DOI:10.13193/j.issn.1673-7717.2026.09.010

基于16S rDNA测序探讨加味活络效灵丹对激素性股骨头坏死大鼠“肠-骨”轴的影响

张江[1,2,3],胡宇晴[1],张诗宇[2],董野[1],侯德才[2]
(1.辽宁中医药大学,辽宁 沈阳 110847;2.辽宁中医药大学附属医院,辽宁 沈阳 110032;
3.辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室,辽宁 沈阳 110847)

摘要:目的 基于“肠-骨”轴理论和16S rDNA技术,探究加味活络效灵丹对激素性股骨头坏死大鼠骨组织修复的作用与机制,及其肠道菌群结构的影响。方法 采用随机数字表法,将24只SPF级雄性SD大鼠分为正常组($n=8$)、模型组($n=8$)、治疗组($n=8$)。模型组和治疗组采用臀肌交替注射甲泼尼龙琥珀酸钠的造模方法,治疗组予加味活络效灵丹(制剂药液)灌胃。对取材的大鼠股骨样品,采用HE染色并计算空骨陷窝率,Micro-CT三维重建分析测量区域骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁分离度(Tb.Sp)等骨组织学参数,免疫组化检测骨组织修复标记物BMP、OPG、Runx2表达;对其粪便样品,采用16S rDNA技术进行肠道菌群测序与ASV分析,α多样性和β多样性分析肠道菌群物种多样性,LEfSe分析肠道菌群物种差异性在科水平和属水平上的改变。结果 加味活络效灵丹可显著改善SANFH大鼠股骨头空骨陷窝率($P<0.05$)及BV/TV、Tb.N、Tb.Th、Tb.Sp等骨组织学参数($P<0.01$),并显著上调骨组织修复标记物BMP、OPG、Runx2表达水平($P<0.01$)。肠道菌群测序结果显示,α多样性分析说明3组大鼠肠道菌群结构的物种多样性和丰富度存在明显差异;β多样性分析显示治疗组菌群结构与模型组存在显著分离,与空白组相近,组间差异大于组内,且差异明显。LEfSe分析发现在科水平和属水平上,模型组大鼠肠道菌群呈现显著的“促炎型”特征,治疗组大鼠肠道菌群呈现“抗炎-促修复”特征。结论 加味活络效灵丹对SANFH大鼠骨组织修复作用与其调控肠道菌群密切相关,干预药物有效重塑了激素扰动的肠道微生态,进一步证实菌群重塑对“肠-骨”轴的双向调节,起到防治SANFH的作用。

关键词:激素性股骨头坏死;加味活络效灵丹;肠道菌群;骨组织修复;“肠-骨”轴
中图分类号:R289.5 **文献标志码**:A **文章编号**:1673-7717(2026)09-0053-09

Effect of Modified Huoluo Xiaoling Dan(加味活络效灵丹) on “Gut-osteoporosis” Axis of Rats with Hormone Induced Femoral Head Necrosis Based on 16S rDNA Sequencing

ZHANG Jiang[1,2,3],HU Yuqing[1],ZHANG Shiyu[2],DONG Ye[1],HOU Decai[2]
(1.Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110847,Liaoning,China;
2.Affiliated Hospital of Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110032,Liaoning,China;
3.Key Laboratory of Ministry of Education for TCM Viscera-State Theory and Applications,
Liaoning University of Traditional Chinese Medicine,Shenyang 110847,Liaoning,China)

Abstract:*Objective* Based on the theory of the “gut-osteoporosis” axis and 16S rDNA technology,to explore the effect and mechanism of Modified Huoluo Xiaoling Dan(加味活络效灵丹) on the repair of bone tissue in the rats with steroid-induced avascular necrosis of the femoral head(SANFH),as well as its influence on the structure of the gut microbiota. *Methods* Using the random number table method,24 SPF-grade male SD rats were divided into a normal group($n=8$),a model group($n=8$) and a treatment group($n=8$). In the model group and the treatment group,the method of alternately injecting methylprednisolone sodium succinate into the gluteal muscles was used to establish the model,and the treatment group was given intragastric adminis-

基金项目:国家自然科学基金项目(82305275);辽宁中医药大学中医脏象理论及应用教育部重点实验室开放基金项目(zyzx2007);沈阳市第一批中医药专家学术经验继承项目(20221205);辽宁中医药大学教学改革研究项目(LNZYJG2024027);辽宁中医药大学大学生创新创业训练计划项目(X202310162078)

作者简介:张江(1988-),男,辽宁辽阳人,主治医师,博士在读,研究方向:中医药防治股骨头坏死。
通讯作者:侯德才(1961-),男,辽宁沈阳人,教授、主任医师,博士研究生导师,博士,研究方向:中医药防治股骨头坏死。E-mail:lnzyhdc@163.com。

tration of Modified Huoluo Xiaoling Dan(preparation liquid). For the femoral samples of the rats, HE staining was performed and the empty bone lacuna rate was calculated. Three-dimensional reconstruction by Micro-CT was used to analyze and measure the bone histological parameters such as the bone volume fraction(BV/TV), trabecular number(Tb. N), trabecular thickness(Tb. Th) and trabecular separation(Tb. Sp) in the measurement area. Immunohistochemistry method was used to detect the expressions of bone tissue repair markers BMP, OPG and Runx2. For the fecal samples, 16S rDNA technology was used for gut microbiota sequencing and ASV analysis. The α-diversity and β-diversity were used to analyze the species diversity of the gut microbiota, and LEfSe analysis was used to detect the changes in the species differences of the gut microbiota at the family level and genus level. *Results* Modified Huoluo Xiaoling Dan could significantly improve the empty bone lacuna rate of the femoral head($P<0.05$) and bone histological parameters such as BV/TV, Tb. N, Tb. Th and Tb. Sp($P<0.01$) in the rats with SANFH, and significantly up-regulate the expression levels of bone tissue repair markers BMP, OPG and Runx2($P<0.01$). The results of gut microbiota sequencing showed that α-diversity analysis indicated that there were obvious differences in the species diversity and richness of the gut microbiota structures of the rats in the three groups; β-diversity analysis showed that the flora structure of the treatment group was significantly separated from that of the model group, and was similar to that of the blank group. The difference among groups was greater than that within groups, and the difference was obvious. LEfSe analysis has found that at the family level and genus level, the gut microbiota of the rats in the model group showed significant "pro-inflammatory" characteristics, while the gut microbiota of the rats in the treatment group showed "anti-inflammatory-promoting repair" characteristics. *Conclusion* The effect of Modified Huoluo Xiaoling Dan on the repair of bone tissue in the rats with SANFH is closely related to its regulation of the gut microbiota. The intervention drug effectively reshapes the intestinal microecology disturbed by hormones, further confirming that the reshaping of the flora has a bidirectional regulatory effect on the "gut-osteoporosis" axis, playing a role in preventing and treating SANFH.

Keywords: steroid-induced avascular necrosis of the femoral head; Modified Huoluo Xiaoling Dan(加味活络效灵丹); gut microbiota; bone tissue repair; "gut-osteoporosis" axis

激素性股骨头坏死(Steroid-Induced Avascular Necrosis of the Femoral Head, SANFH),是患者因罹患某类自身免疫性、慢性炎症性疾病,亦或内分泌、血液系统特应性疾病,需要长期或大量使用激素类药物导致的股骨头缺血性坏死,亦可诱发骨质疏松症、骨关节病变的病症[1]。因其病程进展快、治疗难度大、致残风险高、多发群体低龄化等特点,严重影响病患生活质量,病久可造成髋关节结构异常与功能障碍,甚则需行人工关节置换手术治疗,是病理机制复杂并亟待攻克的骨伤科难治性常见病[2]。SANFH属于中医学的"骨痹、骨痿、骨蚀"等范畴,核心病机为"血瘀阻络,骨失濡养",现代中医药学家承袭"从脾治痹""治痿独取阳明""活血通络"等理论,在"治未病"思想指导下,结合"络病学说"和"瘀去、新生、骨合"的递进式骨修复治疗思路,深耕中医经典复方及化裁经验方,在SANFH保髋治疗及创新药物研发领域,逐渐彰显"未病先防、既病防变"的中医药智慧[3-7]。

加味活络效灵丹,是近代医家张锡纯《医学衷中参西录》中经典方剂"活络效灵丹"加味"牛膝、续断"的经验方,有活血化瘀、通络止痛、强筋健骨之功效,在中医临床应用中疗效稳定可靠,不良反应少,且患者耐受性好、接受度高。现代研究"活络效灵丹"在多种血瘀证疾病中展现出独特优势,该方有调节血液流变学、改善微循环、抗炎抗氧化等药理作用,"牛膝、续断"药对在拮抗炎症反应、减缓骨脂代谢异常、调控细胞凋亡和骨组织修复等方面,对股骨头坏死的防治有积极作用[8-10]。诸多研究发现,肠道健康与炎症性、代谢性、退行性关节病(如关节炎、骨质疏松症)密切相关,而对股骨头坏死的研究不足[11-13]。肠道菌群作为"人体第二大基因库",在骨稳态中发挥着重要作用,并用"肠-骨"轴来概括肠道微生物调控骨代谢的关系[14]。肠道菌群失调或肠道屏障功能受损,可通过免疫、代谢等途径影响骨骼疾病的预后转归[15]。本研究旨在探讨加味活络效灵丹对SANFH大鼠肠道菌群的影响,并验证其经"肠-骨"轴对骨组织修复的影响,为防治SANFH提供理论基础及实验依据。

