

基于肠道菌群探讨金藤清痹颗粒抗类风湿关节炎的作用机制

周政, 赵灵灵, 贾文瑞, 王娟*

郑州大学第一附属医院, 河南 郑州 450052

摘要:目的 以“肠-关节”轴为切入点, 探讨金藤清痹颗粒抗类风湿关节炎的作用机制。方法 按体质量将大鼠随机分为 6 组, 即对照组、模型组、双氯芬酸钠组以及金藤清痹颗粒高、中、低剂量组, 每组 6 只。采用胶原诱导法进行造模, 设计金藤清痹颗粒高、中、低剂量组给药剂量分别为 6.30、3.15、1.58 g/kg; 双氯芬酸钠组给药剂量为 3 mg/kg; 对照组和模型组 ig 等量生理盐水, 给药 4 周。苏木精-伊红染色法(HE)观察大鼠踝关节部位病理变化, 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测大鼠血清相关炎症指标, 16S rDNA 分析盲肠内容物中肠道菌群变化。**结果** 与模型组比较, 金藤清痹颗粒可明显降低胶原诱导型关节炎模型大鼠关节肿胀度, 减少踝关节炎性细胞浸润, 同时可显著降低胶原诱导型关节炎大鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素(IL)-1 β 、C 反应蛋白(CRP)水平($P < 0.05$ 、 0.01); 16S rDNA 结果显示, 金藤清痹颗粒 6.30 g/kg 可增加 Cyanobacteria、软壁菌门、疣微菌门、梭杆菌门、毛螺菌科 NK4A136 群和 Ruminiclostridium 5 等菌群的相对丰度, 以及降低变形菌门、乳杆菌属和瘤胃球菌属 1 等菌群的相对丰度。**结论** 金藤清痹颗粒可能通过调控“肠-关节”轴发挥抗类风湿关节炎的作用。

关键词: 金藤清痹颗粒; 类风湿关节炎; 肠道菌群; “肠-关节”轴; Cyanobacteria; 软壁菌门; 疣微菌门

中图分类号: R979.5 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2023)02-0270-10

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2023.02.004

Mechanism of Jinteng Qingbi Granules against rheumatoid arthritis based on gut microbiota

ZHOU Zheng, ZHAO Ling-ling, JIA Wen-rui, WANG Juan

The First Affiliated Hospital of Zhengzhou University, Zhengzhou 450052, China

Abstract: Objective To investigate the mechanism of Jinteng Qingbi Granules against rheumatoid arthritis based on gut microbiota. **Methods** According to body weight, the rats were randomly divided into 6 groups, namely control group, model group, diclofenac sodium group, and Jinteng Qingbi Granules high, medium, and low-dose groups, with 6 rats in each group. Collagen induction method was used for modeling, and the dosages of Jinteng Qingbi Granules in high, medium, and low dose groups were 6.30, 3.15, 1.58 g/kg, respectively. The dose of diclofenac sodium group was 3 mg/kg; Control group and model group were given the same amount of normal saline intragastrically for 4 weeks. Hematoxylin-eosin staining (HE) was used to observe the pathological changes of the ankle joint of the rats, ELISA was used to detect the serum inflammatory indicators, and 16S rDNA was used to analyze the changes of intestinal flora in the cecum contents. **Results** Compared with the model group, Jinteng Qingbi Granules could significantly reduce the degree of joint swelling, the infiltration of ankle arthritic cells, and the serum levels of TNF- α , IL-1 β and CRP in collagen-induced arthritis model rats. At the same time, 16S rDNA showed that Jinteng Qingbi Granules could increase the relative abundance of Cyanobacteria, Tenericutes, Verrucomicrobia, Fusobacteria, Lachnospiraceae NK4A136 group, and Ruminiclostridium 5, as well as decrease the relative abundance of Proteobacteria, Lactobacillus and Ruminococcus 1. **Conclusion** Jinteng Qingbi Granules may play an anti-rheumatoid arthritis role by regulating the “gut-joint” axis.

Key words: Jinteng Qingbi Granules; rheumatoid arthritis; gut microbiota; “Gut-joint” axis; Cyanobacteria; Tenericutes; Verrucomicrobia

收稿日期: 2022-11-18

基金项目: 河南省医学科技攻关计划联合共建项目(LHGJ20190275)

作者简介: 周政, 主管药师, 研究方向为中药药理。E-mail: zhouzheng037@163.com

*通信作者: 王娟, 女, 主任药师, 研究方向为中药临床药学。E-mail: wangjuan6691@163.com

类风湿性关节炎是一种全身性多关节慢性自身免疫性疾病, 主要影响手足^[1]。临床中类风湿性关节炎的临床病理主要表现为免疫细胞浸润、滑膜增生及关节软骨和骨的破坏^[2]。虽然类风湿性关节炎的确切病因尚不清楚, 但可以肯定的是遗传和环境因素对类风湿性关节炎的发生具有重要影响。目前, 类风湿性关节炎影响了全球 0.5%~1.0% 的人口, 特别是女性患该病的风险更高, 为男性的 2~3 倍^[3-4]。此外, 有研究显示, 80% 未得到充分治疗的类风湿性关节炎患者将发展为关节畸形, 40% 的患者在发病 10 年内无法正常工作^[5-7]。可见, 及时有效地治疗类风湿性关节炎极为重要。

目前, 临床中可选择治疗类风湿性关节炎药物包括非甾体抗炎药、糖皮质激素、抗风湿药^[8]。其中非甾体抗炎药, 如阿司匹林、双氯芬酸, 可有效地减轻疼痛和肿胀, 并改善关节功能, 但不能防止额外的关节损伤^[9], 且非甾体抗炎药应用过程中常伴随着肾脏、肝脏、胃肠道和心血管的不良反应^[10]; 糖皮质激素, 如泼尼松龙, 通过普遍抑制基因表达来延缓类风湿性关节炎早期的进展, 是高度有效的抗炎药物, 然而长期使用糖皮质激素易引起多系统代谢紊乱, 如胃肠道出血、骨质疏松症和溃疡形成等^[11-12]; 抗风湿药物如甲氨蝶呤、磺胺嘧啶等, 可有效缓解类风湿性关节炎症状, 改善身体功能和抑制关节结构性损伤进展, 但是上述药物在使用过程中易引起脱发、口腔炎和肝脏毒性等不良反应, 极大限制了其对类风湿性关节炎患者的治疗^[13-14]。因此, 寻找安全、有效治疗类风湿性关节炎的药物尤为迫切。

