

DOI:10.13350/j.cjpb.240205

• 论著 •

# 加味半夏白术天麻汤对代谢性高血压大鼠的有益作用及机制研究\*

吴赛,于广宇,胡心荷,迟伟峰\*\*

(青岛大学附属青岛市海慈医院(青岛市中医医院),山东青岛 266011)

**【摘要】** **目的** 探讨加味半夏白术天麻汤通过调节肠道微生物结构和抑制肠源性 LPS/TLR4 途径对代谢性高血压 (metabolic hypertension, MH) 大鼠的有益作用及相关机制。 **方法** 通过酒精和高糖/高脂肪饮食 (ACHSFDs) 诱导 MH 大鼠模型,加味半夏白术天麻汤分别以 2.52 g/kg 和 10.08 g/kg 的剂量每天给药。通过血压、血脂和肝脏脂质沉积测定来评估加味半夏白术天麻汤对 MH 的影响。通过高通量 16S rRNA 测序检测肠道菌群的变化,同时分别通过气相色谱法 (GC) 和酶联免疫吸附测定法 (ELISA) 定量代谢物短链脂肪酸 (SCFAs) 和 LPS 水平。苏木精和伊红 (H&E) 染色和透射电子显微镜 (TEM) 评估大鼠结肠的组织病理学变化。测量 D-乳酸 (D-LA) 水平和紧密连接蛋白 (TJPs) 表达,以评估肠道屏障功能。检测血清内皮素 1 (ET-1) 和一氧化氮 (NO) 水平,以确定血管内皮功能;评估主动脉和肠道中的 TLR4/MyD88 信号通路。 **结果** 加味半夏白术天麻汤给药可改善 ACHSFDs 诱导的 MH 大鼠的血压和血脂代谢紊乱。肠道菌群分析显示,加味半夏白术天麻汤给药后链球菌物种水平增加,脱硫杆菌和脱硫弧菌物种水平降低。加味半夏白术天麻汤增加了结肠中 SCFAs 水平以及 SCFAs 受体 GPCR41 和 GPCR43 的表达。同时,紧密连接蛋白 (TJPs) (如 Claudin-1, occludin) 在结肠中的表达上调,而 TLR4 和 MyD88 则下调,从而增强肠道屏障完整性并降低血清 LPS 水平。此外,加味半夏白术天麻汤可通过抑制血管中的 TLR4/MyD88 通路以及调节 NO 和 ET-1 平衡来改善血管内皮功能。

**结论** 本研究在 MH 大鼠模型中证明了加味半夏白术天麻汤的有益作用和潜在机制。基于肠道微生物群结构调节和肠道屏障改善,加味半夏白术天麻汤抑制 LPS 诱导的血管 TLR4/MyD88 信号激活,以改善血管内皮功能,进而降低血压。

**【关键词】** 加味半夏白术天麻汤;肠道微生物;LPS;TLR4 途径;代谢性高血压

**【文献标识码】** A **【文章编号】** 1673-5234(2024)02-0149-08

[Journal of Pathogen Biology, 2024 Feb;19(2):149-156.]

## The beneficial effect and related mechanism of Jiawei Banxia Baizhu Tianma Decoction on metabolic hypertension (MH) rats

WU Sai, YU Guangyu, HU Xinhe, CHI Weifeng (Qingdao Hiser Hospital Affiliated of Qingdao University (Qingdao Traditional Chinese Medicine Hospital), Qingdao 266011, Shandong, China)\*\*\*

**【Abstract】** **Objective** To explore the beneficial effects of Jiawei Banxia Baizhu Tianma Decoction on metabolic hypertensive rats by regulating intestinal microbial structure and inhibiting intestinal LPS/TLR4 pathway. **Methods** MH rat models were induced by alcohol and high-sugar/high-fat diets (ACHSFDs), modified Banxia Baizhu Tianma Tang is administered daily at doses of 2.52 g/kg and 10.08 g/kg, respectively. The effects of Banxia Baizhu Tianma Tang on MH were evaluated by measuring blood pressure, blood lipids and liver lipid deposition. The changes of intestinal flora were detected by high-throughput 16 S rRNA sequencing, and the levels of metabolites short-chain fatty acids (SCFAs) and LPS were quantified by gas chromatography (GC) and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), respectively. Hematoxylin and eosin (H&E) staining and transmission electron microscopy (TEM) were used to evaluate the histopathological changes of the colon in rats. D-lactic acid (D-LA) levels and tight junction proteins (TJPs) expression were also measured to assess intestinal barrier function. In addition, serum endothelin-1 (ET-1) and nitric oxide (NO) levels were also studied to determine vascular endothelial function. The TLR4/MyD88 signaling pathway in the aorta and intestine was evaluated. **Results** Modified Banxia Baizhu Tianma Decoction can improve the blood pressure and lipid metabolism disorder of MH rats induced by ACHSFDs. Analysis of gut microbiota showed that the level of Streptococcus species increased after administration of modified Banxia Baizhu Tianma Tang, while the levels of Desulfurization Bacillus

\* **【基金项目】** 山东省中医药科研发展计划(No. Q-2023131)。

\*\* **【通讯作者】** 迟伟峰, E-mail: momo0820@163.com

**【作者简介】** 吴赛(1988-),女,山东济南人,博士,主治医师,研究方向:中西医结合治疗心血管病。E-mail: naona1988sai@163.com

and Desulfurization *Vibrio* species decreased. Modified Banxia Baizhu Tianma Decoction increased the level of SCFAs in the colon and the expression of SCFAs receptors GPCR41 and GPCR43. At the same time, the expression of tight junction proteins (TJPs) (such as Claudin-1 and occludin) was up-regulated in the colon, while TLR4 and MyD88 were down-regulated, thereby enhancing intestinal barrier integrity and reducing serum LPS levels. In addition, Modified Banxia Baizhu Tianma Decoction can improve vascular endothelial function by inhibiting TLR4/MyD88 pathway in blood vessels and regulating the balance of NO and ET-1. **Conclusion** This study demonstrated the beneficial effects and potential mechanisms of modified Banxia Baizhu Tianma Tang in an MH rat model. Based on the regulation of gut microbiota structure and improvement of intestinal barrier, the modified Banxia Baizhu Tianma Tang inhibits LPS induced activation of TLR4/MyD88 signaling in blood vessels, thereby improving endothelial function and lowering blood pressure.