1 材料

1.1 实验试药与试剂

当归、丹参、乳香、没药、牛膝、续断(安徽普仁中药饮片有限公司,2308143、2305142、2306082、2306232、2307082、2308311);加味活络效灵丹(制剂药液,辽宁中医药大学附属医院制剂中心,Z20230120000);注射用甲泼尼龙琥珀酸钠(国药集团容生制药有限公司,国药准字H20030727);苏木精-伊红HE染液(武汉塞维尔生物科技有限公司,CR22006082、GB22230);辣根酶标记山羊抗兔免疫球蛋白G(IgG)(北京中杉金桥生物技术有限公司,ZB-2301);DAB显色试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,CW0125);免疫组化试剂盒(中杉通用型,PV6000-18);anti-BMP2、anti-osteoprotegerin、anti-Runx2(affinity、abcam, af5163、af6824、ab236639);OMEGA Soil DNA试剂盒(北京诺博莱德科技有限公司,N9635-03);NovaSeq 6000 SP试剂盒(上海易汇生物科技有限公司,Y5631-04);Quant-iT PicoGreen dsDNA(英潍捷基上海贸易有限公司,D3214-01);TruSeq Nano DNA LT Library Prep试剂盒(因美纳中国科学器材有限公司,Q6548)。

1.2 实验设备与仪器

Micro-CT机(Perkin Elmer公司,QuantumGX),组织包埋

机、石蜡切片机、烘片机(Leica,EG 1150H、RM2235、HI1220),生物显微镜(Nikon,ECLIPSE Ci-L),生物组织摊片机(金华市益迪医疗设备有限公司,YD-A),电热恒温干燥箱(上海龙跃仪器设备有限公司,GZX-DH.600-BS-Ⅱ),超低温冰箱、分光光度计、核酸纯化仪、生物分析仪(赛默飞世尔科技中国有限公司,Forma 900、NanoDrop NC 2000、KingFisher Apex、Qubit 4),基因测序仪(因美纳中国科学器材有限公司,MiSeq)。

1.3 实验动物

SPF级雄性SD大鼠24只,8周龄,体质量250~300 g,购于辽宁长生生物技术股份有限公司,许可证号SCXK(辽)2020-0001,实验单位使用许可证编号SYXK(辽)2019-0004,并通过辽宁中医药大学附属医院动物实验伦理委员会审批,伦理审查批件受理号2022CS(DW)-018-01。

2 方法

2.1 实验用药制备与剂量选择

辽宁中医药大学附属医院实验中心提供造模用激素药物,配置浓度12 mg/mL,给药剂量35 mg/(kg·d);辽宁中医药大学附属医院制剂中心提供治疗用灌胃药液,配置浓度1.12 g/mL,给药剂量5.6 g/(kg·d)。

2.2 动物饲养分组与造模给药

适应性饲养1周,采用随机数字表法,将24只SPF级雄性SD大鼠随机分为空白组($n=8$)、模型组($n=8$)、治疗组($n=8$)。模型组和治疗组,予注射甲泼尼龙琥珀酸钠,左右臀肌交替注射,剂量为35 mg/(kg·d),每周连续3 d,持续4周。空白组,予等体积0.9%氯化钠注射液(密封无菌)。完成造模操作的1周内,开始灌胃给药。空白组和模型组予0.9%氯化钠注射液,治疗组予加味活络效灵丹(制剂药液),10 mL/kg灌胃,1次/d,持续6周。

2.3 样品取材与处理

实验结束后,予3%戊巴比妥钠10 mL/kg对实验用大鼠行麻醉,按照文献[16-17]取样方法,完整留取双侧股骨(注意股骨头保护),提取大鼠盲肠内容物,并迅速转移至无菌离心管,液氮速冻,-80 ℃保存。3组各取8个股骨样品,6个粪便样品,按照空白组(Blank)、模型组(Model)、治疗组(Treat)标注股骨和粪便样品,编号待检测。

2.4 大鼠股骨样品HE染色

大鼠股骨样品,经固定、脱钙、脱水与透明后,使用石蜡包埋,切片厚度5 μm进行HE染色,脱水透明、封片、镜下观察。使用生物显微镜及Case Viewer 2.6软件进行骨组织形态分析,计算各组大鼠股骨样品空骨陷窝率,空骨陷窝率(%)=(空骨陷窝数量/总骨陷窝数量)×100%[16]。

2.5 大鼠股骨样品Micro-CT扫描分析

大鼠股骨样品,经4%多聚甲醛固定液固定72 h、缓冲溶液冲洗3次后4 ℃保存,取用时使用封口膜包裹股骨样品。按照文献[18]Micro-CT扫描分析方法,设备设定为大鼠模式,扫描参数:空间体素尺寸0.072 mm,电流89 μA,电压90 kV。股骨近端被作为感兴趣区域(ROI),测量该区域相关骨组织学参数,包括骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁分离度(Tb.Sp)。

2.6 免疫组化检测大鼠股骨样品骨组织修复标记物

大鼠股骨样品组织切片,经脱蜡复水、蛋白酶K修复、抗氧化封闭、一抗孵育、二抗孵育、显色、复染、透明脱水、封片等操作,在镜下观察骨组织修复标记物BMP、OPG、Runx2的表达情况。

2.7 粪便样品肠道菌群测序与物种多样性分析

粪便样品的肠道菌群测序(上海派森诺生物科技股份有限公司),经派森诺基因云分析平台(https://www.genescloud.cn/home)下载原始数据并完成数据分析。肠道菌群测序数据质量评估,结合ASV分析,说明肠道菌群结构和多样性差异。肠道菌群物种多样性分析,采用α多样性分析和β多样性分析。物种差异分析,采用LEfSe分析,主要选取不同物种分类学在科水平和属水平上,显示各组样品的物种相对丰度及其变化,并结合β多样性分析中的主坐标分析法(PCoA),进行交叉验证。

2.8 统计学分析

使用SPSS 27.0统计学软件进行数据分析与处理,采用$K-S$正态性检验检测计量资料是否符合正态分布,符合正态分布和方差齐性的计量资料,以均数±标准差($\bar{x}\pm s$)表示,多组间比较采用单因素方差分析,方差不齐用非参数检验,$P<0.05$为差异有统计学意义。统计学分析经由辽宁中医药大学附属医院实验中心生物统计学专家审核。

3 结果

3.1 大鼠一般状态观察

空白组大鼠,随饲养情况,体质量波动在正常范围,体毛光泽,进食水量和活动度正常,呈现健康状态。开展造模后,模型组、治疗组大鼠,均开始出现不同程度表现:背毛毛色光泽度下降,毛质粗糙且抓取时易脱落,进食水量减少,活动度减低,随造模进程推进,体质量增长缓慢,偶见降低,体质量情况未呈规律性改变。

3.2 大鼠股骨头组织病理改变

大鼠股骨头HE染色结果显示,与正常组比较,模型组骨小梁空间结构紊乱,间隙增宽,形状变细,空骨陷窝率明显增加,差异有显著统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,治疗组的骨小梁空间结构排列稍规整,间隙近似正常,形状略变粗,空骨陷窝率明显降低,差异有统计学意义($P<0.05$),见插页XV图1和表1。

表1 3组大鼠股骨头的空骨陷窝率比较($\bar{x}\pm s$) 单位:%

组别	n	空骨陷窝率/(%)
空白组	8	2.52±0.68
模型组	8	16.27±1.64**
治疗组	8	7.84±1.14#

注:**与正常组比较,$P<0.01$;#与模型组比较,$P<0.05$。

3.3 大鼠股骨头Micro-CT扫描结果

利用Micro-CT将大鼠股骨头Micro-CT平扫图像进行三维重建,从额状面、矢状面、横断面等多轴位清晰显示3组大鼠股骨头影像学变化,立体直观呈现3组大鼠股骨头的骨小梁及软骨下骨改变情况,见插页XV图2。正常组:骨小梁结构正常,软骨下骨密度均匀正常,无骨丢失迹象,未出现股骨头坏死

相关改变。模型组:骨小梁稀疏、变细并出现断裂,软骨下骨密度增高,骨丢失严重,出现股骨头坏死相关改变。与模型组比较,治疗组:骨小梁紧密、粗壮且断裂较少,软骨下骨密度接近正常或稍增高,骨丢失不明显。

通过大鼠股骨头 Micro-CT 扫描图像,提取并计算相关骨组织学参数,结果见表2。与正常组的大鼠股骨近端骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb. N)、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁分离度(Tb. Sp)比较,模型组上述指标均有明显改变,差异有显著统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,治疗组上述指标均有所改善,差异有显著统计学意义($P<0.01$)。

