

引用:张倩,周颖,秦思佳,伍梅芳.参附注射液对异丙肾上腺素诱导的慢性心衰大鼠肠道菌群及肠道通透性的影响[J].中医导报,2025,31(12):67-74.

参附注射液对异丙肾上腺素诱导的慢性心衰大鼠肠道菌群及肠道通透性的影响

张倩,周颖,秦思佳,伍梅芳
(长沙卫生职业学院,湖南 长沙 410605)

[摘要] 目的:探究参附注射液对异丙肾上腺素(ISO)诱导的慢性心衰大鼠肠道菌群及肠道通透性的影响。方法:将32只SPF级雄性SD大鼠随机分为正常组(CONT组,6只)和模型制备组(26只)。模型制备组大鼠皮下注射ISO(5 mg/kg),CONT组大鼠注射等量生理盐水,连续给药14 d。完成模型制备后,将符合慢性心力衰竭标准的大鼠随机分为模型组(MOD组)、参附组(SF组)和卡托普利组(KT组),分别给予相应干预措施,持续15 d。干预后采用心脏彩超检测大鼠心功能,称量大鼠体质量、心脏质量、左心室质量并计算心脏质量指数、左心室质量指数;心脏苏木精-伊红染色(HE染色)观察心肌组织结构改变情况;酶联免疫吸附试验(ELISA)检测血清氨基末端B型脑钠肽前体(NT-proBNP)含量;蛋白质印迹法(Western blotting)检测小肠组织中闭锁小带蛋白1(ZO-1)、闭合蛋白(occludin)表达水平;采用RT-qPCR技术检测小肠组织中ZO-1 mRNA和occludin mRNA表达水平;16S rDNA检测肠道内容物菌群。结果:MOD组大鼠左室射血分数(LVEF)、左室短轴缩短率(LVFS)及体质量低于CONT组($P<0.01$),LVEDD、LVESD、心脏质量指数、左心室质量指数及血清NT-proBNP含量高于CONT组($P<0.01$);SF组、KT组大鼠LVEF、LVFS、体质量高于MOD组($P<0.01$ 或 $P<0.05$),LVESD、心脏质量指数、左心室质量指数及血清NT-proBNP含量均低于MOD组($P<0.01$ 或 $P<0.05$)。心脏HE染色提示CONT组大鼠心肌细胞排列规则,结构完整;MOD组大鼠心肌呈现显著病变,心肌细胞结构紊乱,部分心肌纤维断裂、溶解,炎症细胞浸润;SF组大鼠心肌细胞间质内纤维结缔组织和炎症细胞较MOD组明显减少,心肌细胞结构完整,排列整齐;KT组大鼠心肌纤维排列较整齐,炎症浸润显著减轻。MOD组大鼠小肠组织ZO-1及occludin蛋白相对表达量低于CONT组($P<0.01$);SF组、KT组大鼠小肠组织中ZO-1、occludin蛋白相对表达量均高于MOD组($P<0.01$)。MOD组大鼠小肠组织ZO-1 mRNA及occludin mRNA相对表达量低于CONT组($P<0.01$);SF组、KT组大鼠小肠组织ZO-1 mRNA和occludin mRNA相对表达量均高于MOD组($P<0.01$)。16S rDNA检测结果显示,MOD组大鼠Shannon指数、Ace指数及Chao1指数低于CONT组($P<0.05$),Simpson指数高于CONT组($P<0.01$);SF组、KT组大鼠Shannon指数、Chao1指数均高于MOD组($P<0.05$ 或 $P<0.01$),Simpson指数低于MOD组($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。β多样性结果显示,SF组大鼠肠道菌群分布更接近CONT组;MOD组大鼠乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)的相对丰度低于CONT组($P<0.05$),狭义梭菌属_1(*Clostridium_sensu_stricto_1*)及unclassified_f_Peptostreptococcaceae相对丰度高于CONT组($P<0.01$);SF组大鼠乳酸杆菌属的相对丰度高于MOD组($P<0.01$),狭义梭菌属_1及unclassified_f_Peptostreptococcaceae相对丰度低于MOD组($P<0.01$)。结论:参附注射液能提高慢性心衰大鼠的心功能,恢复大鼠的肠道通透性,改善肠道菌群紊乱。

[关键词] 慢性心衰;参附注射液;肠道菌群;肠道通透性;大鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)12-0067-08

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2025.12.011

Effect of Shenfu Injection (参附注射液) on Gut Microbiota and Permeability in Isoproterenol-Induced Chronic Heart Failure Rats

ZHANG Qian, ZHOU Ying, QIN Sijia, WU Meifang

(Changsha Health Vocational College, Changsha Hunan 410605, China)

[Abstract] Objective: To investigate the effects of Shenfu injection (SF) on intestinal microbiota and intestinal permeability in rats with chronic heart failure (CHF) induced by isoproterenol (ISO). Method: Totally 32 SPF-grade male Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into control group (CONT group, $n=6$) and

