

整合脂质代谢重编程与转录调控网络解析 健脾活骨方治疗激素性股骨头坏死的功效科学内涵

李涛¹, 张楚¹, 贾雁², 陈卫衡², 林娜^{1*}, 张彦琼^{1*}

(1. 中国中医科学院 中药研究所, 北京 100700; 2. 北京中医药大学 第三附属医院, 北京 100029)

[摘要] 综合运用临床转录组学、脂质代谢组学与生物分子网络挖掘技术,系统解析健脾活骨方治疗激素性股骨头坏死(SONFH)痰瘀阻络证的功效科学内涵。研究发现,健脾化痰组(党参、白术、茯苓、陈皮)通过115种化学成分靶向ALDH7A1、ACOX1等效应靶标基因,调控AMPK、鞘脂信号通路,显著降低甘油二酯(DAG)、胆固醇酯水平,有效纠正脂代谢紊乱;活血通络组(当归、川芎、赤芍、牛膝、桂枝)凭借197种化学成分干预趋化因子、NOD样受体通路,抑制中性粒细胞诱捕网形成,下调炎症因子表达,促进血管功能修复;补肾强骨组(熟地黄、鹿角)则通过调控PI3K/Akt、Ras/MAPK信号通路,抑制破骨分化基因CTSK和MMP9,推动骨稳态重建。进一步对健脾活骨方治疗SONFH前后的临床血样进行转录组学和脂质代谢组学检测,经多组学整合分析,揭示该方3个功效组协同构建起“脂代谢-免疫-骨稳态”多维作用网络。临床转录组筛选出594个方药干预前后差异表达的效应靶标基因(367个下调,227个上调),临床脂质代谢组鉴定出179个与方药疗效相关的差异脂质代谢物(以甘油三酯和DAG为主),结合2657个病证基因构建“病-证-症-方”关联网络。通过拓扑特征值计算与功能挖掘显示,健脾活骨方干预SONFH的核心网络靶标主要通过调节破骨细胞分化、细胞凋亡、Ras、MAPK、PI3K/Akt和p53等信号通路,实现抑制破骨细胞活性、促进成骨细胞增殖、平衡骨吸收与骨形成过程、改善骨髓微环境的作用。该研究系统揭示了健脾活骨方通过“脂质代谢重编程-转录调控网络”协同作用,从脂代谢、炎症、骨重塑3个关键维度干预SONFH病理进程的功效科学内涵,充分体现了中医药复方多成分、多靶点、多通路协同调节的整体优势,为阐释中医药防治SONFH的作用机制提供了创新视角与数据支撑。

[关键词] 激素性股骨头坏死; 痰瘀阻络证; 健脾活骨方; 脂质代谢重编程; 转录组学

Scientific connotation of Jianpi Huogu Formula in treating steroid-induced ONFH based on lipid metabolism reprogramming and transcriptional regulatory network

LI Tao¹, ZHANG Chu¹, JIA Yan², CHEN Wei-heng², LIN Na^{1*}, ZHANG Yan-qiong^{1*}

(1. Institute of Chinese Materia Medica, China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100700, China;

2. Third Affiliated Hospital, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 100029, China)

[Abstract] This study systematically elucidated the scientific connotation of Jianpi Huogu Formula in treating phlegm-stasis blocking collaterals syndrome in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (SONFH) by integrating clinical transcriptomics, lipid metabolomics, and biomolecular network mining techniques. The invigorating the spleen and resolving phlegm group (Codonopsis Radix, Atractylodes Macrocephalae Rhizoma, Poria, and Citri Reticulatae Pericarpium) targeted effective target genes such as ALDH7A1 and ACOX1 through 115 chemical components, regulated the AMPK and sphingolipid signaling pathways, significantly

[收稿日期] 2025-06-09

[基金项目] 国家自然科学基金重点(82030122);国家自然科学基金面上项目(82474548);深圳“医疗卫生三名工程”中医药高层次医疗团队立项项目(SZZYSM202311020)

[通信作者] *张彦琼,研究员,主要从事临床中药学研究,E-mail:yqzhang@icmm.ac.cn; *林娜,研究员,主要从事抗炎免疫中药药理学研究,E-mail:nlin@icmm.ac.cn

[作者简介] 李涛,博士研究生,E-mail:qd_litao1218@126.com

reduced the levels of diacylglycerol (DAG) and cholesterol esters, and effectively corrected lipid metabolism disorders. The activating blood circulation and dredging collaterals group (Angelicae Sinensis Radix, Chuanxiong Rhizoma, Paeoniae Radix Rubra, Achyranthis Bidentatae Radix, and Cinnamomi Ramulus) exerts effects through 197 chemical components by intervening in the chemokine and NOD-like receptor pathways, inhibiting the formation of neutrophil extracellular traps (NETs), downregulating inflammatory factor expression, and promoting vascular function repair. The tonifying the kidney and strengthening bones group (Rehmanniae Radix Praeparata and Cervi Cornu) regulated the PI3K/Akt and Ras/MAPK signaling pathways, inhibited osteoclast differentiation genes CTSK and MMP9, and facilitated the reconstruction of bone homeostasis. Transcriptomic and lipid metabolomic analyses were performed on clinical blood samples collected before and after treatment with Jianpi Huogu Formula. Multi-omics integration revealed that the three efficacy groups synergistically constructed a multidimensional network involving "lipid metabolism-immunity-bone homeostasis". A total of 594 differentially expressed effector genes (367 downregulated and 227 upregulated) were identified via clinical transcriptomics, and 179 differential lipid metabolites (mainly triglycerides and DAG) associated with the formula's efficacy were identified via lipid metabolomics. Together with 2 657 disease/syndrome-related genes, a "disease-syndrome-symptom-formula" association network was constructed. Topological eigenvalue analysis and functional mining indicated that the core network targets of Jianpi Huogu Formula in intervening SONFH mainly regulated signaling pathways such as osteoclast differentiation, apoptosis, Ras, MAPK, PI3K/Akt, and p53, thereby inhibiting osteoclast activity, promoting osteoblast proliferation, balancing bone resorption and formation, and improving the bone marrow microenvironment. This study systematically reveals the scientific basis of Jianpi Huogu Formula in intervening in the pathological process of SONFH through the synergistic action of "lipid metabolism reprogramming-transcriptional regulatory network" from three key dimensions, *i. e.*, lipid metabolism, inflammation, and bone remodeling. It fully demonstrates the holistic advantages of traditional Chinese medicine (TCM) formulas in multi-component, multi-target, and multi-pathway coordinated regulation, and provides an innovative perspective and data support for elucidating the mechanism of TCM in the prevention and treatment of SONFH.

