基于 RNA 测序探讨养心通脉方治疗冠心病心气虚证的作用机制*

黎妍[1,2]，张磊[1,2]，宋佳园[1,2]，王建国[1,2]

1. 湖南中医药大学，湖南 长沙 410208；2. 湖南中医药大学中医诊断学湖南省重点实验室，湖南 长沙 410208

摘要：目的：基于 RNA 测序技术筛选养心通脉方治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病（atherosclerotic cardiovascular disease，ASCVD）简称冠心病（coronary heart disease，CHD）心气虚证的潜在作用靶点。方法：将 24 只 SD 大鼠随机分为空白组（9 只）和造模组（15 只），后者采用力竭游泳联合异丙肾上腺素注射的方法建立 CHD 心气虚证模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组和养心通脉方组（4.5 g·kg^{-1}），连续灌胃 14 d。采用 ELISA 法检测大鼠血清环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate，cAMP）、心钠素（atrial natriuretic peptide，ANP）含量，HE 染色观察大鼠心脏病理形态。采用 M 型超声检测大鼠心功能，包括左室收缩末内径（left ventricular end - systolic dimension，LVEDs）、左室舒张末内径（left ventricular end - diastolic dimension，LVEDd）、射血分数（ejection fraction，EF）及缩短分数（fractional shortening，FS）。采用 RNA 测序技术检测差异表达基因，进行基因本体（Gene Ontology，GO）和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）分析。通过 STRING 数据库构建蛋白质 - 蛋白质相互作用（protein - protein interaction，PPI）网络，利用 Cytoscape 软件筛选核心基因。结果：空白组大鼠精神正常，活动灵敏。模型组大鼠精神不振，伴明显的身体不适症状。养心通脉方组大鼠精神状态改善，活动增加。空白组大鼠心电图无明显异常。模型组大鼠心电图呈现 QRS 波变宽、ST 段抬高以及病理性 Q 波。养心通脉方组大鼠心电图无明显异常。与空白组比较，模型组大鼠血清 cAMP、ANP 含量升高，经养心通脉方治疗后降低（$P<0.01$）。HE 染色显示，空白组大鼠心肌细胞结构清晰。模型组大鼠心肌横纹不清，存在变性与坏死，伴炎症细胞浸润。养心通脉方组大鼠呈现轻度心肌纤维变性与结缔组织增生。与空白组比较，模型组大鼠 LVEDd、LVEDs 增加，EF、FS 减少，经养心通脉方处理后得到逆转（$P<0.01$）。RNA 测序发现三组间有 1 057 个差异表达基因，主要富集于细胞周期、染色体分离、蛋白质结合等生物过程以及 T 细胞受体信号通路、Th17 细胞分化、Th1 和 Th2 细胞分化等通路。5 个核心基因包括 Mcm7、Mcm4、Mcm6、Rfc3、Rfc5，采用 ROC 曲线验证了其临床价值。结论：养心通脉方可能通过调控 Mcm7、Mcm4、Mcm6、Rfc3、Rfc5，从而发挥治疗 CHD 心气虚证的作用。

关键词：养心通脉方；冠状动脉粥样硬化性心脏病；心气虚证；RNA 测序；大鼠

DOI：10.16368/j.issn.1674-8999.2025.01.035

中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674-8999(2025)01-0192-09

Action Mechanism of Yangxin Tongmai Formula in Treating Coronary Heart Disease with Heart Qi Deficiency Syndrome Based on RNA Sequencing

LI Yan[1,2]，ZHANG Lei[1,2]，SONG Jiayuan[1,2]，WANG Jianguo[1,2]

1. Hunan University of Chinese Medicine，Changsha Hunan China 410208；2. Hunan Key Laboratory of Chinese Medicine Diagnostics，Hunan University of Chinese Medicine，Changsha Hunan China 410208

Abstract：Objective：Based on RNA sequencing technology，we screened the potential targets of Yangxin Tongmai Formula for treatment of coronary heart disease（CHD）with Heart Qi deficiency syndrome. Methods：Twenty-four SD rats were randomly divided into a control group（9 rats）and a modeling group（15 rats），the latter of which used forceful swimming combined with isoprenaline injection to establish a model of CHD Heart Qi deficiency syndrome. The rats with successful modeling were randomly divided into the model group

* **基金项目**：湖南省教育厅科研项目（22A0280）

and the group of Nourishing Heart and Channel Formula (4.5 g · kg^{-1}), and were gavaged continuously for 14 d. The serum cyclic adenosine monophosphate (cAMP), atrial natriuretic peptide (ANP), and cardiac natriuretic peptide (CNP) levels of the rats were detected by ELISA, and HE staining was used to observe the rats' blood serum. The cardiac pathological morphology of rats was observed by HE staining. M-mode ultrasound was used to detect the cardiac function of rats, including left ventricular end-systolic dimensions (LVEDs), left ventricular end-diastolic dimensions (LVEDd), ejection fraction (EF) and cardiac function. ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS). Differentially expressed genes were detected by RNA sequencing and analyzed by Gene Ontology (GO) and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Protein-protein interaction (PPI) network was constructed by STRING database, and core genes were screened by Cytoscape software. Results: The rats in the modeling group were mentally unstable, accompanied by obvious symptoms of physical discomfort. The rats in the Yangxin Tongmai Formula group showed improved mental status and increased activity. There was no obvious abnormality in the electrocardiogram of rats in the blank group. The electrocardiogram of rats in the model group showed QRS wave widening, ST segment elevation and pathological Q waves. Compared with the blank group, the serum levels of cAMP and ANP were increased in the model group and decreased after treatment with Yangxin Tongmai Formula ($P<0.01$). HE staining results showed that the myocardial transverse stripe was unclear, with degeneration and necrosis, and with inflammatory cell infiltration in the model group rats. The rats in the Nourishing Heart and Promoting Pulse Formula group showed mild myocardial fiber degeneration and connective tissue hyperplasia. Compared with the blank group, rats in the model group showed an increase in LVEDd and LVEDs, and a decrease in EF and FS ($P<0.01$), which was reversed after treatment with Yangxin Tongmai Formula. Altogether 1 057 differentially expressed genes were identified by RNA sequencing among the three groups, which were enriched in biological processes such as cell cycle, chromosome segregation, and protein binding, as well as in pathways such as T cell receptor signaling pathway, Th17 cell differentiation, and Th1 and Th2 cell differentiation. Th2 cell differentiation and other pathways. 5 core genes including Mcm7, Mcm4, Mcm6, Rfc3, Rfc5 were validated for their clinical value using ROC curve. Conclusion: Yangxin Tongmai Formula may play a role in the treatment of Heart Qi deficiency in CHD by regulating Mcm7, Mcm4, Mcm6, Rfc3 and Rfc5.

