DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2025.07.014

清脂通脉方改善肠道菌群防治动脉粥样硬化的理论与机制探究

张欢[1],于游[2],段盈竹[1],庞琳琳[3],赵宏月[3],张颖[1],郭鹤[1],郑一[1],于嘉详[1],刘鑫[1],戴劲[1],胡楠[3],于睿[1]
(1.辽宁中医药大学,辽宁 沈阳 110847;2.辽宁中医药大学附属二院,辽宁 沈阳 110034;
3.辽宁中医药大学附属医院,辽宁 沈阳 110032)

摘要:目的 基于"心合小肠"理论,探讨清脂通脉方防治动脉粥样硬化的机制。方法 将32只雄性ApoE$^{-/-}$小鼠随机分为模型组、清脂通脉方最佳剂量1组、清脂通脉方最佳剂量2组和西药对照组。正常对照组为8只雄性C57BL/6J小鼠。模型组、中药干预组及西药组以高脂饲料喂饲,正常对照组喂以普通饲料,喂饲12周后,中药干预组给予最佳剂量清脂通脉方灌胃,西药对照药为立普妥。第12周采集小鼠新鲜粪便标本,采用16S rRNA基因测序技术对各组粪便样本进行肠道菌群分析。结果 肠道菌群16S rRNA基因测序发现,各组小鼠肠道菌群主要由厚壁菌门、拟杆菌门、变形杆菌门、TM7菌门、疣微菌门、放线菌门、脱铁杆菌门、软壁菌门、绿菌门以及绿弯菌门构成,在乳酸杆菌、异杆菌、脱硫弧菌、葡萄球菌、图灵杆菌、颤螺菌、安德克氏菌、瘤胃球菌、拟杆菌等菌属存在差异。正常对照组在门水平上的优势菌门为拟杆菌门(Bacteroidetes),其平均相对丰度为65%;模型组样本在门水平上的优势菌门为拟杆菌门(Bacteroidetes),其平均相对丰度为50%;清脂通脉方最佳剂量1组和清脂通脉方最佳剂量2组样本在门水平上的优势菌门为厚壁菌门(Firmicutes),其平均相对丰度分别为56%和65%;西药组样本在门水平上的优势菌门为厚壁菌门(Firmicutes),其平均相对丰度为65%,由各组门分类学水平菌种组成及相对丰度比较结果可知,各组优势菌门相似、但菌种的丰度比例均发生变化。结论 清脂通脉方能够通过改善菌门构成,影响肠道菌群物种组成、结构、菌群多样性,维持肠道菌群稳态,发挥防治AS的作用。

关键词:清脂通脉方;动脉粥样硬化;肠道菌群
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2025)07-0063-14

Investigation on Theory and Mechanism of Qingzhi Tongmai Formula(清脂通脉方) Improving Gut Microbiota to Prevent Atherosclerosis

ZHANG Huan[1], YU You[2], DUAN Yingzhu[1], PANG Linlin[3], ZHAO Hongyue[3], ZHANG Ying[1], GUO He[1], ZHENG Yi[1], YU Jiaxiang[1], LIU Xin[1], DAI Jin[1], HU Nan[3], YU Rui[1]
(1. Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110847, Liaoning, China;
2. The Second Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110034, Liaoning, China;
3. Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang 110032, Liaoning, China)

Abstract: *Objective* Based on the theory that "heart is corresponding to small intestine", to explore the mechanism of Qingzhi Tongmai Formula(清脂通脉方) in preventing and treating atherosclerosis. *Methods* Thirty-two male ApoE$^{-/-}$ mice were randomly divided into model group, Qingzhi Tongmai Formula optimal dose group 1, Qingzhi Tongmai granules optimal dose group 2 and western medicine control group. The normal control group consisted of 8 male C57BL/6J mice. Model group, traditional Chinese medicine intervention groups and western medicine group were fed with high-fat diet, while the normal control group was fed the ordinary diet. After 12 weeks feeding, the Chinese medicine intervention groups were given the optimal dose of Qingzhi Tongmai Formula by gavage, and Lipitor was the control drug of western medicine. At the 12th week, the fresh fecal samples of mice were collected, and 16S rRNA gene sequencing technology was used to analyze the intestinal flora of fecal samples from each group. *Results* Intestinal flora 16S rRNA gene sequencing showed that the intestinal flora of mice in each group was mainly com-

基金项目:国家自然科学基金项目(81904069);国家中医药管理局第七批全国老中医专家学术经验继承项目(国中医药人教函〔2022〕76号);辽宁省科学技术厅应用基础研究计划项目(2023JH2/101600030;2023JH2/101700241);辽宁省博士启动基金项目(2021-BS-1762020);辽宁省社会科学规划基金项目(L19DSH002);辽宁中医药大学中医脏象理论及应用国家教育部重点实验室开放基金项目(zyzx1903)
作者简介:张欢(1988-),女,辽宁锦州人,副教授,博士,研究方向:中西医结合心血管。
通讯作者:于睿(1969-),女(锡伯族),辽宁阜新人,教授,博士研究生导师,博士,研究方向:中西医结合心血管。E-mail:yurui1969@163.com。
胡楠(1979-),女,辽宁鞍山人,主任医师,硕士研究生导师,博士,研究方向:中西医结合防治心脑血管疾病。E-mail:1503090282@qq.com。

posed of Firmicutes, Bacteroides, Proteobacteria, TM7, verrucobacteria, actinobacteria, ferricobacteria, Leucoticus, Chloromycetes and chloromycetes. There were differences in Lactobacillus, heterobacillus, Vibrio desulphurificus, Staphylococcus, Turingbacillus, Spirillum fibrillans, Anderkeria, rumen coccus, Bacteroides and other bacteria. The dominant Bacteroidetes in the normal group were Bacteroidetes at the phylum level, and their average relative abundance was 65%. At the phylum level, the dominant Bacteroidetes in the model group were Bacteroidetes with an average relative abundance of 50%. Firmicutes were the dominant bacteria in samples of Qingzhi Tongmai Formula groups at the phylum level, and their average relative abundance was 56% and 65%, respectively. The dominant bacteria in the samples of Lipitor group at the phylum level were Firmicutes, with an average relative abundance of 65%. According to the results of comparison of taxonomic species composition and relative abundance of each phylum, the dominant bacteria were similar in each group, but the abundance proportion of species changed. *Conclusion* Qingzhi Tongmai Formula can affect the species composition, structure and diversity of intestinal flora by improving the composition of microflora, and maintain the homeostasis of intestinal flora, and plays a role in the prevention and treatment of atherosclerosis.

Keywords: Qingzhi Tongmai Formula(清脂通脉方); atherosclerosis; gut microbiota

动脉粥样硬化(AS)作为慢性炎症性疾病,是诱发心血管疾病的主要病理基础。根据中医“心合小肠”理论,心与小肠两者在生理和病理上相互影响。根据“肠心轴”学说,肠道菌群作为小肠的内源微生物,参与多种心血管疾病的发生发展。有研究显示,肠道菌群与 AS 之间联系密切,肠道菌群可能参与 AS 的发病过程,与炎症反应相关,经肠道屏障进入人体,导致肠道菌群失调,引发炎症反应,进而可能促进 AS 的发生[1-2]。

在致病因素作用下,ApoE$^{-/-}$ 小鼠肠道菌群失调,肠道屏障功能受损,清脂通脉方可能纠正失调的肠道菌群,观察其对 AS 小鼠肠道菌群数量、多样性、丰度的影响,改善肠黏膜屏障功能,可能是清脂通脉方防治 AS 相关性心血管疾病的潜在分子生物学机制之一。

1 “心合小肠”的理论研究

“心合小肠”理论源于中医经典《黄帝内经》,《灵枢·本输》首次提到:“心合小肠,小肠者,受盛之腑”,中医学认为“心与小肠相表里”,即小肠为心之离腑,一上一下,转利枢机合为表里,强调心可病及小肠,小肠病亦可反作用于心。肠道菌群作为小肠腑的内源微生物,与小肠的功能失调密切相关,目前的一些研究亦表明肠道菌群参与多种心血管疾病的发生发展,这一理论与现代医学研究认为 AS 与肠道菌群是密切相关的理念相符[3]。肠道菌群是小肠生理功能正常发挥的生物学基础,肠道菌群通过不同产物参与人体的生理病理和免疫代谢过程,直接影响 AS 的发生发展[4]。“心合小肠”理论为阐释 AS 与肠道菌群的关系提供了新思路。

2 材料和方法

2.1 实验动物及分组

将健康的 32 只雄性 ApoE$^{-/-}$ 小鼠(购自北京华阜康生物科技股份有限公司),6 周龄,体质量(20±2)g,SPF 级,适应性喂饲 2 周后,按照随机数字表法随机分为 4 组:模型组、清脂通脉方最佳剂量 1 组、清脂通脉方最佳剂量 2 组和西药组,每组 8 只。并以 8 只 C57BL/6J 小鼠作为正常对照组。

2.2 分组及给药

正常对照组(Z):予以基础饲料喂饲,自由饮水,喂饲 12 周。第 13 周开始,在予基础饲料喂饲的同时给予 0.01 mL·g^{-1}·d^{-1}纯净水灌胃,时间 8 周。

模型组(M):予以高脂饲料喂饲,自由饮水,喂饲 12 周。第 13 周开始,高脂饲料喂饲的同时给予 0.01 mL·g^{-1}·d^{-1}纯净水灌胃,时间 8 周。

西药组(LP):予以高脂饲料喂饲,自由饮水,喂饲 12 周。第 13 周开始,在予高脂饲料喂饲的同时给予 0.01 mL·g^{-1}·d^{-1}立普妥灌胃,时间 8 周。

清脂通脉方最佳剂量 1 组(QZ1):予以高脂饲料喂饲,自由饮水,喂饲 12 周。第 13 周开始,在予高脂饲料喂饲的同时给予 0.01 mL·g^{-1}·d^{-1}清脂通脉方最佳剂量 1 灌胃,时间 8 周。

