

本文引用: 赵震宇, 李琳, 胡志希. 基于16S rRNA测序和网络药理学方法探讨参附注射液治疗心力衰竭的作用机制[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(2): 239-249.

基于16S rRNA测序和网络药理学方法探讨参附注射液治疗心力衰竭的作用机制

赵震宇¹, 李琳^{2*}, 胡志希^{2*}

1. 湖南中医药大学中医诊断学湖南省重点实验室, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学中医诊断研究所, 湖南长沙 410208

[摘要] **目的** 探讨参附注射液治疗心力衰竭(以下简称“心衰”)的作用机制。**方法** 30只雄性SD大鼠随机分为空白组($n=7$)和造模组($n=23$)。造模组大鼠采用异丙肾上腺素皮下注射法($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 连续1周)制备心衰大鼠模型, 空白组大鼠经皮下注射等量生理盐水。造模完成后, 将成模大鼠随机分为模型组($n=8$)和参附组($n=8$)。参附组大鼠腹腔注射参附注射液($6\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$, 连续1周), 空白组和模型组大鼠腹腔注射等量生理盐水。药物干预结束后, 于麻醉状态下行心脏超声心动图检测; 经腹主动脉取血, 收集血液样本检测炎症指标; 于结肠段收集粪便样本和结肠组织进行16S rRNA测序和HE染色; 摘取大鼠心脏行HE染色。运用网络药理学方法, 筛选参附注射液活性成分、靶点及心衰和差异菌群相关靶点, 并对相同靶点进行GO功能和KEGG通路富集分析。**结果** 与空白组比较, 模型组大鼠射血分数(EF)、缩短分数(FS)下降($P<0.001$), N末端B型利钠肽原(NT-proBNP)升高($P<0.001$), 脂多糖(LPS)、白细胞介素(IL)-6、IL-1 β 升高($P<0.001$)。与模型组比较, 参附组大鼠EF、FS升高($P<0.001$), NT-proBNP下降($P<0.001$), LPS、IL-6、IL-1 β 下降($P<0.01$, $P<0.001$)。参附组与空白组的肠道菌群相似度高于模型组与空白组。群落组成和线性判别分析效应量(LEfSe)结果表明, 与空白组比较, 模型组大鼠多级物种丰度发生改变, 上述改变在参附组中呈现回调趋势。网络药理学结果发现, “参附注射液-肠道菌群-心衰”的共同靶点为IL-10、IL-1 β 、IL-6、肿瘤坏死因子, 并且GO功能、KEGG富集分析结果也与炎症反应密切相关。**结论** 参附注射液可能通过调节肠道菌群, 抑制机体炎症反应, 进而改善心功能。

[关键词] 参附注射液; 心力衰竭; 16S rRNA; 肠道菌群; 网络药理学; 异丙肾上腺素

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2025.02.007

Mechanism of action of Shenfu Injection in treating heart failure based on 16S rRNA sequencing and network pharmacology approaches

ZHAO Zhenyu¹, LI Lin^{2*}, HU Zhixi^{2*}

1. Hunan Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Diagnostics, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. Institute of Chinese Medicine Diagnosis, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To investigate the mechanism of action of Shenfu Injection in treating heart failure (HF). **Methods** Thirty male SD rats were randomly divided into blank group ($n=7$) and modeling group ($n=23$). Rats in the modeling group were administered subcutaneous injections of isoproterenol ($5\text{ mg}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for one week) to induce HF, while rats in the blank group

[收稿日期] 2024-07-31

[基金项目] 国家自然科学基金项目(82274412, 82305092); 湖南省自然科学基金项目(2023JJ30453); 湖南省青年科技创新人才项目(2024RC3199); 湖南省中医药科研项目(B2023045)。

[通信作者] * 胡志希, 男, 博士, 二级教授, 博士研究生导师, E-mail: 003405@hnu.edu.cn; 李琳, 女, 博士, 副教授, E-mail: 471920830@qq.com。

received an equal volume of normal saline subcutaneously. After model induction, successfully modeled rats were randomly divided into model group ($n=8$) and Shenfu group ($n=8$). Rats in the Shenfu group were treated with Shenfu Injection ($6 \text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}\cdot\text{d}^{-1}$ for one week) via intraperitoneal injection, while rats in the normal and model groups received intraperitoneal injections of an equal volume of normal saline. After drug intervention, echocardiography was performed under anesthesia, blood samples were collected from the abdominal aorta for the detection of inflammatory markers, fecal samples and colon tissues were collected for 16S rRNA sequencing and HE staining, and rats' hearts were excised for HE staining. Network pharmacology methods were used to screen the active components and targets of Shenfu Injection, as well as targets related to HF and differential microbiota, followed by GO function and KEGG pathway enrichment analysis for common targets. **Results** Compared with the blank group, the rats in the model group showed decreased ejection fraction (EF) and fractional shortening (FS) ($P<0.001$), and increased N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) ($P<0.001$), lipopolysaccharide (LPS), interleukin-6 (IL-6), and interleukin-1 β (IL-1 β) levels ($P<0.001$). Compared with the model group, rats in the Shenfu group exhibited increased EF and FS ($P<0.001$) and decreased NT-proBNP ($P<0.001$), LPS, IL-6, and IL-1 β levels ($P<0.01$, $P<0.001$). The intestinal microbiota composition in the Shenfu group was more similar to that of the normal group than to the model group. Community composition and linear discriminant analysis effect size (LEfSe) results indicated that compared with the blank group, the model group rats had altered multi-level species abundance, and these changes showed a trend of recovery in the Shenfu group. Network pharmacology results revealed that the common targets of "Shenfu Injection-intestinal microbiota-HF" were interleukin-10 (IL-10), IL-1 β , IL-6, and tumor necrosis factor, and the GO function and KEGG enrichment analyses results were also closely related to the inflammatory response. **Conclusion** Shenfu Injection may improve cardiac function by regulating the intestinal microbiota and inhibiting the body's inflammatory response.

[**Keywords**] Shenfu Injection; heart failure; 16S rRNA; intestinal microbiota; network pharmacology; isoprenaline

心力衰竭(以下简称“心衰”)是由心脏结构或功能异常引起的,以肺循环和(或)体循环淤血为主的一组临床综合征^[1]。在过去的半个世纪里,心血管疾病的预防、诊断和治疗取得了重大进展,发达国家心血管疾病死亡率显著降低,但心衰除外^[2]。包括利尿剂、 β 受体拮抗剂、肾素-血管紧张素-醛固酮系统抑制剂等在内的许多药物被广泛用于心衰的临床治疗。然而,目前的治疗方法主要针对一小部分假定的病理生理途径。心衰总体预后不佳,是患者住院和死亡的最常见原因之一^[3-4]。中医药因其毒副作用小且作用靶点、途径广泛的特点日益受到重视。许多中药注射剂被广泛应用于心血管疾病的治疗^[5],其中参附注射液有明确治疗心衰的效果^[6]。杨柳等^[7]研究发现,参附注射液能通过减轻 Toll 样受体信号通路介导的炎症反应和心肌纤维化,对心衰大鼠心肌起到保护作用。课题组前期实验研究结果证实^[8],参附注射液可通过降低血管加压素及其 2 型受体的表达,改善心衰大鼠水钠潴留现象。人体各处生活着数万亿微生物群,其在肠道中的密度最高,称为肠道菌群^[9]。肠道菌群是一个复杂的共生微生物系统,定植着约 100 万亿微生物,包括细菌、真菌、古菌、病毒等,其中细菌占 99%以上,在人类健康和疾病中发挥着重要作用,如调节自身代谢与免疫功能、排出体内毒素、提供营养等^[9-10]。肠道菌群失调在心衰的发

