

基于生物信息学探讨复方丹参滴丸改善阿司匹林抵抗的潜在机制

高晟玮^{1,2}, 贾福运^{1,2}, 谷旭放¹, 张露丹¹, 钟 钰^{1,2}, 吕子琛^{1,2}, 张博文^{1,2}, 吕春晓^{1*}, 王保和^{2,3*}

1. 天津中医药大学第二附属医院, 天津 300150

2. 天津中医药大学, 天津 301617

3. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300193

摘要: **目的** 基于生物信息学技术构建阿司匹林抵抗 (aspirin resistance, AR) 分子预测模型, 探究复方丹参滴丸改善 AR 潜在机制。**方法** 在基因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 中获取 AR 和阿司匹林敏感 (aspirin sensitivity, AS) 相关的芯片数据, 筛选差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 对 AR 和 AS 的 DEGs 进行富集分析, 注释其功能; 采用机器学习算法构建 AR 分子预测模型; 在中国知网、万方、维普、PubMed、Web of Science 数据库中获取复方丹参滴丸指纹图谱, 根据 Lipinski 规则预测药物活性成分, 使用 Swiss Target Prediction 数据库预测活性成分作用靶点, 将 DEGs 和药物靶点取交集, 获得复方丹参滴丸改善 AR 的潜在靶点, 在 metascape 平台中对靶点基因进行功能注释; 使用 Autodock 软件对核心靶点与活性成分进行分子对接; 应用单样本基因集富集分析 (single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA) 算法对复方丹参滴丸干预 AR 的每个靶点分别进行通路富集分析, 最后构建复方丹参滴丸改善 AR 的“成分-靶点-通路-功能”桑基图。**结果** 共得到 AR 相关 DEGs 597 个, 其中上调基因 292 个, 下调基因 305 个。DEGs 富集结果提示, AR 相关基因主要定位在血小板 α 颗粒、分泌颗粒腔、细胞质囊泡腔上, 通过介导花生四烯酸代谢、氧化磷酸化、WNT 信号通路、白细胞介素-17 (interleukin-17, IL-17) 信号通路、类固醇同源物生物合成等信号通路, 参与血液凝固、血小板活化、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 转录因子活性、脂质代谢过程的负调控、白细胞活化相关炎症反应、肾上腺素受体信号通路、氧化应激反应等生物过程, 发挥调控肝素结合、胰岛素受体结合、血小板衍生生长因子受体结合、肾上腺素受体活性、生长因子受体结合、磷脂酰肌醇激酶活性、主要组织相容性复合物 II (MHC II) 类受体活性等功能。基于机器学习算法获得 9 个 AR 的分子标志物, 并构建了曲线下面积 (area under curve, AUC) = 1 的精准预测模型。通过网络药理学的方法获得复方丹参滴丸改善 AR 的 10 个活性成分和 14 个作用靶点及 3 个核心靶点, 分子对接结果表明核心靶点和所有活性成分均能自发结合, 富集分析提示复方丹参滴丸能够通过调控血栓形成、糖脂代谢、炎症反应、氧化应激、激素水平改善 AR。**结论** 由 9 个 AR 的分子标志物组成的 AR 预测模型具有较为精准的预测性能; 除血小板活化和聚集外, 炎症反应、激素水平、氧化应激、糖脂代谢同样参与了 AR 的形成, 复方丹参滴丸能够通过多靶点调控以上途径改善 AR。

关键词: 复方丹参滴丸; 阿司匹林抵抗; 活血化瘀; 生物信息学; 机器学习

中图分类号: Q811.4; R285; TP18 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2024)14-4824-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.14.019

Exploring potential mechanism of Compound Danshen Dropping Pills in alleviating aspirin resistance based on bioinformatics

GAO Shengwei^{1, 2}, JIA Fuyun^{1, 2}, GU Xufang¹, ZHANG Ludan¹, ZHONG Yu^{1, 2}, LYU Zichen^{1, 2}, ZHANG Bowen^{1, 2}, LYU Chunxiao¹, WANG Baohe^{2, 3}

1. The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300150, China

2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

3. The First Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

收稿日期: 2024-03-01

基金项目: 天津市教委科研计划项目 (2022ZD052); 国家自然科学基金青年基金项目 (81803930); 国家自然科学基金项目 (81873149); 国家“重大新药创制”科技重大专项资助项目 (2018ZX09734002); 天津市“项目+团队”重点培养专项: 抗凝作用中西药对筛选系统研制 (XC202033)

作者简介: 高晟玮, 博士研究生, 主要从事心脑血管疾病中医药防治、中药临床药理研究及中药临床评价工作。E-mail: gaosw0826@sina.com

***通信作者:** 王保和, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事心脑血管疾病中医药防治、中药临床药理研究及中药临床评价工作。

E-mail: wbh3423@sina.com

吕春晓, 副研究员, 主要从事临床药理及相关研究。E-mail: lvchunxiao1989@163.com

Abstract: Objective To construct a molecular prediction model for aspirin resistance (AR) based on bioinformatics technology and to investigate the potential mechanism of Compound Danshen Dripping Pills (复方丹参滴丸) for relieving AR. **Methods** Microarray data of AR and aspirin sensitivity (AS) were obtained from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. Differentially expressed genes (DEGs) of AR and AS were screened by R software, and their functions were annotated by enrichment analysis. AR molecular prediction models were constructed by machine learning methods. The fingerprint of Compound Danshen Dripping Pills were obtained from CNKI, Wanfang database, VIP, PubMed and Web of Science databases; The active ingredient was predicted according to Lipinski's rule; The active ingredient targets were predicted using Swiss Target Prediction database; The DEGs and drug targets were intersected to obtain the potential targets of Compound Danshen Dripping Pills for relieving AR. The functional annotation of target genes was performed on the metasplice platform; The molecular docking of core targets and active ingredients was performed using Autodock software; The single sample gene set enrichment analysis (ssGSEA) algorithm was applied to analyze the pathway enrichment of each target of Compound Danshen Dripping Pills for AR intervention, and finally the "component-target-pathway-function" sankey diagram of Compound Danshen Dripping Pills for AR relieving was constructed. **Results** A total of 597 AR-related DEGs were obtained, including 292 up-regulated genes and 305 down-regulated genes. The enrichment results of DEGs suggested that AR-related genes were mainly localized in platelet α granules, secretory granule lumen, cytoplasmic vesicle lumen, and were involved in many biological processes, such as blood coagulation, platelet activation, nuclear factor kappa-B (NF- κ B) transcription factor activity, negative regulation of lipid metabolic process, leukocyte activation-related inflammatory response, adrenergic receptor signaling pathway, oxidative stress response, and etc, by mediating arachidonic acid metabolism, oxidative phosphorylation, WNT signaling pathway, interleukin-17 (IL-17) signaling pathway, steroid homologue biosynthesis and other signal pathways, thus playing a role in regulating heparin binding, insulin receptor binding, platelet-derived growth factor receptor binding, adrenergic receptor activity, growth factor receptor binding, phosphatidylinositol kinase activity, MHC class II receptor activity, and other functions. Nine molecular markers of AR were obtained based on machine learning algorithms, and an accurate prediction model with area under curve (AUC) = 1 was constructed. Ten active components, 14 action targets and three core targets of Compound Danshen Dropping Pills for improving AR were obtained through network pharmacology. The molecular docking results showed that the core targets and all active ingredients could bind spontaneously, and the enrichment analysis suggested that Compound Danshen Dripping Pills could improve AR by regulating thrombosis, glucolipid metabolism, inflammatory response, oxidative stress, and hormone levels. **Conclusion** The AR prediction model consisting of nine molecular markers of AR had accurate prediction performance. In addition to platelet activation and aggregation, inflammatory response, hormone levels, oxidative stress, and glucolipid metabolism might also be involved in the formation of AR, and Compound Danshen Dripping Pills can relieve AR through multi-targeted modulation of these pathways.

