中国实验方剂学杂志
Chinese Journal of Experimental Traditional Medical Formulae
ISSN 1005-9903,CN 11-3495/R

《中国实验方剂学杂志》网络首发论文

题目：基于蛋白质组学的缺血性心脏病气阴两虚证小鼠模型的建立与评价
作者：张秋艳，李瑛，高云霄，胡珑潇，袁月，陈潇潇，史亚丽，任钧国
DOI：10.13422/j.cnki.syfjx.20251463
收稿日期：2024-12-05
网络首发日期：2025-03-06
引用格式：张秋艳，李瑛，高云霄，胡珑潇，袁月，陈潇潇，史亚丽，任钧国．基于蛋白质组学的缺血性心脏病气阴两虚证小鼠模型的建立与评价[J/OL]．中国实验方剂学杂志. https://doi.org/10.13422/j.cnki.syfjx.20251463

网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

网络首发时间：2025-03-06 18:17:09　　网络首发地址：https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20250306.1103.001

收稿日期：2024-12-05
基金项目：中国中医科学院科技创新工程项目（CI2021A04601，CI2023C016YL）；国家自然科学基金面上项目（82374184）；北京市自然科学基金项目（7232316）
第一作者：张秋艳，在读硕士，从事中药心血管药理学研究，E-mail：qyzhang818@163.com
通信作者：任钧国，博士，研究员，从事中药心血管药理及代谢药理研究，E-mail：reek2003@163.com

基于蛋白质组学的缺血性心脏病气阴两虚证小鼠模型的建立与评价

张秋艳[1,2]，李瑛[2]，高云霄[2]，胡珑潇[1,2]，袁月[2]，陈潇潇[2]，史亚丽[2]，任钧国[1,2*]
（1.北京中医药大学，北京 100029；2.中国中医科学院 西苑医院，基础医学研究所，中药药理北京市重点实验室，北京 100091）

[摘要] 目的：探索腹腔注射异丙肾上腺素（ISO）建立缺血性心脏病（IHD）气阴两虚证小鼠模型的最佳构建方法及其生物学基础。**方法：**将 144 只雄性 C57BL/6J 小鼠按照体质量随机分为 3 个正常组和 9 个模型组，每组 12 只。以 ISO 腹腔注射剂量（5、10、15 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$），注射时间（4、7、14 d）为因素，建立 L_9（2^3）正交表，3 个正常组分别于相应时间内注射等量生理盐水。造模结束后检测各组小鼠体质量、24 h 食水量、抓力、自主活动情况，采用超声心动图检测小鼠心功能，酶联免疫吸附测定法（ELISA）检测血清中去甲肾上腺素（NE）、环磷酸腺苷（cAMP）及环磷酸鸟苷（cGMP）水平，生化法检测心肌组织中腺嘌呤核苷三磷酸（ATP）含量，结合 HE 染色观测心肌组织病理变化；采用正交试验直观分析与方差分析，筛选 IHD 气阴两虚证小鼠模型的最佳造模条件。采用数据依赖型质谱采集（DDA）蛋白质组学技术定量检测最佳模型组与正常组间的心肌组织差异蛋白，结合生物信息学分析，探索 IHD 气阴两虚证模型潜在的生物学机制。**结果：**正交结果显示，注射时间对模型建立影响较大，最佳造模方式为腹腔注射 ISO 15 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$，连续 14 d；此条件下与正常组比较，模型组体质量、摄食量及摄水量、抓力、运动总路程及平均速度、EF、FS 值、血清中 NE、cGMP 及心肌组织中 ATP 含量均显著下降（$P<0.01$），不活动时间、cAMP 含量及 cAMP/cGMP 值明显升高（$P<0.05$，$P<0.01$）；HE 染色结果显示，模型组心肌组织细胞排列紊乱、炎性细胞浸润、心肌纤维断裂、纤维组织增生。蛋白质组学结果显示，与正常组比较，模型组共有 141 个差异蛋白，其中 52 个上调蛋白，89 个下调蛋白；基因功能注释（GO）及京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集显示，细胞组分（CC）主要与线粒体及线粒体内膜相关，生物过程（BP）与补体激活、血小板激活、对金属离子的反应等相关，作用通路可能与补体与凝血级联反应、卟啉代谢两条信号通路关联。**结论：**ISO 15 $mg\cdot kg^{-1}$ 连续腹腔注射 14 d 能够建立 IHD 气阴两虚证小鼠模型，相关机制可能与补体 C3、C5 与 Cp 对铁离子的调控有关，并通过补体激活、血小板激活、对金属离子的反应等生物过程及补体与凝血级联反应、卟啉代谢两条信号通路发挥调控作用。

[关键词] 正交试验；异丙肾上腺素；气阴两虚；缺血性心脏病；小鼠模型；蛋白质组学
[中图分类号] R541；R256；R228　　[文献标识码] A
[doi]10.13422/j.cnki.syfjx.20251463

Establishment and Evaluation of a Mouse Model of Ischemic Heart Disease with Qi and Yin Deficiency Syndrome Based on Proteomics

ZHANG Qiuyan[1,2], LI Ying[2], GAO Yunxiao[2], HU Longxiao[1,2], YUAN Yue[2], CHEN Xiaoxiao[2], SHI Yali[2], REN Junguo[1,2*]
(1.Beijing University of Chinese Medicine,Beijing 100029,China;2.Beijing Key Laboratory of Chinese Materia Pharmacology, Institute of Basic Medical Sciences, Xiyuan Hospital,China Academy of Chinese Medical Sciences,Beijing 100091,China)

[Abstract] Objective: To explore the optimal construction method and the biological basis for establishing a mouse model of Qi-Yin deficiency syndrome in ischemic heart disease(IHD) using intraperitoneal injection of isoproterenol(ISO). **Methods:** A total of 144 male C57BL/6J mice were randomly assigned into three normal groups and nine model groups based on body mass. Each group contained 12 mice. The model groups 1, 4, and 7 were administered isoproterenol(ISO) via intraperitoneal injection at a dose of 5 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ for four consecutive days. The model groups 2, 5, and 8 received ISO at a dose of 10 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ for seven consecutive days, while the model groups 3, 6, and 9 were given ISO at a dose of 15 $mg\cdot kg^{-1}\cdot d^{-1}$ for 14 consecutive days. The normal groups were administered an equivalent volume of normal saline via intraperitoneal injection. After the modeling process, body mass, 24-hour food and water intake, grip strength, and spontaneous activity of the mice were measured. Cardiac function was assessed using echocardiography. Serum levels of norepinephrine(NE), cyclic adenosine monophosphate(cAMP), and cyclic guanosine monophosphate(cGMP) were determined via enzyme-linked immunosorbent assay(ELISA). The myocardial tissue content of adenosine triphosphate(ATP) was measured using biochemical analysis, while histopathological changes in myocardial tissue were observed via hematoxylin-eosin(HE) staining. An orthogonal experimental design was applied for intuitive analysis and variance analysis to screen the mouse model of Qi-Yin deficiency in ischemic heart disease(IHD). A data-dependent acquisition(DDA) proteomic technique was employed to

quantitatively detect differentially expressed proteins in myocardial tissue between the optimal model group and the normal group. Bioinformatics analysis was conducted to explore the potential biological mechanisms underlying the Qi-Yin deficiency model of IHD. **Results：** The optimal modeling condition was identified as intraperitoneal injection of ISO at 15 $mg \cdot kg^{-1} \cdot d^{-1}$ for 14 consecutive days. Compared to normal group, model group demonstrated significant reductions in body mass, food intake, water intake, grip strength, total movement distance, average speed, EF, FS value, serum NE, cGMP, and myocardial ATP levels($P<0.01$), while immobility time, cAMP levels, and the cAMP/cGMP ratio were significantly increased($P<0.05$, $P<0.01$). HE staining results revealed disordered myocardial cell arrangement, inflammatory cell infiltration, myocardial fiber rupture, and fibrotic tissue proliferation in the model groups. Proteomic analysis identified 141 differentially expressed proteins in the model group compared to the normal group, with 52 upregulated and 89 downregulated. Notably. Gene Ontology(GO) functional annotation and Kyoto encyclopedia of genes and genomes(KEGG) pathway enrichment analysis indicated that the cellular components(CC) were related to mitochondria and the inner mitochondrial membrane. The biological processes(BP) were associated with complement activation, platelet activation, and responses to metal ions, suggesting that the potential functional pathways involve the complement and coagulation cascade, as well as porphyrin metabolism signaling pathways. **Conclusion：** Continuous intraperitoneal injection of ISO at a dose of 15 $mg \cdot kg^{-1}$ for 14 days successfully establishes a mouse model of IHD with Qi-Yin deficiency syndrome. The underlying mechanisms appear to be linked to the regulation of iron ions by complement C3, C5 and Cp, and their influence on biological processes such as complement activation, platelet activation, and response to metal ions Additionally, two key signaling pathways, the complement and coagulation cascade and porphyrin metabolism, are likely involved in the pathophysiology.

