·实验研究·

骨坏死康复丸治疗激素性股骨头坏死的作用机制*

曹洋[1]，董博[2]，申力[3]，李越[1]，曹玉举[4,5]，张瑾[4]，刘子嘉[6]，杨志敏[4]，李文茜[4]，沈彩红[4]，张宇航[5]

1. 陕西中医药大学，陕西 咸阳 712046；2. 西安交通大学附属红会医院，陕西 西安 710054；3. 中国中医科学院中医基础理论研究所，北京 100700；4. 河南中医药大学附属郑州中医骨伤病医院，河南 郑州 450047；5. 河南中医药大学，河南 郑州 450046；6. 南阳市第二人民医院风湿免疫科，河南 南阳 473000

摘要：目的：基于磷脂酰肌醇（phosphatidyl inositol 3－kinase，PI3K）/蛋白激酶 B（protein kinase B，PKB，又称 Akt）/低氧诱导因子－1α（hypoxia inducible factor－1α，HIF－1α）信号通路与糖原合酶激酶－3β（glycogen synthase kinase－3 beta，GSK－3β）信号通路探讨骨坏死康复丸治疗激素性股骨头坏死（steroid－induced osteonecrosis of the femoral head，SONFH）的作用机制。方法：从 65 只雄性大鼠中随机选取 12 只作为空白组，其余大鼠采用脂多糖（20 μg·kg^{-1}）联合甲基强的松龙（40 mg·kg^{-1}）注射法建立 SONFH 模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组、仙灵骨葆胶囊组（0.315 g·kg^{-1}）、骨坏死康复丸高剂量组（27.30 g·kg^{-1}）及中剂量组（13.65 g·kg^{-1}），每组 12 只，连续灌胃 6 周。采用 Micro－CT 观察大鼠股骨头结构，HE 染色观察股骨头病理形态，ELISA 法检测血清 HIF－1α 含量。骨髓间充质干细胞（bone marrow mesenchymal stem cells，BMSCs）的分组方式同动物实验，CCK－8 法检测细胞增殖率，Western blot 法检测 GSK－3β、HIF－1α、Akt 蛋白表达水平。结果：Micro－CT 显示，与空白组比较，模型组大鼠股骨头骨小梁短少、稀疏，组织微结构明显破坏。与模型组比较，药物组大鼠骨小梁结构得到改善，排列趋于规则。与空白组比较，模型组大鼠骨体积分数、骨矿物质密度、骨小梁厚度及骨小梁数量减少（$P<0.01$）。与模型组比较，骨坏死康复丸高剂量组大鼠骨体积分数、骨矿物质密度、骨小梁数量增加（$P<0.05$）。HE 染色显示，空白组大鼠股骨头软骨层较厚，骨小梁排列整齐，髓腔内可见大量活跃的增生骨髓组织。模型组大鼠软骨层较薄，骨小梁稀疏，排列紊乱，髓腔内见大量坏死组织碎片，伴随大量空缺骨陷窝和骨坏死。与模型组比较，药物组大鼠骨小梁紊乱、断裂得到改善，空骨陷窝减少。与空白组比较，模型组大鼠血清 HIF－1α 含量减少；与模型组比较，药物组大鼠血清 HIF－1α 含量增加（$P<0.01$）。CCK－8 检测显示，与空白组比较，模型组 BMSCs 的增殖率降低（$P<0.05$）。与模型组比较，仙灵骨葆胶囊组和骨坏死康复丸高剂量组 BMSCs 的增殖率升高（$P<0.01$）。Western blot 显示，与空白组比较，模型组 BMSCs 的 GSK－3β、HIF－1α、Akt 表达水平降低（$P<0.01$）。与模型组比较，药物组 BMSCs 的 GSK－3β、HIF－1α、Akt 表达水平升高（$P<0.01$）。结论：骨坏死康复丸可能通过调控 PI3K/Akt/HIF－1α 信号通路、GSK－3β 信号通路发挥对 SONFH 的治疗作用。

关键词：激素性股骨头坏死；骨坏死康复丸；PI3K/Akt/HIF－1α 信号通路；GSK－3β 信号通路；大鼠；骨髓间充质干细胞
DOI：10.16368/j.issn.1674－8999.2025.01.034
中图分类号：R285.5　　**文献标志码**：A　　**文章编号**：1674－8999(2025)01－0184－08

Action Mechanism of Osteonecrosis Rehabilitation Pill in Treatment of Hormonal Femoral Head Necrosis

CAO Yang[1]，DONG Bo[2]，SHEN Li[3]，LI Yue[1]，CAO Yuju[4,5]，ZHANG Jin[4]，LIU Zijia[6]，YANG Zhimin[4]，LI Wenqian[4]，SHEN Caihong[4]，ZHANG Yuhang[5]

1. Shaanxi University of Chinese Medicine，Xianyang Shaanxi China 712046；2. Honghui Hospital，Xi′an Jiaotong University，Xi′an Shaanxi China 710054；3. Institute of Basic Theory of Traditional Chinese Medicine，China Academy of Chinese Medical Sciences，Beijing China 100700；4. Zhengzhou Hospital of Orthopedics and Traumatology of Traditional Chinese

