

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2026.07.014

养心通脉方对冠心病血瘀证模型大鼠心肌组织甲基化关键基因蛋白及 PERK/ATF4/CHOP 信号通路的影响

张纯, 张书萌, 毛妍, 陈杏, 匡慧芳, 杨怡, 陈伶俐, 李杰✉

湖南中医药大学, 湖南省长沙市岳麓区含浦科教园学士路 300 号, 410208

[摘要] **目的** 基于 DNA 甲基化探讨养心通脉方治疗冠心病血瘀证的作用机制。**方法** 将 72 只 SD 大鼠随机分为对照组 12 只和造模组 60 只, 造模组大鼠采用高脂饲料喂养+维生素 D3 灌胃+异丙肾上腺素皮下注射法构建冠心病血瘀证大鼠模型。将造模成功的 41 只大鼠随机分为模型组、养心通脉方低、中、高剂量组和阿托伐他汀钙组, 每组 8 只, 1 只留作备用。养心通脉方低、中、高剂量组分别予养心通脉方 6、12、18 g/(kg·d) 灌胃, 阿托伐他汀钙组予阿托伐他汀钙片 1.8 mg/(kg·d) 灌胃, 对照组和模型组予 0.9% 氯化钠注射液 4 ml/(kg·d) 灌胃, 每日 1 次, 连续灌胃 3 周。末次给药 24 h 后, ELISA 法检测血清血脂 [总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)]、心肌酶 [心肌肌钙蛋白 T (cTnT)、肌酸激酶同工酶 MB (CK-MB)、乳酸脱氢酶 (LDH)]、炎症因子 [白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-10 (IL-10)] 水平, HE 染色观察心肌组织病理改变。全血 DNA 甲基化测序分析对照组、模型组和养心通脉方高剂量组差异甲基化基因表达, 并对筛选到的关键基因采用 Western Blot 法进行下游信号通路的蛋白水平验证。**结果** 与对照组比较, 模型组大鼠 TC、TG、LDL-C、cTnT、CK-MB、LDH、IL-1 β 水平升高, HDL-C、IL-10 水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。与模型组比较, 各给药组 TC、LDL-C、CK-MB、LDH 水平降低, IL-10 水平升高, 其中养心通脉方高剂量组在降低 cTnT 水平方面优于其他中药组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。HE 病理染色表明养心通脉方高剂量组可改善心肌细胞肿胀、排列紊乱和胞核固缩、消失等情况, 减轻心肌细胞损伤。全血 DNA 甲基化测序结果表明, 对照组、模型组和养心通脉方高剂量组共有差异甲基化表达基因 240 个, 其中高甲基化表达 109 个, 低甲基化表达 131 个, 真核翻译启动因子 2 α 激酶 3 (*eif2ak3*) 为关键差异甲基化表达基因。与对照组比较, 模型组 EIF2AK3、磷酸化蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 (p-PERK)、活化转录因子 4 (ATF4)、C/EBP 同源蛋白 (CHOP)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 蛋白水平升高、B 淋巴细胞瘤-2 (Bcl-2) 蛋白水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$); 与模型组比较, 养心通脉方高剂量组 EIF2AK3、p-PERK、ATF4、CHOP、Bax 蛋白水平降低、Bcl-2 蛋白水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。**结论** 养心通脉方可能通过调控关键差异甲基化表达基因 *eif2ak3* 及 PERK/ATF4/CHOP 信号通路, 从而抑制内质网应激, 减少心肌细胞凋亡, 达到治疗冠心病血瘀证的作用。

[关键词] 冠心病; 血瘀证; 真核翻译启动因子 2 α 激酶 3; 蛋白激酶 RNA 样内质网激酶; 活化转录因子 4; C/EBP 同源蛋白; 养心通脉方

冠心病 (coronary heart disease, CHD) 是在动脉粥样硬化的基础上继发的冠状动脉管腔狭窄或阻

塞导致心肌缺血、缺氧、坏死的一类慢性炎症性疾病。针对血压、血糖、血脂等冠心病危险因素的现代医学治疗方案, 仍面临着疗效欠佳的困境^[1]。心理因素、社会因素、环境污染等可控可变的非传统发病因素^[2], 为冠心病的治疗提供了新视角。表观遗传学说旨在揭示基因表达与环境因素之间的动态可逆关系, DNA 甲基化作为其重要修饰形式之一,

基金项目: 国家自然科学基金 (81874375); 湖南省自然科学基金青年项目 (2025JJ60521); 湖南省研究生科研创新项目 (CX20251195); 湖南中医药大学研究生科研创新项目 (2025CX162); 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

可因环境信号的变化改变特定基因的甲基化水平, 调控蛋白功能的发挥, 影响冠心病的发病和治疗效果^[3]。

冠心病属于中医学“胸痹”“心痛”范畴, 血瘀证为其主要证型^[4]。养心通脉方是袁肇凯在著名中医学大家秦伯未遣方基础上化裁而来治的疗胸痹心痛的经验效方, 前期研究^[5]表明, 养心通脉方可有效改善 CHD 血瘀证患者血脂水平, 减轻临床症状, 延缓疾病进展。本研究借助测序技术分析冠心病血瘀证模型大鼠心肌组织 DNA 甲基化水平变化情况, 挖掘致病关键基因, 同时探讨养心通脉方治疗冠心病血瘀证的可能作用机制, 为其临床应用提供证据支撑。本研究获得湖南中医药大学动物伦理委员会批准, 批件号 LLBH-202207050003。

