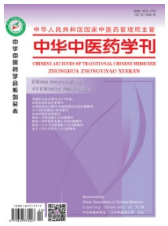


中华中医药学刊
Chinese Archives of Traditional Chinese Medicine
ISSN 1673-7717,CN 21-1546/R

《中华中医药学刊》网络首发论文

题目：基于“心合小肠”探讨肠道菌群驱动 TMA/FMO3/TMAO 通路影响痰瘀互结证急性冠脉综合征大鼠血小板聚集的机制

作者：张妮，陈彦熹，李馨雅，陈韦

网络首发日期：2024-11-13

引用格式：张妮，陈彦熹，李馨雅，陈韦．基于“心合小肠”探讨肠道菌群驱动 TMA/FMO3/TMAO 通路影响痰瘀互结证急性冠脉综合征大鼠血小板聚集的机制[J/OL]．中华中医药学刊．
https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20241112.1547.002

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 13:19:24　网络首发地址：https://link.cnki.net/urlid/21.1546.R.20241112.1547.002

基于“心合小肠”探讨肠道菌群驱动 TMA/FMO3/TMAO 通路影响痰瘀互结证急性冠脉综合征大鼠血小板聚集的机制

张妮[1*]，陈彦熹[2]，李馨雅[2]，陈韦[1]

（1. 辽宁中医药大学附属医院 沈阳 110032，2. 辽宁中医药大学 沈阳 110847）

摘要：目的：基于中医“心合小肠”理论探讨肠道菌群驱动 TMA/FMO3/TMAO 通路影响痰瘀互结证急性冠脉综合征大鼠血小板聚集的机制。**方法：**45 只 SPF 级健康 SD 大鼠，随机分为对照组（CON）、急性冠脉综合征组（ACS）、痰瘀互结证急性冠脉综合征组（TYACS），每组 15 只。八通道多导心电图记录大鼠标准肢体II导联心电图变化。全自动生化分析仪检测大鼠血清血脂水平。苏木素—伊红（Hematoxylin-eosin staining, HE）染色法观察大鼠心肌组织结构变化。光电比浊法检测血小板花生四稀酸（Arachidonic acid, AA）、二磷酸腺苷（Adenosine diphosphate, ADP）最大聚集率。LC/MS 技术检测大鼠血浆三甲胺（Trimethylamine, TMA）、氧化三甲胺（Trimethylamine N-oxide, TMAO）含量，Realtime RT-PCR 及 Westernblot 检测大鼠肝脏含黄素单氧化酶 3（Flavin containing monooxygenase 3, FMO3）基因及蛋白表达。Spearman 相关分析探讨 TMAO 与血小板 AA、ADP 最大聚集率的相关性。宏基因组技术检测大鼠肠道微生物组特征。**结果：**ACS 组及 TYACS 组大鼠心电图改变符合急性冠脉综合征，TYACS 组大鼠血清血脂水平符合痰瘀互结证饮食不节改变。HE 染色显示 CON 组大鼠心肌排列整齐、胞质丰富。ACS 组及 TYACS 组大鼠缺血区炎症细胞浸润，心肌细胞核丢失，心肌细胞呈空泡样变，心肌组织紊乱。ACS 组和 TYACS 组大鼠血小板 AA 和 ADP 最大聚集率均显著升高（$P<0.01$）。LC/MS 技术检测发现 ACS 组大鼠 TMA、TMAO 含量均呈上升趋势。TYACS 组大鼠 TMA 含量呈上升趋势，TMAO 含量显著升高（$P<0.001$）。ACS 组和 TYACS 组大鼠肝脏 FMO3 mRNA 及蛋白表达水平明显增高（$P<0.01$）。血小板 AA、ADP 最大聚集率与 TMAO 水平呈正相关。宏基因组技术发现 ACS 组和 TYACS 组大鼠肠道微生物组特征发生明显改变。CON 组大鼠显著差异的物种标志物是拟杆菌门（p__Bacteroidetes），ACS 组大鼠显著差异的物种标志物是厚壁菌门（p__Firmicutes）、梭杆菌门（p__Fusobacteria），TYACS 组大鼠显著差异的物种标志物是变形杆菌门（p__Proteobacteria）、放线菌门（p__Actinobacteria）、螺旋体门（p__Spirochaetes）。KEGG 富集分析发现痰瘀互结证 ACS 大鼠尤其以花生四烯酸代谢、核黄素的新陈代谢等通路富集的菌群最多，差异最明显。ACS 大鼠尤其以花生四烯酸代谢、胰岛素抵抗和核黄素的新陈代谢等通路相关。**结论：**痰瘀互结证 ACS 大鼠和 ACS 大鼠肠道微生物组发生显著特征性改变，模型大鼠血小板聚集过程可能与多种差异菌群共同驱动 TMA/FMO3/TMAO 通路，参与花生四烯酸代谢和核黄素的新陈代谢通路等有关。这一发现可能为探索通过调节菌群森林改善血小板聚集功能，预防 ACS 的新手段提供理论依据，丰富中医“心合小肠”理论。

Based on "the heart is connected with the small intestine" to explore the mechanism of gut microbiota drives

第一及通讯作者简介：张妮，女，汉，1993 年 3 月生人，主治医师，硕士学位，研究方向：中西医结合防治心血管疾病。地址：辽宁省沈阳市皇姑区北陵大街 33 号辽宁中医药大学附属医院。邮编：110032，电话：024-82961932，邮箱：zhang_ni1993@163.com。

基金资助：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）

TMA/FMO3/TMAO pathway affecting platelet aggregation in ACS with syndrome of phlegm and blood stasis rats

ZHANG Ni [1*], CHEN Yanxi [2], LI Xinya [2], CHEN Wei [1]

(1. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, *Shenyang, 110032* , 2. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, *Shenyang, 110847*)

Abstract: Objective: Based on the theory of "the heart is connected with the small intestine" in traditional Chinese medicine, this study explored the mechanism by which gut microbiota drives the TMA/FMO3/TMAO pathway to affect platelet aggregation in ACS with syndrome of phlegm and blood stasis rats. **Methods:** Forty-five SPF healthy SD rats were randomly divided into control group (CON), acute coronary syndrome group (ACS), and acute coronary syndrome with syndrome of phlegm and blood stasis group (TYACS), with 15 rats in each group. Eight-channel multi-lead electrocardiogram was used to record the changes of lead II electrocardiogram of the standard limb of rats. The serum lipid levels of rats were detected by automatic biochemical analyzer. HE staining was used to observe the structural changes of myocardial tissue. Platelet AA% and ADP% were detected by photoelectric turbidimetry. Plasma TMA and TMAO were detected by LC/MS, and liver FMO3 gene and protein expression were detected by RT-PCR and Westernblot. Spearman correlation analysis was used to investigate the correlation between TMAO and the maximum aggregation rate of platelet AA and ADP. Metagenomic technology was used to detect the characteristics of gut microbiome in rats. **Results:** The ECG changes of rats in ACS group and TYACS group were consistent with acute coronary syndrome, and the serum lipid levels of rats in TYACS group were consistent with the dietary imbalance of the syndrome of phlegm and blood stasis. HE staining showed that the myocardium of the CON group was arranged neatly and the cytoplasm was abundant. In the ACS group and TYACS group, inflammatory cell infiltration in the ischemic area, loss of myocardial nucleus, vacuolar degeneration of myocardial cells, and disorder of myocardial organization were observed. The maximum aggregation rate of platelet AA and ADP were significantly increased in ACS and TYACS group ($P<0.01$). LC/MS showed that the levels of TMA and TMAO in ACS rats and TMA in TYACS group were showed upward trend, and the level of TMAO in TYACS group was significantly increased ($P<0.001$). FMO3 mRNA and protein in liver of ACS and TYACS group were significantly increased ($P<0.001$). Maximum aggregation rate of platelet AA and ADP were positively correlated with TMAO level. Metagenomic analysis revealed that the characteristics of gut microbiome in ACS and TYACS rats were significantly changed. The species markers significantly different in CON rats was p__Bacteroidetes, in ACS rats were p__Firmicutes and p__Fusobacteria, in TYACS group were p__Proteobacteria, p__Actinobacteria, and p__Spirochaetes. KEGG enrichment analysis showed that the bacteria were most enriched in Arachidonic acid metabolism, Riboflavin metabolism and other pathways in ACS with syndrome of phlegm and blood stasis rats, and the differences were the most obvious. ACS rats are especially related to Arachidonic acid metabolism, Insulin resistance, Riboflavin metabolism and other pathways. **Conclusions:** The gut microbiome of rats with ACS and ACS with syndrome of phlegm and blood stasis had significant characteristic changes. The platelet aggregation process of

