

本文引用: 卢一帆, 徐无忌, 熊 辉, 齐新宇, 伍搏宇, 简功辉, 杨 卓, 段建辉. 基于 16S rDNA 测序分析独活寄生汤对膝骨关节炎大鼠肠道菌群的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2024, 44(12): 2277-2285.

基于 16S rDNA 测序分析独活寄生汤对膝骨关节炎大鼠肠道菌群的影响

卢一帆^{1,2,3}, 徐无忌², 熊 辉³, 齐新宇³, 伍搏宇⁴, 简功辉³, 杨 卓^{1*}, 段建辉^{1*}

1. 常德市第一中医医院, 湖南 常德 415000; 2. 湖南中医药大学第二附属医院, 湖南 长沙 410005;

3. 湖南中医药大学, 湖南 长沙 410208; 4. 广州中医药大学东莞医院, 广东 东莞 523000

〔摘要〕 **目的** 通过 16S rDNA 测序探讨独活寄生汤(Duhuo Jisheng Decoction, DHJSD)在调控肠道菌群以治疗膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)中的潜在机制。**方法** 选取 18 只 SD 大鼠, 随机分为模型组(关节腔内注射 50 μ L 浓度为 40 mg/mL 的碘乙酸钠)、空白组(灌胃等量生理盐水)以及 DHJSD 组(造模方法与模型组相同, 灌胃独活寄生汤 16.5 g/kg), 每组 6 只。造模 2 周后开始干预, 每天灌胃 1 次, 持续 4 周, 并观察其一般情况。给药结束后进行取材, 通过 HE 染色观察软骨变化。ELISA 法检测血清白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、IL-17 和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)炎症因子水平。RT-qPCR 检测滑膜中核因子 κ B p65(nuclear factor- κ B p65, NF- κ B p65)、雷帕霉素靶蛋白(mechanistic target of rapamycin, mTOR)、AMP 激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase, AMPK)和磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase, PI3K)的相对表达量。取肠道粪便进行 16S rDNA 测序分析肠道微生物群的差异。**结果** 相比空白组, 模型组大鼠的活动减少, 毛发失去光泽, 摄食量和饮水量减少。相比模型组, DHJSD 组大鼠的活动性、毛发光泽和饮食均明显改善。HE 染色结果表明, DHJSD 能有效改善软骨损伤, 减轻纤维化和炎症反应。ELISA 结果表明, 相比空白组, 模型组的 IL-1 β 、IL-6、IL-17 和 TNF- α 水平升高($P<0.01$)。相比模型组, DHJSD 组 IL-1 β 、TNF- α 水平降低($P<0.01$)。RT-qPCR 结果表明, 相比空白组, 模型组 NF- κ B p65、mTOR 和 AMPK 的相对表达量升高($P<0.05$)。相比模型组, DHJSD 组 mTOR 的相对表达量降低($P<0.05$)。16S rDNA 测序结果表明, DHJSD 可以调控 KOA 大鼠的肠道菌群结构, 并影响菌群的 α 和 β 多样性。乳球菌属(*Lactococcus*)和肠杆菌属(*Enterobacter*)分别是 DHJSD 组和模型组中富集最显著的菌群。**结论** DHJSD 能有效修复软骨损伤, 减缓 KOA 的进展, 其机制可能与调控肠道菌群、维护肠道屏障完整性以及减少免疫炎症反应有关。

〔关键词〕 膝骨关节炎; 16S rDNA 测序; 肠道菌群; 独活寄生汤; 菌群多样性; 菌群相对丰度

〔中图分类号〕 R285.5

〔文献标志码〕 A

〔文章编号〕 doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2024.12.020

Effects of Duhuo Jisheng Decoction on intestinal flora of rats with knee osteoarthritis based on 16S rDNA sequencing

LU Yifan^{1,2,3}, XU Wujie², XIONG Hui³, QI Xinyu³, WU Boyu⁴, JIAN Gonghui³,
YANG Zhuo^{1*}, DUAN Jianhui^{1*}

1. Changde First Hospital of Traditional Chinese Medicine, Changde, Hunan 415000, China; 2. The Second Hospital of Hunan

〔收稿日期〕 2024-07-12

〔基金项目〕 湖南省自然科学基金项目(2022JJ30087, 2024JJ6342); 湖南省教育厅资助科研项目(21B0377, 23B0343); 湖南省中医药科研计划项目(D2022033, C2023031); 常德市技术研发和技术创新引导项目(CDKJJ20220357); 湖南中医药大学校级科研课题(2022XYLH045, 2022XYLH051)。

〔通信作者〕 * 杨 卓, 男, 硕士, 主治医师, E-mail: 735517624@qq.com; 段建辉, 男, 硕士, 主任医师, 硕士研究生导师, E-mail: djh0905@sina.com。

University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410005, China; 3. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China; 4. Dongguan Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Dongguan, Guangdong 523000, China