[Keywords] orthogonal test; isoproterenol; Qi and Yin deficiency syndrome; ischemic heart disease; mouse model; proteomics

缺血性心脏病（IHD）是指动脉粥样硬化（动脉斑块积聚）、冠状动脉痉挛和血栓等多种因素引起心脏组织血液供应减少，造成心肌细胞死亡和瘢痕形成的一种慢性疾病，可导致心肌梗塞或心源性猝死[1-2]，是全球死亡的主要原因[3]。气阴两虚证是 IHD 临床常见证型之一，以胸闷或隐痛，心悸心烦，神疲乏力，气短自汗或兼之盗汗，脉细数，舌红或有齿痕，苔少，手足心热，口干不欲饮为主要表现[4-6]。中医药在治疗 IHD 气阴两虚证方面具有显著优势[7-8]。IHD 气阴两虚证动物模型建立常采用手术法及药物法[9]。手术法主要包括结扎复合高脂高糖喂养[10]、缺血再灌注法[11]等，存在动物死亡率高、造模方法困难、疾病干扰因素较多等缺点，复制难度较高。药物法主要采用腹腔或皮下注射垂体后叶素[12]、异丙肾上腺素（ISO）[13]等进行造模，造模方法简单，广泛应用于 IHD 动物模型的制备。

ISO 是一种合成儿茶酚胺，主要作用于 β 受体，引起心肌耗氧量增大，冠状动脉强烈收缩，外周阻力加大，心率加快，导致心肌缺血缺氧及心室功能障碍，并诱导心肌细胞凋亡和间质纤维化[14-16]。ISO 的不良反应包括口咽发干、心悸不安、头晕目眩、面潮红、多汗、乏力等，与气阴两虚证表现相似。有研究表明，益气养阴中药对 ISO 诱导的 IHD 小鼠具有明显保护作用[17]，也有研究认为连续 28 d 腹腔注射 ISO（7.5 $mg \cdot kg^{-1}$）制备的小鼠模型属于阳虚证[18]，说明时间及剂量的不同可能会导致证候本质发生变化。因此，本研究采用正交设计，以剂量和时间为主要考察因素，探索 ISO 诱导小鼠 IHD 模型的证候特点，筛选腹腔注射 ISO 制作 IHD 气阴两虚证小鼠模型的最佳条件。

1 材料

YLS-13A 型大小鼠抓力测定仪（北京众实迪创科技发展有限公司），Visual-Sonics Vevo 2100 型高分辨率小动物超声影像系统（日本富士胶片有限公司），Supermaze 型旷场分析系统（上海欣软信息科技有限公司），Centrifuge 5417R 型低温离心机（德国 Eppendorf 公司），INFINITE 200 PRO 型酶标仪（奥地利 Tecan 公司），JXFSTPRP-CL-BSC 型冷冻研磨仪（上海净信实业发展有限公司），Pannoramic SCAN 型玻片扫描系统（匈牙利 3Dhistech 公司），Vanquish Neo Nano 型纳升流速液相色谱系统、Orbitrap Exploris 480 型质谱仪（美国 Thermo Fisher 公司）。

ISO（美国 Sigma 公司，货号 I5627），戊巴比妥钠，10%中性甲醛固定液、苏木素-伊红（HE）染色试剂盒（北京索莱宝科技有限公司，货号：G2161、G1120），腺嘌呤核苷三磷酸（ATP）试剂盒（南京博研生物科技有限公司，BYSH-0857W），去甲肾上腺素（NE）酶联免疫吸附测定法（ELISA）试剂盒（黄石市艾恩斯生物科技有限公司，货号 INS-J20570），环磷酸腺苷（cAMP）、环磷酸鸟苷（cGMP）ELISA 试剂盒（上海酶联生物科技有限公司，货号分别为 ml057902V、ml001887V），BCA 蛋白定量试剂盒（美国 Thermo Fisher 公司，货号分别为 YH372890），SISPROT FLEX 蛋白样本处理试剂盒（深圳市贝普奥生物科技有限公司，货号 BO-012-24），十二烷基硫酸钠（SDS）、200 $mmol \cdot L^{-1}$HEPES 缓冲液（北京酷来搏科技有限公司，货号分别为 151-21-3，SL34173901），蛋白酶抑制剂（德国 Roche 公司，货号 56079100），甲酸、乙腈均为质谱级，其余试剂均为分析级。

SPF 级别雄性 C57BL/6J 小鼠 144 只，体质量 18~20 g，购自斯贝福（北京）生物技术有限公司，合格证编号 SCXK（京）2019-0010，饲养于中国中医科学院西苑医院 SPF 级实验动物室，室温 20~25 ℃，相对湿度 40%~70%。实验单位使用许可证编号 SYXK（京）2018-0018。实验动物的相关操作符合实验动物管理条例。本实验经中国中医科学院西苑医院实验动物伦理委员会审批，实验动物伦理批号 2023XLC015。

2 方法

2.1 IHD 气阴两虚证小鼠模型筛选

2.1.1 模型建立　小鼠按照体质量随机分为正常组 3 组，模型组 9 组，每组 12 只。模型组小鼠腹腔注射 ISO（质量浓度 0.5、1.0、1.5 g·L^{-1}），注射体积为 10 mL·g^{-1}，正常组腹腔注射等量生理盐水，作为不同时间模型组对照。以注射时间（*A*）、注射剂量（*B*）为主要考察因素，采用 L_9（2^3）正交设计方法优选 IHD 气阴两虚证小鼠模型，实验设计及流程见表 1。

表 1　IHD 气阴两虚证小鼠模型建立的正交设计

Table 1　Orthogonal design of IHD Qi-Yin deficiency syndrome mice model

水平	*A* 注射时间/d	*B* 注射剂量/mg·kg^{-1}
1	4	5
2	7	10
3	14	15

2.1.2 摄食量、饮水量及体质量检测　各组末次给药后，称取小鼠体质量，并记录小鼠的 24 h 摄食量、饮水量，摄食量、饮水量由检测日剩余食、水质量与前一日给予量的差值计算。

2.1.3 抓力检测　各组末次给药后，每组小鼠使用抓力测定仪进行测定，将小鼠轻放于抓力板上，左手向前推抓力板，右手拉住小鼠尾部并使之与抓力板保持平行，撤去对抓力板的推力，待小鼠用力抓住抓力板时，及时施加水平拉力使小鼠向后运动，小鼠脱离抓力板时记录得到最大抓力，每只小鼠连续检测 3 次抓力，取平均值进行统计。

2.1.4 旷场实验　采用旷场实验方法评价各组小鼠自主活动情况。实验第 4、7、14 天，在安静、暗光条件下检测小鼠活动，先将小鼠单独放入自发活动实验仪中适应 2 min 后，轻轻将小鼠放入旷场箱中格内，观察 5 min 内小鼠活动情况，分析记录小鼠在旷场箱中的活动路程、平均速度及不动时间。

2.1.5 超声心动图检测　各组末次给药 24 h 后，于取材前，进行超声心动图检测。仰卧位固定，小鼠胸部左侧锁骨至肋骨下缘进行备皮处理。通过高分辨率小动物超声影像系统，将探头定位在乳头肌水平长轴切面，记录 30 s 动态影像。选用左心室长轴切面测量心功能指标，包括射血分数（EF）、短轴缩短率（FS），每只小鼠选择 3 个心动周期进行测量，结果取平均值。

2.1.6 ELISA 检测小鼠血清 NE、cAMP、cGMP 水平　小鼠麻醉超声后，眼球取血，静置 2 h。4 ℃、3 500 r·min^{-1} 离心 15 min（离心半径 8.3 cm，下同），分离血清，-80 ℃冻存。按照 ELISA 试剂盒说明书，检测各组小鼠血清 NE、cAMP、cGMP 水平，并计算 cAMP/cGMP。

2.1.7 HE 染色观察小鼠心肌组织病理结构　取小鼠心肌组织心尖部位，10%中性甲醛固定液固定，乙醇逐级脱水，二甲苯固定，石蜡包埋，切片，HE 染色。二甲苯脱蜡至透明，中性树脂封片，使用 Pannoramic SCAN 型玻片扫描系统观察组织病理学形态改变。

2.1.8 生化法检测小鼠心肌组织 ATP 含量　称取 30 mg 心肌组织，按照 1:10 加入磷酸盐缓冲液（PBS），匀浆，4 ℃、12 000 r·min^{-1} 离心 5 min 取上清液，按照试剂盒要求检测小鼠心肌组织中 ATP 含量。

2.2 小鼠心肌组织蛋白质组学分析

2.2.1 小鼠心肌组织样本处理　最佳模型组与正常组每组随机选取 6 个心肌组织样品进行蛋白质组学研究。将心肌组织剪碎，分别称取 10 mg 左右，加入 SDS 裂解液 600 μL，匀浆，4 ℃静置 0.5 h，12 000 r·min^{-1} 离心 5 min 取上清液，BCA 法定量蛋白质浓度。取提取后的蛋白 8 μg，按照 SISPROT FLEX 蛋白样本处理试剂盒说明书进行后续样本酶解及多肽除盐步骤，干燥回收，加入 0.1%甲酸水溶液复溶，待测。

2.2.2 色谱条件　Acclaim^{TM} PepMap 100 预分析柱（75 μm×2 cm，2 μm）后经过 DNV PepMap Neo C_{18} 色谱分析柱（75 μm×150 mm，2 μm），流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液，流动相 B 为含 0.1%甲酸的 80%乙腈水溶液，梯度洗脱（0~2 min，2%~6%B；2~52 min，6%~20%B；52~73 min，20%~35%B；73~83 min，35%~55%B；83~85 min，55%~99%B；85~90 min，99%B），流速 300 nL·min^{-1}，进样量 2 μL。

2.2.3 质谱条件　正离子模式检测，离子源为纳升电喷雾离子源（NSI），喷雾电压 2.3 kV，高场非对称离子迁移谱（FAIMS）补偿电压-43、-63 V。一级质谱扫描范围 *m*/*z* 400~1 200，分辨率为 60 000；二级质谱扫描范围固定起点为 *m*/*z* 100~1 200，分辨率为 30 000，标准化碰撞能 27.0。数据采集模式使用数据依赖型质谱采集（DDA）程序，自动增益控制（AGC）为 75%，信号阈值为 1×10^4，最大注入时间为 100 ms，串联质谱扫描的动态排除时间为 30 s。多肽及其碎片采集参数为，每次全扫描后采集碎片图谱（二级质谱）的采集周期为 1.5 s。碎片化模式采用高能碰撞解离，归一化碰撞能量为 30%。

2.2.4 蛋白质组学数据处理　质谱原始数据分别采用 Proteome Discoverer 2.5 对原始数据的 RAW 文件定性和定量，搜索引擎 SEQUEST HT。用 UniProt 来源的 uniprotkb_taxonomy_id_10090_AND_reviewe_2024_08_16.fasta 蛋白数据库进行检索，添加了反库以计算随机匹配造成的假阳性率（FDR），酶切方式设置为 Trypsin（Full），漏切位点数设为 2，肽段最小长度设置为 6 个氨基酸残基，肽段最大修饰数设为 3，一级母离子质量误差容忍度设为 10 ppm，二级碎片离子的质量误差

