基于“肠道菌群-炎症”通路探讨丹蒌片防治 ApoE$^{-/-}$小鼠动脉粥样硬化的作用及机制

孙英新，黄 洋，曾 妙，甘家丽，黄培锋，姜希娟，高 青*

天津中医药大学 病理教研室，天津 301617

摘 要：目的 观察丹蒌片对高脂喂养动脉粥样硬化模型 ApoE$^{-/-}$小鼠的影响，从菌群失调诱发炎症角度探讨丹蒌片抗动脉粥样硬化的作用机制。**方法** 采用 C57BL/6J 野生型小鼠作为对照，高脂喂养 ApoE$^{-/-}$小鼠 24 周后随机分为模型组、丹蒌片组，连续 ig 给药 8 周后取血测定血脂水平；ELISA 法检测血清中脂多糖（LPS）水平；动脉大体油红 O 及主动脉窦 HE 染色观察斑块形成；粪便 16 S rRNA 扩增子测序检测肠道菌群；GC-MS 法检测短链脂肪酸；实时荧光定量 PCR 法检测炎症因子肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、细胞间黏附分子-1（ICAM-1）和白细胞介素-1β（IL-1β）mRNA 的表达。**结果** 与对照组比较，模型组小鼠血脂水平升高，肠道菌群失调，有害菌增加，有益菌减少，血清 LPS 水平升高，主动脉周围炎症水平升高；与模型组比较，丹蒌片干预可明显降低小鼠总胆固醇（TC）、三酰甘油（TG）及低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）水平（P＜0.01），有效减少斑块面积；调节肠道菌群，进而降低血清 LPS 及主动脉周围炎症因子 TNF-α、ICAM-1 和 IL-1β 水平（P＜0.01）。**结论** 丹蒌片通过改善菌群结构，降低菌群失调诱发的炎症反应发挥抗动脉粥样硬化作用。

关键词：丹蒌片；动脉粥样硬化；ApoE$^{-/-}$小鼠；肠道微生物；炎症反应

中图分类号：R285.5 **文献标志码：**A **文章编号：**0253 - 2670(2020)09 - 2492 - 09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2020.09.026

Based on “intestinal flora-inflammation” pathway to investigate effect and mechanism of Danlou Tablet on atherosclerosis of ApoE$^{-/-}$ mice

SUN Ying-xin, HUANG Yang, ZENG Miao, GAN Jia-li, HUANG Pei-feng, JIANG Xi-juan, GAO Qing

Department of Pathology, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

Abstract: Objective To investigate the efficacy and mechanism of Danlou Tablet against atherosclerosis model of ApoE$^{-/-}$ mice fed with high fat diet. **Methods** C57BL/6J mice were used as controls and ApoE$^{-/-}$ mice were randomly divided into two groups after 24 weeks of high fat feeding, including the model group received saline and the treatment group received Danlou Tablet. Animals were executed after 8 weeks of treatment and serum was collected to measure blood lipids; Plaque formation in the aorta was observed by red O and HE staining; 16 S rRNA sequencing was used to analyze changes in intestinal flora, and GC-MS test for detection fecal SCFAs content, ELISA for the determination of serum LPS, and real time PCR for detection of mRNA expression. **Results** Compared with the control group, the blood lipid levels were increased; intestinal flora was imbalance with increased harmful bacteria and reduced beneficial bacteria; The level of serum LPS and inflammation around the aorta were increased in the model group. Compared with the model group, the contents of TG, TC, LDL-C and the plaque area of Danlou Tablet group were decreased (P < 0.01); Danlou Tablet group can regulate intestinal flora, thus effectively reducing serum LPS and inflammatory factors TNF-α, ICAM-1 and IL-1β levels around the aorta (P < 0.01). **Conclusion** Danlou Tablet exerts an anti-atherosclerosis action with favorable efficacy through restructing the intestinal flora stucture, inhibiting endotoxin releasing and constraining the inflammatory response induced by dysbacteriosis.

Key words: Danlou Tablet; atherosclerosis; ApoE$^{-/-}$ mice; intestinal flora; inflammation

伴随我国经济的日益发展、生活水平的逐渐提高，人均寿命延长，年龄相关性心脑血管疾病的危害日趋严重。联合国卫生组织调查证实动脉粥样硬化（atherosclerosis，AS）所致的心脑血管疾病是当

收稿日期：2019-09-09

基金项目：国家自然科学基金资助项目（81573733）；天津市自然科学基金资助项目（18JCYBJC94500）；研究生创新基金（ZXYCXLX201804）；研究生创新基金（YJSKC-20191003）

作者简介：孙英新（1990—），女，博士研究生，研究方向为中医药防治心脑血管疾病。Tel: 18222690800 E-mail: 957299773@qq.com

***通信作者** 高 青 Tel: 15022078055 E-mail: gaoq88@126.com

今威胁人类健康的主要疾病[1]。AS 由多种因素共同作用所引起，发病机制复杂，但目前对其病因及机制研究进展较缓慢。近期研究表明，肠道菌群与人体血管健康密切相关，其中肠道菌群组成的变化可以通过激活 Toll 样受体（TLRs）信号转导通路[2]，引发机体天然免疫反应，导致炎症发生，而炎症反应在 AS 的发生发展中起重要作用。目前，肠道菌群与心血管疾病之间的关系已经逐渐被人们所熟知，肠道菌群失调导致动脉粥样硬化的相关分子机制研究得到进一步加深。AS 归属于中医学“胸痹”“心痛”及“真心痛”等疾病范畴。系统回顾和荟萃分析[3-4]表明，中医药可能为心血管疾病患者提供另一种治疗选择，具有良好的临床应用前景[5]。研究证实中医药在防治 AS 方面可发挥良好的抗炎作用，但其具体机制及靶点尚未完全阐释清楚。丹蒌片以《金匮要略·胸痹心痛短气病脉证治》中的“瓜蒌薤白白酒汤”为基础方，以瓜蒌皮及薤白为君药，并加入川芎、丹参和赤芍等活血化瘀之品而成，可用于痰瘀互结所致胸痹心痛[6-9]。目前已有不同的研究采用液相色谱-质谱联用或气相色谱-质谱联用（GC-MS）技术检测丹蒌片的主要化学成分，初步确定了非挥发性成分中的 68 种化合物，并从挥发性成分中鉴定出 44 个化合物[10-11]。此外现代药理研究显示丹蒌片可以通过调脂、抗炎及稳定斑块改善患者临床症状[12]，在防治 AS 方面具有良好的效果。实验室前期研究[13]同样证实了丹蒌片通过有效抗炎、调脂作用改善了 ApoE$^{-/-}$小鼠 AS 病变，因此本研究在前期研究的基础上进一步通过观察丹蒌片干预高脂喂养 ApoE$^{-/-}$小鼠斑块形成情况、血清脂多糖（LPS）水平、斑块周围炎症因子水平及肠道菌群的改变，评价丹蒌片防治 AS 的相关机制，从而拓展丹蒌片的作用靶点。

