

基于非靶向代谢组学探讨血脂康胶囊干预 ApoE^{-/-}小鼠冠状动脉微循环障碍的作用机制

张丽媛¹, 黄日康¹, 谭淇玲¹, 成璐¹, 张明倩¹, 程真真¹, 史浩男¹, 赵子阳¹, 张体¹, 刘曦⁴, 裴欢⁴, 樊利青⁴, 贾占红¹, 张硕峰¹, 葛东宇^{3*}, 董世芬^{1,2*}

1. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488
2. 中药制药与新药开发教育部工程研究中心, 北京 100029
3. 北京中医药大学中医学院, 北京 102488
4. 北京北大维信生物科技有限公司, 北京 100094

摘要: **目的** 基于非靶向代谢组学探讨血脂康胶囊干预 ApoE^{-/-}小鼠冠状动脉微循环障碍 (coronary microvascular dysfunction, CMD) 的作用机制。**方法** SPF级 ApoE^{-/-}小鼠高脂喂养7周后, 尾iv月桂酸钠复制CMD模型, 随机分为模型组、阿托伐他汀 (6 mg/kg) 组及血脂康低、中、高剂量 (90、180、360 mg/kg) 组, 另取12只 C57BL/6J 小鼠作为对照组。给予药物干预8周后, 采用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE)、Carstairs、Heidenhain 染色检测小鼠心肌组织与心肌微血管形态与病理学变化; 超声心动分析评估心脏功能性损伤; 油红O染色评估主动脉脂质蓄积程度; 生化法、ELISA法、免疫组化及免疫荧光检测血脂、心肌损伤及内皮功能相关指标; 非靶向代谢组学技术分析小鼠粪便代谢物的变化, 并分析差异代谢物与显著富集代谢通路; Western blotting 检测心肌组织沉默信息调节因子1 (silent information regulator 1, SIRT1)、过氧化物酶体增殖物激活受体γ共激活因子-1α (peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1α, PGC-1α)、p-p65和p65蛋白表达。**结果** 与模型组比较, 血脂康胶囊可显著降低小鼠血清中三酰甘油、总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇水平以及心肌损伤和血管内皮损伤程度 ($P < 0.05$ 、 0.01), 显著改善小鼠微血栓、心肌缺血和心功能下降程度 ($P < 0.01$)。非靶向代谢组学鉴定出14种差异代谢物和15条富集通路 ($P < 0.05$)。Western blotting 结果显示, 与模型组比较, 血脂康胶囊可显著上调心肌组织 SIRT1、PGC-1α 的蛋白表达 ($P < 0.01$), 并下调 p-p65/p65 的蛋白表达 ($P < 0.01$)。**结论** 血脂康胶囊可发挥调血脂、改善内皮功能障碍和炎症反应作用, 从而有效改善CMD模型小鼠心功能并减轻心肌结构损伤, 其作用机制可能与调控精氨酸-脯氨酸-α-酮戊二酸代谢轴和 eNOS/SIRT1/PGC-1α 信号通路有关。

关键词: 血脂康胶囊; 冠状动脉微循环障碍; ApoE^{-/-}小鼠; 非靶向代谢组学; 精氨酸-脯氨酸-α-酮戊二酸代谢轴; eNOS/SIRT1/PGC-1α 信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)05-1727-15

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.05.013

Mechanism of Xuezhikang Capsules on coronary microvascular dysfunction in ApoE^{-/-} mice based on untargeted metabolomics

ZHANG Liyuan¹, HUANG Rikang¹, TAN Qiling¹, CHENG Lu¹, ZHANG Mingqian¹, CHENG Zhenzhen¹, SHI Haonan¹, ZHAO Ziyang¹, ZHANG Ti¹, LIU Xi⁴, PEI Huan⁴, FAN Liqing⁴, JIA Zhanhong¹, ZHANG Shuofeng¹, GE Dongyu³, DONG Shifen^{1,2}

1. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China
2. Engineering Research Center for Pharmaceutics of Chinese Materia Medica and New Drug Development, Ministry of Education, Beijing 100029, China
3. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China
4. Beijing Peking University WBL Biotech Co., Ltd., Beijing 100094, China

收稿日期: 2025-09-24

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81503287); 北京市自然科学基金资助项目 (7232287)

作者简介: 张丽媛, 硕士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: 13171269816@163.com

*通信作者: 葛东宇, 实验师, 研究方向为中医药防治心脑血管疾病。E-mail: dongyuge@163.com

董世芬, 博士, 副教授, 硕士生导师, 研究方向为中药防治心脑血管疾病。E-mail: dongshifen@bucm.edu.cn

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Xuezhikang Capsules (血脂康胶囊) in intervening coronary microvascular dysfunction (CMD) in ApoE^{-/-} mice based on non-targeted metabolomics. **Methods** After seven weeks of high-fat diet feeding, SPF-grade ApoE^{-/-} mice were injected with sodium laurate via tail vein to establish CMD model. The mice were then randomly divided into model group, atorvastatin (6 mg/kg) group, Xuezhikang low-, medium-, and high-dose (90, 180, 360 mg/kg) groups, another 12 C57BL/6J mice were selected as the control group. After eight weeks of drug intervention, the morphology and pathological changes of myocardial tissue and myocardial microvessels in mice were detected using hematoxylin-eosin (HE), Carstairs and Heidenhain staining. Cardiac functional injury was evaluated by echocardiography. Oil red O staining was used to evaluate the degree of lipid accumulation in the aorta. Lipid levels, myocardial injury and endothelial function-related indicators were detected by biochemical assays, ELISA, immunohistochemistry and immunofluorescence. The changes in fecal metabolites were analyzed using non-targeted metabolomics, and differential metabolites and significantly enriched metabolic pathways were identified. Western blotting was used to detect silent information regulator 1 (SIRT1), peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α (PGC-1 α), p-p65 and p65 protein expressions in myocardial tissue. **Results** Compared with model group, Xuezhikang Capsules significantly reduced the levels of triglycerides, total cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, as well as the degree of myocardial and endothelial injury in serum of mice ($P < 0.05, 0.01$), and significantly improved the degree of microthrombus, myocardial ischemia and heart function decline in mice ($P < 0.01$). Non-targeted metabolomics identified 14 differentially expressed metabolites and 15 enriched pathways ($P < 0.05$). Western blotting results showed that compared with model group, Xuezhikang Capsules significantly up-regulated the protein expressions of SIRT1 and PGC-1 α in myocardial tissue ($P < 0.01$), and down-regulated the protein expression of p-p65/p65 ($P < 0.01$). **Conclusion** Xuezhikang Capsules could regulate blood lipids, improve endothelial dysfunction and inflammatory response, thereby effectively improving cardiac function and reducing myocardial structural damage in CMD model mice. Its mechanism may be related to the regulation of arginine-proline- α -ketoglutarate metabolic axis and eNOS/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway.

Key words: Xuezhikang Capsules; coronary microvascular dysfunction; ApoE^{-/-} mice; untargeted metabolomics; arginine-proline- α -ketoglutarate metabolic axis; eNOS/SIRT1/PGC-1 α signaling pathway

冠状动脉微血管功能障碍 (coronary microvascular dysfunction, CMD) 是一种冠状动脉微血管结构或功能受到影响, 导致冠状动脉血流受损, 最终导致心肌缺血的临床情况^[1]。2020年欧洲心脏病学会冠状动脉病理生理学和微循环工作组数据表明, 冠脉微循环障碍影响多达50%的慢性冠脉综合征 (chronic coronary syndrome, CCS) 患者和20%的急性冠脉综合征 (acute coronary syndrome, ACS) 患者^[2]。冠状动脉微循环是血管阻力的主要部位, 广泛存在于 CCS 患者中的 CMD 可能与阻塞性动脉粥样硬化相互作用, 在生理上显著的心外膜动脉狭窄的情况下, 这种额外的阻力限制了冠状动脉最大血流量, 加速心血管疾病的发展^[3]。临床上, 在接受经皮冠状动脉介入治疗的 CCS 患者中, 但仍有多达 1/3 的患者仍存在持续性心绞痛^[4], 即使在没有明显的冠状动脉心外膜段狭窄或完全血运重建后, 患者预后情况并不理想, 因此 CCS 患者微循环功能的评估结果, 将对其长期预后的判定产生关键性影响^[5]。

CMD 的发病机制复杂, 其中内皮细胞损伤是 CMD 发生发展的核心环节, 可导致冠状动脉微血管系统收缩, 使冠状动脉血流储备降低、心肌供血

供氧不足和代谢出现异常等导致 CMD, 进而导致心绞痛、胸闷和窒息、劳力性呼吸困难和运动耐力下降等临床症状^[6]。血脂康胶囊主要成分为无晶型结构的洛伐他汀等 13 种同系物, 含有 8% 的不饱和脂肪酸、甾醇和少量黄酮类物质等, 由粳米接种特殊红曲菌, 采用现代生物制药工艺发酵、精制而成, 具有化浊调脂、活血化瘀、健脾消食的功效^[7-8]。在 CMD 治疗中展现出多方面作用。为此, 本研究采用动物实验和非靶向代谢组学方法, 探究血脂康胶囊对 CMD 的干预作用与其涉及的异常代谢途径, 以及干预治疗 CMD 的可能作用机制。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 ApoE^{-/-} 小鼠 60 只及 C57BL/6J 小鼠 12 只, 8 周龄, 体质量 (20 \pm 2) g, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号 SCXK (京) 2021-0006。动物饲养于北京中医药大学动物实验中心, 实验单位使用许可证号 SYXK (京) 2023-0011, 饲养条件为恒温 (25 \pm 2) $^{\circ}$ C、相对湿度 (60 \pm 5) %。动物实验经北京中医药大学实验动物伦理审查委员会批准 (批准号 BUCM-2024061301-2172)。

