

· 临床 ·

急性缺血性中风阴阳类证的血清转录组学特征分析

刘文琛¹, 李国铭², 何春华¹, 乔利军², 申昕¹, 程骁², 蔡业峰², 黄燕^{2*}

(1. 广州中医药大学第二临床医学院, 广州 510120; 2. 广东省中医院, 广州 510120)

[摘要] 目的:筛选急性缺血性中风阴类证、阳类证患者血清的差异表达长链非编码核糖核酸(lncRNA),微小RNA(miRNA),信使RNA(mRNA),获取基因间调控关系,从转录组学层面探讨急性缺血性中风阴类证、阳类证形成的物质基础与生物学机制。方法:使用lncRNA,mRNA及miRNA芯片微阵列,分别检测急性缺血性中风阴类证、阳类证与非中风受试者(各10例)血清中lncRNA,miRNA与mRNA的表达情况,通过联合分析,筛选出阴类证、阳类证相关的差异表达谱。对获得的差异基因进行反义lncRNA与mRNA共表达分析、基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)功能通路分析,获取基因间调控关系,预测lncRNA的靶基因。对40例(阳类证10例,阴类证30例)样本中部分差异基因进行实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)验证。结果:227个lncRNA,54个mRNA,4个miRNA的表达与阳类证密切相关,394个lncRNA,206个mRNA的表达和阴类证密切相关。阳类证组中反义lncRNA RP11-647P12.1和RP11-677M14.2可能通过上调表达水平,分别调控神经元衍生神经营养因子(NDNF)和神经颗粒素(NRGN)的基因表达。通路富集显示,阴类证、阳类证之间转录组表达谱差异主要与血压调节、神经递质受体活性调节、内分泌激素调节、炎症反应、肾素-血管紧张素系统等通路相关。结论:急性缺血性中风阴类证、阳类证的lncRNA,miRNA,mRNA表达谱存在差异,阴、阳类证的表型差异可能由血压调节、肾上腺素能受体调节、肾素-血管紧张素系统以及 γ -氨基丁酸(GABA)等多个通路的共同参与。转录组学特征为研究急性缺血性中风阴类证、阳类证的生物学基础提供了一定的科学依据。

[关键词] 急性缺血性中风; 阴类证; 阳类证; 长链非编码RNA; 微小RNA; 信使RNA; 转录组学

[中图分类号] R22;R24;Q342+3;C37 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2019)15-0122-09

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20190957

[网络出版地址] <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20190117.0931.006.html>

[网络出版时间] 2019-01-17 17:02

Analysis of Serum Transcriptome Characteristics of Patients with Yin and Yang Syndromes of Acute Ischemic Stroke

LIU Wen-chen¹, LI Guo-ming², HE Chun-hua¹, QIAO Li-jun², SHEN Xin¹, CHENG Xiao²,
CAI Ye-feng², HUANG Yan^{2*}

(1. College of Second Clinical Medical, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China;
2. Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China)

[Abstract] **Objective:** To obtain the regulatory relationship between genes by screening the differentially expressed long non-coding ribonucleic acid (lncRNA), microRNA (miRNA) and messenger RNA (mRNA) in serum of patients with Yin and Yang syndromes of acute ischemic stroke, and to discuss the material basis and biological mechanism of formation of Yin and Yang syndromes of acute ischemic stroke from the transcriptome level. **Method:** The microarray chips were adopted to detect expression of lncRNA, mRNA and miRNA in serum of ischemic stroke patients with Yin and Yang syndromes and non-stroke subjects (10 cases each). Differential

[收稿日期] 20190102(011)

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(81774042);2018年国家中医药管理局“刘茂才全国名中医传承工作室”项目;广州市科技计划项目(201604020003);广东省中医院中医药科学技术研究专项

[第一作者] 刘文琛,在读博士,住院医师,从事脑血管病的基础与临床研究,E-mail:wenchen20@foxmail.com

[通信作者] *黄燕,主任医师,教授,从事脑血管病的基础与临床研究,Tel:020-81887233-34530,E-mail:gdszyhy@126.com

expression profiles related to Yin and Yang syndromes were selected by conjoint analysis. Further, the obtained differential genes were subjected to antisense lncRNA and mRNA co-expression analysis, gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) functional pathway analysis, and the intergenic regulatory relationship was obtained to predict the target genes of lncRNA. Partial differential genes in 40 patients (10 with Yang syndrome and 30 with Yin syndrome) were verified by real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR). **Result:** The expression of 227 lncRNA, 54 mRNA and 4 miRNA were closely related to Yang syndrome, 394 lncRNA and 206 mRNA were closely related to Yin syndrome. Antisense lncRNA RP11-647P12.1 and RP11-677M14.2 may regulate the expression of neuron-derived neurotrophic factor (NDNF) and neurogranin (NRGN) by up-regulating the expression level in Yang syndrome. The differential expression of mRNA between Yin syndrome and Yang syndrome was mainly related to neurotransmitter receptor activity regulation, endocrine hormone regulation, inflammatory response, renin-angiotensin system and other pathways. **Conclusion:** There are differences in the expression profiles of lncRNA, miRNA and mRNA between Yin syndrome and Yang syndrome in acute ischemic stroke, which may be regulated by multiple pathways, such as blood pressure regulation, adrenergic receptor regulation, renin-angiotensin system and γ -aminobutyric acid (GABA). The transcriptome characteristics provide scientific basis for studying the biological basis of Yin syndrome and Yang syndrome in acute ischemic stroke.

