

DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240008

· 论 著 ·

脂肪因子代谢对冠状动脉微血管功能障碍的影响及麝香通心滴丸的临床应用价值

吴元昊^{1△}, 蔺艳军^{2△}, 傅宏亮³, 孟舒^{2*}

1. 上海交通大学医学院附属新华医院临床医学院, 上海 200029

2. 上海交通大学医学院附属新华医院心内科, 上海 200029

3. 上海交通大学医学院附属新华医院放射科, 上海 200029

[摘要] **目的** 探讨脂肪因子代谢对冠状动脉微血管功能障碍 (MVD) 的影响及麝香通心滴丸 (STDP) 的临床应用价值。**方法** 纳入 2018 年 9 月至 2019 年 12 月上海交通大学医学院附属新华医院心内科收治的 41 例冠心病患者, 分为非 MVD 组 (20 例) 和 MVD 组 (21 例); 29 例 MVD 患者随机分为基础治疗组 (14 例) 和 STDP 组 (15 例), 分别进行为期 3 个月的基础治疗和基础治疗加 STDP 治疗; 分析各组患者主诉、血生物化学指标、血浆炎症因子及脂肪因子水平的变化。采用 12~14 周龄雄性 C57BL/6 小鼠制备心肌缺血再灌注 (IR) 模型, 分为假手术组、IR 组 (生理盐水灌胃) 和 IR+STDP 组 (STDP 灌胃), 每组 5 只, 采用 ELISA 测定血浆炎症因子水平, 通过硫黄素-S 荧光密度法测定心脏组织微血管阻塞情况, 采用蛋白质组学分析探寻 IR 组与 IR+STDP 组间差异表达蛋白质并通过蛋白质印迹法进行验证。**结果** 与非 MVD 组比较, MVD 组血浆瘦素水平增高 [(9.89±2.42) μg/L vs (4.76±1.02) μg/L, $P<0.01$], 脂联素水平下降 [(5.02±1.30) pg/mL vs (7.19±1.76) pg/mL, $P<0.05$], 抵抗素水平升高 [(9.20±2.03) μg/L vs (5.70±1.32) μg/L, $P<0.05$]。Pearson 相关分析显示血浆瘦素水平与微循环阻力呈正相关 ($r=0.82$, $P<0.01$)。ROC 曲线分析结果显示, 根据血浆瘦素水平判断 MVD 的 AUC 值为 0.855, 最佳临界值为 >9.395 μg/L, 灵敏度为 0.714, 特异度为 0.867。MVD 患者治疗 3 个月后, 相较于基础治疗组, STDP 组主诉胸闷、胸痛症状改善率较高 [73.3% (11/15) vs 21.4% (3/14)], 血浆瘦素、IL-6、TNF-α 水平均降低 [(11.36±0.54) μg/L vs (12.12±0.85) μg/L、(3.96±1.76) pg/mL vs (8.65±1.29) pg/mL、(24.82±3.07) ng/mL vs (32.45±3.32) ng/mL, 均 $P<0.05$]。在动物实验中, 与 IR 组相比, IR+STDP 组小鼠 IR 术后无回流量减少 45% ($P<0.01$)、低回流及无回流量减少 23% ($P<0.05$), 血浆 IL-6、TNF-α 水平均下降 [(378.25±19.66) pg/mL vs (457.32±32.01) pg/mL、(289.71±47.62) pg/mL vs (371.28±41.05) pg/mL, 均 $P<0.05$]。蛋白质组学分析结果显示, IR+STDP 组小鼠心脏组织中血管性血友病因子 (vWF)、细胞间黏附分子-1 (ICAM-1) 蛋白质表达水平低于 IR 组, 蛋白质印迹法验证结果亦提示 IR+STDP 组 vWF 及 ICAM-1 蛋白质表达较 IR 组下调 (均 $P<0.01$)。**结论** MVD 患者存在脂肪因子代谢异常, 血浆瘦素水平较高。STDP 治疗可改善 MVD 患者的临床症状, 降低血浆瘦素水平和炎症指标, 机制可能与其抗血小板、抗炎作用有关。

[关键词] 微血管功能障碍; 冠状动脉; 麝香通心滴丸; 瘦素; 脂肪因子代谢; 抗炎

[引用本文] 吴元昊, 蔺艳军, 傅宏亮, 等. 脂肪因子代谢对冠状动脉微血管功能障碍的影响及麝香通心滴丸的临床应用价值[J]. 海军军医大学学报, 2024, 45 (10): 1250-1258. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240008.

Impact of adipokine metabolism on coronary microvascular dysfunction and clinical application value of *Shexiang Tongxin* dropping pills

WU Yuanhao^{1△}, LIN Yanjun^{2△}, FU Hongliang³, MENG Shu^{2*}

1. Clinical Medicine School, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200029, China

2. Department of Cardiology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200029, China

3. Department of Radiology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine, Shanghai 200029, China

[Abstract] **Objective** To explore the impact of adipokine metabolism on coronary microvascular dysfunction (MVD) and the clinical application value of *Shexiang Tongxin* dropping pill (STDP). **Methods** From Sep. 2018 to Dec. 2019, 41 patients with coronary heart disease in Department of Cardiology, Xinhua Hospital Affiliated to Shanghai Jiao Tong University School of Medicine were enrolled and divided into non-MVD group (20 cases) and MVD group (21 cases); 29 MVD patients

[收稿日期] 2024-01-04

[接受日期] 2024-05-07

[作者简介] 吴元昊, 硕士生. E-mail: 1229022134@qq.com; 蔺艳军, 博士生. E-mail: aiyanjun1992@126.com

△共同第一作者 (Co-first authors).

