

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2025.11.013

养心通脉方不同时间干预对早发冠心病血瘀证模型大鼠 DNA 甲基化的影响

陈杏¹, 于子璇¹, 张书萌², 刘燕娟¹, 邓双有¹, 王莹¹, 陈伶俐³, 李杰^{1✉}

1. 湖南中医药大学中医诊断研究所, 湖南省长沙市岳麓区含浦科教园学士路 300 号, 410208; 2. 湖南中医药大学中医学院;
3. 湖南中医药大学医学院

[摘要] **目的** 观察养心通脉方子午流注法干预对早发冠心病 (PCHD) 血瘀证模型大鼠的效果, 并从 DNA 甲基化差异基因表达角度探讨其作用机制。**方法** 1) 设空白组、造模组、养心通脉方组 SD 大鼠各 3 只, 造模组、养心通脉方组大鼠以高脂饲料持续饲养+维生素 D3 灌胃+盐酸异丙肾上腺素皮下注射方法构建 PCHD 血瘀证大鼠模型。造模成功后养心通脉方组大鼠以养心通脉方溶液 18 g/ (kg·d) 灌胃, 空白组和造模组大鼠以 0.9% 氯化钠溶液 4 ml/ (kg·d) 灌胃, 3 周后采集各组大鼠血清样本进行 DNA 甲基化测序, 筛选相关 DNA 甲基化差异基因。2) 另将 PCHD 血瘀证造模成功的大鼠随机分为模型组、养心通脉方子午流注干预组 [养心通脉方溶液 18 g/ (kg·d) 分别于心经时段 (12: 00) 和心包经时段 (20: 00) 两次灌胃]、养心通脉方对照组 [养心通脉方溶液 18 g/ (kg·d) 分别于 8: 00 和 18: 00 两次灌胃] 和阿托伐他汀钙组 [阿托伐他汀钙片溶液 1.8 mg/ (kg·d) 灌胃, 时间同养心通脉方对照组], 另设空白对照组, 每组 8 只。模型组和空白对照组以 0.9% 氯化钠溶液 4 ml/ (kg·d) 灌胃, 时间同养心通脉方对照组。灌胃 3 周后, 检测各组大鼠血脂 [包括总胆固醇 (TC)、低密度脂蛋白 (LDL)、高密度脂蛋白 (HDL)] 水平, 大鼠心肌组织及胸主动脉 HE 染色观察病理形态学改变, 检测血清炎症指标 [肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、脂多糖 (LPS)、白细胞介素 10 (IL-10)] 水平, 免疫沉淀-实时荧光定量 PCR 法检测心脏组织筛选差异基因相对表达量。**结果** 1) 筛选出差异甲基化区域的基因为钙调蛋白 2 (*Caln2*)、钙电压门控通道亚基 $\alpha 1s$ (*Cacna1s*)、磷脂酶 C $\beta 1$ (*Plcb1*)。2) 与空白对照组比较, 模型组大鼠 TC、LDL、TNF- α 、LPS 含量均升高, HDL、IL-10 含量降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); HE 染色显示心肌纤维明显肿胀, 并伴有大量炎症细胞浸润, 主动脉血管内壁增厚, 内壁损伤, 可见大量脂质胆固醇结晶, 炎症细胞浸润明显。与模型组比较, 养心通脉方子午流注干预组、养心通脉方对照组、阿托伐他汀钙组大鼠 TC、LDL、TNF- α 、LPS 含量均降低, HDL、IL-10 含量均升高 ($P < 0.05$), 心肌组织损伤改善, 炎症浸润减少, 胸主动脉内膜损伤改善, 脂质浸润减少。与养心通脉方对照组比较, 养心通脉方子午流注干预组 LDL、TNF- α 、LPS 含量降低, IL-10 含量升高 ($P < 0.05$)。与模型组比较, 养心通脉方对照组和养心通脉方子午流注干预组 *Caln2*、*Plcb1* 基因相对表达量降低、*Cacna1s* 基因相对表达量升高 ($P < 0.05$); 与养心通脉方对照组比较, 养心通脉方子午流注干预组 *Caln2* 基因相对表达量降低、*Cacna1s* 基因相对表达量升高 ($P < 0.05$)。**结论** 养心通脉方于心经 (12: 00)、心包经 (20: 00) 时段干预更能有效改善 PCHD 血瘀证模型大鼠血脂水平、抑制炎症反应和改善心肌组织损伤, *Caln2*、*Cacna1s* 基因可能是养心通脉方干预 PCHD 血瘀证的关键靶点。

[关键词] 早发冠心病; 血瘀证; DNA 甲基化; 血脂; 炎症因子; 养心通脉方; 子午流注

基金项目: 国家自然科学基金 (81874375); 湖南省自然科学基金 (2023JJ30452); 湖南省中医药科研计划 (C2023002); 湖南省教育厅科学研究项目 (22A0278); 湖南省普通高等学校科技创新团队 (湘教通[2023]233 号)

✉ 通讯作者: 003290@hnucm.edu.cn

冠心病是由冠状动脉粥样硬化引起的血管腔狭窄、冠状动脉供血不足等复杂的病理生理过程导致的心脏病。我国冠心病现患人数达 1139 万, 且患者逐渐趋于年轻化, 包括早发冠心病 (premature

coronary heart disease, PCHD) 在内的心血管疾病已成为重大公共卫生问题^[1]。PCHD 是受遗传和环境双因素交互作用而导致的多基因异常的复杂疾病, 该病人群疾病发作时男性 <55 岁, 女性 <65 岁^[2]。相较于非早发冠心病, PCHD 病变进展快、粥样斑块更不稳定、冠状动脉斑块组织纤维化程度更高、更易引发心血管不良事件, 且预后不良^[3-4]。研究表明, 相对非早发冠心病而言, PCHD 遗传基础更突出, 遗传因素对发病风险的贡献率超过 50%^[5]。表观遗传学能够很好地反映环境和遗传因素在心血管疾病中的交互作用^[6]。DNA 甲基化是表观遗传修饰中最关键的一种形式, 且与动脉粥样硬化等心血管疾病发生密切相关, 同时 DNA 甲基化随年龄的增长而发生动态变化^[7], 因此其对 PCHD 早期诊断和治疗具有重要意义。

