

# 基于病-证-方多源异构数据整合探索健脾活骨方治疗激素性股骨头坏死的优势环节及其作用机制

李涛<sup>1</sup>, 张楚<sup>1</sup>, 贾雁<sup>2</sup>, 陈卫衡<sup>2</sup>, 林娜<sup>1\*</sup>, 张彦琼<sup>1\*</sup>

(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]** 该研究基于多源异构生物学数据整合分析,并结合动物实验验证,系统探讨健脾活骨方治疗激素性股骨头坏死(SONFH)的优势作用环节及其分子机制。研究首先通过中医药百科全书(ETCM v 2.0)获取健脾活骨方所含候选活性成分及靶点;同时借助 HPO 数据库挖掘该证候的潜在关联基因;最后,运用临床转录组学检测获取 SONFH 痰瘀阻络证的相关靶点。对上述三类靶点取交集后,构建“中药-成分-疾病-证候”多维网络。利用 STRING 数据库进行蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络分析,并通过 DAVID 平台对核心靶点进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析,以预测其关键生物学过程与信号通路。最后,通过制备 SONFH 痰瘀阻络证大鼠模型进行药效学和机制验证。经数据整合挖掘获得包含 146 个网络核心靶标的“病证基因-方药靶标”网络,通路富集分析表明,健脾活骨方主要通过嘌呤能受体 P2Y12(P2RY12)-磷脂酰肌醇 3-激酶(PI3K)-丝氨酸/苏氨酸激酶(Akt)-纤维蛋白原  $\gamma$  链(FGG)信号通路,调节血脂偶联干预 SONFH 痰瘀阻络表型。HE 染色结果发现,SONFH 痰瘀阻络证大鼠的股骨头组织钙化比例降低,骨小梁排列松散,骨细胞欠饱满,空骨陷窝增多明显,骨髓内脂肪细胞增多;血脂四项检测表明,SONFH 痰瘀阻络证大鼠甘油三酯、总胆固醇、低密度脂蛋白升高,高密度脂蛋白降低;凝血四项检测表明,SONFH 痰瘀阻络证大鼠活化部分凝血活酶时间、凝血酶原时间降低,凝血酶时间和血浆纤维蛋白原升高。免疫组织化学染色结果显示,与正常组比较,模型组大鼠股骨头组织中 P2RY12、磷酸化 PI3K(p-PI3K)、磷酸化 Akt(p-Akt)和 FGG 蛋白的阳性表达面积显著增加( $P<0.05$ );而各给药组上述蛋白表达均显著降低( $P<0.05$ ),且高剂量组抑制效果最为明显,表明健脾活骨方能够剂量依赖性地调控 P2RY12-PI3K-Akt-FGG 信号轴。综上所述,健脾活骨方可通过多靶点、多通路协同作用,尤其是抑制 P2RY12-PI3K-Akt-FGG 信号轴的过度激活,改善 SONFH 痰瘀阻络证的血脂及骨代谢异常,发挥对证治疗作用。

**[关键词]** 激素性股骨头坏死;痰瘀阻络证;健脾活骨方;血脂偶联;P2RY12-PI3K-Akt-FGG 信号通路

## Advantageous therapeutic pathways and mechanisms of Jianpi Huogu Formula in treating steroid-induced osteonecrosis of femoral head based on multi-source heterogeneous data integration of disease-syndrome-formula framework

LI Tao<sup>1</sup>, ZHANG Chu<sup>1</sup>, JIA Yan<sup>2</sup>, CHEN Wei-heng<sup>2</sup>, LIN Na<sup>1\*</sup>, ZHANG Yan-qiong<sup>1\*</sup>

(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]** Based on integrated analysis of multi-source heterogeneous biomedical data combined with animal experimental validation, this study systematically explored the advantageous therapeutic pathways and molecular mechanisms of Jianpi Huogu

**[收稿日期]** 2025-09-22

**[基金项目]** 国家自然科学基金重点项目(82030122);国家自然科学基金临床专项(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,主要从事临床中药学研究,E-mail: nlin@icmm.ac.cn

**[作者简介]** 李涛,博士研究生,E-mail: qd\_litao1218@126.com

Formula (JPHGF) in treating steroid-induced osteonecrosis of the femoral head (SONFH). First, the candidate active components and targets of JPHGF were obtained from the Encyclopedia of Traditional Chinese Medicine (ETCM v 2.0). Meanwhile, the Human Phenotype Ontology (HPO) database was used to identify potential genes associated with the corresponding syndrome pattern. Finally, clinical transcriptomic data were analyzed to obtain relevant targets for the phlegm-blood stasis blocking collateral syndrome of SONFH. The intersection of these three types of targets was used to construct a multidimensional "drug-ingredient-disease-syndrome" network. The STRING database was employed for protein-protein interaction (PPI) network analysis, and the Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analysis of core targets was performed via the DAVID platform to predict key biological processes and signaling pathways. Pharmacodynamic and mechanistic validation was subsequently conducted using a rat model of SONFH with phlegm-blood stasis obstructing collateral syndrome. Data integration and mining yielded a "disease and syndrome gene-formula and drug target" network containing 146 core targets. Pathway enrichment analysis indicated that JPHGF primarily regulates lipid-coupled intervention in the SONFH phlegm-blood stasis blocking collateral phenotype through the purinergic receptor P2Y12 (P2RY12)-phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-serine/threonine kinase (Akt)-fibrinogen gamma chain (FGG) signaling pathway. Hematoxylin-eosin (HE) staining revealed that rats with SONFH of the phlegm-blood stasis blocking collateral type exhibited reduced calcification in femoral head tissues, loosely arranged trabeculae, hypoplastic osteocytes, significantly increased lacunae, and elevated numbers of intramedullary adipocytes. Lipid profile analysis showed elevated triglyceride, total cholesterol, and low-density lipoprotein (LDL) levels, along with decreased high-density lipoprotein (HDL). Coagulation assays demonstrated shortened activated partial thromboplastin time (APTT) and prothrombin time (PT), as well as prolonged thrombin time (TT) and increased plasma fibrinogen levels. Immunohistochemical staining showed that compared with the normal group, the model group exhibited significantly increased positive expression areas of P2RY12, phosphorylated PI3K (p-PI3K), phosphorylated Akt (p-Akt), and FGG proteins in femoral head tissues ( $P < 0.05$ ). In contrast, all drug-treated groups showed significantly reduced expression of these proteins ( $P < 0.05$ ), with the most pronounced inhibitory effect observed in the high-dose group. These results indicate that JPHGF modulates the P2RY12-PI3K-Akt-FGG signaling axis in a dose-dependent manner. In conclusion, JPHGF exerts a syndrome-specific therapeutic effect through multi-target and multi-pathway synergistic actions. By particularly suppressing the excessive activation of the P2RY12-PI3K-Akt-FGG signaling axis, it improves lipid and bone metabolism abnormalities in SONFH with phlegm-blood stasis blocking collateral syndrome.

