

药食同源中药复方改善肠道菌群结构和调节血清代谢物对高血压大鼠治疗作用

郭丽娜¹, 盛雯¹, 何盈犀¹, 许欣筑¹, 林淑娴¹, 陈文生^{2*}

1. 广东省中医院 临床营养科, 广东 广州 510120

2. 广东省中医院 心律失常科, 广东 广州 510120

摘要: **目的** 探究药食同源中药复方(葛根、夏枯草、杜仲叶、菊花、山楂、芹菜)对两肾一夹(2 kidneys and 1 clip, 2K1C)型高血压大鼠血压、肠道菌群结构和血清代谢物的调控作用。**方法** 2K1C 型高血压大鼠随机分为模型组、氯沙坦(0.3 mg/kg)组和药食同源中药复方低、中、高剂量(0.5、2.5、5.0 mg/kg)组, 每组 7 只。连续给药 6 周后, 取眼周血, 采用全自动生化分析仪检测各组大鼠血清相关指标; 采用 16S rDNA 测序技术分析各组大鼠肠道菌群变化; 采用苏木素-伊红(HE)染色观察各组大鼠肝脏和肾脏组织病理变化; 采用高效液相色谱检测各组大鼠血清代谢产物变化。**结果** 药食同源中药复方干预 6 周后, 大鼠血压明显下降($P<0.05$ 、 0.001), 血清中总胆红素(total bilirubin, TBIL)和直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)水平显著降低($P<0.05$)。16S rDNA 测序结果显示, 在门水平上, 大鼠肠道微生物群落的主要结构由厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidetes)、变形菌门(Proteobacteria)、放线杆菌门(Actinobacteria)和酸杆菌门(Acidobacteria)组成, 其中与模型组比较, 药食同源中药复方组拟杆菌门相对丰度升高, 厚壁菌门相对丰度降低; 在属水平上主要由乳酸杆菌属 *Lactobacillus*、肠球菌属 *Enterococcus*、布劳特氏菌属 *Blautia*、罗姆布茨菌属 *Romboutsia* 和丁酸弧菌属 *Anaerostipes* 组成, 药食同源中药复方组乳酸杆菌属相对丰度明显高于模型组。各组大鼠血清代谢产物存在明显差异, 筛选得到 143 个差异性血清代谢产物。药食同源中药复方组血清中牛磺胆酸、L-抗坏血酸、焦谷氨酸、苯乙酰甘氨酸水平显著上调, 甘氨酸水平显著下调。组织病理切片结果表明, 药食同源中药复方干预可修复高血压造模造成的腹主动脉及肾脏结构性损伤, 进一步修复腹主动脉及肾脏的功能。**结论** 药食同源中药复方可通过改善 2K1C 型高血压大鼠肠道菌群结构, 调节血清代谢产物, 从而发挥对高血压的治疗作用。

关键词: 高血压; 药食同源中药; 肠道菌群; 血清代谢产物; 黄酮苷; 芹菜苷; 葛根素; 夏枯草苷; 桃叶珊瑚苷; 绿原酸; 菊苷

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2023)20-6743-10

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2023.20.018

Effect of medicine and food homologous Chinese medicine on hypertensive rats by affecting intestinal flora structure and regulating serum metabolites

GUO Li-na¹, SHENG Wen¹, HE Ying-xi¹, XU Xin-zhu¹, LIN Shu-xian¹, CHEN Wen-sheng²

1. Department of Clinical Nutrition, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

2. Department of Arrhythmia, Guangdong Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510120, China

Abstract: Objective To study the regulation of blood pressure, intestinal flora structure and serum metabolites of 2 kidneys and 1 clip (2K1C) hypertension rats by the intervention of medicine and food homologous Chinese medicine formula [MFHCMF, including Gegen (*Puerariae Lobatae Radix*), Xiakucao (*Prunellae Spica*), Duzhongye (*Eucommiae Folium*), Juhua (*Chrysanthemi Flos*), Shanzha (*Crataegi Fructus*), Hanqin (*Apium graveolens*)]. **Methods** 2K1C hypertension rats were randomly divided into model group, losartan (0.3 mg/kg) group, and MFHCMF low-, medium-, high-dose (0.5, 2.5, 5.0 mg/kg) groups, with seven rats in each group. After continuous administration for six weeks, periocular blood was collected and serum related indicators of rats in each group were detected using a fully automated biochemical analyzer; 16S rDNA sequencing technology was used to analyze the changes in gut microbiota of

收稿日期: 2023-04-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81602848)

作者简介: 郭丽娜, 女, 副主任营养师, 研究方向为中药临床营养学。E-mail: gln408@163.com

*通信作者: 陈文生, 男, 副主任医师, 研究方向为心血管内科。E-mail: chenwensheng1982@163.com

rats in each group; Pathological changes in liver and kidney tissues of rats in each group were observed by hematoxylin eosin (HE) staining; High performance liquid chromatography mass spectrometry was used to detect changes in blood metabolites of rats in each group. **Results** After six weeks of intervention with MFHCMF, the blood pressure of rats was significantly decreased ($P < 0.05$, 0.001), and the levels of total bilirubin (TBIL) and direct bilirubin (DBIL) in serum were significantly decreased ($P < 0.05$). 16S rDNA sequencing results showed that at the phylum level, the main structure of the gut microbiota in rats was composed of Firmicutes, Bacteroidetes, Proteobacteria, Actinobacteria and Acidobacteria. Compared with model group, the relative abundance of Bacteroidetes in MFHCMF group was increased, while the relative abundance of Firmicutes was decreased. At the genus level, the main structure of the gut microbiota in rats was composed of *Lactobacillus*, *Enterococcus*, *Blautia*, *Romboutsia* and *Anaerostipes*. The abundance of *Lactobacillus* in MFHCMF group was significantly higher than that in model group. There were significant differences in serum metabolites among different groups of rats, and a total of 143 differential serum metabolites were screened. The levels of taurocholic acid, *L*-ascorbic acid, pyroglutamic acid and phenylacetyl glycine in serum of MFHCMF group were significantly upregulated, while the level of glycocholic acid was significantly downregulated. The results of tissue pathological sections indicated that the intervention of MFHCMF could repair the structural damage to the abdominal aorta and kidneys caused by hypertension modeling, further repairing the function of the abdominal aorta and kidneys. **Conclusion** MFHCMF can improve the intestinal microbiota structure of 2K1C type hypertensive rats, regulate serum metabolites, and thus exert a therapeutic effect on hypertension.

