

·实验研究·

本文引用: 周 慧, 肖长江, 夏相宜, 鄢 磊, 尹晓芳, 莫 凌, 王孟可. 四磨汤对心力衰竭大鼠肠道菌群及氧化三甲胺的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(5): 790-798.

四磨汤对心力衰竭大鼠肠道菌群及氧化三甲胺的影响

周 慧¹, 肖长江^{2*}, 夏相宜², 鄢 磊¹, 尹晓芳¹, 莫 凌¹, 王孟可¹

1. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 2. 湖南省中医药研究院附属医院, 湖南 长沙 410006

[摘要] **目的** 观察肠道-氧化三甲胺(trimethylamine oxide, TMAO)-心力衰竭(heart failure, HF)轴上四磨汤对 HF 大鼠肠道菌群及 TMAO 的影响, 初步探讨四磨汤从肠道菌群方面防治 HF 的可能机制。**方法** 选用 40 只雄性大鼠, 运用随机数字表法分为对照组、四磨汤对照组、模型组、四磨汤模型组, 每组 10 只。对照组、四磨汤对照组予生理盐水 2.5 mg/kg 腹腔注射; 模型组、四磨汤模型组予异丙肾上腺素 2.5 mg/kg 腹腔注射造模, 4 组大鼠连续 4 周腹腔注射结束后, 连续灌胃治疗 2 周。对照组、模型组予生理盐水 7.56 mL/kg 灌胃, 每日 1 次; 四磨汤对照组、四磨汤模型组予四磨汤 7.56 mL/kg 灌胃, 每日 1 次。使用液相色谱-质谱法检测血浆 TMAO, ELISA 法检测血清氨基端前脑钠素(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP), 16S rRNA 检测粪便样本, 生物信息学方法分析与比较样品间的菌群结构特征。**结果** 模型组、四磨汤模型组 TMAO、NT-proBNP 含量均明显高于对照组($P<0.05$, $P<0.01$), 四磨汤模型组 TMAO、NT-proBNP 含量均明显低于模型组($P<0.05$, $P<0.01$)。与对照组相比, 四磨汤对照组乳酸杆菌含量明显升高($P<0.05$), 肠球菌含量明显减少($P<0.05$); 模型组乳酸杆菌、普氏菌、双歧杆菌含量均明显减少($P<0.05$), 肠球菌、大肠埃希菌含量均明显升高($P<0.05$); 四磨汤模型组普氏菌含量明显减少($P<0.05$), 肠球菌、大肠埃希菌含量均明显升高($P<0.05$)。与模型组相比, 四磨汤模型组普氏菌含量明显升高($P<0.05$), 肠球菌、大肠埃希菌含量均明显降低($P<0.05$)。**结论** 四磨汤可以降低 HF 大鼠 TMAO、NT-proBNP 含量, 其机制可能与四磨汤改变 HF 大鼠肠道菌群、肠道-TMAO-HF 轴相关。

[关键词] 心力衰竭; 四磨汤; 肠道菌群; 氧化三甲胺; 氨基端前脑钠素; 生物信息学

[中图分类号] R285.5

[文献标志码] A

[文章编号] doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.05.006

Effects of Simo Decoction on intestinal flora and TMAO in rats with heart failure

ZHOU Hui¹, XIAO Changjiang^{2*}, XIA Xiangyi², YAN Lei¹, YIN Xiaofang¹, MO Ling¹, WANG Mengke¹

1. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 2. The Hospital of Hunan

Academy of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410006, China

[Abstract] **Objective** To observe the effects of Simo Decoction on intestinal flora and trimethylamine oxide (TMAO) in rats with heart failure (HF) on intestinal-TMAO-HF axis, and to preliminarily explore the possible mechanism of Simo Decoction in preventing and treating HF from the intestinal flora. **Methods** Forty male rats were selected and divided into control group, Simo Decoction control group, model group and Simo Decoction model group by random number table method, with 10 rats in each group. The control group and Simo Decoction control group received intraperitoneal injection of normal saline 2.5 mg/kg; model group and Simo Decoction model group were given isoprenaline 2.5 mg/kg to establish model by intraperitoneal injection. After 4 weeks of intraperitoneal injection, the rats in 4 groups were continuously treated with gastric gavage for 2 weeks. The control group and the model group were given normal saline 7.56 mL/kg by gastric gavage, once a day; the Simo Decoction control group and Simo Decoction model group were given Simo Decoction 7.56 mL/kg by gastric gavage, once a day. liquid chromatograph-mass

[收稿日期] 2022-08-13

[基金项目] 国家中医药管理局全国名老中医药专家传承工作室建设项目(国中医药人教发[2013]47号); 湖南省中医药管理局重点课题(2021008); 湖南省“十四五”中医药学科带头人培养计划项目(湘中医[2022]4号)。

[第一作者] 周 慧, 女, 硕士研究生, 研究方向: 心血管疾病的中西医结合防治。

[通信作者] *肖长江, 男, 博士, 教授, 硕士研究生导师, E-mail: changjiangx@163.com。

spectrometer was used to determine rat plasma TMAO, ELISA was used to measure N-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-proBNP) in rat serum, 16S rRNA was used to examine rat stool samples, and bioinformatics method was used to analyze and compare flora structure characteristics among samples. **Results** The TMAO and NT-proBNP content in plasma in model group and Simo Decoction model group was significantly higher than that in control group ($P<0.05$, $P<0.01$), and the TMAO and NT-proBNP content in plasma in Simo Decoction model group was lower than that in model group ($P<0.05$, $P<0.01$). Compared with control group, the content of Lactobacillus dramatically increased in Simo Decoction control group ($P<0.05$), the content of Enterococcus decreased significantly ($P<0.05$); the content of Lactobacillus, Prevotella and Bifidobacterium dramatically decreased in model group ($P<0.05$), the content of Enterococcus and Escherichia coli increased significantly ($P<0.05$); the content of Prevotella dramatically decreased in Simo Decoction model group ($P<0.05$), the content of Enterococcus and Escherichia coli increased significantly ($P<0.05$). Compared with model group, the content of Prevotella dramatically increased in Simo Decoction model group ($P<0.05$), the content of Enterococcus and Escherichia coli decreased significantly ($P<0.05$). **Conclusion** Simo Decoction can reduce the content of TMAO and NT-proBNP in HF rats, and the mechanism may be related to the change of intestinal flora and intestinal-TMAO-HF axis in HF rats induced by Simo Decoction.

