

桂枝汤调控免疫和肠道菌群抗动脉粥样硬化的作用

袁晓雯¹, 姜楠¹, 柏冬¹, 陈冰¹, 李玉梅¹, 曾辉^{2,3}, 马雅璠^{1*}

(1. 中国中医科学院中医基础理论研究所, 北京 100700; 2. 首都医科大学附属北京地坛医院传染病研究所, 北京 100015; 3. 新发突发传染病研究北京市重点实验室, 北京 100015)

[摘要] **目的:**观察桂枝汤对高脂饮食导致的载脂蛋白E基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠外周血单核细胞、肠道菌群和主动脉血管动脉粥样硬化(AS)斑块形成的影响。**方法:**40只12周龄雌性ApoE^{-/-}小鼠采用配对比较法随机分为普食组(ApoE^{-/-}+CD),高脂组(ApoE^{-/-}+WD),桂枝汤组(ApoE^{-/-}+WD+GZT, 7.83 g·kg⁻¹)和阿托伐他汀组(ApoE^{-/-}+WD+Atr, 3.33 mg·kg⁻¹),10只匹配的C57BL/6小鼠为野生普食组(C57BL/6+CD)。除普食组外,其余给予高脂饮食诱导AS模型。治疗组于高脂饮食同时分别给予口服灌胃桂枝汤和阿托伐他汀,正常组和模型组采用同时间、同体积双蒸水灌胃对照。干预4周,每组取5只小鼠,取眼球血,采用全自动生化分析仪检测血浆血脂水平、流式细胞仪检测外周血单核细胞及其亚型比例、表面受体Toll样受体4(TLR4)和CD36表达水平;取回肠内容物采用16S rRNA相对应的DNA序列(16S rDNA)测序检测小鼠肠道菌群。每组余下的5只小鼠干预12周后,取胸腹主动脉采用油红O染色检测主动脉血管斑块形成情况。**结果:**干预4周,与C57BL/6+CD组比较,ApoE^{-/-}+CD组血浆总胆固醇(TC)和低密度脂蛋白(LDL)水平升高($P<0.01$),ApoE^{-/-}+WD组血浆TC和LDL水平进一步升高($P<0.01$);ApoE^{-/-}+WD组外周血单核细胞及其炎症亚型Ly6C⁺比例升高,TLR4表达上升($P<0.05$);ApoE^{-/-}+WD组回肠菌群的厚壁菌门增加,疣微球菌门减少。与ApoE^{-/-}+WD组比较,ApoE^{-/-}+WD+GZT组血脂水平没有明显改变,但炎症亚型单核细胞Ly6C⁺比例降低,单核细胞表面受体TLR4和CD36表达降低($P<0.05$);回肠菌群的厚壁菌门比例减少,拟杆菌门和疣微球菌门增加。干预12周,ApoE^{-/-}+WD组主动脉血管AS斑块形成,ApoE^{-/-}+WD+GZT组AS斑块病变程度减轻。**结论:**桂枝汤可以改善高脂饮食饲喂ApoE^{-/-}小鼠的单核细胞免疫异常以及肠道菌群失衡,抑制AS斑块形成。

[关键词] 桂枝汤; 高脂血症/动脉粥样硬化; 肠道菌群; 免疫损伤

[中图分类号] R2-0;R22;R285.5;R289 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2021)04-0024-06

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20202402

[网络出版地址] <https://kns.cnki.net/kcms/detail/11.3495.R.20201126.1001.002.html>

[网络出版日期] 2020-11-26 13:50

Effect of Guizhitang on Atherosclerosis by Regulating Immune and Intestinal Flora

YUAN Xiao-wen¹, JIANG Nan¹, BAI Dong¹, CHEN Bing¹, LI Yu-mei¹, ZENG Hui^{2,3}, MA Ya-luan^{1*}

(1. Institute of Basic Theory, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China; 2. Institute of Infectious Disease, Beijing Ditan Hospital, Capital Medical University, Beijing 100015, China; 3. Beijing Key Laboratory of Emerging Infectious Diseases, Beijing 100015, China)

