

• 实验研究 •

基于 16S rRNA 技术分析金乌健骨胶囊对胶原诱导关节炎模型大鼠肠道菌群的影响

李湖帆^{1,2}, 钟琴², 马武开², 黄颖², 朱丹², 陈昌明^{2*}

1. 贵州中医药大学, 贵州 贵阳 550002

2. 贵州中医药大学第二附属医院 风湿免疫科, 贵州 贵阳 550001

摘要: 目的 基于 16S rRNA 技术研究金乌健骨胶囊对胶原诱导关节炎模型大鼠肠道菌群的影响, 并探讨其作用机制。方法 将 24 只 Wistar 大鼠随机分为 6 组, 分别为对照组, 模型组, 金乌健骨胶囊 0.225、0.450、1.350 g/kg 组及甲氨蝶呤 (0.001 g/kg) 组, 每组 4 只。除对照组外, 其余各组大鼠制备胶原诱导关节炎模型后 ig 相应药物, 给药期间观察大鼠一般状态并收集大鼠粪便, 连续 ig 4 周后处死大鼠。苏木精-伊红 (HE) 染色观察各组大鼠关节滑膜及结肠组织病理变化情况, 提取粪便基因组 DNA, 利用 Illumina Miseq 测序平台对样本 16S rRNA 进行测序, 对测序结果进行生物信息学分析。结果 与模型组大鼠相比, 金乌健骨胶囊 1.350 g/kg 组和甲氨蝶呤组关节炎指数评分显著降低 ($P < 0.05$ 、 0.01)。6 组样本间 Chao、observed species、Shannon、Simpson 指数没有统计学差异。肠道菌群组成及结构差异分析显示, 与对照组相比, 模型组普雷沃菌属 *Prevotella* Shan and Collins 和螺旋杆菌属 *Helicobacter* Gest and Favinger 的相对丰度均增高 ($P < 0.05$), 毛螺菌属_NK4A136_group (*Lachnospira* Bryant and Small_NK4A136_group) 的相对丰度降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 金乌健骨胶囊 0.225 g/kg 组 *Lachnospira* Bryant and Small_NK4A136_group 的相对丰度显著增高 ($P < 0.01$); 金乌健骨胶囊 0.450 g/kg 组 *Lachnospira* Bryant and Small_NK4A136_group 的相对丰度增高 ($P < 0.05$), *Prevotella* Shan and Collins 和 *Helicobacter* Gest and Favinger 的相对丰度降低 ($P < 0.05$)。结论 金乌健骨胶囊可能是通过调节肠道菌群的结构组成而发挥治疗类风湿关节炎的作用。

关键词: 金乌健骨胶囊; 16S rRNA 技术; 类风湿关节炎; 肠道菌群; 普雷沃菌属; 螺旋杆菌属; 毛螺菌属_NK4A136_group

中图分类号: R9285.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2022)11-2413-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2022.11.001

Effect of Jinwu Jiangu Capsules on intestinal flora of collagen-induced arthritis model rats was analyzed based on 16S rRNA technology

LI Hu-fan^{1,2}, ZHONG Qin², MA Wu-kai², HUANG Ying², ZHU Dan², CHEN Chang-ming²

1. Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550002, China

2. Department of Rheumatology and Immunology, The 2nd Affiliated Hospital of Guizhou University of Traditional Chinese Medicine, Guiyang 550001, China

Abstract: Objective To study the effects of Jinwu Jiangu Capsules on intestinal microflora of collagen-induced arthritis model rats based on 16S rRNA technology, and discuss the mechanism of action. **Methods** A total of 24 Wistar rats were randomly divided into 6 groups: control group, model group, Jinwu Jiangu Capsules 0.225, 0.450, 1.350 g/kg group, and methotrexate (0.001 g/kg) group, with 4 rats in each group. Except the control group, the other groups were given relevant drugs intragastrically after the preparation of collagen-induced arthritis model. During the administration, the general state of the rats was observed and the feces of the rats were

收稿日期: 2022-06-26

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82060909, 82260894); 贵州省科技支撑计划项目 (黔科合支撑[2020]4Y155, 黔科合平台人才[2020]2202); 贵州省卫生健康委科学技术基金项目 (gzwkj2021-143); 贵州省高层次创新型人才培养计划—“百”层次人才项目 (黔科合平台人才[2016]5650)

作者简介: 李湖帆, 男, 硕士研究生, 研究方向为风湿免疫病。E-mail: 1587870376@qq.com

***通信作者:** 陈昌明, 女, 副主任技师。E-mail: dychangming_chen@163.com

collected, and the rats were sacrificed after continuous ig for 4 weeks. The histopathological changes in joint synovium and colon were observed by HE staining. Genome DNA of fecal specimens were extracted and the 16S rRNA were sequenced by Illumina Miseq platform. Sequencing results were analyzed by bioinformatics methodology. **Results** Compared with model group, the arthritis index scores of Jinwu Jiangu Capsules 1.350 g/kg group and methotrexate group were significantly decreased ($P < 0.05, 0.01$). There was no statistical difference in Chao, observed species, Shannon, and Simpson indexes among the 6 groups of samples. The analysis of intestinal flora composition and structure showed that compared with the control group, the relative abundance of *Prevotella* Shan and Collins and *Helicobacter* Gest and Favinger in the model group was increased ($P < 0.05$). The relative abundance of the *Lachnospira* Bryant and Small_NK4A136_group was decreased ($P < 0.05$). Compared with model group, the relative abundance of *Lachnospira* Bryant and Small_NK4A136_group in Jinwu Jiangu Capsules 0.225 g/kg group was significantly increased ($P < 0.01$). Compared with model group, the relative abundance of *Lachnospira* Bryant and Small_NK4A136_group in Jinwu Jiangu Capsules 0.450 g/kg group were increased ($P < 0.05$), while the relative abundance of *Prevotella* Shan and Collins and *Helicobacter* Gest and Favinger was decreased ($P < 0.05$). **Conclusions** Jinwu Jiangu Capsules may play a role in treatment of rheumatoid arthritis by regulating the structural composition of intestinal flora.