[Abstract] Objective To explore the potential mechanism of Duhuo Jisheng Decoction (DHJSD) in regulating intestinal flora for the treatment of knee osteoarthritis (KOA) through 16S rDNA sequencing. **Methods** Eighteen SD rats were randomized into model group (intra-articularly injected with 50 μ L of sodium iodoacetate at a concentration of 40 mg/mL), blank group (gavaged with an equal volume of normal saline), and DHJSD group (modeled using the same method as the model group and gavaged with DHJSD at a dose of 16.5 g/kg), with six rats in each group. Intervention began two weeks after modeling, with once-daily gavage for four weeks, during which the rat general condition was observed. After the administration period, samples were collected. Cartilage changes were observed using HE staining. ELISA was used to measure serum levels of inflammatory factors including interleukin (IL)-1 β , IL-6, IL-17, and tumor necrosis factor- α (TNF- α). RT-qPCR was employed to determine the relative expression levels of nuclear factor- κ B p65 (NF- κ B p65), mechanistic target of rapamycin (mTOR), AMP-activated protein kinase (AMPK), and phosphatidylinositol 3-kinase (PI3K) in the synovium. Fecal samples were collected for 16S rDNA sequencing to analyze differences in the intestinal flora. **Results** Compared with the blank group, rats in the model group exhibited decreased activity, lusterless fur, and reduced food and water intake. In contrast, the DHJSD group showed significant improvements in activity, fur luster, and food intake compared to the model group. The HE staining indicated that DHJSD effectively reduced cartilage damage, fibrosis, and inflammatory responses. The ELISA showed that, compared with the blank group, the levels of IL-1 β , IL-6, IL-17, and TNF- α in the model group were significantly higher ($P<0.01$). However, compared with the model group, the levels of IL-1 β and TNF- α in the DHJSD group were significantly lower ($P<0.01$). The RT-qPCR indicated that, compared with the blank group, the relative expression levels of NF- κ B p65, mTOR, and AMPK significantly increased in the model group ($P<0.05$). Compared with the model group, the relative expression level of mTOR in the DHJSD group significantly decreased ($P<0.05$). The 16S rDNA sequencing showed that DHJSD regulated the intestinal microbiota structure in KOA rats, and affected both α and β diversity of the microbiota. *Lactococcus* and *Enterorhabdus* were the most significantly enriched genera in the DHJSD and model groups, respectively. **Conclusion** DHJSD can effectively repair cartilage damage and slow down the progression of KOA. Its mechanism may be related to regulating intestinal flora, maintaining intestinal barrier integrity, and reducing immune-inflammatory responses.

[Keywords] knee osteoarthritis; 16s rDNA sequencing; intestinal flora; Duhuo Jisheng Decoction; microbial diversity; relative abundance of microbiota

膝骨关节炎(knee osteoarthritis, KOA)是一种常见的退行性关节疾病,其特征是关节软骨的逐渐磨损、骨质增生和关节功能的退化,导致疼痛、僵硬和活动受限^[1-2]。KOA的发病机制主要包括软骨退变、炎症反应、骨质变化和机械负荷等,其中关节软骨的退变和磨损是其核心病理改变,骨细胞凋亡和基质降解是导致软骨损伤的主要原因^[3-4]。由于人口老龄化和肥胖症的流行,KOA的患病率在全球范围内呈现上升趋势^[5]。目前,针对KOA主要以抗炎、止痛和手术治疗为主^[6]。然而这些方法的临床效果有限,且可能伴有较高的副作用风险。中医学治疗KOA以整体调理为主,注重标本兼治,具有独特的优势,在改善症状和提高患者生活质量方面显示出

良好的潜力^[7]。

独活寄生汤(Duhuo Jisheng Decoction, DHJSD)是一种传统中药方剂,临床上对KOA治疗效果显著^[8]。其现代药理学机制涉及多种成分和多靶点的协同作用。现代研究表明,DHJSD具有抗炎、止痛、免疫调节、抗氧化、促进血液循环和调节神经系统等药理学效应^[9-10]。DHJSD通过抑制软骨细胞凋亡,促进软骨细胞增殖和分化,保护软骨和骨组织,从而延缓软骨退变,维持关节稳态,减缓疾病进展^[11]。然而,其具体机制尚未完全明确。

肠道菌群失调可以通过各种机制影响KOA的发病机制和进展,包括炎症和免疫调节^[12]。肠道菌群中某些有益菌能够促进抗炎性免疫细胞的生成,减

少炎症介质的释放^[13]。而肠道菌群失调则可能导致免疫系统失衡,促进炎症细胞因子如白细胞介素(interleukin, IL)-1 β 、IL-6、IL-17和肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)的释放,从而加重KOA的病情^[14]。因此,本研究旨在通过16S rDNA测序探讨DHJSD在调控肠道菌群以治疗KOA中的潜在机制。

1 材料和方法

1.1 动物

健康2月龄SPF级雄性SD大鼠18只,体质量为250~280 g,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司,许可证号:SYXK(湘)2019-0009。饲养于湖南中医药大学SPF级动物实验中心,环境条件控制为恒温(21 $\pm$ 3)℃、相对湿度50% $\pm$ 10%,并保持良好通风。大鼠自由饮食,食用普通饲料,光照和黑暗周期各为12 h。本实验严格遵循湖南中医药大学医学实验动物伦理委员会的规定(批准号:LLBH-202207190001)。

1.2 药物

本研究中使用的DHJSD购自湖南中医药大学第一附属医院药剂科。独活15 g、桑寄生15 g、白芍10 g、党参15 g、川芎6 g、当归15 g、牛膝10 g、防风10 g、甘草6 g(批号:92240205、92230921、92240156、92240836、92240528、92240802、92240407、92240945、92231239)购自湖南春光九汇现代中药有限公司;杜仲10 g、秦艽10 g、肉桂6 g(批号:AB442472、AB450782、A2041902)购自广东一方制药有限公司;茯苓15 g、熟地黄15 g、细辛3 g(批号:C240636、C240397、C240397)购自湖南天地恒一制药有限公司。

将上述药材混合后加水煎煮两次,每次1 h,第1次加水量为药材重量的10倍,第2次为8倍。煎煮后的药液用纱布过滤,收集2次药液。将过滤后的药液在50℃水浴中减压浓缩至1 g/mL原药材的浓缩液,分装于无菌瓶中,4℃保存备用。

1.3 主要试剂和仪器

HE染液、分化液、返蓝液(Servicebio公司,批号:G1005、G1005-3、G1005-4);RNA提取试剂、microRNA逆转录试剂盒、DNA标志物Marker、qPCR试剂盒(Vazyme公司,批号:R401-01、R233-01、MD101-02、Q712-02);核酸染料(Biotium公司,批