1.2 药品与试剂

血脂康胶囊（国药准字 Z10950029，批号 Y202310190）购自北京北大维信生物科技有限公司；阿托伐他汀钙片（批号 H20051408）购自辉瑞制药有限公司；高脂饲料（批号 D12108C）购自小泰有泰生物科技有限公司；月桂酸钠（批号 01591945）购自美国 Sigma 公司；羧甲基纤维素钠（carboxymethyl cellulose sodium, CMC-Na，批号 M12IS214651）购自上海源叶生物科技有限公司；异氟烷（批号 G45992）购自北京易则佳科技有限公司；三酰甘油（triglyceride, TG）测定试剂盒（批号 A110-1-1）、总胆固醇（total cholesterol, TC）测定试剂盒（批号 A111-1-1）、低密度脂蛋白胆固醇（low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C）测定试剂盒（批号 A113-1-1）、高密度脂蛋白胆固醇（high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C）测定试剂盒（批号 A112-1-1）购自南京建成生物工程研究所；内皮素-1（endothelin-1, ET-1）试剂盒（批号 KT3435-A）、同型半胱氨酸（homocysteine, Hcy）比色法测定试剂盒（批号 E-BC-K854-M）、小鼠血栓调节蛋白（thrombomodulin, TM）ELISA 试剂盒（批号 E-EL-M1140）购自武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司；苏木素-伊红（hematoxylin-eosin, HE）染色试剂盒（批号 G1120）、Heidenhain 染色试剂盒（批号 G4480）购自北京索莱宝科技有限公司；石蜡切片 Carstairs 染色试剂盒（批号 GMS80128.1）购自上海杰美基因医药科技有限公司；BCA 蛋白质定量试剂盒（批号 ZJ102）购自雅酶生物技术有限公司；血小板内皮细胞黏附分子-1（platelet endothelial cell adhesion molecule-1, PECAM-1/CD31）抗体（批号 28083-1-AP）购自武汉三鹰生物技术有限公司；油红 O 染色试剂盒（批号 G1015）、血管内皮生长因子 A（vascular endothelial growth factor A, VEGFA）抗体（批号 GB15165-100）购自武汉赛维尔生物科技有限公司；内皮型一氧化氮合酶（endothelial nitric oxide synthase, eNOS）抗体（批号 sc-376751）购自美国 Santa Cruz Biotechnology 公司；沉默信息调节因子 1（silent information regulator 1, SIRT1）抗体（批号 1001598-95）、过氧化物酶体增殖物激活受体 γ 共激活因子-1 α （peroxisome proliferator activated receptor γ coactivator-1 α , PGC-1 α ）抗体（批号 1113677-8）购自英国 Abcam 公司；p-p65 抗体（批号 19）、p65 抗体（批号 20）购自美国 CST 公司；甘油醛-3-磷酸

脱氢酶（glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH）抗体（批号 bs-10900R）购自北京博奥森生物有限公司；超敏 ECL 化学发光试剂盒（批号 20241206）购自新赛美生物科技有限公司。

1.3 仪器

KW-XXY-2 型小鼠尾注射静脉显像仪（南京卡尔文生物科技有限公司）；Mutti Skan Mk3 型 Multiskan FC 型酶标仪（美国赛默飞世尔科技公司）；MZ81 型体视显微镜（广州市明美光电技术有限公司）；Histo Core Arcadia C 型石蜡包埋机、RM2255 型轮转式切片机[徕卡显微系统（上海）有限公司]；Centrifuge5810 型低温高速离心机（德国 Eppendorf 公司）；HT7700 型透射电子显微镜（株式会社日立制作所）；PowerPacTM HC 型高电流电泳仪、Mini-PROTEAN[®] Tetra 型垂直式蛋白质电泳槽、Mini-Trans-Blot[®] Module 型槽式转印系统（上海伯乐生命医学产品有限公司）；Amersham Imager 680 型超敏多功能成像仪（美国 Cellular Technology 公司）。

2 方法

2.1 溶液配制

2.1.1 月桂酸钠溶液的配制 取 0.2 g 月桂酸钠粉末于 50 mL 生理盐水中，配制成 4 mg/mL 的月桂酸钠溶液，用于造模。

2.1.2 阿托伐他汀给药溶液的配制 取 3 片阿托伐他汀钙片于 100 mL 0.5% CMC-Na 溶液中，配制成质量浓度为 0.6 g/L 的混悬液，用于 ig 给药。

2.1.3 血脂康给药溶液的配制 分别取 0.9、1.8、3.6 g 血脂康胶囊粉末于 100 mL 0.5% CMC-Na 溶液中，配制成质量浓度分别为 9、18、36 g/L 的混悬液，用于 ig 给药。

2.2 CMD 模型建立、分组与给药

ApoE^{-/-}小鼠适应性饲养 1 周后，给予高脂饲料喂养 7 周，尾 iv 0.8 mL 以生理盐水配制的月桂酸钠溶液（4 mg/mL），将 60 只 ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组、阿托伐他汀（6 mg/kg）组和血脂康高、中、低剂量（360、180、90 mg/kg，分别相当于 2、1、1/2 临床等效剂量）组，每组 12 只，继续给予高脂饲料喂养。另取 12 只 C57BL/6J 小鼠作为对照组，给予普通饲料喂养。于注射月桂酸钠溶液后 1 周各给药组 ig 相应药物（10 mL/kg），对照组和模型组 ig 等体积的生理盐水，1 次/d，连续给药 8 周。

2.3 动物处死与取材

小鼠禁食 12 h 后，摘眼球采血，4 °C、3 000

r/min 离心 10 min 制备血清, 于-80 °C 保存。继而经生理盐水灌注后, 解剖分离主动脉全长, 进行油红 O 染色分析。心脏组织下半部分用 4%多聚甲醛固定用于病理学分析; 上半部分制备成 1 mm³ 组织块用于电镜检测; 剩余部分冻存于-80 °C。无菌收集肠道粪便样本, 于-80 °C 条件下保存备用。

2.4 心脏超声检测心功能水平

经异氟烷气麻小鼠后, 利用脱毛膏在胸腔位置进行脱毛, 仰卧位固定于操作台上, 涂耦合剂, 将探头置于左胸前, 调整探头, 获得左室短轴切面和 M 型曲线, 计算左室射血分数 (left ventricular ejection fraction, LVEF)、左室短轴缩短率 (left ventricular fractional shortening, LVFS)、舒张期左心室内径 (left ventricular internal diameter at diastole, LVIDd) 及收缩期左心室内径 (left ventricular internal diameter at systole, LVIDs)。

2.5 HE、Carstairs、Heidenhain 染色评估心肌组织与心肌微血管形态与病理学变化

分离小鼠心脏, 经生理盐水灌注后, 于心脏底端 1/3 处取材, 获取心肌组织。样本经 4%多聚甲醛固定、梯度乙醇脱水、透明及石蜡包埋后, 制备成 5 μm 厚度的组织切片备用。心肌组织分别进行 HE、Carstairs、Heidenhain 染色, 按照炎症浸润水平评级^[9]对 HE 染色进行半定量分析, 并计算心肌缺血比例和微血栓阳性比例。

心肌缺血比例 = 心肌缺血面积/总面积

微血栓阳性比例 = 微血栓面积/总微血管面积

2.6 油红 O 染色检测主动脉脂质蓄积程度

取用 4%多聚甲醛溶液固定的主动脉全体, PBS 清洗 2 次后, 用解剖剪将其纵向剖开; 用 60%异丙醇润洗 3 s 后, 放入 37 °C 预热的油红 O 工作液中, 避光染色 60 min; 60%异丙醇分化, 蒸馏水洗后, 采用数码相机采集图像, 应用 Image J 软件测量斑块和脂滴面积。

2.7 血清血脂水平的检测

取小鼠血清, 按照试剂盒说明书检测血清 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平。

2.8 血清 Hcy、ET-1、TM 水平的检测

取小鼠血清, 按照试剂盒说明书检测 Hcy、ET-1、TM 水平。

2.9 透射电镜观察心脏线粒体超微结构

取电镜固定液固定的 1 mm³ 心脏组织, 经梯度乙醇和丙酮脱水、环氧树脂渗透包埋后, 制备 1 μm

半薄切片并经甲苯胺蓝染色以光镜定位。切取 60~80 nm 超薄切片, 经铀铅双染后, 于透射电子显微镜下观察心肌及微血管的超微结构。

2.10 免疫组化检测心肌组织 CD31 表达

石蜡切片脱蜡至水后, 抗原修复, 经过阻断内源性过氧化物酶和血清封闭后, 依次进行一抗、二抗孵育、DAB 显色、核复染、组化后脱水及封片等操作, 置于白光显微镜下观察并拍照, 使用 Image J 软件计算平均灰度值。

2.11 免疫荧光染色检测心肌组织 eNOS、VEGF 表达

石蜡切片脱蜡至水, 抗原修复, 画圈血清封闭后, 加入 2 种不同来源的 eNOS、VEGF 一抗的混合试剂, 再加二抗, 经 DAPI 复染细胞核、淬灭组织自发荧光、封片后, 采集图像, 使用 Image J 软件量化结果。

2.12 非靶向代谢组学研究

2.12.1 样本处理 低温称取 25 mg 样品于 EP 管中, 加入 2 个匀浆珠, 加入 500 μL 含同位素标记内标 (琥珀酸-2,2,3,3-d₄、马尿酸-d₅、烟酰胺-2,4,5,6-d₄、L-亮氨酸-5,5,5-d₃、氧化三甲胺-d₉ N-氧化物、4-氨基丁酸-2,2,3,3,4,4-d₆) 的提取液 (甲醇: 乙腈: 水 = 2: 2: 1), 涡旋混匀 30 s; 放入匀浆仪中匀浆 4 min (35 Hz), 再转移到冰水浴超声 5 min, 此步骤重复 3 次; -40 °C 静置 1 h, 取 350 μL 加入 96 孔过滤板内, 将 96 孔过滤板-收集板组合放入正压装置, 缓慢加压至 6 psi (1 psi = 6.895 kPa), 持续 3 min; 从正压装置取下过滤板-收集板组合, 取收集板中溶液上机检测。取等体积的所有样品混合, 作为质控样品上机检测。

2.12.2 色谱条件 采用 Vanquish 超高效液相色谱仪, Waters Acquity UPLC BEH Amide 色谱柱 (50 mm × 2.1 mm, 1.7 μm)。流动相为含 25 mmol/L 乙酸铵和 25 mmol/L 氨水的水溶液 (A)-乙腈 (B), 梯度洗脱: 0~0.25 min, 95% B; 0.25~3.50 min, 95%~65% B; 3.50~4.00 min, 65%~40% B; 4.00~4.55 min, 40%~95% B; 4.50~6.00 min, 95% B。样品盘温度 4 °C; 进样体积 2 μL; 体积流量 0.5 mL/min; 柱温 30 °C。

2.12.3 质谱条件 电喷雾离子源 (electron spray ionization, ESI), 于正、负离子模式下采集数据。正离子喷雾电压为 3.80 kV, 负离子喷雾电压为 -3.40 kV; 鞘气体积流量 50 arb; 辅助气体流量 15 arb; 毛细管温度 320 °C; 以分辨率 60 000 进行

一级全扫描，一级离子扫描范围 m/z 70~1 200，碰撞能量 SNCE 20/30/40，二级分辨率为 15 000，采集信号前 4 离子进行碎裂，同时采用动态排除去除无必要的 MS/MS 信息。

2.12.4 差异代谢物的鉴定 采用 BiotreeDB(V3.0) 数据库鉴定代谢物。设置 m/z 误差卡值，二级定性匹配 m/z 偏差 $\pm (2.5 \times 10^{-5})$ ，一级匹配 m/z 偏差 $\pm (1.5 \times 10^{-5})$ 。鉴定等级在 level 4 及以上。