[Key words] steroid-induced osteonecrosis of the femoral head; phlegm stasis blocking collaterals syndrome; Jianpi Huogu Formula; lipid metabolism reprogramming; transcriptomics

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20250717.402

在现代医学领域,糖皮质激素凭借其强大的抗炎与免疫调节作用,在炎症性疾病治疗及器官移植抗排斥中占据不可替代的地位。然而,其长期或大剂量使用引发的激素性股骨头坏死(SONFH),正成为严重威胁患者生存质量的棘手难题^[1-2]。流行病学数据显示,长期使用激素人群中 SONFH 发生率高达 9.9%~40%,然而临床特异性治疗手段却极为匮乏^[3]。中医药以整体观念和辨证论治为指导,在早期 SONFH 的干预治疗方面颇具优势和特点,股骨头坏死已成为中医药优势病种之一。基于“肾主骨生髓”“脾主运化”理论,中医认为股骨头坏死属于“骨蚀”“骨痿”范畴^[4],其核心病机为“本虚标实,痰瘀互结”。陈卫衡教授提出的“脾虚生痰,由痰致瘀,因瘀致痹”三期四型辨证学说,系统阐释了 SONFH 的动态演变规律:激素损伤脾胃致痰湿内生(I 期)→痰阻脉络致血瘀痹阻(II 期)→痰瘀互结致骨败筋萎(III 期)^[5]。临床流行病学调查显示,早期 SONFH 患者中痰瘀阻络证占比达 62.3%,其病性证素以痰湿血瘀为主,病位证素以脾为主,印证了本病“早期

在脾”的证候规律和“痰瘀同病”的病机特点^[6]。

现代研究证实,脂代谢紊乱和血管内凝血是“痰瘀同病”的病理实质:痰证对应脂质代谢异常,如低密度脂蛋白升高、高密度脂蛋白降低;瘀证对应高凝状态,如纤维蛋白原升高、抗凝血酶Ⅲ活性下降^[7]。临床队列研究发现,SONFH 痰瘀阻络型患者载脂蛋白 A1、高密度脂蛋白胆固醇水平较健康对照组分别降低 37.2%、28.6%,而纤维蛋白原水平显著升高,提示脂-凝代谢网络失衡可作为该证型的客观化诊断指标^[8]。基于此,健脾活骨方由苓桂术甘汤和四物汤加减化裁而成,由赤芍、茯苓、党参、当归、川芎、川牛膝、白术、桂枝、熟地黄等组成,通过“健脾化痰-活血通络-补肾壮骨”三法联动发挥良好的 SONFH 治疗作用^[9-11]。随机对照试验显示,该方干预早中期 SONFH 患者 12 个月后,Harris 髋关节评分提高 29.7%,股骨头塌陷率较对照组降低 41.3%,疗效与髓芯减压术相当但并发症发生率显著降低^[12]。基础研究进一步揭示,健脾活骨方可下调过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR) γ mRNA 表

达,上调 Runt 相关转录因子 2(Runx2)/Osterix 成骨基因,并降低血清氧化低密度脂蛋白(ox-LDL)水平^[13],但其多成分、多靶点的作用机制尚未系统阐明。因此,本研究以“脂质代谢重编程与转录调控网络协同互作”为切入点,综合运用临床转录组学、脂质代谢组学与生物分子网络挖掘技术,系统解析健脾活骨方治疗 SONFH 痰瘀阻络证的功效科学内涵。

1 材料与方法

1.1 试剂与仪器 DNA 含量检测试剂盒(批号 CA1510)购自北京索莱宝科技有限公司;TRIzol 试剂(批号 10296028)、逆转录试剂盒(批号 K1691)购自美国 Invitrogen 公司。低温离心机(型号 5840R,德国 Eppendorf 公司);3.0 Quibit Fluorometer 荧光定量仪(型号 Q33216,美国 ThermoFisher Scientific 公司)。

1.2 伦理声明 本研究经中国中医科学院望京医院(批准号 WJEC-KT-2016-009-P003)和北京中医药大学第三附属医院(批准号 BZYSY-2021KYKTPJ-01)伦理委员会批准。

1.3 研究对象 病例组来源于中国中医科学院望京医院和北京中医药大学第三附属医院明确诊断为 SONFH 痰瘀阻络证的患者,收集时间为 2021 年 12 月至 2022 年 8 月,共计 4 例。分别于诊断为 SONFH 痰瘀阻络证时和服用健脾活骨方治疗 3 个月后收集静脉全血样本。

所有入组患者均已完成相应阶段的病例报告表(CFR)填写和全血样本的收集。全血样本保存于北京中医药大学第三附属医院-80℃冰箱。临床研究根据《赫尔辛基宣言》中表达的原则进行,所有患者都同意参加这项研究并签署知情同意书。SONFH 痰瘀阻络证患者一般情况见表 1。

1.4 纳入和排除标准 纳入标准:①符合 MONT MA 等^[14]1995 年提出的股骨头坏死诊断标准;②符合 ARCO 2019 更新版本中的影像分期标准^[15];③符合《股骨头坏死中医辨证标准(2019 年版)》^[16]制订的中医辨证标准;④没有明显的直接创伤史;⑤既往有明确的糖皮质激素使用史,激素类型、用法不限;⑥年龄≥18 周岁;⑦自愿签署知情同意书,能够配合完成病史记录和血样采集。

排除标准:①糖皮质激素用药史不详者;②长期酗酒史者;③患有严重危及生命的全身性疾病或精

表 1 SONFH 痰瘀阻络证患者一般情况比较

Table 1 Comparison of general conditions of SONFH patients with phlegm stasis blocking collaterals syndrome

