

宗永辉, 李欣欣, 张宁, 等. 通心络对小鼠钙化性主动脉瓣膜病早期病变的影响研究 [J]. 中国比较医学杂志, 2022, 32(1): 82-88, 140.

Zong YH, Li XX, Zhang N, et al. Effect of Tongxinluo on early lesions of calcified aortic valve disease in mice [J]. Chin J Comp Med, 2022, 32(1): 82-88, 140.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2022.01.011

通心络对小鼠钙化性主动脉瓣膜病早期病变的影响研究

宗永辉^{1,2}, 李欣欣², 张宁², 陈云³, 刘新灿^{3*}

(1.濮阳市油田总医院, 河南 濮阳 457000; 2.河南中医药大学, 郑州 450000;
3.河南中医药大学第一附属医院, 郑州 450000)

【摘要】 目的 观察在钙化性主动脉瓣膜病早期进行通心络干预能否延缓其进展。方法 小鼠造模1周后通过随机区组法分成5组, 分别为: 假手术组、模型组、通心络大剂量组、通心络中剂量组、通心络小剂量组, 通心络干预6周后行多普勒超声检测主动脉瓣峰值流速变化; 检测血清髓过氧化物酶(MPO)活力和总胆固醇(TC)的浓度; 病理学观察主动脉瓣膜组织病理变化和钙盐沉积情况; 免疫组化染色检测瓣膜小叶内巨噬细胞浸润, 瓣膜间质细胞分化为肌成纤维细胞和成骨细胞的情况。**结果** 通心络干预6周后, 与模型组相比能够显著降低主动脉瓣膜的峰值流速($P<0.05$), 并且能够显著降低血清总胆固醇水平和血清MPO活力($P<0.01$); 与通心络干预各组相比, 模型组主动脉瓣小叶厚度明显增加($P<0.05$)并表现出钙盐沉积; 免疫组化结果显示: 与模型组比, 通心络干预各组巨噬细胞募集减少, α -SMA和OPN阳性细胞表达降低。**结论** 在钙化性主动脉瓣膜病早期通心络能够通过降低血清TC浓度, 抑制炎性巨噬细胞的浸润和降低MPO活性减少病变内氧化应激, 进而影响瓣膜间质细胞向肌成纤维细胞和成骨细胞分化, 延缓瓣膜钙化的进展。

【关键词】 钙化性主动脉瓣膜病; 炎症; 通心络; 小鼠

【中图分类号】 R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2022) 01-0082-07

Effect of Tongxinluo on early lesions of calcified aortic valve disease in mice

ZONG Yonghui^{1,2}, LI Xinxin², ZHANG Ning², CHEN Yun³, LIU Xincan^{3*}

(1. Puyang Oilfield General Hospital, Puyang 457000, China. 2. Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000. 3. the First Affiliated Hospital of Henan University of Traditional Chinese Medicine, Zhengzhou 450000)

【Abstract】 **Objective** To observe whether Tongxinluo treatment delays progression of calcified aortic valve disease in the early stage. **Methods** One week after modeling, the mice were randomly divided into five groups; sham operation, model, Tongxinluo high-dose, Tongxinluo medium-dose and Tongxinluo low-dose groups. Changes in aortic valve peak velocity were assessed by Doppler ultrasound after Tongxinluo treatment for 6 weeks. The activity of serum myeloperoxidase (MPO) and the concentration of total cholesterol (TC) were measured. Pathological changes and calcium

【基金项目】 河南省中医药科学研究重点专项(2017ZY1013); 河南省中医管理局国家中医临床研究基地科研重点专项(2018JDZX008)。

【作者简介】 宗永辉(1992—), 男, 硕士研究生, 研究方向: 心血管疾病防治及介入医学研究。E-mail: zongyonghui101@163.com

【通信作者】 刘新灿(1965—), 男, 博士, 主任医师, 教授, 硕士生导师, 研究方向: 心血管疾病防治及介入医学研究。

E-mail: liuxincan103@163.com

deposition were observed in the aortic valve. Infiltration of macrophages and differentiation of valve stromal cells into myofibroblasts and osteoblasts were examined by immunohistochemical staining. **Results** After 6 weeks of treatment, compared with the model group, Tongxinluo significantly reduced the peak flow velocity of the aortic valve ($P < 0.05$), the serum level of total cholesterol, and the activity of serum MPO ($P < 0.01$). Compared with the Tongxinluo intervention group, the leaflet thickness of the aortic valve was significantly increased in the model group ($P < 0.05$) and showed calcium salt deposition. Immunohistochemistry showed that, compared with the model group, macrophage recruitment was decreased, expression of α -SMA and OPN-positive cells were decreased in the Tongxinluo intervention group. **Conclusions** In the early stage of calcified aortic valve disease, Tongxinluo reduces oxidative stress by reducing the concentrations of serum TC, inhibiting infiltration of inflammatory macrophages, reducing MPO activity, and then affects the differentiation of valve stromal cells into myofibroblasts and osteoblasts to delay the progression of valvular calcification.

