

沈利叶,潘永明,徐雁云,等. 高脂高糖饮食诱导五指山小型猪动脉粥样硬化模型肠道菌群的变化 [J]. 中国实验动物学报, 2022, 30(3): 299-308.

Shen LY, Pan YM, Xu YY, et al. Changes in intestinal flora in a Wuzhishan minipig atherosclerosis model induced by high-fat and high-sugar diet [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2022, 30(3): 299-308.

Doi:10. 3969/j. issn. 1005-4847. 2022. 03. 001

高脂高糖饮食诱导五指山小型猪动脉粥样硬化模型肠道菌群的变化

沈利叶,潘永明,徐雁云,郁晨,黄俊杰,马全鑫,陈民利*

(浙江中医药大学动物实验研究中心/比较医学研究所,杭州 310053)

【摘要】 目的 观察高脂高糖饮食致五指山小型猪动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)模型肠道菌群的变化。**方法** 雄性五指山小型猪 12 只,按体重分为两组,即正常对照(NC)组和模型(AS)组,每组 6 只。NC 组饲喂正常饲料,AS 组饲喂高脂高糖饲料,连续饮食 24 周后,前腔静脉采血测定糖脂代谢等生化指标,同时进行葡萄糖耐量试验。实验结束后行安死术,观察体内脂肪沉积,并取主动脉血管行苏丹 IV 染色和腹主动脉血管行 HE 染色分别观察脂质沉积和组织病理学变化。取盲肠内容物进行 16S rDNA 测序分析肠道菌群的变化。**结果** 与 NC 组比较,AS 模型组血清总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)、血糖(GLU)、果糖胺(FMN)菌明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),体重和体内脂肪沉积亦显著增加($P < 0.01$),同时 AS 模型组主动脉血管明显脂质沉积和 AS 病变。肠道菌群测序分析显示,与 NC 组相比,AS 模型组肠道菌群 α -多样性显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。在门水平上,AS 模型组拟杆菌门和放线菌门明显下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),变形菌门和厚壁菌门/拟杆菌门比值均显著升高($P < 0.05$)。在属水平上,AS 模型组黑斯伯利亚菌属(*Hespellia*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、毛螺菌属(*Lachnospiraceae _incertae _sedis*)、假丁酸弧菌属(*Pseudobutyrvibrio*)、巴恩斯氏菌属(*Barnesiella*)等 17 个菌属的相对丰度显著下降($P < 0.05$, $P < 0.01$),沙壤土杆菌属(*Ramlibacter*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingorhabdus*)、污水管杆菌属(*Cloacibacillus*)、草酸杆菌属(*Oxalobacter*)、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、新鞘脂菌属(*Novosphingobium*)等 11 个菌属的相对丰度显著上升($P < 0.05$)。功能预测分析显示,脂多糖生物合成、脂多糖生物合成蛋白途径、初级胆汁酸的生物合成、花生四烯酸代谢等多条途径可能参与 AS 的形成。相关分析显示,TC、内中膜厚度、脂质沉积、果糖胺与草酸杆菌属、鞘氨醇单胞菌属、污水管杆菌属、梭菌属、瘤胃球菌属等 14 个菌属存在关联。**结论** 高脂高糖饮食诱导的五指山小型猪 AS 模型具有肥胖、糖脂代谢紊乱和明显的 AS 病变的特点,其发生可能与肠道菌群失调有关。

【关键词】 肠道菌群;高脂高糖饮食;动脉粥样硬化模型;五指山小型猪

【中图分类号】 Q95-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1005-4847(2022)03-0299-10

Changes in intestinal flora in a Wuzhishan minipig atherosclerosis model induced by high-fat and high-sugar diet

SHEN Liye, PAN Yongming, XU Yanyun, YU Chen, HUANG Junjie, MA Quanxing, CHEN Minli*

(Laboratory Animal Research Center/Institute of Comparative Medicine, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China)

Corresponding author: CHEN Minli. E-mail: cml991@zcmu.edu.cn

[基金项目] 国家自然科学基金面上项目(31970514)。
Funded by the National Natural Science Foundation of China(31970514).

[作者简介] 沈利叶(1996—)女,在读硕士研究生,研究方向:实验动物与比较药理。Email:17805053349@163.com

[通信作者] 陈民利(1963—),女,教授,研究方向:实验动物与比较医学。Email:cml991@zcmu.edu.cn

[Abstract] Objective To observe changes in the intestinal flora in a Wuzhishan minipig model of atherosclerosis (AS) induced by a high-fat/high-sugar diet. **Methods** Twelve male Wuzhishan minipigs were divided into normal control (NC) and AS model groups according to body weight ($n = 6$ per group). The NC group was fed a normal diet and the AS model group was fed a high-fat/high-sugar diet. After 24 weeks of continuous diet, blood samples were taken from the anterior vena cava to determine biochemical indexes, including glucolipid metabolism, and a glucose to tolerance test was also performed. At the end of the experiment, the minipigs were euthanized and body fat deposition was observed. The aortic vessels were stained with Sudan IV and the abdominal aortic vessels were stained with hematoxylin and eosin to observe lipid deposition and histopathological changes, respectively. The cecal contents were used for 16S rDNA sequencing to analyze changes in the intestinal flora. **Results** Serum total cholesterol, high-density lipoprotein cholesterol, low-density lipoprotein cholesterol, blood glucose, and fructosamine levels were all significantly higher in the AS model group compared with the NC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). Body weight and body fat deposition were also significantly higher in the AS model group ($P < 0.01$). The aortic vessels showed increased lipid deposition and AS lesions. DNA sequencing analysis showed significantly lower intestinal flora α -diversity in the AS model group compared with the NC group ($P < 0.05$, $P < 0.01$). At the phylum level, the phyla Bacteroidetes and Actinomycetes were significantly reduced in the AS model group ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the phylum Proteobacteria and the Firmicutes/Bacteroidetes ratio were significantly increased ($P < 0.05$). At the genus level, the relative abundances of 17 genera, including *Hespellia*, *Ruminococcus*, *Lachnospiracea_incertae_sedis*, *Pseudobutyrvibrio*, and *Barnesiella*, were significantly decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the relative abundances of 11 genera, including *Ramlibacter*, *Sphingorhabdus*, *Cloacibacillus*, *Oxalobacter*, *Sphingomonas*, and *Novosphingobium*, were significantly increased ($P < 0.05$). Functional prediction analysis showed that multiple pathways such as lipopolysaccharide biosynthesis, lipopolysaccharide biosynthesis proteins, primary bile acid biosynthesis, and arachidonic acid metabolism may participate in the formation of AS. Correlation analysis showed that total cholesterol, intima media thickness, lipid deposition, and fructosamine were associated with 14 genera, including *Oxalobacter*, *Sphingomonas*, *Cloacibacillus*, *Clostridiales_unclassified*, and *Ruminococcus*. **Conclusions** High-fat/high sugar diet-induced AS in Wuzhishan minipigs is characterized by obesity, disturbed glucolipid metabolism, and obvious AS lesions, possibly related to dysbiosis of the intestinal flora.

