

## 研究论文

## 短链脂肪酸丁酸抑制动脉粥样硬化形成及其分子机制

白洪波<sup>1</sup>, 杨萍<sup>2</sup>, 张汉斌<sup>2</sup>, 刘钰林<sup>2</sup>, 方淑香<sup>2</sup>, 许小洋<sup>1,\*</sup>广州医科大学<sup>1</sup>基础医学院生理教研室, 广州 511436; <sup>2</sup>第二临床学院, 广州 510260

**摘要:** 本研究通过观察丁酸对动脉粥样硬化斑块形成以及肠道组织结构和功能的影响, 探讨丁酸防治动脉粥样硬化的效应及可能机制。选取8周龄雄性载脂蛋白E基因敲除(*apolipoprotein E-knockout, ApoE<sup>-/-</sup>*)小鼠, 随机分成对照组(高脂高胆固醇饲料+饮水中给予200 mmol/L氯化钠,  $n = 10$ )和丁酸组(高脂高胆固醇饲料+饮水中给予200 mmol/L丁酸钠,  $n = 10$ ), 喂养12周。干预结束后麻醉处死小鼠并分离主动脉、心脏, 油红O染色定量分析动脉粥样硬化斑块面积。取新鲜的小鼠肠道组织检测肠道组织长度、结构和通透性。定量PCR和酶联免疫吸附法检测炎症因子水平。结果表明: 与对照组相比, 丁酸组小鼠动脉粥样硬化斑块面积显著减少( $P < 0.01$ ), 血清总胆固醇和低密度脂蛋白胆固醇水平也明显降低( $P < 0.05$ ), 主动脉、肠道组织以及血液循环中炎症因子表达水平显著下降。同时, 丁酸干预后小鼠肠道结构更加致密, 肠道通透性降低, 血液内毒素脂多糖水平也明显降低, 肠道紧密连接蛋白Occludin和ZO-1基因表达水平显著升高。体外人小肠上皮细胞Caco-2实验结果显示, 丁酸可以剂量依赖性地上调Occludin和ZO-1 mRNA和蛋白表达水平, 这一效应可以被G蛋白耦联受体41小干扰RNA所阻断。以上结果提示, 丁酸显著抑制小鼠动脉粥样硬化发生, 其作用机制可能与其降低肠道通透性、减少血液脂多糖和炎症因子水平有关。

**关键词:** 短链脂肪酸; 丁酸; 动脉粥样硬化; 肠道通透性**中图分类号:** R353

## Short-chain fatty acid butyrate acid attenuates atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-knockout mice and the underlying mechanism

BAI Hong-Bo<sup>1</sup>, YANG Ping<sup>2</sup>, ZHANG Han-Bin<sup>2</sup>, LIU Yu-Lin<sup>2</sup>, FANG Shu-Xiang<sup>2</sup>, XU Xiao-Yang<sup>1,\*</sup><sup>1</sup>Department of Physiology, School of Basic Medical Science, Guangzhou Medical University, Guangzhou 511436, China; <sup>2</sup>The Second Clinical School of Guangzhou Medical University, Guangzhou 510260, China

**Abstract:** This study was designed to evaluate the role of short-chain fatty acid butyrate acid on intestinal morphology and function, and atherosclerotic plaque formation in apolipoprotein E-knockout (*ApoE<sup>-/-</sup>*) mice. *ApoE<sup>-/-</sup>* mice on high-fat, high-cholesterol diet were treated with butyrate acid (200 mmol/L) or NaCl (control) in the drinking water for 12 weeks, followed by histological evaluations of atherosclerotic lesion in aorta. Real-time PCR analysis and ELISA were used to measure the expression levels of proinflammatory cytokines. Butyrate acid significantly attenuated high-fat, high-cholesterol diet-induced atherosclerotic plaque formation in *ApoE<sup>-/-</sup>* mice. Butyrate acid prevented high-fat, high-cholesterol diet-induced inflammation in both the aorta and the circulation, as evidenced by reduced expression of proinflammatory cytokines. These changes were accompanied by a marked attenuation in metabolic endotoxemia lipopolysaccharide (LPS). Butyrate acid induced intestinal expression of the tight junction proteins (Occludin and zona occludens protein-1), thereby preventing the gut permeability. Butyrate acid dose-dependently upregulated the expression of the tight junction proteins in Caco-2 cells in GPR41-dependent manner. In conclusion, butyrate acid attenuates atherosclerotic lesions by ameliorating metabolic endotoxemia-induced inflammation through restoration of the gut barrier.

**Key words:** short-chain fatty acid; butyrate acid; atherosclerosis; gut permeability

Received 2020-03-13 Accepted 2020-08-28

This work was supported by the Natural Science Foundation of Guangdong Province (No. 2019A1515010983) and Open Laboratory Project for College Students from Guangzhou Medical University, China (No. 2018-2).

\*Corresponding author. E-mail: xiaoyang-xu@gzhmu.edu.cn

动脉粥样硬化是心血管疾病的常见类型, 是冠心病、脑梗死以及外周血管疾病、卒中等的主要病因及共同病理学基础, 严重危害人类健康<sup>[1,2]</sup>。本质上来说, 动脉粥样硬化是一种多因素、多阶段的脂质沉积和炎症反应性疾病<sup>[3]</sup>, 其发病机制非常复杂, 至今尚未完全明确, 寻找动脉粥样硬化的有效防治措施非常必要。

越来越多的研究报道, 菌群紊乱、细菌移位及肠道黏膜屏障的改变等所致的肠源性内毒素血症在动脉粥样硬化病理过程中起着重要的作用<sup>[4,5]</sup>。有研究证实, 高脂膳食会引起肠道菌群紊乱, 造成肠道内正常的优势菌群减少甚至消失, 而革兰氏阴性菌的数量却大大增加, 并且大量释放内毒素脂多糖(lipopolysaccharide, LPS), 同时肠道屏障功能受到破坏, 通透性增加, 造成内毒素血症, 进而诱导全身性炎症反应和动脉粥样硬化的发病<sup>[6]</sup>。丁酸是短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFAs)的一种, 主要是膳食纤维在肠道组织中经肠道厌氧菌发酵而产生的代谢产物<sup>[7,8]</sup>。丁酸是上皮细胞的重要能量来源。丁酸主要通过其特异性G蛋白耦联受体(G protein-coupled receptor, GPR)发挥生物学效应<sup>[9,10]</sup>。现已证明丁酸在调节宿主的营养、代谢和免疫方面发挥重要作用<sup>[11]</sup>。然而, 它对动脉粥样硬化斑块形成的影响尚不清楚。

