

# 基于粪菌移植研究青娥丸的抗骨质疏松作用

谢辉, 林上阳, 华政颖, 郭梦雨, 于垠廷, 李伟东

(南京中医药大学药学院, 江苏省中药炮制重点实验室, 江苏 南京 210023)

**摘要:**目的 探讨粪菌移植对骨质疏松症的改善作用, 以及大鼠肠道菌群对青娥丸生、盐品中主要化学成分的代谢作用。方法 将36只SD大鼠随机分为6组, 假手术组、模型组、仙灵骨葆胶囊治疗组(阳性药组)、青娥丸生品粪菌移植治疗组(青娥丸生品移植组)、青娥丸盐品粪菌移植治疗组(青娥丸盐品移植组)以及益生菌组。采用去除双侧卵巢法制备大鼠骨质疏松症模型。青娥丸生、盐品移植组自造模6周后开始分别给予相应的粪菌液(每100g体质量给予2mL), 对照组和模型组给予等体积生理盐水, 益生菌组给予乳酸杆菌菌液1mL。给药8周后, 采用Micro-CT检测大鼠骨密度(BMD); 通过ELISA法检测大鼠血清雌二醇(E<sub>2</sub>)、骨钙素(BGP)、碱性磷酸酶(BAP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)的含量以及炎症因子IL-17、IL-6和TNF-α的水平; 采用三点弯曲试验法检测大鼠股骨力学指标的变化; 采用GC-MS技术测定大鼠肠道内容物中乙酸、丙酸和丁酸的含量。体外实验将青娥丸生、盐品分别与大鼠肠道菌群共孵育, 采用UHPLC-Q-TOF/MS技术对共孵育样品中青娥丸主要成分的原型和代谢产物进行检测与分析, 并推测其代谢途径。结果 与假手术组相比, 骨质疏松模型组大鼠表现为BMD降低( $P < 0.001$ ), 血清中E<sub>2</sub>水平降低( $P < 0.001$ ), BGP、BAP、TRAP水平升高( $P < 0.001$ ), 骨力学参数中最大载荷、最大挠度和刚度降低( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), 血清中IL-17、IL-6和TNF-α水平升高( $P < 0.001$ ), 肠道内容物中乙酸、丙酸和丁酸含量降低( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ )。与模型组相比, 青娥丸生、盐品移植组上述指标均有不同程度的改变, 趋于假手术组水平, 但青娥丸生、盐品移植组之间各指标无显著性差异。体外共孵育实验结果表明, 青娥丸方中4种主要原型成分在经肠道菌群代谢后共产生14种代谢产物, 其中主要代谢产物为肠二醇、肠内酯、补骨脂素和异补骨脂素等, 而青娥丸生、盐品共孵育样品的代谢产物之间无显著差异。结论 青娥丸可通过肠道菌群减少大鼠血清中炎症因子的产生, 增加大鼠肠道中短链脂肪酸的含量, 改善大鼠骨质疏松; 大鼠肠道菌群能够影响青娥丸方中主要成分的代谢。肠道菌群是青娥丸治疗骨质疏松症的靶点, 青娥丸和肠道菌群之间相互作用可能是青娥丸改善骨质疏松症的机制之一。

**关键词:**青娥丸; 粪菌移植; 骨质疏松; 药物代谢; 作用机制

**中图分类号:** R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 1672-0482(2021)04-0521-08

**DOI:** 10.14148/j.issn.1672-0482.2021.0521

**引文格式:** 谢辉, 林上阳, 华政颖, 等. 基于粪菌移植研究青娥丸的抗骨质疏松作用[J]. 南京中医药大学学报, 2021, 37(4): 521-528.

## To Explore the Effect of Qinge Pills on Anti-Osteoporosis Based on Fecal Microbiota Transplantation

XIE Hui, LIN Shang-yang, HUA Zheng-ying, GUO Meng-yu, YU Yin-ting, LI Wei-dong

(School of Pharmacy, Engineering Center of State Ministry of Education for Standardization of Chinese Medicine Processing, Nanjing University of Chinese Medicine, Nanjing, 210023, China)

**ABSTRACT: OBJECTIVE** To explore the effect of the intestinal flora transplantation in rats on osteoporosis, and to explore the metabolization of the main chemical components in Qinge pills raw and salt products by rats intestinal flora. **METHODS** 36 SD rats were randomly divided into sham operation group, model group, Xianling Gubao capsule treatment group (positive drug group), Qinge pills raw product fecal bacteria transplantation treatment group (Qing'e pills raw product transplantation group), Qinge pills salt fecal bacteria transplantation treatment group (Qing'e pills salt transplantation group) and probiotics group. A rat model of osteoporosis was prepared by removing both ovaries. The Qinge pills raw product transplantation group and the Qinge pills salt transplantation group were given 2 mL per 100 g (body weight) of fecal bacteria solution 6 weeks after the model was established. The control group and the model group were given equal volumes of normal saline, and the probiotic group was given 1 mL of lactobacillus liquid prepared. After 8 weeks of administration, the bone mineral density (BMD) of rats was measured by Micro-CT; the serum estradiol (E<sub>2</sub>), osteocalcin (BGP), alkaline phosphatase (BAP) and anti-tartaric acid were measured by ELISA method. The content of acid phosphatase (TRAP); the three-point bending test method was used to detect the changes in rat femur mechanics; ELISA method was used to detect the levels of IL-17, IL-6 and TNF-α in the rat serum; GC-MS was used. The technique measures the contents of acetic acid, propionic acid and butyric acid in the intestinal contents of the rat ileum. *In vitro*, Qinge pills and salt products were incubated with rat intestinal flora. UHPLC-Q-