[Abstract] **Objective:** To observe the effect of Guizhitang (GZT) on peripheral blood monocytes, intestinal flora and AS plaque formation of ApoE^{-/-} mice induced by Western diet (WD). **Method:** In this study, 40 12-week-old homozygous female ApoE^{-/-} mice were randomly divided into chow diet (CD) group (ApoE^{-/-}+CD), WD group (ApoE^{-/-}+WD), GZT group (ApoE^{-/-}+WD+GZT, 7.83 g·kg⁻¹) and atorvastatin (Atr) group (ApoE^{-/-}+WD+Atr, 3.33 mg·kg⁻¹). And 10 matched C57BL/6 mice were set as wild CD control group (C57BL/6+CD). Except the CD group, the rest groups were given WD to induce models. Treatment groups were given

[收稿日期] 20200915(006)

[基金项目] 中国中医科学院自主选题项目(YZ-1702)

[第一作者] 袁晓雯,在读硕士,从事中西医结合基础研究,E-mail:yuanxiaowen2014@163.com

[通信作者] * 马雅璠,博士,研究员,从事中医药抗炎与免疫药理研究,Tel:010-64089027,E-mail:yajuanma@163.com

Guizhitang or atorvastatin orally in addition to WD, while ApoE^{-/-}+CD and ApoE^{-/-}+WD model groups were treated with the same volume of double steam water at the same time. After 4 weeks of intervention, 5 mice in each group were selected to collect the eyeball blood samples. The levels of plasma lipids were detected by automatic biochemical analyzer, and the proportion of peripheral blood mononuclear cells and its subtypes, and the expression levels of surface receptors toll like receptor 4 (TLR4) and CD36 were detected by flow cytometry, the intestinal flora of mice was detected by 16S rDNA sequencing. The remaining 5 mice in each group were intervened for 12 weeks, and the aorta was taken to detect the formation of aortic plaque by oil red O staining. **Result:** After intervention for 4 week, compared with C57BL/6+CD group, the levels of plasma total cholesterol (TC) and low-density lipoprotein (LDL) levels in ApoE^{-/-}+CD and ApoE^{-/-}+WD groups were increased ($P<0.01$). ApoE^{-/-}+WD group showed increase in the proportion of monocytes, their inflammatory subtypes Ly6C⁺, and TLR4 expression on monocyte surface in blood ($P<0.05$). ApoE^{-/-}+WD group induced the imbalance of intestinal flora, with increase of Firmicutes and decrease of Verrucomicrobia in ileum of ApoE^{-/-} mice. Compared with ApoE^{-/-}+WD group, there was no significant change in blood lipid level and monocyte proportion in ApoE^{-/-}+WD+GZT group, but with decrease in the proportion of Ly6C⁺, increase in the proportion of anti-inflammatory subtype Ly6C⁻, and decrease in the expression of TLR4 and CD36 on monocyte surface ($P<0.05$). ApoE^{-/-}+WD+GZT group showed decrease of Firmicutes and increase of Bacteroidetes and Verrucomicrobia in ileum of ApoE^{-/-} mice. After 12 weeks of intervention, ApoE^{-/-}+WD group showed increase in the number and area of aortic plaques in ApoE^{-/-} mice. ApoE^{-/-}+WD+GZT group showed decrease of the area of aortic AS plaques. **Conclusion:** GZT can reduce the immune damage and imbalance of intestinal flora caused by WD, then inhibit the formation of AS plaque.

[Key words] Guizhitang; hyperlipidemia/atherosclerosis; intestinal flora; immune damage

高脂血症(HP)及动脉粥样硬化(AS)是慢性的炎症性代谢疾病^[1]。单核/巨噬细胞造成的炎性免疫损伤,是AS发生和发展的重要病理生理基础^[1-2]。多种机制参与了HP激活单核/巨噬细胞炎症反应的过程^[2]。因此,近年有关治疗AS的药物靶点和机制的研究,不再仅仅局限于单纯的降脂作用。很多没有降脂作用,但能够抑制单核/巨噬细胞炎症反应的药物逐步进入基础和临床研究视野^[1-2]。

桂枝汤出自《伤寒论》,由桂枝、芍药、炙甘草、生姜和大枣5味药物组成,是祛风解肌,调和营卫的古方。临床常用于治疗感冒、流行性感、原因不明的低热、产后及病后的低热,以及消化道炎症^[3]。随着研究的深入,发现该方具有抑制活化的单核-巨噬细胞功能和炎症因子分泌的作用^[4-5]。已有研究发现,桂枝汤可降低高脂血症心肌缺血模型大鼠血脂水平、保护血管内皮、减轻氧化应激和减轻炎症损伤等多种机制,延缓模型大鼠AS的发生^[6-8]。

