

Бициклом уменьшает проявления атеросклероза, воздействуя на кишечную микробиоту

Сяо-Линь Ли¹, Джин-Джин Цуй², Вэнь-Шэн Чжэн¹, Цзинь-Лан Чжан¹, Руи Ли¹, Сяо-Лей Ма¹, Мяо Линь¹, Хуэй-Хуэй Го¹, Конг Ли¹, Сяо-Ю Ю¹, Пэн Ду¹, Ли-Мин Чжао¹, Шуванг Хэ³, Пей Лан¹, Цзянь-Дун Цзян^{1,2}, Юншэн Че², Лу-Лу Ван^{1,2}

- PMID: 35088527
- DOI: 10.1002/смл.202105021

1. Государственная ключевая лаборатория биоактивных веществ и функций натуральных лекарственных средств, Институт Материя Медика, Китайская академия медицинских наук и Медицинский колледж Пекинского союза, 100050, Китай;

2. Институт медицинской биотехнологии, Китайская академия медицинских наук и Пекин. Медицинский колледж Союза, 100050, Китай

3. Фармацевтический колледж Шаньдунского университета, 250012, Китай.

#: Равный вклад в эту работу.

Корреспонденцию следует направлять по адресу: Лу-Лу Ван (wanglulu@imm.ac.cn) или Юншэн Че (cheyongsheng@163.com) или Цзянь-Дун Цзян (jiang.jdong@163.com)

Абстракт

Атеросклероз (АС) связан с высокой заболеваемостью и смертностью, что ложится все возрастающим бременем на современное общество. Бициклом растительного происхождения (ВРС) представляет собой универсальное биоактивное соединение, которое можно использовать для лечения АС. Однако его эффективность при АС еще не описана. Здесь показано, что ВРС нормализует дисбактериоз кишечной микрофлоры, вызванный диетой с высоким содержанием жиров у Арое (-/-)мышей. Анализ метагеномных ассоциаций подтверждает, что модуляция углеводов-активных ферментов и генов, генерирующих короткоцепочечные жирные кислоты, в кишечной флоре является одним из механизмов. Здоровье кишечника, особенно иммунитет и целостность кишечника, восстанавливаются с помощью вмешательства ВРС, что приводит к улучшению динамики системных иммунных клеток и функций печени. Соответственно, эндотелиальная активация, инфильтрация макрофагов и накопление эфиров холестерина в дуге аорты облегчаются ВРС, что уменьшает возникновение бляшек. Более того, доказано, что терапевтический эффект ВРС на АС передается при трансплантации фекальной микробиоты. Текущее исследование впервые демонстрирует антиатеросклеротические

эффекты ВИС и показывает, что его терапевтическое значение может быть, по крайней мере, частично связано с его воздействием на микробиоту кишечника.

Ключевые слова: атеросклероз; бициклол (ВИС); микробиота кишечника; метагеномные ассоциативные исследования.

Долгосрочная безопасность

Чтобы изучить долгосрочную безопасность ВИС, мы сохранили NCD и ВИС (100 мг/кг) группы лечения в течение пяти месяцев. Окрашивание HE не выявило каких-либо явных гистологических различия между основными органами обработанных и необработанных мышей (рис. S30), в то время как уровни в плазме АЛТ, АСТ, креатинина и азота мочевины не показали каких-либо четких различий в группе, получавшей ВИС и группы контроля, что указывает на то, что ВИС можно безопасно вводить.

Материалы и методы

Лечение животных

Исследование было одобрено Институциональным комитетом по уходу за животными и их использованию. Китайской академии медицинских наук и проводится в соответствии с руководящими принципами и этике Китайского совета по уходу за животными (номер утверждения: 00005970). Шесть недель 2 старые самцы мышей Арое(-/-) (The Vital River Laboratory Animal Technology Co., Ltd, Пекин, Китай) были случайным образом разделены на четыре группы после акклиматизации в течение 1 недели: нормальный контрольный рацион (NCD), нормальная контрольная диета с бициклолом (200 мг/кг/сут, NBIC через зонд), контрольная диета с высоким содержанием жиров (WD), HFD с бициклолом (100 мг/кг/сут, LBIC через зонд) или (200 мг/кг/сут, NBIC через зонд). Доза, использованная в этом исследовании, была основана на предыдущих исследованиях.1-5 Каждая группа состояла из 15 мышей, и все диеты были приобретены у Huafukang Bioscience Co. (Пекин, Китай). Вес тела и потребление пищи измеряли каждую неделю. Через 20 недель неинвазивное и количественное анализ липидов печени у мышей проводили по спектру ¹H-MPC и MPT, а у мышей голодали в течение ночи перед умерщвлением с помощью хлоралгидрата внутривенно (300 мг/кг). Плазма образцы собирали и хранили при температуре -80°C для биохимического и цитокинового анализов. Артериальную дугу, печень, жир придатка яичка, селезенку, почки и ткани кишечника выделяли и взвешивали немедленно. Часть этих тканей фиксировали 10% формалином для гистологического, ИГХ и IF-анализ, а оставшуюся часть хранили при температуре -80 °C для дальнейшего анализа. Свежий кал был заморожен в жидком азоте и хранятся при температуре -80°C для анализа микробиоты кишечника.

Для ТФМ использовали стул мышей группы NCD (мыши-доноры NCD), мышей группы WD (доноры WD мышей) и мышей группы NBIC (мыши-доноры NBIC) собирали ежедневно в стерильных условиях. (Номер разрешения: 00000382). Стул из одной и той же группы объединяли, и 200 мг стула из каждой группы суспендировали в 2 мл стерильного физиологического раствора. Подвеска была энергично встряхивали в течение 10 с, супернатант собирали центрифугированием при 500 g в течение 2 мин и используют в качестве трансплантационного материала для перорального введения животным-реципиентам в день трансплантации. Мышам Арое(-/-) (животным-реципиентам) вводили антибиотики, содержащие 0,2 г/л ампициллина, неомицин, метронидазол и 0,1 г/л ванкомицина ежедневно в течение 2 недель, через питье вода. После последней дозы антибиотиков мышей разделили на FMT-NCD (кормили HFD, трансфектировать с помощью NCD), FMT-WD (накормлен HFD, трансфектирован на WD) и FMT-BIC (накормлен группа HFD, трансфицированная ВИС (n=8)). Объем 0,1 мл свежего трансплантата из мышам-донорам вводили перорально через зонд каждый день в течение 3 месяцев. Долгосрочная безопасность *in vivo* проводилась в течение 5 месяцев для изучения безопасности ВИС. 10 мышей Арое(-/-) (6-недельного

возраста, самцы) были разделены на 2 группы, группу В1С, в которой мыши были желудочные зонды с В1С (200 мг/кг/сутки); и группа NCD, мышам которой вводили через желудочный зонд фосфатно-солевой буфер (PBS). В конце эксперимента всех мышей забивали вывих шейки матки. Плазму собирали для анализа АСТ, АЛТ, креатинина и мочевины азота для оценки печеночной и почечной токсичности соответственно. Кроме того, основные органы, в том числе сердце, печень, селезенку, легкие и почки фиксировали 10% формалином и окрашивали HE для оценки морфологическое изменение.

Биохимический и цитокиновый анализ

Уровни плазмы АЛТ, АСТ, холестерина, ТГ, ЛПНП-с, глюкозы, креатинина и мочевины азот измеряли с использованием коммерческих наборов для анализа (Biosino, Пекин, Китай), и все измерения проводились на автоматическом биохимическом анализаторе TOSHIBA (TOSHIBA Ltd., Токио, Япония), в соответствии с инструкциями производителя. LPS был измерен с помощью иммуноферментный анализ (ИФА) с использованием люминометра (BioTek Instrument, Inc., Вермонт, Калифорния, США) при 450 нм в соответствии с инструкциями производителя (Cloud-clone, Ухань, Китай). Уровень СОД в печени определяли с помощью коммерческих наборов для анализа. (Нанкинский институт биоинженерии Цзяньчэн, Нанкин, Китай) по данным производителя протоколы.

Люминесцентный анализ

Образцы плазмы мышей размораживали и анализировали на системе Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США) с использованием набора для анализа цитокинов, хемокинов и факторов роста Bio-Plex Pro (Bio-Rad), согласно протоколу производителя. Измеряемые цитокины включали IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-10, IL-12 (p40), IL-13, IL-14, IL-15, IL-17, гранулоцитарный колониобразующий фактор (G-CSF), IFN- γ , TNF- α , хемокин, полученный из кератиноцитов (KC), макрофагальный воспалительный белок-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β и зотаксин, регулируемый при активации нормальных Т-клеток экспрессируемый и секретируемый фактор (RANTES) и хемоаттрактантный белок-1 моноцитов (MCP-1). Все измерения проводились с использованием программного обеспечения Bio-Plex Manager 6.1 (Bio-Rad).

ОТ-ПЦР и вестерн-блоттинг

Суммарную РНК экстрагировали из тканей с использованием набора для очистки РНК TRIzol[®] Plus. (Invitrogen, Калифорния, США) и спектрофотометр ND2000 (Thermo Scientific, Массачусетс, США). Для этого применялась количественная оценка ПЦР в реальном времени, набор Power SYBR[™] Green RNA-to-CT[™] One-Step Kit). Данные анализировали методом 2- $\Delta\Delta$ Ct с глицеральдегид-3-фосфатом. дегидрогеназы (GAPDH), выступающей в качестве эндогенного контрольного гена. Реакция повторилась три раза, и все праймеры перечислены в таблице S3. Подробная информация об антителах приведена в

Таблица S4.

Гистологическое и иммуногистохимическое окрашивание

Образцы ткани аорты, печени и толстой кишки заливали в парафин и нарезали на кусочки толщиной 4 мкм срезы для дальнейшего окрашивания. Ткани аорты и печени окрашивали HE, чтобы наблюдать морфометрическое поражение, ткань печени окрашивали Oil Red O для анализа жира накопление. Для оценки площади атеросклеротического поражения аорты разрезали продольно, окрашивали с помощью Oil Red O и отсканированы в цифровом виде с использованием программного обеспечения Image J для количественной оценки поражений в область аорты. Толстую кишку окрашивали АВ-PAS для анализа количества бокаловидных клеток. Для ИХК, ткань аорты инкубировали с анти-ICAM (Servicebio, Ухань, Китай) и анти-VCAM (Cell Signaling Technology,

Массачусетс, США) антитела в течение ночи при 4 °С. Затем ткани промывали трижды с PBS, инкубировали с козьим антикроличьим вторичным антителом (Servicebio) в течение 50 мин при 37°C и докрашивали гематоксилином. Иммунопозитивные клетки в тканях были наблюдали и сканировали с помощью светового микроскопа (Nikon, Токио, Япония).

Иммунофлуоресцентное окрашивание

Для окрашивания IF использовали метод усиления сигнала тирамидом (TSA)³. Кратко, для каждого маркер, образцы обрабатывали первичными кроличьими антителами, а затем инкубировали с HRP-конъюгированными козьим вторичное антитело. После промывки предметные стекла инкубировали с флуоресцентный реагент и нагревают в микроволновой печи для удаления комбинированных антител. То антитела перечислены в **Таблице S5**.

Выделение клеток, окрашивание и проточный цитометрический анализ

Как описано Weigmann et al.,⁶ кишечник мышей промывали холодным PBS, а затем нарезать на сегменты длиной 1 см. Затем сегменты помещали в 50 мл центрифужную пробирку, содержащую 5 мл сбалансированного солевого раствора Хенкса (HBSS), 5 мМ ЭДТА и 1 мМ ДТТ и инкубировали 20 мин при 37°C. Эпителиальные клетки кишечника удаляли после вихрь в течение 10 с. Сегменты ткани помещали в пробирку С, содержащую 5 мл пищеварительного раствора (среда DMEM, 10% FBS, 0,5 мг/мл коллагеназы D (Roche), 0,1 мг/мл ДНКазы I (Sigma), и 3 мг/мл диспазы II (Roche)) гомогенизировали, и надосадочную жидкость собирали центрифугированием при 120 об/мин в течение 45 мин, ресуспендировали в буфере MACS и собирали центрифугированием при 1000 об/мин в течение 10 мин. Суспензию клеток промывали буфером MACS и инкубировали с анти-антителами CD16/32 в течение 10 минут на льду для блокировки неспецифического связывания. В дальнейшем клетки будут использоваться для окрашивания маркеров иммунных клеток.

Иммунные клетки подвергали окрашиванию с помощью панели маркеров иммунных клеток. После окрашивая поверхностные молекулы, клетки фиксировали 4% параформальдегидом, пермеабелизировали 0,1% сапонины и окрашивали цитокин-специфическими моноклональными антителами (mAb). То для проточной цитометрии использовали следующие mAb: APC-Cy7-антимышиный CD45 (кат. № 103116), APC-антимышиный CD4 (кат. № 100516), PE-антимышиный CD3 (кат. № 100308), PerCP-Cy5.5-антимышиный Ly6G (кат. № 127615), APC-антимышиный CD14 (кат. № 123312), FITC-антимышиный 11b (кат. № 101206), PE-Cy7-антимышиный 11c (кат. № 117318), PE-антимышиный F4/80 (кат. № 123110), APCanti-мышиный CD206 (кат. № 141708), APC-Cy7-антимышиный IFN-γ (кат. № 505850), PE-Cy7-антимышиный IL4 (кат. № 504118), PerCP-Cy5.5-антимышиный IL17A (кат. № 506920) и PE-антимышиный FOXP3 (кат. № 126404). Изотип использовали для контрольного окрашивания. Проточный цитометрический анализ был выполнен на проточном цитометре (BD Biosciences) и проанализированные с использованием программного обеспечения FlowJo_V10. Антитела были приобретены у компании biolegend, Сан-Диего, Калифорния, США.

Анализ бактериального состава

Бактериальный состав каждого образца анализировали с помощью анализа гена 16S рРНК. Общую ДНК образцов замороженных фекалий экстрагировали с помощью QIAamp Fast DNA Stool. Мини-набор (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Гены 16S рРНК были амплифицированы с использованием набора праймеров 341F/806R, направленного на область V3-V4, и очищены с использованием набор для экстракции ДНК из геля AxyPrep (Axygen, США). Библиотеки секвенирования были созданы с использованием набора для подготовки образцов ДНК TruSeq и секвенирования на платформе HiSeq2500 (Illumina, США) (размер вставки 300 п.н., длина считывания 250 п.н.). Последовательности были отнесены к операционным таксономическим единицам (OTU, идентичность 97%) после качественной фильтрации с

последующим выбором репрезентативных последовательности с использованием программного пакета QIIME (Quantitative Insight in Microbial Ecology).

