

崔露,李萧,李杏,等. 基于 miRNA 测序技术探讨艾灸治疗骨质疏松模型大鼠的分子机制 [J]. 中国比较医学杂志, 2025, 35(6): 22-34.

Cui L, Li X, Li X, et al. Exploring the molecular mechanisms of moxibustion treatment for osteoporosis using microRNA sequencing analysis of model rats [J]. Chin J Comp Med, 2025, 35(6): 22-34.

doi: 10.3969/j.issn.1671-7856.2025.06.003

## 基于 miRNA 测序技术探讨艾灸治疗骨质疏松模型大鼠的分子机制

崔露<sup>1</sup>, 李萧<sup>1</sup>, 李杏<sup>1</sup>, 陈小丽<sup>1</sup>, 胡笑桑<sup>2</sup>, 周海燕<sup>1,3\*</sup>, 李享<sup>1,3\*</sup>

(1.成都中医药大学针灸推拿学院, 成都 610075; 2.成都中医药大学养生康复学院, 成都 610075;  
3.针灸与时间生物学四川省重点实验室, 成都 610075)

**【摘要】** 目的 基于微小 RNA (micro-RNA, miRNA) 高通量测序技术, 探究艾灸改善骨质疏松模型大鼠的分子机制。方法 18 只雌性 SD 大鼠随机分为假手术 (SO) 组 (6 只) 和手术组 (12 只)。手术组以去卵巢手术法制备骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 模型, 将造模成功的 12 只大鼠随机分为模型 (OVX) 组和艾灸 (MOX) 组, 每组 6 只。艾灸组大鼠艾灸双侧“肾俞”“关元”穴, 每天 1 次, 每天 20 min, 持续 12 周。Micro-CT 扫描大鼠股骨并成像, 分析骨小梁厚度 (trabecular thickness, Tb. Th)、骨小梁分离度 (trabecular separation, Tb. Sp)、骨体积分数 (bone volume/total volume, BV/TV); HE 染色观察大鼠胫骨组织形态; ELISA 法检测血清碱性磷酸酶 (alkaline phosphatase, ALP)、骨钙素 (osteocalcin, OCN) 含量; 随机挑选 3 只大鼠的右胫骨进行 miRNA 高通量测序, 筛选差异表达的 miRNA, 并对差异表达 miRNA 进行功能富集分析与靶基因预测。结果 Micro-CT 图像显示艾灸组骨密度优于模型组, 与模型组比较, 艾灸组骨小梁厚度显著增加, 骨体积分数显著上升, 骨小梁分离度显著下降 ( $P < 0.05$ ); ELISA 结果表明, 与模型组比较, 艾灸组血清 ALP 活性显著降低, 血清 OCN 含量显著上升 ( $P < 0.05$ ); miRNA 测序结果显示模型组上调基因与干预后下调基因共同表达 34 个, 模型组下调与干预后上调基因共同表达 15 个。KEGG 通路富集分析结果显示, 差异基因的表达主要富集于 MAPK、Ras、FoxO、TNF、癌症中的 miRNA 等信号通路途径。对显著性最高的前 5 个差异 miRNA (miR-153-5p、miR-201-5p、miR-449c-5p、miR-451-3p、miR-153-3p) 的靶基因预测得到 10 个主要靶点 (Ebf2、Rtn4、Fbxl3、Naa15、Vamp2、Daam1、Akap6、Camta1、Ptprz1、Lamp1)。结论 艾灸能够延缓 OP 病程、改善骨微结构、平衡骨代谢, 这种治疗作用可能通过调控 miRNA 及其靶基因表达来实现, 更详细的机制有待进一步探索。

**【关键词】** 骨质疏松症; 艾灸; miRNA 测序; 生物信息学分析

**【中图分类号】** R-33 **【文献标识码】** A **【文章编号】** 1671-7856 (2025) 06-0022-13

### Exploring the molecular mechanisms of moxibustion treatment for osteoporosis using microRNA sequencing analysis of model rats

[基金项目] 四川省自然科学基金面上项目 (2024NSFSC0729); 国家自然科学基金 (82105027, 82205239)。

[作者简介] 崔露 (1999—), 女, 在读硕士研究生, 研究方向: 针灸治疗骨质疏松症的效应机制。E-mail: cui lu134274@163.com

[通信作者] 周海燕 (1979—), 女, 博士, 教授, 研究方向: 针灸调理神经-内分泌-免疫机制的研究。

E-mail: zhouhaiyan@cdutcm.edu.cn

李享 (1986—), 男, 博士, 副教授, 研究方向: 针灸治疗骨质疏松症的效应机制。E-mail: lixiang@cdutcm.edu.cn

\* 共同通信作者

CUI Lu<sup>1</sup>, LI Xiao<sup>1</sup>, LI Xing<sup>1</sup>, CHEN Xiaoli<sup>1</sup>, HU Xiaoshen<sup>2</sup>, ZHOU Haiyan<sup>1,3\*</sup>, LI Xiang<sup>1,3\*</sup>

(1. School of Acu-Mox and Tuina, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075, China.

2. School of Health Rehabilitation, Chengdu University of Traditional Chinese Medicine, Chengdu 610075.

3. Sichuan Provincial Key Laboratory of Acupuncture and Chronobiology, Chengdu 610075)

**【Abstract】 Objective** To explore the molecular mechanisms of moxibustion in improving osteoporosis in rats using high-throughput micro-RNA (miRNA) sequencing analysis. **Methods** A total of 18 female Sprague-Dawley (SD) rats were randomly divided into an operation group (12 rats), which was subjected to ovariectomy to induce osteoporosis, and a sham operation control (SO) group (6 rats). The 12 osteoporosis model rats were randomly divided into a model (OVX) group and a moxibustion (MOX) group (6 rats per group), which were treated with once-daily moxibustion at the “Shenshu” (BL23) and “Guanyuan” (CV4) acupoints for 20 minutes each time, for 12 weeks. Micro-computed tomography (CT) scans of the rat femur were taken to analyze the trabecular bone thickness (Tb. Th), trabecular separation (Tb. Sp), and bone volume total volume (BV/TV) ratio of the trabecular bone. Hematoxylin and eosin staining was used for morphological observation of tibial tissues. Serum alkaline phosphatase (ALP) and osteocalcin (OCN) levels were measured using ELISA. Three randomly selected rats from each group were used for miRNA high-throughput sequencing to screen for differentially expressed miRNAs, which were subjected to functional enrichment analysis and target gene prediction. **Results** Micro-CT images showed that, compared with the OVX group, the MOX group had superior bone density, significant increases in the Tb. Th and BV/TV score, and a significant decrease in Tb. Sp ( $P < 0.05$ ). ELISA indicated that, compared with the OVX group, the MOX group showed a significant decrease in serum ALP activity and a significant increase in serum OCN content ( $P < 0.05$ ). The miRNA sequencing result showed that 34 miRNAs were commonly expressed between the OVX group and the intervention group, and 15 miRNAs were commonly expressed between the OVX group and the intervention group. KEGG pathway enrichment analysis showed that the differentially expressed genes were mainly enriched in signaling pathways involving MAPK, Ras, FoxO, TNF, and cancer-related microRNAs. For the top five most differentially expressed microRNAs, namely miR-153-5p, miR-201-5p, miR-449c-5p, miR-451-3p, and miR-153-3p, target gene predictions yielded 10 major targets: Ebf2, Rtn4, Fbxl3, Naa15, Vamp2, Daam1, Akap6, Camta1, Ptpnz1, and Lamp1. **Conclusions** Acupuncture slowed the progression of osteoporosis, improved bone microstructure, and balanced bone metabolism in rats. This therapeutic effect may be achieved through regulation of the expression of microRNAs and their target genes; however, the underlying mechanism requires further exploration.

