· 论著 ·

基于非靶向代谢组学探讨龟鹿二仙胶防治绝经后骨质疏松症的机制

于冬冬，郭强，陈奎竹，顾海立，乔隆，乔野
（辽宁中医药大学附属医院骨科，沈阳 110032）

摘要 **目的** 基于非靶向代谢组学探讨龟鹿二仙胶（GLE）在防治绝经后骨质疏松症（PMO）过程中体内代谢产物的生物效应及变化规律。**方法** 用随机数字表法将50只SD雌性大鼠分为假手术（sham）组，模型（OVX）组，GLE低、中、高剂量（GLE-L、GLE-M、GLE-H）组，每组10只。造模1周后开始灌胃给药，8周后取材。用显微计算机断层扫描（MicroCT）检测骨微观结构，用免疫组织化学（IHC）染色分析骨代谢相关指标，用液质联用技术构建大鼠血清代谢物图谱，观察代谢物及相关通路的分布差异。**结果** MicroCT结果显示，与OVX组相比，GLE-M组骨小梁百分比提高，骨微观结构恢复（$P < 0.05$）。IHC染色显示，与OVX组相比，GLE-M组股骨中Runx2表达水平升高（$P < 0.05$）。sham组、GLE-H组、OVX组相互交叉出现3-（3-甲氧基苯基）丙酸、乙酰胺、Equol、1-油酰基-Sn-甘油-3-磷胆碱共4种共调节代谢产物，在sham组呈高表达，OVX组呈低表达，GLE-M组又恢复至高表达。KEGG通路分析显示，sham组与OVX组间涉及的主要通路为类固醇激素生物合成、皮质醇合成和分泌等，GLE组与OVX组为色氨酸代谢、苯丙氨酸代谢等。**结论** GLE可能通过调控体内的代谢产物防治PMO。

关键词 龟鹿二仙胶；非靶向代谢组学；代谢产物；绝经后骨质疏松症
中图分类号 R274.9 **文献标志码** A **文章编号** 0258-4646（2025）05-0390-06
网络出版地址 https://link.cnki.net/urlid/21.1227.R.20250519.1521.020
DOI：10.12007/j.issn.0258-4646.2025.05.002

Mechanism of Guilu erxian glue in the treatment of postmenopausal osteoporosis based on non-targeted metabolomics

YU Dongdong，GUO Qiang，CHEN Kuizhu，GU Haili，QIAO Long，QIAO Ye
（Department of Orthopedics，The Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine，Shenyang 110032，China）

Abstract **Objective** To explore the biological effects and changes of metabolites of Guilu erxian glue（GLE）in vivo in the prevention and treatment of postmenopausal osteoporosis（PMO），based on non-targeted metabolomics. **Methods** Fifty SD female rats were divided into five groups using the random number table method：sham group，model group（OVX），and low-，medium-，and high-dose GLE（GLE-L，GLE-M and GLE-H）groups，with ten mice in each group. After 1 week of modeling，the drug was given by gavage，and samples were collected 8 weeks later. Bone microstructure was detected by MicroCT，bone metabolism-related indices were analyzed by immunohistochemistry（IHC），and a serum metabolite atlas was constructed using the LC-MS/MS technique to observe the distribution differences of metabolites and related pathways. **Results** The MicroCT results showed that GLE could increase the percentage of bone trabeculae and restore bone microstructure（$P < 0.05$，GLE-M group vs. OVX group）. IHC analysis showed that GLE could increase Runx2 expression in femur（$P < 0.05$，GLE-M group vs. OVX group）. There were four co-regulated metabolites in the sham group，GLE-H group，and OVX group，including 3-（3-methoxyphenyl）propionic acid，acetamide，Equol，and 1-oleoacyl-SN-glycerol-3-phosphocholine，which showed high expression in the sham group，low expression in the OVX group，and high expression in the GLE-M group. The KEGG pathway result showed that the main pathways involved between the sham group and OVX group were steroid hormone biosynthesis and cortisol synthesis and secretion. Tryptophan metabolism and phenylalanine metabolism were observed in the GLE group and OVX group. **Conclusion** GLE may prevent PMO by regulating metabolites in the body.