Key words: Jinwu Jiangu Capsules; 16S rRNA technology; rheumatoid arthritis; intestinal microflora; *Prevotella* Shan and Collins; *Helicobacter* Gest and Favinger; *Lachnospira* Bryant and Small_NK4A136_group

类风湿关节炎发病机制复杂, 包括遗传因素、环境因素及免疫功能紊乱等, 其中肠道菌群失调作为重要的环境因素在类风湿关节炎的发病及病情进展中发挥重要作用^[1-2]。据最新的流行病学和基础研究证据表明, 黏膜部位(肠道黏膜、口腔黏膜或肺黏膜)与失调微生物群之间的相互作用可能在类风湿关节炎的发展中起重要作用^[3-4], 这些证据支持了类风湿关节炎的发病机制可能开始于黏膜部位, 然后过渡到滑膜关节的观点^[1]。而在类风湿关节炎患者中观察到患者出现肠道炎症及屏障功能的降低现象, 说明肠道菌群失调会改变机体肠道上皮黏膜细胞的通透性, 发生肠道炎症及屏障功能紊乱, 产生大量自身抗体或促炎免疫细胞, 自身抗体和免疫细胞产生的细胞因子运输到关节部位, 造成关节滑膜组织炎症及骨质破坏, 即失调肠道菌群会通过肠-关节轴引发关节炎发作, 促进类风湿关节炎的发病^[5-6]。

甲氨蝶呤、来氟米特、硫酸羟氯喹等传统抗风湿药物连用是目前临床规范化治疗类风湿关节炎的主要方案。但是传统抗风湿药具有起效慢, 不良反应率高的缺点^[7]。苗药金乌健骨胶囊是贵州中医药大学第二附属医院院内制剂, 是苗医治疗痹证的经典验方, 由金毛狗脊、黑骨藤、小花青风藤、乌梢蛇、三七、姜黄、甘草等组成, 具有补肾祛邪、散瘀解毒之功。经长期临床观察, 金乌健骨胶囊对类风湿关节炎的治疗有着良好的疗效, 能够有效改善类风湿关节炎患者临床症状和体征, 降低抗风湿药如甲氨蝶呤等的不良反应^[8-10]。

动物实验研究证实金乌健骨胶囊能够减轻胶

原诱导关节炎模型大鼠足趾的肿胀, 降低模型大鼠血清致炎因子白细胞介素-17 (IL-17)、肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-1 (IL-1) 等的分泌, 同时能够抑制滑膜细胞核因子- κ B (NF- κ B) /P65、NF- κ B/P50 的蛋白活性^[11-12]。体外细胞实验证实金乌健骨方含药血清可以抑制人类类风湿关节炎关节滑膜细胞增殖, 降低滑膜细胞培养上清液血管内皮生长因子 (VEGF)、血管紧张素 (Ang)、缺氧诱导因子-1 α (HIF-1 α)^[13], 抑制类风湿关节炎滑膜细胞自噬相关基因蛋白轻链 3 (LC3)、自噬相关基因 (Beclin-1)、III型磷脂酰肌醇 3 激酶 (VPS34) 的表达^[14]。上述研究说明金乌健骨胶囊对类风湿关节炎的治疗具有多靶点协同作用, 然而, 金乌健骨胶囊与肠道菌群之间的关系尚不清楚。本研究主要目的是检测金乌健骨胶囊对胶原诱导的关节炎模型大鼠肠道菌群的丰度、物种组成及多样性的影响, 从肠-关节轴出发对进一步揭示金乌健骨胶囊对胶原诱导关节炎大鼠肠道菌群的影响, 并为类风湿关节炎治疗提供新的理论依据具有重要意义。

1 材料和方法

1.1 动物

雌性 SPF 级 Wistar 大鼠, 6~8 周龄, 体质量 150~180 g, 由长沙市天勤生物技术有限公司提供, 许可证号 SCXK (湘) 2019-0013。实验动物饲养于贵州中医药大学甲秀校区实验动物中心内, 动物饲养室保持 (23.0 $\pm$ 1.5) $^{\circ}$ C, 相对湿度 (45 $\pm$ 15) %。大鼠待适应性喂养 7 d 后进行实验。所有实验大鼠的使用和喂养严格遵照贵州中医药大学伦理委员会规章制度执行 (批准号 ky2020035)。

1.2 试剂与仪器

金乌健骨胶囊(黔药制字 Z20160028, 规格 0.45 g/粒, 批号 170701) 购自贵州中医药大学第二附属医院药剂科; 甲氨蝶呤片(上海上药信谊药厂有限公司, 批号 H31020644)。牛 II 型胶原冻干粉(美国 Chondrex 公司, 批号 200078); 弗氏完全佐剂(美国 Sigma 公司, 批号 SLCD4457); DNA 提取试剂盒(天根生化科技北京有限公司, 批号 DP328); Qubit dsDNA Assay Kit(美国 Life Technologies 公司, 批号 Q32854); Tks Gflex DNA Polymerase(日本 Takara 公司, 批号 R060B)。

5418 台式高速冷冻离心机(天津一方科技有限公司); 580BR10905 PCR 仪(美国 Bio-rad 公司); SN 002358 QIAextractor(天根生化科技北京有限公司); NanoDrop 2000 超微量分光光度计(美国 Thermo Fisher 公司); HE-120 电泳仪(上海天能公司); 2500 凝胶成像仪(上海天能公司); 2500 Hiseq 测序仪(美国 Illumina 公司)。

1.3 实验分组、动物模型制备与样品采集

24 只雌性 SPF 级 Wistar 大鼠, 随机分为对照组, 模型组, 金乌健骨胶囊低、中、高剂量组, 甲氨蝶呤组, 每组 4 只。参考文献方法^[15]制备胶原诱导关节炎模型, 除对照组外, 其余各组大鼠待尾根部及右后足垫部消毒后, 注射 0.2 mL/只胶原乳剂致炎。7 d 后再次加强免疫, 于尾根部及右后足垫部皮内注射 0.4 mL/只致炎。造模后大鼠如出现烦躁, 精神萎靡, 足趾、趾骨及膝关节肿胀, 行走困难, 则胶原诱导关节炎模型成功^[16]。

加强免疫后 1 d 开始 ig 给药, 对照组及模型组每日按照大鼠体质量 100 g/mL ig 生理盐水, 其余各组按照成人与动物给药等效剂量换算给药, 等效剂量换算 = (人药物剂量/60 kg) × 0.625, 金乌健骨胶囊组每日分别给药(低剂量: 0.225 g/kg, 中剂量: 0.45 g/kg; 高剂量: 1.35 g/kg), 甲氨蝶呤组每周给药 0.001 g/kg。ig 时间为 4 周。末次给药后各组大鼠禁食不禁水, 采集大鼠新鲜粪便 6~8 粒至灭菌后的离心管中, -80 °C 冰箱保存, 用于后续肠道菌群分析。采集血清后处死动物, 分离关节滑膜组织及结肠组织用于观察组织病理变化。

1.4 检测指标及方法

1.4.1 一般情况与疾病活动指数评分 致炎第 7 天后观察各组大鼠一般情况(体质量变化、毛色变化、活动状态、饮食及饮水情况), 测量大鼠关节肿胀

度。按照关节炎指数 5 级评分法评价大鼠四肢关节的变化情况^[17]。根据评分总和得到关节炎指数。

1.4.2 关节滑膜及结肠组织病理切片 处死大鼠后取大鼠双后膝关节滑膜组织及大鼠大肠组织, 于 4%多聚甲醛液固定, 按照常规方法脱钙、脱水、石蜡包埋、切片组织块, 厚度为 4 μm, 进行苏木精-伊红染色(HE), 高倍镜下选取视野观察关节滑膜及结肠组织病理变化情况。

