

碘乙酸钠诱导的大鼠膝骨关节炎模型 肠道菌群变化及其潜在影响

肖延成^{1,2} 徐波^{1,2} 张力^{1,2} 李晓辰^{1,2} 吴鹏^{1,2} 张立^{1,2} 丁亮^{1,2△}
梅伟^{1,2} 黄正泉^{1,2} 茆军^{1,2} 王培民^{1,2}

[摘要] 目的:研究碘乙酸钠诱导的大鼠膝骨关节炎(KOA)模型肠道菌群变化情况,探究肠道菌群与 KOA 的潜在联系。方法:将 SPF 级大鼠分为空白对照组和 KOA 组,通过膝关节局部注射碘乙酸钠制造大鼠 KOA 模型。通过 16SrDNA 检测大鼠粪便中的肠道菌群变化情况,蛋白印记法检测结肠组织中 NF- κ B 和 TNF- α 蛋白表达,RT-qPCR 检测结肠组织中 Caspase-1 和 IL-1 β 基因表达情况,苏木精-伊红染色观察结肠黏膜通透性变化,苏木精-伊红染色观察关节滑膜和软骨组织的病理变化情况。ELISA 检测血液上清中 LBP,IL-1 β ,TNF- α 及 IL-10 炎症因子水平。结果:与空白对照组相比,从 KOA 组中筛选出明显变化的肠道菌群,以 Akkermansia 和疣微菌门变化最为显著,结肠黏膜通透性增加,结肠组织中 NF- κ B p65 及 TNF- α 蛋白表达升高,结肠组织中 Caspase-1 和 IL-1 β 基因表达升高,血液中促炎因子 LBP,IL-1 β 及 TNF- α 蛋白含量升高,抗炎因子 IL-10 蛋白含量降低。结论:KOA 病理状态下肠道菌群发生变化,结肠炎症反应增强,结肠炎症反应或许在提高全身炎症反应水平、促进与肠道菌群相关的 KOA 的病理进程中起到重要的桥梁作用。

[关键词] 膝骨关节炎;肠道菌群;结肠炎症;全身炎症因子

[中图分类号] R-33 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2020)04-0001-05

Intestinal Flora Changes and Its Potential Effects in Rats with Knee Osteoarthritis Induced by Iodoacetate Sodium

XIAO Yancheng^{1,2} XU Bo^{1,2} ZHANG Li^{1,2} LI Xiaochen^{1,2} WU Peng^{1,2} ZHANG Li^{1,2}
DING Liang^{1,2△} MEI Wei^{1,2} HUANG Zhengquan^{1,2} MOU Jun^{1,2} WANG Peimin^{1,2}

¹ Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China;

² Jiangsu Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Nanjing 210029, China.

Abstract Objective: To study the changes of intestinal flora in the model of knee osteoarthritis (KOA) induced by iodoacetate sodium and explore the potential relationship between intestinal flora and KOA. **Methods:** SPF rats were divided into blank control group and KOA group, KOA rat model was made by local injection of iodoacetic acid into the knee joint. Changes of intestinal flora in rat feces were detected by 16SrDNA. Protein expression of NF- κ B, TNF- α in colon tissue were detected by Western Blot. The gene expression of caspase-1, IL-1 β in colon tissue were detected by RT-qPCR. The permeability of colonic mucosa was observed by HE staining. Pathological changes of synovial and cartilage tissue were observed by HE staining. Inflammatory factors of LBP, IL-1, TNF- α , IL-10 in serum of rats were detected by ELISA. **Results:** Compared with control group, changed intestinal flora were screened out from KOA group, akkermansia and verrucomicrobia were the most significant, permeability of colon mucosa was destructed, protein expression of NF- κ B, TNF- α and gene expression of caspase-1, IL-1 β in colon tissue were increased ($P < 0.05$). Inflammatory factors of LBP, IL-1, TNF- α increased in serum while IL-10 decreased ($P < 0.01$). **Conclusion:** Under the pathological state of KOA, intestinal

flora changes and colonic inflammatory response is enhanced. Colonic inflammatory response may play an important role in improving the level of systemic inflammatory response and promoting the pathological process of KOA related to intestinal flora.

