

朱华,李卓,苏磊,等. 冠心病源肠道菌群小鼠模型的建立及评价[J]. 中国实验动物学报, 2019, 27(6): 716-724.

Zhu H, Li Z, Su L, et al. Establishment and evaluation of a mouse model of human gut microbiota transplanted from patients of coronary heart disease [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2019, 27(6): 716-724.

Doi:10.3969/j.issn.1005-4847.2019.06.005

冠心病源肠道菌群小鼠模型的建立及评价

朱华¹,李卓¹,苏磊¹,郭亚茜¹,杜晓鹏¹,袁建松^{2*},秦川^{1*}

(1. 卫健委人类疾病比较医学重点实验室,中国医学科学院医学实验动物研究所,北京协和医学院比较医学中心,北京 100021; 2. 中国医学科学院阜外心血管医院,北京 100037)

【摘要】 目的 通过粪菌移植方法建立冠心病源肠道菌群(human flora-associated,HFA)小鼠模型并对模型进行评价。**方法** 28只无菌雌性C57BL/6J小鼠分为对照(CON)组和模型(CAD)组,分别接种健康志愿者和冠心病患者新鲜粪便悬液,移植后6周和10周每组安乐7只动物,取粪便、血液、主动脉进行16S rDNA、血脂、细胞因子和组织病理学检查。**结果** 从第5周开始CAD组动物体重增长加快($P<0.05$)。 α -多样性分析,CAD组的Simpson指数在两个时间点的数值均升高($P<0.05$, $P<0.01$),Shannon指数($P<0.05$, $P<0.01$)、ACE($P<0.05$)和Chao1指数均降低($P<0.05$)。CON组reads主要分布在厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、梭杆菌门(*Fusobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、蓝藻菌门(*Cyanobacteria*)、软壁菌门(*Tenericutes*)。造模6周时,CAD组厚壁菌门、软壁菌门丰度降低($P<0.05$),拟杆菌门、疣微菌门丰度升高($P<0.01$);造模10周时,CAD组厚壁菌门丰度降低($P<0.01$),拟杆菌门、疣微菌门丰度升高($P<0.01$)。 β -多样性分析,CAD组、CON组的肠型分布在不同区域,同一组的不同阶段则分布在相同区域。CAD组与CON组在微生物物种构成方面存在显著性差异($P<0.05$)。CAD组小鼠在建模6周和10周时血液中甘油三酯(TG)($P<0.05$, $P<0.01$),胆固醇(TC)($P<0.05$),乳酸脱氢酶(LDH)($P<0.01$, $P<0.0001$)和磷酸激酶(CK)($P<0.01$, $P<0.05$)值均升高。低密度脂蛋白(LDL-C)在建模6周时升高($P<0.05$)。细胞因子检测,IL-6在建模6周时浓度升高($P<0.05$),10周时减低($P<0.00001$);IL-10在建模10周时浓度降低($P<0.05$);IL-2、IL-4、IL-5、IL-1 β 在建模10周时浓度升高($P<0.0001$, $P<0.05$, $P<0.0001$, $P<0.01$)。IL-12p70、TNF- α 、INF- γ 在两个时间点差异无统计学意义。CAD组及CON组小鼠的冠状动脉苏木素-伊红(H.E)染色在建模后两个时间点均未见泡沫细胞形成等动脉粥样硬化改变。**结论** 本研究利用粪菌移植方法获得冠心病源菌群小鼠,肠道菌群结构丰度、体重、血脂、细胞因子含量等指标出现了与临床类似的改变。

【关键词】 冠心病;肠道菌群;无菌小鼠;菌群人源化动物

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2019) 06-0716-09

Establishment and evaluation of a mouse model of human gut microbiota transplanted from patients of coronary heart disease

ZHU Hua¹, LI Zhuo¹, SU Lei¹, GUO Yaxi¹, DU Xiaopeng¹, YUAN Jiansong^{2*}, QIN Chuan^{1*}

(1. Key Laboratory of Human Disease Comparative Medicine, Ministry of Health; Institute of Laboratory Animal Science, Chinese Academy of Medical Sciences (CAMS) Comparative Medical Center, Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100021, China.

2. Fuwai Hospital, Academy of Medical Sciences (CAMS) & Peking Union Medical College (PUMC), Beijing 100037)

Corresponding author: YUAN Jiansong. E-mail: yuanjiansong@fuwaihospital.org; QIN Chuan. E-mail: chuanqin@vip.sina.com

【基金项目】 医科院重大协同创新项目(2017-12M-2-005)。
Funded by CAMS Innovation Fund for Medical Science (CIFMS, 2017-12M-2-005).
【作者简介】 朱华,主任技师,研究方向:疾病与肠道微生态。Email:zhuhua0226@vip.sina.com;
【通信作者】 秦川,教授,博士生导师。研究方向:病理与病理生理学。Email:chuanqin@vip.sina.com。
袁建松,副主任医师,硕士生导师。研究方向:冠心病介入治疗。Email:yuanjiansong@fuwaihospital.org。
* 共同通信作者

