

DOI:10.13288/j.11-2166/r.2022.07.008

益气活血方及其拆方对冠心病心力衰竭气虚血瘀证患者心功能及血浆 miRNA 差异表达的影响

马腾¹, 李彬², 彭广操², 王新陆², 赵齐飞², 王建茹², 王永霞², 朱明军²✉, 赵英强³

1. 河南中医药大学, 河南省郑州市金水东路 156 号, 450046; 2. 河南中医药大学第一附属医院; 3. 天津中医药大学第二附属医院

[摘要] **目的** 探究益气活血方治疗冠心病心力衰竭气虚血瘀证的疗效及可能作用机制。**方法** 将 160 例冠心病心力衰竭气虚血瘀证患者随机分为益气活血组、活血组、益气组、对照组, 每组 40 例。各组患者均给予西医规范治疗, 在此基础上对照组给予中药模拟剂、益气活血方组给予益气活血方颗粒剂、益气方组和活血方组分别给予益气活血方拆方的益气药颗粒剂和活血药颗粒剂, 各组中药颗粒剂均每次半剂口服, 早晚各 1 次, 均治疗 3 个月。治疗前后各组均进行中医证候评分并观察心功能分级分布情况, 治疗后采血进行血浆差异 miRNA 指标筛选, 各组两两比较对 miRNA 差异靶基因进行预测, 将差异靶基因再进行 GO 富集分析、KEGG 富集分析。**结果** 试验过程中各组均有脱落, 最终对照组 33 例, 益气组、益气活血组各 34 例, 活血组 37 例纳入统计分析。与本组治疗前比较, 各组治疗后中医证候积分均明显降低, 心功能分布差异具有统计学意义 ($P < 0.01$); 与对照组治疗后比较, 益气组、活血组、益气活血组心功能分级分布差异均有统计学意义, 益气活血组中医证候积分明显降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$); 治疗后益气组、活血组、益气活血组组间两两比较, 心功能分级分布差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$)。差异表达 miRNA 筛选最终共获得 5 组比较结果, 益气组与对照组比较, 共有 1 个 miRNA 发生了上调, 预测未获得目标靶基因; 活血组与对照组比较, 共有 1 个 miRNA 发生了上调, 预测得到 15 个靶基因, 涉及的 KEGG 通路主要为缺氧诱导因子 1 (HIF-1) 信号通路、磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K-Akt) 信号通路等; 益气活血组与对照组比较, 共有 4 个 miRNA 发生了上调, 预测得到 65 个靶基因, 涉及的 KEGG 通路主要为丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、酪氨酸激酶受体 (ErbB) 信号通路等; 益气活血组与益气组比较, 共有 1 个 miRNA 发生了上调, 预测得到 37 个靶基因, 涉及的 KEGG 通路主要为钙通路、3',5'-环磷酸腺苷 (cAMP) 通路等; 活血组与益气组比较, 共有 3 个 miRNA 发生了下调, 预测得到 76 个靶基因, 涉及的 KEGG 通路主要为 Ras 相关蛋白 1 (Rap1) 信号通路、昼夜节律、维甲酸诱导基因 1 (RIG-1) 信号通路、腺苷酸活化蛋白激酶 (AMPK) 信号通路等。**结论** 在规范西药治疗的基础上加用益气活血方能进一步改善患者临床症状及心功能, 其机制可能与调节 MAPK、ErbB 等信号通路有关。

[关键词] 冠心病; 心力衰竭; 气虚血瘀; 微小 RNA; 益气活血方; 心功能

心力衰竭是各种心脏疾病的晚期阶段, 其病死率和再住院率一直居高不下, 是目前不可忽视的重大公共卫生问题^[1]。近年来我国冠心病发病率逐年

升高, 而由冠心病引起的心力衰竭亦逐年增加^[2]。《中国心血管健康与疾病报告 2019 概要》^[3] 表明, 我国慢性心力衰竭患者约有 890 万, 患者的五年生存率约为 50%。现代研究^[4-8] 发现, miRNA 与多种心血管疾病, 如动脉粥样硬化性心脏病、心肌梗死及心力衰竭等关系密切, 其以外泌体为载体, 靶向结合目标细胞, 从而影响细胞功能发挥调控作用, 在心血管疾病的诊断及治疗方面具有极大的潜在研

基金项目: 国家重点研发计划 (2019YFC1710000, 2019YFC1710003); 国家中医药管理局中医药循证能力建设项目 (2019XZZX-XXG003); 河南省高校科技创新团队支持计划 (13IRTSTHN012); 河南省中医药科学研究专项课题 (2018JDZX009); 河南省中原千人计划-中原名医项目

✉ 通讯作者: zhumingjun317@163.com

究价值。中医学认为,心力衰竭为本虚标实之证,阳气亏虚为病机之本,而瘀、痰、水为病机之标,气虚血瘀证为冠心病慢性心力衰竭的基本证型^[9]。课题组前期研究发现,益气活血中药可以改善心力衰竭患者临床表现和生活质量,提高心功能,提升运动耐力^[10];不仅能改善心力衰竭大鼠心肌纤维化及心肌能量代谢,而且具有抗心室重构的作用^[11-12]。本研究进一步观察益气活血方及其拆方对冠心病心力衰竭气虚血瘀证的临床疗效,并分析患者 miRNA 表达谱及相关通路,从而为冠心病心力衰竭患者提供更加合理的诊断及治疗方案。本研究经河南中医药大学第一附属医院伦理委员会审查批准(批件号:2015HL-045-01)。