Анализ метагеномных ассоциаций (MWAS)

Фекалии извлекали из мышей WD и инкубировали с ВИС в строгих анаэробных условиях (солевой раствор в качестве контроля) в течение 24 часов. Были получены свежие образцы, замороженные в жидком азоте, и хранили при -80°C до анализа. ДНК экстрагировали и собирали библиотеку фрагментов ДНК построен в виде следующего того же рабочего процесса, что и описанный: выполнить генерацию кластера, шаблон гибридизация, изотермическая амплификация, линейаризация, блокирование, денатурация и гибридизация праймеров для секвенирования. Библиотека ДНК была сконструирована в соответствии с инструкциями производителя инструкции (БГИ). Во-первых, мы использовали IDBA_UD для сборки отфильтрованных парных чтений в контиги (параметры: $-\text{min-contig-len } 135$). Далее база данных прокариотических генов KEGG и был использован MGENES, в котором гены KEGG из образцов метагенома были аннотированы. на основе ортологии с битовой оценкой > 60 для идентификации генов KEGG, белков UniRef и CAZymes. Мы идентифицировали 108268 белков UniRef, 14084 белка UniRef и 186717 белков KEGG. гены. Затем отфильтрованные чтения парных концов были сопоставлены с собранными контигами с помощью Bowtie2 с параметрами по умолчанию (версия 2.3.2), а результаты основывались на обилии ORF. Мы тоже получили результаты анализа обогащения набора генов с помощью пакета R clusterProfiler (версия 3.8.1) и исключил наборы генов, содержащие $> 30\,000$ генов или < 50 генов для контроля оперативность и точность. Гены, аннотированные базой данных UniRef и базой данных CAZymes, были ранжированы на основе величины их эффекта в тестах на генетическую ассоциацию случай-контроль. Гены были аналогично аннотируется базой данных генов KEGG. Альфа-разнообразие (разнообразие внутри выборки) был проанализирован на основе распространенности генов и каждого уровня (L2: тип, L3: класс, L4: порядок, L5: семейство, L6: род, L7: вид) для шести образцов по индексу Шеннона. Статистический сравнение индекса Шеннона между группами, получавшими ВИС, и контрольной группой рассчитывали по t-критерий Стьюдента. Неметрическое многомерное шкалирование на несходстве Брея-Кертиса и Анализ подобия Anosim использовался для оценки бета-разнообразия.

Анализ биометаболитов

Анализ ТМА, ТМАО: Уровни ТМА и ТМАО определяли количественно с помощью жидкости. хроматография с масс-спектрометрией, как описано ранее Awwad et al.⁸ стандартные спектры показаны на рисунке S31A. Анализ SCFAs: Как описано выше,⁹ прямой метод инъекционной ГХ использовался для анализа концентрации SCFAs в образцах фекалий. То стандартные спектры показаны на рисунке S31, время удерживания находится в порядке возрастания уксусная кислота, пропионовая кислота, изомаляновая кислота, масляная кислота, изовалериановая кислота, валериановая кислота, изокапроновая кислота, гексановая кислота и н-гептановая кислота. Производство СЕ: уровень СЕ в каждом образце печени оценивали с помощью метода УВЭЖХ–МС/МС, как описано выше.¹⁰ Анализ ЛПС: содержание LPS в образцах определяли с помощью набора LPS ELISA в соответствии с инструкцией производителя инструкция (Fine Test, Ухань, Китай).

Трансмиссионная электронная микроскопия

Как описано в предыдущих исследованиях, 11 кишечника мышей, получавших ВИС или носитель, обработки собирали в конце эксперимента, промывали 0,1 М фосфатом Соренсена буфера (pH 7,4) и фиксировали с помощью Servicebio (G1102, технология Servicebio). Тогда ткань была трижды промывали буфером и постфиксировали в течение 2 ч в 1% четырехоксида осмия в том же растворе буфера. Затем образцы снова промывали буфером. Далее ткань обезвоживали в возрастающих концентрациях этанола, обработанных ацетоном и залитых эпоксидной смолой Epon. Ультратонкие

срезы (толщиной 70 нм) обрабатывали двойным окрашиванием свинцом-ураном. Образцы были исследованы с помощью HITACHI TEM (HT7700, HITACHI, Токио, Япония).

Литература

1. Liu G-T, Li Y, Wei H-L et al. Toxicity of novel anti-hepatitis drug bicyclol: a preclinical study. *World journal of gastroenterology* 2005; 11:665-671.
2. Dai H-J, Li D-W, Wang Y-X et al. Induction of heat shock protein 27 by bicyclol attenuates d-galactosamine/lipopolysaccharide-induced liver injury. *European Journal of Pharmacology* 2016; 791:482-490.
3. Luo Y, Zhang B, Xu D-Q et al. Protective effect of bicyclol on lipopolysaccharide-induced acute lung injury in mice. *Pulmonary Pharmacology & Therapeutics* 2011; 24:240-246.
4. Sun H, Yu L, Wei H, Liu G. A novel antihepatitis drug, bicyclol, prevents liver carcinogenesis in diethylnitrosamine-initiated and phenobarbital-promoted mice tumor model. *J Biomed Biotechnol* 2012; 2012:584728-584728.
5. Zhu B, Liu GT, Su Wu R, Strada SJ. Chemoprevention of bicyclol against hepatic preneoplastic lesions. *Cancer Biology & Therapy* 2006; 5:1665-1673.
6. Weigmann B, Tubbe I, Seidel D, Nicolaev A, Becker C, Neurath MF. Isolation and subsequent analysis of murine lamina propria mononuclear cells from colonic tissue. *Nature Protocols* 2007; 2:2307.
7. Junjie, Qin, Yingrui et al. A metagenome-wide association study of gut microbiota in type 2 diabetes. *Nature* 2012; 490:55-55.
8. H. M. Awwad, J. Geisel, R. Obeid. *Journal of Chromatography B*, 2016, 1038, 12
9. L. L. Wang, H. H. Guo, S. Huang, Y. X. Han, J. D. Jiang. *Journal of Chromatography B*, 2017, 105770
10. M. Lin, Z. Wang, D. Wang, X. Chen, J. L. Zhang. *Anal Chem*, 2019, 91, 4504-45128
11. N. D. Mathewson, R. Jenq, A. V. Mathew, M. Koeniqsknecht, A. Hanash, T. Toubai, K. Oravec-Wilson, S. R. Wu, Y. Sun, C. Rossi, H. Fujuwara, J. Byun, Y. Shono, C. Lindemans, M. Calafiore, T. M. Schmidt, K. Honda, V. B. Young, S. Pennathur. M. van den Brink, P. Reddy.

***Nature immunology*, 2016, 17, 505**

Таблица S1 Информация о диете с высоким содержанием жиров (HFD).

Продукт #Н10141	г%	ккал%
Белок 20 1	20	17
Углеводы	50	43
Жир	21	40
Всего		100
ккал/г	4,7	
Ингредиент	г	ккал
Казеин	195	780
Метионин	3	12
Кукурузный крахмал	50	200
Мальтодекстрин	100	400
Сахароза	341	1364
Целлюлоза	50	0
Кукурузное масло	10	90

Молочный жир		
Безводный	200	1800
Минеральная смесь		
M1001	35	0
Карбонат кальция	4	0
Витаминный микс		
V1001	10	40
Холина битартрат	2	0
Холестерин	1,5	0
Антиоксидант ТБГХ	0.04	0
Итого	1001.54	4686

Таблица S2 Контроль качества MWAS

Таблица S2-а Высокое качество чистых данных

Sample name	#of raw bases	#of clean1 bases	Clean1/Raw (%)	# of clean2 bases (Remove host)	Clean2/Raw (%)
m1	14662452900	12676403100	86.45	12662099700	86.36
m2	14986799100	13021007100	86.88	13007193300	86.79
m3	14986799100	12918860100	86.2	12909795000	86.14
m4	14986799100	12862788600	85.83	12854315100	85.77
m5	15512651700	13018866000	83.92	13012179000	83.88
m6	15044643000	12392862000	82.37	12385260900	82.32

Таблица S2-б Сборочные данные каждого образца

Sample	Software	Contig Number	Assembly Length (bp)	N50 (bp)	N90 (bp)	Max (bp)	Min (bp)	Average Size (bp)	Mapping Rate (%)
m1	IDBA_UD	361506	3.6E+08	1513	389	291793	300	996	52.53
m2	IDBA_UD	337682	3.45E+08	1645	392	244154	300	1023	53.14
m3	IDBA_UD	346969	3.49E+08	1563	390	279789	300	1005	54.11
m4	IDBA_UD	344513	3.44E+08	1550	387	222503	300	999	53.41

m5	IDBA_UD	350369	3.47E+08	1484	387	332689	300	989	52.96
m6	IDBA_UD	313503	3.12E+08	1543	384	262135	300	993	48.38

Таблица S3 Последовательность праймеров для ОТ-ПЦР.

Origin	Name	Sequence (5'–3')
Mice	<i>Il1β-F</i>	CAGCTGGAGAGTGTGGATCC
	<i>Il1β-R</i>	TGCTTGTGAGGTGCTGATGT
	<i>Il6-F</i>	AGCCAGAGTCCTTCAGAGAGA
	<i>Il6-R</i>	GGATGGTCTTGGTCCTTAGCC
	<i>Tnfa-F</i>	CACAGAAAGCATGATCCGCG
	<i>Tnfa-R</i>	ACTGATGAGAGGGAGGCAT
	<i>Icam-1-F</i>	AGGTGTGATATCCGGTAGAT
	<i>Icam-1-R</i>	CCTTCTAAGTGGTTGGAACA
	<i>Vcam-1-F</i>	CACTTGTGGAAATGTGCCCG
	<i>Vcam-1-R</i>	TCACACTCGTATATGCCGGC
	<i>Abca1-F</i>	GCCTGGATCTACTCTGTGCG
	<i>Abca1-R</i>	GCCGAGCCTCCTTCTCATA
	<i>Cyp7a1-F</i>	CGTGATCCTCTGGGCATCTC
	<i>Cyp7a1-R</i>	CGCAGAGCCTCCTTGATGAT
	<i>Nfkb2-F</i>	AGATCGAGAGGCCTGTAACG
	<i>Nfkb2-R</i>	TCCTCTGCACTTCCTCCTTG
	<i>Tlr4-F</i>	CTGGGGAGGCACATCTTCTG
	<i>Tlr4-R</i>	TCAGGTCCAAGTTGCCGTTT
	<i>Fmo3-F</i>	GGGGCCTGTGGAAATTCTCA
	<i>Fmo3-R</i>	CGGGATAGGGGAAGTCTGGA
	<i>Fxr1-F</i>	CACGAAGACTCCCTCACAGT
	<i>Fxr1-R</i>	CATCCGAACTTTAGCCAGCC
	<i>Gapdh-F</i>	CTCCCACTCTTCCACCTTCG
	<i>Gapdh-R</i>	TAGGGCCTCTCTTGCTCAGT

Таблица S4 Антитело, использованное в вестерн-блоттинге.

Name	Company	Production number	Dilution
TNF- α	Proteintech	60291-1-Ig	1:1000
IL-1 β	Abcam	ab200478	1:250
IL-6	Proteintech	21865-1-AP	1:1000
ABCA1	Immunoway	YN2847	1:1000
CYP7A1	Abcam	ab65596	1:1000

NFκB2	Immunoway	YT3093	1:1000
TLR4	CST	#14358S	1:1000
FMO3	Proteintech	17469-1-AP	1:250
FXR1	CST	#12295S	1:1000
ICAM-1	Invitrogen	MA5407	1:250
VCAM-1	Invitrogen	PA5-80214	1:2000
β-actin	CST	#4970	1:1000

Таблица S5 Реагенты, используемые в иммунофлуоресцентном анализе.

	Name	Company	Product code
Rabbit	IL-6	Abcam	Ab208113
Polyclonal	IL-1β	Abcam	Ab205924
Antibody	TNF-α	Servicebio	GB13452
	ZO-1	Abcam	Ab221547
	Occludin	Abcam	Ab216327
	CYP7α	Invitrogen	PA5-100892
	ABCA1	Abcam	Ab7360
	NFκB	Abcam	Ab32536
	TLR4	Abcam	Ab13556
	Dapi	Servicebio	G1012
Goat anti rabbit IgG	HRP-conjugated	Servicebio	GB23301
Fluorescent dye	Fitc-TSA	Servicebio	G1222
	CY3-TSA	Servicebio	G1223
	647-TSA	Servicebio	G1224

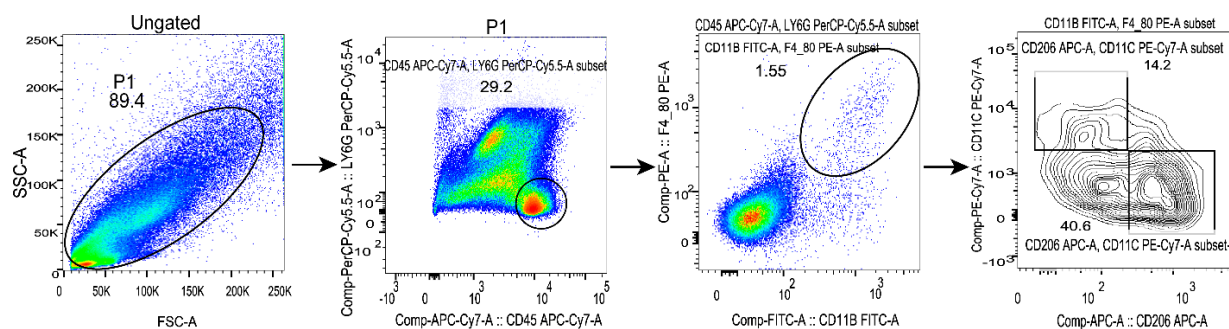


Рисунок S1 Стратегия гейтирования FACS для инфильтрированных моноцитов в дуге аорты мышей ApoE (-/-).

Сначала использовали морфологический шлюз для удаления дебриса, после чего клетки CD45+/Ly6G- были закрыты. Из этой популяции были отобраны моноциты как CD11b+ и F4/80+, так и макрофаги M1/M2 далее гейтировали как клетки CD11c+/CD206- или CD206+/CD11c-.

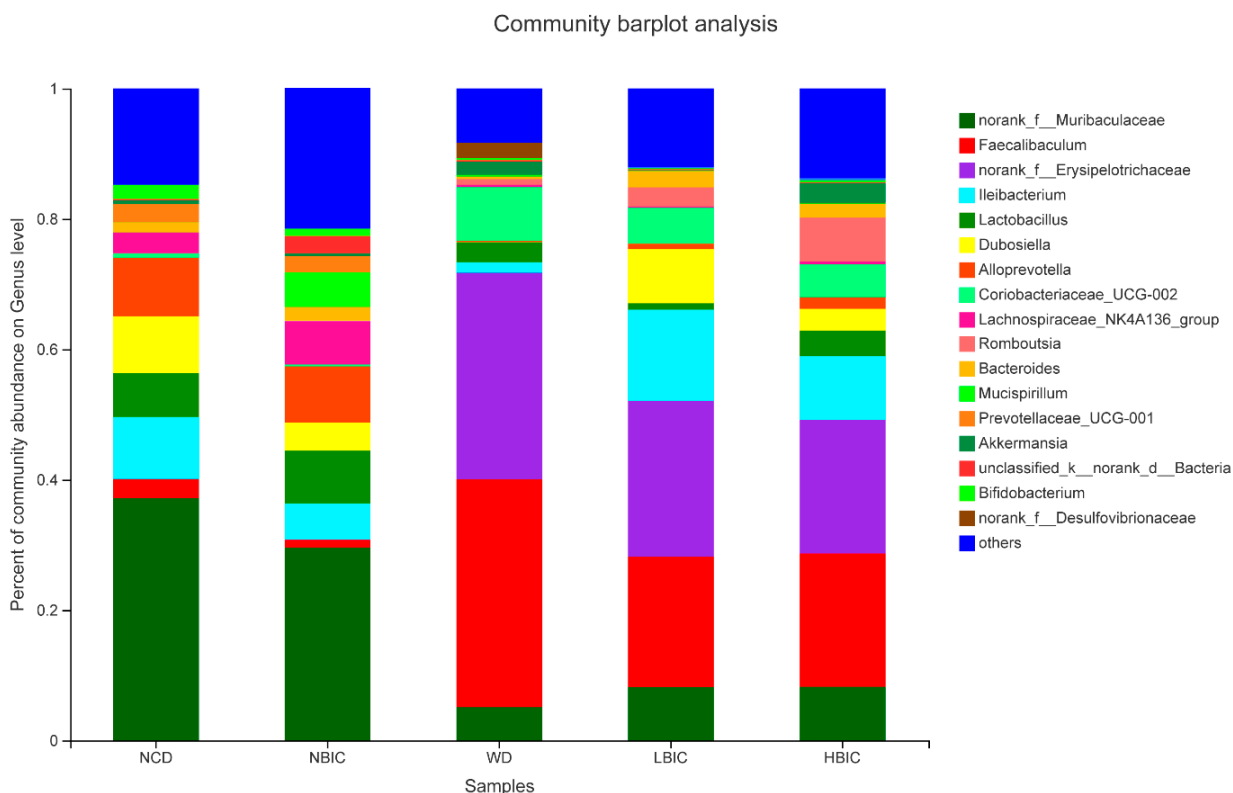


Рисунок S2 Анализ секвенирования гена 16S рРНК на уровне рода.