[Abstract] Objective To establish and evaluate a mouse model of human flora-associated (HFA) from patients of coronary heart disease via fecal microbiota transplantation. **Methods** Twenty-eight female germ-free (GF) C57BL/6J mice were divided into the healthy control (CON) and coronary heart disease (CAD) groups. Eight-week-old mice were orally inoculated with 0.4 mL of stool suspension from healthy participants or CAD patients to build the HFA mouse model. At 6 and 10 weeks post-inoculation, fresh fecal samples were collected and examined for the V3 region of the 16S rDNA gene. Blood sera were collected and examined for blood lipid, cholesterol, myocardial enzymes and cytokine levels. Coronary arteries were collected, processed and stained with hematoxylin and eosin (H&E) for pathological examination. **Results** The average body weight of the CAD group was significantly higher than that of the CON group ($P < 0.05$) from 5 weeks post-inoculation. α -diversity analysis showed that the Simpson ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Chao1 ($P < 0.05$) and ACE indices ($P < 0.05$) were significantly lower in the CAD group than that in the CON group. The Shannon index ($P < 0.05$, $P < 0.01$) was higher in the CAD group than in the CON group at 6 and 10 weeks post-inoculation. The intestinal floras were mainly comprised of the phyla *Firmicutes*, *Proteobacteria*, *Bacteroidetes*, *Verrucomicrobia*, *Fusobacteria*, *Actinobacteria*, *Cyanobacteria* and *Tenericutes*. At six weeks post-inoculation, the relative abundances of *Firmicutes* and *Tenericutes* were lower ($P < 0.05$), and those of *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobia* were higher ($P < 0.01$) in the CAD group than in the CON group. At ten weeks post-inoculation, the relative abundance of *Firmicutes* ($P < 0.01$) was lower, and the relative abundances of *Bacteroidetes* and *Verrucomicrobia* ($P < 0.01$) were higher in the CAD group than in the CON group. β -diversity analysis showed that the CON and CAD groups were distributed in different quadrants, but the same groups at different stages were distributed in the same quadrants, with a significant difference between the groups ($P < 0.05$). The serum levels of TG ($P < 0.05$, $P < 0.01$), TC ($P < 0.05$), LDH ($P < 0.01$, $P < 0.0001$) and CK ($P < 0.01$, $P < 0.05$) were significantly higher in the CAD group than in the CON group at 6 and 10 weeks post-inoculation. LDL-C levels were significantly higher ($P < 0.05$) in the CAD group than in the CON group at 10 weeks post-inoculation. IL-6 levels were higher at 6 weeks ($P < 0.05$) and lower at 10 weeks ($P < 0.01$) post-inoculation in the CAD group than in the CON group. The IL-2, IL-4, IL-5 and IL-1 β levels were significantly higher ($P < 0.0001$, $P < 0.05$, $P < 0.0001$, $P < 0.01$, respectively) in the CAD group than in the CON group at 10 weeks post-inoculation. IL-12p70, TNF- α and INF- γ levels did not differ between the CAD and CON groups. Pathological examination using HE staining of the coronary arteries showed no obvious atherosclerotic changes (e.g., foam cell infiltration). **Conclusions** A mouse model of HFA from CAD patients was established via fecal microbiota transplantation. The main advantages of using bacteria from CAD patients are that the GF mice were well colonized, and the animals have similar body weights and serum levels of blood lipid, cholesterol and cytokines.

[Keywords] coronary heart disease; intestinal flora; germ-free mice; human flora-associated animal

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

冠状动脉粥样硬化性心脏病简称冠心病,是一种非常常见的心血管疾病。截止到 2016 年的数据显示,我国城乡居民因冠心病死亡 173.6 万例^[1]。冠心病是一种遗传因素与环境因素共同作用导致的慢性复杂性疾病。在遗传因素方面,有文献报道通过全基因组关联研究发现了 46 个与冠心病相关的危险基因,占冠心病遗传因素的 10.6%,并且这些因素只与脂质和血压相关且稳定性高,不易受饮食、性别、年龄和药物的影响^[2],从而使危险基因较难成为预防治疗冠心病的靶点。肠道菌群作为环境因素的重要组成部分越来越受到研究者重视。直接利用人进行肠道菌群研究存在伦理学限制,动

物模型是研究肠道菌群与宿主健康与疾病关系是必不可少的手段。由于实验动物肠道菌群组成及代谢活性与人存在显著差异,因此将动物体内实验结果外推到人不是完全可靠的。以无菌(germ free mice, GF)小鼠为研究对象通过粪菌移植方式建立人源菌群(human flora-associated, HFA)动物模型,其微生物背景清晰,可有效控制遗传基因、肠道微生物、饮食、性别年龄等因素造成的混杂性偏倚^[3-4]。本研究通过灌胃方式给无菌小鼠接种冠心病患者的新鲜粪便悬液建立冠心病 HFA 动物模型,为探索肠道菌群在冠心病发生发展过程中的作用机制提供研究基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

本实验室自己繁育的无菌雌性 C57BL/6J 小鼠 28 只,饲养于专用无菌隔离器,设施合格证号:【SYXK(京)2018-0019】。饲养环境:温度 21~25℃,湿度 40%~70%,光照周期明暗比 12 h:12 h。动物自由摄入经 50 kGy ⁶⁰Co γ 射线辐照消毒的定制无菌小鼠饲料。实验中使用的饮水、垫料、鼠盒、水瓶、灌胃针等均经过 126℃,30 min 的高温高压灭菌处理。本实验已获得中国医学科学院医学实验动物研究所实验动物使用与管理委员会(IACUC)批准,批准号:ZH17001。

1.1.2 试剂与仪器

抗体芯片检测试剂:仪器校准试剂盒 Bio-Plex Validation Kit (Bio-Rad); Bio-Plex Calibration Kit

(Bio-Rad)。检测试剂盒 Bio-Plex Pro Mouse Cytokine Grp I Panel 23-plex(货号 M60009RDPD)。主要仪器:悬液微珠芯片平台, Bio-Plex MAGPIX System (Bio-Rad)。组织脱水机、石蜡包埋机、石蜡切片机(德国 Leica)、IQ5PCR 仪(美国 Bio-Rad 公司)。

1.2 方法

1.2.1 志愿者信息

采集 2 位冠心病患者、1 位健康志愿者的新鲜粪便用于建立 HFA 模型(表 1)。冠心病及健康志愿者均来自北京,为典型非素食中国饮食,体检、血相正常;健康志愿者及冠心病患者的消化系统无其它器质性疾病;消化道未进行过手术;无酗酒史、糖尿病及其它影响肠道菌群的问题;取样前 8 周末服用处方药、益生菌、抗生素、非甾体类药物。冠心病患者符合世界卫生组织/国际心脏病学会制定的冠心病诊断标准^[5]。