【Keywords】 calcified aortic valve disease; inflammation; Tongxinluo; mice

钙化性主动脉瓣膜病 (calcified aortic valve disease, CAVD) 又称为“退行性”主动脉瓣膜病,是目前引起主动脉狭窄的最常见原因。由于 CAVD 的发生呈现出时间依赖性和被动性的钙沉积,以往很长一段时间被认为是一种退行性病变。随着对瓣膜组织病理学和流行病学研究的深入,发现其是一种类似于动脉粥样硬化的主动进展性疾病。首先越来越多的证据显示 CAVD 具有与动脉粥样硬化相同的病理特点:脂质在内皮下的大量堆积,炎症细胞的浸润,内皮功能障碍以及钙化等;其次是在流行病学发现二者之间具有多种危险因素的重叠,包括:年龄、吸烟、高血压、糖尿病、高脂血症和肾功能不全等^[1-2]。这些观察结果表明,CAVD 发病机制可能与动脉粥样硬化的早期机制相似,同样也有被防治的可能。通心络具有多效性作用,是动脉粥样硬化疾病治疗中常用的中成药。研究表明通心络通过剂量依赖型作用在降血脂,抗氧化和抗炎以及调节内皮功能障碍等方面与他汀类药物药理作用相当^[3-4]。基于 CAVD 早期发病机制与动脉粥样硬化相似,本研究拟通过导丝损伤瓣膜内皮机制建立 CAVD 动物模型^[5-7],在早期阶段进行中药通心络超微粉干预,尝试探讨通心络对 CAVD 早期阶段脂质、炎症、氧化应激等方面的影响,观察是否能够延缓 CAVD 的进展。

1 材料和方法

1.1 实验动物

选取 50 只 10 周龄 SPF 级雄性 C57BL/6J 小鼠,体重 25~28 g,购自郑州市惠济区华兴实验动物养殖场[SCXK(豫)2019-0002]。小鼠饲养于河南中医药大学一附院动物实验研究中心动物房[SYXK(豫)2017-0001],室内环境清洁,室温恒定

(22±2)℃,12 h 为明/暗周期,并随意接受食物和饮用水。动物实验研究方案已经过河南中医药大学第一附属医院动物实验中心伦理委员会的审查和批准(YFYDW2019039),实验研究过程中对实验鼠严格遵守 3R 原则。

1.2 主要试剂与仪器

总胆固醇(TC)含量检测液(BC1980, Elabscience);苏木素伊红(HE)染色液(G1120, Solarbio);髓过氧化物酶检测液(SEKM-0118, Elabscience);钙盐染色液(改良茜素红 S 法,G3280, Solarbio);anti-CD68 单克隆抗体(K200071 M, Solarbio);anti-ACTA2 单克隆抗体(K200017 M, Solarbio);anti-OPN 单克隆抗体(ABclonal);anti-NOS3 多克隆抗体(K009697P, Solarbio)。通心络超微粉剂,主要成分:人参、水蛭、全蝎、赤芍、蝉蜕、土鳖虫、蜈蚣、檀香、降香、乳香(制)、酸枣仁(炒)、冰片,均购自以岭药业。

1.3 方法

1.3.1 模型建立

10~12 周龄雄性 C57BL/6J(野生型)小鼠,体重 25~28 g,抽取适量 1.25%阿佛丁以 0.2 mL/10 g 剂量麻醉;待小鼠充分麻醉后,用脱毛膏清除颈部及胸前区(主要为左侧心前区)毛发,然后固定于鼠板上;持手术剪纵向剪开颈前皮肤,然后持无齿镊子和止血钳钝性分离出右颈动脉,并使其充分暴露;预留 2~3 根结扎线,结扎远端颈动脉;右手持穿刺针先 45°进针后平行血管向前推进一段距离,固定穿刺针外鞘后拔出针芯;将雅培直导丝(HI-TORQUE 0.014'')沿穿刺鞘管在超声引导下缓慢送入主动脉瓣膜处,前后移动 50 次后再以每秒 2 次的速度旋转 100 次。结束后退出导丝立即对主动脉瓣处行多普勒超声检测,确定是否反流。然后进行

