

doi:10.3969/j.issn.1006-4931.2022.08.008

基于肠道菌群的丹参-红花药对抗心肌缺血机制探讨*

王小平,杜少兵,白吉庆,周慧慧,李菁,权利娜,王鹏飞

(陕西中医药大学药学院,陕西 咸阳 712046)

摘要:目的 探讨丹参-红花药对抗心肌缺血的机制。方法 将60只SD雄性大鼠随机分为空白对照组(A组,等体积纯净水)、模型组(B组,等体积纯净水)、复方丹参滴丸组(C组,73 mg/kg)及丹参-红花低、中、高剂量组(D₁组、D₂组、D₃组,原药材4,8,16 g/kg),各10只,各组大鼠灌胃给予相应药物或纯净水,每天1次,连续7 d。于第6天、第7天灌胃给药1 h后,除A组外,其余各组均皮下注射盐酸异丙肾上腺素(85 mg/kg)以复制急性心肌缺血大鼠模型。观察大鼠心肌病理形态、心肌细胞凋亡情况,采用酶联免疫吸附法检测大鼠心肌酶水平;采用多指标综合指数法计算各组总效应值和偏最小二乘回归分析(PLS-DA)得分,筛选效果最佳的剂量组进行肠道菌群多样性分析。结果 D₃组的综合指数最高(7.68),其次是D₂组(7.18),D₃组和D₂组PLS-DA得分差异较小,选用D₂组进行肠道菌群多样性分析;与B组比较,D₂组放线菌门、TM7菌门、厚壁菌门/拟杆菌门、乳杆菌属、棒状杆菌属、葡萄球菌属和SMB53菌属的相对丰度显著升高($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$),拟杆菌门、软壁菌门、脱铁杆菌门、颤螺菌属和罗斯氏菌属的相对丰度显著降低($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。结论 丹参-红花药对可能通过调节肠道菌群而发挥抗心肌缺血的作用。

关键词:丹参-红花药对;急性心肌缺血;大鼠;盐酸异丙肾上腺素;病理形态学;心肌细胞凋亡;心肌酶;肠道菌群;16S rRNA基因测序

中图分类号:R972;R285

文献标志码:A

文章编号:1006-4931(2022)08-0030-08

Mechanism of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* - *Carthami Flos* Drug Pairs Against Myocardial Ischemia Based on Intestinal Bacteria

WANG Xiaoping, DU Shaobing, BAI Jiqing, ZHOU Huihui, LI Jing, QUAN Lina, WANG Pengfei

(College of Pharmacy, Shaanxi University of Chinese Medicine, Xi'an, Shaanxi, China 712046)

Abstract: Objective To investigate the mechanism of *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* - *Carthami Flos* drug pairs against myocardial ischemia. **Methods** A total of 60 male SD rats were randomly divided into the blank control group (group A, equal volume purified water), the model group (group B, equal volume purified water), the compound Danshen Dropping Pills group (group C, 73 mg/kg) and the *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* - *Carthami Flos* low-, medium- and high-dose groups (group D₁, group D₂, group D₃, 4, 8, 16 g raw medicine/kg respectively), with ten rats in each group. Rats in each group were given corresponding drugs or purified water by gavage once a day for seven days. On the 6th and 7th day after intragastric administration for 1 h, isoproterenol hydrochloride (85 mg/kg) was injected subcutaneously in all groups except group A to replicate the acute myocardial ischemia rat model. The myocardial pathological morphology and cardiomyocyte apoptosis in rats were observed, and the level of myocardial enzyme in rats was detected by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The total effect value and partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) score of each group were calculated by multi-index comprehensive evaluation method, and the group with the best effect was selected for intestinal bacteria diversity analysis.

Results The comprehensive index of group D₃ was the highest (7.68), followed by group D₂ (7.18), there was little difference between the PLS-DA score of group D₃ and group D₂, and group D₂ was selected for intestinal bacteria diversity analysis. Compared with those of group B, the relative abundances of Actinomycetes, TM7, Firmicutes / Bacteroidetes, *Lactobacillus*, *Corynebacterium*, *Staphylococcus* and *SMB53* in group D₂ were significantly increased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$), while the relative abundances of Bacteroidetes, Tenericutes, Deferribacteres, *Oscillospora* and *Rothia* were significantly decreased ($P < 0.05$ or $P < 0.01$).

Conclusion *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* - *Carthami Flos* drug pairs can against myocardial ischemia by regulating intestinal bacteria.