本研究拟通过高脂饮食喂养载脂蛋白E基因敲除(apolipoprotein E-knockout, *ApoE*<sup>-/-</sup>)小鼠, 建立动脉粥样硬化小鼠模型<sup>[12]</sup>, 进而通过丁酸干预12周, 观察*ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化斑块面积、肠道组织结构和功能、炎症因子以及内毒素LPS的水平, 探讨丁酸对动脉粥样硬化形成的影响及其可能的分子机制。

## 1 材料与方 法

**1.1 实验动物和饲料** 20只8周龄*ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠购自江苏集萃药康生物科技有限公司。小鼠适应性喂养一周后, 随机分为两组: 对照组和丁酸组, 每组10只, 分笼喂养。对照组给予高脂高胆固醇饲料(江苏美迪森生物医药有限公司提供)喂养, 并在饮水中给予氯化钠(200 mmol/L), 丁酸组给予高脂高胆固醇饲料, 并在饮水中给予丁酸钠(200 mmol/L, Sigma公司)。喂养周期为12周, 每周记录小鼠摄食、饮水量及小鼠体重。

**1.2 细胞实验** 人小肠上皮细胞(human colon

carcinoma cell line, Caco-2)购自美国典型培养物保藏中心(ATCC)。采用高糖DMEM基础培养基+20%胎牛血清(FBS)+1%双抗(P/S)+1%非必需氨基酸(NEAA)置于细胞培养箱内培养。然后采用去血清培养基培养, 加入0、10 μmol/L、100 μmol/L丁酸干预Caco-2细胞24 h, 或者用100 μmol/L丁酸与100 nmol/L GPR41 siRNA 或 GPR43 siRNA (Santa Cruz Biotechnology, Inc.) 共处理12 h。

**1.3 小鼠血清指标检测** 喂养结束后, 小鼠禁食过夜, 麻醉状态下心脏灌注采集分离全血, 4 °C 静置, 2 000 r/min 离心 10 min, 血清在 -20 °C 保存待用。血清总胆固醇(total cholesterol, TC)、甘油三酯(triglyceride, TG)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)和空腹血糖(fasting blood glucose, FBG)采用 Hitachi747 型全自动生化分析仪(日本日立)检测, 试剂盒购自日本和光纯药工业株式会社。血清炎症因子包括单核细胞趋化蛋白1(monocyte chemoattractant protein 1, MCP-1)、白介素1β(interleukin-1β, IL-1β)、细胞间黏附分子1(intercellular cell adhesion protein 1, ICAM-1)的水平采用免疫试剂盒(R&D Systems)检测。血清内毒素LPS水平采用内毒素鲎试剂测定法(Limulus Amebocyte Lysate, Hycult Biotechnology)。

**1.4 小鼠肝脏脂质含量测定** 称取小鼠适量肝脏组织, 冰上充分研磨制成匀浆液, 在4 °C 条件下过夜萃取脂质, 低温下以15 000 r/min 离心30 min, 取上清。测定上清TG、游离胆固醇(free cholesterol, FC)和胆固醇酯(cholesterol ester, CE)含量, 以 μg/mg liver protein 表示。

**1.5 小鼠离体主动脉分离及动脉粥样硬化斑块染色**<sup>[13]</sup>

麻醉状态下, 取出小鼠主动脉, 在显微镜下剥离血管周围脂肪组织, 纵向剖开主动脉, 新鲜配制的油红O染液避光染色15 min, 染色结束后显微镜下拍照, 用全自动图像分析软件对小鼠主动脉斑块面积定量分析。

**1.6 小鼠主动脉窦冰冻切片及动脉粥样硬化斑块染色**<sup>[13]</sup>

取新鲜小鼠心脏组织, 用冰冷生理盐水冲洗心脏组织, 用OCT包埋, 用冰冻切片对心脏组织连续切片, 每张切片厚度10 μm, 主动脉窦远端以心脏和连接处的三尖瓣作为标准。主动脉窦冰冻切片用油红O染色观察。全自动图像分析软件对小鼠主动脉窦斑块面积定量分析。

**1.7 小鼠肠道形态观察**<sup>[14]</sup> 分离新鲜的小鼠肠道组织, 截取十二指肠至直肠组织的全长, 迅速放入 4 °C 预冷的生理盐水内进行润洗, 制作石蜡切片, 进行苏木精-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察。

**1.8 小鼠肠道通透性检测**<sup>[15]</sup> 小鼠空腹禁食 6 h, 用异硫氰酸酯荧光标记的右旋糖酐 (FITC-labeled dextran, DX-4000-FITC, 500 mg/kg body weight, Sigma-Aldrich) 进行灌胃, 尾静脉采血 100  $\mu$ L, 离心分离血浆并与等体积的 PBS (pH7.4) 混合, 荧光分光光度计检测荧光强度, 激发光波长 485 nm, 发射光波长 535 nm。计算小鼠血浆中的 DX-4000-FITC 浓度。

**1.9 Caco-2 细胞表面紧密连接蛋白分子表达** 用丁酸干预 Caco-2 细胞后, PBS 冲洗 1 遍, 4% 多聚甲醛固定 15 min, PBS 洗 1 次, 分别加抗人 Occludin 和 ZO-1 一抗 (Abcam, 按 1:100 稀释), 37 °C 孵育后 PBS 清洗。加入 FITC 标记的二抗 (Life Technologies, 按 1:100 稀释), 37 °C 避光孵育 1 h。PBS 充分清洗, 再向切片上滴加 1  $\mu$ g/mL 的 DAPI 工作液, 37 °C 避光孵育 30 min。水性封片剂封片, 激光共聚焦显微镜拍照。