* **基金项目**：河南省自然科学基金面上项目（232300421193）

Medicine, Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan China 450047; 5. Henan University of Chinese Medicine, Zhengzhou Henan China 450046; 6. Department of Rheumatology and Immunology, The Second People's Hospital of Nanyang City, Nanyang Henan China 473000

Abstract: Objective: Based on the relationship between phosphatidyl inositol 3 - kinase (PI3K)/protein kinase B (PKB, also known as Akt)/hypoxia inducible factor - 1α (HIF - 1α) signaling pathway and glycogen synthase kinase - 3 beta (GSK - 3β) signaling pathway to explore the mechanism of action of Osteonecrosis Rehabilitation Pill in treatment of steroid - induced osteonecrosis of the femoral head (SONFH). Methods: Twelve rats were randomly selected from 65 male rats as a blank group, and the rest of the rats were injected with lipopolysaccharide (20 μg · kg^{-1}) in combination with methylprednisolone (40 mg · kg^{-1}) to establish the SONFH model. The rats successfully modeled were randomly divided into the model group, Xianling Gubao Capsule group (0.315 g · kg^{-1}), Osteoradionecrosis Rehabilitation Pill high - dose group (27.30 g · kg^{-1}), and the medium - dose group (13.65 g · kg^{-1}), with 12 rats in each group, and were gavaged consecutively for 6 weeks. Micro - CT was used to observe the structure of the femoral head of rats, HE staining was used to observe the pathologic morphology of the femoral head, and ELISA was used to detect the content of serum HIF - 1α. Bone marrow mesenchymal stemcells (BMSCs) were grouped in the same way as animal experiments, and the cell proliferation rate was detected by CCK - 8 method, and the protein expression levels of GSK - 3β, HIF - 1α and Akt were detected by Western blot method. Results: Micro - CT results showed that compared with the blank group, the bone trabeculae of the femoral head of rats in the model group were short and sparse, and the tissue microstructure was obviously damaged. Compared with that of the model group, the structure of trabeculae in the drug group was improved, and the arrangement tended to be regular. Compared with that of the blank group, the bone volume fraction, bone mineral density, bone trabecular thickness and the number of bone trabeculae in the model group were reduced ($P < 0.01$). Compared with that of the model group, bone volume fraction, bone mineral density and number of trabeculae increased in the high dose group ($P < 0.05$). HE staining results suggested that the cartilage layer of the femoral head of the rats in the blank group was thicker, the trabeculae were neatly arranged, and a large amount of active proliferative bone marrow tissue could be seen in the medullary cavity. In the model group, the cartilage layer was thinner, the bone trabeculae were sparse and disorganized, and many necrotic tissue fragments were seen in the medullary cavity, accompanied by many vacant bone sockets and osteonecrosis. Compared with that of the model group, the rats in the drug group showed improved disorganization and fracture of bone trabeculae, and fewer vacant bone sockets. Compared with that of the blank group, the serum HIF - 1α content of rats in the model group was decreased; compared with that of the model group, the serum HIF - 1α content of rats in the drug group was increased ($P < 0.01$). With CCK - 8 assay, it was suggested that the proliferation rate of BMSCs in the model group was decreased compared with the blank group ($P < 0.05$). Compared with the model group, the proliferation rate of BMSCs was increased in Xianling Gubao Capsules group and Osteonecrosis Rehabilitation Pill high - dose group ($P < 0.01$). Western blot results indicated that the expression levels of GSK - 3β, HIF - 1α and Akt of BMSCs in the model group were decreased compared with the blank group ($P < 0.01$). Compared with that of the model group, the expression levels of GSK - 3β, HIF - 1α, and Akt in BMSCs in the drug group were increased ($P < 0.01$). Conclusion: Osteonecrosis Rehabilitation pill may exert a therapeutic effect on SONFH by regulating PI3K/Akt/HIF - 1α signaling pathway and GSK - 3β signaling pathway.

Key words: hormonal osteonecrosis of the femoral head; Osteonecrosis Rehabilitation Pill; PI3K/Akt/HIF - 1α signaling pathway; GSK - 3β signaling pathway; rat; bone marrow mesenchymal stem cell

股骨头坏死(osteonecrosis of the femoral head, ONFH)作为一种致残率高的骨科常见疑难疾病,多发生在 30 ~ 70 岁人群,男女比例为 2.4 ∶ 1[1]。据统计,我国非创伤性股骨头坏死患者约为 812 万例,每年新增 1 万 ~ 2 万例[2-3]。激素性股骨头坏死(steroid - induced osteonecrosis of the femoral head, SONFH)是非创伤性股骨头坏死的主要类别之一[4]。SONFH 的机制较复杂,深入探讨其发病机制并进行干预,对于实现精准诊断和防治、改善预后具有重要的研究意义和临床价值。

