

本文引用: 张天慧, 刘婷, 雷晓明, 王舒, 王丰林, 刘平安, 张国民. 壮骨止痛胶囊对去卵巢致骨质疏松大鼠肠道微生态的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2023, 43(12): 2150-2156.

壮骨止痛胶囊对去卵巢致骨质疏松大鼠肠道微生态的影响

张天慧, 刘婷, 雷晓明, 王舒, 王丰林, 刘平安*, 张国民*

湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南长沙 410208

[摘要] **目的** 探讨壮骨止痛胶囊(Zhuanggu Zhitong Capsule, ZGZTC)对去卵巢(ovariectomised, OVX)所致骨质疏松症(osteoporosis, OP)大鼠肠道菌群的影响。**方法** 选用雌性SD大鼠,随机分为假手术(SHAM)组10只、造模组30只。造模组切除双侧卵巢,SHAM组仅切除卵巢周围等质量脂肪组织。1周后,将造模组随机分为OVX组、戊酸雌二醇(estradiol valerate, EV)组和ZGZTC组,每组10只。EV组灌服EV混悬液[0.09 mg/(kg·d)],ZGZTC组灌服ZGZTC混悬液[1.944 g/(kg·d)],SHAM组、OVX组灌服等体积生理盐水,给药12周后取材。HE染色观察股骨、结肠结构变化,RT-PCR法分析结肠闭合小环蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1)、咬合蛋白(Occludin)mRNA的表达,ELISA法检测血清白细胞介素-17(interleukin-17, IL-17)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β)、脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)的表达,收集大鼠粪便行肠道菌群16S rRNA测序,分析肠道微生物群的差异。**结果** 与SHAM组比较,OVX组大鼠股骨骨小梁稀疏、断裂,结肠上皮细胞形态破坏,炎症细胞浸润;与OVX组比较,ZGZTC组、EV组大鼠股骨骨小梁数目增加,结肠中炎症细胞浸润减少。与SHAM组比较,OVX组大鼠结肠组织Occludin,ZO-1 mRNA相对表达量明显降低($P<0.01$),血清IL-17、LPS值升高($P<0.01$),TGF- β 值降低($P<0.01$);与OVX组比较,ZGZTC组和EV组大鼠结肠组织Occludin,ZO-1 mRNA相对表达量明显升高($P<0.01$),血清IL-17、LPS值均降低($P<0.01$),TGF- β 值升高($P<0.01$)。与OVX组比较,ZGZTC组、EV组厚壁菌门丰度均增加,拟杆菌门丰度均减少。**结论** ZGZTC能改善OVX大鼠骨微结构,其作用机制可能同增加肠道菌群的多样性、调节肠道菌群结构有关。

[关键词] 去卵巢大鼠;壮骨止痛胶囊;绝经后骨质疏松;骨代谢;肠道微生态;16S rRNA;代谢产物

[中图分类号]R285.5

[文献标志码]A

[文章编号]doi:10.3969/j.issn.1674-070X.2023.12.002

Effects of Zhuanggu Zhitong Capsule on intestinal microecology of ovariectomised rats with osteoporosis

ZHANG Tianhui, LIU Ting, LEI Xiaoming, WANG Shu, WANG Fenglin, LIU Ping'an*, ZHANG Guomin*

School of Integrated Chinese and Western Medicine, Hunan University of Chinese Medicine, Changsha, Hunan 410208, China

[Abstract] **Objective** To investigate the effects of Zhuanggu Zhitong Capsule (ZGZTC) on the intestinal flora of rats with ovariectomized (OVX)-induced osteoporosis (OP). **Methods** Female SD rats were selected and randomized into ten in the sham-operated (SHAM) group and 30 in the modeling group. In the modeling group, both ovaries were excised, and in the SHAM group,

[收稿日期]2023-07-14

[基金项目]国家自然科学基金面上项目(81973920);湖南省中医药科研计划重点项目(E2022007);湖南省教育厅科学研究重点项目(22A0260);湖南中医药大学研究生科研创新项目(2022CX62);湖南省研究生科研创新项目(CX20220821);长沙市2022年度指导性科技计划项目(kzd22005)。

[第一作者]张天慧,女,硕士研究生,研究方向:中西医结合防治老年病。

[通信作者]*刘平安,男,博士,副教授,硕士研究生导师,E-mail:723679086@qq.com;张国民,男,博士,教授,博士研究生导师,E-mail:834095773@qq.com。

