

基于“肠-关节”轴探究肠道菌群与类风湿关节炎的因果关系及潜在干预中药预测

王怡文^{1,2}, 王思维^{1,2}, 卫博文^{1,2}, 王文^{1,2}, 金玥^{1,2*}, 刘维^{1,2*}

1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300381

2. 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300381

摘要: 目的 采用孟德尔随机化 (Mendelian randomization, MR) 方法评估肠道菌群与类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 之间的因果关系, 并预测能够通过调控肠道菌群治疗 RA 的潜在有效中药。方法 获取 RA 与肠道菌群全基因组关联研究数据 (genome-wide association study, GWAS)。使用 R 语言进行 MR 分析, 采用逆方差加权法 (inverse variance weighted, IVW) 探究肠道微生物群与 RA 之间的潜在因果关联, 通过实施敏感性分析来评估分析结果的稳健性和可靠性。对工具变量对应的邻近基因进行基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 富集分析, 探索可能涉及 RA 发病机制的相关通路。通过 Coremine 数据库、TCMSP 数据库预测对“肠-关节”轴存在潜在治疗作用的中药, 统计性味归经及有效成分。结果 MR 分析发现肠道菌群多尔氏菌属 *Dorea* (OR=0.852, 95% CI: 0.744~0.975, $P=0.020$); 副血链球菌 *Streptococcus parasanguinis* (OR=0.918, 95% CI: 0.847~0.995, $P=0.037$); 韦荣球菌属 *Veillonella_unclassified* (OR=0.926, 95% CI: 0.869~0.987, $P=0.018$); 毛螺菌科 (Lachnospiraceae) 细菌 5_1_63FAA (OR=1.070, 95% CI: 1.006~1.138, $P=0.031$) 与 RA 患病风险存在显著因果关系。主要通过病毒蛋白与细胞因子受体的相互作用、钙信号通路及自然杀伤细胞介导的细胞毒性通路干预 RA。根据临近基因筛选出 95 味中药, 四气主要以寒为主, 温、平次之; 五味以苦为主, 甘、辛次之; 归经以肝经为主, 肺经、脾经次之; 功效以清热药为主, 补虚药、活血化瘀药次之。出现频次较高的有效成分为 β -谷甾醇 (β -sitosterol)、槲皮素 (quercetin)、山柰酚 (kaempferol)、豆甾醇 (stigmasterol)。结论 通过 MR 分析发现多尔氏菌属、副血链球菌及韦荣球菌属 *Veillonella_unclassified* 与 RA 发病呈负相关, 毛螺菌科细菌 5_1_63FAA 可增加 RA 发病风险, 富集分析得到了肠道菌作用于 RA 的生物过程及信号通路, 升麻、白花蛇舌草、苍耳子、高良姜等中药可以通过改善肠道微生物群治疗 RA, 其中 β -谷甾醇、槲皮素等有效成分具有治疗潜力。这些发现为从“肠-关节”轴视角探索 RA 的中医药防治提供参考, 对 RA 的达标治疗及药物研发提供新思路。

关键词: 类风湿关节炎; 肠道菌群; 孟德尔随机化; 升麻; 白花蛇舌草; 苍耳子; 高良姜

中图分类号: Q811.4; R285 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2025)02-0585-13

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2025.02.021

Exploration of causal relationship between gut microbiota and rheumatoid arthritis based on “gut-joint” axis and prediction of potential intervention of traditional Chinese medicine

WANG Yiwen^{1,2}, WANG Siwei^{1,2}, WEI Bowen^{1,2}, WANG Wen^{1,2}, JIN Yue^{1,2}, LIU Wei^{1,2}

1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China

2. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300381, China

Abstract: Objective To evaluate the causal relationship between gut microbiota (GM) and rheumatoid arthritis (RA) using

收稿日期: 2024-08-11

基金项目: 中医药传承与创新“百千万”人才工程 (岐黄工程) 岐黄学者 (20210602-1); 国家中医药管理局名老中医传承工作室 (975022); 国家自然科学基金青年项目“从肠道微生态失衡探讨寒湿外邪加重类风湿关节炎的病理机制” (81704000); 中国科学技术协会青年人才托举工程 (YESS20210352)

作者简介: 王怡文 (1998—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中医内科风湿免疫。E-mail: wangyiwen9810@163.com

***通信作者:** 金玥 (1992—), 硕士, 主治医师, 研究方向为中西医结合治疗风湿免疫病。E-mail: 18002012581@163.com

刘维 (1962—), 女, 博士, 主任医师, 研究方向为中医内科风湿免疫。E-mail: fengshiliuwei@163.com

Mendelian randomization (MR), and predict potential effective traditional Chinese medicines (TCMs) that can regulate gut microbiota to treat RA. **Methods** The genome-wide association study (GWAS) between RA and GM were obtained. MR analysis was conducted using R language, the potential causal relationship between RA and GM was explored using inverse variance weighting (IVW) method. Sensitivity analysis was conducted to evaluate the robustness and reliability of the analysis results. Gene ontology (GO) and Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrichment were performed on the analysis on adjacent genes corresponding to instrumental variables to explore potential pathways involved in the pathogenesis of RA. Coremine database and TCMSP database were used to predict potential therapeutic effects of TCMs, statistical flavor meridian analysis, and active ingredients on the “gut joint” axis. **Results** MR analysis found *Dorea* (OR=0.852, 95% CI: 0.744 to 0.975, $P=0.020$); *Streptococcus parasanguinis* (OR=0.918, 95% CI: 0.847 to 0.995, $P=0.037$); *Veillonella*_ unclassified (OR=0.926, 95% CI: 0.869 to 0.987, $P=0.018$); Lachnospiraceae bacterium 5_1_63FAA (OR=1.070, 95% CI: 1.006 to 1.138, $P=0.031$) had a significant causal relationship with the risk of RA disease. RA was mainly intervened through the interaction of viral protein interaction with cytokine receptor, calcium signaling pathway and natural killer cell mediated cytotoxicity. A total of 95 TCMs were screened according to the proximate genes, and the four *qi* were cold, followed by warmth and flatness; the five flavors were mainly bitter, followed by sweetness and pungency; the attributed meridians were liver meridian, followed by lung meridian and spleen meridian; and the efficacies were mainly heat-removing drugs, followed by deficiency-tonifying drugs and drugs to activate blood circulation and remove blood stasis. The active ingredients with high frequently were β -sitosterol, quercetin, kaempferol, and stigmasterol. **Conclusion** Through MR analysis, it was found that *Dorea*, *Streptococcus parasanguinis*, and *Veillonella* unclassified were protective factors for the onset of RA, while Lachnospiraceae bacteria 5_1_63FAA can increase the risk of RA. Enrichment analysis revealed the biological processes and signaling pathways of gut bacteria acting on RA. TCMs such as Shengma (*Cimicifugae Rhizoma*), Baihua Sheshecao (*Hedyotis diffusa*), Cangerzi (*Xanthii Fructus*), and Gaoliangjiang (*Alpiniae Officinarum Rhizoma*) can treat RA by improving the GM, with active ingredients such as β -sitosterol and quercetin having therapeutic potential. These findings provide reference for exploring the TCMs prevention and treatment of RA from the perspective of the “gut joint” axis, and provide new ideas for the standardized treatment and drug development of RA. **Key words:** rheumatoid arthritis; gut microbiota; Mendelian randomization; *Cimicifugae Rhizoma*; *Hedyotis diffusa* Willd.; *Xanthii Fructus*; *Alpiniae Officinarum Rhizoma*

类风湿关节炎 (rheumatoid arthritis, RA) 是一种常见的全身炎症性自身免疫病, 主要症状为关节疼痛、肿胀、僵硬及功能丧失, 以滑膜增生、炎症细胞浸润及骨破坏为主要病理特征, 严重损害患者生活质量, 是我国肢体致残的主要原因之一^[1-3]。RA 的全球平均患病率为 0.5%~1.0%^[4], 据估计中国约有 500 万人患病^[5]。其致病因素不明, 发病机制复杂, 疾病晚期预后较差, 因此如何达标治疗一直是国内外研究的热点问题。目前临床上主要使用抗风湿药进行治疗, 但仍存在治疗不完善的情况^[6]。肠道菌群作为能够直接影响机体免疫反应的因素之一, 其在 RA 领域中的作用逐渐被挖掘^[7], 有研究表明罗伊氏乳杆菌 *Lactobacillus reuteri* 等益生菌可以改善 RA 症状, 可成为治疗的新靶点和新手段, “肠-关节” 轴为重要的潜在机制^[8-10]。

孟德尔随机化 (Mendelian randomization, MR) 是一种利用全基因组关联研究数据 (genome-wide association study, GWAS)、单核苷酸多态性 (single nucleotide polymorphism, SNP) 作为工具变量 (instrumental variable, IV) 来评估暴露因素与疾病