清脂通脉方最佳剂量 2 组(QZ2):予以高脂饲料喂饲,自由饮水,喂饲 12 周。第 13 周开始,在予高脂饲料喂饲的同时给予 0.01 mL·g^{-1}·d^{-1}清脂通脉方最佳剂量 2 灌胃,时间 8 周。

2.3 肠道菌群 16SrRNA 基因测序

2.3.1 *粪便样品采集及制备* 造模成功后,采集新鲜粪便标本,用液氮冷冻,在 -80 ℃环境中保存备用。根据标准规范的操作程序,用 TIANamp Stool DNA 试剂盒(天根,北京,中国)从解冻的粪便中提取微生物基因组 DNA。使用 1% 琼脂糖凝胶电泳测定 DNA 纯度,通过 NanoDrop ND-1000 分光光度计(Thermo Fisher Scientific, Waltham, USA)测量其浓度。

2.3.2 *高通量测序* 使用反向引物 806R(5′-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3′)和正向引物 338F(5′-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3′)通过聚合酶链式反应(PCR)扩增 16S rRNA 基因的高变区。使用 AxyPrep DNA 凝胶提取试剂盒(Axygen Biosciences, Union City, USA)对 PCR 的扩增产物进行纯化,再用 Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 进行定量。构建 DNA 文库用 TruSeq Nano,并在 Agilent Bioanalyzer(Agilent Technologies Inc., Palo Alto, USA)上进行测试。随后,对样本的双末端 2×250 bp 读数用 Illumina Miseq 平台(Illumina, San Diego, USA)进行汇集和测序。

2.3.3 *测序数据分析* (1)根据官方教程,初筛高通量测序的原始数据序列质量。

(2)按照分析流程进行序列过滤、去噪、拼接等处理。

(3)展示对各样本在不同分类学水平的具体物种组成。

(4)根据 ASV 在不同样本中的分布,评估样本的 Alpha 多样性水平,绘制稀疏曲线。

(5)衡量不同样本间的 Beta 多样性差异及差异显著性。

(6)根据物种在各样本中的组成分布,构建关联网络,计

算拓扑指数,并尝试找出关键物种,包括门、纲、目、科、属、种组成的不同分类水平,相当于通过不同的分辨率查看群落组成结构。

(7)根据测序结果,预测菌群的代谢功能,找出差异通路,并获得特定通路的物种组成。

(8)整理实验结果,绘制图表,并进行统计检验分析。

3 结果

3.1 $ApoE^{-/-}$ 小鼠肠道菌群物种组成变化

3.1.1 ASV/OTU 韦恩图 M 组与 Z 组有 31.89%(1560 个)的 OTUs 种类一致,独有的 OTUs 比例 M 组为 29.86%(1461 个)和 Z 组 38.25%(1871 个)。QZ1 组与 M 组有 28.31%(1342 个)的 OTUs 种类一致,独有的 OTUs 比例分别为 31.67%(1501 个)和 40.02%(1897 个)。QZ2 组与 M 组 30.41%(1299 个)的 OTUs 种类一致,独有的 OTUs 比例分别为 23.16%(989 个)和 46.43%(1983 个)。见插页Ⅻ图 1。

3.1.2 Krona 物种组成图 Krona 圈图从内到外依次代表域、门、纲、目、科、属、种 7 个分类水平,扇形的大小反映了不同分类单元的相对丰度高低,并给出具体数值。在每个分类水平,各分类单元以不同的颜色加以区分。使用 Krona 软件主要从 Phylum(门)分类水平展示组别不同分类单元的相对丰度高低,并给出具体数值[5]。样本在不同分类水平上的物种组成及相对丰度见插页ⅩⅪ图 2。

Z 组在门水平上的优势菌门为拟杆菌门(Bacteroidetes),其平均相对丰度为 65%,其次为厚壁菌(Firmicutes),平均相对丰度为 29%,其他丰度值大于 1% 的菌门为变形菌门(Proteobacteria),其平均相对丰度为 3%。

M 组样本在门水平上的优势菌门为拟杆菌门(Bacteroidetes),其平均相对丰度为 50%,其次为厚壁菌门(Firmicutes),其平均相对丰度为 38%,其他丰度值大于 1% 的为 TM7 菌门、变形菌门(Proteobacteria)、有放线菌门(Actinobacteria),其平均相对丰度依次为 5%、4%、2%。

QZ1 组样本在门水平上的优势菌门为厚壁菌门(Firmicutes),其平均相对丰度为 56%,其次为拟杆菌门(Bacteroidetes),平均相对丰度为 33%。其他丰度值大于 1% 的菌门有变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia),其平均相对丰度依次为 4%、2%、2%。

QZ2 组样本在门水平上的优势菌门为厚壁菌门(Firmicutes),其平均相对丰度为 65%,其次为拟杆菌门(Bacteroidetes),平均相对丰度为 27%。其他丰度值大于 1% 的菌门有变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia),其平均相对丰度依次为 4%、2%、2%。

LP 组样本在门水平上的优势菌门为厚壁菌门(Firmicutes),其平均相对丰度为 65%,其次为拟杆菌门(Bacteroidetes),平均相对丰度为 29%。其他丰度值大于 1% 的菌门有变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteria),其平均相对丰度均为 2%。

由各组门分类学水平菌种组成及相对丰度比较结果可知,各组优势菌门相似、但菌种的丰度比例均发生显著变化。

3.2 Alpha 多样性分析

肠道内容物样本的 Alpha 多样性分析揭示了每组小鼠肠道微生物群落组成的差异。利用各样本在不同测序深度时的微生物 Alpha 多样性指数构建稀释曲线(Rarefaction curve,RC)。

3.2.1 Alpha 多样性指数 本实验选取了 Chao1、Observed_species、Shannon、Simpson、Faith_pd、Pielou_e、Goods_coverage 7 个表示物种多样性的指标。各组小鼠肠道菌群 Alpha 多样性指数如表 1、插页ⅩⅩ图 3。经过测序分析后,各组的 Coverage 指数均大于 0.9。与 Z 组相比,M 组 Chao1 指数明显降低;与 M 组相比,QZ1 组和 QZ2 的 Shannon、Pielou_e 指数均有一定程度升高,差异有统计学意义($P<0.05$)。结果提示,经过高脂饲料喂养后,$ApoE^{-/-}$ 小鼠肠道菌群丰度及多样性受到一定影响,予中药治疗后小鼠菌群的多样性和丰度有一定恢复。

表 1 多样性指数结果

组别	Chao1	Shannon	Coverage	Pielou_e
Z 组	1 582.37 ± 87.01	7.21 ± 0.43	0.99 ± 0.001	0.69 ± 0.02
M 组	1 474.35 ± 112.13	5.23 ± 1.94	0.99 ± 0.002	0.52 ± 0.17
LP 组	1 071.87 ± 172.73	6.88 ± 0.50	0.99 ± 0.001	0.67 ± 0.03
QZ1 组	1 223.88 ± 53.92	5.84 ± 0.73	0.99 ± 0.001	0.58 ± 0.07
QZ2 组	1 092.14 ± 124.26	5.25 ± 0.99	0.99 ± 0.001	0.60 ± 0.07

3.2.2 稀释曲线 如插页Ⅻ图 4 所示,反映各组样本在不同测序数量时物种的丰富度、均一性或多样性。它可以用来比较样本在测序数据量,也反映测序数据量是否合理。曲线的平缓程度表示测序深度对于观测样本多样性的影响大小,曲线越平缓,表明测序结果已足够反映当前样本所包含的多样性,提示 Alpha 多样性接近饱和。

3.2.3 丰度等级曲线 如插页Ⅻ图 5 所示,与 M 组比较,Z 组、中药组折线更为平缓,且在横轴 OTU 数目更高,说明群落中各 ASV/OTU 间的丰度差异小,群落组成的均匀度及丰富度更高。

3.3 Beta 多样性分析

3.3.1 主坐标分析 (1)模型组和正常组。基于 Jaccard 距离的小鼠肠道菌群结构 PCoA 分析如插页ⅩⅩ图 6 所示,横坐标 Axis1 解释样本差异数据的比例为 19.1%,纵坐标 Axis2 解释样本差异数据的比例为 11.1%。图中 M 组位于左半部分,Z 组位于右半部分。基于 Bray - Curtis 距离的高脂小鼠肠道菌群结构 PCoA 分析如插页ⅩⅪ图 7 所示,横坐标 Axis1 解释样本差异数据的比例为 45.4%,纵坐标 Axis2 解释样本差异数据的比例为 17%。图中 M 组位于右半部分,Z 组位于左半部分,两部分在坐标轴上的投影距离较远。结果提示高脂饮食喂养的 AS 小鼠肠道菌群结构发生明显的差异性变化。

(2)模型组和中药组。基于 Jaccard 距离的小鼠肠道菌群结构 PCoA 分析如插页ⅩⅪ图 8 所示,横坐标 Axis1 解释样本差异数据的比例为 14.5%,纵坐标 Axis2 解释样本差异数据的比例为 10.9%。图中 M 组位于右半部分,中药 QZ1 组和 QZ2 组位于左半部分。基于Bray - Curtis 距离的 AS 小鼠肠道菌群结构 PCoA 分析如插页Ⅻ图 9 所示,横坐标 Axis1 解释样本差异数据的比例为 37.4%,纵坐标 Axis2 解释样本差异数据的比例为 19.8%。图中 M 组位于左半部分,QZ1 和 QZ2 组位于右半部分,两部分在坐标轴上的投影距离较远,无交叉。结果提示高脂饮食喂养的 AS 小鼠肠道菌群结构发生明显的差异性变化。