1 临床资料

1.1 诊断及辨证标准

冠心病及心力衰竭诊断标准采用中华医学会和世界卫生组织的相关标准^[13-14]制定。气虚血瘀证辨证标准参照《慢性心力衰竭中医诊疗专家共识》^[15]及《慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识》^[16]拟定。主症:1)气短/喘息;2)乏力;3)心悸。次症:1)倦怠懒言,活动易劳累;2)自汗;3)语声低微。舌象:舌体正常,舌质紫暗,苔白,舌下脉络迂曲青紫或舌上有瘀斑、瘀点;脉象:脉沉、细或虚无力。具备主症2项,次症2项,结合舌脉,即可诊断。

1.2 纳入标准

1)符合上述诊断及中医辨证标准;2)年龄40~75岁;3)心功能分级^[13]为Ⅱ、Ⅲ级;4)知情同意并签署知情同意书。

1.3 排除标准

1)合并肺栓塞、急性冠状动脉综合征及急性脑血管病;2)合并其他心血管疾病,如高原性心脏病、肺源性心脏病、瓣膜心脏病、扩张型心肌病和先天性心脏病;3)合并高血压、糖尿病等治疗后仍不能达到指南目标,可能发生高血压急症、糖尿病酮症酸中毒;4)合并严重肝肾疾病或恶性肿瘤终末阶段恶病质状态;5)合并活动性结核病或风湿免疫疾病;6)合并血液病、尿毒症;7)脏器移植患者,精神病且病情控制不良及吸毒人员未戒毒;8)对本研究所用药物或某味中药过敏;9)近1个月内参与其他临床研究;10)哺乳期或妊娠期女性。

1.4 脱落标准

1)依从性差,试验过程自行退出、随访期失联或拒绝随访;2)出现治疗药物的严重不良反应或过敏;3)未按照研究方案用药。

1.5 病例来源及分组

160例冠心病心力衰竭气虚血瘀证患者来自于2016年6月至2018年12月河南中医药大学第一附属医院(52例)、河南省商丘市睢县中医院(29例)、河南省洛阳市嵩县中医院(29例)、河南省驻马店市上蔡县中医院(26例)、河南省中医院(22例)、河南省第七人民医院(2例)。运用SAS 9.2统计软件设计随机化程序,采用区组随机化方法,分为对照组、益气组、活血组、益气活血组,每组40例。

2 方法

2.1 治疗方法

各组患者均采用西医规范治疗方案^[13-14],主要包括抗血小板药物阿司匹林、氯吡格雷等,扩血管药物硝酸异山梨酯等,调脂药物瑞舒伐、阿托伐他汀等,血管紧张素转化酶抑制剂(ACEI)卡托普利、培哚普利等,血管紧张素2受体阻滞剂(ARB)缬沙坦、氯沙坦钾等, β 受体阻滞剂琥珀酸美托洛尔、比索洛尔等,利尿剂螺内酯、呋塞米、氢氯噻嗪等。

在西医治疗基础上,对照组给予中药模拟剂,模拟剂为规格、外观、气味等与试验药物相似的颗粒剂,由华润三九药业有限公司生产;益气方组给予益气方颗粒剂,处方:黄芪60g。活血方组给予活血方颗粒剂,处方:当归20g,红花12g,桃仁12g,赤芍15g,川芎12g,地龙12g;益气活血方组给予益气活血方颗粒剂,处方:黄芪60g,红花12g,桃仁12g,赤芍15g,当归20g,川芎12g,地龙12g。各组中药颗粒剂均每次半剂口服,早晚各1次,各组均治疗3个月。

2.2 观察指标及方法

2.2.1 中医证候积分 中医证候积分评价标准参照《慢性心力衰竭中医诊疗专家共识》^[15]及《慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识》^[16]并结合专家讨论拟定。1)气短;2)喘息;3)乏力;4)心悸;5)倦怠懒言;6)自汗;7)面色紫暗;8)口唇紫暗;9)舌质紫暗;10)脉沉细或脉虚,前9项按无、轻、中、重度分别计0、1、2、3分,第10项根据是否分别计0、2分。治疗前后各评价1次。

2.2.2 心功能分级 治疗前后参照美国纽约心脏病协会 (NYHA) 标准^[13] 对各组患者的心功能分级进行判定。

2.2.3 血浆差异表达 miRNA 的筛选 治疗后采用随机数字表法每组分别选取 20 例患者, 共计 80 例, 均空腹采集外周静脉血 5 ml, 分离血浆后冻存。委托上海欧易生物医学科技有限公司, 采用 Agilent Human miRNA, Release 21.0, 8x60K (DesignID: 070156) 芯片进行 miRNA 表达谱的测定。根据差异筛选标准 (差异倍数 > 2, $P < 0.05$) 结合分组情况进行差异表达 miRNA 筛选。

2.2.4 miRNA 靶基因、GO 富集分析、KEGG 富集分析 分别使用 miRWalk3.0 数据库 (<http://mirwalk.umm.uni-heidelberg.de/>)、miRDB 数据库 (<http://mirdb.org/>) 对显著差异 miRNA 进行靶基因预测。为增加预测结果的准确性, 最终获取这 2 个数据库的交集基因后再实施下一步分析。

通过 DAVID 生物信息数据库 (<https://david.ncicrf.gov/tools.jsp>) 进行 GO 富集分析, 以预测靶基因的生物学功能。基于各 GO 条目的差异基因数, 通过超几何分布算法算得各 GO 条目中差异基因富集的显著性, 其 P 值越低说明其统计学差异越显著。本次实验分别对差异表达基因, 上调差异基因以及下调差异基因进行生物学进程、分子功能和细胞组分的富集分析。

