

菊粉对 $ApoE^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化症的保护作用

王丽娟^{1,2}, 李一唯³, 杨立波^{1,4,5}, 严宁^{4,5}, 王浩³, 贾绍斌^{4,5*}

(1. 宁夏医科大学临床医学院, 宁夏银川 750004) (2. 银川市第二人民医院心内科, 宁夏银川 750011)
(3. 宁夏医科大学基础医学院, 宁夏银川 750004) (4. 宁夏医科大学总医院心脏中心, 宁夏银川 750081)
(5. 国家卫生健康委员会代谢性心血管疾病研究重点实验室, 宁夏医科大学, 宁夏银川 750004)

摘要: 该研究旨在评价菊粉 (INU) 干预动脉粥样硬化症 (AS) 的作用及可能机制。8 周龄雄性 $ApoE^{-/-}$ 小鼠随机分为 3 组: 对照组 (CON) 给予正常饮食, AS 组 (AS) 采用高脂饮食, INU 干预组 (AS+INU) 在 AS 造模基础上采用 INU 口服干预。干预 12 周后, 采用病理切片油红 O、马松和 HE 染色评价 INU 干预 AS 的效果, 16S rRNA 测序分析肠道菌群, 鲎试剂法检测血浆脂多糖 (LPS), 流式多重蛋白定量技术 (CBA) 检测炎症因子, 气质联用 (GC-MS) 检测肠道短链脂肪酸 (SCFAs)。结果显示, INU 干预缓解了 AS 脂质斑块沉积、纤维化及病理损害; 血浆总胆固醇 (TC)、甘油三酯 (TG)、低密度脂蛋白 (LDL) 显著降低至 14.04 mmol/L、0.35 mmol/L、2.31 mmol/L (p 均 <0.05); *Alistipes*、*Intestinimonas*、*Bilophila*、*Oscillibacter*、*Negativibacillus* 相对丰度显著减少至 1.09×10^{-3} 、 3.46×10^{-4} 、 1.86×10^{-4} 、 1.56×10^{-4} 、 3.72×10^{-4} (p 均 <0.05), *Faecalibaculum* 显著增加至 0.28 ($p < 0.05$); SCFAs 和血浆 LPS 显著改善; 主动脉根部组织和血浆肿瘤坏死因子 (TNF)- α 、白细胞介素 (IL)-1 β 、IL-6、IL-17A 显著降低至 27.32 和 6.59 pg/mL、19.15 和 4.60 pg/mL、49.81 和 8.57 pg/mL、16.70 和 3.57 pg/mL ($p < 0.05$)。该研究表明膳食 INU 通过调节肠道菌群和抑制炎症改善 AS。

关键词: 菊粉; 动脉粥样硬化症; 肠道菌群; 脂多糖; 炎症; 短链脂肪酸

文章编号: 1673-9078(2021)10-7-18

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2021.10.0180

Protective Effects of Inulin on Atherosclerosis in $ApoE^{-/-}$ Mice

WANG Li-juan^{1,2}, LI Yi-wei³, YANG Li-bo^{1,4,5}, YAN Ning^{4,5}, WANG Hao³, JIA Shao-bin^{4,5*}

(1. Clinical Medical College, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

(2. Department of Cardiovascular Diseases, Yinchuan Second People's Hospital, Yinchuan 750011, China)

(3. School of Basic Medical Sciences, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China) (4. Heart Centre, General Hospital of Ningxia Medical University, Yinchuan 750081, China) (5. Key Laboratory of Metabolic Cardiovascular

Diseases of National Health Commission, Ningxia Medical University, Yinchuan 750004, China)

Abstract: In this study, the effects and possible mechanism of inulin (INU) on atherosclerosis (AS) were investigated. Eight-week male $ApoE^{-/-}$ mice were randomly divided into control group (CON), atherosclerosis model group (AS) and INU treatment group (AS+INU), in which CON group fed with a standard chow diet, AS group fed with a high-fat diet, AS+INU group fed with dietary INU based on AS model. After 12 weeks of treatments, oil red O, Masson's trichrome and HE stainings were used to evaluate the effects of INU on AS, 16S rRNA sequencing analysis was used to determine the community of gut microbiota. Limulus amebocyte lysate method was adopted to measure lipopolysaccharide (LPS) levels in plasma. Flow cytometry multiple proteins cytometric bead array (CBA) was used to measure the inflammatory cytokines. Fecal short-chain fatty acids (SCFAs) were determined using gas chromatography-mass spectrometer (GC-MS) method. The results showed that the lipid acceleration, fibrosis and vascular lesion of aorta plaque were attenuated with dietary INU intervention. Total cholesterol (TC) Triglyceride

引文格式:

王丽娟, 李一唯, 杨立波, 等. 菊粉对 $ApoE^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化症的保护作用[J]. 现代食品科技, 2021, 37(10): 7-18

WANG Li-juan, LI Yi-wei, Yang Li-bo, et al. Protective effects of inulin on atherosclerosis in $ApoE^{-/-}$ mice [J]. Modern Food Science and Technology, 2021, 37(10): 7-18

收稿日期: 2021-02-21

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (81602713); 宁夏回族自治区重点研发计划重点项目 (2018BE02006); 宁夏医科大学心血管疾病优势学科群项目 (2001210501); 宁夏高等学校一流学科建设 (宁夏医科大学基础医学) 资助项目 (NXYLXK2017B07)

作者简介: 王丽娟 (1981-), 女, 在读硕士研究生, 主治医师, 研究方向: 心血管疾病的基础与临床, E-mail: 1741568156@qq.com

通讯作者: 贾绍斌 (1962-), 男, 博士, 教授, 主任医师, 研究方向: 心血管疾病的临床与基础, E-mail: jsbxn@163.com

(TG) and low density lipoprotein (LDL) in plasma with INU treatment were separately reduced to 14.04 mmol/L, 0.35 mmol/L, 2.31 mmol/L, respectively ($p < 0.05$). The gut microbiota was modulated in long-term INU administration by significantly reducing *Alistipes* (1.09×10^{-3}), *Intestinimonas* (3.46×10^{-4}), *Bilophila* (1.86×10^{-4}), *Oscillibacter* (1.56×10^{-4}), *Negativibacillus* (3.72×10^{-4}) ($p < 0.05$), as well as intriguingly increasing the relative abundance of *Faecalibaculum* (0.28) ($p < 0.05$). Moreover, gut microbiota-derived SCFAs and plasma translocated LPS were improved with INU treatment. The pro-inflammatory tumor necrosis factor (TNF)- α , interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-17A in plasma and aorta root tissue were notably decreased to 27.32 and 6.59 pg/mL, 19.15 and 4.60 pg/mL, 49.81 and 8.57 pg/mL, 16.70 and 3.57 pg/mL, respectively, in AS with long-term dietary INU intervention ($p < 0.05$). Collectively, this study highlights that INU ameliorates AS via modulating gut microbiota and anti-inflammation.

Key words: inulin; atherosclerosis; gut microbiota; lipopolysaccharide; inflammation; short-chain fatty acids

动脉粥样硬化 (Atherosclerosis, AS) 是一种与脂质代谢障碍有关的、主要累及大、中动脉的全身性疾病, 病变特征是血液中脂质在动脉内膜沉积并引起内膜发生坏死、斑块形成、纤维化病理损害, 伴有显著升高的血浆总胆固醇 (Total cholesterol, TC)、甘油三酯 (Triglyceride, TG)、低密度脂蛋白 (Low density lipoprotein, LDL) 含量。AS 是冠心病、脑梗死及外周血管病的主要病变基础之一^[1]。心血管疾病是我国目前死亡率最高的疾病, 占居民死亡构成的 40% 以上, 并且仍处于上升阶段, 迫切需要丰富安全、有效的干预策略与手段^[2]。

近年来, 越来越多的研究证实肠道菌群的变化与 AS 疾病的发生发展密切相关^[3,4]。正常生理情况下, 宿主肠道内定植着大量的肠道菌群包括细菌、病毒、原虫、蠕虫和真菌, 这些肠道菌群作为一个“特殊器官”, 在宿主生命过程中发挥着重要的作用^[5]。但 AS 疾病中肠道菌群发生显著改变。采用 16S rRNA 测序分析动脉粥样硬化症患者与健康志愿者肠道菌群发现存在显著差异, 如在属水平上, *Collinsella* 菌在动脉硬化患者肠道内显著增多, 与此同时, *Roseburia*、*Eubacterium* 与健康者相比显著减少^[6,7]。另一项研究表明, 肠道菌群中拟杆菌、梭菌属、乳杆菌与动脉粥样硬化以及冠心病密切相关^[8], 但是确切的相关机制尚不清楚。肠道菌群中乳酸杆菌 (*Lactobacillus plantarum*) 能够缓解部分患者疾病, 并且增加患者肠道菌群多样性, 降低炎症水平与胆固醇水平^[9]。

慢性炎症已被证实参与了包括 AS 在内的多种慢性病的发生发展^[10]。动脉粥样硬化病理改变过程中, 多种促炎细胞因子如肿瘤坏死因子 (Tumor necrosis factor, TNF) - α 、白细胞介素 (Interleukin, IL) -1 β 、IL-6 等显著增加^[11]。ApoE 存在于除了 LDL 以外的所有脂蛋白中, 主要通过 LDL 受体 (LDLR) 途径和非 LDLR 途径参与血浆 TC、TG 的转运与清除^[12]。在 *ApoE*^{-/-} 基因敲除小鼠中证实, 采用 *Tlr4* 和/或 *Myd88* 基因敲除可以减少炎症因子的产生, 进而减少主动脉