Key words: Compound Danshen Dripping Pills; aspirin resistance; blood-activating and stasis-removing; bioinformatics; machine learning

阿司匹林作为抗血小板治疗基石，广泛应用于心脑血管疾病的一级和二级预防，该药可通过非选择性地乙酰化环氧合酶，阻断血栓素 A_2 合成，从而抑制血小板活化和聚集^[1-2]。然而并非所有患者均能在阿司匹林治疗下获益，在规律服用治疗剂量的阿司匹林的情况下，仍未能有效地抑制血小板聚集，这种现象被称为阿司匹林抵抗 (aspirin resistance, AR)^[3]。据统计，临床中约有 25% 的阿司匹林使用者会产生 AR^[4]；相比于敏感型患者，此类患者心脑血管不良事件的发生率增长了近 4 倍^[5]，对生命健康造成极大的威胁。目前认为 AR 的发生可能与患者依从性差、药物间相互作用、血小板受体基因多态性、血小板聚集替代途径激活等因素相关^[6]。然而到目前为止，难以用某一种机制完全解释所有的 AR 现象^[7]。在改善 AR 的策略中，单纯增加药物剂

量和联合用药因胃肠道损伤和出血风险的增加而无法得到指南推荐，并且对于血栓事件风险的影响尚缺乏足够的循证支持^[8]。

AR 作为一个未被明确定义的临床现象，是临床、遗传、药理和生物学等多种因素共同作用的结果，而多成分、多靶点、作用相对缓和的中医药有望成为理想的防治方案。证候分布规律研究表明，心血瘀阻证患者发生 AR 最为常见^[9]，活血化瘀药物在改善 AR 方面展现了良好的临床效用和安全性^[10]，其中复方丹参滴丸综合疗效最优^[11]。1 项纳入 10 项 RCT，涉及 800 例患者的 Meta 分析结果显示，复方丹参滴丸可有效改善 AR、降低心脑血管不良事件且不增加出血风险^[12]。当前围绕其内在机制的研究相对匮乏且角度较为局限，相关机制探讨多围绕复方丹参滴丸及其成分改善花生四烯酸

代谢、增加体内环磷酸腺苷含量、降低血栓素 A₂ 与前列环素比值、抑制二磷酸腺苷 (adenosine diphosphate, ADP) 诱导的血小板聚集等协同抗血小板作用等角度展开^[13-14]。有学者尝试从调节免疫微环境角度进行阐述, 然而结果显示复方丹参滴丸虽在一定程度上增加了外周血中调节性 T 细胞 (regulatory T cells, Tregs)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) 及白细胞介素-10 (interleukin-10, IL-10) 水平, 但差异不具有统计学意义^[15]。在相互作用方面, 复方丹参滴丸也并未对肝微粒体匀浆中阿司匹林酯酶活性产生影响^[16]。

鉴于心脑血管疾病的高发率和阿司匹林在临床的广泛应用, 明确 AR 发生机制、早期识别 AR 潜在人群、探索相应干预措施具有重大临床意义。本研究通过对杜克大学基因研究所提供的阿司匹林敏感 (aspirin sensitivity, AS) 和 AR 患者外周血高通量测序数据进行挖掘, 试图描绘阿司匹林抵抗机制全景图, 预测 AR 患者潜在标志物, 探究复方丹参滴丸改善 AR 的潜在分子靶点与作用机制, 为中西药联合抗血栓治疗提供思路与借鉴。

1 资料与方法

1.1 基因数据预处理与差异分析

在基因表达数据库 (Gene Expression Omnibus, GEO) 中获得来自杜克大学基因组科学与政策研究所提供的 AR 患者相关的芯片数据集 (GSE38511)。该数据集包含 8 例 AR 患者和 9 例 AS 患者外周血样本, 平台编号为 GPL 570。将矩阵数据经过背景校正、探针注释、标准化处理后, 以 $|\log_2FC| \geq 0.5$ [FC 表示差异倍数 (fold change)] 且 $P < 0.05$ 为标准筛选差异表达基因 (differentially expressed genes, DEGs), 应用 Bioconductor 平台的“pheatmap”的和“ggplot2”包实现 DEGs 可视化。

1.2 AR 相关基因富集分析

应用 R 程序“cluster Profiler”包对 AR 与 AS 的 DEGs 进行基因本体论 (gene ontology, GO) 富集分析进而探究 DEGs 的生物过程 (biological processes, BP)、细胞成分 (cell component, CC) 和分子功能 (molecular function, MF); 使用 Cytoscape 软件进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 分析, 阈值均设定为 $P < 0.05$ 。

1.3 机器学习筛选 AR 潜在标志物

采用最小绝对值收敛和选择算子 (least absolute

shrinkage and selection operator, Lasso) 回归分析筛选 AR 特征基因, 对特征基因构建诺谟 (nomogram) 预测模型, 使用受试者工作曲线 (receiver operating characteristic, ROC) 评价模型预测性能。

1.4 复方丹参滴丸改善 AR 的靶点鉴定

在中国知网、万方、维普、PubMed、Web of Science 数据库中检索复方丹参滴丸指纹图谱, 根据 Lipinski 规则^[17]预测药物活性成分, 使用 Swiss Target Prediction 数据库对复方丹参滴丸活性成分进行靶点预测, 将 DEGs 和药物靶点取交集, 获得复方丹参滴丸改善 AR 的潜在靶点。

1.5 复方丹参滴丸改善 AR 靶点富集分析

将复方丹参滴丸改善 AR 的靶点导入 metascape 平台进行富集分析, 本体论来源选择: KEGG、GO、Reactome 基因集、标志性基因集和 Wiki 通路, 阈值设定为 $P < 0.01$ 且富集因子 > 1.5 。在 DisGeNET 数据库中预测靶点相关疾病; 对靶点分子进行蛋白-蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 分析, 采用 MCODE 算法获得核心靶点。

1.6 分子对接

对核心靶点与活性成分进行分子对接, 在 PDB 和 TCMSP 数据库中获取核心靶点和药物活性成分的 3D 结构, 经过去水、加全氢、设置扭转键等预处理后, 使用 Autodock 软件对受体 (核心靶点) 与配体 (活性成分) 进行分子对接。使用 Pheatmap 包绘制分子对接热图, 并展示结合能最低的活性成分与核心靶点的对接情况。

1.7 单样本基因集富集分析 (single sample gene set enrichment analysis, ssGSEA)

ssGSEA 是基因集富集分析的拓展算法, 能够实现对单个样本进行富集分析。应用 ssGSEA 算法对复方丹参滴丸干预 AR 的每个靶点分别进行通路富集分析 (基于 Reactom 和 KEGG 通路), 使用 R 软件的 ggplot2 包量化这些靶点在血栓形成、糖脂代谢、炎症反应、氧化应激、激素水平相关通路上的富集情况。