股骨头坏死属于中医“骨痹”“骨痿”“骨蚀”范畴。SONFH 主要由于合并基础疾病,久病气血耗伤,肾精亏虚,肾主骨生髓,肾虚则筋骨不健,气血不足则筋骨失养。加上长期服用糖皮质激素,药毒内蕴,性寒凝滞,痹阻脉络,气滞血瘀,导致骨蚀、骨痿[5]。本病特点为“本虚标实”,病机为肾虚血瘀[6-7],肾虚是根本,血瘀是关键。本课题组研制的骨坏死康复丸由淫羊藿、龟板、当归、熟地黄、菟丝子、盐杜仲、黄芪组成,主要功效为补肾填髓、养血活血。骨坏死康复丸可有效改善 SONFH 患者的症状,提高生活质量[8-9],增加大鼠骨量,进而促进血管新生[10],但作用机制尚未阐明。本研究旨在探索骨坏

死康复丸防治 SONFH 的机制，对于其临床应用推广具有积极意义。

1　材料

1.1　动物与细胞　成年 Wistar 雄性大鼠 65 只，体质量（200 ± 20）g，购于河南省实验动物中心，实验动物生产许可证号：SCXK（豫）2022 - 0001。大鼠饲养于郑州中医骨伤病医院实验动物中心，温度 22 ~ 25 ℃，湿度 50%，12 h/12 h 昼夜交替循环，饲养期间自由饮水。本实验经郑州中医骨伤病医院伦理委员会审批通过，伦理编号为 IECYJ2023010501。

小鼠骨髓间充质干细胞（bone marrow mesenchymal stem cells，BMSCs）购自武汉普诺赛生命科技有限公司，批号：CP - M131。

1.2　药物与试剂　骨坏死康复丸（郑州中医骨伤病医院，批号：豫药制备字 Z20180008001）；仙灵骨葆胶囊（贵州同济堂制药有限公司，批号：200802）；注射用甲泼尼龙琥珀酸钠（天津金耀药业有限公司，批号：2108030B）；脂多糖（北京索莱宝科技有限公司，批号：L8880）；低氧诱导因子 - 1α（hypoxia inducible factor - 1α，HIF - 1α）ELISA 检测试剂盒（上海源桔生物科技中心，批号：YJ002882）；细胞裂解液（无抑制剂）、CCK - 8 试剂盒（上海碧云天生物技术有限公司，批号：P0013、C0037）；预染蛋白 marker、BCA 蛋白定量/浓度测定试剂盒、飞克特超敏 ECL 发光液、TBST 缓冲液（大连美仑生物科技有限公司，货号：MA0342 - 1、MA0082 - 2、MA0186 - 2、MA0091 - 1）；糖原合酶激酶 - 3β（glycogen synthase kinase - 3 beta，GSK - 3β）、HIF - 1α、蛋白激酶 B（protein kinase B，PKB，又称 Akt）抗体（武汉三鹰生物技术有限公司，货号：22104 - 1 - AP、20960 - 1 - AP、10176 - 2 - AP）。

1.3　仪器　Micro - CT 扫描仪（美国 Bruker 公司，型号：SkyScan 1276）；酶标仪（ThermoFisher Scientific 公司，型号：VARIOSKAN FLASH）；凝胶成像系统、电泳仪（美国伯乐生命医学产品有限公司，型号：8187、PowerPacBasic）；Centrifuge 5424 离心机（Eppendorf 公司）；光学显微镜（日本 Olympus 公司，型号：BX53）。

2　方法

2.1　药物制备　骨坏死康复丸用蒸馏水溶解，配置质量浓度为 10 g · mL^{-1}的药液。

2.2　SONFH 模型制备　根据参考文献研究[11]，大鼠腹腔注射 2 次脂多糖（20 μg · kg^{-1}），中间间隔 24 h。注射后 24 h，肌肉注射甲基强的松龙（40 mg · kg^{-1}），连续 3 次，每次间隔 24 h。注射 4 周后，随机选取 5 只大鼠，进行股骨头组织病理学检查。若股骨头空骨陷窝数量增加，造血细胞减少，坏死脂肪细胞增加，证明 SONFH 造模成功。

2.3　分组及给药　65 只大鼠适应性喂养 1 周后，随机选取 12 只作为空白组，其余大鼠采用上述方法建立 SONFH 模型。将造模成功的大鼠随机分为模型组、仙灵骨葆胶囊组（0.315 g · kg^{-1}）、骨坏死康复丸高剂量组（27.30 g · kg^{-1}）及中剂量组（13.65 g · kg^{-1}），每组 12 只，连续灌胃 6 周。对照组和模型组大鼠给予等剂量生理盐水灌胃。

将 BMSCs 分为空白组、模型组、仙灵骨葆胶囊组、骨坏死康复丸高剂量组及骨坏死康复丸中剂量组。空白组采用含有 10% FBS 的 DMEM 完全培养基培养；模型组采用含有 1 × 10^{-8} mol · L^{-1}地塞米松的完全培养基培养 72 h[12]；仙灵骨葆胶囊组采用含有 1 × 10^{-8} mol · L^{-1}地塞米松的完全培养基培养 48 h 后，再用含有 1.0 g · L^{-1}仙灵骨葆胶囊的完全培养基培养 24 h[13]。骨坏死康复丸高剂量组和中剂量组先用含有 1 × 10^{-8} mol · L^{-1}地塞米松的完全培养基培养 48 h 后，再分别用含有 40 μmol · L^{-1}、20 μmol · L^{-1}骨坏死康复丸的完全培养基培养 24 h。

