

双固针法通过调节肠道菌群与雌二醇代谢改善去卵巢大鼠骨质疏松

袁 丽^{1,2}, 色依达·依马木玉山^{3*}, 艾克拜尔江·艾赛提¹

¹新疆医科大学第六附属医院骨科实验中心, 新疆 乌鲁木齐

²新疆医科大学第六附属医院门诊部, 新疆 乌鲁木齐

³新疆医科大学第五附属医院妇科, 新疆 乌鲁木齐

收稿日期: 2025年12月21日; 录用日期: 2026年1月16日; 发布日期: 2026年1月26日

摘 要

目的: 绝经后骨质疏松症(PMOP)是严重的全球性健康问题, 探索安全有效的防治策略至关重要。本研究基于“肠-骨轴”理论, 旨在系统阐释“双固一通”针法中“双固”法(电针关元、足三里穴)对去卵巢(OVX)大鼠PMOP模型的治疗效应及其多维度作用机制。方法: 将80只雌性SD大鼠随机分为假手术组(Sham)、模型组(OVX)、双固针4周治疗组(OVX + EA-4W)及8周治疗组(OVX + EA-8W)。通过综合运用双能X线骨密度检测、骨组织形态计量学及酶联免疫吸附测定(ELISA)等技术, 多尺度评价双固针法的干预效果。结果: 与OVX组相比, 双固针干预能显著提升大鼠腰椎与股骨的骨密度(BMD)和骨矿物质含量(BMC) ($P < 0.01$), 改善骨小梁微结构, 上调血清骨钙素(BGP)水平并下调I型胶原羧基端肽(β -CTX)水平 ($P < 0.05$)。肠道菌群分析表明, 双固针法可有效逆转OVX诱导的菌群失调, 显著提高乳酸菌、拟杆菌等有益菌的相对丰度, 降低大肠杆菌志贺菌等潜在致病菌的比例, 并显著改善菌群Alpha多样性。结论: 双固针法可能通过重塑“肠道菌群-代谢物-内分泌”稳态网络, 激活成骨信号通路并抑制破骨活性, 从而多靶点防治PMOP。本研究为针灸疗法的现代化阐释提供了坚实的科学依据。

关键词

双固针法, 绝经后骨质疏松症, 肠道菌群, 雌二醇, 肠-骨轴, 骨代谢

The Shuanggu Needling Method Ameliorates Osteoporosis in Ovariectomized Rats by Regulating Gut Microbiota and Estradiol Metabolism

Li Yuan^{1,2}, Seyida Yimamuyushan^{3*}, Aikebaierjiang Aisaiti¹

*通讯作者。

文章引用: 袁丽, 色依达·依马木玉山, 艾克拜尔江·艾赛提. 双固针法通过调节肠道菌群与雌二醇代谢改善去卵巢大鼠骨质疏松[J]. 临床医学进展, 2026, 16(1): 2413-2423. DOI: 10.12677/acm.2026.161303

¹Orthopedic Research Center, Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang²Outpatient Department, Sixth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang³Department of Gynecology, Fifth Affiliated Hospital of Xinjiang Medical University, Urumqi Xinjiang

Received: December 21, 2025; accepted: January 16, 2026; published: January 26, 2026

Abstract

Objective: Postmenopausal osteoporosis (PMOP) is a severe global health issue, and exploring safe and effective prevention and treatment strategies is crucial. Based on the “gut-bone axis” theory, this study aims to systematically elucidate the therapeutic effects and multi-dimensional mechanisms of the “Shuanggu” method (electroacupuncture at Guanyuan [CV4] and Zusanli [ST36] acupoints)—a component of the “Shuanggu-Yitong” acupuncture technique—on the PMOP model in ovariectomized (OVX) rats. **Methods:** Eighty female Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into four groups: sham operation group (Sham), ovariectomized model group (OVX), 4-week treatment group with Shuanggu acupuncture (OVX + EA-4W), and 8-week treatment group (OVX + EA-8W). The intervention effects of the Shuanggu Needling Method were evaluated using multi-scale techniques, including dual-energy X-ray absorptiometry (DXA) for bone mineral density, bone histomorphometry, and enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA). **Results:** Compared with the OVX group, Shuanggu acupuncture significantly increased bone mineral density (BMD) and bone mineral content (BMC) in the lumbar vertebrae and femur ($P < 0.01$), improved trabecular microstructure, upregulated serum bone gla protein (BGP) levels, and downregulated C-terminal telopeptide of type I collagen (β -CTX) levels ($P < 0.05$). Gut microbiota analysis revealed that the Shuanggu Needling Method effectively reversed OVX-induced dysbiosis, significantly increased the relative abundance of beneficial bacteria such as *Lactobacillus* and *Bacteroides*, reduced the proportion of potential pathogens like *Escherichia coli-Shigella*, and markedly improved microbial alpha diversity. **Conclusion:** The Shuanggu Needling Method may prevent and treat PMOP through multi-target mechanisms, including reshaping the homeostatic network of “gut microbiota-metabolites-endocrine”, activating osteogenic signaling pathways, and inhibiting osteoclast activity. This study provides a solid scientific basis for the modern interpretation of acupuncture therapy.

