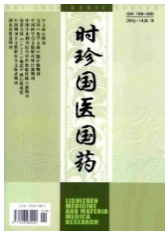


时珍国医国药
Lishizhen Medicine and Materia Medica Research
ISSN 1008-0805,CN 42-1436/R

《时珍国医国药》网络首发论文

题目：　　痰瘀互结证急性冠脉综合征大鼠肠道菌群的宏基因组测序探析
作者：　　陈彦熹，张妮
收稿日期：　　2024-07-03
网络首发日期：　　2024-11-13
引用格式：　　陈彦熹，张妮．痰瘀互结证急性冠脉综合征大鼠肠道菌群的宏基因组测序探析[J/OL]．时珍国医国药. https://link.cnki.net/urlid/42.1436.R.20241113.0842.002

网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

网络首发时间：2024-11-13 15:00:31　网络首发地址：https://link.cnki.net/urlid/42.1436.R.20241113.0842.002

痰瘀互结证急性冠脉综合征大鼠肠道菌群的宏基因组测序探析

陈彦熹[1]，张　妮[2*]
（1. 辽宁中医药大学第一临床学院，辽宁 沈阳　110847；
2. 辽宁中医药大学附属医院，辽宁 沈阳　110032）

【摘要】**目的** 基于宏基因组测序探析痰瘀互结证急性冠脉综合征（Acute Coronary Syndrome，ACS）大鼠的肠道菌群特征，为临床防治提供科学实验依据。**方法** 采用高脂饮食联合腹腔注射异丙肾上腺素建立痰瘀互结证 ACS 模型，宏基因组测序分析大鼠肠道菌群物种组成，并进行 Alpha 多样性指数分析、LEfSe 多级物种差异判别分析、KEGG 功能注释及 Network 分析。**结果** 与正常组相比，痰瘀互结证 ACS 组放线菌门、变形菌门、螺旋体门、梭菌属等丰度升高，乳杆菌属等丰度降低，差异菌群为变形菌门、放线菌门、密螺旋体属、柯林斯菌属等，差异代谢通路为苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成等。正常组大鼠的差异菌群为乳杆菌属等，差异代谢通路为半乳糖代谢等。放线菌门、变形菌门、螺旋体门与苯丙氨、酸酪氨酸和色氨酸的生物合成、精氨酸的生物合成、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成等成显著正相关（$P<0.05$）。**结论** 痰瘀互结证 ACS 组大鼠特征性差异菌群为变形菌门、密螺旋体属、柯林斯菌属等，变形菌门等与苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成等代谢通路显著相关，差异菌群通过协同调节差异通路可能是痰瘀互结证急性冠脉综合征发生发展的关键病机。

【关键词】肠道菌群；　痰瘀互结证；　急性冠脉综合征；　宏基因组测序
DOI 标识：
【中图分类号】R259；R256.2　　【文献标识码】A

急性冠脉综合征（Acute Coronary Syndrome，ACS）是冠脉内不稳定的粥样硬化斑块破裂最终引起心脏急性缺血的疾病[1]。近 40 年来我国痰瘀互结型冠心病患者显著增多[2]，疾病复发率和死亡率逐渐升高[3]，严重威胁着人们身体健康。中医认为 ACS 应归属于“胸痹”“真心痛”等范畴[4]，流行病学调查显示 ACS 最常见证型之一为痰瘀互结证[5,6]。《丹溪心法》中提到“痰夹瘀血，遂成窠囊”，痰瘀同源，相互化生，痰瘀互结是导致胸痹心痛病情发展恶化的重要因素[7]。肠道菌群通过调节人体免疫应答反应、脂质代谢、碳水化合物代谢等途径参与心血管病的发生[8]，影响 ACS 的诊治和预后[9]。宏基因组测序是一种对特定环境中所有微生物 DNA 进行测序的高通量测序技术[10]，可检测肠道菌群的整个基因组，相较 16SrRNA 测序[11]灵敏度和分辨率更高，能够检测到种属水平的差异并对菌群功能进行准确注释[12]。本研究通过建立痰瘀互结证 ACS 大鼠模型，利用宏基因组测序，分析痰瘀互结证 ACS 大鼠肠道菌群的结构特征，为从肠道菌群角度防治 ACS 常见证型痰瘀互结证提供实验依据。

1　材料

1.1　实验动物及分组

健康 SPF 级 SD 大鼠 30 只，体重（220 ± 20）g，雌雄各半，适应性饲养一周后，随机分为正常组和痰瘀互结证 ACS 组，每组 15 只。正常组正常饲料喂养，痰瘀互结证 ACS 组高脂饲料喂养。动物由辽宁长生生物技术有限公司提供，合格证号 SCXK（辽）2020 - 0001。所有大鼠均在辽宁中医药大学动物中心饲养，动物自由饮食。本研究动物实验方案已通过辽宁中医药大学实验动物伦理委员会审查批准（批准号：21000042023058）。所有实验操作均严格按照实验动物伦理相关规定进行。

1.2　试剂与仪器

高脂饲料配方：10% 猪油，1% 胆固醇，0.5% 胆酸钠，0.2% 甲基硫氧嘧啶，5% 蔗糖，83.3% 基础饲料，购自江苏美迪森生物医药有限公司（许可证号：10030）。维生素 D3 购自哈尔滨市通外区宏达动物药品厂（批号：080021417）。异丙肾上腺素购自 MedChemExpress 生物科技公司（批号：HY - B0468）。HE 染液套装（货

收稿日期：2024-07-03；　**修订日期**：2024-10-25
基金项目：国家自然科学基金青年基金项目（82104841），辽宁省教育厅青年科技人才“育苗”项目（L202039）
作者简介：陈彦熹（2001-），女（汉族），湖南长沙人，辽宁中医药大学在读硕士研究生，主要从事中西医结合防治心血管疾病基础研究工作.
* **通讯作者简介**：张　妮（1993-），女（汉族），辽宁昌图人，辽宁中医药大学附属医院主治医师，硕士研究生导师，硕士学位，主要从事中西医结合防治心血管疾病基础和临床研究工作.