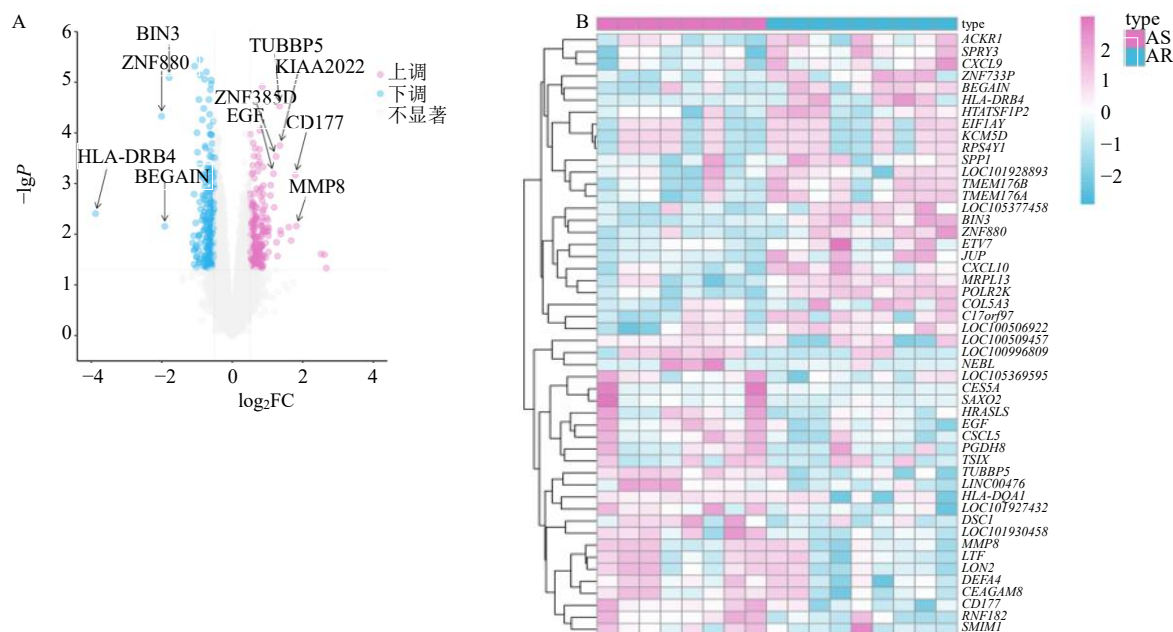
1.8 复方丹参滴丸改善 AR 机制网络构建

构建复方丹参滴丸改善 AR 的“成分-靶点-通路-功能”桑基图, 梳理复方丹参滴丸改善 AR 的潜在机制。

2 结果

2.1 DEGs 的筛选

相比于 AS 组, AR 组共有 DEGs 597 个, 其中上调基因 292 个, 下调基因 305 个。火山图如图 1-A



A-DEGs 火山图; B-表达差异最为显著的 25 个上、下调 DEGs 热图。

A-volcano map of DEGs; B-heat maps 25 upper and lower DEGs with the most significant expression differences.

图 1 AR 相关 DEGs 筛选

Fig. 1 Screening of AR-related DEGs

所示,上调和下调基因分别用粉色和蓝色节点表示,对排名前 10 的 DEGs 进行基因名称注释;以热图(图 1-B)的形式展示表达差异最为显著的 25 个上、下调 DEGs。

2.2 AR 相关 DEGs 富集分析

通过 GO 和 KEGG 富集分析注释 DEGs 功能,探究 AR 发生的潜在机制。GO 分析结果(图 2-A)显示,AR 相关 DEGs 的 CC 主要定位在分泌颗粒腔、细胞质囊泡腔、线粒体内膜、血小板 α 颗粒、主要组织相容性复合物 II (major histocompatibility complex II, MHC II) 类蛋白复合物等;参与血液凝固、血小板活化、核因子- κB (nuclear factor- κB , NF- κB) 转录因子活性、免疫球蛋白的产生与免疫球蛋白介导的免疫反应、脂质代谢过程的负调控、内皮细胞凋亡、白细胞活化相关炎症反应、肾上腺素受体信号通路、MHC II 类蛋白质复合物组装、氧化应激反应等 BP;发挥调控肝素结合、生长因子受体结合、肾上腺素受体活性、磷脂酰肌醇激酶活性、胰岛素受体结合、MHC II 类蛋白复合物结合、MHC II 类受体活性、血小板衍生生长因子受体结合等 MF。KEGG 结果表明 AR 相关 DEGs 主要富集在花生四烯酸代谢、氧化磷酸化、轴突引导、Wnt 信号通路、IL-17 信号通路、类固醇同源物生物合成、

中性粒细胞外陷阱的形成、不饱和脂肪酸的生物合成等通路上,如图 2-B 所示。富集结果提示除血小板活化和聚集外,炎症反应、激素失衡、氧化应激、糖脂代谢紊乱可能同样参与了 AR 的形成。

2.3 AR 潜在标志物与预测模型

通过 Lasso 特征选择,共得到 9 个标志性基因:腺苷酸环化酶 10 假基因 1 (adenylate cyclase 10 pseudogene 1, *ADCY10P1*)、神经突延伸和迁移因子 (neurite extension and migration factor, *NEXMIF*)、WD 重复域 11 反义 RNA1 (WD repeat domain 11 antisense RNA 1, *WDR11-AS1*)、去唾液酸糖蛋白受体 1 (asialoglycoprotein receptor 1, *ASGRI*)、天冬酰胺合成酶结构域包含蛋白 1 (asparagine synthetase domain containing 1, *ASNSD1*)、聚合酶家族成员 15 [poly(ADP-ribose)polymerase family member 15, *PARP15*]、RNA 聚合酶 II 亚基 K (RNA polymerase II subunit K, *POLR2K*)、蛋白磷酸酶 1 调节亚基 13 样 (protein phosphatase 1 regulatory subunit 13 like, *PPP1R13L*)、硫氧还蛋白样 4B (thioredoxin like 4B, *TXNL4B*) (图 3-A)。Nomogram 预测模型如图 3-B 所示,根据总评可预测 AR 发生概率。ROC 分析结果(图 3-C)显示,由 9 个标志分子组成的预测模型具有精准的预测性能 ($AUC=1$),可用于抗血小板治疗前评估患者存在 AR 的潜在风险。

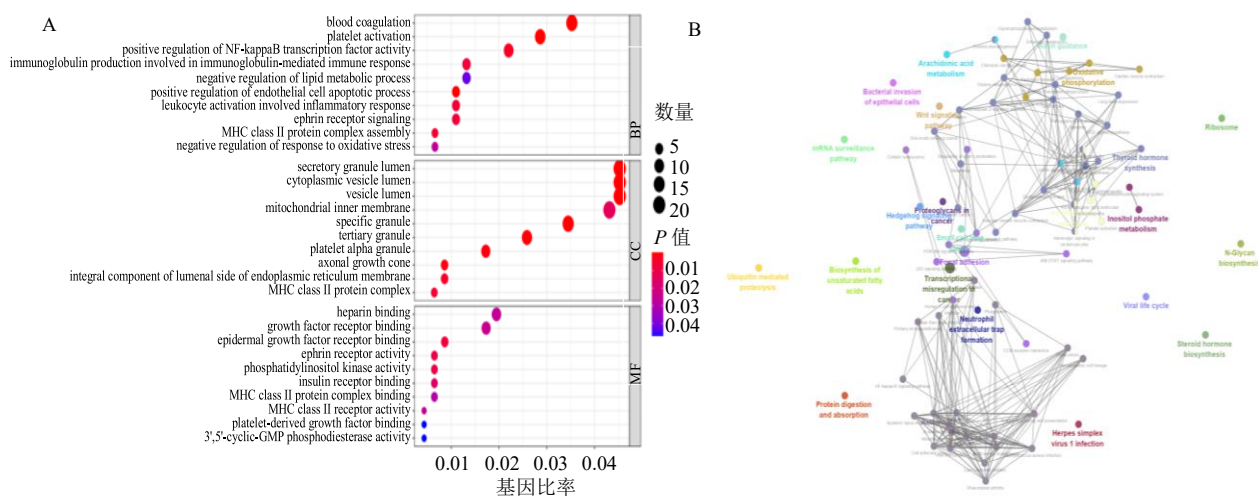
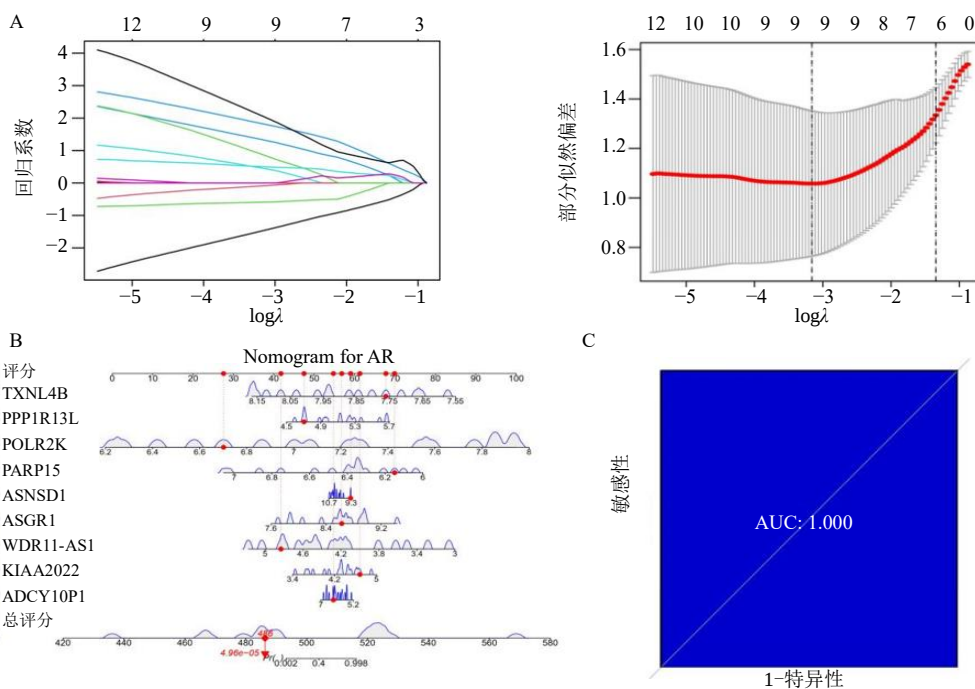