表2 3组大鼠股骨近端相关骨组织学参数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	n	BV/TV/(%)	Tb. N/(mm)	Tb. Th/(mm)	Tb. Sp/(mm)
空白组	8	26.36±2.48	4.42±0.84	0.10±0.01	0.17±0.01
模型组	8	14.27±3.05**	1.80±0.48**	0.07±0.01**	0.27±0.02**
治疗组	8	20.13±2.48##	3.84±0.25##	0.09±0.01##	0.20±0.01##

注:**与正常组比较,$P<0.01$;##与模型组比较,$P<0.01$。

3.4 大鼠股骨样品骨组织修复标记物 BMP、OPG、Runx2 表达水平

免疫组化检测大鼠股骨样品骨组织修复标记物 BMP、OPG、Runx2 表达水平结果显示,与正常组比较,模型组大鼠 BMP、OPG、Runx2 表达明显降低,差异有显著统计学意义($P<0.01$);与模型组比较,治疗组大鼠 BMP、OPG、Runx2 表达显著升高,差异有显著统计学意义($P<0.01$),见插页Ⅻ图3-插页Ⅻ图5 和表3。

表3 3组大鼠股骨样品骨组织修复标记物 BMP、OPG、Runx2 表达水平($\bar{x}\pm s$) 单位:%

组别	n	BMP	OPG	Runx2
空白组	3	10.10±1.49	20.03±1.18	9.30±1.10
模型组	3	3.44±0.94**	6.06±2.08**	1.66±0.41**
治疗组	3	7.82±0.49##	12.34±2.64##	5.03±0.90##

注:**与正常组比较,$P<0.01$;##与模型组比较,$P<0.01$。

3.5 肠道菌群测序数据质量评估与 ASV 分析

3组大鼠的18例样品经16S rDNA测序,稀释曲线末端趋于平缓,表明测试深度满足要求,测序质量良好,测序数据量达到饱和,可进行后续分析,见插页Ⅻ图6;纵坐标比较,模型组的物种丰度略高于 Blank 组,治疗组的物种丰度明显低于 Model 组。结合 ASV 分析,与空白组(8743)相比,模型组(8814)ASV 数目增加;与模型组(8814)比较,治疗组(5608)ASV 数目减少;表明3组大鼠肠道菌群结构和多样性存在差异。

3.6 肠道菌群物种多样性分析

3.6.1 α 多样性分析 α 多样性,表示生境内物种的丰富度、多样性等特征,选取3组样品的 Chao1 指数和 Observed species 指数,表征菌种丰富度;Shannon 指数和 Simpson 指数,表征群落多样性。α 多样性指数变化显示,与空白组比较,模型组的各指数均有上升趋势,Simpson 指数差异有统计学意义($P<0.05$);与模型组比较,治疗组的各指数均有下降趋势,chao1、Observed_species、Shannon 指数差异有统计学意义($P<0.05$)。说明3组大鼠肠道菌群结构的物种多样性和丰富度存在明显差异。见表4。

3.6.2 β 多样性分析 β 多样性,称为生境间多样性,通过对不同组间样本的肠道菌群结构进行比较,寻找其组间差异的分析方法。选取主坐标分析(PCoA)进行组间多样性分析,更符合生态学数据特征。3组样品肠道菌群的 PCoA 分析结果,添加了95%置信椭圆,第1主成分 PCo1 的贡献率达到48.9%,第2主成分 PCo2 的贡献率为15.9%。由插页Ⅻ图7可见,3组样品存在部分重叠,可区分3组的群落结构;空白组与模型组明显分离,治疗组与空白组相近、与模型组分离明显,说明3组样品的肠道菌群结构组成发生改变,组间差异大于组内,且差异明显。

表4 3组大鼠肠道菌群 α 多样性指数比较($\bar{x}\pm s$)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	Chao1	Observed_species	Shannon	Simpson
空白组		2 047.24±252.94	1 951.33±239.02	7.85±0.90	0.95±0.04
模型组	0.035	2 078.48±566.73	1 981.28±583.53	8.12±0.79	0.98±0.01*
治疗组	5.600	1 045.53±432.27#	1 354.48±416.60#	7.09±0.75#	0.96±0.03

注:*与空白组比较,$P<0.05$;#与模型组比较,$P<0.05$。

3.6.3 物种差异分析 根据3组样品肠道菌群 LEfSe 分析的 LDA 得分发现,正常组中,乳杆菌目(Lactobacillales)、乳酸菌科(Lactobacillaceae)、柠檬乳杆菌属(limosilactobacillus)、UBA3282、CAG-508 等5个分类群为主要优势菌群;模型组中,分枝杆菌目(Mycobacteriales)、分枝杆菌科(Mycobacteriaceae)、棒状杆菌属(Corynebacterium)等3个分类群为主要优势菌群;治疗组中,γ-变形杆菌纲(Gammaproteobacteria)、丹毒菌目(Erysipelotrichales)、伯克氏菌科(Burkholderiaceae)、异杆菌属(Allobaculum)、布劳特氏菌属(Blautia_A)等5个分类群为主要优势菌群。

3组大鼠的肠道菌群相对丰度发生了改变。在科水平上,与空白组比较,模型组分枝杆菌科(Mycobacteriaceae)、颤螺旋菌科(Oscillospiraceae)的菌群相对丰度升高,后者更显著($P<0.05$);乳酸菌科(Lactobacillaceae)、鼠杆菌科(Muribaculaceae)、CAG-508 的菌群相对丰度降低($P<0.05$)。与模型组比较,治疗组乳酸菌科(Lactobacillaceae)、CAG-508 的菌群相对丰度升高;分枝杆菌科(Mycobacteriaceae)、鼠杆菌科(Muribaculaceae)、颤螺旋菌科(Oscillospiraceae)的菌群相对丰度降低,其中分枝杆菌科(Mycobacteriaceae)变化更显著($P<0.05$)。见表5。

在属水平上,与空白组比较,模型组的棒状杆菌属(Corynebacterium)、异杆菌属(Allobaculum)的菌群相对丰度升高;阿克曼菌属(Akkermansia)、乳杆菌属(Ligilactobacillus)、柠檬乳杆菌属(Limosilactobacillus)的菌群相对丰度降低,后两者更显著($P<0.05$)。与模型组比较,治疗组棒状杆菌属(Corynebacterium)的菌群相对丰度显著降低($P<0.05$);异杆菌属(Allobaculum)、阿克曼菌属(Akkermansia)、柠檬乳杆菌属(Limosilactobacillus)的菌群相对丰度均升高。见表6。

4 讨论

4.1 中药复方防治激素性股骨头坏死的可行性

SANFH 是长期使用糖皮质激素类药物导致的严重并发症之一,其病理机制涉及骨髓脂肪化、血管内皮损伤、成骨/破骨细胞失衡及炎症反应等[19]。传统中药复方及临床经验化裁方在 SANFH 治疗中展现出独特优势,其多靶点、多通路的作用模

表5 3组大鼠肠道菌群在科水平上不同细菌的相对丰度($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	Lactobacillaceae	Mycobacteriaceae	Muribaculaceae	Oscillospiraceae	CAG-508
空白组		0.30±0.23	0.00±0.00	0.15±0.06	0.05±0.02	0.06±0.02
模型组	0.035	0.02±0.02*	0.23±0.07	0.08±0.07*	0.08±0.02*	0.02±0.01*
治疗组	5.600	0.03±0.02	0.06±0.02#	0.06±0.05	0.07±0.05	0.04±0.06

注：*与空白组比较，$P<0.05$；#与模型组比较，$P<0.05$。

表6 3组大鼠肠道菌群在属水平上不同细菌的相对丰度($\bar{x} \pm s$)

组别	剂量/(g·kg^{-1})	Corynebacterium	Ligilactobacillus	Allobaculum	Akkermansia	Limosilactobacillus
空白组		0.00±0.00	0.23±0.22	0.00±0.00	0.02±0.06	0.05±0.04
模型组	0.035	0.23±0.07	0.02±0.02*	0.03±0.04	0.01±0.02	0.00±0.00*
治疗组	5.600	0.06±0.02#	0.02±0.02	0.09±0.06	0.08±0.11	0.01±0.01

注：*与空白组比较，$P<0.05$；#与模型组比较，$P<0.05$。

式与“整体观念”的治疗理念高度契合[20]。加味活络效灵丹，以当归、丹参活血养血，共为君药；乳香、没药活血祛瘀，行气止痛，为臣药，使瘀血去，经脉通，诸痛止；下肢瘀肿、腿痛，加牛膝、续断等补肾壮骨之品，兼具“活血通络”与“益肾强筋骨”多重功效。本研究结果显示，加味活络效灵丹显著改善大鼠股骨头空骨陷窝率及骨小梁数量、厚度、分离度等骨组织学参数，提示其能通过改善SANFH模型大鼠股骨头的骨微结构促进骨组织修复。