**【Key words】** Jiawei Banxia Baizhu Tianma Decoction; enteric microorganisms; LPS; TLR4 pathway; metabolic hypertension

随着生活质量的提高,高血压发病率随之增加。遗传是高血压的一个常见风险因素,但不健康的饮食行为(如高糖、高脂肪和高盐饮食,以及过量饮酒)都是最终升高血压的风险因素<sup>[1]</sup>。代谢紊乱会增加血压升高的风险,而改善代谢有助于治疗高血压。代谢性高血压(metabolic hypertension, MH)的发病机制与多种复杂因素有关,但一个关键的致病因素是不良饮食习惯介导的肠道稳态失衡<sup>[2-3]</sup>。Wang 等<sup>[4]</sup>建立了 ACHSFDs 诱导的 MH 大鼠模型,并发现肠道来源的脂多糖/toll 样受体 4(LPS/TLR4)通路是 MH 的重要触发机制。肠道来源的 LPS/TLR4 通路激活,过量的 LPS 产生、LPS 进入血液循环和激活血管 TLR4。此外,肠内屏障损伤被认为是这一病理过程中的关键一步。半夏白术天麻汤内含有多种中药,适用于多种疾病的治疗,包括神经性眩晕、面神经瘫痪以及血管神经性头痛<sup>[5]</sup>。徐男等<sup>[6]</sup>研究表明半夏白术天麻汤可有效改善血压与血脂、抑制机体炎症反应、保护内皮细胞等。目前尚未对加味半夏白术天麻汤对 MH 的作用及其机制进行研究。本研究建立了 MH 大鼠模型以观察加味半夏白术天麻汤对 MH 大鼠血压和血脂的影响,并通过肠道来源的 LPS/TLR4 途径表征其对 MH 的机制作用。

## 材料与方 法

### 1 试剂来源

加味半夏白术天麻汤源自青岛市海慈医院(青岛市中医医院)。标准总甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)试剂购自宁波医科系统生物技术有限公司。D-乳酸(D-LA)、脂多糖(LPS)、肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ )、白细胞介素-6 (IL-6)试剂盒、一氧化氮(NO)、内皮素-1 (ET-1)、内皮型一氧化氮合酶(eNOS)均购自臻萃(江苏)酶科技发展有限公司(中国)。闭合蛋白抗体(GTX 114949)购自 Gene Tex (Alton Pkwy Irvine, 美国),而 ZO-1 (sc-33725)和

TLR 4 (sc-293072) 抗体购自 Santa Cruz Biotechnology(美国)。p-IKK  $\beta$  (ab 194528)、 $\beta$ -肌动蛋白(ab 8226)和 GAPDH (ab 181602) 抗体购自 Abcam (英国)。p-NF- $\kappa$ B p65 (3033)、NF- $\kappa$ B p65 (8242)、IKK $\beta$ (8943)、p-I $\kappa$ B $\alpha$  (2859)、I $\kappa$ B $\alpha$  (4814) 抗体购自 Cell Signaling Technology(美国)。MyD 88(YT 2928)抗体购自 Immunoway(中国)。紧密连接蛋白-1 (28674-1-AP)和 GPCR 43 (19952-1-AP) 抗体购自 Proteintech Group(中国),GPCR 41 (AP 51949) 抗体购自 Abgent(美国)。FITC 偶联的 AffiniPure 山羊抗兔 IgG(H+L)(BA 1105)、DAPI(AR 1177)和抗荧光淬灭试剂(AR 0036) 购自 Boster Biological Technology(美国)。

### 2 加味半夏白术天麻汤制备

加味半夏白术天麻汤(法半夏 9 g、白术 18 g、天麻 6 g、陈皮 6 g、钩藤 15g、茯苓 18 g、泽泻 30 g、甘草 3 g),煎煮至 0.505 g/mL 煎剂。

### 3 实验动物和分组

36 只无特异性病原体的雄性 Sprague-Dawley 大鼠购自济南朋悦实验动物繁育有限公司(中国)[许可证号:SCXK(鲁)20190003]。在适应 1 周后,随机选择 9 只大鼠作为对照组,并给予正常食物和水饲养。其余大鼠给予 ACHSFD 以诱导 MH 模型。酒精浓度从 5% 增加到 10%(第一周),然后每周增加 2%,直到达到 18%。高糖和高脂饮食购自南通特洛菲饲料科技有限公司(中国)。由 64% 的普通饲料、0.2% 的胆酸钠、0.8% 的胆固醇、15% 的猪油和 20% 的蔗糖组成。

MH 造模过程中每隔 1 周记录大鼠血压、体重、血清甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein-cholesterol, HDL-c)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein-cholesterol, LDL-c)水平。当收缩压(systolic blood pressure, SBP)  $\geq$  140 mmHg,且血脂水平出现显著性差异时,认为造模成功。将造模成功的 32 只大鼠随机

分为4组:模型组( $n=9$ )、加味半夏白术天麻汤低剂量组(2.52g/kg,  $n=9$ )、剂量组(10.08 g/kg,  $n=9$ )。对照组大鼠和模型组大鼠给予生理盐水处理。加味半夏白术天麻汤使用浓度参考王琪格等<sup>[7]</sup>的研究方法。

本研究经青岛市海慈医院(青岛市中医医院)动物伦理委员会批准。

#### 4 血压测量

使用智能无创血压计(BP-2010AUL)并行测量血压,即同时测量不同组的大鼠。该过程包括:加味半夏白术天麻汤(2.52 g/kg, 10.08 g/kg)2 h后,将大鼠置于血压室中,直到达到( $25 \pm 1$ ) $^{\circ}\text{C}$ 。15 min后开始测量。将大鼠放入恒温40 $^{\circ}\text{C}$ 的大鼠夹中,其尾部插入脉冲传感器。测量期间保持安静的环境。传感器信号稳定后,仪器自动采集收缩压(systolic blood pressure, SBP)、舒张压(diastolic blood pressure, DBP)和平均动脉压(mean arterial pressure, MBP)。

#### 5 血清血脂测定

建模5周后从大鼠眼眶取血,12周后从大鼠动脉取血。将血液以3 500 r/min离心15 min以分离血清。为使用试剂盒和自动生化分析仪(日本日立-7020)测定TG、TC、HDL-c和LDL-c水平。

#### 6 油红O染色

为了检查肝组织,将肝脏样本在-80 $^{\circ}\text{C}$ 下冷冻,切成6 $\mu\text{m}$ 的切片,在蒸馏水中彻底清洗后,在60%异丙醇中浸泡30 s,在油红O染色溶液中避光浸泡10~15 min,并在60%乙醇中在显微镜(MF 43-N, 中国)下检查。然后将载玻片在蒸馏水中洗涤并在苏木精中复染。

#### 7 酶联免疫吸附试验(Enzyme-linked immunosorbent assay, ELISA)

加味半夏白术天麻汤给药12周后,使用试剂盒通过ELISA测定一氧化氮(nitric oxide, NO)、内皮素-1(endothelin 1, ET-1)、eNOS、D-LA和LPS血清水平。

