

石秋月, 侯付景, 韩姣姣, 等. 基于高通量测序技术的牡蛎壳粉缓解骨质疏松症的研究 [J]. 食品工业科技, 2021, 42(18): 372-379. doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020120189

SHI Qiuyue, HOU Fujing, HAN Jiaojiao, et al. Research on the Alleviation of Osteoporosis by Oyster Shell Powder Based on High-throughput Sequencing Technology[J]. Science and Technology of Food Industry, 2021, 42(18): 372-379. (in Chinese with English abstract). doi: 10.13386/j.issn1002-0306.2020120189

· 营养与保健 ·

基于高通量测序技术的牡蛎壳粉 缓解骨质疏松症的研究

石秋月^{1,2}, 侯付景³, 韩姣姣^{1,4}, 李菁菁^{1,2}, 陈 菊^{1,2}, 苏秀榕^{1,4,*}

(1. 宁波大学农产品质量安全危害因子与风险防控国家重点实验室, 浙江宁波 315211;

2. 宁波大学食品与药学院, 浙江宁波 315832;

3. 宁波绿之健药业有限公司, 浙江宁波 315505;

4. 宁波大学海洋学院, 浙江宁波 315832)

摘要:目的: 探究牡蛎壳粉对糖皮质激素性骨质疏松小鼠的缓解作用。方法: 将 ICR 雌性小鼠随机分为对照组、模型组、碳酸钙组和牡蛎壳粉组, 肌肉注射地塞米松 (1 mg/kg/d) 构建骨质疏松小鼠模型, 分析股骨微结构、血清钙、粪便钙、股骨钙、骨转换指标和肠道菌群变化。结果: 牡蛎壳粉能显著提高骨密度和骨小梁厚度 ($P<0.05$) 并降低骨小梁分离度和结构模型指数, 改善骨微结构, 显著降低血清钙含量 ($P<0.001$)。牡蛎壳粉也能显著升高血清中碱性磷酸酶酶活 ($P<0.001$), 降低抗酒石酸酸性磷酸酶酶活 ($P<0.01$); 显著升高骨形成标记物碱性磷酸酶和骨保护素的基因转录 ($P<0.05$), 降低骨吸收标记物抗酒石酸酸性磷酸酶和硬骨素的基因转录 ($P<0.05$)。牡蛎壳粉还能改变小鼠肠道菌群结构, 增加约氏乳杆菌、产粪甾醇真细菌等的丰度。嗜酸乳酸杆菌、豚鼠乳杆菌、罗伊氏乳杆菌、产酸拟杆菌与骨形成指标显著负相关, 而与骨吸收指标显著正相关。结论: 牡蛎壳粉能够抑制骨矿物质流失, 提高骨密度和骨小梁厚度, 促进骨形成指标而抑制骨吸收指标, 改善肠道菌群, 从而有效缓解骨质疏松。

关键词: 牡蛎壳粉, 糖皮质激素, 骨质疏松, 骨小梁微结构, 肠道微生物

中图分类号: Q93

文献标识码: A

文章编号: 1002-0306(2021)18-0372-08

DOI: 10.13386/j.issn1002-0306.2020120189



本文网刊:

Research on the Alleviation of Osteoporosis by Oyster Shell Powder Based on High-throughput Sequencing Technology

SHI Qiuyue^{1,2}, HOU Fujing³, HAN Jiaojiao^{1,4}, LI Jingjing^{1,2}, CHEN Ju^{1,2}, SU Xiurong^{1,4,*}

(1.State Key Laboratory for Managing Biotic and Chemical Threats to the Quality and Safety of Agro-products, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.College of Food and Pharmaceutical Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China;

3.Ningbo Green-Health Pharma-ceutical Co., Ltd., Ningbo 315505, China;

4.School of Marine Sciences, Ningbo University, Ningbo 315832, China)

Abstract: Objective: To study the alleviating effect of oyster shell powder on glucocorticoid induced osteoporosis in mice. Methods: Female ICR mice were randomly divided into four groups, including control, model, calcium carbonate and oyster shell powder groups. Intramuscular injection of 1 mg/kg/d dexamethasone was used to induce osteoporosis in mice and the femoral microstructure, blood calcium, fecal calcium, bone calcium, bone turnover markers and gut bacteria changes were analyzed. Results: Oyster shell powder treatments improved bone microstructure which was characterized by

收稿日期: 2020-12-23

基金项目: 国家海洋经济创新发展区域示范项目 (2013710)。

作者简介: 石秋月 (1995-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 食品加工与安全, E-mail: 2685373194@qq.com。

* 通信作者: 苏秀榕 (1956-), 女, 博士, 教授, 研究方向: 食品科学与工程, E-mail: suxiurong@nbu.edu.cn。

significantly increased bone mineral density and trabecular thickness($P<0.05$) and reduced trabecular bone separation and structural model index. The calcium content in blood was also reduced after oyster shell powder treatments($P<0.001$). Oyster shells powder significantly increased the enzyme activity of serum alkaline phosphatase($P<0.001$) and reduced the enzyme activity tartrate-resistant acid phosphatase($P<0.01$). The gene transcription of the bone formation marker alkaline phosphatase and osteoprotegerin were significantly increased($P<0.05$), while the gene transcription of the bone resorption markers tartrate-resistant acid phosphatase and sclerostin were decreased($P<0.05$). Oyster shell powder modulated the structure of gut microbiota with increased abundance of *Lactobacillus johnsonii* and *Eubacterium coprostanoligenes*. In addition, *Lactobacillus acidophilus*, *Lactobacillus caviae*, *Lactobacillus reuteri* and *Bacteroides acidifaciens* were negatively correlated with bone formation indexes, while positively correlated with bone resorption indexes. Conclusion: Oyster shell powder inhibited bone mineral loss, increased bone mineral density and trabecular thickness, promoted bone formation indicators and inhibited bone resorption indicators, modulated the gut microbiota and thus effectively alleviated osteoporosis.