2.12.5 数据处理 原始数据经 ProteoWizard 软件转成 mzXML 格式后，采用 BiotreeDB (V3.0) 数据库鉴定代谢物，用自主编写的 R 包进行可视化分析。两组比较的差异代谢物采用差异倍数 (fold change, FC) 分析结合非配对 t 检验，筛选阈值设定为 $FC > 1$ 或 $FC < 0.5$ 且 $P < 0.05$ ；同时参考正交偏最小二乘-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 的变量权重值 (variable importance for the projection, VIP)，以 $VIP > 1$ 且 $P < 0.05$ 作为显著差异代谢物的综合筛选标准。为降低检测系统误差对结果的影响，并更好地突显数据的生物学意义，对原始数据进行以下整理：①进行偏离值过滤，基于 RSD 对单个特征峰进行筛选，以去除噪声信号；②进行缺失值过滤，仅保留在任意单组中缺失值不超过 50%或在所有组中总缺失值不超过 50%的特征峰数据；③对保留数据中

的缺失值进行模拟填补，采用最小值二分之一法进行补值；④通过内标进行数据标准化处理，以消除系统误差并获得具有生物学可比性的表达水平。

2.13 Western blotting 检测心脏组织中 SIRT1、PGC-1 α 、p-p65、p65 蛋白表达

提取心脏组织的总蛋白，用 BCA 蛋白定量试剂盒测定浓度。蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转至 PVDF 膜，加入 5%脱脂牛奶封闭 2 h。加入一抗 (1 : 1 000)，4 °C 孵育过夜，TBST 洗膜 3 次，每次 15 min；加入 HRP 标记的山羊抗兔二抗 (1 : 5 000)，室温孵育 80 min，TBST 洗膜 3 次，每次 15 min。加入 ECL 化学发光试剂显影，采用 Image J 软件分析条带的灰度值。

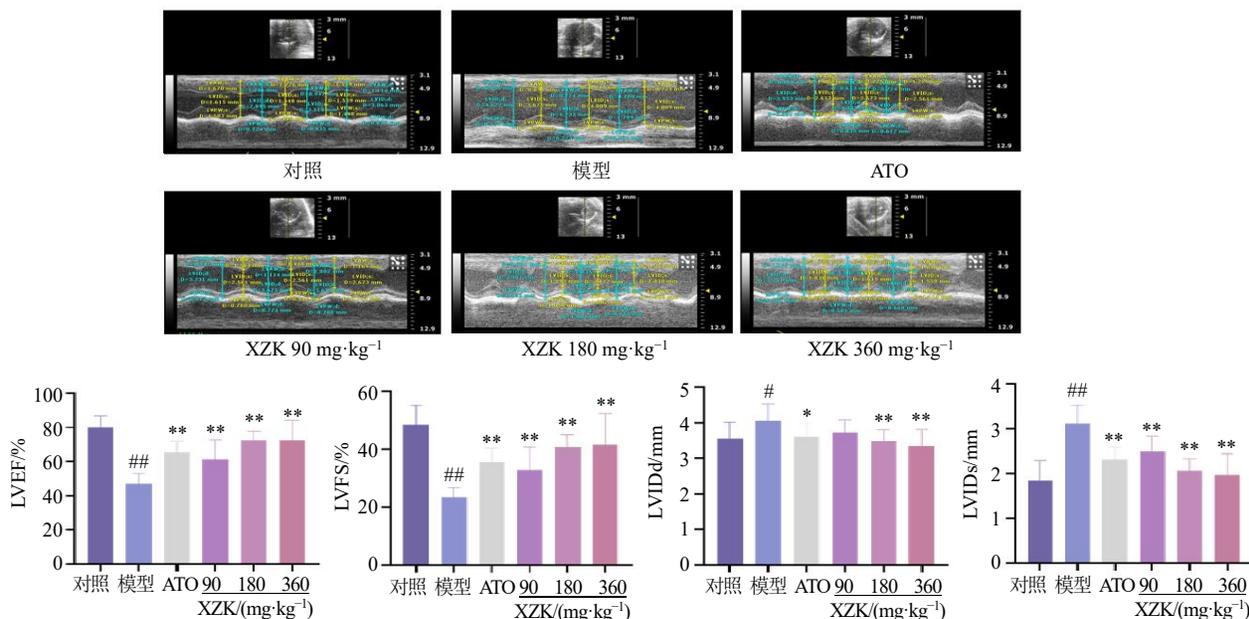
2.14 统计学分析

免疫组化和病理组织染色图像用 Image J 2.3.0 软件分析。数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，采用 Graph Pad Prism 10 软件进行统计学分析。组间比较采用单因素方差分析 (One-way ANOVA)，然后进行 Dunnett's 多重比较检验。

3 结果

3.1 血脂康胶囊对 CMD 模型小鼠心功能的影响

如图 1 所示，与对照组比较，模型组小鼠 LVEF、LVFS 明显降低 ($P < 0.01$)，LVIDd、LVIDs 明显升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，提示心功能下降；与模型组比



ATO-阿托伐他汀；XZK-血脂康胶囊；与对照组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ ；与模型组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ，下同。
ATO-atorvastatin；XZK-Xuezhikang Capsules；# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group；* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 血脂康胶囊对 CMD 模型小鼠心功能的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 12$)

Fig. 1 Effect of Xuezhikang Capsules on cardiac function in mice with CMD model ($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 12$)

较,各给药组小鼠LVEF、LVFS明显升高($P<0.01$),LVIDs明显降低($P<0.01$),阿托伐他汀组和血脂康中、高剂量组LVIdd明显降低($P<0.05$ 、 0.01),提示血脂康胶囊对CMD模型小鼠心功能有不同程度的改善作用。

3.2 血脂康胶囊对CMD模型小鼠组织形态学变化影响

如图2所示,对照组小鼠心脏整体形态结构未见明显异常,心肌细胞完整,左、右心室结构未见明显异常;模型组可见右心室壁心肌中度纤维组织增生以及轻度炎细胞浸润;与模型组比较,各给药组纤维组织增生以及炎细胞浸润显著减少($P<0.05$ 、 0.01)。

3.3 血脂康胶囊对CMD模型小鼠主动脉脂质蓄积的影响

如图3所示,对照组主动脉未见明显脂质红染;与对照组比较,模型组主动脉红染脂质密布;与模型组比较,阿托伐他汀组和血脂康中、高剂量组小

鼠主动脉红染脂质面积显著减少($P<0.01$),提示血脂康胶囊明显改善血管内脂质蓄积。

3.4 血脂康胶囊对CMD模型小鼠血栓形成的影响

Carstairs染色^[10]用于区分血栓、血小板、胶原纤维等,组织中血栓与血小板会特异性染成橙红或亮红色,红细胞、肌红蛋白等血管内容物呈现亮黄色或橙黄色,胶原纤维呈蓝紫色。如图4所示,与对照组比较,模型组小鼠微血管($<20\mu\text{m}$)内形成明显血栓($P<0.01$);与模型组比较,阿托伐他汀组和血脂康中、高剂量组小鼠血栓与血小板明显减少($P<0.01$),微血管内血栓形成显著改善。

3.5 血脂康胶囊对CMD模型小鼠心肌缺血的影响

Heidenhain染色^[11]用于鉴别早期心肌缺血,正常心肌纤维染色呈红色,细胞核呈灰色,缺血时心肌、红细胞呈灰黑色,随着缺血时间延长和程度加深,黑染心肌纤维数量增多,着色区域可扩大呈片状、团块状分布。如图5所示,对照组小鼠Heidenhain染色全部心肌纤维染为红色,未见明显

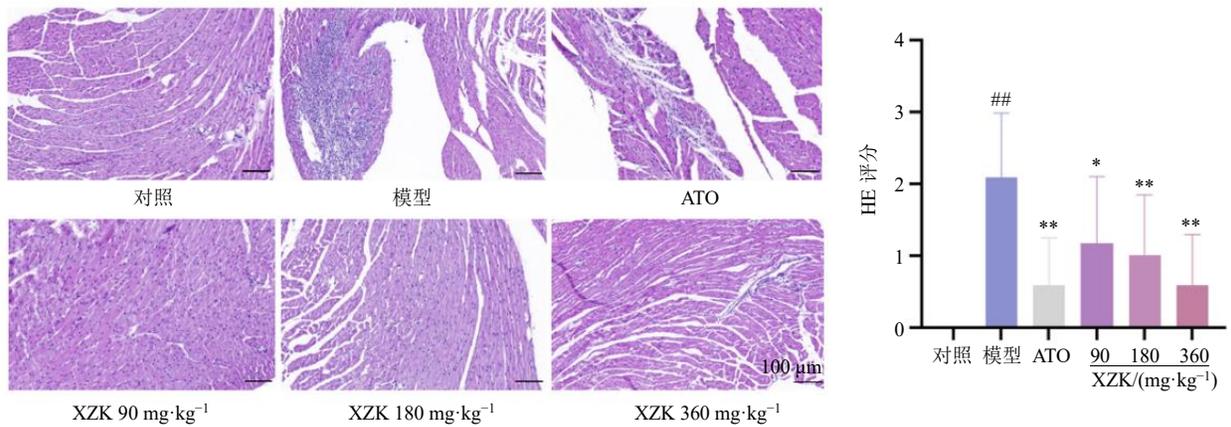


图2 血脂康胶囊对CMD模型小鼠组织形态学变化影响($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n=10\sim 12$)

Fig. 2 Effect of Xuezhikang Capsules on histomorphological changes in mice with CMD model ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n=10\sim 12$)

