◆临床证治◆

锌指转录因子在冠心病心力衰竭气虚血瘀证患者血清中的表达及意义研究

张蕾[1,2]，何建成[1]，李小茜[1]，沈琳[3]，曹雪滨[4]，王代明[5]

1. 上海中医药大学，上海 201203
2. 河南科技大学第一附属医院（河南科技大学临床医学院），河南 洛阳 471003
3. 上海中医药大学附属龙华医院，上海 201203
4. 中国人民解放军252医院，河北 保定 071000
5. 上海市公惠医院，上海 201203

［摘要］**目的：**研究锌指转录因子（GATA4）在冠心病心力衰竭（HF）气虚血瘀证患者血清中的表达及其与临床指标的相关性，初步拟定该证候的诊断界值。**方法：**收集冠心病HF气虚血瘀证患者及健康对照者各30例，酶联免疫吸附法（ELISA）检测血清中GATA4的含量。**结果：**GATA4在HF气虚血瘀证患者血清的含量为（5 098.14±1 446.98）pg/mL，明显高于健康对照组（2 819.28±1 022.74）pg/mL，差异有统计学意义（$P<0.05$）；且随纽约心脏病协会（NYHA）心功能分级的增加，HF气虚血瘀证患者血清中GATA4含量不断升高，差异有统计学意义（$P<0.05$）；HF气虚血瘀证患者血清GATA4与NYHA心功能分级呈正相关性（$r=0.914$，$P<0.001$），与B型钠尿肽（BNP）（$r=0.697$，$P<0.001$）呈正相关性，与左心室射血分数（LVEF）呈负相关性（$r=-0.592$，$P=0.001$）。绘制ROC曲线初步拟定血清清中GATA4诊断HF气滞血瘀证的界值为3 777.49 pg/mL，曲线下面积为0.92。**结论：**GATA4能够反映HF病情轻重程度，可为HF气虚血瘀证提供客观化、量化的参考和依据。

［关键词］心力衰竭；冠心病；气虚血瘀证；锌指转录因子；诊断界值
［中图分类号］R541.6+1 ［文献标志码］A ［文章编号］0256-7415（2023）20-0052-05
DOI：10.13457/j.cnki.jncm.2023.20.010

Study on Serum Expression and Significance of Zinc Finger Transcription Factor in Patients with Heart Failure in Coronary Heart Disease with Qi Deficiency and Blood Stasis Syndrome

ZHANG Lei[1,2], *HE Jiancheng*[1], *LI Xiaoqian*[1], *SHEN Lin*[3], *CAO Xuebin*[4], *WANG Daiming*[5]

1. Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 2. The First Affiliated Hospital(College of Clinical Medicine) of Henan University of Science and Technology, Luoyang Henan 471003, China; 3. Longhua Hospital Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China; 4. Chinese People's Liberation Army 252 Hospital, Baoding Hebei 071000, China; 5. Shanghai Gonghui Hospital, Shanghai 201203, China

Abstract: Objective: To study the expression of zinc finger transcription factor (GATA4) in the serum of patients with heart failure (HF) in coronary heart disease with qi deficiency and blood stasis syndrome and its

［收稿日期］2023-02-24
［修回日期］2023-08-28
［基金项目］国家自然科学基金青年项目（81803996）
［作者简介］张蕾（1987-），女，医学博士，E-mail：syzl02018@163.com。
［通信作者］何建成（1966-），男，教授，博士研究生导师，E-mail：hejc8163@163.com。李小茜（1979-），女，副教授，E-mail：lixiaoqian5258@126.com。

correlation with clinical indexes，and to preliminarily formulate the diagnostic threshold for the syndrome. **Methods**：A total of 30 patients with HF in coronary heart disease with qi deficiency and blood stasis syndrome and 30 healthy people for control were collected. The enzyme–linked immunosorbent assay method (ELISA) was applied to detect the content of GATA4 in serum. **Results**：The content of GATA4 in serum of patients with HF with qi deficiency and blood stasis syndrome was 5 098.14 ± 1 446.98 pg/mL，significantly higher than that of 2 819.28 ± 1 022.74 pg/mL in the healthy control group，the difference being significant ($P<0.05$). With the increase of heart function grading by the New York Heart Association (NYHA)，the serum GATA4 content in patients with HF with qi deficiency and blood stasis syndrome continues to increase，the difference being significant ($P<0.05$). Serum GATA4 was positively correlated with NYHA heart function grading (r=0.914，$P<0.001$)，positively correlated with BNP (r=0.697，$P<0.001$)，and negatively correlated with left ventricular ejection fraction (LVEF) in HF patients with qi deficiency and blood stasis syndrome (r=–0.592，P=0.001). The ROC was drawn to preliminarily draw the cut–off value of GATA4 in serum for diagnosing HF with qi stagnation and blood stasis syndrome，which was 3 777.49 pg/mL，and the area under the curve is 0.92. **Conclusion**：GATA4 can reflect the severity of HF and provide objective and quantitative reference and basis for HF with qi deficiency and blood stasis syndrome.