2.4　样本制备　大鼠末次给药 2 h 后，腹主动脉取血制备血清，- 80 ℃冻存备用。取各组大鼠右侧股骨头组织，4% 多聚甲醛固定用于 HE 染色。

2.5　Micro - CT 观察大鼠股骨头结构　治疗 6 周后，采用 3% 戊巴比妥钠腹腔注射麻醉大鼠，固定大鼠左后侧股骨。通过 Micro - CT 系统收集股骨头图像，用 3D 图像重建骨缺损，对股骨头进行评价（90 kV，111 μA）。随后，通过软件自动计算骨体积分数、骨面积/组织体积比值、骨矿物质密度、骨小梁厚度和骨小梁数量。

2.6　HE 染色观察大鼠股骨头病理形态　取 4% 多聚甲醛固定的大鼠右侧股骨头组织，固定 24 h ~ 48 h 后，10% EDTA 脱钙液脱钙 3 ~ 4 d，常规石蜡包埋后沿冠状面切片，厚度 4 μm。切片进行苏木精 - 伊红（hematoxylin - eosin，HE）染色，在光学显微镜下观察。

2.7　ELISA 法检测大鼠血清 HIF - 1α 含量　根据 ELISA 试剂盒的说明书进行操作，使用酶标仪在 450 nm 波长下测定光密度（optical density，OD）值。以标准品的 OD 值为纵坐标，标准品浓度为横坐标，

绘制标准曲线。将样本的 OD 值代入标准曲线，读出样本所对应的浓度，乘以相应的稀释倍数即为样本的实际浓度。

2.8　细胞培养　BMSCs 用 DMEM 完全培养基（含有 10% 胎牛血清和 1% 青链霉素），在 37 ℃、5% CO_2 的细胞培养箱中培养，隔天换液，当细胞长到 80% 时，用胰酶消化，进行传代。

2.9　CCK－8 法检测 BMSCs 增殖情况　制备 BMSCs 悬液，将状态良好的 BMSCs 进行重悬计数，以每孔 1×10^3 个接种至 96 孔板，摇匀，于 37 ℃培养箱中培养 24 h 至细胞贴壁，吸除培养液。按照不同分组进行干预，继续培养 24 h 后，每孔加入 10 μL CCK－8 反应液，摇匀，放入培养箱中培养 2 h，采用酶标仪检测 450 nm 处的 OD 值，计算细胞增殖率。

细胞增殖率（%）＝[（实验孔 OD 值－空白孔 OD 值）/（对照孔 OD 值－空白孔 OD 值]×100%

2.10　Western blot 法检测 BMSCs 的 GSK－3β、HIF－1α、Akt 蛋白表达水平　将 BMSCs 接种于六孔板上，每孔 1×10^5 个细胞，培养 24 h 后根据细胞分组干预 72 h，收集细胞进行裂解并提取蛋白。采用 BCA 法进行蛋白定量，95 ℃加热 10 min 使蛋白变性，通过 12% SDS 聚丙烯酰胺凝胶进行电泳（80 V，120 min），然后转移到聚偏二氟乙烯（polyvinylidene difluoride，PVDF）膜上（250 mA，80 min），在室温下用无蛋白快速封闭液封闭 10 min。加入一抗 GSK－3β（1∶2 000）、HIF－1α（1∶5 000）、Akt（1∶5 000），4 ℃孵育过夜，TBST 洗涤 5 次，每次 5 min。二抗（1∶1 000）室温孵育 1 h，TBST 洗涤 3 次，每次 5 min。配置 ECL 显影液，放入全自动化学发光图像分析系统内成像并拍照。以 GAPDH 为内参蛋白，采用 Image J 软件分析目标条带的灰度值。

2.11　统计学方法　采用 SPSS 22.0 软件分析数据，计量资料以均数±标准差（$\bar{x}\pm s$）表示。若数据服从正态分布，两组间比较采用 t 检验，多组间比较采用单因素方差分析，两两比较若方差齐时采用 *LSD* 检验，方差不齐采用 *Tamhane's* 检验；若数据不服从正态分布，采用非参数检验。$P<0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3　结果

3.1　骨坏死康复丸对大鼠股骨头结构的影响

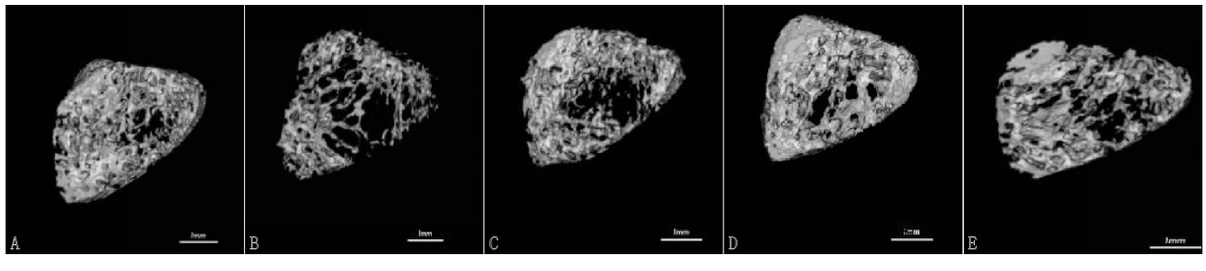
Micro－CT 显示，与空白组比较，模型组大鼠骨体积分数、骨矿物质密度、骨小梁厚度及骨小梁数量减少，骨面积/组织体积比值增加（$P<0.01$）。与模型组比较，骨坏死康复丸高剂量组大鼠骨体积分数、骨矿物质密度、骨小梁数量增加，骨面积/组织体积比值减少（$P<0.05$）。与模型组比较，骨坏死康复丸中剂量组大鼠骨小梁数量增加，骨面积/组织体积比值减少（$P<0.05$），见表 1。