[Key words] acute ischemic stroke; Yin syndrome; Yang syndrome; long non-coding RNA; microRNA; messenger RNA; transcriptomics

缺血性中风(脑梗死)是目前最常见的卒中类型,近 30 年期间,我国住院的急性脑梗死患者死亡率和残疾率较之前略有下降,但仍较其他发达国家高^[1]。在中医整体观念指导下,全国名中医刘茂才教授团队在中风救治临床实践中,倡导中风病以阴阳为纲辨证施治,形成了“中风阴阳类证辨证及其方证疗效体系”诊疗方案。阴阳类证是在中风病共性病机的基础上,依据体质从化和类化的理论归纳的辨证方法。急性缺血性中风素体阴虚而阳盛者,则邪气多从热化、从阳化,主要临床表现为面赤身热、烦躁不宁、口苦咽干等机体相对亢奋的状态,为阳类证;素体阳虚而阴盛者,则邪气多从寒化、从阴化,主要临床表现为面唇晦暗、静卧不烦、口淡不欲饮等机体相对减弱的状态,为阴类证^[2]。中风阴阳类证辨证体系简化了辨证方法,能在短时间内对中风患者辨证论治,有助于发挥中西医结合治疗的优势,经过了“十五”“十一五”攻关课题多中心、大样本的研究验证了其可靠性^[3-6]。既往证候生物学研究显示,急性缺血性中风患者调控细胞间黏附分子-1(ICAM-1)的基因 K469E 多态性、血浆内皮素(ET)高表达与阴类证个体关系密切^[7-8],血浆中胆囊收缩素-8(CCK-8)在阳类证患者中较高^[9]。但目前对急性缺血性中风阴阳类证的证候生物学实质研究仍相对较少,需进一步建立生物学观测指标体系,深入研究证候的生物学机制,阐释阴阳类证的科学内涵。

转录组表达谱是组织细胞在特定状态下转录出的所有 RNA 的总和,受内源因子和环境因素的影响,综合反映了生物个体在特定器官、组织细胞或特定时空环境下所有基因的表达水平。目前,研究的热点主要集中在非编码 RNA 如微小 RNA(miRNA)和长链非编码 RNA(lncRNA)^[10]。miRNA 与 lncRNA 通常在转录、转录后及表观遗传等层面调控基因的表达水平^[11-12]。转录组学在整体水平上通过分析转录组表达谱提供的信息,能展现疾病所涉及的生物学过程与分子信号通路,揭示疾病的生物调控机制。目前已有部分研究证实 lncRNA 和 miRNA 在急性缺血性中风人群的血清中有差异性表达^[13]。

证候是由先天与后天因素的共同作用下,在疾病某一阶段中医病位、病性的综合概括,这与个体受遗传、疾病及环境等内外因素影响而致转录组差异表达,进而出现个体症状表型差异的遗传原理相契合。中风病阴类证、阳类证患者在体质以及环境的影响下,两者发病时机能状态不同,在临床上症状表现迥异,对证候的转录组学特征进行分析,有可能发现病证结合生物标志物^[14],探寻疾病、证候演变过程中涉及的生物调控机制变化^[15-16],是阴阳类证证候研究的切入点。基于以上研究背景,本研究采用芯片微阵列技术检测急性缺血性中风阴类证、阳类证与非脑梗死患者血清中 lncRNA,miRNA 与信使

RNA(mRNA)的表达,通过联合分析,筛选阴类证、阳类证的差异性转录组表达谱;并通过生物信息学方法进一步分析阴类证、阳类证形成所涉及的生物学过程,从转录组学层面探讨急性缺血性中风阴类证、阳类证的证候本质。

1 临床资料

1.1 一般资料 结合目前阴阳类证发病情况及转录组学表达谱检测的要求,对广东省中医院生物资源中心在库冻存的标本进行筛选,并按性别、年龄匹配后,纳入急性缺血性中风阴类证组 30 例、阳类证组 10 例和非中风对照组 20 例。所有病例均源于 2016 年 5 月至 2017 年 12 月广东省中医院脑病中心的门诊及住院患者,均签署了《知情同意书》并严格按照下述标准纳入。阴类证组、阳类证组与非脑梗死对照组相比,患者在性别、年龄、高脂血症病史、糖尿病病史、冠心病病史、吸烟史方面无明显差异。阴类证组与阳类证组患者在性别、年龄、高血压病史、高脂血症病史、糖尿病病史、冠心病病史、吸烟史方面无明显差异。本研究方案已由广东省中医院医学伦理委员会审查通过,伦理审查批件编号 B2016-149-01。

1.2 诊断标准 急性缺血性卒中诊断标准参照 2014 年中华医学会制定的《中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014》^[17]:急性起病,局灶性神经功能缺损,经神经影像学检查提示有责任缺血性病灶,排除脑出血及其他非血管性病因。阴阳类证诊断标准参照广东省中医院刘茂才教授制定的中风阳类证、阴类证辨证标准^[18],符合中风病诊断,兼以下症状 3 项或以上者辨为阳类证:①面赤身热,②烦躁甚则躁扰不宁,③口苦咽干,④舌质红,⑤舌苔黄,⑥脉弦数或脉滑数;兼以下症状 3 项或以上者辨为阴类证:①面唇晦暗或苍白,②静卧不烦,③口淡不欲饮,④舌质淡,⑤舌苔白,⑥脉弦细或脉滑。由 3 位临床中医脑病临床专业主治医师以上级别专家共同辨证,确定中医证型。

1.3 纳入、排除标准

1.3.1 纳入标准 急性缺血性中风阴类证组、阳类证组纳入年龄在 18~80 岁且符合诊断标准的患者;非中风对照组纳入年龄在 18~80 岁且经检查排除心脑血管疾病者。患者均签署《知情同意书》并自愿加入本实验研究。

1.3.2 排除标准 各组均排除发病时伴有严重的脏器功能不全,恶性肿瘤,消化道出血者,精神病患者;妊娠和哺乳期妇女。

2 方法

2.1 样品采集及血浆的制备 阴类证组、阳类证组、非脑梗死对照组患者入院次日清晨空腹状态抽取静脉血 5 mL 至一次性使用真空乙二胺四乙酸二钾采血管(EDTA-K₂, 2.0 g·L⁻¹)中,于 4℃,1 700×g 离心 10 min,收集上层血清再次于 4℃,2 000×g 离心 10 min,取上清转入 2 mL 冻存管,标记后冻存于广东省中医院生物资源中心-80℃冰箱。样品经干冰储冷送至数谱(上海)生物科技有限公司检测。从-80℃冰箱中取出血清样品,解冻后于 4℃,12 000×g 离心 10 min,去除可能存在的杂质,取血清 250 μL,转移至 1.5 mL 的离心管中,加入 RNA 抽提试剂 TRIzol LS Reagent(美国 Invitrogen 公司,批号 10296028)750 μL,手动剧烈振荡管体至混匀后抽提 RNA,经质量检测合格后进行高通量测序。

