



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

# Engineering

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/eng](http://www.elsevier.com/locate/eng)



Research  
Microecology—Article

## 肠道菌群与冠状动脉疾病的发生风险

胡嘉祿<sup>a</sup>, 姚志峰<sup>a</sup>, 唐敏娜<sup>a</sup>, 唐春<sup>b</sup>, 赵晓璠<sup>b</sup>, 苏曦<sup>c</sup>, 卢淡泊<sup>a</sup>, 李秋荣<sup>b</sup>, 王张生<sup>d</sup>, 颜彦<sup>a,\*</sup>, 王则能<sup>e,\*</sup>

<sup>a</sup> Department of Cardiology, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

<sup>b</sup> Research Institute of General Surgery, Jinling Hospital, Medical School of Nanjing University, Nanjing 210002, China

<sup>c</sup> Department of Laboratory Medicine, Zhongshan Hospital, Fudan University, Shanghai 200032, China

<sup>d</sup> Department of Cardiology, The Fifth People's Hospital of Shanghai, Fudan University, Shanghai 200240, China

<sup>e</sup> Department of Cardiovascular and Metabolic Sciences, Lerner Research Institute, Cleveland Clinic, Cleveland, OH 44195, USA

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 9 October 2019

Revised 27 April 2020

Accepted 6 May 2020

Available online 5 February 2021

#### 关键词

肠道菌群

动脉粥样硬化

冠状动脉疾病

#### 摘要

在过去的几年中,小规模队列研究发现肠道菌群随冠状动脉疾病出现而改变。既往研究中所发现的冠状动脉疾病患者肠道中富集或减少的微生物群,在其他冠状动脉疾病队列中是否具有可重复性,有待进一步研究和验证。本研究共纳入78名受试者,其中19例受试者无冠状动脉狭窄(Ctrl组),14例受试者冠状动脉狭窄程度小于50%(LT50组),45例受试者冠状动脉狭窄程度大于50%(GT50组)。采集受试者粪便标本,并提取DNA进行16S核糖体RNA基因测序。对可执行的分类操作单位(operational taxonomic units, OTU)进行分析以确定不同类群的分类单元,采用多变量logistic回归分析检验所定义的分类单元是否能独立预测冠状动脉疾病风险。结果显示,δ-变形杆菌纲、梭杆菌属、嗜胆菌属、放线菌属和梭菌XIX属在Ctrl组中富集;普雷沃氏菌科、副拟杆菌属和芽孢杆菌属在LT50组中富集;罗氏菌属和丁酸单胞菌属在GT50组中富集。δ-变形杆菌纲、梭杆菌属、嗜胆菌属和脱硫弧菌科种群的增加与冠状动脉疾病风险降低相关。在相对丰度高于中位数的个体中,冠状动脉疾病风险分别降低为相对丰度低于中位数的个体的0.26倍、0.21倍、0.18倍和0.26倍( $p < 0.05$ ),而普雷沃氏菌科种群的增加与冠状动脉疾病风险增加相关,冠状动脉疾病风险增加5.63倍( $p < 0.01$ )。使用20种微生物群联合诊断LT50组与Ctrl组、GT50组与Ctrl组、LT50组+GT50组与Ctrl组、GT50组与Ctrl组+LT50组,受试者工作特征(ROC)曲线下的面积均高于0.88。然而,除拟杆菌属外,既往研究所报道的在冠状动脉疾病或健康对照组受试者中富集的肠道菌群在本队列并未观察到。总之,冠状动脉疾病与健康对照组受试者具有不同的菌群特征。不同队列研究所发现的冠状动脉疾病富集的肠道菌群特征不具有重复性,提示肠道菌群较难应用于冠状动脉疾病的早期诊断和预防。综合本研究与既往研究结果,只有拟杆菌属丰度减少是冠状动脉疾病进展的可靠标志物。

© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

## 1. 引言

肠道菌群在人类健康中发挥着重要作用。数以万亿计的微生物定植在人类的肠道中,其中大部分是细菌。这些肠道微生物帮助人体建立免疫系统、抑制病原菌生长、发

酵未消化的膳食纤维以产生短链脂肪酸(short-chain fatty acids, SCFA),并产生维生素[1-4]。由于肠道菌群产生的代谢产物可作用于肠外器官,因此肠道菌群也被认为是一个内分泌器官[5-6]。

肠道菌群调控着脂肪组织的增生肥大、肠道屏障和葡

\* Corresponding authors.

E-mail addresses: yan.yan@zs-hospital.sh.cn(Y. Yan), wangz2@ccf.org(Z. Wang).

#These authors contributed equally to this study.

2095-8099/© 2021 THE AUTHORS. Published by Elsevier LTD on behalf of Chinese Academy of Engineering and Higher Education Press Limited Company. This is an open access article under the CC BY-NC-ND license (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

英文原文: Engineering 2021, 7(12): 1715–1724

引用本文: Jia-Lu Hu, Zhi-Feng Yao, Min-Na Tang, Chun Tang, Xiao-Fan Zhao, Xi Su, Dan-Bo Lu, Qiu-Rong Li, Zhang-Sheng Wang, Yan Yan, Zeneng Wang. Gut Microbiota Community Shift with Severity of Coronary Artery Disease, *Engineering*. <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.05.025>

葡萄糖代谢功能[7]。在正常的生理条件下，致病微生物和有益的共生微生物处于一种平衡状态。一旦这种平衡被打破，就会导致致病微生物的快速增长，即出现菌群失调。菌群失调可引起多种与肠道微生物相关的疾病，如胃溃疡、炎症性肠病、肥胖症、糖尿病、非酒精性脂肪性肝病（non-alcoholic fatty liver disease, NAFLD）、肝硬化、结肠癌、过敏性疾病、心血管疾病（cardiovascular disease, CVD）、阿尔茨海默病、自闭症、注意力缺陷/多动障碍（attention-deficit/hyperactivity disorder, ADHD）和帕金森病[8]。

最近，肠道菌群在心血管疾病发生发展中的作用引起学界注意，多个团队报道了冠状动脉疾病（coronary artery disease, CAD）状态下肠道菌群发生的变化[9-13]，但不同的队列中CVD患者的菌群富集程度相异。此外，肠道菌群结构会随着年龄和饮食结构改变而变化[14-15]。因此，肠道菌群与CVD的关系需要更多独立的队列研究进行进一步验证，以确定何种肠道菌群是与CVD相关的可靠标志物。

肠道菌群通过代谢产物参与CVD发生。迄今为止，已发现与CVD在机制上有因果关系的肠道菌群衍生的代谢物包括氧化三甲胺（trimethylamine N-oxide, TMAO）、对甲酚硫酸酯和硫酸吡啶酯[16-19]。其他可能对CVD起到保护作用的肠道菌群代谢产物有SCFA、胆汁酸和植物雌激素等[16]。

在本研究中，我们比较了依据冠状动脉狭窄程度分类的三组受试者的肠道菌群的结构。结果表明，肠道菌群结构随着CAD的进展而变化，某几个菌群可以独立预测CAD风险。此外，我们还验证了先前关于肠道菌群随CVD发生改变的研究报道[16]。

## 2. 材料和方法

### 2.1. 研究对象

从2015年4月1日至2015年6月30日，本研究共连续地纳入了381名被怀疑可能患有CAD的患者。根据以下标准，这381名患者中有273人被排除：胃肠道溃疡、炎症性肠病（克罗恩病或溃疡性结肠炎）、乙肝或肝硬化、癌症、器官衰竭和其他病史；一个月内可能服用过益生菌（包括发酵乳制品，如酸奶）或益生元；最近一个月内接受过抗生素、抗酸剂、类固醇或消炎药（阿司匹林除外）的治疗；最近一个月内出现过便秘或腹泻；在过去六个月内接受过免疫抑制剂或生物制剂治疗。筛选后，108名患者接受了冠状动脉造影，最终共有78名粪便样本合格的

患者被纳入研究。

78名符合条件的受试者被分为三组：无冠状动脉狭窄（Ctrl组）、冠状动脉有狭窄且狭窄程度小于50%（LT50组）、冠状动脉狭窄程度大于50%（GT50组）的受试者。GT50的受试者被定义为CAD患者。所有受试者均提供了书面知情同意书。复旦大学附属中山医院的机构审查委员会批准了所有的研究方案（IRB#327）。空腹血糖、血脂、酶活性、胆汁酸、尿素等均在雅培ARCHITECT平台（美国雅培诊断公司）检测。

### 2.2. 样本采集、DNA提取、16S核糖体RNA基因测序和聚类分析

获取住院患者的新鲜粪便样本（每份约0.2 g），在液氮中快速冷冻，后转移至-80 °C下保存。使用试剂盒QIAamp DNA Stool Mini Kit（QIAGEN，美国），按照制造商的说明从粪便中分离细菌DNA。使用引物F357 + GC/R518扩增16S核糖体RNA（rRNA）基因V4高变异区[20]。聚合酶链反应（PCR）产物用Agencourt AMPure bead（Beckman Coulter，美国）进行纯化。使用少量（50 ng）纯化DNA与Ion Plus Fragment Library Kit（Life Technologies，美国）构建条形码文库。