KEGG 富集分析是基于 KEGG 通路数据库 (<https://www.kegg.jp/kegg/pathway.html>) 分别对差异表达基因、上调差异基因以及下调差异基因进行分析, 探索研究得到的基因集 (主要为差异基因) 可能与哪些通路相关; 同时利用超几何分布算法计算每个通路中差异基因富集的显著性, P 值越小, 说明对应的通路在本次差异基因的关联程度

越高。

2.3 统计学方法

本研究采用盲法, 分别对实施者 (患者、医生) 及结局评估者 (统计者) 施盲, 统计分析由第三方 (中国中医科学院) 完成。采用 SPSS 26.0 进行统计分析, 定性指标以例数、百分率描述, 多组间比较采用卡方检验, 组间两两比较采用秩和检验; 定量指标均符合正态分布, 以均数 $\pm$ 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 多组间比较采用方差检验, 组内两两对比采用配对样本 t 检验, 组间两两对比采用 LSD 法。以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 各组患者一般资料比较

试验过程中对照组脱落 7 例、活血组脱落 3 例、益气组及益气活血组各脱落 6 例, 最终纳入统计分析对照组 33 例, 活血组 37 例, 益气组及益气活血组各 34 例。各组患者一般资料详见表 1, 各组患者在性别、年龄、体重指数 (BMI)、呼吸频率、心率、血压、心功能分级方面比较差异均无统计学意义 ($P > 0.05$), 具有可比性。

3.2 各组患者治疗前后心功能分级分布情况比较

表 2 示, 治疗前各组心功能分级分布比较差异无统计学意义 ($P > 0.05$); 治疗后各组心功能分级分布比较差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与本组治疗前比较, 各组治疗后心功能分布差异有统计学意义 ($P < 0.01$)。与对照组治疗后比较, 益气组、活血组、益气活血组心功能分级分布差异均有统计学意义 ($P < 0.01$); 治疗后益气组、活血组、益气活血组之间两两比较, 心功能分级分布差异均具有统计学意义 ($P < 0.01$), 益气活血组对心功能的改善明显优于益气组和活血组。

表 1 各组冠心病心力衰竭气虚血瘀证患者一般资料比较

指标	对照组 (33 例)	益气组 (34 例)	活血组 (37 例)	益气活血组 (34 例)	P 值
年龄/岁, $\bar{x} \pm s$	64.93 $\pm$ 8.13	62.13 $\pm$ 10.05	64.28 $\pm$ 7.52	64.68 $\pm$ 7.89	0.685
BMI/kg $\cdot$ m ⁻² , $\bar{x} \pm s$	24.27 $\pm$ 3.60	25.69 $\pm$ 2.97	24.56 $\pm$ 3.22	24.72 $\pm$ 3.70	0.265
呼吸频率/次 $\cdot$ 分 ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$	18.63 $\pm$ 1.24	18.28 $\pm$ 1.32	18.50 $\pm$ 1.45	18.50 $\pm$ 1.15	0.810
心率/次 $\cdot$ 分 ⁻¹ , $\bar{x} \pm s$	66.72 $\pm$ 7.74	70.37 $\pm$ 8.87	70.88 $\pm$ 8.51	69.65 $\pm$ 7.75	0.067
收缩压/mmHg, $\bar{x} \pm s$	127.80 $\pm$ 17.70	128.97 $\pm$ 17.41	125.60 $\pm$ 17.47	129.40 $\pm$ 17.35	0.737
舒张压/mmHg, $\bar{x} \pm s$	77.50 $\pm$ 11.15	80.47 $\pm$ 12.26	76.92 $\pm$ 12.27	80.22 $\pm$ 9.94	0.385
性别 (男) /例 (%)	26 (65.0)	26 (65.0)	32 (80.0)	27 (67.5)	0.405
心功能/例 (%)					0.957
Ⅱ级	21 (63.6)	22 (64.7)	23 (62.2)	22 (64.7)	
Ⅲ级	12 (36.4)	12 (35.3)	14 (37.8)	12 (35.3)	

注: BMI, 体重指数。

表 2 各组冠心病心力衰竭气虚血瘀证患者治疗前后心功能分级分布情况比较						[例(%)]
组别	时间	例数	I 级	II 级	III 级	IV 级
对照组	治疗前	33	0	21 (63.6)	12 (36.4)	0
	治疗后	33	7 (21.2)	24 (72.7)	1 (3.0)	1 (3.0)
益气组	治疗前	34	0	22 (64.7)	12 (35.3)	0
	治疗后	34	2 (5.9)	22 (64.7)	9 (26.5)	1 (2.9)
活血组	治疗前	37	0	23 (62.2)	14 (37.8)	0
	治疗后	37	2 (5.4)	25 (67.6)	9 (24.3)	1 (2.7)
益气活血组	治疗前	34	0	22 (64.7)	12 (35.3)	0
	治疗后	34	18 (52.9)	15 (44.2)	1 (2.9)	0

3.3 各组患者治疗前后中医证候积分比较

表 3 示, 治疗前各组中医证候积分比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。与本组治疗前比较, 各组治疗后中医证候积分均明显降低 ($P<0.01$); 与对照组治疗后比较, 益气活血组中医证候积分明显降低 ($P<0.05$), 益气组和活血组差异无统计学意义 ($P>0.05$); 治疗后益气组、活血组和益气活血组组间两两比较差异均无统计学意义 ($P>0.05$)。