通信作者:伍梅芳,女,副教授,研究方向为月经疾病的中医治疗

model preparation group ($n=26$). The model preparation group was subcutaneously injected with ISO (5 mg/kg) for 14 consecutive days to establish the CHF model, while the CONT group received subcutaneous injections of saline for 14 days. After modeling, the CHF rats were randomly divided into model group (MOD group), Shenfu injection group (SF group), and captopril group (KT group), with each group receiving corresponding interventions for 15 days. After the intervention, cardiac ultrasound was used to assess cardiac function in rats. The body weight, heart weight and left ventricular weight of the rats were measured, and the heart mass index and left ventricular mass index were calculated. Myocardial tissue structural changes were observed through hematoxylin and eosin staining (HE staining) of the heart. Serum levels of N-terminal pro-B-type natriuretic peptide (NT-proBNP) were measured using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). The expression levels of zonula occludens-1 (ZO-1) and occludin in intestinal tissue were detected by Western blotting. RT-qPCR was employed to measure the expression levels of ZO-1 mRNA and occludin mRNA in intestinal tissue. The gut microbiota in intestinal contents was analyzed using 16S rDNA sequencing. Results: In rats of the MOD group, the left ventricular ejection fraction (LVEF), left ventricular fractional shortening (LVFS), and body weight were lower than those in the CONT group ($P<0.01$), while the left ventricular end-diastolic diameter (LVEDD), left ventricular end-systolic diameter (LVESD), cardiac mass index, left ventricular mass index, and serum level of NT-proBNP were higher than those in the CONT group ($P<0.01$). In rats of the SF group and KT group, the LVEF, LVFS and body weight were higher than those in the MOD group ($P<0.01$ or $P<0.05$), while the LVESD, cardiac mass index, left ventricular mass index and serum level of NT-proBNP were lower than those in the MOD group ($P<0.01$ or $P<0.05$). HE staining revealed that cardiomyocytes in the CONT group were regularly arranged with intact structure, and that the MOD group exhibited significant myocardial pathological changes, including disordered cardiomyocyte structure, fragmentation and lysis of some myocardial fibers, and inflammatory cell infiltration. In the SF group, the fibrous connective tissue and inflammatory cells in the myocardial interstitium were significantly reduced compared with the MOD group, and cardiomyocytes remained intact and regularly arranged. In the KT group, myocardial fibers were relatively regularly arranged, and inflammatory infiltration was significantly alleviated. In the MOD group, the relative expression levels of ZO-1 and occludin proteins in the small intestinal tissue of rats were lower than those in the CONT group ($P<0.01$). In the SF group and KT group, the relative expression levels of ZO-1 and occludin proteins in the small intestinal tissue of rats were higher than those in the MOD group ($P<0.01$). In the MOD group, the relative expression levels of ZO-1 mRNA and occludin mRNA in the small intestinal tissue of rats were lower than those in the CONT group ($P<0.01$). In the SF group and KT group, the relative expression levels of ZO-1 mRNA and occludin mRNA in the small intestinal tissue of rats were higher than those in the MOD group ($P<0.01$). 16S rDNA sequencing results revealed that the Shannon index, Ace index, and Chao1 index of rats in the MOD group were lower than those in the CONT group ($P<0.05$), while the Simpson index was higher than that in the CONT group ($P<0.01$). The Shannon index and Chao1 index of rats in the SF group and KT group were higher than those in the MOD group ($P<0.05$ or $P<0.01$), while the Simpson index was lower than that in the MOD group ($P<0.05$ or $P<0.01$). Results of β -diversity analysis showed that the intestinal microbiota distribution of the SF group was closer to that of the CONT group. In the MOD group, the relative abundance of *Lactobacillus* in rats was lower than that in the CONT group ($P<0.05$), while the relative abundances of *Clostridium_sensu_stricto_1* and *unclassified_f_Peptostreptococcaceae* were higher than those in the CONT group ($P<0.01$). In the SF group, the relative abundance of *Lactobacillus* in rats was higher than that in the MOD group ($P<0.01$), while the relative abundances of *Clostridium_sensu_stricto_1* and *unclassified_f_Peptostreptococcaceae* were lower than those in the MOD group ($P<0.01$). Conclusion: Shenfu injection can improve cardiac function in rats with chronic heart failure, restore intestinal permeability, and ameliorate gut microbiota dysbiosis.

[Keywords] chronic heart failure; Shenfu injection; intestinal microbiota; intestinal permeability; rat

心力衰竭(heart failure, HF)是众多心脏疾病发展的最终结果,已成为全球慢性心血管疾病防治体系中的关键环节。其特征是发病率和死亡率高,患者生活质量差及治疗费用高^[1]。在中国城镇居民中, HF患病率大约为1.1%,并且患病率

均随着年龄的增长而升高。在25~64岁、65~79岁和 ≥ 80 岁人群中, HF的患病率分别为0.57%、3.86%和7.55%^[2]。肠道微生物群及其代谢物在宿主心血管疾病的发展中起着重要的调节作用,已成心衰的潜在治疗靶点^[3]。目前有各种干预措施针

对肠道微生物群来治疗心衰,包括饮食干预、益生菌疗法、粪便微生物群移植、抗生素等,但存在操作复杂、效果不确切、并发症多等问题^[4-5]。中药复方的药物组成丰富,副作用小,还具有多靶点的特点,在调节肠道菌群治疗心衰方面发挥着越来越重要的作用。

参附注射液源自《校注妇人良方》记载的参附汤,由红参与附子配伍组成^[6]。其中红参具有益气固脱之效,而附子则被誉为回阳救逆的要药,两者协同可发挥温补心阳、回阳救逆的作用^[7]。现代临床中,该制剂已成功应用于心力衰竭、急性心肌梗死及扩张型心肌病等多种心脏疾病的治疗。参附注射液可通过抑制心肌细胞铁死亡、抗炎、抗氧化、抑制心肌纤维化等多种机制来延缓慢性心衰的病情进展^[8-10]。本研究将从肠道微生物组出发,探究参附注射液对异丙肾肾上腺素(isoproterenol, ISO)诱导的慢性心衰大鼠肠道菌群及肠道通透性的影响,以期参附注射液的临床应用提供实验依据。

1 材 料

1.1 实验动物 32只5周龄SPF级雄性SD大鼠,体质量(170.00±10.00)g,由湖南斯莱克景达实验动物有限公司提供,动物质量合格证号:430727221101154125。动物生产许可证号:SYXK(湘)2019-0009。实验在湖南中医药大学SPF级动物实验中心完成,温度(22±5)℃,湿度(45±10)%,12 h/12 h明暗交替,水和食物可自由获取。本研究方案经湖南中医药大学实验动物伦理委员会审批通过(伦理批件号:LL2022041305)。

1.2 药物与试剂 盐酸异丙肾肾上腺素(美国MedChemExpress公司,批号:121267);参附注射液[华润三九(雅安)药业有限公司,批号:210904AK03];卡托普利(重庆科瑞制药有限公司,批号:641003);乌拉坦(上海源叶生物科技有限公司,批号:M25HS183263);大鼠氨基末端B型脑钠肽前体(N-terminal pro-brain natriuretic peptide,NT-proBNP)酶联免疫吸附试验(enzyme-linked immunosorbent assay,ELISA)试剂盒(源桔生物有限公司,批号:U16032230)。

1.3 主要仪器 脱水机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JT-12S);包埋机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JB-L5);病理切片机(德国LEICA公司,型号:RM2016);电泳仪(北京六一生物科技有限公司,型号:DYY-6C);荧光定量RCP仪(美国Thermo公司,型号:PIKOREAL96);PCR仪(美国ABI公司,型号:9700型);测序仪(美国Illumina公司,型号:Illumina Miseq);超微量分光光度计(Thermo Fisher Scientific公司,型号:Nano Drop2000);微型荧光计(Promega公司,型号:Quantus™ Fluorometer)。

