

陈枝凡,陈钰璘,聂莎,等.瓜蒌薤白白酒汤调节肠道菌群及其代谢物改善小鼠动脉粥样硬化的实验研究[J].中国比较医学杂志,2024,34(7):10-19.

Chen ZF, Chen YL, Nie S, et al. Mechanism of Gualou Xiebai Baijiu Decoction for regulating the intestinal microflora and its metabolites to improve atherosclerosis in mice [J]. Chin J Comp Med, 2024, 34(7): 10-19.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2024.07.002

# 瓜蒌薤白白酒汤调节肠道菌群及其代谢物改善小鼠动脉粥样硬化的实验研究

陈枝凡<sup>1,2</sup>,陈钰璘<sup>1,2</sup>,聂莎<sup>1,2</sup>,孙文昊<sup>1,2</sup>,李畅<sup>1,2</sup>,马梓珊<sup>1,2</sup>,胡凯<sup>1,2</sup>,  
何莹莹<sup>1,2</sup>,刘鹰<sup>1</sup>,唐耀平<sup>1,2,3\*</sup>

(1.广西中医药大学,南宁 530200;2.广西中医药大学附属瑞康医院,南宁 530011;  
3.广西高发传染病中西医结合转化医学重点实验室,南宁 530200)

**【摘要】** 目的 探索瓜蒌薤白白酒汤通过调节肠道菌群(gut microbiota, GM)及其代谢物从而改善小鼠动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)的作用机制。方法 将32只雄性ApoE<sup>-/-</sup>小鼠随机分为空白(Blank)组、模型(Model)组、阿托伐他汀(Ato)组、瓜蒌薤白白酒汤(GXB)组,每组8只。除Blank组以外的3组小鼠建立AS模型后按组别灌胃给药。用油红O染色检测主动脉斑块面积,HE染色观察主动脉组织病理变化。采用16S rRNA基因测序技术分析小鼠GM。检测小鼠GM代谢物氧化三甲胺(TMAO)、短链脂肪酸(SCFA)以及血清中TG、TC、LDL-C、HDL-C和NO水平。结果 与Blank组比较,Model组、Ato组AS斑块面积均增多( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ );Model组血清TG、TC、LDL-C水平升高( $P<0.001$ ),HDL-C、NO水平降低( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ )。与Model组比较,Ato组、GXB组斑块面积减少( $P<0.001$ );Ato组、GXB组中血清TG、TC、LDL-C水平降低( $P<0.001$ ),NO水平升高( $P<0.01$ );GXB组HDL-C水平升高( $P<0.05$ )。与Ato组比较,GXB组斑块面积减少( $P<0.05$ ),NO水平升高( $P<0.01$ )。16S rRNA所得特征序列有6345个。 $\alpha$ 多样性分析提示GXB能降低AS小鼠GM的丰富度( $P<0.001$ )并提升其均匀度( $P<0.05$ )。 $\beta$ 多样性分析提示GXB组的菌群群落结构与Blank组较为相似。各组菌群丰度在门水平、属水平上均存在差异。门水平上,小鼠AS造模后Proteobacteria的丰度上升( $P<0.01$ ),GXB干预后能使其丰度下降( $P<0.01$ )的同时提升Verrucomicrobiota的丰度( $P<0.05$ )。属水平上,GXB干预后能有效提升Akkermansia的丰度水平( $P<0.05$ )。与Model组比较,GXB组中SCFA水平显著升高( $P<0.01$ ),TMAO水平显著降低( $P<0.01$ )。结论 本研究发现,瓜蒌薤白白酒汤可以调节GM及其代谢物SCFA、TMAO来改善AS,Akkermansia可能是GXB通过GM改善AS的关键菌属。

**【关键词】** 动脉粥样硬化;Akkermansia;16S rRNA 测序;瓜蒌薤白白酒汤;肠道菌群;肠道菌群代谢物

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856(2024)07-0010-10

## Mechanism of Gualou Xiebai Baijiu Decoction for regulating the intestinal microflora and its metabolites to improve atherosclerosis in mice

CHEN Zhifan<sup>1,2</sup>, CHEN Yulin<sup>1,2</sup>, NIE Sha<sup>1,2</sup>, SUN Wenhao<sup>1,2</sup>, LI Chang<sup>1,2</sup>, MA Zishan<sup>1,2</sup>, HU Kai<sup>1,2</sup>, HE Yingying<sup>1,2</sup>,  
LIU Ying<sup>1</sup>, TANG Yaoping<sup>1,2,3\*</sup>

**【基金项目】** 国家自然科学基金(82160856,81774115)。

**【作者简介】** 陈枝凡(1995—),男,硕士研究生,研究方向:心血管疾病的中西医结合防治。E-mail:chenzhifan777@126.com

**【通信作者】** 唐耀平(1969—),男,研究员,博士,研究方向:心血管疾病的中西医结合防治。E-mail:tangyp2014@gxtcmu.edu.cn

(1. Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530200, China. 2. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Traditional Chinese Medicine, Nanning 530011. 3. Guangxi Key Laboratory of Translational Medicine of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine with High Infectious Diseases, Nanning 530200)

**[Abstract]** **Objective** To explore the mechanism of Gualou Xiebai Baijiu Decoction (GXB) in improving atherosclerosis (AS) in mice by regulating the gut microbiota (GM) and its metabolites. **Methods** Thirty-two male *ApoE*<sup>-/-</sup> mice were divided randomly into a Blank group, Model group, atorvastatin (Ato) group, and GXB group ( $n=8$  mice per group). AS was established in all mice, except the Blank group, and the respective treatments were administered by gavage. Aortic plaques were detected by Oil red O staining and pathological changes in aortic tissue were detected by hematoxylin and eosin staining. The GM was analyzed using 16S rRNA gene sequencing technology, and mouse GM metabolites, including trimethylamine oxide (TMAO), short-chain fatty acids (SCFA), and serum levels of triglycerides (TG), total cholesterol (TC), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), and nitric oxide (NO) were determined. **Results** Compared with the Blank group, mice in the Model and Ato groups showed an increase in AS plaque area ( $P<0.05$ ). Serum levels of TG, TC, and LDL-C were increased ( $P<0.001$ ) while levels of HDL-C and NO were decreased ( $P<0.01$ ,  $P<0.001$ ) in the Model group compared with the Blank group. The plaque area was decreased ( $P<0.05$ ), serum levels of TG, TC, and LDL-C were decreased ( $P<0.001$ ), and NO levels were increased ( $P<0.01$ ) in the Ato and GXB groups, while HDL-C levels were increased in the GXB group ( $P<0.05$ ) compared with the Model group. Plaque area was decreased ( $P<0.05$ ) and the NO level was increased ( $P<0.01$ ) in the GXB group compared with the Ato group. A total of 6345 characteristic sequences were obtained from 16S rRNA analysis.  $\alpha$ -Diversity analysis indicated that GXB reduced the richness of the GM in AS mice ( $P<0.001$ ) and improved its uniformity ( $P<0.05$ ).  $\beta$ -Diversity analysis suggested that the microbial community structure in the GXB group was similar to that in the Blank group. The abundance of microbial communities differed among the groups at the phylum and genus levels. At the phylum level, the abundance of *Proteobacteria* was increased ( $P<0.01$ ) in AS mice, while GXB intervention reduced the abundance of *Proteobacteria* ( $P<0.01$ ) and increased the abundance of *Verrucomimicrobiota* ( $P<0.05$ ). At the genus level, GXB effectively increased the abundance of *Akkermansia* ( $P<0.05$ ). SCFAs were significantly increased ( $P<0.01$ ) and TMAO levels were significantly decreased ( $P<0.01$ ) in the GXB group compared with the Model group. **Conclusions** GXB can regulate the intestinal flora and intestinal flora metabolites SCFA and TMAO to improve AS. *Akkermansia* may be a key bacterial genus of the gut microbiota through which GXB may improve AS.

