

川芎-赤芍药对干预心肌梗死合并动脉粥样硬化复合模型的 circRNA/lncRNA 表达谱研究

袁蓉¹, 李梓涵^{1,2}, 黄美雯^{1,3}, 李芃琪¹, 缪宇¹, 莫蕙⁴, 曾莉³, 鞠振宇⁵,
信琪琪^{1*}, 丛伟红^{1*}

(1. 中国中医科学院 西苑医院 心血管病实验室, 北京 100091; 2. 天津中医药大学, 天津 301617;
3. 澳门科技大学, 澳门 999078; 4. 澳门卫生局, 澳门 999078;
5. 暨南大学 衰老与再生医学研究院, 广东 广州 510632)

[摘要] 探索川芎-赤芍药对(Chuanxiong-Chishao herb pair, CX-CS)对心肌梗死合并动脉粥样硬化(myocardial infarction-atherosclerosis, MI-AS)小鼠复合模型的干预作用,并探讨其对缺血心肌、主动脉组织环状 RNA(circular RNA, circRNA)/长链非编码 RNA(long non-coding RNA, lncRNA)表达谱的影响。将 60 只雄性 ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组、CX-CS 高(7.8 g·kg⁻¹)、中(3.9 g·kg⁻¹)、低(1.95 g·kg⁻¹)剂量组、阳性药组(美托洛尔 26 mg·kg⁻¹, 辛伐他汀 5.2 mg·kg⁻¹),每组 12 只。假手术组采用雄性 C57BL/6J 小鼠。模型组及药物干预组给予高脂喂养 10 周后进行冠状动脉前降支结扎术,术后继续给予高脂饲料 2 周,建立 MI-AS 模型。假手术组给予普通饲料喂养,手术时只穿线不接扎。药物干预组于高脂喂养第 9 周起给予 CX-CS、阳性药灌胃 4 周,模型组和假手术组给予等体积生理盐水。给药结束后取 CX-CS 中剂量组、模型组、假手术组心脏和主动脉组织行全转录组测序。结果发现,CX-CS 高、中剂量组小鼠心功能显著改善、心肌纤维化面积缩小,CX-CS 中剂量组斑块面积显著减小。CX-CS 处理可逆转复合模型中粥样硬化主动脉的 circRNA_07227、circRNA_11464 以及缺血心肌的 circRNA_11505 等 circRNA 的表达。主动脉 CX-CS(ACC)组与主动脉模型组(AM)组间的差异 circRNA 主要富集在脂质合成、代谢及转运、炎症、血管新生等过程。心脏 CX-CS(HCC)组与模型组(HM)组间差异 circRNA 主要富集在血管新生、血压调节等过程。CX-CS 处理可逆转复合模型中粥样硬化主动脉的 ENSMUST00000162209 以及缺血心肌的 TCONS_00002123 等 lncRNA 表达变化。ACC 组与 AM 组间的差异 lncRNA 主要富集在脂质代谢、血管新生、自噬、凋亡、铁死亡等过程。HCC 组与 HM 组间差异 lncRNA 主要富集在血管新生、自噬、铁死亡等过程。综上,CX-CS 可调控多种 circRNA 及 lncRNA 的表达,其干预冠心病的机制可能与调控缺血心肌血管新生、炎症以及 AS 主动脉的脂质代谢及转运、炎症、血管新生等过程有关。

[关键词] 冠心病; 川芎-赤芍药对; 心肌梗死; 动脉粥样硬化; 环状 RNA; 长链非编码 RNA

Intervention effect of Chuanxiong-Chishao herb pair on circRNA/lncRNA expression profile in a myocardial infarction-atherosclerosis model

YUAN Rong¹, LI Zi-han^{1,2}, HUANG Mei-wen^{1,3}, LI Peng-qi¹, MIAO Yu¹, MO Hui⁴, ZENG Li³, JU Zhen-yu⁵,
XIN Qi-qi^{1*}, CONG Wei-hong^{1*}

(1. Laboratory of Cardiovascular Diseases, Xiyuan Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100091, China; 2. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China; 3. Macau University of Science and Technology, Macau 999078, China; 4. Macau Health Bureau, Macau 999078, China;
5. Institute of Aging and Regenerative Medicine, Jinan University, Guangzhou 510632, China)

[收稿日期] 2023-01-24

[基金项目] 中国中医科学院科技创新工程项目(CI2021A00914); 国家自然科学基金项目(82104680, 82004193)

[通信作者] * 丛伟红, 博士, 研究员, 主要从事中西医结合心血管病及中药药理研究, Tel: (010) 62835568, E-mail: congcao@188.com;

* 信琪琪, 博士, 副研究员, 主要从事中西医结合心血管病及中药药理研究, Tel: (010) 62835628, E-mail: xinqiqiyuan@126.com

[作者简介] 袁蓉, 助理研究员, 主要从事中西医结合心血管病研究, E-mail: yuanrong427@163.com

[Abstract] This study aimed to explore the intervention effect of Chuanxiong-Chishao herb pair (CX-CS) on a myocardial infarction-atherosclerosis (MI-AS) mouse model and investigate its effect on the expression profile of circular RNAs (circRNAs)/long non-coding RNAs (lncRNAs) in ischemic myocardium and aorta. Sixty male ApoE^{-/-} mice were randomly assigned to a model group, high-, medium-, and low-dose CX-CS groups (7.8, 3.9, and 1.95 g·kg⁻¹), and a positive drug group (metoprolol 26 mg·kg⁻¹ and simvastatin 5.2 mg·kg⁻¹), with 12 mice in each group. Male C57BL/6J mice were assigned to the sham group. The mice in the model group and the groups with drug intervention were fed on a high-fat diet for 10 weeks, followed by anterior descending coronary artery ligation. After that, the mice were fed on a high-fat diet for another two weeks to induce the MI-AS model. The mice in the sham group received normal feed, followed by sham surgery without coronary artery ligation. Mice in the groups with drug intervention received CX-CS or positive drug by gavage for four weeks from the 9th week of high-fat feeding, and those in the model group and the sham group received an equal volume of normal saline. Whole transcriptome sequencing was performed on the heart and aorta tissues of the medium-dose CX-CS group, the model group, and the sham group after administration. The results showed that the medium- and high-dose CX-CS groups showed improved cardiac function and reduced myocardial fibrosis area, and the medium-dose CX-CS group showed significantly reduced plaque area. CX-CS treatment could reverse the expression of circRNA_07227 and circRNA_11464 in the aorta of AS model and circRNA expression (such as circRNA_11505) in the heart of the MI model. Differentially expressed circRNAs between the CX-CS-treated mice and the model mice were mainly enriched in lipid synthesis, lipid metabolism, lipid transport, inflammation, and angiogenesis in the aorta, and in angiogenesis, blood pressure regulation, and other processes in the heart. CX-CS treatment could reverse the expression of lncRNAs such as ENSMUST00000162209 in the aorta of the AS model and TCONS_00002123 in the heart of the MI model. Differentially expressed lncRNAs between the CX-CS-treated mice and model mice were mainly enriched in lipid metabolism, angiogenesis, autophagy, apoptosis, and iron death in the aorta, and in angiogenesis, autophagy, and iron death in the heart. In summary, CX-CS can regulate the expression of a variety of circRNAs and lncRNAs, and its intervention mechanism in coronary heart disease may be related to the regulation of angiogenesis and inflammation in ischemic myocardium, as well as lipid metabolism, lipid transport, inflammation, angiogenesis in AS aorta.

[Key words] coronary heart disease; Chuanxiong-Chishao herb pair; myocardial infarction; atherosclerosis; circular RNA; long non-coding RNA

DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20230306.703

冠心病(coronary heart disease, CHD)是冠状动脉粥样硬化引起冠状动脉狭窄、痉挛或闭塞,造成心肌缺血、缺氧甚至心肌梗死(myocardial infarction, MI)的缺血性心脏病。《中国心血管健康与疾病报告2021》显示,我国心血管病患者率仍处在持续上升阶段,心血管病现有患病人数3.3亿,其中CHD约1 139万^[1],已严重威胁人类生命健康。CHD的主要病理基础是动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS),AS引起斑块破裂或糜烂导致冠状动脉血栓形成,破裂/糜烂斑块长期不愈合导致急性心血管事件反复发作^[2]。因此,CHD治疗除了保护缺血心肌,还应兼顾修复破裂或糜烂斑块,以预防再发心血管事件^[3]。现有治疗手段存在手术适应症局限、药效单一等问题^[4],如何科学有效地防治CHD是当前的科研热点。近年研究显示,长链非编码RNA(long non-coding RNA, lncRNA)和环状RNA(circular RNA, circRNA)在心血管疾病的多种生理和病理过程中发挥着重要作用,同时为心血管疾病提供了新