近段结扎,在伤口处滴洒 2 滴抗生素预防感染。假手术组模型的建立,同样是钝性分离右颈动脉,送入导丝但不进入主动脉瓣膜处,其余操作方法相同。

1.3.2 实验分组和给药

建立模型 1 周后将所有动物行彩超多普勒检测主动脉流速检测,除假手术组(8 只)外把主动脉流速相对增加值(上下差值 $<10\%$)相近的组成一组,再在进行随机分配成 4 组分别为:模型组(12 只)、通心络大剂量组(10 只)、通心络中剂量组(10 只)、通心络小剂量组(10 只)。根据 973 项目关于通心络药物药效试验的配置和剂量规定:依据动物数量将通心络超微粉溶于纯水中配制成大中小剂量(中剂量为临床等效剂量)分别为 1.5、0.75、0.38 g/kg,每天灌胃 1 次。

1.3.3 多普勒超声心动图检测

M 型超声心动图和彩色多普勒超声分别检测左室心功能和主动脉瓣狭窄情况。M 模式下在胸骨旁长轴切面测量左室射血分数。壁厚测量采用胸骨旁长轴 M 型和短轴 M 型。彩色多普勒模式在胸骨旁长轴和胸骨上切面对主动脉瓣峰值流速及反流进行成像,超声探头角度校正范围为 $40^{\circ}\sim 50^{\circ}$ 。峰值流速较基线增加 $15\%\sim 50\%$ 定义为轻度狭窄, $50\%\sim 75\%$ 定义为中度狭窄, $>75\%$ 定义为重度主动脉瓣狭窄。整个操作过程有 1 人独自完成,减少个体间差异性;所有操作方法和检测结果都在超声科老师指导下完成。

1.3.4 血清指标检测

取材后采用腹主动脉采血法收集血液,将采集血样室温静置 2 h,然后放入离心机以 3500 r/min 离心 10 min 后分离血清备用,采用比色法检测血清髓过氧化物酶(MPO)活力和总胆固醇(TC)的浓度。

1.3.5 主动脉瓣瓣叶厚度和钙盐沉积情况检测

取新鲜主动脉瓣组织,10%中性福尔马林固定,乙醇梯度脱水,石蜡包埋。用组织切片机切 3 和 5 μm 超薄石蜡切片,分别进行 HE 染色和茜素红钙盐

染色观察主动脉瓣形态变化和钙盐沉积情况。

1.3.6 免疫组化检测分析

取脱水包埋后主动脉瓣组织,切 3 μm 超薄石蜡切片,免疫组化 SP 法检测各组标本中巨噬细胞, α -SMA 和 OPN 阳性细胞表达情况。采用 Image J 图像软件分析切片的阳性染色面积(平均光密度值表示)。

1.4 统计学方法

实验结果采用 SPSS 19.0 进行统计学分析,计量资料采用平均数 \pm 标准差($\bar{x}\pm s$),若数据方差齐且符合正态分布,采用单因素方差分析,当数据不是正态分布或方差不相等时,采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。 $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 多普勒超声心动图检测结果

通心络灌胃 6 周后对各组主动脉峰值流速进行多普勒超声检测。与假手术组比较,其它各组主动脉瓣峰值流速明显增加,其中模型组增加最为显著;与模型组相比,经通心络干预后主动脉瓣峰值流速明显降低,而通心络 1.5 g/kg 组降低最多,如表 1 所示。

2.2 血清指标检测

通心络超微粉灌胃 6 周后,检测各实验组血清中总胆固醇和髓过氧化物酶的水平,结果显示:通心络各组血清总胆固醇含量较假手术组、模型组明显降低($P<0.05$),表明通心络在降低胆固醇方面效果显著;髓过氧化物酶作为氧化应激的来源,以此检测实验各组氧化应激水平。与假手术相比,其它实验组 MPO 活力明显升高($P<0.05$),但通心络干预各组较模型组 MPO 活力显著下降($P<0.05$),如表 2 所示。

