

基于文献的气滞血瘀证差异表达谱生物信息学研究^{*}

何浩强^{1,2}, 陈 光^{1,2}, 高嘉良¹, 胡 坤¹, 刘 超^{1,2}, 王 阶^{1**}

(1. 中国中医科学院广安门医院心血管科 北京 100053; 2. 北京中医药大学研究生院 北京 100029)

摘 要:目的:运用生物信息学方法分析气滞血瘀证差异表达谱,以探索气滞血瘀证可能的生物学基础与发生机制。方法:①检索中国知网和PubMed数据库中气滞血瘀证组学层面研究的相关文献331篇,提取并总结基本资料与RNA差异表达谱;②应用GeneCards数据库进行基因功能注释;③借助DAVID平台对差异表达RNA进行生物功能与信号通路富集分析;④利用starBase v2.0平台中的miRNA-target interactions模块、miRNA-lncRNA interactions模块、miRNA-circRNA interactions模块与STRING Version 10.5平台中的Multiple proteins模块建立气滞血瘀证ceRNA-mRNA-protein相互作用网络。结果:①文献分析显示,共有41篇文献报道了气滞血瘀证组学层面研究的结果,其中蛋白表达研究数量最多,其次为mRNA、SNP、miRNA、DNA甲基化、lncRNA、circRNA;②差异表达谱GO功能富集显示,在生物过程方面,气滞血瘀证相关基因主要与细胞对环状化合物的反应、对转录、神经元凋亡基因表达的负性调控以及炎症反应相关;在细胞组成方面,气滞血瘀证相关基因主要与蛋白复合物、核质、细胞表面相关;在分子功能方面,气滞血瘀证相关基因主要与可识别蛋白结合、酶结合、转录调控区域的基因结合相关,其中炎症反应与目前气滞血瘀证生物学基础研究联系最为密切。③差异表达谱KEGG信号通路分析显示,与气滞血瘀证相关基因可能有关的信号通路包括肿瘤相关蛋白多糖、肿瘤坏死因子信号通路、肿瘤相关信号通路、人类T淋巴细胞病毒感染,其中肿瘤坏死因子信号通路与目前气滞血瘀证生物学基础研究联系较为密切。结论:气滞血瘀证相关基因涉及多种生物功能、多条信号通路,其中与炎症反应与肿瘤坏死因子信号通路联系最为密切。

关键词:气滞血瘀证 差异表达谱 生物信息学 基因组 转录组

doi:10.11842/wst.2019.04.016 中图分类号:R-241.9 文献标识码:A

证候的生物学基础研究是中医客观化研究的关键部分,几十年来,学者从整体、细胞、分子等多个层面做了相关探索。随着后基因组时代的到来,证候生物学基础研究在基因层面找到新的方向。借用基因芯片、基因测序等技术,筛查与证候相关的基因差异表达谱,并通过已有的基因注释信息,对差异表达谱进行生物信息学分析以探索与证候发生相关的生物功能或信号

通路,从而为揭示证候的发生机制提供理论支持^[1]。气滞血瘀证是中医临床常见证候之一,现有研究已发现其与微循环障碍、血液流变学改变、炎症、凝血-纤溶系统失衡、内皮功能障碍、免疫功能紊乱等病理改变相关,另外,气滞血瘀证研究在组学层面也取得一定进展,但尚未完全阐明气滞血瘀证发生机制,同时,对于不同研究得到的差异结果,未建立起气滞血瘀证基因数据库。因此,本文通过查找气滞血瘀证组学研究相关文献,梳理归纳现有研究结果,并运用生物信息学方

收稿日期:2019-03-11

修回日期:2019-04-11

^{*} 国家中医药管理局公益性行业专项(201207009):证候类中药新药疗效评价方法研究;负责人:王阶;国家自然科学基金面上基金项目(81673847):冠心病血瘀证相关miRNA表达的甲基化调控机制研究,负责人:王阶。

^{**} 通讯作者:王阶,主任医师,本刊编委,主要研究方向:从事心血管疾病的中西医结合防治与研究。

法对基因差异表达谱进行综合分析,以期气滞血瘀证组学研究提供新的思路。

1 材料

1.1 文献检索

在中国知网——《中国学术期刊(网络版)》和PubMed数据库中以“气滞血瘀证、气滞血瘀、血瘀气滞、基因、DNA、RNA、mRNA、miRNA、lncRNA、circRNA”以及相应英文为检索词,检索时间限定为建库至2018年2月,检索气滞血瘀证组学层面研究的相关文献。将检索得到的文献根据以下纳入/排除标准进行筛选。

