

毛冬青三萜皂苷对动脉粥样硬化大鼠肠道菌群的影响

白荣钰¹, 易欢¹, 陈丰连¹, 邱静文¹, 王莹¹, 陈冰莹¹, 李瑜², 张蕾^{1*}

1. 广州中医药大学中药学院, 广东 广州 510006

2. 广州中医药大学护理学院, 广东 广州 510006

摘要: 目的 探讨毛冬青三萜皂苷对动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 大鼠肠道菌群的影响。方法 采用高脂饮食联合 ip 维生素 D₃ 诱导 AS 大鼠模型, 给予辛伐他汀和毛冬青三萜皂苷进行干预, 检测各组大鼠血清中总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triglycerides, TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、一氧化氮 (nitric oxide, NO)、内皮素-1 (endothelin-1, ET-1)、血管紧张素-II (angiotensin-II, Ang-II) 水平; 采用苏木素-伊红 (HE) 染色法观察各组大鼠胸主动脉病理变化; 通过高通量测序检测各组大鼠肠道菌群变化。结果 与模型组比较, 毛冬青三萜皂苷组 AS 斑块减少, 血管内皮功能改善, 血清中 TC、ET-1 和 Ang-II 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), HDL-C、NO 水平明显升高 ($P < 0.05, 0.01$), NO/ET-1 显著升高 ($P < 0.05, 0.01$)。16S rRNA 测序结果显示, 模型组大鼠肠道菌群紊乱, 经毛冬青三萜皂苷干预后大鼠肠道菌群结构改善, 拟杆菌等益生菌相对丰度增加, 大肠杆菌等致病菌相对丰度降低。结论 毛冬青三萜皂苷可以调节 AS 大鼠肠道菌群结构, 对 AS 大鼠具有较好的治疗作用。

关键词: 毛冬青; 三萜皂苷; 动脉粥样硬化; 肠道菌群; 高通量测序

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2021)20-6245-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2021.20.014

Effect of triterpenoid saponins from *Ilex pubescens* on intestinal flora in atherosclerotic rats

BAI Rong-yu¹, YI Huan¹, CHEN Feng-lian¹, QIU Jing-wen¹, WANG Ying¹, CHEN Bing-ying¹, LI Yu², ZHANG Lei¹

1. College of Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

2. College of Nursing, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To investigate the effect of triterpene saponins from *Ilex pubescens* (IPTS) on intestinal flora in atherosclerotic (AS) rats. **Methods** High-fat diet combined with ip vitamin D₃ was used to induce AS rats model, simvastatin and IPTS were used for intervention. Total cholesterol (TC), triglycerides (TG), low density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high density lipoprotein cholesterol (HDL-C), nitric oxide (NO), endothelin-1 (ET-1) and angiotensin-II (Ang-II) levels in serum of rats in each group were detected; Hematoxylin-eosin (HE) staining method was used to observe the pathological changes of thoracic aorta of rats in each group; High-throughput sequencing was used to detect the changes in intestinal flora of rats in each group. **Results** Compared with model group, AS plaques in IPTS group was reduced, vascular endothelial function was improved, levels of TC, ET-1 and Ang-II in serum were significantly reduced ($P < 0.05, 0.01$), levels of HDL-C and NO were increased ($P < 0.05, 0.01$), and NO/ET-1 was increased ($P < 0.05, 0.01$). 16S rRNA sequencing results showed that intestinal flora of rats in model group was disordered, the structure of intestinal flora of rats was improved after the intervention of IPTS, the relative abundance of probiotics

收稿日期: 2021-03-30

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81803824); 广东省科技计划项目(2016A020226031); 广东省自然科学基金资助项目(2018A030313328); 广东省中医药局项目(20211112)

作者简介: 白荣钰(1997—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中药药效物质基础及其作用机制研究。

Tel: 15322258145 E-mail: 312095174@qq.com

*通信作者: 张蕾, 女, 硕士生导师, 教授, 研究方向为中药药效物质基础及其作用机制研究。

Tel: 15622182155 E-mail: zhanglei261291@gzucm.edu.cn

such as *Bacteroidetes* were increased, and relative abundance of pathogenic bacteria such as *Escherichia* were decreased.

Conclusion IPTS can regulate the structure of intestinal flora of AS rats and has a good therapeutic effect on AS rats.

Key words: *Ilex pubescens* Hook. et Am.; triterpene saponins; atherosclerosis; intestinal flora; high-throughput sequencing

动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是一种慢性炎症性疾病, 是冠心病、脑卒中等心脑血管疾病发生发展的病理基础, 其发病机制复杂, 涉及内皮细胞损伤、脂质沉积、炎症细胞的聚集浸润、炎症因子的释放、血小板的聚集活化、血管平滑肌增殖与迁移等多种病理过程^[1]。AS 与人体衰老过程密切相关, 其相关疾病的死亡率位居我国首位。研究表明, 肠道微生物结构和功能的异常可通过三甲胺/三甲胺 *N*-氧化物、初级和次级胆汁酸、短链脂肪酸、细菌内毒素易位等多种途径促进 AS、高血压、心衰、心肌缺血等心血管疾病的发生和发展^[2]。Eelke 等^[3]将 Casp1^{-/-}小鼠的促炎性肠道菌群移植至 Ldlr^{-/-}小鼠, 发现促炎性肠道菌群会增强小鼠全身性炎症反应并加速 AS 的形成。在中医“心与小肠相表里”的理论指导下, 越来越多的研究表明在中医药治疗心血管疾病的作用机制中, 中药与肠道微生态相互作用的过程是关键的一环^[4]。