中药在治疗类风湿性关节炎过程中因其疗效明显、不良反应少而逐步获得临床的青睐。金藤清痹颗粒由金银花、青风藤、白花蛇舌草、玄参、白芍、生地黄、山慈菇、鹿衔草、当归、甘草、蜈蚣组成, 具有清热解毒、活血消肿、通痹止痛之功, 用于类风湿性关节炎活动期^[15]。然而有关金藤清痹颗粒治疗类风湿性关节炎的作用机制研究较薄弱, 目前多停留在临床疗效观察阶段^[16]。近年来, “肠-关节”轴已在类风湿性关节炎的研究中逐步获得国内外学者的认可, 肠道菌群成为类风湿性关节炎研究的热点^[17-18]。因此, 本研究以“肠-关节”轴为切入点, 采用 16S rDNA 研究金藤清痹颗粒对胶原诱导型关节炎模型大鼠肠道菌群的变化, 探讨金藤清痹颗粒抗类风湿性关节炎的作用机制。

1 实验材料

1.1 药品与试剂

金藤清痹颗粒(鲁南厚普制药有限公司, 国药准字 Z20123065, 批号 28190091); 双氯芬酸钠(批号 201007) 购自中国希恩思生化科技有限公司; 牛 II 型胶原蛋白(批号 20200235)、弗氏完全佐剂(批号 SLBR3879V) 和弗氏不完全佐剂(批号 SLBR0324A) 均购自 Sigma 公司。

C-反应蛋白(CRP, 批号 2010-2)、白细胞介素-1 β (IL-1 β , 批号 2010-1) 和肿瘤坏死因子- α (TNF- α , 批号 2008-2) 试剂盒均购自武汉华美生物工程有限公司。

1.2 主要仪器

BX53 型荧光电子显微镜(日本 Olympus); MR-96A 型酶标仪(深圳迈瑞生物医疗电子股份有限公司); YB3002 型分析天平(上海力能电子仪器有限公司); TD3 型低速离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司); DW-HL508 型超低温冰箱(安徽中科美菱低温科技股份有限公司); 激光共聚焦显微镜(日本 Nikon); Leica UC7 型超薄切片机(Leica)。

1.3 试验动物

雄性 SD 大鼠 36 只, 清洁级, 6~7 周龄, 体重 150~160 g, 购自北京华阜康生物科技股份有限公司, 动物合格证号 SCXK(京)2020-0004。动物实验经郑州大学第一附属医院动物实验伦理委员会批准(批准号 K2020-0005)。

2 方法

2.1 实验动物分组

36 只 SD 大鼠适应性饲养 7 d 后, 按体质量随机分为 6 组, 每组 6 只, 即对照组、模型组、双氯芬酸钠组, 以及金藤清痹颗粒高、中、低剂量组。

2.2 胶原诱导型关节炎模型的建立

采用胶原诱导法进行造模^[19], 在实验第 1 天, 于大鼠尾根部多点给予牛 II 型胶原蛋白 5 mg/mL 与弗氏完全佐剂的混合乳剂进行初次免疫; 在实验第 21 天, 再次于大鼠尾根部多点给予牛 II 型胶原蛋白与弗氏不完全佐剂的混合乳剂加强免疫。

2.3 给药和取材

参考金藤清痹颗粒说明书的服用剂量, 并按体表面积折算大鼠等效剂量, 设计金藤清痹颗粒高、中、低剂量组分别 ig 给药 6.30、3.15、1.58 g/kg; 双氯芬酸钠组 ig 给药 3 mg/kg; 称取上述药物溶于生理盐水, 各给药组 ig 相应药物(10 mL/kg), 对

照组和模型组 ig 等量生理盐水。末次给药后,大鼠 ip 水合氯醛麻醉,腹主动脉采血,放置后,在 3 000 r/min 转速下离心 10 min,分离上清液用于测定 TNF- α 、IL-1 β 、CRP 水平;取部分踝关节组织,置于 4%多聚甲醛固定用于苏木精-伊红染色法(HE)染色;收集各组大鼠盲肠内容物于无菌 EP 管中,液氮速冻后置于超低温冰箱-80 $^{\circ}\text{C}$ 保存,用于 16S rDNA 测序。

2.4 大鼠踝关节肿胀度和苏木精-伊红染色法(HE)观察病理形态表现

取上述各组大鼠踝关节,测量各组大鼠踝关节的肿胀度,再以 4%多聚甲醛中固定 24 h, 10%的 EDTA 溶液进行脱钙,然后经包埋、切片、烘干、脱蜡、HE 染色等步骤后,于显微镜下观察各组大鼠踝关节病理改变。

2.5 血清炎症因子水平的测定

取上述各组大鼠血清,用酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测 TNF- α 、IL-1 β 、CRP 的水平,具体步骤按试剂盒说明书进行。

2.6 16S rDNA 测序

采用 CTAB 法对样本的基因组 DNA 进行提取,使用带 Barcode 的特异引物和高保真 DNA 聚合酶对选定的 V3~V4 可变区进行 PCR 扩增,混样与纯

化后使用 NEB Next[®] Ultra[™] DNA Library Prep Kit 文库试剂盒进行文库构建,并结合 Illumina Miseq 测序平台进行测序,得到原始测序序列。

对原始数据进行拼接、过滤及去嵌合体,得到有效数据。根据 97%的相似度,使用 Uparse 软件将序列聚类成 OTUs,并利用 RDP classifier 贝叶斯算法对每条序列进行物种分类注释。随后进行 α 多样性、 β 多样性和菌群物种组成及差异分析,并使用 PICRUS^t 软件进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,预测菌群代谢功能。

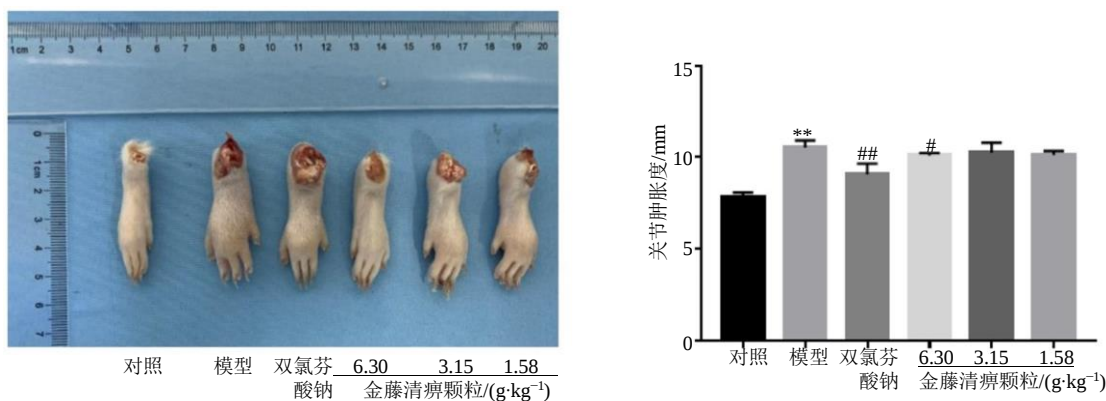
2.7 统计学方法

实验结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示,实验数据用 SPSS 20.0 统计分析软件进行处理,先进行方差齐性检验,两组间均数比较采用 t 检验。

