

· 基础研究 ·

# 基于代谢组学技术探讨肾阳方 治疗骨质疏松症肾阳虚证的作用机制

黄晨, 施杞, 王拥军, 唐德志

(上海中医药大学附属龙华医院, 上海 200032)

**摘要** 目的:探讨肾阳方治疗骨质疏松症(osteoporosis, OP)肾阳虚证的作用机制。方法:将 30 只 2 月龄雌性 SD 大鼠随机分为 3 组,每组 10 只。对照组大鼠从双侧卵巢附近切除少量脂肪组织,模型组和肾阳方组大鼠摘除双侧卵巢,造模手术 1 个月后模型组和肾阳方组大鼠皮下注射氢化可的松注射液进行肾阳虚证造模。造模结束后,肾阳方组以肾阳方药液灌胃,其余 2 组均以等量生理盐水灌胃,连续干预 60 d。药物干预结束后,观察各组大鼠一般情况,采用 ELISA 法进行血清指标检测,以 Micro-CT 检测大鼠 L<sub>4</sub> 骨密度及骨组织微结构,采用超高效液相色谱-质谱法进行血清代谢组学分析。结果:①一般情况观察结果。模型组大鼠出现肾阳虚证表现,肾阳方组大鼠肾阳虚证表现较模型组明显改善。②血清指标检测结果。3 组大鼠雌二醇(estradiol, E2)血清含量、环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP)血清含量、cAMP/环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP)、骨钙素(osteocalcin, OCN)血清含量、I 型胶原 C 末端肽(C-telopeptide of type I collagen, CTX-I)血清含量比较,组间差异均有统计学意义[E2: (99.74 ± 9.53) ng · L<sup>-1</sup>, (42.84 ± 10.84) ng · L<sup>-1</sup>, (60.53 ± 13.03) ng · L<sup>-1</sup>,  $F = 48.850$ ,  $P = 0.000$ ; cAMP: (206.00 ± 13.30) nmol · L<sup>-1</sup>, (184.70 ± 13.01) nmol · L<sup>-1</sup>, (198.80 ± 10.64) nmol · L<sup>-1</sup>,  $F = 7.182$ ,  $P = 0.003$ ; cAMP/cGMP: 3.98 ± 0.34, 3.11 ± 0.48, 3.58 ± 0.35,  $F = 10.374$ ,  $P = 0.001$ ; OCN: (4.62 ± 1.04) ng · L<sup>-1</sup>, (2.36 ± 0.87) ng · L<sup>-1</sup>, (4.24 ± 1.63) ng · L<sup>-1</sup>,  $F = 6.366$ ,  $P = 0.007$ ; CTX-I: (756.16 ± 74.82) ng · L<sup>-1</sup>, (949.36 ± 86.23) ng · L<sup>-1</sup>, (856.69 ± 55.44) ng · L<sup>-1</sup>,  $F = 13.776$ ,  $P = 0.000$ ]; 3 组大鼠 cGMP 血清含量的差异无统计学意义[(52.28 ± 7.69) nmol · L<sup>-1</sup>, (61.39 ± 14.26) nmol · L<sup>-1</sup>, (56.15 ± 8.06) nmol · L<sup>-1</sup>,  $F = 1.572$ ,  $P = 0.228$ ]。对照组和肾阳方组大鼠的 E2 血清含量、cAMP 血清含量、cAMP/cGMP、OCN 血清含量均高于模型组[E2:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.002$ ; cAMP:  $P = 0.001$ ,  $P = 0.014$ ; cAMP/cGMP:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.012$ ; OCN:  $P = 0.004$ ,  $P = 0.008$ ], CTX-I 血清含量均低于模型组( $P = 0.000$ ,  $P = 0.013$ )。③骨密度和骨组织微结构检测结果。3 组大鼠骨密度、骨体积分数、骨小梁数目、骨小梁厚度、骨小梁分离度比较,组间差异均有统计学意义[骨密度: (385.630 ± 46.664) mg · cm<sup>-3</sup>, (246.648 ± 21.253) mg · cm<sup>-3</sup>, (283.183 ± 24.332) mg · cm<sup>-3</sup>,  $F = 47.533$ ,  $P = 0.000$ ; 骨体积分数: (0.441 ± 0.055)%, (0.286 ± 0.022)%, (0.325 ± 0.027)%,  $F = 45.608$ ,  $P = 0.000$ ; 骨小梁数目: (4.525 ± 0.497) 个 · mm<sup>-1</sup>, (3.206 ± 0.289) 个 · mm<sup>-1</sup>, (3.536 ± 0.232) 个 · mm<sup>-1</sup>,  $F = 35.684$ ,  $P = 0.000$ ; 骨小梁厚度: (0.094 ± 0.005) mm, (0.086 ± 0.007) mm, (0.090 ± 0.005) mm,  $F = 4.596$ ,  $P = 0.019$ ; 骨小梁分离度: (0.199 ± 0.028) mm, (0.300 ± 0.039) mm, (0.262 ± 0.021) mm,  $F = 23.218$ ,  $P = 0.000$ ]。对照组和肾阳方组的骨密度、骨体积分数、骨小梁数目均高于模型组(骨密度:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.007$ ; 骨体积分数:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.012$ ; 骨小梁数目:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.023$ ), 骨小梁分离度均低于模型组( $P = 0.000$ ,  $P = 0.006$ ); 对照组的骨小梁厚度大于模型组( $P = 0.006$ ), 肾阳方组和模型组骨小梁厚度的差异无统计学意义( $P = 0.068$ )。④血清代谢组学分析结果。对照组和模型组、肾阳方组和模型组的代谢物均能明显分离。模型组较对照组有 21 个代谢物上调、7 个代谢物下调, 肾阳方组较模型组有 89 个代谢物上调、9 个代谢物下调。这些差异代谢物中 13 个为氨基酸或与氨基酸有关, 93 个为胆固醇酯、鞘磷脂、甘油二酯、甘油三酯等脂质代谢物。模型组较对照组 CE(15:0) 浓度上升、TG(16:0\_37:3) 浓度下降, 肾阳方组较模型组 CE(15:0) 浓度下降、TG(16:0\_37:3) 浓度上升。KEGG 通路富集分析结果显示, 对照组和模型组差异代谢物的信号通路有氨酰 tRNA 生物合成、谷胱甘肽代谢、氨基乙酸-丝氨酸-苏氨酸代谢、苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸生物合成、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸生物合成、泛醌和其它萜类-醌生物合成、苯丙氨酸代谢、组氨酸代谢、β-丙氨酸代谢、卟啉和叶绿素代谢、二羧酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、酪氨酸代谢、初级胆汁酸生物合成, 肾阳方组和模型组差异代谢物的信号通路有氨酰 tRNA 生物合成、生物素代谢、精氨酸生物合成、硒代谢、赖氨酸降解、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢。结论:OP 肾阳虚证的发生可能与氨基酸、脂质代谢紊乱有关, 肾阳方治疗可以纠正部分氨基酸、脂质代谢紊乱, 从而治疗 OP 肾阳虚证。