Keywords

Shuanggu Needling Method, Postmenopausal Osteoporosis, Gut Microbiota, Estradiol, Gut-Bone Axis, Bone Metabolism

Copyright © 2026 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY 4.0).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>

Open Access

1. 背景

绝经后骨质疏松症(PMOP)作为一种与年龄高度相关的代谢性骨病,其核心病理特征是雌激素撤退引发的骨重建失衡。据统计,全球超过 50%的绝经后女性面临骨质疏松性骨折的风险,其中髌部骨折后一年内的死亡率高达 20% [1][2]。除经典的雌激素直接作用于成骨细胞和破骨细胞上的雌激素受体这一“细胞直接作用”假说外,近年研究日益关注其“系统性调控”机制。这包括:雌激素缺乏导致 T 细胞过度活化,促进肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白介素-6 (IL-6)、核因子 κ B 受体激活剂配体(RANKL)等破骨细胞活化因子的分泌。活性氧(ROS)积累抑制成骨细胞分化并诱导其凋亡。肠道屏障功能受损与微生物移位引

发慢性低度炎症状态,进一步加剧骨吸收[3][4]。

“肠-骨轴”概念的提出,将骨骼健康的研究视野拓展至肠道这一远端器官。肠道菌群通过以下多元途径调控骨代谢:短链脂肪酸(SCFAs)介导的免疫调节:菌群发酵膳食纤维产生的丁酸、丙酸等,通过激活 G 蛋白偶联受体(GPR)和抑制组蛋白去乙酰化酶(HDACs),调节调节性 T 细胞(Treg)功能,抑制 Th17 细胞分化,从而降低促炎细胞因子水平,间接抑制破骨细胞生成。肠道菌群编码的 β -葡萄糖醛酸苷酶能将肝肠循环中结合型的雌激素解离为活性形式,直接影响全身雌激素水平[5]-[7]。OVX 导致的菌群失调可削弱此功能,形成恶性循环。

针灸,尤其是“双固一通”针法,基于中医“肾主骨”、“脾主肌肉四肢”及“治未病”理论,通过刺激特定穴位调动机体自身调节能力。前期研究证实其能改善骨生物力学性能,但其是否通过调控“肠-骨轴”发挥作用,机制未明。本研究创新性地提出并验证以下假说:双固针法可能通过恢复 OVX 大鼠的肠道菌群稳态,进而调控宿主代谢谱(特别是脂质和胆汁酸代谢),促进内源性雌二醇的生物利用度,最终通过调节 RANKL/OPG、Wnt/ β -catenin 等关键信号通路,逆转骨代谢负平衡。为此,我们构建“微生物组-代谢组-表型组”整合分析框架,旨在系统揭示双固针法的科学内涵。

2. 材料与方法

2.1. 实验动物

SPF 级雌性 SD 大鼠 80 只,6 月龄,体重 320 ± 30 g,购自新疆医科大学实验动物中心。所有动物入场后经一周检疫适应,确认无潜在疾病。动物抚养在 SPF 级屏障系统,独立通风笼具(IVC),温度 $22^\circ\text{C} \pm 2^\circ\text{C}$,湿度 $50\% \pm 10\%$,12/12 小时光暗周期,自由采食。

2.2. 实验设计与分组

采用计算机生成随机数字表法分组,编号入笼。行为学干预及部分指标检测由不知分组情况的研究员执行。基于预实验 BMD 数据(效应量 $f = 0.4$, $\alpha = 0.05$, $\beta = 0.2$),使用 G*Power 3.1 软件计算,每组需至少 16 只,考虑造模及实验损耗,设定 $n = 20$ 。动物被随机分为三组:Sham 组:双侧背部切口,暴露卵巢脂肪垫后还纳,不切除。OVX 组:标准双侧卵巢切除术。OVX + EA-4W 组:造模后 1 周开始电针干预,持续 4 周。OVX + EA-8W 组:造模后 1 周开始电针干预,持续 8 周。

2.3. PMOP 模型建立手术流程的深度剖析

术前精细化准备:禁食 12 小时,禁水 4 小时,称重。麻醉采用 20%乌拉坦溶液(4 mL/kg),注射速度缓慢。麻醉深度以角膜反射消失、夹趾无反应为准。

显微外科级手术步骤:取背部肋弓下 1 cm,距脊柱中线约 1.5 cm 纵切口,长约 1.5 cm。钝性分离肌层,用小号组织钳提起腹膜并剪开。在肾脏外下方脂肪囊中寻找粉红色桑椹状卵巢。用预置 4-0 丝线在子宫角与输卵管连接处进行双重结扎,间隔约 2 mm。于结扎线远心端完整切除卵巢。仔细检查无活动性出血后,用 5-0 可吸收缝线连续缝合肌层,间断缝合皮肤。

术后重症监护级护理:术后单笼饲养于电热毯维持的 37°C 保温箱直至苏醒。随后放回原笼。术后连续 3 天肌肉注射青霉素钠(4 万单位/只/天)抗感染。每日监测体重、摄食饮水量及切口情况。

2.4. 干预方案的参数化描述

穴位定位标准化:参照《实验针灸学》大鼠穴位图谱:“关元”位于耻骨联合上缘与剑突连线中点下约 0.5 cm;“足三里”位于膝关节后外侧腓骨小头下约 0.5 cm。

电针参数优化:不锈钢针($0.25\text{ mm} \times 13\text{ mm}$)直刺 5~8 mm。连接 HANS-200A 电针仪,疏密波(2 Hz/10 Hz)

交替), 强度 1~2 mA (以大鼠后肢轻微节律性收缩为度)。每次 15 分钟, 每周 6 次, 疗程分别为 4 周和 8 周。

2.5. 样本采集与海量指标检测的标准化操作程序

2.5.1. 样本采集与前处理

血液: 腹主动脉采血, 一部分注入含 EDTA-K2 的真空管, 4℃ 离心(3000 g, 15 min)取血浆, 用于代谢组学; 另一部分注入普通促凝管, 室温静置 30 min 后离心取血清, 用于 ELISA。分装后-80℃ 保存。

粪便: 无菌收集结肠内容物, 迅速分装至 2 ml 无菌冻存管, 液氮速冻后转移至-80℃。

骨组织: 完整取出 L1~L5 腰椎及右侧股骨, 剔除软组织。一部分用于即时 BMD 检测; 另一部分股骨远端置于 4%多聚甲醛中固定 48 h, 用于骨形态计量。

