

· 药效与毒理学研究 ·

白芍总苷长期给药对胶原诱导型关节炎大鼠和正常大鼠肠道菌群影响的纵向研究

彭金娥^{1,2,3}, 韩雅馨^{2,3}, 卢旭然^{2,3}, 谢凯莉^{2,3}, 南楠^{2,3}, 曹炜⁴, 龚慕辛^{2,3}(1. 首都医科大学附属北京地坛医院药学部, 北京 100015; 2. 首都医科大学中医药学院, 北京 100069; 3. 中医络病研究北京市重点实验室, 北京 100069; 4. 中国中医科学院广安门医院, 北京 100053)

摘要: 目的 纵向观察不同剂量白芍总苷(total glucosides of paeony, TGP)给药 12 周过程中对胶原诱导型关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠以及正常大鼠肠道菌群(简称“菌群”)的影响, 发现白芍总苷长期给药重点调控的菌群及其代谢功能, 以探究其通过影响菌群治疗类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的机制。**方法** 将雄性 SD 大鼠随机分为正常组、模型组、正常及模型给药白芍总苷(948、474、158 mg·kg⁻¹)剂量组。于模型复制后给药 0 周(给药前)以及给药 4、8、12 周后收集大鼠粪便样本, 利用 Illumina Miseq 平台进行高通量测序, 采用相应软件进行操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)、Alpha 多样性指数测定, 进行 Beta 多样性分析、基于图形系统发育分析(graphical phylogenetic analysis, GraPhlAn)、偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)与线性判别分析(linear discriminant analysis effect size, LEfSe)等的菌群群落结构相似性分析。同时借助数据库进行菌群不同水平分类学组成分析以及 PICRUSt(phylogenetic investigation of communities by reconstructing unobserved states)菌群功能的预测。每组先进行不同时间点上述指标的动态变化分析, 再进行各组间扣除相同变化后的比较, 筛选出白芍总苷对胶原诱导型关节炎和正常大鼠或 2 个以上剂量调节作用相同的菌群及菌群代谢功能。**结果** (1)白芍总苷 3 个剂量均可影响胶原诱导型关节炎大鼠菌群 OTU 的经时变化, 仅低剂量可影响正常大鼠该指标的经时变化。(2)白芍总苷中、高剂量影响胶原诱导型关节炎大鼠菌群 Alpha 多样性指数的经时变化, 而 3 个剂量均不影响正常大鼠该指标的经时变化。(3)综合 Beta 多样性分析以及 GraPhlAn、PLS-DA、LEfSe 分析, 对胶原诱导型关节炎大鼠菌群的影响白芍总苷低、高剂量强于中剂量, 对正常大鼠则白芍总苷中、高剂量强于低剂量。*Coprococcus* 属是白芍总苷给药后胶原诱导型关节炎和正常大鼠共同的优势菌属, *Akkermansia*、*Sutterella*、*Bacteroides*、*Parabacteroides*、*SMB53* 属是不同剂量白芍总苷给药后共同的菌群差异贡献者。(4)不同剂量白芍总苷对胶原诱导型关节炎大鼠各水平分类学组成分析影响呈剂量依赖性, 对正常大鼠则作用相近; 白芍总苷低、中剂量对胶原诱导型关节炎和正常大鼠菌群影响均不同, 而高剂量对两者的 *Peptococcaceae* 科、*Coprococcus* 属影响明显。(5)胶原诱导型关节炎大鼠升高的 Biosynthesis of Other Secondary Metabolites 菌群代谢功能(以下简称“功能”), 可被中剂量白芍总苷降低; 3 个剂量白芍总苷均明显升高胶原诱导型关节炎大鼠 Endocrine System 功能, 中、高剂量均明显升高 Immune System 功能, 低、高剂量均明显降低 Cardiovascular Diseases、Cellular Processes and Signaling 功能。高剂量白芍总苷降低正常和胶原诱导型关节炎大鼠中 Immune System Diseases 功能。**结论** 白芍总苷对胶原诱导型关节炎大鼠的菌群调节作用强于正常大鼠。上述白芍总苷长期给药稳定和重点调节的菌群和菌群代谢功能解释了其对类风湿关节炎的疗效, 不同剂量白芍总苷明显影响的菌群和菌群代谢功能不同。

关键词: 白芍总苷; 胶原诱导型关节炎; 肠道菌群; 经时变化; 菌群代谢功能; 大鼠

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1003-9783(2021)01-0001-16

doi: 10.19378/j.issn.1003-9783.2021.01.001

收稿日期: 2020-05-20

作者简介: 彭金娥, 女, 药师, 博士, 研究方向: 中药药效物质基础研究。Email: pengjinepinbo@126.com。通信作者: 龚慕辛, 女, 教授, 研究方向: 中药复方药效物质基础研究。Email: gongmuxin@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81773860)。

Longitudinal Study on Dynamic Alterations in the Gut Microbiota of Collagen-Induced Arthritis and Normal Rats Following the Prolonged Administration of Total Glucosides of Paeony

PENG Jine^{1,2,3}, HAN Yaxin^{2,3}, LU Xuran^{2,3}, XIE Kaili^{2,3}, NAN Nan^{2,3}, CAO Wei⁴, GONG Muxin^{2,3} (1. Department of Pharmacy, Beijing Ditan Hospital Capital Medical University, Beijing 100015, China; 2. School of Traditional Chinese Medicine, Capital Medical University, Beijing 100069, China; 3. Beijing Key Laboratory of Tradition Medicine Collateral Disease Theory Research, Beijing 100069, China; 4. Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100053, China)

Abstract: Objective In order to find the main gut flora and its metabolic function regulated by total glucosides of paeony (TGP) after long-term administration, and elucidate the mechanism of TGP in the treatment of RA by modulating the flora, we carried out a 12-week longitudinal study in collagen-induced arthritis (CIA) rats and normal rats following the prolonged administration of three doses of TGP (948, 474, 158 mg·kg⁻¹). **Methods** Male Sprang-Daley (SD) rats were randomly divided into normal group, model group, high, medium and low dose group of TGP. Fecal samples of rats were collected before administration and 4, 8 and 12 weeks after administration of TGP. High throughput sequencing was performed by using Illumina Miseq platform. The operational taxon (operational taxonomic unit, OTU) and alpha diversity index were measured with corresponding software, and the similarity analysis of community structure including beta diversity analysis, visualization analysis based on graphical phylogenetic analysis (GraPhlAn), partial least squares discriminant analysis (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA) and linear discriminant analysis (linear discriminant analysis effect size, LEfSe) were used. At the same time, the taxonomic composition at different levels and the flora function prediction of PICRUSt (phylogenetic investigation of communities by reconstructing unobserved states) were carried out with the help of database. The dynamic alterations of bacterial community structure and metabolic function of flora were analyzed at different time points in each group. After deductions of the same alterations of flora over time, the comparison between different groups was carried out. The same alterations in the gut antimicrobial caused by TGP administration were screened out in CIA and normal rats groups or in different dose groups. **Results** (1) All three doses TGP affected the time-dependent changes of OTU in CIA rats, but only low-dose TGP affected the time-dependent changes of OTU in normal rats. (2) The middle and high doses of TGP affected the time-dependent changes of alpha diversity index in CIA rats, but three doses of TGP did not affect the same index in normal rats. (3) Based on the analysis of beta diversity, GraPhlAn, PLS-DA and LEfSe, it was found that the effect of low-dose and high-dose TGP on the fecal flora in CIA rats is stronger than that of medium-dose, while the effect of medium-doses and high-dose TGP on the fecal flora in normal rats is stronger than that of low-dose. *Coprococcus* is the common dominant genus both in CIA and normal rats after TGP administration. *Akkermansia*, *Sutterella*, *Bacteroides*, *Parabacteroides* and *SMB53* are the common contributors of flora following administration of different doses of TGP. (4) The taxonomic analysis showed that the function intensity of different doses of TGP on the flora was dose-dependent in CIA rats, but it is similar in normal rats. The effects of low-dose and medium-dose TGP on the flora of CIA and normal rats were different, while the high dose of TGP had significant effect on the Peptococcaceae and *Coprococcus* both in normal and CIA rats. (5) The flora metabolism function (function) "Biosynthesis of Other Secondary Metabolites" in CIA rats increased, which could be reduced by the middle dose of TGP; Three doses of TGP significantly increased the "Endocrine System" function in CIA rats, and the middle and high doses significantly increased the "Immune System" function, and the low and high doses significantly reduced "Cardiovascular Diseases", "Cellular Processes and Signaling" function. High dose of TGP decreased "Immune System Diseases" function in normal and CIA rats. **Conclusion** TGP has stronger effect on the flora regulation in CIA rats than in normal rats. The flora and flora metabolism functions regulated by TGP mentioned above explain its therapeutic effect on RA, TGP administration in different doses affects different flora and flora metabolism functions.

Keywords: Total glucosides of paeony; collagen-induced arthritis; intestinal flora; time-dependent changes; metabolic function of flora; rats

白芍总苷(total glucosides of paeony, TGP)作为抗炎免疫调节药已在临床上广泛用于治疗类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA), 疗效确切, 不良反应少, 但存在起效较慢^[1]、疗效个体差异大^[2]等缺陷。分析白芍总苷的药动学行为, 结合临床作用特点, 推测白芍总苷可能通过调节肠道菌群起效。

本课题组前期研究^[3]建立了胶原诱导型关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)大鼠模型, 模拟临床长期给药, 观察白芍总苷不同剂量灌胃正常和胶原诱导型关节炎大鼠 12 周后, 对脏器系数、踝关节形态、关节滑膜 VEGF 含量, 外周血免疫指标的影响, 认为白芍总苷可诱导自身免疫耐受并抑制炎症反应, 从而保护胶原诱导型关节炎大鼠足爪关节和骨组织功能结构; 同时观察灌胃给药 4、8、12 周后每个时间点给药组与对照组的粪便菌群变化, 分类学水平分析中发现白芍总苷逆转了模型对照组与正常对照组之间 78% 的差异菌, 并增加了一些有益共生菌的相对丰度, 为白芍总苷治疗类风湿关节炎的机制研究提供了新思路。但该研究属于横向研究, 容易忽略各个比较组之间除要考察的因素外, 还可能存在其他差异, 也不适用于研究白芍总苷调节菌群变化的稳定性等问题^[4]。为了克服这一缺点, 本研究从纵向研究的角度, 先对同一处理组不同时间点菌群经时变化进行分析, 再进行各组间比较, 筛选出白芍总苷对胶原诱导型关节炎和正常大鼠或 2 个以上剂量调节作用相同的菌群及菌群代谢功能, 以发现不同剂量白芍总苷长期给药稳定及重点调节的粪便菌群及菌群代谢功能, 为进一步明确白芍总苷调节肠道菌群治疗类风湿关节炎的机制提供参考。