Key words: Yangxin Tongmai Formula; coronary heart disease; Heart Qi deficiency syndrome; RNA sequencing; rat

冠状动脉粥样硬化性心脏病(atherosclerotic cardiovascular disease, ASCVD)简称冠心病(coronary heart disease, CHD),是指为心脏供血的冠状动脉因脂肪沉积、炎症细胞浸润或钙化形成斑块,导致动脉粥样硬化、管腔狭窄乃至阻塞,最终引发心肌缺血、缺氧、坏死的疾病[1-3]。CHD 是全球致死率最高的疾病之一,也是导致心血管病发病率和死亡率不断上升的最主要原因[4]。尽管近年来各种预防和治疗手段不断发展,我国 CHD 的发病率与死亡率仍呈现上升趋势[5]。

辨证论治作为病证结合模式的关键环节,在临床上发挥着重要作用。证候研究对于临床实践具有显著的现实意义,特别是在 CHD 的治疗领域[6]。现代关于 CHD 的辨证论治研究涵盖了血瘀、痰浊、气虚、气滞、阴虚、阳虚等多种证候的单一或综合性研究[7]。CHD 的病位在心,心为君主之官,五脏六腑之大主,主血脉而藏神,心脉又是宗气之所,百脉朝会之枢,宗气贯心脉行气血,形成了心气推动气血运行周身的原始动力[8]。心气虚会导致血瘀、寒凝和痰浊等病理产物形成。因此,从病位和病理过程分析,心气虚证是 CHD 的主要证型之一[9-10]。养心通脉方源自我国著名中医学家秦伯未之经验方,功效为补养心气、和血通脉,主要包括人参、丹参、桂枝、枳实、泽泻等中药,临床治疗 CHD 疗效显著[11-13]。

转录组测序即 RNA 测序(RNA sequencing, RNA-seq),是研究生理条件下和疾病发生发展过程中差异分子变化的高质量技术[14]。在阐明各种复杂疾病的基础上,RNA-seq 为基因组研究、免疫与发育基因鉴定,以及数字基因表达分析等奠定了坚实的基础[15-16]。在 CHD 辨病诊治的系统研究中,通常利用差异表达基因和差异富集通路探讨 CHD 某一证型的发生发展机制,主要将 CHD 特定证型患病人群与健康人群作对比研究[17]。

本研究以 CHD 心气虚证为切入点,运用 RNA-seq 分子生物学的相关研究技术,对 CHD 心气虚证相关基因进行深入分析。本研究旨在筛选 CHD 心气虚证的潜在生物标志物,寻找中药干预 CHD 心气虚证的作用靶点,为临床辨证治疗 CHD 提供新思路与新方法。

1　材料

1.1　动物　40 只雄性 SD 大鼠,体质量为 210~230 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。所有大鼠均为无特定病原体动物,实验动物质量合格证编号:NO. 430727211100404532。大鼠饲养于湖南中医药大学动物实验中心 SPF 级屏障环境中,环境温度控制在 23~27 ℃,相对湿度控制在 35%~65%,提供

普通饲料和饮用水。实验过程中对动物的处理符合动物伦理学标准，本研究经湖南中医药大学伦理委员会审核，批准编号：LL2021030502。

1.2　药物与试剂　养心通脉方（中药饮片由湖南中医药大学第一附属医院提供）；酒石酸美托洛尔片（阿斯利康药业有限公司，批号：22104A59）；盐酸普萘洛尔片（江苏亚邦爱普森药业有限公司，批号：H32020133）；环磷酸腺苷（cyclic adenosine monophosphate，cAMP）ELISA 试剂盒、心钠素（atrial natriuretic peptide，ANP）ELISA 试剂盒（湖南艾方生物科技有限公司，批号：220221027、220221027）；4% 多聚甲醛（北京兰杰柯科技有限公司，批号：70111800）；盐酸异丙肾上腺素（上海源叶生物科技有限公司，批号：Z21N10X103254）。

1.3　仪器　MP150 心电图机（美国 BIOPAC 公司）；高速冷冻离心机（德国 Eppendorf 公司，型号：TGL－18R）；动物天平（日本岛津公司，型号：UX6200H）；彩色多普勒超声诊断仪（深圳开立科技有限公司，型号：SonoScape－S2N）；R550 型多通道小动物麻醉机（深圳瑞沃德生命科技有限公司）；移液枪（德国艾本德股份公司，型号：Eppendorf concentrator Plus）；LP115 型石蜡切片机（ThermoFisher Scientific 公司）；BX53 型光学显微镜（日本 Olympus 公司）。

2　方法

2.1　药物制备　养心通脉方组成：人参 10 g，丹参 10 g，桂枝 10 g，枳实 10 g，泽泻 10 g 。取上述药物放入圆底烧瓶中，加入 500 mL 纯水浸泡 20 min，加热回流 40 min，药液放入真空过滤机进行过滤后保存。药渣继续保留在烧瓶中，加入 400 mL 纯水，再次加热回流 30 min，药液经真空过滤机过滤。将 2 次过滤后的药液混合，定容至 100 mL，制备质量浓度为 0.5 g·mL^{-1}的药液。