model rats may be related to a variety of different gut microbiota driving the TMA/FMO3/TMAO pathway, participating in Arachidonic acid metabolism, Riboflavin metabolism, etc. This finding may provide a theoretical basis for exploring new methods to improve platelet aggregation function and prevent ACS by regulating flora forest, and enrich the theory of "the heart is connected with the small intestine" in traditional Chinese medicine.
关键词：心合小肠，痰瘀互结证急性冠脉综合征，血小板聚集，肠道菌群，TMA/FMO3/TMAO
Keywords: The heart is connected with the small intestine, Acute coronary syndrome with syndrome of phlegm and blood stasis, Platelet aggregation, Gut microbiota, TMA/FMO3/TMAO

急性冠脉综合征（acute coronary syndrome, ACS）是众多国家死亡的主要原因，亦是我国发病率、致残率、死亡率和复发率都很高的一类疾病[1,2]。抗栓治疗贯穿于 ACS 患者的一生，是 ACS 预防和治疗的基石，但在临床实践中抗栓治疗十分复杂[3,4]。部分 ACS 患者血小板反应性高[5,6]，即使进行规范化的抗血小板治疗，仍不能充分抑制血小板活性来预防和治疗冠状动脉缺血事件，并会增加部分患者的出血事件风险[7,8]。中医将 ACS 归属于“胸痹”、“卒心痛”、“真心痛”等范畴。明 秦景明《症因脉治》云“心痹之因----痰凝血滞”，将其病机关键概括为“痰凝血滞”。临床中痰瘀互结证作为 ACS 的常见高发证型，亦是中医防治 ACS 的重要切入点[9,10]。肠道微生物组作为人体“第二基因组”，影响 ACS 的发生发展[11,12]，已逐渐成为防治 ACS 的潜在新靶点[12]。作为肠道菌群和肝脏产生的重要代谢产物，氧化三甲胺（Trimethylamine N-oxide, TMAO）可通过促进血小板胞外信号传导增强血小板反应性[13]。《黄帝内经》言“心合小肠，小肠者，脉其应”，概述了心与小肠在生理、病理、经络中的和合关系。小肠“泌别清浊”以养其心，小肠“主液”滑利血脉，小肠失于“别浊”化生痰瘀，痹阻胸阳，阻滞心脉而为胸痹。同时现代医学整合心脏和小肠的神经解剖，揭示了循环系统和消化系统之间的生理和病理相互作用[14]。因此，在中医“心合小肠”理论指导下，深入揭示肠道菌群驱动 TMA/FMO3/TMAO 通路影响痰瘀互结证急性冠脉综合征大鼠血小板聚集过程的机制，为挖掘通过调节菌群森林防治急性冠脉综合征的新方法提供理论基础，同时丰富中医“心合小肠”理论。

1 材料

1.1 实验动物　45 只 SPF 级健康 SD 大鼠，体重（200±20）g，雌雄各半，动物合格证号 SCXK（辽）2020-0001，辽宁长生生物技术有限公司提供。适应性饲养 1 周，SPF 级，光暗交替，恒温恒湿，动物自由饮食。本项目动物实验方案经辽宁中医药大学实验动物伦理委员会审查通过（批准号：21000042023058）。

1.2 药物　高脂饲料：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（号：080021417）。异丙肾上腺素购自 MedChemExpress 生物科技公司（批号：hi-b0468）。

1.3 试剂及仪器

苏木素—伊红（Hematoxylin-eosin staining, HE）染色试剂盒（Servicebio, G1003），血脂检测试剂盒（南京博研生物科技有限公司），RNA 提取液（武汉赛维尔生物科技有限公司，G3013），2×SYBR Green qPCR Master Mix 实时荧光定量试剂盒（武汉赛维尔生物科技有限公司，G3320），SweScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR（One-Step gDNA Remover）（武汉赛维尔生物科技有限公司，G3337），RIPA 裂解液（武汉赛维尔生物科技有限公司，G2002-100ML），BCA 蛋白定量检测试剂盒（武汉赛维尔生物科技有限公司，G2026），超敏 ECL 化学发光试剂盒（武汉赛维尔生物科技有限公司，G2020-25ML），ACTIN（武汉赛维尔生物科技有限公司，GB12001），含黄素单加氧酶 3

（Flavin containing monooxygenase 3，FMO3）（武汉赛维尔生物科技有限公司，GB113169），TMAO（Sigma-Aldrich, 317594）、三甲胺（Trimethylamine，TMA）（Sigma_Aldrich，41284），Omega E.Z.N.A. Stool DNA Kit （Omega Bio-tek, Inc., USAD，4015-02）等。

八通道多导心电图（安省正华生物仪器设备有限公司），全自动生化分析仪（日本东芝），组织切片机（徕卡仪器有限公司），荧光定量 PCR 仪（美国 Bio-rad 公司），垂直电泳仪（武汉赛维尔生物科技有限公司），转印电泳仪（武汉赛维尔生物科技有限公司），超高效液相色谱系统（美国 Agilent 公司），质谱仪（上海 SCIEX 公司），Covaris S220 超声波破碎仪（美国 Covaris 公司），Qubit 2.0 荧光定量仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司），Agilent 2100 生物分析仪（美国 Agilent 公司），Illumina NovaSeq 6000 测序仪（美国 Illumina 公司）。

2 方法

2.1 动物分组及模型制备

45 只 SPF 级健康 SD 大鼠，随机分为对照组（CON）、急性冠脉综合征组（ACS）、痰瘀互结证急性冠脉综合征组（TYACS），每组 15 只。适应性喂养 1 周后，制备痰瘀互结证模型，模拟饮食不节，在喂食开始时一次性腹腔注射维生素 D3 40 万 IU/kg，高脂饲料连续喂饲 30 天。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》对大鼠痰瘀互结证进行评价。痰瘀互结证造模 30 天成功后，给予各组大鼠异氟烷吸入麻醉，待麻醉成功后使其仰卧于台上，给予大鼠腹腔注射异丙肾上腺素 45 mg/kg，复制急性心肌缺血大鼠模型，对照组大鼠腹腔注射等体积生理盐水。