3.3.2 组间差异显著性分析 使用 PERMANOVA 可分析不同分组因素对样品差异的解释度，并使用置换检验进行显著性统计。结果如表2、插页XXII图 10 所示，M 组与 Z 组、M 组与中药 QZ1、QZ2 组间差异度显著（$P<0.05$）。

表2 各组间差异显著性分析

Group 1	Group 2	pseudo－F	P 值
M 组	Z 组	4.403 923	0.014
M 组	QZ1 组	5.612 179	0.003
M 组	QZ2 组	8.749 180	0.003

3.4 物种差异分析

LEfSe 分析，各组之间的物种差异性结果如插页XXIII图 11、插页XXIII图 12 所示。

（1）正常组与模型组之间物种差异性分析。Z 组和 M 组之间的物种差异性结果如插页XXIV图 13 和插页XXIV图 14 所示，M 组与 Z 组之间的差异性物种主要存在于厚壁菌门、芽孢杆菌门、乳酸杆菌门、链球菌门（$P<0.05$）。

（2）中药组与模型组之间物种差异性分析。中药组和 M 组之间的物种差异性结果如插页XXV图 15 和插页XXV图 16 所示，中药 QZ1 组、QZ2 组与 M 组之间的差异性物种主要存在于厚壁菌门、芽孢杆菌门、乳酸杆菌门、链球菌门（$P<0.05$）。

3.5 肠道菌群功能预测

对于肠道菌群的生态学研究，亦要关注菌群所具备的功能潜能。运用 PRCIUSt2 进行分析，参照已知的微生物基因组数据，对测序样本进行菌群基因或功能单元组成的预测，可以了解检测样本中菌群功能潜能的概况，最大化扩增子测序性价比高的优势。根据实验中的基因数据获得的功能单元，依据 KEGG 数据库、MetaCyc 数据库以及 COG 数据库对代谢通路进行计算，获得代谢通路的丰度值，如插页XXVII图 17 所示，针对本次检测到的数据，进行了代谢通路差异分析，得出 19 条差异代谢通路（$P<0.05$）。见表 3。大部分菌群的功能集中在 Biosynthesis 的 Nucleoside and Nucleotide biosynthesis 和 Amino Acid biosynthesis 两个通路中。此外，其他与代谢相关的通路也有菌群大量富集，这表明菌群在不同分组的代谢功能中发挥重要的作用。这些通路中包括脂肪酸和脂类生物合成、碳水化合物生物合成和降解、维生素的生物合成、氨基酸降解、C1 化合物利用与同化等代谢途径。

4 讨论

前期研究表明，清脂通脉方能多角度、多靶点、多途径降低血脂防治 AS，本方由柴胡、当归、山楂、绞股蓝及酸枣仁 5 味药物组成。其中柴胡味苦，性寒，归肝、胆经。具有疏肝解郁，疏散退热，升阳举陷之功。现代药理研究表明柴胡有效成分中的柴胡皂苷、挥发油、多糖、黄酮类及有机酸等，能抑制肝内胆固醇蓄积。当归味甘而重，故专能补血，其气轻而辛，故又能行血，行中有补，补中有动，活血行气。山楂味酸性温，气血并走，化瘀而不伤新血，行滞气而不伤正气，山楂含有大量的维生素 C 与微量元素，能够扩张血管，降低血压，降低血糖，能够改善和促进胆固醇排泄而降低血脂。酸枣仁含多量脂肪油和蛋白质，并含酸枣仁皂苷、甾醇、三萜类、多量维生素 C，具有一定的降脂作用。方中诸药均有现代药理学毒理学的研究资料证明能改善脂代谢，减少动脉硬化斑块内的脂质，消退或延缓动脉硬化，达到稳定斑块作用，因而会降低严重急性心血管病的发生率，且安全，无明显不良反应[6-8]。

表3 差异代谢通路（$P<0.05$）

通路	描述	logFC	SE	P 值
PWY－6581	spirilloxanthin and 2,2′－diketo－spirilloxanthin biosynthesis	0.634 9	0.061 3	<0.001
PWY－5531	chlorophyllide a biosynthesis II (anaerobic)	2.592 0	0.344 2	<0.001
PWY－7159	chlorophyllide a biosynthesis III (aerobic,light independent)	2.592 0	0.344 2	<0.001
PWY－7398	coumarins biosynthesis (engineered)	0.418 6	0.059 2	<0.001
P621－PWY	nylon－6 oligomer degradation	3.111 0	0.672 5	<0.001
PWY－5529	superpathway of bacteriochlorophyll a biosynthesis	3.043 0	0.667 9	<0.001
CHLOROPHYLL－SYN	chlorophyllide a biosynthesis I (aerobic,light－dependent)	1.784 0	0.415 0	<0.001
PWY0－1533	methylphosphonate degradation I	1.482 0	0.374 4	<0.001
3－HYDROXYPHENYLACETATE－DEGRADATION－PWY	4－hydroxyphenylacetate degradation	1.892 0	0.507 8	<0.001
PWY0－321	phenylacetate degradation I (aerobic)	1.816 0	0.594 2	<0.05
PWY－7046	4－coumarate degradation (anaerobic)	0.701 9	0.253 9	<0.05
DENITRIFICATION－PWY	nitrate reduction I (denitrification)	1.336 0	0.497 3	<0.05
PWY－3661	glycine betaine degradation I	1.565 0	0.619 7	<0.05
CRNFORCAT－PWY	creatinine degradation I	1.193 0	0.502 4	<0.05
PWY－6339	syringate degradation	1.114 0	0.499 0	<0.05
GALLATE－DEGRADATION－II－PWY	gallate degradation I	0.984 6	0.447 8	<0.05
PWY－5181	toluene degradation III (aerobic) (via p－cresol)	1.260 0	0.616 1	<0.05
PWY－6338	superpathway of vanillin and vanillate degradation	0.949 7	0.476 3	0.046 13
PWY－7097	vanillin and vanillate degradation I	0.949 7	0.476 3	0.046 13

肠道菌群是小肠生理功能正常发挥的生物学基础，肠道菌群在人体营养物质的消化、吸收及排泄过程中扮演着重要角色。这与小肠“受盛化物”“泌别清浊”的功能相契合。许多研究表明[9-11]肠道菌群对人体健康有很大影响，其本身及代谢产物既能调节机体健康，又可调节膳食与宿主之间的关系，并在多种疾病表型中发挥着重要作用。肠道菌群影响胆固醇和脂类的代谢进而影响动脉粥样硬化斑块的形成，微生物代谢产物已成为动脉粥样硬化的特别重要的介质[12]，饮食和肠道菌群代谢的特定成分对动脉粥样硬化也有不同的影响。

通过 16S rRNA 测序分析发现，各组小鼠肠道菌群主要由厚壁菌门、拟杆菌门、变形杆菌门、TM7 菌门、疣微菌门、放线菌门、脱铁杆菌门、软壁菌门、绿菌门以及绿弯菌门构成，在乳酸杆菌、异杆菌、脱硫弧菌、葡萄球菌、图灵杆菌、颤螺菌、安德克氏菌、瘤胃球菌、拟杆菌等菌属存在差异。目前的很多研究也表明乳酸杆菌可抑制炎症分子表达以及降低氧化应激状态等途径发挥抗 AS 的作用[13]，动物双歧杆菌菌株亚株乳酸F1－7 和阴道乳杆菌 FN3 可有效改善高脂饮食引起的高脂血症，减

轻肝脏脂质积累[14]。金黄色葡萄球菌可能加重慢性炎症反应促进动脉粥样硬化斑块形成[15-16]。拟杆菌属与引起 AS 发生的重要致病标志物氧化三甲胺(trimetlylamine oxide,TMAO)关系密切,TMAO 增多能够影响心血管疾病发生[17],TMAO 是 AS 发生的关键调节因子,可通过影响脂质代谢、炎症、氧化应激以及血栓形成等促进 AS[18-22]。因此推测清脂通脉方能够调节 AS 小鼠肠道菌群,降低致病菌丰度和提高益生菌丰度以达到重塑肠道菌群结构的目的,进而发挥防治 AS 的作用。

肠道菌群在脂质代谢中也发挥重要作用,脂质代谢紊乱常伴有肠道菌群的改变[23-27]。肠道菌群稳态失衡,会导致机体脂代谢异常和炎症的发生。肠道中部分菌群可将三甲胺代谢成氧化三胺,可以直接影响血脂的代谢。脂质代谢异常易致肠道菌群结构失衡,通过应用疏肝健脾清脂通脉法有助于恢复肠道菌群的平衡稳态。

5 小结

在本研究中,选取经典的 AS 小鼠作为模型,同时根据《内经》中"心合小肠"理论,清脂通脉方可奏疏肝健脾、清脂通脉之效[28-30],研究证实了清脂通脉方能够改善 AS 小鼠肠道微生态,通过影响肠道菌群物种、结构、菌群多样性与代谢物情况[31-32],进而起到防治 AS 的作用。

参考文献

[1] 崔运浩, 裘雪莹, 贾连群, 等. 基于"肠道菌群-脂质-线粒体"稳态失衡探讨"从脾论治"动脉粥样硬化[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(6): 134-136.

[2] 郑昊龙, 翟亚荣, 吴瑶, 等. 化瘀祛痰方对 ApoE$^{-/-}$动脉粥样硬化小鼠肠道菌群及肠黏膜屏障损伤的影响[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(1): 81-85, 276-277.

[3] 胡梦弦, 何贵新, 吴成强, 等. 基于"心-肠"轴探索中西医干预肠道菌群治疗冠状动脉斑块研究进展[J]. 辽宁中医药大学学报, 2020, 22(11): 157-161.

[4] VERHAAR B J H, PRODAN A, NIEUWDORP M, et al. Gut microbiota in hypertension and atherosclerosis: a review[J]. Nutrients, 2020, 12(10): 2982.

[5] 王华文. 健脾祛痰法通过调节肠道菌群和胆汁酸代谢改善血脂异常的作用及机制研究[D]. 沈阳: 辽宁中医药大学, 2020.

