

本文引用: 徐雅诗, 易曼婷, 田梦妍, 王聪慧, 李琳, 梁昊. 慢性心力衰竭阳虚证患者血清多组学研究[J]. 湖南中医药大学学报, 2026, 46(9): 1772-1782.

慢性心力衰竭阳虚证患者血清多组学研究

徐雅诗¹, 易曼婷¹, 田梦妍¹, 王聪慧¹, 李琳¹, 梁昊^{1,2*}

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南中医药大学中医诊断研究所, 湖南 长沙 410208

[摘要] **目的** 联合代谢组学与多肽组学分析慢性心力衰竭(CHF)阳虚证患者的血清生物学特征。**方法** 选取湖南中医药大学第一附属医院 2024 年 12 月至 2025 年 7 月收治的 CHF 阳虚证患者 30 例(阳虚组)、非阳虚证患者 30 例(非阳虚组)、健康体检者 31 例(对照组)为研究对象,采集其血液样本,并将血液离心分离出血清。研究采用非靶向代谢组学技术检测血清代谢物,运用主成分分析验证样本组间代谢轮廓的分离效果;构建偏最小二乘判别分析与正交偏最小二乘判别分析模型,结合丰度倍数变化、*P* 值及 VIP 值筛选组间差异代谢物,筛选标准为 $\log_2\text{FCI} \geq 0.2$ 、 $P < 0.05$ 和 $\text{VIP} > 1$;对获得的差异代谢物进行 GO 功能富集和 KEGG 通路富集分析。采用液相色谱-质谱检测血清多肽,经相同多元统计策略筛选差异多肽,并完成 GO 功能富集与 KEGG 通路富集分析。基于上述筛选出的差异代谢物与差异多肽,分别构建受试者工作特征(ROC)曲线,评估其作为潜在生物标志物的诊断效能,并通过 Logistic 回归构建代谢物-多肽联合诊断模型。**结果** 与对照组相比,阳虚组最终筛选出 2 个差异代谢物和 2 个差异多肽,分别是乙醛酸、尿酸、结合珠蛋白片段(肽段序列:VDSGNDVTDIAD,主蛋白质登录号:P00738)、补体 C3 片段(肽段序列:PERLGREGVQKEDIPPADLSD,主蛋白质登录号:P01024)。将以上 4 个差异分子通过 Logistic 回归构建联合诊断模型,ROC 曲线分析显示,该联合模型区分阳虚组与对照组的曲线下面积为 0.887,提示该生物标志物组合具有诊断效能。以上 4 个差异分子共涉及 5 条富集通路,分别为:氨酰-tRNA 生物合成,精氨酸和脯氨酸代谢,亚油酸代谢,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成,补体和凝血级联。**结论** CHF 阳虚证患者血清存在特征性的代谢物及多肽紊乱;乙醛酸、尿酸、结合珠蛋白片段和补体 C3 片段等可能作为潜在生物标志物,为 CHF 阳虚证的客观化辨证提供辅助依据。

[关键词] 慢性心力衰竭;阳虚证;代谢组学;多肽组学;生物标志物

[中图分类号] R256.2

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2026.09.004

Serum multi omics profiling of patients with chronic heart failure and yang deficiency pattern

XU Yashi¹, YI Manting¹, TIAN Mengyan¹, WANG Conghui¹, LI Lin¹, LIANG Hao^{1,2*}

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Institute of TCM Diagnostic, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To analyze the serum biological characteristics of patients with chronic heart failure (CHF) and yang deficiency pattern by combining metabolomics and peptidomics. **Methods** Subjects were recruited at the First Hospital of Hunan University of Chinese Medicine from December 2024 to July 2025, including 30 CHF patients with yang deficiency pattern (yang deficiency group), 30 patients with non-yang-deficiency pattern (non yang deficiency group), and 31 healthy examinees (control

[收稿日期] 2026-07-01

[基金项目] 国家重点研发计划项目(2025YFF0523900);国家自然科学基金面上项目(82274411);芙蓉实验室科技攻关项目(2025PT5018)。

[通信作者] * 梁昊,男,博士,副教授,博士研究生导师, E-mail: lianghao@hnu.edu.cn。

group). Blood samples were collected, and serum was separated via centrifugation. Untargeted metabolomics was applied to detect serum metabolites. Principal component analysis (PCA) was used to verify the separation of metabolic profiles across groups. Partial least squares–discriminant analysis (PLS–DA) and orthogonal partial least squares–discriminant analysis (OPLS–DA) models were constructed. Differential metabolites among groups were screened based on fold change, P value and variable importance in projection (VIP), with thresholds set at $|\log_2FC| \geq 0.2$, $P < 0.05$ and $VIP > 1$. GO and KEGG metabolic pathway enrichment analysis were performed on the obtained differential metabolites. Liquid chromatography–mass spectrometry (LC–MS) was used to detect serum peptides. Differential peptides were screened using the same multivariate statistical strategy, followed by GO functional enrichment and KEGG pathway enrichment analyses. Based on the screened differential metabolites and differential peptides, receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted separately to evaluate their diagnostic performance as potential biomarkers. Logistic regression was applied to establish a combined metabolite–peptide diagnostic model. **Results** Compared with the control group, two differential metabolites and two differential peptides were finally screened out in the yang deficiency group, namely glyoxylic acid, uric acid, haptoglobin fragment (peptide sequence: VDSGNDVTDIAD, master protein accession: P00738), and complement C3 fragment (peptide sequence: PERLGREGVQKEDIPPADLSD, master protein accession: P01024). A combined diagnostic model was established by Logistic regression using these four differential molecules. ROC curve analysis demonstrated that the area under the curve (AUC) of this combined model for discriminating CHF patients with yang deficiency pattern from healthy examinees was 0.887, indicating that this biomarker panel had certain diagnostic performance. These four differential molecules were collectively involved in five enriched pathways: Aminoacyl–tRNA biosynthesis, Arginine and proline metabolism, Linoleic acid metabolism, Valine, leucine and isoleucine biosynthesis, and Complement and coagulation cascades. **Conclusion** CHF patients with yang deficiency pattern show characteristic serum metabolic and peptidomic disturbances. Glyoxylic acid, uric acid, haptoglobin fragments and complement C3 fragments may serve as biomarkers for objective auxiliary pattern identification of CHF with yang deficiency pattern.