**收稿日期:** 2021-03-19

**基金项目:** 国家自然科学基金(81773902, 81973484)

**第一作者:** 谢辉, 女, 硕士研究生, E-mail: xhcarrie@163.com

**通信作者:** 李伟东, 男, 研究员, 主要从事中药炮制机理研究, E-mail: liweidong0801@163.com

TOF/MS was used to detect and analyze the prototypes and metabolites of the main components of Qing'e pills in the co-incubated samples. Speculate its metabolic pathway. **RESULTS** Compared with the sham operation group, rats in the osteoporosis model group showed decreased BMD ( $P < 0.001$ ), decreased  $E_2$  level ( $P < 0.001$ ), increased BGP, BAP, and TRAP levels ( $P < 0.001$ ), decreased maximum load, maximum deflection and stiffness in bone mechanical parameters ( $P < 0.05$ ,  $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ), and increased IL-17, IL-6 and TNF- $\alpha$  ( $P < 0.001$ ), and decreased the contents of acetic acid, propionic acid and butyric acid in the ileum and intestinal contents ( $P < 0.01$ ,  $P < 0.001$ ). After intervention treatment of fecal bacteria transplantation group, compared with model group, the above indicators all changed to different degrees, tending to the level of sham operation group, but there was no significant difference between Qing'e pills raw product transplantation group and salt transplantation group. *In vitro* Qing'e pills raw materials, salt products and rat intestinal flora co-incubation samples were tested and 14 metabolites were produced from the four main prototype components found in Qing'e pills prescription produced by the intestinal flora, of which the main metabolites were intestinal diol, intestinal fat, psoralen and isopsoralen. There was no difference between the metabolites of Qing'e pills raw and salt products. **CONCLUSION** Qing'e pills can reduce the production of inflammatory factors in the rat serum through the intestinal flora, increase the content of short-chain fatty acids in the rat's intestine, and improve the osteoporosis of rats. The rat's intestinal flora can affect the metabolism of certain main ingredients in Qing'e pills prescription. Intestinal flora is the target of Qing'e pills in the treatment of osteoporosis. The interaction between Qing'e pills and intestinal flora may be one of the mechanisms by which Qing'e pills can improve osteoporosis.

**KEYWORDS:** Qing'e pills; fecal microbiota transplantation; osteoporosis; drug metabolism; mechanism of action

绝经后骨质疏松症(PMO)是一种常见疾病,约50%妇女绝经后会出现骨质疏松。近年来,肠道微生物与骨代谢的关系已成为医学研究的热点,肠道菌群与骨质疏松症发生发展有关<sup>[1]</sup>。益生菌可通过调节宿主肠道菌群,降低炎症因子的表达水平,促进钙的吸收等多种途径来改善骨质代谢<sup>[2-4]</sup>。

课题组前期研究发现,青娥丸对去卵巢引起的大鼠骨质疏松症具有良好的治疗效果,且由盐杜仲、盐补骨脂组方的青娥丸(青娥丸盐品)具有更强的抗骨质疏松作用<sup>[5]</sup>。课题组研究还发现,PMO发生时出现益生菌数量减少、肠道菌群丰度改变等肠道微生态变化,而青娥丸能调节去卵巢大鼠的肠道菌群丰度趋于假手术组,并与短链脂肪酸的改变及炎症因子的降低相关,但具体机制尚不明确。粪菌移植通过将供菌体粪便中的菌群经口服方式移植给接收体,使得接收体肠道内细菌组成以及丰度改变,并接近于供菌体<sup>[6]</sup>。采用粪菌移植实验,能够将青娥丸改善的肠道菌群移植给骨质疏松模型大鼠,验证肠道菌群是否为青娥丸发挥抗骨质疏松作用的靶点之一。此外,青娥丸中的部分化学成分也可能通过肠道菌群发生脱氢、脱羟基、脱糖基等反应,转化成不同的代谢产物,发挥抗骨质疏松作用<sup>[7]</sup>。

本文通过粪菌移植和肠道菌群共孵育实验探讨青娥丸与大鼠肠道菌群的相互作用,为青娥丸通过肠道菌群途径发挥抗骨质疏松作用提供实验依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 主要试剂

青娥丸由盐杜仲、盐补骨脂、炒核桃仁、蒸大蒜4味中药组成,杜仲饮片购于北京本草方源药业科技有限公司(四川成都,批号:18010-1);补骨脂饮片购于北京本草方源药业科技有限公司(河南商丘,批

号:18050-1);雌二醇( $E_2$ )、骨钙素(BGP)、骨特异性碱性磷酸酶(BAP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)、IL-17、TNF- $\alpha$ 、IL-6 ELISA 检测试剂盒均购自上海酶联生物科技有限公司(批号:20210111A, 20210108A, 20210106A, 20210106A, 20210106A, 20210106A, 20210108A);鼠李糖乳杆菌(*Lactobacillus rhamnosum*)购于南京乐诊有限公司(批号:20042501);LB培养基购自青岛高科技工业园海博生物技术有限公司(批号:20191029);仙灵骨葆胶囊购于贵州同济堂制药有限公司(批号:181125)。

### 1.2 仪器

Micro-CT (Skyscan 1176, 比利时 Bruker 公司);生物力学测试仪 (Acumen3, 美国 MTS 公司);厌氧培养箱 (AW200SG, 英国 Electrotek 公司);Genespeed 1536 离心机 (基因有限公司);UHPLC-Q-TOF/MS 质谱联用系统:超高效液相色谱系统 (30AD, 日本 Shimadzu 公司), Q-TOF-MS/MS 5600<sup>+</sup> 质谱仪 (ESI 离子源, 美国 AB Sciex 公司)。

### 1.3 实验动物

雌性 SD 大鼠 48 只,3 月龄,由南京青龙山实验动物中心提供,合格证号:SCXK(苏)-2018-0049。实验前将大鼠置于 SPF 级恒温(20~24℃)、恒湿(45%~60%)的环境控制室中,按标准光照/暗循环 12 h/12 h,连续 7 d。实验获得了南京中医药大学动物伦理委员会的批准(批准号:202006A005)。

### 1.4 青娥丸给药样品的制备

1.4.1 杜仲不同炮制样品的制备 生杜仲:刮去残留粗皮,洗净,切块或丝,干燥。盐杜仲:取净杜仲丝或块,用盐水拌匀,闷润,待盐水被吸尽后,置锅内,中火加热,炒至丝断,表面焦黑色,取出放凉,每 100 kg 净杜仲用食盐 2 kg。