1 材料

1.1 实验动物

选用 5 周龄 SPF 级雄性 ApoE$^{-/-}$小鼠（品系 C57BL/6J）作为模型动物，选用同周龄雄性 C57BL/6J 野生型小鼠作为对照[14]，体质量（20±4）g，实验动物购自维通利华实验动物技术有限公司，许可证号 SCXK（京）2014-003。

1.2 饲料

乳脂动脉粥样硬化饲料（含 21%脂肪和 0.15%胆固醇），批号 MD12015，购自江苏美迪森生物医药有限公司。

1.3 药品、试剂与仪器

丹蒌片购自吉林康奈尔药业有限公司（批号 20150910）；756MC 紫外可见分光光度计（上海光学仪器一厂）；荧光定量 PCR 仪（美国 ABI 公司）；三酰甘油（TG）、血清总胆固醇（TC）、高密度脂蛋白胆固醇（HDL-C）、低密度脂蛋白胆固醇（LDL-C）及油红 O 试剂盒均购自南京建成生物工程研究所；LPS 检测试剂盒购自武汉云克隆科技股份有限公司；qRT-PCR 试剂盒购自北京天根生化科技公司，引物序列由生工生物工程（上海）股份有限公司合成；其余均为市售分析纯。

2 方法

2.1 模型制备、分组与给药

适应性饲养 1 周后，C57BL/6J 野生型小鼠饲以普通饲料，作为对照组。ApoE$^{-/-}$小鼠饲以高脂饲料 24 周以复制 AS 模型。24 周后，将 ApoE$^{-/-}$小鼠随机分为模型组和丹蒌片组，每组各 15 只，根据体表面积折算法，计算出小鼠给予丹蒌片水溶物的人鼠等效剂量为 0.55 g/kg，对照组和模型组小鼠 ig 给予等体积的生理盐水，每日给药 1 次，共给药 8 周。本研究动物实验得到天津中医药大学动物管理委员会（批准号 TCM-LAEC2019039）批准实施。

2.2 血清学指标检测

干预结束后，小鼠内眦取血，静置 30 min，于 4 ℃、3 000 r/min 离心 15 min，收集血清，−80 ℃冻存备用。采用血脂试剂盒检测 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 水平；采用酶联免疫吸附测定（ELISA）法检测 LPS 水平，具体步骤参照检测说明书进行。

2.3 全主动脉斑块观察

剪开小鼠右心耳，快速以预冷生理盐水从左心室进行灌流，至右心房流出澄清液体为止。分离、切取主动脉全长，体视镜下仔细剥离外膜，剖开、展平、福尔马林固定 24 h，60%异丙醇润洗 10 min，油红 O 染液浸染 10 min，70%乙醇分化、水洗，直至斑块呈鲜红色，其余部分呈白色为止。取出动脉，置于载玻片上，铺平、拍照后，用 Image-Pro Plus 6.0 数据分析软件分析红染部分（斑块）面积占全动脉面积的百分比。

2.4 主动脉根部斑块及肝脏病理学观察

分离小鼠心脏及肝脏，心脏全部及肝大叶用福尔马林固定，行常规石蜡连续切片，HE 染色。心脏每 5 张连续切片留取 1 张用于观察统计。通过 Leica Qwin Image Processing and Analysis 软件分析

切片，测量 AS 斑块横截面积，并计算校正斑块面积（校正斑块面积＝斑块面积/血管管腔面积）。

2.5 肠道菌群及短链脂肪酸检测

实验干预结束后，取材之前，收集小鼠新鲜大便，−80 ℃冰箱保存，用于肠道菌群及短链脂肪酸的检测。其中肠道菌群检测采用 16 S rRNA 扩增子测序法，CTAB 法提取样本 DNA，利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度及浓度后，稀释样品至 1 ng/μL，行 PCR 扩增，引物对应区域 16 S V4 区（515F 和 806R）；PCR 产物混样和纯化之后进行文库构建和上机测序。

短链脂肪酸含量测定采用 GC-MS 法。将新鲜小鼠粪便溶于含 500 μL 甲醇溶液的 EP 管中，制成粪便悬液，并用硫酸调节 pH 值在 2～3，静置，混匀之后 5 000 r/min 离心 20 min，取上清用于 GC-MS 分析。检测条件：用氦气为载体，控制气体积流量为 1 mL/min，色谱柱起始温度设置为 100 ℃，时间 0.5 min，接着以 8 ℃/min 升温至 180 ℃，时间维持 1 min，然后以 20 ℃/min 升温至 200 ℃，时间维持 5 min，检测器的温度设置为 240 ℃，进样口温度为 200 ℃，进样体积 1 μL，每个样本的检测时间为 20.9 min。