[Keywords] intestinal flora; high-fat and high-sugar diet; atherosclerosis model; Wuzhishan minipig
Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

心血管疾病是全世界人口死亡的主要原因^[1], 据统计我国心血管疾病死亡率一直占据首位^[2], 并呈逐年上升趋势, 给我国的医疗卫生行业带来了巨大的经济负担^[3]。动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是心血管疾病的主要病理基础^[4], 也被认为是一种慢性代谢综合征, 其特征是由血管内皮损伤引起的轻度血管炎造成的长期代谢紊乱。大量的研究已证实, AS 的发生与饮食、血脂异常、糖尿病、高血压各种代谢紊乱性疾病等环境因素有关, 而饮食是引起 AS 的重要环境因素。高脂高糖饮食是目前常见的一种生活方式, 研究发现高脂饮食能够改变肠道中定植的微生物, 从而导致肠道通透性的增加和菌群代谢产物水平的变化, 激活体内多条通路^[5], 加重肥胖与 AS 的发生发展^[6]。

小型猪与人的各器官系统不仅在形态结构上相似, 而且生理学功能也基本相同, 特别是心血管系统与胃肠道系统, 且 AS 病变与人类 AS 病变的分布特点相一致, 并具有人类成熟斑块的特点^[7]。五

指山小型猪是我国的特色小型猪品种。前期研究发现五指山小型猪在饲喂高脂 6 个月后, 会发生明显的脂质代谢异常和炎症反应, 主动脉病理可见明显的 AS 斑块^[8], 但对肠道菌群的变化尚不清楚。为此, 本研究采用高脂高糖饮食诱导五指山小型猪 AS 模型, 观察五指山小型猪 AS 模型肠道菌群的变化, 为五指山小型猪在 AS 研究中的应用提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物

12 只 3 ~ 4 月龄普通级雄性五指山小型猪, 体重 12 ~ 15 kg, 购买于五指山小型猪购自海南省农业科学院畜牧兽医研究所【SCXK(琼)2014-0006】。所有小型猪饲养于浙江中医药大学动物实验研究中心普通环境设施中【SYXK(浙)2018-0012】。室温 (22 ± 2) °C, 相对湿度 40% ~ 70%, 光照黑暗交替 12 h/12 h。所有饲养和操作均经过浙江中医药大

学实验动物管理与伦理委员会审查并批准(批准号:ZSLL-2016-0031)。

1.1.2 主要试剂与仪器

苏丹 IV 粉末(美国 Sigma 公司);曙红 Y(国药集团化学试剂有限公司);苏木精(上海伯奥生物科技有限公司);总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(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)、葡萄糖(glucose, GLU)、果糖胺(FMN, fructosamine)等生化试剂盒均购自宁波美康生物科技股份有限公司。RM2245 半自动石蜡切片机(德国徕卡公司);Autostainer XL 自动染色机(德国徕卡公司);2.0 RS Nana Zoomer 数字切片扫描设备(日本滨松公司);日立 3100 全自动生化分析仪(日本日立公司)。

1.2 方法

1.2.1 AS 模型的建立

五指山小型猪经适应性饲养 8 周后,根据体重随机分成 2 组,即正常对照(normal control, NC)组和 AS 组,每组 6 只。NC 组饲喂基础饲料,AS 组饲喂高脂高糖(high fat/sugar diet, HFS)饲料,连续饲喂 24 周,HFS 饲料配方为 1.5%胆固醇、15.0%起酥油、10.0%蛋黄粉、20.0%果糖、1.0%食盐和 52.5%基础饲料,每组饲喂量为体重的 2.5%,分成两等份,上下午各 1 次,每 2 周重新称重计算饲喂量。

1.2.2 生化检测

造模 24 周后,禁食不禁水 16 h,取前腔静脉血 5 mL,3000 rpm,离心 10 min,分离血清,使用日立 3100 全自动生化分析仪检测血清 TC、TG、HDL-C、LDL-C、GLU、FMN 等生化指标。同时进行糖耐量试验,耳缘静脉注射 1.2 mL/kg 50%葡萄糖注射液,在 1 ~ 2 min 内注射完毕,检测注射后 0、5、15、30、60、120 min 的血糖值,计算糖耐量曲线下面积(area under glucose tolerance curve, U-GLU)。

1.2.3 体重与体脂观察

造模 24 周后,禁食不禁水 16 h,称重,行安乐死,取腹部脂肪、大网膜脂肪、肠系膜脂肪、睾丸周边脂肪进行称重。

1.2.4 组织病理观察

动物安乐死后取主动脉弓至腹主动脉髂部的主动脉血管,经 4%中性甲醛固定 24 h 后,用苏丹 IV 染液染色 15 min 后,拍照后用 Image-pro Plus 6.0 软

件测定主动脉的脂质沉积率(脂质沉积率=红染面积/血管总面积 $\times 100\%$)。另取部分腹主动脉血管组织经 10%中性甲醛固定 24 h 后,制备 4 μm 石蜡切片,进行 HE 染色后用 NDP.view 2 软件观察腹主动脉血管组织的病变情况,并计算腹主动脉内中膜厚度(intima-media thickness, IMT)。