近期研究表明,高脂饮食可导致肠道菌群失衡,进而激活的天然免疫应答,是HP促进炎症反应的重要机制之一^[9]。本文应用高脂饮食饲喂载脂蛋白E基因敲除(ApoE^{-/-})小鼠这一国际标准的AS动物模型^[10],在证实桂枝汤对该模型AS治疗作用的

基础上,探讨桂枝汤对单核/巨噬细胞活化和肠道菌群的影响,拓宽桂枝汤的临床应用范围。

1 材料

1.1 动物 本研究选用雌性12周龄C57BL/6及ApoE^{-/-}小鼠,体质量(20±2)g,购自北京大学实验动物中心,动物合格证号SCXK(京)2016-0010,在北京大学实验动物中心SPF条件下饲养。动物实验符合中国中医科学院中医基础理论研究所实验动物福利伦理审查委员会标准。

1.2 药物与试剂 饮片由桂枝10g,芍药10g,炙甘草7g,生姜10g,大枣10g组成。药材均购自北京同仁堂药店,由北京中医药大学中药学院刘春生教授鉴定为正品。上述饮片按常规方法煎煮取汁,浓缩60mL,生药质量浓度为0.783g·mL⁻¹, -20℃分装保存。阿托伐他汀(20mg/片,美国辉瑞制药有限公司,批号S36972);总胆固醇(TC),甘油三酯(TG),低密度脂蛋白(LDL),高密度脂蛋白(HDL)试剂盒(四川Maccura公司,批号分别为CH0101152,CH0101151,CH0101162,CH0101161);油红O(美国Sigma-Aldrich公司,批号#SLBR6841V);抗小鼠抗体CD11b-PercpCy5.5(美国Invitrogen公司,批号45-0112-82);抗小鼠抗体Gr-1-APC,

Ly6C-FITC(美国BD Pharmingen公司,批号分别为553129,553104);抗小鼠抗体Toll样受体4(TLR4)-PE,CD36-PE抗体(美国eBioscience公司,批号分别为12-9041-80,12-0361-82);QIAampDNA Stool Mini Kit试剂盒(德国Qiagen公司,批号Qiagen51504);MiSeq Reagent Kit v2(美国Illumina公司,批号MS-103-1003);Q5超保真DNA聚合酶(美国New England Biolabs公司,批号#M0494X);Kapa文库定量试剂盒(瑞士Roche公司,批号KK4824)。

1.3 仪器 Beckman CX4型全自动生化分析仪(美国贝克曼·库尔特公司);FACS Callibur型流式细胞仪(美国BD公司);GENESYS 10S Vis型紫外可见分光光度计(美国Thermo公司);伯乐T100型梯度PCR仪(美国Bio-Rad公司);Illumina Miseq测序仪(美国Illumina公司)。

2 方法

2.1 动物分组及干预方法 实验动物分5组,每组10只小鼠。C57BL/6+普食(C57BL/6+CD)为正常组;ApoE^{-/-}小鼠采用配对比较法随机分为ApoE^{-/-}+普食组(ApoE^{-/-}+CD),ApoE^{-/-}+高脂组(ApoE^{-/-}+WD),ApoE^{-/-}+高脂+桂枝汤组(ApoE^{-/-}+WD+GZT),ApoE^{-/-}+高脂+阿托伐他汀组(ApoE^{-/-}+WD+Atr)。高脂饲料含78.85%基础饲料,0.15%胆固醇,21%脂肪^[10]。干预组小鼠根据体质量每天给予临床等效剂量(桂枝汤7.83 g·kg⁻¹,阿托伐他汀3.33 mg·kg⁻¹)。临床等效剂量按人与小鼠体表面积比值计算得出,即小鼠剂量为人剂量的9.1倍。其他小组采用等量纯净水灌胃。每周检测体质量变化,分别干预4周和12周。

2.2 检测指标及方法 干预4周的C57BL/6及ApoE^{-/-}小鼠,每组取5只,异戊烷吸入麻醉,小鼠摘眼球采EDTA抗凝血,离心(800×g,10 min)后取血浆,用于血脂检测;血细胞用于流式细胞仪检测;处死小鼠,取回肠内容物用于16S rDNA测序分析。