一个特定样品的“DNA分子标签（条形码）”是一条可特异性识别原始模板分子的14个碱基的半随机序列。条形码文库中的DNA浓度用Qubit™ dsDNA HS检测试剂盒（Thermo Fisher Scientific Inc.，美国）检测。每次检测时文库被稀释到26 pmol·L<sup>-1</sup>以制备模板。使用Ion One-Touch 200 Template Kit v2（Life Technologies，美国）乳化PCR。扩增子文库的测序在318个芯片上使用Ion Torrent™个人基因组机器（PGM™）系统和Ion PGM测序200试剂盒（Life Technologies，美国）进行。测序后，各序列读数由PGM软件过滤，去除低质量和多克隆序列。经过修剪和过滤，所有PGM质量合格的数据被导出为FASTQ文件。长度在150~220个碱基对、平均质量分数在20以上的序列被在线比对到可操作的序列中。然后用高识别度的集群数据库（CD-HIT），将长度在150~220个碱基对的序列同操作分类单位（OTU）进行在线比对[21]。使用核糖体数据库项目（RDP）分类器对OTU进行分类，自举阈值为50% [22]。

所有程序都符合人类实验负责委员会（机构和国家）的伦理标准。本研究获得了所有纳入患者的知情同意。

### 2.3. 统计分析

如前所述，按照公式计算出OTU的生物多样性和丰

富性[23]。分类变量用百分数表示，不同组间用 $\chi^2$ 检验进行比较。其他大多数分析采用 $t$ 检验来比较不同组间的均值差异，除非另有说明。使用一个基于网络的基因组分析工具 Galaxy 来分析不同组间的菌群差异，该分析工具可以从 Huttenhower 实验室网页 (<http://huttenhower.sph.harvard.edu/galaxy/>) 获得[24–25]。

使用统计软件包 SPSS (11.0.1 版) 建立多变量 logistic 回归模型，计算出丰度高于中位数与低于中位数的每个类群的 CAD 患病率的比值比 (OR) 及 95% 置信区间 (95% CI)。模型中对传统的个人心脏危险因素或 Framingham 风险评分及肾功能进行了调整。通过 Hosmer-Lemeshow 拟合度检验和 SPSS 的受试者工作特征 (ROC) 曲线下的面积来评估最终多变量二元 logistic 回归分析的总体预测价值和判别能力。

使用 R 软件 (3.6.2 版) 的 ggplot2 软件包绘制菌群在门、纲、属级别的相对丰度。使用单向 Kruskal-Wallis 方差分析 (ANOVA) 比较三种 CAD 表型之间的 Chao1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数和均匀度指数的差异。使用 R 软件 Wilcoxon 秩和检验比较两组之间的菌群相对丰度的区别。使用 MetaboAnalyst 进行主成分分析 (PCA) 和部分最小平方判别分析 (PLSDA) [26]。β 多样性由 Bray-Curtis 异质性与方差分析 (PERMANOVA) 确定，以检验三组之间的菌群结构差异。使用 MicrobiomeAnalyst [27–28] 根据 Bray-Curtis 异质性定义的 β 多样性，采用 Ward 聚类聚集法进行层次聚类树状图的制作。使用 R 软件中的 pcaMethod 和 pls 软件包分别计算 PCA 的预测良好性 ( $Q^2$ ) 和拟合良好性 ( $R^2$ )。对于所有的统计检验，以  $p < 0.05$  为差异具有统计学意义。

### 3. 结果

#### 3.1. 基线情况

Ctrl、LT50 和 GT50 三组的平均年龄分别为 (61.4 ± 7.5) 岁、(60.6 ± 10.8) 岁和 (61.7 ± 9.0) 岁，男性比例分别为 68.4%、64.3% 和 84.4% (表 1)。与 LT50 组相比，GT50 组的低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C) 明显降低。甘油三酯 (triglyceride, TG) 水平是动脉粥样硬化性心血管疾病的危险因素[29]，本研究中观察到血浆 TG 水平随着动脉粥样硬化的进展而升高。糖尿病 (diabetes mellitus, DM) 是 CAD 的危险因素[30]，本研究中 DM 诊断标准为空腹血糖大于 7.0 mmol·L<sup>-1</sup> 或有 DM 疾病史。在本研究队列中，尽管三组之间的空腹血糖没有明显差异，但我们观察到 LT50 组和 GT50 组

的 DM 患病率明显低于 Ctrl 组。GT50 组的高血压 (HBP) 患病率明显低于 Ctrl 组。三组间其他参数没有明显差异。

表 1 受试者基线特征及实验室检测结果

Variables	Control (n = 19)	LT50 (n = 14)	GT50 (n = 45)
Age (year)	61.4 ± 7.5	60.6 ± 10.8	61.7 ± 9.0
Sex (male %)	68.4	64.3	84.4
BMI	24.2 ± 4.3	23.4 ± 3.4	24.7 ± 2.4
DM (%)	47.4	14.3 <sup>a</sup>	15.6 <sup>b</sup>
HBP (%)	78.9	57.1	44.4 <sup>a</sup>
Leukocyte (× 10 <sup>9</sup> L <sup>-1</sup> )	7.8 ± 3.8	6.1 ± 2.3	7.0 ± 2.5
TC (mmol·L <sup>-1</sup> )	4.1 ± 0.8	4.5 ± 1.2	3.8 ± 1.0
LDL-C (mmol·L <sup>-1</sup> )	2.3 ± 0.7	2.5 ± 0.9	1.9 ± 0.8 <sup>c</sup>
HDL-C (mmol·L <sup>-1</sup> )	1.3 ± 0.4	1.3 ± 0.3	1.2 ± 0.4
TG (mmol·L <sup>-1</sup> )	1.2 ± 0.8	1.8 ± 1.5	2.0 ± 1.7 <sup>a</sup>
ApoA1 (g·L <sup>-1</sup> )	1.5 ± 0.2	1.5 ± 0.3	1.5 ± 0.4
ApoB (g·L <sup>-1</sup> )	0.8 ± 0.2	0.8 ± 0.3	0.7 ± 0.2
ApoE (mg·L <sup>-1</sup> )	38.5 ± 13.0	40.5 ± 13.8	37.1 ± 18.5
LP(a) (mg·L <sup>-1</sup> )	367.6 ± 392.3	264.9 ± 362.0	312.2 ± 356.0
Hb (g·L <sup>-1</sup> )	134.6 ± 19.0	135.7 ± 15.4	138.3 ± 12.4
Albumin (g·L <sup>-1</sup> )	38.1 ± 2.2	39.2 ± 3.4	41.6 ± 5.8
ALT (U·L <sup>-1</sup> )	24.9 ± 26.9	24.9 ± 24.6	31.3 ± 21.2
AST (U·L <sup>-1</sup> )	65.6 ± 142.8	20.9 ± 7.5	28.3 ± 14.3
Glycosylated hemoglobin (%)	7.2 ± 2.4	5.9 ± 0.8	6.1 ± 0.6
Alkaline phosphatase (U·L <sup>-1</sup> )	57.4 ± 13.8	60.3 ± 19.6	65.8 ± 26.3
Bilirubin (ng·mL <sup>-1</sup> )	15.9 ± 17.4	10.4 ± 4.1	13.0 ± 8.7
Bile acid (mmol·L <sup>-1</sup> )	4.6 ± 3.4	4.2 ± 2.2	4.1 ± 3.0
Urea (mmol·L <sup>-1</sup> )	6.5 ± 3.2	5.9 ± 3.0	4.9 ± 1.8
eGFR (mL·min <sup>-1</sup> (1.73 m <sup>2</sup> ) <sup>-1</sup> )	79.9 ± 15.1	84.1 ± 12.8	85.3 ± 15.8
Uric acid (mmol·L <sup>-1</sup> )	314.6 ± 113.9	380.7 ± 165.5	326.3 ± 78.2
Glucose (mmol·L <sup>-1</sup> )	6.3 (5.2 - 7.4)	5.3 (5.1 - 6.1)	5.7 (5.0 - 6.7)
Na <sup>+</sup> (mmol·L <sup>-1</sup> )	141.7 ± 5.3	141.6 ± 3.2	141.7 ± 1.9
K <sup>+</sup> (mmol·L <sup>-1</sup> )	4.0 ± 0.5	4.1 ± 0.2	3.9 ± 0.6
Cl <sup>-</sup> (mmol·L <sup>-1</sup> )	100.9 ± 5.6	103.7 ± 3.9	103.0 ± 2.9

<sup>a</sup>  $p < 0.05$  vs Ctrl group; <sup>b</sup>  $p < 0.01$  vs Ctrl group; <sup>c</sup>  $p < 0.05$  vs LT50 group.

BMI: body mass index; DM: diabetes mellitus; HBP: high blood pressure; TC: total cholesterol; LDL-C: low density lipoprotein cholesterol; HDL-C: high density lipoprotein cholesterol; TG: triglyceride; ApoA1: apolipoprotein A-I; ApoB: apolipoprotein B; ApoE: apolipoprotein E; LP: lipoprotein; Hb: hemoglobin; ALT: alanine aminotransferase; AST: aspartate aminotransferase; eGFR: estimated glomerular filtration rate.

Data were presented as mean ± standard deviation (SD) or median (interquartile (IQR)).

