

基于“开窍通络”探究艾片改善冠脉微循环障碍的作用机制

侯薇^{1,2}, 陈兰英^{1,2*}, 袁蓓欣^{1,2}, 崔亚茹^{1,2}, 段文彬^{1,2}, 汪文龙^{1,2}, 刘荣华^{1*}

1. 江西中医药大学, 江西 南昌 330004

2. 中药固体制剂制造技术国家工程研究中心, 江西 南昌 330006

摘要: 目的 探究艾片基于“开窍通络”改善冠脉微循环障碍 (coronary microcirculation disorders, CMD) 大鼠的作用及可能机制。方法 选取雄性 SD 大鼠 48 只, 随机分为假手术组、模型组和艾片低、高剂量组 (0.05、0.10 g/kg), 除假手术组注射等量 PBS 外, 其余组大鼠经左心室注射聚乙烯微球混悬液构建 CMD 大鼠模型。观察中医证候宏观评价指标舌象; 检测血流动力学中 CMD 大鼠血流量 (mean blood flow, MBF)、动脉平均压 (mean arterial pressure, MAP) 及左心室压变化; 检测血液流变学中血液黏度、凝血四项、血小板功能指标的异常变化情况; 生化分析仪及试剂盒检测大鼠血清中心功能、内皮功能及能量代谢相关指标含量变化; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察心肌组织病变情况; 通过可视化技术结合 Angio Tool 软件及泊肃叶公式分析冠脉微血管面积、密度、直径、空隙度及血流阻力; Western blotting 检测心肌组织中能量代谢相关蛋白肝激酶 B1 (liver kinase B1, LKB1)、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMP-activated protein kinase, AMPK)、磷酸化腺苷酸活化蛋白激酶 (phospho-AMPK, p-AMPK)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活因子-1 α (peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator-1 alpha, PGC-1 α) 及血管新生相关蛋白血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF)、血管内皮细胞生长因子受体 2 (vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2) 蛋白表达情况。结果 与假手术组比较, 艾片可显著升高 CMD 大鼠 MBF、MAP ($P < 0.01, 0.05$), 改善左心室压异常现象; 显著降低 CMD 大鼠平均血小板体积 (mean platelet volume, MPV), 升高血小板计数 (platelet count, PLT), 显著延长凝血酶原时间 (prothrombin time, PT) 及活化部分凝血酶原时间 (activated partial thromboplastin time, APTT), 改善 CMD 大鼠血液流变学异常情况 ($P < 0.05, 0.01$); 显著降低血清中肌酸激酶 (creatine kinase, CK)、肌酸激酶同工酶 (creatine kinase MB, CK-MB)、乳酸脱氢酶 (lactate dehydrogenase, LDH)、天门冬氨酸氨基转移酶 (aspartic transaminase, AST)、葡萄糖 (glucose, GLU)、内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) 含量 ($P < 0.05, 0.01$), 升高血清中一氧化氮 (nitric oxide, NO) 和心肌组织中腺嘌呤核苷三磷酸 (adenosine Triphosphate, ATP) 含量 ($P < 0.05, 0.01$), 改善内皮功能受损及能量代谢紊乱情况; 显著改善 CMD 大鼠微血管密度、直径及面积降低, 空隙度和血流阻力升高的情况 ($P < 0.01$); Western blotting 结果显示艾片能显著升高 CMD 大鼠心肌组织 LKB1、p-AMPK/AMPK、PGC-1 α 、VEGF、VEGFR2 蛋白水平表达 ($P < 0.05, 0.01$)。结论 艾片可能通过改善 CMD 大鼠心肌能量代谢异常情况, 促进血管新生、纠正血管舒缩障碍达到“开窍通络”的作用, 为治疗 CMD 提供新思路。

关键词: 艾片; 冠脉微循环障碍; 微血管可视化技术; 能量代谢; 内皮功能; 促进血管新生; 纠正血管舒缩障碍; 开窍通络

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2024)23-8079-12

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.23.015

Mechanism of *Blumea balsamifera* in improving coronary microcirculatory disorders based on “Kaiqiao Tongluo”

HOU Wei^{1,2}, CHEN Lanying^{1,2}, YUAN Beixin^{1,2}, CUI Yaru^{1,2}, DUAN Wenbin^{1,2}, WANG Wenlong^{1,2}, LIU Ronghua¹

1. Jiangxi University of Chinese Medicine, Nanchang 330004, China

2. National Pharmaceutical Engineering Research Center of Solid Preparation in Chinese Herbal Medicine, Nanchang 330006, China

收稿日期: 2024-08-05

基金项目: 江西省自然科学基金重点项目 (2022ACB206043); 国家自然科学基金项目 (82160732); 国家重点研发计划项目 (2018YFC1706102); 中药药效物质基础江西省重点实验室项目 (2024SSY07102)

作者简介: 侯薇 (2000—), 女 (汉族), 硕士研究生, 从事中药药效评价与作用机制研究。E-mail: 2248923541@qq.com

*通讯作者: 陈兰英 (1966—), 女 (汉族), 教授, 博士生导师, 从事中药药效评价与作用机制研究。E-mail: clyxy2513@163.com

刘荣华 (1964—), 男 (汉族), 教授, 博士生导师, 从事中药药效物质基础与中药质量评价研究。E-mail: rhliu@163.com

Abstract: Objective To investigate the effects and possible mechanisms of *Blumea balsamifera* in improving coronary microcirculation disorders (CMD) in rats based on “Kaiqiao Tongluo”. **Methods** A total of 48 male SD rats were selected and randomly divided into sham group, model group, low- and high-dose group of *B. balsamifera* (0.05, 0.10 g/kg). Except for the sham group, which was injected with an equal amount of PBS, the other three groups were injected with polyethylene microsphere suspension into the left ventricle to prepare CMD rat models. Observing the tongue image, a macroscopic evaluation index of traditional Chinese medicine evidence, detecting the changes of mean blood flow (MBF), mean arterial pressure (MAP) and left ventricular pressure in CMD rats in hemodynamics, detecting the abnormal changes of blood viscosity, coagulation four items, and platelet function indexes in blood rheology, and the changes of the content of serum central function, endothelial function, and energy metabolism-related indexes were detected by biochemical analyzers and kits. Hematoxylin-eosin (HE) staining was used to observe myocardial tissue lesions, coronary microvessel area, density, diameter, voidness, and resistance to blood flow were analyzed by visualization technology combined with Angio Tool software and Poisson Leaf formula, and energy metabolism-related proteins liver kinase B1 (LKB1), AMP-activated protein kinase (AMPK), phospho-AMPK (p-AMPK), peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α), and vascular neovascularization-related proteins vascular endothelial growth factor (VEGF) and vascular endothelial growth factor receptor 2 (VEGFR2) protein expression were detected by Western blotting. **Results** Compared with the sham surgery group, *B. balsamifera* significantly increased MBF and MAP in CMD rats ($P < 0.05, 0.01$), and improved abnormal left ventricular pressure; significantly reduced mean platelet volume (MPV) and increased platelet count (PLT) in CMD rats, significantly prolonged prothrombin time (PT) and activated partial thromboplastin time (APTT), and improved abnormal hemorheology in CMD rats ($P < 0.05, 0.01$); significantly reduced the levels of creatine kinase (CK), creatine kinase MB (CK-MB), lactate dehydrogenase (LDH), aspartate transaminase (AST), glucose (GLU), and endothelin-1 (ET-1) in serum ($P < 0.05, 0.01$), increased the levels of nitric oxide (NO) in serum and adenosine triphosphate (ATP) in myocardial tissue ($P < 0.05, 0.01$), and improved endothelial function impairment and energy metabolism disorders; significantly improved decreased microvessel density, diameter and area, and elevated voidness and resistance to blood flow in CMD rats ($P < 0.01$). The Western blotting results showed that *B. balsamifera* significantly increased the protein levels of LKB1, p-AMPK/AMPK, PGC-1 α , VEGF, and VEGFR2 in the myocardial tissue of CMD rats ($P < 0.05, 0.01$). **Conclusion** *B. balsamifera* may improve the abnormal myocardial energy metabolism in CMD rats, promote angiogenesis, and correct vascular constriction disorders to achieve the “Kaiqiao Tongluo” effect, providing new ideas for treating CMD.

