

· 论 著 ·

基于 16S rRNA 序列分析糖皮质激素诱导大鼠骨质疏松模型肠道菌群的变化

董万涛¹ 宋敏^{2*} 巩彦龙² 董平² 田杰祥¹ 张亚彬² 文浩楠²

1. 甘肃中医药大学附属医院, 甘肃 兰州 730020

2. 甘肃中医药大学, 甘肃 兰州 730000

中图分类号: R363 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2020) 09-1291-07

摘要: **目的** 通过 16S rRNA 序列分析探讨糖皮质激素诱导大鼠骨质疏松模型肠道菌群结构及功能的变化。**方法** 将 20 只 Wistar 大鼠, 随机分为模型组(K 组, 10 只) 正常组(MY 组, 10 只), 模型组采用糖皮质激素诱导法复制骨质疏松模型, 正常组正常饲养, 8 周后每组随机选取 4 只收集大鼠粪便, 提取并检测粪菌总 DNA, 检测样品质量, 肠道菌群 OTU 分析、香农指数曲线分析、NMDS 分析, 16S rRNA 扩增子测序, 对标本中的细菌 16S rRNA V3-V4 进行定性分析, 16S rRNA 功能基因预测分析。**结果** 经样品质量控制及甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测提示样品质量合格; K 组与 MY 组共同含有 575 个 OTU 数据, K 组和 MY 组分别有 12 个不同的 OUT 数据; 当香农指数为 3~4 时, 每个样本抽取的测序条数发现的物种趋于饱和; NMDS 分析显示 stress=0.05<0.2; 与正常组比较, 模型组大鼠肠道菌群的多样性增加; 功能主要以细胞运动、能量生产和转换、防御机制、转录、碳水化合物转运和代谢为主。**结论** 糖皮质激素诱导大鼠骨质疏松模型肠道菌群在多样性、结构及功能方面发生了较大变化, 肠道微生态细胞运动、能量生产和转换、防御、转录、碳水化合物转运和代谢等功能失衡可能为糖皮质激素诱发骨质疏松症的发病机制之一。

关键词: 糖皮质激素; 骨质疏松; 肠道菌群; 结构及功能; 16S rRNA

The intestinal microflora changes in rat osteoporosis model induced by glucocorticoid based on 16S rDNA sequence analysis

DONG Wantao¹, SONG Min^{2*}, GONG Yanlong², DONG Ping², TIAN Jiexiang¹, ZHANG Yabin², WEN Haonan²

1. The Affiliated Hospital of Gansu University of TCM, Lanzhou 730020, China

2. Gansu University of TCM, Lanzhou 730000, China

* Corresponding author: SONG Min, Email: sm@gszy.edu.cn

Abstract: **Objective** To investigate the changes in the structure and function of intestinal flora in glucocorticoid induced osteoporosis model in rats with 16S rRNA sequence analysis. **Methods** Twenty Wistar rats were randomly divided into the model group (group K, $n = 10$) and normal group (group MY, $n = 10$). Rats in model group were induced to osteoporosis with glucocorticoid. Rats in normal group were raised normally. After 8 weeks, 4 rats in each group was randomly selected and their feces was collected. The total DNA and sample quality of the feces, the OTU analysis of the intestinal flora, the Shannon diversity index curve analysis, the NMDS analysis, and the 16S rRNA amplicon sequencing were performed. Qualitative analysis of bacteria in the specimen and predictive analysis of 16SrRNA functional genes were conducted. **Results** Sample quality control and formaldehyde denaturing agarose gel electrophoresis showed that the sample quality was qualified. K group and MY group contained 575 common OUT data. There were 12 different OTU data in group K and group MY. When the Shannon diversity index was 3-4, the number of sequencing strips extracted from each sample tended to be saturated. NMDS analysis showed that the stress was 0.05 and less than 0.2. Compared with that in the normal group, the diversity of the intestinal flora in the model group increased. The function was mainly based on cell motion, energy production and conversion, defense mechanisms, transcription, carbohydrate transport, and

基金项目: 国家自然科学基金项目(81960878); 甘肃省创新基地和人才计划-自然科学基金计划项目(17JR5RA056, 1506RJZA048); 甘肃省中医药防治慢性疾病重点实验室开放基金项目(GSMBKY2015-07)

* 通信作者: 宋敏, Email: sm@gszy.edu.cn

metabolism. **Conclusion** The intestinal microflora in glucocorticoids-induced osteoporosis rats have changed greatly in diversity, structure, and function. The imbalance of intestinal microecological cell movement, energy production and conversion, defense, transcription, carbohydrate transport, and metabolism may be one of the pathogenesis of osteoporosis induced by glucocorticoids.