与空白组比较，模型组大鼠股骨头骨小梁短少、稀疏，容易发生骨折，骨组织微结构明显破坏。与模型组比较，仙灵骨葆胶囊组、骨坏死康复丸高剂量组、骨坏死康复丸中剂量组大鼠骨小梁结构改善，排列趋于规则，见图 1。

表 1　各组大鼠股骨头指标比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	骨体积分数/%	骨面积/组织体积比值（mm^{-1}）	骨矿物质密度（ρ/mg·cm^{-3}）	骨小梁厚度（l/mm）	骨小梁数量/个·mm^{-1}
空白组	12	43.40±0.05	17.23±0.34	6.23±0.07	0.28±0.01	2.65±0.16
模型组	12	31.26±2.07##	23.50±0.22##	3.60±0.06##	0.17±0.01##	1.75±0.13##
仙灵骨葆胶囊组	12	36.44±1.32	22.03±0.65	4.70±0.07	0.26±0.03	1.78±0.39
骨坏死康复丸高剂量组	12	42.58±2.11**	17.59±1.33**	5.00±0.07*	0.17±0.01	2.54±0.22*
骨坏死康复丸中剂量组	12	42.35±0.89	18.71±0.78*	4.90±0.07	0.16±0.01	1.86±0.35*

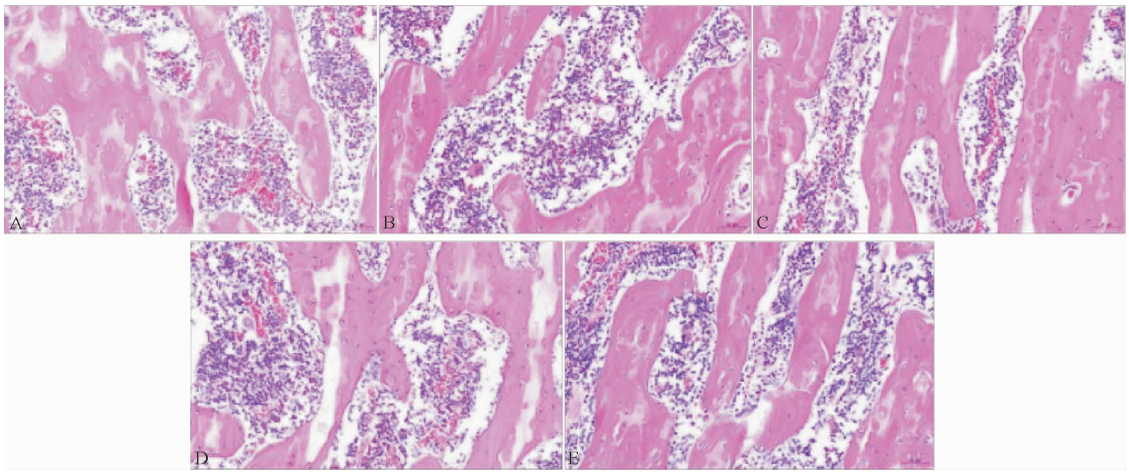
注：与空白组比较，##$P<0.01$，#$P<0.05$；与模型组比较，**$P<0.01$，*$P<0.05$。



注：A：空白组；B：模型组；C：仙灵骨葆胶囊组；D：骨坏死康复丸高剂量组；E：骨坏死康复丸中剂量组。

图 1　各组大鼠股骨头 Micro－CT 图

3.2　骨坏死康复丸对大鼠股骨头病理形态的影响　HE 染色显示，空白组大鼠股骨头软骨层较厚，骨细胞清晰可见，细胞核居于细胞中央，呈圆形或卵圆形；骨小梁排列整齐，结构致密饱满；髓腔内可见大量活跃的增生骨髓组织，造血细胞数量较多，空缺骨陷窝数量较少。模型组大鼠软骨层较薄，软骨下可见明显的坏死病灶，骨细胞呈月牙形或三角形，紧贴骨陷窝壁；骨小梁稀疏，排列紊乱，间距增大，可见骨小梁断裂；髓腔内分布大量坏死组织碎片，伴随大量空缺骨陷窝和骨坏死。与模型组比较，仙灵骨葆胶囊组、骨坏死康复丸高剂量组、骨坏死康复丸中剂量组大鼠骨小梁紊乱、断裂得到改善，空骨陷窝减少，见图 2。



