

六堡茶对胶原诱导类风湿性关节炎DBA/1小鼠肠道菌群的影响

滕翠琴^{1,2}, 于翠平^{1,2}, 吴健华^{1,2}, 张均伟³, 谢加仕³, 潘雯婧^{1,2}, 龚受基^{4*}

¹梧州市农业科学研究所/广西农科院梧州分院, 广西 梧州

²梧州市六堡茶研究院, 广西 梧州

³梧州中茶茶业有限公司, 广西 梧州

⁴北部湾大学食品工程学院, 广西 钦州

收稿日期: 2023年6月4日; 录用日期: 2023年8月1日; 发布日期: 2023年8月22日

摘要

为探明六堡茶对类风湿性关节炎模型小鼠肠道菌群结构的影响, 以牛II型胶原蛋白注射到DBA/1小鼠尾部建立类风湿性关节炎模型, 分别给予六堡茶提取物、没食子酸灌胃治疗。结果表明, 六堡茶和没食子酸都能够改善模型小鼠肠道菌群紊乱, 六堡茶增加小鼠模型肠道中Alloprevotella、Muribaculaceae和Alistipes丰度, 降低Colidextribacter、Lachnospiraceae_NK4A136_group、Lachnoclostridium和Lactobacillus的丰度, 没食子酸增加Muribaculaceae、Clostridia_UCG-014和Alloprevotella的丰度, 降低Lachnospiraceae_NK4A136_group、Lachnospiraceae_UCG-006和Lachnoclostridium的丰度。六堡茶和没食子酸能够显著改善类风湿性关节炎小鼠肠道菌群的结构。

关键词

六堡茶, 没食子酸, 胶原诱导关节炎, 类风湿性关节炎, 肠道菌群

Effects of Liupao Tea Ingredients on Intestinal Microflora in Collagen Induced Arthritis DBA/1 Mice

Cuiqin Teng^{1,2}, Cuiping Yu^{1,2}, Jianhua Wu^{1,2}, Junwei Zhang³, Jiashi Xie³, Wenjing Pan^{1,2}, Shouji Gong^{4*}

¹Wuzhou Institute of Agricultural Sciences/Wuzhou branch of Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Wuzhou Guangxi

²Liupao Tea Research Institute of Wuzhou, Wuzhou Guangxi

*通讯作者。

文章引用: 滕翠琴, 于翠平, 吴健华, 张均伟, 谢加仕, 潘雯婧, 龚受基. 六堡茶对胶原诱导类风湿性关节炎 DBA/1 小鼠肠道菌群的影响[J]. 食品与营养科学, 2023, 12(3): 235-242. DOI: 10.12677/hjfn.2023.123029

³China Tea (Wuzhou) Co., Ltd., Wuzhou Guangxi⁴College of Food Engineering, Beibu Gulf University, Qinzhou GuangxiReceived: Jun. 4th, 2023; accepted: Aug. 1st, 2023; published: Aug. 22nd, 2023

Abstract

To investigate the effect of ingredients from Liupao tea on the gut microbiota structure of collagen induced arthritis models, rheumatoid arthritis model was established by injecting bovine type II collagen into the tail of DBA/1 mice, and treated with Liupao tea extracts and gallic acid by gavage. Both Liupao tea and gallic acid can ameliorate intestinal microbiota disorder. Liupao tea increases the abundance of *Alloprevotella*, *Muribaculaceae*, and *Alistipes* in the intestine of a mouse model, while reducing the abundance of *Colidextribacter*, *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, *Lachnoclostridium*, and *Lactobacillus*, with gallic acid increasing the abundance of *Muribaculaceae*, *Clostridia_UCG-014* and *Alloprevotella*, reducing the abundance of *Lachnospiraceae_NK4A136_group*, *Lachnospiraceae_UCG-006* and *Lachnoclostridium*. Both of Liupao tea and gallic acid can certainly correct intestinal microbiota disorders. The ingredients of Liupao tea and gallic acid can significantly improve the structure of intestinal microbiota in mice with rheumatoid arthritis.