表 1 实验志愿者信息

Table 1 General information of the volunteers

项目 Items	健康对照 Healthy control	冠心病患者 1 CAD patient 1	冠心病患者 2 CAD patient 2
性别 Gender	男 Male	男 Male	男 Male
年龄 Age	48	46	49
舒张压(mmHg) Diastolic Pressure	109	130	140
收缩压(mmHg) Systolic Pressure	68	80	80
体质量指数 BMI(kg/m ²)	20.94	32.85	33.63
胆固醇 TC(mmol/L)	3.79	5.97	5.07
甘油三酯 TG(mmol/L)	0.62	1.93	2.08
高密度脂蛋白 HDL(mmol/L)	0.89	1.80	1.41
低密度脂蛋白 LDL(mmol/L)	2.21	3.71	3.14

1.2.2 模型建立

8 周龄雌性无菌 C57BL/6J 28 只,分为健康对照组(CON)与冠心病(CAD)组,每组 14 只。收集 3 位志愿者清晨第 1 次排出的新鲜粪便,无菌、厌氧条件下称量 1 g 加入 100 mL 0.1 mol/L PBS (pH 7.2) 缓冲液,振荡混匀,制成粪便菌悬液待用。分别向 2 组的每只无菌小鼠体内经口灌喂 0.4 mL 粪便悬液,建立冠心病源菌群动物模型。

1.3 检测指标

动物每周称体重,在粪菌移植 6 周、10 周后每组分别安乐 7 只动物,进行以下指标的检测:

1.3.1 肠道菌群 16S rDNA 的检测

动物安乐死前在隔离器内采集粪便,-80℃冰箱冷冻保存。按参考文献^[6]的方法进行基因组

DNA 提取和 PCR 扩增文库构建、测序及生物信息学分析。

1.3.2 血液学指标:

动物用舒泰(25 mg/kg)麻醉后腹主动脉取血,取血结束剪断腹主动脉放血将动物安乐死。血液 3000 r/min 离心 10 min 取上清,样品送北京中同蓝博临床检测有限公司,采用比色法进行 TG、TC、LDL-C、高密度脂蛋白(HDL-C)、LDH、CK 的检测。

1.3.3 细胞因子检测

血液用 10 000 r/min 离心 10 min,取上清。使用 Luminex 抗体芯片技术检测血清中与粥样硬化斑块形成相关的细胞因子:IL-1β、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、INF-γ、IL-10、IL-12p70、TNF-α 的浓度变化。

1.3.4 组织病理学

动物安乐死后,打开胸腔,取出心脏,自升主动脉处将心脏与主动脉分离并切除心脏的下半部分,用 PBS 洗净残血后 4% 中性甲醛固定进行 HE 染色。

1.4 统计学分析

所有实验数据均采用平均值±标准差($\bar{x} \pm s$)表示,SPSS 22.0 软件进行差异显著性分析,组间比较使用 t 检验,以 $P < 0.05$ 为差异有显著性。

2 结果

2.1 动物一般情况

在整个动物实验过程中,模型组和对照组动物小鼠精神良好、毛色光滑、摄食饮水正常,体重平稳增长。从第 5 周开始,CAD 组动物体重增长加快,与 CON 组比较差异有显著性($P < 0.05$)(图 1)。

2.2 肠道菌群 16S rDNA 检测结果

2.2.1 肠道菌群多样性分析

根据 OTUs 代表序列与数据库注释文件对比,在 97%(种)水平上进行 OTUs 划分,CAD 组在造模后 6 周和 10 周时所获得的 OTUs 数均减少,与 CON 组比较差异有显著性($P < 0.05$)。Shannon 指数大、Simpson 指数小表示肠道菌群的多样性强,CAD 组的 Shannon 指数在造模后两个时间点均降低($P < 0.05, P < 0.01$),Simpson 指数均升高($P < 0.05, P <$

0.01),与 CON 组比较差异有显著性。ACE 和 Chao1 指数大表示菌群丰度高,CAD 组的 ACE 和 Chao1 指数在造模后两个时间点的数值均降低($P < 0.05$),与 CON 组比较差异有显著性(表 2)。

2.2.2 肠道菌群在门和属水平上的构成

在造模 6 周和 10 周两个时间点 CON 组 reads 主要分布在以下 8 个门:厚壁菌门(*Firmicutes*)、变形菌门(*Proteobacteria*)、拟杆菌门(*Bacteroidetes*)、疣微菌门(*Verrucomicrobia*)、梭杆菌门(*Fusobacteria*)、放线菌门(*Actinobacteria*)、蓝藻菌门(*Cyanobacteria*)、软壁菌门(*Tenericutes*)。

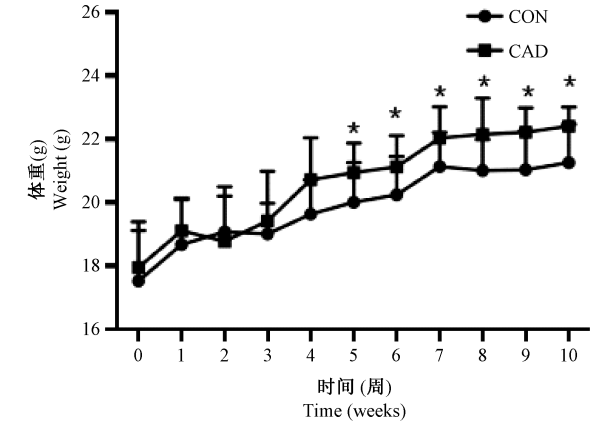


图 1 体重变化
Figure 1 Body weight change in CON groups and CAD groups

表 2 模型组与对照组肠道菌群 α-多样性分析指数比较($\bar{x} \pm s$)