*通信作者 (Corresponding author). Tel: 021-25077300, E-mail: msdoctor@126.com

were randomly divided into basic treatment group (14 cases) and STDP group (15 cases) with basic treatment or additional STDP treatment for 3 months; and the patient's complaints, blood biochemical indicators, expression levels of plasma inflammatory factors and adipokines were analyzed. A myocardial ischemia-reperfusion model was established in male C57BL/6 mice aged 12-14 weeks. Mice were divided into sham operation group, ischemia-reperfusion (IR) group (normal saline gavage), and IR+STDP group (STDP gavage), with 5 mice in each group. The levels of plasma inflammatory factors were measured by enzyme-linked immunosorbent assay, the microvascular occlusion of the heart tissue was measured by thioflavin-S staining, and the differential expression proteins between the IR group and IR+STDP group were explored by proteomics analysis and verified by Western blotting. **Results** Compared with the non-MVD group, the MVD group showed a significant increase in plasma leptin level ($[9.89 \pm 2.42] \mu\text{g/L}$ vs $[4.76 \pm 1.02] \mu\text{g/L}$, $P < 0.01$), a significant decrease in adiponectin level ($[5.02 \pm 1.3] \text{pg/mL}$ vs $[7.19 \pm 1.76] \text{pg/mL}$, $P < 0.05$), and a significant increase in resistin level ($[9.20 \pm 2.03] \mu\text{g/L}$ vs $[5.70 \pm 1.32] \mu\text{g/L}$, $P < 0.05$). Pearson correlation analysis showed a positive correlation between leptin levels and MVD ($r = 0.82$ and $P < 0.01$). Receiver operating characteristic curve analysis showed that the area under curve value of plasma leptin was 0.855 (sensitivity 0.714, specificity 0.867, and optimal cutoff value $> 9.395 \mu\text{g/L}$). After 3 months of treatment, compared with the basic treatment group, the improvement rates of symptoms of chest distress and chest pain in the STDP group were significantly higher ($73.3\% [11/15]$ vs $21.4\% [3/14]$), and the levels of plasma leptin, interleukin-6 (IL-6) and tumor necrosis factor- α (TNF- α) were significantly lower ($[11.36 \pm 0.54] \mu\text{g/L}$ vs $[12.12 \pm 0.85] \mu\text{g/L}$, $[3.96 \pm 1.76] \text{pg/mL}$ vs $[8.65 \pm 1.29] \text{pg/mL}$, $[24.82 \pm 3.07] \text{ng/mL}$ vs $[32.45 \pm 3.32] \text{ng/mL}$, all $P < 0.05$). In animal studies, compared with the IR group, the mice in the IR+STDP group showed a 45% reduction in no-reflow area ($P < 0.01$) and a 23% reduction in low-reflow and no-reflow areas ($P < 0.05$) after myocardial ischemia-reperfusion; the expression levels of IL-6 and TNF- α were significantly decreased ($[378.25 \pm 19.66] \text{pg/mL}$ vs $[457.32 \pm 32.01] \text{pg/mL}$, $[289.71 \pm 47.62] \text{pg/mL}$ vs $[371.28 \pm 41.05] \text{pg/mL}$, both $P < 0.05$). Proteomic analysis showed that the expression levels of von Willebrand factor (vWF) and intercellular cell adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the cardiac tissue of mice in the IR+STDP group were significantly lower than those in the IR group. Western blotting results also showed that the expression levels of vWF and ICAM-1 in the IR+STDP group were significantly lower than those in the IR group (both $P < 0.01$). **Conclusion** MVD patients have abnormal adipokine metabolism and high plasma leptin. STDP can improve clinical symptoms of MVD patients, reduce the plasma leptin level and inflammatory indicators, and the mechanism may be related to its antiplatelet and anti-inflammatory effects.

[Key words] microvascular dysfunction; coronary artery; *Shexiang Tongxin* dropping pills; leptin; adipokine metabolism; anti-inflammation

[Citation] WU Y, LIN Y, FU H, et al. Impact of adipose factors metabolism on coronary microcirculation dysfunction and clinical application value of *Shexiang Tongxin* dropping pills[J]. Acad J Naval Med Univ, 2024, 45(10): 1250-1258. DOI: 10.16781/j.CN31-2187/R.20240008.

冠状动脉微血管功能障碍 (microvascular dysfunction, MVD) 是指在多种致病因素的作用下, 冠状前小动脉和小动脉的结构和/或功能异常所致的劳力性心绞痛或合并心肌缺血客观证据的临床综合征, 其诊治是临床难点和热点^[1-2]。根据常见临床表现, MVD 多见中医学临床证型是心血瘀阻证^[3]。血管周围脂肪组织是一种非常活跃的内分泌组织, 研究发现其通过分泌多种脂肪因子 (包括瘦素和脂联素) 和促炎细胞因子 (如 TNF- α 、IL-1 β 和 IL-6) 参与血管舒缩功能和内皮功能调节, 从而可能参与 MVD 的发生和发展^[4-5]。文献报道麝香通心滴丸 (*Shexiang Tongxin* dropping pill, STDP) 的成分麝香、人参皂苷、丹参、冰片等均有升高脂肪因子脂联素的作用^[6], 且适用于气虚血瘀证患者的临床治疗。由此推测, 具有清开、化浊、活血功能的 STDP 可能通过调节脂肪因子代

谢改善气虚血瘀证 MVD 患者的临床转归, 本研究旨在探讨脂肪因子代谢对 MVD 的影响及 STDP 的临床应用价值和可能机制。

1 资料和方法

1.1 研究对象

1.1.1 临床研究对象 选择 2018 年 9 月至 2019 年 12 月上海交通大学医学院附属新华医院心内科收治的 70 例冠心病患者。纳入标准: (1) 具有典型或不典型胸痛拟行冠状动脉造影的患者; (2) 冠状动脉造影显示冠状动脉狭窄 $< 20\%$; (3) BMI $> 25 \text{ kg/m}^2$ 。排除标准: (1) 年龄 > 80 岁或 < 18 岁; (2) 肝功能受损 [丙氨酸转氨酶 (alanine transaminase, ALT) / 天冬氨酸转氨酶 (aspartate transaminase, AST) 超过正常参考值上限 2 倍]; (3) 肾功能不全者 (血肌酐 $> 20 \text{ mg/L}$);

(4)心力衰竭患者(左心室射血分数 $<50\%$);
(5)癌症患者;(6)精神异常患者;(7)妊娠患者;
(8)近3个月内服用含有STDP成分药物的患者;
(9)近3个月内参加其他临床试验或依从性差的患者。本试验已通过上海交通大学医学院附属新华医院伦理委员会审批(XHEC-C2016-031-2),并在中国临床试验注册中心注册(ChiCTR-IPR-16009785)。

1.1.2 实验动物 12~14周龄雄性C57BL/6小鼠51只,购自上海吉辉实验动物饲养有限公司[实验动物生产许可证号为SCXK(沪)2022-0009],饲养于SPF环境[实验动物使用许可证号为SYXK(沪)2023-0048]。

1.2 临床研究方法

1.2.1 临床数据收集 记录患者的基本信息,包括性别、年龄、有无冠心病易患因素、BMI、陈旧性心肌梗死病史、既往经皮冠状动脉介入治疗史,以及是否服用过血管紧张素转换酶抑制剂(angiotensin converting enzyme inhibitor, ACEI)/血管紧张素II受体阻滞剂(angiotensin II receptor blocker, ARB)、钙离子通道阻滞剂(calcium channel blocker, CCB)、 β 受体阻滞剂和降糖治疗等。

患者于入院后24 h内采集静脉血样保存于生物样本库待检测。使用ELISA法测定血浆IL-6、TNF- α 、IL-1 β 、脂联素、瘦素、抵抗素水平。

患者入院第2天清晨抽静脉血,通过常规方法检测血小板计数和平均血小板体积,采用酶法检测总胆固醇、低密度脂蛋白胆固醇、甘油三酯、高密度脂蛋白胆固醇水平,采用己糖激酶法检测空腹血糖水平,采用化学发光法检测氨基末端脑利钠肽前体,采用生化法检测AST、ALT、血尿素氮、血肌酐水平。

