

# 基于16S rDNA测序研究当归拈痛汤对风湿热痹佐剂性关节炎大鼠肠道菌群的影响

梁露莹<sup>1</sup>, 林鸿鑫<sup>1</sup>, 蔡义思<sup>1</sup>, 林思聪<sup>1</sup>, 谭婧炜<sup>1</sup>, 马国梁<sup>1</sup>, 袁立霞<sup>1,2\*</sup>

(1. 南方医科大学中医药学院, 广州 510515;

2. 南方医科大学广东省中药制剂重点实验室, 广州 510515)

**[摘要]** 目的:从肠道菌群变化研究当归拈痛汤治疗风湿热痹佐剂性关节炎(AA)大鼠的作用机制。方法:将60只SD大鼠随机分为6组:正常组、风湿热痹模型组(FSR组)、当归拈痛汤(DGNTT)低、中、高剂量组(5.67、11.34、22.68 g·kg<sup>-1</sup>),甲氨蝶呤组(MTX, 1.35 mg·kg<sup>-1</sup>),每组10只,除正常组外,其余各组均注射灭活结核分支杆菌(Mtb)佐剂进行免疫,置于风湿热环境的人工气候箱中进行64 h干预造模。初次免疫当天起,给予大鼠灌胃给药,连续灌胃28 d。对大鼠进行关节炎指数(AI)检测,使用足趾容积测量仪检测大鼠足趾容积变化及苏木素-伊红(HE)染色观察膝关节滑膜组织形态改变,并且采用16S rDNA高通量基因测序法分析给药治疗前后大鼠的肠道菌群变化。结果:当归拈痛汤能够减轻风湿热痹证AA大鼠滑膜组织增生和炎症程度及血管翳形成,并且16S rDNA测序结果显示,与正常组比较,FSR组厚壁菌门、乳酸杆菌属、普雷沃氏菌属9、拟普雷沃氏菌属的相对丰度明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),拟杆菌门、拟杆菌属的相对丰度显著升高( $P<0.01$ );与FSR组比较,当归拈痛汤各剂量组和MTX组中乳酸杆菌属均明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),拟杆菌门显著降低( $P<0.01$ ),当归拈痛汤中、高剂量组和MTX组中厚壁菌门、普雷沃氏菌属9、拟普雷沃氏菌属显著增加,拟杆菌属明显降低,差异均具有统计学意义( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。Spearman相关性分析显示,拟杆菌属、螺杆菌属与AI呈正相关( $P<0.05$ ),普雷沃氏菌属9、候选单胞生糖菌属与AI呈负相关( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ );普雷沃氏菌属9与足趾容积呈负相关( $P<0.01$ );瘤胃球菌科NK4A214群、克里斯滕森菌科R-7、拟杆菌属与脾脏指数呈正相关( $P<0.05$ ),普雷沃氏菌属9与脾脏指数呈负相关( $P<0.01$ )。结论:当归拈痛汤治疗风湿热痹类关节炎具有明显疗效,能够改善AA大鼠菌群结构,提升益生菌的丰度,抑制致病菌生长,促使肠道菌群恢复至正常水平,其作用机制可能与改善肠道免疫代谢功能,维持肠道稳态相关。

**[关键词]** 类风湿性关节炎; 风湿热痹证; 当归拈痛汤; 肠道菌群; 16S rDNA高通量测序

**[中图分类号]** R2-0;R33;R289;R22;684.3 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)09-0018-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20230337

**[网络出版地址]** <https://kns.cnki.net/kcms/detail//11.3495.R.20230215.1414.005.html>

**[网络出版日期]** 2023-02-16 11:37:01

## Effect of Danggui Niantongtang on Intestinal Flora in Adjuvant-induced Arthritis Rats of Wind-dampness-heat Arthralgia: Based on 16S rDNA Sequencing

LIANG Luying<sup>1</sup>, LIN Hongxin<sup>1</sup>, CAI Yisi<sup>1</sup>, LIN Sicong<sup>1</sup>, TAN Jingwei<sup>1</sup>, MA Guoliang<sup>1</sup>, YUAN Lixia<sup>1,2\*</sup>

(1. School of Traditional Chinese Medicine, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China;

2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Chinese Medicine Pharmaceuticals, Southern Medical University, Guangzhou 510515, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the mechanism of Danggui Niantongtang (DGNTT) against adjuvant-induced arthritis (AA) in rats with wind-dampness-heat arthralgia (FSR) based on the variation of intestinal

**[收稿日期]** 2022-10-26

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82274400);广东省自然科学基金面上项目(2022A1515011681);南方医科大学2021年度大学生创新创业训练计划项目(S202112121167)

**[第一作者]** 梁露莹,从事方剂作用机制研究,E-mail:1149383741@qq.com

**[通信作者]** \*袁立霞,博士,教授,从事方证相应机制研究,E-mail:195154565@qq.com

flora. **Method:** A total of 60 SD rats were randomized into normal (control) group, FSR group, low-, medium-, and high-dose DGNTT (5.67, 11.34, 22.68 g·kg<sup>-1</sup>) groups, and methotrexate (MTX) group (1.35 mg·kg<sup>-1</sup>), with 10 rats in each group. The rats, except the control group, were injected with Mtb adjuvant and then exposed to artificial climatic chamber (hot and humid with wind) for 64 h for modeling. The rats were treated with water, DGNTT or MTX for 28 days from the day of injection. Arthritis index (AI) of rats was measured and paw volume was determined with a volume meter. The morphology of synovial tissues of the knees was observed based on hematoxylin-eosin (HE) staining and the changes of intestinal flora were analyzed based on 16S rRNA sequencing. **Result:** DGNTT can alleviate the hyperplasia of synovial tissue and inflammation of AA rats with FSR and inhibit the formation of pannus. The results of 16S rRNA sequencing showed that the relative abundance of Firmicutes, *Lactobacillus*, *Prevotella 9*, and *Alloprevotella* decreased ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and the relative abundance of Bacteroidetes and *Bacteroides* increased ( $P<0.01$ ) in FSR group compared those in the control group. Compared with the FSR group, all DGNTT groups and MTX group had high relative abundance of *Lactobacillus* ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ) and low relative abundance of Bacteroidetes ( $P<0.01$ ) and medium-dose and high-dose DGNTT groups and MTX group showed high abundance of Firmicutes, *Prevotella 9*, and *Alloprevotella* and low abundance of *Bacteroides* ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). Spearman's correlation analysis suggested that the abundance of *Bacteroides* and *Helicobacter* was in positive correlation with AI ( $P<0.05$ ), while the abundance of *Prevotella 9* and *Candidatus Saccharimonas* was in negative correlation with AI ( $P<0.01$ ,  $P<0.05$ ). There was a negative correlation between the abundance of *Prevotella 9* and paw volume ( $P<0.01$ ), and the abundance of Ruminococcaceae NK4A214 group, Christensenellaceae R-7 group, and *Bacteroides* was in negative correlation with spleen index ( $P<0.05$ ). The abundance of *Prevotella 9* was in negative correlation with spleen index ( $P<0.01$ ). **Conclusion:** DGNTT is effective for arthritis with FSR, as it can regulate the composition of intestinal flora in AA rats by increasing the abundance of probiotics and inhibiting the growth of pathogenic bacteria. The mechanism is the likelihood that it improves intestinal immune metabolism to ensure intestinal homeostasis.