1.4.2 补骨脂不同炮制样品的制备 生补骨脂:簸净杂质,洗净,晒干。盐补骨脂:取净补骨脂用盐水拌匀,微润,置锅内用文火炒至微鼓起,取出,晾干。每100 kg净补骨脂用食盐2 kg。

1.4.3 青娥丸生品制备 取生杜仲480 g,生补骨脂240 g,炒核桃仁150 g,大蒜120 g。将大蒜蒸熟,干燥后与杜仲以及补骨脂粉碎成细粉,然后过筛,再将核桃仁捣烂,与以上粉末共研,过筛混匀,每100 g粉末加炼蜜50 g制成大蜜丸。

1.4.4 青娥丸盐品制备 取盐杜仲480 g,盐补骨脂240 g,炒核桃仁150 g,大蒜120 g,制备方法同“1.4.3”。

1.4.5 青娥丸样品的提取 分别取青娥丸生、盐品样品各800 g,粉碎,加入8倍量95%乙醇,加热回流提取2次,每次1 h;醇提后过滤得到药渣,再加入8倍量的水,加热回流提取2次,每次1 h;合并4次提取液浓缩,药液最终浓度为0.6 g/mL。

1.5 青娥丸生、盐品给药大鼠粪菌移植菌液和益生菌菌液的制备

另取12只SD大鼠,每天上午10点分别给予大鼠( $n=6$ )青娥丸生、盐品3.0 g/(kg·d),然后于次日上午8点通过腹部挤压法,采集新鲜粪便各100 mg,用1 mL灭菌PBS溶解,涡旋混匀,3000 r/min离心10 min,取上层清液,即为菌液。每日现用现配。将鼠李糖乳杆菌冻干粉稀释至 $1 \times 10^9$  CFU/mL分装,放置于4℃冰箱备用。

1.6 动物造模以及给药方法

36只SD大鼠随机分为假手术组,模型组,阳性药组,青娥丸生、盐品移植组,益生菌组,每组6只。适应性喂养1周后进行戊巴比妥(40 mg/kg)腹腔麻醉。去卵巢大鼠通过背部切口切除双侧卵巢,假手术大鼠切除同等质量的脂肪组织。术后5周,称取氨苄青霉素1 g,甲硝唑1 g,万古霉素0.5 g以及硫酸新霉素0.5 g,加入1 L双蒸水中,充分混匀制备抗生素水。青娥丸生、盐品移植组分别给予抗生素水5 d,随后给予正常水3 d,用于制造低菌鼠模型<sup>[5]</sup>。从第6周开始,青娥丸生、盐品移植组分别灌胃相应的粪菌移植菌液,每100 g大鼠灌胃2 mL,过程如图1所示。阳性药组给予仙灵骨葆胶囊0.6 g/(kg·d),模型组与假手术组给予等量生理盐水,益生菌组每天给予制备的乳酸杆菌1 mL,各组每日给药1次,持续8周。

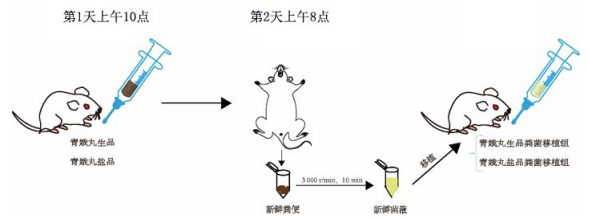


图1 粪菌移植组给药示意图

1.7 大鼠粪便、血清以及组织样本的收集

各组大鼠连续给药8周后,腹主动脉取血,室温静置1 h后,4500 r/min离心5 min,取上清,并立即-80℃保存。动物处死后,剥离双侧股骨,其中左侧股骨用生理盐水浸泡过的纱布包裹,4℃保存,右侧股骨用4%中性福尔马林溶液固定。每只大鼠取肠道内容物于EP管中,-80℃冰箱保存。

1.8 大鼠骨微结构和骨密度(BMD)检测

将大鼠右侧股骨样本独立固定,使用Micro-CT对股骨远端进行扫描,扫描条件设置为:电压65 kV,电流385 μA,扫描层厚度18 μm。扫描数据导入NRecon v1.6.3进行三维重建,使用CTAn和CTvol软件进行分析,获得BMD参数。

1.9 大鼠骨生物力学检测

取大鼠左侧股骨,使用游标卡尺测量股骨的长度并确定中点位置。使用夹具将标本固定在生物力学测试仪上,直至股骨出现断裂为实验终点。根据参数得载荷-位移曲线,计算最大负荷、最大挠度和刚度3项参数。

1.10 大鼠血清E<sub>2</sub>、BGP、BAP和TRAP水平检测

将大鼠血清样品从冰箱取出,于4℃解冻。根据说明书使用E<sub>2</sub>、BGP、BAP和TRAP ELISA试剂盒进行检测。

1.11 大鼠肠道内容物中乙酸、丁酸、丙酸含量检测

取大鼠肠道内容物100 mg,参照文献<sup>[8]</sup>制备及检测。在水、丙醇和吡啶(8:3:2)的反应系统中,加入氯甲酸丙酯100 μL,用正己烷两步萃取法提取。采用Agilent HP-5 ms(1901s-433)柱(0.25 mm×30 m×0.25 μm)分离,分离比为50:1。电离能为70 eV,源温度为230℃,四极杆温度为150℃。入口温度设置为250℃。溶剂延迟1.5 min后,得到GC-MS数据,MS扫描范围 $m/z$  40~550。

1.12 大鼠血清IL-17、IL-6和TNF-α水平检测

将大鼠血清样品从冰箱取出,于4℃解冻。根据说明书使用IL-17、IL-6和TNF-α ELISA试剂盒



进行检测。

### 1.13 青娥丸生、盐品浸膏的制备

分别精密称取青娥丸生、盐品各 50.00 g,用 8 倍量水(400 mL)浸泡 30 min,武火煮沸,文火保持微沸 1 h,4 层纱布过滤药液,加热回流提取 2 次,水提后药渣再加 8 倍量的 95%乙醇,加热回流提取 2 次,每次 1 h;合并 4 次提取液,浓缩至 1 g/mL,再倒入蒸发皿中水浴蒸至干浸膏,−20 °C 保存。