2.2 芯片微阵列检测 各组分别取 10 例血清样品,采用 Agilent Human miRNA 8×60K 芯片检测 miRNA 表达谱,采用 Arraystar Human lncRNA 8×60K 芯片检测 lncRNA 和 mRNA 表达谱。根据 Agilent one-color microarray-based gene expression analysis 实验方案执行,使用随机引物方法将每个样品放大并转录成带荧光的互补核糖核酸(cRNA);使用 RNeasy Mini Kit(德国 Qiagen 公司,批号 74106)纯化标记的 cRNAs,运用 NanoDrop 1000 型微量分光光度计(美国 Thermo 公司)检测浓度和活性;芯片杂交,洗涤、固定并使用 GenePix 4000B 型芯片扫描仪(美国 Molecular Devices 公司)扫描芯片的荧光强度,并将实验结果转换成数字型数据保存。

2.3 差异表达谱筛选 使用 GeneSpring GX 12.1 软件(美国 Agilent 公司)对原始数据进行处理,筛选高质量探针进行后续分析。两组样品间的差异表达 lncRNA, mRNA 和 miRNA 采用 *t* 检验计算, $P < 0.05$ 表示组间相对表达量存在统计学差异。差异基因筛选标准需同时满足以下条件:①两组间 $P < 0.05$;②表达差异倍数(fold change, FC) > 2.0。按标准筛选出的 lncRNAs, mRNAs, miRNAs 即为各组的差异基因。以阴类证组、阳类证组与非脑梗死对照组差异基因取交集,分别得到阴类证、阳类证差异性表达谱。

2.4 lncRNA 功能预测与生物信息学分析 在 lncRNA 中,反义 lncRNA 可与互补的正义 RNA(如 mRNA)通过碱基互补配对形成双链 RNA。反义

lncRNA 可通过与邻近基因转录的 mRNA 形成 RNA 互补双链、改变染色质重塑、表观遗传调控转录和 mRNA 剪接等方式来调控的基因表达^[19]。在已知人类反义 lncRNA 与相应 mRNA 基因数据库 (Gencode 数据库, <http://www.gencodegenes.org/>) 基础上,对阴类证组、阳类证组的反义 lncRNAs 与相应 mRNAs 基因表达谱进行整合。采用 *t* 检验方法计算,按差异基因筛选标准,获取阴类证组和阳类证组之间的反义 lncRNAs 及相应 mRNAs 差异基因表达谱,进一步推断 lncRNA 对基因的表达调控作用。使用基因本体 (GO)^[20] 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG)^[21] 数据库对两组证候间差异表达的 mRNA 进行功能富集和信号通路富集分析。对差异表达基因进行基因富集分析,计算富集分数,以 *P* 表示富集分数的显著性。设定 $P < 0.05$ 视为通路存在显著变化,*P* 越小表明富集水平越高,即基因功能和信号通路变化水平越显著。

2.5 急性缺血性中风阴、阳类证差异 lncRNA 表达水平的验证 选取部分急性缺血性中风阴阳类证的差异 lncRNA,在 30 例阴类证,10 例阳类证及 20 例对照样本中进行实时荧光定量聚合酶链式反应 (ViiA 7 Real-time PCR 系统,美国 Applied Biosystems 公司) 实验,检验 lncRNA 表达谱检测的

可靠性。符合正态分布的采用独立样本 *t* 检验;不符合正态分布的采用秩和检验。上述实验过程由数谱(上海)生物科技有限公司协助完成。

3 结果

3.1 阴、阳类证 lncRNA, miRNA, mRNA 差异性表达谱 经筛选后,阳类证相关差异基因包括 227 个 lncRNA (73 个相对上调,154 个相对下调),54 个 mRNA (21 个相对上调,33 个相对下调),4 个 miRNA (miR-6757-5p, miR-1914-3p, miR-4788, miR-1281,均相对上调)。阴类证相关差异基因包括 394 个 lncRNA (283 个相对上调,111 个相对下调),206 个 mRNA (177 个相对上调,29 个相对下调)。

3.2 反义 lncRNA 与 mRNA 共表达分析 阳类证与阴类证相比,发现与神经系统及脑缺血相关的 2 条反义 lncRNA 及相应的 mRNA 表达差异均具有统计学意义 ($P < 0.05$)。其中,与反义 lncRNA RP11-647P12.1 和反义 lncRNA RP11-677M14.2 相关的 mRNA 基因标识分别为神经元衍生神经营养因子 (NDNF) 和神经颗粒素 (NRGN),二者在阳类证中表达均上调。推测反义 lncRNA RP11-647P12.1 和反义 lncRNA RP11-677M14.2 可能通过上调各自表达水平来调控相应 mRNA 基因表达,参与阳类证形成过程,见表 1。

表 1 阳类证转录组表达谱中涉及脑缺血的反义 lncRNAs 及相应的 mRNA

Table 1 Antisense lncRNAs involved in cerebral ischemia in transcriptome expression profile of Yang syndrome and their corresponding mRNAs

lncRNA 序列	反义 lncRNA		mRNA		相关蛋白质
	基因标识	FC ¹⁾	基因标识	FC ¹⁾	
ENST00000507782	RP11-647P12.1	2.38	NDNF	3.68	神经元衍生神经营养因子
ENST00000531241	RP11-677M14.2	2.67	NRGN	2.06	神经颗粒素