only an equal mass of adipose tissue around the ovaries was excised. One week later, the modeling group was randomized into the OVX group, the estradiol valerate (EV) group, and the ZGZTC group, with ten rats in each. The EV group was administered EV suspension 0.09 mg/(kg·d), the ZGZTC group was administered ZGZTC suspension 1.944 g/(kg·d), and the SHAM group and OVX group were administered equal volume of saline. The material was taken after 12 weeks of drug administration. The structural changes of femur and colon were observed by HE staining, the expression of zonula occludens-1 (ZO-1) and Occludin mRNA in colon was analyzed by RT-PCR, the expression of serum interleukin-17 (IL-17), transforming growth factor- β (TGF- β) and lipopolysaccharide (LPS) was determined by ELISA. The feces of rats were collected for 16S rRNA sequencing of intestinal flora, to analyze the differences of intestinal microbiota. **Results** Compared with the SHAM group, in the OVX group the femoral trabeculae of rats were sparse and broken, and the morphology of colonic epithelial cells was disrupted and infiltrated by inflammatory cells; compared with the OVX group, in the ZGZTC and EV groups the number of trabeculae increased and the infiltration of inflammatory cells in the colon was reduced. Compared with the SHAM group, in the OVX group the relative expression of Occludin and ZO-1 mRNA in the colon tissues of rats was significantly lower ($P<0.01$), the values of serum IL-17 and LPS were higher ($P<0.01$), and the value of TGF- β was lower ($P<0.01$). Compared with the OVX group, in the ZGZTC and EV groups the colon tissues of rats showed a significant increase in the expression of Occludin and ZO-1 mRNA relative expression ($P<0.01$), serum IL-17 and LPS values were reduced ($P<0.01$), and TGF- β values increased ($P<0.01$). Compared with the OVX group, in the ZGZTC and EV groups the abundance of thick-walled bacillus phylum was increased, and the abundance of anaplastic bacillus phylum was decreased. **Conclusion** ZGZTC can improve the bone microstructure of OVX rats, and its mechanism may be related to increasing the diversity of intestinal flora and regulating the structure of intestinal flora.

[**Keywords**] ovariectomised rats; Zhuanggu Zhitong Capsule; postmenopausal osteoporosis; bone metabolism; intestinal flora; 16S rRNA; metabolite

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是一种常发生于女性绝经后 5~10 年内的骨科疾病,由于卵巢功能的下降,雌激素大幅度下降,导致成骨细胞和破骨细胞的动态平衡受到影响,继而结构和功能发生紊乱,表现为骨痛、易骨折^[1]。目前,临床中采取的药物疗法,长期服用易产生耐药性和许多不良反应,因此,亟须寻找更加安全可靠的治疗方式^[2]。中医药优势在于资源丰富、药效理想、不良反应少,可通过调控骨代谢相关信号通路及骨骼相关细胞的增殖分化等来治疗骨代谢紊乱导致的 PMOP,进而维护骨骼健康^[3]。越来越多的研究表明,中医药对骨代谢的调控作用可能与肠道菌群有关,但其具体机制仍需进一步探讨^[4]。因此,本研究以去卵巢(ovariectomised, OVX)大鼠为研究对象,探索壮骨止痛胶囊(Zhuanggu Zhitong Capsule, ZGZTC)对 OVX 所致骨质疏松症(osteoporosis, OP)大鼠肠道菌群结构与多样性的影响。

1 材料和方法

1.1 实验动物

2 月龄 SPF 级 SD 雌性大鼠 40 只,购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司[许可证号:SCXK(湘)2019-0009],于湖南中医药大学动物实验中心饲养,选用无菌颗粒饲料饲养,自由饮水,环境温度 20~25 °C,室内通风良好。适应性喂养 1 周后进行实验。操作均

符合实验动物伦理学要求,并通过湖南中医药大学实验动物中心伦理审查(伦理号:LL2022110903)。

1.2 主要试剂和仪器

ZGZTC 由补骨脂、淫羊藿、枸杞子、女贞子、骨碎补(烫)、狗脊、川牛膝组成(0.45 g/粒,四川美大康药业股份有限公司,国药准字:Z20050118,批号:220703);戊酸雌二醇(estradiol valerate, EV)片(1 mg/片,拜耳医药保健有限公司广州分公司,国药准字:J20171038,批号:699A);脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)、白细胞介素-17(interleukin-17, IL-17)、转化生长因子- β (transforming growth factor- β , TGF- β) ELISA 试剂盒(厦门仑昌硕生物科技有限公司,批号:YD-31044、YD-30201、YD-31073);大鼠 GAPDH 内参引物(生工生物工程股份有限公司,批号:IB08KA7169)。

多功能酶标仪(奥地利 TECAN 公司,型号:1811004222);荧光定量 PCR 仪(瑞士 Roche 公司,型号:LightCycler480 II);显微镜(德国 Zeiss 公司,型号:Axioscope 5)。

1.3 分组及给药

将实验动物随机分为造模组(30 只)、假手术(SHAM)组(10 只)。造模组采用国内外公认的去卵巢大鼠双侧卵巢方法建立 PMOP 病理模型^[5-7],即经腹腔注射 1%戊巴比妥钠(0.03 g/kg)麻醉后,将大鼠置于俯卧位,备皮消毒,背侧正中旁 1~2 cm 行纵

切口打开腹腔,找到卵巢,结扎摘除该侧卵巢组织后,逐层缝合切口,同法处理对侧卵巢,SHAM 组仅摘除卵巢周围等质量脂肪组织,术后注射青霉素。1 周后,将造模组随机分为 OVX 组、ZGZTC 组、EV 组,每组 10 只。4 组大鼠均灌胃,ZGZTC 组灌服 ZGZTC 混悬液[1.944 g/(kg·d)]^[8],EV 组灌服 EV 混悬液[0.09 mg/(kg·d)]^[9],SHAM 组、OVX 组灌服等体积生理盐水,连续灌胃 12 周后处死并取材。