1.2.5 16S rDNA 测序及生物信息学分析

每组随机取 3 只动物的盲肠内容物进行 16S rDNA 测序,按照 Stool DNA Kit(200)试剂盒说明从五指山小型猪盲肠内容物中提取微生物总 DNA。琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量,紫外分光光度计进行 DNA 定量。随后使用引物扩增 16S rDNA 基因的可变区(V3 和 V4)该部分及 16S rDNA 测序交由杭州联川生物科技有限公司完成。对获得的原始数据进行预处理,质量优化,舍弃低质量序列,连接序列,过滤连接的序列,获得最终用于分析的序列。使用 Versearch v2.3.4 软件进行过滤,将相似度大于 97%的操作分类单元(operational taxonomic units, OTU)进行分类,进一步使用核糖体数据库项目分类器给每一个 OTU 选择一条代表序列,最终得到各 OTU 的代表序列和对应丰度。在 Microbiomeanalyst 网站上分析菌群 α -多样性和 β -多样性,在门和属水平上对比两个组的差异,找出具有显著性差异的微生物类型,默认阈值为 0.05。在联川生物云平台上使用 LEfSe(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)分析两个组之间差异丰富的微生物分类群,使用联川 PICRUST2 功能分析预测微生物基因功能,然后使用京都基因和基因组百科全书(Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)数据库对预测的基因及其功能进行注释。

1.3 统计学分析

所有数据均采用平均值 $\pm$ 标准误差($\bar{x} \pm s\bar{x}$)表示,采用 GraphPad prism 8.0 软件统计处理,组间比较采用独立样本 t 检验, $P < 0.05$ 有统计学意义。肠道菌群数据组间比较使用 STAMP(statistical analysis of metagenomic profiles)软件分析,采用 Welch's t -test 检验, $P < 0.05$ 具有统计学意义。联川云工具进行 LEfSe 分析和 PICRUST2 功能富集以及相关聚类分析。

2 结果

2.1 血脂变化

与 NC 组相比,AS 组血清 TC、HDL-C 和 LDL-C

均显著升高 ($P < 0.01$), 但 TG 差异不显著 ($P > 0.05$) (见图 1)。

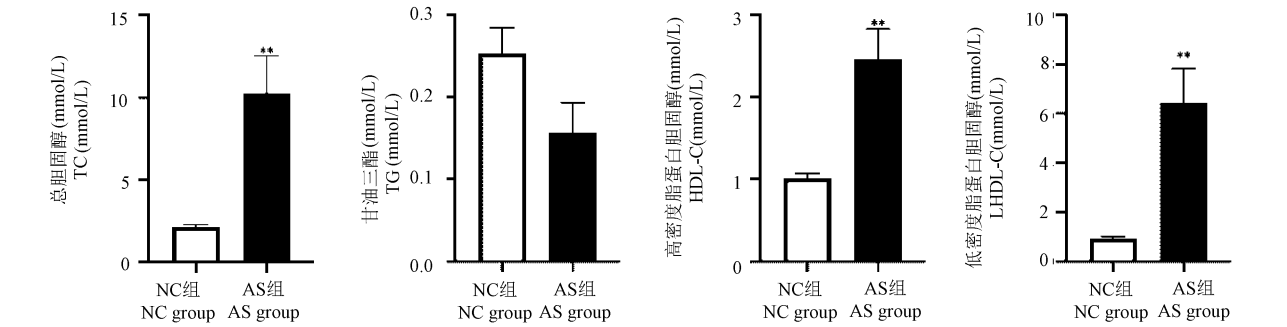
2.2 血糖、果糖胺与糖耐量的变化

与 NC 组比, AS 组 GLU 和 FMN 均显著上升 ($P < 0.05, P < 0.01$); 糖耐量试验结果显示, AS 模型组给糖后的血糖曲线均高于 NC 组, 在 15、60、90

min 时具有显著性差异, 且 AS 模型组 G-AUC 显著高于 NC 组, ($P < 0.05$) (见图 2)。

2.3 体重和体脂分布的变化

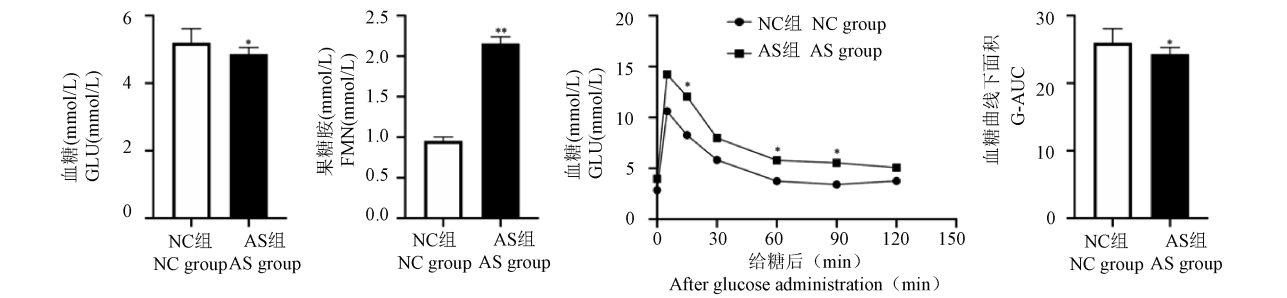
与 NC 组相比, AS 组小型猪体重、腹部脂肪、大网膜脂肪、肠系膜脂肪、睾丸周边脂肪和总脂肪重量均显著增加 ($P < 0.01$) (见表 1)。



注:与 NC 组相比, ** $P < 0.01$ 。
图 1 各组血脂水平的变化

Note. Compared with NC group, ** $P < 0.01$.