Key words: oyster shell powder; glucocorticoid; osteoporosis; bone trabecular microstructure; gut microbiota

糖皮质激素性骨质疏松(glucocorticoid induced osteoporosis, GIOP)属于继发性骨质疏松,是一种因内源或外源糖皮质激素所致的、以骨强度下降、骨折风险性增加为特征的代谢性骨病^[1]。地塞米松是一种强效合成糖皮质激素,它能显著降低成骨细胞数量和骨形成率,同时增加骨吸收和破骨细胞寿命,最终导致糖皮质激素性骨质疏松症的发生^[2-3]。肠钙吸收减少是糖皮质激素性骨质疏松症发病的重要机制,需要补充大量的钙剂,以促进骨骼的构建^[4]。双膦酸盐广泛用于预防或治疗骨质疏松症,其抑制骨吸收形成的时候也会对骨正常矿物化造成影响,增加类骨质,加大骨折产生风险,还能产生胃肠不耐症和下颌骨坏死等副作用^[5-6]。因此,需要寻找更加安全的钙剂来治疗骨质疏松症。

牡蛎属于软体动物门、双壳纲、牡蛎目、牡蛎总科、牡蛎科,全世界牡蛎共有 100 多种,我国沿海有 20 多种,分布广泛,是中国四大养殖贝类之一,现入药的牡蛎主要有近江牡蛎、长牡蛎和大连湾牡蛎^[7-8]。牡蛎壳含钙量丰富,经特殊处理后更容易被人体吸收,是良好的天然生物钙源^[9]。通过高温煅烧达到离子化状态且经超微粉碎的牡蛎钙更容易被人体吸收利用,同时牡蛎中多种微量元素及氨基酸还能反过来促进钙的吸收^[10]。此外,牡蛎钙对口腔癌的发生具有抑制作用^[11]。有研究表明,以牡蛎壳为原料制备的 L-天冬氨酸螯合钙可以通过上调血清 OPG 含量和下调 RANKL 含量来显著增强生物力学性能和骨骼质量,调节骨骼代谢,从而减少骨钙流失,并使骨质疏松性骨恢复为更健康的骨组织结构,具有更好的改善效果^[12]。有越来越多的研究表明肠道菌群及其代谢产物也可通过影响钙吸收、调节免疫反应、参与雌激素代谢发挥促进成骨抑制破骨等作用影响骨代谢^[13]。但是,牡蛎壳粉缓解糖皮质激素性骨质疏松的过程中是否会导致菌群变化,却没有相关研究报道。

本研究以牡蛎壳粉为研究对象,以地塞米松构建的糖皮质激素性骨质疏松小鼠为动物模型,从股骨微观结构、钙代谢、成骨破骨标记物及肠道菌群的角度研究了牡蛎壳粉对糖皮质激素诱导的骨质疏松的

缓解作用。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验所用牡蛎壳 由宁波今日食品有限公司提供;实验用雌性小鼠 购自浙江省实验动物中心,合格证号:SCXK(浙)2014-0001(编号:1704050008);常规饲料 购于宁波大学实验动物中心;总钙、碱性磷酸酶(ALP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)测定试剂盒 购于南京建成生物工程研究所;TransZol Up Plus RNA 试剂盒(ER501)和 TransScript®All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR 试剂盒(AT341) 北京全式金生物技术有限公司;其他化学试剂 均为分析纯,购自国药集团化学试剂有限公司。

PM-100 超微球磨机 德国 Retsch GmbH 公司; Microtrac S3500 激光粒度分布仪 美国 Microtrac 公司;Elan5000 电感耦合等离子体质谱仪 美国 Perkin-ElmerSciex 公司;eXplore Locus 微计算机断层扫描仪 美国 GE Healthcare 公司。

1.2 实验方法

1.2.1 牡蛎壳粉的制备及粒径分布的测定 牡蛎壳去除表面附着的泥沙和杂物后,用马弗炉于 300 °C 煅烧 8 h,冷却后用超微球磨机研磨成细颗粒,经 100 目不锈钢筛网过筛获得牡蛎壳粉(oyster shell powder, OSP),其粒径分布(particle size distribution)利用上海交通大学分析测试中心提供的激光粒度分布仪测定,平均粒径采用中位粒径(D50)表示。

1.2.2 矿物质元素的测定 取 0.5 g 牡蛎壳粉放入四氟乙烯密封的消解管中,加入 5 mL HNO₃(65%),将消解管置于微波消解仪,消解 5 h 直至无色透明,用超纯水定容消化后的样品至 25 mL。然后,利用电感耦合等离子体质谱仪测定。

1.2.3 动物实验 将 20 只 ICR 雌性小鼠(22.81±1.53 g)随机分成 4 个处理组,分别是对照组、模型组、碳酸钙组和牡蛎壳粉组。除对照组小鼠肌肉注射生理盐水,其余组小鼠每只肌肉注射(1 mg/kg/d)

地塞米松, 每 2 d 一次。同时, 对照组和模型组中的小鼠灌胃生理盐水; 根据钙的推荐摄入量^[14], 碳酸钙组和牡蛎壳粉组接受相同剂量的钙水平, 为 227.5 mg/kg/d。动物实验在恒温(25 ℃)环境下共饲养 10 周, 12 h 光照/12 h 黑暗循环, 所有小鼠都可以自由获取食物和饮用水。在实验结束之前, 收集每只小鼠的粪便保存在-80 ℃ 用于 16S rRNA 基因测序。动物实验结束后, 眼眶取血, 4 ℃, 3000 r/min 离心 15 min 制备血清。

1.2.4 骨组织 CT 扫描 利用微计算机断层扫描仪, 对小鼠进行股骨扫描、骨骼三维重建以及骨密度指标分析来评估骨量和微结构的变化。使用 GEHC micro view 2.2 软件进行三维重建、骨密度及骨小梁结构分析, 并使用骨密度(Bone mineral density, BMD)、骨小梁厚度(Trabecular thickness, Tb.Th)、骨小梁分离度(Trabecular bone separation, Tb.Sp)和结构模型指数(Structural model index, SMI)等参数表示。

1.2.5 生理生化检测 血清钙(calcium, Ca)、碱性磷酸酶(Alkaline phosphatase, ALP)和抗酒石酸酸性磷酸酶(Tartrate-resistant acid phosphatase, TRACP)含量按照试剂盒说明书进行。

