

· 基础研究 ·

基于 16S 核糖体 RNA 测序研究健脾方 对绝经后骨质疏松症小鼠肠道菌群的影响

陈斯亮, 石瑛, 汤辰明, 马威, 詹红生

(上海中医药大学附属曙光医院, 上海 201203)

摘要 目的:探讨健脾方对绝经后骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 小鼠肠道菌群的影响。**方法:**将 30 只雌性 C57BL/6 小鼠随机分为假手术组、模型组和健脾方组, 每组 10 只。模型组和健脾方组小鼠通过双侧卵巢摘除术进行 OP 造模, 假手术组小鼠打开腹腔后切除卵巢附近的一团脂肪组织, 保留卵巢。造模后第 7 天, 假手术组和模型组小鼠以生理盐水灌胃, 健脾方组以健脾方药液灌胃 (中药配方颗粒用量为 $54 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 3 组小鼠均每天灌胃 1 次, 每次 0.2 mL, 连续灌胃 28 d。药物干预结束后, 测定小鼠体质量, 获取各组小鼠粪便样本、左侧股骨, 切取子宫并称重, 进行小鼠肠道菌群 16S 核糖体 RNA 测序分析及小鼠股骨病理学观察。**结果:**①一般情况。实验期间各组均无小鼠死亡。药物干预前, 3 组小鼠体质量的差异无统计学意义 [$(20.88 \pm 0.83) \text{ g}$, $(20.65 \pm 0.74) \text{ g}$, $(20.59 \pm 0.47) \text{ g}$, $F = 0.484$, $P = 0.622$]。药物干预结束后, 模型组小鼠的体质量高于假手术组和健脾方组 [$(26.96 \pm 1.63) \text{ g}$, $(23.42 \pm 0.84) \text{ g}$, $P = 0.000$; $(26.96 \pm 1.63) \text{ g}$, $(24.62 \pm 1.55) \text{ g}$, $P = 0.001$], 假手术组和健脾方组小鼠体质量的差异无统计学意义 ($P = 0.063$)。假手术组小鼠的子宫质量高于模型组和健脾方组 [$(0.66 \pm 0.05) \text{ g}$, $(0.24 \pm 0.05) \text{ g}$, $P = 0.000$; $(0.66 \pm 0.05) \text{ g}$, $(0.28 \pm 0.06) \text{ g}$, $P = 0.000$], 模型组和健脾方组小鼠子宫质量的差异无统计学意义 ($P = 0.053$)。②小鼠肠道菌群丰度分析结果。假手术组与模型组含有 499 个共同操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs) 数据; 除共同 OTUs 数据外, 假手术组有 87 个特异性 OTUs 数据, 模型组有 74 个特异性 OTUs 数据。模型组与健脾方组含有 489 个共同 OTUs 数据; 除共同 OTUs 数据外, 模型组有 84 个特异性 OTUs 数据, 健脾方组有 54 个特异性 OTUs 数据。偏最小二乘法判别分析结果显示, 3 组小鼠肠道菌群丰度差异明显。③小鼠肠道菌群结构分析结果。物种累计曲线随样本量增加逐渐趋于平缓, 说明样品中的物种已经基本被测序覆盖, 测序数据量充足。3 组小鼠肠道菌群相对丰度在门水平处于前 4 位的依次为拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门、脱硫菌门, 相对丰度在属水平处于前 5 位的依次为 Muri 菌属、乳杆菌属、拟普雷沃菌属、梭菌属、粪杆菌属。3 组小鼠厚壁菌门、脱硫菌门相对丰度比较, 总体差异均无统计学意义。假手术组和健脾方组拟杆菌门相对丰度均高于模型组 (23.19 ± 2.09 , 17.12 ± 3.87 , $P = 0.016$; 23.58 ± 2.46 , 17.12 ± 3.87 , $P = 0.012$)、放线菌门相对丰度低于模型组 (0.32 ± 0.29 , 0.79 ± 0.31 , $P = 0.027$; 0.26 ± 0.07 , 0.79 ± 0.31 , $P = 0.014$); 其余各组间两两比较, 组间差异均无统计学意义。3 组小鼠 Muri 菌属、乳杆菌属、粪杆菌属相对丰度比较, 总体差异均无统计学意义。假手术组拟普雷沃菌属相对丰度高于模型组 (4.96 ± 1.77 , 1.33 ± 0.37 , $P = 0.009$)、梭菌属相对丰度低于模型组 (0.45 ± 0.17 , 1.41 ± 0.18 , $P = 0.000$), 健脾方组梭菌属相对丰度低于模型组 (0.62 ± 0.30 , 1.41 ± 0.18 , $P = 0.001$); 其余各组间两两比较, 组间差异均无统计学意义。④健脾方组与模型组差异菌群 KEGG 分析结果。健脾方组与模型组有明显差异的代谢途径有维生素 B6 代谢、硫化物代谢、硒化合物代谢、硫氨基酸代谢、硫胺素代谢、钙离子通道。⑤小鼠股骨病理学观察结果。模型组小鼠的骨小梁厚度、骨小梁数量均低于假手术组 [$(50.13 \pm 7.72) \text{ mm}$, $(71.87 \pm 6.20) \text{ mm}$, $P = 0.000$; $(1.87 \pm 0.92) \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-1}$, $(4.40 \pm 1.24) \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-1}$, $P = 0.000$], 骨小梁分离度高于假手术组 [$(344.60 \pm 41.32) \text{ mm}$, $(205.80 \pm 27.21) \text{ mm}$, $P = 0.000$]。健脾方组小鼠的骨小梁厚度、骨小梁数量均低于假手术组 [$(60.53 \pm 6.38) \text{ mm}$, $(71.87 \pm 6.20) \text{ mm}$, $P = 0.000$; $(3.13 \pm 0.92) \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-1}$, $(4.40 \pm 1.24) \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-1}$, $P = 0.002$], 健脾方组与假手术组小鼠骨小梁分离度的差异无统计学意义。健脾方组小鼠的骨小梁厚度、骨小梁数量均高于模型组 [$(60.53 \pm 6.38) \text{ mm}$, $(50.13 \pm 7.72) \text{ mm}$, $P = 0.000$; $(3.13 \pm 0.92) \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-1}$, $(1.87 \pm 0.92) \text{ 个} \cdot \text{mm}^{-1}$, $P = 0.002$], 骨小梁分离度低于模型组 [$(221.40 \pm 33.16) \text{ mm}$, $(344.60 \pm 41.32) \text{ mm}$, $P = 0.000$]。 **结论:**健脾方能够调节绝经后 OP 小鼠肠道菌群结构, 改变代谢途径, 这可能是其治疗 OP 的作用机制之一。