1 材料与方法

1.1 动物 7~8 周龄的健康雄性 Sprague-Dawley (SD) 大鼠, SPF 级, 体质量(180±20)g, 北京维通利华实验动物技术有限公司提供, 动物许可证号: SCXK(京)2016-0011, 动物质量合格证号: 11400700218906。饲养于首都医科大学实验动物中心, 湿度 55%~60%, 光/暗循环 12 h, 温度 22~24 °C。大鼠可以自由接触经过消毒的食物和水。动物协议由首都医科大学动物实验与实验动物管理委员会(伦理批准号: AEEI-2014-128)批准。

1.2 药物及试剂 白芍总苷胶囊, 宁波立华制药有限公司, 批号: 161118; 牛源性 II 型胶原蛋白(2 mg·mL⁻¹, 货号: 2002)、完全弗氏佐剂(4 mg·mL⁻¹, 货号: 7001)、非完全弗氏佐剂(货号: 7002), 以上 3 种均购于美国 Chondrex 公司。Mag-Bind soil DNA kit (200), 美国 Omega 公司, 货号: M5635-02; Q5[®] High-Fidelity DNA Polymerase, 美国 NEB 公司, 货号: M0491L; Agencourt AMPure Beads, 美国 Beckman Coulter 公司, 货号: A63881; PicoGreen dsDNA Assay Kit, 美国 Invitrogen 公司, 货号: P7589; RNA 6000 Nano kit, 美国 Agilent 公司, 货号: 5067-1511; MiSeq Reagent Kit v3 (600 cycle), 美国 Illumina 公司, 货号: MS-102-3003。

1.3 仪器 -80 °C 超低温冰箱及 NanoDropND-1000 分光光度计, 美国 Thermo Fisher Scientific 公司; TP-402 电子天平, 丹佛仪器北京有限公司; CP224C 万分之一天平, 贝豪斯上海有限公司; DV215CD 十万分之一天平, 美国 Discovery 公司; PRO200 匀浆仪, 美国 Pro Scientific 公司; TBS380 荧光计, 美国 Promega 公司; DYY-6C 电泳仪, 北京六一生物科技有限公司; 2100 生物分析仪, 美国 Agilent 公司; 2720 PCR 扩增仪, 美国 ABI 公司; Illumina Miseq 高通量测序仪, 美国 Illumina 公司。

1.4 分组、模型复制^[5-7]及给药方法 模型复制第 1 天, 在距离大鼠尾根部 1.5 cm 处皮内注射 0.1 mL 含牛源性 II 型胶原的浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的 BC II/CFA 乳液; 模型复制第 21 天, 同法注射 0.1 mL 含牛源性 II 型胶原的浓度为 1 mg·mL⁻¹ 的 BC II/IFA 乳液。大鼠致炎后开始观察并记录关节病变程度, 按 5 级评分法评分^[8], 4 个足爪的病变程度累计积分, 计算出关节炎指数(Arthritis index, AI)。在模型复制第 28 天, 将大鼠中 AI ≥ 4 的大鼠视为模型复制成功, 成模率为 80%。

将 36 只 SD 大鼠按照体质量随机分为 4 组, 分别是正常对照组(Control), 白芍总苷低、中、高剂量正常组(C+LTGP、C+MTGP、C+HTGP), 每组 9 只。将 50 只 SD 大鼠用来复制模型, 造模成功后按照关节炎指数、体质量随机分为 4 组, 分别是模型对照组(CIA), 白芍总苷低、中、高剂量模型组(CIA+LTGP、CIA+MTGP、CIA+HTGP), 每组 10 只。保证

各胶原诱导型关节炎大鼠在模型复制成功后体质量、关节炎指数评分无明显差异。TGP 高、中、低剂量组(948、474、158 mg·kg⁻¹, 为成人临床剂量的 6、3、1 倍), 每天取胶囊内容物用蒸馏水溶解至浓度为 126、63、21 mg·mL⁻¹, 灌胃给药 1 次, 连续 84 d。正常对照组及模型对照组给予等容积的蒸馏水。

1.5 16S rDNA PCR 扩增及高通量测序 于给药 0、4、8、12 周收集大鼠新鲜粪便于高压灭菌的冻存管中, -80 °C 保存。取各组药效指标变化明显的大鼠粪便样品各 3 份进行分析。应用试剂盒提取大鼠新鲜粪便的微生物组总 DNA, 并通过琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 提取质量, 同时采用分光光度计对 DNA 进行定量。微生物组总 DNA 保存于 -20 °C 备用。微生物 16S rRNA 基因通过使用前引物 338F (5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3') 和后引物 806R (5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3') 进行 V3~V4 区域 PCR 扩增。样本特异性 7-bp 条形码被整合到引物中用于多重测序。PCR 反应体系包括 5 μL 的 Q5 反应缓冲液(5×)、5 μL 的 Q5 高保真 GC 缓冲液(5×)、0.25 μL 的 Q5 高保真 DNA 聚合酶(5 U·μL⁻¹)、2 μL 的 dNTPs(2.5 mmol·L⁻¹)、引物各 1 μL(10 μmol·L⁻¹)、2 μL 的 DNA 模板和 8.75 μL ddH₂O。PCR 扩增条件: 98 °C 预变性 5 min; 98 °C 预变性 30 s, 50 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 24 次循环; 72 °C 再延伸 10 min。PCR 扩增产物用 Agencourt AMPure Beads 进行纯化, 用 PicoGreen dsDNA Assay Kit 进行定量。将纯化后的扩增产物等量混合, 并使用 MiSeq Reagent Kit v3 根据 Illumina MiSeq 测序平台的标准规程进行 2 × 300 bp 双末端测序。

1.6 操作分类单元(operational taxonomic unit, OTU)测定 Quantitative Insights Into Microbial Ecology (QIIME, 1.8 版)软件用于原始序列质量筛选^[9]。使用 FLASH 组装成对的末端读数^[10]。在检测到嵌合体之后, 剩余的高质量序列被 UCLUST 以 97% 的序列一致性聚集成 OTU^[11]。使用默认参数从每个 OTU 中选择一个具有代表性的序列。然后, 利用最佳命中率^[12]对 Greengenes 数据库中的代表性序列进行 BLAST 搜索, 进行 OTU 分类^[13]。序列数据分析主要使用 QIIME 和 R 软件包(版本 3.2)进行。使用 R 软件包和基于样本/组之间的 OTU 的出现(无论其相对丰度如何)生成 Venn 图, 来使样本或组间的共享和独有的 OTU 可视化。

1.7 Alpha 多样性指数测定 利用 QIIME 生成的

OTU 表计算 OTU 水平 Alpha 多样性指数, 如 Chao1 丰富度指数和 Shannon 多样性指数, 比较不同样品之间 OTU 的相对丰度和多样性^[14]。

1.8 菌群群落结构相似性分析

1.8.1 Beta 多样性分析 使用 UniFrac 距离度量^[15-16]和非度量多维标度(Nonmetric Multidimensional Scaling, NMDS)^[17]进行, 以研究样品之间微生物群落的结构变化。使用 R 软件包中的 vegan 功能, 通过相似性分析(analysis of similarities, ANOSIM)^[18-19]和变异的方差多元分析(permutational multivariate analysis of variance, PERMANOVA)^[20]评估各组之间微生物群落结构差异。

1.8.2 基于 GraPhlAn 的可视化分析 基于 GraPhlAn 的可视化分析显示分类学组成信息^[21]。

1.8.3 偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA)与线性判别分析(Linear discriminant analysis effect size, LEfSe) 利用 R 软件包 mixOmics 中的 plsda 功能揭示组间微生物群的变化^[22]。然后, 使用默认参数进行 LEfSe 分析, 以检测各组之间不同相对丰度的分类群^[23]。

1.9 分类学组成分析 利用分类学组成分析(<http://qiime.org/>)对不同种类的物种在门、纲、目、科和属水平上的相对丰度进行统计。

1.10 PICRUST(phylogenetic investigation of communities by reconstructing unobserved states)菌群功能的预测 通过将 16S rRNA 基因测序数据与 KEGG(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库对比, 实现对菌群功能的预测^[24]。

1.11 统计学处理方法 所有统计分析采用 SPSS 17 (IBM, Armonk, NY, USA)和 Prism 7 (GraphPad, CA, USA)软件进行。原始数据的统计学分析首先做正态性检验, 若符合正态性和方差齐性, 则应用 LSD 进行多组间单因素方差(ANOVA)分析, 否则用秩和检验。计量资料结果以均数±标准误($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)表示, 所有的统计检验均采用双侧检验, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。基于 Benjamini & Hochberg 方法, 用 Prism 7 软件进行多重比较的校正, 以避免出现假阳性。

2 结果

2.1 白芍总苷对 OTU 的影响 如表 1 所示, 正常对照组大鼠粪便菌群 OTU 总数和独有 OTU 数在 4、8 周先降低, 12 周有所回升。除白芍总苷低剂量正常组 8 周到 12 周降低外, 白芍总苷中、高剂量正常组的变化规律与正常对照组相同。模型对照组大鼠

粪便菌群 OTU 总数从给药 0 周到 4 周增加幅度较小, 从 4 周到 8 周降低幅度较大, 从 8 周到 12 周增加幅度较小; 同时各时间点独有 OTU 数一直降低。而白芍总苷低剂量模型组 OTU 总数在 4 周略有升高, 8、12 周降低, 同时各时间点独有 OTU 数一直降低; 白芍总苷中剂量模型组 OTU 总数在 4、8、12 周降低, 同时各时间点独有 OTU 数在先降低后有所回升; 白芍总苷高剂量模型组 OTU 总数和各时间点独有 OTU 数在 4、8、12 周降低, 但是 12 周相对于 8 周有所回升。以上说明白芍总苷低、中、高剂量干预均影响胶原诱导型关节炎大鼠菌群 OTU 的经时变化规律。

表 1 3 种剂量白芍总苷对正常和胶原诱导型关节炎大鼠粪便菌群 OTU 经时变化的影响(n=3)

Table 1 Effects of three doses of TGP on the time-dependent changes of OTU of fecal flora in normal and CIA rats(n=3)

| 组别 | 剂量/ (mg·kg ⁻¹) | OTU 总数/个 | | | | 独有 OTU 数/个 | | | |
|------------|-------------------------------|----------|-------|-------|-------|------------|-----|-----|------|
| | | 0 周 | 4 周 | 8 周 | 12 周 | 0 周 | 4 周 | 8 周 | 12 周 |
| 正常对照组 | - | 3 466 | 3 188 | 1 893 | 2 507 | 1 314 | 795 | 306 | 619 |
| 白芍总苷低剂量正常组 | 158 | 2 019 | 2 140 | 1 414 | 1 310 | 1 012 | 847 | 439 | 336 |
| 白芍总苷中剂量正常组 | 474 | 2 225 | 1 817 | 1 353 | 1 555 | 1 233 | 575 | 336 | 491 |
| 白芍总苷高剂量正常组 | 948 | 2 569 | 1 972 | 1 223 | 1 359 | 1 567 | 684 | 263 | 342 |
| 模型对照组 | - | 2 273 | 2 304 | 1 845 | 1 889 | 790 | 674 | 538 | 508 |
| 白芍总苷低剂量模型组 | 158 | 1 900 | 1 997 | 1 418 | 1 361 | 897 | 667 | 448 | 377 |
| 白芍总苷中剂量模型组 | 474 | 2 031 | 2 015 | 1 536 | 1 446 | 1 023 | 708 | 388 | 394 |
| 白芍总苷高剂量模型组 | 948 | 1 933 | 1 913 | 1 251 | 1 472 | 1 032 | 659 | 291 | 448 |