毛冬青是冬青科冬青属植物毛冬青 *Ilex pubescens* Hook. et Am. 的干燥根, 主产于广东、广西、湖南等地, 具有消肿止痛、活血通脉、清热解毒等功效^[5-6], 已被开发成针剂、片剂、胶囊剂等, 临床上广泛用于治疗冠状动脉粥样硬化性心脏病、脑血栓、血栓性脉管炎、中心视网膜炎等疾病^[5]。毛冬青主要活性成分为三萜皂苷类成分^[7-8]。毛冬青三萜皂苷 (IPTS) 的口服生物利用度低, 本课题组前期研究表明, IPTS 主要分布于胃肠道和胸主动脉, 仅有少量分布于心脏、肝脏和肾脏, 脑中几乎检测不到^[9]。其较低的生物利用率难以直接解释其对 AS 等心血管疾病的治疗作用, 本研究拟探究 IPTS 对 AS 大鼠肠道菌群的调节作用及其机制, 为 IPTS 治疗 AS 提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量 (180±20) g, 6~7 周龄, 购自广州中医药大学实验动物中心, 动物合格证号 SCXK (粤) 2013-0034。动物于广州中医药大学实验动物中心 SPF 级动物房适应性喂养 1 周, 温度 (24±2) °C、12 h 光昼交替, 自由进食饮水。动物实验经广州中医药大学实验动物伦理审查

委员会批准 (批准号 ZYD-2020-065)。

1.2 药材

毛冬青购自广州致信药业股份有限公司, 经广州中医药大学张丹雁教授鉴定为冬青科冬青属植物毛冬青 *I. pubescens* Hook. et Am. 的干燥根。

1.3 药品与试剂

毛冬青皂苷 B₁ 对照品 (质量分数 >98%) 购自维克奇生物科技有限公司; 高脂饲料 (由 3%胆固醇、0.5%胆酸钠、0.2%丙基硫氧嘧啶、10%猪油、5%白糖、81.3%基础饲料组成) 购自北京华阜康生物科技股份有限公司; 羧甲基纤维素钠 (CMC-Na)、甲醛溶液和水合氯醛购自广州苏铨粤贸易有限公司; 辛伐他汀片 (20 mg/片, 批号 T020243) 购自上海信谊万象药业股份有限公司; 维生素 D₃ 注射液 (批号 20190401) 购自哈尔滨市道外区宏达动物药品厂; 总胆固醇 (total cholesterol, TC) 试剂盒 (批号 20190924)、三酰甘油 (triglycerides, TG) 试剂盒 (批号 201909016)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 试剂盒 (批号 20190905)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C) 试剂盒 (批号 20190905) 和一氧化氮 (nitric oxide, NO) 试剂盒 (批号 20190904) 购自南京建成生物工程研究所; 内皮素-1 (endothelin-1, ET-1) ELISA 试剂盒 (批号 I30013321) 和血管紧张素-II (angiotensin-II, Ang-II) ELISA 试剂盒 (批号 J22013320) 购自武汉华美生物工程有限公司; 琼脂糖购自广州浩玛生物科技有限公司; 3422A 100bp DNA ladder 购自日本 Takara 公司; 引物由美国 Thermo Fisher Scientific 公司合成; 无水乙醇均为分析纯, 购自广州苏城粤有限公司; 凝胶回收试剂盒购自美国 Omega 公司; 粪便基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司。

1.4 仪器

多功能酶标仪 (美国 Promega 公司); 生化培养箱 (上海和呈仪器制造有限公司); 冷冻切片机 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); 恒温水浴箱 (上海一恒科技有限公司); 制冰机 (郑州南北仪器设备有限公司); 实验室纯水系统 (上海和泰仪器有限公

司); 5417R 型冷冻离心机(德国 Eppendorf 公司); 涡旋混合器电泳仪(北京六一生物科技有限公司); 凝胶成像仪(上海天能科技有限公司); PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

2 方法

2.1 IPTS 的制备

将毛冬青饮片打成粗粉, 加入 10 倍量水浸泡 24 h, 定时搅拌, 浸泡 2 次, 滤过, 弃去滤液。粗粉再按料液比 1:10 加入 85%~90%乙醇, 加热回流提取 2 次, 1 h/次, 收集滤液, 浓缩, 干燥后得提取物粉末。粉末分散于 5 倍量 10%~20%乙醇中, 滤过, 弃去滤液, 沉淀经干燥后得 IPTS。以毛冬青皂苷 B₁ 为对照品, 采用比色法^[10]测定总三萜皂苷的含量, 标准曲线为 $Y=369.95X-0.0529 (R^2=1)$, 计算得三萜皂苷的质量分数为 81.63%。

2.2 造模、分组与给药

SD 大鼠随机分为对照组、模型组、辛伐他汀(5 mg/kg)组和 IPTS 低、中、高剂量(30、60、120 mg/kg, 分别相当于临床剂量的 0.5、1.0、2.0 倍)组, 每组 10 只。模型组、辛伐他汀组和 IPTS 低、中、高剂量组大鼠给予高脂饲料喂养 8 周, 并于第 3 天 ip 维生素 D₃ 注射液(7×10⁵ U/kg); 对照组大鼠给予正常饲料喂养, 并于第 3 天 ip 等体积 0.9%氯化钠溶液。IPTS 溶于 0.5% CMC-Na 分别配制质量浓度为 30、60、120 mg/mL 的溶液, 超声 20 min 使其分散均匀; 辛伐他汀片溶于 0.5% CMC-Na 配制质量浓度为 5 mg/mL 的溶液。各给药组大鼠自造模第 1 天 ig 相应药物(10 mL/kg), 对照组和模型组大鼠 ig 等体积 0.5% CMC-Na 溶液, 1 次/d, 连续 8 周。

2.3 粪便样本采集

给药结束后, 将大鼠置于代谢笼中, 连续收集 8 h 的粪便样本, 分装于 2 mL 冷冻离心管中, 于 -80 °C 保存。

2.4 IPTS 对 AS 大鼠血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C、NO、ET-1 和 Ang-II 含量的影响

收集粪便后, 大鼠禁食不禁水 12 h, 麻醉后腹主动脉取血。血液静置 30 min, 4 °C、3800 r/min 离心 10 min, 分离得到血清。按照试剂盒说明书测定血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C、NO、ET-1 和 Ang-II 含量。