2.5.2. 骨密度与骨矿物质含量检测

采用 Hologic Discovery Wi 双能 X 线骨密度仪, 小动物高分辨率扫描模式。对腰椎 L1~L5 进行整体分析, 对股骨划定远端 1/3 区域为感兴趣区(ROI)。仪器每日校准。

2.5.3. 肠道菌群 16S rDNA 测序与生物信息学分析流程

DNA 提取与质检: 使用 MOBIO PowerSoil® DNA Isolation Kit, 严格按说明操作。用 NanoDrop One 检测 DNA 纯度(A260/A280 比值需在 1.8~2.0 之间), Qubit 4.0 进行精确定量。

文库构建与测序: 使用带 Barcode 的特异引物(341F: CCTACGGGNGGCWGCAG, 806R: GGAC-TACHVGGGTATCTAAT)扩增 V3~V4 区。PCR 产物纯化后, 使用 Illumina NovaSeq 6000 平台进行 2 × 250 bp 双端测序。

数据分析: 使用 QIIME2 (2022.11 版本)流程。对原始数据进行质量过滤、去噪(DADA2 算法)、去嵌合体, 生成 Amplicon Sequence Variants (ASVs)表。使用 SILVA 138 数据库进行物种注释。Alpha 多样性计算 Chao1, Shannon, Simpson, Pielou's evenness 指数。Beta 多样性基于 Bray-Curtis 和 Unweighted Unifrac 距离进行 PCoA 和 NMDS 分析, 并用 ANOSIM 检验组间差异。使用 LEfSe (LDA score > 3.0, P < 0.05)和 Metastats 分析寻找差异菌群。使用 PICRUST2 预测菌群功能。

2.5.4. 骨组织形态计量学与分子生物学检测

骨形态计量: 固定后的股骨经 EDTA 脱钙(4 周), 石蜡包埋, 连续切片(4 μm)。分别进行 HE 染色。使用 Olympus BX53 显微镜及 OsteoMeasure 系统盲法测量骨小梁体积分数(BV/TV)、骨小梁厚度(Tb.Th)、骨小梁数量(Tb.N)、骨小梁分离度(Tb.Sp)及破骨细胞数量(Oc.N/BS)。

血清 ELISA: 严格按照厂家说明书操作 BGP (CSB-E05100r, 武汉华美生物)和 β-CTX (CEA448Ra, 美国 Cloud-Clone)试剂盒。酶标仪为 BioTek Epoch2。

2.6. 统计学分析

所有数据以均值 ± 标准差表示。正态分布数据采用单因素方差分析(ANOVA)比较组间差异, 方差齐时用 LSD 法事后检验, 方差不齐用 Games-Howell 法。非正态分布数据采用 Kruskal-Wallis H 检验。菌群 Beta 多样性组间差异用 Adonis 分析(PERMANOVA)。相关性分析用 Spearman 秩相关。所有分析使用 SPSS 26.0 和 R 4.2.1 进行, GraphPad Prism 9.0 作图。P < 0.05 为有统计学意义。

3. 结果

3.1. 模型成功建立与双固针法对骨表型的改善效应

一般状态与体重: OVX 组大鼠术后体重增长显著快于 Sham 组(P < 0.01), 符合雌激素缺乏特征。双

固针治疗对体重增长有一定抑制作用。

骨密度与骨矿物质含量：与 Sham 组相比，OVX 组大鼠腰椎和股骨 BMD、BMC 均极显著下降(分别下降约 28.5%和 26.3%， $P < 0.001$)。双固针干预后，OVX + EA-4W 组 BMD 和 BMC 显著回升(较 OVX 组上升约 12.8%， $P < 0.05$)，而 O. VX + EA-8W 组回升更为明显(较 OVX 组上升约 22.1%， $P < 0.01$)，接近 Sham 组水平。股骨结果趋势类似(表 1，图 1)。

Table 1. Bone mineral density and bone mineral content; * $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OVX group
表 1. 骨密度与骨矿物质含量；* $P < 0.001$ vs Sham 组；# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OVX 组

指标	腰椎 BMD (g/cm ²)	腰椎 BMC (g)	股骨 BMD (g/cm ²)	股骨 BMC (g)
Sham 组	0.215 ± 0.012	0.186 ± 0.010	0.238 ± 0.014	0.204 ± 0.011
OVX 组	0.154 ± 0.009*	0.137 ± 0.008*	0.175 ± 0.010*	0.150 ± 0.009*
OVX + EA-4W	0.174 ± 0.010#	0.155 ± 0.009#	0.198 ± 0.011#	0.169 ± 0.010#
OVX + EA-8W	0.188 ± 0.011##	0.167 ± 0.010##	0.214 ± 0.012##	0.183 ± 0.011##