表 3 各组冠心病心力衰竭气虚血瘀证患者治疗前后中医证候积分比较 (分, $\bar{x}\pm s$)			
组别	例数	治疗前	治疗后
对照组	33	15.18 $\pm$ 4.00	12.67 $\pm$ 3.17 ^{a)}
益气组	34	14.74 $\pm$ 3.74	11.88 $\pm$ 4.30 ^{a)}
活血组	37	15.32 $\pm$ 3.89	12.08 $\pm$ 4.04 ^{a)}
益气活血组	34	14.71 $\pm$ 2.96	9.97 $\pm$ 3.83 ^{a) b)}

注: a) 与本组治疗前比较, $P<0.01$; b) 与对照组治疗后比较, $P<0.05$

3.4 各组患者血浆差异表达 miRNA 筛选结果

最终共获得 5 组比较结果。表 4 示, 益气组与对照组比较, 共有 1 个 miRNA 发生了上调; 活血组与对照组比较, 共有 1 个 miRNA 发生了上调; 益气活血组与对照组比较, 共有 4 个 miRNA 发生了上调; 益气活血组与益气组比较, 共有 1 个 miRNA 发生了上调; 活血组与益气组比较, 共有 3 个 miRNA 发生了下调。

3.5 差异表达 miRNA 靶基因预测

益气组与对照组比较差异表达 miRNA 共 1 个, 通过 miRWalk 数据库预测到 3119 个靶基因, 通过 miRDB 数据库预测到 7 个靶基因, 二者取交集未获得目标靶基因; 活血组与对照组比较差异表达 miRNA 共 1 个, 通过 miRWalk 数据库预测到 2705 个靶基因, 通过 miRDB 数据库预测到 135 个靶基因, 二者取交集得到 15 个靶基因; 益气活血组与对照组比较差异表达 miRNA 共 4 个, 通过 miRWalk

数据库预测到 10 762 个靶基因, 通过 miRDB 数据库预测到 677 个靶基因, 二者取交集得到 65 个靶基因; 益气活血组与益气组比较差异表达 miRNA 共 1 个, 通过 miRWalk 数据库预测到 2430 个靶基因, 通过 miRDB 数据库预测到 394 个靶基因, 二者取交集得到 37 个靶基因; 活血组与益气组比较差异表达 miRNA 共 3 个, 通过 miRWalk 数据库预测到 10 442 个靶基因, 通过 miRDB 数据库预测到 576 个靶基因, 二者取交集得到 76 个靶基因。

表 4 各组冠心病心力衰竭气虚血瘀证患者治疗后血浆差异表达 miRNA 筛选结果		
比较组别	差异 miRNA	表达趋势
益气组与对照组	hsa-miR-6785-3p	上调
活血组与对照组	hsa-miR-634	上调
益气活血组与对照组	hsa-miR-4750-3p	上调
	hsa-miR-6765-3p	上调
	hsa-miR-4731-3p	上调
	hsa-miR-7114-3p	上调
益气活血组与益气组	hsa-miR-4731-3p	上调
活血组与益气组	hsa-miR-6751-3p	下调
	hsa-miR-197-3p	下调
	hsa-miR-4728-3p	下调

3.6 差异表达 miRNA 靶基因 GO 富集分析结果

差异表达 miRNA 靶基因 GO 富集分析结果显示, 活血组与对照组比较, 在生物学进程方面主要参与肺发育、肺形态发生的上皮细胞增殖的正调控、蛋白质转运的调节等过程; 在细胞组分方面, 主要为运输囊泡、循环内体等; 在分子功能方面, 主要富集于 CTD 磷酸酶活性、RNA 帽结合等, 排名前 5 位的富集结果见表 5。

益气活血组与对照组比较, 在生物学进程方面主要参与通过质膜黏附分子的同质细胞黏附、神经系统发育等过程; 在细胞组分方面, 主要为质膜的组成部分、PRC1 复合体等; 在分子功能方面, 主要富集于钙离子结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性等, 排名前 5 位的富集结果见表 6。

表5 活血组与对照组治疗后血浆差异表达 miRNA 靶基因 GO 富集分析结果 (排名前 5 位)

分类	GO ID	名称	P 值
生物学进程	GO: 0030324	肺发育	0.0008
	GO: 0060501	肺形态发生的上皮细胞增殖的正调控	0.0027
	GO: 0051223	蛋白质转运的调节	0.0032
	GO: 0060013	翻正反射	0.0037
	GO: 0042297	声乐学习	0.0037
细胞组分	GO: 0030133	运输囊泡	0.0013
	GO: 0055037	循环内体	0.0021
	GO: 0097025	MPP7-DLG1-LIN7 复合体	0.0030
	GO: 0016589	NURF 复合体	0.0036
	GO: 0005828	动粒微管	0.0042
分子功能	GO: 0008420	CTD 磷酸酶活性	0.0037
	GO: 0000339	RNA 帽结合	0.0068
	GO: 0035591	信号适配器活动	0.0074
	GO: 0000340	RNA 7-甲基鸟苷帽结合	0.0080
	GO: 0031489	肌球蛋白 V 结合	0.0100

表6 益气活血组与对照组治疗后血浆差异表达 miRNA 靶基因 GO 富集分析结果 (排名前 5 位)