Key words: hypertension; medicine and food homologous TCM; intestinal flora; serum metabolites; flavonoid glycosides; apigenin; puerarin; prunellin; aucubin; chlorogenic acid; chrysanthemin

高血压是最常见的慢性疾病之一，能引起心、脑、肾和血管等重要组织、脏器结构的功能障碍，是卒中、心梗和心衰竭等恶性心脑血管事件的最主要危险因素^[1-2]。因其存在“三高一低”（发病率高、致残率高、死亡率高、知晓率低）及严重损害心、脑、肾等靶器官的作用而备受关注^[3-4]。目前，高血压的治疗以药物治疗为主，抗高血压的药物包括钙阻滞剂、血管紧张素转化酶抑制剂、利尿剂、 β 受体阻滞剂、血管紧张素 II 受体拮抗剂 5 大类 60 多种^[5-6]。然而，我国数亿高血压患者仅约 30% 接受了治疗，血压控制达标率仅为 7.2%，全球高血压的控制率不到 10%^[7-8]。另外，大部分高血压患者需要同时服用 2 种及以上降压药才有可能有效控制血压。但以上药物在临床实际应用中面临易产生耐药、不良反应大、患者治疗达标率低、长期使用降压药物可显著增加患者肺癌发病率等问题^[9-10]。因此，寻找安全有效的降压药物势在必行。

药食同源中药较化学药在调控血压方面具有多途径、多靶点、综合干预的优势，而且更具安全性和适用性，在长期用药方面具有加减灵活性、个体化、不良反应小等特点^[11-12]，因此增强对药食同源中药治疗高血压疾病方面的探索，对控制高血压治疗达标率具有重要意义。中药应用于高血压治疗由来已久，如《圣惠》卷六十九甘菊花饮子中记载了生姜、石膏、菊花、葛根、葱白、薄荷组成的甘菊花饮子可缓解妇人头痛目眩，心神烦渴；《长寿药粥谱》中的芹菜粥则可降血压、调血脂等；曹氏降压

方由豨薟草、夏枯草、杜仲、天麻、钩藤（后下）、葛根、牛膝组成，可治疗原发性高血压。最新研究发现，中药可以调节肠道菌群结构，使肠道菌群恢复动态平衡状态^[13-15]，对肠道微生态相关疾病（如肠道菌群紊乱导致的肥胖、胰岛素抵抗、高血压等^[16-19]）的调控和改善有其独特的作用^[20-23]。

目前，国内外较少有关药食同源中药干预对高血压患者肠道菌群结构变化及血清代谢物谱的影响研究^[24-25]。基于此，本研究以两肾一夹（2 kidneys and 1 clip, 2K1C）型高血压大鼠为对象，采用 16S rDNA 序列分析及 LC-MS 技术，探究经验方（甘菊花饮子、《长寿药粥谱》中的芹菜粥、曹氏降压方等）中药食同源中药复方对 2K1C 型高血压大鼠血压及盲肠内容物菌群结构和血清代谢产物的影响，初步探讨其治疗机制，以期药食同源中药治疗高血压提供有益思路。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 35 只，8 周龄，体质量 200~220 g，购自斯贝福（北京）生物科技有限公司，动物合格证号 SCXK（京）2019-0010。动物饲养于广东医科大学实验动物中心 SPF 级实验室，室温 20~25℃，相对湿度 40%~60%，12 h/12 h 循环照明。实验过程中严格按照动物伦理标准对大鼠进行各项处理（伦理批准号 GDY2202537）。

1.2 药材

药食同源中药复方由经验方中公示和在试点的

药食两用中药组成,包括葛根、夏枯草、杜仲叶、菊花、山楂、芹菜(旱芹)。以上中药材均购自康美药业股份有限公司,经广东省中医院药剂科林华主任分别鉴定为豆科植物野葛 *Pueraria lobata* (Willd.) Ohwi 的干燥根、唇形科植物夏枯草 *Prunella vulgaris* L. 的干燥果穗、杜仲科植物杜仲 *Eucommia ulmoides* Oliv. 的干燥叶、菊科植物菊 *Chrysanthemum morifolium* Ramat. 的干燥头状花序、蔷薇科植物山里红 *Crataegus pinnatifida* Bge. var. *major* N. E. Br. 的干燥成熟果实、伞形科植物旱芹 *Apium graveolens* L. 的带根全草。

1.3 药品与试剂

氯沙坦钾片(国药准字 H20070264, 100 mg/片)购自浙江华海药业股份有限公司;粪便微生物基因组 DNA 提取试剂盒(批号 LS-R-N-015)、PCR 试剂盒(Q5® High-Fidelity DNAPolymerase M0491, NEB)购自广东南芯医疗科技有限公司;AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(批号 AP-GX-50G)购自上海金畔生物科技有限公司;Agilent High Sensitivity DNA Kit(批号 5067-4626)购自美国 Agilent 公司;MiSeq Reagent Kit V3 (600 cycles, 批号 MS-102-3003)购自美国 Illumina 公司;Invitrogen™ Quant-iTPicoGreen dsDNA Assay Kit(批号 P11496)购自上海恒斐生物科技有限公司。

1.4 仪器

ALC-NIBP 型无创尾动脉血压测量分析系统(上海奥尔科特生物科技有限公司);离心机(德国 Eppendorf 公司);DT-280 型全自动生化分析仪(盛世东唐江苏生物科技有限公司);T100 型 PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司);MiSeq-PE250 型测序仪(美国 Illumina 公司);6470 型 LC-MS(美国 Agilent 公司);Quanti Fluor™-ST 型荧光定量系统(美国 Promega 公司);Agilent 2100 型核酸电泳分析仪(美国 Agilent 公司)。

2 方法

2.1 药食同源中药复方的制备

药食同源中药由葛根 15 g、夏枯草 10 g、杜仲叶 10 g、菊花 10 g、山楂 5 g、芹菜(旱芹) 20 g 配伍组成,称取以上药材,加入 500 mL 水浸润 1 h 后煎煮,煎煮 1 h 后用纱布滤过,随后将滤渣加入 500 mL 水继续煎煮 1 h,合并 2 次滤液进行浓缩,浓缩至 70 mL,即生药质量浓度为 1.0 g/mL,4 °C 储存,备用。采用 UPLC-MS 对药食同源中药浓缩液中主要成分进行定量分析,其主要成分为黄酮苷、芹菜苷、葛根素、夏枯草苷、桃叶珊瑚苷、绿原酸、菊

