

补阳还五汤对缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠肠道菌群及其血浆代谢产物的影响

吴万丰^{1,2}, 聂慧芳¹, 胡立娟¹, 孙艺航¹, 罗 宁¹, 蒋成婷¹, 成绍武^{1*}, 葛金文^{1*}

1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南 长沙 410208

2. 湖南中医药高等专科学校附属第一医院, 湖南 株洲 412000

摘 要: **目的** 探讨补阳还五汤对缺血性脑卒中气虚血瘀证模型大鼠肠道菌群及其相关血浆代谢产物的影响。**方法** 采用中医证型与大脑中动脉闭塞 (middle cerebral artery occlusion, MCAO) 联合造模的方法, 建立缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠模型, 随机分为对照组、补阳还五汤 (24 g/kg) 组、双歧杆菌 (0.81 g/kg) 组。除对照组大鼠 ig 生理盐水外, 其余各组大鼠 ig 相应药物, 72 h 后处死大鼠, 取全脑采用 TTC 染色检测脑梗死体积, 取盲肠内容物采用 16S rRNA 基因测序检测肠道菌群, 分离血浆用代谢组学方法检测血浆代谢产物, 并建模分析肠道菌群与代谢产物之间的联系。**结果** 与对照组比较, 补阳还五汤显著改善缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠神经行为学评分 ($P < 0.05$), 减小脑梗死体积 ($P < 0.001$), 调节肠道菌群 ($P < 0.01$), 影响缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠血浆代谢轮廓; 双歧杆菌四联活菌片对缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠肠道菌群及代谢产物影响较小, 对大鼠神经行为学评分、脑梗死体积无显著影响。**结论** 补阳还五汤可能通过调节缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠的肠道菌群, 继而影响其血浆代谢轮廓, 从而发挥治疗缺血性脑卒中血瘀证的作用。

关键词: 补阳还五汤; 缺血性脑卒中; 气虚血瘀证; 肠道菌群; 代谢产物

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2021)01-0118-11

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.01.015

Effect of Buyang Huanwu Decoction on gut microbiota and plasma metabolites in ischemic stroke rats with *qi* deficiency and blood stasis syndrome

WU Wan-feng^{1,2}, NIE Hui-fang¹, HU Li-juan¹, SUN Yi-hang¹, LUO Ning¹, JIANG Cheng-ting¹, CHENG Shao-wu¹, GE Jin-wen¹

1. College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China

2. The First Affiliated Hospital of Hunan College of Traditional Chinese Medicine, Zhuzhou 412000, China

Abstract: Objective To study the effect of Buyang Huanwu Decoction (补阳还五汤) on gut microbiota and plasma metabolites in ischemic stroke rats with *qi* deficiency and blood stasis syndrome. **Methods** Rat models with *qi* deficiency and blood stasis of ischemic stroke were established by combining TCM syndrome and middle cerebral artery occlusion (MCAO) modeling methods. Rats were divided into control group, Buyang Huanwu Decoction (24 g/kg) group and bifidobacterium (0.81 g/kg) group. Except rats in control group were ig normal saline, rats in the other groups were ig corresponding drugs. After 72 h, whole brain of rats were collected and TTC staining were performed to detect the volume of cerebral infarction; Contents of cecum were collected to detect the intestinal flora by 16S rRNA gene sequencing; Plasma were separated to detect the plasma metabolites by metabolomics, the relationship between intestinal flora and metabolite were analyzed by establishing model. **Results** Compared with control group, Buyang Huanwu Decoction improved neurological deficit score ($P < 0.05$), reduced the infarct volume ($P < 0.001$), and regulated the gut microbiota significantly ($P < 0.01$). Therefore, it affected the plasma metabolites profile of ischemic stroke in rats model. Conversely, bifidobacterium quadruple viable tablets displayed little effect on gut microbiota and plasma metabolites, which had no effect on neurological deficit score and infarction volume. **Conclusion** Buyang Huanwu Decoction has a therapeutic effect on *qi* deficiency and blood stasis syndrome by regulating rats gut microbiota of ischemic stroke and influencing the plasma metabolism profile.

收稿日期: 2020-07-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81774174); 湖南中医药大学研究生科研创新项目 (2018CX01)

作者简介: 吴万丰, 男, 副主任医师, 博士研究生, 从事肠道微生态与脑病的中西医结合研究。Tel: 13786364825 E-mail: wwffxy@163.com

*通信作者: 葛金文, 博士, 教授, 从事中西医结合防治心脑血管病的研究, Tel: (0731)88458007 E-mail: 40831556@qq.com

成绍武, 博士, 教授, 从事神经生物学与中药抗衰老。E-mail: 702058195@qq.com

Key words: Buyang Huanwu Decoction (补阳还五汤); ischemic stroke; qi deficiency and blood stasis syndrome; gut microbiota; metabolites

肠道菌群与缺血性脑卒中关系密切, 缺血性脑卒中可改变肠道菌群的组成结构, 肠道菌群又能影响缺血性脑卒中的发生与发展^[1]。Wang 等^[2]研究发现脑梗死患者肠道微生物多样性和相对丰度与健康受试者存在显著差异, 在纲水平上, 脑梗死患者粪便中变形杆菌增多、拟杆菌减少。肠道菌群可以通过 T 细胞免疫^[3-4]及其相关代谢产物如氧化三甲胺^[5-6]、短链脂肪酸^[7]等影响缺血性脑卒中的发生发展。目前除粪菌移植之外, 缺少其他通过调节肠道菌群治疗缺血性脑卒中的方法, 且与肠道菌群相关的缺血性脑卒中代谢物靶标较少, 其临床应用仍有待深入研究。课题组前期研究发现缺血性脑卒中大鼠的肠道菌群及其相关代谢产物均发生明显改变, 共发现 308 个失调的代谢产物, 通过关联性分析发现许多代谢产物的失调与肠道菌群紧密相关; 进一步研究发现缺血性脑卒中气虚血瘀证与气滞血瘀证模型大鼠肠道菌群的组成结构之间存在显著差异, 表明肠道菌群及其相关代谢产物可能参与缺血性脑卒中的发展和中医证候的形成。

