

基于肠道菌群及代谢组学探讨荆防合剂抗血栓的作用机制

倪雯婷^{1,2}, 李市荣³, 孙成宏⁴, 姚景春^{1,2}, 张贵民^{1,2*}

1. 山东中医药大学, 山东 济南 250355

2. 鲁南制药集团股份有限公司, 山东 临沂 276000

3. 天津中医药大学, 天津 301617

4. 枣庄学院, 山东 枣庄 277160

摘要: **目的** 基于肠道菌群和代谢组学探讨荆防合剂抗血栓的作用机制。**方法** 48 只大鼠随机分为对照组、模型组及荆防合剂低、中、高剂量组和阿司匹林组, 每组 8 只。采用 ip 角叉菜胶及低温处理诱导大鼠血栓, 造模前连续给药 7 d, 造模后 48 h 麻醉处死, 取大鼠尾巴进行苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 和 Masson 染色, 结肠进行 AB-PAS 染色; 取血浆检测凝血四项; ELISA 检测血浆中血栓烷 B₂ (thromboxane B₂, TXB₂)、6-酮-前列环素 F₁ α (6-keto-PGF₁ α)、抗凝血酶 III (antithrombin III, ATIII)、纤维蛋白原降解产物 (fibrinogen degradation products, FDP) 和血清中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6 及肠道分泌型免疫球蛋白 A (secretory immunoglobulin A, SIgA) 含量; 检测肠道黏膜屏障指标内毒素 (endotoxin, LPS)、二胺氧化酶 (diamine oxidase, DAO)、D-乳酸 (D-lactic acid, D-LA) 含量; qRT-PCR 和 Western blotting 检测肠道紧密连接蛋白 1 (zonula occludens proteins-1, ZO-1) 和咬合蛋白 (Occludin) 基因和蛋白表达; 基于 16S rDNA 高通量测序技术和非靶向代谢组学联合测定大鼠肠道菌群和内源性代谢物变化。**结果** 荆防合剂可显著降低血栓大鼠的相对黑尾长度 ($P < 0.05$ 、 0.01), 减少尾巴炎性浸润现象及胶原含量 ($P < 0.05$ 、 0.01), 回调凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶时间 (thrombin time, TT)、纤维蛋白原 (fibrinogen, FIB), 凝血因子 TXB₂、6-keto-PGF₁ α 、ATIII、FDP ($P < 0.05$ 、 0.01), 炎性因子 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 ($P < 0.05$ 、 0.01) 及肠道 SIgA 水平 ($P < 0.05$), 降低肠黏膜损伤因子 LPS、DAO、D-LA 水平 ($P < 0.05$ 、 0.01), 升高肠道紧密连接蛋白表达水平 ($P < 0.05$ 、 0.01)。16S rDNA 和血清非靶向代谢组学结果显示, 荆防合剂可显著改善血栓大鼠体内的肠道菌群紊乱, 其代谢相关通路可能与不饱和脂肪酸、亚油酸代谢等有关。**结论** 荆防合剂对角叉菜胶引起的大鼠血栓有较好的治疗作用, 能够减轻大鼠尾巴病理改变, 缓解凝血因子、炎性因子失调, 改善肠道屏障损伤及肠道菌群紊乱, 影响不饱和脂肪酸等相关代谢通路。

关键词: 荆防合剂; 血栓; 肠道屏障; 肠道菌群; 代谢组学; 不饱和脂肪酸代谢

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)07-2396-16

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.07.016

Antithrombotic mechanism of Jingfang Mixture based on intestinal flora and metabolomics

NI Wenting^{1,2}, LI Shirong³, SUN Chenghong⁴, YAO Jingchun^{1,2}, ZHANG Guimin^{1,2}

1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

2. Lunan Pharmaceutical Group Co., Ltd., Linyi 276000, China

3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China

4. Zaozhuang University, Zaozhuang 277160, China

Abstract: **Objective** To explore the antithrombotic mechanism of Jingfang Mixture (荆防合剂) based on intestinal flora and metabolomics. **Methods** A total of 48 rats were divided into control group, model group, Jingfang Mixture low-, medium-, high-dose groups and aspirin group, with eight rats in each group. Thrombus was caused by intraperitoneal injection of carrageenan combined

收稿日期: 2024-12-31

基金项目: 山东省自然科学基金创新发展联合基金项目 (ZR2022LZY021)

作者简介: 倪雯婷, 博士研究生, 研究方向为中药药理学。E-mail: 1258022966@qq.com

*通信作者: 张贵民, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药新药研究、中药及复方活性成分与质量控制研究。E-mail: lunanzhangguimin@yeah.net

with low-temperature induction. The drug was administered 7 d before modeling, anesthetized and sacrificed 48 h after modeling. The tail of rats was taken for hematoxylin-eosin (HE) and Masson staining, and the colon was stained for AB-PAS staining; Plasma was taken for four coagulation items; ELISA was used to detect the contents of thromboxane B₂ (TXB₂), 6-keto-PGF1 α , antithrombin III (ATIII), fibrinogen degradation products (FDP) in plasma and tumor necrosis factor- α (TNF- α), interferon- γ (IFN- γ), interleukin-1 β (IL-1 β), IL-6 and intestinal secretory immunoglobulin A (SIgA) in serum; The contents of endotoxin (LPS), diamine oxidase (DAO) and D-lactic acid (D-LA) in intestinal mucosal barrier indicators were measured; qRT-PCR and Western blotting were used to detect the gene and protein expressions of intestinal zonula occludens proteins-1 (ZO-1) and Occludin; Changes in rat intestinal flora and endogenous metabolites were measured based on 16S rDNA high-throughput sequencing technology and non-targeted metabolomics. **Results** Jingfang Mixture could significantly reduce the relative black tail length of thrombotic rats ($P < 0.05$, 0.01), reduce inflammatory infiltration and collagen content in tail ($P < 0.05$, 0.01), regulate the levels of activated partial thromboplastin time (APTT), thrombin time (TT), fibrinogen (FIB), coagulation factors TXB₂, 6-keto-PGF1 α , ATIII, FDP ($P < 0.05$, 0.01), inflammatory factors TNF- α , IFN- γ , IL-1 β , IL-6 ($P < 0.05$, 0.01) and intestinal SIgA ($P < 0.05$), reduce the levels of intestinal mucosa damage factors LPS, DAO, D-LA ($P < 0.05$, 0.01), and increase the expression levels of intestinal tight junction protein gene and protein ($P < 0.05$, 0.01). 16S rDNA and serum non-targeted metabolomic results showed that Jingfang Mixture could significantly improve intestinal flora disorders in rats with thrombosis, and its metabolic pathways may be related to the metabolism of unsaturated fatty acids and linoleic acid. **Conclusion** Jingfang Mixture has a good therapeutic effect on thrombotic rats caused by carrageenan, as well as reducing pathological changes in rat tails, alleviating the imbalance of coagulation factors and inflammatory factors, improving intestinal barrier damage and intestinal flora disorders, and affecting related metabolic pathways such as unsaturated fatty acids.

Key words: Jingfang Mixture; thrombus; intestinal barrier; intestinal flora; metabolics; unsaturated fatty acid metabolism

血栓引起的肺栓塞、缺血性脑卒中、下肢静脉栓塞和急性心肌梗死导致的死亡人数占总死亡人数的 1/4^[1], 且近年来发病率逐年上涨, 因此, 寻找预防和治疗血栓相关疾病的手段和药物至关重要。西医认为血栓形成系心血管内皮损伤、血液凝固性增加、血流异常等因素导致凝血系统失衡所致, 中医认为血栓形成系寒邪入侵机体, 气血、经络阻塞, 气滞血瘀引发, 属于“血瘀”症范畴^[2-3]。目前临床常用化学药如阿司匹林、氯吡格雷、替罗非班等存在药物途径单一、胃肠道反应、药物选择性低、致出血等缺点^[3-4], 因此开发疗效可靠、高效安全、不良反应少的抗血栓药物是临床防治血栓性疾病研究的重点。

中药具有多靶点、多成分、多途径等特点^[5], 并具有安全性高、不良反应少、逆转耐多药、疗效可靠等优点^[6], 在临床发挥着不可替代的作用, 因此, 开发具有抗血栓作用的中药对心血管疾病等的研究意义重大。荆防合剂来源于“四时感冒之神剂”之称的荆防败毒散, 具有发汗解表、散风祛湿之效, 由荆芥、防风、羌活、独活、柴胡、前胡、川芎、枳壳、茯苓、桔梗、甘草共 11 味药组成, 对提高机体免疫力发挥着重要作用^[7-9], 课题组前期研究发现, 荆防颗粒对角叉菜胶引起的小鼠尾部血栓具有较好的治疗作用^[10], 但目前尚无荆防合剂抗血栓是否通过影响肠道菌群发挥作用的研究。因此, 本研

究拟通过 ip 角叉菜胶诱导大鼠血栓, 从肠道菌群角度并结合代谢组学探讨荆防合剂抗血栓的作用机制, 以期荆防合剂的进一步开发提供实验基础和科学依据。

1 材料

1.1 动物

SPF 级雄性 SD 大鼠 60 只, 6~8 周龄, 体重 180~220 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 动物生产合格证号 SCXK(京)2019-0008, 实验单位使用许可证号 SYXK(鲁)20230023。大鼠于相对湿度 40%~60%、温度 20~25 ℃、昼夜交替时间为 12 h/12 h 的环境中, 适应性饲养 3 d。本动物实验经鲁南制药集团股份有限公司实验动物福利伦理审查委员会批准(批准号 AN-IACUC-2023-058)。