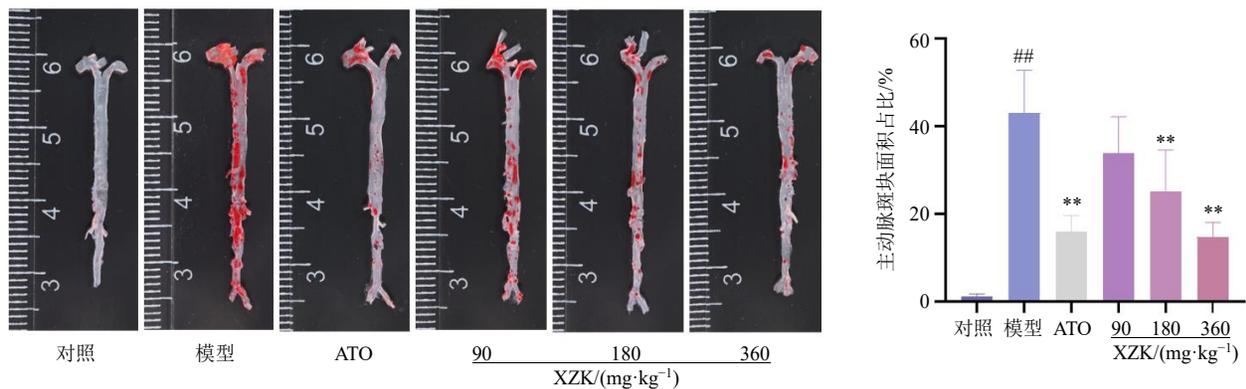
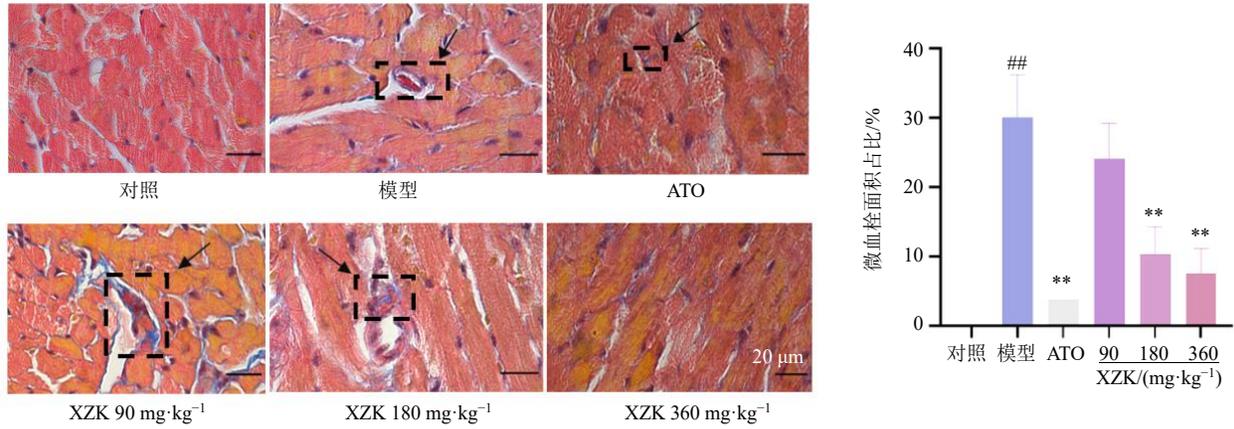


图3 血脂康胶囊对CMD模型小鼠主动脉脂质蓄积的影响($\bar{x} \pm s$, $n=4\sim 6$)

Fig. 3 Effect of Xuezhikang Capsules on aortic lipid accumulation in mice with CMD model ($\bar{x} \pm s$, $n=4\sim 6$)



黑色方框内为血管内血栓与血小板。

Within black box is intravascular thrombus and platelets.

图 4 血脂康胶囊对 CMD 模型小鼠血栓形成的影响 (×400; $\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 4 Effect of Xuezhikang Capsules on thrombosis in mice with CMD model (× 400; $\bar{x} \pm s, n = 6$)

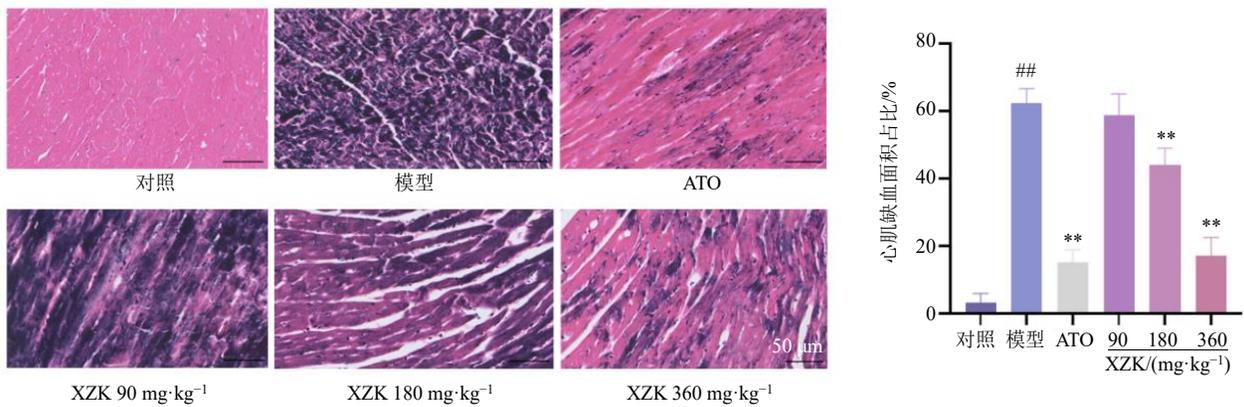


图 5 血脂康胶囊对 CMD 模型小鼠心肌缺血的影响 (×400; $\bar{x} \pm s, n = 10$)

Fig. 5 Effect of Xuezhikang Capsules on myocardial ischemia in mice with CMD model (× 400; $\bar{x} \pm s, n = 10$)

黑染区域; 与对照组比较, 模型组心肌纤维可见大量明显多灶性、团块状、弥漫性黑染; 与模型组比较, 阿托伐他汀组和血脂康中、高剂量组黑染程度降低, 心肌缺血显著改善 ($P < 0.01$)。

3.6 血脂康胶囊对 CMD 模型小鼠血脂水平的影响
如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组小鼠血清

中 TG、TC 和 LDL-C 水平显著上升 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 各给药组小鼠血清中 TC 水平显著降低 ($P < 0.01$), 阿托伐他汀组和血脂康高剂量组 TG 水平显著降低 ($P < 0.01$), 阿托伐他汀组和血脂康中、高剂量组 LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$), 提示血脂康胶囊能够改善 CMD 模型小鼠血脂水平。

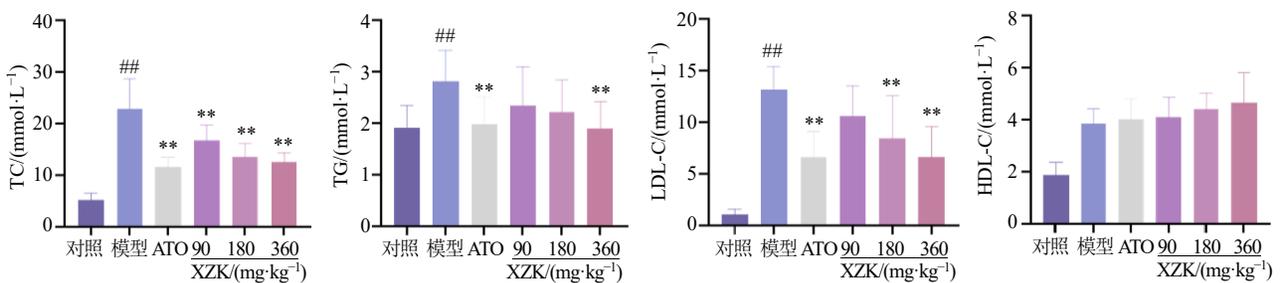


图 6 血脂康胶囊对 CMD 模型小鼠血脂水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 12$)

Fig. 6 Effect of Xuezhikang Capsules on blood lipid levels of mice with CMD model ($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 12$)

3.7 血脂康胶囊对CMD模型小鼠血清中Hcy、ET-1和TM水平的影响

如图7所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中Hcy、ET-1和TM水平显著升高($P < 0.01$);与模型组比较,阿托伐他汀组和血脂康中、高剂量组小鼠血清中Hcy水平显著降低($P < 0.01$),各给药组ET-1和TM水平显著降低($P < 0.01$),提示血脂康胶囊能够改善CMD模型小鼠内皮及凝血障碍。

3.8 血脂康胶囊对CMD模型小鼠心肌超微结构和微血管超微结构的影响

如图8-A所示,对照组小鼠肌原纤维排列整齐,明暗带清楚,肌节对称,Z线清晰平直;模型组肌原纤维退化,曲直不齐分布紊乱,明暗带不清,肌节Z线断裂或模糊不清,散在脂滴,存在线粒体畸形,线粒体膜不完整,内嵴断裂溶解;阿托伐他汀组明暗带清楚,Z线清晰,线粒体较完整;血脂康低剂量组肌原纤维损伤,线粒体分布不均,散在少量脂

滴;血脂康中剂量组肌原纤维略不清晰,散在脂滴;血脂康高剂量组明暗带清楚,Z线清晰。

如图8-B所示,对照组心肌组织微血管超微结构清晰,内质网附着大量核糖体颗粒,未见明显扩张,线粒体膜结构完整,未见明显破裂,血管基底膜连续而完整,内皮细胞间紧密连接存在;模型组小鼠心肌组织微血管基膜不完整,紧密连接缺失,细胞器减少,胞质溶解;阿托伐他汀组紧密连接清晰;血脂康低剂量组血管基底膜不完整,紧密连接弥散,线粒体损伤;血脂康中剂量组紧密连接模糊,线粒体分裂;血脂康高剂量组线粒体完整,内质网附着大量核糖体。

3.9 血脂康胶囊对CMD模型小鼠心肌组织中CD31表达的影响

如图9所示,棕黄色颗粒表示CD31阳性表达,对照组小鼠心肌组织细胞核染色及棕黄色颗粒沉着呈均匀分布,但未见明显血管增生;模型组可见

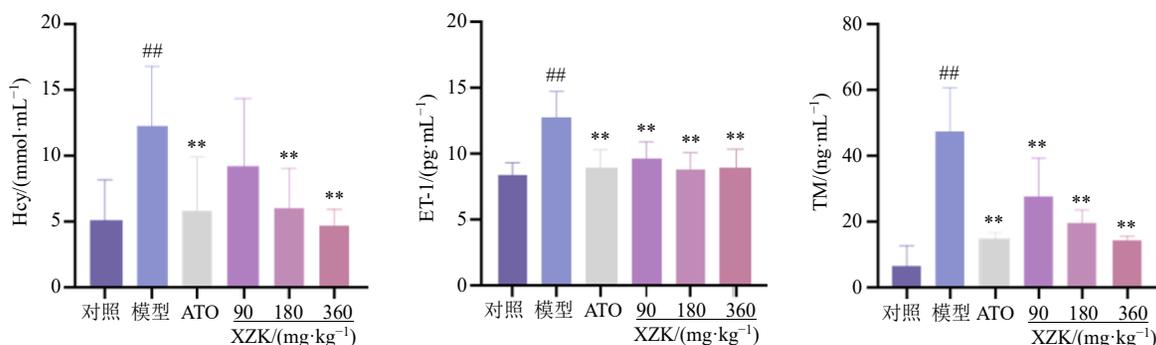
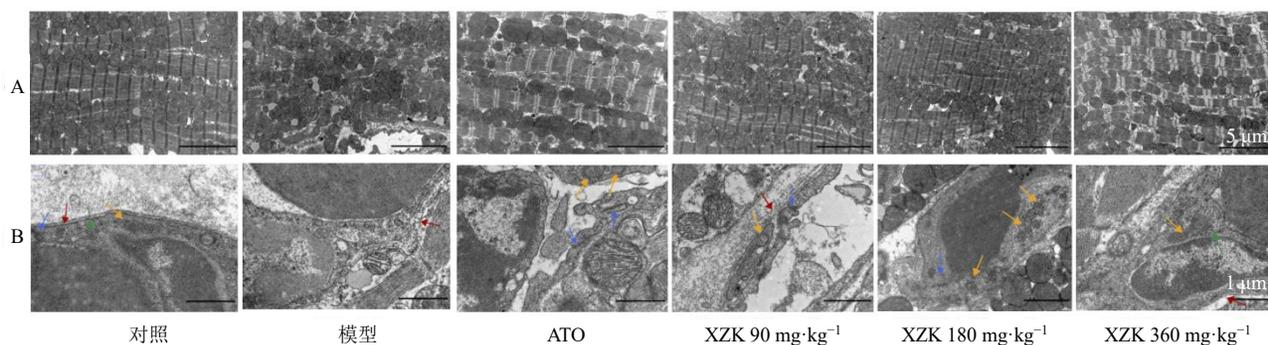