苷,质量分数分别为 3.57%、1.36%、0.73%、0.45%、0.32%、0.17%、0.08%。

2.2 2K1C 型高血压大鼠模型的建立、分组与给药

通过手术构建 2K1C 型肾性高血压大鼠模型:手术前 12 h,大鼠禁食自由饮水,吸入异氟烷麻醉后,固定四肢,碘伏消毒皮肤,纵向切开左背部 1.5 cm 切口,小心分离左侧肾动脉,放置银夹收缩血管,滴入 2 滴青霉素后缝合切口。术后常规饲养,自由进食,6 周后,待血压升高至平稳后,测量大鼠血压,动物模型成功标准为收缩压大于 21.3 kPa。将建模成功的大鼠随机分为模型组、氯沙坦(0.3 mg/kg)组和药食同源中药复方低、中、高剂量(0.5、2.5、5.0 mg/kg)组,每组 7 只。各给药组 ig 相应药物,模型组 ig 100 μ L PBS 溶液,1 次/d,连续 6 周,给药过程中每周监测,并记录大鼠血压。

2.3 取材与检测

给药结束后,取大鼠外周血,室温静置 30 min,1000 r/min 离心 10 min,收集上清液,置-80 °C 冰箱备用。采用全自动生化分析仪检测血清中总胆红素(total bilirubin, TBIL)、直接胆红素(direct bilirubin, DBIL)、血清尿素氮(serum urea nitrogen, BUN)、血清肌酐(creatinine, Cr)及血尿酸(uric acid, UA)水平。取肾脏及腹主动脉组织,用生理盐水清洗,滤纸吸附血水后,于 4%多聚甲醛溶液中固定过夜,石蜡包埋后切片,进行苏木素-伊红(HE)染色,在显微镜下观察腹主动脉及肾脏病理变化。收集盲肠内容物和粪便用于肠道菌群结构分析。

2.4 16S rDNA 测序分析大鼠肠道菌群结构

按照粪便微生物基因组 DNA 提取试剂盒操作说明提取粪便菌群 DNA,采用 PCR 试剂盒对各组样本基因 V3~V4 高度可变区进行扩增,PCR 扩增产物通过 2%琼脂糖凝胶电泳进行检测。采用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒对目标片段进行切胶回收,电泳初步定量。参照电泳结果,将 PCR 扩增回收产物进行荧光定量,采用测序平台制备测序文库。采用 Agilent High Sensitivity DNA Kit 对文库在核酸电泳分析仪上进行质检。采用 Quanti-iTPicoGreen dsDNA Assay Kit 在 Quanti Fluor™-ST 荧光定量系统上对质检合格的文库进行定量。测序试剂采用 MiSeq Reagent Kit V3,使用 MiSeq-PE250 测序仪进行 2×300 bp 的双端测序。将最终获得 Clean 数据进行分类操作单元(operational taxonomic unit, OTU)归并划分,在此基础上进行 α 多样性分

析, 评估样本的多样性水平和丰度分布、在不同分类水平的具体组成, 并检验组间是否具有统计学差异; β 多样性分析进一步衡量各组样本间的菌群结构差异及关键物种筛选。最后根据 16S rRNA 基因测序结果, 预测各样本的菌群代谢功能。

2.5 血清代谢物分析

采用 LC-MS 对血清样本进行正、负离子模式检测, 流动相 A 为水-乙腈-甲酸 (900:100:1), 流动相 B 为乙腈-水-甲酸 (900:100:1), 洗脱程序: 0~10 min, 2%~98% B; 保持 2 min。进样量 2 μ L, 柱温 35 $^{\circ}$ C。质谱采用 ESI 离子源; 雾化气压 379.225 kPa; 辅助气压 379.225 kPa; 气帘气压 275.8 kPa; 温度 550 $^{\circ}$ C (正离子模式)、450 $^{\circ}$ C (负离子模式); 喷雾电压 $\pm$ 5500 V。使用 MSDIAL 软件对转换后 abf 文件进行峰寻找、峰提取、鉴定等数据处理, 同时基于一级与二级图谱搜索 MassBank、MoNA、Respect、GNPS 数据库, 得到鉴定结果。对于 MSDIAL 软件鉴定的数据, 通过质控样品控制样品指标 RSD<30%, 删除组内缺失值>50%的离子峰。采用 Pareto-scaling 方法进行归一化, 应用 MetaboAnalyst 软件进行差异分析和富集分析。在 MetaboAnalyst 软件内采用主成分 (principle component analysis, PCA)、偏最小二乘-

判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PL-SDA) 进行多变量统计分析; 采用变异倍数 (fold change, FC) 分析、 t 检验对代谢物进行单变量统计分析, 以 $P<0.05$ 、FC>2 且 VIP>1 为差异代谢指标的筛选标准。得到差异代谢物采用京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库进行相关通路分析。

2.6 统计学分析

实验数据采用 GraphPad Prism 8 软件分析, 结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用 t 检验和单因素方差分析进行统计学分析。

3 结果

3.1 药食同源中药复方对高血压大鼠血压的影响

手术 4 周后大鼠血压明显升高, 所有手术大鼠收缩压均高于 21.3 kPa, 提示高血压模型构建成功。如表 1 所示, 给药 4 周后, 与模型组比较, 各给药组血压均显著下降 ($P<0.05$ 、0.01、0.001)。如图 1 所示, 给药 6 周后, 与模型组比较, 各给药组大鼠血压 (收缩压、舒张压及平均血压) 均有下降, 其中氯沙坦组和药食同源中药复方各剂量组收缩压均显著降低 ($P<0.05$ 、0.01、0.001), 药食同源中药复方中、高剂量组平均血压均显著降低 ($P<0.05$)。各组大鼠心率无显著性差异。

表 1 药食同源中药复方对高血压大鼠血压的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

Table 1 Effect of medicine and food homologous Chinese medicine formula on blood pressure in hypertensive rats ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	收缩压/kPa		
		给药前	给药 4 周	给药 6 周
模型	—	23.34 $\pm$ 0.12	23.30 $\pm$ 0.33	23.10 $\pm$ 0.35
药食同源中药复方	0.5	23.32 $\pm$ 0.16	19.64 $\pm$ 0.83*	19.34 $\pm$ 0.93*
	2.5	23.25 $\pm$ 0.29	17.89 $\pm$ 0.95**	17.09 $\pm$ 0.90***
	5.0	23.25 $\pm$ 0.12	17.65 $\pm$ 1.06***	16.95 $\pm$ 1.86***
氯沙坦	0.3	23.06 $\pm$ 0.31	19.94 $\pm$ 0.88*	18.94 $\pm$ 0.88**