#### 8 SCFAs提取和分析

给药10周后,对大鼠进行腹部按摩,并诱导其在干净的桌子上排便。将粪便(约500 mg)与2 mL稀释液(己酸和稀盐酸的混合物)混合2 min。加入盐酸酸化样品,确保SCFAs质子化,并防止色谱图中的分裂峰。样品在12 000 r/min下离心10 min,上清液通过0.22 $\mu\text{m}$ 过滤器过滤,移取700 $\mu\text{L}$ 加入0.2 mL 50%硫酸溶液和0.7 mL乙醚中。样品混匀后,在12 000 r/min条件下离心5 min。

将样品置于冰箱30 min,取上层醚层进行气相色谱(GC)分析。使用配备DB-FFAP(30 mm $\times$ 0.25 mm $\times$ 0.25 $\mu\text{m}$ )色谱柱的Varian 3800 GC系统,在GC火焰离子化检测器(GC-FID)中分析样品。对于样

品加热,温度最初50 $^{\circ}\text{C}$ ,持续1 min,然后在5 min内以10 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度升至190 $^{\circ}\text{C}$ 。在5 min内,以30 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$ 的速度将温度升至230 $^{\circ}\text{C}$ ,温度降至50 $^{\circ}\text{C}$ 并保持5 min。FID检测器设置:温度250 $^{\circ}\text{C}$ ,具有氮气的尾鼓风机30 mL/min;空气400 mL/min;氢气47.0 mL/min;气化室温度250 $^{\circ}\text{C}$ 。载气为高纯氮气。线速度1.0 mL/min。分流比50:1。最终进样体积3 $\mu\text{L}$ 。

#### 9 组织学评估和免疫组织化学

血管、肝脏和结肠组织在4%多聚甲醛中固定2 d,自动脱水器脱水后包埋在石蜡中。蜡块用切片剂切成4 $\mu\text{m}$ 厚的切片。为了评估血管、肝脏和结肠病变,使用肉毒毒素和伊红(hematoxylin & eosin, H&E)染色。在肠道中检测TLR4、MyD88、GPCR43和GPCR41的表达,采用油红O染色<sup>[8]</sup>检测血管中TLR4和MyD88的表达。

#### 10 透射电子显微镜(Transmission electron microscopy, TEM)

将盲肠附近的结肠压平并切成1 mm<sup>3</sup>切片,固定在2.5%戊二醛中,4 $^{\circ}\text{C}$ 下避光保存过夜。使用梯度乙醇和丙酮对样品进行脱水。在用包埋剂渗透样品之后,将聚合器加热过夜。然后用超薄切片剂切片,并在50%乙醇溶液和柠檬酸铅中用醋酸铀染色。最后,使用TEM(H-7650, 日本日立)在20 000倍下观察结肠超微结构。

#### 11 蛋白质免疫印迹法(Western blot)

在液氮中研磨血管和结肠组织后,加入适当体积的RIPA缓冲液以完全裂解样品。十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶用于分离蛋白质,然后转移到聚偏氟乙烯膜。将膜在含有0.1% Tween-20(PBST)加5%脱脂奶粉的磷酸盐缓冲溶液中封闭2 h。将几种一抗依次与膜在4 $^{\circ}\text{C}$ 下孵育过夜,包括针对TLR4、Myd88、NF- $\kappa\text{B}$  p65、p-NF- $\kappa\text{B}$  p65、I $\kappa\text{B}\alpha$ 、p-I $\kappa\text{B}\alpha$ 、IKK $\beta$ 、p-IKK $\beta$ 的抗体。第2 d,将膜在PBST中洗涤,并在室温下与对应的二抗HRP缀合的抗体孵育2 h。最后,使用增强化学发光溶液(ECL),使用化学发光检测器来显示蛋白质条带。

#### 12 16S rDNA高通量测序与分析

给药结束,收集各组大鼠新鲜粪便,然后快速置于液氮中冷冻。根据上述检测结果,选取效果显著的大鼠粪便,交由北京阅微基因技术有限公司对粪便中的微生物菌群进行测序。

#### 13 统计分析

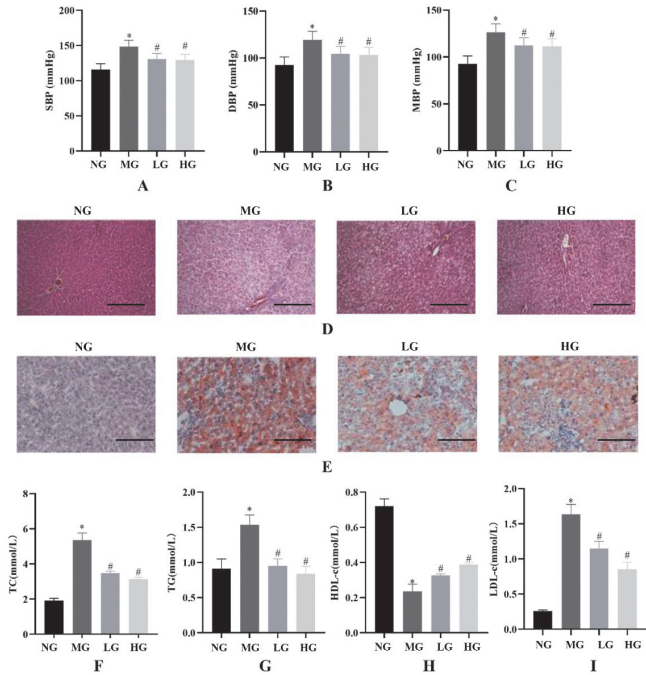
单因素方差分析(ANOVA)用于分析数据,结果表示为平均值 $\pm$ 标准差(SD)。使用GraphPad Prism 8软件绘制图表。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。



### 结果

#### 1 加味半夏白术天麻汤给药对 MH 模型大鼠血压及脂质代谢的影响

与对照组相比,模型大鼠中 SBP 和 MBP 显著增加( $P < 0.05$ ) (图 1A、C)。建模后,大鼠的收缩压、舒张压和 MBP 水平显著高于对照大鼠( $P < 0.05$ ) (图 1A-C), SBP  $\geq 140$  mmHg。此外,模型组大鼠血清 TC 和 LDL-c 水平显著升高( $P < 0.05$ ) (图 1F、I), 而 HDL-c 显著降低( $P < 0.05$ ) (图 1H)。因此, MH 模型成功建立。



A~C 收缩压(SBP)、舒张压(DBP)和平均血压(MBP)的变化 D 肝脏 H&E 染色的代表图( $\times 100$ ),比例尺为  $100 \mu\text{m}$  E 肝脏油红 O 染色( $200\times$ ),比例尺为  $50 \mu\text{m}$  F~I 血清总胆固醇(TC)、甘油三酯(TG)、高密度脂蛋白胆固醇(HDL-c)和低密度脂蛋白胆固醇(LDL-c)的变化 NG 对照组 MG 模型组 LG 加味半夏白术天麻汤低剂量治疗组 HG 加味半夏白术天麻汤高剂量治疗组 与 NG 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 MG 组比较, #  $P < 0.05$ , n=9