关键词 骨质疏松, 绝经后; 胃肠道微生物群; RNA, 核糖体, 16S; 健脾方

A study of the effects of Jianpi Fang (健脾方) on intestinal flora of mice with postmenopausal osteoporosis based on 16S ribosomal RNA gene sequencing

CHEN Siliang, SHI Ying, TANG Chenming, MA Wei, ZHAN Hongsheng

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81674003); “华东片区及市级中医专科筋骨病损专科联盟建设”项目

通讯作者: 石瑛 E-mail: shiying1974@126.com

Shuguang Hospital Affiliated to Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 201203, China

ABSTRACT Objective: To explore the effects of Jianpi Fang (健脾方, JPF) on intestinal flora of postmenopausal osteoporosis (PMOP) mice. **Methods:** Thirty female C57BL/6 mice were randomly divided into sham-operated group, model group and JPF group, 10 mice in each group. The mice in model group and JPF group were subjected to bilateral ovariectomy for inducing PMOP; while the ones in sham-operated group underwent removal of peri-ovarian adipose tissues, with ovaries retained. On the 7th day after the modeling operation, the mice in sham-operated group and model group were intragastric administrated with normal saline, while the ones in JPF group with JPF decoction (the dosage of Chinese medicinal granules was 54 mg/kg). All mice in the 3 groups were intragastric administrated once a day, 0.2 mL at a time for consecutive 28 days. After the end of drug intervention, the body mass of the mice was measured and their stool samples and left femurs were harvested, moreover their uteri were dissected and weighed, and analysis on 16S ribosomal RNA (rRNA) gene sequencing of intestinal flora and pathological observation on femurs of the mice were conducted. **Results:** ① No dead mice were found during the experiment period. There was no statistical difference in body mass among the 3 groups before the drug intervention (20.88 ± 0.83 , 20.65 ± 0.74 , 20.59 ± 0.47 g, $F = 0.484$, $P = 0.622$). After the end of drug intervention, the body mass was higher in model group compared with that of sham-operated group and JPF group (26.96 ± 1.63 vs 23.42 ± 0.84 g, $P = 0.000$; 26.96 ± 1.63 vs 24.62 ± 1.55 g, $P = 0.001$), while the difference in body mass between sham-operated group and JPF group was not statistically significant ($P = 0.063$). The quality of uteri was higher in sham-operated group compared with that of model group and JPF group (0.66 ± 0.05 vs 0.24 ± 0.05 g, $P = 0.000$; 0.66 ± 0.05 vs 0.28 ± 0.06 g, $P = 0.000$), while there was no significant difference between model group and JPF group ($P = 0.053$). ② The sham-operated group and model group shared 499 common operational taxonomic units (OTUs). In addition to the common OTUs, 87 specific OTUs were found in sham-operated group, and 74 ones were observed in model group. The model group and the JPF group shared 489 common OTUs. In addition to the common OTUs, 84 specific OTUs were found in model group, and 54 ones were observed in JPF group. The results of partial least squares discriminant analysis (PLS-DA) showed that there were significant differences in the abundance of intestinal flora among the 3 groups. ③ The species accumulation curve gradually flattened out with the sample size increased, indicating that the species in the samples had been adequately covered by sequencing and the sequencing data were sufficient. At the phylum level, the top 4 abundant phyla in the mouse intestinal flora of the 3 groups were Bacteroidetes, Firmicutes, Actinobacteria and Desulfobacterota in turn; while, at the genus level, the top 5 abundant genera were Muri, Lactobacillus, Alloprevotella, Clostridium and Faecalibacterium in turn. There was no significant differences in the relative abundance of Firmicutes and Desulfobacterota among the 3 groups. The relative abundance of Bacteroidetes was higher, while the relative abundance of Actinobacteria was lower in sham-operated group and JPF group compared to model group (23.19 ± 2.09 vs 17.12 ± 3.87 , $P = 0.016$; 23.58 ± 2.46 vs 17.12 ± 3.87 , $P = 0.012$; 0.32 ± 0.29 vs 0.79 ± 0.31 , $P = 0.027$; 0.26 ± 0.07 vs 0.79 ± 0.31 , $P = 0.014$). Further pairwise comparison showed that there was no statistical difference in the relative abundance of Bacteroidetes and Actinobacteria between sham-operated group and JPF group. There was no significant differences in the relative abundance of Muri, Lactobacillus and Faecalibacterium among the 3 groups. The relative abundance of Alloprevotella was higher in sham-operated group compared to model group (4.96 ± 1.77 vs 1.33 ± 0.37 , $P = 0.009$), and the relative abundance of Clostridium was lower in sham-operated group and JPF group compared to model group (0.45 ± 0.17 vs 1.41 ± 0.18 , $P = 0.000$; 0.62 ± 0.30 vs 1.41 ± 0.18 , $P = 0.001$). Further pairwise comparison showed that there was no statistical difference in the relative abundance of Alloprevotella between sham-operated group and JPF group as well as between model group and JPF group, and no statistical difference in the relative abundance of Clostridium between sham-operated group and JPF group. ④ The significant differences in metabolic pathways, including vitamin B6 metabolism, sulfide metabolism, selenocompound metabolism, sulfur amino acid metabolism, thiamine metabolism and calcium ion channels, were found between JPF group and model group. ⑤ The trabecular thickness (Tb. Th) and trabecular number (Tb. N) in femurs were less, while the trabecular separation (Tb. Sp) was higher in model group compared to sham-operated group (50.13 ± 7.72 vs 71.87 ± 6.20 mm, $P = 0.000$; 1.87 ± 0.92 vs 4.40 ± 1.24 trabeculae/mm, $P = 0.000$; 344.60 ± 41.32 vs 205.80 ± 27.21 mm, $P = 0.000$). The Tb. Th and Tb. N in femurs were less in JPF group compared to sham-operated group (60.53 ± 6.38 vs 71.87 ± 6.20 mm, $P = 0.000$; 3.13 ± 0.92 vs 4.40 ± 1.24 trabeculae/mm, $P = 0.002$), while there was no significant differences in Tb. Sp between JPF group and sham-operated group. The Tb. Th was greater, the Tb. N was more, while the Tb. Sp was lower in JPF group compared to model group (60.53 ± 6.38 vs 50.13 ± 7.72 mm, $P = 0.000$; 3.13 ± 0.92 vs 1.87 ± 0.92 trabeculae/mm, $P = 0.002$; 221.40 ± 33.16 vs 344.60 ± 41.32 mm, $P = 0.000$). **Conclusion:** The JPF can modulate the intestinal flora structure and alter the metabolic pathways in PMOP mice, which may be one of its mechanisms of action in treatment of OP.