容忍度为 0.02 Da。固定修饰设定半胱氨酸碘乙酰胺化（carbamidomethy/+57.021 Da），可变修饰选择甲硫氨酸氧化（oxidation/+15.995 Da）和 *N*-乙酰化（acetyl/+42.011 Da），蛋白和多肽定性假阳性率 FDR 为 1%。数据定量结果以 Excel 表格的形式输出。

2.2.5 生物信息学分析各组样品重复性检验　用各组独立样本之间的蛋白定量相对标准差（RSD）来评估蛋白定量重复性具有生物统计学意义，各组差异蛋白的筛选以差异倍数（FC）≥1.2 或≤0.83 作为上调及下调蛋白的变化阈值，采用 Metascape（http://metascape.org/gp/index.html/）,及 David（https://david.ncifcrf.gov/）对差异蛋白进行基因本体（GO）生物功能富集和京都基因与基因组百科全书（KEGG）通路富集分析，GO 生物功能富集结果导入 Cytoscape3.10.0 软件进行分析。

2.3 统计学分析　数据资料进行正态分布检验和方差齐性检验，符合正态分布的资料，组间比较采用单因素方差分析，方差齐采用最小显著性差异法（LSD），方差不齐则采用 Tamhane's *T*2 法，数据以$\bar{x}\pm s$ 表示。不符合正态分布者采用秩和检验，以 $P<0.05$ 为具有统计学意义。正交试验采用 Microsoft Office Excel 2019 进行直观分析和方差分析。

3 结果

3.1 IHD 气阴两虚证小鼠模型的筛选

3.1.1 ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠体质量变化　造模 4 d 后，模型组 5、6 各死亡 2 只小鼠，造模 10、12 d 后，模型组 9 和 7 各死亡 1 只小鼠。与正常组 1 比较，模型组 2 的体质量明显升高（$P<0.05$）；与正常组 3 比较，模型组 7 和 9 的体质量明显下降（$P<0.05$，$P<0.01$），见表 2。

表 2　ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠体质量变化（$\bar{x}\pm s$）

Table 2　Body weight changes in mice with ISO-induced Qi-Yin deficiency syndrome in the context of IHD（$\bar{x}\pm s$，n=10-12）

组别	*n*	*A*/d	*B*/mg·kg^{-1}	*C*/空白	体质量/g
正常组 1	12				20.90±0.83
正常组 2	12				22.05±0.79
正常组 3	12				21.26±1.45
模型组 1	12	1	1	1	21.28±0.64
模型组 2	12	1	2	2	21.68±0.47$^{1)}$
模型组 3	12	1	3	3	20.51±0.99
模型组 4	12	2	1	3	21.35±0.96
模型组 5	10	2	2	1	21.64±0.67
模型组 6	10	2	3	2	21.55±0.86
模型组 7	10	3	1	2	19.88±1.56$^{1)}$
模型组 8	12	3	2	3	21.82±1.50
模型组 9	10	3	3	1	19.51±1.06$^{2)}$

注：与同时间点正常组比较 $^{1)}P<0.05$，$^{2)}P<0.01$（表 2-表 9 同）

3.1.2 ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠食水量变化　与正常组 1 比较，模型组 2-3 的摄食量明显下降（$P<0.05$，$P<0.01$），与正常组 3 比较，模型组 7-9 的摄食量显著下降（$P<0.01$）；与正常组比较，全部模型组摄水量显著降低（$P<0.01$），见表 3。

表 3　ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠食水量变化（$\bar{x}\pm s$，n=3）

Table 3　Food and water intake changes in ISO-induced mice with Qi and Yin deficiency syndrome of IHD（$\bar{x}\pm s$，n=3）

编号	*A*/d	*B*/mg·kg^{-1}	*C*/空白	摄食量/g	摄水量/g
正常组 1				3.66±0.17	6.85±0.23
正常组 2				3.63±0.38	6.92±0.18
正常组 3				3.90±0.08	6.25±0.13
模型组 1	1	1	1	3.63±0.24	5.43±0.40$^{2)}$
模型组 2	1	2	2	3.31±0.08$^{1)}$	5.43±0.17$^{2)}$
模型组 3	1	3	3	2.97±0.18$^{2)}$	5.45±0.29$^{2)}$
模型组 4	2	1	3	2.95±0.31	5.71±0.39$^{2)}$
模型组 5	2	2	1	3.84±0.40	5.56±0.24$^{2)}$
模型组 6	2	3	2	3.15±0.34	4.27±0.28$^{2)}$
模型组 7	3	1	2	2.03±0.21$^{2)}$	3.78±0.20$^{2)}$
模型组 8	3	2	3	2.65±0.24$^{2)}$	4.67±0.59$^{2)}$
模型组 9	3	3	1	2.41±0.23$^{2)}$	3.71±0.85$^{2)}$

3.1.3 ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠抓力变化　与正常组 1 比较，模型组 2 的抓力明显下降（$P<0.05$）；与正常组 2 比较，模型组 4-6 的抓力显著下降（$P<0.01$）；与正常组 3 比较，模型组 7-9 的抓力显著下降（$P<0.01$），见表 4。

表 4　ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠抓力变化（$\bar{x}\pm s$，n=8）

Table 4　Grip strength changes in ISO-induced mice with Qi and Yin deficiency syndrome of IHD（$\bar{x}\pm s$，n=8）

组别	*A*/d	*B*/ mg kg^{-1}	*C*/空白	抓力
正常组 1				85.83±20.70
正常组 2				91.43±8.31
正常组 3				88.25±16.68
模型组 1	1	1	1	61.42±11.25
模型组 2	1	2	2	53.14±13.45$^{1)}$
模型组 3	1	3	3	66.72±9.03
模型组 4	2	1	3	53.10±5.57$^{2)}$
模型组 5	2	2	1	55.89±15.50$^{2)}$
模型组 6	2	3	2	47.71±7.75$^{2)}$
模型组 7	3	1	2	45.96±6.98$^{2)}$
模型组 8	3	2	3	44.11±9.88$^{2)}$
模型组 9	3	3	1	41.98±6.83$^{2)}$

3.1.4 旷场实验中小鼠的运动情况　与正常组 2 比较，模型组 4~6 的运动总路程、平均速度均显著下降（P<0.01），不动时间明显升高（P<0.05，P<0.01）；与正常组 3 比较，模型组 7~9 的运动总路程、平均速度明显下降（P<0.05，P<0.01），模型组 8-9 的不动时间均明显升高（P<0.05，P<0.01），见表 5。

表 5　ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠运动情况变化（$\bar{x}\pm s$，n=8）

Table 5　Visual analysis of movement conditions in ISO-induced IHD mice with Qi and Yin deficiency syndrome（$\bar{x}\pm s$，n=8）

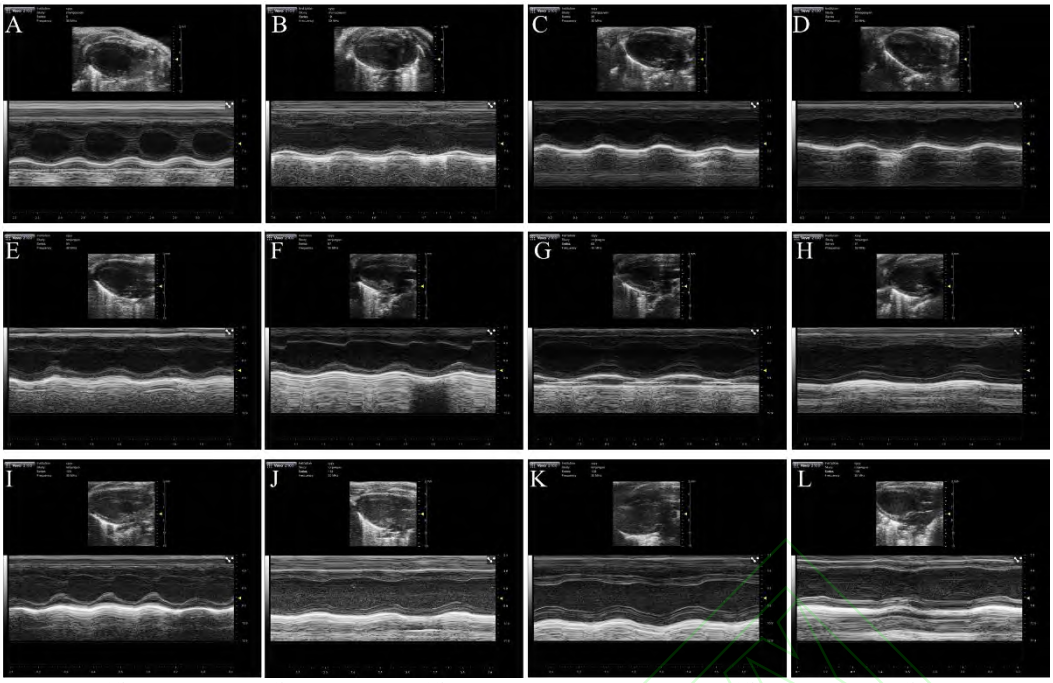
编号	*A*/d	*B*/mg kg^{-1}	*C*/空白	总路程/cm	平均速度/cm s^{-1}	不动时间/s
正常组 1				1695.69±714.47	5.65±2.38	134.96±34.61
正常组 2				1669.5±338.26	5.89±1.35	116.87±29.70
正常组 3				1488.93±333.15	4.96±1.11	112.66±29.19
模型组 1	1	1	1	1656.87±172.45	5.52±0.57	114.07±27.20
模型组 2	1	2	2	1323.81±369.81	4.41±1.23	123.61±35.16
模型组 3	1	3	3	1340.57±236.89	4.47±0.79	124.40±18.78
模型组 4	2	1	3	971.23±380.87$^{2)}$	3.24±1.68$^{2)}$	164.05±48.48$^{1)}$
模型组 5	2	2	1	797.81±213.39$^{2)}$	2.66±0.71$^{2)}$	164.16±36.53$^{1)}$
模型组 6	2	3	2	809.91±196.47$^{2)}$	2.7±0.66$^{2)}$	182.43±38.16$^{2)}$
模型组 7	3	1	2	820.94±177.78$^{1)}$	2.74±0.59$^{1)}$	159.08±21.94
模型组 8	3	2	3	683.24±205.8$^{2)}$	2.28±0.69$^{2)}$	184.63±37.28$^{2)}$
模型组 9	3	3	1	669.87±263.79$^{2)}$	2.23±0.88$^{2)}$	177.96±52.39$^{1)}$