Keywords Guilu erxian glue；non-targeted metabolomics；metabolite；postmenopausal osteoporosis

绝经后女性体内雌激素水平降低，导致骨吸收增加，骨形成减少，骨平衡破坏，从而诱发绝经后骨质疏松症（postmenopausal osteoporosis，PMO）[1]。全球约有10%的人口和超过30%的50岁以上绝经后女性患有骨质疏松症[2-3]。目前抗PMO的药物以选择

基金项目：国家自然科学基金（82374480）
作者简介：于冬冬（1983-），男，教授，博士.
通信作者：于冬冬，E-mail：dongdongyu10256@163.com
收稿日期：2024-04-26
网络出版时间：2025-05-20 10:26:44

性雌激素受体调节剂、降钙素、双膦酸盐类药物为主，但不良反应较多[4]。目前传统中医药已广泛用于PMO治疗[5]。骨质疏松症属于中医“骨痿”范畴，“肾虚髓枯”是其最主要病机[6]。绝经后女性脏腑机能衰退，久病肾阴阳俱虚[7]。龟鹿二仙胶对肾阴阳两虚型骨质疏松症疗效确切[8]。

代谢组学是基于高通量化学分析技术对生物体细胞、组织中的代谢产物进行定性和定量的研究[9]。其中，非靶向代谢组学能全面准确地反映生物体、组织样本中的代谢物信息，有利于挖掘生物样本新的代谢通路等[10]。超高效液相色谱与高分辨质谱联用，即液质联用技术，广泛应用于非靶向代谢组学研究[11]。本研究结合非靶向代谢组学技术，深入探讨龟鹿二仙胶防治PMO过程中的药效学机制。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　实验动物：50只7~8周龄 SPF级雌性SD大鼠购自辽宁长生生物技术股份有限公司，体重（200 ± 20）g，许可证号：SCXK（辽）2020-0001。大鼠饲养于辽宁中医药大学动物实验中心，温度22~25 ℃，湿度30%~50%，饲养1周，大鼠饮食水自由。本研究已获得我院实验动物伦理委员会批准［2023CS（DW）-026-01］。

1.1.2　药品和主要试剂：龟鹿二仙胶（龟板489 g、鹿角胶489 g、人参489 g、枸杞733 g），购自辽宁省沈阳市康多辽河药房。4%多聚甲醛溶液、EDTA脱钙液购自北京索莱宝科技有限公司。

1.1.3　主要设备：电子光学显微镜（ECLIPSE LV150NA，日本Nikon公司）；显微计算机断层扫描（microcomputed tomography，MicroCT）机（ZKKSMCT-Sharp-Ⅰ，广州中科恺盛医疗科技有限公司）。

1.2　方法

1.2.1　实验动物分组及处理：将50只大鼠按随机数字法分为假手术（sham）组、模型（OVX）组、龟鹿二仙胶低剂量（GLE-L）组、龟鹿二仙胶中剂量（GLE-M）组、龟鹿二仙胶高剂量（GLE-H）组，每组10只。所有大鼠腹腔注射3%戊巴比妥纳溶液（0.1 mL/100 g）麻醉后，俯卧固定于实验台，消毒，备皮，在股骨近端连线与后正中线交点处，做约2 cm纵行切口，摘除双侧卵巢组织，止血，缝合，消毒。sham组大鼠仅取等量的皮下脂肪组织。大鼠术后观察7 d后，开始每日灌胃给药，持续8周。依据第4版《药理实验方法学》，计算出龟鹿二仙胶给药浓度为1.7 g/mL。OVX组大鼠给予龟鹿二仙胶4.030 g/kg灌胃；GLE-L组大鼠给予龟鹿二仙胶2.015 g/kg灌胃；GLE-M组大鼠给予龟鹿二仙胶4.030 g/kg灌胃；GLE-H组大鼠给予龟鹿二仙胶8.060 g/kg灌胃；sham组大鼠灌胃等体积饮用水。

1.2.2　大鼠血清、骨组织标本收集：实验结束时，大鼠麻醉后经腹主动脉采血，离心取上清液置于EP管中，于–80 ℃冻存。取大鼠两侧股骨，去除附着组织，用生理盐水洗净，外包锡纸，于–80 ℃冻存。

