

灵宝护心丹对动脉粥样硬化小鼠肠道黏膜屏障和肠道菌群的影响

芦瑞霞, 林文勇, 靳琪鹏, 王肖龙*

上海中医药大学附属曙光医院, 上海 200100

摘要: **目的** 探讨灵宝护心丹对动脉粥样硬化模型小鼠的改善效果及其对肠道菌群结构的调节作用, 并比较其与他汀类药物对肠道菌群影响的差异性。**方法** 高脂饮食喂养 ApoE^{-/-}小鼠 12 周诱导动脉粥样硬化模型, 随机分为模型组及灵宝护心丹低、中、高剂量 (4.68、9.36、18.72 mg/kg) 组和阿托伐他汀 (2.4 mg/kg) 组。造模成功后连续给药 8 周, C57BL/6 小鼠喂养普通饲料作为空白组。通过油红 O 染色和苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察小鼠主动脉窦的斑块面积和病理结构改变, 检测血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、三酰甘油 (triacylglycerol, TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (high-density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low-density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 水平, 采用 16S rRNA 测序技术检测小鼠粪便微生物群的多样性和丰度, 免疫荧光染色和 qRT-PCR 检测结肠紧密连接蛋白 Occludin 的表达情况。**结果** 与模型组比较, 灵宝护心丹能够有效减少动脉斑块沉积和局部炎症损伤, 降低 TC、TG、LDL-C 水平 ($P < 0.01$ 、 0.001), 改善肠道微生物的丰富度和多样性, 且与他汀类药物治疗后的肠道微生物有显著差异, 灵宝护心丹组的差异物种是 *Parasutterella* 属、Sutterellaceae 科、Burkholderiales 目和 γ -变形菌纲等, 阿托伐他汀组的差异物种是拟杆菌属、拟杆菌科、*Butyricimonas* 属和 Marinifilaceae 科等。免疫荧光和 qRT-PCR 结果显示灵宝护心丹显著增加结肠 Occludin 的表达 ($P < 0.05$), 提高小鼠肠道黏膜屏障的完整性。**结论** 灵宝护心丹具有改善动脉粥样硬化、调血脂、保护肠黏膜屏障的作用, 其机制可能与调节肠道菌群有关。

关键词: 灵宝护心丹; 动脉粥样硬化; 肠道菌群; 血脂; Occludin

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 0253-2670(2024)12-4075-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2024.12.015

Effect of Lingbao Huxin Pill on intestinal mucosal barrier and gut microbiota in mice with atherosclerosis

LU Ruixia, LIN Wenyong, JIN Qipeng, WANG Xiaolong

Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200100, China

Abstract: Objective To explore the improvement effect of Lingbao Huxin Pill (灵宝护心丹) on atherosclerosis model mice and its regulatory effect on the structure of intestinal flora, and compare its effects with statins on intestinal flora. **Methods** ApoE^{-/-} mice were fed high-fat diet for 12 weeks to induce atherosclerosis model, and were randomly divided into model group, Lingbao Huxin Pill low-, medium-, high-dose (4.68, 9.36, 18.72 mg/kg) and atorvastatin (2.4 mg/kg) group. After the model was successfully established, C57BL/6 mice were fed with ordinary feed by continuous intragastric administration for eight weeks as a blank group. The plaque area and pathological structural changes of aortic sinus in mice were observed through oil red O staining and hematoxylin-eosin (HE) staining; Total cholesterol (TC), triacylglycerol (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C) levels in serum were detected; 16S rRNA sequencing technology was used to detect the diversity and abundance of fecal microbiota in mice; Immunofluorescence staining and qRT-PCR were used to detect the expression of tight junction protein Occludin in colon. **Results** Compared with model group, Lingbao Huxin Pill effectively reduced arterial plaque deposition and local inflammatory damage, reduced TC, TG and LDL-C levels in serum ($P < 0.01$, 0.001), improved the richness and diversity of intestinal

收稿日期: 2024-02-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82074222); 国家自然科学基金资助项目 (82374252); 上海市医学创新研究专项-重大专项 (23Y31920200); 上海市中医临床重点实验室项目 (14DZ2273200)

作者简介: 芦瑞霞 (1994—), 女, 博士研究生, 主要从事中西医结合治疗动脉粥样硬化相关研究。E-mail: 1191238809@qq.com

*通信作者: 王肖龙 (1965—), 男, 主任医师, 教授, 博士生导师, 主要从事中西医结合防治心血管疾病相关研究。

E-mail: wxlqy0214@163.com

microorganisms, and there was a significant difference between Lingbao Huxin Pill and statin treatment in intestinal microorganisms. The different species in Lingbao Huxin Pill group were *Parasutterella*, Sutterellaceae, Burkholderiales and γ -Proteobacteria, etc. The different species in atorvastatin group were *Bacteroides*, Bacteroidaceae, *Butyrivimonas* and Marinifilaceae, etc. The results of immunofluorescence and qRT-PCR showed that Lingbao Huxin Pill significantly increased the expression of Occludin in colon ($P < 0.05$) and improved the integrity of the intestinal mucosal barrier in mice. **Conclusion** Lingbao Huxin Pill can improve atherosclerosis, regulate blood lipid, and protect the intestinal mucosal barrier. Its mechanism may be related to the regulation of intestinal flora.