2.5 IPTS 对 AS 大鼠胸主动脉病理变化的影响

大鼠失血致死, 解剖取胸主动脉, 除去胸主动

脉的脂肪组织, 于冰浴上用 0.9%氯化钠溶液冲洗组织, 切取部分胸主动脉组织置于 4%甲醛溶液中, 用常规石蜡包埋, 均匀切片, 进行苏木素-伊红(HE)染色, 于显微镜下观察并拍照。

2.6 粪便中细菌 DNA 的提取与测序

2.6.1 DNA 的提取与检测 按照粪便基因组 DNA 提取试剂盒说明书提取总 DNA, 采用微量分光光度计测定样品 DNA 的浓度和纯度, 采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测样品 DNA 完整性。

2.6.2 PCR 扩增及产物检测 选用上游引物 515F(5'-GTGYCAGCMGCCGCGGTAA-3')和下游引物 806R(5'-GGACTACNVGGGTWTCTAAT-3')对大鼠粪便样本的 16S rRNA V4 区进行扩增。采用 1%琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物片段长度和浓度, 主带长度在 290~310 bp 的样品可用于进一步的实验; 利用 GeneTools 软件(Version 4.03.05.0)对 PCR 产物进行浓度对比, 再计算每个样品所需的体积, 将每个 PCR 产物进行混合。使用凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物, 用 TE 缓冲液洗脱回收目标 DNA 片段。

2.6.3 16S rRNA 基因测序 使用 Illumina Hiseq2500 平台对样本进行 16S 扩增子测序, 采用 paired-end 双端测序方式对产物的 V4 区域进行高通量测序, 测序过程在广东美格基因科技有限公司进行。

2.6.4 测序数据分析 利用 USEARCH 软件对样本的 Clean Tags 进行分类学单元操作(operational taxonomic unit, OTU)聚类, 借助 QIIME 平台对 OTU 数据进行 β 多样性分析、Lefse 分析和 PICRUST 功能预测。β 多样性分析主要是针对组间差异性进行分析, 可以判断相同条件下样本组成的相似程度, 样本之间的距离表示样本的组成相似程度, 样本点越接近说明样品的相似程度越高。Lefse 分析可以对多个组别之间进行比较, 从而找到各组在丰度上有显著差异的物种。通过 PICRUST 功能预测来推测样本中的菌群基因功能的构成, 从而分析不同组别之间在功能上的差异。

2.7 统计学方法

采用 SPSS 19.0 进行数据统计分析, 计量资料满足正态分布以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 计量资料不满足正态分布用 M(P25, P75)描述; 多组资料进行单因素方差分析检验, 如方差齐采用 LSD 检验, 如方差不齐采用 Dunnett T3 检验; 不符合正态分布的计量资料比较采用非参数 Mann-Whitney U 检验。

3 结果

3.1 IPTS 对 AS 大鼠血清中 TC、TG、LDL-C、HDL-C、NO、ET-1 和 Ang-II 含量的影响

如表 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 TC、TG 和 LDL-C 水平明显升高 ($P < 0.01$), HDL-C 水平明显降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 辛伐他汀组和 IPTS 高剂量组大鼠血清中 TC 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), HDL-C 水平明显升高 ($P < 0.05$); 辛伐他汀组大鼠血清中 LDL-C 水平显

著降低 ($P < 0.05$)。

如表 2 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠血清中 NO 水平显著降低 ($P < 0.01$), ET-1 和 Ang-II 水平显著增高 ($P < 0.05$ 、 0.01), NO/ET-1 显著降低 ($P < 0.01$); 与模型组比较, IPTS 各剂量组大鼠血清中 NO 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), ET-1 和 Ang-II 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01); IPTS 各剂量组和辛伐他汀组大鼠血清中 NO/ET-1 显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

表 1 IPTS 对 AS 大鼠血清中 TC、TG、LDL-C 和 HDL-C 含量的影响 ($n = 10$)

Table 1 Effect of IPTS on contents of TC, TG, LDL-C and HDL-C in serum of AS rats ($n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	TC/(mmol·L ⁻¹)	TG/(mmol·L ⁻¹)	LDL-C/(mmol·L ⁻¹)	HDL-C/(mmol·L ⁻¹)
对照	—	1.66 (1.25, 1.71)	0.44 ± 0.07	0.54 ± 0.08	0.68 (0.64, 0.76)
模型	—	17.26 (13.86, 19.57) ##	0.88 ± 0.26##	5.29 ± 1.28##	0.41 (0.36, 0.59) #
辛伐他汀	5	8.94 (7.55, 13.15) **	0.63 ± 0.16	3.53 ± 0.92*	0.55 (0.52, 0.77) *
IPTS	120	12.07 (9.38, 13.68) *	0.71 ± 0.19	3.97 ± 0.88	0.59 (0.49, 0.78) *
	60	13.45 (10.41, 16.71)	0.71 ± 0.22	4.03 ± 0.56	0.53 (0.47, 0.83)
	30	11.39 (10.07, 16.07)	0.76 ± 0.18	4.17 ± 1.33	0.56 (0.52, 0.62)

与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 表 2 同

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as table 2

表 2 IPTS 对 AS 大鼠血清中 NO、ET-1 和 Ang-II 含量的影响 ($n = 10$)