1.2 诊断标准

气滞血瘀证诊断标准参照《中医证候鉴别诊断学》^[2]、《中药新药临床研究指导原则(试行)》^[3]中相关的气滞血瘀证诊断标准。

1.3 文献纳入标准

1.3.1 气滞血瘀证诊断标准

符合研究证型符合气滞血瘀证诊断标准的文献均可纳入。

1.3.2 文献类型

临床试验、动物实验、细胞实验等研究类文献均可纳入。

1.3.3 研究技术

研究采用基因芯片、测序技术、qRT-PCR、免疫组化等技术检测均可纳入。

1.3.4 研究指标

DNA、RNA、mRNA、miRNA、lncRNA、circRNA等组学指标均可纳入。

1.4 文献排除标准

排除:①气滞血瘀证非主要研究证型或研究结果与气滞血阻证无关的文献;②综述类文献;③研究内容重复文献。

2 方法

2.1 文献资料提取与统计分析

使用Excel2010进行文献资料的基本信息与组学信息提取。

2.2 基因形式统一

分别利用NCBI基因数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>), miRBase(<http://www.mirbase.org/>), LNCipedia(<https://lncipedia.org/>), circBase(<http://www.circbase.org/cgi-bin/listsearch.cgi>)将从文献提取的气滞血瘀证DNA、

mRNA、Protein、miRNA、lncRNA、circRNA统一为Gene symbol的形式。

2.3 基因功能富集与信号通路分析

利用The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID)平台(<https://david.ncifcrf.gov/>)中的GeneOntology (GO)和Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG)数据库对气滞血瘀证基因进行功能富集与信号通路分析。在“upload gene list”(基因列表载入)框输入Gene symbol形式的气滞血瘀证基因,在“Identifier”(基因识别)点击“OFFICIAL_GENE_SYMBOL”选项,在“List Type”(列表类型)勾选“Gene List”(基因列表),再点击SubmitList”(提交基因列表),在下一界面中的“Gene List Manager”(基因列表管理)栏目下,“Species”(物种)选择“Homo Sapiens”(人类),再点击“Use”。显示分析结果,将GO基因富集和KEGG信号通路分析结果导出。

2.4 基因相互作用网络分析

利用starBase v2.0(<http://starbase.sysu.edu.cn/index.php>)平台中的miRNA-target interactions模块(预测miRNA与靶基因关系网络)、miRNA-lncRNA interactions模块(预测miRNA与lncRNA关系网络)、miRNA-circRNA interactions(预测miRNA与circRNA关系网络)与STRING Version 10.5(<https://string-db.org/>)平台中的Multiple proteins模块建立气滞血瘀证ceRNA-mRNA-protein相互作用网络,并进行可视化展示。

3 结果

3.1 文献检索结果

本次共检索出气滞血瘀证相关文献331篇,通过阅读篇名、摘要以及全文对文献进行综合筛选,最终纳入41篇文献。其中国内期刊文献38篇,国外期刊文献3篇。41项纳入文献的基本信息(表1)。

3.2 基本资料分析

纳入的41项研究中涉及的病种范围较为广泛,其中冠心病心绞痛3项,心肌梗死1项,急性冠脉综合征1项,高血压5项,闭塞性动脉硬化症3项,胃癌6项,大肠癌2项,乳腺癌1项,肝癌1项,肺癌1项,高脂血症3项,糖尿病2项,肝纤维化3项,溃疡性结肠炎1项,子宫内膜异位症3项,单纯证候研究6项。将疾病按照临床科属归类,可大致分为5类,其中心血管病领域研究最多,占31%,其次为癌症,占26%,代谢性疾病占12%,消化系统疾病占10%,妇科疾病占7%。这一病