余下小鼠继续干预至12周,异戊烷吸入麻醉,取胸主动脉,用于油红O染色。

2.3 全自动生化分析仪检测血脂水平 小鼠的血浆采用过氧化酶法测定TC;脂肪酶/甘油磷酸酯氧化酶—过氧化物酶比色法测定TG;直接法测定LDL和HDL。

2.4 流式细胞仪检测外周血单核细胞 根据CD11b和Gr1表达,分出CD11b⁺Gr1⁺单核细胞群,根据Ly6C表达高低分为Ly6C⁺,Ly6C⁺和Ly6C⁻3个亚群。流式检测代表图见参考文献^[11]。

2.5 测序分析回肠内容物菌群 干预4周的C57BL/6及ApoE^{-/-}小鼠回肠内容物采用QIAamp DNA Stool Mini Kit试剂盒提取DNA;采用两步PCR法,构建小鼠肠道内容物16S rDNA测序文库;利用Illumina Miseq测序平台进行测序;测序结果采用QIIME软件,GreenGenes数据库,R(3.4.3)软件和Past 3.0软件进行分析和计算。

2.6 油红O染色检测血管组织AS斑块病理变化 干预12周的C57BL/6及ApoE^{-/-}小鼠,剥离胸腹主动脉,用4%多聚甲醛固定,20%蔗糖脱水,经油红O染色、分化后观察。

2.7 统计学分析 实验重复3次。本实验数据采用GraphPad Prism 6.0软件进行统计分析,各数据均以 $\bar{x}\pm s$ 表示,各组数据分别与野生普食组和ApoE^{-/-}高脂组两两比较,进行t检验;组间菌门丰度比较,进行Wilcoxon检验, $P<0.05$ 表示差异有统计学意义。

3 结果

3.1 对小鼠血浆血脂水平的影响 与C57BL/6+CD组比较,ApoE^{-/-}+CD组小鼠血脂TC和LDL水平显著升高,HDL显著降低($P<0.01$);4周高脂饮食导致ApoE^{-/-}小鼠的TC和LDL水平进一步增高($P<0.01$);ApoE^{-/-}+WD+GZT和ApoE^{-/-}+WD+Atr干预后小鼠TC,TG,LDL和HDL的水平差异无明显统计学意义。见表1。

表1 桂枝汤对小鼠血浆血脂水平的影响($\bar{x}\pm s,n=5$)

Table 1 Effect of Guizhitang (GZT) on blood lipid level of mice in each group ($\bar{x}\pm s,n=5$)

mmol·L⁻¹

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	TC	TG	LDL	HDL
C57BL/6+CD		1.96±0.15	0.84±0.14	0.16±0.03	0.61±0.11
ApoE ^{-/-} +CD		7.74±0.66 ^{2,4)}	0.86±0.09 ³⁾	0.84±0.16 ^{2,4)}	0.07±0.03 ²⁾
ApoE ^{-/-} +WD		17.46±3.29 ²⁾	0.70±0.12	2.49±0.44 ²⁾	0.06±0.06 ²⁾
ApoE ^{-/-} +WD+GZT	7 833.33	17.36±1.49	0.66±0.12	2.56±0.17	0.03±0.04
ApoE ^{-/-} +WD+Atr	3.33	15.95±1.48	0.66±0.15	2.30±0.30	0.08±0.08

注:与C57BL/6+CD组比较¹⁾ $P<0.05$,²⁾ $P<0.01$;与ApoE^{-/-}+WD组比较³⁾ $P<0.05$,⁴⁾ $P<0.01$ (表2~4同)。

3.2 对小鼠外周血单核细胞的影响

3.2.1 对小鼠外周血单核细胞比例及其表面受体TLR4和CD36表达水平的影响 与C57BL/6+CD组比较,ApoE^{-/-}+CD组小鼠外周血单核细胞比例及其表面受体TLR4和CD36表达差异无明显统计学意义。4周的高脂饮食显著增加ApoE^{-/-}小鼠外周血

单核细胞比例和受体TLR4表达($P<0.05$),ApoE^{-/-}+WD+GZT干预后小鼠单核细胞比例差异无明显统计学意义,但其表面受体TLR4和CD36表达明显降低($P<0.05$);ApoE^{-/-}+WD+Atr干预后小鼠单核细胞及其表面受体TLR4和CD36表达差异无明显统计学意义。见表2。