2.2　CHD 心气虚证模型制备　大鼠适应性喂养 3 d 后，采用随机数字表分层法将 24 只大鼠随机分为空白组 9 只和造模组 15 只。依据参考文献[18]中的方法建立心气虚证模型，即将大鼠置于游泳箱内，水温 33～36 ℃，水深 50～60 cm，强迫大鼠负重力竭游泳，负重为自身体质量的 1%～5%，每只大鼠所占水面积≥500 cm^2。大鼠每日游泳 2 次，中间间隔 10 min，持续 19 d，力竭标准为动作明显不协调、神态慌张，并有逐渐无力游动甚至下沉的表现。大鼠游泳第 15 日开始，每日灌服盐酸普萘洛尔溶液（24 mg·kg^{-1}），持续 4 d。空白组大鼠则以等剂量生理盐水灌胃，持续 4 d。

以心气虚证模型为基础，制备 CHD 心肌缺血模型，即大鼠背部皮下分为三点注射异丙肾上腺素（5 mg·kg^{-1}），连续 5 d。

2.3　CHD 心气虚证模型验证　采用大鼠宏观表现与微观指标相结合的方法评价 CHD 心气虚证模型。宏观指标评价：大鼠精神差包括食欲减退，反应迟钝，活动范围缩小，身体蜷缩拱背，毛发干枯无光泽，唇舌、爪甲与尾尖由淡粉色变为苍白色。微观指标评价：造模完成后，每组随机取 3 只，腹主动脉采血检测大鼠血清 cAMP、ANP 含量。若大鼠出现上述宏观表现且 cAMP、ANP 含量升高，则认为心气虚证模型建立成功。CHD 心肌缺血模型以心电图出现异常改变作为评价方法。

2.4　动物分组及给药　CHD 心气虚证模型建立成功后，将大鼠随机分为模型组和养心通脉方组（4.5 g·kg^{-1}），每组 6 只，连续灌胃 14 d。空白组和模型组灌服等剂量生理盐水。

2.5　超声心电图检测　末次给药后，采用异氟烷吸入麻醉（维持量 3.0～4.5 mL·h^{-1}）大鼠。将大鼠呈仰卧位固定于鼠板上，针式电极依次刺入右上肢、右下肢、左下肢皮下，设置超声心电图记录仪的信号通道和参数，待心电图波形稳定后，记录大鼠Ⅱ导联心电图变化。

2.6　心功能检测　采用异氟烷吸入麻醉（维持量 3.0～4.5 mL·h^{-1}）大鼠，胸部脱毛备皮。超声探头频率设置为 12 MHz，图像深度设置为 2.5 cm。在大鼠左胸部涂抹耦合剂，探头指向左上以便找到 M 型超声取样位置，待图像清楚稳定后，在心动周期中测量大鼠左室收缩末内径（left ventricular end－systolic dimension，LVEDs）、左室舒张末内径（left ventricular end－diastolic dimension，LVEDd）、射血分数（ejection fraction，EF）及缩短分数（fractional shortening，FS）。

2.7　ELISA 法检测大鼠血清 cAMP、ANP 含量　大鼠经异氟烷吸入（维持量 3.0～4.5 mL·h^{-1}）麻醉后，采集腹主动脉血液，在室温条件下静置 20 min，待血液凝固分层后离心，取上清液采用 ELISA 试剂盒进行检测。

2.8　苏木精－伊红（hematoxylin－eosin，HE）染色　取大鼠心脏，4% 多聚甲醛溶液固定，随后进行心脏组织包埋切片。采用 HE 染色法进行染色，在光学显微镜下观察大鼠心脏病理形态。

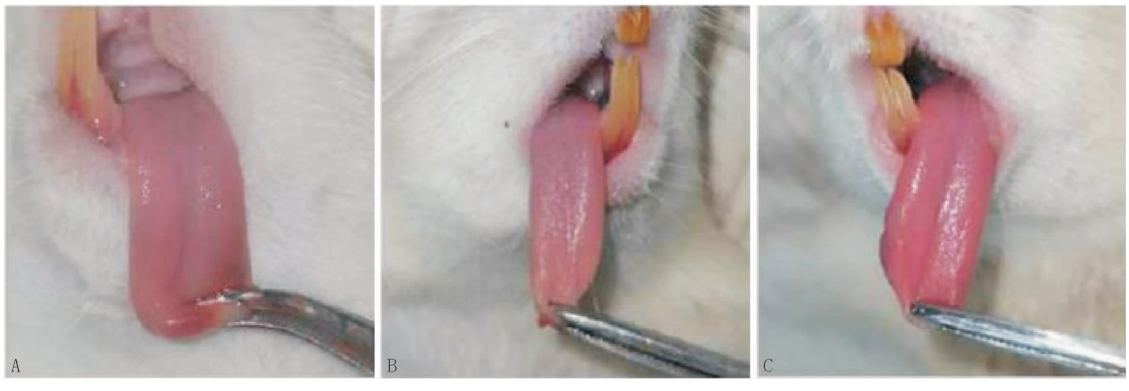
2.9　RNA 测序　在基迪奥生物有限公司完成 RNA 提取、cDNA 文库构建、质量控制和测序分析。用 Trizol 试剂提取心脏总 RNA，通过 Agilent 2100 仪