注: ¹⁾ 与阴类证相比。

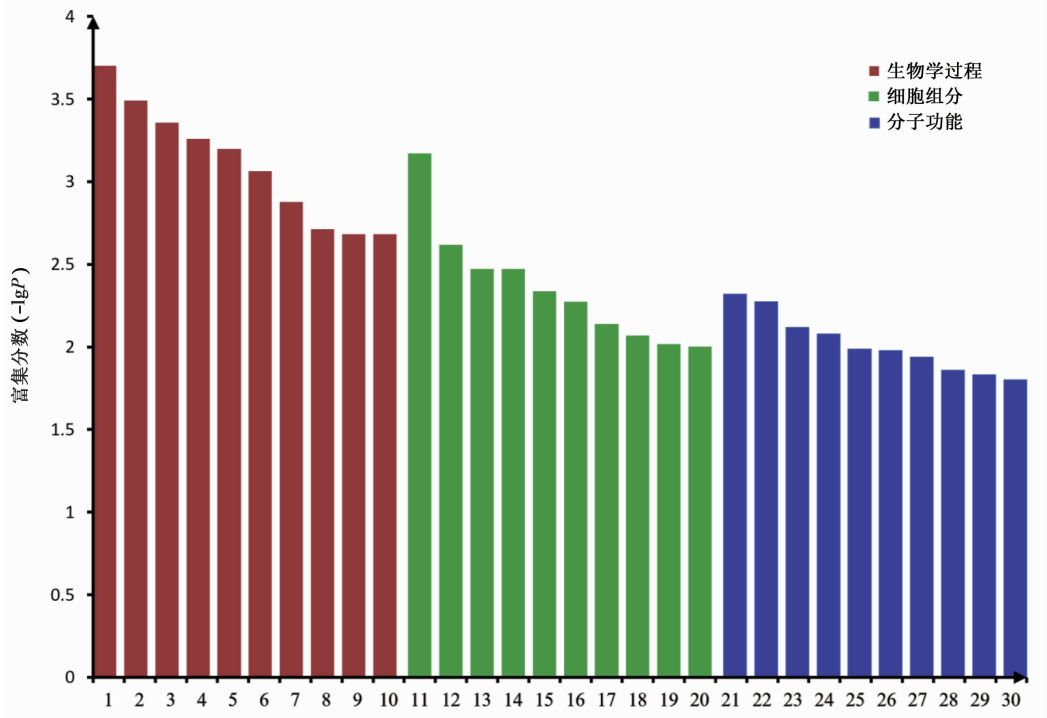
3.3 功能与信号通路富集分析 阳类证与阴类证相比,表达上调 mRNAs 的 GO 项目富集包含 335 项生物学过程,42 项分子功能和 30 项细胞组分;表达下调 mRNAs 的 GO 项目富集包含 120 项生物学过程,34 项分子功能和 46 项细胞组分。生物学过程、分子功能和细胞组分每项富集水平排名前 10 的项目见图 1, 2。阳类证、阴类证之间差异表达的 mRNA 主要与血压调节、神经递质受体活性调节、内分泌激素调节、炎症反应等相关。KEGG 通路富集结果提示,阳类证、阴类证之间差异表达 mRNAs 与多个生物信号通路如类固醇激素合成、肾素-血管紧张素系统等相关。其中肾素-血管紧张素系统信号

通路与脑血管病危险因素关系较为密切,见图 3。

3.4 急性缺血性中风阴、阳类证差异 lncRNAs 的 PCR 验证 在样本中使用 Real-time PCR 检测部分急性缺血性中风阴类证、阳类证差异 lncRNA 的相对表达量。采用 Mann-Whitney U 秩和检验进行分析。结果表明 T131416, ENST00000527450 在阳类证组中表达量较阴类证组上调,且组间差异存在统计学意义 ($P < 0.05$),见表 2。

4 讨论

急性缺血性中风分阴、阳辨治的理论基础与中风病深层次的病因病机密切相关。急性缺血性中风的发生,是由于机体气血阴阳俱虚,复以风火痰瘀等



1 ~ 30. 血压负性调节 (negative regulation of blood pressure, GO: 0045776); 全身动脉血压调节 (regulation of systemic arterial blood pressure, GO: 0003073); 线粒体去极化反应 (response to mitochondrial depolarisation, GO: 0098780); 血压调节 (regulation of blood pressure, GO: 0008217); 全身动脉血压正调节 (positive regulation of systemic arterial blood pressure, GO: 0003084); 染色质组装 (chromatin assembly, GO: 0031497); 脱氧核糖核酸 (DNA) 包装 (DNA packaging, GO: 0006323); 细胞通讯的正向调节 (positive regulation of cell communication, GO: 0010647); 全身动脉血压负调节 (negative regulation of systemic arterial blood pressure, GO: 0003085); Notch 受体加工 (Notch receptor processing, GO: 0007220); cullin-RING 泛素连接酶复合物 (cullin-RING ubiquitin ligase complex, GO: 0031461); 细胞膜部分 (membrane part, GO: 0044425); 溶解液泡 (lytic vacuole, GO: 0000323); 溶酶体 (lysosome, GO: 0005764); 内质网 (endoplasmic reticulum, ER) 膜蛋白复合物 (ER membrane protein complex, GO: 0072546); CUL4-RING E3 泛素连接酶复合物 (CUL4-RING E3 ubiquitin ligase complex, GO: 0080008); 细胞质动力蛋白复合物 (cytoplasmic dynein complex, GO: 0005868); 线粒体外膜的固有成分 (intrinsic component of mitochondrial outer membrane, GO: 0031306); Skp1-Cul1-F-box 蛋白 (SCF) 泛素连接酶复合物 (SCF ubiquitin ligase complex, GO: 0019005); 树突细胞质 (dendrite cytoplasm, GO: 0032839); 肾上腺素能受体活性 (adrenergic receptor activity, GO: 0004935); 延迟整流钾通道活性 (delayed rectifier potassium channel activity, GO: 0005251); mRNA 5' 端非翻译区 (5'-untranslated regions) 结合 (mRNA 5'-UTR binding, GO: 0048027); 氧化还原酶活性, 作用于还原型辅酶 I 或辅酶 II [NAD(P)H], 血红素蛋白作为受体 [oxidoreductase activity, acting on NAD(P)H, heme protein as acceptor, GO: 0016653]; 非跨膜蛋白酪氨酸激酶活性 (non-membrane spanning protein tyrosine kinase activity, GO: 0004715); 假尿苷合成酶活性 (pseudouridine synthase activity, GO: 0009982); 微管运动活性 (microtubule motor activity, GO: 0003777); 分子内转移酶活性 (intramolecular transferase activity, GO: 0016866); 转移酶活性, 转移含硫基团 (transferase activity, transferring sulfur-containing groups, GO: 0016782); 硫酸乙酰肝素磺基转移酶活性 (heparan sulfate sulfotransferase activity, GO: 0034483)