Key words: glucocorticoid; osteoporosis; intestinal flora; structure and function; 16S rRNA

糖皮质激素诱导性骨质疏松症 (glucocorticoid-induced osteoporosis, GIOP) 是全身性糖皮质激素 (glucocorticoid, GC) 治疗的常见并发症, 是继发性骨质疏松症最常见的原因, GC 的临床应用所导致的骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 与骨骼脆弱性和骨折风险增加有关^[1]。临床中糖皮质激素被广泛应用于免疫性疾病、肾病、过敏性疾病、器官移植等疾病的治疗中, 其中骨质疏松症的发生率高达 41.4%^[2], 还有更多的患者有潜在的 OP 发生的危险^[3]。GC 导致骨质疏松症的作用机制复杂, 研究^[4]显示, GC 是骨形成和成骨细胞生成的负调节因子, 其对骨形成的抗合成作用与 1 型原胶原 N-端前肽 (procollagen type 1 N-terminal propeptide, PINP) 的快速抑制有关, 并且其可直接通过抗成骨细胞合成和促进成骨细胞代谢而导致骨质疏松的发生^[5], 目前对 GIOP 的病理机制主要从成骨细胞、破骨细胞、内分泌系统、钙磷代谢及骨代谢相关因子等途径展开, 而从肠道菌群方面研究 GIOP 发生的机制尚未见报道, 本研究从肠道菌群方面探讨了 GIOP 的发病机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物

购自于甘肃中医药大学 SPF 级实验室 [SCXK (甘) 2011-0001] 的 Wistar 大鼠 (雌雄各半) 20 只体重 (180±20) g, 在 SPF 级实验室环境下 (室温 20~24℃、相对湿度 40%~65%、每天光照明暗各半) 每五只饲养在同一笼中, 每 2 天更换一次垫料, 给予充足的水和食物。

1.2 试验药物、试剂与仪器

水合氯醛 250 g/瓶 (上海展云化工有限公司, 生产批号: 20151023); VnF 和 VnR (10 μmol/L) (上海英俊生物技术有限公司); dNTP Mix (10 mmol/L) (BioLabs); Phusion HF MM (M0 541 L) 和 Phusion (BioLabs); VAHTSTM DNA Clean (VAHTSTM); Min Elute © PCR Purification Kit (QIAGEN); 100 bp DNA Ladder Marker (Ta Ta Ra); Mobio 土壤微生物 DNA 强力提取试剂盒 Power Soil © DNA Isolation Kit。96well PCR 仪 (AB, 型号 9902); 24 孔离心机

(EPPENDORF, 型号 5424EQ766751)。

1.3 方法

1.3.1 动物分组及造模: 20 只大鼠适应性喂养 7 d 后, 随机分为正常组 (K 组, 10 只)、模型组 (MY 组, 10 只); 模型组按人鼠等效剂量给予醋酸地塞米松片 (成都第一制药有限公司, 规格 0.75 mg×100 片, 国药准字 H41021038, 生产批号 170001), 每日 0.5 mg/kg; 连续给药 8 周。正常组不做任何处理。

1.3.2 2 组大鼠的粪便收集及粪菌总 DNA 的提取与检测: 模型成功后, 两组随机抽取 4 只, 10% 水合氯醛腹腔注射麻醉并处死, 剖开腹腔后在回盲部行“V”形切口, 无菌镊子夹取内容物放入冻存管中, -80℃ 冰箱保存备用。8 个样品每个称取 0.3 g 提取每个样品粪便 DNA、经甲醛变性琼脂糖凝胶电泳检测提取的总 DNA 质量, 分光光度法测量 DNA 的纯度及浓度, -20℃ 冰箱保存备用。

1.3.3 16srRNA 扩增子测序: 以提取后样本的 DNA 为模板, 使用细菌 16S rRNA (V3+V4) 区域引物^[6]: 5'-ACTCCTACGG GAGGCAGCA-3', 5'-GGACTACHVGGGTWTCTAAT-3' 进行扩增及纯化。

1.3.4 肠道菌群物种注释及功能预测: 在物种注释的基础上, 选每组样本在门、纲、目、科、属、种 (Phylum、Class、Order、Family、Genus) 分类水平上的丰度柱形累加图; 根据物种注释结果, 选取每个样品或分组在各分类水平 (Phylum、Class、Order、Family、Genus、Species) 上最大丰度排名前 10 的 OTU, 生成相对丰度柱形累加图, 以观察各样品在不同分类水平上的丰度; 采用 PICRUSt (Phylogenetic Investigation of Communities by Reconstruction of Unobserved States) 工具通过 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) 代谢途径分析两组的差异途径, 通过 COG (Clusters of Orthologous Groups of Proteins) 分析蛋白功能分类^[7]。