[Key words] steroid-induced osteonecrosis of the femoral head; phlegm-blood stasis blocking collateral syndrome; Jianpi Huoguo Formula; blood-lipid coupling; P2RY12-PI3K-Akt-FGG signaling axis

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20251011.709

激素性股骨头坏死 (SONFH) 是临床常见的骨科难治性疾病,其主要病理特征为股骨头内血供障碍、骨细胞死亡及随之出现的骨结构塌陷,严重影响患者生活质量<sup>[1]</sup>。该病发生与长期或大量应用糖皮质激素密切相关,现代医学认为其发病机制涉及脂代谢紊乱、血管内凝血、骨内压增高及氧化应激等多个环节,但目前尚无理想的防治策略。

在中医理论中,虽无 SONFH 之病名,但根据其临床症状及体征,可将其归属于“骨蚀”“骨痿”“骨痹”等范畴<sup>[2]</sup>。本病多因禀赋不足、久病耗伤,或激素药毒损伤脾肾,致脾肾两虚。脾虚则运化无权,水谷精微不布,痰湿内生;肾虚则骨髓失养,骨质不坚<sup>[3]</sup>。久病入络,气虚血行无力,渐致瘀血阻络,终而形成“脾肾两虚、瘀血阻络”的核心病机。脂代谢紊乱与血管内凝血异常是 SONFH 发生发展的重要病理基础,也与中医“痰瘀同病”理论高度契合<sup>[4]</sup>。

中医古籍中已有“膏”“脂”等相关论述,现代临床研究也发现,SONFH 痰瘀阻络证患者常伴有载脂蛋白、高密度脂蛋白胆固醇降低及纤维蛋白原升高、活化部分凝血活酶时间 (APTT) 缩短等特征,体现为“痰瘀互结”的现代生物学内涵<sup>[5]</sup>。

针对 SONFH“痰瘀阻络”的核心病机,本课题组创新性地提出“从脾论治”的治疗思路,确立了“健脾化痰、活血通络”的治法,并基于经典名方苓桂术甘汤与四物汤进行化裁,组方为健脾活骨方。临床实践表明,健脾活骨方可以延缓或阻止 SONFH 患者的股骨头塌陷,效果与手术治疗相当,且在生理功能、生理职能、躯体疼痛、社会功能和情感职能等 5 个维度的生存质量均优于手术治疗患者<sup>[6]</sup>。基础研究进一步揭示,健脾活骨方通过“健脾化痰-活血通络-补肾强骨”三重治法协同作用,并借由“脂代谢-免疫-骨稳态”多维调控网络,对 SONFH 痰瘀阻

络证的复合病机进行整体干预<sup>[7]</sup>。然而,该复方在多成分、多靶点、多通路层面的协同作用机制尚未系统阐明,其“病-证-方”对应的药效物质基础与分子网络调控机制亦有待深入揭示。

随着系统生物学与生物信息学的发展,整合药理学、转录组学及临床证候数据已成为阐释中药复方作用机制的有效路径。因此,本研究立足于“病-证-方”结合研究模式,整合中医药百科全书(ETCM v 2.0)活性成分筛选、临床转录组学分析与人类表型本体论(HPO)证候基因挖掘等多源异构数据,构建“中药-成分-疾病-证候”交互网络,并通过蛋白互作(PPI)及通路富集分析预测健脾活骨方的作用靶点与信号通路。进一步通过建立 SONFH 痰瘀阻络证大鼠模型,从组织形态、血脂代谢、凝血功能及关键蛋白表达等方面验证健脾活骨方的治疗效应与分子机制,旨在系统揭示该方干预 SONFH 的优势作用环节,为其临床推广应用提供充分的科学依据。

## 1 材料与方法

**1.1 动物** 50只雄性 SPF 级 SD 大鼠购自北京维通利华生物科技有限公司,动物许可证号 SYXK(京)2021-0017,体质量 230~250 g。本研究由中国中医科学院中药研究所伦理委员会批准。所有动物均按照中国中医科学院实验动物护理中心的动物使用和护理指南及规定进行处理(动物实验伦理编号 2022B086)。所有动物都保持在特定的无病原体条件下,温度(24±1)℃,光照/黑暗周期 12 h,并可自由获得标准的啮齿动物饮食和水,适应性喂养 7 d 后开始后续操作。