**[Keywords]** rheumatoid arthritis; wind-dampness-heat arthralgia; Danggui Niantongtang; intestinal flora; 16S rRNA sequencing

类风湿关节炎(RA)是一种滑膜关节慢性炎症的自身免疫性疾病,与滑膜形成、进行性骨质侵蚀和关节破坏有关,常见症状包括关节肿胀和压痛,严重者甚至通常伴有残疾<sup>[1]</sup>。中医常将RA归属“痹证”“历节风”“顽痹”等范畴,临床上主要分为风寒湿痹、风湿热痹、痰瘀痹阻和肝肾两虚四大证型,其中受地域特点等影响,岭南地区的RA患者以风湿热痹证型居多<sup>[2]</sup>。而方剂是中医治疗疾病的重要手段,证候是中医使用方剂的标签,有是证用是方,方与证的相应关系是方证研究的关键。因此,基于“方证相应”理论研究,针对风湿热痹证RA患者,应选用功擅清热化湿,疏风止痛的当归拈痛汤进行治疗。目前治疗RA的优选方案是采用抗风湿药物(DMARDs)如甲氨蝶呤等,对RA起到有效缓解的作用,然而长时间使用DMARDs进行治疗可能使患者产生耐药性,导致后期的治疗效果低效<sup>[3]</sup>。当归拈痛汤是临床治疗RA的常用方剂,临床用于治疗

风湿热痹证RA疗效显著,药效温和且鲜有不良反应<sup>[4]</sup>。

肠道微生物群是多种多样细菌种类的复杂集合,是生活在人类肠道中的微生物群落的总称。研究发现肠道微生物群有助于维持免疫系统的稳定,与机体先天性免疫防御、适应性免疫防御和免疫耐受过程息息相关<sup>[5]</sup>。肠道菌群失调作为环境因素在RA的发病及病情演变发展中发挥至关重要的作用<sup>[6]</sup>。

本课题组前期对当归拈痛汤部分机制进行研究,证实当归拈痛汤对佐剂性关节炎(AA)大鼠具有显著防治作用,其机制与抗炎及抑制滑膜组织增生相关<sup>[7]</sup>。但当归拈痛汤对AA大鼠肠道菌群是否具有调节作用目前尚未明确。因此,本实验在建立风湿热痹佐剂性关节炎(AA)大鼠模型基础上,采用当归拈痛汤进行干预,观察大鼠模型实验结果,以研究当归拈痛汤对AA大鼠的影响及治疗效果,为该

复方方证结合研究奠定基础,并从肠道菌群变化探讨该方治疗风湿热痹证RA的可能作用机制,继而为临床使用提供可循证的实验数据及可参考的理论依据。

## 1 材料

**1.1 动物** SPF级雄性SD大鼠60只,体质量(160±10)g。动物由南方医科大学实验动物中心所提供,许可证号为SYXK(粤)2016-0041,于南方医科大学SPF级实验室喂养,自由饮食,适应性喂养7 d后开展实验。实验符合南方医科大学的实验动物伦理委员会相关要求及原则,伦理决议编号L2019201。

**1.2 药物制备** 当归拈痛汤药液制备:称取羌活15 g、茵陈15 g、猪苓9 g、泽泻9 g、知母9 g、防风9 g、苍术9 g、当归9 g、苦参6 g、葛根6 g、人参6 g、升麻3 g、白术3 g、黄芩3 g、炙甘草15 g,上述药物由南方医院中药房提供,经南方医科大学马骥教授鉴定为正品,置于中药煎煮容器内煎煮2次,第1次加入蒸馏水800 mL充分浸泡30 min,武火煮沸后文火煎煮1 h,第2次加入蒸馏水600 mL,煮沸后文火煎煮0.5 h。将2次药液纱布过滤,均匀混合,利用旋转蒸发仪浓缩药液,将低、中、高不同浓度分别浓缩至含生药质量浓度0.567、1.134、2.268 g·mL<sup>-1</sup>,置-20℃冰箱保存备用。

**1.3 试剂** 灭活结核分支杆菌(Mtb,美国Becton Dickinson公司,批号7104681),矿物油(美国Sigma公司,批号N1586),苏木素染液、伊红染液(上海碧云天生物技术有限公司,批号分别为112818190320、120318190215),甲氨蝶呤片(上海药信谊药厂有限公司,批号036190807),4%多聚甲醛通用型组织固定液(安徽Biosharp公司,批号22242687),石蜡(德国Leica公司,批号39601006)。

**1.4 仪器** N-12008型旋转蒸发仪(日本Eyela公司),RM2135型石蜡切片机(德国Leica公司),5804R型高速离心机(德国Eppendorf公司);PV-200型足趾容积测量仪(四川科仪诚科技有限公司),DS-11型超微量紫外分光光度计(美国De Novix公司),Light Cycler96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(瑞士Roche公司),Mini-Protean Tetra型电泳仪及转膜仪(美国Bio-Rad公司)。

## 2 方法

**2.1 动物模型制备、分组** 准确称量Mtb 40 mg,置于高压灭菌的研钵中,充分研磨20 min,直到变成灰白色并完全变性,加入矿物油500 μL,研磨并混合

均匀,再加入矿物油7.5 mL,调配至质量浓度5 g·L<sup>-1</sup>。将悬浮液吸至玻璃注射器中,用三通管连接2个玻璃注射器,将Mtb和矿物油的悬浮液抽吸约15 min,使其乳化并混合均匀,然后转移到10 mL离心管中。适应性饲养7 d后,从60只SD大鼠中随机选出10只作为正常组,于大鼠尾根部皮内注射生理盐水0.2 mL;剩余50只大鼠作为造模组,于尾根部皮内注射Mtb佐剂0.2 mL进行免疫,并在免疫当天于人工气候箱中予风湿热环境干预。造模成功后将造模组再随机分成风湿热痹RA模型组(FSR组)、当归拈痛汤低、中、高剂量组及甲氨蝶呤组(MTX),每组10只大鼠并做好标记。造模后大鼠精神萎靡,行动受限,足趾关节红肿,表明Mtb诱导佐剂性关节炎模型成功<sup>[8]</sup>。

**2.2 给药** 初次免疫当天起,给予大鼠灌胃给药,连续灌胃28 d。根据体表面积得出人与大鼠给药量换算系数为0.018,当归拈痛汤低、中、高剂量组分别为等效剂量的0.5、1、2倍<sup>[9]</sup>,剂量分别为5.67、11.34、22.68 g·kg<sup>-1</sup>,各给药组大鼠每日灌服对应剂量当归拈痛汤2 mL;MTX组每周灌服甲氨蝶呤混悬液(1.35 mg·kg<sup>-1</sup>)2次,每次灌胃2 mL;正常组、FSR组则每天给予生理盐水2 mL。于实验第28天的末次给药2 h后对大鼠进行相应处理。