的治疗靶点,基于非编码RNA的治疗手段正迅速成为心血管疾病的全新治疗方法^[5-6]。

CHD属于中医胸痹范畴,血瘀证是其最常见证型^[7-8],治以活血化瘀。“川芎-赤芍”药对(Chuanxiong-Chishao herb pair, CX-CS)是活血化瘀经典药对,已证实CX-CS制剂在CHD患者心肌缺血及AS中均有良好的临床疗效^[9]。然而既往研究多只针对于心肌缺血或AS,缺少在同一机体内观察CX-CS改善CHD 2种病理改变的实验证据,且研究层面局限于编码RNA及相关蛋白层面,缺乏更深入的机制探讨。因此,本研究从表观遗传学角度出发,通过构建MI合并AS(MI-AS)复合模型,借助高通量测序技术探索CX-CS基于circRNA和lncRNA调控CHD中MI合并AS的作用机制,为CX-CS的临床应用及机制探索提供依据。

1 材料

1.1 动物与饲料 ApoE^{-/-}小鼠60只,C57BL/6J小鼠12只,雄性,6~8周龄,体质量20~25 g,SPF

级 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 许可证号 SCXK(京) 2021-0006。于 SPF 级动物房饲养, 自由摄食饮水, 12 h/12 h 明暗光照环境下饲养。高脂饲料购自北京科澳协力饲料有限公司, 含 21% 猪油、0.15% 胆固醇。实验操作全部遵循《北京市实验动物福利伦理审查指南》《北京市实验动物管理条例》要求。本实验经中国中医科学院西苑医院医学伦理委员会批准后实施(伦理审查批件号 2021XLC041)。

1.2 药物与试剂 川芎和赤芍购自河北百草康神有限公司, 由中国中医科学院西苑医院药剂科制备成浸膏(每 1 g 浸膏含 1.84 g 生药, 批号 20200730)。mirVana™ miRNA Isolation Kit 试剂盒(Ambion, 批号 1561) 用于提取组织样本总 RNA。TruSeq Stranded Total RNA with Ribo-Zero Gold 试剂盒(Illumina, 批号 RS-122-2301)、Agencourt AMPure XP 试剂盒(BECKMAN COULTER, 批号 A63881)、Agencourt RNAClean XP 试剂盒(BECKMAN COULTER, 批号 A63987)、Qubit RNA Assay Kit 试剂盒(Life Technologies, 批号 Q32852)、Qubit dsDNA Assay Kit 试剂盒(Life Technologies, 批号 Q328520)、Bioanalyzer 2100 RNA-6000 Nano Kit 试剂盒(Agilent, 批号 5067-1511)、Bioanalyzer 2100 DNA-1000 Kit 试剂盒(Agilent, 批号 5067-1504)、SuperScript II Reverse Transcriptase 试剂盒(Invitrogen, 批号 18064014) 用于测序建库。

2 方法

2.1 分组及给药 小鼠分为假手术组、MI-AS 复合模型组、CX-CS 高(7.8 g·kg⁻¹)、中(3.9 g·kg⁻¹)、低剂量组(1.95 g·kg⁻¹)、阳性药组(美托洛尔 26 mg·kg⁻¹、辛伐他汀 5.2 mg·kg⁻¹)。模型组与药物干预组采用 ApoE^{-/-} 小鼠, 每组 12 只, 给予高脂饲料喂养, 假手术组采用 C57BL/6J 小鼠, 给予普通饲料喂养。药物干预组于第 9 周起给予 CX-CS 或阳性药灌胃, 模型组、假手术组小鼠给予等体积生理盐水灌胃。给药 2 周后对模型组与药物干预组小鼠构建急性 MI 模型, 假手术组仅穿线不接扎。术后继续此前喂养及药物干预方案至 12 周。

2.2 MI-AS 复合模型建立 ApoE^{-/-} 小鼠以高脂饲料(含 21% 猪油、0.15% 胆固醇)喂养, 饲养 10 周后进行冠状动脉前降支结扎术, 建立急性 MI 模型。以 0.3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉小鼠, 固定后用针形电极插入四肢皮下, 观察记录标准肢体 II 导联

心电图。行气管插管, 连接小动物呼吸机, 胸部备皮, 消毒后于左侧第 3、4 肋间开胸暴露心脏, 左心耳下方 1~2 mm 处进针, 无菌医用带线缝合针结扎小鼠左前降支冠状动脉, 以结扎左冠状动脉前降支后左心室前壁颜色变化及心电图 J-S-T 段抬高和/或 T 波高耸为造模成功的标志。假手术组采用普通饲料喂养, 手术时只穿线不接扎。

2.3 超声心动图检测 将小鼠麻醉, 自胸部左侧锁骨至肋骨下缘进行备皮处理。仰卧固定, 以 VisualSonics Vevo 2100 高分辨率超声仪进行心动图检测。将探头定位在乳头肌水平长轴切面, 进行 M 型超声检查。选用左室短轴切面 M 型超声检测左心室射血分数(left ventricular ejection factor, LVEF)。各项指标均连续测量 3 个周期, 取平均值。

2.4 取材与样品处理 测量心功能后, 迅速开胸取出心脏及主动脉。CX-CS 中剂量组、模型组、假手术组每组 3 只小鼠, 取心梗周围区组织及主动脉用于转录组测序分析。剩余小鼠心脏及主动脉组织用于病理学观察。因各组造模成功率差异, 每组最终用于病理学观察的小鼠只数不等, 均不少于 6 只。选取主动脉根部用于动脉粥样硬化组织形态学制片及观察分析, 选取心脏心梗部位组织切片用于心肌纤维化情况观察分析。

2.5 心脏 Masson 染色 心肌组织块以 10% 中性福尔马林于 4 ℃ 固定后石蜡包埋, 将蜡块切成 5 μm 的切片, 然后将切片放入复合染色液浸泡 5 min, 用 0.2% 醋酸溶液浸泡清洗, 5% 磷酸盐浸泡 5 min; 醋酸溶液冲洗 2 次, 苯胺蓝染色液染色, 无水乙醇脱水后用透明中性树胶封固, 制片。显微镜下观察, 胶原纤维染为蓝色, 胞核染为蓝黑色, 肌纤维染为红色。ImageJ 图像处理软件分析染成蓝色的胶原面积及心肌组织面积, 计算心肌纤维化比例。

2.6 主动脉根部油红 O 染色 取出主动脉与心脏连接部位, 固定后将其放置于冰冷的 30% 蔗糖磷酸盐缓冲液中 24 h, 随后用包埋剂进行包埋。从主动脉根部开始向心脏心尖方向切片, 当主动脉管腔横切面出现 3 个瓣膜被分为 3 个相互独立部分时为主动脉窦开始区域, 连续切片。将冷冻切片在 4% 多聚甲醛中固定 15 min, ddH₂O 洗 2 min, 60% 异丙醇分化 10 s, 油红 O 染液室温染色 15 min, 浸泡在 ddH₂O 中并清洗。60% 异丙醇作用 5 s, ddH₂O 缓慢冲洗。苏木素染液复染 30 s, ddH₂O 缓慢冲洗。水

洗 2 min 分色,甘油明胶封片,倒置显微镜拍照。

2.7 RNA 的提取及质控 选取小鼠主动脉组织和心肌梗死周围区组织,采用柱式法提取总 RNA;采用微量紫外分光光度法检测 RNA 纯度;Qubit 2.0 核酸蛋白定量仪测定 RNA 浓度。

2.8 cDNA 文库构建和全转录组测序 采用 ribo-zero 试剂盒消化核糖体 RNA,以最大限度保留 mRNA 及非编码 RNA;通过打断试剂将 RNA 随机打断成短片段,以 RNA 片段为模板,用六碱基随机引物合成 cDNA 一链,然后配制二链合成反应体系合成二链 cDNA(以 dUTP 代替 dTTP),然后连接不同接头,再利用 UNG 酶法将含有 dUTP 的一条链进行消化,只保留连接链不同接头的 cDNA 一链;使用试剂盒纯化 cDNA 一链;纯化的 cDNA 一链再进行末端修复、加 A 尾并连接测序接头,然后进行片段大小选择,最后进行 PCR 扩增;构建好的文库用 Agilent 2100 Bioanalyzer 质检合格后,使用 Illumina 测序仪进行测序。

2.9 转录组数据预处理及基因定量 通过 Trimmomatic 软件去除测序下机的 raw reads 中存在接头、模糊碱基(N)或者低质量碱基组成的 reads,得到 clean reads。使用 HISAT2 将 clean reads 比对至小鼠参考基因组,使用 Stringtie 软件对转录本进行组装、融合。

circRNA 预测、定量: 用 CIRI 软件将 clean reads 比对到小鼠参考基因组,针对每个样本预测并融合后获得 Merged Circ-Bed,然后统计每个预测到的 circRNA 的 junction reads 数,计算每 10 亿 mapped reads 中 junction reads 数。

lncRNA 预测、定量: 通过 Cuffcompare 将转录本同已知参考基因模型比较、筛选,并通过 CPC、

CNCI、PLEK 和 Pfam 4 种软件预测编码能力,获取候选 lncRNA。通过 Bowtie2 软件将 clean reads 比对至转录模板之后,使用 eXpress 软件进行基因表达定量,获得 lncRNA 的每千个碱基的转录每 100 万映射读取的 fragments 值和 counts。

