

基于 AdipoR/AMPK α /Cpt1b 信号轴探讨健脾活骨方治疗酒精性股骨头坏死的作用机制

陈沛萍¹, 黄凤玉¹, 张昕卓¹, 丁黛悦¹, 宋常月¹, 刘春芳¹,
孔祥英¹, 陈卫衡², 苏晓慧^{1*}, 林娜^{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] 基于脂联素受体/5'-AMP 激活蛋白激酶催化亚基 α -1/肉碱棕榈酰转移酶 1b (AdipoR/AMPK α /Cpt1b) 信号轴, 探讨健脾活骨方治疗酒精性股骨头坏死 (AONFH) 的作用机制。将 72 只 SD 大鼠随机分为正常组、模型组和健脾活骨方组 (5.0 g·kg⁻¹)。除正常组外, 其余 2 组采用 46% 乙醇灌胃建立 AONFH 模型, 健脾活骨方组在造模 4 周后开始药物干预。分别于干预 4 周和 8 周后取材, 采用 Von Frey 纤维丝及丙酮滴试验测定机械痛阈和冷敏痛阈; 斜板实验评估下肢肌力; Micro-CT 扫描并测定骨密度 (BMD)、骨体积分数 (BV/TV)、骨小梁厚度 (Tb. Th) 等骨计量学参数, HE 染色观察组织病理学改变, 转录组测序筛选健脾活骨方干预 AONFH 的差异表达基因 (DEGs) 并进行基因本体论 (GO) 功能和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 通路富集; Western blot 检测股骨头组织中 AdipoR1、AdipoR2、p-AMPK α 及 Cpt1b 蛋白表达水平。结果显示, 模型组大鼠在造模 8 周后出现机械痛阈显著降低及冷敏痛阈升高 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 提示痛觉超敏; 斜板实验最大倾斜角度明显减小 ($P < 0.01$), 提示下肢肌力减退; 股骨头表面粗糙、软骨暗红区扩大, 骨小梁稀疏断裂, 空骨陷窝率及脂肪细胞数量显著增加 ($P < 0.01$), BMD、BV/TV、Tb. Th 及骨小梁数量 (Tb. N) 均显著下降 ($P < 0.01$)。健脾活骨方干预 4 周即显著缓解机械及冷痛超敏 ($P < 0.05$), 恢复下肢肌力 ($P < 0.01$), 改善股骨头表面形态; 8 周后骨小梁结构进一步恢复, 空骨陷窝率下降、脂肪细胞减少, BMD、BV/TV、Tb. Th 及 Tb. N 显著回升 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 囊变及塌陷明显减轻。转录组学分析显示, 健脾活骨方显著调控 231 个关键 DEGs, 显著富集于脂肪细胞因子信号通路, 并且与 AdipoR1、AdipoR2、p-AMPK α 及 Cpt1b 等基因密切相关。Western blot 结果表明, AONFH 模型组 AdipoR1、AdipoR2、p-AMPK α 及 Cpt1b 表达较正常组显著下调 ($P < 0.01$), 健脾活骨方干预后上述蛋白表达水平明显回调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$)。综上, 该研究证实健脾活骨方可通过激活 AdipoR/AMPK α /Cpt1b 信号轴, 改善骨髓脂质环境, 改善股骨头骨微结构, 从而有效缓解 AONFH 的疼痛及功能障碍, 为临床 AONFH 的防治提供新的实验依据和分子靶点。

[关键词] 酒精性股骨头坏死; 健脾活骨方; 转录组学; AdipoR/AMPK α /Cpt1b 信号轴

Mechanism of Jianpi Huogu Formula in treatment of alcohol-induced osteonecrosis of femoral head via AdipoR/AMPK α /Cpt1b signaling axis

CHEN Pei-ping¹, HUANG Feng-yu¹, ZHANG Xin-zhuo¹, DING Dai-yue¹, SONG Chang-yue¹, LIU Chun-fang¹,
KONG Xiang-ying¹, CHEN Wei-heng², SU Xiao-hui^{1*}, LIN Na^{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] Based on the adiponectin receptor/5'-AMP-activated protein kinase catalytic subunit α -1/carnitine palmitoyltransferase 1b (AdipoR/AMPK α /Cpt1b) signaling axis, this study investigated the therapeutic mechanisms of Jianpi Huogu Formula (JPHGF) in alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head (AONFH). A total of 56 Sprague-Dawley rats were randomly divided into a normal

[收稿日期] 2025-09-16

[基金项目] 国家自然科学基金重点项目 (82030122); 国家自然科学基金面上项目 (82474548)

[通信作者] * 林娜, 博士, 研究员, 博士生导师, 主要从事中药药性和中药药理研究, E-mail: linna888@163.com; * 苏晓慧, 博士, 副研究员, 主要从事中药药理研究, E-mail: xhsu@icmm.ac.cn

[作者简介] 陈沛萍, 博士研究生, E-mail: cpeiping@163.com

group, a model group, and a JPHGF group ($5.0 \text{ g} \cdot \text{kg}^{-1}$). Except for the normal group, rats in the other two groups were administered 46% ethanol by gavage to establish the AONFH model, and JPHGF intervention was initiated in the treatment group at week 4 after model induction. After 4 and 8 weeks of intervention, samples were collected. Mechanical and cold pain thresholds were assessed using Von Frey filaments and the acetone drop test, respectively. Hindlimb muscle strength was evaluated by the inclined plane test. Micro-computed tomography (micro-CT) was used to determine bone mineral density (BMD), bone volume fraction (BV/TV), trabecular thickness (Tb. Th), and other bone morphometric parameters. Hematoxylin-eosin (HE) staining was performed to observe histopathological changes. Transcriptomic sequencing was conducted to identify differentially expressed genes (DEGs) regulated by JPHGF in AONFH, followed by Gene Ontology (GO) functional and Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG) pathway enrichment analyses. Western blot was used to detect the protein expression of AdipoR1, AdipoR2, phosphorylated AMPK α , and Cpt1b in femoral head tissues. The results showed that after 8 weeks of modeling, rats in the model group exhibited significantly decreased mechanical pain thresholds and increased cold sensitivity ($P < 0.05$, $P < 0.01$), indicating hyperalgesia. The maximum inclined angle was markedly reduced ($P < 0.01$), suggesting weakened hindlimb muscle strength. The femoral head surface appeared rough, with enlarged dark-red cartilage areas and sparse, disrupted trabeculae; the proportion of empty lacunae and the number of adipocytes were significantly increased ($P < 0.01$), while BMD, BV/TV, Tb. Th, and trabecular number (Tb. N) were significantly decreased ($P < 0.01$). After 4 weeks of JPHGF intervention, mechanical and cold hyperalgesia were significantly alleviated ($P < 0.05$), hindlimb strength was restored ($P < 0.01$), and surface morphology of the femoral head was improved. After 8 weeks, trabecular structure was further restored, with decreased empty lacunae and reduced adipocyte numbers, and BMD, BV/TV, Tb. Th, and Tb. N significantly increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$); cystic degeneration and collapse were markedly alleviated. Transcriptomic analysis revealed that JPHGF significantly regulated 231 key DEGs, which were mainly enriched in adipocytokine signaling pathways and closely associated with AdipoR1, AdipoR2, p-AMPK α , and Cpt1b. Western blot analysis showed that AdipoR1, AdipoR2, p-AMPK α , and Cpt1b expression levels were significantly downregulated in the AONFH model group compared with the normal group ($P < 0.01$), but were markedly upregulated following JPHGF treatment ($P < 0.05$, $P < 0.01$). In summary, this study demonstrates that JPHGF exerts therapeutic effects against AONFH by activating the AdipoR/AMPK α /Cpt1b signaling axis, thereby improving bone marrow lipid homeostasis and restoring femoral head microarchitecture, effectively relieving pain and functional impairment. These findings provide new experimental evidence and molecular targets for the prevention and treatment of AONFH in clinical practice.