**2.3 各组大鼠关节炎指数(AI)的检测** 从免疫当天开始,每隔4 d进行一次检测。分别在未进行造模时和造模完成后的第4、8、12、16、20、24、28天,观察各组大鼠的关节炎症状,并进行AI评分。

**2.4 各组大鼠足趾肿胀程度的检测** 从首次免疫开始,每隔4 d进行一次检测,取马克笔对大鼠双踝关节进行画线标记,随之将大鼠左、右足依次置于足趾容积测量仪中测量大鼠双踝关节以下足趾容积,观察足趾关节肿胀程度并进行记录。

**2.5 各组大鼠膝关节滑膜组织的提取** 大鼠麻醉后取仰卧位,消毒膝关节,用手术器械从膝关节中间纵向切开皮肤,露出膝关节中间约3 cm×3 cm的区域,用镊子轻轻抬起髌骨。沿股骨附近的髌骨上缘切割,然后沿髌骨两侧继续分离,直至胫骨,成功打开膝关节腔。用无菌镊子小心地取出完整的关节组织,并立即放入-80℃的冰箱中,在液氮中冷冻保存。

**2.6 HE染色观察大鼠滑膜组织和脾脏病理学变化** 取大鼠滑膜组织和脾脏,磷酸盐缓冲液(PBS)清洗,除去血滴与脂肪,4%多聚甲醛中固定48 h;再用组织剪将其剪成小块,蒸馏水洗涤,并使用滤纸吸

干水分,制作石蜡包埋组织蜡块;苏木素、伊红染色,乙醇梯度脱水,中性树胶封片。在显微镜下观察踝关节组织和脾脏的形态学病理改变情况并拍照。

**2.7 肠道菌群分析** 每组随机选取6只大鼠,最后一次给药后使用离心管收集粪便,将所有粪便样本冷冻在-80℃下,根据DNA提取试剂盒的说明进行提取,并进行肠道微生物基因组DNA检测。基因组DNA的完整性和纯度通过1%琼脂糖凝胶电泳进行验证,DNA的浓度和纯度则使用NanoDropOne仪器进行检测。基因组DNA将被用作模板,进行PCR扩增和产物的电泳检测,其中选择V3V4作为测序区。使用基因工具分析软件(版本4.03.05.0, SynGene)比较PCR产物的浓度,计算每个样本所需的体积,并混合各组的PCR产物。回收PCR产物和TE缓冲液以洗脱和回收DNA片段。按照NEBNextIllumina文库制备试剂盒的标准构建测序文库,采用高通量测序平台IlluminaHiSeq测序(广东美格基因科技有限公司),并采用生物信息分析的方法进行序列分析和物种注释。通过操作分类单元(OTU)聚类分析,获得各组样本在不同水平上的群落组成和结构,分析alpha多样性,比较样本之间

的差异,使用基于OTUs的R软件绘制Spearman相关性热图计算微生物区系和脾脏指数、AI值及足趾肿胀度之间的相关性。

**2.8 统计学分析** 实验数据均采用SPSS 22.0统计软件进行分析,采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,两独立样本比较采用t检验,多样本均数比较用单因素方差分析(One-way ANOVA)。如果实验数据为非正态性分布,则采用秩和检验(Kruskal-Wallis H检验)。相关性采用Spearman相关系数分析。以 $P < 0.05$ 为差异具有统计学意义。

### 3 结果

**3.1 对风湿热痹证AA大鼠AI的影响** 在实验的4d前,各组大鼠AI值无变化,均为0,且至8d之前,各组大鼠AI之间比较差异无统计学意义。从8d之后,除正常组外的各组大鼠AI值均呈上升趋势,FSR组增长速率明显高于当归拈痛汤各剂量组和MTX组( $P < 0.05$ ),并于第20天左右达到峰值。此后至28d,FSR组AI值无明显改变,均维持在较高水平。而当归拈痛汤各剂量组及MTX组AI值明显低于FSR组,差异具有统计学意义( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ )。且当归拈痛汤各剂量组及MTX组AI值均有不同程度下降。见表1。

表1 当归拈痛汤对风湿热痹证AA大鼠AI的影响( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

Table 1 Effect of Danggui Niantongtang on arthritis index of wind-damp-heat arthralgia model rats ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=10$ )

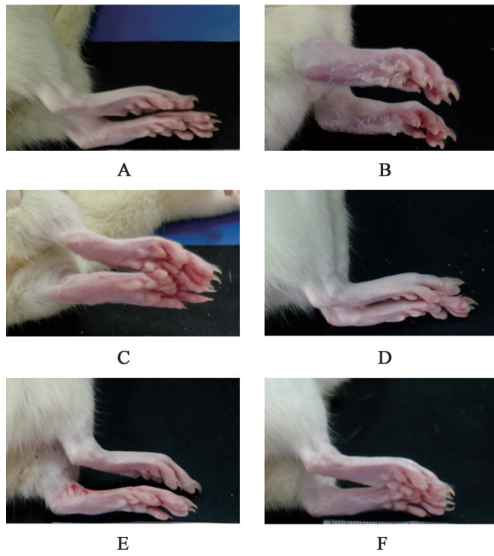
组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	4 d	8 d	12 d	16 d	20 d	24 d	28 d
正常组		0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00	0.00±0.00
FSR组		0.00±0.00	1.60±0.89 <sup>2)</sup>	3.80±1.48 <sup>2)</sup>	5.60±2.07 <sup>2)</sup>	6.60±1.67 <sup>2)</sup>	6.60±1.67 <sup>2)</sup>	6.60±1.67 <sup>2)</sup>
当归拈痛汤低剂量组	5.67	0.00±0.00	0.67±0.52	2.67±2.34	3.00±2.00	3.83±1.72 <sup>3)</sup>	3.83±1.47 <sup>3)</sup>	3.67±2.07 <sup>3)</sup>
当归拈痛汤中剂量组	11.34	0.00±0.00	0.50±0.55 <sup>3)</sup>	1.50±1.22 <sup>3)</sup>	2.33±1.37 <sup>3)</sup>	2.67±2.25 <sup>3)</sup>	2.50±2.07 <sup>4)</sup>	2.50±1.64 <sup>4)</sup>
当归拈痛汤高剂量组	22.68	0.00±0.00	1.00±0.63	3.00±1.10	3.83±1.60	4.33±2.07	4.00±1.90 <sup>3)</sup>	3.67±2.16 <sup>3)</sup>
MTX组	1.35×10 <sup>-3</sup>	0.00±0.00	0.50±0.58	1.75±0.50 <sup>3)</sup>	1.25±0.50 <sup>4)</sup>	1.25±0.50 <sup>4)</sup>	0.75±0.50 <sup>4)</sup>	0.75±0.50 <sup>4)</sup>

注:与正常组比较<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$ ;与FSR组比较<sup>3)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>4)</sup> $P < 0.01$ (表2、表3、表5、表6同)