2.2 八通道多导心电图记录大鼠标准肢体II导联心电图变化

八通道多导心电图记录 30min 大鼠标准肢体II导联心电图变化，测 5 个心动周期。

2.3 全自动生化分析仪检测大鼠血清血脂水平

采集大鼠眼眶血，在试剂盒说明书指导下全自动生化分析仪检测血清中总胆固醇（Total Cholesterol, TC）、甘油三酯（Triglyceride, TG）、低密度脂蛋白（Low-density lipoprotein, LDL -C）、高密度脂蛋白（High density liptein cholesterol, HDL -C）含量。

2.4 苏木素—伊红（HE）染色法观察大鼠心肌组织结构变化

取 100 g/L 多聚甲醛固定的心肌组织，脱水、石蜡包埋、切片、脱蜡、梯度入水、苏木素—伊红（HE）染色、晾干、封片，光镜下观察心肌组织结构情况。

2.5 光电比浊法检测血小板 AA、ADP 最大聚集率

室温下 100 g、10-15 min 离心准备富血小板血浆，室温下 1600-2000 g、10-15 min 离心富集血小板血浆，得到乏血小板血浆，对标本富血小板血浆和正常质控富血小板血浆进行血小板计数。最后设置血小板聚集仪参数并上机进行检测。

2.6 LC/MS 技术检测大鼠血浆 TMA、TMAO 含量

（1）代谢物提取

每 50 μL 血清样品，加入 10μL 内标，450μL 预冷乙腈溶液，涡旋混合 30 s； 4℃孵育 10 min，沉淀蛋白；14000 rcf，4℃离心 20 min，取上清冷冻干燥。

（2）超高效液相色谱系统进行分离

样品置于 4℃进样器中，柱温 25℃，A: 10 mmol/L 甲酸铵+0.4%甲酸水溶液，B: 0.4%甲酸乙腈溶液，流速为 400 μL/min。液相梯度：0-1.5 min，95% B；1.5-7.0 min，95%-85% B；7.0-7.1 min，85%-50% B；7.1-10 min，50% B；10-10.5 min，50%-90% B；10.5-14.5 min，90% B。质谱仪在正离子模式下进行质谱分析。5500 QTRAP ESI 源条件如下：source temperature: 550℃; ion SourceGas1 （Gas1）: 55; Ion Source Gas2 （Gas2）: 55; Curtain gas（CUR）: 40; ionSapary Voltage Floating （ISVF）: +4500 V；采用 MRM 模式检测离子对。

2.7 RT-PCR 及 Westernblot 检测大鼠肝脏 FMO3 基因及蛋白表达

取大鼠肝脏组织，按照 RNA 提取试剂盒说明书进行总 RNA 提取，将样本总 RNA 稀释

至 200 ng/μL，按照反转录试剂盒将总 RNA 反转录为 cDNA，实时荧光定量试剂盒进行扩增，冰上配制扩增反应体系，进行 40 个循环扩增，根据扩增结果采用“标准曲线法”计算基因 mRNA 相对表达量并进行数据分析。FMO3、GAPDH 引物委托武汉赛维尔生物科技有限公司合成，引物序列如下：FMO3: 5′-TGGGCAGCACAAGTAATAAGAGG-3′、5′-TGGCTCCTGACCACTTCCCT-3′，GAPDH: 5′-CTGGAGAAACCTGCCAAGTATG-3′、5′-GGTGGAAGAATGGGAGTTGCT-3′。

取大鼠肝脏组织，于离心管中加入 10 倍组织体积裂解液，充分研磨提取匀浆液，4 ℃、12000 r/min、10 min 离心，分离上清液，提取总蛋白。配制蛋白标准品，使用 BCA 蛋白质定量检测试剂盒测量蛋白质浓度。将蛋白样品在 SDS-PAGE 凝胶上分离，并转移到 PVDF 膜上。然后将膜与抗 FMO3 抗体孵育过夜，然后用含 HRP-偶联的山羊抗兔抗体，使用 ECL 增强化学发光试剂盒观察蛋白条带，并暴露于 X 射线胶片，扫描图像并分析灰度值。

2.8 宏基因组技术检测大鼠肠道微生物组特征

参照 Omega E.Z.N.A. Stool DNA Kit 试剂盒说明书进行肠道微生物组 DNA 提取。提取得到的 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 样品用 Covaris 超声波破碎仪将基因组 DNA 随机打断成长度约 300bp 的小片段，经末端修复、加 A 尾、加测序接头、纯化、PCR 扩增等步骤完成整个文库制备。文库构建完成后，先使用 Qubit 2.0 进行初步定量，稀释文库至 2 ng/μl，随后使用 Agilent 2100 对文库的插入片段进行检测，插入片段符合预期后，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 ＞3 nmol/L），以保证文库质量。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 NovaSeq 6000 平台测序。

对原始下机数据使用 Trimmomatic（v0.36）软件进行质控，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。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。

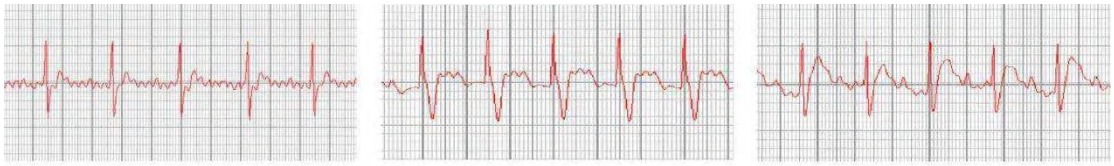
2.9 统计学方法

本实验数据为计量资料数据，符合正态分布，采用 $\bar{x} \pm s$ 表示，统计分析软件采用 SPSS 28.0 及 GraphPad Prism 8.0。组间数据比较采用单因素方差齐性分析，方差齐时组间两两比较采用 t 检验，余进行 LSD 法检验；方差不齐时组间比较采用 Tamhane 检验，相关性分析采用 Spearman 相关分析，$P<0.05$ 为差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 各组大鼠标准肢体II导联心电图（30min）变化

CON 组大鼠心电图正常，未见心律失常及 ST-T 异常改变；ACS 组大鼠可见 ST 段上移约 0.1mV，TYACS 组大鼠可见 ST 段上移约 0.2mV，ACS 组及 TYACS 组大鼠心电图改变均为急性冠脉综合征心电图改变，说明造模成功，且 TYACS 组大鼠心电图改变较 ACS 组明显，说明痰瘀互结证会增加 ACS 大鼠心肌缺血病变。见图 1。



CON　　ACS　　TYACS

图 1 各组大鼠标准肢体II导联心电图（30min）变化

3.2 各组大鼠血清血脂水平比较

与 CON 组和 ACS 组大鼠相比，TYACS 组大鼠血清中 TC、TG、LDL-C 水平均显著升高（$P<0.01$），HDL-C 水平显著下降（$P<0.01$），说明痰瘀互结证大鼠通过饮食不节造模成功。见图 2。