1.2.6 荧光定量 PCR 用 TransZol Up Plus RNA 试剂盒提取总 RNA, 利用 TransScript All-in-One First-Strand cDNA Synthesis SuperMix for qPCR(One-Step gDNA Removal)试剂盒合成 cDNA。以 β -actin 作为内参基因, 利用 Rotor-Gene 6000 对 cDNA 分别进行目的基因和内参基因的扩增, 利用标准曲线由检测仪自动计算出 Ct 值, 并利用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法进行相对定量分析^[15-16]。利用 Primer 5 软件进行设计引物, 具体引物信息如表 1。

表 1 基因引物序列(5'→3')
Table 1 Target genes primer sequence (5'→3')

基因名称	引物序列
管家基因(β -Actin)	F- TGTGATGGTGGGAATGGG
	R- TGCCAGATCTTCTCCATGTC
碱性磷酸酶(ALP)	F- TAACACCAACGCTCAGGTCC
	R- TGGATGTGACCTCATTGCC
抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)	F- TTCAGGACGAGAACGGTGTG
	R- CCAGGGAGTCTCCATGATCCA
骨保护素(OPG)	F- ACGGAGACACAGCTCACAAG
	R- CAGGCTCTCCATCAAGGCCAA
硬骨素(sclerostin)	F- GGTAGTGAACAGACTCCGGC
	R- GCGGTCTTCAAGCCATACT

1.2.7 肠道微生物的高通量测序 利用 QIAamp DNA Stool Mini 提取试剂盒抽提粪便 DNA, 对 16S rRNA 可变区(V3+V4)进行 PCR 扩增。使用 Illumina MiSeq 测序仪进行 2×300 bp 的双端测序。分别使用 QIIME 1.8.0, Mothur 1.30.1 和 Userach 7.1 进行原始测序读数的预处理, α 和 β 多样性的计算以及 OTU 的生成, 采用 RDP classifier 软件对处理后的序列

进行物种分类、群落变化的分析^[17-19]。通过 Spearman 相关性分析计算优势菌种和骨转换标记物之间的相关性。 $P<0.05$ 和 false discovery rate <0.25 被定义为具有显著相关性。

1.3 数据分析

所有数据均采用 SPSS19.0 统计分析, 采用平均值±标准差的方式表示。符合正态分布的数据采用 ANOVA 和 Tukey's post hoc test 进行分析, 不符合方差分析特征的数据采用 Mann-Whitney test。 $P<0.05$ 表示在统计学意义上具有显著差异。

2 结果与分析

2.1 牡蛎壳粉粒径及矿物质含量

经 300 ℃ 马弗炉煅烧 8 h 后, 经一系列处理得到牡蛎壳粉的粒径分布图如图 1 所示, 峰两侧粗细粒径的百分比含量互相对应地减少, 形成以峰为对称轴的对称曲线。牡蛎壳粉以 24.92 μm 中位粒径为中心的单峰分布(图 1)且牡蛎壳粉中 Ca 含量 36.90 g/kg (表 2)。

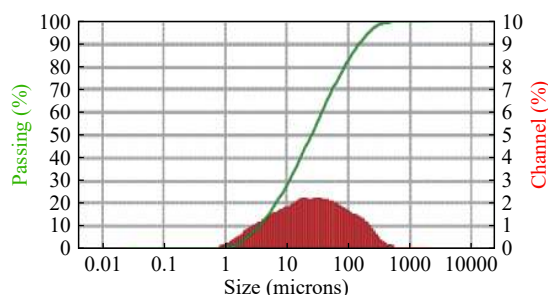


图 1 牡蛎壳粉的粒径分布图
Fig.1 Particle size distribution of OSP

表 2 牡蛎壳粉的矿物质元素组成
Table 2 Mineral composition of OSP

矿物质元素	牡蛎壳粉(g/kg)
Ca	36.90±0.31
P	0.67±0.03
Sr	0.23±0.03
Na	0.644±0.053
Mg	0.988±0.091
Zn	0.008±0.001
Fe	0.402±0.036
Pb	0.00097±0.000042

2.2 骨组织形态计量学变化

通过微计算机断层扫描仪(Micro CT)对各组实验小鼠的骨头进行观察(图 2); 并通过 GEHC micro view 2.2 软件计算出骨密度、骨小梁结构等骨组织形态计量学的微观参数(图 3)。与对照组相比, 模型组的骨密度(BMD)、骨小梁厚度(Tb.Th)均显著减小($P<0.05$); 且骨小梁分离度(Tb.Sp)和结构模型指数(SMI)均显著增加($P<0.05$), 糖皮质激素使小鼠骨量流失并使骨小梁区域的骨组织受损, 这说明造模成功。经碳酸钙和牡蛎壳粉治疗后, 四个指标均发生变化, 且牡蛎壳粉组显著增加了骨密度和骨小梁厚度($P<0.05$)。