**1.10 RNA 提取和定量 PCR 检测** 取小鼠新鲜小肠组织用预冷的生理盐水润洗后纵向剪开小肠组织, 刮取黏膜组织, 收集至冻存管中。收取丁酸干预的 Caco-2 细胞。用 TRIzol 试剂 (Life Technologies) 提取肠黏膜组织和 Caco-2 细胞中总 RNA, 具体步骤参照说明书。用逆转录试剂盒 (Promega) 转录成 cDNA 模板, 定量 PCR 仪 (Life Technologies) 进行扩增。反应条件: 95 °C 10 min 预变性; 95 °C 15 s, 60 °C 1 min, 重复 40 个循环。结果用  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  方法进行分析。扩增基因的引物见表 1。

**1.11 数据处理与统计分析** 实验数据录入用 SPSS 19.0 统计软件包进行统计分析, 数据结果采用 mean  $\pm$  SEM 表示。两组间比较采用非配对 *t* 检验或者 Mann-Whitney test,  $P < 0.05$  为差异具有统计学意义, 采用 GraphPad Prism 软件作图。

## 2 结果

### 2.1 丁酸对动脉粥样硬化斑块面积的影响

为了研究丁酸对动脉粥样硬化发生的影响, *ApoE*<sup>-/-</sup> 小鼠给予高脂高胆固醇饲料并在饮水中分别加入氯化钠 (对照组) 和丁酸 (丁酸组), 喂养 12 周, 分离小鼠心脏进行主动脉窦油红 O 染色。与对照组相比, 丁酸组小鼠主动脉窦内红色动脉粥

表 1. 引物序列

Gene	Primer sequence (5'-3')
MCP-1	Forward: CCACTCACCTGCTGCTACTCA Reverse: TGGTGATCCTCTGTAGCTCTCC
IL-1 $\beta$	Forward: GGATGAGGACATGAGCACCT Reverse: GGAGCCTGTAGTGCAGTTGT
ICAM-1	Forward: GCCTTGGTAGAGGTGACTGAG Reverse: GACCGGAGCTGAAAAGTTGTA
Occludin	Forward: ATGTCCGGCCGATGCTCTC Reverse: TTTGGCTGCTCTTGGGTCTGTAT
ZO-1	Forward: TTTTGGACAGGGGGAGTGG Reverse: TGCTGCAGAGGTCAAAGTTCAAG
GAPDH	Forward: CTCATGACCACAGTCCATGC Reverse: CACATTGGGGGTAGGAACAC

样硬化斑块明显减少 (图 1A)。定量分析结果显示, 与对照组相比, 丁酸组主动脉窦斑块面积减少了 55% [(3.3  $\pm$  0.5)  $\times 10^4$  vs (7.3  $\pm$  1.0)  $\times 10^4$   $\mu$ m<sup>2</sup>,  $P < 0.01$ , 图 1B]。

小鼠主动脉纵切面油红 O 染色显示, 丁酸组小鼠主动脉内红色的动脉粥样硬化斑块明显减少 (图 1C)。定量分析结果显示, 与对照组相比, 丁酸组小鼠主动脉斑块病变面积减少了 46% ( $P < 0.01$ , 图 1D)。

### 2.2 丁酸对血脂和血糖及肝脏脂质水平的影响

对照组和丁酸组喂养 12 周后, 分离小鼠血清检测血脂和血糖水平, 结果显示, 与对照组相比, 丁酸组小鼠血清 TC 和 LDL-C 含量分别下降 33.5% ( $P < 0.01$ ) 和 32.0% ( $P < 0.01$ ), HDL-C 下降 23.4%, 而 TG 和 FGB 水平无显著变化 (表 2)。与对照组相比, 丁酸组小鼠肝脏脂质包括 TG、FC 和 CE 含量均有下降, 但差异没有统计学意义 (表 3)。

### 2.3 丁酸对小鼠炎症因子水平的影响

分离小鼠主动脉和肠道组织, 定量 PCR 检测炎症因子的表达水平。与对照组相比, 丁酸组小鼠主动脉炎症因子包括 MCP-1、IL-1 $\beta$  和 ICAM-1 mRNA 的表达水平均显著下降 (图 2A~C)。丁酸组小鼠肠道组织中炎症因子 MCP-1、IL-1 $\beta$  和 ICAM-1 mRNA 的表达水平也明显降低 (图 2D~F)。进一步采用 ELISA 方法检测血液循环中炎症因子的水平, 发现丁酸组血清中 MCP-1、IL-1 $\beta$  和 ICAM-1 的浓度较对照组也明显下降 (图 2G~I)。

### 2.4 丁酸对小鼠肠道结构的影响

肠道组织 HE 染色表明, 对照组小肠 (图 3A)



和结肠 (图 3B) 呈现典型病理改变, 包括细胞核聚集增多、炎症细胞增多、腺体紊乱、绒毛稀疏, 表明小肠结构遭到破坏, 黏液层吸收功能丧失; 而丁酸组小鼠这些病理变化显著改善, 结肠绒毛杯状细胞排列紧密 (图 3A, B)。

测定小鼠小肠绒毛高度, 结果表明, 与对照组相比, 丁酸组小鼠小肠绒毛高度显著增加 [(261.6 ± 13.2) μm vs (196.6 ± 13.5) μm,  $P < 0.01$ ]。