表2 桂枝汤对小鼠单核细胞比例及表面受体TLR4,CD36表达的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 2 Effect of GZT on ratio of monocyte and its receptor TLR4 and CD36 of mice ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	M/%	TLR4/MFI	CD36/MFI
C57BL/6+CD		2.89±0.86	181.17±18.25	18.63±5.54
ApoE ^{-/-} +CD		3.70±1.49 ³⁾	161.00±14.70 ⁴⁾	20.06±4.11
ApoE ^{-/-} +WD		7.68±3.01 ¹⁾	218.80±7.85 ¹⁾	15.38±3.87
ApoE ^{-/-} +WD+GZT	7 833.33	7.54±2.51	190.80±14.79 ³⁾	11.01±1.57 ³⁾
ApoE ^{-/-} +WD+Atr	3.33	8.15±0.65	230.17±58.63	13.75±5.26

3.2.2 对小鼠外周血单核细胞亚型比例的影响 与C57BL/6+CD组比较,ApoE^{-/-}+CD组小鼠外周血单核细胞亚型比例差异无明显统计学意义。与ApoE^{-/-}+CD组比较,4周的高脂饮食明显增加ApoE^{-/-}小鼠外周血单核细胞炎症亚型Ly6C⁺⁺比例,

降低抑炎亚型Ly6C⁻比例($P<0.05$),ApoE^{-/-}+WD+GZT干预后降低ApoE^{-/-}小鼠外周血单核细胞炎症亚型Ly6C⁺⁺比例,增加抑炎亚型Ly6C⁻比例($P<0.05$);ApoE^{-/-}+WD+Atr干预后小鼠单核细胞亚型差异无明显统计学意义。见表3。

表3 桂枝汤对小鼠单核细胞亚型比例的影响($\bar{x}\pm s, n=5$)

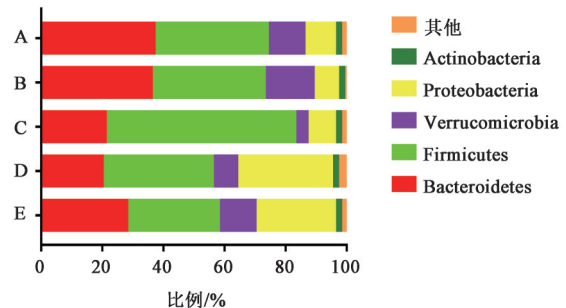
Table 3 Effect of GZT on ratio of monocyte subtype of mice ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Ly6C ⁺⁺	Ly6C ⁺	Ly6C ⁻
C57BL/6+CD		59.25±7.79	24.53±4.81	15.06±4.48
ApoE ^{-/-} +CD		50.42±16.60 ³⁾	28.70±11.58 ³⁾	19.32±5.26 ³⁾
ApoE ^{-/-} +WD		76.34±9.09 ¹⁾	14.13±6.16 ¹⁾	8.56±2.99 ¹⁾
ApoE ^{-/-} +WD+GZT	7 833.33	64.82±5.75 ³⁾	19.34±3.22	14.50±3.28 ³⁾
ApoE ^{-/-} +WD+Atr	3.33	75.03±6.20	13.58±3.31	10.22±3.99

3.3 对小鼠肠道菌群的影响

3.3.1 对小鼠肠道菌群的β多样性的影响 与C57BL/6+CD组比较,ApoE^{-/-}+CD组小鼠结肠厚壁菌门(Firmicutes)和变形菌门(Proteobacteria)增加,拟杆菌门(Bacteroidetes)和疣微球菌门(Verrucomicrobia)减少。高脂饮食进一步导致ApoE^{-/-}小鼠肠道Firmicutes增加,Verrucomicrobia和Proteobacteria比例降低。ApoE^{-/-}+WD+GZT和ApoE^{-/-}+WD+Atr均增加Bacteroidetes和Verrucomicrobia比例,降低结肠的Firmicutes。此外,ApoE^{-/-}+WD+GZT还降低Proteobacteria比例。见图1。

3.3.2 对小鼠肠道菌群Firmicutes/Bacteroidetes(F/B)的影响 与C57BL/6+CD组比较,ApoE^{-/-}+CD组小鼠肠道Firmicutes增加,Bacteroidetes减少,F/B增



