

· 基础研究 ·

清热活血方对胶原诱导性关节炎大鼠肠道微生态及 Th17/Treg 平衡的影响

武子英¹ 曹 炜¹ 祁 鑫² 王海霞¹ 智 恺³ 吴广均⁴
刘立玲¹ 果 彤¹ 燕美彤¹ 唐孟杰¹

摘要 **目的** 通过观察清热活血方对胶原诱导性关节炎(collagen induced arthritis, CIA)大鼠的肠道微生态和 Th17/Treg 平衡的影响,探讨其治疗类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)的机制。**方法** SD 大鼠 30 只,采用随机数字表法分为与正常组、模型组、甲氨蝶呤(MTX)组、清热活血方组、益生菌组,每组 6 只。除正常组外,其余组大鼠均以Ⅱ型胶原和完全弗式佐剂的混合乳化剂为抗原,尾根部注射制作 CIA 模型。MTX 组每周给予 MTX 1.0 mg/kg;清热活血方组和益生菌组每晨分别给予 20 g/kg 清热活血方和 350 mg/kg 益生菌。连续灌胃 4 周后,采用 16SrDNA 技术对大鼠肠道粪便菌群测序并分析;采用流式细胞术检测各组大鼠脾脏辅助性细胞亚群 Th17 (CD4⁺ IL-17⁺) 细胞和调节性 T 细胞 Treg (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) 的比例。**结果** 与正常组比较,模型组菌群丰度降低($P < 0.05$, $P < 0.01$),Th17 水平升高,Treg 水平降低($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,清热活血方组菌群丰度升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),Th17 水平降低,Treg 水平升高($P < 0.05$);MTX 组和益生菌组 Treg 水平均上调($P < 0.05$),但下调 Th17 水平不明显($P > 0.05$)。**结论** 清热活血方缓解 RA 的关节症状可能与其改善肠道菌群失调,调节机体 Th17/Treg 免疫失衡有关。

关键词 类风湿关节炎;清热活血方;微生态;辅助性 T 细胞/调节性 T 细胞

Effect of Qingre Huoxue Recipe on Intestinal Microecology and Th17/Treg Balance in Collagen Induced Arthritis Rats WU Zi-ying¹, CAO Wei¹, QI Xin², WANG Hai-xia¹, ZHI Kai³, WU Guang-jun⁴, LIU Li-ling¹, GUO Tong¹, YAN Mei-tong¹, and TANG Meng-jie¹ 1 Department of Rheumatology, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100053); 2 Oncology Laboratory, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100053); 3 Medicine Development Research Center, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100700); 4 Immunology Laboratory, Guang'anmen Hospital, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing (100053)

ABSTRACT **Objective** To observe the effects of Qingre Huoxue Recipe (QHR) on intestinal microecology and Th17/Treg balance of collagen induced arthritis (CIA) rats, and to study its mechanism for treating rheumatoid arthritis (RA). **Methods** Thirty SD rats were divided into the normal group, the model group, the Methotrexate (MTX) group, the QHR group, the probiotics group using random digit table, 6 rats in each group. Except rats in the normal control group, the CIA model was induced by injecting mixed emulsifier of type II-collagen and complete Freund's adjuvant from the tail root in the rest rats of the other groups. MTX (1.0 mg/kg) was administered to rats in the MTX group every week. QHR (20 mg/kg) was administered to rats in the QHR group every morning. Probiotics (350 mg/kg) was ad-

基金项目:国家自然科学基金面上项目(No. 81673952)

作者单位:1.中国中医科学院广安门医院风湿科(北京 100053);2.中国中医科学院广安门医院肿瘤科实验室(北京 100053);3.中国中医科学院中医药发展研究中心(北京 100700);4.中国中医科学院广安门医院免疫研究室(北京 100053)