Keywords

Liupao Tea, Gallic Acid, Collagen Induced Arthritis, Rheumatoid Arthritis, Intestinal Microbiota

Copyright © 2023 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Open Access

1. 引言

六堡茶为广西名茶,最早记载于清嘉庆年间,在苍梧县六堡乡生产,距今已经 1500 多年历史,以“红、浓、陈、醇”品质闻名于世,佳品具有特殊的槟榔香[1]。六堡茶为传统的东南亚侨销茶,现畅销世界各国。六堡茶具有解腻消食、消暑祛湿功效,现代科学研究已经证实六堡茶具有较好的减肥降脂[2] [3]功效,一定程度上阐释了传统意义上的解腻消食,但六堡茶的祛湿功能研究还鲜有报道,其祛湿功效机理还尚不明确,故对六堡茶的祛湿功能开展研究很有必要。

中医湿证与微炎症具有很大相关性,微炎症状态可能是中医湿证在病理变化上的重要体现之一,可初步推测湿证所处的微炎症状态发生机制可能与肠道菌群紊乱有关[4]。胶原诱导性关节炎(collagen-induced arthritis, CIA)模型肠道菌群出现了明显的紊乱[5],也与健康群体的菌群构成有着明显差异[6],但不同的 CIA 模型肠道菌群种类和数量均存在不同程度差异[7],肠道菌群中乳酸杆菌、幽门螺杆菌和双歧杆菌含量较丰富[8] [9],与正常小鼠相比, CIA 模型小鼠肠道菌属链球菌属、脱硫弧菌属、梭状芽胞杆菌 XIVa 上升,乳酸杆菌属、巴恩斯氏菌属、别样棒菌属、拟杆菌属、丹毒丝菌属、双歧杆菌属下降;经过 2 周治疗后,足趾肿胀减轻明显($P < 0.05$), 3 周后显著减轻($P < 0.01$),同时肠道菌群失衡改善,链球菌属、梭状芽胞杆菌 XIVa、脱硫弧菌属丰度下降,巴恩斯氏菌属、别样棒菌属与丹毒丝菌属水平上升, CIA 模型可能通过调节肠道菌群结构从而有效缓解类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)症状[10]。

虽然六堡茶传统上被用作祛湿饮料,但其对炎症模型及肠道菌群结构的影响尚不清楚。本研究选择

DBA/1 小鼠建立胶原诱导性关节炎模型, 研究六堡茶对模型肠道菌群结构的影响, 为六堡茶改善 RA 症状提供理论依据。没食子酸是黑茶中微生物代谢的产物[11][12], 具有抗炎等多种活性[13], 故本研究除了选用六堡茶做实验材料外, 也选用了没食子酸做实验材料。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

六堡茶茶叶: 10 年陈六堡茶, 梧州中茶茶业有限公司提供。

实验动物: DBA/1 小鼠, 购自常州卡文斯实验动物有限公司, 动物使用许可证号: SCXK(苏)2016-0010。

甘油三酯(YX-W-B408)、蛋白试剂(YX-W-C202)、血糖试剂(YX-W-B600)、总胆固醇(YX-W-B409)等测定试剂盒, 合肥莱尔生物科技有限公司; 不完全弗氏佐剂 IFA (7001)、完全弗氏佐剂 CFA (7002)、牛 II 型胶原(20022), 美国 Chondrex 公司; 没食子酸, 武汉鑫禾嘉泰科技有限公司;

ME204E/02 电子天平, 梅特勒-托利多仪器(上海)有限公司; HT-1300-U 洁净工作台, 苏州安泰空气技术有限公司; YTLG-12A 冷冻干燥机, 上海叶拓科技有限公司。

普通饲料与高脂饲料: 购自江苏省协同医药生物工程有限责任公司, 具体饲料配方如表 1。

Table 1. Feed formulations

表 1. 饲料配方

普通饲料		高脂饲料	
名称	比例	名称	比例
玉米	42%	基础饲料	77.2%
麸皮	26%	猪油	15%
豆饼	29%	蛋黄	0.06%
食盐	1%	胆固醇	0.01%
骨粉	1%	胆酸钠	0.002%
赖氨酸	1%	丙基硫氧嘧啶	0.001%