3.1.5 ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠超声心动图变化　与正常组 1 比较，模型组 3 的 FS 值明显降低（P<0.05），与正常组 2 比较，模型组 5、6 的 EF、FS 值明显降低（P<0.05，P<0.01），与正常组 3 比较，模型组 9 的 EF、FS 值均显著下降（P<0.01），见表 6。

表 6　ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠心功能变化（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Table 6　Cardiac function changes in ISO-induced mice with Qi and Yin deficiency syndrome of IHD（$\bar{x}\pm s$，n=6）

编号	*A*/d	*B*/mg kg^{-1}	*C*/空白	EF/%	FS/%
正常组 1				82.76±8.3	56.86±10.49
正常组 2				79.38±4.17	47.49±4.13
正常组 3				81.46±3.29	49.39±3.35
模型组 1	1	1	1	75.76±3.66	43.05±2.93
模型组 2	1	2	2	72.97±3.33	40.68±2.87
模型组 3	1	3	3	70.25±9.82	39.00±7.32$^{1)}$
模型组 4	2	1	3	73.67±7.65	42.32±6.58
模型组 5	2	2	1	69.40±8.18$^{1)}$	38.60±6.51$^{1)}$
模型组 6	2	3	2	66.72±7.93$^{2)}$	36.55±5.99$^{2)}$
模型组 7	3	1	2	72.44±12.88	37.85±10.67
模型组 8	3	2	3	65.88±6.22	35.78±5.07
模型组 9	3	3	1	59.32±5.22$^{2)}$	30.77±3.53$^{2)}$



注：A.正常组 1；B.模型组 1；C.模型组 2；D.模型组 3；E.正常组 2；F.模型组 4；G.模型组 5；H.模型组 6；I.正常组 3；J.模型组 7;K.模型组 8;L.模型组 9（图 2 同）

图 1　ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠心功能变化

Fig. 1　Changes of cardiac function in ISO-induced IHD mice with Qi and Yin deficiency syndrome

3.1.6 小鼠心肌组织 HE 染色　病理结果显示，3 个正常组心肌细胞排列整齐，细胞完整。模型组 1、4 仅出现细胞间质水肿现象，模型组 2、3、5~9 出现不同程度的细胞排列紊乱、炎性细胞浸润、心肌纤维断裂等现象。见图 2。

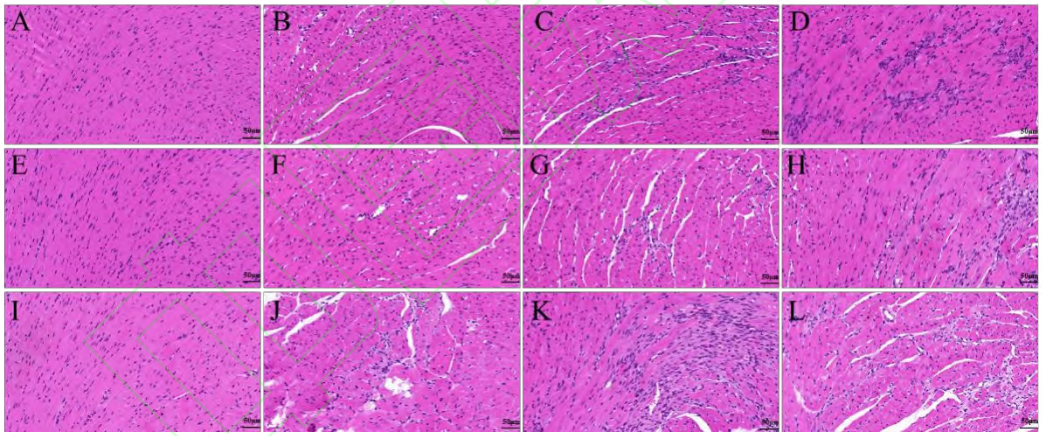


图 2　ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠心肌组织 HE 染色(n=6,HE,×400)

Fig. 2　HE staining of myocardial tissue in ISO-induced mice with Qi and Yin deficiency syndrome of IHD(n=6，HE，×400)

3.1.7 ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠血清中 NE 含量变化　结果显示，与正常组 3 比较，模型组 7~9 的 NE 含量显著下降（P<0.01），其余各模型组与对应正常组间差异均无统计学意义。见表 7。

表 7 ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠血清中 NE 含量直观分析（$\bar{x}\pm s$，n=6）

Table 7 NE content in the serum of IHD mice with Qi and Yin deficiency induced by ISO（$\bar{x}\pm s$，n=6）

编号	A/d	B/mg kg^{-1}	C/空白	NE/ng mL^{-1}
正常组 1				6.27±1.43
正常组 2				6.42±1.09
正常组 3				6.83±0.96
模型组 1	1	1	1	7.08±1.80
模型组 2	1	2	2	8.23±1.91
模型组 3	1	3	3	8.05±2.86
模型组 4	2	1	3	5.70±1.23
模型组 5	2	2	1	4.61±0.62
模型组 6	2	3	2	5.14±1.49

模型组 7	3	1	2	4.92±0.70[2)]
模型组 8	3	2	3	4.20±1.05[2)]
模型组 9	3	3	1	3.90±0.47[2)]

3.1.8 ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠心肌组织 ATP 含量变化　结果显示，与正常组 3 比较，模型组 8、9 的心肌组织 ATP 含量明显下降（$P<0.05$，$P<0.01$），其余各模型组与对应正常组间差异均无统计学意义。见表 8。

表 8　ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠心肌组织 ATP 含量变化（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

Table 8 ATP content changes in myocardial tissue of IHD mice with Qi and Yin deficiency induced by ISO（$\bar{x}\pm s$，$n=8$）

编号	*A*/d	*B*/mg·kg^{-1}	*C*/空白	ATP/pmol·g^{-1}
正常组 1				216.11±41.65
正常组 2				221.89±36.86
正常组 3				215.84±53.92
模型组 1	1	1	1	221.03±47.63
模型组 2	1	2	2	197.00±35.91
模型组 3	1	3	3	179.56±32.47
模型组 4	2	1	3	203.60±57.11
模型组 5	2	2	1	186.81±43.22
模型组 6	2	3	2	159.19±13.92
模型组 7	3	1	2	201.65±35.31
模型组 8	3	2	3	161.12±34.77[1)]
模型组 9	3	3	1	117.06±32.76[2)]

3.1.9 ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠环核苷酸含量变化　与正常组 1 比较，模型组 3 的 cGMP 含量明显下降（$P<0.05$），cAMP/cGMP 比值明显升高（$P<0.05$）；与正常组 2 比较，模型组 6 的 cAMP 含量显著升高（$P<0.01$），模型组 5、6 的 cGMP 含量明显下降（$P<0.05$，$P<0.01$）、cAMP/cGMP 比值明显升高（$P<0.05$，$P<0.01$）；与正常组 3 比较，模型组 8、9 的 cAMP 含量明显升高（$P<0.05$，$P<0.01$），模型组 7~9 的 cGMP 含量显著下降（$P<0.01$），cAMP/cGMP 比值明显升高（$P<0.05$，$P<0.01$）。见表 9。

表 9 ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠环核苷酸含量变化（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

Table 9 Cyclic nucleotide content changes in ISO-induced IHD mice with Qi and Yin deficiency syndrome（$\bar{x}\pm s$，$n=6$）

编号	*A*/d	*B*/mg·kg^{-1}	*C*/空白	cAMP/pmol·mL^{-1}	cGMP/nmol·mL^{-1}	cAMP/cGMP
正常组 1				1.62±0.10	2.10±0.11	0.77±0.05
正常组 2				1.58±0.12	2.19±0.20	0.73±0.08
正常组 3				1.66±0.17	2.26±0.21	0.74±0.09
模型组 1	1	1	1	1.66±0.18	1.98±0.18	0.85±0.12
模型组 2	1	2	2	1.65±0.19	1.96±0.15	0.85±0.12
模型组 3	1	3	3	1.71±0.15	1.85±0.14[2)]	0.93±0.10[1)]
模型组 4	2	1	3	1.65±0.11	1.99±0.18	0.84±0.09
模型组 5	2	2	1	1.72±0.13	1.96±0.13[1)]	0.88±0.10[1)]
模型组 6	2	3	2	1.82±0.16[2)]	1.72±0.10[2)]	1.06±0.09[2)]
模型组 7	3	1	2	1.72±0.10	1.81±0.17[2)]	0.97±0.15[1)]
模型组 8	3	2	3	1.93±0.17[1)]	1.64±0.27[2)]	1.21±0.24[2)]
模型组 9	3	3	1	2.08±0.19[2)]	1.64±0.24[2)]	1.28±0.11[2)]

3.1.10 正交试验分析　正交实验方差结果表明，造模时间对运动总路程、平均速度、cGMP 含量、cAMP/cGMP 比值影响显著，造模剂量对 ATP 含量、cGMP 含量、cAMP/cGMP 比值有明显影响；造模时间与造模剂量对摄食量、摄水量、体质量、抓力、EF、FS、NE 均无明显影响；直观分析结果显示，影响运动总路程、平均速度的最佳造模条件为 A_3B_2，造模剂量对 ATP 含量有明显影响，造模时间无明显影响，最佳造模条件为 A_3B_3，影响 cAMP 及 cGMP 含量、cAMP/cGMP 比值的最佳造模条件均为 A_3B_3。结合与正常组比较结果，确定造模条件为 A_3B_3，即注射时间 14 d，注射剂量为 15 mg·kg^{-1}。见表 10。

表 10　ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠模型方差分析

Table 10　Analysis of variance in the ISO-induced mouse model of IHD with Qi-Yin deficiency syndrome