补阳还五汤出自《医林改错》, 作为治疗缺血性脑卒中气虚血瘀证的代表方剂, 具有较好的疗效。补阳还五汤及其组方成分与肠道菌群存在着复杂的联系, 孙明良等^[8]发现补阳还五汤与瑞代合用能有效增加缺血性脑卒中模型大鼠肠道乳酸杆菌和双歧杆菌数量, 显著降低大肠杆菌数量。组方中黄芪的主要有效成分黄芪多糖能增加肥胖小鼠肠道拟杆菌门与厚壁菌门的相对丰度, 降低变形菌门细菌的相对丰度^[9]。结合课题组前期研究, 推测补阳还五汤可以通过调节缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠的肠道菌群, 从而影响其内源性代谢产物, 最终影响缺血性脑卒中的神经损伤和修复。本研究旨在明确补阳还五汤对缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠肠道菌群的影响, 筛选出与肠道菌群相关的代谢产物, 为治疗缺血性脑卒中提供依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级 SD 雄性大鼠, 7~9 周龄, 体质量 240~270 g, 购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 合格证号 SCXK(湘)2016-0002。动物饲养于湖南中医药大学附属第一医院动物实验中心, 湿度 45%~

65%、室温 25 ℃、自由饮水, 摄食。适应性喂养 3 d 后开始实验。所有动物实验遵循湖南中医药大学有关实验动物管理和使用的规定, 均符合 3R 原则。

1.2 药物

补阳还五汤由黄芪 120 g、归尾 6 g、赤芍 4.5 g、地龙 3 g、川芎 3 g、桃仁 3 g、红花 3 g 组成, 购自湖南中医药大学第一附属医院, 经湖南中医药大学刘林副教授鉴定分别为豆科植物蒙古黄芪 *Astragalus membranaceus* (Fisch.) Bge. var. *mongholicus* (Bge.) Hsiao 的干燥根、伞形科植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels. 的根尾、毛茛科植物川赤芍 *Paeonia veitchii* Lynch. 的根、钜蚓科动物参环毛蚓 *Pheretima aspergillum* (E. Perrier) 的去内脏全体、伞形科植物川芎 *Ligusticum chuanxiong* Hort. 的根茎、蔷薇科植物桃 *Amygdalus persica* Linn. 的干燥成熟种子、菊科植物红花 *Carthamus tinctorius* L. 的花, 均符合《中国药典》2015 年版规定。双歧杆菌四联活菌片(规格 0.5 g/片, 批号 201711056)购自杭州远大生物制药有限公司。

1.3 试剂

2,3,5-氯化三苯基四氮唑(TTC, 上海如吉生物科技有限公司); 大脑中动脉闭塞(middle cerebral artery occlusion, MCAO)栓线-2634A4(北京西浓科技有限公司); E.Z.N.A 粪便 DNA 提取试剂盒(Omega Bio-tek 公司)。

1.4 仪器

QuantiFluor™ 荧光计(Promega 公司); HiSeq2500 PE250 测序系统(Illumina 公司); 1290 超高效液相色谱仪(Agilent 公司); AB 5600 Triple TOF 质谱仪(AB Sciex 公司); Heraeus Fresco17 离心机(Thermo Fisher Scientific 公司); 明澈 D24UV 纯水仪(Merck Millipore 公司); PS-60AL 超声仪(深圳市雷德邦电子有限公司)。

2 方法

2.1 补阳还五汤的制备

将补阳还五汤 7 种药材混合, 加入 5 倍体积的蒸馏水浸泡 2 h, 武火煮沸 0.5 h, 文火慢煎 1 h, 滤过, 收集滤液; 用 3 倍体积的蒸馏水按上述步骤再次提取滤液, 合并 2 次滤液, 采用旋转蒸发器浓缩至最终药物质量浓度为 2 g/mL(以生药量计)。

2.2 缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠模型的制备

参照张锦等^[10]方法,将大鼠按 (4.0 ± 0.5) % 体重负重后放进内径 150 cm、水深 40 cm 的圆形游泳池,水温控制在 $(20 \pm 1)^\circ\text{C}$,强迫大鼠不停游泳直至力竭后捞出,力竭表现为游泳动作失调、水淹没鼻尖、身体下沉超过 10 s 不能浮出水面。对大鼠进行适应性游泳训练 3 d,然后每天力竭性游泳 1 次,持续 21 d。于第 22 天采用改良 Longa 线栓法阻塞大鼠右侧大脑中动脉制备 MCAO 模型^[11]。大鼠手术麻醉清醒后出现左侧肢体瘫痪、站立不稳、提尾时向一侧转圈,即模型制备成功。

2.3 分组和给药

按体表面积计算,给药剂量相当于人临床剂量的 2 倍。缺血性脑卒中气虚血瘀证模型大鼠随机分为对照组、补阳还五汤(24 g/kg)组、双歧杆菌(0.81 g/kg,双歧杆菌四联活菌片溶于生理盐水配制成质量浓度为 50 mg/mL 的溶液)组,每组 12 只。大鼠神经行为学评分确定模型成功后于 1、24、48 h 相应药物,对照组 ig 4 mL 生理盐水。

2.4 神经行为学评分

大鼠 ig 药物后 72 h,采用 Longa 等^[12]制定的 5 级 4 分制评分标准进行行为学评分。评分标准为:0 分,无神经损伤症状;1 分,不能完全伸展对侧前爪;2 分,向对侧转圈;3 分,向对侧倾倒;4 分,不能自发行走,意识丧失。分值越高,说明动物行为障碍越严重。

2.5 样本采集和处理

大鼠进行神经行为学评分后,ip 10%水合氯醛(0.35 mL/100 g)麻醉,腹主动脉采血至肝素钠抗凝管中,直到血液采尽,大鼠死亡但躯体尚未僵硬时,断头取全脑行 TTC 染色,并取盲肠内容物检测肠道菌群;将采集的全血立即分离血浆,与盲肠内容物于 -80°C 保存,干冰填埋转运至广州基迪奥生物科技有限公司进行检测。

2.6 TTC 染色

大鼠断头取全脑后,以生理盐水洗涤后于 -20°C 速冻 15 min,沿大脑冠状面切成 6 片,厚 2 mm;放入 1% TTC 溶液中,于 37°C 避光染色 15 min,每 5 分钟轻微振荡混匀,染色后用 4%多聚甲醛固定并拍照。正常区为红色,缺血梗死区为白色,用 Image Pro Plus 6.0 图像分析软件计算脑梗死体积比。