展过程中扮演着重要角色,调节肠道菌群可能是治疗心衰的一个新的靶点^[11]。ZHAO 等^[12]研究证实,四逆汤可通过改善心衰大鼠肠道黏膜屏障功能和菌群结构,降低致病菌丰度,增加产短链脂肪酸(short chain fatty acids, SCFAs)细菌的丰度,从而改善心功能。GAO 等^[13]研究发现,芪参颗粒可显著增加心衰大鼠肠道菌群中拟杆菌门的丰度,并增加 SCFAs 的产生,同时降低血清脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)水平,改善肠道结构,恢复肠道屏障功能,提高心功能。故本文运用 16S rRNA 高通量测序联合网络药理学研究参附注射液治疗心衰的潜在机制。

1 材料与方法

1.1 动物

30 只雄性 SD 大鼠[动物合格证号:4307272111 01030871,动物生产许可证号:SCXK(湘)2019-0004],体质量(220 ± 10) g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司。本实验过程符合相关伦理要求,已通过湖南中医药大学动物实验伦理委员会审核(审批号:LLBH-202105180001)。实验前,所有大鼠于湖南中医药大学 SPF 级实验动物中心饲养,温度 20~23 $^{\circ}\text{C}$,湿度 55%~67%,12 h 周期性明暗交替,适应性喂养 7 d。

1.2 药物

参附注射液(华润三九雅安药业有限公司,批号:201106AK05,国药准字:Z51020664,规格:10 mL/支);盐酸异丙肾上腺素(美国 MedChemExpress 公司,批号:HY-B0468/CS-2582,规格:5 g);乌拉坦[阿拉丁试剂(上海)有限公司,批号:U299635-100,规格:500 g]。

1.3 主要试剂与仪器

DNA 抽提试剂盒(美国 Omega Bio-Tek 公司,批号:M9636-02);琼脂糖(美国 Thermo Scientific 公司,批号:75510019);高保真 DNA 聚合酶(中国 TransGen 公司,批号:AS221-02);AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒(中国逾华公司,批号:C01-10000);建库试剂盒(美国 Bioo Scientific 公司,批号:NO-VA-5144);测序试剂盒(美国 Illumina 公司,批号:MS-102-3003)。

电泳仪(中国北京六一仪器厂,型号:DYY-6C);机械破碎研磨仪(美国 MP 公司,型号:Fast-Prep-24 5G);测序仪(美国 Illumina 公司,型号:Illumina Miseq);粉碎研磨仪(中国上海万柏生物科技有限公司,型号:TL-48R);便携式小动物超声仪(北京益仁恒业科技有限公司,型号:6 LAB);-80 °C 低温冰箱(美国 Thermo 公司,型号:TDE30086FV-ULTS)。

1.4 动物分组与造模

采用 Excel 表格的 Random 函数随机生成 7 个数字,对应 7 只空白组大鼠,空白组大鼠皮下注射等量生理盐水。其余 23 只大鼠皮下注射异丙肾上腺素 $5 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$ (给药浓度 $2.5 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$),连续 1 周,制备心肌缺血诱导的心衰大鼠模型^[14]。适应性喂养 2 周后,经眼眶取血检测 N 末端 B 型利钠肽原(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)及超声心动图。与空白组大鼠比较,射血分数(ejection fraction, EF)降低 20%以上,判定为造模成功^[15]。本研究成功构建 16 只模型大鼠(成模率 69.57%)。

1.5 给药和取材

16 只大鼠按照 Excel 表格的 Random 函数随机分为模型组和参附组。参附组大鼠腹腔注射参附注射液($6 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),模型组大鼠腹腔注射生理盐水($6 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$),连续 1 周。所有大鼠实验期间常规饲养。末次给药后禁食 24 h,于乌拉坦麻醉下行超声心动图检测。随后经腹主动脉取血,静置 30 min,于 $4 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $3\ 000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 离心 15 min(离心半径 10 cm),收集上层血清冻存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。在 4%多聚甲醛溶液中保存取出的完整心脏。切除大鼠结肠段,

按照 SHAO 等^[16]的方法收集粪便,液氮速冻后保存于 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 冰箱中。将结肠段用生理盐水冲洗后保存于 4%多聚甲醛溶液中。

1.6 检测指标及方法

1.6.1 超声心动图检测 利用大鼠超声检测系统,在大鼠探头上均匀涂抹耦合剂,通过二维超声的引导,使用 M 型超声线阵探头对大鼠左心室长轴进行切面观察,并运用 8 点法对 EF 和缩短分数(fractional shortening, FS)进行测算,评价心脏功能。

1.6.2 HE 染色 对固定后的心肌与结肠组织进行清洗以去除多余的固定剂,并脱水处理。组织经过透明化处理,浸入石蜡中,制成石蜡包埋块。使用切片机将石蜡包埋块切成薄片,贴附在载玻片上。对载玻片上的组织进行去蜡和水分恢复。使用苏木精染液对细胞核进行染色,使用伊红染液对细胞质进行染色。染色完成后,对组织进行脱水、透明化处理,并使用封片剂封固,在显微镜下进行观察。

1.6.3 血清 ELISA 检测 严格按照 ELISA 试剂盒说明书步骤检测各组大鼠血清 NT-proBNP、LPS、白细胞介素(interleukin, IL)-6、IL-1 β 水平。

1.6.4 肠道菌群的 DNA 抽提和测序 根据 FastDNA[®] Spin Kit for Soil 说明书对大鼠粪便进行微生物群落总 DNA 抽提与检测。使用 338F_806R 引物对 16S rRNA 基因 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增^[17]。根据中国上海美吉生物医药科技有限公司的标准协议,将纯化的扩增子汇集在等摩尔浓度中,在 Illumina MiSeq PE300 平台上进行配对末端测序。使用 fastp 0.20.0 (<https://github.com/OpenGene/fastp>) 软件对原始测序序列进行质控,使用 FLASH 1.2.7 (<http://www.cbcb.umd.edu/software/flash>) 软件进行拼接^[17]。

1.7 网络药理学分析

1.7.1 中药活性成分、靶点及心衰靶点、肠道菌群靶点的获取 通过 BATMAN-TCM 数据库 (<http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/>) 筛选参附注射液所含中药红参、附子的活性成分和靶点,标准设置为 $\text{Score} > 20, P < 0.05$,并通过 UniProt 数据库标准化靶点名称,去除重复靶点后得到中药靶点;以“Heart Failure”为关键词检索 OMIM 数据库 (<https://www.omim.org/>)、GeneCards 数据库 (<http://www.genecards.org>)、NCBI 数据库 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/>) 和 DisGeNet 数据库 (<https://www.disgenet.org/>), GeneCards 筛选标准为 $\text{Relevance score} > 20$,合并后去重,得到心衰靶点;通过 gutMGene 数据库 (<http://bio-computing.hrbmu.edu.cn/gutmgene/#/Home>) 检

索模型组与参附组间显著差异细菌所调控的基因, 得到菌群作用靶点。

1.7.2 “中药-肠道菌群-心衰”共同靶点的可视化分析 将中药、肠道菌群和心衰靶点通过 PERL 5.38.0 软件进行筛选, 并利用 Venny 平台 (<https://bioinfogp.cnb.csic.es/tools/venny/index.html>) 进行可视化分析。

1.7.3 核心有效成分和靶点的筛选 将获得的共同靶点导入 STRING 在线数据库 (<https://stringdb.org/>), 选择物种“Homo sapiens”, 设置置信度 ≥ 0.4 。

1.7.4 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析 运用 Bioconductor 数据库及 R 4.2.2(64 bit) 软件对潜在靶点进行 GO 功能和 KEGG 富集分析。

1.8 统计学分析

使用 SPSS 22.0 软件分析数据, 计量资料均以 “ $\bar{x} \pm s$ ” 表示, 多组比较采用单因素方差分析。两组比较若数据服从正态分布, 采用参数 *t* 检验; 若数据不服从正态分布, 采用非参数 *t* 检验。以 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 各组心功能指标比较