1.2 药品与试剂

荆防合剂(国药准字 Z51021516, 批号 245200022)由鲁南厚普制药有限公司提供, 相当于生药 1 g/mL; 阿司匹林肠溶片(国药准字 H37023270, 批号 B22102723)购自辰欣药业股份有限公司; 角叉菜胶(批号 63YBM-FC)购自梯希爱(上海)化成工业发展有限公司; 大鼠血栓烷 B₂ (thromboxane B₂, TXB₂)、6-酮-前列环素 F1 α (6-keto-PGF1 α)、抗凝血酶 III (antithrombin III, ATIII)、纤维蛋白原降解产物 (fibrinogen degradation

products, FDP)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)、 γ 干扰素 (interferon- γ , IFN- γ)、白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、分泌型免疫球蛋白 A (secretory immunoglobulin A, SIgA)、内毒素 (endotoxin, LPS)、二胺氧化酶 (diamine oxidase, DAO)、D-乳酸 (D-lactic acid, D-LA) 试剂盒 (批号分别为 Nov 2023、Dec 2023、Dec 2023、Jan 2024、Jan 2024、Feb 2024、Feb 2024、Apr 2024、Apr 2024、Apr 2024、2024/04/19) 均购自上海酶联生物科技有限公司; 苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE)、AB-PAS 染色液、Masson 三色染色试剂液 (批号分别为 914N033、2230628002、20210830、20210904) 均购自北京索莱宝科技有限公司; RNAeasy™ 动物 RNA 抽提试剂盒 (离心柱式, 批号 080822221007)、BeyoRT™ Q cDNA 第一链合成试剂盒 (批号 020922220728)、BeyoFast™ SYBR Green qPCR MIX (批号 013024240604)、BCA 蛋白浓度测定试剂盒 (批号 111922230406)、SDS-PAGE 蛋白上样缓冲液 (批号 020823230605)、SDS-PAGE 凝胶快速配制试剂盒 (批号 040223230407)、BeyoColor™ 彩色预染蛋白 Marker (批号 061523230721)、蛋白酶磷酸酶抑制剂混合物 (批号 123022230711)、BeyoECL Plus 超敏化学发光试剂盒 (批号 102922230407)、HRP 标记的山羊抗小鼠二抗 (批号 031622220621) 均购自上海碧云天生物技术股份有限公司; 紧密连接蛋白 1 (zonula occludens proteins-1, ZO-1) 抗体、咬合蛋白 (Occludin) 抗体、甘油醛-3-磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH) 抗体、HRP 标记山羊抗兔二抗 (批号分别为 1034898-1、1002475-15、GR3424359-1、GR258796-5) 均购自英国 Abcam 公司。

1.3 仪器

DWX-2000A 型小动物低温环境箱 (上海谷宁仪器有限公司); TDZ5-WS 型多管架自动平衡离心机 (湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); CA-620 型全自动凝血分析仪 (日本希森美康株式会社); CryoMill 型全自动冷冻研磨仪 (德国 RETSCH 公司); Z326K 型高速冷冻离心机 (德国 Hermle 公司); Multiskan GO 型酶标仪、NanoDrop™ One/OneC 型微量紫外分光光度计、7500 Fast 型实时荧光定量 PCR 系统、LTQ-Oribitrap 高分辨质谱联用仪、Vanquish 超高效液相色谱仪 (美国 Thermo Fisher

Scientific 公司); DYY-6D 型电泳仪 (北京六一生物科技有限公司); Chemi Scope6200 型化学发光成像系统 (上海勤翔科学仪器有限公司); IM-5FLD 型倒置荧光显微镜 (意大利 Optika 公司)。

2 方法

2.1 动物分组、造模及给药

将大鼠随机分为对照组、模型组、阿司匹林 (9 mg/kg, 相当于人临床等效剂量) 组和荆防合剂低、中、高剂量 (3.9、7.8、15.6 g/kg, 分别相当于人临床等效剂量的 0.5、1、2 倍) 组, 每组 8 只。各给药组 ig 相应药物, 1 次/d, 连续给药 7 d, 对照组及模型组 ig 等体积蒸馏水。除对照组外, 其他各组大鼠于第 7 天给药 2 h 后 ip 角叉菜胶 (55 mg/kg), 并将大鼠放入恒温 (4 °C) 恒湿培养箱中 4 h, 低温诱导血栓形成, 并以此时间点作为造模后 0 h。造模后持续给药 2 d, 并于造模后 48 h 解剖。

2.2 动物取材

大鼠取材解剖前 12 h 禁食不禁水, 采用舒泰 50 联合盐酸赛拉嗪注射液麻醉后腹主动脉取血, 分离血清及血浆, 用于不同的指标检测。收集大鼠肠道内容物, 并用无菌镊子夹取并置于灭菌冻存管中, 迅速放入液氮保存以防止菌群变化。取大鼠尾巴及结肠部分, 分为 3 段, 一段放于 10% 中性缓冲福尔马林溶液中固定, 用于病理切片的制作; 另一段放于 -80 °C 保存, 用于检测肠道 SIgA 水平、紧密连接蛋白的基因及蛋白表达; 最后一段放于 -80 °C 留存。

2.3 大鼠相对黑尾长度测定

分别于造模后 0、24、48 h 测量大鼠黑尾长度并计算相对黑尾长度, 并于解剖时对大鼠黑尾进行拍照记录。

相对黑尾长度 = 黑尾长度/尾巴总长度

2.4 大鼠尾巴 HE 染色

大鼠尾巴标本以 10% 中性缓冲福尔马林溶液固定 48 h 后, 用 30% 甲酸进行脱钙处理 3 d, 以针刺入尾骨无阻力感为止, 脱钙完成后, 流水冲洗过夜, 常规脱水、透明、浸蜡、包埋、切片, 进行 HE 染色, 光学显微镜下观察血管及周围组织的病理损伤情况、炎性细胞浸润、血栓及出血等情况。

2.5 大鼠尾巴 Masson 染色

切片脱蜡至水后, 分别进行苏木素染色、酸性乙醇分化、蓝化液返蓝、丽春红品红染色、磷钼酸染色、苯胺蓝染色、乙醇脱水、二甲苯透明后, 进行中性树胶封固, 显微镜下观察染色情况。

2.6 凝血四项检测

大鼠麻醉后,腹主静脉取血 2.7 mL 放入含枸橼酸钠的真空采血管中,3 500 r/min 离心 15 min,取上层血浆,全自动凝血仪检测凝血四项,即凝血活酶时间 (activated partial thromboplastin time, APTT)、凝血酶时间 (thrombin time, TT)、凝血酶原时间 (prothrombin time, PT)、纤维蛋白原 (fibrinogen, FIB)。

2.7 ELISA 法测定血浆中 TXB₂、6-keto-PGF1 α 、ATIII、FDP 的含量

取大鼠血浆,按照 ELISA 试剂盒说明书,对大鼠血浆中 TXB₂、6-keto-PGF1 α 、ATIII、FDP 的含量进行测定。

2.8 ELISA 法测定血清中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 及结肠组织中 SIgA 的含量

大鼠麻醉后进行腹主静脉取血,并转移至含有分离胶的生化管中,静置 30 min 后,3 000 r/min 离心 15 min,分离上层大鼠血清,按照 ELISA 试剂盒说明书测定大鼠血浆中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 的含量。取大鼠结肠组织并加入 PBS 匀浆,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min,取上清按照 ELISA 试剂盒说明书测定 SIgA 含量。

2.9 结肠 AB-PAS 染色

切片脱蜡至水后,进行阿利新蓝染色、氧化剂氧化、Schiff 染色、苏木素染色、酸性分化液分化、Scott 蓝化液返蓝,常规乙醇脱水,二甲苯透明,中性树脂胶封固后,显微镜下观察肠上皮杯状细胞数量。

2.10 肠道黏膜屏障指标 LPS、DAO、D-LA 含量的测定

取大鼠血清,按照试剂盒说明书测定大鼠血浆中 LPS、DAO、D-LA 的含量。

2.11 qRT-PCR 检测肠道 ZO-1 和 Occludin 基因表达水平

取大鼠结肠组织,加入裂解液进行匀浆,采用 RNA 提取试剂盒提取 RNA,超微量分光光度计测定浓度后,按照逆转录试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,并进行 qRT-PCR 分析。反应条件设置为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 5 s, 60 $^{\circ}$ C 退火 34 s, 40 个循环。用 2^{- $\Delta\Delta$ Ct} 法计算 mRNA 的相对表达量。引物序列见表 1。

2.12 Western blotting 检测肠道 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达水平

取大鼠结肠组织按照 1 : 10 比例加入 RIPA 裂

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences

基因	序列 (5'-3')
ZO-1	F: GCTCACCAGGGTCAAAATGT R: GGCTTAAAGCTGGCAGTGTCT
Occludin	F: ATCTAGAGCCTGGAGCAACG R: GTCAAGGCTCCCAAGACAAG
GAPDH	F: GTCGGTGTGAACGGATTGTG R: CTTGCCGTGGGTAGAGTCAT

解液,于冰上进行匀浆操作,4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 离心 15 min,进行 BCA 蛋白浓度测定后,加入 5 $\times$ 还原型蛋白上样缓冲液,金属浴中高温变性 10 min,蛋白样品经十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳,转至 PVDF 膜,脱脂奶粉封闭 2 h, PBST 清洗。分别加入 ZO-1、Occludin、GAPDH (1 : 1 000) 抗体,4 $^{\circ}$ C 孵育过夜。次日回收一抗,并加入相应二抗 (1 : 5 000) 孵育 2 h,洗膜,并滴加 ECL 化学发光液显色,用 Image-J 软件分析条带相对表达量。

2.13 16S rDNA 测序技术分析肠道菌群结构变化

结合动物实验结果,荆防合剂中剂量组在药效学指标中起到的保护效果最加,因此后续采用中剂量组进行后续机制研究。在对照组、模型组及荆防合剂中剂量组随机选取 6 只大鼠粪便样本,采用 16S rDNA 高通量测序技术进行肠道微生物的检测,具体操作由上海美吉生物科技有限公司完成。主要步骤为粪便 DNA 抽提、PCR 扩增并建立测序文库、高通量测序数据分析。采用 mothur 软件进行 α 多样性分析、主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) 和非度量多维尺度分析 (non-metric multidimensional scaling, NMDS) 评价群落的 β 多样性,采用 LEfSe 分析判断不同组间水平丰度差异显著的菌群。

2.14 大鼠血清非靶向代谢组学分析

取大鼠血清,加入甲醇-乙腈 (2 : 1) 进行蛋白沉淀,涡旋、超声、离心后,取上清液进行 LC-MS 分析。采用 Waters Acquity UPLC HSS T3 色谱柱 (100 mm $\times$ 2.1 mm, 1.8 μ m) 进行色谱分离。流动相 A 为水相 (含 5 mmol/L 乙酸铵和 5 mmol/L 乙酸), B 为乙腈。梯度洗脱: 0~0.7 min, 99% A, 体积流量 0.35 mL/min; 0.7~9.5 min, 99%~1% A, 体积流量 0.35 mL/min; 9.5~11.8 min, 1% A, 体积流量 0.35~0.5 mL/min; 11.8~12.0 min, 1%~99% A, 体积流量 0.5 mL/min; 12.0~14.6 min, 99% A, 体积流量 0.5 mL/min; 14.6~14.8 min, 99% A, 体