器检测 RNA 的完整值以确定 RNA 的质量。使用 HISAT2[19] 软件开展基于参考基因组的比对分析。基于 HISAT2 的比对结果，使用 Stringtie 重构转录本，并通过 RSEM[20] 计算每个样本中所有基因的表达量。采用 R（http://www.r-project.org/）进行主成分分析（principal component analysis，PCA）。通过 DESeq2 软件筛选差异表达基因（differentially expressed genes，DEGs），条件为 $|\log_2 \text{Fold Change}| \geqslant 1$ 同时伪发现率（false discovery rate，FDR）< 0.05。针对 DEGs 进行基因本体（Gene Ontology，GO）和京都基因与基因组百科全书（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）富集分析。GO 分析主要包括分子功能（molecular function，MF）、细胞组分（cellular component，CC）及生物过程（biological process，BP）。以 $P < 0.05$、$Q < 0.05$ 为标准，应用超几何检验方法，筛选显著富集的 GO 条目和 KEGG 通路。

2.10　统计学方法　采用 SPSS 26.0 统计学软件分析实验数据，计量资料以均数 ± 标准差（$\bar{x} \pm s$）表示。多组间比较若满足正态分布采用单因素方差分析，多重比较若符合方差齐性采用 *LSD* 检验，否则采用 *Kruakal-Wallis H* 检验；若不满足正态分布采用非参数检验。$P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　各组大鼠宏观表现及舌象变化　空白组大鼠精神、食欲正常，活动灵敏，舌质红润光泽，苔薄白。模型组大鼠精神不振，并表现出明显的身体不适症状，包括食欲减退、反应迟钝、抓取时反抗小、活动范围缩小、身体蜷缩拱背、毛发干枯无光泽等，爪甲与尾尖呈苍白色，舌色较浅，舌质较软，舌苔较少。与模型组比较，养心通脉方组大鼠精神状态改善，食欲增加，活动灵敏，毛发有光泽，爪甲和尾尖呈淡粉色，舌色红润有光泽，舌质较为粗糙。见图 1。



注：A：空白组；B：模型组；C：养心通脉方组。

图 1　各组大鼠舌象图

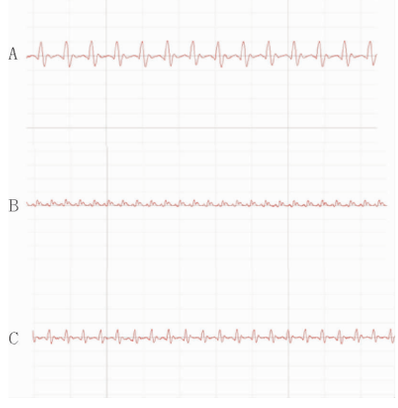
3.2　各组大鼠心电图变化　空白组大鼠心电图 P 波、QRS 波及 ST 段无明显异常。模型组大鼠心电图可见 QRS 波变宽，ST 段抬高，T 波高尖且呈“红旗”状，T 波高度与 QRS 主波高度之比为 1∶1，显示出病理性 Q 波。与模型组比较，养心通脉方组大鼠心电图无明显异常，见图 2。

3.3　各组大鼠血清 cAMP、ANP 含量变化　与空白组比较，模型组大鼠血清 cAMP、ANP 含量升高（$P < 0.01$）；与模型组比较，养心通脉方组大鼠血清 cAMP、ANP 含量降低（$P < 0.01$），见表 1。

表 1　各组大鼠血清 cAMP、ANP 含量比较（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	cAMP（c/nmol · L^{-1}）	ANP（ρ/ng · L^{-1}）
空白组	6	25.83 ± 2.66	276.01 ± 26.26
模型组	6	46.23 ± 2.19**	556.88 ± 29.26**
养心通脉方组	6	37.22 ± 3.50##	467.35 ± 26.70##

注：与空白组比较，** $P < 0.01$；与模型组比较，## $P < 0.01$。

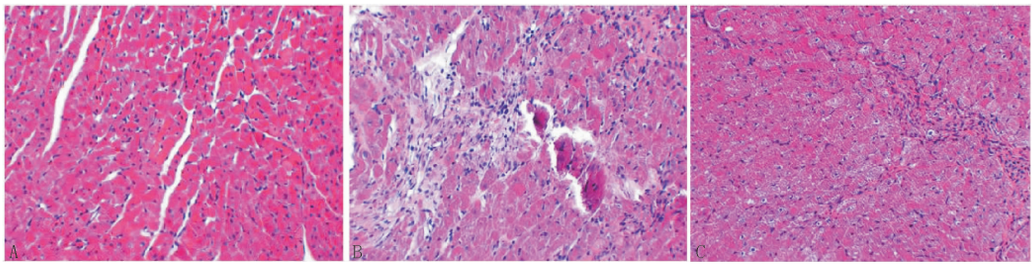


注：A：空白组；B：模型组；C：养心通脉方组。

图 2　各组大鼠心电图

3.4　各组大鼠心脏病理形态变化　HE 染色显示，空白组大鼠心肌细胞结构清晰，未见炎症细胞与坏死细胞。模型组大鼠心肌横纹不清，存在变性与坏死，伴有间质纤维结缔组织增生与炎症细胞浸润。

养心通脉方组大鼠心脏可见轻微心肌纤维变性与结缔组织增生，见图 3。



注：A：空白组；B：模型组；C：养心通脉方组。

图 3　各组大鼠心脏 HE 染色图（×200）

3.5　各组大鼠心功能指标变化　与空白组比较，模型组大鼠 LVEDd、LVEDs 增加，EF、FS 减少（$P<0.01$）。与模型组比较，养心通脉方组大鼠 LVEDd、LVEDs 减少，EF、FS 增加（$P<0.01$），见表 2。

表 2　各组大鼠心功能指标比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	LVEDd（l/mm）	LVEDs（l/mm）	EF/%	FS/%
空白组	6	5.51 ± 1.01	2.12 ± 0.44	93.58 ± 1.01	61.63 ± 1.91
模型组	6	6.69 ± 0.49**	4.54 ± 0.27**	66.08 ± 3.35**	31.93 ± 2.21**
养心通脉方组	6	6.47 ± 0.43##	3.29 ± 0.38##	85.03 ± 3.83##	49.14 ± 4.78##