脑梗死体积比 = (对侧半球体积 - 梗死侧正常体积) / 对侧半球体积

2.7 16S rRNA 基因测序和生物信息学分析

按照 E.Z.N.A 粪便 DNA 试剂盒说明书从大鼠盲肠内容物中提取总 DNA,用带有条形码的特异引物(341F: 5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3'; 806R: 5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3')和 Phanta Max Super-Fidelity DNA Polymerase 试剂盒扩增 DNA 样本中 16S rDNA 的 V3+V4 区。PCR 扩增产物切胶回收后从 2%琼脂糖凝胶中提取并纯化,用 QuantiFluor™ 荧光计进行定量。将纯化的扩增产物进行等量混合,连接测序接头,构建测序文库,上机测序,对低质量数据过滤,然后进行组装和过滤,按照一致性 $>97\%$ 将测序序列聚类为操作分类单元(operational taxonomic units, OTUs),依次进行物种注释、 α 多样性分析、 β 多样性分析,并进行组间差异比较和检验。

2.8 非靶向代谢组学检测血浆代谢产物

2.8.1 样本处理 取 100 μL 血浆样本,加入 400 μL 含内标(L-2-氯苯丙氨酸,质量浓度为 1 mg/mL)的甲醇-乙腈溶液(1:1);涡旋混匀 30 s,超声 5 min,于 -20°C 静置 1 h; 4°C 、15 338 $\times g$ 离心 15 min,取 425 μL 上清于真空浓缩器中干燥,加入 100 μL 50%乙腈溶液复溶,涡旋 30 s,超声 10 min。 4°C 、15 338 $\times g$ 离心 15 min,取 60 μL 上清于 2 mL 进样瓶,每个样本各取 10 μL 混合成质控(QC)样本,再取 60 μL 上机进行液相色谱-质谱联用(LC-MS)分析。

2.8.2 色谱条件 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱(100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.7 μm);流动相 A 为含 25 mmol/L 醋酸铵、25 mmol/L 氨水的水,流动相 B 为乙腈,梯度洗脱: 0~7 min, 95% B; 7~8 min, 95%~65% B; 8~9 min, 65%~40% B; 9~12 min, 40%~95% B; 体积流量 0.5 mL/min; 进样量 3 μL 。

2.8.3 质谱条件 AB 5600 Triple TOF 质谱仪能够在控制软件(Analyst TF 1.7, AB Sciex)控制下基于 IDA 功能进行一级、二级质谱数据采集。在每个数据采集循环中,筛选出强度最强且 $m/z > 100$ 的分子离子,采集对应的二级质谱数据。碰撞能量 30 eV,每 50 毫秒采集 15 张二级谱图。电喷雾离子源(ESI)参数设置如下:雾化气压为 413.7 kPa (60 psi),辅助气压为 413.7 kPa (60 psi),气帘气压为 241.325 kPa (35 psi),温度为 650°C ,喷雾电压为 5000 V (正离子模式)、-4000 V (负离子模式)。

2.8.4 数据分析 使用 ProteoWizard 软件将质谱原始数据转成 mzXML 格式,使用 XCMS 进行保留时间矫正、峰识别、峰提取、峰积分、峰对齐等。根据公共

数据库与软件自建二级质谱数据库对代谢物进行定性；利用归一化后的数据矩阵进行多元统计分析，包括主成分分析（principal component analysis, PCA）、偏最小二乘法-判别分析（partial least squares discrimination analysis, PLS-DA）、正交偏最小二乘法判别分析（orthogonal partial least squares discrimination analysis, OPLS-DA）；利用多元统计分析 OPLS-DA 和单变量统计分析相结合的方法筛选差异代谢物。

2.9 16S rRNA 基因测序与代谢组学关联分析

为了整合肠道微生物群和代谢组学数据，进行两组学正交偏最小二乘法（two-way orthogonal partial least squares, O2PLS）分析。利用 R 语言中 Omics PLS 计算代谢物丰度数据集和微生物区系各分类水平的数据集，建立 O2PLS 模型；进一步利用 R 语言计算微生物群在门和科水平与代谢组学数据集间的 Pearson 相关系数。在 R 语言中生成相关热图并进行网络分析。

2.10 统计学方法

采用 SPSS 21.0 进行统计分析，实验数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组之间用 t 检验分析。

3 结果

3.1 补阳还五汤对缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠神经行为学和脑梗死的影响

MCAO 术后 72 h 内对照组有 3 只大鼠死亡，



与对照组比较：*** $P < 0.001$ ；与双歧杆菌组比较：## $P < 0.01$
*** $P < 0.001$ vs control group; ## $P < 0.01$ vs bifidobacterium group

图 1 补阳还五汤对缺血性脑卒中大鼠脑梗死的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 1 Effect of Buyang Huanwu Decoction on cerebral infarction volume in ischemic stroke rats ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

3.2 补阳还五汤对缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠肠道菌群群落结构的影响

基于 OTUs 序列开展肠道细菌群落 α 多样性分析，如表 2 所示，对照组、补阳还五汤组、双歧杆菌组间 Chao、Ace、Shannon、Simpson 指数均无显著差异，提示样本肠道菌群多样性和丰富度无显著

差异。进一步分析肠道菌群 β 多样性，判断组间群落组成差异，在 OTUs 水平上基于未加权 UniFrac 距离进行主坐标分析（PCoA），如图 2-A 所示，对照组、补阳还五汤组、双歧杆菌组有明显区别；如图 2-B 所示，经 t 检验发现 3 组之间群落组成情况存在显著差异（ $P < 0.01$ ）；Anosim 检验如图 2-C 所

表 1 补阳还五汤对缺血性脑卒中大鼠神经行为学的影响 ($\bar{x} \pm s$)

Table 1 Effect of Buyang Huanwu Decoction on neurologic deficit in ischemic stroke rats ($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	n	神经行为学评分
对照	—	9	2.22 ± 0.67
补阳还五汤	24	8	1.50 ± 0.53*
双歧杆菌	0.81	10	1.70 ± 0.47