注：A：空白组；B：模型组；C：仙灵骨葆胶囊组；D：骨坏死康复丸高剂量组；E：骨坏死康复丸中剂量组。

图 2　各组大鼠股骨头 HE 染色图（×20）

3.3　骨坏死康复丸对大鼠血清 HIF－1α 含量的影响　与空白组比较，模型组大鼠血清 HIF－1α 含量减少（$P<0.01$）。与模型组比较，仙灵骨葆胶囊组、骨坏死康复丸高剂量组、骨坏死康复丸中剂量组大鼠血清 HIF－1α 含量增加（$P<0.01$），见表 2。

表 2　各组大鼠血清 HIF－1α 含量比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	HIF－1α 含量（ρ/ng·L^{-1}）
空白组	12	1.86±0.09
模型组	12	0.39±0.03$^{\#\#}$
仙灵骨葆胶囊组	12	0.66±0.02**
骨坏死康复丸高剂量组	12	1.73±0.05**
骨坏死康复丸中剂量组	12	1.62±0.06**

注：与空白组比较，##$P<0.01$；与模型组比较，＊＊$P<0.01$。

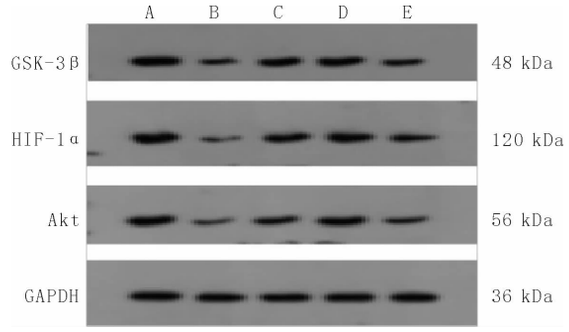
3.4　骨坏死康复丸对 BMSCs 增殖的影响　CCK－8 检测显示，与空白组比较，模型组 BMSCs 的增殖率降低（$P<0.05$）。与模型组比较，仙灵骨葆胶囊组和骨坏死康复丸高剂量组 BMSCs 的增殖率升高（$P<0.01$），见表 3。

3.5　骨坏死康复丸对 BMSCs 中 GSK－3β、HIF－1α、Akt 蛋白表达水平的影响　Western blot 显示，与空白组比较，模型组 BMSCs 的 GSK－3β、HIF－1α、Akt 蛋白表达水平降低（$P<0.01$）。与模型组比较，仙灵骨葆胶囊组、骨坏死康复丸高剂量组、骨坏死康复丸中剂量组 BMSCs 的 GSK－3β、HIF－1α、Akt 蛋白表达水平升高（$P<0.01$），见图 3、表 4。

表 3　各组大鼠 BMSCs 增殖率比较　（$\bar{x}\pm s$）

组别	n	细胞增殖率/%
空白组	3	100.00±6.43
模型组	3	59.50±1.90$^{\#}$
仙灵骨葆胶囊组	3	79.88±1.32**
骨坏死康复丸高剂量组	3	86.46±2.11**
骨坏死康复丸中剂量组	3	65.52±1.88

注：与空白组比较，#$P<0.05$；与模型组比较，＊＊$P<0.01$。



注：A：空白组；B：模型组；C：仙灵骨葆胶囊组；D：骨坏死康复丸高剂量组；E：骨坏死康复丸中剂量组。

图 3　各组 BMSCs 中 GSK－3β、HIF－1α、Akt 蛋白条带图

表 4　各组 BMSCs 中 GSK－3β、HIF－1α、Akt 蛋白表达水平比较　（$\bar{x} \pm s$）

组别	n	GSK－3β/GAPDH	HIF－1α/GAPDH	Akt/GAPDH
空白组	3	1.00 ± 0.01	1.00 ± 0.02	1.00 ± 0.01
模型组	3	0.45 ± 0.01##	0.30 ± 0.01##	0.41 ± 0.01##
仙灵骨葆胶囊组	3	0.78 ± 0.02**	0.84 ± 0.01**	0.78 ± 0.01**
骨坏死康复丸高剂量组	3	0.85 ± 0.01**	0.92 ± 0.01**	0.93 ± 0.01**
骨坏死康复丸中剂量组	3	0.51 ± 0.02**	0.67 ± 0.01**	0.57 ± 0.01**

注：与空白组比较，##P < 0.01；与模型组比较，＊＊P < 0.01。

4　讨论

长期使用糖皮质激素或慢性饮酒均可导致 SONFH 的发生[14]。在此病理过程中，BMSCs 成骨/成脂分化功能紊乱，髓腔内脂肪聚积，血管内皮损伤，进而导致血管狭窄甚至堵塞，造成股骨头缺血、坏死、塌陷。血管损伤是高凝状态下凝血功能障碍的最终结果，可能由镰状细胞性贫血、遗传性血栓形成、恶性肿瘤和炎症性肠病等引起。此外，ONFH 患者的血管损伤也可能来自外界压力、血管内脂肪栓子形成和血管外脂肪组织蓄积等[15]。探索具有双重调控（成血管和成骨）作用的生长因子已经成为骨组织工程研究领域的热点和难点问题。研究显示，BMSCs 与 SONFH 密切相关，其增殖和自我更新能力降低，凋亡数量增加，成骨/成脂分化功能紊乱，使其成脂分化能力增强，成骨分化能力减弱，阻碍了 SONFH 骨组织的修复重建[16－17]。因此，诱导 BMSCs 的成骨和血管生成相关基因表达是促进 SONFH 骨重建和再生的关键[18－19]。