#### 3.2. 肠道菌群结构的丰度 (Chao1, Evenness) 和多样性 (Shannon, Simpson)

在这项研究中，我们使用 Illumina 高通量测序技术检测了粪便样品的菌群分布。在 3% 的相异性水平下，我们



共鉴定了 164 690 个 OTU，平均每个样本 2111 个 ( $n = 78$ ) OTU。OTU 随着 CAD 严重程度的增加呈下降趋势，但未达统计学意义上的差异；菌群属数在三组间未显示出明显差异，表明对照组的  $\alpha$  多样性没有明显高于 CAD 患者。对三组间的 Chao1 指数、Shannon 指数、Simpson 指数和 Evenness 指数的比较进一步证实了这一现象，结果显示三组 CAD 表型间各参数无明显差异（见附录 A 中图 S1）。

### 3.3. 肠道微生物的 $\beta$ 多样性

另一方面，使用 Bray-Curtis 相似度多维缩放图 (MDS)，基于  $\beta$  多样性确定的各样本的肠道微生物组相似度显示，可见沿第一轴的相对分离，占数据中维度分布的 37.4%。使用 PERMANOVA 统计方法可知，CAD 表型可以解释大约 6.1% 的微生物相似性变化 [ $R^2 = 0.061$ ,  $p < 0.01$ , 图 1 (a)]。分层聚类树状图 [图 1 (b)] 显示，相似度与它们各自的 CAD 表型无关。

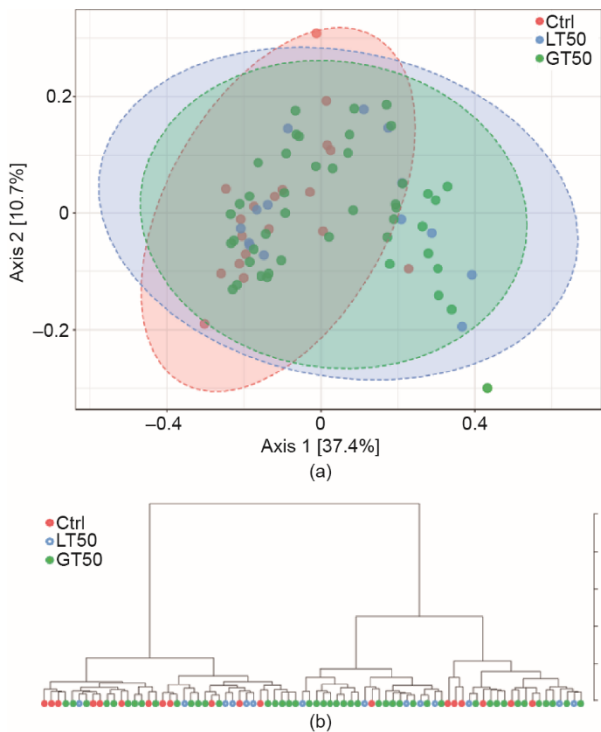


图 1. (a) 通过 CAD 表型可视化得到的肠道菌群  $\beta$  多样性。基于 MDS 图于三种 CAD 表型之间的 Bray-Curtis 差异性得到狭窄程度  $< 50\%$  (LT50 组,  $n = 14$ )、狭窄程度  $> 50\%$  (GT50 组,  $n = 45$ ) 和无狭窄 (Ctrl 组,  $n = 19$ ) 结果。PERMANOVA  $F = 2.42$ 、 $R^2 = 0.061$ 、 $p < 0.01$ 。(b) 分层聚类树状图采用 Bray-Curtis 差异性和 ward 聚类法得到。

### 3.4. 肠道菌群结构差异

使用进一步的分层聚类分析比较 78 名患者肠道微生物组之间的相似性。多变量无监督 PCA [图 2 (a)] 没有将三种 CAD 表型，即 Ctrl、LT50 和 GT50 彼此分离。有监督的 PLSDA [图 2 (b)] 显示三种 CAD 表型之间的区分度为

$Q^2 = 0.20$ ，表明该模型的预测能力很低。然后，在门级别和纲级别上比较三组间的肠道菌群结构。结果显示，95% 以上的细菌种群被归入放线菌、拟杆菌、厚壁菌和变形杆菌四门，以及包括拟杆菌、杆菌和梭菌在内的几个纲 (图 3)。与 Ctrl 组相比，厚壁菌门和梭菌的相对丰度在 LT50 组中显示出明显的增加，而变形杆菌门的相对丰度明显减少 ( $p < 0.05$ )。78 名受试者总共检测到 233 个属。根据所有三组的平均相对丰度，图 4 (a) 显示了三组总数上丰度最高的 10 个属。基于目前发现的人类远端肠道菌群的三种不同肠型 [31-32]，我们评估了三个研究组是否具有不同的肠型特征。图 4 (b) 显示，随着 CAD 发病率的增加，I 型肠型和 III 型肠型的比例下降，而 II 型肠型的比例上升。此外，肠型谱在 Ctrl 组和 GT50 组之间显示出明显的差异 ( $p = 0.04$ ,  $\chi^2$  检验)。有报道称，厚壁菌门与拟杆菌门的比值 (F/B 比值) 与代谢性疾病有关 [33]。然而，在我们的研究中，我们发现三组之间的 F/B 比值没有明显差异。Ctrl 组、LT50 组和 GT50 组的 F/B 比值 [中位数 (IQR)] 分别为 0.49 (0.37~0.61)、0.54 (0.44~0.64) 和 0.47 (0.36~0.61)。

我们进一步使用线性判别分析 (LDA) 效应大小 (LefSe) 方法来识别能够区分不同类群分类单元。在图 5 (a) 中，可见共有 20 个细菌类群在 Ctrl 组、LT50 组和 GT50 组中被不同程度地富集。Ctrl 组的粪便样本中有 13 个细菌类群被富集：拟杆菌 (拟杆菌科及其属)； $\delta$ -变形杆菌 ( $\delta$ -变形杆菌纲、脱硫弧菌目、脱硫弧菌科及嗜胆菌属)；梭杆菌 (梭杆菌门、梭杆菌目、梭杆菌科及其属)；放线菌属以及梭菌 *XIX* 属。在 LT50 组中，普雷沃氏菌科和副拟杆菌、芽孢杆菌、狭义梭菌和厌氧杆菌 4 个属富集。普雷沃氏菌科和副拟杆菌属于拟杆菌目，其他 3 个属属于梭菌科。在 GT50 组中，罗氏菌属和芽孢杆菌属两个属富集，前者属于厚壁菌门，后者属于拟杆菌门。

图 5 (b) 显示了上述每个类群的相对丰度。由于  $\delta$ -变形杆菌纲与其中的脱硫弧菌目及脱硫弧菌科丰度相同，拟杆菌科与拟杆菌属丰度相同，梭杆菌门与梭杆菌纲及下属的梭杆菌目丰度相同，所以图 5 (b) 中省略了 5 个级别相对较高的类群。在 LT50 组和 GT50 组中，副杆菌属和芽孢杆菌属的相对丰度及普雷沃氏菌科的丰度都明显高于 Ctrl 组。在 LT50 组和 GT50 组中，脱硫弧菌科、拟杆菌属、梭杆菌目、梭杆菌科及梭杆菌属的相对丰度均明显低于 Ctrl 组。GT50 组中罗氏菌属的相对丰度明显高于 Ctrl 组。GT50 组中芽孢杆菌属的相对丰度明显低于 LT50 组。

我们使用多变量 logistic 回归分析检验了上述每种肠道菌群的丰度及其与 CAD 表型的关系。如表 2 所示，梭



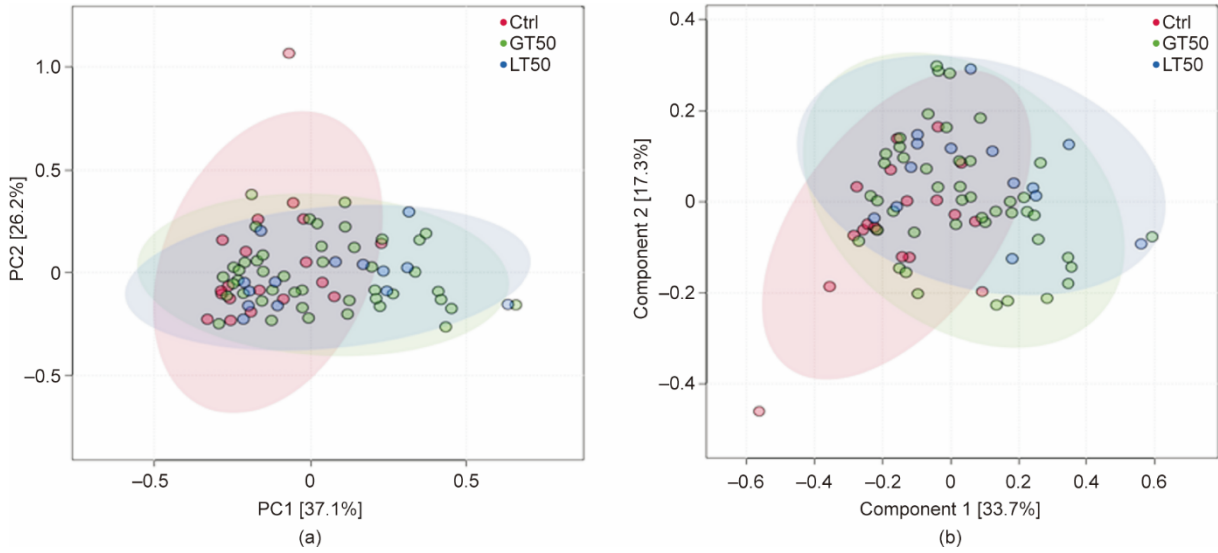


图2. 人类粪便菌群分布的多变量统计分析。(a) 总队列的PCA二维(2D)得分图( $R^2=0.88$ 、 $Q^2=0.82$ )。(b) 监督下的PLSDA二维得分图显示了三种不同的CAD表型之间的区别: 冠状动脉狭窄程度小于50% (LT50组)、冠状动脉狭窄程度大于50% (GT50组)和冠状动脉无狭窄 (Ctrl组)( $R^2=0.85$ 、 $Q^2=0.20$ )。PC: 主成分。