通讯作者:曹 炜, Tel: 13601331063, E-mail: 1527805057@qq.com

DOI: 10.7661/j.cjim.20180308.112

ministered to rats in the probiotics group every morning. After 4 weeks of continuous gastrogavage the intestinal fecal flora of rats was sequenced and analyzed by 16SrDNA technique. And Th17 helper cell ($CD4^+IL-17^+$) subsets and regulatory T cells ratio of Treg ($CD4^+CD25^+Foxp3^+$) in the spleen were detected using flow cytometry. Results Compared with the normal group, the abundance of flora decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), the level of Th17 increased, and the level of Treg decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$) in the model group. Compared with the model group, the flora abundance increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), Th17 level decreased, and the level of Treg increased in the QHR group ($P < 0.05$). Treg level was up-regulated ($P < 0.05$) in the MTX group and the probiotics group, but the level of Th17 was not obviously down-regulated ($P > 0.05$). Conclusion QHR could relieve the symptoms of RA possibly by improving the imbalance of intestinal microecology and regulating the immune imbalance of Th17/Treg.

KEYWORDS rheumatoid arthritis; Qingre Huoxue Recipe; microecology; Th17/Treg

类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)属中医学“痹病”范畴。临床观察发现,湿、热、瘀是 RA 活动期的主要病机之一^[1],清热活血方是广安门医院风湿科国医大师路志正治疗活动期 RA 的临床经验方。前期临床研究表明,清热活血方联合 MTX 可有效延缓 RA 骨破坏的进程,明显改善患者关节肿痛症状,并缩短晨僵时间^[2];在基础研究中,清热活血方亦可抑制滑膜血管新生,延缓关节骨质破坏,抑制炎症因子的活性和表达,尤其是能调节炎症轴 Th1/Th2 细胞的平衡^[3,4]。近年来,随着对 RA 认识的深入,发现肠道菌群的失衡是 RA 发生和发展的重要因素之一^[5]。另外,Th17/Treg 细胞平衡调节肠道免疫微环境,与肠道微生态关系密切^[6]。

本实验拟通过对胶原诱导性关节炎(collagen inducing arthritis, CIA)大鼠肠道菌群和 Th17/Treg 细胞平衡的检测,分析肠道微生态与 Th17/Treg 细胞平衡的关系,为清热活血方在治疗 RA 提供实验依据。

材料与方法

1 动物 SPF 级雌性 SD 大鼠 30 只,体重(200 ± 10)g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司,动物合格证号:SCXK(京)2009—0034。实验期间饲养于中国中医科学院广安门医院实验动物中心,保持环境恒温恒湿,自由饮水,饲料固定。实验过程中善待动物,符合动物伦理要求。

2 药物 清热活血方配方颗粒由新绿色药业科技发展有限公司生产,组成:土茯苓 30 g 金银花 30 g 炒苍术 15 g 黄柏 9 g 赤芍 15 g 萆薢 15 g 丹参 15 g 莪术 9 g 青风藤 15 g 蜈蚣 4 g 蜂房 5 g。颗粒剂每袋 10 g,每克含生药 96 g,制成含生药量为 2 g/mL 的水煎剂;甲氨蝶呤片(MTX),每片 2.5 mg,上海信谊公司生产,生产批号:160204;双歧

杆菌三联活菌胶囊,每粒 360 mg,上海信谊公司生产,生产批号:04720170407。均由中国中医科学院广安门医院科研药房提供。

3 试剂及仪器 免疫源性牛Ⅱ型胶原、完全弗氏佐剂,美国 Cho-ndrex 产品;细胞表面染色荧光抗体 FITC-anti-CD4、APC-anti-CD25、PE-anti-Foxp3、PE-anti-IL-17 以及荧光素标记同型对照抗体,美国 eBioscience 公司产品;PBS、RPMI1640、胎牛血清,美国 CELLGRO 公司产品;双链 DNA 荧光定量检测试剂盒,美国 Life Technologies 公司产品。

手提式均质仪(IKA-T10 Basic Ultraturrax 型,德国 IKA 公司);流式细胞仪(FACS Calibur 型,美国 BD 公司);CO₂ 培养箱(MCO-20AICCO2 型,日本三洋公司);倒置荧光显微镜(IX-70 型,日本 Olympus 公司);白洋离心机(BY 600A 型,北京白洋医疗器械有限公司);PCR 仪(580BR10905 型,美国 Bio-Rad 公司),凝胶成像仪(2500 型,上海天能科技有限公司)。