Figure 1 Changes of blood lipid levels in each group



注:与 NC 组相比, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。(下图/表同)
图 2 各组血糖、果糖胺与糖耐量的变化

Note. Compared with NC group, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$. (The same in the following figures and tables)

Figure 2 Changes of blood glucose, fructose amine and glucose tolerance in each group

表 1 各组体重和体脂分布的变化

Table 1 Changes of body weight and body fat distribution in each group

组别 Groups	体重(kg) Weight(kg)	体内脂肪沉积情况(g) Body fat deposition (g)				
		腹部脂肪 Abdominal fat	大网膜脂肪 Omentum fat	肠系膜脂肪 Mesenteric fat	睾丸周边脂肪 Gonadal fat	总脂肪 Total fat
NC 组 NC group	22. 13 ± 1. 57	77. 56 ± 11. 89	12. 02 ± 2. 02	2. 18 ± 0. 42	5. 89 ± 0. 43	97. 65 ± 14. 35
AS 组 AS group	41. 35 ± 1. 80 **	675. 12 ± 123. 53 **	85. 90 ± 13. 37 **	23. 76 ± 3. 95 **	23. 57 ± 3. 13 **	808. 35 ± 137. 82 **

2.4 主动脉血管脂质沉积的变化

主动脉血管苏丹Ⅳ染色显示, NC 组血管内皮无明显红染脂质沉积, 无突起; 而 AS 组主动脉血管内皮上有明显红染脂质沉积与脂质条纹, 且脂质沉

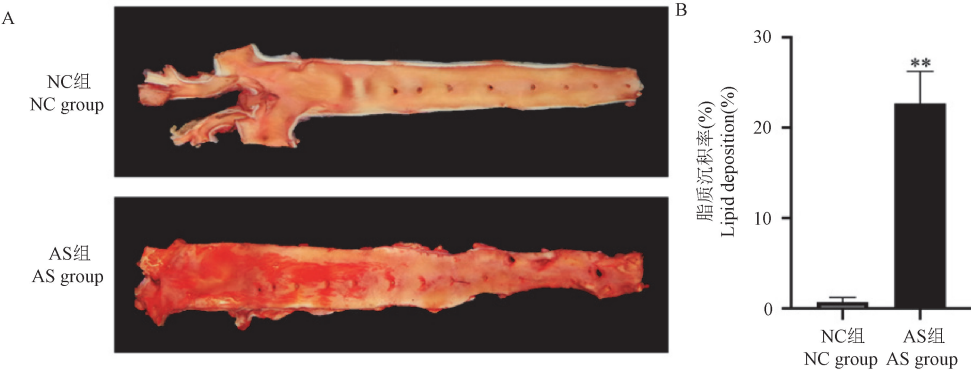
积处呈斑块状突起。定量分析结果显示, AS 组主动脉血管脂质沉积率显著增加 ($P < 0.01$) (见图 3)。

2.5 AS 模型腹主动脉血管组织病理学观察

HE 染色结果显示, NC 组腹主动脉血管结构

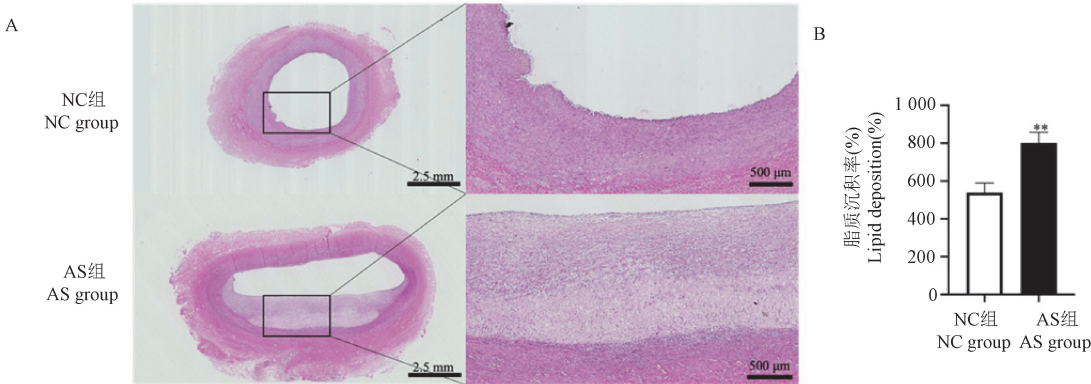
完整清晰,内膜内皮细胞整齐排列,未见有突起斑块,中膜外膜平滑肌细胞排列紧密,弹力纤维层结构完整,未见明显异常。AS 组腹主动脉血管结构破坏,内膜内皮细胞突起,含大量泡沫细胞及炎性

细胞,增生明显,外膜平滑肌细胞与弹力纤维层排列松散。定量分析结果显示,与 NC 组比,AS 组腹主动脉血管 IMT 显著增加($P < 0.01$) (见图 4)。



注:A:主动脉血管苏丹IV染色代表图;B:脂质沉积率。
图 3 各组主动脉血管脂质沉积的变化
Note. A. The representative picture of Sudan IV staining of aortic vessels. B. Lipid deposition rate.

Figure 3 Changes of lipid deposition in aortic vessels in each group



注:A:腹主动脉血管 HE 染色代表图,右图为左图黑框的 40 倍放大图;B:内中膜厚度。
图 4 各组腹主动脉血管组织病理学观察
Note. A. The representative picture of HE staining of abdominal aortic vessels, and the right picture is an enlarged 40-fold of the black frame of the left picture. B. Intima-media thickness.