2.6 实时荧光定量 PCR（qRT-PCR）检测炎症因子 mRNA 的表达

采用 Trizol 提取主动脉总 RNA，测定 RNA 浓度及纯度。以总 RNA 为模板，按照 RT 试剂盒步骤反转录成 cDNA；以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增，以 GAPDH 为内参，目的基因 TLR4、肿瘤坏死因子-α（TNF-α）、细胞间黏附分子-1（ICAM-1）和白细胞介素-1β（IL-1β）引物序列见表 1。扩增条件：95 ℃预变性 15 min，95 ℃变性 10 s，65 ℃退火 30 s，72 ℃延伸 1 min，循环 40 次。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算样品中目的基因相对表达量。

2.7 统计学处理

采用 SPSS 18.0 统计软件包进行数据分析。计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 表示。正态分布数据采用单因素方差分析，组间差异比较采用 LSD-*t* 法，检验水准（α）为 0.05。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

名称	引物序列 (5'→3')	长度/bp
GAPDH	正向：GGTTGTCTCCTGCGACTTCA	183
	反向：GGTCCAGGGTTTCTTACTCC	
TLR4	正向：GCTTTCACCTCTGCCTTCAC	174
	反向：GAAACTGCCATGTTTGAGCA	
TNF-α	正向：CGTCAGCCGATTTGCTATCT	206
	反向：CGGACTCCGCAAAGTCTAAG	
ICAM-1	正向：TTCACACTGAATGCCAGCTC	182
	反向：GTCTGCTGAGACCCCTCTTG	
IL-1β	正向：GCCCATCCTCTGTGACTCAT	230
	反向：AGGCCACAGGTATTTTGTCG	

3 结果

3.1 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠血脂水平的影响

与对照组比较，模型组小鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平均显著升高（P＜0.01），HDL-C 有升高趋势，但差异不显著。与模型组比较，丹蒌片能够有效降低小鼠血清 TC、TG、LDL-C 水平（P＜0.01），升高血清 HDL-C 水平，但差异不显著，见表 2。

3.2 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠血清 LPS 水平的影响

与对照组比较，模型组小鼠血清 LPS 显著升高（P＜0.01）。与模型组比较，丹蒌片干预 8 周后，小鼠血清 LPS 水平存在下降趋势，但差异不显著，见表 3。

3.3 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠肝脏病变的影响

对照组小鼠低倍镜下可见肝小叶结构完整，中央静脉清晰可见，高倍镜下显示肝细胞形态规则呈多边形、界限清楚，核大而圆，位于胞质中间。模型组小鼠肝小叶结构紊乱，中央静脉挤压变形，肝

表 2 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠血脂水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, n = 8)

Table 2 Effect of Danlou Tablet on blood lipid level of ApoE$^{-/-}$ mice ($\bar{x} \pm s$, n = 8)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	TG/(mmol·L^{-1})	TC/(mmol·L^{-1})	LDL-C/(mmol·L^{-1})	HDL-C/(mmol·L^{-1})
对照	—	0.42±0.13	2.22±0.48	0.29±0.10	3.30±0.97
模型	—	2.76±0.63**	26.89±4.19**	13.85±2.58**	4.43±1.29
丹蒌片	0.55	1.52±0.42$^{\#\#}$	20.56±3.32$^{\#\#}$	10.28±1.98$^{\#\#}$	4.48±1.41

与对照组比较：$^{**}P$＜0.01；与模型组比较：$^{\#\#}P$＜0.01，表 3～7 同

$^{**}P$ < 0.01 *vs* control group; $^{\#\#}P$ < 0.01 *vs* model group, same as table 3—7

表 3 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠血清 LPS 水平的影响 ($\bar{x}\pm s$, n = 6)

Table 3 Effect of Danlou Tablet on serum LPS content of ApoE$^{-/-}$ mice ($\bar{x}\pm s$, n = 6)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	LPS/(ng·mL^{-1})
对照	—	45.58±12.62
模型	—	77.94±16.83**
丹蒌片	0.55	68.92±12.06

索排列紊乱，肝细胞脂肪变性明显，体积变大，脂滴明显可见（HE 染色可见小空泡）。丹蒌片干预后，小鼠肝小叶结构紊乱得到改善，肝细胞脂肪变性较模型组明显减轻，脂滴明显减少（图 1）。

3.4 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉内膜斑块面积的影响

主动脉大体油红 O 染色结果（图 2 和表 4）显示，对照组小鼠主动脉内膜无红染，未见斑块形成。

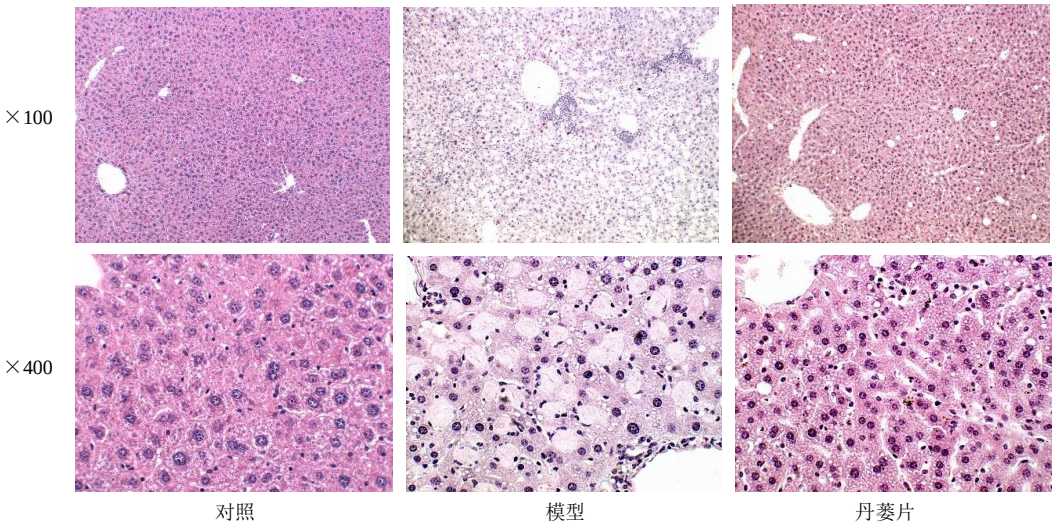

图 1 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠肝脏病变的影响 (HE 染色)