## 2.5 丁酸对小鼠肠道通透性的影响

采用 DX-4000-FITC 方法检测小鼠肠道通透性

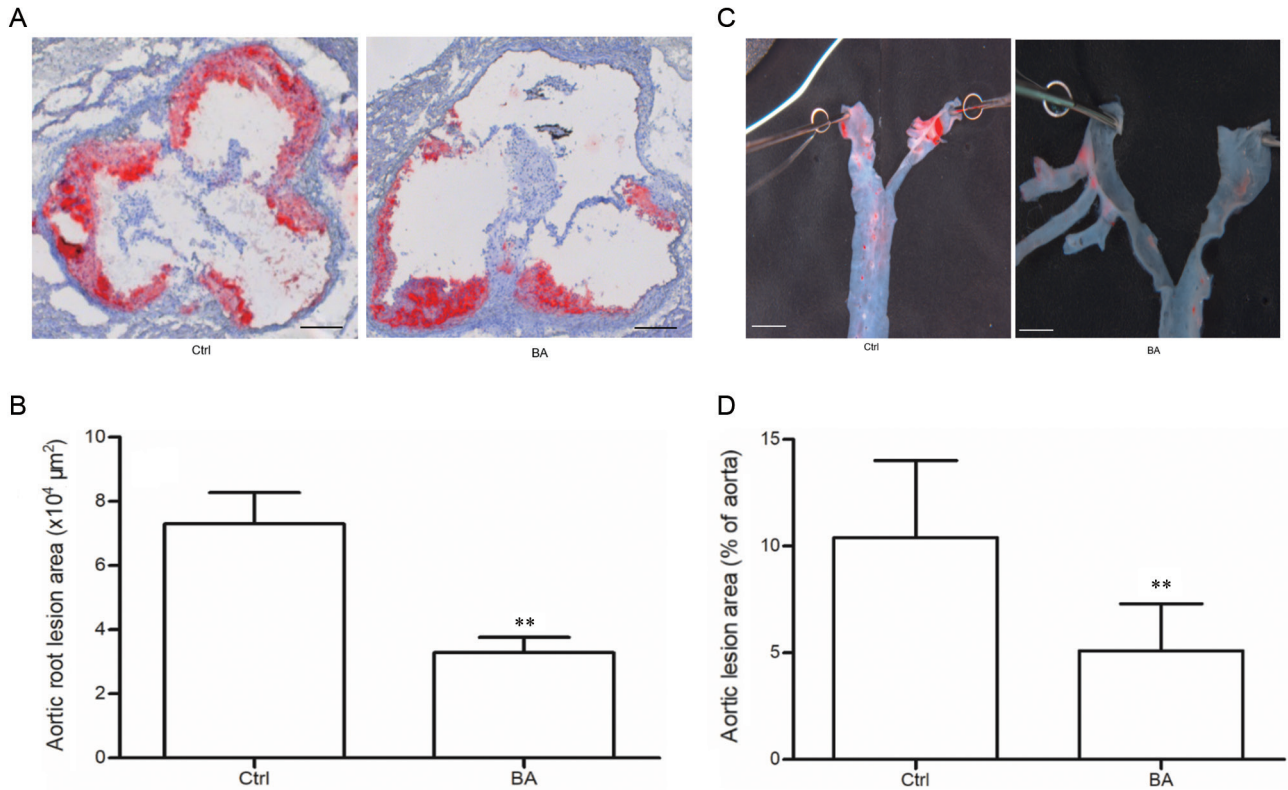


图 1. *ApoE*<sup>-/-</sup>小鼠动脉粥样硬化斑块面积

Fig. 1. Atherosclerotic lesion areas in the aortic root and entire aorta in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice. A: Representative cross-sectional lesion areas at the aortic root in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice from Ctrl and BA groups at 12 weeks. B: Quantitative analysis of aortic root lesion area. C: Representative en face aorta's images of oil red O staining. D: The percentages of lesion area of the whole aorta. Scale bar, 10 μm. Data are presented as the means ± SEM; n = 10. \*\*P < 0.01 vs Ctrl. Ctrl, Control; BA, Butyrate acid.

表2. 小鼠血脂与血糖水平

Table 2. Serum levels of fasting lipid and glucose in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice

Groups	TC (mmol/L)	TG (mmol/L)	LDL-C (mmol/L)	HDL-C (mmol/L)	FBG (mmol/L)
Ctrl	22.61 ± 1.50	0.86 ± 0.08	19.65 ± 1.28	2.05 ± 0.07	3.99 ± 0.15
BA	15.03 ± 1.36**	0.84 ± 0.07	13.36 ± 1.19**	1.57 ± 0.05**	3.81 ± 0.25

Mean ± SEM, n = 10. \*\*P < 0.01 vs Ctrl. TC, total cholesterol; TG, triglycerides; LDL-C, LDL-cholesterol; HDL-C, HDL-cholesterol; FBG, fasting blood glucose; Ctrl, Control; BA, Butyrate acid.

表3. 小鼠肝脏脂质含量

Table 3. The levels of hepatic lipid content in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice

Groups	TG (μg/mg liver protein)	FC (μg/mg liver protein)	CE (μg/mg liver protein)
Ctrl	124.08 ± 14.16	17.54 ± 1.08	67.22 ± 6.13
BA	112.54 ± 15.24	15.85 ± 0.83	60.23 ± 5.31

Mean ± SEM, n = 10. TG, triglycerides; FC, free cholesterol; CE, cholesterol ester; Ctrl, Control; BA, Butyrate acid.