号:G1003)均购自 Servicebio。血脂试剂盒购自南京博研生物科技(BYabscience)有限公司。肠道微生物组 DNA 提取试剂盒(OmegaE. Z. N. A. StoolDNAKit,批号:OmegaD4015 - 02)。Agilent2100 生物分析仪购自美国 Agilent 公司。八通道多导心电图(MD3000 - C)购自安省正华生物仪器设备有限公司。脱水机(型号:Donatello)购自 DIAPATH。包埋机(型号:JB - P5)与冻台(型号:JB - L5)均购自武汉俊杰电子有限公司。病理切片机(型号:RM2016)购自上海徕卡仪器有限公司。组织摊片机(型号:KD - P)购自浙江省金华市科迪仪器设备有限公司。烤箱(型号:GFL - 230)购自天津市莱玻瑞仪器设备有限公司。冰冻切片机(型号:CRYOSTARNX50)购自赛默飞世尔科技(中国)有限公司。粘附载玻片石蜡切片白漆色带(型号:G6012 - 1)与粘附载玻片冰冻切片白漆色带(型号:G6012 - 2)均购自 Servicebio。盖玻片(型号:10212432C)购自江苏世泰实验器材有限公司。正置光学显微镜(型号:NikonEclipseE100)与成像系统(型号:NikonDS - U3)均购自日本尼康。

2　方法

2.1　模型制备

痰瘀互结证 ACS 组大鼠一次性腹腔注射维生素 D340 万 iu/kg 后,用高脂饲料连续喂饲 30d,模拟饮食不节,过食肥甘厚味,以致脾胃失健,聚湿成痰,日久成瘀,痰瘀互结。利用团队前期研制的《中医证候动物模型症状评价专家系统》[13] 筛评痰瘀互结证模型大鼠。给予两组大鼠异氟烷吸入麻醉,采用腹腔注射异丙肾上腺素 45mg/kg 复制急性冠脉综合征模型。正常组大鼠腹腔注射等体积生理盐水。

2.2　血脂检测

从大鼠眼眶静脉丛取血,3000r/min 离心 3min,取上清液,用全自动生物化学分析仪检测两组大鼠血清甘油三酯(Triglycerides,TG)、总胆固醇(Cholesterol,TC)、低密度脂蛋白胆固醇(Low density lipoprotein cholesterol,LDL - C)、高密度脂蛋白胆固醇(High density lipoprotein cholesterol,HDL - C)含量。

2.3　八通道多导心电图记录大鼠标准肢体Ⅱ导联心电图变化

在将大鼠麻醉后腹腔注射异丙肾上腺素前,连接八通道多导生理记录仪并将电极插入大鼠四肢皮下,记录大鼠正常心电图。待心电图稳定后给予痰瘀互结证 ACS 组大鼠腹腔注射异丙肾上腺素,记录 30min 大鼠标准肢体Ⅱ导联心电图变化情况,测量并记录 5 个心动周期。

2.4　苏木精—伊红染色(Hematoxylinandeosinstains,HE 染色)法镜下观察大鼠心肌组织结构

取 100g/L 多聚甲醛低温固定的心肌组织,梯度乙醇脱水、透明、浸蜡、包埋、切片、烤片、脱蜡、水化、HE 染色、晾干、封片,光镜下观察心肌组织结构断裂情况并采集图像。

2.5 宏基因组测序及数据分析

参照 Omega E. Z. N. A. Stool DNA Kit (Omega Bio - tek, Inc., USA)试剂盒说明书提取肠道菌群 DNA,用 1% 琼脂糖凝胶电泳和分光光度法进行 DNA 质量和浓度检测检测合格的 DNA 样品经打碎修复纯化扩增等步骤构建文库。文库用 Qubit2.0 进行初步定量、稀释,后使用 Agilent 2100 对文库的插入片段进行检测,符合预期后,使用 Q - PCR 方法对文库的有效浓度进行准确定量(文库有效浓度 >3nmol. L - 1)。文库质检合格后,把不同文库按照有效浓度及目标下机数据量的需求 pooling 后在 Illumina NovaSeq6000 平台测序。对原始下机数据使用 Trimmomatic(v0.36)软件进行质控,包括去除接头序列、低质量 reads。质控后将得到的高质量序列 clean reads 使用 DIAMOND BLASTX 算法进行比对和物种注释,使用组装软件 MEGAHIT(v1.0.6)对测序数据进行组装,并过滤掉组装结果中 500bp 以下的片段。采用 prodigal(V2.6.3)软件对组装得到的 contig 序列进行 ORF (Open Reading Frame) 预测,使用 CD - HIT(v4.8.1)软件对预测的结果去冗余,从而得到非冗余基因集。采用 Bowtie(v1.1.2)软件将测序数据与构建的非冗余基因集进行比对,并统计单个基因在不同样本的丰度信息。将预测得到非冗余基因集与功能注释数据库 Kegg 进行比对和注释。

2.6　统计学分析方法

采用 IBM SPSS Statistics 27 和 GraphPad Prism10 进行统计分析,计量资料符合正态分布时以 $\bar{x} \pm s$;不符合时以 M 表示。组间比较符合正态且方差齐采用独立样本 t 检验,不符合正态或方差不齐采用 Wilcoxon 秩和检验。$P < 0.05$ 表示差异有统计学意义。

3　结果

3.1　两组大鼠血脂水平比较

与正常组相比,痰瘀互结证 ACS 组大鼠血清中 TG、TC、LDL - C 含量升高($P < 0.01$),HDL - C 含量下降($P < 0.01$),差异有统计学意义。见图 1。