斑块的形成^[13,14]。与此相对应地, 临床研究表明 AS 损害部位的炎症也明显加重^[15,16]。

菊粉 (Inulin, INU) 作为一种植物来源的膳食纤维, 其本身不会被机体所吸收, 但作为重要的益生元已在多种慢性代谢性疾病中被证实具有改善作用, 如酒精性肝病^[17]、非酒精性脂肪性肝病^[18]、多囊卵巢综合征^[19]、II 型糖尿病^[20]、结肠炎^[21]和结肠癌^[22]。但是 INU 干预对于 AS 的研究报道不多且不一致, 本研究旨在确定菊粉干预动脉粥样硬化 *ApoE*^{-/-} 小鼠的作用及对于炎症和肠道菌群的影响, 为心血管疾病的防治提供实验数据与思路。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 主要仪器设备

AU400 全自动生化分析仪, 奥林巴斯; Multiskan GO 全自动酶标仪、TRACE 1310-ISQ LT 气-质联用仪, 赛默飞; DMI3000 倒置显微镜及数码摄像系统, 莱卡; AccuriTM C6 流式细胞仪, BD。

1.1.2 试剂

鲎试剂检测试剂盒, 厦门鲎试剂; 油红 O 染色、马松染色和 HE 染色试剂, 北京索莱宝; 流式多重蛋白定量 (Cytometric bead array, CBA) 小鼠炎症因子检测试剂盒, BD; 短链脂肪酸 (Short-chain fatty acids, SCFAs) 标准品, Sigma-aldrich; PCR 引物, 上海生工; PCR 反应采用 Phusion[®] High-Fidelity PCR Master Mix 试剂盒, New England Biolabs。

1.1.3 实验动物、饲料及菊粉

45 只 8 周龄雄性 *ApoE*^{-/-} 小鼠 (20~22 g), 购自北京维通利华实验动物有限公司, 其许可证号为 scxk2016-0006, 在宁夏医科大学实验动物中心无特定病原体 (Specific pathogen free, SPF) 环境下饲养。所有实验动物研究均通过了宁夏医科大学伦理委员会伦理审核 (2016-106)。菊粉购自中国丰宁平安高科实

业有限公司, 纯度为 91%。高脂饮食 (High fat diet, HFD) 饲料 (60%脂肪, 20%碳水化合物, 20%蛋白质, 含 1.2%胆固醇, 饲料编号 TP28520) 购自南通特洛菲饲料科技有限公司。

1.2 实验设计

参照文献报道方法采用高脂 *ApoE*^{-/-}小鼠建立 AS 模型^[23]。将小鼠随机分为对照组 (CON)、AS 模型组 (AS) 和 INU 干预 AS 组 (AS+INU)。其中, CON 组小鼠给予正常饮食, AS 组给予 HFD 饮食, AS+INU 组在 AS 的基础上饮水中加 INU (10 g/kg 体重)。每周监测体重 (body weight, BW), 每日记录食物摄入量。干预 12 周后, 分别采集新鲜小鼠粪便 (5 个 (只) / 组) 用于后续肠道菌群测序及 SCFA 分析。随后处死小鼠, 收集血浆和主动脉根部组织用于后续实验。

1.3 检测指标及实验方法

1.3.1 主动脉根部病理学观察

主动脉根部组织用 4%多聚甲醛固定, 常规石蜡包埋切片后, 分别采用油红 O 染色、马松染色、苏木素-伊红 (Hematoxylin-eosin, HE) 染色, 经光学显微镜观察各组病理改变并采用 Image J 软件进行定量分析。

1.3.2 血脂指标的检测

全自动生化检测仪分析血浆中 TC、TG、LDL 和高密度脂蛋白 (High density lipoprotein, HDL) 的变化。

1.3.3 16S rRNA 肠道菌群测序与分析

各组分别无菌收集新鲜的小鼠粪便标本各 5 个, 立即保存在 -80 °C 冰箱。待各组收齐后, 采用以往报道过的十六烷基三甲基溴化铵 (Cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) 方法^[24]提取粪便样本中 DNA。经 1%琼脂糖电泳鉴定后, 采用细菌 V3-V4 区引物 (341F 5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3' 和 806R 5'-GGACTACNNGGTATCTAAT-3') 进行 PCR 扩增。建库后送北京诺禾致源公司采用 Illumina HiSeq 2500 测序平台测序及分析。

1.3.4 鲎试剂法检测血浆脂多糖 (Lipopolysaccharide, LPS) 水平

采用鲎试剂盒说明书检测各组血浆 LPS 水平。

1.3.5 微量样本多指标流式蛋白定量技术 (CBA) 检测炎症因子

按照小鼠炎症因子 CBA 检测试剂盒的说明书要求, 首先准备好标准品、混合微球及待测样本 (血浆

和主动脉根部组织研磨上清液)。其次, 每个流式管中分别加入混合微球 50 μ L。随后标准品流式管和待检测样品管中分别加入不同浓度标准品和待测样品 50 μ L, 涡旋混匀。接着流式管中分别加入 PE 标记的检测试剂 50 μ L, 混匀后室温避光孵育 2 h。每管分别加入细胞染色缓冲液 1 mL 并混匀, 300 \times g 离心 5 min, 弃上清后重复洗涤 1 次。最后, 所有流式管分别加入细胞染色缓冲液 300 μ L 重悬微球, 立即上机检测样本并采用 FACP 软件分析炎症因子含量。

1.3.6 气质联用 (Gas chromatography-mass spectrometer, GC-MS) 检测 SCFAs

采用美国 Thermo 公司的 TRACE 1310-ISQ LT 气质联用仪。色谱柱为 Agilent HP-INNOWAX 毛细管柱 (30 m \times 0.25 mm \times 0.25 μ m)。分流进样, 进样量 1 μ L, 分流比为 10:1。进样口温度 250 °C, 离子源温度 230 °C, 传输线温度 250 °C, 四极杆温度 150 °C。程序升温起始温度 90 °C, 然后以 10 °C/min 升温至 120 °C, 再以 5 °C/min 升温至 150 °C, 最后以 25 °C/min 升温至 250 °C 维持 2 min。载气为氦气, 载气流速 1.0 mL/min。质谱 (MS) 条件: 电子轰击电离 (EI) 源, SIM 扫描方式, 电子能量 70 eV。标准品曲线的制作: 称取适量的乙酸、丙酸、丁酸、异丁酸、戊酸、异戊酸、己酸标准品, 用乙醚配分别配制成 0.01、0.1、0.5、1、5、10、25、50、100、250、500 μ g/mL 十一个标准浓度梯度。对标准液的浓度系列分别进行 GC-MS 检测, 以标准品的浓度 (X) 为横坐标, 标准品与内标的峰面积比值 (Y) 为纵坐标进行线性回归分析, 绘制标准曲线。同时进行精密度、重复性、回收率、定量限的考察。

1.4 统计学方法

所有数据经 SPSS 20.0 统计软件和 Graphpad Prism 5 软件进行数据统计和图表制作。数据采用均数 \pm 标准差 (X \pm s) 表示。三组之间比较采用方差分析。结果符合正态分布, 则两两比较采用 *t* 检验进行差异性分析。*p*<0.05 表示差异有统计学意义。

2 结果与讨论

2.1 菊粉干预显著改善动脉粥样硬化小鼠血管病变

从图 1a、b 中的大体油红 O 和显微镜下油红 O 染色结果中可以发现, 与 CON 对照组大体油红 O 及显微镜下油红 O 染色百分比 3.66%、1.19%相比, AS 模

型组分别为 50.39%、8.76%，差异均有统计学意义 ($p<0.001$)，表明 AS 疾病发生发展中动脉血管中脂质显著堆积。而在 INU 干预后分别减少至 40.54%、6.51%，差异均有统计学意义 ($p<0.01$)，证实 INU 的长期干预能显著减缓 AS 血管斑块的脂质沉积，有助于改善疾病。马松染色结果表明，AS 组动脉血管纤维化水平 72.06%与 CON 组的 2.57%相比显著加重 ($p<0.001$ ，图 1a、d)；而 INU 能够改善血管纤维化水平至 57.18%，差异有统计学差异 ($p<0.01$ ，图 1a、d)。进一步通过常规病理 HE 染色表明，AS 疾病组的动脉血管病理损害较为严重，而其可以被 INU 干预后部分逆转。