图7 血脂康胶囊对CMD模型小鼠血清中Hcy、ET-1和TM水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 12$)

Fig. 7 Effect of Xuezhikang Capsules on levels of Hcy, ET-1 and TM in serum of mice with CMD model ($\bar{x} \pm s, n = 10 \sim 12$)



A-心肌超微结构($\times 7000$); B-微血管超微结构($\times 15000$),绿色箭头表示内质网,黄色箭头表示线粒体,红色箭头表示血管基底膜,蓝色箭头表示内皮细胞间紧密连接。

A-myocardial ultrastructure ($\times 7000$); B-microvascular ultrastructure ($\times 15000$), green arrow indicates endoplasmic reticulum, yellow arrow indicates mitochondrion, red arrow indicates vascular basement membrane, blue arrow indicates tight junction between endothelial cells.

图8 血脂康胶囊对CMD模型小鼠心肌超微结构和微血管超微结构的影响

Fig. 8 Effect of Xuezhikang Capsules on myocardial ultrastructure and microvascular ultrastructure in mice with CMD model

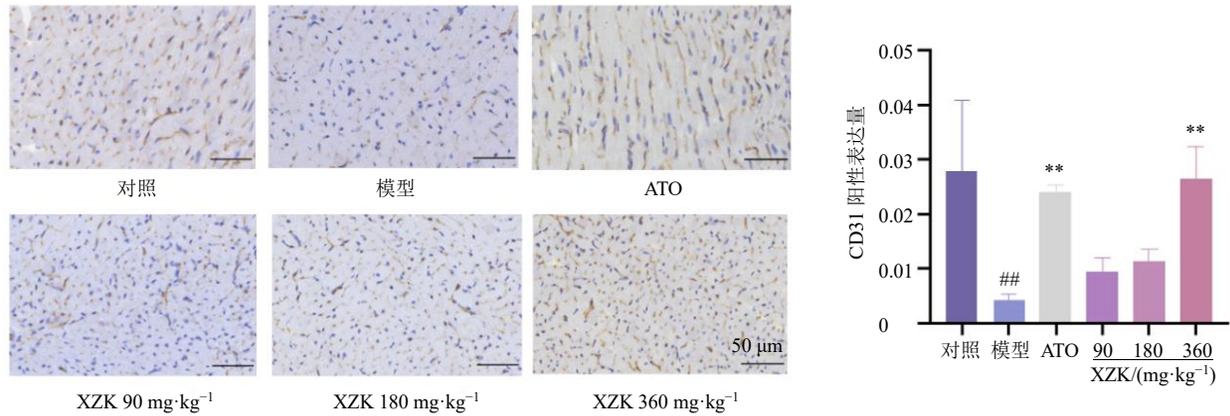


图9 血脂康胶囊对CMD模型小鼠心肌组织中CD31表达的影响 (×400; $\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 9 Effect of Xuezhikang Capsules on CD31 expression in myocardial tissue of mice with CMD model (× 400; $\bar{x} \pm s, n = 6$)

心肌组织细胞核深染且分布不均, 棕黄色颗粒减少 ($P < 0.01$); 阿托伐他汀组和血脂康高剂量组细胞核染色较为均匀, 棕色颗粒增多且均匀分布 ($P < 0.01$), 表明血脂康胶囊可促进CMD模型小鼠心肌组织中CD31表达, 促进血管新生, 抑制冠状动脉血管及微血管损伤。

3.10 血脂康胶囊对CMD模型小鼠心肌组织中eNOS和VEGF表达的影响

如图10所示, 与对照组比较, 模型组小鼠心肌组织中eNOS和VEGF荧光强度明显降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 阿托伐他汀组和血脂康高剂量组心肌组织中eNOS和VEGF的荧光强度明显升高 ($P < 0.05, 0.01$), 提示血脂康胶囊可通过促进CMD模型小鼠心肌组织中eNOS和VEGF的表达, 改善血液供应, 保护心肌细胞。

3.11 非靶向代谢组学分析

3.11.1 多元统计分析 经过预处理后 32 029 个 Feature 被保留, 代谢物共涉及 20 类, 其中种类最多的是有机杂环化合物 (20.2%)、脂质和脂质样分子 (19.9%), 其中二级定性物质保留 2 192 个, 见图 11-A。将峰面积经共峰面积归一化后进行 PCA, 结果显示质控样本紧密聚集在一起 (图 11-B), 实验重复性较好, 各组之间的代谢特征具有可比性, 样本基本处于 95% 置信区间内; OPLS-DA 结果显示模型组与各组间可区分, 经 200 次置换检验, 可见模型不存在过拟合现象, 模型稳定性良好。

3.11.2 差异代谢物的筛选 根据 PCA 结果, 以 Student's *t* 检验的 P 值 < 0.05 、OPLS-DA 模型第一主成分的变量投影重要度 (variable importance in the projection, VIP) > 1 为筛选条件, 结果如图 12 所

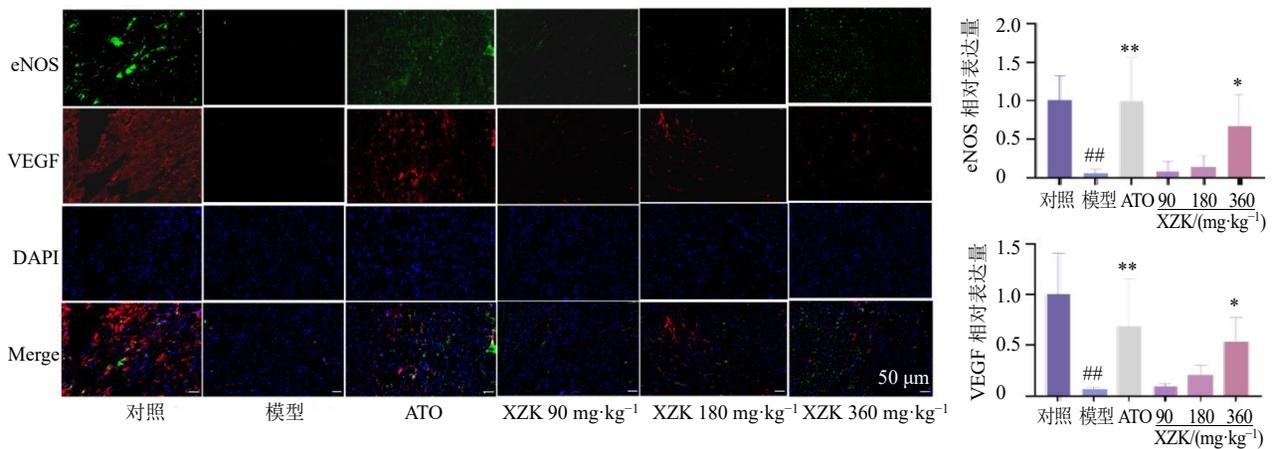
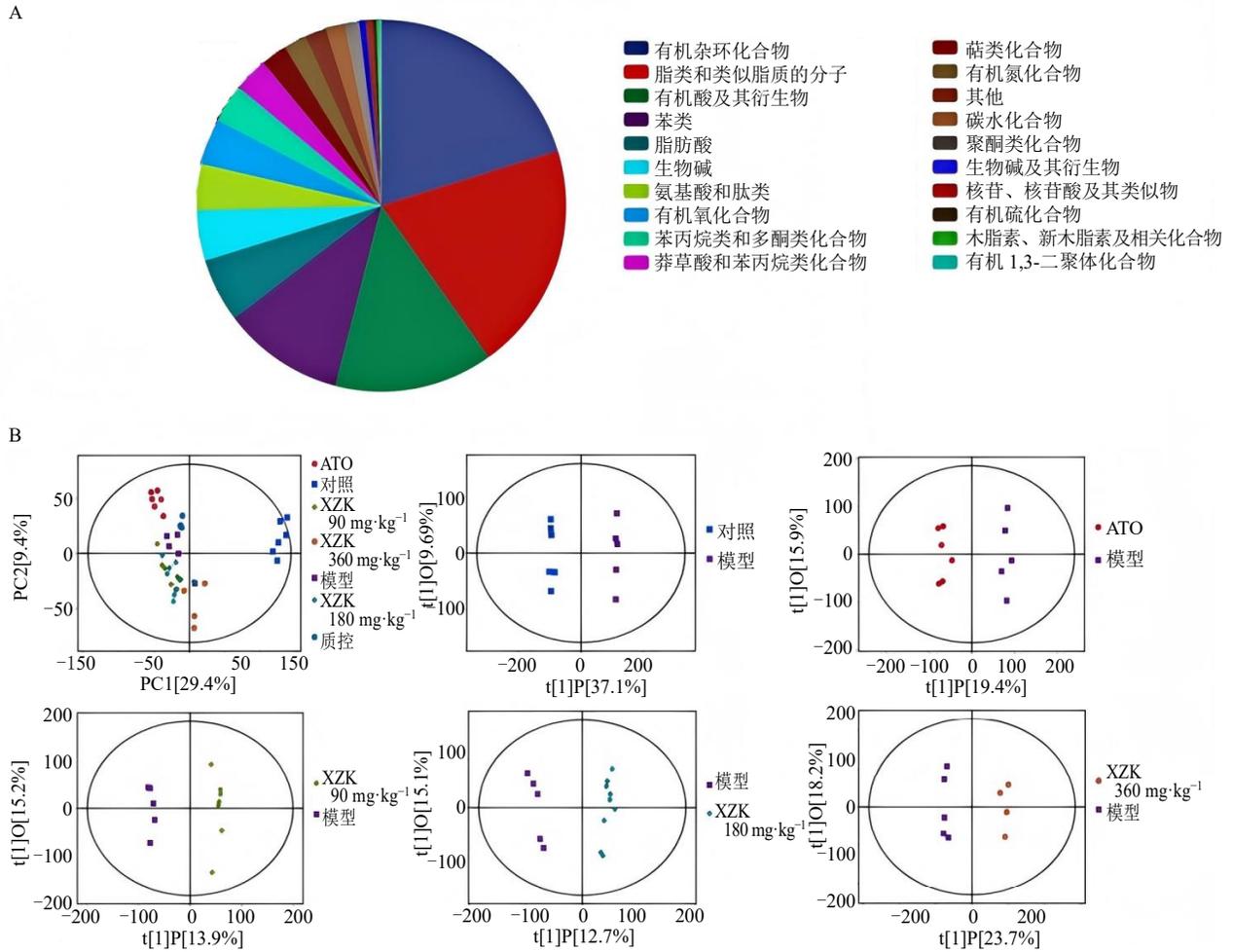


图10 血脂康胶囊对CMD模型小鼠心肌组织中eNOS和VEGF表达的影响 (×200; $\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 10 Effect of Xuezhikang Capsules on expressions of eNOS and VEGF in myocardial tissue of mice with CMD model (× 200; $\bar{x} \pm s, n = 6$)



A-代谢物分类及占比饼图；B-全部样本 PCA 得分散点图及模型组 vs 对照组、模型组 vs 给药组的 OPLS-DA 得分散点图。
A-Pie chart of metabolite classification and their proportions; B-PCA score scatter plot of all samples and OPLS-DA score scatter plots of model group vs control group, model group vs administration group.