2.2. 实验方法

2.2.1. 样品制备

精确称取 200 g 六堡茶, 以 1:10 的料液比加入沸水中, 在沸水中熬煮 30 min, 稍微冷却后过滤, 废渣再以 1:5 的料液比加入沸水煎煮 30 min, 再过滤, 合并两次过滤液, 浓缩至粘稠状, 置于-30℃预冷, 然后于冻干机内冻干得六堡茶提取物, 置于冰箱内备用。

2.2.2. 实验分组和模型建立

1) 实验动物 24 只 7 周龄、体重 20 ± 2 克的 DBA/1 健康小鼠饲养于自然采光饲养室内, 随机分成 4 组, 每组 6 只, 分别为正常对照组、模型组、六堡茶组、没食子酸组。

2) 给药方式 适应性饲养 1 周后给予六堡茶组 500 mg/d.kg 剂量, 给予没食子酸组 50 mg/d.kg 剂量, 给予正常对照组和模型组等量体积蒸馏水灌胃。

3) 构建 II 型胶原诱导性 DBA/1 小鼠关节炎模型 取相同体积胶原溶液与完全弗氏佐剂 CFA 或不完全弗氏佐剂 IFA 于离心管中, 在冰浴中用匀浆机高速搅拌乳化, 乳化时间约为 30 分钟, 然后用 II 型胶原/CFA 乳化剂注射 DBA/1 小鼠的尾根部, 每只小鼠注射量为 100 μ L。适应性饲养一周后进行第一次免

疫，第 21 天后以不完全佐剂与 II 型胶原混合进行第二次免疫。正常对照组给予等量蒸馏水注射。

2.2.3. 实验小鼠一般情况及体重变化情况

实验期间，每日观察并记录小鼠的精神状况以及进食、饮水、活动、毛色等情况。每周末称重，记录小鼠体重变化情况，直至实验结束。

2.2.4. 实验小鼠足趾外观变化

依据胶原诱导性关节炎小鼠模型的评分标准，一周一次观察记录小鼠的足趾状况，并进行评分。标准如下：表 2。

Table 2. Table of arthritis scoring

表 2. 关节炎评分标准表

评分	标准
0	无红斑和肿胀的证据
1	红斑和轻度肿胀，局限于足中段或踝关节
2	红斑和轻度肿胀，从踝关节蔓延至足中段
3	红斑和轻度肿胀，从踝关节蔓延至关节
4	红斑和重度肿胀，包括了踝、足和趾

2.2.5. 小鼠肠道菌群分析

高压灭菌收集粪便的离心管、镊子、容器等工具，收集粪便到编号后的无菌离心管中置于 -80°C 保存待测定。提取粪便 DNA，PCR 扩增，进行 16S rRNA 的文库构建及 Illumina 测序，然后对小鼠肠道菌群进行聚类分析，肠道菌群门水平和属水平菌群结构分析。

2.2.6. 统计学分析

应用 SPSS16.0 软件进行数据分析，数据以 $\bar{x} \pm s$ 表示，用单因素方差分析和 t 检验处理数据，以 $P < 0.05$ 作为差异有显著性， $P < 0.01$ 为有极显著性差异。

3. 实验结果

3.1. 实验小鼠的一般情况和体重变化情况

实验过程中，正常对照组小鼠状态良好、饮食正常、毛发光泽、动作灵敏自如；模型组小鼠出现明显的精神萎靡、少食、皮毛松散无光泽，大部分小鼠足趾部严重红肿溃烂、皮下结节多而明显，活动严重受限；六堡茶治疗组与模型组相比，饮食减少，显得疲乏，不爱运动，皮肤没有光泽，反应较为灵敏；没食子酸组小鼠关节炎症状相对较轻，摄食较积极，后足趾关节红肿较轻，反应灵敏；六堡茶组小鼠体重略有下降，其他各组小鼠体重略有上升，但没有显著性差异，见图 1。