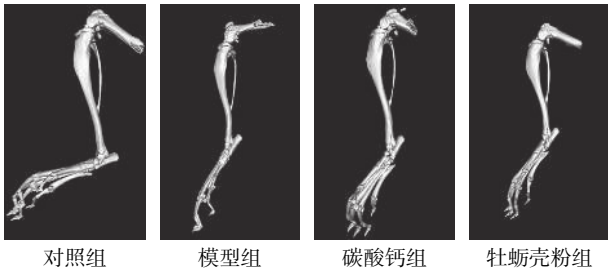


图 2 小鼠的股骨 micro CT 图像

Fig.2 Micro CT images of the femur in mice

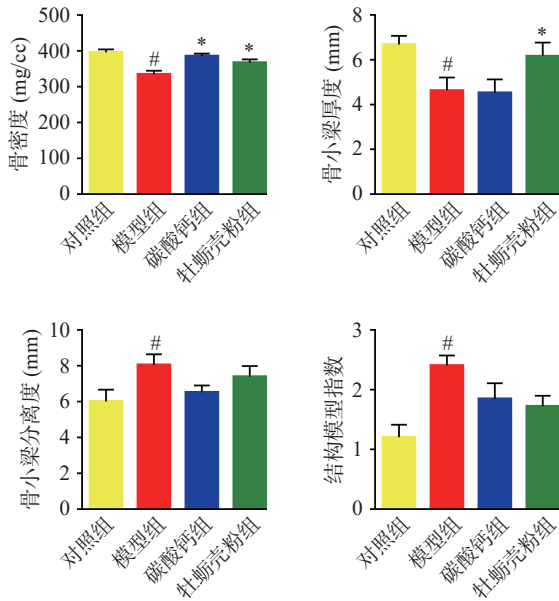


图 3 小鼠骨组织形态计量学指标

Fig.3 Bone tissue morphology index in mice

注: 模型组与对照组相比, #: $P < 0.05$; 两个处理组与模型组相比, *: $P < 0.05$; 图 6 同。

2.3 生理生化指标

2.3.1 钙含量 钙是骨吸收的指标。与对照组相比, 模型组中血清钙 ($1.22 \pm 0.10 \text{ mg/kg}$)、粪便钙 ($30.30 \pm 3.64 \text{ mg/kg}$) 含量显著升高 ($P < 0.05$); 股骨钙的含量降低 ($116.26 \pm 18.24 \text{ mg/kg}$, $P > 0.05$)。与模型组相比, 经牡蛎壳粉组的处理后血清钙 ($0.92 \pm 0.07 \text{ mg/kg}$, $P < 0.001$) 和粪便钙 ($29.14 \pm 1.97 \text{ mg/kg}$, $P > 0.05$) 均降低; 股骨钙含量增加 ($129.06 \pm 17.81 \text{ mg/kg}$, $P > 0.05$), 牡蛎壳粉组与碳酸钙组的股骨钙含量较为相近, 与物理指标中的骨密度(BMD)的结果一致(表 3)。

表 3 小鼠各部分的钙量变化

Table 3 Changes in the amount of calcium in each part of mice

组别	血清钙(mmol/L)	粪便钙(mg/g)	股骨钙(mg/g)
对照组	1.01±0.09	25.97±2.83	135.01±17.09
模型组	1.22±0.10 ^{##}	30.30±3.64 [#]	116.26±18.24
碳酸钙组	0.97±0.05 ^{***}	27.48±2.06	127.86±17.66
牡蛎壳粉组	0.92±0.07 ^{***}	29.14±1.97	129.06±17.81

注: 模型组与对照组相比, #: $P < 0.05$, ###: $P < 0.001$; 两个处理组与模型组相比, ***: $P < 0.001$ 。

2.3.2 骨转换标志酶的变化 骨转换标志物是一些

骨骼重建过程中, 存在于血液或尿液中的产物, 可用于评价骨吸收(ALP)和骨形成(TRACP)是否正常。与对照组相比, 模型组中血清 ALP 的酶活显著降低 ($42.16 \pm 2.56 \text{ U/L}$, $P < 0.05$), TRACP 的酶活显著上升 ($17.69 \pm 0.44 \text{ U/L}$, $P < 0.01$)。与模型组相比, 经牡蛎壳粉组处理后 ALP 的酶活显著上升 ($66.29 \pm 1.15 \text{ U/L}$, $P < 0.001$), TRACP 的酶活显著下降 ($14.55 \pm 0.69 \text{ U/L}$, $P < 0.01$) (图 4)。

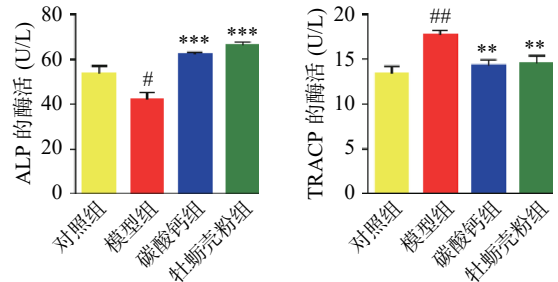


图 4 小鼠的骨转换标记物的酶活

Fig.4 Enzyme activity of bone turnover markers in mice
注: 模型组与对照组相比, #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$; 两个处理组与模型组相比, **: $P < 0.01$, ***: $P < 0.001$ 。

2.4 骨转换标记物相关基因表达

与对照组相比, 糖皮质激素的处理使 ALP 和 OPG 基因的转录水平显著下调 (0.24 ± 0.03 , 0.63 ± 0.08 , $P < 0.01$); 而使 TRACP 和 Sclerostin 基因的转录水平显著上调 (1.96 ± 0.15 , 1.53 ± 0.07 , $P < 0.01$, $P < 0.05$)。经过牡蛎壳粉和碳酸钙治疗后骨转换指标均不同程度逆转(图 5)。

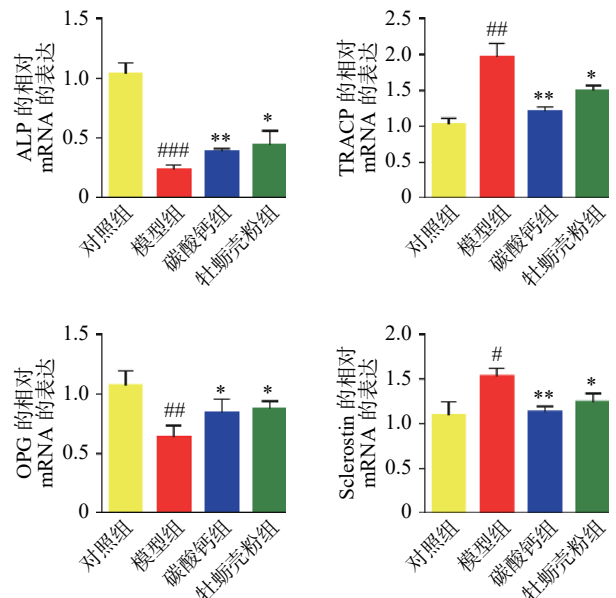


图 5 小鼠的骨转换标记物相关基因表达

Fig.5 Gene expression related to bone turnover markers in mice

注: 模型组与对照组相比, #: $P < 0.05$, ##: $P < 0.01$, ###: $P < 0.001$; 两个处理组与模型组相比, *: $P < 0.05$, **: $P < 0.01$ 。

2.5 肠道菌群组成和结构的变化

2.5.1 Alpha 多样性 Chao1 指数和 Shannon 指数

用于评估肠道菌群的物种丰富度和多样性。Chao1 指数和 Shannon 指数越高表明样品物种丰富度和多样性越高,如图 6 所示,模型组的物种丰富度和多样性均显著低于对照组($P<0.05$),经过牡蛎壳粉治疗后能显著增加肠道微生物的丰富度和多样性($P<0.05$)。