与空白组比较, 模型组 EF、FS 显著降低 ($P < 0.001$),

表 1 各组心功能指标比较 ($n=6, \bar{x} \pm s$)

Table 1 Comparison of cardiac function indicators among different groups ($n=6, \bar{x} \pm s$)

组别	EF/%	FS/%	NT-proBNP/(pg·mL ⁻¹)
空白组	86.43±2.37	53.29±3.64	101.80±35.16
模型组	55.38±4.98***	26.00±2.07***	322.40±143.50***
参附组	74.50±2.51***###	42.25±5.97***###	134.10±12.42###

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

NT-proBNP 含量显著升高 ($P < 0.001$)。与模型组比较, 参附组 EF、FS 显著升高 ($P < 0.001$), NT-proBNP 含量显著降低 ($P < 0.001$)。详见表 1、图 1。

2.2 各组心肌与结肠组织形态学观察

空白组大鼠心肌组织结构完整, 形态正常, 未见炎性细胞浸润、水肿、坏死等病理性改变; 模型组大鼠心肌组织可见明显炎性细胞浸润, 成纤维细胞增多, 部分心肌纤维溶解; 参附组大鼠心肌组织炎性细胞减少, 可见纤维化现象, 未见心肌纤维溶解。空白组大鼠结肠组织绒毛上皮连续、光滑、无脱落, 未见充血和炎性细胞; 模型组大鼠结肠组织可见绒毛上皮脱落坏死, 炎性细胞浸润; 参附组大鼠结肠组织绒毛上皮连续但欠光滑, 炎性细胞减少。详见图 2。

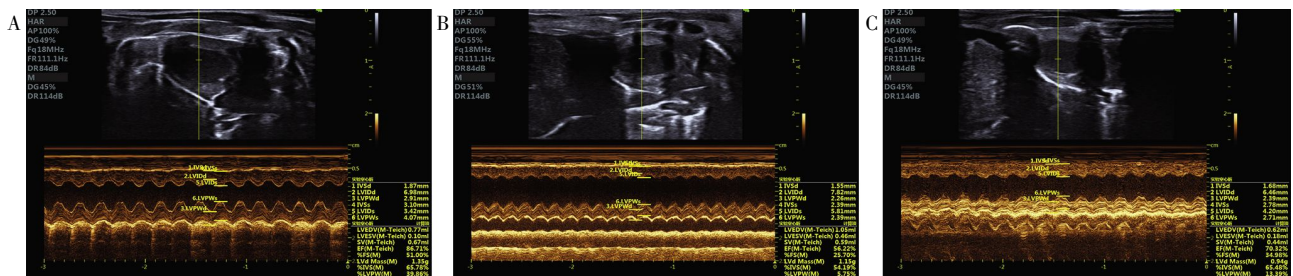


图 1 各组超声心动图

Fig.1 Echocardiograms of different groups

注: A.空白组; B.模型组; C.参附组。

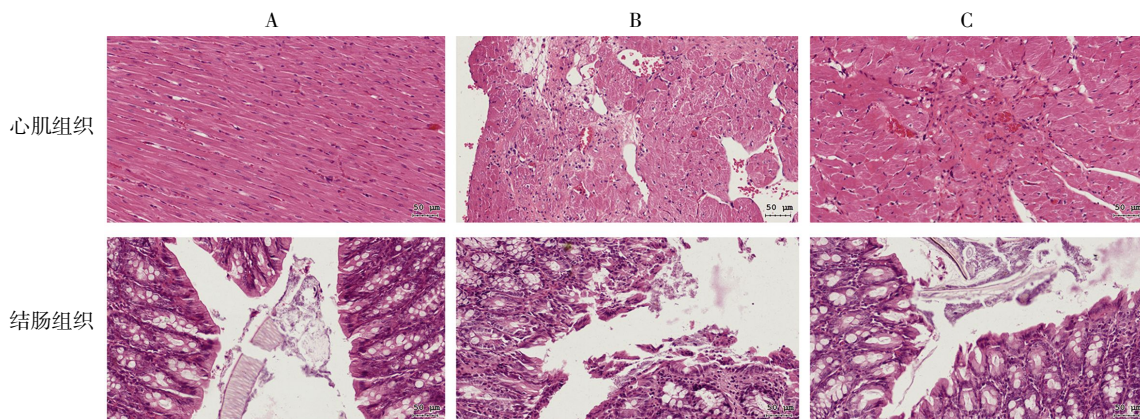


图 2 各组心肌与结肠组织病理观察 (HE, $\times 200$, 标尺=50 μm)

Fig.2 Pathological observation of myocardial and colon tissue in different groups (HE, $\times 200$, scale bar=50 μm)

注: A.空白组; B.模型组; C.参附组。

2.3 各组炎症因子含量比较

与空白组比较,模型组 LPS、IL-6、IL-1 β 含量显著升高($P<0.001$)。与模型组比较,参附组 LPS、IL-6、IL-1 β 含量显著降低($P<0.01, P<0.001$)。详见表 2。

表 2 各组炎症因子含量比较($n=6, \bar{x}\pm s$)

Table 2 Comparison of inflammatory factor levels among different groups ($n=6, \bar{x}\pm s$)

组别	LPS/(EU/L)	IL-6/(pg/mL)	IL-1 β /(pg/mL)
空白组	329.20 \pm 20.50	50.65 \pm 10.00	21.55 \pm 3.21
模型组	650.70 \pm 60.98***	89.24 \pm 13.29***	34.66 \pm 2.54***
参附组	531.00 \pm 38.68*** ^{##}	69.02 \pm 6.41*** ^{##}	28.77 \pm 3.59*** ^{##}

注:与空白组比较,** $P<0.01$,*** $P<0.001$;与模型组比较,^{##} $P<0.01$,^{###} $P<0.001$ 。

2.4 各组肠道菌群比较

2.4.1 稀释曲线分析 如图 3 所示,各组曲线趋于平缓,测序数据达到饱和,所获数据能够较全面地反映大鼠肠道菌群信息,可用于后续分析。

2.4.2 韦恩图分析 所有序列依据 97%相似度水

平划分为 872 个操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU),绘制可直观表现 3 组样本物种组成相似性和重叠状况的韦恩图(图 4)。统计并分析空白组、模型组、参附组样本中共有和特有的 OTU 数量。空白组、模型组、参附组的 OTU 分别为 620、497、736 个。3 组共有 OTU 为 354 个(40.60%),其中空白组、模型组、参附组特有的 OTU 分别为 53 个(6.08%)、53 个(6.08%)、139 个(15.94%)。空白组和模型组共有的 OTU 为 384 个(44.04%),空白组和参附组共有的 OTU 为 537 个(61.59%),模型组和参附组共有的 OTU 为 414 个(47.48%)。空白组与参附组的共有菌占比高于模型组与参附组的共有菌占比,空白组大鼠与参附组大鼠的菌群结构更加相近。

2.4.3 PCoA 分析(principal co-ordinates analysis, PCoA) PC1 的代表性为 26.79%,PC2 的贡献度是 10.82%。基于未加权的 Unifrac 距离算法的 PCoA 分析(图 5)表明,空白组、模型组、参附组的肠道细菌存在明显的组间差异,空白组样本同参附组样本的组间距离较空白组样本同模型组样本的组间距离缩短。