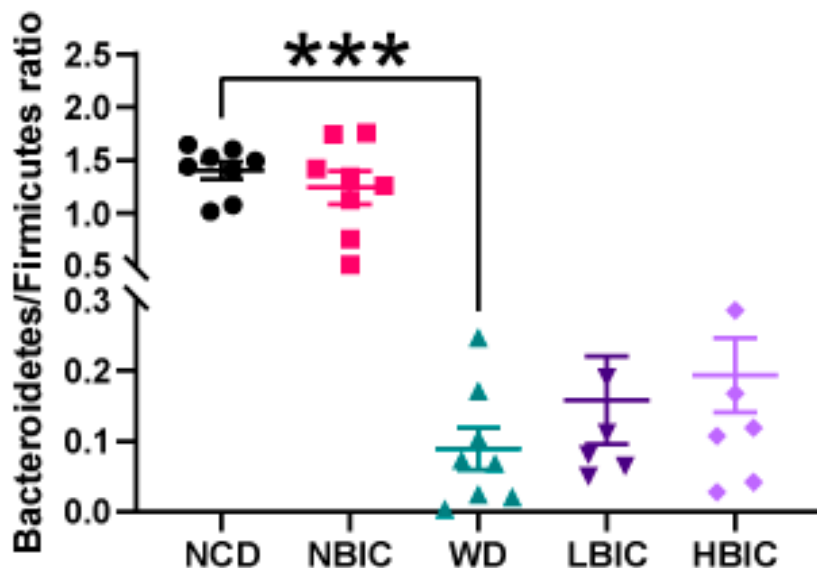


Рисунок S3 Отношение Bacteroidetes к Firmicutes.

Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (n=6-8). Указаны достоверные различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, по сравнению с WD односторонней дисперсионный тест.

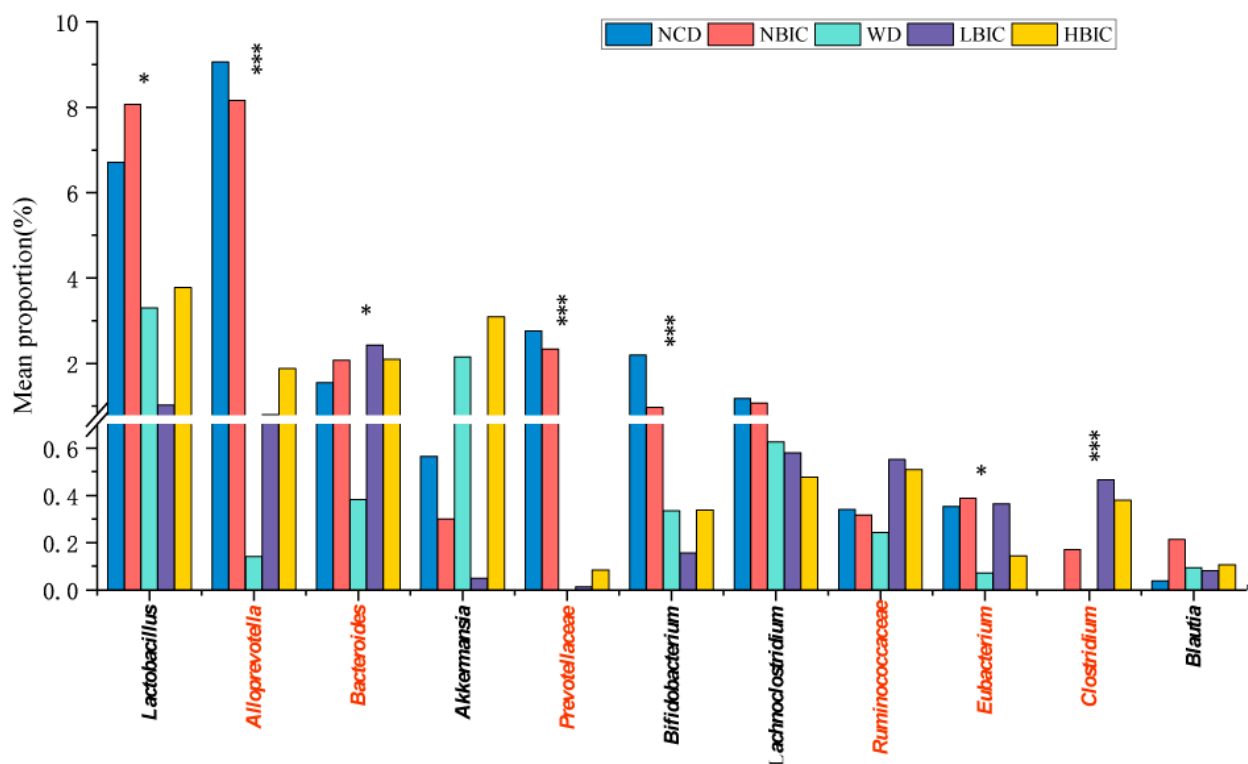


Рисунок S4. Сравнение родов бактерий, связанных с АС.

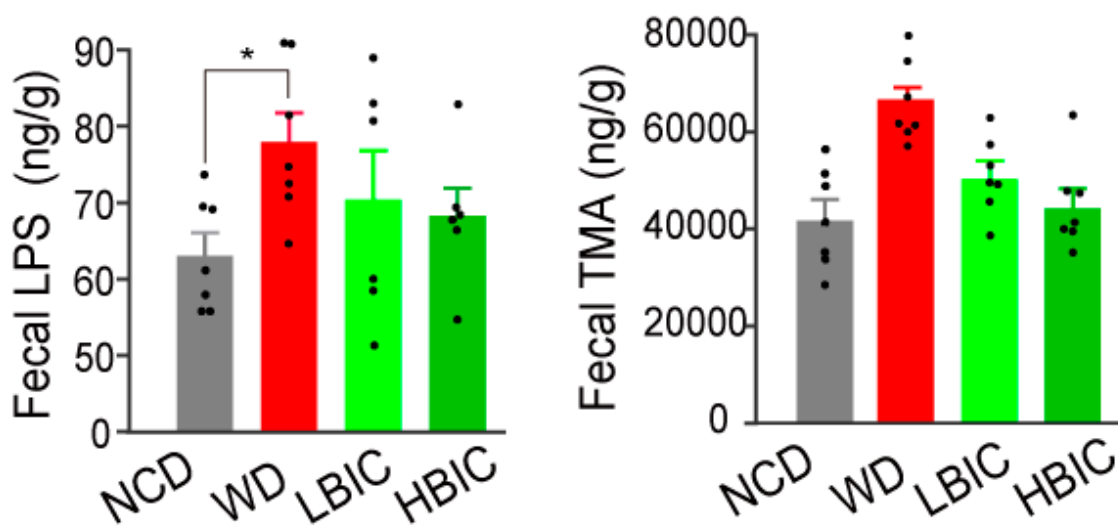


Рисунок S5. Концентрация содержания ЛПС и ТМА в образцах фекалий.

Данные представлены в виде среднее \pm SEM (n=5-9). Указаны достоверные различия: *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001, против WD с помощью теста One-way ANOVA.

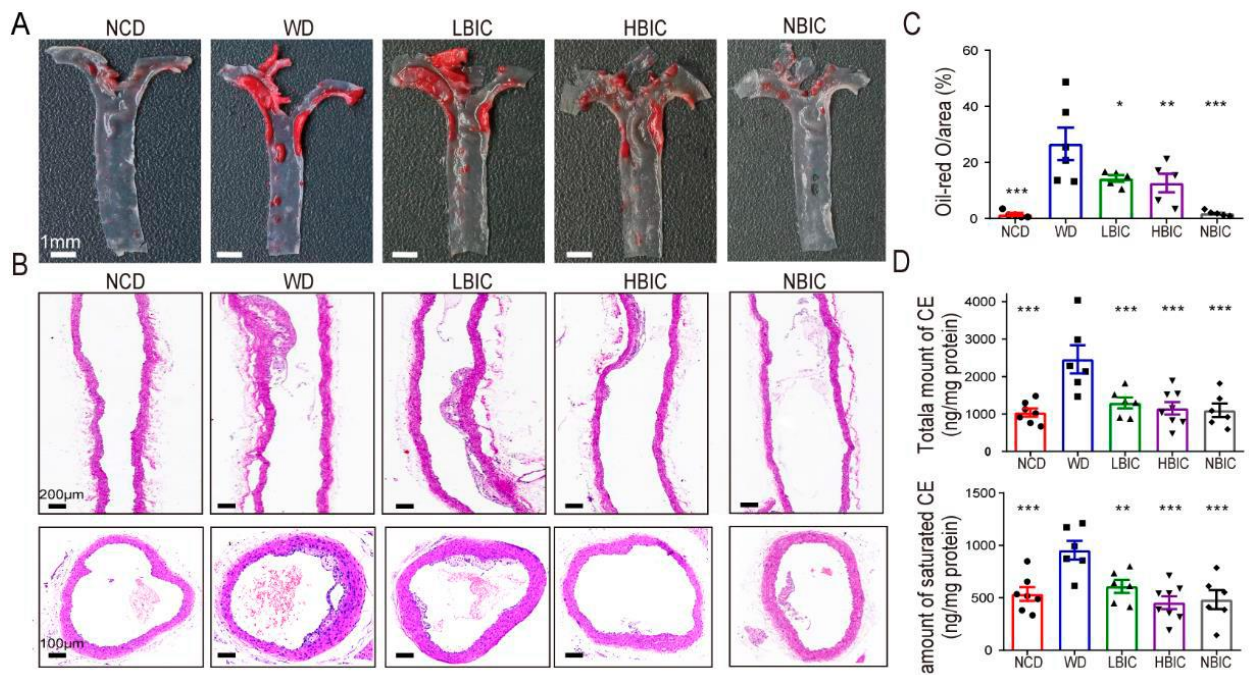


Рисунок S6. Формирование артериальных бляшек у мышей ApoE(-/-) А.

Репрезентативное изображение дуги аорты поражение у мышей ApoE(-/-) с использованием окрашивания Oil red-O. В. Репрезентативное изображение продольного сечения (вверху) и поперечное сечение (внизу) аорты у мышей ApoE(-/-) с использованием гематоксилина и эозина (HE) окрашивание. С. Поражения дуги аорты измеряли в процентах от окрашивания Oil Red-O. Д. Эфиры холестерина (ХЭ) в артериях. Уровень КЭ в каждом образце оценивали с помощью УВЭЖХ-МС/МС метод.

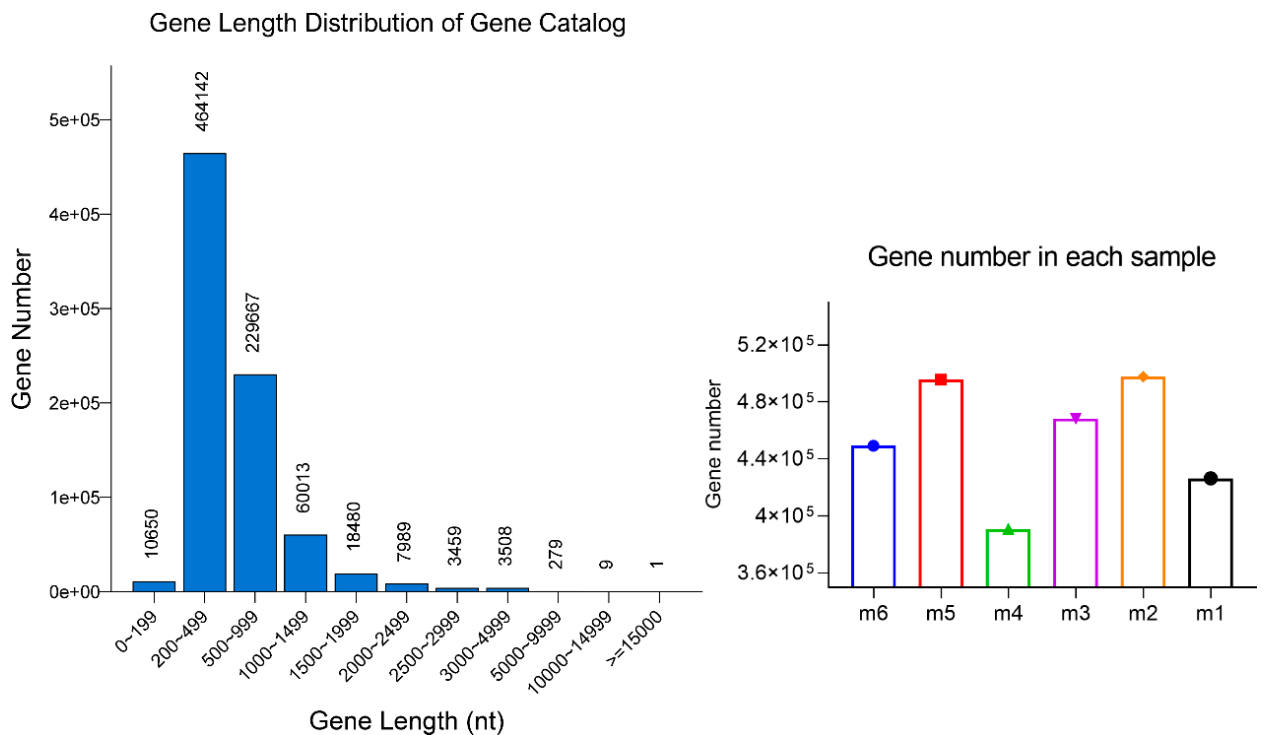


Рисунок S7 Распределение длины генов MAWAS и количества генов в каждом образце.