**3.2 对风湿热痹证AA大鼠足趾肿胀度的影响** 实验过程中,正常组大鼠足趾肿胀度轻微上升,考虑其与体质量增加因素相关,且前后差异无统计学意义。与正常组大鼠比较,FSR组大鼠在第8天开始出现足趾关节红肿热痛,局部皮肤发红,皮温升高,足趾增厚并逐渐加重;在第16天左右开始,足踝关节肿胀明显,足趾畸形,活动受限,关节屈伸不利,步态改变,出现跛行现象,足趾肿胀度显著升高( $P < 0.01$ )并于第24天左右到达顶峰后基本无明显改变。与FSR组比较,当归拈痛汤各剂量组和MTX组的足趾肿胀度较低,差异具有统计学意义( $P <$

0.05)。并且在第16天左右之后当归拈痛汤各剂量组和MTX组大鼠的关节肿胀程度开始下降,随着治疗时间的推进其肿胀程度呈逐渐减轻的趋势。见图1、表2。

**3.3 对风湿热痹证AA大鼠滑膜组织影响** 正常组大鼠的滑膜组织排列紧密整齐,平滑柔润,无充血、水肿及增生等病理改变,没有明显的炎症细胞浸润;与正常组比较,FSR组滑膜组织显著增生且细胞水肿明显、排列紊乱,滑膜组织中可见大量炎性细胞浸润及新生毛细血管充血,滑膜细胞向关节腔内增生。与FSR组比较,当归拈痛汤各剂量组和MTX



注:A.正常组;B.FSR组;C.当归拈痛汤低剂量组;D.当归拈痛汤中剂量组;E.当归拈痛汤高剂量组;F.MTX组(图2和图3同)

图1 当归拈痛汤对风湿热痹证AA大鼠足趾肿胀情况的影响  
Fig. 1 Effect of Danggui Niantongtang on toe morphology of wind-damp-heat arthralgia model rats

组的滑膜组织增生程度降低,排列较整齐,滑膜与关节连接清楚,仅有少量炎性细胞浸润,尤其是当归拈痛汤中剂量和MTX组,滑膜增生程度轻微,不甚明显,组织结构趋于正常组水平,提示当归拈痛汤可有效改善大鼠滑膜异常增生的情况。见图2。

**3.4 对风湿热痹证AA大鼠脾脏指数及脾脏组织病理学改变的影响** 与正常组比较,FSR组大鼠脾脏组织白髓及边缘区增生明显,炎症细胞浸润,大量生发中心形成,其脾脏指数显著升高( $P<0.01$ );与FSR组比较,当归拈痛汤各剂量组和MTX组白髓和边缘区增生体积变小、数目减少,生发中心生成情况也有明显改善,脾脏指数均显著下降( $P<0.01$ )。见图3、表3。

**3.5 对风湿热痹证AA大鼠肠道菌群影响**

**3.5.1  $\alpha$ 多样性分析** 通过 $\alpha$ 多样性指数 Reads 和

表2 当归拈痛汤对风湿热痹证AA大鼠足趾肿胀度的影响( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

Table 2 Effect of Danggui Niantongtang on toe swelling degree of wind-damp-heat arthralgia model rats ( $\bar{x}\pm s, n=10$ )

组别	剂量 /g·kg <sup>-1</sup>	足趾肿胀度							
		0 d	4 d	8 d	12 d	16 d	20 d	24 d	28 d
正常组		1.71±0.02	1.83±0.13	1.96±0.06	2.04±0.12	2.08±0.08	2.14±0.11	2.13±0.15	2.16±0.06
FSR组		1.74±0.13	1.93±0.14	2.49±0.17 <sup>1)</sup>	3.23±0.28 <sup>1)</sup>	3.30±0.19 <sup>2)</sup>	3.56±0.21 <sup>2)</sup>	3.64±0.24 <sup>2)</sup>	3.61±0.26 <sup>2)</sup>
当归拈痛汤低剂量组	5.67	1.77±0.26	1.80±0.23	2.11±0.24	2.65±0.26	2.78±0.17	2.83±0.21	2.77±0.09 <sup>3)</sup>	2.74±0.26 <sup>3)</sup>
当归拈痛汤中剂量组	11.34	1.66±0.12	1.74±0.11	1.89±0.18	2.58±0.32	2.62±0.25 <sup>3)</sup>	2.57±0.22 <sup>4)</sup>	2.54±0.37 <sup>3)</sup>	2.49±0.18 <sup>3)</sup>
当归拈痛汤高剂量组	22.68	1.74±0.08	1.80±0.07	2.15±0.08 <sup>3)</sup>	2.60±0.13 <sup>3)</sup>	2.79±0.34 <sup>3)</sup>	2.93±0.08 <sup>3)</sup>	2.89±0.35 <sup>3)</sup>	2.86±0.23 <sup>3)</sup>
MTX组	1.35×10 <sup>-3</sup>	1.78±0.14	1.84±0.11	1.90±0.17 <sup>3)</sup>	2.23±0.18 <sup>3)</sup>	2.38±0.29 <sup>4)</sup>	2.36±0.18 <sup>4)</sup>	2.30±0.18 <sup>4)</sup>	2.28±0.27 <sup>4)</sup>

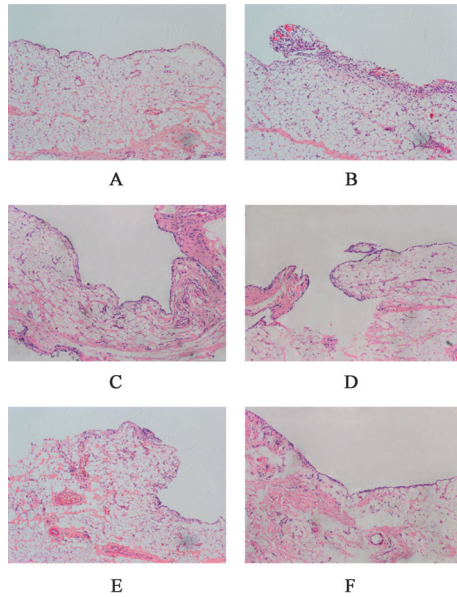


图2 当归拈痛汤对风湿热痹证AA大鼠滑膜组织病理学改变的影响(HE,×100)

Fig. 2 Effect of Danggui Niantongtang on synovial tissues histopathology of wind-damp-heat arthralgia model rats (HE,×100)

Simpson指数对各组大鼠肠道菌群的多样性进行评估,结果发现正常组、FSR组、当归拈痛汤各剂量组和MTX组的Reads指数和Simpson指数差异均无统计学意义。见表4。

**3.5.2 菌群结构差异分析** 经16S rDNA高通量测序发现,在门水平上,正常组、FSR组与当归拈痛汤各剂量组和MTX组的共有OTU为17个,与正常组比较,FSR组的特有OTU数减少,与FSR组比较,给药后当归拈痛汤低剂量组和MTX组的特有OTU数增多;在属水平上,正常组、FSR组与当归拈痛汤各剂量组和MTX组的共有OTU为118个,与正常组比较,FSR组的特有OTU数明显减少,而与FSR组比较,当归拈痛汤各剂量组和MTX组特有OTU数均有不同程度增多。见图4。