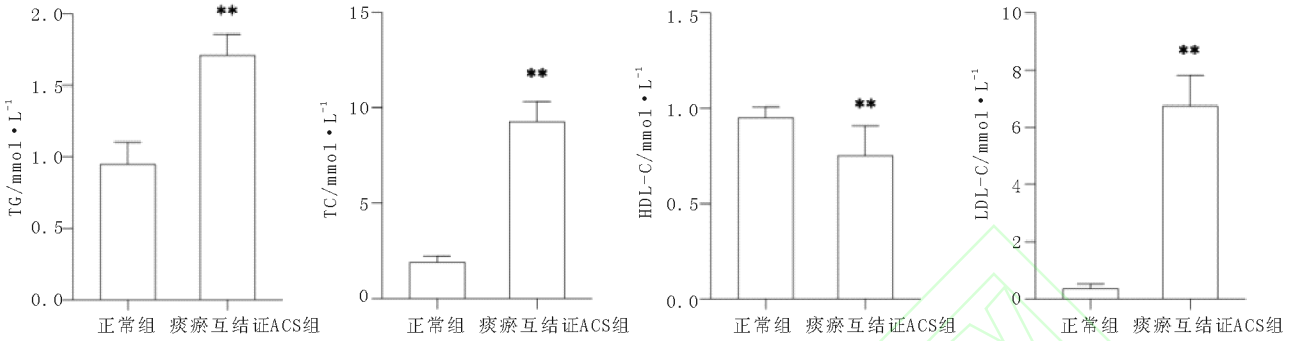
3.2　两组大鼠心电图比较

正常组大鼠心电图正常,未见心律失常及 ST - T 异常改变;痰瘀互结证 ACS 组大鼠可见 ST 段上移,高尖 T 波,为急性冠脉综合症心电图改变。见图 2。

3.3　HE 染色镜下观察心肌细胞形态

光镜下观察 HE 染色的两组心肌细胞形态,正常组大鼠心肌细胞排列整齐、胞质丰富。痰瘀互结证

ACS 组大鼠缺血区心肌组织紊乱、心肌束断裂、间隙增宽、间质大量炎性细胞浸润、心肌细胞核丢失，心肌细胞呈空泡样变。见图 3。



与正常组大鼠比较，$^{**}P<0.01$；$n=15$

图 1　两组大鼠血脂水平比较

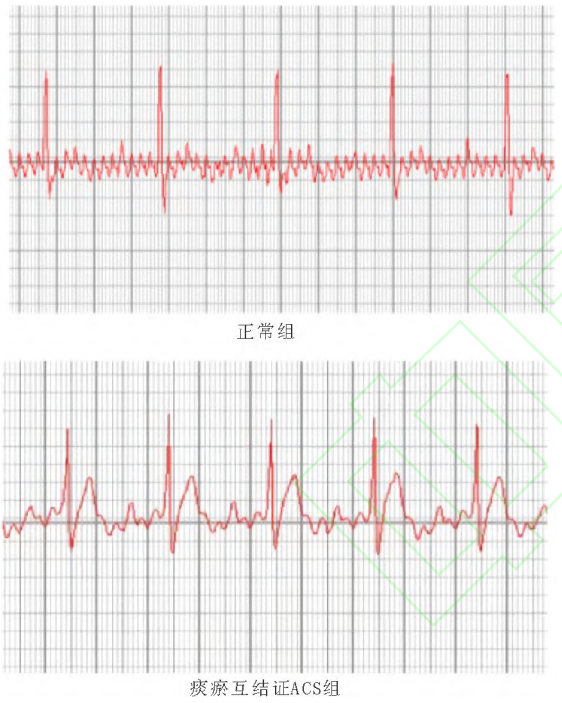


图 2　两组大鼠心电图比较

3.4　Alpha 多样性指数分析

Alpha 多样性指数是反应微生物群落中物种多样性的重要依据。其中 Shannon 指数和 Simpson 指数可反应物种丰富度和均匀度。Shannon 值和 Simpson 值越大，说明群落多样性越高。结果显示，痰瘀互结证 ACS 组的 Shannon 指数和 Simpson 值均显著高于正常组（$P<0.01$），说明痰瘀互结证 ACS 组菌群多样性显著增高。见图 4。

3.5　肠道菌群物种组成分析

两组在门水平上的菌群分布如图 5 所示。丰度排名前五的依次是厚壁菌门（Firmicutes）、拟杆菌门（Bacteroidota）、放线菌门（Actinobacteriota）、变形菌门（Proteobacteria）和螺旋体门（Spirochaetes），这五种菌门占全部物种组成的 90% 以上。其中厚壁菌门占主要优势。与正常组相比，痰瘀互结证 ACS 组厚壁菌门和拟杆菌门丰度降低，放线菌门、变形菌门、螺旋体门丰度升高，厚壁菌门/拟杆菌门比例升高。见图 5。

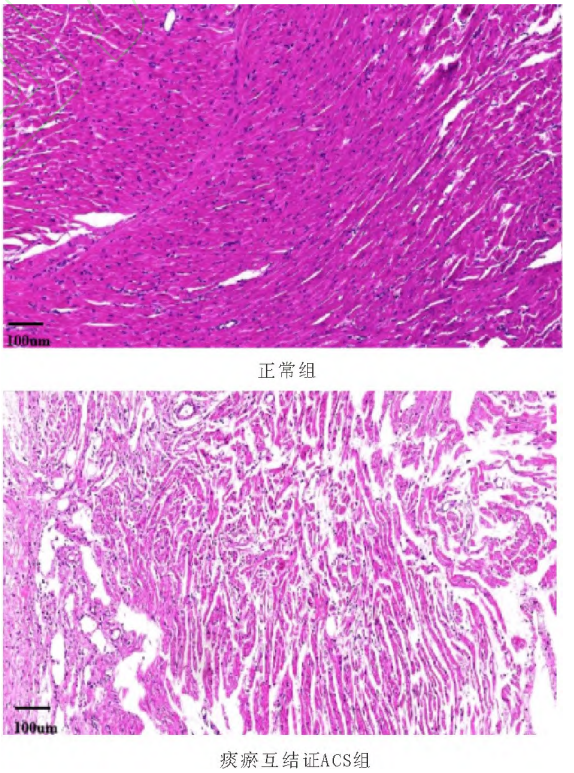
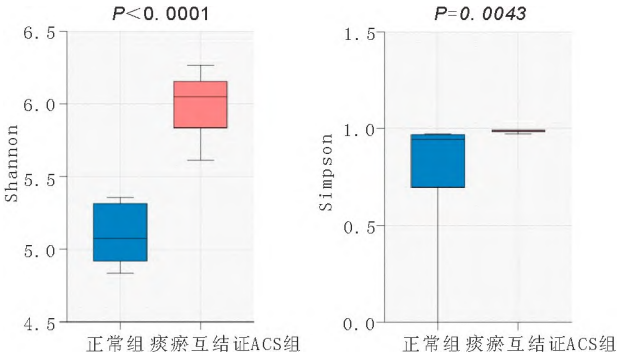


图 3　两组大鼠心肌细胞形态学结果

两组在属水平上丰度前 20 位的菌属在两组均占全部物种组成 60% 以上，以乳杆菌属（Lactobacillus）、Ligilactobacillus、普雷沃氏菌（Prevotella）、梭菌属（Clostridium）、Firmicutes；unclassified、拟杆菌属（Bacteroides）、瘤胃球菌属（Ruminococcus）为主要菌属，如图

6 所示。与正常组相比,痰瘀互结证 ACS 组乳杆菌属、Ligilactobacillus、普雷沃氏菌丰度降低,梭菌属、Firmicutes;unclassified、瘤胃球菌属丰度升高。见图 6。