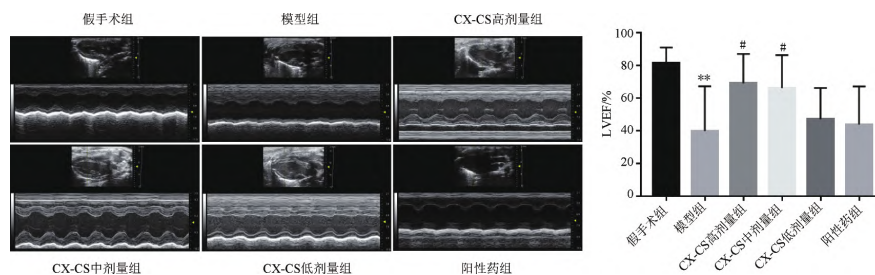
2.10 差异基因分析 使用 DESeq 软件对组间 circRNA 和 lncRNA 进行差异分析,默认差异筛选条件为 $P < 0.05$ 且 fold change > 2 。运用火山图,直观展示组间差异 circRNA 和 lncRNA 的情况,并采用热图呈现聚类结果。

2.11 富集分析 基于差异表达结果,通过 Swiss-Prot 获得每个转录本的基因本体论(Gene Ontology, GO)注释信息,通过 KAAS 获得每个转录本序列的京都基因与基因组百科全书(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)注释信息,并通过超几何分布检验每个差异 circRNA host 基因和 lncRNA 临近基因被富集 GO 条目或 KEGG 通路的显著性。 $P < 0.05$ 表明富集具有显著性。

2.12 统计学分析 数据采用 SPSS 26.0 软件进行统计,数据以平均值 $\pm$ 标准差($\bar{x} \pm s$)表示。通过正态性检验及方差齐性检验后,多组间比较用单因素方差分析,非正态分布数据或方差不齐时用秩和检验,多组间两两比较采用 Bonferroni t 检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 CX-CS 对 MI-AS 小鼠心功能的影响 术后 2 周,与假手术组比较,模型组小鼠心脏 LVEF 显著降低($P < 0.01$);与模型组比较,CX-CS 高($P < 0.05$)、中($P < 0.05$)剂量组小鼠 LVEF 显著升高;CX-CS 低剂量组及阳性药组 LVEF 有所改善,但差异无统计学意义,见图 1。



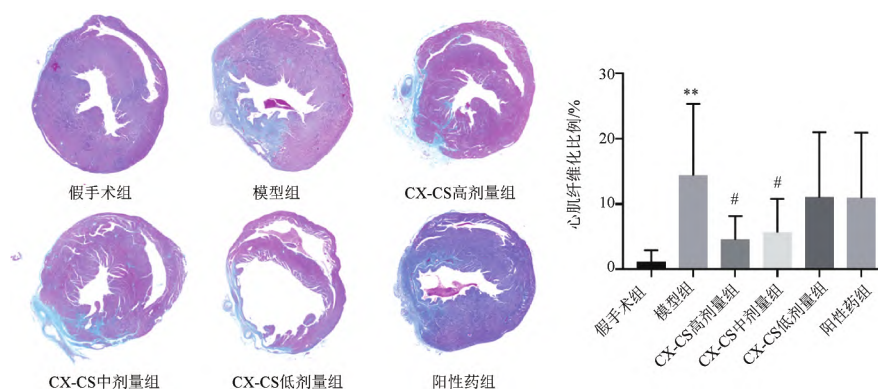
与假手术组比较* $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与模型组比较# $P < 0.05$ (图 2~3 同)。LVEF,左心室射血分数。CX-CS,川芎-赤芍药对;MI-AS,心肌梗死-动脉粥样硬化(图 2~3 同)。假手术组、模型组、CX-CS 高、中、低剂量组、阳性药组样本量分别为 12、9、10、10、9、9。

图 1 CX-CS 对 MI-AS 复合模型小鼠心功能的影响($\bar{x} \pm s$)

Fig.1 Effect of CX-CS on cardiac function in the MI-AS joint mice model ($\bar{x} \pm s$)

3.2 CX-CS 对 MI-AS 小鼠心肌纤维化面积的影响 术后 2 周,与假手术组比较,模型组小鼠心肌纤维化面积显著增加($P<0.01$);与模型组比较,CX-CS

高、中剂量组小鼠心肌纤维化面积显著降低($P<0.05$);CX-CS 低剂量组及阳性药组心肌纤维化面积有所下降,但差异无统计学意义,见图 2。



假手术组、模型组、CX-CS 高、中、低剂量组、阳性药组样本量分别为 9、6、7、7、6、6(图 3 同)。

图 2 CX-CS 对 MI-AS 复合模型小鼠心肌纤维化面积的影响 (Masson 染色 $\times 10$; $\bar{x} \pm s$)

Fig.2 Effect of CX-CS on the myocardium fibrosis area of the MI-AS joint mice model (Masson staining $\times 10$; $\bar{x} \pm s$)

3.3 CX-CS 对 MI-AS 小鼠斑块面积的影响 假手术组小鼠主动脉斑块内无明显红染脂质。与假手术组比较,模型组小鼠主动脉斑块内脂质浸润明显增加($P<0.05$);与模型组比较,CX-CS 中剂量

组、阳性药组小鼠主动脉斑块染红减轻,脂质浸润减少,脂质面积/血管管腔面积的比值降低($P<0.05$),CX-CS 高、低剂量组斑块面积改善不显著,见图 3。

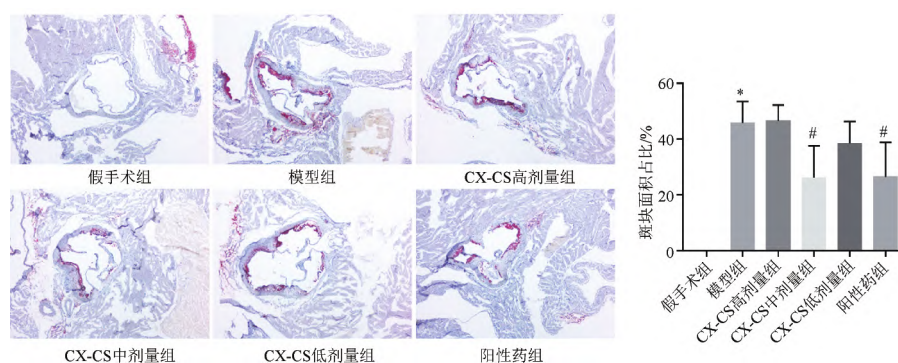


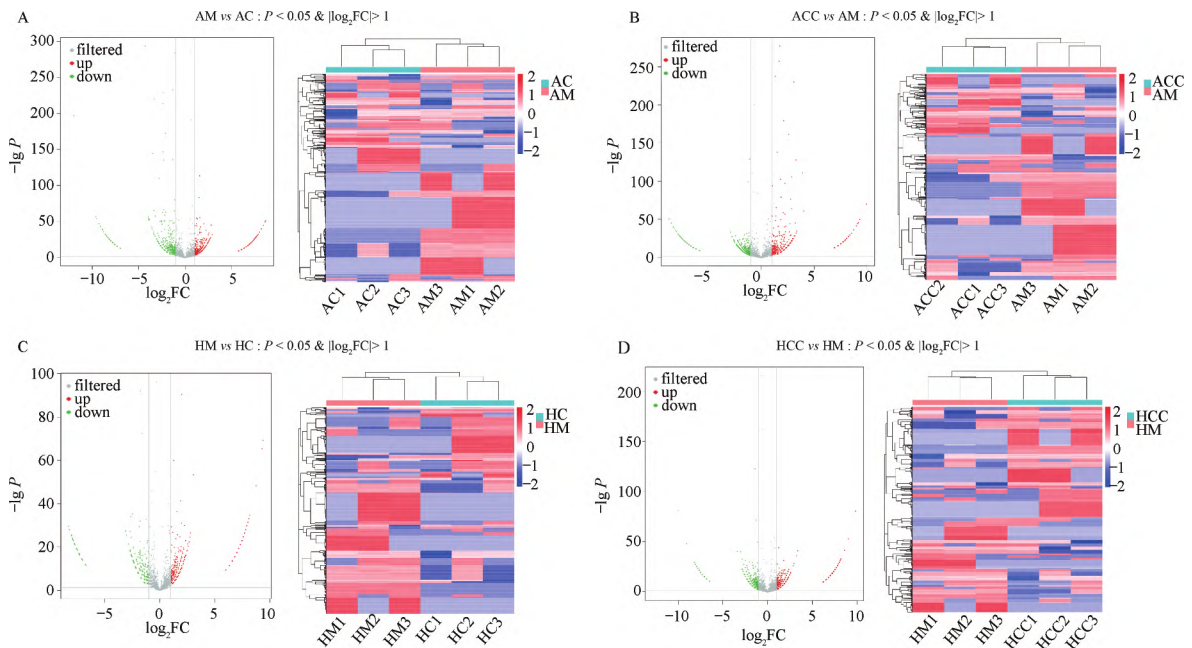
图 3 CX-CS 对 MI-AS 复合模型小鼠斑块面积的影响 (油红 O 染色 $\times 40$; $\bar{x} \pm s$)