2.2 白芍总苷对 Alpha 多样性指数的影响 由图 1-A 可知, 与 0 周比较, 正常对照组 8、12 周的 Chao1、ACE 指数均降低 ($P < 0.01$), Shannon 指数也降低 ($P < 0.05$)。与 0 周比较, 白芍总苷低剂量正常组 8 周的 Chao1、ACE 指数均降低 ($P < 0.05$), Shannon 指数降低 ($P < 0.01$); 12 周的 Chao1、Shannon 指数均降低 ($P < 0.05, P < 0.01$)。与 0 周比较, 白芍总苷中剂量正常组 8 周的 Chao1、ACE、Shannon 指数均降低 ($P < 0.01$), 12 周 3 个指数均降低 ($P < 0.05$)。与 0 周比较, 白芍总苷高剂量正常组 8 周 Chao1、ACE 指数均降低 ($P < 0.01$), 12 周 Chao1、ACE、Shannon 指数均降低 ($P < 0.01, P < 0.01, P < 0.05$)。结果显示, 随时间迁移正常大鼠粪便菌群大部分 Alpha 多样性指数降低, 给予白芍总苷并不能改变这种趋势。

由图 1-B 可知, 与 0 周比较, 模型对照组和白芍总苷低剂量模型组的 Chao1、ACE 指数随时间迁移

均无明显变化。与 0 周比较, 白芍总苷中剂量模型组 12 周 Chao1、ACE 指数均降低 ($P < 0.05$); 白芍总苷高剂量模型组 8 周和 12 周的 Chao1、ACE 指数均降低 ($P < 0.01, P < 0.05$)。在模型对照组、白芍总苷低、中、高剂量模型组这 4 组, Shannon 指数随时间迁移均无明显变化。结果显示, 随时间迁移胶原诱导型关节炎大鼠粪便菌群 Alpha 多样性指数均无明显变化, 而白芍总苷中、高剂量随给药时间延长, 可持续降低胶原诱导型关节炎大鼠的 Chao1、ACE 指数, 白芍总苷低剂量则无此作用。图 1 说明正常大鼠和胶原诱导型关节炎大鼠肠道菌群的 Alpha 多样性随时间的变化明显不同。

2.3 白芍总苷对菌群群落结构相似性的影响

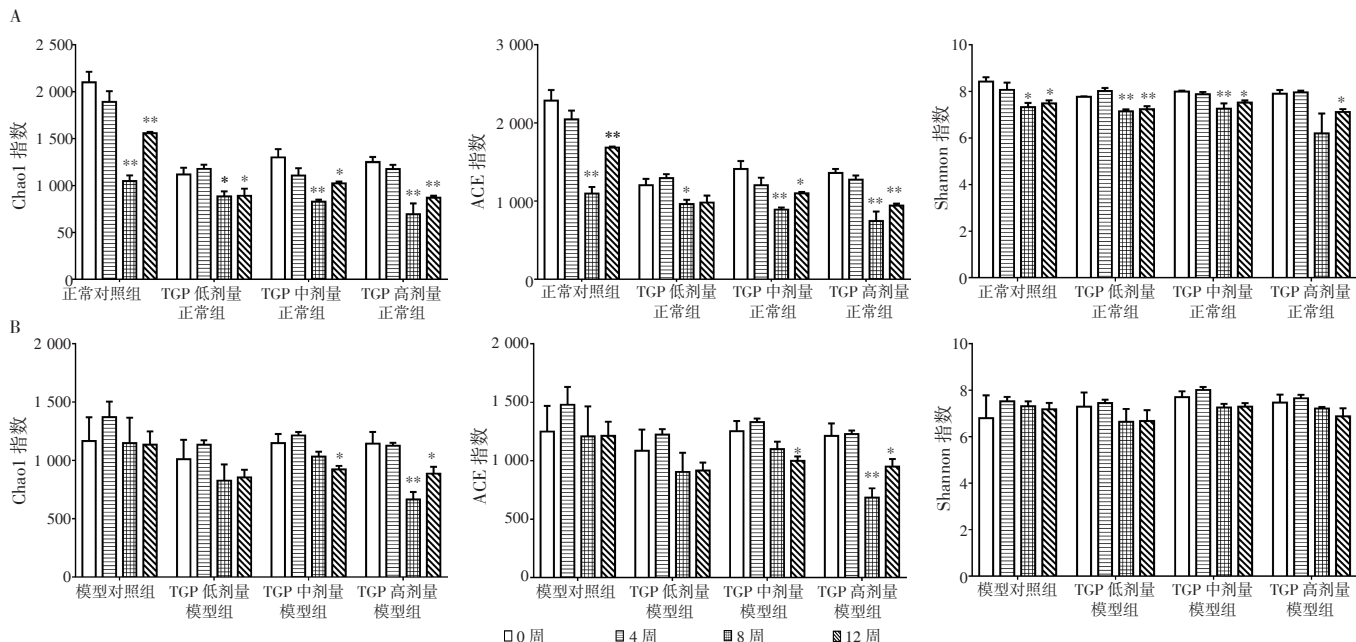
2.3.1 Beta 多样性分析结果 由图 2 可知, 8 组大鼠的粪便菌群结构在同一个时间点均组内聚集, 但是随时间迁移, 同组不同时间点之间的粪便菌群结构存在差异。ANOSIM (Unweighted UniFrac) 和 Adonis/PERMANOVA (Unweighted UniFrac) 分析结果也显示, 无论白芍总苷给药与否, 胶原诱导型关节炎和正常大鼠的菌群结构均会随时间发生变化。

2.3.2 基于 GraPhlAn 的可视化分类学组成信息分析结果 由表 2 可知, 正常对照组及白芍总苷低、中、高剂量正常组均有 14 个共同的优势微生物类群; 模型对照组及白芍总苷低、中、高剂量模型组均有 13 个共同的优势微生物类群。将其扣除后, 正常各组及正常两组以上共有的优势微生物类群见表 3, 可见中、高剂量白芍总苷对正常大鼠菌群的影响大于低剂量。白芍总苷低、中、高剂量模型组均有 *Coprococcus* 属的优势微生物类群, 值得重点关注。模型各组及模型两组以上共有的优势微生物类群见表 3, 说明低、高剂量白芍总苷对胶原诱导型关节炎大鼠菌群的影响大于中剂量。白芍总苷低、中、高剂量模型组 3 组间没有共同的优势微生物类群; 白芍总苷低、中剂量模型组这 2 个组有 2 科共同的优势微生物类群; 白芍总苷中、高剂量模型组这 2 个组有 1 科、1 属共同的优势微生物类群, 值得重点关注。考虑 Prevotellaceae、Peptostreptococcaceae 科在模型对照组也是优势菌属, 故 Bacteroidaceae 科、*Coprococcus* 属更可能是白芍总苷影响的菌, 值得重点关注。

除正常和模型 8 个组共有的 13 个优势微生物类群外, 正常对照组与模型对照组大鼠除 Peptostreptococcaceae、Prevotellaceae 科外无相同的优

势微生物类群。将同一剂量白芍总苷对正常和胶原诱导型关节炎大鼠 4 个时间点的综合影响进行对比,发现白芍总苷低剂量对正常和胶原诱导型关节炎大鼠的动态影响中 *Prevotella* 属为相同的优势微生物类群;白芍总苷中、高剂量对正常和胶原诱导型

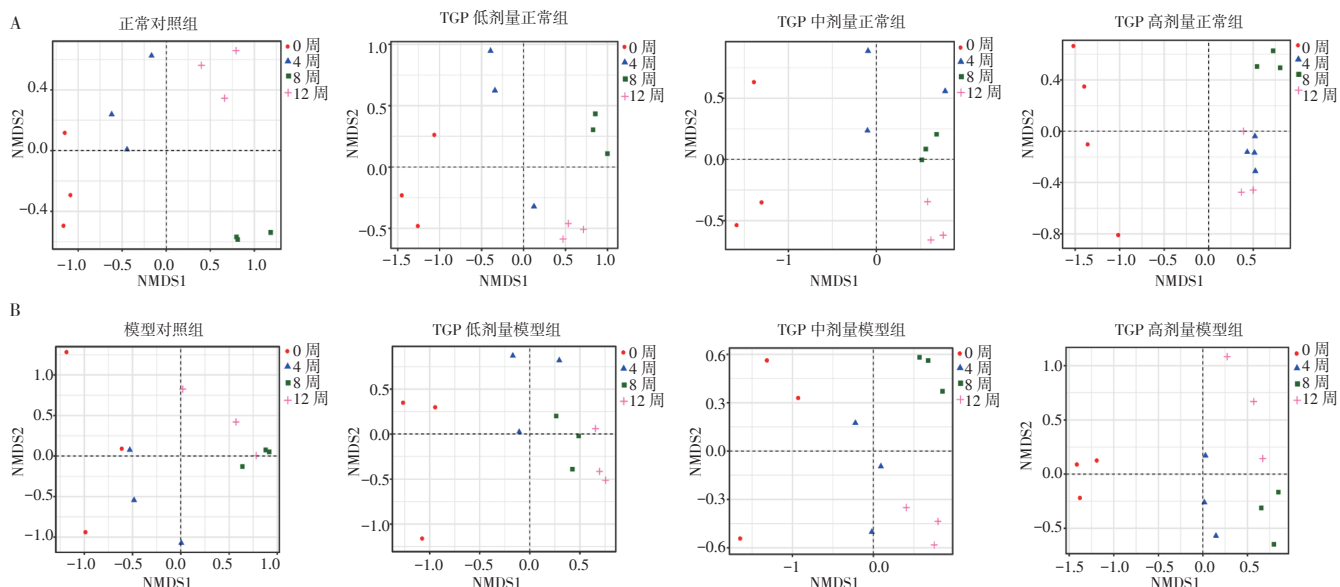
关节炎大鼠的动态影响中 *Coprococcus* 属为相同的优势微生物类群;白芍总苷高剂量对正常和胶原诱导型关节炎大鼠的动态影响中 Verrucomicrobia 门、Verrucomicrobiae 纲、Verrucomicrobiales 目、Verrucomicrobiaceae 科, *Akkermansia*、*Coprococcus* 属