1.4.3 基因组 DNA 的提取及上机测序 分别用采集勺挑取收集好的大鼠粪便样本中间部分置于无菌管中并置于冰上待用, 每个样本称取 0.2 g 分装于 2 mL 无菌 EP 管中, 剩余样本存于 -80 °C 冰箱。采用粪便基因组 DNA 提取试剂盒提取大鼠粪便基因组 DNA 并利用琼脂糖电泳检测基因组 DNA 的纯度。紫外分光光度计(Nanodrop)定量后取适量检测合格的肠道菌群 DNA 样本于离心管中, 用无菌水稀释至 1 ng/mL 用作模板, 使用 Takara Ex TAq(Takara)高保真酶和细菌 16S rRNA 高变区 V3~V4 引物(前端引物: 5'-TACGGRAGGCAGCAG-3', 后端引物: 5'-AGGGTATCTAATCCT-3')进行 PCR 扩增。PCR 产物使用电泳检测, 检测后使用磁珠纯化, 纯化后作为二轮 PCR 模板, 并进行二轮 PCR 扩增, 再次使用电泳检测, 使用磁珠纯化, 并进行文库制备、文库质检及产物定量, 利用高通量测序平台对检测合格的文库样本进行 16S rRNA 测序。

1.5 生物信息学分析

1.5.1 数据处理 使用 Trimmomatic(0.35 版本)、Flash(1.2.11 版本)、Split Libraries(1.8.0 版本)、Uchime(2.4.2 版本)软件对测序生成的原始数据进行低质量部分剪切、拼接、过滤, 得到有效数据。

1.5.2 运算分类单元(OTU)分类^[18] 利用 Vsearch(2.4.2 版本)软件以有效数据 97%的相似度进行基于序列间相似度的 OTU 聚类, 选取丰度最高的序列作为该 OUT 的代表序列。

1.5.3 α 多样性分析^[18] α 多样性指某个群落内部或环境内部物种的多样性, 重点关注群落内的物种多样性及均匀度, 通过单样本的多样性分析来反映样本内微生物群落的丰富度和多样性, 物种丰富度和多样性主要通过 α 多样性指数(Simpson、Chao1、Shannon、Observed species)来表示。

1.5.4 β 多样性分析^[18] β 多样性指不同环境条件下群落之间物种组成的相似性及差异性。

1.5.5 群落结构分布 对 6 组数据在门、属的分类

层级进行相对丰度的注释和汇总，并绘制长条图。

1.6 统计学分析

采用 SPSS 23.0 软件进行分析，计量资料描述用 $\bar{x} \pm s$ 表示，两组间比较采用独立样本的 t 检验。

2 结果

2.1 胶原诱导关节炎大鼠一般情况与疾病活动指数评分

对照组大鼠在 4 周实验中毛色明亮而光滑，食物摄入量和饮水量正常，体质量逐渐增加。模型组、金乌健骨胶囊低、中、高剂量组和甲氨蝶呤组在造模后 1 周内可见足垫部及尾根注射出红肿，在致炎关节对侧出现轻度肿胀现象。造模第 2 周，大鼠双

后肢出现一定程度肿胀，模型组的关节肿胀程度较金乌健骨胶囊低、中、高剂量组和甲氨蝶呤组明显，待造模时间达到第 3 周，模型组大鼠的关节肿胀程度达到高峰，并伴有行动迟缓、摄食饮水减少、体重减轻、毛色泛黄暗淡现象。造模第 4 周，模型组大鼠关节出现肿胀变形现象，金乌健骨胶囊中、高剂量组和甲氨蝶呤组大鼠的上述表现得到一定改善，金乌健骨胶囊低剂量组改善不明显。

与对照组大鼠相比，模型组大鼠关节炎指数评分显著升高 ($P < 0.01$)；与模型组大鼠相比，第 4 周金乌健骨胶囊 1.350 g/kg 组和甲氨蝶呤组关节炎指数评分显著降低 ($P < 0.05, 0.01$)，见表 1。

表 1 各组大鼠关节炎指数评分 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)
Table 1 Score of joint inflammation index in each group ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	关节炎指数评分			
		第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周
对照	—	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00	0.00 ± 0.00
模型	—	1.75 ± 0.25**	3.25 ± 0.25**	3.75 ± 0.25**	4.00 ± 0.00**
金乌健骨胶囊	0.225	1.50 ± 0.29	3.00 ± 0.00	3.50 ± 0.29	3.75 ± 0.25
	0.450	1.50 ± 0.29	3.00 ± 0.00	3.50 ± 0.29	3.50 ± 0.29
	1.350	1.50 ± 0.29	2.75 ± 0.25	3.00 ± 0.00*	3.00 ± 0.00#
甲氨蝶呤	0.001	1.50 ± 0.29	2.75 ± 0.25	3.00 ± 0.00*	2.75 ± 0.25##

与对照组比较：* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ ；与模型组比较：# $P < 0.05$ ## $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; # $P < 0.05$ ## $P < 0.01$ vs model group

2.2 大鼠关节滑膜及结肠组织病理变化

大鼠关节滑膜组织 HE 染色结果见图 1，镜下观察关节滑膜组织，对照组大鼠滑膜细胞排列整齐，未见明显炎性细胞浸润、血管舒张及组织增生现象；模型组大鼠滑膜细胞增厚，可见大量炎性细胞浸润，滑膜细胞呈现绒毛状增生，滑膜血管增生，血管翳形成。金乌健骨胶囊 0.225、0.450、1.350 g/kg 组及甲氨蝶呤组滑膜细胞可见少量炎性细胞浸润，滑膜组织增生情况较模型组有不同程度的改善。

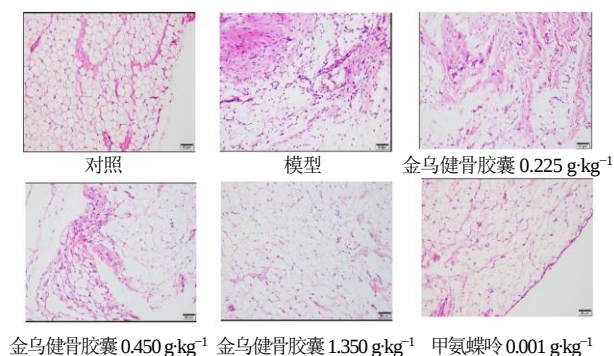


图 1 大鼠关节滑膜组织 HE 染色结果

Fig. 1 HE staining results of synovial tissue of rat joints

大鼠结肠组织 HE 染色结果见图 2，镜下观察大鼠结肠组织，对照组大鼠结肠黏膜完整，肌层结构正常，未见炎症；模型组大鼠结肠黏膜部分有炎症，肌层结构组织出现炎症及炎性细胞浸润，个别黏膜层变薄。金乌健骨胶囊 0.225、0.450、1.350 g/kg 组及甲氨蝶呤组结肠组织细胞可见少量炎性细胞浸润，结肠组织细胞病变情况较模型组有不同程度的改善。