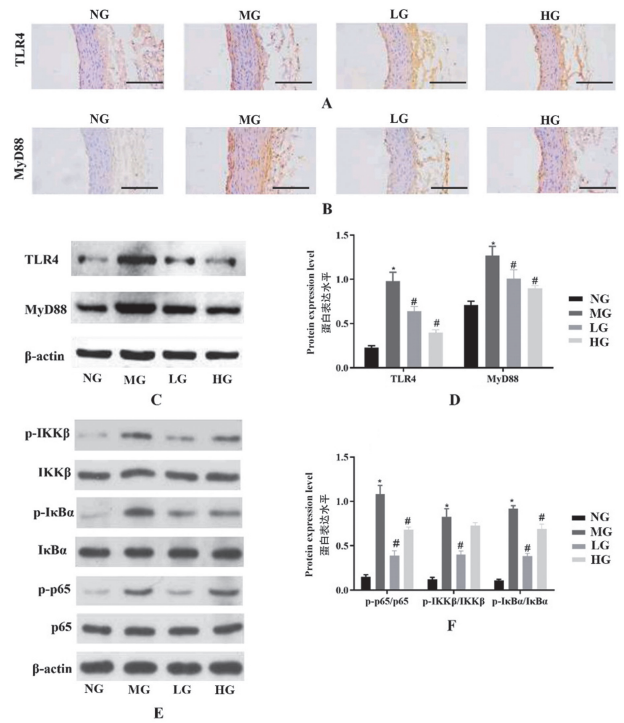
图 1 加味半夏白术天麻汤对 MH 模型大鼠血压和脂质代谢的影响

A-C Changes in systolic blood pressure (SBP), diastolic blood pressure (DBP), and mean blood pressure (MBP) D Representative diagram of liver H&E staining( $100\times$ ), the scale is  $100 \mu\text{m}$  E Liver Oil Red O Staining ( $200\times$ ), the scale is  $50 \mu\text{m}$  F-I Changes in serum total cholesterol (TC), triglycerides (TG), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-c), and low-density lipoprotein cholesterol (LDL-c) NG Control group MG Model group LG Modified Banxia Baizhu Tianma Tang high-dose treatment group HG modified Banxia Baizhu Tianma Tang high-dose treatment group Compared with the NG group, \*  $P < 0.05$ ; Compared with the MG group, #  $P < 0.05$ , n = 9

Fig. 1 The effect of modified Banxia Baizhu Tianma Tang on blood pressure and lipid metabolism in MH model rats

与模型组相比,加味半夏白术天麻汤给药大鼠 SBP、DBP 和 MBP 显著降低( $P < 0.01$ ) (图 1A-C)。加味半夏白术天麻汤低剂量和高剂量组的 TC、TG 和

LDL-c 水平显著低于模型组( $P < 0.05$ ), 而 HDL-c 水平增加(图 2F-I)。



A 血管中 TLR4 的代表性免疫组织化学图像( $200\times$ , 比例尺为  $50 \mu\text{m}$ ) B MyD88 在血管中的代表性免疫组织化学图像( $200\times$ , 比例尺为  $50 \mu\text{m}$ ) C、D 血管中 TLR4、MyD88 水平的蛋白质印迹分析 E、F 血管中 IKKβ 和 p-IKKβ、IκBα 和 p-IκBα、p65 和 p-p65 水平的蛋白质印迹分析 NG 对照组 MG 模型组 LG 加味半夏白术天麻汤低剂量治疗组 HG 加味半夏白术天麻汤高剂量治疗组 与 NG 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 MG 组比较, #  $P < 0.05$ , n=9

图 2 加味半夏白术天麻汤对血管中 TLR4/MyD88 通路的影响

A Representative immunohistochemical images of TLR4 in blood vessels ( $200\times$ , the scale is  $50 \mu\text{m}$ ) B Representative immunohistochemical images of MyD88 in blood vessels ( $200\times$ , the scale is  $50 \mu\text{m}$ ) C, D Western blot analysis of TLR4 and MyD88 levels in blood vessels E, F Western blot analysis of IKKβ and p-IKKβ, IκBα and p-IκBα, p65 and p-p65 levels in blood vessels NG Control group MG Model group LG Modified Banxia Baizhu Tianma Tang high-dose treatment group HG Modified Banxia Baizhu Tianma Tang high-dose treatment group Compared with the NG group, \*  $P < 0.05$ ; Compared with the MG group, #  $P < 0.05$ , n = 9

Fig. 2 The effect of modified Banxia Baizhu Tianma Tang on the TLR4/MyD88 pathway in blood vessels

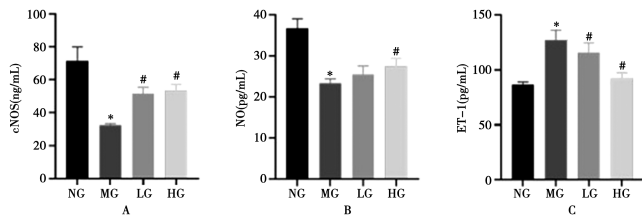
与模型组相比,加味半夏白术天麻汤组大鼠 SBP、DBP 和 MBP 的显著降低( $P < 0.05$ ) (图 1A-C)。在加味半夏白术天麻汤施用后 12 周,加味半夏白术天麻汤组 TC、TG 和 LDL-c 水平显著低于模型组( $P < 0.05$ ), 而 HDL-c 水平增加但无统计意义(图 1F-I)。

H&E 和油红 O 染色显示具有明显的降血脂作用。HE 染色显示,与对照组相比,模型组大鼠肝细胞中观察到广泛的气球状病变(图 1D)。油红 O 染色显示,模型组大鼠在肝脏中积累了显著的脂质水平(图 1E)。与模型组相比,给予加味半夏白术天麻汤改善了肝细胞空泡化和肝脏脂质积聚。ACHSFDs 诱导的

MH 模型大鼠具有严重的脂质代谢异常和血压升高,提示加味半夏白术天麻汤给药可改善脂质代谢并降低血压。

## 2 加味半夏白术天麻汤给药对 MH 大鼠 TLR4/MyD88 信号传导及内皮血管损伤的影响

模型组血管中的 eNOS 水平低于正常血管(图 3A), NO 和 eNOS 血清水平降低( $P < 0.05$ ), ET-1 血清水平升高( $P < 0.05$ )(图 3)。与模型组相比,加味半夏白术天麻汤给药增加了 MH 大鼠的 eNOS 蛋白表达和血清 eNOS 水平( $P < 0.05$ ),增加了 NO 血清水平,并降低了 ET-1 水平( $P < 0.05$ )。