在中医理论中, 冠心病属于“胸痹”“真心痛”等范畴, 血脉瘀滞是其重要病理特征, 血瘀证是冠心病最常见的证型之一^[8]。养心通脉方是袁肇凯教授治疗胸痹心痛的经验方, 具有扶正养心、祛瘀止痛的功效。本团队前期研究已证明该方在改善 PCHD 患者血液流变学指标、保护冠状动脉结构、调控表观遗传修饰等方面疗效显著^[9]。子午流注理论是将一天 24 h 划分为十二时辰, 对应十二地支, 与人体十二脏腑的气血运行结合, 在一天十二时辰之中, 人体气血首尾相衔地循环流注, 盛衰开合均有时间节奏和时间特性理论^[10]。子午流注理论中, 在某经脉或脏腑的特定时间内进行治疗, 能对该病变脏腑或经脉功能起到最大的调节作用, 在各脏腑气血旺盛时间服药能够起到有效的治疗效果^[11]。午时属心经, 戌时属心包经。因此, 本研究筛选养心通脉方对 PCHD 血瘀证模型大鼠的 DNA 甲基化差异基因, 并根据子午流注理论采用心经(午时)和心包经(戌时)两个时间段进行养心通脉方干预, 以期更深入地研究养心通脉方对 PCHD 血瘀证大鼠的作用机制及最佳给药时间。本实验经湖南中医药大学动物伦理委员会审批通过(审批号: LLBH-202212140002)。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 72 只, 6~8 周龄, 体质量 180~220 g, 由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供, 实验动物许可证号: 430727231100480051。饲养于湖南中医药大学动物实验中心 SPF 级动物

室, 自由进食进水, 昼夜周期 12 h, 相对湿度 (50±10)%, 温度 (22±2)℃。

1.2 药物

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。养心通脉方配方颗粒由四川新绿色药业科技发展有限公司生产, 1 g 颗粒剂相当于生药 11.91 g, 溶于 0.9% 氯化钠注射液中配成浓度为 1 g/ml 的溶液; 阿托伐他汀钙片(湖南迪诺制药股份有限公司, 批号: 1230520), 捣粉溶于蒸馏水, 配制成浓度为 0.2 mg/ml 的溶液。

1.3 主要试剂与仪器

维生素 D3 (批号: S13012)、盐酸异丙肾上腺素 (批号: B26918), 上海源叶生物科技有限公司; 异氟烷 (批号: R510-22-10), 深圳瑞沃德生命科技有限公司; DNA 分离试剂盒 (批号: 69506), 德国 QIAGEN 公司; 肿瘤坏死因子 α (TNF- α) ELISA 试剂盒 (批号: LOT20230810-31063B)、脂多糖 (LPS) ELISA 试剂盒 (批号: LOT20230810-38916B)、白细胞介素 10 (IL-10) ELISA 试剂盒 (批号: LOT20230810-30194B), 上海酶联生物科技有限公司; HE 染液 (批号: G1120), Solarbio 公司; 蛋白酶 K (批号: 127149304)、核糖核酸酶 A (批号: 142351601), 德国 QIAGEN 公司; AMPure XP 磁珠 (批号: A63881), 美国 Beckman Coulter 公司; 5-甲基胞嘧啶抗体 (批号: MAB-006-500), 比利时 Diagenode 公司; 氯化钠 (批号: 71386-1L), 美国 Sigma 公司。

数字心电图机 (型号: ECG-2303B), 广州三锐电子科技有限公司; 小动物呼吸麻醉机 (型号: GOWEF680), 长沙临科仪器设备有限公司; 台式冷冻离心机 (型号: H1650R), 湖南湘仪实验室仪器有限公司; 全自动血流变测试仪 (型号: SA-6600), 北京赛科希德科技发展有限公司; 全自动生化检测仪 (型号: Cobas 8000-775), 瑞士罗氏诊断公司; 光学显微镜 (型号: NIKON ECLIPSE E100), 日本尼康公司; QuantStudio™ 5 实时荧光定量 PCR 系统 (型号: Primer 5.0), Applied Biosystems 公司; NovaSeq600 测序平台 (型号: NovaSeq6000)、超微量分光光度计 (型号: ND-1000), 赛默飞世尔科技公司; 多功能酶标仪 (型号: Freedom EVOlyzer), 奥地利帝肯贸易有限公司; 超声破碎仪 (型号: UCD-200), 比利时 Diagenode 公司; 生物分析仪 (型号: Agilent2100), 德国安捷伦科技有限公司。

1.4 模型制备

72 只大鼠适应性喂养 1 周后, 用 SPSS 28.0 软件产生的随机数字表选取 16 只作为空白对照大鼠, 剩余 56 只作为造模大鼠。空白对照大鼠采用普通饲料喂养, 造模大鼠根据本团队前期研究经验构建血瘀证大鼠模型^[12]: 采用高脂饲料(北京科澳协力饲料有限公司定制, 配方为 81.3% 基础饲料、3% 胆固醇、0.5% 胆酸钠、5% 白糖、10% 猪油、0.2% 丙基硫氧嘧啶) 喂养 8 周, 同时分别于造模第 1 天、第 3 天给予维生素 D3 30 万 IU/(kg·d) 灌胃、第 7 天给予维生素 D3 15 万 IU/(kg·d) 灌胃。8 周后运用 SPSS 28.0 软件生成随机数字表抽取空白对照、造模大鼠各 5 只进行模型评价。当造模组大鼠总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C) 水平中至少 2 项较空白对照大鼠显著升高, 且血液流变学指标中全血黏度和血浆黏度显著升高, 差异有统计学意义($P < 0.05$), 可认为血瘀证造模成功^[12]。