与模型组比较: * $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$

* $P<0.05$ ** $P<0.01$ *** $P<0.001$ vs model group

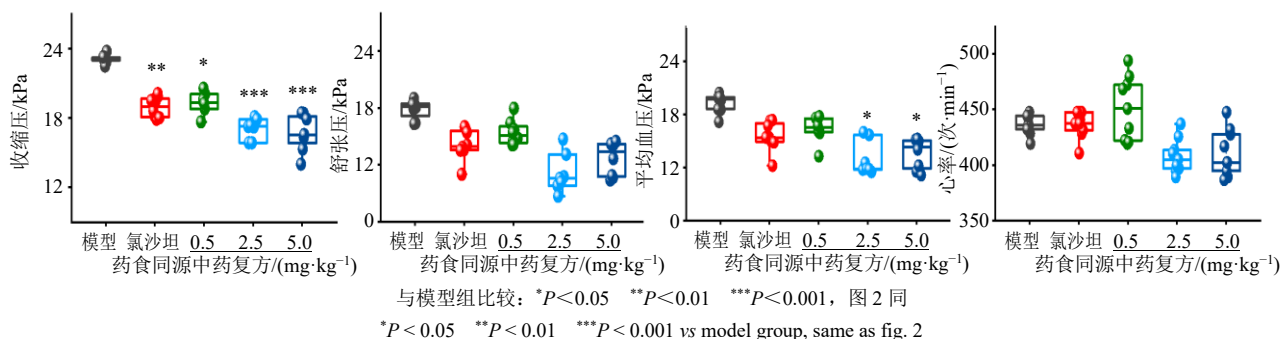


图 1 药食同源中药复方对高血压大鼠血压和心率的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

Fig. 1 Effect of medicine and food homologous Chinese medicine formula on blood pressure and heart rate in hypertensive rats ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

3.2 药食同源中药复方对高血压大鼠血清生化指标的影响

如图 2 所示,与模型组比较,氯沙坦组和药食

同源中药复方高剂量组血清 TBIL 和 DBIL 水平均显著降低 ($P<0.05$),各组 BUN、Cr、UA 水平无显著性差异。

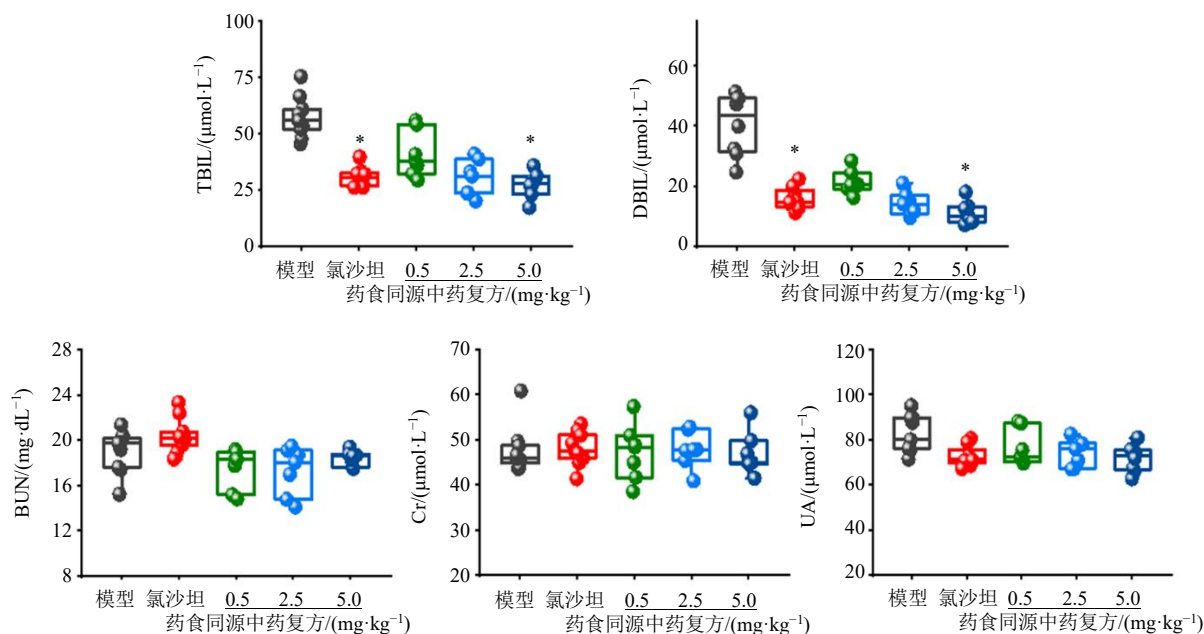


图 2 药食同源中药复方对高血压大鼠血清生化指标的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

Fig. 2 Effect of medicine and food homologous Chinese medicine formula on serum biochemical indicators in hypertensive rats ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

3.3 高通量测序序列分析

提取各组大鼠粪便中的细菌总 DNA 后,对 16S DNA 基因的 V3~V4 区进行高通量测序,并对其进行分析,得到 152 497 937 条有效检测序列 (60 389 183 053 bp),其中 119 653 114 条合并读取序列、32 844 823 条非合并读取序列,序列有效平均长度约为 396 bp,各组样品菌群测序数据在质控指标上的差异无统计学意义 (表 2)。各组大鼠的肠道菌群测序覆盖率超过 0.997,说明微生物序列在样品中被检测到的概率极高,测序结果为后续的数据分析提供了依据。

3.4 大鼠肠道菌群多样性分析

以 2K1C 型高血压大鼠为研究对象,应用 α 多样性算法,分析各组大鼠肠道菌群多样性指数,

用 ACE 指数评估菌群中 OTU 数目;采用 Simpson 指数评估样品中微生物群落种类多样性,群落多样性越低, Simpson 指数越大;采用 Shannon 指数从群落的丰富度和均匀度 2 个方面来评估样品中微生物多样性,群落多样性越高, Shannon 指数越大。如表 3 所示,与模型组比较,各给药组大鼠肠道菌群 ACE 指数和 Shannon 指数升高, Simpson 指数降低,表明经药食同源中药复方干预后能增加大鼠肠道菌群的多样性,且呈剂量相关性。

3.5 大鼠肠道菌群微生物群落结构分析

如图 3-A 所示,在门水平上,各组大鼠肠道菌群主要包含厚壁菌门 (Firmicutes)、变形菌门 (Proteobacteria)、放线杆菌门 (Actinobacteria)、拟杆菌门 (Bacteroidetes) 和酸杆菌门 (Acidobacteria)

表 2 各组大鼠肠道菌群测序数据质控结果 ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

Table 2 Quality control results of intestinal flora sequencing data in rats of each group ($\bar{x} \pm s$, $n=7$)