注: A. 正常对照组及白芍总苷(TGP)各给药组; B. 胶原诱导型关节炎模型对照组及白芍总苷各给药组。与 0 周比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图 1 3 种剂量白芍总苷对正常和胶原诱导型关节炎大鼠粪便菌群 Alpha 多样性指数经时变化的影响($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n=3$)

Figure 1 Effects of three doses of TGP on the time-dependent changes of alpha diversity index of fecal flora in normal and CIA rats($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n=3$)



注: A. 正常对照组及白芍总苷(TGP)各给药组; B. 胶原诱导型关节炎模型对照组及白芍总苷各给药组

图 2 基于 Unweighted UniFrac NMDS 分析的 3 种剂量白芍总苷(TGP)对正常和胶原诱导型关节炎大鼠粪便菌群结构经时变化的影响

Figure 2 The effect of three doses of TGP on the time-dependent changes of fecal flora structure in normal and CIA rats based on unweighted UniFrac NMDS analysis

表 2 基于 GraPhlAn 的正常组间及模型组间共有优势微生物类群

Table 2 Common dominant microflora among normal groups and CIA groups based on GraPhlAn

| 组别 | 门 | 纲 | 目 | 科 | 属 |
|------------|---------------|-----------------|------------------|---------------------|----------------------|
| 正常及给药组 | Bacteroidetes | Bacilli | Clostridiales | Lachnospiraceae | <i>Lactobacillus</i> |
| | Firmicutes | Bacteroidia | Clostridia | Lactobacillaceae | <i>Oscillospira</i> |
| | | | | Prevotellaceae | <i>Ruminococcus</i> |
| | | Ruminococcaceae | S24-7 | | |
| | | | 模型及给药组 | Bacteroidetes | Bacilli |
| Firmicutes | Bacteroidia | Clostridia | Lactobacillaceae | <i>Oscillospira</i> | |
| | | | Ruminococcaceae | <i>Ruminococcus</i> | |
| | S24-7 | | | | |

为相同的优势微生物类群，因此这些白芍总苷对正常和胶原诱导型关节炎大鼠均有明显影响的优势微生物类群值得重点关注。

2.3.3 PLS-DA 分析和 LEfSe 分析结果 PLS-DA 分析中，由图 3 可知各个正常组和各个模型组的粪便菌群结构，在同一时间点，组内均聚集较好，不同时间点的菌群结构随时间迁移会发生变化。但是各正

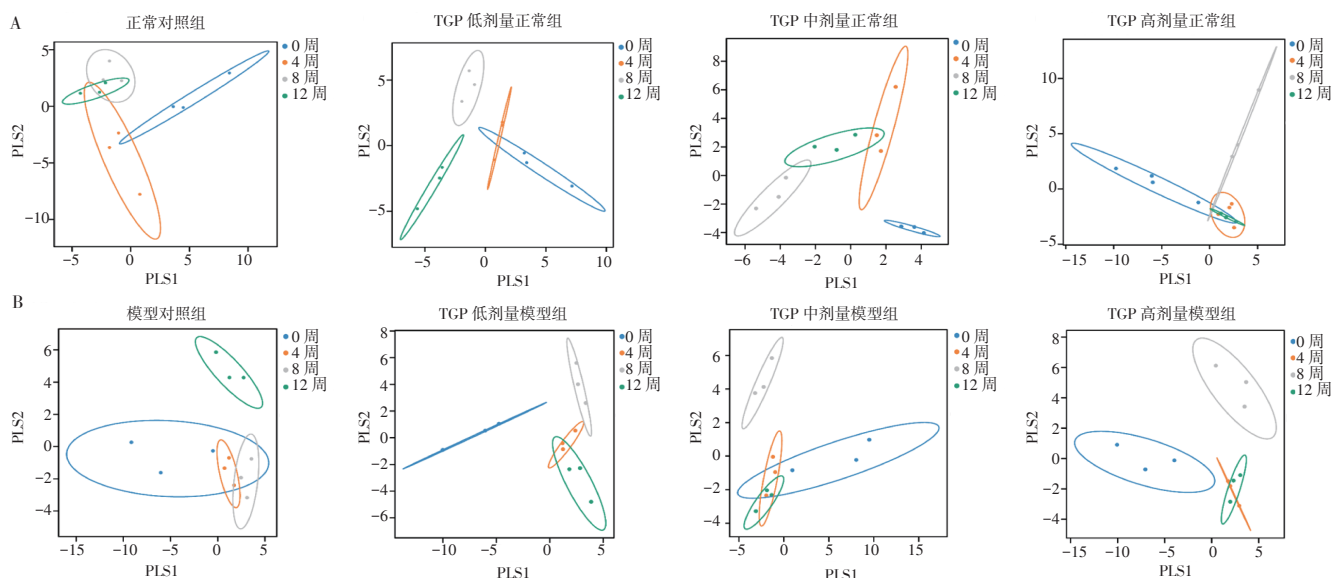
常组并非随时间迁移，变化越来越大，反而是总体上从给药 0 周到给药 4 周，再到给药 8 周，菌群结构差异逐渐变大，但到给药 12 周，菌群结构差异没有继续变大，即给药和不给药的正常大鼠粪便菌群结构似乎具有自我修复能力。模型对照组从 0 周到 4、8 周的变化不大，但是到 12 周变化明显。白芍总苷低、中、高剂量模型组给药 4、8、12 周后，粪便菌群结构基本上都与 0 周完全分离。同时可见白芍总苷干预 4 周与 12 周的菌群结构比较接近，说明随时间迁移，白芍总苷对胶原诱导型关节炎大鼠菌群结构的调节作用并非越来越大，被调节的菌群似乎有自我修复能力。

表 4 是各组在 4 个时间点具有明显差异，同时在 PLS-DA 分析中特征变量投影重要性值 (variable importance in projection, VIP) 大于 1 的菌属。扣除正常对照组 4 个时间点共同的粪便菌群结构差异的主要贡献者 *Prevotella* 属，发现白芍总苷也影响了动态变化的正常大鼠粪便菌群结构，白芍总苷低、中、高剂量干预后对正常大鼠在 4 个时间点粪便菌群结构差异有主要贡献的菌属分别是 2、4、9 个，说明

表 3 扣除正常组间及模型组间共有优势微生物类群后各组及两组以上共有优势微生物类群

Table 3 Dominant microflora in each group and more than two groups after deducting the common dominant microflora among normal groups and model groups

| 组别 | 门 | 纲 | 目 | 科 | 属 |
|------------------|-----------------|------------------|--------------------|--|---|
| 正常对照组 | | | Lactobacillales | Peptostreptococcaceae Bacteroidiaceae | <i>Clostridium</i> <i>Prevotella</i> <i>Bacteroides</i> |
| 白芍总苷低剂量正常组 | | Erysipelotrichi | Erysipelotrichales | Peptostreptococcaceae | <i>Prevotella</i> |
| 白芍总苷中、高剂量正常组 | Verrucomicrobia | Verrucomicrobiae | Verrucomicrobiales | Verrucomicrobiaceae | <i>Coprococcus</i> <i>Akkermansia</i> |
| 正常对照组、白芍总苷低剂量正常组 | | | Lactobacillales | Peptostreptococcaceae | <i>Prevotella</i> |
| 模型对照组 | | | Turicibacterales | Peptostreptococcaceae Clostridiaceae Turicibacteraceae [Paraprevotellaceae] Prevotellaceae | <i>Turicibacter</i> |
| 白芍总苷低剂量模型组 | | | | Veillonellaceae Prevotellaceae Bacteroidaceae | <i>Roseburia</i> <i>Phascolarctobacterium</i> <i>Prevotella</i> <i>Bacteroides</i> |
| 白芍总苷中剂量模型组 | | Lactobacillales | | Peptostreptococcaceae [Paraprevotellaceae] Prevotellaceae Bacteroidaceae | <i>Coprococcus</i> [<i>Prevotella</i>] |
| 白芍总苷高剂量模型组 | Verrucomicrobia | Verrucomicrobiae | Verrucomicrobiales | Peptostreptococcaceae Verrucomicrobiaceae | <i>Coprococcus</i> <i>Akkermansia</i> |
| 模型对照组、白芍总苷低剂量模型组 | | | | Prevotellaceae | |
| 模型对照组、白芍总苷中剂量模型组 | | | | Peptostreptococcaceae [Paraprevotellaceae] Prevotellaceae | |
| 模型对照组、白芍总苷高剂量模型组 | | | | Peptostreptococcaceae | |
| 白芍总苷低、中剂量模型组 | | | | Prevotellaceae Bacteroidaceae | |
| 白芍总苷中、高剂量模型组 | | | | Peptostreptococcaceae | <i>Coprococcus</i> |



注：A. 正常对照组及白芍总苷(TGP)各给药组；B. 胶原诱导型关节炎模型对照组及白芍总苷各给药组

图3 基于PLS-DA分析的3种剂量白芍总苷(TGP)对正常和胶原诱导型关节炎模型大鼠粪便菌群结构经时变化的影响

Figure 3 Effects of three doses of TGP on the time-dependent changes of fecal flora in normal and CIA rats based on PLS-DA analysis

随剂量增加差异主要贡献者的种类越来越多。其中 *Coprococcus* 属是白芍总苷低、中、高剂量正常组共同的差异主要贡献者，*Akkermansia* 属是白芍总苷中、高剂量正常组共同的差异贡献者。扣除模型对照组4个时间点共同的粪便菌群结构差异的主要贡献者 *Christensenella*、*Clostridium*、*Dorea* 属，发现白芍总苷也影响了动态变化的胶原诱导型关节炎大鼠粪便菌群结构。白芍总苷低、中、高剂量干预对胶原诱导型关节炎大鼠在4个时间点粪便菌群结构差异有主要贡献的菌属分别是7、4、8个，说明白芍总苷低、高剂量对胶原诱导型关节炎大鼠菌群动态变化有主要贡献的菌属种类比中剂量多。其中 *Sutterella* 属是白芍总苷低、中、高剂量模型组共同的菌群差异贡献者，*Bacteroides*、*Parabacteroides* 属是白芍总苷低、高剂量模型组共同的菌群差异贡献者。

将正常对照组与模型对照组对比，发现二者菌群差异的主要贡献者未见相同。将同一剂量白芍总苷对正常和胶原诱导型关节炎大鼠4个时间点的综合影响进行对比，发现白芍总苷低剂量对正常和胶原诱导型关节炎大鼠的动态影响中差异主要贡献者未见相同；白芍总苷中剂量对正常和胶原诱导型关节炎大鼠的动态影响中 *Coprococcus* 属为相同的菌群差异贡献者；白芍总苷高剂量对正常和胶原诱导型关节炎大鼠的动态影响中 *SMB53* 属为相同的菌群差异贡献者，值得重点关注。也说明正常和胶原诱导型关节炎大鼠之间的菌群结构本身存在差异，白芍总