图2 AR相关DEGs的GO功能富集(A)和KEGG通路富集(B)分析

Fig. 2 GO functional enrichment (A) and KEGG pathway enrichment (B) analysis of AR related DEGs



A-Lasso 回归分析筛选 AR 特征基因 (最上面一行的数字表示交叉验证的次数, 即在不同 $\log_2$ 值下, 每次交叉验证中被选择为最优模型的次数); B-列线图构建 AR 预测模型; C-ROC 曲线评价模型预测性能。

A-Lasso regression analysis to screen characteristic genes of AR (number in top row represents number of cross-validations, that is, times of model is selected as the best in each cross-validation for different $\log\lambda$ values); B-construction of a nomogram to predict AR; C-evaluation of model predictive performance using ROC curve.

图3 AR潜在标志物与预测模型

Fig. 3 AR potential markers and prediction model

2.4 复方丹参滴丸改善 AR 靶点鉴定与富集分析

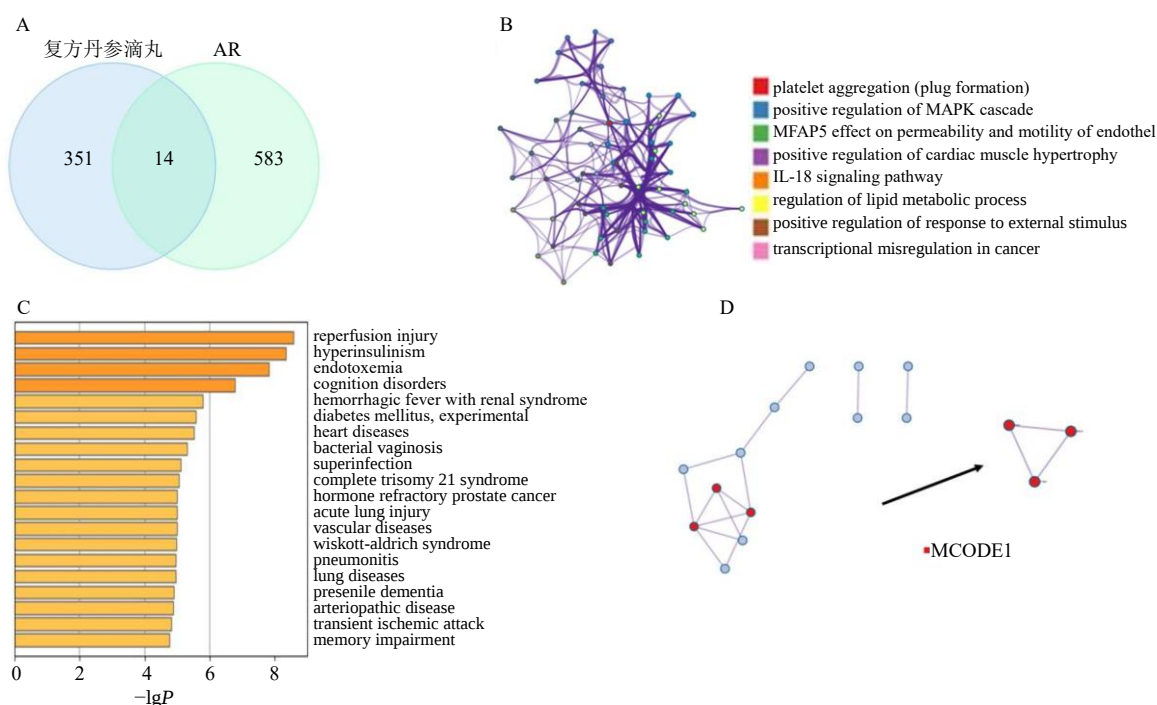
复方丹参滴丸的化学成分参照张伯礼教授团队^[18]通过超高压液相色谱串联四极杆飞行时间质谱(UHPLC-QTOF-MS)技术获得的36个化合物,包括

13 种酚酸、15 种皂苷和 8 种丹参酮。经过 Lipinski 原则筛选、Swiss Target Prediction 数据库预测及药物疾病靶点映射, 共得到 10 个复方丹参滴丸改善 AR 的活性成分(表 1)和 14 个作用靶点(图 4-A)。富

表 1 复方丹参滴丸改善 AR 活性成分

Table 1 Active ingredients of Compound Danshen Dropping Pills in relieving AR

序号	分子式	成分名称	物质的量/ (g·mol ⁻¹)	氢键受体 数量	氢键供体 数量	分子亲脂 性潜力
1	C ₉ H ₈ O ₄	咖啡酸 (caffeic acid)	180.16	4	3	0.70
2	C ₁₈ H ₁₂ O ₇	丹酚酸 G (salvianolic acid G)	340.28	7	4	0.75
3	C ₁₈ H ₁₆ O ₈	迷迭香酸 (rosmarinic acid)	360.31	8	5	0.90
4	C ₁₉ H ₁₈ O ₄	丹参酮 II _B (tanshinone II _B)	310.34	4	1	1.39
5	C ₂₁ H ₂₀ O ₄	丹参新醌 D (danshenxinkun D)	336.38	4	1	1.76
6	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	15,16-二氢丹参酮 I (15,16-dihydrotanshinone I)	278.30	3	0	1.93
7	C ₁₉ H ₂₀ O ₃	隐丹参酮 (cryptotanshinone)	296.36	3	0	2.36
8	C ₁₈ H ₁₄ O ₃	亚甲基丹参醌 (methylenetanshinquinone)	278.30	3	0	1.93
9	C ₁₉ H ₁₈ O ₃	丹参酮 II _A (tanshinone II _A)	294.34	3	0	2.24
10	C ₁₉ H ₂₂ O ₂	丹参新酮 (miltirone)	282.38	2	0	3.24



A-复方丹参滴丸和 AR 共同靶点韦恩图; B-复方丹参滴丸改善 AR 靶点的富集分析; C-复方丹参滴丸改善 AR 靶点的疾病预测; D-复方丹参滴丸改善 AR 的核心靶点推算。

A-Venn diagram of common targets of Compound Danshen Dripping Pills and AR; B-enrichment analysis of targets alleviated by Compound Danshen Dripping Pills in AR; C-disease prediction of targets alleviated by Compound Danshen Dripping Pills in AR; D-inference of core targets alleviated by Compound Danshen Dripping Pills in AR.