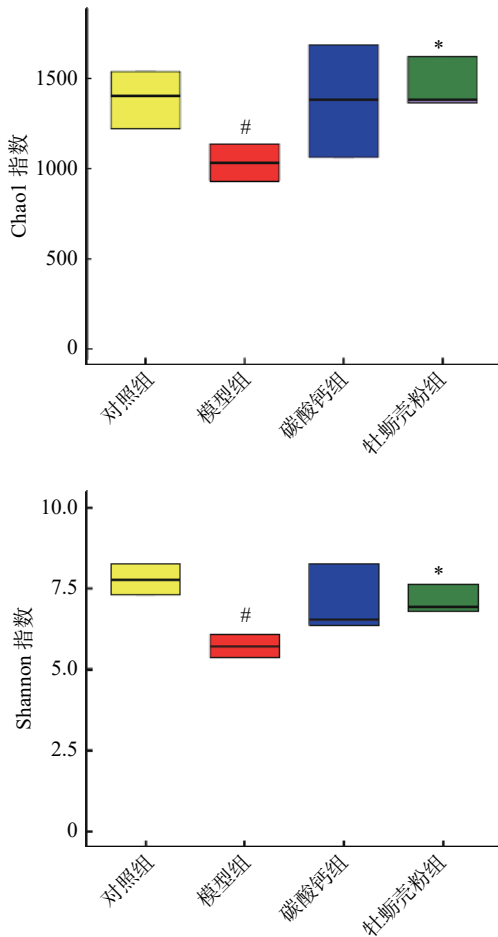


图 6 小鼠肠道菌群 Chao1 指数及 Shannon 指数
Fig.6 Chao1 index and Shannon index of gut microbiota in mice

2.5.2 Beta 多样性的差异 Beta 多样性是指不同环境群落之间的物种差异性。如图 7 所示,经过糖皮质激素造模 10 周后,肠道菌群结构偏离了对照组。在此基础上,牡蛎壳粉和碳酸钙治疗均可调节肠道菌群结构,使小鼠的肠道菌群结构发生不同程度的改变。

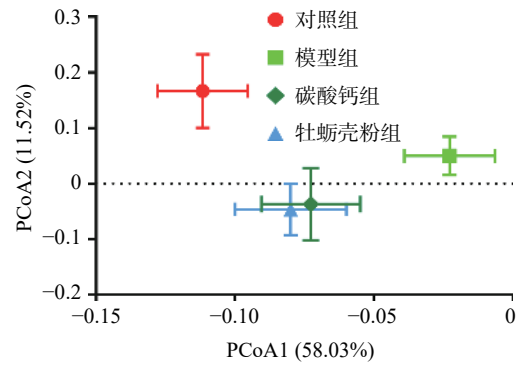


图 7 各组小鼠的 PCoA 图
Fig.7 PCoA of each group of mice

2.5.3 种群的组成变化 桑基图用来展示数据的“流动”变化,分支的宽度表示流量的大小。图 8 显示了不同样本对应的门水平和种水平的菌群相对丰度。基于相对丰度>2%的原则,从 4 组中共筛选出 9 个优势菌种,包括 *Christensenella massiliensis*、产粪甾醇真细菌 (*Eubacterium coprostanoligenes*)、*K.alysoides*、嗜酸乳酸杆菌 (*Lactobacillus acidophilus*)、动物乳杆菌 (*Lactobacillus animalis*)、粪便乳杆菌 (*Lactobacillus faecis*)、约氏乳杆菌 (*Lactobacillus johnsonii*)、*Muribaculum intestinale*、狄氏副拟杆菌 (*Parabacteroides distasonis*),其中 *M.intestinale* 和狄氏副拟杆菌属于拟杆菌门 (*Bacteroidetes*),而 *C.massiliensis*、产粪甾醇真细菌、*K.alysoides*、嗜酸乳酸杆菌、动物乳杆菌、粪便乳杆菌和约氏乳杆菌属

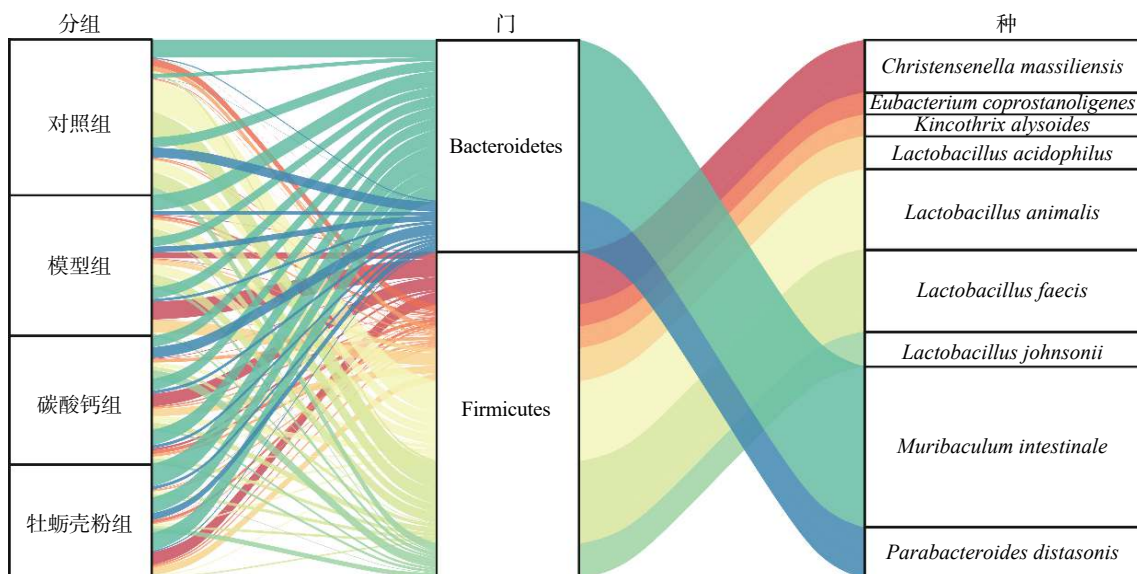


图 8 小鼠肠道菌群门和种的变化趋势
Fig.8 Changes in the phyla and species of mice gut microbiota

于厚壁菌门(Firmicutes)。与对照组相比,模型组的动物乳杆菌、粪便乳杆菌、约氏乳杆菌、产粪甾醇真细菌和 *K.alysoides* 的相对丰度降低,而 *M.intestinale*、狄氏副拟杆菌、嗜酸乳酸杆菌和 *C.massiliensis* 的相对丰度升高。与模型组相比,牡蛎壳粉和碳酸钙治疗组的 *C.massiliensis*、动物乳杆菌、粪便乳杆菌、嗜酸乳酸杆菌和狄氏副拟杆菌的相对丰度降低,而约氏乳杆菌、产粪甾醇真细菌、*K.alysoides* 和 *M.intestinale* 的相对丰度升高。