Keywords: knee osteoarthritis (KOA); intestinal flora; inflammation of colon; systemic inflammatory response

基金项目:国家自然科学基金资助项目(8187151765)

江苏省中医药领军人才培养项目(SLJ0207)

¹ 南京中医药大学附属医院(南京,210029)

² 江苏省中医院

△通信作者 E-mail:dee1987@126.com

难愈性肠道疾病是肠道菌群失衡的重要表现^[1-3],而外周关节疾病如风湿性关节炎、骨性关节炎等是难愈性肠道疾病的重要肠外表现^[4],但目前缺乏相关机制的研究。推测与肠道菌群紊乱相关的炎症性肠病是膝骨关节炎(KOA)发病的重要上游环节,本研究旨在观察 KOA 大鼠模型肠道菌群结构及结肠炎症反应的变化情况,了解肠道菌群与 KOA 的内在联系,探索肠道菌群紊乱诱发 KOA 的病理基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验动物 6 周龄雄性 SPF 级 SD 大鼠 20 只,购自青龙山养殖公司。体质量 80~100 g,自由进食和饮水,动物房室温(25±2)℃,相对湿度 60%±5%,每日照明 12 h。根据《关于善待实验动物的指导性意见》(中华人民共和国科学技术部颁发)处理实验动物。

1.1.2 主要仪器和试剂 NF-κB, TNF-α 蛋白一抗,二抗;动物组织 RNA 提取试剂盒, RNA 逆转录试剂盒, Prime Script™ RT Master Mix 扩增试剂盒, ELISA 检测试剂, 酶标仪, 7500 荧光定量 PCR 仪器, 切片机, 包埋机, 全自动脱水机, 光学显微镜, 离心机, SDS 凝胶电泳仪, 苏木精-伊红染液。

1.2 方法

1.2.1 实验分组与 KOA 模型的建立 空白组和 KOA 组各 10 只。术前 12 h 禁食,手术开始前腹腔注射 3%戊巴比妥钠 30 mg/kg,待其麻醉后,仰卧位固定,两侧膝关节备皮,手术范围常规消毒。每个膝关节使用 1 mL 注射器穿刺老鼠膝关节髌韧带注入关节腔中,注射 50 μL 配好的碘乙酸溶液(1 mg/50 μL, 1 mg 碘乙酸溶解在 50 μL 无菌生理盐水或 0.9%生理盐水中)。将注射碘乙酸后的大鼠后肢伸展弯曲 5 次后,送回笼子自由活动 14 d,对照组注射等量的生理盐水。

1.2.2 大鼠粪便肠道菌群检测 大鼠腹主动脉采血后提取大鼠结肠段粪便,立即放入液氮速冻,转入-80℃冰箱保存。交由南京派森诺生物科技股份有限公司,利用 16SrDNA 检测肠道菌群。

1.2.3 大鼠结肠组织炎症指标基因及蛋白表达检测 蛋白印记法:将结肠组织加入 RIPA 裂解液(上海碧云天生物技术有限公司)提取总蛋白,按 BCA 蛋白测定试剂盒说明测定蛋白浓度,将配平的蛋白于 98℃变性 5 min 后保存,制胶,电泳后转膜至 PVDF 膜,5%脱脂奶粉室温密封 2 h,加入(NF-κB, TNF-α)一抗,4℃孵育过夜,次日 TBST 洗涤 3 次,10 min/次,二抗室温孵育 2 h, ECL 显色曝光。

RT-qPCR 检测:设计相关基因 PCR 扩增引物后,用 TRIZOL 试剂提取总 RNA。定量后,将 1 μg 总 RNA 逆转录成 cDNA,参照 QPCR Mixes 试剂说明书,上机进行定量 PCR 扩增和检测,设置相应参数,用 GAPDH 作为内参校正,独立地重复实验 3 次。每个样本均设置副孔。引物设计:采用 Oligo v6.6 软件,根据 GenBank 中的基因序列设计引物并交由上海生物工程技术服务有限公司合成,序列如下:caspase-1, 前引物 5'-CACGAGACCTGTGCGATCATGTC-3', 后引物 5'-GCTGATGGACCTGACTGAAGCTC-3'。IL-1: 前引物 5'-ATCTCACAGCAGCATCTCGA-CAAG-3', 后引物 5'-CACACTAGCAGGTCGTCAT-CATCC-3'。GAPDH: 前引物 5'-CTGCCTTCTCTT-GTGACAAAGTGGAC3', 后引物 5'-ACATACT-CAGCACCAGCA-TCACC-3'。