分类	GO ID	名称	P 值
生物学进程	GO: 0007156	通过质膜黏附分子的同质细胞黏附	6.3×10^{-10}
	GO: 0007399	神经系统发育	6.2×10^{-9}
	GO: 0007155	细胞黏附	3.2×10^{-8}
	GO: 0006417	翻译规范	0.0004
	GO: 0006513	蛋白质单泛素化	0.0032
细胞组分	GO: 0005887	质膜的组成部分	8.9×10^{-6}
	GO: 0035102	PRC1 复合体	0.0007
	GO: 0031519	PcG 蛋白复合物	0.0023
	GO: 0036126	精子鞭毛	0.0060
	GO: 0031228	高尔基体膜的内在成分	0.0130
分子功能	GO: 0005509	钙离子结合	0.0012
	GO: 0004674	蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性	0.0030
	GO: 0018812	3-羟酰基辅酶 A 脱水酶活性	0.0014
	GO: 0010385	双链甲基化 DNA 结合	0.0014
	GO: 0008092	细胞骨架蛋白结合	0.0190

益气活血组与益气组比较,在生物学进程方面主要参与通过质膜黏附分子的同质细胞黏附、神经系统发育等过程;在细胞组分方面,主要为质膜的组成部分、PRC1 复合体等;在分子功能方面,主要富集于钙离子结合、双链甲基化 DNA 结合等,排名前 5 位的富集结果见表 7。

益气组与活血组比较,在生物学进程方面主要参与神经元凋亡过程的负调控、前脑发育等过程;在细胞组分方面,主要为异源三聚体 G 蛋白复合物、ER 到高尔基体的转运囊泡等;在分子功能方面,主要富集于 G 蛋白 β/γ 亚基复合物结合、蛋白磷酸酶抑制剂活性等,排名前 5 位的富集结果见表 8。

3.7 差异表达 miRNA 靶基因 KEGG 富集分析结果

活血组与对照组比较,差异表达 miRNA 富集的排名前 7 位的 KEGG 通路分别为加压素调节的水重吸收、内分泌和其他因子调节的钙通道、EGFR 酪氨酸激酶抑制剂耐药、长寿调节途径、胰腺分泌物、缺氧诱导因子 1 (HIF-1) 信号通路、磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶 B (PI3K-Akt) 信号通路。益气活血组与对照组比较,差异表达 miRNA 富集的排名前 7 位的 KEGG 通路分别为胰岛素信号通路、不饱和脂肪酸的生物合成、脂肪酸延伸率、N-聚糖生物合成、丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号通路、酪氨酸激酶受体 (ErbB) 信号通路、醛固酮的合成与分泌。益气活血组与益气组比较,差异表

表7 益气活血组与益气组治疗后血浆差异表达 miRNA 靶基因 GO 富集分析结果（排名前 5 位）

分类	GO ID	名称	P 值
生物学进程	GO: 0007156	通过质膜黏附分子的同质细胞黏附	4. 8×10 ⁻¹²
	GO: 0007399	神经系统发育	8. 3×10 ⁻¹⁰
	GO: 0007155	细胞黏附	1. 9×10 ⁻⁹
	GO: 0016358	枝晶发育	0. 0015
	GO: 0070317	G0 到 G1 过渡的负调节	0. 0021
细胞组分	GO: 0005887	质膜的组成部分	4. 3×10 ⁻⁶
	GO: 0035102	PRC1 复合体	0. 0025
	GO: 0031519	PeG 蛋白复合物	0. 0081
	GO: 0036126	精子鞭毛	0. 0022
	GO: 0031228	高尔基体膜的内在成分	0. 0078
分子功能	GO: 0005509	钙离子结合	1. 2×10 ⁻⁶
	GO: 0010385	双链甲基化 DNA 结合	0. 0081
	GO: 0018812	3-羟酰基辅酶 A 脱水酶活性	0. 0081
	GO: 0030346	蛋白磷酸酶 2B 结合	0. 0110
	GO: 0008312	7S RNA 结合	0. 0110

表8 活血组与益气组治疗后血浆差异表达 miRNA 靶基因 GO 富集分析结果（排名前 5 位）

分类	GO ID	名称	P 值
生物学进程	GO: 0043524	神经元凋亡过程的负调控	0. 0002
	GO: 0030900	前脑发育	0. 0028
	GO: 0032515	磷蛋白磷酸酶活性的负调节	0. 0034
	GO: 0007188	腺苷酸环化酶调节 G 蛋白偶联受体信号通路	0. 0038
	GO: 0071560	细胞对转化生长因子β刺激的反应	0. 0042
细胞组分	GO: 0005834	异源三聚体 G 蛋白复合物	0. 0012
	GO: 0030134	ER 到高尔基体的转运囊泡	0. 0020
	GO: 0044297	胞体	0. 0068
	GO: 0005793	内质网-高尔基体中间室	0. 0072
	GO: 0070765	γ 分泌酶复合物	0. 0100
分子功能	GO: 0031683	G 蛋白β/γ 亚基复合物结合	0. 0005
	GO: 0004864	蛋白磷酸酶抑制剂活性	0. 0013
	GO: 0043565	序列特异性 DNA 结合	0. 0034
	GO: 0001664	G 蛋白偶联受体结合	0. 0048
	GO: 0008142	氧甾醇结合	0. 0079

达 miRNA 富集的排名前 7 位的 KEGG 通路分别为脂肪酸代谢、ErbB 信号通路、醛固酮合成与分泌、钙通路、趋化因子信号通路、3',5'-环磷酸腺苷（cAMP）通路、Rap1 信号通路。活血组与益气组比较，差异表达 miRNA 富集的排名前 7 位的 KEGG 通路分别为 GABA 能突触、吗啡突触、血清素突触、Ras 相关蛋白 1（Rap1）信号通路、昼夜节律、维甲酸诱导基因 1（RIG-1）信号通路、腺苷酸活化蛋白激酶（AMPK）信号通路。