**关键词** 骨质疏松; 肾阳虚; 代谢组学

基金项目:国家重点研发计划项目(2018YFC1704300); 国家中医药传承创新团队项目(ZYYCXTD-C-202202)

通讯作者:唐德志 E-mail: dztang702@126.com

## A study of mechanism of Shenyang Fang( 肾阳方) in treatment of osteoporosis with syndrome of kidney-yang deficiency based on metabonomics technology

HUANG Chen, SHI Qi, WANG Yongjun, TANG Dezhi

Longhua Hospital Shanghai University of Traditional Chinese Medicine, Shanghai 200032, China

**ABSTRACT Objective:** To explore the mechanism of Shenyang Fang( 肾阳方, SYF) in treatment of osteoporosis(OP) with kidney-yang deficiency syndrome(KYDS). **Methods:** Thirty 2-month-old female Sprague-Dawley(SD) rats were randomly assigned into control group, model group and SYF group, 10 cases in each group. The rats in control group were subjected to removal of a small amount adipose tissues near the ovaries, with ovaries retained; while the ones in model group and SYF group underwent bilateral ovariectomy for inducing OP, followed by subcutaneous injection of hydrocortisone injection at 1 month after the modeling surgery for inducing KYDS. After the end of modeling, the mice in SYF group were intragastric administrated with SYF solution, while the ones in control group and model group with the same dose of normal saline. All mice in the 3 groups were intragastric administrated for consecutive 60 days. After the end of drug intervention, the general condition of the rats was observed, the serum indicators were detected by using ELISA method, and the bone mineral density(BMD) and bone microstructure of L<sub>4</sub> lumbar vertebra were evaluated by using Micro-CT. Furthermore, the serum metabolomic analysis was performed by using ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry(UHPLC-MS). **Results:** ①The KYDS was found in rats of model group, and it was significantly improved in rats of SYF group in contrast to that of model group. ②There was statistical difference in cAMP/cGMP and serum levels of estradiol(E<sub>2</sub>), cAMP, osteocalcin(OCN) and CTX-I among the 3 groups(cAMP/cGMP:  $3.98 \pm 0.34$ ,  $3.11 \pm 0.48$ ,  $3.58 \pm 0.35$ ,  $F = 10.374$ ,  $P = 0.001$ ; E<sub>2</sub>:  $99.74 \pm 9.53$ ,  $42.84 \pm 10.84$ ,  $60.53 \pm 13.03$  ng/L,  $F = 48.850$ ,  $P = 0.000$ ; cAMP:  $206.00 \pm 13.30$ ,  $184.70 \pm 13.01$ ,  $198.80 \pm 10.64$  nmol/L,  $F = 7.182$ ,  $P = 0.003$ ; OCN:  $4.62 \pm 1.04$ ,  $2.36 \pm 0.87$ ,  $4.24 \pm 1.63$  ng/L,  $F = 6.366$ ,  $P = 0.007$ ; CTX-I:  $756.16 \pm 74.82$ ,  $949.36 \pm 86.23$ ,  $856.69 \pm 55.44$  ng/L,  $F = 13.776$ ,  $P = 0.000$ ); while there was no statistical difference in the serum level of cGMP among the 3 groups( $52.28 \pm 7.69$ ,  $61.39 \pm 14.26$ ,  $56.15 \pm 8.06$  nmol/L,  $F = 1.572$ ,  $P = 0.228$ ). The cAMP/cGMP and serum levels of E<sub>2</sub>, cAMP and OCN were higher, while the serum level of CTX-I was lower in control group and SYF group compared to model group(cAMP/cGMP:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.012$ ; E<sub>2</sub>:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.002$ ; cAMP:  $P = 0.001$ ,  $P = 0.014$ ; OCN:  $P = 0.004$ ,  $P = 0.008$ ; CTX-I:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.013$ ). ③The differences in BMD, bone volume fraction(BVF), trabecular number(Tb.N), trabecular thickness(Tb.Th) and trabecular separation(Tb.Sp) were statistically significant among the 3 groups(BMD:  $385.630 \pm 46.664$ ,  $246.648 \pm 21.253$ ,  $283.183 \pm 24.332$  mg/cm<sup>3</sup>,  $F = 47.533$ ,  $P = 0.000$ ; BVF:  $0.441 \pm 0.055$ ,  $0.286 \pm 0.022$ ,  $0.325 \pm 0.027$  %,  $F = 45.608$ ,  $P = 0.000$ ; Tb.N:  $4.525 \pm 0.497$ ,  $3.206 \pm 0.289$ ,  $3.536 \pm 0.232$  trabeculae/mm,  $F = 35.684$ ,  $P = 0.000$ ; Tb.Th:  $0.094 \pm 0.005$ ,  $0.086 \pm 0.007$ ,  $0.090 \pm 0.005$  mm,  $F = 4.596$ ,  $P = 0.019$ ; Tb.Sp:  $0.199 \pm 0.028$ ,  $0.300 \pm 0.039$ ,  $0.262 \pm 0.021$  mm,  $F = 23.218$ ,  $P = 0.000$ ). The control group and SYF group had higher BMD, BVF and Tb.N, but lower Tb.Sp compared to model group(BMD:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.007$ ; BVF:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.012$ ; Tb.N:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.023$ ; Tb.Sp:  $P = 0.000$ ,  $P = 0.006$ ). The Tb.Th was greater in control group compared to model group, while there was no statistical difference between SYF group and model group( $P = 0.006$ ;  $P = 0.068$ ). ④The metabolites could be distinctly separated between control group and model group as well as between SYF group and model group. Twenty-one metabolites were up-regulated and 7 ones were down-regulated in model group compared with that of control group; while 89 metabolites were up-regulated and 9 ones were down-regulated in SYF group compared with that of model group. Among these differential metabolites, 13 ones were amino acids or related to amino acids, and 93 ones were lipid metabolites, including cholesterol esters, sphingomyelin, diglycerides and triglycerides. The concentration of CE(15:0) increased, and TG(16:0\_37:3) decreased in model group compared to control group; while the concentration of CE(15:0) decreased, and TG(16:0\_37:3) increased in SYF group compared with that of model group. The results of KEGG signaling pathway enrichment analysis indicated that the signaling pathways of differential metabolites between control group and model group included aminoacyl-tRNA biosynthesis, glutathione metabolism, glycine-serine-threonine metabolism, phenylalanine-tyrosine-tryptophan biosynthesis, valine-leucine-isoleucine biosynthesis, ubiquinone and other terpenoid-quinone biosynthesis, phenylalanine metabolism, histidine metabolism,  $\beta$ -alanine metabolism, porphyrin and chlorophyll metabolism, dicarboxylic acid metabolism, arginine and proline metabolism, tyrosine metabolism and primary bile acid biosynthesis; the signaling pathways of differential metabolites between SYF group and model group included aminoacyl-tRNA biosynthesis, biotin metabolism, arginine biosynthesis, selenium metabolism, lysine degradation, alanine-aspartate-glutamate metabolism, and cysteine and methionine metabolism. **Conclusion:** The occurrence of OP with KYDS may be related to the disorder of amino acid and lipid metabolism. SYF can correct some of these metabolism disorders so as to treat KYDS of OP.