[**Key words**] alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head; Jianpi Huogu Formula (JPHGF); transcriptomics; AdipoR/AMPK α /Cpt1b signaling axis

DOI:10.19540/j.cnki.cjcm.20251024.901

酒精性股骨头坏死 (AONFH) 是长期或大量饮酒所致的股骨头血供中断、骨细胞坏死及继发性关节面塌陷的难治性疾病,近年来随饮酒人群扩大其发病率持续攀升^[1-2]。历代医家多从“酒伤”理论进行认识,认为其病机以脾胃虚弱、痰瘀互结、肾精亏虚为主要特点,本虚标实,其中脾肾两虚为本、痰瘀互结为标^[3-4]。现代流行病学资料显示,AONFH 多见于中年男性,起病隐匿、进展迅速,中医证型以经脉痹阻为主,常兼痰瘀阻络与肝肾亏虚^[5],提示治疗宜从健脾化痰、活血通络、补肾健骨等多环节入手。

健脾活骨方 (JPHGF) 为北京中医药大学第三附属医院陈卫衡教授在“脾虚生痰、痰瘀互结”的病机认识指导下创制,由苓桂术甘汤和四物汤加减化裁而成,具有健脾化痰、活血通络、补肾生骨的功效。前瞻性 & 回顾性临床研究均表明,该方对早中期非创伤性股骨头坏死疗效确切,其影像学稳定率与手

术相当,且在缓解疼痛、改善关节功能、提升生活质量方面优于手术治疗^[6-7]。动物实验研究亦证实,健脾活骨方可改善血管损伤、纠正脂质代谢紊乱,从而保护股骨头^[8-9]。然而,其在 AONFH 中的整体作用机制仍未阐明,尤其缺乏从系统水平揭示关键分子靶点的研究。基于此,本研究采用 AONFH 大鼠模型,从行为学、影像学、病理学等多维度验证健脾活骨方的疗效,并结合转录组学解析其潜在机制,旨在为 AONFH 的防治提供新的实验依据和分子靶点。

1 材料

1.1 动物

72 只 SPF 级 SD 大鼠,雌雄各半,体质量 220 ~ 250 g,购自北京维通利华实验动物技术有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (京) 2021-0011]。饲养于中国中医科学院中药研究所 SPF 级动物房,该实验符合中国中医科学院中药研究所实验动物福

利伦理规定,伦理批准号为 2023B288。

1.2 仪器

全自动酶标仪(美国 Thermo 公司,型号 MK3);倒置光学显微镜(日本 Olympus 公司,型号 CX31);凝胶成像仪(法国 Vilber 公司,型号 FusionFX5);Von Frey 纤维丝(上海玉研科学仪器有限公司,型号 Aesthesio);SPECT/CT 型微计算机断层扫描(Micro-CT)仪(美国 GE Healthcare 公司,型号 RS0800604-0063)。

1.3 药物与试剂

健脾活骨方由茯苓、赤芍、党参、白术、当归、川芎、桂枝、熟地黄、川牛膝等各 5 g 组成,药材购自北京匡达制药厂(批号 1609001G143V),经安国市昌达中药材饮片有限公司鉴定,质量均符合 2025 年版《中国药典》一部标准。红星二锅头购自北京红星股份有限公司(乙醇浓度为 46%,货号 6906785022364);考马斯亮蓝蛋白测定试剂盒、加强型 RIPA 裂解液及磷酸酶抑制剂购自北京普利莱基因技术有限公司(货号 P1510、C1053、P1260); β -肌动蛋白(β -actin)抗体购自美国 Santa Cruz 公司(货号 sc-47778);肉碱棕榈酰转移酶 1b(Cpt1b)、5'-AMP 激活蛋白激酶催化亚基 α -1(AMPK α)、脂联素受体 2(AdipoR2)抗体均购自美国 Proteintech 公司(货号分别为 22170-1-AP、109829-2-AP、14361-1-AP);脂联素受体 1(AdipoR1)抗体购自北京博奥森生物技术有限公司(货号 bs-0610R);磷酸化 AMPK α (p-AMPK α)抗体购自美国 Cell Signaling Technology 公司(货号 2535)。

2 方法

2.1 AONFH 大鼠模型建立及分组

大鼠适应性饲养 1 周后,按体质量随机分为正常组、模型组及健脾活骨方($5.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$)组,每组 24 只,雌雄各半。 $5.0\text{ g}\cdot\text{kg}^{-1}$ 的健脾活骨方为课题组前期剂量优化实验确定的最佳剂量,已在股骨头坏死模型中验证其显著疗效且无明显不良反应^[9-11]。除正常组外,其余 2 组均通过单纯乙醇灌胃法建立 AONFH 模型。每日下午以 46° 红星二锅头($10\text{ mL}\cdot\text{kg}^{-1}$)灌胃,连续 6 d 后停药 1 d,循环进行,持续 12 周;正常组给予等量纯净水灌胃。灌酒造模 4 周后,健脾活骨方组开始给药干预,正常组及模型组给予等量纯净水灌胃,上午灌胃相应药物,下午继续酒精造模。给药 4 周后各组取材 12 只大鼠,其余大鼠给药 8 周后取材。