[**Keywords**] heart failure; Simo Decoction; intestinal flora; trimethylamine oxide; N-terminal pro-brain natriuretic peptide; bioinformatics method

心力衰竭(heart failure, HF)是由多种原因导致的心脏结构和(或)功能的异常改变,使心室收缩和(或)舒张功能发生障碍,从而引起的一组复杂临床综合征,亦为各种心血管病的终末期表现。我国的HF患者基数大、发病率高。我国的心血管病患病率现在处于持续上升阶段,2019年我国农村和城市因心血管病死亡的人数分别占总死亡人数的46.74%和44.26%,我国现有心血管病患者人数3.3亿人,其中,HF 890万人^[1]。目前,我国的住院患者中的HF患者的平均年龄呈上升趋势,感染是导致HF发作最常见的诱因,HF患者住院病死率为4.1%^[2]。HF会引起多种病理反应,HF患者可有疲乏、无力、头晕、食欲不振、腹部不适等表现。肠道假说暗示HF伴血流动力学改变,全身性充血增加可导致肠黏膜充血、水肿,黏膜屏障受损,从而导致细菌移位及循环内毒素增加,此种情况可能导致HF患者潜在炎症发生^[3],使患者死亡风险增加。在某种程度上,肠道也被认为是人体的“功能器官”^[4]。正常情况下,肠道菌群与人类宿主和谐共生,其具有帮助宿主获取营养和促进免疫系统发育等功能^[5]。但当肠道菌群出现紊乱时,也会与多种疾病的发生发展密切相关,如帕金森病、阿尔茨海默病、原发性高血压、动脉粥样硬化、肥胖症、糖尿病等^[6]。

HF可引起肠道瘀血的病理改变。研究表明,HF患者的肠道菌群会发生改变,药物可引起肠道菌群改变^[7],肠道微生物可能通过其代谢影响心脏的代谢健康^[8]。研究发现,肠道代谢产物氧化三甲胺(trimethylamine oxide, TMAO)是参与HF进展强有

力的预后标志物,调节肠道微生物群的组成和靶向肠道-TMAO-HF轴都可能对HF患者的生存产生深远的影响^[9]。氨基端前脑钠素(N-terminal pro-brain natriuretic peptide, NT-proBNP)因其成分稳定,可作为HF诊断和评估的生物学标记物。TMAO与HF相关死亡风险有关,TMAO和NT-proBNP的组合可为HF提供额外的预后信息^[10]。有团队研究发现,随着HF的进展,患者TMAO的浓度逐渐增加^[11]。因此,提出猜想,能否通过干预肠道菌群或相关酶来降低循环TMAO水平,从而影响HF患者的预后。

中医药对于治疗疾病有疗效佳,不良反应少的特点。研究证明,中医药能显著调节肠道菌群失衡,促进有益菌生长,抑制有害菌过度繁殖,平衡有益菌和病原菌的数量,维持健康的肠道环境^[12]。本课题组前期已对四磨汤进行了一些研究^[13-15],前期临床研究发现四磨汤对改善HF的临床疗效确切有效^[16]。因此,本研究选用肠道经典方剂四磨汤干预HF大鼠。本课题组选用的四磨汤由木香、枳壳、槟榔、乌药4味药组成,主要功效为降气顺逆,消积止痛。本研究欲探讨四磨汤能否调节大鼠的肠道菌群及TMAO,以期四磨汤防治HF提供更为明确的科学依据。

1 材料

1.1 实验动物

6~8周龄SPF级SD雄性大鼠40只,体质量200~220g,购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SYXK(湘)2020-0008。分笼饲养于湖南省

中医药研究院动物实验中心, 饲养温度 24~26 ℃, 湿度 50%~70%。所有动物可自由获得食物和水, 普通饲料由湖南省中医药研究院动物实验中心提供。本实验通过湖南省中医药研究院医学院实验动物中心实验动物伦理委员会认证, 伦理批号: 2021-0070。

1.2 实验药物

四磨汤口服液(湖南汉森制药股份有限公司, 批号: 2107118); 异丙肾上腺素(上海禾丰制药有限公司, 批号: 41210501)。

1.3 主要试剂与仪器

NT-proBNP ELISA 试剂盒(武汉华美生物工程有限公司, 批号: L11031983); 粪便基因组 DNA 提取试剂盒(批号: #DP328-02)、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(批号: #DP209-03)均购自北京天根生化科技有限公司; 双链 DNA 荧光定量检测试剂盒(上海翊圣生物科技有限公司, 批号: 12640ES76); 磁珠(无锡百迈格生物科技有限公司, 货号: BMSX-200)。