之间因果关系的方法^[11-12], 与传统观察性研究相比, 可以更好地控制混杂因素, 增加研究结果稳健性^[13-14]。已有研究发现生活环境、饮食习惯等因素与 RA 发病间存在因果关系, 某些肠道菌可能与 RA 之间存在因果关系, 但由于纳入病例较少, 存在较高的偏倚, 仍然缺乏探究 GM 与 RA 之间的联系的 MR 分析^[15-16]。

本研究旨在通过孟德尔随机化方法探讨肠道菌群与类风湿关节炎之间的关系, 并预测能通过“肠-关节”轴起到治疗作用的中药及其有效成分, 以期临床提供新的治疗思路与药物选择。

1 资料与方法

1.1 研究设计

本研究采取孟德尔随机化分析方法, 对肠道菌群与类风湿关节炎的因果关系进行研究。选择肠道菌群作为暴露因素, 与肠道菌群相关的 SNPs 作为 IV, RA 作为结果变量。满足 MR 三大假设^[13]: ① IV 与暴露因素 (肠道菌群) 密切相关; ② IV 与混杂因素无关; ③ SNPs 不直接影响结局, 仅通过肠道菌群影响结局。采用 Cochran's Q 检验评估异质性,

MR-Egger 检验水平多效性,“留一法”敏感性分析验证结果的稳定性。获得 SNPs 相邻基因,进行功

能、通路富集分析,并检索基因相关中药,对其基本信息及有效成分进行统计分析。研究流程见图 1。

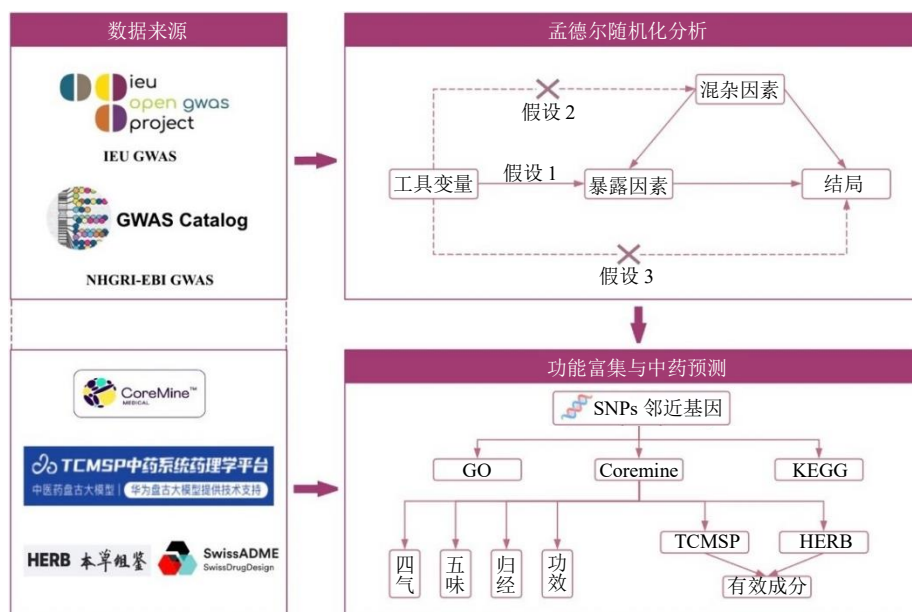


图 1 研究流程图

Fig. 1 Flow chart of study

1.2 数据来源

本研究通过 NHGRI-EBI GWAS 数据库 (<https://www.ebi.ac.uk/gwas/>) 获取肠道菌群的 GWAS; 通过 IEU GWAS 数据库 (<https://gwas.mrcieu.ac.uk/terms/>) 获取 RA 的 GWAS。肠道微生物的遗传数据 (ID: GCST90027446-GCST90027857) 来源于 Lopera-Maya 等^[17]发表于 2022 年的 1 项研究, 涉及 7 738 例参与者, 通过宏基因组测序与 16S 粪便微生物测序, 得到 207 个肠道微生物分类群 (5 门、10 纲、13 目、26 科、48 属和 105 种) 及 205 条遗传分析途径。RA 的 GWAS 数据 (ID: ebi-a-GCST90018910) 来源于 Sakaue 等^[18]发表于 2021 年的 1 项研究, 包含 417 256 个样本以及 24 175 266 个 SNPs。所有数据均来源于欧洲, 暴露人群与结局人群不存在人种差异。原始 GWAS 研究已得到相应机构伦理委员会批准, 本研究未使用个体水平数据, 不需要新的伦理委员会批准。

1.3 工具变量选择

为严格控制数据质量, 选择恰当的 IVs, 以确保满足相关性假设, 使结论具有准确性与真实性。首先, 筛选出与肠道菌群显著相关的 SNPs, 阈值设定为 $P < 1 \times 10^{-5}$ ^[19], 删去存在回文结构的 SNPs, 参数设置为 kb=10 000, $r^2=0.001$, 去除连锁不平衡的 SNPs^[20],

避免 IV 间的连锁不平衡 (linkage disequilibrium, LD) 的影响, 并记录相应的效应等位基因 (effect allele, EA)、非效应等位基因 (other allele, OA)、 β 值、标准误差 (standard error, SE) 值及 P 值, 计算 F 统计值评估 IV 与暴露因素的相关性, $F < 10$ 的 SNP 被认为相关性较差为弱工具变量, 需予以剔除^[21]。

1.4 MR 分析

将筛选后得到的 SNPs 作为 IV, 进行 MR 分析。逆方差加权法 (inverse variance weighted, IVW) 假设所有 SNP 都是有效的 IVs, 通过比较所有 SNP 的个体变异比率估计的加权平均值, 综合评估暴露因素与疾病之间的关联性^[22], 具有最准确的效应估计值^[23], 因此主要使用 IVW 来分析肠道菌群与 RA 之间的相关性。同时还使用了 MR Egger 回归法、加权中位数法 (weighted median estimator, WME)、简单模式法、加权众数法作为补充方法^[24]。MR Egger 回归法多用于检测和调整多效性^[25]。WME 法能够在大于 50% 的 IVs 无效的情况下, 提供正确的因果关系^[26]。简单模式法和加权众数法作为 MR 分析中的 2 种分析方式, 补充分析以提高结果可靠性。因此使用 IVW 作为主要分析方法, 当 IVW 的 $P < 0.05$ 时, 认为因果关系显著, 与其他 4 种方法获得的 P 值方向相同时, 考虑具有相对稳定的因果关系^[27]。

1.5 敏感性分析

MR Egger 截距试验用于确定是否存在水平多效性^[28], 以截距值 <0.05 、 $P>0.05$ 代表数据不存在水平多效性。Cochran's Q 用于检验异质性^[29], $P>0.05$ 代表数据不存在异质性。“留一法”用于评估结果是否具有稳健性, 确定每个 SNP 是否影响结局^[30]。

1.6 工具变量邻近基因功能富集分析

基于特定 SNP 的位置即其所在的染色体序列和位点, 来识别与之相邻的相关基因^[31]。为进一步探究邻近基因的潜在功能, 对邻近基因进行基因本体论 (gene ontology, GO) 分析和京都基因与基因组百科全书 (Kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 分析, 筛选出具有显著富集意义 (adjust $P<0.05$) 的 GO 和 KEGG 条目。GO 分析分为分子功能 (molecular function, MF)、生物过程 (biological process, BP)、细胞成分 (cellular component, CC) 3 类, 用于注释基因功能; KEGG 用于识别基因富集的途径。通过微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 对 GO 和 KEGG 结果进行可视化处理。

1.7 潜在干预中药预测与分析

将得到的邻近基因提交到 Coremine 数据库 (<https://coremine.com/medical/>), 检索调控邻近基因的中药, $P<0.05$ 为筛选标准。根据《中国药典》《中药大辞典》《中华本草》《中药学》统计纳入中药的四气五味及归经^[32]。通过 TCMSP 数据库 (<https://www.tcmsp-e.com/#/home>) 检索中药的活性成分, 以口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (drug-likeness, DL) $\geq 18\%$ 筛选活性成分; HERB 数据库 (<http://herb.ac.cn/>) 进行补充, SwissADME 数据库 (<http://www.swissadme.ch/>) 中检索有效成分, 筛选条件为同时满足 GI absorption 为 “high”, 类药性 (lipinski、Ghose、Veber、Egan、Muegge) “Yes” 结果至少多与 2 个。通过 Cytoscape (<https://cytoscape.org/>) 构建 “基因-中药-活性成分” 网络图。

1.8 统计学分析

本研究使用 R4.2.3 进行统计学分析, 使用 “TwoSampleMR” “ieugwasr” “gwasglue” 等 R 包进行 MR 分析, 使用 “vautils” “dplyr” 包提取工具变量的邻近基因。

2 结果

2.1 肠道菌群与 RA 的因果效应

将 412 个不同的肠道微生物群 (207 个分类群

和 205 个通路) 纳入研究后, 严格筛选 IV, 选择 RA 相应的 SNPs, 且 IV 的 F 检验值 >10 , 以消除弱工具变量, 最终筛选出 25 个 SNPs, 具体数据见表 1。