Fig.3 Effect of CX-CS on atherosclerotic plaque lesion area in the MI-AS mouse model (oil red O staining, $\times 40$; $\bar{x} \pm s$)

3.4 circRNA 鉴定及差异表达分析 本研究共鉴定出 15 871 个 circRNA。根据筛选标准 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 且 $P < 0.05$ 鉴定主动脉假手术组 (AC)、主动脉川芎-赤芍药干预组 (ACC)、主动脉模型组 (AM) 以及心脏假手术组 (HC)、心脏川芎-赤芍药干预组 (HCC)、心脏模型组 (HM) 间差异表达的 circRNA。利用火山图展示差异表达基因的整体分布情况;利用热图展示各差异分组聚类分析结果。

在 AM 和 AC 组间有差异表达的 circRNA 2 015 个,其中上调 1 197 个,下调 818 个;ACC 组和 AM 组之间有差异表达的 circRNA 1 940 个,其中上调 740 个,下调 1 200 个,见图 4。主动脉中差异表达倍数最大的 circRNA 结果见表 1。

与 AC 组相比,AM 组 circRNA_07227、circRNA_11464 基因表达升高,circRNA_10354、circRNA_16490 表达下降,这些基因与脂质代谢、糖代谢等生



A、B.主动脉组织; C、D.心脏组织(图 6 同)。AC.主动脉假手术组; ACC. 主动脉川芎-赤芍组; AM.主动脉模型组; HC. 心脏假手术组; HCC.心脏川芎-赤芍组; HM.心脏模型组(图 5~7 表 1~4 同)。FC.差异倍数(图 6、表 1~4 同)。各组样本量均为 3(图 5~7、表 1~4 同)。

图 4 CX-CS 对粥样硬化主动脉和缺血心肌组织 circRNAs 表达的影响

Fig.4 Effect of CX-CS on circRNAs expression in atherosclerotic aorta and ischemic myocardium

表 1 粥样硬化主动脉组织差异表达 top circRNAs

Table 1 Top differentially expressed circRNAs of aorta tissues in atherosclerosis

组别	circRNA	来源基因	log ₂ FC	调控方向
AM vs AC	circRNA_14619 Chr7: 19436938_19437518_-	Mark4	8.68	上调
	circRNA_11464 Chr4: 31510612_31512064_-	-	8.62	上调
	circRNA_07227 Chr17: 34696537_34711024_+	Tnxb	8.43	上调
	circRNA_04539 Chr13: 56083120_56084285_-	H2afy	8.23	上调
	circRNA_09946 Chr2: 119712009_119721252_+	Rtf1	8.01	上调
	circRNA_08082 Chr18: 53473421_53552389_+	Prdm6	7.86	上调
	circRNA_04653 Chr13: 74180435_74184773_-	Exoc3	7.77	上调
	circRNA_09014 Chr2: 12386609_12410080_-	Fam188a	7.76	上调
	circRNA_12166 Chr4: 131897657_131897871_+	Srsf4	7.69	上调
	circRNA_00926 Chr1: 149901100_149902442_-	Pla2g4a	7.67	上调
	circRNA_10273 Chr2: 154143755_154162657_+	Bpifa1	-12.58	下调
	circRNA_14120 Chr6: 90598186_90637001_+	Slc41a3	-11.96	下调
	circRNA_16893 Chr9: 77164765_77190737_-	Mlip	-9.60	下调
	circRNA_16490 Chr9: 50995608_50998616_-	Sik2	-9.51	下调
	circRNA_17347 Chr9: 121364001_121392051_+	Trak1	-9.26	下调
	circRNA_07353 Chr17: 51803431_51809287_-	Satb1	-9.11	下调
	circRNA_10354 Chr2: 158382504_158383163_+	Snhg11	-9.10	下调
	circRNA_16991 Chr9: 86611853_86619834_-	Me1	-8.92	下调
	circRNA_00994 Chr1: 156900586_156907778_-	Ralgs2	-8.92	下调
	circRNA_08952 Chr2: 10058996_10064311_-	Atp5c1	-8.91	下调
ACC vs AM	circRNA_17422 ChrMT: 15071_15220_-	-	9.97	上调
	circRNA_13714 Chr6: 29361560_29361753_+	Calu	9.34	上调
	circRNA_16490 Chr9: 50995608_50998616_-	Sik2	9.19	上调
	circRNA_10354 Chr2: 158382504_158383163_+	Snhg11	9.18	上调

续表1

组别	circRNA	来源基因	log ₂ FC	调控方向
	circRNA_11833 Chr4: 97956374_98020954_+	Nfia	9.13	上调
	circRNA_07246 Chr17: 35263839_35359525_+	H2-D1	9.01	上调
	circRNA_12987 Chr5: 89084642_89179844_+	Slc4a4	8.76	上调
	circRNA_00416 Chr1: 63148396_63148571_-	Ndufs1	8.54	上调
	circRNA_05574 Chr14: 78982236_78995163_+	Vwa8	8.40	上调
	circRNA_00014 Chr1: 5095615_5101123_+	Atp6v1h	8.28	上调
	circRNA_00204 Chr1: 38534906_38536946_-	Aff3	-8.68	下调
	circRNA_11464 Chr4: 31510612_31512064_-	-	-8.67	下调
	circRNA_08272 Chr18: 79027924_79087180_-	Setbp1	-8.5	下调
	circRNA_07227 Chr17: 34696537_34711024_+	Tnxb	-8.48	下调
	circRNA_06473 Chr16: 14200847_14201040_-	Myh11	-8.29	下调
	circRNA_04579 Chr13: 59512324_59544451_-	Agtbp1	-8.20	下调
	circRNA_07411 Chr17: 64287001_64293024_-	Pja2	-8.07	下调
	circRNA_03502 Chr12: 28859252_28867153_+	Tssc1	-8.07	下调
	circRNA_10739 Chr3: 68616440_68621066_+	Gm21949	-7.99	下调
	circRNA_08195 Chr18: 68064217_68064686_+	Ldlrad4	-7.98	下调

注: $P < 0.01$ 。

物过程相关 ,CX-CS 处理可逆转以上 circRNA 的表达。

在 HM 和 HC 组间有差异表达的 circRNA 1 366 个 ,其中上调 866 个 ,下调 500 个; HCC 组和 HM 组间有差异表达的 circRNA 1 596 个 ,其中上调

880 个 ,下调 716 个 ,见图 4。缺血心脏组织中差异表达倍数最大的 circRNA 见表 2。与 HC 组相比 , HM 组 circRNA_11505 表达下降 ,该基因可能与能量代谢相关 ,CX-CS 处理可逆转其表达。

表 2 缺血心肌差异表达 top circRNAs

Table 2 Top differentially expressed circRNAs in ischemic myocardium

组别	circRNA	来源基因	log ₂ FC	调控方向
HM vs HC	circRNA_05327 Chr14: 54948081_54974066_-	Myh6	9.40	上调
	circRNA_05331 Chr14: 54949338_54975417_-	Myh6	9.30	上调
	circRNA_00884 Chr1: 139085883_139110485_+	Dennd1b	8.75	上调
	circRNA_15954 Chr8: 88156462_88158265_+	Heatr3	8.17	上调
	circRNA_12281 Chr4: 141167713_141170940_+	Fbxo42	8.09	上调
	circRNA_08965 Chr2: 11760481_11763021_-	Fbxo18	8.09	上调
	circRNA_00457 Chr1: 71074543_71089527_-	Bard1	8.01	上调
	circRNA_05962 Chr15: 40752896_40774146_+	Zfpm2	8.00	上调
	circRNA_02945 Chr11: 86661123_86665878_-	Vmp1	8.00	上调
	circRNA_02468 Chr11: 53283529_53292314_-	Hspa4	7.91	上调
	circRNA_10173 Chr2: 142648428_142690701_-	Kif16b	-8.30	下调
	circRNA_05479 Chr14: 66824345_66829982_-	Dpysl2	-8.20	下调
	circRNA_13979 Chr6: 65869181_65928021_+	Prdm5	-8.04	下调
	circRNA_01011 Chr1: 160700712_160740931_-	Rabgap11	-8.04	下调
	circRNA_10069 Chr2: 127284095_127284581_+	Stard7	-8.02	下调
	circRNA_02940 Chr11: 86532772_86535460_-	Rps6kb1	-7.93	下调
	circRNA_08842 Chr19: 53620589_53621906_+	Smc3	-7.91	下调
	circRNA_02763 Chr11: 76811695_76814913_-	Cpd	-7.90	下调
	circRNA_11505 Chr4: 40163719_40167191_+	Aco1	-7.89	下调
	circRNA_08849 Chr19: 53813248_53853635_+	Rbm20	-7.87	下调
HCC vs HM	circRNA_11254 Chr3: 142303943_142314448_-	Pdlim5	9.83	上调
	circRNA_12811 Chr5: 57913156_57942262_+	Pcdh7	9.06	上调
	circRNA_17383 ChrMT: 1680_1844_-	-	8.62	上调