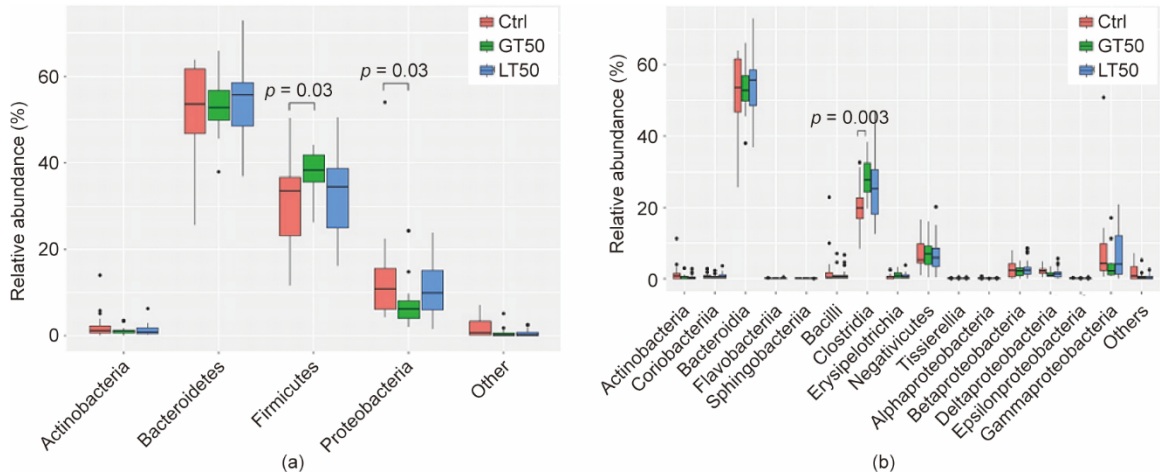


图3. 三种不同CAD表型的人类受试者的粪便菌群在门级别 (a) 和纲级别 (b) 上的对比: 冠状动脉狭窄程度小于50% (LT50组)、冠状动脉狭窄程度大于50% (GT50组)和冠状动脉无狭窄 (Ctrl组)。p值由Wilcoxon秩和检验计算, 只有小于0.05的p值被标记出来。

杆菌(梭杆菌门、梭杆菌纲、梭杆菌目、梭杆菌科、梭杆菌属)和嗜胆菌的丰度增加与发生动脉粥样硬化的风险降低有关;例如,对于粪便中梭杆菌丰度高于中位数范围的受试者,其中只有19% (95% CI: 4.1%~84%,  $p=0.028$ )可能发展为LT50, 26% (95% CI: 8.1%~80%,  $p=0.02$ )可能发展为GT50。在调整了Framingham风险因素[年龄、性别、HBP、高密度脂蛋白(HDL)、LDL和糖尿病]和肾功能这些传统的CAD风险因素后[34-35],除了梭杆菌科及其梭杆菌属与LT50的关联外,这些关联仍然存在,表明梭杆菌及其子类群丰度的增加与CAD风险的降低独立相关。即使在调整了Framingham危险因素和肾功能后, $\delta$ -变形杆菌和梭菌XIX类群相对丰度的增加与不发生GT50明显相关,但与不发生LT50没有明显的关系。考虑

到LT50组患者处于CAD的早期阶段,这一结果表明梭杆菌和嗜胆菌这两个类群在减少动脉硬化风险方面的作用。另一方面,普雷沃氏菌或副杆菌丰度的增加与患LT50或GT50的可能性增加独立相关,表明这两个类群可能促进动脉粥样硬化。相比之下,梭杆菌、 $\delta$ -变形杆菌、嗜胆菌和梭菌XIX可能具有抗动脉粥样硬化作用,并且可以作为益生菌发挥作用。

为了进一步研究由LEfSe识别的20个类群组成的菌群特征对不同CAD表型的预测价值,采用Hosmer-Lemeshow检验确定20个类群丰度与CAD表型之间的二元logistic回归模型的真实性和采用ROC曲线下的面积(AUC)来评估判别。图6(a)显示LT50组与Ctrl组的AUC为1.00, Hosmer-Lemeshow拟合度检验的p值为1.00

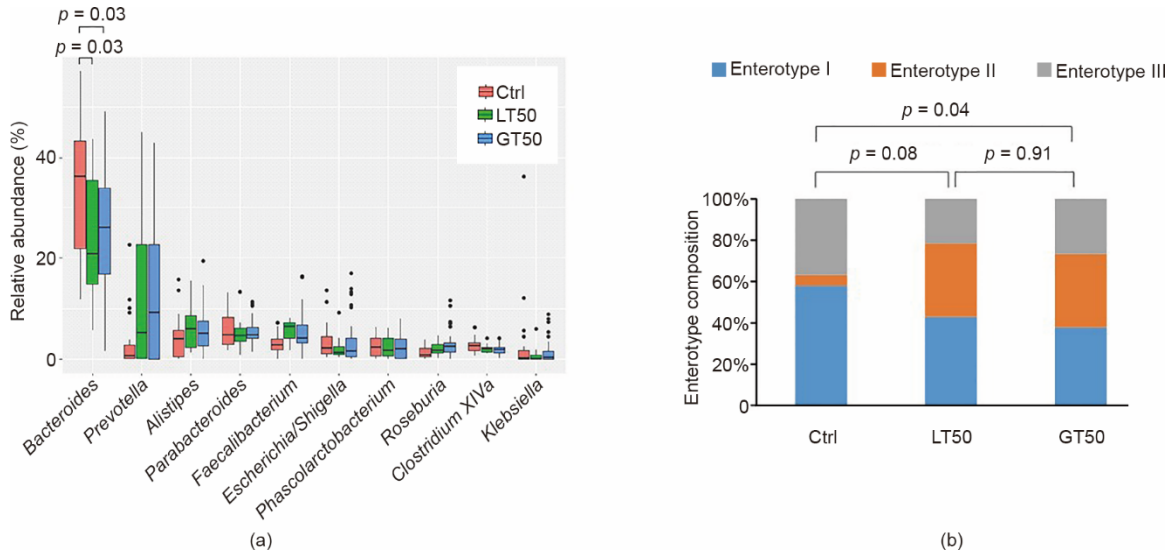


图4. 粪便菌群的属级别与肠型组成对比。(a) 三种不同CAD表型的人类受试者的粪便菌群属级别的对比。仅显示三组丰度最高的10个属。 $p$ 值由Wilcoxon秩和检验计算, 只有小于0.05的 $p$ 值被标记出来。(b) 比较三种CAD表型的肠型组成: 冠状动脉狭窄程度小于50% (LT50组)、冠状动脉狭窄程度大于50% (GT50组)和冠状动脉无狭窄 (Ctrl组)。 $p$ 值通过 $\chi^2$ 检验计算。

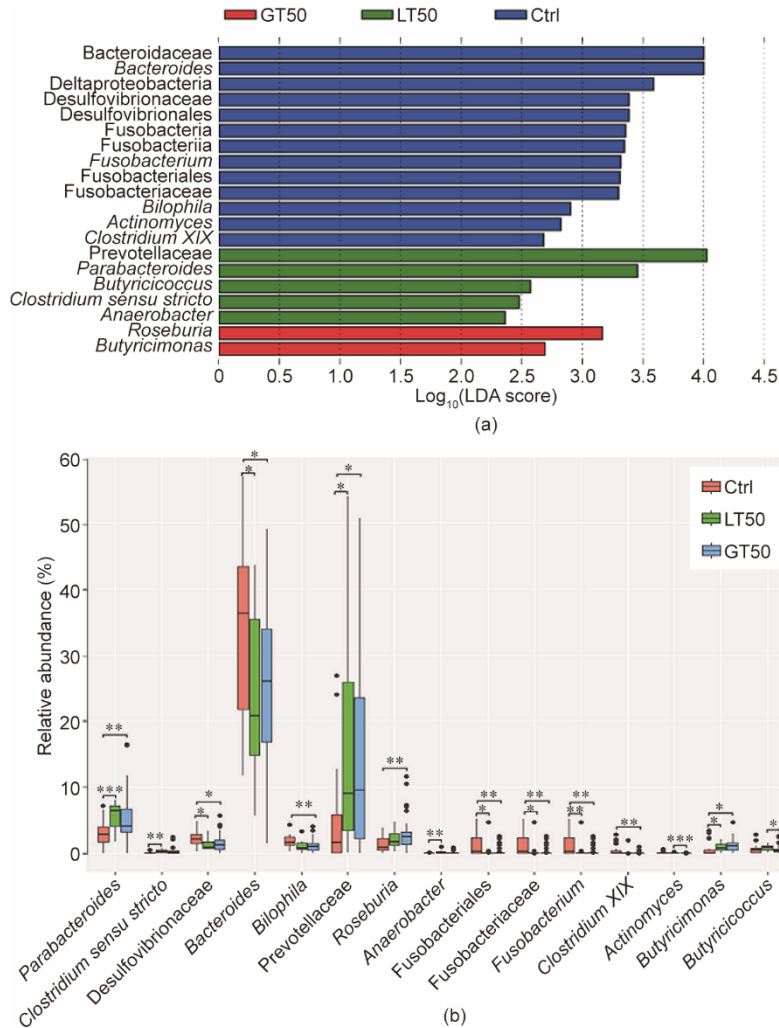


图5. 三种不同CAD表型的人类受试者的菌群构成特点。(a) LT50组和GT50组与Ctrl组相比, LefSe识别的粪便菌群在不同的CAD表型中的富集特征[通过Kruskal-Wallis检验,  $\log_{10}(\text{LDA得分}) > 2$ ,  $p < 0.05$ ]。(b) 特定菌群的相对丰度: 冠状动脉狭窄程度小于50% (LT50组)、冠状动脉狭窄程度大于50% (GT50组)和冠状动脉无狭窄 (Ctrl组)。根据Mann-Whitney  $U$ 检验, \* $p < 0.05$ 、\*\* $p < 0.01$ 和\*\*\* $p < 0.001$ 有显著差异。