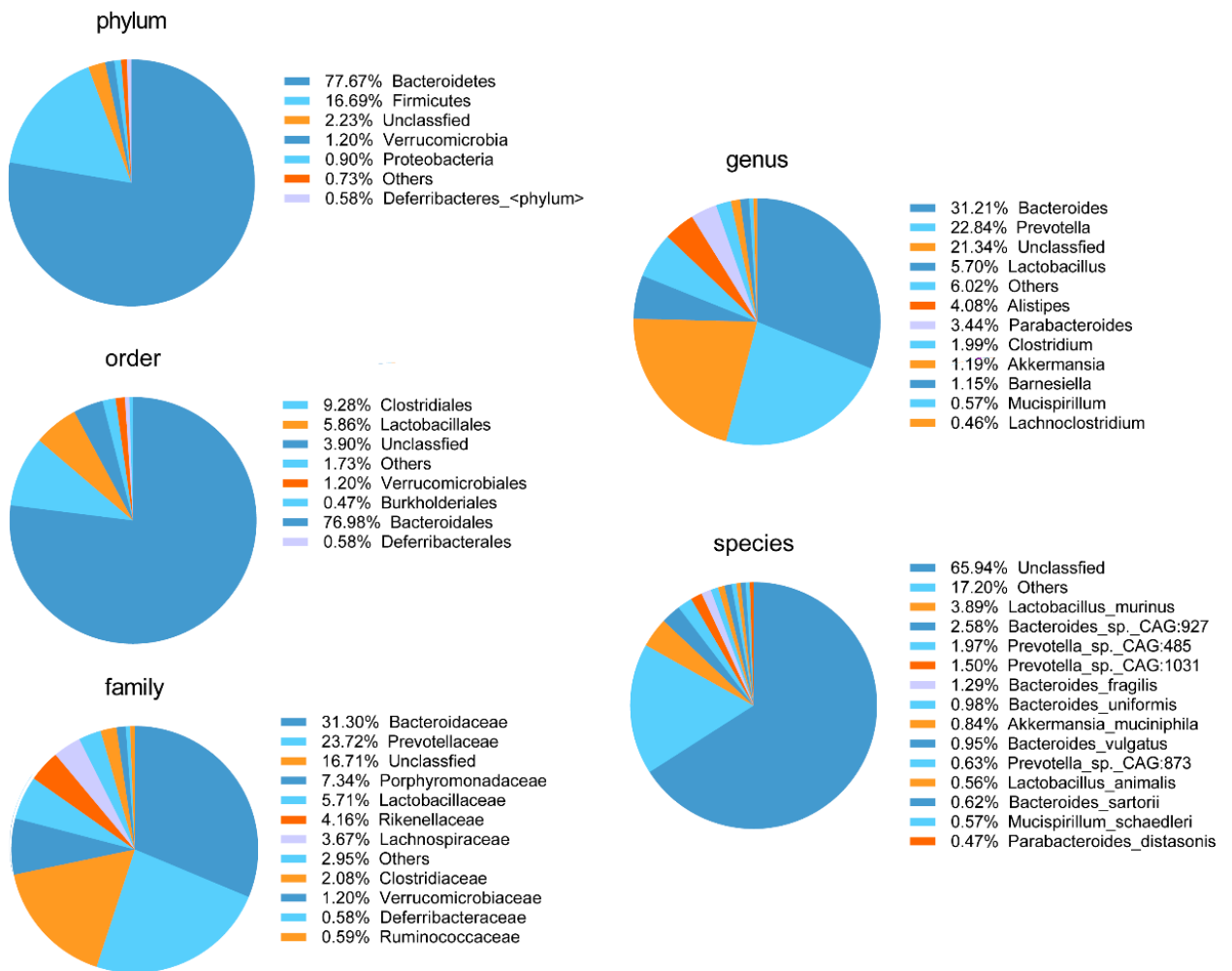


Рисунок S8 Профиль относительного обилия кишечной флоры по типу, отряду, семейству, роду, и уровне вида.

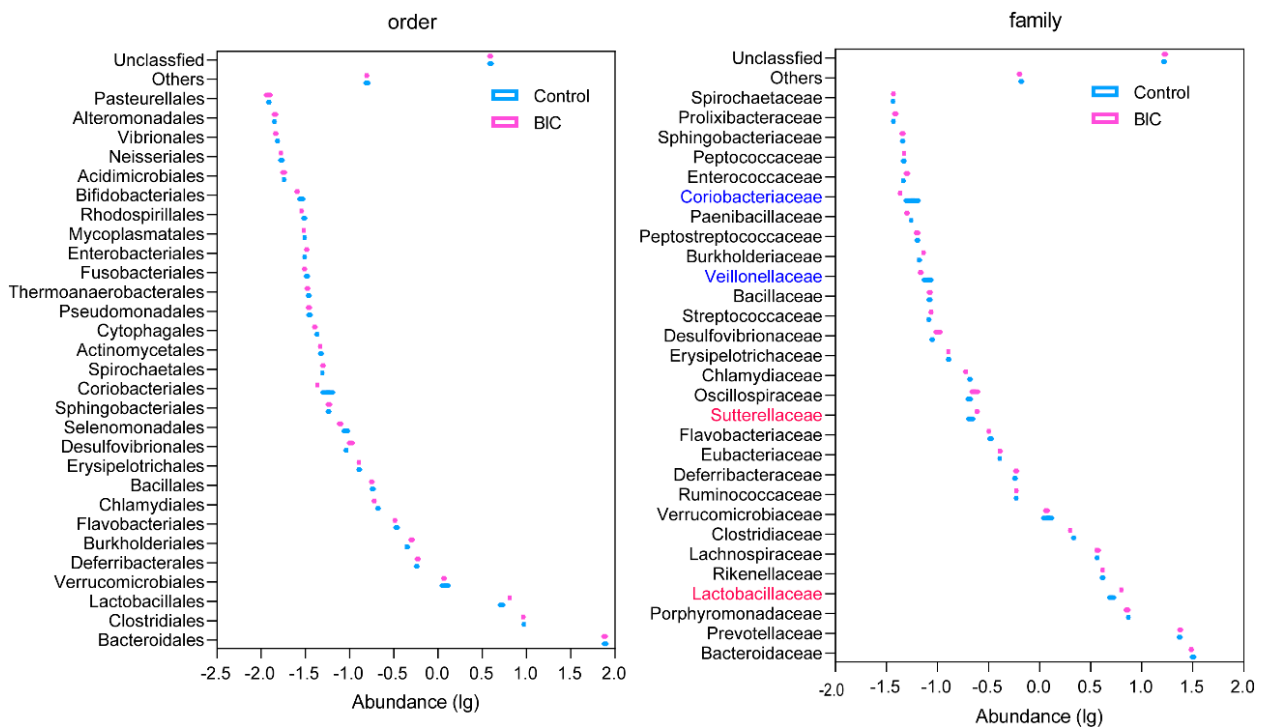


Рисунок S9 Различия в микробиомах на уровне отряда и семейства между контролем и BIC группы.

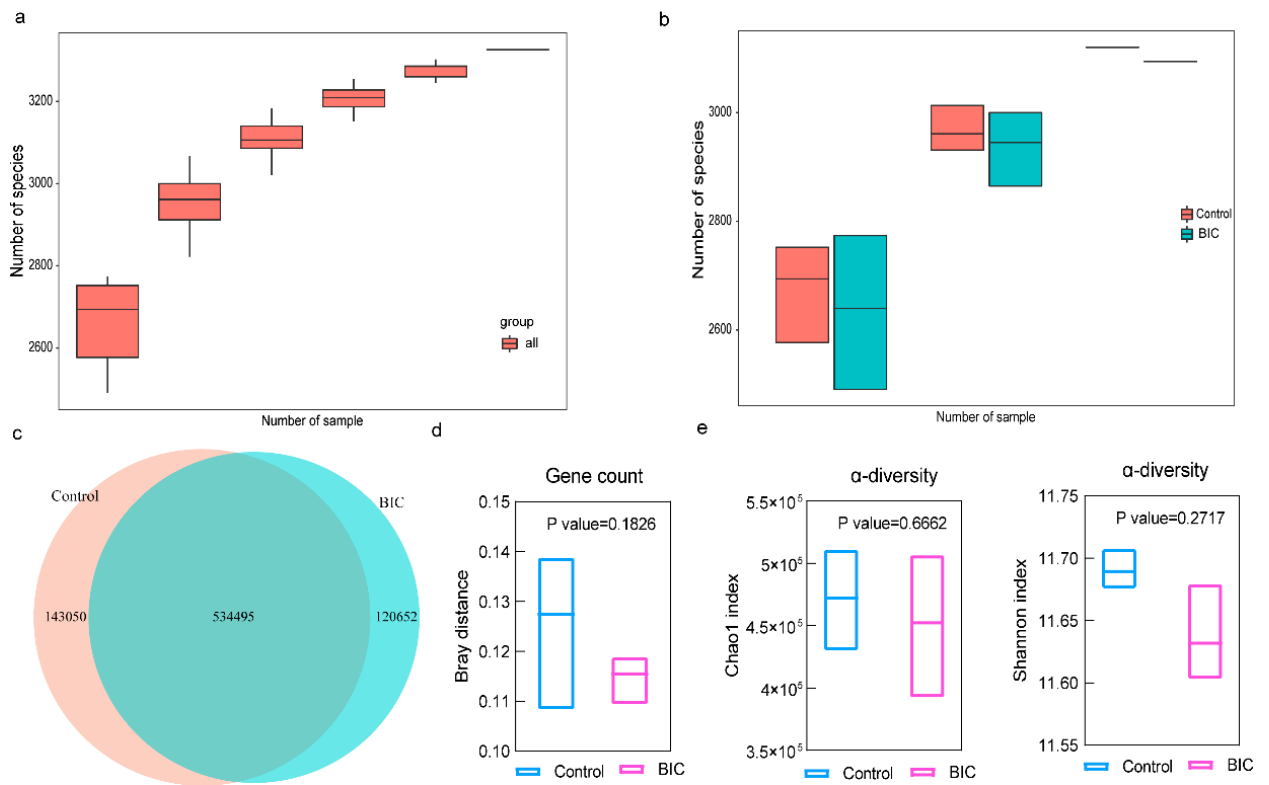


Рисунок S10 Генные различия между контрольной группой и группой BIC.

а. Кривые разрежения на основе количество генов во всех образцах. б. Кривые разрежения, основанные на количестве генов в контроле и группе BIC.

в. Диаграмма Венне, сравнивающая контрольную группу с группой BIC на основе количества генов. д. β -разнообразие (Bray- индекс сходства Кертиса) групп «Контроль» и «БИК» на геном уровне. е. α -разнообразии (Шеннон index и индекс Chao1) групп Control и BIC на геном уровне.

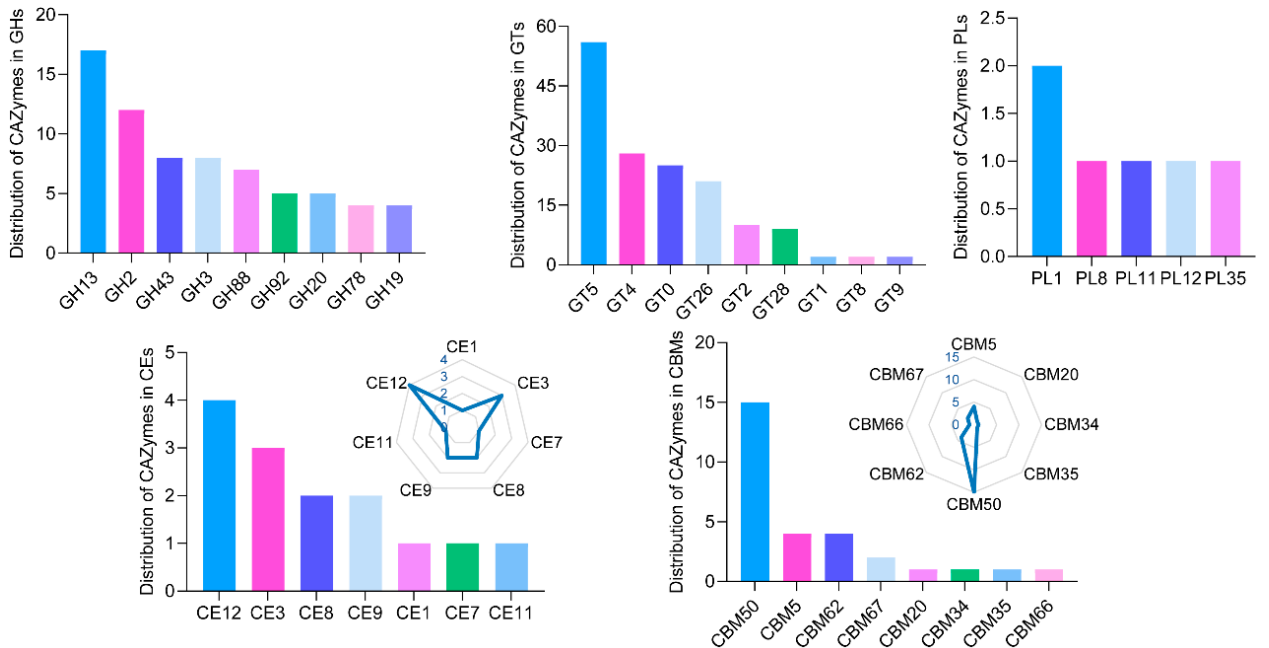


Рисунок S11 Распределение CAZymes в категориях GH, GT, PL, CE и CBM.

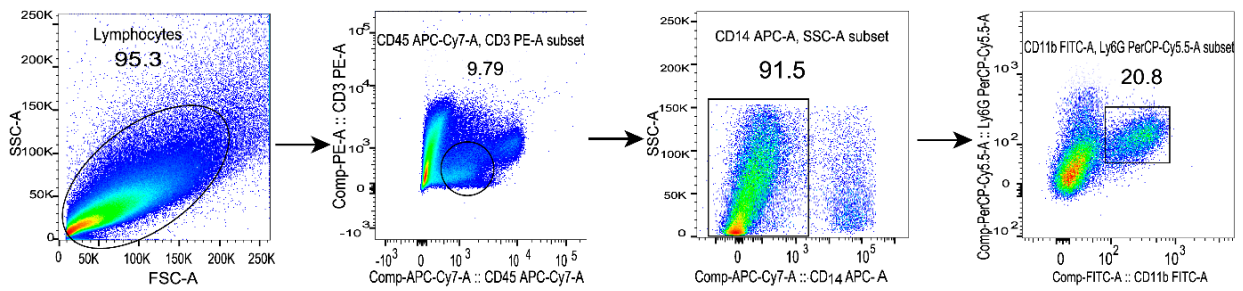


Рисунок S12-а Стратегия гейтирования FACS для нейтрофилов в толстой кишке мышей Ароу (-/-). Морфология ворота сначала использовались для удаления дедбриса, после чего клетки CD45+/CD3- закрывали. Из этого популяционные CD4-клетки были гейтированы, а нейтрофилы были гейтированы как CD11b+ и Ly6G+ клетки из CD4-популяции.