表4 3种剂量白芍总苷对正常和胶原诱导型关节炎大鼠给药后粪便中LEfSe分析经时有明显差异且PLS-DA分析VIP值大于1的菌属

Table 4 The genus of fecal flora with significant differences over time in LEfSe analysis, and the VIP > 1 in PLS-DA analysis after administration of three doses of TGP

| 组别 | 给药时间/周 | | | |
|----------------------------------|--------|------------------------------|---------------------|--|
| | 0 | 4 | 8 | 12 |
| 正常对照组 | | | <i>Prevotella</i> | |
| 白芍总苷低剂量正常组 | | <i>Oscillospira</i> | <i>Coprococcus</i> | |
| 白芍总苷中剂量正常组 [<i>Prevotella</i>] | | | <i>Akkermansia</i> | <i>Coprococcus</i> |
| | | | <i>Prevotella</i> | |
| | | | <i>rc4_4</i> | |
| 白芍总苷高剂量正常组 <i>SMB53</i> | | <i>Lachnospira</i> | <i>Lachnospira</i> | <i>Bifidobacterium</i> <i>Turicibacter</i> |
| | | <i>Coprococcus</i> | <i>Allobaculum</i> | |
| | | <i>Bilophila</i> | <i>Akkermansia</i> | |
| 模型对照组 | | | | <i>Christensenella</i> |
| | | | | <i>Clostridium</i> |
| | | | | <i>Dorea</i> |
| 白芍总苷低剂量模型组 <i>Bacteroides</i> | | | <i>Allobaculum</i> | |
| | | <i>Parabacteroides</i> | <i>Pseudomonas</i> | |
| | | <i>Phascolarctobacterium</i> | | |
| | | <i>Blautia</i> | | |
| | | <i>Sutterella</i> | | |
| 白芍总苷中剂量模型组 <i>Sutterella</i> | | <i>Ruminococcus</i> | <i>Coprococcus</i> | <i>Lachnospira</i> |
| 白芍总苷高剂量模型组 <i>Bacteroides</i> | | | <i>Prevotella</i> | |
| | | [<i>Prevotella</i>] | <i>Oscillospira</i> | |
| | | <i>Parabacteroides</i> | | |
| | | <i>Lactococcus</i> | | |
| | | <i>SMB53</i> | | |
| | | <i>Sutterella</i> | | |

昔低剂量促进正常和胶原诱导型关节炎大鼠菌群结构趋同的作用小于白芍总苷中剂量和高剂量。

2.4 白芍总苷对菌群各水平分类学组成的影响 使用 QIIME 软件, 获取各样本在门、纲、目、科、属 5 个分类水平上的组成和相对丰度分布情况。正常对照组及白芍总苷低、中、高剂量正常组在门、Firmicutes/Bacteroidetes 比值(F/B)、纲、目、科、属水平的经时明显变化见图 4-A。与 0 周比较, 正常对照组 Firmicutes 门、Bacteroidetes 门、Bacteroidia 纲、Bacteroidales 目、Prevotellaceae 科、Unclassified Prevotellaceae 属、Prevotella 属的相对丰度以及 F/B 在 8 周与 4、12 周变化趋势相反, 似乎该组粪便菌群自身变化具有周期性; 而 rc4-4 属的相对丰度在 4、8、12 周的变化趋势均为升高, 但只在 8 周差异有统计学意义($P < 0.05$)。白芍总苷低、中、高剂量正常组与 0 周比较, 4、8、12 周 F/B 差异无统计学意义($P > 0.05$), 即白芍总苷干预使正常大鼠 F/B 的周期性变化不明显。同时发现在正常对照组, 与 0 周比较, 8 周 Prevotellaceae 科的相对丰度明显升高($P < 0.01$), 但是白芍总苷高剂量干预 8 周后, 其相对丰度明显降低($P < 0.05$)。与 0 周比较, Unclassified Clostridiales 科是白芍总苷低、中剂量干预后相对丰度升高的菌科($P < 0.01$, $P < 0.05$), Coprococcus 属是白芍总苷低、中、高剂量干预后相对丰度升高的菌属($P < 0.05$, $P < 0.01$), Unclassified Clostridiales 属是白芍总苷低、中剂量干预后相对丰度升高的菌属($P < 0.01$, $P < 0.05$), Oscillospira 属也是白芍总苷低、中剂量干预后相对丰度升高的菌属($P < 0.05$), 值得重点关注, 同时说明对于正常大鼠, 白芍总苷低、中剂量作用相似, 高剂量作用明显不同于低、中剂量。

白芍总苷低、中、高剂量模型组在门、F/B、纲、目、科、属水平的经时显著性变化见图 4-B。与 0 周比较, 模型对照组 F/B 比值及门、纲、目、科、属各水平随时间迁移没有明显变化, 与前述正常对照组大鼠不同。白芍总苷中剂量干预 12 周, 高剂量干预 4、12 周均可升高胶原诱导型关节炎大鼠 F/B 比值($P < 0.05$); 白芍总苷高剂量干预在门、纲、目、科、属水平上, 白芍总苷中剂量干预在目、科、属水平上, 白芍总苷低剂量干预在科、属水平上均产生了明显变化($P < 0.05$, $P < 0.01$)。以上结果说明对于胶原诱导型关节炎大鼠, 白芍总苷高、中、低剂量菌群的调节作用依次降低, 此点与“2.3.3”项结果近似。白芍总苷各剂量模型组均无相

同的被明显影响的菌。

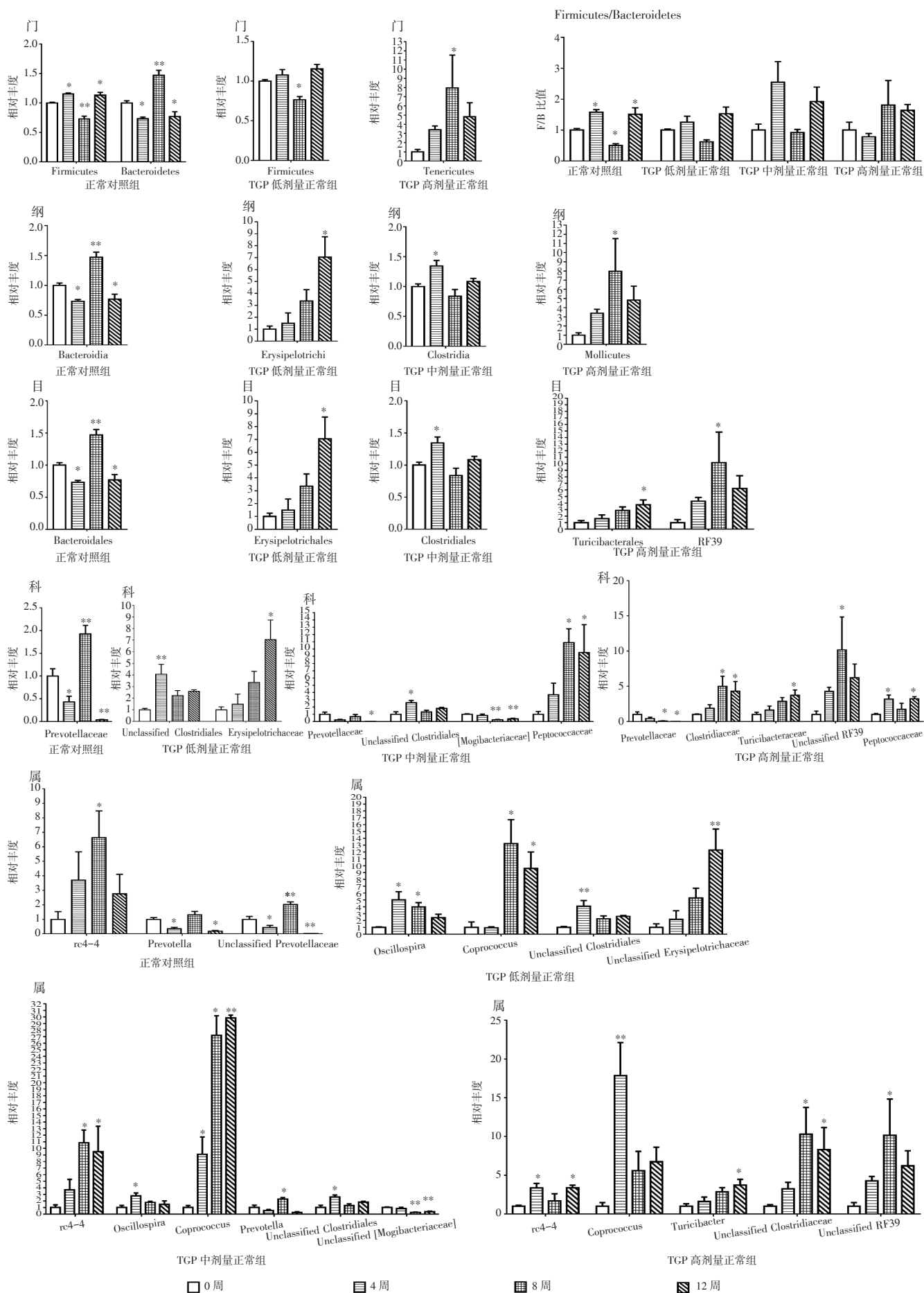
将正常对照组与模型对照组对比, 发现二者无相同的明显变化菌。将同一剂量白芍总苷对正常和胶原诱导型关节炎大鼠 4 个时间点的综合影响进行对比, 发现白芍总苷低、中剂量对正常和胶原诱导型关节炎大鼠菌群的影响均不同, 而白芍总苷高剂量可使正常和胶原诱导型关节炎大鼠的 Peptococcaceae 科的相对丰度均明显升高($P < 0.05$, $P < 0.01$), Coprococcus 属相对丰度均明显升高($P < 0.01$, $P < 0.05$), 值得重点关注。