Keywords: *Blumea balsamifera* (L.) DC.; coronary microcirculation disorders; microvascular visualization technology; energy metabolism; endothelial function; promoting angiogenesis; correcting vascular constriction disorders; Kaiqiao Tongluo

冠脉微循环障碍 (coronary microcirculation disorders, CMD) 是由血管内皮功能障碍、微栓塞形成、微血管痉挛等多种致病因素导致的冠状前小动脉和小动脉结构或功能异常, 从而形成冠脉血流受损和心肌缺血的一种微血管疾病^[1-3]。CMD 临床多表现为胸痛、胸闷、心前区不适等症状, 属中医学“胸痹、真心痛”等范畴, 多因气滞而血行缓慢, 进而留滞成瘀、瘀阻心络、不通则痛所致。研究表明孙络整体较狭窄且迂曲, 易于瘀阻, 故此病需在心之孙络、浮络治疗, 非辛香开窍之品不能达也, 可利用其芳香上达, 行散走窜的特性, 达到开窍通络、行气活血的目的使其血行流畅充盈、脉络通利^[4-6]。

中药艾片为菊科植物艾纳香 *Blumea balsamifera* (L.) DC. 的新鲜叶经提取加工制成的结晶, 主要成分为左旋龙脑, 味辛、苦, 微寒, 归心、脾、肺经, 具有开窍醒神, 清热止痛之效^[7-8], 为商品冰片的一种。《本草纲目》记载其“通诸窍, 散郁火”之功, 在治疗胸痹心痛、脉络不畅的冠心苏合丸、银丹心脑通等名方中均有

配伍^[9-10]。艾片芳香辛散, 然迄今鲜见其利用辛散通络之用于治疗微循环方面的报道, 且 CMD 形成机制及过程复杂, 需要从多环节、多靶点联合干预, 这正是中医药的优势所在^[11-12], 故本研究首次结合微循环可视化技术探究艾片基于“开窍通络”治疗 CMD 大鼠的可能作用机制, 以期为中药防治 CMD 提供新思路。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 48 只, 体质量 (250±20) g, 6 周龄, 购自湖南斯莱克公司, 动物许可证号 SCXK (湘) 2019-0004。饲养房恒温 (25±2) °C, 相对湿度 (55±5) %, 昼夜交替环境, 自由饮水进食喂养 5 d 后开始实验。本实验经江西中医药大学动物伦理委员会批准 (伦理号 JZSYDWLL-20200801)。

1.2 药物与试剂

艾片 (批号 B250201) 购自贵州苗药生物技术有限公司, 由江西中医药大学药学院刘荣华教授研究团队鉴定为菊科植物艾纳香 *B. balsamifera* (L.)

DC.的新鲜叶经提取加工制成的结晶,其中左旋龙脑质量分数 91.060%,异龙脑质量分数 0.053%,樟脑质量分数 4.363%,符合《中国药典》2020 年版标准。本研究艾片给药剂量参照《中国药典》2020 版及人鼠等效剂量换算^[13],依据成人日用量 0.3 g 计算得高、低剂量,即 0.10、0.05 g/kg。取艾片少量多次加入 1% 聚山梨酯-80 研磨,超声仪混匀,4 ℃ 保存备用。

聚乙烯微球(批号 220716)购自上海译元生物科技有限公司;肌酸激酶(creatine kinase, CK, 批号 20090320)、肌酸激酶同工酶(creatine kinase MB, CK-MB, 批号 22051301)、葡萄糖(glucose, GLU, 批号 22080503)、天冬氨酸氨基转移酶(aspartate aminotransferase, AST)测定试剂盒(批号 22071514)均购自北京利德曼公司;乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)测定试剂盒(批号 KM174)购自上海富士胶片和光纯耀化学有限公司;大鼠内皮素 1(endothelin-1, ET-1)ELISA 科研试剂盒(批号 202312)购自江苏酶免实业有限公司;一氧化氮(nitric oxide, NO)一步法试剂盒(批号 20231228)、腺嘌呤核苷三磷酸(adenosine Triphosphate, ATP)含量测试盒(批号 A095-1-1)购自南京建成生物工程研究所;DiI C12(批号 C12210335)购自上海麦克林生化科技有限公司;DiI C18(批号 BCCF7490)购自上海默克化工技术有限公司;含 DAPI 抗荧光衰减封片剂(批号 20230129)购自北京 Solarbio 科技有限公司;肝激酶 B1(liver kinase B1, LKB1)抗体(批号 HA500143)、腺苷酸活化蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)抗体(批号 10022448)、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 辅激活酶因子-1 α (peroxisome proliferators-activated receptor γ coactivator-1 alpha, PGC-1 α)抗体(批号 H661962007)、血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)抗体(批号 ER30607)、血管内皮细胞生长因子受体 2(vascular endothelial growth factor receptor 2, VEGFR2)抗体(批号 ET1608-33)、GAPDH 抗体(批号 R1210-1)均购自杭州 HUABIO 公司;P-AMPK 抗体(批号 F112301)购自上海 ABWAYS 公司;兔二抗(批号 ASO05)购自上海爱必信公司。

1.3 仪器

F3AL250V 型全自动血液流变分析仪(重庆南方数控设备股份有限公司);ML866 型 Power Lab

电生理记录仪(澳大利亚 AD 公司);TS420 型流量仪(美国 Transonic 公司);BC-5000Vet 型血球仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司);SC40 型半自动凝血分析仪(泰州中勤世帝生物技术有限公司);7100 型全自动生化分析仪(日本 HITACHI 公司);Ni-u 型正置荧光显微镜(日本 Nikon 公司);SP8 型激光共聚焦显微镜、CM1850 型冰冻切片机(德国 Leica 公司);InfiniteM200PRO 型酶标仪(瑞士 TECAN 公司);Chemi Doc XRS 型凝胶成像仪(美国 Bio-rad 公司)。

2 方法

2.1 CMD 大鼠分组、造模及给药

SD 大鼠随机分为 4 组,每组 12 只,分别为假手术组、模型组和艾片低、高剂量组(0.05、0.10 g/kg)。给药组 ig 相应药物(10 mL/kg),假手术组与模型组给予 ig 等体积蒸馏水,1 次/d,连续 7 d。

第 6 天给药 45 min 后进行造模,造模方法参考文献报道^[14]。采用乌拉坦(60 mg/kg)联合 5%异氟烷麻醉,经左心室注射 100 μ L 聚乙烯微球混悬液(3×10^4 个/mL)。造模过程中进行心电图检测,当大鼠心电图出现心肌缺血表现(ST 段出现倒置、压低或抬高),表示造模成功^[12,14]。假手术组经左心室注射等量 PBS,其余操作同模型组。

2.2 中医证候评价指标检测

第 7 天给药 45 min 后,ip 乌拉坦(120 mg/kg)麻醉大鼠,在同一光源、同一位置利用病理大体拍摄仪对大鼠舌面同 Casmach 标准比色卡进行红(red, R)、绿(green, G)、蓝(blue, B)图像采集。