Table 2 Effect of IPTS on contents of NO, ET-1 and Ang-II in serum of AS rats ($n = 10$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	NO/(μmol·L ⁻¹)	ET-1/(pg·mL ⁻¹)	NO/ET-1	Ang-II/(pg·mL ⁻¹)
对照	—	5.10 (4.41, 6.03)	3.22 (2.72, 3.44)	1.43 (1.28, 2.05)	10.76 ± 3.09
模型	—	3.20 (2.77, 3.82) ##	6.51 (4.33, 7.75) ##	0.59 (0.32, 0.76) ##	14.64 ± 2.15#
辛伐他汀	5	3.89 (3.43, 4.35)	4.47 (4.06, 6.22)	0.77 (0.73, 0.87) *	11.42 ± 2.34
IPTS	120	4.81 (4.48, 5.44) **	3.33 (2.28, 5.08) **	1.57 (0.93, 2.13) **	10.49 ± 3.90*
	60	4.35 (3.33, 4.65) *	4.63 (3.40, 4.86) *	0.93 (0.67, 1.37) **	10.55 ± 4.32*
	30	4.45 (4.09, 5.31) *	4.26 (3.26, 5.62) *	1.18 (0.73, 1.36) *	10.57 ± 2.69*

3.2 IPTS 对 AS 大鼠胸主动脉病理变化的影响

如图 1 所示, 对照组大鼠胸主动脉壁未见增厚, 未见粥样硬化斑块形成, 血管内皮光滑, 未见损伤脱落; 模型组大鼠胸主动脉管壁中有明显的蓝色钙化斑块形成, 可见胆固醇结晶, 血管内皮损伤脱落, 有坏死的组织沉积; 辛伐他汀组大鼠胸主动脉管壁有些增厚, 无明显斑块, 血管内皮粗糙, 有些损伤脱落; IPTS 中、高剂量组大鼠大部分动脉壁未见增厚, 血管内皮大致正常, 较平滑, 未见明显损伤脱落; IPTS 低剂量组大鼠胸主动脉壁有些增厚, 但无

明显斑块, 血管内皮较粗糙。

3.3 大鼠肠道菌群多样性分析

β 多样性分析中样品的空间距离越接近, 样品的物种组成结构越相似。如图 2 所示, 模型组与对照组肠道菌群组成有很大差异; IPTS 中、高剂量组肠道菌群组成彼此间接近, 与模型组有较大差异, 表明 IPTS 可以调节大鼠肠道菌群的组成。

3.4 肠道菌群物种归属与差异分析

将 OTU 表格中的信息按照门水平提取序列信息, 并计算各物种的相对丰度, 同时选取相对丰度

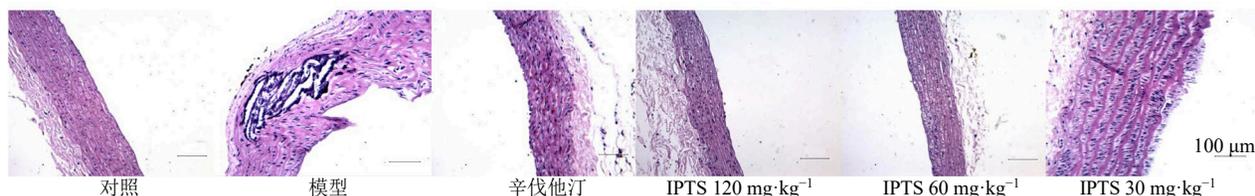


图 1 IPTS 对 AS 大鼠胸主动脉病理变化的影响 (HE, ×100)

Fig. 1 Effect of IPTS on pathological changes of thoracic aorta in AS rats (HE, ×100)

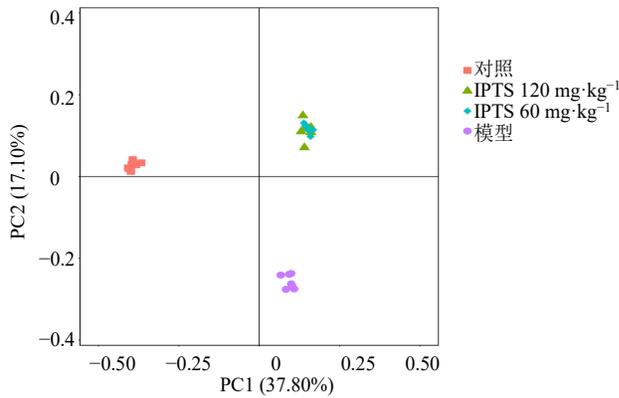


图2 各组粪便样本β多样性PCoA分析
Fig. 2 PCoA analysis of β diversity in feces samples of each group

在1%以上的物种绘制物种相对丰度分布图(图3)。从门水平上看,4组之间的优势菌群主要为厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门和疣微菌门。与对照组相比,模型组大鼠肠道菌群中拟杆菌门相对丰度降低,变形菌门相对丰度增加,厚壁菌门相对丰度差异不大;与模型组相比,IPTS中、高剂量组大鼠肠道菌群中拟杆菌门相对丰度增加,厚壁菌门、变形菌门相对丰度降低,肠道菌群结构得到改善。