1.2.4 大鼠结肠组织 HE 染色观察肠黏膜通透性 4%甲醛溶液中的结肠组织进行石蜡切片:石蜡包埋,切成 4 μm 切片,脱蜡,水化,染色,封片,镜下观察结肠组织病理情况。

1.2.5 大鼠血清免疫炎症指标检测 大鼠麻醉后,腹主动脉取血,室温放置 2 h 后,3 000 r/min 离心 10 min,取上清分装,保存于-80℃待测。用大鼠试剂盒检测 LPS, LBP, IL-1β, IL-18, TNF-α, IL-4, IL-10 的变化,按照说明书进行操作。

1.2.6 大鼠膝关节滑膜、软骨组织苏木精-伊红染色 4%甲醛溶液中的滑膜、软骨组织进行石蜡切片染色,石蜡包埋,切成 4 μm 切片,脱蜡,水化,染色,封片,镜下观察结肠组织病理情况。

1.3 统计学分析

采用 SPSS19.0 软件进行统计学分析。所有数据采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,组间比较采用 *t* 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 肠道菌群检测

筛选出具有显著差异性的肠道菌群, KOA 组与空白对照组相比, PLS-DA 判别分析图显示空白组(CF)与 KOA 组(KF)之间肠道菌群结构明显不同(图 1a),柱形图表明具有差异的菌群中,杆菌门、疣微菌门、普氏菌属、Akkermansia、Blautia、SMB53 整体明显增多,拟杆菌纲减少,脱磷孤菌属明显减少,以 Akkermansia、疣微菌门最为显著(图 1b,c)。