Fig. 1 Effect of Danlou Tablet on liver tissue of ApoE$^{-/-}$ mice (HE staining)

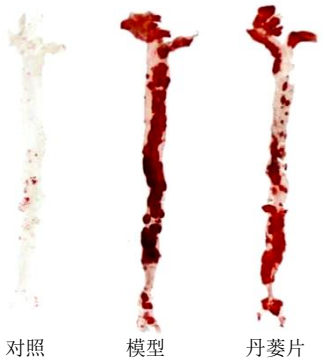

图 2 各组小鼠主动脉油红 O 染色结果

Fig. 2 Results of oil red O staining in aorta of each group

表 4 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉内膜斑块面积的影响 ($\bar{x}\pm s$, n = 6)

Table 4 Effects of Danlou Tablet on atherosclerotic lesion area in each group ($\bar{x}\pm s$, n = 6)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	主动脉内膜斑块面积占比/%
对照	—	0
模型	—	53.67±8.68**
丹蒌片	0.55	42.10±3.62$^{\#\#}$

模型组小鼠主动脉内膜可见散在、面积较大的红染斑块。丹蒌片组小鼠主动脉红染区域明显减少（P＜0.01）。

3.5 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉根部斑块形成的影响

主动脉根部 HE 染色结果（表 5 和图 3）显示，对照组小鼠主动脉根部内膜光滑完整，无斑块形成。模型组小鼠主动脉根部可见明显的斑块形成，内膜增厚，纤维帽及胆固醇结晶并存，伴有炎细胞浸润，绝大多数斑块内存在钙盐沉积。丹蒌片干预后，斑块面积及斑块校正面积较模型组明显减少（P＜0.01）。

表 5 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉根部斑块形成的影响 ($\bar{x}\pm s$, n = 6)

Table 5 Effects of Danlou Tablet on atherosclerotic lesion area in ApoE$^{-/-}$ mice ($\bar{x}\pm s$, n = 6)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	斑块面积/mm^2	校正斑块面积/%
对照	—	0	0
模型	—	0.68±0.10**	41.88±4.73**
丹蒌片	0.55	0.59±0.14$^{\#\#}$	36.94±6.65$^{\#\#}$

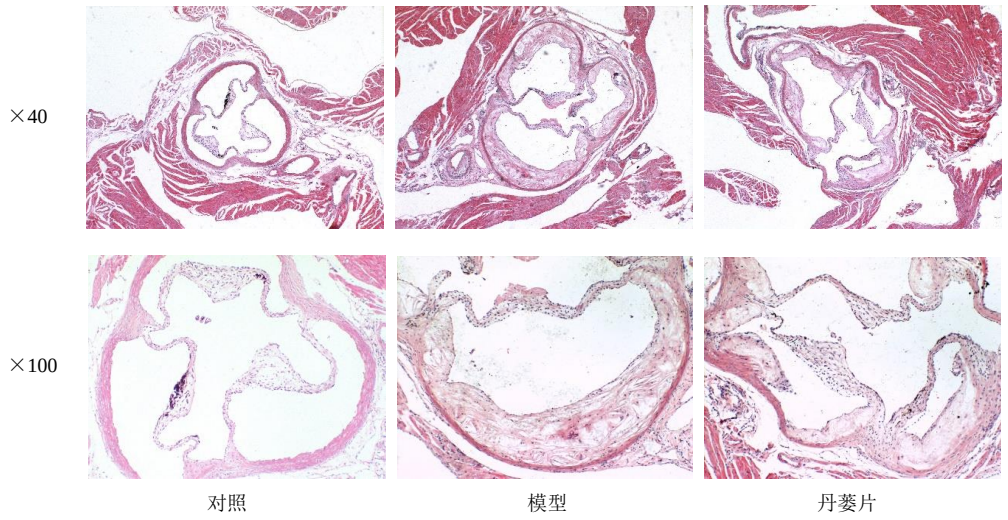

图 3 各组小鼠主动脉根部 HE 染色

Fig. 3 Results of HE staining of aortic root of mice in each group

3.6 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉炎症因子的影响

与对照组比较，模型组小鼠主动脉炎症相关因子 TLR4、TNF-α、IL-1β、ICAM-1 mRNA 水平显著升高（P＜0.01）。与模型组比较，丹蒌片干预 8 周后，小鼠主动脉 TLR4 mRNA 水平有下降趋势，但差异不显著，TNF-α、ICAM-1、IL-1β mRNA 水平均显著降低（P＜0.01，表 6）。

3.7 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠肠道短链脂肪酸的影响

与对照组比较，模型组小鼠肠道中短链脂肪酸乙酸、丙酸及丁酸水平显著降低（P＜0.01）。与模型组比较，丹蒌片干预后，仅丁酸水平有升高趋势，而乙酸及丙酸水平反而有下降趋势，但差异不显著（表 7），说明丹蒌片有效抗动脉粥样硬化并非通过短链脂肪酸途径起作用。

表 6 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠主动脉 TLR4、TNF-α、IL-1β、ICAM-1 mRNA 水平的影响（$\bar{x}\pm s$, n = 6）

Table 6 Effect of Danlou Tablet on gene expression levels of TLR4, TNF-α, IL-1β and ICAM-1 around aorta in ApoE$^{-/-}$ mice ($\bar{x}\pm s$, n = 6)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	mRNA 相对表达量			
		TLR4	TNF-α	ICAM-1	IL-1β
对照	—	1.04±0.28	1.04±0.29	1.03±0.25	1.01±0.16
模型	—	1.52±0.34**	3.56±1.07**	3.16±0.63**	5.03±1.43**
丹蒌片	0.55	1.23±0.37	1.41±0.39$^{\#\#}$	1.56±0.37$^{\#\#}$	2.13±0.47$^{\#\#}$