这些病理检测结果均提示，膳食 INU 在当前的实验条件下能够显著改善动脉粥样硬化的病理损害。以往研究中，Rault-Nania 等^[25]亦发现膳食纤维能够显著改善 AS 疾病的发生。但是，另一个研究团队发现膳食纤维不能够改善 AS^[26,27]。通过分析上述这两个研究结果矛盾的原因，发现可能是由于采用的动物模型不一致：前者采用的是 *ApoE*^{-/-} 小鼠，但是并未给予高脂高胆固醇饮食；而后者尽管给予了高脂高胆固醇饮食诱导 AS，但不是采用 *ApoE*^{-/-} 小鼠，而是采用其实验室制备一种模型高胆固醇血症的 *APOE**3-Leiden.CETP 小鼠。基于此，试图采用更为广泛的 HFD 饮食诱导 *ApoE*^{-/-} 小鼠制备 AS 模型，进一步确定 INU 对于 AS 的作用，而结果表明 INU 能够有效改善 AS 疾病的发生发展，这为膳食纤维防治临床 AS 提供动物实验依据。此结果与以往的 INU 能够改善多种慢性代谢性疾病如 II 型糖尿病^[20]、非酒精性脂肪肝病^[18]、酒精性肝病^[17,28]、多囊卵巢综合征^[18]等的结果相一致，证实了 INU 的可靠性。由于 INU 属于植物来源的低聚果糖，作为一种益生元能够有效改善肠道菌群但不会被机体所吸收，为 AS 的防治提供了安全、廉价而有效的选择。

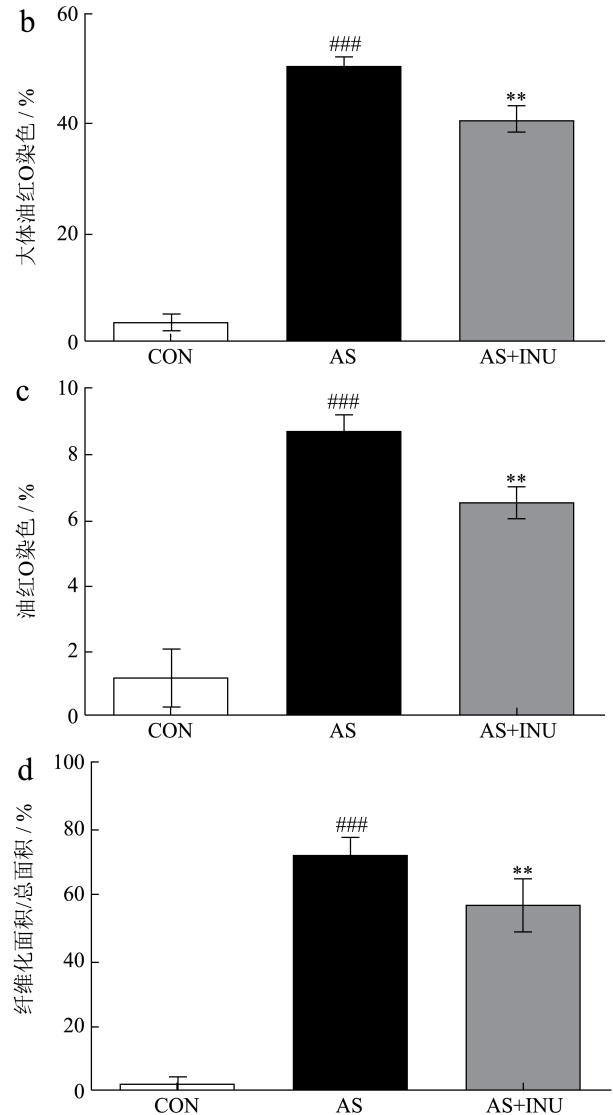
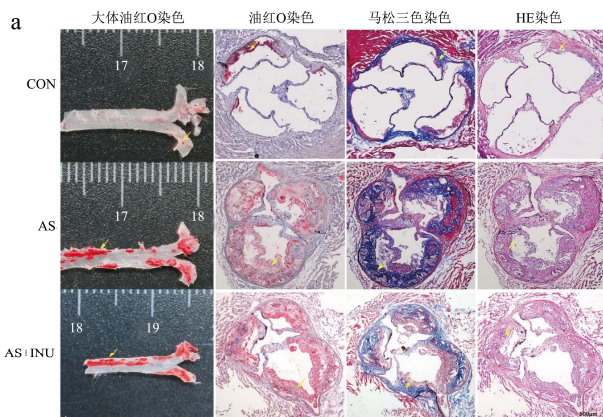


图 1 主动脉根部组织切片染色检测 INU 干预 AS 的效果

Fig.1 Detection of the effects of INU intervention on AS by tissue section staining of aorta root

注：显微镜下放大倍数为×40 倍；箭头显示病变部位；### $p<0.001$ ，** $p<0.01$ 。

2.2 菊粉膳食干预逆转部分 AS 常规指标

进一步检测了不同组之间的基础指标的变化 (图 2)。其中，各组体重在动物实验开始时无差异 (图 2a)，而在干预结束时，与对照组 BW 26.43 g 相比，AS 组的 BW 增加至 32.99 g，差异有统计学意义 ($p<0.05$)，这可能是由于对照组只给予了正常饮食，而 AS 组小鼠给予了高脂高胆固醇饮食。但 INU 干预 3 个月后 BW 为 32.02 g，与 AS 相比无显著差异 ($p>0.05$)，说明膳食纤维并不是通过改变体重而改善 AS 疾病。同样，发现 CON 组、AS 组和 AS+INU 组的平均食物摄入量分别为 34.60 g、34.06 g、35.48 g，差异无统计学

意义 ($p>0.05$, 图 2b), 提示 INU 对 AS 的改善作用与饮食摄入量无关。以往的研究表明, INU 能够增加不同阶段糖尿病的体重并分析可能与改善肠道能量吸收有关^[20], 但是在非酒精性脂肪性肝病的研究中发现体重在 INU 干预后是显著下降的^[18]。本研究中并没有发现显著改变的体重, 这可能是由于 INU 对于不同慢性病体重的影响是不一样的。有研究表明 INU 不会对饮食摄入量造成显著影响, 这与本研究的结果是一致的^[18,20]。

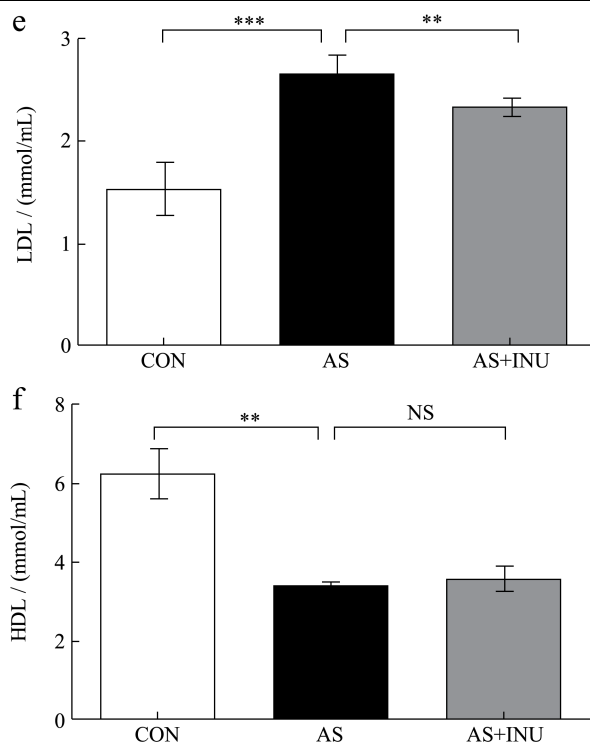
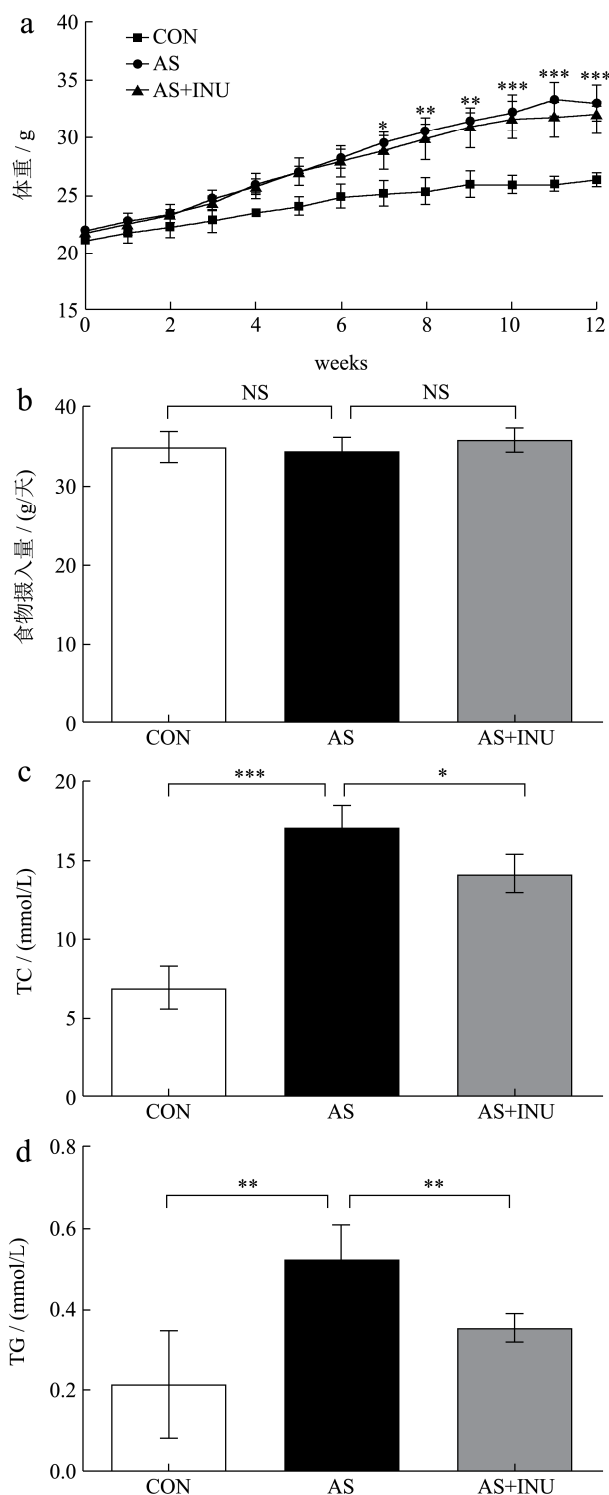