1.2.2 临床分组与干预 经桡动脉途径进行冠状动脉造影,操作过程遵照标准临床程序进行。冠状动脉造影显示冠状动脉狭窄 $<20\%$ 的患者,于第2天行静息+负荷放射性计算机断层扫描(emission computed tomography, ECT)检查。共纳入41例冠心病患者,根据ECT检查有无MVD分为非MVD组和MVD组。

根据随机、对照原则,将ECT诊断为MVD的29例患者分为基础治疗组和STDP组。基础治疗组患者采用基础治疗,即阿司匹林(75~100 mg每

天1次口服)、酒石酸美托洛尔(12~47.5 mg每天1次口服)和瑞舒伐他汀(5~10 mg每晚1次睡前口服)。STDP组患者在基础治疗的基础上加用STDP(每次2丸,每天3次口服)。两组患者可根据胸痛情况酌情含服硝酸甘油,记录含服的次数和剂量。高血压患者和糖尿病患者遵医嘱使用降压药物(ARB、ACEI、CCB等)、降糖药物(口服降糖药或胰岛素注射)。治疗0、3个月时收集基础治疗组及STDP组患者的临床主诉和外周血样,检测其炎症因子、脂肪因子水平。

1.3 动物实验方法 实验动物及动物实验方案由上海交通大学医学院附属新华医院实验动物资源办公室和机构动物护理与使用委员会根据《中国实验动物管理条例》审批通过。

1.3.1 小鼠心肌缺血再灌注(ischemia-reperfusion, IR)模型的制备 在标准条件下适应性喂养1周后,将小鼠随机分为假手术组、IR组、IR+STDP组,每组5只。假手术组、IR组小鼠行生理盐水灌胃7 d, IR+STDP组行STDP生理盐水溶液($70 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$)灌胃7 d,第7天对IR组及IR+STDP组小鼠制备心肌IR模型。采用戊巴比妥钠(50 mg/kg)腹腔注射麻醉小鼠后,经胸骨左侧第四肋间开胸,暴露心脏;以8-0尼龙线穿过左心耳下缘1~2 mm处的2/3心肌层,穿线后在上方放置1条长约1 cm的聚乙烯管,结扎左前降支。实验过程中通过心电图实时监测,以小鼠心肌颜色变白且心电图ST段持续弓背抬高($>1/2 \text{ R波}$)呈单峰曲线作为心肌缺血模型成功标志。结扎15 min后,去除聚乙烯管,撤除结扎线,以心肌恢复红润且ST段下降作为再灌注模型成功标志。假手术组小鼠仅做开胸操作,不结扎,其余操作同IR组。

1.3.2 血浆炎症因子及MVD变化的检测 各组小鼠在IR术后24 h行尾静脉抽血,采用ELISA测定小鼠血浆IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平。通过硫黄素-S荧光密度法测定微血管阻塞情况以观察MVD变化^[7],操作方法如下:麻醉小鼠,打开胸腔,在同一位置重新闭塞冠状动脉后行主动脉插管,并通过2 mL生理盐水冲洗心脏以清除血液;然后注射伊文思蓝染色液(0.1 mL, 5%),伊文思蓝会将非缺血心肌染为蓝色,而非染色区代表危险区域(area at risk);再将荧光染料硫黄素-S(1 mg/mL)推注入左心房,迅速取出心脏,干冰冷冻,横向切成

7~8个部分;最后在紫外线下观察心脏切片,检测有无荧光缺失区域,并使用ImageJ软件获取图像进行轮廓分析。具有硫黄素-S荧光但没有伊文思蓝染色的区域为危险区域,危险区域内荧光减弱或没有荧光的区域为微血管阻塞区域(荧光减弱为低回流区域,无荧光为无回流区域)。

1.3.3 小鼠心脏组织行蛋白质组学分析 对IR组和IR+STDP组各3只小鼠的心脏组织进行蛋白质组学分析,蛋白质组学分析由深圳华大基因股份有限公司完成。提取小鼠心脏组织并溶解获得蛋白质后,使用Bradford分析和SDS-PAGE进行定量和质量控制。在涡旋和低速离心1 min后,以1:20的体积比(酶:底物)进行胰蛋白酶消化。然后将混合物在37℃下孵育4 h,然后进行脱盐和冷冻干燥。根据样品数量,取适量同位素标记相对和绝对定量(isobaric tags for relative and absolute quantification, iTRAQ)标记试剂,等试剂恢复至室温后每管加入50 μ L异丙醇,涡旋后进行低速离心。将肽样品溶解在0.5 mol/L四乙基溴化铵溶液中,并加入相应的iTRAQ标记试剂中,将混合物在室温下静置2 h。使用Shimadzu LC-20AD液相色谱系统分离混合样品,并将20 μ g混合样品加载到Gemini C₁₈柱(5 μ m, 20 cm $\times$ 180 μ m)上进行液相分离。用流动相A(2%乙腈,0.1%甲酸)重构干燥的肽样品,在20 000 $\times$ g离心10 min后收集上清液用于进样。使用Thermo Ultimate 3000超HPLC系统进行分离。样品首先进入捕集柱进行富集和脱盐,然后串联至自填充C₁₈柱(3 μ m, 25 cm $\times$ 75 μ m),使用有效梯度以300 nL/min的流速进行分离。在纳米液体分离结束时,将分离的肽片段直接连接到质谱仪。液相分离的肽段通过纳米电喷雾离子源电离,然后通过Q-Exactive HF X质谱仪(美国ThermoFisher Scientific公司)在数据相关采集模式下检测。使用Mascot 2.3.02软件在NCBI nr数据库、NCBI nr分类数据库、SwissProt/UniProt分类数据库和NCBI nr对应物种数据库中进行搜索。使用蛋白质组学软件Quant进行蛋白质过滤、标记纯度校准、定量值归一化、缺失值完成、蛋白质定量计算、统计分析和最终结果展示。以差异倍数(fold change, FC) $\geq$ 1.2或 $\leq$ 5/6、 $P<0.05$ 为差异表达蛋白质。

1.3.4 蛋白质印迹法检测 取每组5只小鼠的心脏

组织,在RIPA裂解缓冲液中裂解处理。通过SDS-PAGE分离蛋白质提取物(50 μ g),并转移到NC膜,加一抗[β 肌动蛋白抗体(货号AC038)、细胞间黏附因子1(intercellular cell adhesion molecule-1, ICAM-1)抗体(货号A19300)和血管性血友病因子(von Willebrand factor, vWF)抗体(货号A1335)]4℃过夜孵育后,加入二抗(HRP偶联的山羊抗兔IgG,货号AS014)室温孵育1 h。所有抗体均购自美国ABclonal Technology公司,稀释比例均为1:1 000。用ECL试剂处理NC膜后,通过成像系统(LI-COR Biosciences)进行可视化分析。