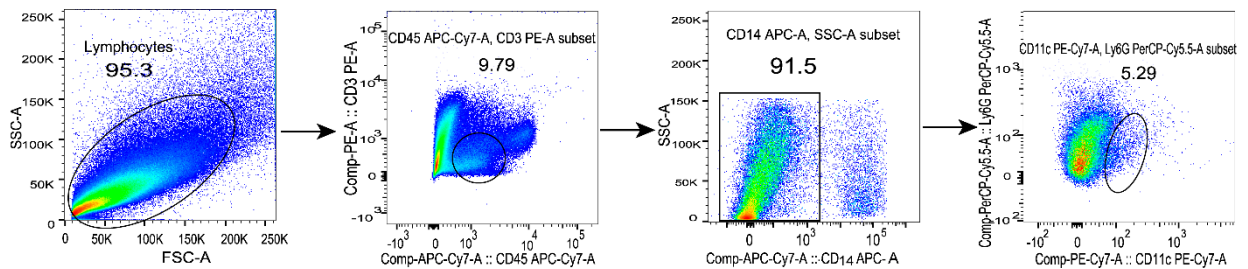


Рисунок S12-б Стратегия гейтирования FACS для клеток DC в кишечнике мышей Ароу (-/-). Морфологические ворота были впервые использованы для удаления дедбриса, после чего CD45+/CD3- клетки были закрыты. Из этой популяционные CD4-клетки были дополнительно гейтированы, а DC-клетки были гейтированы как CD11c+ и Ly6G- клетки из CD4- популяции.

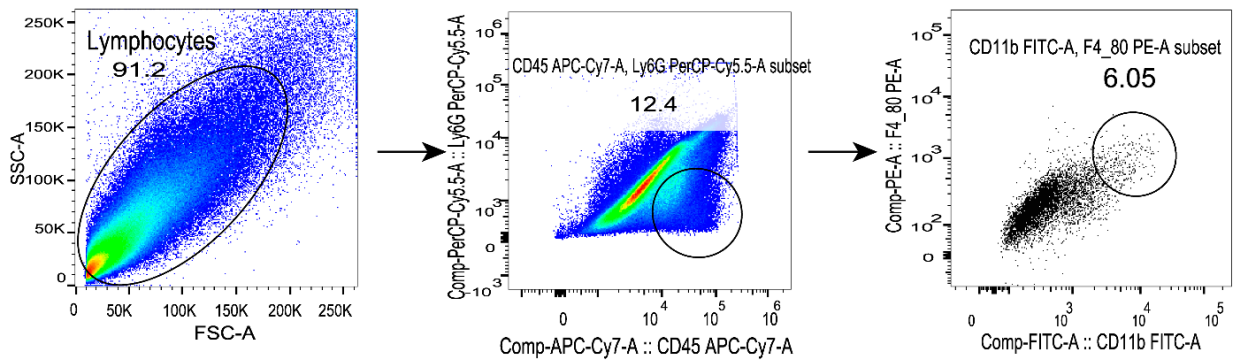


Рисунок S12-с Стратегия гейтирования FACS для инфильтрированных моноцитов в кишечнике мышей Ароу (-/-). А

Морфологические ворота сначала использовали для удаления дедбриса, после чего клетки CD45+/Ly6G- были закрыты. Из этой популяции моноциты были отобраны как клетки CD11b+ и F4/80.

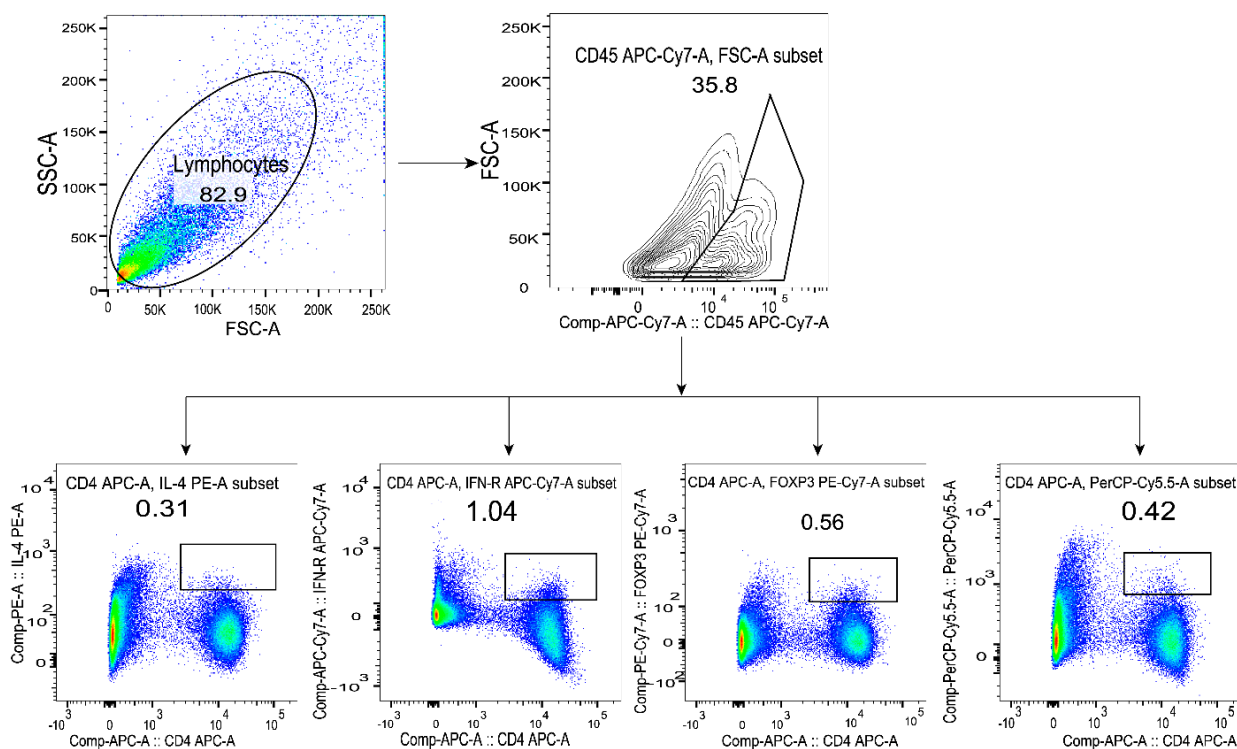


Figure S12-d FACS gating strategy for infiltrated Thelp cells in Apoe (-/-) mice gut.

A morphology gate was first used to remove debris, after which CD45+ cells were gated. From this population Th1 cells were gated as CD CD4+/IFN γ +; Th2 cells were gated as CD CD4+/IL4+; Treg cells were gated as CD CD4+/FoxP3+ and Th17 cells were gated as CD4+/IL17+.

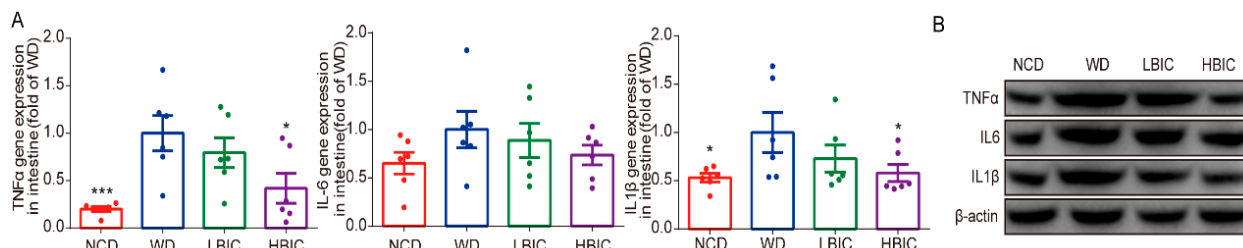


Рисунок S13 HBIC уменьшает воспаление кишечника.

А. Экспрессия IL-6, IL-1 β и TNF- α мРНК в кишечнике оценивали с помощью ОТ-ПЦР. Результаты были нормализованы к GAPDH. Б. Экспрессию белков IL-6, IL-1 β и TNF- α в кишечнике оценивали вестерн-блоттингом, β -актин использовали в качестве контроля. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (n=5-7). Существенные различия указано: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, по сравнению с WD по тесту One-way ANOVA.

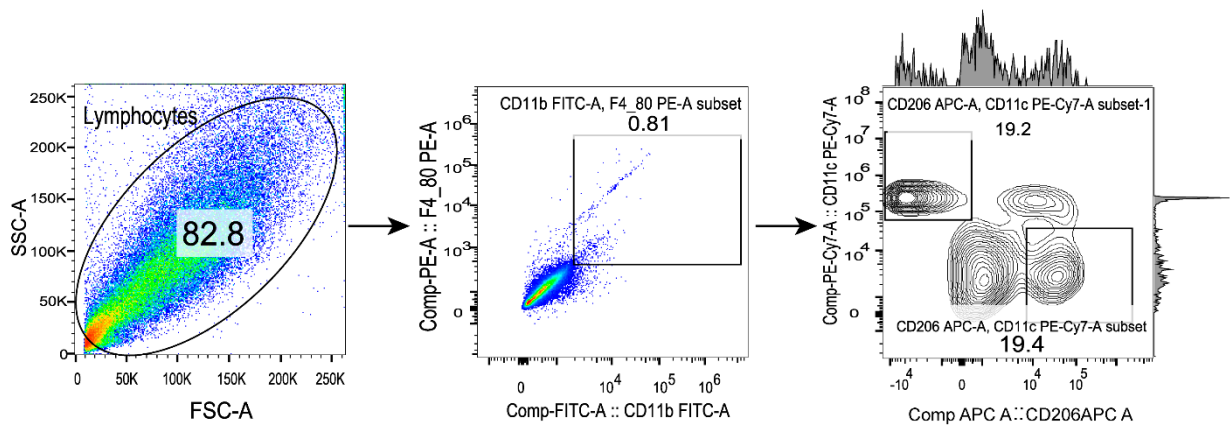


Рисунок S14. Стратегия гейтирования FACS для инфильтрированных моноцитов в клетках Caco-2. Морфология гейт был впервые использован для удаления дедбриса, после чего моноциты были гейтированы как CD11b+ и F4/80+, и макрофаги M1/M2 далее были включены как клетки CD11c+ или CD206+.

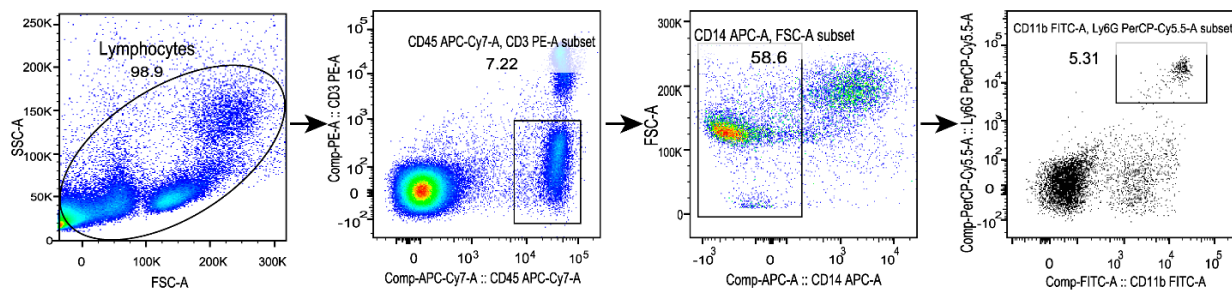


Рисунок S15 Стратегия гейтирования FACS для нейтрофилов в циркуляции мышей Apo (-/-).

А Морфологический гейт сначала использовали для удаления мусора, после чего CD45+/CD3-клетки были гейтированы. Из этой популяции далее гейтировали CD4-клетки, а нейтрофилы гейтировали как CD11b+ и Клетки Ly6G+ из CD4- популяции.

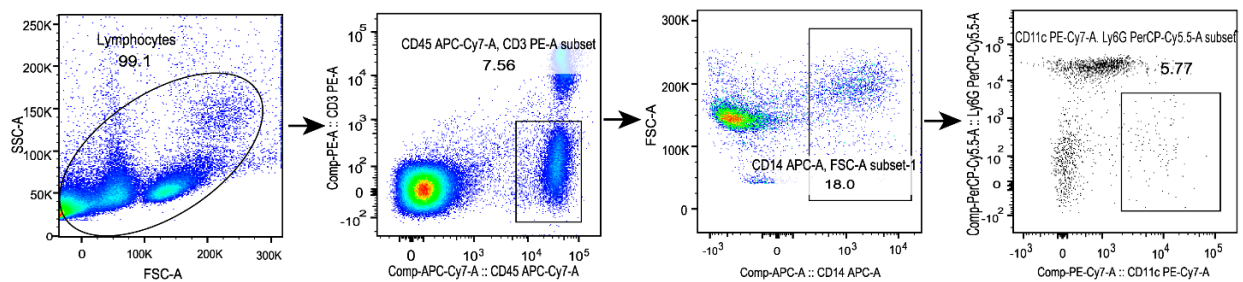


Рисунок S16 Стратегия гейтирования FACS для моноцитов в циркуляции мышей Apo (-/-).

А Морфологический гейт сначала использовали для удаления мусора, после чего CD45+/CD3-клетки были гейтированы. Из этой популяции далее гейтировали CD4+клетки, а нейтрофилы гейтировали как CD11c+ и Ly6G-клетки из популяции CD4+.

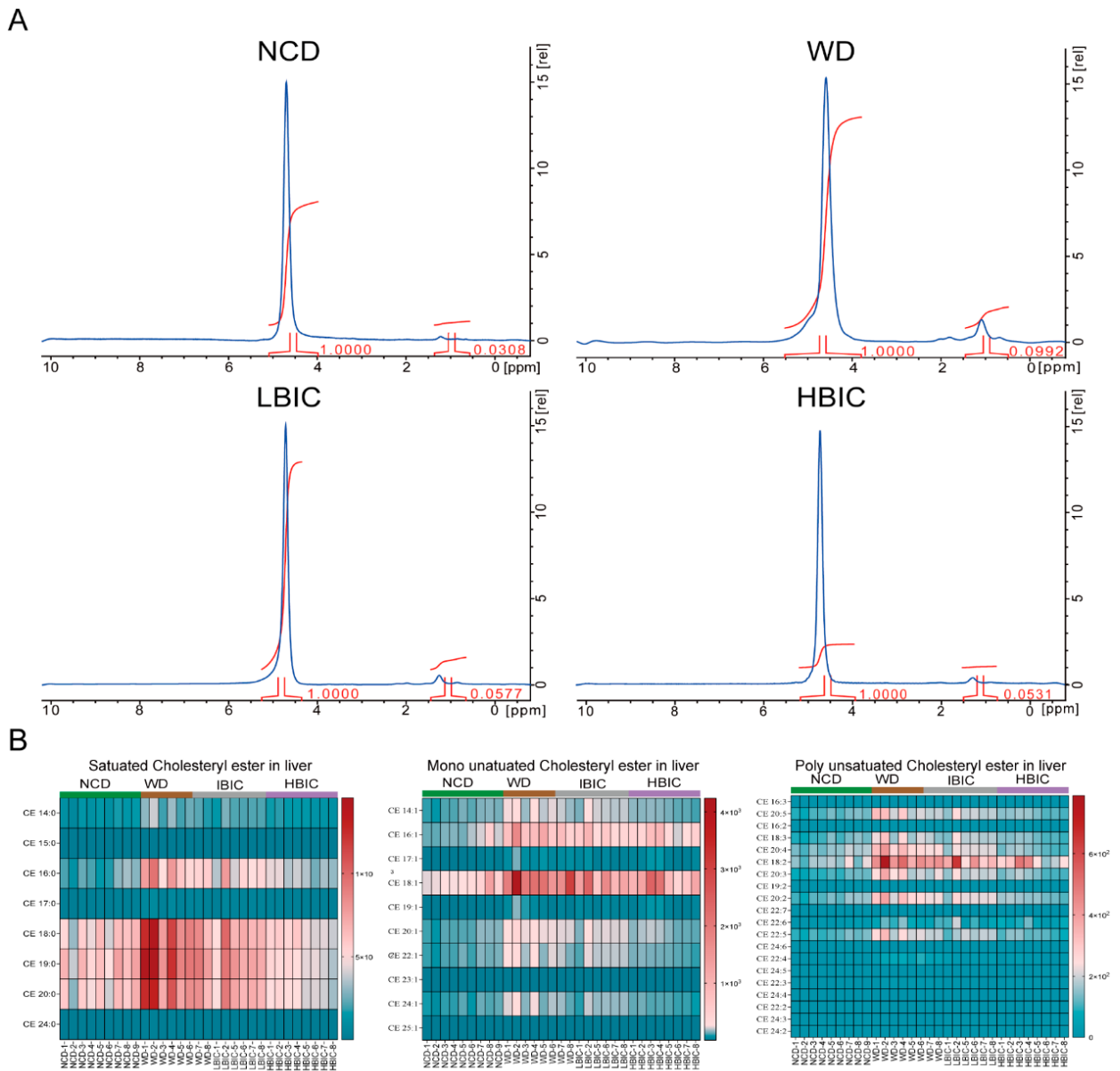


Рисунок S17 ВИС уменьшает накопление жира в печени у мышей *ApoE(-/-)*, получавших HFD. А. Репрезентативные диаграммы $^1\text{H-MRS}$ в ткани печени. В. Тепловые карты уровней эфира холестерина в каждом образце печени. Содержание холестеринового эфира оценивали с помощью UHPLCMS/MS.