Key words: Lingbao Huxin Pill; atherosclerosis; gut microbiota; blood lipid; Occludin

动脉粥样硬化是一种影响动脉壁的慢性炎症性疾病,是急性冠状动脉综合征、缺血性卒中等动脉粥样硬化性心脑血管疾病的病理基础。目前已成为全球主要的残疾和死亡原因之一^[1]。动脉粥样硬化的病理复杂性主要来源于其多元化的发病机制,其中肠道微生物的作用尤为关键。近年多项临床和动物研究强调了肠道微生物在动脉粥样硬化进展中扮演的关键角色。人类与肠道微生物共同构成一个高度代谢活跃的系统,这种互动通过多种代谢途径影响宿主的生理状态。然而,当内脏循环发生充血,肠壁水肿,肠道屏障功能和通透性变化时,细菌及其代谢产物就会转位进入体内循环,从而加剧心血管疾病的炎症前状态^[2]。此外,失调的肠道微生物通过与宿主基因的相互作用,进一步提高来冠状动脉疾病的风险^[3]。因此,动脉粥样硬化的进展在很大程度上是由肠道微生物群驱动的。特别是三甲胺 *N*-氧化物,一种由肠道菌群从饮食来源的胆碱和 *L*-肉碱代谢而来的产物,已被证明在动脉粥样硬化的形成中发挥重要作用。三甲胺 *N*-氧化物能够抑制胆固醇的正常代谢,促进血小板聚集和血栓的形成,从而加速动脉粥样硬化的进程。它的存在直接或间接参与了心血管疾病的多个发病机制,成为了影响疾病进展甚至预后的一个重要因素^[4]。此外,口腔健康状况,特别是牙龈卟啉单胞菌的感染,也会影响肠道菌群的平衡,进一步促进动脉粥样硬化的发展^[5]。这一系列发现强调了在心血管疾病的预防和治疗中考虑肠道微生态的重要性,为未来的治疗策略提供了新的视角。

近期研究显示,通过调节肠道微生物可以有效改善动脉粥样硬化。生姜精油和柠檬醛通过调节三甲胺-*N*-氧化物和肠道微生物来改善 ApoE^{-/-}小鼠的动脉粥样硬化^[6]。赤霞珠干红葡萄酒^[7]、全谷青稞^[8]及番茄红素^[9]等物质也通过影响炎症反应、内皮功能、单磷酸腺苷活化蛋白激酶(adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK)激

活以及肠道微生物的调整,展现了改善动脉粥样硬化的潜力。这表明,通过针对性地调节肠道微生物和代谢产物,可以为动脉粥样硬化的治疗提供新的策略。

基于此,本课题组前期临床和动物研究已经表明灵宝护心丹可以减轻动脉粥样硬化,但其是否通过调节肠道菌群发挥作用尚未明确,因此,本研究通过对高脂饮食喂养的 ApoE^{-/-}小鼠给予灵宝护心丹治疗,旨在深入探讨其对动脉粥样硬化的改善作用及其可能的肠道微生物调节机制,进一步阐明肠道微生态与心血管疾病之间的复杂联系,为开发新的治疗手段提供科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 ApoE^{-/-}小鼠 40 只, C57BL/6 小鼠 8 只, 体质量 19~23 g, 由北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证号 SCXK(京)2021-0006。动物常规饲养于上海中医药大学动物实验中心, 相对湿度 40%~60%, 环境温度 20~25 °C, 自由进食饮水, 昼夜交替照明, 适应性喂养 1 周后开展实验, 动物实验经上海中医药大学动物实验伦理委员会批准(批准号 PZSHUTCM220711035)。

1.2 药品与试剂

灵宝护心丹(国药准字 Z32021181, 批号 VA05003)购自雷允上药业有限公司; 阿托伐他汀钙片(国药准字 J20130129, 批号 8165588)购自美国辉瑞有限公司; 三酰甘油(triglycerides, TG)测定试剂盒(批号 20230607)、总胆固醇(total cholesterol, TC)测定试剂盒(批号 S03042)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)测定试剂盒(批号 S03025)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)测定试剂盒(批号 S03029)购自深圳雷杜生命科技有限公司; Occludin 抗体(批号 AC240422050)、CY3 标记山羊抗兔 IgG 抗体(批

号 AC2403301045) 购自 Servicebio 公司; MagPure Soil DNA KF Kit (批号 MD150300) 购自 Magen 公司; Tks Gflex DNA Polymerase (批号 AJG0614A) 购自日本 Takara 公司。

1.3 仪器

Centrifuge 5418 型台式高速离心机 (德国 Eppendorf 公司); 580BR10905 型 PCR 仪 (美国 Bio-Rad 公司); HE-120 型电泳仪、2500 型凝胶成像仪 (上海 Tanon 公司); 2100 型生物分析仪 (美国 Agilent 公司); 2000 型 NanoDrop 微量分光光度计、CRYOSTAR NX50 型冰冻切片机、Veriti DX 梯度 PCR 仪 (美国 Thermo Fisher Scientific 公司); Pannoramic MIDI 组织切片数字扫描仪 (匈牙利 3DHISTECH 公司); Chemray 240 型全自动生化分析仪 (深圳雷杜生命科技有限公司); Donatello 型脱水机 (意大利迪佩斯公司); JB-P5 型包埋机、JB-L5 型冻台 (武汉俊杰电子有限公司); RM2016 型病理切片机 (上海徕卡仪器有限公司); KD-P 型组织摊片机 (浙江省金华市科迪仪器设备有限公司); GFL-230 型烤箱 (天津市莱玻瑞仪器设备有限公司); NIKON ECLIPSE E100 型正置光学显微镜 (日本尼康公司); Roche480II Real Time PCR System 荧光定量 PCR 仪 (瑞士 Roche 公司)。

2 方法

2.1 动脉粥样硬化模型的建立、分组及给药

40 只 ApoE^{-/-}小鼠给予高脂饮食 (22.62% 蛋白质、45.51% 碳水化合物和 20.06% 脂肪) 3 个月, 8 只 C57BL/6 小鼠作为空白组喂以普通饲料。ApoE^{-/-}小鼠随机分为模型组及灵宝护心丹低、中、高剂量 (4.68、9.36、18.72 mg/kg) 组和阿托伐他汀 (2.4 mg/kg) 组, 每组 8 只。各给药组 ig 相应药物, 空白组和模型组 ig 等体积生理盐水, 1 次/d, 连续给药 8 周, 给药期间除空白组外均持续高脂饲料喂养。

2.2 标本采集

给药 8 周后, 小鼠禁食不禁水 12 h, 摘眼球取血, 3 000 r/min 离心 10 min, 分离血清, 液氮速冻; 打开胸腔和腹腔, 剪右心耳, 心尖注射 PBS 缓冲液进行心脏灌流, 取主动脉根部和结肠置于 4% 多聚甲醛充分固定, 取盲肠内容物、结肠置于无菌 EP 管液氮速冻。