Key words: *Salviae Miltiorrhizae Radix et Rhizoma* - *Carthami Flos* drug pairs; acute myocardial ischemia; rat; isoproterenol hydrochloride; pathomorphology; cardiomyocyte apoptosis; myocardial enzyme; intestinal bacteria; 16S rRNA gene sequencing

国家心血管病中心《中国心血管健康与疾病报告2019》指出,中国现有心血管疾病患者3.30亿,其中心肌梗死约250万,且患病率持续上升,而心肌缺血是导致心血管疾病患者死亡的主要原因^[1]。丹参-红花属活血化瘀药对,疗效确切,广泛存在于具有活血化瘀功效的中成药(如丹红注射液、丹红化瘀口服液、心宁片

等)中^[2]。肠道菌群与多种疾病密切相关^[3-5],推测丹参-红花药对抗心肌缺血可能与肠道菌群有关。为此,本研究采用16S rRNA基因测序技术,分析丹参-红花药对急性心肌缺血模型大鼠肠道菌群丰度和不同分类水平的影响,探讨该药对抗心肌缺血的作用与肠道菌群调节的密切关系,为阐明其抗心肌缺血的机制奠定

*基金项目:国家自然科学基金[81974544];陕西省重点研发计划项目[2019SF-286];陕西省教育厅重点科学研究计划项目[18JS025]。

第一作者:王小平,女,博士,教授,研究方向为中药药效物质基础研究,(电话)029-38185165(电子信箱)wangxiaoping323@126.com。

基础,也为缺血性心脏病的防治提供有效的药物治疗靶点。现报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

仪器:RM2235型切片机(徕卡显微系统<上海>有限公司);QH01-9030A型电热恒温鼓风干燥箱(上海精宏实验设备有限公司);DP73型显微镜(奥林巴斯<北京>销售服务有限公司);KQ-400KDE型超声仪(昆山市超声仪器有限公司);EXPERT 18K-R型台式高速冷冻离心机(长沙市鑫奥仪器仪表有限公司);XSE105型分析天平(瑞士梅特勒-托利多国际股份有限公司,精度为0.01 mg,0.1 mg);Nano Drop NC2000型超微量分光光度计(美国ThermoFisher公司);BG-gds-AUTO(130)型凝胶成像系统(北京百晶生物技术有限公司);DYY-6C型琼脂糖电泳仪(北京六一生物技术有限公司);2720 PCR型扩增仪(美国应用生物系统公司);NovaSeq 测序仪(美国Illumina公司);FLX800T型酶标仪(美国BioTek公司)。

试剂:盐酸异丙肾上腺素(ISO,美国Sigma公司,批号为P1794259);苏木精(北京索莱宝科技有限公司,批号为H8070);醇溶性伊红Y(批号为A600190,生工生物工程<上海>股份有限公司);天门冬氨酸氨基转移酶(AST)酶联免疫吸附试验(ELISA)试剂盒(武汉默沙克生物技术有限公司,批号为kt22023);肌酸激酶同工酶(CK)ELISA试剂盒(上海邦奕商贸有限公司,批号为DRE20781);大鼠CK-MB ELISA试剂盒(上海科顺生物科技有限公司,批号为KS12296);大鼠乳酸脱氢酶(LDH)ELISA试剂盒(武汉默沙克生物技术有限公司,批号为kt30149);大鼠心肌肌钙蛋白I(cTnI)ELISA试剂盒(美国Burlingame公司,批号为kt30311);琼脂糖凝胶(批号为75510-019)、琼脂糖凝胶电泳缓冲液(批号为AM9870)、NovaSeq 6000 SP 500 cycles Reagent Kit(批号为20012866)、Quant-iT PicoGreen dsDNA Assay Kit(批号为P7589),均购自美国Invitrogen公司;Marker(日本宝生物股份有限公司,批号为DL1500/DL2000);Q5® High-Fidelity DNA聚合酶(纽英伦生物技术<北京>有限公司,批号为M0491L);MagPure Soil DNA LQ Kit(广州美基生物科技有限公司,批号为D6356-03);水为纯净水。丹参及红花药材均购自河北安国药材市场,经陕西中医药大学白吉庆教授鉴定为真品。

动物:健康SPF级SD大鼠60只,雄性,体质量(200±20)g,购自成都达硕实验动物有限公司,实验动物生产许可证号SCXK(川)2020-030。在温度(25±2)℃、相对湿度50%±10%条件下适应性饲养1周,期间自由饮食。动物实验通过陕西中医药大学实验动物伦理委员会批准(批准号TCM-2018-030-E01)。

1.2 方法

1.2.1 丹参-红花药对有效物质的提取及质量控制

提取:取丹参饮片300 g,红花饮片100 g,加8倍量的水浸泡1 h,温(45℃)浸2 h,取出,放冷至室温,滤过,滤渣加8倍量水,再提取2次(每次2 h),滤过,滤液合并,减压浓缩至250 mL(即相当于原药材每1 mL含1.6 g)。实验高、中、低剂量分别为1.6,0.8,0.4 g原药材/mL。

质量控制:精密吸取含原药材0.4 g/mL的溶液6 mL,置10 mL容量瓶中,加水定容,采用高效液相色谱法测定。结果丹参素、原儿茶醛、羟基红花黄色素A、迷迭香酸、紫草酸、丹酚酸B的质量浓度分别为0.05,0.22,0.026,0.029,0.075,0.70 mg/mL。

1.2.2 分组、给药与复制模型

将60只雄性SD大鼠随机分为空白对照组(A组,等体积纯净水)、模型组(B组,等体积纯净水)、复方丹参滴丸组(C组,73 mg/kg)及丹参-红花低、中、高剂量组(D₁组、D₂组、D₃组,相当于原药材4,8,16 g/kg),各10只。各组大鼠灌胃给予相应纯净水或药物,每天1次,连续7 d。于第6天、第7天灌胃1 h后,除A组外,其余各组大鼠皮下注射ISO(85 mg/kg),选择5次心率计算ST段偏移电压的平均值,ST段向上或向下偏移超过0.1 mV即为复制急性心肌缺血大鼠模型成功^[6]。