1 材料与方法

1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠 72 只, 6~8 周龄, 体质量 220~250 g, 购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 实验动物生产许可证编号: SCXK(湘) 2019-0004。分笼饲养于湖南中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房, 自由饮水、进食。相对湿度 (50±10) %, 温度 (22±2) °C, 明暗交替 12 h。

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。由四川新绿色药业科技发展有限公司提供配方颗粒, 1 g 颗粒相当于 11.91 g 生药。将中药配方颗粒溶于 40 °C 的 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 (乐普制药科技有限公司, 批号 H20133127, 规格: 10 mg/片) 研磨成粉, 加入蒸馏水, 配成 1.8 mg/ml 的溶液。

1.3 主要试剂与仪器

维生素 D3 (批号 F24GS139781)、异丙肾上腺素 (批号 MFCD00012603), 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; 苏木精-伊红染色液 (批号 G1120), 北京索莱宝科技有限公司; 纤维蛋白原 (FIB) ELISA 试剂盒 (批号 LOT20230810-30866B)、乳酸脱氢酶 (LDH) ELISA 试剂盒 (批号 LOT20230810-35234B)、肌酸激酶同工酶 MB (CK-MB) ELISA 试剂盒 (批号 LOT20230810-34981B)、心肌肌钙蛋白 T (cTnT) ELISA 试剂盒 (批号 LOT20230810-30454B)、白细胞介素-1β (IL-1β) ELISA 试剂盒 (批号

LOT20230810-30206B)、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; 基因组 DNA 样本试剂盒 (批号 FC-102-1002)、NovaSeq 6000 试剂盒 (批号 2012866), 美国因美纳公司; AMPure XP 磁珠 (批号 A63881), 美国贝克曼库尔特有限公司; 5-甲基胞嘧啶抗体 (批号 MAB-006-500), 比利时 Diagenode 公司; BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 P0012), 上海碧云天生物技术有限公司; 真核翻译起始因子 2α 激酶 3 (EIF2AK3) 抗体 (批号 AF05828)、磷酸化蛋白激酶 RNA 样内质网激酶 (p-PERK) 抗体 (批号 AF00279)、C/EBP 同源蛋白 (CHOP) 抗体 (批号 AF02035), 湖南艾方生物科技有限公司; 活化转录因子 4 (ATF4) 抗体 (批号 R381426)、B 淋巴细胞瘤 2 (Bcl-2) 抗体 (批号 250412)、Bcl-2 相关 X 蛋白 (Bax) 抗体 (批号 R22708), 成都正能生物技术有限公司; 甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (GAPDH) 抗体 (批号 YM3029)、羊抗小鼠 IgG (批号 RS23710)、羊抗兔 IgG (批号 RS23920), 安诺伦生物科技有限公司。

小动物呼吸麻醉机 (型号 GOWEF680), 长沙临科仪器设备有限公司; 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; 多功能酶标仪 (型号 Freedom EVOlyzer) 奥地利帝肯贸易有限公司; 16 导联生理记录仪 (型号 MP150), 美国拜奥帕克公司; 高速冷冻离心机 (型号 TGL-20MB), 长沙湘智离心机仪器有限公司; 全自动生化检测仪 (型号 Cobas 8000-775), 瑞士罗氏诊断公司; 非接触式超声破碎仪 (型号 UCD-200), 比利时 Diagenode 公司; 微量分光光度计 (型号 ND-1000), 美国 NanoDrop 公司; 高通量基因测序仪 (型号 NovaSeq 6000), 美国因美纳公司; 外荧光成像仪 (型号 Odyssey), 美国 LI-COR 公司。

1.4 动物造模

72 只 SD 大鼠适应性喂养 1 周后, 采用随机数字表法分为对照组 12 只, 造模组 60 只。参照团队前期经验进行冠心病血瘀证大鼠造模^[6]: 造模组大鼠予高脂饲料 (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, 在造模第 1、3、7 天分别予维生素 D3 30 万、30 万、15 万 IU/kg 灌胃。对照组大鼠普通饲料喂养。8 周后采用随机数字表法选取 4 只对照组大鼠、8 只造模组大鼠进行模型验证。4% 异氟烷诱导麻醉, 2% 异氟烷维持麻醉, 腹主动脉采血检

测血液流变学、FIB 水平,若造模组大鼠血浆黏度、全血黏度和 FIB 较对照组显著升高,差异有统计学意义,提示血瘀证造模成功。血瘀证大鼠模型构建成功当日皮下注射异丙肾上腺素 5 mg/(kg·d),每 24 h 注射 1 次,连续 3 次。最后一次注射完成后,隔日异氟烷吸入麻醉大鼠,记录心电图 II 导联 ST 段变化,若出现 ST 段抬高^[7],则表明冠心病血瘀证大鼠模型构建成功。