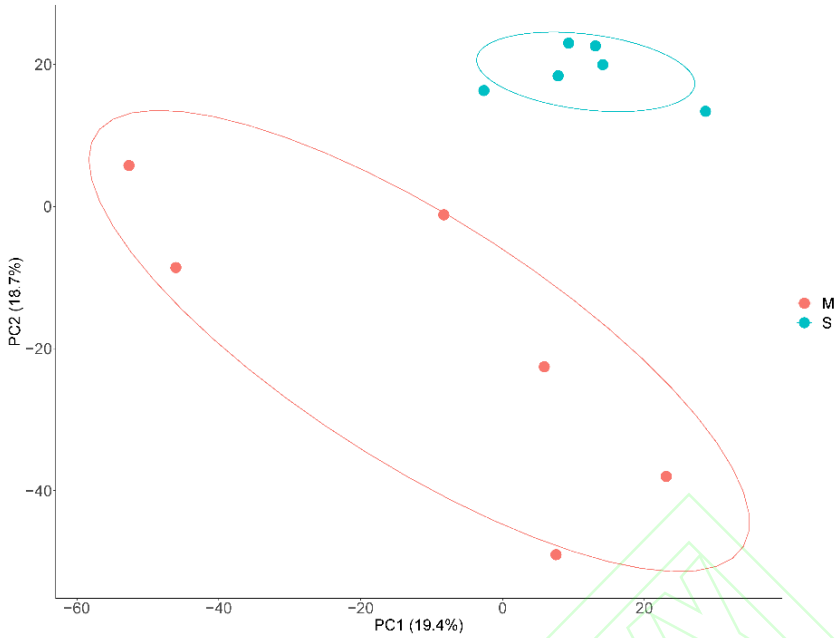
指标	方差来源	*SS*	*MS*	*F*	*P*
体质量	*A*	1.92	0.96	7.51	0.12
	B	2.27	1.14	8.88	0.10
	误差（*C*）	0.26	0.13	-	-
摄食量	*A*	1.77	0.89	4.42	0.18
	B	0.34	0.17	0.84	0.54

	误差（*C*）	0.40	0.20	-	-
摄水量	*A*	3.27	1.64	3.55	0.22
	B	0.87	0.43	0.94	0.52
	误差（*C*）	0.92	0.46	-	-
抓力	*A*	403.94	201.97	7.73	0.11
	B	9.00	4.50	0.17	0.85
	误差（*C*）	52.29	26.14	-	-
总路程	*A*	867 784.41	433 892.21	165.22	0.006
	B	90 052.71	45 026.35	17.15	0.055
	误差（*C*）	5 252.16	2 626.08	-	-
平均速度	*A*	9.63	4.81	164.06	0.006
	B	1.00	0.50	16.97	0.055
	误差（*C*）	0.06	0.03	-	-
不动时间	*A*	221 227.93	110 613.96	1.02	0.494
	B	216 338.74	108 169.37	1.00	0.500
	误差（*C*）	215 979.87	107 989.93	-	-
EF	*A*	76.38	38.19	7.44	0.12
	B	109.38	54.69	10.66	0.09
	误差（*C*）	10.26	5.13	-	-
FS	*A*	59.35	29.67	16.13	0.06
	B	47.63	23.81	12.94	0.07
	误差（*C*）	3.68	1.84	-	-
NE	*A*	19.54	9.77	13.48	0.07
	B	0.09	0.05	0.06	0.94
	误差（*C*）	1.45	0.72	-	-
ATP	*A*	2 336.92	1 168.46	12.79	0.07
	B	4 847.05	2 423.53	26.53	0.04
	误差（*C*）	182.67	91.34	-	-
cAMP	*A*	0.092 5	0.046 2	7.95	0.11
	B	0.055 8	0.027 9	4.80	0.17
	误差（*C*）	0.011 6	0.005 8	-	-
cGMP	*A*	0.092 3	0.046 2	44.38	0.02
	B	0.053 9	0.027 0	25.92	0.04
	误差（*C*）	0.002 1	0.001 0	-	-
cAMP/cGMP	*A*	0.131 3	0.065 6	39.04	0.02
	B	0.064 0	0.032 0	19.04	0.049 9
	误差（*C*）	0.003 4	0.001 7	-	-

注：$F_{0.05}(2,2)=19$，$F_{0.01}(2,2)=99$

3.2 小鼠心肌组织蛋白质组学分析　根据正交试验结果筛选得到最佳造模方式为腹腔注射 ISO 15 $mg\cdot kg^{-1}$ 连续 14 d。因此，从模型组 9 和正常组 3 两个组各随机选出 6 个样本进行蛋白质组学检测。

3.2.1 样本定量分析　通过定量蛋白质组学获得检索获得 4 609 个蛋白的定量数据。根据不同样本间蛋白的表达情况，进行 PCA 相关性分析。主成分分析发现 PC1 和 PC2 分别代表总方差的 19.4%和 18.7%，所有样本明显分为两簇，组内样本聚为一类，结果表明此次实验符合生物重复性及技术重复性检验，说明所选取的样本可以反应模型组 9 和正常组 3 之间的差异；见图 3。



注：S.正常组；M.模型组

图 3　ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠心肌组织 PCA

Fig. 3　PCA analysis of from myocardial tissue of IHD mice with Qi and Yin deficiency induced by ISO

3.2.2 ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠心肌组织差异蛋白火山分析　以 FC≥1.2 且 P<0.05 为筛选标准，共得到差异蛋白总数 141 个，与正常组比较，模型组上调蛋白数目 52 个，包括补体成分 3（C3）、C5、铜蓝蛋白（Cp）、补体因子 H（Cfh）、羧肽酶 B2（Cpb2）、纤维蛋白原 γ 链（Fgg）、纤维蛋白原 β 链（Fgb）、尿苷二磷酸葡萄糖醛酸转移酶 2A1（Ugt2a1）、吡哆胺 5'-磷酸氧化酶（Pnpo）、谷氨酰胺合成酶（Glul）等，下调蛋白数目 89 个，包括丝氨酸蛋白酶抑制剂 A1d（Serpina1d）、Serpina1a、C8b、核糖体蛋白 L19（Rpl19）、Rpl31、Rps10、线粒体核糖体蛋白 L23（Mrpl23）、Rpl10a、Mrpl15、Rpl22l1、Mrps2、Rps5、Rpl32、Rps19、粪卟啉原氧化酶（Cpox）、甲基丙二酸尿症 B 型相关蛋白（Mmab）、δ-氨基酮戊酸脱水酶（Alad）、氨基甲酰磷酸合成酶 2/天冬氨酸转氨甲酰酶/二氢乳清酶（Cad）、谷丙转氨酶 2（Gpt2）等，见图 4。

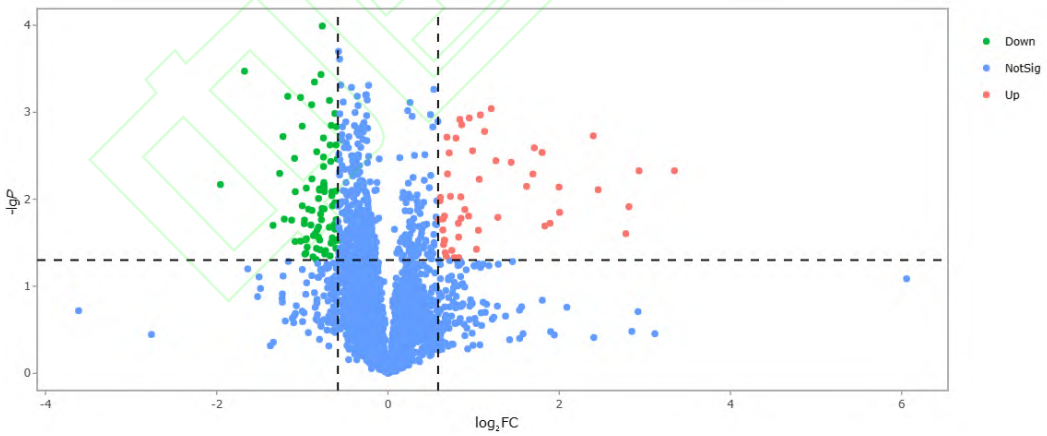


图 4　ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠心肌组织差异蛋白火山分析

Fig. 4　Differential protein volcano map of myocardial tissue of IHD mice with Qi and Yin deficiency induced by ISO

3.2.3 差异蛋白基因本体（GO）功能富集分析　将差异蛋白靶点利用 Metascape 数据库进行 GO 功能富集分析，设置阈值 P<0.01，默认最小计数值>3、富集因子 1.5。选择生物过程（BP）条目的富集分析结果，该平台以“kappa scores”作为相似性参数，对分析结果中相似性>0.3 的条目进行分层聚类分析，利用微生信（https://www.bioinformatics.com.cn/）绘制富集结果的气泡图。生物过程包括补体激活与替代途径、细胞质翻译、纤溶蛋白溶解、急性期反应、四吡咯代谢过程、单羧酸代谢过程、补体激活、血小板激活、核糖体组装等途径；细胞内结构主要定位在核糖体、核糖体亚基、细胞器内膜、线粒体膜、细胞质核糖体、线粒体内膜、血液微粒、血小板 α 颗粒、小核糖体亚基、酶激活复合物等位置；分子功能主要聚焦在核糖体结构成分、内肽酶抑制活性、肽酶抑制活性、结构分子活性、内肽酶调节活性、丝氨酸型内肽酶抑制活性、肽酶调节活性、ATP 酶调节活性、维生素结合、翻译调节活性等功能的调节。对生物过程结果聚类分析发现：补体激活与替

代途径、转录、四吡咯代谢过程、对金属离子的反应、体液免疫应答的调节、核糖体组装、细胞解毒、单羧酸代谢过程的表达等生物过程与其他生物过程关联较为密切。见图 5、图 6、表 11。