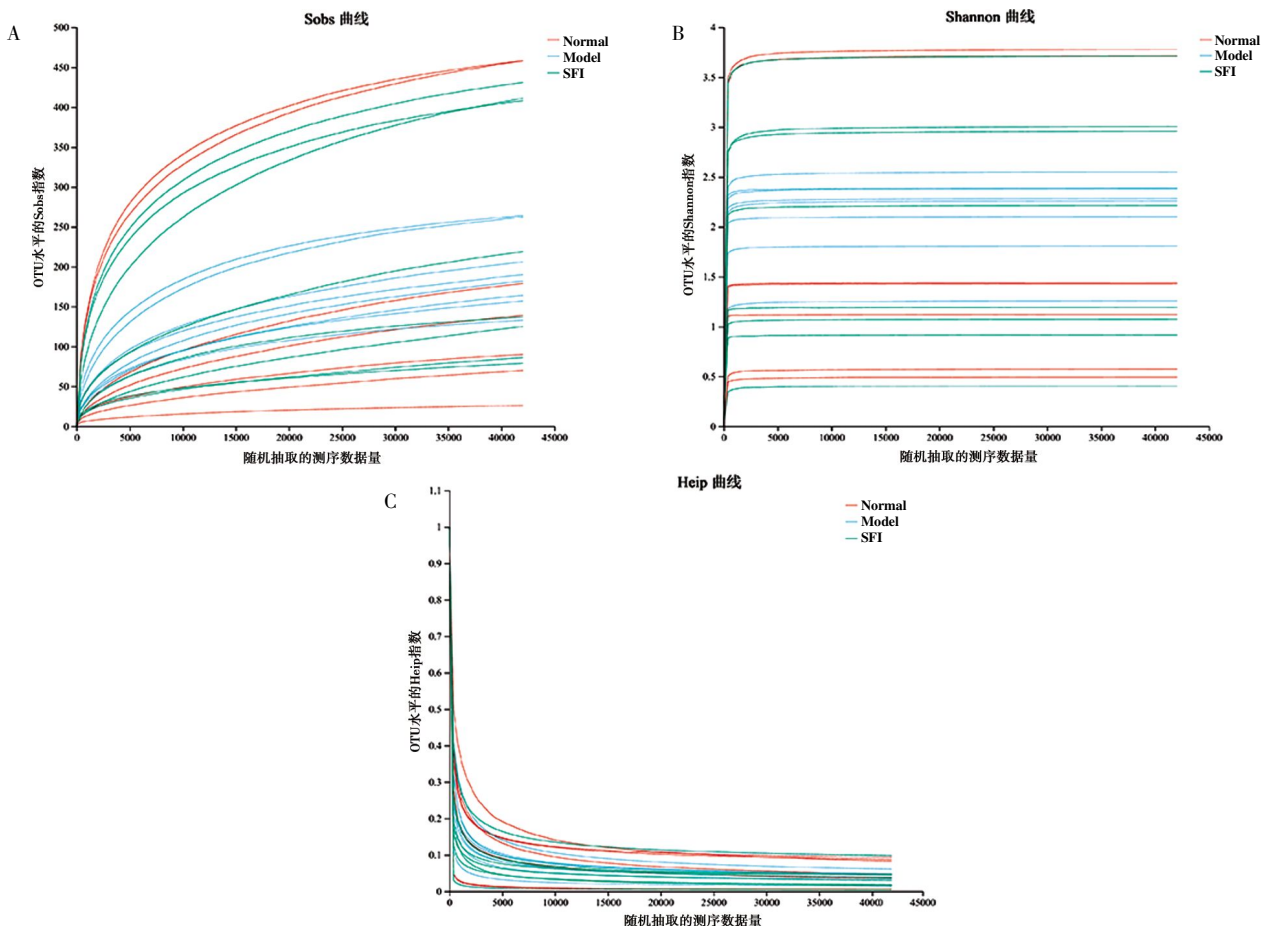


图 3 稀释曲线分析

Fig.3 Dilution curve analysis

注:A.Sobs 曲线图,反映微生物丰富度;B.Shannon 曲线图,反映微生物多样性;C.Heip 曲线图,反映微生物均匀度。Normal.空白组;Model.模型组;SFI.参附组。

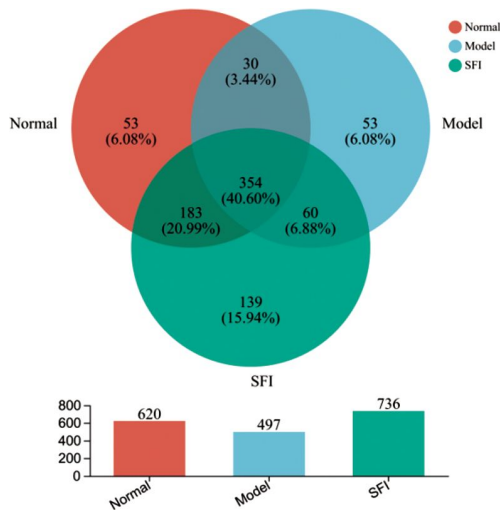


图 4 样本组成相似性和重叠状况韦恩图

Fig.4 Venn diagram of sample composition similarity and overlap status

注: Normal.空白组; Model.模型组; SFI.参附组。

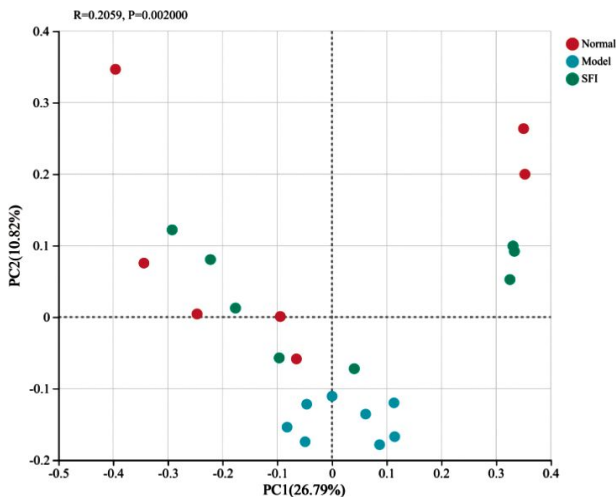


图 5 PCoA 分析图

Fig.5 PCoA analysis diagram

注: 两样本点越接近, 表明两样本物种组成越相似。Normal.空白组; Model.模型组; SFI.参附组。

2.4.4 群落组成分析 (1) 门水平物种组成情况: 如图 6A 所示, 结果表明空白组、模型组、参附组在门水平的最优细菌相同, 为厚壁菌门 (Firmicutes); 其余优势细菌门依次为变形菌门 (Proteobacteria)、放线菌门 (Actinobacteriota)、拟杆菌门 (Bacteroidota)。相较于空白组, 模型组的厚壁菌门相对丰度由 96.30% 降低至 86.03%, 拟杆菌门相对丰度由 2.15% 降低至 0.08%; 变形菌门相对丰度由 0.28% 升高至 8.27%, 放线菌门相对丰度由 0.99% 升高至 5.23%。相较于模型组, 参附组的厚壁菌门相对丰度由 86.03% 升高至 95.91%, 拟杆菌门相对丰度由 0.08% 升高至 0.62%; 变形菌门相对丰度由 8.27% 降低至

0.64%, 放线菌门相对丰度由 5.23% 降低至 1.92%。

(2) 科水平物种组成情况: 如图 6B 所示, 空白组的优势细菌科及其相对丰度依次为乳酸杆菌科 (Lactobacillaceae) 48.22%、消化链球菌科 (Peptostreptococcaceae) 30.28%、毛螺旋菌科 (Lachnospiraceae) 6.86%、颤螺旋菌科 (Oscillospiraceae) 3.99% 等。模型组的优势细菌及其相对丰度依次为乳酸杆菌科 44.61%、消化链球菌科 21.47%、梭菌科 (Clostridiaceae) 10.28%、肠杆菌科 (Enterobacteriaceae) 7.40% 等。参附组的优势细菌科及其相对丰度依次为乳酸杆菌科 47.65%、消化链球菌科 27.39%、丹毒丝菌科 (Erysipelotrichaceae) 4.56%、毛螺旋菌科 2.90% 等。