超高效液相色谱仪(香港岛津企业管理有限公司, 型号: Nexera UHPLC LC-30A); 涡旋仪(海门市其林贝尔仪器制造有限公司, 型号: XW-80A); 低温高速离心机(型号: H1656R)、台式高速冷冻离心机(型号: H1650R)均购自湖南湘仪实验室仪器开发有限公司; 超声仪(杭州信仪科技有限公司, 型号: JY92-IIW); 多功能酶标分析仪(深圳市汇松科技发展有限公司, 型号: MB-530)。

2 方法

2.1 实验动物分组与造模

所有大鼠经适应性喂养 1 周后, 按照随机数字表法分为正常组和造模组, 每组 20 只。造模组采用异丙肾上腺素每日 2.5 mg/kg 腹腔注射, 连续 4 周^[17]。正常组腹腔注射生理盐水每日 2.5 mg/kg, 连续 4 周。造模结束后, 正常组随机分为对照组和四磨汤对照组, 造模组随机分为模型组、四磨汤模型组, 每组 10 只。

2.2 HF 大鼠模型评估

造模结束后, 对 HF 大鼠模型进行评估。

2.2.1 大鼠一般情况 正常组大鼠活动正常, 无明显特殊表现。造模组大鼠精神萎靡, 安静不欲动, 进食减少, 毛发光泽度降低。

2.2.2 大鼠超声心动图情况 从正常组和造模组中各随机抽取 6 只大鼠, 进行心脏超声心动图检查。与正常组比较, 模型组左室收缩末期内径(left ventricular end diastolic diameter, LVEDD)、左室舒张期内径(left ventricular end systolic diameter, LVESD)、室间隔厚度(inter ventricular septal diameter, IVSd)明显升高($P < 0.01$), 左室射血分数(left ventricular ejection fraction, LVEF)明显降低($P < 0.01$)。造模组 LVEF 均值比正常组降低大于 20%^[18]并结合两组的大鼠一般表现情况, 可知造模成功。详见表 1。

表 1 正常大鼠心脏彩超与模型大鼠心脏彩超结果($\bar{x} \pm s, n=6$)

组别	LVESD/mm	LVEDD/mm	IVSd/mm	LVEF/%
正常组	3.84±0.68	6.44±0.04	1.22±0.31	77.69±0.74
造模组	5.83±0.54	7.64±0.04	1.97±0.04	55.55±0.57
<i>t</i> 值	56.349	47.168	34.053	57.882
<i>P</i> 值	0.000	0.000	0.000	0.000

2.3 给药方法

根据临床 70 kg 体质量成人每日服药量进行换算, 四磨汤口服液成人每日所需总量为 60 mL, 换算后 200 g 大鼠每日所需重量为 1.08 mL, 即 5.4 mL/kg^[17]。四磨汤对照组、四磨汤模型组予四磨汤每日 7.56 mL/kg 灌胃^[9], 对照组、模型组予生理盐水每日 7.56 mL/kg 灌胃。各组均每日灌胃 1 次, 灌胃 2 周。实验期间因打斗死亡 6 只大鼠(模型组 4 只, 四磨汤模型组 2 只)。每组随机抽取 6 只进行后续的检测。

2.4 HE 染色观察心肌病理变化

各组大鼠心肌石蜡切片常规脱蜡, 再浸泡、脱洗、浸洗、染色、冲洗、脱水、封片, 镜下观察组织形态。

2.5 血清 NT-ProBNP 检测

灌胃 2 周结束后, 各组大鼠腹主动脉采集血清。采用 NT-ProBNP ELISA 试剂盒检验血清中 NT-ProBNP 的含量, 具体操作严格按照所检测指标对应的说明书进行。

2.6 血浆 TMAO 含量检测

灌胃 2 周结束后, 每只大鼠腹主动脉使用紫色采血管采血得血浆。采用液相色谱-质谱法检测大鼠血浆 TMAO 含量, 用峰面积定量 TMAO 含量, 峰面积越大, TMAO 含量越多, 峰面积无明显有效单位^[20]。按如下步骤进行: (1) 取 100 mol/L 血浆与 400 mol/L 甲醇/乙腈(体积比 1:1)涡旋 30 s, 超声 10 min(4 ℃水

浴);(2)在 20 ℃下孵育 1 h(促进蛋白质沉淀);(3)在 13 000 r/min(半径 7 cm)4 ℃下离心 15 min;(4)取上清液,用真空浓缩器在 4 ℃或室温下蒸发至干;复溶 100 mol/L 乙腈/H₂O(体积比 1:1);(5)涡旋 30 s 超声 10 min(4 ℃水浴);(6)在 13 000 r/min(半径 7 cm)和 4 ℃下离心 15 min;(7)取上清液进行检测;(8)上液进行正向和反向色谱分离和质谱检测。质谱分离相关参数设置如下:流速 0.3 mL/min,进样盘温度 4 ℃,柱温 40 ℃,色谱柱 Waters HSS T3 column (100 mm×2.1 mm,1.7 μm)[H₂O (0.1%FA),Acetonitrile 进样量:3 μL]。

2.7 肠道菌群的检测

灌胃 2 周结束后,每只大鼠以提尾法取无菌粪便样本 0.5 g,置于 10 mL 无菌冻存管中,液氮冷冻后转移至-80 ℃冰箱保存以备后续 16S rRNA 检测。使用 DNA 提取试剂盒进行基因组 DNA 抽提,将大鼠粪便样本纯化,对样本采用 Illumina NovaSeq PE250 进行 16S 扩增子测序,获取下机原始数据(Raw Data)。对 Raw Data 进行去接头、过滤、去重、碱基校正以及去除嵌合体序列等操作,得到可以用于后续分析的有效序列。采用 Qiime 2 对数据进行处理。参考数据库:silva-132-99,引物名称:Bacterial V3/V4 (341F+805R),引物序列:CTACGGGNGGCWGCAG、GACTACHVGGGTATCTAATCC。

