

引用:李远志,时宗庭,迟敬轩,李志文,黄江海,方志远,童昊坤.基于多组学探讨肾阳虚证绝经后骨质疏松症的生物标志物及潜在治疗中药[J].中医药导报,2025,31(6):115-123.

基于多组学探讨肾阳虚证绝经后骨质疏松症的生物标志物及潜在治疗中药

李远志¹,时宗庭²,迟敬轩¹,李志文¹,黄江海³,方志远³,童昊坤¹

(1.北京中医药大学第二临床医学院,北京 100078;

2.北京中医药大学第三临床医学院,北京 100029;

3.北京中医药大学东方医院,北京 100078)

[摘要] 目的:通过多组学探索肾阳虚证绝经后骨质疏松症(PMOP)的生物标志物及发病机制,并寻找其潜在的中药治疗策略。方法:通过高通量基因表达数据库(GEO)检索肾阳虚证PMOP相关芯片,利用R语言limma包分析得到肾阳虚证PMOP特有差异基因。利用Cytoscape3.10.2中MCODE插件分析肾阳虚证PMOP特有差异基因,得到肾阳虚证PMOP核心基因群,利用验证基因集评估该基因群中的seed基因对PMOP的诊断效能。使用IRnet算法对肾阳虚证PMOP中的通路重要性以及通路相互作用重要性进行分析。对肾阳虚证PMOP核心基因群进行单细胞基因集分析。利用北京中医药大学第三附属医院住院部病历系统信息以及全国健康和营养调查(NHANES)数据库对肾阳虚证PMOP患者生化相关指标进行7种机器学习分析。利用肾阳虚证PMOP核心基因群进一步预测潜在治疗中药。结果:共获得341个肾阳虚证PMOP特有差异基因及1个肾阳虚证PMOP核心基因群,其seed基因为HOXD3,在验证数据集PMOP组中表达显著上升,具有较高的诊断效能。单细胞基因集分析显示,肾阳虚证PMOP核心基因群可能在骨细胞中高表达。同时,发现RNA降解通路、药物代谢-其他酶通路、鞘脂代谢与半胱氨酸和蛋氨酸代谢、溶酶体与糖胺聚糖降解的相互作用在肾阳虚证PMOP的病理过程中起着重要作用。机器学习分析结果显示,肌酸激酶(CK)与乳酸脱氢酶(LDH)对肾阳虚证PMOP具有较高的诊断效能。此外,还预测得到了36种可能用于治疗肾阳虚证PMOP的中药。结论:肾阳虚证PMOP可能是由于骨细胞参与骨骼和肌肉之间的机械耦联,而使骨生成不足而导致,而预测得到的36种中药对于治疗肾阳虚证PMOP具有重要的参考价值,为中医药干预此类疾病的机制研究提供了一定的方向。

[关键词] 绝经后骨质疏松症;多组学分析;肾阳虚证;中药预测

[中图分类号] R285.6 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2025)06-0115-09

DOI:10.13862/j.cn43-1446/r.2025.06.020

Multi-omics Exploration of Biomarkers and Potential Traditional Chinese Medicines for Postmenopausal Osteoporosis with Kidney-Yang Deficiency Syndrome

LI Yuanzhi¹, SHI Zongting², CHI Jingxuan¹, LI Zhiwen¹, HUANG Jianghai³, FANG Zhiyuan³, TONG Haokun¹

(1. Second Clinical Medical College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China;

2. Third Clinical Medical College, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China;

3. Dongfang Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100078, China)

[Abstract] Objective: To identify biomarkers and elucidate the underlying mechanisms of postmenopausal osteoporosis (PMOP) with kidney-yang deficiency syndrome (KYDS) through multi-omics approaches, and to explore potential traditional Chinese medicine (TCM) therapeutic strategies. Methods: PMOP-related microarray datasets with KYDS were retrieved from the Gene Expression Omnibus (GEO) database. Differential gene expression analysis was performed using the limma package in R. The MCODE plugin in Cytoscape 3.10.2 was employed

通信作者:方志远,男,主任医师,研究方向为脊柱退行性疾病及四肢关节运动损伤的微创及开放手术治疗

to identify core gene clusters specific to KYDS-PMOP, with diagnostic efficacy of seed genes evaluated using validation datasets. The IRnet algorithm analyzed pathway significance and interactions. Single-cell gene set enrichment analysis was conducted for the core gene cluster. Biochemical markers from hospital records and NHANES database were analyzed using seven machine learning methods. Potential TCM treatments were predicted based on the core gene cluster. Results: A total of 341 differentially expressed genes specific to KYDS-PMOP and one core gene cluster were identified, with HOXD3 as the seed gene demonstrating significantly upregulated expression in the PMOP validation dataset and exhibiting high diagnostic efficacy. Single-cell gene set enrichment analysis revealed predominant expression of the KYDS-PMOP core gene cluster in osteocytes. Pathway analysis identified crucial involvement of RNA degradation, drug metabolism-enzyme pathways, sphingolipid metabolism, cysteine and methionine metabolism, as well as lysosomal-glycosaminoglycan degradation interactions in KYDS-PMOP pathogenesis. Machine learning analysis indicated that creatine kinase(CK) and lactate dehydrogenase(LDH) possess high diagnostic value for KYDS-PMOP. Additionally, 36 potential traditional Chinese medicine(TCM) candidates were predicted for KYDS-PMOP treatment. Conclusion: KYDS-PMOP pathogenesis may involve insufficient osteogenesis due to impaired mechanical coupling between bone and muscle mediated by osteocytes. The predicted 36 TCMs provide valuable therapeutic references and offer important directions for investigating the mechanisms of TCM interventions in this condition.