2.3 各组主动脉瓣 HE 和茜素红钙盐染色

通过 HE 和茜素红钙盐染色分别观察主动脉瓣小叶的形态变化和钙盐沉积情况,如图 1、表 3 所示。HE 染色结果显示,与假手术组相比,其它实验各组主动脉瓣小叶海绵层内部结构紊乱,有不同程

表 1 通心络干预 6 周后主动脉流速检测值($\bar{x}\pm s, n=8$)

Table 1 Aortic flow velocity after 6 weeks of Tongxinluo intervention

组别 Groups	假手术组 Sham group	模型组 Model group	通心络 1.5 g/kg Tongxinluo 1.5 g/kg	通心络 0.75 g/kg Tongxinluo 0.75 g/kg	通心络 0.38 g/kg Tongxinluo 0.38 g/kg
主动脉流速(m/s) AV Peak velocity	589.77 \pm 25.90	1024.98 \pm 81.67*	788.36 \pm 48.05**	848.68 \pm 54.20**	949.73 \pm 32.61** Δ

注:与假手术组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$;与通心络 1.5 g/kg 相比, $\Delta P<0.05$ 。

Note. Compared with sham operation group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with Tongxinluo 1.5 g/kg, $\Delta P<0.05$.

表 2 血清胆固醇和髓过氧化物酶的变化($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 2 Changes of serum cholesterol and myeloperoxidase

组别 Groups	假手术组 Sham group	模型组 Model group	通心络 1.5 g/kg Tongxinluo 1.5 g/kg	通心络 0.75 g/kg Tongxinluo 0.75 g/kg	通心络 0.38 g/kg Tongxinluo 0.38 g/kg
总胆固醇(mmol/L) TC	2.43±0.34	2.24±0.26	1.61±0.11 ^{**}	1.65±0.21 ^{**}	1.86±0.18 ^{**}
髓过氧化物酶(U/L) MPO	47.44±14.50	453.40±63.83 [*]	116.30±28.74 ^{**}	166.22±29.81 ^{**}	208.46±35.21 ^{**△}

注:与假手术组相比, * $P<0.05$;与模型组相比, # $P<0.05$;与通心络 1.5 g/kg 相比, $\Delta P<0.05$ 。

Note. Compared with sham operation group, * $P<0.05$. Compared with the model group, # $P<0.05$. Compared with Tongxinluo 1.5 g/kg, $\Delta P<0.05$.

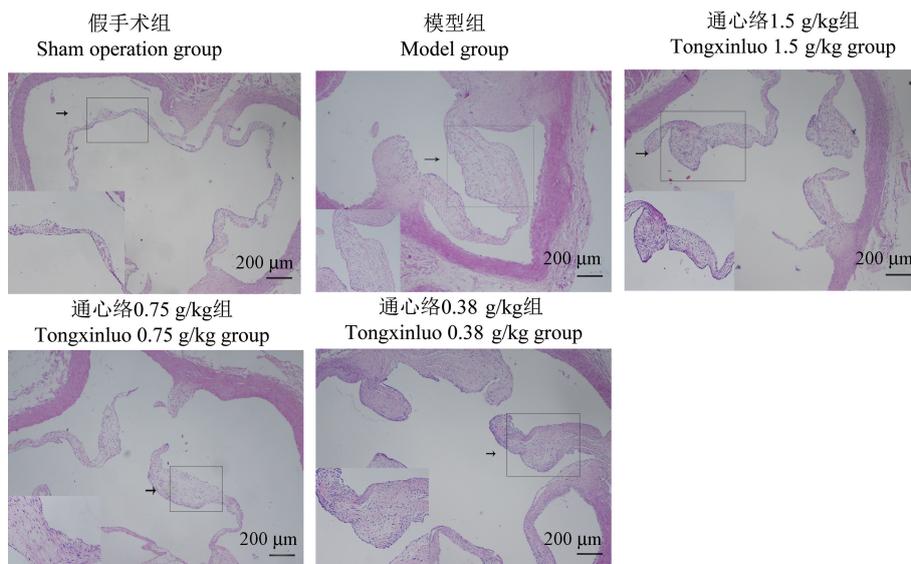


图 1 各组主动脉瓣小叶 HE 染色

Figure 1 HE staining of aortic valve leaflets in each group

表 3 主动脉瓣小叶厚度比较($\bar{x}\pm s, n=8$)
Table 3 Comparison of aortic leaflet thickness

组别 Groups	假手术组 Sham group	模型组 Model group	通心络 1.5 g/kg Tongxinluo 1.5 g/kg	通心络 0.75 g/kg Tongxinluo 0.75 g/kg	通心络 0.38 g/kg Tongxinluo 0.38 g/kg
主动脉瓣叶厚度(μm) Aortic leaflet thickness	23.55±2.11	58.24±2.40 [*]	37.72±1.67 ^{**}	40.87±1.58 ^{**}	42.04±1.45 ^{**}

注:与假手术组相比, * $P<0.01$;与模型组相比, # $P<0.01$ 。

Note. Compared with sham operation group, * $P<0.01$. Compared with model group, # $P<0.01$.