模型验证当日, 剩余 51 只造模大鼠连续 3 次(每次间隔 24 h) 皮下注射盐酸异丙肾上腺素 5 mg/(kg·d), 第 3 次注射结束后间隔 24 h, 对大鼠行心电图检测(大鼠提前禁食禁水 12 h), 通过观察心电图 ST 段是否抬高或压低 ≥ 0.1 mV 为冠心病血瘀证大鼠模型成功标准^[13-14]。本实验大鼠适应性喂养 1 周, 模型构建 9 周, 此时大鼠处于 17~19 周龄的成年期范围, 根据大鼠 8 周龄时达到性成熟换算, 此时的造模大鼠相当于人类的青壮年时期^[15], 属于 PCHD 的发病年龄, 故将此模型作为 PCHD 血瘀证模型。造模期间死亡 11 只大鼠, 造模成功大鼠 40 只。

1.5 DNA 甲基化测序

按照随机数字表抽取空白对照大鼠 3 只(空白组), 造模成功大鼠 6 只分为造模组、养心通脉方组各 3 只。空白组和造模组大鼠以 0.9% 氯化钠溶液 4 ml/(kg·d) 灌胃, 养心通脉方组以养心通脉方溶液 18 g/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次, 共干预 3 周。3 周给药结束后, 大鼠经异氟烷麻醉, 无菌条件下打开大鼠腹腔, 用腹主动脉采血法将血液收集至含抗凝剂的离心管中, 每只大鼠采血约 5 ml。随后迅速将血液样本于 4℃、3000 r/min(离心半径 10 cm) 离心 15 min, 分离出血细胞沉淀。弃去上层血浆, 取下层血细胞沉淀, 采用 DNA 分离试剂盒提取基因组 DNA, 使用超声破碎仪将基因组 DNA 片段化为 200~800 bp。通过末端修复、连接 Illumina 测序接

头。利用 AMPure XP 磁珠筛选 300~900 bp 的片段。使用抗 5-甲基胞嘧啶抗体富集甲基化 DNA 片段。对富集的 DNA 进行 PCR 扩增, 增加文库复杂度。通过生物分析仪评估文库质量。0.1 mol/L NaOH 变性后进行原位扩增后用 Illumina NovaSeq 6000 测序平台(8 pmol/L 标准浓度, cBot 簇生成)进行测序。

通过基于模型的 ChIP-Seq 数据分析工具(Model-based Analysis of ChIP-Seq2 MACS2)($q \leq 10^{-4}$) 鉴定长链非编码 RNA(lncRNA)、信使 RNA(mRNA)、小非编码 RNA(Small ncRNA) 相关甲基化富集峰, 结合 UCSC RefSeq 数据库(<https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway?db=hg19>) 进行功能注释。采用 diffReps 程序筛选启动子区差异甲基化区域(DMRs), 设定阈值($\log_2FC \geq 1$, $P \leq 0.01$) 确定统计学显著位点, 筛选有意义的差异甲基化基因。

1.6 养心通脉方不同时间干预对 PCHD 血瘀证的影响

1.6.1 分组及干预方法 按照随机数字表将剩余造模成功的 34 只大鼠分为模型组、养心通脉方子午流注干预组、养心通脉方对照组、阿托伐他汀钙组, 每组 8 只(剩余 2 只留作备用)。养心通脉方子午流注干预组大鼠给予养心通脉方溶液 18 g/(kg·d), 分别于每日心经时段(12:00)和心包经时段(20:00) 两次灌胃; 养心通脉方对照组给予养心通脉方溶液 18 g/(kg·d), 分别于每日 8:00 和 18:00 两次灌胃; 阿托伐他汀钙组给予阿托伐他汀钙片溶液 1.8 mg/(kg·d), 分别于每日 8:00 和 18:00 两次灌胃; 剩余空白对照大鼠 8 只(空白对照组), 和模型组大鼠予 0.9% 氯化钠注射液 4 ml/(kg·d), 分别于每日 8:00 和 18:00 两次灌胃。空白对照组采用普通饲料喂养, 其他各组继续高脂饲料喂养, 各组均干预 3 周。

1.6.2 观察指标及方法 最后一次灌胃后, 大鼠禁食不禁水 12 h 取材。1) 血脂指标: 经大鼠腹主动脉采集血液, 采用随机数字表法每组选取 5 只大鼠全血检测 TC、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL) 水平, 采用全自动生化检测仪检测。2) 心肌组织、胸主动脉病理改变: 采用随机数字表法选取每组 3 只大鼠的心肌组织 1.5~2.5 g 及胸主动脉组织 0.2~0.5 g 在 4% 多聚甲醛固定后进行常规包埋、切片、HE 染色, 封片后, 在高倍显微镜下 400 倍观察, KF-viewer(ver. 1.7.1.1) 软件进行图像分析和采集。3) ELISA 法检测血清炎症指标: 采用随机数字表法每组抽取 5 只大鼠的血清样本, 检

测 TNF- α 、LPS、IL-10 水平,按照试剂盒说明书步骤完成。在酶标仪 450 nm 处测量各孔吸光度,按照标准曲线方程确定样本浓度。4) 免疫沉淀-实时荧光定量 PCR 法 (Medip-qpcr 法) 检测心肌组织筛选基因水平:采用随机数字表法选取模型组、养心通脉方对照组、养心通脉方子午流注干预组各 3 只大鼠的心脏组织 100 mg,按照试剂盒说明书步骤进行 DNA 抽提、超声处理、DNA 沉淀 (MeDIP)、DNA 纯化、配置 Realtime PCR 反应体系后进行加样与封口,进行实时定量 PCR 检测,运用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法将目的基因表达的相对定量值用于统计分析。钙调蛋白 2 (*Caln2*)、钙电压门控通道亚基 $\alpha 1s$ (*Cacna1s*)、磷脂酶 C $\beta 1$ (*Plcb1*) 为 DNA 甲基化差异基因筛选结果,采用 Primer 5.0 软件进行引物设计,目的基因引物序列由上海康成生物工程有限公司合成。*Cacna1s* 引物:上游 5'GGGCAGGGACCTCAATCTCT3',下游 5'ACCCTTGCGTCTATTCCCAGT 3',产物长度 216 bp; *Caln2* 引物:上游 5'CCCAACT-CTGTTTCTCTCCCAA 3',下游 5'CATAGCGTCGAGTCAGAGCAA 3',产物长度 160 bp; *Plcb1* 引物:上游 5'AAGGCTTCTTACTGAAAATGCG 3',下游 5'CGGTTAGAGGACCTGTTTCATTC 3',产物长度 189 bp。