[Keywords] postmenopausal osteoporosis; multi-omics analysis; kidney-yang deficiency syndrome; traditional Chinese medicine prediction

绝经后骨质疏松症(postmenopausal osteoporosis, PMOP)是一种全身性骨骼疾病,其特征是骨量减少、骨组织微结构恶化、骨脆性增加以及绝经后雌激素缺乏导致骨折的易感性^[1]。目前,PMOP的诊断通常取决于骨密度(bone mineral density, BMD),但BMD的变化相对较慢,并不能精确和及时地诊断早期PMOP^[2]。目前,缺乏用于早期PMOP诊断的生物标志物。流行病学研究强调,PMOP增加了约50%的女性发生脆性骨折的可能性^[3]。这些骨折会对患者产生严重的致残影响,给全球医疗系统构成巨大的经济负担^[4],因此PMOP的早期治疗已是全球医疗界亟待解决的问题。

中医因其令人满意的临床疗效和安全性被公认为治疗PMOP的一种潜力巨大的替代疗法^[5]。在中医理论中,PMOP的发病机制被归因于绝经后妇女的肾虚^[6],其中肾阳虚为绝经后骨质疏松症患者最为常见的证型之一。探究肾阳虚证PMOP的相关病理过程及分子机制,可为早期防治PMOP提供一定的科学依据,具有重要的社会意义^[7]。

本研究对肾阳虚证PMOP进行全面系统的生物信息学分析,旨在揭示肾阳虚证PMOP的生物标志物及病理变化过程,并预测潜在靶向中药,为肾阳虚证PMOP的机制、诊断及治疗提供新的见解。

1 资 料

1.1 数据来源 以“postmenopausal osteoporosis”为关键词检索高通量基因表达数据库(gene expression omnibus, GEO)并确定芯片号为GSE56116(该数据集包含4例肾阴虚证PMOP患者、3例肾阳虚证PMOP患者、3例非肾虚证PMOP患者、3名健康绝经后妇女)及GSE230665(该数据集包含12例PMOP患

者和3名健康绝经后妇女);从GEO数据库中下载GSE147287数据集(该数据集包含1例骨关节炎患者及1例骨质疏松症患者),以上数据用于进行转录组学层面的分析。

收集2022年8月至2024年9月北京中医药大学第三附属医院住院部病历系统中肾阳虚证PMOP患者的相关生化信息,利用2017—2020年全国健康和营养调查(national health and nutrition examination survey, NHANES)数据库收集绝经后健康女性的相关生化数据,以上数据用于进行代谢组学层面的分析。

1.2 诊断标准

1.2.1 西医诊断标准 参考《围绝经期和绝经后妇女骨质疏松防治专家共识》^[8]或《骨质疏松性椎体压缩性骨折的治疗指南》^[9]拟定。

1.2.2 中医诊断标准 参考《骨质疏松症中西医结合诊疗专家共识》^[10]拟定,满足肾阳虚证辨证标准。

1.3 纳入标准 (1)符合上述诊断标准;(2)年龄≥40岁的绝经期女性;(3)临床资料完整,不影响统计分析;(4)患者的经治医师为副主任医师及以上职称。

1.4 排除标准 (1)合并肝、肾及造血系统等严重原发性疾病患者;(2)合并严重精神疾病者;(3)类风湿关节炎、糖尿病、甲状腺功能亢进引起的继发性骨质疏松症和严重心脑血管疾病患者。

1.5 NHANES数据处理 在NHANES数据库中,2017—2020年总样本人数为15 560名,排除男性7 721名,再排除已绝经且绝经年龄<40岁者或绝经年龄异常者6 195名,以及相关生化数据信息不全者891名,再排除骨密度信息不全者155名,最终

筛选出598名参与者进行分析。

T分数(T-score)是在骨密度测量中用来表示骨密度与年轻成年人平均骨密度相比的标准差数。它是一个相对值,用于评估个人的骨密度是否低于正常水平^[1]。T分数的计算公式为:(个体骨密度-同龄人群平均骨密度)/同龄人群骨密度的标准差。根据世界卫生组织的定义,T分数的范围通常在-1到+1之间。T分数的具体划分如下:T分数≥-1:骨密度正常;-1<T分数<-2.5:骨密度降低,称为骨量减少;T分数≤-2.5:骨密度严重降低,称为骨质疏松症^[2]。在获取问卷中的骨密度值后,通过公式计算T分数^[3],以明确诊断。在本研究中,骨量减少及骨质疏松患者被归于骨质疏松组,骨密度正常患者被归于非骨质疏松组。

2 方 法

2.1 筛选肾阳虚证PMOP核心基因群 利用R语言中limma包分析GSE56116数据集,将3名健康绝经后妇女外周血样本作为对照组,分别将4例肾阴虚证PMOP患者外周血样本、3例肾阳虚证PMOP患者外周血样本、3例非肾虚证PMOP患者外周血样本作为实验组,结合校正后P值(adj.P.vaule)和差异倍数(foldchange,FC)进行筛选,将差异表达基因(DEGs)的筛选条件设置为adj.P.vaule<0.05,|lgFC|>0.5,筛选出DEGs,将上述差异分析的结果进行韦恩分析,得到肾阳虚证PMOP特有差异基因。将肾阳虚证PMOP特有差异基因导入到蛋白质互作网络分析数据平台(String)(<https://cn.string-db.org/>)构建PPI网络模型,选择蛋白种类为“Homo sapiens”,隐藏掉与其他节点无交互作用的节点后得到PPI网络。为明确靶点间的相互作用关系以及核心靶点,将该PPI网络导入Cytoscape3.10.2中,并利用MCODE插件挖掘相关功能模块^[4],得到肾阳虚证PMOP核心基因群。

2.2 验证肾阳虚证PMOP诊断标志物 将GSE230665数据集作为验证数据集,将数据集中12例PMOP患者外周血样本作为实验组,3名健康绝经后女性外周血样本作为对照组,以P<0.05为差异有统计学意义,通过该数据集验证肾阳虚证PMOP核心基因群中的seed基因在两组间的表达差异^[5]。随后,利用R语言中pROC包建立受试者工作曲线(receiver operating characteristic,ROC),计算ROC曲线下面积(area under the curve,AUC)值,评估seed基因对PMOP的诊断效能^[6],一般认为当AUC大于0.7时,具有较高的诊断价值^[7]。

2.3 信号通路表达分析 IRnet算法是一种深度学习框架,与现有方法相比,它不预先选择任何生物标志物,而是输入由患者的整个基因组转录组组成的表达矩阵,使模型能够自主学习各种标记的重要性^[8]。从京都基因和基因组百科全书数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes,KEGG)^[9]中提取通路信息,包括参与每个通路和通路相互作用的基因,利用IRnet算法对肾阳虚证PMOP中的通路重要性以及通路相互作用重要性进行分析。