表1 41项纳入文献的基本信息

编号	ID号	年份	疾病	物种	干预	样本部位	样本数量	检测指标
1	高 ^[4] 2017	2017	—	人	—	外周血	25	circRNA
2	梁 ^[5] 2017	2017	—	大鼠	—	舌	20	mRNA
3	邵 ^[6] 2017	2017	胃癌	人	—	胃癌组织	44	蛋白
4	刘 ^[7] 2017	2017	子宫内膜异位症	大鼠	活血消异方	外周血	5	miRNA
5	沈 ^[8] 2017	2017	急性冠脉综合征	人	—	外周血	229	SNP
6	乔 ^[9] 2017	2017	溃疡性结肠炎	人	自拟溃灵汤	肠粘膜	86	蛋白、mRNA
7	蒋 ^[10] 2016	2016	胃癌	人	—	癌部组织	130	蛋白
8	崔 ^[11] 2016	2016	乳腺癌	人	—	外周血	9	miRNA
9	向 ^[12] 2016	2016	冠心病	人	—	外周血	9	DNA 甲基化
10	王 ^[13] 2016	2016	胃癌	人	—	癌部组织	64	蛋白
11	宁 ^[14] 2016	2016	—	大鼠	—	肝组织	—	mRNA
12	He ^[15] 2016	2016	高血压	人	—	外周血	52	mRNA
13	邵 ^[16] 2015	2015	冠心病	人	—	外周血	300	SNP
14	程 ^[17] 2015	2015	肝癌	人	—	外周血	63	DNA 甲基化
15	何 ^[18] 2015	2015	高血压	人	—	外周血	52	miRNA
16	魏 ^[19] 2015	2015	高血压	人	—	外周血	30	LncRNA
17	徐 ^[20] 2014	2014	肝纤维化	人	—	外周血	80	SNP
18	Hou ^[21] 2014	2014	冠心病	人	—	外周血	29	miRNA
19	于 ^[22] 2013	2013	肝纤维化	人	化纤保肝方	外周血	45	蛋白
20	李 ^[23] 2013	2013	胃癌	人	—	癌部组织	120	蛋白
21	文 ^[24] 2013	2013	子宫内膜异位症	人	—	在位内膜异位内膜	24	蛋白
22	宁 ^[25] 2013	2013	—	大鼠	血府逐瘀汤	肝组织	24	mRNA
23	蒋 ^[26] 2012	2012	高脂血症	人	—	外周血	312	SNP
24	崔 ^[27] 2012	2012	大肠癌	人	—	外周血	99	SNP
25	宁 ^[28] 2012	2012	—	大鼠	血府逐瘀汤	肝组织	—	蛋白
26	黄 ^[29] 2012	2012	子宫内膜异位症	人	—	在位内膜异位内膜	24	蛋白
27	李 ^[30] 2012	2012	肺癌	人	—	外周血	100	DNA 甲基化
28	孔 ^[31] 2011	2011	大肠癌	人	—	外周血	85	mRNA
29	蒋 ^[32] 2009	2009	高脂血症	人	血脂康	外周血	74	SNP
30	马 ^[33] 2009	2009	闭塞性动脉硬化症	人	川芎嗪	外周血	160	蛋白
31	龚 ^[34] 2009	2009	乙肝后肝硬化	人	—	外周血	80	蛋白
32	刘 ^[35] 2008	2008	心肌梗死	人	—	外周血	60	SNP
33	马 ^[36] 2006	2006	闭塞性动脉硬化症	人	行气活血复方	外周血	160	蛋白
34	马 ^[37] 2006	2006	闭塞性动脉硬化症	人	—	外周血	175	蛋白
35	蒋 ^[38] 2006	2006	高脂血症	人	—	外周血	102	SNP
36	陈 ^[39] 2005	2005	高血压糖尿病	人	—	外周血	160	蛋白
37	Hu ^[40] 2004	2005	胃癌前病变	人	—	胃粘膜	67	mRNA、蛋白
38	马 ^[41] 2004	2004	高血压糖尿病		—	外周血	160	蛋白
39	张 ^[42] 2004	2004	冠心病	大鼠	—	心肌细胞	60	mRNA
40	刘 ^[43] 2003	2003	胃癌	人	—	癌部组织	4	mRNA
41	孔 ^[44] 2001	2001	—	人	—	外周血	118	蛋白

—表示文献中未提及

种研究分布情况与现代医学在疾病组学研究的方向基本一致,同时,也提示气滞血瘀证在临床分布广泛,为常见证候。

3.3 组学研究分析

纳入的41项研究中,蛋白表达研究数量最多,有16项,其次为 mRNA 研究,有8项,SNP 研究7项,

表2 气滞血瘀证已知基因、转录组研究数据总结表

类别	项目
DNA	CYP2C19、CTNNB1、DES、ACE、DLC-1、TGF- β 1、APOE、ERCC1、C19007T、MGMT
mRNA	IL-8、NF-KB、CEBPB、JUN、TSC2205、VEGF
protein	DLL4、RPL23、MDM2、C-erbB-2、TGF- β 1、PDGF、TNF- α 、P53、VEGF、MLC、CRT、HSP、Annexin、Vimentin、 β -Tubulin、Ang-2、Foxp3、MIF、CD62p、TFAR19、bcl-2、HSP70、c-fos、CD63、TSP
miRNA	Hsa-miR-199a-5p、Hsa-miR-1283、let-7c、miR-4487、miR-619、miR-8075、miR-6735、miR-32-5p
lncRNA	CTD-2369P2.8、HIT000092395_03、HIT000095414_04、XR_171093.1、TCONS_00010987、ENST00000595309.1、ENST00000513626.1、ENST00000424181.1
circRNA	circRNA09849、circRNA11523、circRNA18046、circRNA24450