图 4 复方丹参滴丸改善 AR 靶点富集分析

Fig. 4 Enrichment analysis of targets of Compound Danshen Dropping Pills in relieving AR

集结果显示, 14 个靶点分子主要与血小板聚集、IL-18 信号通路、脂质代谢调节、丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 级联调控、心肌肥大、外部刺激反应相关, 见图 4-B。对作用靶点进行相关疾病预测 (图 4-C), 结果显示靶点分

子主要与心脏病、短暂性脑缺血发作、血管疾病、动脉疾病、糖尿病、肺炎等疾病相关。使用 MCODE 算法获得由整合素 $\beta 3$ 亚基 (integrin subunit beta 3, ITGB3)、蛋白激酶 $C\alpha$ (protein kinase C alpha, PRKCA)、蛋白酪氨酸激酶 2 (protein tyrosine kinase

2, PTK2) 组成的核心靶点模块, 功能富集结果表明核心靶点主要与血小板聚集、止血、黏着、血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 信号通路相关。

2.5 分子对接

将 3 个核心靶点 (PTK2、PRKCA、ITGB3) 与 10 个活性成分分别进行分子对接。根据结合能判断评估成分与靶点间构象稳定情况, 当结合能低于 -4.25 kcal/mol (1 kcal = 4.2 kJ) 则认为配体与受体

间能发生结合; 当结合能低于 -5.0 kcal/mol 时, 可认为体系较为稳定; 当结合能低于 -7.0 kcal/mol 时, 则表明配体与受体具有强烈的结合活性^[19]。对接结果显示, 所有活性成分与核心靶点间均有结合活性, 且除咖啡酸与 ITGB3 结合能为 -4.9 kcal/mol, 其余活性成分与核心靶点间结合稳固 (结合能低于 -5.0 kcal/mol), 验证了网络药理学预测结果的准确性。分子对接热图及结合能最低的活性成分 (隐丹参酮) 与核心靶点 (PTK2) 的对接情况见图 5。

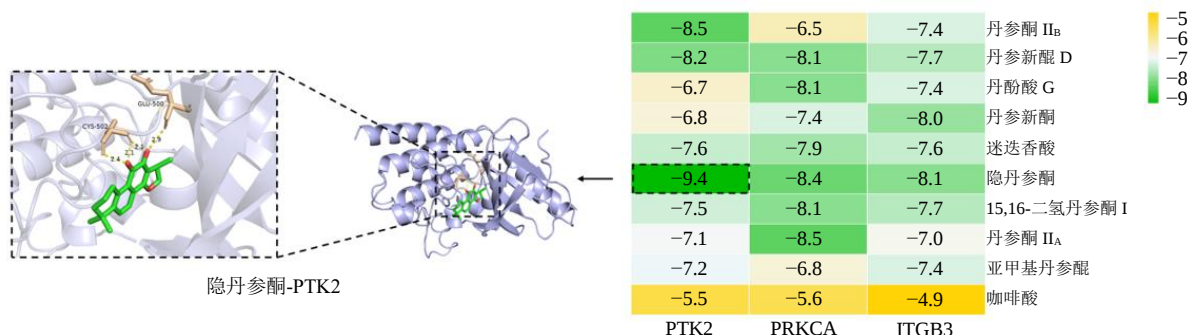


图 5 分子对接结果

Fig. 5 Results of molecular-docking

2.6 ssGSEA 分析及复方丹参滴丸改善 AR 机制网络

基于 Reactom 和 KEGG 数据集, 应用 ssGSEA 算法对每个药物作用靶点分别进行通路富集分析, 使用 R 软件的 ggplot2 包量化这些基因在血栓形成、糖脂代谢、炎症反应、氧化应激、激素水平相关通路上的富集情况。双特异性酪氨酸磷酸化调节激酶 1A (dual specificity tyrosine phosphorylation regulated kinase 1A, *DYRK1A*)、*ITGB3* 及肌球蛋白轻链激酶 (myosin light chain kinase, *MYLK*) 基因富集了 5 条以上通路, 其中 *DYRK1A* 经由血小板活化和聚集、对血小板胞浆钙离子升高的响应、雌激素生物合成、盐皮质激素生物合成、氧化应激、胰岛素分泌调节通路, 参与调节血栓形成、激素水平、氧化应激、糖代谢; *ITGB3* 主要富集在血小板活化和聚集、对血小板胞浆钙离子升高的响应、IL-12 刺激后 Janus 激酶 (Janus kinase, JAK) /信号转导和转录激活因子 3 (signal transducer and activator of transcription 3, STAT3) 信号传导、氧化应激、胰岛素分泌调节等通路上, 参与血栓形成、炎症反应、氧化应激、糖代谢等过程的调控; *MYLK* 通过介导血小板活化和聚集、对血小板胞浆钙离子升高的响应、盐皮质激素生物合成、氧化应激、胰岛素分泌调节等通路, 发挥调控血栓形成、激素水平、氧化应激、糖代谢

的功能; 其他基因相关通路富集结果如图 6 所示。进一步对复方丹参滴丸改善 AR 的 10 个活性成分、14 个作用靶点、15 条关键通路及 5 个核心功能构建调控网络, 见图 7。

3 讨论

阿司匹林是临床中使用最多的抗血小板药物, 自从 20 世纪 80 年代研究证实其可使心脑血管疾病患者获益以来, 一直作为国内外权威指南优先推荐用药^[20-22]。尽管近年来以 Twilight 为代表药物的研究向阿司匹林在心脑血管疾病二级预防中的地位发起挑战^[23], 但由于其试验设计仍存在局限性, 且缺乏长期随访的循证证据, 尚不足以改变现有指南推荐。同年《柳叶刀》的 1 项荟萃分析从疗效和安全性方面再次证明阿司匹林在抗血栓治疗中的不可替代性, 特别是在发生过心肌梗死和血运重建的人群中, 其基石地位依旧稳固^[24]。然而 AR 患者难以得到阿司匹林充分的抗血栓保护, 往往伴随着不良的心脑血管结局。1 项纳入 35 个临床试验涉及 19 025 例冠心病患者的 Meta 分析显示, AR 患者的全因死亡 [7.9% vs 2.5%, OR = 2.42, 95% CI (1.86 ~ 3.15), $P < 0.000 01$] 及血运重建 [4.5% vs 1.7%, OR = 2.20, 95% CI (1.19 ~ 4.08), $P = 0.01$] 风险均高于 AS 患者^[25]; 另 1 项类似的研究同样提示 AR 患者主要不