1.2.3 药效学指标检测

心肌病理形态:采用HE染色法。处死大鼠,取出心脏,固定,石蜡包埋、切片,脱蜡,以苏木素染色。采用1%盐酸酒精分化,以自来水返蓝,伊红染色,脱水,透明,封片,显微镜下观察大鼠心肌病理形态。

心肌细胞凋亡情况:采用TUNEL染色法。取出心脏,组织固定,石蜡包埋、切片,脱蜡,组织透化,过氧化氢封闭,酶标记,POD标记,DAB显色,复染,封片,显微镜下观察心肌细胞凋亡情况。

心肌酶:采用ELISA法。在末次注射ISO 12 h后,大鼠腹腔注射10%水合氯醛(5 mL/kg)麻醉^[5],腹主动脉取血,待凝固30 min后常规离心,取血清。采用酶标仪检测各孔吸光度(OD)值,计算大鼠血清中AST,CK,CK-MB,LDH,cTnI活性或含量。

1.2.4 药效综合评分及效应评价

采用多指标综合指数法^[7],对心肌细胞凋亡率、AST、LDH、CK、CK-MB、cTnI 6个指标进行标化处理,计算丹参-红花药对抗心肌缺血的总效应值。当B组指标数值高于A组时, $V_{\text{标化}} = (V_{\text{模型}} - V_{\text{给药}}) / V_{\text{模型}}$;当B组指标数值低于A组时, $V_{\text{标化}} = (V_{\text{给药}} - V_{\text{模型}}) / V_{\text{模型}}$,式中V为各指标数值。结合文献报道和临床实际检测和衡量心肌缺血的指标,确定上述6个指标的相对重要性,再利用变量投影重要性(VIP)定义各指标的权重,抗心肌缺血总效应值即为6项指标标化值乘以权重后的总和。采用Simca软件计算各指标的VIP值,依据VIP值的

大小判断各个指标对总体结果的重要程度,通常 $VIP > 1$ 的指标贡献较大。

将所有指标的数据导入 Simca - P 11.5 软件进行偏最小二乘判别分析(PLS - DS),通过对原始数据降维处理,建立包含第1个主成分 $t[1]$ 与第2个主成分 $t[2]$ 的 PLS - DA 得分图,得分图的空间坐标就是各样本在第1个主成分和第2个主成分构成的平面上的投影得分值,可直观反映组间的相似或差异性,样本的坐标点在得分图上的位置越远,说明样本间的差异越明显,反之亦然。根据组间样本坐标点位置的远近,获取组间差异信息。结合综合评分和 PLS - DS 法的效应评价,从丹参 - 红花高、中、低剂量组中选取疗效最佳的一个组进行肠道菌多样性分析。

1.2.5 肠道菌群多样性分析

细菌 DNA 抽提:以心脏 HE 染色结果为依据,每组筛选3只大鼠。取大鼠盲肠内容物 200 mg,提取细菌总 DNA,采用超微量分光光度计进行定量分析,以 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检查所提取 DNA 的完整程度。

DNA 文库构建:PCR 上游引物为 338F,序列为 5' - ACTCCTACGGGAGGCAGCA - 3',下游引物为 806R,序列为 5' - GGACTACHVGGGTWTCTAAT - 3'。PCR 扩增条件,98 °C 预变性 3 min;98 °C 变性 15 s,55 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 30 s,28 个循环;最终扩展延伸 72 °C 5 min。以 Quant - iT PicoGreen dsDNA Assay Kit 对 PCR 扩增产物用酶标仪进行荧光定量分析。根据结果,按样本测序量需求,按相应比例对样本进行混合。

测序:通过 Illumina Novaseq - PE250 测序平台进行 2 × 250 bp 的双端测序获得的 Paired - end (PE) reads,根据 Fastq 文件对测序样品进行数据质量评估,根据 PE reads 之间的 overlap (最小 overlap 长度为 10 bp)使用 FLASH (<http://www.cbcb.umd.edu/software/flash>, version 1.2.7) 软件拼接成 1 条序列,对目标序列进行质控过滤 [采用 fastx - toolkit 工具过滤数据,仅保留高质量 (Q 值 ≥ 25) 的碱基比例 $\geq 90\%$ 的 reads],过滤后的序列与参考数据库 (RDP) 作比对,用 usearch 64 - bit 软件进行嵌合体序列的检测及过滤,去除已知序列的嵌合体,得到最终的优化序列。基于优化序列利用 Uparse (<http://drive5.com/uparse/>, version 7.0.1090) 进行 OTU 聚类分析,基于 OTU 聚类结果进行多样性指数分析;基于 Silva (如 Release132, <https://www.arb-silva.de/documentation/release-132>) 参考数据库,对每个样品的 OTUs 进行物种分类学注释,基于分类学信息进行物种结构分析和物种差异分析。