度的胶原纤维增($P<0.05$),其中模型组增厚较为明显,通心络干预各组随着剂量的增加,主动脉瓣增厚和分化程度逐渐减少。

茜素红钙盐染色结果显示,如图 2 所示,模型组出现少量钙盐沉积,通心络干预各组均未出现。

2.4 免疫组化检测分析

CD68 抗体主要用于检测瓣膜病变部位炎性巨噬细胞浸润情况;如图 3 所示,巨噬细胞主要分布在主动脉瓣根部和病变部位瓣膜内皮细胞下;与假手术组比,各实验组巨噬细胞阳性率均增加,模型组最为显著;与模型组相比,通心络干预各组其阳性细胞占比均明显减少;通心络干预各组随着剂量增加,瓣膜

内巨噬细胞阳性率逐渐减少,但差异不显著。

ACTA2 单克隆抗体标记的平滑肌肌动蛋白(α -SMA)主要检测瓣膜肌成纤维的分布;如图 4 所示,假手术组中几乎未表达 α -SMA,模型组中阳性细胞分布向内皮下层延伸,并且阳性细胞分布面积均高于其他各组;通心络干预各组阳性细胞分布面积较模型组减少但高于假手术组。

骨桥蛋白(OPN)抗体染色阳性细胞主要分布在瓣膜病变部位,在所有各组中模型组阳性率最高,通心络干预各组有少量阳性细胞,但明显少于模型组,假手术组仅有极少量阳性细胞,如图 5 所示。

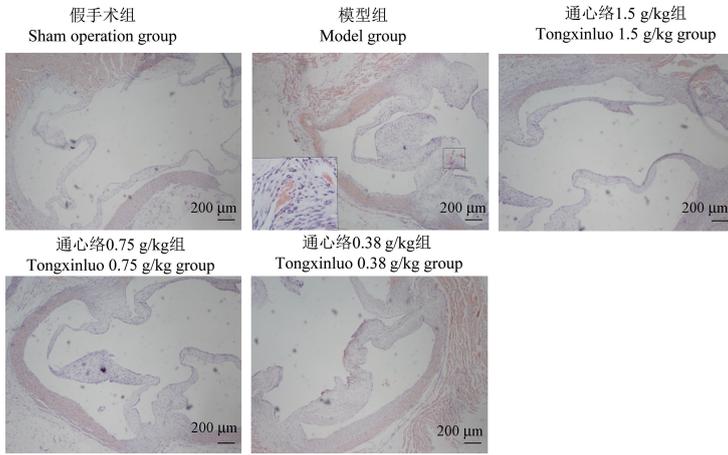
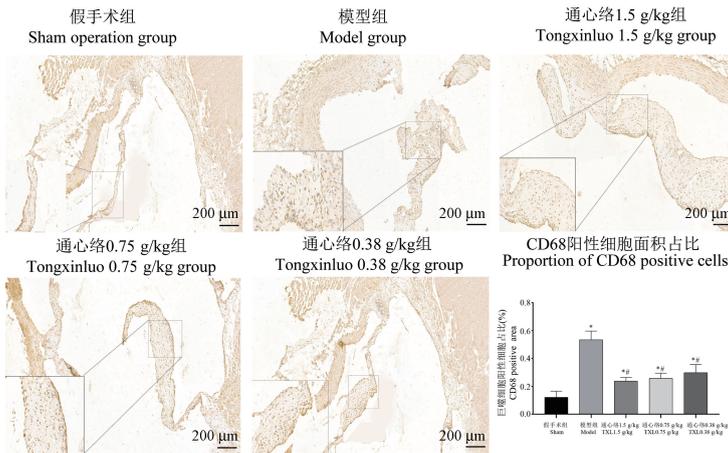