Keywords：Heart failure；Coronary heart disease；Qi deficiency and blood stasis syndrome；Zinc finger transcription factor；Diagnostic threshold

心力衰竭(HF)常见于多种心血管疾病终末期，发病率逐年攀升。尽管近年来新技术、新治疗方法不断出现，HF的治疗有了极大改善，但其死亡率仍居高不下[1]。中医中药防治本病的机制与方法得到广泛关注，证候研究尤显重要。本课题组前期研究发现，HF的中医病因病机以虚实夹杂为特点，气虚血瘀证为其临床最为常见的证候之一[2]。锌指转录因子(GATA4)是调控心肌基因表达的重要转录因子，在心脏中高表达，是多种刺激和信号通路的下游效应因子，参与心肌肥厚、HF的进程[3-4]。本研究在病证结合原则的指导下，选取HF气虚血瘀证为研究对象，通过测定血清样本中GATA4含量，综合运用多种统计学分析方法，初步拟定本病气虚血瘀证的诊断界值，旨在全面促进本病的证候标准化、规范化进程，为临床辨证论治提供参考与依据。

1 临床资料

1.1 诊断标准 参考《中国心血管健康与疾病报告2021概要》[1]中HF的诊断标准；心功能分级标准按美国纽约心脏协会(NYHA)心功能分级[5]。

1.2 辨证标准 参考《中药新药临床研究指导原则(试行)》[6]对心力衰竭气虚血瘀证的辨证标准，符合下列主症加次症各2项及以上。主症：气短/喘息、乏力、心悸。次症：倦怠懒言，活动易劳累；自汗；语声低微；面色/口唇紫暗。舌脉：舌质暗(或有瘀斑、瘀点或舌下脉络迂曲青紫)，苔薄白，脉沉、细、涩或虚无力。

1.3 纳入标准 符合HF诊断标准，且以冠心病为原发病的HF；年龄18～85岁；临床资料齐全；签署知情同意书。

1.4 排除标准 合并急性心肌梗死、心源性休克、严重心律失常伴有血流动力学改变者；并发感染者；合并严重的肝功能不全；合并血液系统疾病、恶性肿瘤者；妊娠或哺乳期妇女；精神病、传染病患者。

1.5 一般资料 观察对象为2019年12月—2021年6月上海中医药大学附属龙华医院心内科住院患者。根据纳入、排除标准及HF中医证候诊断标准，选入HF气虚血瘀证患者30例，选取30例上海中医药大学教职工体检人员作为健康对照组。本研究经上海中医药大学附属龙华医院医学伦理委员

会批准(2018LCSY447)。

2 研究方法

2.1 临床资料收集与数据录入 记录入组患者年龄、性别、基础疾病、NYHA心功能分级、左心室射血分数(LVEF)等临床资料。采用双人双机独立数据录入整理的方式，再统一进行数据核对及逻辑检查，找出错误并及时更正，如遇到意见不能统一的情况，通过联系数据录入者、调取原始病例等方式予以核查。

经过培训的临床医师根据前期制定的纳入、排除标准，对住院HF患者进行筛选入组，由2位或以上副主任医师对入组的HF患者进行中医辨证分型复核，规范HF患者临床资料信息，协调处理资料信息及样本采集过程中出现的特殊情况。

2.2 血清样本采集和指标检测方法 入组患者于清晨空腹采静脉血3 mL置于EDTA抗凝管中，4 ℃静置2 h后，3 000 r/min离心10 min，吸取上清至离心管，置于-80 ℃冰箱保存备用。应用酶联免疫吸附法(ELISA)检测血清样本中GATA4含量。GATA4试剂盒厂家及货号：上海美轩生物科技有限公司，货号：MEXN-H0832，测量范围为250～8 000 pg/mL。具体实验操作严格按照试剂盒说明书进行。