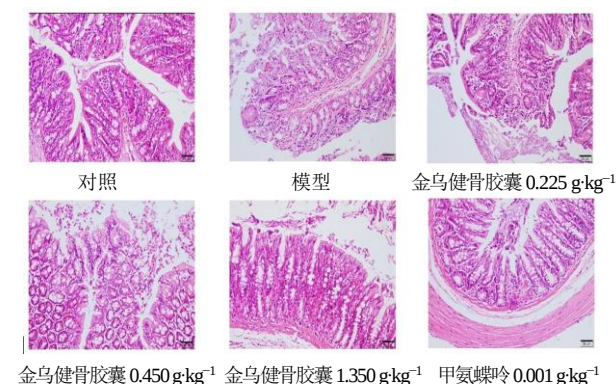


图 2 大鼠结肠组织 HE 染色结果

Fig. 2 HE staining results of rat colon tissue

2.3 16S rRNA 测序结果分析

本研究 6 组 24 个样本经测序后得到的干净标签数据量分布在 65 773~72 689, 干净标签经过过去除嵌合体得到最终用于分析的数据的有效标签数据量分布在 51 459~65 367, 各样本 OTU 个数分布在 1 117~2 312。物种积累曲线显示随着测序样本的数量与相应的等级值增加, 大鼠样本菌群数量与相对丰度趋于恒定值, 表明达到充分的测序深度, 能够反映一定的群落丰富度见图 3。另外, OTU 的数量接近实际情况, 说明本研究测序样本的群落组成均匀度较高, 见图 4。

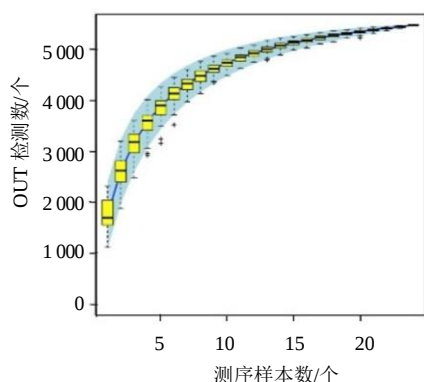
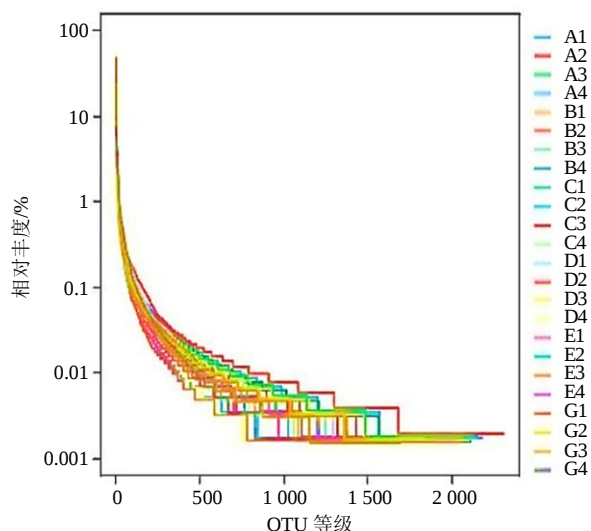


图 3 物种累计曲线

Fig. 3 Species accumulation curve



A1~A4-对照 B1~B4-模型 C1~C4-金乌健骨胶囊 0.225 g·kg⁻¹ D1~D4-金乌健骨胶囊 0.450 g·kg⁻¹ E1~E4-金乌健骨胶囊 1.350 g·kg⁻¹ G1~G4-甲氨蝶呤
A1 — A4 - control B1 — B4 - model C1 — C4 - Jinwujiangu Capsules 0.225 g·kg⁻¹ D1 — D4 - Jinwujiangu Capsules 0.450 g·kg⁻¹ E1 — E4 - Jinwujiangu Capsules 1.350 g·kg⁻¹ G1 — G4 - methotrexate

图 4 OTU 等级 - 丰度分布曲线

Fig. 4 Rank-abundance distribution curve

与对照组相比, 代表模型组大鼠肠道菌群的丰富度指数 (Chao1、Observed species) 和多样性指数 (Shannon、Simpson) 均无明显差异。与模型组相比, 金乌健骨胶囊 0.225、0.450、1.350 g/kg 组和甲氨蝶呤组的大鼠肠道菌群丰富度指数 (Chao1、Observed species) 和多样性指数 (Shannon、Simpson) 也均无明显差异, 见表 2。提示以上 4 组药物对胶原诱导关节炎大鼠的肠道菌群丰富度及多样性无明显影响。

通过 Weighted UniFrac NMDS 分析显示, 对照组、模型组、金乌健骨胶囊 0.225、0.450 g/kg 组之间有一定的重叠, 金乌健骨胶囊 1.350 g/kg 组和甲氨蝶呤组之间有一定的重叠, 它们之间能形成较能区分的两组整体肠道群落结构, 并且 Stress=0.116<0.2, 故此分析较为可靠, 见图 5。

2.4 金乌健骨胶囊治疗前后的大鼠肠道菌群差异分析

根据物种注释结果, 选取每个样品在门、纲、目、科、属以及种水平上最大丰度排名前 15 的 OTU, 生成相对丰度柱形累加图。从门的水平上看, 6 组样本中检测到的拟杆菌门 (Bacteroidetes)、厚壁菌门 (Firmicutes) 及变形菌门 (Proteobacteria) 为优势菌群, 占细菌总数 99% 以上, 见图 6。与对照组相比, 模型组放线菌门 (Actinobacteriota) 的相对丰度增高 ($P<0.05$), 酸杆菌门 (Acidobacteriota) 的相对丰度降低 ($P<0.01$)。与模型组相比, 金乌健骨胶囊 0.225 g/kg 组 Actinobacteriota 的相对丰度降低 ($P<0.05$)。与模型组相比, 金乌健骨胶囊 1.350 g/kg 组弯曲杆菌 (Campilobacterota)、Acidobacteriota、芽单胞菌门 (Gemmatimonadota)、黏菌门 (Myxococcota)、硝化螺旋菌门 (Nitrospirota)、纤维杆菌门 (Fibrobacterota) 的相对丰度显著升高 ($P<0.01$), Actinobacteriota 的相对丰度降低 ($P<0.05$)。与模型组相比, 甲氨蝶呤组 Campilobacterota、Acidobacteriota、Gemmatimonadota 的相对丰度显著升高 ($P<0.01$), Myxococcota、Nitrospirota、Fibrobacterota 的相对丰度升高 ($P<0.05$), Actinobacteriota 的相对丰度降低 ($P<0.05$), 见表 3。