表 7 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠肠道短链脂肪酸的影响（$\bar{x}\pm s$, n = 4）

Table 7 Effect of Danlou Tablet on short-chain fatty acids in intestine of ApoE$^{-/-}$ mice ($\bar{x}\pm s$, n = 4)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	乙酸/(mg·g^{-1})	丙酸/(mg·g^{-1})	丁酸/(mg·g^{-1})
对照	—	22.83±4.35	3.66±0.84	2.04±0.95
模型	—	0.67±0.16**	1.22±0.76**	0.52±0.09**
丹蒌片	0.55	0.30±0.06	0.48±0.08	0.62±0.19

3.8 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠肠道菌群的影响

3.8.1 微生物菌落物种丰富度 在门水平上（图 4 和表 8），与对照组比较，模型组小鼠肠道内的有益菌拟杆菌门（Bacteroidetes）相对丰度下降，且拟杆菌门/厚壁菌门（Firmicutes）值减小（P＜0.05），有害菌厚壁菌门相对丰度有增加趋势，但差异不显著。与模型组比较，丹蒌片干预 8 周后，有益菌拟杆菌门水平明显升高（P＜0.01），厚壁菌门有下降趋势，

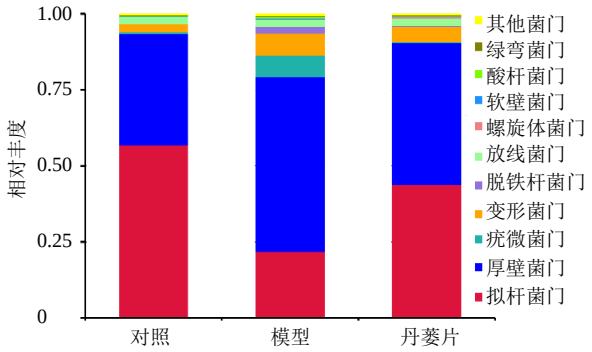

图 4 门水平上不同组别小鼠含量前 10 的菌群物种相对丰度

Fig. 4 Relative abundance of top 10 bacterial species at phylum level

但差异不显著，而拟杆菌门/厚壁菌门值升高（$P<0.05$）。

3.8.2 肠道菌群物种 α 多样性分析 与对照组比较，模型组小鼠肠道菌群丰度指数 Ace 及 Chao1 升高（$P<0.05$，表 9），菌群多样性指数 Shannon 及 Simpson index 有升高趋势，但差异不显著。与模型组比较，丹蒌片干预 8 周后，小鼠肠道内菌群丰度指数明显降低（$P<0.01$），而菌群多样性指数变化不明显。

3.8.3 Beta 多样性分析 各组样本的主成分分析（PCA）结果显示，对照组、模型组及丹蒌片组在第 1 主成分（23.24%）及第 2 主成分（10.61%）可显著分离，说明各组菌群组成存在一定的差异（图 5）。

表 8 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠肠道拟杆菌门和厚壁菌门相对丰度的影响（$\bar{x}\pm s$, $n=4$）

Table 8 Effect of Danlou Tablet on relative abundance of Bacteroidetes and Firmicutes in intestinal of ApoE$^{-/-}$ mice ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	相对丰度		拟杆菌门/厚壁菌门
		拟杆菌门	厚壁菌门	
对照	—	0.57±0.19	0.37±0.17	1.21±0.47
模型	—	0.22±0.05*	0.57±0.10	0.40±0.15*
丹蒌片	0.55	0.44±0.10$^{\#\#}$	0.47±0.09	0.99±0.35$^{\#}$

与对照组比较：$^{*}P<0.05$；与模型组比较：$^{\#}P<0.05$，$^{\#\#}P<0.01$，下表同

$^{*}P<0.05$ *vs* control group; $^{\#}P<0.05$ $^{\#\#}P<0.01$ *vs* model group, same as below table

表 9 丹蒌片对 ApoE$^{-/-}$小鼠肠道微生物群丰富度和多样性的影响（$\bar{x}\pm s$, $n=4$）

Table 9 Effect of Danlou Tablet on richness and diversity of fecal microbiota in ApoE$^{-/-}$ mice ($\bar{x}\pm s$, $n=4$)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	OTUs	Ace	Chao1	Shannon index	Simpson index
对照	—	1 137.67±157.09	1 603.65±169.41	1 531.42±197.47	5.55±0.69	0.91±0.03
模型	—	1 381.00± 32.59*	1 829.82± 47.10*	1 789.21± 51.26*	6.45±0.36	0.96±0.01
丹蒌片	0.55	1 166.00± 46.18$^{\#\#}$	1 627.96± 79.12$^{\#\#}$	1 574.47± 52.95$^{\#\#}$	6.50±0.35	0.96±0.02

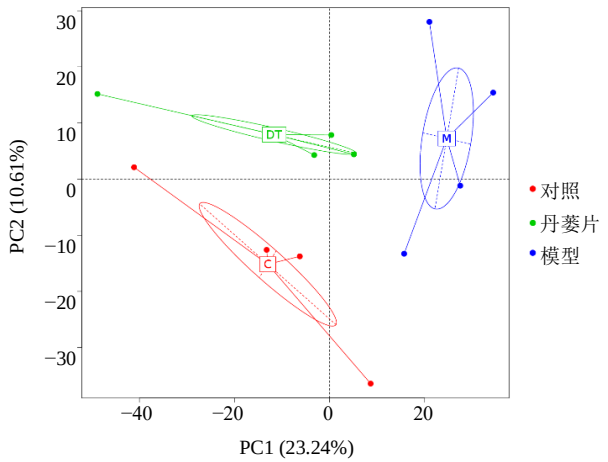

图 5 各组样本 PCA

Fig. 5 PCA of samples of each group

3.8.4 微生物组间差异分析 采用线性判别分析对每组样本肠道菌群的效应大小进行分析，在门水平上（图 6、7），对照组小鼠肠道菌群以拟杆菌门为主，模型组以变形菌门 Proteobacteria 及疣微菌门 Verrucomicrobia 为主；在属水平上，模型组小鼠肠道特有的菌群种类主要包括阿克曼菌属 *Akkermansia* 及瘤胃菌属 *Ruminococcaceae_UCG-014*，丹蒌片干预 8 周后，小鼠肠道菌群发生改变，存在于肠道内的特异性菌群包含脱疏弧菌属 *Desulfovibrio*、瘤胃梭菌属 *Lachnoclostridium*、另枝菌属 *Alistipes* 及乳球菌属 *Lactococcus*。