**Keywords** osteoporosis; syndrome of deficiency of kidney yang; metabonomics

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种常见的代谢性骨病,其特征为骨量减少和骨组织微结构损坏,导致脆性增加、易于发生骨折<sup>[1-2]</sup>。随着人口老龄化问题日益严重,OP 已成为我国 50 岁以上人群的重要健康问题<sup>[3-4]</sup>。国医大师施杞教授以肾阳方为基础方治疗 OP 肾阳虚证,临床疗效较为理想,但其作用机制尚不明确。代谢组学是对细胞内源性和外源性代谢产物进行定量鉴定和定性分析,以揭示生物代谢产物的代谢途径与观察到的生理和/或病理变化之间的相对关系的方法,已被广泛应用于生物标志物检测、药物疗效监测和发病机制研究<sup>[5]</sup>。本研究采用代谢组学技术探讨了肾阳方治疗 OP 肾阳虚证的作用机制,现总结报告如下。

## 1 材料与仪器

**1.1 实验动物** 2 月龄雌性 SD 大鼠 30 只,体质量( $200 \pm 10$ ) g,实验动物合格证号:SCXK(京)2019-0010。大鼠在上海中医药大学动物房饲养,自由饮水、进食。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:PZSHUTCM210625007。

**1.2 药品及试剂** 肾阳方,药物组成包括肉苁蓉 12 g、淫羊藿 9 g、骨碎补 9 g,所有中药饮片均购自上海中医药大学附属龙华医院中药房。向中药饮片中加入饮片质量 12 倍量水,浸泡 30 min,煎煮 30 min 后趁热过滤,滤渣再加入 12 倍量水,煎煮 30 min 后趁热过滤,合并 2 次滤液,浓缩至  $1.03 \text{ g} \cdot \text{mL}^{-1}$ 。氢化可的松注射液(天津金耀药业有限公司),雌二醇(estradiol, E2) ELISA 试剂盒、环磷酸腺苷(cyclic adenosine monophosphate, cAMP) ELISA 试剂盒、环磷酸鸟苷(cyclic guanosine monophosphate, cGMP) ELISA 试剂盒、I 型胶原 C 末端肽(C-telopeptide of type I collagen, CTX-I) ELISA 试剂盒、骨钙素(osteocalcin, OCN) ELISA 试剂盒(南京建成生物工程研究所),MxP<sup>®</sup> Quant 500 靶向代谢组学试剂盒(Biocrates 公司)。

**1.3 实验仪器** vivaCT80 Micro-CT(Scanco 公司),紫外分光光度计(Beckman Coulter 公司),QTRAP 6500+液相质谱联用仪(SCIEX 公司)。

## 2 方法

**2.1 动物分组** 将 30 只大鼠称重后按体质量排序编号,从随机数字表中选取 30 个连续 2 位数记录在大鼠编号下方,再将 30 个随机数字从小到大排序,随机数字排序 1~10 对应的大鼠纳入对照组、11~20 对

应的大鼠纳入模型组、21~30 对应的大鼠纳入为肾阳方组。

**2.2 造模及干预** 禁食不禁水 12 h 后,采用 3% 戊巴比妥钠按  $1 \text{ mL} \cdot \text{kg}^{-1}$  腹腔注射麻醉,对照组大鼠从双侧卵巢附近切除少量脂肪组织,其余 2 组大鼠按照文献[6]中的方法摘除双侧卵巢。造模手术 1 个月后,模型组和肾阳方组大鼠按照  $20 \text{ mg} \cdot \text{kg}^{-1}$  皮下注射氢化可的松注射液( $5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ )进行肾阳虚证造模,每天 1 次,连续注射 14 d<sup>[7-9]</sup>。造模结束后,肾阳方组按生药  $5.14 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1} \cdot \text{d}^{-1}$  以肾阳方药液灌胃,其余 2 组均以等量生理盐水灌胃,连续干预 60 d。

## 2.3 实验指标检测

**2.3.1 一般情况观察** 药物干预结束后,观察各组大鼠外观、精神状况及活动情况。

**2.3.2 血清指标检测** 观察结束后腹腔注射戊巴比妥钠麻醉大鼠,先经腹主动脉取血,再脱颈处死大鼠。分离血清,取部分血清采用 ELISA 法检测 E2、cAMP、cGMP、OCN、CTX-I 含量,具体操作按照试剂盒说明书进行。

**2.3.3 骨密度及骨组织微结构检测** 采用 vivaCT80 Micro-CT 对所有大鼠的 L<sub>4</sub> 进行三维扫描,获得重建图像后进行定量分析,获取骨密度、骨体积分数、骨小梁数目、骨小梁厚度、骨小梁分离度。

**2.3.4 血清代谢组学分析** 采用超高效液相色谱-质谱法对各组大鼠的血清进行代谢组学分析。平台为 QTRAP 6500+液相质谱联用仪,试剂盒选用 MxP<sup>®</sup> Quant 500 靶向代谢组学试剂盒。使用 SCIEX Analyst 软件对代谢组学数据进行量化,并将数据导入 MetIDQ 软件一步处理。数据归一化、标准化处理后进行偏最小二乘判别分析(partial least squares discriminant analysis, PLS-DA),根据差异倍数绘制火山图,结合 PLS-DA 模型变量重要性投影 $\geq 1$ 、差异倍数 $\geq 1.2$ 或 $\leq 0.833$ 、 $P < 0.05$ ( $t$  检验)筛选差异代谢物,并对其进行 KEGG 通路富集分析。