1.4 HE 染色

取左侧股骨及一部分结肠用于 HE 染色,检测股骨、结肠病理形态学变化。取固定的结肠、脱钙后的股骨组织标本,常规梯度乙醇脱水、二甲苯透明,浸入石蜡中包埋,包埋完全后切片,厚度约 5 μm,切片脱蜡、水化,先后用苏木素、伊红染色,脱水透明后采用中性树胶封片,光镜下观察并拍照。

1.5 ELISA 法检测血清 IL-17、TGF-β、LPS 表达

大鼠腹主动脉取血,将血液样本置于 4 °C 冰箱过夜,待充分凝固后,4 °C、3 000 r/min 离心 15 min (离心半径 17.8 cm),取上清液。按照双抗体夹心法对大鼠血清 IL-17、TGF-β、LPS 进行 ELISA 检测,使用多功能酶标仪检测 450 nm 波长处的 OD 值,计算浓度。

1.6 RT-PCR 法检测结肠 Occludin、ZO-1 mRNA 表达量

取适量结肠组织,使用超纯总 RNA 提取试剂盒提取 RNA,核酸蛋白浓度测定仪测量 RNA 浓度。逆转录成 cDNA 后行两步法扩增 PCR(95 °C 反应 1 min,95 °C 变性 20 s,60 °C 退火 1 min,循环 45 次)。依据原始检测结果,运用 2^{-ΔΔCt} 法计算咬合蛋白(Occludin)、闭合小环蛋白-1(zonula occludens-1, ZO-1) mRNA 相对表达量。引物目的基因序列搜索于美国国家生物技术信息中心,设计、合成于生工生物工程股份有限公司,引物序列见表 1。

1.7 16S rRNA 测序检测大鼠肠道菌群

取新鲜大鼠粪便,提取 DNA 后进行 16S rRNA 高通量测序。采用细菌通用引物扩增 16S 的 V3-V4 区,扩增产物经过纯化和质检后通过 Illumina Miseq

表 1 引物序列表

基因	引物序列(5'-3')	长度/bp
ZO-1	正向 AACCCGAAACTGATGCTGTGGATAG	300
	反向 CGCCCTTGGAATGTATGTGGAGAG	
Occludin	正向 GCAACGATAACCTAGACACCTTC	150
	反向 GGTCTGCTCTTCGCCTTCC	

平台进行测序。

1.8 统计学分析

本实验数据采用 Graphpad Prism 8.0 统计软件进行统计分析。计量资料以“ $\bar{x} \pm s$ ”表示,对符合正态分布的数据,组间比较采用单因素方差分析,组间多重比较采用 LSD 检验(方差齐时)或 Dunnett's T3 检验(方差不齐时);若不符合正态分布,组间比较采用秩和检验(Kruskal-Wallis)。P<0.05 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 各组大鼠股骨、结肠 HE 染色结果

SHAM 组大鼠股骨组织骨小梁结构完整、分布均匀,骨髓腔大小无异常。与 SHAM 组比较,OVX 组股骨的骨小梁网状结构破坏,骨小梁数目减少,骨小梁部分出现断裂,脂肪空泡形成增多。与 OVX 组比较,ZGZTC 组、EV 组骨小梁数目增加,脂肪细胞形成的空泡减少。详见图 1。

SHAM 组结肠形态正常,杯状细胞和隐窝细胞数量较多,腺体分布整齐,炎症细胞浸润及渗出程度低。OVX 组上皮细胞的形态被破坏并且炎性细胞浸润。与 OVX 组相比,EV 组杯状细胞有所增多,炎症细胞浸润减少;ZGZTC 组见正常杯状细胞和 U 型隐窝,腺体排列整齐,炎症细胞浸润显著变少。详见图 2。

2.2 各组大鼠结肠 Occludin、ZO-1 mRNA 相对表达量比较

与 SHAM 组比较,OVX 组大鼠结肠组织 Occludin、ZO-1 mRNA 相对表达量明显降低(P<0.01);与 OVX 组比较,ZGZTC 组和 EV 组大鼠结肠组织 Occludin、ZO-1 mRNA 相对表达量明显升高(P<0.01)。详见图 3。

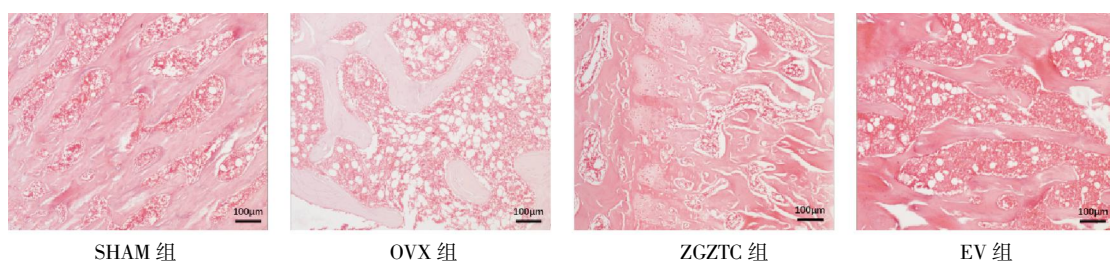


图 1 各组大鼠股骨微结构情况(HE,×100)