4.2 加味活络效灵丹对骨组织修复的多维度调控

骨组织病理学与影像学分析是评估SANFH治疗效果的关键指标[21]。HE染色结果显示，模型组大鼠股骨头空骨陷窝率高达(16.27±1.64)%，而治疗组显著降至(7.84±1.14)%($P<0.05$)，提示成骨细胞活性增强与骨细胞凋亡减少。CT三维重建进一步证实，治疗组骨体积分数(BV/TV)从模型组的(14.27±3.05)%提升至(20.13±2.48)%，骨小梁数量(Tb.N)从(1.8±0.48) mm^{-1}增加至(3.84±0.25) mm^{-1}，表明药物有效逆转了激素诱导的骨小梁稀疏与结构破坏。免疫组化结果显示，治疗组BMP、OPG及Runx2表达分别较模型组显著升高($P<0.01$)。其中，BMP作为TGF-β超家族成员，可激活Smad信号通路促进间充质干细胞向成骨细胞分化；OPG通过竞争性结合RANKL抑制破骨细胞成熟；Runx2则是成骨细胞分化的核心转录因子；结果表明加味活络效灵丹可能通过调控BMP/Smad、OPG/RANKL/RANK及Runx2相关通路，形成“促骨形成-抑骨吸收”的双向调节网络，从而加速骨组织修复进程[22-24]。

4.3 肠道菌群多样性改变与“肠-骨”轴的交互作用

本研究发现，加味活络效灵丹对骨组织的直接修复作用与其调节肠道菌群的间接效应密切相关。基于16S rDNA测序的菌群分析显示，α多样性分析说明3组大鼠肠道菌群结构的物种多样性和丰富度存在明显差异，β多样性分析显示治疗组菌群结构与模型组存在显著分离，与空白组相近，提示干预药物有效重塑了激素扰动的肠道微生态。进一步LEfSe分析发现，模型组大鼠肠道菌群呈现显著的“促炎型”特征：分枝杆菌科(Mycobacteriaceae)丰度升高，其可能通过分泌脂阿拉伯甘露聚糖(LAM)激活NOD2受体，诱导IL-17分泌，加剧骨破坏[25]；棒状杆菌属(Corynebacterium)丰度增加，该菌属可产生次级胆汁酸(如石胆酸)，通过激活TGR5受体促进Th17细胞分化，进一步放大炎症级联反应[26]。与之形成鲜明对比的是，模型组中具有骨保护作用的菌群显著减少：柠檬乳杆菌属(Limosilactobacillus)丰度下降($P<0.05$)，其分泌的乳酸可通过GPR81受体抑制破骨细胞活性；阿克曼菌属(Akkermansia)丰度降低，该菌通过增强黏液层厚度减少内毒素入血，其缺失可能导致LPS-TLR4信号通路过度激活，促进骨吸收[27]。这些菌群变化与模型组大鼠股骨头空骨陷窝率和股骨近端骨体积分数的显著异常形成时间-效应关联，提示肠道菌群失调可能是激素性骨坏死的关键启动因素[28]。治疗组大鼠肠道菌群呈现“抗炎-促修复”特征：γ-变形杆菌纲(Gammaproteobacteria)、布劳特氏菌属(Blautia_A)为主要优势菌群，前者的益生菌株可分泌短链脂肪酸(SCFAs)，丁酸浓度与OPG表达呈正相关，可通过抑制RANKL/RANK通路减少破骨细胞分化[29]，后者菌属可降解黄酮类化合物生成马尿酸，通过激活PPARγ通路抑制NF-κB核转位，其抗炎作用可能与此机制相关[30]。异杆菌属(Allobaculum)的丰度增加，其代谢产物丙酸可通过GPR41受体促进成骨细胞分化，治疗组Runx2表达升高可能与此相关[31]；值得注意，CAG-508丰度在模型组显著减少，而治疗组增加接近空白组水平，有研究表明CAG-508可能通过上调抗炎因子(如IL-10、TGF-β)的表达，抑制NF-κB号通路激活，减少促炎因子(如TNF-α、IL-6)释放，从而缓解股骨头局部炎症微环境，其代谢产物短链脂肪酸(如丁酸盐)可通过GPR43受体介导调节巨噬细胞极化，促进M2型抗炎表型，抑制破骨细胞活性[32]。这也为中医“肾主骨”“脾肾相关”理论提供了现代诠释：肾之精气不足可导致肠道菌群失调，活血通络、益肾健骨的中药复方可通过重塑菌群结构，实现骨代谢平衡[33]。

综上，本研究揭示了加味活络效灵丹通过调节肠道菌群结构，间接影响骨组织修复的“肠-骨”轴机制，从调控大鼠肠道菌群结构的物种多样性和丰富度角度，能上调乳酸菌科(Lactobacillaceae)、CAG-508、异杆菌属(Allobaculum)、阿克曼菌属(Akkermansia)、柠檬乳杆菌属(Limosilactobacillus)等有益菌种丰度，下调分枝杆菌科(Mycobacteriaceae)、棒状杆菌属(Corynebacterium)等有害菌种丰度；从骨组织病理学和影像学角度，能改善大鼠股骨头空骨陷窝率及相关骨组织学参数，并能上调骨组织修复标记物BMP、OPG、Runx2表达水平；进一步证实肠道菌群结构与骨代谢稳态的关联性，菌群重塑对“肠-

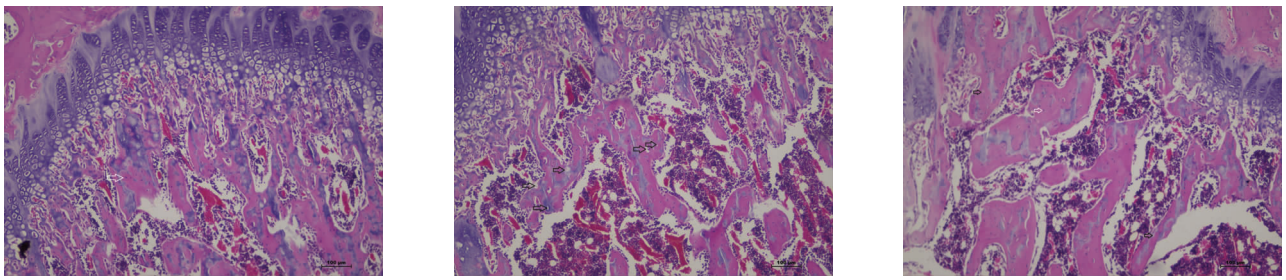
骨”轴的双向调节,起到防治 SANFH 的作用。未来研究可通过代谢组学与单细胞测序技术,进一步解析关键菌属的功能基因表达及与宿主的互作网络,并结合宏基因组学技术解析关键功能菌的代谢通路,为基于肠道菌群的骨坏死靶向疗法微生物制剂的新药研发和开发提供依据[34]。