1.2.3　大鼠股骨组织切片制作：用4%多聚甲醛溶液固定骨组织5 d，放入15%乙二胺四乙酸溶液脱钙4周，以大头针可轻松刺入股骨确定脱钙成功，进行石蜡包埋，制作6 μm厚度切片备用。

1.2.4　MicroCT检测骨结构：用4%多聚甲醛溶液固定股骨标本24 h，将标本固定在MicroCT载物台上扫描，角度为360 °，分辨度为10 μm，以股骨近端1.5 mm区域作为感兴趣区域（region of interest，ROI），建立骨小梁3D图像后进行分析，主要检测参数包括骨体积、骨密度、皮质骨体积、皮质骨厚度、骨小梁体积、骨小梁厚度。

1.2.5　骨组织免疫组织化学（immunohistochemistry，IHC）染色：骨组织切片脱蜡，抗原修复，血清封闭，一抗孵育过夜，二抗标记，DAB显色。显微镜下观察，阳性信号为棕黄色或棕褐色，苏木素复染，固定封片，检测。

1.2.6　Western blotting检测相关蛋白表达：提取骨组织蛋白，上样电泳，转膜，封闭，一抗孵育过夜，辣根过氧化物酶标记二抗孵育，ECL发光成像，使用Image J软件测定各蛋白条带平均灰度值。

1.2.7　非靶向代谢组学检测：将冻存的大鼠血清标本送至北京诺禾致源科技股份有限公司，应用液质联用技术进行非靶向代谢组学检测分析。鉴定结果采用主成分分析（principal component analysis，PCA），对差异代谢物进行筛选与鉴定，对差异代谢物通路等进行综合分析。

1.3　统计学分析

采用SPSS 13.0统计软件进行分析。计量资料用

$\bar{x} \pm s$表示，2组间比较用t检验，多组间比较采用方差分析方法。$P < 0.05$为差异有统计学意义。

2　结果

2.1　MicroCT检测结果