注：与空白组比较，**$P<0.01$；与模型组比较，##$P<0.01$。

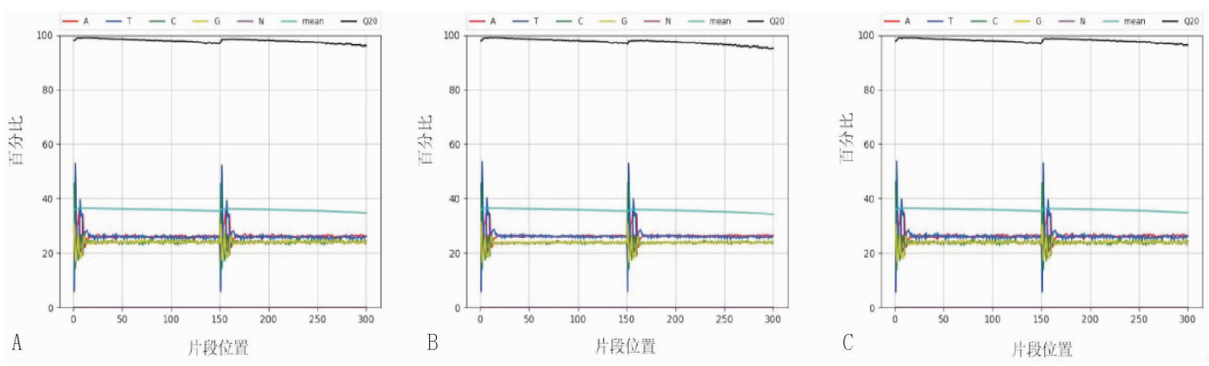
3.6　RNA 测序结果

3.6.1　数据质控　为了保证数据质量，需在分析前对原始数据进行过滤，以减少无效数据的干扰。过滤后的数据质量值≥20 的碱基比例≥96.77%，质量值≥30 的碱基比例≥91.35%，表明数据质量较好，可用于后续分析，见表 3。经过原始数据过滤后，图 4 直观展示了碱基的组成及质量分布。

表 3　各组大鼠心脏 RNA 测序数据

组别	原始数据/bp	BF_Q20/%	BF_Q30/%
空白组 1	5 957 465 100	97.09	92.50
空白组 2	5 698 064 400	97.26	92.76
空白组 3	5 874 297 600	97.07	92.37
空白组 4	5 589 903 000	97.25	92.76
模型组 1	6 018 624 600	96.77	91.75
模型组 2	5 446 928 400	96.58	91.35
模型组 3	6 108 749 700	97.14	92.50
模型组 4	6 301 023 000	97.42	93.23
养心通脉方组 1	6 480 753 900	97.27	92.75
养心通脉方组 2	5 557 829 100	96.94	92.04
养心通脉方组 3	5 578 032 900	96.89	92.02
养心通脉方组 4	6 151 173 600	96.81	91.83

3.6.2　PCA 分析　PCA 主要用于分析组内样本的重复性和组间样本的差异程度。结果显示，模型组与空白组样本呈分离趋势；养心通脉方组与模型组样本存在部分交叠，但养心通脉方组样本趋向空白组，说明养心通脉方对 CHD 心气虚证大鼠有积极治疗作用，见图 5。



注：A：空白组；B：模型组；C：养心通脉方组。

图 4　RNA 测序碱基过滤后质量图

3.6.3　差异表达基因分析　与空白组相比，模型组上调基因有 2 707 个，下调基因有 415 个；与模型组相比，养心通脉方组上调基因有 27 个，下调基因有 1 183 个，见图 6。通过韦恩图筛选交集基因，结果显示在模型组上调且养心通脉方组下调的基因有 1 043 个；在模型组下调且养心通脉方组上调的基

因有 14 个，见图 7。

3.6.4　GO 和 KEGG 富集分析　GO 分析显示，DEGs 主要富集于细胞周期、有丝分裂细胞周期、染色体分离、蛋白质结合等重要生物过程。KEGG 分析显示，DEGs 主要富集于人 T 细胞白血病病毒 1 感染、细胞黏附分子、细胞周期、DNA 复制、T 细胞受体信号通路、Th17 细胞分化、Th1 和 Th2 细胞分化等重要通路，见图 8。

3.6.5　核心基因分析　通过 STRING[21] 数据库（http://string-db.org）对 DEGs 构建蛋白质-蛋白质相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络。针对数据库中包含的物种，将从数据库中提取的差异基因集合，利用 Cytoscape[22] 绘制互作关系网络图；针对数据库中不包含的物种，将目标基因集中的序列对比至 STRING 数据库中参考物种的蛋白质序列上，然后利用比对上的参考物种的蛋白质互作关系进行互作网络分析。以 Degree 值为依据定义节点的大小，筛选出 5 个核心基因：微小染色体维持基因 7（mini chromosome maintenance 7，Mcm7）、微小染色体维持基因 4（mini chromosome maintenance 4，Mcm4）、微小染色体维持基因 6（mini chromosome maintenance 6，Mcm6）、复制因子 C 亚基 3（replication factor C subunit 3，Rfc3）、复制因子 C 亚基 5（replication factor C subunit 5，Rfc5），见图 9。采用 ROC 曲线中曲线下面积（area under curve，AUC）进行验证，Mcm4、Mcm6、Mcm7、Rfc3、Rfc5 的 AUC 值分别为 0.80、1.00、1.00、0.95、1.00。由此说明 Mcm4、Mcm6、Mcm7、Rfc3、Rfc5 核心基因的准确度较高，具有一定的临床价值，见图 10。