不同组小鼠肠道微生物群落结构各不相同,通过 Cytoscape 图分析小鼠肠道微生物发现,在所有组中共检测出 509 个 OTUs,分别是厚壁菌门(Firmicutes, 48.72%)、拟杆菌门(Bacteroidetes, 44.60%)、变形菌门(Proteobacteria, 3.73%)和放线菌门(Actinobacteria, 1.77%)。对照组、模型组、碳酸钙组和牡蛎壳粉组中分别有 78、31、68 和 118 个特有的 OTUs (图 9)。

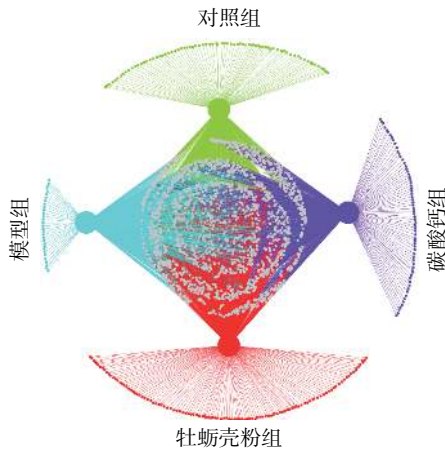


图 9 每组小鼠特有的 OTUs
Fig.9 Specific OTUs to each group of mice

2.6 关联性分析

为了研究肠道微生物的种与骨转换标记物的关系,经冗余分析(RDA)筛选 50 个丰度差异较大的

种,与骨转换标记物进行 Spearman's 相关性分析。结果表明,有 16 个菌种与至少一个骨转换标记物存在显著相关($P<0.05$)。其中与骨形成标记物成正相关的菌种有 2 种,是 *Anaerobacterium chartisolvens* 和 *Millionella massiliensis*,而这两种菌与骨吸收标志物显著负相关。另有 10 种菌与骨形成标志物显著负相关,分别是 *C.massiliensis*、嗜酸乳酸杆菌、豚鼠乳杆菌(*Lactobacillus caviae*)、费氏埃希菌(*Escherichia fergusonii*)、罗伊氏乳杆菌(*Lactobacillus reuteri*)、*Turicibacter sanguinis*、产酸拟杆菌(*Bacteroides acidifaciens*)、*Anaerobium acetethylicum*、产液阿德勒克罗伊茨菌(*Adlercreutzia equolifaciens*)和 *Butyrivibrio synergistica*,而除产液阿德勒克罗伊茨菌外,其他 9 种菌与骨吸收标志物显著正相关(图 10)。

3 讨论与结论

骨组织是一个动态变化的器官,它的强度和结构是由成骨细胞和破骨细胞进行调节的,若骨吸收增加而骨形成减少,将导致骨丢失或骨质疏松症的发生^[3]。骨质疏松导致骨小梁数量减少、厚度减少,骨小梁之间的分离度增大、相互连接结构被打乱,从而增加骨折的风险^[20-21]。本文证明了注射糖皮质激素后,模型组中的小鼠骨量明显减小,骨小梁连接密度减小,骨小梁结构受损。而经牡蛎壳钙治疗后,BMD 和 Tb.Th 升高、Tb.Sp 和 SMI 降低,说明牡蛎壳粉能改善骨微结构。骨转换标志物是主要的骨组织代谢产物,通过骨骼重建将其释放到血液和尿液中,主要包括骨形成标志物以及骨吸收标志物^[22]。而 ALP 和 OPG 是骨形成标志物^[23];TRACP 和 Sclerostin 是骨吸收标志物^[24]。在本研究中糖皮质激素能显著降低血清中 ALP 的酶活($P<0.05$),而显著升高了 TRACP 的酶活($P<0.01$);经牡蛎钙治疗后,血清中 ALP 和 TRACP 的酶活均恢复了且接近于对照组。与对照组相比,模型组中股骨 ALP 水平与 OPG 呈显著正相关,与 sclerostin 呈负相关;而 TRACP 水平与 OPG 呈显著负相关,与 sclerostin 呈正相关,说明

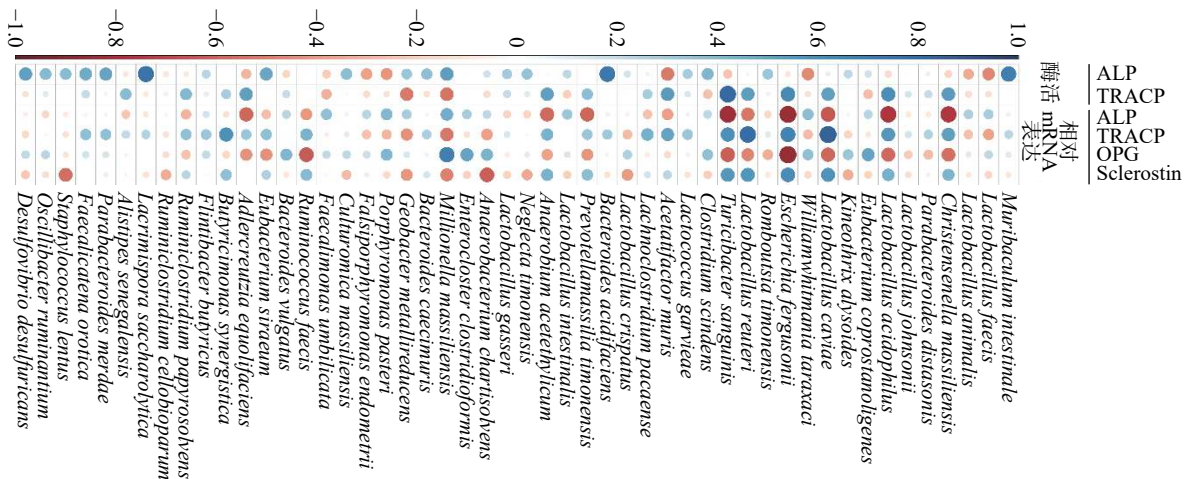


图 10 小鼠肠道菌群优势菌种与骨转换标记物的相关性分析
Fig.10 Correlation analysis of dominant species of gut microbiota and bone turnover markers in mice