4 方法

4.1 分组及造模方法 雌性 SD 大鼠 30 只,参照参考文献[7],采用随机数表法分为正常组、模型组、MTX 组、清热活血方组、益生菌组。每组 6 只。除正常组 6 只,另 24 只造模。实验将 25 mg Ⅱ型胶原,溶于 5 mL 0.01 mol/L 乙酸中,过滤除菌,与 5 mL 完全弗氏佐剂混合,置于冰中匀浆器充分乳化 5 ~ 10 min,乳化物滴入水中不松散为度,制成抗原,其中Ⅱ型胶原浓度为 2.5 mg/mL。造模大鼠尾根部注射抗原 0.1 mL;正常组大鼠尾根部注射 0.9%氯化钠溶液 0.1 mL。1 周后,加强免疫,尾根部再次注射抗原 0.1 mL^[3]。

4.2 给药方法 造模当天即开始给药。持续给药 4 周,给药剂量参考动物与人体每公斤体重剂量

折算系数表^[8], 60 kg 成人与大鼠的折算系数为 6.17, 即大鼠给药剂量 (mg/kg) = 成人剂量 / 60 × 6.17, 清热活血方每天按 20 g 生药/kg 给药; MTX 组每周 1.0 mg/kg; 益生菌组每天 350 mg/kg。正常组和模型组给予等体积量的水。

4.3 观察指标及检测方法

4.3.1 滑膜病理观察 10% 水合氯醛以体重 0.15 mL/100 g 腹腔注射, 麻醉大鼠, 取大鼠双膝关节下滑膜组织, 置于 10% 甲醛溶液固定 48 h, 清水冲洗 24 h, 重新置于甲醛中固定、石蜡包埋, HE 染色, 光镜下观察滑膜病理形态并拍照。

4.3.2 16SrDNA 测序 麻醉大鼠后, 取结肠组织 -80 ℃ 保存, 按照 DNA 抽提试剂盒说明书对大鼠结肠内粪便进行 DNA 抽提, 利用琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的纯度和浓度, 取适量的样品于离心管中, 以稀释后的基因组 DNA 为模板, 使用特异性引物 (341F: 5'-CCTAYGGGRBGCASCAG-3' 和 806R: 5'-GGACTACNNGGGTATCTAAT-3') 对 16SrRNA V3-V4 区基因片段运用 ABI GeneAmp 9700 PCR 仪进行扩增。将获得的扩增产物再次进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 并混样、纯化, 构建 DNA 文库, 最后运用 Illumina Hiseq 2500 测序平台检测。

16SrRNA 测序数据分析: 根据 Barcode 序列和 PCR 扩增引物序列从平台检测数据中拆分出各样品数据, 截去 Barcode 序列和引物序列, 对样品的 reads 进行拼接, 得到的拼接序列为原始 Tags 数据, Raw Tags 经过过滤处低质量, 和不符合长度的 Tags, 以及过滤嵌合体 and 宿主序列, 得到高质量的 Tags 数据 (Clean Tags)。基于 Clean Tags 进行 OTUs 聚类分析。对 OTUs 进行 Alpha 分析, 对 Observed Species 指数、Chao 指数、Shannon Wiener 香农指数、Simpson 指数进行分析, 绘制稀释指数曲线 (Observed Species) 及 Good's Coverage 指数曲线、Rank Abundance 曲线, 以得到样品内物种丰富度和均匀度信息。Rank Abundance 用于同时解释样品多样性的两个方面, 即样品所含物种的丰富程度 (指一个群落或生境中物种数目的多寡) 和均匀程度 (指一个群落或生境中全部物种个体数目的分配的均匀程度)。物种的丰富程度由曲线在横轴上的长度来反映, 曲线越宽, 表示物种的组成越丰富; 物种组成的均匀程度由曲线的形状来反映, 曲线越平坦, 表示物种组成的均匀程度越高。根据各样品的 OTUS 丰度大小排序作丰度分布曲线图; 对 OTUS 进行 Beta 分析, 绘制树状图和 PCoA 图, 了解各组菌群的差异