2.8 统计学方法

采用 SPSS 25.0 软件进行数据分析。符合正态分布的计量资料以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示。两组间比较采用独立样本 *t* 检验,多组间比较采用单因素方差分析。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 心肌 HE 染色结果

对照组、四磨汤对照组 HE 染色显示心肌细胞排列整齐、致密,细胞结构正常,形态完整,无炎性细胞浸润;模型组可以看到心肌细胞结构破坏,形态紊乱,心肌细胞肿大和炎性浸润;四磨汤模型组心肌细胞结构和形态仍有破坏,但较模型组明显改善,心肌细胞肿大和炎性浸润减少,说明四磨汤可对心肌有所改善,但其具体机制仍需进一步探讨。详见图 1。

3.2 NT-proBNP 的检测结果

与对照组相比,模型组、四磨汤模型组 NT-

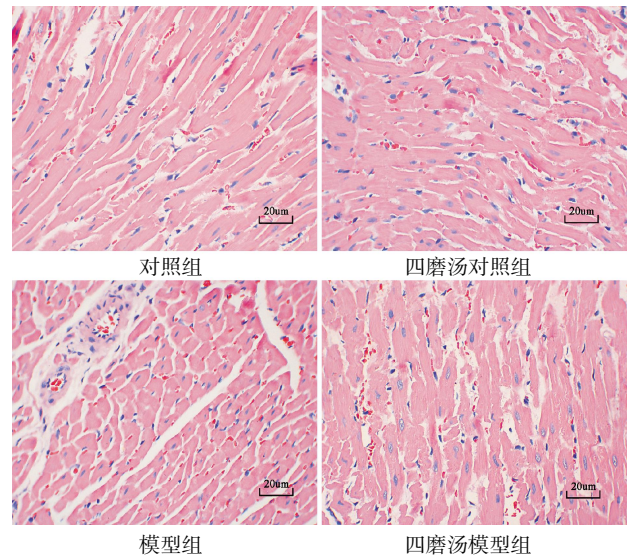


图 1 各组大鼠心肌组织形态(HE,×400)

proBNP 含量均明显增多($P<0.01$)。与模型组相比,四磨汤模型组 NT-proBNP 含量明显减少($P<0.01$)。详见表 2。

表 2 各组大鼠血清 NT-proBNP 含量($\bar{x}\pm s$, pg/mL, $n=6$)

组别	NT-ProBNP
对照组	196.18±4.42
四磨汤对照组	204.39±4.80
模型组	528.37±5.29**
四磨汤模型组	413.25±5.47**#

注:与对照组相比,** $P<0.01$;与模型组相比,# $P<0.01$ 。

3.3 TMAO 的检测结果

与对照组相比,模型组 TMAO 含量均明显增多($P<0.05$)。与模型组相比,四磨汤模型组 TMAO 含量明显减少($P<0.05$)。详见表 3。

表 3 各组大鼠血浆 TMAO 含量($\bar{x}\pm s$, $n=6$)

组别	TMAO 色谱峰面积
对照组	17 517 893.52±1 034 122.63
四磨汤对照组	17 857 200.80±624 736.64
模型组	27 001 427.71±1 910 434.61*
四磨汤模型组	22 421 280.19±644 223.56**

注:与对照组相比, $P<0.05$;与模型组相比, $P<0.05$ 。

3.4 各组大鼠肠道菌群变化

运算分类单元(operational taxonomic unit, OTU)是在系统发生学研究或群体遗传学研究中,为了便于进行分析,人为给某一个分类单元(品系,种,属,分组等)设置的同一标志。通常按照 97%的相似性阈值将序列划分为不同的 OTU,每一个 OTU 通常

被视为一个微生物物种,相似性小于 97%就可以认为属于不同的种。以下的分析均建立在此基础上。每组送 3 份样本进行相关测序。

3.4.1 Rarefaction 稀释性曲线 根据抽到的序列数与它们能代表的数目构建曲线,即稀释曲线。当曲线趋于平坦时,说明测序数据量合理;反之则表明测序不足。本研究中稀释曲线在 15 000 左右后趋于平稳,随着抽取数量加大,曲线不再变化,说明本研究测序量足够,可以覆盖所有细菌物种,足以反应物种多样性的真实情况,可进行下一步分析。详见图 2。