[**Keywords**] chronic heart failure; yang deficiency pattern; metabolomics; peptidomics; biomarker

慢性心力衰竭(chronic heart failure, CHF)是由各种心脏结构和(或)功能异常所致的复杂临床综合征,其主要特征为心室充盈和(或)射血功能受损,进而导致组织器官灌注不足及体、肺循环淤血^[1]。该病发病率高、再住院率高、病死率高,且患者在病因基础、临床表现、治疗反应及预后转归等方面存在明显异质性^[1]。因此,开展更为精准的分层研究具有重要意义。CHF可归属于中医学“心水”“心胀”“胸痹”“喘证”“饮证”等范畴^[2],阳虚证为其常见证候之一。

目前,针对CHF阳虚证的特异性分子标志物与多组学调控机制研究仍较为缺乏,相关客观生物学证据尚不充分。代谢组学可系统表征机体小分子代谢谱的整体改变^[3],血清内源性多肽组学则能揭示蛋白酶解加工紊乱及其介导的细胞功能调控异常。二者联合可从多维度阐释CHF阳虚证的分子特征差异及其生物学机制^[4]。因此,本研究采用血清代谢组学与多肽组学联合分析策略,设置CHF阳虚组、非阳虚组与对照组3组受试者,开展组间对比分析,筛选CHF阳虚证的潜在生物标志物,并探讨其相关生物学通路机制,构建联合诊断预测模型,将中医学理

论与现代系统生物学相结合,为阐释CHF阳虚证的证候本质提供了生物学依据。

1 资料与方法

1.1 一般资料

本研究纳入2024年12月至2025年7月就诊于湖南中医药大学第一附属医院心内科住院部的CHF患者60例,其中阳虚证及非阳虚证患者各30例。非阳虚证患者根据《慢性心力衰竭中医诊疗指南(2022年)》^[5]进一步辨证分型:气虚血瘀证18例、气阴两虚血瘀证12例。同时收集同期同年龄段体检结果正常者31例为对照组。对照组31例中,男性15例(48.4%),女性16例(51.6%);年龄(72.68±9.12)岁;收缩压(120.45±18.76) mmHg,舒张压(76.32±10.21) mmHg;心率(74.52±8.63)次/min;射血分数(left ventricular ejection fractions, LEVF)64.25%±7.34%;氨基末端B型利钠肽原(N-terminal pro-B-type natriuretic peptide, NT-proBNP)118.00(72,184) pg/mL;无冠心病、高血压、糖尿病、抗CHF及合并用药。阳虚组与非阳虚组患者在性别、年龄、心率、收缩压、舒

张压、高血压、冠心病、抗 CHF 及合并用药等方面比较,差异均无统计学意义($P>0.05$)。本试验已在中国临床试验注册中心注册(ChiCTR2000033278),并获得湖南中医药大学第一附属医院伦理委员会审查批准,伦理审批编号:HN-LL-GZR-202030。采集样本与信息前已征得患者知情同意,并对受试者的个人信息严格保密,所有资料均用于本次医学研究。

1.2 诊断标准

1.2.1 CHF 西医诊断标准 参照《中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018》^[6]中的 CHF 诊断标准:存在呼吸困难、乏力、液体潴留等典型 CHF 症状;肺部听诊可闻及啰音,心脏听诊可发现心脏扩大、心率增快、奔马律等,脑钠肽水平升高。

1.2.2 CHF 中医诊断标准 参照《慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识》^[7]中阳虚证及《慢性心力衰竭中医诊疗指南(2022 年)》^[5]中气虚血瘀证与气阴两虚血瘀证。(1)阳虚证主症:畏寒,肢冷,脘腹或腰背发凉。次症:困倦嗜睡,喜热饮,面色白,小便不利,浮肿或胸/腹水。舌象:舌质淡,舌体胖或有齿痕,苔白或白滑。脉象:脉沉细或迟、结、代。具备 2 项主症,或 1 项主症加典型舌象,或 1 项主症加 2 项次症且符合脉象,即可诊断为阳虚证。(2)气虚血瘀证主症:气短/喘息,乏力,心悸。次症:倦怠懒言,活动易劳累;白天无明显原因而不自主地出汗,活动后加重;语声低微;面色或口唇紫暗。舌脉:舌质紫暗(或有瘀斑、瘀点或舌下脉络迂曲青紫),舌体不胖不瘦,苔白,脉沉、细或虚无力。具备 2 项主症、2 项次症,结合舌脉象,即可辨证。(3)气阴两虚血瘀证主症:气短/喘息,乏力,心悸。次症:口渴或咽干;白天无明显原因而不自主地出汗且活动后加重,或睡眠中汗出异常而醒来后汗出停止;手足心发热;面色或口唇紫暗。舌脉:舌质暗红或紫暗(或有瘀斑、瘀点,或舌下脉络迂曲青紫),舌体瘦,少苔,或无苔,或剥苔,或有裂纹,脉细数无力或结代。具备 2 项主症、2 项次症,结合舌脉象,即可辨证。

1.3 阳虚组/非阳虚组纳入标准

(1)符合上述中西医诊断标准;(2)纽约心脏病协会(New York Heart Association, NYHA)心功能分级为 II~III 级^[8];(3)年龄 50~80 岁;(4)近 3 个月内未使用糖皮质激素、免疫抑制剂等可显著干扰机体代谢水平的药物;(5)CHF 受试者近 3 个月的抗 CHF

及合并用药方案保持稳定,无新增、停用或大幅度调整降糖药、降脂药、降尿酸药物及中药制剂;(6)患者自愿接受并配合检查,且已签署知情同意书。

1.4 阳虚组和非阳虚组排除标准

(1)合并急性心肌梗死、不稳定型心绞痛、心源性休克、严重心律失常(如完全性房室传导阻滞、室性心动过速等)、梗阻型心肌病、限制型心肌病、先天性心脏病、严重心脏瓣膜病、缩窄性心包炎、肺栓塞等可能严重干扰代谢者;(2)严重肝肾衰竭、恶性肿瘤、活动性自身免疫病、急慢性感染性疾病等可能干扰代谢者;(3)妊娠、哺乳期女性及精神、认知障碍者;(4)血清样本明显溶血、脂血等不合格者;(5)中医辨证信息不全,无法分型者;(6)近 3 个月内有重大外科手术或严重创伤史者;(7)拒绝接受此项研究或无法配合完成血样采集者。

1.5 临床资料收集方法

患者病例资料及实验室数据从就诊当次结果中录入。患者病例资料、实验室检查结果均取自本次住院就诊的临床检测记录。同时,通过查阅住院电子医嘱,结合现场核对患者自备药盒的方式,完整收集 CHF 受试者近 3 个月内的全部用药信息,包括抗 CHF 药物(β -受体阻滞剂、醛固酮受体拮抗剂、利尿剂等)、调脂药、降尿酸药、降糖药、抗血小板药物以及所服用的中药、中成药制剂。记录药物通用名、日剂量、用药时长,以及近 3 个月内是否存在药物新增、停用或剂量大幅调整的情况。将各类药物的使用情况作为二分类变量纳入基线资料,对阳虚组与非阳虚组的用药构成开展组间均衡性比较。

1.6 血液样本采集

使用普通采血管采集清晨空腹患者全血,从血样中分离血清,储存于 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱,用于代谢组学及多肽组学检测。

1.7 血清非靶向代谢组学研究方法

1.7.1 血清代谢物提取 样本自 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱取出后冰浴解冻,涡旋混匀,取 $6\text{ }\mu\text{L}$ 血清,加入 $24\text{ }\mu\text{L}$ 的蛋白沉淀剂(甲醇:乙腈体积比例 1:1),在室温下 $1\text{ }500\text{ r/min}$ 振荡摇床上振荡 5 min ,离心 5 min 。取上清液 $10\text{ }\mu\text{L}$,加入 $6\text{ }\mu\text{L}$ 超纯水混匀,室温条件下, $2\text{ }000\text{ r/min}$ 振荡 1 min 。采用全自动点样工作站将样品点加于 Met-Si Array[®] 芯片(杭州汇健科技有限公司,专利号:CN219676489U),点样量为 $0.8\text{ }\mu\text{L}$