**2.4 数据统计** 采用 SPSS25.0 软件进行数据统计分析。3 组大鼠 E2 血清含量、cAMP 血清含量、cGMP 血清含量、cAMP/cGMP、OCN 血清含量、CTX-I 血清含量、骨密度、骨体积分数、骨小梁数目、骨小梁厚度、骨小梁分离度的组间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 一般情况观察结果** 与对照组相比,模型组大鼠出现脚趾和耳朵颜色变淡、泛白,体毛颜色暗淡、发黄、枯萎、粗糙,精神萎靡,活动减少,抓取抵抗性降低,喜扎堆等肾阳虚证表现;肾阳方组大鼠上述表现较模型组明显改善(图 1)。

**3.2 血清指标检测结果** 3 组大鼠 E2 血清含量、cAMP 血清含量、cAMP/cGMP、OCN 血清含量、CTX-I 血清含量比较,组间差异均有统计学意义;3 组大鼠 cGMP 血清含量的差异无统计学意义。对照组和肾阳方大鼠的 E2 血清含量、cAMP 血清含量、cAMP/cGMP、OCN 血清含量均高于模型组( $P=0.000$ ,  $P=0.002$ ;  $P=0.001$ ,  $P=0.014$ ;  $P=0.000$ ,  $P=0.012$ ;  $P=0.004$ ,  $P=0.008$ ), CTX-I 血清含量均低于模型组( $P=0.000$ ,  $P=0.013$ )。见表 1。

**3.3 骨密度和骨组织微结构检测结果** 3 组大鼠骨密度、骨体积分数、骨小梁数目、骨小梁厚度、骨小梁分离度比较,组间差异均有统计学意义。对照组和肾阳方组的骨密度、骨体积分数、骨小梁数目均高于模型组(骨密度: $P=0.000$ ,  $P=0.007$ ;骨体积分数: $P=0.000$ ,  $P=0.012$ ;骨小梁数目: $P=0.000$ ,  $P=0.023$ ),骨小梁分离度均低于模型组( $P=0.000$ ,  $P=0.006$ );对照组的骨小梁厚度大于模型组( $P=0.006$ ),肾阳方组和模型组骨小梁厚度的差异无统计学意义( $P=0.068$ )。见图 2、表 2。

### 3.4 血清代谢组学分析结果

**3.4.1 PLS-DA 结果** 对照组和模型组、肾阳方组和模型组的代谢物均能明显分离,表明 OP 肾阳虚证大鼠的血清代谢物轮廓发生了改变,肾阳方治疗能够改变这种代谢物的轮廓(图 3)。

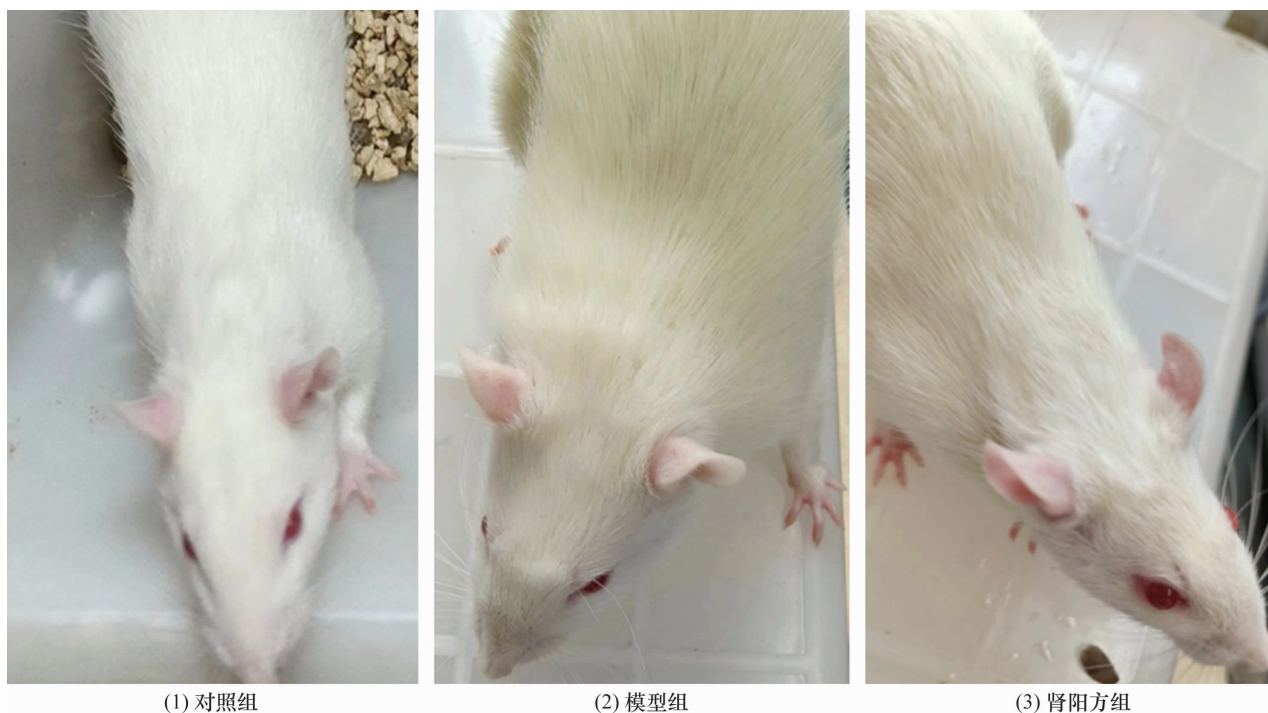


图 1 3 组大鼠药物干预结束后外观图

表 1 3 组大鼠血清指标检测结果

组别	样本量/ 只	E2 <sup>1)</sup> / ( $\bar{x} \pm s$ , ng · L <sup>-1</sup> )	cAMP <sup>2)</sup> / ( $\bar{x} \pm s$ , nmol · L <sup>-1</sup> )	cGMP <sup>3)</sup> / ( $\bar{x} \pm s$ , nmol · L <sup>-1</sup> )	cAMP <sup>2)</sup> /cGMP <sup>3)</sup> ( $\bar{x} \pm s$ )	OCN <sup>4)</sup> / ( $\bar{x} \pm s$ , ng · L <sup>-1</sup> )	CTX-I <sup>5)</sup> / ( $\bar{x} \pm s$ , ng · L <sup>-1</sup> )
对照组	10	99.74 ± 9.53	206.00 ± 13.30	52.28 ± 7.69	3.98 ± 0.34	4.62 ± 1.04	756.16 ± 74.82
模型组	10	42.84 ± 10.84	184.70 ± 13.01	61.39 ± 14.26	3.11 ± 0.48	2.36 ± 0.87	949.36 ± 86.23
肾阳方组	10	60.53 ± 13.03	198.80 ± 10.64	56.15 ± 8.06	3.58 ± 0.35	4.24 ± 1.63	856.69 ± 55.44
F 值		48.850	7.182	1.572	10.374	6.366	13.776
P 值		0.000	0.003	0.228	0.001	0.007	0.000