以 IVW 法为主要分析方法, 结果显示多尔氏菌属 *Dorea* (GCST90027711, OR=0.852, 95% CI: 0.744~0.975, $P=0.020$); 副血链球菌 *Streptococcus parasanguinis* (OR=0.918, 95% CI: 0.847~0.995, $P=0.037$); 韦荣球菌属 *Veillonella_unclassified* (OR=0.926, 95% CI: 0.869~0.987, $P=0.018$) 与 RA 发病呈负相关; 毛螺菌科 (Lachnospiraceae) 细菌 5_1_63FAA (OR=1.070, 95% CI: 1.006~1.138, $P=0.031$) 是 RA 发病的危险因素。具体数据见表 2, 结果见图 2。

2.2 敏感性分析

ME-Egger 回归法与 Cochran's Q 异质性检验结果表明, MR 分析结果不存在水平多效性和异质性 ($P>0.05$), 具体数据见表 3。“留一法”逐一剔除 SNP 后, 分析结果未发生变化, 表明研究结果具有稳健性, 具体数据见图 3。

2.3 工具变量邻近基因的 GO、KEGG 功能富集分析

对 SNP 邻近基因进行功能和通路富集分析。GO 分析结果见图 4-A, BP 主要涉及肿瘤坏死因子相关凋亡诱导配体 (tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand, TRAIL) 激活的凋亡信号通路 (TRAIL-activated apoptotic signaling pathway)、核因子- κ B (nuclear factor- κ B, NF- κ B) 诱导激酶活性的激活 (activation of NF- κ B-inducing kinase activity extrinsic apoptotic signaling pathway) 以及通过死亡结构域受体的外源性凋亡信号通路 (negative regulation of extrinsic apoptotic signaling pathway via death domain receptors) 等; CC 主要涉及细胞投影的肌动蛋白基础簇 (cluster of actin-based cell projections) 等; MF 主要涉及细胞内配体门控离子通道活性 (intracellular ligand-gated ion channel activity) 等。KEGG 分析结果见图 4-B, 主要富集到病毒蛋白与细胞因子及细胞因子受体的相互作用 (viral protein interaction with cytokine and cytokine receptor)、钙信号通路 (calcium signaling pathway) 及自然杀伤细胞介导的细胞毒性 (natural killer cell mediated cytotoxicity) 等。

2.4 潜在中药预测分析

使用 Coremine Medical 数据库, 对 SNP 邻近基因相关中药进行筛选, 共得到 95 味中药 ($P<0.05$),

表 1 工具变量信息

Table 1 Information on instrumental variables

肠道菌群	SNPs	EA	OA	β 值	SE	P	F
GCST90027711	rs12541342	G	A	0.093	0.021	7.03×10^{-6}	20.180
	rs404634	C	T	-0.104	0.020	9.76×10^{-8}	28.414
	rs56398621	T	C	0.103	0.023	9.19×10^{-6}	19.669
	rs74448283	T	C	-0.136	0.029	3.99×10^{-6}	21.266
	rs7479452	G	A	-0.088	0.020	7.62×10^{-6}	20.026
	rs9560166	A	G	-0.080	0.017	3.84×10^{-6}	21.339
GCST90027783	rs117329402	T	G	-0.355	0.076	3.16×10^{-6}	21.711
	rs1893286	G	T	-0.208	0.046	4.75×10^{-6}	20.931
	rs6481791	C	T	-0.239	0.050	2.14×10^{-6}	22.463
GCST90027808	rs11102545	G	A	0.145	0.032	4.24×10^{-6}	21.148
	rs72743290	T	C	0.241	0.052	3.23×10^{-6}	21.669
	rs3000812	G	A	0.155	0.034	4.65×10^{-6}	20.969
	rs6548355	G	A	0.135	0.030	9.09×10^{-6}	19.689
	rs6601127	T	G	-0.136	0.030	4.00×10^{-6}	21.258
	rs325705	A	G	-0.140	0.031	8.32×10^{-6}	19.857
	rs8017450	T	G	0.262	0.058	7.39×10^{-6}	20.086
	rs9797071	A	T	0.136	0.030	4.48×10^{-6}	21.041
	rs62111248	A	G	0.232	0.050	3.88×10^{-6}	21.316
	rs12978412	T	C	0.141	0.031	4.88×10^{-6}	20.880
	rs7274039	T	C	-0.266	0.056	2.31×10^{-6}	22.309
	rs12047309	A	G	-0.358	0.081	9.63×10^{-6}	19.579
	rs3935551	G	A	-0.216	0.046	2.90×10^{-6}	21.875
	rs10785016	T	G	-0.197	0.044	8.92×10^{-6}	19.726
GCST90027851	rs17661696	G	A	-0.249	0.056	8.69×10^{-6}	19.775
	rs147524453	G	A	0.313	0.069	5.95×10^{-6}	20.500

表 2 肠道菌群与类风湿关节炎 MR 分析结果

Table 2 MR analysis results of gut microbiota and rheumatoid arthritis

菌属 ID	SNP 数量	方法	β 值	SE	OR (95% CI)	P
GCST90027711	6	MR Egger	-0.590	0.465	0.554 (0.223~1.380)	0.274
		加权中位数	-0.093	0.084	0.911 (0.773~1.073)	0.265
		逆方差加权	-0.160	0.069	0.852 (0.744~0.975)	0.020
		简单模式	-0.087	0.114	0.916 (0.733~1.146)	0.479
		加权众数	-0.081	0.121	0.923 (0.727~1.170)	0.536
GCST90027783	3	MR Egger	-0.176	0.206	0.839 (0.561~1.255)	0.550
		加权中位数	-0.093	0.053	0.911 (0.821~1.012)	0.082
		逆方差加权	-0.085	0.041	0.918 (0.847~0.995)	0.037
		简单模式	-0.113	0.060	0.893 (0.794~1.005)	0.201
		加权众数	-0.110	0.062	0.896 (0.794~1.011)	0.216
GCST90027808	11	MR Egger	-0.053	0.133	0.948 (0.730~1.232)	0.701
		加权中位数	-0.114	0.043	0.893 (0.821~0.970)	0.008
		逆方差加权	-0.077	0.033	0.926 (0.869~0.987)	0.018
		简单模式	-0.127	0.062	0.880 (0.779~0.995)	0.071
		加权众数	-0.126	0.064	0.881 (0.777~1.000)	0.081
GCST90027851	5	MR Egger	0.058	0.163	1.060 (0.770~1.460)	0.744
		加权中位数	0.069	0.037	1.072 (0.996~1.153)	0.064
		逆方差加权	0.068	0.031	1.070 (1.006~1.138)	0.031
		简单模式	0.072	0.048	1.075 (0.979~1.180)	0.202
		加权众数	0.071	0.049	1.074 (0.975~1.182)	0.220

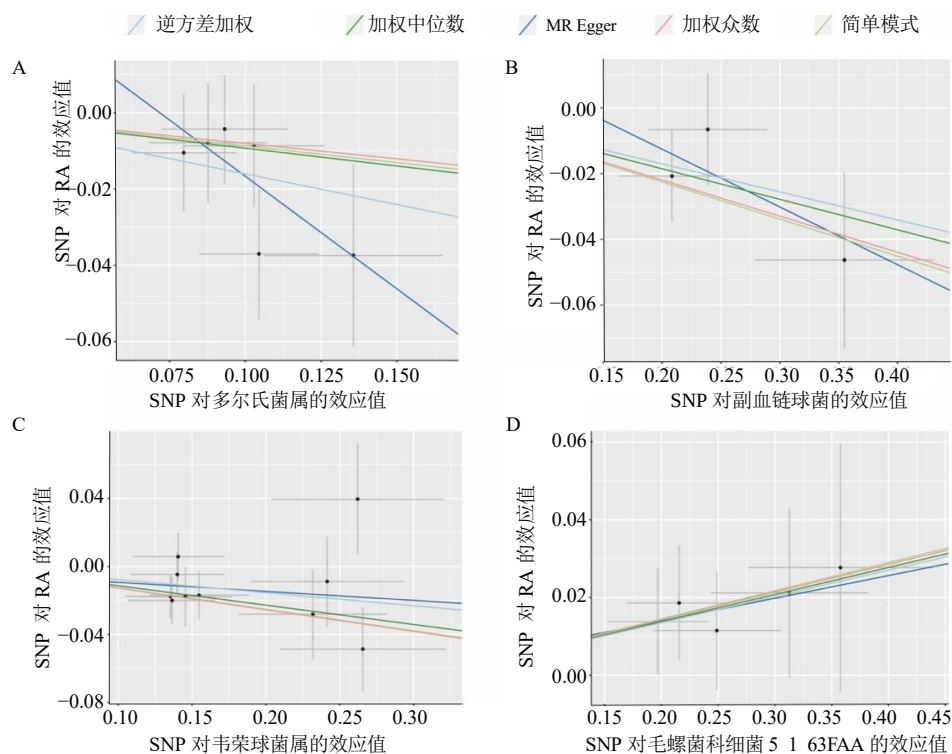


图 2 肠道菌群多尔氏菌属 (A)、副血链球菌 (B)、韦荣球菌属 (C)、毛螺菌科细菌 5_1_63FAA (D) 与类风湿关节炎的散点图

Fig. 2 Scatter plots of gut microbiota *Dorea* (A), *Streptococcus parasanguinis* (B), *Veillonella_unclassified* (C), *Lachnospiraceae bacterium 5_1_63FAA* (D) and rheumatoid arthritis