状况。

4.3.3 脾脏采集及处理 麻醉大鼠后, 分离脾脏, PBS 冲洗干净; 将脾组织置于 300 目的自制滤袋中, 加入 2% 的 FBS-PBS 用 10 mL 的注射器针芯轻轻碾压几次; 将研磨好的细胞悬液移至 15 mL 离心管内, 置于冰上, 再取 3~5 mL 2% FBS-PBS 冲洗滤袋和培养皿, 移至离心管后, 1 200 r/min 离心 5 min; 倒掉上清, 震荡成混悬液, 加入 1 mL 的溶血素, 室温静置 5 min, 1 200 r/min 离心 5 min; 加入 2 mL 2% FBS-PBS 洗涤离心 1 次; 倒上清, 加入 5 mL 2% FBS-PBS 重悬, 吹打混匀; 再次 300 目滤过; 离心倒上清, 5 mL 重悬。吹打混匀; 胎盘蓝染色计数, 调整细胞浓度为 1×10^7 个/mL; 混匀待测。

4.3.4 Th17 的检测 将混匀的细胞悬液加入 24 孔板, CO₂ 培养箱内孵育 6 h; 取出吹打混匀后, 收集细胞, 将细胞分装于不同管中, 每管 100 μ L, 各测定管分别加入 FITC-anti-CD4, 同型对照管加入等量的同型对照抗体, 用于调节荧光补偿和确认抗体的特异性。避光, 4 ℃, 孵育 30 min 进行细胞膜染色; PBS 洗涤 1 次, 100 μ L PBS 重悬细胞, 每管加入新鲜配制的 Fixation /Permeabilization 工作液 1 mL, 避光, 4 ℃, 孵育 60 min, 2 mL 1 × Permeabilization Buffer 洗涤 2 次, 测定管加入 PE-anti-IL-17, 同型对照管加入等量的同型对照抗体, 避光, 4 ℃, 孵育 30 min, 2 mL 1 × Permeabilization Buffer 洗涤 2 次, 0.5 mL PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测, 以 CD4⁺ 细胞设门分析 CD4⁺ 细胞中 IL-17⁺ 细胞比率。本研究中, 每一个样本收集分析 1×10^6 个细胞, 所有检测细胞中淋巴细胞设门为 R1, 以 R1 门内细胞为分析对象, 得出 CD4⁺ 细胞为 R2, Th17 的结果均在各自的 R2 内得出, Th17 细胞比例以 CD4⁺ IL-17⁺ 在 CD4⁺ T 细胞中的百分比表示。

4.3.5 Treg 的检测 收集细胞吹打混匀后, 将细胞分装于不同管中, 每管 100 μ L, 各测定管分别加入 FITC-anti-CD4, APC-anti-CD25 同型对照管加入等量的同型对照抗体, 用于调节荧光补偿和确认抗体的特异性。避光, 4 ℃, 孵育 30 min 进行细胞膜染色; PBS 洗涤 1 次, 100 μ L PBS 重悬细胞, 每管加入新鲜配制的 Fixation /Permeabilization 工作液 1 mL, 避光, 4 ℃, 孵育 60 min, 2 mL 1 × Permeabilization Buffer 洗涤 2 次, 测定管加入 PE-anti-Foxp3, 同型对照管加入等量的同型对照抗体, 避光, 4 ℃, 孵育 30 min, 2 mL 1 × Permeabilization Buffer 洗涤 2 次, 0.5 mL PBS 重悬细胞, 流式细胞仪检测, 以

CD4⁺细胞设门分析 CD4⁺细胞中 Foxp3⁺细胞比率。本研究中,每一个样本收集分析 1 × 10⁶ 个细胞,所有检测细胞中淋巴细胞设门为 R1,以 R1 门内细胞为分析对象,得出 CD4⁺细胞为 R2,Treg 的结果均在各自的 R2 内得出,Treg 细胞比例以 CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ 在 CD4⁺ T 细胞中的百分比表示。

4.4 统计学方法 实验数据采用 SPSS 21.0 软件分析。计量资料采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,如满足方差齐性,多组比较采用单因素方差分析,如不满足方差齐性,采用秩和检验。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