**【Keywords】** osteoporosis; moxibustion; microRNA sequencing; bioinformatics analysis

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种慢性骨代谢性疾病, 表现为骨重塑周期中骨形成与骨吸收不平衡导致的骨量减少以及骨微结构受损<sup>[1]</sup>。随着人口老龄化, 其患病率显著增加, 严重影响了患者的生活质量和社会经济, 甚至增加死亡率。一项针对亚太地区 OP 患病率和骨折发生的系统评价表示: 亚太地区约 10%~40% 的 40 岁以上女性和 10% 的 40 岁以上男性患有 OP, 每 100 000 人中约有 50~1000 名 50 岁以上患者发生继发性骨折<sup>[2]</sup>。双膦酸盐类是目前常用的抗骨质疏松症药物, 但长期服用该药物存在肝、肾等诸多不良反应<sup>[3]</sup>。另外, 一项针对患者依从性

的研究显示, OP 药物治疗依从性在发达国家仅 50%, 发展中国家则更低<sup>[4]</sup>。中医传统疗法中的艾灸, 凭借其独特的疗法机制, 通过温和而深透的热量以及艾叶本身蕴含的药性, 能够有效渗透至身体深层, 促进气血的顺畅流动, 达到治疗疾病的目的。近年来研究发现, 艾灸治疗 OP 疗效确切, 能够增加骨量, 改善血清骨代谢指标, 但其起效机制尚未完全阐明<sup>[5-6]</sup>。

随着表观遗传学的深入研究, 有证据表明 microRNA (miRNA) 与代谢性疾病、炎性疾病等发生发展密切相关<sup>[7]</sup>, 而表观遗传变化作为连接遗传和环境影响的重要介质, 也是 OP 发病和继发

骨折风险增加的关键<sup>[8]</sup>。miRNA 由约 15~25 个核苷酸非编码小 RNA 分子组成,通过靶向 miRNA 参与转录后基因表达调节<sup>[9]</sup>,是潜在的治疗靶点或生物标志物。当前已有研究表明 miRNA 能够参与各类细胞等的增殖分化,调整骨稳态<sup>[9]</sup>。一项针对 126 名患者的横断面研究显示,miRNA 表达增加与绝经后 OP 患病率呈正相关<sup>[10]</sup>。因此,借助高通量测序和生物信息分析技术,本研究拟深入挖掘艾灸治疗骨质疏松症的分子机制,探索 miRNA 在 OP 发病与艾灸治疗中的作用。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物

选用 18 只 9 周龄 SPF 级雌性 SD 大鼠,体重(220±10)g,购买自成都达硕实验动物有限公司[SCXK(川)2020-0030]。大鼠每笼 2 只,饲养于成都中医药大学动物实验中心屏障环境内[SYXK(川)2024-0049],温度 23~25℃,相对湿度 55%~60%,12 h/12 h 明暗周期,大鼠自由进食常规饲料和饮水,请单独的人员进饲养,即饲养人员不清楚大鼠的分组及干预情况。本研究已通过成都中医药大学实验伦理委员会审批(2024133);所有参与实验的人员均经过实验动物福利伦理培训,实验过程严格遵守 3R 原则且所有实验步骤均遵照科技部 2006 年颁布的《关于善待实验动物的指导性意见》。

### 1.2 主要试剂与仪器

细艾条(湖香艾企业,0.9 cm×12 cm);碱性磷酸酶(alkaline phosphatase,ALP)活性检测试剂盒(南京建成,A059-1-1);骨钙素(osteocalcin,OCN)试剂盒(上海茁彩生物,ZC-36660);苏木素染液(武汉塞维尔,G1004);伊红染液(合肥博美生物,YE2080);EDTA2Na(合肥博美,YE0105);无水乙醇(国药集团,100092680);二甲苯(国药集团,10023418);中性树胶(Biosharp,BL704A);4%多聚甲醛固定液(Biosharp,BL539A);异丙醇(上海化学试剂,80109218);氯仿(国药集团,10006828);DEPC 水(美国 sigma,693520);Marker(TaKaRa,DL2000/DL15000);Agarose(Biowest,111860);TRIzol Reagent(上海净信,15596018);外泌体纯化 Maxi 试剂盒(加拿大,

Norgen);动物总 RNA 分离试剂盒(中国成都,Foregene);RNA 6000 nano Kit(安捷伦,5067-1511);Quant-iT PicoGreensDNA Assay Kit 定量试剂盒(Invitrogen,P7589);Quantifluor-ST fluorometer(Promega,E6090);高灵敏度 DNA 试剂盒(安捷伦,5067-4626)。

Quantum GX2 micro-CT 成像系统(QUANTUM GX2,PerkinElmer Inc);数字切片扫描仪(匈牙利 3DHISTECH,Pannoramic250);切片机(德国徕卡公司,徕卡-2016);刀片(理查雅岚科技,MX35);组织包埋盒(广州维格斯生物科技,2200037P);组织包埋机(常州郊区中威电子,BMJ-A);酶标仪(美谷,SpectraMAX Plus384);电子恒温水浴锅(北京中兴伟业,DZKW-4);电子天平(赛多利斯,BSA224S-CW);2100 生物分析仪(安捷伦,2100Bioanalyzer);高速冷冻离心机(美国 Thermo,ST 16R);电泳仪(北京六一,DYY-6c);凝胶成像系统(Bio-Rad,GelDoc2000);研磨仪(上海净信,Tissuelyser-48);PCR 仪(Bio-Rad,T100);Nanodrop 紫外定量设备(美国 Thermo,Nanodrop 2000);测序仪(Illumina novaseq Xplus)。

### 1.3 实验方法

#### 1.3.1 动物分组及模型制备

大鼠适应性喂养 1 周,待完全熟悉环境后开始正式实验。以随机数表法,将 18 只大鼠随机分为假手术(SO)组(6 只)和手术组(12 只)。手术组大鼠造模成功后,以随机数表法随机分为模型(OVX)组和艾灸(MOX)组,每组 6 只。

采用双侧卵巢切除手术法制备 OP 大鼠模型<sup>[11]</sup>,具体如下:模型组和艾灸组大鼠术前禁食禁水 12 h,称重后腹腔注射 2%戊巴比妥钠溶液(40 mg/kg)麻醉。大鼠完全麻醉后,俯卧位固定,选定背部后正中中线平肋缘下 1.5 cm 处,边长 2 cm 正方形区域备皮剃毛,消毒铺巾,纵向切开皮肤 1.5~2 cm,拉动术区皮肤,切口左移 1 cm,钝性分离皮下组织暴露腹腔,以组织钳提取脂肪组织,暴露下方粉红色桑葚状卵巢,用外科缝合线对卵巢下输卵管及附带血管进行双重环形结扎,剪除卵巢,确认无出血后将断端输卵管放回腹腔,缝合该侧肌肉,以相同步骤切除右侧卵巢,最后缝合皮肤,再次消毒术口。术后 3 d,每天于大鼠大腿肌肉内注射青霉素 80 000 U 防感染。假

手术组大鼠进行同样的操作,但不进行结扎及剪除卵巢。

### 1.3.2 艾灸干预

卵巢切除术 8 周后,对艾灸组大鼠进行艾灸治疗,穴位为双侧“肾俞”和“关元”穴,定位参考《实验动物常用穴位名称与定位第 2 部分:大鼠》<sup>[12]</sup>和《实验针灸学》大鼠标准穴位图谱定位取穴<sup>[13]</sup>。肾俞:第 2 腰椎下两旁,背正中线上旁开 6 mm;关元:大鼠两后肢根部连线的中点,脐下约 25 mm 处。剔毛暴露穴区皮肤,将大鼠先俯卧位固定于自制捆绑架上,利用魔术贴固定其肩关节与髋髂关节,使用悬灸软管支架将 0.9 cm×12 cm 艾条悬于距肾俞穴皮肤 1 cm 处进行温和灸治疗,结束后以同样的方式仰卧位固定重复上述方式对关元穴进行温和灸治疗,艾灸过程及时抖灰并通过软管支架调整距离。假手术组及模型组在同一环境中只固定捆绑不艾灸。每次每穴灸 20 min,每天 1 次,6 次为一个疗程,每个疗程结束后休息 1 d,共 12 个疗程(12 周)。

### 1.3.3 检测指标及方法

(1) Micro-CT 扫描与分析:①取材与准备:艾灸干预完成后第 2 天,大鼠腹腔麻醉后,取左侧股骨,剥离周围软组织并用 0.9%氯化钠溶液冲洗干净,以 4%多聚甲醛固定备用。②micro-CT 扫描:开启仪器,选择安装 small bore cover,打开电脑主机程序 QuantumGX 并预热;预热结束后,用透明胶带将股骨标本固定于分析床前 1/3 处,送入螺旋扫描仪。选择扫描方式 360°旋转,视野参数 Acquisition:72, Recon:45, Voxel:90 μm,扫描模式为 High Resolution,扫描时间 4 min。先预览调整样本位置,再进行扫描。③分析:使用 Calipers Analyze 软件进行骨重建后处理及分析。先进行图像矫正,选取股骨远端生长板顶端向上 50 层为兴趣区域,先定义皮质骨范围,后定义骨小梁,形成局部骨组织图像数据集,再分析骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb. Th)、骨小梁分离度(trabecular separation, Tb. Sp)、骨体积分数(bone volume/total volume, BV/TV)。