Figure 4 Histopathological observation of abdominal aorta in each group

2.6 肠道菌群的分析结果

2.6.1 多样性分析

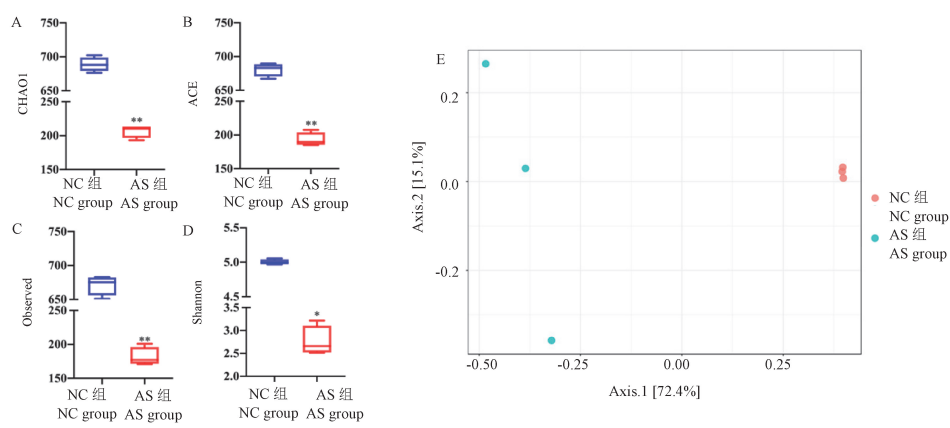
α -多样性是体现体内肠道微生物物种的个数(丰富度)以及每个物种的数量及分布(均匀度),常见指标为 Chao1、ACE、Observed、Shannon。Chao1 是 C 用 Chao1 算法估计样本 OTU 数量的指数,可以度量物种类别多样性。ACE 也是用来估计群落种 OTU 数目的指数,与 Chao1 的算法不同,这两个指数可以显示肠道微生物群落的丰富度。Observed 描述的是群落中实际的 OTU 的个数。Shannon 可以描述群落物种的丰富度和均匀度,相同物种丰富度的

情况下,群落中的物种均匀度越高,则多样性越大。与 NC 组相比,AS 组的 Chao1、ACE、Observed、Shannon 指数均显著降低($P < 0.05$, $P < 0.01$) (图 5A, 5B, 5C, 5D)。 β -多样性分析是对不同样本之间的微生物群落构成进行比较分析。将各样本在属水平下,基于 Bray-Curtis index 距离进行 PCoA 分析。以第一主坐标 (Axis1) 为基准,NC 组与 AS 组相距较远,表明长期的高脂高糖饮食能够使五指山小型猪 AS 模型的肠道菌群发生 (图 5E)。

2.6.2 从门水平上分析 AS 模型小型猪肠道菌群组成变化

将样本进行 OTU 聚类分析,在门的水平上对物种进行分类,五指山小型猪的盲肠内容物中的菌群主要包括厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroidetes)、螺旋体菌门 (Spirochaetes)、变形杆菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteria)、广古菌门 (Euryarchaeota)、疣微菌门 (Verrucomicrobia)、软壁菌门 (Tenericutes)、互养菌门 (Synergistetes)、纤维杆菌门

(Fibrobacteres)、梭杆菌门 (Fusobacteria) 等 11 个门(图 6A)。NC 组的优势菌群为厚壁菌门与拟杆菌门,占有菌群的 90.4%,AS 组的优势菌群为厚壁菌门、变形杆菌门和拟杆菌门,占总菌群的 97.2%。与 NC 组比,AS 组拟杆菌门和放线菌门丰度均明显降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),变形菌门丰度则明显升高($P < 0.05$) (图 6C);同时厚壁菌门/拟杆菌门比值亦显著升高($P < 0.05$) (图 6B)。

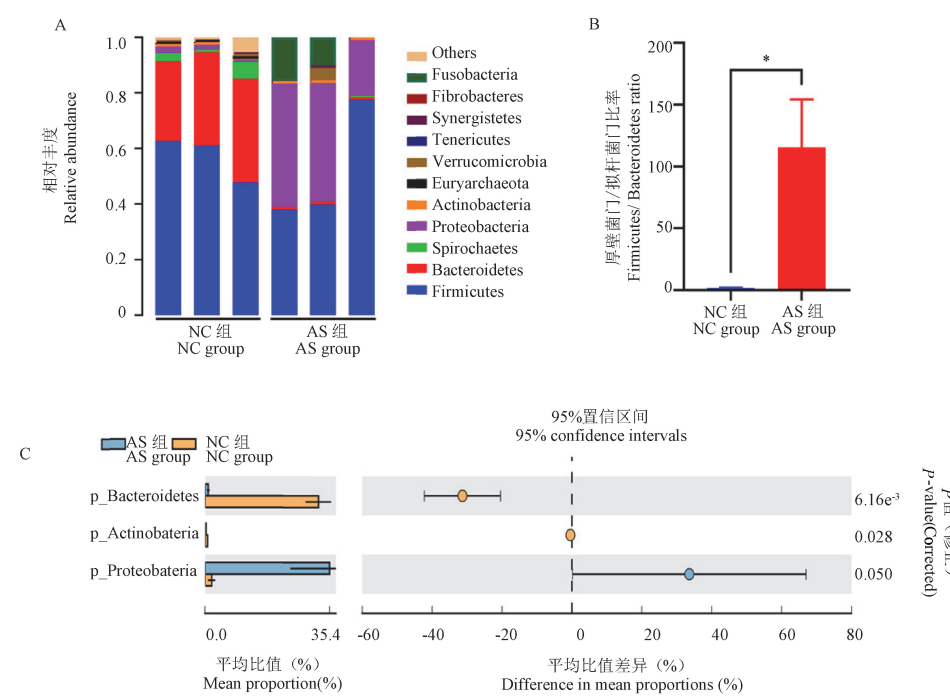


注: A: CHAO1; B: ACE; C: Observed; D: Shannon; E: β -多样性。

图 5 各组肠道菌群多样性分析

Note. A. CHAO1. B. ACE. C. Observed. D. Shannon. E. β -diversity.