A. ApoE^{-/-}+WD+Atr组; B. ApoE^{-/-}+WD+GZT组; C. ApoE^{-/-}+WD组; D. ApoE^{-/-}+CD组; E. C57BL/6+CD组

图1 桂枝汤对小鼠肠道菌群的门水平变化的影响

Fig. 1 Effect of GZT on phylum level of mouse intestinal flora

加。高脂饲喂ApoE^{-/-}小鼠Firmicutes进一步增加($P<0.05$),F/B进一步增加。ApoE^{-/-}+WD+GZT和ApoE^{-/-}+WD+Atr干预减少Firmicutes,增加Bacteroidetes,减少F/B。见表4。

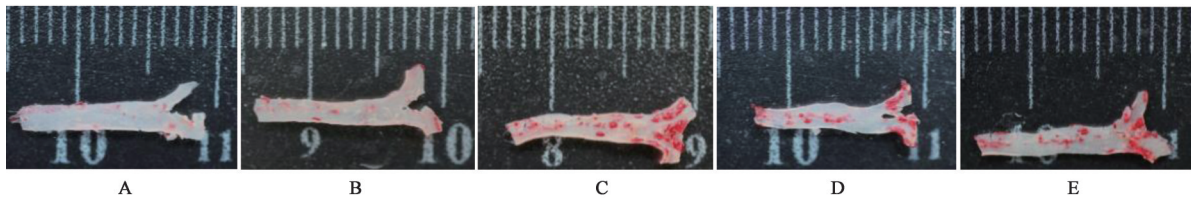
表 4 桂枝汤对小鼠肠道菌群 F/B 的影响 ($\bar{x}\pm s, n=5$)

Table 4 Effect of GZT on F/B in intestinal flora of mice ($\bar{x}\pm s, n=5$)

组别	剂量/mg·kg ⁻¹	Firmicutes/%	Bacteroidetes/%	F/B
C57BL/6+CD		29.58±14.17	28.43±11.28	1.33±1.03
ApoE ^{-/-} +CD		35.99±14.57	20.34±11.60	1.78±0.28
ApoE ^{-/-} +WD		62.41±23.66 ¹⁾	21.11±18.77	6.52±5.29
ApoE ^{-/-} +WD+GZT	7 833.33	36.86±18.60	35.62±16.63	0.71±0.83
ApoE ^{-/-} +WD+Atr	3.33	36.86±15.51	37.46±16.55	1.26±0.91

3.4 对小鼠主动脉 AS 斑块形成的影响 干预 12 周后, 主动脉血管油红 O 染色可见, 高脂导致 ApoE^{-/-}+WD 组小鼠主动脉血管斑块 AS 病变程度严

重; ApoE^{-/-}+WD+GZT 干预后明显减轻主动脉斑块 AS 病变程度; ApoE^{-/-}+WD+Atr 一定程度减轻主动脉斑块 AS 病变。见图 2。



A. C57BL/6+CD组; B. ApoE^{-/-}+CD组; C. ApoE^{-/-}+WD组; D. ApoE^{-/-}+WD+GZT组; E. ApoE^{-/-}+WD+Atr组

图 2 桂枝汤对小鼠主动脉血管 AS 斑块形成的影响(油红 O, ×50)

Fig. 2 Effect of GZT on atherosclerotic plaque formation of aorta in mice(油红 O, ×50)

4 讨论

AS 的发病机制复杂, 目前认为与脂质渗入、内皮细胞损伤、平滑肌细胞突变、氧化应激、炎症损伤和肠道菌群失衡有关。在既往研究桂枝汤延缓大鼠模型 AS 发生的基础上^[6-8], 采用高脂饮食干预 ApoE^{-/-}小鼠, 证实了桂枝汤抑制主动脉血管 AS 斑块的形成发现桂枝汤可以降低单核细胞 TLR4 表达, 降低 Ly6C^{hi} 比例, 其作用也不依赖于降脂作用。这一发现与既往在黄连解毒汤和活血方治疗高脂血症引发 AS 的研究结果一致^[12-13], 提示非降脂依赖性机制在治疗 AS 药物中的重要性。发现桂枝汤干预可改善高脂引发的 ApoE^{-/-}小鼠菌群失衡, 提示在保护血管内皮、减轻氧化应激和减轻炎症损伤等多种机制外, 桂枝汤还通过其他途径发挥效应。