2.3 主动脉窦的病理学分析

将小鼠心脏置于 4% 多聚甲醛固定 24 h, 使用 OCT 包埋, 冰冻切片, 以 8~10 μm 的厚度进行切

片, 分别进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色和油红 O 染色。显微镜下观察主动脉窦切片, 并使用组织切片数字扫描仪拍照, 用 Image J 软件对斑块面积进行测量。

2.4 生化指标检测

按照试剂盒说明书检测血清 TC、TG、HDL-C 和 LDL-C 水平。

2.5 免疫荧光染色检测结肠组织 Occludin 表达

取小鼠结肠的石蜡样本, 脱蜡至水, 将切片放入枸橼酸缓冲液中加热进行抗原修复。使用牛血清白蛋白血清封闭。加入 Occludin 一抗 (1:200), 于 4 °C 湿盒中避光孵育过夜; 加入山羊抗兔 IgG 二抗, 避光孵育 50 min; 加入 DAPI 染液复染细胞核, 淬灭组织自发荧光, 封片后采集图像。显微镜下红色为阳性表达, 使用 Image J 软件统计 Occludin 阳性表达的平均吸光度 (A) 值。

2.6 qRT-PCR 检测结肠组织 Occludin mRNA 表达

取空白组、模型组和灵宝护心丹中剂量组的小鼠结肠, Trizol 提取总 RNA, 根据试剂盒说明书进行逆转录反应, 进行 qRT-PCR 分析, 引物由 NCBI Primer-blast 设计, 由苏州金唯智合成。引物序列见表 1。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	引物序列 (5'-3')
GAPDH	F: AGGTCGGTGTGAACGGATTTG
	R: TGTAGACCATGTAGTTGAGGTCA
Occludin	F: GCTCTCTCAGCCAGCGTACT
	R: ATAGCCTCTGTCCCAAGCAA

2.7 16S rRNA 肠道菌群测序分析

首先采用专用的 DNA 抽提试剂盒从空白组、模型组、灵宝护心丹中剂量组和阿托伐他汀组的样本中提取基因组 DNA, 并通过琼脂糖凝胶电泳以及 NanoDrop2000 光谱光度计对提取的 DNA 浓度和纯度进行检测。随后, 以提取的基因组 DNA 作为模板, 选用带有条形码的特异性引物针对 16S rRNA 基因的 V3~V4 变异区进行 PCR 扩增。扩增产物经过琼脂糖凝胶电泳检测后, 使用磁珠法进行纯化, 以确保后续实验的准确性。纯化后的 PCR 产物将作为二轮 PCR 的模板, 进行进一步扩增, 扩增后同样通过电泳检测并再次纯化, 确保扩增产物的纯度和专一性。纯化的最终产物将通过 Qubit 定量, 以精确控制后续上机测序的样品混合比例。在完成 PCR

产物的精确定量后, 根据各样品的浓度进行等量混合, 以保证测序数据的均衡性。最后, 混合后的样品进行高通量测序分析, 以获得肠道微生物群落结构的详细信息。

2.8 菌群生物信息分析

首先将得到的原始测序数据 (FASTQ 格式) 经过 cutadapt 软件处理, 以去除引物序列, 保证数据的准确性。接着, 利用 DADA2 在 QIIME 2 (版本 2020.11) 环境下对处理后的双端序列进行质量过滤、降噪、拼接以及去除嵌合体, 这些步骤旨在确保数据质量, 从而获得高质量的代表序列和扩增子序列变异体 (amplicon sequence variants, ASV) 丰度表。随后, 通过 QIIME 2 软件包选取各 ASV 的代表序列, 并将它们与 Silva 数据库 (Version 138) 进行比对, 以进行物种注释。这一步骤帮助理解每个 ASV 在不同样本中的相对丰度, 以及它们在生物分类上的定位, 如门、纲、目、科、属等级。最终, 对样本中的微生物群落结构在各个分类级别上

进行总结和注释, 使用线性判别分析 (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 来识别 4 组样本间群落组成的显著差异物种, 以揭示潜在的生物标志物或功能性差异。

2.9 统计学分析

采用 GraphPad Prism (Version 9.4.1) 软件进行统计分析和绘图, 所有数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 使用单因素方差分析进行多组间比较, 采用 Tukey 多重比较测试进行后续分析。

3 结果

3.1 灵宝护心丹对 ApoE^{-/-}小鼠主动脉粥样斑块的影响

如图 1 所示, 空白组小鼠主动脉窦的组织结构完整, 内膜几乎没有脂质沉积, 表明无明显的动脉粥样硬化病理特征。相比之下, 模型组小鼠的主动脉窦结构呈显著的不规则性, 内膜层出现大量的脂质沉积, 动脉内膜增厚不均。经灵宝护心丹治疗后, 主动脉窦内的脂质沉积显著减少, 动脉内膜结构恢复至较为规整的状态, 表现出病理改变的明显缓解。

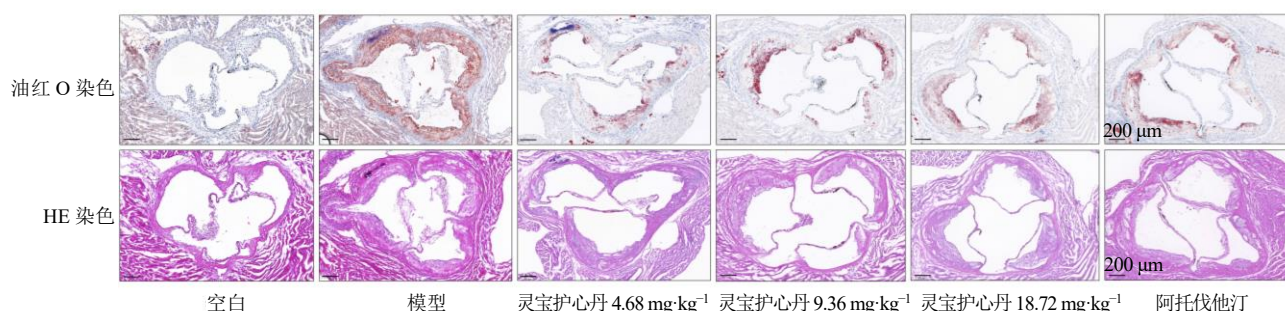


图 1 小鼠主动脉窦的油红 O 染色和 HE 染色 (×50)