### 1.14 青娥丸与大鼠肠道菌离体共培养

取正常大鼠粪便适量,配制粪菌液后,再以 1:10 的比例用 LB 培养基对肠道菌上清液进行稀释,混悬 3 min<sup>[9]</sup>。青娥丸生、盐品浸膏用 60%乙醇溶解分别制成 0.03 g/mL 的青娥丸浸膏复溶液。于灭菌后的离心管中接种入 980 μL 肠道菌液,平行 3 份。其中 2 份加入 20 μL 青娥丸生、盐品浸膏复溶液,分别作为药物与肠道菌共孵育组,另 1 份作为肠道菌空白组。取青娥丸生、盐品浸膏复溶液加入到 LB 培养液中,作为药物空白组。各组均轻轻吹打均匀,于 37 °C 厌氧培养箱中共同孵育 72 h。孵育后,以体积比 1:1 加入甲醇终止反应,涡旋 2 min,12 000 r/min 离心 10 min,取上清,利用真空浓缩仪将其溶液挥干,残渣加入 1 mL 60%甲醇溶解,涡旋 2 min,以 12 000 r/min 离心 10 min,取上清,进样 UHPLC-Q-TOF/MS 分析。

### 1.15 UHPLC-Q-TOF/MS 分析条件

色谱柱: Waters C<sub>18</sub> 反相色谱柱(2.1 mm × 100 mm, 1.7 μm),流动相为 0.1%甲酸水(A)-乙腈(B),梯度洗脱程序: 0~2 min, 5% B; 2~5 min, 5%~20% B; 5~7 min, 20%~24% B; 7~8 min, 24%~36% B; 8~10 min, 36%~45% B; 10~16 min, 45%~58% B; 16~21 min, 58%~85% B; 21~25 min, 85%~100% B。柱温为 30 °C,流速为

0.3 mL/min,进样量为 2 μL。

质谱扫描分别于正、负离子模式下进行。喷雾辅助气体: 雾化气(Gas1): 55 psi(1 psi = 6.896 kPa); 辅助加热器(Gas2): 55 psi; 气帘气: 35 psi。离子源温度: 550 °C; 离子喷雾电压(ISVF): +4 500 V/−4 500 V; 去簇电压(DP): +60 V/−60 V; 碰撞能量(CE): +35 V/−35 V; TOF-MS 扫描范围: 100~2 000 Da; Production MS 扫描范围: 50~1 500 Da。

### 1.16 数据分析

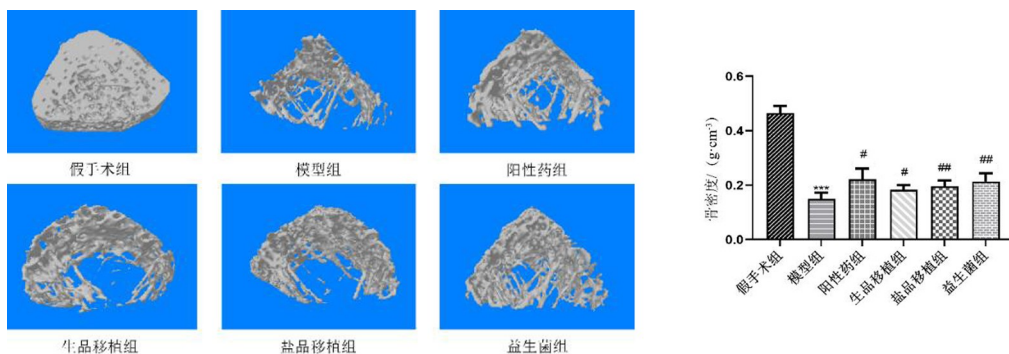
1.16.1 统计学方法 应用 SPSS17.0 统计软件。计量资料以  $\bar{x} \pm s$  表示。符合正态分布并且方差齐,则进行单因素方差分析;不符合正态分布或方差不齐,进行非参数检验。 $P < 0.05$  为差异有统计学意义。

1.16.2 代谢产物鉴定 通过 Chemicalbook、SciFinder 数据库下载各有效成分的 mol 文件,建立包含化学成分的名称、分子式和 mol 结构式等信息的青娥丸有效成分化学成分库。将质谱数据导入 PeakView1.2 中,对化学成分进行匹配鉴别。将质谱数据导入 Metabolitepilot 2.0.4 中,处理过程分为初步筛选代谢产物和进一步确认代谢产物。

## 2 结果

### 2.1 青娥丸生、盐品移植组大鼠的骨小梁结构及 BMD 测定结果

如图 2 所示,与假手术组比较,模型组骨小梁稀疏,骨小梁微结构受损。与模型组相比,各治疗组骨小梁数目增加,但未能完全使受损的骨小梁微结构恢复至假手术组的水平。给药 8 周后,与假手术组比较,模型组 BMD 明显减少( $P < 0.001$ );与模型组相比,青娥丸生、盐品移植组和益生菌组 BMD 均能显著增加( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

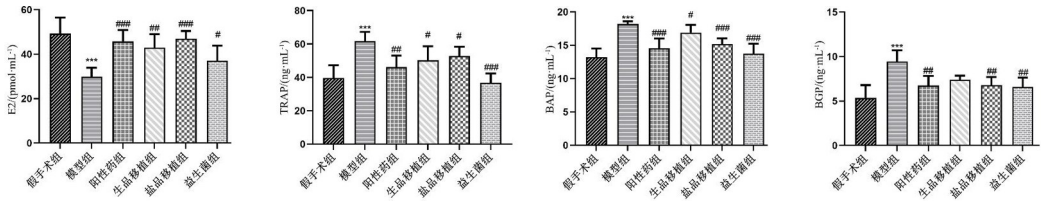


注:与假手术组比较,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 6$ 。

图 2 青娥丸生、盐品移植组大鼠的骨小梁结构和 BMD

## 2.2 青娥丸生、盐品移植组大鼠血清指标的测定结果

如图3所示,给药8周后,与假手术组比较,模型组大鼠血清E<sub>2</sub>的含量明显减少( $P < 0.001$ );与模型组相比,青娥丸生、盐品移植组和益生菌组大鼠血清E<sub>2</sub>含量明显增加( $P < 0.05, P < 0.01, P <$



