

DOI: 10.13288/j.11-2166/r.2021.13.014

动脉粥样硬化模型小鼠肠道菌群及其代谢产物 TMAO 与心功能的相关性

吕美君, 贾连群[✉], 冷雪, 王莹, 杜莹, 李宁, 王群, 陈丝, 曹媛

辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室, 辽宁省沈阳市皇姑区崇山东路 79 号, 110032

摘要 目的 探讨动脉粥样硬化模型小鼠肠道菌群特征、代谢产物氧化三甲胺 (TMAO) 含量、心功能水平及三者的相关性。方法 10 只 ApoE^{-/-} 小鼠高脂饲料喂饲 12 周建立动脉粥样硬化模型设为模型组, 另取 10 只 C57BL/6/J 小鼠作为正常组。运用小动物超声仪检测心功能 [包括左心室射血分数 (LVEF)、左心室短轴缩短率 (LVFS)], 采用全自动生化分析仪检测各组小鼠血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 含量, 油红 O 染色观察小鼠主动脉脂质沉积情况, 高效液相色谱质谱联用 (LC/MS) 法检测血浆 TMAO 水平, 16SrDNA 高通量测序技术分析肠道菌群特征。采用 Spearman 相关系数法对模型组小鼠肠道优势菌属、TMAO 水平及心功能进行相关性分析。结果与正常组比较, 模型组小鼠 LVEF、LVFS 值显著下降, 血清 TG、TC、LDL-C 水平显著升高, HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.05$)。模型组小鼠主动脉脂质沉积明显, 血浆 TMAO 水平明显升高 ($P < 0.05$), 肠道菌群中 Lachnospiraceae_NK4A136_group、罗氏菌属、Lachnospiraceae、肠杆菌属、优杆菌属丰度显著升高, 拟普雷沃菌属丰度显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。相关分析结果显示, 优势菌属中 Lachnospiraceae 与 TMAO 水平呈正相关, TMAO 水平与 LVEF、LVFS 呈正相关 ($P < 0.05$)。结论 动脉粥样硬化模型小鼠肠道菌群发生紊乱, 代谢产物 TMAO 增多, 且菌群多样性改变与血浆 TMAO 水平及心功能具有相关性。

关键词 动脉粥样硬化; 肠道菌群; 氧化三甲胺; 心功能

心血管疾病是严重危害人类健康的常见病,《中国心血管健康与疾病报告 2019 概要》^[1] 显示,我国现阶段心血管病人数约为 3.3 亿,占居民死亡原因的 43% 以上,高居死亡原因首位。动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 是心血管疾病的主要病理基础,而血脂异常则是 AS 等心脑血管疾病的重要危险因素。中医学认为,脾主运化,为气血生化之源,而血中脂质亦由水谷化生,并依赖脾的运输功能布散周身。脾失健运,脾虚生痰,因痰致瘀,痰瘀互结,阻于脉道则是 AS 的重要病机^[2]。肠道菌群作为机体“第二基因组”,对宿主代谢、免疫调节、炎症反应等均具有重要影响,肠道菌群失调与 AS 的发生、发展密切相关^[3]。且肠道菌群直接参与饮食物的消化吸收,是脾主运化功能的微

观表现,维持肠道菌群平衡是脾主运化的主要生理功能^[4],而肠道菌群失调则是脾失健运的重要病理因素。研究显示,与健康人比较,AS 患者的肠道菌群明显失衡^[5-6],且脾虚状态下,血脂水平异常,血清总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白胆固醇 (LDL-C) 水平升高,高密度脂蛋白胆固醇 (HDL-C) 水平降低,心功能亦降低,此时肠道菌群也发生紊乱,同时菌群多样性改变与血清血脂水平具有一定的相关性^[7-8]。因此,有效纠正肠道菌群失调可能成为预防和治疗 AS 的新途径和新靶点。氧化三甲胺 (TMAO) 是广泛分布于海洋生物组织内的小分子有机化合物,肠道菌群可将胆碱类物质代谢为三甲胺 (TMA),TMA 在肝脏黄素单氧化酶 (FMOs) 的催化下氧化为 TMAO 进入血液。研究^[9-11]表明,血浆 TMAO 水平高的人群发生心血管危险事件的风险比低水平人群高 2.5 倍,TMAO 已被公认为心血管疾病的独立危险因素,会促进 AS 发展。本研究应用载脂蛋白 E 基因