2.2 Western Blot 检测结肠组织 NF-κB p65 及 TNF-α 蛋白的表达

Western Blot 检测结肠组织 NF-κB p65 及 TNF-α 蛋白的表达见图 2。

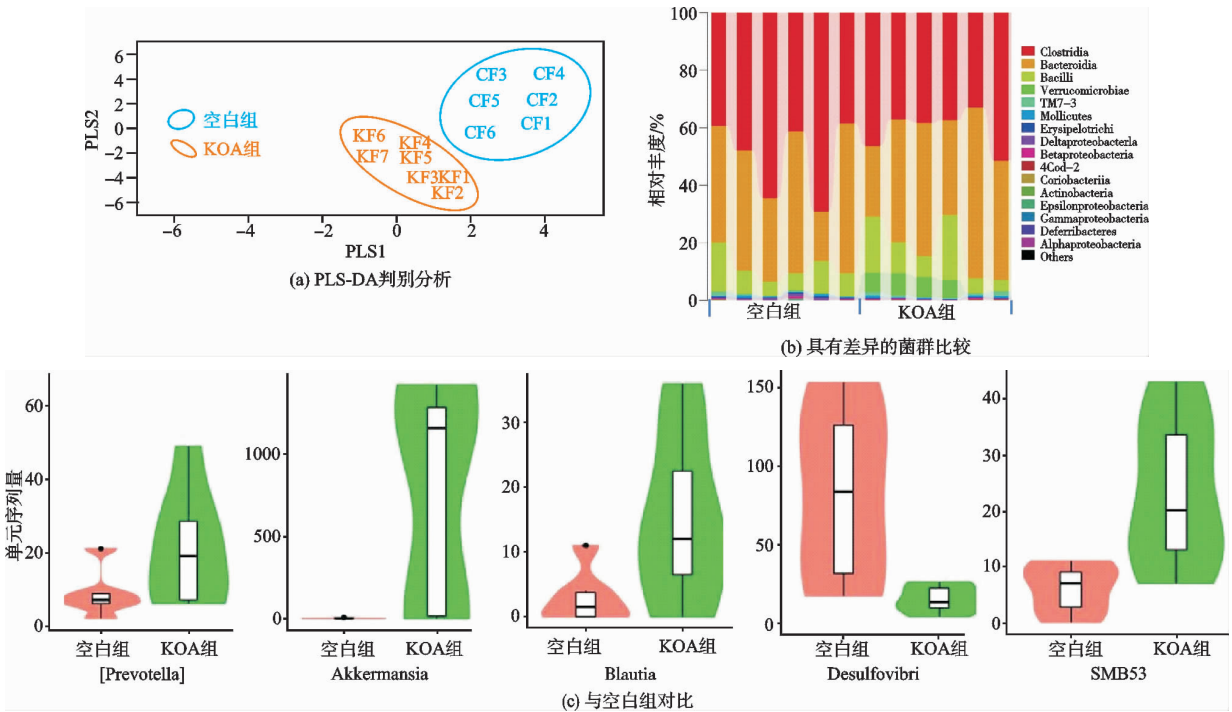


图 1 肠道菌群结构变化对比

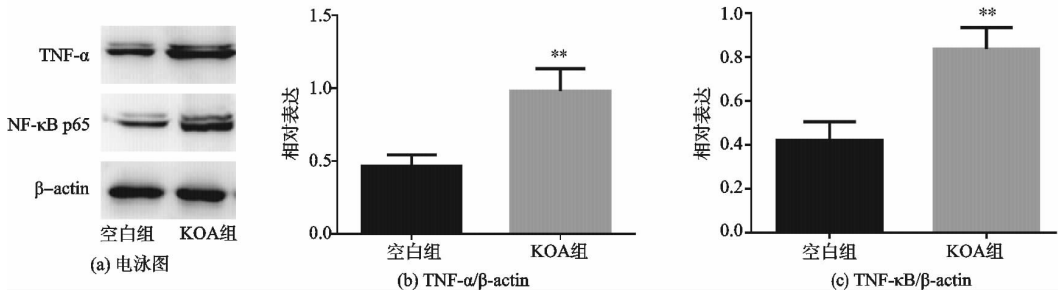


图 2 Western Blot 检测结肠组织 NF-κB p65 及 TNF-α 蛋白的表达(与空白组相比, ** $P<0.01$)

2.3 RT-qPCR 检测结肠组织 Caspase-1 及 IL-1β 基因表达

RT-qPCR 检测结肠组织 Caspase-1 及 IL-1β 基因表达见图 3。

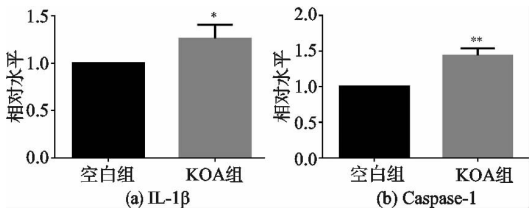


图 3 Caspase-1 及 IL-1β 基因表达

(与空白组相比, * $P<0.05$, ** $P<0.01$)