Keywords osteoporosis, postmenopausal; gastrointestinal microbiome; RNA, Ribosomal, 16S; Jianpi fang

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种以骨量降低、骨组织微结构损坏, 导致骨脆性增加, 易发生骨折为特征的全身性骨病。目前 OP 的发病率逐年增加, 已成为一个重要的公共卫生问题^[1]。肠道菌群与 OP 关系密切^[2-3], 肠道菌群可能是治疗 OP 的新靶点^[4]。健脾类中药可以调节肠道菌群结构^[5], 并具有明确的抗骨质疏松作用^[6]。健脾方是石氏伤科石印玉教授的经验方, 具有补肾健脾除湿、强筋健骨的功效。前期研究表明, 健脾方能够维持骨密度、改善骨微结构、提高骨生物力学性能^[7], 但目前尚不清楚其作用机制是否与肠道菌群有关。因此, 本研究观察了健脾方对绝经后 OP 小鼠肠道菌群的影响, 现总结报告如下。

1 材料与仪器

1.1 实验动物 8 周龄 SPF 级雌性 C57BL/6 小鼠 30 只, 体质量 (20 ± 2) g, 实验动物合格证号: 20180006035413。在上海中医药大学动物实验中心 SPF 级动物实验室饲养并进行后续实验, 饲养环境温度 25 ℃、湿度 50% ~ 60%。实验方案经上海中医药大学实验动物伦理委员会审查通过, 伦理批件号: PZSHUTCM211129023。

1.2 药品及试剂 健脾方药物组成为炒谷芽 15 g、山药 15 g、陈皮 9 g; 本实验选用对应中药配方颗粒, 炒谷芽 (每袋 0.5 g, 相当于饮片 10 g), 山药 (每袋 0.5 g, 相当于饮片 10 g), 陈皮 (每袋 1 g, 相当于饮片 6 g), 均购自江阴天江药业有限公司; 使用时称取相应质量的中药配方颗粒溶于 100 ℃ 热水中, 搅拌振荡均匀。舒泰 50 (苏州坤宸生物科技有限公司), 多聚甲醛固定液 (碧云天生物技术有限公司), HE 染液 (广州硕谱生物科技有限公司), DNA 提取试剂盒 (Axygen Biosciences 公司), 粪便试剂盒 (Omega Biotek 公司)。

1.3 实验仪器 JA10002 电子天平 (上海精天电子仪器有限公司), U570-86 超低温冰箱 (Eppendorf 公司), BX43 正置显微镜 (Olympus 公司), DK-S26 石蜡切片机、EG1150 石蜡包埋机、TP1020F 全自动组织脱水机 (Leica 公司), KOS 微波组织处理机 (Milestone 公司), DYY-6C 电泳仪 (北京六一仪器厂), Gene-Amp9700 PCR 仪 (ABI 公司), MISEQ 测序仪、HISEQ 测序仪 (Illumina 公司)。

2 方法

2.1 动物造模及药物干预 将 30 只小鼠称重, 按体质量排序后每 3 只分为 1 个区间, 共分为 10 个区间, 然后依次分别将每个区间的 3 只小鼠随机选入假手术组、模型组和健脾方组, 每组 10 只。适应性饲养 1 周后, 模型组和健脾方组小鼠通过双侧卵巢摘除术进行 OP 造模^[8], 具体方法: 无菌条件下腹腔注射舒泰 50 进行麻醉 (用量 $75 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 麻醉后于脊柱两侧做纵切口, 切除双侧卵巢并结扎。假手术组小鼠打开腹腔后切除卵巢附近的一团脂肪组织, 保留卵巢。造模后第 7 天, 称重后假手术组和模型组小鼠以生理盐水灌胃, 健脾方组根据 0.02 kg 小鼠与 60 kg 成人表面积等效剂量换算, 以健脾方药液灌胃 (中药配方颗粒用量为 $54 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$), 3 组小鼠均每天灌胃 1 次, 每次 0.2 mL, 连续灌胃 28 d。

2.2 样本采集 药物干预结束后, 禁食、不禁水 24 h, 称重、麻醉后迅速解剖取出小鼠肠组织, 用无菌镊子取出 2 粒粪便, 迅速转移至灭菌的冻存管中, 在 $-80 \text{ }^{\circ}\text{C}$ 保存备用。同时仔细剥离、切取子宫, 并在湿重状态下称重。完整切取小鼠左侧股骨, 远端以膝关节为界、近端以股骨大转子为界, 仔细清除附着的软组织后置于 10% 多聚甲醛溶液中。