表2 冠状动脉粥样硬化不同表型在各种肠道菌群丰度的比值比(95% CI)

Taxa	Model	Phenotype		
		Ctrl	LT 50	GT 50
<i>Bacteroidaceae/Bacteroides</i>	A	1.00	0.35 (0.08 - 1.45)	0.40 (0.13 - 1.25)
	B	1.00	0.36 (0.05 - 2.86)	0.11 (0.01 - 0.84) <sup>a</sup>
Deltaproteobacteria	A	1.00	0.27 (0.06 - 1.17)	0.26 (0.08 - 0.85) <sup>a</sup>
	B	1.00	$9.50 \times 10^{-4}$ ( $2.40 \times 10^{-7}$ - 3.78)	0.12 (0.02 - 0.77) <sup>a</sup>
Desulfovibrionaceae/Desulfovibrionales	A	1.00	0.27 (0.06 - 1.17)	0.26 (0.08 - 0.85) <sup>a</sup>
	B	1.00	$9.50 \times 10^{-4}$ ( $2.40 \times 10^{-7}$ - 3.78)	0.12 (0.02 - 0.77) <sup>a</sup>
Fuscobacteria/Fuscobacteriia/Fusobacteriales	A	1.00	0.19 (0.04 - 0.84) <sup>a</sup>	0.26 (0.08 - 0.85) <sup>a</sup>
	B	1.00	0.02 ( $5.10 \times 10^{-4}$ - 0.85) <sup>a</sup>	0.09 (0.01 - 0.62) <sup>a</sup>
Fuscobacteriaceae	A	1.00	0.13 (0.03 - 0.63) <sup>a</sup>	0.21 (0.07 - 0.66) <sup>b</sup>
	B	1.00	$2.00 \times 10^{-7}$ ( $1.00 \times 10^{-7}$ - 3487.00)	0.09 (0.01 - 0.61) <sup>b</sup>
<i>Fuscobacterium</i>	A	1.00	0.08 (0.01 - 0.46) <sup>b</sup>	0.21 (0.07 - 0.66) <sup>b</sup>
	B	1.00	$1.40 \times 10^{-7}$ ( $1.00 \times 10^{-7}$ - 3487.00)	0.09 (0.01 - 0.61) <sup>b</sup>
<i>Bilophila</i>	A	1.00	0.20 (0.04 - 0.92) <sup>a</sup>	0.18 (0.05 - 0.62) <sup>b</sup>
	B	1.00	$1.70 \times 10^{-3}$ ( $5.20 \times 10^{-5}$ - 0.54) <sup>a</sup>	0.07 (0.08 - 0.61) <sup>a</sup>
<i>Actinomyces</i>	A	1.00	2.29 (0.56 - 9.37)	0.43 (0.13 - 1.40)
	B	1.00	0.95 (0.10 - 9.53)	0.35 (0.07 - 1.82)
<i>Clostridium XIX</i>	A	1.00	0.23 (0.04 - 1.32)	0.21 (0.06 - 0.74) <sup>a</sup>
	B	1.00	0.23 (0.02 - 3.66)	0.14 (0.02 - 0.92) <sup>a</sup>
Prevotellaceae	A	1.00	5.08 (1.08 - 23.06) <sup>a</sup>	5.63 (1.61 - 19.71) <sup>b</sup>
	B	1.00	29.02 (1.41 - 599.10) <sup>a</sup>	588.00 (4.70 - 73579.00) <sup>a</sup>
<i>Parabacteroides</i>	A	1.00	7.00 (1.49 - 32.82) <sup>a</sup>	3.20 (0.99 - 10.38)
	B	1.00	22.65 (1.37 - 374.14) <sup>a</sup>	11.20 (1.45 - 87.25) <sup>a</sup>
<i>Butyricoccus</i>	A	1.00	4.07 (0.85 - 19.43)	0.81 (0.28 - 2.39)
	B	1.00	101.40 (1.21 - 8488.20) <sup>a</sup>	5.79 (0.90 - 37.26)
<i>Clostridium sensu stricto</i>	A	1.00	7.94 (1.60 - 39.42) <sup>a</sup>	2.07 (0.67 - 6.42)
	B	1.00	483.60 (0.46 - 512841.00)	2.66 (0.44 - 15.95)
<i>Anaerobacter</i>	A	1.00	7.00 (1.49 - 32.82) <sup>a</sup>	3.20 (0.99 - 10.38)
	B	1.00	9.57 (0.84 - 109.00)	6.51 (1.03 - 41.07) <sup>a</sup>
<i>Roseburia</i>	A	1.00	1.63 (0.39 - 6.82)	3.25 (1.04 - 10.13) <sup>a</sup>
	B	1.00	2.07 (0.20 - 21.14)	3.40 (0.65 - 17.78)
<i>Butyricimonas</i>	A	1.00	2.81 (0.61 - 12.97)	6.80 (1.93 - 23.98)
	B	1.00	0.93 (0.10 - 8.75)	4.91 (0.90 - 26.69)

Odds ratios (95% CI) comparing each bacterium taxon population% above median value versus below median value to predict atherosclerotic phenotype were presented. A: unadjusted; B: adjusted for Framingham risk factors (age, sex, HBP, HDL, LDL, and diabetes) and renal function.

<sup>a</sup>  $p < 0.05$ ; <sup>b</sup>  $p < 0.01$ .

[ $\chi^2 = 0$ , 自由度 (df) = 7], 表明 20 个细菌类群的组合特征可以完美地区分 LT50 组和 Ctrl 组。图 6 (b) 显示 GT50 组与 Ctrl 组的 AUC 为 0.97 (95% CI: 0.92~1.02,  $p < 0.001$ ), Hosmer-Lemeshow 拟合度检验的  $p$  值为 0.13 ( $\chi^2 = 12.4$ , df = 8), 表明合并的 20 个细菌类群的组合特征可以区分 GT50 组与 Ctrl 组。图 6 (c) 显示 LT50 组+ GT50 组与 Ctrl 组的 AUC 为 0.95 (95% CI: 0.89~1.01,  $p = 0.03$ ), Hosmer-Lemeshow 拟合度检验的  $p$  值为 0.78 ( $\chi^2 = 4.8$ , df = 8), 表明合并的 20 个细菌类群的组合特征可以区分 LT50

组+GT50 组和 Ctrl 组。图 6 (d) 显示 GT50 组与 Ctrl 组+ LT50 组的 AUC 为 0.88 (95% CI: 0.80~0.96,  $p = 0.04$ ), Hosmer-Lemeshow 拟合度检验的  $p$  值为 0.12 ( $\chi^2 = 12.7$ , df = 8), 表明合并的 20 个细菌类群的组合特征可以区分 GT50 组与 Ctrl 组+LT50 组。通过选择 ROC 曲线的 Youden 指数的最大值, 我们发现合并后的 20 个细菌类群对 LT50 组与 Ctrl 组、GT50 组与 Ctrl 组、LT50 组+GT50 组与 Ctrl 组、GT50 组与 Ctrl 组+LT50 组的判别预测准确率分别为 100%、95.3%、88.4% 和 87.2%。



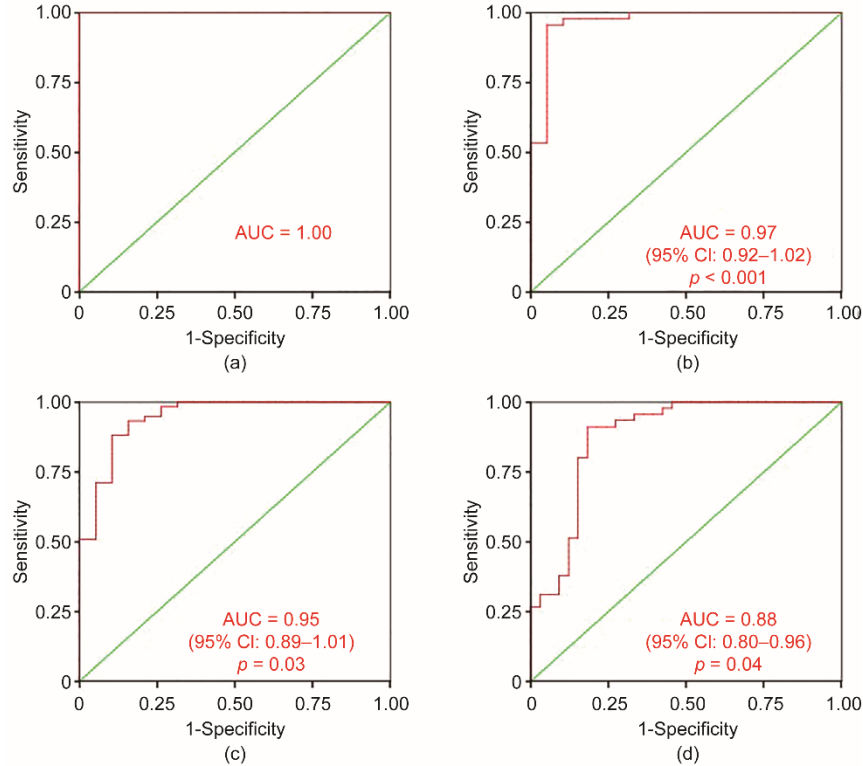


图6. 使用二元 logistic 回归模型绘制的 ROC 曲线，用于使用 Hosmer-Lemeshow 拟合优度检验预测 CAD 的概率。由 LefSe 识别的 20 个细菌类群联合诊断组合在所有横断面比较中 AUC 均大于 0.88。(a) LT50 组与 Ctrl 组的比较；(b) GT50 组与 Ctrl 组的比较；(c) LT50 组+ GT50 组与 Ctrl 组的比较；(d) GT50 组与 Ctrl 组+LT50 组的比较。