2.4 结肠组织苏木精-伊红染色

正常组大鼠结肠黏膜结构完整, 杯状细胞排列整

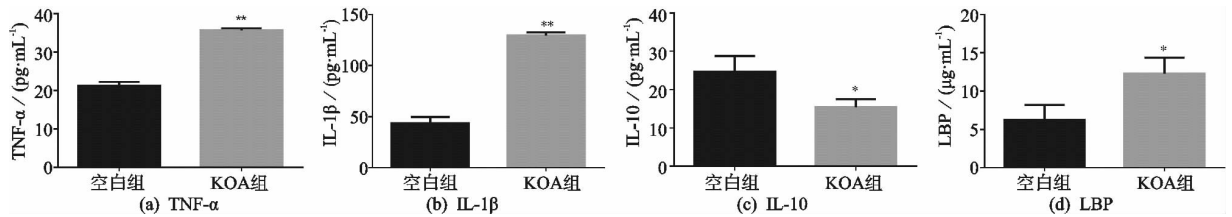


图 4 KOA 组结肠黏膜相对于空白组发生明显破坏

2.5 ELISA 检测大鼠血清中促炎因子与抗炎因子水平

ELISA 检测大鼠血清中促炎因子与抗炎因子水平见图 5。

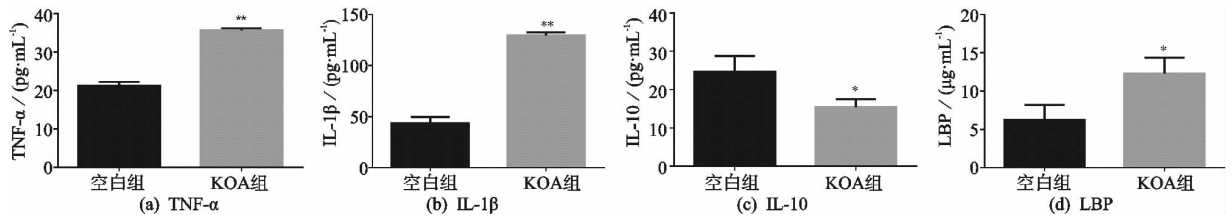


图 5 ELISA 检测大鼠血清中促炎因子与抗炎因子水平(与空白组相比, ** $P<0.01$, * $P<0.05$)

2.6 大鼠滑膜组织及膝关节软骨组织苏木精-伊红染色

滑膜组织苏木精-伊红染色:空白组滑膜组织内细胞呈扁平分布,可见大量的脂肪细胞,无炎性细胞浸润及血管扩张现象(图 6a);模型组滑膜组织可见大量炎

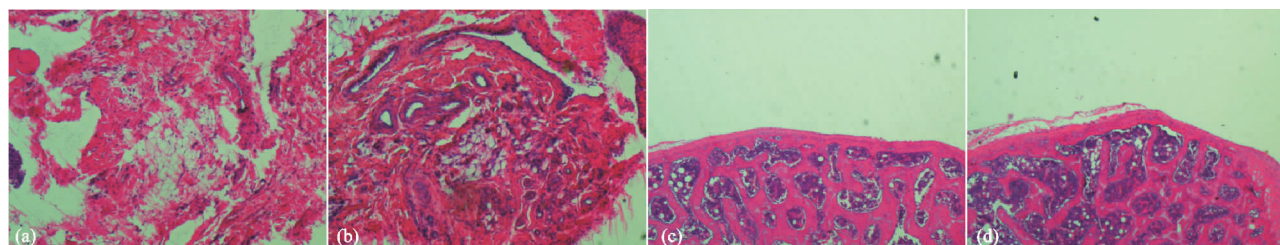


图 6 软骨滑膜苏木精-伊红染色结果

3 讨论

KOA 成为一种系统性慢性免疫炎症性疾病的观点已经逐渐得到大多学者的认可,大量研究证实:KOA 患者血液中 IL-1 β 、TNF- α 等促炎因子升高,IL-10 等抑炎因子水平降低,患者体内处于一种慢性低度炎症反应状态^[5-6]。肠道菌群是一个“被遗忘的器官”,又可分为“人类基因的第二套宝库”,近年来的研究发现,肠道菌群紊乱与 KOA 都属于全身性的免疫炎症性疾病^[7-10]。在 KOA 的相关致病因素中,如肥胖、高血压、糖尿病、年龄、性别、代谢综合征等,都存在肠道菌群紊乱现象^[11-12],同时也处于系统性的慢性低度炎症反应状态^[13],因此肠道菌群紊乱在 KOA 的发病中起到非常重要的促进作用。然而肠道菌群与 KOA 之间通过何种途径相互影响的机制仍不明确。

大量研究已经证实,肠道菌群通过“免疫-炎症”环节参与多种疾病的病理过程,其中炎症性肠病(IBD)是肠道菌群失衡的重要病理表现,而 IBD 肠外表现存在关节症状,累及外周关节或者中枢关节,如溃疡性结肠炎、克罗恩病相关的类风湿性关节炎,银屑病性关节炎,强直性脊柱炎,骶髂关节炎,骨质疏松症和骨软化症等,临床上针对 IBD 的治疗同样对关节症状有效^[14-17],如非甾体抗炎药的使用(NSAIDs)。相关调查显示^[18],40%的 IBD 患者至少发生一次外周关节性疾病。大量的研究发现,IBD 等肠道炎症性疾病伴随着明显的肠道菌群紊乱及全身性的关节炎症性症状,IBD 常见肠道内巨噬细胞聚集,NLRP3、Caspase-1 等炎性小体活化,引起巨噬细胞焦亡并促进 IL-1 β 、IL-18 等大量炎性因子释放,NF- κ B 及 AMPK 等炎症信号通路激活,这在激发系统免疫炎症反应方面起到重要的推动作用^[19]。关于肠道菌群紊乱与 KOA 发病的具体联系,目前较多的研究认为:多种代谢性疾病导致肠道菌群紊乱,肠道革兰氏阴性菌等肠道致病菌增多并分泌大量 LPS^[20],LPS 释放入血后与靶目标 TLR4 结合激活免疫炎症应答环节,TLR4 是经典的模式识别