1.7 统计学方法

采用 SPSS 28.0 软件进行统计学分析。计量资料均符合正态分布,以均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示,方差齐者两组间比较采用独立样本 *t* 检验,方差不齐者采用韦尔奇 *t* (Welch's *t*) 检验;多组间比较,若方差齐采用单因素方差分析,方差不齐者采用韦尔奇方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 DNA 甲基化差异基因筛选结果

将养心通脉方组 vs 空白组间启动子内 mRNA 相关的差异甲基化基因,与造模组 vs 空白组间启动子内 mRNA 相关的差异甲基化基因取交集,得到

共同的启动子内差异甲基化区域高表达的基因 110 个,启动子内差异甲基化区域低表达的基因 131 个。再根据两组间差异倍数不同,以 $\log_2FC$ (造模组 vs 空白组) / $\log_2FC$ (养心通脉方组 vs 空白组) >2 为差异基因的筛选条件,即若为启动子内差异甲基化区域高表达的基因,则该基因在 3 组中的数值大小为造模组 $>$ 养心通脉方组 $>$ 空白组;若为启动子内差异甲基化区域低表达的基因,则该基因在 3 组中的数值大小为空白组 $>$ 养心通脉方组 $>$ 造模组。以上述条件为基准,筛选得到启动子内差异甲基化区域高、低表达基因分别为 13、25 个,最后根据 $P\leq 0.01$ 、基因功能及冠心病血瘀证气血不畅、瘀血阻滞心脉,伴微循环障碍、钙信号及血管内皮功能异常的生理病理特点^[16-20]筛选得到 3 个启动子内差异甲基化区域的基因 *Caln2*、*Cacna1s*、*Plcb1*。

2.2 各组大鼠血脂水平比较

表 1 示,与空白对照组比较,模型组 TC、LDL 含量升高, HDL 含量降低 ($P<0.01$);与模型组比较,养心通脉方子午流注干预组、养心通脉方对照组、阿托伐他汀钙组 TC、LDL 含量均降低, HDL 含量均升高 ($P<0.05$);与养心通脉方对照组比较,养心通脉方子午流注干预组 LDL 含量降低 ($P<0.05$), TC、HDL 含量差异无统计学意义 ($P>0.05$);与阿托伐他汀钙组比较,养心通脉方子午流注干预组 TC、HDL、LDL 含量差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

2.3 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果

图 1 示,空白对照组大鼠心肌组织排列整齐有序,结构清晰。模型组大鼠心肌组织排列紊乱,心肌细胞明显肿胀,并伴有大量炎症细胞浸润。与模型组比较,养心通脉方子午流注干预组、养心通脉方对照组、阿托伐他汀钙组心肌组织损伤均有所改善,细胞肿胀变形减少,仅有少量炎症细胞浸润,其中养心通脉方子午流注干预组和阿托伐他汀钙组

表 1 各组大鼠血脂水平比较

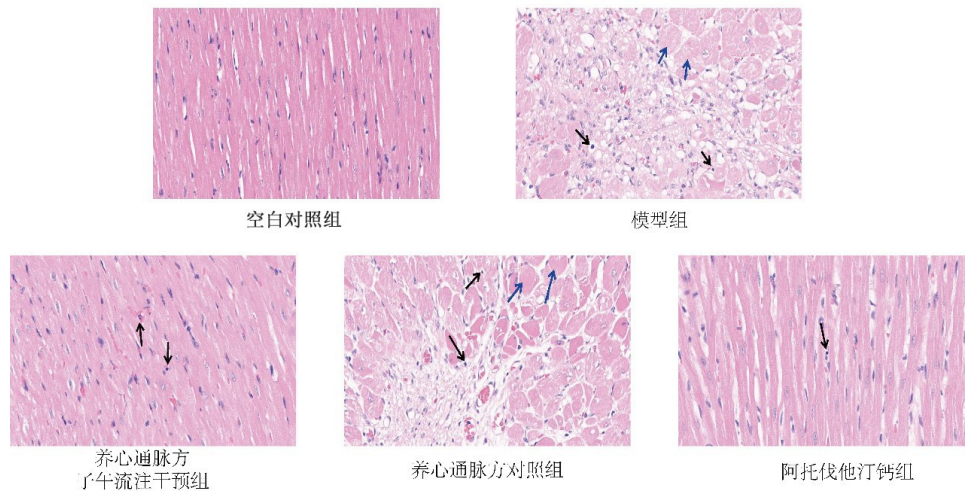
Table 1 Comparison of blood lipid levels in rats in each group

(mmol/L, $\bar{x}\pm s$)

组别	鼠数	TC	HDL	LDL
空白对照组	5	1.60 $\pm$ 0.56	2.01 $\pm$ 0.48	0.30 $\pm$ 0.15
模型组	5	9.96 $\pm$ 0.95 ^{a)}	0.89 $\pm$ 0.12 ^{a)}	8.86 $\pm$ 0.13 ^{a)}
养心通脉方对照组	5	2.32 $\pm$ 0.62 ^{b)}	1.15 $\pm$ 0.22 ^{b)}	0.70 $\pm$ 0.13 ^{b)}
养心通脉方子午流注干预组	5	1.82 $\pm$ 0.13 ^{b)}	1.16 $\pm$ 0.10 ^{b)}	0.48 $\pm$ 0.04 ^{b) c)}
阿托伐他汀钙组	5	1.95 $\pm$ 0.42 ^{b)}	1.19 $\pm$ 0.23 ^{b)}	0.39 $\pm$ 0.08 ^{b)}