表 3 敏感性分析结果

Table 3 Results of sensitivity analysis

菌群 ID	方法	ME-Egger		Cochran's Q 异质性检验	
		截距值	P 值	Q 值	P 值
GCST90027711	IVW	0.042	0.403	2.797	0.731
GCST90027783	IVW	0.022	0.732	1.057	0.590
GCST90027808	IVW	-0.004	0.858	7.606	0.574
GCST90027851	IVW	0.002	0.958	0.210	0.995

其中出现频次较高的药物有升麻、白花蛇舌草、苍耳子、高良姜等。对 95 味中药进行四气五味、归经及功效统计分析, 结果显示, 预测中药的四气以寒为主, 温、平次之; 五味以苦为主, 甘、辛次之; 归经以肝经为主, 肺经、脾经次之; 功效以清热药为主, 补虚药、活血化瘀药次之, 如图 5-A~D 所示。通过 TCMSP 数据库和 HERB 数据库, 对基因进行有效成分检索, 得到 898 种有效成分, 其中出现频次较高的代表成分为 β -谷甾醇 (β -sitosterol)、槲皮素 (quercetin)、山柰酚 (kaempferol)、豆甾醇 (stigmaterol) 等, 使用 Cytoscape 软件构建“基因-中药-有效成分”网络, 如图 6 所示。

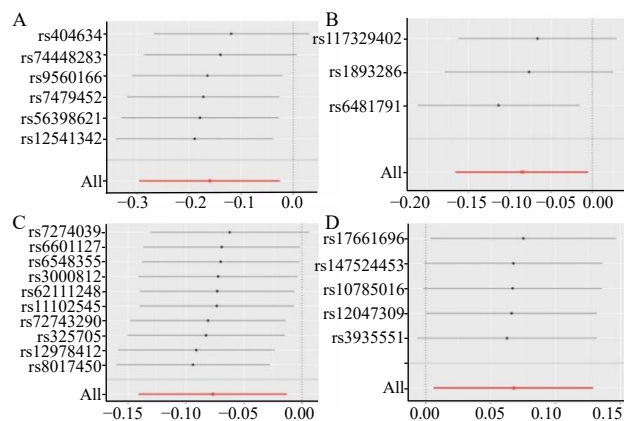


图 3 肠道菌群多尔氏菌属 (A)、副血链球菌 (B)、韦荣球菌属 (C)、毛螺菌科细菌 5_1_63FAA (D) 对类风湿关节炎的留一法敏感性分析

Fig. 3 Sensitivity analysis of gut microbiota *Dorea* (A), *Streptococcus parasanguinis* (B), *Veillonella_unclassified* (C), *Lachnospiraceae bacterium 5_1_63FAA* (D) on rheumatoid arthritis using leave-one-out method

3 讨论

RA 是最常见的自身免疫性炎性关节炎, 其复杂的免疫机制尚不明确^[33]。有多项研究表明, 肠道

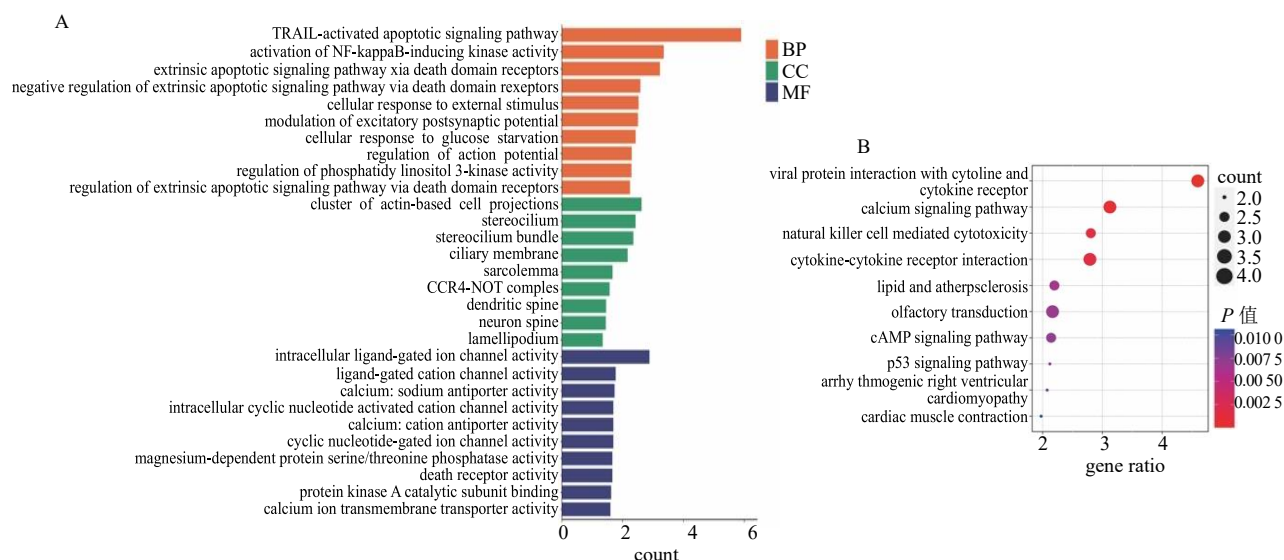


图 4 GO (A)、KEGG (B) 富集分析
Fig. 4 GO (A) and KEGG (B) enrichment analysis

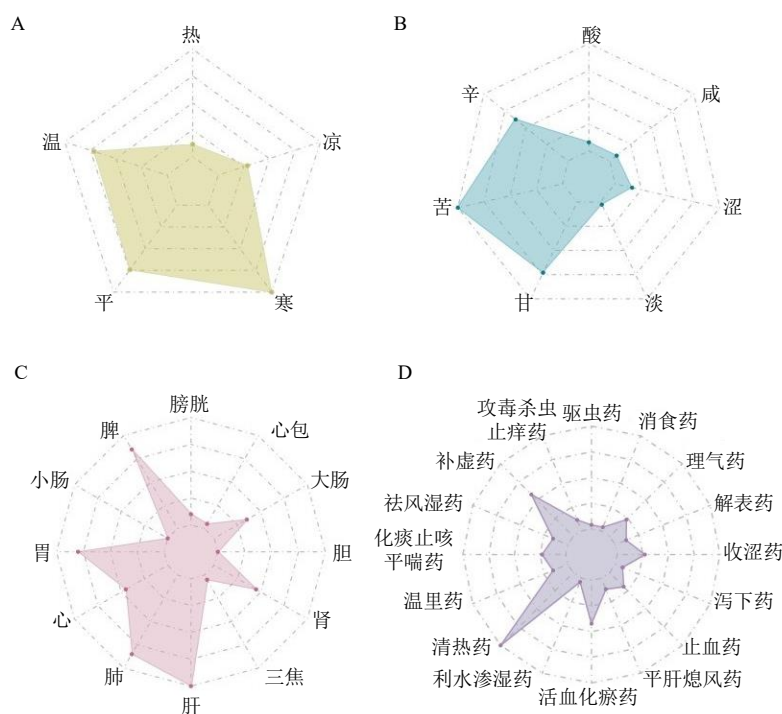


图 5 预测中药的四气 (A)、五味 (B)、归经 (C)、功效 (D) 统计雷达图

Fig. 5 Statistical radar map for four *qi* (A), five flavours (B), meridian tropism (C) and efficacy (D) of prediction traditional Chinese medicine

菌群在宿主免疫系统的启动、维持和运行中起着关键作用，菌群及其代谢产物失调在 RA 的发生及发展中发挥作用^[34-35]。肠道菌群与 RA 的关系已成为近 10 年的热门研究课题，肠道菌群在 RA 的预防和治疗中发挥作用的具体机制仍然是目前医学

界积极钻研的课题^[36-39]。目前，此类研究报道相对有限，迫切需要进行更高质量的研究以探求明确两者之间存在的关联，故本研究采用 MR 分析评估肠道菌群与 RA 之间的因果关系，对相关邻近基因进行功能及通路富集，并使用公共数据库