号:41003)。PCR梯度扩增仪(Scilogex公司,型号:SCI1000-G);微量分光光度计(美国GE医疗公司,型号:GE NanoVue Plus);高速组织研磨仪(Jingxin公司,型号:JXFSTPRP-48);台式冷冻离心机、掌上离心机(Scilogex公司,型号:CF1524R、S1010E);漩涡混合器(Servicebio公司,型号:MV-100);4℃冰箱、-20℃冰箱(XINGX公司,型号:BC-1480Y、BC-628GE);酶标仪(Rayto公司,型号:RT-6100,450 nm波长);微量高速离心机(长沙湘智离心机仪器有限公司,型号:TG16W);台式高速冷冻离心机(上海卢湘仪离心机仪器有限公司,型号:TGL16M)。

1.4 建模、分组和干预

采用关节腔内注射碘乙酸钠的方法^[15]构建KOA大鼠模型。将大鼠腹腔注射10%水合氯醛(3 mL/kg)进行麻醉,固定后在无菌条件下,将2 mg碘乙酸钠溶于50 μ L无菌生理盐水中(浓度为40 mg/mL),并缓慢注射到右膝关节腔内。空白组大鼠注射等体积的无菌生理盐水。消毒后,将大鼠放回笼内饲养2周,自由进食和活动,并观察其关节状态和活动情况。造模后第1天大鼠右侧膝关节肿胀,滑膜充血水肿,右侧患肢承重下降,提示造模成功^[16]。

将18只大鼠编号,并按体质量随机分为空白组、模型组、DHJSD组,每组6只,每笼3只。空白组予以右膝关节腔注射50 μ L无菌生理盐水,其余两组进行造模。DHJSD组大鼠的服药量依据人-鼠等效剂量^[17]换算[大鼠剂量(mg/kg)=6.17 $\times$ 人剂量(mg/kg)],按每只大鼠体质量给予DHJSD 16.5 g/(kg $\cdot$ d)。造模2周后开始干预,每天灌胃1次,持续4周。DHJSD组每天以16.5g/(kg $\cdot$ d)的剂量给予DHJSD药液3 mL灌胃,空白组和模型组则以等量生理盐水灌胃。

1.5 取材方法

在干预4周后,对各组大鼠进行颈椎脱位处死处理。常规消毒双膝术区皮肤后,切开皮肤并暴露关节囊,完整切下胫骨平台软骨。剔除软骨表面的脂肪和肌肉组织,使用生理盐水冲洗干净。部分软骨用于HE染色,其余软骨经过处理后立即放入-80℃冰箱保存,以备后续检测。

1.6 观察指标及检测方法

1.6.1 一般情况观察 各组大鼠的整体生存状况评估包括以下几个方面:大鼠的活动水平、毛发的光泽

度以及饮食情况等。

1.6.2 大鼠软骨组织病理变化 取下大鼠右后膝关节,用生理盐水冲洗并去除软组织后,固定于 4%多聚甲醛 24 h,10% EDTA 脱钙 3 周。脱水、透明、石蜡包埋后,切片并进行 HE 染色,脱水、透明、封片。显微镜下观察膝关节病理变化。

1.6.3 ELISA 检测 采用 ELISA 法测定 IL-1 β 、IL-6、IL-17 和 TNF- α 的水平,具体操作步骤依据试剂盒说明书进行。

1.6.4 RT-qPCR 检测 采用 RT-qPCR 检测滑膜中核因子 κ B p65(nuclear factor- κ B p65,NF- κ B p65)、雷帕霉素靶蛋白(mechanistic target of rapamycin, mTOR)、AMP 激活蛋白激酶(AMP-activated protein kinase,AMPK)和磷脂酰肌醇-3-激酶(phosphatidylinositol 3-kinase,PI3K)的相对表达量。使用 Trizol 法提取滑膜组织总 RNA,并测定 OD 值。配制逆转录和扩增等反应体系,利用 PCR 仪进行扩增,并通过内参基因计算相对表达量,最终以 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 值进行计算。引物序列详见表 1。

表 1 各基因 PCR 引物序列

Table 1 PCR primer sequences for each gene

基因名称	引物序列(5'-3')	产物长度/bp
GAPDH	正向 ACAGCAACAGGGTGGTGGAC	253
	反向 TTGAGGGTGCAGCGAACTT	
NF- κ B p65	正向 GCTGATGGAGTACCCTGAAGC	141
	反向 ATGTCCGCAATGGAGGAGAAG	
mTOR	正向 TCTGCACTTGTGTTCCTC	150
	反向 ACAATCGGCTGAATGATGCG	
AMPK	正向 GGTCACTCTCAGGAAGGCTGT	185
	反向 GCAGACTGGCAATAGAACGG	
PI3K	正向 GCAACAAGTCTCTGCCAAA	222
	反向 ACGTAATAGAGGAGCTGGGC	

1.6.5 肠道菌群 16S rDNA 测序分析 取新鲜大鼠粪便后,提取 DNA 并进行 16S rDNA 高通量测序。使用细菌通用引物扩增 16S rDNA 的 V3~V4 区域。扩增产物经过纯化和质量检测后,通过 Illumina Miseq 平台进行测序。

1.7 统计学分析

实验数据使用 SPSS 25.0 统计软件进行处理,使用 GraphPad Prism 9.0 进行绘图。数据以“ $\bar{x}\pm s$ ”表示,两组间比较符合正态分布者使用两独立样本 t 检验,不符合则使用秩和检验。3 组或 3 组以上组间比较,符合正态分布者采用单因素方差分析,不符合正态分布则采用 *Kruskal-Wallis* 检验。以 $P<0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 一般情况

空白组大鼠活动正常,毛发光滑有光泽,摄食量和饮水量均正常。模型组大鼠的活动减少,毛发失去光泽,摄食量和饮水量减少。与模型组相比,DHJSD 组大鼠的活动增加,行为状态好转,毛发恢复光泽,摄食量和饮水量恢复正常,食欲增加。