**1.2 试剂** 脂多糖(货号 L6386,美国 Sigma-Aldrich 公司);甲泼尼龙琥珀酸钠(货号 H20170199,美国 Pfizer Manufacturing 公司);0.9%氯化钠注射液(货号 2303212003,石家庄四药集团);青霉素钠注射液(货号 H13020655,华北制药股份有限公司);4%组织细胞固定液(货号 P1110,美国 Solarbio 公司);EDTA 脱钙液(货号 E1171,美国 Solarbio 公司);无水乙醇(货号 3851,天津市大茂化学试剂厂);二甲苯(货号 3833,天津市大茂化学试剂厂);苏木素染色液(货号 G1140,美国 Solarbio 公司);伊红染色液(货号 G1100,美国 Solarbio 公司);酸性乙醇分化液(1%)(货号 G1861,美国 Solarbio 公司);氨水(氢氧化铵)AR(货号 10002118,上海沪试实验室器材股份有限公司);磷酸缓冲液(PBS)粉剂(货号

AR0030,武汉博士德生物工程有限公司);聚山梨酯 20(货号 1247LT001,德国 Biofroxx 公司);中性树脂胶(货号 M186781,广东光华科技股份有限公司);盖玻片(货号 10212432C,江苏世泰实验器材有限公司);载玻片(货号 80346-2510,江苏世泰实验器材有限公司);大鼠甘油三酯(TG)、总胆固醇(TC)、低密度脂蛋白(LDL)、高密度脂蛋白(HDL)ELISA 试剂盒(货号分别为 YJ639131、YJ634090、YJ003390、YJ003387,上海酶联生物科技有限公司);嘌呤能受体 P2Y<sub>12</sub>(P2RY<sub>12</sub>)抗体(货号 A1710,武汉爱博泰克生物科技有限公司);磷酸化磷脂酰肌醇 3-激酶(p-PI3K)、磷酸化丝氨酸/苏氨酸激酶(p-Akt)和纤维蛋白原 $\gamma$ 链(FGG)抗体(货号 20584-1-AP、66444-1-Ig、15841-1-AP,武汉三鹰生物技术有限公司)。

**1.3 仪器** 电子天平(型号 BSA224S,德国 Sartorius 公司);涡旋振荡仪(型号 Vortex-5,海门市其林贝尔仪器制造有限公司);低温离心机(型号 5840R,德国 Eppendorf 公司);烤片机(型号 KPJ-1A,天津天利航空机电有限公司);体视显微镜(型号 CX31,日本 Olympus 公司);高清显微镜相机(型号 E3ISPM20000KPA,杭州图谱光电科技有限公司);多功能酶标仪(型号 Multiskoun GO,美国 ThermoFisher 公司);半自动凝血分析仪(型号 BK-CA02,山东博科科学仪器有限公司)。

**1.4 SONFH 痰瘀阻络证大鼠模型制备** 除空白对照(control)组外,其余 4 组雄性 SD 大鼠在第 1~2 天尾静脉注射脂多糖(LPS),注射剂量为 20  $\mu\text{g}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,每日 1 次,第 3~5 天双侧臀部交替肌肉注射甲泼尼龙琥珀酸钠(MPS),注射剂量为 40  $\text{mg}\cdot\text{kg}^{-1}$ ,每日 1 次。control 组大鼠在模型造模给药的相同时间点注射等比例体积生理盐水。另外,每组大鼠均臀部肌肉注射青霉素钠 8 万单位/只,用以预防感染。

**1.5 药物制备** 按照健脾活骨方原方比例,用分析天平分别称取赤芍 5 g、茯苓 5 g、当归 5 g、党参 5 g、桂枝 5 g、川芎 5 g、川牛膝 5 g、陈皮 5 g、麸炒白术 5 g 和熟地黄 5 g,温水浸泡 30 min 后,大火煮开 10 min,转小火微沸煎煮 30 min,纱布过滤得滤液。另称取鹿角胶 3 g,用少量温水烊化后加入滤液中。将全部滤液转移至旋转蒸发仪中浓缩到 2  $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ,得浓缩液。真空冷冻干燥后,得冻干粉,备用。

**1.6 动物分组及给药** 50 只雄性 SD 大鼠随机分为 5 组,每组 10 只。control 组无药物干预;模型

(model)组无药物干预;低、中、高剂量给药(JHF-L、JHF-M、JHF-H)组分别每天灌胃给予2.8、5.6、11.2 g·kg<sup>-1</sup>健脾活骨方。所有大鼠均于造模结束2周后开始药物干预,给药8周,大鼠给药量按照0.01 mL·g<sup>-1</sup>体质量灌胃,control组和model组灌胃给予等量生理盐水。

**1.7 动物取材及组织处理方法** 所有动物均于造模结束10周后使用3%戊巴比妥钠进行麻醉,麻醉剂量按照0.01 mL·g<sup>-1</sup>体质量腹腔注射。使用一次性真空采血管进行腹主动脉采血,室温放置20 min后,3 000 r·min<sup>-1</sup>离心15 min,取上清液,用于血液指标检测。在无菌条件下,分离双侧髌关节和股骨周围的皮毛、软组织,剪开关节囊,保留覆盖完整软骨的股骨头及近端大部分股骨,右侧股骨头保存于4%多聚甲醛固定液中,用于组织病理学检测。

