

续苓健骨方对骨质疏松模型大鼠肠道菌群结构和功能的影响

陈娟, 吴思团, 李生强, 谢丽华, 叶云金, 黄景文, 陈赛楠*, 葛继荣*

福建省中医药科学院, 福建省中西医结合防治骨质疏松重点实验室(福建省中医药科学院、福建中医药大学附属康复医院), 福建 福州

收稿日期: 2022年4月12日; 录用日期: 2022年5月20日; 发布日期: 2022年5月26日

摘要

目的: 研究续苓健骨方对去卵巢骨质疏松模型大鼠肠道菌群的组成及基因功能影响。方法: 建立去卵巢骨质疏松大鼠模型, 随机分为四组: 假手术组、模型组、续苓健骨方组、雌激素组, 每组6只。造模4周后, 药物干预12周取材, 双能X线骨密度仪小动物扫描模式检测大鼠胫骨骨密度, 宏基因组全基因组测序技术检测大鼠肠道菌群的组成、结构及功能。结果: 与假手术组相比, 模型组大鼠胫骨骨密度显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 续苓健骨方组和雌激素组骨密度明显提高($P < 0.01$); 对不同组别肠道菌群的物种组成及丰度情况进行分析, 在门、纲、目、科、属、种各个水平, 组间差异有统计学意义($P < 0.001$); LEfSe差异性分析结果显示, 厚壁菌门、杆菌纲、乳酸杆菌目等菌种是骨质疏松症模型组大鼠肠道内关键差异菌群; 与模型组比较, 古菌门、甲烷杆菌纲目科、甲烷球菌属种是续苓健骨方组关键差异菌群; 进一步对差异基因的KEGG功能注释结果统计并进行富集分析, 在KEGG第一层级水平, 各组大鼠肠道菌群基因注释到6大类生物代谢通路, 其中注释到第一位的为新陈代谢通路; 在KEGG第二层级水平, 注释到的主要代谢通路包括: 碳水化合物代谢、氨基酸代谢等, 富集到的通路中60%属于在KEGG一级水平中的新陈代谢通路; 对基因注释得到的功能丰度进行差异分析, 续苓健骨方组与骨质疏松症组肠道菌群基因功能注释结果差异具有统计学意义, 其中差异明显的代谢通路包括内分泌抵抗通路、ErbB信号通路、TGF- β 信号通路等。结论: 续苓健骨方在骨质疏松模型大鼠肠道菌群结构组成、多样性及生物代谢通路上具有调节作用, 平衡肠道微生态稳态是续苓健骨方实现防治骨质疏松症作用的靶点之一。

关键词

中医中药, 续苓健骨方, 骨质疏松, 肠道菌群, 宏基因组, 16S rRNA

Effects of Xuling Jiangu Recipe on the Composition of Intestinal Flora and Gene Function in Osteoporosis Model Rats

Juan Chen, Situan Wu, Shengqiang Li, Lihua Xie, Yunjing Ye, Jingwen Huang, Sainan Chen*, Jirong Ge*

*通讯作者。

文章引用: 陈娟, 吴思团, 李生强, 谢丽华, 叶云金, 黄景文, 陈赛楠, 葛继荣. 续苓健骨方对骨质疏松模型大鼠肠道菌群结构和功能的影响[J]. 中医学, 2022, 11(3): 468-477. DOI: 10.12677/tcm.2022.113067

Fujian Key Laboratory of Integrated Medicine for Prevention and Treatment of Osteoporosis (Fujian Academy of Chinese Medical Sciences, Rehabilitation Hospital Affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine), Fujian Academy of Chinese Medical Sciences, Fuzhou Fujian

Received: Apr. 12th, 2022; accepted: May 20th, 2022; published: May 26th, 2022

Abstract

Objective: To study the effect of Xuling Jiangu recipe on the composition and gene function of intestinal flora in ovariectomized osteoporosis model rats. **Methods:** Rat models of ovariectomized osteoporosis were established and randomly divided into four groups: sham operation group, model group, Xuling Jiangu recipe group, and estrogen group, with 6 rats in each group. After 4 weeks of modeling, samples were collected after 12 weeks of drug intervention. The bone mineral density of rat tibia was detected by dual-energy X-ray absorptiometry in small animal scanning mode, and the composition, structure and function of intestinal flora in rats were detected by metagenomic whole genome sequencing technology. **Results:** Compared with the sham operation group, the bone mineral density of the tibia of the model group was significantly decreased ($P < 0.01$); The species composition and abundance of intestinal flora in different groups were analyzed, and there were statistically significant differences between groups at the levels of phylum, class, order, family, genus, and species ($P < 0.001$); LEfSe difference analysis results. It showed that the bacteria species such as Firmicutes, *Bacillus*, *Lactobacillus* were the key differential flora in the intestinal tract of rats in the osteoporosis model group; It is the key differential flora of the Xuling Jiangu recipe group; further statistics on the KEGG functional annotation results of differential genes and enrichment analysis are carried out. At the first level of KEGG, the intestinal flora genes of rats in each group are annotated into 6 categories of organisms Metabolic pathways, of which the first annotated is the metabolic pathway; at the second level of KEGG, the main metabolic pathways annotated include: carbohydrate metabolism, amino acid metabolism, etc. 60% of the enriched pathways belong to the KEGG level Metabolic pathways in the horizontal level; the difference analysis of the functional abundance obtained by gene annotation, the results of functional annotation of intestinal flora genes between the Xuling Jiangu prescription group and the osteoporosis group were statistically significant, and the metabolic pathways with significant differences were significantly different including endocrine resistance pathway, ErbB signaling pathway, TGF- β signaling pathway, etc. **Conclusion:** Xuling Jiangu recipe has a regulatory effect on the composition, diversity and biological metabolic pathways of intestinal flora in osteoporosis model rats. Balancing the intestinal microecological homeostasis is the key to the prevention and treatment of osteoporosis by Xuling Jiangu recipe, which is one of the targets of the disease.