**[Keywords]** atherosclerosis; *Akkermansia*; 16S rRNA sequencing; Gualou Xiebai Baijiu Decoction; gut microbiota; metabolites of gut microbiota

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

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)引起的心脑血管疾病是非传染性疾病中威胁人类健康的首要疾病<sup>[1-2]</sup>。近年来,随着对肠道菌群(gut microbiota, GM)的研究逐渐深入,越来越多的证据表明 GM 及其代谢产物与 AS 的发生发展密切相关。随着 GM 的改变,其代谢产物的产出也随之发生变化<sup>[3]</sup>。其中,短链脂肪酸(short chain fatty acid, SCFA)与氧化三甲胺(trimethylamine oxide, TMAO)备受关注。SCFA 通过调节炎症、免疫系统和相关的 G 蛋白偶联受体来降低血压和降低 AS 的风险<sup>[4]</sup>。TMAO 能通过多种机制加重 AS,包括增强泡沫细胞的形成、直接激活炎症反应和干扰胆固醇的反向转运等<sup>[5]</sup>。人体血浆中 TMAO 对不良心血管事件具有独立预

测价值<sup>[6]</sup>。

临床与实验研究提示中医药能过调节 GM 结构,改善肠道屏障功能障碍,降低机体慢性炎症,促进脂质代谢,对 AS 的防治具有巨大的潜在价值<sup>[7]</sup>。瓜蒌薤白白酒汤出自于《金匱要略》,由瓜蒌、薤白、白酒 3 味中药组成,是治疗冠心病的常用经方,具有通阳散结、行气祛痰的功效。方中的瓜蒌和薤白同归胃、大肠经,具有润肠通便的功效。这提示该方与胃肠道存在着密切关系。目前,尚没有研究揭示瓜蒌薤白白酒汤是否能够通过调节 GM 来改善 AS,瓜蒌薤白白酒汤、GM 以及 AS 的关系未有明确定论<sup>[8]</sup>。本研究拟从 GM 及其代谢物的角度阐释瓜蒌薤白白酒汤治疗 AS 的作用机制。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

SPF 级 8 周龄雄性 C57BL/6N *ApoE*<sup>-/-</sup> 小鼠 32 只, 体重 20~22 g, 来源于赛业模式生物研究中心(太仓)有限公司[SCXK(苏)2018-0003]。饲养于广西中医药大学动物中心[SYXK(桂)2019-0001], SPF 级环境温度(25±1)℃, 湿度(55%±5%), 12 h/12 h 光/暗循环, 并严格按照 3R 原则进行实验。本实验经广西中医药大学实验动物福利与伦理委员会审查批准(DW20230830-166)。

### 1.2 主要试剂与仪器

4%多聚甲醛通用型组织固定液(北京兰杰柯科技有限公司, 货号: BL539A); 饱和油红 O 染色液(北京索莱宝科技有限公司, 货号: G1260); 苏木素、伊红(北京中杉金桥生物技术有限公司, 货号: ZLI-9610、ZLI-9613); 甘油三酯(TG)测试盒、总胆固醇(TC)测试盒、低密度脂蛋白胆固醇(LDL-C)测试盒、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-C)测试盒(南京建成生物工程研究所, 货号: A110-1-1、A111-1-1、A113-1-1、A112-1-1); 总 NO 试剂盒(上海碧云天生物科技有限公司, 货号: S0024); 小鼠短链脂肪酸(SCFA)ELISA 检测试剂盒(上海源桔生物科技公司, 货号: YJ406150); 小鼠氧化三甲胺(TMAO)定量检测试剂盒(ELISA)(深圳市优品生物科技有限公司, 货号: YPJ1180); 中药饮片购自中国北京同仁堂(集团)有限公司; 10% Vol 米酒购自贵州忆香醇酒业有限公司。

Tecan Infinite 200Pro 酶标仪(上海迪奥生物科技有限公司); 包埋机(武汉俊杰电子有限公司); 病理切片机(Thermo Fisher)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 药物与制备

按照《金匱要略》所记载: 瓜蒌实 1 枚, 薤白 0.5 L, 白酒 7 L。参照全小林<sup>[9]</sup>《方药量效学》经方剂量折算标准, 方中瓜蒌与薤白的比例约为 1:1。经方白酒实为现代米酒, 1 L 约 200 mL<sup>[10]</sup>。按比例瓜蒌、薤白在米酒中浸泡 30 min 后大火煮沸, 煮沸后小火煎煮 40 min, 过滤, 浓缩至浓度为 1.3 g/mL 浓缩液, 即为瓜蒌薤白白酒汤药液。

#### 1.3.2 模型建立

将 32 只雄性 *ApoE*<sup>-/-</sup> 小鼠分笼饲养, 实验前所有小鼠适应性喂养 1 周, 随机选择 8 只小鼠作为空白组, 以普通饲料喂养, 剩余 24 只小鼠饲喂高脂饲

料(2%胆固醇, 10%猪油, 0.5%胆酸钠, 10%蛋黄粉, 0.1%丙基硫氧嘧啶, 5%白糖, 72.4%基础饲料), 喂养 16 周。

#### 1.3.3 分组及给药

8 只以普通饲料喂养的小鼠作为空白(Blank)组, 24 只模型小鼠随机分为模型(Model)组、阿托伐他汀(Ato)组、瓜蒌薤白白酒汤(GXB)组, 每组 8 只。Blank 组与 Model 组小鼠给予等量无菌 0.9% NaCl 溶液, Ato 组小鼠给予浓度 0.26 mg/mL 阿托伐他汀混悬液, GXB 组小鼠给予瓜蒌薤白白酒汤药液, 每只小鼠 200 μL/d, 灌胃给药。每天给药 1 次, 连续 4 周。