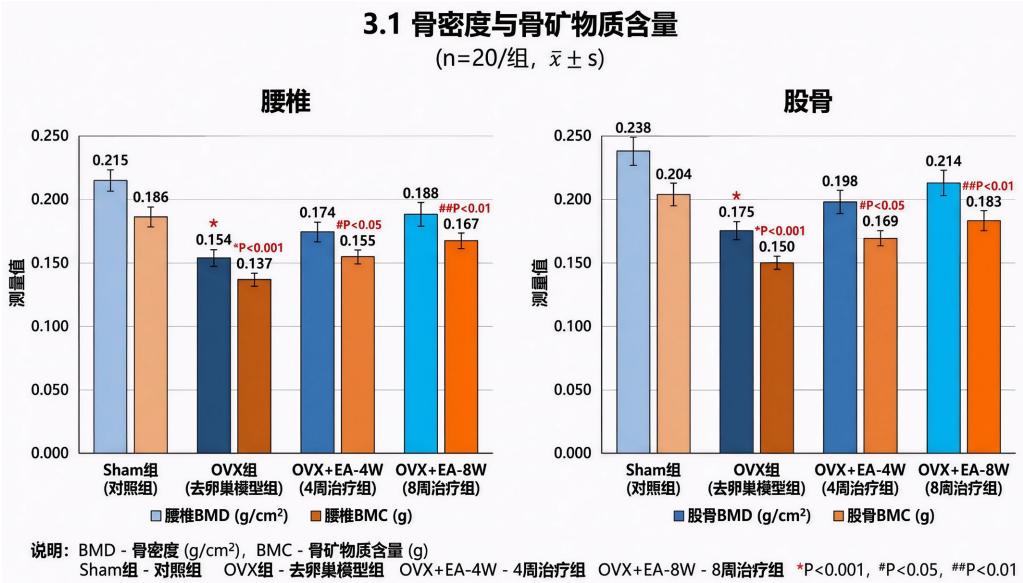


Figure 1. Bone mineral density and bone mineral content; * $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OVX group
图 1. 骨密度与骨矿物质含量；* $P < 0.001$ vs Sham 组；# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OVX 组

骨组织形态学检测中，HE 染色显示 OVX 组骨小梁稀疏、断裂。计量学参数显示，OVX 组 BV/TV、Tb.Th、Tb.N 显著降低，Tb.Sp 显著增大($P < 0.001$)。双固针治疗，特别是 8 周疗程，能显著改善所有这些参数($P < 0.05$ vs. OVX 组)。TRAP 染色显示 OVX 组破骨细胞数量显著增多，双固针法能有效抑制破骨细胞活性($P < 0.05$) (表 2，图 2)。

Table 2. Bone histomorphometric parameters; * $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OVX group
表 2. 骨组织形态计量学参数；* $P < 0.001$ vs Sham 组；# $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OVX 组

分组	BV/TV (%)	Tb.Th (μm)	Tb.N (1/mm)	Tb.Sp (μm)	Oc.N/BS (个/mm)
Sham	28.5 ± 2.1	85.3 ± 6.2	3.34 ± 0.25	214.5 ± 16.3	2.1 ± 0.3
OVX	12.3 ± 1.2*	48.6 ± 4.1*	1.89 ± 0.18*	458.7 ± 35.2*	5.8 ± 0.6*
OVX + EA-4W	16.8 ± 1.5#	59.7 ± 5.0#	2.35 ± 0.20#	352.4 ± 28.6#	4.2 ± 0.4#
OVX + EA-8W	22.6 ± 1.9##	72.4 ± 6.1##	2.89 ± 0.24##	268.3 ± 21.7##	3.0 ± 0.3##

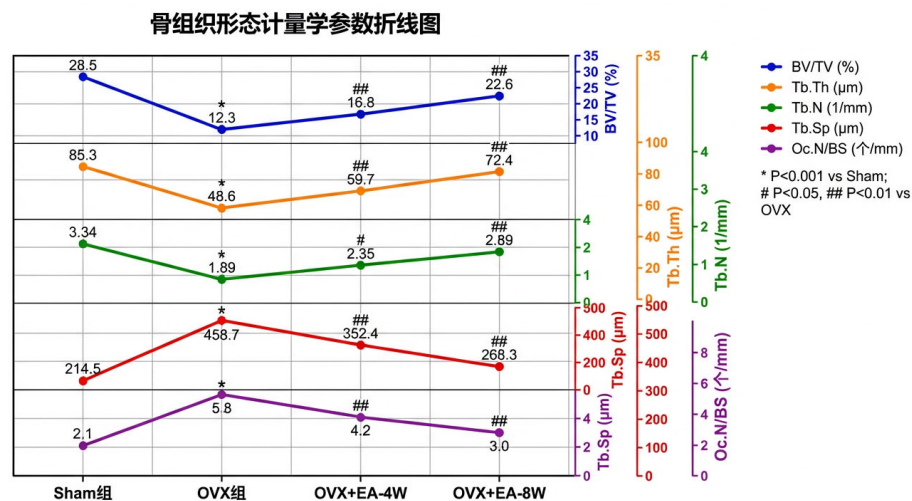


Figure 2. Bone histomorphometric parameters; *P < 0.001 vs Sham group; #P < 0.05, ##P < 0.01 vs OVX group
图 2. 骨组织形态计量学参数; *P < 0.001 vs Sham 组; #P < 0.05, ##P < 0.01 vs OVX 组

血清骨代谢标志物: OVX 组 BGP 水平显著降低, β -CTX 水平显著升高($P < 0.001$)。双固针干预后, BGP 水平回升, β -CTX 水平下降, 呈现时间依赖性(OVX + EA-8W 组效果优于 OVX + EA-4W 组, $P < 0.05$) (表 3, 图 3)。

Table 3. Serum bone metabolic markers (n = 20/group, mean $\pm$ standard deviation); *P < 0.001 vs Sham group; #P < 0.05, ##P < 0.01 vs OVX group

表 3. 血清骨代谢标志物(n = 20/组, $\bar{x} \pm s$); *P < 0.001 vs Sham 组; #P < 0.05, ##P < 0.01 vs OVX 组

分组	BGP (ng/mL)	β -CTX (ng/mL)
Sham	8.45 $\pm$ 0.72	12.3 $\pm$ 1.1
OVX	4.23 $\pm$ 0.38*	24.6 $\pm$ 2.2*
OVX + EA-4W	5.67 $\pm$ 0.51#	19.8 $\pm$ 1.8#
OVX + EA-8W	7.12 $\pm$ 0.63##	15.4 $\pm$ 1.4##