ApoE^{-/-}小鼠是由于基因缺陷导致的血脂代谢异常, 本身可形成类似于人类 AS 斑块的病变, 高脂饮食可以进一步增高其血脂水平, 加剧 AS 斑块病变。正常情况下, 脂肪在肠道经过酶及胆汁酸的作用被消化, 水解为甘油、脂肪酸等吸收入血。由于高脂饮食富含大量的饱和脂肪酸, 引发肠道胆汁酸成分和含量的改变, 影响细菌生存的环境, 导致肠道菌群失衡^[14]。发现高脂饮食引发的肠道菌群失衡有 2 个特征: 一方面导致 ApoE^{-/-}小鼠肠道 Firmicutes 和 Proteobacteria 等条件致病菌丰度增加, Firmicutes/Bacteroidetes 升高^[15], 另一方面, Bacteroidetes 和

Verrucomicrobia 等益生菌减少或消失。有研究表明 Firmicutes 和 Proteobacteria 菌与肥胖、炎症和 AS 相关^[15-16]。而益生菌如 Bacteroidetes 和 Verrucomicrobia 与炎症和代谢紊乱负相关, 可防治肥胖、糖尿病和 AS^[15, 17]。

AS 是一种多种免疫细胞参与的慢性炎症反应^[1]。血脂异常激活内皮细胞和免疫细胞, 包括单核细胞, 中性粒细胞, 树突状细胞及 T 淋巴细胞等。活化的内皮细胞产生黏附分子、细胞因子等促炎因子, 促进激活的免疫细胞浸润到损伤的血管^[1]。单核细胞分化为巨噬细胞, 表达天然免疫识别受体 TLR4, 脂质受体 CD36 等, 吞噬脂质成为的泡沫细胞, 构成 AS 斑块的基础, 同时还分泌炎性细胞因子, 不仅引发炎症反应, 还通过募集活化其他免疫细胞, 放大炎症反应, 参与并促进 AS 斑块形成^[1]。既往研究证实高脂导致 ApoE^{-/-}小鼠免疫损伤和炎症反应, 例如炎症性单核细胞比例上升, 单核细胞表面 TLR4 和 CD36 的表达增高^[12-13, 18-19]。目前, 缺乏直接证据表明上述变化与肠道菌群变化直接相关。但有研究表明, 菌群失衡反过来也可影响机体胆固醇代谢和免疫, 加速高脂血症和 AS 的进展^[20]。已有大量研究证实肠道菌群失衡还可引发免疫损伤, 例如革兰氏阳性菌细胞壁肽聚糖增强免疫反应, 促进 AS 的形成^[20]。TLR4 不仅是前炎症感受体, 还是联系炎症和高脂血症的桥梁, 介导泡沫细

胞形成^[21]。革兰阴性杆菌释放出的脂多糖(LPS),通过TLR4激活免疫细胞,促进炎症反应^[9,22]。本研究发现桂枝汤能够降低炎症性单核细胞比例以及单核细胞表面TLR4和CD36的表达,降低这些变化引发机体固有免疫应答。也有文献表明,失衡的肠道菌群对不同的T细胞分化改变,导致免疫损伤^[20]。桂枝汤能否影响T细胞分化,尚需进一步研究。

桂枝汤组分复杂,其作用机制可能涉及多成分、多靶点。明确桂枝汤可以改善高脂饮食饲喂ApoE^{-/-}小鼠的单核细胞免疫异常以及肠道菌群失衡,抑制AS斑块形成。但是,这只是其中的一个方面,其他机制尚待进一步研究。本研究将桂枝汤与调节肠道菌群失衡、降低炎症反应,抑制AS发生发展联系起来,为拓宽辛温解表代表方桂枝汤的临床应用范围提供了实验依据。

[参考文献]

[1] BÄCK M, YURDAGUL J R A, TABAS I, et al. Inflammation and Its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities [J]. *Nat Rev Cardiol*, 2019, 16(7):389-406.

[2] GROH L, KEATING S T, JOOSTEN L A B, et al. Monocyte and macrophage immunometabolism in atherosclerosis [J]. *Semin Immunopathol*, 2018, 40(2):203-214.