注: TC, 总胆固醇; HDL, 高密度脂蛋白; LDL, 低密度脂蛋白。

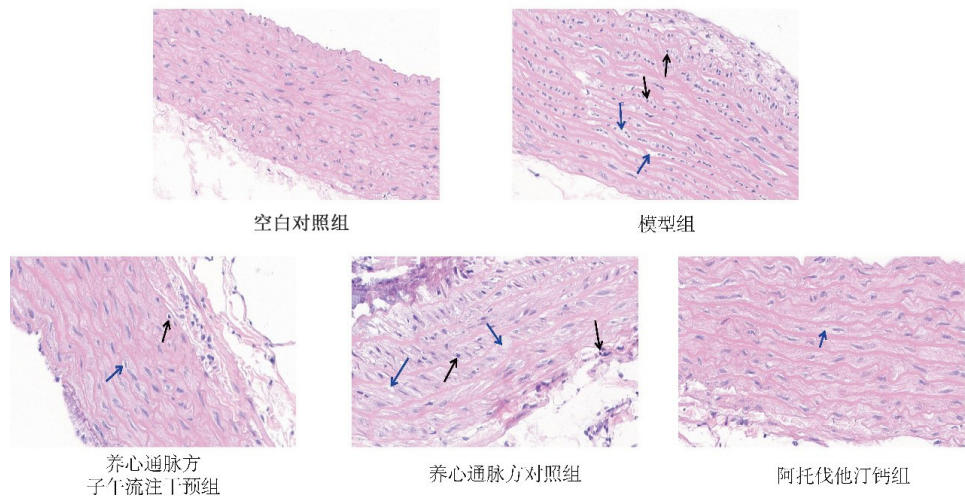
a) 与空白对照组比较, $P<0.01$; b) 与模型组比较, $P<0.05$; c) 与养心通脉方对照组比较, $P<0.05$ 。



注：黑色箭头指示为炎症细胞；蓝色箭头指示为心肌细胞肿胀变形。

图1 各组大鼠心肌组织病理学形态（HE染色，×400）

Figure 1 Histopathological morphology of rat myocardium in various groups (HE staining, ×400)



注：黑色箭头指示为炎症细胞；蓝色箭头指示为血管平滑肌细胞肿胀。

图2 各组大鼠胸主动脉病理学形态（HE染色，×400）

Figure 2 Pathological morphology of the thoracic aorta of rats in each group (HE staining, ×400)

改善较为明显。

2.4 各组大鼠胸主动脉HE染色结果

图2示，空白对照组大鼠胸主动脉组织结构清晰，管腔规则，血管内皮细胞完整、中膜平滑肌细胞排列整齐，纤维组织排列整齐。与空白对照组比较，模型组大鼠胸主动脉血管内壁增厚、损伤，血管平滑肌细胞肿胀变形，结构紊乱，可见大量脂质、胆固醇结晶，炎症细胞浸润明显，部分纤维组织断裂。养心通脉方子午流注干预组、养心通脉方对照组、阿托伐他汀钙组大鼠胸主动脉内膜损伤均有所改善，脂质、胆固醇结晶及炎症细胞浸润减少，纤维组织断裂有所修复，其中养心通脉方子午

流注干预组和阿托伐他汀钙组改善较为明显。

2.5 各组大鼠血清TNF-α、LPS、IL-10含量比较

表2示，与空白对照组比较，模型组大鼠血清TNF-α、LPS含量升高，IL-10含量降低 ($P<0.05$)；与模型组比较，养心通脉方对照组、养心通脉方子午流注干预组、阿托伐他汀钙组血清TNF-α、LPS含量降低，IL-10含量升高 ($P<0.05$)；与养心通脉方对照组比较，养心通脉方子午流注干预组血清TNF-α、LPS含量降低，IL-10含量升高 ($P<0.05$)；与阿托伐他汀钙组比较，养心通脉方子午流注干预组、养心通脉方对照组TNF-α、LPS、IL-10含量差异无统计学意义 ($P>0.05$)。

表2 各组大鼠血清 TNF- α 、LPS、IL-10 含量比较Table 2 Comparison of serum TNF- α , LPS and IL-10 levels in rats of each group($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TNF- α /pg·ml ⁻¹	LPS/EU·L ⁻¹	IL-10/pg·ml ⁻¹
空白对照组	5	319.83±95.76	260.82±77.20	54.73±4.00
模型组	5	907.57±109.83 ^{a)}	611.94±75.64 ^{a)}	29.81±3.12 ^{a)}
养心通脉方对照组	5	716.46±87.07 ^{b)}	490.16±71.86 ^{b)}	37.35±6.00 ^{b)}
养心通脉方子午流注干预组	5	540.37±156.17 ^{b) c)}	353.47±82.03 ^{b) c)}	46.11±3.92 ^{b) c)}
阿托伐他汀钙组	5	570.56±113.03 ^{b)}	395.62±90.50 ^{b)}	43.52±3.92 ^{b)}

注: TNF- α , 肿瘤坏死因子 α ; LPS, 脂多糖; IL-10, 白细胞介素 10。a) 与空白对照组比较, $P < 0.05$; b) 与模型组比较, $P < 0.05$; c) 与养心通脉方对照组比较, $P < 0.05$ 。表3 各组大鼠心肌组织 *Calm2*、*Cacna1s*、*Plcb1* 基因相对表达量比较Table 3 Comparison of relative expression of *Calm2*, *Cacna1s* and *Plcb1* genes in rat myocardial tissues of each group($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	<i>Calm2</i>	<i>Cacna1s</i>	<i>Plcb1</i>
模型组	3	1.91±0.38	0.06±0.01	0.36±0.07
养心通脉方对照组	3	1.17±0.17 ^{a)}	0.15±0.01 ^{a)}	0.19±0.06 ^{a)}
养心通脉方子午流注干预组	3	0.45±0.39 ^{a) b)}	0.25±0.06 ^{a) b)}	0.12±0.08 ^{a)}

注: *Calm2*, 钙调蛋白 2; *Cacna1s*, 钙电压门控通道亚基 $\alpha 1s$; *Plcb1*, 磷脂酶 C $\beta 1$ 。a) 与模型组比较, $P < 0.05$; b) 与养心通脉方对照组比较, $P < 0.05$ 。

2.6 各组大鼠心肌组织 *Calm2*、*Cacna1s*、*Plcb1* 基因相对表达量比较

表 3 示, 与模型组比较, 养心通脉方对照组和养心通脉方子午流注干预组 *Calm2*、*Plcb1* 基因相对表达量降低, *Cacna1s* 基因相对表达量升高 ($P < 0.05$); 与养心通脉方对照组比较, 养心通脉方子午流注干预组 *Calm2* 基因相对表达量降低、*Cacna1s* 基因相对表达量升高 ($P < 0.05$), 而 *Plcb1* 基因相对表达量差异无统计学意义 ($P > 0.05$)。