3 结果

3.1 各组大鼠关节肿胀度

与对照组大鼠比较,模型组大鼠双侧踝关节出现关节红肿,活动受限,而金藤清痹颗粒各剂量组和双氯芬酸钠组大鼠踝关节红肿明显减小,关节活动度基本正常。其中金藤清痹颗粒 6.30 g/kg 组和双氯芬酸钠组关节肿胀度较模型组显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01),其余各组关节肿胀度无显著差异,见图 1。



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

图 1 各组大鼠关节肿胀度

Fig. 1 Degree of joint swelling of rats in each group

3.2 各组大鼠踝关节 HE 染色

如图 2 所示,对照组大鼠踝关节组织内无病变。模型组大鼠踝关节内滑膜细胞显著增生,有单核细胞、淋巴细胞等大量炎性细胞浸润。其余各组踝关节内滑膜细胞增生不显著,可见部分炎性细胞浸润和较少新生毛细血管,病变程度较模型组减轻。

3.3 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、CRP 水平

如表 1 所示,与对照组比较,模型组大鼠 TNF- α 和 CRP 水平显著升高 ($P < 0.01$), IL-1 β 无显著变化。双氯芬酸钠组和金藤清痹颗粒 6.30 g/kg 组 TNF- α 、IL-1 β 和 CRP 水平显著降低 ($P < 0.05$ 、0.01); 金藤清痹颗粒 3.15 g/kg 组 TNF- α 水平显著

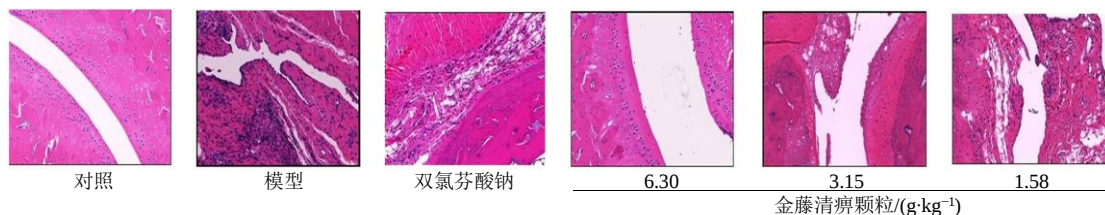


图 2 各组大鼠踝关节 HE 染色 (×200)

Fig. 2 HE staining of the ankle joints of rats in each group (×200)

表 1 各组大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、CRP 水平变化 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)Table 1 Serum levels of TNF- α , IL-1 β , and CRP in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	TNF- α /(pg·mL ⁻¹)	IL-1 β /(pg·mL ⁻¹)	CRP/(mg·L ⁻¹)
对照	—	123.60 ± 56.11	142.55 ± 46.60	3.36 ± 0.22
模型	—	257.79 ± 63.58**	198.22 ± 58.06	9.88 ± 3.40**
双氯芬酸钠	3 mg·kg ⁻¹	136.51 ± 38.91 ^{##}	138.91 ± 26.26 [#]	4.39 ± 2.41 ^{##}
金藤清痹颗粒	6.30	116.19 ± 82.52 ^{##}	126.95 ± 28.85 [#]	5.89 ± 2.12 [#]
	3.15	182.29 ± 39.28 [#]	138.13 ± 39.32	8.58 ± 2.04
	1.58	268.62 ± 65.50	122.90 ± 25.95 [#]	9.85 ± 1.27

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

降低 ($P < 0.05$), 金藤清痹颗粒 1.58 g/kg 组大鼠 IL-1 β 水平显著降低 ($P < 0.05$), 其余各组炎症指标无显著变化。

3.4 肠道菌群物种注释

鉴于金藤清痹颗粒 6.30 g/kg 组具有较好的抗类风湿性关节炎药效, 接下来选择金藤清痹颗粒 6.30 g/kg 组大鼠开展肠道菌群研究。测序数据 3 组共 18 个样本, 按最小样本序列数抽平后 OTU 物种分析, 结果见图 3。按照 97% 相似度聚类分类得到 1 386 个 OTUs, 3 组相同的 OTU 共有 737 个。对照组 OUT 有 1011 个, 独有 142 个; 模型组 OUT 有 975 个, 独有 74 个; 金藤清痹颗粒 6.30 g/kg 组 OUT 有 1 111 个, 独有 196 个。

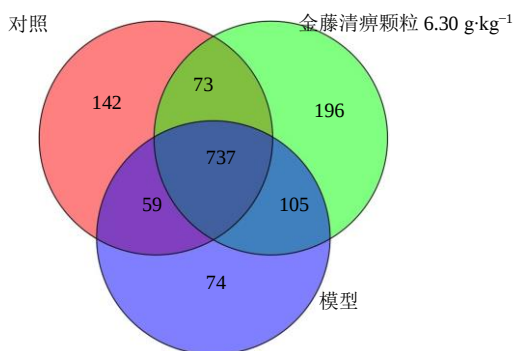


图 3 基于 OTU 分布的 Venn 图

Fig. 3 Venn diagram based on OTU distribution

3.5 各组大鼠肠道菌群多样性比较

3.5.1 各组大鼠 α 多样性分析 采用 α 多样性分析法对各组大鼠肠道物种多样性进行评价, 包括 Shannon、Simpson、Ace、Chao1, 结果显示 3 组之间无显著差异。然而, 与对照组相比, 模型组 Shannon、Simpson、Ace、Chao1 指数均降低, 而金藤清痹颗粒 6.30 g/kg 组可升高上述指数, 说明金藤清痹颗粒 6.30 g/kg 组可改善类风湿性关节炎大鼠的群落物种多样性, 见表 2。