Keywords

Traditional Chinese Medicine, Xuling Jiangu Prescription, Osteoporosis, Intestinal Flora, Metagenomic, 16S rNA

Copyright © 2022 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

骨质疏松(osteoporosis, OP)是由于体内骨代谢平衡的破坏导致的以骨量减少和骨组织微结构退化、骨强度降低为特征的全身性代谢性骨病[1]。近年来随着肠道菌群研究的深入,其对骨质疏松症的影响也被

人们所关注。肠道菌群可通过免疫、内分泌和自身代谢产物影响骨代谢,与骨质疏松的发生密切相关[2] [3]。

续苓健骨方是课题组治疗骨质疏松症的经验方,前期研究结果表明[4] [5] [6],续苓健骨方能提高模型大鼠骨密度和生物力学,细胞学实验证实,续苓健骨汤含药血清能促进成骨细胞的增殖和分化,但作用机理目前尚未完全阐明。本研究通过宏基因组测序观察续苓健骨方干预后对去卵巢骨质疏松症大鼠肠道菌群的丰度与多样性的影响,以肠道菌群为靶点探讨续苓健骨方抗骨质疏松的作用机理,为该方的临床推广及研制、开发奠定实验基础。

2. 材料与方法

2.1. 材料

2.1.1. 实验动物

3月龄清洁级SD雌性大鼠24只,购自上海斯莱克实验动物有限责任公司,实验动物许可证:SCXK(沪)2007-0005,合格证编号:2007000530078。饲养于福建省中医药科学院比较医学实验中心[合格证号:SYXK(闽)2016-0005],所有动物饲养条件一致,在室温为 $(19 \pm 2)^\circ\text{C}$,相对湿度 $(58 \pm 12)\%$ 、光照周期12 h/12 h的环境中饲养,给予普通饲料、自由饮水和活动。

2.1.2. 实验动物

续苓健骨方由川续断、茯苓、白术、红花、赤芍和甘草陈皮等12味中药组成,每剂总量为122克,中药材购由福建鹭燕中宏医药有限公司。戊酸雌二醇片,购自拜耳医药保健有限公司,规格:1 mg,批准文号:国药准字J20171038。

2.1.3. 试剂和仪器

双能X线骨密度仪(HOLOGIC, Discovery WS/N89006)、高速离心机(Eppendorf 5415D)、梯度PCR仪(LONG GENE MG96G)、Qubit (Invitrogen Q32857)、Magnetic Stand (Invitrogen AM10026)、测序试剂盒TruSeq Nano DNA LT Library Preparation Kit-Set A(FC-121-4001)。

2.2. 实验方法

2.2.1. 动物模型制备

SD大鼠饲养至6月龄,按随机数字表法分成4组:假手术组、骨质疏松模型组、续苓健骨方组、雌激素组,每组6只。除假手术组外,其余组根据参考文献[7]制备双侧卵巢切除术模型,假手术组采用相同手术方法,切除卵巢附近等量脂肪组织。

2.2.2. 药物干预

手术后30天开始药物干预,根据临床用药,按照同等体重的大鼠耐药量为人6.25倍进行换算,续苓健骨方生药量15 g/(kg·d)对大鼠进行灌胃,雌激素组灌胃剂量为0.1 mg/(kg·d),模型组和假手术组给予每日1次等量生理盐水灌胃处理,连续12周。

2.2.3. 取材

最后一次灌胃完成2 h后予以10%水合氯醛麻醉处理,取左侧胫骨用于骨密度检测;采集大鼠粪便样本用16s rRNA测序:从直肠部位取新鲜粪便约5 g,装入10 ml无菌离心管内,迅速放入液氮,随后置于 -80°C 冰箱保存。

2.2.4. 骨密度检测

取左侧胫骨,应用双能X线骨密度仪小动物模式进行扫描,测定各组大鼠骨密度。

2.2.5. 微生物组总 DNA 提取

采用 CTAB 法进行微生物总 DNA 提取, 并通过琼脂糖凝胶电泳进行 DNA 质量鉴定, 采用紫外分光光度计对 DNA 进行定量。

2.2.6. 文库构建

DNA 序列随机断裂为 200~500 bp 的短片段, 随后对 DNA 末端进行修复, 将碱基“A”添加到 DNA 短片段的 3'端, 纯化连接产物、PCR 扩增、纯化、定量并进行文库质控。

2.2.7. 上机测序及分析流程

文库质检合格后用 NovaSeq6000 进行高通量测序, 测序模式为 PE150。将测序得到的原始数据进行去接头 cutadapt (v1.9)、去低质量序列 fqtrim (v0.94)。得到有效数据后, 进行 CDS 预测 Meta Gene Mark (v3.26)、聚类 and 去冗余 CD-HIT (v4.6.1), 并通过 bowtie2 (v2.2.0) 进行 TPM 丰度计算, 过滤低丰度表达后获得 Unigenes, 与 NR_mate 库进行比对, 获得物种注释信息, 将 Unigenes 与 GO、KEGG、Eggnog、CAZy、CARD、PHI、MGEs、VFDB 数据库进行比对及功能注释, 统计 unigene 进行差异比较分析: 在物种、功能、基因水平进行表达丰度及差异性分析, 宏基因组全基因组测序委托博奥晶典生物技术有限公司。