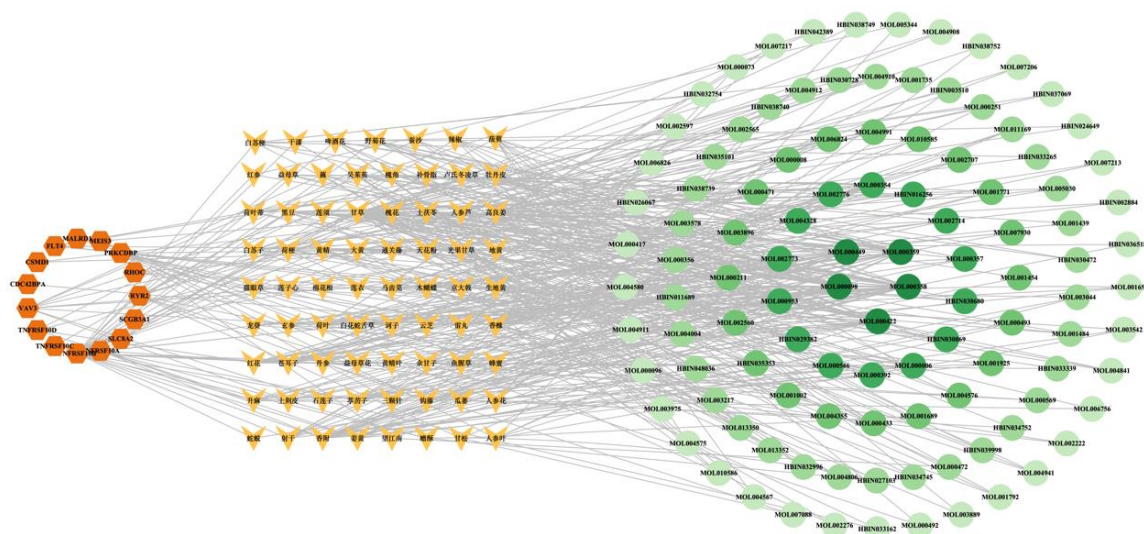


图 6 “基因-中药-有效成分”网络图

Fig. 6 Network diagram of “gene-traditional Chinese medicine-effective ingredient”

找到通过“肠-关节”轴靶向治疗的中药及其有效成分。研究发现，多尔氏菌属、副血链球菌及韦荣氏球菌属 *Veillonella_unclassified* 与 RA 的患病风险存在负向因果关系；毛螺菌科细菌 5_1_63FAA 与 RA 的患病风险存在正向因果关系。

多尔氏菌属属于厚壁菌门毛螺菌科^[40]，可以通过调节肠道屏障功能和炎症反应参与宿主免疫反应的调节，有研究^[41-44]指出多尔氏菌属与饮食相关，在溃疡性结肠炎、2 型糖尿病及肾结石等多种疾病中丰度存在显著变化，多尔氏菌属参与肠道中多种代谢过程，如发酵碳水化合物及产生短链脂肪酸（short chain fatty acids, SCFAs）等^[45]。SCFAs 是调节肠道健康的关节代谢物，在维持骨稳态、减少调节性 T 细胞（regulatory T cell, Treg）接收促炎信号及抑制破骨细胞活性等方面发挥重要作用^[46]。多尔氏菌属可能通过调节 SCFAs 改善 RA 症状，但其与 RA 的关系还需要基础实验进行进一步验证。副血链球菌是一种兼性厌氧球杆菌状细菌，属于人类口腔微生物群的一部分，并能穿过肠道屏障在黏膜表面定植^[47]。该菌表达大量黏附素，通过竞争性排斥机制，有助于防止潜在病原体的入侵，从而对人体起到保护作用^[48]。动物研究显示，副溶血链球菌 *Streptococcus parasanguinis* 通过促进 Treg 细胞、抑制 Th 细胞的基因表达，在肠道免疫中发挥抗炎和益生作用^[49]。此外，副溶血链球菌对各种病原体具有抑制活性，能够抑制铜绿假单胞菌 *Pseudomonas aeruginosa*、伴放线放线杆菌 *Aggregatibacter*

actinomycetemcomitans 等机会性病原体^[50]，但其与 RA 相关的潜在机制仍不清楚。韦荣球菌属 *Veillonella_unclassified* 是韦荣球菌属中的一个分类单元，而韦荣球菌属具有促进 Th1 免疫应答、调节 Th2 免疫应答的特性^[51]，因此其可能通过调节肠道免疫功能，降低 RA 的发病风险。毛螺菌科细菌 5_1_63FAA 是一种属于毛螺菌科的细菌，有研究发现毛螺菌科可能通过发挥促炎作用增加肉芽肿性多血管炎的发病风险^[52]，毛螺菌科细菌 5_1_63FAA 可能通过炎症反应通路增加 RA 的发病风险。肠道菌群的多样性及可塑性，使其在医疗领域尤其是在个性化治疗方面有着巨大的应用潜力^[53]。中药有效成分在体内与肠道菌群相互作用，参与肠肝循环，改善菌群丰度与代谢产物，肠道菌群参与中药的生物转化过程，发挥治疗作用，恢复肠道微生态系统平衡^[54-55]。有多项研究验证，植物药有效成分能够调节本研究筛选出的肠道菌群^[56-59]。尽管从遗传学角度证实了这 4 个肠道菌群与 RA 具有因果关系，但仍需进一步探索其在 RA 中的致病或治疗意义。为了更深入地探究肠道菌群及其代谢物影响 RA 发病的潜在机制，通过对肠道菌群邻近基因进行 GO 和 KEGG 富集分析，发现主要包括细胞信号传导、免疫反应及细胞死亡等方面。主要在病毒蛋白与细胞因子和细胞因子受体的相互作用抗病毒，钙信号通路，NK 细胞介导的细胞毒性，细胞因子-细胞因子受体相互作用等通路显著富集，从而通过“肠-关节”轴调控 RA 的发病机制。

中医将 RA 归为“痹证”“尪痹”等范畴,据《临证医案指南·痹》记载:“痹者,痹而不通之谓也,正气为邪所阻,脏腑经络不能畅达,皆由气血亏损,腠理疏松,风寒湿三气得以乘虚外袭,留置于内,致湿痰浊血,流注凝涩而得之。”本病属本虚标实,病位以肝、肾、脾为主,其病机特点可概括为邪气侵袭、正气虚弱、痰瘀内阻^[60]。中医药在治疗 RA 方面积累了丰富的经验,中药的多分子、多靶点、多通路的优势在治疗 RA 中发挥重要作用。本研究对工具变量邻近基因进行中药预测及分析,发现药物功效主要表现为清热解毒、补益虚损、活血化瘀;四气多属寒、温、平;五味多属苦、甘、辛;归经多在肝、肺、脾。从中药功效角度看,清热药缓解症状以白花蛇舌草、牡丹皮、生地黄为代表,补虚药扶护正气以甘草、黄精、补骨脂为代表,活血化瘀药驱邪外出以丹参、姜黄、红花为代表,与“扶正理论”的治疗原则相符合^[61]。从中药性味来看,寒凉药以解毒滋阴、温药助行散;苦味药“能泻、能燥、能坚”以化痰散结、降泻逐瘀,辛味药则“能散、能行、能化”以活血化湿、疏通内外,甘平以补虚和中、调和诸药。总体来看,预测中药能清泄邪实、缓中补虚,与本虚标实的病机特点相吻合,证明本研究得到的中药基本符合中医病机及理法方药。通过频次统计,发现升麻、白花蛇舌草、苍耳子、高良姜等药物在基因预测中出现次数较高,在“肠-关节”轴治疗 RA 中起到重要作用。升麻中含有异阿魏酸、三萜皂苷、 β -谷甾醇等化合物^[62],具有抗炎、抗病毒、抗氧化、神经保护和抗骨质疏松等多种药理特性^[63],可以通过抑制 NF- κ B 抑制蛋白 (inhibitory of NF- κ B, I κ B)/NF- κ B 和丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)/激活蛋白-1 (activator protein, AP-1) 信号通路、抑制巨噬细胞活化发挥抗炎作用^[64],下调基质金属蛋白酶-1 (matrix metalloproteinase-1, MMP-1)、MMP-3 及血管内皮生长因子 (vascular endothelial growth factor, VEGF) 的水平促进细胞增殖保护软骨细胞^[65]。高良姜中的高良姜素、山柰酚、槲皮素等为主要活性成分,具有抑制胃肠运动、抗炎和镇痛作用^[66-67],通过抑制 NF- κ B/环氧合酶-2 (cyclooxygenase-2, COX-2) 信号通路及下游炎症因子水平,起到抗炎作用进而保护胃肠道黏膜^[68]。苍耳子主要活性成分为 β -谷甾醇、芦荟大黄素、黄花草木脂素 A、豆甾醇等^[69],具有较强的抗炎、镇痛

作用^[70],可通过阻断 NF- κ B 活化、抑制氨基末端激酶 (jun kinase, JNK)/p38 MAPK 磷酸化来抑制炎症反应^[71],并且能够通过能量代谢、激素代谢、氨基酸代谢和氧化应激反应来治疗 RA^[72]。白花蛇舌草主要包含黄酮类、蒽醌类及其他化合物,其中山柰酚和槲皮素及其衍生物是黄酮类的代表化合物^[73],具有抗菌消炎、抗肿瘤、调节免疫等作用^[74],能够抑制纤维细胞样滑膜细胞 FLS 增殖和 MMP-9 蛋白表达,通过调节 MMP-9/miR-204-5p/心肌梗死相关转录本轴影响 RA 的进展^[75]。