1.3 统计学处理

采用 SPSS 22.0 统计学软件分析。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 (One - way ANOVA)。 $P < 0.05$ 为差

异有统计学意义。

2 结果

2.1 心肌病理形态

A 组大鼠心肌形态结构正常,心肌细胞排列整齐,染色均匀,细胞核染清晰,偶见心肌间质散在炎性细胞。与 A 组比较,B 组心肌间质疏松、充血、肿胀,伴有多量炎性细胞浸润和红细胞溢出,心肌纤维断裂,心肌细胞核固缩、碎裂。与 B 组比较,D₃ 组和 D₂ 组,心肌形态结构基本正常,偶见心肌间质肿胀、充血,少量炎性细胞,红细胞溢出;D₁ 组,心肌间质肿胀、充血,伴有较多炎性细胞浸润和红细胞溢出,心肌细胞核固缩,心肌纤维断裂。详见图 1。

2.2 心肌细胞凋亡情况

详见图 2。B 组、C 组及 D₁ 组、D₂ 组、D₃ 组大鼠心肌细胞凋亡率分别为 26.2%、12.0%、3.2%、3.5%、8.4%。

2.3 心肌酶水平

与 A 组比较,B 组大鼠血浆 LDH,CK,AST,CK - MB,cTnI 水平显著升高 ($P < 0.01$);与 B 组比较,C 组及 D₁ 组、D₂ 组、D₃ 组大鼠血浆 LDH,CK,AST,CK - MB,cTnI 水平显著降低 ($P < 0.01$ 或 $P < 0.05$)。详见图 3。

2.4 药效综合评分

检索到近 10 年心肌缺血相关文献报道 1.6 万篇,其中涉及心肌细胞凋亡,AST,LDH,CK,CK - MB,cTnI 的数量分别为 739 篇、83 篇、872 篇、201 篇、98 篇、70 篇;将所有指标的数据导入到 SIMCA - P 11.5 软件,可得到 VIP 值 (图 4)。可见,LDH、心肌细胞凋亡率、CK 指标的 VIP 值均大于 1,表明上述指标对心肌缺血的影响相对重要;而 AST,CK - MB,cTnI 指标的 VIP 值均小于 1,表明其对心肌缺血的影响相对较小。再结合各指标标准化后的数据 (见表 1),最终确定心肌细胞凋亡、LDH 的权重系数为 3,CK 的权重系数为 2,AST,CK - MB,cTnI 的权重系数为 1。

2.5 抗心肌缺血效应评价 (PLS - DA 法)

A 组与 B 组 PLS - DA 得分有显著差异,表明建模成功;A 组、C 组及 D₁ 组、D₂ 组、D₃ 组差异较小,但两类之间有显著差异,表明 C 组及 D₂ 组、D₃ 组大鼠急性心肌缺血状态得到缓解;D₂ 组、D₃ 组部分重叠,表明差异较小。详见图 5。

2.6 肠道菌群多样性分析

Alpha 多样性:指局部均匀生长环境下的物种在丰富度、多样性和均匀度等方面的指标,其通过群落多样性指数、群落均匀度指数与群落丰度指数等反映样品的物种多样性,以 Chao1 (Chao, 1984) 和 Observed species 指数表征丰富度,以 Shannon (Shannon, 1948a, b) 和 Simpson (Simpson, 1949) 指数表征多样性,以 Pielou's evenness (Pielou, 1966) 指数表征均匀度。与 A 组比较,B 组 Chao1, Observed species, Pielou, Shannon 和 Simpson 指

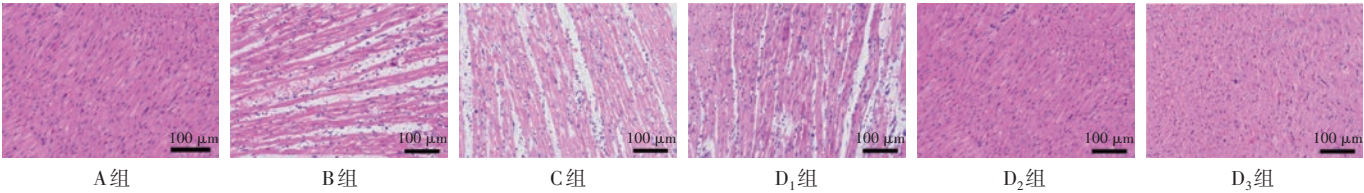


图 1 大鼠心肌病理形态(HE, ×200)

Fig. 1 Myocardial pathomorphology of rats(HE, ×200)