参考文献

[1] 肖涟波,梁倩倩. 股骨头坏死中西医结合诊疗专家共识[J]. 世界中医药,2023,18(7):901-910.
[2] 中国中医药研究促进会中医骨伤临床循证医学分会,何伟,王智勇. 非创伤性股骨头坏死中西医结合诊疗专家共识[J]. 中医正骨,2024,36(9):1-11.
[3] 徐芳茹,周全. 基于“肠-关节轴”浅析“从脾治痹”[J]. 安徽中医药大学学报,2022,41(3):1-5.
[4] 侯伟. 基于“治痿独取阳明”理论探究激素性股骨头坏死患者肠道菌群分布规律的临床研究[D]. 南京:南京中医药大学,2022.
[5] 翁沟,何晓铭,何敏聪,等. 基于络病理论探讨股骨头坏死患者的疼痛特点及疼痛区域经脉循行特点[J]. 中医正骨,2023,35(12):25-29.
[6] 乌日莎娜,沈莹姗,袁颖嘉,等. 基于“瘀去、新生、骨合”理论从细胞层面探讨祛瘀、活血及补肾中药治疗股骨头坏死的作用机制[J]. 中医正骨,2022,34(4):61-63,69.
[7] 贾振华. 肺疫证治规律探讨与连花清瘟组方新解[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(17):203-210.
[8] 王丽丽,李群,胡智星,等. 基于氧化脂质代谢组和转录组学整合策略探索健脾活骨方治疗大鼠激素性股骨头坏死的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志,2025,31(11):190-199.
[9] 席洪钟,陈浩,何帅,等. 右归饮通过调节 PPARγ 通路减轻骨髓间充质干细胞成脂分化治疗糖皮质激素诱导的骨坏死[J/OL]. 中国中药杂志,1-14[2025-04-06]. https://doi.org/10.19540/j.cnki.cjcmm.20250307.401.
[10] 李金宗,侯德才,巩雪. 牛膝-续断治疗股骨头坏死的作用机制[J]. 中医药临床杂志,2022,34(7):1294-1301.
[11] 李伟举,陈晓聪,曾家莹,等. 参骨颗粒通过肠道菌群改善骨质疏松的研究[J]. 中国骨质疏松杂志,2024,30(9):1341-1347,1352.
[12] 林青霞,聂春梅,车润莉,等. 基于代谢组学和肠道菌群探讨正清风痛宁缓释片治疗膝骨关节炎作用机制[J]. 中国中药杂志,2024,49(23):6417-6428.
[13] 吴霜,袁立霞,廖晴,等. 基于16S rDNA 测序研究当归拈痛汤对膝骨关节炎小鼠肠道菌群的影响[J]. 中国实验方剂学杂志,2024,30(11):9-17.
[14] 薛鹏,杜斌,刘锌,等. 基于肠-骨轴探讨肠道菌群对骨代谢影响的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志,2023,29(1):84-88.
[15] 巩彦龙,黄九妹,张杰,等. 肠道屏障与骨代谢[J]. 中国骨质疏松杂志,2024,30(12):1815-1819.
[16] 韦雨柔,田佳庆,肖方骏,等. 活血通络胶囊对激素性股骨头坏死大鼠肠道菌群影响的研究[J]. 中国全科医学,2023,26(29):3674-3682.
[17] XIAO W P,SU J B,GAO X J,et al. The microbiota-gut-brain axis participates in chronic cerebral hypoperfusion by disrupting the metabolism of short-chain fatty acids[J]. Microbiome,2022,10(1):62.
[18] 郜希尧. 活络效灵丹对激素诱导的股骨头坏死大鼠骨修复的影响[D]. 沈阳:辽宁中医药大学,2024.
[19] MA T C,WANG Y,MA J X,et al. Research progress in the pathogenesis of hormone-induced femoral head necrosis based on microvessels:a systematic review[J]. J Orthop Surg Res,2024,19(1):265.
[20] CHEN D,ZHONG D M,MEI R H,et al. Screening and identification of potential key biomarkers for glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. J Orthop Surg Res,2023,18(1):28.
[21] 何帅,刘锌,杜斌,等. 肠道菌群变化对大鼠激素性股骨头坏死造模效果的影响[J]. 解放军医学杂志,2023,48(5):552-559.
[22] 杨祥军,王丛悦,徐西林,等. 虎杖苷调节 JAK2/STAT3 信号通路治疗大鼠激素性股骨头坏死的实验研究[J]. 中国骨伤,2025,38(2):195-203.
[23] 李文茜,田亮玉,张瑾,等. 基于 WGCNA 和动物实验探究骨坏死康复丸治疗激素性股骨头坏死的作用机制[J]. 中药新药与临床药理,2024,35(9):1306-1318.
[24] 申意伟,张晓峰,李雪,等. 活骨灌注液干预骨坏死的病理形态学、血管新生和成骨分化的实验研究[J]. 时珍国医国药,2022,33(4):831-834.
[25] TELLO RUBIO B,BUGAULT F,BAUDON B,et al. Molecular mechanisms underpinning the circulation and cellular uptake of *Mycobacterium ulcerans* toxin mycolactone[J]. Front Pharmacol,2021,12:733496.
[26] CHENG H Y,GUAN X,CHEN D K,et al. The Th17/treg cell balance:a gut microbiota-modulated story[J]. Microorganisms,2019,7(12):583.
[27] WANG Y C,XIAO J,WEI S M,et al. Protective effect of zinc gluconate on intestinal mucosal barrier injury in antibiotics and LPS-induced mice[J]. Front Microbiol,2024,15:1407091.
[28] SHAO W K,WANG P,LV X,et al. Unraveling the role of endothelial dysfunction in osteonecrosis of the femoral head:a pathway to new therapies[J]. Biomedicines,2024,12(3):302-312.
[29] WANG S S,WANG S J,WANG X N,et al. Effects of icariin on modulating gut microbiota and regulating metabolite alterations to prevent bone loss in ovariectomized rat model[J]. Front Endocrinol,2022,13:874849.
[30] ZANG R X,ZHOU R,LI Y D,et al. The probiotic Lactobacillus plantarum alleviates colitis by modulating gut microflora to activate PPARγ and inhibit MAPKs/NF-κB[J]. Eur J Nutr,2024,64(1):32.
[31] HUANG H,HUANG J,HUANG W D,et al. Breast milk jaundice affects breastfeeding:From the perspective of intestinal flora and SCFAs-GPR41/43[J]. Front Nutr,2023,10:1121213.
[32] YING M X,YU Q,ZHENG B,et al. Cultured Cordyceps sinensis polysaccharides modulate intestinal mucosal immunity and gut microbiota in cyclophosphamide-treated mice[J]. Carbohydr Polym,2020,235:115957.
[33] 魏秋实. 股骨头坏死态靶辨治体系的构建[J]. 中医正骨,2024(9):15-18.
[34] 景田园,王平,王仪,等. 鹿仲健骨汤治疗股骨头坏死模型大鼠:肠道菌群及血清激素变化[J]. 中国组织工程研究,2024,28(35):5598-5605.

基于 16S rDNA 测序探讨加味活络效灵丹对激素性股骨头坏死大鼠“肠－骨”轴的影响

（正文见 53－58 页）



空白组　　模型组　　治疗组

注：白色箭头表示正常骨细胞，黑色箭头表示空骨陷窝。

图 1　3 组大鼠股骨头 HE 染色结果（100）

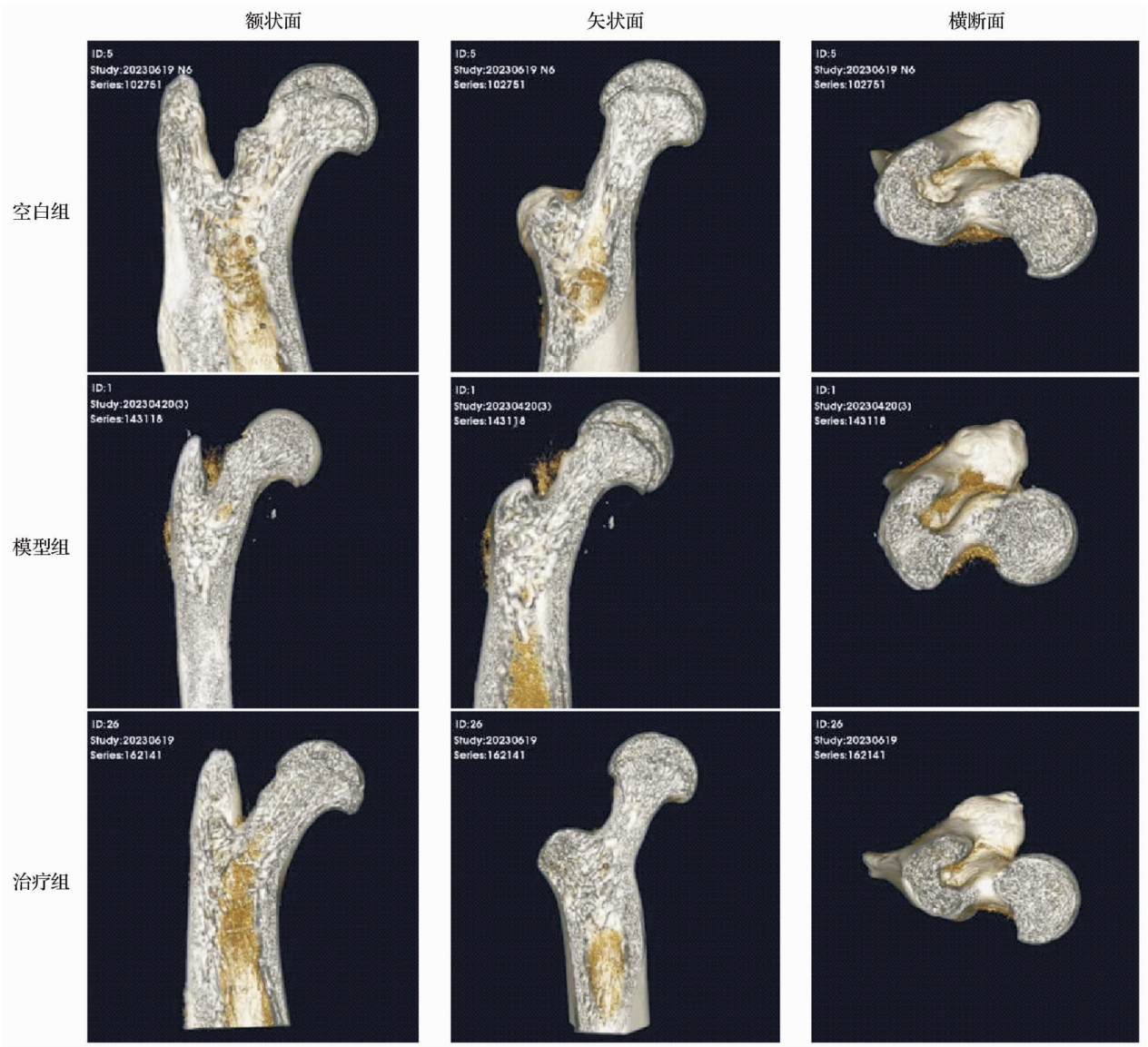
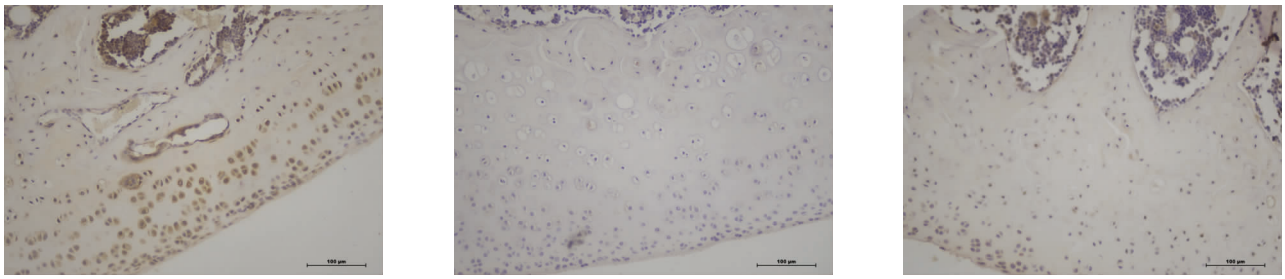
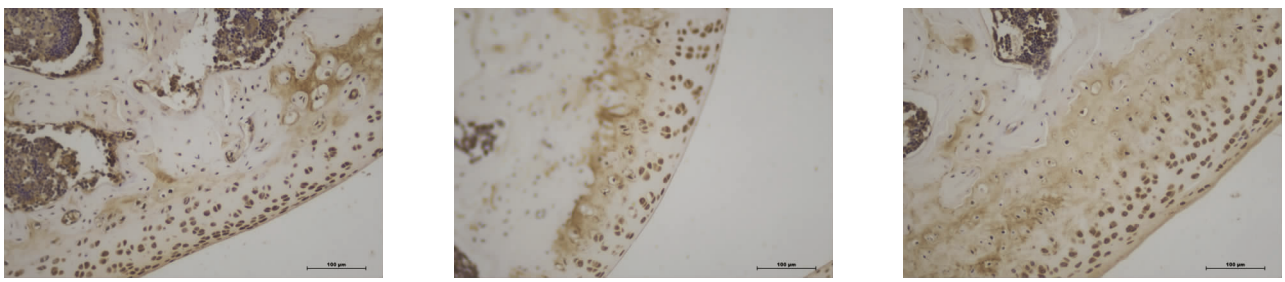