$P<0.01$ 即为有显著差异

图 4　Alpha 多样性指数 P 值及箱型图

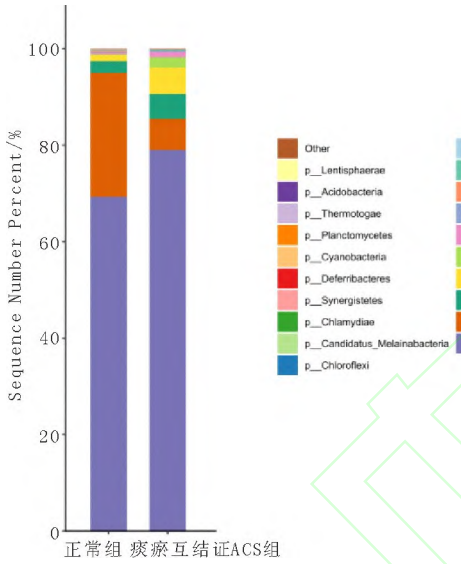


图 5　两组门水平物种组成

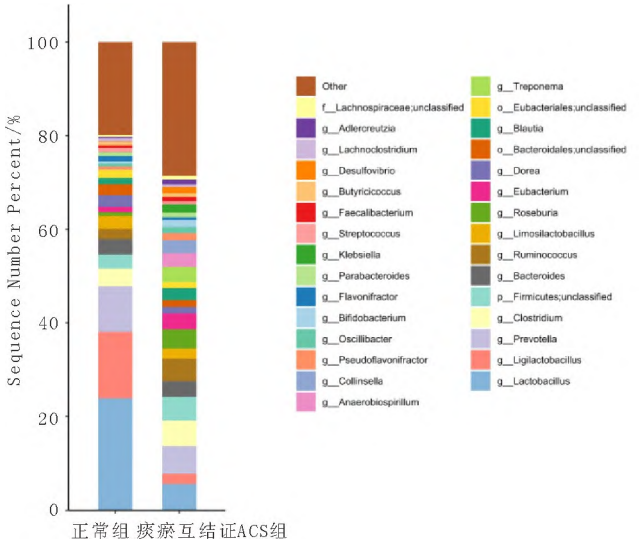
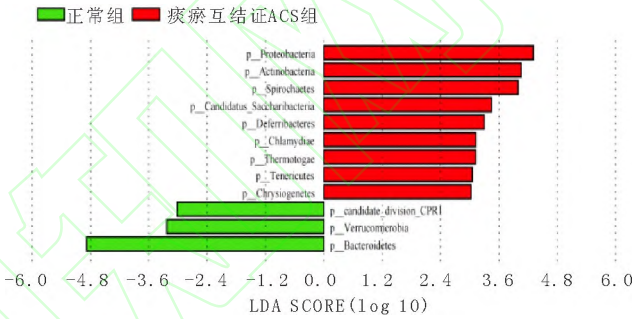


图 6　两组属水平物种组成

3.6　LEfSe 分析

通过 LEfSe 分析筛选出丰度有显著差异的菌群。

LDA 值分布条形图显示造成两组菌群差异的主要贡献菌,在门水平上,痰瘀互结证 ACS 组为变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、螺旋体门(Spirochaetes)、脱铁杆菌门(Deferribacteres),正常组为拟杆菌门(Bacteroidetes)、疣微菌门(Verrucomicrobia)和 candidate_division_CPR;属水平上,痰瘀互结证 ACS 组主要为罗氏菌属(Roseburia)、密螺旋体属(Treponema)、柯林斯菌属(Collinsella)、厌氧螺菌属(Anaerobiospirillum)和克雷伯氏菌属(Klebsiella);正常组为乳杆菌属(Lactobacillus)、Ligilactobacillus 和另枝菌属(Alistipes)。见图 7、图 8。



图中每列代表一种物种,列的长度对应 LDA 分数;LDA 分数越高,差异越大;LDA 的绝对值表示 2 个组之间不同水平差异显著的物种的影响程度

图 7　两组门水平 LDA 值分布条形图(LDA>2)

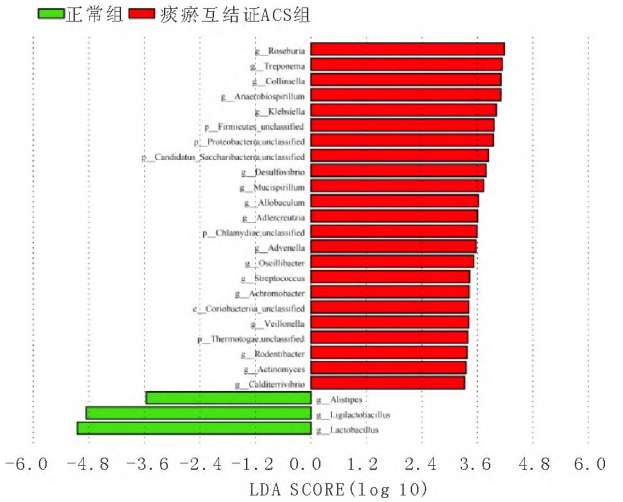
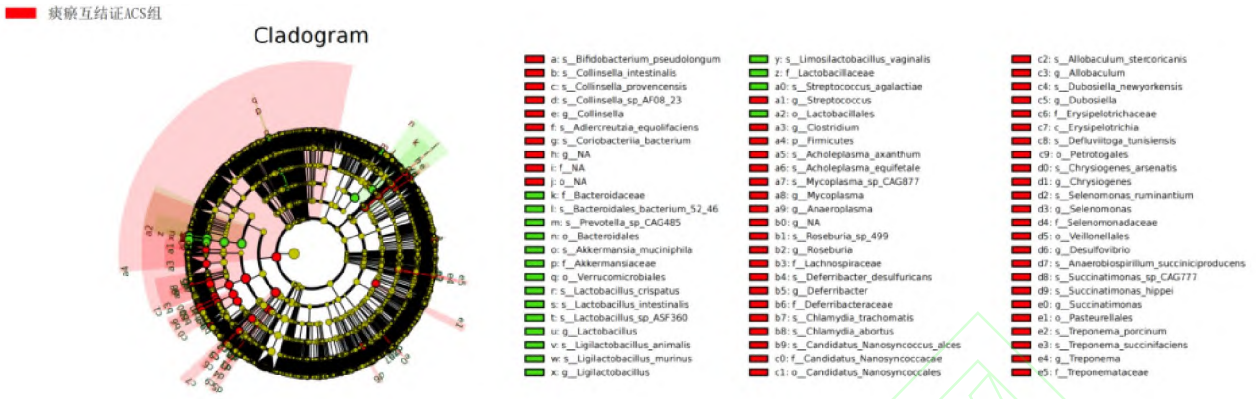


图 8　两组属水平 LDA 值分布条形图(LDA>3)

进化分支图显示,痰瘀互结证 ACS 组大鼠显著富集的菌群为密螺旋体科、密螺旋体属、Treponema_porcinum 种、Treponema_succinifaciens 种,柯林斯菌属、肠道柯林斯菌种、Collinsella_provencensis 种、Collinsella_sp_AF08_23 种,罗氏菌属、Roseburia_sp_499 种,脱铁杆菌科、脱铁杆菌属、Deferribacter_desulfuricans 种等。正常组中显著富集的菌群为阿克曼氏菌科、嗜黏蛋白阿克

曼菌种,乳杆菌属、乳杆菌种,Ligilactobacillus、鼠联合乳杆菌种、动物联合乳杆菌种。见图 9。



图中从内到外辐射的圆圈分别代表了门、纲、目、科、属、种的分类层级;
不同层级上的每一个小圆圈代表相应水平下的一组微生物集群,小圆圈大小与相对丰度呈正比,
小圆圈的绿色和红色分别代表正常组和痰瘀互结证 ACS 组的差异物种,黄色小圆圈代表在两组中均无显著差异的物种