3.5.2 各组大鼠 β 多样性分析 采用 Unweighted Unifrac 距离的主坐标分析 (PcOA) 研究不同样本群落组成 β 多样性, 见图 4。结果显示对照组和模型组可基本分开, 提示胶原诱导型关节炎模型大鼠肠道菌群结构发生改变。同时, 金藤清痹颗粒 6.30 g/kg 组聚集的类群与对照组聚集的类群距离较为接近, 说明金藤清痹颗粒能够改善胶原诱导型关节炎模型大鼠肠道菌群组成。

3.6 各组大鼠肠道菌群组成与结构分析

3.6.1 各组大鼠门水平肠道菌群组成 在门水平上检测 3 组的菌群结构, 与对照组相比, 模型组可显著降低 Cyanobacteria、软壁菌门、疣微菌门、梭杆菌门等的相对丰度, 而金藤清痹颗粒 6.30 g/kg 组能显著升高上述菌门的相对丰度; 相反, 与对照组相比, 模型组可显著升高变形菌门等的相对丰度, 而金藤清痹颗粒 6.30 g/kg 组能够显著降低上述菌

表 2 各组大鼠肠道菌群 α 多样性分析

Table 2 Alpha diversity analysis of gut microbiota in each group

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	物种多样性		物种丰度	
		Shannon	Simpson	Ace	Chao1
对照	—	4.92±0.49	0.90±0.04	641.26±45.77	628.66±50.27
模型	—	4.86±1.10	0.86±0.13	637.04±93.89	624.72±90.61
金藤清痹颗粒	6.30	5.49±0.44	0.93±0.02	701.32±61.29	675.80±54.00

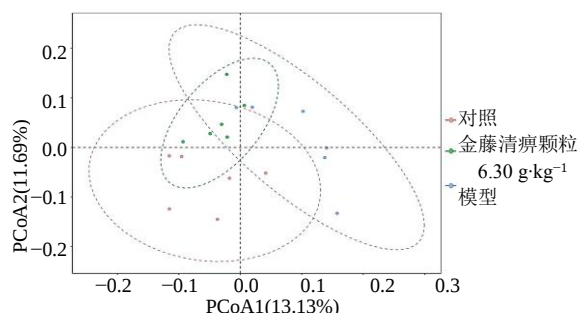


图 4 基于 Unweighted Unifrac 距离的 β 多样性分析
Fig. 4 Beta diversity analysis based on Unweighted Unifrac

门相对丰度, 见图 5。

3.6.2 各组大鼠属水平肠道菌群组成 在属水平检测 3 组的菌群结构如图 6 所示, 与对照组相比, 模型组毛螺菌科 NK4A136 群和 Ruminiclostridium 5 等相对丰度显著下降, 而金藤清痹颗粒 6.30 g/kg 组能够显著升高上述菌属的相对丰度; 相反, 与对照组相比, 模型组可显著升高乳杆菌属和瘤胃球菌属 1 等相对丰度, 而金藤清痹颗粒 6.30 g/kg 组能够显著降低上述菌属的相对丰度。

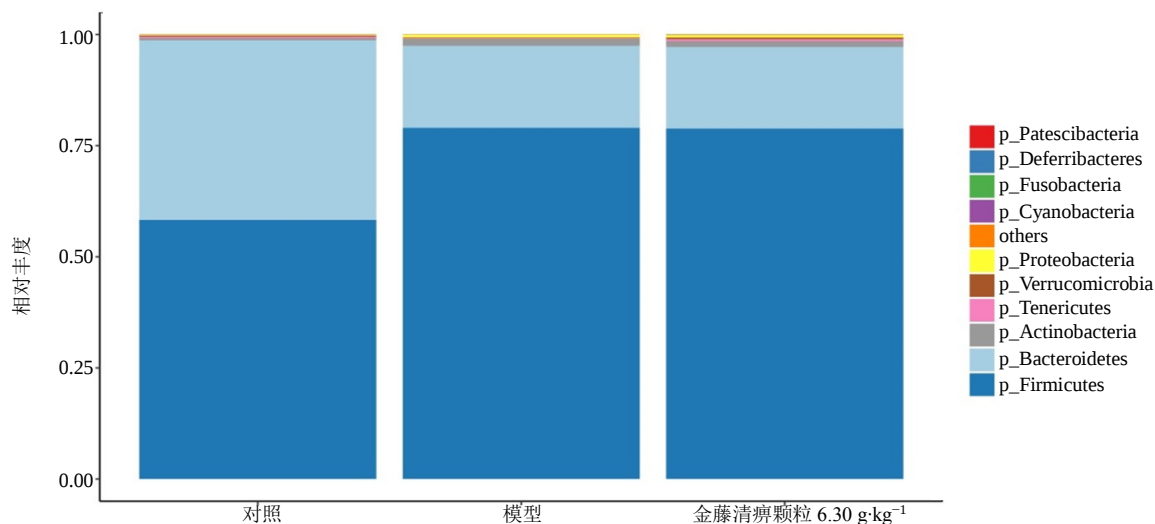


图 5 门水平上各组肠道菌群相对丰度

Fig. 5 Relative abundance of gut microbiota at phylum level in each group

3.7 大鼠肠道菌群 LEfSe 多级物种差异判别分析

采用 LEfSe (linear discriminant analysis effect size) 分析比较各组大鼠从门到属的菌群变化, 并分析具有显著差异的物种。以 $LDA > 2$ 为筛选标准, 进化分支图见图 7, LDA 值分布柱状图见图 8。结果表明, 对照组大鼠肠道微生物中拟杆菌目、拟杆菌纲、拟杆菌门和普雷沃氏菌科等的相对丰度较大; 模型组大鼠肠道微生物中厚壁菌门、瘤胃球菌属 1、放线菌门和假纤细芽胞杆菌属等的相对丰度较大; 而金藤清痹颗粒 6.30 g/kg 组大鼠肠道微生物中 k_Bacteria、g_Clostridium_sensu_stricto_1、梭菌科 1 和 Sulfurospirillaceae 等的相对丰度较大。

3.8 肠道菌群功能预测分析

使用 PICRUSt 软件通过比对 16S 测序数据获得的物种组成信息, 预测肠道菌群功能, Heatmap 分析结果见图 9。与模型比较, 金藤清痹颗粒 6.30 g/kg 组共发现 39 种差异功能通路。其中金藤清痹颗粒 6.30 g/kg 组干预后氨基酸代谢、细胞运动性、信号传导和膜转运等功能通路相对丰度上调; 而遗传信息处理、免疫系统、免疫系统疾病和传染性疾病等功能通路相对丰度下调, 表明金藤清痹颗粒可能通过调控这些功能通路发挥抗类风湿性关节炎作用。