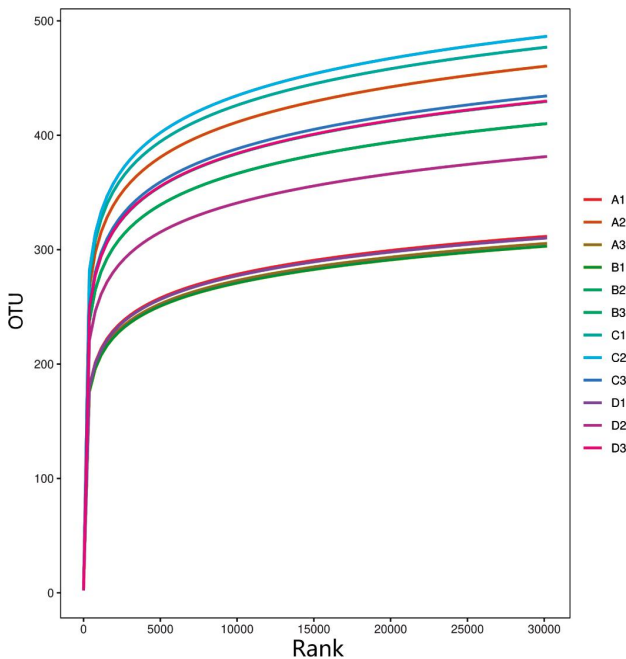


图 2 样本 Rarefaction 稀释性曲线图

注:A.对照组;B.四磨汤对照组;C.模型组;D.四磨汤模型组;每条曲线为一个样本;横坐标为抽取到的序列数,纵坐标为可以检测到的细菌种类。

3.4.2 Rank-Abundance 曲线 Rank-Abundance 曲线可反映物种丰度和物种均匀度两个方面,物种丰度由曲线在横轴上的长度来反映,曲线在横轴上的范围越大,物种的丰度越高;物种均匀度由曲线的形状(平滑度)来反映,曲线越平坦,表示物种的均匀度越高。本研究可知四磨汤对照组大鼠的粪便的物种丰度最高,对照组、四磨汤对照组的物种丰度都大于 400,模型组大鼠的粪便物种丰度最低,四磨汤模型组丰度较模型组高。其中对照组的物种均匀度最好。详见图 3。

3.4.3 韦恩图 根据分析各组间的 OTU 绘制韦恩图。可知各组间共有 OTU 256 个,与对照组相比,其

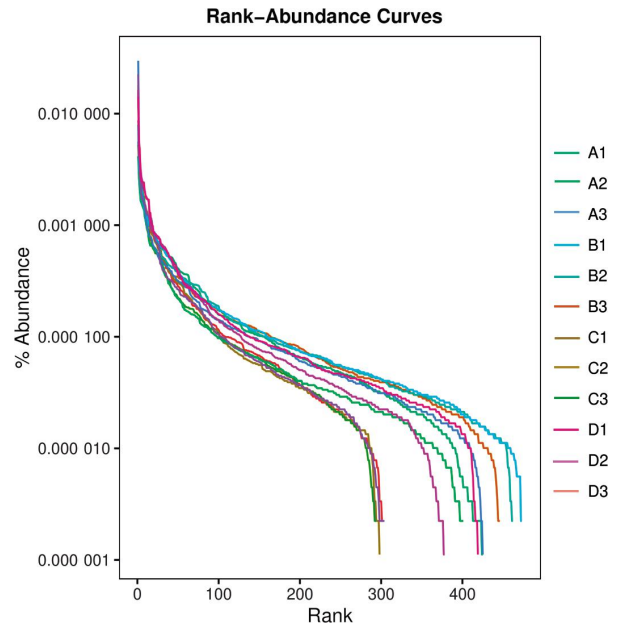


图 3 样本 Rank-Abundance 曲线图

注:A.对照组;B.四磨汤对照组;C.模型组;D.四磨汤模型组;每条曲线为一个样本;将所含有的有效序列条数由大到小按等级排序,横坐标为 ASV 等级,纵坐标为 ASV 中序列数的相对百分含量;为方便理解,将得到的分析数据中的每一种属为 ASV。

与四磨汤对照组共有 404 个,与模型组共有 330 个,与四磨汤模型组共有 458 个。对照组与四磨汤模型组共有 OTU 含量最多,与模型组共有 OTU 含量最少。四磨汤模型组特有的 OTU 为 164,其特有数量最多,对照组 100 个,四磨汤对照组 112 个,模型组 111 个。说明模型组、四磨汤模型组与对照组在菌群种类和数量上有较大差别,其中四磨汤模型组较模型组与对照组相比差别更少,说明四磨汤可以改善 HF 大鼠的肠道菌群组成。详见图 4。

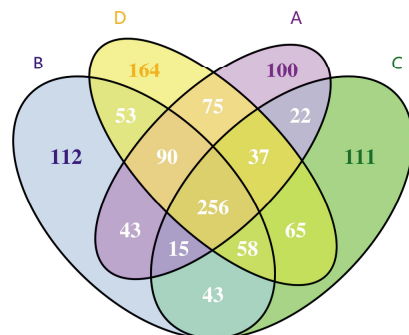


图 4 样本韦恩图

注:A.对照组;B.四磨汤对照组;C.模型组;D.四磨汤模型组。

3.4.4 丰度热图 为进一步直观表现重要类群在不同样本间的分布,以总丰度排名前 20 的 ASV 进行作图,不同的微生物物种标记在纵轴上,横轴表示为样品编号,颜色偏红表示含量偏高,颜色偏蓝表示含量

偏低。可知在门水平上的物种排名前四的为拟杆菌门(Bacteroidia)、厚壁菌门(Firmicutes)、毛螺旋菌(Lachnospirales)、弯曲菌门(Campilobacterota)。在属水平上,含量较多的有普氏菌属(*Prevotella*)、*Muribaculaceae*、乳杆菌属(*Lactobacillus*)、*Lachnospiraceae*_NK4A163_group、瘤胃球菌属(*Ruminococcus*)、奎因氏菌属(*Quinella*)、梭状芽胞杆菌(*Clostridia*)。详见图5。

3.4.5 基于属水平各组大鼠肠道微生物物种(部分)分布情况 肠道细菌的种类非常丰富,有研究发现增加有益菌的丰度可以调节人体肠道菌群微生物属^[21]。目前的相关研究显示:在厚壁菌门(Firmicutes)^[22]这一门类中,乳酸杆菌(*Lactobacillus*)属于“有益菌”,肠球菌(*Enterococcus*)属于“有害菌”;在拟杆菌门(Bacteroidia)^[23]这一门类中,普氏菌(*Prevotella*)属于“有益菌”;在放线菌门(Actinobacteriota)这一门类中,双歧杆菌(*Bifidobacterium*)^[24]属于“有益菌”;在变形菌门(Proteobacteria)在一门类中,主要为“有害菌”,包括大肠埃希菌(*Escherichia coli*)。拟杆菌门