基线变量		SONFH 痰瘀阻络证病例组
性别	男	2
	女	2
年龄	中位数(范围)	34.5(20~67)
	$\bar{x} \pm s$	22.00±1.68
体质量指数(BMI)/kg·m ⁻²	中位数(范围)	21.59(20.62~24.22)
	$\bar{x} \pm s$	22.00±1.68
总胆固醇/μmol·L ⁻¹	中位数(范围)	3.84(2.89~4.49)
	$\bar{x} \pm s$	3.76±0.76
甘油三酯/μmol·L ⁻¹	中位数(范围)	0.9(0.62~3.25)
	$\bar{x} \pm s$	1.42±1.23
低密度脂蛋白/μmol·L ⁻¹	中位数(范围)	2.11(1.42~2.80)
	$\bar{x} \pm s$	2.11±0.62
高密度脂蛋白/μmol·L ⁻¹	中位数(范围)	1.09(1.01~1.16)
	$\bar{x} \pm s$	1.09±0.06
治疗药物种类	N/A	曲安奈德、甲强龙、强的松
激素持续治疗时间/d	中位数(范围)	23(8~120)
	$\bar{x} \pm s$	43.5±51.49
ARCO 分期	N/A	ARCO II 期
Harris 髋关节评分/分(左)	中位数(范围)	83(79~98)
	$\bar{x} \pm s$	85.75±8.38
Harris 髋关节评分/分(右)	中位数(范围)	75(64~96)
	$\bar{x} \pm s$	77.50±13.75

注:N/A. 未规定特定的药物种类。

神疾病,或可能对研究结果造成干扰的疾病,如脑卒中、心力衰竭、急性心肌梗死、癌症、骨折、结核、感染、癫痫、抑郁症、精神分裂等;④无法配合完成研究所必需的信息并可能因此影响结果分析者。

1.5 健脾活骨方理论与功效组的划分 围绕健脾活骨方的核心功效与遣药组方特点,将其拆分为健脾化痰组(党参、白术、茯苓、陈皮),活血通络组(当归、川芎、赤芍、牛膝、桂枝)和补肾强骨组(熟地黄、鹿角)3 个功效组,全方补泻兼施,气血同调,符合“痰瘀同治,脾肾双补”的治则。

1.6 健脾活骨方化学成分及候选靶标谱的收集 通过 ETCM v2.0 数据库^[17-18](<http://www.tcmip.cn/ETCM2/front/#/>)收集方中 11 味中药所含化学成分,选择与健脾活骨方所含各成分结构相似度(similar score)>0.70 的已知药物靶标为该方的候选靶标,并构成“化学成分预测靶标基因集”。

1.7 临床效应靶标获取 分别收集健脾活骨方治疗前与治疗后的临床全血细胞样本 ($n=4$) 进行转录组测序 (mRNA-Seq), 以筛选健脾活骨方临床效应靶标基因。参照 $P<0.05$ 、倍数变化 (FC) >1.5 或 $FC<0.67$ 的筛选标准确定差异基因集, 并构成“临床效应靶标基因集”。

1.8 病证相关基因收集 基于《股骨头坏死中医辨证标准(2019 年版)》^[16] 关于 SONFH 痰瘀阻络证的主次症信息, 通过 HPO 数据库检索痰瘀阻络证的症状相关基因集, 检索词条及痰瘀阻络证主次症信息见表 2。

表 2 SONFH 痰瘀阻络证主次症检索词条

Table 2 Retrieval entries for primary and secondary symptoms of SONFH with phlegm stasis blocking collaterals syndrome

症状	检索词条	主症/次症
髋疼痛	hip pain/arthritis of the hip	主症
静息痛	episodic pain/paroxysmal pain	主症
关节沉重	joint swelling	主症
舌胖大	tongue edema	次症
舌紫/青/暗或有瘀斑	ecchymosis	次症
胸脘满闷	chest tightness	次症
形体肥胖	obesity/overweight	次症
食少纳呆	anorexia/indigestion/dyspepsia	-
消化不良	indigestion/dyspepsia	-
头重如裹	vertigodizziness	-
口干不欲饮	xerostomia	-
脘痞不舒	epigastric pain	-
食后腹胀	abdominal distention	-
便溏	loose stool	-
嗜睡	lethargy	-
跛行	intermittent claudication	-

注: -, 未在《股骨头坏死中医辨证标准(2019 年版)》中收录的主次症。

1.9 差异脂质代谢物获取 收集健脾活骨方治疗前后且疗效确切的 4 对自体对照患者的临床血清样本, 采用 UPLC-MS/MS 进行脂质组学检测, 以筛选差异脂质代谢物。参照 $P<0.05$ 、投影变量重要性 (VIP) >1 的标准筛选差异脂质代谢物集, 确定为“临床差异脂质代谢物集”。

1.10 网络拓扑特征值计算和关键网络靶标功能挖掘 通过 STRING 11.5 构建健脾活骨方候选靶标与 SONFH 相关基因的相互作用网络, 设置基因间相互作用信息的最低置信度评分为 0.7; 利用

Cytoscape 3.8.2 计算网络节点的拓扑特征值 (最大连通分量、连接度、接近中心性、中介中心性), 筛选 3 个拓扑特征值均大于相应中位数的节点作为关键网络靶标, 进而利用 Navigator 2.3 计算健脾活骨方关键网络靶标与疾病相关基因之间的最短路径值, 以此衡量 2 个基因在网络中的接近度, 并筛选网络接近度居于前 10 位的关键网络靶标作为该方干预疾病的关键作用靶标, 用于后续的生物功能挖掘。

1.11 通路富集分析 整合“化学成分预测靶标基因集”“临床效应靶标基因集”“病证表型相关基因集”“临床差异脂质代谢物集”, 运用 MetaboAnalyst 3.5 进行整合分析, 以 $P<0.05$ 为筛选条件获取目标通路。

1.12 qPCR 检测临床血细胞样本中相关基因的 mRNA 表达 利用健脾活骨方治疗前与治疗后的临床全血细胞样本 ($n=4$), 采用 TRIzol 总 RNA 提取试剂进行样本 RNA 提取; 反应体积 20 μL , 反应体系含样本 RNA 2 μL , Master Mix 10 μL , 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物各 0.4 μL 。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 30 s, 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 10 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火/延伸 30 s, 共 40 个循环。反应结束后进行熔解曲线分析以鉴定 PCR 产物的特异性。使用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算胰岛素样生长因子 1 受体 (IGF1R)、cAMP 应答元件结合蛋白 1 (CREB1)、醛脱氢酶 9A1 (ALDH9A1)、脱氧胞苷激酶 (DCK)、嘌呤核苷磷酸化酶 (PNP)、丝裂原活化蛋白激酶 1 (MAPK1)、脾酪氨酸激酶 (SYK)、中性粒细胞胞质因子 1 (NCF1)、Rac GTP 酶 2 (RAC2)、中性粒细胞胞质因子 4 (NCF4)、细胞色素 b-245 β 链 (CYBB)、精氨酸酶 1 (ARG1)、蛋白激酶 C α 型 (PRKCA)、B 细胞淋巴瘤 2 蛋白 (BCL2)、蛋白激酶 B (AKT1)、泛醇-细胞色素 C 还原酶复合物 III 亚基 VII (UQCRCQ)、蛋白激酶 C β 型 (PRKCB)、BCL2 样蛋白 1 (BCL2-like 1, BCL2L1) mRNA 相对表达。引物序列见表 3。