2.2 组织病理学观察

空白组大鼠软骨组织结构基本正常,软骨层厚度均匀,表面平滑,表层、中间层、深层及钙化层结构清晰,软骨细胞无坏死变性,小梁间连接呈网状,骨髓腔较小,骨髓细胞丰富,个别小梁轻微破碎。模型组出现重度异常的组织结构,软骨组织大量坏死和纤维化,软骨细胞大量变性和坏死,骨髓腔内可见大量异型细胞,表明 KOA 模型成功建立。与模型组相比,DHJSD 组软骨组织结构显著改善,软骨层厚度均匀,表面平滑,软骨细胞无明显坏死变性,纤维化程度减轻,异型细胞数量减少。详见图 1。

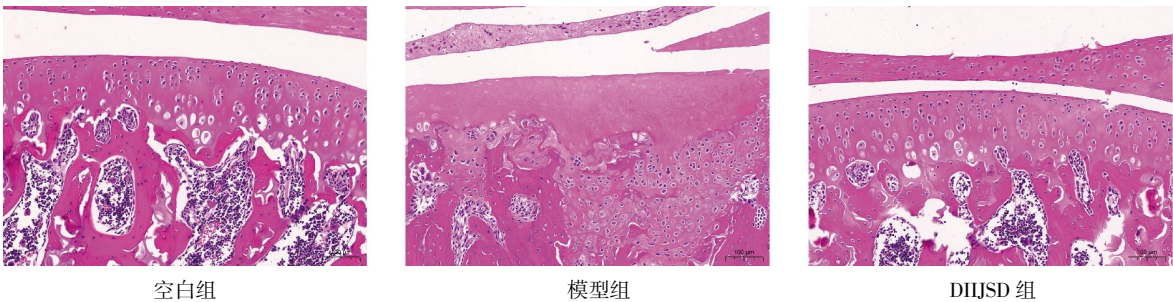


图 1 各组大鼠病理变化(HE,×200)

Fig.1 Pathological changes in rats of each group (HE Staining, ×200)

2.3 DHJSD 对 KOA 大鼠血清炎症因子的影响

与空白组比较,模型组的 IL-1 β 、IL-6、IL-17 和 TNF- α 水平升高($P<0.01$);与模型组比较,DHJSD 组 IL-1 β 、TNF- α 水平降低($P<0.01$)。详见表 2。

表 2 各组大鼠血清炎症因子水平比较($\bar{x}\pm s$, $n=6$, pg·mL⁻¹)

Table 2 Comparison of serum inflammatory factor levels among various groups ($\bar{x}\pm s$, $n=6$, pg·mL⁻¹)

组别	IL-1 β	IL-6	IL-17	TNF- α
空白组	17.47 $\pm$ 1.91	68.48 $\pm$ 21.91	15.76 $\pm$ 2.65	156.78 $\pm$ 9.62
模型组	28.67 $\pm$ 5.02**	110.30 $\pm$ 22.22**	27.36 $\pm$ 4.71**	242.48 $\pm$ 12.85**
DHJSD 组	19.99 $\pm$ 4.23 $\Delta\Delta$	91.07 $\pm$ 12.56	22.82 $\pm$ 3.46**	168.86 $\pm$ 30.07 $\Delta\Delta$

注:与空白组比较,** $P<0.01$;与模型组比较, $\Delta\Delta P<0.01$ 。

2.4 DHJSD 对 KOA 大鼠滑膜组织 NF- κ B p65、mTOR、AMPK 和 PI3K 表达的影响

与空白组比较,模型组 NF- κ B p65、mTOR 和 AMPK 的表达量升高($P<0.05$);与模型组比较,DHJSD 组 mTOR 的表达量降低($P<0.05$)。详见表 3。

表 3 各组大鼠滑膜组织 NF- κ B p65、mTOR、AMPK 和 PI3K 表达量比较($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Table 3 Comparison of NF- κ B p65, mTOR, AMPK, and PI3K expression levels in synovial tissues among various groups ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

组别	NF- κ B p65	mTOR	AMPK	PI3K
空白组	1.206 $\pm$ 0.177	1.091 $\pm$ 0.228	1.161 $\pm$ 0.156	0.946 $\pm$ 0.455
模型组	2.471 $\pm$ 0.606**	5.355 $\pm$ 0.602**	2.373 $\pm$ 0.501**	2.249 $\pm$ 0.835
DHJSD 组	2.045 $\pm$ 0.232	4.044 $\pm$ 0.276** $\Delta\Delta$	1.464 $\pm$ 0.635	1.554 $\pm$ 0.191

注:与空白组比较,** $P<0.05$;与模型组比较, $\Delta\Delta P<0.05$ 。

2.5 肠道菌群分析

2.5.1 各组大鼠肠道菌群在 α 多样性上的变化
送检的 18 个大鼠粪便样本检测均合格,可用于 16S rDNA 高通量测序。 α 多样性分析稀释曲线平缓,表明数据量渐进合理,样品可做进一步分析。如表 4 所示,与空白组相比,模型组和 DHJSD 组大鼠的

Observed_otus 和 Chao1 指数均增加,表明这两组大鼠肠道菌群的物种丰富度较高。模型组的 Shannon 指数和 Simpson 指数高于空白组,表明模型组的菌群多样性增加。DHJSD 组的 Shannon 指数和 Simpson 指数低于模型组,表明其菌群多样性较低。模型组的 Pielou_e 指数高于空白组和 DHJSD 组,表明其菌群均匀度高。

2.5.2 各组大鼠肠道菌群在 β 多样性上的变化
NMDS 分析的 stress 值为 0.06,表明该模型拟合度较好(stress<0.2),NMDS 有一定的解释意义。结果表明,3 组之间的微生物群落结构存在显著差异。DHJSD 组的微生物群落结构与空白组和模型组明显不同,表明 DHJSD 对微生物群落结构有显著的调节作用。NMDS 和 PCoA 的结果一致,均显示 DHJSD 组的 β 多样性显著增加。详见图 2。