3 讨论

PCHD 作为冠心病的特殊类型, 近年来发病率呈年轻化趋势且遗传-环境交互作用显著, 病情凶险死亡率高, 预后不佳^[21-22]。PCHD 患者伴随着红细胞聚集性增加, 导致血液流动阻力增大, 从而增加血液黏度, 同时血脂异常也是 PCHD 患者常见的病理生理变化之一, 血脂异常状态下 LDL 在动脉壁沉积, 形成动脉粥样硬化斑块, 阻塞冠状动脉^[23-24]。PCHD 的发生与遗传易感性及 DNA 甲基化异常表达密切相关, 主要影响炎症因子水平和脂质代谢^[25-26]。本课题组前期研究发现, PCHD 血瘀证的遗传易感性与血管紧张素原 (*AGT*) 基因多态性密切相关, 可能通过调控内皮功能及炎症反应影响血瘀证表型, 提示 *AGT* 基因可能是血瘀证的关键遗传标志^[27]; PCHD 血瘀证的多基因遗传特征, 并筛选出凝血因子、炎症通路基因等相关的分子标志物, 表明其发病机制涉及遗传与环境交互作用^[28]。

但 PCHD 是否受到表观遗传、环境和时间因素的影响靶向调控基因表达, 影响血瘀证的发生发展, 有待深究。

本研究结果筛选得到了养心通脉方干预 PCHD 血瘀证大鼠的差异甲基化高表达基因 *Calm2*、*Plcb1* 和差异甲基化低表达基因 *Cacna1s*。*Calm2* 是钙调蛋白基因家族的成员, 研究发现干扰调节 *Calm2* 可以增加细胞活力并抑制细胞凋亡和自噬, 从而减轻心肌细胞损伤^[19]。*Cacna1s* 基因是负责编码骨骼肌细胞中 L 型电压依赖性钙通道的关键亚基之一, 该亚基具备缓慢失活的特性, 主要通过影响心肌细胞的钙离子平衡从而影响心脏功能^[29]。*Plcb1* 基因编码的蛋白是磷脂酶 C 家族的重要成员, 在先天性心脏病的全基因组筛查研究中, *Plcb1* 是冠心病有关的潜在重要基因, 主要影响心血管发育和功能通路^[17]。研究结果说明, *Calm2*、*Cacna1s*、*Plcb1* 与 PCHD 血瘀证发生发展密切相关, 其基因功能都与钙离子的调节相关, PCHD 患者心肌细胞中钙离子的水平增高影响血管平滑肌细胞的功能, 导致血管钙化, 造成冠状动脉的损伤^[18]。因此, *Calm2*、*Cacna1s*、*Plcb1* 在血管平滑肌通路富集, 影响 PCHD 血瘀证 DNA 甲基化, 调节钙离子水平从而影响 PCHD。而通过养心通脉方的干预后, *Calm2*、*Cacna1s*、*Plcb1* 的表达改变, 这表明养心通脉方对甲基化易感基因具有调节功能。

在中医理论中, 冠心病血瘀证核心病机为本虚标实、虚实交错, 血脉瘀滞是冠心病发病的重要病

理特征^[30]。养心通脉方中丹参活血化瘀、人参补益心气、桂枝温通血脉、枳实理气消痰、泽泻利水补阴，共奏扶正养心、祛瘀止痛的功效，契合 PCHD 病机。本团队认为，PCHD 发病与“阳微阴弦”病理机制相关，当阳气衰微时，容易出现胸痹心痛、呼吸困难、咳嗽气短等症状，夜间阳气较弱，故 PCHD 容易在夜晚发病。子午流注理论是依据五脏主时节律治疗疾病，既往研究发现，在心经（11: 00–13: 00）、心包经（19: 00–21: 00）时段治疗，顺经气盛衰，优于常规早晚治疗^[31–32]。本研究中，与养心通脉方对照组比较，在子午流注理论指导下，按心经、心包经干预比常规给药时间干预更能调节血脂、减少心肌细胞损害，调节血清 TNF- α 、LPS、IL-10 炎症因子水平，有效抑制炎症反应。养心通脉方对照组与养心通脉方子午流注干预组心肌组织 *Calm2*、*Cacna1s* 基因相对表达量差异显著，进一步验证 *Calm2*、*Cacna1s* 基因与养心通脉方不同给药时间干预 PCHD 血瘀证相关，可能是养心通脉方在心经、心包经旺盛时间干预 PCHD 血瘀证大鼠的相关作用靶点。*Plcb1* 基因相对表达量在养心通脉方对照组与养心通脉方子午流注干预组差异无统计学意义，可能受限于引物设计区域或样本异质性或本研究样本量较少，在后续研究将进一步完善实验设计进行验证，以全面解析其生物学意义。

综上，本研究通过基因组学筛选出养心通脉方干预 PCHD 血瘀证大鼠的潜在作用靶点，并基于子午流注理论基础，探究出心经和心包经两个时间段给药能更有效改善 PCHD 血瘀证病理状态，且其作用机制可能与 *Calm2*、*Cacna1s* 基因相关。但这些潜在靶点的具体作用机制、其上下游蛋白和通路的因果表达仍未阐明。此外，本研究每组大鼠的样本量相对偏少，对本研究结果的证据等级造成一定影响，将在下阶段的研究中更加深入探究，以期 PCHD 血瘀证的防治提供更多参考。

参考文献

- [1] 刘明波, 何新叶, 杨晓红, 等. 《中国心血管健康与疾病报告 2023》概要(心血管疾病流行及介入诊疗状况)[J]. 中国介入心脏病学杂志, 2024, 32(10): 541–550.
- [2] National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation, and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III). Third Report of the National Cholesterol Education Program (NCEP) Expert Panel on Detection, Evaluation,