#### 1.3.4 样本收集

末次给药 2 h 后, 经异氟烷气体过量麻醉各组小鼠, 取血, 4℃下 3000 r/min 离心 10 min, 取上清液, -80℃保存。同时收集小鼠主动脉组织、结肠内容物, 主动脉用 4%多聚甲醛固定保存, 结肠内容物 -80℃保存。

#### 1.3.5 油红 O 染色

取固定好的主动脉组织, 蒸馏水充分洗涤, 60%异丙醇浸洗。配制好的油红 O 染液染色 10 min。60%异丙醇分化至间质清晰, 蒸馏水洗。固定在白色滤纸中观察染色结果。

#### 1.3.6 HE 染色

取固定好的主动脉组织, 按常规方式包埋, 切片, 脱蜡至水, 然后用苏木素和伊红染色, 显微镜下观察染色结果。

#### 1.3.7 血脂水平检测

按照试剂盒说明, 使用测定试剂盒检测小鼠血清 TG、TC、HDL-C、LDL-C 水平。

#### 1.3.8 NO 水平检测

按照试剂盒说明, 使用总 NO 试剂盒检测小鼠血清中 NO 水平。

#### 1.3.9 16S rRNA 生物信息学分析

提取每组结肠内容物样本总 DNA, 使用引物对细菌 16S rDNA V3-V4 区进行扩增, 定量后构建文库并使用 Qubit 和 qPCR 对文库进行定量, 将检测合格后的文库使用 NovaSeq 6000 测序系统对其进行双末端测序。每个样本集的数据经过过滤处理, 与物种注释的数据库核对检测后最终得到有效数据。

#### 1.3.10 GM 代谢物水平检测

按照试剂盒说明, 使用 ELISA 试剂盒检测小鼠血清 SCFA、TMAO 水平。

### 1.4 统计学方法

本实验数据采用 SPSS 25.0 软件进行统计学分析,数据以平均数±标准差( $\bar{x} \pm s$ )表示,数据符合正态性和方差齐,两组比较采用 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析,不符合正态性采用非参数检验,以  $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 小鼠主动脉油红 O 染色结果

与 Blank 组比较,Model 组、Ato 组 AS 斑块面积均增多( $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ );与 Model 组比较,Ato 组、GXB 组斑块面积减少( $P < 0.001$ )。与 Ato 组比较,GXB 组斑块面积减少( $P < 0.05$ ) (表 1,图 1)。

### 2.2 小鼠主动脉 HE 染色结果

观察到 Model 组斑块发生程度较 Blank 组加重,而 Ato、GXB 组较 Model 组减轻(图 2)。

### 2.3 血脂水平检测结果

与 Blank 组比较,Model 组中血清 TG、TC、LDL-C 水平升高( $P < 0.001$ ),HDL-C 水平降低( $P < 0.01$ )。与 Model 组比较,Ato 组、GXB 组中血清

TG、TC、LDL-C 水平降低( $P < 0.001$ ),GXB 组 HDL-C 水平升高( $P < 0.05$ ) (表 2)。

### 2.4 NO 检测结果

与 Blank 组比较,Model 组小鼠血清 NO 降低( $P < 0.001$ )。与 Model 组比较,Ato 组、GXB 组中血清 NO 水平升高( $P < 0.01$ 、 $P < 0.001$ )。与 Ato 组比较,GXB 组中血清 NO 水平升高( $P < 0.01$ ) (表 3)。

表 1  $ApoE^{-/-}$  小鼠主动脉粥样硬化斑块面积( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Table 1  $ApoE^{-/-}$  mouse aortic atherosclerotic plaque area

组别 Groups	斑块面积/% Plaque area
空白组 Blank group	0.71±0.37
模型组 Model group	15.72±2.5 <sup>***</sup>
阿托伐他汀组 Ato group	6.72±0.83 <sup>**△△△</sup>
瓜蒌薤白白酒汤组 GXB group	2.71±1.86 <sup>△△△#</sup>

注:与空白组比较,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ,<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ ;与模型组比较,<sup>△△△</sup> $P < 0.001$ ;与阿托伐他汀组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Blank group,<sup>\*\*</sup> $P < 0.01$ ,<sup>\*\*\*</sup> $P < 0.001$ . Compared with Model group,<sup>△△△</sup> $P < 0.001$ . Compared with Ato group,<sup>#</sup> $P < 0.05$ .

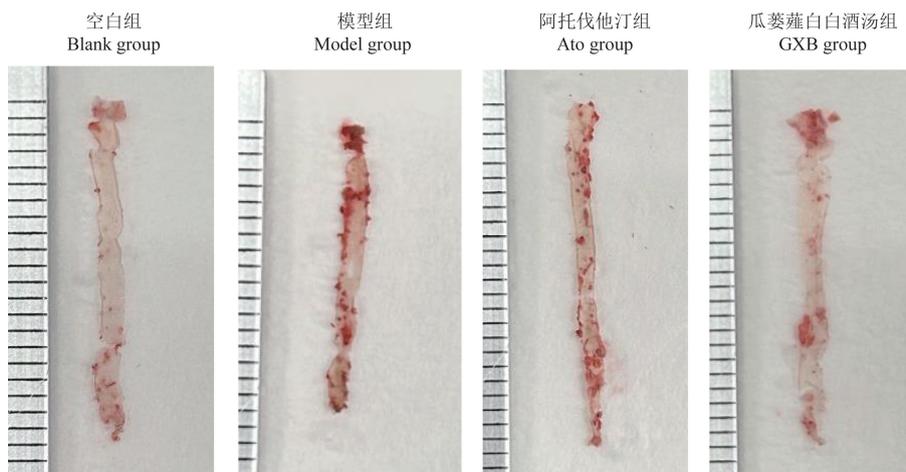


图 1 小鼠降主动脉油红 O 染色代表性照片

Figure 1 Representative photos of mouse descending aorta stained with Oil red O

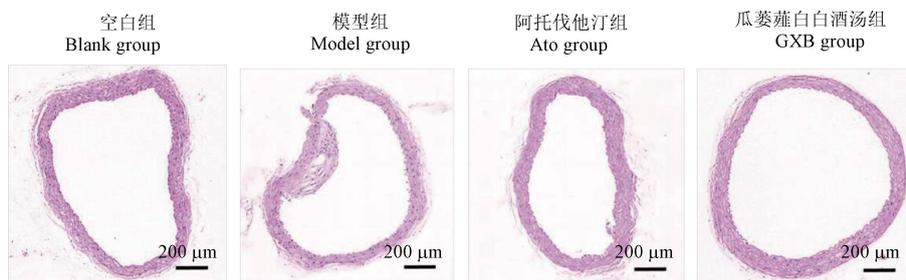


图 2 小鼠主动脉横截面 HE 染色代表性照片

Figure 2 Representative photos of HE staining of mouse aorta cross-section

## 2.5 16S rRNA 生物信息学分析结果

### 2.5.1 ASV 分析

测序所得有效数据使用 DADA2 降噪,产生的每个序列去重后得到的 ASVs (Amplicon Sequence Variants)。本研究得到的特征序列有 6345 个,绘制 4 组的特征序列组成 Venn 图(图 3),其结果显示,Blank 组、Ato 组、GXB 组、Model 组的特征序列数量分别为 1063 个、3362 个、1786 个、3022 个,其