1.4 统计学处理

对所得数据信息进行划分 OTU、香农指数分析、NMDS 分析。采用 SPSS 25.0 统计软件进行获得数据处理, 计量资料以均数±标准差 ($\bar{x} \pm s$) 进行表示, 组间比较采用单因素方差分析, $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结果

2.1 2组肠道菌群的 OTU 分析

正常组与模型组共同含有 575 个 OTU 数据,除共有的 OTU 之外正常组有 12 个不同的 OTU 数据,模型组有 12 个不同的 OTU 数据(图 1)。

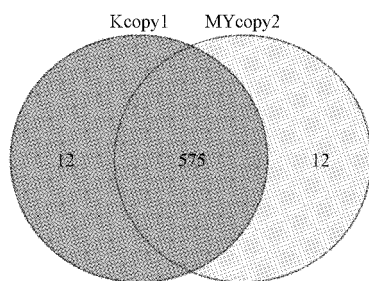


图 1 2组大鼠肠道菌群的 OTU 分布的维恩(Venn)图

Fig.1 Venn diagram of OTU distribution of intestinal microflora in two groups of rats

2.2 2组样本肠道菌群香农指数曲线

当香农指数为 3~4 时,各样本从随机抽取的测序条数发现的物种趋于饱和(图 2)。

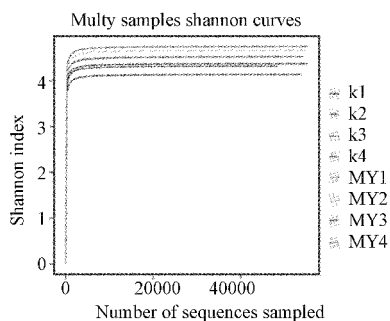


图 2 2组样本肠道菌群香农指数曲线

Fig.2 Shannon index curve of intestinal flora in two groups of samples

2.3 NMDS 分析

由图可见,组间样本距离较近组内差异性小,而各组距离较远,组间差异较大,并且 Stress = 0.05 < 0.2,故此分析较可靠(图 3)。

2.4 物种分布柱状图

如图 4 所示,图 A 为门水平(Phylum)、B 为纲水平(Class)、C 为目水平(Order)、D 为科水平(Family)、E 为属水平(Genus)、F 种水平(Species);模型组大鼠在菌群结构上发生了较大的改变,其中在门、纲、目水平螺旋菌(Spirochaetae)的相对丰度

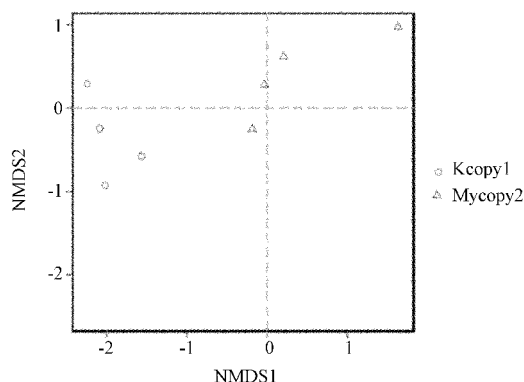


图 3 NMDS 分析图

注:图中三角形代表正常组各样本、圆圈代表模型组各样本,当 Stress<0.2 时,表明 NMDS 分析具有可靠性,在坐标图上两组中各样本间的距离越近说明该组样本间的相似性越高。

Fig.3 NMDS analysis chart

较正常组低,在纲、目、科水平丹毒丝菌(Erysipelotrichia)的相对丰度较正常组高,在门水平变形杆菌(Proteobacteria)、柔膜菌门(Tenericutes)的相对丰度较正常组高,在种、属水平毛螺科菌(Uncultured-bacterium-f-lachnospiraceae)的相对丰度低于正常组,在属水平疣微菌科 UCG-005(Ruminococcaceae-UCG-005)、普雷沃菌科 NK3B31群(Prevotellaceae-NK3B31-group)的相对丰度高于正常组,在种水平巴氏酵母种菌(Uncultured-bacterium-f-Lachnospiraceae)、巴氏杆菌种菌(Uncultured-bacterium-g-prevotella)的相对丰度高于正常组、而巴氏-G-罗马尼亚梭菌-9(Uncultured-bacterium-g-Ruminiclostridium-9)的相对丰度低于正常组,差异具有统计学意义($P < 0.05$)。