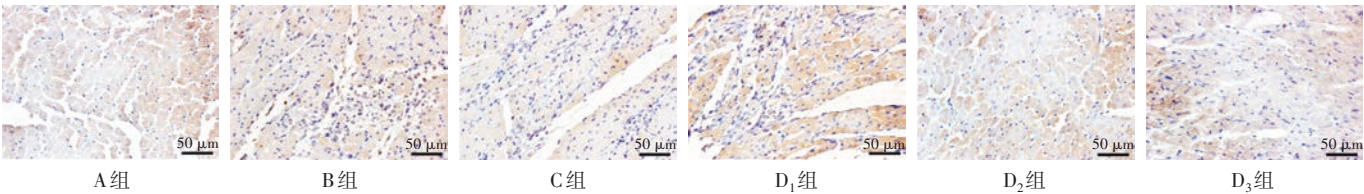
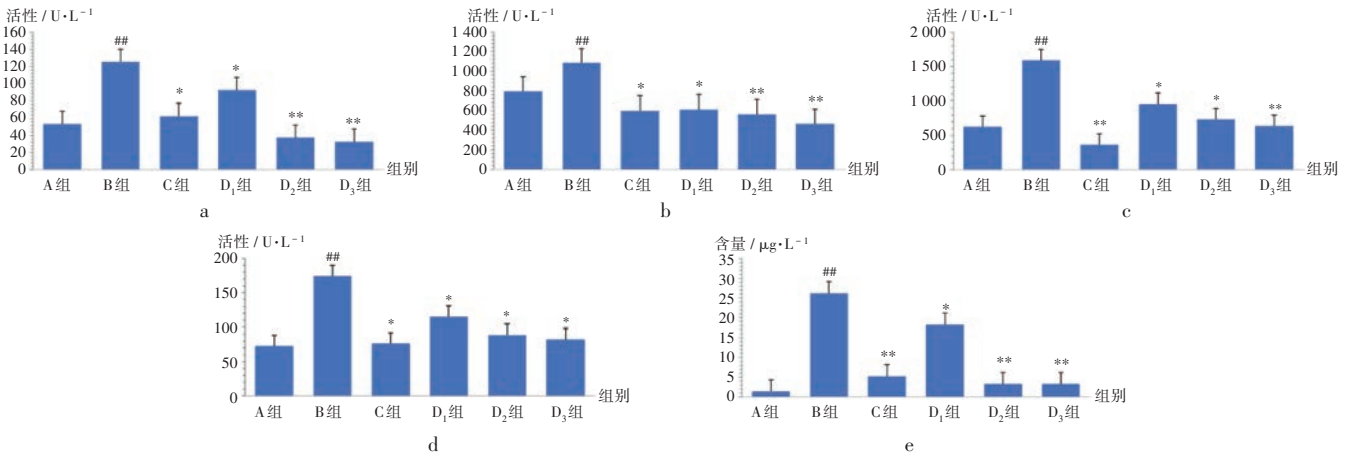


图 2 大鼠心肌细胞凋亡情况(TUNEL, ×400)

Fig. 2 Apoptosis of cardiomyocytes in rats(TUNEL, ×400)



注:与 A 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; 与 B 组比较: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ 。表 2, 图 8, 图 10、图 11 同。

a. AST b. LDH c. CK d. CK - MB e. cTnI

图 3 大鼠心肌酶水平比较

Note: Compared with those in group A, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$; Compared with those in group B, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ (for Fig. 3, Tab. 2, Fig. 8, Fig. 10 - 11).

a. AST b. LDH c. CK d. CK - MB e. cTnI

Fig. 3 Comparison of myocardial enzyme levels of rats in each group

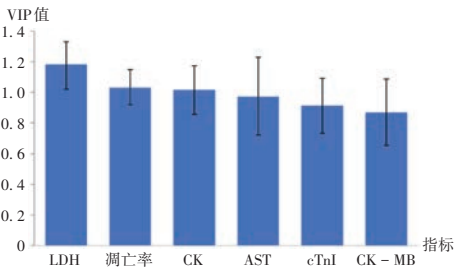


图 4 抗心肌缺血指标的 VIP 图

Fig. 4 VIP diagrams of against - myocardial ischemia index

数显著降低 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与 B 组比较, D_2 组 Chao1, Observed species, Pielou, Shannon 和 Simpson 指数显著升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 表明丹参 - 红花药对可有效增加盲肠中菌群丰度、菌群多样性和均匀度。详见表 2。

各组间菌群扩增子序列变异 (ASVs) 或可操作的分类单元 (OTU) 数量明显发生改变。丰度等级曲线是分析

表 1 各组大鼠总抗心肌缺血效应值比较

Tab. 1 Comparison of total against - myocardial ischemia effect values of rats in each group

组别	剂量(g/kg)	$V_{\text{凋亡率}}$	V_{AST}	V_{LDH}	V_{CK}	$V_{\text{CK-MB}}$	V_{cTnI}	总效应值
A 组	0	0.89	0.57	0.27	0.61	0.58	0.95	6.79
B 组	0.73	0.54	0.50	0.45	0.77	0.56	0.80	6.37
D_1 组	4	0.68	0.26	0.43	0.40	0.34	0.31	5.05
D_2 组	8	0.87	0.70	0.48	0.54	0.49	0.88	7.18
D_3 组	16	0.88	0.74	0.57	0.60	0.53	0.88	7.68

多样性的一种方式,以 OTU 等级为横坐标,以每个 OTU 中所含的序列数 ($\log_2$) 或者用 OTU 中序列数的相对百分含量为纵坐标。该曲线用于解释多样性的物种丰度和物种均匀度 2 个方面。在水平 (横轴) 方向,物种的丰度由曲线的长度来反映,物种的丰度越高,曲线在横轴上的范围越大;曲线的形状 (平滑程度) 反映了样本中物种的均度,曲线越平缓,物种分布越均匀,曲线越陡