结果显示，与sham组较，OVX组、GLE-H组、GLE-M组、GLE-L组骨组织骨体积、骨密度、骨小梁连接密度、骨小梁数均显著减低，差异有统计学意义（$P < 0.05$）。与OVX组比较，GLE-H组、GLE-M组、GLE-L组上述指标显著增高，差异有统计学意义（$P < 0.05$），其中GLE-M组效果最显著，而GLE-H与GLE-L组效果次之。各组皮质骨厚度比较差异无统计学意义（$P > 0.05$）。见表1。

2.2　IHC染色结果分析

表1　MicroCT结果（$\bar{x} \pm s$）

Tab.1　Results of MicroCT（$\bar{x} \pm s$）

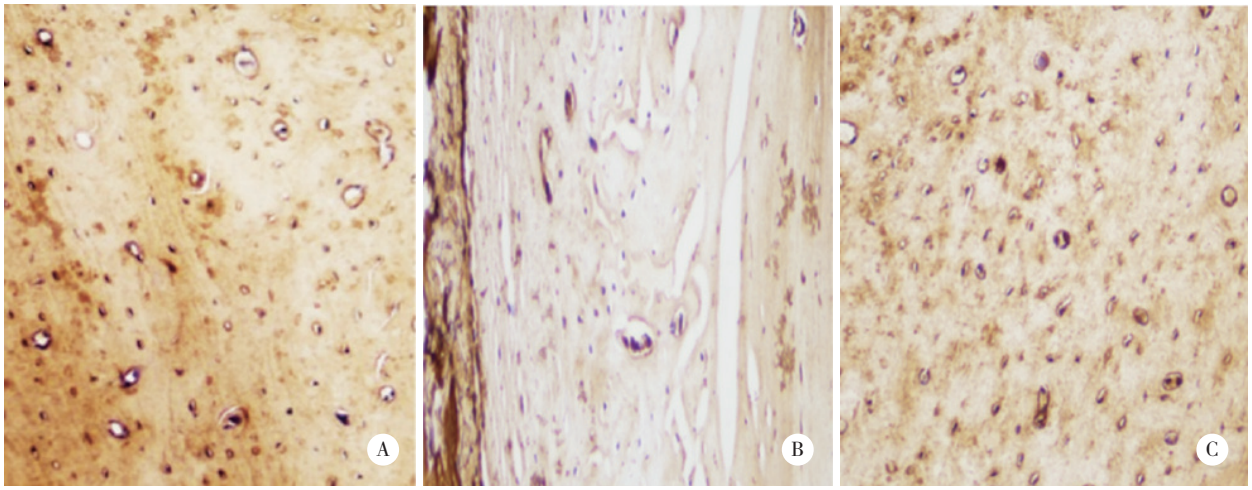
Group	BD（mg/cm^3）	BV（mm^3）	Tb.Conn.D（mm^{-3}）	Tb.N（mm^{-2}）	Ct.Th（μm）
Sham	0.70 ± 0.05	25 ± 2.0	25 ± 1.0	2.5 ± 0.2	16 ± 0.3
OVX	0.40 ± 0.04[1)]	16 ± 1.2[1)]	17 ± 1.3[1)]	1.8 ± 0.2[1)]	15 ± 0.4
GLE-L	0.53 ± 0.04[1),2)]	20 ± 1.9[1),2)]	19 ± 1.5[1),2)]	2.1 ± 0.2[1),2)]	15. ± 0.2
GLE-M	0.66 ± 0.03[1),2)]	23 ± 1.1[1),2)]	22 ± 1.4[1),2)]	2.4 ± 0.2[1),2)]	16 ± 0.2
GEL-H	0.60 ± 0.03[1),2)]	21 ± 1.4[1),2)]	19 ± 1.4[1),2)]	2.2 ± 0.2[1),2)]	16 ± 0.1