2.5.3 各组大鼠肠道菌群在门、属水平物种相对丰度上的变化
在门水平上,各组大鼠中的拟杆菌门(Bacteroidota)为占比较多的菌门。与空白组相比,模型组中的弯曲菌门(Campylobacterota)显著上升($P<0.01$)。与模型组相比,DHJSD 组中的拟杆菌门显著下降($P<0.01$),弯曲菌门显著下降($P<0.05$)。在属水平上,与空白组相比,模型组中拟杆菌属(*Bacteroides*)和肠杆菌属(*Enterorhabdus*)显著上升($P<0.05$)。与模型组相比,DHJSD 组中的拟杆菌属、肠杆菌属显著下降($P<0.01$)。详见图 3。

2.5.4 各组大鼠肠道菌群在属水平指示物种上的变化
筛选出在不同组别中显著富集的微生物物种,可认为这些物种能作为各组检测的潜在指示物种。指示值分析结果显示,在属水平上,空白组、模型组、DHJSD 组中显著富集的微生物物种分别为大肠杆菌属-志贺氏菌属(*Escherichia-Shigella*)、肠杆菌属和乳球菌属(*Lactococcus*)。详见图 4。

2.5.5 各组大鼠肠道菌群在细菌表型上的变化
细

表 4 各组大鼠 α 多样性指数比较

Table 4 Comparison of α diversity indices among various groups

分组	Observed_otus	Shannon	Simpson	Chao1	Goods_coverage	Pielou_e
空白组	668.83 $\pm$ 96.56	6.41 $\pm$ 0.80	0.96 $\pm$ 0.03	669.19 $\pm$ 96.51	1.00	0.68 $\pm$ 0.07
模型组	736.17 $\pm$ 104.60	7.17 $\pm$ 0.90	0.97 $\pm$ 0.05	736.61 $\pm$ 104.74	1.00	0.75 $\pm$ 0.08
DHJSD 组	909.33 $\pm$ 337.74	5.78 $\pm$ 1.09	0.89 $\pm$ 0.10	910.68 $\pm$ 337.74	1.00	0.59 $\pm$ 0.11