2.3 小鼠肠道菌群 16S 核糖体 RNA 测序及数据分析 将小鼠粪便样本送至武汉赛维尔生物科技有限公司进行 16S 核糖体 RNA (ribosomal RNA, rRNA) 测序, 全程按照试剂盒说明书进行操作。PCR 扩增引物序列为 5'-ACTCCTACGGGAGGCAGCA-3' 和 5'-GGAC-TACHVGGGTWTCTAAT-3'。测序结束后进行数据分析。

2.4 小鼠股骨病理学观察 小鼠左侧股骨在 10% 多聚甲醛固定 2 d 后脱钙, 石蜡包埋后制作厚度 $5 \mu\text{m}$ 的切片。常规 HE 染色后在正置显微镜下观察小鼠股骨病理学变化, 用 Image pro plus6.0 图像分析软件进行股骨远端松质骨形态分析, 检测骨小梁厚度、骨小梁数量、骨小梁分离度。

2.5 数据统计 采用 SPSS23.0 软件进行数据统计分析。3 组小鼠体质量、子宫质量、拟杆菌门相对丰度、厚壁菌门相对丰度、放线菌门相对丰度、脱硫菌门相对丰度、Muri 菌属相对丰度、乳杆菌属相对丰度、拟

普雷沃菌属相对丰度、梭菌属相对丰度、粪杆菌属相对丰度的总体比较均采用单因素方差分析,组间两两比较均采用 LSD-*t* 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$ 。

3 结果

3.1 一般情况 实验期间各组均无小鼠死亡。药物干预前 3 组小鼠的体质量比较,差异无统计学意义。

表 1 3 组小鼠的体质量和子宫质量

组别	样本量/只	体质量/ $(\bar{x} \pm s, g)$		子宫质量/ $(\bar{x} \pm s, g)$
		药物干预前	药物干预结束后	
假手术组	10	20.88 \pm 0.83	23.42 \pm 0.84	0.66 \pm 0.05
模型组	10	20.65 \pm 0.74	26.96 \pm 1.63	0.24 \pm 0.05
健脾方组	10	20.59 \pm 0.47	24.62 \pm 1.55	0.28 \pm 0.06
<i>F</i> 值		0.484	16.941	226.875
<i>P</i> 值		0.622	0.000	0.000

3.2 小鼠肠道菌群 16S rRNA 测序数据分析结果

3.2.1 小鼠肠道菌群丰度分析结果 假手术组与模型组含有 499 个共同操作分类单元 (operational taxonomic units, OTUs) 数据;除共同 OTUs 数据外,假手术组有 87 个特异性 OTUs 数据,模型组有 74 个特异性 OTUs 数据。模型组与健脾方组含有 489 个共同 OTUs 数据;除共同 OTUs 数据外,模型组有 84 个特异性 OTUs 数据,健脾方组有 54 个特异性 OTUs 数据。偏最小二乘法判别分析结果显示,3 组小鼠肠道菌群丰度差异明显 (图 1)。

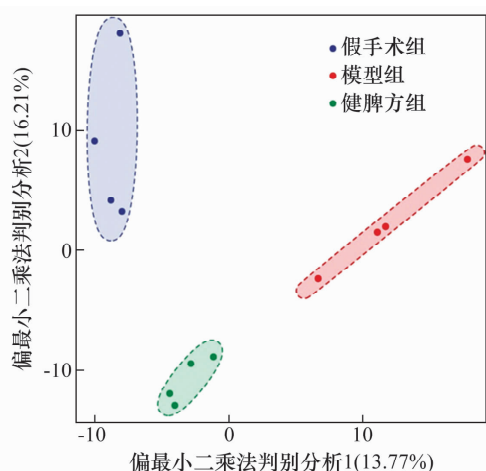


图 1 基于偏最小二乘法的小鼠肠道菌群丰度判别分析结果

3.2.2 小鼠肠道菌群结构分析结果 物种累计曲线随样本量增加逐渐趋于平缓,说明样品中的物种已经基本被测序覆盖,测序数据量充足 (图 2)。3 组小鼠肠道菌群相对丰度在门水平处于前 4 位的依次为拟杆菌门、厚壁菌门、放线菌门、脱硫菌门。3 组小鼠厚壁菌门、脱硫菌门相对丰度比较,总体差异均无统计学意义。3 组小鼠拟杆菌门和放线菌门相对丰度比

较,总体差异均有统计学意义。假手术组和健脾方组拟杆菌门相对丰度均高于模型组 ($P = 0.016, P = 0.012$)、放线菌门相对丰度均低于模型组 ($P = 0.027, P = 0.014$);其余各组间两两比较,组间差异均无统计学意义。见图 3、表 2。3 组小鼠肠道菌群相对丰度在属水平处于前 5 位的依次为 Muri 菌属、乳杆菌属、拟普雷沃菌属、梭菌属、粪杆菌属。3 组小鼠 Muri 菌属、乳杆菌属、粪杆菌属相对丰度比较,总体差异均无统计学意义。3 组小鼠拟普雷沃菌属、梭菌属相对丰度比较,总体差异均有统计学意义。假手术组拟普雷沃菌属相对丰度高于模型组 ($P = 0.009$)、梭菌属相对丰度低于模型组 ($P = 0.000$),健脾方组梭菌属相对丰度低于模型组 ($P = 0.001$);其余各组间两两比较,组间差异均无统计学意义。见图 4、表 3。

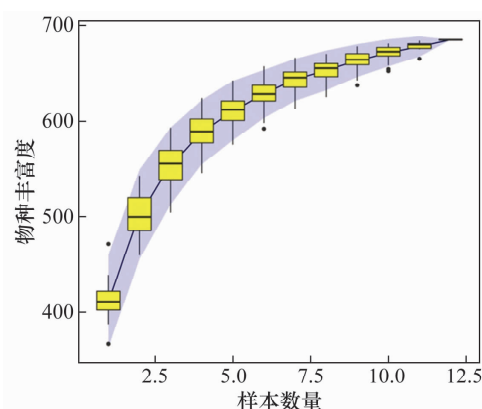


图 2 小鼠肠道菌群物种累计曲线

3.2.3 健脾方组与模型组差异菌群 KEGG 分析结果 健脾方组与模型组有明显差异的代谢途径有维生素 B6 代谢、硫化物代谢、硒化物代谢、硫氨基酸代谢、硫胺素代谢、钙离子通道 (图 5)。

