

# 基于肠道菌群-Th17/Treg轴探讨电针对卵巢切除大鼠骨代谢的影响

王志强<sup>1,2</sup>, 魏振朴<sup>2</sup>, 陈旭征<sup>1</sup>, 陈赛楠<sup>3</sup>, 黄云梅<sup>1</sup>, 林燕萍<sup>1\*</sup>

1 福建中医药大学中西医结合学院 中西医结合研究院, 福建 福州 350122;

2 福建中医药大学针灸推拿学院, 福建 福州 350122;

3 福建省中医药科学院骨质疏松证候基因组学重点实验室, 福建 福州 350003

\* 通信作者: 林燕萍, E-mail: 75175291@qq.com

收稿日期: 2025-02-01; 接受日期: 2025-04-20

基金项目: 国家自然科学基金项目(81574003); 福建省财政厅教育和科研专项资金项目(X2019002-财政专项);

福建中医药大学校管课题(X2023015)

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2025.05009

开放科学(资源服务)标识码(OSID):



**摘要** **目的** 观察电针脾俞穴、肾俞穴对双侧去卵巢大鼠肠道菌群、Th17/Treg细胞与骨代谢的影响,探讨电针调节绝经后骨质疏松症(PMOP)大鼠骨代谢与肠道菌群-Th17/Treg轴的内在联系。**方法** 选择SPF级3月龄雌性SD大鼠20只,采用双侧卵巢切除(OVX)法构建PMOP大鼠模型,并采用随机数字表法将其分为模型组和电针组,每组10只。电针组造模3d后开始电针治疗;模型组每天进行与电针组一样的抓取动作,不做其他任何干预治疗。2组在干预12周后,次日清晨每只大鼠先采集1g左右粪便样本放入无菌EP管并保存于-80℃冰箱,再以2%戊巴比妥钠(0.2 mL/100 g的剂量)经腹腔注射麻醉,处死取材进行后续实验。采用ELISA法检测雌激素(E<sub>2</sub>)水平;16s rDNA技术检测2组粪便样品的肠道菌群,进行菌群表征指数分析、菌群差异分析和LEfSe多级物种差异判别分析;流式细胞术检测结肠系膜淋巴结中Th17细胞和Treg细胞的含量;ELISA法检测I型原胶原N端前肽(PINP)、β胶原降解产物(β-CTX)、白细胞介素-17(IL-17)、白细胞介素-6(IL-6)、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、羟基维生素D<sub>3</sub>(25-OH-D<sub>3</sub>)和白细胞介素-10(IL-10)、转化生长因子-β(TGF-β)等骨代谢相关生化指标;双能X线骨密度仪检测骨密度。**结果** 与模型组比较,电针组外周血E<sub>2</sub>含量增加(P<0.05)。与模型组比较,电针组肠道微生物组健康指数(GMHI)明显升高(P<0.05);与模型组比较,电针组肠道菌群失调指数(MDI)值明显下降(P<0.05);与模型组比较,电针组肠道菌群中乳杆菌属和双歧杆菌属的丰度均升高(P<0.05);与模型组比较,电针组肠道中明显富集双歧杆菌属和乳杆菌属等有益菌(P<0.05)。与模型组比较,电针组结肠淋巴结中Th17细胞含量明显减少(P<0.05);与模型组比较,电针组结肠淋巴结中Treg细胞含量明显增加(P<0.05)。与模型组比较,电针组PINP、β-CTX、IL-17、IL-6和TNF-α表达水平均降低(P<0.05);25(OH)D<sub>3</sub>、IL-10和TGF-β表达水平均升高(P<0.05)。与模型组比较,电针组骨密度增强(P<0.05)。**结论** 电针脾俞穴、肾俞穴可提高E<sub>2</sub>水平,上调双歧杆菌属和乳杆菌属这2类有益菌的丰度,调节肠道菌群-Th17/Treg轴,有效改善雌激素缺乏导致的骨代谢失衡,防治PMOP。

**关键词** 绝经后骨质疏松症;肠道菌群;Th17/Treg轴;骨代谢;电针

引用格式: 王志强, 魏振朴, 陈旭征, 等. 基于肠道菌群-Th17/Treg轴探讨电针对卵巢切除大鼠骨代谢的影响[J]. 康复学报, 2025, 35(5): 504-513, 521.

WANG Z Q, WEI Z P, CHEN X Z, et al. Effects of electroacupuncture on bone metabolism in ovariectomized rats via the gut microbiota-th17/treg axis [J]. Rehabil Med, 2025, 35(5): 504-513, 521.

DOI: 10.3724/SP.J.1329.2025.05009

©《康复学报》编辑部, 开放获取 CC BY-NC-ND 4.0 协议

© Rehabilitation Medicine, OA under the CC BY-NC-ND 4.0

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是雌激素骤降引起的骨量减少,骨组织结构恶化、脆性增加,易于骨折的疾病<sup>[1]</sup>。目前临床上PMOP以双膦酸盐类、选择性雌激素受体调节剂、甲状旁腺激素家族多肽、地诺单抗和维生素D衍生物等药物治疗为主,但长期服用此类药物产生的毒副作用不容忽视<sup>[2]</sup>。因此,寻求PMOP防治新靶点以及开辟安全有效的治疗途径成为一个亟需解决的问题。现在临床上PMOP治疗除了药物疗法,电针疗法也是常用的中医特色治疗手段。研究指出电针可上调卵巢切除(ovariectomy, OVX)大鼠雌激素(estradiol, E<sub>2</sub>)水平,调节白细胞介素-6(interleukin 6, IL-6)、转化生长因子- $\beta$ (transforming growth factor  $\beta$ , TGF- $\beta$ )、I型原胶原N端前肽(procollagen type I N-terminal propeptide, P I NP)等血清骨代谢指标的含,通过OPG/RANKL/RANK信号通路抑制破骨细胞(osteoclast, OC)的生成,促进成骨细胞的增殖及分化,对抗骨丢失,改善PMOP骨代谢<sup>[3-4]</sup>。本课题组前期研究发现,电针OVX大鼠的脾俞穴、肾俞穴后可使血清中骨保护素(osteoprotegerin, OPG)升高,抗酒石酸酸性磷酸酶5b(tritrate-resistant acid phosphatase 5b, TRACP 5b)、RANKL降低,骨小梁面积、骨小梁数目和骨小梁厚度均得以改善,骨密度明显增加<sup>[5]</sup>,但其中的详尽机制尚待深入研究。

近年来的研究提示,PMOP发病机制与“肠道菌群-免疫”轴密切相关<sup>[6-7]</sup>。免疫系统中辅助性T细胞17(T helper cell 17, Th17)能促进OC分化,而调节性T(regulatory T, Treg)细胞却能抑制OC的分化,因此Th17/Treg轴对OC分化和维持骨内环境稳定至关重要<sup>[8]</sup>,Th17/Treg轴失衡所致的骨免疫紊乱是导致骨质疏松发生的重要因素<sup>[9]</sup>。而肠道菌群是刺激T细胞分化生成Th17细胞和Treg细胞的重要因素之一<sup>[10]</sup>,通过调节Th17/Treg轴可以显著影响骨稳态<sup>[11-12]</sup>。因此,调节Th17/Treg轴的动态平衡是雌激素缺乏后肠道菌群影响骨代谢的关键环节<sup>[13-15]</sup>。现有研究表明,电针可以通过调节肠道菌群和Th17/Treg细胞分化治疗脑缺血再灌注损伤、溃疡性结肠炎等疾病<sup>[16-17]</sup>。但电针脾俞穴、肾俞穴调节PMOP骨代谢的机制是否与肠道菌群-Th17/Treg轴相关,目前尚未见报道。因此,本实验就这方面内容开展研究并加以探讨。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验动物