利用 Image-J 软件在大鼠舌面分别取 3 个相同位置的采集点,同时在比色卡灰色块中央部位采集实测值。根据参考文献方法^[15]计算 R、G、B 值。

真实值=(灰色色块真实值 $\times$ 舌面实测值)/灰色色块实测值

2.3 血流动力学检测

采用 Power Lab 电生理仪经右颈总动脉检测大鼠动脉血流量、左颈总动脉检测左心室压、左股动脉检测动脉压。

2.4 血液流变学检测

2.4.1 血液黏度检测 含肝素钠真空采血管进行腹主动脉取血后,置于血液流变仪中检测大鼠全血低、中、高切速率下(1、30、200 s⁻¹)全血黏度,于 4 ℃、3 500 r/min 离心 15 min,取上清,检测血浆黏度。

2.4.2 血小板功能指标检测 全血置于血球仪中检测血小板计数(platelet count, PLT)、平均血小板

体积 (mean platelet volume, MPV)。

2.4.3 凝血四项指标检测 含 3.8%枸橼酸钠真空采血管腹主动脉取血^[16], 于 4 °C、3 000 r/min 离心 10 min, 取上清。检测凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)、活化部分凝血酶原时间 (activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶时间 (thrombin time, TT) 及纤维蛋白原 (fibrinogen, FIB)。

2.5 心功能指标检测

取各组大鼠血清 200 μ L 置于全自动生化分析仪检测 CK、CK-MB、LDH、AST 含量。

2.6 血管内皮功能指标检测

取各组大鼠血清 200 μ L, 按照测定试剂盒说明书操作, 检测 NO、ET-1 含量。

2.7 能量代谢指标检测

取各组大鼠心肌组织 30 mg, 按照测定试剂盒说明书操作, 检测 ATP 含量。取各组大鼠血清 200 μ L, 置于全自动生化分析仪检测 GLU 含量。

2.8 心脏病理切片

心脏组织置于 10%甲醛溶液中固定, 脱水包埋, 切片, HE 染色, 中性树胶封片后观察心脏组织病理变化。

2.9 微循环可视化观察大鼠冠脉微血管

使麻醉大鼠充分暴露胸腔, 夹闭降主动脉, 以 1.5 mL/min 体积流量灌注 PBS 1.5~2.0 min 至大鼠左心室, 夹闭升主动脉, 同时灌注 DiI C₁₂/C₁₈ 荧光染料约 1.5 mL, 2.5 min 后以 1~2 mL/min 体积流量灌注 10%甲醛溶液 4 min, 心脏组织于 10%甲醛固定 24 h、30%蔗糖溶液脱水 12 h; 制成 60 μ m 冰冻切片, 抗荧光衰减封片剂封片, 倒置于激光共聚焦显微镜下观察, 每组以聚乙烯微球为中心随机

拍摄 6~9 个区域后利用 Angio Tool 血管分析软件进行统计分析。

2.10 心肌组织中 LKB1、p-AMPK/AMPK、PGC-1 α 、VEGF、VEGFR2 蛋白表达

测定各组大鼠心肌组织中总蛋白含量, 蛋白样品经 10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳, 转至 PVDF 膜, 5% BSA 封闭 2 h; 一抗 4 °C 孵育过夜、二抗室温孵育 2 h, 显影。采用 Image-J 软件分析条带灰度值。

2.11 统计学分析

实验数据均采用 GraphPad Prism 8.0.1 软件进行统计分析, 各组间采用单因素方差分析, 数据结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。

3 结果

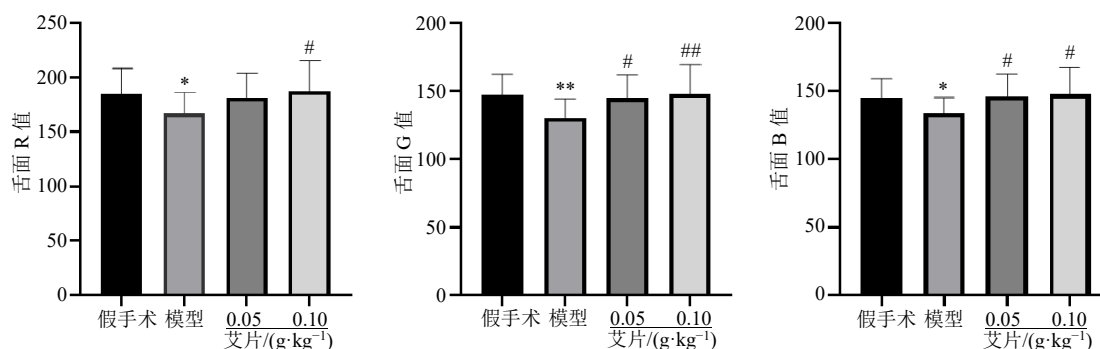
3.1 对 CMD 大鼠舌象的影响

如图 1 所示, 与假手术组比较, CMD 大鼠舌面的 R、G、B 值均显著性下降 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 艾片低剂量组舌面 G、B 值显著上升 ($P < 0.05$), 艾片高剂量组 R、G、B 均显著性上升 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

3.2 改善 CMD 大鼠血流动力学异常情况

3.2.1 对 CMD 大鼠心电图变化的影响 如图 2 所示, 与假手术组比较, CMD 大鼠心率显著下降, 心电图 ST 段显著升高 ($P < 0.01$), 说明造模成功; 与模型组比较, 艾片高剂量组大鼠心率显著上升, ST 段显著降低 ($P < 0.05$)。

3.2.2 对 CMD 大鼠左心室压力变化的影响 如图 3 所示, 与假手术组比较, CMD 大鼠左室收缩压 (left ventricular systolic pressure, LVSP)、左室压力最大上升速率 (maximal left ventricular



与假手术组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下同。
* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 艾片对 CMD 大鼠舌面 RGB 值的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 1 Effects of *B. balsamifera* on RGB values of tongue surface in CMD rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

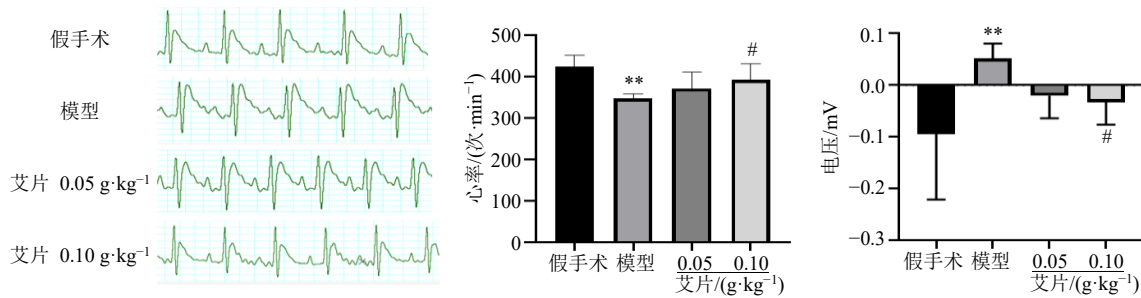


图 2 艾片对 CMD 大鼠心电图、心率及 ST 段的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 2 Effects of *B. balsamifera* on electrocardiogram, heart rate, and ST segment in CMD rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