基金项目: 国家自然科学基金(81774022); 辽宁省“兴辽英才计划”创新领军人才(XLYC1902100); 辽宁省科学技术计划(20180551242); 辽宁省自然科学基金(2020-BS-466)

✉ 通讯作者: jllq-8@163.com, (024) 31207020

敲除(ApoE^{-/-})小鼠构建AS模型,利用16SrDNA高通量测序技术、高效液相色谱质谱联用(LC/MS)技术、高分辨小动物超声技术,观察AS模型小鼠肠道菌群特征、TMAO含量及心功能变化,进一步分析肠道菌群及其代谢产物TMAO与心功能的相关性,为以肠道菌群及其代谢产物为靶点,通过健脾化痰祛瘀法防治AS提供依据。本研究通过辽宁中医药大学附属医院动物实验伦理委员会伦理学审查 批号: 2019Y5(DW)-020-01]。

1 材料与方法

1.1 实验动物

SPF级雄性C57BL/6J小鼠10只,6周龄,体重18~20g;相同遗传背景的SPF级雄性C57BL/6J ApoE^{-/-}小鼠10只,6周龄,体重18~20g,均购自北京维通利华实验动物技术有限公司,实验动物生产许可证号: SCXK(京)2012-0001。适应性喂养于辽宁中医药大学实验动物中心,自然光照,自由饮水,动物房温度为(20.90±2.87)℃,空气相对湿度为(47.50±15.42)%。

1.2 主要试剂与仪器

TC、TG、LDL-C、HDL-C试剂盒(批号分别为CH0103152、CH0105151、CH0105162、CH0105161),四川迈新生物技术有限公司;MoBio PowerSoil DNA Isolation Kit(100)试剂盒(批号12888-100),QIAGEN公司;油红O染色试剂盒(批号G1260),索莱宝科技有限公司;苏木素染液(批号G1004),武汉谷歌生物科技有限公司;水合氯醛(批号S24149),上海源液生物科技有限公司;异氟烷(批号C002160602),河北一品制药股份有限公司;超声耦合剂(批号20190212),天津津亚科技发展有限公司;高脂饲料(含21%脂肪,15%猪油,0.15%胆固醇等,批号201708180),北京科澳协力饲料有限公司。

全自动生化分析仪(日本日立电子公司,型号7180);超高分辨率小动物超声仪(加拿大Visual Sonics公司,型号VEVO2100);高速冷冻离心机(赛默飞世尔科技有限公司,型号ThermoST16R);液相色谱仪(Agilent Technologies Inc,型号1290 Infinity series UHPLC);质谱仪(Agilent Technologies Inc,型号6470 Triple Quadrupole MS/MS);DM IL LED普通型光学显微镜(Leica公司,型号DM IL LED);电泳仪(Bio-Rad公司,型号Power-PacTM Basic);MiSeq高通量二代测序仪(Illumina公司,型号MiSeq)。

1.3 动物分组及造模

适应性喂养1周后,将10只ApoE^{-/-}小鼠作为模型组,C57BL/6J小鼠10只作为正常组。模型组参照文献[2]给予高脂饲料制备AS模型,正常组小鼠给予普通饲料,两组均饲喂12周。ApoE^{-/-}小鼠由于敲除了ApoE基因,导致LDL-C清除障碍而沉积于动脉管壁,易于形成AS病灶,是AS研究中常用且较好的动物模型[3]。造模结束后,取主动脉组织行油红O染色,镜下观察主动脉壁内膜有斑块形成,则说明实验造模成功[4]。本研究10只小鼠均造模成功。