4 讨论

目前，国际上心力衰竭的基本治疗方案以β受体阻滞剂、螺内酯联合 ACEI/ARB 类药物配合血管

紧张素受体脑啡肽酶抑制剂、钠-葡萄糖协同转运蛋白 2 为起始应用，从而达到阻断神经内分泌系统激活、延缓心室重塑的目的^[17-18]。在目前指南方案的基础上对症治疗，提高患者生存质量是临床关注的问题。益气活血方以补阳还五汤为基础，以益气活血为治则，方中黄芪补益元气，当归养血活血通络，赤芍、桃仁、红花、川芎活血祛瘀，地龙疏通经络，全方虚实并举，标本兼顾。本研究结果显示，在中医证候积分、心功能分级方面，各组治疗后均较治疗前有不同程度改善，且在改善中医证候积分方面，益气活血组优于对照组；在改善心功能分级分布方面，活血组、益气组和益气活血组均较对照组效果更佳。以上结果提示，在规范化西医治

疗的基础上加用益气活血方可降低冠心病心力衰竭气虚血瘀证患者中医证候积分,并可改善心功能分级,而加用活血方或益气方仅可改善心功能分级,说明益气活血方全方的疗效更好。

miRNA 是分子生物学的重要组成部分,可在多种细胞和生理过程中发挥重要的调控作用,其可作为 CHF 的潜在治疗靶点^[19-20]。相关研究^[21-22]表明,不同中医证型中多种 miRNA 相对表达量会出现差异,且中医药干预后 miRNA 的表达量亦会产生显著差异。本研究以 miRNA 为切入点,通过对益气活血方及其拆方干预冠心病心力衰竭气虚血瘀证的临床观察,并结合基因芯片技术分析 miRNA 表达谱,对益气活血方及其拆方干预冠心病心力衰竭气虚血瘀证的临床疗效及差异表达 miRNA 进行探讨。结果显示,益气组与对照组比较,1 条 miRNA 显著上调,但经预测未得到靶基因;活血组与对照组比较,1 条 miRNA 发生显著上调,预测得到 15 个靶基因。GO 富集分析结果显示,在生物学进程方面主要参与肺发育、肺形态发生的上皮细胞增殖的正调控、蛋白质转运的调节等过程;在细胞组分方面,主要为运输囊泡、循环内体等;在分子功能方面,主要富集于 CTD 磷酸酶活性、RNA 帽结合等;涉及的主要信号通路有 HIF-1 信号通路、PI3K-Akt 信号通路等。既往研究发现,HIF-1 可通过上调一氧化氮(NO)、血管内皮生长因子(VEGF)、活性氧(ROS)而影响新血管生成、内皮细胞的增殖及功能,并在动脉血管粥样硬化中起到关键作用^[23];缺血缺氧条件下,HIF-1 可通过激活血管生成与重塑,进而抑制耗氧过程,增加细胞低氧耐受性,从而在重塑心肌的能量代谢中起到关键作用^[24]。另有研究^[25-26]表明,PI3K/Akt 信号通路通过下游靶点介导多种凋亡因子实现信号调节,可保护心肌细胞、抑制其凋亡,进而减缓心力衰竭的进展。益气活血组与对照组比较,共有 4 个 miRNA 发生显著上调,预测得到 65 个靶基因;在生物学进程方面主要参与通过质膜黏附分子的同质细胞黏附、神经系统发育等过程;在细胞组分方面,主要为质膜的组成部分、PRC1 复合体等;在分子功能方面,主要富集于钙离子结合、蛋白质丝氨酸/苏氨酸激酶活性等;涉及的主要信号通路有 MAPK 信号通路、ErbB 信号通路等。研究发现,MAPK 信号通路可通过介导细胞生长、发育及凋亡等多个病理生理过程,并可通过内质网应激使得心力衰竭小鼠心肌细胞凋亡^[27]。益气活血组与益气

组比较,共有 1 个 miRNA 发生显著上调,预测得到 37 个靶基因;在生物学进程方面主要参与通过质膜黏附分子的同质细胞黏附、神经系统发育等过程;在细胞组分方面,主要为质膜的组成部分、PRC1 复合体等;在分子功能方面,主要富集于钙离子结合、双链甲基化 DNA 结合等;涉及的主要信号通路有 3',5'-环磷酸腺苷(cAMP)通路及钙通路等。研究发现,钙通路可对心肌细胞离子通道及相关蛋白表达进行调控,从而在心血管形态发生中发挥作用,并可对心肌细胞的凋亡进行双向调节,影响冠心病、心力衰竭、心肌病等多种疾病的进展^[28];另有研究^[29-30]表明,多种益气中药如人参、附子等可通过 cAMP 通路影响心肌舒缩功能,从而改善心功能。活血组与益气组比较,共有 3 个 miRNA 发生显著下调,预测得到 76 个靶基因;在生物学进程方面主要参与神经元凋亡过程的负调控、前脑发育等过程;在细胞组分方面,主要为异源三聚体 G 蛋白复合物、ER 到高尔基体的转运囊泡等;在分子功能方面,主要富集于 G 蛋白 β/γ 亚基复合物结合、蛋白磷酸酶抑制剂活性等;涉及的主要信号通路有 AMPK 及 Rap1 信号通路等。其中 AMPK 信号通路被称为“能量代谢总开关”,与脂质代谢、炎症反应、胰岛素抵抗及细胞凋亡等密切相关,已有研究证实,此通路的激活可有效抑制炎症反应和细胞凋亡^[31]。

综上,在规范西药治疗的基础上加用益气活血方能进一步降低冠心病心力衰竭血瘀证患者的中医证候积分,改善心功能,而其拆方益气方或活血方仅可改善患者心功能;不同药物干预后,各组血浆中存在差异表达 miRNA,通过生物信息分析提示差异表达 miRNA 预测得到的靶基因广泛参与了多个生物学过程及多个重要的信号传导通路。基于此结果进行分析,益气活血方发挥其改善心功能、延缓心力衰竭的疗效可能与调节 MAPK、ErbB 等信号通路有关。后期拟进一步通过扩大样本量或者采用动物模型细胞株进行相关通路验证,以确定冠心病心力衰竭血瘀证的关键靶点及通路,为临床治疗提供依据。

参考文献

- [1]王志燕,陈晨,吕强,等. 2021 年 ESC 急性心力衰竭诊断与治疗指南解读[J]. 中华心血管病杂志, 2021, 49(12): 1252-1255.
- [2]国家卫生健康委合理用药专家委员会,中国药师协会.