2 方 法

2.1 慢性心衰大鼠模型制备 将32只大鼠随机分为正常组(CONT组)6只和模型制备组26只。模型制备组采用背部皮下

多点注射ISO(剂量5 mg/kg,注射浓度1.67 mg/mL)的方式进行造模^[11]。CONT组则采用等剂量的生理盐水进行皮下注射作为对照,连续注射14 d,再观察14 d后进行模型评价。HF模型的验证条件^[12]:模型组大鼠左室射血分数(left ventricular ejection fractions, LVEF)与左室短轴缩短率(left ventricular fraction shortening, LVFS)低于CONT组,且NT-pro BNP高于CONT组,视为HF模型复制成功。

2.2 分组与给药 造模结束后,将18只造模成功大鼠随机分为模型组(MOD组)、参附组(SF组)、卡托普利组(KT组),每组6只。具体给药方案见表1。参附注射液的给药剂量及注射时间参照本团队前期的研究方案,给药持续时间均为15 d^[6]。采用体表面积换算法,大鼠给药剂量(g/kg)=折算系数6.2×人的剂量(g/kg)。其中人的体质量按照60 kg计算。参附注射液成人剂量为58 mL/次,1次/d。大鼠参附注射液给药剂量=6.2×58 mL/60 kg=6.0 mL/kg,1次/d;卡托普利成人剂量为50 mg/次,2次/d,大鼠卡托普利给药剂量=6.2×100 mg/70 kg=8.8 mg/kg,1次/d。

2.3 样本采集 末次给药24 h后,称体质量,腹腔注射乌拉坦(17.5 mg/kg)麻醉,用采血针在腹主动脉处采集血液,室温下静置2 h后离心(4℃,3 000 r/min,15 min,离心半径10 cm),移液枪吸取上层血清,放置于冻存管内-80℃保存。采血完毕后,立即剥离心脏,冲洗干净后,滤纸吸干心脏表面水分,称量心脏质量后分离出左心室和心尖部位的心肌组织,并称量左心室质量,放置在-80℃条件下保存,部分心尖组织用4%多聚甲醛溶液进行固定。打开腹腔,用无菌剪开小肠,取出肠内容物约0.5 g,在液氮罐中速冻3 min后,放置在-80℃冰箱中保存。将部分小肠组织用生理盐水充分冲洗后,放置在冷冻管中置于-80℃条件下保存。

2.4 观察指标

2.4.1 心脏质量指数、左心室质量指数 根据心脏质量、左心室及体质量计算心脏质量指数、左心室质量指数。心脏质量指数=心脏质量/体质量;左心室质量指数=左心室质量/体质量。

2.4.2 心功能 大鼠麻醉后进行固定剃除胸前毛发后胸前皮肤涂少量耦合剂,M型超声探头放置在左前胸部,与胸骨中线成10°~30°,在左室长轴切面上连续测量3个心动周期的左室舒张末期内径(left ventricular end-diastolic dimension, LVEDD)和左室收缩末期内径(left Ventricular End Systolic Diameter, LVESD),计算LVEF和LVFS,连续测量3次,取平均值。

2.4.3 心肌组织病理变化 4%多聚甲醛固定大鼠心尖组织样本,石蜡包埋后切片。苏木精-伊红染色(HE染色)后,在显微镜下观察心肌组织结构改变情况。

2.4.4 血清NT-proBNP含量 按ELISA试剂盒说明书操作检测血清NT-proBNP含量。

表1 大鼠分组给药方案

组别	给药方法、剂量及时间
CONT组	0.9%氯化钠注射液腹腔注射,6.0 mL/kg;蒸馏水灌胃,10 mL/kg
MOD组	0.9%氯化钠注射液腹腔注射,6.0 mL/kg;蒸馏水灌胃,10 mL/kg
SF组	参附注射液腹腔注射,6.0 mL/kg;蒸馏水灌胃,10 mL/kg
KT组	0.9%氯化钠注射液腹腔注射,6.0 mL/kg;蒸馏水灌胃(含临床等效剂量8.8 mg/kg的卡托普利片),10 mL/kg

2.4.5 小肠组织中闭锁小带蛋白1 (Zonula occludens-1,ZO-1) mRNA和闭合蛋白(occludin)mRNA表达水平 采用RT-qPCR技术检测小肠组织中ZO-1mRNA和occludin mRNA表达水平。在小肠组织中加入1 mL Trizol裂解液,充分匀浆裂解,随后按照标准流程提取总RNA。以提取的mRNA为模板,利用逆转录酶合成互补DNA(cDNA)。在NCBI GenBank数据库中检索目的基因的核苷酸序列,并采用Primer5引物设计软件合成特异性引物,引物序列见表2。随后在特定的反应体系中进行扩增。预变性:在温度为95 ℃条件下变性10 min;循环扩增:在95 ℃条件下变性15 s,使双链DNA充分解离,然后在60 ℃条件下退火30 s,使引物与模板结合并延伸,重复40个循环。实验选用β-actin作为内参基因(Housekeeping Gene),以校正不同样本间RNA上样量差异,并采用2^{-ΔΔCt}相对定量法计算ZO-1 mRNA和occludin mRNA表达水平。

表 2 引物序列信息

目的基因	序列(5'-3')	扩增产物片段长度/bp
ZO-1	上游引物:CCTAATAAGAACAGACGCGAGCA	248
	下游引物:GCAACATCAGCAATCGGTCCA	
occludin	上游引物:CCCAGACCACTATGAAACCGACT	248
	下游引物:CAGCCATGTACTCTTCGCTCT	
β-actin	上游引物:ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	223
	下游引物:TACTCTGCTTGCTGATCCAC	

2.4.6 小肠组织ZO-1、occludin蛋白表达水平 采用Western blotting检测小肠组织ZO-1、occludin蛋白表达水平。将小肠组织充分研磨后,加入细胞裂解液,离心取上清液。灌制10%分离胶和4.8%浓缩胶,凝固后备用。每个孔上样10 μL蛋白,在75 V恒压电泳至溴酚蓝到底部,在300 mA恒流转膜后进行切胶和封闭,具体时间依蛋白分子量制定。将膜与ZO-1一抗(1:2 000)、occludin一抗(1:2 000)、β-actin一抗(1:5 000)一起孵育,在4 ℃过夜,接着将稀释后的二抗与膜在室温孵育90 min。使用ECL化学发光液与膜孵育1min,在凝胶成像系统下进行成像,将曝光后的底片扫描,并用quantity one专业灰度分析软件进行分析。