(2) HE 染色:取 4%多聚甲醛固定的左侧胫骨,浸入 15% EDTA 脱钙液进行脱钙处理,每 3 d 观察脱钙效果并更换新鲜脱钙液,直至组织完全脱钙。纵向切片(3 μm)后经全自动脱水机脱水,

石蜡包埋,进行苏木精染色和伊红染色,利用二甲苯溶液进行透明化处理,最后利用中性树胶封固。使用 Panoramic 250 数字切片扫描仪对制备好的组织切片进行高清数字化图像采集,先于低倍下观察整体组织大体病变情况,后续对所需的观察区域采集 100 倍和 400 倍图片,观察大鼠胫骨远端骨组织具体的形态结构。

(3) ELISA 法测定:艾灸干预完成后第 2 天,大鼠腹腔麻醉后,腹主动脉取血约 4 mL 用于 ALP 及 OCN 检测。取全血后常温放置 2 h 后,于 4 °C 离心机中 2500 r/min 离心 15 min,取上层血清于冻存管内,-80 °C 冻存备用。按照试剂盒说明书进行操作检测血清 ALP 及 OCN 的含量,标准品孔按浓度梯度加入标准品 50 μL,封好的酶标板放置于 37 °C 恒温箱温育 60 min。洗板:弃去孔内废液,于吸水纸上轻拍孔壁以去除残余液体,每孔加满洗涤液,静置 1 min,甩去洗涤液,再次使用吸水纸拍干,洗板步骤重复 5 次。显色:每孔分别加入底物 A 和 B 各 50 μL,随后在 37 °C 避光环境下孵育 15 min,促使显色反应发生。向每孔加入终止液 50 μL 中止酶促反应,以空白管调零,利用酶标仪在 450 nm 波长处测定各孔的光密度(OD)值,计算个指标的含量或活性。

(4) 文库构建与 miRNA 测序:将大鼠股骨组织置于冻存管-80 °C 储存,委托上海派森诺生物科技有限公司(Personalbio)进行文库构建和测序。首先,研磨骨组织,使用外泌体纯化 Maxi 试剂盒从离心后的骨组织上清液中提取外泌体,然后使用动物总 RNA 分离试剂盒分离外泌体内的总 RNA,使用 Nanodrop 评估总 RNA 的浓度和纯度,同时通过 RNA 特异性琼脂糖凝胶电泳验证总 RNA 的完整性,使用连接酶 3' 接头和 5' 接头连接,用 Superscript II 逆转录酶将 RNA 反转录合成双链 cDNA,进行 PCR 扩增富集 DNA 片段,按照片段大小,使用 15% PAGE 凝胶分离目标片段大小产物,最终获得文库。使用 Agilent 2100 Bioanalyzer 和 Agilent 高灵敏度 DNA 试剂盒进行文库质量检测,最后将混合好的文库逐步稀释定量后在 Illumina 测序仪上进行 PE150 模式测序。

(5) 差异性 miRNA 筛选、功能富集分析与靶基因预测:对于动物,采用 mirandav3.3a 以该物种的 mRNA 的 3' UTR 序列为目标序列,对差异表

达的 miRNA 序列进行靶基因预测。使用 DESeq V1.390 软件进行两个比较组之间的差异表达的分析,筛选差异表达 miRNA,差异倍数为 Log2 Fold Change > 1, 显著性  $P$ -value < 0.05; 使用 ClusterProfiler(4.6.0) 软件进行差异 miRNA 的靶基因 KEGG 通路富集分析,找出显著富集通路( $P$  < 0.05),根据  $P$  值大小排序,筛选出排名前 20 的信号通路。

(6) 聚类分析:使用 OriginPro 2024 软件对组间比较筛选获得的差异 miRNA 进行分层聚类分析,利用树形图将具有相近表达模式的 miRNA 分块聚到同一簇中。

(7) PPI 分析:使用在线数据库 STRING 可视化数据库中有统计学意义的编码蛋白之间的 PPI,设置置信交互评分  $\geq 0.9$ ,提高 PPI 网络图的准确性,导出 TSV 文件至 Cytoscape 3.9.1 软件来进一步可视化蛋白互作网络图。

#### 1.4 统计学方法

所有数值用平均数  $\pm$  标准差 ( $\bar{x} \pm s$ ) 表示,用

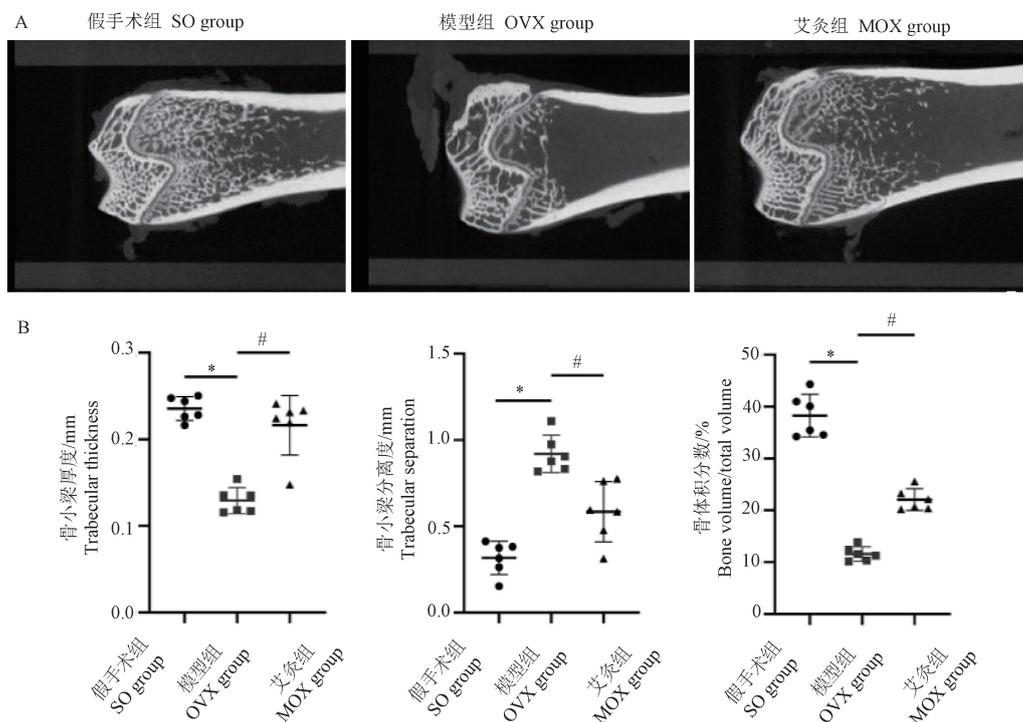
SPSS Statistics 25 统计软件进行分析,使用 GraphPad Prism 8 作统计图。比较不同组别之间的差异采用单因素方差分析(One-way ANOVA),两两比较采用 LSD 检验, $P$  < 0.05 为差异有统计学意义。

## 2 结果

### 2.1 艾灸对 OP 模型大鼠的治疗效果评价

#### 2.1.1 艾灸对股骨骨量的影响

Micro-CT 扫描大鼠左侧股骨并成像,见图 1A。分析骨小梁厚度、骨小梁分离度、骨体积分数;Micro-CT 扫描结果显示,与假手术组相比,模型组大鼠骨组织骨小梁密度下降、断裂明显、髓腔增大,骨组织骨小梁厚度、骨体积分数显著降低( $P$  < 0.05),骨小梁分离度显著升高( $P$  < 0.05);与模型组相比,艾灸组大鼠骨组织中骨小梁密度增加,结构相对完好,骨组织骨小梁厚度、骨体积分数显著升高( $P$  < 0.05),骨小梁分离度显著降低( $P$  < 0.05),见图 1B。



注:A:各组大鼠的左股骨 Micro-CT 扫描图像;B:各组大鼠 Micro-CT 扫描数据分析。与假手术组相比, \*  $P$  < 0.05;与模型组相比, #  $P$  < 0.05。

图 1 大鼠左股骨 Micro-CT 扫描与分析 ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Note. A, Micro-CT scan images of the left femur in each group of rats. B, Analysis of Micro-CT scan data from each group. Compared with the SO group, \*  $P$  < 0.05. Compared with the OVX group, #  $P$  < 0.05.