Akt 是磷脂酰肌醇（phosphatidyl inositol 3－kinase，PI3K）通路的关键激酶，位于细胞浆内。PI3K/Akt 信号通路参与调控细胞增殖、凋亡、分化等多种重要的生物学过程[20]。该通路可通过调控血管、成骨和破骨相关信号通路，促进血管修复再生，加强成骨细胞分化增殖和抑制破骨细胞分化增殖，从而在癌症、血管再生、骨质疏松、骨重建等医学领域发挥重要作用[21]。PI3K/Akt/HIF－α 信号通路在调节血管修复主要因子如血管内皮生长因子中发挥重要作用。PI3K/Akt 信号通路被激活可促进 HIF－α 的表达，在股骨头坏死的低氧环境下，HIF－α 与缺氧反应元件结合后致使血管内皮生长因子的生成及表达增加，刺激血管内皮的新生。PI3K/Akt 信号通路调控 HIF－α 的研究较完善，且相关作用机制已得到广泛验证，但缺乏直接证实 PI3K/Akt/HIF－α 对血管内皮生长因子影响的数据。PI3K/Akt/GSK－3β 信号通路在调节成骨细胞与破骨细胞的分化增殖中亦发挥重要作用。PI3K/Akt 对大多数因子调控具有双向作用[22]，如在调控成骨细胞中 Wnt/β－catenin 信号通路及破骨细胞中核因子 κB 受体活化因子配体（receptor activator of nuclear factor－κB ligand，RANKL）增殖中，GSK－3β 水平变化是导致不同效应的主要原因，但具体剂量尚未研究。

在骨骼生物学领域，体外和体内研究表明微小 RNA（micro RNA，miRNA）能够调节软骨细胞、成骨细胞和破骨细胞的分化功能[23]。miR－135B 的上调能减弱多发性骨髓瘤患者 BMSCs 的成骨分化，并通过激活单磷酸腺苷激活的蛋白激酶（adenosine 5′－monophosphate－activated protein kinase，AMPK）途径，对 ONFH 的发生具有调节作用[24]。研究表明，较少数的 miRNA 抑制糖皮质激素在成骨分化过程中的作用，有的 miRNA 具有“分子开关”功能，能够调控 MSCs[25]。miR－216a 的表达与骨形成标记基因的表达呈正相关，可以显著促进人羊膜间充质干细胞（human amniotic mesenchymal stem cells，hAMSCs）的成骨分化[26]。miR－216a 的靶基因可能是一个重要的凋亡抑制蛋白，该蛋白可抑制成骨细胞凋亡[27]。激活 PI3K 通路显著减弱了糖皮质激素抑制成骨分化的作用，表明 miR－216a 可以作为预防和治疗骨代谢相关疾病的新型治疗剂。前期研究发现，骨坏死康复丸能显著增加 SONFH 患者血液中 p－Akt 含量，验证其通过上调 miR－216a 表达，激活 PI3K/Akt 信号通路，促进 BMSCs 的增殖与分化，成为 SONFH 防治及判断预后的理想途径，并为进一步研究 SONFH 的发病机制提供了新的方向。

ONFH 归属于中医“骨蚀”“骨痿”范畴。《素问·痿论》曰：“肾者，水脏也，令水不胜火，则骨枯而髓虚，故足不任身为骨痿。”肾气虚衰是本病的内在因素，肾气不足，精血生成不足，血液运行输布无力，导致气滞血瘀，筋骨失于濡养，则发为股骨头坏死。故 ONFH 的主要病机是肾气不足，骨枯髓虚。临床治疗多采用活血化瘀和补虚并行的策略，与“肾主骨”“祛瘀生新”理论相契合。缺血也是

ONFH 发病的关键所在，股骨头血液循环障碍，容易造成骨细胞坏死。中药防治 ONFH 强调早诊早治和整体调节，根据中医证候遣方用药。以活血祛瘀为基本防治大法，辅以通络止痛、补肾健骨、健脾利湿等，根据患者的不同临床证候表现而选择具体的防治方法。骨坏死康复丸是郑州中医骨伤病医院院内制剂，方中淫羊藿、当归合用能够温补肾阳、养血活血，共为君药；熟地黄、龟板合用滋阴益肾、填精补髓，黄芪具有益气补中、补益精血功效，共为臣药；菟丝子、盐杜仲合用补肝肾、强筋骨，共为佐药。诸药合用以补肾填髓、养血活血，强筋健骨以固本，攻补兼施，标本同治，切中病机。现代药物化学和药理学研究表明，骨坏死康复丸药物的主要有效成分包括淫羊藿苷、总木脂素、当归多糖等。淫羊藿苷具有补肾阳、强筋骨的功效，可以促进 BMSCs 成骨分化，激活 Runx2 和 Wnt/β－catenin 途径，使 β－catenin 和 Runx2 蛋白和基因表达增加，促进 MC3T3－E1 成骨细胞的增殖和分化，抑制成骨细胞凋亡[28]。杜仲中提取的总木脂素可以诱导原代成骨细胞的增殖分化，增加骨蛋白原表达，减少 RANKL 表达来抑制破骨细胞生成，促进成骨作用[29]。当归水提物抑制 RANKL 的激活剂，下调其表达，从而调控骨吸收功能，发挥细胞保护作用，促进骨骼生长[30]。