4 讨论

中医古籍中并无类风湿性关节炎的记载, 中

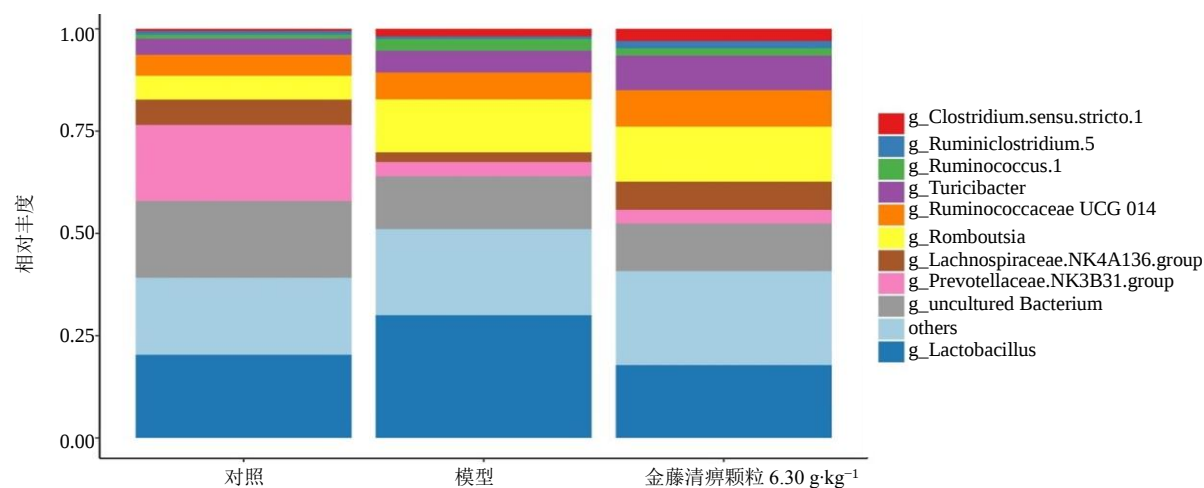


图 6 属水平上各组肠道菌群相对丰度

Fig. 6 Relative abundance of gut microbiota at genus level in each group

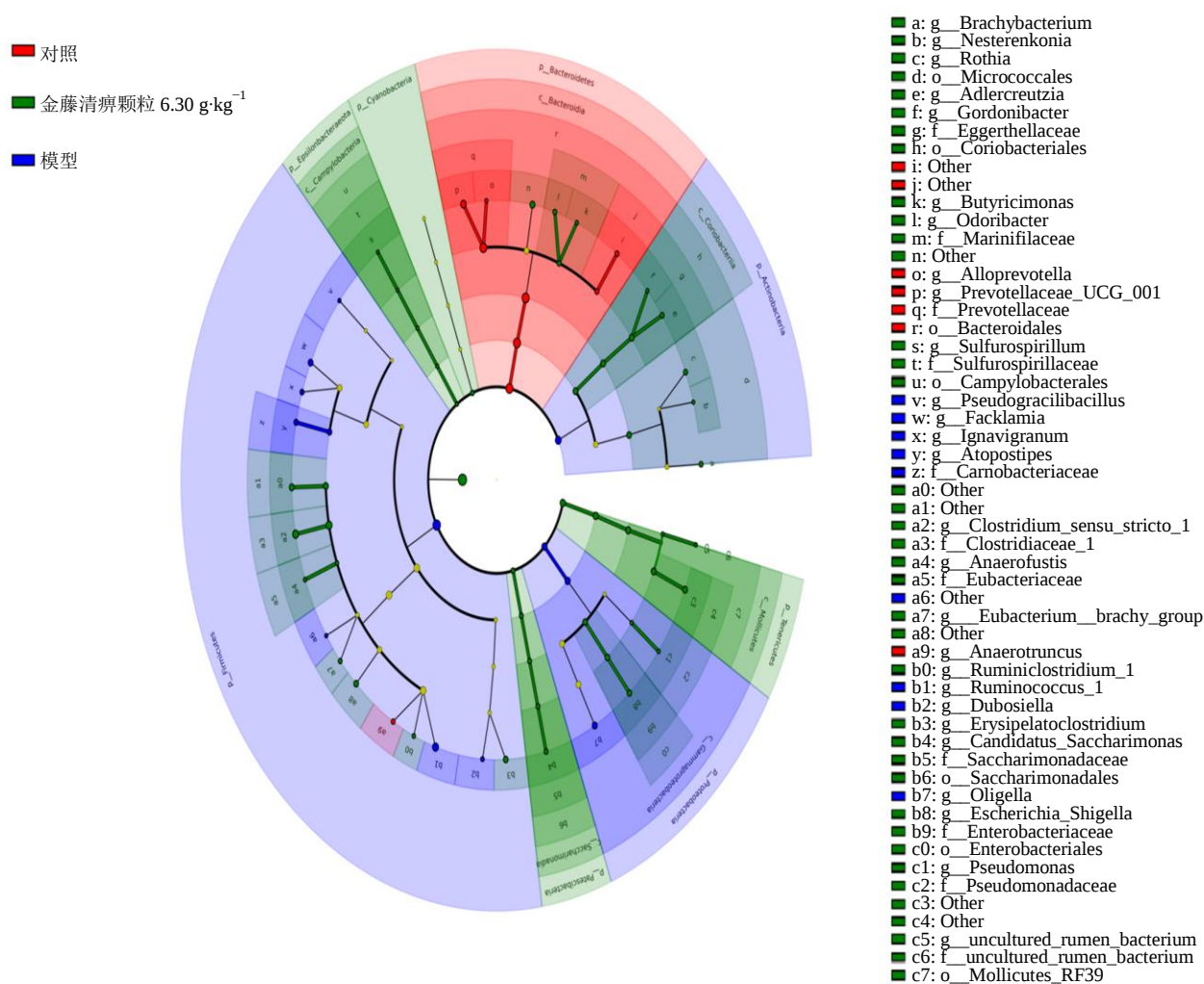


图 7 LefSe 多级物种差异进化分支图

Fig. 7 Branching diagram of multilevel differential evolution of LefSe species

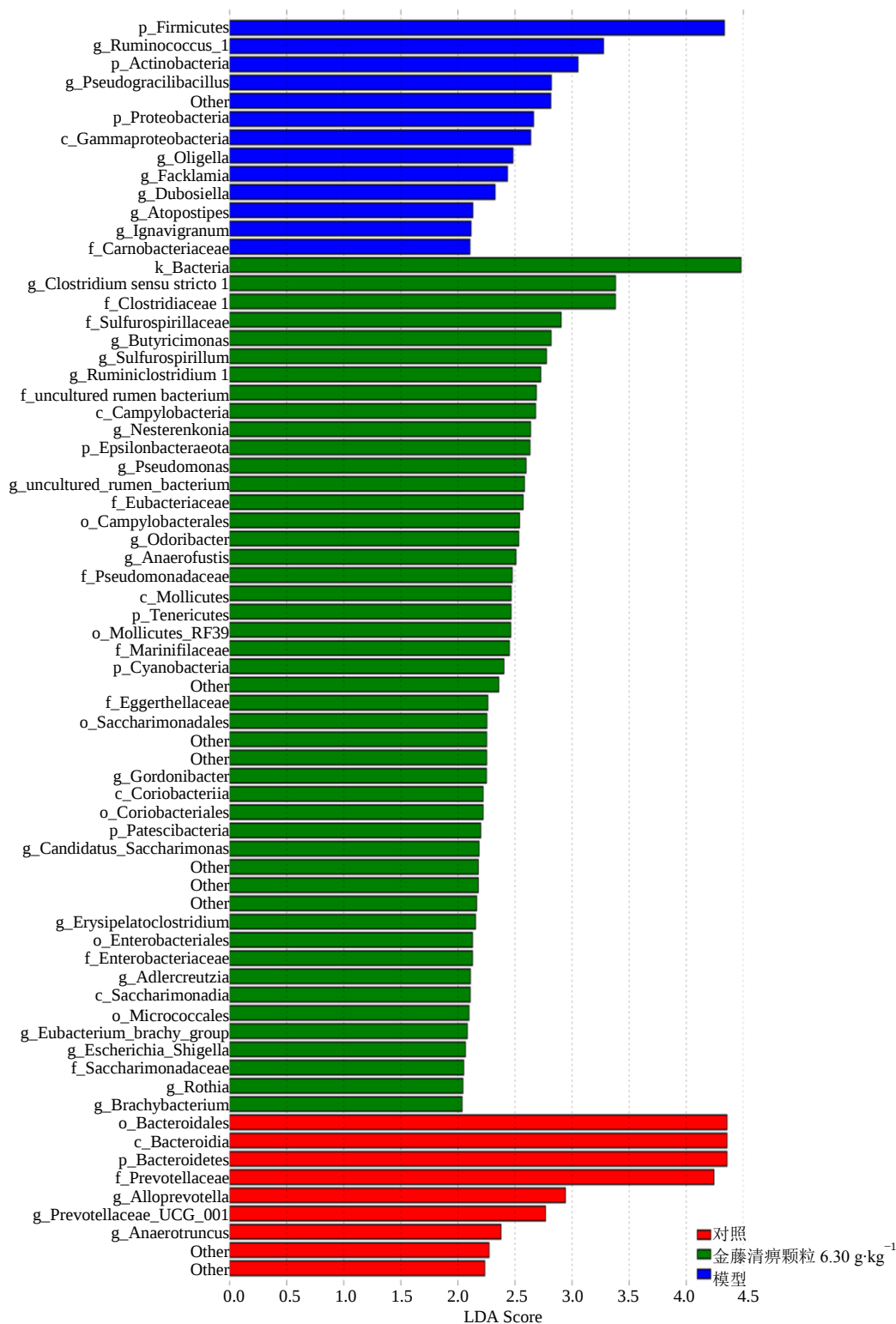


图 8 LEfSe 多级物种差异 LDA 值分布柱状图

Fig. 8 Histogram of LDA value distribution of LEfSe for multilevel species differences

医根据其临床特点常将其归属于“痹病”“痹症”“痹”等范畴^[20-21]。《素问·痹论》提出：“风寒湿三气杂至，合而为痹……风气胜者为行痹，寒气胜者为痛痹，湿气胜者为着痹”^[22]。清《临证指南医案》

指出：“痹者，闭而不通之谓也……皆由气血亏损，腠理疏松，风、寒、湿三气，得以乘虚外袭，留滞于内，致湿痰浊血，流注凝涩而得之”^[23]。可见，风、寒、湿 3 邪是诱发类风湿性关节炎的主要原因。