[6] 于艳丽, 李建学, 于睿. 清脂通脉颗粒制备工艺的研究[J]. 辽宁中医杂志, 2014, 41(2): 313-315.

[7] 张莹, 李建学, 于睿. 清脂通脉颗粒的质量标准研究[J]. 辽宁中医杂志, 2013, 40(11): 2324-2325.

[8] 陈雪, 田原, 于睿, 等. 正交试验法优选清脂通脉颗粒醇提工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2013, 19(11): 22-24.

[9] CHEN W J, ZHANG S, WU J F, et al. Butyrate-producing bacteria and the gut-heart axis in atherosclerosis[J]. Clin Chim Acta, 2020, 507: 236-241.

[10] HOU H M, ZHAO H Y. Epigenetic factors in atherosclerosis: DNA methylation, folic acid metabolism, and intestinal microbiota[J]. Clin Chim Acta, 2021, 512: 7-11.

[11] JONSSON A L, BÄCKHED F. Role of gut microbiota in atherosclerosis[J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(2): 79-87.

[12] BJÖRKEGREN J L M, LUSIS A J. Atherosclerosis: recent developments[J]. Cell, 2022, 185(10): 1630-1645.

[13] 孙东文, 姜文君, 郜晓峰, 等. 中西医对肠道菌群与冠心病关系的研究及治疗进展[J]. 吉林中医药, 2023, 43(12): 1488-1492.

[14] LI B L, EVIVIE S E, JIN D, et al. Complete genome sequence of *Enterococcus durans* KLDS6.0933, a potential probiotic strain with high cholesterol removal ability[J]. Gut Pathog, 2018, 10: 32.

[15] 胡楠, 石岩, 曹宇博, 等. 清脂通脉颗粒对动脉粥样硬化病变 NF-κB 信号通路的影响[J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(9): 67-70.

[16] 刘杰, 房文亮, 唐哲, 等. 中药与肠道微生物的相互调节作用研究概况[J]. 中国药学杂志, 2023, 58(17): 1533-1539.

[17] 肖刘成,曾思宇,陈伟业,等.基于 16S rRNA 测序研究小陷胸汤对动脉粥样硬化小鼠肠道菌群结构的影响[J].中华中医药杂志,2023,38(2):848-852.

[18] CANYELLES M, TONDO M, CEDÓ L, et al. Trimethylamine *N*-oxide: a link among diet, gut microbiota, gene regulation of liver and intestine cholesterol homeostasis and HDL function[J]. Int J Mol Sci, 2018, 19(10): 3228.

[19] ZHU W F, GREGORY J C, ORG E, et al. Gut microbial metabolite TMAO enhances platelet hyperreactivity and thrombosis risk[J]. Cell, 2016, 165(1): 111-124.

[20] WILSON A, MCLEAN C, KIM R B. Trimethylamine-N-oxide: a link between the gut microbiome, bile acid metabolism, and atherosclerosis[J]. Curr Opin Lipidol, 2016, 27(2): 148-154.

[21] 李继军, 荣雅琪, 孟宪卿, 等. 半夏白术天麻汤下调 ApoE$^{-/-}$小鼠 TMAO 代谢的作用研究[J]. 中西医结合心脑血管病杂志, 2023, 21(18): 3336-3341.

[22] 张欢, 于睿. 疏肝清脂法干预 PI3K/Akt 信号通路在动脉粥样硬化中的分子机制研究[J]. 长春中医药大学学报, 2018, 34(3): 486-488, 521.

[23] 徐驷, 刘言薇, 何桂莲, 等. 肠道菌群及其代谢产物氧化三甲胺与冠心病相关性的中西医研究进展[J]. 光明中医, 2023, 38(17): 3467-3470.

[24] 何彦虎, 金华, 刘志军, 等. 基于"心合小肠"理论探讨肠道菌群是冠心病干预的新靶点[J]. 中国微生态学杂志, 2022, 34(12): 1461-1466.

[25] 杜敏, 冯骁腾, 张一凡, 等. 营卫理论指导下从"脾"论治冠状动脉粥样硬化性心脏病的内涵[J]. 世界中医药, 2023, 18(21): 3081-3084, 3089.

[26] 徐嘉琦, 林以宁. 肠道菌群调控肥胖症脂质代谢机制的研究进展[J]. 药学研究, 2023, 42(7): 489-494.

[27] 李彩柳, 贾修滨, 刘云超, 等. 基于肠道菌群调控探讨泰山蛹虫草多糖对 ob/ob 小鼠肝组织脂质代谢和炎症反应的影响[J]. 中国中医药科技, 2023, 30(4): 662-665.

[28] 徐驷, 李毅然, 黄浪浪, 等. 健脾化浊调脂颗粒调节肠道菌群紊乱治疗动脉粥样硬化的临床研究[J]. 中国中医药现代远程教育, 2023, 21(18): 47-49.

[29] 范丽红, 黄河, 常小荣. 基于 16S rDNA 技术研究隔药饼灸对高脂血症兔肠道菌群属水平的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2023, 35(9): 1001-1005.

[30] 郑一, 郭鹤, 倪菲, 等. 于睿基于"疏肝清脂"理论治疗动脉粥样硬化经验总结[J]. 辽宁中医杂志, 2020, 47(4): 39-42.

[31] 刘海云, 于游, 张瀚文, 等. 基于肝脏代谢组学研究清脂通脉颗粒对 ApoE$^{-/-}$动脉粥样硬化的影响[J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(12):132-135.

[32] 张欢, 周莹莹, 于游, 等. 基于 TMA/FMO3/TMAO 信号通路探讨清脂通脉颗粒对膏脂转输障碍大鼠肠道微生态的调控机制[J]. 中华中医药学刊, 2020, 38(10): 134-137.