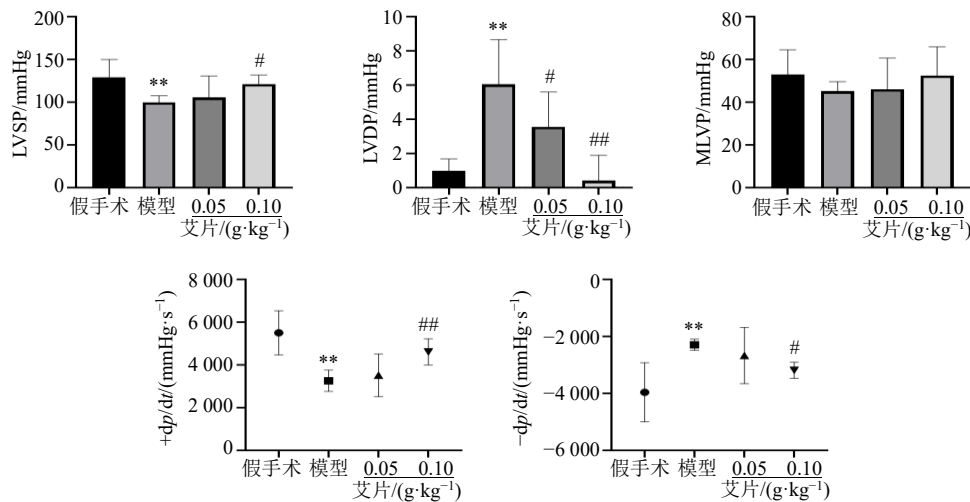


图 3 艾片对 CMD 大鼠左心室压力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 3 Effects of *B. balsamifera* on left ventricular pressure in CMD rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

pressure rising rate, $+dp/dt$) 均显著下降 ($P < 0.01$), 左室平均压 (mean left ventricular pressure, MLVP) 呈下降趋势; 左室舒张压 (left ventricular diastolic pressure, LVDP)、左室内压最大下降速率 (maximal left ventricular pressure decline rate, $-dp/dt$) 均显著性上升 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 艾片低剂量组 LVDP 显著下降 ($P < 0.05$), 艾片高剂量组 LVSP、 $+dp/dt$ 均显著性上升 ($P < 0.05, 0.01$), MLVP 呈上升趋势, LVDP、 $-dp/dt$ 均显著下降 ($P < 0.05, 0.01$)。

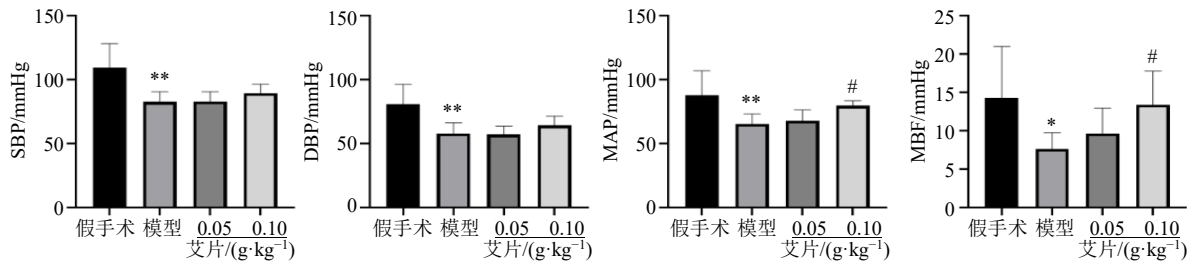
3.2.3 艾片对 CMD 大鼠血压变化的影响 如图 4 所示, 与假手术组比较, CMD 大鼠收缩压 (systolic blood pressure, SBP)、舒张压 (diastolic blood pressure, DBP)、平均压 (mean arterial pressure, MAP) 及平均血流量 (mean blood flow, MBF) 均显著下降 ($P < 0.05, 0.01$); 与模型组比较, 艾片高剂量组 MAP、MBF 显著上升 ($P < 0.05$)。

3.3 改善 CMD 大鼠血液流变学异常情况

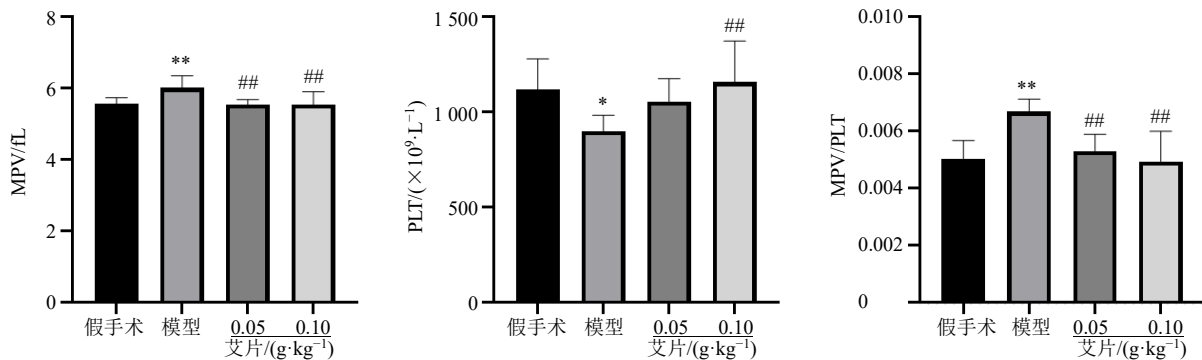
3.3.1 对 CMD 大鼠血液黏度的影响 如表 1 所示, 与假手术组比较, CMD 大鼠全血高切黏度、血浆黏度显著升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 艾片高剂量组全血高切黏度显著降低 ($P < 0.05$)。

3.3.2 对大鼠血小板相关指标的影响 如图 5 所示, 与假手术组比较, CMD 大鼠 MPV、MPV/PLT 比值显著升高 ($P < 0.01$), PLT 显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 艾片低剂量组 MPV、MPV/PLT 显著降低 ($P < 0.01$), 艾片高剂量组 MPV、MPV/PLT 显著降低, PLT 显著升高 ($P < 0.01$)。

3.3.3 对大鼠凝血四项指标影响 如表 2 所示, 与假手术组比较, CMD 大鼠 PT、APTT 时间显著性缩短 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 艾片高剂量组 PT、APTT 时间显著延长 ($P < 0.05, 0.01$)。

图 4 艾片对 CMD 大鼠动脉血压、平均血流量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 4 Effects of *B. balsamifera* on arterial blood pressure and mean blood flow in CMD rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)表 1 艾片对 CMD 大鼠全血高、中、低切黏度及血浆黏度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 1 Effects of *B. balsamifera* on high, medium, and low cut viscosity of whole blood and plasma viscosity in CMD rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	全血高切黏度/(mPa·s)	全血中切黏度/(mPa·s)	全血低切黏度/(mPa·s)	血浆黏度/(mPa·s)
假手术	—	5.42 ± 0.46	6.43 ± 0.59	13.77 ± 1.38	1.02 ± 0.11
模型	—	6.12 ± 0.44*	6.36 ± 0.71	13.98 ± 1.88	1.11 ± 0.14*
艾片	0.05	5.28 ± 1.15	6.30 ± 1.56	13.51 ± 3.66	1.15 ± 0.19
	0.10	5.30 ± 0.67#	6.62 ± 0.74	14.24 ± 1.74	1.02 ± 0.19

假手术组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$, 下表同。* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs sham group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group; same as below tables.图 5 艾片对 CMD 大鼠 MPV、PLT 及 MPV/PLT 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 5 Effects of *B. balsamifera* on MPV, PLT, and MPV/PLT contents in CMD rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)表 2 艾片对 CMD 大鼠凝血四项值的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Table 2 Effects of *B. balsamifera* on four coagulation values in CMD rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	PT/s	TT/s	APTT/s	FIB/s
假手术	—	15.88 ± 0.74	32.93 ± 2.68	29.14 ± 7.59	1.89 ± 0.05
模型	—	13.82 ± 0.80**	34.18 ± 0.87	20.41 ± 3.43**	2.26 ± 0.49
艾片	0.05	14.04 ± 0.84	32.65 ± 2.10	24.40 ± 2.46	2.15 ± 0.45
	0.10	15.80 ± 1.26##	34.33 ± 1.81	27.94 ± 7.62#	2.03 ± 0.38