2.2.8. 统计学

采用 SPSS 17.0 软件进行数据分析, 计量资料用均数±标准差表示, 多组间比较, 方差齐的数据采用 One-way ANOVA 检验, 对于方差不齐数据的多组间比较, 采用 Kruskal-Wallis H 检验, 如统计具有差异时再以 Bonferroni 法进行组间多重比较, 定义 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3. 结果

3.1. 续苓健骨方对骨质疏松模型大鼠骨密度的影响

骨密度检测结果表明(见表 1), 与假手术组相比, 模型组大鼠胫骨骨密度显著降低($P < 0.01$); 与模型组比较, 续苓健骨方组和雌激素组骨密度明显提高($P < 0.01$), 说明续苓健骨方能促进骨质疏松模型大鼠骨密度的提高。

Table 1. Results of bone mineral density in the rats (g/cm^2 , $\bar{x} \pm s$)

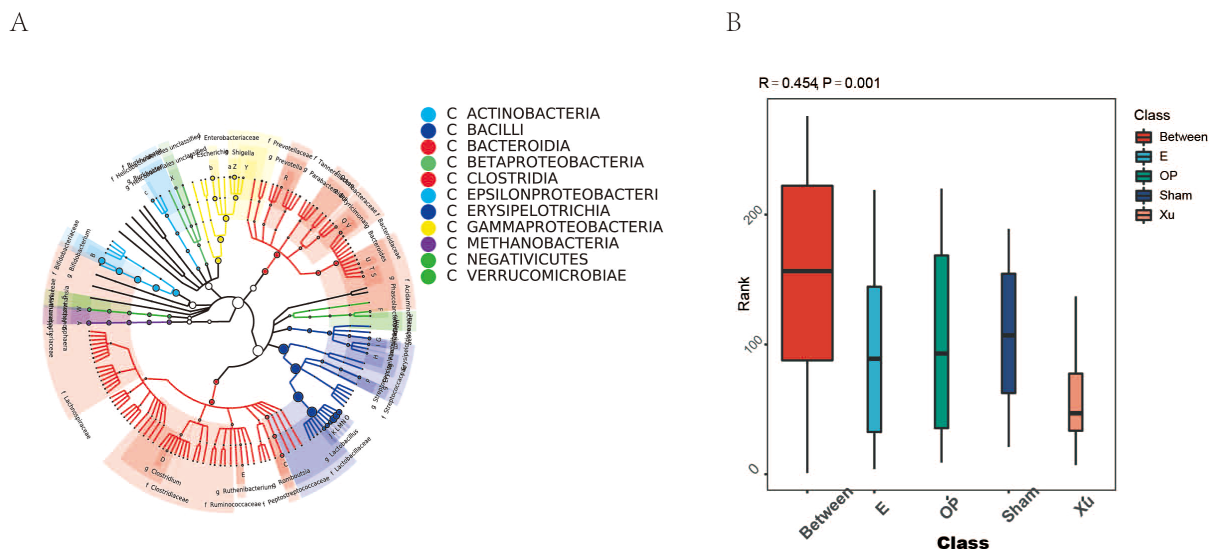
表 1. 大鼠胫骨骨密度结果(g/cm^2 , $\bar{x} \pm s$)

组别	例数(只)	骨密度(g/cm^2)
假手术组	6	0.271 ± 0.017
模型组	6	$0.242 \pm 0.010^*$
续苓健骨方组	6	$0.266 \pm 0.007^{\#}$
雌激素组	6	$0.273 \pm 0.010^{\#}$

注: 与假手术组比较, $^*P < 0.01$; 与模型组比较, $^{\#}P < 0.01$ 。

3.2. 续苓健骨方对肠道菌群物种组成的影响

对各组样本肠道菌群物种丰度进行分析, 物种组成树状图中不同颜色表示不同的科, 节点越大丰度越高(图 1(A)), Anosim 组间相似性分析结果显示组间差异有统计学意义($R = 0.454$, $P = 0.001$) (图 1(B))。