### 3.5. 验证既往研究发现的 CAD 患者肠道菌群富集的可重复性

之前研究发现，某几个类群在 CAD 患者中丰度很高。Jie 等[36]比较了 218 名动脉粥样硬化性心血管疾病 (atherosclerotic cardiovascular disease, ACVD) 患者和 187 名健康对照者的粪便微生物，发现在 ACVD 组中富集了肠杆菌科和链球菌属。肠杆菌科的丰度[中位数 (IQR)]在 Ctrl 组、LT50 组和 GT50 组分别为 0.039 (0.023~0.086)、0.017 (0.010~0.036) 和 0.037 (0.008~0.105)，而链球菌属分别为 0.0024 (0.0016~0.0038)、0.0032 (0.0016~0.0072) 和 0.0028 (0.0013~0.0055)。Wilcoxon 秩和检验分析显示，不同组间结果没有明显差异。Jie 等[36]还发现，拟杆菌属的丰度随着 ACVD 的发生而下降，与 Ctrl 组 [IQR: 0.36 (0.17~0.43)] 相比，LT50 组 [IQR: 0.26 (0.16~0.34)] 中拟杆菌属的相对丰度明显下降，这与我们的研究结果一致。Yin 等[37]比较了大动脉粥样硬化性中风或短暂性脑缺血发作 (transient ischemic attack, TIA) 患者与健康对照组之间的粪便菌群差异，也发现中风/TIA 患者的拟杆菌丰度下降。由此可见，拟杆菌可能对 CVD 有保护作用。

据报道，罗氏菌会随着动脉粥样硬化症状的加重而减少[38]，罗氏菌在无菌的载脂蛋白 E (ApoE) 缺失小鼠肠

道中的定植可以调节粪便丁酸盐的积累，降低全身炎症，改善动脉粥样硬化[39]。然而，我们发现本研究中 GT50 组、CAD 组的粪便中的罗氏菌丰度明显高于 Ctrl 组，而且随着动脉粥样硬化的进展呈现增加的趋势 (ANOVA,  $p = 0.002$ )。Ctrl、LT50 和 GT50 三组罗氏菌的丰度[平均值±标准差 (SD)]分别为  $0.014 \pm 0.003$ 、 $0.022 \pm 0.004$ 、 $0.028 \pm 0.004$ 。

## 4. 讨论

饮食习惯是决定肠道共生菌群，即肠道微生物分型 (肠型) 的重要因素[40]。II 型肠型常在素食者中富集[41]，但在本研究中，我们发现 II 型肠型在 CAD 中富集，这与 Emoto 等[10]早期的研究结果相反。素食对健康有益[41]，本研究中 II 型肠型在 CAD 患者中富集可能归因于患者基于医疗常识而主动调整优化其饮食习惯。事实上，De Filippis 等[42]发现素食者与杂食者的普雷沃氏菌寡聚型存在差异，并且杂食者饮食相关的寡聚型与循环中的 TMAO 水平呈正相关[43]，而 TMAO 是促进 ACVD 和血栓形成的一种代谢物[44-45]。Emoto 等[10]认为 II 型肠型随着 CAD 的发病而减少，可能是由于患者摄入素食减少，

导致与素食相关的普雷沃氏菌寡聚型减少。而我们发现II型肠型在CAD中富集,则可能是由于患者调整饮食结构导致素食相关的寡聚型增加。未来II型肠型与CAD风险之间的关系的进一步验证应聚焦于普雷沃氏菌寡聚型组成或菌株水平。

CAD是一种慢性炎症性疾病,而肠道菌群可以通过产生生物活性代谢物,如SCFA、原儿茶酸、胆汁酸和肠内酯来抑制炎症过程,因而成为CAD治疗的新靶点[16,46]。不同的菌群对炎症产生不同的影响,包括促进、抑制炎症或对炎症无影响,因此肠道菌群与ACVD之间的关联已成为一个热门话题。而迄今为止,仅极少量研究报道了肠道菌群丰度与心血管疾病之间的关联。既往研究报道,与对照组相比,CAD患者的乳酸杆菌目明显增加,而拟杆菌门则减少[10]。

在本研究中,我们使用LefSe-Galaxy并确定了20个与CAD患病率相关的微生物群。此外,我们采用多变量logistic回归分析证实了梭杆菌门/梭杆菌纲/梭杆菌目/梭杆菌科/梭杆菌属、嗜胆菌属和梭菌XIX属微生物群的丰度与CAD风险呈负相关,普雷沃氏菌科和副拟杆菌属的丰度与CAD风险呈正相关。我们还发现,前述提到的9个微生物群可以独立预测CAD风险。

我们没有发现CAD患者与对照组之间在乳酸杆菌目上有显著差异,但观察到CAD患者的拟杆菌科和拟杆菌属的细菌丰度减少。多变量logistic回归分析显示,只有在调整了Framingham危险因素和肾功能后,拟杆菌科及其属的丰度增加才与冠状动脉疾病风险减少有关(表2)。乳酸杆菌被认为是一种益生菌,因为它能使食物发酵产生乳酸[47]。因此可以预测,既往研究所观察到的乳酸杆菌目在CAD患者中富集的这一结果在本研究中难以重复。细菌可以将未消化的多糖发酵成小分子物质,如具备生物活性的SCFA[48]。SCFA具有抗炎特性,对维持心血管健康有益[49]。乙酸和丙酸可以通过嗅觉受体78(OLFR78)调节血压[50-51]。既往一项研究也提到,动脉粥样硬化性中风或TIA患者的拟杆菌属丰度下降[37]。因此,拟杆菌属丰度下降可能是CAD的一个可靠指标。

具核梭杆菌能够诱导黏蛋白分泌和肿瘤坏死因子(TNF)- $\alpha$ 表达,导致肠道疾病,如炎症性肠病(IBD)[52]。另一方面,梭杆菌属及其亚群似乎具有抗动脉粥样硬化作用。具核梭杆菌是一种梭杆菌,也是一种在牙周病中流行的革兰氏阴性厌氧菌。研究显示,其通过调节宿主免疫反应和动脉粥样硬化危险因素对ApoE缺失小鼠产生抗动脉粥样硬化作用[53-54]。梭杆菌属具有致病还是有益作用,取决于其与之相互作用的细菌群落[54]。

嗜胆菌属和梭菌XIX属种群的减少与冠状动脉疾病风险增加相关。嗜胆菌属是脱硫弧菌科的一个属,其丰度随着肉食量增加而增加[55]。某些种类的嗜胆菌属可以还原亚硫酸盐产生 $H_2S$ ,导致T细胞激活和肠道通透性增加[56-57],可能增加CAD的风险。因此,CAD患者中嗜胆菌属丰度的降低可能是由于饮食习惯的调整,而不应作为检测CAD风险的可靠标志。一项比较了重度抑郁症患者和健康对照组之间的肠道菌群结构的研究显示,梭菌XIX属在重度抑郁症患者中的丰度高于健康对照组[58]。因此,梭菌XIX属的丰度降低与CAD的关系仍需进一步验证。

普雷沃氏菌科和副拟杆菌属是两个与CAD风险呈正相关的类群。在肠道中,普雷沃氏菌科可在富含膳食碳水化合物环境中富集,并具有分解多糖的作用[59-61]。普雷沃氏菌科产生琥珀酸,而琥珀酸在高血压、缺血性心脏病和2型糖尿病患者中增加,被认为是由肠道菌群驱动的CVD风险的代谢物标志[61-62]。在饮食中补充乳酸菌后普雷沃氏菌科丰度会降低[63]。患尿毒症大鼠的乳酸杆菌科和普雷沃氏菌科丰度均减少,提示这两个分类群具有正相关性[64]。帕金森病患普的雷沃氏菌科的丰度降低[62,65]。Jeffery等[66]研究指出,肠道中普雷沃氏菌科的高丰度与免疫介导的脑疾病的发生风险降低有关,提示该菌群具有有益的作用。酒精喂养的小鼠的肠道副拟杆菌属丰度增加[67]。戈式副拟杆菌是副拟杆菌属中的一种,据报道,戈式副拟杆菌是一种抗炎细菌,其在氨基酸胆碱缺乏(CDAA)饮食喂养的小鼠中减少,这类小鼠将会发展为脂肪肝[68]。一项比较多发性硬化症患者和健康对照组之间的肠道菌群差异的研究显示,健康对照组的副拟杆菌属丰度更高。因此,拟杆菌属似乎应该被视为一种益生菌[69]。越橘可以增加盲肠部位副拟杆菌属的相对丰度[70]。此外,副拟杆菌属与SCFA的产量相关。果胶可以增加该分类群的丰度[71],所以LT50组中拟杆菌属丰度增加可能是由于CVD患者饮食转换所致,这将有助于抑制动脉粥样硬化的进展。因此,副拟杆菌属丰度增加可能不是促进CAD进展的因素。