A 血清 eNOS 的变化 B 一氧化氮(NO)的变化 C 内皮素 1(ET-1)的变化 NG 对照组 MG 模型组 LG 加味半夏白术天麻汤低剂量治疗组 HG 加味半夏白术天麻汤高剂量治疗组 与 NG 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 MG 组比较, #  $P < 0.05$ , n=9

图 3 酶联免疫吸附试验结果

A Changes in serum eNOS B Changes in nitric oxide (NO) C Changes in endothelin-1 (ET-1) NG Control group MG Model group LG Modified Banxia Baizhu Tianma Tang high-dose treatment group HG Modified Banxia Baizhu Tianma Tang high-dose treatment group Compared with the NG group, \*  $P < 0.05$ ; Compared with the MG group, #  $P < 0.05$ , n=9

Fig. 3 Enzyme linked immunosorbent assay results

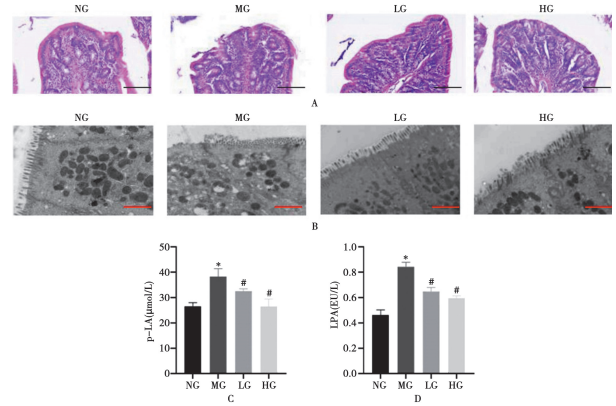
免疫组化和 Western blot 结果显示,与对照组大鼠的血管相比,模型组血管中 TLR 4 和 MyD 88 的表达显著增加(图 2A-D),加味半夏白术天麻汤给药则下调了 TLR4 和 MyD 88 的表达。模型大鼠血管显示 IKK $\beta$ 、I $\kappa$ B $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B p65 磷酸化增加(图 2E-F)。加味半夏白术天麻汤给药抑制了这些蛋白质的磷酸化。提示,加味半夏白术天麻汤给药抑制了血管中 TLR4/MyD88 通路的激活,减轻了血管内皮损伤。

## 3 加味半夏白术天麻汤给药对肠道屏障功能影响

H&E 染色和 TEM 显示,与正常对照组大鼠相比,模型组结肠绒毛脱落,而加味半夏白术天麻汤给药明显改善了 MH 大鼠的结肠绒毛(图 4A、B)。模型组大鼠的 D-LA 和 LPS 血清水平也较高( $P < 0.01$ )(图 4C、D),在加味半夏白术天麻汤给药后显著降低( $P < 0.01$ )。总之,这些数据表明加味半夏白术天麻汤通过增加 TJPs 的表达和减少 LPS 进入循环来增加肠道的屏障功能。

MH 模型大鼠表现出 TLR4/MyD88 通路激活,该通路可能通过肠道中过量产生 LPS 而被激活,从而损害肠道屏障功能并引起肠道炎症。模型组大鼠在肠

组织中的 TLR4 和 MyD88 水平显著高于对照组,加味半夏白术天麻汤给药降低了 TLR4 和 MyD88 的表达(图 5)。

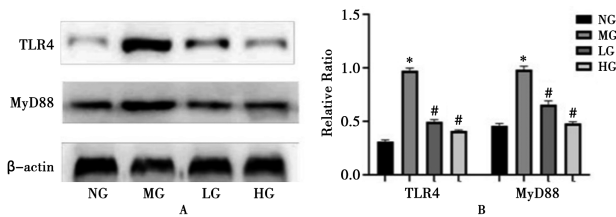


A 结肠苏木精和伊红染色的代表性图(200 $\times$ ,比例尺为 50  $\mu$ m) B 通过透射电子显微镜(TEM)结肠的超微结构(20 000 $\times$ ,比例尺为 1  $\mu$ m) C 血清 D-乳酸(D-LA)的变化 D 血清 LPS 的变化 NG 对照组 MG 模型组 LG 加味半夏白术天麻汤低剂量治疗组 HG 加味半夏白术天麻汤高剂量治疗组

图 4 加味半夏白术天麻汤对肠道屏障的影响

A Representative images of colon hematoxylin and eosin staining (200 $\times$ , the scale is 50  $\mu$ m) B Ultrastructure of the colon through transmission electron microscopy (TEM) (20 000 $\times$ , the scale is 1  $\mu$ m) C Changes in serum D-lactic (D-LA) D Changes in serum LPS NG control group MG Model group LG Modified Banxia Baizhu Tianma Tang high-dose treatment group HG Modified Banxia Baizhu Tianma Tang high-dose treatment group

Fig. 4 The effect of modified Banxia Baizhu Tianma Tang on intestinal barrier



NG 对照组 MG 模型组 LG 加味半夏白术天麻汤低剂量治疗组 HG 加味半夏白术天麻汤高剂量治疗组 与 NG 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 MG 组比较, #  $P < 0.05$ , n=9

图 5 肠中 TLR4 和 MyD88 水平的蛋白质印迹分析

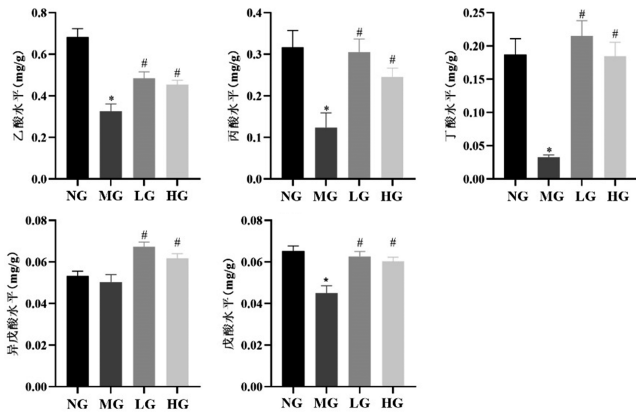
NG control group MG Model group LG Modified Banxia Baizhu Tianma Tang high-dose treatment group HG Modified Banxia Baizhu Tianma Tang high-dose treatment group Compared with the normal control group, \*  $P < 0.05$ ; Compared with the model control group, #  $P < 0.05$ , n=9

Fig. 5 Western blot analysis of TLR4 and MyD88 levels in the intestine

## 4 加味半夏白术天麻汤对 SCFAs、GPCR41/43 的影响

与正常组相比,模型大鼠粪便中的 SCFA(乙酸、丙酸、丁酸和戊酸)水平显著降低,而加味半夏白术天麻汤给药增加了丙酸、丁酸、异戊酸和戊酸水平( $P < 0.05$ )(图 6)。模型大鼠结肠组织中 GPCR41 和 GPCR43 的蛋白质表达降低,而加味半夏白术天麻汤显著增加 MH 大鼠结肠结构中的蛋白质表达(图 7)。