积流量 0.35 mL/min; 14.8~15.0 min, 99% A, 体积流量 0.35 mL/min。进样体积 2 μ L, 进样器温度 4 $^{\circ}$ C。采用 LTQ Orbitrap 型串联质谱仪在正、负离子模式下进行采集, 采集范围 m/z 50~1 800, 采集时间 0~30 min, 离子源温度 350 $^{\circ}$ C, 电离源电压 4 kV, 毛细管电压 35 kV, 鞘气体积流量为 12 L/min, 辅助气体积流量为 6 L/min。

通过偏最小二乘判别分析 (partial least squares-discriminant analysis, PLS-DA) 和正交偏最小二乘法-判别分析 (orthogonal partial least squares-discriminant analysis, OPLS-DA) 筛选组间分类贡献较大的变量, 利用投影变量重要性 (variable importance for the projection, VIP) >1 及 $P < 0.05$ 筛选差异代谢物。并通过京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库进行代谢通路分析。

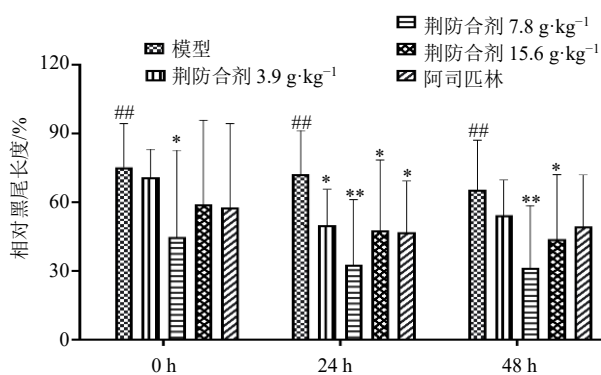
2.15 统计学分析

使用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行数据分析, 所有呈正态分布的计量资料均以 $\bar{x} \pm s$ 表示, 两两比较采用 LSD- t 检验, 多组间比较采用单因素方差 (One-way ANOVA) 分析。

3 结果

3.1 各组大鼠相对黑尾长度变化

如图 1 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠在造模后 0、24、48 h 相对黑尾长度显著增加 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 荆防合剂中剂量组大鼠在造模后 0、24、48 h 相对黑尾长度均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$),



与对照组比较: # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$; 与模型组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$, 下同。

$P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs control group; * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs model group, same as below figures.

图 1 各组大鼠相对黑尾长度 ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

Fig. 1 Relative length of black tail of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 8$)

荆防合剂高剂量组在 24、48 h 大鼠相对黑尾长度显著降低 ($P < 0.05$), 荆防合剂低剂量组在 24 h 大鼠相对黑尾长度显著降低 ($P < 0.05$), 阿司匹林组在 24 h 大鼠相对黑尾长度显著降低 ($P < 0.05$)。

3.2 各组大鼠尾巴 HE 染色结果

如图 2 所示, 对照组大鼠尾部静脉周围结缔组织干净, 血管壁光滑, 无炎性细胞浸润现象, 组织形态完整; 模型组尾部血管几乎完全被血栓堵塞, 炎性细胞浸润现象明显, 血管周围组织水肿现象严重; 各给药组血管堵塞状况较轻, 可见少量炎性细胞浸润现象, 组织形态较完整。表明荆防合剂干预后大鼠尾巴炎性状态得以缓解。

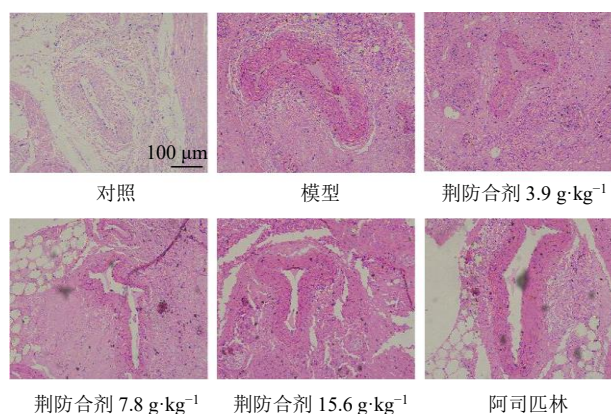


图 2 各组大鼠尾巴 HE 染色 (HE, $\times 200$)

Fig. 2 HE staining of rats in each group (HE, $\times 200$)

3.3 各组大鼠尾巴 Masson 染色结果

如图 3 所示, 与对照组比较, 模型组胶原含量显著升高 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 荆防合剂中剂量组和阿司匹林组大鼠尾巴胶原含量显著降低 ($P < 0.01$), 表明荆防合剂可显著抑制角叉菜胶导致的大鼠血栓形成。

3.4 各组大鼠凝血四项水平

如图 4 所示, 与对照组比较, 模型组大鼠 APTT、TT 和 FIB 含量均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), PT 含量有升高趋势; 与模型组比较, 荆防合剂中剂量组和阿司匹林组大鼠 PT、TT 和 FIB 水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$), 各给药组大鼠 APTT 水平显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)。

3.5 各组大鼠凝血因子水平

如图 5 所示, 与对照组比较, 模型组 TXB₂ 和 FDP 水平显著升高 ($P < 0.05, 0.01$), 6-keto-PGF1 α 和 ATIII 水平显著降低 ($P < 0.05$); 与模型组比较,

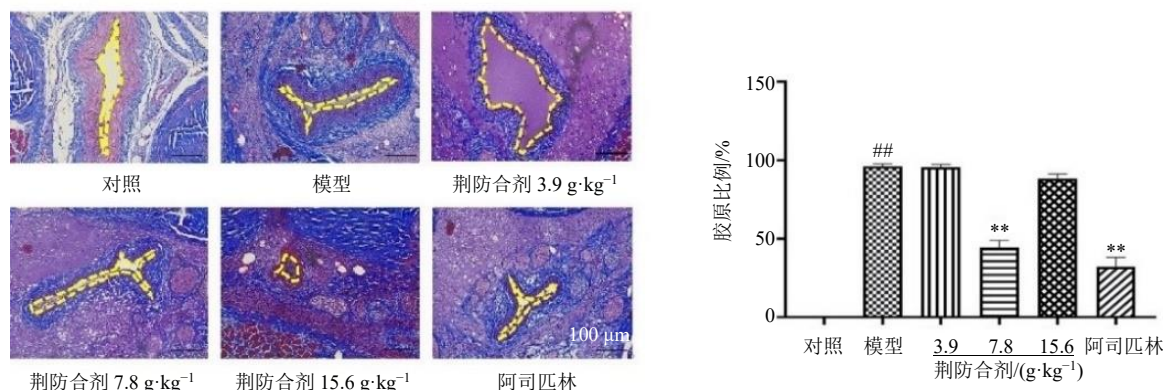


图 3 各组大鼠尾巴 Masson 染色 ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 3 Masson staining of rats in each group ($\times 200$; $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

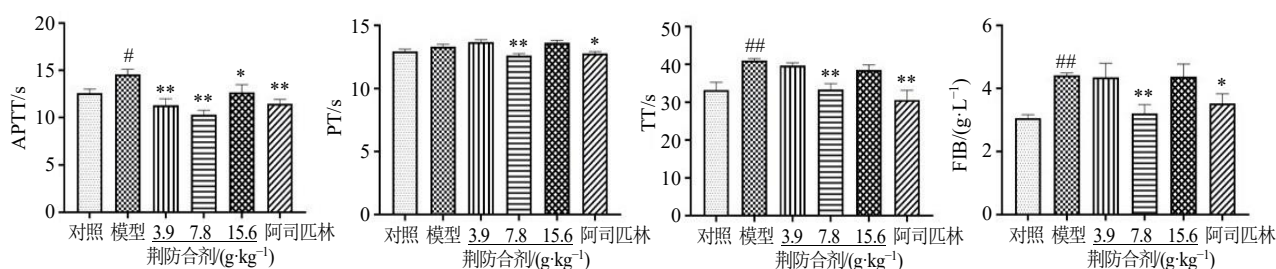


图 4 各组大鼠凝血四项水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 4 Levels of four coagulation factors of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

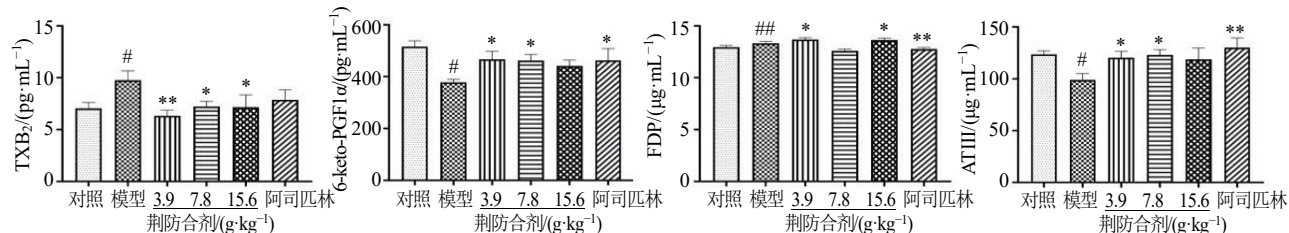


图 5 各组大鼠凝血因子水平 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Fig. 5 Levels of coagulation factors of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

荆防合剂低剂量组 TXB₂ 水平显著降低 ($P < 0.01$), 6-keto-PGF1α、FDP 和 ATIII 水平显著升高 ($P < 0.05$); 荆防合剂中剂量组 TXB₂ 水平显著降低 ($P < 0.05$), 6-keto-PGF1α 和 ATIII 水平显著升高 ($P < 0.05$); 荆防合剂高剂量组 TXB₂ 水平显著降低 ($P < 0.05$), FDP 水平显著升高 ($P < 0.05$); 阿司匹林组 6-keto-PGF1α 和 ATIII 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01), FDP 水平显著降低 ($P < 0.01$)。表明荆防合剂可改善血栓大鼠体内凝血因子失调。