1.13 统计学分析 使用 GraphPad Prism 8.0 软件进行统计分析。数据以平均值 $\pm$ 标准差 ($\bar{x}\pm s$) 表示, 并通过单因素方差分析和 Bonferroni's 或 Dunnett's post-hoc 检验进行多列对比分析。 $P<0.05$ 认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 健脾化痰组多成分、多靶点、多代谢物调控机制解析 健脾化痰组 (党参、白术、茯苓、陈皮) 共有

表 3 引物序列信息

Table 3 Information for primer sequences

引物	序列(5'-3')
IGF1R	上游:TACTCGGACGTCTGGTCCTT 下游:TGGGGTTATACTGCCAGGAC
CREB1	上游:CATGGATTCTGTCTCTCA AG 下游:GTCCAGGCAGCTTGAGTA AT
ALDH9A1	上游:TGGAGTCAAAAATCTGGCATGG 下游:AGTAGCAATTTTCCTCCCGT
DCK	上游:ATGCCTGTCTCAGTGAATAAGA 下游:TGATTCCATCCAATTCAAGGCTT
PNP	上游:CTAAGCACCGACCTCAAGTTG 下游:GGGGATTTACCGTACTCAAAGA
MAPK1	上游:TACACCAACCTCTCGTACATCG 下游:CATGTCTGAAGCGCAGTAAGATT
SYK	上游:TGCACTATCGCATGACAAAG 下游:CATTTCCTGTGTGCCGATTT
NCF1	上游:GGGGCGATCAATCCAGAGAAC 下游:GTACTCGGTAAGTGTGCCCTG
RAC2	上游:CAACGCCTTTCCCGGAGAG 下游:TCCGTCTGTGGATAGGAGAGC
NCF4	上游:CGGGCCGAGACTGACTTTTG 下游:TCTTACCTCGATGACGAAAAAC
CYBB	上游:ACCGGGTTTATGATATCCACCT 下游:GATTTCCAGAGACTGGCAAGA
ARG1	上游:GTGGAAGTTCATGGACAAC 下游:AATCCTGGCACATCGGGAATC
PRKCA	上游:GTCCACAAGAGGTGCCATGAA 下游:AAGGTGGGCTTCCGTAAGT
BCL2	上游:GGTGGGTCATGTCTGTGG 下游:CGGTTCAAGTACTCAGTCATCC
AKT1	上游:ACCGACGTGGCTATTGTGAAG 下游:GCCATCATTCTTGAGGAGGAAGT
UQCRCQ	上游:CGCGAGTTTGGGAATCTGAC 下游:TAGTGAAGACGTGCGGATAGG
PRKCB	上游:AGCCCCACGTTTTGTGACC 下游:GCTGGGAACATTATCATCAGC
BCL2L1	上游:GAGCTGGTGGTTGACTTTTCTC 下游:TCCATCTCCGATTCAAGTCCCT
GAPDH	上游:GAAGGTGAAGTCCGAGTC 下游:GAAGATGCTGATGGGATTTT

115 个化学成分,如洋川芎内酯 C(senkyunolide C)、党参苷 V(tangshenoside V)、茴香苷(foeniculin)、红苋甾酮(rubrosterone)、白术内酯 II(atractylenolide II)、白术内酯 A(atractyloside A)、淫羊藿苷 D2(icariside D2)、橙皮苷(hesperidin)、杯苋甾酮(cyasterone)、柠檬苦素(limonin)、它莫昔芬(tamoxifen)、刺桐苷 A(spinoside A)等,其候选靶标共计 1 035 个,如 ALDH7A1、ALDH9A1、ACOX1、ACADS、MDH2、

SDHA、DLD、GSK3B、BCL2、MAPK1 等。功能富集分析结果显示,该功效组的优势药效环节为改善脂质代谢紊乱,同时参与纠正能量代谢、氨基酸代谢、核苷酸和辅因子等方面的代谢紊乱,相关靶标与通路见图 1。联合临床脂质代谢组的分析结果显示,该功效组主要通过影响卵磷脂、甘油二酯、N-酰基鞘氨醇、磷脂酰乙醇胺、胆固醇酯和 2-溶血卵磷脂,发挥调节脂质代谢紊乱的药理作用。相关差异脂质代谢物含量见表 4。

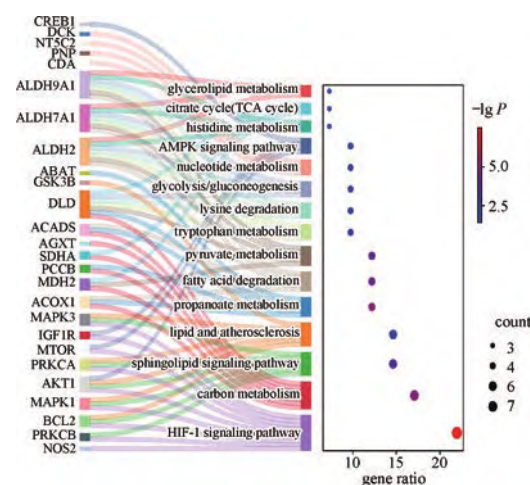


图 1 健脾化痰组核心功效靶标的显著相关通路富集

Fig. 1 Significantly relevant pathway enrichment for core efficacy targets in the invigorating spleen and resolving phlegm group