续表2

组别	circRNA	来源基因	log ₂ FC	调控方向
	circRNA_16963 Chr9: 82926397_82933067_-	Phip	8.23	上调
	circRNA_17741 ChrX: 129801395_129825947_+	Diaph2	8.16	上调
	circRNA_02524 Chr11: 58040391_58044050_+	Larp1	8.12	上调
	circRNA_11505 Chr4: 40163719_40167191_+	Aco1	8.05	上调
	circRNA_07004 Chr17: 5040580_5127024_+	Arid1b	8.05	上调
	circRNA_00881 Chr1: 139060275_139110485_+	Dennd1b	8.03	上调
	circRNA_11180 Chr3: 132705513_132752669_+	Tbck	7.93	上调
	circRNA_14120 Chr6: 90598186_90637001_+	Slc41a3	-12.79	下调
	circRNA_05336 Chr14: 54952246_54979562_-	Myh6	-11.72	下调
	circRNA_02534 Chr11: 59055377_59061107_-	Obscn	-9.99	下调
	circRNA_09676 Chr2: 76854150_76881839_-	Ttn	-9.05	下调
	circRNA_05890 Chr15: 33233664_33250133_+	Cpq	-8.17	下调
	circRNA_10544 Chr3: 27222668_27226142_+	Nceh1	-8.06	下调
	circRNA_05037 Chr14: 20604052_20607905_-	Usp54	-7.94	下调
	circRNA_02803 Chr11: 78013171_78018229_+	Phf12	-7.93	下调
	circRNA_09815 Chr2: 91805024_91810209_+	Ambra1	-7.80	下调
	circRNA_06308 Chr15: 98075809_98087133_-	Senp1	-7.80	下调

注: $P < 0.01$ 。

3.5 差异表达 circRNA 功能富集分析 主动脉组织 GO 富集分析结果显示, ACC 与 AM 组间差异表达 circRNA 主要富集在脂肪的消化和吸收、脂肪细胞脂肪分解的调节、脂肪酸生物合成过程的正调控、甘油三酯转运、胆固醇转运等脂质代谢相关过程, 巨噬细胞活化参与免疫反应、白细胞介素-12 产生的正调控、巨噬细胞细胞因子产生的正调控等炎症相关过程, 血管内皮生长因子受体信号通路等血管新生相关过程, 以及血液凝固、纤维蛋白凝块形成、血小板聚集的调节等凝血相关过程, 以及 TRP 通道的炎症介质调节、VEGF 信号通路、cGMP-PKG 信号通路、血管平滑肌收缩、NF- κ B 信号通路等。KEGG 富集分析显示, 主动脉中差异表达 circRNA 显著富集于脂肪消化和吸收、胆固醇代谢、脂类分解等脂质代谢相关通路, 以及醛固酮合成与分泌、肾素分泌、血管平滑肌收缩、VEGF 信号通路、细胞衰老、血小板活化等通路。

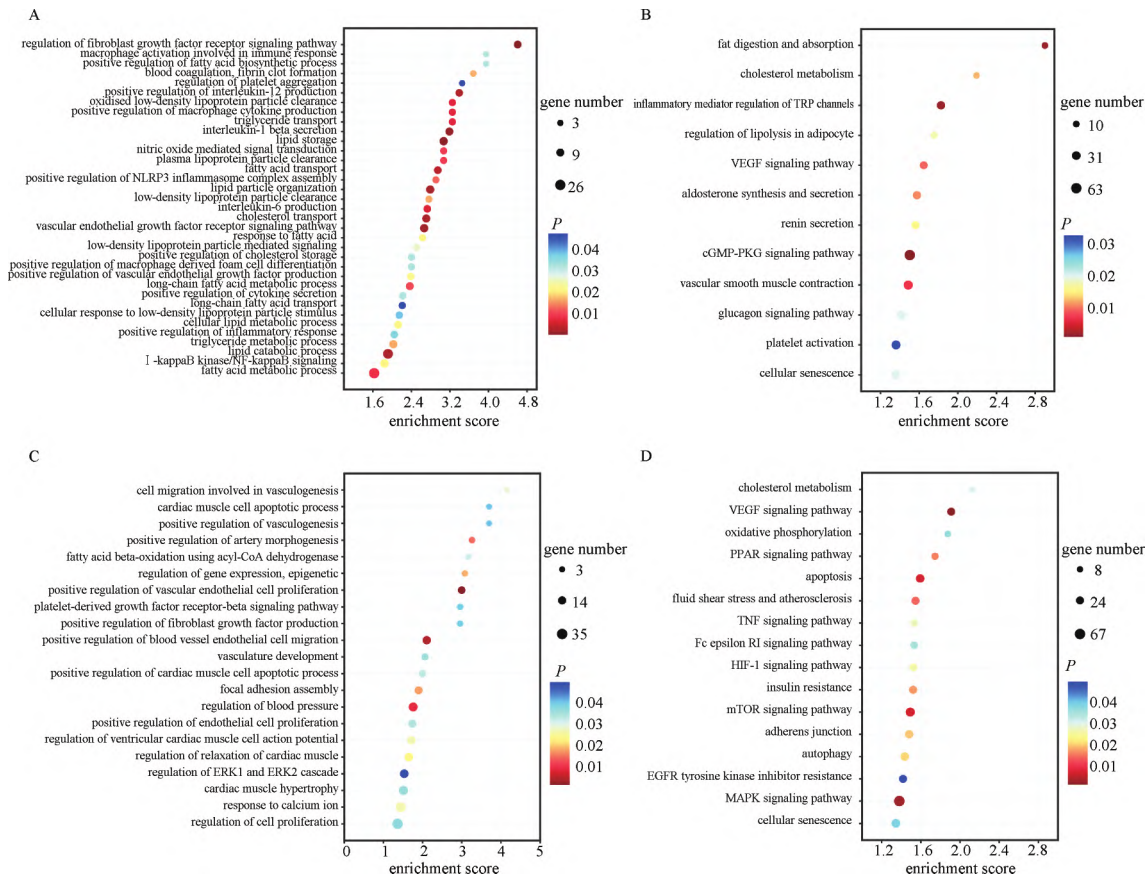
在心脏组织样本中, GO 富集分析显示 HCC 与 HM 组间差异表达 circRNA 显著富集在血管生成中的细胞迁移、血管内皮细胞增殖的正调控、血小板衍生长因子受体 β 信号通路、血管内皮细胞迁移的正调控等与血管新生相关条目, 以及心肌细胞动作电位、钙离子通道反应、心肌细胞肥大、血压调节、ERK 信号通路等生物过程。KEGG 富集分析显示心脏组织差异表达的 circRNA 基因显著富集于 HIF-1

信号通路、VEGF 信号通路、细胞衰老、PPAR 信号通路、TNF 信号通路、MAPK 信号通路、自噬等信号通路, 见图 5。

3.6 lncRNA 鉴定及差异表达分析 一共鉴定出 23 452 个 lncRNA。根据筛选标准 $|\log_2(\text{fold change})| > 1$ 且 $P < 0.05$ 鉴定 AM 和 AC 组、HM 和 HC 组、ACC 组和 AM 组、HCC 组和 HM 组间差异表达的 lncRNA。利用火山图展示差异表达基因的整体分布情况; 利用热图展示各差异分组聚类分析结果。

在 AM 和 AC 组间有差异表达的 lncRNA 683 个, 其中上调 233 个, 下调 450 个; ACC 组和 AM 组之间有差异表达的 lncRNA 671 个, 其中 459 个上调, 212 个下调, 见图 6。主动脉中差异表达倍数最大的 lncRNA 见表 3。与 AC 组相比, AM 组 ENSMUST-00000162209 基因表达升高, NR_015473.1、TCONS_00029210 表达下降, 这些基因可能与金属离子结合、NF- κ B 转录因子活性、蛋白激酶活性调控等生物过程相关, CX-CS 处理可逆转以上 lncRNA 的表达。

在 HM 和 HC 组间有差异表达的 lncRNA 204 个, 其中上调 88 个, 下调 116 个; HCC 组和 HM 组间有差异表达的 lncRNA 244 个, 其中 130 个上调, 110 个下调, 见图 6。缺血心脏组织中差异表达倍数最大的 lncRNA 见表 4。与 HC 组相比, HM 组 TCONS_00002123、TCONS_00006285、TCONS_00009826、



A、B 分别为主动脉组织 ACC 与 AM 组间差异表达 circRNAs 的 GO 和 KEGG 富集分析图；C、D 分别为心脏组织 HCC 与 HM 组间差异表达 circRNAs 的 GO 和 KEGG 富集分析图。

图 5 主动脉和心肌组织差异表达 circRNAs 富集分析

Fig.5 Enrichment analysis of differentially expressed circRNAs in aortic and myocardial tissues