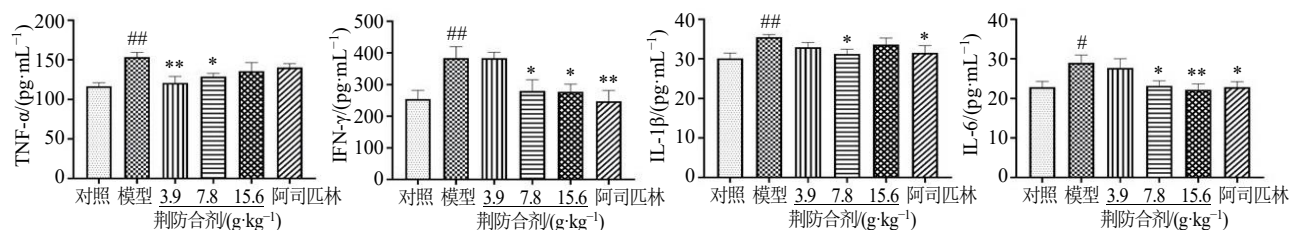
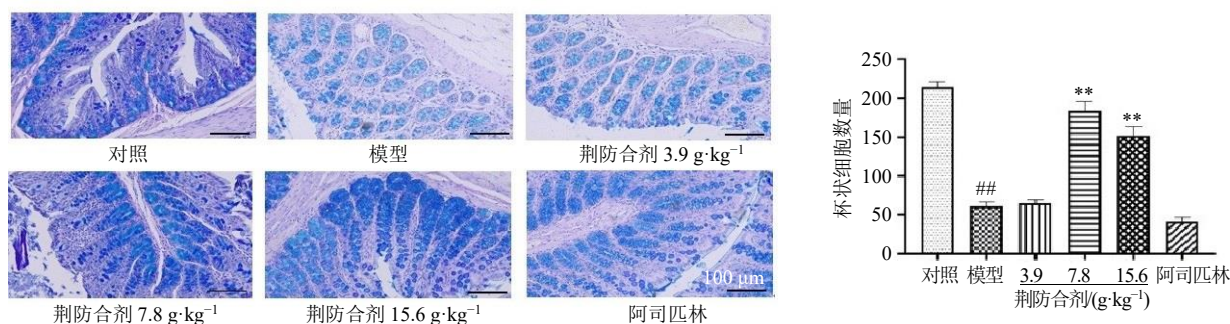
3.6 各组大鼠炎症因子水平

如图 6 所示, 与对照组比较, 模型组 TNF-α、IFN-γ、IL-1β、IL-6 水平显著升高 ($P < 0.05$ 、 0.01); 与模型组比较, 荆防合剂低剂量组 TNF-α 水平显著

降低 ($P < 0.01$), 荆防合剂中剂量组 TNF-α、IFN-γ、IL-1β、IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$), 荆防合剂高剂量组 IFN-γ 和 IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 阿司匹林组 IFN-γ、IL-1β、IL-6 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01), 表明荆防合剂可改善角叉菜胶导致的大鼠体内炎症因子水平失调。

3.7 各组大鼠结肠 AB-PAS 染色

肠绒毛表面存在杯状细胞, 分泌黏液蛋白以阻挡有害菌的侵袭。如图 7 所示, 与对照组比较, 模型组结肠组织内杯状细胞数量显著减少 ($P < 0.01$); 与模型组比较, 荆防合剂中、高剂量组大鼠结肠杯状细胞显著增多 ($P < 0.01$), 表明荆防合剂可以促进肠道黏蛋白的产生, 改善大鼠肠道屏障功能。

图 6 各组大鼠炎症因子水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 6 Levels of inflammatory factors of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)图 7 各组大鼠肠道 AB-PAS 染色 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)Fig. 7 AB-PAS staining of gut of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

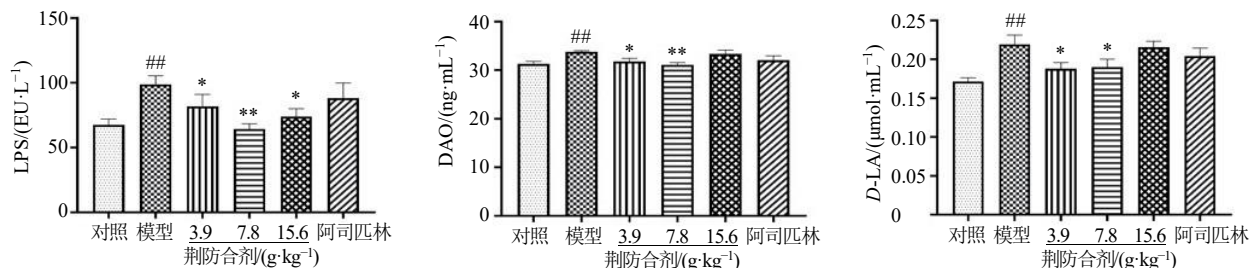
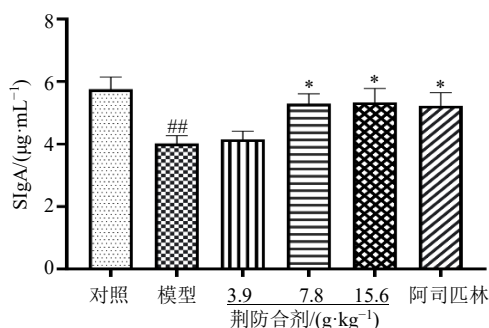
3.8 各组大鼠肠道黏膜屏障因子水平

如图 8 所示,与对照组比较,模型组 LPS、DAO、D-LA 水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,荆防合剂低、中剂量组 DAO、D-LA 水平均显著降低 ($P < 0.05, 0.01$),荆防合剂高剂量组 LPS 水平显著降低 ($P < 0.05$),阿司匹林对 LPS、DAO、D-LA

水平的下调作用无显著性差异。表明荆防合剂对交叉莱胶引起的肠道屏障损伤因子具有回调作用,保护肠道黏膜损伤。

3.9 各组大鼠肠道 SIgA 水平

免疫球蛋白 SIgA 是肠道黏膜免疫的主要抗体,可清除病原体以维护肠道环境。如图 9 所示,与对

图 8 各组大鼠肠道黏膜屏障因子水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 8 Levels of intestinal mucosal barrier factors of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)图 9 各组大鼠肠道 SIgA 水平 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)Fig. 9 SIgA level of gut of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

照组比较,模型组 SIgA 水平显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,荆防合剂中、高剂量和组阿司匹林组肠道 SIgA 水平均显著升高 ($P < 0.05$),表明荆防对交叉莱胶引起的大鼠肠道黏膜免疫下降具有较好的回调作用。

3.10 各组大鼠肠道 ZO-1 和 Occludin 基因表达变化

如图 10 所示,与对照组比较,模型组大鼠肠道 ZO-1 和 Occludin 基因表达水平显著升高 ($P < 0.01$);与模型组比较,荆防合剂中剂量组 ZO-1 基因表达水平显著降低 ($P < 0.01$),荆防合剂低剂量

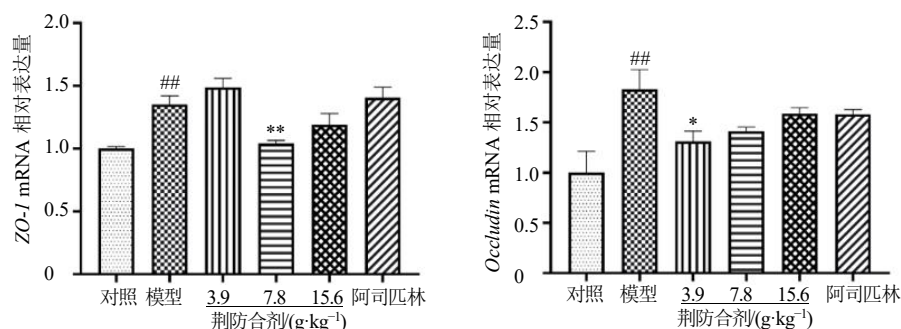


图 10 各组大鼠肠道 ZO-1 和 Occludin 基因表达 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 10 ZO-1 and Occludin gene expressions in gut of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组 Occludin 基因表达水平显著降低 ($P < 0.05$)。

3.11 各组大鼠肠道 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达变化

如图 11 所示,与对照组比较,模型组 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达水平显著降低 ($P < 0.01$);与模型组比较,各给药组 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达水平均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$),表明荆防合剂可改善血栓大鼠肠道紧密连接蛋白水平,维持肠道机械屏障功能。

3.12 各组大鼠肠道菌群变化

3.12.1 α 和 β 多样性分析 如图 12 所示,与对照组比较,模型组 SOBs、CHAO、ACE、Shannon 指数均显著升高 ($P < 0.05, 0.01$),Simpson 指数显著

降低 ($P < 0.05$);与模型组比较,荆防合剂显著下调 SOBs、ACE、Shannon 指数 ($P < 0.05, 0.01$),上调 Simpson 指数 ($P < 0.05$),表明荆防合剂对大鼠肠道菌群物种的丰富度、均匀度和多样性有一定影响。采用 PCoA 和 NMDS 分析评估各组微生物群落之间的差异, β 多样性结果见图 13,对照组与模型组差异菌群明显分离,表明 2 组之间菌群差异结构明显,同时,荆防合剂组与模型组样本之间具有显著区分且趋向对照组,表明荆防合剂组大鼠肠道菌群结构向对照组回调。

3.12.2 各组大鼠不同分类学水平的物种组成分析 门水平差异分析见图 14-A 和表 2,与对照组比较,

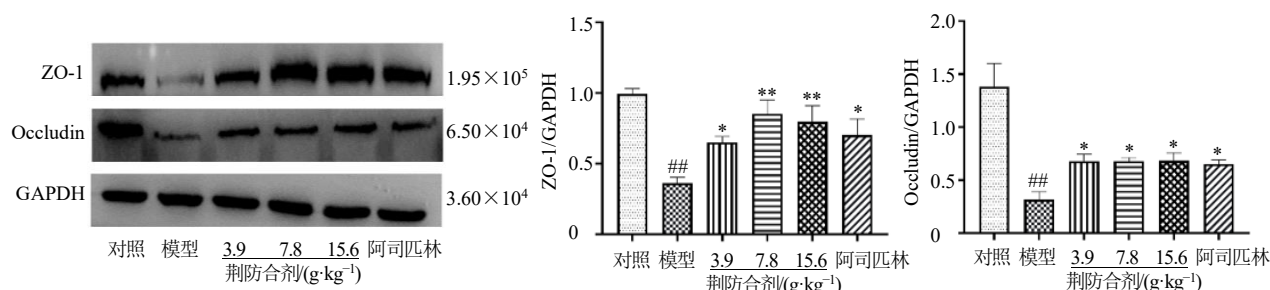


图 11 各组大鼠肠道 ZO-1 和 Occludin 蛋白表达 ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

Fig. 11 ZO-1 and Occludin protein expressions in gut of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 3$)