(3) 属水平物种组成情况: 如图 6C 所示, 相对丰度前 8 的细菌属依次为乳酸杆菌属 (*Lactobacillus*)、罗姆布茨菌属 (*Romboutsia*)、*Clostridium_sensu_stricto_1*、埃希-志贺菌属 (*Escherichia-Shigella*)、毛螺旋菌科 NK4A136 组 (*Lachnospiraceae_NK4A136_group*)、UCG-005、异杆菌属 (*Allobaculum*)、双歧杆菌属 (*Bifidobacterium*)。相较于空白组, 模型组的乳酸杆菌属相对丰度由 48.22% 降低至 44.61%, 罗姆布茨菌属相对丰度由 30.28% 降低至 21.47%, 毛螺旋菌科 NK4A136 组相对丰度由 3.58% 降低至 0.62%, UCG-005 相对丰度由 2.93% 降低至 0.01%; *Clostridium_sensu_stricto_1* 相对丰度由 0.58% 升高至 9.94%, 埃希-志贺菌属相对丰度由 0.10% 升高至 7.40%, 异杆菌属相对丰度由 0.12% 升高至 1.35%, 双歧杆菌属相对丰度由 0.01% 升高至 2.82%。相较于模型组, 参附组的乳酸杆菌属相对丰度由 44.61% 升高至 47.65%, 罗姆布茨菌属相对丰度由 21.47% 升高至 27.39%, 毛螺旋菌科 NK4A136 组相对丰度由 0.62% 升高至 1.13%, UCG-005 相对丰度由 0.01% 升高至 1.17%, 异杆菌属相对丰度由 1.35% 升高至 2.33%; *Clostridium_sensu_stricto_1* 相对丰度由 9.94% 降低至 1.97%, 埃希-志贺菌属相对丰度由 7.40% 降低至 0.34%, 双歧杆菌属相对丰度由 2.82% 降低至 0.34%。

(4) 种水平物种组成情况: 如图 6D 所示, 空白组的优势细菌种及其相对丰度分别为 *Romboutsia_ilealis* 30.28%、*Lactobacillus_intestinalis* 18.37%、*Lactobacillus_reuteri* 12.13%、*Lactobacillus_johnsonii* 9.87% 等。模型组的优势细菌种及其相对丰度分别为 *Romboutsia_ilealis* 21.47%、*Lactobacillus_johnsonii*

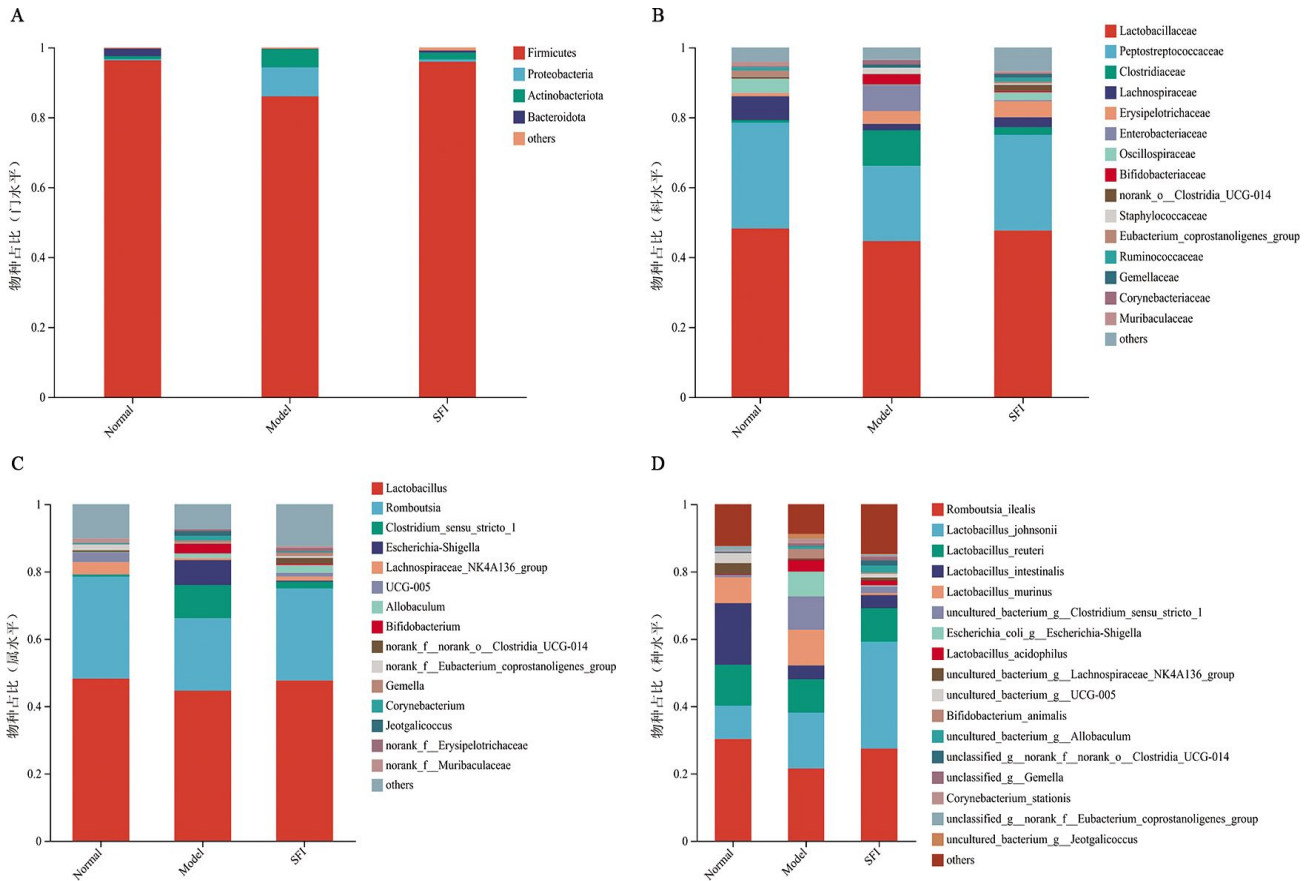


图 6 群落组成柱形图

Fig.6 Bar chart of community composition

注: A.门水平细菌组成; B.科水平细菌组成; C.属水平细菌组成; D.种水平细菌组成。不同颜色区域表示不同物种的占比, 将丰度低于 1% 的物种合并为其他 (others)。Normal.空白组; Model.模型组; SFI.参附组。

16.59%、*Lactobacillus_murinus* 10.59%等。参附组的优势细菌种及其相对丰度分别为 *Lactobacillus_johnsonii* 31.76%、*Romboutsia_ilealis* 27.39%、*Lactobacillus_reuteri* 9.94%等。

2.4.5 多级物种差异判别分析 如图 7 所示, 多级物种差异判别分析法通过检测显著丰度差异特征, 找到丰度有显著性差异的细菌, 采用线性判别分析来估算每个物种丰度对差异效果影响的大小。相较于空白组, 模型组厚壁菌门等细菌丰度显著降低, 梭菌目 (Clostridiales)、梭菌科、变形菌门、肠杆菌目 (Enterobacteriales)、放线菌门等细菌丰度显著升高。与模型组比较, 参附组 *s_Lactobacillus_murinus*、梭菌目、梭菌科、放线菌门等细菌丰度显著下降, 拟杆菌科 (Bacteroidaceae)、拟杆菌属 (*Bacteroides*) 等细菌丰度显著升高。

2.5 网络药理学结果

2.5.1 靶点预测 从 BATMAN-TCM 数据库得到附

子有效成分 46 个、红参有效成分 9 个, 共获得 55 个有效成分; 得到附子靶点 258 种、红参靶点 99 种, 删除重复靶点, 最终得到 342 个中药靶点。分别从 GeneCards 数据库、DisGeNET 数据库、NCBI 数据库、OMIM 数据库得到 1 108、223、748、473 个心衰靶点, 删除重复靶点, 最终得到 1 982 个心衰靶点。从 gutMGene 数据库得到 21 个肠道菌群靶点。利用韦恩图对“中药-肠道菌群-心衰”靶点进行可视化分析, 共有 4 个相同靶点。详见图 8。