图 2 各组主动脉瓣小叶茜素红钙盐染色

Figure 2 Alizarin red calcium salt staining of aortic leaflets in each group

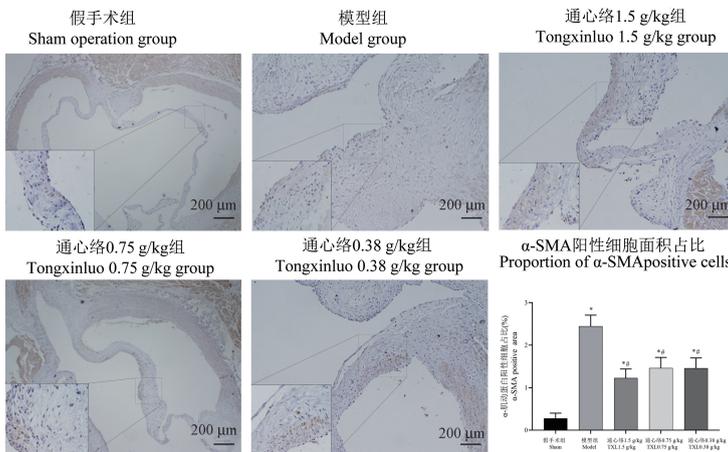


注:与假手术组相比, * $P < 0.05$;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 3 主动脉瓣内巨噬细胞免疫组化 DAB 染色

Note. Compared with sham operation group, * $P < 0.05$. Compared with model group, # $P < 0.05$.

Figure 3 Immunohistochemical DAB staining of macrophages in aortic valve

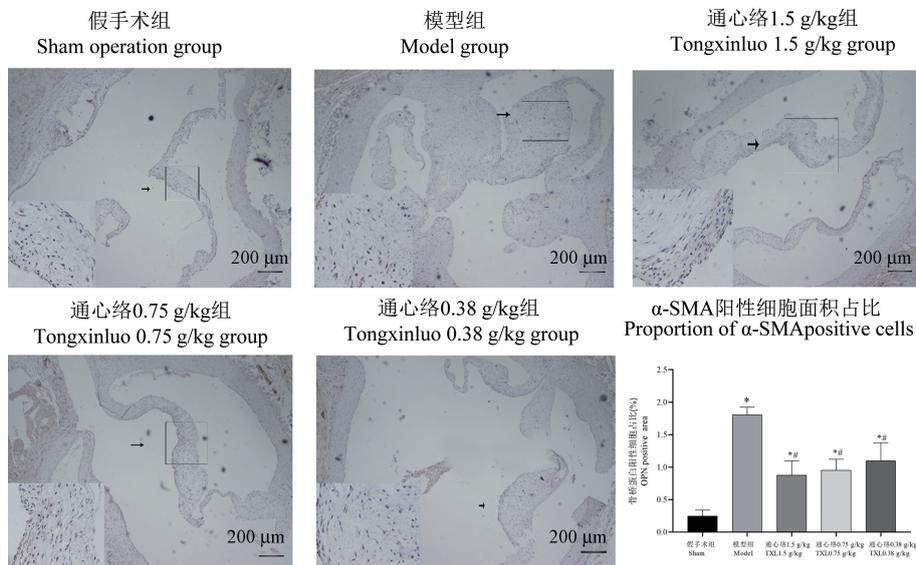


注:与假手术组相比, * $P < 0.01$;与模型组相比, # $P < 0.01$ 。

图 4 主动脉瓣内 α-SMA 免疫组化 DAB 染色

Note. Compared with sham operation group, * $P < 0.01$. Compared with model group, # $P < 0.01$.

Figure 4 Immunohistochemical DAB staining of α-SMA in aortic valve



注:与假手术组相比, * $P < 0.01$;与模型组相比, # $P < 0.01$ 。

图 5 主动脉瓣内 OPN 免疫组化 DAB 染色

Note. Compared with sham operation group, * $P < 0.01$. Compared with model group, # $P < 0.01$.