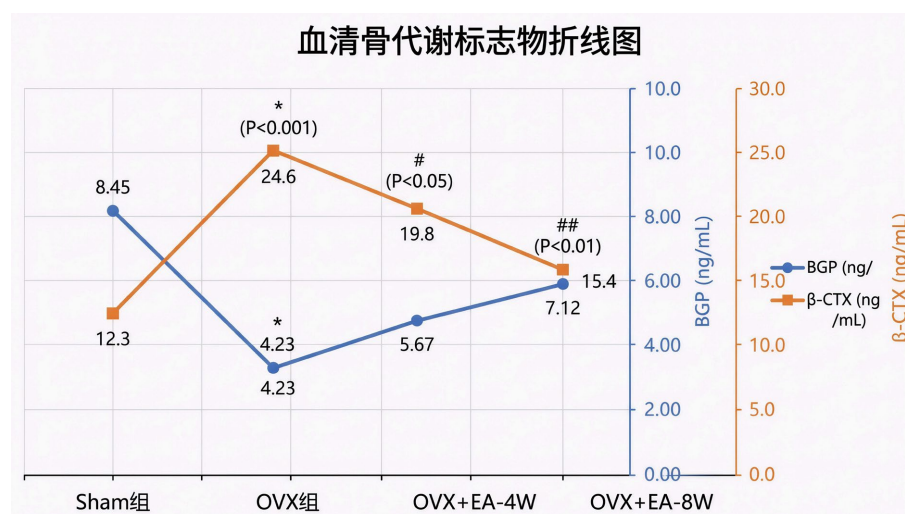


Figure 3. Serum bone metabolic markers (n = 20/group, mean $\pm$ standard deviation); *P < 0.001 vs Sham group; #P < 0.05, ##P < 0.01 vs OVX group
图 3. 血清骨代谢标志物(n = 20/组, $\bar{x} \pm s$); *P < 0.001 vs Sham 组; #P < 0.05, ##P < 0.01 vs OVX 组

3.2. 双固针法对肠道菌群结构的系统性重塑

Alpha 与 Beta 多样性: OVX 组菌群 Chao1 和 Shannon 指数显著低于 Sham 组($P < 0.05$), 表明菌群丰富度和多样性下降。双固针治疗组, 尤其是 OVX + EA-8W 组, 指数显著回升($P < 0.05$)。PCoA 图显示, Sham 组和 OVX 组样本点明显分离, 而双固针治疗组样本点位于两者之间, 且 OVX + EA-8W 组更靠近 Sham 组, Adonis 分析表明组间差异显著($R^2 = 0.18, P = 0.001$) (表 4, 图 4)。

菌群功能预测: PICRUST2 预测显示, OVX 组与氨基酸代谢、能量代谢相关的通路发生改变, 而双固针法干预后, 这些通路部分恢复。

Table 4. Gut microbiota alpha diversity indices; * $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OVX group
表 4. 肠道菌群 Alpha 多样性指数; * $P < 0.001$ vs Sham 组; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OVX 组

分组	Chao1 指数	Shannon 指数	Simpson 指数	Pielou 均匀度
Sham	485.6 ± 35.2	5.82 ± 0.45	0.924 ± 0.032	0.856 ± 0.028
OVX	356.8 ± 28.4*	4.23 ± 0.35*	0.782 ± 0.026*	0.723 ± 0.024*
OVX + EA-4W	412.3 ± 31.6#	4.89 ± 0.38#	0.845 ± 0.029#	0.789 ± 0.026#
OVX + EA-8W	452.7 ± 34.1##	5.46 ± 0.42##	0.892 ± 0.031##	0.832 ± 0.027##

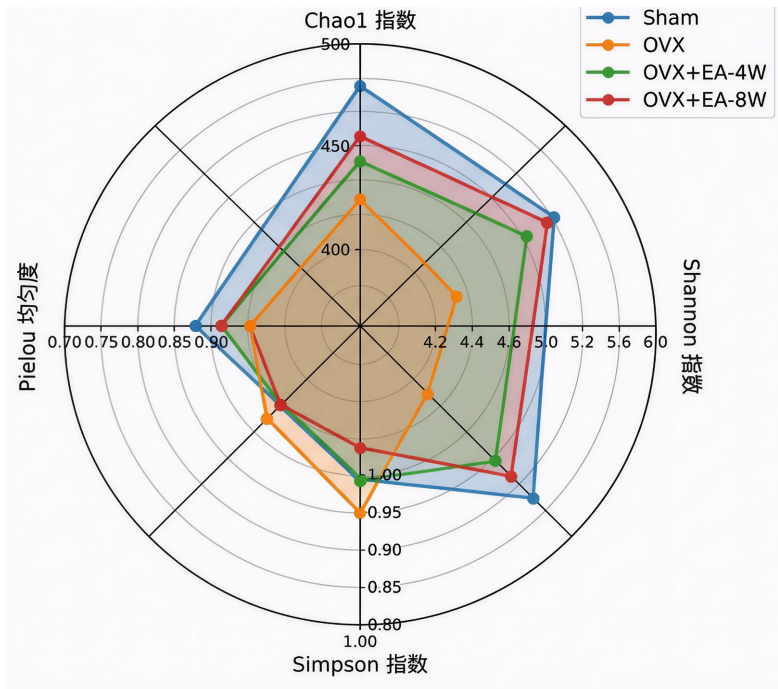


Figure 4. Gut microbiota alpha diversity indices radar chart; * $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OVX group
图 4. 肠道菌群 Alpha 多样性指数雷达图; * $P < 0.001$ vs Sham 组; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OVX 组

菌群组成在门和属水平的变化: 在门水平, OVX 组厚壁菌门(Firmicutes)相对丰度下降, 拟杆菌门(Bacteroidetes)上升, 导致 F/B 比值降低。双固针法回调了这一趋势。在属水平, LEfSe 分析发现, *Lactobacillus*、*Bacteroides*、*Akkermansia* 等在 Sham 组和双固针治疗组显著富集(LDA > 4.0); 而 *Escherichia-Shigella*、*Desulfovibrio* 等在 OVX 组显著富集。双固针法干预后, 有益菌丰度回升, 有害菌丰度受到抑制 (表 5, 图 5)。