2.5 16S 功能基因预测分析

2.5.1 KEGG 功能预测:通过 KEGG 代谢途径的差异分析可见,模型组差异较明显的途径有外源性物质的降解和代谢(xenobiotics biodegradation and metabolism),细胞运动(cell motility),碳水化合物代谢(carbohydrate metabolism),运输和分解代谢(transport and catabolism),信号传输(signal transduction),膜转运(membrane transport),神经系统(nervous system),神经退行性疾病(neurodegenerative disease)(图 5)。

2.5.2 COG 功能预测:通过 COG 功能预测分析显示,模型组差异较明显的功能有细胞运动(cell motility)、能量生产预测和转换(energy production prediction and conversion)、防御机制(defense mechanisms)、未知功能(function unknown)、转录

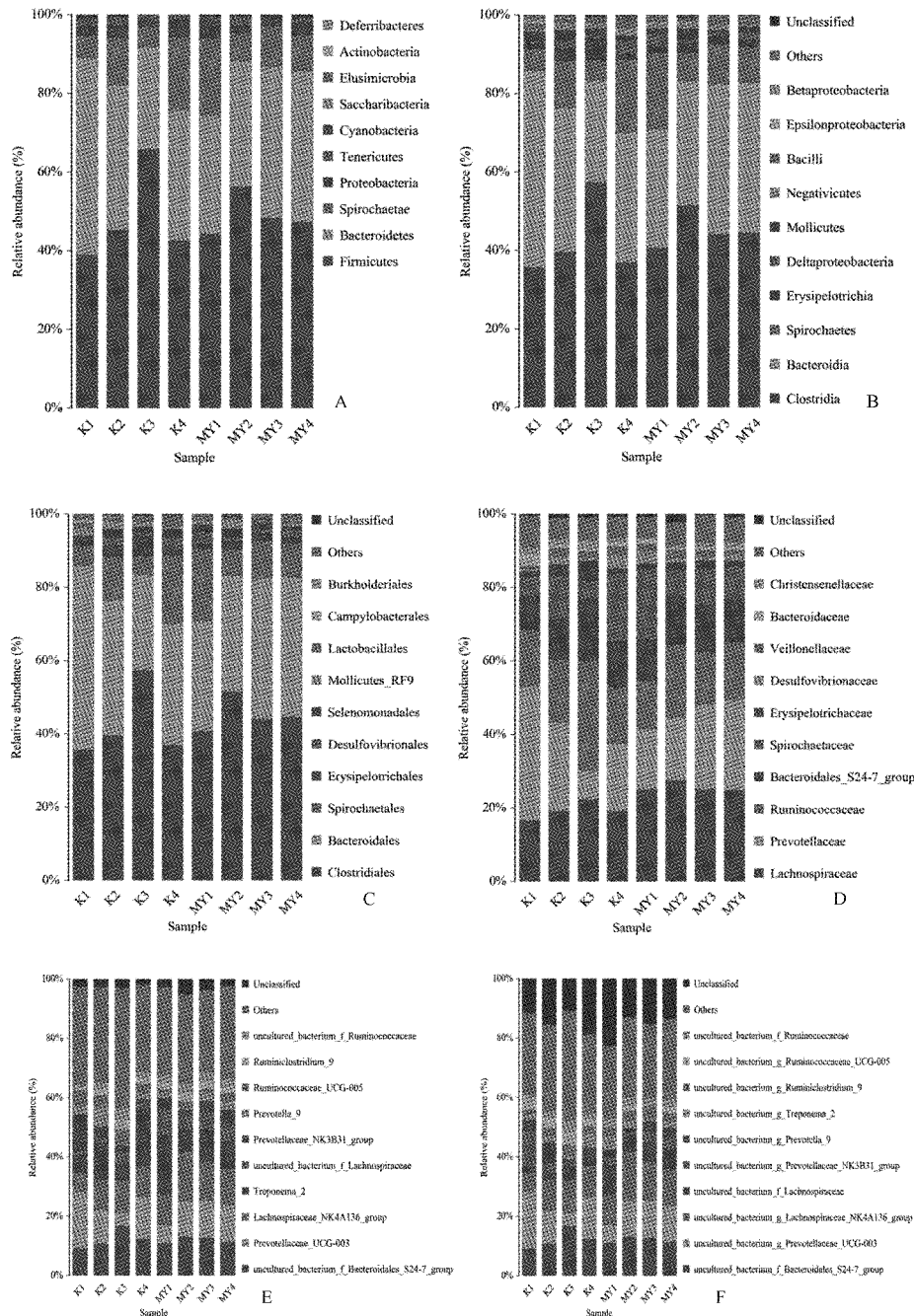


图4 各个分类水平上各组物种的分布图

Fig.4 Percentile bar chart of species distribution at each taxonomic level

(transcription)、碳水化合物转运和代谢(carbohydrate transport and metabolism)(图6)。

3 讨论

内源性糖皮质激素连接内分泌和免疫系统,并通过基因组和快速非基因组途径确保组织修复、再生和病原体清除过程中的炎症反应而发挥功能,由于GC对免疫细胞、组织和器官有很强的免疫抑制、

抗炎和抗过敏作用,尽管GC易导致OP等严重的并发症,但由于其在临床上的有效性和经济实用性,其仍然广泛应用于临床^[8-9]。研究发现,GC受体分布在成骨细胞上,该受体是GC作用于骨结构的重要部位,GC的过度表达会使骨表面变厚而损害骨组织矿化,高于生理浓度的GC可抑制成骨细胞分化和增殖,加速成骨细胞凋亡,并导致骨形成延迟^[10]。肠道细菌在人体健康中起着重要作用,共生肠道细