中 4 组共有特征序列为 277 个。同时 4 组分别检验出特有的特征序列,Blank 组、Ato 组、GXB 组、Model 组中数目分别为 384 个、2193 个、518 个、1839 个。

### 2.5.2 α 多样性分析

α 多样性指数可以反映菌群的丰富度和均匀性,其中 chao1 指数与丰富度相关、pielou\_e 指数与均匀性相关。本研究图 4 显示,与 Blank 组比较,Model 组 chao1 指数明显升高( $P < 0.001$ ),pielou\_e

表 2 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血脂水平( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 2 ApoE<sup>-/-</sup> mouse lipid levels

组别 Groups	TG/(mmol/L)	TC/(mmol/L)	LDL-C/(mmol/L)	HDL-C/(mmol/L)
空白组 Blank group	1.00±0.1	1.57±0.06	1.57±0.17	3.24±0.64
模型组 Model group	3.74±0.12 <sup>***</sup>	3.14±0.08 <sup>***</sup>	4.50±0.13 <sup>***</sup>	1.37±0.39 <sup>***</sup>
阿托伐他汀组 Ato group	1.31±0.12 <sup>**</sup> △△△	1.77±0.06 <sup>***</sup> △△△	1.74±0.09 <sup>△△△</sup>	1.78±0.47 <sup>***</sup>
瓜蒌薤白白酒汤组 GXB group	1.55±0.11 <sup>***</sup> △△△	2.13±0.06 <sup>***</sup> △△△	3.07±0.19 <sup>***</sup> △△△	2.08±0.25 <sup>**</sup> △

注:与空白组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,△ $P < 0.05$ ,△△△ $P < 0.001$ 。

Note. Compared with Blank group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Compared with Model group, △ $P < 0.05$ , △△△ $P < 0.001$ .

表 3 ApoE<sup>-/-</sup>小鼠血清 NO 水平( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 3 ApoE<sup>-/-</sup> mouse serum NO levels

组别 Groups	NO/(μmol/L)
空白组 Blank group	216.05±3.69
模型组 Model group	160.75±8.8 <sup>***</sup>
阿托伐他汀组 Ato group	181.00±13.5 <sup>***</sup> △△
瓜蒌薤白白酒汤组 GXB group	199.46±10.56 <sup>*</sup> △△△##

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,△△ $P < 0.01$ ,△△△ $P < 0.001$ ;与阿托伐他汀组比较,## $P < 0.01$ 。

Note. Compared with Blank group, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Compared with Model group, △△ $P < 0.01$ , △△△ $P < 0.001$ . Compared with Ato group, ## $P < 0.01$ .

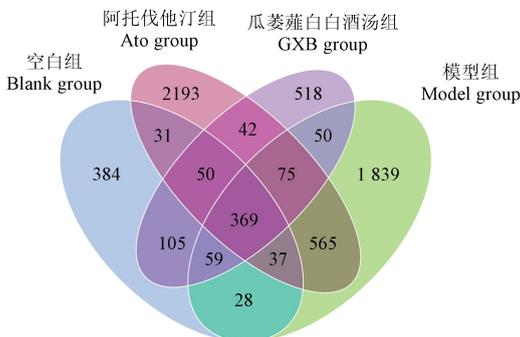
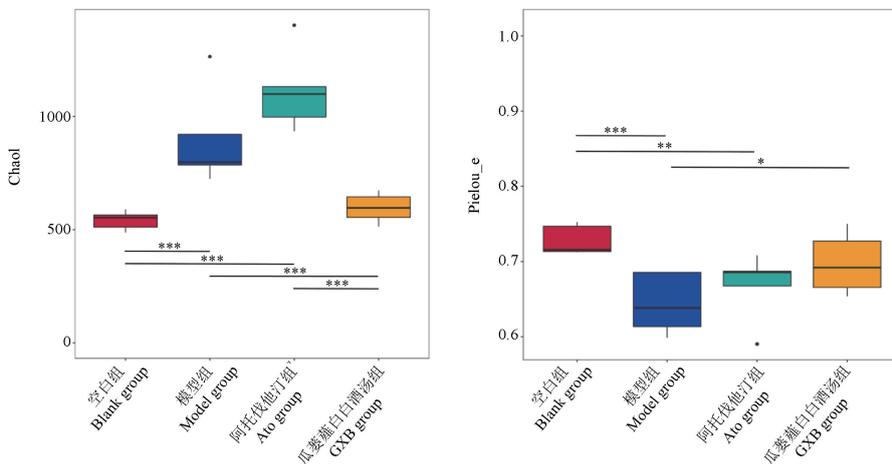


图 3 特征序列分布 Venn 图

Figure 3 Venn plot of feature sequence distribution



注:与空白组比较,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与阿托伐他汀组比较,\*\*\* $P < 0.001$ 。

图 4 Chao1 指数、pielou\_e 指数箱型图

Note. Compared with Blank group, \*\* $P < 0.01$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Compared with Model group, \* $P < 0.05$ , \*\*\* $P < 0.001$ . Compared with Ato group, \*\*\* $P < 0.001$ .

Figure 4 Chao1 index, pielou\_e index box plot

指数明显下降 ( $P < 0.001$ ) ; Ato 组 chao1 指数明显升高 ( $P < 0.001$ ) , pielou\_e 指数下降 ( $P < 0.01$ ) 。与 Model 组比较, GXB 组的 pielou\_e 指数升高 ( $P < 0.05$ ) , chao1 指数明显下降 ( $P < 0.001$ ) 。与 Ato 组比较, GXB 组的 chao1 指数明显下降 ( $P < 0.001$ ) (图 4)。

### 2.5.3 $\beta$ 多样性分析

$\beta$  多样性分析可以对不同样本的 GM 群落构成进行比较分析, 主坐标分析 (principal co-ordinates analysis, PCoA) 是  $\beta$  多样性主要分析方法之一。PCoA 的结果发现 Blank 组样本与 Model 组样本距离较远, 提示与 Blank 组比较, Model 组群落构成发

生较大改变; GXB 组与 Model 组距离较远, 提示与 Model 组比较, GXB 干预后的群落构成发生较大改变; GXB 组与 Blank 组较近, 提示 GXB 组与 Blank 组群落构成最为相似 (图 5)。