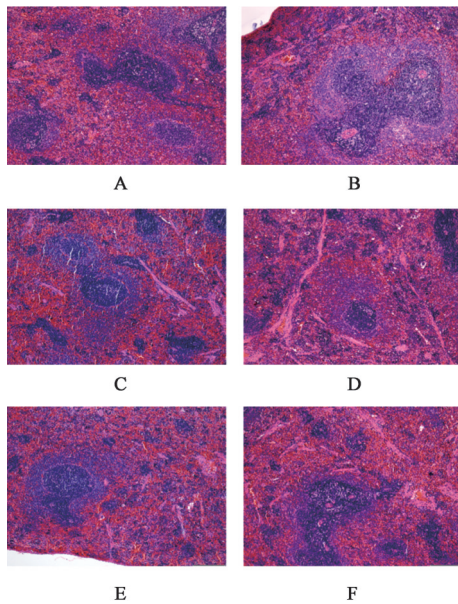


图3 当归拈痛汤对风湿热痹证AA大鼠滑膜组织脾组织病理学改变的影响(HE,×200)

Fig. 3 Effect of Danggui Niantongtang on spleen histopathology of wind-damp-heat arthralgia model rat (HE,×200)

表3 当归拈痛汤对风湿热痹证AA大鼠脾脏指数的影响( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Table 3 Effect of Danggui Niantongtang on spleen index of wind-damp-heat arthralgia model rats ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	脾脏指数/mg·g <sup>-1</sup>
正常组		1.67±0.11
FSR组		4.98±0.29 <sup>2)</sup>
当归拈痛汤低剂量组	5.67	3.09±0.33 <sup>4)</sup>
当归拈痛汤中剂量组	11.34	2.67±0.43 <sup>4)</sup>
当归拈痛汤高剂量组	22.68	3.10±0.52 <sup>4)</sup>
MTX组	1.35×10 <sup>-3</sup>	2.50±0.60 <sup>4)</sup>

表4 各组大鼠肠道菌群α多样性Reads指数及Simpson指数比较( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

Table 4 Alpha-diversity analysis by Reads index and Simpson index ( $\bar{x}\pm s$ ,  $n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Reads指数	Simpson指数
正常组		90 489±3 981	0.038±0.002
FSR组		75 984±2 685	0.011±0.001
当归拈痛汤低剂量组	5.67	82 880±3 512	0.030±0.005
当归拈痛汤中剂量组	11.34	89 367±1 934	0.035±0.002
当归拈痛汤高剂量组	22.68	92 763±1 661	0.055±0.010
MTX组	1.35×10 <sup>-3</sup>	86 598±6 206	0.074±0.017

3.5.2.1 门水平差异分析 在大鼠肠道菌群门水平上, 各组含量最高的菌群均是厚壁菌门(Firmicutes), 其次是拟杆菌门(Bacteroidetes), 为各

组肠道菌群的优势菌门。与正常组比较, FSR组中厚壁菌门的相对丰度降低( $P<0.01$ ), 拟杆菌门的相对丰度升高( $P<0.01$ ); 与FSR组比较, 厚壁菌门的相对丰度在当归拈痛汤中、高剂量组和MTX组显著增加( $P<0.01$ ), 拟杆菌门的相对丰度在当归拈痛汤各剂量组和MTX组都显著降低( $P<0.01$ ), 变化情况趋向正常组。见图5、表5。

3.5.2.2 属水平差异分析 在大鼠肠道菌群属水平上, 与正常组比较, FSR组中拟杆菌属(*Bacteroides*)的相对丰度显著升高( $P<0.01$ )、乳酸杆菌属(*Lactobacillus*)、普雷沃氏菌属9(*Prevotella 9*)、拟普雷沃氏菌属(*Alloprevotella*)的丰度均明显降低( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。经给药治疗后, 与FSR组比较, 拟杆菌属的相对丰度在当归拈痛汤中、高剂量组和MTX组显著降低( $P<0.01$ ), 乳酸杆菌属的相对丰度在当归拈痛汤低、中、高剂量组和MTX组明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), 普雷沃氏菌属9的相对丰度在当归拈痛汤中、高剂量组和MTX组显著升高( $P<0.01$ ), 拟普雷沃氏菌属9的相对丰度在当归拈痛汤中、高剂量组和MTX组均明显升高( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。见图5、表6。

3.6 肠道菌群变化与AI值、足趾容积及脾脏指数水平的相关性 Spearman相关性分析显示, 拟杆菌属(*Bacteroides*)、螺杆菌属9(*Helicobacter*)与AI呈正相关( $P<0.05$ ), 普雷沃氏菌属(*Prevotella 9*)、候选单胞生糖菌属(*Candidatus Saccharimonas*)与AI呈负相关( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ )。普雷沃氏菌属9与足趾容积呈负相关( $P<0.01$ )。瘤胃球菌科NK4A214群(*Ruminococcaceae NK4A214 group*)、克里斯滕森菌科-R-7(*Christensenellaceae R-7 group*)、拟杆菌属与脾脏指数呈正相关( $P<0.05$ ), 普雷沃氏菌属9与脾脏指数呈负相关( $P<0.01$ )。见图6。

#### 4 讨论

当归拈痛汤出自《医学启源》, 基本功效为利湿清热, 疏风止痛。此方充分体现了张元素结合自身临床经验提出的“湿淫于内, 治以苦热, 佐以咸淡, 以苦燥之, 以淡泄之”的湿证治疗方法理论。方中羌活透利关节, 苦燥胜湿, 配伍防风、升麻、葛根祛风解表, 温阳化水, 共奏祛风散邪之功; 茵陈、猪苓、泽泻通利小便以渗湿, 黄芩、苦参、苍术清热健脾以燥湿, 相辅相成, 更助清热利湿之力; 知母、人参、当归、甘草、白术同用, 益气助脾, 滋阴养血, 防诸苦燥药物伤气血阴津, 祛邪而不伤正, 起健脾扶正之效。全方苦燥淡渗以治湿邪之常、养阴祛湿以疗湿邪之

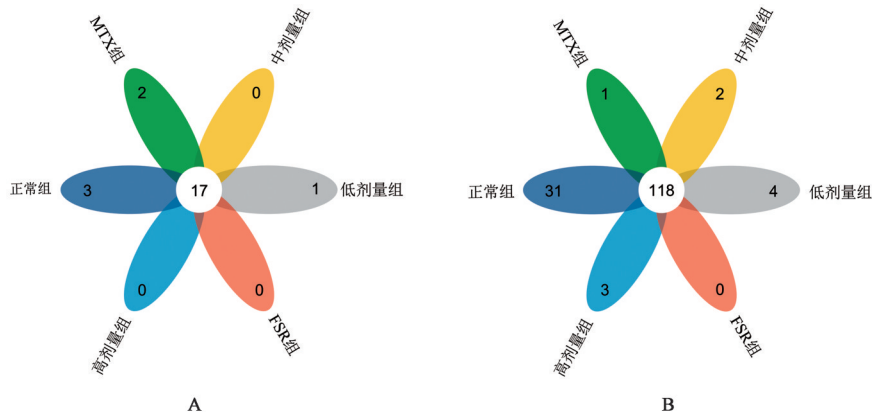


图4 各组大鼠肠道菌群在门水平上(A)及在属水平上(B)共有或特有物种 venn图

Fig. 4 Venn diagram of rat gut flora at phylum level (A) and at genus level (B) in each group