选择SPF级3月龄雌性SD大鼠20只,体质量(270.5±6.7)g,购自上海斯莱克实验动物责任有限公司,实验动物生产许可证号:SCXK(沪)2017-0005。实验动物饲养于福建中医药大学实验动物中心SPF级实验室,使用许可证号:SYXK(闽)2014-0001。本实验研究方法和实验动物处理方法均已通过福建中医药大学动物伦理委员会审查(审批号:FJTCMIACUC 2020099)。

### 1.2 主要实验试剂

大鼠E<sub>2</sub>(货号:ML002871)、P I NP(货号:ML038224)、IL-6(货号:ML102828)等ELISA检测试剂盒均购自于上海酶联生物科技有限公司;刺激阻断剂(货号:550583)、固定破膜剂(货号:554714)、转录因子检测缓冲液(货号:562574)、流式染色缓冲液(货号:563794)、抗大鼠CD8a PerCP荧光抗体(货号:558824)、抗大鼠CD3 FITC荧光抗体(货号:559975)、抗大鼠CD25 PE荧光抗体(货号:554866)均购自于美国BD公司。

### 1.3 主要实验仪器

ELx800型酶标仪(美国Bio-Tek公司);流式细胞仪(BD公司);低温高速离心机64R型(美国Beckman公司);电热恒温水浴锅(武汉华美生物工程有限公司);双能X线骨密度仪Discovery Wi-型(美国Hologic公司);超纯水装置Milli-Q型(美国Milipore公司);电热恒温干燥箱(上海市跃进医疗器械一厂);深低温冰箱DW-86L626(海尔集团)。

## 2 实验方法

### 2.1 PMOP大鼠模型的建立

采用本课题组成熟的双侧OVX法构建PMOP大鼠模型,术后3d常规腹腔注射5×10<sup>5</sup> IU青霉素钠(1次/d)预防感染,术后12周建立PMOP大鼠模型<sup>[18]</sup>。

### 2.2 实验动物分组及干预方法

将20只雌性SD大鼠,在福建中医药大学实验动物中心SPF级动物房适应性饲养1周。按照“2.1”所述方法造模后,采用随机数字表法将其分为模型组和电针组,每组10只。电针组造模3d后开始电针治疗;模型组每天进行与电针组一样的抓取动作,不做其他任何干预治疗;2组在干预12周后,次日清晨每只大鼠先采集1g左右粪便样本放入无菌

的EP管并保存于-80℃冰箱,再以2%戊巴比妥钠(0.2 mL/100 g的剂量)经腹腔注射麻醉,处死取材进行后续实验。

### 2.2.1 电针治疗方案

**2.2.1.1 选穴** 取双侧脾俞穴、肾俞穴。定位:脾俞穴位于第12胸椎下两旁肋间,旁开7 mm处;肾俞穴位于第2腰椎下两旁,旁开7 mm处<sup>[19-20]</sup>。

**2.2.1.2 器具准备** 采用华佗牌1寸针灸针,规格:0.18 mm×25 mm(产品注册证号:苏械注准20162200970)及华佗牌SDZ-II型电子针疗仪(苏州医疗用品厂)。

**2.2.1.3 操作方法** 稍向脊柱方向斜刺5~7 mm,透皮后行提插捻转,以针下有“沉紧感”为度,同侧脾俞穴和肾俞穴各接一组导线:脾俞穴连接正极(+),肾俞穴连接负极(-),连续波2 Hz,电流强度1 mA,持续时间30 min/次,1次/d,连续治疗12周。

## 2.3 观察指标

**2.3.1 E<sub>2</sub>水平检测** 取材时于腹主动脉采血,离心机2 500 r/min离心10 min,收集血清,置-20℃冰箱中保存备用。采用ELISA法检测外周血E<sub>2</sub>水平,具体操作按试剂盒说明书。

**2.3.2 肠道菌群检测** 采用16s rDNA技术检测2组粪便样品的肠道菌群,进行菌群表征指数分析、菌群差异分析和LEfSe多级物种差异判别分析(由上海美吉生物医药科技有限公司检测)。

**2.3.2.1 菌群表征指数分析** 主要包括肠道微生物组健康指数(gut microbiota health index, GMHI)和肠道菌群失调指数(microbiota dysbiosis index, MDI)。GMHI是基于物种分类特征构建的复合指标,通过量化核心共生菌与致病菌的相对丰度比值,评估样本的健康状态及疾病风险概率,其数值与肠道生态健康呈正相关。MDI定量表征微生物群落结构偏离稳态的程度,数值升高提示菌群紊乱加剧。

**2.3.2.2 菌群差异分析** 采用非参数检验结合多重校正算法,系统比较模型组和电针组的微生物组成差异,通过筛选差异具有统计学意义( $P<0.05$ )的物种,鉴定潜在的环境响应关键微生物类群,为生物标志物的发现提供候选靶标。

**2.3.2.3 LEfSe多级物种差异判别分析** 运用线性判别分析效应量算法,在门至种的6个分类水平上逐级筛选组间差异物种,通过计算线性判别LDA阈值(LDA Score)量化差异物种的效应强度,设定LDA

阈值,优先筛选具有显著层级特异性的驱动物种,揭示环境适应过程中的关键功能类群。

**2.3.3 流式细胞术检测** 取出结肠用生理盐水冲洗后,滤纸吸干放入EP管中,摘取大鼠肠系膜淋巴结,去外膜与脂肪组织后,切成0.5 cm×0.5 cm的小块,在0.7%的胶原酶Ⅲ中37℃孵育20 min后,200目不锈钢筛网研磨,无血清1640制成淋巴细胞悬液于4℃保存备用。采用流式细胞术检测结肠系膜淋巴结中Th17细胞和Treg细胞的含量。

**2.3.3.1 Th17细胞检测** Th17细胞的鉴定通常是用CD3和CD8反设CD4细胞,即CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>的细胞被认为是CD3<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup>的细胞,而CD3<sup>+</sup>CD8<sup>-</sup>IL-17<sup>+</sup>细胞被认为是Th17细胞<sup>[21]</sup>。具体方法如下:制备肠系膜淋巴结单细胞悬液,调整密度至 $2\times 10^6$ 个/mL,刺激阻断剂刺激4~6 h。收集细胞悬液,加入L/D AF700 Fixable Viability Stain 510,室温避光孵育10 min;FBS洗涤后,加入CD16/32抗体,4℃孵育5 min;再加入CD45 APC-CY7、CD3 FITC和CD8 PERCP,室温避光孵育15 min。细胞固定破膜后,每管加入2 μL IL-17A,4℃避光孵育50 min~1 h;FBS洗涤离心,重悬于400 μL FBS后上机检测。