Figure 5 Analysis of intestinal flora diversity in each group



注: A: 门水平各菌群相对丰度柱状图; B: 厚壁菌门/拟杆菌门比值; C: 差异菌门。

图 6 各组肠道菌群在门水平上的变化

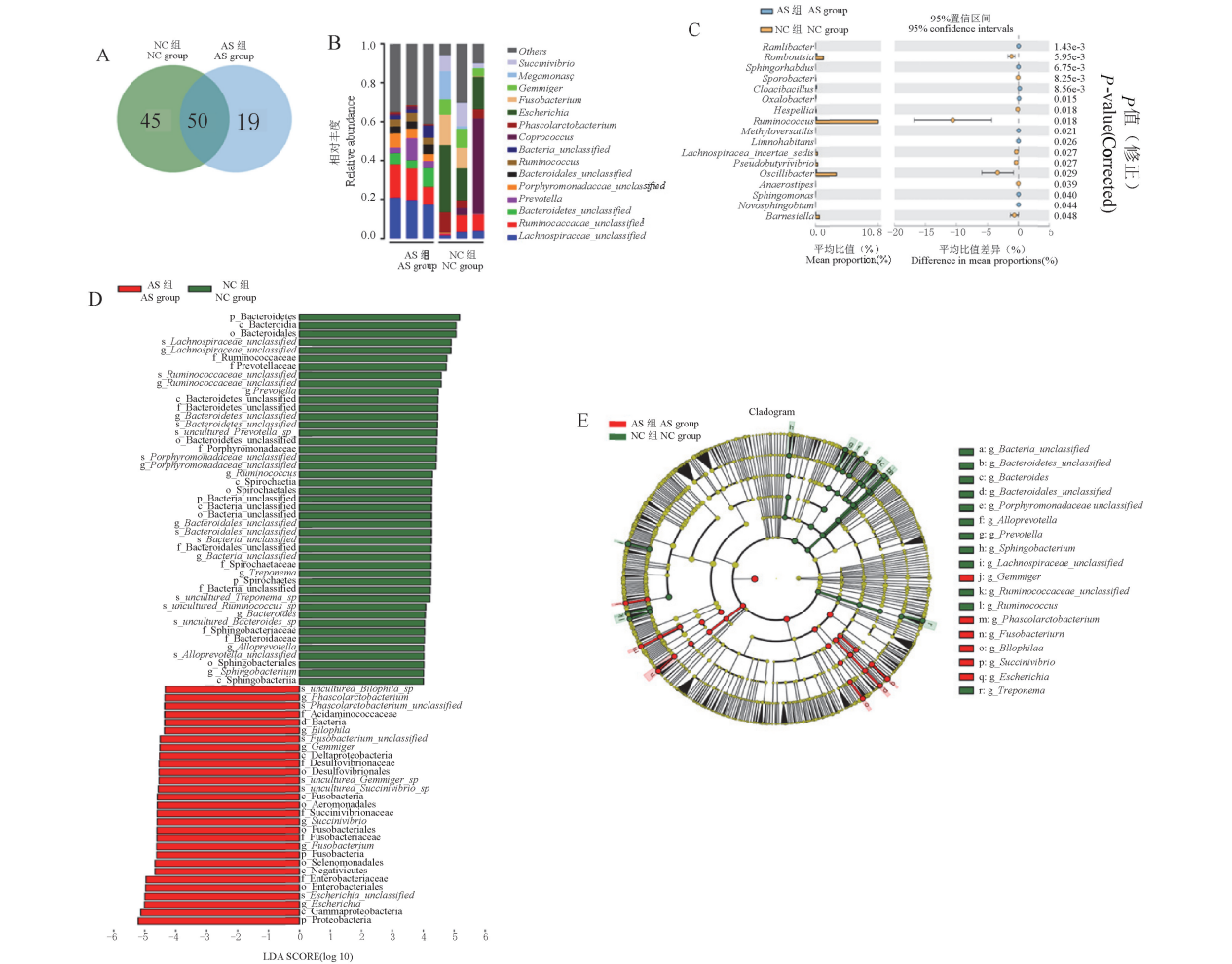
Note. A. Histogram of relative abundance of intestinal flora at phylum level. B. Firmicutes/Bacteroidetes ratio. C. The differential phylum.

Figure 6 Changes of intestinal flora at phylum level in each group

2. 6. 3 从属水平上分析 AS 模型小型猪的肠道菌群组成变化

NC 组与 AS 组肠道菌群种类在属水平上分别发现 95 个和 69 个属,其中普氏菌属(*Prevotella*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、粪球菌属(*Coprococcus*)、考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)、埃希氏菌属(*Escherichia*)为前 15 个丰度较高的菌属。与 NC 组相比,AS 组黑斯伯利亚属(*Hespellia*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、毛螺菌属(*Lachnospiraceae_incertae_sedis*)、假丁酸弧菌属(*Pseudobutyrvibrio*)、颤杆菌属(*Oscillibacter*)、巴恩斯氏菌属(*Barnesiella*)等 17 个

菌属的相对丰度显著下降($P < 0.05, P < 0.01$),沙壤土杆菌属(*Ramlibacter*)、鞘氨醇杆菌属(*Sphingorhabdus*)、污水管杆菌属(*Cloacibacillus*)、草酸杆菌(*Oxalobacter*)、鞘脂单胞菌属(*Sphingomonas*)、新脂醇菌属(*Novosphingobium*)等 11 个菌属的相对丰度显著上升($P < 0.05$)。LEfSe 分析发现普氏菌属(*Prevotella*)、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、考拉杆菌属(*Phascolarctobacterium*)、梭杆菌属(*Fusobacterium*)和芽绿菌属(*Gemmiger*)等这些菌属在 AS 发生过程中产生了影响(见图 7)。



注:A:NC 组与 AS 组比较韦恩图;B:前 15 个菌属的相对丰度;C:属水平菌群差异图;D:LDA 条形图;E:属水平 LEfSe 图。
图 7 各组肠道菌群在属水平的变化
Note. A. Venn diagram of NC group and AS group. B. The relative abundance of the top 15 genera. C. Differential genera. D. The LDA bar chart. E. LEfSe diagram.