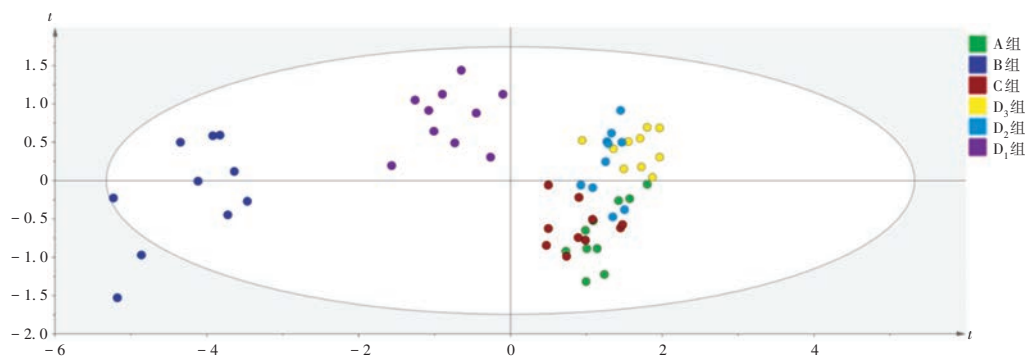


图5 抗心肌缺血指标的PLS-DA得分图

Fig. 5 PLS-DA scores of against-myocardial ischemia index

表2 各组大鼠肠道(盲肠)菌群的 α 多样性指数分析($\bar{X} \pm s, n=6$)
Tab. 2 Analysis of α -diversity index of intestinal (cecal) bacteria of rats in each group ($\bar{X} \pm s, n=6$)

组别	剂量 (g/kg)	指数				
		Chao1	Observed species	Pielou	Shannon	Simpson
A组		3579.68 $\pm$ 298.23	3553.63 $\pm$ 466.30	0.82 $\pm$ 0.05	9.33 $\pm$ 0.56	0.92 $\pm$ 0.01
B组	0.73	2394.88 $\pm$ 249.74 [#]	2376.78 $\pm$ 228.21 [#]	0.72 $\pm$ 0.07 [#]	7.92 $\pm$ 0.49 [#]	0.84 $\pm$ 0.02 [#]
D ₂ 组	8	3616.85 $\pm$ 183.57 ^{**}	3645.67 $\pm$ 337.18 ^{**}	0.80 $\pm$ 0.03 [*]	8.94 $\pm$ 0.41 ^{**}	0.99 $\pm$ 0.01 ^{**}

峭,物种间的丰度差异越大。详见图6 A。D₂组横轴上的折线较长,表明其OTU数量较多。详见图6 B。

Beta多样性:该分析用于评估微生物群落间的差异。与A组比较,B组菌群结构组成差异明显,表明ISO诱导模型大鼠肠道菌群结构组成发生变化;而D₂组偏离B组,表明丹参-红花药对可改善ISO模型大鼠肠道菌群结构组成和菌群多样性。详见图6 C。

2.7 肠道菌群不同分类水平

门水平的肠道菌群组成:从各组样品中鉴定出厚壁菌门、拟杆菌门、变形菌门、放线菌门、软壁菌门等16个菌门,厚壁菌门相对丰度最高,其次是拟杆菌门,厚壁菌门和拟杆菌门相对丰度的比值(F/B)可在一定程度上反映机体的健康状态。详见图7。与A组比较,B组大鼠肠道菌群放线菌门、TM7门的相对丰度和F/B显著

降低($P < 0.05$),拟杆菌门、软壁菌门、脱铁杆菌门的相对丰度显著升高($P < 0.01$);与B组比较,D₂组拟杆菌门、软壁菌门和脱铁杆菌门的相对丰度显著降低($P < 0.01$),放线菌门、TM7门的相对丰度和F/B显著升高($P < 0.05$),表明丹参-红花药对可调节失调的肠道菌群水平和菌群的组成,从而发挥抗心肌缺血作用。详见图8。

科、属水平的肠道菌群组成:从3组样品中共得到肠道菌在科水平、门水平排名前17位的科和属水平组成,详见图9。与A组比较,B组大鼠肠道菌群中瘤胃菌科、拟杆菌科、理研菌科和艰难杆菌科相对丰度显著升高($P < 0.01$);与B组比较,D₂组以上菌科相对丰度显著降低($P < 0.01$)。详见图10。与A组比较,B组大鼠肠道菌群中颤螺菌属和罗斯氏菌属相对丰度显著升高($P < 0.05$),乳杆菌属、棒状杆菌属、葡萄球菌属和SMB53属相对丰度显著降低($P < 0.05$);与B组比较,D₂组颤螺菌属和罗斯氏菌属相对丰度显著降低($P < 0.05$),乳杆菌属、棒状杆菌属、葡萄球菌属和SMB53菌属相对丰度显著升高($P < 0.05$)。表明丹参-红花药对可显著调节急性心肌缺血模型大鼠肠道菌群。详见图11。