### 2.5.4 GM 群落结构分析

在门水平排名前 5 的物种有: *Bacteroidota*、*Firmicutes*、*Verrucomicrobiota*、*Proteobacteria*、*Campilobacterota* (图 6、图 7)。与 Blank 组比较, Model 组 *Proteobacteria* 丰度升高 ( $P < 0.01$ ) , 差异有统计学意义。与 Blank 组比较, Ato 组 *Firmicutes*、*Proteobacteria* 丰度升高 ( $P < 0.05$ 、 $P < 0.001$ ) , *Bacteroidota* 丰度下降 ( $P < 0.05$ ) , 差异有统计学意

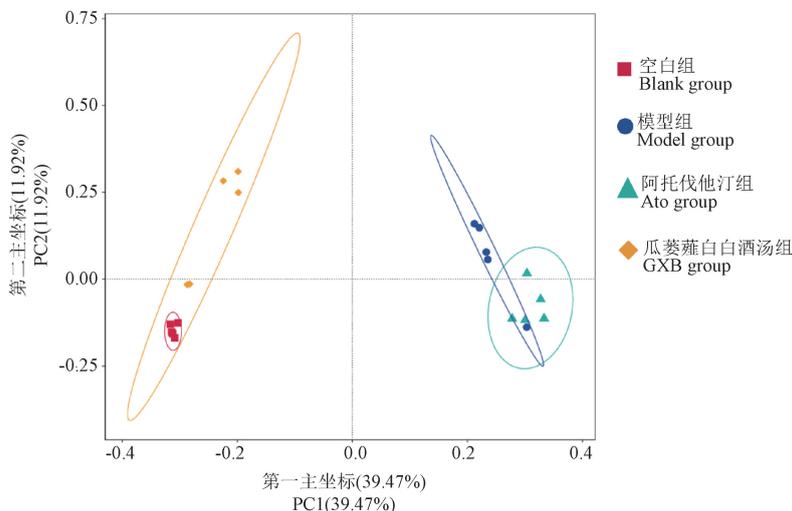


图 5 基于 unweighted\_unifrac 算法的 PCoA 图

Figure 5 PCoA graph based on unweighted\_unifrac algorithm

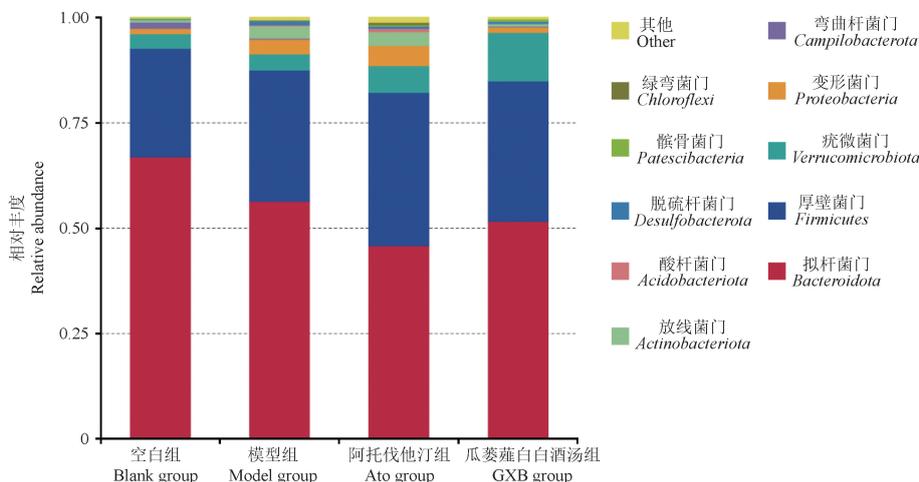


图 6 门水平上物种相对丰度柱状图

Figure 6 Bar chart of relative species abundance at the phylum level

义。与 Blank 组比较, GXB 组 *Verrucomicrobiota* 丰度升高 ( $P < 0.05$ ), 差异有统计学意义。与 Model 组比较, GXB 组 *Verrucomicrobiota* 丰度升高 ( $P < 0.05$ ), *Proteobacteria* 丰度下降 ( $P < 0.01$ ), 差异有统计学意义。与 Ato 组比较, GXB 组 *Proteobacteria* 丰度下降 ( $P < 0.001$ ), 差异有统计学意义 (表 4)。

在属水平排名前 5 的物种有 *Muribaculaceae*、*Lactobacillus*、*Bacteroides*、*Akkermansia*、*Lachnospiraceae*、*NK4A136\_group* (图 8、图 9)。与 Blank 组比较, Ato 组 *Muribaculaceae* 丰度下降 ( $P < 0.05$ ), 差异有统计

学意义。与 Blank 组比较, GXB 组 *Akkermansia* 丰度升高 ( $P < 0.05$ ), 差异有统计学意义。与 Model 组比较, GXB 组 *Akkermansia* 丰度升高 ( $P < 0.05$ ), 差异有统计学意义 (表 5)。

## 2.6 TMAO、SCFA 水平检测结果

与 Blank 组比较, Model 组 TMAO 水平升高 ( $P < 0.05$ ), SCFA 水平降低 ( $P < 0.05$ )。与 Model 组比较, GXB 组中 TMAO 水平降低 ( $P < 0.01$ ), SCFA 水平升高 ( $P < 0.01$ )。与 Ato 组比较, GXB 组 SCFA 水平升高 ( $P < 0.05$ ) (表 6)。

表 4 门水平 GM 分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 4 Analysis of gut microbiota at the phylum level

组别 Groups	<i>Bacteroidota</i> /%	<i>Firmicutes</i> /%	<i>Verrucomicrobiota</i> /%	<i>Proteobacteria</i> /%	<i>Campilobacterota</i> /%
空白组 Blank group	66.96±11.38	25.69±8.24	3.48±3.74	1.24±0.8	1.51±2.44
模型组 Model group	56.46±6.23	30.97±5.97	3.85±5.17	3.55±1.18**	0.23±0.22
阿托伐他汀组 Ato group	45.87±7.26*	36.32±7.82*	6.29±5.14	4.79±1.82***	0.06±0.06
瓜蒌薤白白酒汤组 GXB group	51.73±6.37	33.12±5.63	11.57±5.42* <sup>△</sup>	1.27±0.8 <sup>△△###</sup>	0.20±0.2

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,<sup>△△</sup> $P < 0.01$ ;与阿托伐他汀组比较,<sup>###</sup> $P < 0.001$ 。

Note. Compared with Blank group,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ . Compared with Model group,<sup>△</sup> $P < 0.05$ ,<sup>△△</sup> $P < 0.01$ . Compared with Ato group,<sup>###</sup> $P < 0.001$ .