图 11 多元统计分析

Fig. 11 Multivariate statistical analysis

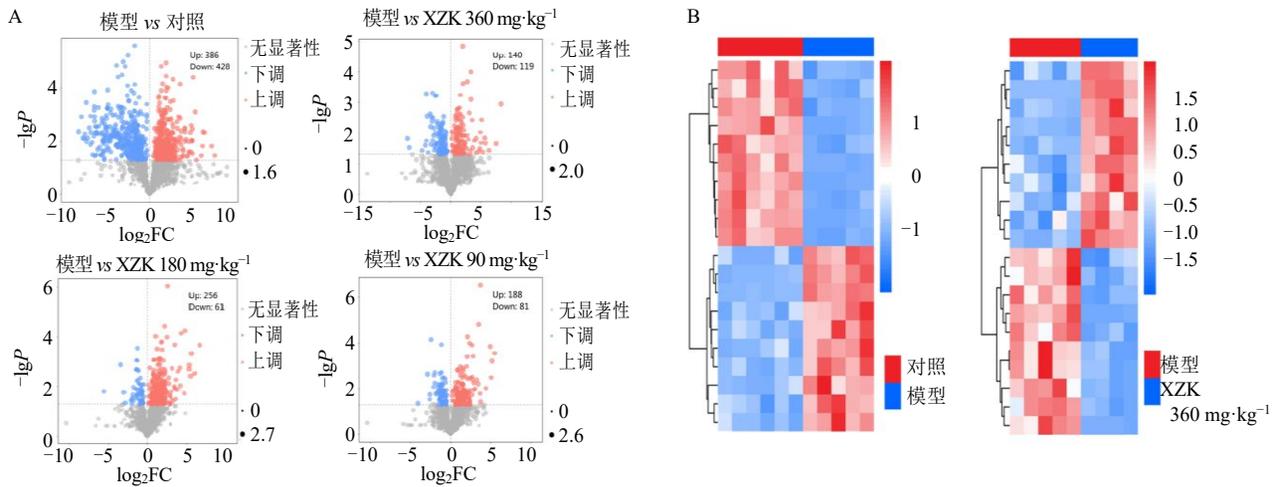


图 12 差异代谢物的火山图 (A) 和热图 (B)

Fig. 12 Volcano plot (A) and heatmap (B) of differential metabolites

示,对照组与模型组间共筛选出 814 个差异代谢物,其中相对含量上调的有 386 个,下调的有 428 个;模型组与血脂康高剂量组间共筛选出 259 个差异代谢物,其中相对含量上调的有 140 个,下调的有 119 个;模型组与血脂康中剂量组间共筛选出 317 个差异代谢物,其中相对含量上调的有 256 个,下调的有 61 个;模型组与血脂康低剂量组间共筛选出 269 个差异代谢物,其中相对含量上调的有 188 个,下调的有 81 个。

3.11.3 标志性差异代谢物分析 以 $VIP > 1$ 、 $P < 0.05$ 为判定标准,在正、负离子模式下筛选出上调

及下调代谢物,对照组 vs 模型组和模型组 vs 血脂康高剂量组取交集共筛选出 137 种差异代谢物,其中与血脂康胶囊治疗作用相关的差异代谢物 14 种(表 1)。与对照组比较,模型组 2-氨基己二酸、葫芦素 C、3-去甲基泛醌-9 水平明显升高,犬尿酸、瓜氨酸、脯氨酸、异烟酸、3-氨基-4-羟基苯甲酸、硫胺素、 α -酮戊二酸 (α -ketoglutaric acid, α -KG)、PC[16:0/18:1(9Z)]、5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazole、4*H*-1-benzopyran-4-one,2-(4-morpholinyl)-8-phenyl 苯丙胺水平显著降低。血脂康胶囊干预后显著逆转上述代谢物的水平。

表 1 标志性差异代谢物
Table 1 Landmark differential metabolites

序号	代谢物	分子式	m/z	对照组 vs 模型组			模型组 vs 血脂康高剂量组		
				VIP	P 值	趋势	VIP	P	趋势
1	犬尿酸	C ₆ H ₆ N ₂ O ₂	139.050 0	1.31	0.029 8	↓	1.91	0.046 2	↑
2	瓜氨酸	C ₆ H ₁₃ N ₃ O ₃	176.102 7	1.06	0.049 8	↓	1.82	0.047 7	↑
3	脯氨酸	C ₅ H ₉ NO ₂	116.070 3	1.24	0.016 8	↓	1.66	0.012 1	↑
4	异烟酸	C ₆ H ₅ NO ₂	124.039 0	1.30	0.029 6	↓	1.65	0.008 8	↑
5	3-氨基-4-羟基苯甲酸	C ₇ H ₇ NO ₃	154.049 7	1.59	0.004 9	↓	1.57	0.018 5	↑
6	硫胺素	C ₁₂ H ₁₇ N ₄ OS	265.111 3	1.24	0.019 2	↓	1.60	0.014 7	↑
7	α -KG	C ₅ H ₆ O ₅	145.014 3	1.25	0.029 7	↓	1.76	0.035 4	↑
8	2-氨基己二酸	C ₆ H ₁₁ NO ₄	160.061 7	1.46	0.024 0	↑	1.77	0.023 9	↓
9	PC[16:0/18:1(9Z)]	C ₄₂ H ₈₂ NO ₈ P	742.574 2	1.15	0.029 1	↓	1.61	0.023 2	↑
10	5-(2-hydroxyethyl)-4-methylthiazole	C ₆ H ₉ NOS	144.047 5	1.17	0.029 2	↓	1.58	0.013 4	↑
11	4 <i>H</i> -1-benzopyran-4-one,2-(4-morpholinyl)-8-phenyl	C ₁₉ H ₁₇ NO ₃	308.125 5	1.24	0.018 5	↓	1.40	0.042 6	↑
12	葫芦素 C	C ₃₂ H ₄₈ O ₈	561.338 0	1.47	0.036 2	↑	1.60	0.036 7	↓
13	苯丙胺	C ₉ H ₁₃ N	158.092 2	1.55	0.004 8	↓	1.76	0.003 9	↑
14	3-去甲基泛醌-9	C ₅₃ H ₈₀ O ₄	781.610 7	1.58	0.004 8	↑	1.65	0.013 9	↓

3.11.4 差异代谢物 KEGG 通路分析 将筛选到的差异代谢物进行 KEGG 通路分析,共筛选出 36 条差异代谢通路。对 $P < 0.05$ 的前 15 条通路进行展示,如图 13 所示,核心通路主要集中在氨基酸的生物合成、精氨酸生物合成、胆汁分泌等。

本研究中,与对照组比较,模型组小鼠粪便组织中瓜氨酸、脯氨酸及 α -KG 含量显著下降,而血脂康高剂量组可明显逆转上述代谢物的降低趋势,提示三者可能通过协同调控氨基酸生物合成、精氨酸生物合成及胆汁分泌通路,调节 eNOS/SIRT1/PGC-1 α 轴发挥心肌保护作用(图 14)。

3.12 血脂康胶囊对 CMD 模型小鼠心肌组织 SIRT1、PGC-1 α 、p-p65 和 p65 蛋白表达的影响

如图 15 所示,与对照组比较,模型组小鼠心肌组织 SIRT1、PGC-1 α 蛋白表达水平显著降低 ($P <$

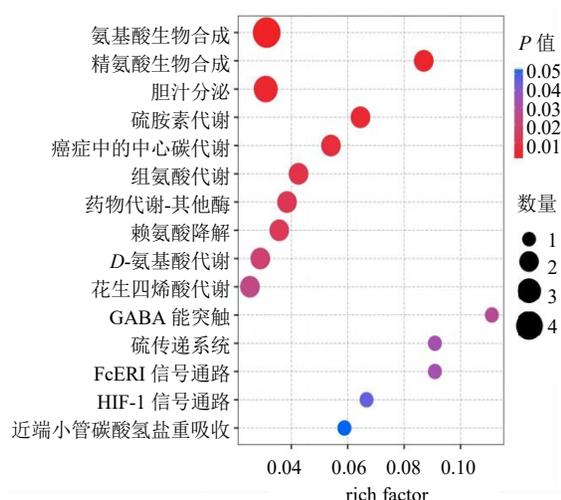
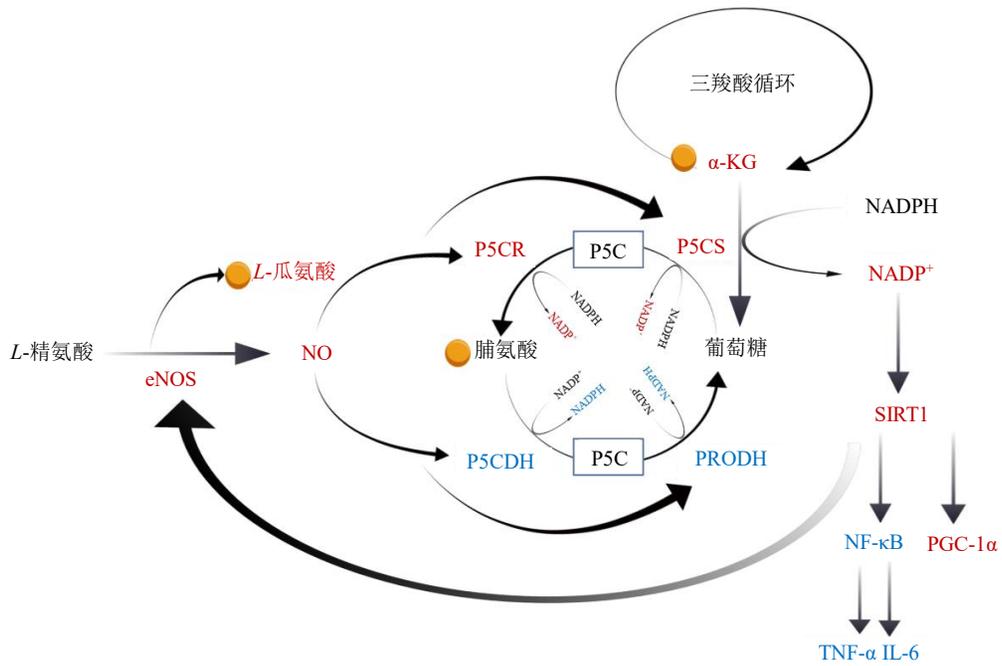


图 13 差异代谢物的 KEGG 通路富集分析结果
Fig. 13 KEGG pathway enrichment analysis results of differential metabolites



P5C-吡咯啉-5-羧酸; P5CR-吡咯啉-5-羧酸还原酶; P5CS-吡咯啉-5-羧酸合成酶; PROD/P5CDH-脯氨酸脱氢酶; P5CDH-吡咯啉-5-羧酸脱氢酶。
 P5C-pyrroline-5-carboxylic acid; P5CR-pyrroline 5-carboxylate reductase; P5CS-pyrroline-5-carboxylic acid synthase; PRODH-proline dehydrogenase; P5CDH-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase.