孔,室温下干燥 30 min 后待测。

1.7.2 MALDI-TOF 质谱检测 血清样本的代谢组检测质谱采集由 MALDI TOF 仪器(德国布鲁克公司,型号:Autoflex Max)完成。测定模式为反射负离子,分子量范围为 40~410 m/z。

1.7.3 数据预处理与统计分析 采用 MDAS Pre-Data 2.23 软件对数据进行预处理,基于 R 语言完成数据归一化与标准化分析。进行主成分分析(principal component analysis, PCA)、偏最小二乘判别分析(partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA)及正交偏最小二乘判别分析(orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA),并采用 Wilcoxon 秩和检验进行组间差异分析。差异代谢物筛选标准为 $VIP > 1$ 、 $P < 0.05$ 且 $|\log_2 FCI| \geq 0.2$,由于血清多肽为蛋白酶解片段,表达丰度变化通常弱于完整蛋白,高阈值易遗漏具有生物学意义的小幅差异多肽。因此,该阈值结合预实验分子分布特征确定,适用于本研究血清多肽组数据筛选。进一步采用 R 语言 pheatmap 包完成差异分子层次聚类分析,并通过 clusterProfiler 包进行 KEGG 通路富集分析。

1.8 血清内源性多肽组学研究方法

1.8.1 内源性多肽提取与纯化 取血清样本离心 5 min,吸取上清液 40 μ L,加入 250 μ L 的 1%三氟乙酸水溶液,沸水浴加热 10 min 后冰浴快速冷却。采用经 70%乙醇预处理的 10 kDa 超滤管,加入处理后的样本,离心 35 min,收集超滤液并冷冻。加入含 0.5%三氟乙酸的 5%乙腈水溶液复溶后,使用 C_{18} 固相萃取柱进行脱盐纯化,依次以 50%乙腈、5%乙腈(含 0.5%三氟乙酸)平衡,5%乙腈(含 0.5%三氟乙酸)洗涤,70%乙腈(含 0.1%三氟乙酸)洗脱,洗脱液经冻干后以 0.1%甲酸水溶液复溶,待质谱检测。

1.8.2 液相色谱-高分辨质谱检测 采用液相色谱仪(赛默飞世尔科技公司,型号:Vanquish Flex)联合四极杆-轨道阱高分辨质谱仪(赛默飞世尔科技公司,型号:Orbitrap Exploris™ 480)进行分析。流动相 A 为 0.1%甲酸水溶液,流动相 B 为含 0.1%甲酸和 80%乙腈的水溶液。色谱分离采用 Thermo PEPMAP C_{18} 分析柱(2 μ m, 75 μ m $\times$ 25 cm),柱温 55 $^{\circ}$ C,按梯度进行洗脱,流速在 3.5~66.5 min 内为 300 nL/min,其余时段为 500 nL/min。采用纳升电喷雾电离源,离子

源电压 2.2 kV;一级质谱扫描范围 350~2 000 m/z,分辨率 120 000;二级质谱扫描范围 120~2 000 m/z,分辨率 60 000。以数据依赖型扫描模式采集数据,循环 2.0 s, HCD 碎裂能量 30%,动态排除时间 45 s。

1.8.3 数据库检索与相对定量 使用 Proteome Discoverer 2.5 软件进行搜库,数据库为 UniProt 人源数据库,酶切方式设为无酶切,肽段长度 4~144 个氨基酸,母离子质量偏差 10 ppm,碎片离子偏差 0.02 Da,甲硫氨酸氧化为可变修饰,蛋白与 PSM 水平 FDR 均设为 1%。以混合 pool 样本为参照,采用无标记定量方法计算各肽段的相对丰度比,用于后续统计分析。

1.8.4 基于 MALDI-TOF 平台的多肽检测 采用血清多肽提取试剂盒(杭州汇健科技有限公司,型号:Bio-pSi®)富集多肽;取 10 μ L 血清与 70 μ L 超纯水混匀,加入 96 孔板,室温下 1 350 r/min 振荡孵育 15 min,离心弃上清后以超纯水洗涤。配制含 α -氰基-4-羟基肉桂酸的基质溶液,取处理后样品与基质混匀,点样于金属靶板,真空干燥后使用 MALDI-TOF 质谱仪(微康医疗科技有限公司,型号:ClinMS-Plat I)检测,采用线性正离子模式,质量范围为 680~18 600 Da。

1.8.5 数据预处理与统计分析 数据预处理与统计分析步骤同“1.7.3”。

1.9 统计学分析

1.9.1 临床基线资料比较 采用 SPSS 26.0 统计软件进行数据分析。计量资料经正态性检验,符合正态分布者以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,两组间比较采用独立样本 t 检验;非正态分布计量资料以“ $M(P_{25}, P_{75})$ ”表示,组间比较采用 Mann-Whitney U 检验。计数资料以例数或百分比描述,采用 χ^2 检验,当理论频数 < 5 次时采用 Fisher 确切概率法。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

1.9.2 基于 Logistic 回归与受试者工作特征曲线的诊断模型构建 运用 SPSS 26.0 软件构建 CHF 阳虚证诊断模型。将筛选得到的差异代谢物和差异多肽纳入二分类 Logistic 回归分析,筛选具有独立辨证价值的特征分子,并输出样本预测概率(predicted probability, Pre);以各单一差异分子、Pre 分别作为检验变量,以是否为 CHF 阳虚证作为二分类状态变

量,绘制受试者工作特征(receiver operating characteristic, ROC)曲线,计算各差异分子及联合模型的曲线下面积(area under the curve, AUC),量化评价单一分子与联合模型对 CHF 阳虚证的辨证诊断效能。以 $P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

2 结果

2.1 血清代谢组学结果

2.1.1 血清代谢 PCA、PLS-DA、OPLS-DA 分析 PCA 得分图显示,第一主成分(first principal component, PC1)和第二主成分(second principal component, PC2)的累计解释率为 36.99%。3 组样本在得分图上呈部分分离趋势,其中对照组与阳虚组沿 PC1 方向存在明显分离。详见图 1。PLS-DA 得分图显示,第一主成分得分(component 1 score, $t[1]$)和第二主成分得分(component 2 score, $t[2]$)的累计解释率为 24.4%,3 组样本在得分图上呈明显分离趋势,详见图 2A。阳虚组与对照组相比, X 矩阵累计解释度(cumulative explained variation in the X matrix, R^2X)=0.222、 Y 矩阵累计解释度(cumulative explained variation in the Y matrix, R^2Y)=0.67、交叉验证解释方差(cross-validated explained variance, Q^2)=0.418。非阳虚组与对照组相比, R^2X =0.281、 R^2Y =0.726、 Q^2 =0.561;阳虚组与非阳虚组相比, R^2X =0.242、 R^2Y =0.397、 Q^2 =-0.174。由此可见,阳虚组与对照组的区分