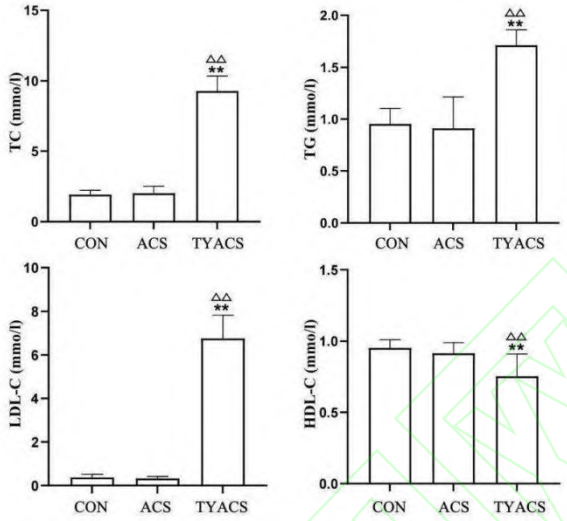


图 2 各组大鼠血清血脂水平比较（n=15）

注：与 CON 组比较，**$P<0.01$；与 ACS 组比较，△△$P<0.01$。

3.3 各组大鼠心肌组织结构变化

CON 组大鼠心肌排列整齐、胞质丰富。ACS 组及 TYACS 组大鼠缺血区炎症细胞浸润，心肌细胞核丢失，心肌细胞呈空泡样变，心肌组织紊乱。见图 3。

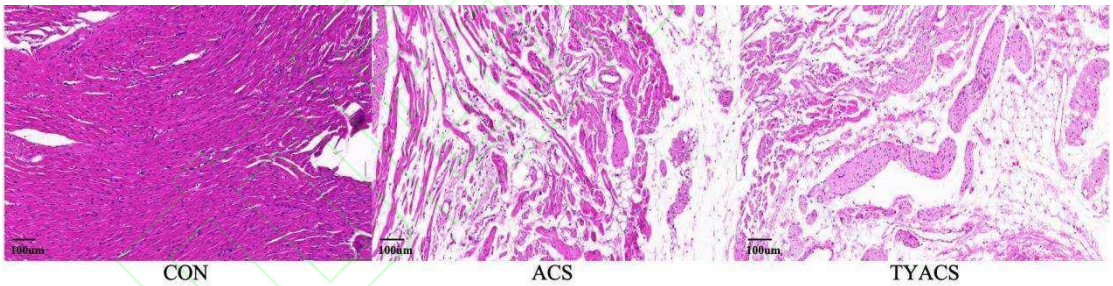


图 3 各组大鼠心肌组织 HE 染色比较（n=3）

3.4 各组大鼠血小板 AA、ADP 最大聚集率比较

与 CON 组相比，ACS 组大鼠血小板 AA、ADP 最大聚集率显著升高（$P<0.01$）；与 ACS 组相比，TYACS 组大鼠血小板 AA、ADP 最大聚集率显著升高（$P<0.01$）。见图 4。

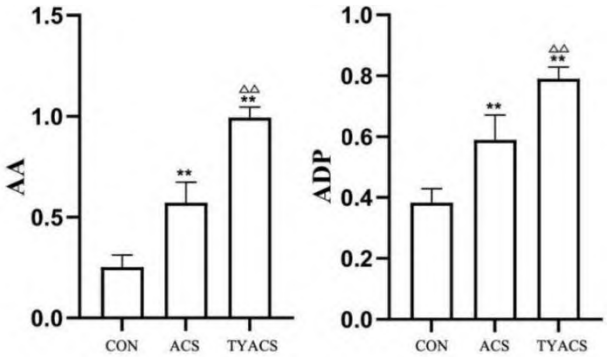


图 4 各组大鼠血小板 AA 和 ADP 最大聚集率比较（n=15）。

注：与 CON 组比较，**P<0.01；与 ACS 组比较，△△P<0.01。

3.5 各组大鼠血浆 TMA、TMAO 含量比较

与 CON 组相比，ACS 组大鼠 TMA、TMAO 含量均呈上升趋势，但差异无统计学意义。与 CON 组相比，TYACS 组大鼠 TMA 含量呈上升趋势，但差异无统计学意义；TMAO 含量显著升高（P<0.001）。与 ACS 组相比，TYACS 组大鼠 TMA 含量呈下降趋势，但差异无统计学意义；TMAO 含量显著升高（P<0.001）。见图 5。

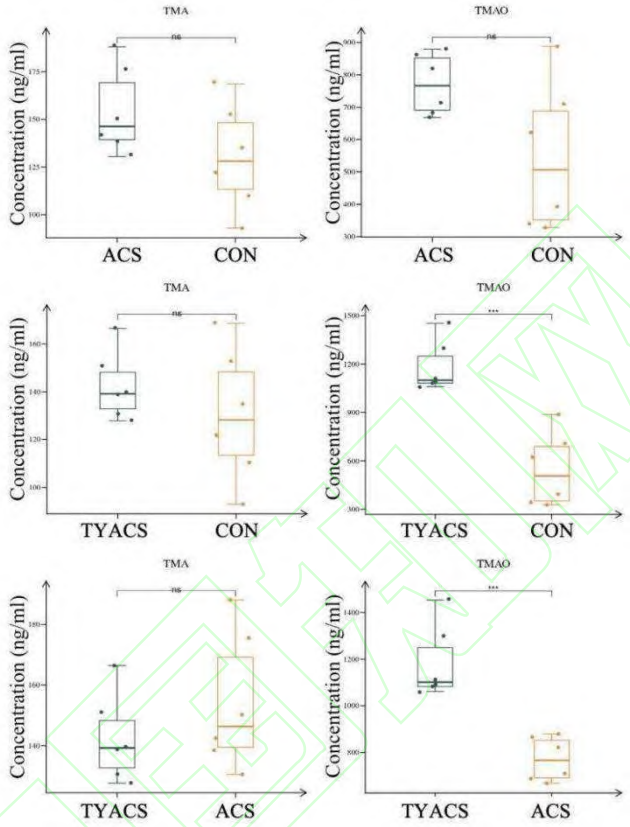


图 5 各组大鼠血浆 TMA、TMAO 含量比较（n=6）

注：***P<0.001，**P<0.01，*P<0.05。

3.6 各组大鼠肝脏 FMO3 基因及蛋白表达情况

与 CON 组相比，ACS 组和 TYACS 组大鼠肝脏 FMO3 mRNA 表达水平明显增高（P<0.01）；ACS 组和 TYACS 组大鼠肝脏 FMO3 mRNA 表达水平无明显差异，见图 6。