注:1) E2 为雌二醇;2) cAMP 为环磷酸腺苷;3) cGMP 为环磷酸鸟苷;4) OCN 为骨钙素;5) CTX-I 为 I 型胶原 C 末端肽。



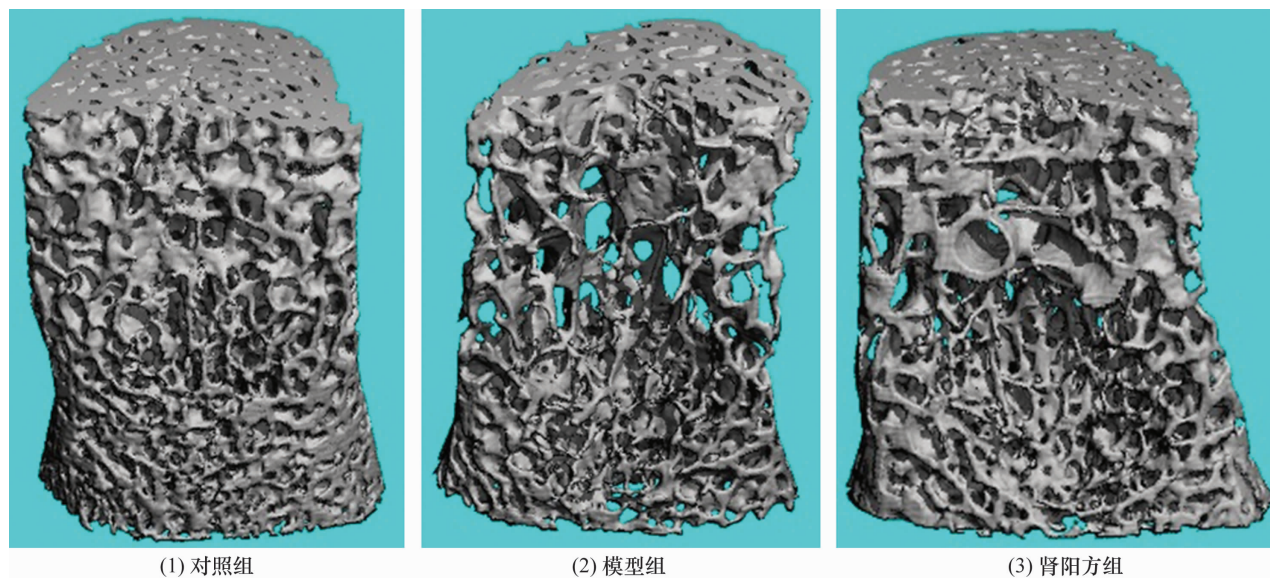
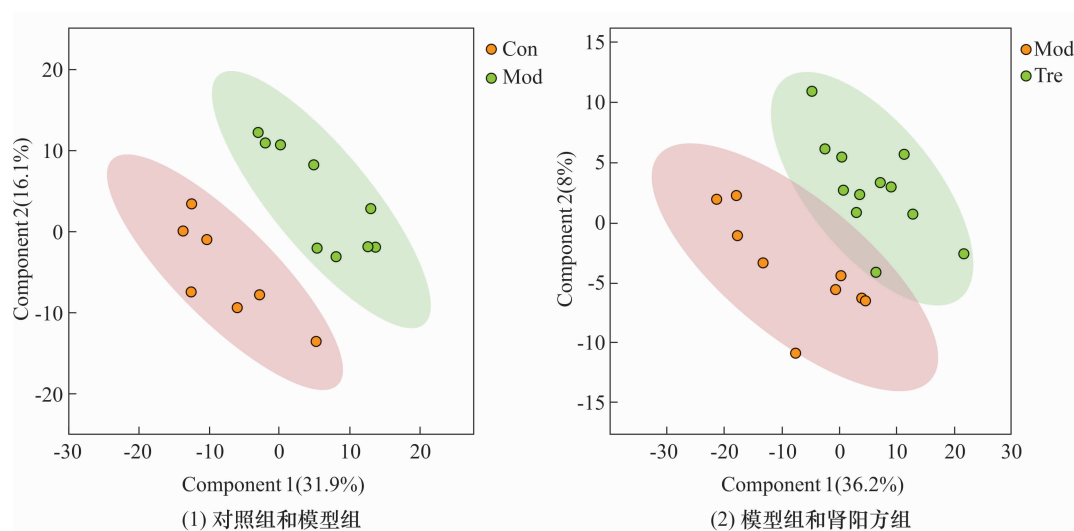


图 2 3 组大鼠 L<sub>4</sub> Micro-CT 三维扫描图

表 2 3 组大鼠骨密度和骨微结构检测结果

组别	样本量/ 只	骨密度/ ( $\bar{x} \pm s, \text{mg} \cdot \text{cm}^{-3}$ )	骨体积分数/ ( $\bar{x} \pm s, \%$ )	骨小梁数目/ ( $\bar{x} \pm s, \text{个} \cdot \text{mm}^{-1}$ )	骨小梁厚度/ ( $\bar{x} \pm s, \text{mm}$ )	骨小梁分离度/ ( $\bar{x} \pm s, \text{mm}$ )
对照组	10	385.630 ± 46.664	0.441 ± 0.055	4.525 ± 0.497	0.094 ± 0.005	0.199 ± 0.028
模型组	10	246.648 ± 21.253	0.286 ± 0.022	3.206 ± 0.289	0.086 ± 0.007	0.300 ± 0.039
肾阳方组	10	283.183 ± 24.332	0.325 ± 0.027	3.536 ± 0.232	0.090 ± 0.005	0.262 ± 0.021
F 值		47.533	45.608	35.684	4.596	23.218
P 值		0.000	0.000	0.000	0.019	0.000