1.4 观察指标及方法

1.4.1 心脏功能 造模结束后采用异氟烷持续吸入性麻醉,小鼠仰卧位固定于操作台上,待翻正反射消失后,胸部给予脱毛膏脱毛备皮,涂适量耦合剂,将高分辨率小动物超声仪的探头(400 MHz)置于耦合剂上,调整探头角度,进行心脏超声检查,获取左心室心脏B型超声、M型超声成像,测量左心室射血分数(LVEF)、短轴缩短率(LVFS)。

1.4.2 血脂水平 造模结束后小鼠禁食不禁水12h,腹腔注射4%水合氯醛(1.5 ml/25 g),眼球取血。3000 r/min,离心半径10 cm,4℃离心30 min,分别取上清液及血浆,全自动生化分析仪检测血清TC、TG、LDL-C和HDL-C水平。

1.4.3 血浆TMAO水平 四倍体积的4℃冰冷甲醇沉淀血浆蛋白质之后,注射上清液中小分子分析物于苯基柱(4.6~250 mm,5 mm SB-Phenyl; Agilent技术),使用Cohesive HPLC接口PE Sciex API 365三重四极杆质谱仪,流速0.8 ml/min。LC梯度测试条件为:已腈10 mmol/L,含有5 mmol/L甲酸铵,25%甲醇和0.1%甲酸,起始于0.5 min,持续3 min。在正面多反应监测(MRM)中监测TMAO,使用特征前体产物离子跃迁的模式:m/z7658。制备TMAO标准品的浓度以制备校准曲线用于定量血浆TMAO水平。

1.4.4 肠道菌群检测分析 急性失血法处死小鼠后,开腹暴露肠道,取出盲肠组织中的粪便样本,迅速冻存于液氮内,后转移至-80℃冰箱保存。基因组DNA提取与PCR:粪便样本解冻后,按照MoBio PowerSoil DNA Isolation Kit(100)试剂盒操作手册提取基因组DNA,Nanodrop检验DNA质量及浓度,引物由北京奥维森基因科技有限公司合成,上游ACTCCTACGGGAGGCAGCAG,下游

GGACTACHVGGGTWTCTAAT, 引物长度为 468 bp, 对菌群 16SrDNA V3 - V4 区进行 PCR 扩增。每个样本重复 3 次, 将同一样本的 PCR 产物混合后用 2% 琼脂糖凝胶电泳检测。菌群 16SrDNA 测序分析由北京奥维森基因科技有限公司完成, 选用 Illumina Miseq 测序平台 PE300 测序技术进行高通量测序, 包括 16SrDNA 测序质量评估、分类单元 (OTU) 分析、肠道菌群物种组成分析。

1.4.5 主动脉组织病理学形态 取固定的胸主动脉组织, 用吸水纸将组织块的固定液充分吸干, 切成 1 cm × 1 cm 小块, 包埋, 固定于冰冻切片机上, 制作 10 μm 冰冻切片, 用干净清洁的硅化载玻片粘取冷冻切片, 切片干燥后用 60% 异丙醇浸 40 s, 油红 O 染色 15 min, 60% 异丙醇冲洗后蒸馏水冲洗 2 次, 苏木素染色 5 min, 蒸馏水冲洗 2 次, 1% 盐酸-乙醇分色 1 s, 甘油明胶封片后显微镜下观察并拍照。

1.5 统计学方法

采用 SPSS 21.0 统计软件分析数据, 符合正态分布数据均以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示, 不符合正态分布数据用中位数和四分位数间距即 $M (Q_{25} \sim Q_{75})$ 表示。两组比较采用独立样本 t 检验, 组间菌群比较采用 Metastats 分析, 相关分析采用 Spearman 相关系数法。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