1.5 动物分组与干预方法

造模组大鼠造模期间死亡 11 只,将剩余的 41 只造模成功大鼠按随机数字表法分为模型组,养心通脉方低、中、高剂量组,阿托伐他汀钙组,每组 8 只,1 只留作备用。对照组大鼠剩余 8 只。养心通脉方低、中、高剂量组分别予养心通脉方 6、12、18 g/(kg·d)灌胃,阿托伐他汀钙组予阿托伐他汀钙片溶液 1.8 mg/(kg·d)灌胃,对照组和模型组予 0.9% 氯化钠注射液 4 ml/(kg·d)灌胃。每日灌胃 1 次,连续 3 周。对照组普通饲料喂养,其余各组均继续高脂饲料喂养。

1.6 观察指标及方法

1.6.1 ELISA 法检测血脂、心肌酶、IL-1 β 、IL-10 含量 末次干预结束后,大鼠禁食不禁水 24 h。每组按随机数字表法选取 4 只大鼠,腹主动脉取血,4℃、3500 r/min(离心半径 6 cm)离心 15 min,取上清。全自动生化检测仪检测总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)含量。按照 ELISA 试剂盒说明书操作,于酶标仪下测定波长 450 nm 处光密度值,检测大鼠血清中 cTnT、CK-MB、LDH、IL-1 β 、IL-10 含量。

1.6.2 HE 染色观察心肌组织病理情况 根据上述检测结果,中药干预组中养心通脉方高剂量组疗效最佳,故选取养心通脉方高剂量组作为中药干预代表进行后续实验。按照随机数字表法每组选取 3 只大鼠心脏组织,脱水、浸蜡、包埋、切片后进行苏木素、伊红染色,封片后置于光学显微镜下观察大鼠心脏形态学变化。

1.6.3 DNA 甲基化测序 采用随机数字表法每组各收集 3 只大鼠的全血样本,样本质量评估合格后使用非接触式超声破碎仪将 DNA 样本片段化。运用基因组 DNA 提取试剂盒将片段化的 DNA 进行末端修复、3'末端加 A 和接头连接。将连接后的 DNA 片段与抗 5-甲基胞嘧啶抗体共同孵育获取富含甲基化的 DNA 片段,并对其进行 PCR 扩增和磁珠纯化。

文库质控合格后按照试剂盒说明书,在高通量基因测序仪上使用 NovaSeq 6000 试剂盒进行测序。

将干净的数据片段与参考基因组进行唯一比对。采用软件 MACS2 ($q < 10^{-4}$) 鉴定不同组别间与 mRNA 相关的有统计学意义的甲基化富集峰。利用 UCSC RefSeq 数据库,将启动子内 mRNA 相关甲基化位点信息注释到距离其最近的基因上。以 $\log_2FC \geq 1$, $P \leq 0.01$ 为筛选标准,使用软件 diffReps 1.55.6 筛选出不同组别间 mRNA 启动子相关的差异甲基化区域,并使用 UCSC RefSeq 数据库对其进行注释,筛选出与冠心病血瘀证发病和治疗密切相关的基因。

1.6.4 Western Blot 法检测心肌组织差异甲基化基因及相关通路蛋白表达水平 采用随机数字表法每组各选取 4 只大鼠的心脏组织,研磨裂解后 BCA 试剂盒测定蛋白浓度,依次上样、电泳、转膜、封闭,加入一抗 EIF2AK3、p-PERK、ATF4、CHOP、Bax、Bcl-2(稀释比例均为 1:1000)、GAPDH(稀释比例为 1:5000)4℃孵育过夜。TBST 洗膜 3 次,10 min/次,加入荧光二抗(稀释比例为 1:10 000)室温摇床孵育, TBST 充分洗涤后置于荧光成像系统对目标条带灰度值进行分析。

1.7 统计学方法

采用 GraphPad Prism 10.0 软件进行统计学分析。计量资料均符合正态分布,以均数 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。两组间比较,若方差齐用独立样本 t 检验,若方差不齐采用 Welch 校正 t 检验;多组间比较选用单因素方差分析,若方差齐组间两两比较选用 Bonferroni 法,若方差不齐选用 Dunnett T_3 法。

2 结果

2.1 各组大鼠血脂水平比较

表 1 示,与对照组比较,模型组大鼠 TC、TG、LDL-C 水平升高, HDL-C 水平降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);与模型组比较,各药物干预组 TC、LDL-C 水平下降,养心通脉方高剂量组 TG 水平下降,养心通脉方低、中剂量组 HDL-C 水平上升 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$);各药物干预组间各指标差异均无统计学意义 ($P > 0.05$)。

2.2 各组大鼠血清中 cTnT、CK-MB、LDH、IL-1 β 、IL-10 含量比较

表 2 示,与对照组比较,模型组 cTnT、CK-MB、LDH、IL-1 β 含量明显升高, IL-10 水平降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各药物干预组 CK-MB、