Figure 1 Micro-CT imaging and analysis of the rat's left femur ( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

### 2.1.2 艾灸对胫骨组织形态的影响

胫骨组织进行 HE 染色,可以观察到假手术组细胞形态结构正常,骨小梁连接紧密,未出现明显的变性、坏死以及纤维组织的增生;模型组骨组织内骨小梁形态缩小变细、数量减少,小梁结构消失,骨髓脂肪细胞增生的病理改变;相较于模型组,艾灸组胫骨组织骨小梁结构受损较轻,增生的脂肪细胞较少,病变程度相对较轻,结果见图 2。

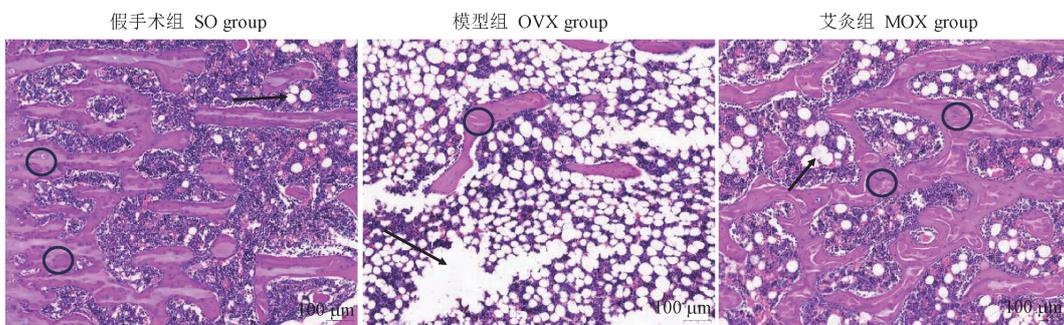
### 2.1.3 艾灸对骨代谢指标的影响

血清 ALP、OCN 含量测定结果显示,与假手术组相比,血清 ALP 活性在模型组显著升高( $P < 0.05$ ),与模型组相比较,艾灸组血清 ALP 活性显著下调( $P < 0.05$ );与假手术组相比较,模型组血

清 OCN 浓度显著下降( $P < 0.05$ ),与模型组相比较,艾灸组 OCN 浓度显著上调( $P < 0.05$ ),结果见图 3。

### 2.2 各组大鼠骨组织差异表达 miRNA 分析

测序结果显示,与假手术组相比,模型组共筛选出 74 个差异表达 miRNA,包含 48 个上调基因与 26 个下调基因;与模型组相比,艾灸组选出 71 个差异表达 miRNA,其中 27 个上调基因与 44 个下调基因,见图 4A、4B。将模型组与艾灸组共表达的差异性 miRNA 进行合并分析,发现模型组上调而艾灸治疗后下调的 miRNA 共 34 个,模型组下调而艾灸治疗后上调的 miRNA 共 15 个,见图 4C、4D。这些共同表达差异性 miRNA 在每个测序样本的表达量见图 5,分别对假手术组与模

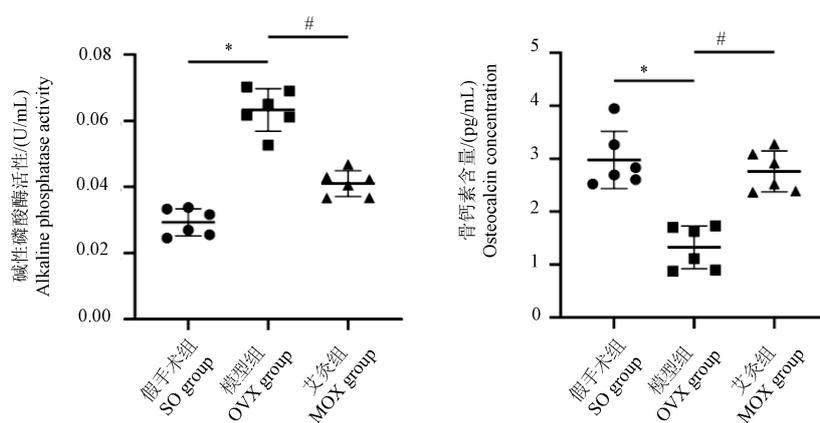


注:黑色圈起为骨小梁,箭头表示脂肪细胞增生形成的空腔。

图 2 大鼠胫骨组织病理形态比较(HE 染色)

Note. Black circles indicate the trabeculae, and the arrows point to the fat cell-induced lacunae.

Figure 2 Comparison of the histomorphological structure of tibia tissue in rats (HE staining)

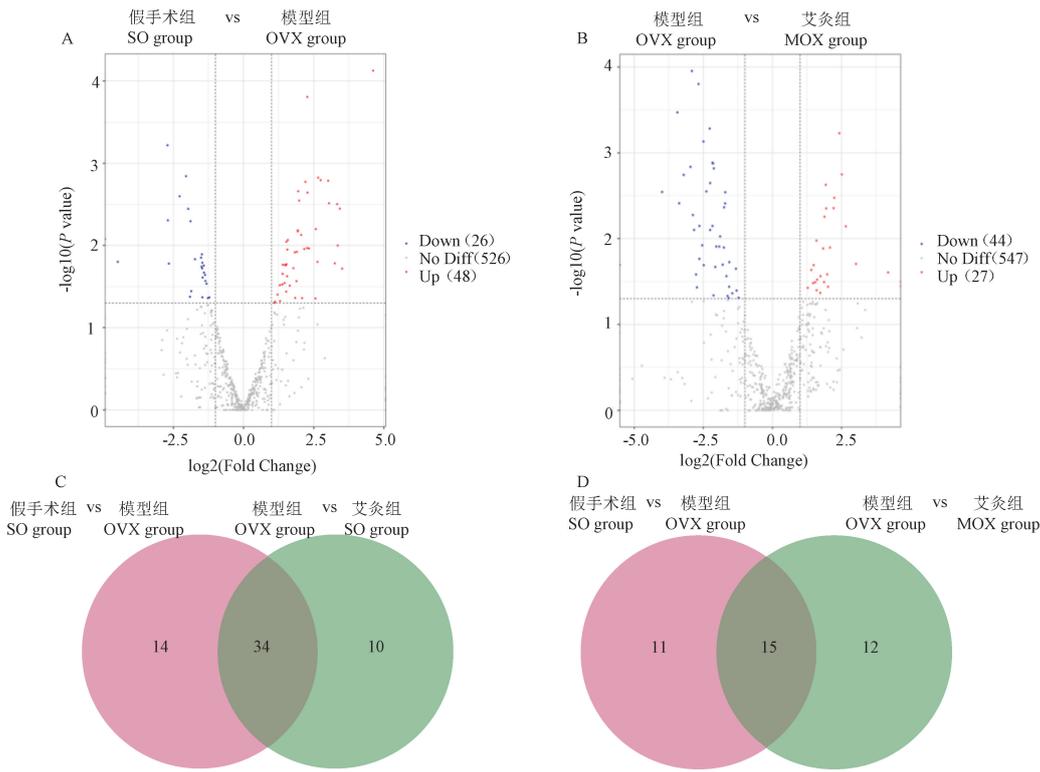


注:A:各组大鼠血清碱性磷酸酶活性;B:各组大鼠血清骨钙素浓度。与假手术组相比, \* $P < 0.05$ ;与模型组相比, # $P < 0.05$ 。

图 3 各组大鼠血清碱性磷酸酶和骨钙素比较( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )

Note. A, Serum alkaline phosphatase activity in each group of rats. B, Serum osteocalcin concentration in each group of rats. Compared with the SO group, \* $P < 0.05$ . Compared with the OVX group, # $P < 0.05$ .

Figure 3 Comparison of serum ALP and OCN levels in each group of rats( $\bar{x} \pm s, n = 6$ )



注:A:假手术组与模型组大鼠差异表达 miRNA 火山图;B:模型组与艾灸组大鼠差异表达 miRNA 火山图;C:模型组上调而艾灸治疗后下调的差异表达 miRNA 韦恩图;D:模型组下调而艾灸治疗后上调的差异表达 miRNA 韦恩图;交集为共表达差异基因数目。

图 4 各组大鼠差异表达 miRNA 火山图和韦恩图

Note. A, Volcano plot of differentially expressed miRNAs between the SO group and the OVX group in rats. B, Volcano plot of differentially expressed miRNAs between the OVX group and the MOX group in rats. C, Venn diagram of differentially expressed miRNAs that were upregulated in the OVX group and downregulated after moxibustion treatment. D, Venn diagram of differentially expressed miRNAs that were downregulated in the OVX group and upregulated after moxibustion treatment. The overlapping regions represent the number of co-expressed differentially expressed genes.