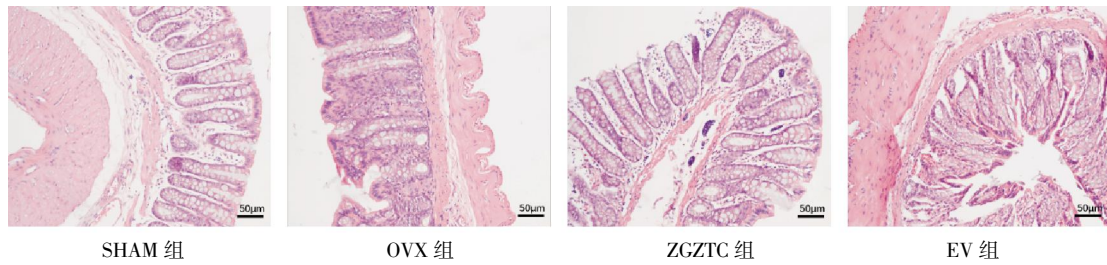


图2 各组大鼠结肠微结构情况(HE,×200)

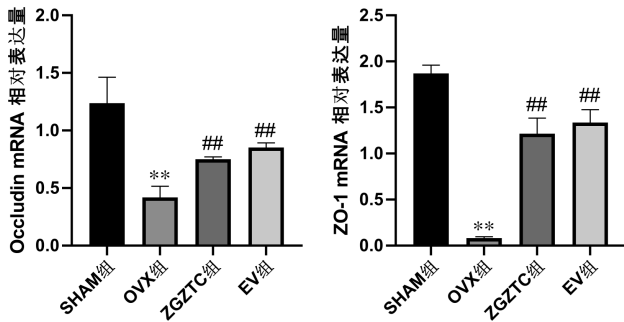


图3 各组大鼠结肠 Occludin、ZO-1 mRNA 表达情况(n=10)
注:与 SHAM 组比较,**P<0.01;与 OVX 组比较,##P<0.01。

2.3 各组大鼠血清 IL-17、TGF-β、LPS 值比较

与 SHAM 组比较,OVX 组血清 IL-17、LPS 值升高(P<0.01),TGF-β 值降低(P<0.01);与 OVX 组比较,ZGZTC 组和 EV 组血清 IL-17、LPS 值均降低(P<

0.01),TGF-β 值升高(P<0.01);ZGZTC 组和 EV 组 IL-17、TGF-β、LPS 值差异均无统计学意义(P>0.05)。详见图 4。

2.4 各组大鼠 16S rRNA 测序结果

2.4.1 肠道菌群测序有效特征序列分析 3组大鼠共分析得到 OTU 物种 1 618 个,OVX 组、ZGZTC 组和 EV 组各有 888、803、801 条,其中,3 组共有物种数目 252 个,特有的特征数分别有 356、318、322 条。详见图 5。

2.4.2 肠道菌群 α 多样性分析 各组大鼠肠道菌群的稀释曲线最终都趋于平缓,表明各组测序获得的特征数量合理,物种丰富度足够,测序深度满足后续数据分析(图 6)。此外,各组大鼠肠道菌群的丰富度指数(潮 1 指数与 Ace 指数)、多样性指数(辛普