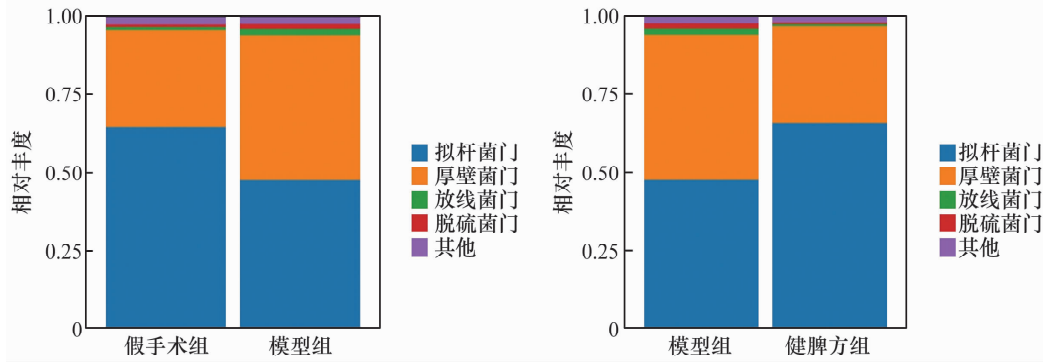


图 3 3 组小鼠肠道菌群门水平物种分布图

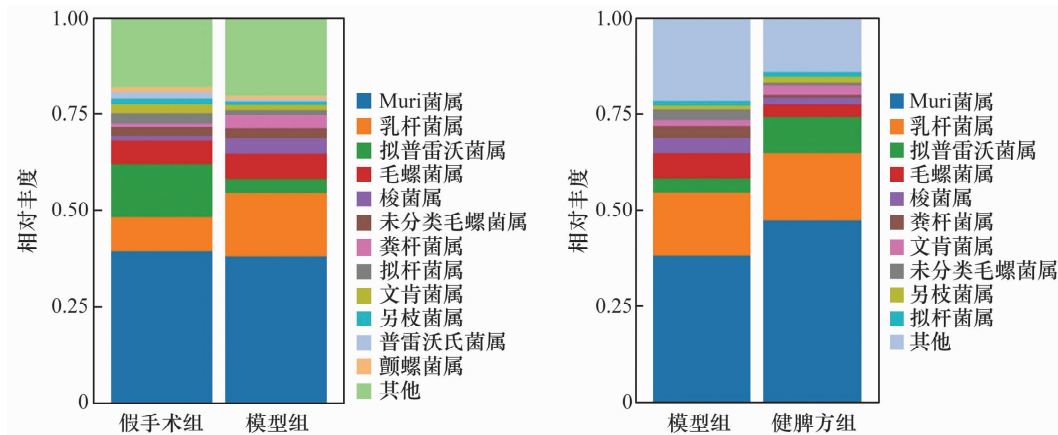


图 4 3 组小鼠肠道菌群属水平物种分布图

表 2 3 组小鼠肠道菌群门水平相对丰度比较

组别	样本量/ 只	拟杆菌门 ($\bar{x} \pm s$)	厚壁菌门 ($\bar{x} \pm s$)	放线菌门 ($\bar{x} \pm s$)	脱硫菌门 ($\bar{x} \pm s$)
假手术组	4	23.19 ± 2.09	11.23 ± 4.55	0.32 ± 0.29	0.31 ± 0.20
模型组	4	17.12 ± 3.87	16.65 ± 3.71	0.79 ± 0.31	0.57 ± 0.52
健脾方组	4	23.58 ± 2.46	11.21 ± 5.59	0.26 ± 0.07	0.19 ± 0.06
F 值		6.207	1.788	5.434	1.437
P 值		0.020	0.222	0.028	0.287

表 3 3 组小鼠肠道菌群属水平相对丰度比较

组别	样本量/ 只	Muri 菌属 ($\bar{x} \pm s$)	乳杆菌属 ($\bar{x} \pm s$)	拟普雷沃菌属 ($\bar{x} \pm s$)	梭菌属 ($\bar{x} \pm s$)	粪杆菌属 ($\bar{x} \pm s$)
假手术组	4	16.74 ± 1.57	3.12 ± 1.56	4.96 ± 1.77	0.45 ± 0.17	0.31 ± 0.17
模型组	4	13.79 ± 1.75	5.84 ± 2.26	1.33 ± 0.37	1.41 ± 0.18	1.17 ± 0.79
健脾方组	4	17.02 ± 1.86	6.30 ± 3.47	3.29 ± 1.97	0.62 ± 0.30	0.28 ± 0.21
F 值		4.237	0.934	5.526	21.105	4.031
P 值		0.050	0.428	0.027	0.000	0.056

3.3 小鼠股骨病理学观察结果 与假手术组相比,模型组小鼠股骨干骺端骨小梁数量明显减少,骨小梁连接较为稀疏,骨髓组织减少;与模型组相比,健脾方组小鼠骨小梁数量明显增多,骨小梁连接更紧密,骨髓组织增多(图 6)。模型组小鼠的骨小梁厚度、骨小梁数量均低于假手术组($P=0.000, P=0.000$),骨小梁分离度高于假手术组($P=0.000$)。健脾方组小鼠

的骨小梁厚度、骨小梁数量均低于假手术组($P=0.000, P=0.002$),健脾方组与假手术组小鼠骨小梁分离度的差异无统计学意义($P=0.221$)。健脾方组小鼠的骨小梁厚度、骨小梁数量均高于模型组($P=0.000, P=0.002$),骨小梁分离度低于模型组($P=0.000$)。见表 4。