2 结果

2.1 两组小鼠心功能、血浆 TMAO 水平比较

表 1 示, 与正常组比较, 模型组小鼠 LVEF、LVFS 显著下降, 血浆 TMAO 水平明显升高 ($P < 0.05$)。

表 1 两组小鼠心功能及血浆 TMAO 水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	LVEF/%	LVFS/%	TMAO/ng · ml ⁻¹
正常组	10	59.84 ± 4.67	31.48 ± 3.22	155.80 ± 29.57
模型组	10	38.13 ± 4.28 ^{a)}	18.32 ± 2.31 ^{a)}	574.30 ± 215.95 ^{a)}

注: TMAO, 氧化三甲胺; LVEF, 左心室射血分数; LVFS, 左心室短轴缩短率。

a) 与正常组比较, $P < 0.05$ 。

表 2 两组小鼠血清 TG、TC、LDL-C、HDL-C 水平比较

(mmol/L, $\bar{x} \pm s$)

组别	鼠数	TC	TG	HDL-C	LDL-C
正常组	10	12.00 ± 0.99	0.33 ± 0.04	2.23 ± 0.12	3.39 ± 0.43
模型组	10	37.73 ± 1.38 ^{a)}	0.92 ± 0.08 ^{a)}	1.56 ± 0.12 ^{a)}	14.54 ± 1.01 ^{a)}

注: TG, 甘油三酯; TC, 总胆固醇; LDL-C, 低密度脂蛋白胆固醇; HDL-C, 高密度脂蛋白胆固醇。

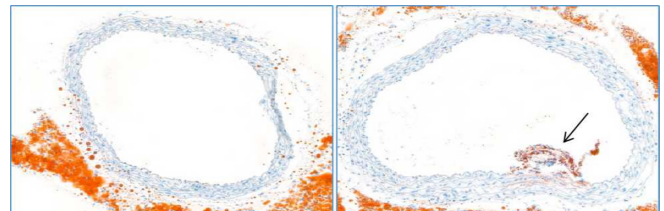
a) 与正常组比较, $P < 0.05$ 。

2.2 两组小鼠血脂水平比较

表 2 示, 与正常组比较, 模型组小鼠血清中 TG、TC、LDL-C 水平显著升高, HDL-C 水平显著降低 ($P < 0.05$)。

2.3 两组小鼠主动脉病理形态结果

图 1 示, 正常组小鼠主动脉管壁无粥样斑块沉积, 模型组小鼠主动脉内可见明显的粥样斑块沉积。



正常组

模型组

注: 箭头所指为沉积于动脉壁的粥样斑块。

图 1 两组小鼠主动脉油红 O 染色结果 (×50)

2.4 两组小鼠肠道菌群比较

2.4.1 16SrDNA 测序质量评估 绘制肠道菌群稀释性曲线以评估样本的测序数据量是否合理, 当曲线趋于平坦时, 说明样本测序数据量合理, 产生的 OTU 趋于平稳; 反之则说明随着测序数据量增大, 可能会产生较多新的 OTU。本次实验两组样本平均得到 20209 条有效序列, 当序列接近 21000 时再增加序列时只产生少量新的 OTU, 表明此次实验测序数据量合理。

2.4.2 肠道菌群 OTU 分析结果 通过对两组小鼠共 20 个样本进行优化, 聚类得到 OTUs 韦恩图, 两组样本共有 434 个相同的 OTUs, 正常组有 698 个特征 OTUs, 模型组有 70 个特征 OTUs。

2.4.3 肠道菌群物种组成分析 根据物种注释结果, 统计两组中至少一组属水平相对丰度在 1.5% 以上的物种, 表 3 示, 与正常组比较, 模型组 Lachnospiraceae_NK4A136_group、Lachnospiraceae、罗氏菌属、肠杆菌属、优杆菌属相对丰度显著升高, 拟普雷沃菌属相对丰度显著降低 ($P < 0.05$ 或 $P < 0.01$)。

表 3 两组小鼠肠道优势菌属丰度比较 (至少一组平均丰度 > 1.5%)

[%, $\bar{x} \pm s/M (Q_{25} \sim Q_{75})$]