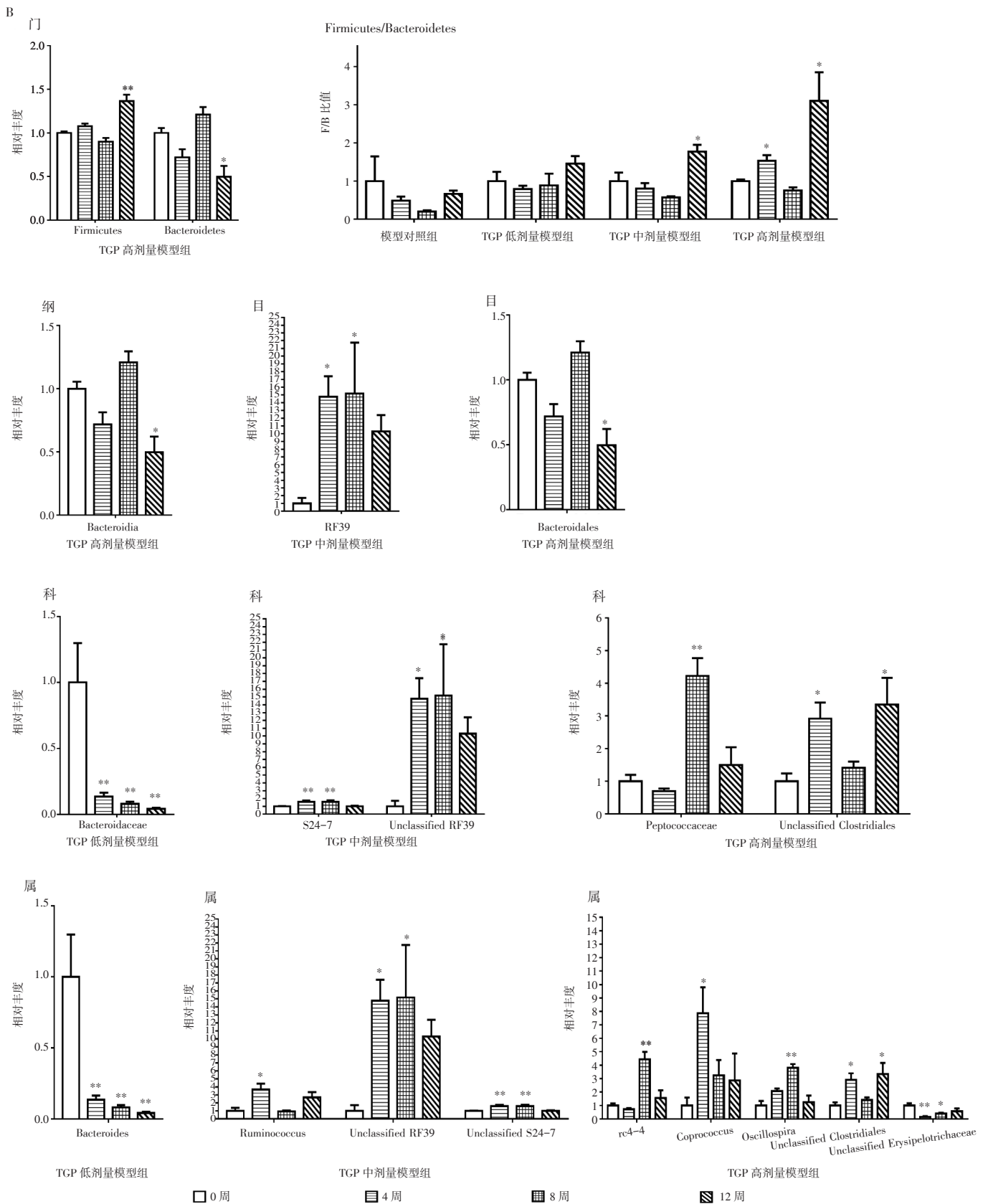
总之在门、纲、目、科、属水平上, 白芍总苷低、中、高剂量分别对正常大鼠的 9、12、14 种微生物类群产生明显影响; 白芍总苷低、中、高剂量分别对胶原诱导型关节炎大鼠的 2、6、11 种微生物类群产生明显影响。说明白芍总苷长期给药对正常大鼠菌群结构影响大, 但不同剂量对菌群影响大小比较接近; 而在胶原诱导型关节炎大鼠中, 高剂量白芍总苷对菌群结构的影响大于低、中剂量。

2.5 白芍总苷对 PICRUST 菌群功能预测结果的影响 正常对照组, 白芍总苷低、中、高剂量正常组的变化见图 5-A。扣除正常对照组中也有明显变化的菌群功能, 与 0 周比较, Transport and Catabolism (运输和分解代谢)、Neurodegenerative Diseases (神经退行性疾病) 是白芍总苷低、中剂量正常组相对丰度均升高的 2 个菌群功能($P < 0.05$); Enzyme Families (酶家族) 是白芍总苷低、高剂量正常组相对丰度均降低的 1 个菌群功能($P < 0.05$); Circulatory System (循环系统) 经白芍总苷低、高剂量干预 8、12 周时相对丰度均降低($P < 0.05$, $P < 0.01$), 但是经白芍总苷低剂量干预 4 周时其相对丰度升高($P < 0.05$), 这些菌群功能值得重点关注。

模型对照组及白芍总苷低、中、高剂量模型组的变化见图 5-B。扣除模型对照组中也有明显变化的菌群功能, 与 0 周比较, Endocrine System (内分泌系统) 是白芍总苷低、中、高剂量模型组相对丰度均升高的 1 个菌群功能($P < 0.05$, $P < 0.01$); Immune System (免疫系统) 是白芍总苷中、高剂量模型组相对丰度升高的菌群功能($P < 0.01$, $P < 0.05$)。Cardiovascular Diseases (心血管疾病)、Cellular Processes and Signaling (细胞过程和信号) 是白芍总苷低、高剂量模型组相对丰度降低的菌群功能($P < 0.05$, $P < 0.01$); Amino Acid Metabolism (氨基酸代谢) 是白芍总苷中剂量模型组 4 周明显升高($P < 0.01$), 而白芍总苷高剂量模型组 12 周相对丰度降低的菌群功能($P < 0.05$)。