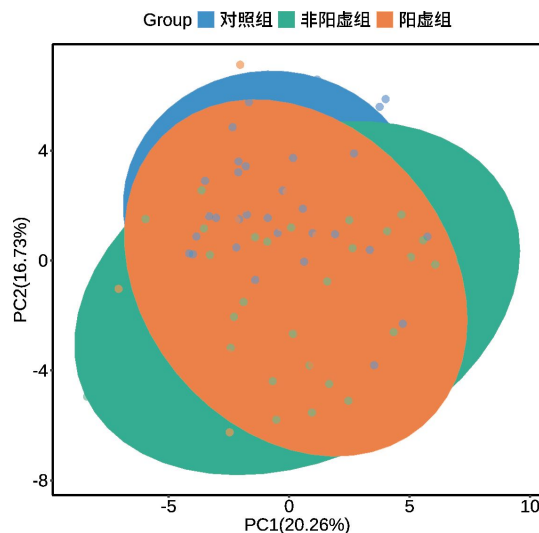


图 1 血清代谢样本的 PCA 得分散点图

Fig.1 PCA score scatter plot of serum metabolic samples

效果更好,详见图 2B—D。置换检验结果显示, R^2Y 的置换检验 P 值(permutation P -value for R^2Y , pR^2Y)=0.05、 Q^2 的置换检验 P 值(permutation P -value for Q^2 , pQ^2)=0.01; pR^2Y =0.01、 pQ^2 =0.01; pR^2Y =0.01、 pQ^2 =0.01;提示 3 组模型不存在明显过拟合,详见图 2E—G。阳虚组与非阳虚组相比, pR^2Y =0.95、 pQ^2 =0.31,提示模型存在过拟合风险,详见图 2H。

2.1.2 差异代谢物层次聚类分析 对照组、阳虚组、非阳虚组对差异代谢物表达量的层次聚类分析,详见图 3。

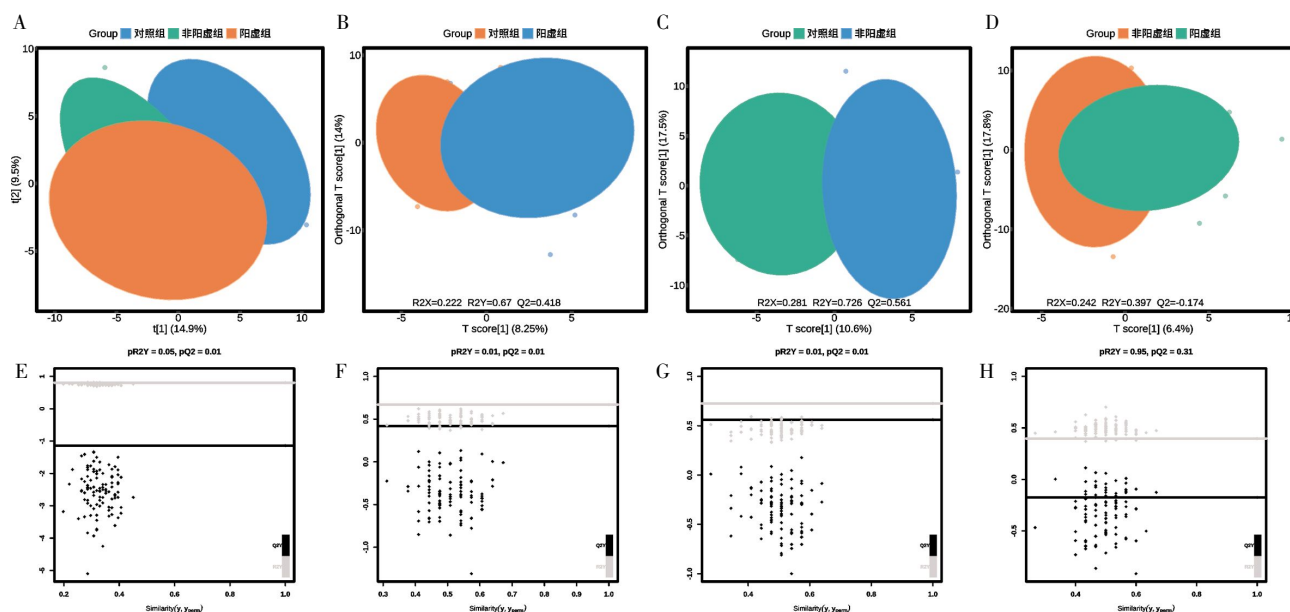


图 2 血清代谢物样本的多元统计分析

Fig.2 Multivariate statistical analysis of serum metabolite samples

注:A 为 PLS-DA 分析;B、C、D 为 OPLS-DA 分析;E、F、G、H 分别是 A、B、C、D 的置换检验。



图 3 差异代谢物层次聚类热图

Fig.3 Hierarchical clustering heatmap of differential metabolites

2.1.3 核心差异代谢物筛选与代谢通路富集 以 $VIP>1$ 、 $P<0.05$ 且 $|\log_2FC|\geq 0.2$ 为差异代谢物筛选标准,并构建 ROC 曲线验证其诊断效能,共筛选出 2 个阳虚证生物标志物,分别是乙醛酸、尿酸,详见图 4。通路富集分析显示,乙醛酸显著富集于氨酰-tRNA 生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢($P<0.05$);尿酸

显著富集于氨酰-tRNA 生物合成,精氨酸和脯氨酸代谢,亚油酸代谢,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成($P<0.05$),详见图 5。