经统计筛选出的潜在干预中药有效成分,发现 β -谷甾醇、槲皮素、山柰酚、豆甾醇等成分出现频次较高。这些活性成分不仅是上述 4 味高频中药中的活性成分,也是多种中药的有效成分,能够作为部分中药的代表化合物,并且在调节肠道菌群方面展具有显著的潜力。其中, β -谷甾醇与豆甾醇均属于植物甾醇类成分。 β -谷甾醇以降低血清胆固醇为主要功能,可调节白细胞介素-6 (interleukin-6, IL-6)、肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α) 水平,抑制慢性炎症^[76]。 β -谷甾醇具有抗炎、抗氧化、调节骨代谢平衡及调节免疫系统等作用^[77],能够抑制 MAPK 信号通路活化从而具有较高的抗炎能力,调节巨噬细胞极化减轻关节症状、抑制 VEGF 信号通路减少滑膜血管生成^[78-81]。同时, β -谷甾醇可以通过调节肠道菌群组成的多样性,增加乳杆菌科 (Lactobacillaceae) 等菌种丰度,改善肠道屏障功能及调节 Th17/Treg 平衡,降低炎症反应^[82]。豆甾醇是一种不饱和甾醇,是植物甾醇生物合成途径的最终产物^[83],具有抗炎、抗癌和神经保护性等药理作用^[84],可以降低 IL-34/集落刺激因子 1 受体信号通路和核苷酸结合寡聚化结构域样受体蛋白 3 (nucleotide-binding oligomerization domain-like receptor protein 3, NLRP3) 炎症小体水平起到镇痛作用^[85];通过抑制磷脂酰肌醇-3-羟激酶 (phosphatidylinositol-3-hydroxykinase, PI3K)/蛋白激酶 B (protein kinase B, Akt) 信号通路从而促进 FLS 的凋亡^[86];通过降低破骨细胞分化相关因子抗 NF- κ B 受体活化因子配体 (receptor activator of nuclear factor kappa-B ligand, RANKL)、抗酒石酸酸性磷酸酶 5 及组织蛋白酶 K 水平从而减轻关节症状。植物甾醇类成分能够上调有益菌丰度,增加 SCFAs 水平,调节免疫反应^[87],多角度、多靶点治疗 RA。槲皮素、山柰酚作为黄酮类化合物,通过靶向细胞

信号传导途径,发挥其生物学效应,在抗炎镇痛及免疫调节方面表现出潜在应用价值^[88]。槲皮素能够恢复 T 细胞稳态,调节 Th17/Treg 相关细胞因子水平,抑制淋巴细胞腺苷脱氨酶,从而发挥免疫调节作用进而减轻 RA 炎症反应^[89];也可以降低半胱氨酸蛋白酶-8 (Caspase-8) 水平,靶向抑制 RA 中的铁死亡和焦亡^[90];通过调节 NF- κ B 信号通路、MAPK 信号通路、miR-146a/人 GATA 结合蛋白 6 轴及抑制中性粒细胞胞外诱捕网产生等多种机制来减轻 RA 临床症状^[91]。槲皮素在调节肠道菌群方面,发现能够通过“肠道菌群-SCFAs-炎症”信号通路减少骨丢失及降低炎症反应^[92-93]。山柰酚可能通过特异性抑制 RANKL 刺激 JNK 和 p38-MAPK 的磷酸化,以达到对破骨细胞的抑制作用^[94];通过阻断 MAPK 通路、NF- κ B/Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mammalian target of rapamycin, mTOR) 通路,抑制 FLS 增殖,从而减轻炎症反应^[95-96],调节胶原诱导性关节炎小鼠的肠道菌群和微生物代谢,使其具有抗关节炎活性^[97]。本研究中预测的中药与有效成分与临床使用的药物存在交集,这不仅间接验证了研究结果的准确性和可靠性,而且凸显了这些中药化合物在“肠-关节”轴上的治疗潜力。鉴于其在 RA 治疗中的潜在应用价值,可能为探索新的治疗策略和药物开发提供重要的研究方向。

4 结论

综上所述,本研究利用 MR 分析方法,对肠道菌群与 RA 的 GAWS 数据进行分析,发现 4 种与 RA 患病风险之间存在显著因果关系的肠道菌群,进行了 SNPs 相关基因的功能和通路的富集分析,肠道菌群主要通过病毒蛋白与细胞因子受体的相互作用、钙信号通路及 NK 细胞介导的细胞毒性通路干预 RA 发病。同时预测能够通过“肠-关节”轴治疗 RA 的中药,对其进行四气五味及归经分析,并且基于 MR 分析与网络药理学提取中药有效成分,丰富中医药治疗 RA 的微观机制,为中医药治疗整体观提供新的治疗思路,对中医药现代化发展起到重要作用。但本研究存在一定局限性:纳入数据库数据均来自欧洲,还需来自其他人种的数据进行研究,减小不同人群之间的差异,使研究结果更具有普适性,为中医药的研究提供有力参考;纳入的数据基数大,可能会存在样本重叠,导致结果出现偏倚;GAWS 数据库中未提供纳入人群的基线信息,因此无法对不同人群亚组进行进一步的研究;

MR 分析与中药预测的结果需要进一步的临床与基础研究进行验证,来证明其在 RA 治疗上的作用与价值。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] Su B W, Ma Q, Edwards C J, *et al.* Characteristics of hand involvement in a comparative study of two early RA cohorts from the UK and China [J]. *Int J Rheum Dis*, 2017, 20(10): 1426-1436.
- [2] Sparks J A. Rheumatoid arthritis [J]. *Ann Intern Med*, 2019, 170(1): ITC1.
- [3] Gravallese E M, Firestein G S. Rheumatoid arthritis-common origins, divergent mechanisms [J]. *N Engl J Med*, 2023, 388(6): 529-542.
- [4] Smolen J S, Aletaha D, Barton A, *et al.* Rheumatoid arthritis [J]. *Nat Rev Dis Primers*, 2018, 4: 18001.
- [5] Gu H P, Yan D D, Li J, *et al.* Trends and future projections of incidence rate and mortality of rheumatoid arthritis in China: A systematic analysis based on GBD 2021 data [J]. *Clin Rheumatol*, 2024, 43(9): 2799-2806.
- [6] Burmester G R, Pope J E. Novel treatment strategies in rheumatoid arthritis [J]. *Lancet*, 2017, 389(10086): 2338-2348.
- [7] 王仲园, 龚剑峰. 肠道菌群与免疫相关疾病 [J]. 中华胃肠外科杂志, 2022, 25(9): 777-7833.
- [8] Bodkhe R, Balakrishnan B, Taneja V. The role of microbiome in rheumatoid arthritis treatment [J]. *Ther Adv Musculoskelet Dis*, 2019, 11: 1759720X19844632.
- [9] Fujimoto K, Uematsu S. Vaccine therapy for dysbiosis-related diseases [J]. *World J Gastroenterol*, 2020, 26(21): 2758-2767.
- [10] Asoudeh F, Djafarian K, Akhlaghi M, *et al.* The effect of probiotic cheese consumption on inflammatory and anti-inflammatory markers, disease severity, and symptoms in patients with rheumatoid arthritis: Study protocol for a randomized, double-blind, placebo-controlled trial [J]. *Trials*, 2022, 23(1): 180.
- [11] Boehm F J, Zhou X. Statistical methods for Mendelian randomization in genome-wide association studies: A review [J]. *Comput Struct Biotechnol J*, 2022, 20: 2338-2351.
- [12] Burgess S, Butterworth A, Thompson S G. Mendelian randomization analysis with multiple genetic variants using summarized data [J]. *Genet Epidemiol*, 2013, 37(7): 658-665.
- [13] Hemani G, Zheng J, Elsworth B, *et al.* The MR-Base platform supports systematic causal inference across the human phenotype [J]. *Elife*, 2018, 7: e34408.
- [14] Smith G D, Ebrahim S. 'Mendelian randomization': Can genetic epidemiology contribute to understanding environmental determinants of disease? [J]. *Int J Epidemiol*, 2003, 32(1): 1-22.