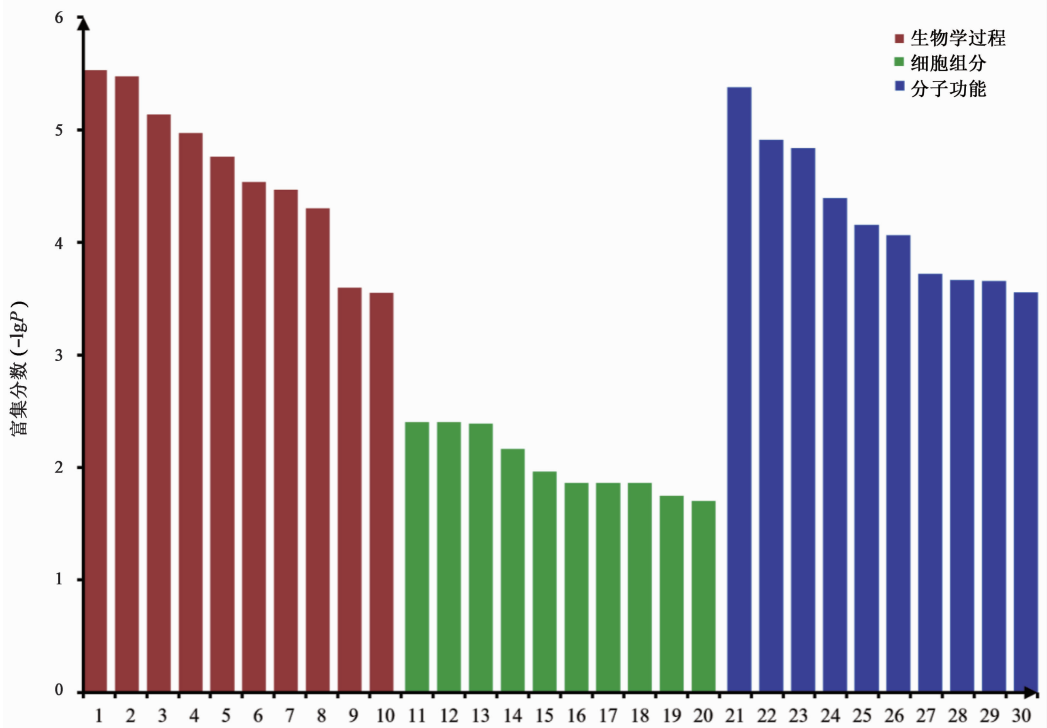
图 1 阳类证较阴类证表达上调 mRNAs 的 GO 条目富集水平 (前 10 项)

Fig. 1 Enrichment level of GO entries in mRNAs up-regulated in Yang syndrome by comparing with Yin syndrome (top 10)

多种因素的共同作用下,引起脏腑功能失调,气血逆乱于脑所致,其标在痰瘀互结于脑络,其本乃正气亏虚^[22]。由于存在体质偏颇而有偏于阴虚或阳虚之别,因而在痰瘀互结这一“标实”的共性病理基础上,个体间可表现出偏于阴或偏于阳的证候^[2]。清代医家周学海在《读医随笔·中风有阴虚阳虚两大纲》中指出“所尤当辨者,阳虚有阴盛,有阴不盛;阴虚有阳盛,有阳不盛”^[23],即阐述中风病辨阴虚、阳虚体质的重要性。体质是疾病证候演变的重要影响因素,中风病偏阴虚阳盛体质者,邪易从热化,表现

为阳类证;偏阳虚阴盛体质者,邪易从寒化,表现为阴类证,此为阴、阳类证的内在辨证逻辑核心。在既往研究基础上,本研究结合高通量的基因转录组学检测及生物信息学分析,构建急性缺血性中风阴类证、阳类证的 lncRNA, mRNA 和 miRNA 差异表达谱,以相对整体的视角,进一步揭示阴、阳类证在发生、发展过程中所涉及的生物学过程和调节通路,系统阐释阴、阳类证的证候生物学本质。

急性缺血性中风阳类证、阴类证患者血清中 lncRNA 和 mRNA 存在差异性表达,体现出了同一



1 ~ 30. 与感觉有关的化学刺激检测 (detection of chemical stimulus involved in sensory perception, GO: 0050907); 感官知觉刺激的检测 (detection of stimulus involved in sensory perception, GO: 0050906); 与嗅觉感知有关的化学刺激检测 (detection of chemical stimulus involved in sensory perception of smell, GO: 0050911); 化学刺激的感觉知觉 (sensory perception of chemical stimulus, GO: 0007606); 化学刺激检测 (detection of chemical stimulus, GO: 0009593); 嗅觉感知 (sensory perception of smell, GO: 0007608); 神经系统过程 (nervous system process, GO: 0050877); 刺激检测 (detection of stimulus, GO: 0051606); G 蛋白偶联受体信号通路 (G-protein coupled receptor signaling pathway, GO: 0007186); 感官感知 (sensory perception, GO: 0007600); 细胞器核糖体 (organellar ribosome, GO: 0000313); 线粒体核糖体 (mitochondrial ribosome, GO: 0005761); 桥粒 (desmosome, GO: 0030057); γ -氨基丁酸 (GABA) 受体复合物 (GABA receptor complex, GO: 1902710); 突触膜 (synaptic membrane, GO: 0097060); 浓缩的染色体外动粒 (condensed chromosome outer kinetochore, GO: 0000940); 宿主细胞部分 (host cell part, GO: 0033643); 轴突起始段 (axon initial segment, GO: 0043194); 质膜 (plasma membrane, GO: 0005886); 主轴突 (main axon, GO: 0044304); 嗅觉受体活性 (olfactory receptor activity, GO: 0004984); 信号传导受体活性 (signaling receptor activity, GO: 0038023); G 蛋白偶联受体活性 (G-protein coupled receptor activity, GO: 0004930); 跨膜信号传导受体活性 (transmembrane signaling receptor activity, GO: 0004888); 泛素水解酶活性 (ubiquitinyl hydrolase activity, GO: 0101005); 跨膜受体活性 (transmembrane receptor activity, GO: 0099600); 受体活性 (receptor activity, GO: 0004872); 分子传感器活性 (molecular transducer activity, GO: 0060089); 硫醇依赖性泛素水解酶活性 (thiol-dependent ubiquitinyl hydrolase activity, GO: 0036459); 信号传感器活性 (signal transducer activity, GO: 0004871)