2.2 血清多肽组学结果

2.2.1 血清多肽 PCA、PLS-DA、OPLS-DA 分析 PCA 得分图显示,PC1 和 PC2 的累计解释率为 45.26%。

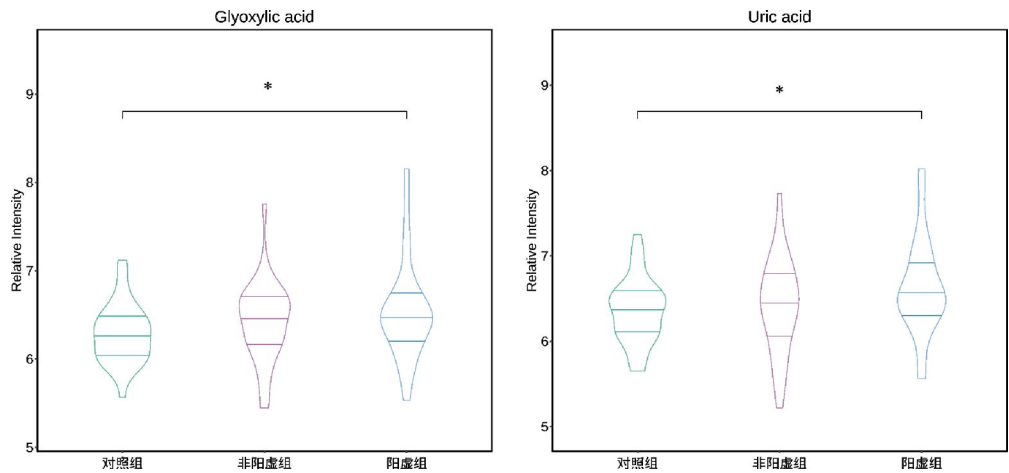


图 4 差异代谢物小提琴图

Fig.4 Violin plot of differential metabolites

注: Glyoxylic acid.乙醛酸; Uric acid.尿酸。* $P<0.05$ 。

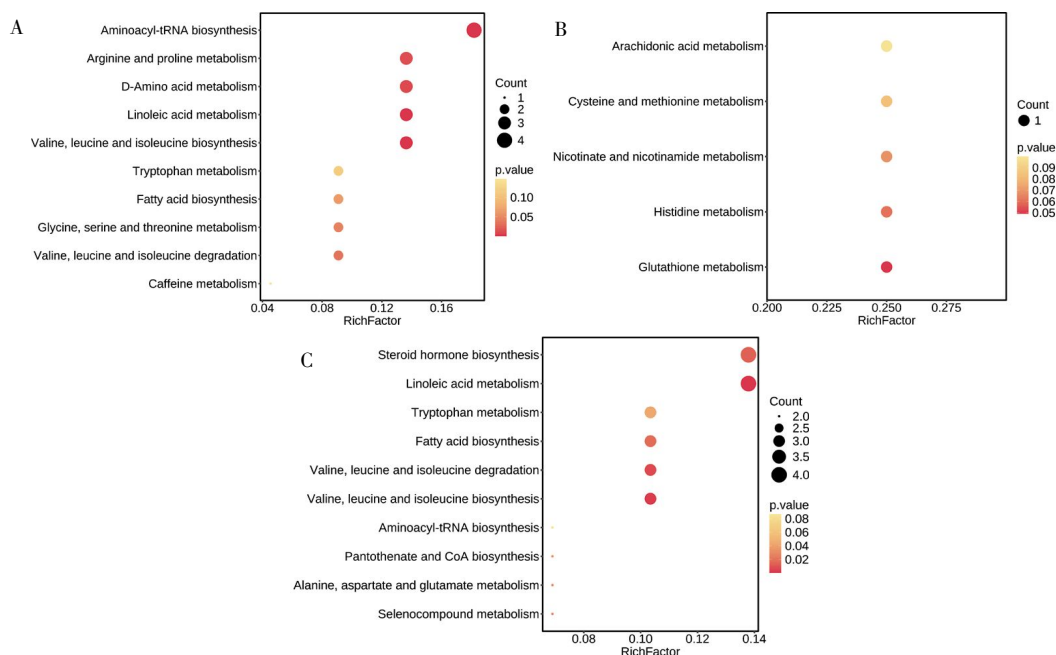


图5 差异代谢物 GO 富集通路气泡图

Fig.5 Bubble plot of GO enriched pathways for differential metabolites

注: A.阳虚组与对照组比较结果; B.阳虚组与非阳虚组比较结果; C.非阳虚组与对照组比较结果。

3组样本在得分图上呈现一定的分离趋势,详见图6。PLS-DA 得分图显示, $t[1]$ 和 $t[2]$ 的累计解释率为 23.95%, 3 组样本在得分图上呈分离趋势,详见图 7A。OPLS-DA 结果显示,阳虚组与对照组比较结果 $R^2X=0.275$ 、 $R^2Y=0.759$ 、 $Q^2=0.52$, 相较于阳虚组与非阳虚组比较结果 $R^2X=0.211$ 、 $R^2Y=0.456$ 、 $Q^2=-0.162$, 以及非阳虚组与对照组比较结果 $R^2X=0.273$ 、 $R^2Y=0.71$ 、 $Q^2=0.483$, 区分效果更好,详见图 7B—D。置换检验结果显示, $pR^2Y=0.01$ 、 $pQ^2=0.01$, 提示模型具有统计学意义,详见图 7E—H; $pR^2Y=0.07$ 、 $pQ^2=0.19$, 提示该模型组间区分效应未达到统计学显著水平,详见图 7G。

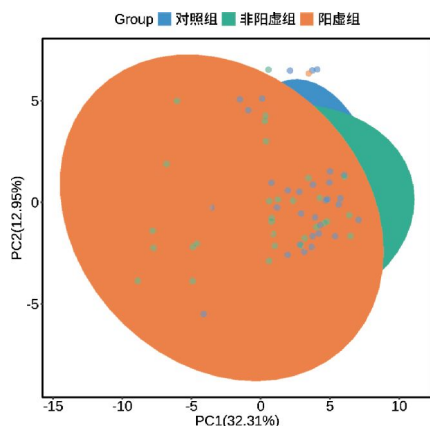


图6 血清多肽样本的 PCA 得分散点图

Fig.6 PCA score scatter plot of serum polypeptide samples

2.2.2 差异代谢物层次聚类分析 对照组、阳虚组、非阳虚组对不同多肽之间的表达差异进行层次聚类分析,详见图 8。

2.2.3 核心差异多肽筛选与通路富集分析 以 $VIP>1$ 、 $P<0.05$ 且 $|\log_2FC| \geq 0.2$ 为差异多肽筛选标准,并构建 ROC 曲线验证其诊断效能,共筛选出 2 个阳虚组生物标志物,分别是结合珠蛋白片段(肽段序列: VDSGNDVTDIAD, 主蛋白质登录号: P00738)和补体 C3 片段(肽段序列: PERLGREGVQKEDIPPADLSD, 主蛋白质登录号: P01024),详见图 9。通路富集分析显示, VDSGNDVTDIAD 和 PERLGREGVQKEDIPPADLSD 均富集于补体和凝血级联($P<0.05$),详见图 10。

2.2.4 差异多肽 GO 富集分析 GO 富集分析显示, 阳虚组的差异多肽主要涉及补体介导的免疫炎症应答、脂蛋白代谢重塑及蛋白酶活性调控等生物学过程。其中,补体经典激活途径与体液免疫应答的显著富集,结合差异多肽中补体 C3 片段的鉴定结果提示,阳虚证患者可能存在补体系统的过度激活。同时,脂蛋白颗粒相关条目在 3 个 GO 维度的一致性富集,与代谢组学发现的亚油酸代谢及支链氨基酸代谢通路异常相互印证,提示阳虚证存在以脂质代谢重塑为核心的能量代谢障碍。上述结果从多肽