3.2. 实验小鼠足趾外观变化

造模第二周，模型组、六堡茶组和没食子酸组小鼠陆续出现足趾及足踝部的红肿。随着时间延长，小鼠足踝及足趾出现严重的红肿及关节僵直，行动能力受限十分明显。按照小鼠关节炎评分细则，没食子酸组有改善关节炎小鼠模型足趾肿胀趋势，但是并没有显著性意义，六堡茶在改善小鼠模型足趾肿胀症状上并没有效果，见图 2(a)、图 2(b)；从症状看六堡茶治疗组与没食子酸组较模型组小鼠相比病变没有显著区别，但没食子酸组小鼠炎症较轻，六堡茶组炎症稍重，见图 2(c)。

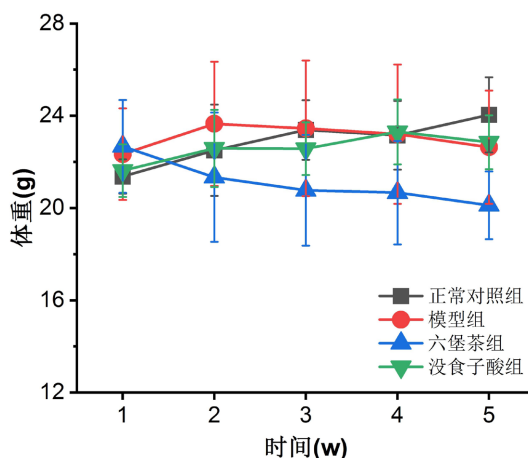
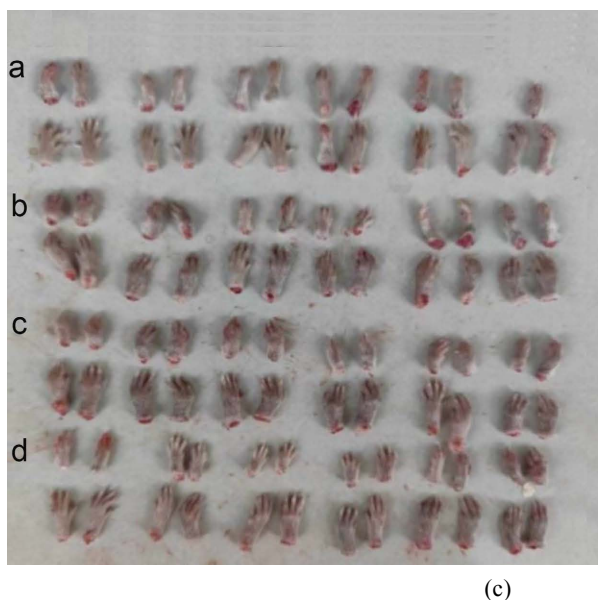
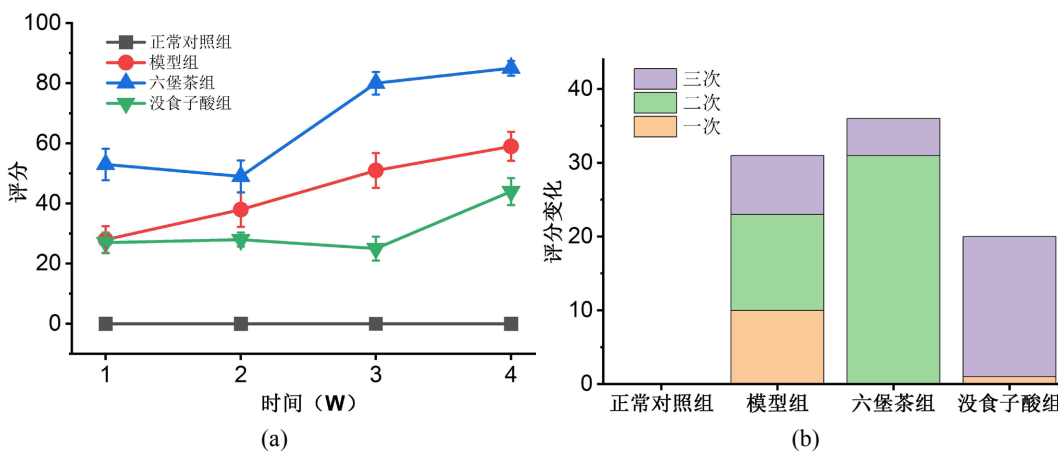