- and Treatment of High Blood Cholesterol in Adults (Adult Treatment Panel III) final report [J]. Circulation, 2002, 106(25): 3143–3421.
- [3] XIE J, QI J, MAO H, et al. Coronary plaque tissue characterization in patients with premature coronary artery disease [J]. Int J Cardiovasc Imag, 2020, 36(6): 1003–1011.
- [4] 彭琴, 周琴怡, 黄柯, 等. 早发冠心病相关脂质代谢基因变异的研究进展 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2021, 29(3): 264–270.
- [5] CHACKO M, SARMA PS, HARIKRISHNAN S, et al. Family history of cardiovascular disease and risk of premature coronary heart disease: a matched case-control study [J]. Wellcome Open Res, 2020, 5: 70. doi: 10.12688/wellcomeopenres.15829.2.
- [6] PRASHER D, GREENWAY SC, SINGH RB. The impact of epigenetics on cardiovascular disease [J]. Biochem Cell Biol, 2020, 98(1): 12–22.
- [7] REITZ CJ, ALIBHAI FJ, DE LIMA-SEOLIN BG, et al. Circadian mutant mice with obesity and metabolic syndrome are resilient to cardiovascular disease [J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol, 2020, 319(5): H1097–H1111.
- [8] 黄湘龙, 李霄, 杨丰文, 等. 1970—2021 年冠心病中医证候特征演变规律文献研究 [J]. 中医杂志, 2023, 64(10): 1058–1063.
- [9] 黄海波. 养心通脉方对早发冠心病血瘀证家系 CHL1、ZEB2 基因甲基化作用影响的研究 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2015.
- [10] 李艳, 郭晖, 宋亚刚, 等. 子午流注与生物钟 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(10): 4770–4773.
- [11] 丁子超, 任献青, 苏杭, 等. 基于《幼幼集成》时段辨治规律治疗小儿慢性咳嗽的思路 [J]. 中医杂志, 2023, 64(10): 1004–1007.
- [12] 简维雄, 左和宁, 袁肇凯, 等. 心血瘀阻证动态演变过程大鼠模型的建立及方证验证评价 [J]. 中医杂志, 2015, 56(16): 1420–1424.
- [13] 周曼丽, 钱舒乐, 胡伊蕾, 等. 冠心病心血瘀阻证大鼠心肌代谢组学研究 [J]. 中医杂志, 2022, 63(10): 968–975.
- [14] 于子璇, 张书萌, 张梦雪, 等. 养心通脉方对心肌梗死血瘀证模型大鼠心肌能量代谢的影响 [J]. 中医杂志, 2023, 64(12): 1255–1262.
- [15] SENGUPTA P. The laboratory rat: relating its age with human's [J]. Inter J Preventive Med, 2013, 4(6): 624–630.
- [16] ZHANG Y, HOU YM, GAO F, et al. lncRNA GAS5 regulates myocardial infarction by targeting the miR-525-

- 5p/CALM2 axis [J]. J Cell Biochem, 2019, 120(11): 18678–1888.
- [17] DASOUKI MJ, WAKIL SM, AL-HARAZI O, et al. New insights into the impact of genome-wide copy number variations on complex congenital heart disease in Saudi Arabia [J]. Omics, 2020, 24(1): 16–28.
- [18] GRANDHI GR, MIRBOLOUK M, DARDARI ZA, et al. Interplay of coronary artery calcium and risk factors for predicting CVD/CHD Mortality: the CAC consortium [J]. JACC Cardiovasc Imaging, 2020, 13(5): 1175–1186.
- [19] MA B, ZHAO M, GUO Z. Circular RNA circ_0010729 knockdown attenuates oxygen-glucose deprivation-induced human cardiac myocytes injury by miR-338-3p/CALM2 axis [J]. J Cardiovasc Pharmacol, 2021, 77(5): 594–602.
- [20] HU S, CHEN L, ZENG T, et al. DNA methylation profiling reveals novel pathway implicated in cardiovascular diseases of diabetes [J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2023, 14: 1108126. doi: 10.3389/fendo.2023.1108126.
- [21] JAHANGIRY L, ABBASALIZAD FARHANGI M, NAJAFI M, et al. Clusters of the risk markers and the pattern of premature coronary heart disease: an application of the latent class analysis [J]. Front Cardiovasc Med, 2021, 8: 707070. doi: 10.3389/fcvm.2021.707070.
- [22] AL-KHLAIWI T, HABIB SS, BAYOUMY N, et al. Identifying risk factors and mortality rate of premature coronary artery disease in young Saudi population [J]. Sci Rep, 2024, 14(1): 12727.
- [23] CHEN BW, LIU JJ, XING JH, et al. Analysis of the correlation between the ratio of monocytes to high-density lipoprotein cholesterol and instant restenosis in patients with premature coronary heart disease [J]. Clin Appl Thromb Hemost, 2022, 28: 10760296221079334. doi: 10.1177/10760296221079334.
- [24] MĂNESCU IB, GABOR MR, MOLDOVAN GV, et al. An 8-SNP LDL cholesterol polygenic score: associations with cardiovascular risk traits, familial hypercholesterolemia phenotype, and premature coronary heart disease in central romania [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(18): 10038.
- [25] LAI EC, HUANG YC, LIAO TC, et al. Premature coronary artery disease in patients with immune-mediated inflammatory disease: a population-based study [J]. RMD Open, 2022, 8(1): e001993.
- [26] STONE NJ, SMITH SC, ORRINGER CE, et al. Managing atherosclerotic cardiovascular risk in young adults: JACC state-of-the-art review [J]. J Am Coll Cardiol, 2022, 79(8): 819–836.
- [27] 袁倩, 毛以林, 李杰, 等. 湖南地区人群早发冠心病血瘀证与 AGT 基因多态性的关系 [J]. 辽宁中医药大学学报, 2015, 17(4): 58–61.
- [28] 李杰, 张书萌, 张湘卓, 等. 基于 DNA 羟甲基化修饰调控 mRNA 表达探讨早发冠心病血瘀证相关易感基因 [J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(12): 5945–5948.
- [29] ALHASAN KA, ABDALLAH MS, KARI JA, et al. Hypokalemic periodic paralysis due to CACNA1S gene mutation [J]. Neurosciences (Riyadh), 2019, 24(3): 225–230.
- [30] 张久亮, 柳翼, 陈旺, 等. 冠心病中医病机及治疗原则分析 [J]. 中医杂志, 2012, 53(19): 1645–1647.
- [31] 李萍, 孙薇. 参脉饮择时服药治疗气阴两虚型心悸 60 例疗效观察 [J]. 四川中医, 2019, 37(11): 76–79.
- [32] 张贺, 张健, 杜艳君, 等. 子午流注纳子法穴位贴敷干预稳定性劳力型心绞痛的临床研究 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2021, 19(9): 1476–1479.