清脂通脉方改善肠道菌群防治动脉粥样硬化的理论与机制探究

（正文见 63－67 页）

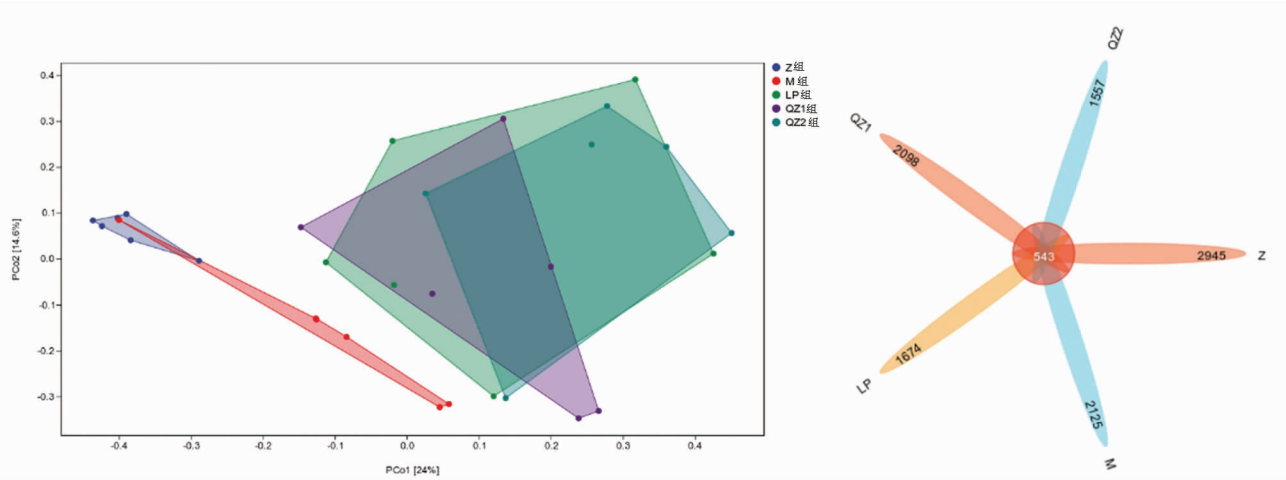


图 1　ASV/OTU 韦恩图

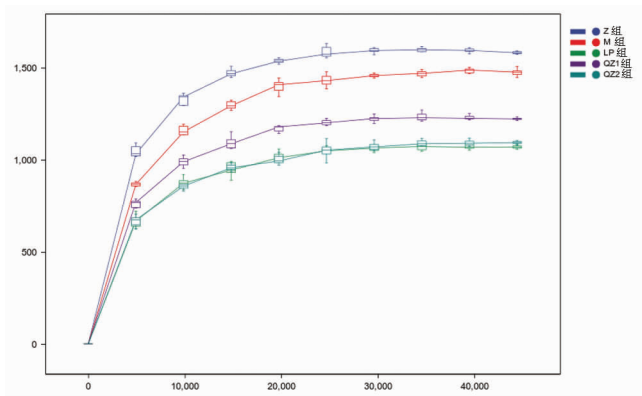


图 4　稀疏曲线图

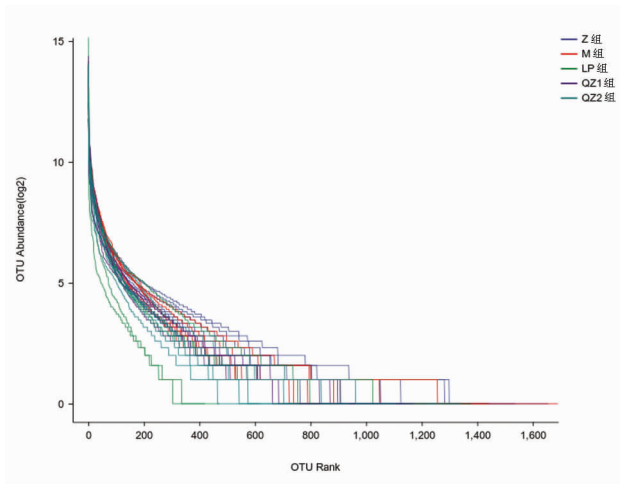


图 5　丰度等级曲线图

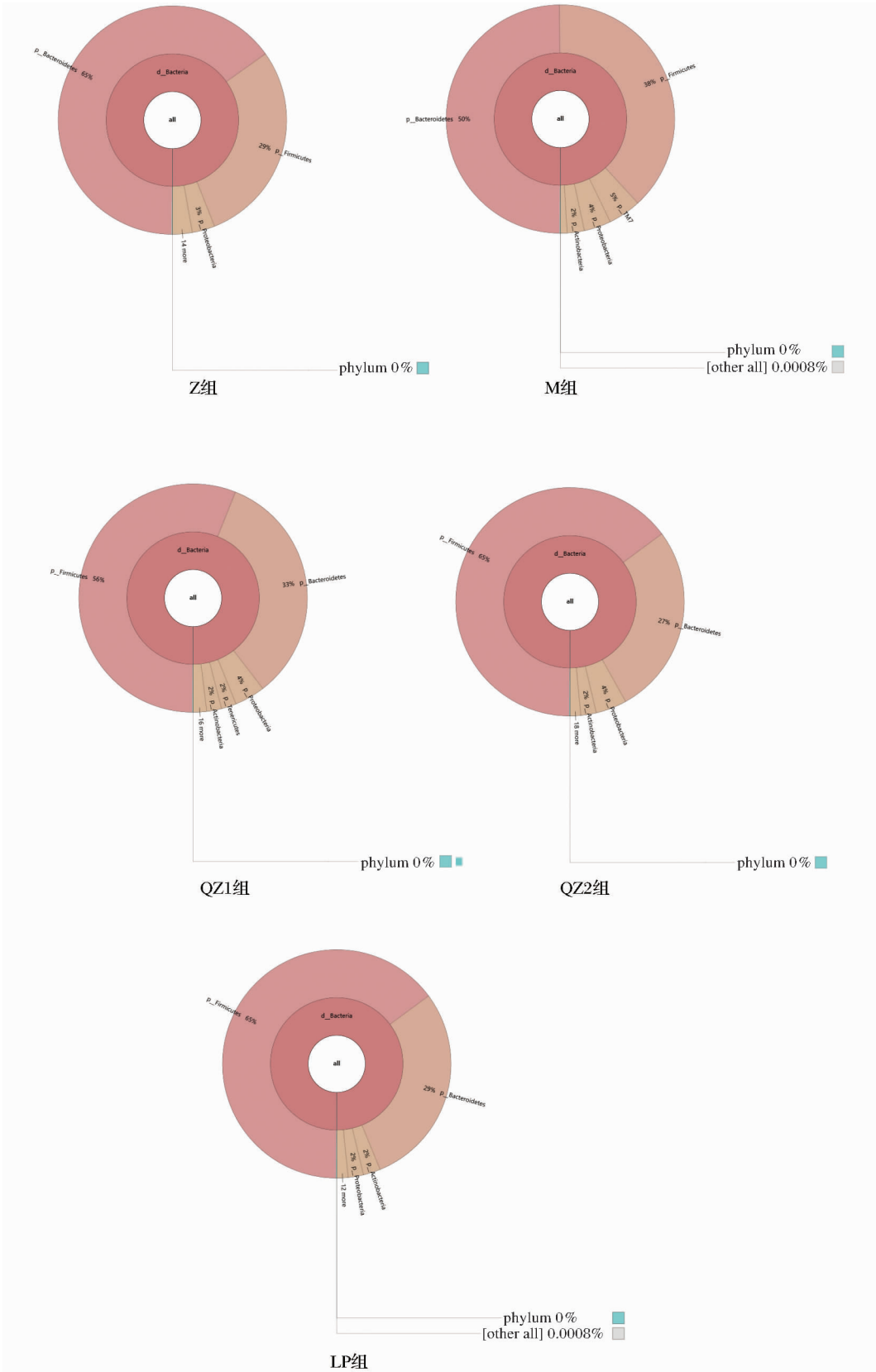