1.4 统计学处理 使用SPSS 25.0软件进行统计分析。符合正态分布或近似正态分布的计量资料以 $\bar{x}\pm s$ 表示,采用独立样本 t 检验分析。计数资料以例数和百分数表示,采用 χ^2 检验分析。相关性分析采用Pearson相关。采用ROC曲线分析血浆瘦素水平判断MVD的能力。检验水准(α)为0.05。

2 结果

2.1 MVD患者存在血浆脂肪因子水平的变化

2.1.1 基本资料 非MVD组20例、MVD组21例,年龄分别为(60.8 $\pm$ 9.2)岁、(62.6 $\pm$ 7.9)岁。MVD组男性患者占比高于非MVD组($P<0.01$)、血小板计数低于非MVD组($P<0.05$),两组患者的其他临床特征差异均无统计学意义(均 $P>0.05$)。见表1。

2.1.2 患者脂肪因子表达水平及相关性分析 与非MVD组比较,MVD组血浆瘦素水平增高[(9.89 $\pm$ 2.42) μ g/L vs (4.76 $\pm$ 1.02) μ g/L, $P<0.01$]、脂联素水平下降[(5.02 $\pm$ 1.30) pg/mL vs (7.19 $\pm$ 1.76) pg/mL, $P<0.05$]、抵抗素水平升高[(9.20 $\pm$ 2.03) μ g/L vs (5.70 $\pm$ 1.32) μ g/L, $P<0.05$]。根据ECT结果,MVD组患者微循环阻力(血流压力下降百分比)高于非MVD组(27.69 $\pm$ 3.25 vs 35.27 $\pm$ 3.83, $P<0.01$)。Pearson相关分析显示血浆瘦素水平与微循环阻力呈正相关($r=0.82$, $P<0.01$)。ROC曲线分析结果显示,根据血浆瘦素水平判断MVD的AUC值为0.855,最佳临界值为 >9.395 μ g/L,灵敏度为0.714,特异度为0.867(图1)。

2.2 STDP治疗改善MVD患者的预后

2.2.1 基本资料 29例MVD患者中基础治疗组

14 例、STDP 组 15 例, 平均年龄分别为 (62.2±8.5) 岁、(62.7±8.2) 岁, 两组患者的临床特征差异均无统计学意义 (均 $P>0.05$)。见表 2。

表 1 患者基本信息

Tab 1 Basic information of participants

Index	Non-MVD $N=20$	MVD group $N=21$	Statistic	P value
Age/year, $\bar{x}\pm s$	60.8±9.2	62.6±7.9	$t=-0.67$	0.51
Male, n (%)	3 (15.0)	12 (57.1)	$\chi^2=7.84$	<0.01
BMI/($\text{kg}\cdot\text{m}^{-2}$), $\bar{x}\pm s$	23.66±3.05	25.07±4.21	$t=-1.25$	0.22
Platelet/($\text{L}^{-1}\times 10^9$), $\bar{x}\pm s$	226.15±24.88	190.18±49.71	$t=3.00$	0.03
MPV/fL, $\bar{x}\pm s$	8.70±1.49	9.03±1.39	$t=-0.73$	0.47
Triglyceride/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $\bar{x}\pm s$	1.37±0.42	1.62±0.73	$t=-1.41$	0.17
TC/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $\bar{x}\pm s$	4.45±0.69	4.44±0.86	$t=0.04$	0.97
HDL-C/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $\bar{x}\pm s$	1.40±0.35	1.29±0.35	$t=1.09$	0.28
LDL-C/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $\bar{x}\pm s$	2.65±0.47	2.75±0.81	$t=-0.51$	0.61
FBG/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $\bar{x}\pm s$	5.62±0.95	5.59±1.60	$t=0.06$	0.95
BUN/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $\bar{x}\pm s$	5.26±1.84	5.83±1.90	$t=-0.98$	0.33
Creatinine/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), $\bar{x}\pm s$	62.28±19.47	66.91±13.24	$t=-0.89$	0.38
Uric acid/($\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$), $\bar{x}\pm s$	331.39±86.90	325.55±110.35	$t=0.19$	0.85
eGFR/($\text{mL}\cdot\text{min}^{-1}\cdot[1.73\text{ m}^2]^{-1}$), $\bar{x}\pm s$	96.16±24.28	94.86±18.58	$t=0.19$	0.85
ALT/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$), $\bar{x}\pm s$	22.35±11.23	22.50±11.93	$t=-0.04$	0.97
AST/($\text{U}\cdot\text{L}^{-1}$), $\bar{x}\pm s$	22.40±6.72	21.55±5.26	$t=0.46$	0.65
NT-proBNP/($\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$), $\bar{x}\pm s$	54.15±36.85	81.09±59.92	$t=-1.00$	0.33

MVD: Microvascular dysfunction; BMI: Body mass index; MPV: Mean platelet volume; TC: Total cholesterol; HDL-C: High density lipoprotein-cholesterol; LDL-C: Low density lipoprotein-cholesterol; FBG: Fasting blood glucose; BUN: Blood urea nitrogen; eGFR: Estimated glomerular filtration rate; ALT: Alanine transaminase; AST: Aspartate transaminase; NT-proBNP: N -terminal pro-brain natriuretic peptide.

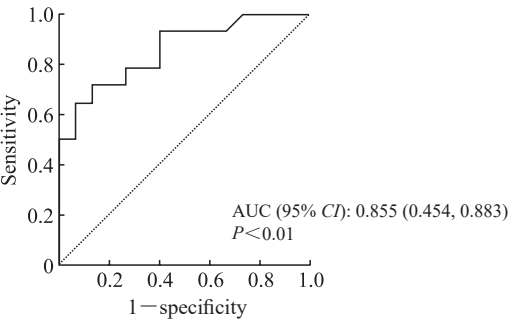


图 1 血浆瘦素水平与 MVD 的 ROC 曲线

Fig 1 ROC curve of plasma leptin and MVD

MVD: Microvascular dysfunction; ROC: Receiver operating characteristic; AUC: Area under curve; CI: Confidence interval.