3 统计学方法

利用SPSS24.0统计学软件进行数据分析。计量资料需进行正态分布检验和方差齐性检验，符合正态分布的计量资料以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示，非正态分布的计量资料用中位数(四分位数)[$M(P_{25}, P_{75})$]表示；计数资料用频数(构成比)进行统计描述。数据符合正态分布且方差齐时，2组均数比较用独立样本t检验，不符合正态分布或方差不齐时，则采用Mann-Whitney U test检测。3组及以上均数比较采用单因素方差分析ANOVA检验，若$P<0.05$则采用LSD检验进行两两比较。如数据不符合正态分布或方差不齐时，则采用Kruskal-Wallis H检验。应用Pearman、Spearman相关分析方法分析钙调磷酸酶(CaN)与B型钠尿肽(BNP)、NYHA心功能分级、LVEF的相关性。符合正态分布的计量资料采用Pearman相关分析，非正态分布的计量资料或等级资料采用Spearman相关分析。以$P<0.05$为差异有统计学意义。

采用受试者工作特征曲线(ROC)确定证候的诊断阈值。以敏感度为纵轴，1-特异性为横轴，绘制HF气滞血瘀证的ROC曲线，计算曲线下面积(AUC)来判断诊断价值。结合ROC曲线下面积，依据Youden指数最大，即(敏感度+特异性-1)达到最大时，所对应的值为该证候的诊断界值。

4 研究结果

4.1 一般资料比较 见表1。HF气滞血瘀证患者中25例有冠心病，20例有高血压病，7例有糖尿病，还有3例高血脂症。健康对照组和HF气虚血瘀证组在年龄、性别、舒张压上，差异均无统计学意义($P>0.05$)，但HF气虚血瘀证组收缩压、心率高于健康对照组，差异均有统计学意义($P<0.05$)。

表1 一般资料比较

项 目	健康对照组(例数=30)	HF气虚血瘀证组(例数=30)	t/χ^2值	P值
年龄($\bar{x}\pm s$，岁)	66.47±10.70	68.07±10.75	-0.578	0.911
男/女[例(%)]	18(60.0)/12(40.0)	19(63.3)/11(36.7)	0.791	0.071
收缩压($\bar{x}\pm s$，mm Hg)	116.87±8.84	134.90±25.28	-3.688	<0.001
舒张压($\bar{x}\pm s$，mm Hg)	74.40±8.94	76.87±14.34	-0.800	0.053
心率($\bar{x}\pm s$，次/min)	76.33±8.75	88.93±21.20	-3.009	0.003

注：1 mm Hg≈0.133 kPa

4.2 GATA4在HF气虚血瘀证组患者血清中的表达 见表2、表3。与健康对照组比较，HF气虚血瘀证组患者血清中GATA4含量显著升高，差异有统计学意义($P<0.05$)。进一步检测发现，随NYHA心功能分级的增加，HF气虚血瘀证组患者血清中GATA4含量逐渐升高，差异有统计学意义($P<0.05$)。

表2 2组GATA4蛋白含量比较($\bar{x}\pm s$) pg/mL

组 别	例数	GATA4	t值	P值
健康对照组	30	2 819.28±1 022.74	-7.044	0.044
HF气虚血瘀证组	30	5 098.14±1 446.98①		

注：①与健康对照组比较，$P<0.05$

表3 NYHA心功能分级GATA4蛋白含量比较($\bar{x}\pm s$) pg/mL

NYHA心功能分级	例数	GATA4	F值	P
Ⅱ级	13	3 752.77±907.99		
Ⅲ级	13	5 835.54±616.05①	43.021	<0.001
Ⅳ级	4	7 074.05±135.63①②		

注：①与Ⅱ级比较，$P<0.05$；②与Ⅲ级比较，$P<0.05$

4.3 GATA4与NYHA心功能分级、BNP、LVEF关系 HF中GATA4与NYHA心功能分级呈正相关性(r=0.914，$P<0.001$)，与BNP含量呈正相关性(r=

0.697，$P<0.001$），与LVEF水平呈负相关性（$r=-0.592$，$P=0.001$）。

4.4　GATA4对HF气虚血瘀证的诊断界值　见图1。本研究绘制ROC曲线初步拟探讨GATA4对HF虚血瘀证的诊断界值，AUC为0.92，95%*CI*[0.83，1.00]（$P<0.001$），临界值为0.90，界值为3 777.49 pg/mL，敏感度为90%，特异性为100%。