**1.8 一般生理性观察** 每周观察大鼠的总体状况2次,包括其行动活跃能力、精神状态、毛色外观、行动便捷与否、食水摄入、排便形态等。

**1.9 股骨头大体观** 股骨头从大鼠体内剥离后,即刻观察股骨头的颜色、光泽度、形态等,并拍照记录,脱钙2个月后重复观察。

**1.10 脏脑指数** 于取材当天采集并称量各组大鼠的肝脏、脾脏、肾脏和大脑组织的质量,计算脏脑指数(脏脑指数=肝脏或肾脏或脾脏质量/大脑质量,单位mg·mg<sup>-1</sup>),用于健脾活骨方的安全性评价。

**1.11 组织脱钙** 于取材当天采集大鼠左后肢股骨头组织置于4%组织固定液中,放置24 h后,取出股骨头组织放入10% EDTA脱钙液中,并置于4℃脱钙,每3~5 d更换一下脱钙液。每3~5 d观察股骨头组织,以1 mL注射器针头可轻松刺入股骨头组织内部为脱钙终点。

**1.12 苏木素-伊红(HE)染色** 采用HE染色观察大鼠股骨头内的脂肪细胞、空骨窝陷和骨小梁形态变化情况以及肝脏组织中脂肪变性和炎性浸润等变化情况。

**1.13 理化指标检测** 采用ELISA法检测各组大鼠血清中TC、TG、LDL、HDL。采用半自动凝血分析仪检测各大鼠血浆凝血四项指标,包括:凝血酶原时间(PT)、APTT、凝血酶时间(TT)和纤维蛋白原(FIB)。

**1.14 网络构建与机制挖掘** 本课题组前期通过中医药百科全书(ETCM v 2.0)数据库获取健脾活骨

方11味中药的化学成分,筛选结构相似度大于0.70的化合物对应靶点,构建了包含1 172个基因的“化学成分靶标基因集”。进一步,基于临床转录组学数据中健脾活骨方治疗SONFH前后的差异表达基因,获得594个“健脾活骨方临床效应靶标基因”<sup>[7]</sup>。同时,利用SONFH痰瘀阻络证患者与健康对照的全血转录组数据,筛选得到1 748个差异表达基因<sup>[8]</sup>,并结合HPO数据库检索获得909个痰瘀阻络证相关症状基因<sup>[7]</sup>,合并去冗余后构建了包含2 657个基因的“病证表型相关基因集”。

利用“化学成分靶标基因集”“健脾活骨方临床效应靶标基因”和“病证表型相关基因集”之间的联系构建“病证基因-方药靶标”的相互作用网络。基因-基因相互作用数据采集自STRING 10.0数据库(<http://string-db.org/>)。

**1.15 统计分析** 使用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析。数据以平均值±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。当 $P < 0.05$ 时,差异具有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 一般生理性观察** 造模前,各组大鼠皮毛洁白光亮,爬行敏捷、饮食饮水正常、排便形态正常。造模后,除正常组外各组大鼠毛发变黄无光,不喜行动,进食减少,大便溏稀,舌部可观察到暗紫色瘀斑。在给予健脾活骨方干预数周后,给药组大鼠皮毛逐渐有光泽,行动活跃,大便形态正常。

**2.2 各组股骨头大体形态变化** control组股骨头形态规整、圆润,软骨面完整,色泽洁白,表面光滑且具有明显光泽。model组股骨头软骨下区域呈弥漫性暗红色,软骨表面光泽度下降,但形态仍保持完整。经健脾活骨方干预后,各剂量组股骨头病理状态均有不同程度改善;JHF-L组软骨结构完整、表面较为光滑,但软骨下仍可见较大范围暗红色区域;JHF-M组股骨头形态圆润、软骨面光滑,软骨下暗红色区域较模型组明显缩小;JHF-H组股骨头形态恢复良好,软骨连续、色白、光滑有光泽,与control组相近,软骨下暗红色区域基本消失,相关图见中国知网本文增强出版附加材料。

**2.3 脏脑指数** 给予健脾活骨方治疗后,与control组相比,model组和给药各组的脏脑指数均无显著性变化,表明健脾活骨方对大鼠无脏器毒性,该方安

全可靠,见表 1。

表 1 大鼠脏脑指数 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 组别      | 肝脑指数      | 脾脑指数      | 肾脑指数      |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| control | 6.62±0.13 | 0.39±0.03 | 1.72±0.08 |
| model   | 6.59±0.79 | 0.48±0.08 | 1.55±0.22 |
| JHF-L   | 6.34±0.30 | 0.46±0.03 | 1.46±0.05 |
| JHF-M   | 5.68±0.45 | 0.38±0.08 | 1.43±0.01 |
| JHF-H   | 5.65±0.49 | 0.49±0.03 | 1.47±0.14 |

注: control. 空白对照组; model. 模型组; JHF-L/M/H. 低、中、高剂量给药组(2.8、5.6、11.2 g·kg<sup>-1</sup> 健脾活骨方)(表 2~5, 图 1、2 同)。

表 2 各组大鼠的血脂四项指标变化 ( $\bar{x} \pm s, n=6$ )

| 组别      | TC                           | TG                            | LDL                           | HDL                          |
|---------|------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|------------------------------|
| control | 664.97±59.49                 | 120.50±16.60                  | 74.98±9.98                    | 162.98±13.43                 |
| model   | 1482.26±53.50 <sup>1)</sup>  | 217.85±10.57 <sup>1)</sup>    | 162.61±6.16 <sup>1)</sup>     | 82.89±10.98 <sup>1)</sup>    |
| JHF-L   | 1038.84±37.14 <sup>2)</sup>  | 172.76±6.94 <sup>2)</sup>     | 134.34±6.96 <sup>2)</sup>     | 121.26±15.27 <sup>2)</sup>   |
| JHF-M   | 821.95±67.18 <sup>2,3)</sup> | 160.12±6.24 <sup>2,3)</sup>   | 127.30±6.92 <sup>2,3)</sup>   | 139.98±15.65 <sup>2,3)</sup> |
| JHF-H   | 637.94±25.56 <sup>2,3)</sup> | 127.36±8.19 <sup>2,3,4)</sup> | 105.48±3.66 <sup>2,3,4)</sup> | 142.76±15.94 <sup>2,3)</sup> |