图 2 各组 Krona 物种组成图

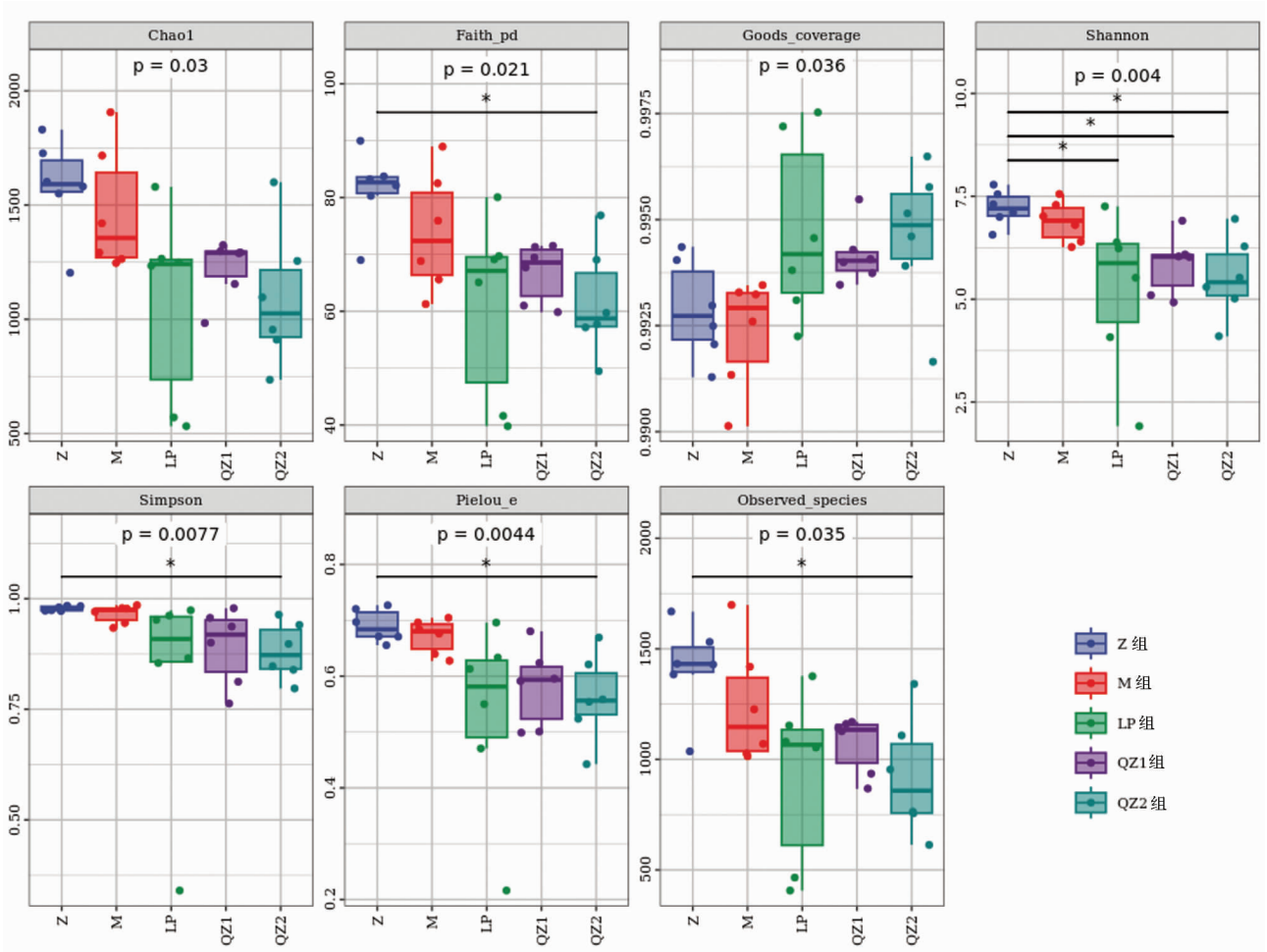


图 3 Alpha 多样性指数

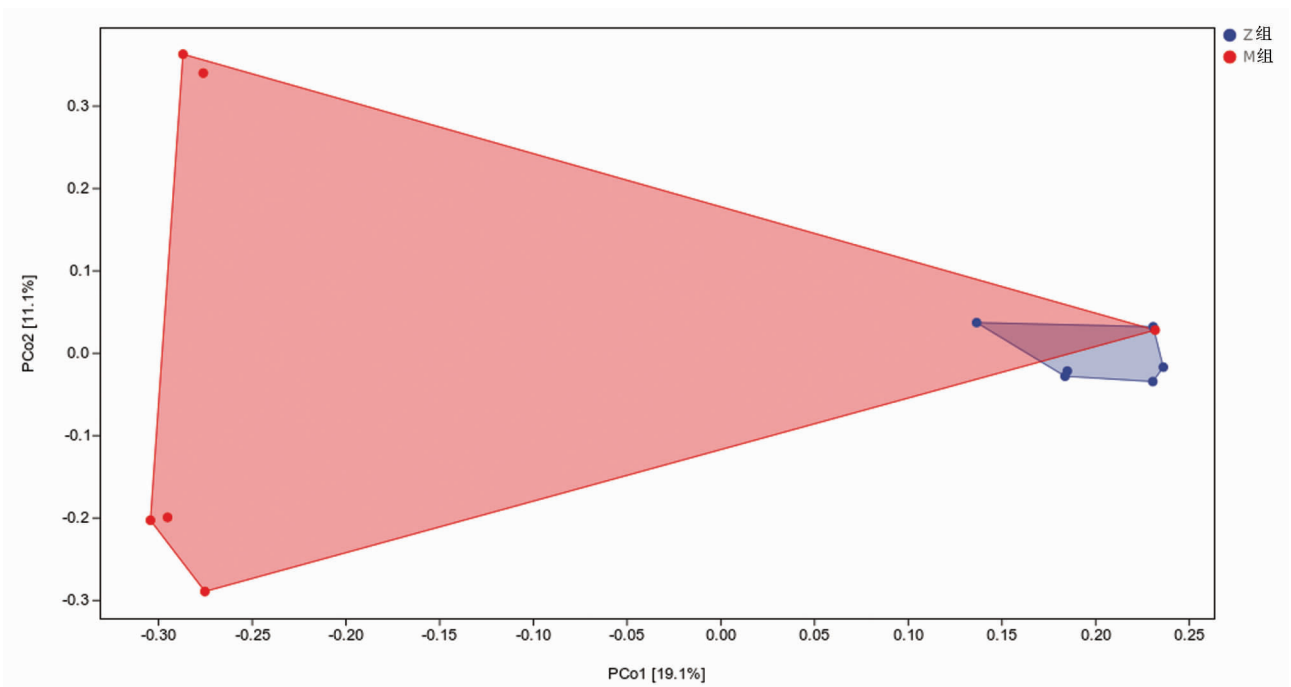


图 6 基于 Jaccard 距离

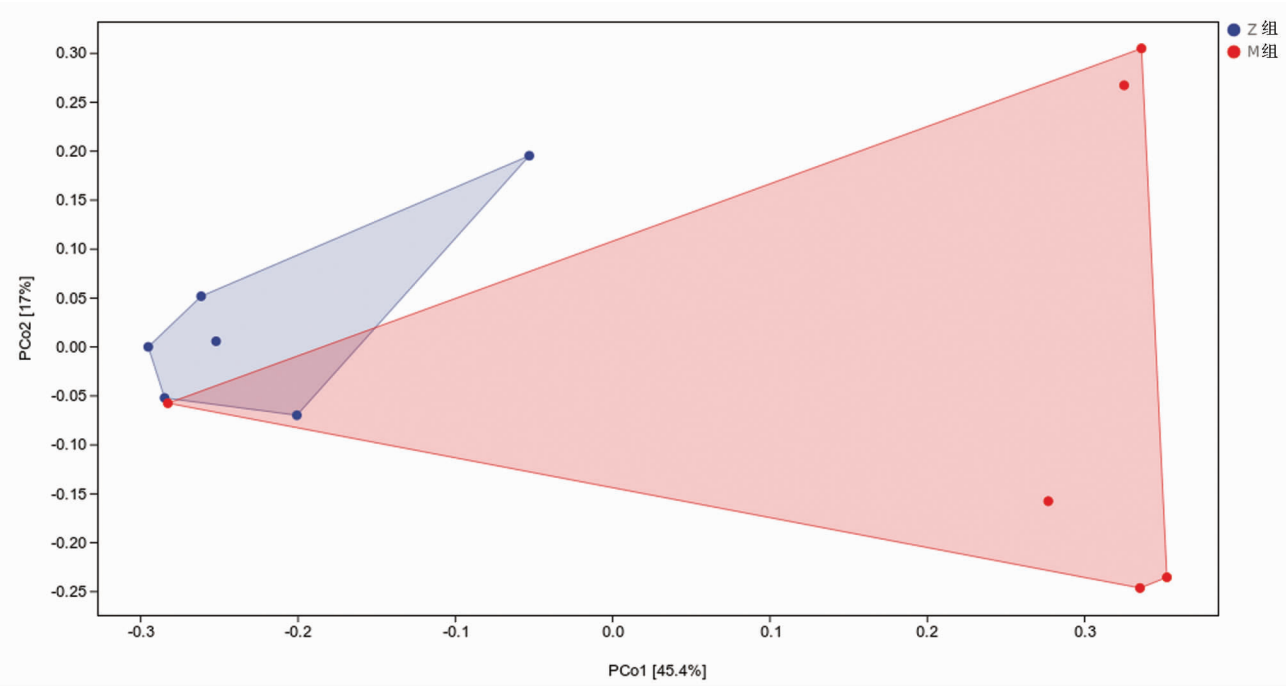


图 7 基于 bray – Curtis 距离

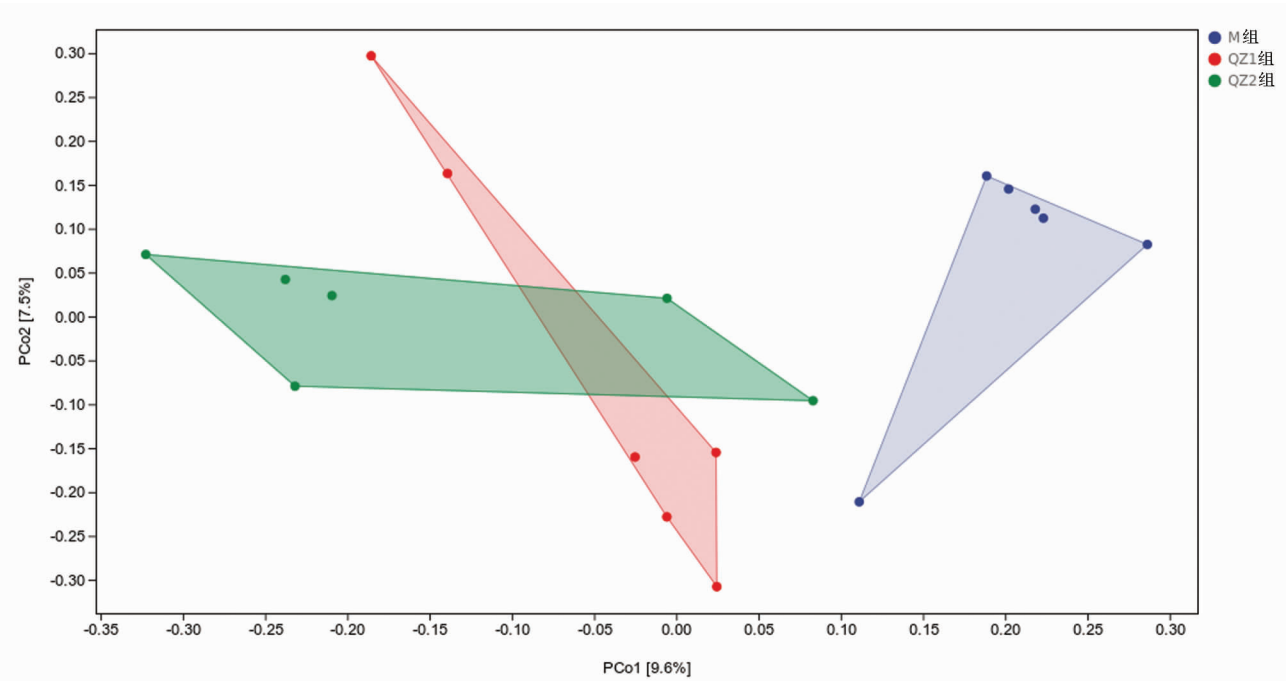