注:与假手术组比较,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ ,### $P < 0.001$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 6$ 。

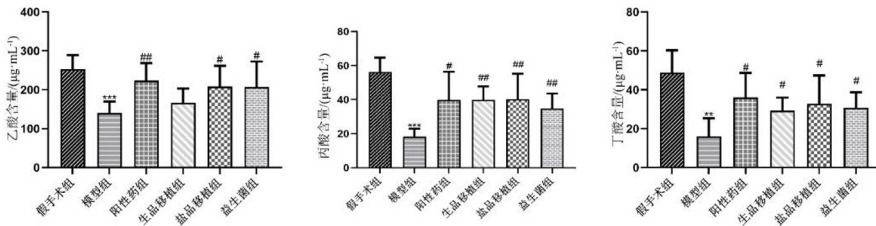
图3 青娥丸生、盐品移植组大鼠血清E<sub>2</sub>、TRAP、BAP、BGP的水平

## 2.3 青娥丸生、盐品移植组大鼠骨力学指标分析结果

如表1所示,与假手术组相比,模型组大鼠股骨的最大载荷、最大挠度和刚度均显著降低( $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$ );与模型组相比,青娥丸生品移植组大鼠股骨的最大载荷和刚度显著增加( $P < 0.01, P < 0.001$ ),青娥丸盐品移植组和益生菌组大鼠股骨的最大载荷、最大挠度和刚度均显著增加( $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$ )。

## 2.4 青娥丸生、盐品移植组大鼠肠道内容物中短链脂肪酸含量的测定结果

如图4所示,与假手术组比,模型组大鼠肠道内容物中乙酸、丙酸和丁酸含量均显著降低( $P < 0.001, P < 0.01$ );与模型组相比,青娥丸生品移植



注:与假手术组比较,\*\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 6$ 。

图4 青娥丸生、盐品移植组大鼠肠道内容物中乙酸、丙酸、丁酸含量

## 2.5 青娥丸生、盐品移植组大鼠血清炎症指标的测定结果

如图5所示,与假手术组相比,模型组大鼠血清IL-17、IL-6和TNF- $\alpha$ 水平显著升高( $P < 0.001$ );

与假手术组比较,模型组大鼠血清的TRAP、BAP和BGP含量均明显增加( $P < 0.001$ );与模型组比较,青娥丸生、盐品移植组和益生菌组大鼠血清中的TRAP、BAP和BGP含量均显著降低( $P < 0.05, P < 0.001, P < 0.01$ )。

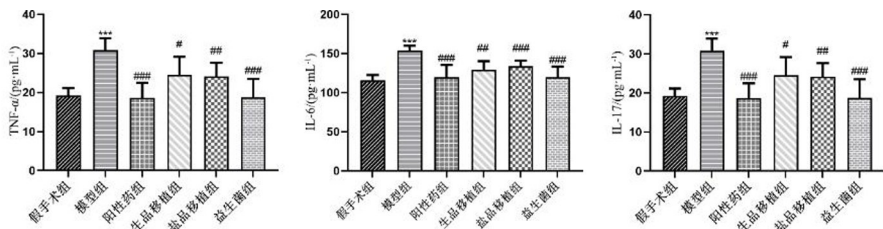
组大鼠肠道内容物中丙酸和丁酸含量显著升高( $P < 0.01, P < 0.05$ ),青娥丸盐品移植组和益生菌组大鼠肠道内容物中乙酸、丙酸和丁酸含量均升高( $P < 0.05, P < 0.01$ )。

表1 青娥丸生、盐品粪菌移植组大鼠骨力学指标( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

组别	最大载荷/ N	最大挠度/ mm	刚度/ (N·mm <sup>-1</sup> )
假手术组	133.33±10.46	0.75±0.10	0.28±0.03
模型组	96.17±14.41***	0.59±0.08*	0.21±0.04**
阳性药组	127.00±5.66###	0.69±0.05#	0.26±0.02#
生品移植组	130.67±7.23###	0.66±0.03	0.27±0.01**
盐品移植组	129.17±4.71###	0.76±0.10##	0.27±0.04#
益生菌组	123.33±8.91##	0.70±0.06#	0.27±0.02##

注:与假手术组比较,\* $P < 0.05$ ,\*\* $P < 0.01$ ,\*\*\* $P < 0.001$ ;与模型组比较,# $P < 0.05$ ,## $P < 0.01$ ,### $P < 0.001$ 。

与模型组相比,青娥丸生、盐品移植组和益生菌组大鼠血清IL-17、IL-6和TNF- $\alpha$ 水平均显著降低( $P < 0.05, P < 0.01, P < 0.001$ )。



注：与假手术组比较，\*\*\*  $P < 0.001$ ；与模型组比较，#  $P < 0.05$ ，##  $P < 0.01$ ，###  $P < 0.001$ 。 $\bar{x} \pm s, n = 6$ 。