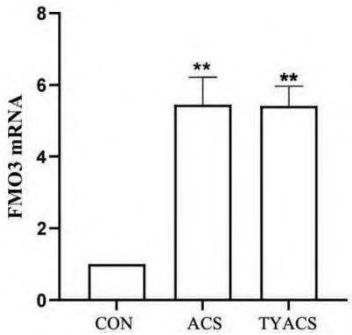


图 6 各组大鼠 FMO3 mRNA 表达水平比较（n=3）

注：与 CON 组比较，**P<0.01；与 ACS 组比较，△△P<0.01。

与 CON 组相比，ACS 组和 TYACS 组大鼠肝脏 FMO3 蛋白表达水平明显增高（P<0.01）；

与 ACS 组相比，TYACS 组大鼠肝脏 FMO3 蛋白表达水平呈增高趋势，但差异无统计学意义。见图 7。

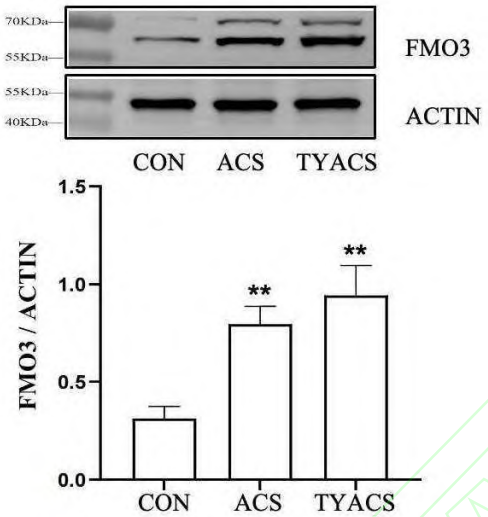


图 7 各组大鼠 FMO3 蛋白表达水平比较（n=3）

注：与 CON 组比较，**P<0.01；与 ACS 组比较，△△P<0.01。

3.7 TMAO 与血小板 AA、ADP 最大聚集率的相关性分析

Spearman 相关分析探讨 TMAO 与血小板 AA、ADP 最大聚集率的相关性，结果显示，TMAO 与血小板 AA、ADP 最大聚集率呈正相关。见图 8。

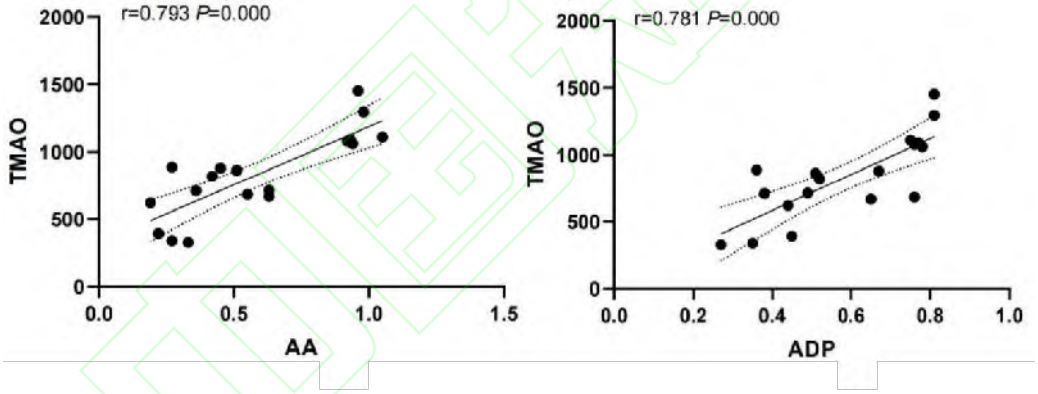


图 8 TMAO 与血小板 AA、ADP 最大聚集率的相关性分析

3.8 各组大鼠肠道微生物组特征

（1）Anosim 分析

通过 Anosim 分析进行样本组间差异与组内差异比较，结果显示 CON 组、ACS 组和 TYACS 组组间样本之间差异显著大于各组组内样本差异，说明各组间的样本微生物存在显著差异，分组具有意义（P=0.001），样本之间差异主要由分组因素导致，见图 9。

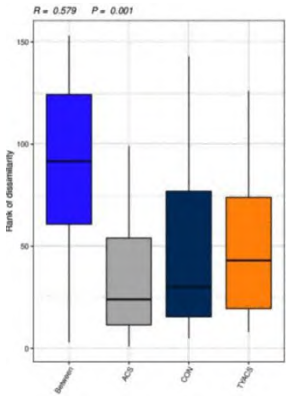


图 9 Anosim 分析

（2）Alpha 多样性分析

对三组菌群进行 Alpha 多样性分析，Shannon 和 Simpson 指数用来估算样品中微生物组成的多样性，数值越大说明群落多样性越高。结果显示，与 CON 组相比，ACS 组和 TYACS 组 Shannon 和 Simpson 指数均升高，且差异存在统计学意义（$P<0.05$），说明 ACS 组和 TYACS 组大鼠群落多样性升高。见图 10。

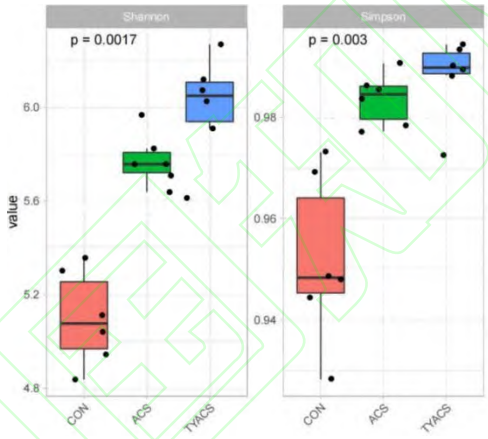


图 10 Alpha 多样性分析

（3）肠道菌群组间物种差异分析

通过秩和检验的方法检测三组组间的差异物种并通过 LDA（线性判别分析）实现降维并评估差异物种的影响大小，即得到 LDA 值分布柱状图。结果发现：CON 组显著差异的物种标志物是拟杆菌门（p__Bacteroidetes），ACS 组显著差异的物种标志物是厚壁菌门（p__Firmicutes）、梭杆菌门（p__Fusobacteria），TYACS 组显著差异的物种标志物是变形杆菌门（p__Proteobacteria）、放线菌门（p__Actinobacteria）、螺旋体门（p__Spirochaetes）。见图 11。