2.2 活血通络组多成分、多靶点、多代谢物调控机制解析 活血通络组(当归、川芎、赤芍、牛膝、桂枝)共有 197 个化学成分,如表儿茶素(epicatechin)、芍药苷 C(paeonins C)、阿魏酸(ferulic acid)、麦角苷(eriocitrin)、洋川芎内酯 A(senkyunolide A)、洋川芎内酯 B(senkyunolide B)、洋川芎内酯 R2(senkyunolide R2)、白花前胡素(narirutin)、前花青素 B2(proanthocyanidin B2)、毛地黄酸(trichoderic acid)、大黄素苷(verbasoside)、鱼藤碱(codonopsine)、丁香酸(syringic acid)、芍药内酯苷(paeonisuffrone)、芍药苷(paeonicluside)、牡丹皮苷 G(mudanpioside G)、牡丹皮苷 F(mudanpioside F)、绿原酸(chlorogenic acid)和异毛地黄苷(isomaltopaeoniflorin)等,其候选靶标共计 555 个,如 LYN、CASP3、NCF4、CYBB、CYBA、RAC2、SYK、NOS2、NCOA1、PRKCD、RARA、ESR1 等。功能富集分析结

表 4 健脾活骨方治疗 SONFH 临床差异脂质代谢物的含量
($\bar{x} \pm s, n=3$)

Table 4 Content of clinically differential lipid metabolites in the treatment of SONFH with Jianpi Huogu Formula($\bar{x} \pm s, n=3$)

No.	脂质名称	治疗前/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	治疗后/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
1	LPC(16;0)	3 889.32±463.64	3 661.00±130.25
2	PC(16;0/22;4)	626.52±88.63	837.43±92.43
3	PC(16;1/20;5)	18.96±1.85	41.73±5.88
4	PC(18;0/18;1)	4 251.44±275.86	3 732.67±581.53
5	PC(18;0/20;2)	228.04±44.47	445.72±49.88
6	PC(18;0/20;3)	3 806.79±422.74	4 207.13±557.11
7	PC(18;0/22;4)	197.44±21.93	333.93±36.27
8	PC(18;0/22;5)	584.23±111.66	863.39±61.72
9	PC(18;0/22;6)	938.46±99.77	1 530.23±37.60
10	PC(18;1/18;3)	120.57±22.07	212.82±48.48
11	PC(18;2/18;3)	88.81±13.81	155.80±50.42
12	PC(18;2/20;0)	24.04±5.05	40.22±2.83
13	PC(18;2/20;3)	322.13±46.74	502.07±39.62
14	PC(20;1/20;3)	42.00±8.19	56.09±6.68
15	PC(20;5/22;5)	38.33±6.25	66.66±2.51
16	PC(20;5/22;6)	41.55±4.81	94.81±9.27
17	CE(20;0)	46.30±5.82	71.57±7.37
18	CE(20;3)	15 837.17±1 621.40	26 277.26±335.21
19	CE(22;2)	23.45±2.21	57.30±7.59
20	CER(d18;1/20;0)	33.77±3.68	47.87±5.48
21	CER(d18;1/22;0)	343.55±46.94	555.39±43.21
22	DAG(16;0/16;0)	1 972.21±102.84	2 388.12±525.08
23	DAG(16;0/16;1)	230.37±7.85	395.95±30.70
24	DAG(16;0/18;0)	2 097.38±92.21	3 307.51±224.78
25	DAG(16;0/20;0)	25.12±1.18	27.09±1.81
26	DAG(16;0/20;1)	6.69±0.33	10.62±1.16
27	DAG(16;1/16;1)	185.86±7.02	260.51±35.66
28	DAG(16;1/18;0)	28.04±3.27	36.27±1.97
29	DAG(16;1/20;1)	2.61±0.39	4.11±0.83
30	DAG(18;0/18;0)	1 862.67±52.04	3 406.58±408.49
31	DAG(18;0/20;0)	13.19±0.959	26.16±2.83
32	DAG(18;0/20;1)	1.87±0.33	3.99±0.49
33	DAG(20;0/20;4)	7 759.79±699.27	10 263.72±925.07
34	PE(P-16;0/22;6)	10.62±0.79	22.13±3.09

果显示,该功效组的优势药效环节为改善机体“免疫-炎症”失衡,同时参与调节血小板运动和血液流变学、扩张血管等,从而改善局部微循环障碍,减轻局部疼痛,相关靶标与通路见图 2。联合临床脂质代谢组的分析结果显示,该功效组主要通过影响甘油二酯发挥调节“免疫-炎症”失衡和血管功能的药理作用。相关差异脂质代谢物含量见表 4。

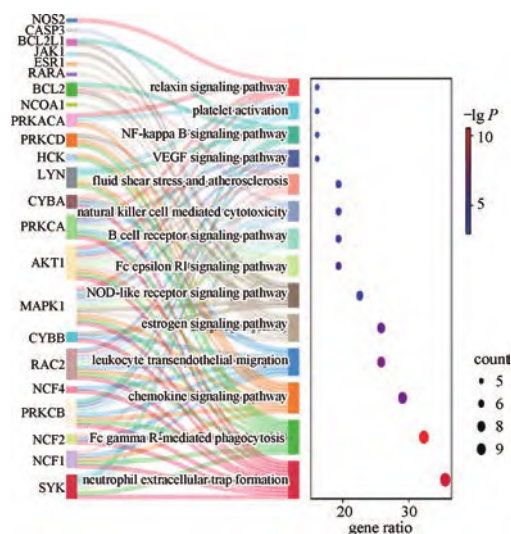


图 2 活血通络组核心功效靶标的显著相关通路富集

Fig. 2 Significantly relevant pathway enrichment for core efficacy targets in the activating blood circulation and dredging collaterals group

2.3 补肾强骨组多成分、多靶点、多代谢物调控机制解析 补肾强骨组(熟地黄、鹿角)共有 11 个化合物,如四甲基-O-菟丝子苷(tetramethyl-O-scutellarin)、异橙黄苷(isosinensetin)、硒酞酸 B(ceanphytamic acid B)、豆甾醇-β-葡萄糖苷(stigmasterol-β-glucoside)和甜菜黄素(betavulgarin)等,其候选靶标共计 274 个,如 CTSK、MMP9、CASP3、BCL2、AKT1、BCL2L1、PRKCA、PRKCB、NCF1、NCF2、NCF4、MAPK3 等。功能富集分析结果显示,该功效组的优势药效环节为调节破骨细胞的增殖和分化,同时参与调节局部骨细胞营养代谢,从抑制骨流失与促进骨形成 2 个层面改善骨骼健康,相关靶标与通路见图 3。联合临床脂质代谢组的分析结果显示,该功效组主要通过影响甘油二酯、胆固醇酯和 2-溶血卵磷脂发挥改善骨髓微环境的药理作用。相关差异脂质代谢物在健脾活骨方干预前后的含量变化特征见表 4。