2.2 行为学评价

为全面评估大鼠的疼痛敏感性 & 下肢功能变化,本研究采用机械性痛阈、冷敏痛阈及斜板实验进行检测^[12]。机械痛阈检测中,将大鼠置于金属网底透明箱中适应 30 min,以 Von Frey 纤维丝垂直刺激左后足跖中央 6~8 s,出现缩足、抬足或舔足反应判为阳性;采用 Dixon up-down 法确定刺激序列,并计算 50% 缩足阈值,每 2 周检测 1 次。冷敏痛阈采用丙酮滴试验:将 $20\text{ }\mu\text{L}$ 丙酮滴于足底,30 s 内观察并按 0~3 分评分,每周检测 1 次。斜板实验用于评估下肢肌力与协调性:逐渐增加斜板角度,记录大鼠能停留 5~10 s 时的最大角度;造模后每周同一时间检测 1 次。

2.3 股骨头大体形态学观察

分别于健脾活骨方给药 4 周及 8 周后取材,将大鼠经麻醉后行腹主动脉取血处死,取出股骨头标本置于刻度纸上观察大体形态并拍摄记录。

2.4 Micro-CT 分析

取左侧股骨头固定 24 h,采用 Micro-CT 扫描仪对股骨头进行扫描,并采用 GEHC Microview 软件对样本进行骨组织模型重建和数据分析,分析的骨计量参数包括骨密度(bone mineral density, BMD)、骨体积分数(bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨表面积体积比(bone surface area/tissue volume, BS/BV)、骨小梁分离度(trabecular bone separation, Tb. Sp)、骨小梁厚度(trabecular bone thickness, Tb. Th)和骨小梁数量(trabecular number, Tb. N)。

2.5 HE 染色观察

完成微断层扫描后,样本先用 10% EDTA 溶液脱钙处理 2 个月,随后进行石蜡包埋,将样本切成 $5\text{ }\mu\text{m}$ 厚切片进行 HE 染色。在显微镜下($\times 200$),对股骨头骨小梁结构和脂肪细胞进行观察,每张切片抽取 3 个视野进行骨小梁面积比和脂肪细胞计数。每个视野计算 50 个骨陷窝中的空骨陷窝数,以计算空骨陷窝率(空骨陷窝数/总骨陷窝数 $\times 100\%$)。

2.6 转录组测序及分析

正常组、模型组 & 健脾活骨方组各随机选取 3 份右侧股骨头组织,提取总 RNA 并经 Agilent 2100 Bioanalyzer 检测质量,确保满足建库要求。去除 rRNA 后富集 mRNA,随后将 RNA 剪切至约 300 bp,并依次合成第一链和第二链 cDNA。经末端修复、加 A 尾、接头连接、片段选择和 PCR 扩增完成文库构建(约 450 bp),再次检测文库质量与浓度(≥ 1.5

nmol·L⁻¹)。合格文库经混样后在 Illumina HiSeq 2500 平台进行双端 150 bp 测序(由诺和致源有限公司完成)。测序数据经碱基识别获得原始序列(raw reads),经质量评估和低质量数据过滤后,利用 DESeq 软件进行差异表达基因(DEGs)分析,并通过 Venn 图展示组间 DEGs。最终对筛选的 DEGs 进行基因本体论(GO)功能和京都基因与基因组百科全书(KEGG)富集分析。

2.7 Western blot 检测

取右侧股骨头组织研磨成粉末,加入含蛋白酶及磷酸酶抑制剂的 RIPA 裂解液,在冰浴条件下裂解 30 min。随后于 4℃、12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min,取上清液用于总蛋白提取。蛋白定量采用考马斯亮蓝法。等量蛋白经 SDS-PAGE 电泳分离后转膜至 PVDF 膜,并以 5%脱脂奶粉室温封闭。膜条分别加入一抗 AdipoR1、AdipoR2、p-AMPKα、AMPKα、Cpt1b(均 1:1 000)及内参 β-actin(1:1 000),4℃孵育过夜;次日于室温加入相应二抗(1:5 000),孵育 2 h。采用 ECL 化学发光法显影,利用凝胶成像系统检测蛋白条带,并通过 ImageJ 软件进行灰度值定量分析。

2.8 统计学分析

采用 GraphPad Prism 10.0 软件进行统计学分析,实验结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。组间比较采用单因素方差分析

(One-way ANOVA),以 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

3 结果

3.1 健脾活骨方对 AONFH 大鼠痛觉敏感性及其下肢功能的影响

机械痛阈测定结果显示,自造模第 8 周(给药第 4 周)起,模型组大鼠的 50%缩足阈值较正常组显著下降($P < 0.01$),提示持续机械痛敏。冷敏感性评估表明,模型组在造模 6 周(给药 2 周)后即出现冷痛评分显著升高($P < 0.05, P < 0.01$),且随病程进展逐渐加剧。经健脾活骨方干预后,2 种痛阈均呈现时间依赖性改善趋势,其中冷痛评分显著回落($P < 0.05, P < 0.01$),提示健脾活骨方能够有效抑制 AONFH 诱发的机械及冷痛超敏,见表 1、2。

表 1 健脾活骨方给药后对 AONFH 大鼠 50%机械痛敏阈值的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 1 Effect of Jianpi Huogu Formula administration on 50% mechanical pain threshold in AONFH rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$) g

组别	第 2 周	第 4 周	第 6 周	第 8 周
control	17.51±9.32	23.80±21.92	24.94±10.97	27.78±10.99
model	14.33±13.91	9.84±3.05 ²⁾	8.48±4.32 ²⁾	7.85±3.35 ²⁾
JPHGF	13.52±7.82	11.83±3.45	17.76±5.48 ³⁾	19.30±4.10 ³⁾

注:control. 正常组;model. AONFH 模型组;JPHGF. 5 g·kg⁻¹健脾活骨方给药组(图 1~5、表 2~6 同);与 control 相比¹⁾ $P < 0.05$, ²⁾ $P < 0.01$;与 model 相比³⁾ $P < 0.05$, ⁴⁾ $P < 0.01$ (表 2~6 同)。

表 2 健脾活骨方给药后对 AONFH 大鼠冷痛觉超敏反应评分的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 2 Effect of Jianpi Huogu Formula administration on cold hyperalgesia scores in AONFH rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$) 分

组别	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周	第 7 周	第 8 周
control	0.96±0.63	1.17±0.30	0.92±0.29	0.94±0.42	1.00±0.18	0.92±0.24	1.17±0.64	1.42±0.42
model	1.27±0.67	1.75±0.53 ²⁾	1.77±0.51 ²⁾	1.96±0.47 ²⁾	2.20±0.34 ²⁾	2.27±0.39 ²⁾	2.10±0.37 ²⁾	2.28±0.45 ¹⁾
JPHGF	1.24±0.88	1.43±0.37	1.41±0.58	1.61±0.64	1.56±0.47 ⁴⁾	1.48±0.87 ⁴⁾	1.54±0.62	1.54±0.67 ⁴⁾