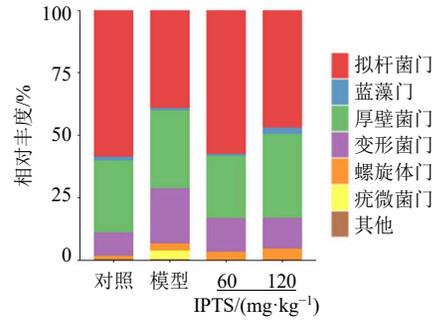
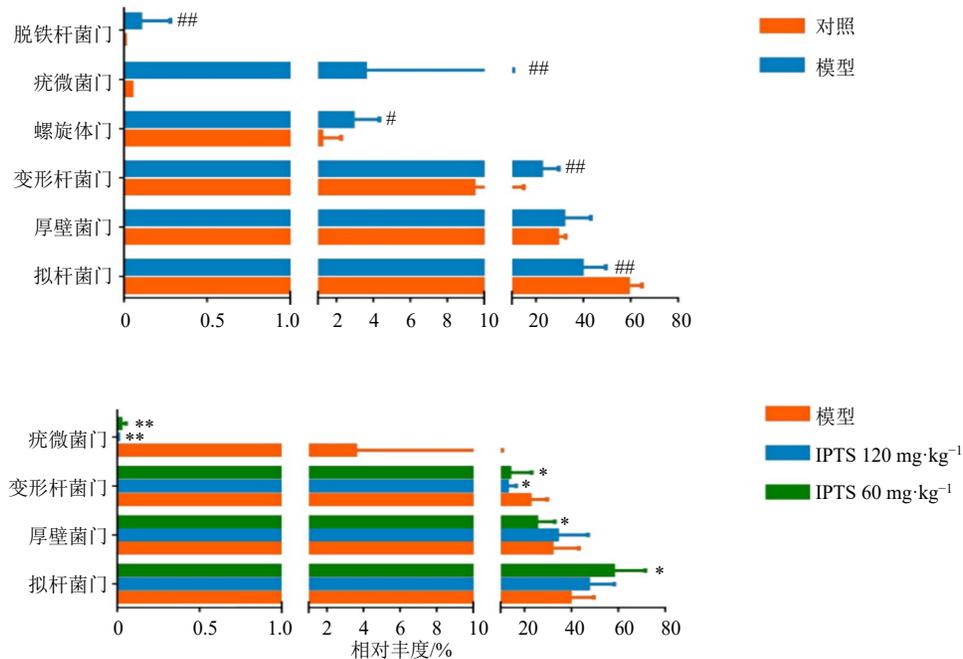


图3 IPTS对AS大鼠肠道菌群的影响
Fig. 3 Effect of IPTS on intestinal flora of AS rats

3.5 LEfSe 分析

LEfSe 分析可以用于微生物菌群标记物的筛选。对对照组、模型组以及 IPTS 中、高剂量组进行 LEfSe 分析,进一步筛选差异菌属,对差异菌属(LDA ≥ 2)进行 Mann-Whitney U 检验,并采用 Graphpad Prism 7 软件对各组在门、科、属水平上的菌属相对丰度差异进行可视化。

3.5.1 门水平肠道菌群相对丰度变化 如图4所示,与对照组比较,模型组大鼠肠道菌群中脱铁杆菌门、疣微菌门、螺旋体门和变形杆菌门相对丰度明显增高(P < 0.05、0.01),拟杆菌门相对丰度明



与对照组比较: #P < 0.05 ##P < 0.01; 与模型组比较: *P < 0.05 **P < 0.01, 下图同
#P < 0.05 ##P < 0.01 vs control group; *P < 0.05 **P < 0.01 vs model group, same as below figures

图4 门水平各组肠道菌群相对丰度
Fig. 4 Relative abundance of intestinal flora in each group at phylum level

显减少 ($P < 0.01$)；与模型组比较，IPTS 中剂量组大鼠肠道菌群中疣微菌门、变形杆菌门和拟杆菌门相对丰度明显降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，厚壁菌门相对丰度明显升高 ($P < 0.05$)；IPTS 高剂量组大鼠肠道菌群中疣微菌门相对丰度明显降低 ($P < 0.01$)，变形杆菌门相对丰度显著升高 ($P < 0.05$)。

3.5.2 科水平肠道菌群相对丰度变化 如图 5 所示，与对照组比较，模型组大鼠肠道菌群中 Christensenellaceae、Odoribacteraceae、肠杆菌科、紫单胞菌科、螺旋体科、疣微菌科、瘤胃菌科、脱硫弧菌科、毛螺菌科相对丰度明显增高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，乳杆菌科、S24-7 和普雷沃氏菌科相对丰度明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较，IPTS 中剂量组大鼠肠道菌群中 Marinilabiaceae、脱硫杆菌科、产碱杆菌科、疣微菌科、毛螺菌科相对丰度显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，鞘氨醇杆菌科和气球菌科相对丰度显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

疏弧菌科、毛螺菌科相对丰度明显增高 ($P < 0.05$ 、 0.01)，乳杆菌科、S24-7 和普雷沃氏菌科相对丰度明显降低 ($P < 0.01$)。与模型组比较，IPTS 中剂量组大鼠肠道菌群中 Marinilabiaceae、脱硫杆菌科、疣微菌科、毛螺菌科相对丰度显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，鞘氨醇杆菌科相对丰度显著升高 ($P < 0.05$)；IPTS 高剂量组大鼠肠道菌群中 Marinilabiaceae、脱硫杆菌科、产碱杆菌科、疣微菌科、毛螺菌科相对丰度显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，鞘氨醇杆菌科和气球菌科相对丰度显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。