2.4 健脾活骨方三法协同治疗 SONFH 痰瘀阻络证的多维网络调控机制解析 根据 $P<0.05$ 、 $FC>1.5$ 或 $FC<0.67$ 的筛选标准,从临床转录组学数据中共获得 594 个健脾活骨方治疗 SONFH 前后的差异表达基因,其中,367 个下调表达基因,227 个上调表达基因(见中国知网本文增强出版附加材料)。根据 $P<0.05$ 、 $VIP>1$ 的筛选标准,从临床脂质代谢组学

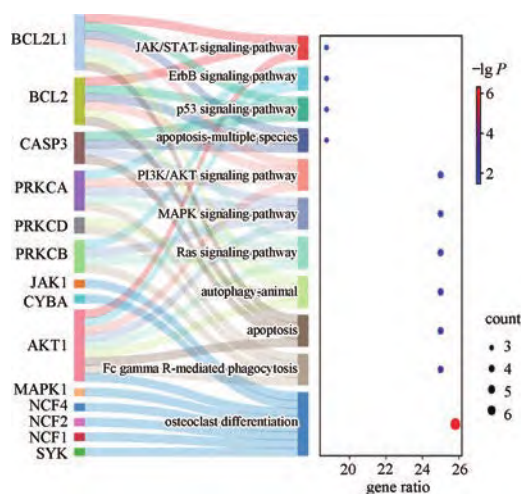


图 3 补肾强骨组核心功效靶标的显著相关通路富集

Fig. 3 Significantly relevant pathway enrichment for core efficacy targets in the tonifying the kidney and strengthening bones group

数据中共得到 179 个与健脾活骨方治疗 SONFH 疗效相关的差异脂质代谢物, 包含 11 种差异脂质类型, 其中, 甘油三酯和甘油二酯数目最多, 占所有差异脂质的 63.6%; 2-溶血卵磷脂 (LPC) 和磷脂酸 (PA) 在给药干预后含量降低, 而其他差异脂质均在给药干预后含量增加 (见中国知网本文增强出版附加材料)。

本课题组前期利用 SONFH 痰瘀阻络证患者与健康受试者全血样本, 通过临床转录组测序, 获得了 SONFH 痰瘀阻络证的差异表达基因集^[19]。根据 $P < 0.05$ 、 $FC > 1.5$ 或 $FC < 0.67$ 的筛选标准, 得到 1 748 个差异表达基因, 其中, 1 124 个上调表达基因和 624 个下调表达基因。基于《股骨头坏死中医辨证标准 (2019 年版)》^[16] 关于 SONFH 痰瘀阻络证的主次症信息, 通过 HPO 数据库检索痰瘀阻络证症状相关基因集, 共得到 909 个症状相关基因。合并上述 2 个基因集, 去冗余后得到包含 2 657 个基因的“病证表型相关基因集”。

根据健脾活骨方“健脾化痰组化学成分预测靶标谱”“临床效应靶标谱”“病证表型相关基因集”所含基因之间的相互作用信息, 建立“病证基因-方药靶标”网络, 通过网络拓扑特征值计算 (最大连通分量 ≥ 2 , 连接度 ≥ 3 , 接近中心性 $\geq 28.668\ 33$, 中介中心性 ≥ 1) 和筛选得到 42 个网络核心靶标。功能富集结果显示, 上述网络核心靶标主要参与调节 SON-

FH 发病相关的脂代谢紊乱环节, 通过调节甘油脂代谢、脂肪酸降解、鞘脂信号通路、脂质与动脉粥样硬化、AMPK 信号通路、磷脂酶 D 信号通路等抑制脂肪合成酶活性、增强抗氧化能力, 减少脂肪的吸收和堆积, 改善机体脂质代谢紊乱。根据组方中药的功效特点可知, 健脾化痰组 4 味中药均入脾经, 其中党参和白术协同补气健脾, 茯苓和白术祛湿再加陈皮理气, 共同促进脾胃运化, 减少痰湿生成, 从根源上改善脾虚痰湿的病理基础, 进而调节脂质代谢, 改善 SONFH 患者舌胖大、舌紫青或有瘀斑、形体肥胖、食少纳呆、腹胀和便溏的症状。

根据健脾活骨方“活血通络组化学成分预测靶标谱”“临床效应靶标谱”“病证表型相关基因集”所含基因之间的相互作用信息, 建立“病证基因-方药靶标”网络, 通过网络拓扑特征值计算 (最大连通分量 ≥ 2 , 连接度 ≥ 2 , 接近中心性 $\geq 10.426\ 19$, 中介中心性 ≥ 0) 和筛选得到 31 个网络核心靶标。功能富集结果显示, 上述网络核心靶标主要参与调节 SONFH 发病相关的“免疫-炎症”失衡和血管功能等病理环节, 通过调节中性粒细胞胞外陷阱的形成、趋化因子信号通路、NOD 样受体信号通路、B 细胞受体信号通路、血小板活化、血管内皮生长因子信号通路等抑制炎症因子水平、调节免疫细胞活性, 同时扩张血管, 改善血液循环。根据组方中药的功效特点可知, 活血通络组 5 味中药中当归补血活血, 川芎活血行气, 赤芍清热凉血, 桂枝温通经脉、助阳化气, 牛膝引血下行, 5 味药通过活血化瘀、清热凉血、温通散寒的协同作用, 实现多靶点调节“免疫-炎症”失衡和血管功能, 改善 SONFH 患者髋疼痛、静息痛的症状。

根据健脾活骨方“补肾强骨组化学成分预测靶标谱”“临床效应靶标谱”“病证表型相关基因集”所含基因之间的相互作用信息, 建立“病证基因-方药靶标”网络, 通过网络拓扑特征值计算 (最大连通分量 ≥ 2 , 连接度 ≥ 2 , 接近中心性 ≥ 2.5 , 中介中心性 ≥ 0) 和筛选得到 14 个网络核心靶标。功能富集结果显示, 上述网络核心靶标主要参与调节破骨细胞增殖、分化等病理环节, 通过调节破骨细胞分化、细胞凋亡、Ras 信号通路、MAPK 信号通路、PI3K/AKT 信号通路和 p53 信号通路等抑制破骨细胞活性, 促进成骨细胞增殖, 平衡骨吸收-骨形成, 改善骨髓微环境。根据组方中药的功效特点可知, 补肾强骨组 2 味中药中熟地黄滋阴补血, 益精填髓, 鹿角温肾阳, 强筋