图 8 基于 Jaccard 距离

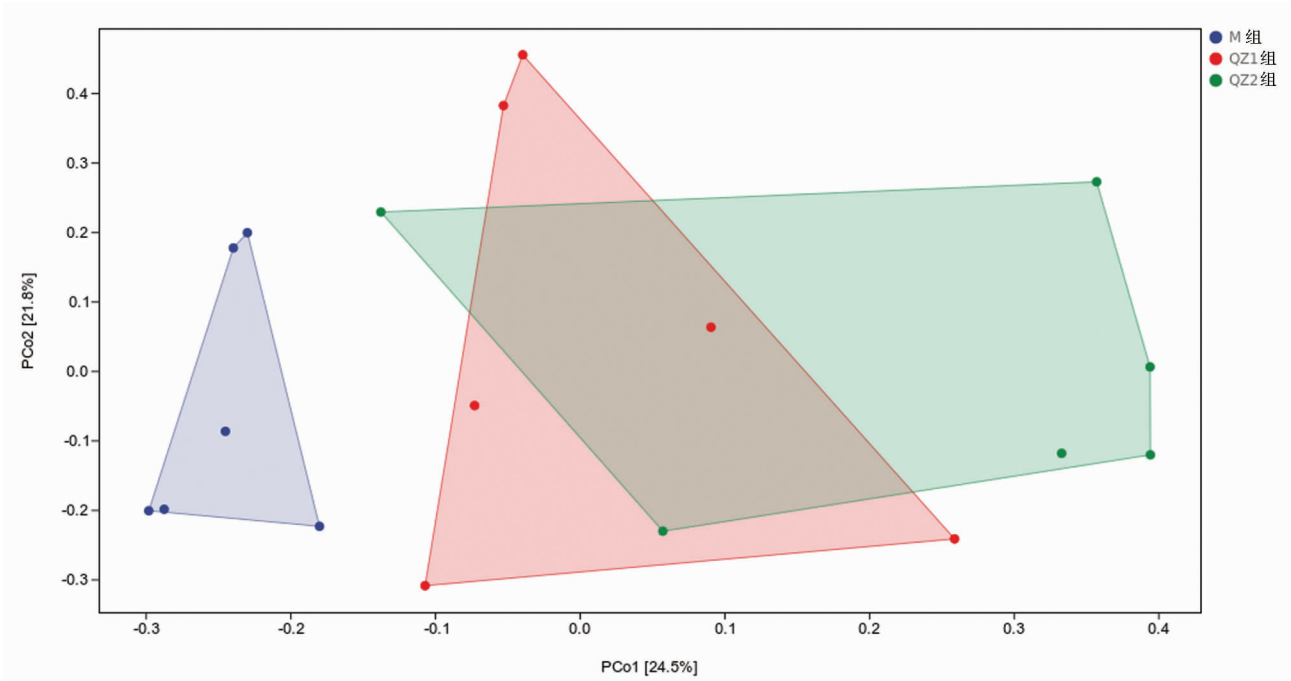


图 9 基于 bray – Curtis 距离

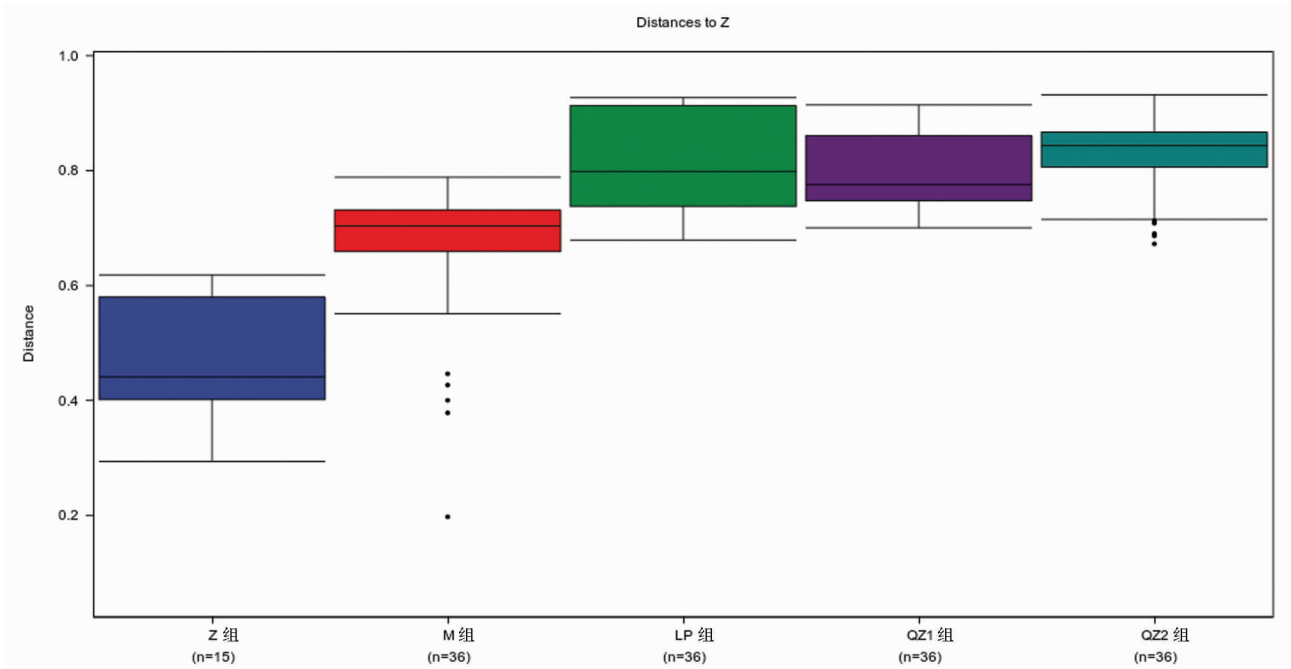


图 10 各组间 PERMANOVA 检验箱线图

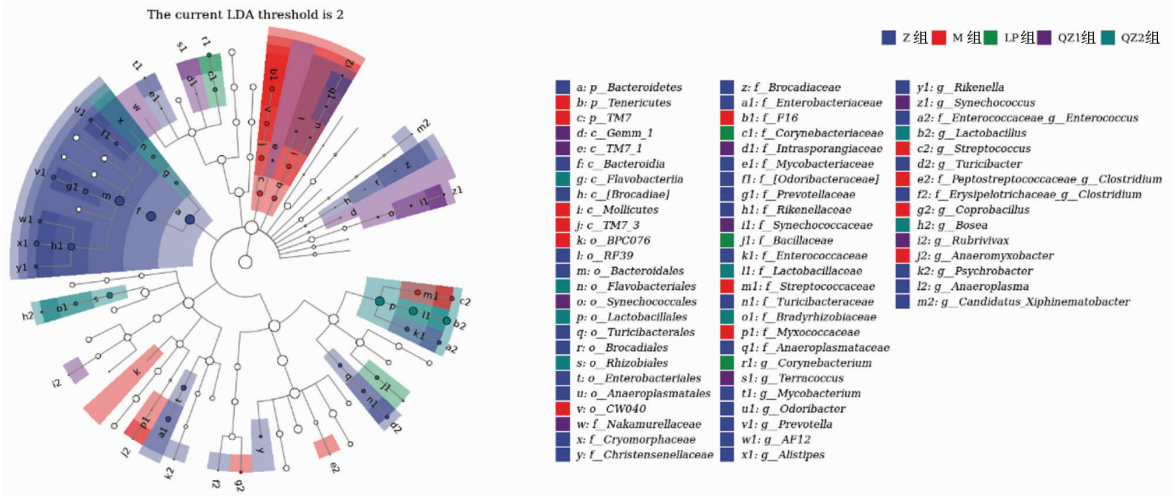


图 11 各组 LEfSe 分析



图 12 物种差异性比较

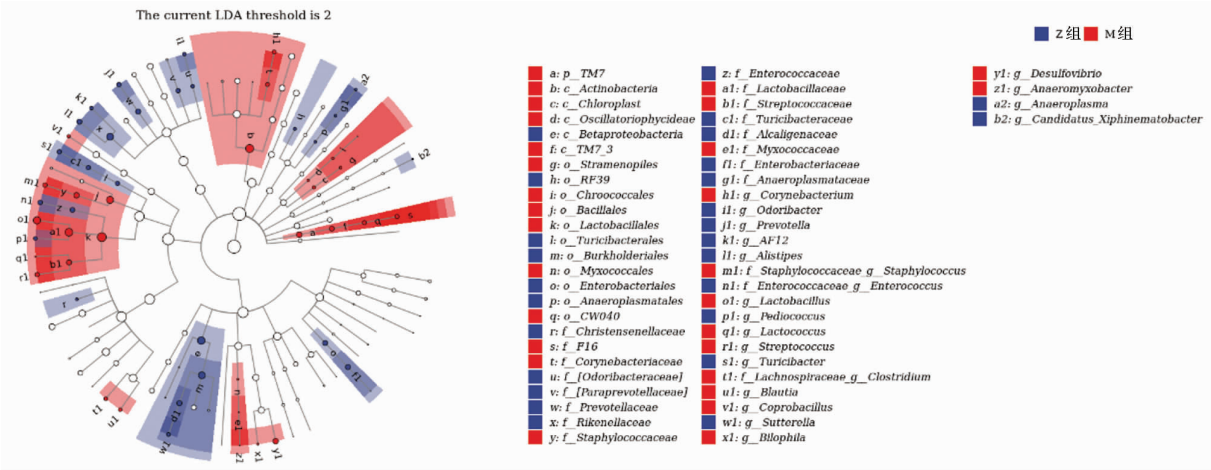