表3 气滞血瘀证基因生物过程分析

ID	Term	List Hits	p-val	Gene
GO:0045892	negative regulation of transcription, DNA-templated	5	7.12E-07	JUN; CTNNB1; TNF; MDM2; CEBPB
GO:0042493	response to drug	4	2.52E-06	JUN; CTNNB1; MGMT; MDM2
GO:0000122	negative regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	4	0.000118	CTNNB1; TNF; MDM2; DLL4
GO:0045944	positive regulation of transcription from RNA polymerase II promoter	4	0.000445	JUN; CTNNB1; TNF; CEBPB
GO:0071407	cellular response to organic cyclic compound	3	8.18E-08	TNF; MGMT; CEBPB
GO:0010629	negative regulation of gene expression	3	1.88E-06	TNF; DLL4; MIF
GO:0043524	negative regulation of neuron apoptotic process	3	2.06E-06	JUN; APOE; CEBPB
GO:0070374	positive regulation of ERK1 and ERK2 cascade	3	6.77E-06	JUN; TNF; MIF
GO:0010628	positive regulation of gene expression	3	2.03E-05	TNF; MDM2; DLL4
GO:0006954	inflammatory response	3	0.000124	TNF; CEBPB; MIF
GO:0008285	negative regulation of cell proliferation	3	0.000154	JUN; CTNNB1; DLL4
GO:0045893	positive regulation of transcription, DNA-templated	3	0.000401	JUN; CTNNB1; TNF

miRNA 研究 5 项, DNA 甲基化研究 4 项, lncRNA 和 circRNA 研究各 1 项。从年份分布来看, 2011 年以前, 气滞血瘀证组学研究以蛋白表达、mRNA 和 SNP 为主, 2011 年以后, 研究丰富了 DNA 甲基化以及 ncRNA 的内容, 提示气滞血瘀证候组学研究的逐步深入以及与科学前沿接轨。气滞血瘀证已知基因组、转录组研究结果总结如下, (表 2)。

3.4 基因 GO 功能富集

3.4.1 生物过程(biological process, BP)分析结果

通过 DAVID 平台, 对气滞血瘀证相关基因进行 GO 富集 BP 分析, 将基因富集数 ≥ 3 的项目总结(表 3)。

3.4.2 细胞组成(cellular component, CC)分析结果

通过 DAVID 平台, 对气滞血瘀证相关基因进行 GO 富集 CC 分析, 将基因富集数 ≥ 3 项目总结(表 4)。

3.4.3 分子功能(Molecular Function, MF)分析结果

通过 DAVID 平台, 对气滞血瘀证相关基因进行 GO 富集 MF 分析, 将基因富集数 ≥ 3 项目总结(表 5)。

分别将 BP、CC 和 MF 分析结果中, 基因富集数目 $\geq$

2, 且富集得分($-\log_{10}$ Pvalue)排名前 10 的 GO 项目总结(图 1)。根据 GO 分析结果可知, 在生物过程方面, 气滞血瘀证相关基因主要与细胞对环状化合物的反应(cellular response to organic cyclic compound)、对转录、神经元凋亡基因表达的负性调控(negative regulation of gene expression)以及炎症反应(inflammatory response)相关; 在细胞组成方面, 气滞血瘀证相关基因主要与蛋白复合物(protein complex)、核质(nucleoplasm)、细胞表面(cell surface)相关; 在分子功能方面, 气滞血瘀证相关基因主要与可识别蛋白结合(identical protein binding)、酶结合(enzyme binding)、转录调控区域的基因结合(transcription regulatory region DNA binding)相关。其中炎症反应与目前气滞血瘀证生物学基础研究联系最为密切。

3.5 基因 KEGG 信号通路分析

通过 DAVID 平台, 对气滞血瘀证相关基因进行 KEGG 信号通路富集分析, 将基因富集数 ≥ 3 项目总结(表 6)。根据 KEGG 分析结果可知, 与气滞血瘀证相关

表4 气滞血瘀证基因细胞组成分析

ID	Term	List Hits	p-val	Gene
GO:0005654	nucleoplasm	7	0.000282	JUN; CTNNB1; MGMT; MDM2; ERCC1; CEBPB; MIF
GO:0005737	cytoplasm	7	0.013738	CTNNB1; MDM2; RPL23; APOE; ERCC1; CEBPB; MIF
GO:0070062	extracellular exosome	6	0.002048	DES; CTNNB1; CD63; RPL23; APOE; MIF
GO:0005886	plasma membrane	6	0.015921	CTNNB1; TNF; CD63; MDM2; DLL4; APOE
GO:0005634	nucleus	6	0.059613	JUN; CTNNB1; MGMT; MDM2; APOE; CEBPB
GO:0005829	cytosol	5	0.02697	JUN; DES; CTNNB1; MDM2; RPL23
GO:0005615	extracellular space	4	0.001817	TNF; CD63; APOE; MIF
GO:0016020	membrane	4	0.009907	CTNNB1; MGMT; RPL23; APOE
GO:0043234	protein complex	3	0.000131	CTNNB1; CD63; MDM2
GO:0009986	cell surface	3	0.000564	TNF; CD63; MIF
GO:0005576	extracellular region	3	0.02068	TNF; APOE; MIF
GO:0005916	fascia adherens	2	4.01E-08	DES; CTNNB1