组别	剂量/ $(\text{mg} \cdot \text{kg}^{-1})$	平均有效序列	平均长度/bp	测序覆盖率
模型	—	75 732.4 $\pm$ 6 429.2	394.5 $\pm$ 2.4	0.997 $\pm$ 0.020
药食同源中药复方	0.5	76 768.4 $\pm$ 4 166.6	396.8 $\pm$ 2.5	0.998 $\pm$ 0.004
	2.5	77 027.1 $\pm$ 3 482.5	396.8 $\pm$ 1.7	0.999 $\pm$ 0.001
	5.0	77 852.3 $\pm$ 2 602.2	397.2 $\pm$ 2.1	0.998 $\pm$ 0.002
氯沙坦	0.3	77 471.3 $\pm$ 4 786.5	396.5 $\pm$ 1.9	0.997 $\pm$ 0.004

表 3 各组大鼠肠道菌群多样性指数 ($\bar{x} \pm s, n = 7$)Table 3 Intestinal flora diversity indexes in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 7$)

组别	剂量/(mg·kg ⁻¹)	ACE 指数	Simpson 指数	Shannon 指数
模型	—	702.43 ± 69.28	0.76 ± 0.10	2.53 ± 0.40
药食同源中药复方	0.5	727.57 ± 46.65	0.74 ± 0.09	2.67 ± 0.40
	2.5	748.14 ± 44.37	0.69 ± 0.04	2.82 ± 0.21
	5.0	768.39 ± 36.18	0.65 ± 0.08	3.37 ± 0.38
	氯沙坦	757.29 ± 46.42	0.67 ± 0.08	3.15 ± 0.32

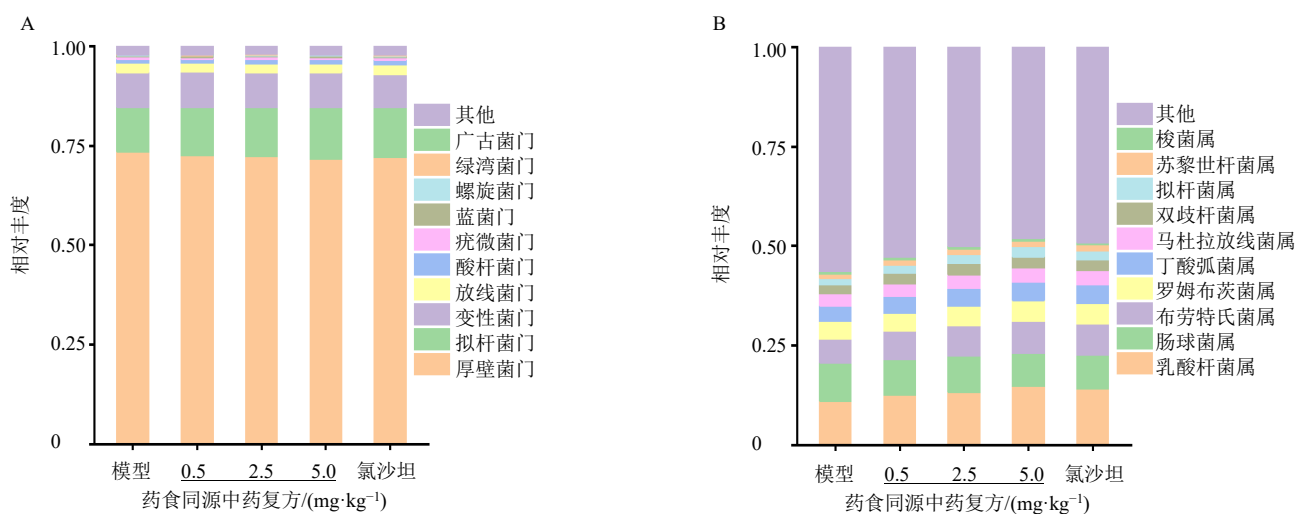


图 3 各组大鼠肠道菌群在门水平 (A) 和属水平 (B) 的分布

Fig. 3 Distributions of intestinal flora in rats of each group at phylum (A) and genus (B) levels

5 个主要菌门, 其中厚壁菌门在各组大鼠肠道菌群中相对丰度最高。此外, 各组大鼠肠道微生物群落还包含疣微菌门 (Verrucomicrobia)、螺旋菌门 (Spirochaetes)、蓝菌门 (Cyanobacteria)、广古菌门 (Euryarchaeota)、绿湾菌门 (Chloroflexi) 及其他门类。

如图 3-B 所示, 在属水平上, 各组大鼠肠道微生物群落结构主要由乳酸杆菌属 *Lactobacillus*、肠球菌属 *Enterococcus*、布劳特氏菌属 *Blautia*、罗姆布茨菌属 *Romboutsia* 和丁酸弧菌属 *Anaerostipes* 组成。与模型组比较, 药食同源中药复方组乳酸杆菌属、布劳特氏菌属和罗姆布茨菌属的相对丰度显著增加, 肠球菌属 *Enterococcus* 的相对丰度显著降低。

3.6 大鼠血清代谢物分析

菌群代谢产物可作为桥梁影响宿主的生理状态, 菌群结构的改变也通常导致菌群代谢谱的变化。利用 LC-MS 技术对各组大鼠血清代谢物进行检测分析。首先对数据组进行归一化处理, 以获得更加直观可靠的结果。为判断各组血清代谢产物是否具有差异性, 采用 PCA 及 OPLS-DA 方法对各样本主

成分进行分析。PCA 结果见图 4-A, 各组大鼠血清代谢产物未能明显区分开来, 可能由于血清样本的复杂性和多样性使得各组间差异性的血清代谢产物未能体现。OPLS-DA 结果见图 4-B, 各组大鼠血清代谢产物有明显的差异性, 尤其药食同源中药复方各剂量组与模型组的组间差异性非常明显, 且组间差异性呈剂量相关性。此外, 药食同源中药复方各剂量组大鼠血清代谢产物组间差异性较小, 可见组间有一定的关联性。通过单因素差异分析 (Kruskal-Wallis, KW) 检验分析筛选出差异血清代谢物 143 个、阳离子型 82 个、阴离子型 61 个, VIP 前 20 名的差异性血清代谢物列于表 4。综合 KW 检验和 OPLS-DA 结果, 筛选 $P < 0.05$ 且 $VIP > 1$ 得到最终的差异性血清代谢产物, 使用差异代谢产物进行 KEGG 数据库中全部代谢通路进行富集分析, 将显著富集 ($P < 0.05$) 的 KEGG 通路进行标记并绘制气泡图 (图 4-C), 各组大鼠血清代谢产物显著性富集 KEGG 通路包括初级胆汁酸生物合成、次级胆汁酸生物合成、苯丙氨酸代谢、嘧啶代谢和谷胱甘肽代谢。