Table 5. Major bacterial genera relative abundance (%; mean $\pm$ standard deviation); *P < 0.001 vs Sham group; #P < 0.05, ##P < 0.01 vs OVX group

表 5. 主要菌属相对丰度(%; $\bar{x} \pm s$); *P < 0.001 vs Sham 组; #P < 0.05, ##P < 0.01 vs OVX 组

分组	<i>Lactobacillus</i>	<i>Bacteroides</i>	<i>Akkermansia</i>	<i>Escherichia-Shigella</i>
Sham	18.5 $\pm$ 1.6	12.3 $\pm$ 1.1	8.7 $\pm$ 0.8	2.1 $\pm$ 0.3
OVX	6.8 $\pm$ 0.7*	5.4 $\pm$ 0.5*	3.2 $\pm$ 0.3*	15.6 $\pm$ 1.4*
OVX + EA-4W	10.3 $\pm$ 0.9#	7.9 $\pm$ 0.7#	5.1 $\pm$ 0.4#	9.8 $\pm$ 0.9#
OVX + EA-8W	15.2 $\pm$ 1.3##	10.6 $\pm$ 0.9##	7.3 $\pm$ 0.6##	4.5 $\pm$ 0.4##

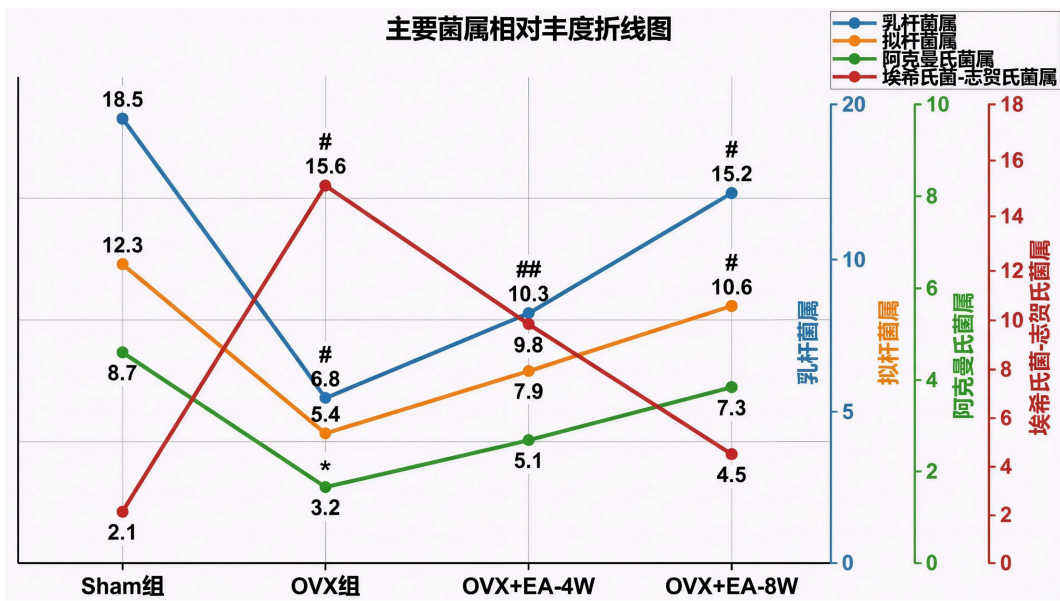


Figure 5. Major bacterial genera relative abundance (%; mean $\pm$ standard deviation); *P < 0.001 vs Sham group; #P < 0.05, ##P < 0.01 vs OVX group

图 5. 主要菌属相对丰度(%; $\bar{x} \pm s$); *P < 0.001 vs Sham 组; #P < 0.05, ##P < 0.01 vs OVX 组

3.3. 血浆代谢谱的扰动与双固针法的调节作用

代谢轮廓分析: OPLS-DA 得分图显示四组样本明显分离, 表明代谢谱存在显著差异。模型验证参数(R2Y, Q2)良好, 表明模型可靠。

差异代谢物鉴定: 共鉴定出 52 种在组间存在显著差异的代谢物。其中, 32 种在 OVX 组发生异常变化, 并在双固针干预后显著回调。这些代谢物主要包括: 溶血磷脂酰胆碱(LysoPC(16:0), LysoPC(18:0))、胆汁酸(甘氨酸胆酸 GCA)、氨基酸(色氨酸、苯丙氨酸)及其衍生物(表 6, 图 6)。

Table 6. Key differential metabolites concentration (mean $\pm$ standard deviation); *P < 0.001 vs Sham group; #P < 0.05, ##P < 0.01 vs OVX group

表 6. 关键差异代谢物浓度($\bar{x} \pm s$); *P < 0.001 vs Sham 组; #P < 0.05, ##P < 0.01 vs OVX 组

代谢物	Sham 组	OVX 组	OVX + EA-4W	OVX + EA-8W
LysoPC(16:0) (μ M)	45.6 $\pm$ 3.8	28.3 $\pm$ 2.4*	35.2 $\pm$ 2.9#	41.8 $\pm$ 3.5##
甘氨酸胆酸 GCA (μ M)	12.3 $\pm$ 1.1	6.5 $\pm$ 0.6*	8.7 $\pm$ 0.8#	10.9 $\pm$ 1.0##
色氨酸(μ M)	68.5 $\pm$ 5.4	42.3 $\pm$ 3.6*	53.7 $\pm$ 4.5#	62.8 $\pm$ 5.2##