Fig. 1 Oil red O staining and HE staining of aortic sinus in mice (×50)

3.2 灵宝护心丹对 ApoE^{-/-}小鼠血清脂质水平的影响

如图 2 所示, 与空白组比较, 模型组小鼠血清中 TC、TG、LDL-C 水平均显著升高 ($P < 0.001$); 与模型组比较, 各给药组血清中 TC 水平显著降低 ($P < 0.001$), 灵宝护心丹中、高剂量组和阿托伐他汀组 TG、LDL-C 水平显著降低 ($P < 0.01$ 、 0.001)。各组 HDL-C 水平均无显著差异。

3.3 灵宝护心丹对 ApoE^{-/-}小鼠肠道菌群生态多样性的影响

如图 3-A 所示, 通过样本测序数量与检出的 ASV 数量的关系图, 可以观察到随着样本数量的增加, 检出的 ASVs 数量逐渐趋于饱和状态, 表明样本的抽取已足够反映肠道菌群的组成多样性。此外, 通过对各样本中 ASVs 的数量进行统计, 绘制花瓣

图 (图 3-B), 可以直观地看出每个样本中 ASVs 的丰度分布。与空白组相比, 模型组中的 ASV 数量有所下降, 而灵宝护心丹组和阿托伐他汀组均能够提高 ASVs 的数量, 显示了对肠道微生物多样性的积极影响。

3.4 灵宝护心丹对 ApoE^{-/-}小鼠微生物群落分布的影响

如图 4 所示, 该条形图展示了各组肠道微生物在各个分类层级上的数量分布, 具体包括门、纲、目、科、属和种 6 个层级。从图中可以观察到, 空白组展示了在没有任何干预的情况下肠道微生物的基线多样性水平, 模型组在动脉粥样硬化疾病状态下的多样性有所下降, 灵宝护心丹和阿托伐他汀有助于恢复动脉粥样硬化疾病状态下受损的微生物群落结构。

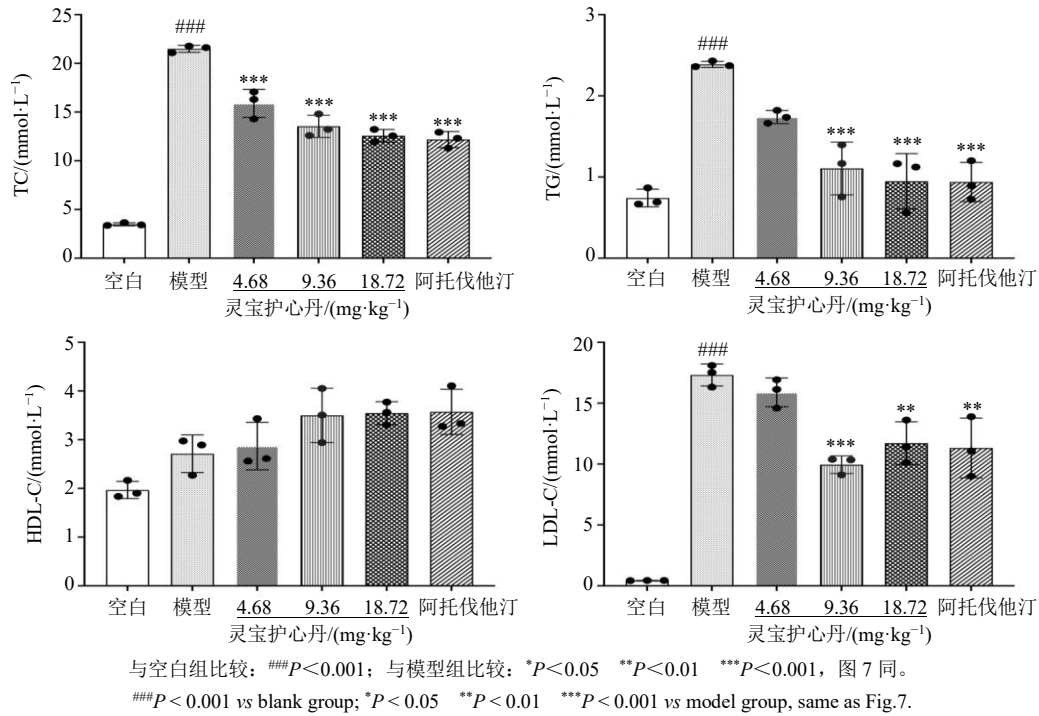


图 2 灵宝护心丹对 $ApoE^{-/-}$ 小鼠血清脂质水平的影响 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 2 Effect of Lingbao Huxin Pill on lipid levels in serum of $ApoE^{-/-}$ mice ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