Effect of Different Time Interventions of *Yangxin Tongmai Formula* (养心通脉方) on DNA Methylation in Rat Models of Premature Coronary Heart Disease with Blood Stasis Syndrome

CHEN Xing¹, YU Zixuan¹, ZHANG Shumeng², LIU Yanjuan¹, DENG Shuangyou¹, WANG Ying¹, CHEN Lingli³, LI Jie¹

1. Institute of Traditional Chinese Medicine Diagnosis, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Hunan University of Chinese Medicine; 3. School of Medicine, Hunan University of Chinese Medicine

ABSTRACT Objective To observe the effect of *Yangxin Tongmai Formula* (养心通脉方) by midnight-noon ebb-flow administration method for rat models of premature coronary heart disease (PCHD) with blood stasis syndrome, and to explore the possible mechanism of action from the perspective of DNA methylation differential gene expression.

Methods There were 3 SD rats in each of the blank group, model group and *Yangxin Tongmai Formula* group, and the rats in the model group and *Yangxin Tongmai Formula* group were fed with high-fat chow plus vitamin D3 by gavage plus isoproterenol hydrochloride by subcutaneous injection to construct rat models of PCHD with blood stasis syndrome. After successful modelling, rats in *Yangxin Tongmai Formula* group were gavaged with 18 g/(kg·d) of

Yangxin Tongmai Formula, and rats in blank group and the model group were gavaged with 4 ml/(kg·d) of 0.9% NaCl solution, and serum samples of rats in each group were collected for DNA methylation sequencing after 3 weeks to screen for the relevant DNA methylation differentiation genes. In addition, rats with successful modelling of PCHD with blood stasis were randomly divided into model group, *Yangxin Tongmai Formula* with midnight-noon ebb-flow administration method group [18 g/(kg·d) of *Yangxin Tongmai Formula* was gavaged twice in the heart channel period (12:00) and pericardium channel period (20:00)], the *Yangxin Tongmai Formula* control group [18 g/(kg·d) of *Yangxin Tongmai Formula* was gavaged twice at 8:00 and 18:00] and the Atorvastatin Calcium group [atorvastatin calcium tablets solution 1.8 mg/(kg·d) at the same intervention time as that in *Yangxin Tongmai Formula* control group], and set up a blank group of 8 rats in each group. The model group and blank group were gavaged with 0.9% NaCl solution 4 ml/(kg·d) for the same time as the *Yangxin Tongmai Formula* control group. After 3 weeks of gavage, the blood lipids [including total cholesterol (TC), low-density lipoprotein (LDL), high-density lipoprotein (HDL)] levels of rats in each group were detected; the HE staining of myocardial tissues and thoracic aorta was used to observe the pathomorphological changes; the levels of serum inflammation indexes [tumour necrosis factor alpha (TNF- α), lipopolysaccharide (LPS), and interleukin 10 (IL-10)] were detected; immunoprecipitation-realtime fluorescence quantitative PCR was used to detect the relative expression of cardiac tissue screening differential genes.

Results The genes screened for differentially methylated regions were calmodulin 2 (*Calm2*), calcium voltage-gated channel subunit $\alpha 1s$ (*Cacna1s*), and phospholipase C $\beta 1$ (*Plcb1*). Compared with the blank group, rats in the model group showed elevated levels of TC, LDL, TNF- α and LPS, and decreased levels of HDL and IL-10 ($P < 0.05$ or $P < 0.01$); HE staining showed obvious swelling of myocardial fibres, accompanied by a large number of inflammatory cell infiltration, and thickening of the inner wall of the aortic vessels with internal wall damage, which was visible as a large number of lipid cholesterol crystals and obvious inflammatory cell infiltration. Compared with the model group, the TC, LDL, TNF- α and LPS contents of rats in the *Yangxin Tongmai Formula* with midnight-noon ebb-flow administration method group, the *Yangxin Tongmai Formula* control group, and the atorvastatin calcium group all reduced, and the contents of HDL and IL-10 all elevated ($P < 0.05$), with the improvement of myocardial tissue damage and the reduction of inflammatory infiltration, and the improvement of the damage of the inner lining of the thoracic aorta and the reduction of lipid infiltration. Compared with *Yangxin Tongmai Formula* control group, LDL, TNF- α and LPS contents reduced, and IL-10 contents increased in the midnight-noon ebb-flow administration method group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the relative expression of *Calm2* and *Plcb1* genes decreased and the relative expression of *Cacna1s* gene increased in *Yangxin Tongmai Formula* control group and the midnight-noon ebb-flow administration method group ($P < 0.05$); compared with the *Yangxin Tongmai Formula* control group, the relative expression of *Calm2* gene decreased and the relative expression of *Cacna1s* gene increased in the midnight-noon ebb-flow administration method group ($P < 0.05$). **Conclusion** The intervention of *Yangxin Tongmai Formula* in the heart channel period (12:00) and pericardium channel period (20:00) was more effective in improving the blood lipid level, inhibiting inflammation, and improving myocardial tissue damage in rats of PCHD with blood stasis syndrome, and *Calm2* and *Cacna1s* genes may be the key targets of *Yangxin Tongmai Formula* in intervening the blood stasis syndrome of PCHD.

Keywords premature coronary heart disease; blood stasis syndrome; DNA methylation; lipids; inflammation factors; *Yangxin Tongmai Formula* (养心通脉方); midnight-noon ebb-flow

(收稿日期: 2025-01-20; 修回日期: 2025-03-23)

[编辑: 邓媛]