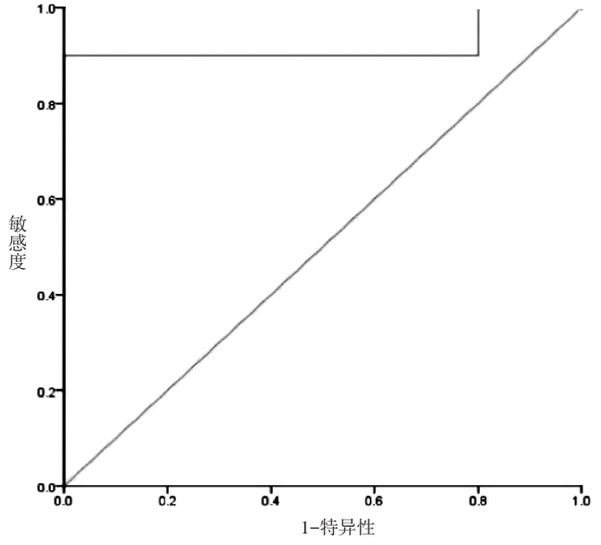


图1　GATA4诊断HF气虚血瘀证的ROC曲线

5　讨论

HF属中医心悸、水肿、喘证、胸痹心痛等疾病范畴。中医药在HF的临床治疗上积累了丰富的经验，在缓解症状、改善心功能、减轻西药副作用以及提高生活质量等方面均发挥重要作用。辨证论治是取得临床疗效的关键，证候研究是中医学的重点与难点，亦是研究取得突破性进展的关键所在。证候的诊断标准是甄别证候的基本准则，更是辨证治疗的基础与保障。本课题组前期研究发现，本病病机为本虚标实，虚实夹杂，本虚以气虚为主，标实常见血瘀[2,7]。气虚进一步发展为气阴两虚、阳气亏虚、阳气虚脱；血瘀证兼水湿停滞、痰饮内阻，虚实交错多变，演变为多种证候。气虚血瘀是HF发生发展始动因素，并贯穿于本病始终，是临床常见、多发证型之一。

GATA4是GATA家族一员，是广泛存在于脊椎动物中的锌指蛋白转录因子。GATA4在心脏高表达，参与心脏发育和生长的整个过程，在胚胎期心脏发育、心肌纤维化、心肌肥厚和心肌重构中发挥重要调控作用，是调节心脏的特异性基因[3]。GATA4是钙调磷酸神经激酶-活化的T细胞核因子3（CaN-NFAT3）、有丝分裂原活化蛋白激酶（MAPK）、异丙肾上腺素激活胞外信号调节激酶（ERK）等多种心脏信号转导通路的下游效应因子，在HF发生发展进程中发挥重要作用。以CaN-NFAT3通路为例，受神经激素如血管紧张素Ⅱ、内皮素Ⅰ刺激，心肌细胞内游离Ca^{2+}浓度升高，CaN活化，在CaN调节下，活化T细胞核因子（NFAT）发生脱磷酸，并由细胞质转移到细胞核，但由于NFAT在细胞核内与DNA结合力较弱，需在细胞核内的其他转录因子GATA4协助下形成共激活因子复合体，提高与DNA亲和力活化过程，从而发挥其生理效应[8-9]。

本研究结果显示，HF气虚血瘀证患者血清中GATA4的含量明显高于健康对照组，差异有统计学意义。进一步分析发现，随NYHA心功能级别的增加，GATA4水平呈上升趋势；相关性分析结果提示GATA4与心功能分级、BNP关联密切，且呈正相关，提示GATA4可反映HF病情轻重程度，为本病中医证候轻重程度的判断提供一定参考。这与国内一些学者研究结果一致，胡厚祥[10]收集39例因瓣膜性心脏病进行二尖瓣置换术HF患者和38例健康对照者，采用免疫沉淀法测心肌组织GATA4蛋白含量，结果显示HF患者心肌组织GATA4蛋白含量明显高于健康对照者，且随心功能恶化，GATA4蛋白表达逐渐增加，同样的研究结论也见于杨永健等[11]的报道。研究报道126例缺血性心肌病患者血清中GATA4、心肌肥厚标志物血清肌球蛋白重链（MHC）蛋白水平均明显高于健康对照组，左心室质量及左心室质量指数亦明显增高，左室射血分数下降，提示左心功能下降，推测GATA4作为转录因子可能参与了心肌缺血所致的心肌重构[12]。亦有研究证实中医中药可通过MAPK/ERK/ GATA4通路，抑制心室肥厚，改善心肌重构，缓解HF症状[13-14]。