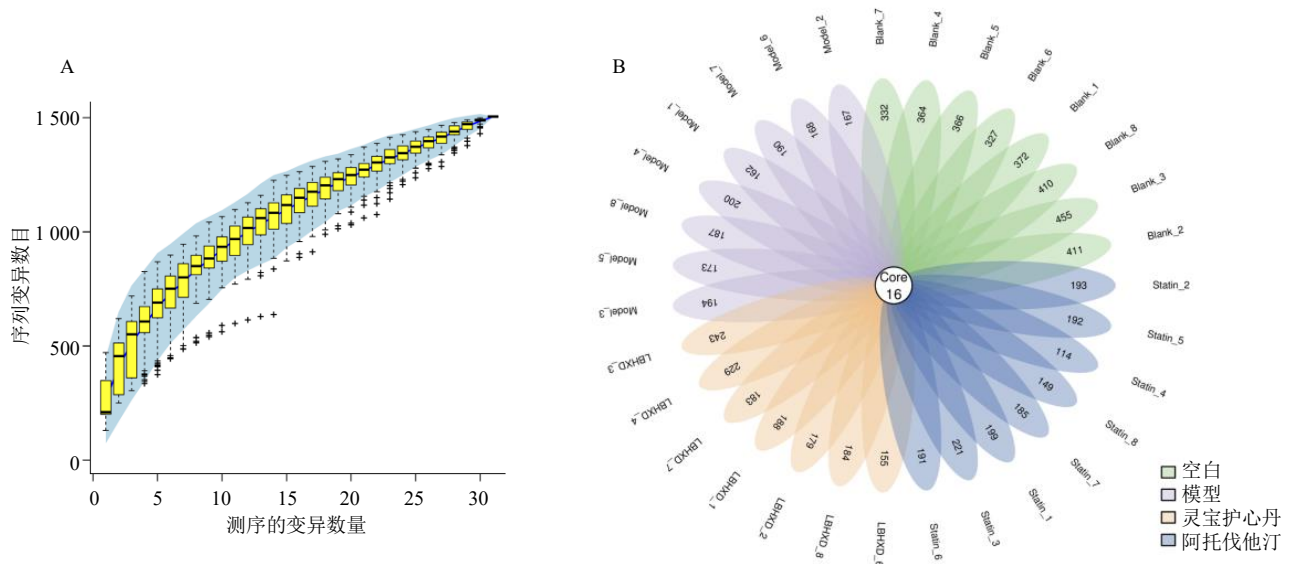


图 3 肠道菌群的物种累积曲线 (A) 和 ASVs 分布花瓣图 (B)

Fig. 3 Species accumulation curve of intestinal flora (A) and ASVs distribution petal diagram (B)

3.5 灵宝护心丹对 $ApoE^{-/-}$ 小鼠群落结构的影响

如图 5 所示, 通过对各组小鼠的肠道微生物在纲、目、科和属 4 个分类水平上的相对丰度分布进行对比, 可以深入了解灵宝护心丹和阿托伐他汀对肠道菌群结构的影响。在纲的分类层级中, 主要优势菌群包括 Bacteroidia、Clostridia 和 Desulfovibronia, 这些菌群在各组中占据了显著的比

例。在目的分类层级中, Bacteroidales、Lachnospirales 和 Oscillospirales 为主要的优势菌目, 它们在不同治疗组中的相对丰度展现出特定的变化模式。在科的分类层级中, Muribaculaceae、Lachnospiraceae、Rikenellaceae、Tannerellaceae、Erysipelotrichaceae 和 Sutterellaceae 等科的微生物占据了丰度排名的前列。在属的分类层级中, Muribaculaceae 科中的 *Bacteroides*、