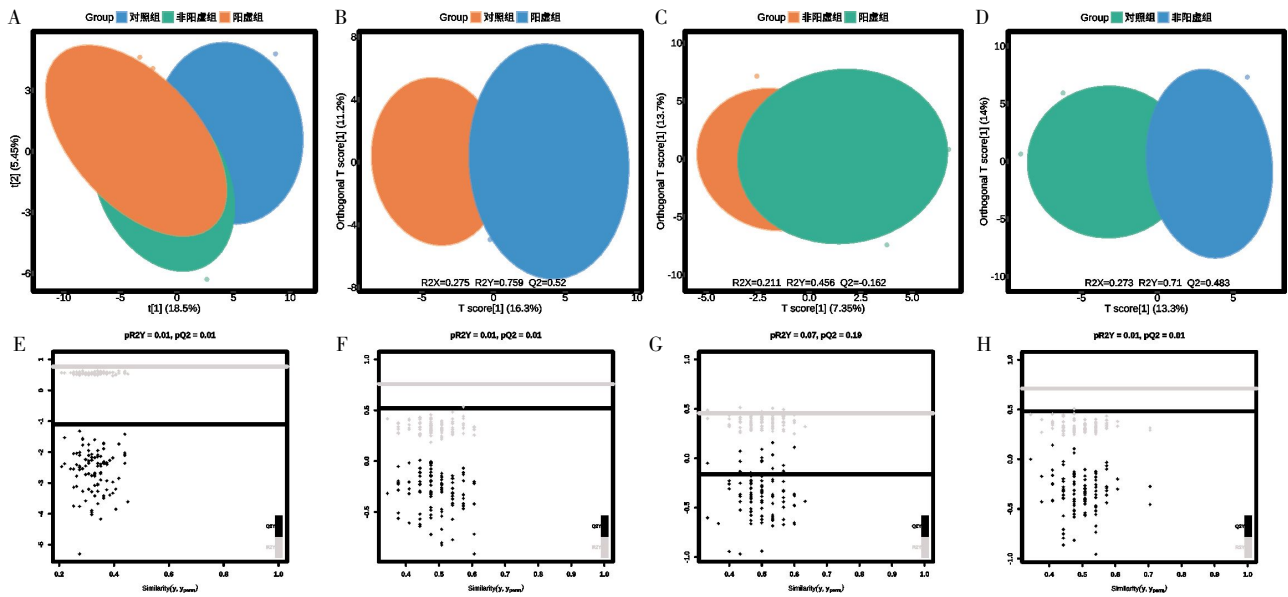


图 7 血清多肽样本的多元统计分析

Fig.7 Multivariate statistical analysis of serum polypeptide samples

注:A 为 PLS-DA 分析;B、C、D 为 OPLS-DA 分析;E、F、G、H 分别是 A、B、C、D 的置换检验。

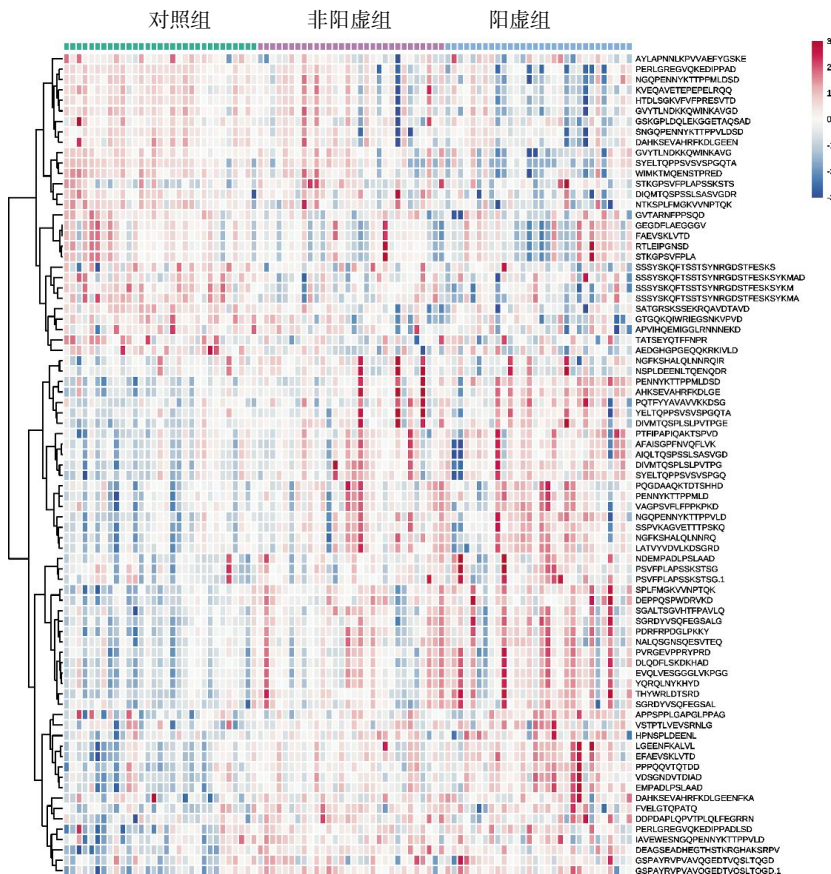


图 8 差异多肽层次聚类热图

Fig.8 Hierarchical clustering heatmap of differential polypeptides

水平为阳虚证的生物学本质提供了实验证据,详见图11。

2.3 核心差异分子诊断效能分析

ROC 曲线分析显示,乙醛酸、尿酸、VDSGND-

VTDIAD、PERLGREGVQKEDIPPADLSD 的 AUC 值分别为 0.649、0.648、0.812、0.752,这 4 个差异分子的联合模型 AUC 为 0.887,联合模型表现明显优于单一模型,具有一定的诊断预测价值。详见图 12。

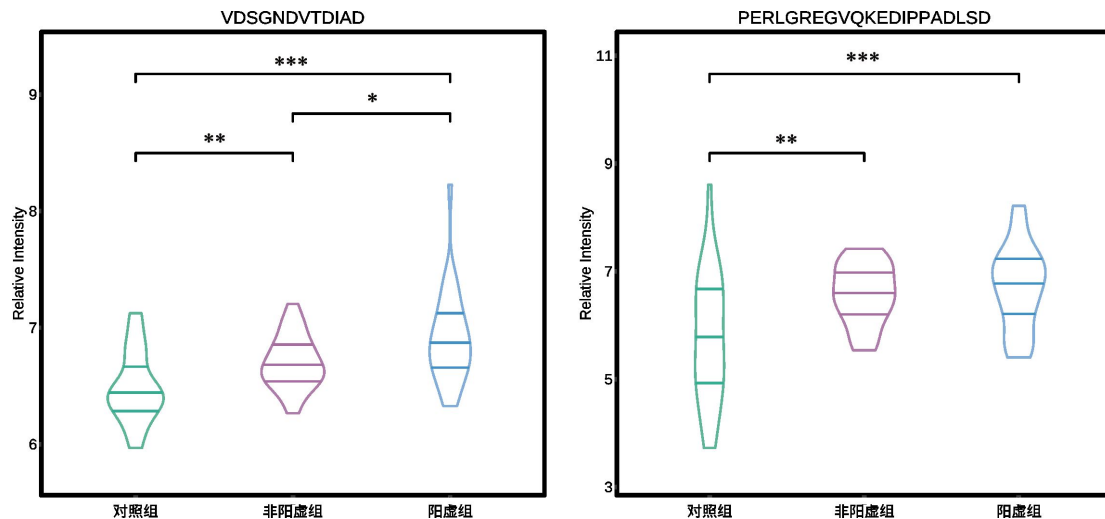


图 9 差异多肽小提琴图

Fig.9 Violin plot of differential polypeptides

注:VDSGNDVTDIAD.结合珠蛋白片段;PERLGREGVQKEDIPPADLSD.补体 C3 片段。* $P<0.05$;** $P<0.01$;*** $P<0.001$ 。