Figure 4 Volcano plots and Venn diagrams showing differentially expressed miRNAs across rat groups

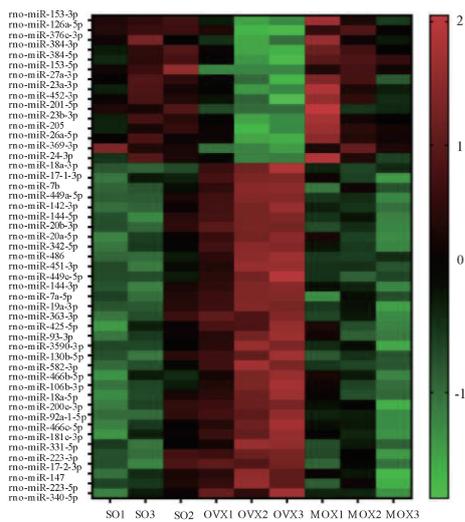


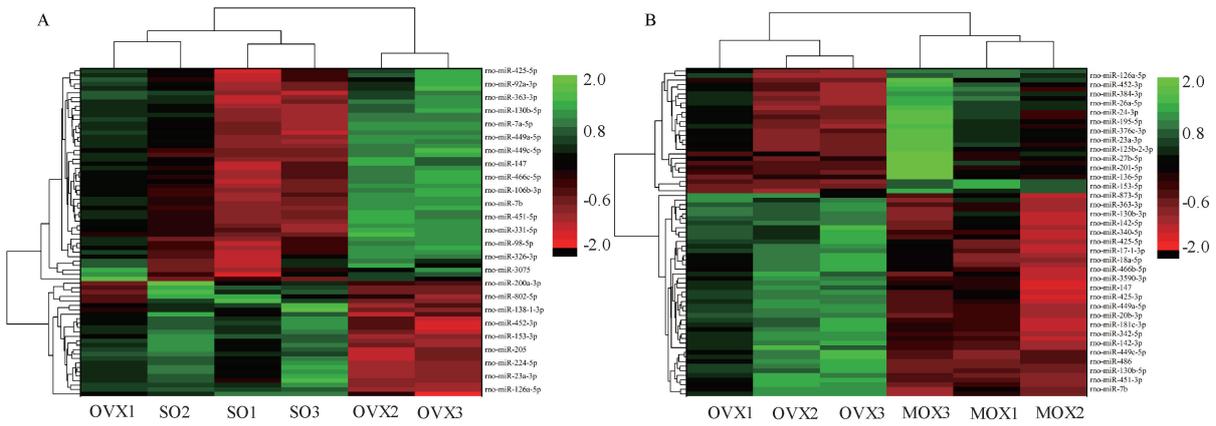
图 5 各组大鼠 miRNA 差异表达热图

Figure 5 Heatmap of differentially expressed miRNAs in each group of rat samples

型组和模型组与艾灸组的 miRNA 进行聚类分析, 差异表达的 miRNA 聚类分析, 见图 6。根据  $\log_2(\text{Fold Change})$  筛选出模型组和艾灸组变化最显著的前 10 个(升高最显著的前 5 个与降低最显著的前 5 个)差异 miRNA 并做交集, 得到受模型制备与艾灸干预影响最大的 5 个 miRNA, 分别为 miR-153-5p、miR-201-5p、miR-449c-5p、miR-451-3p、miR-153-3p。

### 2.3 差异表达 miRNA 的功能分析

对假手术组与模型组和模型组与艾灸组共同调控的差异表达 miRNA 进行 KEGG 通路富集分析, 结果显示, 差异基因的表达主要富集于丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK)、Ras 信号、FoxO 信号、TNF 信号、肿瘤转移 (Endocytosis)、癌症中的 miRNA 等信号通路途径, 见图 7。

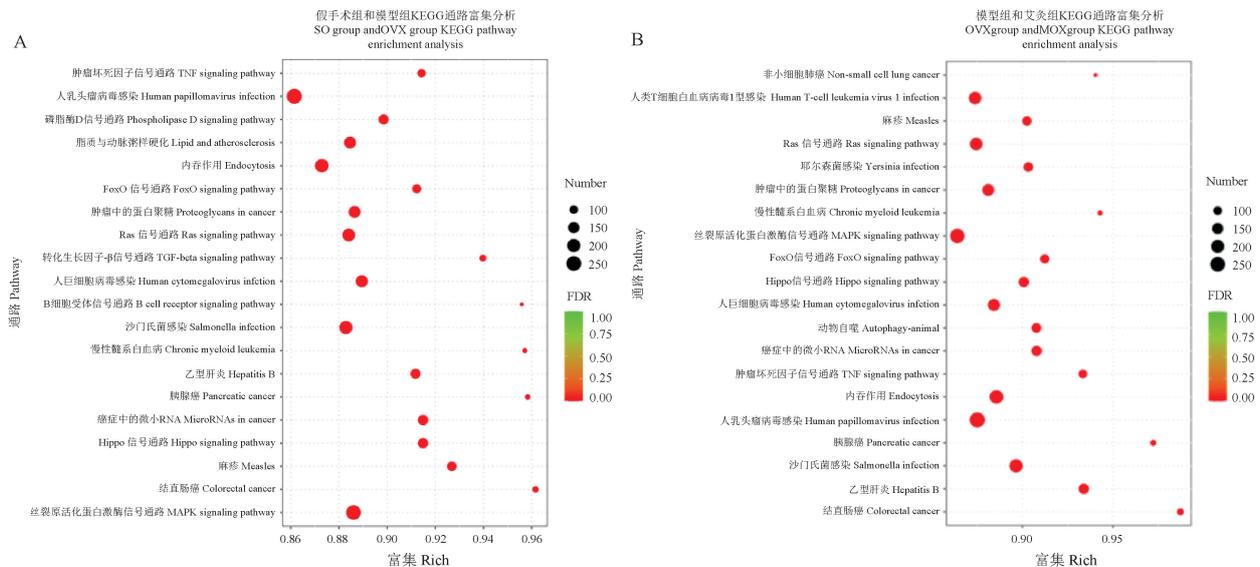


注:A:假手术组与模型组的聚类分析;B:模型组与艾灸组的聚类分子。每列代表一个样本,每行代表一个 miRNA;红色代表上调显著的差异 miRNA,绿色代表下调显著的 miRNA。

图 6 各组大鼠 miRNA 聚类分析图

Note. A, Clustering analysis of the SO group and the OVX group. B, Clustering analysis of the OVX group and the MOX group. Each column represents a sample, and each row represents a miRNA. Red indicates significantly upregulated differential miRNAs, while green indicates significantly downregulated miRNAs.

Figure 6 Clustering analysis of miRNA in each group of rats



注:A:假手术组和模型组共同调控的差异表达 miRNA 的 KEGG 通路富集分析;B:模型组和艾灸组共同调控的差异表达 miRNA 的 KEGG 通路富集分析。

图 7 各组靶基因的 KEGG 通路富集分析(前 20 通路)