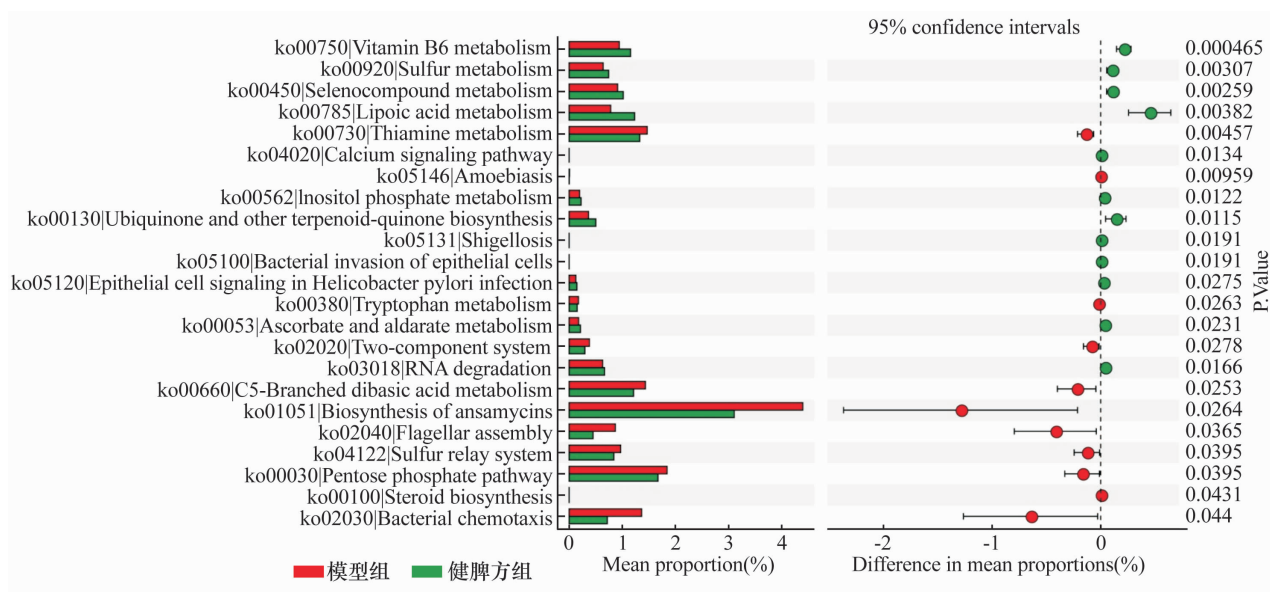


图 5 健脾方组与模型组差异菌群 KEGG 分析结果

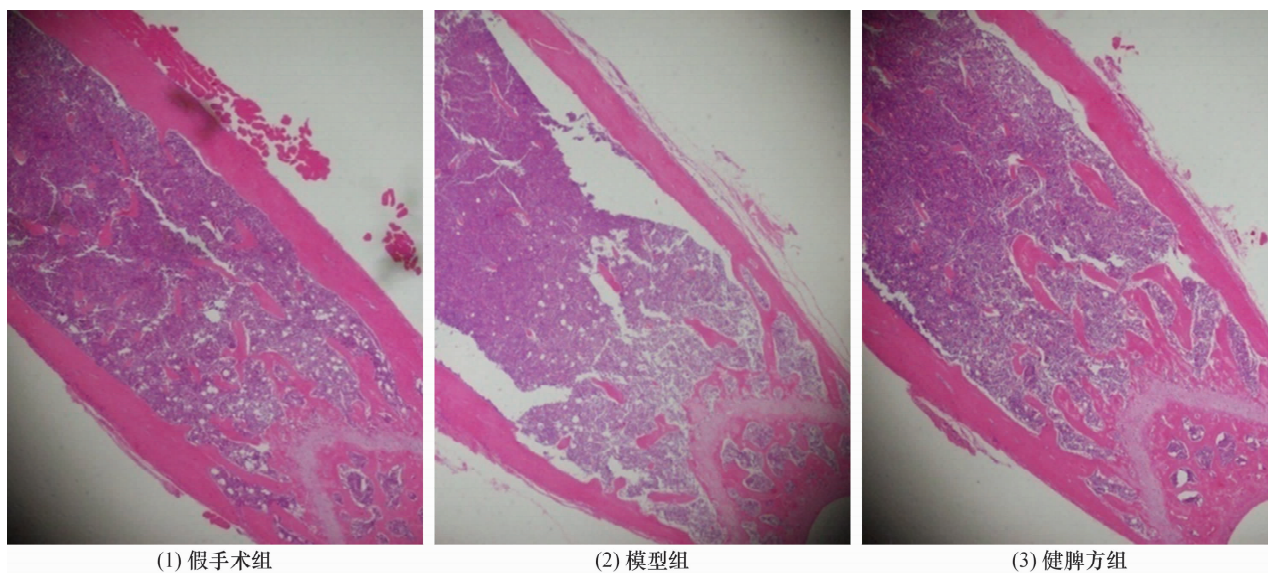


图 6 3 组小鼠股骨切片 (HE 染色 ×400)

表 4 3 组小鼠股骨形态计量学参数

组别	样本量/只	骨小梁厚度/ ($\bar{x} \pm s$, mm)	骨小梁数量/ ($\bar{x} \pm s$, 个 · mm ⁻¹)	骨小梁分离度/ ($\bar{x} \pm s$, mm)
假手术组	10	71.87 ± 6.20	4.40 ± 1.24	205.80 ± 27.21
模型组	10	50.13 ± 7.72	1.87 ± 0.92	344.60 ± 41.32
健脾方组	10	60.53 ± 6.38	3.13 ± 0.92	221.40 ± 33.16
F 值		38.347	22.429	73.351
P 值		0.000	0.000	0.000

4 讨论

脾与大、小肠关系密切,脾虚患者普遍存在肠道菌群紊乱的现象^[9]。肠道菌群可以释放多种小分子物质(雌激素类物质、血清素等),调节免疫功能,影响钙、磷吸收,并通过这 3 种作用影响机体的骨代谢^[10]。肠道菌群紊乱会导致骨量下降^[11],引起骨质