**2.3.3.2 Treg细胞检测** 外周的Treg细胞主要为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg,CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg除表达CD4分子和CD25分子外,其特征标志为其高表达转录因子Foxp3,因此CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Foxp3<sup>+</sup>细胞即是Treg细胞<sup>[21]</sup>。具体方法如下:如“2.3.3”法制备单细胞悬液,调整细胞密度 $2\times 10^6$ 个/mL,加入L/D AF700 Fixable Viability Stain 510混匀,室温避光孵育10 min;用FBS洗涤后,加入CD16/32,4℃孵育5 min;加入CD45 APC-CY7、CD3 FITC、CD8 PERCP和CD25 PE抗体室温避光孵育15 min;细胞经固定破膜后,加入Foxp3 APC抗体4℃避光孵育1.5~2 h;FBS洗涤离心,重悬于400 μL FBS后上机检测。

**2.3.4 ELISA法检测骨代谢相关生化指标** 取材时于腹主动脉采血,离心机2 500 r/min离心10 min,收集血清,以ELISA法检测大鼠外周血清中TGF-β、P I NP、IL-6、羟基维生素D<sub>3</sub>(25-hydroxyvitamin D<sub>3</sub>, 25-OH-D<sub>3</sub>)、β胶原降解产物(β-crosslaps, β-CTX)、白细胞介素-17(interleukin 17, IL-17)、肿瘤坏死因子-α(tumor necrosis factor α, TNF-α)和白细胞介素-10(interleukin 10, IL-10),具体操作按试剂盒说明书操作。

**2.3.5 骨密度检测** 取左侧股骨,剔除肌肉等软组织后,以4%中性多聚甲醛固定。将左侧股骨置于双能X线骨密度仪扫描床的固定位置(APEX Properties软件选择小动物高分辨模式,点分辨率为0.0622 cm),扫描结束后统一选取股骨远端骨垢线下方固定ROI区域,计算骨密度值。

**2.4 统计学方法**

采用SPSS 26.0软件进行统计分析。计量资料符合正态分布,采用( $\bar{x}\pm s$ )表示,组间比较采用两独立样本t检验;计量资料不服从正态分布,数据采用M( $P_{25}, P_{75}$ )表示,组间比较采用两独立样本Wilcoxon秩和检验。 $P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

**3 结果**

**3.1 2组雌激素水平比较**

与模型组比较,电针组外周血E<sub>2</sub>含量增加( $P<0.05$ )。见表1。

表1 2组E<sub>2</sub>表达水平比较( $\bar{x}\pm s$ ) pmol/L  
Table 1 Comparison of E<sub>2</sub> expression level between two groups ( $\bar{x}\pm s$ ) pmol/L

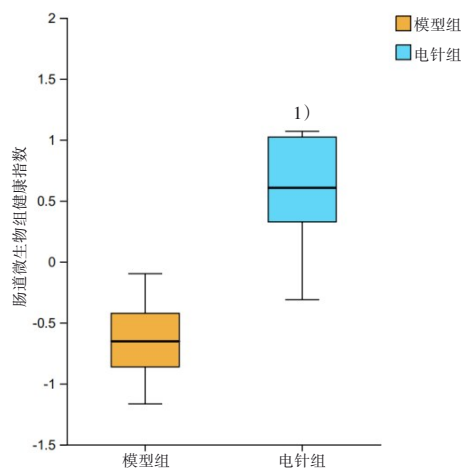
组别	n	E <sub>2</sub> 表达水平
模型组	10	27.139±3.142
电针组	10	52.930±6.579 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较,1)  $P<0.05$ 。

Note: compared with the model group, 1)  $P<0.05$ 。

**3.2 2组肠道菌群的检测结果比较**

**3.2.1 2组GMHI比较** 与模型组比较,电针组GMHI明显升高( $P<0.05$ )。见图1。

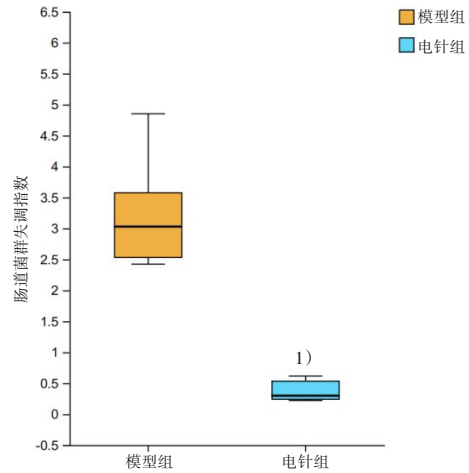


注:与模型组比较,1)  $P<0.05$ 。

Note: compared with the model group, 1)  $P<0.05$ 。

图1 2组肠道微生物组健康指数比较  
Figure 1 Comparison of gut microbiome health index between two groups

**3.2.2 2组MDI比较** 与模型组比较,电针组的MDI值明显下降( $P<0.05$ )。见图2。

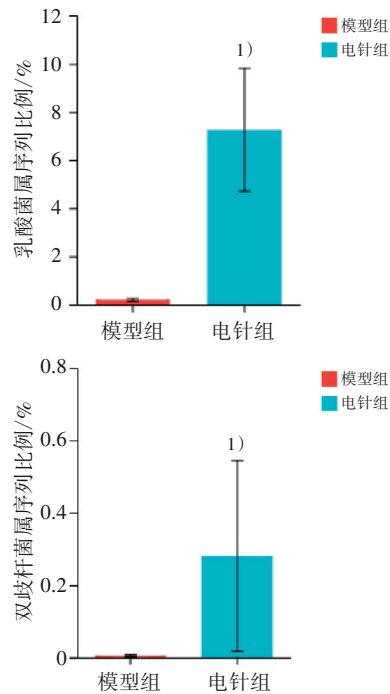


注:与模型组比较,1)  $P<0.05$ 。

Note: compared with the model group, 1)  $P<0.05$ 。

图2 2组肠道菌群失调指数比较  
Figure 2 Comparison of gut microbiota dysbiosis index between two groups

**3.2.3 2组间菌群差异分析** 与模型组比较,电针组肠道菌群中乳杆菌属和双歧杆菌属的丰度均升高( $P<0.05$ )。见图3。



注:与模型组比较,1)  $P<0.05$ 。

Note: compared with the model group, 1)  $P<0.05$ 。

图3 2组单个菌群比较  
Figure 3 comparison of single species between two groups

**3.2.4 2组 LefSe 分析结果比较** 本研究的 LefSe 分析结果以进化分支图和 LDA 值分布直方图的方式展示,以物种分类进化为基础,以分组为依据,采用线性分析找出对样品分组起显著作用的物种,并按

照不同分类水平以进化分支图的方式展示。结果 (LDA 阈值 > 3) 发现,与模型组比较,电针组肠道中明显富集双歧杆菌属和乳杆菌属等有益菌 ( $P < 0.05$ )。见图 4。