2.5.2 核心有效成分及靶点的筛选 按照 Degree 值筛选核心有效成分, 核心有效成分为: 间氨基苯酚、邻氨基苯酚、对氨基苯酚、棍掌碱和榄香烯。按照 Degree 值筛选核心靶点, 核心靶点为: IL-10、IL-1 β 、IL-6 和肿瘤坏死因子 (tumor necrosis factor, TNF)。详见图 9。

2.5.3 GO 功能和 KEGG 通路富集分析 GO 富集分析结果显示, 生物过程 (biological process, BP)

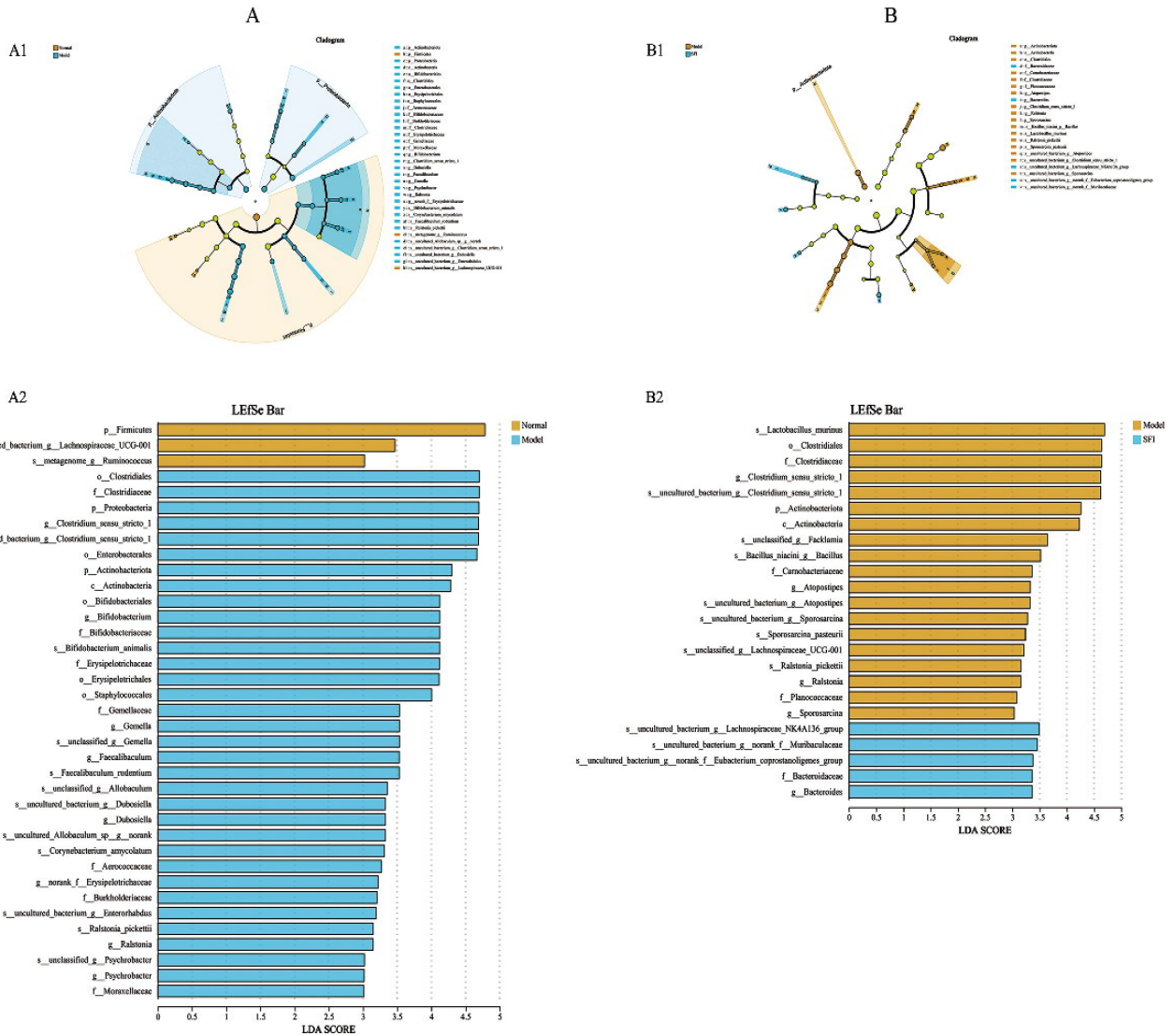


图 7 多级物种差异判别分析图

Fig.7 Discriminant analysis of LEfSe multilevel species differences

注:A.模型组 vs 空白组;B.参附组 vs 模型组。A1、B1. LEfSe(线性判别分析效应量)多级物种层级树图;A2、B2. LDA 判别柱形图。LDA 阈值,3;分类水平:从门到种。Normal.空白组;Model.模型组;SFI.参附组。

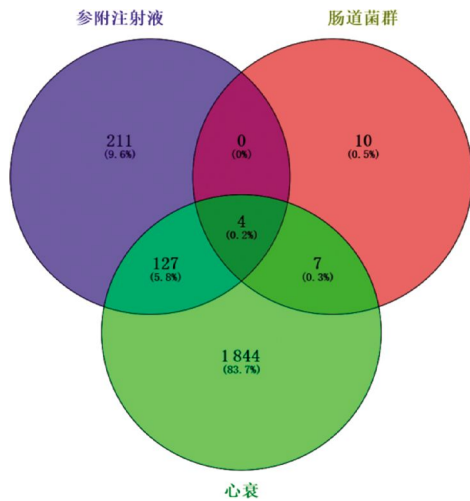


图 8 “中药-肠道菌群-心衰”靶点韦恩图

Fig.8 Venn diagram of "TCM-intestinal microbiota-heart failure" target

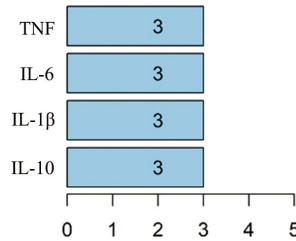


图 9 核心靶点图

Fig.9 Core target map

条目 1 089 条,主要与趋化因子产生的调节、趋化因子的生产等相关;细胞组分(cellular component, CC)条目 1 条,与吞噬杯相关;分子功能(molecular function, MF)条目 0 条,详见图 10。KEGG 富集到 63 条通路,主要与炎症性肠病等疾病通路相关,详见图11。