疏松。一项关于 OP 病位的调查显示,OP 的病位证素中脾占 22.83%^[12]。研究表明,健脾类中药可以明显提升肠道菌群多样性,调节脾虚患者的肠道菌群^[5,13]。肾乃先天之本和元气之根,元气充足,才能推动机体机能成熟。精血同源,精气互生,肾中所藏之精需要后天谷气充养,方能源源不断、生生不息,进

而促进骨骼发育、延缓骨骼退变。故在 OP 的治疗中提倡脾肾同补,补肾健脾能更好地调节骨代谢,防治 OP。健脾方由炒谷芽、山药、陈皮组成,具有补肾健脾除湿、强筋健骨的功效。课题组前期研究证实,健脾方能够有效提升骨密度^[14]。

本研究中,模型组小鼠较假手术组小鼠体质量升高、子宫质量降低,股骨骨小梁厚度减小、骨小梁数量减少、骨小梁分离度升高;健脾方组较模型组体质量降低、子宫质量无明显变化,股骨骨小梁厚度和骨小梁数量增加,骨小梁分离度降低。这提示造模成功,且健脾方能改善骨微结构。

拟杆菌门和放线菌门是机体肠道菌群的重要组成部分^[15]。拟杆菌门有助于膳食纤维和淀粉的消化,促进丙酸盐形成,而丙酸盐能激活维生素 D 受体,提高骨密度^[16]。放线菌门会导致机体发生炎症反应^[17]。Di 等^[18]的研究表明,拟杆菌门与放线菌门的相对丰度在 OP 患者与健康人之间存在差异。拟普雷沃菌属可抑制卵巢切除所致 OP 小鼠骨质流失^[19]。本研究中,与模型组相比,健脾方组拟杆菌门、拟普雷沃菌属相对丰度升高,放线菌门、梭菌属相对丰度下降。

KEGG 分析结果显示,健脾方组与模型组有明显差异的代谢途径有维生素 B6 代谢、硫化物代谢、硒化物代谢、硫氨基酸代谢、硫胺素代谢、钙离子通道。维生素 B6、硫胺素缺乏会导致骨代谢异常,引发 OP 等骨代谢疾病^[20-21]。硫化物、硫氨基酸代谢会引起机体酸碱度的变化,随之影响骨骼健康^[22]。钙离子信号通路可以通过促进破骨细胞氧化和磷酸化,诱导破骨细胞死亡,减少炎症介导的骨丢失^[23]。

本研究的结果提示,健脾方能够调节绝经后 OP 小鼠肠道菌群结构,改变代谢途径,这可能是其治疗 OP 的作用机制之一。

参考文献

[1] 中华中医药学会. 骨质疏松性骨折中医诊疗指南[J]. 中医正骨, 2023, 35(1): 1-9.

[2] SHETH T, PITCHUMONI C S, DAS K M. Musculoskeletal manifestations in inflammatory bowel disease: a revisit in search of immunopathophysiological mechanisms[J]. J Clin Gastroenterol, 2014, 48(4): 308-317.

[3] MA S, QIN J, HAO Y, et al. Association of gut microbiota composition and function with an aged rat model of senile osteoporosis using 16S rRNA and metagenomic sequencing analysis[J]. Aging (Albany NY), 2020, 12(11): 10795-

10808.

[4] SEELY K D, KOTELKO C A, DOUGLAS H, et al. The human gut microbiota: a key mediator of osteoporosis and osteogenesis[J]. Int J Mol Sci, 2021, 22(17): 9452.

[5] 张洪源, 任广振, 黄建政, 等. 健脾类中药多糖对脾虚相关病症肠道菌群影响研究现状[J]. 中国中医药信息杂志, 2022, 29(2): 147-151.

[6] 唐亨方, 姚啸生, 戚晓楠. 补肾健脾类中药改善肠道菌群治疗骨质疏松症的机制分析[J]. 实用中医内科杂志, 2021, 35(3): 1-4.

[7] 王立童, 赵咏芳, 王翔, 等. 密骨胶囊和健脾方对去卵巢大鼠骨结构和力学性能的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2009, 15(1): 27-31.

[8] 葛月宾, 王丽君. 小鼠去卵巢骨质疏松模型的建立及 OPG/RANKL 的表达[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2008, 16(12): 33-35.

[9] 卢林, 杨景云, 李丹红. 脾虚湿盛泄泻患者肠道微生态及舌部菌群变化的临床观察[J]. 中国微生态学杂志, 2007, 19(4): 333-334.

[10] MCCABE L, BRITTON R A, PARAMESWARAN N. Prebiotic and probiotic regulation of bone health: role of the intestine and its microbiome[J]. Curr Osteoporos Rep, 2015, 13(6): 363-371.

[11] CLAESON M J, CUSACK S, O'SULLIVAN O, et al. Composition, variability, and temporal stability of the intestinal microbiota of the elderly[J]. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011, 108(Suppl 1): 4586-4591.

[12] 葛臻, 丁阅昇. 骨质疏松症的中医证素分布研究[J]. 湖南中医杂志, 2019, 35(9): 126-127.

[13] 黄文武, 彭颖, 王梦月, 等. 四君子汤及其单味药水煎液对脾虚大鼠肠道菌群的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(11): 8-15.

[14] 王立童, 赵咏芳, 王翔, 等. 具有补肾、健脾功效的中药复方对切卵大鼠肾脏、股骨中 VDRmRNA 表达的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2009, 17(4): 4-7.

[15] ADAK A, KHAN M R. An insight into gut microbiota and its functionalities[J]. Cell Mol Life Sci, 2019, 76(3): 473-493.

[16] LIN H, HUANG Y, TIAN T, et al. Propionate promotes vitamin D receptor expression via yes-associated protein in rats with short bowel syndrome[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2020, 523(3): 645-650.