糖皮质激素破坏骨骼生长重塑,经过牡蛎壳粉的处理,这些指标得到不同程度的改善。

人类肠道中存在着多达 100 万亿个肠道微生物或肠道菌群,其中绝大多数是对人体健康至关重要的非致病菌^[25]。有研究发现无菌小鼠骨量高于正常小鼠、骨矿物质密度和骨体积分数增加,并且骨吸收标记物的含量降低,说明肠道菌群对骨代谢具有调控作用^[26-27]。肠道微生物可能通过影响 B 细胞产生的骨保护素(OPG)来改变骨吸收^[28]。随着年龄增长,骨质疏松症患病率逐渐增加,肠道菌群结构也随之发生变化,致病性变形菌门和杆菌门比例增加,而具有抗炎作用乳酸杆菌比例下降,这些改变可能影响了骨代谢,增加骨质疏松发生风险^[29]。在本研究中,模型组的乳杆菌相对丰度下降。有研究表明糖皮质激素诱导的雌激素缺乏使表征肠道菌群丰富度和多样性降低^[30],而经牡蛎壳粉处理后,肠道菌群的丰富度和多样性显著增加。罗伊氏乳杆菌产生酸性环境,从而抑制有害微生物的生长和繁殖,可有效避免沙门氏杆菌的感染,并帮助维持肠道菌群的正常化^[31-32]。在本研究中,罗伊氏乳杆菌与骨形成标记物显著正相关,与骨吸收标记物显著负相关。肠道微生物群是一个信号中枢,通过将环境(如饮食)和遗传因素与免疫信号结合起来,从而达到影响宿主的健康和疾病的变换过程^[33]。罗伊氏乳杆菌可以通过发酵产生短链脂肪酸(SCFAs),它是体内破骨细胞代谢和骨量的调节剂,它可以增加钙的吸收和运输,刺激肠源性血清素的生物合成,并直接抑制破骨细胞的分化和骨吸收^[8,34]。牡蛎壳钙对糖皮质激素性骨质疏松的缓解作用可能也与 SCFAs 有关。

牡蛎壳粉能改变小鼠股骨的微观结构、抑制骨矿物质流失、减少骨的丢失,降低血清钙的含量、促进骨形成标记基因的表达而抑制骨吸收标志基因的表达;同时还能影响肠道微生物的 α 、 β 多样性和菌群组成,从而有效地缓解糖皮质激素性骨质疏松症。

参考文献

- [1] Buckley L, Humphrey M B. Glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2018, 379(26): 2547-2556.
- [2] Frenkel B, White W, Tuckermann J. Glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. *Adv Exp Med Biol*, 2015, 872: 179-215.
- [3] 耿彬,夏亚一. 调控骨质疏松模型小鼠的 ERK5 蛋白信号通路[J]. *中国组织工程研究*, 2021, 25(2): 178-185. [Geng B, Xia Y Y. Involvement of ERK5 signaling pathway in osteoporosis development in mice[J]. *Journal of Clinical Rehabilitative Tissue Engineering Research*, 2021, 25(2): 178-185.]
- [4] Yanbey Z A, Hansen K E. Denosumab in the treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis: A systematic review and meta-analysis[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019, 13: 2843-2852.
- [5] 黄东. 糖皮质激素诱导骨质疏松症防治研究进展[J]. *临床合理用药杂志*, 2020, 13(11): 180-181. [Huang D. Research progress in prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. *Chinese Journal of Clinical Rational Drug Use*, 2020, 13(11): 180-181.]
- [6] 张家国,徐晓峰,李明,等. 银杏叶提取物对糖皮质激素诱导的骨质疏松症大鼠骨密度和骨生物力学的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(4): 461-464, 471. [Zhang J G, Xu X F, Li M, et al. Effects of *Ginkgo biloba* extract on bone mineral density and bone biomechanics in rats with glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2019, 25(4): 461-464, 471.]
- [7] 崔宗梅,黄津伟,王海艳,等. 广东雷州半岛东部沿岸潮间带常见牡蛎的种类及其分布[J]. *海洋与湖沼*, 2018, 49(6): 1350-1357. [Cui Z M, Huang J W, Wang H Y, et al. Classification and distribution of oysters in eastern coast of Leizhou peninsula, China[J]. *Oceanologia Et Limnologia Sinica*, 2018, 49(6): 1350-1357.]
- [8] 杨韵,徐波. 牡蛎的化学成分及其生物活性研究进展[J]. *中国现代中药*, 2015, 17(12): 1345-1349. [Yang Y, Xu B. Research progress on chemical composition of oyster and its biological activity[J]. *Modern Chinese Medicine*, 2015, 17(12): 1345-1349.]
- [9] 蒋金来,王令充,吴皓,等. 钙制剂研究进展[J]. *食品工业科技*, 2012, 33(11): 379-382, 387. [Jiang J L, Wang L C, Wu H, et al. Research progress in calcium preparation[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2012, 33(11): 379-382, 387.]
- [10] 李佳,韩丽娜,韦玮,等. 牡蛎在补钙方面的研究进展[J]. *内蒙古中医药*, 2019, 38(3): 90-91. [Li J, Han L N, Wei W, et al. Research progress of oyster in calcium supplement[J]. *Nei Mongol Journal of Traditional Chinese Medicine*, 2019, 38(3): 90-91.]
- [11] Chen Y, Jiang Y, Liao L, et al. Inhibition of 4NQO-Induced oral carcinogenesis by dietary oyster shell calcium[J]. *Integrative Cancer Therapies*, 2016, 15(1): 96-101.
- [12] Wang Z, Wang K Y, Feng Y N, et al. Preparation, characterization of L-aspartic acid chelated calcium from oyster shell source and its calcium supplementation effect in rats[J]. *Journal of Functional Foods*, 2020; 75.
- [13] Lerner A, Neidhöfer S, Matthias T. The gut microbiome feelings of the brain: A perspective for non-microbiologists[J]. *Microorganisms*, 2017, 5(4): 66.
- [14] Li J, Yang M, Lu C, et al. Tuna bone powder alleviates glucocorticoid-induced osteoporosis via coregulation of the NF- κ B and Wnt/ β -catenin signaling pathways and modulation of gut microbiota composition and metabolism[J]. *Molecular Nutrition & Food Research*, 2020, 64(5): e1900861.
- [15] Han J, Huang Z, Tang S, et al. The novel peptides ICRD and LCGEC screened from tuna roe show antioxidative activity via Keap1/Nrf2-ARE pathway regulation and gut microbiota modulation[J]. *Food Chemistry*, 2020, 327: 127094.
- [16] Jiang Q, Lu C, Sun T, et al. Alterations of the brain proteome and gut microbiota in d-galactose-induced brain-aging mice with krill oil supplementation[J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2019, 67(35): 9820-9830.
- [17] Han J J, Wang X, Tang S, et al. Protective effects of tuna meat oligopeptides(TMOP) supplementation on hyperuricemia and associated renal inflammation mediated by gut microbiota[J]. *Faseb*