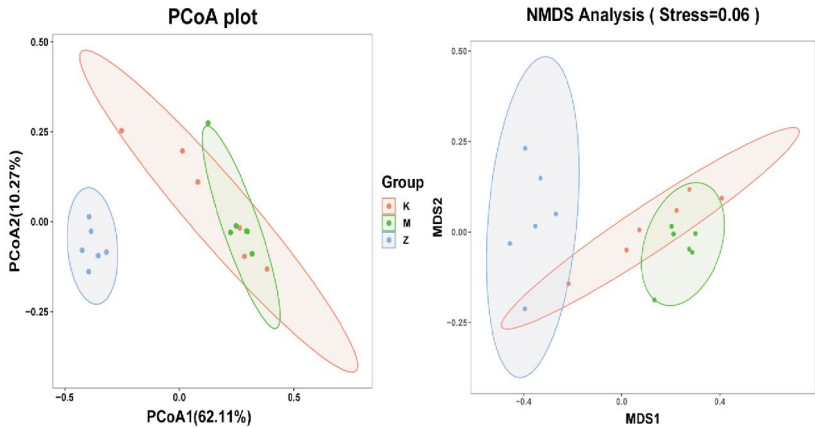


图 2 各组大鼠肠道菌群 PCoA 和 NMDS 分析

Fig.2 PCoA and NMDS analyses of intestinal flora in each group

注:A.PCoA 主坐标分析图;B.NMDS 非度量多维排列图。

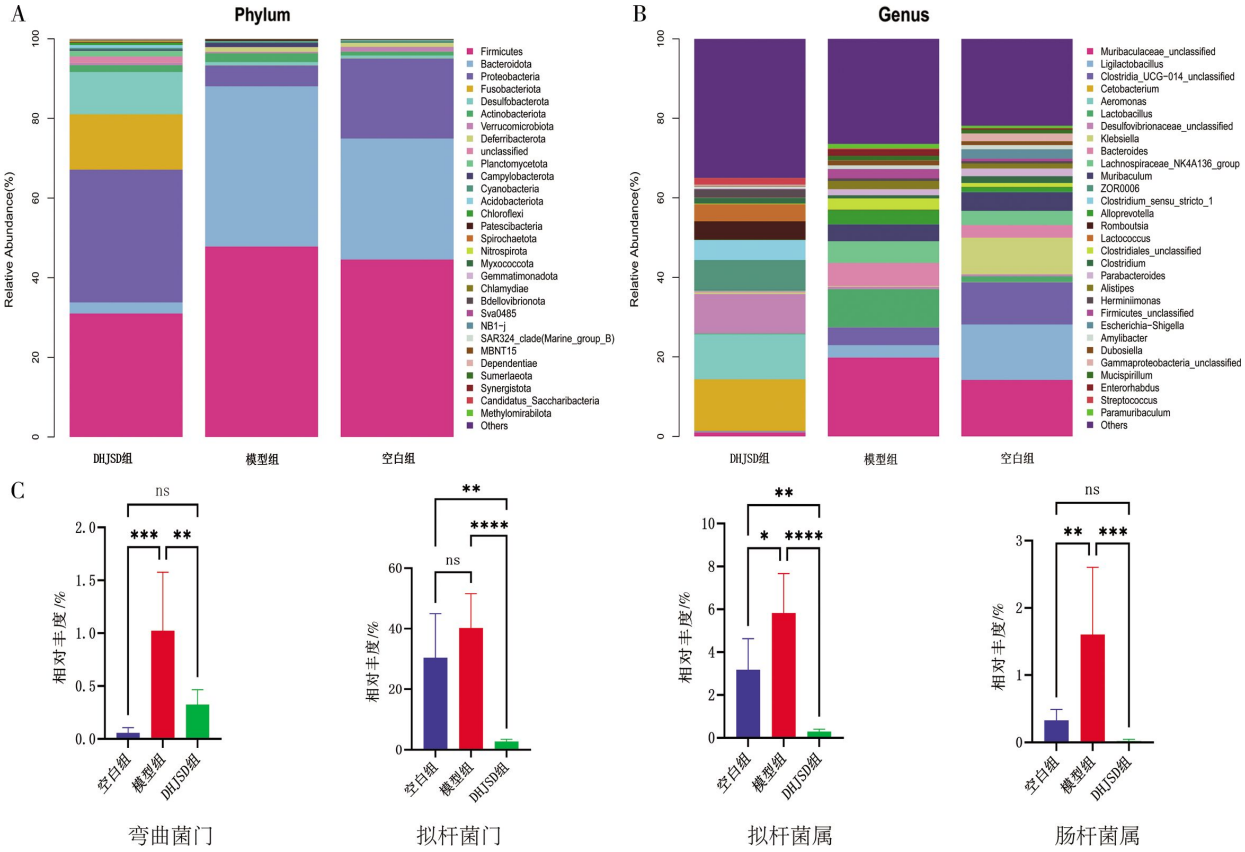


图 3 门、属水平物种分析

Fig.3 Species analysis at phylum and genus levels

注:A.门水平肠道微生物群的相对丰度;B.属水平肠道微生物群的相对丰度;C.门、属水平关键物种相对丰度差异比较柱状图。

菌表型分析结果表明,不同实验组间兼性厌氧菌、生物膜形成菌、潜在致病菌、革兰氏阴性菌、需氧菌、厌氧菌、含活性元件菌和革兰氏阳性菌的相对丰度无显著差异。详见图 5。

3 讨论

KOA 归属于中医学“痹证”范畴,常见的病因包

括风寒湿邪侵袭、气血不足等。DHJSD 是一种经典的中药方剂,具有补肝肾、强筋骨、祛风湿的作用,广泛用于治疗 KOA。本研究探讨 DHJSD 对 KOA 大鼠的治疗效果,结果发现,DHJSD 能改善 KOA 大鼠的一般情况(如活跃性、毛发光泽度及饮食情况),并可有效改善软骨损伤,减轻纤维化和炎症反应;DHJSD 可降低 KOA 大鼠的 IL-1 β 、TNF- α 水平,降低mTOR

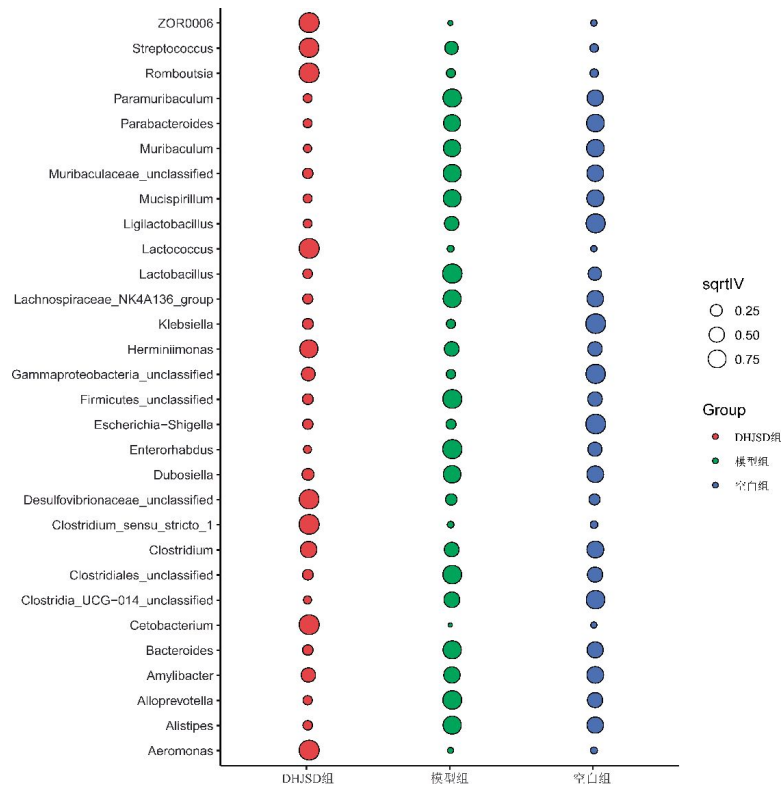


图 4 指示物种分析(属水平)

Fig.4 Indicator species analysis (at the genus level)