表 1 各组大鼠血清中 TC、TG、HDL-C、LDL-C 含量比较

Table 1 Comparison of serum levels of TC, TG, HDL-C, and LDL-C of rats in each group (mmol/L, $\bar{x}\pm s$)					
组别	鼠数	TC	TG	HDL-C	LDL-C
对照组	4	1.41±0.45	0.23±0.06	1.29±0.24	0.30±0.03
模型组	4	17.89±8.77 ^{a)}	0.76±0.18 ^{a)}	0.68±0.23 ^{a)}	10.81±2.72 ^{b)}
养心通脉方低剂量组	4	2.27±0.43 ^{c)}	0.59±0.11	1.33±0.18 ^{c)}	0.48±0.11 ^{d)}
养心通脉方中剂量组	4	2.23±0.24 ^{c)}	0.61±0.10	1.15±0.11 ^{d)}	0.61±0.15 ^{d)}
养心通脉方高剂量组	4	1.70±0.09 ^{c)}	0.37±0.06 ^{d)}	1.09±0.20	0.36±0.07 ^{d)}
阿托伐他汀钙组	4	1.82±0.35 ^{c)}	0.46±0.19	1.20±0.16	0.39±0.07 ^{d)}

注：TC，总胆固醇；TG，甘油三酯；HDL-C，高密度脂蛋白胆固醇；LDL-C，低密度脂蛋白胆固醇。

a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与对照组比较， $P<0.05$ ；c) 与模型组比较， $P<0.01$ ；d) 与模型组比较， $P<0.05$ 。

表 2 各组大鼠血清中 cTnT、CK-MB、LDH、IL-1 β 、IL-10 含量比较

Table 2 Comparison of serum levels of cTnT, CK-MB, LDH, IL-1 β and IL-10 of rats in each group ($\bar{x}\pm s$)						
组别	鼠数	cTnT/pg·ml ⁻¹	CK-MB/ng·ml ⁻¹	LDH/ng·ml ⁻¹	IL-1 β /pg·ml ⁻¹	IL-10/pg·ml ⁻¹
对照组	4	146.40±33.44	8.85±2.18	41.62±4.28	11.46±0.63	61.72±3.61
模型组	4	360.10±14.04 ^{a)}	17.37±1.61 ^{a)}	67.37±7.93 ^{a)}	32.72±2.38 ^{a)}	35.19±4.31 ^{a)}
养心通脉方低剂量组	4	294.30±17.93 ^{c)}	9.71±1.68 ^{b)}	37.47±2.01 ^{b)}	29.51±2.03	45.10±3.43 ^{c)}
养心通脉方中剂量组	4	340.80±12.34	12.01±2.66 ^{c)}	51.47±3.76 ^{b)}	24.95±1.57 ^{b)}	48.56±0.81 ^{b)}
养心通脉方高剂量组	4	231.30±28.09 ^{b) d)}	11.91±2.10 ^{c)}	50.88±5.97 ^{b)}	19.94±3.25 ^{b) e)}	49.50±3.75 ^{b)}
阿托伐他汀钙组	4	237.30±55.08	11.22±1.60 ^{b)}	44.52±4.04 ^{b)}	20.08±3.88 ^{b) e)}	48.66±6.01 ^{b)}

注：cTnT，心肌肌钙蛋白 T；CK-MB，肌酸激酶同工酶；LDH，乳酸脱氢酶；IL-1 β ，白细胞介素-1 β ；IL-10，白细胞介素-10。

a) 与对照组比较， $P<0.01$ ；b) 与模型组比较， $P<0.01$ ；c) 与模型组比较， $P<0.05$ ；d) 与养心通脉方中剂量组比较， $P<0.05$ ；e) 与养心通脉方低剂量组比较， $P<0.05$ 。

LDH 含量降低，IL-10 水平升高，养心通脉方低、高剂量组 cTnT 含量降低，养心通脉方中、高剂量组和阿托伐他汀钙组 IL-1 β 水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与养心通脉方中剂量组比较，养心通脉方高剂量组 cTnT 含量降低 ($P<0.05$)；与养心通脉方低剂量组比较，养心通脉方高剂量组、阿托伐他汀钙组 IL-1 β 水平降低 ($P<0.01$)。

2.3 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果

选取在抗炎、减轻心肌损伤、改善脂质方面疗效最佳的养心通脉方高剂量组作为中药干预的代表。图 1 示，对照组心肌细胞排列整齐紧密，细胞核膜染色清晰均匀；模型组心肌细胞排列紊乱，染色不均，局灶性心肌细胞染色变浅，可见心肌细胞肿胀，胞核固缩或消失，心肌间质水肿增宽；养心通脉方高剂量组、阿托伐他汀钙组心肌细胞排列整齐，染色均匀，未见明显肿胀、坏死。