骨,二者通过“阴阳双补”恢复肾主骨功能,改善局部血瘀与骨代谢失衡,进而改善 SONFH 患者关节沉重、胸脘满闷的症状。

可见,健脾活骨方通过“健脾化痰-活血通络-补肾强骨”三法协同治疗 SONFH 痰瘀阻络证,“党参-白术-茯苓-陈皮”配伍通过补气健脾、祛湿化痰改善脾虚痰湿,聚焦脂代谢调控;“当归-川芎-赤芍-牛膝-桂枝”通过“活血不伤正”的配伍优势,有效缓解血瘀痹阻,靶向免疫炎症与血管修复;“熟地黄-鹿角”配伍通过“阴阳双补”恢复骨代谢稳态。3 组药物通过“脂代谢-免疫-骨稳态”多维调控网络协同干预 SONFH 痰瘀阻络证复合病机。健脾活骨方治疗 SONFH 的“病-证-症-方”关联网络见中国知网本文增强出版附加材料,健脾活骨方核心网络靶标的 mRNA 相对表达量在该方干预前后的差异变化特征见表 5。

表 5 核心网络靶标 mRNA 相对表达量在健脾活骨方干预前后的差异变化($\bar{x} \pm s, n=4$)

Table 5 Differential changes in the relative expression levels of core network target mRNA before and after intervention with Jianpi Huogu Formula($\bar{x} \pm s, n=4$)

基因	治疗前	治疗后
IGF1R	1.00±0.52	0.79±0.11 ¹⁾
DCK	1.00±0.38	1.04±0.10 ¹⁾
CREB1	1.00±0.20	0.76±0.03 ¹⁾
PNP	1.00±0.14	1.19±0.06 ¹⁾
ALDH9A1	1.00±0.25	0.87±0.03 ¹⁾
MAPK1	1.00±0.15	1.10±0.10 ¹⁾
SYK	1.00±0.14	0.85±0.07 ¹⁾
NCF4	1.00±0.87	1.20±0.18 ¹⁾
NCF1	1.00±0.53	0.79±0.06 ¹⁾
CYBB	1.00±0.89	1.35±0.15 ¹⁾
RAC2	1.00±0.35	0.91±0.04 ¹⁾
ARG1	1.00±0.26	1.53±0.66 ¹⁾
PRKCA	1.00±0.15	0.93±0.08 ¹⁾
UQCRCQ	1.00±0.25	1.12±0.09 ¹⁾
BCL2	1.00±0.18	0.92±0.01 ¹⁾
PRKCB	1.00±0.20	1.17±0.06 ¹⁾
AKT1	1.00±0.21	0.81±0.05 ¹⁾
BCL2L1	1.00±0.48	1.33±0.20 ¹⁾

注:与治疗前相比¹⁾ $P<0.05$ 。

3 讨论

健脾活骨方以“痰瘀同治”为法,通过君、臣、佐、使的协同配伍实现“健脾化痰、活血通络、强筋

健骨”的核心功效,方中茯苓、赤芍共为君药,茯苓利水渗湿,健脾宁心,防湿浊加重气血瘀阻,赤芍清热凉血,散瘀止痛,二者起“痰瘀分消”之功效;党参补益脾气,助气血生化,炒白术健脾燥湿,防痰湿阻滞经络,陈皮燥湿化痰,当归补血活血,通络止痛,川芎活血行气,祛瘀通络,桂枝温通经脉,散寒止痛,共为臣药,有助君药益气健脾、化痰祛浊、活血通络,再加熟地黄、鹿角胶 2 味佐药温补肾阳,强筋健骨,意在专攻病位兼肾之证,使以川牛膝调和诸药^[20]。在 SONFH 早期,病情可逆性强,健脾活骨方通过靶向脂代谢紊乱、炎症反应及骨稳态失衡等关键环节,抑制破骨细胞、促进成骨细胞活性,修复骨髓微环境,显著延缓股骨头塌陷,提高保髋成功率。相比晚期依赖关节置换的创伤性治疗,中医药早期介入不仅规避手术风险与高额费用,还能凭借多靶点调节优势,改善患者体质,强化机体修复能力,实现“未病先防、既病防变”的防治理念。而这一治疗优势,与 SONFH“脾虚为本,痰阻为标”的核心病机紧密相关——脾虚致水液代谢失常,痰浊内生,又加重脾虚,形成恶性循环,故以健脾化痰为本的治疗策略,恰能从根源阻断疾病进展。

健脾活骨方中健脾化痰组中药(党参、白术等)靶向 ALDH7A1、ACOX1 等基因,调控 AMPK/鞘脂信号通路,显著降低甘油二酯、胆固醇酯水平,抑制脂肪合成酶活性。甘油二酯作为第二信使,可激活 PKC 通路诱发胰岛素抵抗与脂毒性^[21],而健脾化痰组通过减少甘油二酯堆积,阻断脂质过氧化损伤,与中医“脾主运化,痰湿致瘀”理论高度契合。此外,磷脂酶 D 通路的调控进一步抑制卵磷脂分解为促炎性溶血卵磷脂^[22],从源头减轻脂毒性微环境对骨细胞的损伤。

活血通络组中药(当归、川芎等)通过干预趋化因子信号通路及 NOD 样受体通路,抑制中性粒细胞外陷阱形成,降低 IL-6、TNF- α 等炎症因子释放。该组核心靶标 SYK 与 ESR1 的调控可同时改善血小板活化与血管内皮功能,扩张微血管并增加缺血区血供^[23],这与中医“活血通络,瘀去新生”的治疗原则一致。临床代谢组学显示,活血通络组特异性下调甘油二酯水平,提示脂代谢紊乱与炎症反应存在交互调控,为“痰瘀互结”病机提供了分子证据。