进一步在属水平上对金乌健骨胶囊治疗前后的大鼠肠道菌群进行比较分析, 6 组样本中检测到的优势菌群为普雷沃菌属 *Prevotella* Shan and Collins 和 Muri 菌 (*Muribaculaceae*), 见图 7。与对

表 2 各组大鼠肠道菌群的多样性指数与丰富度指数 ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

Table 2 Diversity index and richness index of intestinal flora of rats in each group ($\bar{x} \pm s, n = 4$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	丰富度指数		多样性指数		覆盖度
		Chao1	Observed species	Shannon	Simpson	
对照	—	2 462.32±200.32	1 923.26±221.62	6.97±0.61	0.95±0.02	0.99
模型	—	2 148.35±65.83	1 562.92±56.59	6.23±0.22	0.94±0.01	0.99
金乌健骨胶囊	0.225	2 273.53±104.84	1 657.86±99.07	5.89±0.44	0.87±0.05	0.99
	0.450	2 138.42±232.01	1 627.02±199.44	6.69±0.30	0.96±0.01	0.99
	1.350	2 431.01±154.12	1 785.42±139.91	6.47±0.42	0.92±0.03	0.99
甲氨蝶呤	0.001	1 875.34±193.53	1 403.12±166.52	6.06±0.53	0.90±0.05	0.99

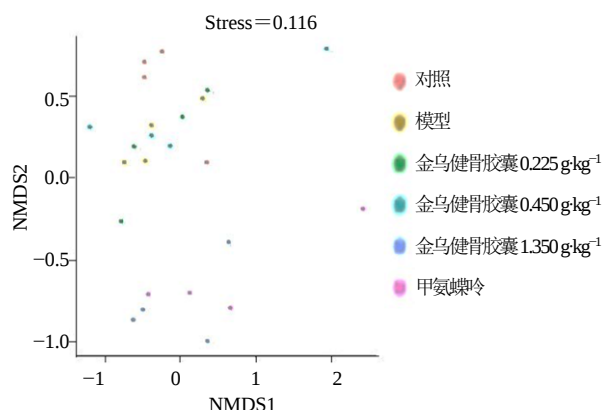
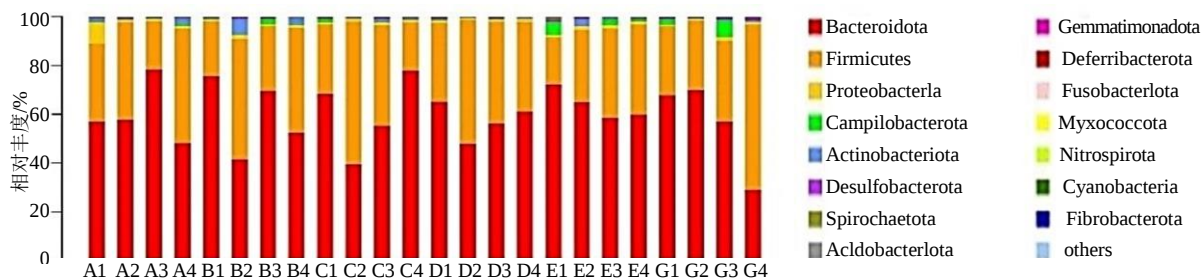


图 5 肠道菌群 β 多样性分析 (NMDS 分析)

Fig. 5 β diversity analysis of intestinal flora (NMDS analysis)

照组相比, 模型组 *Prevotella* Shan and Collins 和螺旋杆菌属 *Helicobacter* Gest and Favinger 的相对丰度增高 ($P < 0.05$), 毛螺菌属_NK4A136_group (*Lachnospira* Bryant and Small_NK4A136_group) 的相对丰度降低 ($P < 0.05$)。与模型组相比, 金乌健骨胶囊 0.225 g/kg 组 *Lachnospira* Bryant and Small_NK4A136_group 的相对丰度显著增高 ($P < 0.01$)。与模型组相比, 金乌健骨胶囊 0.450 g/kg 组 *Lachnospira* Bryant and Small_NK4A136_group 相对丰度增高 ($P < 0.05$)。与模型组相比, *Prevotella* Shan and Collins 和 *Helicobacter* Gest and Favinger 相对丰度降低 ($P < 0.05$), 见表 4。



A1~A4-对照 B1~B4-模型 C1~C4-金乌健骨胶囊 0.225 g·kg⁻¹ D1~D4-金乌健骨胶囊 0.450 g·kg⁻¹ E1~E4-金乌健骨胶囊 1.350 g·kg⁻¹ G1~G4-甲氨蝶呤
A1 — A4 - control B1 — B4 - model C1 — C4 - Jinwujiangu Capsules 0.225 g·kg⁻¹ D1 — D4 - Jinwujiangu Capsules 0.450 g·kg⁻¹ E1 — E4 - Jinwujiangu Capsules 1.350 g·kg⁻¹ G1 — G4 - methotrexate

图 6 门水平上的菌群物种相对丰度

Fig. 6 Relative abundance of flora species at phylum level

3 讨论

类风湿关节炎是临床上常见的多病因共同作用导致的慢性自身免疫疾病, 众多研究表明肠道菌群失调可能是影响类风湿关节炎发生发展的一个重要环境因素。肠道菌群失调不仅会改变机体肠道

上皮黏膜细胞的通透性, 降低机体的免疫耐受功能, 产生多种炎性因子及抗体在关节处或各器官聚集, 启动机体细胞免疫或体液免疫反应, 攻击机体自身组织, 导致类风湿关节炎的发生与发展^[19-20]。临床治疗类风湿关节炎通常采用抗炎或免疫抑制