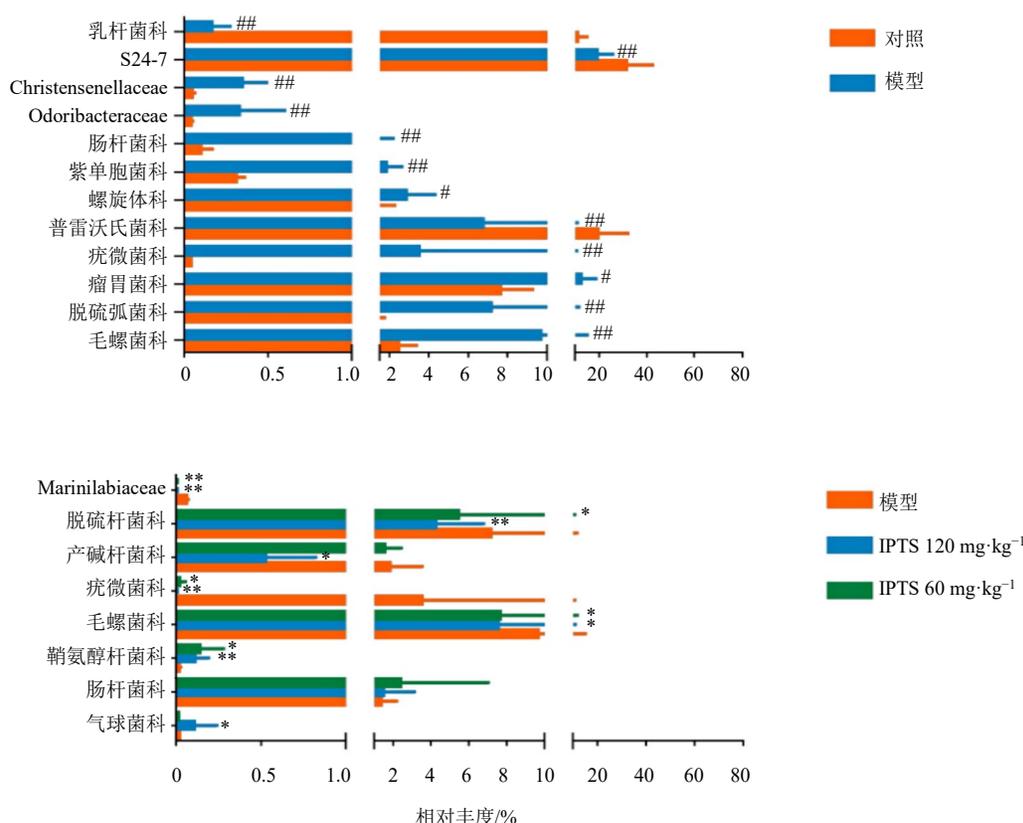


图 5 科水平各组肠道菌群相对丰度

Fig. 5 Relative abundance of intestinal flora in each group at family level

3.5.3 属水平肠道菌群相对丰度变化 如图 6 所示，与对照组比较，模型组大鼠肠道菌群中乳酸杆菌属 *Lactobacillus* 和普雷沃氏菌属 *Prevotella* 相对丰度显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，密螺旋体属 *Treponema*、拟杆菌属 *Bacteroides*、*Parabacteroides*、*Akkermansia*、颤螺菌属 *Oscillospira*、毛螺菌属 *Lachnospira*、粪球菌属 *Coprococcus*、罗氏菌属 *Roseburia*、大肠杆菌属 *Escherichia* 相对丰度显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01)。与模型组比较，IPTS 中剂量

组大鼠肠道菌群中埃希菌属、罗氏菌属、毛螺菌属、脱硫叶菌属 *Desulfobulbus*、脱硫弧菌属 *Desulfovibrio*、*Akkermansia* 相对丰度显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，乳酸杆菌属、布劳特氏菌属 *Blautia* 相对丰度显著升高 ($P < 0.05$)；IPTS 高剂量组大鼠肠道菌群中毛螺菌属、脱硫叶菌属、脱硫弧菌属、萨特氏菌属 *Sutterella*、*Akkermansia* 相对丰度显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)，布劳特氏菌属相对丰度显著升高 ($P < 0.05$)。

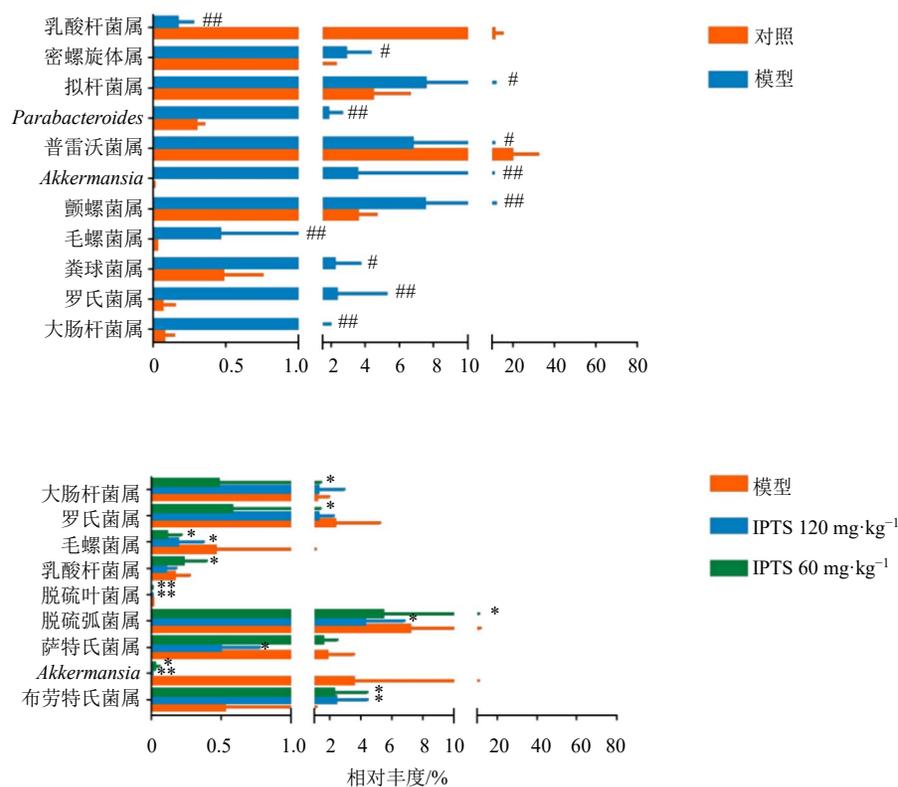


图 6 属水平各组肠道菌群相对丰度

Fig. 6 Relative abundance of intestinal flora in each group at genus level

3.6 PICRUSt 肠道菌群功能预测分析

通过 STAMP 软件的 PICRUSt 分析各组大鼠肠道菌群的基因功能。部分预测代谢途径结果见图 7, 发生显著变化的功能主要是细菌运动蛋白、细菌趋化性以及酶水平变化中的药物代谢酶, 发生显著变化的代谢通路是核苷酸代谢中的嘧啶代谢和嘌呤代谢、脂质代谢中的甘油磷脂代谢、氨基酸代谢中的丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢以及缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成、赖氨酸降解。