(Bacteroidia)、厚壁菌门(Firmicutes)为肠道菌群的主要菌门,占据肠道菌群的95%以上,现选用以上乳酸杆菌(*Lactobacillus*)、普氏菌(*Prevotella*)、双歧杆菌(*Bifidobacterium*)、肠球菌(*Enterococcus*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)的含量进行分析。

与对照组相比,四磨汤对照组乳酸杆菌(*Lactobacillus*)含量明显升高($P<0.05$),肠球菌(*Enterococcus*)含量明显减少($P<0.05$);模型组乳酸杆菌(*Lactobacillus*)、普氏菌(*Prevotella*)、双歧杆菌(*Bifidobacterium*)含量均明显减少($P<0.05$),肠球菌(*Enterococcus*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)含量均明显升高($P<0.05$);四磨汤模型组普氏菌(*Prevotella*)含量明显减少($P<0.05$),肠球菌(*Enterococcus*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)含量均明显升高($P<0.05$)。与模型组相比,四磨汤模型组普氏菌(*Prevotella*)含量明显升高($P<0.05$),肠球菌(*Enterococcus*)、大肠埃希菌(*Escherichia coli*)含量均明显减少($P<0.05$)。详见表4。



图5 样本丰度热图

注:A.对照组;B.四磨汤对照组;C.模型组;D.四磨汤模型组。

表 4 各组大鼠肠道菌群菌属含量比较($\bar{x}\pm s, n=3, \%$)

组别	乳酸杆菌	普氏菌	双歧杆菌	肠球菌	大肠埃希菌
对照组	4.67±1.75	30.00±0.29	0.20±0.27	4.15±0.83	0.28±0.75
四磨汤对照组	6.33±1.21*	31.83±3.87	0.17±0.05	2.20±0.71*	0.35±0.55
模型组	1.78±0.82*	9.83±2.32*	0.08±0.01*	9.67±1.86*	0.77±0.82*
四磨汤模型组	3.72±0.96	15.00±3.03*#	0.11±0.02	7.00±0.89*#	0.43±0.10*#

注:与对照组相比,* $P<0.05$;与模型组相比,# $P<0.05$ 。

4 讨论

肠道菌群参与了人体众多生理、病理过程^[25],它也被称为“人体的微生物器官”。有研究表明,肠道菌群及其代谢产物可以直接参与人体正常的生理代谢活动,并通过炎症、免疫、代谢等途径参与心血管病的发展过程^[26]。HF 被认为与肠道菌群的改变相关^[27]。降低肠道代谢或改变肠道菌群组成可降低 HF 的发生风险,而肠道菌群失调则促进 HF 的发生和发展。KUMMEN 等^[28]研究发现,慢性 HF 患者的肠道菌群成分变化大,细菌丰度降低。另一项支持性研究表明,通过高纤维饮食和补充醋酸盐改变肠道菌群,改变肠道菌群可以预防高血压和 HF^[29]。肠道微生物组研究已经确定,心血管病和 HF 中的一些共同特征,包括肠道微生物丰度降低和 TMAO 循环水平升高^[30]。

本课题组肖长江教授主张“心病从脾论治”,其认为 HF 的病位主要在心,但却不局限于心。在疾病的发生发展过程中,五脏可相互制约,相互影响,其他四脏功能的失调都能影响 HF 的疾病进程,五脏之中尤以心脾关系最为密切。肖长江教授认为可从调脾、健脾等方面治疗 HF^[31]。国医大师邓铁涛教授也认为 HF 与五脏相关,尤应顾护脾胃^[32]。

心与小肠相表里,小肠主化物而分清别浊,其功能障碍必然会造成心血虚弱,心气不足。研究表明,小肠为体内最主要的吸收器官,小肠的组织结构学特点为小肠的吸收创造了良好的条件,小肠的生理功能表现在小肠的运动、分泌、消化及吸收等方面,小肠功能失调可以选用益生菌进行治疗^[33]。在中医学理论中,脾主运化,可将化生的水谷精微输送全身,因此,中医学的脾包括了现代医学小肠的功能,现代医学小肠的功能却不能等同于中医学的小肠。

HF 病理状态下^[34]心血亏虚、心气亏虚,不能推动血液正常运行见血脉瘀滞,脾失健运,加重病理产

物痰浊、瘀血、水饮影响脾胃,运化功能减弱使得脾胃功能受阻。脾之消化、吸收等功能减弱,HF 病理状态下释放的有害物质堆积于肠道可能引起肠道不适,导致肠壁水肿和肠屏障功能受损^[3],出现腹部胀满等不适。HF 会使每搏输出量减少,从而引起体循环淤血,进而可出现肠道淤血、水肿,甚至缺血,使得肠道的正常结构与功能,正常的肠道微生物组成和含量发生改变^[35]。

研究发现,服用益生菌或者发酵乳制品,可以直接影响人体肠道微生物构成^[36-38]。特定的肠道微生物群依赖性途径和下游代谢物都会影响宿主代谢和导致心血管病^[39]。肠道菌群与靶器官的相互作用通过多种途径发生,其中包括肠道-TMAO-HF 轴^[9]。TMAO 为一肠道代谢产物,一项荟萃分析显示显示血浆 TMAO 水平与心血管风险和死亡率增加之间存在正剂量依赖关系^[40]。