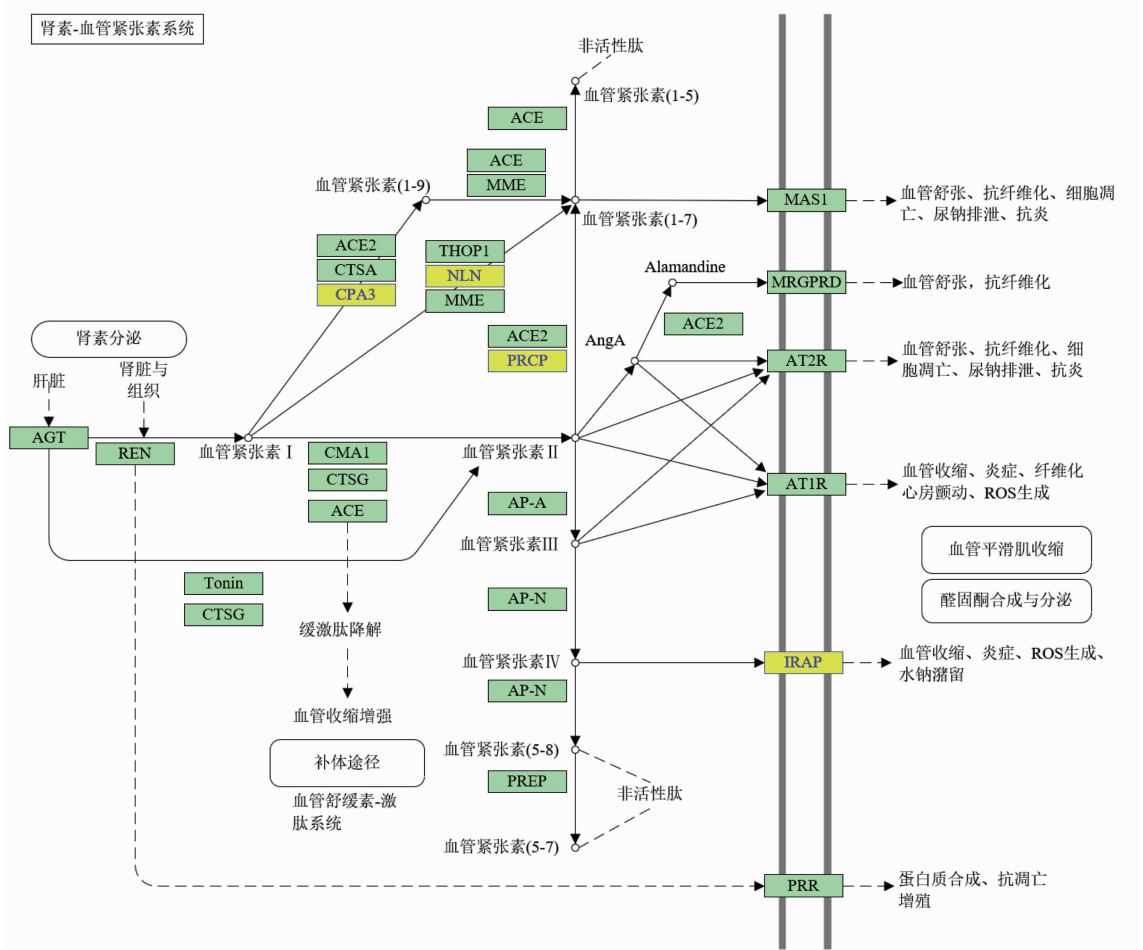
图 2 阳类证较阴类证表达下调 mRNAs 的 GO 条目富集水平 (前 10 项)

Fig. 2 Enrichment level of GO entries in mRNAs down-regulated in Yang syndrome by comparing with Yin syndrome (top 10)

疾病 2 个不同中医证候在转录组学层面存在差异。经过验证的 T131416, ENST00000527450 可作为潜在的区分阴、阳类证的客观诊断指标。阳类证与阴类证相比, 存在一些具有调控关系的反义 lncRNA 与 mRNA 表达水平发生变化。阳类证组中反义 lncRNA RP11-647P12.1 和 RP11-677M14.2 可能通过上调表达水平, 分别调控 NDNF 和 NRGN 的表达水平。既往研究显示 NDNF 和 NRGN 与神经损伤、脑缺血具有密切关系。NDNF 能促进神经元发育、迁移和生长, 并诱导小鼠海马神经元的神经突生长, 是一种潜在的治疗神经损伤和变性的营养因子^[24]。

NRGN 是脑特异性突触后蛋白, 可能在学习、记忆、神经系统发育 (突触可塑性) 等生理过程中发挥重要作用。临床研究表明, 脑脊液及血清中的 NRGN 与脑梗死面积相关^[25]。上述反义 lncRNAs 与 mRNAs 的调控关系有可能参与了急性缺血性中风阳类证的形成。

miR-6757-5p, miR-1914-3p, miR-4788 和 miR-1281 在阳类证组中表达明显上调, 表明部分 miRNAs 亦可能参与了急性缺血性中风阴、阳类证的病理生物机制。miR-1281 参与了由血小板衍生生长因子刺激下引发的平滑肌细胞的增殖、迁移和