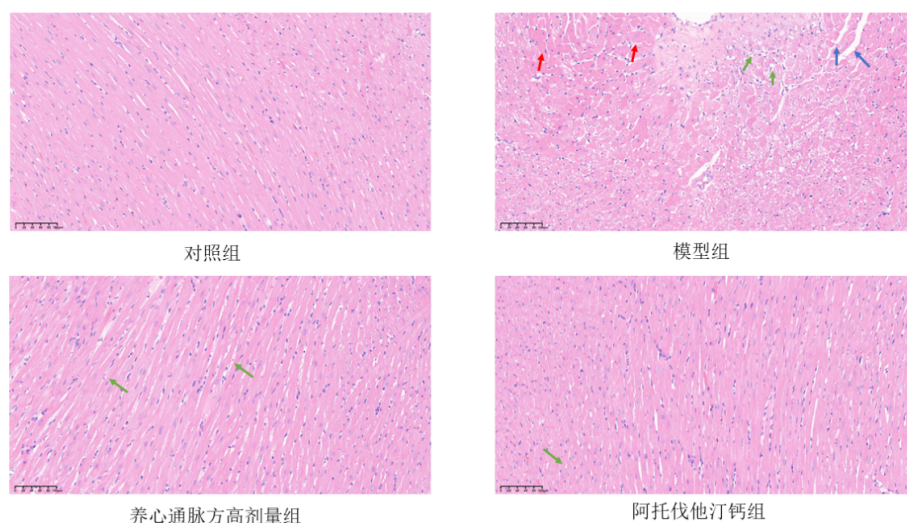
2.4 各组大鼠全血差异甲基化基因分析结果

养心通脉方高剂量组对比对照组共 1192 个基因启动子存在甲基化差异，其中高甲基化 592 个，低甲基化 600 个；模型组对比对照组共 1412 个基因启动子存在甲基化差异，其中高甲基化 913 个，低甲基化 499 个。将养心通脉方高剂量组对比对照组启动子内差异甲基化基因与模型组对比对照组启动

子内差异甲基化基因取交集可知，三组间共有差异甲基化表达基因 240 个，其中高甲基化表达 109 个，低甲基化表达 131 个。以两组间差异表达倍数的比值为筛选条件，即 $\log_2FC$ (模型组 vs 对照组) / $\log_2FC$ (养心通脉方高剂量组 vs 对照组) >1.5 ，再结合冠心病血瘀证血管病理性重塑和心肌细胞的功能特点^[8-9]，筛选出关键基因 *eif2ak3*。*eif2ak3* 为启动子内低甲基化表达致病基因， $\log_2FC$ (模型组 vs 对照组) 值为 -2.49， $\log_2FC$ (养心通脉方高剂量组 vs 对照组) 值为 -1.63，其比值 >1.5 ，既符合筛选条件，又能量化展示经养心通脉方高剂量组干预后，*eif2ak3* 启动子内甲基化修饰程度较模型组有所提升的情况。

2.5 各组大鼠心肌组织 EIF2AK3、p-PERK、ATF4、CHOP、Bax、Bcl-2 蛋白水平比较

表 3 示，与对照组比较，模型组 EIF2AK3、p-PERK、ATF4、CHOP、Bax 蛋白水平升高、Bcl-2 蛋白水平降低 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)；与模型组比较，养心通脉方高剂量组 EIF2AK3、p-PERK、ATF4、CHOP、Bax 蛋白水平降低、Bcl-2 蛋白水平升高 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。各组大鼠心肌组织 EIF2AK3、p-PERK、ATF4、CHOP、Bax、Bcl-2 蛋白电泳图见图 2。



注：红色箭头指示细胞肿胀；绿色箭头指示胞核固缩或消失；蓝色箭头指示间质水肿。

图 1 各组大鼠心肌组织 HE 染色结果 (×200)

Figure 1 HE staining results of myocardial issue of rats in each group (×200)

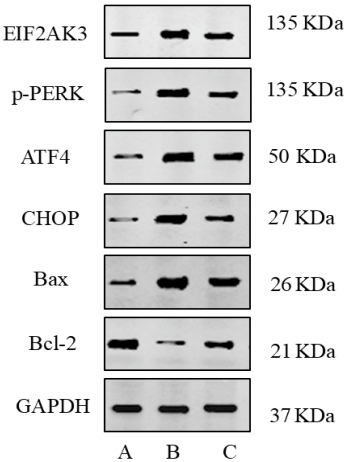
表 3 各组大鼠心肌组织 EIF2AK3、p-PERK、ATF4、CHOP、Bax、Bcl-2 蛋白水平比较

Table 3 Comparison of EIF2AK3, p-PERK, ATF4, CHOP, Bax, and Bcl-2 protein levels in myocardial tissues of rats in each group (/GAPDH, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	EIF2AK3	p-PERK	ATF4	CHOP	Bax	Bcl-2
对照组	4	0.85±0.10	0.59±0.09	0.43±0.12	0.66±0.02	0.80±0.03	0.99±0.06
模型组	4	1.15±0.12 ^{b)}	0.95±0.04 ^{a)}	0.87±0.05 ^{a)}	1.00±0.04 ^{a)}	1.08±0.03 ^{a)}	0.77±0.04 ^{a)}
养心通脉方高剂量组	4	0.88±0.13 ^{d)}	0.75±0.04 ^{c)}	0.73±0.06 ^{d)}	0.83±0.02 ^{c)}	0.92±0.06 ^{c)}	0.90±0.06 ^{d)}

注：EIF2AK3，真核翻译起始因子 2α 激酶 3；p-PERK，磷酸化蛋白激酶 RNA 样内质网激酶；ATF4，活化转录因子 4；CHOP，C/EBP 同源蛋白；Bax，Bcl-2 相关 X 蛋白；Bcl-2，B 淋巴细胞瘤 2。

a) 与对照组比较， $P < 0.01$ ；b) 与对照组比较， $P < 0.05$ ；c) 与模型组比较， $P < 0.01$ ；d) 与模型组比较， $P < 0.05$ 。