明确诊断阈值是证候诊断标准化、量化研究的重要内容之一，ROC曲线作为经典的医学诊断试验性能的评价方法应用广泛[15]。结合AUC来判断其诊断价值，AUC值在0.5～0.7范围时诊断价值偏低，在0.7～0.9范围时诊断价值中等，大于0.9时具有较高的诊断价值[16]。本研究绘制ROC曲线初步拟定HF气虚血瘀证血清GATA4的诊断界值为3 777.49 pg/mL，

此时 AUC 为 0.92，敏感度为 90%，特异性为 100%。基于此，笔者认为血清 GATA4 对 HF 气虚血瘀证的诊断价值较高，此时诊断试验的敏感度和特异性较高，且误诊率和漏诊率较低，可为本病证提供客观化、量化的参考和依据。

本研究样本量较少，尚需大样本临床研究证实或动物实验进一步验证。除气虚血瘀证，在其他不同证候中，GATA4 表达及变化也值得进一步探索，才能更加全面地揭示 HF 常见中医证候的内在物质基础，推进本病中医证候标准化、客观化研究。

[参考文献]

[1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告2021概要[J]. 中国循环杂志，2022，37(6)：553-578.
[2] 何建成，王文武，丁宏娟，等. 心力衰竭的常见证候和证候要素的现代文献研究[J]. 中医药通报，2008，7(1)：58-60.
[3] TONG Y F. Mutations of NKX2.5 and GATA4 genes in the development of congenital heart disease[J]. Gene，2016，588(1)：86-94.
[4] SONG K，NAM Y J，LUO X，et al. Heart repair by reprogramming non- myocytes with cardiac transcriptionfactors[J]. Nature，2012，485(7400)：599-604.
[5] 叶任高，陆再英. 内科学[M]. 北京：人民卫生出版社，2004：165-166.
[6] 郑筱萸. 中药新药临床研究指导原则(试行)[M]. 北京：中国医药科技出版社，2002.
[7] 李小茜，何建成，黄品贤. 基于临床病例回顾的心力衰竭中医证候规律研究[J]. 中华中医药杂志，2013，28(5)：1339-1345.
[8] BENDICKOVA K，TIDU F，FRIC J. Calcineurin-NFAT signalling in myeloid leucocytes： new prospects and pitfallsin immunosuppressive therapy[J]. EMBO Mol Med，2017，9(8)：990-999.
[9] HOGAN PG，CHEN L，NARDONE J，et al. Transcriptional regulation by calcium，calcineurin，and NFAT[J]. Genes Dev，2003，17(18)：2205-2232.
[10] 胡厚祥，高兴玉，李治明，等. 钙调神经磷酸酶参与心衰患者心肌重构的信号转导[J]. 中国病理生理杂志，2006，22(9)：1717-1720.
[11] 杨永健，张鑫，朱文玲，等. 钙调神经磷酸酶信号通路参与心力衰竭患者心肌重塑的机制[J]. 中国循环杂志，2006，21(4)：291-293.
[12] 欧阳泽伟，贺琳，刘鹏，等. PCI治疗缺血性心肌病对GATA4蛋白表达的影响[J]. 中国医师杂志，2015，17(9)：1410-1412.
[13] 李春陵，顾广富，罗建华，等. 益气温阳活血方对慢性心力衰竭心室重塑大鼠GATA4表达的影响[J]. 中华中医药杂志，2014，29(9)：2967-2970.
[14] 陈仁山，肖惠珍，刘宁，等. 参芪扶正注射液抑制ERK1/2、GATA4信号通路改善小鼠心力衰竭实验研究[J]. 陕西中医，2022，43(1)：8-12.
[15] 刘槟，张培彤. 建立中医证候量化诊断标准关键步骤的方法学评述[J]. 中医杂志，2020，61(24)：2204-2208.
[16] 余松林. 医学统计学[M]. 北京：人民卫生出版社，2002：164-178.

(责任编辑：刘淑婷)