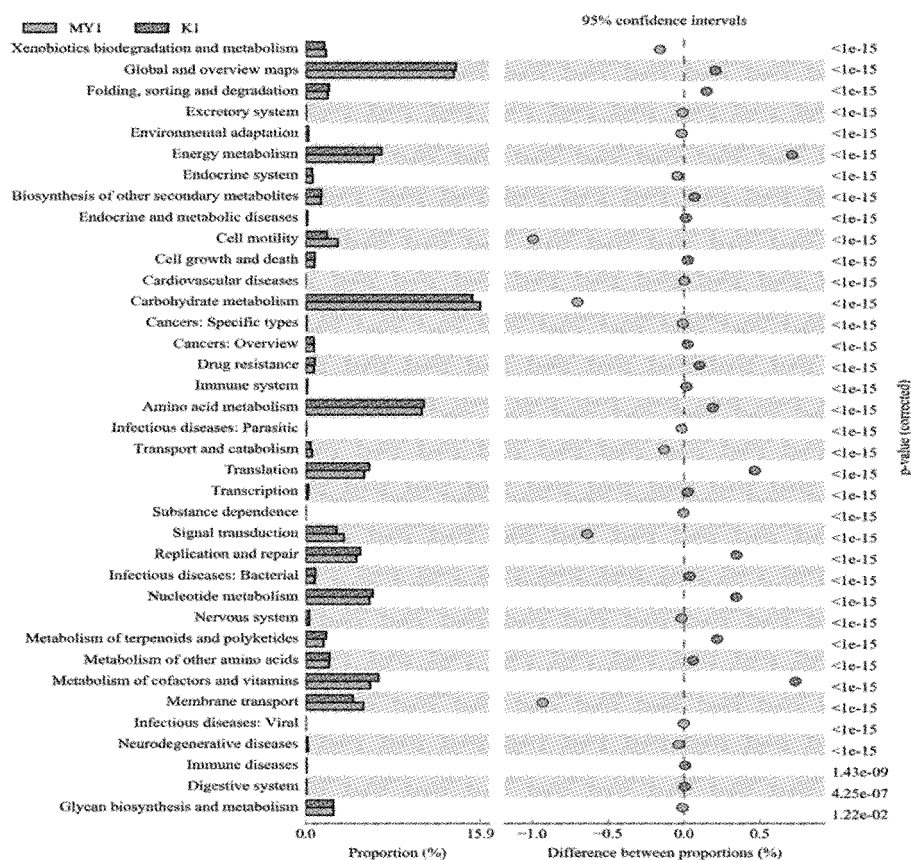


图 5 KEGG 功能预测图

Fig.5 KEGG function prediction chart

注:图 5 为不同功能在两个样品或者两组样品中的丰度比例,中间所示为 95% 置信度区间内功能丰度的差异比例,最右边的值为 P 值。

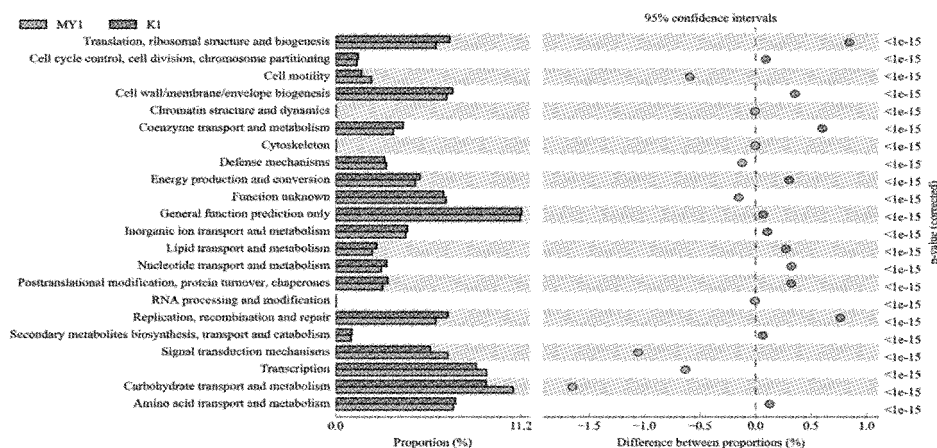


图 6 COG 功能预测图

Fig.6 COG function prediction chart

注:通过比较图 5 与图 6,发现每组有 37 个 KEGG 与 22 个 COG 功能预测分析的结果,且这些预测的结果在两组中差异都具有统计学意义 ($P < 0.05$)。

菌对宿主有多种有益作用,包括促进食物消化、产生必需营养素、增强肠道屏障完整性、完善宿主免疫系统和其他功能,GC 能降低宿主的免疫力,导致肠道

微生物群落组成及功能等实质性变化,增加对病原体的敏感性^[11],而肠道菌群通过对钙磷吸收、能量代谢、分解脂肪酸等复杂的途径参与骨代谢的调

节^[12],但是 GC 作用与肠道菌群对骨代谢产生影响进而导致 OP 的发病机制尚未见报道。

为了进一步探讨 GIOP 与肠道微生物之间的关系,本研究采用 16SrRNA 技术,分析了地塞米松喂养建立骨质疏松模型大鼠肠道菌群的结构变化及功能变化,从肠道微生态角度对 GIOP 的发生机制做以探讨。分析结果显示,模型组大鼠在菌群结构个水平上发生了较大的变化,其中在门、纲、目水平 Spirochaetae 的相对丰度较正常组低,在纲、目、科水平 Erysipelotrichia 的相对丰度较正常组高,在门水平 Proteobacteria、Tenericutes 