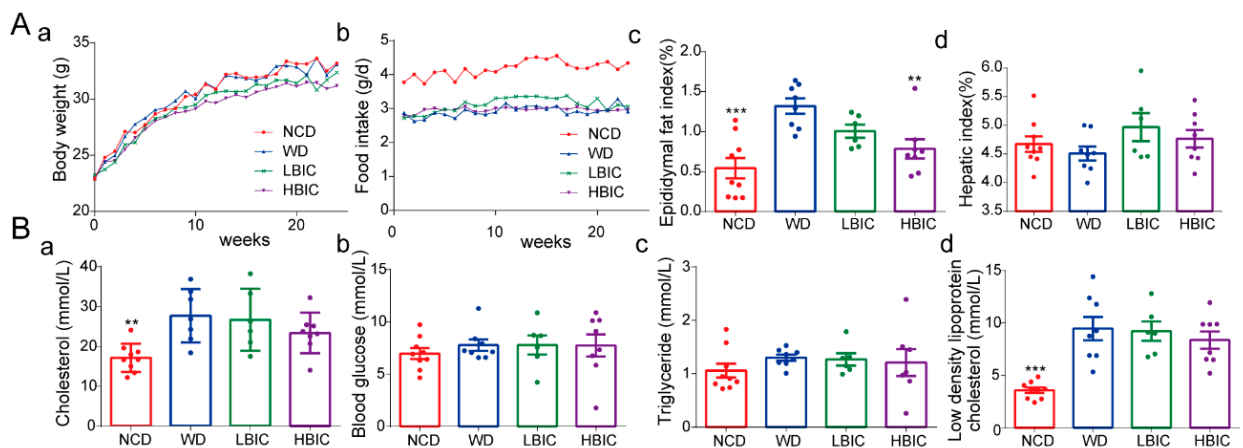


Рисунок S18. Статус у мышей *ApoE(-/-)*, получавших HFD.

Мышей *Arое(-/-)*, получавших HFD, обрабатывали LBIC или HBIC через желудочный зонд. В качестве контроля использовали необработанных мышей, которых кормили HFD (WD) и стандартной диетой для чау-чау (NCD). А-а. Массу тела в каждой группе регистрировали каждую неделю в течение следующих 20 недель; А-б. Потребление пищи регистрировали каждую неделю в течение следующих 20 недель; А-с. анализ индекса жира придатка яичка; Объявление. Анализ печеночного индекса. В. Уровни TG, холестерина, LDL-с и глюкозы в плазме измеряли ферментативными методами с использованием автоматического биохимического анализатора. Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (n=5-7). Указаны значимые различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с WD по тесту One-way ANOVA.

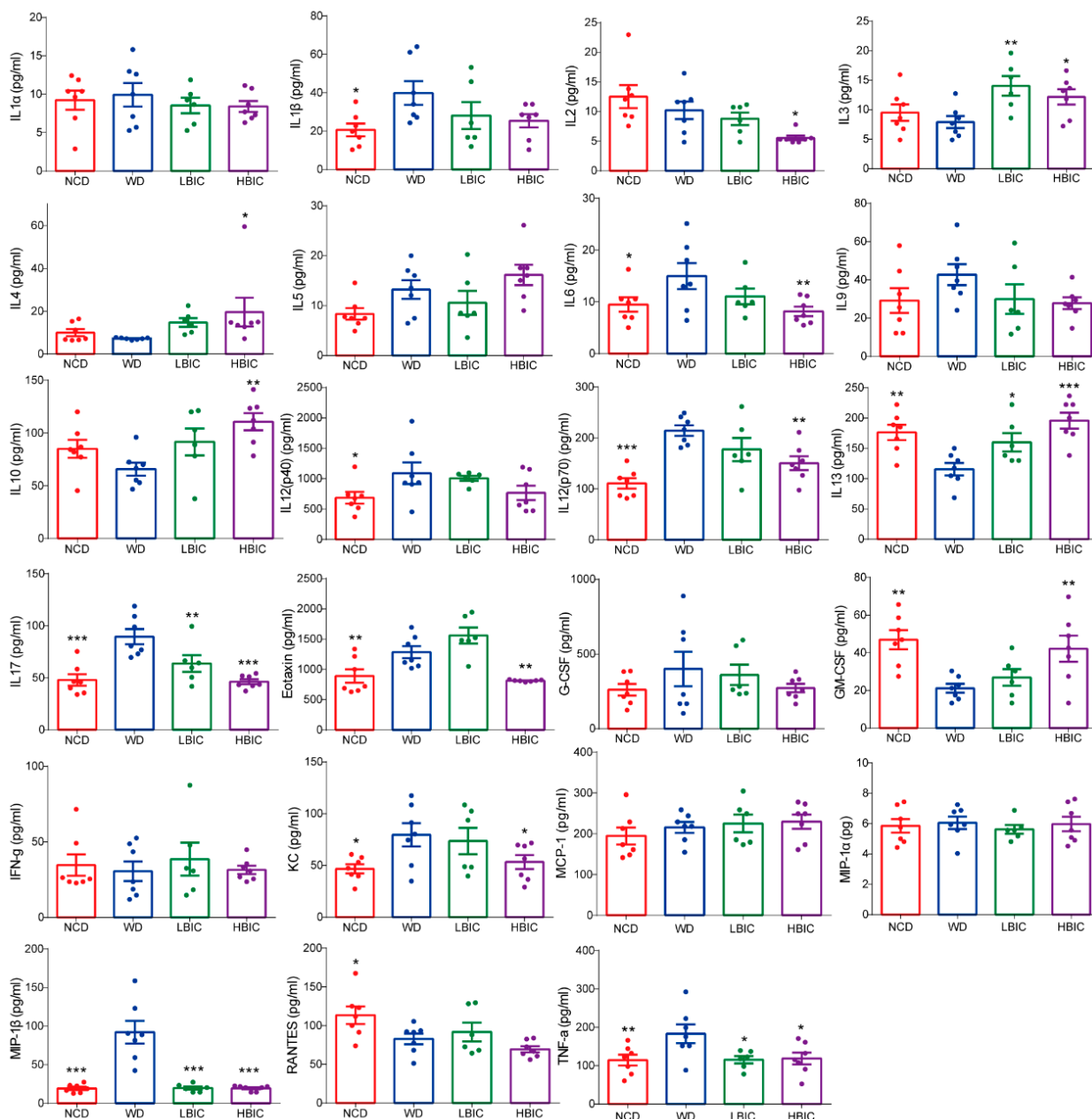


Рисунок S19 ВИС ослабляет хроническое воспаление у мышей *Arое(-/-)*, получавших HFD.

HFD-питание мыши *Arое(-/-)*, получавшие LBIC или HBIC через желудочный зонд. После прекращения действия эксперимента образцы крови были собраны и проанализированы на системе Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США) с использованием набора для анализа цитокинов, хемокинов и факторов роста Bio-Plex Pro (Bio-Rad, США), согласно протоколу производителя. Измеренные цитокины включали интерлейкин-1 α (IL-1 α), ИЛ-1 β , ИЛ-2, ИЛ-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-

12 (p40), ИЛ-13, ИЛ-14, ИЛ-15, ИЛ-17, фактор колонии гранулоцитов (G-CSF), интерферон- γ (IFN- γ), фактор некроза опухоли- α (TNF- α), хемокин кератиноцитов (KC), макрофагальный воспалительный белок-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , эотаксин, регулируемый при активации экспрессируемого и секретируемого нормальными Т-клетками фактора (RANTES) и моноцитарный хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1). Все измерения проводились с использованием программного обеспечения Bio-Plex Manager 6.1 (Bio-Rad, США).

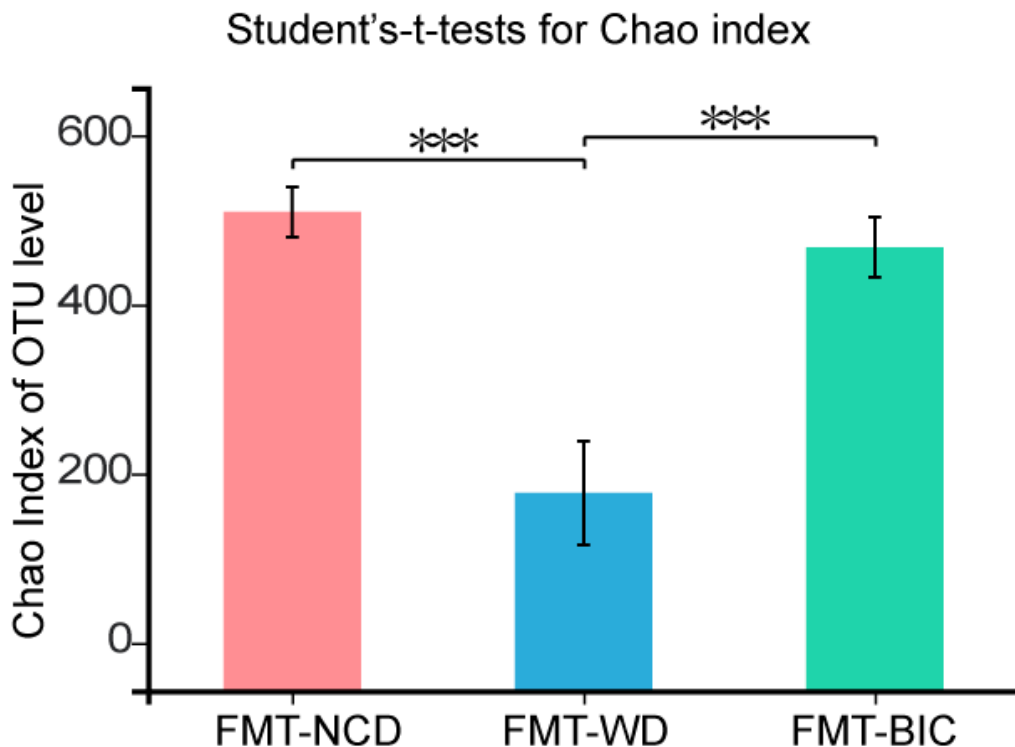


Рисунок S20 Разнообразие и богатство кишечных бактерий. Индекс Хао уровня OTU.

Данные представлено как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (n=10-15). Указаны достоверные различия: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001 по сравнению с F-WD по тесту One-way ANOVA.

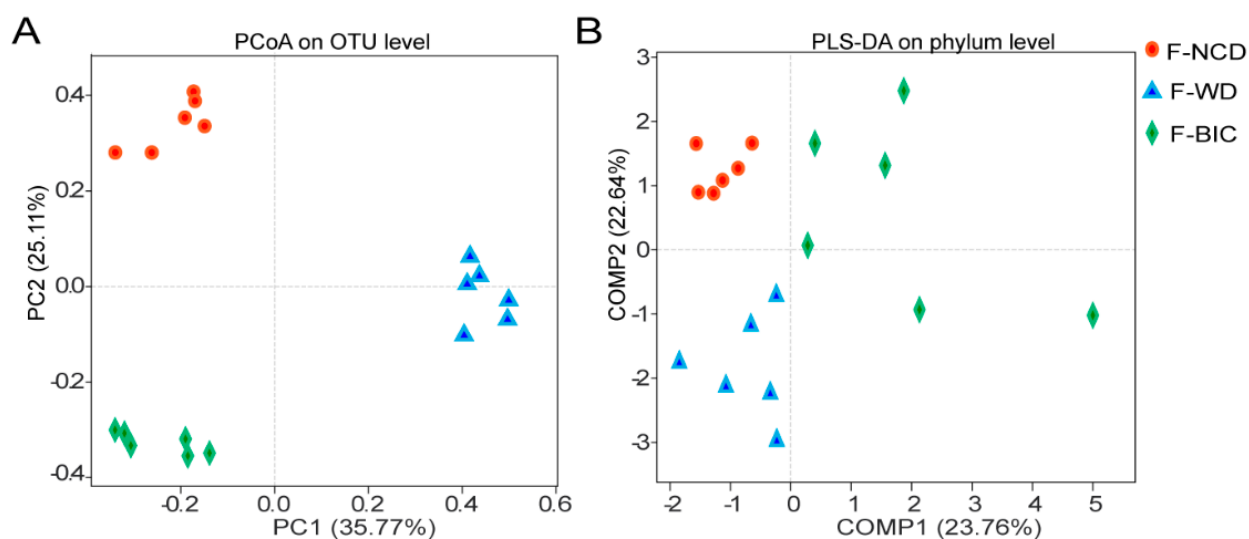


Рисунок S21 Реакция структур кишечной микробиоты на различные группы животных.

А. пока зачетный сюжет. В. График оценки PLS-DA.