与对照组比较：* $P < 0.05$

* $P < 0.05$ vs control group

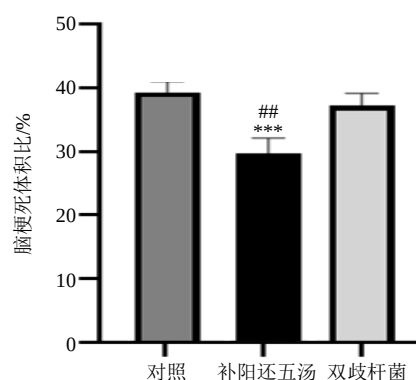
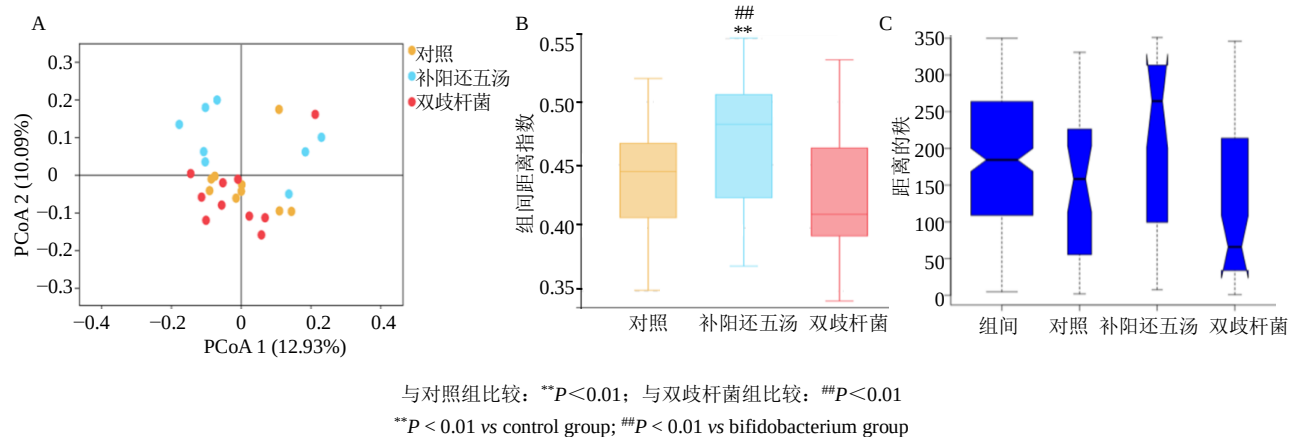


表 2 大鼠肠道菌群 α 多样性指数Table 2 α Diversity index of gut microbiota in rats

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Chao 指数	Ace 指数	Shannon 指数	Simpson 指数
对照	—	824.786	824.065	5.301	0.930
补阳还五汤	24	837.204	837.624	5.346	0.923
双歧杆菌	0.81	801.860	793.563	5.039	0.901

图 2 大鼠肠道菌群 β 多样性分析的 PCoA (A)、肠道菌群群落结构差异分析 (B) 和 Anosim 箱线图分析 (C)Fig. 2 Principal coordinate analysis (A), differences structure in gut microbiota between groups (B) and Anosim boxplot (C) based on β diversity of gut microbiota

示,证实 3 组之间组间差异显著大于组内差异。综上,补阳还五汤组肠道菌群丰富度和多样性与其他 2 组无显著性差异,但肠道菌群的组成结构与其他 2 组间存在显著性差异。

为进一步明确补阳还五汤对缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠肠道菌群分类学的影响,本研究基于细菌门和科分类水平进行差异物种分析。通过对 OTUs 序列进行物种注释,3 组在门分类水平共鉴定出 10 类菌种,其中拟杆菌门、变形菌门、厚壁菌门、疣微菌门、放线菌门、脱铁杆菌门为丰度最高的 6 个菌门,其物种分类叠图如图 3-A 所示,可见补阳还五汤组与其他组之间物种相对丰度存在差异。经 Welch's t 检验如图 3-B 所示,与对照组比较,补阳还五汤组显著下调放线菌门 (*Actinobacterium*) 相对丰度 ($P < 0.01$);与双歧杆菌组比较,补阳还五汤组显著下调变形菌门 (*Proteobacteria*) 相对丰度 ($P < 0.05$),上调拟杆菌门 (*Bacteroidetes*) 相对丰度 ($P < 0.05$),双歧杆菌组与对照组之间未发现显著差异的物种。在科分类水平上,如图 3-C 所示,与对照组比较,补阳还五汤组显著下调脱硫弧菌科 (*Desulfovibrionaceae*)、红螯菌科 (*Coriobacteriaceae*)、理研菌科 (*Rikenellaceae*)、消化球菌科 (*Peptococcaceae*) 相对丰度 ($P < 0.05$ 、 0.01),双歧杆菌组显著下调氨基酸球菌科

(*Acidaminococcaceae*) 相对丰度 ($P < 0.05$);补阳还五汤组与双歧杆菌组之间无明显差异菌群。

为进一步分析补阳还五汤改变肠道菌群结构后可能引起的功能变化,采用 Tax4Fun 对群落进行京都基因与基因组百科全书 (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG) 功能预测。通过热图展示 KEGG 通路二级水平上 KO 丰度前 20 的通路,如图 4-A 所示,不同样本之间存在差异。经 Welch's t 检验如图 4-B 所示,发现与对照组比较,补阳还五汤组显著上调多糖的生物合成及代谢 (*glycan biosynthesis and metabolism*)、转运及分解代谢 (*transport and catabolism*),显著下调细胞运动性 (*cell motility*) ($P < 0.05$),双歧杆菌组无显著性差异。

综上,补阳还五汤可以通过改变缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠肠道菌群物种组成结构,从而影响菌群相关的功能。双歧杆菌四联活菌片对缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠肠道菌群影响较小,且对其功能影响与对照组之间无显著差异,可能与胃酸大量杀伤活菌有关。补阳还五汤较双歧杆菌四联活菌片有更强的调节肠道菌群作用。