4 讨论

本研究发现高脂饲养 24 周后 ApoE$^{-/-}$小鼠血脂

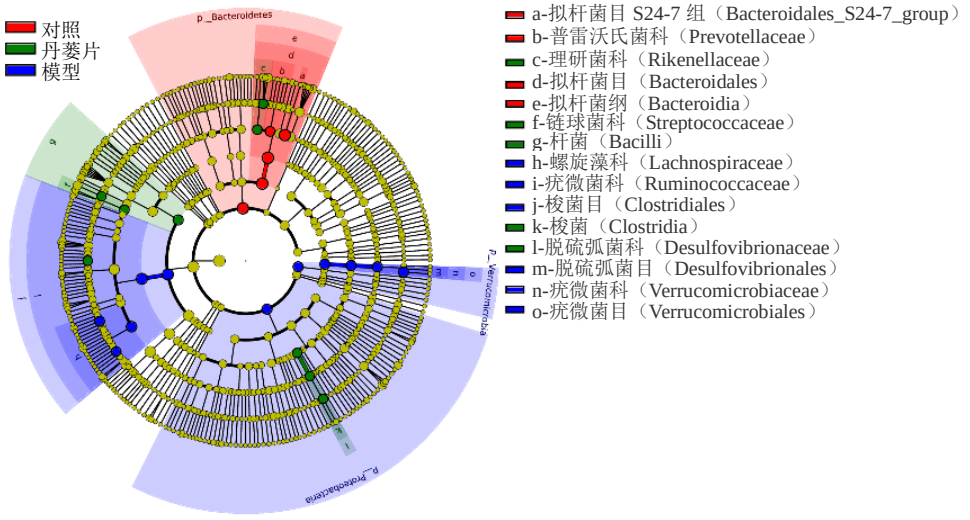

图 6　进化分支

Fig. 6　Cladogram

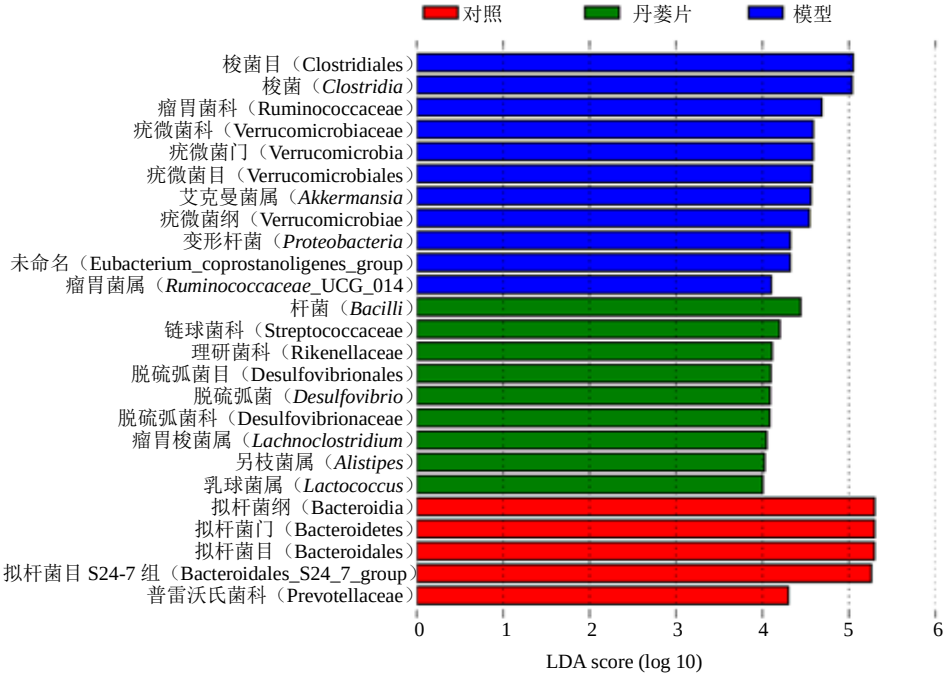

图 7　LDA 值分布

Fig. 7　Distribution of linear discriminant analysis

水平异常，全主动脉及主动脉根部有明显的斑块形成，表明 AS 模型复制成功。进一步检测主动脉周围炎症因子水平，发现模型组病变部位炎症因子 TLR4、TNF-α、IL-1β、ICAM-1 mRNA 水平均显著升高。为了证实肠道菌群在 AS 病变炎症反应中所起到的作用，对小鼠新鲜粪便采用 16 S rRNA 扩增子测序，结果显示模型组与对照组肠道菌群群落结构差异较大，结构分离，且模型组小鼠肠道产毒素的有害菌数量增加，有益菌减少，短链脂肪酸的数量明显减少，提示 ApoE$^{-/-}$小鼠 AS 模型存在肠道菌群失调现象，有害菌增加，导致细菌 LPS 生成增多进而吸收入血，诱发炎症反应，参与了 AS 的发生发展。丹蒌片可以有效调节血脂水平，并减少全主动脉及主动脉根部斑块形成，抗 AS 效果显著，能够逆转肠道菌群结构紊乱，使其接近对照组菌群分布。主动脉周围炎症因子 mRNA 水平明显下降，证实丹蒌片抗高脂喂养 ApoE$^{-/-}$小鼠 AS 的机制除通过调脂外，也与改善肠道菌群失调、减轻菌群失调诱