- Journal, 2020, 34(4): 5061–5076.
- [18] Jiang X T, Peng X, Deng G H, et al. Illumina sequencing of 16S rRNA tag revealed spatial variations of bacterial communities in a mangrove wetland[J]. *Microbial Ecology*, 2013, 66(1): 96–104.
- [19] 鲍伟, 韩姣姣, 张旨轩, 等. 基于高通量测序技术对浙江传统发酵蔬菜微生物多样性的解析[J]. *食品科学*, 2021, 42(6): 178–185. [Bao W, Han J J, Zhang Z X, et al. Analysis of microbial community diversity in Zhejiang traditional fermented vegetables using high-throughput sequencing[J]. *Food Science*, 2021, 42(6): 178–185.]
- [20] Ibrahim N', Khamis M F, Mod Yunoh M F, et al. Targeted delivery of lovastatin and tocotrienol to fracture site promotes fracture healing in osteoporosis model: Micro-computed tomography and biomechanical evaluation[J]. *PLoS One*, 2014, 9(12): e115595.
- [21] Chen C, Jin D, Liu Y, et al. Trabecular bone characterization on the continuum of plates and rods using *in vivo* MR imaging and volumetric topological analysis[J]. *Physics in Medicine and Biology*, 2016, 61(18): N478–N496.
- [22] 尚芬兰, 徐晶晶, 赫荣波, 等. 骨转换标志物在糖尿病中的研究进展[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(4): 541–547. [Shang F L, Xu J J, He R B, et al. Research progress on the application of bone turnover markers in diabetes[J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2017, 23(4): 541–547.]
- [23] 耿娟娟, 秦福芳, 张文才. NTX 与 2 型糖尿病性骨质疏松患者血清中骨转换标志物的相关性研究[J]. *中国合理用药探索*, 2020, 17(6): 56–60. [Geng J J, Qin F F, Zhang W C. Study on the correlation between NTX and serum bone turnover markers in patients with type 2 diabetic osteoporosis[J]. *Chinese Journal of Rational Drug Use*, 2020, 17(6): 56–60.]
- [24] 黄长安, 喻景弈. 血清癌胚抗原相关细胞黏附分子 1、骨标志物硬化蛋白、I 型前胶原氨基端延长肽及护骨素变化与绝经后骨质疏松病人骨密度变化的相关性[J]. *安徽医药*, 2020, 24(9): 1828–1831. [Huang C A, Yu J Y. Correlation between changes of serum CEACAM1, SOST, PINP and osteoprotegerin levels and changes of bone mineral density in PMOP patients with osteoporosis[J]. *Anhui Medical and Pharmaceutical Journal*, 2020, 24(9): 1828–1831.]
- [25] Chung H, Pamp S J, Hill J A, et al. Gut immune maturation depends on colonization with a host-specific microbiota[J]. *Cell*, 2012, 149(7): 1578–1593.
- [26] Yan J, Charles J F. Gut microbiome and bone: To Build, destroy, or both?[J]. *Current Atherosclerosis Reports*, 2017, 15(4): 376–384.
- [27] Ohlsson C, Sjögren K. Effects of the gut microbiota on bone mass[J]. *Trends in Endocrinology and Metabolism: TEM*, 2015, 26(2): 69–74.
- [28] Yan J, Herzog J W, Tsang K, et al. Gut microbiota induce IGF-1 and promote bone formation and growth[J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2016, 113(47): E7554–E7563.
- [29] Ejtahed H S, Soroush A R, Angoorani P, et al. Gut microbiota as a target in the pathogenesis of metabolic disorders: A new approach to novel therapeutic agents[J]. *Hormone and Metabolic Research*, 2016, 48(6): 349–358.
- [30] Wu T, Yang L, Jiang J, et al. Chronic glucocorticoid treatment induced circadian clock disorder leads to lipid metabolism and gut microbiota alterations in rats[J]. *Life Sciences*, 2018, 192: 173–182.
- [31] 孙梦晗, 邓敏, 白杨. 罗伊氏乳杆菌益生特性及治疗溃疡性结肠炎研究进展[J]. *现代消化及介入诊疗*, 2019, 24(12): 1493–1496. [Sun M H, Deng M, Bai Y. Research progress on the probiotic properties of *Lactobacillus reuteri* and the treatment of ulcerative colitis[J]. *Modern Digestion & Intervention*, 2019, 24(12): 1493–1496.]
- [32] 丁佳, 王慧艳, 何秋雯, 等. 益生菌对雌激素代谢及相关疾病的影响[J]. *食品科学*, 2016, 37(11): 248–254. [Ding J, Wang H Y, He Q W, et al. Effects of probiotics on estrogen metabolism and related disorders[J]. *Food Science*, 2016, 37(11): 248–254.]
- [33] Thaiss C A, Zmora N, Levy M, et al. The microbiome and innate immunity[J]. *Nature*, 2016, 535(7610): 65–74.
- [34] Lucas S, Omata Y, Hofmann J, et al. Short-chain fatty acids regulate systemic bone mass and protect from pathological bone loss[J]. *Nat Commun*, 2018, 9(1): 55.