表5 气滞血瘀证基因分子功能分析

ID	Term	List Hits	p-val	Gene
GO:0005515	protein binding	12	0.000406	JUN; DES; CTNNB1; TNF; CD63; MDM2; DLL4; RPL23; APOE; ERCC1; CEBPB; MIF
GO:0042802	identical protein binding	5	2.56E-06	JUN; DES; TNF; MDM2; APOE
GO:0019899	enzyme binding	4	2.93E-06	JUN; CTNNB1; CYP2C19; MDM2
GO:0044212	transcription regulatory region DNA binding	3	1.32E-05	JUN; CTNNB1; TNF
GO:0008134	transcription factor binding	3	4.27E-05	JUN; CTNNB1; CEBPB
GO:0042803	protein homodimerization activity	3	0.001625	JUN; APOE; CEBPB
GO:0003700	transcription factor activity, sequence-specific DNA binding	3	0.00311	JUN; CTNNB1; CEBPB
GO:0003677	DNA binding	3	0.018997	JUN; MGMT; CEBPB

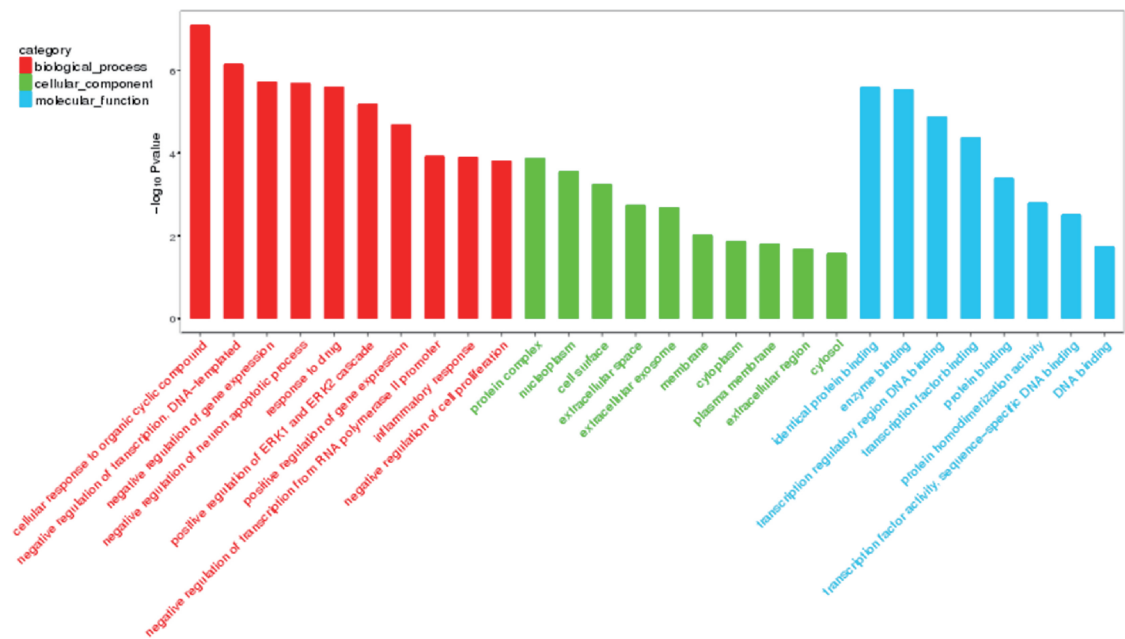


图1 气滞血瘀证相关基因GO富集条目(Top 10)

表6 气滞血瘀证相关基因信号通路富集

ID	term	ListHits	pval	Gene
path:hsa05205	Proteoglycans in cancer	4	2.03E-05	CTNNB1; TNF; CD63; MDM2
path:hsa04668	TNF signaling pathway	3	3.63E-05	JUN; TNF; CEBPB
path:hsa05166	HTLV-I infection	3	0.000972	JUN; CTNNB1; TNF
path:hsa05200	Pathways in cancer	3	0.004751	JUN; CTNNB1; MDM2

基因可能有关的信号通路包括肿瘤相关蛋白多糖(hsa05205: Proteoglycans in cancer)、肿瘤坏死因子信号通路(hsa04668: TNF signaling pathway)、肿瘤相关信号通路(hsa05200: Pathways in cancer)、人类T淋巴细胞病毒感染(hsa05166: HTLV-I infection),其中肿瘤坏死因子信号通路与目前气滞血瘀证生物学基础研究联系较为密切。

4 讨论

通过生物信息学方法,分别对气滞血瘀证相关基因进行功能注释、GO功能富集分析、KEGG信号通路分析以及miRNA-mRNA-protein相互作用网络分析,我们发现目前研究已知的气滞血瘀证相关基因生物学功能相当广泛,主要分为蛋白编码与转录后调控两部分,其中前者编码的蛋白种类丰富、功能多样,后者对靶基因表达的调控也有上调与下调的区别。GO功能富集分析结果显示,相关基因参与转录和神经元凋亡调控、炎症反应、细胞增殖等生物过程,核质、细胞膜、外泌体等细胞组成,具有蛋白结合、酶结合、基因结合等分子功能,其中参与炎症反应过程与目前气滞血瘀证生物学基础研究联系较紧密。KEGG信号通路分析结果显示,相关RNA主要与肿瘤相关蛋白多糖、肿瘤坏死因子、肿瘤和人类T淋巴细胞病毒感染等多条信号通路有关,其中TNF信号通路与气滞血瘀证生物学基础研究关系密切。