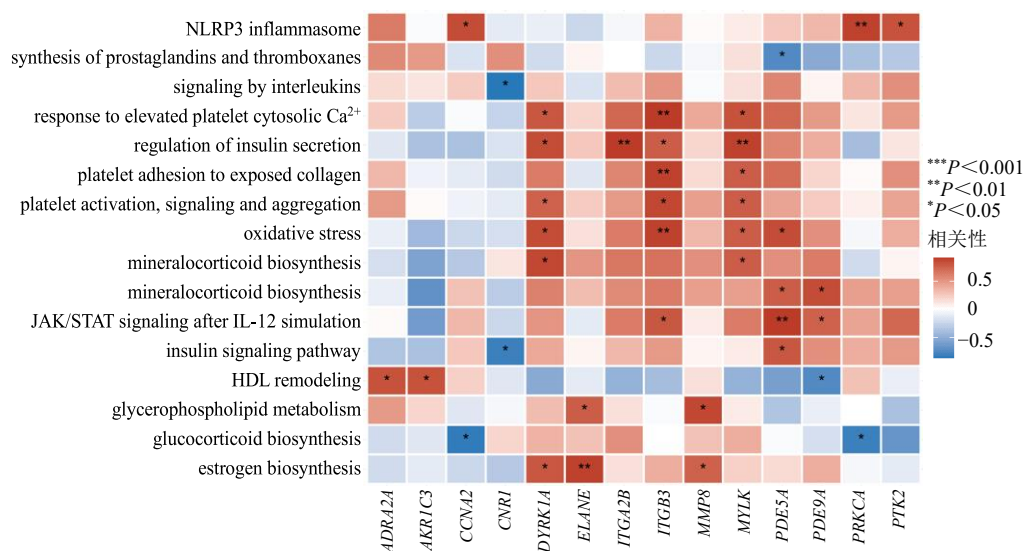


图 6 ssGSEA 结果

Fig. 6 GSEA results

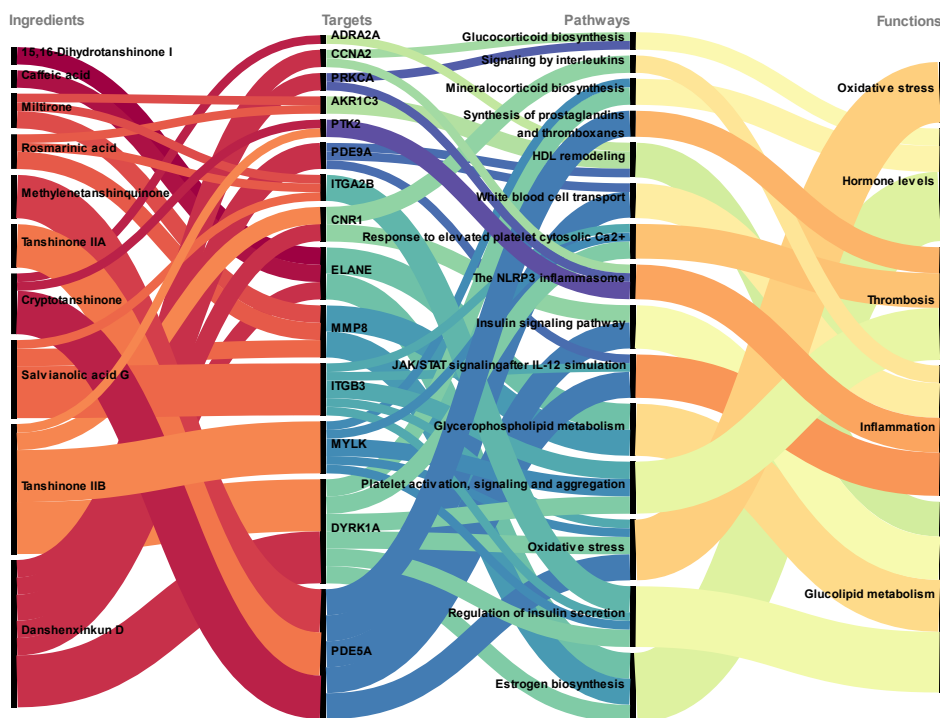


图 7 “成分-靶点-通路-功能”调控网络

Fig. 7 “Ingredient-target-pathway-function” regulatory network

良心血管事件发生风险提升 2.4 倍^[26]。因此早期识别 AR 人群，以便在抗血小板治疗前评估是否需要联合服药或替代治疗，在心脑血管疾病防治中具有重大临床意义。

目前，以光学透射比浊法（light transmission aggregometry, LTA）为代表的血小板功能检测是 AR

诊断的主流方式，可较为准确地评价血小板聚集能力，然而该方法操作流程复杂、检测时间长且室内控制物难以标准化，不能完全满足临床需要^[27]。本研究采用机器学习的方法构建了由 9 个基因组成的诊断模型，具有较高的预测性能，检查结果不易受其他因素影响，具有较好的临床应用前景。

现阶段应对 AR 的策略主要包括增加阿司匹林剂量、提高患者依从性、联合抗血小板治疗、药物替代、控制基础病等,但效果欠佳^[8]。以复方丹参滴丸为代表的活血化瘀中药制剂可多靶点抑制白细胞黏附和血小板聚集、改善微循环障碍,广泛应用于心脑血管疾病防治^[28]。临床中发现在抗血小板治疗基础上联用复方丹参滴丸可显著降低 ADP 及花生四烯酸诱导的血小板聚集率,降低 AR 患者缺血事件发生率,而不增加出血风险^[12],有望成为改善 AR 的理想方案。当前对 AR 的发生机制仍处于探索阶段,且以往的研究多聚焦于阿司匹林作用途径本身,对 AR 的认识缺乏系统性和整体性,难以从根本上解释 AR 现象。本研究结果显示,炎症反应、氧化应激、激素失衡、糖脂代谢紊乱同样参与了 AR 的形成。复方丹参滴丸改善 AR 的机制可能与调控以上病理过程有关。

富集分析结果表明,血小板相关的血栓形成是复方丹参滴丸改善 AR 的关键机制,由 ITGB3、PRKCA、PTK2 组成的血小板聚集相关模块是复方丹参滴丸干预 AR 的核心靶点。ITGB3 是编码血小板膜糖蛋白 IIIa (glycoprotein IIIa, GPIIb/IIIa) 的基因,介导血小板的黏附和聚集,其多态性和异常表达可诱发阿司匹林药效学和药代动力学特征的改变,导致凝血酶形成增强和阿司匹林抗血栓形成作用受损^[29],对该基因表达的抑制可能是复方丹参滴丸中丹酚酸 G 干预 AR 的潜在作用机制。蛋白激酶 C (protein kinase C, PKC) 是一类能够调控基因表达、蛋白分泌、细胞增殖和炎症反应的蛋白激酶家族,其为调节血小板活性提供了重要的细胞内机制^[30-32]。其中 PRKCA 已被确定为调节血小板中 α 颗粒、致密颗粒分泌及血小板聚集的重要调控因子,高度参与着体外和体内血栓形成^[32-33]。PRKCA 的敲除实验提示该分子有望成为抗血栓治疗的一个新型药物靶点^[33],全基因组关联分析也证实了 PRKCA 与冠状动脉疾病的关联^[34]。除了 ADP 等生物活性物质外,以整合素 α IIb β 3 为代表的血小板感应机械力受体分子同样能够活化血小板,促使其快速聚集,在血小板生物力学中发挥关键效用^[35]。作为 α IIb β 3 下游重要的调控分子 PTK2 会积聚在拉伸力形成的黏附部位^[36],能有效调控胶原蛋白和糖蛋白 VI (glycoprotein VI, GPVI) 依赖性血小板活化,在止血和血栓形成的过程中发挥重要作用^[37]。此外,富集结果显示复方丹参滴丸中的丹参新醌 D、丹参酮

II_B、丹酚酸 G、隐丹参酮、亚甲基丹参醌和丹参酮 II_A 能够调控磷酸二酯酶 5A (phosphodiesterase 5A, PDE5A)、MYLK 和 DYRK1A 基因表达,通过血小板活化和聚集、对血小板胞浆钙离子升高的响应、前列腺素和血栓烷的合成等过程抑制血栓形成。

近年来的研究揭示了免疫炎症、血小板功能和凝血系统之间的交互关联,炎症通路的异常激活在血栓形成中的作用已得到广泛证实^[38]。例如,新型冠状病毒肺炎 (corona virus disease 2019, COVID-19) 患者即使没有相关危险因素,严重急性呼吸综合征冠状病毒 2 (severe acute respiratory syndrome coronavirus 2, SARS-CoV-2) 引发的炎症因子风暴也会增加心肌梗死、脑卒中及血栓类疾病的发生风险^[39]。此外,慢性炎症也会诱发冠状动脉疾病患者血小板活化增强和阿司匹林抗血小板治疗失败^[40]。以卡那单抗抗炎血栓结局 (Canakinumab anti-inflammatory thrombosis outcomes study, CANTOS) 研究为代表的临床试验证实了抗炎治疗在心血管疾病二级预防中的确切疗效,提示靶向炎症在预防心血管事件中具有广阔的应用前景^[41]。血小板中 NLRP3 炎症小体能够驱动 IL-1 β 等细胞因子的活化与分泌,诱导血小板的激活和聚集,活化的血小板会再次促使炎症介质和细胞因子分泌^[42],将血栓形成与炎症反应紧密关联。复方丹参滴丸中的隐丹参酮、丹参酮 II_B 和丹参新醌 D 能够作用于 PTK2、PRKCA、大麻素受体 1 (cannabinoid receptor 1, CNR1) 和细胞周期蛋白 A (cyclin A, CCNA) 等核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体和白细胞介素通路的关键分子,参与炎症反应和血小板功能的调控。此外,丹参新醌 D、隐丹参酮和亚甲基丹参醌等活性成分可以通过靶向磷酸二酯酶 9A (phosphodiesterase 9A, PDE9A) 和 PDE5A 调节白细胞转运和一氧化氮-环磷鸟苷 (nitric oxide-cyclic guanosine monophosphate, NO-cGMP) 信号级联反应,抑制血小板活化与血栓形成^[43-45]。异常的糖代谢可能降低血小板对阿司匹林的敏感性^[46]。急性冠脉综合征患者全血 DNA 甲基化谱分析提示胰岛素分泌相关分子途径参与了 AR 的发生^[47],体外研究同样表明高糖环境能干扰阿司匹林对 NO/cGMP/蛋白激酶 G (protein kinase G, PKG) 途径的激活^[48]。ssGSEA 分析显示复方丹参滴丸中的丹参新醌、丹参酮 II_B、丹酚酸 G 等 7 个