注：EIF2AK3，真核翻译起始因子 2α 激酶 3；p-PERK，磷酸化蛋白激酶 RNA 样内质网激酶；ATF4，活化转录因子 4；CHOP，C/EBP 同源蛋白；Bax，Bcl-2 相关 X 蛋白；Bcl-2，B 淋巴细胞瘤 2；A，对照组；B，模型组；C，养心通脉方高剂量组。

图 2 各组大鼠心肌组织 EIF2AK3、p-PERK、ATF4、CHOP、Bax、Bcl-2 蛋白电泳图

Figure 2 Electrophoretic images of EIF2AK3, p-PERK, ATF4, CHOP, Bax, and Bcl-2 proteins in myocardial tissues of rats in each group

3 讨论

中医学认为，冠心病病位在心，总属本虚标实之证。《灵枢·经脉》云：“手少阴气绝则脉不通，脉不通则血不流。”《素问·脉要精微论篇》言：“夫脉者，血之府也……涩则心痛。”《金匮要略·胸痹心痛短气病脉证治》载：“胸痹而痛，所以然者，责其极虚也。”心气亏虚，推动、温煦无力，血液凝滞不行，停留为瘀，随着疾病的进展常兼夹痰、水停等。养心通脉方以人参、丹参为君药，补而不滞，化瘀而不伤正；桂枝为臣药，甘辛而温，与人参、丹参合用，通利血脉之功更著；佐以枳实、泽泻化痰、利水；共奏扶养心气、和利血脉之功。前期研究^[5]证实，养心通脉方可通过恢复肠道菌群稳态、调节肠道屏障功能改善冠状动脉血管病理性重塑。

脂质代谢紊乱和炎症反应是冠心病的重要特征，IL-1β、IL-10 在调节炎症反应方面具有重要作用。本研究结果表明，与对照组比较，模型组大鼠呈现血脂紊乱的状态。经药物干预后，各给药组可在不

同程度上针对性调节血脂指标,改善脂质紊乱。TG、LDL-C 水平升高作为冠心病的独立危险因素,当二者水平协同性降低时,可呈现叠加效应降低冠心病风险^[10]。养心通脉方高剂量组可同时降低 TG、LDL-C 水平,降低心血管危险事件发生的可能性。

模型组大鼠 IL-1 β 水平升高、IL-10 水平降低,经药物干预后,养心通脉方中、高剂量组和阿托伐他汀钙组可显著下调 IL-1 β 水平,升高 IL-10 水平,且养心通脉方高剂量组在降低 IL-1 β 水平方面效果更优。cTnT、CK-MB、LDH 是反映心肌损伤的重要指标。本研究结果表明,模型组 cTnT、CK-MB、LDH 水平升高,表明大鼠心肌细胞受损。各药物干预组大鼠心肌损伤均得到不同程度改善。养心通脉方中、高剂量组 LDH 水平较养心通脉方低剂量组呈现升高趋势,但仍低于模型组水平。考虑 LDH 在多种组织器官中都有分布,对心肌损伤诊断特异性不强^[11],故挑选在心肌组织中特异性分布的 cTnT、CK-MB 来评价中药对心肌损伤的治疗效果。养心通脉方各剂量组能有效降低 cTnT、CK-MB 水平,其中养心通脉方高剂量组在降低 cTnT 方面更具优势。心肌组织病理染色结果也表明,养心通脉方高剂量组可有效改善心肌损伤,与阿托伐他汀钙效果相当。

DNA 甲基化测序技术的发展为中药在表观遗传层面调控疾病进程提供了强有力的证据支撑。前期研究^[6]发现,养心通脉方可调节 *Calm2*、*Cacnals* 基因的甲基化水平干预早发冠心病的治疗效果。本研究通过比较发病和养心通脉方治疗前后差异基因的甲基化水平变化情况,结合冠心病病理生理特点,挑选出潜在核心调控基因 *EIF2AK3*。EIF2AK3,又名蛋白激酶 RNA 样 ER 激酶 (PERK),是内质网膜上的跨膜受体蛋白之一,也是内质网应激状态下,响应最迅速、最直接的信号通路起始因子^[12]。缺血、缺氧、慢性炎症状态刺激下,内质网腔内堆积大量未折叠或错误折叠蛋白质,诱发内质网应激。机体先以内质网相关降解的形式来试图恢复内质网稳态,若内质网腔内蛋白负荷过重则进一步启动未折叠蛋白反应来缓解腔内蛋白质异常蓄积的情况^[13]。若未折叠蛋白和错误折叠蛋白过多导致内质网应激持续时间较长、应激强度较大,适应性的未折叠蛋白反应未能完全拮抗内质网功能紊乱对机体的损害,则启动非适应的蛋白质未折叠反应,诱导细胞凋亡^[14]。PERK 与分子伴侣葡萄糖调节蛋