2.4.7 16S rDNA检测肠道内容物菌群 使用DNA提取试剂盒提取肠道内容物样本细菌总基因组DNA。通过PCR扩增16S rDNA的V3-V4区域。扩增产物经纯化后,用2%琼脂糖凝胶电泳分析,随后制备DNA文库。经质量检测合格后,使用Illumina Miseq PE300系统进行测序。对获得的原始数据进行质量控制、序列拼接,按97%相似性进行OTU划分并去除嵌合序列。采用RDP classifier v2.2以70%置信阈值,基于Silva 16S rRNA数据库对各序列进行物种分类鉴定。

2.5 统计学方法 采用SPSS 29.0软件进行统计分析,计量资料符合正态分布,以“均数±标准差”(x±s)表示。满足方差齐性检验,组间比较采用单因素方差分析,两两比较采用LSD多重比较法。计量资料不符合正态分布以“中位数(四分位数)”[M(P₂₅,P₇₅)]表示,采用Kruskal-Wallis H检验。检验水准α=0.05,P<0.05为差异有统计学意义。

3 结 果

3.1 大鼠存活率及成模率 CONT组大鼠精神状态佳,活动

敏捷,饮水进食情况良好,而模型制备组大鼠出现毛发干枯稀疏,进食减少,体质量增加缓慢甚至停止增长,或嗜卧少动,个别大鼠出现了腹部膨隆的情况。在ISO皮下注射期间,共8只大鼠死亡,存活18只大鼠,存活率为69.23%(18/26)。造模结束后,存活大鼠均达到成模标准。

3.2 各组大鼠心功能比较 MOD组大鼠LVEF和LVFS均低于CONT组(P<0.01),LVEDD和LVESD均高于CONT组(P<0.01)。SF组和KT组大鼠LVEF与LVFS均高于MOD组(P<0.01),LVESD低于MOD组(P<0.01)。(见表3)

表 3 各组大鼠心功能比较 (x±s)

组别	n	LVEF/%	LVFS/%	LVEDD/mm	LVESD/mm
CONT组	6	99.02±0.92	83.30±6.82	4.66±0.63	0.80±0.42
MOD组	6	68.78±5.56 ^a	34.57±4.84 ^a	6.35±0.25 ^a	4.19±0.25 ^a
SF组	6	82.27±2.27 ^b	44.88±3.29 ^b	6.11±0.72	3.20±0.42 ^b
KT组	6	89.86±3.52 ^b	56.19±6.21 ^b	5.85±0.67	2.57±0.53 ^b
F		79.513	88.671	9.506	70.208
P		0.000	0.000	0.000	0.000

注:与CONT组比较,^aP<0.01;与MOD组比较,^bP<0.01。

3.3 各组大鼠体质量、心脏质量指数及左心室质量指数比较 MOD组大鼠体质量低于CONT组(P<0.01),心脏质量指数和左心室质量指数均高于CONT组(P<0.01);SF组、KT组大鼠体质量高于MOD组(P<0.01或P<0.05),心脏质量指数和左心质量指数均低于MOD组(P<0.01或P<0.05)。(见表4)

表 4 各组大鼠体质量、心脏质量指数及左心室质量指数比较 (x±s)

组别	n	体质量/g	心脏质量指数/(×10 ⁻³)	左心室质量指数/(×10 ⁻³)
CONT组	6	498.67±10.82	1.87±0.16	0.49±0.07
MOD组	6	434.50±13.69 ^a	2.69±0.28 ^a	0.79±0.04 ^a
SF组	6	480.83±32.88 ^a	2.09±0.04 ^a	0.57±0.14 ^a
KT组	6	460.50±12.65 ^b	2.21±0.22 ^a	0.63±0.13 ^b
F		11.810	18.856	8.766
P		0.000	0.000	0.000

注:与CONT组比较,^aP<0.01;与MOD组比较,^bP<0.05,^cP<0.01。

3.4 各组大鼠血清NT-proBNP含量比较 MOD组大鼠血清NT-proBNP含量高于CONT组(P<0.01);SF组和KT组大鼠血清NT-proBNP含量均低于MOD组(P<0.01)。(见表5)

表 5 各组大鼠血清 NT-proBNP 含量比较 (x±s)

组别	n	NT-proBNP/(pg/mL)
CONT组	6	430.46±37.63
MOD组	6	639.99±73.01 ^a
SF组	6	484.08±42.91 ^b
KT组	6	523.48±50.11 ^b
F		15.543
P		0.000

注:与CONT组比较,^aP<0.01;与MOD组比较,^bP<0.01

3.5 大鼠心肌组织病理观察 CONT组大鼠心肌细胞排列规则,结构完整,间质区域未见明显炎症细胞浸润及纤维组织增生;MOD组大鼠心肌呈现显著病变,心肌细胞结构紊乱,部分心肌纤维断裂、溶解,同时可见炎症细胞浸润;SF组大鼠心

肌病变明显改善,心肌纤维排列部分恢复,炎症浸润减轻;KT组大鼠心肌结构接近CONT组,纤维排列较整齐,炎症浸润显著减轻。(见图1)

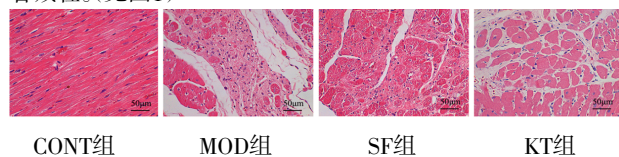


图1 心肌组织 HE 染色 (×400)

3.6 各组大鼠小肠组织ZO-1和occludin蛋白相对表达量比较 MOD组大鼠小肠组织ZO-1和occludin蛋白相对表达量低于CONT组 ($P<0.01$); SF组、KT组大鼠小肠组织ZO-1及occludin蛋白相对表达量均高于MOD组 ($P<0.01$)。(见图2、表6)

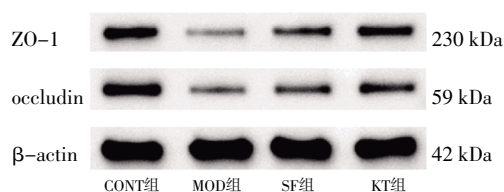


图2 各组大鼠小肠组织 ZO-1 和 occludin 蛋白表达 Western blotting 图

表6 各组大鼠小肠组织 ZO-1 和 occludin 蛋白相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ZO-1/β-actin	occludin/β-actin
CONT组	6	0.59±0.02	0.66±0.02
MOD组	6	0.20±0.04 ^a	0.18±0.02 ^a
SF组	6	0.33±0.03 ^b	0.33±0.03 ^b
KT组	6	0.46±0.03 ^b	0.44±0.03 ^b
F		162.539	303.392
P		0.000	0.000