3.4 对 CMD 大鼠心功能指标的影响

如图 6 所示,与假手术组比较,CMD 大鼠血清中 AST、LDH、CK、CK-MB 含量均显著升高 ($P < 0.05$ 、0.01);与模型组比较,艾片低剂量组 AST、LDH、CK

含量显著下降 ($P < 0.05$ 、0.01),艾片高剂量组 AST、LDH、CK、CK-MB 含量显著下降 ($P < 0.05$ 、0.01)。

3.5 对 CMD 大鼠血管内皮功能的影响

如图 7 所示,与假手术组比较,CMD 大鼠

ET-1、ET-1/NO 含量显著升高，NO 含量显著下降 ($P<0.01$)；与模型组比较，艾片低、高剂量组 ET-1、ET-1/NO 含量显著下降 ($P<0.01$)，艾片低、高剂量组 NO 含量显著上升 ($P<0.05$)。

3.6 对 CMD 大鼠能量代谢指标的影响

如图 8 所示，与假手术组比较，CMD 大鼠心肌组织中 ATP 含量显著降低，血清中 GLU 含量显著升高 ($P<0.05$)；与模型组比较，艾片高剂量组 ATP 含量显著上升，GLU 含量显著降低 ($P<0.01$)。

3.7 对 CMD 大鼠病理组织变化的影响

如图 9 所示，假手术组大鼠心肌组织完整，肌丝疏密有致，细胞核排列均匀；模型组及给药组清晰可见微球碎片，模型组微球周围大量炎性细胞浸润和大量血细胞，并伴有肌丝溶解变形；艾片给药组可见微球周围炎性细胞数量减少，肌丝排列较整齐，具有改善作用。

3.8 CMD 大鼠微血管形态及血流阻力的影响

3.8.1 各组 CMD 大鼠微血管情况 如图 10 所示，

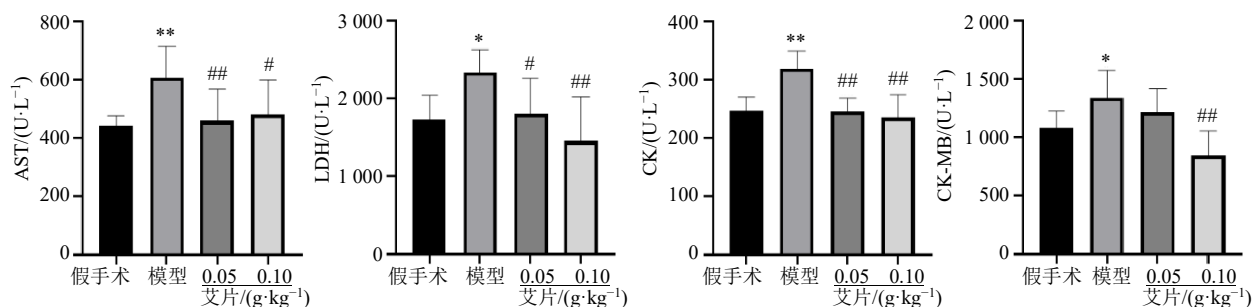


图 6 艾片对 CMD 大鼠 AST、LDH、CK、CK-MB 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=6$)

Fig. 6 Effects of *B. balsamifera* on AST, LDH, CK, and CK-MB contents in CMD rats ($\bar{x} \pm s, n=6$)

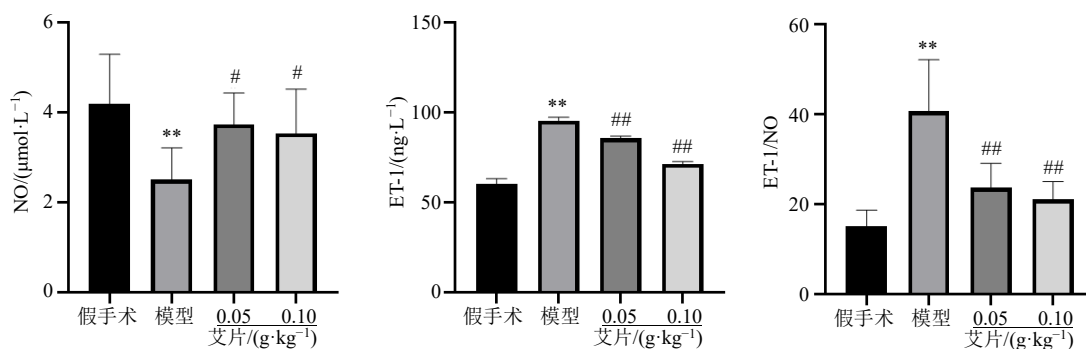


图 7 艾片对 CMD 大鼠 NO、ET-1、ET-1/NO 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Fig. 7 Effects of *B. balsamifera* on NO, ET-1, and ET-1/NO contents in CMD rats ($\bar{x} \pm s, n=7$)

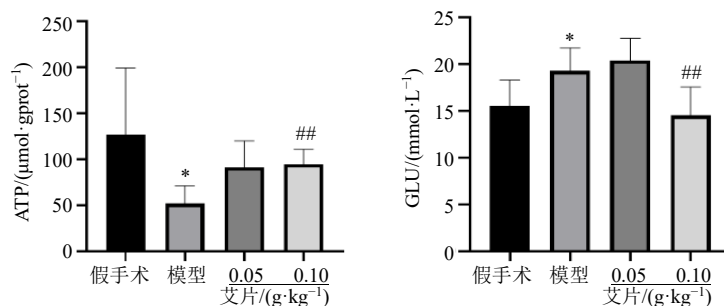
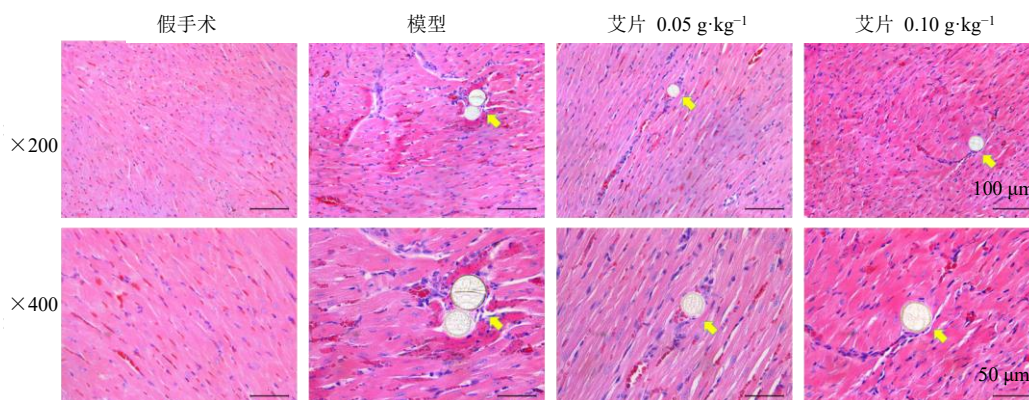


图 8 艾片对 CMD 大鼠 ATP、GLU 含量的影响 ($\bar{x} \pm s, n=7$)

Fig. 8 Effects of *B. balsamifera* on ATP and GLU contents in CMD rats ($\bar{x} \pm s, n=7$)



箭头所指处为栓塞微球，图 10 同。

Arrows point to embolic microspheres, same as figure 10.