Table 2 Comparison of the α-diversity indexes of gut microbiota between CON groups and CAD groups($\bar{x} \pm s$)						
组别 Groups	OUTs		Chao1		Shannon	
	造模 6 周 6 weeks after gavage	造模 10 周 10 weeks after gavage	造模 6 周 6 weeks after gavage	造模 10 周 10 weeks after gavage	造模 6 周 6 weeks after gavage	造模 10 周 10 weeks after gavage
对照组 Control group	123.00±17.50	131.30±12.70	231.28±32.15	224.37±21.04	3.37±0.78	3.39±0.71
模型组 CAD group	110.20±15.10	107.80±14.22	189.24±16.39	179.55±19.41	2.31±0.45	2.39±0.65
P 值 P value	0.0146 *	0.0396 *	0.0142 *	0.0387 *	0.0114 *	0.0000 **

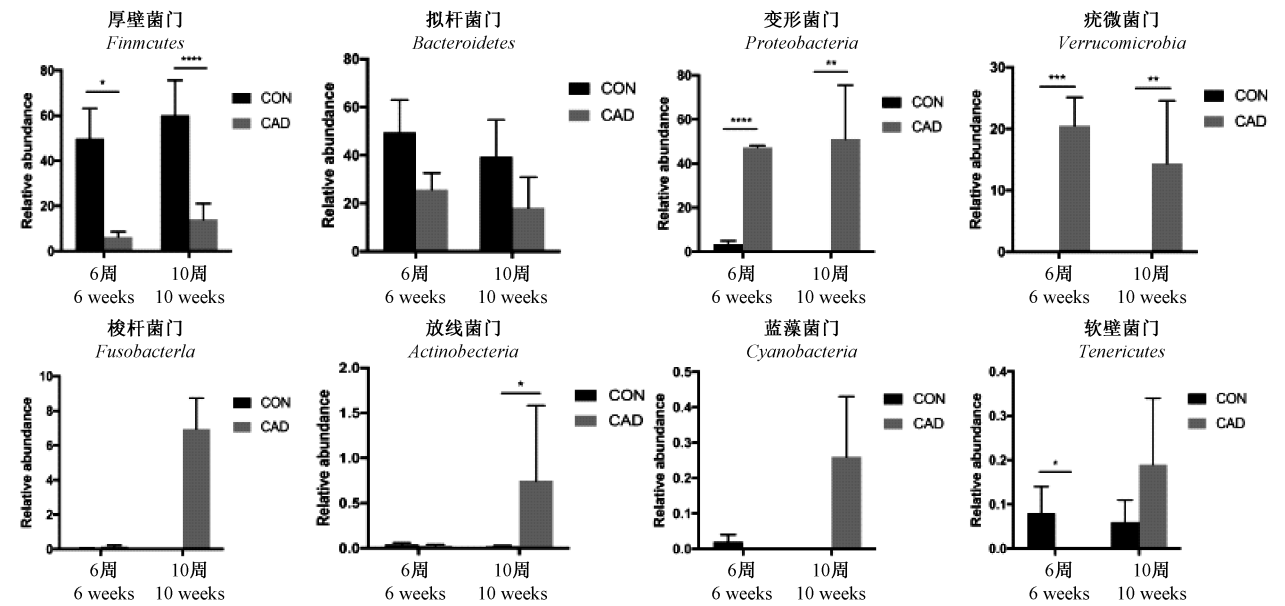
组别 Groups	Simpson		ACE	
	造模 6 周 6 weeks after gavage	造模 10 周 10 weeks after gavage	造模 6 周 6 weeks after gavage	造模 10 周 10 weeks after gavage
对照组 Control group	130.00±17.20	128.70±12.20	219.33±22.29	209.37±35.24
模型组 CAD group	1114.20±12.50	101.60±11.04	177.31±16.42	171.24±19.17
P 值 P value	0.0470 *	0.0000 **	0.0132 *	0.0124 *

注:与对照组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$ 。
Note. Compared with the control group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$.

造模 6 周时, CAD 组厚壁菌门、软壁菌门丰度降低($P<0.05$), 与对照组比较差异有显著性。拟杆菌门、疣微菌门丰度升高($P<0.01$), 与对照组比较差异有显著性。造模 10 周时, CAD 组厚壁菌门丰度降低($P<0.01$), 与对照组比较差异有显著性。拟杆菌门、疣微菌门丰度升高($P<0.01$), 与对照组比较差异有显著性(图 2)。

在属水平, 对相对丰度较高的菌株进行分析,

造模 6 周时拟杆菌属(*Bacteroides*)、*Akkermansia* 菌属相对丰度增高($P<0.01$), *Blautia* 菌属、*Parasutterella* 菌属相对丰度降低($P<0.05$, $P<0.01$), 与对照组比较差异有显著性。造模 10 周时拟杆菌属(*Bacteroides*)、*Akkermansia* 菌属相对丰度增高($P<0.01$), 肠杆菌属(*Lactobacillus*)、*Blautia* 菌属、*Parasutterella* 菌属相对丰度降低($P<0.05$, $P<0.01$), 与对照组比较差异有显著性(图 3)。