图 2 INU 长期干预对于 AS 相关指标的影响

Fig.2 Impacts of INU long-term intervention on parameters of AS

注: * $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, NS: no significance, 无统计学差异。

进一步分析动脉粥样硬化相关的脂质指标发现 (图 2c~f), 与 CON 对照组血浆 TC 6.81 mmol/L、TG 0.21 mmol/L、LDL 1.52 mmol/mL、HDL 6.22 mmol/mL 相比, AS 疾病组血浆 TC、TG、LDL 分别升高至 17.01 mmol/L、0.51 mmol/L、2.65 mmol/mL, 而 HDL 下降至 3.36 mmol/mL, 差异均有统计学意义 ($p<0.05$)。而 INU 干预 3 个月后发现能够显著降低 AS 疾病血浆 TC、TG 及 LDL 至 14.04 mmol/L、0.35 mmol/L、2.31 mmol/mL, 差异均有统计学意义 ($p<0.05$), 但 HDL 3.48 mmol/mL 无影响, 提示膳食纤维的长期摄入不仅能够改善 AS 的病理损害, 还能显著逆转 AS 的脂质异常。以往研究亦表明 INU 及其多种聚合物都能显著改善 AS 的脂质代谢^[29]。研究证实膳食纤维可以改善其他多种慢性代谢性疾病的脂质代谢紊乱^[17-20], 其可能机制在于改善肠道菌群及其代谢产物, 进而由后者发挥血脂调控作用^[30]。

2.3 菊粉膳食干预显著改变肠道菌群组成

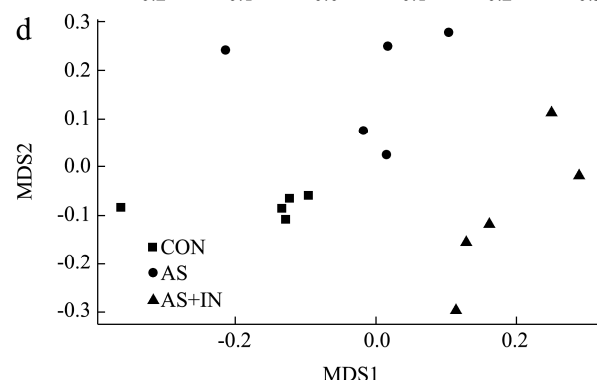
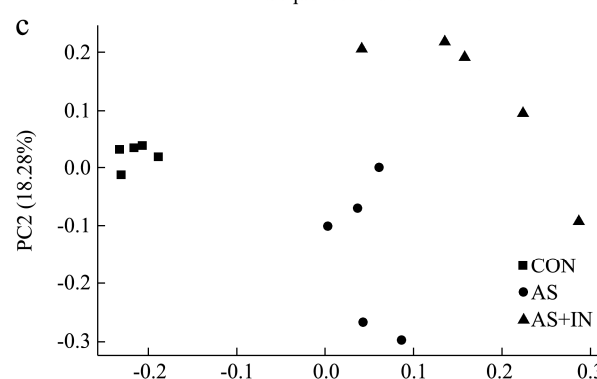
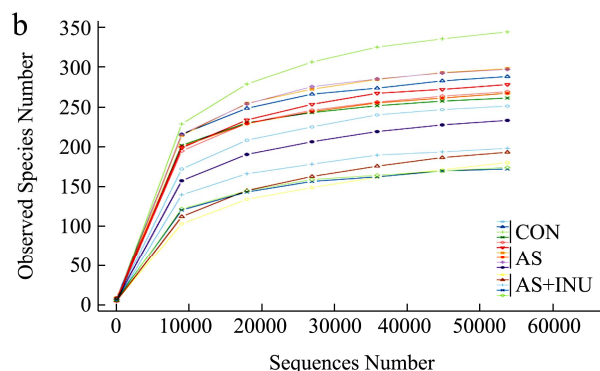
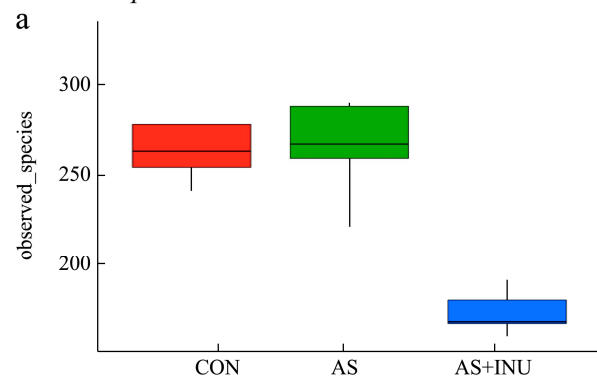
INU 作为一种重要的益生元, 被广泛报具有显著调节肠道菌群失调作用, 为此进一步检测了菊粉干预对 AS 疾病肠道菌群的影响。本研究各组小鼠粪便 (5 只/组) 采用 16S rRNA 肠道菌群测序, 其原始测序数

据已上传到 NCBI 公共序列读取数据库, 登记号为 PRJNA624814。如图 3a 和 3b 所示, 能够发现在 α 多样性上 CON 组与 AS 疾病组有差异, 表明疾病组小鼠肠道菌群多样性发生了改变。而 α 多样性上在 AS 组和 AS+INU 组之间没有差异, 提示 INU 并没有对 AS 疾病的菌群种类的丰度产生显著影响。通过主坐标分析 (Principal Co-ordinates Analysis, PCoA) (图 3c) 与非度量多维尺度分析 (Non-metric multi-dimensional scaling, NMDS) (图 3d) 的结果发现, 各组样本位点显著分开, 提示三组的 β 多样性具有显著差别, 表明 AS 疾病肠道菌群总体组成上发生了显著改变, 而其可以通过 INU 长期干预而显著调节。韦恩图也提示三组共有 240 种细菌, 而 CON 对照组具有更多的特有的菌的种类 (129 种), 与此同时 AS 疾病组仅具有特有的 14 种, 而在膳食纤维干预后其特有的增加到 67 种 (图 3g)。

进一步分析各组之间的差异菌, 发现在门水平上与 CON 组菌厚壁菌门 (Firmicutes)、拟杆菌门 (Bacteroides) 和变形杆菌门 (Proteobacteria) 相对丰度 0.26、0.69、 2.55×10^{-3} 相比 (图 3e、3h), AS 疾病的主要组成菌厚壁菌门和变形杆菌门的相对丰度均显著增加至 0.78、0.03, 而拟杆菌门却减少至 7.93×10^{-2} , 差异均有统计学意义 ($p < 0.001$, $p < 0.001$, $p = 0.001$); 与此相对应的是, 厚壁菌门/拟杆菌门 (Firmicutes/Bacteroides, F/B) 的比值从 CON 的 0.38 显著增加至 AS 的 9.84 ($p < 0.001$, 图 3i)。而 INU 干预后拟杆菌门为 8.28×10^{-2} , 与 AS 相比具有升高趋势, 而厚壁菌门为 0.64, 与 AS 相比呈现下调趋势, 这两种菌在两组间均无统计学差异 ($p > 0.05$); 但有趣的是, INU 干预组的 F/B 比值显著下降至 7.73, 差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。

在属水平上, 较之 CON 组的 *Alistipes*、*Muribaculum*、*Candidatus_Saccharimonas*、*Blautia*、*Intestinimonas*、*Parabacteroides*、*Bilophila*、*Anaerotruncus*、*Parasutterella*、*Oscillibacter*、*Negativibacillus* 的相对丰度 4.91×10^{-2} 、 8.84×10^{-3} 、 6.13×10^{-3} 、 1.60×10^{-4} 、 2.07×10^{-3} 、 1.94×10^{-3} 、 5.21×10^{-5} 、 3.53×10^{-4} 、 7.06×10^{-4} 、 3.23×10^{-4} 、 1.12×10^{-5} 相比, AS 组的 *Alistipes*、*Muribaculum*、*Candidatus_Saccharimonas* 显著减少至 5.80×10^{-3} 、 3.72×10^{-6} 、 1.12×10^{-5} , 差异有统计学意义 ($p < 0.05$); 而 *Blautia*、*Intestinimonas*、*Parabacteroides*、*Bilophila*、*Anaerotruncus*、*Parasutterella*、*Oscillibacter*、*Negativibacillus* 显著增加至 2.07×10^{-3} 、 1.70×10^{-2} 、 1.94×10^{-3} 、 9.65×10^{-3} 、 5.22×10^{-3} 、 2.25×10^{-3} 、 3.85×10^{-3} 、