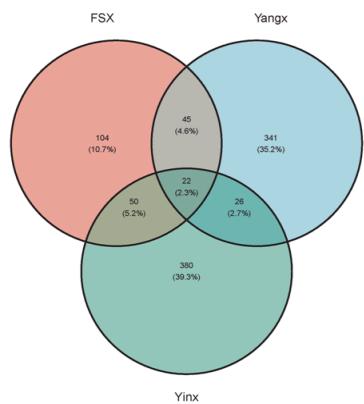
2.4 单细胞基因集评分 使用R语言中Seurat包有效读取GSE147287数据集中骨质疏松患者单细胞RNA数据^[20],进行初步数据质控,通过设置每个单细胞中检测到的基因表达量阈值在2 000~25 000,每个单细胞中检测到的不同基因的数量设定为500~5 000,并对线粒体基因比例>15%的细胞进行去除,并选择前20个主成分作为后续研究的基础,以获得可靠稳健的分析结果。为了实现单细胞聚类的二维平面可视化,应用2种降维方法(“t-SNE”和“UMAP”)^[21],有效地提升数据可视化的直观性,能更好地总结顶部主成分。根据cellmarker数据库^[22],对细胞簇手动进行详细的注释和可视化处理。将肾阳虚证PMOP核心基因作为基因集,对该基因集进行单细胞基因集评分,分析该基因集在各个细胞簇之间的活性差异。

2.5 基于临床生化肾阳虚证PMOP生物标志物分析 将北京中医药大学第三附属医院中肾阳虚证PMOP患者设置为实验组,将NHANES数据库中筛选出的绝经后非骨质疏松参与者作为对照组,利用R语言对总胆固醇(total cholesterol,TC)、甘油三酯(triglycerides,TG)、高密度脂蛋白(high density lipoprotein,HDL)、低密度脂蛋白(low-density lipoprotein,LDL)、肌酸激酶(creatine kinase,CK)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase,LDH)这6项生化指标分别采用决策树(decision tree)、梯度提升机(gradient boosting machine)、广义线性模型(generalized linear model,GLM)、K最近邻(K-nearest neighbor,KNN)分类算法、神经网络(neural network,NNET)、随机森林(random forest,RF)、极度梯度提升(extreme gradient boosting,XGboost)进行重要性分析,训练集比率为0.7,各模型通过ROC曲线及AUC值进行评价。

2.6 肾阳虚证PMOP潜在治疗中药分析 将肾阳虚证PMOP核心基因群依次输入HERB数据库(<http://herb.ac.cn/>)^[23],以P<0.05为筛选条件,检索其靶向药物。通过查阅《中华本草》、《中药大辞典》及《中华人民共和国药典》筛选出相关中药,并对其性味归经绘制雷达图进行可视化分析。

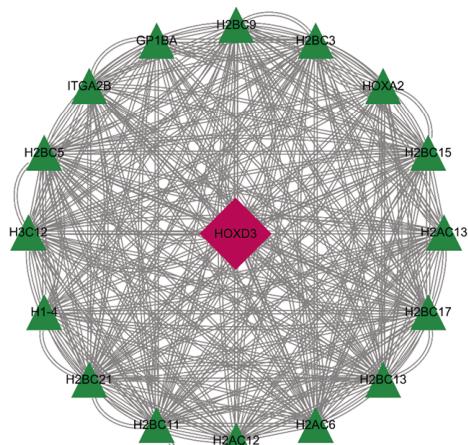
3 结 果

3.1 筛选肾阳虚证PMOP核心基因群 将3名健康绝经后妇女外周血样本作为对照组,分别将4例肾阴虚证PMOP患者外周血样本、3例肾阳虚证PMOP患者外周血样本、3例非肾虚证PMOP患者外周血样本作为实验组,通过R语言中limma包对GSE56116数据集数据进行预处理,进行数据标准化。结果表明,肾阳虚证PMOP患者与健康绝经后妇女的差异基因有434个,肾阴虚证PMOP患者与健康绝经后妇女的差异基因有478个,非肾虚证PMOP患者与健康绝经后妇女的差异基因有221个。经过韦恩分析后,得到341个肾阳虚证PMOP特有差异基因。(见图1)将肾阳虚证PMOP特有差异基因输入String平台,得到PPI网络,并将本次PPI网络分析结果导入到Cytoscape3.10.2中,利用MCODE插件,筛选出1个肾阳虚证PMOP特有差异基因的核心亚群,seed基因为HOXD3。(见图2)



注:FSX代表非肾虚证PMOP, Yangx代表肾阳虚证PMOP, Yinx代表肾阴虚证PMOP。

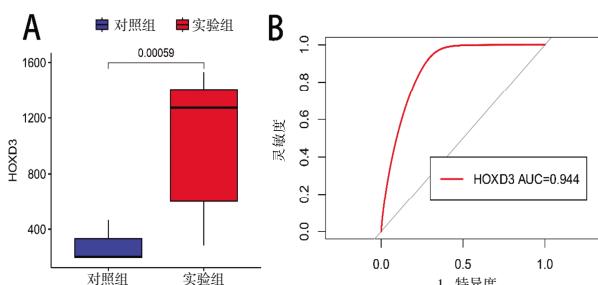
图 1 韦恩图



注：红色靶点为seed基因。

图 2 MCODE 结果

3.2 验证肾阳虚证PMOP诊断标志物 将GSE230665作为验证数据集对seed基因进行验证,结果显示:与对照组比较,HOXD3在实验组中表达显著上升($P<0.05$)(图3A)。同时,ROC曲线显示,HOXD3在验证数据集中对区分PMOP患者与健康对照者具有较高的诊断效能(AUC>0.9)(图3B),这进一步说明了筛选出的诊断标志物具有良好的可靠性。



注:A 箱式图结果;B 曲线结果。

图 3 HOXD3 验证结果

3.3 信号通路表达分析结果 通过IRnet算法对肾阳虚证PMOP中的通路重要性以及通路相互作用重要性进行分析,结果表明在肾阳虚证PMOP中, RNA降解(RNA degradation)和药物代谢-其他酶通路(Drug metabolism-other enzymes)与

其他通路相比,表现出了较高的重要性(见图4);鞘脂代谢(Sphingolipid metabolism)与半胱氨酸和蛋氨酸代谢(Cysteine and methionine metabolism)以及溶酶体(Lysosomes)与糖胺聚糖降解(Glycosaminoglycan degradation)的相互作用表现出较高的重要性。(见图5)