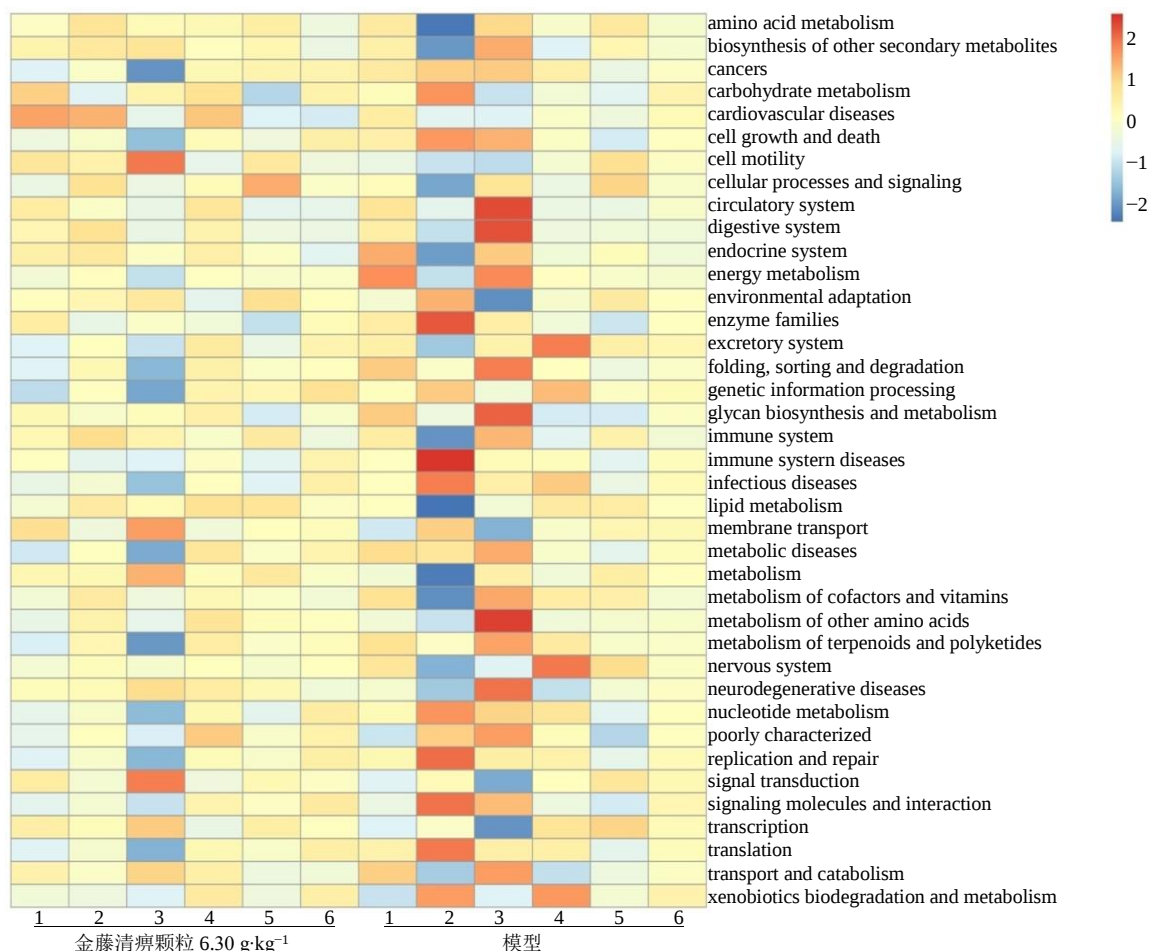


图 9 肠道菌群功能预测分析

Fig. 9 Functional prediction analysis of gut microbiota

目前临床中针对类风湿性关节炎的治疗多以内外兼治^[24], 内治包括脏腑辨证治疗、分期辨证治疗、分病位辨证治疗、特色民族疗法等, 外治包括针灸治疗、穴位贴敷治疗、穴位埋线等。如国医大师刘柏龄在“从血论治”的学术思想基础上, 结合“肾主骨”理论, 采用清热利湿、疏风活络法治疗类风湿性关节炎, 获得了较好疗效^[25]。张洁瑶等^[26]观察温阳活血法熏洗联合西药治疗类风湿性关节炎, 发现采用温阳活血法熏洗治疗类风湿性关节炎可更有效缓解病情, 并且在控制炎症指标 CRP 和血沉上与单纯西药组治疗无异。

本研究结果显示, 与对照组相比, 模型组大鼠踝关节红肿明显, 活动受限, 符合类风湿性关节炎临床特征, 表明胶原诱导型关节炎大鼠模型造模成功。金藤清痹颗粒可显著降低胶原诱导型关节炎大鼠关节肿胀度, 减少踝关节炎性细胞浸润, 同时可显著降低大鼠血清 TNF- α 、IL-1 β 、CRP 水平, 表明

金藤清痹颗粒具有较好的抗类风湿性关节炎药效。金藤清痹颗粒由金银花、清风藤、白芍、生地、白花蛇舌草、当归、鹿衔草、玄参、蜈蚣、生甘草组成。有研究显示, 金银花中的有效成分木犀草苷可通过激活血红素加氧酶 1 (HO-1), 抑制 I κ B 激酶 β /核因子- κ B (IKK β /NF- κ B) 信号通路, 从而抑制类风湿性关节炎中滑膜细胞增殖和炎症反应^[27]。清风藤中的有效成分青藤碱具有较好的抗炎、免疫抑制等作用, 目前已有多种青藤藤相关产品用于临床一线治疗类风湿性关节炎^[28]。符译尹等^[29]发现白芍水煎液可增强类风湿性关节炎患者免疫调节功能, 其机制可能与下调 NF- κ B 信号通路有关。唐今扬等^[30]在探讨金藤清痹颗粒治疗类风湿性关节炎的作用机制时, 发现金藤清痹颗粒可通过抑制大鼠炎症反应、血管生成和骨保护素/核因子- κ B 受体激活因子配体 (OPG/RANKL) 表达来发挥抗类风湿性关节炎疗效。可见, 金藤清痹颗粒可能通过处方中多组分、

多途径发挥治疗类风湿性关节炎作用。

近年来,越来越多的证据表明肠道菌群与类风湿性关节炎具有密切关系^[31-32]。陈梦妮^[33]通过 16S rRNA 基因测序对类风湿性关节炎患者与健康人群的肠道菌群组成进行了比较,发现类风湿性关节炎患者肠道中厚壁菌门中的梭菌目、梭菌纲、瘤胃科的相对丰度显著增加。鉴于肠道菌群在类风湿性关节炎中的重要作用,本研究采用 16S rDNA 测序来探讨金藤清痹颗粒发挥抗类风湿性关节炎作用是否与调节肠道菌群有关。结果显示,金藤清痹颗粒可能通过增加 *Cyanobacteria*、软壁菌门、疣微菌门、梭杆菌门、毛螺菌科 NK4A136 群和 *Ruminiclostridium* 5 等菌群的相对丰度,以及降低变形菌门、乳杆菌属和瘤胃球菌属 1 等菌群的相对丰度,来发挥抗类风湿性关节炎药效。值得注意的是,本研究中某些特定肠道菌群组成的变化也在其它类风湿性关节炎研究中得到了证实^[34-35]。如新发现且未经治疗的类风湿性关节炎与毛螺菌科比例不足有关,而毛螺菌科是主要的产丁酸菌^[34]。这些发现表明丁酸生成菌及微生物来源的丁酸盐可能在类风湿性关节炎的发展中发挥了至关重要的作用。此外,与健康对照者相比,类风湿性关节炎患者的肠道菌群中变形菌门的相对丰度显著升高^[35]。且富含抗性淀粉的高纤维饮食(RS-HFD)可通过增加毛螺菌科 NK4A136 群和拟杆菌目 S24-7 群这 2 个属的相对丰度缓解小鼠中胶原诱导的关节炎^[36]。另 1 个研究发现,羟基积雪草苷不仅可以增加胶原诱导型关节炎大鼠中毛螺菌科、粪杆菌属和丁酸球菌等的相对丰度,而且升高了盲肠内容物中乙酸和丁酸含量。随后,这些改变的肠道菌群和代谢物诱导了小肠中调节性 T (Treg) 细胞的产生,从而发挥抗关节炎作用^[37]。这些发现与本研究的研究结果是一致的。

综上所述,本研究结合肠道菌群初步探讨了金藤清痹颗粒治疗类风湿性关节炎的可能机制,为金藤清痹颗粒治疗类风湿性关节炎后期深入研究提供依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Huang J, Fu X, Chen X, *et al.* Promising therapeutic targets for treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 686155.
- [2] Szekanecz Z, Koch A E, Tak P P. Chemokine and

chemokine receptor blockade in arthritis, A prototype of immune-mediated inflammatory diseases [J]. *Neth J Med*, 2011, 69(9): 356-366.