1.96×10^{-3} ($p < 0.05$), 表明 AS 疾病模型肠道菌群在属水平上发生了显著改变。INU 长期干预近 3 个月, 可以发现 AS 属水平上菌群组成发生部分逆转, 主要体现在 *Faecalibaculum* 的相对丰度增加至 0.28, 而 AS 异常增加的 *Alistipes*、*Intestinimonas*、*Bilophila*、*Oscillibacter*、*Negativibacillus* 均减少至 1.09×10^{-3} 、 3.46×10^{-4} 、 1.86×10^{-4} 、 1.56×10^{-4} 、 3.72×10^{-6} , 差异有统计学意义 ($p < 0.05$)。



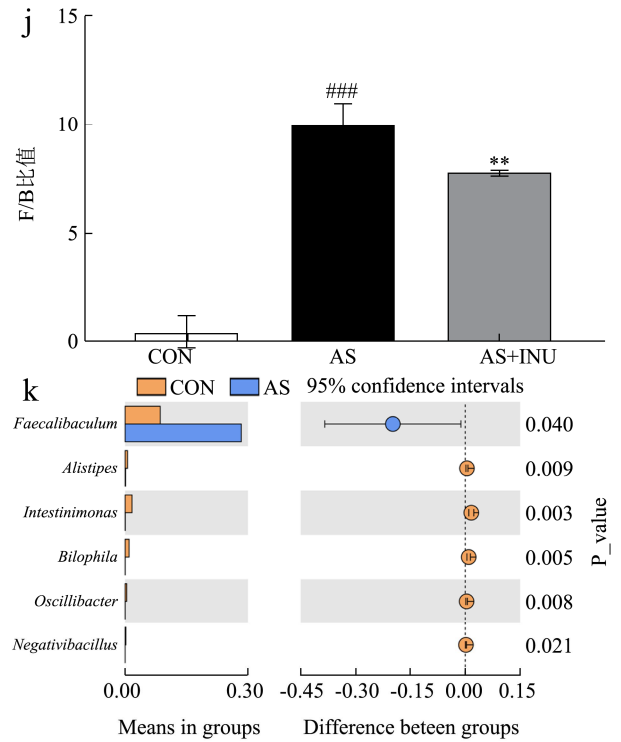
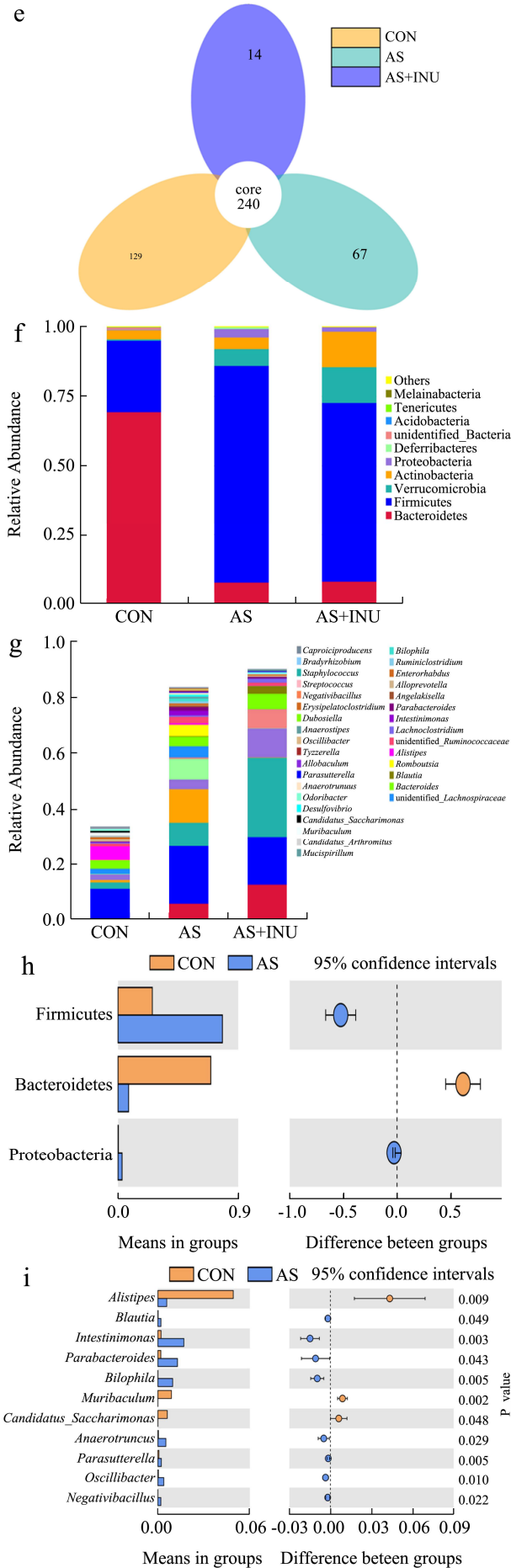


图3 INU 对于 AS 肠道菌群的影响

Fig.3 Modulation of INU on gut microbiota in AS

注: CON 与 AS 比较, ##### $p < 0.0001$; AS 与 AS+INU 比较, * $p < 0.01$, ** $p < 0.01$ 。

上述肠道菌群在门与属水平上显著差异菌表明 AS 疾病会引起肠道菌群的显著改变, 如门水平上的主要组成菌厚壁菌门、拟杆菌、变形杆菌均发生了显著的变化, 而在属水平上也有多种菌显著发生了变化; 而通过 3 个月长期给予膳食纤维干预能够显著调节肠道菌群的组成, 纠正 AS 中异常改变的菌的丰度。其中, 在门水平上, 显著改善 F/B 比值, 说明可能是通过在降低厚壁菌门或升高拟杆菌门发挥作用。有文献报道采用拟杆菌 *Bacteroides vulgatus* 和 *Bacteroides dorei* 直接干预可以显著抑制 AS 疾病进展^[31]。该研究结果与本研究改善拟杆菌及 F/B 比值的结论是一致的。而在属水平上, 特别是 *Faecalibaculum* 并没有在 AS 中发生显著变化, 但是在膳食纤维干预后却成为属水平上显著改变的关键菌。最近有研究揭示该菌是重要的产 SCFAs 菌^[32], 而后者作为肠道菌群重要代谢产物参与了多种生理功能, 为此后续又进一步检测了 SCFAs 的含量 (结果 2.6)。

2.4 菊粉膳食干预减轻内毒素血症

当肠道菌群失调时, 肠道革兰阴性菌来源的 LPS 引起的内毒素血症被认为是引发多种慢性代谢性疾病炎症重要触发因素^[11], 为此检测了外周血 LPS 水平。结果表明, AS 疾病组的血浆 LPS 水平 0.44 EU/mL 较

之 CON 组 0.20 EU/mL 显著升高 ($p < 0.001$, 图 4), 提示 AS 疾病中存在内毒素血症, 这与以往的 AS 临床与动物研究结果是一致的^[33,34]。

而在膳食纤维长期干预后, 发现 AS 疾病血浆中 LPS 水平显著降低至 0.34 EU/mL ($p < 0.01$, 图 4), 表明 INU 能够显著缓解 AS 疾病中的内毒素血症。以往 INU 研究表明能显著下调多种慢性病中血浆 LPS 水平^[17-20,35], 与本研究结果是一致的, 说明 INU 可能是通过抑制 LPS 在肠道中的产生, 减少其经门静脉入肝及血液循环, 进而抑制 AS 慢性低度炎症的发生。