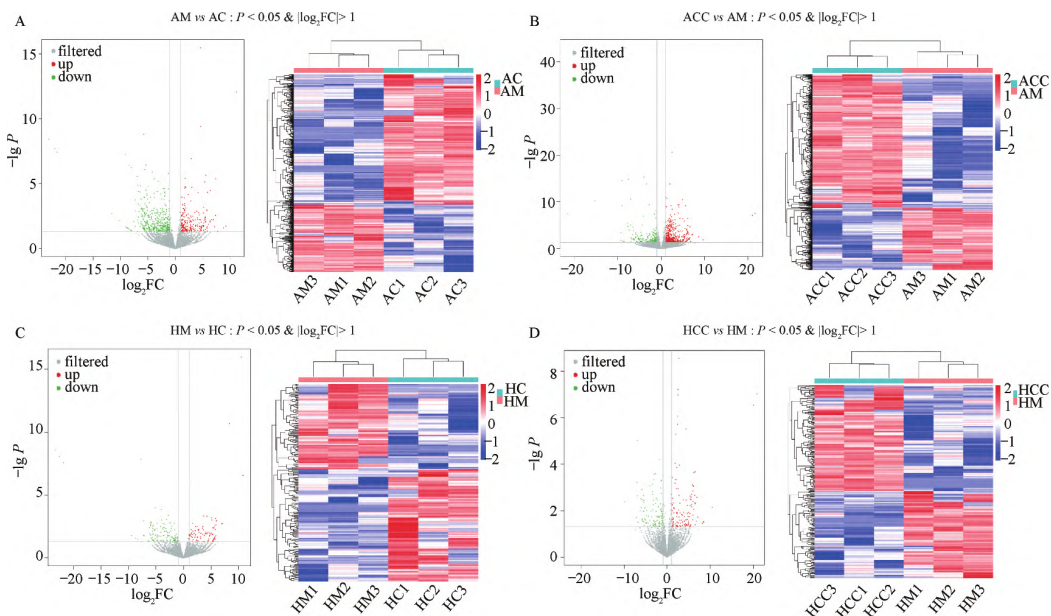


图 6 CX-CS 对粥样硬化主动脉和缺血心肌组织 lncRNAs 表达的影响

Fig.6 Effect of CX-CS on lncRNAs expression in atherosclerotic aorta and ischemic myocardium

表 3 粥样硬化主动脉组织差异表达 top lncRNAs

Table 3 Top differentially expressed lncRNAs in atherosclerotic aorta tissue

组别	lncRNA ID	最适转录本对应基因名	log ₂ FC	P	调控方向
AM vs AC	TCONS_00002558	Adgrg6	11.15	<0.01	上调
	ENSMUST00000228223	Gdnf	9.22	<0.05	上调
	ENSMUST00000162209	Rnf214	8.77	<0.05	上调
	ENSMUST00000190028	Chd2	7.77	<0.05	上调
	TCONS_00009833	Bdp1	7.70	<0.05	上调
	ENSMUST00000067618	Gm14461	7.38	<0.01	上调
	ENSMUST00000182537	Kcnrg	7.32	<0.01	上调
	TCONS_00024690	Zfp37	7.17	<0.05	上调
	ENSMUST00000182517	Zfp949	6.93	<0.01	上调
	ENSMUST00000186717	Parn	6.63	<0.01	上调
	TCONS_00029109	Sspo	-23.01	<0.01	下调
	TCONS_00029237	-	-21.94	<0.01	下调
	TCONS_00003885	Ttc41	-21.53	<0.01	下调
	TCONS_00036705	-	-11.58	<0.01	下调
	TCONS_00036710	-	-10.11	<0.01	下调
	TCONS_00029210	-	-9.10	<0.01	下调
	NR_015473.1	Chp1	-8.97	<0.05	下调
	ENSMUST00000134456	Actc1	-8.80	<0.05	下调
	TCONS_00029216	-	-8.67	<0.05	下调
	NR_029382.1	Gpc5	-8.46	<0.05	下调
ACC vs AM	TCONS_00008519	-	21.67	<0.01	上调
	TCONS_00029210	-	21.04	<0.01	上调
	TCONS_00006637	Gsdma3	9.67	<0.05	上调
	TCONS_00002561	Adgrg6	8.68	<0.01	上调
	XR_881216.1	Fam214b	7.77	<0.05	上调
	ENSMUST00000188611	-	7.27	<0.01	上调
	ENSMUST00000180804	Slc44a3	7.18	<0.01	上调
	NR_015473.1	Chp1	7.17	<0.01	上调
	TCONS_00008935	Zfp273	6.83	<0.05	上调
	ENSMUST00000209429	Ehhadh	6.66	<0.05	上调
	TCONS_00013980	Cyrr1	-21.56	<0.01	下调
	TCONS_00036728	-	-15.25	<0.01	下调
	TCONS_00036726	-	-9.30	<0.01	下调
	XR_001784540.1	Gm12666	-9.26	<0.05	下调
	TCONS_00015128	Gm6712	-8.98	<0.01	下调
	TCONS_00035850	St3gal4	-8.95	<0.01	下调
	TCONS_00015039	Gm2808	-8.81	<0.05	下调
	ENSMUST00000162209	Rnf214	-8.53	<0.05	下调
	TCONS_00036739	-	-8.27	<0.01	下调
	TCONS_00001195	Efhc1	-7.75	<0.01	下调

TCONS_00031363、TCONS_00035850 基因表达下降，XR_388755.1、XR_873865.2 表达升高，这些基因可能与血管新生、炎症、凋亡、外段肌动蛋白结合、细胞骨架调节蛋白结合等生物过程相关，CX-CS 处理可逆转其表达。

3.7 差异表达 lncRNA 的功能富集分析 在主动脉组织中，GO 富集分析结果表明，ACC 与 AM 组间差异表达的 lncRNA 显著富集在长链脂肪酸生物合

成过程、脂质激酶活性的负调节、脂肪酸生物合成过程的负调控等脂质代谢相关过程，细胞对生长因子刺激反应的调节、转化生长因子 β 受体信号通路的正调控等血管新生相关过程，以及固有凋亡信号通路的正调控、自噬等炎症相关过程。KEGG 富集分析发现主动脉组织中差异表达 lncRNA 显著富集于铁死亡、自噬、肌醇磷酸代谢、脂肪分解的调节、肾素分泌等信号通路。