- [3] Firestein G S. Evolving concepts of rheumatoid arthritis [J]. *Nature*, 2003, 423(6937): 356-361.
- [4] Ngo S T, Steyn F J, McCombe P A. Gender differences in autoimmune disease [J]. *Front Neuroendocrinol*, 2014, 35(3): 347-369.
- [5] Aletaha D, Smolen J S. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis: A review [J]. *JAMA*, 2018, 320(13): 1360-1372.
- [6] Sokka T, Kautiainen H, Möttönen T, *et al.* Work disability in rheumatoid arthritis 10 years after the diagnosis [J]. *J Rheumatol*, 1999, 26(8): 1681-1685.
- [7] Deane K D, Holers V M. The natural history of rheumatoid arthritis [J]. *Clin Ther*, 2019, 41(7): 1256-1269.
- [8] Lin Y J, Anzaghe M, Schülke S. Update on the pathomechanism, diagnosis, and treatment options for rheumatoid arthritis [J]. *Cells*, 2020, 9(4): 880.
- [9] Smolen J S, Aletaha D, McInnes I B. Rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2016, 388(10055): 2023-2038.
- [10] Crofford L J. Use of NSAIDs in treating patients with arthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2013, 15(Suppl 3): S2.
- [11] Littlejohn E A, Monrad S U. Early diagnosis and treatment of rheumatoid arthritis [J]. *Prim Care*, 2018, 45(2): 237-255.
- [12] Beasley J. Osteoarthritis and rheumatoid arthritis: Conservative therapeutic management [J]. *J Hand Ther*, 2012, 25(2): 163-171.
- [13] Wasserman A M. Diagnosis and management of rheumatoid arthritis [J]. *Am Fam Physician*, 2011, 84(11): 1245-1252.
- [14] van Ede A E, Laan R F, Rood M J, *et al.* Effect of folic or folinic acid supplementation on the toxicity and efficacy of methotrexate in rheumatoid arthritis: A forty-eight week, multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled study [J]. *Arthritis Rheum*, 2001, 44(7): 1515-1524.
- [15] 郑新春. 金藤清痹颗粒治疗类风湿关节炎(毒热内蕴、湿瘀阻络证)临床研究 [D]. 武汉: 湖北中医学院, 2004.
- [16] 郑新春, 杨德才. 金藤清痹颗粒治疗类风湿关节炎疗效观察 [J]. 湖北中医杂志, 2013, 35(3): 15-16.
- [17] 叶敏, 万军, 王李俊, 等. 中药通过调节肠道菌群治疗类风湿性关节炎的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(22): 7279-7284.
- [18] 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.

- [19] 肖素芸, 罗才琴, 吕冬, 等. 三乌胶提取物水凝胶的制备及其对类风湿性关节炎治疗作用研究 [J]. 中草药, 2022, 53(13): 3929-3939.
- [20] 李露, 许霞, 赵黎, 等. 中医药治疗类风湿性关节炎的研究进展 [J]. 风湿病与关节炎, 2022, 11(4): 77-80.
- [21] 魏美娟, 李琴. 类风湿关节炎辨证分型及客观化研究进展 [J]. 中国民族民间医药, 2022, 31(7): 76-79.
- [22] 陆清怡. 汉防己甲素通过调节中性粒细胞活性治疗类风湿性关节炎的机制研究 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2020.
- [23] 庞宇舟, 罗志洪, 汤倩倩, 等. 类风湿性关节炎中医病机证素—“致痹因子”初探 [J]. 中医杂志, 2018, 59(5): 390-393.
- [24] 曹晔文. 湿热型类风湿性关节炎患者肠道微生态特点及清热活血法对其影响初探 [D]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [25] 李海, 刘玉欢, 赵文海. 国医大师刘柏龄治疗类风湿性关节炎经验 [J]. 中华中医药杂志, 2021, 36(7): 4002-4004.
- [26] 张洁瑶, 韩寒, 罗晓光. 温阳活血法熏洗治疗寒湿痹阻型类风湿性关节炎临床观察 [J]. 光明中医, 2022, 37(14): 2559-2561.
- [27] 管印. 金银花复方治疗活动期 RA 湿热瘀阻证临床观察及单体 GALU 对 FLS 影响的研究 [D]. 南京: 南京中医药大学, 2021.
- [28] 王玺, 张智勇, 仇萍, 等. 青风藤、青藤碱及其相关制剂的研究进展 [J]. 中国药学杂志, 2021, 56(2): 85-93.
- [29] 符译尹, 蒲梅婷, 潘田芬, 等. 白芍水煎液对类风湿性关节炎患者的临床疗效 [J]. 中成药, 2021, 43(12): 3346-3350.
- [30] 唐今扬, 周彩云, 王鑫, 等. 金藤清痹颗粒治疗类风湿性关节炎模型大鼠的作用机制研究 [J]. 北京中医药, 2022, 41(7): 728-732.
- [31] Kishikawa T, Maeda Y, Nii T, *et al.* Metagenome-wide association study of gut microbiome revealed novel aetiology of rheumatoid arthritis in the Japanese population [J]. *Ann Rheum Dis*, 2020, 79(1): 103-111.
- [32] Zhao Y, Cheng M, Zou L, *et al.* Hidden link in gut-joint axis: Gut microbes promote rheumatoid arthritis at early stage by enhancing ascorbate degradation [J]. *Gut*, 2022, 71(5): 1041-1043.
- [33] 陈梦妮. 类风湿关节炎患者与健康人肠道菌群的比较研究 [D]. 遵义: 遵义医科大学, 2019.
- [34] Takahashi D, Hoshina N, Kabumoto Y, *et al.* Microbiota-derived butyrate limits the autoimmune response by promoting the differentiation of follicular regulatory T cells [J]. *EBioMedicine*, 2020, 58: 102913.
- [35] Chen Y, Ma C, Liu L, *et al.* Analysis of gut microbiota and metabolites in patients with rheumatoid arthritis and identification of potential biomarkers [J]. *Aging* (Albany NY), 2021, 13(20): 23689-23701.
- [36] Bai Y, Li Y, Marion T, *et al.* Resistant starch intake alleviates collagen-induced arthritis in mice by modulating gut microbiota and promoting concomitant propionate production [J]. *J Autoimmun*, 2021, 116: 102564.
- [37] Qiao S, Lian X, Yue M, *et al.* Regulation of gut microbiota substantially contributes to the induction of intestinal Treg cells and consequent anti-arthritis effect of madecassoside [J]. *Int Immunopharmacol*, 2020, 89: 107047.

[责任编辑 高源]