AGT. 血管紧张素原; REN. 肾素; Tonin. 激肽释放酶 1; CTSG. 组织蛋白酶 G; ACE2. 血管紧张素 I 转换酶 2; CTSA. 组织蛋白酶 A; CPA3. 羧肽酶 A3; CMA1. 糜蛋白酶 1; ACE. 血管紧张素 I 转换酶; MME. 膜金属内肽酶; THOP1. thimet oligopeptidase 1; NLN. 溶神经素; PRCP. 溶酶体 PRO-X 羧肽酶; AP-A. 谷氨酰氨肽酶; AP-N. 丙氨酰氨肽酶, 细胞膜; PREP. 脯氨酰氨肽酶; AngA. 血管紧张素 A; MAS1. MAS1 原癌基因, G 蛋白偶联受体; MRGPRD. MAS 基因相关的 G 蛋白偶联受体家族成员 D; AT2R. 2 型血管紧张素 II 受体 (angiotensin II receptor type 2); AT1R. 血管紧张素 II -1 型受体; IRAP. 亮氨酸半胱氨酰氨肽酶; PRR. 三磷酸腺苷 (ATP) 酶离子转运辅助蛋白 2

图 3 阴类证、阳类证差异表达 mRNAs 在肾素-血管紧张素系统通路中注释的蛋白 (带黄色标记)

Fig. 3 Proteins involved in differentially expressed mRNAs of Yin and Yang syndromes annotated in renin-angiotensin system pathway (marked by yellow)

表 2 阴类证和阳类证差异 lncRNAs 的 Real-time PCR 验证

Table 2 Real-time PCR verification of differential lncRNAs in Yin and Yang syndromes

lncRNA	相对表达量	
	阳类证 (n = 10)	阴类证 (n = 30)
T131416	1.85 × 10 ²	1.23 × 10 ²
ENST00000527450	4.56 × 10 ⁻²	1.72 × 10 ⁻²

肺血管重构^[26], 在腹主动脉瘤患者血清中明显升高^[27], 且在冠心病心绞痛患者外周血单个核细胞中表达量降低^[28]。miR-1914 在结肠癌患者血清中表达含量升高, 并在体外实验中证实对核因子 I/X 的转录具有靶向抑制作用^[29]。因高通量测序所获得的部分 lncRNA 和 miRNA 未被注释, 具体生理病理

学功能仍未被探索, 本研究重点对差异 mRNA 进行功能分析和通路富集以阐释证候间转录组的差异。GO 条目分析和通路富集显示, 阴类证、阳类证之间差异表达 mRNA 主要与血压调节、内分泌激素调节等相关。既往研究表明, 不同的危险因素引发的中风在病因病机及证型上有一定的相关性。其中男性、性格易怒、高血压病史是利于阳类证辨证的相关危险因素^[30], 与通路富集提示的阴阳类证之间血压调节、肾素-血管紧张素系统相关通路的基因表达存在差异相吻合。肾素-血管紧张素系统 (RAS) 的异常调控可增加交感神经兴奋性, 促进肾上腺髓质释放儿茶酚胺, 进而长期升高血压, 并引发心脏重构事件^[31]。阳类证与阴类证之间的差异, 在 RAS 系

统通路中可能与 IRAP, PRCP, NLM, CPA3 等多种蛋白质表达有关。

GO 富集到了 2 种神经递质(GABA 与肾上腺素能受体)相关的条目在阴、阳类证之间存在差异。GABA 是中枢神经系统中最重要的抑制性神经递质,主要起突触后抑制性调控作用。GABA 的功能紊乱可引起许多神经疾患,并与衰老、认知功能减退关系密切^[32]。肾上腺素能受体属于 G 蛋白偶联受体大家族,可调节体内多种生理反应,包括血管扩张、血管收缩、心率调节、脂代谢调节、凝血作用等^[33]。有学者认为,肾上腺素能神经系统等兴奋性神经活动占优势时引发的兴奋状态,即为“阳”,自主神经等抑制性神经活动占优势时引发的安静状态,即为“阴”^[34]。阳类证患者常见症状为烦躁,甚则躁扰不宁,对应了肾上腺素能神经的异常兴奋作用;阴类证患者静卧不烦、倦怠明显,这类症状很可能与 GABA 通路的神经抑制调节作用相关。阴、阳类证的证候成因在转录组学层面得到了相对合理的解释,进一步丰富了其证候本质的生物学内涵。

综上所述,本研究发现急性缺血性中风阳类证、阴类证患者血清中 lncRNA, mRNA 及 miRNA 存在差异性表达,部分的差异 lncRNA 和 miRNA 可作为潜在证候生物标记物。反义 lncRNA RP11-647P12.1 和 RP11-677M14.2 可能通过上调表达水平,分别调控 NDNF 和 NRG1 的基因表达,进而参与阳类证形成过程。阴、阳类证的表型差异可能由血压调节、肾上腺素能受体调节、肾素-血管紧张素系统以及 GABA 等多个通路的共同参与。受样本量及条件限制,本研究所得成果尚处于阴、阳类证生物学实质的前期探索阶段,研究中所发现的生物标记物、反义 lncRNA 调控作用及信号通路机制仍需进一步验证。未来需开展多中心、大样本、基于多组学联合分析的临床证候研究,并结合动物及细胞造模、方药干预等研究手段,整合代谢组学、蛋白质组学等方法^[35],进一步探讨急性缺血性中风阴、阳类证辨治体系蕴藏的科学内涵。

[参考文献]

[1] WANG W, JIANG B, SUN H, et al. Prevalence, incidence and mortality of stroke in China: results from a nationwide population-based survey of 480 687 adults [J]. *Circulation*, 2017, 135(8): 759-771.

[2] 郑国庆, 黄培新. 中风病辨治阴阳为纲源流[J]. *中华医史杂志*, 2003, 33(4): 227-230.

[3] 卢明, 杜宝新, 郭建文, 等. 对中风病急性期以阴阳辨

证代替传统九型辨证的可行性临床验证[J]. *广州中医药大学学报*, 2006, 23(4): 279-281.