注: 与 control 相比<sup>1)</sup>  $P<0.05$ ; 与 model 相比<sup>2)</sup>  $P<0.05$ ; 与 JHF-L 相比<sup>3)</sup>  $P<0.05$ ; 与 JHF-M 相比<sup>4)</sup>  $P<0.05$ (表 3~5 同)。

**2.5 健脾活骨方改善 SONFH 瘀痹阻络证大鼠凝血功能的作用** 干预 8 周后,与 control 组相比,model 组大鼠的 APTT 和 PT 均显著缩短,而 TT 和 FIB 则显著升高;经健脾活骨方治疗后,各给药组与 model 组比较,APTT 和 PT 均显著延长,TT 和 FIB 显著降低。结果表明,健脾活骨方可有效改善 SONFH 瘀痹阻络证大鼠的凝血功能异常,逆转高凝状态,从而缓解中医所述“瘀”证的病理表现,见表 3。

表 3 各组大鼠的凝血四项指标变化 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Changes in four coagulation parameters in rats of different groups ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

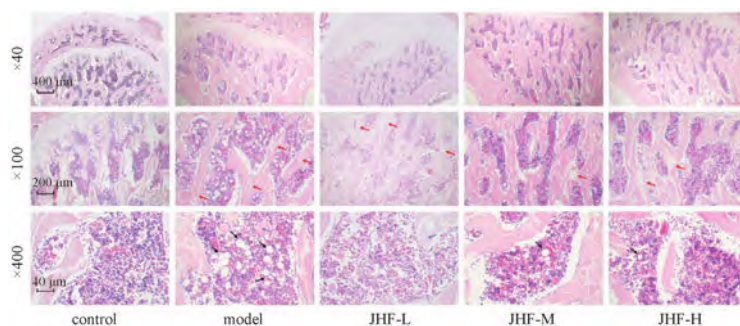
| 组别      | APTT/s                   | PT/s                       | TT/s                       | FIB/g·L <sup>-1</sup>   |
|---------|--------------------------|----------------------------|----------------------------|-------------------------|
| control | 49.66±6.65               | 18.57±0.65                 | 41.88±1.70                 | 0.98±0.14               |
| model   | 32.38±5.36 <sup>1)</sup> | 16.64±0.24 <sup>1)</sup>   | 46.15±1.04 <sup>1)</sup>   | 1.39±0.08 <sup>1)</sup> |
| JHF-L   | 54.26±2.28 <sup>2)</sup> | 17.74±0.18 <sup>2)</sup>   | 45.70±1.15                 | 1.13±0.11               |
| JHF-M   | 55.63±4.09 <sup>2)</sup> | 19.14±0.12 <sup>2,3)</sup> | 46.06±2.47 <sup>3)</sup>   | 1.12±0.07 <sup>2)</sup> |
| JHF-H   | 49.06±5.21 <sup>2)</sup> | 17.97±0.56 <sup>2,4)</sup> | 41.86±0.70 <sup>2,3)</sup> | 1.05±0.03 <sup>2)</sup> |

**2.6 健脾活骨方对 SONFH 瘀痹阻络证大鼠股骨头组织病理形态的影响** 在 40 倍镜下观察,model 组大鼠股骨头骨髓腔内血细胞脱落显著;control 组骨髓腔内血细胞充盈,形态结构正常;各给药组骨髓腔内血细胞亦较为充盈,未见明显异常。

**2.4 健脾活骨方改善 SONFH 瘀痹阻络证大鼠血脂代谢的作用** 经 8 周干预后,与 control 组相比,model 组大鼠血清中 TG、TC、LDL 水平均显著升高,HDL 水平显著降低;给予健脾活骨方治疗后,各给药组较 model 组 TG、TC、LDL 均显著降低,HDL 则明显升高;与 JHF-L 组相比,JHF-M 和 JHF-H 组的 TG、TC、LDL 均显著降低,HDL 则明显升高。结果表明,健脾活骨方可有效改善 SONFH 瘀痹阻络证大鼠的血脂紊乱,且该作用呈现剂量依赖性,其中以 JHF-M、JHF-H 组效果更为显著,见表 2。

在 100 倍镜下,model 组大鼠股骨头钙化比例降低,骨小梁结构紊乱、排列松散、表面不光滑,呈虫蚀样改变,质地不均;control 组骨小梁钙化严密,排列整齐,质地均匀,结构完整;JHF-M、JHF-H 组骨小梁形态结构基本完整,JHF-L 组仍可见骨小梁排列稀疏、结构不完整。在 400 倍镜下,model 组骨细胞形态欠饱满,部分细胞核固缩、坏死,空骨陷窝数量显著增多;control 组骨细胞形态饱满,结构正常;JHF-M、JHF-H 组空骨陷窝数量较 model 组明显减少,JHF-L 组空骨陷窝数量仍较多,与 model 组差异不显著。同时该倍数下可见,model 组骨髓内脂肪细胞数量增多、体积增大,甚至出现融合现象;control 组脂肪细胞与造血细胞形态、数量均无异常;JHF-M、JHF-H 组脂肪细胞形态与数量趋于正常;JHF-L 组脂肪细胞数量较 model 组减少,但仍多于 control 组。以上结果表明,健脾活骨方能够改善 SONFH 瘀痹阻络证大鼠股骨头组织中的脂代谢与骨代谢异常,且 JHF-M、JHF-H 组的治疗效果显著优于 JHF-L 组,见图 1、表 4。