1）$P < 0.05$ vs. sham group；2）$P < 0.05$ vs. OVX group. BD，bone density；BV，bone volume；Tb.Conn.D，trabecular bone connectivity density；Tb.N，trabecular bone number；Ct.Th，cortical bone thickness.

结合2.1部分结果，GLE-M组骨组织微结构改善效果最为理想，故选取sham组、OVX组、GLE-M组进一步IHC染色，以观察各组骨组织中Runx相关转录因子2（Runx-related transcription factor 2，Runx2）的表达情况。结果显示，Runx2表达水平由高至低依次为sham组（40.2% ± 3.5%）、GLE-M组（30.1% ± 2.8%）、OVX组（10.5% ± 1.9%）。OVX组Runx2的蛋白表达较sham组明显减少（$P < 0.01$），GLE-M组OVX大鼠给予中剂量龟鹿二仙胶8周后，Runx2表达水平较OVX组显著增加（$P < 0.05$），但并未恢复至sham组Runx2表达水平。提示龟鹿二仙胶干预可提高Runx2的表达水平。见图1。

2.3　代谢组学分析结果

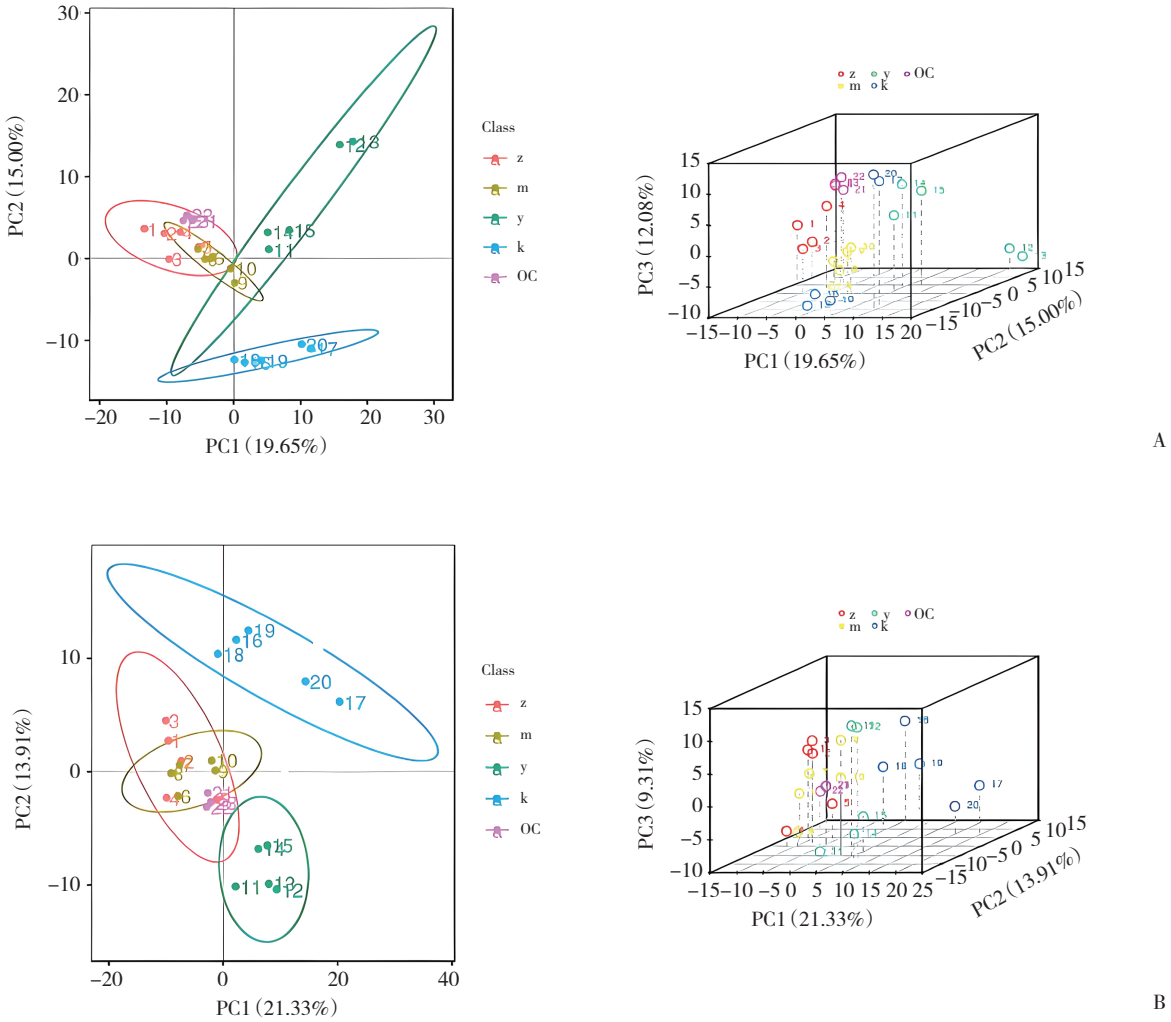
2.3.1　PCA：结果显示，在正负离子模式下，样本呈聚类分布，说明样本组内差异较小，本实验整个过程稳定性、质量较高。见图2。



A，sham group；B，OVX group；C，GLE-M group.

图1　IHC染色结果 ×100

Fig.1　Immunohistochemistry staining results ×100



A, PCA analysis of total samples in positive ion mode; B, PCA analysis of total samples in negative ion mode. The left figure is the PCA analysis diagram, and the right figure is the PCA analysis three-dimensional diagram. The scattered points of different colors in the figure represent the samples of different experimental groups, and the ellipses are 95% confidence intervals.