[4] 缪晓路. 中风病急性期阴阳类证辨证的初步评价研究[D]. 广州: 广州中医药大学, 2007.

[5] 张伯礼, 王玉来, 高颖, 等. 中风病急性期综合治疗方案研究与评价——附 522 例临床研究报告[J]. *中国危重病急救医学*, 2005, 17(5): 259-263.

[6] 牛昱光, 李加玲, 黄燕. “中风阴阳类证辨证及其方证疗效体系”治疗症状性大脑中动脉狭窄的远期疗效[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2014, 20(6): 192-195.

[7] 尤劲松, 黄培新, 刘茂才, 等. 缺血性中风阴阳类证与细胞间黏附分子 I 基因多态性的相关性研究[J]. *新中医*, 2006, 38(11): 21-22.

[8] 文龙. 缺血性中风急性期的证候演变规律与血浆 CGRP、ET 含量变化及意义[D]. 广州: 广州中医药大学, 2006.

[9] 孙景波, 石延榜, 黄培新. 中风病急性期阳类证与血浆胆囊收缩素的相关性研究[J]. *河南中医*, 2006, 26(8): 28-29.

[10] Casamassimi A, Federico A, Rienzo M, et al. Transcriptome profiling in human diseases: new advances and perspectives [J]. *Int J Mol Sci*, 2017, 18(8): E1652.

[11] Gulyaeva L F, Kushlinskiy N E. Regulatory mechanisms of microRNA expression [J]. *J Transl Med*, 2016, doi: 10.1186/s12967-016-0893-x.

[12] Bunch H. Gene regulation of mammalian long non-coding RNA [J]. *Mol Genet Genomics*, 2018, 293(1): 1-15.

[13] HE W, WEI D, CHEN S, et al. Altered long non-coding RNA transcriptomic profiles in ischemic stroke [J]. *Hum Gene Ther*, 2018, 29(6): 719-732.

[14] 王阶, 姚魁武, 刘咏梅, 等. 冠心病血瘀证转录组学研究——病证结合生物标志物研究思路与方法[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(19): 1-5.

[15] 吴芊, 邱文琪, 宋明, 等. 转录组学与中医证候研究现状分析 [J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(9): 4094-4097.

[16] XIN J, ZHANG R C, WANG L, et al. Researches on transcriptome sequencing in the study of traditional chinese medicine [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2017, doi: 10.1155/2017/7521363.

[17] 中华医学会神经病学分会. 中国急性缺血性脑卒中诊治指南 2014 [J]. *中华神经科杂志*, 2015, 48(4): 246-257.

[18] 卢明, 杜宝新, 郭建文, 等. 对中风病急性期以阴阳辨证代替传统九型辨证的可行性临床验证[J]. *广州中医药大学学报*, 2006, 23(4): 279-281.

[19] Villegas V E, Zaphiropoulos P G. Neighboring gene

- regulation by antisense long non-coding RNAs [J]. *Int J Mol Sci*, 2015, 16(2):3251-3266.
- [20] ZHONG S, Storch K F, Lipan O, et al. GoSurfer: a graphical interactive tool for comparative analysis of large gene sets in gene ontology space [J]. *Appl Bioinformatics*, 2004, 3(4):261-264.
- [21] Kanehisa M, Goto S. KEGG: Kyoto encyclopedia of genes and genomes [J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1):27-30.
- [22] 张静, 赵建军, 杨伟, 等. 基于中医证候特征的缺血性中风复发风险的横断面分析 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2018, 24(12):194-198.
- [23] 周学海. 读医随笔 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2007:139.
- [24] DENG J B, SHI Y Y, XU H F, et al. Spatio-temporal expression of a novel neuron-derived neurotrophic factor (NDNF) in mouse brains during development [J]. *BMC Neurosci*, 2010, doi:10.1186/1471-2202-11-137.
- [25] De Vos A, Bjerke M, Brouns R, et al. Neurogranin and tau in cerebrospinal fluid and plasma of patients with acute ischemic stroke [J]. *BMC Neurol*, 2017, 17(1):170.
- [26] LI Y, LI L, QIAN Z, et al. Phosphatidylinositol 3-kinase-DNA methyltransferase 1-miR-1281-histone deacetylase 4 regulatory axis mediates platelet-derived growth factor-induced proliferation and migration of pulmonary artery smooth muscle cells [J]. *J Am Heart Assoc*, 2018, 7(6):e007572.
- [27] ZHANG W, SHANG T, HUANG C, et al. Plasma microRNAs serve as potential biomarkers for abdominal aortic aneurysm [J]. *Clin Biochem*, 2015, 48(15):988-992.
- [28] 李敏. 活血化痰安神方对冠心病心绞痛痰瘀互结证患者临床及 microRNA 研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2016.
- [29] HU J, CAI G, XU Y, et al. The plasma microRNA miR-1914 * and-1915 suppresses chemoresistant in colorectal cancer patients by down-regulating NFIX [J]. *Curr Mol Med*, 2016, 16(1):70-82.
- [30] 郭捷婷. 急性缺血中风证候特征与危险因素的相关性研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
- [31] Hussain M, Awan F R. Hypertension regulating angiotensin peptides in the pathobiology of cardiovascular disease [J]. *Clin Exp Hypertens*, 2018, 40(4):344-352.
- [32] Rozycka A, Liguz-Lecznar M. The space where aging acts: focus on the GABAergic synapse [J]. *Aging Cell*, 2017, 16(4):634-643.
- [33] XIAO R P. β -Adrenergic signaling in the heart: dual coupling of the β_2 -adrenergic receptor to G_s and G_i proteins [J]. *Sci STKE*, 2001, doi: 10.1126/stke.2001.104.re15.
- [34] 陈小野. 阴/阳; 无序/有序、低有序度/高有序度 [J]. *中华中医药杂志*, 2010, 25(12):2013-2015.
- [35] 李雨庭, 李诗畅, 牛雯颖, 等. 方剂药理研究的方法与思路 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2017, 23(21):229-234.

[责任编辑 刘德文]