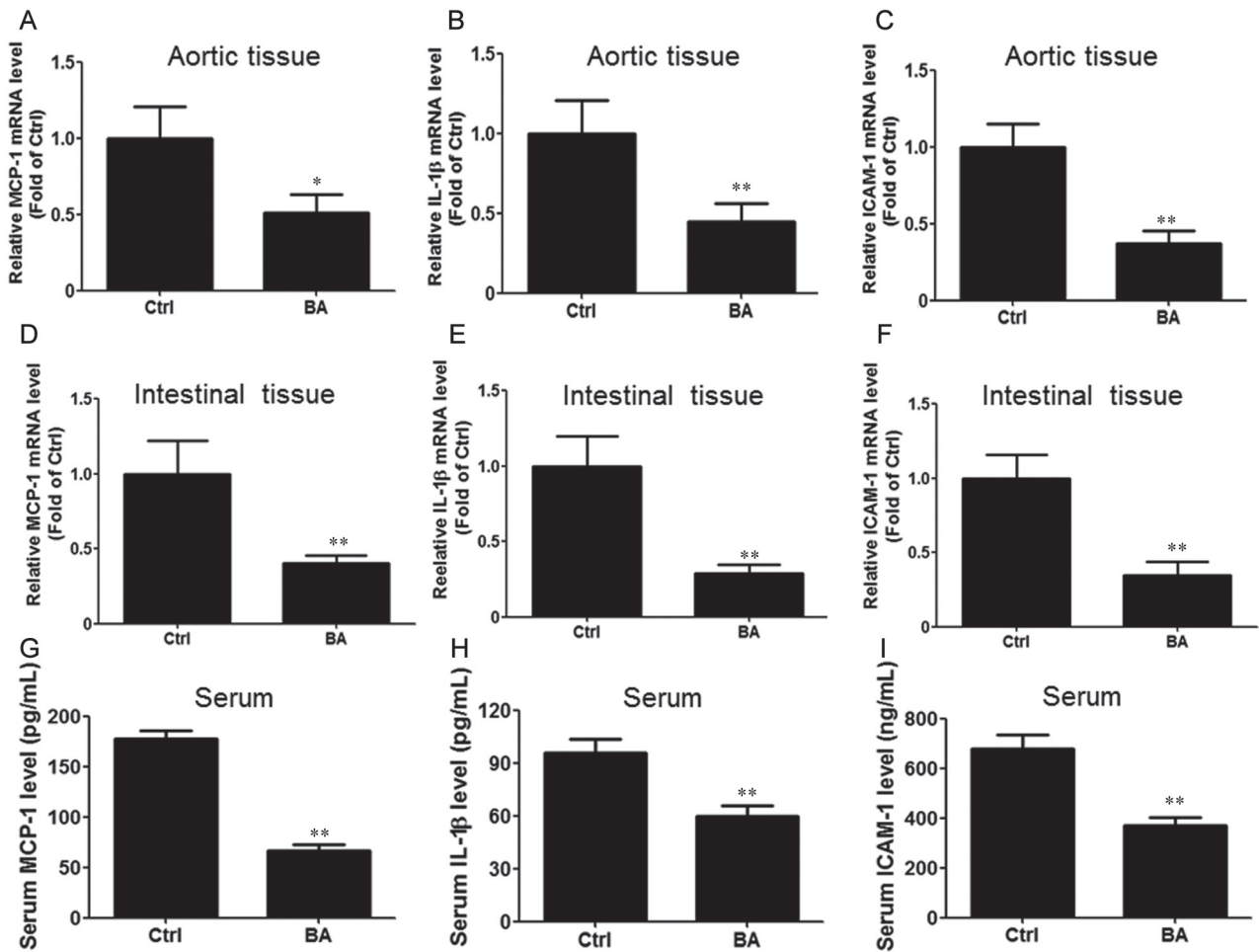


图 2. 小鼠主动脉、肠道组织和循环中炎症因子的表达水平

Fig. 2. Aortic, intestinal and systemic levels of inflammatory molecules. *A–C*: Total RNA was extracted from the dissected aorta. The mRNA expression of monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1), interleukin-1β (IL-1β) and intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) was quantified by quantitative polymerase chain reaction and normalized against GAPDH. *D–F*: MCP-1, IL-1β, and ICAM-1 expression levels in intestine tissue. *G–I*: The circulating levels of MCP-1, IL-1β, and ICAM-1 were measured by ELISA. Data are presented as mean ± SEM;  $n = 8$  to 10. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Ctrl. Ctrl, Control; BA, Butyrate acid.

发现, 与对照组相比, 丁酸组小鼠肠道通透性明显降低 [ $919.2 \pm 67.3$  ng/mL vs  $(1\ 409.0 \pm 87.9)$  ng/mL,  $P < 0.01$ , 图 4A]。丁酸组小鼠血液中 LPS 水平显著降低 (图 4D)。紧密连接蛋白是肠道通透性的生理性调节蛋白, 定量 PCR 检测结果表明, 与对照组相比, 丁酸组小肠组织紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 mRNA 的表达水平显著升高 (图 4B 和 4C)。免疫印迹结果表明, 丁酸组小肠组织 Occludin 和 ZO-1 的蛋白表达水平也明显升高 (图 4E 和 4F)。

## 2.6 丁酸对Caco-2细胞Occludin和ZO-1 mRNA表达的影响

丁酸干预 Caco-2 细胞 24 h, 定量 PCR 检测细胞 Occludin 和 ZO-1 mRNA 表达水平。结果显示,

与对照组相比, 丁酸可以剂量依赖地上调 Caco-2 细胞 Occludin (图 5A) 和 ZO-1 mRNA 表达 (图 5B)。免疫荧光染色结果也证实, 丁酸干预显著上调 Caco-2 细胞 Occludin (图 5C) 和 ZO-1 (图 5D) 的蛋白表达。丁酸上调 Occludin 和 ZO-1 mRNA 和蛋白表达可以被 GPR41 特异性的 siRNA 所阻断。

## 3 讨论

肠道黏膜屏障是机体屏障系统的重要组成部分, 由肠道黏膜机械屏障、化学屏障、生物屏障和免疫屏障所组成。有研究显示肠道屏障功能障碍, 通透性增加会造成细菌及内毒素等进入血液循环中, 导致机体炎症水平升高, 促进动脉粥样硬化斑