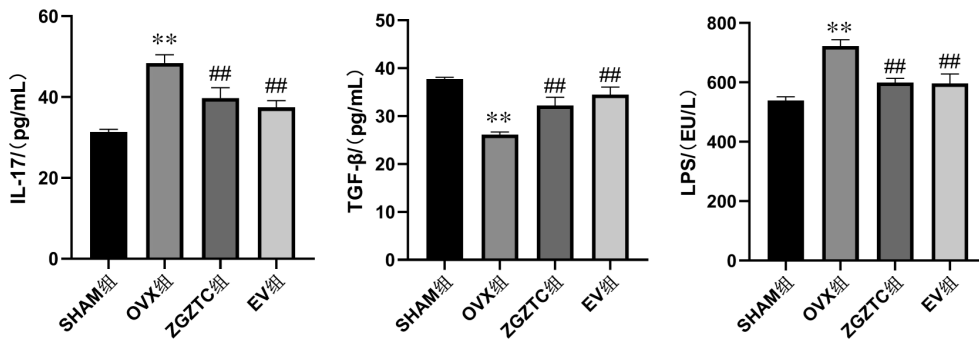


图4 各组大鼠血清中 IL-17、TGF-β、LPS 含量(n=10)
注:与 SHAM 组比较,**P<0.01;与 OVX 组比较,##P<0.01。

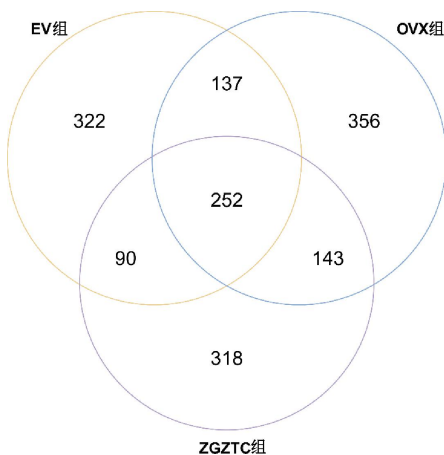


图5 特征分布韦恩图

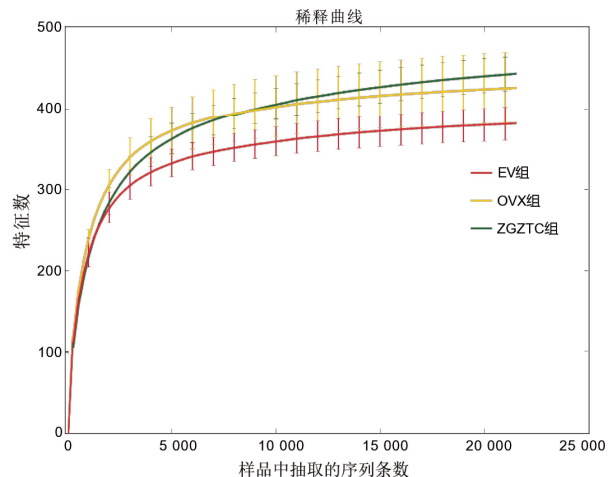


图6 α 多样性指数稀释曲线

森指数与香浓指数)均无显著性差异(图 7)。

2.4.3 肠道菌群 β 多样性分析 通过主坐标分析(principal coordinate analysis, PCoA)和聚类分析来分析 β 多样性的差异。PCoA 结果显示,各组样品显著分离,置换多元方差分析表明组间差异具有显著性($P=0.006<0.01$),聚类分析也显示出类似的结果。详见图 8。

2.4.4 各组大鼠肠道菌群结构丰度分析

(1)门水平菌群丰度及差异

由图 9-A 可知,相对丰度最高的 10 个菌群分别为厚壁菌门(Firmicutes)、拟杆菌门(Bacteroidota)、脱硫菌门(Desulfobacterota)、弯曲菌门(Campilobacterota)、变形菌门(Proteobacteria)、放线菌门(Actinobacteriota)、螺旋菌门(Spirochaetota)、蓝细菌门(Cyanobacteria)、疣微菌门(Verrucomicrobia)、狄氏副拟杆菌(Patescibacteria),其中,厚壁菌门和拟杆菌门为肠道的优势菌群,相对丰度占比 80%以上。在厚壁菌门丰度比较中,相比于 OVX 组(69.53%),