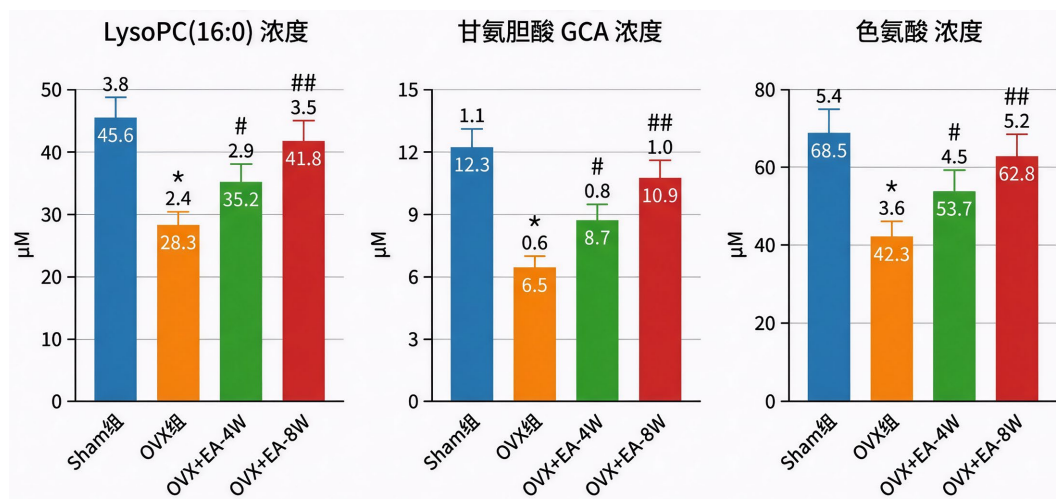


Figure 6. Key differential metabolites concentration (mean ± standard deviation); * $P < 0.001$ vs Sham group; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OVX group

图 6. 关键差异代谢物浓度; * $P < 0.001$ vs Sham 组; # $P < 0.05$, ## $P < 0.01$ vs OVX 组

3.4. 血清雌二醇水平的变化及其与多组学指标的相关性网络

血清雌二醇(E2)水平的变化及其与多组学指标的相关性分析结果如下。与假手术组(Sham, 35.6 ± 3.2 pg/mL)相比, 卵巢切除组(OVX)血清 E2 水平极显著降低至 8.9 ± 0.8 pg/mL ($P < 0.001$)。经双固针电针干预 4 周和 8 周后, E2 水平出现显著回升, 分别为 15.3 ± 1.3 pg/mL (OVX + EA-4W 组, $P < 0.05$)和 26.7 ± 2.4 pg/mL (OVX + EA-8W 组, $P < 0.01$)。

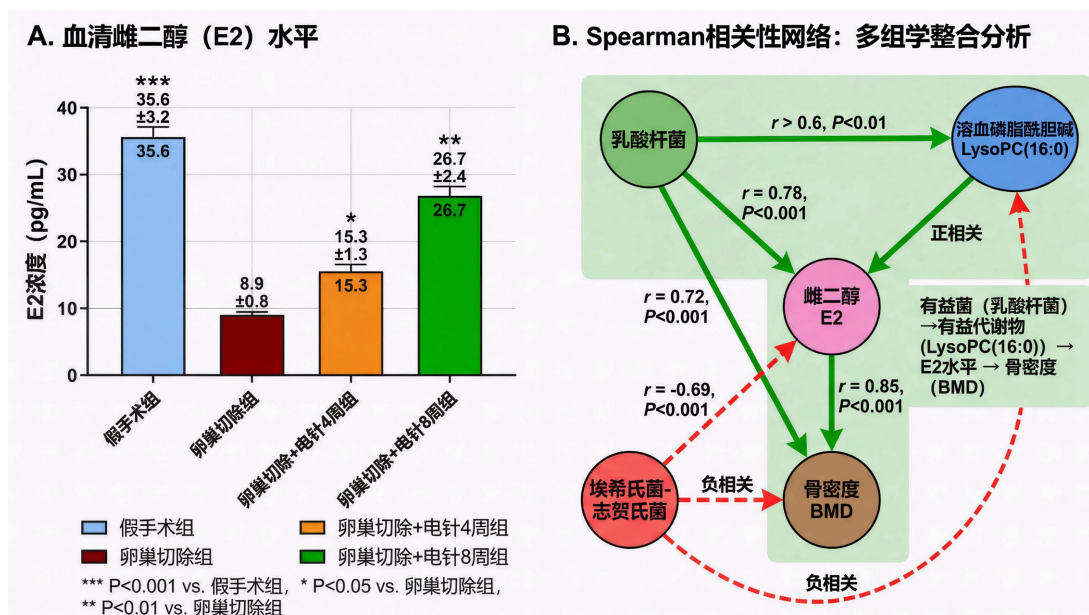


Figure 7. This figure reveals that serum estradiol (E2) levels are significantly decreased after ovariectomy (OVX), while electroacupuncture intervention can effectively increase E2 concentration. Correlation analysis further constructs a potential positive regulatory network: beneficial bacteria (*Lactobacillus*)→beneficial metabolites→E2 levels→bone mineral density (BMD)

图 7. 这张图揭示了卵巢切除(OVX)后血清雌二醇(E2)水平显著降低, 而电针干预能有效提升 E2 浓度。相关性分析进一步构建了一个“有益菌(乳酸杆菌)→有益代谢物→E2 水平→骨密度”的潜在正向调控网络

Spearman 相关性网络分析进一步揭示,乳酸杆菌(*Lactobacillus*)的丰度与溶血磷脂酰胆碱 LysoPC(16:0)水平、血清 E2 浓度以及腰椎骨密度(BMD)均呈显著正相关($r > 0.6$, $P < 0.01$),具体表现为:乳酸杆菌 vs E2: $r = 0.78$; 乳酸杆菌 vs BMD: $r = 0.72$; E2 vs BMD: $r = 0.85$ (均 $P < 0.001$)。相反,埃希氏菌-志贺氏菌(*Escherichia-Shigella*)的丰度与上述指标呈显著负相关(埃希氏菌-志贺氏菌 vs E2: $r = -0.69$, $P < 0.001$)。这些结果初步勾勒出一个“有益菌(乳酸杆菌)→有益代谢物(LysoPC(16:0))→E2 水平→骨密度(BMD)”的潜在正向调控网络(图 7)。