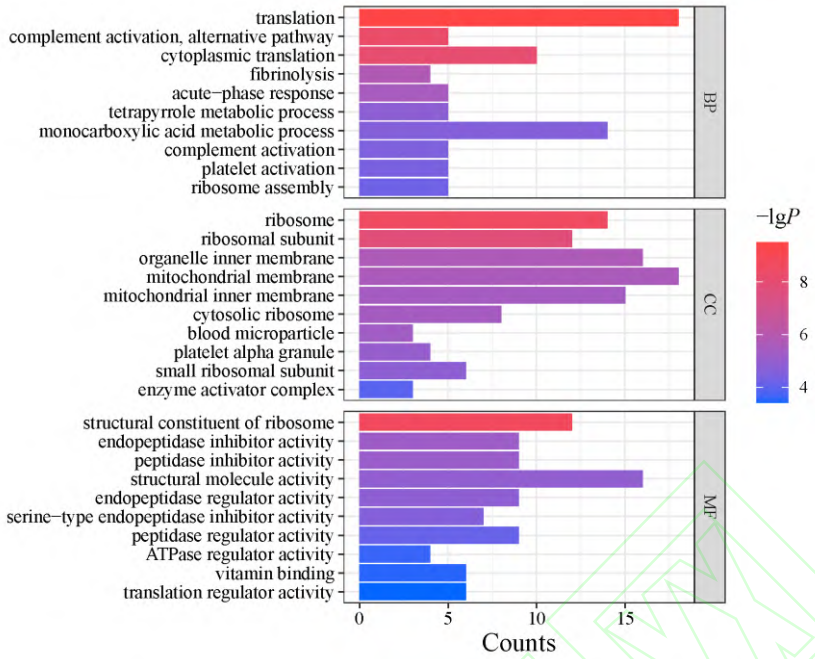


图 5　ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠心肌组织差异蛋白 GO 功能注释

Fig. 5　GO functional annotation of differential proteins of myocardial tissue from IHD mice with Qi and Yin deficiency induced by ISO

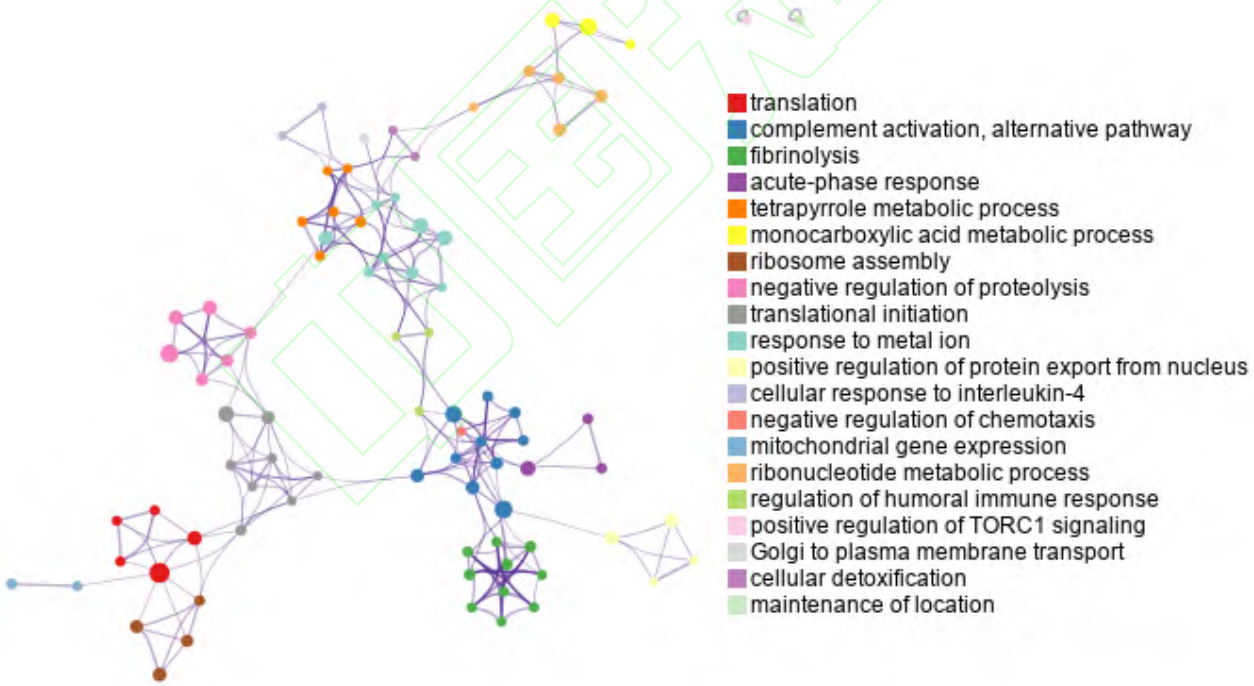


图 6　ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠心肌组织差异蛋白 GO 功能富集 BP 聚类分析

Fig. 6　Cluster analysis of BP enrichment of GO functions of differential proteins of myocardial tissue from IHD mice with Qi and Yin deficiency induced by ISO

表 11　ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠心肌组织差异蛋白 GO 功能富集 BP 聚类分析

Table 11　Cluster analysis of BP enrichment of GO functions of differential proteins of myocardial tissue from IHD mice with Qi and Yin deficiency induced by ISO

描述	节点	中介中心性	接近中心性	特征向量中心性	lg*P*
补体激活与替代途径	11	151	0.179 7	0.181 9	-8.3
翻译	9	504	0.144 8	0.001 8	-9.5
纤维蛋白溶解	9	0	0.141 0	0.219 0	-5.8
翻译起始	8	804	0.162 8	0.008 0	-3.9

四吡咯代谢过程	7	34	0.160 4	0.015 2	-4.8
对金属离子的反应	7	1 231	0.177 1	0.015 8	-3.8
体液免疫应答的调节	7	500	0.186 0	0.107 5	-2.3
核糖体组装	6	301	0.143 8	0.001 6	-4.2
细胞解毒	6	592	0.155 4	0.009 6	-2.2
蛋白质水解的负调控	5	0	0.150 7	0.001 1	-4.0
趋化性的负调控	5	0	0.156 0	0.087 0	-2.6
单羧酸代谢过程	4	81	0.111 4	0.000 1	-4.6
核内蛋白质输出的正向调控	3	0	0.136 7	0.000 1	-3.5
细胞对白介素-4 的应答	3	0	0.141 0	0.003 5	-3.0
核糖核苷酸代谢过程	3	0	0.111 1	0.003 9	-2.4
急性期反应	2	0	0.140 5	0.005 9	-5.5
高尔基体-质膜转运	2	0	0.148 6	0.004 9	-2.2
线粒体基因表达	1	0	0.113 5	0	-2.6
雷帕霉素靶蛋白复合体 1（TORC1）信号通路的正向调控	1	0	0.011 6	0	-2.3
定位维持	1	0	0.011 6	0	-2.1

3.2.4 差异蛋白 KEGG 通路富集分析　采用 David 网站对全部差异蛋白进行 KEGG 通路富集分析。模型组和正常组比较，差异蛋白 KEGG 功能富集的信号通路主要与补体与凝血级联反应、冠状病毒疾病-COVID-19、核糖体、卟啉代谢、辅因子生物合成、精氨酸生物合成、丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢等通路相关。见图 7。

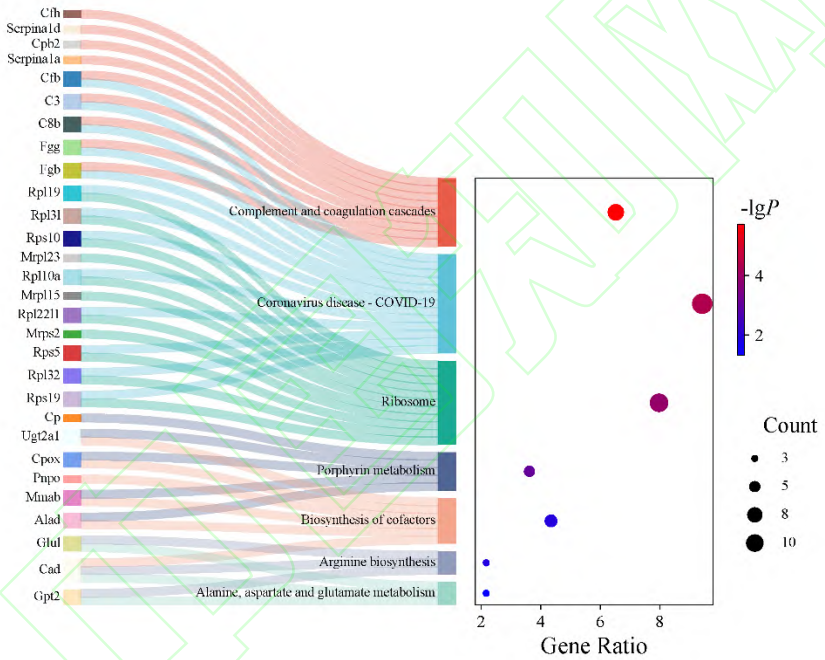


图 7　ISO 诱导 IHD 气阴两虚证小鼠心肌组织差异蛋白 KEGG 通路富集

Fig. 7　KEGG pathway enrichment of different proteins of myocardial tissue from IHD mice with Qi and Yin deficiency induced by ISO

4 讨论

病证结合动物模型是在中医药理论指导下，运用病因病机理论构建的拟临床动物模型。病证结合动物模型能够在一定程度上能够模拟部分中医学“证”的部分临床表现，但因为人与动物的差异性，需从多角度综合评估模型的生物学表征，以确立其证候属性[19-20]。目前病证结合 IHD 动物模型多为证因（高糖喂养造模[10]、睡眠剥夺[21]）与病因（左前降支结扎[10]、药物诱导[12-13]）等多因素复合造模，造模方式复杂。ISO 的不良反应与气阴两虚证表现相似，因此本研究采用未施加证因的单纯疾病模型，观察不同时间、不同造模剂量条件下小鼠疾病与证候的表现。本研究以超声心动图和病理染色反映小鼠心脏功能及受损情况，以体质量变化反映阴虚消瘦，以饮水量反映口干不欲饮，以抓力反映乏力，以运动总路程、平均速度、不动时间反映小鼠神疲乏力，以 ATP、NE 作为气虚指标，以 cAMP、cGMP 及其比值作为阴虚的血清学指标，筛选 IHD 气阴两虚证小鼠模型。