白 78 (GRP78) 解离后,通过二聚化和磷酸化形式来恢复自身活性,并迅速使真核起始因子 2 α (eIF2 α) 磷酸化,特异性促进 ATF4 的转录,上调 CHOP 的表达,影响凋亡相关因子 Bax、Bcl-2 表达水平,启动凋亡程序^[15]。本研究结果表明,作为低甲基化表达基因 EIF2AK3 蛋白在模型组含量升高,经养心通脉方干预后,EIF2AK3 蛋白含量降低。模型组大鼠 p-PERK、ATF4、CHOP、Bax 蛋白水平升高、Bcl-2 蛋白水平降低,表明冠心病血瘀证大鼠内质网应激程度剧烈,PERK 信号通路的激活介导了心肌细胞凋亡;养心通脉方干预后 p-PERK、ATF4、CHOP、Bax 蛋白水平降低、Bcl-2 蛋白水平升高,表明养心通脉方可有效抑制 PERK 信号通路激活,减少心肌细胞凋亡。

综上,本研究通过 DNA 甲基化测序技术挖掘出养心通脉方治疗冠心病血瘀证的潜在调控基因 *EIF2AK3*,并通过对 EIF2AK3 下游通路的机制探讨,发现养心通脉方可能通过抑制 PERK/ATF4/CHOP 信号通路的活化,减少心肌细胞凋亡。本研究不足之处在于:缺乏内质网应激时内质网管腔变化的直观证据,需利用透射电镜表征内质网超微结构变化;未能阐明养心通脉方与甲基化修饰、PERK 信号通路的因果关系,需应用 PERK 抑制剂和甲基转移酶抑制剂来完整阐述养心通脉方抗心肌凋亡的作用机制。

参考文献

- [1] NARKHEDE M, PARDESHI A, BHAGAT R, et al. Review on emerging therapeutic strategies for managing cardiovascular disease [J]. Curr Cardiol Rev, 2024, 20 (4): e160424228949.
- [2] 徐荣荣, 赵健. 冠状动脉粥样硬化性心脏病的非传统危险因素 [J]. 国际心血管病杂志, 2025, 52(3): 129-132.
- [3] LI W, DONG P, LI Y, et al. Examining the potential causal relationships among smoking behaviors, blood DNA methylation profiles, and the development of coronary heart disease and myocardial infarction [J]. Clin Epigenetics, 2024, 16(1): 173.
- [4] 黄湘龙, 李霄, 季宏昌, 等. 基于 2015—2021 年天津地区临床诊疗数据的冠心病现代中医证候特征回顾性研究 [J]. 中医杂志, 2024, 65(13): 1363-1368.
- [5] 刘佳. 基于 PI3K/AKT 信号通路相关基因表达探讨养心通脉方治疗冠心病血瘀证的作用机制 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2022.
- [6] 陈杏, 于子璇, 张书萌, 等. 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 [J].

- 中医杂志, 2025, 66(11): 1165–1173.
- [7]郭倩池, 张龄月, 王康宇, 等. 当归四逆颗粒对冠心病寒凝血瘀证模型大鼠心肌细胞凋亡及血管活性因子的影响[J]. 中医杂志, 2024, 65(13): 1375–1382.
- [8]ZHAO T, JIN K, WANG X, et al. GPAT4 sustains endoplasmic reticulum homeostasis in endocardial cells and safeguards heart development[J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 3345.
- [9]DHAWAN UK, VARTAK T, ENGLERT H, et al. Macrophage DNases limit neutrophil extracellular trap-mediated defective efferocytosis in atherosclerosis [J]. Circ Res, 2025, 137(10): 1255–1275.
- [10]WANG W, LI R, SONG Z, et al. Joint associations of APOC3 and LDL-C-lowering variants with the risk of coronary heart disease[J]. JAMA Cardiol, 2025, 10(5): 463–472.
- [11]汪诗卉, 彭波, 梁红英, 等. 脑脊液 LDH、PCT 水平与新生儿化脓性脑膜炎患儿病情严重程度相关性的及其对预后的预测价值[J]. 国际检验医学杂志, 2025, 46(23): 2889–2895, 2901.
- [12]刘四芳, 刘峰, 张天乐, 等. 小黄鱼 eif2ak3 和 chop 基因的克隆及其对高温胁迫的响应特征[J]. 农业生物技术学报, 2025, 33(11): 2428–2440.
- [13]王晓凡, 谢超, 丛敏. 内质网应激与脂质代谢关系研究进展[J]. 肝脏, 2022, 27(4): 491–494.
- [14]于琪. 内质网应激在 BPDE 诱导 BEAS-2B 细胞焦亡中的作用[D]. 郑州: 郑州大学, 2021.
- [15]SAPTARSHI N, PORTER LF, PARAOAN L. PERK/EIF2AK3 integrates endoplasmic reticulum stress-induced apoptosis, oxidative stress and autophagy responses in immortalised retinal pigment epithelial cells [J]. Sci Rep, 2022, 12(1): 13324.