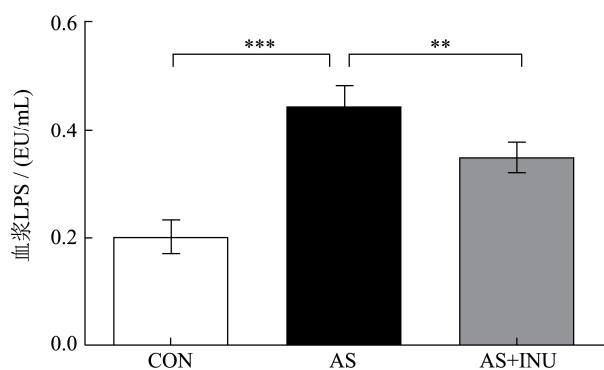


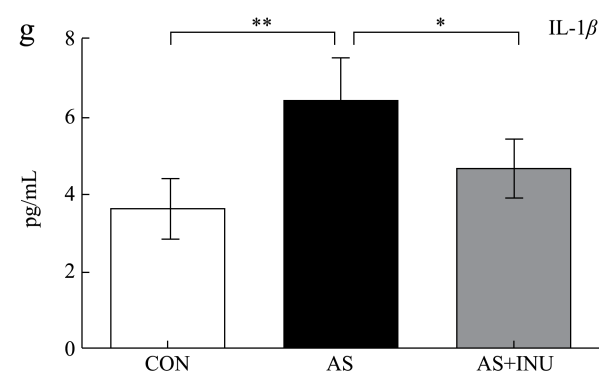
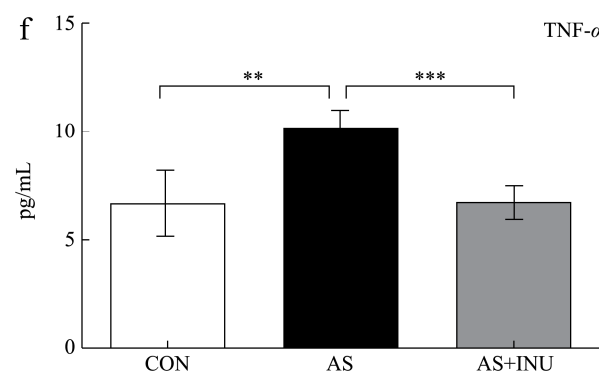
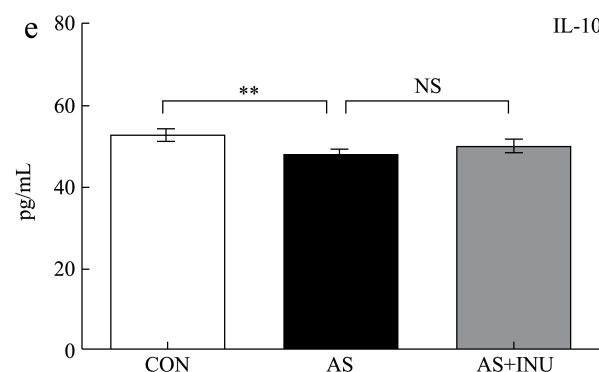
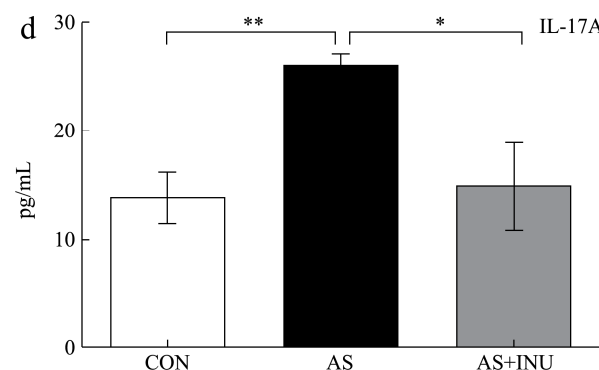
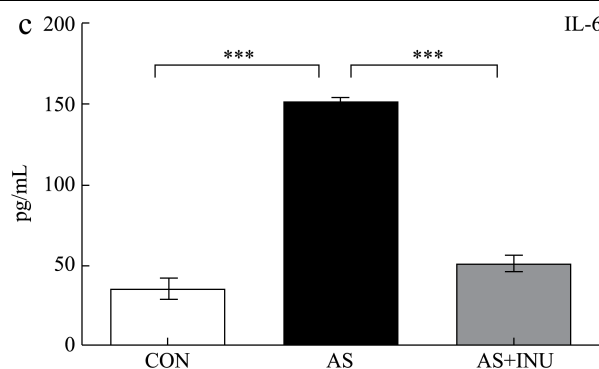
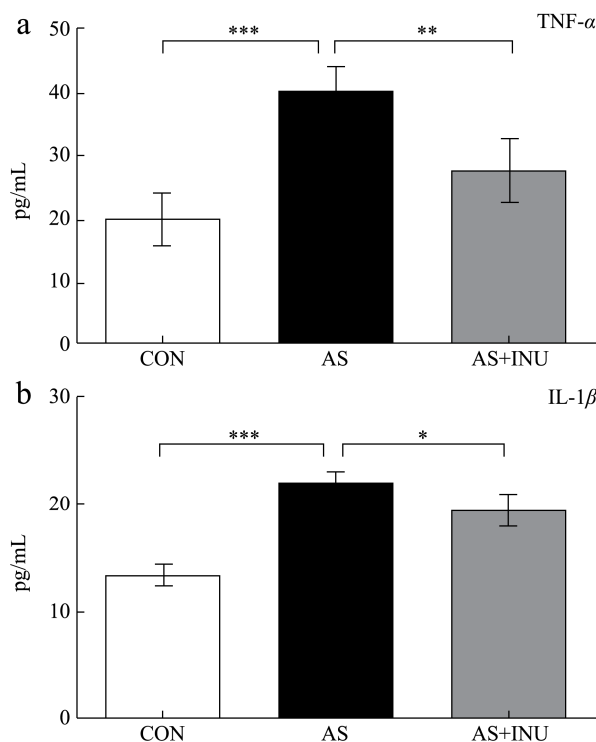
图 4 INU 干预对 AS 血浆 LPS 的影响

Fig.4 The impact of INU intervention on LPS in AS

注: ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

2.5 菊粉膳食纤维干预降低血浆与血管组织炎症

因子浓度



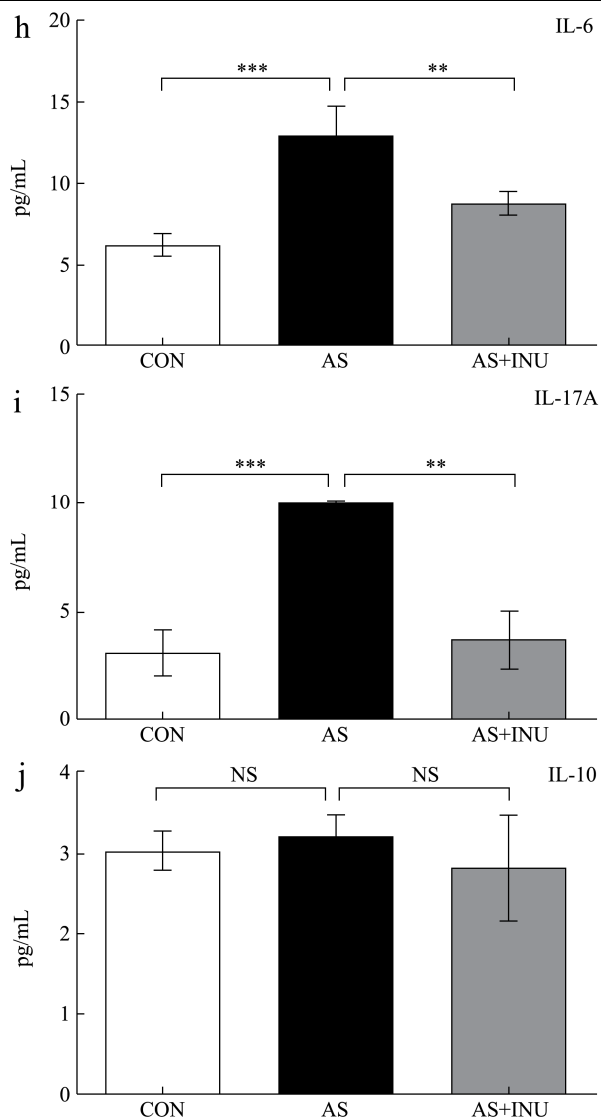


图5 膳食 INU 干预对于 AS 炎症因子的影响

Fig.5 The impacts of dietary INU on the inflammatory cytokines in AS

注: a~e: 主动脉根部组织, f~j: 血浆。* $p<0.05$, ** $p<0.01$, *** $p<0.001$, NS: no significance, 无统计学差异。

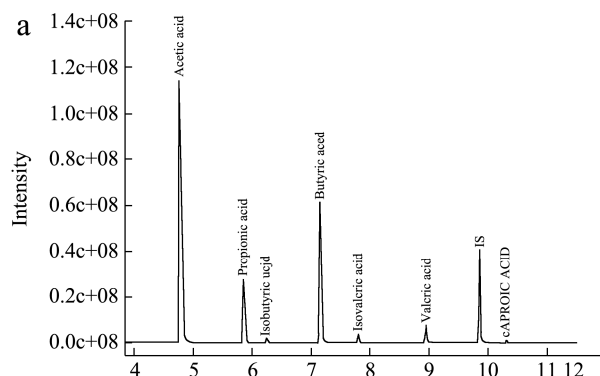
通过分析上述发现的血浆异常升高的 LPS 提示 AS 可能存在炎症, 以往研究中也表明炎症与 AS 密切相关^[10-15], 故本研究又进一步分析了膳食纤维干预对于 AS 炎症的影响。结果提示, 与 CON 对照组主动脉组织和血浆中炎症因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17A、IL-10 的浓度 19.89 pg/mL 和 6.64 pg/mL、13.38 pg/mL 和 3.60 pg/mL、34.86 pg/mL 和 6.08 pg/mL、13.79 pg/mL 和 2.98 pg/mL、52.19 pg/mL 和 2.99 pg/mL 相比, AS 疾病组主动脉组织和血浆中的促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17A 升高至 39.89 pg/mL 和 10.02 pg/mL、21.83 pg/mL 和 6.42 pg/mL、150.20 pg/mL 和 12.80 pg/mL、25.70 pg/mL 和 9.84 pg/mL, 主动脉根部组织 IL-10 降低至 47.24 pg/mL, 差异有统计学意义

($p<0.05$); 而 AS 血浆中抑炎因子 IL-10 为 3.16 \pm 0.13 pg/mL, 无显著改变 ($p>0.05$)。这些结果提示 AS 疾病发生发展中存在慢性低度炎症, 这与以往研究中 AS 中显著升高的促炎因子结果是一致的^[36]。