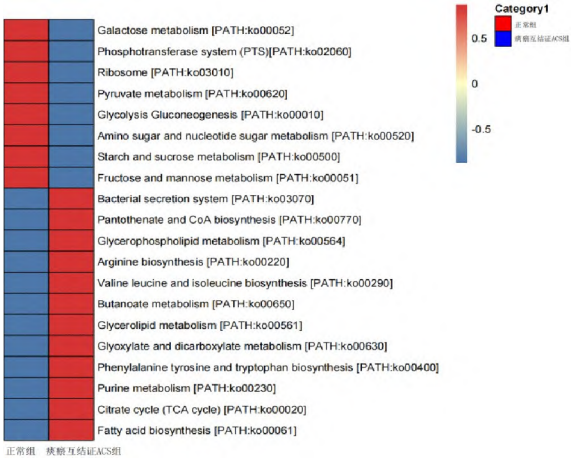
图 9　两组 LEfSe 分析进化分支树

3.7　组间差异代谢通路分析

采用京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes,KEGG)进行差异菌群功能分析预测,两组在 KEGG Level C 有显著差异的代谢通路共有 156 条,选取两组富集菌群数量最多的前 20 条通路作图。由图可见,正常组菌群在半乳糖代谢、磷转移酶系统、核糖体丙酮酸代谢、糖酵解葡萄糖生成、氨基酸和核苷酸糖代谢、淀粉和蔗糖代谢、果糖和甘露糖代谢的富集程度显著升高($P<0.05$);痰瘀互结 ACS 组菌群在细菌分泌系统、泛酸和辅酶 A 的生物合成、甘油磷脂代谢、精氨酸的生物合成、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成、丁酸盐代谢、甘油脂代谢、乙醛酸盐和二羧酸盐代谢、苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成、嘌呤代谢、柠檬酸循环、脂肪酸的生物合成的富集程度显著升高($P<0.05$)。见图 10。

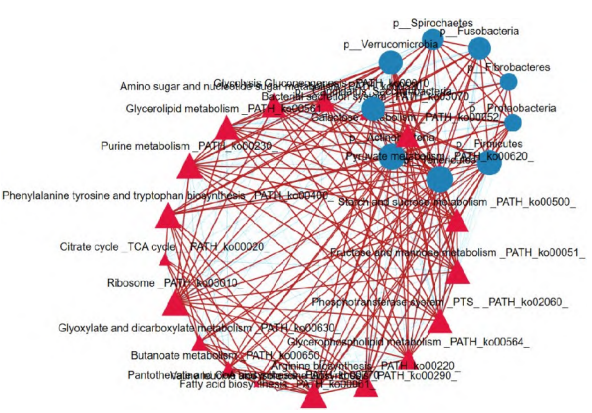
3.8　Network 分析

通过 Network 分析绘制肠道菌群与 KEGG 通路之间相关性网络分析图。结果显示度值较高的通路为苯丙氨酸酪氨酸和色氨酸的生物合成、缬氨酸亮氨酸和异亮氨酸的生物合成、嘌呤代谢、精氨酸的生物合成等。肠道菌群度值从高到低依次为放线菌门、软壁菌门、厚壁菌门、Candidatus_Saccharibacteria、疣微菌门、梭杆菌门、螺旋体门、变形菌门、纤维杆菌门。其中,苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成、精氨酸的生物合成、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成、细菌分泌系统与放线菌门、变形菌门、螺旋体门均成显著正相关,($P<0.05$);嘌呤代谢、半乳糖代谢、糖酵解葡萄糖生成与放线菌门、变形菌门、螺旋体门均成显著负相关($P<0.05$)。放线菌门与丁酸盐代谢、乙醛酸和二羧酸代谢成显著正相关($P<0.05$)。



图中红色代表该通路在正常组中显著富集,
蓝色代表该通路在痰瘀互结证 ACS 组中显著富集

图 10　两组富集程度前 20 的差异代谢通路热图



图中节点圆形代表肠道菌群,三角形代表 KEGG 通路,
节点越大代表度值越高,代表在网络图中越重要,
节点之间线条的粗细与物种相互作用相关系数的绝对值成正相关,
红色线条代表连接的两节点为正相关,蓝色为负相关

图 11　肠道菌群群与 KEGG 通路 Network 分析图

4 讨论

ACS 在中医里属于“胸痹心痛”范畴,痰瘀互结是 ACS 的重要致病原因并且和机体炎症及动脉粥样硬化密切相关[14,15]。肠道菌群多样性和相对丰度的改变可能干扰人体内正常机体代谢活动,导致心血管疾病的发生[16,17]。肠道菌群微生物组及其代谢产物与机体的炎症反应、免疫、脂质代谢等机制密切相关[18,19],部分代谢物能进入血液循环,通过一系列全身信号效应,破坏肠道屏障功能,促进动脉粥样硬化,影响血栓的形成和进展[20]。

本研究中痰瘀互结证 ACS 组大鼠血清 TC、TG、LDL－C 显著升高、HDL－C 显著降低,心电图急性冠脉综合征改变明显,心肌细胞形态明显改变,心肌组织缺血区炎症细胞浸润,与王青等研究一致[21~23]。Alpha 分析显示痰瘀互结证 ACS 组菌群多样性显著高于正常组,菌群结构发生特征性改变,与 Ikram Khan、陈路玉和许果[24~26]等研究一致。

本研究发现两组样本的优势菌群种类虽然相同,但比例存在差异。在门水平上,与正常组相比,痰瘀互结证 ACS 组厚壁菌门和拟杆菌门丰度降低,且厚壁菌门/拟杆菌门(F/B)值较正常组升高,该比值的升高与冠心病、肥胖、斑块形成等密切相关[23,27,28]。变形菌门和放线菌门的升高与 Khan I 等[25,29]研究基本一致。有研究表明变形菌门和放线菌门可作为诊断冠心病的潜在指标[25,29,30]。变形菌门增加可导致血液中脂多糖和氧化三甲胺水平升高[31,32]。LPS 能够促进血管炎症反应,加速斑块发展和影响斑块稳定性[33]。氧化三甲胺能直接导致血小板高反应性并增强体内血栓形成[34],是心血管疾病风险的标志物[35],血浆氧化三甲胺水平与斑块不稳定性和斑块大小呈正相关[36]。在属水平上,与正常组相比,痰瘀互结证 ACS 组梭菌属丰度升高,有研究认为梭菌属与动脉粥样硬化以及冠心病密切相关[37],但是确切的相关机制尚不清楚。