结 果

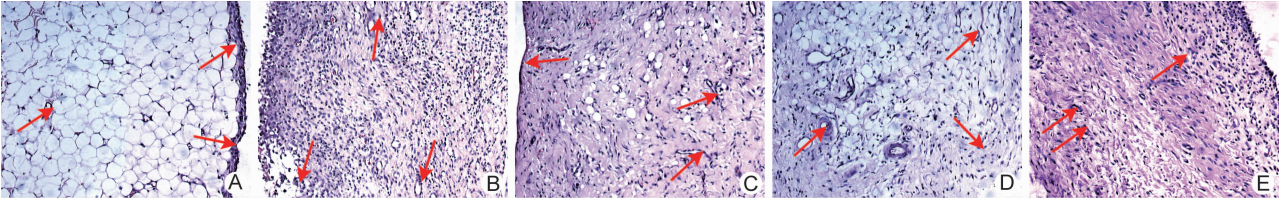
1 各组大鼠滑膜炎性细胞浸润及血管新生的病理形态观察(图 1) 正常组大鼠滑膜细胞排列整齐,无增生,滑膜细胞形态正常,周围脂肪细胞排列规整。与正常组比较,模型组大鼠滑膜细胞增生明显,大量炎性细胞浸润,血管翳数量增多,脂肪细胞结构异常。与

模型组比较,MTX 组、清热活血方组炎性细胞浸润明显减轻,血管新生和血管翳明显减少,大部分滑膜细胞紊乱,结构异常,但外周脂肪细胞还有部分正常未被浸润变形,但益生菌组呈中度炎性浸润,新生血管较多。

2 各组大鼠肠道菌群变化

2.1 Alpha 多样性分析(表 1) 与正常组比较,模型组在物种丰度低,均匀度差;Chao 指数,Observed Species 指数、Shannon Wiener 指数下降($P < 0.05$, $P < 0.01$);与模型组比较,清热活血方组的物种丰度和均匀度较高。Chao 指数,Observed Species 指数,Shannon Wiener 指数显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),MTX 组和益生菌组均有不同程度的升高,其中 MTX 组 Shannon Wiener 指数升高明显($P < 0.05$),益生菌组 Observed Species 指数升高明显($P < 0.01$)。

2.2 Beta 多样性分析(图 2) 图 2A 可见正常组、模型组、清热活血方组、MTX 组样本组内相似性均



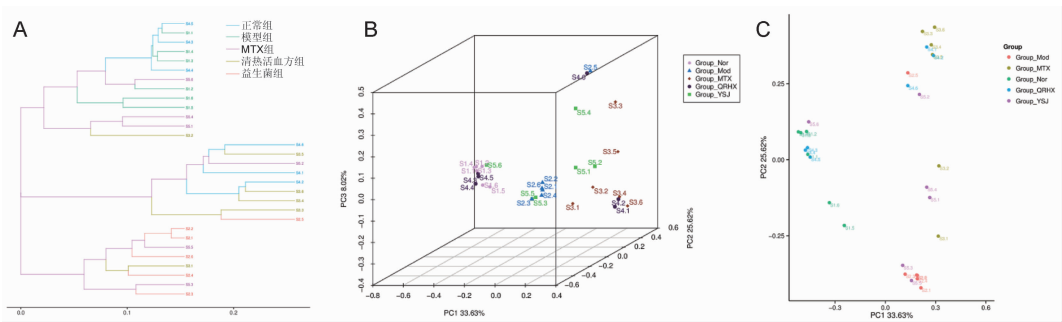
注:A 为正常组;B 为模型组;C 为 MTX 组;D 为清热活血方组;E 为益生菌组;箭头表示阳性结果

图 1 各组大鼠滑膜炎性细胞浸润及血管新生的病理形态观察 (HE, ×20)

表 1 各组大鼠肠道菌群丰度指数比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Chao	Observed Species	Shannon Wiener	Simpson
正常	6	504.16 ± 41.97	485.67 ± 43.69	6.59 ± 0.61	0.97 ± 0.02
模型	6	227.62 ± 125.15 *	163.67 ± 117.27 **	3.03 ± 1.88 **	0.71 ± 0.21
MTX	6	349.26 ± 128.36	290.50 ± 111.93	4.69 ± 1.02 △	0.89 ± 0.05
清热活血方	6	499.78 ± 100.02 △	448.17 ± 91.35 △△	6.03 ± 1.13 △△	0.95 ± 0.47
益生菌	6	452.90 ± 187.28	372.67 ± 169.35 △△	4.58 ± 1.60	0.87 ± 0.98