图 5 青娥丸生、盐品移植组大鼠血清 TNF- $\alpha$ 、IL-6、IL-17 水平

2.6 UHPLC-Q-TOF/MS 基准峰色谱图

正、负离子模式下肠道菌空白组、药物空白组和

生、盐品青娥丸与肠道菌共孵育组的 UHPLC-Q-TOF/MS 总离子流图见图 6~7。

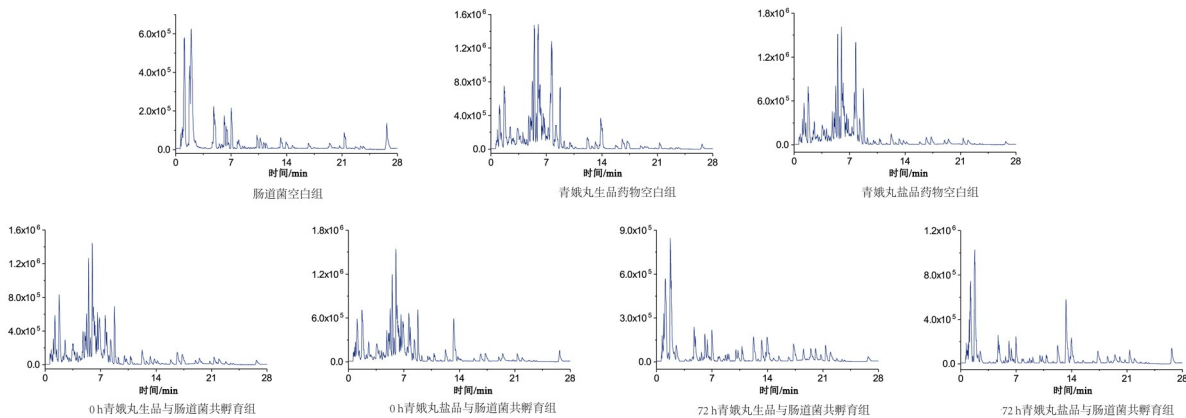


图 6 正离子模式下各实验组 UHPLC-Q-TOF/MS 基准峰色谱图

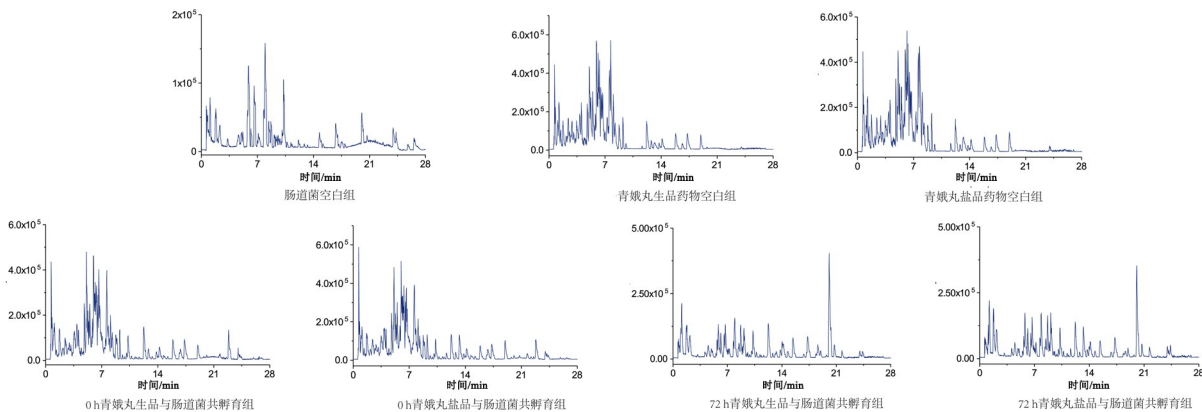


图 7 负离子模式下各实验组 UHPLC-Q-TOF/MS 基准峰色谱图

2.7 青娥丸主要有效成分的代谢产物分析结果

通过查阅单体有效成分肠道菌代谢相关文献，结合课题组前期青娥丸盐灸前后有效成分含量变化的研究结果，选取 4 种有效成分评价青娥丸生、盐品肠道菌代谢的差异，包括环烯醚萜类(京尼平苷)，苯丙素类(松脂醇二葡萄糖苷)，香豆素类(补骨脂苷和异补骨脂苷)。根据对照品保留时间，特征碎片峰及精确质量数的变化鉴定 4 种有效成分在肠道菌孵育液中的代谢过程，其主要代谢途径如图 8~10。主要代谢产物鉴定结果如表 2 所示，共发现 14 种代谢产物，其中主要的代谢产物为植物雌激素肠二醇、肠

内酯、补骨脂素和异补骨脂素，青娥丸生品和盐品在代谢产物种类上相同。

3 讨论

发生 PMO 的主要原因是机体的雌激素水平降低，导致破骨细胞与成骨细胞的动态平衡被打破，破骨细胞的数量与活性增强，从而导致骨量的减少，形成骨质疏松。仙灵骨葆胶囊对于绝经后骨质疏松症的治疗有良好的临床疗效<sup>[10]</sup>，也有大量文献将其用作治疗绝经后骨质疏松症的阳性药<sup>[11]</sup>。血清  $E_2$  的含量反映了体内雌激素的水平，大鼠摘除双侧卵巢后，体内  $E_2$  水平显著降低，表明去卵巢手术成功。