Effects of Yangxin Tongmai Formula (养心通脉方) on Methylation Key Genes and the PERK/ATF4/CHOP Signaling Pathway in Myocardial Tissue of Coronary Heart Disease Model Rats with Blood Stasis Syndrome
ZHANG Chun, ZHANG Shumeng, MAO Yan, CHEN Xing, KUANG Huifang, YANG Yi, CHEN Lingli, LI Jie

Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, 410208

ABSTRACT Objective To investigate the mechanism of *Yangxin Tongmai Formula* (养心通脉方, YTF) in treating coronary heart disease with blood stasis syndrome based on DNA methylation. **Methods** Seventy-two SD rats were randomly divided into a control group (n=12) and a modeling group (n=60). The modeling group was subjected to a high-fat diet, intragastric administration of vitamin D3, and subcutaneous injection of isoprenaline to establish the rat model of coronary heart disease with blood stasis syndrome. Forty-one successfully modeled rats were then randomly allocated into model group, YTF low-, medium-, and high-dose groups, and the atorvastatin calcium group, with 8 rats in each group and 1 rat reserved. The YTF low-, medium-, and high-dose groups received YTF at 6, 12, and 18 g/(kg·d) by gavage, respectively. The atorvastatin calcium group received atorvastatin calcium tablets at 1.8 mg/(kg·d) by gavage. The control group and the model group received 0.9% sodium chloride injection at 4 ml/(kg·d) by gavage. All administrations were performed once daily for 3 weeks. Twenty-four hours after the last administration, serum lipid levels including total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), and high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), myocardial enzymes including cardiac troponin T (cTnT), creatine kinase MB (CK-MB), and lactate dehydrogenase (LDH), and inflammatory factors including interleukin-1 β (IL-1 β) and interleukin-10 (IL-10) were detected by ELISA. Pathological changes in myocardial tissue were observed via HE staining. Whole blood DNA methylation sequencing was used to analyze differential methylation gene expression among the control group, model group, and YTF high-dose group. Western Blotting was used to verify the protein levels of the key genes and downstream signaling pathways. **Results** Compared to the control group, the model group showed increased levels of TC, TG, LDL-C, cTnT, CK-MB, LDH, and IL-1 β , along with decreased levels of HDL-C and IL-10 ($P<0.05$ or $P<0.01$). Compared to the model group, all treatment groups exhibited decreased levels of TC, LDL-C, CK-MB, and LDH, along with increased IL-10 levels. Among these, the high-dose YTF group demonstrated superior efficacy in reducing cTnT levels compared to the other TCM groups ($P<0.05$ or $P<0.01$). HE staining indicated that the YTF high-dose group ameliorated myocardial cell swelling, disordered arrangement, pyknosis, and disappearance of nuclei, thereby reducing myocardial cell damage. Whole

blood DNA methylation sequencing identified 240 differentially methylated genes shared by the control group, model group, and YTF high-dose group, including 109 hypermethylated and 131 hypomethylated genes; *elf2ak3* was identified as a key differentially methylated gene. Compared to the control group, the model group exhibited increased protein levels of eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3 (*elf2ak3*), phosphorylated protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase (p-PERK), activating transcription factor 4 (ATF4), C/EBP homologous protein (CHOP), and Bax, along with a decreased level of B-cell lymphoma-2 (Bcl-2) protein ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). Compared to the model group, the YTF high-dose group showed decreased protein levels of *elf2ak3*, p-PERK, ATF4, CHOP, and Bax, and an increased level of Bcl-2 protein ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). **Conclusion** YTF may regulate key differentially methylated genes such as *elf2ak3* and the PERK/ATF4/CHOP signaling pathway, thereby inhibiting endoplasmic reticulum stress, reducing myocardial cell apoptosis, and exerting therapeutic effects in coronary heart disease blood stasis syndrome.

Keywords coronary heart disease; blood stasis syndrome; eukaryotic translation initiation factor 2 alpha kinase 3; phosphorylated protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase; activating transcription factor 4; C/EBP homologous protein; *Yangxin Tongmai Formula* (养心通脉方)

(收稿日期: 2025-11-08; 修回日期: 2025-12-25)

[编辑: 贾维娜]

珍贵文献 临床科研必备《中医杂志》光盘合订本

广告

《中医杂志》光盘检索系统收录了 1951—2013 年出版发行的《中医杂志》所有期刊(繁体字已转为简体字)。您可借助计算机阅读收录的任意一篇文章,而且可对光盘进行任意词或多组合条件检索,检索结果可以打印或下载保存。您可以在几秒钟内就能检索到某种疾病、某种疗法或某种药的相关文章,本光盘可按自然年、期排序,方便阅读与保存。1951—1986 年光盘还收录了扫描的原文版面图像。

邮购地址: 北京东直门内南小街 16 号中医杂志社, 邮政编码: 100700

电话: (010) 64035632 联系人: 杨秋雷(请在汇款单附言栏写明购买者的电话)

1951—1986 年光盘合订本每套(4 张光盘) 480 元

1987—1994 年光盘合订本每套(1 张光盘) 260 元

1995—2004 年光盘合订本每套(1 张光盘) 280 元

2005—2013 年光盘合订本每套(1 张光盘) 300 元



欢迎关注《中医杂志》公众号

科技精品光盘全文检索管理系统 3.5 - 《中医杂志》(1987-1994)

1 系统工具 2 检索结果 3 检索设置 4 桌面设置 5 帮助