经膳食纤维长期干预 12 周后, 可以发现 AS 疾病中的主动脉组织和血浆中的促炎因子 TNF- α 、IL-1 β 、IL-6、IL-17A 降低至 27.32 pg/mL 和 6.59 pg/mL、19.15 pg/mL 和 4.60 pg/mL、49.81 pg/mL 和 8.57 pg/mL、16.70 pg/mL 和 3.57 pg/mL, 差异有统计学意义 ($p<0.05$); 而抑炎因子 IL-10 的浓度 49.35 pg/mL 和 2.80 pg/mL, 无显著改变 ($p>0.05$)。这些结果表明膳食 INU 显著抑制了 AS 慢性低度炎症, 而原因可能是膳食纤维通过改善肠道菌群失调, 减少 LPS 的异位入血, 进而减少了其引发的炎症损害。这里显著升高的 IL-17A 提示分泌 IL-17A 的 Th17 细胞可能参与了 INU 的有效性。此外, 可能还有其他多种免疫细胞如调节性 T 细胞 (Regulatory T cells, Tregs)、巨噬细胞、单核细胞、中性粒细胞等参与该 INU 对于炎症的调控过程。如有研究表明巨噬细胞及其极化参与了 INU 对于慢性病炎症抑制作用^[28]。前期发现 INU 能够显著影响其他慢性病中的髓源抑制性细胞 (Myeloid suppressor cells, MDSCs)^[37]和肠道粘膜免疫 $\gamma\delta$ T 细胞^[38]。但是这些免疫炎症细胞是否参与了 INU 对 AS 的作用及其相关分子机制需后续进一步实验证实。

此外, 在膳食纤维改善肠道菌群失调过程中, 能够改变多种细菌组成及其代谢产物如 SCFAs、色氨酸代谢、胆汁酸代谢、氧化三甲胺 (Trimethylamine oxide, TMAO) 等, 而这些肠道菌群来源的代谢产物已被证实参与多种疾病的发生与发展, 亦有可能参与调控 INU 抑制炎症的机制, 如 SCFAs 已经被证实能够通过结合 G-蛋白偶联受体 (G-protein coupled receptor, GPR) 而显著抑制炎症的发生^[39]。

2.6 菊粉能够显著改变 AS 疾病中肠道菌群来源的 SCFAs 含量



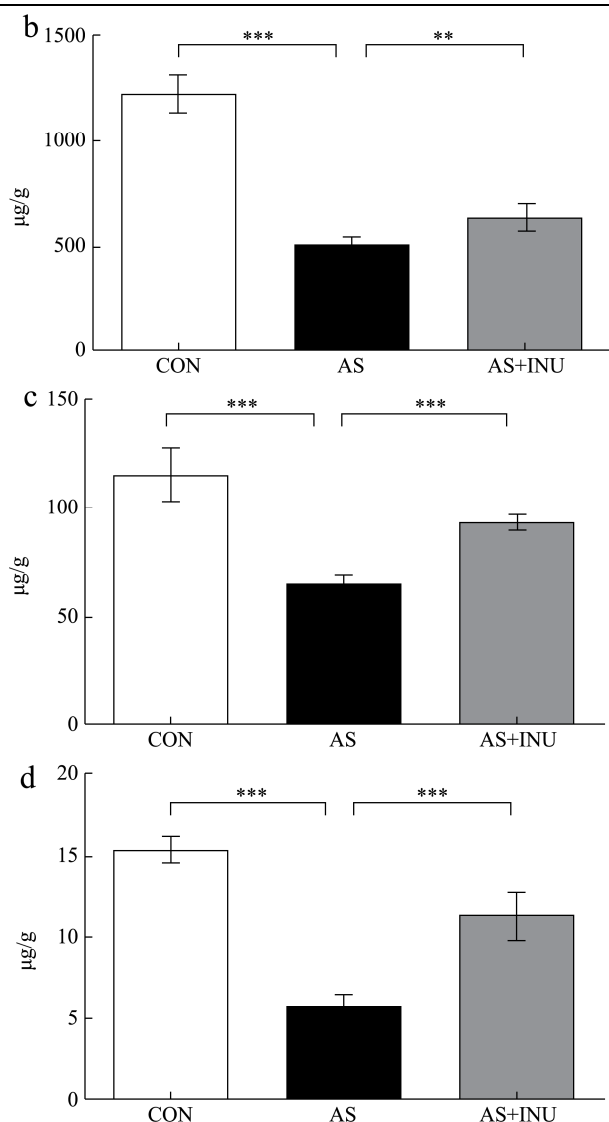


图6 INU对于AS肠道菌群来源SCFAs的作用

Fig.6 The effect of INU on gut microbiota-derived SCFAs in AS

注: b: 乙酸; c: 丙酸; d: 戊酸。 ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$ 。

上述研究发现INU能够调节肠道菌群并抑制LPS及炎症的发生,然而由于肠道菌群代谢产物SCFAs被报道也能显著抑制炎症的发生^[40],故本研究又进一步检测膳食纤维干预后SCFAs的改变。结果发现,与对照组乙酸、丙酸和戊酸的值1218.00 µg/g、115.30 µg/g、15.25 µg/g相比,AS疾病组乙酸、丙酸和戊酸降低至505.00 µg/g、64.52 µg/g、5.74 µg/g,差异有统计学意义($p < 0.05$);在INU长期干预后能够显著改善至631.90 µg/g、92.70 µg/g、11.25 µg/g ($p < 0.05$),而其他短链脂肪酸无显著改变,提示AS疾病存在的肠道菌群失调导致异常减少的代谢产物SCFAs能够通过膳食纤维的干预而部分逆转。已有研究表明,SCFAs的减少会对机体造成如下的影响^[41-43]:首先,SCFAs是能量代谢的基本原料,而其减少将可能引起

肠道内皮细胞的能量代谢紊乱,后者将会破坏肠道屏障功能;其次,SCFAs能够通过结合细胞受体GPR抑制核因子(Nuclear factor, NF)- κ B炎症信号通路,进而显著抑制炎症因子的产生,而SCFAs的减少将会导致炎症的加重;再者,SCFAs作为去乙酰化酶(Histone deacetylase, HDAC)的抑制剂,能够通过影响基因的乙酰化水平进而调控基因的表达,影响疾病的发生发展,而SCFAs的减少可能是参与疾病发生相关基因表达的重要原因。而本研究中INU干预AS过程中显著改变的SCFAs是通过怎样的途径发挥作用仍需后续进一步研究揭示。

3 结论

以动脉粥样硬化症为基础的心脑血管疾病是当前重大疾病,发病人群广泛,由其导致的死亡率位居首位,故寻找安全、有效、低廉的防治方法与策略意义重大。本研究证实菊粉能够有效改善AS疾病的发生发展,并初步提示其作用与调节肠道菌群、抑制炎症发生密切相关。本研究为膳食纤维干预临床AS疾病提供了实验数据与防治思路。

参考文献

- [1] Benjamin E J, Virani S S, Callaway C W, et al. Heart disease and stroke statistics-2018 update: a report from the American heart association [J]. Circulation, 2018, 137(12): e67-e492
- [2] 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(9):1145-1156
National Center for Cardiovascular Disease. 2019 Report on cardiovascular health and diseases in China [J]. Journal of Cardiovascular and Pulmonary Diseases, 2020, 39(9): 1145-1156
- [3] Sanchez-Rodriguez E, Egea-Zorrilla A, Plaza-Diaz J, et al. The gut microbiota and its implication in the development of atherosclerosis and related cardiovascular diseases [J]. Nutrients, 2020, 12(3): 605
- [4] Jonsson A L, Bäckhed F. Role of gut microbiota in atherosclerosis [J]. Nat Rev Cardiol, 2017, 14(2): 79-87
- [5] Almeida Alexandre, Nayfach Stephen, Boland Miguel, et al. A unified catalog of 204,938 reference genomes from the human gut microbiome [J]. Nat Biotechnol, 2021, 39(1): 105-114
- [6] Karlsson F H, Fåk F, Nookaew I, et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome [J]. Nat Commun, 2012, 3: 1245
- [7] Emoto T, Yamashita T, Sasaki N, et al. Analysis of gut microbiota in coronary artery disease patients: a possible link