Con 为对照组, Mod 为模型组, Tre 为肾阳方组;横坐标 Component 1、纵坐标 Component 2 分别表示第一主成分、第二主成分。

图 3 3 组大鼠血清代谢物偏最小二乘判别分析二维得分图

**3.4.2 差异代谢物筛选结果** 模型组较对照组有 21 个代谢物上调、7 个代谢物下调,肾阳方组较模型组有 89 个代谢物上调、9 个代谢物下调(图 4)。这些差异代谢物中 13 个为氨基酸或与氨基酸有关,93 个为胆固醇酯、鞘磷脂、甘油二酯、甘油三酯等脂质代谢物。模型组较对照组 CE(15:0)浓度上升、TG(16:0\_

37:3)浓度下降,肾阳方组较模型组 CE(15:0)浓度下降、TG(16:0\_37:3)浓度上升。

**3.4.3 差异代谢物通路分析结果** KEGG 通路富集分析结果显示,对照组和模型组差异代谢物的信号通路有氨酰 tRNA 生物合成、谷胱甘肽代谢、氨基酸-丝氨酸-苏氨酸代谢、苯丙氨酸-酪氨酸-色氨酸生物

合成、缬氨酸-亮氨酸-异亮氨酸生物合成、泛醌和其它萜类-醌生物合成、苯丙氨酸代谢、组氨酸代谢、 $\beta$ -丙氨酸代谢、卟啉和叶绿素代谢、二羧酸代谢、精氨酸和脯氨酸代谢、酪氨酸代谢、初级胆汁酸生物合成, 肾阳方组和模型组差异代谢物的信号通路有氨酰 tRNA 生物合成、生物素代谢、精氨酸生物合成、硒代谢、赖氨酸降解、丙氨酸-天冬氨酸-谷氨酸代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢(图 5)。

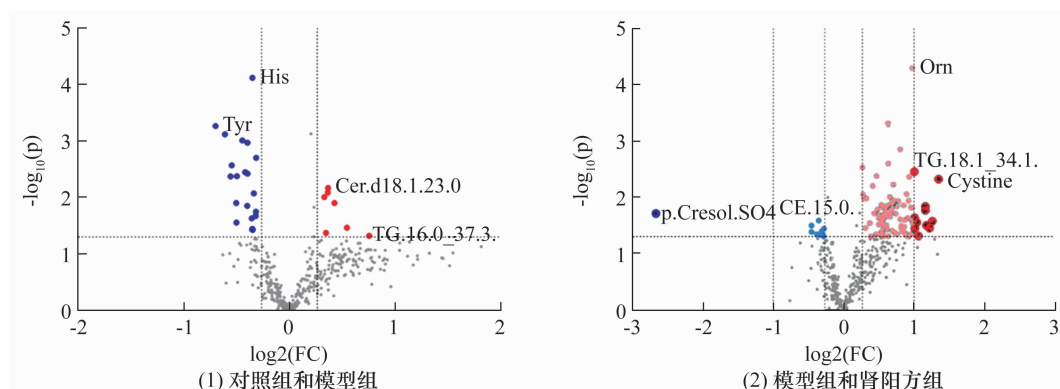
#### 4 讨论

cAMP、cGMP 血清含量及其比值被认为是诊断肾虚证的客观指标, 大部分肾虚证患者 cAMP/cGMP 比值均会明显降低<sup>[10-11]</sup>。本研究通过去卵巢结合皮下注射氢化可的松建立 OP 肾虚证模型。大鼠一般情况、血清指标及骨密度及骨组织微结构检测结果的变化提示, 本研究中 OP 肾虚证模型造模成功。

目前针对 OP 肾虚证的代谢组学研究较少, 而且结果不尽相同。郭胜男等<sup>[12]</sup>筛选出的原发性 OP 肾虚证患者血清特征性代谢物共 221 个, 包括  $\gamma$ -氨基丁酸、L-异亮氨酸、谷氨酸等, 这些差异代谢物参与

的信号通路有色氨酸代谢、谷胱甘肽代谢、精氨酸和脯氨酸代谢等。朱庭辰<sup>[13]</sup>的研究发现, 与原发性 OP 肾虚证有关的 2 个代谢标志物为 L-苯丙氨酸和 s-乳糖谷胱甘肽。本研究结果显示, 模型组较对照组有 21 个代谢物上调、7 个代谢物下调, 肾阳方组较模型组有 89 个代谢物上调、9 个代谢物下调。这些差异代谢物中 13 个为氨基酸或与氨基酸有关, 93 个为脂质代谢物。

本研究结果显示, 氨酰 tRNA 生物合成通路为模型组与对照组, 模型组与肾阳方组差异代谢物富集的共同代谢通路。氨基酸需要被氨酰 tRNA 合成酶催化, 并与其对应的 tRNA 结合形成氨酰 tRNA 才能参与到蛋白质合成过程中<sup>[14]</sup>。因此, 我们认为 OP 肾虚证模型大鼠体内氨基酸合成发生变化可能会影响蛋白质合成, 从而对骨健康产生负面影响。谷胱甘肽代谢和精氨酸生物合成分别是对照组与模型组、肾阳方组与模型组代谢差异物富集到的差异最明显且与骨代谢有关的通路。谷胱甘肽是一种由半胱氨酸、甘氨酸、谷氨酸组成的小分子肽, 具有抗氧化作用和整