注:与CONT组比较,^a $P<0.01$;与MOD组比较,^b $P<0.01$ 。

3.7 各组大鼠小肠组织ZO-1 mRNA和occludin mRNA相对表达量比较 MOD组大鼠小肠组织ZO-1 mRNA和occludin mRNA相对表达量低于CONT组 ($P<0.01$); SF组和KT组大鼠小肠组织ZO-1 mRNA和occludin mRNA相对表达量均高于MOD组 ($P<0.01$)。(见表7)

表7 各组大鼠小肠组织 ZO-1 mRNA 和 occludin mRNA 相对表达量比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	ZO-1 mRNA	occludin mRNA
CONT组	6	0.99±0.06	0.87±0.04
MOD组	6	0.20±0.03 ^a	0.21±0.03 ^a
SF组	6	0.43±0.03 ^b	0.43±0.05 ^b
KT组	6	0.64±0.05 ^b	0.62±0.03 ^b
F		302.826	322.746
P		0.000	0.000

注:与CONT组比较,^a $P<0.01$;与MOD组比较,^b $P<0.01$ 。

3.8 16S rDNA测序

3.8.1 16S rDNA高通量测序深度分析 Shannon指数曲线可评估样本微生物多样性与测序量的关系。随着测序量的提升,曲线逐渐达到平台期,表明现有测序深度已能较全面地覆盖样本中的微生物多样性。(见图3)

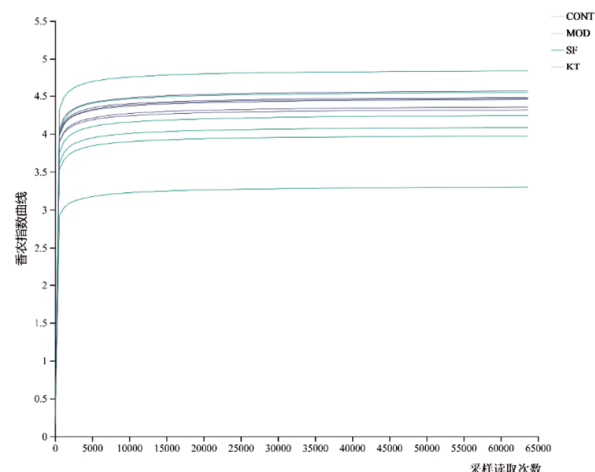


图3 Shannon 指数曲线

3.8.2 物种Venn图分析 4组之间共有的OTU为1 345,CONT组、MOD组、SF组和KT组的OTU数量分别为6 792、5 588、6 410、6 898。MOD组OTU数量低于CONT组;SF组OTU数量高于MOD组。MOD组和CONT组之间独有的OTU数量为212,而SF组和CONT组之间独有的OTU数量为389,说明SF组OTU组成与CONT组更为接近。(见图4)

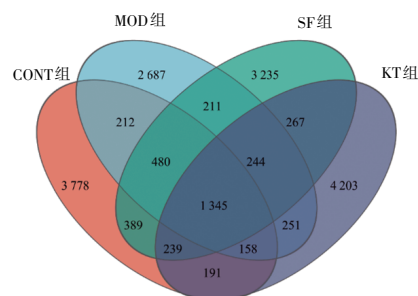


图4 Venn 图

3.8.3 肠道菌群物种α多样性分析 MOD组Shannon指数低于CONT组 ($P<0.05$),Simpson指数高于CONT组 ($P<0.01$); SF组和SF组Shannon指数均高于MOD组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$), Simpson指数低于MOD组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$)。MOD组Ace指数和Chao1指数低于CONT组 ($P<0.05$); SF组和SF组Chao1指数高于MOD组 ($P<0.05$ 或 $P<0.01$) (见表8)。慢性心衰大鼠肠道微生物群落的丰富度和多样性发生了明显变化。参附注射液可以明显回调肠道微生物群落的丰富度和多样性,且卡托普利也表现出与参附注射液相似的作用。

表8 各组大鼠肠道菌群物种 α 多样性结果分析 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Shannon	Simpson	Ace	Chao1
CONT组	6	4.04±0.28	0.06±0.01	2 468.6±308.46	2 182.80±276.22
MOD组	6	3.53±0.35 ^a	0.13±0.06 ^a	1 760.10±192.94 ^a	1 652.50±157.27 ^a
SF组	6	4.16±0.53 ^c	0.08±0.05 ^c	2 005.00±276.33	1 917.20±208.81 ^c
KT组	6	4.43±0.09 ^d	0.05±0.01 ^d	2 485.70±204.30 ^d	2 240.20±150.38 ^d
F		6.960	5.288	12.256	10.462
P		0.002	0.008	0.000	0.000

注:与CONT组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与MOD组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

3.8.4 肠道菌群物种β多样性分析 图5为基于weighted-

normalized-unifrac距离算法的PCoA图,结果显示CONT组和SF组菌群接近,MOD组和KT组的菌群分布远离以上两组。图6为基于weighted-unifrac距离算法的NMDS图,结果显示CONT组和SF组菌群接近,说明慢性心衰大鼠的肠道菌群结构发生了变化,参附注射液可以调节慢性心衰大鼠肠道菌群紊乱,使其肠道菌群结构更接近正常大鼠。