图 2　3 组大鼠股骨头 Micro－CT 三维重建图像



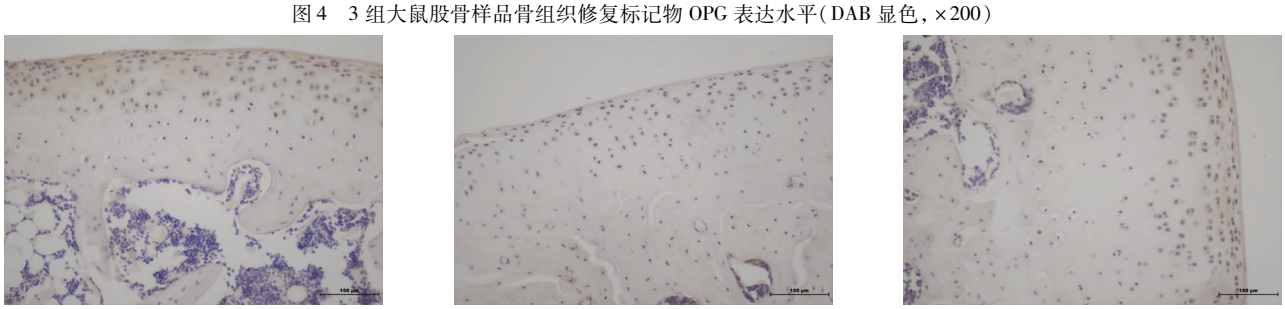
空白组　　模型组　　治疗组

图 3　3 组大鼠股骨样品骨组织修复标记物 BMP 表达水平(DAB 显色，×200)



空白组　　模型组　　治疗组

图 4　3 组大鼠股骨样品骨组织修复标记物 OPG 表达水平(DAB 显色，×200)



空白组　　模型组　　治疗组

图 5　3 组大鼠股骨样品骨组织修复标记物 Runx2 表达水平(DAB 显色，×200)