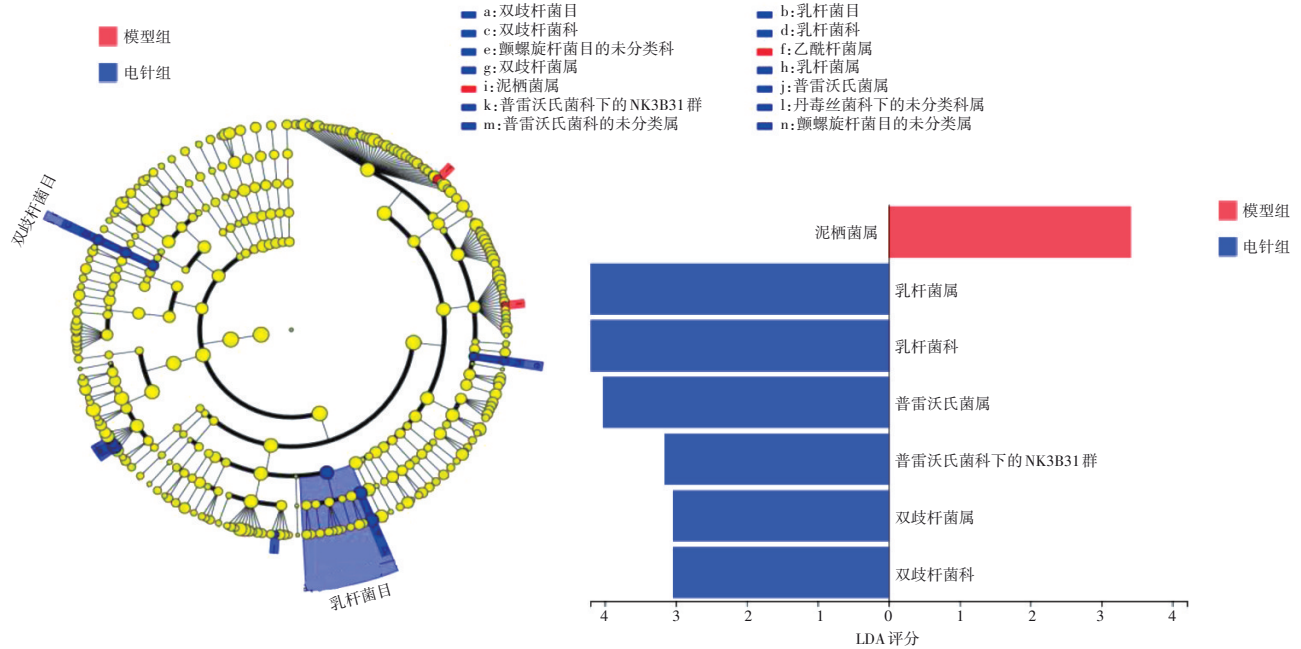


图 4 2组 LefSe 分析结果比较

Figure 4 Comparison of LefSe analysis results between two groups

**3.3 2组结肠淋巴结中 Th17 细胞、Treg 细胞含量比较**

与模型组比较,电针组结肠淋巴结中 Th17 细胞含量明显减少 ( $P < 0.05$ )。见图 5。

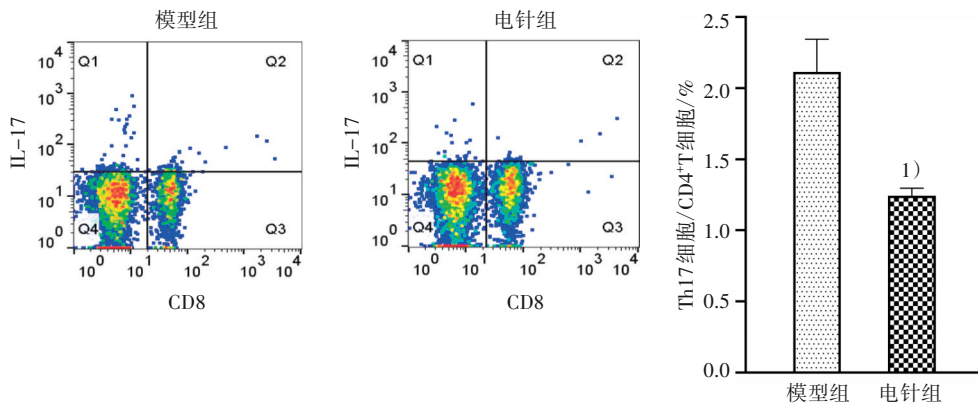
与模型组比较,电针组结肠淋巴结中 Treg 细胞含量明显增加 ( $P < 0.05$ )。见图 6。

**3.4 2组血清骨代谢相关生化指标表达水平比较**

与模型组比较,电针组 P I P、 $\beta$ -CTx、IL-17、IL-6 和 TNF- $\alpha$  表达水平均降低 ( $P < 0.05$ ); 25(OH)D<sub>3</sub>、IL-10 和 TGF- $\beta$  表达水平均升高 ( $P < 0.05$ )。见图 7。

**3.5 2组骨密度比较**

与模型组比较,电针组骨密度明显增强 ( $P < 0.05$ )。见图 8 和表 2。

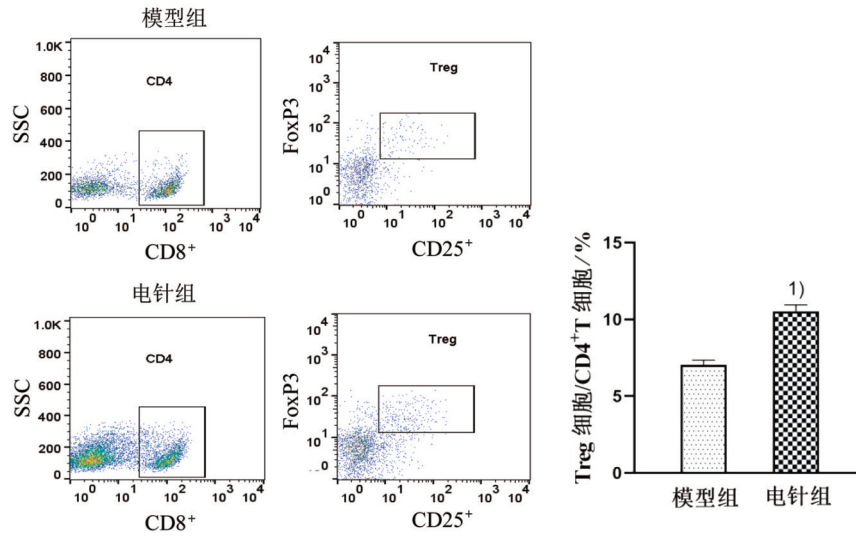


注:与模型组比较,1)  $P < 0.05$ 。

Note: compared with the model group, 1)  $P < 0.05$ 。

图 5 2组结肠淋巴结中 Th17 细胞含量比较(左上象限)

Figure 5 Comparison of Th17 cell content in colon lymph nodes between two groups (upper left quadrant)