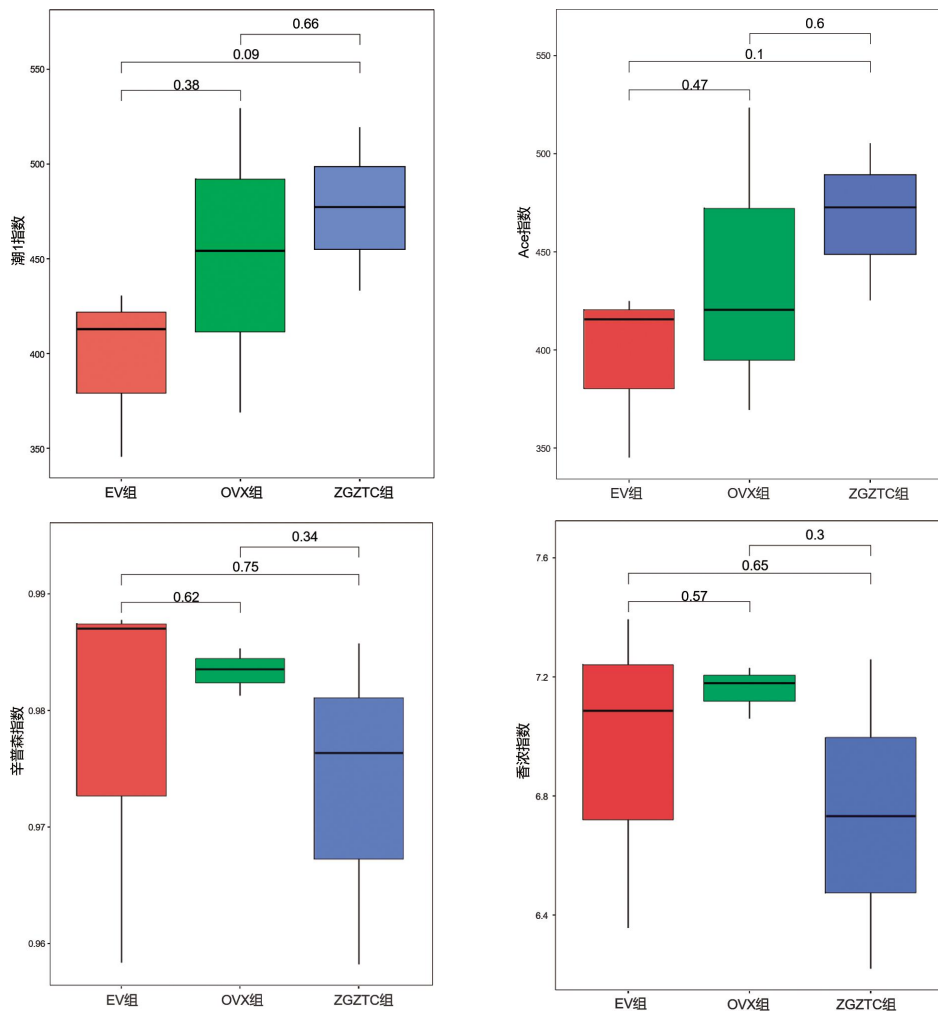


图 7 α 多样性分析指数比较

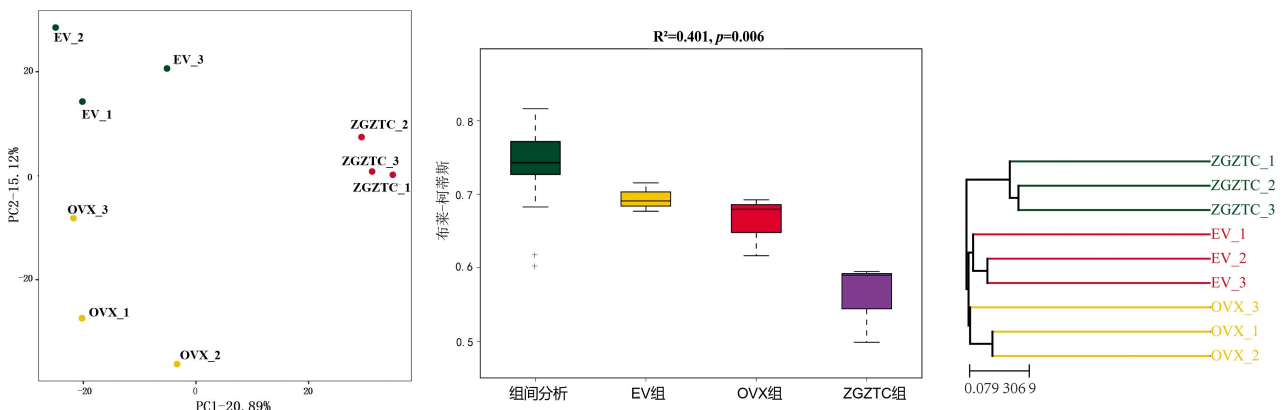


图 8 β 多样性分析比较

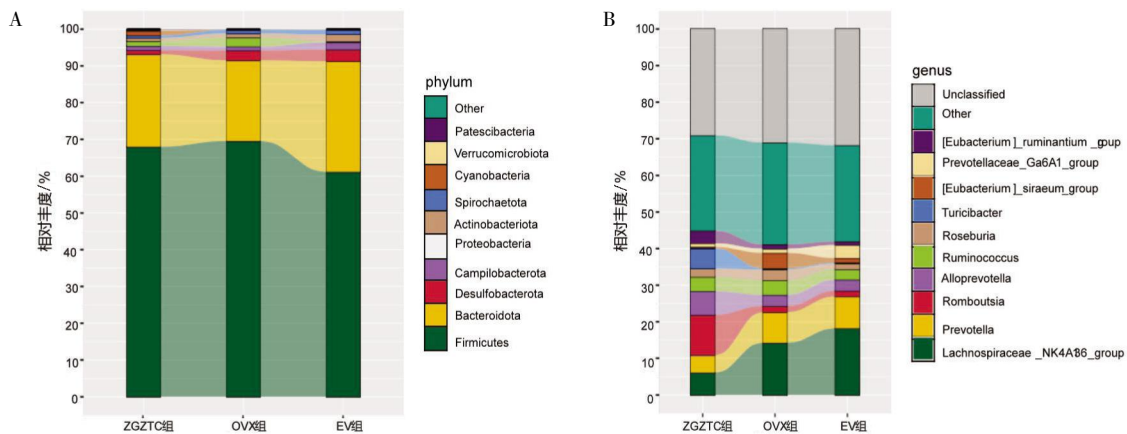


图9 门水平(A)及属水平(B)的肠道菌群相对丰度

ZGZTC 组(67.96%)和 EV 组(61.16%)的相对丰度均下降。在拟杆菌门丰度比较中,相比于 OVX 组(21.94%),ZGZTC 组(25.16%)和 EV 组(30.09%)的相对丰度均增加。

(2)属水平菌群丰度及差异

由图 9-B 可知,相对丰度前 10 的菌属有毛螺菌科_NK4A136 菌属(Lachnospiraceae_NK4A136_group)、普氏菌属(Prevotella)、龙布茨氏菌属(Romboutsia)、全缘球菌属(Alloprevotella)、瘤胃球菌属(Ruminococcus)、罗斯氏菌属(Roseburia)、疣微菌属(Turicibacter)、普雷沃氏菌科_Ga6A1 菌属(Prevotellaceae_Ga6A1_group)、优杆菌科_惰性菌属([Eubacterium]_siraenum_group)、优杆菌科_反刍菌属([Eubacterium]_ruminantium_group)。在毛螺菌科_NK4A136 菌属丰度比较中,相比于 OVX 组(14.23%),ZGZTC 组(6.10%)丰度明显降低,而 EV 组(18.17%)相较于 OVX 组丰度增加;在普氏菌属比较中,对比于 OVX 组(8.36%),ZGZTC 组(4.71%)的相对丰度明显降低,而 EV 组(8.71%)相较于 ZGZTC 组的相对丰度增加;在龙布茨氏菌属比较中,相比于 OVX 组(1.68%),ZGZTC 组(11.03%)的相对丰度显著增加,而 EV 组(1.55%)相较于 ZGZTC 组的相对丰度下降。