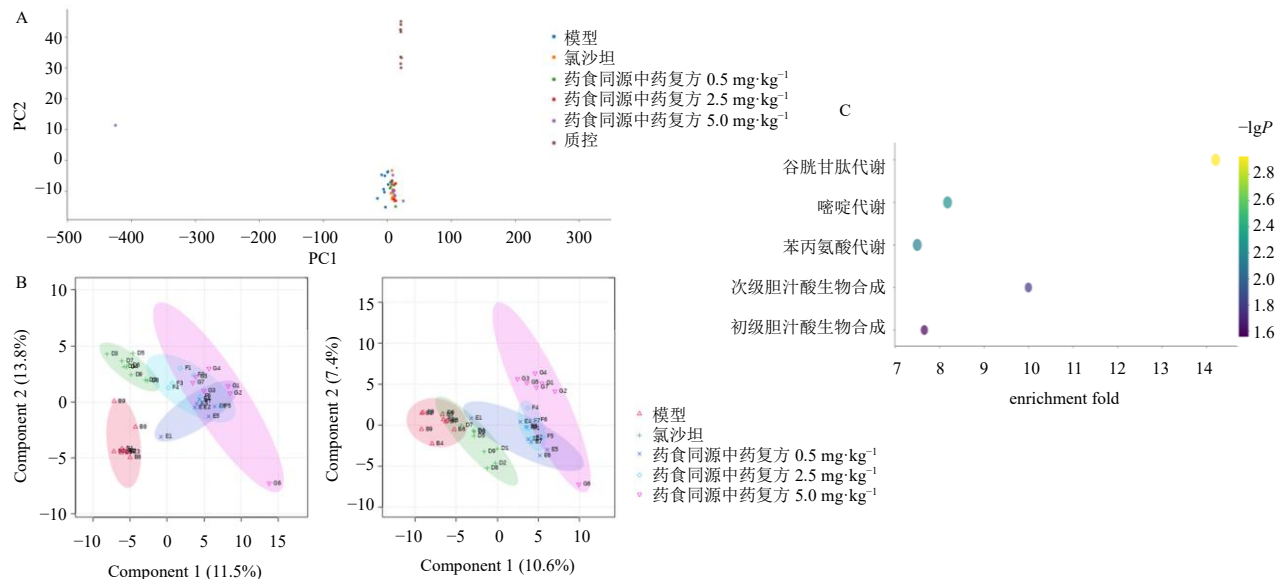


图 4 各组大鼠血清代谢物的 PCA (A)、PLS-DA (B) 及差异性代谢物富集通路 (C)

Fig. 4 PCA (A), PLS-DA (B) and differential metabolite enrichment pathways (C) of serum metabolites in rats of each group

表 4 大鼠差异性血清代谢物

Table 4 Differential serum metabolites in rats

代谢物	<i>m/z</i>	<i>t_R</i> /min	<i>P</i> 值	VIP
硫代烟酰胺腺嘌呤二核苷酸	439.15	9.56	0.000 6	5.00
左乙拉西坦	171.11	0.89	0.000 7	4.99
乙酰基色氨酸胺	244.11	4.78	0.002 2	4.33
对乙酰氨基苯甲醛	162.06	8.23	0.002 2	4.32
氯沙坦	421.15	7.67	0.000 3	4.27
(+)-5-反式胡萝卜素	423.15	7.67	0.000 4	4.22
PG(18:1(9Z)/0:0)	511.29	13.11	0.000 4	4.21
3-甲氧基利马前列素	422.27	13.91	0.002 4	4.17
氯伏胺	285.13	10.24	0.002 1	3.95
8- <i>O</i> -甲基四角霉素	337.10	7.21	0.001 1	3.94
氯沙坦	423.17	8.99	0.000 2	3.93
西司他丁	357.15	7.17	0.000 6	3.89
16-苯基四甲基前列腺素 E ₁	373.20	8.61	0.001 0	3.36
(<i>E</i>)-4-acetoxy-8-(3-oxo-2-(pent-2-en-1-yl)cyclopent-1-en-1-yl)octanoic acid	349.20	9.05	0.000 1	3.10
前列腺素 F _{2α}	439.20	10.68	0.000 2	3.08
前列环素	367.22	7.59	0.000 1	3.06
芥子醇	193.09	1.13	0.001 2	2.70
棕榈酸	359.22	9.33	0.004 8	2.69
<i>N</i> -(2-氰乙基)二乙醇胺	159.11	0.89	0.000 4	2.61
<i>L</i> -N ₆ -亚氨乙基-赖氨酸	186.12	0.76	0.003 5	2.50

3.7 大鼠腹主动脉及肾脏组织病理学观察

如图 5 所示, 模型组大鼠腹主动脉血管壁明显更厚, 腹主动脉内膜表面凹凸不平, 中膜平滑肌排列杂乱无章, 血管壁厚薄不均一; 药食同源中药复方组大鼠腹主动脉结构有明显改变, 且随着给药剂量增加, 血管壁内膜表面平滑完整程度增加, 中膜平滑肌排列越整齐, 厚薄均匀度越高, 中、高剂量组大鼠腹主动脉的结构完整程度与氯沙坦组接近。

模型组大鼠肾小球基底膜明显皱缩、增厚, 肾小球毛细血管袢内出现节段性纤维样坏死, 肾小球球囊间隙明显增宽, 表明肾小囊内压增大; 药食同源中药复方组大鼠腹主动脉结构有明显改变, 其中, 中、高剂量组大鼠肾小球充盈, 结构完好与氯沙坦组接近。以上结果表明, 药食同源中药复方可修复高血压造模造成的腹主动脉及肾脏结构性损伤, 进一步修复腹主动脉及肾脏的功能, 缓解血压水平。

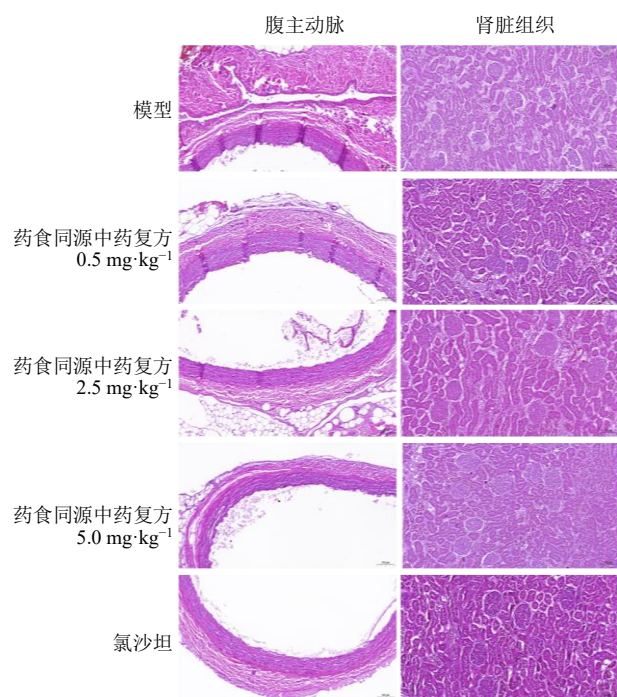


图 5 各组大鼠腹主动脉和肾脏组织病理观察 (HE, $\times 10$)
Fig. 5 Pathological observation of abdominal aorta and kidney tissue of rats in each group (HE, $\times 10$)