3 讨论

本研究中以心肌病理、心肌细胞凋亡及心肌酶等指标,采用多指标综合指数法,计算总效应值,评价高、

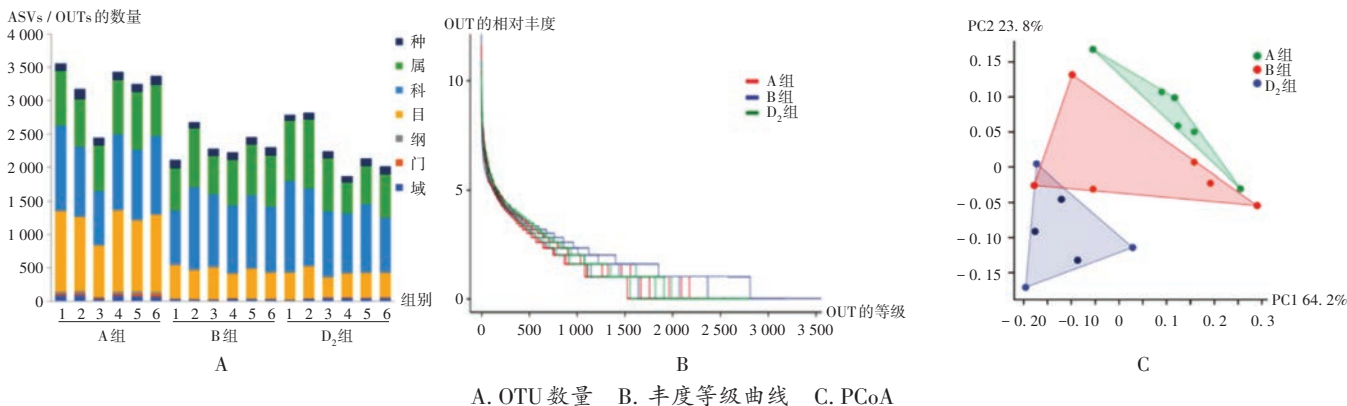
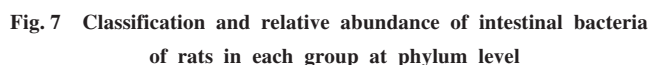


图6 各组大鼠肠道(盲肠)菌群的OTU数量、丰度等级曲线、PCoA比较

A. OTU amount B. Abundance grade curve C. PCoA

Fig. 6 Comparison of OTU amount,abundance grade curve and PCoA of intestinal (cecal) bacteria of rats in each group



本研究结果表明,丹参-红花药对可一定程度上调节门分类水平菌群,主要集中在厚壁菌门和拟杆菌门,显著升高厚壁菌门的相对丰度和F/B($P < 0.01$),



A. Family level B. Genus level

有研究表明,肠道菌群可通过参与色氨酸的代谢来影响CVD的发生与发展^[19]。大肠杆菌和乳杆菌等细菌中的色氨酸酶能将色氨酸转化为吲哚和吲哚-3-乙酸(IAA)等,IAA可减少炎性介质的产生,同时调节

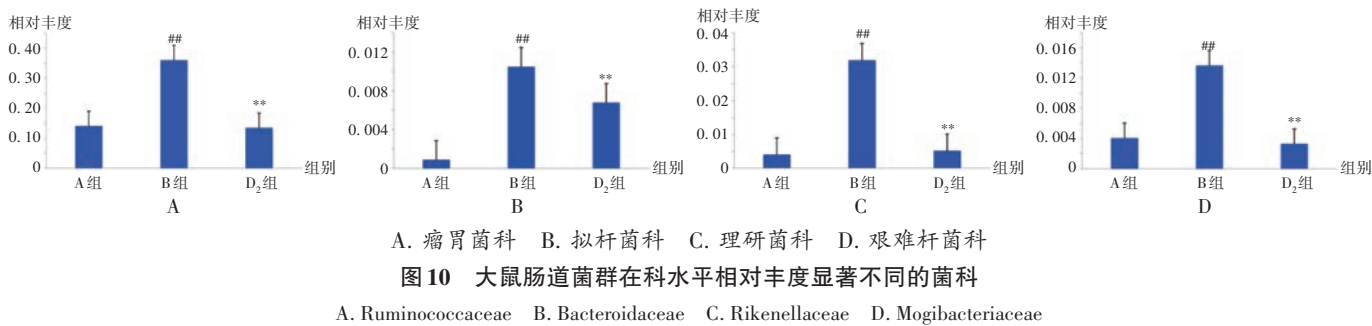


Fig. 10 Families with significantly different relative abundances of intestinal bacteria at the family level of rats in each group