图 13 物种差异性聚类树结果

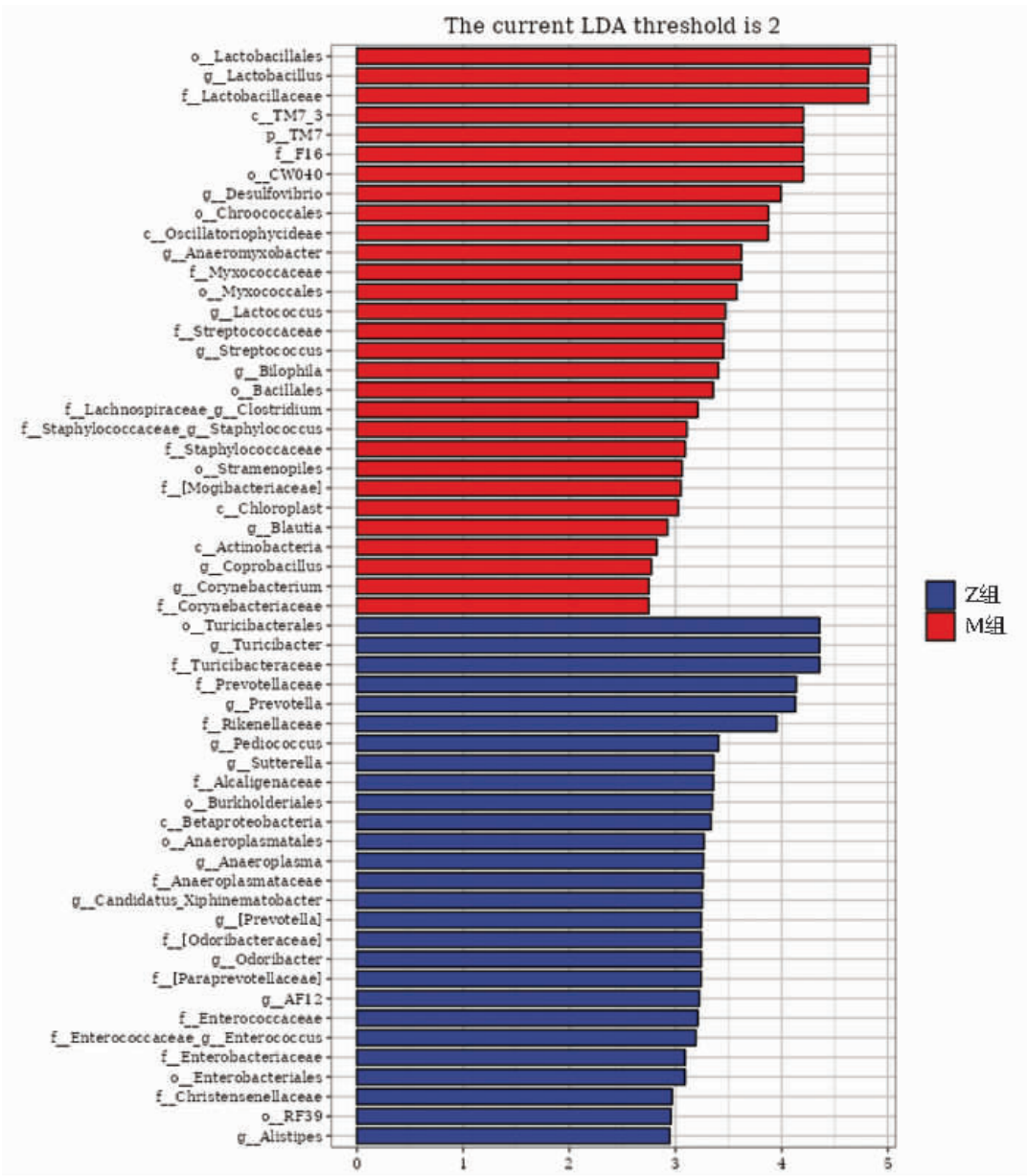


图 14 物种差异性比较

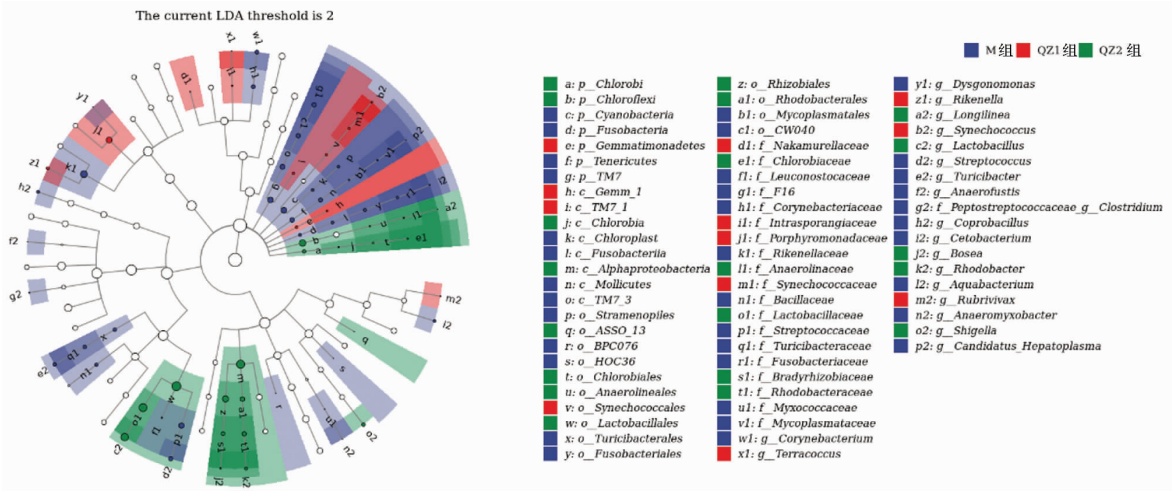


图 15　物种差异性聚类树结果

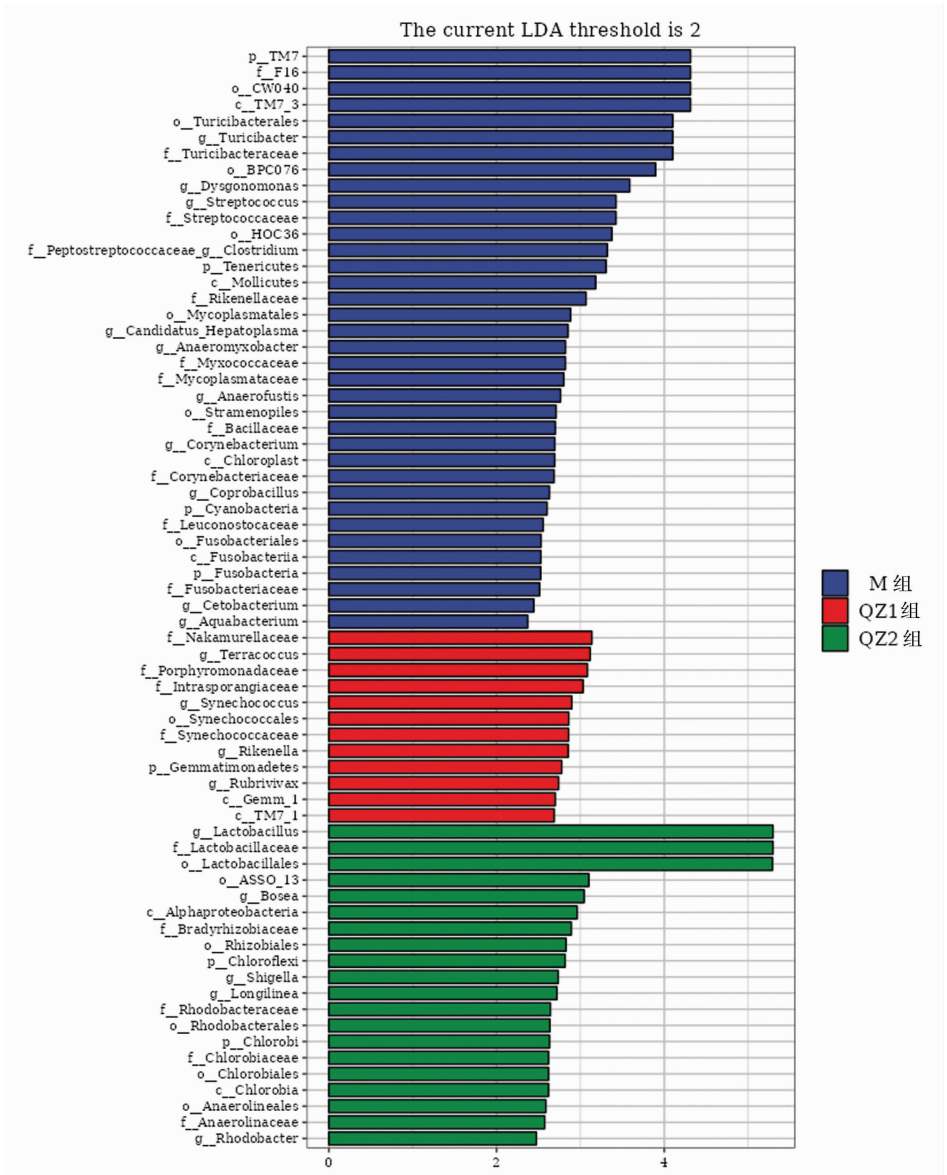


图 16　物种差异性比较

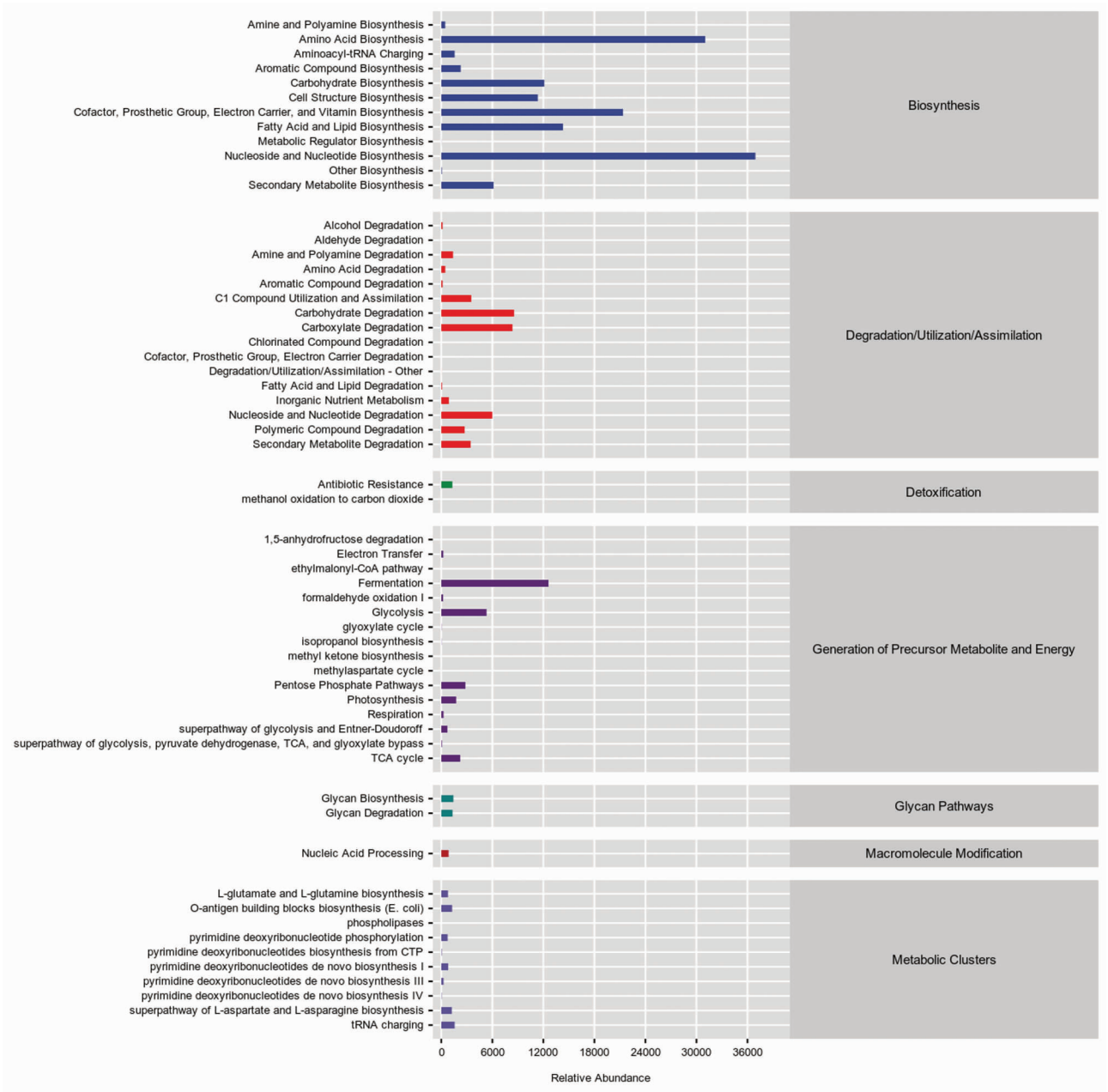


图 17 代谢通路的丰度值统计图