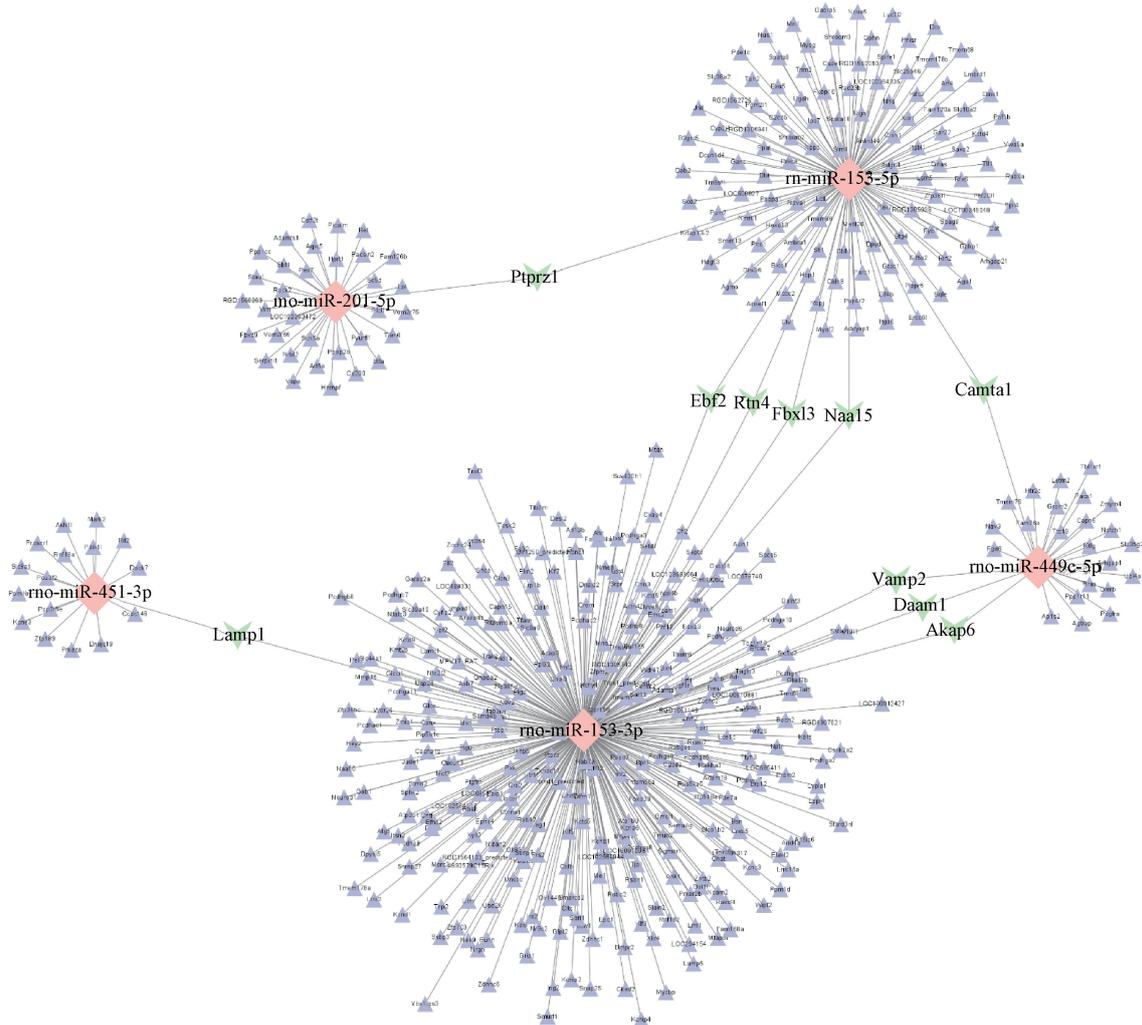
Note. A, KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed miRNAs commonly regulated between the SO group and the OVX group. B, KEGG pathway enrichment analysis of differentially expressed miRNAs commonly regulated between the OVX group and the MOX group.

Figure 7 Pathway enrichment analysis of target genes in each group (top 20 pathways)

## 2.4 靶基因预测

构建各组间差异表达显著的前 5 个 miRNA 与其靶基因的蛋白互作网络图,共分析出 624 个

靶点基因,miRNA 之间共同靶点 10 个,包含 Ebf2、Rtn4、Fbx13、Naa15、Vamp2、Daam1、Akap6、Camta1、Ptrz1、Lamp1,见图 8。



注:粉色为差异表达 miRNA,绿色和紫色表示被 miRNA 靶向调控的 mRNA。

图 8 各组共同表达最具显著性的差异 miRNA 靶基因的网络图

Note. Pink represents differentially expressed miRNAs, and green and purple indicate mRNAs targeted and regulated by miRNAs.

Figure 8 Network diagram of the most significant differentially expressed miRNA target genes across groups

### 3 讨论

OP 在中医归属“骨痿”“骨枯”范畴,其病位在骨,而本质在肾。依据中医理论,肾主骨生髓,骨髓得到肾气的充分滋养才能驱动骨骼的健康发育与强健。因此,针对 OP 的治疗,中医多从补肾培元的角度出发,旨在从根源上强化骨骼的根基。数据挖掘结果显示,“肾俞”穴与“关元”穴是针灸治疗 OP 时的常用穴位<sup>[14]</sup>,艾灸能够增强体质、调和气血、通经活络,是重要的中医外治疗法之一<sup>[15]</sup>,艾灸“肾俞”及“关元”穴,不仅能够有效缓解骨骼疼痛、改善骨骼质量,还能全面提升患者的体质与生活质量<sup>[16]</sup>。近年来研究显示,

miRNA 与 OP 的发病密切相关,尤其是在骨骼发育与骨骼再生环节至关重要<sup>[17]</sup>。本研究通过对 OP 模型大鼠施灸治疗,发现艾灸能够增加骨密度,改善骨微观结构,同时调节骨代谢指标血清 ALP 活性和血清 OCN 含量。通过对骨组织进行 miRNA 高通量测序发现,艾灸能够调整 OP 模型大鼠骨组织中的 49 个差异 miRNA 的表达水平,例如 miR-153-5p、miR-201-5p、miR-449c-5p、miR-451-3p、miR-153-3p 等,研究者进一步挖掘了差异性 miRNA 的富集通路并进行了靶基因预测。

OP 发病的关键在于骨稳态的失调,这一过程主要由成骨细胞和破骨细胞调节,而 miRNA 可以通过靶向 mRNA 参与转录后基因表达,在成骨

和破骨细胞的分化和激活途径中发挥作用<sup>[9]</sup>。对测序发现的 49 个差异性 miRNA 进行文献检索发现,目前已经相关研究报道了这些 miRNA 与 OP 及成骨和破骨细胞调节的相关报道。例如 miR-27a-3p 通过激活 CRY2/ERK1/2 轴促进成骨分化<sup>[18]</sup>;miR-452-3p 通过靶向 Smad4 抑制成骨细胞分化,抑制成骨细胞标志物 Runt 相关转录因子 2 (Runt-related transcription factor 2, RUNX2)、骨桥蛋白 (osteopontin, OPN) 和 1 型胶原蛋白 alpha1 链 (collagen type I alpha 1 chain, Col1A1) 的表达<sup>[19]</sup>;miR-23b-3p 能够靶向甘露糖受体 C 型 2 (mannose receptor C type 2, MRC2) 和调节 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路促进绝经后 OP<sup>[20]</sup>;骨髓间充质干细胞 (bone mesenchymal stem cells, BMSCs) 衍生的外泌体 miR-27a-3p 和 miR-196a-5p 促进 BMSCs 成骨分化标志物的表达,敲低则增加破骨细胞标志物表达<sup>[21]</sup>。遗憾的是,目前尚无从 miRNA 角度,研究艾灸治疗 OP 疗效机制的相关报道,本研究成果则为这一研究方向铺设了基石,为后续的科研工作者在深入探索艾灸调节骨代谢进程中 miRNA 的精确作用途径及其分子机制方面,提供了宝贵的启示与助力。

对筛选出最具显著性的 5 个差异表达 miRNA 进行 PPI 分析,最后得到早期 B 细胞因子 (early B-cell factors, Ebf2)、网状蛋白 4 (reticulon 4, Rtn4)、F-box 和富含亮氨酸重复序列蛋白 3 (F-box and leucine-rich repeat protein 3, Fbxl3)、囊泡相关膜蛋白 2 (vesicle associated membrane protein 2, Vamp2)、Dishevelled 关联激活因子 1 (Dishevelled-associated activator of morphogenesis 1, Daam1)、肌肉特异性 A 激酶锚定蛋白 6 (A-kinase anchoring protein 6, Akap6)、钙调蛋白结合转录激活剂 1 (calmodulin-binding transcription activator 1, Camta1)、溶酶体相关膜蛋白 1 (lysosomal associated membrane protein 1, Lamp1)、受体型酪氨酸蛋白磷酸酶 Z1 型 (protein tyrosine phosphatase receptor-type Z1, Ptpz1)、N- $\alpha$ -乙酰转移酶 15 (N-alpha-acetyltransferase 15, Naa15) 10 个枢纽基因,其中 Ebf2、Akap6 和 Vamp2 主要与破骨细胞、骨骼肌发育相关。Ebf2 是调节间充质来源细胞类型分化的转录因子家族,Ebf2 在骨骼形态和功能表达中具有重要作用,研究发现 Ebf2 在