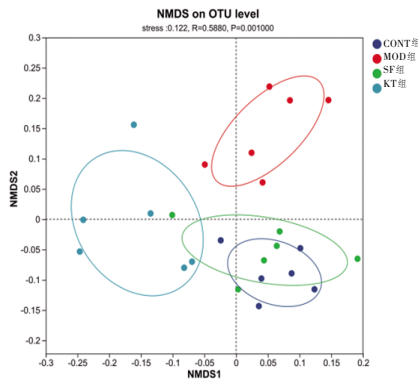


图 5 PCoA 图

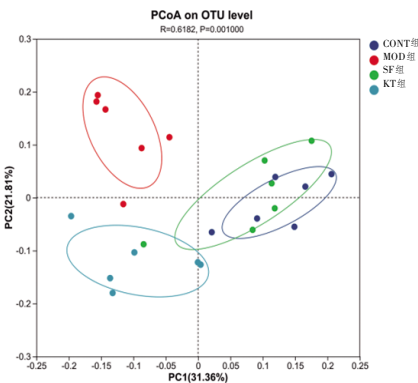


图 6 NMDS 图

3.8.5 属水平肠道菌群的相对丰度对比分析 MOD组大鼠乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)的相对丰度低于CONT组($P<0.05$),狭义梭菌属_1(*Clostridium_sensu_stricto_1*)及*unclassified_f_Peptostreptococcaceae*相对丰度高于CONT组($P<0.01$)。SF组大鼠乳酸杆菌属的相对丰度高于MOD组($P<0.01$),狭义梭菌属_1及*unclassified_f_Peptostreptococcaceae*相对丰度低于MOD组($P<0.01$),说明参附注射液可通过促进乳酸杆菌属的相对丰度,抑制狭义梭菌属_1和*unclassified_f_Peptostreptococcaceae*的相对丰度来对慢性心衰起到干预作用。KT组大鼠UCG-005、*Blautia*、*Allobaculum*、*NK4A214_group*、*Lachnoclostridium*相对丰度高于MOD组($P<0.05$),*Turicibacter*的相对丰度低于MOD

组($P<0.05$),说明卡托普利可以促进UCG-005、*Blautia*、*Allobaculum*、*NK4A214_group*、*Lachnoclostridium*的生长,抑制*Turicibacter*的生长。(见图7、表9)

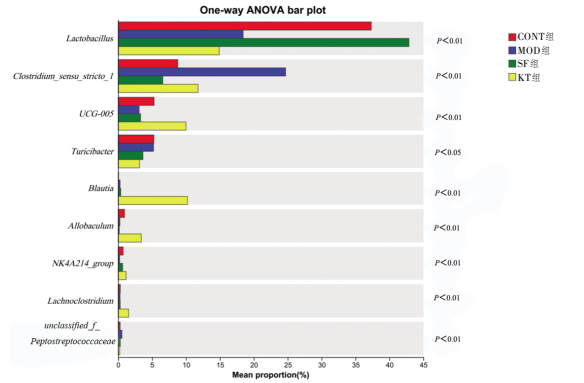


图 7 肠道菌群丰度组间比较

3.8.6 LEfSe分析 根据LEfSe分析确定4组间丰度差异明显的菌群,将线性判别分析(*Linear discriminant analysis*, LDA)的阈值设为4。CONT组的差异菌群主要包括芽孢杆菌纲(*Bacilli*),丹毒菌科、目(*Erysipelotrichaceae*,*Erysipelotrichales*),苏黎世杆菌属;MOD组的差异菌群主要包括梭菌纲、目和科(*Clostridia*,*Clostridiales*,*lostridiaceae*),狭义梭菌属_1,消化链球菌科(*Peptostreptococcaceae*),*Romboutsia*,*Peptostreptococcales-Tissierellales*等,其中大部分是有害菌;SF组的差异菌群包括乳酸杆菌的目、科和属;KT组的差异菌群主要包括毛螺菌目和科(*Lachnospirales*,*Lachnospiraceae*),颤螺菌目和科(*Oscillospirales*,*Oscillospiraceae*)等,其中部分为能产生短链脂肪酸(short-chain fatty acid, SCFA)的有益菌属。(见图8~9)

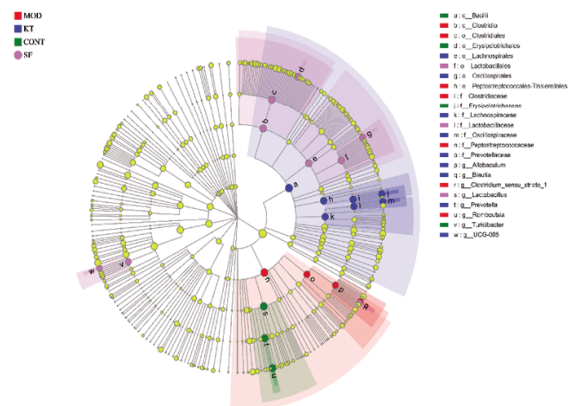


图 8 LEfSe 多级物种树图

表 9 各组大鼠属水平肠道菌群的相对丰度比较

组别	<i>n</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Clostridium_sensu_stricto_1</i>	<i>unclassified_f_Peptostreptococcaceae</i>	UCG-005	<i>Allobaculum</i>	<i>NK4A214_group</i>	<i>Lachnoclostridium</i>	<i>Turicibacter</i>	<i>Blautia</i>
		($\bar{x} \pm s, \%$)	($\bar{x} \pm s, \%$)	($\bar{x} \pm s, \%$)	($\bar{x} \pm s, \%$)	[$M(P_{25}, P_{75}), \%$]	[$M(P_{25}, P_{75}), \%$]	[$M(P_{25}, P_{75}), \%$]	[$M(P_{25}, P_{75}), \%$]	[$M(P_{25}, P_{75}), \%$]
CONT组	6	37.33 \pm 9.84	8.78 \pm 2.45	0.29 \pm 0.00	5.30 \pm 3.88	1.00(0.53, 1.36)	0.54(0.33, 1.02)	0.20(0.08, 0.55)	5.31(4.71, 6.13)	0.04(0.03, 0.08)
MOD组	6	18.43 \pm 10.12 ^a	24.69 \pm 12.77 ^b	0.57 \pm 0.00 ^b	3.09 \pm 2.53	0.09(0.03, 0.42)	0.15(0.13, 0.33)	0.12(0.07, 0.41)	5.49(4.63, 5.54)	0.01(0.01, 0.46)
SF组	6	42.88 \pm 17.94 ^d	6.58 \pm 3.78 ^d	0.32 \pm 0.00 ^d	3.31 \pm 3.24	0.08(0.04, 0.32)	0.65(0.53, 0.84)	0.23(0.11, 0.54)	3.74(2.49, 5.30)	0.06(0.01, 0.58)
KT组	6	14.90 \pm 8.30	11.78 \pm 5.21 ^d	0.23 \pm 0.04 ^d	10.00 \pm 3.88 ^c	3.79(1.49, 4.95) ^d	1.08(0.86, 1.39) ^d	1.49(1.35, 1.76) ^d	3.46(2.01, 4.02) ^e	6.95(5.33, 19.01) ^d
检验统计量		$F=7.745$	$F=7.489$	$F=7.735$	$F=5.245$	$H=16.479$	$H=14.500$	$H=13.340$	$H=10.820$	$H=13.524$
P		0.001	0.002	0.002	0.008	0.001	0.002	0.004	0.013	0.004