4. 讨论

4.1. 双固针法改善骨代谢：从宏观表型到微观机制

本研究证实了双固针法对 PMOP 的明确疗效。其改善骨微结构、抑制破骨细胞活性的效果,提示其可能作用于骨重建的基本多细胞单位(BMU) [8]。

4.2. 肠道菌群：双固针法作用的起点与枢纽

本研究最显著的发现之一是双固针法对肠道菌群的重塑作用。*Lactobacillus* 等益生菌的增殖可能通过产生 SCFAs, 抑制 NF- κ B 信号通路, 减少促炎因子和 RANKL 的表达, 从而间接抑制破骨细胞分化。嗜黏蛋白阿克曼菌的富集可能与改善肠道屏障功能、减少内毒素血症有关。这为“肠-骨轴”理论提供了直接的实验证据。

4.3. 雌二醇水平回升：多因素协同作用的结果

E2 水平的回升是解释骨保护效应的关键。这可能源于：① 针刺穴位对下丘脑-垂体-卵巢轴残余功能的微弱调节。② 更重要的, 可能是肠道菌群改善的结果。菌群结构正常化后, 其 β -葡萄糖醛酸苷酶活性恢复, 增加了活性 E2 的肠肝循环; 同时, 菌群代谢产生的 SCFAs 等物质也可能影响肝脏对 E2 的代谢清除。

4.4. 构建“穴位-脑-肠-骨”整合作用模型

基于上述发现, 我们提出一个更完善的作用模型: 双固针法刺激关元、足三里穴, 信号通过躯体感觉神经上传至中枢神经系统(尤其是下丘脑), 进而通过自主神经系统(如迷走神经)和下丘脑-垂体-肾上腺轴, 调节肠道运动、分泌及免疫状态, 创造有利于益生菌生长的肠道微环境。恢复的菌群通过其代谢产物(SCFAs, 次级胆汁酸等)和免疫调节作用, 改善系统炎症, 并促进活性 E2 的生成。最终, E2 与代谢物协同作用, 通过经典基因组和非基因组途径, 调控 Wnt/ β -catenin 和 RANKL/OPG 等核心信号通路, 促进骨形成, 抑制骨吸收。

本研究为相关性研究, 确切的因果关系需通过粪菌移植(FMT)实验验证。未来可利用基因敲除鼠或受体拮抗剂, 深入探究特定代谢物(如 LysoPCs)的具体受体和下游信号。此外, 将研究对象扩展至绝经后女性, 开展临床转化研究, 是未来的重要方向。

5. 结论

本研究通过整合多组学技术, 系统揭示了双固针法防治 PMOP 的复杂作用网络。核心结论是: 双固针法不仅直接改善骨代谢, 更重要的是, 它可能通过启动“脑-肠对话”, 重塑肠道菌群稳态, 进而调控宿主全身代谢谱(特别是脂质和胆汁酸代谢), 并促进内源性雌二醇的生物利用度, 最终通过多靶点协同作用, 逆转雌激素缺乏导致的骨丢失。这不仅从现代科学层面深刻阐释了“双固一通”针法“补肾健脾”中医理论的科学内涵, 也为开发以“肠-骨轴”为靶点的骨质疏松防治新策略提供了重要的理论依据和实验支撑。

伦理声明

本研究获得新疆医科大学实验动物伦理委员会批准(审批号: IACUC-20220721-29)。

基金项目

本项目获得新疆维吾尔自治区自然科学基金面上项目资助(2022D01C586)。

参考文献

- [1] Rachner, T.D., Khosla, S. and Hofbauer, L.C. (2011) Osteoporosis: Now and the Future. *The Lancet*, **377**, 1276-1287. [https://doi.org/10.1016/s0140-6736\(10\)62349-5](https://doi.org/10.1016/s0140-6736(10)62349-5)
- [2] Morin, S.N., Leslie, W.D. and Schousboe, J.T. (2025) Osteoporosis: A Review. *JAMA*, **334**, Article 894. <https://doi.org/10.1001/jama.2025.6003>
- [3] Chi, G., Qiu, L., Ma, J., Wu, W. and Zhang, Y. (2023) The Association of Osteoprotegerin and Rankl with Osteoporosis: A Systematic Review with Meta-Analysis. *Journal of Orthopaedic Surgery and Research*, **18**, Article No. 839. <https://doi.org/10.1186/s13018-023-04179-5>
- [4] Zhang, C., Li, H., Li, J., Hu, J., Yang, K. and Tao, L. (2023) Oxidative Stress: A Common Pathological State in a High-Risk Population for Osteoporosis. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, **163**, Article 114834. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2023.114834>
- [5] Zhang, Y., Song, P., Wang, S., Liu, H., Shi, Z. and Su, J. (2024) Diets Intervene Osteoporosis via Gut-Bone Axis. *Gut Microbes*, **16**, Article 2295432. <https://doi.org/10.1080/19490976.2023.2295432>
- [6] He, Y. and Chen, Y. (2022) The Potential Mechanism of the Microbiota-Gut-Bone Axis in Osteoporosis: A Review. *Osteoporosis International*, **33**, 2495-2506. <https://doi.org/10.1007/s00198-022-06557-x>
- [7] Zhang, Y., Cao, M., Li, Y., Dai, G., Lu, P., Zhang, M., *et al.* (2023) The Regulative Effect and Repercussion of Probiotics and Prebiotics on Osteoporosis: Involvement of Brain-Gut-Bone Axis. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, **63**, 7510-7528. <https://doi.org/10.1080/10408398.2022.2047005>
- [8] 周晓莉, 刘品莉, 姜青松, 等. “双固一通”针法治疗绝经后骨质疏松症的临床研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2008, 14(3): 204-207.