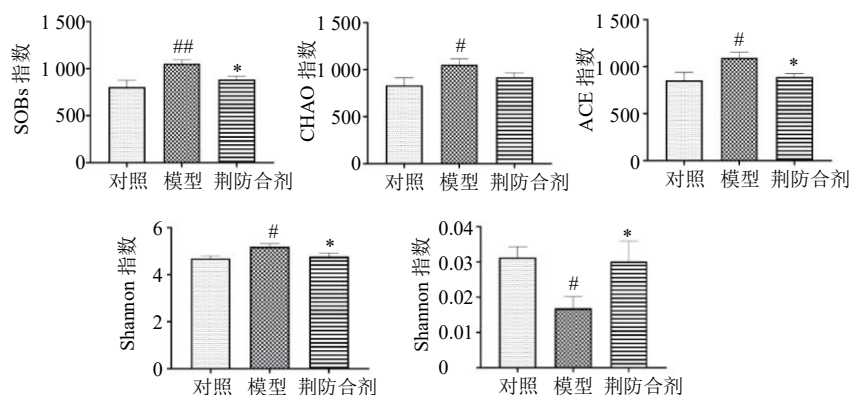
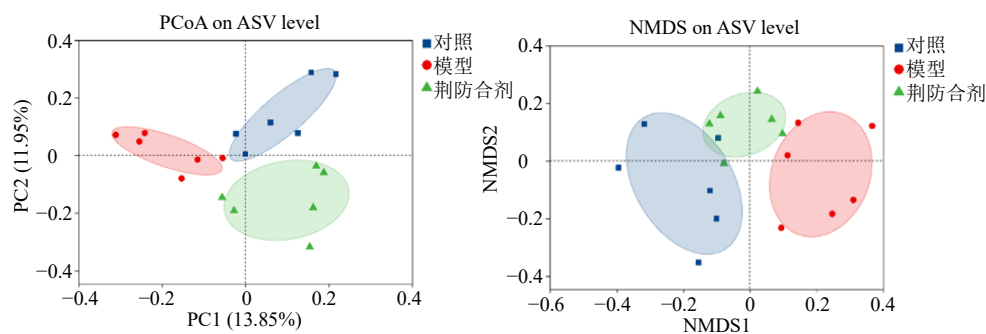
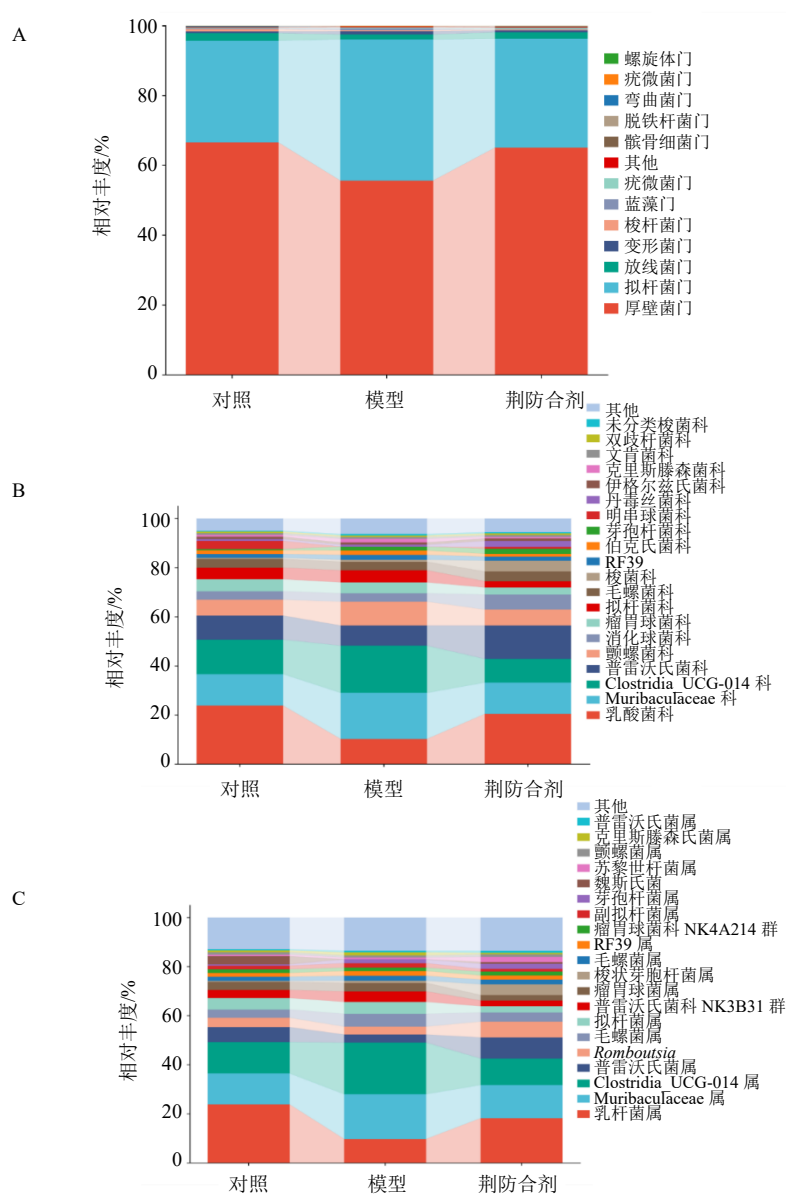


图 12 各组大鼠肠道 α 多样性指数 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Fig. 12 α -Diversity index in gut of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

图 13 各组大鼠肠道 β 多样性指数 ($n = 6$)Fig. 13 β -Diversity in gut of rats in each group ($n = 6$)

A-各组大鼠门水平菌群丰度; B-各组大鼠科水平菌群丰度; C-各组大鼠属水平菌群丰度。

A-abundance of flora at phylum level of rats in each group; B-abundance of flora at family level of rats in each group; C-abundance of flora at genus level of rats in each group.

图 14 不同分类学水平的物种组成分析 ($n = 6$)Fig. 14 Analysis of species composition at different taxonomic levels ($n = 6$)

表 2 各组大鼠肠道菌群门水平相对丰度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 2 Comparison of relative abundance of phylum level intestinal flora in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	相对丰度/%					
		厚壁菌门	拟杆菌门	放线菌门	变形菌门	脱硫杆菌门	蓝藻门
对照	—	66.55±6.44	29.17±5.85	2.16±1.29	0.52±0.23	0.66±0.73	0.24±0.22
模型	—	55.65±5.05 [#]	40.44±5.57 ^{##}	1.44±1.06	0.91±1.08	0.26±0.12	0.56±0.28 [#]
荆防合剂	7.8	65.09±8.10 [*]	31.22±8.09 [*]	1.80±1.18	0.56±0.57	0.26±0.23	0.13±0.15 ^{**}

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

[#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{*} $P < 0.05$ ^{**} $P < 0.01$ vs model group, same as below tables.

模型组大鼠肠道厚壁菌门相对丰度显著降低 ($P < 0.05$), 拟杆菌门、蓝藻门相对丰度显著升高 ($P < 0.05, 0.01$); 荆防合剂干预后可显著回调厚壁菌门、拟杆菌门和蓝藻门相对丰度 ($P < 0.05, 0.01$)。科水平差异分析见图 14-B 和表 3, 与对照组比较, 模型组大鼠肠道乳杆菌科相对丰度显著降低 ($P < 0.01$), Muribaculaceae 科、颤螺旋菌科、克里斯滕森菌科相对丰度显著升高 ($P < 0.05$); 荆防合剂干预后乳杆菌科、Muribaculaceae 科、Clostridia_UCG-014 科、

颤螺旋菌科、克里斯滕森菌科相对丰度均显著回调 ($P < 0.05, 0.01$)。属水平差异分析见图 14-C 和表 4, 与对照组比较, 模型组乳杆菌属相对丰度显著降低 ($P < 0.01$), Muribaculaceae 属、Clostridia_UCG-014 属相对丰度显著升高 ($P < 0.05$); 荆防合剂干预后乳杆菌属、Muribaculaceae 属、Clostridia_UCG-014 属、Romboutsia 相对丰度均显著回调 ($P < 0.05, 0.01$)。以上结果表明荆防合剂可在一定程度上调节血栓大鼠肠道菌群紊乱, 使其趋于正常生理状态。

表 3 各组大鼠肠道菌群科水平相对丰度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 3 Comparison of relative abundance of family level intestinal flora in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	相对丰度/%					
		乳杆菌科	Muribaculaceae 科	Clostridia_UCG-014 科	普雷沃氏菌科	颤螺旋菌科	克里斯滕森菌科
对照	—	23.90±7.40	12.83±4.48	14.05±5.28	9.76±8.06	6.44±1.69	0.80±0.30
模型	—	10.30±4.20 ^{##}	18.76±3.83 [#]	19.21±7.09	8.20±3.05	9.73±3.15 [#]	1.60±0.70 [#]
荆防合剂	7.8	20.41±9.12 [*]	12.80±2.19 [*]	9.62±6.90 [*]	13.59±8.01	6.49±2.17 [*]	0.60±0.51 ^{**}

表 4 各组大鼠肠道菌群属水平相对丰度比较 ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

Table 4 Comparison of relative abundance of genus level intestinal flora in rats of each group ($\bar{x} \pm s, n = 6$)