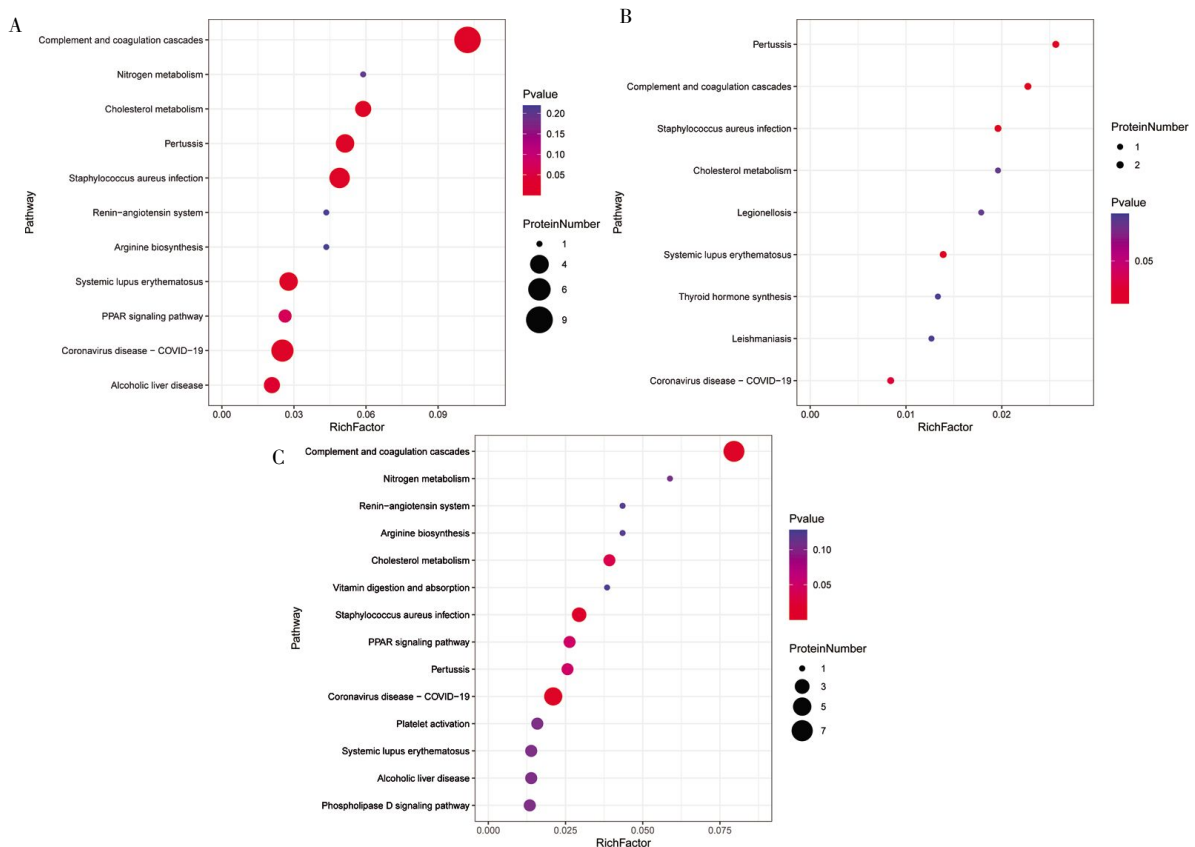


图 10 差异多肽 KEGG 富集通路气泡图

Fig.10 Bubble plot of KEGG enriched pathways for differential polypeptides

注:A.阳虚组与对照组比较结果;B.阳虚组与非阳虚组比较结果;C.非阳虚组与对照组比较结果。

3 讨论

联合多组学分析策略在识别疾病特有表型、筛选生物标志物方面具备突出优势^[9]。本研究创新性整合代谢组学与多肽组学技术,实现上游小分子代谢底物、下游功能性多肽效应的联动分析,弥补单

一技术研究的信息缺失。KEGG 通路富集结果显示,乙醛酸显著富集于氨酰-tRNA 生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢两条通路。氨酰-tRNA 生物合成是蛋白质翻译的关键环节,负责将特定氨基酸与其对应的 tRNA 连接,其功能异常可直接影响蛋白质合成效率^[10]。氨酰-tRNA 合成酶参与 CHF 的发生及病理性心脏重

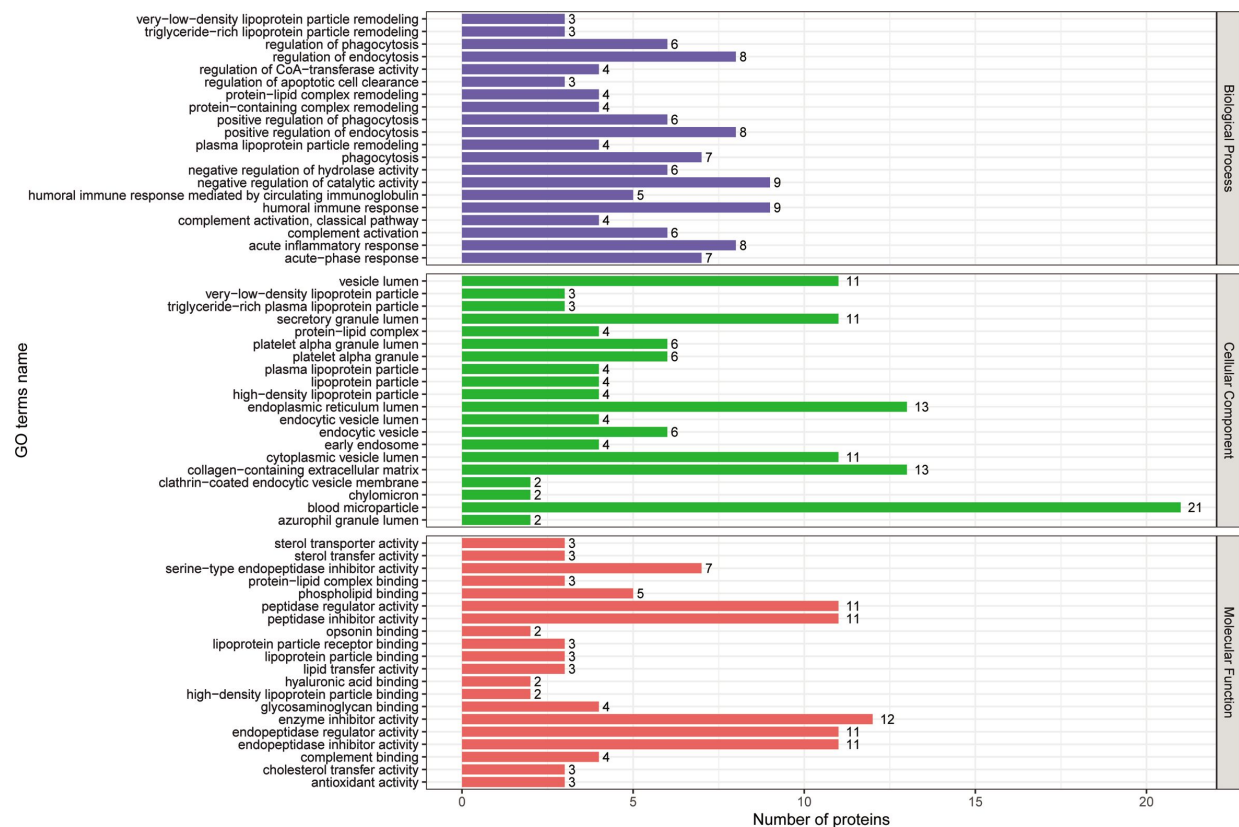


图 11 多肽匹配蛋白的白在 GO 二级分类中的统计分布图

Fig.11 Distribution of identified proteins across level-2 GO categories

注:GO 分类图显示 3 个本体中涉及的各条目的分布情况。

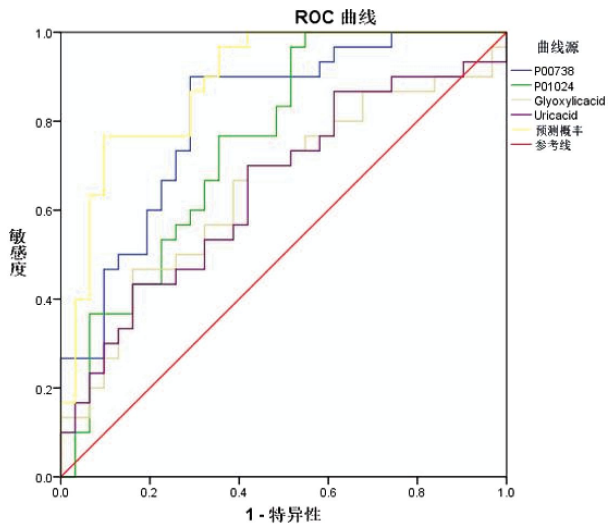


图 12 血清潜在生物标志物的 ROC 分析

Fig.12 ROC analysis of potential serum biomarkers

构;在肥厚型心肌病患者中,氨酰-tRNA 生物合成通路在运动应激下呈现显著差异调节^[11]。精氨酸作为一氧化氮合成的前体,其代谢异常可影响血管内皮功能与心肌收缩力;脯氨酸则是胶原合成的关键原料,其代谢紊乱可能参与心肌纤维化的进程^[12]。因此,CHF 阳虚证患者可能存在蛋白质合成效率受损与氨基酸代谢重编程的双重代谢异常。