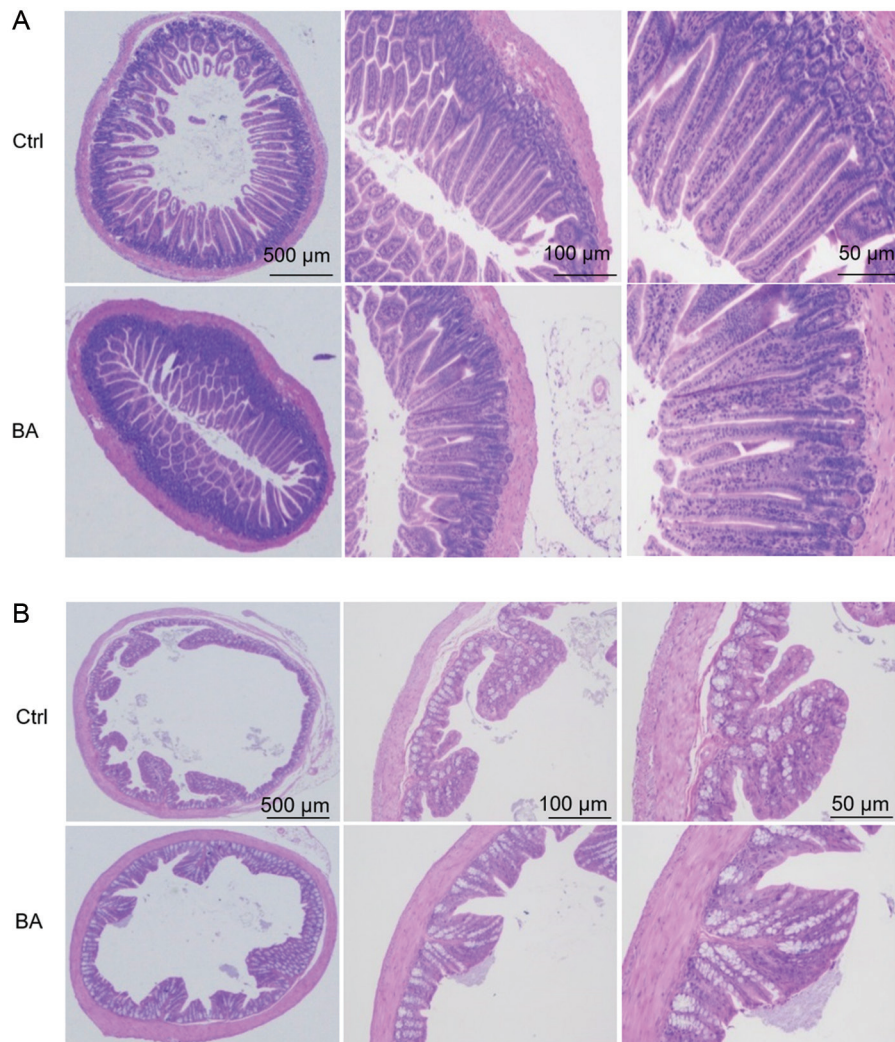


图 3. 小鼠肠道结构和功能改变

Fig. 3. Intestine morphology and function in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice. Hematoxylin and eosin (HE) staining of small intestine (A) and colon (B) of *ApoE*<sup>-/-</sup> mice from Ctrl and BA groups at 12 weeks. Ctrl, Control; BA, Butyrate acid. Scale bar, 500, 100 and 50  $\mu\text{m}$ .

块的形成<sup>[16-18]</sup>。本研究显示丁酸可以显著抑制动脉粥样硬化的发生，这可能与其调节肠道组织的通透性、减少血液循环中内毒素 LPS 的水平、抑制机体系统性炎症反应有关。

丁酸是肠道微生物重要的代谢物之一，同时也是肠道黏膜细胞的主要能量来源<sup>[19]</sup>，它对于维持大肠的正常功能和结肠上皮细胞的形态和功能具有重要作用。以往的研究显示，丁酸可促进肠道黏膜修复及其功能恢复，并且能抑制炎症细胞因子的产生，发挥抗炎作用<sup>[20]</sup>。丁酸还可以明显减少肠道上皮细胞肿瘤坏死因子的分泌，抑制肿瘤细胞的增殖分化和凋亡，发挥抗肿瘤作用<sup>[20]</sup>。然而丁酸对动脉粥样硬化发生的影响未见报道。我们在动物模型中研究

发现，丁酸干预抑制高脂高胆固醇诱导 *ApoE*<sup>-/-</sup> 小鼠动脉粥样硬化脂质斑块的形成，具有抗动脉粥样硬化的作用。

动脉粥样硬化是一种动脉血管壁的慢性炎症反应，伴随着脂质的沉积，循环中的大量白细胞和单核细胞活化，进而释放多种致炎因子。我们进一步研究发现丁酸干预可以减少小鼠主动脉和肠道组织炎症因子的表达，包括 MCP-1、IL-1 $\beta$  和 ICAM-1。ELISA 检测结果也表明丁酸干预显著降低了血液循环中 MCP-1、IL-1 $\beta$  和 ICAM-1 的水平。这些结果表明，丁酸能够抑制动脉粥样硬化病理过程中的炎症反应。