图 14 差异代谢物的潜在代谢通路

Fig. 14 Potential metabolic pathways of differential metabolites

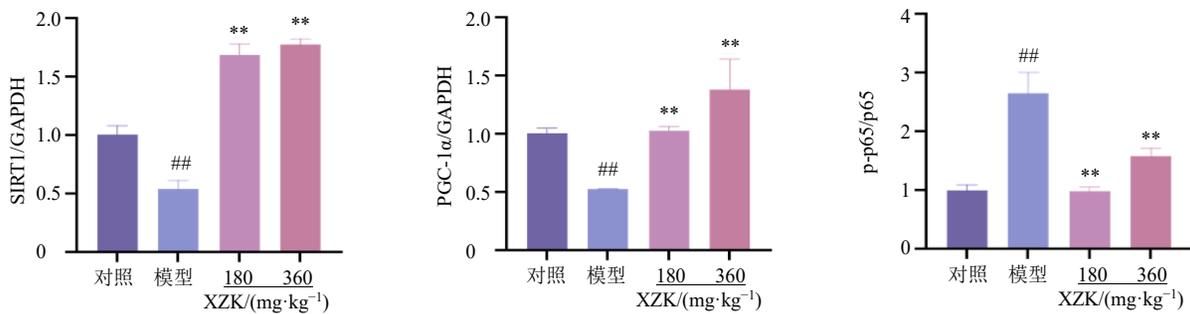
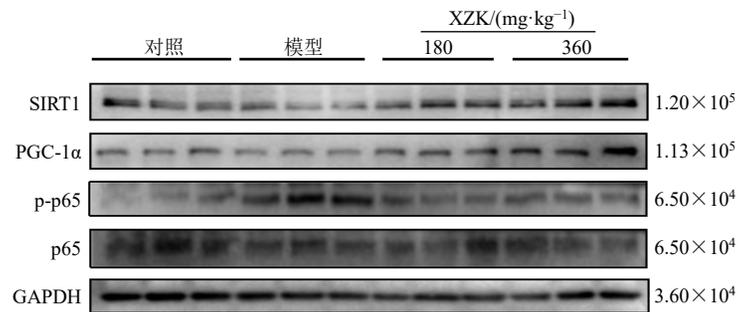


图 15 血脂康胶囊对 CMD 模型小鼠心肌组织 SIRT1、PGC-1α、p-p65 和 p65 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 15 Effect of Xuezhikang Capsules on SIRT1, PGC-1α, p-p65 and p65 protein expressions in myocardial tissue of mice with CMD model ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

0.01), p-p65/p65 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 血脂康中、高剂量组小鼠心肌组织 SIRT1、PGC-1α 蛋白表达水平显著升高 ($P < 0.01$),

p-p65/p65 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$), 提示血脂康胶囊可通过调节线粒体功能和炎症水平缓解 CMD。

4 讨论

CMD 是当代 CCS 患者治疗中的一个新兴议题,对诊断和患者预后均有影响。在 CCS 和中度冠状动脉狭窄的患者中,CMD 的患病率很高,且与直径狭窄程度无关。在符合血运重建条件的患者中,约 34%存在 CMD,这一情况可能导致血运重建后患者仍持续出现心绞痛症状。鉴于目前尚未发现 CMD 的特异性预测因子,在临床中诊断中需开展更常见的功能测试和寻找其他诊断方式便显得尤为必要^[12]。

月桂酸钠诱导的 CMD 模型通过精准模拟人类 CMD 的“终末共同通路”而展现出高度的病理生理相似性。该模型通过月桂酸钠的急性化学损伤,直接引发微血管内皮细胞的结构与功能破坏^[13],这一始动环节是各类人类 CMD(如由糖尿病、高血压等引发)的核心病变。内皮损伤进而暴露内皮下基质,激活血小板并触发凝血级联反应,导致微血栓形成,同时伴随显著的炎症浸润和微血管痉挛,接近临床 CMD 患者中关键的微循环障碍病理进程^[14]。为弥补急性损伤模型在病因复杂性上的不足,将月桂酸钠注射与 ApoE^{-/-}小鼠及高脂饲料喂养相结合^[15]。ApoE^{-/-}小鼠能自发形成与人类极为相似的动脉粥样硬化斑块,其在脂质代谢紊乱方面的背景为 CMD 的发生提供了贴近临床的慢性、多因素疾病环境^[16]。因此,本研究通过高脂饮食诱导 ApoE^{-/-}小鼠并通过尾 iv 月桂酸钠溶液复制大血管及微血管阻塞模型,主动脉呈典型脂质斑块,心肌微血管形成血栓,提示大小血管阻塞模型制备成功。

CMD 的核心病理机制涉及脂质沉积、内皮功能障碍、炎症反应及氧化应激的相互作用。在心肌缺血状态下,氧供不足直接损害内皮细胞连接完整性,导致微血管通透性增加;晚期微血管血栓形成可进一步引发心肌坏死与梗死^[17]。超声心动图评估左心室功能是临床前及临床诊断心功能的关键手段,研究显示心脏微血管稀疏先于舒张功能障碍出现^[18]。缺血可激活氧化应激与炎症反应,其中活性氧(reactive oxygen species, ROS)过量产生会损害 eNOS 的表达与活性,进而影响其产物一氧化氮(nitric oxide, NO)的生成。NO 作为关键血管保护因子,不仅介导血管舒张,还抑制血小板聚集、黏附及炎症因子释放^[19]。与此同时,ET-1 作为强效内源性血管收缩剂,其血清水平与冠状动脉血流反应呈负相关,高水平 ET-1 可加剧内皮功能障碍、炎症

反应及斑块不稳定^[20]。VEGF 则通过促进内皮细胞增殖、迁移与新生血管形成,参与微血管的 NO 依赖性扩张,从而缓解内皮损伤^[21]。内皮功能障碍表现为 NO 与 ET-1 平衡失调,进而通过微血管收缩加重心肌缺血。在结构层面,CD31 作为血管内皮特异性黏附受体,参与信号传导与血管形成过程,其表达水平可用于评估左心室微血管密度^[22-23]。此外,Hcy 和 TM 是反映内皮损伤的重要标志物:Hcy 促进胆固醇积聚与泡沫细胞形成,增加血栓风险^[24-25];TM 作为内皮表面的凝血酶受体,则通过结合凝血酶抑制其活性,发挥抗凝作用^[26]。本研究结果显示,与对照组比较,模型组小鼠心功能指标(LVEF、LVFS、LVIDd、LVIDs)显著恶化,同时血管内皮损伤标志物(Hcy、TM、ET-1)明显升高,而保护性指标(eNOS、VEGF、CD31)显著降低。经血脂康胶囊干预后,上述指标均得到显著改善,表明血脂康胶囊能有效减轻 CMD 模型小鼠的心肌损伤和血管内皮损伤程度。

基于非靶向代谢组学分析,血脂康胶囊可能通过调控精氨酸-脯氨酸- α -KG 代谢轴,协同改善内皮功能、氧化应激和炎症反应。在精氨酸生物合成通路中,瓜氨酸作为 L-精氨酸的天然前体^[27],其含量在模型组小鼠粪便中显著下降,提示 eNOS 合成 NO 的底物供应不足。这一代谢紊乱可能导致 eNOS 功能解偶联,使超氧化物生成增加而 NO 合成减少,进而加剧血管内皮功能障碍与氧化应激^[28-29]。血脂康胶囊干预后瓜氨酸水平的显著回升,表明其可通过恢复精氨酸-NO 代谢通路,增强 eNOS 活性,改善内皮依赖的血管舒张功能,这是其改善内皮依赖性血管舒张功能的关键起始环节。在氨基酸生物合成通路中,模型组脯氨酸含量明显降低。脯氨酸不仅是维持细胞外基质稳态的重要氨基酸,其代谢变化还与线粒体能量代谢密切相关^[30-32]。脯氨酸代谢异常可能影响 α -KG 脱氢酶活性,破坏三羧酸循环的正常运转^[33]。血脂康胶囊通过提升脯氨酸水平,可能恢复其对细胞外基质的调控作用,并通过调节 α -KG 代谢流向改善线粒体代谢平衡, α -KG 作为三羧酸循环的核心中间体及多种氨基酸代谢节点,在心衰衰竭中显著变化^[34], α -KG 可通过 Jumonji 结构域蛋白 3(Jumonji domain-containing protein 3, JMJD3)依赖性机制降低组蛋白 H3 第 27 位赖氨酸三甲基化(histone H3 lysine 27 trimethylation, H3K27me3)修饰,促进心肌细胞增殖^[35],并增强线粒体自噬以清