活性分子能通过调控 MYLK、ITGB3、ITGA2B、DYRK1A、PDE5A、CNR1 等靶点改善胰岛素分泌,纠正糖代谢异常。此外,脂质代谢紊乱也可以通过诱导血管内皮损伤、抑制前列环素等方式削弱阿司匹林临床疗效^[49],胆固醇在血小板膜上的过度积累会降低血小板膜的流动性,而输注重组的高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)可逆转这一过程,提升患者对阿司匹林的敏感性^[50]。丹参新醌 D、丹参新酮、迷迭香酸和隐丹参酮等复方丹参滴丸活性成分可能通过干预 PDE9A、醛-酮还原酶家族 1 成员 C3 (aldo-keto reductase family 1 member C3, AKR1C3)、肾上腺素能受体 $\alpha 2A$ (adrenoceptor alpha 2A, ADRA2A) 等分子表达,提升 HDL-C 功能,进而增强阿司匹林抗血小板活性。过高的血糖水平和脂质过氧化途径会进一步诱导氧化应激增强 8-异前列腺素 $F2\alpha$ 表达,促进血管收缩和血小板活化。8-异前列腺素 $F2\alpha$ 作为一种激动剂可与血栓素血小板受体结合,而该过程与环氧合酶(cyclooxygenase, COX)活性无关,这意味着其不受阿司匹林的影响^[51]。因此,即便在血栓素 A_2 (thromboxane A_2 , TXA_2) 被阿司匹林抑制后,血小板仍然可以通过其他途径活化和聚集,进而导致 AR 发生^[52]。而复方丹参滴丸中的隐丹参酮、亚甲基丹参醌、丹参酮 II_A、丹酚酸 G 等活性成分可能通过干预 PDE5A、MYLK、ITGB3、DYRK1A 等分子表达逆转这一过程。女性在绝经后血栓栓塞和心脑血管疾病的风险增加已得到充分证实,其机制可能与雌激素耗竭介导的血小板高反应性有关^[53]。本研究结果显示复方丹参滴丸可能通过调节雌激素水平抑制血小板聚集,提升机体对阿司匹林敏感性。Nakano 等^[54]研究同样发现激素替代治疗可通过减少钙内流、抑制血小板糖蛋白 IIb/IIIa (glycoprotein IIb/IIIa, GP IIb/IIIa) 受体激活、增加环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)的产生来调节血小板功能。

本研究基于生物信息学的方法,较为系统地阐述了 AR 发生的潜在机制;采用机器学习算法,确定了 9 个 AR 的分子标志物,并构建了 AUC=1 的精准预测模型,有助于在抗血小板治疗前评估 AR 发生风险,优化临床决策,由于缺少外部验证集,模型应用需谨慎,有待大样本数据进一步验证。网络药理学结果表明除血小板活化和聚集外,复方丹参滴丸还能调控炎症反应、激素水平、氧化

应激、糖脂代谢等多途径改善 AR,然而由于缺乏基础实验证据支撑,以上结果仅作为后续机制研究参考,为药物研发设计、药效机制探索及临床合理用药提供思路与借鉴。课题组未来将针对活性成分、关键靶点及核心通路在临床样本和基础实验中进行验证,同时期待更多中医药改善 AR 分子机制深入开展,推动中西药联合应用在抗血栓领域的发展。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Jones W S, Mulder H, Wruock L M, *et al.* Comparative effectiveness of aspirin dosing in cardiovascular disease [J]. *N Engl J Med*, 2021, 384(21): 1981-1990.
- [2] Byrne R A, Collieran R. Aspirin for secondary prevention of cardiovascular disease [J]. *Lancet*, 2020, 395(10235): 1462-1463.
- [3] Dehne S, Heck C, Sander J, *et al.* Editor's choice - association between peri-Operative aspirin Resistance and CardioVascular outcome (POPART-CVO): A prospective non-interventional cohort study [J]. *Eur J Vasc Endovasc Surg*, 2022, 64(4): 407-415.
- [4] Ebrahimi P, Farhadi Z, Behzadifar M, *et al.* Prevalence rate of laboratory defined aspirin resistance in cardiovascular disease patients: A systematic review and Meta-analysis [J]. *Caspian J Intern Med*, 2020, 11(2): 124-134.
- [5] Khan H, Kanny O, Syed M H, *et al.* Aspirin resistance in vascular disease: A review highlighting the critical need for improved point-of-care testing and personalized therapy [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(19): 11317.
- [6] Floyd C N, Ferro A. Mechanisms of aspirin resistance [J]. *Pharmacol Ther*, 2014, 141(1): 69-78.
- [7] Yassin A S, Abubakar H, Mishra T, *et al.* Aspirin resistance: Cardiovascular risk game changer [J]. *Am J Therapeutics*, 2019, 26(5): e593-e599.
- [8] Agayeva N, Topcuoglu M A, Arsava E M. The interplay between stroke severity, antiplatelet use, and aspirin resistance in ischemic stroke [J]. *J Stroke Cerebrovasc Dis*, 2016, 25(2): 397-403.
- [9] 彭宁, 刘勤社, 梁磊, 等. 冠脉粥样硬化患者 AR 中医证型分布及活血胶囊对血瘀型 AR 的干预作用 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2011, 9(3): 257-259.
- [10] Zhao Y X, Yang S J, Wu M. Mechanism of improving aspirin resistance: Blood-activating herbs combined with aspirin in treating atherosclerotic cardiovascular diseases [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 794417.
- [11] 郭红鑫, 李兴渊, 朱明军. 活血化瘀类中成药治疗阿司匹林抵抗疗效的贝叶斯网状 Meta 分析 [J/OL]. 中药药