表 4 缺血心肌差异表达 top lncRNAs

Table 4 Top differentially expressed lncRNAs in ischemic myocardium

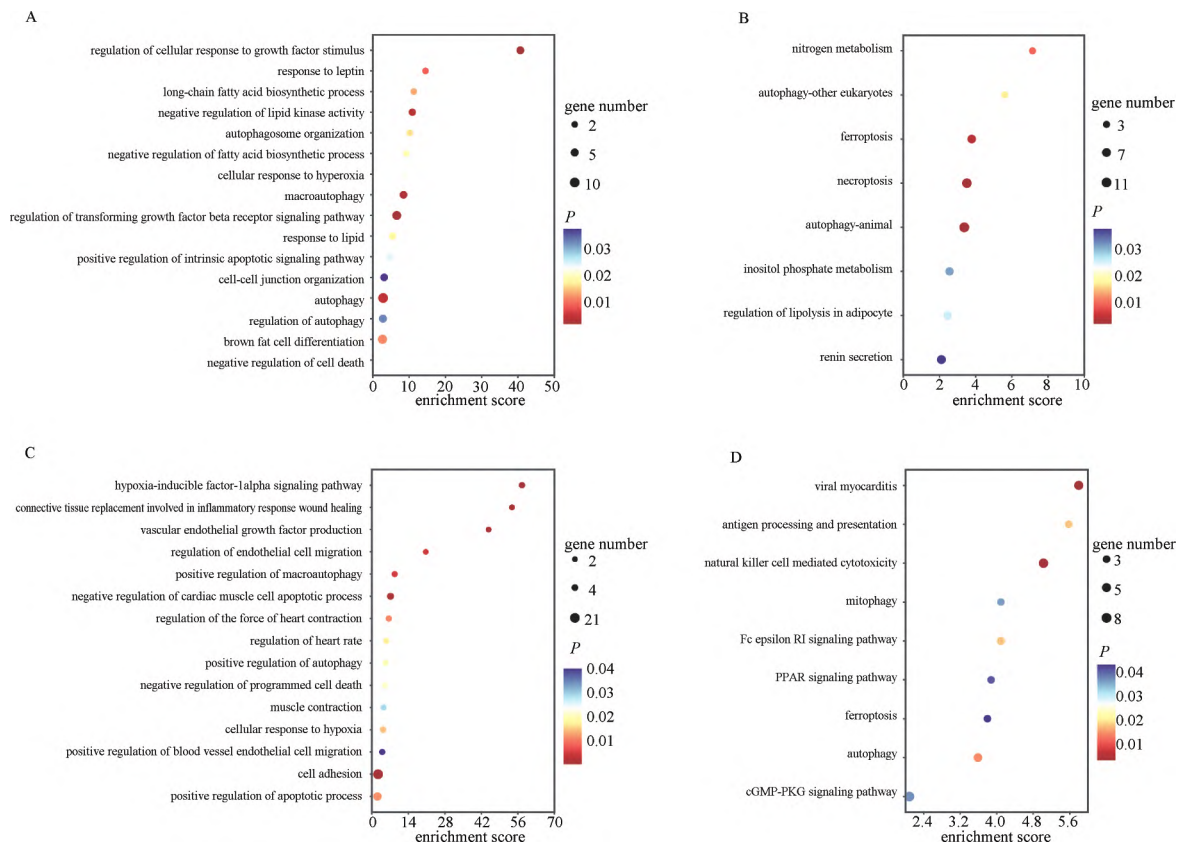
组别	lncRNA ID	最适转录本对应基因名	log ₂ FC	P	调控方向
HM vs HC	TCONS_00036736	-	10.82	<0.01	上调
	TCONS_00021157	Src	10.55	<0.01	上调
	TCONS_00036709	-	8.36	<0.01	上调
	TCONS_00035766	Kank2	7.03	<0.01	上调
	XR_001784816.1	Kmt2e	6.96	<0.01	上调
	ENSMUST00000211729	Zfp369	6.02	<0.01	上调
	XR_388755.1	Map2k4	5.92	<0.01	上调
	ENSMUST00000160152	Zbtb37	5.89	<0.05	上调
	TCONS_00029230	-	5.86	<0.01	上调
	XR_873865.2	Mrps27	5.77	<0.01	上调
	TCONS_00009826	Map1b	-23.27	<0.01	下调
	TCONS_00035850	St3gal4	-22.53	<0.01	下调
	TCONS_00021725	Lrba	-21.77	<0.01	下调
	TCONS_00031363	Sertad3	-9.40	<0.05	下调
	TCONS_00006285	Polr2a	-8.68	<0.05	下调
	TCONS_00002123	Fasl	-8.33	<0.05	下调
	ENSMUST00000161005	Zbtb37	-7.78	<0.01	下调
	TCONS_00002761	Sowahe	-7.23	<0.01	下调
	ENSMUST00000225514	Hand2	-7.21	<0.05	下调
	ENSMUST00000190028	Chd2	-7.15	<0.05	下调
HCC vs HM	TCONS_00035850	St3gal4	20.89	<0.01	上调
	TCONS_00014036	Hlcs	20.07	<0.01	上调
	TCONS_00031363	Sertad3	10.52	<0.01	上调
	TCONS_00002123	Fasl	8.46	<0.05	上调
	TCONS_00009826	Map1b	8.23	<0.05	上调
	TCONS_00001195	Efhc1	7.12	<0.05	上调
	ENSMUST00000230286	Ppara	6.96	<0.01	上调
	TCONS_00006285	Polr2a	6.80	<0.05	上调
	ENSMUST00000162209	Rnf214	6.53	<0.05	上调
	ENSMUST00000220889	Smek1	6.52	<0.01	上调
	ENSMUST00000163836	C330006A16Rik	-22.19	<0.01	下调
	XR_877322.2	Gm38666	-21.44	<0.01	下调
	TCONS_00036710	-	-9.83	<0.01	下调
	XR_001782197.1	Ermard	-7.09	<0.05	下调
	XR_388755.1	Map2k4	-7.02	<0.01	下调
	XR_390587.3	-	-6.96	<0.01	下调
	XR_873865.2	Mrps27	-6.86	<0.01	下调
	XR_881216.1	Fam214b	-6.75	<0.05	下调
	ENSMUST00000182656	-	-6.15	<0.05	下调
	NR_029382.1	Gpc5	-6.04	<0.01	下调

而在心脏组织样本中 ,HCC 和 HM 组间差异表达的 lncRNA 显著富集在血管内皮生长因子的产生、内皮细胞迁移的调节、血管内皮细胞迁移的正调控等血管新生相关过程以及缺氧诱导因子-1 α 信号通路、结缔组织置换参与炎症反应伤口愈合、心肌细胞凋亡过程的负调控等炎症相关过程。KEGG 富集分析显示 ,HCC 与 HM 组间差异表达的 lncRNA 中显

著富集于病毒性心肌炎、自然杀伤细胞介导的细胞毒性、铁死亡、自噬、线粒体、Fc ϵ RI 信号通路、PPAR 信号通路、cGMP-PKG 信号通路等通路 ,见图 7。

4 讨论

CHD 的治疗靶点及其机制研究一直是国内外科研热点。CHD 患者大多合并缺血性心肌损伤和 AS 2 种病变 ,治疗时应予以兼顾。既往临床和基础



A、B 分别为主动脉组织 ACC 与 AM 组间差异表达 lncRNAs 的 GO 和 KEGG 富集分析图; C、D 分别为心脏组织 HCC 与 HM 组间差异表达 lncRNAs 的 GO 和 KEGG 富集分析图。

图 7 主动脉和心肌组织差异表达 lncRNAs 富集分析

Fig.7 Enrichment analysis of differentially expressed lncRNAs in aortic and myocardial tissues

研究证实 CX-CS 在 CHD 缺血性心肌损伤和 AS 中均有疗效。本研究借助 MI-AS 复合模型,证实了 CX-CS 对 CHD 缺血性心肌损伤及 AS 的治疗作用,并通过全转录组测序发现,CX-CS 可调控小鼠 MI-AS 模型多种 circRNA、lncRNA 的表达,其干预 MI-AS 复合模型的机制可能与干预 AS 主动脉的脂质代谢、炎症、血管新生、凝血相关过程以及缺血心肌组织的血管新生、炎症、凋亡有关。研究分析了 CX-CS 改善 CHD 的表观遗传学机制,为深入探究其作用机制提供了数据支持。

CX-CS 是血瘀证的经典药对,来源于王清任《医林改错》“五逐瘀汤”的共有药物。临床研究证实,CX-CS 的提取物芎芍胶囊可预防经皮冠状动脉介入治疗后再狭窄;改善 AS 血瘀证患者内皮依赖性血管舒张功能、病理性血管重构和颈动脉血流参数,减少颈动脉内中膜厚度和斑块面积;降低高脂

血症患者血清甘油三酯、总胆固醇和低密度脂蛋白水平,升高高密度脂蛋白胆固醇水平,降低载脂蛋白 B 与载脂蛋白 A 的比值;改善心绞痛患者胸闷、胸痛、心悸等症状,对稳定性心绞痛心血瘀阻证更有显著疗效。课题组前期研究发现,CX-CS 抗缺血性心肌损伤的作用可能与其调控 Notch 表达水平从而干预血管新生的作用有关^[10]。此外,CX-CS 有效成分川芎嗪和芍药苷配伍可抑制 ApoE^{-/-}小鼠主动脉内血管新生,延缓 AS 的病理进程^[9]。然而既往研究多借助单一疾病模型研究 CX-CS 对 CHD 的干预作用,缺少在同一机体内 CX-CS 对 CHD 缺血性心肌损伤和 AS 2 种病理改变的疗效数据。本研究在前期研究基础上,借助 MI-AS 小鼠复合模型深入分析了 CX-CS 干预 CHD 的作用,发现 CX-CS 可以在同一机体内同时改善缺血性心肌损伤与动脉粥样硬化 2 种病理状态,证实了 CX-CS 对 CHD 的多靶点治疗

作用。

circRNA 是一类由反向剪切形成的单链共价闭合 RNA 分子,可通过吸附微小 RNA (microRNA, miRNA) 结合 RNA 结合蛋白(RNA-binding protein, RBP),以及调控基因表达等途径调控多种生命活动^[11-12],是一种有前景的生物标志物和治疗靶点。已有多项研究表明 circRNA 参与了 AS 脂质代谢及急性 MI 的血管新生过程。SHANG L 等发现阻断 circ_0003575 功能可抑制 FoxO4 和 FoxO3 的表达,进而损害内皮细胞的增殖、迁移以及脂质代谢过程,最终加剧 AS 的发生与进展^[13]。circ0029343 可通过拮抗 miR-96 调控 B 类 I 型清道夫受体,提高 ApoE^{-/-} 基因敲除鼠体内胆固醇逆向转运效率,减轻血管壁及肝脏组织的脂质沉积,从而延缓 AS 进程^[14]。仇治梅发现过表达 circERBB2IP 可促进成年小鼠 MI 后心脏修复和血管新生^[15]。以上研究结果表明, circRNA 在 MI 和 AS 的发病及治疗中有着重要作用,但目前对其调控机制和药物干预的研究尚少,有待进一步探索。本研究结果发现, CX-CS 可逆转 MI-AS 模型的多种 circRNA 表达,其机制涉及 AS 中的脂质代谢以及 MI 模型的心肌能量代谢,这些机制均是冠心病的关键病理机制。差异表达的 circRNA 功能富集分析提示, CX-CS 干预 MI-AS 复合模型中 AS 的机制与调节脂质代谢、炎症、血管新生、血小板激活相关。脂质代谢和炎症是 AS 的关键病理机制,巨噬细胞通过摄取大量修饰的脂蛋白形成泡沫细胞,是早期 AS 病变的一大标志。炎症细胞浸润致使 AS 斑块破裂,血栓形成,血管受损,造成心肌细胞缺血缺氧,最终导致心肌缺血性损伤的发生,针对 AS 发生后炎症反应的调控对预防急性心血管事件有着积极的意义。血管新生可能引起斑块不稳定、诱发斑块破裂出血。血小板活化不仅可导致 AS 进展,还是斑块破裂后血栓形成的原因。本研究的结果提示 CX-CS 可能通过调控 circRNA 表达调控上述生物过程,这可能是其改善 AS 的关键机制。治疗性血管新生是心肌修复的基础,受损组织的血运重建对组织修复至关重要,本研究发现 CX-CS 改善缺血心肌损伤的机制可能包含血管新生,提示 CX-CS 干预冠心病的机制可能与调控缺血心肌血管新生有关。