(A) 肠道菌群物种组成树状图; (B) Anosim 组间相似性分析。

Figure 1. Analysis of species abundance of intestinal flora

图 1. 肠道菌群物种丰度分析

进一步从门(Phylum)、纲(Class)、目(Order)、科(Family)、属(Genus)、种(Species)六个水平对不同组别的物种组成及丰度情况进行分析, 图 2 结果显示在门分类水平, 各组丰度较高的菌群主要由厚壁菌门(Firmicutes)、古菌门(Euryarchaeota)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌(Actinobacteria)和拟杆菌门(Bacteroidetes)5 个菌门构成, 其中厚壁菌门、放线菌和变形菌门三种菌门含量约占肠道菌群总量 80%。与正常组比较, 骨质疏松模型组大鼠的厚壁菌门相对丰度增高, 而变形菌门相对丰度显著减低, 续苓健骨方能降低厚壁菌门和提高变形菌门相对丰度(图 2(A)); 在纲分类水平, 主要由杆菌(Bacilli)、放线菌(Actinobacteria)、梭状芽孢杆菌(Clostridia)、丹毒(Erysipelotrichia)、拟杆菌(Bacteroidia)和伽玛变形杆菌(Gammaproteobacteria)等组成, 模型组的伽玛变形杆菌和梭状芽孢杆菌相对丰度低于正常组, 而杆菌相对丰度高于正常组, 续苓健骨方能降低杆菌丰度(图 2(B)); 在目水平, 肠道菌群主要由乳酸杆菌目(Lactobacillales)、双歧杆菌(Bifidobacteriales)、梭菌目(Clostridiales)、肠杆菌目(Enterobacterales)和拟杆菌目(Bacteroidales)等组成, 其中乳酸杆菌目丰度在模型组显著升高, 而肠杆菌目和梭菌目显著降低, 续苓健骨方能降低乳酸杆菌目相对丰度, 提高梭菌目相对丰度(图 2(C)); 在科分类水平, 与正常组比较, 模型组肠道菌群乳酸杆菌(Lactobacillaceae)相对丰度显著增高, Enterobacteriaceae(肠杆菌科)、拟杆菌科(Bacteroidaceae)和丹毒科(Erysipelotrichaceae)比例减低, 续苓健骨方能提高甲烷杆菌科(Methanobacteriaceae)相对丰度(图 2(D)); 在属分类水平, 正常组肠道菌群主要由大肠埃希菌(*Escherichia*)、拟杆菌属(*Bacteroides*)、志贺氏菌(*Shigella*)、双歧杆菌(*Bifidobacterium*)和乳酸杆菌(*Lactobacillus*)组成, 模型组的志贺氏菌和大肠埃希菌相对丰度低于正常组, 续苓健骨方能提高乳酸杆菌相对丰度(图 2(E)); 在种分类水平, 与正常组比较, 模型组肠道菌群中乳酸杆菌 sp_ASF360 (*Lactobacillus*_sp_ASF360)、约氏乳杆菌(*Lactobacillus*_johnsonii)、均匀拟杆菌(*Bacteroides*_uniformis)和罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus*_reuter)相对丰度显著提高, 大肠杆菌(*Escherichia*_coli)和志贺氏菌(*Shigella*_sonnei)相对丰度明显减低, 而续苓健骨方能显著减低罗伊氏乳杆菌和约氏乳杆菌相对丰度(图 2(F))。

LEfSe (Line Discriminant Analysis (LDA) Effect Size)分析, 可以实现多个分组之间的比较, 还可以在分组比较的内部进行亚组之间的比较, 从而找到组间在丰度上有显著差异的物种。LEfSe 差异性分析结

果显示,厚壁菌门、杆菌纲、乳酸杆菌目、乳酸杆菌科属和约氏乳杆菌、罗伊氏乳杆菌种是骨质疏松症模型组大鼠肠道内关键差异菌群;与模型组比较,古菌门、甲烷杆菌纲目科、甲烷球菌属种和梭菌_sp_ASF502种是续苓健骨方组关键差异菌群(图 3(A));与模型组比较,拟杆菌门、丁酸单胞菌属、拟杆菌属和丁酸单胞菌种是雌激素组优势菌群(图 3(B))。