本实验结果表明,经四磨汤干预后的 HF 大鼠体内 NT-proBNP 的含量较未干预的 HF 大鼠明显减少,提示四磨汤可能对 HF 治疗有促进作用。且经四磨汤干预后的 HF 大鼠心肌损伤也较未干预的 HF 大鼠少。HF 大鼠体内 TMAO 较非 HF 大鼠明显增多,而四磨汤干预后的 HF 大鼠 TMAO 较未干预的 HF 大鼠减少,提示 HF 状态下 TMAO 会增加,四磨汤对 HF 大鼠体内的 TMAO 含量有负性作用。根据 TMAO 和 NT-ProBNP 与 HF 的相关性联系^[10],四磨汤干预后的 HF 大鼠 TMAO、NT-ProBNP 均较未行干预的 HF 大鼠指标好转,可验证四磨汤确对 HF 有降低 TMAO、NT-ProBNP 的作用。提示四磨汤可能通过影响肠道代谢产物 TMAO 进而改善 HF 指标 NT-ProBNP,这也验证了心病与脾之功能密切相关。16S rRNA 结果显示,四磨汤组的肠道菌群物种丰度最高,HF 状态下大鼠的肠道菌群的物种丰度明显下降,四磨汤干预后的 HF 肠道菌群丰度较未干预的 HF 肠道菌群丰度升高。HF 大鼠的 TMAO、NT-

ProBNP 升高,可能与肠道菌群多样性降低密切相关。各组样本菌属含量的变化也不尽相同,在观察到的部分菌属中,四磨汤干预的非 HF 大鼠乳酸杆菌 (*Lactobacillus*) 含量升高,肠球菌 (*Enterococcus*) 含量减少;HF 大鼠肠道菌群里的乳酸杆菌 (*Lactobacillus*)、普氏菌 (*Prevotella*)、双歧杆菌 (*Bifidobacterium*) 含量减少,肠球菌 (*Enterococcus*)、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 含量增高;四磨汤干预下的 HF 大鼠较非四磨汤干预的 HF 大鼠普氏菌 (*Prevotella*) 含量升高,肠球菌 (*Enterococcus*)、大肠埃希菌 (*Escherichia coli*) 含量减少。可认为 HF 可减少“有益菌”的含量,增加“有害菌”的含量;四磨汤可增加“有益菌”的含量,减少“有害菌”的含量。这提示四磨汤可以改变肠道菌群的丰度和种类,对不同菌属的改变也不是单一的。

综上所述,四磨汤可以通过改变 HF 患者肠道中微生物种类和含量,降低肠道代谢产物 TMAO 含量,降低 NT-ProBNP 从而达到防治 HF 的目的。可以期望四磨汤对今后中医药“心病从脾胃论治”治疗 HF 提供一个新的思路。在对肠道菌群的研究可知,微生物群可以为肠道微生物群如何促进 HF 提供新的见解,多种代谢物都会导致心脏病,TMAO 可能只是冰山一角^[41]。

参考文献

- [1] 马丽媛,王增武,樊静,等.《中国心血管健康与疾病报告 2021》要点解读[J]. 中国全科医学, 2022, 25(27): 3331-3346.
- [2] ZHANG Y H, ZHANG J, BUTLER J, et al. Contemporary epidemiology, management, and outcomes of patients hospitalized for heart failure in China: Results from the China heart failure (China-HF) registry[J]. *Journal of Cardiac Failure*, 2017, 23(12): 868-875.
- [3] TANG W H W, LI D Y, HAZEN S L. Dietary metabolism, the gut microbiome, and heart failure[J]. *Nature Reviews Cardiology*, 2019, 16(3): 137-154.
- [4] ESPÍRITO SANTO C, CASEIRO C, MARTINS M J, et al. Gut microbiota, in the halfway between nutrition and lung function[J]. *Nutrients*, 2021, 13(5): 1716.
- [5] CRISTOFORI F, DARGENIO V N, DARGENIO C, et al. Anti-inflammatory and immunomodulatory effects of probiotics in gut inflammation: A door to the body[J]. *Frontiers in Immunology*, 2021, 12: 578386.
- [6] 王冉,包红霞. 肠道菌群代谢产物与宿主疾病[J]. *中国现代应用药学*, 2020, 37(23): 2936-2944.
- [7] WEERSMA R K, ZHERNAKOVA A, FU J Y. Interaction between drugs and the gut microbiome[J]. *Gut*, 2020, 69(8): 1510-1519.
- [8] CHEN L M, WANG D M, GARMAEVA S, et al. The long-term genetic stability and individual specificity of the human gut microbiome[J]. *Cell*, 2021, 184(9): 2302-2315.
- [9] ZHANG Y X, WANG Y, KE B B, et al. TMAO: How gut microbiota contributes to heart failure[J]. *Translational Research: the Journal of Laboratory and Clinical Medicine*, 2021, 228: 109-125.
- [10] SUZUKI T, HEANEY L M, BHANDARI S S, et al. Trimethylamine N-oxide and prognosis in acute heart failure[J]. *Heart (British Cardiac Society)*, 2016, 102(11): 841-848.
- [11] LV S C, WANG Y J, ZHANG W Q, et al. Trimethylamine oxide: A potential target for heart failure therapy[J]. *Heart (British Cardiac Society)*, 2022, 108(12): 917-922.
- [12] JIA Q, WANG L, ZHANG X, et al. Prevention and treatment of chronic heart failure through traditional Chinese medicine: Role of the gut microbiota[J]. *Pharmacological Research*, 2020, 151: 104552.
- [13] 邓娜, 蔺晓源, 易健, 等. 四磨汤有效成分对慢性应激小鼠胃肠运动的影响[J]. *世界中医药*, 2013, 8(7): 731-733.
- [14] 蔺晓源, 刘柏炎, 易健, 等. 四磨汤对不同模型小鼠胃肠运动及血清胃动素、生长抑素的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2013, 28(3): 772-774.
- [15] 蔡莹, 蔺晓源, 蔡光先. 四磨汤对寒冷束缚应激小鼠脑肠肽 NOS 的影响[J]. *中华中医药学刊*, 2014, 32(8): 1877-1879.
- [16] 黄家威. 四磨汤治疗慢性心力衰竭(气滞血瘀证)的临床观察[D]. 长沙: 湖南中医药大学, 2022.
- [17] 郑安财. 异丙肾上腺素诱导的心衰大鼠的肠道菌群结构和功能的改变[D]. 南昌: 南昌大学, 2018.
- [18] 李丽, 张昕, 邹琳. 基于基因组学与代谢组学分析肠道菌群及其代谢物改变与心力衰竭发生的相关性[J]. *安徽医科大学学报*, 2022, 57(3): 407-412.
- [19] 徐叔云, 卞如濂, 陈修. 药理实验方法学[M]. 3版. 北京: 人民卫生出版社, 2005: 1937.
- [20] PARK, D, KIM D, LIM H J, et al. Chia seed-assisted separation and detection of polyvinyl chloride microplastics in water via gas chromatography mass spectrometry[J]. *Chemosphere*, 2021, 273: 129599.
- [21] SERGEEV I N, ALJUTAILY T, WALTON G, et al. Effects of synbiotic supplement on human gut microbiota, body composition and weight loss in obesity[J]. *Nutrients*, 2020, 12(1): 222.
- [22] NAGHMOUCHI K, BELGUESMIA Y, BENDALI F, et al. Lac-