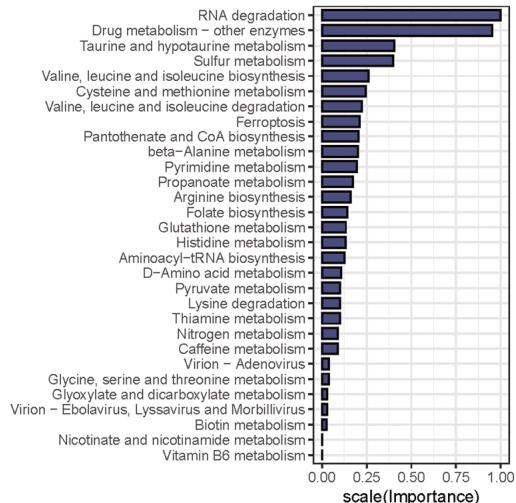


图 4 通路重要性分析结果

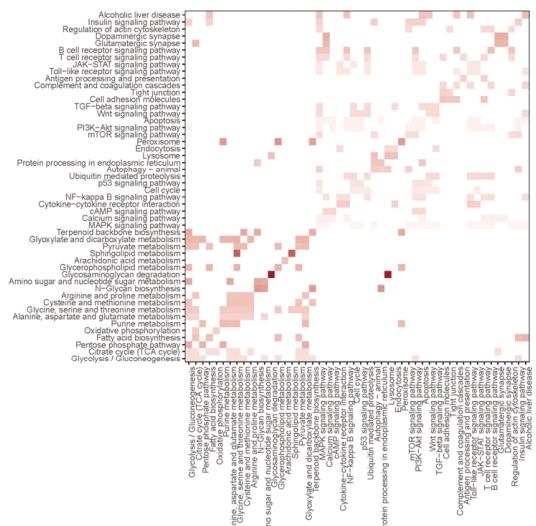
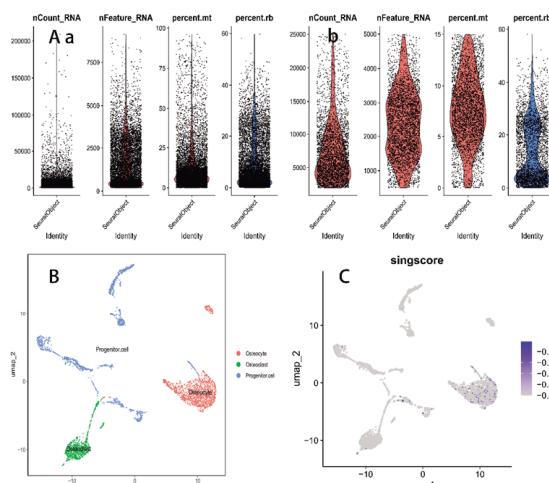


图 5 通路相互作用重要性分析结果

3.4 单细胞测序数据分析 对骨质疏松症患者的单细胞数据进行严格的质量控制,去除可能检测到的双细胞,确保单细胞数据的准确性,获得3 868个质量合格的单细胞。这些细胞共表达20 435个基因。(见图6A)选择前9个主成分用于后续分析,旨在最大程度上纳入细胞异质性,减少单细胞测序技术带来的噪音。为进一步降低单细胞测序数据的维度,使用“UMAP”算法对3 868个细胞进行聚类,最终分为5个不同的细胞簇。根据cellmarker数据库,对这5个细胞簇进行主要细胞类型的注释,包括骨祖细胞(progenitor cell)、破骨细胞(osteoclast)、骨细胞(osteocyte)。(见图6B)使用“singscore”算法对肾阳虚证PMOP核心基因群进行单细胞基因集评分^[24],观察肾阳虚证PMOP核心基因群在各个细胞簇中的表达差异和分布情况。结果表明,肾阳虚证PMOP核心基因群在骨细胞中活性较为显著。(见图6C)



注:Aa为质控前单细胞数据,Ab为质控后单细胞数据,B为手动注释结果,C为单细胞基因集评分结果。

图6 单细胞分析结果

3.5 基于临床生化肾阳虚证PMOP生物标志物分析 2022年8月至2024年9月北京中医药大学第三附属医院住院部病历系统中共筛选出49名肾阳虚证PMOP患者。利用NHANES数据库筛选出的598名参与者中,有219名绝经后非骨质疏松参与者,将49名肾阳虚证PMOP患者纳入实验组,将219名绝经后非骨质疏松参与者纳入对照组,对6种生化指标分别采用7种机器学习方法。结果显示,CK与LDH在7种机器学习模型中均表现出较高的重要性。(见图7)而CK在实验组患者中普遍降低,LDH在实验组患者中普遍升高。(见图8)该7种机器学习模型的ROC曲线结果显示,所有ROC曲线的AUC值均大于0.7,表明该7种机器学习模型对肾阳虚证PMOP都具有良好的诊断效能。(见图9)

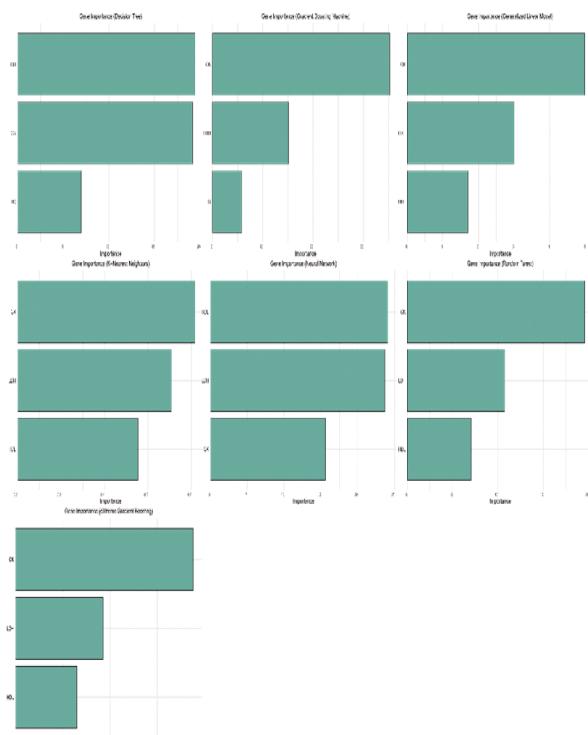
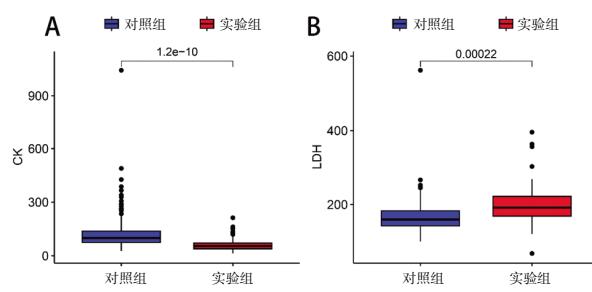