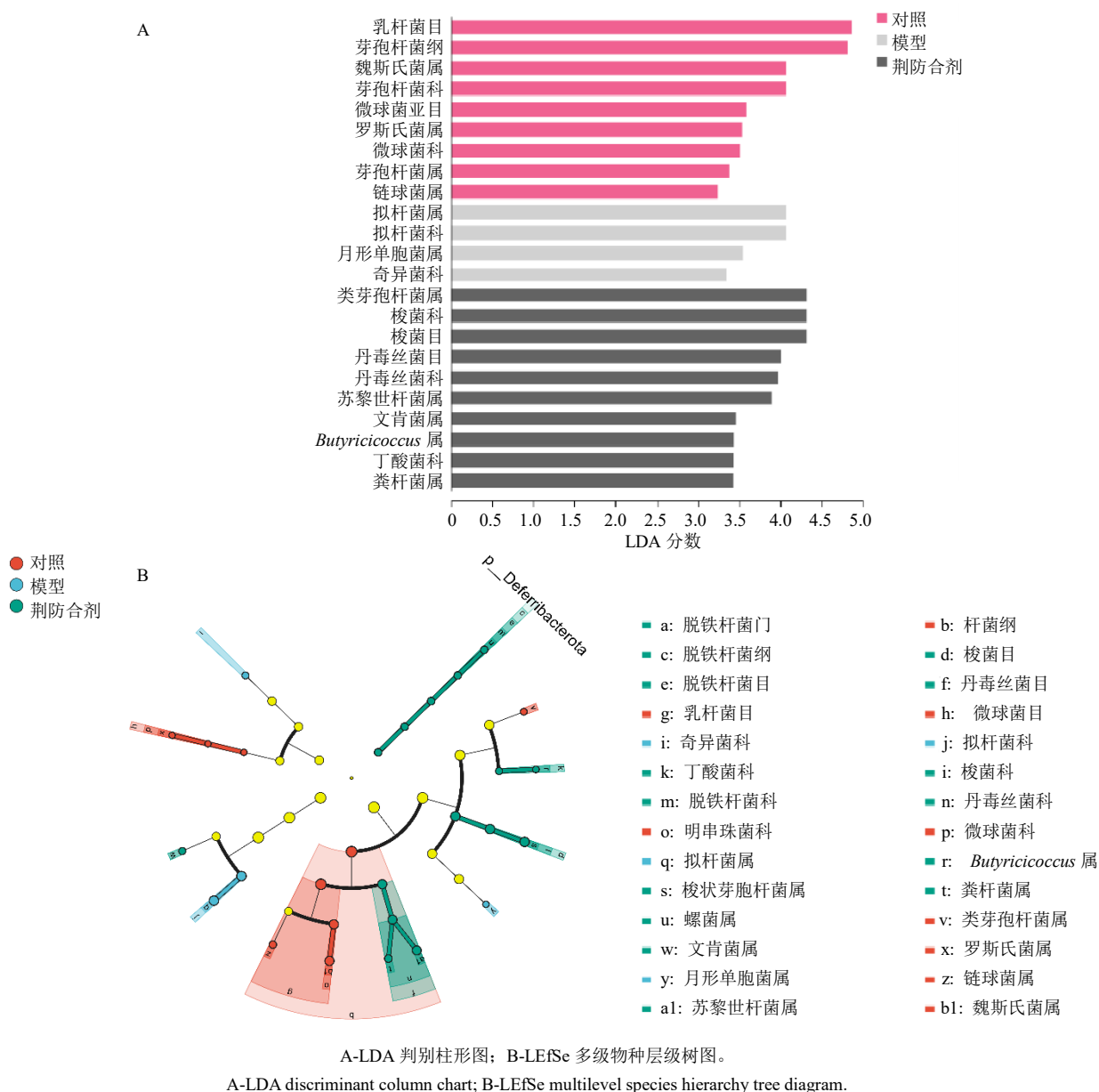
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	相对丰度/%					
		乳杆菌属	Muribaculaceae 属	Clostridia_UCG-014 属	Prevotella	Romboutsia	UCG-005
对照	—	23.88±7.71	12.65±3.64	12.72±4.59	6.11±5.15	3.82±2.46	3.37±1.22
模型	—	9.78±3.56 ^{##}	18.26±3.08 [#]	21.04±5.49 [#]	3.26±2.37	3.22±3.09	5.19±2.31
荆防合剂	7.8	18.28±6.61 [*]	13.51±3.89 [*]	10.79±5.01 ^{**}	8.59±5.60	6.46±1.25 [*]	3.71±2.32

3.12.3 各组大鼠肠道菌群 LEfSe 分析 如图 15-A 所示, 对照组的特征菌群乳杆菌属、杆菌属等在丰度上具有显著性差异, 模型组显著差异菌群为拟杆菌科等, 荆防合剂组显著差异菌群为梭菌属等。LEfSe 多级物种层级树图以发育树状图形式进一步将物种在不同分类水平的差异进行展示, 由内而外的圆圈代表从门至属的分类级别, 见图 15-B。

3.13 血清代谢组学分析

3.13.1 PLS-DA 和 OPLS-DA 结果 在正、负离子模式下, 采用 PLS-DA 和 OPLS-DA 对各组大鼠血清中的内源性代谢物进行分析, 并通过 200 次置换检验对模型进行验证。如图 16-A、17-A 所示, PLS-

DA 结果表明在正、负离子模式下, 对照组、模型组和荆防合剂组大鼠血清代谢产物可以显著分离。为进一步研究血栓大鼠在给予荆防后内源性代谢物的变化, 进行 OPLS-DA, 如图 16-B~C、17-B~C 所示, 在正离子模式下, 对照组与模型组参数为 $R^2 = 0.949$ 、 $Q^2 = -0.536$, 模型组与荆防合剂组参数为 $R^2 = 0.786$ 、 $Q^2 = -0.629$; 在负离子模式下, 对照组与模型组参数为 $R^2 = 0.999$ 、 $Q^2 = -0.0258$, 模型组与荆防合剂组参数为 $R^2 = 0.933$ 、 $Q^2 = -0.148$; 左侧低于最右侧, 且 Q^2 截距小于 0, 表明模型验证有效, 不存在过度拟合现象, 具备较好的预测能力和可靠性。

图 15 各组大鼠肠道菌群 LEfSe 分析结果 ($n = 6$)Fig. 15 LEfSe analysis results of intestinal flora of rats in each group ($n = 6$)

3.13.2 差异代谢物的筛选与鉴定 根据 $FC > 1.5$ 或 < 0.67 结合 $VIP > 1$ 且 $P < 0.05$ 筛选血栓大鼠潜在生物标志物, 共筛选得到 71 个差异代谢物, 与对照组比较, 模型组烟酰胺、16-羟基十六酸等 61 代谢物下调, 丙酮酸、甲硫氨酸等 10 个代谢物上调; 荆防合剂干预后以上差异代谢物水平发生回调。

3.13.3 代谢通路分析 如图 18-A 所示, 荆防合剂主要通过影响不饱和脂肪酸合成、亚油酸代谢、脂肪酸合成、花生四烯酸代谢、半胱氨酸与甲硫氨酸代谢发挥治疗作用。

3.13.4 大鼠肠道菌群和血清代谢的联合分析 如

图 18-B 所示, 为了研究大鼠肠道菌群与代谢物之间的依存关系, 筛选差异菌属和不饱和脂肪酸合成相关的差异性代谢物, 采用 Spearman 相关系数绘制关联热图, 结果显示, 乳杆菌属与棕榈酸、9(Z)-十八烯-12-炔酸、亚油酸、花生四烯酸、 γ -亚油酸、(6Z,9Z,12Z)-十八碳三烯酸、二十二碳六烯酸、二十碳二烯酸呈显著正相关; *Muribaculaceae* 属与棕榈酸、花生四烯酸、9(Z)-十八烯-12-炔酸、亚油酸、 γ -亚油酸呈显著负相关, *Clostridia*_UCG-014 属与二十二碳六烯酸、棕榈酸、 γ -亚油酸、亚油酸呈显著负相关。

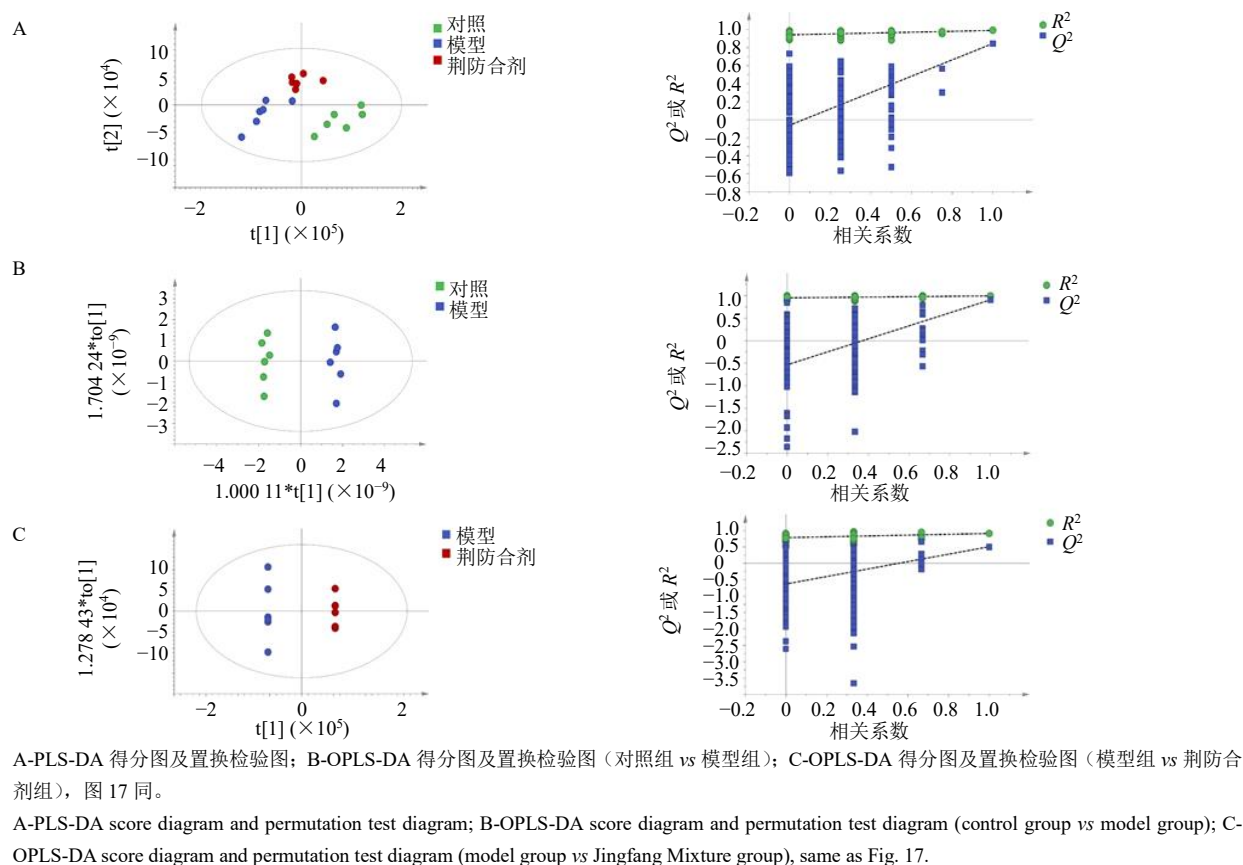


图 16 正离子模式下 PLS、OPLS-DA 及其置换检验图 ($n = 6$)

Fig. 16 PLS, OPLS-DA and its permutation test diagrams in positive ion mode ($n = 6$)