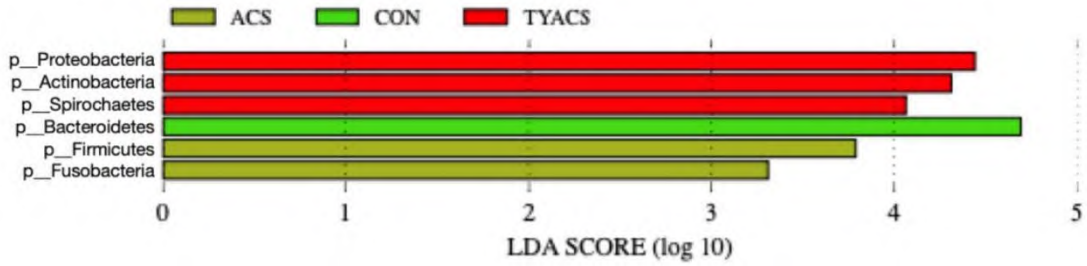


图 11 门水平差异物种 LDA 值分布图

在属水平上，LDA（线性判别分析）结果显示：CON 组显著差异的物种标志物是另枝

菌属（g__Alistipes）、g__Candidatus_Amulumruptor、紫单胞菌属（g__Muribaculum），ACS 组显著差异的物种标志物是活泼瘤胃球菌（g__Mediterraneibacter）、醋酸杆菌属（g__Acetobacterium）、罗氏菌属（g__Roseburia）、梭菌属（g__Clostridium）、优杆菌属（g__Eubacterium）、颤杆菌属（g__Oscillibacter）、g__Pseudoflavonifractor、韦荣球菌属（g__Veillonella）、霍尔德曼氏菌属（g__Holdemania）、普氏梭杆菌（g__Flavonifractor）、毛螺菌科（f__Lachnospiraceae_unclassified）、g__Acetatifactor、链杆菌属（g__Streptobacillus）、丁酸弧菌属（g__Butyrivibrio）、g__Allobaculum、厌氧棍状菌属（g__Anaerotruncus）、g__Neglecta、g__Acutalibacter、粪球菌属（g__Coprococcus）、颤螺菌科（f__Oscillospiraceae_unclassified）、g__Hungatella、博尔特肠杆菌（g__Enterocloster）、厌氧弧菌属（g__Anaerovibrio）、泉发菌属（g__Kineothrix）、梭杆菌属（g__Fusobacterium），TYACS 组显著差异的物种标志物是密螺旋体属（g__Treponema）、厌氧螺菌属（g__Anaerobiospirillum）、柯林斯菌属（g__Collinsella）、克雷伯氏菌属（g__Klebsiella）、γ-变形菌纲（c__Gammaproteobacteria;unclassified）、变形菌门（p__Proteobacteria;unclassified）、产碱杆菌属（g__Advenella）、无色杆菌属（g__Achromobacter）、极小单胞菌属（g__Pusillimonas_ex_Stolz_et_al_2005）、g__Adlercreutzia、脱硫弧菌属（g__Desulfovibrio）、螺旋体门（p__Spirochaetes;unclassified）、红蝽菌纲（c__Coriobacteriia_unclassified）、g__Dakarella、放线菌门（p__Actinobacteria;unclassified）、g__Duodenibacillus、g__Mesosutterella、啮齿杆菌属（g__Rodentibacter）、螺杆菌属（g__Helicobacter）、副沙门氏菌（g__Parasutterella）、沙门氏菌属（g__Salmonella）、放线菌属（g__Actinomyces）、脱硫弧菌科（f__Desulfovibrionaceae_unclassified）、g__Turicimonas。见图 12。

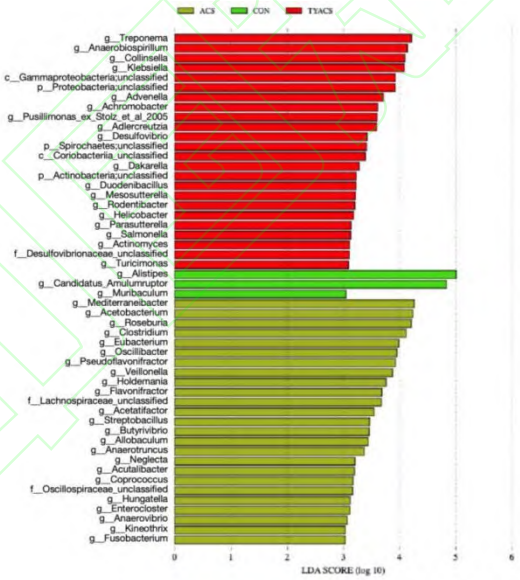


图 12 属水平差异物种 LDA 值分布图

（4）KEGG 功能分析

为深入探讨肠道菌群对血小板功能的影响，本研究对筛选到的菌群进行富集 KEGG 功能分析，结果发现：在菌群富集的 KEGG 通路中与血小板相关的信号通路共 11 个，分别为花生四烯酸代谢 Arachidonic acid metabolism、mTOR 信号通路 mTOR signaling pathway、MAPK 信号通路 MAPK signaling pathway、PPAR 信号通路 PPAR signaling pathway、流体剪切力与动脉粥样硬化 Fluid shear stress and atherosclerosis、血脂与动脉粥样硬化 Lipid and atherosclerosis、血小板激活 Platelet activation、PI3K-Akt 信号通路 PI3K-Akt signaling pathway、核黄素的新陈代谢 Riboflavin metabolism、类胡萝卜素生物合成 Carotenoid biosynthesis、胰

岛素抵抗 Insulin resistance。见图 13。

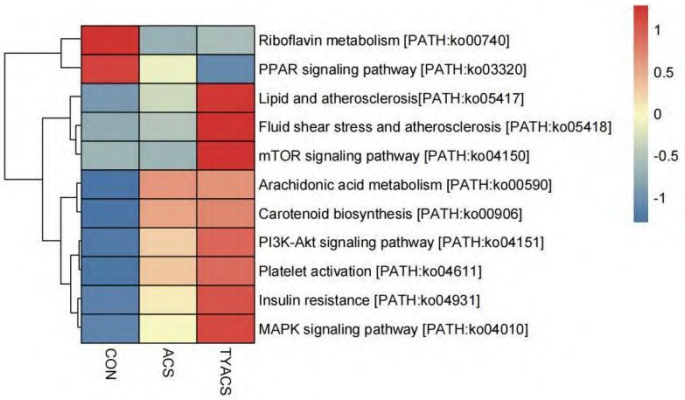


图 13 血小板相关 KEGG 通路

进一步利用 Stamp 分析寻找组间差异 KEGG 通路，结果发现：CON 组和 TYACS 组大鼠花生四烯酸代谢、流体剪切力与动脉粥样硬化、PI3K-Akt 信号通路、PPAR 信号通路和核黄素的新陈代谢通路菌群富集较多，且组间存在显著差异，见图 14A；CON 组和 ACS 组大鼠花生四烯酸代谢、胰岛素抵抗、PI3K-Akt 信号通路、PPAR 信号通路和核黄素的新陈代谢通路菌群富集较多，且组间存在显著差异，见图 14B；ACS 组和 TYACS 组大鼠花生四烯酸代谢、MAPK 信号通路、血小板激活和 PPAR 信号通路菌群富集较多，且组间存在显著差异，见图 14C。