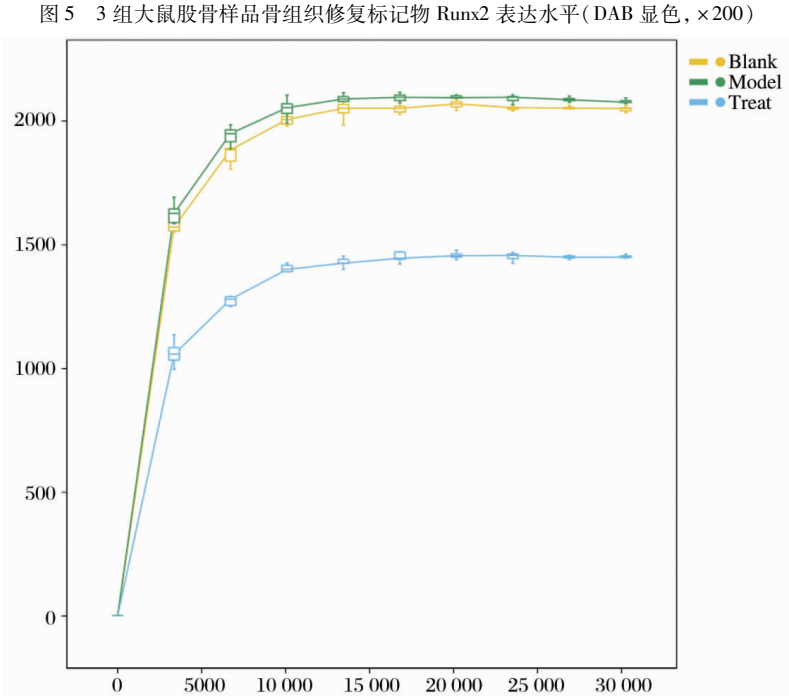


图 6　稀疏曲线

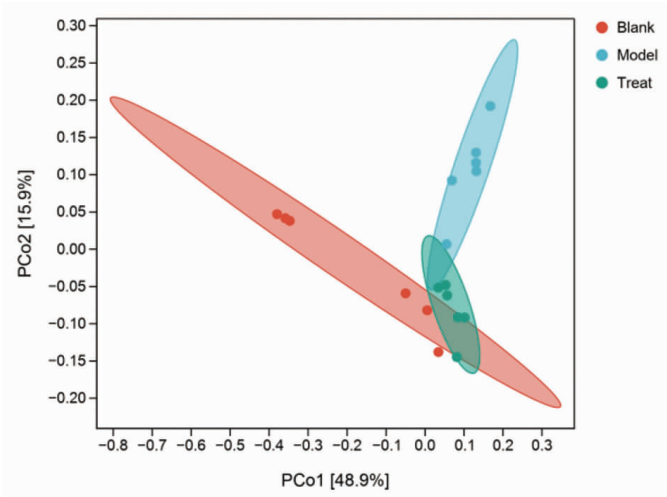


图 7　3 组样品 PCoA 分析

大黄玄明粉冲剂通过 PI3K/AKT/NF－κB 信号传导和改善肠道微生物群改善急性重症胰腺炎诱导的肠屏障损伤

（正文见 59－64 页）

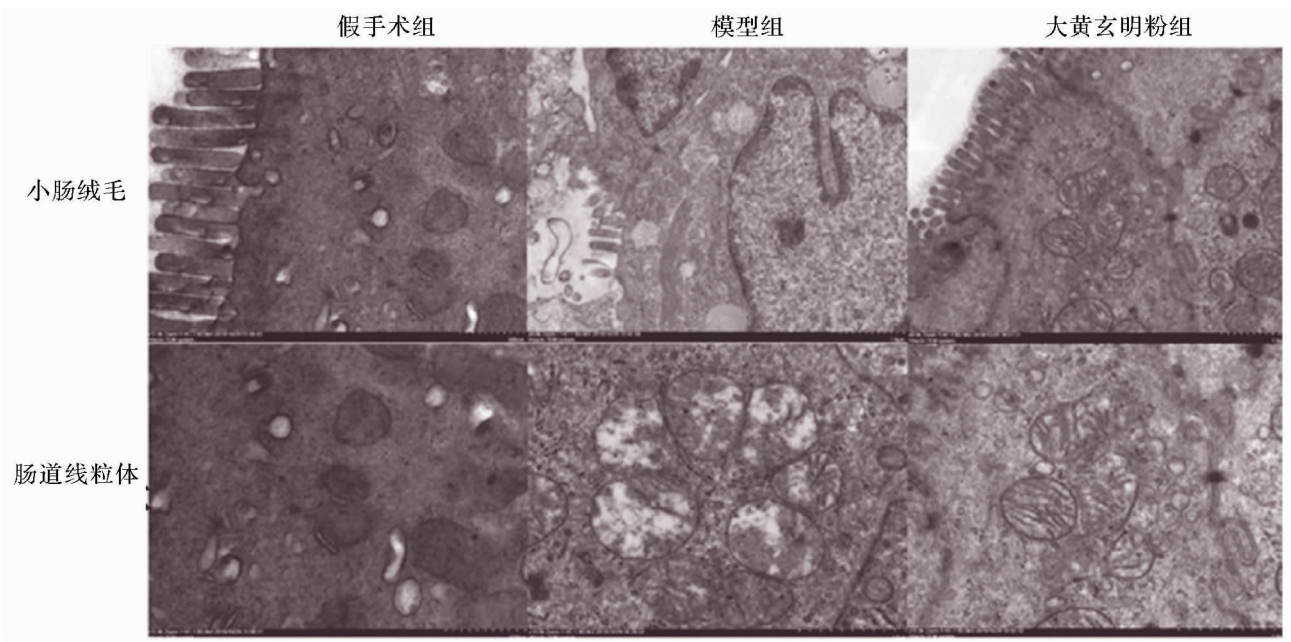
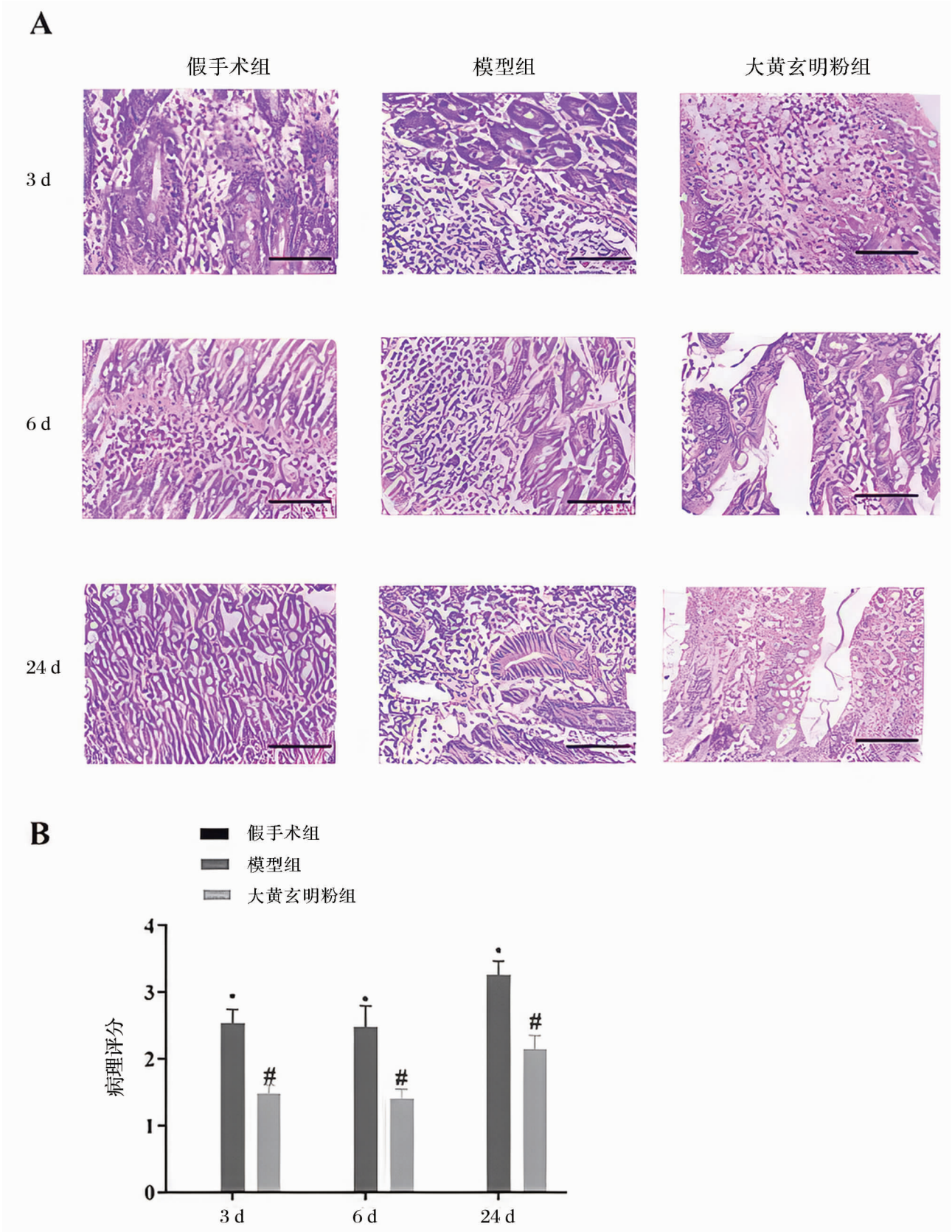
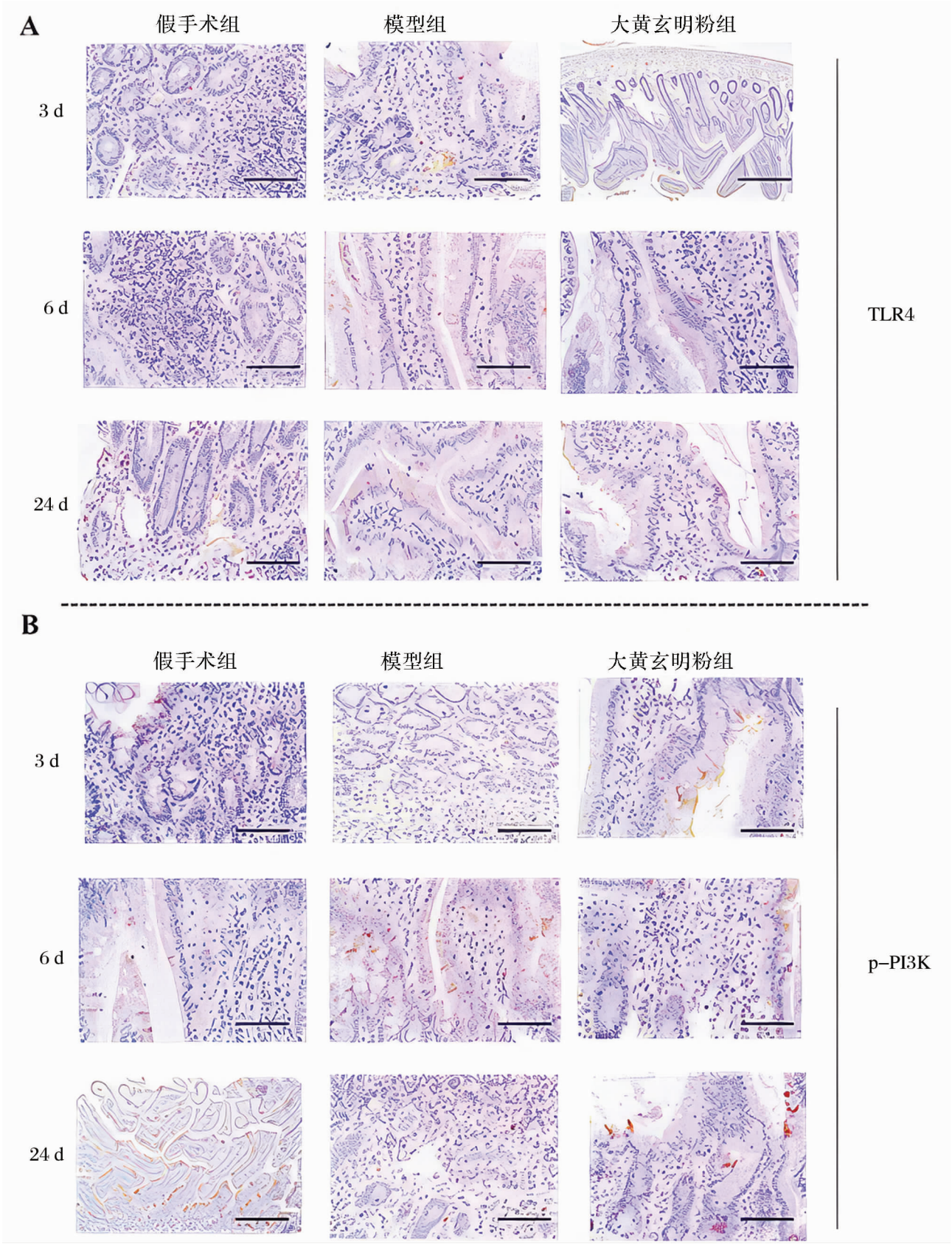