尿酸的富集范围更为广泛,涉及氨酰-tRNA 生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢、亚油酸代谢及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成 4 条通路。亚油酸代谢通路在心力衰竭中的意义尤为突出。先天性心脏病所致 CHF 婴儿的肠道代谢物分析显示,亚油酸代谢通路显著上调^[13]。生脉饮方对 CHF 大鼠的心脏保护作用亦被证实与调节亚油酸代谢通路密切相关^[14]。此外,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸(支链氨基酸,BCAAs)的生物合成通路在 CHF 中具有重要临床意义。益气复脉冻干注射液可显著调节 CHF 小鼠的支链氨基酸生物合成代谢模式^[15]。尿酸的广泛富集表明,嘌呤代谢终产物与氨基酸代谢、脂质代谢之间存在复杂的交叉调控网络,其紊乱可能从多个维度促进 CHF 阳虚证的病理进展。

结合珠蛋白片段(肽段序列:VDSGNDVTDIAD,主蛋白质登录号:P00738)和补体 C3 片段(肽段序列:PERLGREGVQKEDIPPADLSD,主蛋白质登录号:P01024)均显著富集于补体和凝血级联通路。血清多肽组学研究已证实,补体和凝血级联通路与 CHF 的临床结局显著相关^[16]。补体系统作为先天免疫的

核心效应机制,在 CHF 患者中呈异常激活状态。结合珠蛋白作为一种急性期反应蛋白,在中和与清除游离血红素方面发挥重要作用,其基因型已被证实与急性心肌梗死、CHF 及心脏移植排斥的预后相关^[7]。两条多肽同时富集于补体和凝血级联通路,提示 CHF 阳虚证患者可能存在补体系统过度激活与凝血-纤溶平衡失调的协同病理状态。

综上所述,本研究的差异代谢物与差异多肽富集分析从氨基酸代谢重编程(氨酰-tRNA 生物合成、精氨酸和脯氨酸代谢、支链氨基酸生物合成)、脂质代谢紊乱(亚油酸代谢)及免疫炎症-凝血失调(补体和凝血级联)3 个维度揭示了 CHF 阳虚证的分子病理特征。这一发现为理解 CHF 阳虚证的生物学本质提供了多层次依据。最后,本研究筛选获得的生物标志物主要用于区分 CHF 阳虚证患者与健康人群,对 CHF 不同中医证型之间的鉴别效能有限,未来可以整合转录组学、代谢组学与多肽组学数据,构建“基因-多肽-代谢”级联调控网络。

参考文献

- [1] 中国老年医学学会心电与心功能分会,中国心衰中心联盟专家委员会,中华医学会《中华全科医师杂志》编辑委员会.心力衰竭早期筛查与一级预防中国专家共识(2024 年)[J].中华全科医师杂志,2024,23(1):7-18.
- [2] 王嘉伟,林俊佐,凡永杰,等.代谢组学在慢性心力衰竭中医证候辨识及治疗中的应用[J].中国民间疗法,2026,34(10):116-118.
- [3] 贺映辉,高元峰,陈春茗,等.基于 LC-MS 非靶向代谢组学技术探讨经典名方化肝煎干预 CCL₄ 诱导肝纤维化大鼠的作用机制[J].湖南中医药大学学报,2026,46(2):288-296.
- [4] 陈美洁,陶力野,郑俊浩,等.基于血清多肽组学的肝内胆管癌早期诊断模型研究[J].中华外科杂志,2026,64(4):361-372.
- [5] 中华中医药学会慢性心力衰竭中医诊疗指南项目组.慢性心力衰竭中医诊疗指南(2022 年)[J].中医杂志,2023,64(7):743-756.
- [6] 中华医学会心血管病学分会心力衰竭学组,中国医师协会心力衰竭专业委员会中华心血管病杂志编辑委员会.中国心力衰竭诊断和治疗指南 2018[J].中华心血管病杂志,2018,46(10):760-789.
- [7] 中国中西医结合学会心血管病专业委员会,中国医师协会中西医结合医师分会心血管病学专家委员会.慢性心力衰竭中西医结合诊疗专家共识[J].中国中西医结合杂志,2016,36(2):133-141.
- [8] Criteria Committee of the New York Heart Association. Nomenclature and criteria for diagnosis of diseases of the heart and great vessels[M]. 9th ed. Boston: Little, Brown & Co, 1994: 253-256.
- [9] 彭红叶,鲁春丽,黄晓强,等.多组学技术在中医药领域中的应用现状与前景分析[J].中医杂志,2024,65(8):775-781.
- [10] 张丁山,伍浩,兰琪,等.代谢组学视角下中医药防治心力衰竭概况[J/OL].中医学报,[2024-10-21].<https://link.cnki.net/urlid/41.1411.R.20241018.1010.026>.
- [11] 杨春阳,黄钰婷,樊官伟.支链氨基酸代谢与心力衰竭关系的研究进展[J].中西医结合心脑血管病杂志,2022,20(14):2558-2560.
- [12] Sun H P, Olson K C, Gao C, et al. Catabolic defect of branched-chain amino acids promotes heart failure[J].Circulation,2016,133(21):2038-2049.
- [13] Zhang Q L, Ou Q X, Wang Y, et al. Metabolomic analysis reveals the role of gut microbiota metabolic disorders in heart failure due to congenital heart disease[J].Scientific Reports,2026,16:15381.
- [14] Wang S C, Gan J L, Li J F, et al. Shengmai Yin formula exerts cardioprotective effects on rats with chronic heart failure via regulating Linoleic Acid metabolism[J].Prostaglandins & Other Lipid Mediators,2022,158:106608.
- [15] Yuan G Y, Liu Z L, Lai Q, et al. HPLC-QTOF/MS-based metabolomics to explore the molecular mechanisms of Yiqi Fumai Lyophilized Injection in heart failure mice[J].Journal of Separation Science,2021,44(13):2545-2563.
- [16] Graves K L, Vigerust D J. Hp: An inflammatory indicator in cardiovascular disease[J].Future Cardiology,2016,12(4):471-481.
- [17] Zheng S D, Wu H J, Yu S P, et al. Shenfu Injection suppresses inflammation by targeting haptoglobin and pentraxin 3 in rats with chronic ischemic heart failure [J].Chinese Journal of Integrative Medicine,2015,21(1):22-28.

(本文编辑 徐易琳)