- between gut microbiota and coronary artery disease [J]. *J Atheroscler Thromb*, 2016, 23(8): 908-921
- [8] Emoto T, Yamashita T, Kobayashi T, et al. Characterization of gut microbiota profiles in coronary artery disease patients using data mining analysis of terminal restriction fragment length polymorphism: gut microbiota could be a diagnostic marker of coronary artery disease [J]. *Heart Vessels*, 2017, 32(1): 39-46
- [9] Naruszewicz M, Johansson M L, Zapolska-Downar D, et al. Effect of *Lactobacillus plantarum* 299v on cardiovascular disease risk factors in smokers [J]. *Am J Clin Nutr*, 2002, 76(6): 1249-1255
- [10] Wolf D, Ley K. Immunity and inflammation in atherosclerosis [J]. *Circ Res*, 2019, 124(2): 315-327
- [11] Geovanini G R, Libby P. Atherosclerosis and inflammation: overview and updates [J]. *Clin Sci (Lond)*, 2018, 132(12): 1243-1252
- [12] 王建茹,刘萍. ApoE^{-/-}和LDLR^{-/-}动脉粥样硬化模型小鼠差异性的研究进展[J]. *上海交通大学学报(医学版)*, 2017, 37(7): 1033-1037
- WANG Jian-ru, LIU Ping. Advances in differences between ApoE^{-/-} and LDL^{-/-} atherosclerotic model mice [J]. *Journal of Shanghai Jiao Tong University (Medical Science)*, 2017, 37(7): 1033-1037
- [13] Björkbacka H, Kunjathoor V V, Moore K J, et al. Reduced atherosclerosis in MyD88-null mice links elevated serum cholesterol levels to activation of innate immunity signaling pathways [J]. *Nat Med*, 2004, 10(4): 416-421
- [14] Michelsen K S, Wong M H, Shah P K, et al. Lack of toll-like receptor 4 or myeloid differentiation factor 88 reduces atherosclerosis and alters plaque phenotype in mice deficient in apolipoprotein E [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004, 101(29): 10679-10684
- [15] Edfeldt K, Swedenborg J, Hansson G K, et al. Expression of toll-like receptors in human atherosclerotic lesions: a possible pathway for plaque activation [J]. *Circulation*, 2002, 105(10): 1158-1161
- [16] Xu X H, Shah P K, Faure E, et al. Toll-like receptor-4 is expressed by macrophages in murine and human lipid-rich atherosclerotic plaques and upregulated by oxidized LDL [J]. *Circulation*, 2001, 104(25): 3103-3108
- [17] Yang X L, He F, Zhang Y L, et al. Inulin ameliorates alcoholic liver disease via suppressing LPS-TLR4-M Ψ axis and modulating gut microbiota in mice [J]. *Alcoholism: Clinical and Experimental Research*, 2019, 43(3): 411-424
- [18] Bao T, He F, Zhang X X, et al. Inulin exerts beneficial effects on non-alcoholic fatty liver disease via modulating gut microbiome and suppressing the LPS-TLR4-M Ψ -NF- κ B-NLRP3 pathway via gut-liver axis in mice [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11: 1787
- [19] Xue J, Li X, Liu P, et al. Inulin and metformin ameliorate polycystic ovary syndrome via anti-inflammation and modulating gut microbiota in mice [J]. *Endocrine Journal*, 2019, 66(10): 859-870
- [20] Li K, Zhang L, Xue J, et al. Dietary inulin alleviates diverse stages of type 2 diabetes mellitus via anti-inflammation and modulating gut microbiota in *db/db* mice [J]. *Food & Function*, 2019, 10(4): 1915-1927
- [21] Valcheva R, Koleva P, Martínez I, et al. Inulin-type fructans improve active ulcerative colitis associated with microbiota changes and increased short-chain fatty acids levels [J]. *Gut Microbes*, 2019, 10(3): 334-357
- [22] Chadha S, Kumar A, Srivastava S A, et al. Inulin as a delivery vehicle for targeting colon-specific cancer [J]. *Curr Drug Deliv*, 2020, 17(8): 651-674
- [23] Li Y, G Zhang C, Wang X H, et al. Progression of atherosclerosis in *ApoE*-knockout mice fed on a high-fat diet [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2016, 20(18): 3863-3867
- [24] Yuan T, Chu C, Shi R, et al. ApoE-dependent protective effects of sesamol on high-fat diet-induced behavioral disorders: regulation of the microbiome-gut-brain axis [J]. *J Agric Food Chem*, 2019, 67(22): 6190-6201
- [25] Rault-Nania M, Gueux E, Demougeot C, et al. Inulin attenuates atherosclerosis in *apolipoprotein E*-deficient mice [J]. *Br J Nutr*, 2006, 96(5): 840-804
- [26] Hoving L R, de Vries M R, de Jong R C M, et al. The prebiotic inulin aggravates accelerated atherosclerosis in hypercholesterolemic *APOE*3*-Leiden mice [J]. *Nutrients*, 2018, 10(2): 172
- [27] Hoving L R, Katiraei S, Pronk A, et al. The prebiotic inulin modulates gut microbiota but does not ameliorate atherosclerosis in hypercholesterolemic *APOE*3*-Leiden.CETP mice [J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 16515
- [28] Wang Z, Zhang X, Zhu L, et al. Inulin alleviates inflammation of alcoholic liver disease via SCFAs-inducing suppression of M1 and facilitation of M2 macrophages in mice [J]. *International Immunopharmacology*, 2020, 78: 106062
- [29] Han K H, Tsuchihira H, Nakamura Y, et al. Inulin-type fructans with different degrees of polymerization improve lipid metabolism but not glucose metabolism in rats fed a high-fat

- diet under energy restriction [J]. *Dig Dis Sci*, 2013, 58(8): 2177-2186
- [30] Reis S A, Conceição L L, Rosa D D, et al. Mechanisms used by inulin-type fructans to improve the lipid profile [J]. *Nutr Hosp*, 2014, 31(2): 528-534
- [31] Yoshida N, Emoto T, Yamashita T, et al. *Bacteroides vulgatus* and *Bacteroides dorei* reduce gut microbial lipopolysaccharide production and inhibit atherosclerosis [J]. *Circulation*, 2018, 138(22): 2486-2498
- [32] Zagato E, Pozzi C, Bertocchi A, et al. Endogenous murine microbiota member *Faecalibaculum rodentium* and its human homologue protect from intestinal tumour growth [J]. *Nat Microbiol*, 2020, 5(3): 511-524
- [33] Ostos M A, Recalde D, Zakin M M, et al. Implication of natural killer T cells in atherosclerosis development during a LPS-induced chronic inflammation [J]. *FEBS Lett*, 2002, 519(1): 23-29
- [34] Verhaar B J H, Prodan A, Nieuwdorp M, et al. Gut microbiota in hypertension and atherosclerosis: a review [J]. *Nutrients*, 2020, 12(10): 2982
- [35] Guo L, Xiao P, Zhang X, et al. Inulin ameliorates schizophrenia via modulating gut microbiota and anti-inflammation in mice [J]. *Food & Function*, 2021, 12(3): 1156-1175
- [36] Raggi P, Genest J, Giles J T, et al. Role of inflammation in the pathogenesis of atherosclerosis and therapeutic interventions [J]. *Atherosclerosis*, 2018, 276: 98-108
- [37] 鲍婷,王振,朱丽丽,等.菊粉增加非酒精性脂肪肝病小鼠外周血、肝脏及脾脏单核细胞型髓源性抑制细胞比例并调节炎症因子的分泌[J].细胞与分子免疫学杂志,2020,36(3):228-235
- BAO Ting, WANG Zhen, ZHU Li-li, et al. Inulin increases the proportions of monocytic myeloid-derived suppressor cells in peripheral blood, liver, spleen and regulates the secretion of plasma inflammatory cytokines in mice with non-alcoholic fatty liver disease [J]. *Chinese Journal of Cellular and Molecular Immunology*, 2020, 36(3): 228-235
- [38] Lu H X, Liu P, Zhang X X, et al. Inulin and *Lycium barbarum* polysaccharides ameliorate diabetes by enhancing gut barrier via modulating gut microbiota and activating gut mucosal TLR²⁺ intraepithelial $\gamma\delta$ T cells in rats [J]. *Journal of Functional Foods*, 2021, 79: 104407
- [39] Lu Y, Fan C, Li P, et al. Short chain fatty acids prevent high-fat-diet-induced obesity in mice by regulating G protein-coupled receptors and gut microbiota [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 37589
- [40] Ratajczak W, Ryl A, Mizerski A, et al. Immunomodulatory potential of gut microbiome-derived short-chain fatty acids (SCFAs) [J]. *Acta Biochim Pol*, 2019, 66(1): 1-12
- [41] Hu J, Lin S, Zheng B, et al. Short-chain fatty acids in control of energy metabolism [J]. *Crit Rev Food Sci Nutr*, 2018, 58(8): 1243-1249
- [42] Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites [J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1332-1345
- [43] Ho R H, Chan J C Y, Fan H, et al. In silico and *in vitro* interactions between short chain fatty acids and human histone deacetylases [J]. *Biochemistry*, 2017, 56(36): 4871-4878

(上接第 102 页)

- [27] 杨丽萍,张光云,冯德强,等.腺嘌呤不同浓度和不同干预时间对大鼠肾功能的影响及右归丸的治疗作用[J].中兽医医药杂志,2021,40(1):31-35,2
- YANG Li-ping, ZHANG Guang-yun, FENG De-qiang, et al. Effects of adenine with different concentrations and intervention time on renal function in rats and therapeutic effect of Yougui Pill [J]. *Chinese Journal of Veterinary Medicine*, 2021, 40(1): 31-35, 2
- [28] 常晓萍.胸膜肺炎放线杆菌蛋白互作网络的分析与子网络蛋白互作的功能验证[D].武汉:华中农业大学,2011
- CHANG Xiao-ping. Analysis of protein interaction network of *Actinobacillus pleuropneumoniae* and functional verification of subnetwork protein interaction [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2011
- [29] 何园.龙眼体胚成熟过程的蛋白质组学研究[D].福州:福建农林大学,2009
- HE Yuan. Proteomic study on somatic embryo maturation of longan [D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2009
- [30] J S Cameron, F Moro, H A Simmonds. Gout, uric acid and purine metabolism in paediatric nephrology [J]. *Pediatric Nephrology*, 1993, 7(1): 105-118