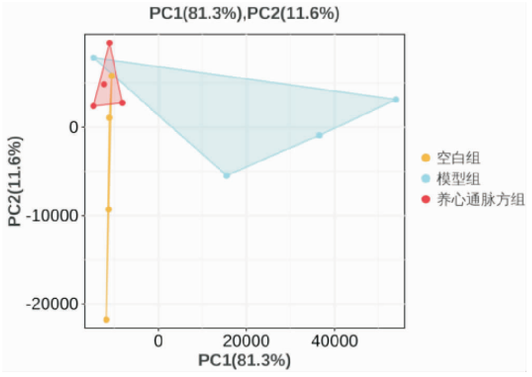
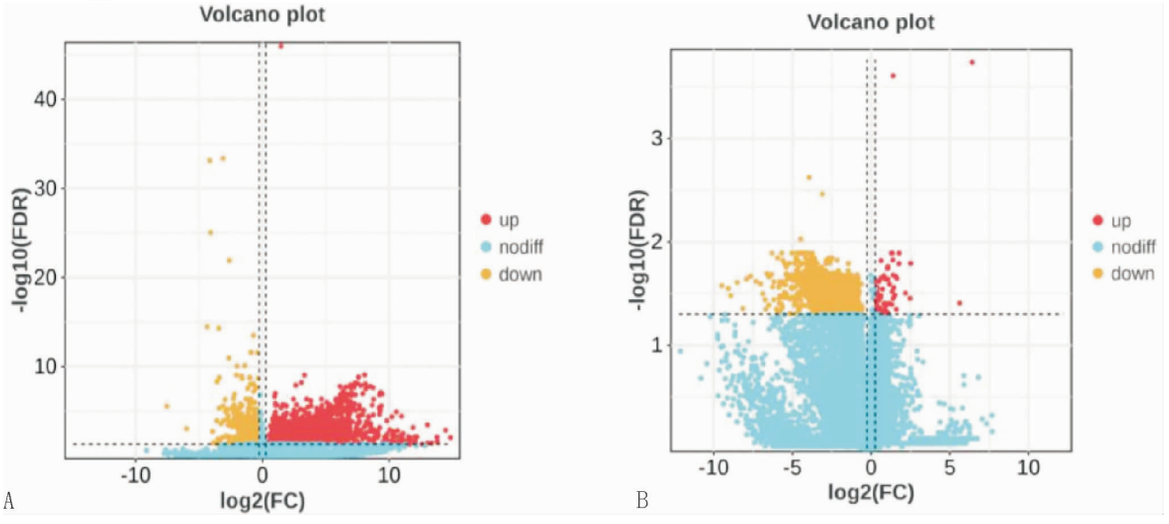
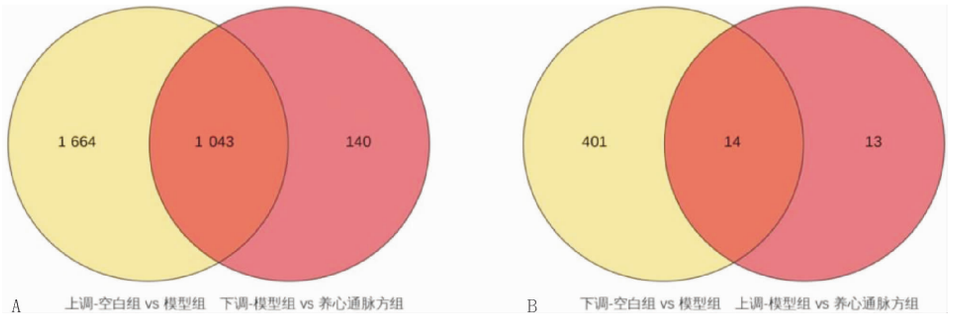