表 3 各组大鼠肠道菌群在门水平上的相对丰度比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)
Table 3 Comparison on relative abundance of intestinal flora in each group at phylum level ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	Bacteroidota	Firmicutes	Proteobacteria	Campilobacterota	Actinobacteriota
对照	—	60.290 0±6.420 0	34.650 0±5.880 0	3.030 0±1.950 0	0.230 0±0.010 0	1.710 0±0.380 0
模型	—	59.800 0±7.830 0	35.350 0±6.410 0	1.060 0±0.280 0	0.270 0±0.030 0	4.500 0±0.720 0*
金乌健骨	0.225	60.240 0±8.360 0	37.010 0±8.430 0	1.040 0±0.180 0	0.250 0±0.010 0	0.890 0±0.230 0 [#]
胶囊	0.450	57.520 0±3.700 0	40.370 0±3.940 0	1.160 0±0.120 0	0.220 0±0.050 0	0.320 0±0.030 0 [#]
	1.350	63.930 0±3.110 0	30.570 0±4.130 0	1.250 0±0.140 0	2.410 0±0.210 0 ^{##}	0.440 0±0.080 0 [#]
甲氨蝶呤	0.001	55.900 0±9.400 0	39.370 0±9.520 0	1.060 0±0.220 0	2.550 0±0.210 0 ^{##}	0.380 0±0.030 0 [#]
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	Desulfobacterota	Spirochaetota	Acidobacteriota	Gemmatimonadota	Deferribacterota
对照	—	0.360 0±0.060 0	0.020 0±0.020 0	0.004 0±0.010 0	0.002 0±0.010 0	0.020 0±0.010 0
模型	—	0.420 0±0.150 0	0.005 0±0.002 0	0.002 0±0.000 3**	0.000 2±0.000 4	0.020 0±0.004 0
金乌健骨	0.225	0.450 0±0.120 0	0.004 0±0.002 0	0.003 0±0.001 0	0.000 2±0.001 0	0.010 0±0.001 0
胶囊	0.450	0.330 0±0.150 0	0.020 0±0.020 0	0.002 0±0.001 0	0.000 4±0.000 4 [#]	0.020 0±0.003 0
	1.350	0.410 0±0.140 0	0.240 0±0.230 0	0.160 0±0.000 4 ^{##}	0.090 0±0.002 0 ^{##}	0.020 0±0.005 0
甲氨蝶呤	0.001	0.780 0±0.260 0	0.010 0±0.002 0	0.060 0±0.000 4 ^{##}	0.040 0±0.010 0 ^{##}	0.010 0±0.003 0
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	Fusobacteriota	Myxococcota	Nitrospirota	Cyanobacteria	Fibrobacterota
对照	—	0.050 0±0.040 0	0.002 0±0.010 0	0.001 0±0.010 0	0.002 0±0.010 0	0.001 0±0.010 0
模型	—	0.003 0±0.001 0	0.002 0±0.000 4	0.001 0±0.000 1	0.004 0±0.002 0	0.001 0±0.000 2
金乌健骨	0.225	0.004 0±0.002 0	0.002 0±0.000 3	0.001 0±0.000 4	0.002 0±0.002 0	0.001 0±0.000 2
胶囊	0.450	0.010 0±0.002 0	0.002 0±0.000 2	0.001 0±0.000 2	0.002 0±0.001 0	0.001 0±0.000 1
	1.350	0.010 0±0.003 0	0.040 0±0.003 0 ^{##}	0.020 0±0.003 0 ^{##}	0.003 0±0.003 0	0.004 0±0.003 0 ^{##}
甲氨蝶呤	0.001	0.004 0±0.001 0	0.010 0±0.003 0 [#]	0.010 0±0.001 0 [#]	0.003 0±0.002 0	0.010 0±0.003 0 [#]

与对照组比较: * $P < 0.05$ ** $P < 0.01$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ ** $P < 0.01$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

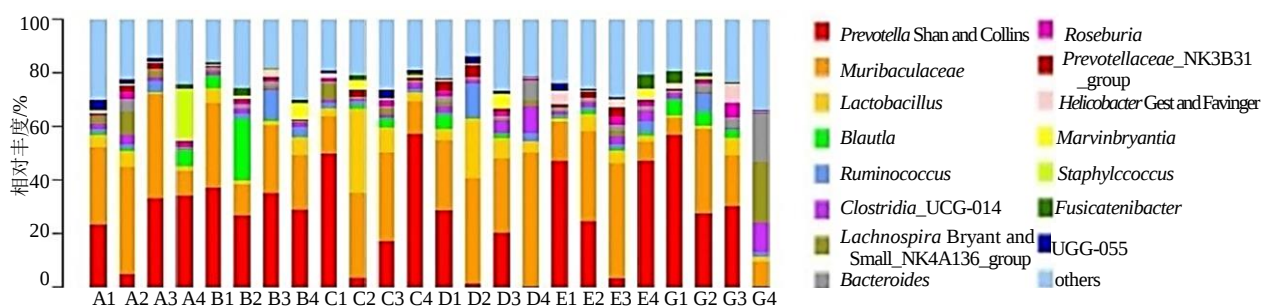


图 7 属水平上的菌群物种相对丰度

Fig. 7 Relative abundance of flora species at genus level

药物如甲氨蝶呤、来氟米特、硫酸羟氯喹等传统抗风湿药物治疗, 但存在停药后易复发、起效慢, 长期使用出现不良反应率高等缺点^[7-21]。已有许多临床和实验表明中医药能克服一些传统抗风湿药物的缺点, 在治疗类风湿关节炎中具有一定优势。本

课题组的前期研究发现苗药金乌健骨胶囊对类风湿关节炎的治疗具有多靶点协同作用, 其能通过其抗炎作用有效减轻胶原诱导关节炎模型大鼠足趾的肿胀及大鼠血清致炎因子分泌, 抑制人滑膜细胞 NF- κ B 通路活性^[11-12]。体外细胞实验证实金乌健骨

表 4 各组大鼠肠道菌群在属水平上的相对丰度比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

Table 4 Comparison on relative abundance of intestinal flora in each group at the genus level ($\bar{x} \pm s$, $n = 4$)