每个圆点代表 1 个代谢物, 灰色表示差异无统计学意义, 蓝色表示下调, 红色表示上调, 颜色越深表示差异越显著。

图 4 3 组大鼠差异代谢物筛选火山图

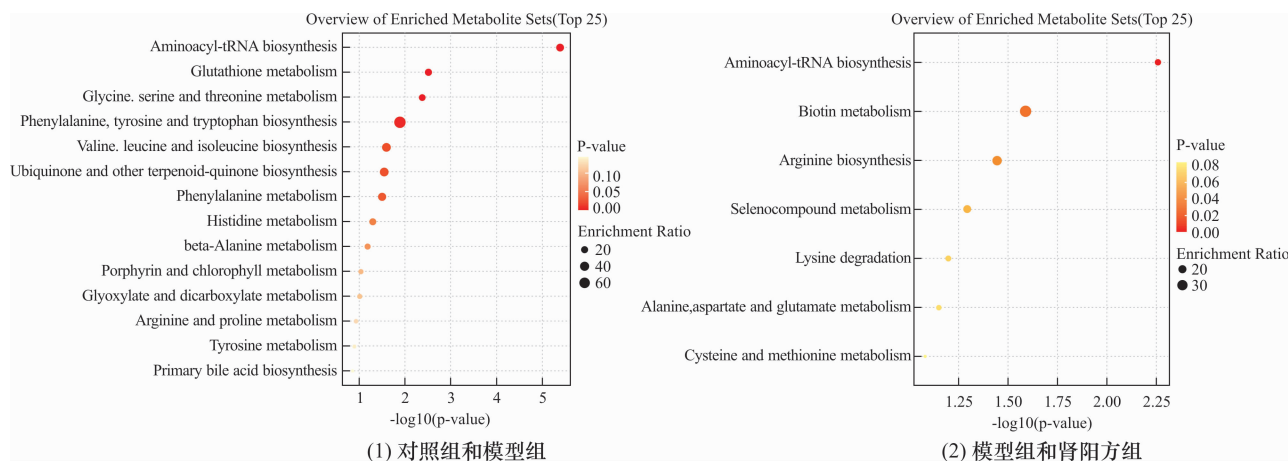


图 5 3 组大鼠差异代谢物 KEGG 代谢通路富集结果图

合解毒作用。谷胱甘肽有还原型和氧化型 2 种形式,生理条件下机体内存在的谷胱甘肽以还原型为主。研究表明,还原型谷胱甘肽可以促进高糖环境下成骨细胞的增殖、分化<sup>[15-16]</sup>。代志鹏<sup>[17]</sup>的研究表明,谷胱甘肽可以通过降低细胞内活性氧的水平抑制人骨髓间充质干细胞成脂分化,增强成骨分化。Jiang 等<sup>[18]</sup>的研究表明,口服精氨酸可以促进大鼠长骨的线性生长,认为这可能与精氨酸调控神经型一氧化氮合酶—一氧化氮合酶(nitric oxide synthase, NOS)—鸟苷酸环化酶-cGMP 通路,使下丘脑生长抑素基因表达下调、垂体生长激素基因表达上调、垂体生长激素分泌增多有关。张世旭等<sup>[19]</sup>的研究显示,腹腔注射左旋精氨酸能提高骨质疏松性骨折大鼠血清 NO 及 NOS 浓度,提高骨质疏松性骨折大鼠的骨痂骨密度和腰椎骨密度。镐英杰等<sup>[20]</sup>的研究表明,左旋精氨酸能上调成骨细胞中护骨素蛋白的表达,认为这可能是通过激活内皮型 NOS 和诱生型 NOS 实现的。

以往的研究发现,甘油三酯葡萄糖指数是 OP 的独立影响因素,可作为鉴别 OP 的客观指标<sup>[21]</sup>;不饱和脂肪酸对防治 OP 有积极作用<sup>[22]</sup>;富含不饱和脂肪酸的罗非鱼鱼头脂质可以通过调整肠道菌群、下调 5-羟色胺表达等方式延缓 OP 病情进展<sup>[23]</sup>;骨髓微环境中的脂肪酸可以触发多种信号通路,直接或间接对 OP 产生有益或者有害的影响<sup>[24]</sup>。这些研究表明,脂质代谢与骨代谢有关。

本研究的结果提示,OP 肾阳虚证的发生可能与氨基酸、脂质代谢紊乱有关,肾阳方治疗可以纠正部分氨基酸、脂质代谢紊乱,从而治疗 OP 肾阳虚证。本研究筛选出的与 OP 肾阳虚证有关的生物标志物中,大量脂质分子的作用目前尚不清楚,也无法匹配信号通路,因此脂质代谢与 OP 肾阳虚证的关系还有待进一步研究。

## 参考文献

- [1] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2017, 10(5): 413-444.
- [2] 游利. 骨质疏松症的症状、筛查和预防[J]. 中国全科医学, 2016, 19(14): 1616-1619.
- [3] 中华人民共和国国家统计局. 中国统计年鉴 2021[M]. 北京: 中国统计出版社, 2021: 54.
- [4] MESSINGER-RAPPORT B J, THACKER H L. Prevention for the older woman. A practical guide to prevention and treat-

- ment of osteoporosis[J]. Geriatrics, 2002, 57(4): 16-18.
- [5] 梅润宏. 基于脂质代谢组学技术探讨中药骨蚀灵胶囊干预激素性股骨头坏死的作用机制[D]. 南昌: 南昌大学, 2022.
- [6] 韩艳, 温利平, 刘娜, 等. 补肾活血方对去卵巢大鼠骨代谢及骨密度的影响[J]. 中医正骨, 2015, 27(12): 7-11.
- [7] 李媛, 许红涛, 李华强, 等. 肾阳虚骨质疏松大鼠动物模型的建立[J]. 药物评价研究, 2015, 38(2): 135-139.
- [8] 陈剑磨, 张胜军, 夏炳江. 骨质疏松肾阳虚病证结合模型构建的实验研究[J]. 中国中医急症, 2015, 24(2): 201-203.
- [9] 招文华, 任辉, 沈耿杨, 等. 骨质疏松症肾阳虚病证结合模型的研究进展[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(1): 219-223.
- [10] 张海洋. 辛甘温阳法对肺阳虚反复感冒者 cGMP、cAMP/cGMP 相关性的验证性试验研究[D]. 长春: 长春中医药大学, 2011.
- [11] 张子怡, 陈宝军, 张英杰, 等. 肾阳虚、肾阴虚证大鼠模型的建立与稳定性观察[J]. 福建中医药, 2015, 46(1): 51-54.
- [12] 郭胜男, 戚晓楠, 姚啸生, 等. UP LC-MS/MS 对肾阳虚原发性骨质疏松临床代谢标志物筛查研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(10): 1410-1415.
- [13] 朱庭辰. 基于阴/阳虚证的原发性骨质疏松症临床代谢组学研究[D]. 南京: 南京中医药大学, 2020.
- [14] MOUTIEZ M, BELIN P, GONDRIY M. Aminoacyl-tRNA-Utilizing enzymes in natural product biosynthesis[J]. Chem Rev, 2017, 117(8): 5578-5618.
- [15] 张琳琳, 张静莹, 曲哲, 等. 还原型谷胱甘肽促进高糖成骨细胞的增殖和分化[J]. 中国组织工程研究, 2015, 19(7): 985-990.
- [16] 杨剑锋, 孙春汉. 成骨细胞增殖分化中还原型谷胱甘肽的作用研究[J]. 中国卫生工程学, 2017, 16(3): 401-402.
- [17] 代志鹏. 谷胱甘肽对激素性股骨头坏死骨髓间充质干细胞分化的影响[D]. 武汉: 华中科技大学, 2015.
- [18] JIANG M Y, CAI D P. Oral arginine improves linear growth of long bones and the neuroendocrine mechanism[J]. Neurosci Bull, 2011, 27(3): 156-162.
- [19] 张世旭, 路考生, 石昌浩, 等. 左旋精氨酸对骨质疏松骨折骨愈合及血生化的影响[J]. 中国组织工程研究, 2013, 17(28): 5120-5125.
- [20] 镐英杰, 王珍, 李秀群, 等. 左旋精氨酸对大鼠成骨细胞的影响[J]. 中华实验外科杂志, 2007, 24(9): 1148.