图2　总样本PCA分析

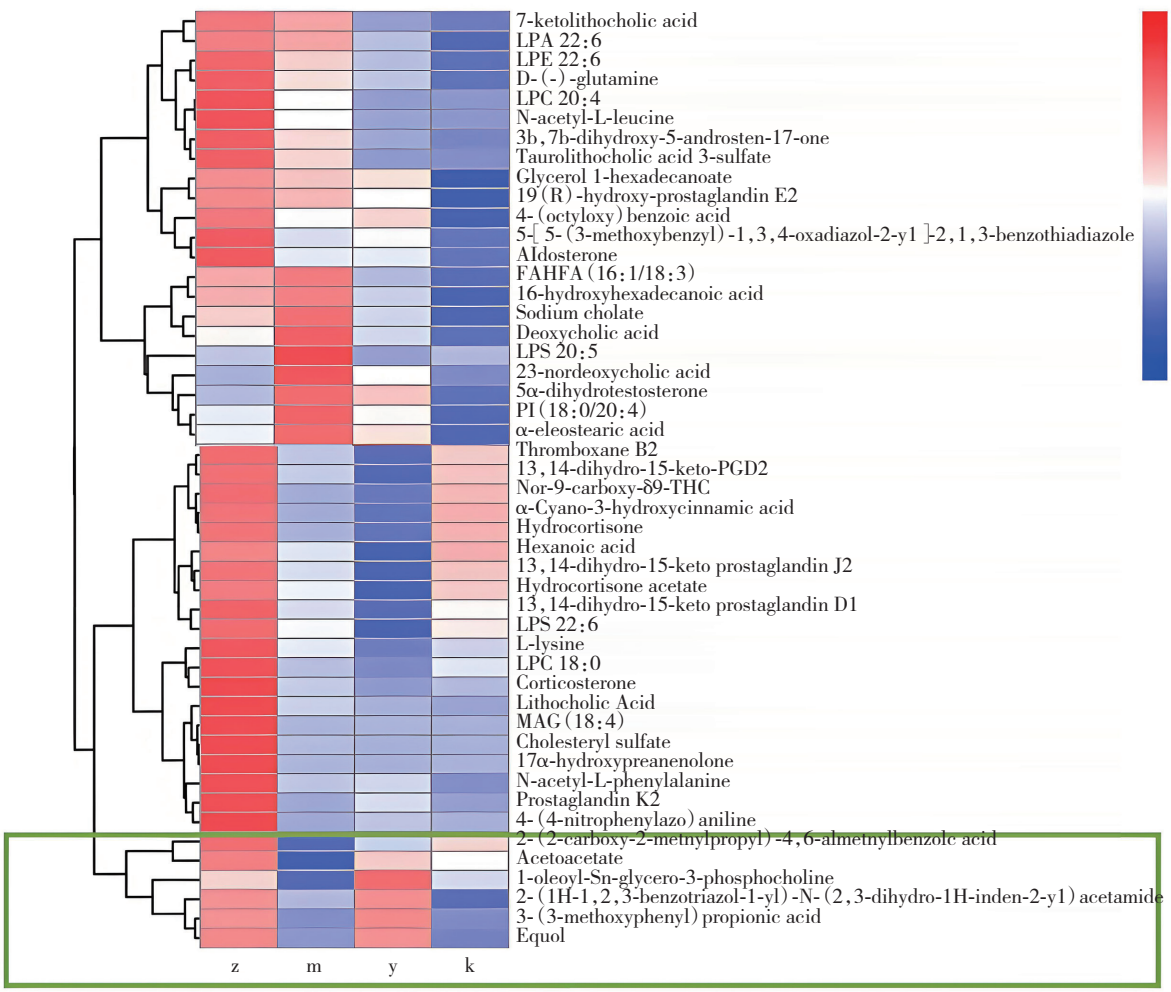
Fig.2　PCA analysis of total samples

2.3.2　差异代谢物的筛选与鉴定：正负离子模式下，sham组、OVX组与GLE-M组间比较筛选差异代谢物，结果显示，3-（3-甲氧基苯基）丙酸、乙酰胺、Equol等代谢物在sham组中呈高表达，在OVX组低表达，而在GLE-M组其表达水平又上调恢复至sham组的表达水平，说明GLE可能通过调控丙酸、乙酸等参与调控肠道微生物菌群变化，发挥防治PMO的作用。

2.3.3　差异代谢物通路富集分析：为了深入研究龟鹿二仙胶干预PMO过程中的代谢改变，将鉴定出的差异代谢物进行京都基因和基因组数据库（Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes，KEGG）富集分析。如图3所示，sham组与OVX组主要涉及类固醇激素生物合成及皮质醇合成和分泌等代谢通路；GLE-M组与OVX组主要涉及色氨酸代谢、苯丙氨酸代谢、半乳糖代谢和丙氨酸等代谢通路；与OVX组比较，GLE-M组谷氨酸、精氨酸、天冬氨酸水平上调，而3-羟基丁酸、牛磺酸、皮质醇、前列腺素G2水平下调。

3　讨论

肾虚可通过影响机体内能量、氨基酸、脂类代谢等多种途径对骨代谢产生影响，被认为是骨质疏松的主要病机[12-13]。龟鹿二仙胶首载于《医便》，其组成为龟甲胶、鹿角胶、人参、枸杞子，其活性成分具有调节骨代谢的作用[14-16]。



The vertical bar represents the changes in metabolite levels: red indicates upregulation, and blue indicates downregulation.