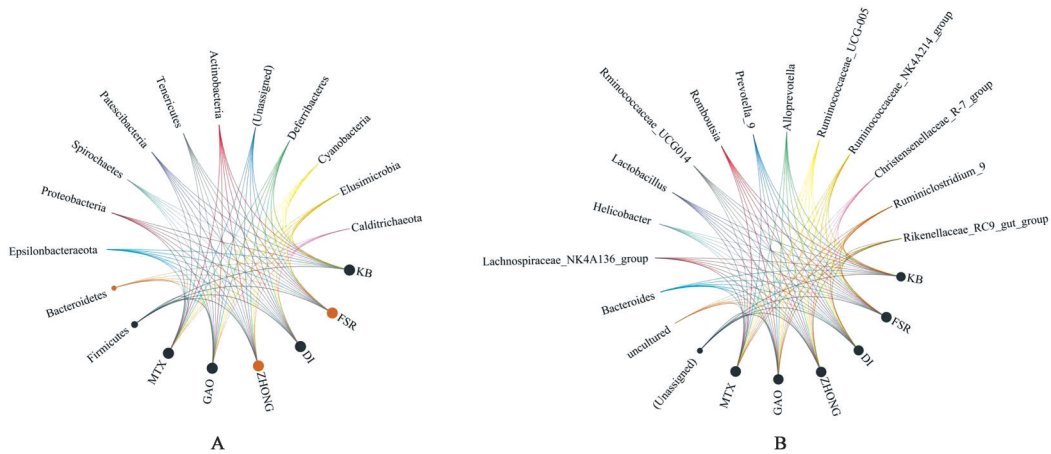


图5 各组大鼠肠道菌群在门水平上(A)及在属水平上(B)菌群组成和弦图

Fig. 5 Chord diagram of rat gut flora at phylum level (A) and at genus level (B) in each group

表5 各组大鼠肠道菌群在门水平上不同细菌的相对丰度 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

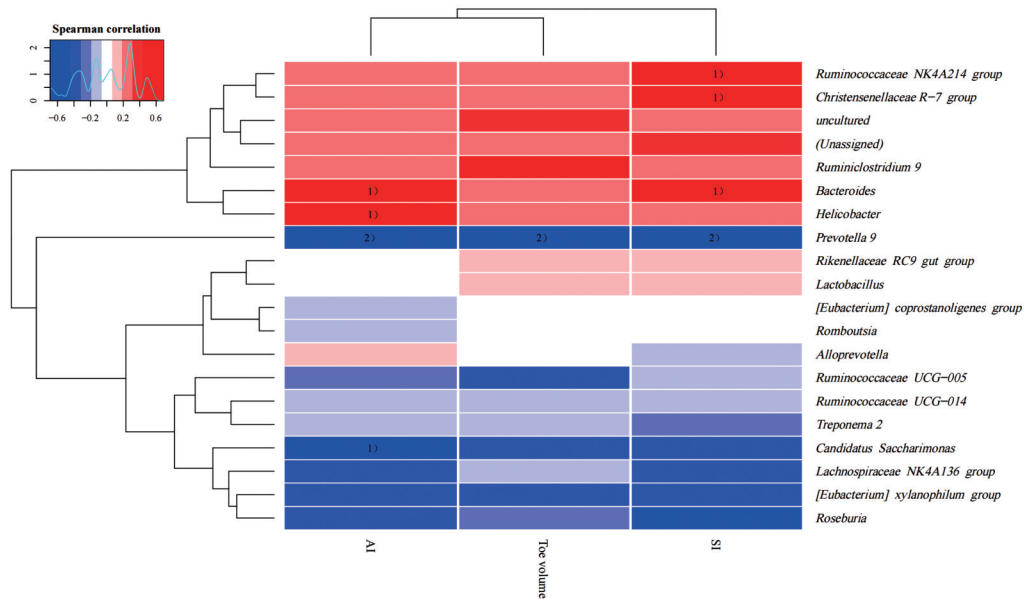
Table 5 Relative abundance of different bacteria at phylum level in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	Firmicutes	Bacteroidetes	Bacteroidetes/Firmicutes
正常组		0.612±0.047	0.309±0.026	0.509±0.083
FSR组		0.413±0.046 <sup>2)</sup>	0.565±0.067 <sup>2)</sup>	1.388±0.282 <sup>1)</sup>
当归拈痛汤低剂量组	5.67	0.462±0.034	0.402±0.018 <sup>4)</sup>	0.873±0.050 <sup>4)</sup>
当归拈痛汤中剂量组	11.34	0.578±0.015 <sup>4)</sup>	0.432±0.032 <sup>4)</sup>	0.746±0.049 <sup>4)</sup>
当归拈痛汤高剂量组	22.68	0.630±0.022 <sup>4)</sup>	0.389±0.032 <sup>4)</sup>	0.620±0.071 <sup>4)</sup>
MTX组	1.35×10 <sup>-3</sup>	0.689±0.041 <sup>4)</sup>	0.329±0.027 <sup>4)</sup>	0.478±0.039 <sup>4)</sup>

表6 各组大鼠肠道菌群在属水平上不同细菌的相对丰度 ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

Table 6 Relative abundance of different bacteria at genus level in each group ( $\bar{x} \pm s, n=10$ )

组别	剂量/g·kg <sup>-1</sup>	<i>Bacteroides</i>	<i>Lactobacillus</i>	<i>Prevotella 9</i>	<i>Alloprevotella</i>
正常组		0.007±0.003	0.065±0.003	0.052±0.004	0.029±0.004
FSR组		0.079±0.006 <sup>2)</sup>	0.044±0.003 <sup>2)</sup>	0.014±0.005 <sup>2)</sup>	0.013±0.004 <sup>1)</sup>
当归拈痛汤低剂量组	5.67	0.064±0.010	0.059±0.006 <sup>3)</sup>	0.024±0.004	0.022±0.007
当归拈痛汤中剂量组	11.34	0.049±0.008 <sup>4)</sup>	0.069±0.008 <sup>4)</sup>	0.034±0.005 <sup>4)</sup>	0.033±0.004 <sup>4)</sup>
当归拈痛汤高剂量组	22.68	0.046±0.005 <sup>4)</sup>	0.068±0.004 <sup>4)</sup>	0.045±0.004 <sup>4)</sup>	0.042±0.004 <sup>4)</sup>
MTX组	1.35×10 <sup>-3</sup>	0.026±0.004 <sup>4)</sup>	0.058±0.004 <sup>3)</sup>	0.032±0.007 <sup>4)</sup>	0.028±0.007 <sup>3)</sup>



注:颜色范围从蓝色(负相关)到红色(正相关);<sup>1)</sup> $P < 0.05$ ,<sup>2)</sup> $P < 0.01$

图6 各组大鼠肠道菌群与脾脏指数水平、足趾容积及AI值的Spearman相关性热图

Fig. 6 Heat map of Spearman correlation between intestinal flora and spleen index levels, toe volume and AI values in each group