- 理与临床 [2024-02-06]. <https://doi.org/10.13412/j.cnki.zyyj.20230828.001>.
- [12] 郭红鑫, 乔利杰, 卫靖靖, 等. 复方丹参滴丸改善阿司匹林抵抗有效性和安全性的 Meta 分析 [J]. 中国药房, 2021, 32(6): 743-749.
- [13] 钱凤丹, 倪铭, 周佳纯, 等. 活血化瘀类中成药与口服抗栓药相互作用的研究进展 [J]. 中国药房, 2019, 30(14): 2008-2012.
- [14] 陈光, 王阶. 中医药干预阿司匹林抵抗的临床研究进展及机制探讨 [J]. 世界中西医结合杂志, 2015, 10(4): 586-589.
- [15] 陈英全, 郑创建, 梁羨方, 等. 冠心病患者阿司匹林抵抗与调节性 T 细胞的关系 [J]. 临床心血管病杂志, 2015, 31(3): 299-301.
- [16] 于宗琴. 复方丹参滴丸及主要成分对阿司匹林酯酶活性的影响 [D]. 济南: 山东大学, 2011.
- [17] Lipinski C A, Lombardo F, Dominy B W, *et al.* Experimental and computational approaches to estimate solubility and permeability in drug discovery and development settings [J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2001, 46(1/2/3): 3-26.
- [18] Liu P, Yang H, Long F, *et al.* Bioactive equivalence of combinatorial components identified in screening of an herbal medicine [J]. *Pharm Res*, 2014, 31(7): 1788-1800.
- [19] Ji L Y, Song T, Ge C L, *et al.* Identification of bioactive compounds and potential mechanisms of *Scutellariae Radix-Coptidis Rhizoma* in the treatment of atherosclerosis by integrating network pharmacology and experimental validation [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 165: 115210.
- [20] Second International Study of Infarct Survival Collaborative Group. Randomised trial of intravenous streptokinase, oral aspirin, both, or neither among 17 187 cases of suspected acute myocardial infarction: Isis-2 [J]. *Lancet*, 1988, 332(8607): 349-360.
- [21] Visseren F L J, Mach F, Smulders Y M, *et al.* 2021 ESC Guidelines on cardiovascular disease prevention in clinical practice: Developed by the Task Force for cardiovascular disease prevention in clinical practice with representatives of the European Society of Cardiology and 12 medical societies With the special contribution of the European Association of Preventive Cardiology (EAPC) [J]. *Rev Esp Cardiol*, 2022, 75(5): 429.
- [22] 中国心血管病预防指南写作组, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心血管病预防指南 (2017) [J]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(1): 10-25.
- [23] Mehran R, Baber U, Sharma S K, *et al.* Ticagrelor with or without aspirin in high-risk patients after PCI [J]. *N Engl J Med*, 2019, 381(21): 2032-2042.
- [24] Chiarito M, Sanz-Sánchez J, Cannata F, *et al.* Monotherapy with a P2Y₁₂ inhibitor or aspirin for secondary prevention in patients with established atherosclerosis: A systematic review and meta-analysis [J]. *Lancet*, 2020, 395(10235): 1487-1495.
- [25] Wang J, Liu J, Zhou Y Q, *et al.* Association among P1A1/A2 gene polymorphism, laboratory aspirin resistance and clinical outcomes in patients with coronary artery disease: An updated meta-analysis [J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 13177.
- [26] Li J B, Song M B, Jian Z, *et al.* Laboratory aspirin resistance and the risk of major adverse cardiovascular events in patients with coronary heart disease on confirmed aspirin adherence [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2014, 21(3): 239-247.
- [27] 中国老年保健医学研究会检验医学分会. 光学比浊法检测血小板聚集标准化专家共识 [J]. 中华检验医学杂志, 2021, 44(6): 472-479.
- [28] 刘永成, 田颖, 郭栋, 等. 复方丹参滴丸治疗原发性高血压的系统评价和 Meta 分析 [J]. 中草药, 2022, 53(10): 3111-3124.
- [29] Islam M R, Nova T T, Momenuzzaman N, *et al.* Prevalence of CYP2C19 and ITGB3 polymorphisms among Bangladeshi patients who underwent percutaneous coronary intervention [J]. *SAGE Open Med*, 2021, 9: 20503121211042209.
- [30] de Silva E, Devine D V, Jan E, *et al.* Filamin A regulates caspase-3 cleavage in platelets in a protein kinase C (PKC)-dependent manner [J]. *Biochem J*, 2022, 479(22): 2351-2364.
- [31] Zhang P Y, Solari F A, Heemskerk J W M, *et al.* Differential regulation of GPVI-induced btk and syk activation by PKC, PKA and PP2A in human platelets [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(9): 7776.
- [32] Liu D, Cao Y, Zhang X L, *et al.* Chemokine CC-motif ligand 2 participates in platelet function and arterial thrombosis by regulating PKC α -P38MAPK-HSP27 pathway [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(9 Pt B): 2901-2912.
- [33] Konopatskaya O, Gilio K, Harper M T, *et al.* PKC α regulates platelet granule secretion and thrombus formation in mice [J]. *J Clin Invest*, 2009, 119(2): 399-407.
- [34] Samani N J, Erdmann J, Hall A S, *et al.* Genomewide association analysis of coronary artery disease [J]. *N Engl J Med*, 2007, 357(5): 443-453.
- [35] van den Kerkhof D L, Nagy M, Wichapong K, *et al.* Inhibition of platelet adhesion, thrombus formation, and fibrin formation by a potent α IIb β 3 integrin inhibitor from

- ticks [J]. *Res Pract Thromb Haemost*, 2020, 5(1): 231-242.
- [36] Tapial Martínez P, López Navajas P, Lietha D. FAK structure and regulation by membrane interactions and force in focal adhesions [J]. *Biomolecules*, 2020, 10(2): 179.
- [37] Huang J N, Jooss N J, Fernández D I, *et al.* Roles of focal adhesion kinase PTK2 and integrin α IIb β 3 signaling in collagen- and GPVI-dependent *Thrombus* formation under shear [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(15): 8688.
- [38] Stark K, Massberg S. Interplay between inflammation and thrombosis in cardiovascular pathology [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2021, 18(9): 666-682.
- [39] Xie Y, Xu E, Bowe B, *et al.* Long-term cardiovascular outcomes of COVID-19 [J]. *Nat Med*, 2022, 28(3): 583-590.
- [40] Larsen S B, Grove E L, Kristensen S D, *et al.* Reduced antiplatelet effect of aspirin is associated with low-grade inflammation in patients with coronary artery disease [J]. *Thromb Haemost*, 2013, 109(5): 920-929.
- [41] Ridker P M, Everett B M, Thuren T, *et al.* Antiinflammatory therapy with canakinumab for atherosclerotic disease [J]. *N Engl J Med*, 2017, 377(12): 1119-1131.
- [42] Murthy P, Durco F, Miller-Ocuin J L, *et al.* The NLRP3 inflammasome and bruton's tyrosine kinase in platelets co-regulate platelet activation, aggregation, and invitro thrombus formation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2017, 483(1): 230-236.
- [43] Gui X, Chu X, Du Y W, *et al.* Impaired platelet function and *Thrombus* formation in PDE5A-deficient mice [J]. *Thromb Haemost*, 2023, 123(2): 207-218.
- [44] Nagy Z, Nieswandt B. PDE5A: Key enzyme to overcome platelet inhibition [J]. *Thromb Haemost*, 2023, 123(2): 131-132.
- [45] Degjoni A, Campolo F, Stefanini L, *et al.* The NO/cGMP/PKG pathway in platelets: The therapeutic potential of PDE5 inhibitors in platelet disorders [J]. *J Thromb Haemost*, 2022, 20(11): 2465-2474.
- [46] Paven E, Dillinger J G, Bal Dit Sollier C, *et al.* Determinants of aspirin resistance in patients with type 2 diabetes [J]. *Diabetes Metab*, 2020, 46(5): 370-376.
- [47] Yu Q L, Yang J, Wang J, *et al.* DNA methylation profile in the whole blood of acute coronary syndrome patients with aspirin resistance [J]. *J Clin Lab Anal*, 2023, 37(1): e24821.
- [48] Russo I, Viretto M, Barale C, *et al.* High glucose inhibits the aspirin-induced activation of the nitric oxide/cGMP/cGMP-dependent protein kinase pathway and does not affect the aspirin-induced inhibition of thromboxane synthesis in human platelets [J]. *Diabetes*, 2012, 61(11): 2913-2921.
- [49] Ferroni P, Basili S, Santilli F, *et al.* Low-density lipoprotein-lowering medication and platelet function [J]. *Pathophysiol Haemost Thromb*, 2006, 35(3/4): 346-354.
- [50] Yalcinkaya E, Celik M. Evaluation of inflammatory conditions associated with aspirin resistance [J]. *Ups J Med Sci*, 2014, 119(3): 292-293.
- [51] Bauer J, Ripperger A, Frantz S, *et al.* Pathophysiology of isoprostanes in the cardiovascular system: Implications of isoprostane-mediated thromboxane A2 receptor activation [J]. *Br J Pharmacol*, 2014, 171(13): 3115-3131.
- [52] Guo J, Wang J, Feng J. Aspirin resistance mediated by oxidative stress-induced 8-Isoprostaglandin F2 [J]. *J Clin Pharm Ther*, 2019, 44(5): 823-828.
- [53] Wickham K A, Nørregaard L B, Lundberg Slingsby M H, *et al.* High-intensity exercise training improves basal platelet prostacyclin sensitivity and potentiates the response to dual anti-platelet therapy in postmenopausal women [J]. *Biomolecules*, 2022, 12(10): 1501.
- [54] Nakano Y, Oshima T, Ozono R, *et al.* Estrogen replacement suppresses function of thrombin stimulated platelets by inhibiting Ca^{2+} influx and raising cyclic adenosine monophosphate [J]. *Cardiovascular Res*, 2002, 53(3): 634-641.

[责任编辑 潘明佳]