[3] 陈晶波. 古方桂枝汤在临床的新用[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2018, 18(20):146, 166.

[4] 赵保胜, 刘洪斌, 马悦颖, 等. 桂枝汤含药血清对小鼠巨噬细胞Toll样受体3、4型及其下游信号转导通路元件的影响[J]. *中药药理与临床*, 2007, 23(3):1-4.

[5] 赵保胜, 霍海如, 李兰芳, 等. 桂枝汤对小鼠巨噬细胞株分泌炎症因子的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2006, 12(10):23-25.

[6] 王群, 贾连群, 郑思成, 等. 基于文献计量学的动脉粥样硬化中西医研究进展可视化分析[J]. *世界中医药*, 2019, 14(6):2166-2176.

[7] 焦宏, 孙琳, 陈彦静, 等. 桂枝汤对高脂血症心肌缺血大鼠血管活性物质的影响[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2011, 19(9):727-730.

[8] 焦宏, 马建伟, 陈彦静, 等. 桂枝汤对高脂血症心肌缺血大鼠炎性细胞因子的影响[J]. *中国中药杂志*, 2012, 37(11):1634-1637.

[9] MARC S, ROBERT C. Dietary lipids, gut microbiota and lipid metabolism [J]. *Rev Endocr Metab Disord*, 2019, 20(4):461-472.

[10] GETZ G S, REARDON C A. Animal models of

atherosclerosis [J]. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*, 2012, 32(5):1104-1115.

[11] 袁晓雯, 乔艳雪, 李蕊, 等. 祛痰方和祛痰化痰方调控单核-巨噬细胞分化抗动脉粥样硬化的作用研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2016, 22(12):1607-1611.

[12] 马雅鑫, 王蓓蓓, 韩俊燕, 等. 黄连解毒汤对高脂饮食ApoE^{-/-}小鼠全身和主动脉血管局部免疫反应影响的研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2013, 33(11):1520-1525.

[13] 姜楠, 袁晓雯, 薛欣, 等. 活血方和阳和汤抗ApoE^{-/-}小鼠动脉粥样硬化并发非酒精性脂肪肝的比较研究[J]. *中国中医基础医学杂志*, 2017, 23(12):1705-1709.

[14] BO T, SHAO S, WU D, et al. Relative variations of gut microbiota in disordered cholesterol metabolism caused by high-cholesterol diet and host genetics [J]. *Microbiologyopen*, 2017, doi:10.1002/mbo3.491.

[15] LYU M, WANG Y, FAN G, et al. Balancing herbal medicine and functional food for prevention and treatment of cardiometabolic diseases through modulating gut microbiota [J]. *Front Microbiol*, 2017, doi:10.3389/fmicb.2017.02146.

[16] SHIN N, WHON T W, BAE J. Proteobacteria: microbial signature of dysbiosis in gut microbiota [J]. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(9):496-503.

[17] YANG J Y, LEE Y S, KIM Y, et al. Gut commensal *Bacteroides acidifaciens* prevents obesity and improves insulin sensitivity in mice [J]. *Mucosal Immunol*, 2017, 10(1):104-116.

[18] 李彤, 韩俊燕, 王蓓蓓, 等. 黄连解毒汤调控单核-巨噬细胞及泡沫细胞分化的实验研究[J]. *中国中西医结合杂志*, 2014, 34(9):1096-1102.

[19] GROH L, KEATING S T, JOOSTEN L A B, et al. Monocyte and macrophage immunometabolism in atherosclerosis [J]. *Semin Immunopathol*, 2018, 40(2):203-214.

[20] 姜楠, 孙慧娟, 张媛媛, 等. 肠道菌群影响动脉粥样硬化免疫机制研究进展[J]. *中国动脉硬化杂志*, 2018, 26(5):531-535.

[21] POZNYAK A V, WU W, MELNICHENKO A A, et al. Signaling pathways and key genes involved in regulation of foam cell formation in atherosclerosis [J]. *Cells*, 2020, doi:10.3390/cells9030584.

[22] CHISTIYAKOV D A, BOBRYSHV Y V, KOZAROV E, et al. Role of gut microbiota in the modulation of atherosclerosis-associated immune response [J]. *Front Microbiol*, 2015, doi:10.3389/fmicb.2015.00671.

[责任编辑 周冰冰]