图7 7种机器学习算法重要度排序



注:A.CK箱式图;B.LDH箱式图。

图8 CK箱式图和LDH箱式图结果

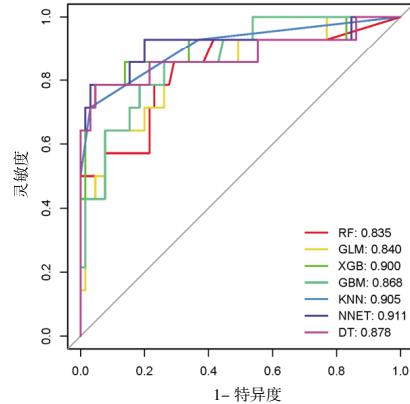


图9 7种机器学习算法ROC曲线结果

3.6 肾阳虚证PMOP潜在治疗中药分析 利用HERB数据库依次检索17个核心基因,H2BC17、H2BC3、H2BC9暂无相关药物数据,其余14个核心基因均能检索到相关靶向药物,通过《中华本草》《中药大辞典》《中华人民共和国药典》筛选整理得到靶向中药36味。(见表1)对药物进行性味归经总结,并绘制雷达图进行可视化。(见图10~11)

中药性味雷达图

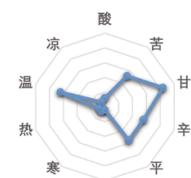


图10 潜在治疗中药性味总结

中药归经雷达图

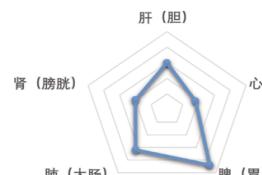


图11 潜在治疗中药归经总结

4 讨 论

PMOP与绝经后卵巢雌激素分泌减少密切相关,可导致患者功能障碍、生存质量下降和死亡率升高^[23]。雌激素能促进破骨细胞凋亡并抑制其形成,并可诱导间充质干细胞的成骨分化。因此,绝经后雌激素水平的下降可能导致骨骼代谢紊

表1 36味靶向中药

靶点	药物	性味	归经	功效
GP1BA	桂柳	甘,辛,平	肺、胃、心经	疏风,解表,透疹,解毒
	党参	甘,平	脾、肺经	补中益气,健脾益肺
	鸡子黄	甘,平	心、肾经	滋阴润燥,养血息风
	使君子	甘,温	脾、胃经	杀虫消积
	黑皮根	甘,平	脾、胃、肾经	健脾益胃,补肾固精
	芦荟	苦,寒	肝、胃、大肠经	清肝热,通便
	紫菀	辛、苦,温	肺经	清热解毒,止痢,止痒
	女贞子	苦,甘,平	肝、肾经	补肝肾,强腰膝
	红花	辛,温	心、肝经	活血通经,散瘀止痛
	地黄	甘,微温	肝、肾经	滋阴补血,益精填髓
H1-4	一枝香	辛,凉	肺经	镇咳,化痰,平喘
	白前	辛,苦,微温	肺经	降气,消痰,止咳
H2AC6	车轴草	微甘,平	肺经	止咳,止喘,镇痉
	桂枝	辛、甘,温	心、肺、膀胱经	发汗解肌,温通经脉,助阳化气,平冲降气
	火麻仁	甘,平	脾、胃、大肠经	润肠通便
	酒	辛,甘,苦,温	心、肝、肺、胃经	通血脉,行药势
	麻根	苦,平		祛瘀,止血,利尿
H2AC12	大麻	辛,温	肺、心经	祛风通络,止痛止血
	白前	辛,苦,微温	肺经	降气,消痰,止咳
H2AC13	车轴草	微甘,平	肺经	止咳,止喘,镇痉
	酒	辛、甘,苦,温	心、肝、肺、胃经	通血脉,行药势
H2BC5	葡萄	甘,酸,平	肺、脾、肾经	补气血,强筋骨,利小便
	车轴草	微甘,平	肺经	止咳,止喘,镇痉
	虎杖	苦,平	肝、胆经	祛风,利湿,破瘀,通经
	酒	辛,甘,苦,温	心、肝、肺、胃经	通血脉,行药势
	棉花壳	辛,温	胃经	温胃降逆,化痰止咳
H2BC11	棉花籽	辛,热	肾、脾经	温肾,补虚,止血
	棉花	甘,温	心、肝经	止血
H2BC13	棉花壳	辛,温	胃经	温胃降逆,化痰止咳
	棉花籽	辛,热	肾、脾经	温肾,补虚,止血
H2BC15	棉花	甘,温	心、肝经	止血
	棉花根	甘,温	肺、脾、肝经	补虚,平喘,调经
H2BC21	棉花籽	辛,热	肾、脾经	温肾,补虚,止血
	棉花	甘,温	心、肝经	止血
H3C12	棉花根	甘,温	肺、脾、肝经	补虚,平喘,调经
	棉花籽	辛,热	肾、脾经	温肾,补虚,止血
HOXA2	车轴草	微甘,平	肺经	止咳,止喘,镇痉
	虎杖	苦,平	肝、胆经	祛风,利湿,破瘀,通经
HOXD3	酒	辛,甘,苦,温	心、肝、肺、胃经	通血脉,行药势
	棉花壳	辛,温	胃经	温胃降逆,化痰止咳
ITGA2B	棉花籽	辛,热	肾、脾经	温肾,补虚,止血
	葡萄	甘,酸,平	肺、脾、肾经	补气血,强筋骨,利小便
HOXA2	醋	酸,苦,温	肝、胃经	散瘀,止血,解毒,杀虫
	柴胡	苦,辛,性微寒	肝、胆经	解表退热,疏肝解郁,升举阳气
HOXD3	白果	甘,苦,涩,平	肺、肾经	敛肺气,定喘嗽,止带浊,缩小便
	茶	苦,甘,凉	心、肺、胃经	清头目,除烦渴,化痰,消食,利尿,解毒
HOXA2	毛杨梅	酸,甘,平	肺、胃经	生津止渴
	美洲金缕梅	甘,平	脾经	益气
ITGA2B	白果	甘,苦,涩,平	肺经	敛肺定喘,止带浊,缩小便
	茶	苦,甘,凉	心、肺、胃经	清头目,除烦渴,化痰,消食,利尿,解毒
HOXD3	川乌	辛,苦,热	心、肝、脾、肾经	祛风除湿,温经,散寒止痛
	党参	甘,平	脾、肺经	补中益气,健脾益肺
HOXA2	烟草	辛,温		消肿解毒,杀虫
	三七	甘,苦,温	肝、胃经	散瘀止血,消肿定痛
HOXD3	毛杨梅	酸,甘,平	肺、胃经	生津止渴
	威灵仙	辛,咸,温	膀胱经	祛风除湿,通络止痛
HOXA2	金缕梅	甘,平	脾经	益气
	婆罗子	甘,温	肝、胃经	理气宽中,和胃止痛