LEfSe 组间差异显著性分析发现,痰瘀互结证 ACS 组中起重要作用的是变形菌门、放线菌门、螺旋体门、密螺旋体属、柯林斯菌属、脱铁杆菌属、罗氏菌属等。其中螺旋体门及门下密螺旋体属作为显著差异贡献菌,在科、属、种三个层级引起显著差异作用,影响最大。螺旋体门包含密螺旋体属、疏螺旋体属和钩端螺旋体属等致病性菌属,与多种感染性疾病譬如梅毒、牙周炎、莱姆病和病毒感染等[38,39]的炎性反应密切相关。有研究发现失眠可能是肠道菌群介导的低炎症反应[40,41],而螺旋体门在脾虚失眠患者和 TNF－α 显著增加的肝郁脾虚大鼠中显著升高,TNF－α 作为一种促炎细胞因子,是最早参与全身炎症反应的介质之一,能促进炎性细胞的黏附,诱导其他炎性细胞因子的释放,加快机体炎症效应[42]。Correa R[43]等发现螺旋体门在出现肠上皮损伤和结肠组织有明显炎症细胞浸润的感染寨卡病毒小鼠中显著增加。密螺旋体属有“隐形病原体”之称,是已被确定的致病类群[44],能够诱导炎性反应[45]和中度先天免疫反应,导致慢性而非急性(通常是全身性)感染[46],粪便中密螺旋体的增加常被视为机体状态不健康[47]。血脂代谢异常被证实与动脉粥样硬化的发生发展密切相关[48]。柯林斯菌属能影响脂质代谢并参与胆汁酸代谢[49],产生的代谢产物可增加肠上皮通透性,破坏肠功能屏障。《黄帝内经》中说“心合小肠”,肠屏障的损伤使肠道代谢物通过“微生物群－肠道－心脏轴(MGH)”引起动脉粥样硬化等心血管疾病[50]。脱铁杆菌属能生产对血管斑块不利的脂多糖,并导致肥胖和慢性炎症[51]。罗氏菌属能够产生丁酸盐,抑制斑块,改善动脉粥样硬化,与动脉粥样硬化病变发展呈负相关[52]。但 Cirstea M 等[53]认为,“好”细菌也有“坏”的一面。近年来有研究发现心肌梗死大鼠中罗氏菌属显著增高[54],但尚未有研究报道罗氏菌属对痰瘀互结证 ACS 有致病作用,且由于本次研究样本量较少,因此,我们尚不清罗氏菌的改变是因急性冠脉病变引起的应激反应短期内所导致,还是已有冠脉病变倾向的个体在急性冠脉病变发生前就已经出现了目前观到的肠道菌群改变,罗氏菌属对动脉粥样硬化在保护作用的同时有无致病作用及其相关机制有待后续研究进一步探讨。在正常组中显著富集的嗜黏蛋白阿克曼菌种具有抗炎特性,能够有效改善肠道炎症等症状,是一种重要的抗动脉粥样硬化的有益菌[55]。其丰度与宿主体内胆汁酸、短链脂肪酸水平成正相关,能通过胆汁酸、膜蛋白、短链脂肪酸等功能成分调节宿主功能[56]。

在功能预测方面,痰瘀互结证 ACS 组中苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成,柠檬酸循环,甘氨酸、丝氨酸和苏氨酸代谢以及乙醛酸和二羧酸代谢途径与冠心病的发生有关[57]。苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸是人体内三种芳香族氨基酸,可调节有关炎症的细胞信号通路而参与炎症过程,对动脉粥样硬化产生影响[58],柠檬酸循环代谢,是糖、脂肪和蛋白质分解的共同通路和最终代谢通路,异常时会影响心功能,直接或间接促进冠心病的发展[59]。柠檬酸循环与氨基酸代谢联系密切[57],精氨酸、酪氨酸的合成障碍会影响细胞内蛋白质的合成与代谢,导致心肌凋亡及坏死[60]。嘌呤代谢和缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸等各种氨基酸代谢的紊乱可能通过调节能量代谢和炎症反应参与冠心病发病过程[61]。缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成及甘油磷脂代谢的变化能反应痰瘀型心绞痛的本质[62]。此外,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成还与支链氨基酸(Brach chain amino acid, BCAA)的合

成有关,BCAA 代谢稳态对机体生理调节发挥着重要的作用[63],血浆 BCAA 及其代谢物的升高与心血管疾病风险独立相关[64,65],对机体健康可能起到负面作用。结合本研究 Network 分析结果所示,放线菌门、变形菌门、螺旋体门可能通过上调苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成,精氨酸的生物合成,缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成等通路促进动脉粥样硬化和冠心病的发生。甘油磷脂代谢途径中的主要成分磷酸甘油酯水解产生的溶血磷脂能破坏细胞膜,激活参与动脉粥样硬化的 PPARγ 通路[66],促进动脉硬化。乙醛酸盐和二羧酸盐代谢产物可改善动脉粥样硬化和脂质代谢[67,68]。有研究表明胆碱、DL－O－磷酸丝氨酸和二甲基甘氨酸等对心血管健康有益的代谢物参与乙醛酸盐和二羧酸盐的代谢途径,在药物治疗冠心病中具有潜在作用[69],该通路的富集程度增加是否为机体应激性增高有待进一步研究。

综上,痰瘀互结证 ACS 大鼠肠道菌群结构与正常大鼠存在显著差异,菌群多样性显著上升。痰瘀互结证 ACS 组大鼠特征性菌群为密螺旋体科、密螺旋体属,柯林斯菌属、肠道柯林斯菌种,脱铁杆菌科、脱铁杆菌属等。且主要差异菌群变形菌门、放线菌门、螺旋体门等与苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的生物合成、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸的生物合成、精氨酸的生物合成等代谢通路显著相关,主要差异菌群通过协同调节差异通路可能是痰瘀互结证急性冠脉综合征发生发展的关键病机。

参考文献:

[1] 张新超, 于学忠, 陈凤英,等. 急性冠脉综合征急诊快速诊治指南(2019)[J]. 临床急诊杂志, 2019,20(4):253.

[2] 毛静远, 牛子长, 张伯礼. 近 40 年冠心病中医证候特征研究文献分析[J]. 中医杂志, 2011,52(11):958.

[3] 王传池. 冠心病不同发展阶段中医证演变规律研究[D]. 湖北中医药大学博士学位论文, 2020.

[4] 范小勇, 王成. 不同中药序贯疗法对痰瘀互结证急性冠脉综合征血小板功能的影响[J]. 中国实验方剂学杂志, 2016,22(4):169.

[5] 毕颖斐, 王贤良, 赵志强,等. 冠心病中医证候地域性特征的临床流行病学调查[J]. 中医杂志, 2020,61(5):418.

[6] 王传池, 杨燕, 吴珊,等. 冠心病不同发展阶段中医证演变规律研究[J]. 中华中医药杂志, 2019,34(5):2101.

[7] 郑珺, 赵佳峪, 王振裕. 急性冠脉综合征痰瘀互结证与血尿酸、血脂、HCY 及 hs－CRP 的关系[J]. 中华中医药杂志, 2023,38(11):5500.

[8] 吴浩南. 基于肠道菌群和肠道屏障功能探讨痰瘀同治方对冠心病痰瘀互结证小鼠作用机制[D]. 中国中医科学院硕士学位论文, 2023.

[9] 乌雅汗. 基于 16SrDNA 高通量测序分析急性冠脉综合征患者肠道菌群改变[D]. 内蒙古医科大学硕士学位论文, 2023.

[10] 彭玺, 冯凯, 厉舒祯,等. 宏基因组学技术与微生物群落多样性分析方法[J]. 科技导报, 2022,40(3):99.

[11] Di Segni A, Braun T, BenShoshan M, et al. Guided Protocol for Fecal Microbial Characterization by 16S rRNA－Amplicon Sequencing [J]. J Vis Exp, 2018(133):56845

[12] Louca P, Menni C, Padmanabhan S. Genomic Determinants of Hypertension With a Focus on Metabolomics and the Gut Microbiome [J]. Am J Hypertens, 2020,33(6):473.

[13] 陈雷,李海权. 中医证候动物模型症状评价专家系统研究[J]. 中华中医药学刊, 2010,28(1):83.