PICRUSt 功能预测结果表明, 模型组大鼠肠道菌群中的细菌运动蛋白、细菌趋化性指标显著升高 ($P < 0.01$), 表明 AS 大鼠肠道菌群中的微生物过度繁殖, 而 IPTS 可显著减少细菌运动蛋白 ($P < 0.05$), 减少病原菌的侵入; 模型组肠道菌群中药物代谢相关酶、嘌呤代谢、嘧啶代谢水平显著低于对照组 ($P < 0.01$), 表明 AS 大鼠的核酸代谢受到抑制, 经 IPTS 干预后核酸代谢得到改善。

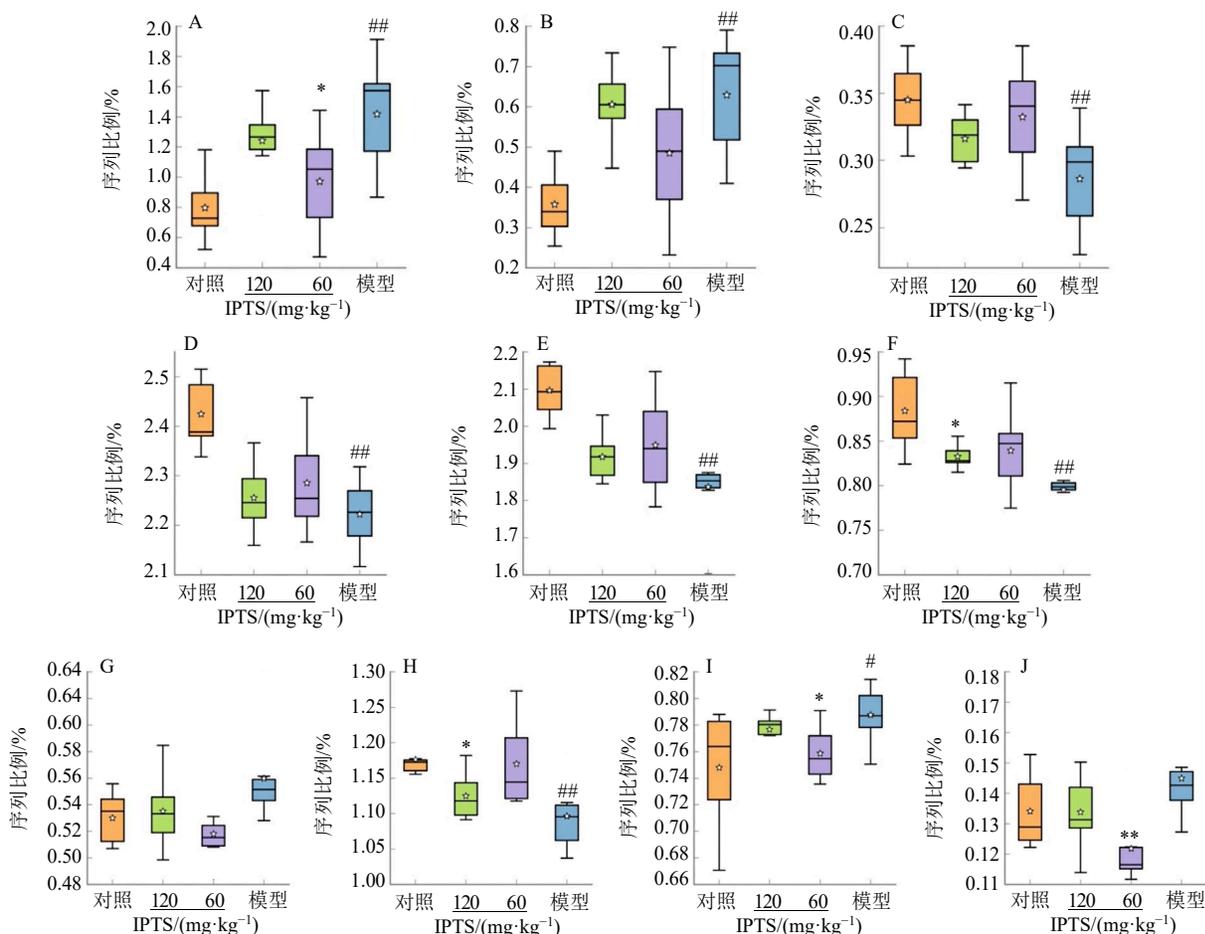
甘油磷脂由甘油、胆碱、丝氨酸等生成, 甘油磷脂代谢属于脂质代谢, 其代谢水平上升会导致脂质在血管内沉积, 易引发 AS 等心血管疾病。模型组

肠道菌群中的肽聚糖生物合成水平显著下调 ($P < 0.01$), 甘油磷脂代谢水平上升; 经 IPTS 干预后, 甘油磷脂代谢和肽聚糖生物合成得到改善。与对照组相比, 模型组肠道菌群中的丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢水平显著下降 ($P < 0.01$), 缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成水平显著上升 ($P < 0.05$), 赖氨酸降解水平上升; 经 IPTS 干预后, 上述氨基酸代谢紊乱得到改善。

4 讨论

本研究采用高脂饲养联合 ip 维生素 D₃ 方法建立 AS 大鼠模型, 对大鼠血脂、血管内皮因子 (NO、ET-1 和 Ang-II) 和胸主动脉病理变化进行考察, 结果显示 IPTS 能够改善 AS 大鼠的血管内皮损伤, 减少 AS 斑块, 且有一定的调脂作用。采用 16S rRNA 高通量测序方法分析 IPTS 对肠道微生物的作用, 菌群差异分析和功能分析结果表明 IPTS 可以改变肠道微生态结构组成, 下调致病菌的相对丰度, 抑制病原菌入侵以及改善部分肠道菌群基因功能, 从而发挥治疗 AS 的作用。