的相对丰度较正常组高,在种、属水平 Uncultured-bacterium-f-lachnospiraceae 的相对丰度低于正常组,在属水平 Ruminococcaceae-UCG-005、Prevotellaceae-NK3B31-group 的相对丰度高于正常组,在种水平 Uncultured-bacterium-f-Lachnospiraceae、Uncultured-bacterium-g-prevotella 的相对丰度高于正常组、Uncultured-bacterium-g-Ruminiclostridium-9 的相对丰度低于正常组,差异具有统计学意义($P<0.05$)。长期服用 GC 后在肠道菌群中拟杆菌和普雷沃菌处于高水平,这与它们摄取高蛋白及碳水化合物的代谢途径相关^[13],而本研究中普雷沃菌与正常组比较处于高水平,并且其代谢途径和功能都涉及到碳水化合物。长期服用 GC 可引起体内脂质积聚、肠道菌群结构改变和结肠黏液分泌减少,这些生理变化的机制可能包括昼夜节律紊乱和糖皮质激素受体(glucocorticoid receptor, GR)表达失调。Wu 等^[15]研究显示,长期外源性 GC 导致下丘脑-垂体-肾上腺轴(hypothalamic-pituitary-adrenal axis, HPA axis)的长期激活状态是内源性 GC 的分泌发生改变,这与肠道微生物群变化有关,GC 治疗导致了高丰度水平的变形杆菌、酵母菌、螺旋菌,这与“促炎症及免疫”相关;另一方面,GC 导致肠道菌群的变化使肠组织中黏液分泌水平发生变化,进而上调结肠抗菌肽相关基因(如 TLR-2 和 defa8)的转录水平,GC 诱导的炎症与免疫反应是肠道微生物群结构变化的直接因素^[15],而 OP 的发生与肠道免疫系统密切相关^[16]。

