pathogenic role of coronary microvascular dysfunction in the setting of other cardiac or systemic conditions [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(4):817-828.

[5] TAQUETI V R, SOLOMON S D, SHAH A M, et al. Coronary microvascular dysfunction and future risk of heart failure with preserved ejection fraction [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(10):840-849.

[6] KOBAYASHI Y, AOI S, LATIB A. Sex differences in coronary microvascular dysfunction and its relationship with outcome [J]. *JACC Cardiovasc Interv*, 2020, 13(14):1680-1682.

[7] 赵梦瑜,王凯,赵留庄. 中医药治疗冠状动脉微循环障碍的研究进展[J]. *中国临床医生杂志*, 2018, 11:1282-1285.

[8] 赵雨薇,付建华,李磊,等. 双参宁心胶囊通过调控线

粒体ATP敏感性钾通道减轻大鼠心肌缺血/再灌注损伤[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(13):112-118.

[9] 黄烁,刘建勋,李磊,等. 双参通冠方对冠心病气虚血瘀证大鼠的干预作用[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 7:287-294.

[10] 于震,刘建勋,李欣志,等. 双参宁心胶囊对小型猪介入性心肌缺血的保护作用[J]. *中国中药杂志*, 2007, 32(16):1695-1699.

[11] SUN Y H, SU Q, LI L, et al. Expression of p53 in myocardium following coronary microembolization in rats and its significance[J]. *J Geriatr Cardiol*, 2017, 14(5):292-300.

[12] CHEN C, WEI J, ALBADRI A, et al. Coronary microvascular dysfunction-epidemiology, pathogenesis, prognosis, diagnosis, risk factors and therapy [J]. *Circ J*, 2016, 81(1):3-11.

[13] BAIREY MERZ C N, PEPINE C J, SHIMOKAWA H, et al. Treatment of coronary microvascular dysfunction [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(4):856-870.

[14] FORDYCE C B, GERSH B J, STONE G W, et al. Novel therapeutics in myocardial infarction: targeting microvascular dysfunction and reperfusion injury [J]. *Trends Pharmacol Sci*, 2015, 36(9):605-616.

[15] 李磊,刘建勋,任建勋,等. 冠状动脉微循环功能障碍动物模型及中医药防治研究进展[J]. *中国中药杂志*, 2017, 42(2):254-258.

[16] 卢健棋,温志浩. 中医药干预冠脉微循环障碍的研究近况[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2013, 19(5):597-600.

[17] 董丽,江云东,潘洪,等. 基于“络病-玄府”探讨糖尿病心肌病冠脉微循环病变[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2020, 285(5):79-80, 114.

[18] 柴宇燕,兰菁,王菲,等. 基于络病理论探讨冠心病PCI术后心绞痛的诊疗思路[J]. *中医临床研究*, 2019, 11(35):23-25.

[19] 邵静,蒋静. 益气活血法治疗冠脉微循环障碍研究进展[J]. *中医研究*, 2019, 32(7):71-74.

[20] 李渊芳. 浅析气血同治法在冠脉微循环障碍中的应用[J]. *辽宁中医杂志*, 508(9):1855-1858.

[21] 黄琨,郭书文,杨丹丹,等. 益气活血中药对心梗大鼠冠脉微循环内皮损伤分子的影响[J]. *北京中医药大学学报*, 2013, 36(6):398-403.

[22] OANA S, JENS V D W, SELENA C, et al. Experimental animal models of coronary microvascular dysfunction [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(4):756-770.

[23] LIU T, ZHOU Y, WANG J Y, et al. Coronary microembolization induces cardiomyocyte apoptosis in

- swine by activating the LOX-1-dependent mitochondrial pathway and Caspase-8-dependent pathway [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2016, 21 (2):209-218.
- [24] HE W, SU Q, LIANG J, et al. The protective effect of nicorandil on cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization by activating Nrf2/HO-1 signaling pathway in rats [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 496(4):1296-1301.
- [25] LI S, ZHONG S, ZENG K, et al. Blockade of NF- κ B by pyrrolidine dithiocarbamate attenuates myocardial inflammatory response and ventricular dysfunction following coronary microembolization induced by homologous microthrombi in rats [J]. *Basic Res Cardiol*, 2010, 105(1):139-150.
- [26] BELL V, MITCHELL G F. Influence of vascular function and pulsatile hemodynamics on cardiac function [J]. *Curr Hypertens Rep*, 2015, 17(9):580.
- [27] DE ALMEIDA S A, CLAUDIO E R G, MENGAL V, et al. Estrogen therapy worsens cardiac function and remodeling and reverses the effects of exercise training after myocardial infarction in ovariectomized female rats [J]. *Front Physiol*, 2018, doi: 10.3389/fphys.2018.01242.
- [28] SU Q, LI L, SUN Y, et al. Effects of the TLR4/Myd88/NF- κ B signaling pathway on NLRP3 inflammasome in coronary microembolization-induced myocardial injury [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(4):1497-1508.
- [29] TAGGART C, WERESKI R, MILLS N L, et al. Diagnosis, investigation and management of patients with acute and chronic myocardial injury [J]. *J Clin Med*, 2021, doi:10.3390/jcm10112331.
- [30] HAWKINS R C, TAN H L. Comparison of the diagnostic utility of CK, CK-MB (activity and mass), troponin T and troponin I in patients with suspected acute myocardial infarction [J]. *Singapore Med J*, 1999, 40(11):680-684.
- [31] KRIJNEN J P A. Apoptosis in myocardial ischaemia and infarction [J]. *J Clin Pathol*, 2002, 55 (11) : 801-811.
- [32] PORTER A G, JANICKE R U. Emerging roles of caspase-3 in apoptosis [J]. *Cell Death Differ*, 1999, 6 (2):99-104.
- [33] WANG J, CHEN H, SU Q, et al. The PTEN/Akt signaling pathway mediates myocardial apoptosis in swine after coronary microembolization [J]. *J Cardiovasc Pharmacol Ther*, 2016, 21(5):471-477.
- [34] CAI J, SUN X, HAN P, et al. The effect of myocardial infarct size on cardiac reserve in rhesus monkeys [J]. *Cardiovasc Toxicol*, 2014, 14(4):309-315.

[责任编辑 周冰冰]