乱^[29],但确切的分子机制目前尚未被阐明。中医将PMOP归因于绝经后妇女的肾虚^[27]。本研究旨在通过生物信息学探索肾阳虚证PMOP的生物标志物及具体分子机制,积极探索其潜在的中药,为治疗PMOP提供新的参考。

本研究结果显示,HOXD3可作为肾阳虚证PMOP诊断标志物。HOXD3是HOXD基因家族的一部分,在发育过程中起重要作用,可以调节体内细胞增殖和分化^[29]。有研究^[29]表明,HOXD3是骨形态发生蛋白(bone morphogenetic protein,BMP)和转化生长因子-β(transforming growth factor-β,TGF-β)信号传导之间的新联系。BMP对于维持骨稳态至关重要,可诱导分化成骨细胞,从而形成新骨,对于治疗骨质疏松症有着至关重要的作用^[30]。TGF-β/BMP信号通路也被证明与雌激素的生成以及骨骼的重塑有着密切相关性^[31-32]。但目前关于HOXD3与PMOP之间联系的研究较少,后续可深入研究。在信号通路表达分析结果中,RNA降解通路和药物代谢-其他酶通路可能主要介导了肾阳虚证PMOP的病理过程,同时鞘脂代谢、半胱氨酸和蛋氨酸代谢以及溶酶体与糖胺聚糖降解的相互作用也扮演着比较关键的角色。单细胞测序数据分析结果提示,肾阳虚证PMOP核心基因群可能是通过骨细胞对肾阳虚证PMOP的病理过程产生影响。在骨重塑中,骨细胞负责感应机械应力并形成骨多细胞单位(BMU),BMU会修改骨骼结构以适应不断变化的机械需求^[33]。

肌肉与骨骼之间的联系,涵盖了机械与内分泌两个维度:在机械耦联方面,肌肉收缩产生的机械力,直接作用于骨骼,刺激骨骼的生长与重塑;在化学耦联方面,肌细胞分泌的肌因子、成骨细胞分泌的成骨因子,以及脂肪细胞分泌的脂肪因子,彼此交织形成化学信号网络,共同调节着骨骼的代谢与稳态^[33]。故本研究以生化指标中与脂肪因子和肌因子相关的6个指标作为研究对象,旨在揭示肾阳虚证PMOP代谢组学层面中的生物标志物和潜在机制。本研究结果表明,相较于其他证型,肾阳虚证PMOP患者体内,CK水平相对较低,LDH水平相对较高。这一发现提示,在临床诊断中,若PMOP患者出现CK水平降低,同时LDH水平升高的情况,那么该患者为肾阳虚证PMOP的可能性将显著增加。CK通常用作心肌梗死的标志物,它是血糖系统中的能量来源,与肌肉质量有关,其水平往往随着肌肉萎缩而降低^[34]。一项前瞻性队列研究显示,肌酸激酶与骨质疏松症表现出较强的相关性^[35]。LDH是氧化还原酶类的细胞内组成酶,能催化丙酮酸转化为乳酸,是厌氧代谢不可或缺的一部分^[36]。有研究^[36]发现,高LDH水平大概率会伴随着肌肉减少以及骨密度的降低。LDH与CK目前普遍被认为是肌肉损伤的标志物^[37],而LDH的升高与CK的降低都与肌肉减少有关。对于绝经后女性来说,由于雌激素水平的下降,肌肉的质量与力量会出现快速下滑^[38]。结合单细胞测序分析结果,其与肾阳虚证PMOP表现出强相关性的机制,可能与绝经后女性肌肉质量与力量减弱而导致骨骼和肌肉之间的机械耦联不足有关。

PMOP在中医理论中被归结于“骨痿”等范畴^[39]。肾阳虚证PMOP患者由于其肾中真阳虚乏,脾胃动力不足,无以化生精气,出现精亏髓少,骨体充养无源而枯槁无力^[40]。《脾胃论》提出“大抵脾胃虚弱……令人骨髓空虚,足不能履地,是阴气重

叠,此阴盛阳虚之证。”李东垣在论治类骨质疏松疾病时,极为注重脾胃阳气,其相关学术观点与诊疗思路,为中医论治此类病症奠定了坚实的理论根基。薛莎以脾肾阳虚理论为核心,构建起治疗PMOP的完整方案。经长期临床实践验证,该方案成效卓然,显著提升了患者的生活质量^[41]。《四圣心源》曰:“肌肉者,脾土之所生也,脾气盛则肌肉丰满而充实。”当脾胃气血旺盛,则肌肉丰满充实,说明了脾胃气血的盛衰与肌肉的关系^[42]。《黄帝内经》将女子衰老的第一个阶段总结为“阳明脉衰”,认为女子衰老时,其脾胃气血也将随之衰弱^[43]。基于生化相关指标分析的结果,可以认为肾阳虚证PMOP患者的肌肉质量与力量的降低,符合中医理论中肾阳虚证PMOP病理变化过程。潜在治疗中药分析结果提示,靶向中药大多药性偏温,药味偏甘,归入脾胃经,符合中医理论对肾阳虚证PMOP的治疗原则。以上结果皆证明了本文利用生物信息学筛选出的生物标志物具有一定的可靠性和准确性,可以为肾阳虚证PMOP患者的治疗提供参考。

综上所述,可以对肾阳虚证PMOP的成因与机制提出假设:(1)绝经后女性肾阳不足及脾胃气血的衰弱,会使其肌肉质量与力量快速降低。此时HODX3表达量提高,可能导致了骨细胞出现异常或接受到的机械应力不足,最终出现骨矿化严重受损、骨形态改变及新形成的骨骼中破骨细胞的数量异常等情况^[44],进而形成了肾阳虚证PMOP。(2)RNA降解通路和药物代谢-其他酶通路可能主要介导了肾阳虚证PMOP的病理过程,同时鞘脂代谢与半胱氨酸和蛋氨酸代谢以及溶酶体与糖胺聚糖降解的相互作用也可能发挥着比较重要的作用,但尚未有研究揭示以上通路在PMOP中的具体作用机制。此外,预测得到的36种中药,也为后续的临床治疗提供了新的方向。