2.2.2 STDP 治疗下调患者脂肪因子及炎症因子水平 MVD 患者治疗 3 个月后, 基础治疗组 3 例 (21.4%) 患者主诉胸闷、胸痛症状改善, STDP 组 11 例 (73.3%) 患者主诉胸闷、胸痛症状改善, 差异有统计学意义 ($P<0.01$)。ELISA 检测结果 (表 3) 显示, 治疗 3 个月后, 相较于基础治疗组, STDP 组患者血浆脂肪因子瘦素及炎症因子 IL-6、TNF- α 水平均降低 (均 $P<0.05$)。

2.3 STDP 改善心肌 IR 小鼠的微血管阻塞、炎

症及血小板黏附相关指标 与 IR 组相比, IR+STDP 组小鼠 IR 手术后无回流面积减少 45% ($P<0.01$), 低回流及无回流面积减少 23% ($P<0.05$), 微血管阻塞得到改善 (图 2)。相较于假手术组, IR 组小鼠血浆炎症因子 IL-6、TNF- α 、IL-1 β 水平均增高 [(457.32±32.01) pg/mL vs (138.60±17.92) pg/mL、(371.28±41.05) pg/mL vs (134.80±10.01) pg/mL、(336.05±65.67) pg/mL vs (135.20±30.05) pg/mL, 均 $P<0.01$]; 而相较于 IR 组, IR+STDP 组小鼠血浆 IL-6、TNF- α 水平均下降 [(378.25±19.66) pg/mL vs (457.32±32.01) pg/mL、(289.71±47.62) pg/mL vs (371.28±41.05) pg/mL, 均 $P<0.05$]、IL-1 β 水平无明显变化 [(307.24±55.58) pg/mL vs (336.05±65.67) pg/mL, $P>0.05$]。蛋白质组学分析结果 (图 3A~3D) 显示, 与 IR 组相比, IR+STDP 组小鼠心脏组织中 vWF、ICAM-1 表达均降低。蛋白质印迹法验证结果显示, 相较于 IR 组, IR+STDP 组小鼠心脏组织中 vWF 及 ICAM-1 蛋白表达水平均下调 (均 $P<0.01$, 图 3E)。

表 2 不同治疗组 MVD 患者的基本信息

Tab 2 Basic information of MVD patients in different treatment groups				
Index	Basic treatment group N=14	STDP group N=15	Statistic	P value
Age/year, $\bar{x}\pm s$	62.2 $\pm$ 8.5	62.7 $\pm$ 8.2	$t=-0.72$	0.43
Male, n (%)	7 (50.0)	9 (60.0)	$\chi^2=0.29$	0.59
BMI/(kg $\cdot$ m ⁻²), $\bar{x}\pm s$	26.68 $\pm$ 3.44	26.55 $\pm$ 3.09	$t=0.48$	0.64
Platelet/(L ⁻¹ , $\times 10^9$), $\bar{x}\pm s$	195.87 $\pm$ 43.87	178.50 $\pm$ 33.37	$t=0.73$	0.47
MPV/fL, $\bar{x}\pm s$	13.47 $\pm$ 1.76	9.87 $\pm$ 1.40	$t=0.85$	0.41
Triglyceride/(mmol $\cdot$ L ⁻¹), $\bar{x}\pm s$	1.57 $\pm$ 0.74	1.50 $\pm$ 0.78	$t=0.47$	0.65
TC/(mmol $\cdot$ L ⁻¹), $\bar{x}\pm s$	4.45 $\pm$ 0.83	3.89 $\pm$ 0.91	$t=1.79$	0.08
HDL-C/(mmol $\cdot$ L ⁻¹), $\bar{x}\pm s$	1.20 $\pm$ 0.27	1.23 $\pm$ 0.33	$t=-0.25$	0.80
LDL-C/(mmol $\cdot$ L ⁻¹), $\bar{x}\pm s$	2.49 $\pm$ 0.74	2.12 $\pm$ 0.66	$t=1.44$	0.16
FBG/(mmol $\cdot$ L ⁻¹), $\bar{x}\pm s$	6.44 $\pm$ 0.96	6.43 $\pm$ 2.52	$t=0.01$	0.99
BUN/(mmol $\cdot$ L ⁻¹), $\bar{x}\pm s$	6.11 $\pm$ 1.62	5.41 $\pm$ 0.97	$t=1.44$	0.16
Creatinine/(μ mol $\cdot$ L ⁻¹), $\bar{x}\pm s$	61.07 $\pm$ 11.64	69.69 $\pm$ 16.89	$t=-1.43$	0.16
Uric acid/(μ mol $\cdot$ L ⁻¹), $\bar{x}\pm s$	354.80 $\pm$ 85.90	361.49 $\pm$ 87.58	$t=-0.21$	0.83
eGFR/(mL $\cdot$ min ⁻¹ $\cdot$ [1.73 m ²] ⁻¹), $\bar{x}\pm s$	102.82 $\pm$ 34.39	93.28 $\pm$ 19.91	$t=0.94$	0.36
ALT/(U $\cdot$ L ⁻¹), $\bar{x}\pm s$	35.67 $\pm$ 11.16	27.81 $\pm$ 17.73	$t=0.85$	0.40
AST/(U $\cdot$ L ⁻¹), $\bar{x}\pm s$	28.60 $\pm$ 19.56	27.06 $\pm$ 9.84	$t=0.27$	0.79

MVD: Microvascular dysfunction; STDP: *Shexiang Tongxin* dropping pill; BMI: Body mass index; MPV: Mean platelet volume; TC: Total cholesterol; HDL-C: High density lipoprotein-cholesterol; LDL-C: Low density lipoprotein-cholesterol; FBG: Fasting blood glucose; BUN: Blood urea nitrogen; eGFR: Estimated glomerular filtration rate; ALT: Alanine transaminase; AST: Aspartate transaminase.

表 3 STDP 对 MVD 患者血浆脂肪因子及炎症因子水平的影响

Tab 3 Effect of STDP on plasma adipokines and inflammatory factors in MVD patients				
Index	Basic treatment group N=14	STDP group N=15	t value	P value
Resistin 0 month after IR/(μ g $\cdot$ L ⁻¹)	7.88 $\pm$ 0.36	7.70 $\pm$ 0.27	0.71	0.50
Resistin 3 months after IR/(μ g $\cdot$ L ⁻¹)	7.79 $\pm$ 0.34	7.85 $\pm$ 0.48	0.56	0.58
Adiponectin 0 month after IR/(pg $\cdot$ mL ⁻¹)	679.30 $\pm$ 20.33	659.00 $\pm$ 25.68	0.74	0.48
Adiponectin 3 months after IR/(pg $\cdot$ mL ⁻¹)	660.54 $\pm$ 29.53	662.22 $\pm$ 33.96	-0.11	0.91
Leptin 0 month after IR/(μ g $\cdot$ L ⁻¹)	11.94 $\pm$ 0.26	12.28 $\pm$ 0.63	-1.21	0.25
Leptin 3 months after IR/(μ g $\cdot$ L ⁻¹)	12.12 $\pm$ 0.85	11.36 $\pm$ 0.54	-2.21	<0.05
IL-6 0 month after IR/(pg $\cdot$ mL ⁻¹)	4.76 $\pm$ 0.85	5.01 $\pm$ 0.45	-0.45	0.68
IL-6 3 months after IR/(pg $\cdot$ mL ⁻¹)	8.65 $\pm$ 1.29	3.96 $\pm$ 1.76	3.72	<0.05
TNF- α 0 month after IR/(ng $\cdot$ L ⁻¹)	35.08 $\pm$ 5.49	41.10 $\pm$ 7.22	-1.15	0.31
TNF- α 3 months after IR/(ng $\cdot$ L ⁻¹)	32.45 $\pm$ 3.32	24.82 $\pm$ 3.07	2.82	<0.05
IL-1 β 0 month after IR/(pg $\cdot$ mL ⁻¹)	6.01 $\pm$ 3.46	5.42 $\pm$ 1.50	0.62	0.54
IL-1 β 3 months after IR/(pg $\cdot$ mL ⁻¹)	5.08 $\pm$ 0.25	5.98 $\pm$ 3.00	0.98	0.35