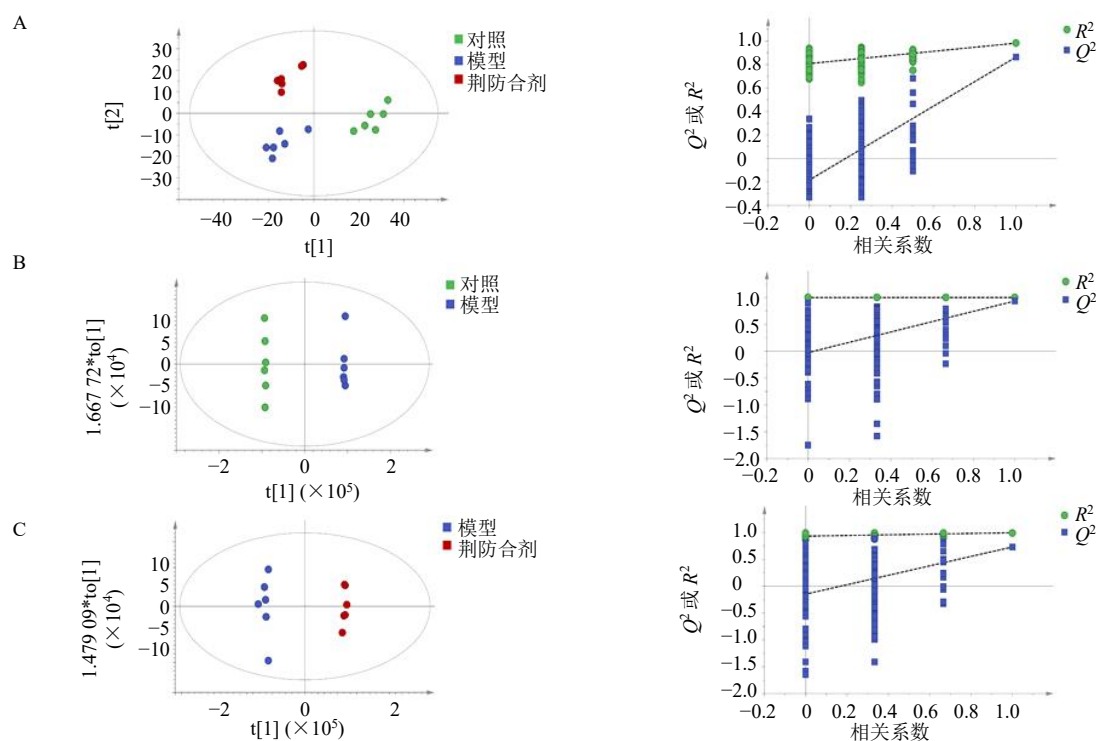
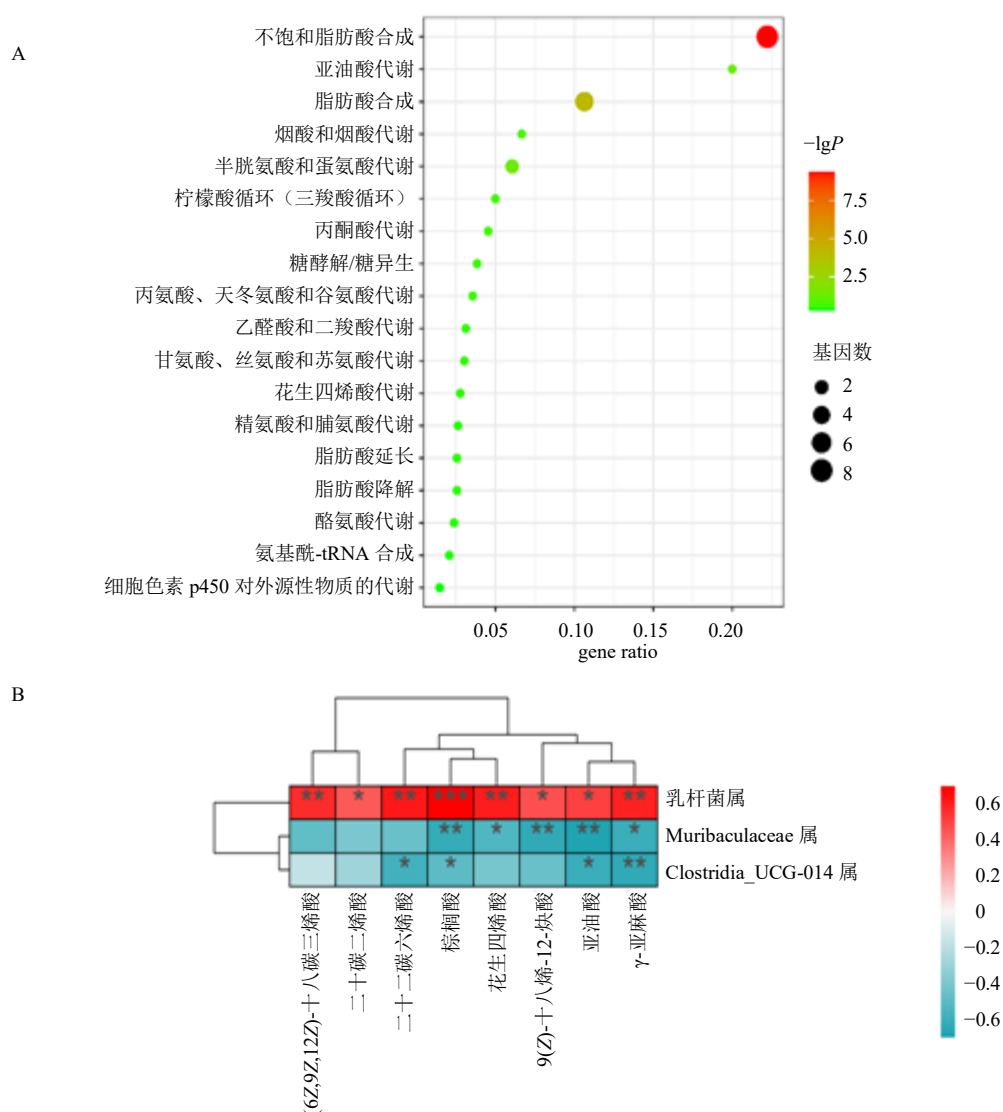


图 17 负离子模式下 PLS、OPLS-DA 及其置换检验图 ($n = 6$)

Fig. 17 PLS, OPLS-DA and its permutation test diagrams in negative ion mode ($n = 6$)



A-KEGG 代謝通路分析；B-大鼠腸道菌群和差異代謝物的相關性分析。

A-KEGG metabolic pathway analysis; B-correlation analysis of intestinal flora and differential metabolites in rats.

圖 18 各組大鼠代謝通路及相關性分析結果 ($n = 6$)Fig. 18 Results of metabolic pathway and correlation analysis of rats in each group ($n = 6$)

4 讨论

本研究聯合 16S rDNA 和血清非靶向代謝組學技術探討荊防合劑抗血栓大鼠的作用機制，結果表明荊防合劑可能通過調節腸道菌群紊亂及不飽和脂肪酸代謝通路，達到保護抗凝血系統失調，平衡凝血因子產生、降低炎症因子水平、改善腸道功能損傷等效果。

現代臨床及基礎研究表明，中藥作用靶點眾多，可以通過抑制血小板活化及炎症反應、改善凝血與抗凝系統及纖溶系統、抗氧化应激等方式發揮作用，在血栓性疾病的防治中具有獨特優勢^[11-12]。近年來，腸道菌群及其代謝物在血栓性疾病的研

究中引起了廣泛關注。菌群紊亂失調會導致腸道屏障損傷，增加腸黏膜通透性，不僅容易引起其他致病菌或其產物進入血液循環從而侵襲機體，刺激宿主免疫系統失調，也可誘發宿主代謝紊亂，促進炎症反應發生，誘發或加重疾病發生^[13-15]。本研究主要從腸道菌群變化和內源性代謝物水平探討荊防合劑對血栓大鼠的保護作用及相關機制。課題組前期已進行過荊防合劑劑量的篩選，綜合考察、評估實驗結果，最終選擇臨床劑量的 0.5、1、2 倍進行研究，而綜合本研究中的各項指標，荊防合劑低、高的治療作用弱於中劑量，推測荊防合劑低劑量組可能因為劑量太低無法達到較好的治療效果，而高劑

量可能由于剂量-反应关系的非线性相关性、饱和效应、补偿机制、适应性耐受、药物毒性等原因而效果不佳,但其具体原因仍需要深入探索。

本研究采用角叉菜胶加恒温恒湿箱低温诱导大鼠血栓形成,角叉菜胶可引起机体急性炎症反应,损伤内皮细胞并导致血栓形成,加之寒湿环境导致机体血管收缩,血流瘀滞,使得血栓形成。本研究结果显示,荆防合剂可显著降低大鼠相对黑尾长度,降低炎性细胞浸润及水肿现象,调节血管壁损伤状态,降低血栓大鼠血管内胶原含量。凝血四项是临床上常用于凝血功能检测的指标,其中 APTT、PT 分别反映内源性和/或共同途径、外源性凝血系统状况,TT 反映纤维蛋白原转化为纤维蛋白的程度,FIB 反映纤维蛋白原含量^[16],结果表明,荆防合剂可显著降低 APTT、PT、TT 和 FIB 水平,表明荆防合剂可通过影响相关凝血因子的激活来发挥抗凝作用。TXA₂和前列腺素 I₂(prostacyclin I₂, PGI₂)之间的动态平衡可以维持机体正常止血功能,TXA₂由血栓素合成酶催化生成,具有聚集血小板和缩血管功能,从而达到止血的作用;PGI₂由血管壁内皮细胞产生,具有抑制血小板促凝活性和聚集的功能。由于 TXA₂和 PGI₂不稳定,其代谢产物 TXB₂和 6-keto-PGF1 α 水平常作为血小板激活的标志^[17];FDP 反映机体凝血纤溶系统激活状态,其水平升高可作为血栓发生的重要指标;ATIII 发挥抗凝作用,是血液中关键的抗凝物质^[18],本研究表明,荆防合剂可以降低 TXB₂和 FDP 水平,升高 6-keto-PGF1 α 和 ATIII 水平,在抗凝系统中发挥重要作用。

细胞因子的激活与血栓形成密切相关,本研究结果显示,荆防合剂可显著降低血栓大鼠血清中 TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 的水平,这 4 种炎性因子均与机体炎症反应相关。TNF- α 可刺激内皮细胞产生损伤相关因子高迁移率族蛋白 B1 (high mobility group protein B1, HMGB1),HMGB1 又可刺激内皮细胞产生 TNF- α ,从而加重内皮细胞损伤,促进血栓的产生。此外,TNF- α 可促进巨噬细胞产生 IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 等炎性因子,进一步加重内皮损伤和血栓形成^[19],表明荆防合剂的抗血栓作用可能与抑制机体炎症反应、保护血管内皮细胞损伤有关。肠道杯状细胞分泌的黏蛋白与上皮细胞、微生物及宿主免疫系统共同作用,可使肠道免受病原微生物的损害,维持内环境稳态,是肠道机械屏障之一;LPS、DAO、D-LA 分别从细菌易位、肠道损