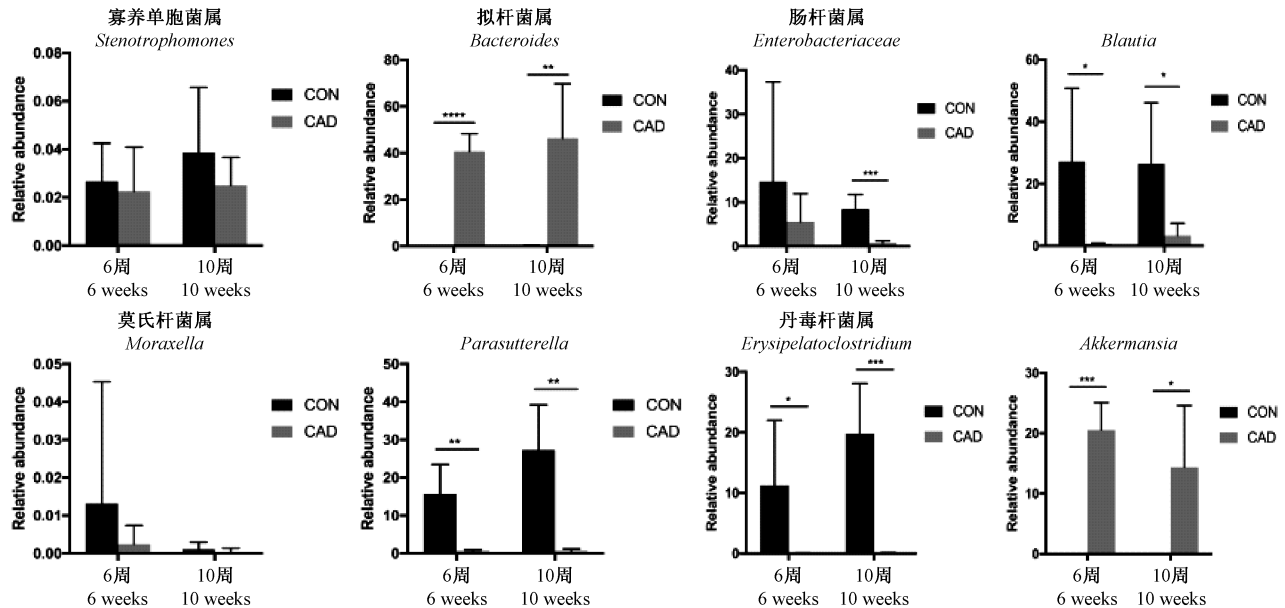


注: 与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图 2 肠道菌群在门水平上的构成

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

Figure 2 Relative abundance of the bacteria in gut microbiota at phylum level in the CON and CAD groups



注: 与对照组比较, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$ 。

图 3 肠道菌群在属水平上的构成

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, **** $P<0.0001$.

Figure 3 Relative abundance of the bacteria in gut microbiota at genus level in the CON and CAD groups

2.2.3 β-多样性分析

β-多样性研究是使用 Weighted Unifrac 距离来衡量组间相异系数,此系数越大表示组间物种多样性的差异越大。分析结果显示,CAD 组在建模 6 周、10 周时的 Weighted Unifrac 距离分别为 0.658、0.681。表明 CAD 组与 CON 组在微生物物种构成方面存在显著性差异($P<0.05$),差异有统计学意义(图 4A)。CAD 组、CON 组的肠型分布在不同区域,同一组的不同阶段则分布在相同区域(图 4B)。

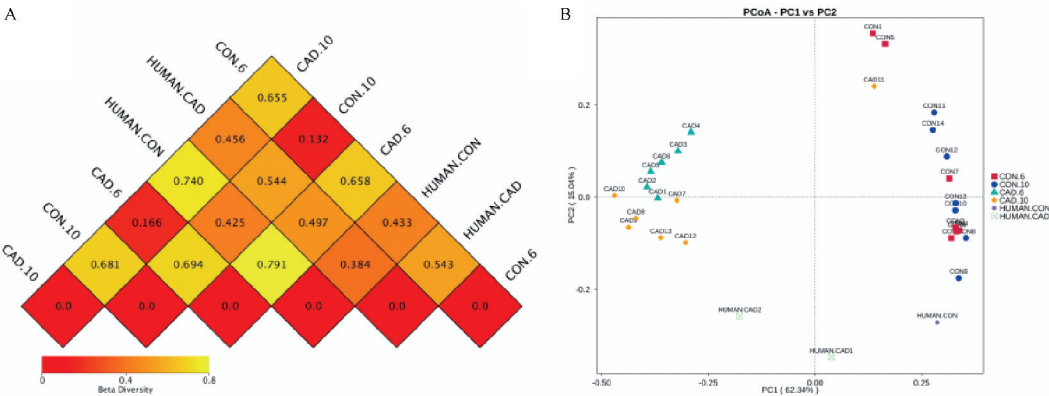
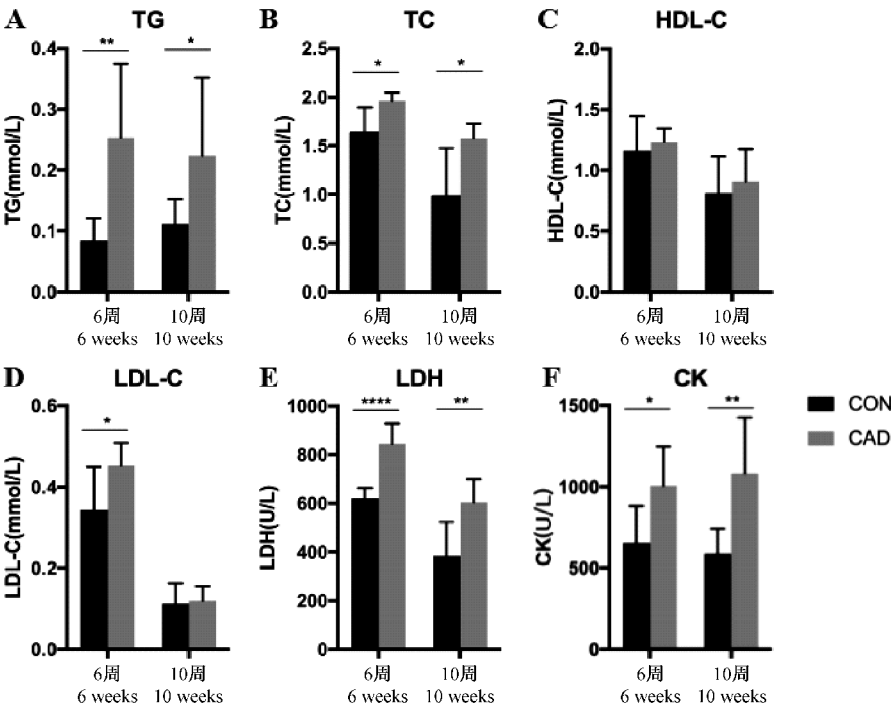