在临床上,炎症局部常表现为红、肿、热、痛,很多中医临床学者认为其应归属于中医“热毒”的范畴。实际上,炎症与气滞血瘀的关系同样紧密,原因包括以下

几点:①临床表现,炎症局部的肿胀、疼痛,按时加重与气滞血瘀临床症状基本一致;②病理变化,炎症介质诱导的血栓形成、血管内皮损伤,局部瘀血,微循环障碍,流变学改变与气滞血瘀的病机十分相似;③发病原因,情绪激动、压力紧张,应激状态是炎症的诱因,同样也是气滞血瘀证的诱因,正如《灵枢·百病始生》提及:“若内伤于忧怒则气上逆,气上逆则六输不通,凝血蕴里不散”。

现代研究也表明,在急性冠脉综合征、高脂血症气滞血瘀证患者中存在高敏C反应蛋白、白细胞介素-6、细胞间黏附分子-1、TNF- α 等炎症因子水平升高的表现^[45-47]。动物实验发现,气滞血瘀证大鼠白细胞介素-6水平异常^[48],血瘀证家兔模型中TNF- α 水平在造模后明显升高^[49],经活血化瘀药物干预后,二者水平下降,侧面反映了炎症与气滞血瘀证的内在联系。

另外,通过靶基因预测、蛋白作用网络及拓扑分析初步构建气滞血瘀证miRNA-mRNA-protein相互作用关系网络,由于受到目前研究数量的限制,并未在已知mRNA、miRNA找到调控关系,而是通过已知miRNA靶基因预测寻找关键mRNA,并与关键mRNA编码蛋白相互作用关系构建调控网络,虽然无法完全体现气滞血瘀证相关RNA内部调控关系,但从方法学上对调控网络构建提供了参考。

综上,气滞血瘀证相关基因涉及多功能、多通路,其中与炎症反应与肿瘤坏死因子信号通路联系最为密切,上述分析结果可为气滞血瘀证生物学基础研究带来一些参考性的启发,但更具体的生物学基础与发生机制仍待进一步探明。

参考文献

- 何浩强, 陈光, 高嘉良, 等. 中医证候的转录组学研究进展与探析. 世界科学技术—中医药现代化, 2018, 20(1): 1-6.
- 姚乃礼. 中医证候鉴别诊断学. 北京: 人民卫生出版社, 2002: 123.
- 国家中医药管理局. 中药新药临床研究指导原则. 北京: 中国医药科技出版社, 2002.
- 高嘉良. 气滞血瘀证诊断量表及其circRNA差异表达研究. 北京: 中国中医科学院博士学位论文, 2017.
- 梁耀月, 董世芬, 程龙, 等. 气滞血瘀证大鼠舌部基因表达谱变化初探. 中国比较医学杂志, 2017, 27(9): 11-16.
- 邵丽娟. DLL4在胃癌中的表达及与中医证相关性研究. 扬州大学,