Figure 1. Body weight changes of mice
图 1. 各组小鼠体重变化



a 正常对照组
b 模型组
c 六堡茶组
d 没食子酸组

A 不同实验组足趾评分
B 不同实验组评分变化及累积评分
C 足趾肿胀对比

Figure 2. Effect of Liupao tea components on toe swelling in mice
图 2. 六堡茶成分对小鼠足趾肿胀程度的影响

3.3. 实验小鼠肠道菌群分析结果

胶原诱导性关节炎小鼠模型的肠道菌群结构发生了明显改变, 六堡茶和没食子酸都能够改善小鼠模型的肠道菌群紊乱。从门水平角度看, 小鼠模型 Bacteroidita 丰度发生降低, Firmicutes 丰度发生增加, 厚壁菌门与拟杆菌门的比值(F/B)由普通对照组的 0.54 增加到 2.38, 给药六堡茶和没食子酸后, F/B 分别恢复到 0.87、1.09, 见图 3(a)。

从属水平来看, 普通对照组 Muribaculaceae 丰度最高, Lachnospiraceae_NK4A136_group 次之, 模型组 Muribaculaceae 丰度出现降低, Lachnospiraceae_NK4A136_group 丰度出现升高, 可能预示 Muribaculaceae、Lachnospiraceae_NK4A136_group 比例与胶原诱导性关节炎有关。给药六堡茶或没食子酸后, Muribaculaceae 丰度升高, Lachnospiraceae_NK4A136_group 丰度降低。其他菌群结构也发生了变化, 但没有发现规律性变化, 见图 3(b)。