这些结果表明,加味半夏白术天麻汤通过增加 SCFAs 水平和上调 GPCR41/43 表达,可能对肠道屏障完整性产生积极的保护作用。

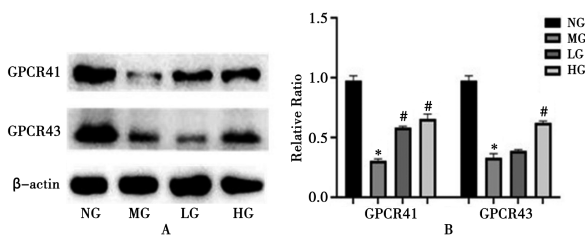


NG 对照组 MG 模型组 LG 加味半夏白术天麻汤低剂量治疗组 HG 加味半夏白术天麻汤高剂量治疗组 与 NG 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 MG 组比较, #  $P < 0.05$ , n=9

图 6 加味半夏白术天麻汤增加粪便 SCFAs 水平

NG Control group MG Model group LG Modified Banxia Baizhu Tianma Tang high-dose treatment group HG Modified Banxia Baizhu Tianma Tang high-dose treatment group Compared with the NG group, \*  $P < 0.05$ ; Compared with the MG group, #  $P < 0.05$ , n=9

Fig. 6 Modified Banxia Baizhu Tianma Tang increases fecal SCFAs levels



NG 对照组 MG 模型组 LG 加味半夏白术天麻汤低剂量治疗组 HG 加味半夏白术天麻汤高剂量治疗组 与 NG 组比较, \*  $P < 0.05$ ; 与 MG 组比较, #  $P < 0.05$ , n=9

图 7 GPCR41 和 GPCR43 的蛋白质表达

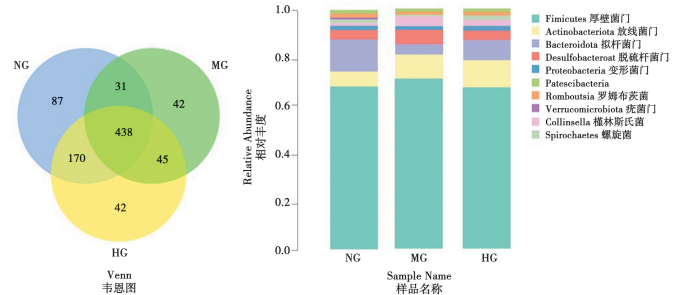
NG Control group MG Model group LG Modified Banxia Baizhu Tianma Tang high-dose treatment group HG Modified Banxia Baizhu Tianma Tang high-dose treatment group Compared with the NG group, \*  $P < 0.05$ ; Compared with the MG group, #  $P < 0.05$ , n=9

Fig. 7 Protein expression of GPCR41 and GPCR43

### 5 加味半夏白术天麻汤对 MH 大鼠肠道微生物的调节作用

Venn(韦恩图,图 8A)显示 NG 组共有 OTUs 726 个, MG 组共有 OTUs 556 个, TG 组共有 OTUs 695 个,说明模型组显示出减少的肠道多样性,而加味半夏白术天麻汤高剂量组具有增加的肠道多样性。在门水平上,三组中共有的 Top 10 优势菌门分别是厚壁菌门 (*Fimicutes*)、放线菌门 (*Actinobacteriota*)、拟杆菌门 (*Bacteroidota*)、脱硫杆菌门 (*Desulfobacterota*)、变形菌门 (*Proteobacteria*)、*Patascibacteria*、罗姆布茨菌

(*Romboutsia*)、疣菌门 (*Verrucomicrobiota*)、柯林斯氏菌 (*Collinsella*) 和螺旋菌 (*Spirochaetes*) 组成。三组中厚壁菌门占绝对优势,当与正常组相比时,模型组肠内放线菌门、脱硫杆菌门、和疣菌门丰度显著增加,而拟杆菌门丰度显著降低。加味半夏白术天麻汤高剂量显著降低了脱硫杆菌门的丰度。



NG 对照组 MG 模型组 HG 加味半夏白术天麻汤高剂量治疗组  
图 8 高通量测序结果

NG Control group MG Model group HG Modified Banxia Baizhu Tianma Tang high-dose treatment group

Fig. 8 High throughput sequencing results

从属的角度来看,三组样品中丰度大于 1% 的共 24 个属,其中 6 个优势属分别是脱硫弧菌 (*Desulfovibrio*)、*Marvinbryantia*、*Sellimonas*、拟杆菌属 (*Bacteroides*)、链球菌属 (*Streptococcus*)、*Turicibacter*。由表 1 可知,与正常组相比,模型组大鼠中脱硫弧菌 (*Desulfovibrio*)、*Marvinbryantia*、*Sellimonas* 的丰度分别增加了 165.12%、216.01%、501.12%,而拟杆菌属 (*Bacteroides*)、*Turicibacter*、链球菌属 (*Streptococcus*) 丰度分别减少了 45.74%、77.01%、37.70%。与模型组相比,加味半夏白术天麻汤高剂量治疗组脱硫弧菌 (*Desulfovibrio*)、*Marvinbryantia*、*Sellimonas* 的丰度分别减少了 21.42%、48.43%、75.01%,而拟杆菌属 (*Bacteroides*)、*Turicibacter*、链球菌属 (*Streptococcus*) 丰度分别增加了 49.80%、88.65%、25.99%。

### 讨论

代谢性高血压(MH)特征是血压升高伴有代谢紊乱。在本研究中,MH 大鼠在服用加味半夏白术天麻汤时 SBP、DBP 和 MBP 显著降低。与模型组相比,加味半夏白术天麻汤治疗显著降低了血清 TC、TG 和 LDL-c 水平,HDL-c 水平呈上升趋势。此外,加味半夏白术天麻汤改善了肝细胞气球状病变,减少了肝脏脂质沉积。因此,当用加味半夏白术天麻汤治疗时,对 MH 有预防作用。

肠道稳态保持良好的健康,主要由微生物、肠上皮



屏障和宿主免疫系统之间的相互作用调节。炎症性肠病、高血压、糖尿病和其他慢性疾病可能是由于这些系统之间的不平衡调节而引起的<sup>[9]</sup>。既往的临床研究报告称,高血压患者肠道菌群失衡,表现为菌群数量和丰度下降<sup>[10]</sup>。在高血压动物模型中,观察到肠道通透性增加、TJPs 表达降低以及肠道绒毛参数(数量和长度)降低<sup>[11]</sup>。