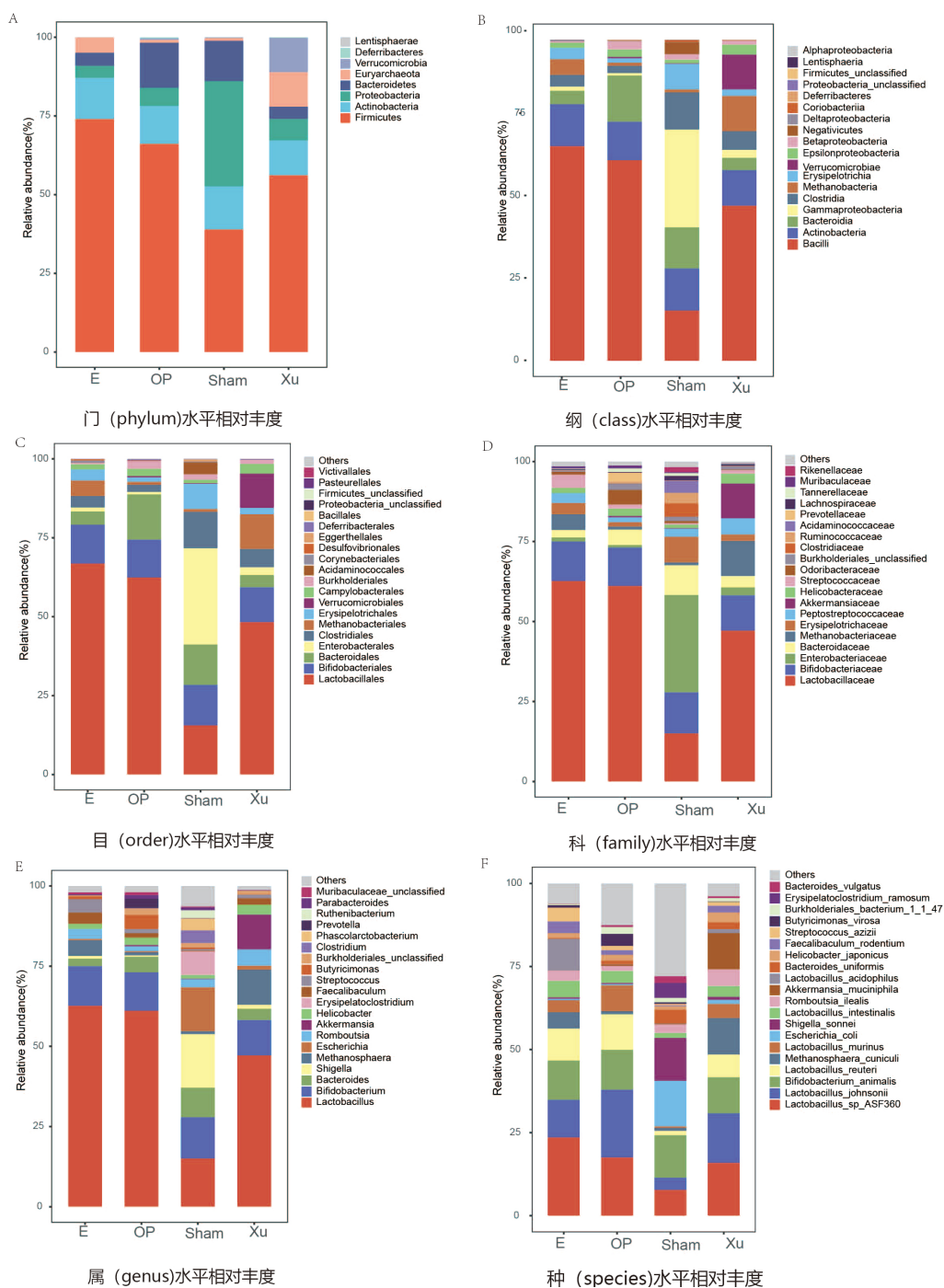
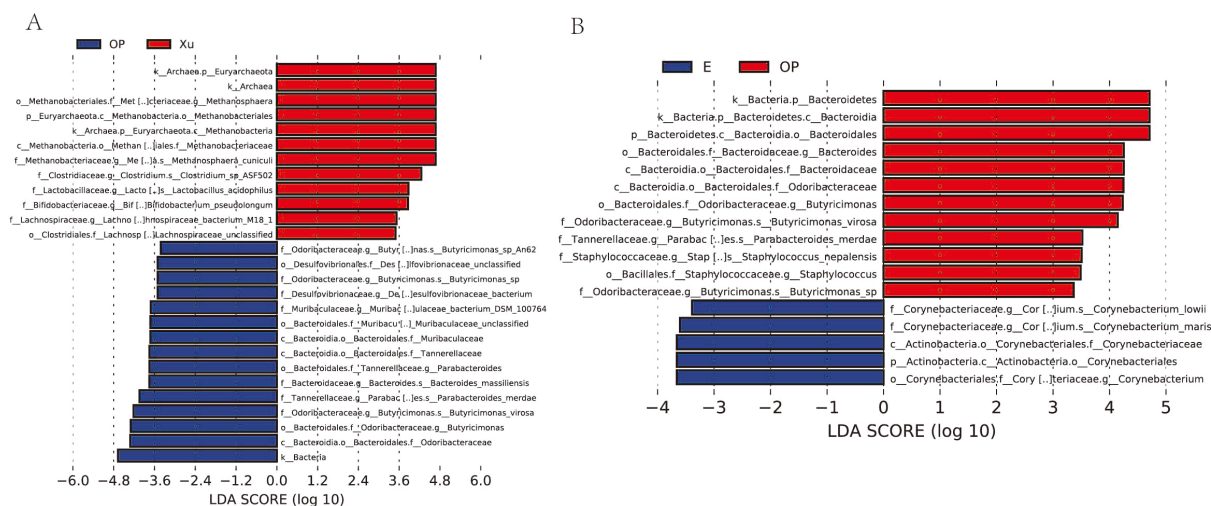


Figure 2. Histogram of the relative abundance of intestinal flora at the taxonomic levels of phylum, class, order, family, genus, and species