图 2　不同组间肠屏障的扫描电镜观察



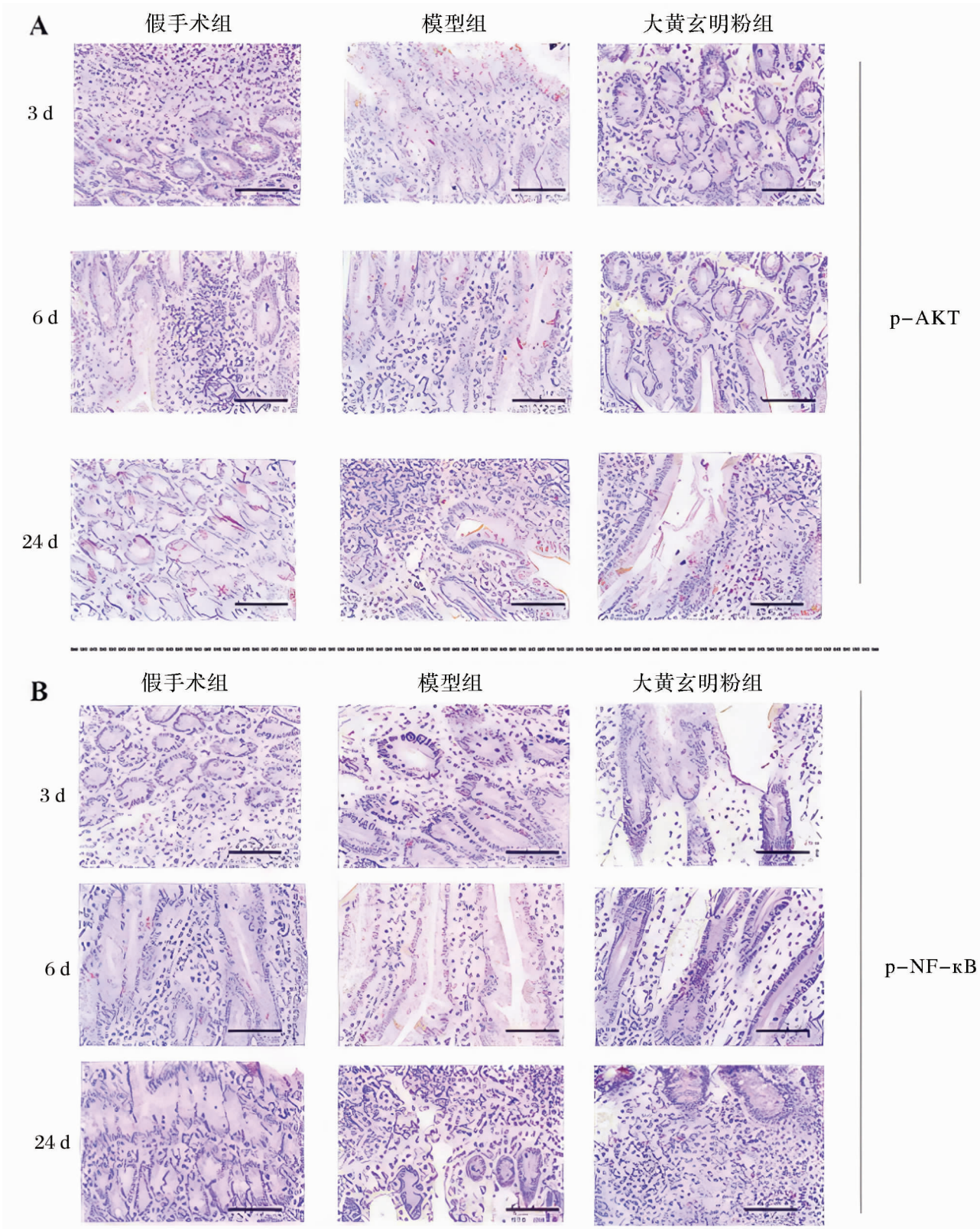
注:(A) 大黄玄明粉冲剂显著改善小肠中的病理性炎症细胞浸润(bar = 100 μm);(B) 病理评分。每组 $n = 10$。* 与假手术组比较,$P < 0.05$;# 与模型组比较,$P < 0.05$。

图 5 大黄玄明粉冲剂对小肠组织的影响



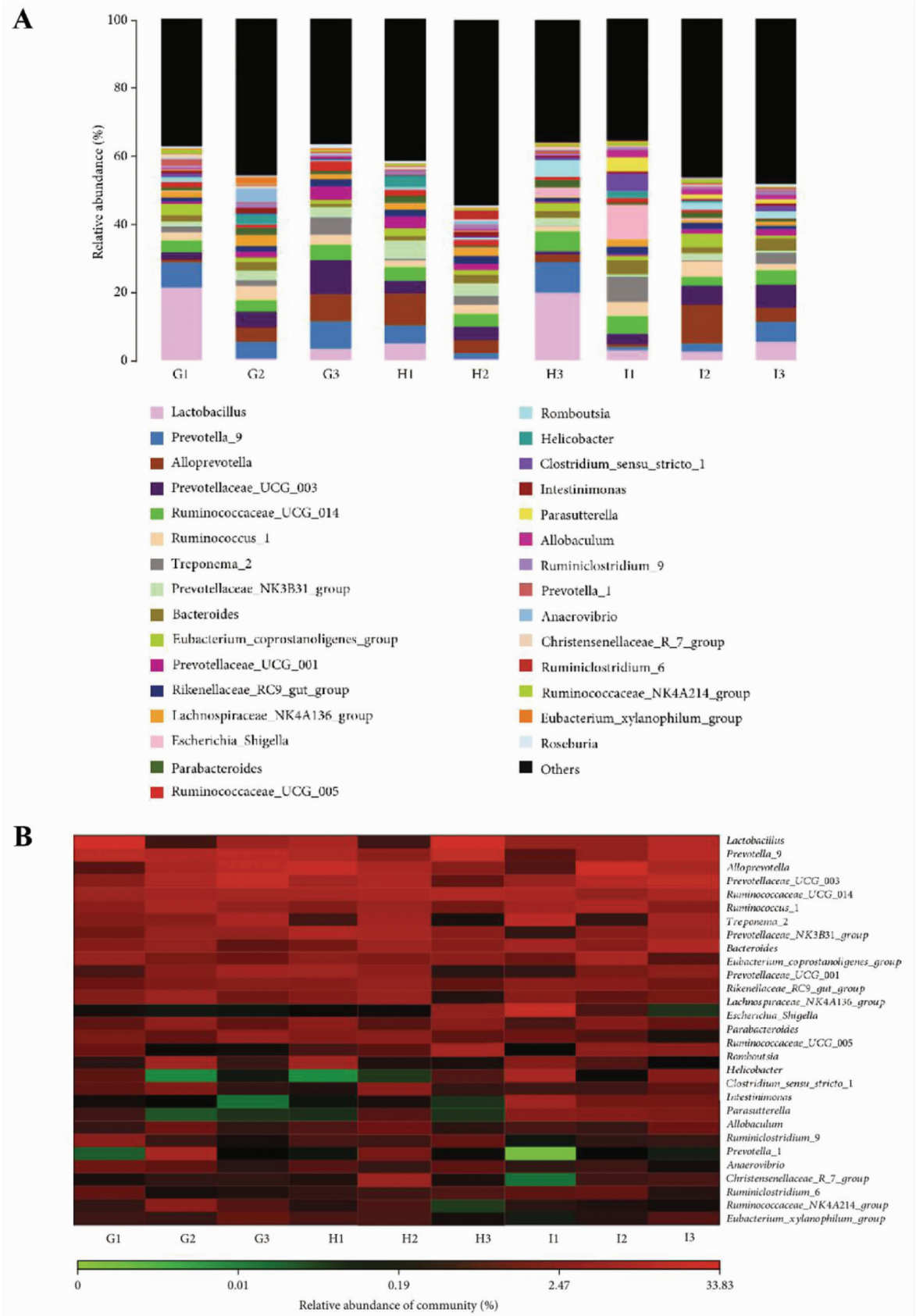
注：（A）结肠组织中 TLR4 的免疫组织化学分析（bar = 100 μm）。（B）结肠组织中 p – P3IK 的免疫组织化学分析（bar = 100 μm）。每组 $n = 10$。

图 6　大黄玄明粉冲剂对 TLR4 依赖性磷酸化 PI3K/AKT/NF – κB 表达的影响



注：（A）结肠组织中 p－AKT 的免疫组织化学分析（bar＝100 μm）。（B）结肠组织中 p－NF－κB 的免疫组织化学分析。每组 $n=10$。

图 7　大黄玄明粉冲剂对 TLR4 依赖性磷酸化 PI3K/AKT/NF－κB 表达的影响



注：(A) 肠道微生物群的比例；(B) 不同处理对肠道微生物群变化的热图分析。G1－3 代表 3 d 时的假手术组、模型组和大黄玄明粉冲剂组；H1－3 代表6 d 时的假手术组、模型组和大黄玄明粉冲剂组；I1－3 代表24 d 时的假手术组、模型组和大黄玄明粉冲剂组。

图 9　不同组间肠道微生物群的组成