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$



注:A 为树状图;B、C 为 PCoA 分析图;横纵轴代表两个能最大程度反映方差的两个特征值。图中每个点代表了一个样本,颜色则代表不同的样本分组。越相似的样本在图中距离越近,反之距离越远的样本差异越大

图 2 Beta 多样性分析图

较高,组间比较,正常组和模型组组间差异较大,清热活血方组与正常组和 MTX 组相似度较高,益生菌组组内相似度低。由图 2B、C 可见正常组和模型组在 X 轴上分离,PC1 是主要的分开因素,PC1 贡献率为 33.63%,表示 X 轴差异可以解释全部分析结果的 33.63%,PC2 是模型组与 MTX 组、清热活血方组的主要因素,贡献率为 25.62%。以上两种分析方法均表现了模型组和正常组的肠道菌群结构的分布不同,与模型组比较,各治疗组组间差异明显 (ANOSIM $R = 0.4012$, $P = 0.001$, permutations 数 = 999)。

3 各组大鼠脾脏 Treg 细胞、Th17 细胞、Th17/Treg 比值水平比较(表 2,图 3、4) 与正常组比较,模型组大鼠脾脏 Treg 细胞比值明显降低,Th17 细胞水平、Th17/Treg 比值显著上调($P < 0.05$, $P < 0.01$)。与模型组比较,MTX 组、清热活血方组、益生菌组 Treg 细胞水平均显著升高($P < 0.05$, $P < 0.01$);清热活血方组 Th17 细胞水平降低($P < 0.05$),MTX 组和益生菌

组均对 CIA 大鼠脾脏内 Th17 细胞水平无明显影响 ($P > 0.05$);MTX 组和清热活血方组 Th17/Treg 均明显下降($P < 0.01$),益生菌组 Th17/Treg 比值略有下降,但差异无统计学意义($P > 0.05$)。清热活血方组的 Th17 细胞水平低于益生菌组($P < 0.05$)。

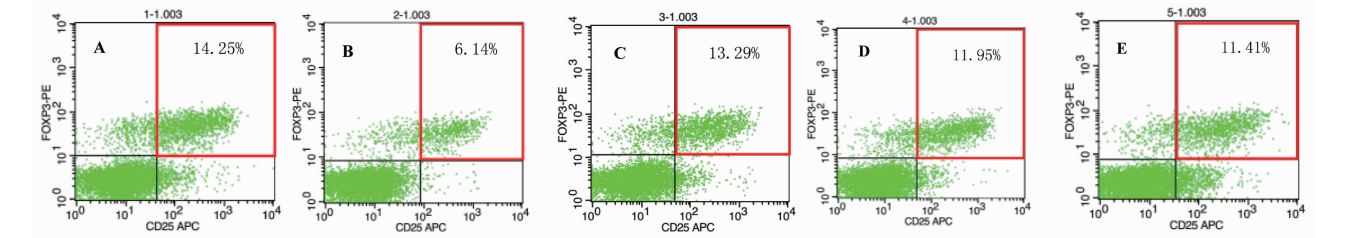
讨 论

RA 是以关节滑膜炎和关节结构破坏为主要特征的常见的自身免疫性疾病,发病机制尚未完全明确,近年来研究发现肠道菌群的失衡是 RA 的发生和发展的重要因素之一^[5],肠道菌群可诱导 Th17、Treg 细胞的成熟,引起自身免疫应答^[9];Th17、Treg 细胞介导的免疫反应,可维持 RA 患者肠道黏膜免疫稳定^[6]。肠道微生态与 Th17、Treg 细胞介导的免疫反应密切相关。清热活血方以金银花、土茯苓为君药,金银花甘、寒,归肺、心、胃经,有清热解毒、散风清热的作用;土茯苓甘、淡、平,归肝、胃经,有解毒除湿、消肿止痛、通利关节的作用。两药合用,既能解毒清热,又能利湿通利关节。苍术、黄柏、丹参、赤芍为本方之臣药,脾为生痰之源,故以苍术燥湿健脾,使湿邪去而不再生;黄柏苦寒,取其苦能燥湿,寒以胜热。苍术、黄柏合为“二妙丸”,清热除湿、通利关节,适用于湿热痹阻证。丹参、赤芍苦微寒,分别入心、肝经,具有清热活血、散瘀止痛之功效。湿热痹阻日久,易邪气阻滞,气血不畅,则血行瘀滞,故本方丹参、赤芍合用以化瘀通络。佐以莪术、青风藤,破气行血、消肿止痛;草薢祛风湿、