补肾强骨组中药(熟地黄、鹿角)通过 PI3K/AKT 通路促进成骨细胞分化^[24],同时抑制破骨细

胞分化关键基因 CTSK、MMP9 的表达。鹿角中的骨形态发生蛋白 (BMP) 与熟地黄的多糖成分协同激活 Ras/MAPK 通路, 调控 BCL2 家族蛋白平衡, 减少骨细胞凋亡^[25]。胆固醇酯与 2-溶血卵磷脂的水平变化提示脂质微环境通过膜受体信号影响骨代谢, 揭示了“肾主骨生髓”理论与“脂-骨轴”调控的潜在关联。

综上所述, 健脾活骨方通过“脂质代谢重编程-转录调控网络”协同作用, 从脂代谢、炎症、骨重塑三轴干预 SONFH 病理进程, 彰显了中医药“整体调节、标本兼治”的独特优势。本研究不仅为 SONFH 的精准治疗提供了新策略, 也为中医药在骨伤科疾病早期防治领域的应用拓展了思路。

[参考文献]

- [1] JIA D, ZHANG Y, LI H, et al. Predicting steroid-induced osteonecrosis of the femoral head: role of lipid metabolism biomarkers and radiomics in young and middle-aged adults[J]. J Orthop Surg Res, 2024, 19(1): 749.
- [2] 陈志健, 张苏雅, 丁龙龙, 等. 从“病-证-方”关联视角探讨熟地强筋丸治疗激素性股骨头坏死的疗效特点和机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, doi: 10.13422/j.cnki.syfjx.20250941.
- [3] LI L, ZHAO S, LENG Z, et al. Pathological mechanisms and related markers of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. Ann Med, 2024, 56(1): 2416070.
- [4] 孙昭杰, 张宁, 李明阳, 等. 激素性股骨头坏死的中西医治疗进展[J]. 中医学报, 2023, 51(6): 105.
- [5] 陈卫衡, 刘道兵, 张洪美, 等. 股骨头坏死的三期四型辨证思路[J]. 中国中医基础医学杂志, 2003, 9(12): 51.
- [6] 陈卫衡, 周宇, 何海军, 等. 健脾活骨方治疗早中期非创伤性股骨头坏死临床回顾性研究[J]. 中国中西医结合杂志, 2013, 33(8): 1054.
- [7] 王丽丽, 李群, 胡智星, 等. 基于氧化脂质代谢组和转录组学整合策略探索健脾活骨方治疗大鼠激素性股骨头坏死的作用机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(11): 190.
- [8] 李泰贤, 张彦琼, 薛志鹏, 等. 激素性股骨头坏死不同中医证型相关基因表达谱的鉴定及其候选标志分子的发现与验证[J]. 中华中医药杂志, 2019, 34(10): 4536.
- [9] 陈星. 健脾活骨方治疗早中期非创伤性股骨头坏死的临床效果[J]. 中国民康医学, 2020, 32(14): 97.
- [10] 魏绍山. 健脾活骨方联合丹参注射液治疗股骨头坏死效果观察[J]. 实用中医药杂志, 2019, 35(1): 34.
- [11] 李艳峰. 观察健脾活骨方治疗早中期非创伤性股骨头坏死的有效性[J]. 光明中医, 2017, 32(10): 1445.
- [12] 陈卫衡, 周宇, 何海军, 等. 健脾活骨方治疗早中期非创伤性股骨头坏死的前瞻性临床研究[J]. 中华关节外科杂志(电子版), 2013, 7(3): 287.
- [13] JIANG Y, LIU D, KONG X, et al. Huogu I formula prevents steroid-induced osteonecrosis in rats by down-regulating PPARgamma expression and activating wnt/LRP5/beta-catenin signaling[J]. J Tradit Chin Med, 2014, 34(3): 342.
- [14] MONT M A, HUNGERFORD D S. Non-traumatic avascular necrosis of the femoral head[J]. J Bone Joint Surg Am, 1995, 77(3): 459.
- [15] YOON B H, MONT M A, KOO K H, et al. The 2019 revised version of association research circulation osseous staging system of osteonecrosis of the femoral head[J]. J Arthroplasty, 2020, 35(4): 933.
- [16] 陈卫衡, 何伟, 童培建, 等. 股骨头坏死中医辨证标准(2019年版)[J]. 中医正骨, 2019, 31(6): 1.
- [17] ZHANG Y, LI X, SHI Y, et al. ETCM v2.0: an update with comprehensive resource and rich annotations for traditional Chinese medicine[J]. Acta Pharm Sin B, 2023, 13(6): 2559.
- [18] XU H, ZHANG Y, WANG P, et al. A comprehensive review of integrative pharmacology-based investigation: a paradigm shift in traditional Chinese medicine[J]. Acta Pharm Sin B, 2021, 11(6): 1379.
- [19] LI T, ZHANG Y, WANG R, et al. Discovery and validation an eight-biomarker serum gene signature for the diagnosis of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. Bone, 2019, 122: 199.
- [20] 徐腾腾, 王金霞, 明瑞蕊, 等. 健脾活骨方对糖皮质激素致血管内皮细胞功能损伤的干预作用[J]. 中国中药杂志, 2022, 47(6): 1625.
- [21] XU W, ZHANG D, MA Y, et al. Ceramide synthesis inhibitors prevent lipid-induced insulin resistance through the DAG-PKCε-insulin receptor T1150 phosphorylation pathway[J]. Cell Rep, 2024, 43(10): 114746.
- [22] THANIKACHALAM P V, RAMAMURTHY S, MALLAPU P, et al. Modulation of IL-33/ST2 signaling as a potential new therapeutic target for cardiovascular diseases[J]. Cytokine Growth Factor Rev, 2023, doi: 10.1016/j.cytogfr.2023.06.003.
- [23] KIM S Y, ZHANG X, SCHIATTARELLA G G, et al. Epigenetic reader BRD4 (bromodomain-containing protein 4) governs nucleus-encoded mitochondrial transcriptome to regulate cardiac function[J]. Circulation, 2020, 142(24): 2356.
- [24] 张江, 胡宇晴, 张诗宇, 等. 基于 16S rDNA 测序探讨加味活络效灵丹对激素性股骨头坏死大鼠“肠-骨”轴的影响[J/OL]. 中华中医药学刊[2025-06-09]. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/21.1546.R.20250430.1800.019.html>.
- [25] PAN M, ZHANG Y, WRIGHT W C, et al. Bone morphogenetic protein (BMP) signaling determines neuroblastoma cell fate and sensitivity to retinoic acid[J]. Nat Commun, 2025, 16(1): 2036.

[责任编辑 马超一]