发的炎症反应有关。

AS 病变的突出特点是脂质沉积，高脂状态的建立是复制 AS 模型的基础。ApoE$^{-/-}$小鼠是较为公认的 AS 病变及易损斑块机制研究的重要动物模型，具有造模速度快，接近自然发生的 AS 进程的优点[15-16]，因此本研究选用高脂喂养 ApoE$^{-/-}$小鼠复制 AS 模型。AS 起病隐匿，病程发展较缓慢，随着疾病的进展，沉积在血管壁上的斑块逐渐增多，管壁增厚，管腔变窄。而 AS 发病机制复杂，至今尚未完全阐明，其中炎症反应贯穿始终[17]。近年来研究发现，肠道菌群在伴有低度炎症的代谢性疾病如肥胖、糖尿病中起到举足轻重的作用，甚至引发心血管疾病。而肠道微生物菌群失调激发机体的免疫调节，参与 AS 的发生发展[18]。中药复方在防治 AS 方面发挥独特优势，具有毒副作用小，多成分发挥协同效应，多靶点、整体调节的作用。因此本实验采用 ApoE$^{-/-}$小鼠为研究对象，高脂喂养 24 周复制 AS 模型，使更接近人类复杂斑块的形成过程。本研究成功复制 AS 模型，模型组小鼠血脂水平显著升高，主动脉斑块形态学观察及斑块数据分析均显示复杂斑块的形成。

随着测序技术及宏基因组研究的发展，近年来有关肠道菌群的研究一直处于井喷状态，关于菌群的新研究、新进展日新月异，而且热度有增无减[19]。大量研究证实肠道微生物与心血管疾病之间具有明显相关性，且实验室前期研究证实衰老小鼠出现明显的菌群失调，为心血管类慢性病的研究提供了新方向。在本研究中采用 16 S rRNA 扩增子测序技术检测小鼠肠道菌群的改变情况，发现在干预终点即 ApoE$^{-/-}$小鼠 8 月龄时，与对照组比较，粪便中肠道菌群的结构发生改变，α 多样性分析显示菌群丰度及多样性均增加。此结果与调查不同年龄组健康受试者肠道菌群时发现，与健康的成年人相比，老龄组肠道微生态多样性降低存在一定的差别[20]，分析可能与高脂饲养的时间长短有关，有待进一步实验证实。微生物菌落物种丰度分析显示模型组有益菌丰度下降，有害菌丰度增加，且拟杆菌门/厚壁菌门减小，并促进 AS 的形成。通过分析差异物种发现，模型组肠道内出现特有菌属包含阿克曼菌及瘤胃菌属。除此之外，采用 GC-MS 法测定小鼠粪便中短链脂肪酸含量，包括乙酸、丙酸及丁酸，模型组与对照组相比三者均显著减少，而短链脂肪酸不仅可以提高宿主的代谢能力，还具有抗炎作用[21-22]。当短链脂肪酸的产量减少，将导致肠上皮细胞产生黏蛋白分泌受阻，引发致病菌进入肠黏膜，同时释放 LPS 并吸收入血，引发机体慢性低度炎症反应。采用 ELISA 法证实模型组小鼠血清中 LPS 水平显著升高，从而引发 TLR4 依赖性促炎症信号通路激活[23]，预示高脂喂养 ApoE$^{-/-}$小鼠存在更明显的炎症状态。

丹蒌片来自于中医古方瓜蒌薤白白酒汤，主要用于治疗心绞痛、心肌梗死等心血管类疾病，是目前我国 SFDA 批准的唯一痰瘀同治代表方。在探讨丹蒌片改善 AS 病变的药效研究中，针对其临床调脂、抗炎进行实验设计，采用生化法检测了血脂水平，发现丹蒌片能够显著调节血脂水平，结果符合文献有关其可以调节高血脂症大鼠的血脂水平，并改善血管内皮功能的报道[24]。同时与实验室前期研究中丹蒌片呈现的良好调脂及减少斑块面积的效果一致[13]，力证其调脂作用在延缓 AS 进展方面的有效性。检测主动脉周围炎症因子水平，显示丹蒌片可以明显的降低炎症因子 TLR4、TNF-α、IL-1β 及 ICAM-1 mRNA 水平，验证其抗炎作用。研究发现，LPS 可以通过人和鼠 AS 病变中内皮细胞 TLR4 激活核转录因子-κB（NF-κB），进而上调 ICAM-1 和血管间黏附因子 1（VCAM-1）的表达，参与单核细胞聚集，并启动更进一步的炎症反应[25]。本研究为进一步探究丹蒌片发挥抗炎作用可能的上游靶点，通过 ELISA 检测血清 LPS 水平，实验结果显示丹蒌片可以减少 LPS 吸收入血，但效果并不显著。

在丹蒌片干预高脂喂养 ApoE$^{-/-}$小鼠 8 周后，本研究在丹蒌片有效调脂、减少斑块形成、减轻病变周围炎症水平的良好药效基础上，进一步采用 16 S rRNA 扩增子测序技术检测肠道菌群的改变情况，结果表明丹蒌片逆转了模型组的肠道微生物紊乱现象，使其接近对照组水平，表明其具有维护正常菌群生长和调整菌群失调的作用。由此推测，丹蒌片显著的抗炎作用可能与改善菌群失调，减少有害菌衍生物质 LPS 吸收入血有关。基于以上研究初步证实了丹蒌片在改善 AS 病变中，逆转肠道菌群失调与减轻主动脉周围炎症水平具有相关性。此外，基于实验室前期研究结果[22]，本实验仅采用丹蒌片临床用量的等效剂量用于动物实验研究，未设置不同的药物剂量进行对比观察，乃本研究的不足之处。基于此，下一步实验将增加丹蒌片相当于人鼠等效剂量的高（等效剂量的 2 倍剂量）及低（等效剂量

的 1/2 倍剂量）2 个剂量，以证实丹蒌片最佳作用剂量，并在此基础上对丹蒌片改善肠道菌群失调，降低由此诱发的炎症反应进行验证，进一步深入探讨丹蒌片抗 AS，调节肠道菌群的具体靶点。

参考文献

[1] 国家心血管病中心. 中国心血管病报告 2017 [M]. 北京: 中国大百科全书出版社, 2018.