菌属	鼠数	正常组	模型组	P 值
Lachnospiraceae_NK4A136_group	10	14.57 ± 8.42	27.95 ± 13.40	0.0171
拟普雷沃菌属	10	5.68 ± 5.15	0.05 ± 0.04	0.0009
Lachnospiraceae	10	2.21 ± 1.74	4.17 ± 2.09	0.0341
罗氏菌属	10	1.43 ± 1.29	2.37 (1.70 ~ 12.16)	0.0311
肠杆菌属	10	1.42 ± 0.94	3.22 ± 1.32	0.0032
优杆菌属	10	0.12 (0.04 ~ 1.22)	2.87 ± 2.49	0.0091

2.5 模型组小鼠肠道优势菌属、血浆 TMAO 水平与心功能的相关性分析

表 4 示, 模型组小鼠肠道优势菌属中, Lachnospiraceae 与 TMAO 水平呈显著正相关 ($P < 0.05$), 所有优势菌属与 LVEF、LVFS 均无显著相关性 ($P > 0.05$); 血浆 TMAO 水平与 LVEF、LVFS 呈显著正相关 ($P < 0.05$)。

表 4 模型组小鼠优势菌属与 TMAO、LVEF、LVFS 的相关性分析结果

项目	TMAO		LVEF		LVFS	
	相关系数	P 值	相关系数	P 值	相关系数	P 值
Lachnospiraceae_NK4A136_group	0.055	0.881	-0.237	0.510	-0.176	0.626
Lachnospiraceae	0.648	0.043	0.353	0.318	0.438	0.206
罗氏菌属	-0.539	0.108	-0.328	0.354	-0.438	0.206
肠杆菌属	0.564	0.090	0.383	0.275	0.371	0.291
优杆菌属	0.030	0.934	-0.225	0.532	-0.128	0.725
TMAO	1.000	-	0.705	0.023	0.754	0.012

注: TMAO, 氧化三甲胺; LVEF, 左心室射血分数; LVFS, 左心室短轴缩短率。

3 讨论

中医学认为, 脾主运化水谷, 为气血生化之源, 血中脂质亦由脾运化水谷而生成, 并依赖脾的转输功能布散周身。若过食肥甘厚味, 损伤脾胃, 脾失健运, 水谷精微物质输布失常, 聚而为痰, 因痰致瘀, 痰瘀互结, 常导致血脂异常及 AS, 日久则易引发心血管疾病。本研究结果显示, 采用高脂饲料 ApoE^{-/-} 小鼠 12 周后, 模型组小鼠血清 TG、TC、LDL-C 水平显著升高, HDL-C 水平显著降低, 同时模型组小鼠主动脉内可见明显的脂质沉积, 形成粥样斑块, 说明成功建立 AS 模型。

LVEF、LVFS 是反映心排出量及心肌收缩能力的重要指标, 随着动脉硬化病变程度的增加, LVEF 及 LVFS 不同程度降低^[13]。本研究结果显示, 与正常组比较, 模型组小鼠 LVEF 及 LVFS 值均显著下降, 说明小鼠左心室心肌收缩能力下降, 心功能降低。