Micro-CT 可以通过三维视角反映骨小梁形态结构,得到的骨小梁三维图像可直观反映骨小梁状态。

BMD 测定作为临床评价骨脆性的常用方法,对于评估骨折危险具有重要意义。

表 2 青娥丸有效成分体外肠道菌代谢物分析结果

No.	保留时间/ min	分子式	理论 质量数	实测 质量数	误差	二级碎片	代谢物鉴定
PDG	5.89	C <sub>32</sub> H <sub>42</sub> O <sub>16</sub>	681.240 0	681.240 6	0.9	681.263 8,519.186 6,357.133 8,151.041 6	松脂醇二葡萄糖苷
PDG-M1	9.47	C <sub>20</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	357.134 4	357.134 1	0.9	357.134 1,151.038 9	松脂醇
PDG-M2	8.36	C <sub>20</sub> H <sub>26</sub> O <sub>6</sub>	361.165 7	361.166 7	2.9	331.166 2,313.140 9,179.070 5,165.055 6	开环异落叶松树脂酚
PDG-M3	5.72	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>6</sub>	333.134 4	333.135 0	1.9	303.128 7,167.070 1,135.045 2,123.047 9	肠二醇+2OH
PDG-M4	8.31	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>5</sub>	317.139 5	317.139 6	0.5	271.196 4,121.065 9,119.049 8,107.052 1	肠二醇+OH
PDG-M5	9.05	C <sub>18</sub> H <sub>22</sub> O <sub>4</sub>	301.144 5	301.144 2	-1.0	271.132 8,133.064 8,107.050 2	肠二醇
PDG-M6	10.17	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>4</sub>	297.113 2	297.113 8	1.8	253.122 3,189.085 9,121.065 3,107.051 5	肠内酯
PDG-M7	7.89	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>6</sub>	329.103 1	329.104 6	4.7	285.114 0,135.082 1,107.105 1	肠内酯+2OH
PDG-M8	8.52	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	313.108 2	313.109 6	4.7	268.129 3,189.055 6,135.043 3,123.044 9	肠内酯+OH
PDG-M9	8.92	C <sub>18</sub> H <sub>18</sub> O <sub>5</sub>	313.108 2	313.109 6	4.7	268.129 3,189.055 6,135.043 3,107.053 3	肠内酯+OH
JNPG	5.73	C <sub>17</sub> H <sub>24</sub> O <sub>10</sub>	387.129 7	387.129 1	-1.5	355.110 9,225.077 3,207.065 3,101.024 9	京尼平苷
JNPG-M1	6.54	C <sub>11</sub> H <sub>14</sub> O <sub>5</sub>	225.076 9	225.077 2	1.4	207.065 7,123.046 1,105.036 3,101.026 3	京尼平
C-1	6.05	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	365.087 8	365.087 5	-0.9	203.034 0,159.045 0,130.042 2	补骨脂苷
C-M1	10.02	C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	187.038 8	187.039 1	0.7	187.039 1,143.050 1,131.050 7,115.056 1	补骨脂素
C-M2	8.93	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	207.065 2	207.065 1	-0.4	189.056 0,161.060 7,147.044 7,133.062 7	补骨脂素+2H+H <sub>2</sub> O
C-2	6.17	C <sub>17</sub> H <sub>18</sub> O <sub>9</sub>	365.087 8	365.087 0	-2.1	203.033 9,159.044 8	异补骨脂苷
C-M3	10.23	C <sub>11</sub> H <sub>6</sub> O <sub>3</sub>	187.038 9	187.039 1	0.1	187.039 0,143.050 1,131.050 7,115.056 1	异补骨脂素
C-M4	9.21	C <sub>11</sub> H <sub>10</sub> O <sub>4</sub>	207.065 2	207.065 4	0.8	189.056 1,161.064 7,147.044 3,133.065 3	异补骨脂素+2H+H <sub>2</sub> O

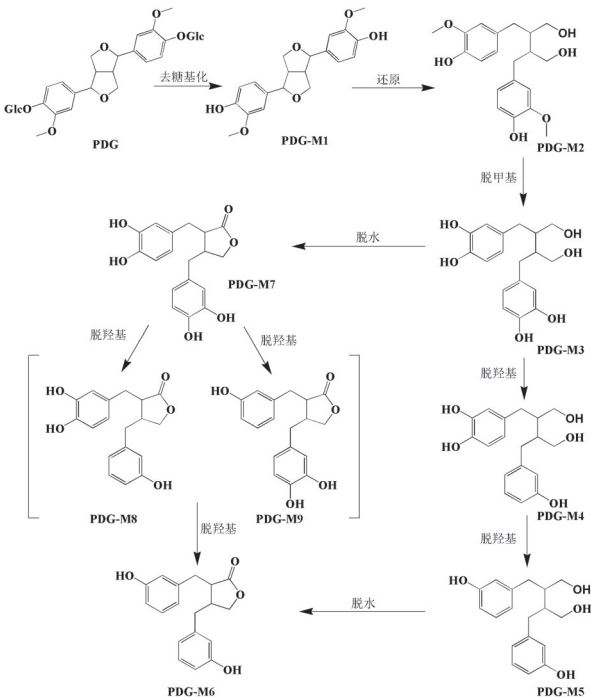


图 8 松脂醇二葡萄糖苷在大鼠肠道菌中可能的代谢途径

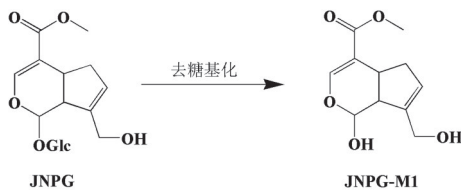


图 9 京尼平苷在大鼠肠道菌中可能的代谢途径

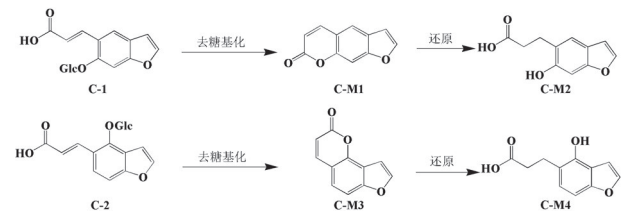


图 10 补骨脂苷和异补骨脂苷在大鼠肠道菌中可能的代谢途径

骨代谢主要由破骨细胞介导的骨吸收和成骨细胞介导的骨形成构成,骨代谢可及时反映机体内骨转换状态以及骨代谢、骨重建的变化<sup>[12]</sup>。BAP 与 BGP 是反映成骨细胞活性的重要指标,女性绝经后骨合成速率较对照组明显增快,符合“高转换型”骨代谢特点<sup>[13]</sup>。TRAP 是反映破骨细胞活性的重要指标。骨生物力学指标可以提供更多有关骨力学性质的信息,是一种直接的测试手段。本实验测定并分析了青娥丸粪菌移植之后大鼠 BMD,血清 E<sub>2</sub>、BAP、BGP、TRAP 含量以及股骨生物力学参数,发现粪菌移植后,大鼠 BMD 升高,PMO 得到改善。但青娥丸生、盐品移植组之间无显著性差异,说明肠道菌群是青娥丸抗大鼠骨质疏松的作用靶点之一,但盐炙不能通过肠道菌群途径来增强大鼠骨质疏松症作用。