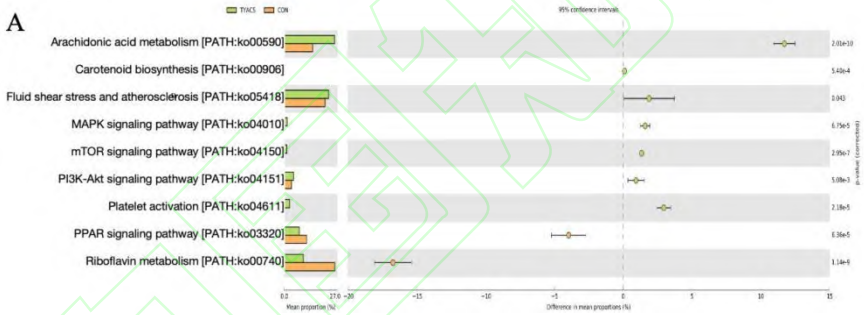


图 14A CON 组和 TYACS 组血小板相关 KEGG 通路比较

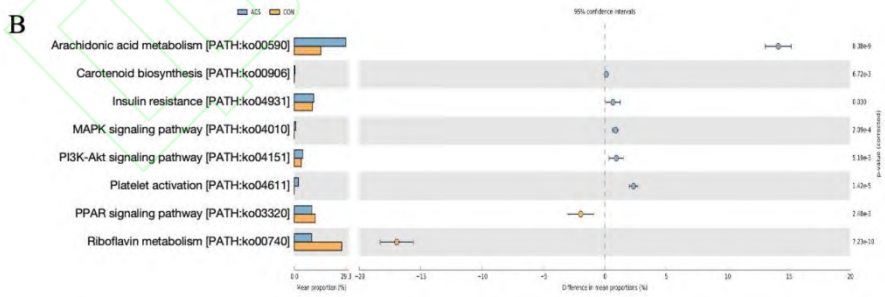


图 14B CON 组和 ACS 组血小板相关 KEGG 通路比较

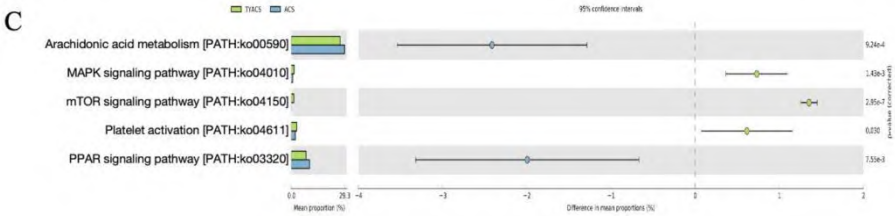


图 14C ACS 组和 TYACS 组血小板相关 KEGG 通路比较

4 讨论

ACS 是我国目前危害公民健康的重要疾病。血小板黏附、活化和聚集在 ACS 的病理过程中起关键作用。抗血小板治疗是预防和治疗血栓形成和减少临床不良事件的重要基石[15]。然而，环境、临床和遗传因素的相互作用导致了患者血小板反应的异质性[16]。同一种抗血小板药物在不同患者中具有不同的抗血小板作用，即血小板反应多样性[16,17]。部分患者由此导致心血管死亡等临床不良事件增加。因此，探讨影响 ACS 患者血小板反应性的机制具有重要意义。本研究通过高脂饮食喂养大鼠模拟饮食不节诱导痰瘀互结证模型。并通过腹腔注射异丙肾上腺素建立 ACS 模型。ACS 及痰瘀互结证 ACS 大鼠血小板反应性增高，且痰瘀互结证 ACS 大鼠更加显著。

Zhu W 等发现，肠道微生物通过产生 TMAO 直接促进血小板高反应性和血栓形成潜能增强[18]。TMAO 是由肠道菌群驱动的饮食诱导代谢物，主要通过肾脏排泄，可引起胆固醇代谢变化、炎症、内皮功能障碍和血小板活化[19-21]。TMAO 直接暴露于血小板通过增加细胞内储存 Ca（2+）的释放来增强血小板活化，引起血小板高反应性，促进血栓形成，并与心血管疾病相关[22-24]。并且肠道菌群和 TMAO 在调节血小板高反应性中的作用被微生物移植的动物模型证实[25]。TMAO 由含 TMA 的饮食前体产生。高脂食品中的营养物质通过多种微生物酶复合物的作用产生 TMA，进入门静脉循环，经肝脏中 FMO3 进一步代谢，生成 TMAO[26,27]。本研究痰瘀互结证 ACS 大鼠血清 TMAO 水平明显升高，ACS 大鼠血清 TMAO 水平呈上升趋势。痰瘀互结证 ACS 大鼠及 ACS 大鼠肝脏 FMO3 表达明显升高。说明痰瘀互结证 ACS 大鼠 TMA/FMO3/TMAO 通路激活。且研究进一步通过 Spearman 相关分析显示，血小板 AA%、ADP%与 TMAO 水平呈正相关。这与前人研究发现 TMAO 可直接促进血小板高反应性结论一致，进一步为临床预防痰瘀互结证 ACS 患者血小板高反应性提供新的目标靶点。

TMAO 作为一种新发现的肠道菌群依赖性代谢物，可以作为早期预警标志物来识别有疾病进展风险的个体[28-31]。肠道微生物衍生的代谢物参与多种疾病的病理过程。在本研究中，ACS 大鼠和痰瘀互结证 ACS 大鼠的肠道菌群特征发生了显著变化。正常大鼠显著差异的物种标志物是拟杆菌门，ACS 大鼠显著差异的物种标志物是厚壁菌门、梭杆菌门，TYACS 大鼠显著差异的物种标志物是变形杆菌门、放线菌门、螺旋体门。属水平差异物种标志物与门水平基本一致。且本研究 ACS 大鼠厚壁菌门（Firmicutes）与拟杆菌门（Bacteroidetes）的比例（F/B）上升。ApoE-/-小鼠肠道菌群物种丰富度及多样性下降明显，厚壁菌门（Firmicutes）与拟杆菌门（Bacteroidetes）的比例（F/B）显著上升[32]。在分析不稳定性心绞痛热毒血瘀证患者的肠道菌群特征发现，非热毒血瘀证患者拟杆菌门丰度较热毒血瘀证患者显著增高，热毒血瘀证患者放线菌门丰度显著增多[33]。方向颖研究发现 2 型糖尿病合并冠心病患者肠道菌群中变形杆菌门水平增多[34]。2 型糖尿病及糖尿病肾病患者血清 hs-CRP 水平与肠道毛螺菌属、瘤胃菌科、粪球菌属、梭杆菌属呈正相关[35]。亦有研究发现，老年脑梗死患者长期应用抗血小板治疗后肠道菌群特征以链球菌属、梭杆菌门等为优势菌群[36]。本研究与前人研究主要差异菌群趋势大体一致，但存在部分差异，这与肠道菌群特征及影响因素的复杂性等密切相关。

为深入探讨肠道菌群对血小板功能的影响，在菌群富集的 KEGG 通路中初步筛选与血小板相关的信号通路共 11 个，痰瘀互结证 ACS 大鼠花生四烯酸代谢、流体剪切力与动脉粥样硬化、PI3K-Akt 信号通路、血小板激活、PPAR 信号通路和核黄素的新陈代谢通路菌群富集较多，尤其以花生四烯酸代谢、PPAR 信号通路和核黄素的新陈代谢通路富集的菌群最多，差异最明显。说明痰瘀互结证 ACS 大鼠血小板反应性增高与以上 6 个通路相关，其中可能尤其与花生四烯酸代谢、核黄素的新陈代谢通路和 PPAR 信号通路相关。ACS 大鼠血小板反应性增高可能与花生四烯酸代谢、胰岛素抵抗、核黄素的新陈代谢通路、PI3K-Akt 信号

通路和 PPAR 信号通路相关。

综上，本研究初步揭示了痰瘀互结证 ACS 大鼠和 ACS 大鼠肠道菌群存在显著特征性变化，ACS 大鼠显著差异的物种标志物是厚壁菌门、梭杆菌门，TYACS 大鼠显著差异的物种标志物是变形杆菌门、放线菌门、螺旋体门。模型大鼠血小板聚集过程可能与上述多种菌群共同驱动 TMA/FMO3/TMAO 通路，参与花生四烯酸代谢和核黄素的新陈代谢通路等有关。这一发现可能为探索通过调节菌群森林改善血小板聚集功能，预防 ACS 的新手段提供理论依据，同时为痰瘀互结证 ACS 的诊疗策略更加优化奠定基础，并丰富中医“心合小肠”理论。然而，我们目前的数据是初步的，需要做更多的工作，包括诊断水平和更深入的研究水平。

参考文献

1. Gach O, El HZ, Lancellotti P. Acute coronary syndrome. Rev Med Liege 2018;73(5-6):243-250.

2. Wang L, Jin Y. Noncoding RNAs as Biomarkers for Acute Coronary Syndrome. Biomed Res Int 2020;2020:3298696.

3. Sabouret P, Spadafora L, Fischman D, Ullah W, Zeitouni M, Gulati M, et al. De-escalation of antiplatelet therapy in patients with coronary artery disease: Time to change our strategy?. Eur J Intern Med 2023;110:1-9.

4. Kwon O, Park DW. Antithrombotic Therapy After Acute Coronary Syndromes or Percutaneous Coronary Interventions in East Asian Populations. JACC Asia 2022;2(1):1-18.