图 4 β-多样性分析结果
Figure 4 β-diversity analysis of the CON and CAD groups



注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,**** $P<0.0001$ 。

图 5 血脂和心肌酶标检测结果

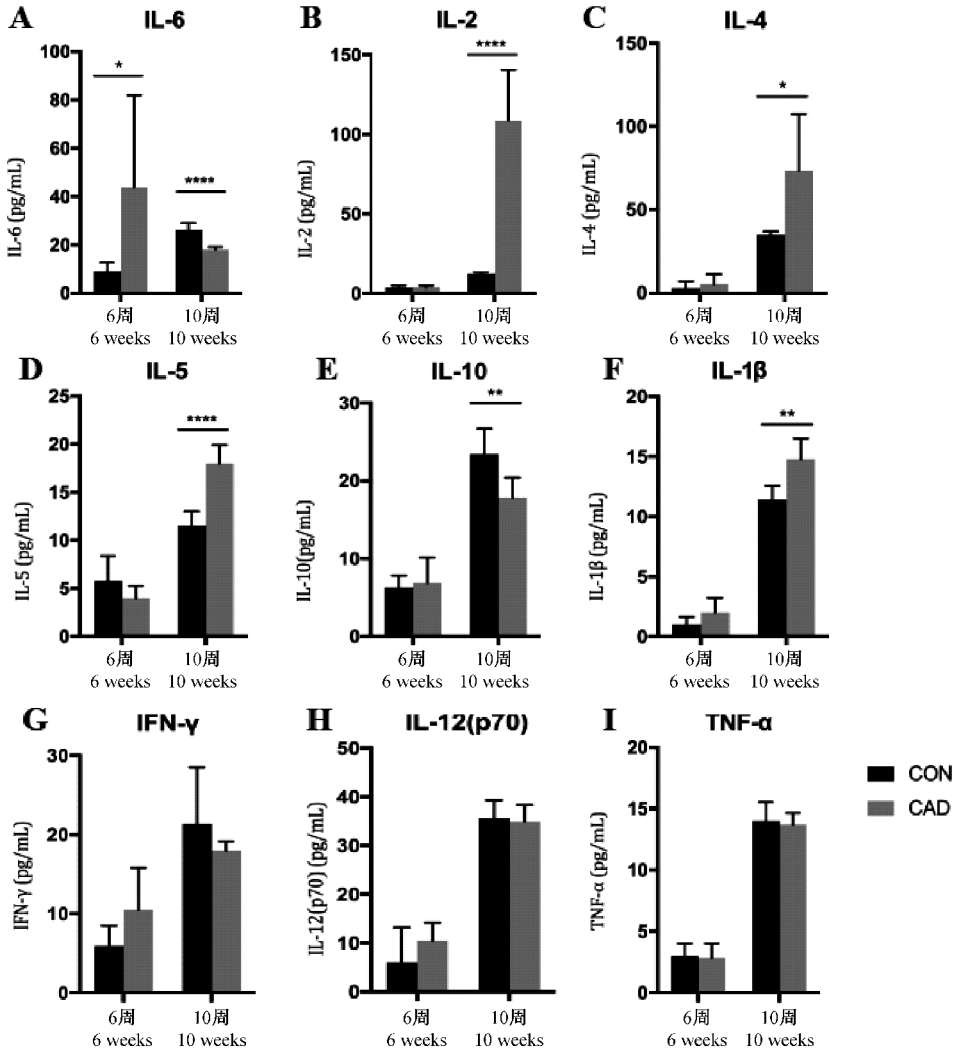
Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, **** $P<0.0001$.

Figure 5 Detection of the serum lipid levels and myocardial enzymes in the CON and CAD groups

2.4 细胞因子检测

结果显示,与斑块形成、进展相关的细胞因子中,IL-6 在建模 6 周时浓度升高($P<0.05$),10 周时减低($P<0.0001$,图 6A);IL-10 在建模 10 周时浓度降低($P<0.05$,图 6E); IL-2、IL-4、IL-5、IL-

1 β 在建模 10 周时浓度升高($P<0.0001$, $P<0.05$, $P<0.0001$, $P<0.01$,图 6B, C, D, F),与 CON 组比较差异有统计学意义。IL-12p70、TNF- α 、INF- γ 在建模 6 周和 10 周时差异均无统计学意义(图 6G, H, I)。



注:与对照组比较,* $P<0.05$,** $P<0.01$,*** $P<0.0001$ 。

图 6 细胞因子检测结果

Note. Compared with the control group, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.0001$.