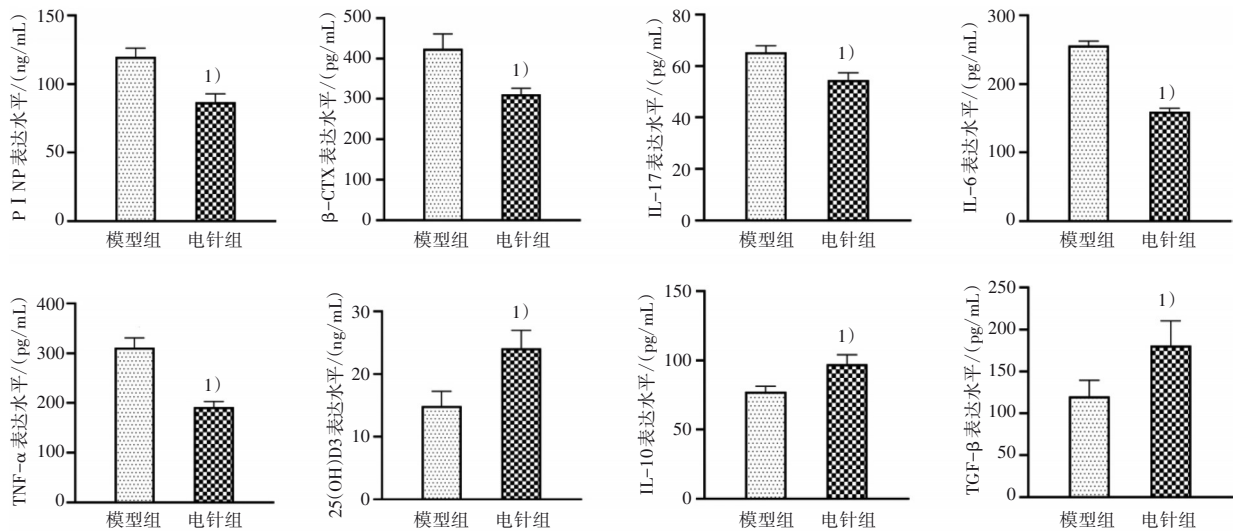


注:SSC :侧向散射光;与模型组比较,1)  $P < 0.05$ .

Note: SSC means side scatter; compared with the model group, 1)  $P < 0.05$ .

图6 2组结肠淋巴结中Treg细胞含量比较

Figure 6 Comparison of Treg cell content in colon lymph nodes between two groups



注:与模型组比较,1)  $P < 0.05$ .

Note: compared with the model group, 1)  $P < 0.05$ .

图7 2组血清骨代谢相关生化指标表达水平比较

Figure 7 Comparison of serum biochemical indexes related to bone metabolism between two groups

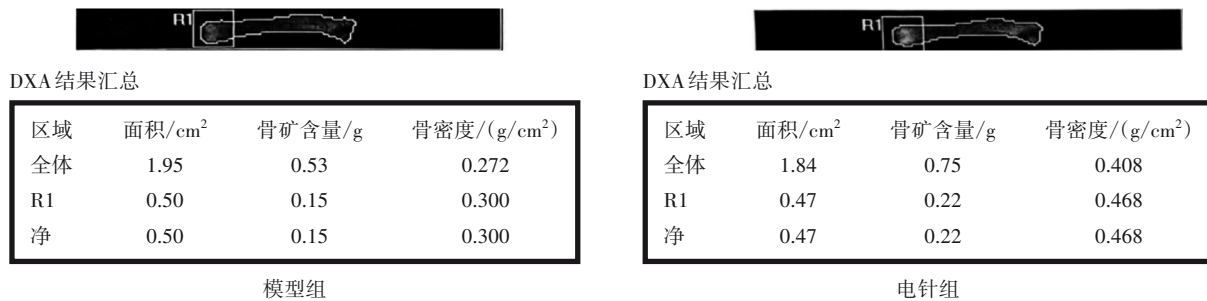


图8 2组骨密度检测照片和结果照片示例

Figure 8 Examples of bone mineral density test photos and result photos between two groups

表2 2组骨密度比较( $\bar{x}\pm s$ ) g/cm<sup>2</sup>  
Table 2 Comparison of bone mineral density between two groups ( $\bar{x}\pm s$ ) g/cm<sup>2</sup>

组别	n	骨密度
模型组	10	0.302±0.024
电针组	10	0.410±0.018 <sup>1)</sup>

注:与模型组比较,1)  $P<0.05$ 。

Note: compared with the model group, 1)  $P<0.05$ 。

## 4 讨论

### 4.1 补肾健脾是PMOP治疗的中医基本治则

PMOP归属中医学“骨痿”的范畴,多数医家认为该病的发生与脾肾两脏关系最为密切,脾肾两虚、天癸之源渐枯导致的骨代谢失衡是PMOP的关键中医病机<sup>[22-23]</sup>。如《素问·上古天真论》明确指出:“女子七七天癸竭,地道不通,形坏而无子”。中医学理论认为天癸是肾中精气充盈到一定程度时产生的具有促进人体生殖器官成熟并维持生殖功能的物质;研究认为“下丘脑-垂体-性腺”轴分泌和合成的多种性激素是中医天癸的物质基础,其中雌激素最具代表性<sup>[24-25]</sup>。

天癸的形成源于与生俱来的肾精,并受后天脾胃化生的水谷精微滋养而逐渐充盛,因此天癸主要由肾封藏的先天之精和脾化生的后天之精组成,天癸竭是脾肾亏虚的产物。肾藏精生髓养骨,脾化生气血濡养筋骨;肾脾亏虚,精亏血少,天癸渐枯,筋骨失养,髓亏骨枯,终致骨痿<sup>[26-27]</sup>。故大多数中医学者提倡从脾肾论治PMOP<sup>[28]</sup>。针对PMOP关键病机——脾肾亏虚,针刺以“补肾健脾”治则为指导,通过补肾健脾可以促进精微物质的生成和吸收,滋养骨骼,改善骨代谢,达到防治骨质疏松的目的<sup>[29]</sup>。

### 4.2 电针对OVX大鼠肠道菌群-Th17/Treg轴的调节作用

本研究基于既往研究提示的针灸免疫调节机制展开。多项证据表明,针刺可通过调控T淋巴细胞亚群分化动态平衡(Th1/Th2、Th17/Treg轴)发挥治疗效应<sup>[30-33]</sup>,其中Th17/Treg免疫稳态的调节在炎症性肠病中已获实验验证<sup>[17,34]</sup>。同时,针刺对肠道菌群的重塑作用在慢性腹泻、慢性疲劳和单纯性肥胖等代谢性疾病研究中得到印证,其能提升双歧杆菌科与乳杆菌科等有益菌属丰度,进而改善菌群-免疫轴功能<sup>[35-36]</sup>。

本实验选取脾俞、肾俞作为干预靶点,二者作为脾肾脏腑经气输注之背俞穴,具有“补肾填髓,健

脾益气”的协同效应<sup>[37]</sup>,系防治PMOP的经典配穴<sup>[38]</sup>。经12周电针干预后与模型组比较发现:电针组血清E<sub>2</sub>浓度明显回升;GMHI显著升高而MDI显著下降,结肠中双歧杆菌属和乳杆菌属为主的有益菌群富集程度显著增加,双歧杆菌属和乳杆菌属的丰度显著升高;同时电针组结肠Th17细胞及其特征性细胞因子IL-17表达降低,而Treg细胞及其功能因子IL-10表达升高。值得注意的是,现有研究揭示上述益生菌可通过调控Th17/Treg分化平衡改善PMOP骨代谢紊乱<sup>[39-40]</sup>,结合本实验结果提示,电针脾俞、肾俞可能通过3个作用路径:①提升E<sub>2</sub>水平以改善雌激素缺乏的微环境;②富集益生菌群重塑肠道稳态,调节菌群失调,改善菌群生态;③逆转CD4<sup>+</sup>T细胞向Th17的异常分化,最终促使Th17/Treg轴趋向Treg极化,实现骨代谢稳态的调节<sup>[41]</sup>。