4 讨论

《中国心血管健康与疾病报告 2021 概要》显示,在人口老龄化和代谢危险因素流行的压力下,我国心血管的发病率和死亡率呈逐年上升趋势,且心血管疾病已成为死亡的首位原因^[26]。高血压是我国最常见的心血管疾病,因其高发病率已成为我国一个重大的公众健康问题^[27]。因此,从更广泛的角度探索高血压治疗的新方法是维持心血管健康至关重要的策略。对于保持人体健康起着非常关键作用的肠道菌群,被视为是一种特殊的“器官”,是人类的“第二基因组”,在维持人体健康中发挥重要作用^[28]。近 10 年来,国内外学者进行了大量的实验和研究分析,发现“肠-心轴”的调节机制是心血管疾病发生和发展关键环节之一,揭示了在心血管疾病发生、发展过程中扮演重要角色^[29-30]。高血压可能是由于肠道菌群失衡而对宿主肠道菌群结构及菌群代谢物产生的影响所致^[31]。既往的研究表明高血压人群、高血压模式动物肠道菌群多样性明显降低,菌群代谢产物也与高血压的发生发展密切相关^[32-33]。近年来,人们对药食同源理论的推崇及研究表明,药食同源中药对高血压治疗有积极作用^[34]。文献报道表明大量药食同源药材中含有的大量的活性成分具有良好的血压调控作用^[35],如葛根可通过葛根素增强

内皮型一氧化氮合酶活性参与血压的调节^[36];夏枯草总苷及杜仲叶中的生物碱、桃叶珊瑚苷、绿原酸和多糖均有不同程度的降压效果,芹菜提取物及芹菜素可有效降低肾素活性,降低血浆中血管紧张素 II 含量,达到降低血压的作用^[37];山楂提取物可减少外周血管阻力从而降低血压,同时可以通过抗氧化作用预防高血压诱导的重要器官损伤^[38]。本研究在属水平对 2K1C 高血压大鼠肠道菌群多样性进行探究,结果表明,与模型组相比,药食同源中药复方组 Simpson 指数明显降低,Shannon 指数明显升高,说明大鼠肠道菌群多样性通过药食同源中药复方干预后可以提高。其中,中、高剂量组 Simpson 指数和 Shannon 指数与氯沙坦组接近。

本研究中药食同源中药复方可显著降低 2K1C 型高血压大鼠的血压水平,降低大鼠血清胆红素 (TBIL、DBIL) 水平。从门水平分析各组大鼠肠道微生物群落结构,结果表明,在繁多的肠道微生物中,厚壁菌门、拟杆菌门和变形菌门为优势菌门,其次为放线杆菌门和酸杆菌门。与模型组相比,药食同源中药复方组大鼠厚壁菌门相对丰度显著降低。从属水平分析各组大鼠肠道微生物群落结构差异明显,结果表明,药食同源中药复方组乳酸杆菌属、罗姆布茨菌属和布劳特氏菌属的相对丰度显著增加,肠球菌属的相对丰度较模型组显著降低。乳酸杆菌可以利用自身黏附作用和竞争抑制作用,构成将致病菌与肠上皮组织隔离的一道屏障,达到抑制或减少病原菌的侵入,抵抗疾病并增强机体的免疫调节功能。前期研究发现,中药能明显抑制肠道菌群中有害菌群生长,促进肠道有益菌群生长,由此推断药食同源中药可能通过高血压大鼠肠道益生菌 (乳酸杆菌) 丰度增加而发挥降压的作用。此外,经药食同源中药复方干预后,大鼠血清代谢产物有明显的改变,药食同源中药复方低、中和高剂量组与模型组的血清代谢产物组间差异性非常明显,且组间差异性随中药剂量增加而更明显,表明药食同源中药干预可改变高血压大鼠血清代谢产物。各组大鼠筛选得到差异性血清代谢产物 143 个,药食同源中药复方组中的血清代谢物牛磺胆酸、L-抗坏血酸、焦谷氨酸、苯乙酰甘氨酸显著上调,甘氨酸显著下调。血清代谢产物显著性富集 KEGG 通路分析表明,甘氨酸和牛磺胆酸参与初级胆汁酸和次级胆汁酸生物合成,苯乙酰甘氨酸参与苯丙氨酸代谢,胞嘧啶、胞嘧啶核苷和脱氧胞苷参与嘧啶代谢,