表 5 属水平 GM 分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 5 Analysis of gut microbiota at the genus level

组别 Groups	<i>Muribaculaceae</i> /%	<i>Lactobacillus</i> /%	<i>Bacteroides</i> /%	<i>Akkermansia</i> /%	<i>Lachnospiraceae</i> _ <i>NK4A136_group</i> /%
空白组 Blank group	47.84±11.34	1.38±0.85	7.72±3.98	3.48±3.74	4.64±2.09
模型组 Model group	41.43±4.67	6.84±7.6	9.11±9.65	3.79±5.17	3.55±3.36
阿托伐他汀组 Ato group	29.16±9.92*	8.67±11.44	8.49±2.35	6.16±5.09	2.48±1.21
瓜蒌薤白白酒汤组 GXB group	40.47±4.11	2.75±1.39	5.2±1.38	11.57±5.43* <sup>△</sup>	5.76±3.78

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>△</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Blank group,\* $P < 0.05$ . Compared with Model group,<sup>△</sup> $P < 0.05$ .

表 6 *ApoE*<sup>-/-</sup> 小鼠血清 TMAO 和 SCFA 水平 ( $\bar{x} \pm s, n = 5$ )

Table 6 *ApoE*<sup>-/-</sup> mouse serum TMAO and SCFA levels

组别 Groups	氧化三甲胺/(ng/mL) TMAO	短链脂肪酸/( $\mu\text{g/mL}$ ) SCFA
空白组 Blank group	313.58±22.09	77.89±7.31
模型组 Model group	369.76±19.87*	69.29±2.57*
阿托伐他汀组 Ato group	325.91±55.74	72.96±6.11
瓜蒌薤白白酒汤组 GXB group	298.83±41.27 <sup>△△</sup>	81.06±5.87 <sup>△△#</sup>

注:与空白组比较,\* $P < 0.05$ ;与模型组比较,<sup>△△</sup> $P < 0.01$ ;与阿托伐他汀组比较,<sup>#</sup> $P < 0.05$ 。

Note. Compared with Blank group,\* $P < 0.05$ . Compared with Model group,<sup>△△</sup> $P < 0.01$ . Compared with Ato group,<sup>#</sup> $P < 0.05$ .