[14] 高毛毛,杨硕,汪阳,等. 不稳定性心绞痛痰瘀互结证病理机制与临床证治[J]. 实用中医内科杂志, 2022,36(4):57.

[15] 刘悦, 张哲,张会永,等. 杨关林“痰瘀学说”理论发挥[J]. 辽宁中医杂志, 2017,44(11):2280.

[16] 宋潼潼. 肠道菌群代谢产物丁酸调控心肌梗死大鼠胶原表达的机制研究[D]. 吉林大学博士学位论文, 2021.

[17] 王玉珍, 洪小卫, 尹涛, 等. 肠道菌群多样性改变在 NAFLD 诱发心血管疾病中的重要作用[J]. 心脏杂志, 2019,31(4):379.

[18] 孟浩先, 金华, 席金梦, 等. 基于“肠道菌群－胆汁酸”途径探讨动脉粥样硬化“土壅木郁”病机的生物学内涵[J]. 中国中医药信息杂志, 2024,31 (9): 12

[19] 王芳, 万桃, 杨永秀. 2 型糖尿病相关子宫内膜癌与肠道菌群相关性的研究进展[J]. 国际生殖健康/计划生育杂志, 2024,43(3):249.

[20] 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.

[21] 王青, 刘凤岚, 徐仕晗,等. 冠心病继发认知障碍的动物模型研究进展[J]. 医学新知, 2022,32(4):260.

[22] 陈凯, 董静, 赵学飞. 槲皮素通过上调沉默信息调控因子 1 减轻心肌梗死后心室重构[J]. 国际心血管病杂志, 2022,49(3):157.

[23] 张薇, 黄小楼, 韦雪兰, 等. 穴位埋线对心肌梗死大鼠巨噬细胞 MerTK 胞葬作用的影响[J]. 云南中医药大学学报, 2023,46(4):87.

[24] 许果. 电针心经对心肌缺血模型大鼠小肠肠道菌群及其代谢产物和血清 TNF－a、IL－6 的影响[D]. 安徽中医药大学硕士学位论文, 2020.

[25] Khan I, Khan I, Usman M, et al. Analysis of the blood bacterial composition of patients with acute coronary syndrome and chronic coronary syndrome[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2022,12:943808.

[26] 陈路玉. 冠心病与肠道菌群及其代谢物 TMAO 的相关性分析[D]. 福建医科大学硕士学位论文, 2019.

[27] Yin J, Li Y, Han H, et al. Administration of Exogenous Melatonin Improves the Diurnal Rhythms of the Gut Microbiota in Mice Fed a High－Fat Diet[J]. mSystems, 2020,5(3):e00002.

[28] 魏乐乐, 顾永哲, 罗云, 等. 中药调节肠道菌群治疗心脑血管疾病的研究进展[J]. 中草药, 2023,54(18):6185.

[29] 陈扬平. 肠道菌群与冠状动脉粥样硬化心脏病的相关性研究[D]. 南方医科大学硕士学位论文, 2020.

[30] Koren O, Spor A, Felin J, et al. Human oral, gut, and plaque microbiota in patients with atherosclerosis[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011,108 Suppl 1(Suppl 1):4592.

[31] Feghali K, Iwasaki K, Tanaka K, et al. Human gingival fibroblasts release high－mobility group box－1 protein through active and passive pathways[J]. Molecular Oral Microbiology, 2010,24(4):292.

[32] Alhmoud T, Kumar A, Lo C C, et al. Investigating intestinal permeability and gut microbiota roles in acute coronary syndrome patients [J]. Hum Microb J, 2019,13,100059.

[33] 赵一璇, 张军平. 膳食纤维通过调节肠道微生物及其代谢产物对动脉粥样硬化的影响研究进展[J]. 食品安全质量检测学报, 2022,13(3):697.

[34] Zhu W, Gregory J C, Org E, et al. Gut Microbial Metabolite TMAO

Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk[J]. Cell, 2016,165(1):111.

[35] Koay Y C Y J. Plasma levels of trimethylamine - N - oxide can be increased with ˝healthy˝and ˝unhealthy˝diets and do not correlate with the extent of atherosclerosis but with plaque instability[J]. Cardiovascular Research, 2021,117(2):435.

[36] Wu P, Chen J, Chen J, et al. Trimethylamine N - oxide promotes apoE(-/-) mice atherosclerosis by inducing vascular endothelial cell pyroptosis via the SDHB/ROS pathway[J]. J Cell Physiol, 2020, 235(10):6582.

[37] Emoto T, Yamashita T, Kobayashi T, et al. Characterization of gut microbiota profiles in coronary artery disease patients using data mining analysis of terminal restriction fragment length polymorphism: gut microbiota could be a diagnostic marker of coronary artery disease[J]. Heart Vessels, 2017,32(1):39.

[38] Ko Y, Lee E M, Park J C, et al. Salivary microbiota in periodontal health and disease and their changes following nonsurgical periodontal treatment[J]. J Periodontal Implant Sci, 2020,50(3):171.

[39] Gupta R S, Mahmood S, Adeolu M. A phylogenomic and molecular signature based approach for characterization of the phylum Spirochaetes and its major clades: proposal for a taxonomic revision of the phylum[J]. Front Microbiol, 2013,4:217.

[40] Hurtado - Alvarado G, Dominguez - Salazar E, Pavon L, et al. Blood - Brain Barrier Disruption Induced by Chronic Sleep Loss: Low - Grade Inflammation May Be the Link[J]. J Immunol Res, 2016, 2016(1): 4576012.

[41] Krueger J M, Opp M R. Sleep and Microbes[J]. Int Rev Neurobiol, 2016,131:207.

[42] Kubysheva N, Boldina M, Eliseeva T, et al. Relationship of Serum Levels of IL - 17, IL - 18, TNF - α, and Lung Function Parameters in Patients with COPD, Asthma - COPD Overlap, and Bronchial Asthma[J]. Mediators of Inflammation, 2020,2020(9):1.

[43] Correa R, de Oliveira S I, Braz - de - Melo H A, et al. Gut microbiota modulation induced by Zika virus infection in immunocompetent mice[J]. Sci Rep, 2021,11(1):1421.

[44] Giacani L, Lukehart S A. The endemic treponematoses[J]. Clin Microbiol Rev, 2014,27(1):89.

[45] 赵彩娇，谌桑妮，李鑫，等. 艾灸“足三里”对衰老大鼠氧化应激和肠道菌群的影响[J]. 中国针灸，2024,44(3):303.

[46] Schroder N W, Opitz B, Lamping N, et al. Involvement of lipopolysaccharide binding protein, CD14, and Toll - like receptors in the initiation of innate immune responses by Treponema glycolipids[J]. J Immunol, 2000,165(5):2683.

[47] Brussow H. Problems with the concept of gut microbiota dysbiosis [J]. Microb Biotechnol, 2020,13(2):423.