图 2. 肠道菌群在门、纲、目、科、属、种各分类水平的相对丰度柱状图



(A) 续苓健骨方组和模型组 LDA 分值分布柱状图; (B) 雌激素组和模型组 LDA 分值分布柱状图。

Figure 3. Histogram of distribution of intestinal flora LDA value

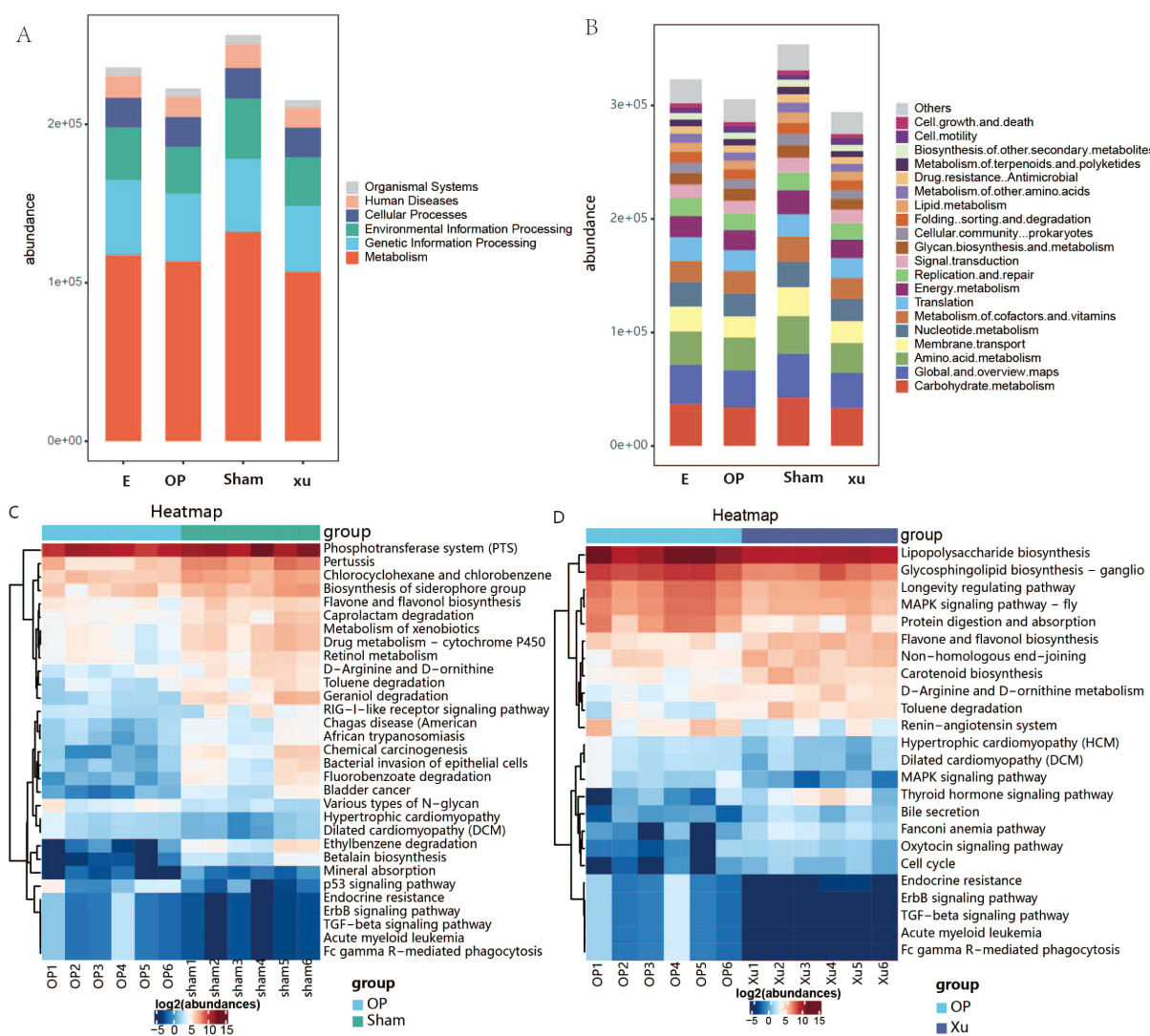
图 3. 肠道菌群 LDA 值分布柱状图

3.3. 肠道菌群差异基因功能注释和富集分析

KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes)数据库是系统分析基因产物在细胞中的代谢途径以及这些基因产物功能的数据库。进一步对差异基因的 KEGG 功能注释结果统计并进行富集分析,结果显示:在 KEGG 第一层级水平,各组大鼠肠道菌群基因注释到 6 大类生物代谢通路,分别为新陈代谢(Metabolism)、细胞过程(Cellular Processes)、人类疾病(Human Diseases)、遗传信息处理(Genetic Information Processing)、生物体系统(Organismal Systems)和环境信息处理(Environmental Information Processing),其中注释到第一位的为新陈代谢通路(图 4(A));在 KEGG 第二层级水平,注释到的主要代谢通路包括:碳水化合物代谢(Carbohydrate metabolism)、辅助因子和维生素代谢(Metabolism of cofactors and vitamins)、能量代谢(Energy metabolism)、核苷酸代谢(Nucleotide metabolism)、膜运输(Membrane transport)和氨基酸代谢(Amino acid metabolism),富集到的通路中 60%属于在 KEGG 一级水平中的新陈代谢通路(图 4(B));对基因注释得到的功能丰度进行差异分析,与正常组比较,骨质疏松组肠道菌群基因功能注释结果差异有统计学意义(图 4(C)),其中乙苯降解、甜菜碱生物合成、氟苯甲酸酯降解、RIG-I 样受体信号通路、视黄醇代谢和己内酰胺降解代谢通路差异最为显著;续苓健骨方组与骨质疏松组肠道菌群基因功能注释结果差异具有统计学意义,其中差异明显的代谢通路包括内分泌抵抗通路、ErbB 信号通路、TGF- β 信号通路、肾素-血管紧张素系统、MAPK 信号通路和脂多糖生物合成通路(图 4(D)),而雌激素组与骨质疏松组肠道菌群基因功能注释结果差异无统计学意义(数据未展示)。

4. 讨论

近年来肠道菌群的研究已成为热点,其对骨质疏松症的影响也被人们所关注。随着肠道菌群的深入研究,也为中医药研究提供崭新视角和研究领域[8][9]。肠道菌群是中药药效发挥的重要介质,中药可以通过影响肠道菌群结构和数量,纠正和改善肠道菌群失调发挥治疗疾病作用。续苓健骨方是课题组治疗骨质疏松症的经验方,但作用机理尚未完全阐明。本研究以肠道菌群为切入点,通过宏基因组测序观察续苓健骨方干预后对去卵巢骨质疏松症大鼠肠道菌群的丰度与多样性的影响,探讨续苓健骨方抗骨质疏松的作用机理。



(A) KEGG 数据库第一层级注释的功能丰度柱形图; (B) KEGG 数据库第二层级注释的功能丰度柱形图; (C) 模型组和正常组 KEGG 差异基因的热图; (D) 续苓健骨方组和模型组 KEGG 差异基因的热图。

Figure 4. KEGG functional annotation and enrichment analysis of differential genes in the gut microbiota