3.3 补阳还五汤对缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠血浆代谢产物的影响

研究表明,肠道菌群可以通过代谢产物影响缺血性脑卒中神经损伤和修复^[13]。为了探讨补阳还五

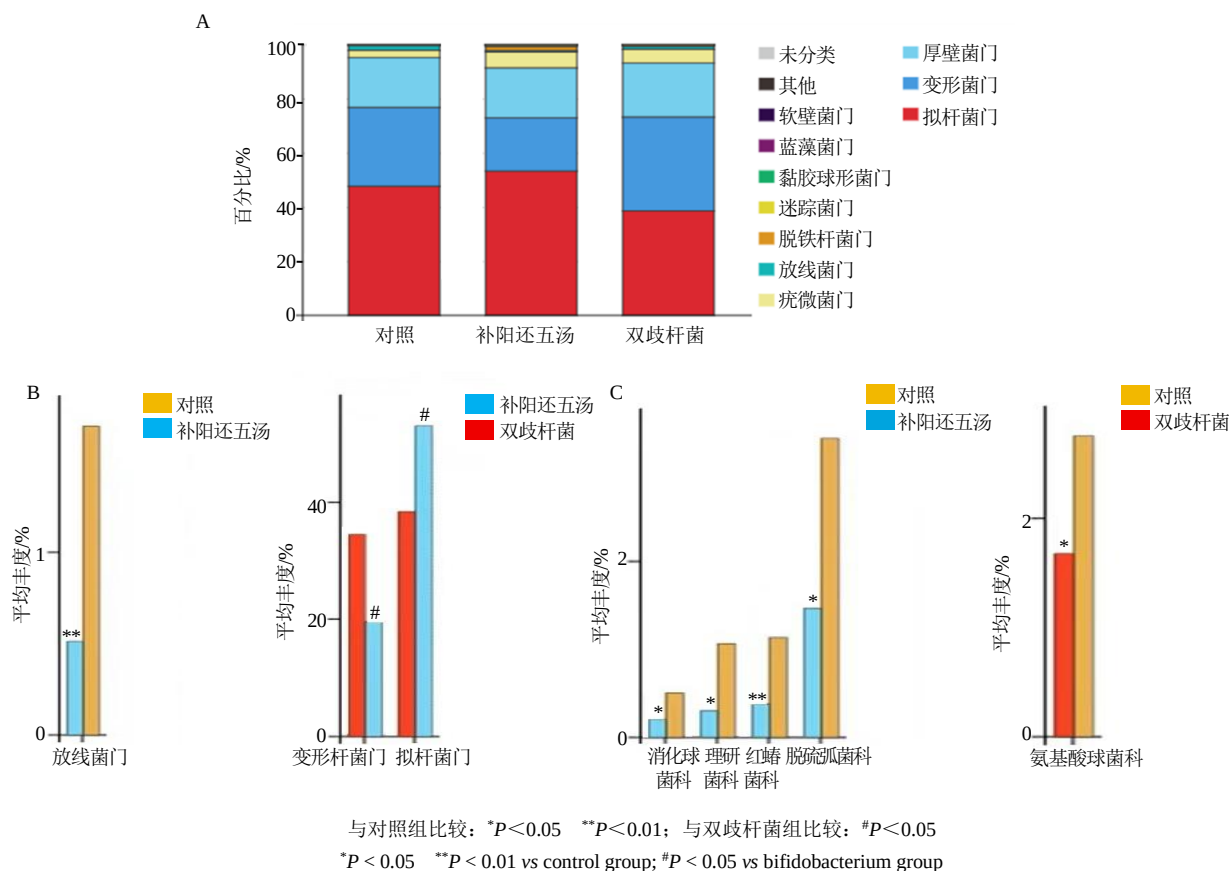


图 3 肠道菌群门分类水平物种分类叠图 (A)、门分类水平的差异分析 (B) 和科分类水平的差异分析 (C)

Fig. 3 Taxonomy stack distribution of phylum (A), species differences between groups on phylum (B) and species differences between groups on family (C) of gut microbiota

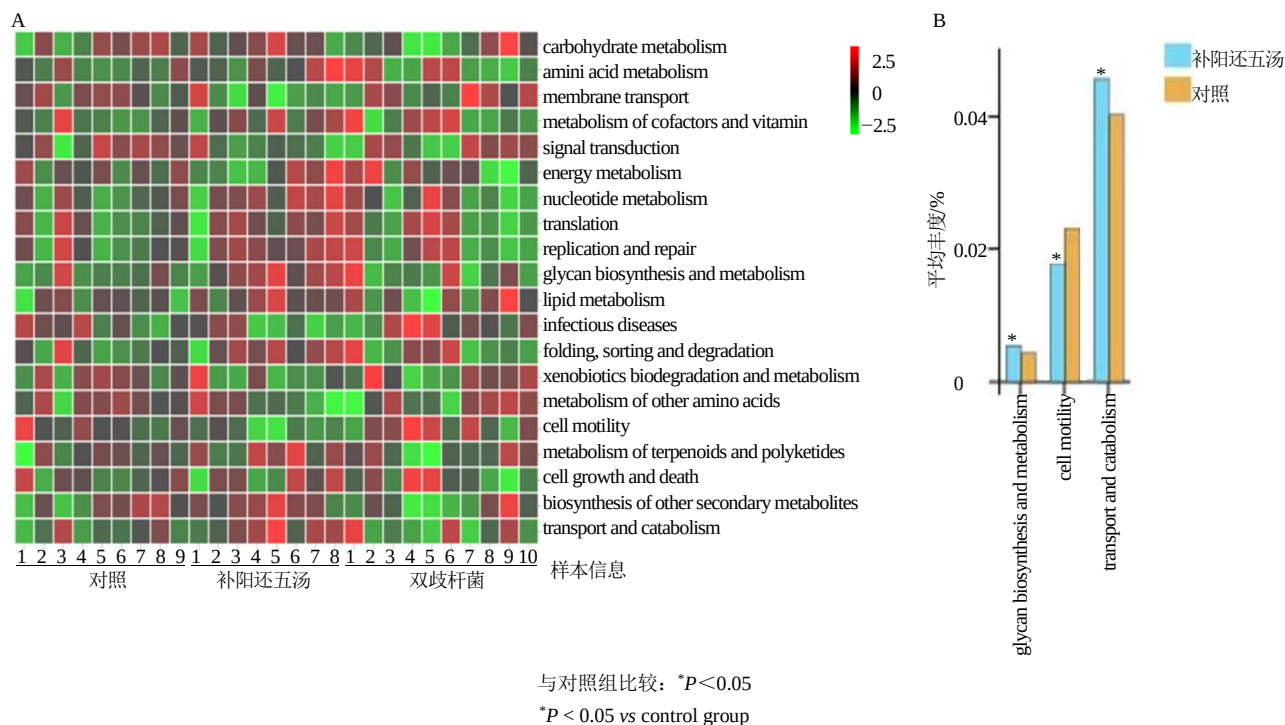


图 4 肠道菌群群落 KEGG 通路相关热图 (A) 和经 Welch's t 检验差异的 KEGG 通路 (B)

Fig. 4 Heat map of KEGG pathway (A) and difference of KEGG pathway by Welch's t test (B) of gut microbiota community

汤影响缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠的肠道菌群组成后,对相关代谢产物的影响,本研究采用非靶向代谢组学即 LC-MS 法,分析大鼠血浆代谢产物。如图 5 所示,利用 OPLS-DA 发现正离子模式和负离子模式下,与对照组比较,补阳还五汤组大鼠血浆代谢谱存在差异,经交叉验证证实模型稳定(正离子模式: $R^2_Y=0.881$ 、 $Q^2_Y=0.293$; 负离子模式: $R^2_Y=0.873$ 、 $Q^2_Y=0.26$)。如图 6 所示,差异代谢物聚类热图直观显示出对照组与补阳还五汤组之间在正、负离子模式下的代谢产物的聚类差异,提示对照组与补阳还五汤组间代谢轮廓存在差异。补阳还五汤组与双歧杆菌组、双歧杆菌组与对照组模型稳定性差,有过拟合现象,提示其代谢轮廓差异性不明显。