**2.7 基于多源数据整合挖掘健脾活骨方干预 SONFH 瘀痹阻络证的关键靶点与通路** 为系统揭示健脾活骨方干预 SONFH 瘀痹阻络证的潜在作用机制,本研究整合了多源生物学医学数据进行分析。基于课



黑色箭头代表脂肪细胞;蓝色箭头代表空骨陷窝;红色箭头代表骨小梁松散结构。

图 1 大鼠股骨头组织 HE 染色病理切片

Fig. 1 HE-stained histological section of rat femoral head tissue

表 4 大鼠股骨头组织 HE 染色骨小梁相对面积和空骨陷窝率( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Relative area of trabeculae and cavity rate in HE stained rat femoral head tissue( $\bar{x} \pm s, n=3$ ) %

| 组别      | 骨小梁相对面积                  | 空骨陷窝率                      |
|---------|--------------------------|----------------------------|
| control | 80.28±1.64               | 9.00±1.00                  |
| model   | 68.37±1.01 <sup>1)</sup> | 36.33±2.08 <sup>1)</sup>   |
| JHF-L   | 72.82±6.25 <sup>2)</sup> | 26.66±2.08 <sup>2)</sup>   |
| JHF-M   | 77.52±1.01 <sup>2)</sup> | 14.33±1.52 <sup>2,3)</sup> |
| JHF-H   | 80.13±0.80 <sup>2)</sup> | 11.66±2.08 <sup>2,3)</sup> |

题组前期研究基础,将“化学成分靶标基因集”“健脾活骨方临床效应靶标基因”“病证表型相关基因集”3个基因集取交集,共获得506个共享基因。以此为基础构建“病证基因-方药靶标”交互网络,并通过网络拓扑分析(连接度 $\geq 15$ ,接近中心性 $\geq 174.6$ ,中介中心性 $\geq 173.59801$ )筛选出146个核心靶标。KEGG富集分析表明,这些核心靶标显著富集于代谢紊乱、免疫炎症反应、细胞功能调控及血液循环障碍等与痰瘀阻络表型密切相关的病理过程。主要通路包括 metabolic pathways, lipid and atherosclerosis, HIF-1 signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, 提示健脾活骨方可能通过调节血脂代谢与血液循环发挥干预作用。

进一步分析发现,P2RY12、FGG和Akt等关键分子在多个数据集中均呈现显著关联。其中,P2RY12作为“舌紫/青/暗或有瘀斑”的症状相关基因,同时是炒白术活性成分洋川芎内酯D和洋川芎内酯R以及茯苓成分鸟苷的预测靶点;FGG作为“关节沉重”的症状基因,是炒白术成分L-缬氨酸的预测靶点;Akt作为痰瘀阻络证的证候相关基因,可被方中多味中药的活性成分(炒白术的L-缬氨酸,

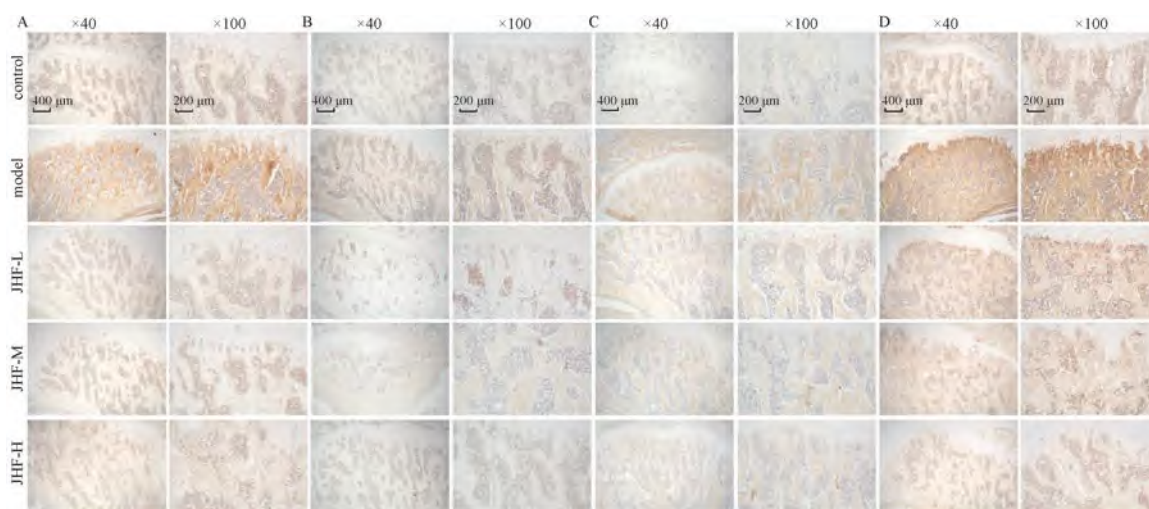
茯苓的鸟苷和桉树素,赤芍的花青素、5,6,4'-三羟基-7,3'-二甲氧基黄酮和柚皮苷,川牛膝的7-羟基香豆素,川芎的柚皮黄素,党参的焦地黄苷B2,当归的苦参醇,熟地黄的异黄橙酮)调控。上述结果表明,P2RY12-PI3K-Akt-FGG信号轴可能是健脾活骨方干预SONFH痰瘀阻络证的关键靶标通路。相关图见中国知网本文增强出版附加材料。