本研究也存在一些不可避免的局限性:(1)数据集及样本数量有限,可能导致数据结果与真实病理机制的差异。(2)虽然模型成功鉴定肾阳虚证PMOP中的关键生物标志物以及重要通路,但具体调控机制尚未完全阐明。这意味着对肾阳虚证PMOP的发生、发展和预后的理解仍有限,深入研究这些调控机制将对制定肾阳虚证PMOP的未来治疗策略具有重要意义。

参考文献

- [1] LI J X, QIU Q, JIANG S D, et al. Efficacy and safety of odanacatib in the treatment of postmenopausal women with osteoporosis: A meta-analysis[J]. J Orthop Surg Res, 2024, 19(1):521.
- [2] FANG S Y, NI H N, ZHANG Q H, et al. Integrated single -cell and bulk RNA sequencing analysis reveal immune-related biomarkers in postmenopausal osteoporosis[J]. Heliyon, 2024, 10(18):e38022.
- [3] YANG Y L, ZHANG X H, YANG Y, et al. A two-pronged approach to inhibit ferroptosis of MSCs caused by the iron overload in postmenopausal osteoporosis and promote osseointegration of titanium implant[J]. Bioact Mater, 2024, 41:336-354.
- [4] GAO G, CUI J, XIE Y Y, et al. Effects of romosozumab

- combined with routine therapy on pain relief, disease progression and adverse reactions in patients with postmenopausal osteoporosis: A systematic review and meta-analysis[J]. *Front Med*, 2024, 11:1440948.
- [5] CHEN Y J, JIA L H, HAN T H, et al. Osteoporosis treatment: Current drugs and future developments [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15:1456796.
- [6] LI J, FU S F, YANG Y, et al. Clinical practice of traditional Chinese medicine for the treatment of postmenopausal osteoporosis: A literature review[J]. *Climacteric*, 2022, 25(6):562–569.
- [7] XIA H T, LIU J Y, YANG W L, et al. Integrated strategy of network pharmacological prediction and experimental validation elucidate possible mechanism of bu-Yang herbs in treating postmenopausal osteoporosis via ESR1[J]. *Front Pharmacol*, 2021, 12:654714.
- [8] 中国老年学和老年医学学会骨质疏松分会妇产科专家委员会与围绝经期骨质疏松防控培训部.围绝经期和绝经后妇女骨质疏松防治专家共识[J].中国临床医生杂志,2020, 48(8):903–908.
- [9] 印平,马远征,马迅,等.骨质疏松性椎体压缩性骨折的治疗指南[J].中国骨质疏松杂志,2015,21(6):643–648.
- [10] 赵东峰,唐德志.骨质疏松症中西医结合诊疗专家共识[J].世界中医药,2023,18(7):887–894.
- [11] REID I R, MCCLUNG M R. Osteopenia: A key target for fracture prevention[J]. *Lancet Diabetes Endocrinol*, 2024, 12(11):856–864.
- [12] SUBARAJAN P, ARCEO-MENDOZA R M, CAMACHO P M. Postmenopausal osteoporosis: A review of latest guidelines[J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2024, 53(4):497–512.
- [13] XUE S S, ZHANG Y Z, QIAO W J, et al. An updated reference for calculating bone mineral density T-scores[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2021, 106(7):e2613–e2621.
- [14] XU Z W, RASTEH A M, DONG A, et al. Identification of molecular targets of Hypericum perforatum in blood for major depressive disorder: A machine learning pharmacological study[J]. *Chin Med*, 2024, 19(1):141.
- [15] XIA Z, CHENG R, LIU Q, et al. Screening and validating genes associated with cuproptosis in systemic lupus erythematosus by expression profiling combined with machine learning[J]. *Biomol Biomed*, 2025, 25(4):965–975.
- [16] GUO H, HAN F, QU J R, et al. Scoring and validation of a simple model for predicting diabetic retinopathy in patients with type 2 diabetes based on a meta-analysis approach of 21 cohorts[J]. *Ann Med*, 2024, 56(1):2413920.
- [17] MANDREKAR J N. Receiver operating characteristic curve in diagnostic test assessment[J]. *J Thorac Oncol*, 2010, 5(9):1315–1316.
- [18] JIANG Y X, IMMADI M S, WANG D L, et al. IRnet: Immunotherapy response prediction using pathway knowledge-informed graph neural network[J]. *J Adv Res*, 2024;S2090–S1232.
- [19] ZHANG Y D, CHEN Y R, ZHANG W, et al. Assessing prospective molecular biomarkers and functional pathways in severe asthma based on a machine learning method and bioinformatics analyses[J]. *J Asthma*, 2025, 62(3):465–480.
- [20] YANG J R, WU B, LI G, et al. Landscape of epithelial cell subpopulations in the human esophageal squamous cell carcinoma microenvironment[J]. *Heliyon*, 2024, 10(19):e38091.
- [21] LAUSE J, BERENS P, KOBAK D. The art of seeing the elephant in the room: 2D embeddings of single-cell data do make sense[J]. *PLoS Comput Biol*, 2024, 20(10):e1012403.
- [22] YUAN Q H, GAO W D, GUO M, et al. Analysis of the mechanism underlying radiotherapy resistance caused by oligodendroglia cells in glioblastoma by applying the single-cell RNA sequencing technology[J]. *Curr Med Chem*, 2024, (12):142993.
- [23] WU L, DONG L, ZHOU Z, et al. Preclinical metabolism and metabolic drug-drug interaction profile of pedunculoside and rotundic acid[J]. *Clin Transl Sci*, 2024, 17(10):e70043.
- [24] HE R Z, TANG J, LAI H T, et al. Deciphering the role of sphingolipid metabolism in the immune microenvironment and prognosis of esophageal cancer via single-cell sequencing and bulk data analysis[J]. *Discov Oncol*, 2024, 15(1):505.
- [25] HUANG H, CHEN J, LIN X M, et al. Morinda officinalis polysaccharides inhibit osteoclast differentiation by regulating miR-214-3p/NEDD4L in postmenopausal osteoporosis mice[J]. *Calcif Tissue Int*, 2024, 115(5):673–685.
- [26] JIN X, WANG Y, WANG H, et al. Correlation study: Bone density and circulating inflammatory markers in postmenopausal patients[J]. *Immun Inflamm Dis*, 2024, 12(8):e1365.
- [27] 谢雁鸣,刘峘,姜俊杰,等.绝经后骨质疏松症中医临床实践指南(征求意见稿)[J].中国中药杂志,2021,46(22):5992–5998.
- [28] CUI Y Y, LV C, WEN Y, et al. HOXD3 up-regulating KDM5C promotes malignant progression of diffuse large B-cell lymphoma by decreasing p53 expression [J]. *Balkan Med J*, 2022, 39(1):30–38.
- [29] WANG L M, YAO J Y, YU T T, et al. Homeobox D3, A novel link between bone morphogenetic protein 9 and transforming growth factor beta 1 signaling[J]. *J Mol*