伤、肠黏膜通透性方面评价肠道屏障功能^[20];SIgA 是肠黏膜的主要免疫球蛋白,起到中和毒素、抵御外来病原体入侵的作用,对调节肠道菌群也起着重要作用;ZO-1 和 Occludin 作为肠道紧密连接蛋白,对于维持细胞间紧密连接和维持肠道通透性发挥重要作用,从而形成一个完整的生物屏障^[21]。本研究结果表明,荆防合剂可显著增加肠道杯状细胞数目,降低血栓大鼠血清中 LPS、DAO、D-LA 含量,上调紧密连接蛋白 ZO-1 和 Occludin 表达,提高 SIgA 水平。

肠道菌群对机体的病理生理过程起着至关重要的作用,其菌群数量、多样性及物种比例等都会对机体产生影响。中药及天然产物可以调节肠道菌群的丰富度和多样性,在血栓性疾病的治疗中起着重要作用。路美娟等^[22]研究发现,补阳还五汤可上调普氏菌属、乳杆菌属等有益菌,在门、属水平影响菌群的多样性,调节肠道细菌比例,从而达到抗血小板作用;Baeza 等^[23]研究表明,绿原酸经肠道代谢后,生成的代谢产物可以抑制血小板聚集,具有较好的抗血小板活性;也有研究表明,酚酸类物质可以调节三甲胺微生物的生成,降低血液循环中三甲胺氮氧化物水平,达到抑制血栓作用^[24]。本研究肠道菌群结果显示,荆防合剂可以使肠道菌群 α 和 β 多样性指数趋向于正常状态,乳杆菌属、Muribaculaceae 属、Clostridia_UCG-014 属等发挥着重要作用。乳酸杆菌主要是通过抑制三甲胺氮氧化物来减少血栓形成,三甲胺氮氧化物可促进血小板对胶原蛋白的黏附作用,促进细胞钙的释放,提高血小板反应性,诱导血栓形成^[25]。Muribaculaceae 是拟杆菌门的菌属,Clostridia_UCG-014 属于梭菌属,其生物学特征不明显,现阶段关于该菌在血栓中的研究报道不多,且在人群中无大样本的研究,在血栓疾病的诊疗中是否具有普适性亦需要深入研究。肠道菌群的代谢产物也直接或间接影响着机体的生理功能,根据非靶向代谢组学结果可知,荆防合剂干预后可回调亚油酸、花生四烯酸、棕榈酸、二十二碳六烯酸等多种代谢物水平,从而在炎症反应、血栓性相关疾病中起着重要作用,如亚油酸具有抑制肠道病原菌、抗氧化、抗炎、促进血液循环、参与人体心血管疾病的发生等作用。有研究表明,亚油酸可以抑制组织因子表达,从而抑制血液在血管内皮细胞表面形成血栓^[26];花生四烯酸具有抑制炎症反应、氧化应激等作用,血小板中的花生四烯

酸可被代谢成前列腺素 H_2 和血栓素 A_2 ，并促进凝血和血管收缩^[27-28]。代谢组学富集到的差异通路主要为不饱和脂肪酸合成通路，据报道，不饱和脂肪酸过量合成会增加血液黏度、升高血管收缩度和痉挛度，促进血小板聚集和血栓形成^[29]，本研究结果显示，给予荆防合剂干预后，TNF- α 、IFN- γ 、IL-1 β 、IL-6 水平均明显降低，APTT、PT、TT、FIB 及凝血因子 TXB2、FDP、6-keto-PGF1 α 和 ATIII 水平趋向于对照组，综合药效作用机制以及肠道菌群结果，推测荆防合剂可能通过调节乳杆菌属、Muribaculaceae 属、Clostridia_UCG-014 属等菌属及其代谢产物，增强肠道屏障屏障及免疫功能并维持肠道通透性，进一步影响机体不饱和脂肪酸合成通路，从而改善角叉菜胶诱导的大鼠血栓。

肠道菌群及其代谢产物为临床预防和治疗血栓性疾病提供了新的作用靶点及研究策略，然而，本研究仍存在以下不足，如肠道菌群因果关系的验证、个体差异及代谢物作用机制的研究等，未来应深入探索以上问题，以便更好地支持中药在血栓性疾病防治中的应用，为中医药现代化研究提供新视角和有利证据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Wendelboe A M, Raskob G E. Global burden of thrombosis: Epidemiologic aspects [J]. *Circ Res*, 2016, 118(9): 1340-1347.
- [2] 房凌云. 抗血栓中药复方制剂的药理作用研究进展 [J]. *中国处方药*, 2023, 21(11): 185-188.
- [3] Khuu M P, Paeslack N, Dremova O, *et al.* The gut microbiota in thrombosis [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2025, 22(2): 121-137.
- [4] Priya V, Viswanadh M K, Mehata A K, *et al.* Targeted nanotherapeutics in the prophylaxis and treatment of thrombosis [J]. *Nanomedicine*, 2021, 16(13): 1153-1176.
- [5] 倪雯婷, 邢中夫, 孙成宏, 等. 白桦脂酸对乳腺癌的干预作用及核心通路预测 [J]. *中药药理与临床*, 2024, 40(6): 50-58.
- [6] Wei J, Liu Z, He J, *et al.* Traditional Chinese medicine reverses cancer multidrug resistance and its mechanism [J]. *Clin Transl Oncol*, 2022, 24(3): 471-482.
- [7] 倪雯婷, 侯林, 马大龙, 等. 基于 p38 MAPK/NF- κ B 通路探索荆防合剂治疗甲型 H1N1 流感的作用机制 [J]. *中药药理与临床*, 2023, 39(1): 12-17.
- [8] 吕婧, 高燕, 赵渤年, 等. 荆防颗粒增强免疫作用机制研究 [J]. *中草药*, 2024, 55(16): 5541-5550.
- [9] 张永康, 孙成宏, 王西双, 等. 基于网络药理学和实验验证探讨荆防颗粒对自身免疫性肝炎小鼠的治疗作用及作用机制 [J]. *中草药*, 2023, 54(5): 1461-1470.
- [10] 周继栋, 李红华, 李翔子, 等. 基于 ERK/p38 MAPK 信号通路探讨荆防颗粒对角叉菜胶所致小鼠尾部血栓的作用研究 [J]. *中国中药杂志*, 2022, 47(8): 2195-2199.
- [11] Xu M, Wu R X, Li X L, *et al.* Traditional medicine in China for ischemic stroke: Bioactive components, pharmacology, and mechanisms [J]. *J Integr Neurosci*, 2022, 21(1): 26.
- [12] Li X, Lou Y, Shang J J, *et al.* Traditional Chinese medicine injections with activating blood circulation, equivalent effect of anticoagulation or antiplatelet, for acute myocardial infarction: A protocol for the systematic review and Meta-analysis of randomized clinical trials [J]. *Medicine*, 2022, 101(24): e29089.
- [13] Chen X F, Zhang H, Ren S C, *et al.* Gut microbiota and microbiota-derived metabolites in cardiovascular diseases [J]. *Chin Med J*, 2023, 136(19): 2269-2284.
- [14] Jansen V L, Gerdes V E, Middeldorp S, *et al.* Gut microbiota and their metabolites in cardiovascular disease [J]. *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 2021, 35(3): 101492.
- [15] Fan Z Q, Xu S L, Deng Y S, *et al.* Disordered gut microbiota and alterations in the serum metabolome are associated with venous thromboembolism [J]. *Thromb Res*, 2024, 235: 68-74.
- [16] Wang S, Yao W, Zhu X D, *et al.* Exploring the mechanism of the antithrombotic effects of *Pueraria lobata* and *Pueraria lobata* var. *thomsonii* based on network pharmacology [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 300: 115701.
- [17] Cheng T F, Zhao J, Wu Q L, *et al.* Compound Dan Zhi Tablet attenuates experimental ischemic stroke via inhibiting platelet activation and thrombus formation [J]. *Phytomedicine*, 2020, 79: 153330.
- [18] Wada T, Gando S. Phenotypes of disseminated intravascular coagulation [J]. *Thromb Haemost*, 2024, 124(3): 181-191.
- [19] Puchenkova O A, Soldatov V O, Belykh A E, *et al.* Cytokines in abdominal aortic aneurysm: Master regulators with clinical application [J]. *Biomark Insights*, 2022, 17: 11772719221095676.
- [20] Yin N M, Xu B Q, Huang Z H, *et al.* Inhibition of Pck1 in intestinal epithelial cells alleviates acute pancreatitis via modulating intestinal homeostasis [J]. *FASEB J*, 2024, 38(8): e23618.
- [21] Luo Z Y, Liu C S, Hu Y N, *et al.* Gegen Qinlian Decoction restores the intestinal barrier in bacterial diarrhea piglets

- by promoting *Lactobacillus* growth and inhibiting the TLR2/MyD88/NF- κ B pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2022, 155: 113719.
- [22] 路美娟, 杨培丽, 刘毅. 补阳还五汤通过干预肠道菌群改善阿司匹林致消化道损伤作用及机制研究 [J]. 天津中医药, 2023, 40(8): 1043-1051.
- [23] Baeza G, Bachmair E M, Wood S, *et al*. The colonic metabolites dihydrocaffeic acid and dihydroferulic acid are more effective inhibitors of *in vitro* platelet activation than their phenolic precursors [J]. *Food Funct*, 2017, 8(3): 1333-1342.
- [24] Annunziata G, Maisto M, Schisano C, *et al*. Effects of grape pomace polyphenolic extract (Taurisolo®) in reducing TMAO serum levels in humans: Preliminary results from a randomized, placebo-controlled, cross-over study [J]. *Nutrients*, 2019, 11(1): 139.
- [25] 梁燕, 高静. 乳酸杆菌在急性心肌梗死防治中的潜在机制及应用进展 [J]. 天津医药, 2024, 52(1): 107-112.
- [26] 赵敏. 亚油酸及亚油酸甲酯的抗炎作用研究 [D]. 成都: 西南交通大学, 2012.
- [27] Qu Y, Zhang H L, Zhang X P, *et al*. Arachidonic acid attenuates brain damage in a rat model of ischemia/reperfusion by inhibiting inflammatory response and oxidative stress [J]. *Hum Exp Toxicol*, 2018, 37(2): 135-141.
- [28] Farooqui A A, Farooqui T, Sun G Y, *et al*. COVID-19, blood lipid changes, and thrombosis [J]. *Biomedicines*, 2023, 11(4): 1181.
- [29] Susai S R, Healy C, Mongan D, *et al*. Evidence that complement and coagulation proteins are mediating the clinical response to omega-3 fatty acids: A mass spectrometry-based investigation in subjects at clinical high-risk for psychosis [J]. *Transl Psychiatry*, 2022, 12(1): 454.

[责任编辑 李亚楠]