注:与CONT组比较,^a $P<0.05$,^b $P<0.01$;与MOD组比较,^c $P<0.05$,^d $P<0.01$ 。

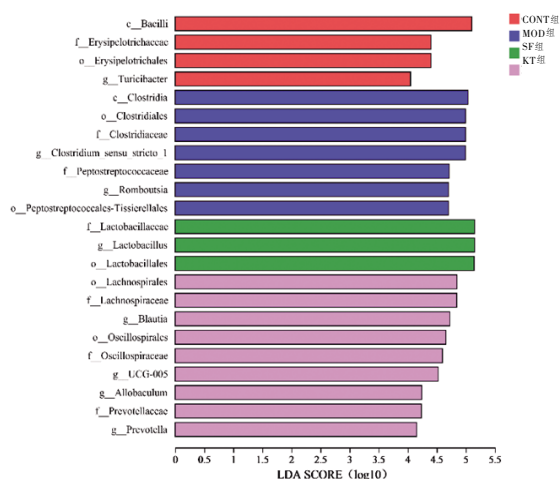


图9 LDA 判别柱形图

4 讨 论

本研究表明,慢性心衰大鼠的LVEF和LVFS均显著下降,血清NT-proBNP含量显著升高。参附注射液可以显著升高慢性心衰大鼠LVEF和LVFS水平,降低血清NT-proBNP含量。心肌细胞HE染色显示:MOD组大鼠心肌细胞体积明显增大,细胞间质内有大量纤维结缔组织增生和炎症细胞浸润。经参附注射液干预后,慢性心衰大鼠的心肌细胞间质纤维结缔组织和炎症细胞较明显减少。以上结果说明参附注射液能有效改善慢性心衰大鼠的心功能。

“肠漏假说”提出心输出量减少和体循环再分布可导致肠道灌注减少和肠道黏膜缺血,最终引起肠黏膜受损^[13]。本研究结果表明,慢性心衰大鼠小肠黏膜中的ZO-1和occludin两种肠道紧密连接蛋白含量少于正常大鼠,符合“肠漏假说”的表现。ZO-1和occludin是两种重要的紧密连接蛋白,在维持肠上皮屏障通透性方面起着至关重要的作用^[14]。在参附注射液干预后,慢性心衰大鼠肠道组织中ZO-1和occludin蛋白的表达上调,表明参附注射液能够恢复肠道黏膜的通透性。有研究发现,肠道微生物群可通过靶向多种途径改变肠道紧密连接蛋白的表达来调节肠道屏障功能^[15-16],其中乳酸杆菌与肠道紧密连接蛋白关系密切。嗜酸乳酸杆菌和植物乳酸杆菌可分别增加体内模型和体外模型中的occludin蛋白表达^[17-18]。此外,植物乳酸杆菌的预处理还能防止产肠毒素大肠杆菌引起的肠上皮细胞中闭合蛋白-1 (claudin-1)、occludin和ZO-1减少^[19]。SF组大鼠肠道菌群中乳酸杆菌属的相对丰度显著升高,表明参附注射改善心衰大鼠肠道通透性的作用机制可能与提高乳酸杆菌属的相对丰度有关。

16S rDNA测序结果表明,异丙肾上腺素诱导慢性心衰大鼠的 α 多样性和 β 多样性发生了显著的变化。参附注射液可以明显增加慢性心衰大鼠肠道微生物群落的相对丰度和多样性,使其肠道菌群结构接近正常大鼠。SF组大鼠乳酸杆菌属的相对丰度高于MOD组,狭义梭菌属_1和unclassified_f_Peptostreptococcaceae的相对丰度低于MOD组,说明参附注射液可以增加慢性心衰大鼠肠道菌群中有益菌乳酸杆菌属的相对丰度,并降低狭义梭菌属_1和unclassified_f_Peptostreptococcaceae的相对丰度。乳酸杆菌属是人类肠道菌群中的重要菌属,已

成为人类医学中最常用的益生菌之一^[20]。乳酸杆菌属具有抗炎活性,可增加心脏毒性模型小鼠体质量,恢复其心脏功能,降低炎症因子C-C趋化因子配体3(C-C chemokine ligand 3, Ccl3)、C-C趋化因子配体2(C-C chemokine ligand 2, Ccl2)和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)表达^[21]。此外,乳酸杆菌属与血清抗氧化相关指标成正相关,如血清中总抗氧化能力、谷胱甘肽过氧化物酶、过氧化氢酶含量与丙二醛和炎症细胞因子水平呈负相关^[22]。除了有益菌属的改变外,狭义梭菌属_1和unclassified_f_Peptostreptococcaceae可通过多种方式参与慢性心衰的病程进展。有研究表明,白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)和TNF- α 作为炎症损伤因子可以加速心衰进展,而肠组织中IL-1 α 和TNF- α 的转录水平与狭义梭菌属_1的富集呈正相关^[23-24]。此外,狭义梭菌属_1作为肠道疾病的病原体,能对肠道黏膜产生有害影响,导致结肠上皮炎和肠道通透性增加等^[25]。三甲胺N-氧化物(trimethylamine N-oxide, TMAO)是一种加重心衰进展的有害代谢物,Peptostreptococcaceae加速心衰进展主要与TMAO相关^[25-26]。

综上所述,参附注射液能提高慢性心衰大鼠的心功能,恢复大鼠的肠道通透性,改善肠道菌群紊乱。然而,本实验仍存在一定的局限性,如参附注射液的化学成分较为复杂,治疗心衰的特定活性成分尚不明确。