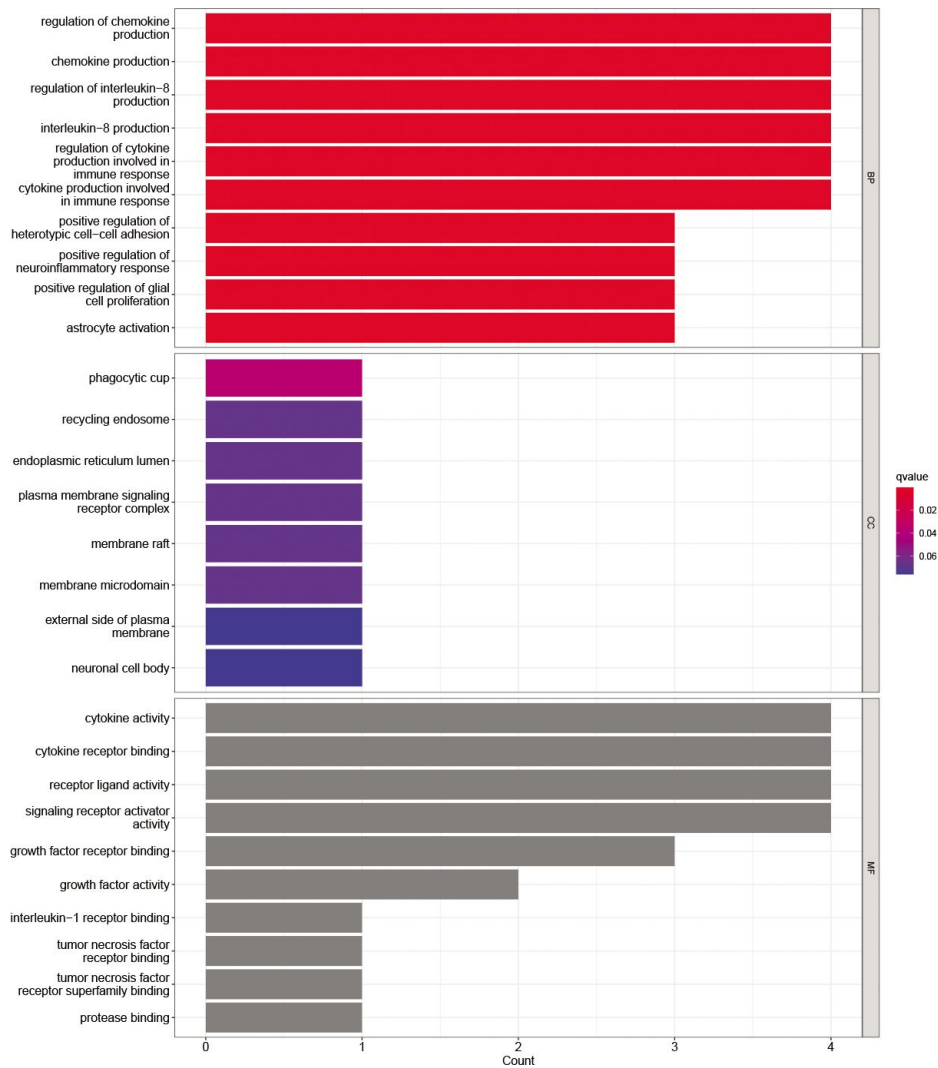


图 10 GO 富集分析图

Fig.10 GO enrichment analysis

3 讨论

目前,许多研究证实肠道菌群及其代谢产物与心衰具有相关性,即“心力衰竭的肠道假说”^[18]。心衰通过影响机体的血流动力学,引发肠黏膜的缺血-再灌注损伤,导致其防御功能减弱,有利于肠道菌群及其内毒素向肠外转移,从而促进炎症因子的释放,引起系统炎症损伤,加重心衰程度^[19-20]。可见,心衰的发展与肠道菌群的改变相互影响,调节肠道菌群结构,改善肠道微环境,或可成为治疗心衰的新途径。

动物实验结果中,韦恩图和 PCoA 分析结果均表明,空白组肠道菌群结构与参附组相近,与模型组存在差异,提示心衰发展过程中存在菌群失调现象,参附注射液对菌群结构的恢复有一定作用。

菌群组成分析结果表明,与空白组比较,模型组

大鼠变形菌门数量显著增加,成为模型组第二丰富的细菌门,和 SUN 等^[21]的发现类似。变形菌门被认为是肠道菌群失衡的标志^[22],该菌门的所有成员都是革兰氏阴性菌,其外膜主要由 LPS 构成,LPS 入血后可激活 NF- κ B 信号通路,促进 TNF- α 、IL-6、IL-1 β 的表达,加重系统炎症反应,对心衰的发展产生负面影响^[23-24]。治疗后大鼠肠道内变形菌门丰度降低,推测参附注射液可能通过改善肠道菌群结构,减轻炎症反应,发挥治疗心衰的作用。SCFAs 是肠道微生物最丰富的代谢产物之一,主要包括乙酸、丙酸、丁酸等,能够参与心衰相关的免疫代谢^[25]。乙酸可通过上调 TRIM40 的表达,抑制 TNF- α 、IL-6 等炎症因子的释放,减轻炎症反应^[26];丙酸可通过 FFAR2 依赖的方式增强 Treg 功能,使结肠促炎因子水平降低,改善肠道微环境^[27];丁酸作为 SCFAs 的一种,可以激活活化蛋白 1 信号通路,抑制 IL-6、IL-1 β 等促炎因子的

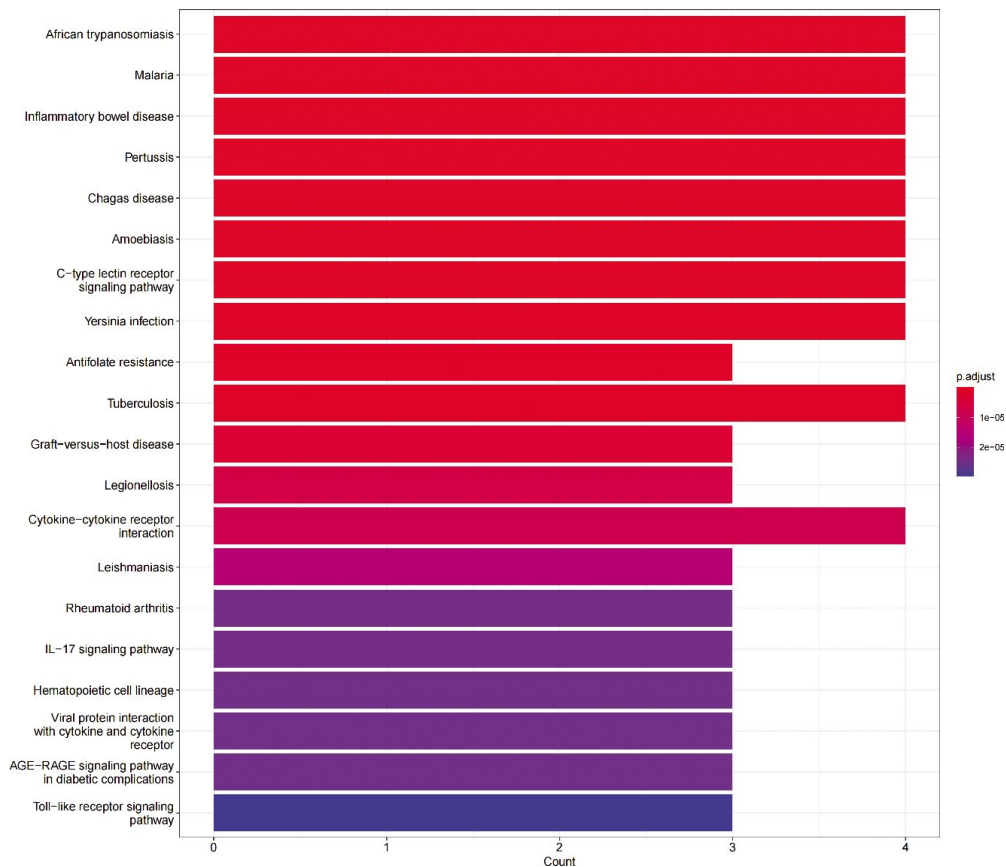


图 11 KEGG 通路富集分析图

Fig.11 KEGG pathway enrichment analysis

释放,并通过抑制 NF- κ B 等信号通路,调控免疫反应,改善机体炎症状态^[28]。毛螺旋菌科和瘤胃菌科(Ruminococcaceae)是丁酸盐产生菌^[29];拟杆菌属和阿克曼菌属(*Akkermansia*)丰度与丁酸盐、丙酸盐水平呈正相关^[30];鼠杆菌科(Muribaculaceae)可通过降解特定类型的多糖产生乙酸、丙酸等,其丰度是肠道 SCFAs 含量的重要预测指标^[31]。本研究结果表明,与空白组大鼠比较,模型组毛螺旋菌科、瘤胃菌科、拟杆菌属、阿克曼菌属、鼠杆菌科相对丰度降低,参附注射液治疗后上述细菌丰度增加,其中拟杆菌属丰度与模型组比较有显著差异,提示参附注射液治疗心衰的机制可能与促进肠道内产 SCFAs 细菌增殖,进而抑制机体炎症反应有关。