狭义的梭菌属丰度随着CAD发病而增加。梭菌属的许多菌种可以利用胆碱产生三甲胺,促进具有促动脉粥样硬化作用的物质TMAO的产生。因此,梭菌属的富集将促进ACVD发生。然而,logistic回归分析显示,该分类群数量的增加仅与LT50发生频率增加有显著相关性,与GT50无显著关系。此外,在调整了Framingham危险因素和肾功能后,该菌群丰度与LT50发生频率之间不再具有显著关联(表2)。这一结果提示多种因素参与调节该菌群的丰度。尽管如此,我们依然认为狭义的梭菌属可能参与了

与动脉粥样硬化性心血管疾病相关的多种因素的调控。

LT50是动脉粥样硬化的早期阶段，而GT50是动脉粥样硬化的进一步发展阶段。与对照组相比，上述大多数菌群显示出几乎相同的趋势变化，这表明CAD相关的肠道菌群可能稳定地限定于几个分类群。

本研究所发现的与CAD相关的肠道菌群究竟是导致CAD的因素还是CAD发展所产生的结果，仍需进一步验证。通常肠道内益生菌群落的减少将会促进疾病发生。但在CAD人群中，仍存在一些预期外的研究结果，如既往研究报道的CAD患者中乳酸杆菌目增加[10]，以及本研究发现的CAD患者普雷沃氏菌科和副拟杆菌属增加。

肠道菌群与CAD的关系是一个有趣和重要的、值得进一步研究的领域。根据本研究与既往研究的结果[12]，只有拟杆菌属丰度减少是冠状动脉疾病进展的可靠标志物。因此，通过优化饮食结构增加细菌的丰度可能有望成为一种治疗心脏疾病的方法。

## 5. 结论

肠道菌群与CAD的进展有关，并有可能被用于诊断CAD。然而，与CAD相关的肠道菌群特征在不同的CAD队列中较难重复，只有拟杆菌属丰度减少是冠状动脉疾病发病的可靠标志物。

## 致谢

本研究获得以下科研项目经费支持：上海市徐汇区科委人工智能项目-2、上海市公共卫生人才培养项目(GWV-10.2-YQ11)、国家自然科学基金项目(81873538)、国家心肺血液研究所和国家卫生研究院院长办公室(RO1HL130819)。

## Compliance with ethics guidelines

Jia-Lu Hu, Zhi-Feng Yao, Min-Na Tang, Chun Tang, Xiao-Fan Zhao, Xi Su, Dan-Bo Lu, Qiu-Rong Li, Zhang-Sheng Wang, Yan Yan, and Zeneng Wang declare that they have no conflict of interest or financial conflicts to disclose.

## Appendix A. Supplementary data

Supplementary data to this article can be found online

at <https://doi.org/10.1016/j.eng.2020.05.025>.

## References

- [1] Conlon MA, Bird AR. The impact of diet and lifestyle on gut microbiota and human health. *Nutrients* 2014;7(1):17–44.
- [2] Nagao-Kitamoto H, Kitamoto S, Kuffa P, Kamada N. Pathogenic role of the gut microbiota in gastrointestinal diseases. *Intest Res* 2016;14(2):127–38.
- [3] Donaldson DS, Mabbott NA. The influence of the commensal and pathogenic gut microbiota on prion disease pathogenesis. *J Gen Virol* 2016;97(8):1725–38.
- [4] Budden KF, Gellatly SL, Wood DLA, Cooper MA, Morrison M, Hugenholtz P, et al. Emerging pathogenic links between microbiota and the gut–lung axis. *Nat Rev Microbiol* 2017;15(1):55–63.
- [5] Brown JM, Hazen SL. The gut microbial endocrine organ: bacterially derived signals driving cardiometabolic diseases. *Annu Rev Med* 2015;66(1):343–59.
- [6] Clarke G, Stilling RM, Kennedy PJ, Stanton C, Cryan JF, Dinan TG. Minireview: gut microbiota: the neglected endocrine organ. *Mol Endocrinol* 2014;28(8):1221–38.
- [7] Geurts L, Neyrinck AM, Delzenne NM, Knauf C, Cani PD. Gut microbiota controls adipose tissue expansion, gut barrier and glucose metabolism: novel insights into molecular targets and interventions using prebiotics. *Beneficial Microbes* 2014;5(1):3–17.
- [8] Sun J, Chang EB. Exploring gut microbes in human health and disease: pushing the envelope. *Genes Dis* 2014;1(2):132–9.
- [9] Emoto T, Yamashita T, Kobayashi T, Sasaki N, Hirota Y, Hayashi 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. *Heart Vessels* 2017;32(1):39–46.
- [10] Emoto T, Yamashita T, Sasaki N, Hirota Y, Hayashi T, So A, et al. Analysis of gut microbiota in coronary artery disease patients: a possible link between gut microbiota and coronary artery disease. *J Atheroscler Thromb* 2016; 23(8): 908–21.
- [11] Liu H, Chen X, Hu X, Niu H, Tian R, Wang H, et al. Alterations in the gut microbiome and metabolism with coronary artery disease severity. *Microbiome* 2019;7(1):68.
- [12] Zhu Q, Gao R, Zhang Y, Pan D, Zhu Y, Zhang X, et al. Dysbiosis signatures of gut microbiota in coronary artery disease. *Physiol Genomics* 2018; 50(10): 893–903.
- [13] Yoshida N, Sasaki K, Sasaki D, Yamashita T, Fukuda H, Hayashi T, et al. Effect of resistant starch on the gut microbiota and its metabolites in patients with coronary artery disease. *J Arterioscler Thromb* 2019;26(8):705–19.
- [14] Wang F, Yu T, Huang G, Cai D, Liang X, Su H, et al. Gut microbiota community and its assembly associated with age and diet in Chinese centenarians. *Microb Biotechnol* 2015;25(8):1195–204.
- [15] Zhao L, Zhang F, Ding X, Wu G, Lam YY, Wang X, et al. Gut bacteria selectively promoted by dietary fibers alleviate type 2 diabetes. *Science* 2018; 359(6380):1151–6.
- [16] Wang Z, Zhao Y. Gut microbiota derived metabolites in cardiovascular health and disease. *Protein Cell* 2018;9(5):416–31.
- [17] Seldin MM, Meng Y, Qi H, Zhu WF, Wang Z, Hazen SL, et al. Trimethylamine N-oxide promotes vascular inflammation through signaling of mitogen-activated protein kinase and nuclear factor- $\kappa$ B. *J Am Heart Assoc* 2016; 5(2): e002767.
- [18] Barisione C, Ghigliotti G, Canepa M, Balbi M, Brunelli C, Ameri P. Indoxyl sulfate: a candidate target for the prevention and treatment of cardiovascular disease in chronic kidney disease. *Curr Drug Targets* 2015;16(4):366–72.
- [19] Bogiatzi C, Gloor G, Allen-Vercoe E, Reid G, Wong RG, Urquhart BL, et al. Metabolic products of the intestinal microbiome and extremes of atherosclerosis. *Atherosclerosis* 2018;273:91–7.
- [20] Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci USA* 2011;108(Suppl 1): 4516–22.
- [21] Li W, Godzik A. CD-HIT: a fast program for clustering and comparing large sets of protein or nucleotide sequences. *Bioinformatics* 2006;22(13):1658–9.
- [22] Wang Q, Garrity GM, Tiedje JM, Cole JR. Naive Bayesian classifier for rapid assignment of rRNA sequences into the new bacterial taxonomy. *Appl Environ Microbiol* 2007;73(16):5261–7.