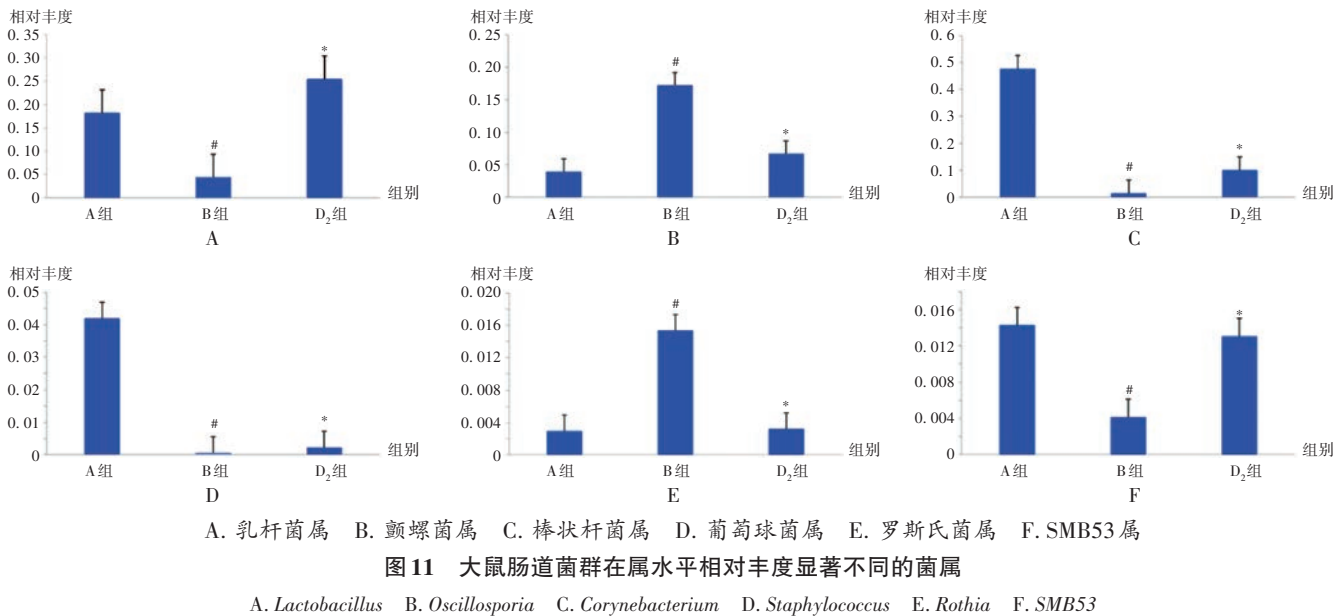


Fig. 11 Genera with significantly different relative abundances of intestinal bacteria at the genus level of rats in each group

胆固醇和胆汁酸生物合成,减轻炎症反应^[20],而丹参-红花药对可升高急性心肌缺血模型大鼠肠道中乳杆菌属相对丰度,说明丹参-红花药对可能是通过升高乳杆菌属的相对丰度,促进IAA的生成,减轻炎症反应,从而发挥保护心肌缺血的作用。

综上所述,丹参-红花药对的抗心肌缺血作用可能与调节性T细胞分化增殖、色氨酸代谢途径、抗炎作用有关,也可能与参与上述作用的相关菌群有关。本课题组后续将通过分子生物学方法对差异菌群和调节性T细胞的分化增殖、色氨酸代谢途径等可验证途径进行验证。本研究有助于探讨丹参-红花药对抗心肌缺血的作用机制,为其临床应用提供理论依据。

参考文献

[1] 国家心血管病中心. 中国心血管健康与疾病报告2019[J]. 心肺血管病杂志, 2020, 39(10): 1157 - 1162.
[2] WANG YL, ZHANG Q, YIN SJ, et al. Screening of blood - activating active components from Danshen - Honghua herbal pair by spectrum - effect relationship analysis [J]. Phytomedicine, 2019, 54: 149 - 158.
[3] 赵怡涵, 王丽宏, 车慧. 肠道微生物群对心血管疾病的影

响[J]. 心血管康复医学杂志, 2021, 30(1): 115 - 118.

[4] MARZULLO P, DI RENZO L, PUGLIESE G, et al. From obesity through gut microbiota to cardiovascular diseases: a dangerous journey[J]. Int J Obes Suppl, 2020, 10(1): 35 - 49.
[5] 赵映霞, 许腾, 田俊生, 等. 柴归颗粒对慢性不可预知温和刺激抑郁大鼠模型肠道菌群的作用[J]. 中草药, 2021, 52(3): 736 - 743.
[6] WANG XP, WANG PF, BAI JQ, et al. Investigating the effects and possible mechanisms of danshen - honghua herb pair on acute myocardial ischemia induced by isoproterenol in rats[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 118: 109268.
[7] 肖日传, 罗光明, 朱继孝, 等. 基于偏最小二乘法和多指标综合指数法的栀子根不同提取部位保肝作用评价[J]. 中草药, 2017, 48(23): 4921 - 4927.
[8] XIA N, LU YZ, GU MY, et al. A Unique Population of Regulatory T Cells in Heart Potentiates Cardiac Protection From Myocardial Infarction[J]. Circulation, 2020, 142(20): 1956 - 1973.
[9] 张云, 刘咏梅, 刘宗莲, 等. 化浊祛湿通心方对心肌梗死大鼠肠道菌群的调节及功能基因预测[J]. 中华中医药杂志, 2020, 35(6): 2813 - 2817.
[10] AYYANNA R, ANKAIAH D, ARUL A. Anti - inflammatory