斜板实验进一步显示,造模第 8 周及 11 周(给药第 4 周及 7 周)后,模型组大鼠在斜板上可维持的最大倾斜角度较正常组明显减小($P < 0.01$),提示下肢肌力显著减退。经健脾活骨方

治疗第 4 周及 7 周后,大鼠最大倾斜角度逐渐回升($P < 0.05, P < 0.01$),爬板能力恢复,表明该方能够有效缓解 AONFH 导致的双肢无力,见表 3。

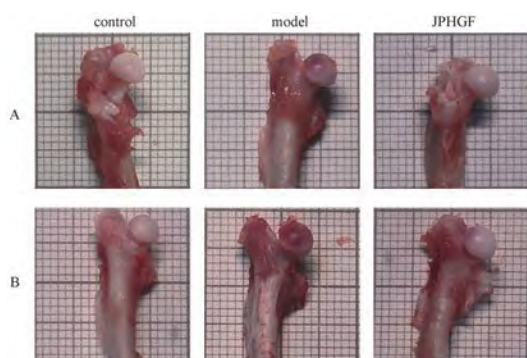
表 3 健脾活骨方给药后对 AONFH 大鼠斜板实验最大倾斜角度的影响($\bar{x} \pm s, n = 12$)

Table 3 Effect of Jianpi Huogu Formula administration on the maximum inclination angle in the inclined plane test of AONFH rats ($\bar{x} \pm s, n = 12$) °

组别	第 1 周	第 2 周	第 3 周	第 4 周	第 5 周	第 6 周	第 7 周	第 8 周
control	70.70±2.69	71.46±3.32	70.70±1.51	71.30±2.92	71.42±2.47	71.97±2.79	72.36±2.92	72.55±1.56
model	69.24±1.80	69.43±2.45	69.16±1.69	69.03±2.83 ¹⁾	69.79±3.56	70.33±3.31	68.90±1.75 ¹⁾	68.56±1.54 ¹⁾
JPHGF	69.33±3.73	69.52±3.34	70.17±3.64	71.17±4.10 ³⁾	72.27±1.50	72.51±1.49	73.42±2.36 ⁴⁾	73.38±2.49 ⁴⁾

3.2 健脾活骨方对 AONFH 大鼠股骨头大体形态的影响

正常组大鼠股骨头呈饱满半球形,软骨面光滑完整,色泽粉白而润泽。乙醇造模 8 周时,股骨头软骨面上端出现局灶性暗红血瘀,光泽减退;造模至 12 周,暗红色区域扩展至大部分软骨面,表面粗糙失泽。健脾活骨方干预 4 周后,股骨头形貌趋于圆润,软骨面重新光滑,暗红色范围明显缩小;持续用药 8 周,软骨恢复原有光泽,仅见少量残余暗红区,整体形态已接近正常,见图 1。



A. 健脾活骨方给药 4 周;B. 健脾活骨方给药 8 周(图 2、3 同)。

图 1 健脾活骨方对 AONFH 大鼠股骨头大体形态变化的影响
Fig. 1 Effect of Jianpi Huogu Formula on the gross morphology of the femoral head in AONFH rats

3.3 健脾活骨方对 AONFH 大鼠股骨头组织病理学的影响

HE 染色结果显示,正常组骨小梁致密饱满、排

列规则,骨细胞核居中,髓腔内仅偶见小型脂肪细胞。模型组随病程进展呈现阶梯式恶化:造模 8 周时,骨小梁开始变细、稀疏,骨细胞核偏移并可见少量空骨陷窝,髓腔脂肪细胞轻度增生;至造模 12 周,骨小梁多处断裂,空骨陷窝率显著升高($P<0.01$),脂肪细胞数量及体积均显著增大($P<0.01$),骨小梁面积明显缩小($P<0.01$)。健脾活骨方干预 4 周即可见骨小梁连续性恢复,空骨陷窝率较 8 周模型组降低($P<0.01$),脂肪细胞体积缩小、数量减少;持续给药 8 周后,骨小梁进一步增粗、排列紧密,空骨陷窝率升高($P<0.01$),脂肪细胞减少,骨小梁面积较模型组升高($P<0.01$)。结果提示,健脾活骨方可逐级阻断并逆转 AONFH 的病理进程,早期抑制骨细胞凋亡与脂肪浸润,后期重建骨小梁结构,见图 2、表 4。

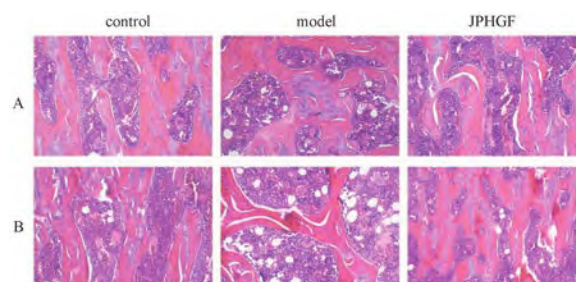


图 2 健脾活骨方对 AONFH 大鼠股骨头组织病理学的影响 (HE 染色, $\times 200$)

Fig. 2 Effect of Jianpi Huogu Formula on histopathological changes of the femoral head in AONFH rats (HE staining, $\times 200$)

表 4 健脾活骨方给药后对 AONFH 大鼠股骨头组织病理半定量评分的影响($\bar{x}\pm s, n=6$)

Table 4 Effect of Jianpi Huogu Formula administration on the semiquantitative histopathological scores of femoral head tissue in AONFH rats ($\bar{x}\pm s, n=6$)

组别	空骨陷窝率/%		脂肪细胞数/个		骨小梁面积/%	
	第 4 周	第 8 周	第 4 周	第 8 周	第 4 周	第 8 周
control	12.87 $\pm$ 1.69	15.99 $\pm$ 1.47	6.00 $\pm$ 1.41	7.33 $\pm$ 1.63	47.00 $\pm$ 0.88	42.17 $\pm$ 0.54
model	33.02 $\pm$ 1.80 ²⁾	40.88 $\pm$ 2.92 ²⁾	16.00 $\pm$ 2.00 ²⁾	25.00 $\pm$ 1.41 ²⁾	32.00 $\pm$ 1.98 ²⁾	28.50 $\pm$ 1.62 ²⁾
JPHGF	17.04 $\pm$ 1.42 ⁴⁾	18.06 $\pm$ 2.82 ⁴⁾	7.50 $\pm$ 1.05 ⁴⁾	9.50 $\pm$ 1.05 ⁴⁾	41.67 $\pm$ 1.86 ⁴⁾	44.00 $\pm$ 2.95 ⁴⁾