Figure 6 The serum levels of cytokines in the CON and CAD groups

2.5 心脏组织病理学

在建模 6 周(图 7A, B)和 10 周(图 7C, D)时, CON 组及 CAD 组小鼠胸主动脉无斑块形成,血管内膜平滑,未见断裂增厚,内皮细胞排列整齐,中膜厚度正常,平滑肌细胞排列整齐,均未见泡沫细胞形成等动脉粥样硬化改变。

3 讨论

根据 Hazenberg 等^[7]、Che 等^[8]的研究结果,在

接种人肠道菌群 2 周后, HFA 动物肠道内菌群结构丰度与志愿者菌群几乎完全一致,并且至少保持 5 周稳定不变。所以本研究选择在灌胃接种志愿者粪便菌悬液 6 周和 10 周后,收集 CON 组和 CAD 组小鼠的新鲜粪便、血液、组织样品进行检测。通过对肠道菌群 β -多样性进行分析, CON 组小鼠与健康志愿者分布在同一象限、CAD 组小鼠与冠心病患者分布在同一象限,而健康志愿者及接种了健康志愿者肠道菌群的小鼠与冠心病患者及接种了患者菌

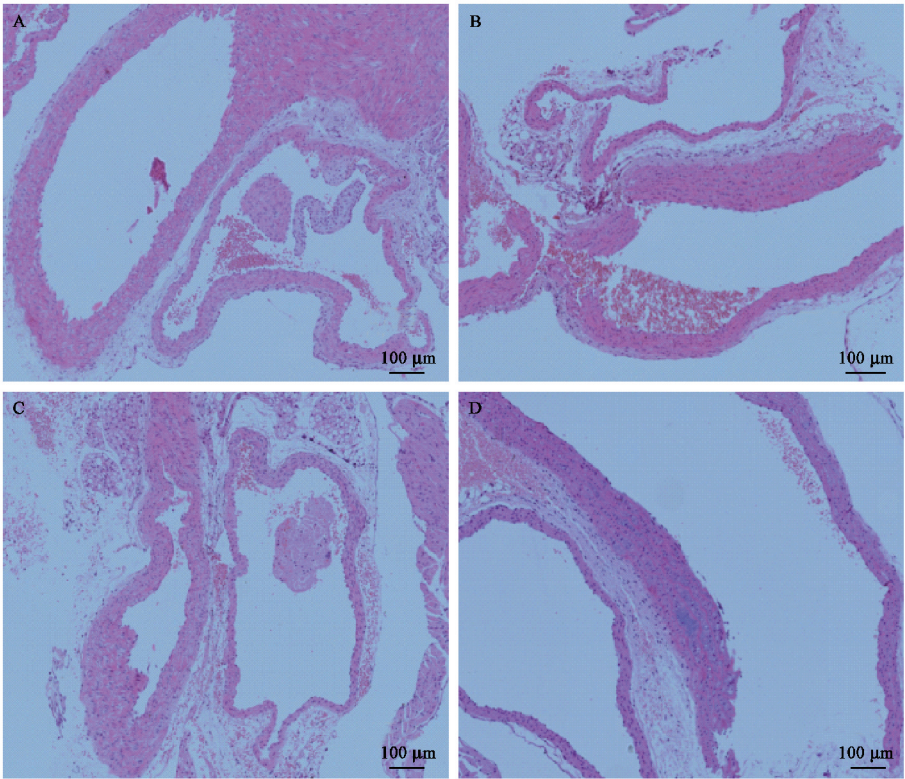


图 7 心脏组织的病理学改变

Figure 7 Histopathological changes in the mouse myocardial tissues of the CON and the CAD groups

群的小鼠分布在不同区域,且 Weighted Unifrac 距离差异有显著性。 α -多样性分析结果, CAD 组的 Shannon 指数在两个时间点均降低, Simpson 指数均升高, ACE 和 Chao1 指数在造模后 6 周和 10 周两个时间点的数值均降低,与 CON 组比较差异有显著性。表明志愿者肠道菌群在无菌小鼠体内成功定植,并可形成复杂且与志愿者菌群相似的微生物区系,且 CON 组、CAD 组小鼠肠道菌群结构与丰度差异显著。

血脂是动脉血管壁发生病变的基础物质,高血脂既是冠心病的独立危险因素,也是其病理表现,其机理可能与心肌受损后泵血功能下降导致的血液流变学改变相关^[9-11]。Fu 等^[12]的研究发现厚壁菌门和拟杆菌门的丰度与体质量指数、甘油水平、高密度脂蛋白水平呈有相关性。Velagapudi 等^[13]通过动物实验证实肠道菌群可影响小鼠的能量代谢和血脂水平。我们的实验中,2 名冠心病志愿者的体质量指数、血脂均高于正常值。粪菌液接种到无菌小鼠肠道后, CAD 组动物体重在移植后 5 周上升幅度增加,小鼠血清中的 TG、TC、LDL-C 与 CON 比较显著升高。厚壁菌门和拟杆菌门是 CON 组与 CAD 组肠道菌群中丰度差异最大的两个门,结果与

已有的研究报道相符。

动脉粥样硬化是一个慢性的炎症发展过程^[14],其机制目前较为认同的是损伤反应学说及在此基础上发展出的炎症学说,在这个过程里始终存在各种炎症细胞和大量炎症介质参与^[15-16]。IL-6 作为心脏不良事件的独立危险因素标志物参与易损斑块的炎症全程^[17]。IL-10 的作用主要是在免疫应答进行负调节,它可以通过直接抑制免疫细胞的功能实现免疫抑制^[18],也可以通过控制 IL-1 β 产生的炎症反应避免组织过度损伤^[19]。IL-2 与 IL-2 受体 α 亚基结合后可调节 T 淋巴细胞的活化,而活化的 T 淋巴细胞能分泌趋化因子增强炎症反应,从而促进动脉粥样硬化斑块的形成及进展^[20]。实验结果显示,移植冠心病患者的肠道菌群后,小鼠血清中 IL-6、IL-2 升高, IL-10 降低而被 IL-10 调节的 IL-1 β 升高,验证了上述研究结果。IL-4 参与粥样硬化的机制比较复杂,目前尚无定论。我们的结果显示移植 6 周时 IL-4 已经升高但无显著性差异, 10 周时显著升高,说明 IL-4 参与的体液免疫可能促进动脉粥样硬化的发展。