性细胞浸润、脂肪细胞减少,小血管扩张及增多(图 6b)。软骨组织苏木精-伊红染色:空白组软骨表面平滑,细胞核蓝色,细胞排列规则,各层结构界限清晰,黏合线明显,胞质均匀红染(图 6c);模型组软骨表层软骨膜破损,结构层次紊乱,黏合线不明显(图 6d)。

受体,在膝关节的软骨、滑膜及背根神经节组织上都有广泛的分布,主要介导上游炎症反应通路,在促进软骨退变、诱发滑膜炎、介导膝关节疼痛过程中发挥着重要的作用^[21-22],本研究发现 KOA 大鼠血清中 LBP 含量明显升高,在一定程度上表明 KOA 大鼠肠道中可能发生明显的肠道菌群紊乱。

代谢性疾病是代谢性 KOA 发病的重要因素,大量的研究已经证实如肥胖、糖尿病、代谢综合征等都会导致肠道菌群紊乱,而全身性的慢性炎症反应是联系肠道菌群与 KOA 的中间桥梁。本研究从肠道菌群紊乱与 KOA 之间存在的密切联系入手,通过碘乙酸钠诱导大鼠 KOA 模型,发现大鼠的肠道菌群确实发生变化,同时结肠段炎症反应增强,血液中促炎因子水平升高。相关研究通过手术建立 KOA 模型之后也发现小鼠肠道菌群发生了明显变化,同时有菌小鼠对比无菌小鼠 KOA 病理评分增高,证明了肠道菌群对 KOA 病理进程的推动作用^[23]。因此推测:肠道菌群与 KOA 之间存在着密切的联系,二者一定程度上可以相互影响,相互为病,但是模型 KOA 是如何引起肠道菌群变化的机制目前尚不明确。Monica 等^[24]研究发现,“脑-肠-骨”轴揭示了“骨病”与“脑-肠轴”的密切联系,即“骨病”相关病理变化将信号传导到大脑,然后大脑与肠道菌群之间通过神经内分泌等多种途径相互影响,进而实现对肠道菌群的调控作用,但是 KOA 与“脑-肠-骨”轴的内在联系仍不清楚。本研究旨在观察 KOA 大鼠模型肠道菌群变化及其情况下结肠炎症反应情况,进一步明确肠道菌群失衡与 KOA 的内在联系,并筛选出几种变化明显的肠道菌作为下一步研究目标,为 KOA 的治疗提供新思路、新策略,为开发利用相关中药改善肠道菌群紊乱、治疗 KOA 提供理论基础,并为开辟运用“菌群移植”相关疗法治疗 KOA 提供参考。