Figure 5 Immunohistochemical DAB staining of OPN in aortic valve

3 讨论

CAVD 是一个慢性演变过程,涉及遗传易感性、内皮切应力、慢性炎症、脂质沉积和瓣膜钙化,并以进行性纤维化组织重塑和矿化为特征^[8-9]。在初期阶段由于机械和(振荡)剪切应力会诱发瓣膜内皮细胞层(VEC)的内皮功能障碍,从而导致脂蛋白在内皮下的沉积并引起炎症细胞浸润^[10-11]。基于CAVD与动脉硬化性疾病早期发病机制的相似性,他汀类药物也被应用于CAVD中,非常可惜的是在多个大型临床研究中证实是不能减缓钙化性瓣膜病的进展^[12-13],原因可能是干预时已经进展到钙化不可逆阶段。近年来有研究发现在CAVD的早期进行他汀药物的干预能够延缓疾病的进程^[14],而且在疾病早期阶段能够有效延缓病程进展这一假设在其他动物实验已经被验证。本实验研究通过超声引导下导丝损伤瓣膜内皮细胞,并在早期阶段使用通心络药物干预CAVD动物模型发现:通心络能够通过抑制炎性巨噬细胞的产生,减少超氧化物的氧化应激以及抑制瓣膜骨化的信号通路中主要蛋白的表达;实验证实通心络能够在早期对CAVD的钙化具有延缓作用。

通心络作为心血管疾病中最常用的中成药已在临床实践中用于治疗心绞痛患者十多年了^[15],其主要成分包括人参、赤芍、冰片和酸枣仁等。正是

因为由多味草药合制而成,导致提取物中多种化合物的累积或协同作用,这也是为什么通心络具有包括改进内皮功能、降脂、抗氧化、血管舒张、抗血栓、抗炎、抗凋亡和增强血管生成等多效性作用的原因^[16-17]。例如,通心络药物中的人参,其主要成分为人参皂甙。据报道,人参皂苷 Rb1 可有效阻断高半胱氨酸诱导的猪冠状动脉内皮功能障碍,超氧阴离子产生和内皮一氧化氮合酶下调^[18];人参皂甙 Rb2 能够降低经高脂培养基中 3T3-L1 脂肪细胞的 TC 和 TG 的水平^[19]。研究发现,赤芍同样具有抗氧化、血管舒张、抗血小板、降脂和抗炎能力^[20-21]。此外,酸枣仁也具有提升免疫力和降脂的作用。

目前研究表明瓣膜内皮细胞的破坏是CAVD形成的首要因素^[22-23]。同动脉粥样硬化一样,CAVD的触发事件是机械应力增加和剪切应力减少引起的内皮损伤。剪应力改变后的内皮损伤允许脂质的浸润,尤其是LDL和脂蛋白-a(Lp-a),开始将炎症细胞招募到瓣膜中。在手术切除的钙化主动脉瓣中发现炎症浸润主要是有巨噬细胞、肥大细胞、CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞组成^[24]。这些炎症是先天免疫的主要反应,发生在内皮细胞受损后,伴随着炎症的激活和脂质沉积。先天性免疫反应及其它细胞和体液反应都牵涉到这一过程。作为对外来生物体、细胞残骸或物理刺激物引起的损伤的反应,先天免疫系统代表了对外部或内部触发的

第一反应,并启动了组织再生的过程。一旦炎症过程被触发,它将沿着一定的过程进行,直到炎症刺激被根除,愈合机制可以开始。然而,如果炎症源不能被消除,炎症将会进展,随着时间的推移强度不同^[25]。CAVD 中的先天性免疫反应最初是由几种氧化类脂物质通过 toll 样受体和 NF- κ B 途径引起的。VICs 表达 TLRs,已知在炎症和抗原特异性适应性免疫反应的启动中起关键作用。TLRs 可以被几种脂类物质激活,特别是 ox-LDL,信号通过特定适配分子的补充进而激活转录因子 NF- κ B^[26]。通过这种方式 TLRs 信号通过核因子 NF- κ B 途径调整炎症,对维持组织内环境稳定至关重要。通心络不仅能够下调 TLR4、NF- κ B 的表达,而且可以通过抑制血管损伤引起的巨噬细胞浸润,分泌炎症因子 TNF- α 下调转录因子 KLF5 而改善新生内膜的形成,从而起到保护内皮细胞的作用^[27],这与我们的实验结果相一致。

我们的实验研究和其他人一样存在不足之处。首先,由于对导丝损伤瓣膜的力度无法做到严格的一致性,导致对瓣膜损伤程度的差异性;对此我们在建立模型时此部分操作都有同一人完成,同时根据术后瓣膜流速的变化进行区组随机分组以保证实验各组间的可比性。第二,由于小鼠瓣膜组织较小并且在该实验中样本量较少,我们没有对主要蛋白进行蛋白质定量分析的蛋白质印迹分析。第三,尽管已经验证了通心络的降脂,抗炎,抗氧化作用对早期 CAVD 的影响,但这些作用背后的详细分子机制仍需进一步大样本量验证。

参考文献:

[1] Katz R, Wong ND, Kronmal R, et al. Features of the metabolic syndrome and diabetes mellitus as predictors of aortic valve calcification in the multi-ethnic study of atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2006, 113(17): 2113-2119.