图 5　PCA 图



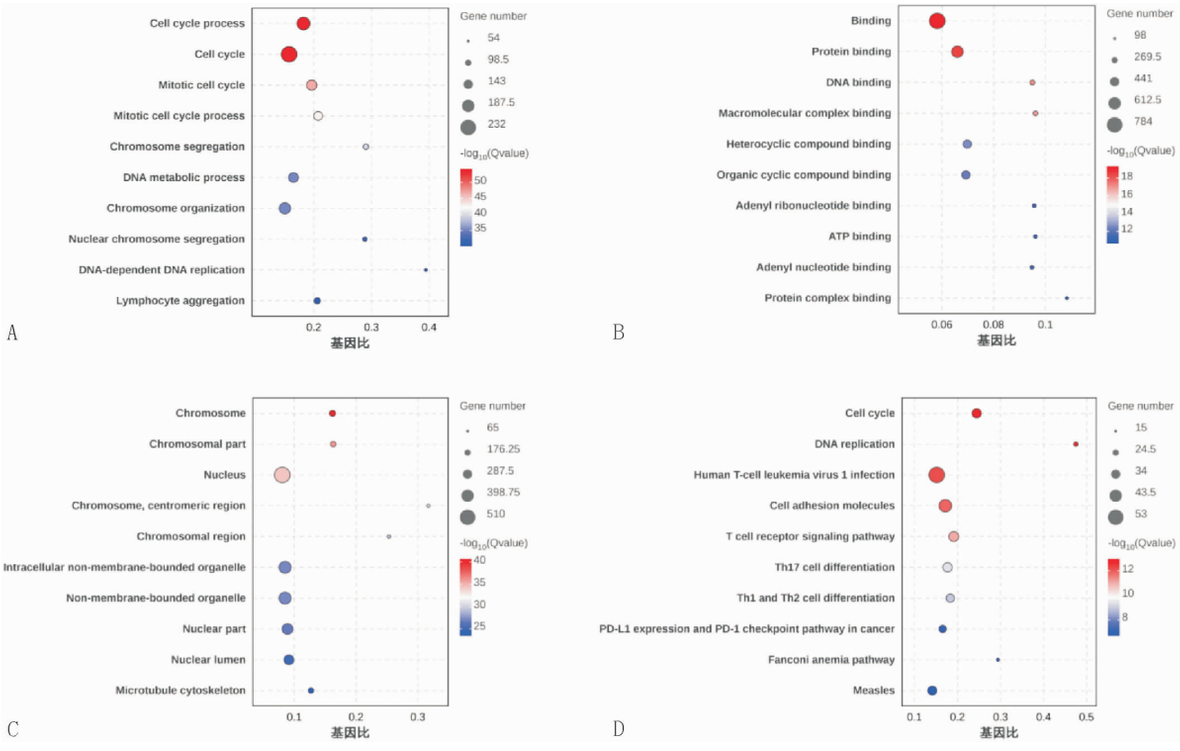
注：A：空白组 vs 模型组；B：模型组 vs 养心通脉方组。

图 6　差异表达基因火山图



注：A：模型组上调且养心通脉方组下调的交集基因；B：模型组下调且养心通脉方组上调的交集基因。

图 7　交集基因韦恩图



注：A：BP；B：MF；C：CC；D：KEGG 通路。

图 8　GO 和 KEGG 分析气泡图

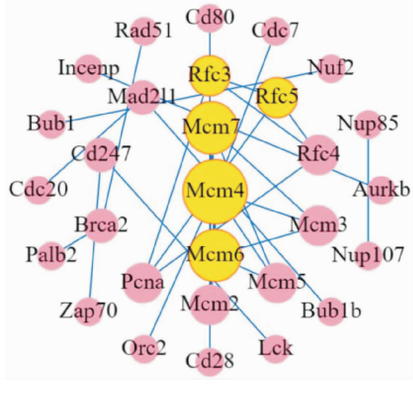


图 9　差异表达基因 PPI 网络图

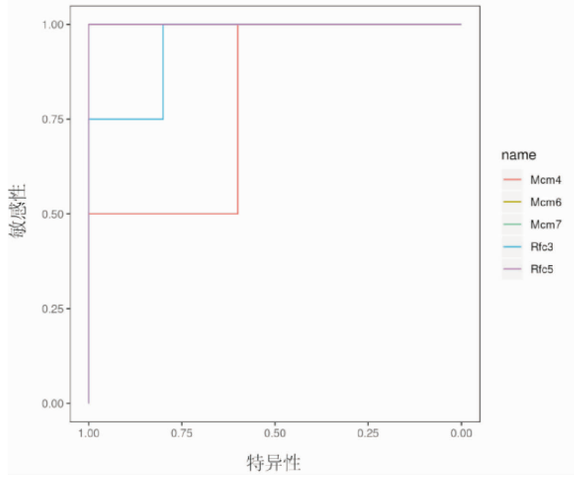


图 10　核心基因 ROC 曲线图

4　讨论

目前，CHD 是全球致死率最高的疾病之一，且是典型的多基因、多因素疾病。CHD 发病机制的研究涉及炎症反应、基因多态性、表观遗传学等多方面，但具体机制尚待阐明[23-24]。CHD 病位在心，心主血脉，心气虚则不能帅血而行，因此心气虚证是 CHD 的关键证型之一[25-26]。心气虚即心脏功能减弱，无法正常输送血液至各个器官，从而出现心慌、气短、乏力等一系列症状。心气虚多由先天禀赋不足，元气不充或后天脾胃虚损，导致气血生化乏源；或长期处于压抑、焦虑等不良情绪；或长时间工作劳累，劳倦久病；或由于贫血、心脏疾病等影响心脏功能。中医认为保心、护心为第一要务，即补益心气，因气不足者，不能行血，则致血瘀。养心通脉方是治疗 CHD 心气虚证的有效方剂，方中以人参补养心气，桂枝温通血脉，丹参滋养活血，枳实理气化痰，泽泻利水化痰，五药合用共奏补养心气、活血化瘀之效。本研究采用病症证候与对症药物相结合，探索 CHD 心气虚证的生物标志物及养心通脉方的干预机制。辨证论治仍是病证结合模式在临床取效的关键，因此 CHD 的证候研究具有重要的临床意义[27]。

RNA－Seq 技术作为一种高通量测序手段，广泛用于细胞转录组学水平的研究[28]。相较于传统的 Sanger 测序和微阵列技术，RNA－Seq 显著提高了对基因转录动态过程的数据覆盖度和分辨率[29]。此外，RNA－Seq 不仅能定量分析基因表达量，其生成的数据有助于发现新的转录本，鉴定选择性的剪接基因，并检测等位基因的特异性表达[30]。本研究对正常大鼠与 CHD 心气虚证大鼠的心脏样本进行 RNA 测序，通过 PCA 分析发现各组样本组内相似度较高，空白组与模型组存在明显差异，养心通脉方组趋向空白组，说明养心通脉方具有积极治疗作用。因空白组－模型组－养心通脉方组是正常－致病－治愈的过程，故定义空白组－模型组、模型组－养心通脉方组的交集为 CHD 心气虚证致病与治愈的相关基因。结果显示，养心通脉方可能通过 1 057 个基因发挥治疗 CHD 心气虚证的作用。进一步研究表明，5 个核心基因 Mcm4、Mcm6、Mcm7、Rfc3、Rfc5 的准确度较高，可用于区分 CHD 心气虚证人群与健康人群，有望作为 CHD 心气虚证的潜在生物标志物。

本研究发现的差异表达基因可能揭示了 CHD 心气虚证的发生与发展机制，探索了养心通脉方通过生物途径治疗 CHD 心气虚证的机制，为临床辨证论治提供新的科学依据，有助于制定个体水平靶向治疗和预防策略。未来研究仍需致力于探索和鉴定新的生物标志物，以提升对心血管疾病危险因素识别的有效性和特异性。

参考文献：

[1] ROSS R. Atherosclerosis: an inflammatory disease[J]. N Engl J Med, 1999, 340(2): 115－126.

[2] GEOVANINI G R, LIBBY P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates[J]. Clin Sci (Lond), 2018, 132(12): 1243－1252.