模型组差异较明显的 KEGG 代谢途径有 xenobiotics biodegradation and metabolism、cell motility、carbohydrate metabolism、transport and catabolism、signal transduction、membrane transport、nervous system、neurodegenerative disease 等,差异较明显的 COG 功能有 cell motility、energy production prediction and conversion、defense mechanisms、

function unknown、transcription、carbohydrate transport and metabolism 等。研究显示,碳水化合物参与的能量转运与代谢在 GIOP 的发生过程中具有重要的作用,而骨钙素的能量转运与代谢调节作用参与了在这一过程中^[17];在 GIOP 的病理过程中神经-内分泌-免疫网络发挥了重要作用,神经系统可通过多种骨代谢相关信号通路(如 OPG/RANK/RANKL 信号通路)P 物质、神经肽 Y 促进骨髓间充质干细胞增殖及向成骨细胞的分化和矿化以促进成骨作用、通过 β_2 肾上腺素受体,参与交感神经系统对骨重建的调控作用,以抑制骨量的丢失^[18];而免疫细胞本身作为破骨细胞的前体参与骨代谢^[19];在本研究中 16S rRNA 分析得出 GIOP 模型大鼠肠道菌群的功能及通路主要有能量转运与代谢、神经系统及免疫功能等,与上述研究相符合。

综上,本研究成功复制糖皮质激素诱导大鼠骨质疏松模型,应用 16S rRNA 技术,分析了模型组和正常组大鼠肠道菌群结构及功能的变化情况,对从肠道菌群方面阐明 GIOP 发病、病理变化机制和进一步深入研究及指导治疗具有重要意义。随着肠道菌群对机体健康机制的逐步阐明,从肠道菌群方面预防和治疗疾病的思路及方法受到越来越多学者的关注与重视,这为进一步从“肠-骨轴”方面研究防治 OP 提供了便利。但是,肠道菌群本身是一个非常复杂的器官,其对机体的调节更是全方位、多途实现的,所以其对 GIOP 复杂的调节及防治机制仍需要进一步深入研究。

【参 考 文 献】

- [1] Geng Q, Heng K, Li J, et al. A soluble bone morphogenetic protein type 1A receptor fusion protein treatment prevents glucocorticoid-induced bone loss in mice[J]. Am J Transl Res, 2019, 11(7): 4232-4247.
- [2] Zayn A, Almokhtar M, Wikvall K, et al. Effects of glucocorticoids on vitamin D3-metabolizing 24-hydroxylase (CYP24A1) in Saos-2 cells and primary human osteoblasts[J]. Mol Cell Endocrinol, 2019, 496: 110525.
- [3] Rooney M, Bishop N, Davidson J, et al. The prevention and treatment of glucocorticoid-induced osteopaenia in juvenile rheumatic disease: A randomised double-blind controlled trial[J]. EClinical Medicine, 2019, 12: 79-87.
- [4] Fenton CG, Webster JM, Martin CS, et al. Therapeutic glucocorticoids prevent bone loss but drive muscle wasting when administered in chronic polyarthritis[J]. Arthritis Res Ther, 2019, 21(1): 182.

(下转第 1339 页)

- sarcopenia, malnutrition and activities of daily living in patients with vertebral compression fractures: a comparison based on admission and discharge parameters evaluating these conditions [J]. *J Physic Ther Sci*, 2018, 30(12):1401-1407.
- [12] Morandi A, Onder G, Fodri L, et al. The association between the probability of sarcopenia and functional outcomes in older patients undergoing in-hospital rehabilitation [J]. *J Am Med Direct Associat*, 2015;6(11):951-956.
- [13] Koca I, Savas E, Ozturk ZA, et al. The evaluation in terms of sarcopenia of patients with fibromyalgia syndrome.[J]. *Wien Klin Wochenschrift*, 2016, 128(21):1-6.
- [14] Rudolphi E. Prospective study of self-reported pain, radiographic osteoarthritis, sarcopenia progression, and falls risk in community-dwelling older adults.[J]. *Arthritis Care Res*, 2012, 64(1):30-37.
- [15] Tague SE, Clarke GL, Winter MK, et al. Vitamin D deficiency promotes skeletal muscle hypersensitivity and sensory hyperinnervation (Article) [J]. *J Neurosci*, 2011, 31(39):13728-13738.
- [16] Li Y, Liu J, Liu ZZ, et al. Inflammation in low back pain may be detected from the peripheral blood: suggestions for biomarker [J]. *Biosci Rep*, 2016, 36(4): e00361.
- [17] Sakuma K, Aoi W, Yamaguchi A. Current understanding of sarcopenia; possible candidates modulating muscle mass [J]. *Pflügers Arch*, 2015, 467(2):213-229.
- [18] El Hajj C, Fares S, Chardigny JM, et al. Vitamin D supplementation and muscle strength in pre-sarcopenic elderly Lebanese people: a randomized controlled trial [J]. *Arch Osteoporos*, 2018, 14(1):4.
- [19] Takeuchi Izumi, Yoshimura Yoshihiro, Shimazu Sayuri, et al. Effects of branched-chain amino acids and vitamin D supplementation on physical function, muscle mass and strength, and nutritional status in sarcopenic older adults undergoing hospital-based rehabilitation: A multicenter randomized controlled trial [J]. *Geriatr Gerontol Int*, 2019, 19(1):12-17.
- [20] Matthieu H, Olivier P, Daniel T. Vitamin D: A review on its effects on muscle strength, the risk of fall, and frailty [J]. *Bio Med Res Int*, 2015, 2015:1-11.
- [21] Ingrid Heuch, Ivar Heuch, Knut Hagen, et al. Is there an association between vitamin D status and risk of chronic low back pain? A nested case-control analysis in the Nord-Trøndelag Health Study [J]. *BMJ Open*, 2017, 7(11):e018521.
- [22] Ghai B, Bansal D, Kapil G, et al. High prevalence of hypovitaminosis D in Indian chronic low back patients [J]. *Pain Physic*, 2015, 18(5):853-862.
- [23] Katarzyna PD, Wojciech S, Katarzyna BK, et al. Vitamin D deficiency is associated with muscle atrophy and reduced mitochondrial function in patients with chronic low back pain [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2019, 2019: 6835341.