AS 是一种慢性炎症性疾病, 炎症反应在 AS 病变的发生发展中发挥着非常重要的作用^[14]。肠道菌群失调参与代谢性和炎症性疾病的发生和进展^[3], 越来越多的研究表明肠道菌群在 AS 的发生发展中有重要作用^[15]。既往研究^[6]表明, AS 患者的肠道菌群失衡, 其中拟杆菌、乳酸杆菌等益生菌明显减少, 毛螺旋菌等厚壁菌门明显增多。TMAO 是肠道菌群的重要代谢产物, 其作为心血管疾病重要的风险预测因子, 能够通过多种途径促进动脉粥样硬化的发展^[18-20]。TMAO 的生成量与人类肠道菌群的种类有关, 普氏菌属丰度高的肠道菌群要比拟杆菌属丰度高的肠道菌群 TMAO 含量多^[21]。本研究结果显示, 与正常组小鼠相比, 模型组小鼠 Lachnospiraceae_NK4A136_group、罗氏菌属、肠杆菌属、优杆菌属、Lachnospiraceae 丰度显著升高, 拟普雷沃菌属丰度显著降低, 血浆 TMAO 水平显著升高。Lachnospiraceae_NK4A136_group 属于毛螺旋菌科, 与罗氏菌属及优杆菌属均属于厚壁菌门。Lachnospiraceae 是 Amadou 等^[22]首次从肥胖患者的粪便样品中分离出来的。肠杆菌属为普遍存在于肠道菌群中的一个机会致病菌^[23]。研究显示, 二甲基亚硝胺处理的大鼠, 在炎症反应的同时伴随着肠杆菌属增加, 而且肠杆菌属与高脂诱导的氧化应激呈正相关^[24], 通过抑制肠球菌的生长可以改善糖和脂肪的代谢^[25]。另有研究^[26]表明, 梭菌 (Lachnospiraceae_NK4A136_group 及罗氏菌属为梭菌纲) 的增加可能会增强葡聚糖硫酸钠诱导的炎症反应。本研究肠道菌群物种组成结果与上述报道一致, 提示高脂饮食造成了 AS 小鼠肠道菌群紊乱。

此外, 肠道菌群优势菌属、血浆 TMAO 水平与心功能的相关性研究结果显示, 模型组小鼠肠道优势菌属中, Lachnospiraceae 与 TMAO 水平呈显著正相关, 血浆 TMAO 水平与 LVEF、LVFS 呈显著正相关, 提示肠道菌群与 TMAO、心功能密切相关。未来实验中可以进一步探讨三者之间的相互作用及机制。Lachnospiraceae 目前研究尚少, 其在

AS 发生发展中的作用有待进一步深入研究。

综上所述,高脂饮食条件下,脾胃受损,运化失司,痰瘀互结致血脂异常,且不能维持肠道微生物稳态,导致 AS 小鼠肠道菌群发生紊乱,益生菌丰度下降,与脂代谢相关的菌属丰度升高,代谢产物 TMAO 增多,且菌群多样性改变与血浆 TMAO 水平及心功能具有一定的相关性。本研究样本量虽然满足测序需求,但仍相对不足,后续研究中拟增加样本量并结合临床研究,采用健脾化痰祛瘀法防治 AS,为揭示 AS 的发病机制及临床多角度、多靶点防治 AS 提供一定的研究思路及依据。