(下转第 29 页)

- [2] CHEN B, ZHANG C, ZHANG R P, et al. Acupotomy versus acupuncture for cervical spondylotic radiculopathy: protocol of a systematic review and meta-analysis [J/OL]. BMJ Open, 2019, 9 (8): e029052 [2022 - 11 - 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31399459/>.
- [3] 彭思萍, 赵红艳, 庄子齐. 三通平衡法针刺治疗气滞血瘀型神经根型颈椎病的临床研究[J]. 河北中医, 2022, 44(3): 456 - 459.
- [4] 张子璇. 调背振阳针刺治疗神经根型颈椎病的临床研究[D]. 合肥: 安徽中医药大学, 2022.
- [5] 朱琳琳, 蔡向红, 尹逊路, 等. 针刺青灵组穴治疗神经根型颈椎病疗效观察[J]. 中国中医基础医学杂志, 2018, 24(6): 813 - 814.
- [6] 谢睿哲, 张婷. 针刺治疗神经根型颈椎病时效性的临床研究[J]. 中国中医药科技, 2022, 29(2): 181 - 184.
- [7] 孟灵, 杨松, 钟青华, 等. 电针颈夹脊穴对神经根型颈椎病模型大鼠小胶质细胞、P38 丝裂原活化蛋白激酶和炎症因子表达的影响[J]. 针灸临床杂志, 2023, 39(1): 82 - 89.
- [8] 邓北强, 牟杨. 针刺治疗对神经根型颈椎病患者疼痛及细胞因子的影响研究[J]. 现代医药卫生, 2018, 34(16): 2526 - 2528.
- [9] 中国中医药学会, 湖南电子音像出版社, 嘉鸿科技开发有限公司. 中华医典[M/CD]. 长沙: 湖南电子音像出版社, 1998.
- [10] 王德深. 针灸穴名国际标准化手册[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1988.
- [11] 王德深. 中国针灸穴位通鉴[M]. 青岛: 青岛出版社, 1994.
- [12] 张梦琦. 基于 Apriori 算法的关联规则分析[D]. 大连: 大连理工大学, 2021.
- [13] 由佳鑫, 李丹, 王德龙, 等. 基于关联规则探索明清时期针灸治疗面瘫选穴规律研究[J]. 针灸临床杂志, 2022, 38(3): 45 - 49.
- [14] ZHANG D, LV J, ZHANG B, et al. The characteristics and regularities of cardiac adverse drug reactions induced by Chinese materia medica: a bibliometric research and association rules analysis[J/OL]. J Ethnopharmacol, 2020, 252: 112582 [2022 - 11 - 20]. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31972324/>.
- [15] 汤楠, 温伟伦, 梁天山, 等. 黄褐斑中医辨证分型及处方用药规律的文献研究[J]. 广州中医药大学学报, 2022, 39(5): 1201 - 1207.
- [16] 刘宾. 基于数据挖掘的小儿肺炎中医辨证分型研究[J]. 江西中医药大学学报, 2022, 34(2): 53 - 55.
- [17] 韩其琛, 孙忠人, 尹洪娜, 等. 基于数据挖掘分析针灸治疗中风后疲劳的选穴规律[J]. 中医药学报, 2022, 50(3): 48 - 53.
- [18] 谢睿哲, 张婷. 针刺治疗神经根型颈椎病时效性的临床研究[J]. 中国中医药科技, 2022, 29(2): 181 - 184.
- [19] 段生艳, 武水民, 赵云龙. 独活寄生汤加减治疗神经根型颈椎病[J]. 长春中医药大学学报, 2022, 38(1): 68 - 71.
- [20] 刘华, 夏铭蔚, 苏浩. 温针灸联合塞来昔布对神经根型颈椎病(风寒阻络证)的临床观察[J]. 中国中医急症, 2022, 31(2): 265 - 267.
- [21] 马幸福, 朱俊琛, 王超, 等. 后溪深刺联合红外线照射作辅助治疗神经根型颈椎病的疗效[J]. 颈腰痛杂志, 2019, 40(1): 82 - 83.
- [22] 卢璐, 傅俊媚, 冯福盈, 等. 小艾炷直接灸治疗慢性颈痛的量效关系研究[J]. 中国针灸, 2019, 39(7): 734 - 738.
- [23] 洪秋阳, 王世广, 邓越, 等. 牵引动气针法联合体法治疗神经根型颈椎病疗效观察[J]. 现代中西医结合杂志, 2018, 27(1): 49 - 52.
- [24] 叶毅君, 谢育修, 严天玮, 等. 滚针拔罐法与传统絮刺拔罐法治疗颈型颈椎病: 随机对照研究[J]. 中国针灸, 2020, 40(12): 1299 - 1303.
- [25] 覃业校. 八脉交会穴结合夹脊电针治疗神经根型颈椎病的临床疗效观察[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2016.
- [26] 崔光豪, 何春珂, 郭敏, 等. 基于“飞腾八法”针刺八脉交会穴治疗神经根型颈椎病的治疗体会[J]. 中国医药指南, 2017, 15(36): 185 - 186.
- [27] 杨倩, 张媛, 毕宇峰. 从阳论治颈椎病研究进展[J]. 陕西中医, 2020, 41(5): 690 - 692.

(收稿日期: 2022-11-21 本文编辑: 郭毅曼)

(上接第 7 页)

- [21] 雍家成, 朱菲, 陈昊, 等. 自然人群甘油三酯葡萄糖指数与骨质疏松关系的横断面研究[J]. 实用临床医药杂志, 2023, 27(6): 29 - 32.
- [22] YE M, ZHANG C, JIA W, et al. Metabolomics strategy reveals the osteogenic mechanism of yak (*Bos grunniens*) bone collagen peptides on ovariectomy-induced osteoporosis in rats[J]. Food Funct, 2020, 11(2): 1498 - 1512.
- [23] 朱玉杰. 罗非鱼鱼头脂质改善大鼠骨质疏松症的作用及其机制研究[D]. 海口: 海南大学, 2022.
- [24] 唐翠松, 汤光宇. 骨髓脂肪酸与骨质疏松相关性的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(3): 420 - 425.

(收稿日期: 2023-05-14 本文编辑: 李晓乐)