3.4 健脾活骨方对 AONFH 大鼠股骨头 Micro-CT 影像学的影响

Micro-CT 扫描结果显示,正常组股骨头外形完整,表面光滑,骺板上骨组织致密且规则,骨小梁排列紧密。与正常组相比,AONFH 造模 8 周模型组大鼠股骨头外形不完整,骺板上区域出现囊变,

骨小梁稀疏、断裂,提示造模后明显的骨质破坏。随着造模时间延长至 12 周股骨头轻度塌陷,囊变范围扩大,骨小梁结构进一步紊乱,骨量显著减少。健脾活骨方干预 4 周后,大鼠股骨头表面光滑度和外形完整性较模型组明显改善,囊变及塌陷情况有所减轻,骨小梁密度和连续性较模型组

提高。健脾活骨方干预 8 周效果更为显著,股骨头塌陷明显缓解,囊变范围缩小,骨小梁排列致密且规则。进一步骨计量学分析显示,与正常组相比,造模 8、12 周(给药 4、8 周)的模型组大鼠 BMD、BV/TV、Tb. Th、Tb. N 均显著降低($P < 0.01$),BS/BV 和 Tb. Sp 显著升高($P < 0.01$),且随

造模周期延长变化更加明显。与模型组比较,健脾活骨方干预后 BMD、BV/TV、Tb. Th、Tb. N 逐步升高($P < 0.05$, $P < 0.01$),健脾活骨方干预 8 周组 BS/BV 和 Tb. Sp 显著下降($P < 0.01$),提示健脾活骨方可有效抑制 AONFH 的进行性骨质破坏,并呈现时间依赖性逐级干预作用,见图 3、表 5。

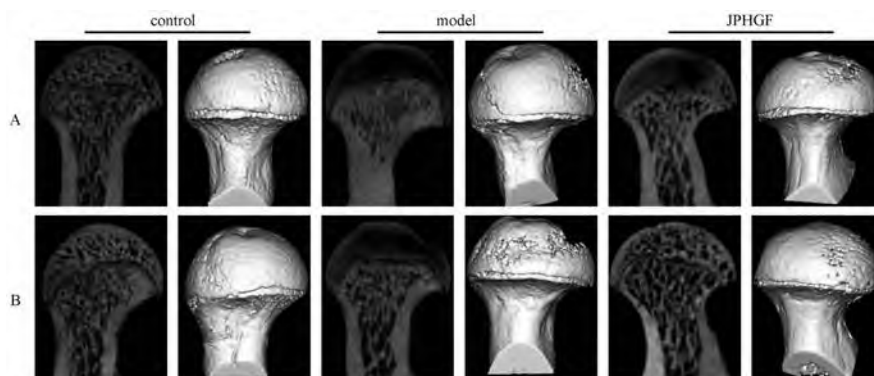


图 3 健脾活骨方对 AONFH 大鼠股骨头的 Micro-CT 影像学影响

Fig. 3 Effect of Jianpi Huogu Formula on Micro-CT imaging of the femoral head in AONFH rats

表 5 健脾活骨方给药后对 AONFH 大鼠股骨头骨计量学参数的影响($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Table 5 Effect of Jianpi Huogu Formula administration on bone morphometric parameters of the femoral head in AONFH rats ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	BMD/mg·cc ⁻¹		BV/TV/%		BS/BV/mm ⁻¹	
	第 4 周	第 8 周	第 4 周	第 8 周	第 4 周	第 8 周
control	783.69±128.12	740.27±80.13	0.99±0.01	1.00±0.01	1.92±0.44	1.20±1.26
model	528.54±37.60 ²⁾	457.23±14.65 ²⁾	0.93±0.02 ²⁾	0.86±0.03 ²⁾	5.31±0.86 ²⁾	8.21±1.06 ²⁾
JPHGF	593.86±55.05	585.57±61.48 ⁴⁾	0.96±0.02 ³⁾	0.94±0.03 ⁴⁾	2.99±1.26 ⁴⁾	4.46±1.92 ⁴⁾
组别	Tb. Sp./mm		Tb/Th/mm		Tb. N./mm ⁻¹	
	第 4 周	第 8 周	第 4 周	第 8 周	第 4 周	第 8 周
control	0.02±0.01	0.02±0.01	0.60±0.17	0.59±0.07	2.46±0.18	1.81±0.45
model	0.03±0.01 ²⁾	0.04±0.01 ²⁾	0.34±0.07 ²⁾	0.25±0.10 ²⁾	1.42±0.10 ²⁾	1.22±0.12 ¹⁾
JPHGF	0.02±0.01	0.03±0.01 ⁴⁾	0.37±0.09	0.41±0.14 ³⁾	1.20±0.41	1.62±0.42 ³⁾