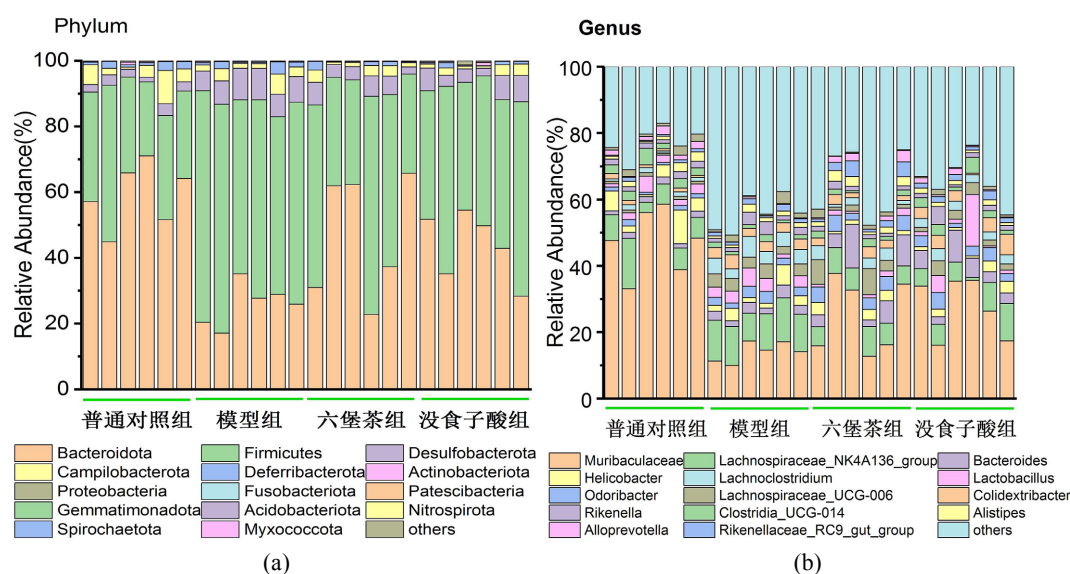


Figure 3. Effect of Liupao tea components on gut microbiota structure in mice

图 3. 六堡茶成分对小鼠肠道菌群结构的影响

4. 讨论

肠道微生物与宿主免疫系统密切相关, 在 RA 等自身免疫性疾病的发生发展中起重要作用, 其可能通过分子模拟机制、抗原交叉反应等多种途径影响机体免疫稳态[14], 但具体机制仍不明确。肠道菌群结构与肥胖、能量摄入密切相关, 一般认为在门水平上, 厚壁菌门/拟杆菌门丰度比值(F/B)与能量摄入相关性较大, F/B 比值大, 摄入能量高, 体重容易增加, 摄入能量低, 体重增加较慢[15]。拟杆菌门丰度在早期未经治疗的 RA 患者中发生降低, 伴随着其他微生物丰度升高, 预示拟杆菌门在 RA 的发生、发展上存在关联性[16]。本试验中正常对照组体重较大, 但 F/B 比值小, 六堡茶组体重小, 但 F/B 比值较大, 没食子酸组体重与模型组类似, F/B 比值相对比模型组大。但是六堡茶和没食子酸增加了拟杆菌门丰度, 降低了厚壁菌门丰度。

属水平的 Muribaculaceae 对肠道健康和改善炎症发挥重要作用[17] [18] [19], 调控肠道碳水化合物的代谢和短链脂肪酸水平, 营造健康的肠道微生态环境[20]。在高脂饮食和胶原诱导情况下, 小鼠肠道菌群发生紊乱。六堡茶增加肠道中 Alloprevotella ($p < 0.01$)、Muribaculaceae 和 Alistipes ($p < 0.05$)丰度, 降低小

鼠模型肠道中 *Colidextribacter*、*Lachnospiraceae_NK4A136_group*、*Lachnoclostridium* 和 *Lactobacillus* ($p < 0.01$)等属的丰度, 纠正菌群紊乱; 没食子酸增加 *Muribaculaceae* ($p < 0.01$)、*Clostridia_UCG-014* 和 *Alloprevotella* ($p < 0.05$)的丰度, 降低 *Lachnospiraceae_NK4A136_group* ($p < 0.01$)、

Lachnospiraceae_UCG-006 和 *Lachnoclostridium* ($p < 0.05$)的丰度, 从而纠正肠道菌群紊乱。但是六堡茶和没食子酸对调整菌群的属和程度并不完全相同, 可能预示六堡茶成分中除了没食子酸作用外, 还有其他成分调控肠道菌群结构, 结果与孙慧慧等[10]的研究并不完全相同。

高脂饮食联合胶原诱导关节炎, 引起模型肠道菌群失调, 六堡茶提取物和没食子酸都能提高 *Muribaculaceae*、*Alloprevotella* 丰度, 降低 *Lachnoclostridium*、*Lachnospiraceae_NK4A136_group* 丰度, 而对其他微生物的调节作用存在差异。