- [15] Gou Y F, Zhang J X, Li C E, *et al.* Causal relationship between gut microbiota and rheumatoid arthritis: A two-sample Mendelian randomisation study [J]. *Clin Exp Rheumatol*, 2024, 42(1): 166-173.
- [16] Gu P, Pu B, Liu T, *et al.* Appraising causal risk and protective factors for rheumatoid arthritis [J]. *Bone Joint Res*, 2023, 12(9): 601-614.
- [17] Lopera-Maya E A, Kurilshikov A, van der Graaf A, *et al.* Effect of host genetics on the gut microbiome in 7 738 participants of the Dutch Microbiome Project [J]. *Nat Genet*, 2022, 54: 143-151.
- [18] Sakaue S, Kanai M, Tanigawa Y, *et al.* A cross-population atlas of genetic associations for 220 human phenotypes [J]. *Nat Genet*, 2021, 53(10): 1415-1424.
- [19] Sanna S, van Zuydam N R, Mahajan A, *et al.* Causal relationships among the gut microbiome, short-chain fatty acids and metabolic diseases [J]. *Nat Genet*, 2019, 51(4): 600-605.
- [20] Myers T A, Chanock S J, Machiela M J. LDlinkR: An R package for rapidly calculating linkage disequilibrium statistics in diverse populations [J]. *Front Genet*, 2020, 11: 157.
- [21] Burgess S, Small D S, Thompson S G. A review of instrumental variable estimators for Mendelian randomization [J]. *Stat Methods Med Res*, 2017, 26(5): 2333-2355.
- [22] Chen W Q, Cai X L, Yan H Y, *et al.* Causal effect of obstructive sleep apnea on atrial fibrillation: A Mendelian randomization study [J]. *J Am Heart Assoc*, 2021, 10(23): e022560.
- [23] Burgess S, Davey Smith G, Davies N M, *et al.* Guidelines for performing Mendelian randomization investigations: Update for summer 2023 [J]. *Wellcome Open Res*, 2019, 4: 186.
- [24] Zhang H C, Wang Y D, Zhao H, *et al.* The involvement of effector memory CD4⁺ T cells in mediating the impact of genus *Oscillibacter* gut microbiota on Alzheimer's disease: A Mendelian randomization study [J]. *Front Aging Neurosci*, 2024, 16: 1423707.
- [25] Burgess S, Thompson S G. Interpreting findings from Mendelian randomization using the MR-Egger method [J]. *Eur J Epidemiol*, 2017, 32(5): 377-389.
- [26] Zhao J V, Schooling C M. Using Mendelian randomization study to assess the renal effects of antihypertensive drugs [J]. *BMC Med*, 2021, 19(1): 79.
- [27] Zhang L L, Zi L L, Kuang T R, *et al.* Investigating causal associations among gut microbiota, metabolites, and liver diseases: A Mendelian randomization study [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1159148.
- [28] Bowden J, Davey Smith G, Burgess S. Mendelian randomization with invalid instruments: Effect estimation and bias detection through Egger regression [J]. *Int J Epidemiol*, 2015, 44(2): 512-525.
- [29] Greco M F D, Minelli C, Sheehan N A, *et al.* Detecting pleiotropy in Mendelian randomisation studies with summary data and a continuous outcome [J]. *Stat Med*, 2015, 34(21): 2926-2940.
- [30] Chalitsios C V, Tsilidis K K, Tzoulaki I. Psoriasis and COVID-19: A bidirectional Mendelian randomization study [J]. *J Am Acad Dermatol*, 2023, 88(4): 893-895.
- [31] 肖祥, 吴宜谕, 韩洁榕, 等. “肺与大肠相表里”视角下探索肠道菌群与肺癌因果关联及潜在干预中药预测 [J]. *中草药*, 2024, 55(12): 4108-4120.
- [32] 张道平, 姚昆鹏, 刘起立, 等. 基于生物信息学探讨肝癌相关细胞焦亡基因及潜在中药预测 [J]. *中草药*, 2022, 53(23): 7467-7476.
- [33] Daikh D I. Rheumatoid arthritis: Evolving recognition of a common disease [J]. *Best Pract Res Clin Rheumatol*, 2022, 36(1): 101740.
- [34] 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.
- [35] Belvoncikova P, Maronek M, Gardlik R. Gut dysbiosis and fecal microbiota transplantation in autoimmune diseases [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, 23(18): 10729.
- [36] Dong Y, Yao J L, Deng Q Y, *et al.* Relationship between gut microbiota and rheumatoid arthritis: A bibliometric analysis [J]. *Front Immunol*, 2023, 14: 1131933.
- [37] Yang Y, Hong Q, Zhang X H, *et al.* Rheumatoid arthritis and the intestinal microbiome: Probiotics as a potential therapy [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1331486.
- [38] Attur M, Scher J U, Abramson S B, *et al.* Role of intestinal dysbiosis and nutrition in rheumatoid arthritis [J]. *Cells*, 2022, 11(15): 2436.
- [39] Romero-Figueroa M D S, Ramírez-Durán N, Montiel-Jarquín A J, *et al.* Gut-joint axis: Gut dysbiosis can contribute to the onset of rheumatoid arthritis via multiple pathways [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2023, 13: 1092118.
- [40] Sowah S A, Milanese A, Schübel R, *et al.* Calorie restriction improves metabolic state independently of gut microbiome composition: A randomized dietary intervention trial [J]. *Genome Med*, 2022, 14(1): 30.
- [41] Zhang Y L, Cai L T, Qi J Y, *et al.* Gut microbiota contributes to the distinction between two traditional Chinese medicine syndromes of ulcerative colitis [J]. *World J Gastroenterol*, 2019, 25(25): 3242-3255.
- [42] Al Bataineh M T, Künstner A, Dash N R, *et al.* Uncovering the relationship between gut microbial dysbiosis, metabolomics, and dietary intake in type 2 diabetes mellitus and in healthy volunteers: A multi-omics analysis [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 17943.
- [43] Tang R Q, Jiang Y H, Tan A H, *et al.* 16S rRNA gene sequencing reveals altered composition of gut microbiota in individuals with kidney stones [J]. *Urolithiasis*, 2018, 46(6): 503-514.

- [44] Jiang W, Yu X Q, Kosik R O, *et al.* Gut microbiota may play a significant role in the pathogenesis of Graves' disease [J]. *Thyroid*, 2021, 31(5): 810-820.
- [45] Juárez-Fernández M, Goikoetxea-Usandizaga N, Porras D, *et al.* Enhanced mitochondrial activity reshapes a gut microbiota profile that delays NASH progression [J]. *Hepatology*, 2023, 77(5): 1654-1669.
- [46] de Sire A, de Sire R, Petit V, *et al.* Gut-joint axis: The role of physical exercise on gut microbiota modulation in older people with osteoarthritis [J]. *Nutrients*, 2020, 12(2): 574.
- [47] Lin G, Kageyama S, Maeda A, *et al.* Oral-to-rectum microbial transmission in orthopedic patients without a history of intestinal disorders [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2024, 14: 1358684.
- [48] Nobbs A, Kreth J. Genetics of *sanguinis*-group streptococci in health and disease [J]. *Microbiol Spectr*, 2019, 7(1): 1-15.
- [49] Li S, Li N, Wang C W, *et al.* Gut microbiota and immune modulatory properties of human breast milk *Streptococcus salivarius* and *S. parasanguinis* strains [J]. *Front Nutr*, 2022, 9: 798403.
- [50] Wang L J, Wang H X, Zhang H, *et al.* Formation of a biofilm matrix network shapes polymicrobial interactions [J]. *ISME J*, 2023, 17(3): 467-477.
- [51] Arrieta M C, Stiemsma L T, Dimitriu P A, *et al.* Early infancy microbial and metabolic alterations affect risk of childhood asthma [J]. *Sci Transl Med*, 2015, 7(307): 307ra152.
- [52] Chen S, Nie R, Wang C, *et al.* A two sample Mendelian randomization analysis investigates causal effects between gut microbiome and immune related vasculitis [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 18810.
- [53] Ursell L K, Haider H J, Van Treuren W, *et al.* The intestinal metabolome: An intersection between microbiota and host [J]. *Gastroenterology*, 2014, 146(6): 1470-1476.
- [54] Zhang H Y, Tian J X, Lian F M, *et al.* Therapeutic mechanisms of traditional Chinese medicine to improve metabolic diseases via the gut microbiota [J]. *Biomedicine Pharmacother*, 2021, 133: 110857.
- [55] Gong X, Li X, Bo A, *et al.* The interactions between gut microbiota and bioactive ingredients of traditional Chinese medicines: A review [J]. *Pharmacol Res*, 2020, 157: 104824.
- [56] Yutharaksanukul P, Tangpromphan P, Tunsagool P, *et al.* Effects of purified vitexin and iso-vitexin from mung bean seed coat on antihyperglycemic activity and gut microbiota in overweight individuals' modulation [J]. *Nutrients*, 2024, 16(17): 3017.
- [57] Wang X H, Yang Y N, Li Y H, *et al.* Oral bacteriome and mycobiome of patients with idiopathic membranous nephropathy with different tongue coatings treated with a Chinese herbal formula [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 331: 118233.
- [58] Zanardi K R, Grancieri M, Silva C W, *et al.* Functional effects of yacon (*Smallanthus sonchifolius*) and kefir on systemic inflammation, antioxidant activity, and intestinal microbiome in rats with induced colorectal cancer [J]. *Food Funct*, 2023, 14(19): 9000-9017.
- [59] Liu Y, Xie T F, Wu S J, *et al.* Effect of macadamia oil cake on blood lipid characteristics and intestinal microbiota in hyperlipidemic rat [J]. *Food Sci Nutr*, 2023, 11(9): 5318-5324.
- [60] 叶敏, 万军, 王李俊, 等. 中药通过调节肠道菌群治疗类风湿关节炎的研究进展 [J]. *中草药*, 2022, 53(22): 7279-7284.
- [61] 吴国琳, 余国友, 卢雯雯. 肠道微生态的中医本质探讨 [J]. *中华中医药学刊*, 2015, 33(11): 2586-2588.
- [62] 陈李乙, 李佳欣, 张美晴, 等. 升麻药材化学成分及药理作用研究进展 [J]. *中草药*, 2023, 54(5): 1685-1704.
- [63] Zhang Q Q, Wei W, Jin X Y, *et al.* Traditional uses, phytochemistry, pharmacology, quality control and clinical studies of *Cimicifugae Rhizoma*: A comprehensive review [J]. *Chin Med*, 2024, 19(1): 66.
- [64] Chen C Y, Li L, Liu X M, *et al.* 23-O-acetylshengmanol-3-O- α -L-arabinoside alleviates lipopolysaccharide-induced acute lung injury through inhibiting IkB/NF- κ B and MAPK/AP-1 signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2023, 300: 115725.
- [65] Huh J E, Shin Y J, Baek Y H, *et al.* Combined prescription (OAH19T) of *Aralia cordata* Thunb and *Cimicifuga heracleifolia* Komar and its major compounds inhibit matrix proteinases and vascular endothelial growth factor through the regulation of mitogen-activated protein kinase pathway [J]. *J Ethnopharmacol*, 2011, 135(2): 414-421.
- [66] Lei X, Wang J P, Zuo K, *et al.* *Alpinia officinarum* Hance: A comprehensive review of traditional uses, phytochemistry, pharmacokinetic and pharmacology [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1414635.
- [67] Abubakar I B, Malami I, Yahaya Y, *et al.* A review on the ethnomedicinal uses, phytochemistry and pharmacology of *Alpinia officinarum* Hance [J]. *J Ethnopharmacol*, 2018, 224: 45-62.
- [68] Lin K W, Wang Y, Gong J W, *et al.* Protective effects of total flavonoids from *Alpinia officinarum* rhizoma against ethanol-induced gastric ulcer *in vivo* and *in vitro* [J]. *Pharm Biol*, 2020, 58(1): 854-862.
- [69] 于盼盼, 杨忠杰, 郭丽娜, 等. 基于网络药理学苍耳子的物质基础和作用机制的分析 [J]. *安徽医药*, 2020, 24(2): 234-237.
- [70] 盛天露, 张祖良, 陈冠宜, 等. 苍耳草与苍耳子的研究进展 [J]. *广州中医药大学学报*, 2021(12): 2812-2816.
- [71] Yeom M, Kim J H, Min J H, *et al.* *Xanthii Fructus* inhibits inflammatory responses in LPS-stimulated RAW264.7 macrophages through suppressing NF- κ B and JNK/p38 MAPK [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 176: 394-401.
- [72] Zhang Z H, Zhang J P, Zhao S, *et al.* Synovial tissue