图3　差异代谢产物热图

Fig.3　Heat map of differential metabolites

Runx2能够促进骨形成，是骨骼发育必需的转录因子[17]。本研究结果显示，PMO模型大鼠骨组织中Runx2的表达较假手术大鼠显著降低，而龟鹿二仙胶则能显著提高Runx2表达水平。PMO可导致氨基酸代谢紊乱，而谷氨酸能够促进钙吸收，提高骨密度[18]。精氨酸等可通过增强胰岛素样生长因子-1，促进成骨细胞的增殖和分化[19]。组氨酸能够促进钙吸收，增加骨钙含量[20]。色氨酸减少被认为是骨质疏松症的典型生物标志物[21]。本研究发现，龟鹿二仙胶干预后大鼠骨组织中精氨酸等代谢产物上调，并可影响组氨酸、色氨酸代谢通路。

前列腺素具有促进破骨细胞分化的作用[22]。本研究中，龟鹿二仙胶干预后，大鼠血清中前列腺素G2表达下调，由此推测龟鹿二仙胶可通过降低前列腺素G2的表达防治PMO。皮质醇分泌过多会造成骨密度下降[23]。本研究通过代谢组学分析发现，模型大鼠PMO的发生与类固醇激素生物合成、皮质醇合成和分泌等代谢通路密切相关。

肠道中的乙酸、丙酸、丁酸等短链脂肪酸（short-chain fatty acid，SCFA）与骨代谢关系密切[24]。本研究结果显示，sham组3-(3-甲氧基苯基)丙酸呈高表达，OVX组呈低表达，而GLE组则恢复了高表达，而吲哚-3-乙酸也在药物干预后表达水平上调。由此推测龟鹿二仙胶可能通过调节SCFA参与肠道微生物群的变化，从而发挥防治PMO的作用。

总之，龟鹿二仙胶可能通过调控体内的代谢产物来防治PMO，但其更深层次的药理及作用机制尚不明确。本研究利用非靶向代谢组学挖掘了龟鹿二仙胶防治PMO的药理学机制，为探寻防治PMO的中医药治疗方法提供了新的依据。

参考文献：

[1] REID IR，HORNE AM，MIHOV B，et al. Duration of fracture prevention after zoledronate treatment in women with osteopenia：observational follow-up of a 6-year randomised controlled trial to 10 years [J]. Lancet Diabetes Endocrinol，2024，12（4）：247-256. DOI：10.1016/S2213-8587（24）00003-2.

[2] BROWN JP. Long-term treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. Endocrinol Metab，2021，36（3）：544-552. DOI：10.3803/EnM.2021.301.

[3] WALKER MD，SHANE E. Postmenopausal osteoporosis [J]. N Engl J Med，2023，389（21）：1979-1991. DOI：10.1056/NEJMcp2307353.

[4] 郑蹦蹦，王佳明，余迎奇，等. 绝经后骨质疏松症的药物防治研究进展 [J]. 医学综述，2021，27（18）：3675-3681. DOI：10.3969/j.issn.1006-2084.2021.18.025.

[5] 夏荣林.中医药防治老年骨质疏松骨折的研究进展 [J]. 内蒙古中医药，2022，41（4）：135-137. DOI：10.16040/j.cnki.cn15-1101.2022.04.055.

[6] 陈诗淇，王意坚，陈瑶，等. 基于网络药理学和分子对接探究壮骨止痛方治疗绝经后骨质疏松症的作用机制 [J]. 海南医学院学报，2024，30（16）：1246-1258. DOI：10.13210/j.cnki.jhmu.20240425.001.

[7] 梁伟乔，钟诚，李宇明. 骨质疏松症的中医病因病机认识与治疗进展 [J]. 中国骨质疏松杂志，2020，26（1）：135-139. DOI：10.3969/j.issn.1006-7108.2020.01.028.

[8] 齐鹏坤，侯德才，吕艳芳，等. 龟鹿二仙胶诱导破骨细胞凋亡的机制研究 [J]. 中华中医药学刊，2024，42（6）：86-90，274-275. DOI：10.13193/j.issn.1673-7717.2024.06.016.

[9] GAO JY，XIAO Y. Metabolomics and its applications in assisted reproductive technology [J]. IET Nanobiotechnol，2023，17（5）：399-405. DOI：10.1049/nbt2.12141.

[10] ZHENG FJ，ZHAO XJ，ZENG ZD，et al. Development of a plasma pseudotargeted metabolomics method based on ultra-high-performance liquid chromatography-mass spectrometry [J]. Nat Protoc，2020，15（8）：2519-2537. DOI：10.1038/s41596-020-0341-5.