ISO 激活交感神经，抑制骨骼肌细胞的合成代谢，从而导致肌肉萎缩[22]。同时过量的 ISO 引起心肌细胞坏死、胶原纤维增生和氧化应激，导致心肌损伤。心脏功能下降使机体通过增加代谢代偿，进一步加剧能量消耗。小鼠的体质量结果分析可得，ISO 注射剂量为 15 $mg \cdot kg^{-1}$，持续注射 14 d 时，小鼠体质量下降明显，符合气阴两虚证动物消瘦的证候表现。饮水量是判断小鼠口干不欲饮的重要指标[23]。本实验中饮水量结果提

示，腹腔注射 ISO 造成小鼠饮水量显著下降，符合心阴虚证中口干不欲饮的证候表现。FS 和 EF 是评估心脏收缩功能最常用变量，FS 反映左心室大小百分比变化，是衡量心肌细胞收缩的重要指标；EF 则表示左心室容积百分比变化，用于评估左心室的整体泵血功能[24]。超声结果显示，随着 ISO 剂量及给药时间的增加，FS 和 EF 值均呈现不同程度的下降，在 14 d 时，各模型组与正常组比较均呈现显著差异。病理结果显示，正常组的心肌细胞排列整齐且结构完整；模型组表现出不同程度的细胞排列紊乱、炎性细胞浸润以及心肌纤维断裂等现象。ISO 注射剂量为 15 $mg \cdot kg^{-1}$ 并持续注射 14 d 的情况下，细胞形态改变更加明显，表现为肌纤维断裂和纤维组织增生。

NE 是一种儿茶酚胺类神经递质，急性应激会加剧 NE 的分泌，从而增加炎症和氧化反应[25-26]。在给予 ISO 4 d 后，小鼠血清中 NE 含量升高，表明小鼠处于应激状态。随着注射时间及剂量的增加，NE 含量逐渐下降，与抑郁模型相似[27]，符合神疲的表现。“少气则无力”，在气虚状态下，小鼠的抓力下降，且懒于运动，不动时间增加，表现出乏力特征。心脏是高耗能器官，其正常的收缩、舒张与泵血功能依赖充足的 ATP 维持。心气虚损会导致 ATP 合成出现障碍，进一步损伤心脉，耗竭心气，损伤心肌细胞[28]。本研究中，小鼠心肌组织中 ATP 的含量降低，且随着注射时间及剂量的增加，下降趋势更加显著，说明 ISO 造模使小鼠出现了较为明显的气虚表现。环核苷酸 cAMP 和 cGMP 是生物体内重要的第二信使，通常呈拮抗性，其相对浓度和比值在信息表达、调控及对维持机体平衡的重要作用[29]。cAMP 和 cGMP 的这种拮抗性调节与阴阳消长规律相吻合，美国生物学家 Goldberg 提出生物控制二元论学说——阴阳学说，认为这种拮抗调节作用可以用中医的“阴”和“阳”两词来概括[30]。研究表明，阴虚状态下 cAMP 含量、cAMP/cGMP 升高，或伴有 cGMP 含量下降[31]。本研究表明，本研究表明造模时间与造模剂量的不同会导致小鼠血清中环核苷酸含量与比值出现不同程度的改变，且受到时间因素影响更大，腹腔注射 ISO 持续 14 d 时，各剂量组均表现出 cGMP 均降低、cAMP 含量及 cAMP/cGMP 显著升高。ISO 能够造成小鼠出现阴虚的表现，且随着注射时间及注射剂量的改变，阴虚的表现更加明显。

补体 C3 是凝集素途径、替换途径和经典补体途径的交汇中心[32]，也是经典补体途径中不可或缺的核心蛋白，能够调节炎症反应[33]。研究表明，C3 与气阴两虚证和 IHD 密切相关[34-35]，C3 活化后可激活补体与凝血级联反应通路，促进血栓形成；而 C5 则通过凝血反应激活升高，导致心肌梗死[36-38]，抑制 C5 表达能够减轻心肌病理损伤[39]。本研究发现 C3 与 C5 含量显著升高，GO 与 KEGG 分析富集到补体激活、血小板激活两个生物过程及补体与凝血级联反应通路，表明 C3 和 C5 可能是 IHD 气阴两虚证重要指标，主要和补体与凝血级联反应通路相关。Cp 是一种重要的铁离子氧化酶，能够将 Fe^{2+}氧化成 Fe^{3+}从而促进铁代谢，并与铁死亡导致的心肌损伤有关[40]。铁蛋白主要含 Fe^{3+}，研究表明铁蛋白与气阴两虚证相关，益气养阴清热药能够显著降低铁蛋白的含量[41]。血红素是一种含 Fe^{2+}的四吡咯化合物，在生物体中具有重要意义[42]。血红素主要在线粒体内合成，其破坏或合成受阻会导致游离 Fe 在线粒体内积聚，引发线粒体内膜发生脂质过氧化，最终导致心肌细胞死亡[43]。本研究发现 Cp 显著上调，GO 及 KEGG 富集到线粒体内膜及线粒体膜两种细胞组分、对金属离子的反应生物过程和卟啉代谢通路，这些结果均与铁离子代谢密切相关。因此推测，铁离子可能是 IHD 气阴两虚证的重要指标之一。

综上，本研究通过综合分析中医证候指标及西医疾病指标，评估了模型的建立情况，并采用蛋白质组学技术进一步探索了最佳模型组小鼠心肌组织的蛋白变化情况，发现 IHD 气阴两虚证的发病机制可能与补体 C3、C5 以及 Cp 对铁离子的调控有关，并通过补体激活、血小板激活、对金属离子的反应等生物过程及补体与凝血级联反应、卟啉代谢两条信号通路进行调控。然而，本研究仅有直接评价，缺乏反向验证，未能以方测证的角度系统评价模型的特点。本课题组后续将根据“方证相应”理论，采用益气养阴方药对模型进行反证，并结合代谢组、转录组等技术进一步探索模型生物学基础，完善模型评价体系，为后续的新药研发提供理论依据。

利益冲突：任钧国为本刊编委，未参与本文的审稿与编辑，本文不存在任何利益冲突。

参考文献

[1]KIJONKA J，VAVRA P，PENHAKER M，et al.Present results and methods of vectorcardiographic diagnostics of ischemic heart disease[J].Comput Biol Med，2024，169：107781.

[2]TUNG L W，GROPPA E，SOLIMAN H，et al.Spatiotemporal signaling underlies progressive vascular rarefaction in myocardial infarction[J].Nat Commun，2023，14（1）：8498.

[3]NOWBAR A N，GITTO M，HOWARD J P，et al.Mortality from ischemic heart disease[J].Circ Cardiovasc Qual Outcomes，2019，12（6）：e005375.

[4]冠心病稳定型心绞痛中医诊疗指南[J].中医杂志，2019，60（21）：1880-1890.
Guideline for diagnosis and treatment of coronary heart disease with stable angina pectoris[J].J Tradit Chin Med，2019，60（21）：1880-1890.

[5]黄湘龙，李霄，杨丰文，等.1970—2021 年冠心病中医证候特征演变规律文献研究[J].中医杂志，2023，64（10）：1058-1063.

HUANG X L，LI X，YANG F W，et al.Literature study on the evolution law of traditional Chinese medicine syndrome characteristics of coronary heart disease from 1970 to 2021[J].J Tradit Chin Med，2023，64（10）：1058-1063.
[6]林增炜，吴玉芳，衣巧蕾，等.冠状动脉粥样硬化性心脏病中医证候分类临床文献研究[J].中医临床研究，2022，14（2）：53-56.
LIN Z W，WU Y F，YI Q L，et al.A study on clinical literature of TCM syndrome classification of coronary heart disease [J].Clinl Study Trad Chin Mede，2022，14（2）：53-56.
[7]王凤儒，徐京育，杜琳，等.中西医结合治疗冠心病（气阴两虚证）疗效的 Meta 分析[J].中国中医急症，2021，30（12）：2069-2073，2082.
WANG F R，XU J Y，DU L，et al.Meta-analysis of curative effect of integrated traditional Chinese and western medicine on coronary heart disease with deficiency of both Qi and Yin [J]. J Emerg Tradit Chin Med，2021，30（12）：2069-2073+2082.
[8]郝月姣，司丹丹，邵静.养阴安神健脾方治疗气阴两虚型冠心病稳定性心绞痛疗效及对中医证候与心功能的影响[J].时珍国医国药，2021，32（7）：1676-1679.
HAO Y J，SI D D，SHAO J.The therapeutic efficacy of the formula for nourishing Yin，tranquilizing the mind and invigorating the spleen in treating stable angina pectoris of coronary heart disease with Qi-Yin deficiency and its impact on traditional Chinese medicine syndromes and cardiac function[J].Lishizhen Med Mater Med Res，2021，32（7）：1676-1679.
[9]陈宇霞，张书萌，肖清玄，等.冠心病病证结合动物模型研究探讨[J].湖南中医药大学学报，2023，43（6）：1144-1148.
CHEN Y X，ZHANG S M，XIAO Q X，et al.Animal models for integrated differentiation of coronary heart disease and pattern[J].J Hunan Univ Tradit Chin Med，2023，43（6）：1144-1148.
[10]弓铭. 冠心病复合高血糖病证结合动物模型的建立及其生物学基础研究[D].北京：北京中医药大学，2021.
GONG M. Establishment of an Animal Model Integrating coronary heart disease and hyperglycemia syndrome and research on its biological basis[D].Beijing：Beijing University of Traditional Chinese Medicine，2021.
[11]任建勋，李磊，尹云泽，等.通脉养心丸对小型猪心肌缺血再灌注损伤后期气阴两虚证的干预作用[J].中草药，2018，49（7）：1612-1616.
REN J X，LI L，YIN Y Z，et al.Intervening effects of Tongmai Yangxin pills on miniature pigs with syndrome of deficiency of both Qi and Yin in later stage of myocardial ischemia reperfusion injury[J].Chin Tradit Herb Drugs，2018，49（7）：1612-1616.
[12]王朋，杨明会，李绍旦，等.冠心病心绞痛寒凝血瘀证动物模型的建立[J].中国中医基础医学杂志，2014，20（3）：309-311.
WANG P，YANG M H，LI S D，et al.Establishment of coronary heart disease and angina pectoris syndrome of cold coagulation and blood stasis animal model[J].J Basic Chin Med，2014，20（3）：309-311.
[13]朱竟赫，刘驰，刘禾，等.不同剂量异丙肾上腺素致小鼠慢性心肌缺血模型的制备及评价标准的建立[J].实验动物科学，2019，36（1）：41-47.
ZHU J H，LIU C，LIU H，et al.Preparation and evaluation of chronic myocardial ischemia model induced by different doses of isoproterenol in mice[J].Lab Anim Sci，2019，36（1）：41-47.
[14]QIAN L，XU H，YUAN R，et al.Formononetin ameliorates isoproterenol induced cardiac fibrosis through improving mitochondrial dysfunction[J].Biomed Pharmacother，2024，170：116000.
[15]YAN X，LI M，LAN P，et al.Regulation of Na^+-K^+-ATPase leads to disturbances of isoproterenol-induced cardiac dysfunction via interference of Ca^{2+} -dependent cardiac metabolism[J].Clin Sci （Lond），2024，138（1）：23-42.
[16]常厦云，朱凌鹏，王秋娟，等.红景天苷对异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌缺血的影响[J].中药药理与临床，2016，32（2）：67-70.
CHANG X Y ，ZHU LP ，WANG Q J，et al.Protective effects of salidroside on myocardial ischemia induced by isoproteronol in mice[J].Pharmacol Clin Chin Mater Med，2016，32（2）：67-70.
[17]张明倩，崔爽，梁五林，等.养心生脉颗粒对异丙肾上腺素诱导的小鼠心肌缺血及焦虑样行为的影响[J].中南药学，2022，20（7）：1521-1526.
ZHANG M Q ，CUI S，LIANG W L，et al.Effect of Yangxin Shengmai granules on myocardial ischemia and anxiety like behaviors induced by isoproterenol in mice[J].Cent South Pharm，2022，20（7）：1521-1526.
[18]杨梦，胡思远，李琳，等.基于“以方测证”探讨异丙肾上腺素诱导慢性心衰小鼠模型的中医证型及证候本质[J].中药药理与临床，2024，40（2）：101-108.
YANG M，HU S Y，LI L，et al.Chinese medical syndrome and nature of isoproterenol-induced chronic heart failure mice based on syndrome determination by formulas[J].Pharmacol Clin Chin Mater Med，2024，40（2）：101-108.
[19]任钧国，刘建勋，韦佳慧.病证结合药理学：中药药理学研究的策略与方法[J].中国中药杂志，2021，46（19）：4922-4929.