图 9 艾片对 CMD 大鼠心脏病理切片的影响

Fig. 9 Effects of *B. balsamifera* on cardiac pathological sections in CMD rats

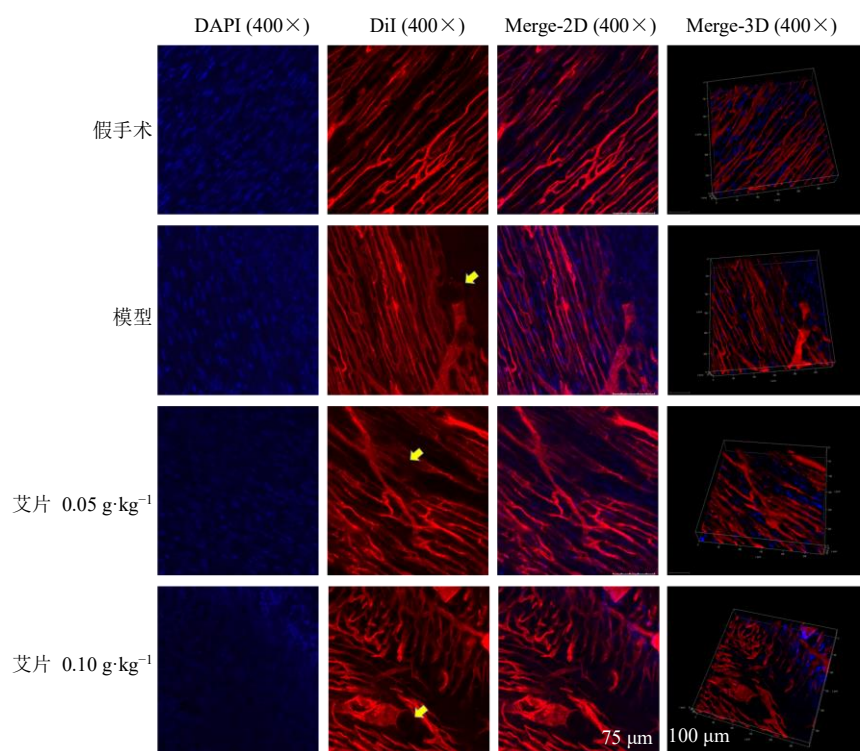


图 10 艾片对 CMD 大鼠心脏微血管结构变化的 2D、3D 可视化图

Fig. 10 2D and 3D visualization of changes in cardiac microvascular structure of CMD rats induced by *B. balsamifera*

在共聚焦显微镜下，可见假手术组血管形态完整，轮廓清晰且流畅；模型组血管出现萎缩变形、断流现象，并且可观察到留存其中的聚乙烯微球；与模型组比较，艾片低、高剂量组大鼠可见血管萎缩情况改善。

3.8.2 对 CMD 大鼠微血管密度、面积、直径、空隙度及血流阻力的影响 如图 11 所示，与假手术组比较，CMD 大鼠的血管密度、面积、直径显著下

降，空隙度显著上升 ($P < 0.01$)；与模型组比较，艾片低剂量组血管直径显著上升 ($P < 0.01$)，艾片高剂量组血管密度、面积、直径显著上升，空隙度显著下降 ($P < 0.01$)。

如图 12 所示，与假手术组比较，CMD 大鼠微血管阻力显著上升 ($P < 0.01$)；与模型组相比，艾片低、高剂量大鼠微血管阻力显著下降 ($P < 0.01$)。

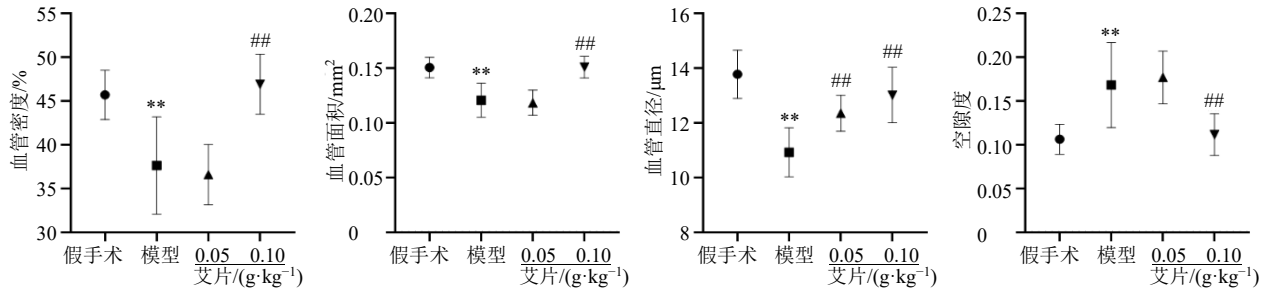


图 11 艾片对 CMD 大鼠血管面积、密度、直径及空隙度的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 11 Effects of *B. balsamifera* on vascular area, density, diameter, and voidness in CMD rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

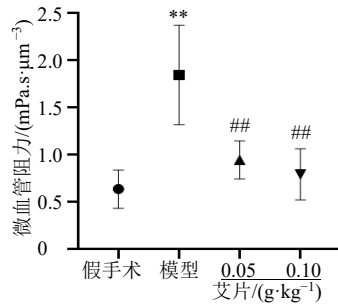


图 12 艾片对 CMD 大鼠微血管阻力的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 12 Effects of *B. balsamifera* on microvascular resistance in CMD rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.9 对 CMD 大鼠心肌组织 LKB1、p-AMPK/AMPK、PGC-1α、VEGF/VEGFR2 蛋白表达水平的影响

3.9.1 艾片对 CMD 大鼠能量代谢相关通路的影响
Western blotting 结果显示, 与假手术组比较, CMD 大鼠心肌组织中 LKB1、P-AMPK/AMPK 蛋白表达显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组相比, 艾片高剂量组 LKB1、p-AMPK/AMPK、PGC-1α 蛋白表达显著上升 ($P < 0.05, 0.01$), 见图 13。

3.9.2 艾片对 CMD 大鼠血管相关通路的影响 如图 14 所示, 与假手术组比较, CMD 大鼠心肌组织 VEGR、VEGFR2 蛋白表达水平显著下降 ($P < 0.01$);

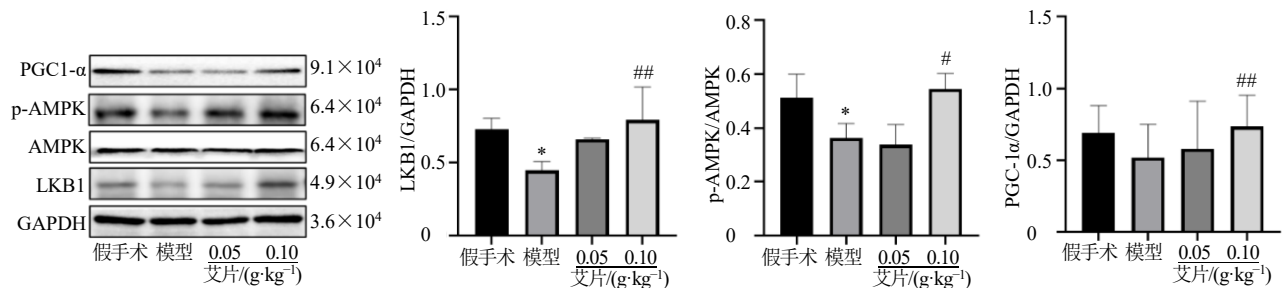


图 13 艾片对 CMD 大鼠 LKB1、p-AMPK/AMPK、PGC-1α 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 13 Effects of *B. balsamifera* on expression of LKB1, p-AMPK/AMPK, and PGC-1α proteins in CMD rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