结合多元统计分析 OPLS-DA 中 $VIP \geq 1$ 且 $P < 0.05$ 来筛选不同组间的显著差异代谢物^[14],发现 POS 和 NEG 模式下有多个代谢物失调。与对照组比较,在 POS 模式下补阳还五汤组上调 10 个代谢产物,下调 17 个代谢产物;在 NEG 模式下,补阳还五汤组上

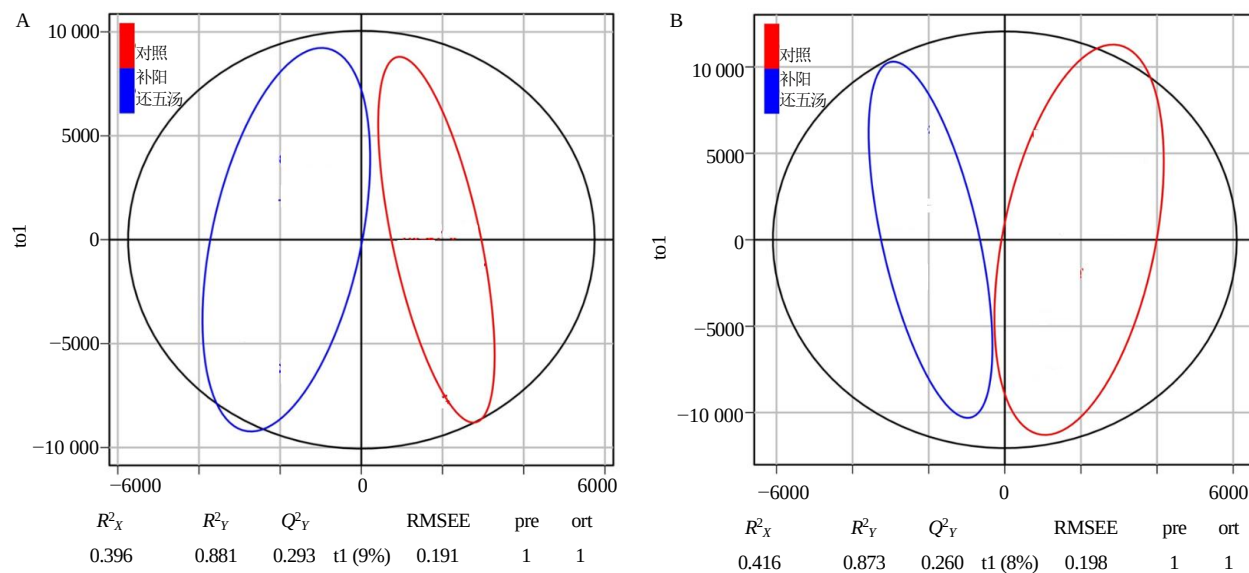


图 5 正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 下对照组与补阳还五汤组大鼠血浆代谢产物 OPLS-DA 得分图

Fig. 5 Plasma metabolites OPLS-DA scores of rats in control group and Buyang Huanwu Decoction group in positive ion mode (A) and negative ion mode (B)

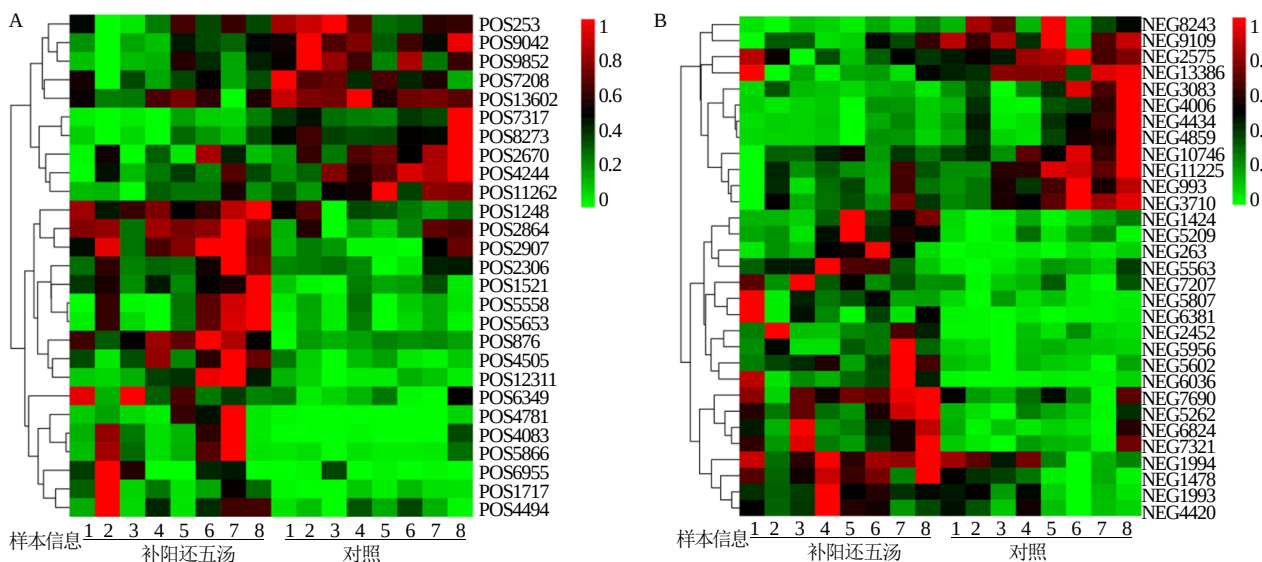


图 6 正离子模式 (A) 和负离子模式 (B) 下对照组与补阳还五汤组大鼠血浆差异代谢产物的聚类热图

Fig. 6 Plasma metabolites cluster heat map of rats in control group and Buyang Huanwu Decoction group in positive ion mode (A) and negative ion mode (B)

调 12 个代谢产物, 下调 19 个代谢产物。由于大部分代谢物未定性, 故只列出部分已定性且有显著差异的代谢产物, 见表 3。综上, 补阳还五汤可以改变缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠的血浆代谢产物, 可能是补阳还五汤治疗缺血性脑卒中的重要途径。

表 3 补阳还五汤对缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠部分内源性代谢物的影响

Table 1 Effect of Buyang Huanwu Decoction on endogenous metabolites in IS rats with qi deficiency and blood stasis syndrome