成骨细胞前体细胞表达,可以调节成骨细胞与破骨细胞的分化,并且参与核因子  $\kappa$ B 受体激活剂/核因子  $\kappa$ B 受体激活剂配体 (receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B/receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANK/RANKL) 信号转导调节骨稳态<sup>[22]</sup>。近期研究显示,在 Ebf2 敲除小鼠模型中,Ebf2 的缺失会导致骨吸收增强与骨量减少,这种影响与年龄增加和性别存在相关性<sup>[23]</sup>。Vamp2 是调节细胞内囊泡融合过程的可溶性 N-乙基马来酰亚胺敏感因子附着蛋白受体 (soluble N-ethylmaleimide-sensitive fusion factor attachment protein receptors, SNARE) 蛋白家族成员,研究发现 Vamp2 在大鼠发育过程逐渐表达在心脏、神经纤维、肌节中成肌细胞、骨骼肌中并参与骨骼肌发育<sup>[24]</sup>。Akap6 是人破骨细胞中核膜中心体微管组织中心 (microtubule organizing center, MTOC) 的形成和骨吸收活动进行的必需品<sup>[25]</sup>。Lamp1 是一种糖基化溶酶体膜蛋白,研究报道 Lamp1 可能自噬相关增殖、细胞凋亡、氧化应激的调节因子<sup>[26-27]</sup>。Camta1、Ptpz1 是与肿瘤疾病高度相关的基因靶点,癌病同时也是骨质疏松症的继发原因之一<sup>[28]</sup>。miRNA 在骨骼发育中扮演关键角色,艾灸在这一过程中通过调节成骨细胞与破骨细胞的相互作用来维持骨稳态,这可能是通过这些 miRNA 表达和对靶基因的调节实现的。然而,目前尚无相关研究报道这些差异基因和靶基因与 OP 间的联系,因此在未来需要进一步探索和研究。

对艾灸调控差异表达 miRNA 的靶基因进行 KEGG 通路富集分析发现,差异基因主要富集的信号通路包括 MAPK、Ras、FoxO、TNF 等。丝裂原活化蛋白激酶 (mitogen-activated protein kinase, MAPK) 家族包括细胞外信号调节激酶 MAPK1 或 3 (extracellular signal-regulated kinase, ERK)、c-Jun 氨基末端激酶 MAPK8 (c-Jun N-terminal kinase, JNK),这些信号转导不仅是破骨细胞激活和代谢的主要贡献者<sup>[29]</sup>,同时也能被 miRNA 靶向调节 BMSC 的增殖和成骨分化<sup>[30]</sup>,已有研究报道 miR-142-3p 通过抑制 14-3-3 eta 来调节 MAPK 蛋白家族,增强 BMSC 成骨分化<sup>[31]</sup>。Ras 蛋白是小 GTP 酶的经典成员之一,BMSC 衍生的凋亡细胞外囊泡 (ApoEV) 能够激活 Ras 蛋白通路促进骨形

成<sup>[32]</sup>。FoxO 作为一种细胞内信号因子,属于叉头盒 O 转录调节因子家族,在抗凋亡和抗氧化等生物过程起关键调节作用<sup>[33-34]</sup>。抗肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)超家族中,最常见的炎性细胞因子 TNF- $\alpha$ ,与骨质疏松症的发展有关,有研究发现 TNF- $\alpha$  能够显著抑制 BMSC 中的 miR-27a-3p 的表达进而抑制了成骨分化,一项研究使用去卵巢小鼠与对照组比较发现 TNF- $\alpha$  在 BMSCs 成骨分化中调节一种新的 miR-27a-3p-Sfrp1 轴,并且 miR-27a-3p-Sfrp1 轴通过调节 Wnt3a- $\beta$ -catenin 信号传导在 BMSC 成骨分化中发挥调节功能<sup>[35]</sup>,这些结果提示差异 miRNA 及其靶基因主要富集的通路 OP 的发生发展关系密切,当前已有研究证实艾灸能够调控这些靶基因富集相关通路治疗膝骨关节炎、类风湿性关节炎等疾病<sup>[36-37]</sup>,但缺少艾灸治疗 OP 涉及的靶基因及其富集通路的深入研究。

总之,本研究通过构建大鼠模型,表明艾灸治疗 OP 疗效确切,有助于改善骨微结构和平衡骨代谢。艾灸的作用机制之一在于其对 miRNA 的精细调节,特别是 miR-153-5p、miR-201-5p、miR-449c-5p、miR-451-3p、miR-153-3p 等;这些 miRNA 可能通过调节下游靶基因如 Ebf2、Vamp2、Akap6 等,进一步影响 MAPK、Ras、FoxO、TNF 等信号通路,从而发挥对 OP 的治疗作用。本研究不仅深化了研究者对艾灸治疗 OP 机制的认识,还为新治疗策略的探索提供了重要线索。通过阐明艾灸调节 miRNA 及下游通路促进骨骼健康的机制,为开发针对 OP 等骨骼疾病的新疗法指明了方向,具有深远的科学及临床应用价值。本研究将基于 miRNA 测序,对艾灸治疗 OP 整体疗效和作用机制进行初步探索,但在穴位效应特异性、艾灸治疗特异性等方面仍存在一定局限性,未来研究将考虑增加非特异穴位(非经非穴)作为对照组以研究特异经学对 OP 疗效的特异性,增加单纯温热刺激(香烟、纸棒)对照组以研究艾灸温热之外的治疗效应。

#### 参考文献:

[1] RACHNER T D, KHOSLA S, HOFBAUER L C. Osteoporosis: now and the future [J]. *Lancet*, 2011, 377 (9773): 1276-1287.

[2] CHANDRAN M, BRIND'AMOUR K, FUJIWARA S, et al. Prevalence of osteoporosis and incidence of related fractures in developed economies in the Asia Pacific region: a systematic review [J]. *Osteoporos Int*, 2023, 34(6): 1037-1053.

[3] REID I R, BILLINGTON E O. Drug therapy for osteoporosis in older adults [J]. *Lancet*, 2022, 399 (10329): 1080-1092.

[4] HESARI E, SANJARI M, MANSOURZADEH M J, et al. Osteoporosis medication adherence tools: a systematic review [J]. *Osteoporos Int*, 2023, 34(9): 1535-1548.

[5] 刘静,王彤,徐道明,等.雷火灸对骨质疏松症伴骨骼肌质量减少患者运动功能的影响:随机对照试验[J].*针刺研究*, 2022, 47(9): 809-813.

LIU J, WANG T, XU D M, et al. Effects of thunder-fire moxibustion on the motor function in the patients of osteoporosis with low skeletal muscle mass: a randomized controlled trial [J]. *Acupunct Res*, 2022, 47(9): 809-813.

[6] 黎彦红,王亚军.灸法治疗骨质疏松症的临床应用与实验研究进展[J].*按摩与康复医学*, 2022, 13(8): 78-80.

LI Y H, WANG Y J. Clinical application and experimental research progress of moxibustion in the treatment of osteoporosis [J]. *Chin Manip Rehabil Med*, 2022, 13(8): 78-80.

[7] YANG Y, WANG Y, WANG F, et al. The roles of miRNA, lncRNA and circRNA in the development of osteoporosis [J]. *Biol Res*, 2020, 53(1): 40.

[8] BANIASADI M, TALEBI S, MOKHTARI K, et al. Role of non-coding RNAs in osteoporosis [J]. *Pathol Res Pract*, 2024, 253: 155036.

[9] BELLAVIA D, SALAMANNA F, RAIMONDI L, et al. Deregulated miRNAs in osteoporosis: effects in bone metastasis [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2019, 76(19): 3723-3744.

[10] MOHAMMADISIMA N, FARSHBAF-KHALILI A, OSTADRAHIMI A. Up-regulation of plasma miRNA-21 and miRNA-422a in postmenopausal osteoporosis [J]. *PLoS One*, 2023, 18(10): e0287458.

[11] 周浩伟,王秉谦,张宇辰,等.基于数据挖掘的骨质疏松症动物模型建立与分析[J].*中国实验动物学报*, 2023, 31(8): 1042-1050.

ZHOU H W, WANG B Q, ZHANG Y C, et al. Establishment and analysis of animal models of osteoporosis based on data mining [J]. *Acta Lab Anim Sci Sin*, 2023, 31(8): 1042-1050.

[12] 中国针灸学会.实验动物常用穴位名称与定位第 2 部分:大鼠[J].*针刺研究*, 2021, 46(4): 351-352.