REN J G，LIU J X，WEI J H.Pharmacology of combination of disease and syndrome:strategies and methods of pharmacology of Chinese medicine[J].Chin J Chin Mater Med，2021，46（19）：4922-4929.
[20]李磊，刘建勋，任钧国，等.中医药动物模型研究现状及展望[J].中国比较医学杂志，2022，32（1）：104-110.
LI L ，LIU J X ，REN J G，et al.Research status and perspective of animal models in research and development traditional Chinese medicine[J].Chin J Comp Med，2022，32（1）：104-110.
[21]高云霄，张秋艳，彭菊琴，等.冠心病急性心肌梗死气阴两虚证动物模型的构建与评价[J].中国实验方剂学杂志，2024，30（4）：134-142.
GAO Y X，ZHANG Q Y，PENG J Q，et al.Establishment and Evaluation of Animal Model of Acute Myocardial Infarction with Syndrome of Qi and Yin Deficiency [J].Chin J Exp Tradit Med Form，2024，30（4）：134-142.
[22]YUE J，XU W，XIANG L，et al.Continuous exposure to isoprenaline reduced myotube size by delaying myoblast differentiation and fusion through the NFAT-MEF2C signaling pathway[J].Sci Rep，2023，13（1）：436.
[23]丁崧，高长久，卢芳，等.两种气阴两虚证小鼠模型制备方法比较[J].中医杂志，2023，64（4）：401-409.
DING S，GAO C J，LU F，et al.Two preparation methods of Qi and Yin deficiency syndrome mice models[J].J Tradit Chin Med，2023，64（4）：401-409.
[24]高嘉梦，胡兵，申锷.小鼠超声心动图的实验操作现状与建议[J].中华医学超声杂志（电子版），2020，17（1）：85-89.
GAO J M，HU B，SHEN E.Echocardiography in mice: procedures and standardization[J].Chin J Med Ultrasound Electron Ed，2020，17（1）：85-89.
[25]HUANG C J，WEBB H E，ZOURDOS M C，et al.Cardiovascular reactivity，stress，and physical activity[J].Front Physiol，2013，4：314.
[26]NEF H M，MöLLMANN H，AKASHI Y J，et al.Mechanisms of stress （Takotsubo） cardiomyopathy[J].Nat Rev Cardiol，2010，7（4）：187-193.
[27]谢云亮，张博.当归挥发油对小鼠抑郁行为的影响[J].现代食品科技，2024，40（3）：9-17.
XIE Y L，ZHANG B.Effects of Angelica sinensis volatile oil on depressive behavior in mice[J].Mod Food Sci Technol，2024，40（3）：9-17.
[28]李静，钟森杰，匡慧芳，等.基于“虚气留滞”理论探析心肌能量底物代谢重构的病机与中药干预研究进展[J].中国实验方剂学杂志，2023，29（17）：195-202.
LI J，ZHONG S J，KUANG H F，et al.Pathogenesis of metabolic remodeling of energy substrate based on theory of deficient Qi stagnation and progress of Chinese medicine intervention[J].Chin J Exp Tradit Med Form，2023，29（17）：195-202.
[29]张翠珍，王天芳.cAMP、cGMP 拮抗性代谢调节与中医证候关系研究进展[J].北京中医药大学学报，1999，（6）：51-53.
ZHANG C Z，WANG T F.Research progress on the relationship between antagonistic metabolic regulation of cAMP and cGMP and traditional Chinese medicine syndromes[J].J Beijing Univ Tradit Chin Med，1999，（6）：51-53.
[30]GOLDBERG N D，HADDOX M K，ZEILIG C E，et al.Cyclic GMP，cyclic AMP，and the Yin Yang hypothesis of biologic regulation[J].J Invest Dermatol，1976，67（5，Part 2）：641-645.
[31]张译心，王鑫，刘博，等.2 型糖尿病气阴两虚病证结合动物模型的制备及评价指标的建立[J].中国实验动物学报，2021，29（2）：219-229.
ZHANG Y X，WANG X，LIU B，et al.Preparation of animal model of type 2 diabetes with Qi-Yin deficiency syndrome and establishment of evaluation index[J].Acta Lab Anim Sci Sin，2021，29（2）：219-229.
[32]TANG J，JILA S，LUO T，et al.C3/C3aR inhibition alleviates GMH-IVH-induced hydrocephalus by preventing microglia-astrocyte interactions in neonatal rats[J].Neuropharmacology，2022，205：108927.
[33]唐璎娟，郭海鹏，邹蔓姝，等.柴芍开郁汤通过补体 C3/C3aR 通路改善抑郁模型大鼠海马神经炎症的研究[J].中国中药杂志，2025，50（1）：1-9.
TANG Y J，GUO H P，ZOU M S，et al.Mechanism of Chaishao Kaiyu decoction in ameliorating hippocampal neuroinflammation in depressed rats based on complement component C3/C3aR pathway[J].Chin J Chin Mater Med，2025，50（1）：1-9.
[34]郭琳琳，刘尧，陈亚文，等.铁皮枫斗颗粒对气阴两虚证小鼠环核苷酸-内分泌-免疫系统的影响[J].世界中医药，2023，18（1）：20-26.
GUO L L，LIU Y，CHEN Y W，et al.Effect of Tiepi Fengdou Granules on cyclic nucleotide-endocrine system-immune system of mice with Qi and Yin Deficiency[J].World Chin Med，2023，18（1）：20-26.
[35]栗程，刘丹.冠心病患者血清补体 C3、C4 及 HDL-C 水平分析[J].中华心脏与心律电子杂志，2018，6（2）：68-70.

LI C，LIU D.The levels of serum complement C3，C4 and HDL-C in patients with coronary heart disease[J].Chin J Heart Heart Rhythm （Electronic Edition），2018，6（2）：68-70.
[36]SAUTER R J，SAUTER M，REIS E S，et al.Functional relevance of the anaphylatoxin receptor C3aR for platelet function and arterial thrombus formation marks an intersection point between innate immunity and thrombosis[J].Circulation，2018，138（16）：1720-1735.
[37]SUBRAMANIAM S，JURK K，HOBOHM L，et al.Distinct contributions of complement factors to platelet activation and fibrin formation in venous thrombus development[J].Blood，2017，129（16）：2291-2302.
[38]REN J，TSILAFAKIS K，CHEN L，et al.Crosstalk between coagulation and complement activation promotes cardiac dysfunction in arrhythmogenic right ventricular cardiomyopathy[J].Theranostics，2021，11（12）：5939-5954.
[39]成玲俐，李志樑，付强，等.C5-siRNA 沉默补体 C5 对大鼠心肌缺血损伤影响的病理学研究[J].南方医科大学学报，2010，30（6）：1486-1488.
CHENG L L，LI Z L，FU Q，et al.Effect of C5-siRNA silencing receptor C5 on myocardial ischemia injury in rats[J].J South Med Univ，2010，30（6）：1486-1488.
[40]GAWARGI F I，MISHRA P K.Regulation of cardiac ferroptosis in diabetic human heart failure：uncovering molecular pathways and key targets[J].Cell Death Discov，2024，10（1）：268.
[41]陈远瑾.益气养阴清热方对 2 型糖尿病患者铁负荷的影响研究[D].南宁：广西中医药大学，2021.
CHEN Y J. Effect of Yiqi Yangyin Qingre recipe on iron load in patients with type 2 diabetes[D].Nanning：Guangxi University of Chinese Medicine，2021.
[42]YU F，WANG Z，ZHANG Z，et al.Biosynthesis，acquisition，regulation，and upcycling of heme：recent advances[J].Crit Rev Biotechnol，2024，44（7）：1422-1438.
[43]FANG X，WANG H，HAN D，et al.Ferroptosis as a target for protection against cardiomyopathy[J].PNAS，2019，116（7）：2672-2680.