[48] Duncan M S, Vasan R S, Xanthakis V. Trajectories of Blood Lipid Concentrations Over the Adult Life Course and Risk of Cardiovascular Disease and All - Cause Mortality: Observations From the Framingham Study Over 35 Years [J]. J Am Heart Assoc, 2019, 8 (11):e11433.

[49] Stenman L K, Holma R, Eggert A, et al. A novel mechanism for gut barrier dysfunction by dietary fat: epithelial disruption by hydrophobic bile acids[J]. Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol, 2013,304 (3):G227.

[50] Varela - Trinidad G U, Dominguez - Diaz C, Solorzano - Castanedo K, et al. Probiotics: Protecting Our Health from the Gut[J]. Microorganisms, 2022,10(7):1428.

[51] Zhang - Sun W, Augusto L A, Zhao L, et al. Desulfovibrio desulfuricans isolates from the gut of a single individual: structural and biological lipid A characterization[J]. FEBS Lett, 2015,589(1):165.

[52] Kasahara K, Krautkramer K A, Org E, et al. Interactions between Roseburia intestinalis and diet modulate atherogenesis in a murine model[J]. Nat Microbiol, 2018,3(12):1461.

[53] Cirstea M, Radisavljevic N, Finlay B B. Good Bug, Bad Bug: Breaking through Microbial Stereotypes[J]. Cell Host Microbe, 2018, 23(1):10.

[54] 张云，刘咏梅，刘宗莲，等. 化浊祛湿通心方对心肌梗死大鼠肠道菌群的调节及功能基因预测[J]. 中华中医药杂志，2020,35 (6):2813.

[55] 赵鹏，郑玉琪，田进伟，等. 阿克曼氏菌与动脉粥样硬化关系的研究进展[J]. 中国动脉硬化杂志，2023,31(5):456.

[56] 李月，张红岩，马新，等. 嗜黏蛋白阿克曼氏菌 ONE 对高胆固醇血症小鼠的改善效果[J]. 食品科学，2024,45 (19): 65.

[57] Chu C, Liu S, Nie L, et al. The interactions and biological pathways among metabolomics products of patients with coronary heart disease [J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2024,173:116305.

[58] McGarrah R W, White P J. Branched - chain amino acids in cardiovascular disease[J]. Nature Reviews Cardiology, 2023,20(2):77.

[59] Santos J L, Ruiz - Canela M, Razquin C, et al. Circulating citric acid cycle metabolites and risk of cardiovascular disease in the PREDIMED study[J]. Nutr Metab Cardiovasc Dis, 2023,33(4):835.

[60] 吴德坤，郑景辉，王铁华，等. 大鼠急性心肌梗死血瘀证心肌组织代谢组学的生物信息学分析[J]. 辽宁中医杂志，2016,43 (3):630.

[61] 张博，王雨婷，刘洁，等. 经典药对“瓜蒌 - 薤白”治疗痰瘀互结心血管疾病的血清代谢组学研究[J]. 中国中药杂志，2024,49 (1):232.

[62] Zheng L, Mingxue Z, Zeng L, et al. A Landscape of Metabonomics for Intermingled Phlegm and Blood Stasis and Its Concurrent Syndromes in Stable Angina Pectoris of Coronary Heart Disease[J]. Front Cardiovasc Med, 2022,9:871142.

[63] 张丽敏. 早期和晚期限时饮食对超重和肥胖成年人体重和心血管代谢健康的影响及其机制研究[D]. 河北医科大学博士学位论文，2022.

[64] Bhattacharya S, Granger C B, Craig D, et al. Validation of the association between a branched chain amino acid metabolite profile and extremes of coronary artery disease in patients referred for cardiac catheterization[J]. Atherosclerosis, 2014,232(1):191.

[65] Shah S H, Sun J L, Stevens R D, et al. Baseline metabolomic profiles predict cardiovascular events in patients at risk for coronary artery disease[J]. Am Heart J, 2012,163(5):844.

[66] Tsukahara T, Matsuda Y, Haniu H. Lysophospholipid - Related Diseases and PPARgamma Signaling Pathway[J]. Int J Mol Sci, 2017, 18(12):2730.

[67] Chen G, Ye G, Zhang X, et al. Metabolomics Reveals Protection of Resveratrol in Diet - Induced Metabolic Risk Factors in Abdominal Muscle[J]. Cell Physiol Biochem, 2018,45(3):1136.

[68] Ban Q, Sun X, Jiang Y, et al. Effect of synbiotic yogurt fortified with monk fruit extract on hepatic lipid biomarkers and metabolism in rats with type 2 diabetes[J]. J Dairy Sci, 2022,105(5):3758.

[69] Zhao L, Qiu X, Wang R, et al. (1)H NMR - based metabolomics study of the dynamic effect of Xue - Fu - Zhu - Yu capsules on coronary heart disease rats induced by high - fat diet, coronary artery ligation[J]. J Pharm Biomed Anal, 2021,195:113869.

Characterization of intestinal flora in rats with Acute Coronary Syndrome due to phlegm and stasis syndrome based on Metagenomic next – generation sequencing

CHEN Yan-xi[1], ZHANG Ni[2*],

(1. *Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *First Clinical School*, *Shenyang*, 110847; 2. *Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine*, *Department of Cardiology*, *Shenyang*, 110032)

Abstract: Objective To characterize the intestinal flora of rats with acute coronary syndrome with phlegm and blood stasis based on metagenomic next – generation sequencing, and to provide a scientific and experimental basis for clinical prevention and treatment. **Methods** The model of mutual syndrome of phlegm and blood stasis in ACS was established by feeding high – fat diet combined with intraperitoneal injection of isoprenaline. The structure of intestinal microbiota in both groups was analyzed by metagenomic next – generation sequencing, and the alpha diversity index analysis, LEfSe multi – level species difference discrimination analysis, KEGG functional annotation, and Network analysis were performed. **Results** Compared with the normal group, the abundance of Actinobacteria, Proteobacteria, Spirochaetes and Clostridium in the ACS group increased, and the abundance of Lactobacillus decreased, and the differential flora was Actinobacteria, Proteobacteria, Treponema, Collinsella, etc. The differential flora of the normal group of rats was Lactobacillus, and the differential metabolic pathway was galactose metabolism. Actinobacteria, Proteobacteria and Spirochaetes were significantly and positively correlated with the phenylalanine tyrosine and tryptophan biosynthesis, valine leucine and isoleucine biosynthesis($P<0.05$). **Conclusion** The characteristic bacterial groups in mutual syndrome of phlegm and blood stasis in ACS group were Proteobacteria, Treponema, Collinsella etc. Proteobacteria etc. are significantly related to metabolic pathways such as phenylalanine tyrosine and tryptophan biosynthesis. The differential bacteria groups may be the key pathogenesis of the occurrence and development of acute coronary syndrome of phlegm and blood stasis interjunction through synergistic regulation of the differential pathways.

Key words: Gut Microbes; Mutual syndrome of phlegm and blood Stasis; Acute coronary syndrome; Metagenomic next – generation sequencing

(责任编辑:周弈轩)