六堡茶提取物和没食子酸对类风湿性关节炎小鼠模型肠道菌群作用尚不清楚, 缺乏机理的研究, 如何通过调节肠道菌群发挥作用需进一步探讨。

基金项目

广西创新驱动发展专项基金项目(AA20302018), 国家现代农业产业技术体系广西茶叶创新团队(nycytxgxcxt-d-18-09)。

参考文献

- [1] 苏悦娟, 孔祥军. 六堡茶的地理标志产品保护分析[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(34): 21388-21390.
- [2] Huang, S.Y., Chen, H., *et al.* (2022) Antihyperlipidemic Effect and Increased Antioxidant Enzyme Levels of Aqueous Extracts from Liupao Tea and Green Tea *in Vivo*. *Journal of Food Science*, **87**, 4203-4220. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.16274>
- [3] 龚受基, 滕翠琴, 梁东姨, 等. 六堡茶茶褐素体外降脂功效研究[J]. 茶叶科学, 2020, 40(4): 536-543.
- [4] 汪海东, 吴晴, 王秀薇, 等. 中医湿病的现代认识[J]. 中医杂志, 2015, 56(13): 1089-1092.
- [5] 陈斌, 白羽, 陈芮, 等. 艾灸对诱导性大鼠关节炎及肠道菌群的影响[J]. 中国微生态学杂志, 2019, 31(6): 632-637.
- [6] 曹晔文. 湿热型类风湿关节炎患者肠道微生态特点及清热活血法对其影响初探[D]: [硕士学位论文]. 北京: 北京中医药大学, 2021.
- [7] 王海瑜, 钱唐亮, 康天伦, 等. 肠道菌群与类风湿关节炎寒热证型相关性研究[J]. 中国中医药信息杂志, 2020, 27(6): 44-49.
- [8] 阴旭芳. 类风湿关节炎患者肠道菌群分析与外周血细胞因子关系的研究[D]: [硕士学位论文]. 太原: 山西医科大学, 2021.
- [9] 闫梦真, 余婕, 董甜甜, 等. 由肠道菌群变化研究资木瓜总苷对 K/BxN 小鼠血清转移性关节炎的治疗作用[J]. 现代免疫学, 2020, 40(4): 265-271.
- [10] 孙慧慧. 历节胶囊对胶原诱导性关节炎小鼠肠道菌群影响的研究[D]: [硕士学位论文]. 南宁: 广西中医药大学, 2020.
- [11] 颜鸿飞, 王美玲, 邹灿, 等. LC-IT-TOF MS 法分析湖南黑茶中水溶性成分[J]. 化学分析计量, 2017, 26(3): 22-26.
- [12] 陈小强, 叶阳, 成浩, 等. 三类茶中茶氨酸、咖啡碱及多酚类的比较分析[J]. 食品研究与开发, 2007(12): 141-144.
- [13] 郑雪花, 杨君, 杨跃辉. 没食子酸药理作用的研究进展[J]. 中国医院药学杂志, 2017, 37(1): 94-98.
- [14] Chriswell, M.E., Lefferts, A.R., Clay, M.R., *et al.* (2022) Clonal IgA and IgG Autoantibodies from Individuals at Risk for Rheumatoid Arthritis Identify an Arthritogenic Strain of Subdoligranulum. *Science Translational Medicine*, **14**, eabn5166. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.abn5166>
- [15] Pereira, I.C.M.D., Ferreira, R.K., Midori, C.P., *et al.* (2018) Childhood Obesity and Firmicutes/Bacteroidetes Ratio in the Gut Microbiota: A Systematic Review. *Childhood Obesity (Print)*, **14**, 501-509. <https://doi.org/10.1089/chi.2018.0040>
- [16] Scher, J.U., Sczesnak, A., Longman, R.S., *et al.* (2013) Expansion of Intestinal *Prevotella copri* Correlates with En-

- hanced Susceptibility to Arthritis. *Elife*, **2**, e1202. <https://doi.org/10.7554/eLife.01202>
- [17] Chen, H., Liu, Y., Huang, K., *et al.* (2023) Fecal Microbiota Dynamics and Its Relationship to Diarrhea and Health in Dairy Calves. *Journal of Animal Science and Biotechnology*, **14**, 358-377.
- [18] 史湘铃. 亚麻籽粉和亚麻籽油调节 T1DM 小鼠肝脏炎症和肠道菌群的作用研究[D]: [硕士学位论文]. 南京: 东南大学, 2020.
- [19] Hui, D., *et al.* (2023) The Spleen-Strengthening and Liver-Draining Herbal Formula Treatment of Non-Alcoholic Fatty Liver Disease by Regulation of Intestinal Flora in Clinical Trial. *Frontiers in Endocrinology*, **13**, Article ID: 1107071. <https://doi.org/10.3389/fendo.2022.1107071>
- [20] Liu, H., Liao, C., Wu, L., *et al.* (2022) Ecological Dynamics of the Gut Microbiome in Response to Dietary Fiber. *The ISME Journal*, **16**, 2040-2055. <https://doi.org/10.1038/s41396-022-01253-4>