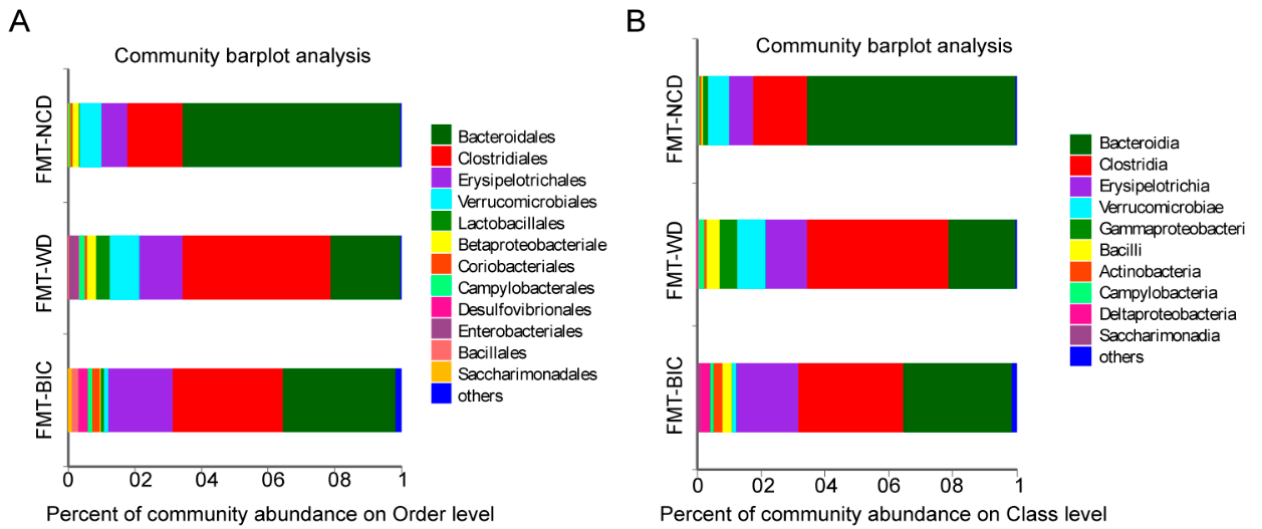


Рисунок S22 Анализ численности сообщества на разных уровнях.

A. Ген 16S рPHK анализ последовательности на уровне заказа. Анализ секвенирования гена B 16S рPHK на уровне класса.

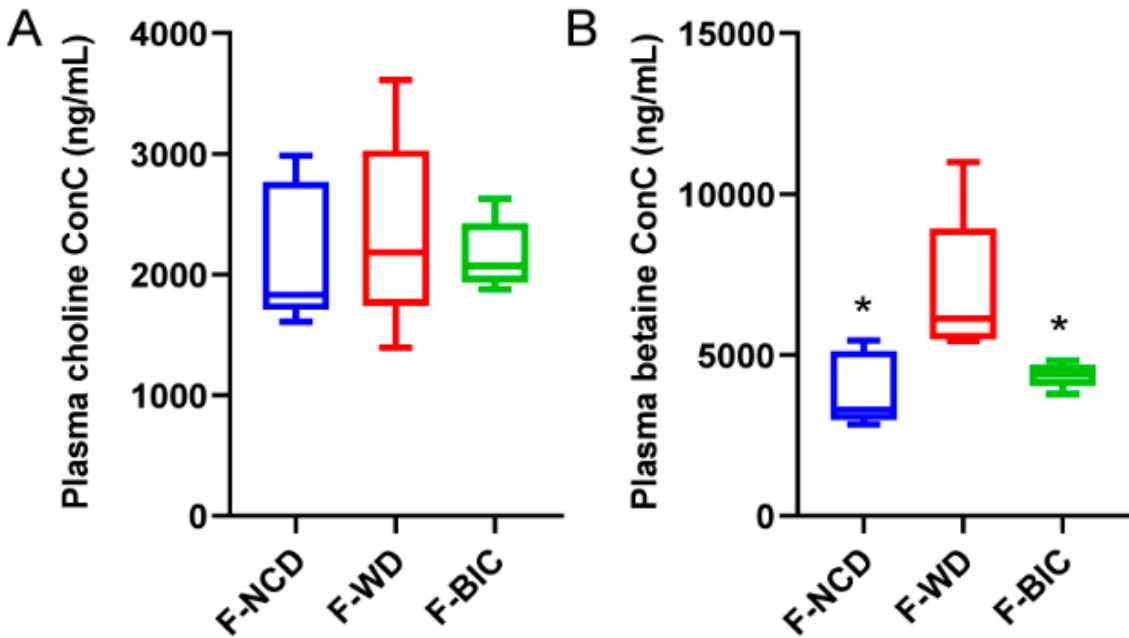


Рисунок S23. Биометаболиты, продуцируемые кишечными бактериями, у мышей-реципиентов Арое(-/-). Концентрацию холина (A) и бетаина (B) в образцах плазмы определяли с помощью ЖХ/МС.

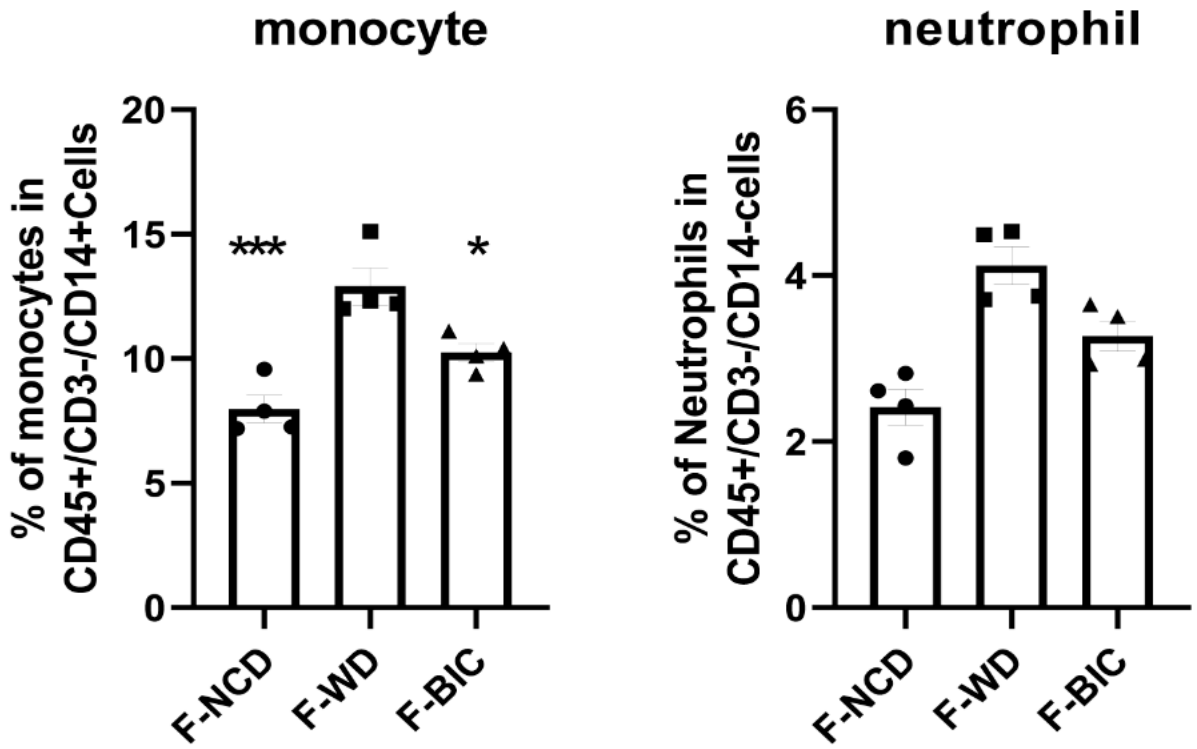


Рисунок S24 Процент нейтрофилов и моноцитов.

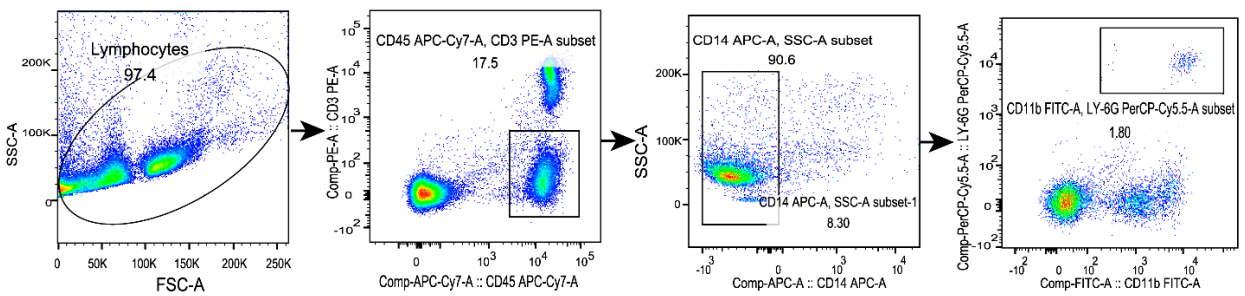


Рисунок S25 - стратегия гейтирования FACS для нейтрофилов в циркуляции мышей ApoE (-/-). А Морфологический гейт сначала использовали для удаления мусора, после чего CD45+/CD3-клетки были гейтированы. Из этой популяции далее гейтировали CD4-клетки, а нейтрофилы гейтировали как CD11b+ и клетки Ly6G+ из CD4- популяции.

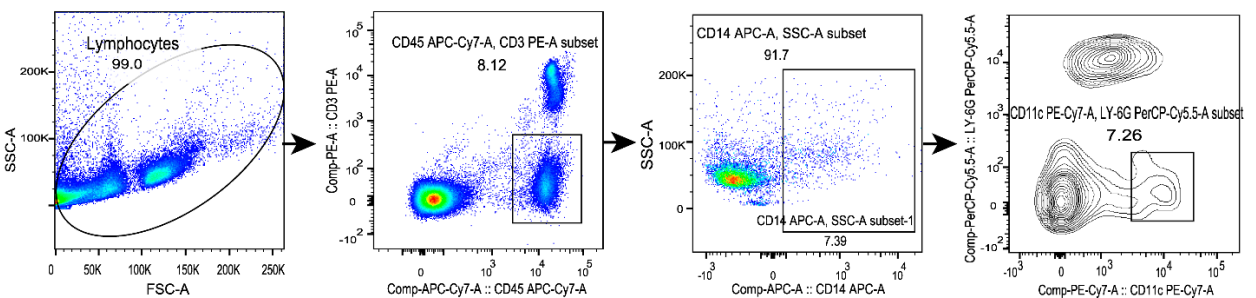


Рисунок S25-b Стратегия гейтирования FACS для моноцитов в циркуляции мышей ApoE (-/-). А Морфологический гейт сначала использовали для удаления мусора, после чего CD45+/CD3-клетки были гейтированы. Из этой популяции далее гейтировали CD4+клетки, а нейтрофилы гейтировали как CD11c+ и Ly6G-клетки из популяции CD4+.

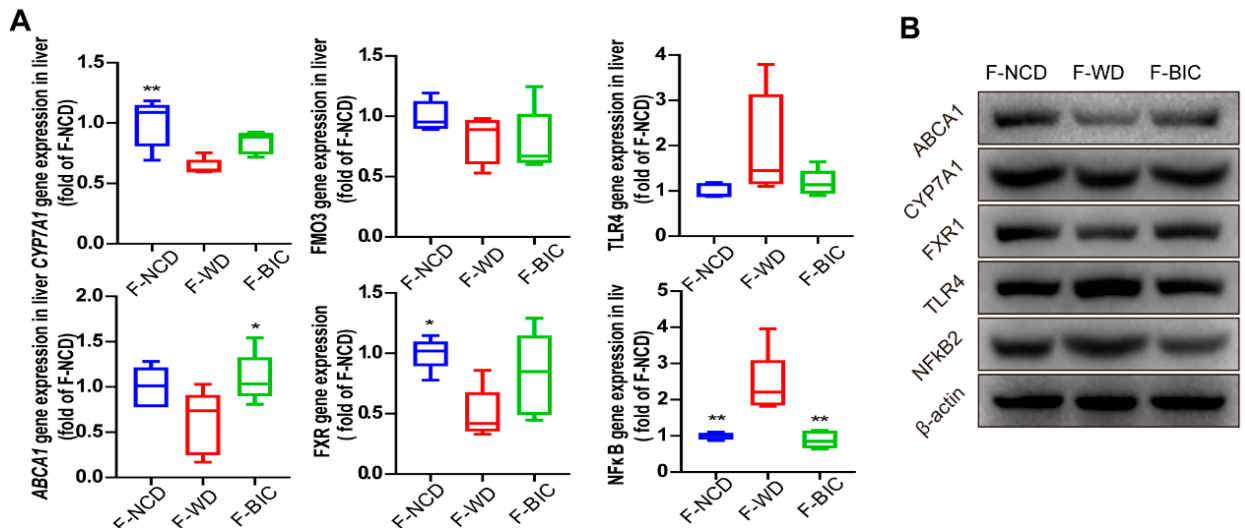


Рисунок S26. Экспрессия ключевых молекул в печени мыш-реципиентов *Aroe(-/-)*.

Aroe(-/-) мыш-реципиентов разделили на три группы: FMT-NCD (кормили HFD, пересаживали фекалии мыш-реципиентов NCD), FMT-WD (кормление HFD, пересаживание фекалиями мыш-реципиентов WD) и FMT-BIC (кормление с HFD, трансплантированными фекалиями мыш-реципиентов BIC) ($n=8$). Свежий трансплантат от донора мышам вводили через зонд каждый день в течение 3 месяцев. А. Экспрессия NF-κB, Toll-подобная мРНК рецептора 4 (TLR4), ABCA1, CYP7a1, FMO и FXR1 в ткани печени методом ОТ-ПЦР. Результаты были нормализованы к GAPDH. В. Экспрессия белка NF-κB, TLR4, ABCA1, CYP7a1 и FXR1 в тканях печени оценивали с помощью вестерн-блоттинга, β-актин использовали в качестве контроля. Данные представлены как среднее значение ± стандартная ошибка среднего ($n=5-6$). Существенные различия указаны: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, по сравнению с F-WD по тесту One-way ANOVA.

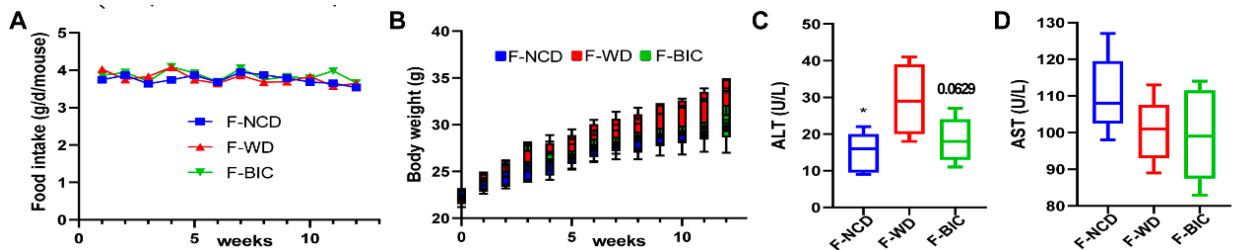


Рисунок S27. Метаболический статус мыш-реципиентов *Aroe(-/-)*. А. Потребление пищи регистрировалось каждую неделю в течение следующих 12 недель. В. Массу тела в каждой группе регистрировали каждую неделю в течение следующие 12 недель. Состояние печени, профилированное по уровням ALT (E) и AST (F). Данные представлены в виде среднее ± SEM ($n=5-6$). Указаны достоверные различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$, против F-WD с помощью теста One-way ANOVA.