- 2017.
- 7 刘辉艳. 基于 microRNA 表达谱的变化探讨活血消癥方治疗子宫内膜异位症疗效机制研究. 北京: 中国中医科学院博士学位论文, 2017.
- 8 沈智杰, 陈晓康, 王英杰, 等. 229 例急性冠脉综合征氯吡格雷抵抗患者 CYP2C19 基因多态性与中医证型分布的相关性. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(3): 291-296.
- 9 乔磊, 王海芹. 自拟溃灵汤灌肠治疗气滞血瘀型重症溃疡性结肠炎的疗效及对肠黏膜组织中 IL-8 和 NF- κ B mRNA 表达的影响. 中医药信息, 2017, 34(4): 98-101.
- 10 蒋雨薇. RPL23、MDM2 的表达与胃癌中医证型的相关性研究. 武汉: 湖北中医药大学, 硕士学位论文, 2016.
- 11 崔飞飞. 不同辨证分型的晚期三阴乳腺癌免疫及 miRNA 特点及辨证中药临床疗效. 北京: 北京中医药大学硕士论文, 2016.
- 12 向忠军. 基于甲基化修饰探讨加味养心通脉方对冠心病血瘀证及亚型 CTNBN1、DES 基因表达的影响研究. 长沙: 湖南中医药大学硕士学位论文, 2015.
- 13 王雨村, 刘宏斌. 胃癌中医证型与 C-erbB-2 表达水平的相关性研究. 医学研究杂志, 2016, 45(8): 109-113.
- 14 宁天一, 程嘉艺, 王婷婷. 血府逐瘀汤对不可预见性刺激致血瘀的作用及机制. 中国实验方剂学杂志, 2016(4): 110-114.
- 15 He L, Fang M, Chen L, *et al.* Transcriptome analysis of blood stasis syndrome in subjects with hypertension. 中医杂志(英文版), 2016, 36(2): 173-180.
- 16 邵静, 朱晓萌. 不稳定型心绞痛患者血管紧张素转换酶基因多态性与中医证型及冠状动脉斑块性质的关系. 中医杂志, 2015, 56(19): 1671-1674.
- 17 程荣菲, 武哲丽. 肝癌中医证型与 DLC-1 基因甲基化表达的相关性研究, 2015(2): 64-67.
- 18 何铃, 方梅霞, 陈利国, 等. 高血压病血瘀证相关 miRNA 的筛选. 中国病理生理杂志, 2015, 31(5): 817-822.
- 19 魏艺. 老年高血压病中医证候流行病学特征及 LncRNA 表达谱研究. 北京: 中国中医科学院博士学位论文, 2015.
- 20 徐建军, 过建春, 蔡兆斌, 等. TGF- β 1 基因多态性与慢性乙肝肝纤维化中医证型的相关性探讨. 浙江中医杂志, 2014, 49(5): 313-314.
- 21 Hou J, Wang J, Lin C, *et al.* Circulating microRNA profiles differ between qi-stagnation and qi-deficiency in coronary heart disease patients with blood Stasis syndrome. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2014, (2014-12-4): 926962.
- 22 于立友, 汪龙德, 张晶, 等. 化纤保肝方治疗气滞血瘀型肝纤维化的临床研究. 西部中医药, 2013(10): 84-87.
- 23 李国威. 胃癌中医证型与 P53、VEGF 表达水平相关性研究. 西安: 陕西中医学院硕士学位论文, 2013.
- 24 文怡. 子宫内膜异位症血瘀证差异蛋白质组学研究. 成都中医药大学, 2013.
- 25 宁天一, 王婷婷, 姜静, 等. 气滞血瘀证大鼠 NO/NOS 体系的变化. 世界中医药, 2013, 8(1): 71-73.
- 26 蒋卫民, 朱长乐, 刘健, 等. 212 例高脂血症患者中医证候特点与 ApoE 基因多态性的相关性分析. 中华中医药杂志, 2012(5): 1458-1460.
- 27 崔同建, 陈义乾, 戴永美, 等. 大肠癌中医证型与 ERCC1 基因多态性的相关研究. 中国中西医结合杂志, 2012, 32(5): 628-632.
- 28 宁天一, 王婷婷, 程嘉艺. 气滞血瘀证大鼠 H2S/CSE、CBS 体系的变化. 中药药理与临床, 2012, 28(5): 234-237.
- 29 黄金燕. 人子宫内膜异位症血瘀证在位内膜差异蛋白质组学及免疫组化研究. 成都: 成都中医药大学博士学位论文, 2012.
- 30 李雪梅, 许玥, 林华胜, 等. 中晚期非小细胞肺癌 MGMT 基因甲基化表达与中医证型的相关性研究. 四川中医, 2012, 30(5): 36-38.
- 31 孔祥训. 大肠癌中医辨证分型与外周血 VEGF 及 P53 基因表达水平的相关性研究. 福州: 福建中医药大学硕士学位论文, 2011.
- 32 蒋卫民, 方祝元, 陈晓虎, 等. 不同证型高脂血症患者血脂调脂疗效差异及与 ApoE 基因多态性的相关性研究. 江苏中医药, 2009, 41(6): 17-19.
- 33 马民, 张桂娟, 李德辉, 等. 川芎嗪对老年闭塞性动脉硬化症血瘀证患者 CD62p 基因表达的调控. 中国老年学, 2009, 29(3): 327-328.
- 34 龚向京, 羊燕群, 林燕, 等. 乙肝后肝硬化中医证型与凋亡相关蛋白 TFAR19 表达关系的临床分析. 新中医, 2009, 41(1): 32-33.
- 35 刘南, 李开梅. 心梗后心室重构中医证型与 ACE 基因多态性的研究. 辽宁中医杂志, 2008, 35(6): 812-813.
- 36 马民, 张桂娟, 陈利国. 行气活血方对闭塞性动脉硬化症血瘀证患者 CD62p 基因表达的调控. 江苏中医药, 2006, 27(4): 22-24.
- 37 马民, 张桂娟. 闭塞性动脉硬化症血瘀证患者 bcl-2 和 HSP70 基因的表达. 辽宁中医杂志, 2006, 33(3): 260-262.
- 38 蒋卫民, 唐蜀华, 赖仁胜, 等. 载脂蛋白 E 基因多态性与原发性高脂血症中医辨证的相关性研究. 中国中西医结合杂志, 2006, 26(1): 38-41.
- 39 陈利国, 马民, 屈援, 等. 高血压病、2 型糖尿病血瘀证与非血瘀证患者白细胞 HSP70 基因表达研究. 山东中医药大学学报, 2005, 29(1): 21-23.
- 40 Hu L, Lao S X, Tang C Z. Expression of bcl-2 oncogene in gastric precancerous lesions and its correlation with syndromes in traditional Chinese medicine. *World J Gastroenterol*, 2005, 11(21): 3293-3296.
- 41 马民, 陈利国, 屈援, 等. 高血压病、2 型糖尿病血瘀证与非血瘀证患者白细胞中 c-fos 基因表达的研究. 新中医, 2004, 36(5): 22-23.
- 42 张玉生. 心痛舒对冠心病心绞痛的治疗作用及对缺血心肌细胞延迟保护作用的机理研究. 长沙: 湖南中医学院硕士学位论文, 2004.
- 43 刘莺, 李俊军, 朱文锋, 等. 胃癌中医证型相关基因的表达谱. 世界华人消化杂志, 2003, 11(9): 1318-1321.
- 44 孔令钧, 李鲁扬, 唐占府. 老年气滞血瘀、气虚血瘀患者与 CD62p、CD63 及 TSP 关系的临床观察. 中国中西医结合杂志, 2001, 21(8): 588-590.
- 45 刘南, 曹伟锋, 余锋. 急性冠脉综合征中医辨证分型与丝裂原活化蛋白激酶、内脂素等炎症因子的相关性. 广州中医药大学学报, 2013, 30(5): 615-618.
- 46 Cai Y, Jing H, Jian X, *et al.* Relationship between two blood stasis syndromes and inflammatory factors in patients with acute coronary syndrome. *Chinese Journal of Integrative Medicine*, 2017(11): 1-5.
- 47 倪永骋, 陈江宁. 高脂血症中医辨证分型与炎症因子的相关性研究. 辽宁中医杂志, 2007, 34(1): 7-8.
- 48 李炜, 刘培, 段金庵, 等. 香附四物汤对气滞血瘀证雌性大鼠神经-内