图 4. 肠道菌群差异基因 KEGG 功能注释和富集分析

本研究从门、纲、目、科、属、种六个水平对各组样本肠道菌群物种丰度进行分析,发现在门分类水平,各组丰度较高的菌群构成基本相似,其中厚壁菌门、放线菌和变形菌门三种菌门含量约占肠道菌群总量的 80%,与正常组比较,骨质疏松模型组大鼠的厚壁菌门相对丰度增高,而变形菌门相对丰度显著减低,续苓健骨方能降低厚壁菌门和提高变形菌门相对丰度;在纲分类水平,骨质疏松模型组杆菌相对丰度高于正常组,续苓健骨方能降低杆菌丰度;在目水平,乳酸杆菌目丰度在骨质疏松模型组显著升高,而肠杆菌目和梭菌目显著降低,续苓健骨方能降低乳酸杆菌目相对丰度,提高梭菌目相对丰度;在科分类水平,与正常组比较,骨质疏松模型组肠道菌群乳酸杆菌相对丰度显著增高,肠杆菌科、拟杆菌科和丹毒科比例减低,续苓健骨方能提高甲烷杆菌科相对丰度;在属分类水平,模型组的志贺氏菌和大肠埃希菌相对丰度低于正常组,续苓健骨方能提高乳酸杆菌相对丰度;在种分类水平,与正常组比较,模型组肠道菌群中乳酸杆菌 sp_ASF360、约氏乳杆菌、均匀拟杆菌和罗伊氏乳杆菌相对丰度显

著提高, 大肠杆菌和志贺氏菌相对丰度明显减低, 而续苓健骨方能显著减低罗伊氏乳杆菌和约氏乳杆菌相对丰度, 以上结果表明, 续苓健骨方对骨质疏松模型大鼠肠道菌群的组成成分和结构具有调节作用。为明确组间在丰度上有显著差异的物种, 对各组患者肠道菌群进行物种 LEfSe 差异性分析, 结果显示: 厚壁菌门、杆菌纲、乳酸杆菌目、乳酸杆菌科属和约氏乳杆菌、罗伊氏乳杆菌种是骨质疏松症模型组大鼠肠道优势菌群; 与模型组比较, 拟杆菌门、丁酸单胞菌属、拟杆菌属和丁酸单胞菌种是雌激素组优势菌群, 古菌门、甲烷杆菌纲目科、甲烷球菌属种和梭菌_sp_ASF502 种是续苓健骨方组关键差异菌群。

肠道菌群是人体肠道内的正常共生菌, 肠道内约数万亿共生菌与宿主共生, 肠道菌群与人体相互作用, 影响宿主代谢和免疫功能, 其对骨质疏松症的影响也被人们所关注[10] [11]。Cox LM [12]发现, 与非干预组小鼠比较, 抗生素干预的小鼠骨密度增加, 提示肠道微生物群组成结构的变化可以影响骨密度。研究发现乳杆菌和副干酪乳杆菌能通过降低骨质疏松模型鼠的炎症因子 TNF- α 和 IL-1 β 水平, 增加 OPG 表达, 抑制骨吸收和皮质骨的骨量丢失[13]。肠道菌群组成结构和功能发生变化时, 其代谢产物会影响宿主免疫和内分泌, 继而通过骨免疫桥梁影响骨代谢[14] [15]。此外, 作为肠道益生菌的主要代谢产物, 短链脂肪酸一方面可调节肠道 pH 值促进钙吸收, 另外一方面通过免疫途径调节骨代谢, 增加骨强度和骨密度[16] [17] [18]。本研究发现乳酸杆菌、甲烷杆菌和梭菌_sp_ASF502 与续苓健骨方在体内的代谢有关, 这可能是续苓健骨方通过发挥调节上述菌属而实现防治骨质疏松症作用的靶点之一。

为进一步分析肠道菌群基因产物在细胞中的代谢途径, 本研究对差异基因的 KEGG 功能注释结果统计并进行富集分析, 结果显示: 在 KEGG 第一层级水平, 各组大鼠肠道菌群基因注释到 6 大类生物代谢通路, 其中注释到第一位的为新陈代谢通路; 在 KEGG 第二层级水平, 注释到的主要代谢通路包括: 碳水化合物代谢、能量代谢、氨基酸代谢、维生素和辅助因子代谢、膜运输和核苷酸代谢; 续苓健骨方组与骨质疏松症组肠道菌群基因功能注释结果差异具有统计学意义, 其中差异明显的代谢通路包括内分泌抵抗通路、ErbB 信号通路、TGF- β 信号通路、肾素 - 血管紧张素系统、MAPK 信号通路和脂多糖生物合成通路。

研究表明, 肠道菌群代谢物可通过直接进入血液循环或间接调节宿主所分泌的激素, 参与宿主复杂的生物代谢网络[19]。碳水化合物参与生物体能量转运与代谢, 发酵生成的代谢产物短链脂肪酸 (short-chain fatty acids, SCFAs) 在骨质疏松的发生过程中具有重要的作用[20]。膜转运功能与细胞寿命密切相关, 膜转运功能紊乱会导致细胞过早凋亡, 钙盐代谢失调, 从而影响骨代谢。此外, 作为钙平衡的关键调控因子, 维生素 D 及其代谢产物能促进骨质矿化和骨形成, 参与骨代谢过程的调控[21]。本研究中, 骨质疏松症组肠道菌群碳水化合物代谢、氨基酸代谢、膜运输、核苷、脂多糖生物合成通路等代谢异常, 续苓健骨方干预后肠道菌群组成趋向正常, 上述代谢通路得到调节, 说明续苓健骨方防治骨质疏松症与肠道菌群的多靶点、多途径调节有关。

综上, 本研究发现去卵巢骨质疏松症大鼠肠道菌群组成、结构和碳水化合物代谢、氨基酸代谢、能量代谢和维生素代谢等紊乱, 续苓健骨方可调节肠道中微生物物种组成, 改善其代谢功能。因此, 平衡肠道微生态稳态是续苓健骨方实现骨质疏松症防治的作用靶点之一。然而肠道菌群复杂多样, 对骨代谢的调节是多途径、多靶点的, 本研究只是对续苓健骨方调节肠道菌群稳态作用的初步探索, 其对骨质疏松症骨代谢发挥作用的机制, 尚需进一步深入研究。