- tobacillus fermentum: A bacterial species with potential for food preservation and biomedical applications[J]. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 2020, 60(20): 3387–3399.
- [23] ZAFAR H, SAIER M H. Gut Bacteroides species in health and disease[J]. *Gut Microbes*, 2021, 13(1): 1–20.
- [24] XIAO Y, ZHAI Q X, ZHANG H, et al. Gut colonization mechanisms of Lactobacillus and Bifidobacterium: An argument for personalized designs[J]. *Annual Review of Food Science and Technology*, 2021, 12: 213–233.
- [25] VALDES ANA M, JENS W, ERAN S, et al. Role of the gut microbiota in nutrition and health[J]. *Brithish Medical Journal (Clinical Research Ed)*, 2018, 361: k2179.
- [26] BRANDSMA E, KLOOSTERHUIS N J, KOSTER M, et al. A proinflammatory gut microbiota increases systemic inflammation and accelerates atherosclerosis[J]. *Circulation Research*, 2019, 124(1): 94–100.
- [27] 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.
- [28] KUMMEN M, MAYERHOFER C C K, VESTAD B, et al. Gut microbiota signature in heart failure defined from profiling of 2 independent cohorts[J]. *Journal of the American College of Cardiology*, 2018, 71(10): 1184–1186.
- [29] MARQUES F Z, NELSON E, CHU P Y, et al. High-fiber diet and acetate supplementation change the gut microbiota and prevent the development of hypertension and heart failure in hypertensive mice[J]. *Circulation*, 2017, 135(10): 964–977.
- [30] TRØSEID M, ANDERSEN G Ø, BROCH K, et al. The gut microbiome in coronary artery disease and heart failure: Current knowledge and future directions[J]. *EBioMedicine*, 2020, 52: 102649.
- [31] 王孟可, 夏相宜, 周 慧, 等. 基于“心脾相关”理论的慢性心力衰竭“形、气、神”同治模式[J]. *中医药临床杂志*, 2022, 34(11): 2020–2023.
- [32] 金 政, 吴 伟, 皮建彬, 等. 国医大师邓铁涛辨治心力衰竭的经验[J]. *中国中西医结合杂志*, 2020, 40(6): 754–755.
- [33] JUDKINS T C, ARCHER D L, KRAMER D C, et al. Probiotics, nutrition, and the small intestine[J]. *Current Gastroenterology Reports*, 2020, 22(1): 2.
- [34] 蔡晓月, 李 甜, 赵英强. 赵英强教授调理脾胃分期论治慢性心力衰竭[J]. *天津中医药大学学报*, 2022, 41(2): 154–156.
- [35] VLASOV A A, SALIKOVA S P, GRINEVICH V B, et al. Gut microbiota and systemic inflammation in patients with chronic heart failure[J]. *Kardiologia*, 2020, 60(5): 859.
- [36] WANG X Z, ZHANG P, ZHANG X. Probiotics regulate gut microbiota: An effective method to improve immunity[J]. *Molecules*, 2021, 26(19): 6076.
- [37] DE FILIPPIS F, PASOLLI E, ERCOLINI D. The food-gut axis: Lactic acid bacteria and their link to food, the gut microbiome and human health[J]. *FEMS Microbiology Reviews*, 2020, 44(4): 454–489.
- [38] LORDAN C, THAPA D, ROSS R P, et al. Potential for enriching next-generation health-promoting gut bacteria through prebiotics and other dietary components[J]. *Gut Microbes*, 2020, 11(1): 1–20.
- [39] WITKOWSKI M, WEEKS T L, HAZEN S L. Gut microbiota and cardiovascular disease[J]. *Circulation Research*, 2020, 127(4): 553–570.
- [40] SCHIATTARELLA G G, SANNINO A, TOSCANO E, et al. Gut microbe-generated metabolite trimethylamine-N-oxide as cardiovascular risk biomarker: A systematic review and dose-response meta-analysis[J]. *European Heart Journal*, 2017, 38(39): 2948–2956.
- [41] 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.

(本文编辑 黎志清)