变,临床实践中应用此方治疗类风湿关节炎,灵活变通,辨证论治,常可收获奇效。现代研究发现当归拈痛汤对治疗湿热痹阻证RA具有明显疗效,能够改善实验室检测指标使其趋于正常水平,且无明显不良反应发生,对AA大鼠有显著的防治作用,这与抑制滑膜细胞增殖,促进线粒体途径细胞凋亡有关<sup>[10-11]</sup>。

本实验通过注射Mtb佐剂诱导构建风湿热痹证RA动物模型,造模组大鼠均出现与RA相关的炎症反应与病理改变,其大便稀软、懒怠好卧,脾脏显著肿大,足趾关节红肿明显且关节炎指数升高,HE染色显示滑膜细胞明显增生,一定程度上符合风湿热痹证RA的特点<sup>[12]</sup>。而各项结果显示,相较于FSR组,当归拈痛汤各剂量组及MTX组能够不同程度的改善AA大鼠风湿热痹证,并且中剂量组的防治效果是当归拈痛汤各剂量组中与正常组最为接近的。各治疗组大鼠足趾和足踝关节红肿程度较轻,在治疗后期足趾肿胀度有所改善,HE染色结果显示滑膜组织仅轻度增生,脾脏指数和脾脏HE染色也提示免疫应答水平减低,证实了当归拈痛汤能够减轻滑膜组织增生和炎症程度及血管翳形成,通过推迟发病时间、减缓疾病进程对风湿热痹证AA大鼠发挥防病和治疗作用。

近年来各研究显示肠道菌群能够对免疫细胞及炎症反应、肠黏膜屏障、瓜氨酸化进行调节,能够通过分子模拟机制及与宿主基因相互作用等多方

面影响RA<sup>[13]</sup>。肠道微生物能够通过产生一些短链脂肪酸类代谢产物,调节维持肠道微生态平衡,对机体的免疫系统起到一定的调节作用。而既往有充分文献报道中药复方在研究肠道菌群及RA上发挥非常重要的作用,因此,从肠道菌群角度出发,研究中药复方当归拈痛汤对RA的防治作用具有深远意义。

本实验采取AA大鼠粪便样本,分析了不同剂量当归拈痛汤及MTX给药后AA大鼠肠道菌群的变化。结果显示,经给药治疗后 $\alpha$ 多样性指数(Reads和Simpson指数)整体呈上升的趋势,但差异无统计学意义,表明AA大鼠经治疗后菌群多样性有一定程度的增加,生态系统更趋于稳定。并且从各组的菌群结构变化发现,在门及属水平上,FSR组相较于正常组,大鼠菌群结构发生了显著的变化;当归拈痛汤各剂量组和MTX组相较于FSR组,肠道菌群结构也出现了明显改变。其中厚壁菌与拟杆菌的比率是判断肠道菌群健康的重要指标,厚壁菌具有抗炎作用,而拟杆菌具有促炎作用,其比值降低往往与炎症性肠病有关<sup>[14-15]</sup>。本结果显示,与正常组比较,FSR组的拟杆菌与厚壁菌的比值升高,予当归拈痛汤服用治疗后比值降低,说明当归拈痛汤能够改善改善厚壁菌门与拟杆菌门的比值,增加益生菌的丰度,调节肠道健康。此外,既往研究发现乳酸杆菌属能够改善肠上皮细胞的完整性,调节菌群失调,防止有害细菌定居,具有抗炎作用,并且

普氏菌属能够减少促炎症细胞因子的产生,而拟普雷沃氏菌属与炎症的生物标志物密切相关,其含量降低能够促进RA病情的发展<sup>[16-18]</sup>。因此,在属水平上,与FSR组比较,予治疗后乳酸杆菌属、普雷沃氏菌属9、拟普雷沃氏菌属的相对丰度升高,提示肠道微生物中有益菌数目的增多,抗炎作用的增强,对大鼠关节炎的进展起抑制作用。故本实验结果表明,当归拈痛汤能够调节肠道菌群结构,改善厚壁菌门与拟杆菌门的比值,促进提升益生菌的丰度,抑制致病菌生长,其作用机制可能与维持肠黏膜屏障功能,减少肠源性内毒素释放,抑制炎症反应密切相关。

本研究进一步分析了肠道菌群变化与AI值、足趾容积及脾脏指数水平的相关性。脾脏指数反映着机体的免疫功能,在中医理论中,脾为后天之本,气血生化之源。《素问·痹论》有言“卫者,水谷之悍气也”,卫气代表着机体抵御外邪,固护肌表的功能,而脾胃为水谷之海,与卫气息息相关。若脾胃功能障碍则水谷精微无以化生输布,以致卫气不固,则免疫功能下降。肠道黏膜抵御外邪侵袭的这种屏障功能也属于卫气作用的范畴,是中医学脾胃“御邪”功能的具体表现,与“脾为之卫”理论相符<sup>[19]</sup>。因此从肠道菌群角度分析脾脏指数相关性具有重要意义。所以,笔者推测采用当归拈痛汤健脾化湿,恢复脾之健运,气血精液得以化生输布,能够进而改善风湿热痹证AA大鼠肠道菌群的构成比及数量,使得肠道微生态平衡得以恢复。

Spearman相关性热图最终结果发现拟杆菌属与AI、脾脏指数呈正相关,提示该菌属含量升高与肠道微生态失调、炎症反应及免疫反应发生密切相关,与既往文献报道一致。而普雷沃氏菌属与AI、足趾容积、脾脏指数呈负相关,提示其能够抑制关节炎的进展。另外,螺杆菌属与AI呈正相关,候选单胞生糖菌属与AI呈负相关,可以发现螺杆菌属在RA发展过程中发挥促炎作用,候选单胞生糖菌属则发挥抗炎作用,与以往螺杆菌属诱导骨侵蚀、介导滑膜损伤和增生及候选单胞生糖菌属丰度下降可能会导致炎症介质的过度表达的研究相符<sup>[20-21]</sup>。本实验中瘤胃球菌科NK4A214群、克里斯滕森菌科-R-7与脾脏指数呈正相关,提示二者机制可能与促进免疫反应有关。大量研究表明瘤胃球菌能够稳定肠道屏障,具有很强的促炎作用,激发免疫系统细胞,刺激促炎症细胞因子的分泌<sup>[22-23]</sup>。并且以往实验报道,克里斯滕森菌科-R-7可以影响血脂

谱以及SCFA水平,与免疫反应密切相关<sup>[24]</sup>。由此可见,普雷沃氏菌属9、候选单胞生糖菌属在肠道内发挥抑制炎症、调节免疫、维持肠道微生态平衡的作用,而拟杆菌属、螺杆菌属、瘤胃球菌科NK4A214群和克里斯滕森菌科-R-7均与炎症反应加重、促使RA病情发生发展关系密切。