研究报告,ACHSFD 诱导的 MH 模型大鼠的肠道菌群多样性降低,厚壁菌门/拟杆菌门比例显著增加<sup>[12]</sup>。在本研究中,当给予加味半夏白术天麻汤时,模型大鼠的肠道菌群丰度和多样性都有所增加。从门的角度来看,ACHSFD 诱导的 MH 大鼠中的厚壁菌门、脱硫杆菌门和疣菌门丰度显著增加,而拟杆菌门丰度显著减少。加味半夏白术天麻汤给药显著降低了脱硫杆菌门的丰富度,在一定程度上降低了厚壁菌门的丰度,增加了拟杆菌门的丰度。

在属水平上,MH 大鼠表现出产生 SCFAs 的细菌(如 *Clostridium\_sensu\_stricto\_1*、拟杆菌和瘤胃球菌)显著减少,有益细菌(如 *Turicibacter*)减少,有害属(如脱硫弧菌和 *Lachnoclostridium*)增加。加味半夏白术天麻汤降低了有害细菌的丰度(如脱硫弧菌),同时增加了产生 SCFAs 的细菌水平。脱硫弧菌是一种 G-细菌,其丰度的增加直接诱导大量 LPS 的产生<sup>[13]</sup>。脱硫弧菌也是一种硫酸盐还原菌,代谢食物中的化合物产生氢化物,损害肠粘膜。相关性分析表明,脱硫杆菌和脱硫弧菌与 LPS 呈正相关。此外,暴露于加味半夏白术天麻汤的 MH 大鼠血浆 LPS 水平显著降低。加味半夏白术天麻汤调节肠道菌群的可能生物学作用可以通过降低脱硫弧菌和其他 G-细菌的丰度来抑制 LPS 的产生来介导。

既往的研究报道,LPS 增加细胞凋亡,降低 TJPs 表达,破坏肠道组织学,显著增加细胞通透性和肠道渗漏<sup>[14-15]</sup>。LPS 诱导的肠紧密连接(TJ)通透性是由肠细胞膜中 TLR4 表达增加介导的<sup>[15]</sup>,而靶向 TLR4 或 NF- $\kappa$ B 敲除抑制了 LPS 诱导的 Caco-2 细胞中的 TJ 通透性。在本研究中,MH 大鼠的血浆 D-LA 水平升高,结肠绒毛脱落,肠道 TJPs 表达降低,结肠 TLR4 和 MyD88 蛋白表达显著增加,而加味半夏白术天麻汤给药逆转了这些观察结果。SCFAs 是结肠中肠道微生物群通过难消化多糖发酵(纤维)产生的主要代谢产物<sup>[16]</sup>,可提高肠道屏障完整性,抑制 LPS 进入血液。长期高糖、高脂肪<sup>[17-18]</sup>和酒精<sup>[19]</sup>的摄入降低了粪便中的 SCFAs 水平,抑制了 TJPs 的释放,并转移了内毒素。SCFAs 是肠黏膜的关键营养物质;在喂食无菌小鼠含丁酸饲料后,SCFAs 改善了肠上皮结构的完整性<sup>[20]</sup>。在肠上皮细胞中,丙酸和丁酸增强了 ZO-1

和 occludin 的表达<sup>[21-22]</sup>。在本研究中,MH 大鼠粪便中的 SCFA 显著降低,而加味半夏白术天麻汤给药增加了这些水平(丙酸、丁酸、异戊酸和戊酸)。因此,加味半夏白术天麻汤可能会增加肠道 TJPs,这对肠道屏障的完整性很重要。

SCFAs 通过 GPCR43/41 受体介导发挥抗炎和降压作用。在患有炎症性肠病的大鼠中,丁酸或 SCFAs 灌肠剂通过与 GPCR43 受体相互作用和抑制肠道通透性来减轻结肠粘膜损伤和炎症<sup>[23]</sup>。SCFAs 可抑制 NF- $\kappa$ B 信号传导,从而抑制肠道炎症<sup>[24]</sup>,SCFAs 具有血管舒张作用,补充外源性 SCFAs 可降低了高血压大鼠的血压,并且这种作用在 GPCR41 缺陷小鼠中减弱<sup>[16,25]</sup>。在本研究中,ACHSFD 显著降低了 SCFAs 水平和相关受体表达,而加味半夏白术天麻汤给药增加了 MH 大鼠粪便中的丙酸、丁酸、异戊酸和戊酸水平,还上调了结肠中 GPCR41 和 GPCR43 的蛋白质表达。链球菌是一个产生 SCFA 的细菌属<sup>[26]</sup>。本研究也发现加味半夏白术天麻汤增加了链球菌的丰度,这可能是主要 SCFA 增加的原因。本研究表明,SCFAs 与链球菌、拟杆菌和乳酸杆菌呈正相关,提示,加味半夏白术天麻汤可能通过增加 SCFAs 的产生以及上调肠道中 GPCR41、GPCR43 和 TJPs 蛋白的表达来调节肠道菌群。

血管内皮损伤是高血压的直接原因。NO 和 ET-1 由血管内皮细胞分泌,是调节血压的重要分子<sup>[27]</sup>。在血管损伤时,内皮功能障碍使 NO 合成减少,而 ET-1 分泌增加,导致血压升高。既往研究发现,在 ACHSFD 诱导的 MH 大鼠中,血清 NO 显著降低,主动脉 eNOS 表达水平增加<sup>[28]</sup>。在本研究中,加味半夏白术天麻汤改善了不平衡的 NO 和 ET-1 水平,并增加了血清 eNOS 水平。此外,加味半夏白术天麻汤改善了 MH 大鼠主动脉中膜增厚和血管内皮脱落。因此,加味半夏白术天麻汤减少了血管内皮损伤,改善了血管运动功能。eNOS 是 NO 的前端物质。过表达的 TLR4/MyD88 信号通路下调 eNOS 的表达<sup>[29-30]</sup>。当给予加味半夏白术天麻汤时,MH 大鼠的血管中 TLR4 和 MyD88 蛋白和 mRNA 表达降低,并且加味半夏白术天麻汤还抑制 I $\kappa$ k $\beta$ 、IKB $\alpha$  和 NF- $\kappa$ B p65。因此,加味半夏白术天麻汤可以调节肠道菌群,抑制 LPS 的产生,增加粪便 SCFAs 水平,提高肠道屏障的完整性,从而减少 LPS 进入循环。因此,加味半夏白术天麻汤可以减少血管 TLR4 信号的激活,改善血管内皮损伤,并最终降低血压。