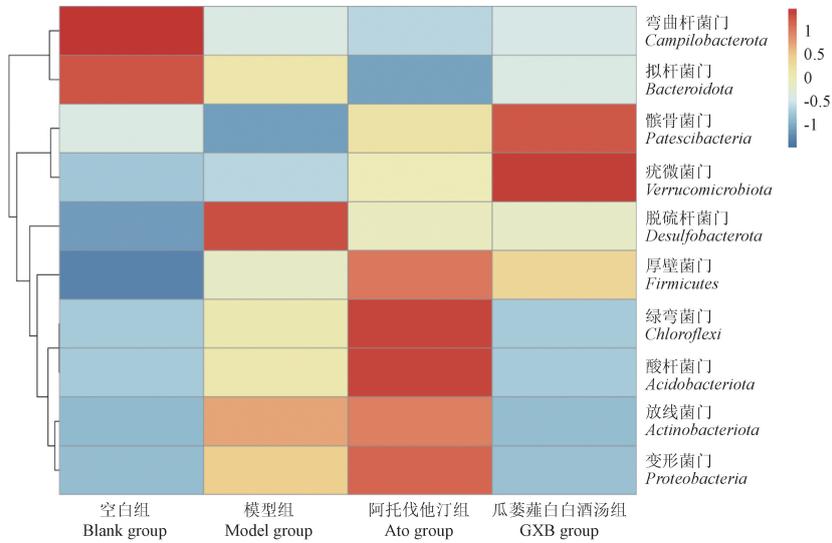


图 7 门水平上物种相对丰度热图

Figure 7 Heatmap of relative species abundance at the phylum level

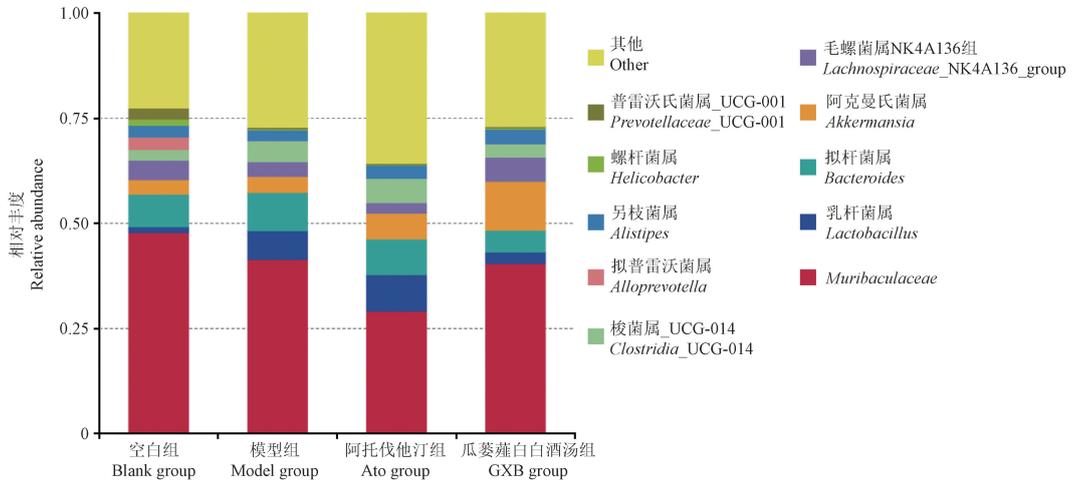


图 8 属水平上物种相对丰度柱状图

Figure 8 Bar chart of relative species abundance at the genus level

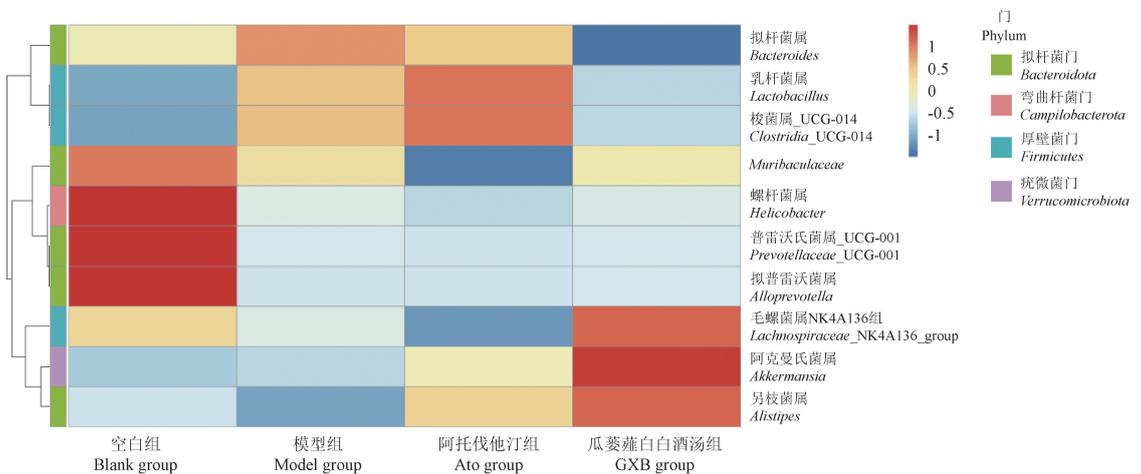


图 9 属水平上物种相对丰度热图

Figure 9 Heatmap of relative species abundance at the genus level

### 3 讨论

近年来,随着高通量测序技术的不断发展,GM 对人体健康影响引起广泛关注。GM 参与到机体的消化、吸收、代谢、免疫等多个环节,一旦 GM 的平衡被打破,肠 GM 的结构、功能和代谢活性的差异就会影响到代谢和免疫等环节,引发各种疾病<sup>[10]</sup>。作为 GM 代谢产物之一的 TMAO,已经成为心血管疾病的独立危险因素和预后指标。GM 通过分解食物中的磷脂酰胆碱、L-肉碱、甜菜碱而产生 TMAO 的前体三甲胺(trimethylamine, TMA),然后进入血液,在肝进一步转化 TMAO。研究者发现,TMAO 能通过促进氧化应激以及降低 NO 的生物利用度来损伤血管内皮功能<sup>[11]</sup>,使血管内皮依赖性舒张功能减弱、血小板聚集增加、白细胞黏附、血管平滑肌增生等,最终导致 AS<sup>[12]</sup>。一项临床研究表明,高脂血症患者的 TMAO 水平明显较高,TMAO 水平明显与 TG 呈正相关、与 HDL-C 呈负相关<sup>[13]</sup>。另一 GM 代谢物 SCFA 能通过调节肠腔 pH 值和粘液产生为上皮细胞提供燃料,影响粘膜免疫功能从而调节胃肠功能、修复损伤肠道黏膜。SCFA 可以激活整个胃肠道的一系列 G 蛋白偶联受体(GPR41、GPR43 和 GPR109A)从而影响关键代谢过程,如能量代谢、脂质代谢和调节饱腹感<sup>[14]</sup>。

中医药在调节 GM 抗 AS 方面有着独特优势。GM 可通过参与中药成分体内代谢,增加机体对其吸收作用,调节 GM 比例,促进 GM 与中医药的相互作用参与 AS 进程。多项研究以 GM 为切入点,初步证实了部分中药单体、单味中药及中药复方能通过改变 GM 结构干预其发生发展及参与治疗,具有改善脂代谢紊乱、稳定斑块、抗凝等作用<sup>[15]</sup>。研究发现,化痰祛痰方能通过改变 GM 结构,减少 TMAO 合成,从而抑制 AS 发生发展<sup>[16]</sup>。炙红芪可以通过调节 GM,改善 SCFA 代谢起到治疗脾气虚大鼠作用<sup>[17]</sup>。瓜蒌薤白白酒汤是一组传统的中药复方,不仅用于治疗心血管疾病,还具有宽胸理气,润肠通便等作用。瓜蒌薤白白酒汤的主要活性成分能影响人 GM 中的代谢,瓜蒌薤白白酒汤能提高 NO 的生物活性,对缺血心肌具有良好的保护作用,可有效改善血脂水平及血液流变学状态<sup>[18-20]</sup>。

故本研究基于 16S rRNA 基因测序技术,对小鼠 GM、瓜蒌薤白白酒汤和 TMAO、SCFA 的关系展开研究。结果表明,瓜蒌薤白白酒汤及阿托伐他汀

均能降低 AS 小鼠的血脂,提升 AS 小鼠 NO 水平,可显著减少动脉斑块的面积,具有抗 AS 的作用。相较阿托伐他汀,瓜蒌薤白白酒汤的作用更为显著。 $\alpha$ 多样性指数分析结果显示,小鼠的 GM 群落丰富度可因 AS 的发生而升高,群落均匀度可因 AS 的发生而降低,瓜蒌薤白白酒汤能有效降低其群落丰富度、提升群落均匀度,使二者恢复到正常水平。 $\beta$ 多样性分析结果表明,小鼠的 GM 群落构成会因 AS 的发生较大的变化,经瓜蒌薤白白酒汤干预后的群落构成与 AS 发生前较为相似,可认为瓜蒌薤白白酒汤能使小鼠的 GM 群落构成得到一定的恢复。本研究中各组菌群丰度在门水平、属水平上均存在差异。门水平上,AS 小鼠造模后会提高 *Proteobacteria* 的丰度,瓜蒌薤白白酒汤干预后能使其下降。瓜蒌薤白白酒汤干预后能提高 *Verrucomicrobiota* 的丰度水平。属水平上,瓜蒌薤白白酒汤干预后能有效提高 *Akkermansia* 的丰度水平。小鼠发生 AS 会提高体内的 TMAO、降低 SCFA,但瓜蒌薤白白酒汤能使 AS 小鼠的 TMAO 降低,SCFA 升高。

*Akkermansia* 是属于 *Verrucomicrobiota* 的菌属。研究发现,增加 *Akkermansia* 丰度能减轻 TMAO 诱导的动脉粥样硬化<sup>[21]</sup>。同时, *Akkermansia* 能促进 SCFA 的分泌,负向调节炎症反应,影响肥胖、糖尿病和心血管代谢疾病的发生发展<sup>[22]</sup>。因此,瓜蒌薤白白酒汤能通过提升 *Akkermansia* 的丰度从而降低 TMAO 的代谢和促进 SCFA 的分泌,提高 NO 的生物利用度,调节脂质紊乱。*Akkermansia* 可能是瓜蒌薤白白酒汤通过 GM 改善 AS 的关键菌属之一。

综上所述,瓜蒌薤白白酒汤能通过调节 GM 的关键菌属 *Akkermansia* 及其代谢物 SCFA、TMAO,进而改善血脂紊乱,增加 NO 生物利用度,最终改善 AS。

#### 参考文献:

- [1] 马丽媛,王增武,樊静,等.《中国心血管健康与疾病报告 2022》要点解读[J].中国全科医学,2023,26(32):3975-3994.  
MA L Y, WANG Z W, FAN J, et al. Interpretation of report on cardiovascular health and diseases in China 2022 [J]. Chin Gen Pract, 2023, 26(32): 3975-3994.
- [2] TSAO C W, ADAY A W, ALMARZOOQ Z I, et al. Heart disease and stroke statistics-2023 update: a report from the American heart association [J]. Circulation, 2023, 147(8): e93-e621.
- [3] WANG J, ZHU N, SU X, et al. Gut-microbiota-derived