### 4.3 电针对OVX大鼠骨代谢的调节作用

既往的研究探讨了电针可有效调节OVX大鼠的E<sub>2</sub>和瘦素等激素,碱性磷酸酶、骨钙素、抗酒石酸性磷酸酶5b、骨保护素等骨代谢生化指标,改善骨组织形态学、骨强度、骨密度等骨结构指标<sup>[42-44]</sup>。本研究的血清骨代谢指标分析结果也显示电针可以有效防治PMOP的发生发展。研究结果显示电针脾俞穴、肾俞穴治疗OVX大鼠12周后与同时段的OVX大鼠比较,随着血清E<sub>2</sub>水平显著升高,与骨形成紧密关系的25(OH)D<sub>3</sub>、TGF-β和IL-10水平升高,而与骨吸收紧密关系的IL-6、TNF-α和IL-17水平降低;骨形成标记物P I NP和骨吸收标记物β-CTx水平降低。结合2组骨密度变化,提示:电针脾俞穴、肾俞穴12周,双侧OVX后大鼠因为雌激素缺乏导致的高转换型骨代谢病理状态得到了显著改善,骨转换速率减慢,骨吸收速度明显受到控制,相对应的骨形成得到促进,骨流失减少,有效改善OVX组大鼠的骨密度。

## 5 小结

电针肾俞穴和脾俞穴可以提高雌激素水平,调整OVX大鼠的肠道菌群结构,富集乳杆菌属和双歧杆菌属等益生菌,主要增加乳杆菌属和双歧杆菌属的丰度,促使结肠中T细胞分化生成Treg细胞增多而Th17细胞减少,调节雌激素水平下降引发的Th17/Treg轴的失衡状态,缓解过激的免疫反应,即电针肾俞穴和脾俞穴可通过肠道菌群-Th17/Treg轴改善OVX大鼠的骨代谢,减少骨流失,从而提高

骨密度,有效防治PMOP。

肠道菌群与免疫系统的交互作用在PMOP的病理进程中具有重要调节作用。作为肠道健康状态的关键生物标志物,双歧杆菌属和乳杆菌属的丰度变化已被证实与宿主骨代谢稳态密切相关<sup>[45]</sup>。目前学术界主要围绕益生菌对Th17/Treg免疫平衡的调控机制展开研究,发现以乳杆菌属和双歧杆菌属为代表的益生菌可能通过调节Th17/Treg细胞分化平衡发挥PMOP防治作用<sup>[39-40,46]</sup>。本研究通过实验证实电针刺激可特异性上调PMOP状态下双歧杆菌属和乳杆菌属的相对丰度,提示其可作为一种潜在的非药物干预策略来优化PMOP防治体系。需要指出的是,本研究目前仅针对丰度变化最显著的2种优势有益菌进行机制解析,而肠道微生态中其他功能菌属(如拟杆菌门等)的种群动态及其与PMOP骨丢失的因果关联仍待建立多组学技术平台开展纵向研究,从而有助于全面揭示“肠-骨轴”调控网络在PMOP发病中的生物学基础。此外,现有研究结论在益生菌干预的长期有效性与安全性方面尚未达成明确共识<sup>[47-48]</sup>,待该条件成熟后,课题组将在后续研究中增设益生菌干预的对照实验组,以系统阐明菌群丰度变化与Th17/Treg免疫轴之间的分子关联机制。

### 参考文献

- [1] WATTS N B, BILEZIKIAN J P, CAMACHO P M, et al. American Association of Clinical Endocrinologists Medical Guidelines for Clinical Practice for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis; executive summary of recommendations [J]. *Endocr Pract*, 2010, 16(6): 1016-1019.
- [2] ISHIZU H, ARITA K, TERKAWI M A, et al. Risks vs. benefits of switching therapy in patients with postmenopausal osteoporosis [J]. *Expert Rev Endocrinol Metab*, 2021, 16(5): 217-228.
- [3] BAO S Y, ZHANG S J, LIN W J, et al. Effect of electroacupuncture on the biochemical indices of bone and bone collagen metabolism and TNF- $\alpha$  in osteoporosis model rats without ovaries [J]. *Zhongguo Zhen Jiu*, 2012, 32(12): 1108-1112.
- [4] 李金庭, 孟祥悦, 刘洋, 等. 近10年针灸治疗女性绝经后骨质疏松症的临床与机制研究进展[J]. *针灸临床杂志*, 2023, 39(4): 106-111.  
LI J T, MENG X Y, LIU Y, et al. Clinical and mechanism research progress of acupuncture and moxibustion in treating postmenopausal osteoporosis over past 10 years [J]. *J Clin Acupunct Moxibustion*, 2023, 39(4): 106-111.
- [5] ZHENG X F, NIE Y, SUN C T, et al. Long-term electroacupuncture stimulation prevents osteoporosis in ovariectomised osteopaenic rats through multiple signalling pathways [J]. *Acupunct Med*, 2018, 36(3): 176-182.
- [6] CHEN C, LEI H H, ZHAO Y T, et al. A novel small molecule effectively ameliorates estrogen deficiency-induced osteoporosis by targeting the gut-bone signaling axis [J]. *Eur J Pharmacol*, 2023, 954: 175868.
- [7] FENG B Y, LU J J, HAN Y H, et al. The role of short-chain fatty acids in the regulation of osteoporosis: new perspectives from gut microbiota to bone health: a review [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2024, 103(34): e39471.
- [8] ZHU L, HUA F, DING W G, et al. The correlation between the Th17/Treg cell balance and bone health [J]. *Immun Ageing*, 2020, 17: 30.
- [9] HUANG F, WONG P, LI J L, et al. Osteoimmunology: the correlation between osteoclasts and the Th17/Treg balance in osteoporosis [J]. *J Cell Mol Med*, 2022, 26(13): 3591-3597.
- [10] SONG X Y, SUN X M, OH S F, et al. Microbial bile acid metabolites modulate gut ROR $\gamma^+$  regulatory T cell homeostasis [J]. *Nature*, 2020, 577(7790): 410-415.
- [11] GUO M Y, LIU H J, YU Y T, et al. *Lactobacillus rhamnosus* GG ameliorates osteoporosis in ovariectomized rats by regulating the Th17/Treg balance and gut microbiota structure [J]. *Gut Microbes*, 2023, 15(1): 2190304.
- [12] LIU Y D, DENG Q, ZHANG Y J, et al. Research progress on the role of regulatory T cells/Th17 cells balance in muscle-bone degeneration and reconstruction [J]. *Xi Bao Yu Fen Zi Mian Yi Xue Za Zhi*, 2024, 40(10): 948-953.
- [13] OMENETTI S, PIZARRO T T. The Treg/Th17 axis: a dynamic balance regulated by the gut microbiome [J]. *Front Immunol*, 2015, 6: 639.
- [14] WANG X X, SUN B, WANG Y J, et al. Research progress of targeted therapy regulating Th17/Treg balance in bone immune diseases [J]. *Front Immunol*, 2024, 15: 1333993.
- [15] ZHOU L, LOPES J E, CHONG M M W, et al. TGF- $\beta$ -induced Foxp3 inhibits T(H)<sub>17</sub> cell differentiation by antagonizing ROR- $\gamma$  function [J]. *Nature*, 2008, 453(7192): 236-240.
- [16] 张继瑶. 电针预处理调控肠道菌群与Th17/Treg免疫平衡降低大鼠脑缺血再灌注损伤的作用机制研究[D]. 哈尔滨: 黑龙江中医药大学, 2021: 104-105.  
ZHANG J Y. Study on the mechanism of electroacupuncture preconditioning regulating intestinal flora and Th17/Treg immune balance to reduce cerebral ischemia-reperfusion injury in rats [D]. Harbin: Heilongjiang University of Chinese Medicine, 2021: 104-105.
- [17] 周睿璇, 彭嘉颖, 向晶, 等. 电针刺激上巨虚、天枢对溃疡性结肠炎模型大鼠Th17相关特异性因子及Treg的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2023, 43(5): 877-884.  
ZHOU R X, PENG J Y, XIANG J, et al. Effects of electroacupuncture at 'Shangjuxu'(ST37) and 'Tianshu'(ST25) on Th17-related specificity factors and Treg cells in rats with ulcerative colitis [J]. *J Hunan Univ Chin Med*, 2023, 43(5): 877-884.
- [18] 魏振朴, 张文明, 孙攀, 等. miR-141及成骨基因Dlx5、Msx2,