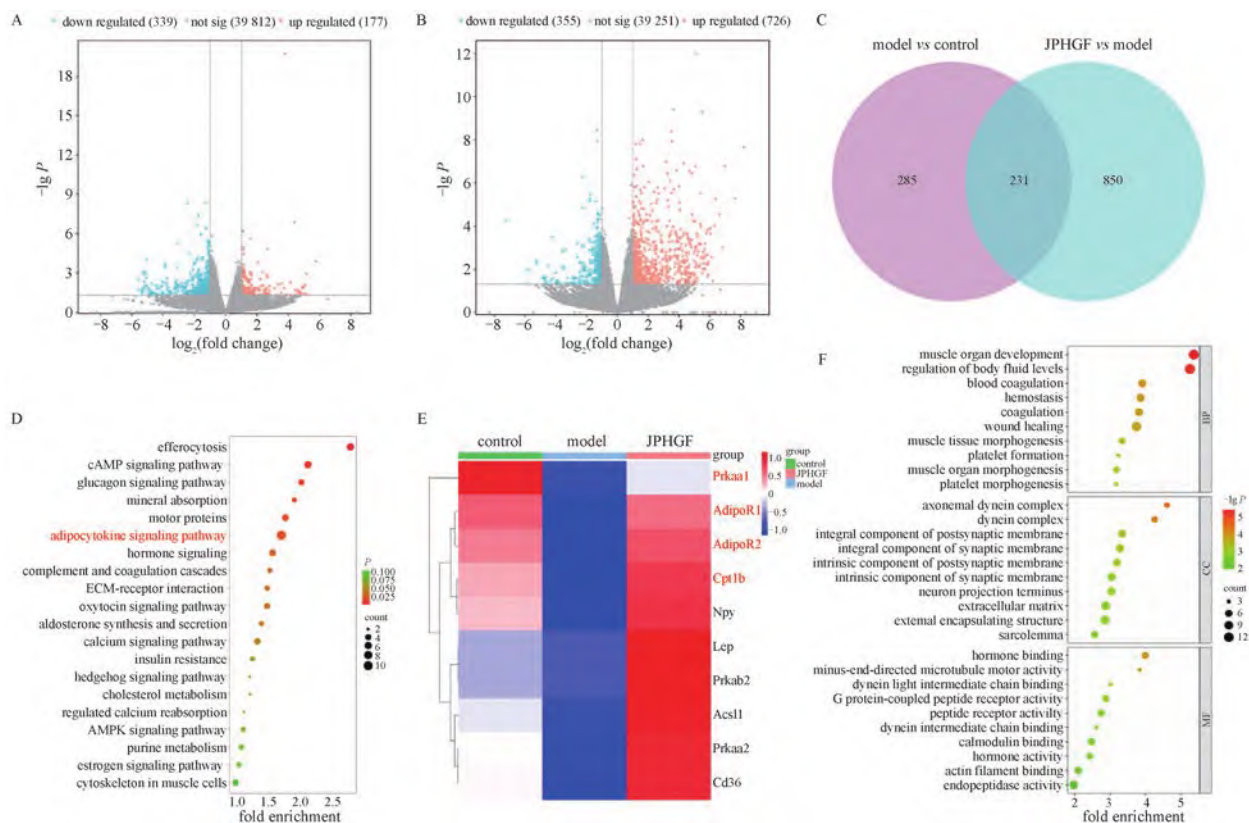
3.5 转录组学核心靶标筛选

基于差异倍数 $|\log_2 \text{fold change}| > 1$ 且 $P < 0.05$ 的筛选标准,得到 516 个 AONFH 相关的显著差异基因与 1 081 个健脾活骨方干预 AONFH 的显著差异基因,见图 4A、4B。将二者取交集获得 231 个与健脾活骨方治疗 AONFH 密切相关的核心基因,见图 4C。GO 富集结果显示,这 231 个核心基因主要涉及的生物过程(BP)包括肌肉器官发育(muscle organ development)、体液水平调节(regulation of body fluid levels)等;其主要定位的细胞组分(CC)为丝动力蛋白复合物(axonemal dynein complex)、突触

后膜内在成分(integral component of postsynaptic membrane)等;在分子功能(MF)方面,则与激素结合(hormone binding)密切相关,见图 4F。KEGG 富集结果提示,这些核心基因主要参与 cAMP 信号通路(cAMP signaling pathway)、胰高血糖素信号通路(glucagon signaling pathway)、脂肪细胞因子信号通路(adipocytokine signaling pathway)以及补体与凝血级联反应(complement and coagulation cascades)等,见图 4D。结合已有研究,AONFH 的典型病理特征之一为骨髓脂肪异常增生及脂代谢紊乱,而脂肪细胞因子信号通路的核心分子脂肪因子(adipocytokine)

kines) 是联系全身脂代谢与局部骨微环境的关键信使。该通路不仅深度参与炎症与免疫调控,还影响胰岛素敏感性,其病理机制与 ONFH 的缺血性及炎症过程高度一致^[13-14]。此外,脂肪细胞因子信号通路与本研究富集结果中的“insulin resistance”“AMPK signaling”等多条代谢与炎症相关通路存在

广泛交互,在信号网络中处于枢纽位置^[15]。因此,推测健脾活骨方可能通过调控该上游核心通路,协调下游多条信号网络而发挥综合治疗作用。后续研究将进一步聚焦于脂肪细胞因子信号通路,探讨健脾活骨方对脂肪因子表达谱及其下游信号网络的精细调控机制。



A. 模型组 *vs* 正常组的火山图; B. 健脾活骨方组 *vs* 模型组的火山图; C. 共表达 DEGs 韦恩图; D. KEGG 通路富集分析; E. 富集在 adipocytokine signaling pathway 上的 DEGs; F. GO 注释分析 (BP: 生物过程; CC: 细胞组分; MF: 分子功能)。

图 4 基于转录组测序筛选健脾活骨方治疗大鼠 AONFH 的核心靶标

Fig. 4 Core targets of Jianpi Huogu Formula in the treatment of AONFH in rats identified based on transcriptome sequencing

差异基因在脂肪细胞因子信号通路上的分布及其表达情况见图 4E, 与脂肪细胞因子信号通路密切相关的 AdipoR1、AdipoR2、Prkaa1 (即 AMPK α) 及 Cpt1b 在不同分组之间呈现显著差异表达。AdipoR1 和 AdipoR2 作为脂肪因子受体, 是脂肪细胞因子信号通路的核心节点, 直接介导脂联素的信号传导; Prkaa1 则是 AMPK 信号通路的关键下游效应分子, 参与能量代谢和炎症调控; Cpt1b 作为线粒体脂肪酸 β -氧化的限速酶, 与脂代谢稳态密切相关。基于此, 本研究在后续实验中

重点验证了 AdipoR1、AdipoR2、Prkaa1 和 Cpt1b 的表达变化, 以期进一步阐明健脾活骨方干预 AONFH 的分子机制。

3.6 健脾活骨方对 AONFH 大鼠股骨头中 AdipoR1、AdipoR2、p-AMPK α 及 Cpt1b 表达水平的影响

Western blot 检测结果显示, 与正常组相比, AONFH 模型组大鼠股骨头中 AdipoR1、AdipoR2、p-AMPK α 及 Cpt1b 蛋白表达水平均显著下降 ($P < 0.01$), 提示 AONFH 可抑制该信号通路的活化。经健脾活骨方干预后, AdipoR1、AdipoR2、p-AMPK α 及

Cpt1b 表达水平较模型组明显上调 ($P < 0.05$, $P < 0.01$), 其中 AdipoR1 及 Cpt1b 表达水平的上调尤为显著, 表明健脾活骨方能够促进 AdipoR/AMPK α /Cpt1b 信号通路的激活, 从而改善 AONFH 所致的异常改变, 见图 5、表 6。

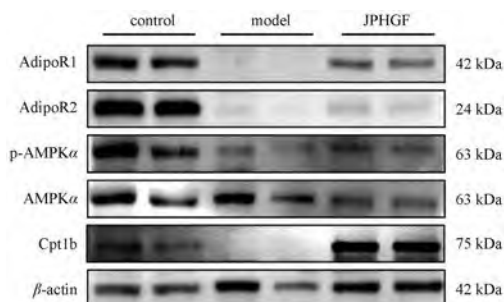


图 5 健脾活骨方对 AONFH 大鼠股骨头 AdipoR1、AdipoR2、p-AMPK α 及 Cpt1b 蛋白表达的影响

Fig. 5 Effect of Jianpi Huogu Formula on the expression of AdipoR1, AdipoR2, p-AMPK α , and Cpt1b proteins in the femoral head of AONFH rats