表 2 各组大鼠脾脏 Th17/Treg 细胞水平比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	n	Treg 细胞(%)	Th17 细胞(%)	Th17/Treg
正常	6	11.19 ± 1.95	1.30 ± 0.41	0.12 ± 0.04
模型	6	8.33 ± 2.08 *	2.29 ± 0.57 * *	0.29 ± 0.09 * *
MTX	6	12.01 ± 0.82 △△	2.27 ± 0.35	0.19 ± 0.03 △△
清热活血方	6	10.20 ± 2.40 △	1.79 ± 0.26 △	0.18 ± 0.06 △△
益生菌	6	10.14 ± 1.96 △	2.51 ± 0.39 ▲	0.26 ± 0.06

注:与正常组比较,* $P < 0.05$,** $P < 0.01$;与模型组比较,△ $P < 0.05$,△△ $P < 0.01$;与清热活血方比较,▲ $P < 0.05$



注: A 为正常组;B 为模型组;C 为 MTX 组;D 为清热活血方组;E 为益生菌组;图 4 同

图 3 Treg 细胞流式 FACSC 的检测分析

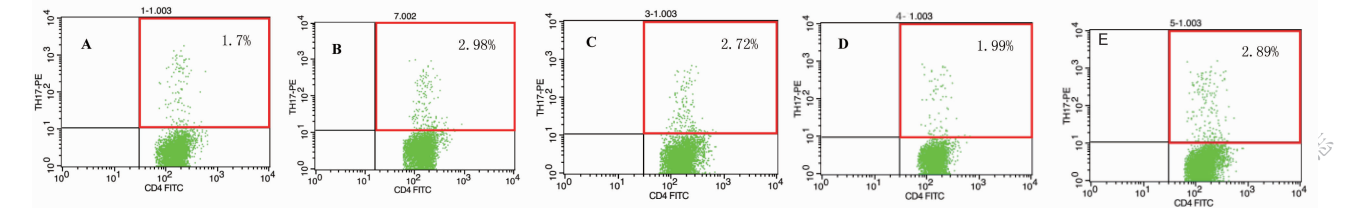


图 4 Th17 细胞流式 FACSC 的检测分析

通经络;蜈蚣、蜂房等虫类药,其药性走窜,内达脏腑,外连经络,凡气血凝聚之处,皆可开之。方中金银花、土茯苓、黄柏、苍术诸药合用可增强清热除湿、消肿通络的功效;丹参、赤芍、莪术、青风藤、蜈蚣诸药合用可增强活血祛瘀、通络止痛的功效。诸药合用,共奏清热祛湿、活血止痛的功效。

本研究主要以大鼠粪便和脾脏为研究对象。滑膜病理结果表明,清热活血方通过减少炎性浸润,减轻血管新生,缓解 RA 滑膜症状。Alpha 多样性分析表明,与正常组比较,模型组的丰富度明显降低,并且物种分布均匀度较差;从菌群种类差异看,模型组与正常组的菌群差异明显,清热活血方在丰富度、均匀度相较模型组增加,并且物种差异明显。说明 CIA 大鼠的肠道菌群丰富度下降,存在菌群失衡状况。清热活血方对肠道菌群丰富度呈正向调节,可以改善菌群的丰富程度和菌群物种的均匀度,恢复肠道微生态的平衡。Treg 是一群具有免疫负性调节功能的 T 细胞亚群,控制体内自身免疫反应。其中以 $CD4^+CD25^+$ Treg 维持免疫内环境的稳态^[10]。Foxp3 是 Treg 细胞表面重要的转录因子,也是其特异性标志,在绝大多数 $CD4^+CD25^+$ Treg 细胞中均有表达^[11]。Th17 细胞是一群能够分泌 IL-17 的 $CD4^+$ T 细胞亚群,在 RA 病程中发挥致炎性作用^[12]。在 RA 患者体内, Th17/Treg 细胞平衡失调会导致 RA 的滑膜炎,骨质破坏和骨侵蚀^[13]。调节 Th17/Treg 细胞失衡成为治疗 RA 的新途径。清热活血方治疗活动期 RA 可能是通过调节 Th17/Treg 细胞失衡状态,抑制病理性 T 细胞的增值,活化抑制自身免疫的细胞,从而缓解 RA 局部关节炎性破坏和滑膜血管新生。益生菌对 RA 的影响作用成为目前研究的热点^[14]。本实验益生菌组可有效上调 Treg 细胞,但对 Th17 细胞无明显效果,说明本实验所用的益生菌的治疗可以有效调节免疫,但对 RA 的炎症因子的活化作用尚不明显。