**2.8 健脾活骨方通过调控P2RY12-PI3K-Akt-FGG信号轴改善SONFH痰瘀阻络证的实验验证** 免疫组织化学染色结果显示,与control组相比,model组大鼠股骨头组织中P2RY12、p-PI3K、p-Akt和FGG的蛋白表达水平显著升高,表明该信号通路被异常激活;经健脾活骨方干预后,各给药组上述蛋白的表达均受到显著抑制,且呈现剂量依赖性效应,其中JHF-H组效果最为显著。该结果证实,健脾活骨方能够有效抑制SONFH痰瘀阻络证大鼠股骨头组织中的P2RY12-PI3K-Akt-FGG信号轴,这与其改善血脂代谢和凝血功能、保护骨组织的药效作用密切相关,从蛋白表达水平验证了前期的生物信息学预测结果,见图2、表5。

### 3 讨论

本研究基于“病-证-方结合”的研究思路,整合多源异构生物数据与动物实验验证,系统探讨了健脾活骨方治疗SONFH痰瘀阻络证的作用机制。结果显示,该方能够显著改善模型大鼠的血脂水平、凝血功能及股骨头组织病理状态,其作用机制可能与调控P2RY12-PI3K-Akt-FGG信号轴密切相关。

从中医理论来看,SONFH的核心病机为“脾肾两虚,痰瘀互结”<sup>[9]</sup>。脾失健运则痰湿内生,肾不主骨则骨髓空虚,久病入络致瘀血阻脉,终致骨骼失



A. P2RY12; B. p-PI3K; C. p-Akt; D. FGG。

图 2 大鼠股骨头组织的免疫组织化学染色

Fig. 2 Immunohistochemical staining in rat femoral head tissue

表 5 大鼠股骨头组织免疫组织化学染色阳性表达面积  
( $\bar{x} \pm s, n=3$ )Table 5 Positive expression areas in immunohistochemical staining in rat femoral head tissue( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

| 组别      | P2RY12                    | p-PI3K                   | p-Akt                    | FGG                      |
|---------|---------------------------|--------------------------|--------------------------|--------------------------|
| control | 5.54±0.48                 | 0.55±0.07                | 0.46±0.05                | 6.45±0.30                |
| model   | 34.39±0.65 <sup>1)</sup>  | 12.28±0.41 <sup>1)</sup> | 15.73±0.45 <sup>1)</sup> | 45.48±1.55 <sup>1)</sup> |
| JHF-L   | 6.43±0.57 <sup>2)</sup>   | 0.95±0.15 <sup>2)</sup>  | 1.03±0.08 <sup>2)</sup>  | 6.31±0.48 <sup>2)</sup>  |
| JHF-M   | 5.01±0.12 <sup>2,3)</sup> | 0.57±0.04 <sup>2)</sup>  | 0.78±0.04 <sup>2)</sup>  | 5.25±0.78 <sup>2)</sup>  |
| JHF-H   | 4.25±0.31 <sup>2,3)</sup> | 0.51±0.03 <sup>2)</sup>  | 0.72±0.07 <sup>2)</sup>  | 4.56±0.52 <sup>2)</sup>  |

养、坏死塌陷<sup>[10]</sup>。健脾活骨方以健脾化痰、活血通络为法,方中白术、党参、茯苓健脾祛湿,当归、川芎、赤芍活血化痰,桂枝、牛膝温通经络,陈皮理气化痰,熟地黄、鹿角胶补肾填精<sup>[11]</sup>。全方共奏健脾补肾、化痰通瘀之效<sup>[12]</sup>。本研究从现代科学角度印证了该方对“痰”“瘀”互结病机的整体调节作用。

通过网络药理学分析,构建“病证基因-方药靶标”交互网络,筛选出 146 个核心靶点,富集分析提示健脾活骨方主要参与脂质代谢、动脉粥样硬化、HIF-1 及 PI3K-Akt 等信号通路。进一步分析发现, P2RY12、PI3K、Akt 和 FGG 是该方干预 SONFH 痰瘀阻络证的关键靶标。其中, P2RY12 作为嘌呤受体家族成员,在血小板活化、血栓形成及脂代谢中发挥核心作用<sup>[13]</sup>; FGG 作为纤维蛋白原  $\gamma$  链,直接参与凝血过程及微血栓构筑<sup>[14]</sup>; PI3K-Akt 信号通路则同时调控细胞自噬<sup>[15]</sup>、炎症反应<sup>[16]</sup>、脂代谢<sup>[17]</sup>与血

管生成<sup>[18]</sup>等多个病理环节。已有研究报道, P2RY12 主要在血小板中表达,被 ADP 激活后可促进血小板聚集和血栓形成<sup>[19]</sup>。在疾病状态下,糖皮质激素诱导血管内皮损伤,激活血小板并释放 ADP,通过“P2RY12 激活→血小板聚集→ADP 释放”正反馈循环加剧血栓形成。同时, P2RY12 通过 PI3K-Akt-mTOR 信号通路抑制自噬,导致血管平滑肌细胞脂质清除障碍,促进泡沫细胞形成<sup>[20]</sup>。FGG 作为纤维蛋白原的关键组分之一,在 P2RY12 介导的血小板聚集过程中作为“分子桥”促进微血栓形成,进一步加重股骨头微循环障碍<sup>[21]</sup>。本研究推测,健脾活骨方可能通过抑制 P2RY12,解除对 PI3K-Akt-mTOR 通路的异常激活,恢复自噬功能,促进脂质外排,减少泡沫细胞形成;同时阻断血小板聚集和 FGG 沉积,改善股骨头局部微循环,从而缓解 SONFH 痰瘀阻络证的病理进程,相关图见中国知网本文增强出版附加材料。上述靶点与中医“痰瘀互结”的病机高度吻合,表明健脾活骨方具有多成分、多靶点、整体调控的作用特点。