综上,本研究表明加味半夏白术天麻汤可以调节肠道菌群,抑制 LPS,增加 SCFAs 的产生,并改善肠道屏障功能,加味半夏白术天麻汤减少了 LPS 进入系统

循环,抑制了肠道来源的 LPS/TLR4 的激活,减少了血管内皮损伤,并最终降低了 MH 大鼠的血压。

#### 【参考文献】

- [1] O'Donnell JA, Zheng T, Meric G, et al. The gut microbiome and hypertension[J]. Nat Rev Nephrol, 2023, 19(3):153-167.
- [2] 张金朋, 王亚楠, 李保龙, 等. 头穴丛刺结合康复训练对脑缺血再灌注大鼠肠道菌群及 CaM/CaMK II 信号通路的影响[J]. 中国病原生物学杂志, 2023, 18(12):1381-1387.
- [3] Tanaka M, Itoh H. Hypertension as a metabolic disorder and the novel role of the gut[J]. Curr Hypertens Rep, 2019; 21(8):63.
- [4] Wang YJ, Su J, Yu JJ, et al. Buddleioside-rich chrysanthemum indicum L. extract has a beneficial effect on metabolic hypertensive rats by inhibiting the enteric-origin LPS/TLR4 pathway[J]. Front Pharmacol, 2021, 12:755140.
- [5] 阎岩. 观察加味半夏白术天麻汤联合温胆汤治疗高血压合并高血脂血症的临床疗效[J]. 中国现代药物应用, 2021, 15(21):209-211.
- [6] 徐男, 王亮, 时海燕, 等. 基于整合药理学平台探究半夏白术天麻汤治疗高血压的分子机制 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(2):109-117.
- [7] 王琪格, 隋国媛, 丁思元, 等. 半夏白术天麻汤通过 FOXO1 通路对血脂异常合并高血压大鼠 DsbA-L/脂联素的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(5):2898-2902.
- [8] 陈菲, 李丽, 牛钰清, 等. 介绍一种新型高效的油红 O 染色法[J]. 临床与实验病理学杂志, 2018, 34(7):808-809.
- [9] Meijnikman AS, Gerdes VE, Nieuwdorp M, et al. Evaluating causality of gut microbiota in obesity and diabetes in humans[J]. Endocr Rev, 2018, 39(2):133-153.
- [10] Van Hecke T, De Vrieze J, Boon N, et al. Combined consumption of beef-based cooked mince and sucrose stimulates oxidative stress, cardiac hypertrophy, and colonic outgrowth of desulfovibrionaceae in rats[J]. Mol Nutr Food Res, 2019, 63(2):e1800962.
- [11] Tokarek J, Budny E, Saar M, et al. Does the composition of gut microbiota affect hypertension? molecular mechanisms involved in increasing blood pressure[J]. Int J Mol Sci, 2023, 24(2):1377.
- [12] Li B, He X, Jin HY, et al. Beneficial effects of *Dendrobium officinale* on metabolic hypertensive rats by triggering the enteric-origin SCFA-GPCR43/41 pathway [J]. Food Funct, 2021, 12(12):5524-5538.
- [13] Liu F, Fan C, Zhang L, et al. Alterations of gut microbiome in Tibetan patients with coronary heart disease [J]. Front Cell Infect Microbiol, 2020, 10:373.
- [14] 刘敏科, 金华. 肠道菌群与高血压及其危险因素研究进展及问题探讨[J]. 中国微生态学杂志, 2023, 35(2):245-249.
- [15] 康国彬, 李真, 苗华为, 等. 肠道菌群代谢产物短链脂肪酸与高血压的关系和机制[J]. 中华高血压杂志, 2021, 29(8):718-722.
- [16] Bartolomeus H, Balogh A, Yakoub M, et al. Short-chain fatty acid propionate protects from hypertensive cardiovascular damage[J]. Circulation, 2019, 139(11):1407-1421.
- [17] Machate DJ, Figueiredo PS, Marcelino G, et al. Fatty Acid Diets: Regulation of Gut Microbiota Composition and Obesity and Its Related Metabolic Dysbiosis. Int J Mol Sci. 2020 Jun 8; 21(11):4093.
- [18] Yu R, Yin Y, Cao M, et al. Fructo-oligosaccharides lower serum lipid levels and suppress high-fat/high-sugar diet-induced inflammation by elevating serum and gut levels of short-chain fatty acids[J]. J Int Med Res, 2020, 48(4):300060519896714.
- [19] Forsyth CB, Shaikh M, Bishehsari F, et al. Alcohol feeding in mice promotes colonic hyperpermeability and changes in colonic organoid stem cell fate[J]. Alcohol Clin Exp Res, 2017, 41(12):2100-2113.
- [20] Li Y, Fu R, Li R, et al. Causality of gut microbiome and hypertension: A bidirectional mendelian randomization study[J]. Front Cardiovasc Med, 2023, 10:1167346.
- [21] 王长毅, 王猛, 江洪. 肠脑轴在高血压中的研究进展[J]. 中华老年心脑血管病杂志, 2022, 24(9):994-996.
- [22] Zhang H, Zhang S, Jia L, et al. MyD88 overexpression deteriorates Ang-II-induced ED via upregulating MPO and COX2 and downregulating eNOS in the corpus cavernosum of rats[J]. J Cell Biochem, 2019, 120(5):7133-7146.
- [23] Maslowski KM, Vieira AT, Ng A, et al. Regulation of inflammatory responses by gut microbiota and chemoattractant receptor GPR43[J]. Nature, 2009, 461(7268):1282-1286.
- [24] Yao J, Chen Y, Xu M. The critical role of short-chain fatty acids in health and disease: A subtle focus on cardiovascular disease-NLRP3 inflammasome-angiogenesis axis [J]. Clin Immunol, 2022, 238:109013.
- [25] Sun D, Xiang H, Yan J, et al. Intestinal microbiota: A promising therapeutic target for hypertension[J]. Front Cardiovasc Med, 2022, 9:970036.
- [26] 吴博谦, 张虹玺. 中医药治疗便秘对肠道菌群影响的研究进展 [J]. 中华中医药学刊, 2023, 41(6):115-122.
- [27] Cerrato R, Crabtree M, Antoniadis C, et al. Effects of endothelin-1 on intracellular tetrahydrobiopterin levels in vascular tissue[J]. Scand Cardiovasc J, 2018, 52(3):163-169.
- [28] Liu B, Tang Y, Song Z, et al. *Polygonatum sibiricum* F. Delaroche polysaccharide ameliorates HFD induced mouse obesity via regulation of lipid metabolism and inflammatory response. Mol Med Rep. 2021 Jul; 24(1):501.
- [29] Stark RJ, Koch SR, Choi H, et al. Endothelial nitric oxide synthase modulates Toll-like receptor 4-mediated IL-6 production and permeability via nitric oxide-independent signaling[J]. FASEB J, 2018, 32(2):945-956.
- [30] 张萌萌, 李瑶, 欧莉, 等. 肠道微生物代谢物在肠易激综合征中的研究进展[J]. 微生物学通报, 2023, 50(7):3122-3136.

【收稿日期】 2023-10-11 【修回日期】 2024-01-10