[3] CAGNINA A, CHABOT O, DAVIN L, et al. Atherosclerosis, an inflammatory disease[J]. Rev Med Liege, 2022, 77(5/6): 302－309.

[4] KANG W X. Personality traits predict life satisfaction in coronary heart disease (CHD) patients[J]. J Clin Med, 2022, 11(21): 6312.

[5] 黄静静. 延续性护理对冠心病患者的临床效果及满意度分析[J]. 心血管病防治知识, 2021, 11(17): 72－74.

[6] 王阶, 姚魁武, 刘咏梅, 等. 冠心病血瘀证转录组学研究：病证结合生物标志物研究思路与方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2017, 23(19): 1－5.

[7] 王安璐, 徐浩. 从代谢免疫角度谈病证结合防治冠心病[J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(9): 1122－1126.

[8] 夏成文, 苏士印. 中医药治疗冠心病并心律失常的研究进展[J]. 中国中医药现代远程教育, 2024, 22(6): 173－176.

[9] 王倩, 羿雷, 周亚楠, 等. 心气虚与冠脉病变及心脏结构相关性研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2020, 18(20): 70－72.

[10] 秦士焱. 基于非靶向代谢组学探讨冠心病心气虚证尿液潜在生物标志物及生物学基础[D]. 长沙：湖南中医药大学, 2023.

[11] 袁肇凯, 周泽泉, 范福元, 等. 养心通脉片治疗冠心病心绞痛的临床观察[J]. 中国中西医结合杂志, 1999, 19(2): 47－48.

[12] 刘吉勇, 袁肇凯. 袁肇凯教授辨证治疗心病经验[J]. 湖南中医药大学学报, 2017, 37(3): 281－284.

[13] 曾雪芹. 从“心—肠—菌”出发探讨养心通脉方对冠心病血瘀证大鼠模型肠道微生态平衡的影响[D]. 长沙：湖南中医药大学, 2020.

[14] STARK R, GRZELAK M, HADFIELD J. RNA sequencing: the teenage years[J]. Nat Rev Genet, 2019, 20(11): 631－656.

[15] GAO X J, JIANG Z Y, ZHANG S M, et al. Transcriptome analysis and immune－related genes expression reveals the immune responses of Macrobrachium rosenbergii infected by Enterobacter cloacae[J]. Fish Shellfish Immunol, 2020, 101: 66－77.

[16] 王旭. 从转录组学角度探讨血府逐瘀胶囊治疗冠心病心绞痛气滞血瘀证的临床和机制研究[D]. 天津：天津中医药大学, 2022.

[17] XU X X, HAO Y H, XIONG S, et al. Comprehensive analysis of long non－coding RNA－associated competing endogenous RNA network in Duchenne muscular dystrophy[J]. Interdiscip Sci, 2020, 12(4): 447－460.

[18] 姚立. 用比较医学的方法建立心气虚证动物模型[D]. 杭州：浙江中医学院, 2003.

[19] KIM D, LANGMEAD B, SALZBERG S L. HISAT: a fast spliced aligner with low memory requirements[J]. Nat Methods, 2015, 12(4): 357－360.

[20] LI B, DEWEY C N. RSEM: accurate transcript quantification from RNA－Seq data with or without a reference genome[J]. BMC Bioinformatics, 2011, 12: 323.

[21] SZKLARCZYK D, FRANCESCHINI A, WYDER S, et al. STRING v10: protein - protein interaction networks, integrated over the tree of life[J]. Nucleic Acids Res, 2015, 43 (Database issue): D447 - D452.

[22] SHANNON P, MARKIEL A, OZIER O, et al. Cytoscape: a software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. Genome Res, 2003, 13(11): 2498 - 2504.

[23] WU L D, SHI Y, KONG C H, et al. Dietary inflammatory index and its association with the prevalence of coronary heart disease among 45, 306 US adults[J]. Nutrients, 2022, 14(21): 4553.

[24] YAN Y P, YIN X L, LI J J, et al. NPAS4 polymorphisms contribute to coronary heart disease (CHD) risk[J]. Cardiovasc Toxicol, 2022, 22(6): 515 - 527.

[25] WANG Y Q, XU J, GUO R, et al. Therapeutic effect in patients with coronary heart disease based on information analysis from traditional Chinese medicine four diagnostic methods[J]. Chung I Tsa Chih Ying Wen Pan, 2014, 34(1): 34 - 41.

[26] 何章欣,程炜,潘熠,等.“心主血脉”“心主神明”的科学内涵探析:从冠心病与认知功能障碍关联的角度[J].亚太传统医药,2024,20(2):193 - 198.

[27] XU Z X, XU J, YAN J J, et al. Analysis of the diagnostic consistency of Chinese medicine specialists in cardiovascular disease cases and syndrome identification based on the relevant feature for each label learning method[J]. Chin J Integr Med, 2015, 21(3): 217 - 222.

[28] DILLIES M A, RAU A, AUBERT J, et al. A comprehensive evaluation of normalization methods for Illumina high - throughput RNA sequencing data analysis[J]. Brief Bioinform, 2013, 14(6): 671 - 683.

[29] KUKURBA K R, MONTGOMERY S B. RNA sequencing and analysis [J]. Cold Spring Harb Protoc, 2015, 2015(11): 951 - 69.

[30] RAMSKOLD D, KAVAK E, SANDBERG R. How to analyze gene expression using RNA - sequencing data[J]. Methods Mol Biol, 2012, 802: 259 - 274.

收稿日期:2024 - 09 - 27

作者简介:黎妍(1998 -),女,湖南永州人,医学硕士,研究方向:心血管疾病中医证治规律。

通信作者:王建国(1966 -),男,湖南长沙人,医学博士,副教授,研究方向:心血管疾病中医证治规律。E - mail: 707973244@qq.com

编辑:刘凯歌