动物实验结果表明,健脾活骨方可显著降低 SONFH 模型大鼠血清 TG、TC、LDL 水平,提高 HDL 水平,延长 APTT 与 PT,降低 FIB 含量和 TT,说明该方能够有效调节脂代谢并改善血液高凝状态。组织病理学结果显示,健脾活骨方(尤其是 JHF-M、JHF-H 组)能明显增加骨小梁面积、降低空骨陷窝率、减少骨髓脂肪沉积,表明该方可有效改善骨微观

结构并促进骨组织修复。免疫组织化学染色结果进一步显示,健脾活骨方可抑制股骨头组织中 P2RY12、p-PI3K、p-Akt 和 FGG 的蛋白表达,提示其作用机制可能与抑制 P2RY12-PI3K-Akt-FGG 信号轴有关。该信号轴连接了血脂代谢障碍与凝血系统异常,可能是健脾活骨方“痰瘀并治”的生物学基础。

综上所述,健脾活骨方可通过多组分、多靶点、多通路的方式,整体调节 SONFH 痰瘀阻络证大鼠的血脂代谢、凝血功能及骨组织结构,其机制可能与抑制 P2RY12-PI3K-Akt-FGG 信号轴有关。本研究从现代药理学角度阐释了健脾活骨方“健脾化痰、活血通络”的科学内涵,也为中医药治疗 SONFH 的临床应用提供了实验依据。

#### [参考文献]

- [1] 张旭升,杨昊飞,李金生,等. 骨微环境对激素性股骨头坏死影响的研究进展[J]. 中国骨伤,2025,38(8):867.
- [2] 戴超俊,耿振波,黄昉萌,等. 严晓华教授从体质辨治激素性股骨头坏死经验浅析[J]. 西藏医药,2025,46(1):176.
- [3] 张亚奇,李博,汤建成,等. 中医药调控 PI3K/Akt 通路治疗激素性股骨头坏死的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志,2025,31(5):141.
- [4] 苏艺,周金良,丁强. 骨碎补总黄酮改善激素性股骨头坏死脂代谢紊乱的作用机制[J]. 天津医药,2025,doi:10.11958/20252085.
- [5] 李群,胡智星,张彦琼,等. 转录组学数据挖掘结合“临床-动物”研究验证识别激素性股骨头坏死全病程的证素标志基因[J]. 中国中药杂志,2024,49(5):1343.
- [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] 李涛,张楚,贾雁,等. 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[J]. 中国中药杂志,2026,51(2):332.
- [8] 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.
- [9] 李泰贤,李晓亮,赵继阳,等. 健脾活骨方治疗非创伤性股骨头坏死的生物力学机制研究[J]. 中医正骨,2024,36(9):29.
- [10] 张程,李龔,王均玉,等. 非创伤性股骨头坏死血运特点的初步研究[J]. 中华骨与关节外科杂志,2025,18(5):422.
- [11] 王潇潇,何莲花,方罗昌婷,等. 基于 Akt/JNK/p38 MAPK 信号通路探讨健脾活骨方对酒精致血管内皮细胞功能损伤的保护作用[J]. 中国实验方剂学杂志,2023,29(11):64.
- [12] 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.
- [13] ŠKANDIK M, FRIESS L, VAZQUEA-CABRERA G, et al. Age-associated microglial transcriptome leads to diminished immunogenicity and dysregulation of MCT4 and P2RY12/P2RY13 related functions[J]. Cell Death Discov,2025,11(1):16.
- [14] YING A, ZHOU Y, WANG C, et al. The FGG c. 952G>A variant causes congenital dysfibrinogenemia characterized by recurrent cerebral infarction: a case report[J]. Front Neurol, 2024,15:1272802.
- [15] CHAI S, YANG Y, WEI L, et al. Luteolin rescues postmenopausal osteoporosis elicited by OVX through alleviating osteoblast pyroptosis via activating PI3K-Akt signaling [J]. Phytomedicine,2024,128:155516.
- [16] POMPURA S L, DOMINGUEZ-VILLAR M. The PI3K/Akt signaling pathway in regulatory T-cell development, stability, and function[J]. J Leukoc Biol,2018,103(6):1065.
- [17] YE Q, LIU Y, ZHANG G, et al. Deficiency of gluconeogenic enzyme PCK1 promotes metabolic-associated fatty liver disease through PI3K/Akt/PDGF axis activation in male mice [J]. Nat Commun,2023,14(1):1402.
- [18] LI R, ZHENG Y, ZHANG J, et al. Gomisins N attenuated cerebral ischemia-reperfusion injury through inhibition of autophagy by activating the PI3K/Akt/mTOR pathway [J]. Phytomedicine,2023,110:154644.
- [19] PI S, MAO L, CHEN J, et al. The P2RY12 receptor promotes VSMC-derived foam cell formation by inhibiting autophagy in advanced atherosclerosis[J]. Autophagy,2021,17(4):980.
- [20] BAO Y, ZHU L, WANG Y, et al. Gualou-Xiebai herb pair and its active ingredients act against atherosclerosis by suppressing VSMC-derived foam cell formation via regulating P2RY12-mediated lipophagy[J]. Phytomedicine,2024,128:155341.
- [21] SIMURDA T, BRUNCLIKOVA M, ASSELTAR, et al. Genetic variants in the FGB and FGG genes mapping in the beta and gamma nodules of the fibrinogen molecule in congenital quantitative fibrinogen disorders associated with a thrombotic phenotype[J]. Int J Mol Sci,2020,21(13):4616.

[责任编辑 陈玲]