参考文献

[1] YU L C. Microbiota dysbiosis and barrier dysfunction in

- inflammatory bowel disease and colorectal cancers; exploring a common ground hypothesis[J]. *J Biomed Sci*, 2018, 25(1):79.
- [2] NI J, WU G D, ALBENBERG L, et al. Gut microbiota and IBD; causation or correlation? [J]. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*, 2017, 14(10):573-584.
 - [3] 劳万江, 左占国. 温肾运脾柔肝法防治慢性难愈性结肠炎[J]. *临床心身疾病杂志*, 2016, 22(z1):309.
 - [4] MALATY H M, LO G H, HOU J K. Characterization and prevalence of spondyloarthritis and peripheral arthritis among patients with inflammatory bowel disease[J]. *Clin Exp Gastroenterol*, 2017, 10:259-263.
 - [5] 张晓哲, 张栋, 马玉峰, 等. 通络止痛凝胶制剂对膝关节关节炎大鼠的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(5):2184-2188.
 - [6] 潘建科, 罗斌, 郭达, 等. 龙螯胶囊对膝关节关节炎大鼠 IL-1 β , IL-6, IL-10 水平的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2015, 30(5):1675-1679.
 - [7] KRIEGOVA E, MANUKYAN G, MIKULKOVA Z, et al. Gender-related differences observed among immune cells in synovial fluid in knee osteoarthritis[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 26(9):1247-1256.
 - [8] MARTINEZ-NAVA G A, FERNANDEZ-TORRES J, MARTINEZ-FLORES K, et al. The association of AKNA gene polymorphisms with knee osteoarthritis suggests the relevance of this immune response regulator in the disease genetic susceptibility[J]. *Mol Biol Rep*, 2018, 45(2):151-161.
 - [9] PETERS V, VAN DE STEEG E, VAN BILSEN J, et al. Mechanisms and immunomodulatory properties of pre-and probiotics[J]. *Benef Microbes*, 2019, 10(3):1-12.
 - [10] DEHNER C, FINE R, KRIEGEL M A. The microbiome in systemic autoimmune disease; mechanistic insights from recent studies[J]. *Curr Opin Rheumatol*, 2019, 31(2):201-207.
 - [11] KYRIACHENKO Y, FALALYEYEVA T, KOROTKYI O, et al. Crosstalk between gut microbiota and antidiabetic drug action[J]. *World J Diabetes*, 2019, 10(3):154-168.
 - [12] MOOSSAVI S, BISHEHSARI F. Microbes; possible link between modern lifestyle transition and the rise of metabolic syndrome[J]. *Obes Rev*, 2019, 20(3):407-419.
 - [13] SZYCHLINSKA M A, DI ROSA M, CASTORINA A, et al. A correlation between intestinal microbiota dysbiosis and osteoarthritis[J]. *Heliyon*, 2019, 5(1):e1134.
 - [14] HOFFMANN T W, PHAM H P, BRIDONNEAU C, et al. Microorganisms linked to inflammatory bowel disease-associated dysbiosis differentially impact host physiology in gnotobiotic mice[J]. *ISME J*, 2016, 10(2):460-477.
 - [15] OULDALI N, HUGOT J P, VIALA J, et al. Early arthritis is associated with failure of immunosuppressive drugs and severe pediatric crohn's disease evolution[J]. *Inflamm Bowel Dis*, 2018, 24(11):2423-2430.
 - [16] SCHETT G, NEURATH M F. Resolution of chronic inflammatory disease; universal and tissue-specific concepts [J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1):3261.
 - [17] MATSUMOTO S, MASHIMA H. Efficacy of ustekinumab against infliximab-induced psoriasis and arthritis associated with Crohn's disease[J]. *Biologics*, 2018, 12:69-73.
 - [18] SPECA S, DUBUQUOY L. Chronic bowel inflammation and inflammatory joint disease; pathophysiology[J]. *Joint Bone Spine*, 2017, 84(4):417-420.
 - [19] ZHEN Y, ZHANG H. NLRP3 inflammasome and inflammatory bowel disease[J]. *Front Immunol*, 2019, 10:276.
 - [20] HUANG Z, KRAUS V B. Does lipopolysaccharide-mediated inflammation have a role in OA? [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(2):123-129.
 - [21] BARRETO G, SANDELIN J, SALEM A, et al. Toll-like receptors and their soluble forms differ in the knee and thumb basal osteoarthritic joints[J]. *Acta Orthop*, 2017, 88(3):326-333.
 - [22] MILLER R E, BELMADANI A, ISHIHARA S, et al. Damage-associated molecular patterns generated in osteoarthritis directly excite murine nociceptive neurons through Toll-like receptor 4 [J]. *Arthritis Rheumatol*, 2015, 67(11):2933-2943.
 - [23] ULICI V, KELLEY K L, AZCARATE-PERIL M A, et al. Osteoarthritis induced by destabilization of the medial meniscus is reduced in germ-free mice[J]. *Osteoarthritis Cartilage*, 2018, 26(8):1098-1109.
 - [24] SANTISTEBAN M M, KIM S, PEPINE C J, et al. Brain-gut-bone marrow axis; implications for hypertension and related therapeutics [J]. *Circ Res*, 2016, 118(8):1327-1336.

(收稿日期:2019-09-16)