[2] Kell D B, Pretorius E. On the translocation of bacteria and their lipopolysaccharides between blood and peripheral locations in chronic, inflammatory diseases: The central roles of LPS and LPS-induced cell death [J]. *Integr Biol*, 2015, doi: 10.1039/c5ib00158g.

[3] 朱 星, 靳宏光, 黄永生. 动脉粥样硬化的中医诊治研究概况 [J]. 中国中医基础医学杂志, 2019, 25(8): 1164-1167.

[4] Li W, Zhi W, Zhao J, Li W, *et al*. Cinnamaldehyde attenuates atherosclerosis via targeting the IκB/NF-κB signaling pathway in high fat diet-induced ApoE$^{-/-}$mice [J]. *Food Funct*, 2019, 10(7): 4001-4009.

[5] Wang J Y, Xiao L, Chen J, *et al*. Potential effectiveness of traditional Chinese medicine for cardiac syndrome X (CSX): A systematic review and meta-analysis [J]. *BMC Compl Altern Med*, 2013, doi: 10.1186/1472-6882-13-62.

[6] Dong J, Zhu Y, Gao X M, *et al*. Qualitative and quantitative analysis of the major constituents in Chinese medicinal preparation Dan-Lou tablet by ultra high performance liquid chromatography/diode-array detector/quadrupole time-of-flight tandem mass spectrometry [J]. *J Pharm Biomed*, 2013, doi: 10.1016/j.jpba.2013.02.011.

[7] 张 娜, 李 琳, 高 杉, 等. HS-SPEM-GC-MS 分析丹蒌片中的挥发性化学成分 [J]. 天津中医药大学学报, 2016, 35(4): 258-261.

[8] 刘 勇, 刘超峰. 丹蒌片药理作用及临床应用研究进展 [J]. 河北医药, 2019, 41(18): 2861-2865.

[9] 李文平, 吴宗贵. 丹蒌片治疗冠心病临床疗效的 Meta 分析 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2016, 14(4): 337-342.

[10] 朱欣彦, 匡大鹏, 杨文卓. 肠道微生物菌群紊乱和肠道黏膜屏障功能障碍—肝脏疾病的致命要害? [J]. 肝脏, 2013, 18(4): 254.

[11] 纪睿圳. 丹蒌片调解脂质代谢及其抗动脉粥样硬化作用的研究 [D]. 上海: 第二军医大学, 2013.

[12] 纪睿圳, 俞诚虹, 吴宗贵, 等. 丹蒌片改善急性高脂血症大鼠血脂紊乱的实验研究 [J]. 上海医学, 2014, 37(7): 568-573.

[13] Deng H, Wu B, Guo M J, *et al*. Ethanol extracts of Danlou tablet attenuate atherosclerosis via inhibiting inflammation and promoting lipid effluent [J]. *Pharmacol Res*, 2019, doi: 10.1016/j.phrs.2019.104306.

[14] Kader T, Porteous C M, Jones G T, *et al*. Ribose-cysteine protects against the development of atherosclerosis in apoE-deficient mice [J]. *PLoS One*, 2020, 15(2): e0228415.

[15] 牛 颖, 姚 娜, 郭向东. 丹蒌片治疗高脂血症 30 例 [J]. 河南中医, 2013, 33(11): 1911-1912.

[16] 洪 铁, 杨 振, 刘玉梅, 等. 丹蒌片对高脂血症大鼠血管内皮功能的影响 [J]. 世界中西医结合杂志, 2010, 5(4): 308-310.

[17] 付 军, 红 梅, 冷吉燕, 等. 丹蒌片对异丙肾上腺素致大鼠急性心肌缺血的保护作用 [J]. 中国老年学杂志, 2011, 31(7): 1024-1027.

[18] Ulleryd M A, Prahl U, Börsbo J, *et al*. The association between autonomic dysfunction, inflammation and atherosclerosis in men under investigation for carotid plaques [J]. *PLoS One*, 2017, 12(4): e0174974.

[19] Brandsma E, Kloosterhuis N J, Koster M H, *et al*. A proinflammatory gut microbiota increases systemic inflammation and accelerates atherosclerosis [J]. *Circul Res*, 2019, 124(1): 94-100.

[20] Ravinder N, Rabina M, Shokouh A, *et al*. Gut microbiome and aging: Physiological and mechanistic insights [J]. *Nutr Healthy Aging*, 2018; 4(4): 267-285.

[21] 董 凯, 任 杰, 司 彪, 等. 肠道微生物群在动脉粥样硬化中的作用 [J]. 生命的化学, 2017, 37(4): 553-560.

[22] Yuan X X, Wang L, Bhat O M, *et al*. Differential effects of short chain fatty acids on endothelial Nlrp3 inflammasome activation and neointima formation: Antioxidant action of butyrate [J]. *Redox Biol*, 2018, doi: 10.1016/j.redox.2018.02.007.

[23] 匡忠生, 何玉萍, 许翌嘉. 脑动脉硬化痰证 TLR4、ICAM-1 相关性探讨 [J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2010, 8(8): 944-945.

[24] Ghosh S S, Bie J, Wang J, *et al*. Oral supplementation with non-absorbable antibiotics or curcumin attenuates western diet-induced atherosclerosis and glucose intolerance in LDLR$^{-/-}$mice--role of intestinal permeability and macrophage activation [J]. *PLoS One*, 2014, 9(9): e108577.

[25] Merino H, Parthasarthy S. Partial ligation-induced carotid artery occlusion induces leukocyte recruitment and lipidaccumulation-A shear stress model of atherosclerosis [J]. *Mol Cell Biochem*, 2013, 372(1/2): 267-273.