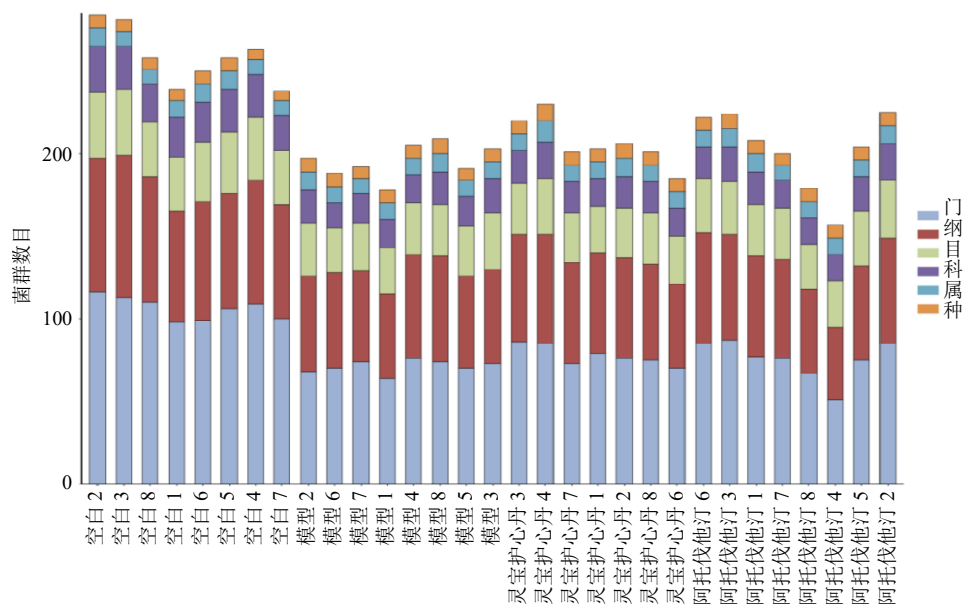


图 4 微生物群落分布累积柱状图

Fig. 4 Cumulative histogram of microbial community distribution

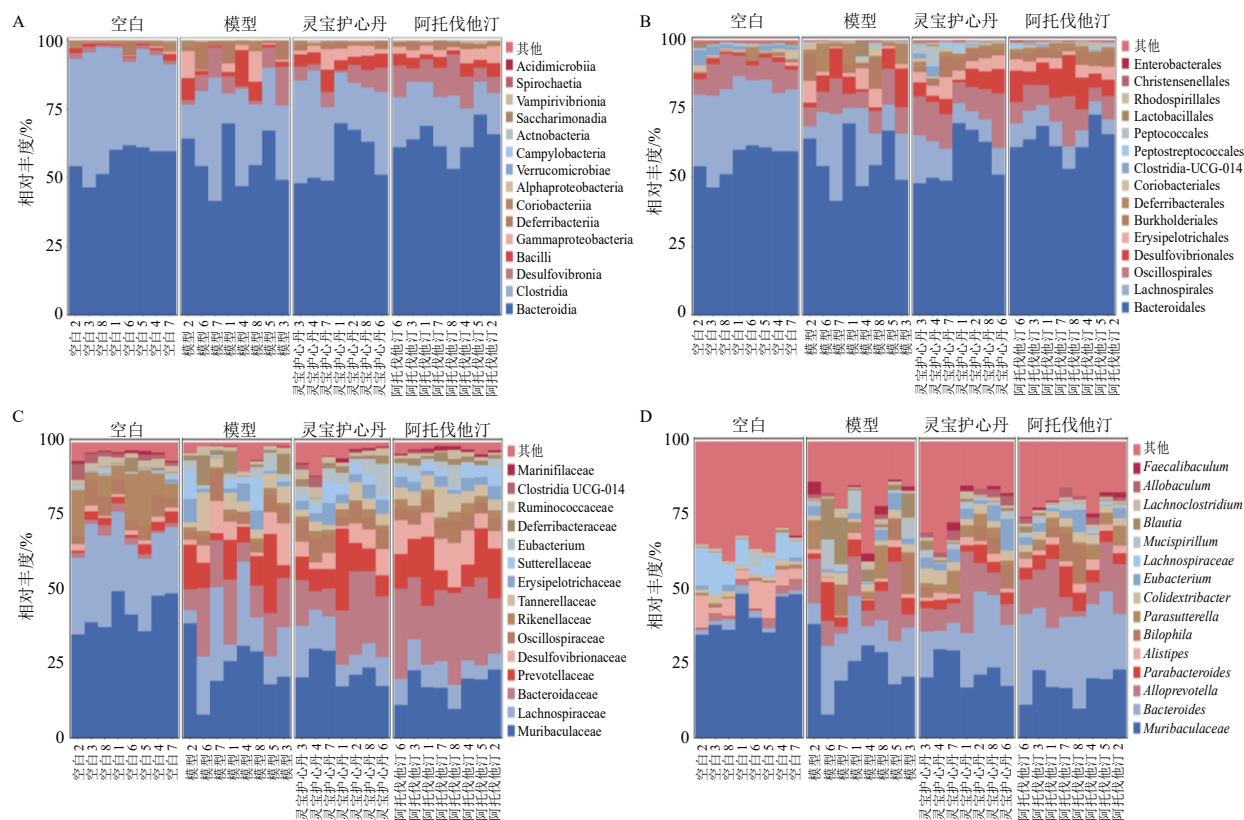


图 5 群落纲 (A)、目 (B)、科 (C)、属 (D) 结构柱状图

Fig. 5 Community structure histogram of class (A), order (B), family (C) and genus (D)

Alistipes、*Alloprevotella* 和 *Parabacteroides* 属的微生物种类, 在各组中的占比最为显著。

3.6 LEfSe 分析

根据 LEfSe 差异物种注释分支例图 (图 6-A)

和差异物种分数图 (图 6-B) 的综合分析, 可以确定在灵宝护心丹组中, 如 *Erysipelotrichales* 目、芽孢杆菌纲、 γ -变形菌纲的微生物表现出相对较高的丰度。这些物种的增加可能与灵宝护心丹对肠道微

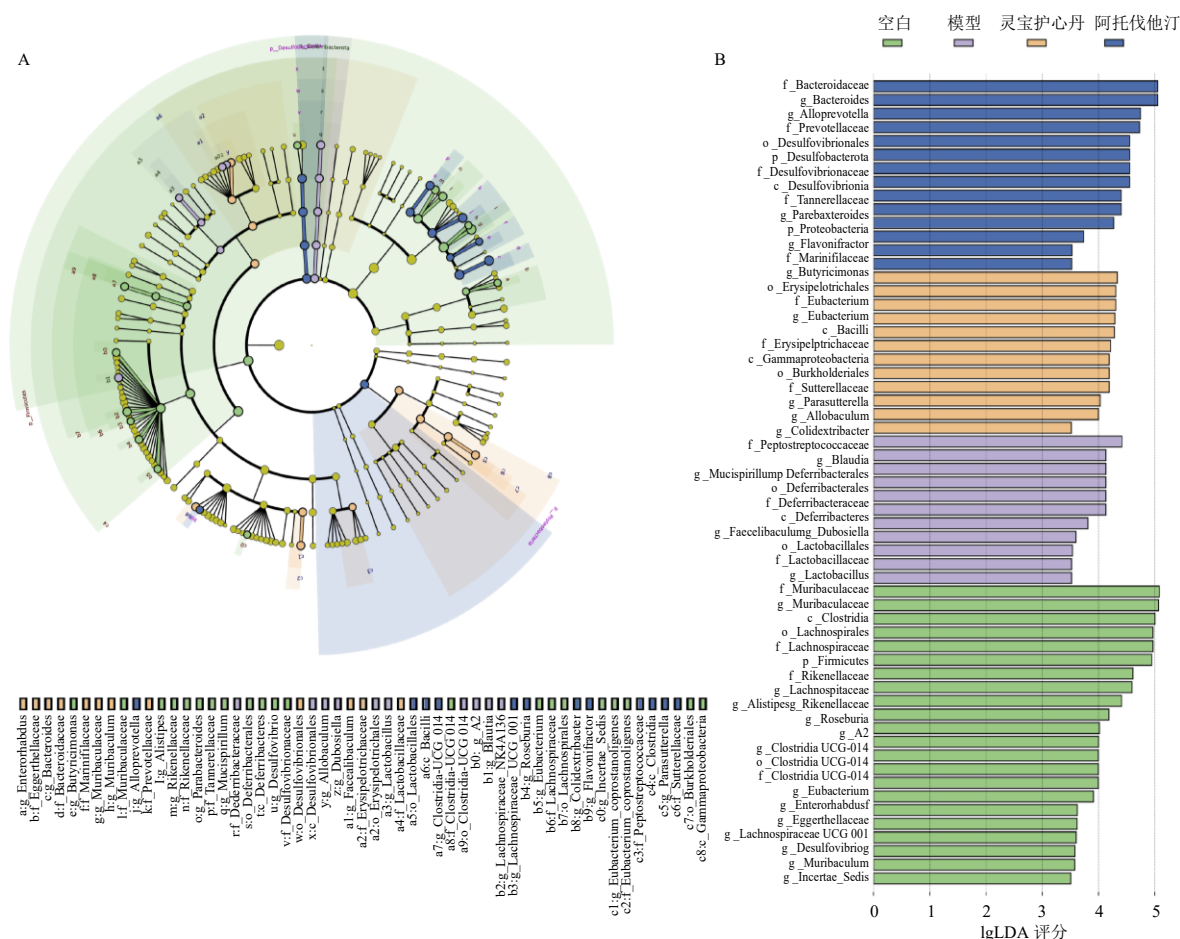


图 6 LEfSe 差异物种注释分支例图 (A) 和差异物种分数图 (B)