与对照组相比，丁酸也改善了小鼠肠道黏膜微



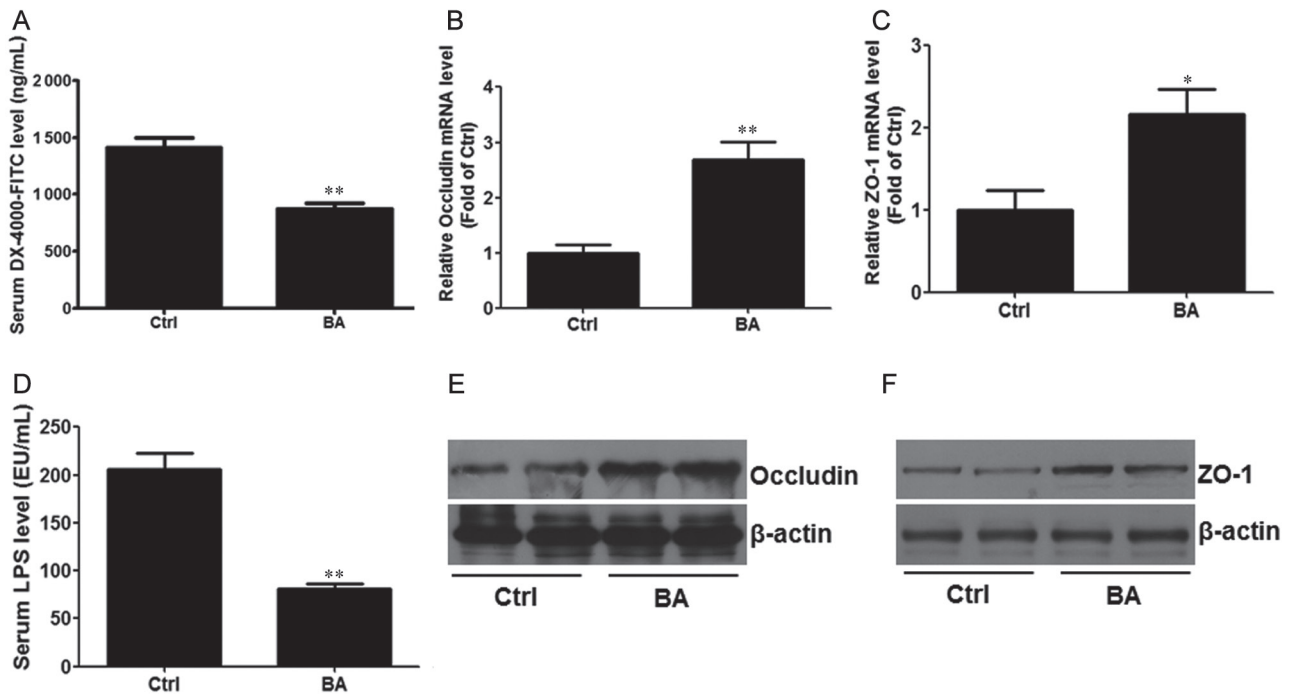


图 4. 小鼠肠道通透性、循环中脂多糖水平以及紧密连接蛋白表达

Fig. 4. The intestinal permeability, circulating lipopolysaccharide (LPS) level and tight junction proteins expression. *A*: *In vivo* gut permeability was determined by measurement of serum concentrations of DX-4000-FITC at 1 h after oral gavage. *B* and *C*: Total RNA of ileum was extracted, and mRNA levels of Occludin and zona occludens protein-1 (ZO-1) were determined by quantitative polymerase chain reaction. *D*: Serum LPS levels were quantified by LAL assay. *E* and *F*: Protein levels of Occludin and ZO-1 were measured by immunoblotting, respectively. Data are presented as mean  $\pm$  SEM;  $n = 8$  to 10. \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs Ctrl.

绒毛的结构, 降低了肠道的通透性, 减少了血液循环中内毒素 LPS 的水平。同时, 丁酸干预显著上调小鼠肠道组织紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的表达。GPR 是人体中分布最广、地位最重要的一类膜蛋白受体, 其中 GPR41 (Ffar3) 和 GPR43 (Ffar2) 是 SCFAs 的特异性受体, 然而它们对不同 SCFAs 的亲合力有较大的差异, GPR41 与丙酸和丁酸的亲合力较高, 而 GPR43 对乙酸和丙酸的亲合力较高<sup>[9, 10]</sup>。我们在体外实验中利用 Caco-2 细胞研究证实, 丁酸剂量依赖性上调 Caco-2 细胞紧密连接蛋白 Occludin 和 ZO-1 的表达, 这一效应可能主要由 GPR41 所介导。

综上所述, 本研究结果显示丁酸抑制动脉粥样硬化斑块形成, 具有抗动脉粥样硬化作用, 其机制可能与其调节肠道紧密连接蛋白表达、降低肠道通透性、减少血液循环中内毒素 LPS 和炎症因子水平密切相关。

### 参考文献

1 Zhao D, Liu J, Wang M, Zhang X, Zhou M. Epidemiology

of cardiovascular disease in China: current features and implications. *Nat Rev Cardiol* 2019; 16(4): 203–212.

- Libby P, Buring JE, Badimon L, Hansson GK, Deanfield J, Bittencourt MS, Tokgözoğlu L, Lewis EF. Atherosclerosis. *Nat Rev Dis Primers* 2019; 5(1): 56.
- Tabas I, Lichtman AH. Monocyte-macrophages and T cells in atherosclerosis. *Immunity* 2017; 47(4): 621–634.
- Maynard CL, Elson CO, Hatton RD, Weaver CT. Reciprocal interactions of the intestinal microbiota and immune system. *Nature* 2012; 489(7415): 231–241.
- Clemente JC, Ursell LK, Parfrey LW, Knight R. The impact of the gut microbiota on human health: an integrative view. *Cell* 2012; 148(6): 1258–1270.
- Wiedermann CJ, Kiechl S, Dunzendorfer S, Schratzberger P, Egger G, Oberhollenzer F, Willeit J. Association of endotoxemia with carotid atherosclerosis and cardiovascular disease: prospective results from the Bruneck Study. *J Am Coll Cardiol* 1999; 34(7): 1975–1981.
- den Besten G, van Eunen K, Groen AK, Venema K, Reijngoud DJ, Bakker BM. The role of short-chain fatty acids in the interplay between diet, gut microbiota, and host energy metabolism. *J Lipid Res* 2013; 54(9): 2325–2340.