A

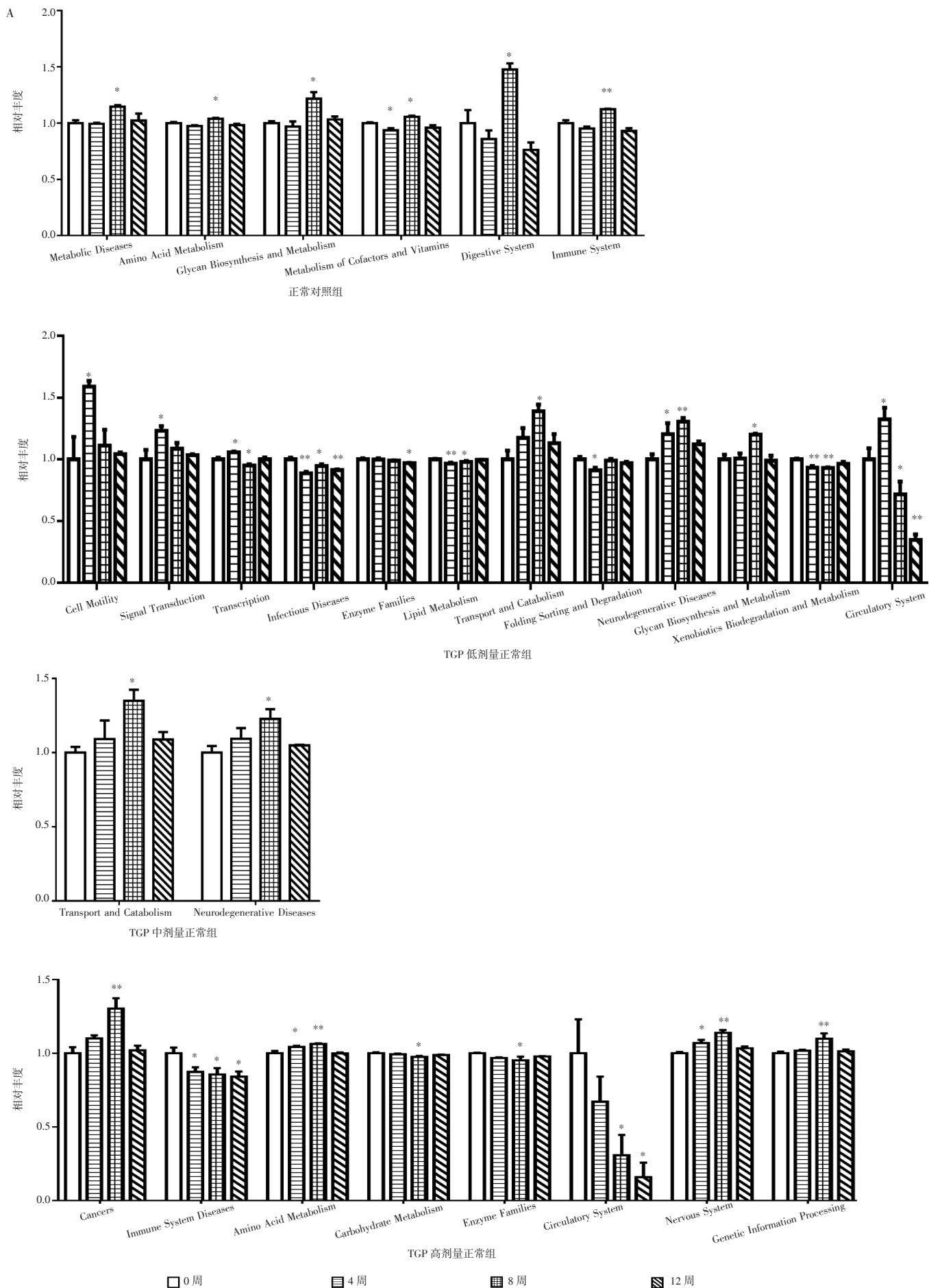


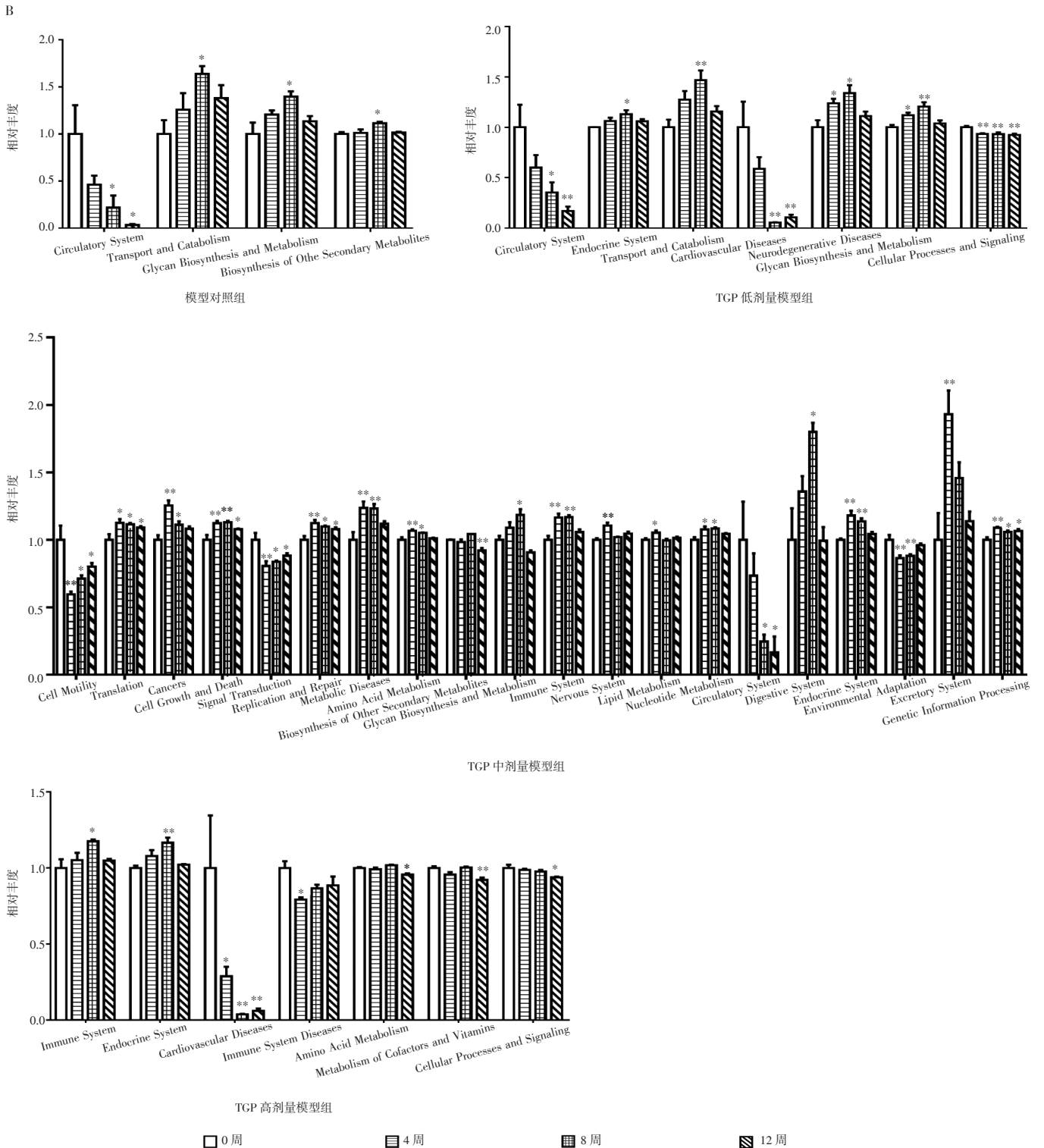


注: A. 正常对照组与白芍总苷(TGP)各给药组; B. 胶原诱导型关节炎模型对照组与白芍总苷各给药组。与0周比较, * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$

图4 基于分类学组成分析的3种剂量白芍总苷(TGP)对正常和胶原诱导型关节炎大鼠粪便菌群在门、纲、目、科、属水平经时变化的影响($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n=3$)

Figure 4 Effects of three doses of TGP on the time-dependent changes of gut microbial composition in normal and CIA rats at the phylum, class, order, family and genus level based on taxonomic composition analysis($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$, $n=3$)





注：A. 正常对照组及白芍总苷(TGP)各给药组；B. 胶原诱导型关节炎模型对照组及白芍总苷各给药组。与 0 周比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$
 图 5 基于 PICRUSt 预测分析的 3 种剂量白芍总苷(TGP)对正常和胶原诱导型关节炎大鼠粪便菌群功能经时变化的影响($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Figure 5 Effects of three doses of TGP on the function of fecal flora in normal and CIA rats based on PICRUSt analysis($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

与 0 周比较，模型对照组 Biosynthesis of Other Secondary Metabolites(其他次生代谢产物的生物合成)的相对丰度在 4、8、12 周一直呈升高趋势，并且在 8 周明显升高($P < 0.05$)，但白芍总苷中剂量干预后

4 周呈降低趋势，8 周呈升高趋势，而在 12 周明显降低($P < 0.01$)。说明白芍总苷可以逆转部分由时间迁移对胶原诱导型关节炎大鼠粪便菌群功能产生的影响。上述菌群功能都值得重点关注。

将正常对照组和模型对照组对比,发现随时间迁移, Glycan Biosynthesis and Metabolism 的相对丰度在正常、胶原诱导型关节炎大鼠中均升高($P < 0.05$),但前者有变化的菌群功能比后者多,说明正常对照组大鼠在生长过程中菌群功能变化强于模型对照组,此点与“2.2”和“2.4”项下的结果相近似。将同一剂量白芍总苷对正常和胶原诱导型关节炎大鼠4个时间点的综合影响进行比对,发现白芍总苷低剂量干预后, Transport and Catabolism、Neurodegenerative Diseases、Glycan Biosynthesis and Metabolism 的相对丰度在正常和胶原诱导型关节炎大鼠中均升高($P < 0.05$, $P < 0.01$); Circulatory System 的相对丰度在正常组给药4周明显升高后($P < 0.05$)持续降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),在模型组给药后则持续降低($P < 0.05$, $P < 0.01$)。白芍总苷中剂量对正常和胶原诱导型关节炎大鼠的动态影响中没有相同的菌群功能。白芍总苷高剂量干预后, Immune System Diseases 的相对丰度在正常和胶原诱导型关节炎大鼠中均降低($P < 0.05$); Amino Acid Metabolism 的相对丰度在正常大鼠中升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),而在胶原诱导型关节炎大鼠中降低($P < 0.05$)。

3 讨论

3.1 纵向研究与横向研究的区别 目前绝大多数中药调控肠道菌群的研究,都采用横向研究方法,重点关注同一时间点给药组与对照组比较变化了的菌群,以此阐释疗效,但难以观察到受试对象除处理因素(如给药)以外,因饲养环境、自然生长,特别是肠道菌群复杂体系动态平衡和自调试对实验结果的影响,并常发现不同时间点药物调控的菌群不一致,以之阐释治疗机制仍嫌不足,也难以指导进一步的研究。本研究采用了与之不同的纵向研究方法,在充分观察正常对照组、模型对照组及给药组在实验过程中动态变化的基础上,发现菌群这一复杂集合体也可自我修复与产生动态平衡^[25],说明疾病发生和发展过程复杂,机体本身可产生对抗疾病的反应。然后扣除各组随时间迁移相同的变化后,再进行组间比较,筛选出白芍总苷长期给药在正常和模型大鼠中以及两个剂量以上均可调控的优势菌,可作为白芍总苷稳定调控的菌群进行重点关注与分析。我们认为,只有将纵向研究与横向研究的结果互参,才有助于全面阐释白芍总苷通过影响肠道菌群治疗类风湿关节炎的机制。

3.2 重点关注菌群的作用 基于 PLS-DA 和 LEISc

分析在正常大鼠中筛选值得关注的明显差异菌, *Akkermansia* 属的相对丰度经白芍总苷干预后升高。在胶原诱导型关节炎大鼠中筛选值得关注的明显差异菌, *Sutterella*、*Bacteroides*、*Parabacteroides* 属的相对丰度经白芍总苷干预后降低。在正常和胶原诱导型关节炎大鼠中同时筛选值得关注的明显差异菌, *Coprococcus* 属的相对丰度经白芍总苷干预后均升高;而 *SMB53* 属的相对丰度经白芍总苷干预后均降低。上述白芍总苷干预后升高的菌在文献报道中对关节炎、自身免疫性疾病、炎症性疾病的影响与本文结果一致的有:与健康对照组比较, *Akkermansia*、*Coprococcus* 属的相对丰度在银屑病关节炎中明显降低^[26]。富含 *Akkermansia muciniphila* 的粪便微生物群移植更有可能诱导溃疡性结肠炎患者疾病缓解^[27]。*Akkermansia muciniphila* 可通过分泌内源性大麻素逆转肥胖和胰岛素抵抗^[28],高蛋白饮食可减少大鼠肥胖和/或脂肪量,同时使 *Akkermansia muciniphila* 在肠道富集^[29]。槲皮素和白藜芦醇联合应用恢复高脂饮食诱导的大鼠肠道微生物群失调,明显升高 *Akkermansia* 属的相对丰度^[30]。口腔暴露于有毒金属如镉、铅、铜和铝均明显降低 *Akkermansia* 的相对丰度^[31]。艰难梭菌感染 (*Clostridium difficile* infection, CDI)是引起抗生素性腹泻和结肠炎的主要原因之一, CDI 患者通过粪便微生物移植成功治疗后肠道富含 *Coprococcus* 属^[32]。上述白芍总苷干预后降低的菌在文献报道中对关节炎、自身免疫性疾病、炎症性疾病的影响与本文结果一致的有:在骨性关节炎滑膜组织中 *Bacteroides uniformis*、*Bacteroides fragilis* 均较丰富,在骨性关节炎滑液 *Bacteroides caccae* 较丰富^[33]。在实验性自身免疫性脑脊髓炎^[34],原发性干燥综合征和系统性红斑狼疮患者^[35],以及口腔暴露于有毒金属如铜^[31]时, *Bacteroides* 属的相对丰度均增加。阿托伐他汀治疗降低了高脂饮食诱导的高胆固醇血症大鼠的 *SMB53* 属相对丰度^[36]。说明白芍总苷可能通过调节上述菌群对正常和胶原诱导型关节炎大鼠产生有益作用。

基于各分类水平的分类学组成分析在正常大鼠中筛选重点关注的菌, *Unclassified Clostridiales* 科, *Unclassified Clostridiales*、*Oscillospira* 属的相对丰度经白芍总苷干预后升高。在正常和胶原诱导型关节炎大鼠中同时筛选重点关注的菌, *Peptococcaceae* 科、*Coprococcus* 属的相对丰度经白芍总苷干预后均升高。其中 *Coprococcus* 属的变化趋势与前述一致,在

此不再赘述。上述白芍总苷干预后升高的菌在文献报道中对关节炎、自身免疫性疾病、炎症性疾病的影响与本文结果一致的有：与对照组比较，在慢性乙型肝炎中观察到 Unclassified Clostridiales 科的相对丰度减少^[37]。水苏糖^[38]和南瓜多糖^[39]调节 2 型糖尿病大鼠肠道菌群，可使 *Oscillospira* 属增加。说明白芍总苷可能通过调节上述菌群对正常和胶原诱导型关节炎大鼠产生有益作用。未发现 Peptococcaceae 科菌变化与上述疾病有关的报道。

3.3 菌群功能预测 PICRUST 利用菌群的测序数据进行菌群代谢功能的预测，可以把物种的“身份”和它们的“功能”对应起来。本研究发现胶原诱导型关节炎大鼠粪便菌群功能随时间迁移，与正常大鼠变化不同的是 Transport and Catabolism(转运与分解代谢)、Biosynthesis of Other Secondary Metabolites(其他次生代谢产物的生物合成)的相对丰度明显升高，而 Circulatory System(循环系统)的相对丰度明显降低。提示胶原诱导型关节炎大鼠的菌群代谢功能增强，与前期用其孵育白芍总苷的结果相符。而 Biosynthesis of Other Secondary Metabolites 可被中剂量白芍总苷降低。此外，Immune System(免疫系统)是中、高剂量白芍总苷干预胶原诱导型关节炎大鼠后明显升高的菌群功能，Immune System Diseases(免疫系统疾病)是高剂量白芍总苷干预正常和胶原诱导型关节炎大鼠中均降低的菌群功能；Endocrine System(内分泌系统)是 3 个剂量白芍总苷干预胶原诱导型关节炎大鼠明显升高的菌群功能，Cardiovascular Diseases(心血管疾病)、Cellular Processes and Signaling(细胞过程和信号)则是低、高剂量明显降低的菌群功能，与白芍总苷作为免疫调节药物^[2]、可纠正应激大鼠行为和内分泌紊乱^[40]以及对心血管疾病中的防治效果^[41]相吻合。