L-抗坏血酸和焦谷氨酸参与谷胱甘肽代谢。

肠道菌群结构紊乱是心血管疾病的发生发展中的重要环节,与高血压的发病关系密切,中医药对肠道菌群结构及其血清代谢产物的调节,成为防治高血压疾病研究的新靶点。本研究表明药食同源中药复方干预后,高血压模型大鼠肠道微生物群落结构及血清代谢产物发生了显著变化,部分优势菌及益生菌的丰度升高,血清代谢物牛磺胆酸、L-抗坏血酸、焦谷氨酸、苯乙酰甘氨酸显著上调。探讨其对高血压发病的影响和作用机制,可为药食同源干预治疗高血压的临床应用提供理论依据。本研究尚存在样本量相对偏少、结果的代表性可能欠佳等不足,尚需考虑中药干预的时间点、不同给药剂量等效应关系等因素的影响,下一步将围绕上述问题作为切入点,进一步扩大样本量进行测序分析。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Koenen M, Hill M A, Cohen P, *et al.* Obesity, adipose tissue and vascular dysfunction [J]. *Circ Res*, 2021, 128(7): 951-968.
- [2] Members W G, Mozaffarian D, Benjamin E J, *et al.* Heart disease and stroke statistics-2016 update: A report from the American heart association [J]. *Circulation*, 2016, 133(4): e38-e360.
- [3] Qasem Surrati A M, Mohammedsaeed W, Shikieri A B E. Cardiovascular risk awareness and calculated 10-year risk among female employees at Taibah University 2019 [J]. *Front Public Health*, 2021, 9: 658243.
- [4] Zilberman J M. Menopause: Hypertension and vascular disease [J]. *Hipertens Riesgo Vasc*, 2018, 35(2): 77-83.
- [5] 张建玲, 李刚. 2021 世界卫生组织《成人高血压药物治疗指南》解读 [J]. *中华高血压杂志*, 2023, 31(1): 18-20.
- [6] 王献平. 对治疗高血压常用药物及其不良反应的研究 [J]. *当代医药论丛*, 2017, 15(12): 11-12.
- [7] 张新军. 血压管理理念更新: 联合治疗, 助力达标 [J]. *西南医科大学学报*, 2022, 45(4): 277-281.
- [8] Juhasz A, Collier D, Caulfield M, *et al.* Achievement of blood pressure targets and safety of azilsartan medoxomil/chlorthalidone fixed dose combination versus azilsartan medoxomil in hypertensive patients uncontrolled on monotherapy [J]. *J Hypertens*, 2015, 33: 8.
- [9] Lamirault G, Artifoni M, Daniel M, *et al.* Resistant hypertension: Novel insights [J]. *Curr Hypertens Rev*, 2020, 16(1): 61-72.
- [10] Chia R, Pandey A, Vongpatanasin W. Resistant hypertension-defining the scope of the problem [J]. *Prog Cardiovasc Dis*, 2020, 63(1): 46-50.
- [11] Li M Y, Zheng Y C, Deng S, *et al.* Potential therapeutic effects and applications of *Eucommiae Folium* in secondary hypertension [J]. *J Pharm Anal*, 2022, 12(5): 711-718.
- [12] Xu X, Tian W D, Duan W H, *et al.* Quanduzhong Capsules for the treatment of grade 1 hypertension patients with low-to-moderate risk: A multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled clinical trial [J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13: 1014410.
- [13] Kim M, Huda M N, Bennett B J. Sequence meets function-microbiota and cardiovascular disease [J]. *Cardiovasc Res*, 2022, 118(2): 399-412.
- [14] Garcia-Rios A, Torres-Peña J D, Perez-Jimenez F, *et al.* Gut microbiota: A new marker of cardiovascular disease [J]. *Curr Pharm Des*, 2017, 23(22): 3233-3238.
- [15] García-Ríos A, Camargo García A, Perez-Jimenez F, *et al.* Gut microbiota: A new protagonist in the risk of cardiovascular disease? [J]. *Clin Investig Arterioscler*, 2019, 31(4): 178-185.
- [16] Wilson Tang W H, Kitai T, Hazen S L. Gut microbiota in cardiovascular health and disease [J]. *Circ Res*, 2017, 120(7): 1183-1196.
- [17] Witkowski M, Weeks T L, Hazen S L. Gut microbiota and cardiovascular disease [J]. *Circ Res*, 2020, 127(4): 553-570.
- [18] Verhaar B J H, Prodan A, Nieuwdorp M, *et al.* Gut microbiota in hypertension and atherosclerosis: A review [J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): 2982.
- [19] 魏乐乐, 顾永哲, 罗云, 等. 中药调节肠道菌群治疗心脑血管疾病的研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(18): 6185-6194.
- [20] Zhang H Y, Tian J X, Lian F M, *et al.* Therapeutic mechanisms of traditional Chinese medicine to improve metabolic diseases via the gut microbiota [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2021, 133: 110857.
- [21] Jia Q J, Wang L R, Zhang X N, *et al.* Prevention and treatment of chronic heart failure through traditional Chinese medicine: Role of the gut microbiota [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 151: 104552.
- [22] Yang G, He H Q, Chen G, *et al.* Effect of traditional Chinese medicine in attenuating coronary heart disease and main risk factors by regulating gut micro-biota [J]. *China J Chin Mater Med*, 2020, 45(1): 29-36.
- [23] 张艳鹤, 郑亚云, 芦超, 等. 余甘子鞣质对代谢相关脂肪性肝病小鼠脂质代谢及肠道菌群的调节作用 [J]. *药物评价研究*, 2022, 45(2): 287-293.
- [24] Zhang G X, Jin L, Jin H, *et al.* Influence of dietary components and traditional Chinese medicine on

- hypertension: A potential role for gut microbiota [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 5563073.
- [25] 马晓聪, 熊兴江, 莫毅, 等. 基于 16S rDNA 测序技术的自发性高血压大鼠肠道菌群结构变化及中药干预作用 [J]. *中华中医药学刊*, 2020, 38(8): 71-74.
- [26] 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.
- [27] Liu S W, Li Y C, Zeng X Y, *et al*. Burden of cardiovascular diseases in China, 1990—2016: Findings from the 2016 global burden of disease study [J]. *JAMA Cardiol*, 2019, 4(4): 342-352.
- [28] Zhu B L, Wang X, Li L J. Human gut microbiome: The second genome of human body [J]. *Protein Cell*, 2010, 1(8): 718-725.
- [29] Wang Z N, Zhao Y Z. Gut microbiota derived metabolites in cardiovascular health and disease [J]. *Protein Cell*, 2018, 9(5): 416-431.
- [30] Kazemian N, Mahmoudi M, Halperin F, *et al*. Gut microbiota and cardiovascular disease: Opportunities and challenges [J]. *Microbiome*, 2020, 8(1): 36.
- [31] Richards E M, Li J, Stevens B R, *et al*. Gut microbiome and neuroinflammation in hypertension [J]. *Circ Res*, 2022, 130(3): 401-417.
- [32] Yang T, Santisteban M M, Rodriguez V, *et al*. Gut dysbiosis is linked to hypertension [J]. *Hypertension*, 2015, 65(6): 1331-1340.
- [33] Li J, Zhao F Q, Wang Y D, *et al*. Gut microbiota dysbiosis contributes to the development of hypertension [J]. *Microbiome*, 2017, 5(1): 14.
- [34] 贺韵涵, 辛宝. 三种具有降压作用的药食两用物品研究进展 [J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2018, 6(27): 169.
- [35] 穆欣, 周苗苗, 任蓁, 等. 药食同源物品中 5 种抗高血压病中药的研究进展 [J]. *中国医药导报*, 2016, 13(14): 29-32.
- [36] 施伟丽. 葛根素对自发性高血压大鼠血压的干预作用及机制研究 [D]. 北京: 中国中医科学院, 2017.
- [37] 安平祥, 缪天玲. 浅述早芹治疗 20 例原发性高血压的临床疗效 [J]. *中西医结合心血管病电子杂志*, 2018, 6(5): 181-182.
- [38] 马征, 刘健豪, 马晓宁, 等. 银杏叶与山楂提取物配伍治疗 SHR 高血压的实验研究 [J]. *中药药理与临床*, 2015, 31(1): 170-174.

[责任编辑 李亚楠]