表 6 健脾活骨方对 AONFH 大鼠股骨头 AdipoR1、AdipoR2、p-AMPK α /AMPK α 及 Cpt1b 蛋白表达水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

Table 6 Effect of Jianpi Huogu Formula on the expression levels of AdipoR1, AdipoR2, p-AMPK α /AMPK α , and Cpt1b proteins in the femoral head of AONFH rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 6$)

组别	AdipoR1 / β -actin	AdipoR2 / β -actin	p-AMPK α /AMPK α	Cpt1b / β -actin
control	0.97 $\pm$ 0.14	0.95 $\pm$ 0.08	1.03 $\pm$ 0.09	1.02 $\pm$ 0.21
model	0.10 $\pm$ 0.02 ²⁾	0.04 $\pm$ 0.01 ²⁾	0.46 $\pm$ 0.16 ²⁾	0.11 $\pm$ 0.03 ²⁾
JPHGF	0.31 $\pm$ 0.03 ⁴⁾	0.11 $\pm$ 0.01 ³⁾	0.65 $\pm$ 0.15 ³⁾	0.78 $\pm$ 0.05 ⁴⁾

4 讨论

AONFH 是一种公认的难治性骨科疾病, 其病理演变大致经历骨细胞凋亡与骨髓脂肪化 (I ~ II 期)、微骨折及局灶性塌陷 (III 期)、继发性骨关节炎 (IV 期) 等阶段^[16]。临床上, 早期患者多表现为隐匿性髋部疼痛和关节活动受限; 影像学检查可见骨小梁模糊、囊性变及软骨下骨折, 而在疾病进展期则常伴随股骨头塌陷与关节破坏^[17]。本研究模拟 AONFH 患者长期饮酒的饮食习惯, 采用 46% 乙醇长期灌胃建立 AONFH 大鼠模型。在药效学评价方面, Von Frey 纤维丝与丙酮滴试验用于评估机械痛阈和冷敏痛阈, 能够灵敏反映 AONFH 动物在疾病进展过程中的疼痛敏感性变化^[18-19]; 斜板实验则用于检

测下肢肌力与协调性, 从而弥补单一疼痛行为学评价的不足^[20]; 行为学、影像学 and 病理学的综合分析, 使得对健脾活骨方干预效果的评估更为系统与可靠。结果显示, 造模 8 周时, 大鼠股骨头表面粗糙、软骨暗红区扩大, Micro-CT 显示囊性变及骨小梁紊乱, HE 染色提示骨小梁稀疏断裂、空骨陷窝率显著升高; 至 12 周时, 出现轻度塌陷, 痛阈下降明显。这些改变与临床上早中期 AONFH 的影像学 and 病理学特征一致。在此基础上, 健脾活骨方干预 4 周即可显著改善大鼠疼痛和股骨头形态, 8 周后骨小梁连续性明显恢复, 骨密度及骨体积分数等指标显著回升, 同时空骨陷窝率和脂肪细胞数量下降, 提示该方能够在 AONFH 早中期有效阻断病程进展, 发挥骨保护作用。

AONFH 的核心病理机制是骨髓脂肪异常增生与微循环栓塞共同导致骨内压升高及缺血缺氧^[21]。在此过程中, 脂联素 (APN) 及其受体 AdipoR1/AdipoR2 发挥关键作用。APN-AdipoR 信号通过调节多条下游通路, 维系脂质代谢平衡、炎症稳态以及成骨-成脂分化^[22-23]。AdipoR1 通过激活 Wnt/ β -catenin 通路促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化^[24], 抑制破骨细胞形成以维持骨稳态^[25]; AdipoR2 主要通过 PPAR α 通路抑制 NF- κ B 信号, 降低炎症因子表达, 减轻局部炎症反应^[26-27]。此外, APN 及其受体 AdipoR1 可通过磷酸化 AMPK α , 调控乙酰辅酶 A 羧化酶与 Cpt1b 活性, 促进脂肪酸 β -氧化, 避免脂滴堆积与骨髓脂肪细胞肥大^[28-29]。本研究转录组学结果显示, 健脾活骨方干预 AONFH 后, 差异基因显著富集于脂肪细胞因子信号通路, 其中 AdipoR1、AdipoR2、Prkaa1 (AMPK α 编码基因) 及 Cpt1b 均呈上调。进一步的 Western blot 验证亦表明, 该方能够显著恢复 AONFH 大鼠股骨头中 AdipoR1、AdipoR2、p-AMPK α 及 Cpt1b 蛋白水平, 这些结果共同提示, 健脾活骨方可能通过激活 APN/AdipoR/AMPK/Cpt1b 信号轴, 改善骨髓脂质代谢异常, 从而延缓病变进展。

AONFH 的中医治疗多以补肾、活血、化瘀为主要策略, 重点在于改善病程中后期的“骨虚”与“瘀阻”病机, 而对疾病早期代谢异常环节的干预则相对不足^[30]。健脾活骨方以茯苓、白术健脾化湿, 赤芍、当归活血通络, 鹿角胶补益肾精, 由此构建出“健脾调脂、活血改善循环、补肾助修复”的配伍优

势。这一思路不仅有助于纠正脂质代谢异常与微循环障碍,还可以在病程早期发挥防御作用,而非仅限于塌陷后的修复支持^[31-32]。在分子机制层面,既往研究已揭示健脾活骨方能够通过 AMPK、PPAR 等代谢调控通路改善脂质稳态,并依赖 VEGF/PI3K/Akt 信号轴促进血管新生,从而在“调脂-促循环”双重环节发挥作用^[8,33]。在此基础上,本研究进一步发现其还可激活 AdipoR/AMPK α /Cpt1b 信号轴,提示健脾活骨方通过促进脂肪酸 β -氧化、改善骨髓脂质环境,为 AONFH 的早期干预提供了新的分子证据。

尽管本研究在探讨健脾活骨方改善酒精性股骨头坏死作用机制方面取得了一定进展,但仍存在局限。首先,本研究采用单一乙醇灌胃法造模,虽能较好模拟长期饮酒所致的骨质损伤,但与糖皮质激素等其他病因相关的 AONFH 仍存在差异,模型的外推性有限。其次,本研究关于脂质代谢改善的推断主要基于组织学观察,仍需结合血清脂质因子检测或代谢组学分析进一步加以证实。基于上述不足,后续研究将从模型多样化以及机制验证的纵深方向加以完善,以更全面阐释健脾活骨方的作用潜力。