3.4 肠道菌群与白芍总苷对胶原诱导型关节炎大鼠干预作用的相关性 本课题组前期从脏器系数、踝关节形态、滑膜 VEGF 含量、外周血免疫等方面监测了不同剂量白芍总苷干预 4、8、12 周对胶原诱导型关节炎大鼠的动态影响。结果表明，随着给药时间的延长，白芍总苷可逐渐调节 VEGF 水平从而抑制血管生成和滑膜细胞增殖；通过下调 Th1 细胞和 Th17 细胞的水平及上调 Th2 细胞和 Treg 细胞的水平来维持胶原诱导型关节炎大鼠中 T 细胞亚群的平衡，说明白芍总苷可能诱导自身免疫耐受并抑制炎症反应，从而保护胶原诱导型关节炎大鼠足爪关节

功能结构，也解释了其临床需要长期给药才能发挥显著疗效。而本研究采用纵向研究的方法发现了白芍总苷长期给药稳定和重点调节的菌群，通过与自身免疫性疾病肠道菌群研究结果对比，结合其主要改变的与转运、代谢、免疫、内分泌相关的菌群代谢功能，进一步验证了肠道菌群可能在白芍总苷介导的胶原诱导型关节炎大鼠治疗效果中发挥作用。同时发现不同剂量白芍总苷影响的菌群和菌群代谢功能不同，相较于不同剂量白芍总苷对脏器系数、踝关节形态、滑膜 VEGF 含量、外周血免疫等指标影响的差异更灵敏。总之，本研究从新的角度对白芍总苷干预胶原诱导型关节炎大鼠和正常大鼠菌群的作用进行了研究，结果为全面阐释其治疗类风湿关节炎以及其他疾病的作用提供了参考。

参考文献：

- [1] 王春, 魏伟. 芍药苷药物代谢动力学研究进展[J]. 中国药理学通报, 2014, 30(12): 1646-1650.
- [2] 刘斌. 芍药苷在正常大鼠体内的多剂量药物动力学研究[D]. 合肥: 安徽医科大学, 2009.
- [3] PENG J E, LU X R, XIE K L, et al. Dynamic alterations in the gut microbiota of collagen-induced arthritis rats following the prolonged administration of total glucosides of Paeony[J]. Front Cell Infect Microbiol, 2019, 9: 204.
- [4] 林琳. 拖延行为的干预: 计划行为理论和实施意向的影响[J]. 心理学报, 2017, 49(7): 953-965.
- [5] TRENTHAM D E, TOWNES A S, KANG A H. Autoimmunity to type II collagen an experimental model of arthritis[J]. J Exp Med, 1977, 146(3): 857-868.
- [6] BRAND D D, LATHAM K A, ROALONIEC E F. Collagen-induced arthritis[J]. Nat Protoc, 2007, 2(5): 1269-1275.
- [7] JIA N, CHU W, LI Y, et al. Iridoid glycosides from the flowers of *Gentiana macrophylla* Pall. ameliorate collagen-induced arthritis in rats[J]. J Ethnopharmacol, 2016, 189: 1-9.
- [8] MARCIŃSKA K, MAJEWSKA-SZCZEPANIK M, LAZAR A, et al. Epicutaneous (EC) immunization with type II collagen (COLL II) induces CD4(+) CD8(+) T suppressor cells that protect from collagen-induced arthritis (CIA)[J]. Pharmacol Rep, 2016, 6(2): 483-489.
- [9] CAPORASO J G, KUCZYŃSKI J, STOMBAUGH J, et al. QIIME allows analysis of high-throughput community sequencing data[J]. Nat Methods, 2010, 7(5): 335-336.
- [10] MAGOČ T, SALZBERG S L. FLASH: fast length adjustment of short reads to improve genome assemblies[J]. Bioinformatics, 2011, 27(21): 2957-2963.
- [11] EDGAR R C. Search and clustering orders of magnitude faster than BLAST[J]. Bioinformatics, 2010, 26(19): 2460-2461.
- [12] ALTSCHUL S F, MADDEN T L, SCHÄFFER A A, et al. Gapped

- BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs[J]. *Nucleic Acids Res*, 1997, 25(17): 3389-3402.
- [13] DESANTIS T Z, HUGENHOLTZ P, LARSEN N, et al. Greengenes, a chimera-checked 16S rRNA gene database and workbench compatible with ARB[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2006, 72(7): 5069-5072.
- [14] ZAURA E, KEIJSER B J, HUSE S M, et al. Defining the healthy "core microbiome" of oral microbial communities[J]. *BMC Microbiol*, 2009, 9: 259.
- [15] LOZUPONE C, KNIGHT R. UniFrac: a new phylogenetic method for comparing microbial communities[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2005, 71(12): 8228-8235.
- [16] LOZUPONE C A, HAMADY M, KELLEY S T, et al. Quantitative and qualitative beta diversity measures lead to different insights into factors that structure microbial communities[J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(5): 1576-1585.
- [17] RAMETTE A. Multivariate analyses in microbial ecology[J]. *FEMS Microbiol Ecol*, 2007, 62(2): 142-160.
- [18] CLARKE K. Non-parametric multivariate analyses of changes in community structure[J]. *Austral Ecology*, 1993, 18(1): 117-143.
- [19] WARTON D I, WRIGHT S T, WANG Y. Distance-based multivariate analyses confound location and dispersion effects[J]. *Methods Ecol Evo*, 2012, 3(1): 89-101.
- [20] McARDLE B H, ANDERSON M J. Fitting multivariate models to community data: a comment on distance-based redundancy analysis [J]. *Ecology*, 2001, 82(1): 290-297.
- [21] ASNICAR F, WEINGART G, TICKLE T L, et al. Compact graphical representation of phylogenetic data and metadata with GraPhlAn[J]. *Peerj*, 2015, 3: e1029.
- [22] CHEN Y F, YANG F L, LU H F, et al. Characterization of fecal microbial communities in patients with liver cirrhosis[J]. *Hepatology*, 2011, 54(2): 562-572.
- [23] SEGATA N, IZARD J, WALDRON L, et al. Metagenomic biomarker discovery and explanation[J]. *Genome Biol*, 2011, 12: R60.
- [24] LANGILLE M G, ZANEVELD J, CAPORASO J G, et al. Predictive functional profiling of microbial communities using 16S rRNA marker gene sequences[J]. *Nat Biotechnol*, 2013, 31(9): 814-821.
- [25] IGARASHI H, OHNO K, HORIGOME A, et al. Fecal dysbiosis in miniature dachshunds with inflammatory colorectal polyps[J]. *Res Vet Sci*, 2016, 105: 41-46.
- [26] SCHER J U, UBEDA C, ARTACHO A, et al. Decreased bacterial diversity characterizes the altered gut microbiota in patients with psoriatic arthritis, resembling dysbiosis in inflammatory bowel disease[J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(1): 128-139.
- [27] KUMP P, WURM P, GROCHENIG H P, et al. The taxonomic composition of the donor intestinal microbiota is a major factor influencing the efficacy of faecal microbiota transplantation in therapy refractory ulcerative colitis[J]. *Aliment Pharmacol Ther*, 2018, 47(1): 67-77.
- [28] SHIVAJI S. We are not alone: a case for the human microbiome in extra intestinal diseases[J]. *Gut Pathog*, 2017, 9: 13.
- [29] WANG L, JACOBS J P, LAGISHETTY V, et al. High-protein diet improves sensitivity to cholecystokinin and shifts the cecal microbiome without altering brain inflammation in diet-induced obesity in rats[J]. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*, 2017, 313(4): R473-R486.
- [30] ZHAO L, ZHANG Q, MA W N, et al. A combination of quercetin and resveratrol reduces obesity in high-fat diet-fed rats by modulation of gut microbiota[J]. *Food Funct*, 2017, 8(12): 4644-4656.
- [31] ZHAI Q X, LI T Q, YU L L, et al. Effects of subchronic oral toxic metal exposure on the intestinal microbiota of mice[J]. *Sci Bull*, 2017, 62(12): 831-840.
- [32] SHANKAR V, HAMILTON M J, KHORUTS A, et al. Species and genus level resolution analysis of gut microbiota in clostridium difficile patients following fecal microbiota transplantation[J]. *Microbiome*, 2014, 2: 13.
- [33] ZHAO Y, CHEN B, LI S F, et al. Detection and characterization of bacterial nucleic acids in culture-negative synovial tissue and fluid samples from rheumatoid arthritis or osteoarthritis patients[J]. *Sci Rep*, 2018, 8(1): 14305.
- [34] TAKATA K, TOMITA T, OKUNO T, et al. Dietary yeasts reduce inflammation in central nerve system via microflora[J]. *Ann Clin Transl Neurol*, 2015, 2(1): 56-66.
- [35] VAN DER MEULEN T A, HARMSEN H J, VILA A V, et al. Shared gut, but distinct oral microbiota composition in primary Sjogren's syndrome and systemic lupus erythematosus[J]. *J Autoimmun*, 2019, 97: 77-87.
- [36] KHAN T J, AHMED Y M, ZAMZAMI M A, et al. Effect of atorvastatin on the gut microbiota of high fat diet-induced hypercholesterolemic rats[J]. *Sci Rep*, 2018, 8: 662.
- [37] WANG J, WANG Y, ZHANG X, et al. Gut microbial dysbiosis is associated with altered hepatic functions and serum metabolites in chronic hepatitis B patients[J]. *Front Microbiol*, 2017, 8: 2222.
- [38] LIU G M, BEI J, LIANG L, et al. Stachyose improves inflammation through modulating gut microbiota of high-fat diet/streptozotocin-induced type 2 diabetes in rats[J]. *Mol Nutr Food Res*, 2018, 62(6): e1700954.
- [39] LIU G M, LIANG L, YU G Y, et al. Pumpkin polysaccharide modifies the gut microbiota during alleviation of type 2 diabetes in rats[J]. *Int J Biol Macromol*, 2018, 115: 711-717.
- [40] 丛茜玉, 王晓敏, 周志愉, 等. 白芍总苷对应激大鼠的行为和下丘脑神经内分泌的影响[J]. *医药导报*, 2018, 37(1): 16-19.
- [41] 戴淑萍, 颜勤明. 白芍总苷在心血管疾病模型动物中的药理研究进展[J]. *中国药房*, 2015, 26(10): 1418-1420.

(编辑: 修春)