- metabolomics analysis of the therapeutic effects of stir-fried *Xanthii Fructus* on rheumatoid arthritis in rats [J]. *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2023, 1216: 123594.
- [73] 王英杰, 胡恢权, 吴倩, 等. 白花蛇舌草化学成分、药理作用、质量标志物预测的研究现状 [J]. 中国临床药理学杂志, 2024(15): 2296-2300.
- [74] Chen R, He J Y, Tong X L, *et al.* The *Hedyotis diffusa* Willd. (Rubiaceae): A review on phytochemistry, pharmacology, quality control and pharmacokinetics [J]. *Molecules*, 2016, 21(6): 710.
- [75] Jiang J, Huang M, Zhang S S, *et al.* Identification of *Hedyotis diffusa* Willd-specific mRNA-miRNA-lncRNA network in rheumatoid arthritis based on network pharmacology, bioinformatics analysis, and experimental verification [J]. *Sci Rep*, 2024, 14(1): 6291.
- [76] Kurano M, Hasegawa K, Kunimi M, *et al.* Sitosterol prevents obesity-related chronic inflammation [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Biol Lipids*, 2018, 1863(2): 191-198.
- [77] 陈元堃, 曾奥, 罗振辉, 等. β -谷甾醇药理作用研究进展 [J]. 广东药科大学学报, 2021, 37(1): 148-153.
- [78] Liao P C, Lai M H, Hsu K P, *et al.* Identification of β -sitosterol as *in vitro* anti-inflammatory constituent in *Moringa oleifera* [J]. *J Agric Food Chem*, 2018, 66(41): 10748-10759.
- [79] Paniagua-Pérez R, Flores-Mondragón G, Reyes-Legorreta C, *et al.* Evaluation of the anti-inflammatory capacity of beta-sitosterol in rodent assays [J]. *Afr J Tradit Complement Altern Med*, 2017, 14(1): 123-130.
- [80] Qian K, Zheng X X, Wang C, *et al.* β -sitosterol inhibits rheumatoid synovial angiogenesis through suppressing VEGF signaling pathway [J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12: 816477.
- [81] Liu R, Hao D L, Xu W Y, *et al.* β -Sitosterol modulates macrophage polarization and attenuates rheumatoid inflammation in mice [J]. *Pharm Biol*, 2019, 57(1): 161-168.
- [82] Ma L Y, Ma Y, Liu Y X. β -Sitosterol protects against food allergic response in BALB/c mice by regulating the intestinal barrier function and reconstructing the gut microbiota structure [J]. *Food Funct*, 2023, 14(10): 4456-4469.
- [83] Valitova J, Renkova A, Beckett R, *et al.* Stigmasterol: An enigmatic plant stress sterol with versatile functions [J]. *Int J Mol Sci*, 2024, 25(15): 8122.
- [84] Bakrim S, Benkhaira N, Bourais I, *et al.* Health benefits and pharmacological properties of stigmasterol [J]. *Antioxidants*, 2022, 11(10): 1912.
- [85] Si W M, Chen Z N, Bei J, *et al.* Stigmasterol alleviates neuropathic pain by reducing Schwann cell-macrophage cascade in DRG by modulating IL-34/CSF1R [J]. *CNS Neurosci Ther*, 2024, 30(4): e14657.
- [86] Lu D M, Yang Y Z, Ma W K, *et al.* Stigmasterol depresses the proliferation and facilitates the apoptosis of fibroblast-like synoviocytes via the PI3K/AKT signaling pathway in collagen-induced arthritis rats [J]. *Altern Ther Health Med*, 2024, 30(8): 338-345.
- [87] Miszczuk E, Bajguz A, Kiraga Ł, *et al.* Phytosterols and the digestive system: A review study from insights into their potential health benefits and safety [J]. *Pharmaceuticals*, 2024, 17(5): 557.
- [88] 曹伟国, 刘志勤, 邵云, 等. 黄酮类化合物药理作用的研究进展 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(12): 2241-2247.
- [89] Atta A, Salem M M, El-Said K S, *et al.* Mechanistic role of quercetin as inhibitor for adenosine deaminase enzyme in rheumatoid arthritis: Systematic review [J]. *Cell Mol Biol Lett*, 2024, 29(1): 14.
- [90] Zheng Q C, Wang D, Lin R J, *et al.* Quercetin is a potential therapy for rheumatoid arthritis via targeting caspase-8 through ferroptosis and pyroptosis [J]. *J Inflamm Res*, 2023, 16: 5729-5754.
- [91] 蒋海旭, 许杰, 陆清怡. 槲皮素治疗类风湿关节炎的研究进展 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(5): 243-250.
- [92] Feng R B, Wang Q, Yu T T, *et al.* Quercetin ameliorates bone loss in OVX rats by modulating the intestinal flora-SCFAs-inflammatory signaling axis [J]. *Int Immunopharmacol*, 2024, 136: 112341.
- [93] Feng J, Li Z R, Ma H, *et al.* Quercetin alleviates intestinal inflammation and improves intestinal functions via modulating gut microbiota composition in LPS-challenged laying hens [J]. *Poult Sci*, 2023, 102(3): 102433.
- [94] Yu X, Wu Q, Ren Z R, *et al.* Kaempferol attenuates wear particle-induced inflammatory osteolysis via JNK and p38-MAPK signaling pathways [J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318(Pt B): 117019.
- [95] Wang J, Zhao Q. Kaempferitrin inhibits proliferation, induces apoptosis, and ameliorates inflammation in human rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes [J]. *Phytother Res*, 2019, 33(6): 1726-1735.
- [96] Pan D M, Li N, Liu Y Y, *et al.* Kaempferol inhibits the migration and invasion of rheumatoid arthritis fibroblast-like synoviocytes by blocking activation of the MAPK pathway [J]. *Int Immunopharmacol*, 2018, 55: 174-182.
- [97] Aa L X, Fei F, Qi Q, *et al.* Rebalancing of the gut flora and microbial metabolism is responsible for the anti-arthritis effect of kaempferol [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2020, 41(1): 73-81.

[责任编辑 潘明佳]