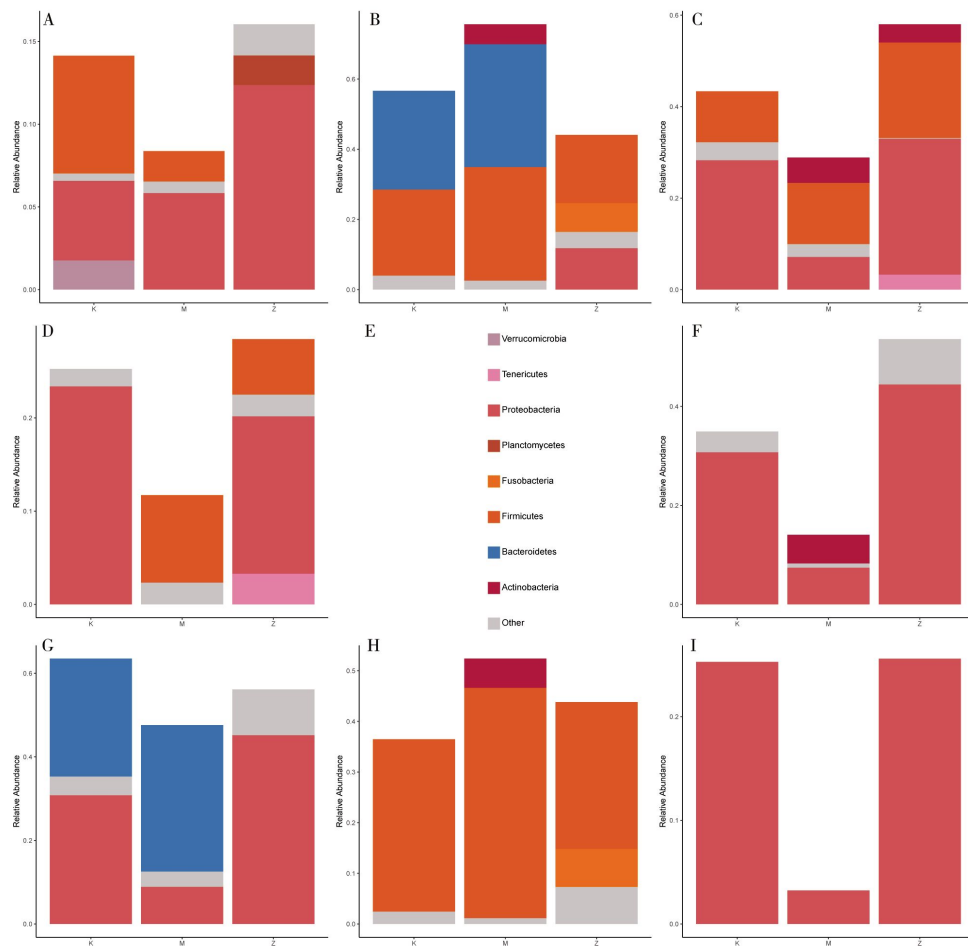


图 5 细菌表型预测分析

Fig.5 Predictive analysis of bacterial phenotypes

注:A.好氧;B.厌氧;C.含移动元素;D.兼性厌氧;E.菌型介绍;F.生物膜形成;G.革兰氏阴性;H.革兰氏阳性;I.潜在致病性。

相对表达量;DHJSD 通过调控肠道菌群多样性和物种组成发挥作用,提示肠道菌群的调节是其干预 KOA 的重要机制。

中医药对肠道菌群领域的探讨逐渐增加,其对慢性心力衰竭、血管性痴呆、慢性疲劳综合征和孤独症等有显著的调节作用^[18-21]。过往研究同样发现,中药对肠道菌群具有调节作用。吴霜等^[22]的研究显示,当归捻痛汤可以显著回调 KOA 模型中升高的放线菌门和拟杆菌属的丰度比例。易南星等^[23]的研究表明,加味 DHJSD 在治疗 KOA 大鼠时,能提高变形菌门的丰度,同时减少拟杆菌门和拟杆菌属的比例。本研究的结果与现有研究结果一致,进一步体现了中药在调节肠道菌群方面的潜力。在本研究中 α 、 β 多样性分析结果提示,DHJSD 可能通过增加物种丰富度和多样性而影响更多的靶点,从而发挥其治疗效果,但其中的潜在机制尚不清楚。

在本研究中,DHJSD 组表现出最高的物种丰富度,但其菌群多样性和均匀度稍低于模型组,表明 DHJSD 通过选择性增加某些关键菌群的丰度而发挥作用。具体而言,DHJSD 可能通过降低拟杆菌门的丰度,间接减少炎症因子 IL-1 β 和 IL-6 的表达,从而减轻炎症反应,缓解 KOA 的症状^[24]。而拟杆菌门丰度的降低还可以改善肠道屏障功能,减少肠道渗透性,防止有害物质进入血液循环,从而减少全身炎症反应^[25]。此外,副拟杆菌属(*Parabacteroides*)在维生素 D 缺乏的 KOA 患者中占主导地位,提示其丰度的增加可能对 KOA 的进展产生影响。这表明 DHJSD 可能通过调控拟杆菌门的丰度,间接改善维生素 D 缺乏的状态,从而对 KOA 的进展产生影响^[26]。而本研究 RT-qPCR 结果显示,DHJSD 可能通过调节肠道菌群组成,间接影响 mTOR 信号通路,从而发挥其治疗作用。mTOR 信号通路氧化应激反应有关,下调 mTOR 可减少氧化应激,保护关节细胞免受氧化损伤^[27]。

在本研究中,DHJSD 还显著降低了弯曲菌门物种丰度。弯曲菌门通过降低上皮钠离子通道的依赖性钠转运和下调紧密连接蛋白-8 的表达,可导致钠吸收功能障碍和肠道屏障功能损害^[28]。提示 DHJSD 可能通过抑制弯曲菌门的生长改善肠道屏障,减少有

害物质通过肠壁进入血液,从而促进 KOA 的恢复。

此外,在属水平方面,DHJSD 显著降低了肠杆菌属物种丰度,该菌属在模型组中富集最显著。同时指示物种分析结果显示,乳球菌属在 DHJSD 组中富集最显著,该菌属的益生菌作用已被广泛研究,其可以增强免疫反应、减少炎症和促进肠道健康^[29]。本研究结果表明,DHJSD 可以通过提高乳球菌属物种丰度减少全身炎症和增强整体代谢健康,从而对 KOA 等疾病产生有益影响。

综上所述,本研究发现 DHJSD 能调节肠道菌群结构、改善肠道屏障功能以及影响炎症和代谢通路,可能为 KOA 的治疗提供一种有效的中药方案。这些发现不仅拓展了中药治疗 KOA 的理论基础,也为进一步研究其潜在机制提供了参考方向。