参考文献

- [1] SAVARESE G, BECHER P M, LUND L H, et al. Global burden of heart failure: A comprehensive and updated review of epidemiology[J]. Cardiovasc Res, 2023, 118(17):3272-3287.
- [2] WANG H, CHAI K, DU M H, et al. Prevalence and incidence of heart failure among urban patients in China: A national population-based analysis[J]. Circ Heart Fail, 2021, 14(10):e008406.
- [3] CHEN A T, ZHANG J, ZHANG Y H. Gut microbiota in heart failure and related interventions[J]. Imeta, 2023, 2(3):e125.
- [4] 肖纯钢,丁铠,曹华,等.肠道菌群对心力衰竭的影响:聚焦氧化三甲胺[J].中国老年学杂志, 2023, 43(3):763-767.
- [5] LUQMAN A, HASSAN A, ULLAH M, et al. Role of the intestinal microbiome and its therapeutic intervention in cardiovascular disorder[J]. Front Immunol, 2024, 15: 1321395.
- [6] 邓志杰,董子洵,刘家伟,等.参附注射液综合评价研究[J].中国临床药理学杂志, 2023, 39(24):3682-3692.
- [7] 赫一鸣,宋佳昱,薛嘉宝,等.参附注射液HPLC指纹图谱及化学识别研究[J].时珍国医国药, 2023, 34(2):338-340.
- [8] 郭瑾,王梓仪,张倩,等.基于miR-139/Wnt/ β -catenin信号通路探讨参附注射液对慢性心力衰竭大鼠心肌纤维化的保护作用[J].湖南中医药大学学报, 2024, 44(2):197-205.
- [9] 王梓仪,郭瑾,张倩,等.参附注射液抑制铁死亡对大鼠心

- 肌细胞氧化应激损伤的影响[J].中国中医药信息杂志, 2025,32(6):86-92.
- [10] 黄淑敏,廖晓倩,范星宇,等.基于HMGB1/TLR4/NF- κ B信号通路探讨参附注射液对慢性心力衰竭大鼠的保护作用[J].中国中药杂志,2022,47(20):5556-5563.
- [11] LIAO M R, XIE Q, ZHAO Y Q, et al. Main active components of Si-Miao-Yong-An decoction (SMYAD) attenuate autophagy and apoptosis via the PDE5A-AKT and TLR4-NOX4 pathways in isoproterenol (ISO)-induced heart failure models[J]. Pharmacol Res,2022,176:106077.
- [12] 钟森杰,熊霞军,张倩,等.基于“方证对应”理论探讨主动脉弓缩窄致心力衰竭大鼠模型的中医证型与代谢标志物[J].中国实验方剂学杂志,2022,28(16):130-139.
- [13] MAHENTHIRAN A, WILCOX J, WILSON TANG W H. Heart failure: A punch from the gut[J]. Curr Heart Fail Rep,2024,21(2):73-80.
- [14] KUO W T, ODENWALD M A, TURNER J R, et al. Tight junction proteins occludin and ZO-1 as regulators of epithelial proliferation and survival[J]. Ann N Y Acad Sci,2022,1514(1):21-33.
- [15] LEWIS C V, TAYLOR W R. Intestinal barrier dysfunction as a therapeutic target for cardiovascular disease[J]. Am J Physiol Heart Circ Physiol,2020,319(6): H1227-H1233.
- [16] ULLUWISHEWA D, ANDERSON R C, MCNABB W C, et al. Regulation of tight junction permeability by intestinal bacteria and dietary components[J]. J Nutr,2011, 141(5):769-776.
- [17] WU Y Q, JHA R, LI A, et al. Probiotics (Lactobacillus plantarum HNU082) supplementation relieves ulcerative colitis by affecting intestinal barrier functions, immunity-related gene expression, gut microbiota, and metabolic pathways in mice[J]. Microbiol Spectr, 2022, 10 (6): e0165122.
- [18] KANG Y B, KANG X, YANG H, et al. Lactobacillus acidophilus ameliorates obesity in mice through modulation of gut microbiota dysbiosis and intestinal permeability[J]. Pharmacol Res,2022,175:106020.
- [19] WANG J, JI H F, WANG S X, et al. Probiotic Lactobacillus plantarum promotes intestinal barrier function by strengthening the epithelium and modulating gut microbiota[J]. Front Microbiol,2018,9:1953.
- [20] ZHAO X, ZHONG X Q, LIU X, et al. Therapeutic and improving function of lactobacilli in the prevention and treatment of cardiovascular-related diseases: A novel perspective from gut microbiota[J]. Front Nutr, 2021,8:693412.
- [21] ZHAO L B, XING C Y, SUN W Q, et al. Lactobacillus supplementation prevents cisplatin-induced cardiotoxicity possibly by inflammation inhibition[J]. Cancer Chemother Pharmacol,2018,82(6):999-1008.
- [22] WANG Y B, XIE Q H, SUN S, et al. Probiotics-fermented Massa Medicata Fermentata ameliorates weaning stress in piglets related to improving intestinal homeostasis[J]. Appl Microbiol Biotechnol, 2018, 102(24): 10713-10727.
- [23] WANG Y, XU L, LIU J H, et al. A high grain diet dynamically shifted the composition of mucosa-associated microbiota and induced mucosal injuries in the colon of sheep[J]. Front Microbiol,2017,8:2080.
- [24] PENA E, BRITO J, EL ALAM S, et al. Oxidative stress, kinase activity and inflammatory implications in right ventricular hypertrophy and heart failure under hypobaric hypoxia[J]. Int J Mol Sci,2020,21(17):6421.
- [25] KOETH R A, WANG Z N, LEVISON B S, et al. Intestinal microbiota metabolism of L-carnitine, a nutrient in red meat, promotes atherosclerosis[J]. Nat Med,2013, 19(5):576-585.
- [26] JARMUKHANOV Z, MUKHANBETZHANOV N, KOZHAKHMETOV S, et al. The association between the gut microbiota metabolite trimethylamine N-oxide and heart failure[J]. Front Microbiol,2024,15:1440241.
- (收稿日期:2025-07-02 编辑:蒋凯彪)

(上接第13页)

- [24] 郭贺华,曾玉兰,聂雅兰,等.红景天苷通过Wnt/ β -catenin信号通路对肺腺癌A549细胞的影响[J].世界中西医结合杂志,2024,19(5):927-932.
- [25] 王芝玉,周立霞.非小细胞肺癌中ncRNAs对Wnt/ β -catenin信号通路调控的研究进展[J].遵义医科大学学报,2024, 47(8):829-836.
- [26] 彭明,王亚红,宋泽庆,等.四跨膜蛋白超家族在Wnt/ β -catenin信号通路中的作用及机制研究进展[J].现代医院,2020,20(5):730-734,740.
- [27] FAN G C, XU P, TU P. miR-1827 functions as a tumor suppressor in lung adenocarcinoma by targeting MYC and FAM83F[J]. J Cell Biochem, 2020, 121(2): 1675-1689.
- (收稿日期:2025-05-06 编辑:蒋凯彪)