[17] FATAHI-BAFGHI M. Antibiotic resistance genes in the actinobacteria phylum[J]. Eur J Clin Microbiol Infect Dis, 2019, 38(9): 1599-1624.

态,避免小鼠发生腹部冻伤;④整个低温诱导过程应确保鼠箱内温度保持稳定。

本研究结果表明,DMM 法联合低温诱导法是构建小鼠 KOA 阳虚血瘀证模型的有效方法。

参考文献

- [1] MICHAEL J W, SCHLÜTER-BRUST K U, EYSEL P. The epidemiology, etiology, diagnosis, and treatment of osteoarthritis of the knee[J]. *Dtsch Arztebl Int*, 2010, 107(9): 152 – 162.
- [2] KAN H S, CHAN P K, CHIU K Y, et al. Non-surgical treatment of knee osteoarthritis[J]. *Hong Kong Med J*, 2019, 25(2): 127 – 133.
- [3] MAHMOUDIAN A, LOHMANDER L S, MOBASHERI A, et al. Early-stage symptomatic osteoarthritis of the knee-time for action[J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2021, 17(10): 621 – 632.
- [4] WU B, YANG L, CHEN L, et al. Traditional Chinese medicine therapies for patients with knee osteoarthritis: a protocol for systematic review and network meta-analysis[J]. *Medicine (Baltimore)*, 2022, 101(28): e29404.
- [5] 王中华. 补肾活血汤为主治疗肾阳虚血瘀型膝骨关节炎的临床观察[D]. 广州: 广州中医药大学, 2011.
- [6] PRIMORAC D, MOLNAR V, ROD E, et al. Knee osteoarthritis: a review of pathogenesis and state-of-the-art non-operative therapeutic considerations[J]. *Genes (Basel)*, 2020, 11(8): 854.
- [7] JANG S, LEE K, JU J H. Recent updates of diagnosis, pathophysiology, and treatment on osteoarthritis of the knee[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(5): 2619.
- [8] CAO P, LI Y, TANG Y, et al. Pharmacotherapy for knee osteoarthritis: current and emerging therapies[J]. *Expert Opin Pharmacother*, 2020, 21(7): 797 – 809.
- [9] 刘晓辰, 付维力. 骨关节炎动物模型的选择[J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(11): 1769 – 1776.
- [10] 冯萌, 钱庄, 李萌, 等. 内侧半月板失稳诱发 C57BL/6 小鼠骨关节炎模型中关节腔微量注射方法的建立[J]. *西安交通大学学报(医学版)*, 2018, 39(3): 434 – 437.
- [11] 彭银花, 龚辉, 赵晔, 等. 抗癌消水散对人胃癌小鼠腹腔移植阳虚模型的干预作用[J]. *湖南中医杂志*, 2022, 38(6): 179 – 183.
- [12] 袁苑, 陈燕霞, 马堃, 等. 探索建立雷公藤多苷致早发性卵巢功能不全肾虚血瘀证的小鼠模型[J]. *中国中药杂志*, 2019, 44(9): 1895 – 1903.
- [13] 中国中医药研究促进会骨伤科分会. 膝骨关节炎中医诊疗指南(2020 年版)[J]. *中医正骨*, 2020, 32(10): 1 – 14.
- [14] 陈黎明, 郭盛君, 许根荣, 等. 28763 例膝骨关节炎患者证候中医特征分析[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(2): 1061 – 1064.
- [15] 史云佳, 吴斌, 李延萍, 等. 重庆地区膝骨关节炎中医证候分布规律[J]. *实用中医内科杂志*, 2022, 36(12): 36 – 39.
- [16] 李兆福, 狄朋桃, 彭江云, 等. 昆明市膝骨关节炎中医证候研究[J]. *中医正骨*, 2014, 26(6): 24 – 27.
- [17] 李言杰, 孙振双, 蔡西国, 等. 膝骨关节炎中医证素与膝关节疼痛及软骨损伤的关系研究[J]. *中医正骨*, 2020, 32(9): 9 – 11.
- [18] 徐传毅, 樊粤光, 宁显明. 肾虚血瘀与膝骨性关节炎关系初探[J]. *新中医*, 2002, 34(3): 7 – 9.
- [19] 康俊峰, 邢士新, 贺金亮, 等. 二仙汤加加减配合小针刀治疗阳虚血瘀型膝骨性关节炎疗效观察[J]. *亚太传统医药*, 2021, 17(7): 70 – 73.
- (收稿日期: 2022-09-04 本文编辑: 吕宁)
- (上接第 17 页)
- [18] DI D S, LI C, DAI Y, et al. Integrative analysis of LGR5/6 gene variants, gut microbiota composition and osteoporosis risk in elderly population[J]. *Front Microbiol*, 2021, 12: 765008.
- [19] ZHANG Y W, CAO M M, LI Y J, et al. The preventive effects of probiotic *Prevotella histicola* on the bone loss of mice with ovariectomy-mediated osteoporosis[J]. *Microorganisms*, 2023, 11(4): 950.
- [20] OBI Y, MIKAMI S, HAMANO T, et al. Intravenous vitamin B6 increases resistance to erythropoiesis-stimulating agents in hemodialysis patients: a randomized controlled trial[J]. *J Ren Nutr*, 2016, 26(6): 380 – 390.
- [21] YOUNG R C, BLASS J P. Iatrogenic nutritional deficiencies[J]. *Annu Rev Nutr*, 1982, 2: 201 – 227.
- [22] DARLING A L, MILLWARD D J, LANHAM-NEW S A. Dietary protein and bone health: towards a synthesised view[J]. *Proc Nutr Soc*, 2021, 80(2): 165 – 172.
- [23] ANDREEV D, LIU M, WEIDNER D, et al. Osteocyte necrosis triggers osteoclast-mediated bone loss through macrophage-inducible C-type lectin[J]. *J Clin Invest*, 2020, 130(9): 4811 – 4830.
- (收稿日期: 2022-11-04 本文编辑: 李晓乐)