参考文献

- [1] HUNTER D J, BIERMA-ZEINSTRAS S. Osteoarthritis[J]. Lancet, 2019, 393(10182): 1745-1759.
- [2] SHI X W, YU W J, WANG T, et al. Electroacupuncture alleviates cartilage degradation: Improvement in cartilage biomechanics via pain relief and potentiation of muscle function in a rabbit model of knee osteoarthritis[J]. Biomedicine & Pharmacotherapy, 2020, 123: 109724.
- [3] ZHENG W W, LI X L, LIU D Q, et al. Mechanical loading mitigates osteoarthritis symptoms by regulating endoplasmic reticulum stress and autophagy[J]. FASEB Journal, 2019, 33 (3): 4077-4088.
- [4] 杨浩宇, 王世坤, 杨东元, 等. 补肾活血中药治疗膝骨性关节炎与骨质疏松症“共病”机制研究进展[J]. 中草药, 2024, 55(11): 3898-3905.
- [5] CUI A Y, LI H Z, WANG D W, et al. Global, regional prevalence, incidence and risk factors of knee osteoarthritis in population-based studies[J]. Eclinicalmedicine, 2020, 29/30: 100587.
- [6] SIDDIQ M A B, CLEGG D, JANSEN T L, et al. Emerging and new treatment options for knee osteoarthritis[J]. Current Rheumatology Reviews, 2022, 18(1): 20-32.
- [7] 刘 军, 曾令峰, 杨伟毅, 等. 基于中医大健康理念探讨膝关节炎循证分期及阶梯治疗[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(4): 1321-1327.
- [8] CAO J H, FENG D G, WANG Y Z, et al. Chinese herbal medicine Du-Huo-Ji-Sheng-decoction for knee osteoarthritis: A protocol for systematic review and meta-analysis[J]. Medicine, 2021, 100 (3): e24413.

- [9] CHEN C W, SUN J, LI Y M, et al. Action mechanisms of du-Huo-ji-Sheng-Tang on cartilage degradation in a rabbit model of osteoarthritis[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2011, 2011: 571479.
- [10] CHEN Y, LI J L, LI Q, et al. Du-Huo-ji-Sheng-Tang attenuates inflammation of TNF- α mice related to promoting lymphatic drainage function[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2016, 2016: 7067691.
- [11] 贺琳钦, 李鹏飞, 李小冬, 等. 独活寄生汤调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路介导细胞焦亡对膝关节关节炎模型兔的影响[J]. *中国中药杂志*, 1-11[2024-11-29]. <https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20240912.401>.
- [12] SUN C, ZHOU X, GUO T, et al. The immune role of the intestinal microbiome in knee osteoarthritis: A review of the possible mechanisms and therapies[J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14: 1168818.
- [13] SICHETTI M, MARCO S D, PAGIOTTI R, et al. Anti-inflammatory effect of multistrain probiotic formulation (*L. rhamnosus*, *B. lactis*, and *B. longum*)[J]. *Nutrition*, 2018, 53: 95-102.
- [14] KALINKOVICH A, LIVSHITS G. A cross talk between dysbiosis and gut-associated immune system governs the development of inflammatory arthropathies[J]. *Seminars in Arthritis and Rheumatism*, 2019, 49(3): 474-484.
- [15] BOVE S E, CALCATERRA S L, BROOKER R M, et al. Weight bearing as a measure of disease progression and efficacy of anti-inflammatory compounds in a model of monosodium iodoacetate-induced osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis and Cartilage*, 2003, 11(11): 821-830.
- [16] 陈蔚, 李恒聪, 万红叶, 等. 电针对膝关节骨关节炎大鼠滑膜炎性反应期自发痛及后期诱发痛的影响[J]. *中国针灸*, 2022, 42(12): 1385-1393.
- [17] REAGAN-SHAW S, NIHAL M, AHMAD N. Dose translation from animal to human studies revisited[J]. *FASEB Journal*, 2008, 22(3): 659-661.
- [18] 吕李飞, 朱婷婷, 丁帆, 等. 慢性心力衰竭气虚血瘀证模型大鼠肠道菌群诱发心肌炎症的特征变化[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(10): 1771-1780.
- [19] 倪伟, 钟润琪, 陈海交, 等. 基于肠道菌群探针刺激通调阳明治疗血管性痴呆的机制[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(7): 1292-1297.
- [20] 钟叶蓓, 林巧婷, 杨尚林, 等. 背俞功能带推拿对慢性疲劳综合征大鼠肠道菌群及色氨酸代谢的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(6): 1042-1050.
- [21] 郝兴宇, 谢映, 吴吉, 等. 归脾丸对粪菌移植造模的孤独症谱系障碍大鼠行为学及脑 5-HT 含量的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(6): 936-942.
- [22] 吴霜, 袁立霞, 廖晴, 等. 基于 16S rDNA 测序研究当归拈痛汤对膝关节炎小鼠肠道菌群的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(11): 9-17.
- [23] 易南星, 米倚林, 许晓彤, 等. 加味独活寄生合剂缓解小鼠膝关节炎过程中肠道菌群的参与机制[J]. *中国药理学通报*, 2022, 38(4): 625-632.
- [24] WAN F, HAN H, ZHONG R Q, et al. Dihydroquercetin supplement alleviates colonic inflammation potentially through improved gut microbiota community in mice[J]. *Food & Function*, 2021, 12(22): 11420-11434.
- [25] LIAN W S, WANG F S, CHEN Y S, et al. Gut microbiota ecosystem governance of host inflammation, mitochondrial respiration and skeletal homeostasis[J]. *Biomedicine*, 2022, 10(4): 860.
- [26] RAMASAMY B, MAGNE F, TRIPATHY S K, et al. Association of gut microbiome and vitamin D deficiency in knee osteoarthritis patients: A pilot study[J]. *Nutrients*, 2021, 13(4): 1272.
- [27] WU J J, YANG F, ZHANG X, et al. Hydrogen sulfide inhibits endoplasmic reticulum stress through the GRP78/mTOR pathway in rat chondrocytes subjected to oxidative stress[J]. *International Journal of Molecular Medicine*, 2021, 47(4): 34.
- [28] NATTRAMILARASU P K, BÜCKER R, LOBO DE SÁ F D, et al. *Campylobacter concisus* impairs sodium absorption in colonic epithelium via ENaC dysfunction and claudin-8 disruption[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2020, 21(2): 373.
- [29] DARBY T M, OWENS J A, SAEEDI B J, et al. *Lactococcus lactis* subsp. *cremoris* is an efficacious beneficial bacterium that limits tissue injury in the intestine[J]. *iScience*, 2019, 12: 356-367.

(本文编辑 周旦)