PMO 发生后会使肠道微生态紊乱,使具有降解黏蛋白能力的细菌丰度增加,黏蛋白减少,则细菌更多地黏附到肠上皮细胞,使肠上皮细胞上的模式



识别受体发出信号,激活 NF- $\kappa$ B 通路。上皮细胞 NF- $\kappa$ B 活化增加促炎细胞因子,如 TNF- $\alpha$ , IL-1 和 INF- $\gamma$  等破坏肠道屏障<sup>[14]</sup>,肠道通透性增加,导致肠道菌群中的有害菌以及影响骨质疏松的有害代谢物进入机体,进一步引发免疫应答,生成大量以 TNF- $\alpha$  为主的促破骨细胞生成因子, TNF- $\alpha$  诱导核因子  $\kappa$ B 受体活化因子配体(RANKL)和巨噬细胞集落刺激因子(M-CSF),并下调骨保护素,最终促进破骨细胞的激活和骨吸收<sup>[15]</sup>。短链脂肪酸可增加紧密连接蛋白(Occludin)的表达,从而保护肠道屏障,减少上述反应<sup>[16]</sup>。因此,本实验检测了粪菌移植后血清炎症标志物水平的变化,结果显示青娥丸生、盐品粪菌移植均可降低大鼠血清中 TNF- $\alpha$ 、IL-17 和 IL-6 水平。同时实验发现青娥丸生、盐品粪菌移植可增加肠道内容物内短链脂肪酸的含量。因此,减少炎症因子的产生,增加短链脂肪酸的含量可能是青娥丸通过肠道菌群改善骨质疏松症的机制之一。

通过青娥丸与大鼠肠道菌体外共孵育实验,利用 UHPLC-Q-TOF/MS 法对其 4 种原型有效成分代谢产物进行检测和分析,发现青娥丸主要代谢产物为植物雌激素肠二醇、肠内酯、补骨脂素和异补骨脂素等。植物雌激素化学结构与雌激素类似,可以通过雌激素受体影响骨重建。补骨脂素通过上调成骨细胞特异性标志基因(包括 BGP 和骨唾液蛋白)的表达,增强 BAP 的活性,激活骨形态发生蛋白信号,以剂量依赖的方式促进成骨分化<sup>[17]</sup>。异补骨脂素可调控骨质疏松大鼠骨组织 Runx2/MMP13 信号通路实现骨保护作用<sup>[18]</sup>,还可通过激活成骨细胞的生物学活性改善骨代谢<sup>[19]</sup>。因此,青娥丸通过肠道菌群代谢产生治疗骨质疏松症的代谢产物,可能也是青娥丸通过肠道菌群改善骨质疏松症的机制之一。

本文从肠道微生物与中药复方相互作用的角度探讨了青娥丸是通过多靶点、多途径治疗骨质疏松症,而肠道菌群是其治疗骨质疏松症的靶点之一。

#### 参考文献:

- [1] DAO MC, EVERARD A, ARON-WISNEWSKY J, et al. Akkermansia muciniphila and improved metabolic health during a dietary intervention in obesity: Relationship with gut microbiome richness and ecology[J]. Gut, 2016, 65(3): 426-436.
- [2] LIU XH, ZHENG JZ, LI F, et al. Lactobacillus plantarum HFY15 helps prevent retinoic acid-induced secondary osteoporosis in wistar rats[J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2020, 2020: 1-10.
- [3] BRITTON RA, IRWIN R, QUACH D, et al. Probiotic L. Reuteri treatment prevents bone loss in a menopausal ovariectomized mouse model[J]. J Cell Physiol, 2014, 229 (11): 1822-1830.
- [4] LIU H, GU R, LI W, et al. Probiotics protect against tenofovir induced mandibular bone loss in mice by rescuing mandible-derived mesenchymal stem cell proliferation and osteogenic differentiation[J]. J Oral Rehabil, 2020, 47(S1): 83-90.
- [5] 颜翠萍,翁泽斌,吴育,等.青娥丸盐品与生品抗去卵巢诱导的骨质疏松效应的比较研究[J].南京中医药大学学报,2014,30(5):438-442.
- [6] 吴佳伟.基于肠道菌群以及肠道屏障完整性探讨大黄酸治疗结肠炎症的作用机制[D].南京:南京中医药大学,2019.
- [7] QUARTIERI A, GARCIA-VILLALBA R, AMARETTI A, et al. Detection of novel metabolites of flaxseed lignans *in vitro* and *in vivo*[J]. Mol Nutr Food Res, 2016, 60(7): 1590-1601.
- [8] 刘丽,康安,刘春样,等.清肠化湿方对溃疡性结肠炎小鼠炎症及肠道菌群的影响[J].南京中医药大学学报,2021,37(1):47-53.
- [9] 王颖异.黄葵调控肠道菌群介导的尿素素代谢通路及其作用机制研究[D].南京:南京中医药大学,2019.
- [10] 陈鑫,朱雄白,林文军,等.仙灵骨葆胶囊治疗绝经后骨质疏松的疗效及其机制研究[J].中国临床药理学杂志,2015,31(10): 827-829,854.
- [11] 张威,郑洪新.补肾健骨中药对去势后大鼠骨质疏松症激素水平表达和骨密度影响的研究[J].中医临床杂志,2018,30(3):479-482.
- [12] 陈文明,胡志源.葛根素联合阿仑膦酸钠对绝经后骨质疏松大鼠氧化应激、炎症反应及骨代谢的影响[J].中国骨质疏松杂志,2021,27(1):73-76,100.
- [13] 赵玺,赵文,孙璟,等.骨代谢指标与骨关节炎及绝经后骨质疏松症的关系[J].中国组织工程研究,2014,18(2):245-250.
- [14] 谢辉,林上阳,夏晨洁,等.肠道菌群对骨质疏松的影响机制及治疗的研究进展[J].中国药理学通报,2020,36(5):600-603.
- [15] PACIFICI R. Role of T cells in ovariectomy induced bone loss-revisited[J]. J Bone Miner Res, 2012, 27 (2): 231-239.
- [16] MA X, FAN PX, LI LS, et al. Butyrate promotes the recovering of intestinal wound healing through its positive effect on the tight junctions[J]. J Anim Sci, 2012, 90(S4): 266-268.
- [17] 叶志伟,王丹,杨钟华,等.补骨脂素对乳鼠颅骨成骨细胞分化成熟的影响[J].基因组学与应用生物学,2020,39(1):402-406.
- [18] 尚延春,张海英,柴巍巍.异补骨脂素改善骨质疏松大鼠骨代谢的作用探讨[J].中国骨质疏松杂志,2021,27(2):220-224.
- [19] GE L, CUI Y, CHENG K, et al. Isopsoralen enhanced osteogenesis by targeting AhR/ER $\alpha$ [J]. Molecules, 2018, 23(10): 2600-2610.

(编辑:杨巍敏)