- Chinese Society of Acupuncture and Moxibustion. Names and location of commonly used acupoints in experimental animals Part 2: Rats [J]. *Acupunct Res*, 2021, 46(4): 351-352.
- [13] 余曙光, 郭义. 实验针灸学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2009.
- YU S G, GUO Y. *Experimental acupuncture* [M]. Shanghai: Shanghai Scientific & Technical Publishers, 2009.
- [14] 刘恩琦, 徐慧, 郑好, 等. 基于数据挖掘探究针刺治疗原发性骨质疏松症选穴规律 [J]. *中国中医药信息杂志*, 2022, 29(1): 33-38.
- LIU E Q, XU H, ZHENG H, et al. Exploration on the law of acupoint selection for acupuncture treatment of primary osteoporosis based on data mining [J]. *Chin J Inf Tradit Chin Med*, 2022, 29(1): 33-38.
- [15] 屈佳乐, 刘江, 李念虎, 等. 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(4): 615-620.
- QU J L, LIU J, LI N H, et al. Research the postmenopausal osteoporosis by acupuncture and moxibustion therapy [J]. *Chin J Osteoporos*, 2024, 30(4): 615-620.
- [16] 陶林, 张磊, 李姣, 等. 热敏灸治疗原发性骨质疏松症的系统评价与 Meta 分析 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2022, 28(8): 1109-1114.
- TAO L, ZHANG L, LI J, et al. Efficacy of heat sensitive moxibustion for primary osteoporosis: a systematic review and Meta analysis [J]. *Chin J Osteoporos*, 2022, 28(8): 1109-1114.
- [17] ZOU J, SUN J, CHEN H, et al. The regulatory roles of miR-26a in the development of fracture and osteoblasts [J]. *Ann Transl Med*, 2022, 10(2): 37.
- [18] REN L R, YAO R B, WANG S Y, et al. miR-27a-3p promotes the osteogenic differentiation by activating CRY2/ERK1/2 axis [J]. *Mol Med*, 2021, 27(1): 43.
- [19] WU M, WANG H, KONG D, et al. miR-452-3p inhibited osteoblast differentiation by targeting Smad4 [J]. *PeerJ*, 2021, 9: e12228.
- [20] LI R, RUAN Q, YIN F, et al. miR-23b-3p promotes postmenopausal osteoporosis by targeting MRC2 and regulating the Wnt/ $\beta$ -catenin signaling pathway [J]. *J Pharmacol Sci*, 2021, 145(1): 69-78.
- [21] LAI G, ZHAO R, ZHUANG W, et al. BMSC-derived exosomal miR-27a-3p and miR-196b-5p regulate bone remodeling in ovariectomized rats [J]. *PeerJ*, 2022, 10: e13744.
- [22] KIESLINGER M, FOLBERTH S, DOBREVA G, et al. EBF2 regulates osteoblast-dependent differentiation of osteoclasts [J]. *Dev Cell*, 2005, 9(6): 757-767.
- [23] NIEMINEN-PIHALA V, RUMMUKAINEN P, WANG F, et al. Age-progressive and gender-dependent bone phenotype in mice lacking both Ebf1 and Ebf2 in Prrx1-expressing mesenchymal cells [J]. *Calcif Tissue Int*, 2022, 110(6): 746-758.
- [24] TAJIKA Y, MURAKAMI T, SATO M, et al. VAMP2 is expressed in myogenic cells during rat development [J]. *Dev Dyn*, 2008, 237(7): 1886-1892.
- [25] VERGARAJAUREGUI S, BECKER R, STEFFEN U, et al. AKAP6 orchestrates the nuclear envelope microtubule-organizing center by linking Golgi and nucleus via AKAP9 [J]. *eLife*, 2020, 9: e61669.
- [26] SANMARCO L M, WHEELER M A, GUTIÉRREZ-VÁZQUEZ C, et al. Gut-licensed IFN $\gamma$ <sup>+</sup> NK cells drive LAMP1<sup>+</sup>TRAIL<sup>+</sup> anti-inflammatory astrocytes [J]. *Nature*, 2021, 590(7846): 473-479.
- [27] SONG Y, ZHANG Y, WAN Z, et al. CTRP3 alleviates cardiac ischemia/reperfusion injury via LAMP1/JIP2/JNK signaling pathway [J]. *Aging (Albany NY)*, 2022, 14(3): 1321-1335.
- [28] FITZPATRICK L A. Secondary causes of osteoporosis [J]. *Mayo Clin Proc*, 2002, 77(5): 453-468.
- [29] HU X H, YANG X Y, LIAN J, et al. *Moringa oleifera* leaf attenuate osteoporosis in ovariectomized rats by modulating gut microbiota composition and MAPK signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2023, 161: 114434.
- [30] QI J L, ZHANG Z D, DONG Z, et al. miR-150-5p inhibits the osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells by targeting irisin to regulate the p38/MAPK signaling pathway [J]. *J Orthop Surg Res*, 2024, 19(1): 190.
- [31] LIU Y Q, XU Y C, SHUAI Z W. miR-142-3P regulates MAPK protein family by inhibiting 14-3-3 $\eta$  to enhance bone marrow mesenchymal stem cells osteogenesis [J]. *Sci Rep*, 2023, 13(1): 22862.
- [32] LI M, TANG Q, LIAO C, et al. Extracellular vesicles from apoptotic BMSCs ameliorate osteoporosis via transporting regenerative signals [J]. *Theranostics*, 2024, 14(9): 3583-3602.
- [33] GÓMEZ-PUERTO M C, VERHAGEN L P, BRAAT A K, et al. Activation of autophagy by FOXO3 regulates redox homeostasis during osteogenic differentiation [J]. *Autophagy*, 2016, 12(10): 1804-1816.
- [34] ZHANG Y, XIONG Y, ZHOU J, et al. FoxO1 expression in osteoblasts modulates bone formation through resistance to oxidative stress in mice [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(3): 1401-1408.
- [35] ZHANG D F, JIN X N, MA X, et al. Tumour necrosis factor  $\alpha$  regulates the miR-27a-3p-Sfrp1 axis in a mouse

- model of osteoporosis [J]. *Exp Physiol*, 2024, 109(7): 1109-1123.
- [36] 李琳慧, 何阳梅, 周志刚, 等. 基于 NGF/p38 MAPK/TRPV1 信号通路探讨热敏灸治疗膝骨关节炎的外周敏化效应机制 [J]. *中华中医药杂志*, 2022, 37(3): 1379-1383.
- LI L H, HE Y M, ZHOU Z G, et al. Mechanism of peripheral sensitization on heat-sensitive moxibustion for knee osteoarthritis based on NGF/p38 MAPK/TRPV1 signaling pathway [J]. *China J Tradit Chin Med Pharm*, 2022, 37(3): 1379-1383.
- [37] 牛乾, 谢毅强, 杨帆, 等. 艾灸通过调控信号转导通路干预治疗相关疾病的研究进展 [J]. *甘肃中医药大学学报*, 2018, 35(6): 94-96.
- NIU Q, XIE Y Q, YANG F, et al. Moxibustion for intervention treatment of related diseases by regulating signaling transduction pathways [J]. *J Gansu Univ Chin Med*, 2018, 35(6): 94-96.
- 〔收稿日期〕2024-12-24

编者·读者·作者

## 《中国比较医学杂志》不接受重复投稿说明

本刊严格执行国家有关科研诚信建设的相关规定及标准,包括但不限于《CY/T 174-2019: 学术出版规范 期刊学术不端行为界定》、《关于进一步加强科研诚信建设的若干意见》(国务院公报 2018 年第 17 号)、《发表学术论文“五不准”》(科协发组字[2015]98 号)等,严肃对待各种学术不端行为。

本刊不接受重复发表(包括不同语种),也不允许作者一稿多投。具体表现形式包括:  
重复发表:

- a) 不加引注或说明,在论文中使用自己(或自己作为作者之一)已发表文献中的内容。
- b) 在不做任何说明的情况下,摘取多篇自己(或自己作为作者之一)已发表文献中的部分内容,拼接成一篇新论文后再次发表。
- c) 被允许的二次发表不说明首次发表出处。
- d) 不加引注或说明地在多篇论文中重复使用一次调查、一个实验的数据等。
- e) 将实质上基于同一实验或研究的论文,每次补充少量数据或资料后,多次发表方法、结论等相似或雷同的论文。

f) 合作者就同一调查、实验、结果等,发表数据、方法、结论等明显相似或雷同的论文。  
一稿多投:

- a) 将同一篇论文同时投给多个期刊。
- b) 在首次投稿的约定回复期内,将论文再次投给其他期刊。
- c) 在未接到期刊确认撤稿的正式通知前,将稿件投给其他期刊。
- d) 将只有微小差别的多篇论文,同时投给多个期刊。
- e) 在收到首次投稿期刊回复之前或在约定期内,对论文进行稍微修改后,投给其他期刊。
- f) 在不做任何说明的情况下,将自己(或自己作为作者之一)已经发表论文,原封不动或做些微修改后再次投稿。

若存在以上问题,一经查实,编辑部有责任揭露,给予书面警告,拒绝发表有其署名的文稿,通知其所在单位,并在我刊公开曝光。

《中国比较医学杂志》编辑部