综上所述,本研究结果表明风湿热痹证RA发生发展与肠道菌群紊乱具有紧密联系,而当归拈痛汤治疗风湿热痹证RA具有明显疗效,尤其以中剂量效果最佳。其作用机制可能与调节肠道菌群结构,改善肠道免疫代谢功能,维持肠道稳态息息相关,尤其以厚壁菌门和拟杆菌门为明显差异菌群。前期研究已证实,在炎症因子刺激下,滑膜细胞凋亡水平显著减低,自噬水平显著增强,当归拈痛汤对风湿热痹证类风湿关节炎的治疗涉及多靶点,其可能通过调控蛋白激酶B(Akt)/B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2)/Bcl-2相关X蛋白(Bax)通路,促进线粒体途径细胞凋亡,也可能与调控滑膜组织中自噬相关因子微管相关蛋白1轻链3(LC3)、Beclin1、p62的表达,抑制自噬有关<sup>[25-26]</sup>。结合本次研究结果,给药后乳酸杆菌属、普雷沃氏菌属9、拟普雷沃氏菌属等抗炎相关菌群的丰度升高,拟杆菌与厚壁菌的比值降低,AA大鼠炎症减轻,提示当归拈痛汤能够多方面作用,调控Akt/Bax/Bcl-2通路,调节自噬和炎症、抗炎因子水平或通过调整肠道微生态结构,调节肠道内炎症、免疫相关菌群,从而发挥其对风湿热痹证RA的防治作用。本研究以中医“辨证论治”为核心,“方证相应”为切入点,通过联系中药方剂、肠道菌群与免疫系统,研究当归拈痛汤治疗风湿热痹证RA的作用机制,后续将继续结合宏基因组学和免疫组学等技术深入研究,为临床治疗提供更充分的实验基础。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

- [1] ZHAO J, GUO S, SCHRODI S J, et al. Molecular and cellular heterogeneity in rheumatoid arthritis: Mechanisms and clinical implications [J]. *Front Immunol*, 2021, 12: 790122.
- [2] 王晨彤,姜德友. 我国类风湿性关节炎中医证候分布频率Meta分析[J]. *浙江中医药大学学报*, 2022, 46(4): 439-450.
- [3] VIJ R, STEBBINGS K A, KIM H, et al. Safety and efficacy of autologous, adipose-derived mesenchymal stem cells in patients with rheumatoid arthritis: A phase

- I/II a, open-label, non-randomized pilot trial [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2022, 13(1):88.
- [4] 袁立霞. 当归拈痛汤对类风湿性关节炎作用机理及配伍的实验研究[D]. 哈尔滨:黑龙江中医药大学, 2006:90.
- [5] BELLOCCHI C, FERNÁNDEZ-OCHOA Á, MONTANELLI G, et al. Identification of a shared microbiomic and metabolomic profile in systemic autoimmune diseases [J]. *J Clin Med*, 2019, doi: 10.3390/jcm8091291.
- [6] MAEDA Y, TAKEDA K. Host-microbiota interactions in rheumatoid arthritis [J]. *Exp Mol Med*, 2019, 51(12):1-6.
- [7] 赵帆, 李佳钰, 陆麒麟, 等. 当归拈痛汤调控 Fas/Caspase-8 通路促进类风湿关节炎滑膜成纤维细胞凋亡[J]. *南方医科大学学报*, 2020, 40(8):1119-1126.
- [8] 祁芳, 李艳玲, 艾坤, 等. SD大鼠佐剂性关节炎模型的建立与评估[J]. *湖南中医药大学学报*, 2016, 36(1):23-26.
- [9] NAIR A B, JACOB S. A simple practice guide for dose conversion between animals and human [J]. *J Basic Clin Pharm*, 2016, 7(2):27-31.
- [10] 胡茹英, 刘效栓, 刘军刚, 等. 当归拈痛汤治疗湿热痹阻型类风湿关节炎的 Meta 分析[J]. *甘肃医药*, 2021, 40(2):133-138.
- [11] 尚延春, 申晟, 柴巍巍, 等. 当归拈痛汤对类风湿关节炎大鼠滑膜细胞凋亡通路的影响[J]. *世界中医药*, 2018, 13(7):1718-1722.
- [12] 富丽萍, 李佳钰, 陆麒麟, 等. 从炎症、凋亡与自噬评价 Mtb 诱导类风湿关节炎风湿热痹动物模型[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(23):44-52.
- [13] 牛思佳, 张娟, 张志毅, 等. 肠道菌群与类风湿关节炎相关性研究进展[J]. *中华风湿病学杂志*, 2022, 26(4):266-271.
- [14] STOJANOV S, BERLEC A, ŠTRUKELJ B. The influence of probiotics on the *Firmicutes/Bacteroidetes* ratio in the treatment of obesity and inflammatory bowel disease [J]. *Microorganisms*, 2020, 8(11):1715.
- [15] YAN R, WANG K, WANG Q, et al. Probiotic *Lactobacillus casei* shirota prevents acute liver injury by reshaping the gut microbiota to alleviate excessive inflammation and metabolic disorders [J]. *Microb Biotechnol*, 2022, 15(1):247-261.
- [16] PAUL A K, PAUL A, JAHAN R, et al. Probiotics and amelioration of rheumatoid arthritis: Significant roles of *Lactobacillus casei* and *Lactobacillus acidophilus* [J]. *Microorganisms*, 2021, 9(5):1070.
- [17] MARIETTA E V, MURRAY J A, LUCKEY D H, et al. Suppression of inflammatory arthritis by human gut-derived *Prevotella histicola* in humanized mice [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2016, 68(12):2878-2888.
- [18] NGUYEN N T, SUN W H, CHEN T H, et al. Gut mucosal microbiome is perturbed in rheumatoid arthritis mice and partly restored after TDAG8 deficiency or suppression by salicylanilide derivative [J]. *Int J Mol Sci*, 2022, doi: 10.3390/ijms23073527.
- [19] 李盼飞, 卢曦, 王艳, 等. 中医对现代医学肠道功能的认识[J]. *环球中医药*, 2019, 12(6):871-874.
- [20] 赵明明, 罗微, 谷海瀛. 幽门螺杆菌感染引起非消化系统疾病的研究进展[J]. *宁波大学学报:理工版*, 2020, 33(3):116-120.
- [21] 彭龙, 张立平. 16S rRNA 高通量测序研究柴芪汤对代谢综合征大鼠肠道菌群的影响[J]. *世界中医药*, 2021, 16(5):758-764.
- [22] PAL D, NASKAR M, BERA A, et al. Chemical synthesis of the pentasaccharide repeating unit of the O-specific polysaccharide from *Ruminococcus gnavus* [J]. *Carbohydr Res*, 2021, 507:108384.
- [23] SUN Y, CHEN Q, LIN P, et al. Characteristics of gut microbiota in patients with rheumatoid arthritis in Shanghai, China [J]. *Front Cell Infect Microbiol*, 2019, 9:369.
- [24] WANG Y, YAO W, LI B, et al. Nuciferine modulates the gut microbiota and prevents obesity in high-fat diet-fed rats [J]. *Exp Mol Med*, 2020, 52(12):1959-1975.
- [25] 蔡义思, 李佳钰, 陆麒麟, 等. 基于定量蛋白质组学研究当归拈痛汤对风湿热痹佐剂性关节炎大鼠的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(13):62-70.
- [26] 陆麒麟, 李佳钰, 蔡义思, 等. 当归拈痛汤对风湿热痹型佐剂性关节炎大鼠自噬蛋白 LC3, Beclin1, p62 表达的影响[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(1):41-49.

[责任编辑 孙丛丛]