- Biol, 2020, 432(7):2030–2041.
- [30] OHYAMA Y, OHTA Y, SUGAMA R, et al. Effect of recombinant irisin on recombinant human bone morphogenetic protein-2 induced osteogenesis and osteoblast differentiation[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2024, 734:150787.
- [31] HA Y H, KIM J H, RYU C S, et al. Association between TGF- β /BMP signaling pathway polymorphisms and the risk of primary ovarian insufficiency in Korean women[J]. Genes Genomics, 2024, 46(10):1201–1208.
- [32] SARANYA I, SELVAMURUGAN N. Regulation of TGF- β /BMP signaling during osteoblast development by non-coding RNAs: Potential therapeutic applications[J]. Life Sci, 2024, 355:122969.
- [33] LI F N, LI Y H, DUAN Y H, et al. Myokines and adipokines: Involvement in the crosstalk between skeletal muscle and adipose tissue[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2017, 33:73–82.
- [34] KOHARA Y, YASUDA S, NAGAI M, et al. Prognostic significance of creatine kinase in resected pancreatic cancer[J]. J Hepatobiliary Pancreat Sci, 2024, 31(12): 906–916.
- [35] ZHENG Y, LI J C, LI Y C, et al. Plasma proteomic profiles reveal proteins and three characteristic patterns associated with osteoporosis: A prospective cohort study[J]. J Adv Res, 2024:S2090–S1232.
- [36] THOMPSON J J, MCGOVERN J, ROXBURGH C S D, et al. The relationship between LDH and GLIM criteria for cancer cachexia: Systematic review and Meta-analysis[J]. Crit Rev Oncol, 2024, 199:104378.
- [37] TILLER N B, MILLET G Y. Decoding ultramarathon: Muscle damage as the main impediment to performance[J]. Sports Med, 2025, 55(3):535–543.
- [38] CRITCHLOW A J, HIAM D, WILLIAMS R, et al. The role of estrogen in female skeletal muscle aging: A systematic review[J]. Maturitas, 2023, 178:107844.
- [39] 陈天鹏, 陈天乐, 袁忠, 等. 穴位压力刺激贴联合地舒单抗对PMOP的临床疗效研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(9):1329–1334.
- [40] 马姣姣, 权祯, 秦大平, 等. 从“温督启阳”理论探讨针灸治疗绝经后骨质疏松症的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(1):93–97.
- [41] 凌家艳, 薛莎. 薛莎基于“阳化气, 阴成形”治疗绝经后骨质疏松症经验[J]. 中医药导报, 2023, 29(4):186–188, 192.
- [42] 戴娜, 何兰, 胡晶, 等.“脾主肌肉”的理论探讨及其临床意义[J]. 中医杂志, 2018, 59(2):95–99.
- [43] 张友芳, 赵长伟. 基于“阳明脉衰”探讨绝经后骨质疏松症的发病机制[J]. 风湿病与关节炎, 2024, 13(5):57–60.
- [44] GOMARASCA M, BANFI G, LOMBARDI G. Myokines: The endocrine coupling of skeletal muscle and bone[J]. Adv Clin Chem, 2020, 94:155–218.

(收稿日期:2024-11-15 编辑:罗英姣)

(上接第110页)121745.

- [10] 牛林强, 唐锦程, 易腾达, 等. 当归产地基原及性味本草考证[J]. 辽宁中医药大学学报, 2022, 24(8):147–151.
- [11] 王翔宇, 陈晓彤, 黄嘉雯, 等. 当归芍药散水提液的质量控制研究[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(4):866–869.
- [12] 丁岩, 华永庆, 林紫微, 等. 当归芍药散对围绝经期模型大鼠子宫结构及雌激素受体表达的影响[J]. 中国药房, 2017, 28(34):4788–4792.
- [13] 王满媛, 刘俊, 宋欣, 等. 当归芍药散对痛经大鼠的作用及对精氨酸加压素含量的影响[J]. 安徽中医学院学报, 2011, 30(2):49–52.
- [14] 杨堃, 邓卉, 王彩霞, 等. 当归芍药散对慢性盆腔炎大鼠子宫组织NF- κ B信号通路蛋白的影响[J]. 中医药导报, 2020, 26(9):7–11.
- [15] WUN Y T, LAM T P, LAM K F, et al. Comparison of the knowledge, attitudes and practice with antibiotic use between traditional Chinese medicine and western medicine usual attenders in Hong Kong Original Research Article[J]. Complementary Therapies in Medicine, 2014, 22(1):99–106.
- [16] 李晓冰, 任玉梅, 张立赜, 等. 当归芍药散对糖尿病早期肾损伤大鼠氧化应激的影响[J]. 时珍国医国药, 2019, 30(9): 2082–2084.
- [17] 王栋, 范圣此, 李安平. 中药材贮藏方法的研究进展[J]. 中国现代中药, 2013, 15(5):416–419.
- [18] 张贵君. 中药鉴定学[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2009.
- [19] 陈玉. 当归优质高产栽培技术[J]. 农业工程技术, 2023, 43(33):48–49.
- [20] LI C C, JI P, HE J, et al. Screening of polysaccharides from the differently processed products of Angelica sinensis with the best liver protection effect on chicken and the intervention mechanism study based on tandem mass tag proteomics and multiple reaction monitoring approach[J]. Biomed Chromatogr, 2024, 38(5):e5840.
- [21] 冯晓姣, 王继林, 杨文卓, 等. 中药多成分的共递送给药系统的构建策略和方法[J]. 中国实验方剂学杂志, 2024, 30(5):186–196.
- [22] 张铮茹, 江媛, 曾宇馨, 等. 贮藏温度和时间对当归种苗顶芽分化及根部木质素积累的影响[J]. 中医药导报, 2024, 30(8):63–67.
- [23] 王伟东. 当归规范化种植技术及其主要病虫害防治[J]. 农业科技与信息, 2022(15):17–19.

(收稿日期:2025-01-08 编辑:李海洋)