[11] YU SL，ZOU YT，MA XL，et al. Evolution of LC-MS/MS in clinical laboratories [J]. Clin Chim Acta，2024，555：117797. DOI：10.1016/j.cca.2024.117797.

[12] 马静，范顺，王舒心. 基于“天癸竭”探析绝经后骨质疏松性腰痛的治疗思路 [J]. 江西中医药，2024，55（9）：11-13，17. DOI：10.20141/j.0411-9584.2024.09.04.

[13] LU LY，TIAN L. Postmenopausal osteoporosis coexisting with sarcopenia：the role and mechanisms of estrogen [J]. J Endocrinol，2023，259（1）：e230116. DOI：10.1530/JOE-23-0116.

[14] 迟雪婷，陈芳园，皮子凤，等. 鹿茸多肽对大鼠绝经后骨质疏松的改善作用及其机制 [J]. 吉林大学学报（医学版），2024，50（4）：963-969. DOI：10.13481/j.1671-587X.202404010.

[15] 周红，张亚维，张堃，等.人参皂苷Rg3对骨质疏松大鼠骨代谢及肠钙吸收功能的影响 [J]. 重庆医科大学学报，2024，49（2）：141-146. DOI：10.13406/j.cnki.cyxb.003425.

[16] 刘艺洁，赵薇，李林隆，等. 枸杞多糖对C57BL/6J骨质疏松症小鼠的早期防治 [J]. 宁夏医科大学学报，2024，46（6）：586-591. DOI：10.16050/j.cnki.issn1674-6309.2024.06.007.

[17] 吴钰坤，韩杰，温帅波. 骨折愈合过程中*Runx2*基因的作用机制 [J]. 中国组织工程研究，2021，25（14）：2274-2279. DOI：10.12122/j.issn.1674-4500.2019.03.26.

[18] SI ZX，ZHOU SF，SHEN ZL，et al. High-throughput metabolomics discovers metabolic biomarkers and pathways to evaluating the efficacy and exploring potential mechanisms of osthole against osteoporosis based on UPLC/Q-TOF-MS coupled with multivariate data analysis [J]. Front Pharmacol，2020，11：741. DOI：10.3389/fphar.2020.00741.

[19] WANG Y，WANG XR，WANG KJ，et al. Extract of Curculigo capitulata ameliorates postmenopausal osteoporosis by promoting osteoblast proliferation and differentiation [J]. Cells，2024，13（23）：2028. DOI：10.3390/cells13232028.

[20] ZHANG AH，MA ZM，SUN H，et al. High-throughput metabolomics evaluate the efficacy of total lignans from acanthophanax senticosus stem against ovariectomized osteoporosis rat [J]. Front Pharmacol，2019，10：553. DOI：10.3389/fphar.2019.00553.

[21] TANG XY，GAO MX，XIAO HH，et al. Simultaneous quantitative analysis of multiple biotransformation products of Xian-ling-gu-bao，a traditional Chinese medicine prescription，with rat intestinal microflora by ultra-performance liquid chromatography tandem triple quadrupole mass spectrometry [J]. J Chromatogr Sci，2020，58（6）：494-503. DOI：10.1093/chromsci/bmaa012.

[22] CHO SW，BAEK S，HAN S，et al. Metabolic phenotyping with computed tomography deep learning for metabolic syndrome，osteoporosis and sarcopenia predicts mortality in adults [J]. J Cachexia Sarcopenia Muscle，2024，15（4）：1418-1429. DOI：10.1002/jcsm.13487.

[23] KIMURA TAKIGUCHI M，MORIMOTO S，WATANABE D，et al. Urinary free cortisol excretion is associated with lumbar bone density in patients with adrenal Cushing's syndrome [J]. Hypertens Res，2022，45（10）：1632-1642. DOI：10.1038/s41440-022-00939-8.

[24] WANG C，QIU M，WANG S，et al. Gut-microbiota-derived butyric acid overload contributes to ileal mucosal barrier damage in late phase of chronic unpredictable mild stress mice [J]. Int J Mol Sci，2024，25（23）：12998. DOI：10.3390/ijms252312998.

（编辑　王又冬）