基金项目

福建省自然科学基金项目(2019J01337); 福建省属公益类科研院所基本科研专项项目(2020R1003002)。

参考文献

- [1] Ensrud, K.E. and Crandall, C.J. (2018) Osteoporosis. *Annals of Internal Medicine*, **168**, 306-307.
- [2] Weersma, R.K., Zhernakova, A. and Fu, J. (2020) Interaction between Drugs and the Gut Microbiome. *Gut*, **69**, 1510-1519. <https://doi.org/10.1136/gutjnl-2019-320204>
- [3] Seely, K.D., Kotelko, C.A., Douglas, H., *et al.* (2021) The Human Gut Microbiota: A Key Mediator of Osteoporosis and Osteogenesis. *International Journal of Molecular Sciences*, **22**, Article No. 9452. <https://doi.org/10.3390/ijms22179452>
- [4] 陈赛楠, 吴华嵩, 程佑民, 等. 续苓健骨方对去卵巢骨质疏松模型大鼠血液钙磷代谢的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(4): 528-532.
- [5] 陈娟, 陈赛楠, 叶云金, 等. 续苓健骨汤含药血清对 MC3T3-E1 细胞分化及增殖的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(11): 1545-1549.
- [6] 葛继荣, 李生强, 陈娟, 等. 续苓健骨方对骨质疏松模型大鼠骨密度及 OPG 和 RANKL 蛋白表达的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2016, 22(5): 592-595.
- [7] Yousefzadeh, N., Kashfi, K., Jeddi, S., *et al.* (2020) Ovariectomized Rat Model of Osteoporosis: A Practical Guide. *EXCLI Journal*, **19**, 89-107.
- [8] Cheng, T.Y., Li, J.X., Chen, J.Y., *et al.* (2021) Gut Microbiota: A Potential Target for Traditional Chinese Medicine Intervention in Coronary Heart Disease. *Chinese Medicine*, **16**, Article No. 108. <https://doi.org/10.1186/s13020-021-00516-0>
- [9] 赵进东, 余婵娟, 陆瑞敏, 等. 肠道菌群与骨质疏松症中西医研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2018, 24(12): 1676-1680.
- [10] Locantore, P., Del, G.V., Gelli, S., *et al.* (2020) The Interplay between Immune System and Microbiota in Osteoporosis. *Mediators of Inflammation*, **2020**, Article ID: 3686749. <https://doi.org/10.1155/2020/3686749>
- [11] Ibanez, L., Rouleau, M., Wakkach, A., *et al.* (2019) Gut Microbiome and Bone. *Joint Bone Spine*, **86**, 43-47. <https://doi.org/10.1016/j.jbspin.2018.02.008>
- [12] Cox, L.M., Yamanishi, S., Sohn, J., *et al.* (2014) Altering the Intestinal Microbiota during a Critical Developmental Window Has Lasting Metabolic Consequences. *Cell*, **158**, 705-721. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2014.05.052>
- [13] Britton, R.A., Irwin, R., Quach, D., *et al.* (2014) Probiotic *L. reuteri* Treatment Prevents Bone Loss in a Menopausal Ovariectomized Mouse Model. *Journal of Cellular Physiology*, **229**, 1822-1830. <https://doi.org/10.1002/jcp.24636>
- [14] Pronovost, G.N. and Hsiao, E.Y. (2019) Perinatal Interactions between the Microbiome, Immunity, and Neurodevelopment. *Immunity*, **50**, 18-36. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.11.016>
- [15] D'Amelio, P. and Sassi, F. (2018) Gut Microbiota, Immune System, and Bone. *Calcified Tissue International*, **102**, 415-425. <https://doi.org/10.1007/s00223-017-0331-y>
- [16] 张钰涵, 梅其炳, 牛银波. 短链脂肪酸调控骨代谢的作用及机制的研究进展[J]. 微生物学通报, 2021, 48(11): 4306-4314.
- [17] Lucas, S., Omata, Y., Hofmann, J., *et al.* (2018) Short-Chain Fatty Acids Regulate Systemic Bone Mass and Protect from Pathological Bone Loss. *Nature Communications*, **9**, Article No. 55. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-02490-4>
- [18] Chen, F., Wei, Q., Xu, D., *et al.* (2021) The Associations of Gut Microbiota and Fecal Short-Chain Fatty Acids with Bone Mass Were Largely Mediated by Weight Status: A Cross-Sectional Study. *European Journal of Nutrition*, **60**, 4505-4517. <https://doi.org/10.1007/s00394-021-02597-x>
- [19] Adak, A. and Khan, M.R. (2019) An Insight into Gut Microbiota and Its Functionalities. *Cellular and Molecular Life Sciences*, **76**, 473-493. <https://doi.org/10.1007/s00018-018-2943-4>
- [20] Kanazawa, I. (2017) Interaction between Bone and Glucose Metabolism [Review]. *Endocrine Journal*, **64**, 1043-1053. <https://doi.org/10.1507/endocrj.EJ17-0323>
- [21] Schlesinger, P.H., Blair, H.C., Beer, S.D., *et al.* (2020) Cellular and Extracellular Matrix of Bone, with Principles of Synthesis and Dependency of Mineral Deposition on Cell Membrane Transport. *American Journal of Physiology—Cell Physiology*, **318**, 111-124. <https://doi.org/10.1152/ajpcell.00120.2019>