Fig. 6 LEfSe differential species annotation branch example diagram (A) and differential species score diagram (B)

生物群落结构调整的作用有关。与之相对的，阿托伐他汀组拟杆菌科 (Bacteroidaceae)、拟杆菌属 *Bacteroides*、*Alloprevotella* 属、Prevotellaceae 科和 Desulfovibrionales 目的微生物显示出较高的相对丰度。这表明他汀类药物的应用可能倾向于提升这些微生物群落的比例。在 4 组比较中，灵宝护心丹组的显著差异物种包括 *Parasutterella* 属、Sutterellaceae 科、伯克霍尔德菌目、 γ -变形菌纲等。这些物种的特征增强可能反映了灵宝护心丹对于特定肠道微生物群落结构的调整作用。而阿托伐他汀组的显著差异物种则包括拟杆菌属、拟杆菌科、*Butyricimonas* 属、Marinifilaceae 科等。这些物种的丰度改变可能与他汀类药物对肠道环境的影响有关。

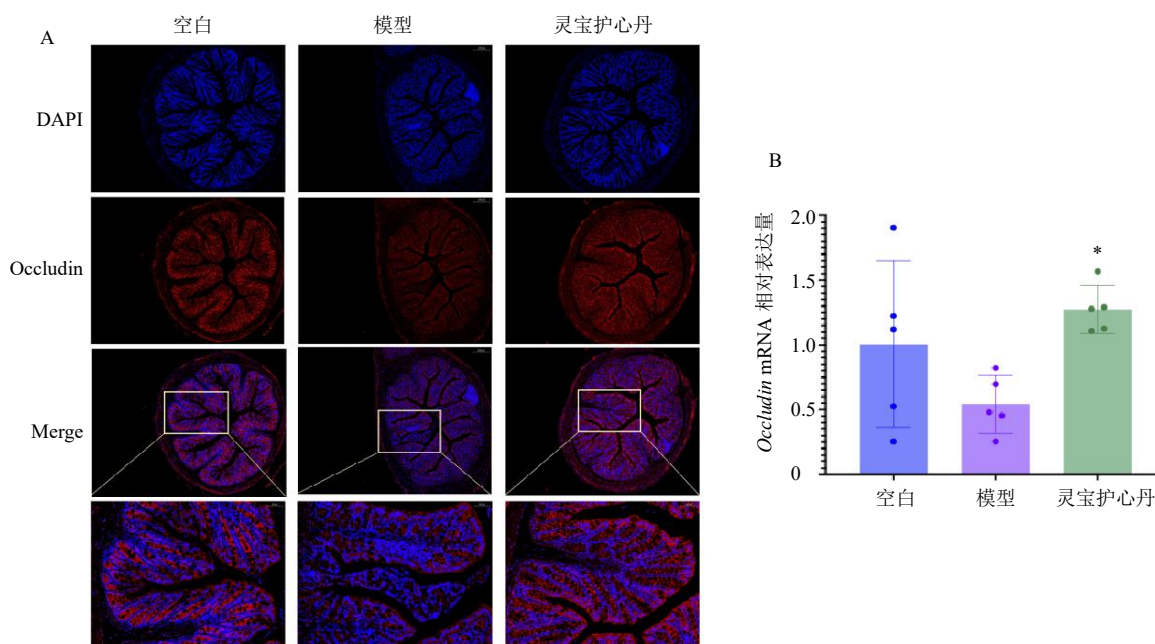
3.7 灵宝护心丹对 ApoE^{-/-}小鼠结肠 Occludin 表达的影响

Occludin 是紧密连接蛋白，其在肠道屏障功能中起着关键作用。图 7-A 展示了结肠 Occludin 蛋白的免疫荧光染色，在空白组中，Occludin 的表达呈

现均匀连续红色信号，沿着结肠上皮细胞的边界清晰可见，DAPI 染色显示了细胞核的蓝色荧光，表明了细胞的位置和形态，合并图像中，Occludin 的红色信号与 DAPI 的蓝色信号呈现良好的重叠，显示出结肠的完整和正常的紧密连接结构。在模型组中，Occludin 的红色信号相比于空白组出现中断和弱化，表明紧密连接可能受损，且结构完整性下降。这可能反映了动脉粥样硬化模型中结肠屏障功能的损害。灵宝护心丹组 Occludin 表达相比于模型组有所改善，红色信号更加连续和明显。qRT-PCR 结果 (图 7-B) 显示，与模型组比较，灵宝护心丹组 Occludin mRNA 表达水平显著升高 ($P < 0.05$)，这表明灵宝护心丹治疗有助于恢复动脉粥样硬化引起的结肠屏障功能损伤。

4 讨论

本研究系统地评估了灵宝护心丹对 ApoE^{-/-}动脉粥样硬化小鼠多方面的影响，包括主动脉粥样斑块形成、血清脂质水平、肠道菌群的多样性与结构，



A-Occludin 的结肠免疫荧光染色 ($\times 200$); B-Occludin 基因表达 ($n=5$)。
A-immunofluorescence staining of Occludin in colon ($\times 200$); B-Occludin gene expression ($n=5$).