- [23] Morris EK, Caruso T, Buscot F, Fischer M, Hancock C, Maier TS, et al. Choosing and using diversity indices: insights for ecological applications from the German Biodiversity Exploratories. *Ecol Evol* 2014;4(18):3514–24.
- [24] Goecks J, Nekrutenko A, Taylor J; The Galaxy Team. Galaxy: a comprehensive approach for supporting accessible, reproducible, and transparent computational research in the life sciences. *Genome Biol* 2010;11(8):R86.
- [25] Blankenberg D, Von Kuster G, Coraor N, Ananda G, Lazarus R, Mangan M, et al. Galaxy: a web-based genome analysis tool for experimentalists. *Curr Protoc Mol Biol* 2010;89(1):19.10.1–21.
- [26] Xia J, Wishart DS. Using MetaboAnalyst 3.0 for comprehensive metabolomics data analysis. *Curr Protoc Bioinformatics* 2016;55:14.10.1–91.
- [27] Chong J, Liu P, Zhou G, Xia J. Using MicrobiomeAnalyst for comprehensive statistical, functional, and meta-analysis of microbiome data. *Nat Protoc* 2020; 15(3):799–821.
- [28] Dhariwal A, Chong J, Habib S, King IL, Agellon LB, Xia J. MicrobiomeAnalyst—a web-based tool for comprehensive statistical, visual and meta-analysis of microbiome data. *Nucleic Acids Res* 2017;45(W1):W180–8.
- [29] Talayero BG, Sacks FM. The role of triglycerides in atherosclerosis. *Curr Cardiol Rep* 2011;13(6):544–52.
- [30] Norhammar A, Malmberg K, Diderholm E, Lagerqvist B, Lindahl B, Rydén L, et al. Diabetes mellitus: the major risk factor in unstable coronary artery disease even after consideration of the extent of coronary artery disease and benefits of revascularization. *J Am Coll Cardiol* 2004;43(4):585–91.
- [31] Arumugam M, Raes J, Pelletier E, Le Paslier D, Yamada T, Mende DR, et al. Enterotypes of the human gut microbiome. *Nature* 2011;473(7346):174–80.
- [32] Wu GD, Chen J, Hoffmann C, Bittinger K, Chen Y, Keilbaugh SA, et al. Linking long-term dietary patterns with gut microbial enterotypes. *Science* 2011;334(6052):105–8.
- [33] Koliada A, Syzenko G, Moseiko V, Budovska L, Puchkov K, Perederiy V, et al. Association between body mass index and Firmicutes/Bacteroidetes ratio in an adult Ukrainian population. *BMC Microbiol* 2017;17:120.
- [34] Wilson PW, Castelli WP, Kannel WB. Coronary risk prediction in adults (The Framingham Heart Study). *Am J Cardiol* 1987;59(14):G91–4.
- [35] Sarnak MJ, Levey AS, Schoolwerth AC, Coresh J, Cullerton B, Hamm LL, et al. Kidney disease as a risk factor for development of cardiovascular disease: a statement from the American Heart Association Councils on Kidney in Cardiovascular Disease, High Blood Pressure Research, Clinical Cardiology, and Epidemiology and Prevention. *Circulation* 2003;108(17):2154–69.
- [36] Jie Z, Xia H, Zhong SL, Feng Q, Li S, Liang S, et al. The gut microbiome in atherosclerotic cardiovascular disease. *Nat Commun* 2017;8(1):845.
- [37] Yin J, Liao SX, He Y, Wang S, Xia GH, Liu FT, et al. Dysbiosis of gut microbiota with reduced trimethylamine-N-oxide level in patients with large-artery atherosclerotic stroke or transient ischemic attack. *J Am Heart Assoc* 2015;4(11):e002699.
- [38] Karlsson FH, Fåk F, Nookaew I, Tremaroli V, Fagerberg B, Petranovic D, et al. Symptomatic atherosclerosis is associated with an altered gut metagenome. *Nat Commun* 2012;3:1245.
- [39] Kasahara K, Krautkramer KA, Org E, Romano KA, Kerby RL, Vivas EI, et al. Interactions between *Roseburia intestinalis* and diet modulate atherogenesis in a murine model. *Nat Microbiol* 2018;3(12):1461–71.
- [40] de Moraes AC, Fernandes GR, da Silva IT, Almeida-Pititto B, Gomes EP, Pereira AD, et al. Enterotype may drive the dietary-associated cardiometabolic risk factors. *Front Cell Infect Microbiol* 2017;7:47.
- [41] Glick-Bauer M, Yeh MC. The health advantage of a vegan diet: exploring the gut microbiota connection. *Nutrients* 2014;6(11):4822–38.
- [42] De Filippis F, Pellegrini N, Laghi L, Gobetti M, Ercolini D. Unusual sub-genus associations of faecal *Prevotella* and *Bacteroides* with specific dietary patterns. *Microbiome* 2016;4(1):57.
- [43] Stock J. Gut microbiota: an environmental risk factor for cardiovascular disease. *Atherosclerosis* 2013;229(2):440–2.
- [44] Tang WH, Wang Z, Levison BS, Koeth RA, Britt EB, Fu X, et al. Intestinal microbial metabolism of phosphatidylcholine and cardiovascular risk. *N Engl J Med* 2013;368(17):1575–84.
- [45] Wang Z, Roberts AB, Buffa JA, Levison BS, Zhu W, Org E, et al. Non-lethal inhibition of gut microbial trimethylamine production for the treatment of atherosclerosis. *Cell* 2015;163(7):1585–95.
- [46] Yamashita T. Intestinal immunity and gut microbiota in atherogenesis. *J Atheroscler Thromb* 2017;24(2):110–9.
- [47] Makarova K, Slesarev A, Wolf Y, Sorokin A, Mirkin B, Koonin E, et al. Comparative genomics of the lactic acid bacteria. *Proc Natl Acad Sci USA* 2006;103(42):15611–6.
- [48] Giuliano C, Khan AW. Conversion of cellulose to sugars by resting cells of a mesophilic anaerobe *Bacteriodes cellulosolvens*. *Biotechnol Bioeng* 1985;27(7): 980–3.
- [49] Kasubuchi M, Hasegawa S, Hiramoto T, Ichimura A, Kimura I. Dietary gut microbial metabolites, short-chain fatty acids, and host metabolic regulation. *Nutrients* 2015;7(4):2839–49.
- [50] Pluznick JL, Protzko RJ, Gevorgyan H, Peterlin Z, Sipos A, Han J, et al. Olfactory receptor responding to gut microbiota-derived signals plays a role in renin secretion and blood pressure regulation. *Proc Natl Acad Sci USA* 2013; 110(11):4410–5.
- [51] Pluznick J. A novel SCFA receptor, the microbiota, and blood pressure regulation. *Gut Microbes* 2014;5(2):202–7.
- [52] Allen-Vercoe E, Strauss J, Chadee K. *Fusobacterium nucleatum*: an emerging gut pathogen? *Gut Microbes* 2011;2(5):294–8.
- [53] Han YW, Ikegami A, Rajanna C, Kawsar HI, Zhou Y, Li M, et al. Identification and characterization of a novel adhesin unique to oral *Fusobacteria*. *J Bacteriol* 2005;187(15):5330–40.
- [54] Velsko IM, Chukkappalli SS, Rivera-Kweh MF, Chen H, Zheng D, Bhattacharyya I, et al. *Fusobacterium nucleatum* alters atherosclerosis risk factors and enhances inflammatory markers with an atheroprotective immune response in ApoE (null) mice. *PLoS ONE* 2015;10(6):e0129795.
- [55] David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, et al. Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 2014;505(7484):559–63.
- [56] Miller TW, Wang EA, Gould S, Stein EV, Kaur S, Lim L, et al. Hydrogen sulfide is an endogenous potentiator of T cell activation. *J Biol Chem* 2012;287 (6):4211–21.
- [57] Pitcher MC, Cummings JH. Hydrogen sulphide: a bacterial toxin in ulcerative colitis? *Gut* 1996;39(1):1–4.
- [58] Jiang H, Ling Z, Zhang Y, Mao H, Ma Z, Yin Y, et al. Altered fecal microbiota composition in patients with major depressive disorder. *Brain Behav Immun* 2015;48:186–94.
- [59] Nakayama J, Yamamoto A, Palermo-Conde LA, Higashi K, Sonomoto K, Tan J, et al. Impact of westernized diet on gut microbiota in children on Leyte Island. *Front Microbiol* 2017;8:197.
- [60] Heinritz SN, Weiss E, Eklund M, Aumiller T, Louis S, Rings A, et al. Intestinal microbiota and microbial metabolites are changed in a pig model fed a highfat/low-fiber or a low-fat/high-fiber diet. *PLoS ONE* 2016;11(4):e0154329.
- [61] Serena C, Ceperuelo-Mallafre V, Keiran N, Queipo-Ortuño MI, Bernal R, Gomez-Huelgas R, et al. Elevated circulating levels of succinate in human obesity are linked to specific gut microbiota. *ISME J* 2018;12(7):1642–57.
- [62] Scheperjans F, Aho V, Pereira PA, Koskinen K, Paulin L, Pekkonen E, et al. Gut microbiota are related to Parkinson's disease and clinical phenotype. *Mov Disord* 2015;30(3):350–8.
- [63] London LE, Kumar AH, Wall R, Casey PG, O'Sullivan O, Shanahan F, et al. Exopolysaccharide-producing probiotic *Lactobacilli* reduce serum cholesterol and modify enteric microbiota in ApoE-deficient mice. *J Nutr* 2014;144(12): 1956–62.
- [64] Vaziri ND, Wong J, Pahl M, Piceno YM, Yuan J, DeSantis TZ, et al. Chronic kidney disease alters intestinal microbial flora. *Kidney Int* 2013;83(2):308–15.
- [65] Unger MM, Spiegel J, Dillmann KU, Grundmann D, Philippeit H, Bürmann J, et al. Short chain fatty acids and gut microbiota differ between patients with Parkinson's disease and age-matched controls. *Parkinsonism Relat Disord* 2016;32:66–72.
- [66] Jeffery ND, Barker AK, Alcott CJ, Levine JM, Meren I, Wengert J, et al. The association of specific constituents of the fecal microbiota with immunemediated brain disease in dogs. *PLoS ONE* 2017;12(1):e0170589.
- [67] Zhang X, Wang H, Yin P, Fan H, Sun L, Liu Y. Flaxseed oil ameliorates alcoholic liver disease via anti-inflammation and modulating gut microbiota in mice. *Lipids Health Dis* 2017;16:44.
- [68] Ishioka M, Miura K, Minami S, Shimura Y, Ohnishi H. Altered gut microbiota composition and immune response in experimental steatohepatitis mouse models. *Dig Dis Sci* 2017;62(2):396–406.
- [69] Chen J, Chia N, Kalari KR, Yao JZ, Novotna M, Paz Soldan MM, et al. Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci Rep* 2016;6:28484.
- [70] Matziouridou C, Marungruang N, Nguyen TD, Nyman M, Fak F. Lingonberries reduce atherosclerosis in ApoE(−/−) mice in association with altered gut microbiota composition and improved lipid profile. *Mol Nutr Food Res* 2016;60 (5):1150–60.
- [71] Li W, Zhang K, Yang H. Pectin alleviates high fat (lard) diet-induced non-alcoholic fatty liver disease in mice: possible role of short-chain fatty acids and gut microbiota regulated by pectin. *J Agric Food Chem* 2018;66(30):8015–25.