ID	名称	m/z	VIP 值	P 值	补阳还五汤 vs 对照	补阳还五汤 vs 双歧杆菌
POS876	甘氨酸-苏氨酸	177.086 13	1.291 12	0.000 04	↑	↑
POS1248	3-(2-羟乙基)吡啶	203.113 04	4.456 42	0.001 73	↑	↑
POS2907	油酸酰胺	282.278 09	3.971 29	0.001 80	↑	—
POS4505	华法林	353.067 34	1.118 40	0.004 18	↑	—
POS4803	L-棕榈酰肉碱	387.340 76	2.176 35	0.003 15	↑	—
POS5558	DL-O-酪氨酸	401.114 73	2.743 59	0.048 28	↑	—
POS5653	磷酸硫酸素	405.108 63	1.609 98	0.030 16	↑	—
POS6349	异甘草苷	436.158 39	1.082 02	0.023 73	↑	—
POS7208	α-亚麻酸肉碱	482.358 35	6.802 98	0.028 34	↓	—
POS2306	棕榈酰胺	256.262 34	1.326 10	0.036 71	↑	—
NEG5807	色氨酸-精氨酸	359.186 98	2.164 70	0.015 20	↑	↑
NEG5956	L-同型半胱氨酸	365.030 65	1.049 07	0.034 85	↑	—
NEG993	右旋葡萄糖内酯	175.024 87	1.555 21	0.029 33	↓	↓

“↑”表示上调, “↓”表示下调

“↑” denotes upregulation, “↓” denotes downregulation

数 (Pearson correlation coefficient, cor), 对肠道微生物组和血浆代谢组学进行关联分析^[15-16]。O2PLS 模型显示了肠道微生物与代谢物之间的共变 ($R^2_X=0.537$ 、 $R^2_Y=0.354$ 、 $R^2_{Xcor}=0.537$ 、 $R^2_{Ycor}=0.354$), 肠道菌群在科水平的变化与代谢物变化相关, 提示补阳还五汤可以通过改变缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠的肠道菌群, 从而影响其血浆代谢产物 ($|cor|>0.5$ 、 $P<0.05$)。为清晰直观地呈现微生物与代谢物的相关性, 取 $|cor|>0.5$ 的关系以热图展示, 如图 7-A 所示, 科水平微生物与代谢产物存在较强的相关性, 补阳还五汤组显著下调红蝾菌科 (Coriobacteriaceae) 丰度, 与代谢产物 POS8344、POS13328、POS13329、POS2402、POS4011、POS7208 (α-亚麻酸肉碱) 等呈正相关, 与 POS862、POS630、POS4803 (L-棕榈酰肉碱) 等呈负相关; 补阳还五汤组显著下调理研菌科 (Rikenellaceae) 丰度, 与 POS5541、NEG2023、NEG7802、NEG7803、NEG7847 呈正相关。

为了进一步展示肠道微生物与血浆代谢物之间的关系, 在肠道菌群科水平将配对显著相关的微生物与代谢物构建相关网络, 如图 7-B 所示, 可见 1 个代谢物可以与多个肠道菌群相关, 1 个肠道菌群可以与多个代谢物相关, 提示肠道菌群与代谢物之

3.4 补阳还五汤通过改变缺血性脑卒中大鼠肠道菌群影响其血浆代谢轮廓

为了探讨补阳还五汤组改变缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠肠道菌群结构与其血浆代谢产物之间的关联性, 本研究利用 O2PLS 模型结合皮尔逊相关系

间存在复杂关系。综上, 补阳还五汤可以通过影响缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠肠道菌群的组成结构, 从而影响其相关代谢产物, 这可能是补阳还五汤治疗缺血性脑卒中的重要机制。

4 讨论

缺血性脑卒中的病因和病理生理过程复杂, 对于无法在时间窗内开通血管恢复局部血液供应的患者, 其缺血半暗带脑组织继发性损伤机制更为复杂, 目前临床上仍缺少有效的生物标记物和治疗靶点。本研究采用高通量 16S rRNA 基因测序和非靶向代谢组学分析补阳还五汤对缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠肠道微生物群和血浆代谢产物的影响, 通过整合肠道微生物和代谢组学数据, 发现补阳还五汤能够显著改变缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠肠道微生物群落组成结构及其血浆代谢产物, 且肠道菌群的改变与血浆代谢物变化显著相关, 表明补阳还五汤不仅改变了肠道菌群, 还影响了其相关的代谢表型。整合肠道菌群和代谢产物数据有助于筛选补阳还五汤治疗缺血性脑卒中有效的血浆代谢产物及其相应的肠道微生物群落, 为其临床应用提供思路。

补阳还五汤为治疗缺血性脑卒中气虚血瘀证的代表方剂, 方中重用黄芪 120 g, 约为其他药材总用量的 5 倍。黄芪及其有效成分具有调节肠道菌群的

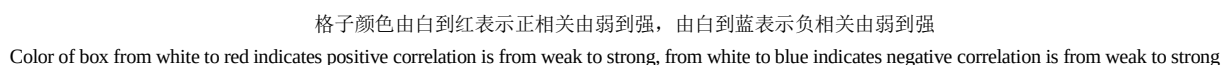


Fig. 7 Heat map analysis (A) and network (B) of relationship between gut microbiota and plasma metabolites by O2PLS model

作用。张宇等^[17]研究发现黄芪多糖有扶植有益菌、抑制有害菌的作用；孙立群等^[18]采用纳米级黄芪治疗溃疡性结肠炎大鼠，发现大鼠肠道内双歧杆菌、乳酸杆菌水平明显上升，肠球菌、肠杆菌水平下降，大鼠肠道菌群比例恢复正常。课题组前期研究发现，缺血性脑卒中大鼠肠道菌群失调表现为厚壁菌门、拟杆菌门丰度下调，变形菌门、脱铁杆菌门丰度上调，与 Wang 等^[12]研究一致，提示上述肠道菌群失调可能导致缺血性脑卒中神经损伤加重。本研究结果显示，与双歧杆菌组比较，补阳还五汤显著下调缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠肠道变形菌门，显著上调拟杆菌门；与对照组比较，显著下调放线菌门（Actinobacterium），表明补阳还五汤可以调节缺血性脑卒中后的肠道菌群失调，促进肠道菌群正常结构的恢复，且作用明显优于双歧杆菌四联活菌片。补阳还五汤对肠道菌群的调节作用可能是其治疗缺血性脑卒中气虚血瘀证的重要机制，后续将进一步通过粪菌移植的方法来验证上述机制。