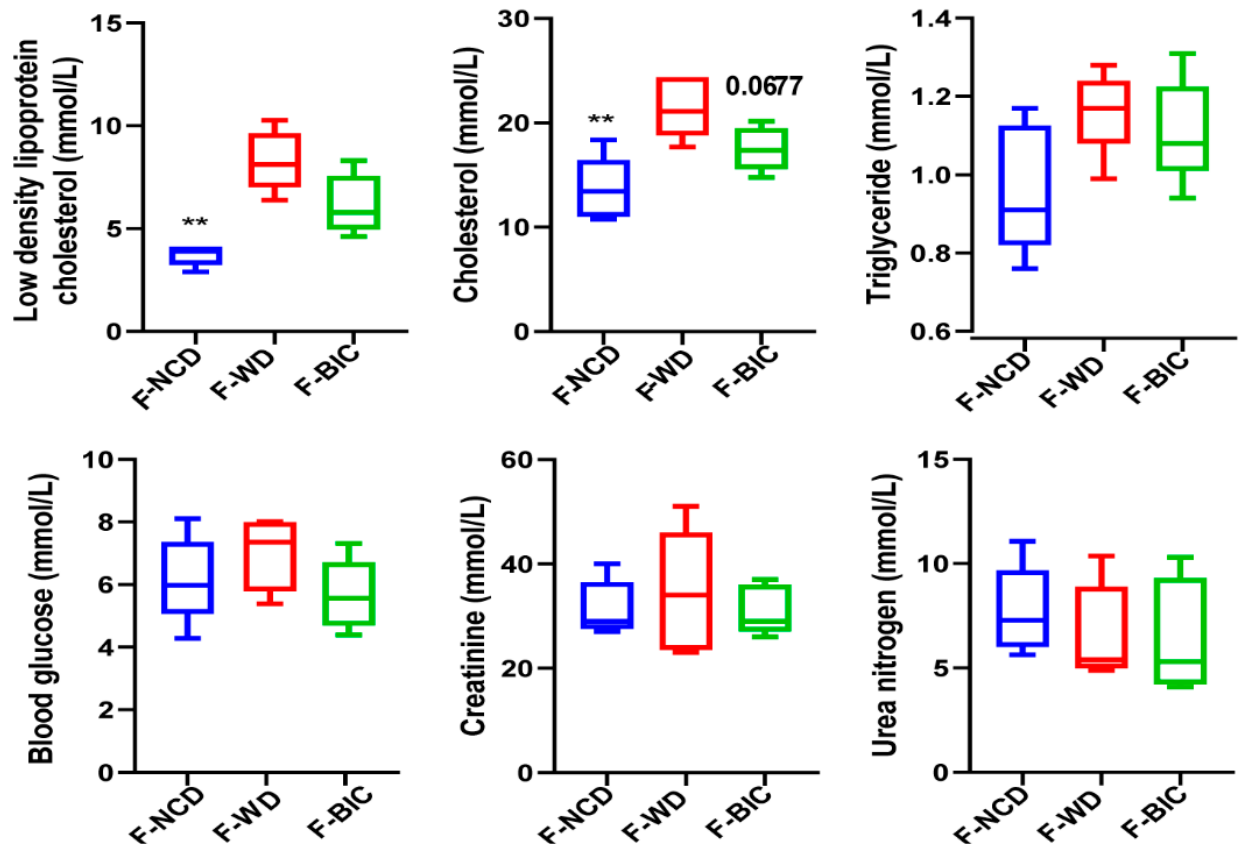


Рисунок S28. Биохимический индекс у мышей-реципиентов Арое(-/-). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего. (n=5-6). Указаны достоверные различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с F-WD по одностороннему тесту ANOVA.

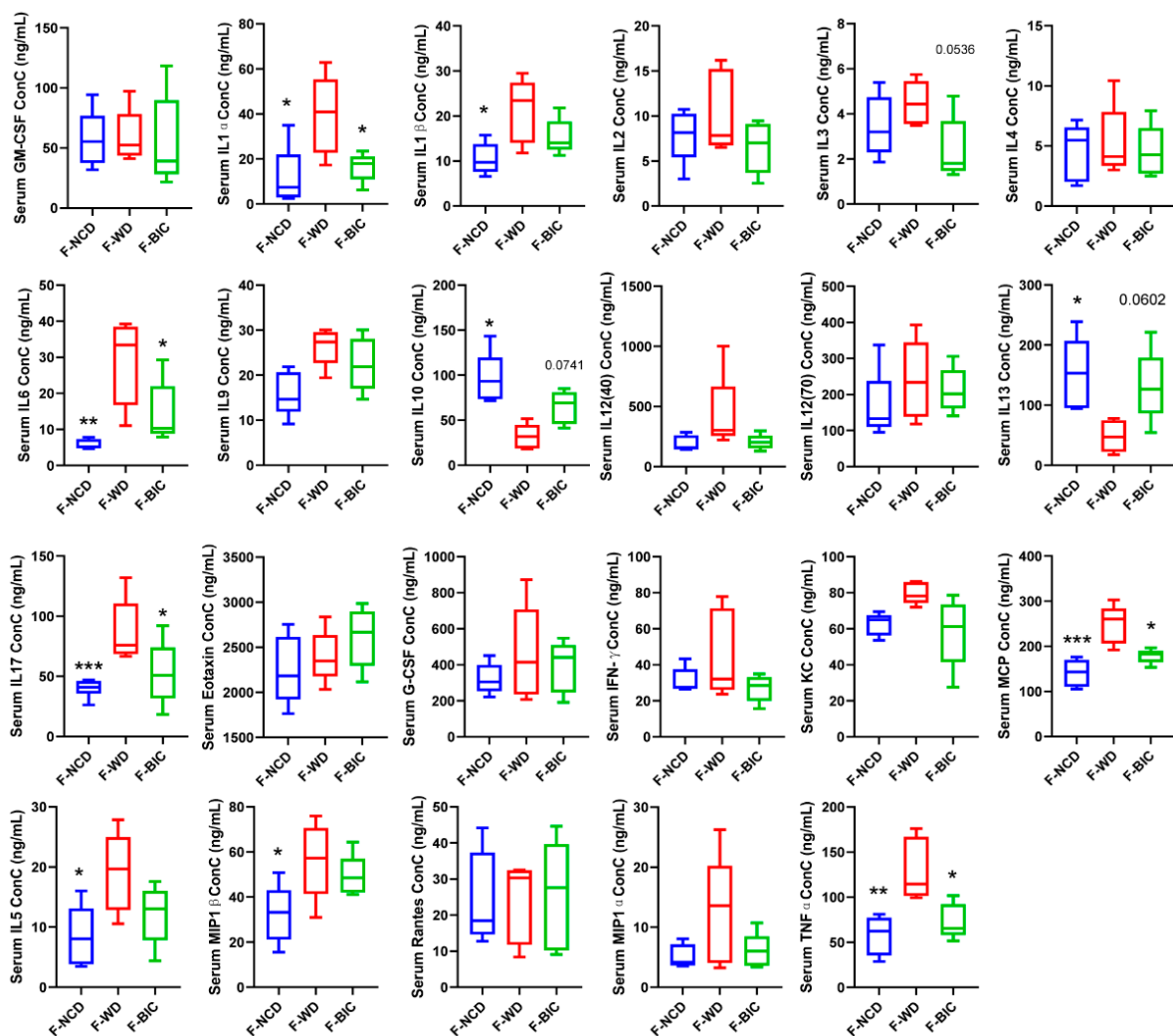


Рисунок S29. Хроническое воспаление у мышей-реципиентов *Arое(-/-)*. Мыши *Arое(-/-)* были разделены на три группы: FMT-NCD (кормят HFD, пересаживают фекалии мышей NCD), FMT-WD (кормление HFD, пересажено фекалиями мышей WD) и FMT-BIC (кормление HFD, трансплантированные фекалиями мышей BIC) (n=8). Был получен свежий трансплантат от мышей-доноров через желудочный зонд каждый день в течение 3 месяцев. После окончания эксперимента кровь образцы собирали и анализировали на системе Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США) с использованием Набор для анализа цитокинов, хемокинов и факторов роста Plex Pro (Bio-Rad, США), согласно протокол производителя. Измеряемые цитокины включали интерлейкин-1 α (IL-1 α), IL-1 β , IL-2, IL-3, ИЛ-4, ИЛ-5, ИЛ-6, ИЛ-9, ИЛ-10, ИЛ-12 (p40), ИЛ-13, ИЛ-14, ИЛ-15, ИЛ-17, колония гранулоцитов фактор (G-CSF), интерферон- γ (IFN- γ), фактор некроза опухоли- α (TNF- α), производный от кератиноцитов хемокин (KC), макрофагальный воспалительный белок-1 α (MIP-1 α), MIP-1 β , эотаксин, регулируемый при активации нормальные Т-клетки экспрессируют и секретируют фактор (RANTES) и моноциты хемоаттрактантный белок-1 (MCP-1). Все измерения проводились с использованием Bio-Plex. Программное обеспечение Manager 6.1 (Bio-Rad, США). Данные представлены как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (n=5-6). Значительные различия: *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001, по сравнению с F-WD по однофакторному дисперсионному анализу тестовое задание.

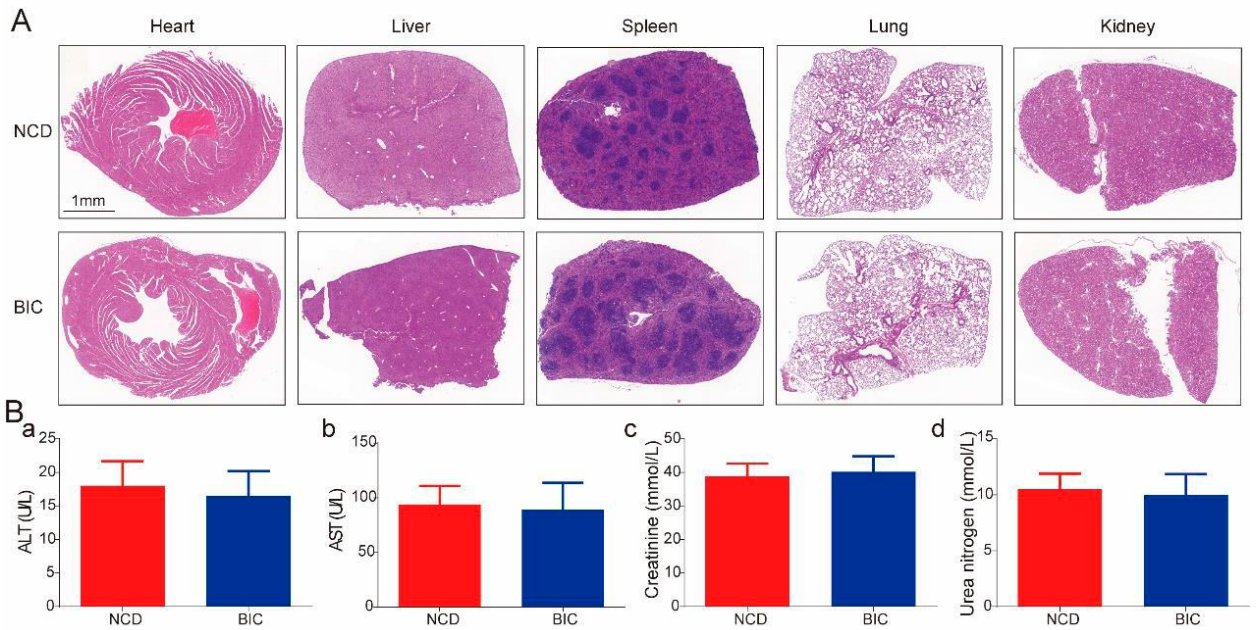


Рисунок S30 Анализ долгосрочной безопасности. Мыши *Arое(-/-)* получали BIC (200 мг кг⁻¹ день⁻¹ BBR) в течение 5 следующих месяцев через желудочный зонд, мышам *Arое(-/-)* через желудочный зонд использовали в качестве контроля. А. Окрашивание основных тканей ГЭ. В-а Концентрация ALT, В-б Концентрация ALT, В-с Концентрация CRE В-д Концентрация BUN Данные представлены как среднее значение \pm SEM (n = 5). Указаны значимые различия: * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$ по сравнению с НИЗ по тесту Oneway ANOVA. Масштабные линейки, 1 мм.

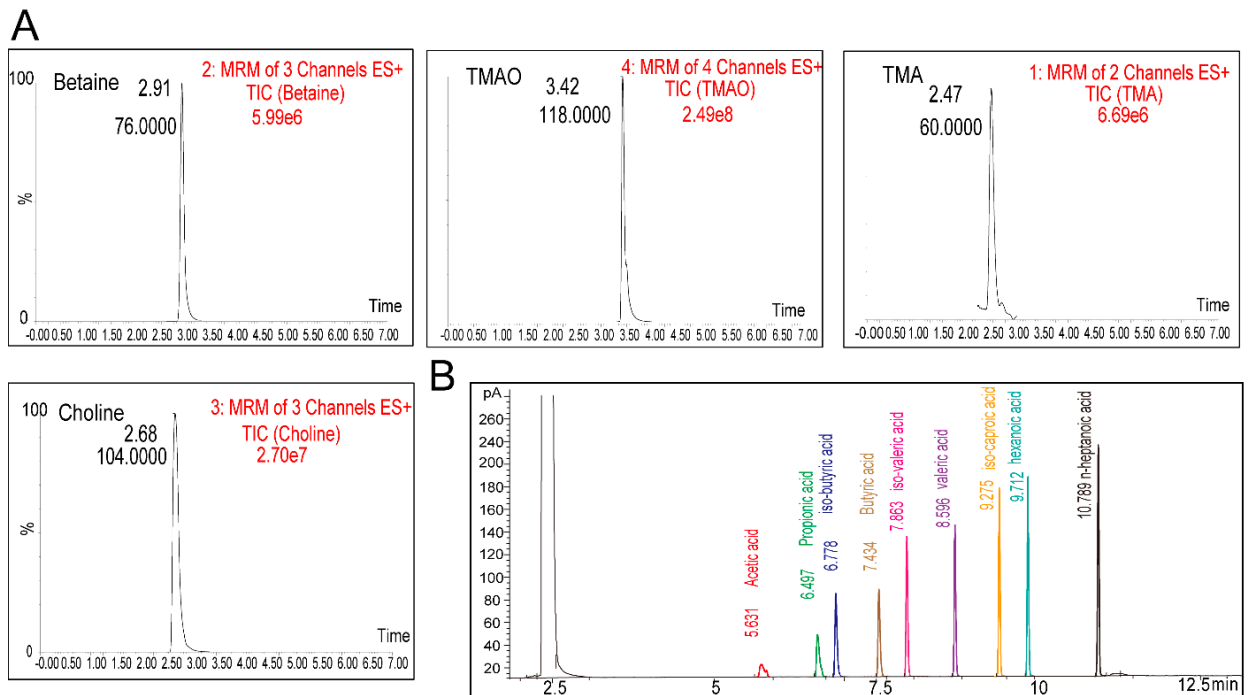


Рисунок S31 Стандартная хроматография для анализа. А. Хроматограммы репрезентативных Бетаин, ТМАО, ТМА и холин, профилированные с помощью ВЭЖХ-МС/МС в образцах. Б. Хроматограммы репрезентативных SCFAs, профилированных GC в фекалиях.