参考文献

- [1] 中国心血管健康与疾病报告编写组. 中国心血管健康与疾病报告 2019 概要 [J]. 中国循环杂志, 2020, 35(9): 833-854.
- [2] 喻松仁, 周丽, 周步高, 等. 动脉粥样硬化“痰瘀”演变的内在机制研究 [J]. 江西中医药大学学报, 2014, 26(4): 23-27.
- [3] 王安璐, 李秋忆, 徐浩, 等. 肠道菌群与动脉粥样硬化的关系 [J]. 中国动脉硬化杂志, 2020, 28(2): 93-98.
- [4] 贾连群, 宋囡, 张妮, 等. 基于“脾主运化”理论探讨肠道微生物稳态与膏脂转输的关系 [J]. 中医杂志, 2017, 58(18): 1554-1557.
- [5] HEUSCH G. Molecular basis of cardioprotection: signal transduction in ischemic pre-, post-, and remote conditioning [J]. Circ Res, 2015, 116(4): 674-699.
- [6] ROSA GL, BIASUCCI LM. The gut microbiota and atherosclerosis: the state of the art and novel perspectives [J]. CVIA, 2016, 1(4): 433-442.
- [7] 吕美君, 贾连群, 宋囡, 等. 脾虚痰浊巴马小型猪肠道菌群多样性及与血脂、SAA 的相关性分析 [J]. 时珍国医国药, 2020, 31(9): 2281-2285.
- [8] 李阳, 冷雪, 宋囡, 等. 化痰祛瘀方干预 MAPK 信号通路对 AS 小鼠心功能的影响及其机制研究 [J]. 时珍国医国药, 2019, 30(6): 1336-1338.
- [9] FENNEMA D, PHILLIPS IR, SHEPARD EA. Trimethylamine and trimethylamine N-oxide, a flavin-containing monooxygenase 3 (FMO3)-mediated host-microbiome metabolic axis implicated in health and disease [J]. Drug Metab Dispos, 2016, 44(11): 1839-1850.
- [10] NOWIŃSKI A, UFNAL M. Trimethylamine N-oxide: a harmful, protective or diagnostic marker in lifestyle diseases? [J]. Nutrition, 2018, 46: 7-12. doi: 10.1016/j.nut.2017.08.001.
- [11] TANG WH, WANG ZN, LEVISON BS, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk [J]. N Engl J Med, 2013, 368(17): 1575-1584.
- [12] SHAH PK, NILSSON J, KAUL S, et al. Effects of recombinant apolipoprotein A-I (Milano) on aortic atherosclerosis in apolipoprotein E-deficient mice [J]. Circulation, 1998, 97(8): 780-785.
- [13] WANG SZ, WU M, CHEN KJ, et al. Hawthorn extract alleviates atherosclerosis through regulating inflammation and apoptosis related factors: an experimental study [J]. Chin J Integr Med, 2018, 25(2): 108-115.
- [14] 黄雪云, 李七一, 严士海, 等. 冠心平对动脉粥样硬化 ApoE^{-/-}小鼠 ox-LDL、LoX-1 蛋白及 mRNA、ICAM-1、ELAM-1 水平的影响 [J]. 中国老年学杂志, 2019, 39(15): 3725-3729.
- [15] 郭纪群, 葛均波. 冠状动脉粥样硬化程度与左室收缩功能的关系 [J]. 心脏杂志, 2013, 25(5): 554-557.
- [16] RIDKER PM. Residual inflammatory risk: addressing the obverse side of the atherosclerosis prevention coin [J]. Eur Heart J, 2016, 37(22): 1720-1722.
- [17] JONSSON AL, BÄCKHED F. Role of gut microbiota in atherosclerosis [J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(2): 79-87.
- [18] KOETH RA, WANG ZN, LEVISON BS, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis [J]. Nat Med, 2013, 19(5): 576-585.
- [19] SELDIN MM, MENG Y, QI H, et al. Trimethylamine N-oxide promotes vascular inflammation through signaling of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor-κB [J]. J Am Heart Assoc, 2016, 5(2): e002767. doi: 10.1161/JAHA.115.002767.
- [20] SCHUGAR RC, BROWN JM. Emerging roles of flavin monooxygenase 3 in cholesterol metabolism and atherosclerosis [J]. Curr Opin Lipidol, 2015, 26(5): 426-431.
- [21] WU GD, CHEN J, HOFFMANN C, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes [J]. Science, 2011, 334(6052): 105-108.
- [22] AMADOU T, HOSNY M, LA SCOLA B, et al. “Lachnoclostridium bouchesdurhonense,” a new bacterial species isolated from human gut microbiota [J]. New Microbes New Infect, 2016, 12: 54-55. doi: 10.1016/j.nmni.2016.04.003.
- [23] KAO PHN, KLINE KA. Dr. Jekyll and Mr. Hide: How enterococcus faecalis subverts the host immune response to cause infection [J]. J Mol Biol, 2019, 431(16): 2932-2945.
- [24] QIAO Y, SUN J, DING YY, et al. Alterations of the gut microbiota in high-fat diet mice is strongly linked to oxidative stress [J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2013, 97

(4): 1689-1697.

[5] QIAO Y, SUN J, XIA SF, et al. Effects of resveratrol on gut microbiota and fat storage in a mouse model with high-fat-induced obesity [J]. Food Funct, 2014, 5(6): 1241-1249.