上述实验结果证明移植冠心病患者肠道菌群 10 周后 HFA 小鼠的心肌细胞和血管内皮细胞已发

生功能上的损伤,导致血脂、细胞因子的含量发生变化。但由于斑块形成是一个复杂且缓慢的过程,移植 10 周时心肌细胞和血管内皮细胞还未发生器质性改变,故 HE 染色中未发现泡沫细胞浸润等斑块形成的病理学变化。

理想的动物模型应具备以下特点:发病过程和机制尽量接近临床情况;能够对相关药物或治疗手段作出客观评价;模型的制备应操作简便、经济、可重复性高^[21]。本研究利用粪菌移植方法建立了冠心病 HFA 小鼠模型,除肠道菌群的结构与丰度与人类类似外,体重、血脂、细胞因子含量也出现了与临床类似的改变,为研究肠道菌群与冠心病关系研究提供了更多可选择的动物模型。

参 考 文 献(References)

- [1] 中国心血管病风险评估和管理指南编写联合委员会. 中国心血管病风险评估和管理指南[J]. 中国循环杂志, 2019, 13(1): 7-29.
The Joint Task Force for Guideline on the Assessment and Management of Cardiovascular Risk in China. Guideline on the Assessment and Management of Cardiovascular Risk in China [J]. Chin Circul J. 2019, 11(1): 7-29.
- [2] Van't HF, Ruigrok YM, Baas AF, et al. Impact of inherited genetic variants associated with profile, hypertension, and coronary artery disease on the risk of intracranial and abdominal aortic aneurysms [J]. Circ Cardiovasc Gene, 2013, 6(3): 264-270.
- [3] Faith JJ, Rey FE, O' Donnell D, et al. Creating and characterizing communities of human gut microbes in gnotobiotic mice [J]. ISME J, 2010, 4(9): 1094-1098.
- [4] Turnbaugh PJ, Ridaura VK, Faith JJ, et al. The effect of diet on the human gut microbiome: a metagenomic analysis in humanized gnotobiotic mice [J]. Sci Transl Med, 2009, 1(6): 6ra14.
- [5] 江一清, 刘朝中, 朱国英. 现代冠心病学 [M]. 北京: 人民军医出版社. 2001.
Jiang YZ, Liu CZ, Zhu GY. Coronary Heart Disease [M]. Beijing: People's Military Medical Press; 2001.
- [6] 朱华, 郭亚茜, 杜晓鹏, 等. 链脲佐菌素诱导糖尿病大鼠模型肠道菌群变化 [J]. 中国实验动物学报, 2018, 26(3): 349-356.
Zhu H, Guo YX, Du XP, et al. Analysis of gut microbiota in SD rat model of diabetes mellitus induced by streptozotocin [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2018, 26(3): 349-356.
- [7] Hazenberg MP. Effects of the human intestinal flora on germ-free mice [J]. J App Bacteriol, 1981, 50(1): 95-106.
- [8] Che C, Pang X, Hua X, et al. Effects of human fecal flora on intestinal morphology and mucosal immunity in human flora-associated piglet [J]. Scand J Immunol, 2009, 69(4): 223-233.
- [9] Chen Y, Ba L, Huang W, et al. Role of carvacral in cardioprotection against myocardial ischemia/reperfusion injury in rats through activation of MAPK/EPK and Akt/eNOS signaling pathway [J]. Eur J Pharmacol, 2016, 796: 90-100.
- [10] Brittan M, Hnuter A, Boulberdaa M, et al. Impaired vascular function and repair in patients with premature coronary artery disease [J]. Eur J Prev Cardiol, 2015, 22(12): 1557-1566.
- [11] Mega JL, Stitziel NO, Smith JG, et al. Genetic risk, coronary heart disease events, and the clinical benefit of statin therapy: An analysis of primary and secondary prevention trials [J]. Lancet, 2015, 385(9984): 2264-2267.
- [12] Fu J, Bonder MJ, Cniti MC, 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] Velagapudi VR, Hezaveh R, Reigestad CS, et al. The gut microbiota modulate host energy and lipid metabolism in mice [J]. J Lipid Res, 2010, 51(5): 1101-1112.
- [14] Viola J, Soehnlein O. Atherosclerosis — a matter of unresolved inflammation [J]. Semin Immunol, 2015, 27(3): 184-193.
- [15] Talas I. 2016 Russell Ross Memorial Lecture in vascular biology molecular-cellular mechanisms in the progression of atherosclerosis [J]. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2017, 37(2): 183-189.
- [16] Lin M, Zhao L, Zhao W, et al. Dissecting the mechanism of carotid atherosclerosis from the perspective of regulation [J]. Int Mol Med, 2014, 34(6): 1458-1466.
- [17] Janssen H, Wanger CS, Demmer P, et al. Acute perioperative-stress-induced increase of atherosclerotic plaque volume and vulnerability to rupture in apolipoprotein-E-deficient mice is amenable to statin treatment and IL-6 inhibition [J]. Dis Model Mech, 2015, 8(9): 1071-1080.
- [18] Brauner S, Jiang X, Thorlacius GE, et al. Augmented Th17 differentiation in Trim21 deficiency promotes a stable phenotype of atherosclerotic plaques with high collagen content [J]. Cardiovasc Res, 2018, 114(1): 158-167.
- [19] Janik M, Hejna P, Ublova, et al. Multiple giant coronary artery aneurysms: a rare cause of sudden cardiac death [J]. J Forens Sci, 2017, 62(2): 515-518.
- [20] Bachmann MF, Oxenius A. Interleukin 2: from immunostimulation to immunoregulation and back again [J]. EMBO Rep, 2007, 8(12): 1142-1148.
- [21] Bernbom N, Norrung B, Saasbe P, et al. Comparison of methods and animal models commonly used for investigation of fecal microbiota: Effects of time, host and gender [J]. J Microbiol Methods, 2006, 66(1): 87-95.

[收稿日期] 2019-07-09