Emoto 等^[11]发现 AS 患者肠道菌群中厚壁菌门/



A-细菌运动蛋白 B-细菌趋化性 C-药物代谢相关酶 D-嘌呤代谢 E-嘧啶代谢 F-肽聚糖生物合成 G-甘油磷脂代谢 H-丙氨酸、天冬氨酸和谷氨酸代谢 I-缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成 J-赖氨酸降解
 A-bacterial motor protein B-bacterial chemotaxis C-drug metabolism-related enzymes D-purine metabolism E-pyrimidine metabolism F-peptidoglycan biosynthesis G-glycerophospholipid metabolism H-alanine, aspartic acid and glutamic acid metabolism I-valine, leucine and isoleucine biosynthesis J-lysine degradation

图7 肠道菌群功能预测结果

Fig. 7 Result of intestinal flora function prediction

拟杆菌门相对丰度增加，拟杆菌门数量减少。另有文献报道厚壁菌门/拟杆菌门相对丰度与血脂变化相关^[12]。IPTS 组大鼠肠道菌群中拟杆菌门相对丰度降低，厚壁菌门相对丰度升高，表明 IPTS 可以改善 AS 大鼠的肠道菌群的结构失衡，调节肠道菌群的组成，从而发挥抗 AS 的作用。IPTS 组大鼠肠道菌群中毛螺菌科相对丰度降低，Koren 等^[13]发现肠道中毛螺菌科相对丰度与 LDL-C、TC 水平呈正相关，LDL-C 和 TC 升高会加剧 AS，表明 IPTS 可能通过下调肠道菌群中的毛螺菌科相对丰度调节 AS 大鼠血脂水平。

肠道菌群中的双歧杆菌、乳酸杆菌可以促进胆固醇排泄，提高机体的抗氧化能力^[14-15]，口服益生菌可以预防小鼠 AS 的发展。王玲等^[16]研究表明冠

心病患者肠道中的大肠杆菌数量明显增加，AS 与致病菌数量上调有关。经 IPTS 干预后，埃希菌属相对丰度降低，推测 IPTS 可能通过下调致病菌来改善 AS。虽然与对照组相比，模型组布劳特氏菌属相对丰度没有显著变化，但经 IPTS 干预后，布劳特氏菌属相对丰度增加。Ozato 等^[17]发现布劳特氏菌属与女性的内脏脂肪面积呈负相关，且与性别无关，表明 IPTS 抗 AS 作用可能与上调布劳特氏菌属有关。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Liuzzo G. Atherosclerosis: An inflammatory disease [J]. *Rays*, 2001, 26(4): 221-230.

- [2] 王安璐, 李秋忆, 徐浩, 等. 肠道菌群与动脉粥样硬化的关系 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(2): 93-98.
- [3] Brandsma E, Kloosterhuis N J, Koster M, *et al.* A proinflammatory gut microbiota increases systemic inflammation and accelerates atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2019, 124(1): 94-100.
- [4] 何锴琳, 纪浩然, 张航, 等. 心肠对话: 肠道菌群在心血管疾病中的作用 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2019, 27(8): 718-723.
- [5] 邓六勤, 钟鸣, 马志玲. 毛冬青化学成分、药理作用及应用研究进展 [J]. 中国中医药现代远程教育, 2006, 4(10): 24-26.
- [6] 郝巨祥, 杨崇真. 毛冬青的药理作用及临床应用研究进展 [J]. 黑龙江医药, 2010, 23(4): 592-594.
- [7] 姜一平, 李华, 潘学智, 等. 毛冬青根的化学成分 [J]. 中药材, 2013, 36(11): 1774-1778.
- [8] 焦爱军, 王捷, 张宏亮. 中药毛冬青的研究 [J]. 广西医科大学学报, 2015, 32(2): 322-325.
- [9] Zhang J W, Zhou F, Wu X L, *et al.* Cellular pharmacokinetic mechanisms of adriamycin resistance and its modulation by 20(S)-ginsenoside Rh2 in MCF-7/Adr cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2012, 165(1): 120-134.
- [10] 陈钰泉, 刘玉婷, 邱杰, 等. 不同比色法测定植物源总三萜皂苷含量的对比 [J]. 黑龙江农业科学, 2018(3): 108-112.
- [11] Emoto T, Yamashita T, Sasaki N, *et al.* Analysis of gut microbiota in coronary artery disease patients: A possible link between gut microbiota and coronary artery disease [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2016, 23(8): 908-921.
- [12] Fu J, Bonder M J, Cenit M C, *et al.* The gut microbiome contributes to a substantial proportion of the variation in blood lipids [J]. *Circ Res*, 2015, 117(9): 817-824.
- [13] Koren O, Spor A, Felin J, *et al.* Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis [J]. *PNAS*, 2011, 108(Suppl 1): 4592-4598.
- [14] Cavallini D C, Suzuki J Y, Abdalla D S, *et al.* Influence of a probiotic soy product on fecal microbiota and its association with cardiovascular risk factors in an animal model [J]. *Lipids Health Dis*, 2011, 10: 126.
- [15] Liu H L, Yang C J, Jing Y, *et al.* Ability of lactic acid bacteria isolated from mink to remove cholesterol: *In vitro* and *in vivo* studies [J]. *Can J Microbiol*, 2013, 59(8): 563-569.
- [16] 王玲, 李群. 冠心病患者肠道菌群分布及其与尿酸代谢的关系分析 [J]. 现代消化及介入诊疗, 2012, 17(6): 327-330.
- [17] Ozato N, Saito S, Yamaguchi T, *et al.* *Blautia* genus associated with visceral fat accumulation in adults 20-76 years of age [J]. *NPJ Biofilms Microbiomes*, 2019, 5(1): 28.

[责任编辑 李亚楠]