lncRNA 是一类由 RNA 聚合酶 II 转录形成的长度超过 200 个核苷酸的内源性 RNA,研究表明, 3902

lncRNA 在诸多心血管疾病中发挥着重要的作用^[16]。YU X H 等报道了 lncRNA kenq1ot1 可以通过介导 miR-452-3p/组蛋白去乙酰化酶 3/ATP 结合盒转运蛋白 A1 通路促进脂质的积累并促进 AS^[17]; HU Y W 等报道了 RP5-833A20.1 可以通过降低核因子 IA 表达减少高密度脂蛋白胆固醇表达,增加低密度脂蛋白胆固醇和前炎症因子表达,进而促进 AS 形成^[18]。lncRNA-p21 通过去乙酰化酶 1 诱导前蛋白转化酶枯草溶菌素/Kexin9 型蛋白启动子序列的去乙酰化,从而抑制 AS 的发展^[19]。lncRNA MALAT1 可促进急性 MI 后缺血心肌血管新生并减小心肌梗面积^[20]。lncRNA UCA1 可通过 miR-143/B 淋巴细胞瘤-2/Beclin-1 轴缓解急性心肌缺血再灌注损伤^[21]。lncRNA NEAT1 基因可调控心肌细胞、成纤维细胞凋亡, NEAT1 缺失导致 MI 后心功能受损^[22]。以上研究提示 lncRNA 在 MI 和 AS 的治疗中有重要作用,可作为改善 CHD 的潜在治疗靶点。本研究结果显示, CX-CS 可逆转 MI-AS 复合模型中多种 lncRNA 表达,其机制涉及血管新生、炎症、蛋白激酶活性、肌动蛋白结合等,这些机制与冠心病心肌缺血损伤及 AS 的修复相关。对差异表达 lncRNA 富集分析发现,在 AS 主动脉组织中差异基因显著富集在脂质代谢调控、自噬等过程。脂质代谢和自噬是 AS 发生发展的危险因素,同时也是 AS 的治疗机制^[23-26]。结合本研究结果,提示脂质代谢、自噬等途径可能是 CX-CS 治疗 AS 的机制。本研究心肌组织中差异 lncRNA 显著富集于血管新生相关途径,提示血管新生可能是 CX-CS 干预 MI 的主要机制之一。以上研究结果揭示了 CX-CS 干预 CHD 2 种病理状态可能的表观遗传学药理机制。

本研究首次借助 ApoE^{-/-} 小鼠构建 MI-AS 复合模型,借助全转录组测序,探索 CX-CS 干预 CHD 的表观遗传学机制。本研究发现 CX-CS 可调控多种 circRNA 及 lncRNA 的表达,其对 CHD 的干预作用可能与干预缺血心肌血管新生,影响 AS 主动脉的脂质代谢及转运、炎症、血管新生、血小板活化等机制有关。本研究为 CX-CS 干预 CHD 的作用机制提供理论依据,同时也为基于表观遗传学的 CHD 创新治疗靶点的挖掘提供数据支持。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

[参考文献]

[1] 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 2021 概要 [J]. 中国循环杂志, 2022, 37(6): 553.
- [2] DE HERT M, DETRAUX J, VANCAMPFORT D. The intriguing relationship between coronary heart disease and mental disorders [J]. *Dialogues Clin Neurosci*, 2018, 20(1): 31.
- [3] VERGALLO R, CREA F. Atherosclerotic plaque healing [J]. *N Engl J Med*, 2020, 383(9): 846.
- [4] BOUDOULAS K D, TRIPOSCIADIS F, GELERIS P, et al. Coronary atherosclerosis: pathophysiologic basis for diagnosis and management [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2016, 58(6): 676.
- [5] POLLER W, DIMMELER S, HEYMANS S, et al. Non-coding RNAs in cardiovascular diseases: diagnostic and therapeutic perspectives [J]. *Eur Heart J*, 2018, 39(29): 2704.
- [6] FASOLO F, DI GREGOLI K, MAEGDEFESSEL L, et al. Non-coding RNAs in cardiovascular cell biology and atherosclerosis [J]. *Cardiovasc Res*, 2019, 115(12): 1732.
- [7] 黄明艳, 高嘉良, 刘超, 等. 中医药辨治动脉粥样硬化规律探析 [J]. 中国临床保健杂志, 2018, 21(6): 834.
- [8] 陈善达, 梁昊, 李亮. 基于 Python 语言的冠心病证候与用药规律挖掘研究 [J]. 世界中医药, 2022, 17(17): 2501.
- [9] 袁蓉, 施伟丽, 信琪琪, 等. 川芎-赤芍药对研究进展 [J]. 环球中医药, 2019, 12(5): 808.
- [10] SHI W L, ZHAO J, YUAN R, et al. Combination of Ligusticum Chuanxiong and Radix Paeonia promotes angiogenesis in ischemic myocardium through Notch signalling and mobilization of stem cells [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2019, 2019: 7912402.
- [11] LIU C X, CHEN L L. Circular RNAs: characterization, cellular roles, and applications [J]. *Cell*, 2022, 185(12): 2016.
- [12] KRISTENSEN L S, ANDERSEN M S, STAGSTED L V W, et al. The biogenesis, biology and characterization of circular RNAs [J]. *Nat Rev Genet*, 2019, 20(11): 675.
- [13] SHANG L, QUAN A, SUN H, et al. MicroRNA-448a-3p promotes survival and migration of endothelial cells isolated from ApoE deficient mice through restricting circular RNA 0003575 [J]. *Gene*, 2019, 711: 143948.
- [14] 曾勇智. Circ_0029343/miR-96 调控 SR-BI 对 apoE 基因敲除鼠动脉粥样硬化的影响 [D]. 衡阳: 南华大学, 2019.
- [15] 仇治梅. CircERBB2IP 通过 miR-145a-5p/Smad5 轴调控心肌梗死后血管新生的分子机制研究 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2021.
- [16] WANG Y, SUN X. The functions of LncRNA in the heart [J]. *Diabetes Res Clin Pract*, 2020, 168: 108249.
- [17] YU X H, DENG W Y, CHEN J J, et al. LncRNA kcnq1ot1 promotes lipid accumulation and accelerates atherosclerosis via functioning as a ceRNA through the miR-452-3p/HDAC3/ABCA1 axis [J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(12): 1043.
- [18] HU Y W, ZHAO J Y, LI S F, et al. RP5-833A20.1/miR-382-5p/NFIA-dependent signal transduction pathway contributes to the regulation of cholesterol homeostasis and inflammatory reaction [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2015, 35(1): 87.
- [19] WANG H, HE F, LIANG B, et al. LncRNA-p21 alleviates atherosclerosis progression through regulating the miR-221/SIRT1/Pcsk9 axis [J]. *J Cell Mol Med*, 2021, 25(19): 9141.
- [20] SHYU K G, WANG B W, FANG W J, et al. Hyperbaric oxygen-induced long non-coding RNA MALAT1 exosomes suppress microRNA-92a expression in a rat model of acute myocardial infarction [J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(22): 12945.
- [21] DIAO L, ZHANG Q. Transfer of lncRNA UCA1 by hUCMSCs-derived exosomes protects against hypoxia/reoxygenation injury through impairing miR-143-targeted degradation of Bcl-2 [J]. *Aging (Albany NY)*, 2021, 13(4): 5967.
- [22] KENNEWEG F, BANG C, XIAO K, et al. Long noncoding RNA-enriched vesicles secreted by hypoxic cardiomyocytes drive cardiac fibrosis [J]. *Mol Ther Nucleic Acids*, 2019, 18: 363.
- [23] HU R, DAI C, DONG C, et al. Living macrophage-delivered tetrapod PdH nanoenzyme for targeted atherosclerosis management by ROS scavenging, hydrogen anti-inflammation, and autophagy activation [J]. *ACS Nano*, 2022, 16(10): 15959.
- [24] MADRIGAL-MATUTE J, DE BRUIJN J, VAN KUIJK K, et al. Protective role of chaperone-mediated autophagy against atherosclerosis [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2022, 119(14): e2121133119.
- [25] 周曼丽, 俞赞丰, 赵彦禛, 等. 中药及天然化合物靶向自噬调控动脉粥样硬化的研究进展 [J]. 中国中药杂志, 2023, 48(2): 311.
- [26] 周曼丽, 赵彦禛, 俞赞丰, 等. 中医药调控动脉粥样硬化相关信号通路的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(15): 232.

[责任编辑 陈玲]