3 讨论

中医古籍并无 PMOP 的记载,但其临床表现与“骨痿”相似^[10]。“骨痿”以肝肾阴虚证、脾肾阳虚证及肾虚血瘀证多见,故治疗多从先后天之本——脾肾入手^[11]。ZGZTC 作为治疗 OP 的良药之一,具有补益肝肾、壮骨止痛之效。方中君药补骨脂可温肾壮阳,臣药淫羊藿可强筋壮骨,二药共奏助生肝肾之阳之功;枸杞子、女贞子滋补肝肾,骨碎补活血通经,狗脊补肝肾、强腰膝,四者共助补下焦肝肾之阴、强筋壮

骨之功,共为佐药;使药牛膝则引药下行达病所^[12]。然而,基于肠道菌群探讨 ZGZTC 防治 PMOP 的相关机制尚未阐明,有待进一步验证。

PMOP 的发病核心是骨代谢失衡,而导致骨代谢失衡的原因有炎症高表达、免疫系统失衡、雌激素水平降低,过程中均有肠道菌群参与。MCCABE 等^[13]发现,肠道炎症可导致 OP 发生,其中肿瘤坏死因子- α (tumor necrosis factor- α , TNF- α)和 IL-17 等炎症因子可刺激破骨细胞形成。MA 等^[14]发现,OVX 大鼠闭合蛋白-1 (Claudin-1) 和 Occludin 表达降低,提示 PMOP 会破坏肠道屏障功能,而肠道菌群可能通过激活免疫细胞来调节 Claudin-1 和 Occludin 蛋白表达。随着绝经后雌激素水平逐渐降低,甲状旁腺素分泌逐渐增多,但肠道菌群主要代谢产物短链脂肪酸的产生可以降低甲状旁腺素水平,从而增加矿物质吸收,影响激素代谢^[15]。EV 可提高体内的雌激素水平,具有抗骨质疏松作用。临床上将 EV 和淫羊藿总黄酮合用,淫羊藿的雄激素样作用可抵抗雌激素的毒副作用,从而起到平补阴阳、益肾健骨的疗效^[16]。健骨颗粒对肠道菌群环境和骨免疫调节有影响,可通过肠道菌群-短链脂肪酸-调节性 T 细胞 (regulatory T cell, Treg)/辅助性 T 细胞 17 (T helper cell 17, Th 17) 轴调节骨代谢^[17]。亦有研究表明,肠道中的有益菌群可通过调节肠道微生物群的组成和功能来影响 Treg/Th17 细胞及其相关细胞因子 IL-17、TGF- β 之间的平衡以维持骨骼稳态^[18]。因此,本实验检测了各组血清炎症标志物水平,结果显示,与 SHAM 组相比,OVX 组大鼠 IL-17 明显升高、TGF- β 降低,肠道黏膜存在大量炎性细胞,紧密连接相关蛋白 ZO-1、Occludin 表达均降低。与 OVX 组比较,ZGZTC 组及 EV 组 IL-17 明显降低、TGF- β 升高,肠道炎症情况明显改善。因此,减少炎症因子的产生,增加益生菌含量可能是 ZGZTC 通过肠道菌群改善 PMOP 的机

制之一。

肠道厚壁菌门-乳杆菌属的减少与老年阶段常见疾病之间存在密切相关性^[19]。研究显示,与骨密度正常的受试者相比,OP 患者的肠道菌群在门的水平上,厚壁菌门显著增加,而拟杆菌门显著减少,厚壁菌门/拟杆菌门与腰椎骨密度呈负相关;在属的水平上,OP 患者肠道菌群中梭菌属、粪球菌属、乳酸杆菌属的相对丰度显著增加,韦荣氏球菌属的相对丰度显著下降^[20]。本研究通过对比肠道菌群门、属丰度发现,门水平上,相比于 OVX 组,ZGZTC 组与 EV 组厚壁菌门丰度减少,拟杆菌门丰度上升,而此菌在帮助宿主维持肠道微生态平衡方面起到相当重要的作用,同时可通过与雌激素之间的相互作用有效调节骨代谢^[21],说明 ZGZTC 可能通过改善 OVX 大鼠肠道菌群中厚壁菌门/拟杆菌门的比例,改善由 OVX 所致的肠道菌群紊乱状态。在属的水平上,ZGZTC 能逆转瘤胃球菌属优势菌属在 OVX 大鼠肠道菌群中的丰度减少的情况,减少 OVX 组致病菌属的存在,进一步防止 LPS 分泌增加及肠黏膜屏障破坏。毛螺菌科是体内的有害菌,与体质量及血清总胆固醇含量呈正相关,提示其与骨-脂代谢的调节密切相关^[22]。本实验结果显示,ZGZTC 组毛螺菌科丰度降低,提示 ZGZTC 可能通过肠道菌群及其代谢产物进行骨-脂代谢调节,从而发挥抗 PMOP 作用。