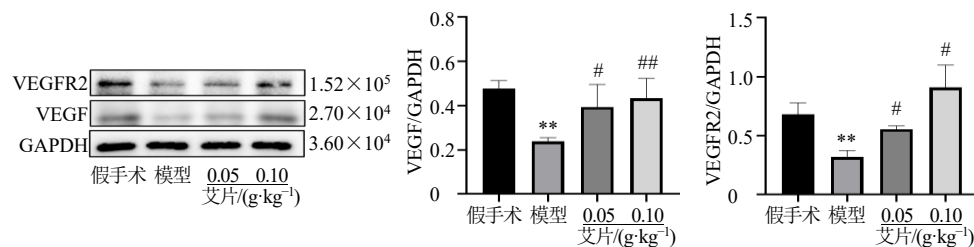


图 14 艾片对 CMD 大鼠 VEGR、VEGFR2 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 14 Effects of *B. balsamifera* on expression levels of VEGR and VEGFR2 proteins in CMD rats ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

与模型组比较,艾片低、高剂量组 VEGR、VEGFR2 蛋白表达水平显著上升 ($P<0.05$ 、 0.01)。

4 讨论

CMD 主要由冠脉微血管结构和(或)功能障碍导致的一系列心血管不良疾病,可发展为心肌缺血、心力衰竭及心绞痛等,与“脉络-血管系统”之说中的心络受损具有同一性^[17]。目前,治疗 CMD 以抗心肌缺血、改善内皮功能及镇痛为主,但临床效果不佳。随着中医对 CMD 的深入研究,发现治疗可从“通络”的角度切入,并由此提出芳香通络疗法^[4-5]。龙脑在《中国药典》2020 年版收载有艾片(左旋龙脑)、冰片(合成龙脑)、天然冰片(右旋龙脑)3 种,其中艾片在 1937 年被《本草药品实地之观察》正式列为商品冰片的一种,研究发现,艾片在治疗急性心肌梗死、脑缺血、抑菌的药效较冰片、合成冰片更胜一筹^[18-19]。叶桂在《临证指南医案》中载“辛味通络”^[20]。艾片,味辛而芳香,入心、肺二经,可取其辛香走窜之性以达到活血化瘀、开窍止痛之功,治疗血行不畅、脉络瘀阻导致的胸痹心痛、脑缺血、中风。现代药理学研究发现其在抗脑缺血、心肌缺血时都展现出良好的扩张血管、抗炎、抗氧化应激和凋亡作用^[21-24]。本研究结果显示,艾片可显著改善 CMD 大鼠心电图、心率、血压及血流量异常变化情况,可能是通过抑制血栓形成、促进血管新生、改善内皮功能和调节能量代谢而发挥作用。其中,促进血管新生与抗心肌缺血作用与相关研究结果一致^[18],验证了艾片在芳香通络疗法中的可行性。

中医认为 CMD 属本虚标实之证,脉络受损失养而气血虚损,标实以血行不畅、瘀血阻络为主,其血液呈现浓、黏、凝、聚的病理状态,中医立足“司外揣内”的思维方式,常通过观舌象作为其病的辅助判断,如舌质暗紫,即为“血瘀证”的特点^[24],现代医学以血液流变学、血流动力学作为判断血瘀证的客观指标,与本研究 CMD 大鼠舌面暗紫色,且血液黏度升高,血流动力学紊乱结果相符合。“血瘀”的出现与血小板功能、凝血功能及内皮功能息息相关^[25-26]。本研究通过检测 MPV 和 PLT 指标反映血小板凝血、活化情况,其中 CMD 大鼠 MPV/PLT 比值显著性增高代表更活跃的血小板和更多的血栓形成,凝血四项显著性改变表现出凝血系统障碍,APTT 和 PT 指标分别反映了内、外源性凝血系统^[25]。艾片给药治疗后, CMD 大鼠舌面由暗紫转变成粉,提示艾片可能通过内外源凝血系统延长凝血时间、

改善血小板功能、抑制血栓形成及增加血流量,从而改善大鼠“瘀血阻塞心窍”的情况。

研究表明,内皮功能障碍是引起 CMD 的潜在发病机制,而作为内皮细胞合成释放的血管收缩介质 ET-1 和血管舒张因子 NO^[27],内皮功能的障碍可导致二者分泌失衡、血管舒缩频率异常,微循环阻力增加而供血不足。在心肌缺血早期,作用于血管内皮细胞的特异性肝素结合生长因子 VEGF 即发生相应变化^[28],与亲和力最强的跨膜酪氨酸激酶受体 VEGFR2 结合,促进受体二聚化后激活细胞内酪氨酸激酶,在刺激血管内皮细胞增殖、迁移的同时激活一氧化氮合酶促进 NO 生成,提高血管渗透性,进而促进血管新生和血管稳态的调节。本研究结合 DiI C₁₂/C₁₈ 染料标记血管内皮细胞的可视化技术观察到 CMD 大鼠微血管结构异常改变,而给药后微血管数量回调、管腔狭窄断流情况减少的结果^[29-30],提示艾片开窍通络的功效,可能是通过改善血管内皮功能、增强血管舒张、促血管新生从而恢复大鼠冠脉微血管结构损伤及微血管血流灌注量达成的。

《素问·痿论》:“心主身之血脉”,作为高耗能器官,心脏大多由心肌细胞通过线粒体氧化磷酸化产生能量以保证正常生理活动^[31]。研究表明,引起心室结构性改变的重要因素为代谢重构,即当线粒体功能障碍导致心肌能量供应不足,造成的心脏结构和功能受损^[32-34]。本研究发现艾片给药后, CMD 大鼠心肌损伤指标^[35-36]CK、CK-MB、AST、LDH 和能量代谢指标 GLU、ATP 含量异常变化均得到显著性改善,提示艾片可能通过影响能量代谢通路改善 CMD 大鼠心功能受损情况,而 AMPK 作为细胞能量代谢的关键枢纽,一旦心肌细胞能量代谢紊乱,ATP 合成减少时可受到上游代谢调控因子 LKB1 激活其磷酸化位点从而调节能量代谢,改善线粒体功能。当 P-AMPK 的表达水平提高,促进下游因子 PGC-1 α 通过增强线粒体数目,抑制线粒体氧化应激等途径防止心肌细胞能量耗竭^[37]。同时线粒体呼吸作为细胞增殖的必要合成细胞器,对于血管的新生和重塑起着不可或缺的作用,说明其通路还具有调节血管张力和新生重塑的作用^[38]。艾片辛香行气,助心行血,可使心络之气血畅达,其作用可能是通过激活 LKB1/AMPK/PGC-1 α 信号通路促进 CMD 大鼠心肌组织产能从而改善心肌受损情况,提高心功能达