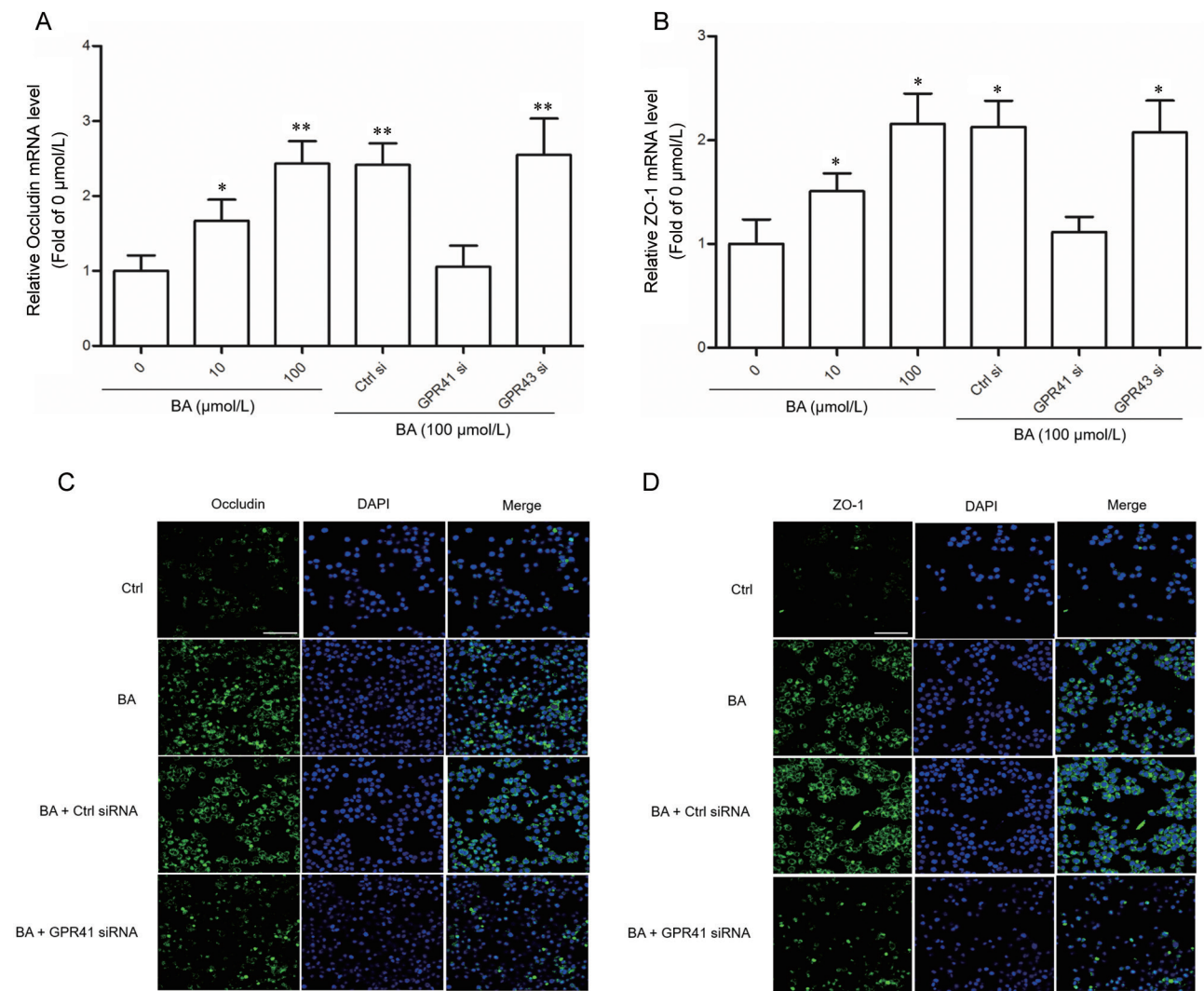


图 5. 丁酸对Caco-2细胞肠道紧密连接蛋白Occludin和ZO-1表达的影响

Fig. 5. Effects of butyrate acid treatment on Occludin and ZO-1 gene expression in Caco-2 cells. *A, B*: Occludin and ZO-1 mRNA expression in Caco-2 cells treated with different concentrations of butyrate acid for 24 h in the absence or presence of Ctrl si (Control siRNA), GPR41 si (GPR41 siRNA) and GPR43 si (GPR43 siRNA). Data are presented as the means  $\pm$  SEM;  $n = 3$ . \* $P < 0.05$ , \*\* $P < 0.01$  vs 0  $\mu\text{mol/L}$ . *C, D*: Occludin and ZO-1 protein expression in Caco-2 cells were analyzed by immunofluorescence staining. Scale bar, 20  $\mu\text{m}$ .

- Voltolini C, Battersby S, Etherington SL, Petraglia F, Norman JE, Jabbour HN. A novel anti-inflammatory role for the short-chain fatty acids in human labor. *Endocrinology* 2012; 153(1): 395–403.
- Ulven T. Short-chain free fatty acid receptors FFA2/GPR43 and FFA3/GPR41 as new potential therapeutic targets. *Front Endocrinol (Lausanne)* 2012; 3: 111.
- Kim MH, Kang SG, Park JH, Yanagisawa M, Kim CH. Short-chain fatty acid activate GPR41 and GPR43 on intestinal epithelial cells to promote inflammatory responses in mice. *Gastroenterology* 2013; 145(2): 396–406. e1–10.
- Tan J, McKenzie C, Potamitis M, Thorburn AN, Mackay CR, Macia L. The role of short-chain fatty acids in health and disease. *Adv Immunol* 2014; 121: 91–119.
- Nakashima Y, Plump AS, Raines EW, Breslow JL, Ross R. ApoE-deficient mice develop lesions of all phases of atherosclerosis throughout the arterial tree. *Arterioscler Thromb* 1994; 14(1): 133–140.
- Wan W, Lim JK, Lionakis MS, Rivollier A, McDermott DH, Kelsall BL, Farber JM, Murphy PM. Genetic deletion of chemokine receptor Ccr6 decreases atherogenesis in ApoE-deficient mice. *Circ Res* 2011; 109(4): 374–381.
- Anhê FF, Roy D, Pilon G, Dudonné S, Matamoros S, Varin TV, Garofalo C, Moine Q, Desjardins Y, Levy E, Marette A.



- A polyphenol-rich cranberry extract protects from diet-induced obesity, insulin resistance and intestinal inflammation in association with increased *Akkermansia* spp. population in the gut microbiota of mice. *Gut* 2015; 64(6): 872–883.
- 15 Li J, Lin S, Vanhoutte PM, Woo CW, Xu A. *Akkermansia muciniphila* protects against atherosclerosis by preventing metabolic endotoxemia-induced inflammation in *ApoE*<sup>-/-</sup> mice. *Circulation* 2016; 133(24): 2434–2446.
- 16 Lin L, Zhang J. Role of intestinal microbiota and metabolites on gut homeostasis and human diseases. *BMC Immunol* 2017; 18(1): 2.
- 17 Milani C, Duranti S, Bottacini F, Casey E, Turrone F, Mahony J, Belzer C, Delgado Palacio S, Arboleya Montes S, Mancabelli L, Lugli GA, Rodriguez JM, Bode L, de Vos W, Gueimonde M, Margolles A, van Sinderen D, Ventura M. The first microbial colonizers of the human gut: composition, activities, and health implications of the infant gut microbiota. *Microbiol Mol Biol Rev* 2017; 81(4): e00036–17.
- 18 Pickard JM, Zeng MY, Caruso R, Núñez G. Gut microbiota: Role in pathogen cplonization, immune responses, and inflammatory disease. *Immunol Rev* 2017; 279(1): 70–89.
- 19 Hamer HM, Jonkers D, Venema K, Vanhoutvin S, Troost FJ, Brummer RJ. Review article: the role of butyrate on colonic function. *Aliment Pharmacol Ther* 2008; 27(2): 104–119.
- 20 Williams EA, Coxhead JM, Mathers JC. Anti-cancer effects of butyrate: use of micro-array technology to investigate mechanisms. *Proc Nutr Soc* 2003; 62(1): 107–115.