Figure 7 Changes of intestinal flora at genus level in each group

2. 6. 4 肠道菌群功能预测及与 AS 相关指标的关联分析

PICRUSt2 功能分析结果显示,与 NC 组相比,

AS 组肠道菌群的分泌系统、多糖的生物合成和代谢、脂多糖(LPS)的生物合成、脂多糖生物合成蛋白等 15 条途径丰度显著增加($P < 0.05$),而谷胱甘肽

沉积率、果糖胺明显正相关,污水管杆菌属、未分类的梭菌属、瘤胃球菌属、锥杆菌属、盐生孢杆菌属、毛螺菌属与 TC、IMT、脂质沉积、果糖胺明显相关,巴恩斯氏菌属与 IMT、脂质沉积、果糖胺呈负相关;未分类的厚壁菌属与脂质沉积、果糖胺呈负相关,黑斯伯利亚属、梭菌属和未分类的毛螺菌属与果糖胺呈负相关(见图 8B)。

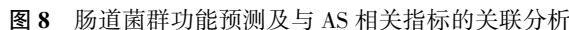


Figure 8 Functional prediction of intestinal flora and correlation analysis with AS related indicators

指山小型猪的肠道菌群多样性明显降低,表明肠道菌群失衡。

正常人群的肠道优势菌门为厚壁菌门和拟杆菌门,其次是放线菌门与疣微菌门^[12],这与五指山小型猪的肠道菌群总体特征十分相似。拟杆菌门是人类及小型猪体内的优势菌种,拟杆菌能够降解食物中的大分子碳水化合物,降解成葡萄糖和其他易消化的小分子糖类,从而提高食物的利用率。拟杆菌是体内维持体内肠道微生物稳态的重要菌群^[10],当体内拟杆菌门特殊物种发生变化,它们在营养消化和能量吸收等代谢功能也会发生变化,可能会导致肥胖、糖尿病、动脉粥样硬化和神经退行性疾病等炎症性疾病^[13]。在肥胖人群中,厚壁菌门与拟杆菌门的比值上升,肥胖人群的心血管患病率也高于正常人群,冠心病患者的拟杆菌门也存在显著下降^[14]。同样,在高脂高糖饮食诱导的 AS 模型猪肠道菌群的拟杆菌门显著降低,厚壁菌门与拟杆菌门的比值显著上升,提示高脂高糖饮食诱导五指

山小型猪出现的肥胖、糖脂代谢紊乱和 AS 的形成,可能与拟杆菌门丰度减少和肠道菌群失调有关。放线菌门虽在肠道微生物中所占比例较小,但放线菌门是维持肠道屏障稳态的主要菌门之一,它还能参与调节肠道通透性、免疫系统、新陈代谢和肠脑轴^[15]。在本研究也发现 AS 模型猪的放线菌门显著下降,提示可能存在肠道通透性增加,肠道屏障稳态被破坏的现象。另外,健康的哺乳动物肠道含有少量变形菌门的细菌,当这些细菌的数量较少时,这些细菌表现为良性,但是当数量增加并改变肠道微生物结构,会成为引发炎症的微生物^[16]。这与本研究中观察到五指山小型猪 AS 模型中变形菌门丰度上升相一致,表明高脂高糖饮食会引起五指山小型猪肠道菌群结构改变,影响肠道通透性和肠屏障功能,促发脂质紊乱和炎症,加速 AS 形成。

肠道菌群失衡可引起肠粘膜通透性的增加,特别是革兰氏阴性菌外膜上的脂多糖(LPS)可进入血液循环,引发慢性炎症与血栓形成,促进 AS 的发生;另外,LPS 也可与 Toll 样受体 4 结合,促进脂蛋白相关受体的表达,摄取脂质并影响胆固醇转运,加剧泡沫细胞生成和 AS 的发生发展。在本研究中,观察到五指山小型猪 AS 模型中鞘氨醇杆菌属、梭状菌属、鞘氨醇单胞菌属、新鞘氨醇菌属等革兰氏阴性菌丰度的增加,能产生低毒的 LPS,且与菌群功能预测到 LPS 的生物合成和 LPS 生物合成蛋白途径丰度增加相一致,推测五指山小型猪 AS 的发生发展可能与肠道菌群失调引发的 LPS 慢性低度炎症有关。

进一步关联分析显示,TC、内中膜厚度、脂质沉积、果糖胺与草酸杆菌属、鞘氨醇单胞菌、污水管杆菌属、梭菌属、瘤胃球菌属等 14 个菌属存在关联。Briand 等^[17]研究发现,在高胆固醇血症金黄地鼠中 *Oxalobacter* 菌属与总胆固醇水平明显相关,这与本研究一致。*Sphingomonas* 的 DNA 被发现存在于 AS 斑块与血清中,该菌可产生脂化蛋白参与体内的免疫反应^[18],本研究相关分析也显示该菌与 TC、IMT 和脂质沉积关联,推测该菌可能参与血管中斑块的生成与发展。短波单胞菌属普遍存在于土壤和水中,被认为无处不在,有报告发现该菌在心内膜炎的患者血液中存在^[19],推测该菌能够激发机体免疫反应,参与促炎反应,从而促进脂质沉积和斑块的发展。瘤胃球菌属被认为与肥胖等代谢性疾病相关,在肥胖患者中与体重和血脂呈明显正相关^[20],

且该菌属与机体肥胖、胃肠道炎症、血脂异常、胆汁酸代谢以及 AS 斑块发生均相关,同时瘤胃球菌属能够通过降解纤维素产生短链脂肪酸,调节机体免疫反应和血脂代谢^[21-22],影响 AS 斑块发生,同时该菌属能够产生炎性多糖,诱导 Toll 样受体 4 产生肿瘤坏死因子- α (TNF- α),而 TNF- α 在 AS 过程中发挥促炎作用^[23]。相关性分析结果发现,瘤胃球菌属与 TC、IMT、脂质沉积和果糖胺明显相关,提示瘤胃球菌属在五指山小型猪 AS 模型中可能通过产生短链脂肪酸和炎性多糖参与体内糖脂代谢和 AS 斑块形成。最近,毛螺菌属等菌群被发现冠状动脉粥样硬化患者中丰度降低,且这些患者的脂多糖生物合成蛋白、脂多糖生物合成、蛋白质折叠等途径显著上升^[24],同时该菌还被发现与血糖水平相关联,并能够通过产生短链脂肪酸进而调节机体的免疫炎症反应^[25]。同样,在五指山小型猪 AS 模型中毛螺菌属丰度下降,提示该菌可能参与 AS 进程中的炎症反应。可见,通过这些菌属与 AS 相关指标的关联分析,为进一步寻找 AS 发生的关键靶向菌群提供了新的方向,同时也表明了五指山小型猪 AS 的发生与肠道菌群失调有关。