- 心力衰竭合理用药指南(第2版)[J]. 中国医学前沿杂志(电子版), 2019, 11(7): 1-78.
- [3]中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2019 概要[J]. 中国循环杂志, 2020, 35(9): 833-854.
- [4]D'ALESSANDRA Y, DEVANNA P, LIMANA F, et al. Circulating microRNAs are new and sensitive biomarkers of myocardial infarction[J]. Eur Heart J, 2010, 31(22): 2765-2773.
- [5]WANG L, LIU J, XU B, et al. Reduced exosome miR-425 and miR-744 in the plasma represents the progression of fibrosis and heart failure [J]. Kaohsiung J Med Sci, 2018, 34(11): 626-633.
- [6]WU T, CHEN Y, DU Y, et al. Serum exosomal miR-92b-5p as a potential biomarker for acute heart failure caused by dilated cardiomyopathy[J]. Cell Physiol Biochem, 2018, 46(5): 1939-1950.
- [7]LIU X, TONG Z, CHEN K, et al. The role of miRNA-132 against apoptosis and oxidative stress in heart failure [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 3452748. doi: 10.1155/2018/3452748.
- [8]FANG X, STROUD MJ, OUYANG K, et al. Adipocyte-specific loss of PPAR gamma attenuates cardiac hypertrophy[J]. JCI Insight, 2016, 1(16): e89908. doi: 10.1172/jci.insight.89908.
- [9]罗良涛, 赵慧辉, 王娟, 等. 中医医院冠心病慢性心力衰竭患者中医证候要素分布特点分析[J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(2): 130-134.
- [10]朱明军, 王永霞, 李彬, 等. 参附益心颗粒辨证联合西药治疗慢性心力衰竭的多中心、随机、双盲、安慰剂对照研究[J]. 中医杂志, 2019, 60(21): 1843-1848.
- [11]卫靖靖, 李彬, 王新陆, 等. 参附益心方对缺氧条件下原代心肌细胞葡萄糖利用的作用研究[J]. 时珍国医国药, 2020, 31(5): 1069-1072.
- [12]程彦玲, 谢世阳, 王小晓, 等. 参附益心颗粒对心肌梗死后心力衰竭大鼠心肌纤维化的影响[J]. 中医杂志, 2020, 61(1): 68-73.
- [13]中华医学会心血管病学分会心力衰竭学组, 中国医师协会心力衰竭专业委员会, 中华心血管病杂志编辑委员会. 中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018[J]. 中华心血管病杂志, 2018, 46(10): 760-789.
- [14]国际心脏病学会和协会, 世界卫生组织临床命名标准化联合专题组. 缺血性心脏病的命名及诊断标准[J]. 中华心血管病杂志, 1981, 9(1): 75.
- [15]冠心病中医临床研究联盟, 中国中西医结合学会心血管病专业委员会, 中华中医药学会心病分会, 等. 慢性心力衰竭中医诊疗专家共识[J]. 中医杂志, 2014, 55(14): 1258-1260.
- [16]陈可冀, 吴宗贵, 朱明军, 等. 慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识[J]. 中国中西医结合杂志, 2016, 36(2): 133-141.
- [17]匡丽萍, 单春燕. 心力衰竭治疗药物研究进展[J]. 慢性病学杂志, 2020, 21(11): 1656-1659.
- [18]邹玉宝, 王倩. 关于射血分数降低的心力衰竭治疗的 10 个关键问题:《2021 ACC 专家共识决策路径:优化心力衰竭的治疗》解读[J]. 实用心脑血管病杂志, 2021, 29(3): 1-10.
- [19]邹翼飞, 施恒荷, 刘斌. 外泌体微小 RNA 在心力衰竭诊断及治疗中的研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2020, 22(12): 1333-1335.
- [20]孙理华, 吕忠英, 幸世峰, 等. 微小 RNA-423-5p 在脂肪间充质干细胞外泌体治疗老龄心力衰竭大鼠的作用及机制[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2020, 22(12): 1308-1311.
- [21]朱惠征. 冠心病气虚血瘀证与气虚痰瘀证 miRNA 差异表达分析及通冠胶囊干预研究[D]. 广州:广州中医药大学, 2017.
- [22]丁艳. 消癌解毒方联合放疗治疗痰瘀郁毒气阴两虚型食管癌的临床观察及对血清 miRNA 的影响[D]. 南京:南京中医药大学, 2019.
- [23]许禄华, 林丰夏, 宋银枝, 等. 丹芪散对气虚血瘀型冠心病患者血管内皮功能的影响及网络药理学机制预测[J]. 广州中医药大学学报, 2021, 38(1): 147-158.
- [24]XIN Z, MA Z, JIANG S, et al. FOXOs in the impaired heart: new therapeutic targets for cardiac diseases [J]. BBA-Mol Basis Dis, 2017, 1863(2): 486-498.
- [25]LIN RC, WEEKS KL, GAO XM, et al. PI3K (p110 alpha) protects against myocardial infarction-induced heart failure: identification of PI3K-regulated miRNA and mRNA [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2010, 30(4): 724-732.
- [26]DIMITROVA V, ARCARO A. Targeting the PI3K/AKT/mTOR signaling pathway in medulloblastoma [J]. Current Molecul Med, 2015, 15(1): 82-93.
- [27]尹运堂, 王燕, 龚放. MAPK 信号通路通过内质网应激反应调控梗死后心力衰竭小鼠心肌细胞凋亡[J]. 基因组学与应用生物学, 2017, 36(8): 3438-3446.
- [28]覃东红, 徐小红. 钙调神经磷酸酶对心肌凋亡作用研究进展[J]. 疑难病杂志, 2006, 5(1): 70-72.
- [29]梁涛, 耿姗, 周玲玲, 等. 附子及附子干姜配伍对心衰大鼠血流动力学和 cAMP-PKA 信号转导通路的影响[J]. 中国老年学杂志, 2015, 35(19): 5392-5394.
- [30]张艺红, 刘智. 人参皂苷 Rg1 对冠心病大鼠的影响研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2020, 36(2): 133-136.