图 7 灵宝护心丹对 $ApoE^{-/-}$ 小鼠结肠 Occludin 表达的影响

Fig. 7 Effect of Lingbao Huxin Pill on expression of Occludin in colon of $ApoE^{-/-}$ mice

以及结肠紧密连接蛋白 Occludin 的表达。研究结果表明,灵宝护心丹能够显著减少主动脉窦内脂质沉积,降低血清中 TC、TG、LDL-C 水平,但对 HDL-C 的改善作用不明显。此外,灵宝护心丹还能显著提升肠道菌群的多样性和改善微生物群落结构,LEfSe 分析进一步揭示了灵宝护心丹特异性增强的微生物物种,这可能与调节肠道微生物群落结构的能力相关,这与他汀类药物对肠道菌群结构的改变存在差异。此外,灵宝护心丹对结肠屏障功能的恢复作用,特别是通过改善 Occludin 蛋白的表达,进一步证实了其对动脉粥样硬化综合治疗效果的贡献。

灵宝护心丹组的显著差异物种包括 *Parasutterella* 属、Sutterellaceae 科、伯克霍尔德菌目、 γ -变形菌纲等。值得注意的是, *Parasutterella* 属作为人类和小鼠肠道微生物群的核心成员,在胆汁酸维持和胆固醇代谢过程中扮演了重要角色^[10]。伯克霍尔德菌目在动脉粥样硬化患者的颈总动脉粥样硬化斑块中丰度较高,并与 TC、丙氨酸氨基转移酶和纤维蛋白原水平等临床参数相关,这暗示着肠道微生物和斑块中的细菌可能通过影响宿主的代谢途径或促进炎症反应,间接参与动脉粥样硬化的病理过程^[11]。然而, Sutterellaceae 科、 γ -变形菌纲与动脉粥样硬化的关系,目前的研究尚未能提供完整的解

释。对于阿托伐他汀组,显著差异物种包括拟杆菌属、拟杆菌科、丁酸单胞菌属、海藻科等。拟杆菌能减少肠道微生物脂多糖的产生,从而抑制动脉粥样硬化^[12]。丁酸单胞菌属与代谢综合征之间的关联也被证明,进一步证实了肠道微生物在宿主健康中的关键作用^[13]。

在本研究中,通过免疫荧光观察到 Occludin 在不同组别中的表达存在显著差异。Occludin 作为紧密连接蛋白,在保持肠道屏障完整性和调节肠道通透性中起着至关重要的角色^[14]。在空白组中, Occludin 的均匀连续表达反映了健康结肠的正常紧密连接结构,然而,动脉粥样硬化模型组中 Occludin 的表达中断和弱化,暗示动脉粥样硬化病理状态下引发了炎症或代谢变化,可能导致紧密连接的结构和功能受损,破坏肠道屏障^[15]。灵宝护心丹组 Occludin 表达显著改善,显示出比模型组更连续和明显的红色信号,这表明灵宝护心丹治疗有助于修复由动脉粥样硬化引起的结肠屏障功能损伤,从而恢复紧密连接的正常结构和功能。

综上,灵宝护心丹通过调节血脂水平,改善肠道菌群多样性及结构,并恢复结肠屏障功能,展现了对动脉粥样硬化的综合治疗效果。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Weber C, Habenicht A J R, von Hundelshausen P. Novel mechanisms and therapeutic targets in atherosclerosis: Inflammation and beyond [J]. *Eur Heart J*, 2023, 44(29): 2672-2681.
- [2] Nesci A, Carnuccio C, Ruggieri V, *et al.* Gut microbiota and cardiovascular disease: Evidence on the metabolic and inflammatory background of a complex relationship [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(10): 9087.
- [3] Chen L Y, Mou X T, Li J J, *et al.* Alterations in gut microbiota and host transcriptome of patients with coronary artery disease [J]. *BMC Microbiol*, 2023, 23(1): 320.
- [4] Zhen J, Zhou Z, He M, *et al.* The gut microbial metabolite trimethylamine *N*-oxide and cardiovascular diseases [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1085041.
- [5] Park S, Kim I, Han S J, *et al.* Oral *Porphyromonas gingivalis* infection affects intestinal microbiota and promotes atherosclerosis [J]. *J Clin Periodontol*, 2023, 50(11): 1553-1567.
- [6] Panyod S, Wu W K, Peng S Y, *et al.* Ginger essential oil and citral ameliorates atherosclerosis in ApoE^{-/-} mice by modulating trimethylamine-*N*-oxide and gut microbiota [J]. *NPJ Sci Food*, 2023, 7: 19.
- [7] Cheng X L, Han X, Zhou L F, *et al.* Cabernet sauvignon dry red wine ameliorates atherosclerosis in mice by regulating inflammation and endothelial function, activating AMPK phosphorylation, and modulating gut microbiota [J]. *Food Res Int*, 2023, 169: 112942.
- [8] Wu T, Yu Q Y, Luo Y T, *et al.* Whole-grain highland barley attenuates atherosclerosis associated with NLRP3 inflammasome pathway and gut microbiota in ApoE^{-/-} mice [J]. *Nutrients*, 2023, 15(19): 4186.
- [9] Tu T C, Liu H, Liu Z H, *et al.* Amelioration of atherosclerosis by lycopene is linked to the modulation of gut microbiota dysbiosis and related gut-heart axis activation in high-fat diet-fed ApoE^{-/-} mice [J]. *Nutr Metab*, 2023, 20(1): 53.
- [10] Ju T T, Kong J Y, Stothard P, *et al.* Defining the role of *Parasutterella*, a previously uncharacterized member of the core gut microbiota [J]. *ISME J*, 2019, 13(6): 1520-1534.
- [11] Ziganshina E E, Sharifullina D M, Lozhkin A P, *et al.* Bacterial communities associated with atherosclerotic plaques from Russian individuals with atherosclerosis [J]. *PLoS One*, 2016, 11(10): e0164836.
- [12] Yoshida N, Emoto T, Yamashita T, *et al.* *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* reduce gut microbial lipopolysaccharide production and inhibit atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2018, 138(22): 2486-2498.
- [13] Yang S, Hu T, Liu H, *et al.* *Akebia* saponin D ameliorates metabolic syndrome (MetS) via remodeling gut microbiota and attenuating intestinal barrier injury [J]. *Biomed Pharmacother*, 2021, 138: 111441.
- [14] Suzuki T. Regulation of intestinal epithelial permeability by tight junctions [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2013, 70(4): 631-659.
- [15] Turner J R. Intestinal mucosal barrier function in health and disease [J]. *Nat Rev Immunol*, 2009, 9(11): 799-809.

[责任编辑 李亚楠]