到的。

综上,艾片在改善冠脉微循环障碍上具有显著治疗作用,其现代药理学机制可能是通过 LKB1/AMPK/PGC-1 α 和 VEGF/VEGFR2 信号通路促进 ATP 生成供能,维持心肌能量代谢平衡,改善内皮功能、纠正血管舒缩失衡和维持缺血心肌血管稳态。本研究为临床上使用艾片配伍治疗相关疾病提供了一定的思路和理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Crea F, Montone R A, Rinaldi R. Pathophysiology of coronary microvascular dysfunction [J]. *Circ J*, 2022, 86(9): 1319-1328.
- [2] Rehan R, Yong A, Ng M, *et al*. Coronary microvascular dysfunction: A review of recent progress and clinical implications [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2023, 10: 1111721.
- [3] 张津, 龚艳君, 郑博. 冠状动脉微循环障碍评估现状及进展 [J]. 中国介入心脏病学杂志, 2023, 31(10): 770-774.
- [4] 张健真, 吴焕林, 刘佳, 等. 基于络病理论从芳香通络疗法论治冠状动脉微循环障碍 [J]. 世界中医药, 2023, 18(8): 1206-1209.
- [5] 李艺, 张艳, 孙晓宁. 基于“气血理论”探讨冠脉微循环障碍病机及治法 [J]. 西部中医药, 2023, 36(11): 120-123.
- [6] 季帅, 张军平, 吕仕超, 等. 基于心脑同治学说探讨冰片的临床运用 [J]. 中医杂志, 2013, 54(2): 114-116.
- [7] 罗世兰, 廖利, 邹琼芳, 等. 冰片的研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2018, 27(5): 73-76.
- [8] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 207.
- [9] Sun Y L, Yao Y L, Jia M J, *et al*. Evaluation of the efficacy and safety of Suxiao Jiuxin Pill in the treatment of stable angina: A randomized, double-blind, placebo-controlled, multi-center clinical trial [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318(Pt A): 116959.
- [10] 杨博, 孙佳, 陆苑, 等. 银丹心脑通软胶囊化学成分及药理作用研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2023, 32(15): 76-84.
- [11] 付尹, 杨显娟, 王建, 等. 基于网络药理学研究艾片抗脑缺血再灌注损伤的作用机制及验证 [J]. 中草药, 2021, 52(8): 2374-2383.
- [12] 赵文举, 付海鑫, 应春苗, 等. 中药调控铁死亡抑制脑缺血再灌注损伤的研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(8): 2812-2819.
- [13] 黄继汉, 黄晓晖, 陈志扬, 等. 药理试验中动物间和动物与人体间的等效剂量换算 [J]. 中国临床药理学与治疗学, 2004, (9): 1069-1072.
- [14] 袁蓓欣, 陈兰英, 汪文龙, 等. 基于微循环可视化技术对交趾黄檀改善大鼠冠脉微循环障碍的药效学及代谢组学研究 [J]. 中国中药杂志, 2024, 49(8): 2247-2261.
- [15] 史雅红, 任建勋, 刘建勋, 等. 睡眠剥夺诱导的大鼠血瘀证对血小板活化影响的研究 [J]. 中国中药杂志, 2018, 43(16): 3341-3345.
- [16] 孙国结, 王蒙蒙, 王燕, 等. 益母草碱对 SD 大鼠抗凝血因子的影响 [J]. 黑龙江畜牧兽医, 2023(1): 101-105.
- [17] 张历元, 李元文, 林欢儿, 等. 中药冰片的商品种类与现代药理学研究进展 [J]. 世界中医药, 2018, 13(4): 1025-1029.
- [18] 马骁, 罗世兰, 彭婉, 等. 动态观测艾片、天然冰片、合成冰片、苏合香、安息香 5 种开窍药对脂多糖致发热大鼠生理指标的影响 [J]. 中草药, 2017, 48(15): 3110-3116.
- [19] 周志彬. 几种冰片的区分 [J]. 中国药业, 2006, 15(9): 57.
- [20] 张洁晗. 络病理论指导微血管内皮细胞功能障碍介导的炎症反应在心律失常中的作用及参松养心胶囊的干预研究[D]. 河北: 河北医科大学, 2024.
- [21] 马艺伦, 连佳宁, 皇冯玉, 等. 左旋龙脑与左旋樟脑配伍对永久性局灶性中动脉阻断脑缺血模型大鼠的脑保护作用 [J]. 中国医院药学杂志, 2023, 43(23): 2607-2612.
- [22] Ma R, Xie Q, Li H Y, *et al*. *l*-Borneol exerted the neuroprotective effect by promoting angiogenesis coupled with neurogenesis via Ang1-VEGF-BDNF pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 641894.
- [23] Dong T W, Chen N, Ma X, *et al*. The protective roles of *L*-borneolum, *D*-borneolum and synthetic borneol in cerebral ischaemia via modulation of the neurovascular unit [J]. *Biomed Pharmacother*, 2018, 102: 874-883.
- [24] 田徽, 王建, 高天, 等. 艾片与合成冰片对脑缺血缺氧小鼠模型的影响 [J]. 中药药理与临床, 2013, 29(2): 53-56.
- [25] 邓泓博, 邓浩, 生伟, 等. 术前平均血小板体积与血小板计数比值对非体外循环冠状动脉旁路移植术后远期疗效的预测价值 [J]. 心肺血管病杂志, 2020, 39(9): 1076-1079.
- [26] 刘旭, 吴宿慧, 陈小菲, 等. 基于 vWF/GPIb-IX-V 信号通路的丹红注射液对急性血瘀大鼠模型活血化瘀作用及机制研究 [J]. 中草药, 2023, 54(4): 1173-1183.
- [27] 路丽娟, 陈晓丹, 周雪菲. 三七总皂苷对冠心病心绞痛患者血浆内皮素-1 和血小板功能的影响价值 [J]. 内蒙古中医药, 2024, 43(3): 65-66.
- [28] 刘泳钊, 颜梦凡, 李彩云, 等. 丹参通络解毒汤调控 MicroRNA-126 对心肌缺血再灌注损伤大鼠血管新生的影响 [J]. 时珍国医国药, 2024, 35(10): 2305-2310.

- [29] Liu X G, Wang Y T, Tang M L, *et al.* Three-dimensional visualization of coronary microvasculature in rats with myocardial infarction [J]. *Microvasc Res*, 2020, 130: 103990.
- [30] 陈兰英, 李安, 程林辉, 等. 染色剂、心脏切片制备方法 & 微血管灌注染色评价方法: 中国 CN115014908A [P]. 2022-09-06.
- [31] 袁惠, 魏佳明, 施敏, 等. 基于“正邪理论”探讨心力衰竭心肌能量代谢及中药干预机制 [J]. 天津中医药, 2024, 41(10): 1347-1353.
- [32] Hohendanner F, Boegner M, Huettmeister J, *et al.* Microvascular dysfunction in heart transplantation is associated with altered cardiomyocyte mitochondrial structure and unimpaired excitation-contraction coupling [J]. *PLoS One*, 2024, 19(5): e0303540.
- [33] Ford T J, Rocchiccioli P, Good R, *et al.* Systemic microvascular dysfunction in microvascular and vasospastic angina [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(46): 4086-4097.
- [34] Lee K Y, Choi H C. Acetylcholine-induced AMP-activated protein kinase activation attenuates vasoconstriction through an LKB1-dependent mechanism in rat aorta [J]. *Vascul Pharmacol*, 2013, 59(3/4): 96-102.
- [35] Mehta P K, Huang J W, Levit R D, *et al.* Ischemia and no obstructive coronary arteries (INOCA): A narrative review [J]. *Atherosclerosis*, 2022, 363: 8-21.
- [36] Falk E. Plaque rupture with severe pre-existing stenosis precipitating coronary thrombosis. Characteristics of coronary atherosclerotic plaques underlying fatal occlusive thrombi [J]. *Br Heart J*, 1983, 50(2): 127-134.
- [37] Warren J S, Tracy C M, Miller M R, *et al.* Histone methyltransferase Smyd1 regulates mitochondrial energetics in the heart [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2018, 115(33): E7871-E7880.
- [38] Kim S G, Kim J R, Choi H C. Quercetin-induced AMP-activated protein kinase activation attenuates vasoconstriction through LKB1-AMPK signaling pathway [J]. *J Med Food*, 2018, 21(2): 146-153.

[责任编辑 罗 曦]