5. Pedersen OB, Pasalic L, Nissen PH, Grove EL, Kristensen SD, Hvas AM. Flow Cytometric Assessment of Changes in Platelet Reactivity after Acute Coronary Syndrome: A Systematic Review. Semin Thromb Hemost 2022;48(5):542-551.

6. Alenazy FO, Thomas MR. Novel antiplatelet targets in the treatment of acute coronary syndromes. Platelets 2021;32(01):15-28.

7. Wongsalap Y, Kengkla K, Wilairat P, Ratworawong K, Saokaew S, Wanlapakorn C. Efficacy and safety of different dual antiplatelet strategies in patients undergoing percutaneous coronary intervention: A systematic review and network meta-analysis. Chronic Dis Transl Med 2023;9(4):299-308.

8. De Luca L, Gragnano F, Calabrò P, Huber K. Balancing Benefits and Risks of Oral Antiplatelet Strategies in patients With Coronary Artery Diseases: An Evolving Issue. Curr Probl Cardiol 2023;48(12):102025.

9. Yi M, Dai X, Li Q, Zhao Y, Nie S, Wang D. 1H-NMR-based metabolomics study on coronary heart disease with blood-stasis syndrome and phlegm syndrome. Zhong Nan Da Xue Xue Bao Yi Xue Ban 2021;46(6):591-600.

10. Liu R, Jiang LJ, Yang Y, Wang CC, Tong X, Xu WM, et al. Study on syndrome differentiation strategy of phlegm and blood stasis syndromes of coronary heart disease based on expert consultation on medical cases. Ann Palliat Med 2021;10(9):9940-9952.

11. Fang J, Yu CH, Li XJ, Yao JM, Fang ZY, Yoon SH, et al. Gut dysbiosis in nonalcoholic fatty liver disease: pathogenesis, diagnosis, and therapeutic implications. Front Cell Infect Microbiol 2022;12:997018.

12. Piccioni A, de Cunzo T, Valletta F, Covino M, Rinninella E, Raoul P, et al. Gut Microbiota and Environment in Coronary Artery Disease. Int J Environ Res Public Health 2021;18(8):4242.

13. Xie Z, Liu X, Huang X, Liu Q, Yang M, Huang D, et al. Remodelling of gut microbiota by Berberine attenuates trimethylamine N-oxide-induced platelet hyperreaction and thrombus formation. Eur J Pharmacol 2021;911:174526.
14. Zhang F, Wu LB, Hu L, Wu ZJ, Cui S, Yu Q, et al. Study on the central neural pathway and the relationship between the heart and small intestine via a dual neural tracer. PLoS One 2022;17(11):e0277644.
15. Galli M, Andreotti F, Sabouret P, Gragnano F. 2023 ESC Guidelines on ACS: what is new in antithrombotic therapy?. Eur Heart J Cardiovasc Pharmacother 2023;9(7):595-596.
16. Heemskerk JWM, West J. Emerging Technologies for Understanding Platelet Diversity. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2022;42(5):540-552.
17. Van der Meijden PEJ, Heemskerk JWM. Platelet biology and functions: new concepts and clinical perspectives. Nat Rev Cardiol 2019;16(3):166-179.
18. Zhu W, Gregory JC, Org E, Buffa JA, Gupta N, Wang Z, et al. Gut Microbial Metabolite TMAO Enhances Platelet Hyperreactivity and Thrombosis Risk. Cell 2016;165(1):111-124.
19. Canyelles M, Borràs C, Rotllan N, Tondo M, Escolà-Gil JC, Blanco-Vaca F. Gut Microbiota-Derived TMAO: A Causal Factor Promoting Atherosclerotic Cardiovascular Disease?. Int J Mol Sci 2023;24(3):1940.
20. Ivashkin VT, Kashukh YA. Impact of L-carnitine and phosphatidylcholine containing products on the proatherogenic metabolite TMAO production and gut microbiome changes in patients with coronary artery disease. Vopr Pitan 2019;88:25-33.
21. Ge X, Zheng L, Zhuang R, Yu P, Xu Z, Liu G, et al. The Gut Microbial Metabolite Trimethylamine N-Oxide and Hypertension Risk: A Systematic Review and Dose-Response Meta-analysis. Adv Nutr 2020;11:66-76.
22. Hasan RA, Koh AY, Zia A. The gut microbiome and thromboembolism. Thromb Res 2020;189:77-87.
23. Emonds JJ, Ringel C, Reinicke M, Müller D, Von Eckardstein A, Meixensberger J, et al. Influence of Trimethylamine N-Oxide on Platelet Activation. Nutrients 2022;14(16):3261.
24. Nam HS. Gut Microbiota and Ischemic Stroke: The Role of Trimethylamine N-Oxide. J Stroke 2019;21(2):151-159.
25. Duttaroy AK. Role of Gut Microbiota and Their Metabolites on Atherosclerosis, Hypertension and Human Blood Platelet Function: A Review. Nutrients 2021;13(1):144.
26. Massey W, Osborn LJ, Banerjee R, Horak A, Fung KK, Orabi D, et al. Flavin-Containing Monooxygenase 3 (FMO3) Is Critical for Dioxin-Induced Reorganization of the Gut Microbiome and Host Insulin Sensitivity. Metabolites 2022;12(4):364.
27. Zhang WQ, Wang YJ, Zhang A, Ding YJ, Zhang XN, Jia QJ, et al. TMA/TMAO in Hypertension: Novel Horizons and Potential Therapies. J Cardiovasc Transl Res 2021;14(6):1117-1124.
28. Zhang Y, Wang Y, Ke B, Du J. TMAO: how gut microbiota contributes to heart failure. Transl Res 2021;228:109-125.
29. Tang WH, Wang Z, Li XS, Fan Y, Li DS, Wu Y, et al. Increased Trimethylamine N-Oxide Portends High Mortality Risk Independent of Glycemic Control in Patients with Type 2 Diabetes Mellitus. Clin Chem 2017;63:297-306.
30. Witkowski M, Weeks TL, Hazen SL. Gut Microbiota and Cardiovascular Disease. Circ Res 2020;127(4):553-570.

31. Verhaar BJH, Prodan A, Nieuwdorp M, Muller M. Gut Microbiota in Hypertension and Atherosclerosis: A Review. Nutrients 2020;12(10):2982.
32. 曾祥法,王武胜,程璇,等. 化痰活血通络方调节肠道菌群抑制脂多糖介导的炎症通路改善动脉粥样硬化小鼠血管损伤 [J/OL]. 中华中医药学刊, 1-12[2024-04-01].
33. 刘垠杏. 基于肠道菌群和代谢组学探讨养心通脉方对冠心病血瘀证大鼠的作用机制[D]. 湖南中医药大学, 2023.
34. 方向颖. 2 型糖尿病合并冠心病患者肠道菌群与冠状动脉病变的相关性分析[D]. 桂林医学院, 2023.
35. 冯春念,曾琳智,王仕均,等. 2 型糖尿病与糖尿病肾病患者微炎症及肠道微生物多样性分析[J]. 中国微生态学杂志, 2020, 32 (11): 1273-1278.
36. 晏才国,王红梅,李露. 长期抗血小板治疗对老年脑梗死患者肠道菌群特征及肠道功能的影响 [J]. 心脑血管病防治, 2024, 24 (01): 50-53.