- Runx2 在去卵巢骨质疏松模型小鼠 BMSCs 成骨分化中的表达[J]. 康复学报, 2019, 29(6): 37-43.
- WEI Z P, ZHANG W M, SUN P, et al. Expression of miR-141 and osteogenic gene Dlx5, Msx2 and Runx2 in osteogenic differentiation of BMSCs in ovariectomized osteoporosis model mice [J]. Rehabil Med, 2019, 29(6): 37-43.
- [19] 田环环, 曹曷焱, 高珊, 等. 大鼠肾俞定位之我见[J]. 针灸临床杂志, 2014, 30(1): 51-52.
- TIAN H H, CAO B Y, GAO S, et al. Views on rat's BL23 location [J]. J Clin Acupunct Moxibustion, 2014, 30(1): 51-52.
- [20] 刘继生, 张泓, 尹秀婷, 等. 大鼠“脾俞”穴的取穴方法研究[J]. 中华中医药杂志, 2017, 32(4): 1793-1794.
- LIU J S, ZHANG H, YIN X T, et al. Study on acupoint positioning method for Pishu (BL20) in rats [J]. China J Tradit Chin Med Pharm, 2017, 32(4): 1793-1794.
- [21] LAUER F T, DENSON J L, BESWICK E, et al. Intracellular cytokine detection by flow cytometry in surface marker-defined human peripheral blood mononuclear T cells [J]. Curr Protoc Toxicol, 2017, 73: 18. 19. 1-18. 1918. 19. 14.
- [22] 姚文智, 李月炜, 吴佳宝, 等. 从“天癸竭”和“清镇赫依”论治绝经后骨质疏松症[J]. 中国民族医药杂志, 2023, 29(9): 56-58, 66.
- YAO W Z, LI Y W, WU J B, et al. On the treatment of postmenopausal osteoporosis from the perspective of "Tianguai exhaustion" and "Qingzhen heyi" [J]. J Med Pharm Chin Minor, 2023, 29(9): 56-58, 66.
- [23] 韩一旦, 张海凤, 卓俊宽, 等. 基于“肾气-天癸”节律性变化探讨绝经后骨质疏松症的内在发生机制[J]. 中医正骨, 2022, 34(12): 42-44.
- HAN Y D, ZHANG H F, ZHUO J K, et al. Investigation on internal mechanism of postmenopausal osteoporosis based on rhythm change of "Shenqi-Tianguai" [J]. J Tradit Chin Orthop Traumatol, 2022, 34(12): 42-44.
- [24] 梁文娜, 李灿东, 高碧珍, 等. 天癸盛衰调控绝经后骨质疏松物质本源的探讨[J]. 世界中医药, 2011, 6(2): 101-103.
- LIANG W N, LI C D, GAO B Z, et al. On material base of Tian Gui rise and fall regulating menopausal osteoporosis [J]. World Chin Med, 2011, 6(2): 101-103.
- [25] 封鑫宇, 曾粤睿, 戴欣晴, 等. 天癸本质与临床应用的研究进展[J]. 中医药导报, 2021, 27(6): 131-133, 141.
- FENG X Y, ZENG Y R, DAI X Q, et al. Research progress on the essence and clinical application of Tianguai [J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm, 2021, 27(6): 131-133, 141.
- [26] 董万涛, 吕泽斌, 宋敏, 等. “骨肉不相亲”理论发微—从脾肾论治原发性骨质疏松症的科学涵义[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(6): 714-717.
- DONG W T, LYU Z B, SONG M, et al. Scientific meaning of the treatment of primary osteoporosis from the spleen and kidney theory by the divergence of "Disharmony between bone and muscle" [J]. Chin J Osteoporos, 2014, 20(6): 714-717.
- [27] 王兵, 李富震, 张森, 等. 骨痿探源[J]. 长春中医药大学学报, 2015, 31(2): 417-419.
- WANG B, LI F Z, ZHANG M, et al. Origins of bone atrophy [J]. J Changchun Univ Chin Med, 2015, 31(2): 417-419.
- [28] 董世健, 杨博文, 刘晨, 等. 从脾肾论治绝经后骨质疏松症的研究进展[J]. 光明中医, 2018, 33(17): 2620-2622.
- DONG S J, YANG B W, LIU C, et al. Research progress on treatment of postmenopausal osteoporosis from spleen and kidney [J]. Guangming J Chin Med, 2018, 33(17): 2620-2622.
- [29] 王璐, 许鸿新, 张思伟, 等. 补肾健脾针刺法治疗老年男性原发性骨质疏松症的临床疗效评估研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2019, 25(2): 224-227.
- WANG L, XU H X, ZHANG S W, et al. Clinical efficacy analysis of acupuncture treatment on primary osteoporosis in elderly male patients: tonifying kidney and strengthening spleen acupuncture [J]. Chin J Osteoporos, 2019, 25(2): 224-227.
- [30] WANG M, LIU W L, GE J Y, et al. The immunomodulatory mechanisms for acupuncture practice [J]. Front Immunol, 2023, 14: 1147718.
- [31] YAN M Y, WANG R G, LIU S Y, et al. The mechanism of electroacupuncture at Zusanli promotes macrophage polarization during the fibrotic process in contused skeletal muscle [J]. Eur Surg Res, 2019, 60(5/6): 196-207.
- [32] 徐枝芳, 公一因, 窦报敏, 等. 针灸改善慢性炎症反应的效应规律及机制研究现状与展望[J]. 针刺研究, 2023, 48(2): 111-117.
- XU Z F, GONG Y N, DOU B M, et al. Current situation and prospect of researches on regularities and mechanisms of acupuncture-moxibustion in alleviating chronic inflammatory response [J]. J Acupunct Res, 2023, 48(2): 111-117.
- [33] LIU F, WANG Y, LYU K, et al. Acupuncture and its ability to restore and maintain immune homeostasis [J]. QJM, 2024, 117(3): 167-176.
- [34] BAO C H, WU L Y, WANG D, et al. Acupuncture improves the symptoms, intestinal microbiota, and inflammation of patients with mild to moderate Crohn's disease: a randomized controlled trial [J]. Eclinicalmedicine, 2022, 45: 101300.
- [35] 孙路强, 张微, 魏韬, 等. 针灸对肠道菌群影响的研究进展[J]. 湖南中医杂志, 2018, 34(1): 190-193.
- SUN L Q, ZHANG W, WEI T, et al. Research progress on the effect of acupuncture on intestinal flora [J]. Hunan J Tradit Chin Med, 2018, 34(1): 190-193.
- [36] 刘霞, 胡舒宁, 刘密, 等. 针灸调控肠道菌群的研究进展与思考[J]. 世界中医药, 2019, 14(3): 527-530.
- LIU X, HU S N, LIU M, et al. Research advances and thoughts of acupuncture in regulating intestinal flora [J]. World Chin Med, 2019, 14(3): 527-530.
- [37] 郑雪峰, 聂焱, 何庆建, 等. 电针对绝经后骨质疏松患者血清 BGP, DKK-1, OPG 和 OPN 水平的影响[J]. 江西中医药大学学报, 2020, 32(5): 64-67.
- ZHENG X F, NIE Y, HE Q J, et al. Effect of electroacupuncture on the serum protein level of BGP, DKK-1, OPG and OPN in