参 考 文 献

- [1] 巩勋,姜泉,曹炜,等. 湿热瘀阻与活动期类风湿关节炎骨侵蚀[J]. 中医杂志, 2014, 55(14): 1189-1192.
- [2] 姜泉,殷海波,罗成贵,等. 清热活血方药治疗类风湿关节炎骨破坏 2 年期放射学研究[J]. 世界中西医结合杂志, 2012, 7(4): 343-347.

- [3] 刘鹏霄,曹炜,姜泉,等. 清热活血方抑制 II 型胶原诱导型关节炎大鼠滑膜组织血管新生的研究[J]. 北京中医药大学学报, 2014, 37(10): 686-690.
- [4] 智恺,刘春芳,曹炜,等. 清热活血方对肿瘤坏死因子 α 诱导的类风湿关节炎成纤维样滑膜细胞迁移和黏附的影响[J]. 中医杂志, 2016, 57(20): 1777-1781.
- [5] Liu X, Zeng B, Zhang J, et al. Role of the gut microbiome in modulating arthritis progression in mice[J]. Sci Rep, 2016, 8: 30594. doi: 10.1038/srep30594.
- [6] Sara O, Pizarro TT. The Treg/Th17 axis: A dynamic balance regulated by the gut microbiome[J]. Front Immunol, 2015, 6(Suppl 1): 639.
- [7] 周一平. 用 Excel 软件进行药物毒理实验的随机分组[J]. 药学进展, 2005, 29(9): 425-427.
- [8] 魏伟,吴锡美,李元建主编. 药理实验方法学[M]. 第 4 版. 北京: 人民卫生出版社, 2010: 71.
- [9] Gaboriau-Routhiau V, Rakotobe S, Lécuyer E, et al. The key role of segmented filamentous bacteria in the coordinated maturation of gut helper T cell responses[J]. Immunity, 2009, 31(4): 677-689.
- [10] Buckner JH. Mechanisms of impaired regulation by $CD4^+CD25^+$ Foxp3⁺ regulatory T cells in human autoimmune diseases[J]. Nature Rev Immunol, 2010, 10(12): 849-859.
- [11] Kennedy A, Schmidt EM, Cribbs AP, et al. A novel upstream enhancer of FOXP3, sensitive to methylation-induced silencing, exhibits dysregulated methylation in rheumatoid arthritis Treg cells[J]. Eur Immunol, 2014, 44(10): 2968-2978.
- [12] Benedetti G, Miossec P. Interleukin 17 contributes to the chronicity of inflammatory diseases such as rheumatoid arthritis[J]. Eur Immunol, 2014, 44(2): 339-347.
- [13] Li G, Zhao Y, Wang P, et al. Detection of Th17/Treg cells and related factors in gingival tissues and peripheral blood of rats with experimental periodontitis[J]. Iranian Basic Med Sci, 2017, 20(3): 294-300.
- [14] 潘胡丹,李润泽,李婷,等. 益生菌辅助治疗类风湿关节炎的益处: 随机对照临床试验荟萃分析和系统综述[J]. Engineering, 2017, 3(1): 245-259.

(收稿: 2017-11-15 在线: 2018-05-10)

责任编辑: 段碧芳

英文责编: 张晶晶