STDP: *Shexiang Tongxin* dropping pill; MVD: Microvascular dysfunction; IR: Ischemia-reperfusion; IL-6: Interleukin-6; TNF- α : Tumor necrosis factor- α ; IL-1 β : Interleukin-1 β .

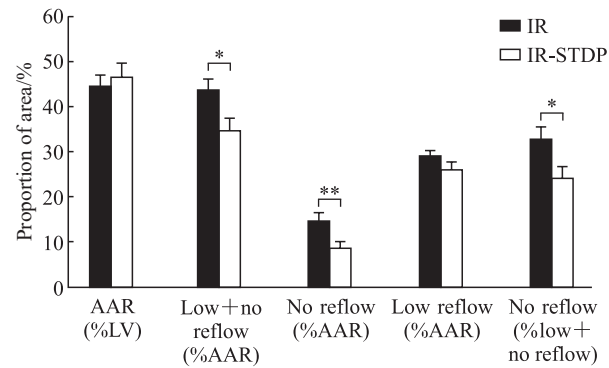


图 2 STDP 对心肌 IR 小鼠微血管阻塞的影响
Fig 2 Effect of STDP on microvascular obstruction in myocardial IR mice
n=5, $\bar{x}\pm s$. STDP: *Shexiang Tongxin* dropping pill; IR: Ischemia-reperfusion; AAR: Area at risk; LV: Left ventricle.

3 讨论

MVD 是临床常见疾病, 目前其诊断简明性和治疗有效性仍欠缺^[8]。2020 年, 欧洲心脏病学会发表声明, 在具有心肌缺血症状但冠状动脉造影显示非阻塞性病变的患者中, MVD 的发生率为 45%~60%^[9]; 一项纳入 202 例射血分数保留的心力衰竭患者的多国多中心前瞻性观察性研究显示, 75% 的患者合并有 MVD^[10]; 而冠状动脉微血管病中医诊疗指南 (2023 年) 提出 MVD 的发生率超过 40%^[3]。目前临床上诊断 MVD 的金标准是使用血管内超声测量冠状动脉血流储备^[11], 典型的

MVD 和微循环栓塞表现出收缩期逆向血流、收缩期前向血流减少、舒张期血流快速减弱等特点^[12]。其他方法诸如 ECT 心肌灌注显像、心脏 MRI 等也

可确诊 MVD^[13-14], 但这些方法的有创性及费用昂贵等特点限制了重复使用。本研究的目的是寻找临床预警指标, 以期协同诊断 MVD 及明确治疗转归。

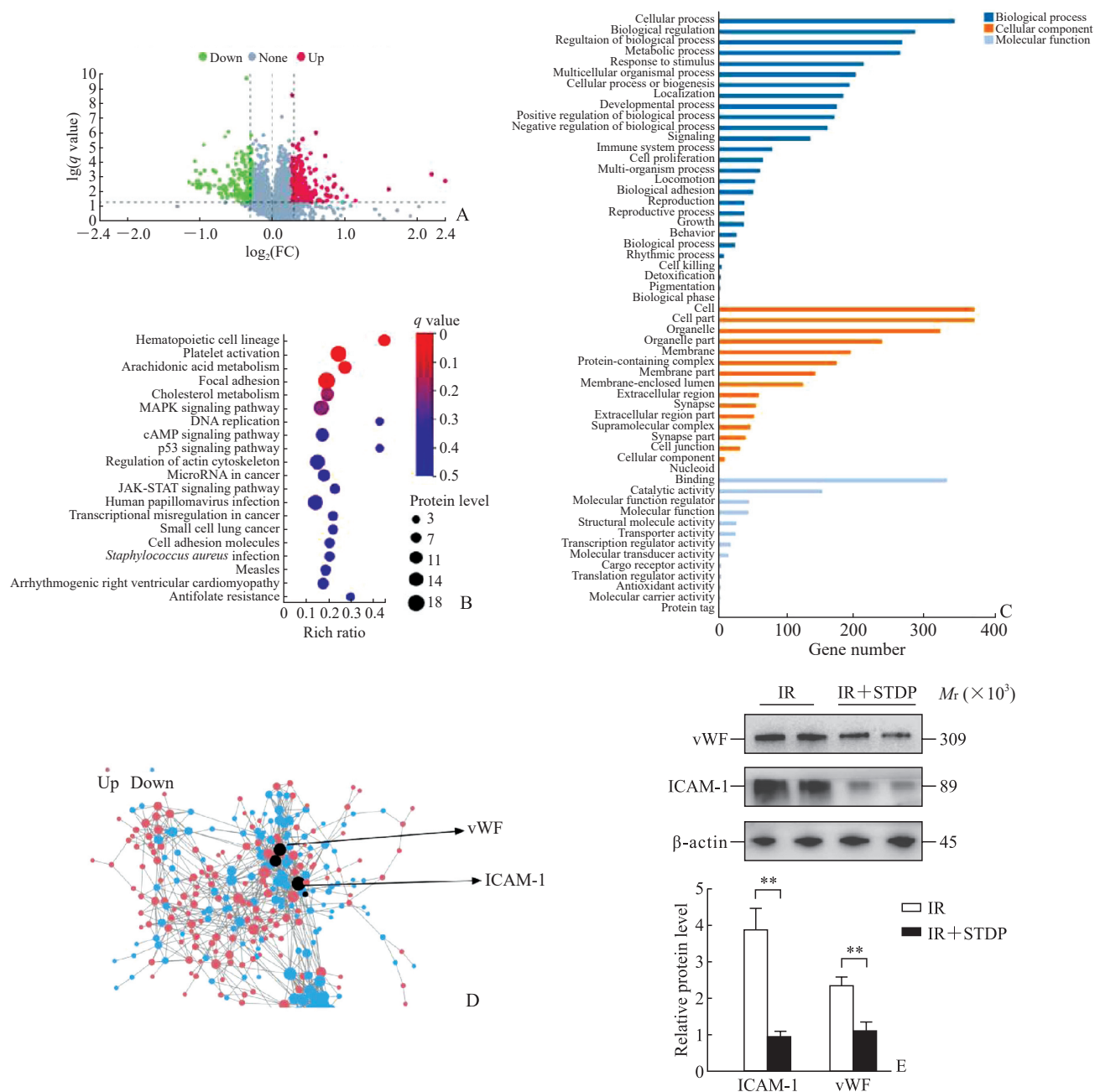


图3 IR 与 IR+STDP 组小鼠心脏组织中差异表达蛋白质分析

Fig 3 Analysis of differentially expressed proteins in heart tissues of mice between IR and IR+STDP groups