- patients with PMOP [J]. *J Jiangxi Univ Tradit Chin Med*, 2020, 32(5):64-67.
- [38] 汪袁凤,吴沛冉,朱笑举,等.基于文献分析针灸治疗绝经后骨质疏松症的选穴规律及作用机制[J].*辽宁中医药大学学报*, 2022, 24(2):192-196.
- WANG Y F, WU P R, ZHU X J, et al. Acupoint selection rules and mechanism of acupuncture and moxibustion in the treatment of post menopausal osteoporosis based on literature analysis [J]. *J Liaoning Univ Tradit Chin Med*, 2022, 24(2):192-196.
- [39] SAPRA L, SHOKEEN N, PORWAL K, et al. *Bifidobacterium longum* ameliorates ovariectomy-induced bone loss via enhancing anti-osteoclastogenic and immunomodulatory potential of regulatory B cells (bregs) [J]. *Front Immunol*, 2022, 13:875788.
- [40] DAR H Y, SHUKLA P, MISHRA P K, et al. *Lactobacillus acidophilus* inhibits bone loss and increases bone heterogeneity in osteoporotic mice via modulating Treg-Th17 cell balance [J]. *Bone Rep*, 2018, 8:46-56.
- [41] QI P, XIE R X, LIU H, et al. Mechanisms of gut homeostasis regulating Th17/Treg cell balance in PMOP [J]. *Front Immunol*, 2024, 15:1497311.
- [42] 屈媛媛,杨添淞,孙忠人,等.电针干预去势骨质疏松大鼠“骨微生态”的作用机制研究[J].*针灸临床杂志*, 2024, 40(1):68-77.
- QU Y Y, YANG T S, SUN Z R, et al. Mechanism of EA interven-
- tion on "bone microecology" in rats with ovariectomized osteoporosis [J]. *J Clin Acupunct Moxibustion*, 2024, 40(1):68-77.
- [43] FAN H L, JI F, LIN Y, et al. Electroacupuncture stimulation at CV4 prevents ovariectomy-induced osteoporosis in rats via Wnt- $\beta$ -catenin signaling [J]. *Mol Med Rep*, 2016, 13(3):2485-2491.
- [44] ZHOU J, CHEN S J, GUO H, et al. Electroacupuncture prevents ovariectomy-induced osteoporosis in rats: a randomised controlled trial [J]. *Acupunct Med*, 2012, 30(1):37-43.
- [45] 中国食品科学技术学会益生菌分会.人体肠道菌群主要特征的专家共识[J].*中国食品学报*, 2024, 24(7):460-470.
- Probiotics Society of the Chinese Institute of Food Science and Technology. Scientists consensus on human gut microbiota [J]. *J Chin Inst Food Sci Technol*, 2024, 24(7):460-470.
- [46] DAR H Y, PAL S, SHUKLA P, et al. *Bacillus clausii* inhibits bone loss by skewing Treg-Th17 cell equilibrium in postmenopausal osteoporotic mice model [J]. *Nutrition*, 2018, 54:118-128.
- [47] ZENG L T, YU G P, YANG K L, et al. The improving effect and safety of probiotic supplements on patients with osteoporosis and osteopenia: a systematic review and meta-analysis of 10 randomized controlled trials [J]. *Evid Based Complement Alternat Med*, 2021, 2021:9924410.
- [48] SUEZ J, ZMORA N, SEGAL E, et al. The pros, cons, and many unknowns of probiotics [J]. *Nat Med*, 2019, 25(5):716-729.

## Effects of Electroacupuncture on Bone Metabolism in Ovariectomized Rats via the Gut Microbiota-Th17/Treg Axis

WANG Zhiqiang<sup>1,2</sup>, WEI Zhengpu<sup>1,2</sup>, CHEN Xuzheng<sup>1</sup>, CHEN Sainan<sup>3</sup>, HUANG Yunmei<sup>1</sup>, LIN Yanping<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> College of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Research Institute of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

<sup>2</sup> College of Acupuncture Moxibustion and Massage, Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou, Fujian 350122, China;

<sup>3</sup> Key Research Laboratory of Osteoporosis Syndrome Genomics, Fujian Academy of Chinese Medical Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China

\*Correspondence: LIN Yanping, E-mail: 75175291@qq.com

**ABSTRACT Objective** To observe the effects of electroacupuncture at Pishu and Shenshu acupoints on gut microbiota, Th17/Treg cells, and bone metabolism in bilateral ovariectomized rats, and to explore the intrinsic relationship between electroacupuncture in regulating bone metabolism and the gut microbiota-Th17/Treg axis in postmenopausal osteoporosis (PMOP). **Methods** A total of twenty SPF-grade 3-month-old female Sprague-Dawley rats were selected. They were subjected to bilateral ovariectomy (OVX) to establish PMOP rat models. The rats were randomly divided into two groups using a random number table method: model group and electroacupuncture group, with 10 rats in each group. The electroacupuncture group began electroacupuncture treatment 3 days after modeling, while the model group underwent daily handling similar to the electroacupuncture group without any additional interventions. After 12 weeks of intervention, on the following morning, each rat had approximately 1 g of fecal sample collected into sterile EP tubes and stored at -80 °C refrigerator. The rats were then anesthetized with 2% pentobarbital sodium (0.2 mL/100 g) via intraperitoneal injection, and euthanized for tissue collection to conduct subsequent experiments. ELISA was used to detect the level of  $E_2$ . The gut microbiota of fecal samples from both groups was analyzed using 16S rDNA technology, followed by microbial profiling analysis, inter-group difference analysis, and LEfSe multi-Level species difference discriminant analysis. Flow cytometry was used to determine the levels of Th17 and Treg cells in the colonic mesenteric lymph nodes. ELISA was also used to measure bone metabolism-related biochemical markers, including procollagen type I N-terminal propeptide (P I NP),  $\beta$ -collagen degradation product ( $\beta$ -CTx), interleukin-17 (IL-17), interleukin-6 (IL-6), tumor necrosis factor- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), hydroxyvitamin D<sub>3</sub> (25-OH-D<sub>3</sub>), interleukin-10 (IL-10), and transforming growth factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ). Bone mineral density was measured using dual-energy X-ray absorptiometry (DXA). **Results** Compared with the model group, the estradiol ( $E_2$ ) content in peripheral blood increased in the electroacupuncture group ( $P < 0.05$ ). Compared with the model group, the gut microbiota health index (GMHI) significantly increased in the electroacupuncture group ( $P < 0.05$ ); compared with the model group, the microbiota dysbiosis index (MDI) value significantly

(下转第521页)