组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	<i>Prevotella</i> Shan and Collins	<i>Muribaculaceae</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Blautia</i>	<i>Ruminococcus</i>
对照	—	24.230 0±6.330 0	29.220 0±7.140 0	3.210 0±1.220 0	2.010 0±1.390 0	1.740 0±0.800 0
模型	—	32.010 0±2.340 0*	22.270 0±4.210 0	3.740 0±1.350 0	7.210 0±5.370 0	4.110 0±2.330 0
金乌健骨	0.225	31.990 0±12.850 0	22.640 0±5.610 0	11.810 0±6.700 0	1.240 0±0.710 0	1.220 0±0.330 0
胶囊	0.450	12.660 0±7.070 0 [#]	35.800 0±5.560 0	9.570 0±4.300 0	1.830 0±1.220 0	4.160 0±2.910 0
	1.350	30.620 0±10.500 0	24.560 0±8.260 0	3.610 0±1.200 0	1.050 0±0.160 0	1.910 0±0.800 0
甲氨蝶呤	0.001	28.790 0±11.550 0	16.520 0±5.690 0	2.600 0±1.330 0	3.500 0±1.320 0	2.350 0±1.550 0
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	<i>Clostridia</i> _UC G-014	<i>Lachnospira</i> Bryant and Small_NK4A136_group	<i>Bacteroides</i>	<i>Roseburia</i>	<i>Prevotellaceae</i> _NK3B31_group
对照	—	1.810 0±0.730 0	3.570 0±0.600 0	1.440 0±1.100 0	1.330 0±0.510 0	0.330 0±0.100 0
模型	—	1.300 0±0.310 0	0.540 0±0.190 0*	1.120 0±0.300 0	0.970 0±0.580 0	0.770 0±0.520 0
金乌健骨	0.225	1.360 0±0.330 0	2.360 0±0.120 0 ^{##}	0.500 0±0.120 0	2.150 0±1.000 0	0.550 0±0.370 0
胶囊	0.450	4.730 0±1.950 0	1.190 0±0.110 0 [#]	2.740 0±1.670 0	1.280 0±0.430 0	0.140 0±0.070 0
	1.350	2.470 0±0.610 0	0.890 0±0.380 0	1.410 0±0.270 0	1.230 0±0.720 0	2.160 0±1.110 0
甲氨蝶呤	0.001	3.380 0±2.580 0	5.340 0±5.560 0	6.400 0±3.980 0	1.760 0±1.210 0	2.300 0±1.530 0
组别	剂量/ (g·kg ⁻¹)	<i>Helicobacter</i> Gest and Favinger	<i>Marvinbryantia</i>	<i>Staphylococcus</i>	<i>Fusicatenibacter</i>	UCG-005
对照	—	0.330 0±0.100 0	5.010 0±4.610 0	0.004 0±0.003 0	0.002 0±0.001 0	0.020 0±0.010 0
模型	—	0.770 0±0.140 0*	0.150 0±0.100 0	0.010 0±0.010 0	0.004 0±0.002 0	0.001 0±0.000 2
金乌健骨	0.225	0.540 0±0.370 0	0.140 0±0.060 0	0.010 0±0.004 0	0.002 0±0.002 0	0.010 0±0.010 0
胶囊	0.450	0.140 0±0.070 0 [#]	0.100 0±0.020 0	0.004 0±0.002 0	0.002 0±0.001 0	0.010 0±0.010 0
	1.350	2.160 0±1.110 0	0.090 0±0.070 0	0.010 0±0.010 0	0.003 0±0.003 0	0.010 0±0.010 0
甲氨蝶呤	0.001	2.300 0±1.530 0	0.030 0±0.020 0	0.020 0±0.010 0	0.003 0±0.002 0	0.001 0±0.001 0

与对照组比较: * $P < 0.05$; 与模型组比较: [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$

* $P < 0.05$ vs control group; [#] $P < 0.05$ ^{##} $P < 0.01$ vs model group

胶囊含药血清可以抑制人类风湿关节炎关节滑膜细胞增殖,降低 VEGF、Ang、HIF-1 α 、LC3、Beclin-1、VPS34 等表达水平^[13-14]。而金乌健骨胶囊与肠道菌群之间的关系尚不清楚,因此研究金乌健骨胶囊对胶原诱导关节炎模型大鼠肠道菌群的丰度、物种组成及多样性的影响能够帮助阐述金乌健骨胶囊对类风湿关节炎的作用机制,具有重要意义。

在本研究中,观察金乌健骨胶囊对胶原诱导关节炎模型大鼠的抗炎作用,模型组大鼠出现关节肿胀,并伴有行动迟缓、摄食饮水减少、体质量减轻、毛色泛黄暗淡现象。HE 染色结果显示,模型组大鼠滑膜细胞增厚,可见大量炎性细胞浸润,滑膜细胞呈现绒毛状增生,滑膜血管增生,血管翳形成。金乌健骨胶囊 0.450、1.350 g/kg 组和甲氨蝶呤组大鼠滑膜及结肠组织的上述表现得到一定改善,金乌健

骨胶囊 0.225 g/kg 组改善不明显。由此证明了本次实验造模比较成功,金乌健骨胶囊能改善类风湿关节炎,且金乌健骨胶囊 0.450、1.350 g/kg 组改善类风湿关节炎效果最好。

高通量测序结果表明无论是甲氨蝶呤还是金乌健骨胶囊对胶原诱导关节炎大鼠的肠道菌群总体的丰富度和多样性均无明显影响,金乌健骨胶囊对胶原诱导关节炎大鼠的抗炎作用可能不是通过改变胶原诱导关节炎大鼠总体的肠道菌群丰富度和多样性实现的,可能是通过改变其中的某些特定菌的丰富度或者某些特定菌的功能来实现的。肠道微生物群落结构直方图显示各组大鼠肠道微生物种类及相对丰度,各组样本中检测到的优势菌群相对丰度无差异,拟杆菌门、厚壁菌门及变形菌门占细菌总数 99% 以上。与对照组相比,模型组

Actinobacteriota 的相对丰度增高, Acidobacteriota 的相对丰度降低; 与模型组相比, 金乌健骨胶囊 0.225 g/kg 组 Actinobacteriota 的相对丰度降低; Campilobacterota、Acidobacteriota、Gemmatimonadota、Myxococcota、Nitrospirata、Fibrobacterota 的相对丰度增高。

各组样本中检测到的优势菌群为 *Prevotella* Shan and Collins 和 *Muribaculaceae*。与对照组相比, 模型组相对丰度增高的菌群有 *Prevotella* Shan and Collins 和 *Helicobacter* Gest and Favinger, 降低的有 *Lachnospira* Bryant and Small_NK4A136_group。与模型组相比, 金乌健骨胶囊给药组相对丰度增高的菌群有 *Lachnospira* Bryant and Small_NK4A136_group 和 *Helicobacter* Gest and Favinger; 降低的有 *Prevotella* Shan and Collins。

Prevotella Shan and Collins 主要集聚于正常人体的口腔、女性生殖道等部位, 是临床上较常见的一种条件致病菌。Scher 等^[22]研究人员在类风湿关节炎患者的临床研究发现, 类风湿关节炎初诊患者携带的 *Prevotella* Shan and Collins 比健康者或病人与慢性、接受治疗的类风湿关节炎患者多, 说明 *Prevotella* Shan and Collins 可能介导类风湿关节炎的发生发展。这项研究与本研究结果一致, 模型组 *Prevotella* Shan and Collins 的相对丰度增高, 而金乌健骨胶囊给药组能够在不同程度降低 *Prevotella* Shan and Collins 含量, 说明金乌健骨胶囊可能通过抑制 *Prevotella* Shan and Collins 起到对胶原诱导关节炎大鼠的抗炎作用, 其具体作用机制值得进一步探讨。

Helicobacter Gest and Favinger 中特别是幽门螺杆菌是定植于胃黏膜的革兰阴性菌, 与胃溃疡、胃癌、食管癌等许多消化系统疾病密切相关, 宿主免疫应答的异常可能是致病机制之一。近年来的研究发现幽门螺杆菌与类风湿关节炎的发病机制密切相关, Zentilin 等^[23]证实根除幽门螺杆菌可降低类风湿性关节炎的疾病严重程度。本研究结果与这项研究相符, 相比于对照组, 模型组 *Helicobacter* Gest and Favinger 的相对丰度增高。而对比于模型组, 金乌健骨胶囊给药组 *Helicobacter* Gest and Favinger 的相对丰度降低。因此, 推断金乌健骨胶囊可能通过抑制 *Helicobacter* Gest and Favinger 的含量起到抑炎作用。