综上所述,高脂高糖饮食诱导的五指山小型猪 AS 模型具有肥胖、糖脂代谢紊乱和明显的 AS 病变的特点,其发生可能与肠道菌群失调有关。

参 考 文 献 (References)

- [1] Joseph P, Leong D, McKee M, et al. Reducing the global Burden of cardiovascular disease, part 1: the epidemiology and risk factors [J]. Circ Res, 2017, 121(6): 677-694.
- [2] 《中国心血管健康与疾病报告 2020》编写组. 《中国心血管健康与疾病报告 2020》要点解读 [J]. 中国心血管杂志, 2021, 26: 209-218.
The Writing Committee of the Report on Cardiovascular Health and Diseases in China. Interpretation of the main points of China Cardiovascular Health and Disease report 2020 [J]. Chin J Cardiovase Med, 2021, 26(3): 209-218.
- [3] Liu S, Li Y, Zeng X, 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.
- [4] Ambrose JA, Srikanth S. Vulnerable plaques and patients: improving prediction of future coronary events [J]. Am J Med, 2010, 123(1): 10-16.
- [5] Leigh SJ, Morris MJ. Diet, inflammation and the gut microbiome: mechanisms for obesity-associated cognitive impairment [J]. Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis, 2020, 1866(6): 165767.
- [6] Zhu YH, Xian XM, Wang ZZ, et al. Research progress on the relationship between atherosclerosis and inflammation [J].

- Biomolecules, 2018, 8(3): 80.
- [7] 陈民利. 西藏小型猪和五指山小型猪的生理特点及其动脉粥样硬化的发病特征比较研究 [J]. 实验动物与比较医学, 2018, 38(5): 325–328.
- Chen ML. Comparative study on physiological characteristics and atherosclerotic characteristics of Tibetan miniature pig and Wuzhishan minipig [J]. Exp Anim Comp Med, 2018, 38(5): 325–328.
- [8] 郁晨, 刘志华, 潘永明, 等. 高脂环境下五指山小型猪和西藏小型猪冠心病相关血脂和炎症易感基因的表达 [J]. 中国比较医学杂志, 2019, 29(5): 1–10.
- Yu C, Liu ZH, Pan YM, et al. Expression of coronary heart disease-related blood lipids and inflammatory susceptibility genes in Wuzhishan minipigs and Tibetan minipigs under high fat environment [J]. Chin J Comp Med, 2019, 29(5): 1–10.
- [9] Zabek A, Paslawski R, Paslawska U, et al. The influence of different diets on metabolism and atherosclerosis processes-A porcine model: Blood serum, urine and tissues 1H NMR metabolomics targeted analysis [J]. PLoS One, 2017, 12(10): e0184798.
- [10] Lyu M, Wang YF, Fan GW, et al. Balancing herbal medicine and functional food for prevention and treatment of cardiometabolic diseases through modulating gut microbiota [J]. Front Microbiol, 2017, 8: 2146.
- [11] Brown JM, Hazen SL. Microbial modulation of cardiovascular disease [J]. Nat Rev Microbiol, 2018, 16(3): 171–181.
- [12] Li DY, Tang WHW. Gut microbiota and atherosclerosis [J]. Curr Atheroscler Rep, 2017, 19(10): 39.
- [13] Gibiino G, Lopetuso LR, Scaldaferri F, et al. Exploring Bacteroidetes: Metabolic key points and immunological tricks of our gut commensals [J]. Dig Liver Dis, 2018, 50(7): 635–639.
- [14] Liu H, Chen X, Hu X, et al. Alterations in the gut microbiome and metabolism with coronary artery disease severity [J]. Microbiome, 2019, 7(1): 68.
- [15] Binda C, Lopetuso LR, Rizzatti G, et al. Actinobacteria: A relevant minority for the maintenance of gut homeostasis [J]. Dig Liver Dis, 2018, 50(5): 421–428.
- [16] Rizzatti G, Lopetuso LR, Gibiino G, et al. Proteobacteria: a common factor in human diseases [J]. Biomed Res Int, 2017, 2017: 9351507.
- [17] Briand F, Sulpice T, Giammarinaro P, et al. Saccharomyces boulardii CNCM I-745 changes lipidemic profile and gut microbiota in a hamster hypercholesterolemic model [J]. Benef Microbes, 2019, 10(5): 555–567.
- [18] Tanaka A, Leung PS, Gershwin ME. Environmental basis of primary biliary cholangitis [J]. Exp Biol Med (Maywood), 2018, 243(2): 184–189.
- [19] Estrela AB, Abraham WR. Brevundimonas vancouveriensis sp. nov., isolated from blood of a patient with endocarditis [J]. Int J Syst Evol Microbiol, 2010, 60(9): 2129–2134.
- [20] Zeng Q, Li DF, He Y, et al. Discrepant gut microbiota markers for the classification of obesity-related metabolic abnormalities [J]. Sci Rep, 2019, 9(1): 13424.
- [21] Kurilshikov A, van den Munckhof ICL, Chen L, et al. Gut microbial associations to plasma metabolites linked to cardiovascular phenotypes and risk [J]. Circ Res, 2019, 124(12): 1808–1820.
- [22] Moon YH, Iakiviak M, Bauer S, et al. Biochemical analyses of multiple endoxylanases from the rumen bacterium Ruminococcus albus 8 and their synergistic activities with accessory hemicellulose-degrading enzymes [J]. Appl Environ Microbiol, 2011, 77(15): 5157–5169.
- [23] Toya T, Corban MT, Marrietta E, et al. Coronary artery disease is associated with an altered gut microbiome composition [J]. PLoS One, 2020, 15(1): e0227147.
- [24] Han Y, Gong Z, Sun G, et al. Dysbiosis of gut microbiota in patients with acute myocardial infarction [J]. Front Microbiol, 2021, 12: 680101.
- [25] Enqi W, Huanhu Z, Ritu W, et al. Age-stratified comparative analysis of the differences of gut microbiota associated with blood glucose level [J]. BMC Microbiol, 2019, 19(1): 111.

[收稿日期] 2021-09-25