为了阐明缺血性脑卒中后肠道菌群的变化导致代谢组学的变化，本研究对大鼠血浆进行非靶向代谢谱分析。通过 OPLS-DA 和 PLS-DA 等多变量统计分析显示，补阳还五汤改变了缺血性脑卒中大鼠血浆的代谢轮廓。与对照组比较，补阳还五汤组共发现甘氨酸、苏氨酸、酪氨酸、精氨酸等 58 种血浆代谢产物存在显著性差异，表明补阳还五汤可能通过影响氨基酸代谢发挥治疗缺血性脑卒中的作用；补阳还五汤组油酸酰胺、异甘草苷血浆浓度分别上调 2.17 倍和 2.43 倍，提示抗氧化作用是其参与缺血性脑卒中后神经保护的机制^[19-20]；补阳还五汤组华法林血浆浓度上调 3.43 倍，提示补阳还五汤可降低缺血性脑卒中血液高凝状态。这些代谢产物均可能是补阳还五汤治疗缺血性脑卒中的重要物质基础，后续有待进一步验证。非靶向代谢组学检测的代谢产物相对分子质量一般小于 1000，且质谱数据库资料有限，尤其是中药有效成分质谱数据的短缺，导致大部分物质无法识别定性，可能存在未发现的具重要治疗作用的血浆代谢产物。

肠道菌群相关的代谢表型变化有助于了解疾病的发生发展^[21-22]。本研究将 2 个组学的数据通过 O2PLS 模型进行结合分析，发现某些血浆代谢产物与组间有显著差异的肠道菌群存在较强的关联性，这些代谢产物可能是肠道菌群直接作用于缺血性脑卒中的重要物质。结果显示，与对照组比较，补阳

还五汤组红蜡菌科丰度显著下调，导致其相关代谢产物 L-棕榈酰肉碱（POS4803）显著上调、 α -亚麻酸肉碱（POS7208）显著下调，提示补阳还五汤通过调节肠道菌群从而影响肉碱的代谢和吸收，而肉碱在神经系统中有重要的抗氧化保护作用。

综上所述，补阳还五汤可以调节缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠肠道菌群，促进缺血性脑卒中后大鼠肠道菌群的恢复，并且影响其血浆代谢轮廓，而部分代谢产物的改变与肠道菌群显著相关，提示肠道菌群可能是补阳还五汤发挥治疗作用的重要生物学基础，作用机制可能与影响代谢产物有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Nam H S. Gut microbiota and ischemic stroke: The role of trimethylamine N-oxide [J]. *J Stroke*, 2019, 21(2): 151-159.
- [2] Wang W Y, Li X, Yao X H, et al. The characteristics analysis of intestinal microecology on cerebral infarction patients and its correlation with apolipoprotein E [J]. *Medicine*, 2018, 97(41): e12805.
- [3] Singh V, Roth S, Llovera G, et al. Microbiota dysbiosis controls the neuroinflammatory response after stroke [J]. *J Neurosci*, 2016, 36(28): 7428-7440.
- [4] Benakis C, Brea D, Caballero S, et al. Commensal microbiota affects ischemic stroke outcome by regulating intestinal $\gamma\delta$ T cells [J]. *Nat Med*, 2016, 22(5): 516-523.
- [5] Zhu C, Li G Z, Lv Z, et al. Association of plasma trimethylamine-N-oxide levels with post-stroke cognitive impairment: A 1-year longitudinal study [J]. *Neurol Sci*, 2020, 41(1): 57-63.
- [6] Zhai Q J, Wang X, Chen C, et al. Prognostic value of plasma trimethylamine N-oxide levels in patients with acute ischemic stroke [J]. *Cell Mol Neurobiol*, 2019, 39(8): 1201-1206.
- [7] Zeng X L, Gao X X, Peng Y, et al. Higher risk of stroke is correlated with increased opportunistic pathogen load and reduced levels of butyrate-producing bacteria in the gut [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9: 4.
- [8] 孙明良, 施玖龙. 补阳还五汤与瑞代合用对缺血再灌注损伤大鼠保护作用及肠道菌群影响 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(9): 2274-2278.
- [9] 何旭云, 贺姣姣, 郑宁宁, 等. 黄芪多糖对肥胖小鼠的减肥作用与调节肠道菌群的关系研究 [J]. *世界中医药*, 2016, 11(11): 2379-2384.
- [10] 张锦, 张允岭, 李秀, 等. 缺血性脑卒中气虚血瘀证大鼠模型的研究 [J]. *北京中医药大学学报*, 2008, 31(9):

- 590-593.
- [11] 廖君. 基于铁代谢失调探讨脑缺血损伤新机制及益气活血法的干预作用 [D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2014.
- [12] Longa E Z, Weinstein P R, Carlson S, *et al.* Reversible middle cerebral artery occlusion without craniectomy in rats [J]. *Stroke*, 1989, 20(1): 84-91.
- [13] Durgan D J, Lee J, McCullough L D, *et al.* Examining the role of the microbiota-gut-brain axis in stroke [J]. *Stroke*, 2019, 50(8): 2270-2277.
- [14] Saccenti E, Hoefsloot H C J, Smilde A K, *et al.* Reflections on univariate and multivariate analysis of metabolomics data [J]. *Metabolomics*, 2014, 10(3): 361-374.
- [15] Shankar V, Homer D, Rigsbee L, *et al.* The networks of human gut microbe-metabolite associations are different between health and irritable bowel syndrome [J]. *ISME J*, 2015, 9(8): 1899-1903.
- [16] Lu K, Abo R P, Schlieper K A, *et al.* Arsenic exposure perturbs the gut microbiome and its metabolic profile in mice: An integrated metagenomics and metabolomics analysis [J]. *Environ Health Perspect*, 2014, 122(3): 284-291.
- [17] 张宇, 沈宇, 胡新俊, 等. 黄芪多糖对微生态调节作用的物质基础研究初探 [J]. 中国微生态学杂志, 2012, 24(2): 113-116.
- [18] 孙立群, 梁金花, 高月娟. 探讨纳米级中药黄芪对溃疡性结肠炎大鼠肠道菌群失调的调整作用 [J]. 中国中医急症, 2012, 21(8): 1263-1265.
- [19] 周书娟. 褐藻羊栖菜等化学成分及其抗氧化活性的研究 [D]. 温州: 温州大学, 2015.
- [20] 李想, 李冀. 甘草提取物活性成分药理作用研究进展 [J]. 江苏中医药, 2019, 51(5): 81-86.
- [21] Arrieta M C, Stiemsma L T, Dimitriu P A, *et al.* Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(307): 152.
- [22] Kamada N, Seo S U, Chen G Y, *et al.* Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(5): 321-335.

[责任编辑 李亚楠]