[31] MOCANU AO, MULYA A, HUANG H, et al. Effect of Roux-en-Y gastric bypass on the NLRP3 inflammasome

in adipose tissue from obese rats[J]. PLoS One, 2015, 10(10):e0139764. doi:10.1371/journal.pone.0139764.

Effects of Yiqi Huoxue Formula (益气活血方) and its Diassembled Components on Cardiac Function and Plasma miRNA Differential Expression in Coronary Heart Disease and Heart Failure Patients with Qi Deficiency and Blood Stasis Syndrome

MA Teng¹, LI Bin², PENG Guangcao², WANG Xinlu², ZHAO Qifei², WANG Jianru², WANG Yongxia², ZHU Mingjun², ZHAO Yingqiang³

1. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou, 450046; 2. The First Affiliated Hospital of Henan University of Chinese Medicine; 3. The Second Affiliated Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine

ABSTRACT **Objective** To explore the effect and the possible mechanism of *Yiqi Huoxue Formula* (益气活血方, YHF) in the treatment of coronary heart disease and heart failure (CHD-HF) with *qi* deficiency and blood stasis syndrome. **Methods** A total of 160 CHD-HF patients with *qi* deficiency and blood stasis syndrome were randomly divided into YHF group, Huoxue group, Yiqi group, and control group, with 40 patients in each group. All the groups received standard western medicine, and additionally, YHF granules and placebo were administered in the YHF group and control group. The diassembled components Yiqi granules and Huoxue granules were additionally given to the corresponding Yiqi group and Huoxue group. The granules in all groups were taken orally, half a dose each time, once in the morning and in the evening, for three months. The scores of traditional Chinese medicine (TCM) syndromes and heart functional class were assessed. Blood was collected for screening of differential miRNA indicators, and pairwise comparison was performed to predict differentially expressed miRNA target genes. GO enrichment analysis and KEGG enrichment analysis of the differentially expressed miRNA target genes were performed further. **Results** Except for the dropouts, 33 cases in the control group, 34 cases in the Yiqi group and YHF group each, and 37 cases in the Huoxue group were included for analysis. After treatment, TCM syndrome score significantly decreased, and the cardiac functional class significantly improved in all groups ($P < 0.01$). Compared to the control group, the other three groups had significantly improved cardiac functional class, and moreover, the YHF group had significantly lower TCM syndrome score ($P < 0.01$ or $P < 0.05$). There were significant differences in the pairwise comparisons of Yiqi group, Huoxue group and YHF group regarding the cardiac functional class after treatment ($P < 0.01$). Finally, five comparison results were obtained from differentially expressed miRNA screening. For comparison between Yiqi group and the control group, one up-regulated miRNA was found, but no target gene was predicted. For comparison between Huoxue group and the control group, one up-regulated miRNA was found, and 15 target genes were predicted, involving Hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) signaling pathway, phosphatidylinositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K-Akt) signaling pathway, and other KEGG pathways. In terms of the comparison between Yiqi group and the control group, four up-regulated genes were obtained, and 65 target genes were predicted, involving mainly mitogen-activated protein kinase (MAPK) signaling pathway and tyrosine kinase receptor (ErbB) signaling pathway. When comparing YHF group with Yiqi group, one up-regulated miRNA and 37 predicted target genes were obtained, and calcium pathway and 3', 5'-cyclic adenosine monophosphate (cAMP) pathway were mainly involved. The comparison of Huoxue group and Yiqi group showed that three miRNA were down-regulated, and 76 predicted target genes were obtained; the mainly involved KEGG pathways were Ras-related protein 1 (Rap1) signaling pathway, circadian rhythm, retinoic acid-inducible gene 1 (RIG-1) signaling pathway, and the adenosine monophosphate-activated protein kinase (AMPK) signaling pathway. **Conclusion** The addition of YHF to the standard western medicine can further improve the TCM syndromes and cardiac function in CHD-HF patients with *qi* deficiency and blood stasis, and the underlying mechanism may be related the regulation of MAPK, ErbB, and other signaling pathways.

Keywords coronary heart disease; heart failure; *qi* deficiency and blood stasis; miRNA; *Yiqi Huoxue Formula* (益气活血方); cardiac function

(收稿日期: 2021-07-26; 修回日期: 2021-10-15)

[编辑: 邓媛]