[6] MUNYAKA P, RABBI M, KHAFIPOUR E, et al. Acute dextran sulfate sodium (DSS)-induced colitis promotes gut microbial dysbiosis in mice [J]. J Basic Microbiol, 2016, 56(9): 986-998.

Intestinal Flora and its Metabolite Trimethylamine Oxide in Correlation with Cardiac Function in Atherosclerosis Model Mice

LYU Meijun, JIA Lianqun, LENG Xue, WANG Ying, DU Ying, LI Ning, WANG Qun, CHEN Si, CAO Yuan

Key Laboratory of Ministry of Education in Theory and Application of Visceral Manifestations of Chinese Medicine, Liaoning University of Traditional Chinese Medicine, Shenyang, 110032

ABSTRACT Objective To explore the characteristics of the intestinal flora of atherosclerosis model mice, the content of the metabolite trimethylamine oxide (TMAO), the cardiac function level, and the correlations among them.

Methods Ten ApoE^{-/-} mice were fed with high-fat diet for 12 weeks to establish the atherosclerosis model, and another 10 C57BL/6/J mice were set as the normal group. The small animal ultrasonic detector was used to assess the cardiac function including left ventricular ejection fraction (LVEF) and left ventricular fractional shortening (LVFS); automatic biochemical analyzer was used to detect the content of serum total cholesterol (TC), triglyceride (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C) and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C); Oil Red O staining was used to assess the lipid deposition of aorta; high-performance liquid chromatography-mass spectrometry (LC/MS) method was used to detect the plasma TMAO level; 16SrDNA high-throughput sequencing technology was used to analyze the characteristics of intestinal flora. The correlations among the dominant bacteria in the mice intestines, the TMAO level and the cardiac function in the model group were analyzed with Spearman correlation coefficient method.

Results Compared to the normal group, the model group had significantly lower levels of LVEF and LVFS, higher levels of serum TG, TC and LDL-C, and lower HDL-C level ($P < 0.05$). In the model group, the deposition of aorta lipid was obvious; the plasma TMAO level was significantly increased ($P < 0.05$); the abundance of Lachnospiraceae_NK4A136_group, Rosella, Lachnospiraceae, Enterobacter, and Eubacterium in the intestinal flora were significantly increased, while the abundance of Prevotella was significantly reduced ($P < 0.05$ or $P < 0.01$). The results of correlation analysis showed that the dominant bacteria genus Lachnospiraceae was positively correlated with the TMAO level, and the TMAO level was positively correlated with LVEF and LVFS ($P < 0.05$). **Conclusion** In mice model of atherosclerosis, the intestinal flora is disturbed and the metabolite TMAO increased, suggesting that the diversity of flora changes, the plasma TMAO level and the cardiac function seem to be correlated.

Keywords atherosclerosis; intestinal flora; trimethylamine oxide; cardiac function

(收稿日期: 2020-10-09; 修回日期: 2021-01-02)

编辑: 王利芬

欢迎邮购《中医杂志》过刊

2000、2001 年合订本, 每本 100 元, 2002、2003 年合订本每本 105 元, 2004 年合订本 115 元, 2005 年合订本 125 元, 2007—2010 年合订本每年 140 元。2011 (缺 5、6 期)—2013 年每册 9.80 元, 2014 (缺 21 期)—2017 年 (缺 3、5、15、18 期) 每册 15 元, 2018 年每册 20 元 (缺 5、7、9 期), 2020 年每册 20 元 (缺 7、8、9 期)。2011—2013 年合订本, 每年 4 本, 全年 280 元, 2014、2015、2016、2017 年合订本 (每年 4 本, 缺 2017 年上半年合订本), 全年 400 元。2018、2019、2020 年合订本 (4 本), 600 元。《中医杂志》2006—2008 年增刊每册 40 元。

以上免费邮寄, 如需挂号每件另加 3 元。

欲购者请汇款至北京市东直门内南小街 16 号, 收款人: 中医杂志社

或关注《中医杂志》官方微信 (zyzzgzh) 购买。邮编: 100700, 电话: (010) 64089195。