[2] Owens DS, Katz R, Takasu J, et al. Incidence and progression of aortic valve calcium in the multi-ethnic study of atherosclerosis (MESA) [J]. *Am J Cardiol*, 2010, 105(5): 701-708.

[3] Zhang Y, Pan T, Zhong X, et al. Tongxinluo prevents endothelial dysfunction induced by homocysteine thiolactone *in vivo* via suppression of oxidative stress [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2015, 2015: 929012.

[4] Zhang L, Liu Y, Lu XT, et al. Traditional Chinese medication Tongxinluo dose-dependently enhances stability of vulnerable plaques: a comparison with a high-dose simvastatin therapy [J]. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 2009, 297(6): 2004-2014.

[5] Honda S, Miyamoto T, Watanabe T, et al. A novel mouse model

of aortic valve stenosis induced by direct wire injury [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2014, 34(2): 270-278.

[6] 宗永辉,刘新灿.钙化性主动脉瓣膜病小鼠模型比较及应用研究进展 [J]. *中国比较医学杂志*, 2020, 30(11): 133-139, 145.

[7] Niepmann ST, Steffen E, Zietzer A, et al. Graded murine wire-induced aortic valve stenosis model mimics human functional and morphological disease phenotype [J]. *Clin Res Cardiol*, 2019, 108(8): 847-856.

[8] Mathieu P, Bouchareb R, Boulanger MC. Innate and adaptive immunity in calcific aortic valve disease [J]. *J Immunol Res*, 2015, 2015: 851945.

[9] Dweck MR, Boon NA, Newby DE. Calcific aortic stenosis: a disease of the valve and the myocardium [J]. *J Am Coll Cardiol*, 2012, 60(19): 1854-1863.

[10] Otto CM, Kuusisto J, Reichenbach DD, et al. Characterization of the early lesion of 'degenerative' valvular aortic stenosis. Histological and immunohistochemical studies [J]. *Circulation*, 1994, 90(2): 844-853.

[11] Yearwood TL, Misbach GA, Chandran KB. Experimental fluid dynamics of aortic stenosis in a model of the human aorta [J]. *Clin Phys Physiol Meas*, 1989, 10(1): 11-24.

[12] Chan KL, Teo K, Dumesnil JG, et al. Effect of Lipid lowering with rosuvastatin on progression of aortic stenosis: results of the aortic stenosis progression observation: measuring effects of rosuvastatin (ASTRONOMER) trial [J]. *Circulation*, 2010, 121(2): 306-314.

[13] Cowell SJ, Newby DE, Prescott RJ, et al. A randomized trial of intensive lipid-lowering therapy in calcific aortic stenosis [J]. *N Engl J Med*, 2005, 352(23): 2389-2397.

[14] Antonini-Canterin F, Hirsu M, Popescu BA, et al. Stage-related effect of statin treatment on the progression of aortic valve sclerosis and stenosis [J]. *Am J Cardiol*, 2008, 102(6): 738-742.

[15] 徐贵成,高荣林,吴以岭,等.通心络胶囊治疗冠心病心绞痛临床研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1997, 17(7): 414-416.

[16] 吴以岭,游佳华,袁国强,等.通心络超微粉对高脂饮食兔胸主动脉 NF- κ B、胞间黏附分子 1 及血管细胞黏附分子 1 表达的影响 [J]. *中华心血管病杂志*, 2007, 35(3): 271-274.

[17] Zhang L, Wu Y, Jia Z, et al. Protective effects of a compound herbal extract (Tong Xin Luo) on free fatty acid induced endothelial injury: implications of antioxidant system [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2008, 14(8): 39.

[18] Zhou W, Chai H, Lin PH, et al. Ginsenoside Rb1 blocks homocysteine-induced endothelial dysfunction in porcine coronary arteries [J]. *J Vasc Surg*, 2005, 41(5): 861-868.

[19] Kim EJ, Lee HI, Chung KJ, et al. The ginsenoside-Rb2 lowers cholesterol and triacylglycerol levels in 3T3-L1 adipocytes cultured under high cholesterol or fatty acids conditions [J]. *BMB Rep*, 2009, 42(4): 194-199.