- metabolites maintain gut and systemic immune homeostasis [J]. *Cells*, 2023, 12(5): 793.
- [4] HU T, WU Q, YAO Q, et al. Short-chain fatty acid metabolism and multiple effects on cardiovascular diseases [J]. *Ageing Res Rev*, 2022, 81: 101706.
- [5] MA S R, TONG Q, LIN Y, et al. Berberine treats atherosclerosis via a vitamine-like effect down-regulating Choline-TMA-TMAO production pathway in gut microbiota [J]. *Signal Transduct Target Ther*, 2022, 7(1): 207.
- [6] ZONG X, FAN Q, YANG Q, et al. Trimethyllysine, a trimethylamine N-oxide precursor, predicts the presence, severity, and prognosis of heart failure [J]. *Front Cardiovasc Med*, 2022, 9: 907997.
- [7] FENG W, AO H, PENG C, et al. Gut microbiota, a new frontier to understand traditional Chinese medicines [J]. *Pharmacol Res*, 2019, 142: 176-191.
- [8] 李艳, 王省, 张瑞. 瓜蒌薤白白酒汤的研究进展及其质量标志物的预测分析 [J]. *中药新药与临床药理*, 2023, 34(5): 707-712.
- LI Y, WANG X, ZHANG R. Research progress of Gualou Xiebai Baijiu Decoction and prediction analysis on its Q-marker [J]. *Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol*, 2023, 34(5): 707-712.
- [9] 仝小林. 方药量效学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2019.
- TONG X L. Quantitative and effective science of prescription drugs [M]. Beijing: China Traditional Chinese Medicine Press, 2019.
- [10] CHEN Y, ZHOU J, WANG L. Role and mechanism of gut microbiota in human disease [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2021, 11: 625913.
- [11] BRUNT V E, GIOSCIA-RYAN R A, CASSO A G, et al. Trimethylamine-N-oxide promotes age-related vascular oxidative stress and endothelial dysfunction in mice and healthy humans [J]. *Hypertension*, 2020, 76(1): 101-112.
- [12] 郭玉洪, 唐耀平, 赵洋洋, 等. 瓜蒌薤白白酒汤通过  $\text{NO}_3^-$ - $\text{NO}_2^-$ -NO 途径保护小鼠缺血心肌的实验研究 [J]. *辽宁中医杂志*, 2022, 49(1): 202-207, 224.
- GUO Y H, TANG Y P, ZHAO Y Y, et al. Study on Gualou Xiebai Baijiu Decoction protecting ischemic myocardium of mice through  $\text{NO}_3^-$ - $\text{NO}_2^-$ -NO pathway [J]. *Liaoning J Tradit Chin Med*, 2022, 49(1): 202-207, 224.
- [13] XIONG X, ZHOU J, FU Q, et al. The associations between TMAO-related metabolites and blood lipids and the potential impact of rosuvastatin therapy [J]. *Lipids Health Dis*, 2022, 21(1): 60.
- [14] BLAAK E E, CANFORA E E, THEIS S, et al. Short chain fatty acids in human gut and metabolic health [J]. *Benef Microbes*, 2020, 11(5): 411-455.
- [15] 吴琼, 何金涛, 罗舒文, 等. 肠道菌群与动脉粥样硬化关联性中医药干预作用的研究进展 [J]. *中国民族民间医药*, 2021, 30(21): 67-71.
- WU Q, HE J T, LUO S W, et al. Research progress on the relationship between intestinal flora and atherosclerosis and the intervention effect of TCM [J]. *Chin J Ethnomed Ethnopharmacol*, 2021, 30(21): 67-71.
- [16] 隋国媛, 赵娜, 宋囡, 等. 化痰祛痰方对 ApoE<sup>-/-</sup>动脉粥样硬化模型小鼠肠道菌群驱动 TMA/FMO3/TMAO 通路的影响 [J]. *中医杂志*, 2021, 62(8): 700-706.
- SUI G Y, ZHAO N, SONG N, et al. Effect of Huayu qutan formula on gut microbiota-driven TMA/FMO3/TMAO pathway in ApoE<sup>-/-</sup> atherosclerosis model mice [J]. *J Tradit Chin Med*, 2021, 62(8): 700-706.
- [17] 李国峰, 李咸慰, 宋沁洁, 等. 炙红芪对脾气虚大鼠肠道菌群组成与短链脂肪酸代谢的调节作用 [J]. *中国临床药理学杂志*, 2023, 39(18): 2669-2673.
- LI G F, LI X W, SONG Q J, et al. Regulatory effects of Hedysari *Radix* Preparata cum Melle on intestinal flora composition and short-chain fatty acid metabolism in rats with spleen deficiency [J]. *Chin J Clin Pharmacol*, 2023, 39(18): 2669-2673.
- [18] 邹纯才, 李玉龙, 鄢海燕, 等. 米酒对瓜蒌薤白中 3, 29-二苯甲酰基栝楼仁三醇在人肠道菌群降解影响的研究 [J]. *中国药学杂志*, 2017, 52(1): 53-56.
- ZOU C C, LI Y L, YAN H Y, et al. Effect of rice wine on degradation of 3, 29-dibenzoyl karounitriol in Gualou-xiebai in human intestinal flora [J]. *Chin Pharm J*, 2017, 52(1): 53-56.
- [19] 黄油梅, 郭玉洪, 赵洋洋, 等. 基于  $\text{NO}_3^-$ - $\text{NO}_2^-$ -NO 通道探索白酒在瓜蒌薤白白酒汤保护小鼠缺血心肌中的佐使作用 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2021, 23(4): 23-27.
- HUANG S M, GUO Y H, ZHAO Y Y, et al. Exploration of the adjuvant effect of white liquor in Gualou Xiebai Baijiu Decoction on protecting ischemic myocardium in mice based on  $\text{NO}_3^-$ - $\text{NO}_2^-$ -NO pathway [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2021, 23(4): 23-27.
- [20] 毛信心, 肖志凯, 朱雪萍, 等. 瓜蒌薤白白酒汤加减治疗冠心病心绞痛随机对照试验的 Meta 分析 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2023, 21(6): 961-968.
- MAO X X, XIAO Z K, ZHU X P, et al. Meta-analysis of the randomized controlled trials in treating angina pectoris of coronary heart disease with modified Gualou Xiebai Baijiu Decoction [J]. *Chin J Integr Med Cardio Cerebrovasc Dis*, 2023, 21(6): 961-968.
- [21] STIEFVATTER L, NEUMANN U, RINGS A, et al. The microalgae *Phaeodactylum tricornutum* is well suited as a food with positive effects on the intestinal microbiota and the generation of SCFA: results from a pre-clinical study [J]. *Nutrients*, 2022, 14(12): 2504.
- [22] HE Z, ZHU H, LIU J, et al. Mangiferin alleviates trimethylamine-N-oxide (TMAO)-induced atherogenesis and modulates gut microbiota in mice [J]. *Food Funct*, 2023, 14(20): 9212-9225.