(收稿日期: 2019-10-14;修回日期: 2020-04-30)

(上接第 1296 页)

- [5] Schakman O, Kalista S, Barbe C, et al. Glucocorticoid-induced skeletal muscle atrophy [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2013, 45(10):2163-2172.
- [6] Fang S, Xiong X, Su Y, et al. 16S rRNA gene-based association study identified microbial taxa associated with pork intramuscular fat content in feces and cecum lumen [J]. *BMC Microbiol*, 2017, 17(1):162-171.
- [7] 巩彦龙, 董万涛, 宋敏, 等. 基于 16S rDNA 序列分析骨质疏松大鼠肠道菌群结构变化及固本增骨方的调控机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2019, 34(5):2040-2045.
- [8] Strehl C, Ehlers L, Gaber T, et al. Glucocorticoids-all-rounders tackling the versatile players of the immune system [J]. *Front Immunol*, 2019, 10:1744.
- [9] Wang J, Li H. Treatment for Eastern Asians with glucocorticoids-induced osteoporosis, bisphosphonates alone, vitamin D alone or the combination: a Meta-analysis [J]. *Curr Pharm Des*, 2019, doi:10.2174.
- [10] Lucato P, Trevisan C, Stubbs B, et al. Nephrolithiasis, bone mineral density, osteoporosis, and fractures: a systematic review and comparative metaanalysis [J]. *Osteoporos Int*, 2016, 27(11):1-10.
- [11] Qi XZ, Tu X, Zha JW, et al. Immunosuppression-induced alterations in fish gut microbiota may increase the susceptibility to pathogens [J]. *Fish Shellfish Immunol*, 2019, 88(5):540-545.
- [12] Zhang J, Lu Y, Wang Y, et al. The impact of the intestinal microbiome on bone health [J]. *Intractable Rare Dis Res*, 2018, 7(3):148-155.
- [13] Moeller AH, Li Y, Ngole EM, et al. Rapid changes in the gut microbiome during human evolution [J]. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2014, 111(46):16431-16435.
- [14] Forsythe P, Kunze WA, Bienenstock J. On communication between gut microbes and the brain [J]. *Curr Opin Gastroenterol*, 2012, 28(6):557-562.
- [15] 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 Sci*, 2018, 192(1):173-182.
- [16] 董万涛, 巩彦龙, 宋敏, 等. 肠道免疫功能与骨代谢的研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2017, 23(8):1090-1093.
- [17] 盛彤, 郭翔宇, 王新祥, 等. 骨钙素的能量代谢调节作用 [J]. *中华内分泌代谢杂志*, 2014, 30(10):862-864.
- [18] Liu XY, Liu HY. Interrelation between the hypothalamic arcuate nucleus and the bone variation of osteoporosis in rats [J]. *Sheng Li Xue Bao*, 2013, 65(5):525-532.
- [19] 董万涛, 吕泽斌, 宋敏, 等. 从脾肾论治骨质疏松症的神经-内分泌-免疫网络平衡机制 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(11):1416-1419.

(收稿日期: 2019-11-12;修回日期: 2019-12-29)