A: Statistical analysis of differentially expressed proteins. The IR+STDP group showed significant down-regulation of 190 proteins and up-regulation of 222 proteins. B: KEGG pathway enrichment bubble chart of the differentially expressed proteins. C: GO classification analysis of the differentially expressed proteins. D: Protein-protein interaction network of the differentially expressed proteins. E: Western blotting analysis of vWF and ICAM-1 proteins in mouse cardiac tissue ($n=5$, $\bar{x} \pm s$). IR: Ischemia-reperfusion; STDP: *Shexiang Tongxin* dropping pill; FC: Fold change; MAPK: Mitogen-activated protein kinase; cAMP: Cyclic adenosine monophosphate; JAK: Janus kinase; STAT: Signal transducer and activator of transcription; KEGG: Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes; GO: Gene Ontology; vWF: von Willebrand factor; ICAM-1: Intercellular cell adhesion molecule-1.

脂肪因子由血管周围的棕色脂肪组织分泌,具有调节炎症和内皮功能的作用^[4-5],其可通过促进活性氧产生促进心血管疾病的发生和发展^[15]。本研究结果提示,MVD患者血浆脂肪因子水平存在改变。研究发现瘦素可通过与瘦素受体结合激活PI3K和信号转导及转录激活因子3等多条信号通路,从而刺激不同类型细胞,促进动脉粥样硬化和血栓形成^[16]。已有研究证明高水平的瘦素与血小板聚集、动脉血栓形成及血管生成增强相关^[17-18]。此外,瘦素能调节炎症反应,并诱导血管平滑肌细胞增殖和迁移^[19-20]。鉴于临床获取血液样本的易操作性和经济性,脂肪因子尤其是瘦素有成为临床上预警MVD指标的可行性,但仍需大样本临床研究进一步证实。

近年来,随着中西医结合的迅速发展,MVD的中医疗法日益受到人们的重视。现代中医学者从经络学说入手,从功能结构角度看,认为冠状动脉微循环与中医的络脉相似,心络瘀阻、血行不畅或瘀滞甚或微小癥积(血栓)可类同冠状动脉微循环的结构受损、灌注不足^[21-22]。对其病因病机的分析则认为MVD多因寒、热、郁、痰等各种病因长期作用形成瘀阻心络、久病耗气,或因血瘀阻络不能载气养心,导致本虚标实。结合临床所见,认为气虚血瘀证是最为常见的证型^[23]。传统中药在中国的应用已经有几千年的历史,STDP是被国家药品监督管理局批准用于临床治疗冠心病心绞痛的口服速效纯中药制剂,其由人工麝香、人参茎叶总皂苷、蟾酥、丹参、人工牛黄、熊胆、冰片等组成,能缓解血管痉挛、改善血流动力学,补益心气、活血化瘀,清心解毒、化痰开窍,对疏通血管有很好的治疗作用,临床主要适用于中医辨证为气虚血瘀证,证见胸痛、胸闷、心悸气短、神疲乏力的患者^[24]。研究证实STDP具有保护血管和抗炎^[25-26]、保护缺血心肌^[27]等作用,STDP的主要成分麝香^[28]、人参皂苷^[29]、丹参^[30]、冰片^[6]具有升高血浆脂联素的作用,因此推测STDP及其清开化浊活血功效可能具有改善脂肪因子代谢的作用。本研究中,相较于基础治疗组,STDP治疗3个月后MVD患者主诉胸闷、胸痛等症状减少,血浆IL-6、TNF- α 、瘦素水平降低,说明STDP可能通过抗炎、调节脂肪代谢等途径改善MVD患者的预后,而瘦素水平的降低也可作为MVD临床治

疗有效的评价手段。进一步通过动物实验探讨了STDP的作用机制,结果提示STDP可使心肌IR术后小鼠的MVD改善,血浆炎症因子表达下降,心脏组织中vWF、ICAM-1表达降低。vWF是一种内皮细胞释放的活性物质,主要存在于成熟的内皮细胞Weibel-Palade小体(Weibel-Palade body)内,是目前公认的内皮损伤标志物及血小板与内皮黏膜连接的桥梁,可介导血小板在受损血管内膜或内膜下发生黏附、聚集^[31]。ICAM-1能够介导血液循环中白细胞与血管内皮细胞的黏附,研究发现ICAM-1可参与经皮冠状动脉介入治疗前后的病理学过程,在炎症反应、血管平滑肌细胞迁移和增殖及细胞外基质沉积等方面发挥重要作用^[32]。这说明STDP改善MVD预后的作用是多靶点的,可能与抗炎、抗血小板等相关,而其作用靶细胞可能是血管内皮细胞。

综上所述,MVD患者血浆瘦素水平升高,故瘦素水平下调可用于评价MVD临床治疗有效性。STDP治疗可改善MVD患者的症状,降低血浆瘦素水平和炎症指标,其作用机制与抗炎、抗血小板相关,值得进一步深入研究。

[参考文献]

- [1] 林谦,吴宗贵,张立晶,等.冠状动脉微血管疾病中西医结合诊疗专家共识[J].中西医结合心脑血管病杂志,2022,20(21):3841-3850. DOI: 10.12102/j.issn.1672-1349.2022.21.001.
- [2] ARIBAS E, ELIAS-SMALE S E, DUNCKER D J, et al. Questionnaire survey on cardiologists' view and management of coronary microvascular disease in clinical practice[J]. Neth Heart J, 2019, 27(5): 252-262. DOI: 10.1007/s12471-019-1274-x.
- [3] 中华中医药学会冠状动脉微血管病中医诊疗指南项目组.冠状动脉微血管病中医诊疗指南[J].中医杂志,2023,64(21):2261-2268. DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2023.21.017.
- [4] TAKAOKA M, SUZUKI H, SHIODA S, et al. Endovascular injury induces rapid phenotypic changes in perivascular adipose tissue[J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(8): 1576-1582. DOI: 10.1161/ATVBAHA.110.207175.
- [5] TANAKA K, SATA M. Roles of perivascular adipose tissue in the pathogenesis of atherosclerosis[J]. Front Physiol, 2018, 9: 3. DOI: 10.3389/fphys.2018.00003.
- [6] 李晓雪,杨瑞,包·照日格图,等.药物对脂联素作用的研究进展[J].中华内分泌代谢杂志,2016,32(11): 969-971. DOI: 10.3760/cma.j.issn.1000-6699.2016.11.017.
- [7] DU X. Post-infarct cardiac injury, protection and repair:

- roles of non-cardiomyocyte multicellular and acellular components[J]. *Sci China Life Sci*, 2018, 61(3): 266-276. DOI: 10.1007/s11427-017-9223-x.
- [8] 国家卫生计生委合理用药专家委员会,中国药师协会. 冠心病合理用药指南(第2版)[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2018, 10(6): 1-130. DOI: 10.12037/YXQY.2018.06-01.
- [9] 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. DOI: 10.1093/cvr/cvaa003.
- [10] KNUUTI J, BALLO H, JUAREZ-OROZCO L E, et al. The performance of non-invasive tests to rule-in and rule-out significant coronary artery stenosis in patients with stable angina: a meta-analysis focused on post-test disease probability[J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(35): 3322-3330. DOI: 10.1093/eurheartj/ehy267.
- [11] DEAN J, DELA CRUZ S, MEHTA P K, et al. Coronary microvascular dysfunction: sex-specific risk, diagnosis, and therapy[J]. *Nat Rev Cardiol*, 2015, 12(7): 406-414. DOI: 10.1038/nrcardio.2015.72.
- [12] NICCOLI G, SCALONE G, LERMAN A, et al. Coronary microvascular obstruction in acute myocardial infarction[J]. *Eur Heart J*, 2016, 37(13): 1024-1033. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv484.
- [13] 中华医学会心血管病学分会基础医学学组,中华医学会心血管病学分会介入心脏病学组,中华医学会心血管病学分会女性心脏健康学组,等. 冠状动脉微血管疾病诊断和治疗的中国专家共识[J]. 中国循环杂志, 2017, 32(5): 421-430.
- [14] 中国老年医学学会心血管病分会. 中国多学科微血管疾病诊断与治疗专家共识[J]. 中国循环杂志, 2020, 35(12): 1149-1165. DOI: 10.3969/j.issn.1000-3614.2020.12.001.
- [15] ŚWIĄTKIEWICZ I, WRÓBLEWSKI M, NUSZKIEWICZ J, et al. The role of oxidative stress enhanced by adiposity in cardiometabolic diseases[J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(7): 6382. DOI: 10.3390/ijms24076382.
- [16] WANG H, LUO W, EITZMAN D T. Leptin in thrombosis and atherosclerosis[J]. *Curr Pharm Des*, 2014, 20(4): 641-645. DOI: 10.2174/13816128113199990015.
- [17] BIGALKE B, STELLOS K, GEISLER T, et al. High plasma levels of adipocytokines are associated with platelet activation in patients with coronary artery disease[J]. *Platelets*, 2010, 21(1): 11-19. DOI: 10.3109/09537100903377584.
- [18] SIERRA-HONIGMANN M R, NATH A K, MURAKAMI C, et al. Biological action of leptin as an angiogenic factor[J]. *Science*, 1998, 281(5383): 1683-1686. DOI: 10.1126/science.281.5383.1683.
- [19] LORD G M, MATARESE G, HOWARD J K, et al. Leptin modulates the T-cell immune response and reverses starvation-induced immunosuppression[J]. *Nature*, 1998, 394(6696): 897-901. DOI: 10.1038/29795.
- [20] SHAMSUZZAMAN A S, WINNICKI M, WOLK R, et al. Independent association between plasma leptin and C-reactive protein in healthy humans[J]. *Circulation*, 2004, 109(18): 2181-2185. DOI: 10.1161/01.CIR.0000127960.28627.75.
- [21] 史载祥. 冠脉微循环障碍及中西医结合治疗[J]. 中日友好医院学报, 2005, 19(6): 362-364.
- [22] 玄进. 冠脉微循环的病理生理及中西医结合治疗[J]. 实用中医内科杂志, 2012, 26(3): 90-91. DOI: 10.3969/j.issn.1671-7813.2012.03.55.
- [23] 曹迎. 冠脉微循环功能障碍及气虚络阻[D]. 北京: 北京中医药大学, 2007.
- [24] LIANG C S. Sympatholysis and cardiac sympathetic nerve function in the treatment of congestive heart failure[J]. *J Am Coll Cardiol*, 2003, 42(3): 549-551. DOI: 10.1016/s0735-1097(03)00643-0.
- [25] XIONG M Q, JIA C L, CUI J G, et al. Anti-atherosclerotic effects of bear bile powder in *Shexiang Tongxin* dripping pill: a mechanism study[J]. *Chin J Integr Tradit West Med*, 2015, 35(9): 1083-1089.
- [26] XIONG M, JIA C, CUI J, et al. *Shexiang Tongxin* dropping pill attenuates atherosclerotic lesions in ApoE deficient mouse model[J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 159: 84-92. DOI: 10.1016/j.jep.2014.11.013.
- [27] LIN S, LIN J M, ZHANG L, et al. *Shexiang Tongxin* dropping pill protects against Na₂S₂O₄-induced hypoxia-reoxygenation injury in H9C2 cells[J]. *Chin J Integr Med*, 2019, 25(6): 439-445. DOI: 10.1007/s11655-018-2976-4.
- [28] 刘士平. 麝香保心丸治疗老年冠心病心绞痛的疗效及对患者血清脂联素及丙二醛水平的影响[J]. 黑龙江医药, 2016, 29(6): 1122-1123. DOI: 10.14035/j.cnki.hljyy.2016.06.038.
- [29] 尚文斌, 郭超, 于希忠, 等. 人参皂苷Rb1与小檗碱配伍对糖尿病小鼠糖脂代谢的影响[J]. 时珍国医国药, 2015, 26(3): 518-521. DOI: 10.3969/j.issn.1008-0805.2015.03.003.
- [30] 张桢. 复方丹参滴丸对早期糖尿病肾病患者血清脂联素、TNF-α、IL-6的影响[J]. 中医临床研究, 2014, 6(9): 5-6. DOI: 10.3969/j.issn.1674-7860.2014.09.002.
- [31] BIGUZZI E, SIBONI S M, CESSIE S L, et al. Increasing levels of von Willebrand factor and factor VIII with age in patients affected by von Willebrand disease: reply from original authors Biguzzi et al[J]. *J Thromb Haemost*, 2021, 19(1): 310. DOI: 10.1111/jth.15150.
- [32] 肖奇贵, 王铮, 杨勤玲, 等. 肝癌切除术前患者血清sP-selectin, sICAM-1水平变化及其临床意义[J]. 分子诊断与治疗杂志, 2020, 12(9): 1208-1212. DOI: 10.3969/j.issn.1674-6929.2020.09.020.