除受损线粒体、减少 ROS 积累,从而抑制心肌肥大与纤维化^[36]。此外, α -KG 在谷氨酸脱氢酶催化下与氨反应生成谷氨酸与烟酰胺腺嘌呤二核苷酸 (nicotinamide adenine dinucleotide, NAD⁺), 进而激活 SIRT1/PGC-1 α 轴, 调节线粒体生物合成与炎症反应^[37-38]。本研究结果显示, 模型组 α -KG 含量显著降低, 而血脂康胶囊治疗后明显回升, 结合心功能指标改善, 表明血脂康胶囊可能通过恢复 α -KG 水平, 协同调节能量代谢、表观遗传及抗氧化防御, 减轻心肌损伤。综上所述, 血脂康胶囊可能通过协同上调瓜氨酸、脯氨酸和 α -KG 的水平, 多靶点调节 eNOS/SIRT1/PGC-1 α 信号轴, 改善内皮功能障碍、线粒体功能异常、氧化应激和炎症反应, 从而缓解心肌微循环障碍, 其具体分子相互作用机制有待多组学联合分析及检测通路激活或抑制的直接证据进一步阐明。基于本研究证实血脂康胶囊可显著改善 CMD 模型小鼠的心功能及血管内皮损伤标志物, 其未来临床转化研究应着力于从调脂治疗向微血管并发症防治延伸。明确其在调节 eNOS/ET-1 平衡、改善微血管灌注方面独立于调血脂的临床价值。同时结合网络药理学与循证医学方法, 系统解析其多组分通过调控氧化应激-炎症-内皮功能轴保护微血管的整合作用机制, 并探索建立影像学的微血管功能评价体系, 最终为血脂康胶囊拓展用于血脂异常相关微循环并发症的防治提供关键科学依据。

综上, 血脂康胶囊通过显著改善血管内皮功能、减轻心肌与损伤和抑制炎症反应, 对 CMD 产生治疗作用, 其机制可能与调控精氨酸-脯氨酸- α -KG 代谢轴及 eNOS/SIRT1/PGC-1 α 信号通路相关。未来可进一步探索血脂康胶囊中活性成分通过多通路协同改善冠脉微血管疾病的作用机制, 为血脂康胶囊的临床推广应用提供科学依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zhang W, Singh S, Liu L, *et al.* Prognostic value of coronary microvascular dysfunction assessed by coronary angiography-derived index of microcirculatory resistance in diabetic patients with chronic coronary syndrome [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2022, 21(1): 222.
- [2] Padro T, Manfrini O, Bugiardini R, *et al.* ESC Working Group on Coronary Pathophysiology and Microcirculation position paper on 'coronary microvascular dysfunction in cardiovascular disease' [J]. *Cardiovasc Res*, 2020, 116(4): 741-755.
- [3] Zhang W, Liu L, Chen H Y, *et al.* Association between the triglyceride-glucose index and the presence and prognosis of coronary microvascular dysfunction in patients with chronic coronary syndrome [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2023, 22(1): 113.
- [4] Fawaz S, Marin F, Khan S A, *et al.* Comparison of bolus versus continuous thermodilution derived indices of microvascular dysfunction in revascularized coronary syndromes [J]. *Int J Cardiol Heart Vasc*, 2024, 51: 101374.
- [5] Qiu Z J, Wang Y, Liu Y, *et al.* Diagnostic value of angiography-derived index of microcirculatory resistance (AMR) for coronary microcirculatory dysfunction (CMD) and its prognostic significance in patients with chronic coronary syndromes in the smoking population [J]. *Medicine*, 2024, 103(6): e37022.
- [6] Yang Z H, Liu Y X, Li Z Z, *et al.* Coronary microvascular dysfunction and cardiovascular disease: Pathogenesis, associations and treatment strategies [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 164: 115011.
- [7] 中国老年学和老年医学学会心脑血管病专业委员会, 血脂康胶囊临床应用中国专家共识组, 刘梅林, 等. 血脂康 (胶囊) 临床应用中国专家共识 (2017 修订版) [J]. *中华内科杂志*, 2018, 57(2): 97-100.
- [8] 乔宝进, 周政, 朱春胜, 等. 血脂康胶囊治疗小鼠代谢相关脂肪性肝病的作用机制及其对 FXR 通路相关蛋白的影响 [J]. *现代药物与临床*, 2025, 40(1): 30-36.
- [9] 黄日康, 张丽媛, 臧子叶, 等. 血脂康通过 PI3K/Akt/eNOS 通路防治冠状动脉微循环障碍疾病 [J]. *中国现代中药*, 2025, 27(2): 282-295.
- [10] Li W Z, Yang Y, Liu K, *et al.* FGL2 prothrombinase contributes to the early stage of coronary microvascular obstruction through a fibrin-dependent pathway [J]. *Int J Cardiol*, 2019, 274: 27-34.
- [11] 庄园妃, 钟梅, 刘春贵, 等. 基于 Nrf2/HO-1 信号通路探讨冠心通络方对大鼠冠脉微循环障碍的影响 [J]. *中药材*, 2023, 46(4): 986-993.
- [12] Niewiara Ł, Kleczyński P, Guzik B, *et al.* Prevalence of coronary microcirculatory dysfunction in patients with chronic coronary syndromes and moderate coronary stenosis [J]. *Kardiol Pol*, 2025, 83(4): 465-473.
- [13] 葛昭, 任秋安, 任思霖, 等. 理气化痰活血方对冠脉微循环障碍大鼠血管内皮功能及细胞凋亡的影响 [J]. *世界中医药*, 2025, 20(8): 1302-1312.
- [14] Zhao J X, Wang G D, Guan L N, *et al.* Establishment of nonobstructive coronary microcirculatory disorders in rabbits using three established methods and a comparative study [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2024, 700: 149535.

- [15] Gabaldon-Perez A, Marcos-Garces V, Gavara J, *et al.* Coronary revascularization and long-term survivorship in chronic coronary syndrome [J]. *J Clin Med*, 2021, 10(4): 610.
- [16] 夏迎龙, 姚璐, 田国祥, 等. 血小板及形态学参数与 APOE 基因多态性致动脉粥样硬化性血管疾病的分析 [J]. *中国循证心血管医学杂志*, 2025, 17(1): 78-82.
- [17] Liu H H, Zhao J J, Pan S L, *et al.* Shexiang Tongxin Dropping Pill protects against sodium laurate-induced coronary microcirculatory dysfunction in rats [J]. *J Tradit Chin Med*, 2021, 41(1): 89-97.
- [18] Veitch S, Njock M S, Chandy M, *et al.* miR-30 promotes fatty acid beta-oxidation and endothelial cell dysfunction and is a circulating biomarker of coronary microvascular dysfunction in pre-clinical models of diabetes [J]. *Cardiovasc Diabetol*, 2022, 21(1): 31.
- [19] Förstermann U, Xia N, Li H G. Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2017, 120(4): 713-735.
- [20] Ford T J, Corcoran D, Padmanabhan S, *et al.* Genetic dysregulation of endothelin-1 is implicated in coronary microvascular dysfunction [J]. *Eur Heart J*, 2020, 41(34): 3239-3252.
- [21] Lopez J J, Laham R J, Carrozza J P, *et al.* Hemodynamic effects of intracoronary VEGF delivery: Evidence of tachyphylaxis and NO dependence of response [J]. *Am J Physiol*, 1997, 273(3 Pt 2): H1317-H1323.
- [22] 温小慧, 刘学红, 黄诗雅, 等. 加味芍药甘草汤对他莫昔芬诱导的子宫颈肌病小鼠血管生成相关因子的影响 [J]. *中药新药与临床药理*, 2025, 36(4): 515-521.
- [23] Shida T, Nozawa T, Sobajima M, *et al.* Fluvastatin-induced reduction of oxidative stress ameliorates diabetic cardiomyopathy in association with improving coronary microvasculature [J]. *Heart Vessels*, 2014, 29(4): 532-541.
- [24] Guo W, Zhang H P, Yang A N, *et al.* Homocysteine accelerates atherosclerosis by inhibiting scavenger receptor class B member1 via DNMT3b/SP1 pathway [J]. *J Mol Cell Cardiol*, 2020, 138: 34-48.
- [25] Koller A, Szenasi A, Dornyei G, *et al.* Coronary microvascular and cardiac dysfunction due to homocysteine pathometabolism; a complex therapeutic design [J]. *Curr Pharm Des*, 2018, 24(25): 2911-2920.
- [26] Ambreen S, Fatima S, Elwakiel A, *et al.* Hypercoagulability impairs plaque stability in diabetes-induced atherosclerosis [J]. *Nutrients*, 2022, 14(10): 1991.
- [27] 杨庆万, 周松, 陈春兰, 等. 基于代谢组学探索小檗碱对 APC^{min/+}小鼠结直肠腺瘤的作用机制 [J]. *中草药*, 2024, 55(22): 7736-7745.
- [28] Rashid J, Kumar S S, Job K M, *et al.* Therapeutic potential of citrulline as an arginine supplement: A clinical pharmacology review [J]. *Paediatr Drugs*, 2020, 22(3): 279-293.
- [29] Ortiz-Vilchis P, Ortiz-Flores M, Pacheco M, *et al.* The cardioprotective effects of (-)-epicatechin are mediated through arginase activity inhibition in a murine model of ischemia/reperfusion [J]. *Eur J Pharmacol*, 2018, 818: 335-342.
- [30] 曾钰, 闫磊, 刘亚林, 等. 外源脯氨酸对缺硼下棉花幼苗生长、生理特性以及脯氨酸代谢的影响 [J]. *棉花学报*, 2020, 32(3): 258-268.
- [31] Forlani G, Funck D. A specific and sensitive enzymatic assay for the quantitation of L-proline [J]. *Front Plant Sci*, 2020, 11: 582026.
- [32] Romani M, Hofer D C, Katsyuba E, *et al.* Niacin: An old lipid drug in a new NAD⁽⁺⁾ dress [J]. *J Lipid Res*, 2019, 60(4): 741-746.
- [33] 胡小露, 崔树梅, 柯崇榕, 等. 微生物合成 L-脯氨酸和反式-4-羟基-L-脯氨酸的研究进展 [J]. *生物工程学报*, 2022, 38(12): 4498-4519.
- [34] Nikolaidou T, Mamas M, Oceandy D, *et al.* BAS/BSCR6 α -ketoglutarate: Biological effects of a novel biomarker of heart failure [J]. *Heart*, 2010, 96(17): e14.1-e14.14.
- [35] Shi Y, Tian M, Zhao X F, *et al.* α -Ketoglutarate promotes cardiomyocyte proliferation and heart regeneration after myocardial infarction [J]. *Nat Cardiovasc Res*, 2024, 3(9): 1083-1097.
- [36] 伍华燕, 温艺红, 赵亨利, 等. α -酮戊二酸介导异柠檬酸脱氢酶 3A 发挥抑制心肌细胞肥大的作用 [J]. *中山大学学报: 医学科学版*, 2025, 46(2): 275-283.
- [37] Hird F J R, Marginson M A. Formation of ammonia from glutamate by mitochondria [J]. *Nature*, 1964, 201(4925): 1224-1225.
- [38] Golatkar V, Bhatt L K. Artesunate attenuates isoprenaline induced cardiac hypertrophy in rats via SIRT1 inhibiting NF- κ B activation [J]. *Eur J Pharmacol*, 2024, 977: 176709.

[责任编辑 李亚楠]