分泌-免疫网络的调控与影响. 中国实验方剂学杂志, 2014, 20(2): 99-104.

49 胡文娟, 赵凤达, 张秉韬, 等. 不同血瘀证亚型血小板活化及炎症反应改变的实验研究. 世界中西医结合杂志, 2011, 6(11): 931-934.

Bioinformatics Study on Differential Expression Profiles of Qi Stagnation and Blood Stasis Syndrome Based on Literature

He Haoqiang^{1,2}, Chen Guang^{1,2}, Gao Jialiang¹, Hu Kun¹, Liu Chao^{1,2}, Wang Jie¹

(1. Department of Cardiovascular, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China; 2. Graduate School of Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

Abstract: To analyze the differential expression profiles of *qi* stagnation and blood stasis syndrome (QSBSS) with bioinformatics method, so as to explore the possible biological basis and mechanism of QSBSS. A total of 331 papers on the study of QSBSS were retrieved in CNKI and PubMed databases, and the basic information as well as RNA differential expression profiles were extracted and summarized. The gene function was annotated by GeneCards database, and the Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery (DAVID) was used for enrichment analysis on the biological function and signaling pathway of differentially expressed RNA. The miRNA-target interactions module, miRNA-lncRNA interactions module, miRNA-circRNA interactions module in starBase v2.0 and the Multiple proteins module in STRING Version 10.5 were utilized to establish the ceRNA-mRNA-protein interaction network of QSBSS. The literature analysis showed that 41 studies reported the results of QSBSS on omics, in which the number of protein expression studies was the most, followed by studies on mRNA, SNP, miRNA, DNA methylation, lncRNA, and circRNA. GO function enrichment analysis of differential expression profiles showed that, firstly, in biological process, QSBSS related genes are mainly relevant to cell response to organic cyclic compounds, negative regulation of transcription, negative regulation of neuronal apoptosis gene expression, and inflammatory response. Secondly, in cellular component, QSBSS related genes are mainly relevant to protein complex, nucleoplasm and cell surface. Thirdly, in molecular function, QSBSS related genes are mainly relevant to identifiable protein binding, enzyme binding, and the gene binding in transcriptional regulatory region. Among of them, inflammatory response is the most relevant to the basic biological research on QSBSS. KEGG signal pathway analysis showed that the signal pathway related to QSBSS related genes included proteoglycans in cancer, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, pathways in cancer, and human T lymphocyte virus infection. Among of them, the TNF signaling pathway is the most relevant to the basic biological research on QSBSS. The genes related to QSBSS involve multiple biological functions and multiple signaling pathways. Among of them, the inflammatory response and the TNF signal pathway are the most relevant.

Keywords: Qi stagnation and blood stasis syndrome, differential expression profiles, bioinformatics, genome, transcriptome

(责任编辑:刘 宁,责任译审:王 昭)