Lachnospira 可能为一种潜在的有益菌, 能够参

与多种碳水化合物的代谢。Coras 等^[24]的研究表明抗炎饮食有助于改善类风湿关节炎患者的临床症状。瘤胃菌科、梭状芽胞杆菌属、拟杆菌属、毛螺菌属在基线时与疾病活动度呈负相关, 而肠杆菌科与基线疾病活性指标呈正相关。同时最近的研究发现抗环瓜氨酸多肽抗体阳性 (CCP+) 组中靶向链球菌科细菌和毛螺菌科的噬菌体增加, 因此类风湿关节炎风险人群中靶向这些细菌的噬菌体出现富集或表明噬菌体可能通过靶向这些关键的细菌类群, 从而参与类风湿关节炎的发病过程^[25]。本研究同样能证实以上观点, 模型组 *Lachnospira* Bryant and Small_NK4A136_group 的相对丰度相较于对照组降低, 而金乌健骨胶囊给药组能够在增高 *Lachnospira* Bryant and Small_NK4A136_group 的相对丰度, 金乌健骨胶囊可能通过调节 *Lachnospira* Bryant and Small_NK4A136_group 的含量抑制类风湿关节炎的作用机制同样值得进一步研究。

综上, 金乌健骨胶囊可能通过增加肠道内 *Lachnospira* Bryant and Small_NK4A136_group 的相对丰度, 降低 *Prevotella* Shan and Collins 和 *Helicobacter* Gest and Favinger 的相对丰度, 调整肠道的微生态平衡, 从而发挥治疗类风湿关节炎的作用。从中也可以看出菌群、疾病与药物之间存在着较为复杂的网络关系。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Zaiss M M, Joyce Wu H J, Mauro D, et al. The gut-joint axis in rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17(4): 224-237.
- [2] Kinashi Y, Hase K. Partners in leaky gut syndrome: Intestinal dysbiosis and autoimmunity [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 673708.
- [3] Catrina A I, Deane K D, Scher J U. Gene, environment, microbiome and mucosal immune tolerance in rheumatoid arthritis [J]. *Rheumatology (Oxford)*, 2016, 55(3): 391-402.
- [4] Holers V M, Demoruelle M K, Kuhn K A, et al. Rheumatoid arthritis and the mucosal origins hypothesis: protection turns to destruction [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2018, 14(9): 542-557.
- [5] Alpizar-Rodriguez D, Lesker T R, Gronow A, et al. *Prevotella copri* in individuals at risk for rheumatoid arthritis [J]. *Ann Rheum Dis*, 2019, 78(5): 590-593.
- [6] Jeong Y, Kim J W, You H J, et al. Gut microbial composition and function are altered in patients with early

- rheumatoid arthritis [J]. *J Clin Med*, 2019, 8(5): 693.
- [7] Radu A F, Bungau S G. Management of rheumatoid arthritis: An overview [J]. *Cells*, 2021, 10(11): 2857.
- [8] 元晓龙, 马武开. 苗药金乌健骨方治疗类风湿关节炎疗效观察 [J]. 亚太传统医药, 2018, 14(10): 188-190.
- [9] 凌益, 任妮娜, 徐晖, 等. 金乌健骨胶囊对类风湿关节炎滑膜细胞增殖、迁移及凋亡的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2022, 37(1): 513-517.
- [10] 蔡鑫, 唐芳, 马武开, 等. 苗药金乌健骨方治疗类风湿关节炎的研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2021, 41(9): 2001-2004.
- [11] 李蓉, 姚血明, 宁乔怡, 等. 苗药金乌健骨方对类风湿关节炎滑膜细胞 IL-17/IL-17R 的影响 [J]. 中药新药与临床药理, 2018, 29(5): 546-551.
- [12] 陆道敏, 马武开, 姚血明, 等. 苗药金乌健骨方对 CIA 模型大鼠关节滑膜细胞 NF- κ B 调控作用研究 [J]. 时珍国医国药, 2014, 25(10): 2318-2320.
- [13] 马武开, 李蓉, 徐晖, 等. 苗药金乌健骨方对类风湿关节炎滑膜血管新生的影响 [J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(10): 4571-4575.
- [14] 吴闵, 徐晖, 黄颖, 等. 金乌健骨胶囊对胶原诱导关节炎模型大鼠自噬相关基因表达的影响 [J]. 中药材, 2021, 44(5): 1202-1207.
- [15] Xu T, Guo J C, Wu S S, *et al.* Novel compound Q-1 alleviates type II collagen-induced arthritis in rats through the NF- κ B pathway [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021: 6627290.
- [16] Luan J, Hu Z, Cheng J, *et al.* Applicability and implementation of the collagen-induced arthritis mouse model, including protocols (Review) [J]. *Exp Ther Med*, 2021, 22(3): 939.
- [17] Rosloniec E F, Whittington K, Proslovsky A, *et al.* Collagen-induced arthritis mouse model [J]. *Curr Protoc*, 2021, 1(12): e313.
- [18] Weinroth M D, Belk A D, Dean C, *et al.* Considerations and best practices in animal science 16S ribosomal RNA gene sequencing microbiome studies [J]. *J Anim Sci*, 2022, 100(2): skab346.
- [19] Li M, Wang F. Role of intestinal microbiota on gut homeostasis and rheumatoid arthritis [J]. *J Immunol Res*, 2021, 2021: 8167283.
- [20] Romão V C, Fonseca J E. Etiology and risk factors for rheumatoid arthritis: A state-of-the-art review [J]. *Front Med (Lausanne)*, 2021, 8: 689698.
- [21] 周莹莹, 刘宇灵, 林龙飞, 等. 青藤碱及其新剂型治疗类风湿性关节炎的研究进展 [J]. 中草药, 2021, 52(24): 7709-7717.
- [22] Scher J U, Sczesnak A, Longman R S, *et al.* Expansion of intestinal *Prevotella copri* correlates with enhanced susceptibility to arthritis [J]. *Elife*, 2013, 2: e01202.
- [23] Zentilin P, Seriole B, Dulbecco P, *et al.* Eradication of *Helicobacter pylori* may reduce disease severity in rheumatoid arthritis [J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2002, 16(7): 1291-1299.
- [24] Coras R, Murillo-Saich J D, Guma M. Circulating pro- and anti-inflammatory metabolites and its potential role in rheumatoid arthritis pathogenesis [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 827.
- [25] Mangalea M R, Paez-Espino D, Kieft K, *et al.* Individuals at risk for rheumatoid arthritis harbor differential intestinal bacteriophage communities with distinct metabolic potential [J]. *Cell Host Microbe*, 2021, 29(5): 726-739.

[责任编辑 高源]