[参考文献]

- [1] PANG K, LI H Y, CHEN H F, et al. The bibliometric and visualization analysis of alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head: research trends and future directions (1998—2024)[J]. *J Orthop Surg Res*, 2025, 20(1): 724.
- [2] YU H P, ZHU D Y, LIU P, et al. Osthole stimulates bone formation, drives vascularization and retards adipogenesis to alleviate alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *J Cell Mol Med*, 2020, 24(8): 4439.
- [3] 陈财,曾平,刘金富,等. 酒精性股骨头坏死的发病机制及其气滞血瘀型中医药治疗的研究进展[J]. *广西医学*, 2022, 44(4): 438.
- [4] 黄建峰,何海军. 从酒伤理论论治酒精性股骨头坏死[J]. *中医正骨*, 2022, 34(9): 69.
- [5] 陈志伟,王振涛,李泰贤,等. 酒精相关性股骨头坏死的发病特征分析[J]. *中医正骨*, 2017, 29(12): 23.
- [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的前瞻性临床研究[J]. *中华关节外科杂志(电子版)*, 2013, 7(3): 287.
- [7] 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.
- [8] 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.
- [9] 方罗昌婷,汪倩倩,孙丛丛,等. 基于 VEGF/VEGFR2/PI3K/Akt 信号通路研究健脾活骨方对酒精性股骨头坏死血管损伤的修复作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2023, 29(8): 186.
- [10] 李群. 从血骨耦联角度探讨健脾活骨方治疗激素性股骨头坏死大鼠的作用[D]. 北京:中国中医科学院, 2024.
- [11] 李涛,黄丰,林娜. 健脾活骨方缓解大鼠激素性股骨头坏死的病证方关联机制[D]. 昆明:云南中医药大学, 2024.
- [12] YOON C, WOOK Y Y, SIK N H, et al. Behavioral signs of ongoing pain and cold allodynia in a rat model of neuropathic pain[J]. *Pain*, 1994, 59(3): 369.
- [13] LIU X L, LI Q, SHENG J G, et al. Unique plasma metabolomic signature of osteonecrosis of the femoral head[J]. *J Orthop Res*, 2016, 34(7): 1158.
- [14] 闫玉珠,于燕,刘俊叶,等. 酒精性和激素性股骨头坏死的外周脂质组学分析[J]. *中南大学学报(医学版)*, 2022, 47(7): 872.
- [15] LIN T Y, CHEN W J, YANG P, et al. Bioinformatics analysis and identification of genes and molecular pathways in steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 327.
- [16] HINES J T, JO W L, CUI Q, et al. Osteonecrosis of the femoral head: an updated review of ARCO on pathogenesis, staging and treatment[J]. *J Korean Med Sci*, 2021, 36(24): e177.
- [17] 陈卫衡,何伟,赵德伟,等. 股骨头坏死中医疗效评价标准(2019年版)[J]. *中医正骨*, 2019, 31(6): 3.
- [18] DEUIS J R, DVORAKOVA L S, VETTER I. Methods used to evaluate pain behaviors in rodents[J]. *Front Mol Neurosci*, 2017, 10: 284.
- [19] XU Z Z, XIE W L, FENG Y Q, et al. Positive interaction between GPER and β -alanine in the dorsal root ganglion uncovers potential mechanisms mediating continuous neuronal sensitization and neuroinflammation responses in neuropathic pain[J]. *J Neuroinflamm*, 2022, 19(1): 164.
- [20] CHEN C C, CHANG C P, YANG C L. An adaptive fall-free rehabilitation mechanism for ischemic stroke rat patients[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 984.
- [21] GILLET C, VALLE A D, GASPARD N, et al. Osteonecrosis of the femoral head: lipotoxicity exacerbation in MSC and modifications of the bone marrow fluid[J]. *Endocrinology*, 2017, 158(1): 490.
- [22] ZHANG C F, LIN Y Z, YAN C H, et al. Adipokine signaling pathways in osteoarthritis[J]. *Front Bioeng Biotechnol*, 2022, 10: 865370.
- [23] ZHANG S L, WANG H J, MENG Q, et al. Recent advances in osteonecrosis of the femoral head: a focus on mesenchymal stem cells and adipocytes[J]. *J Transl Med*, 2025, 23(1): 592.
- [24] WANG Y Y, ZHANG X H, SHAO J, et al. Adiponectin regulates BMSC osteogenic differentiation and osteogenesis through the Wnt/ β -catenin pathway[J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1):

- 3652.
- [25] CHEN G P, HUANG L T, WU X, et al. Adiponectin inhibits osteoclastogenesis by suppressing NF- κ B and p38 signaling pathways[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 503(1): 2075.
- [26] TIAN L, LUO N L, ZHU X L, et al. Adiponectin-AdipoR1/2-APPL1 signaling axis suppresses human foam cell formation; differential ability of AdipoR1 and AdipoR2 to regulate inflammatory cytokine responses[J]. *Atherosclerosis*, 2012, 221(1): 66.
- [27] LEWIS J W, EDWARDS J R, NAYLOR A J, et al. Adiponectin signalling in bone homeostasis, with age and in disease [J]. *Bone Res*, 2021, 9(1): 1.
- [28] MILJKOVIC I, YERGES L M, LI H, et al. Association of the CPT1B gene with skeletal muscle fat infiltration in Afro-Caribbean men[J]. *Obesity (Silver Spring)*, 2009, 17(7): 1396.
- [29] 杨旸, 马铁, 曹师承, 等. 脂联素在骨骼肌中的新功能及其与运动的关系[J]. *生物化学与生物物理进展*, 2023, 50(2): 306.
- [30] OUYANG W S, MENG Y B, GUO G M, et al. Efficacy and safety of traditional Chinese medicine in the treatment of osteonecrosis of the femoral head[J]. *J Orthop Surg Res*, 2023, 18(1): 600.
- [31] 李泰贤, 张彦琼, 黄泽青, 等. 从分子网络解析非创伤性股骨头坏死不同中医证候的生物学基础及其对证方药的作用机制[J]. *中国实验方剂学杂志*, 2020, 26(16): 192.
- [32] 孙诗艺, 颜炎, 吴子轩, 等. 基于网络药理学和分子对接技术分析健脾活骨方治疗股骨头坏死的作用机制[J]. *中药新药与临床药理*, 2022, 33(10): 1357.
- [33] 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/OL]. *中国中药杂志*, 2026, 51(2): 332.

[责任编辑 丁广治]