综上所述,ZGZTC 能够通过调节肠道菌群结构、减少炎症因子生成、改善肠道炎症等方式调节 OVX 大鼠骨的形态学变化。本实验为 ZGZTC 治疗 OVX 提供了一定的科学依据,并且证实了其作用机制与调节肠道微生态有关,为补肾类方药通过调节肠道微生态改善疾病提供了研究基础。但本研究只采用了 16S rRNA 进行测序,存在覆盖不足等缺陷,后续将进行更深入的生物信息学分析,并对涉及的相关信号通路行进一步实验研究。

参考文献

[1] CHEN G Z, LIU H Y, WU X F, et al. Biomarkers of postmenopausal osteoporosis and interventive mechanism of catgut embedding in acupoints[J]. *Medicine*, 2020, 99(37): e22178.

[2] MIGLIORINI F, COLAROSSO G, BARONCINI A, et al. Pharmacological management of postmenopausal osteoporosis: A level I evidence based-expert opinion[J]. *Expert Review of Clinical Pharmacology*, 2021, 14(1): 105-119.

[3] 易生辉, 招文华, 任 辉, 等. 中西医结合治疗绝经后骨质疏松症的研究进展[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2022, 28(5): 274-282.

[4] 孙传睿, 李秋月, 金子开, 等. 中医药调控肠道菌群治疗绝经后骨质疏松症的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(5): 739-

744.

[5] 陈 沙, 王桂云, 李荣慧, 等. 雌性大鼠手术去势骨质疏松症模型建立及评价[J]. *湖南中医药大学学报*, 2020, 40(11): 1315-1319.

[6] 张 悦, 李运峰. 骨质疏松症动物模型研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(1): 152-156.

[7] 江瑞雪, 蒋欣泉, 文 晋. 骨质疏松动物模型研究现状与进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(7): 1039-1044.

[8] 王桂云, 吴结枝, 梁 琼, 等. 壮骨止痛胶囊对去卵巢大鼠股骨组织 Runx2、Osx 及 DKK1 蛋白表达的影响[J]. *世界科学技术: 中医药现代化*, 2021, 23(10): 3621-3629.

[9] 张 超, 李强强, 王 雄, 等. 异甘草素抑制 RANKL/RANK/ TRAF6 信号通路对骨质疏松大鼠成骨细胞分化的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(4): 488-492, 508.

[10] 郭诗琪, 陈学明, 张春晖, 等. 中医药治疗骨质疏松症的临床研究概况[J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(9): 5281-5284.

[11] 于冬冬, 李 泽, 李 鑫, 等. 绝经后骨质疏松症中医辨证分型和治疗研究进展[J]. *辽宁中医药大学学报*, 2020, 22(3): 61-63.

[12] 陈 沙, 吴文建, 吴结枝, 等. 壮骨止痛方对去势雌鼠转化生长因子 $\beta 1$ mRNA 及 I 型胶原纤维 mRNA 表达的影响[J]. *中医药导报*, 2020, 26(5): 35-38.

[13] MCCABE L R, PARAMESWARAN N. Advances in probiotic regulation of bone and mineral metabolism[J]. *Calcified Tissue International*, 2018, 102(4): 480-488.

[14] MA S C, QIN J H, HAO Y Q, et al. Structural and functional changes of gut microbiota in ovariectomized rats and their correlations with altered bone mass[J]. *Aging*, 2020, 12(11): 10736-10753.

[15] 雷欣东, 于 慧, 龙 琼, 等. 绝经后骨质疏松症发病机制研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27(11): 1681-1684.

[16] 肖 平, 侯 平, 林正坚, 等. 淫羊藿总黄酮和戊酸雌二醇对骨质疏松症大鼠 TGF- $\beta 1$ /Smads 信号通路的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(6): 818-824.

[17] SUN P, ZHANG C T, HUANG Y M, et al. Jiangu Granule ameliorated OVX rats bone loss by modulating gut microbiota-SCFAs-Treg/Th17 axis[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapie*, 2022, 150: 112975.

[18] 何姣姣, 陈玉林, 张 敏, 等. 肠道菌群在骨质疏松症发病机制中的研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2023, 29(8): 1197-1202.

[19] WEI M H, LI C, DAI Y, et al. High-throughput absolute quantification sequencing revealed osteoporosis-related gut microbiota alterations in Han Chinese elderly[J]. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, 2021, 11: 630372.

[20] 赵常红, 李世昌, 孙 朋, 等. 肠道微生物与骨质疏松症的相关性研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(10): 1493-1497.

[21] 周广文, 向 楠, 张 妍, 等. 高通量测序研究补肾化痰方对去势骨质疏松大鼠肠道菌群结构与多样性的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(7): 3305-3310.

[22] ZANG L Q, BAHARLOOEIAN M, TERASAWA M, et al. Beneficial effects of seaweed-derived components on metabolic syndrome via gut microbiota modulation[J]. *Frontiers in Nutrition*, 2023, 10: 1173225.

(本文编辑 周 旦)