网络药理学分析发现,“参附注射液-肠道菌群-心衰”共有 4 个炎症相关靶点,分别是 IL-10、IL-1 β 、IL-6 和 TNF。GO 功能富集分析显示,参附注射液通过肠道菌群治疗心衰主要与趋化因子的产生等炎症反应途径相关。KEGG 分析主要富集在与免疫调节相关的通路。结合血液炎症指标 LPS、IL-6、IL-1 β 的改变,推测参附注射液对心衰伴发菌群失

调大鼠的治疗与调节免疫炎症反应密切相关。

本实验通过 16S rRNA 测序联合网络药理学方法初步开展了基于心衰状态下的“肠-心”对话研究,发现参附注射液治疗心衰的潜在靶点、作用通路,及其与肠道菌群的内在联系。这一发现不仅可以提高研究人员对参附注射液治疗心衰机制的认识,而且揭示了调节肠道菌群可能成为治疗心衰的一种新策略。但由于本实验未进行菌群移植以验证其抗炎效果的直接作用,参附注射液能否通过调节肠道菌群,抑制机体炎症反应,进而改善心功能,尚需深入探究。

参考文献

- [1] 徐 芬,周 洲.《心力衰竭通用定义和分类》将开启心力衰竭诊疗的标准化进程[J]. 协和医学杂志, 2021, 12(5): 621-623.
- [2] LIANG B, ZHAO Y X, ZHANG X X, et al. Reappraisal on pharmacological and mechanical treatments of heart failure[J]. Cardiovascular Diabetology, 2020, 19(1): 55.
- [3] SEVERINO P, MAESTRINI V, MARIANI M V, et al. Structural and myocardial dysfunction in heart failure beyond ejection fraction[J]. Heart Failure Reviews, 2020, 25(1): 9-17.

- [4] JIA Q J, LI H, ZHOU H, et al. Role and effective therapeutic target of gut microbiota in heart failure[J]. *Cardiovascular Therapeutics*, 2019, 2019: 5164298.
- [5] 王 淳, 刘丽梅, 宋志前, 等. 心血管疾病常用中药注射液及相关中药有效组分研究概况[J]. *中草药*, 2015, 46(15): 2315-2328.
- [6] 侯雅竹, 毛静远, 王贤良, 等. 参附注射液治疗心力衰竭的系统评价[J]. *中国循证医学杂志*, 2011, 11(3): 292-299.
- [7] 杨 柳, 叶 东, 胡 耀, 等. 参附注射液基于TLRs信号通路对慢性心力衰竭大鼠模型保护作用的机制研究[J]. *中国中医药现代远程教育*, 2023, 21(13): 134-137.
- [8] 梁 昊, 黄建华, 简维雄, 等. 参附注射液通过血管加压素逃避改善心衰大鼠水钠代谢[J]. *中药药理与临床*, 2020, 36(6): 57-62.
- [9] ZOU Y F, SONG X J, LIU N, et al. Intestinal flora: A potential new regulator of cardiovascular disease[J]. *Aging and Disease*, 2022, 13(3): 753-772.
- [10] WEN Y N, SUN Z F, XIE S Y, et al. Intestinal flora derived metabolites affect the occurrence and development of cardiovascular disease[J]. *Journal of Multidisciplinary Healthcare*, 2022, 15: 2591-2603.
- [11] CHEN X, LI H Y, HU X M, et al. Current understanding of gut microbiota alterations and related therapeutic intervention strategies in heart failure[J]. *Chinese Medical Journal*, 2019, 132(15): 1843-1855.
- [12] ZHAO Z Y, LIU J H, HU Y Z, et al. Bacterial diversity in the intestinal mucosa of heart failure rats treated with Sini Decoction[J]. *BMC Complementary Medicine and Therapies*, 2022, 22(1): 93.
- [13] GAO K, YU X, LI F H, et al. Qishen granules regulate intestinal microecology to improve cardiac function in rats with heart failure[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2023, 14: 1202768.
- [14] 黄淑敏, 廖晓倩, 范星宇, 等. 基于“以方测证”理论探讨异丙肾上腺素诱导慢性心力衰竭大鼠模型的制备及中医证型[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(3): 368-375.
- [15] 孔文文, 张 昕. 内质网应激和蛋白质羧基化在心力衰竭恶病质中的作用[J]. *安徽医科大学学报*, 2021, 56(2): 244-248.
- [16] SHAO H Q, ZHANG C Y, XIAO N Q, et al. Gut microbiota characteristics in mice with antibiotic-associated diarrhea[J]. *BMC Microbiology*, 2020, 20(1): 313.
- [17] 赵震宇, 胡炎芝, 董振华, 等. 参附注射液对阿霉素诱导的心力衰竭大鼠肠道细菌多样性的影响[J]. *中成药*, 2022, 44(7): 2334-2340.
- [18] LI L, ZHONG S J, CHENG B, et al. Cross-talk between gut microbiota and the heart: A new target for the herbal medicine treatment of heart failure? [J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2020, 2020: 9097821.
- [19] 武文娟, 吴纪珍, 黄改荣, 等. 老年肠道菌群失调与特发性肺纤维化患者心力衰竭的相关性研究[J]. *中华老年心脑血管病杂志*, 2022, 24(1): 14-16.
- [20] 李国敬, 刘玲梅. 肠道菌群改变与心力衰竭关系的研究进展[J]. *内科*, 2021, 16(5): 643-645.
- [21] SUN W J, DU D B, FU T Z, et al. Alterations of the gut microbiota in patients with severe chronic heart failure[J]. *Frontiers in Microbiology*, 2022, 12: 813289.
- [22] SHIN N R, WHON T W, BAE J W. Proteobacteria: Microbial signature of dysbiosis in gut microbiota[J]. *Trends in Biotechnology*, 2015, 33(9): 496-503.
- [23] VIOLI F, CASTELLANI V, MENICHELLI D, et al. Gut barrier dysfunction and endotoxemia in heart failure: A dangerous conubium? [J]. *American Heart Journal*, 2023, 264: 40-48.
- [24] 孙悦龙, 张梦洁, 豆佳红, 等. 基于网络药理学及分子对接技术研究黄芪调控仔猪肠道菌群失调性腹泻的作用[J]. *中国畜牧兽医*, 2022, 49(8): 3200-3211.
- [25] ZHAO P, ZHAO S H, TIAN J W, et al. Significance of gut microbiota and short-chain fatty acids in heart failure[J]. *Nutrients*, 2022, 14(18): 3758.
- [26] YANG H G, MENG L, AI D B, et al. Acetic acid alleviates the inflammatory response and liver injury in septic mice by increasing the expression of TRIM40[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2019, 17(4): 2789-2798.
- [27] SMITH P M, HOWITT M R, PANIKOV N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis[J]. *Science*, 2013, 341(6145): 569-573.
- [28] 张锦涛, 伊 曼, 李志嘉, 等. 丁酸盐在炎症反应中作用机制的研究进展[J]. *免疫学杂志*, 2015, 31(12): 1101-1104.
- [29] AHMAD A F, DWIVEDI G, O'GARA F, et al. The gut microbiome and cardiovascular disease: Current knowledge and clinical potential[J]. *American Journal of Physiology Heart and Circulatory Physiology*, 2019, 317(5): H923-H938.
- [30] WANG Z J, LIU J, LI F, et al. Mechanisms of qingyi decoction in severe acute pancreatitis-associated acute lung injury via gut microbiota: Targeting the short-chain fatty acids-mediated AMPK/NF- κ B/NLRP3 pathway[J]. *Microbiology Spectrum*, 2023, 11(4): e0366422.
- [31] SUN Z Q, YU Z, WANG B. *Perilla frutescens* leaf alters the rumen microbial community of lactating dairy cows[J]. *Microorganisms*, 2019, 7(11): 562.

(本文编辑 周 旦)