综上所述，骨坏死康复丸可能通过调控 PI3K/Akt/HIF－1α 信号通路、GSK－3β 信号通路，拮抗糖皮质激素对成骨分化的抑制作用，促进 BMSCs 增殖，从而发挥对 SONFH 的治疗作用。

参考文献：

[1]TAN B，LI W L，ZENG P，et al. Epidemiological study based on China osteonecrosis of the femoral head database[J]. Orthop Surg，2021，13(1)：153－160.

[2]MONT M A，SALEM H S，PIUZZI N S，et al. Nontraumatic osteonecrosis of the femoral head：where do we stand today?：a 5－year update[J]. J Bone Joint Surg Am，2020，102(12)：1084－1099.

[3]PETEK D，HANNOUCHE D，SUVA D. Osteonecrosis of the femoral head：pathophysiology and current concepts of treatment[J]. EFORT Open Rev，2019，4(3)：85－97.

[4]KUBO Y，DRESCHER W，FRAGOULIS A，et al. Adverse effects of oxidative stress on bone and vasculature in corticosteroid－associated osteonecrosis：potential role of nuclear factor erythroid 2－related factor 2 in cytoprotection[J]. Antioxid Redox Signal，2021，35(5)：357－376.

[5]曹玉举，郭永昌，张素梅，等. 李哲萍主任医师治疗股骨头坏死经验[J]. 世界中西医结合杂志，2013，8(9)：872－874.

[6]武瑞骐，崔伟，杨启培，等. 激素性股骨头坏死的中医药治疗机制[J]. 中国组织工程研究，2023，27(17)：2763－2771.

[7]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)：1－2.

[8]张鑫杰，曹玉举，郭永昌. 骨坏死康复丸治疗 60 例脾肾阳虚型股骨头缺血性坏死[J]. 世界中医药，2020，15(3)：442－445.

[9]董树平，曹玉举，熊征宇，等. 骨坏死康复丸治疗股骨头坏死(肝肾亏虚证)临床研究[J]. 光明中医，2018，33(22)：3275－3277.

[10]李文茜，田亮玉，张谨，等. 基于 VEGF/PI3K/Akt 通路基因表达探讨骨坏死康复丸对激素性股骨头坏死大鼠血管新生的影响[J]. 广州中医药大学学报，2024，41(8)：2127－2135.

[11]XU H H，FANG L，ZENG Q H，et al. Glycyrrhizic acid alters the hyperoxidative stress－induced differentiation commitment of MSCs by activating the Wnt/β－catenin pathway to prevent SONFH[J]. Food Funct，2023，14(2)：946－960.

[12]杨智洋. 淫羊藿苷联合四环素对糖皮质激素诱导的大鼠骨髓间充质干细胞损害的保护作用[D]. 锦州：辽宁医学院，2012.

[13]艾亮. 仙灵骨葆胶囊通过 miR－100－5p/JMJD3/RUNX2 促进成骨细胞分化的研究[D]. 广州：广州中医药大学，2020.

[14]QIN X，JIN P，JIANG T M，et al. A human chondrocyte－derived in vitro model of alcohol－induced and steroid－induced femoral head necrosis[J]. Med Sci Monit，2018，24：539－547.

[15]LUO P，GAO F Q，HAN J，et al. The role of autophagy in steroid necrosis of the femoral head：a comprehensive research review[J]. Int Orthop，2018，42(7)：1747－1753.

[16]YANG A F，YU C C，LU Q L，et al. Mechanism of action of icariin in bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Stem Cells Int，2019，2019：5747298.

[17]WANG T S，TENG S F，ZHANG Y X，et al. Role of mesenchymal stem cells on differentiation in steroid－induced avascular necrosis of the femoral head[J]. Exp Ther Med，2017，13(2)：669－675.

[18]CONFALONIERI D，SCHWAB A，WALLES H，et al. Advanced therapy medicinal products：a guide for bone marrow－derived MSC application in bone and cartilage tissue engineering[J]. Tissue Eng Part B Rev，2018，24(2)：155－169.

[19]GANGULY P，EL－JAWHARI J J，GIANNOUDIS P V，et al. Age－related changes in bone marrow mesenchymal

stromal cells:a potential impact on osteoporosis and osteoarthritis development[J]. Cell Transplant,2017,26(9):1520 - 1529.

[20]HOXHAJ G,MANNING B D. The PI3K - Akt network at the interface of oncogenic signalling and cancer metabolism[J]. Nat Rev Cancer,2020,20:74 - 88.

[21]WANG X Y,GONG L J,HUANG J M,et al. Pinocembrin alleviates glucocorticoid - induced apoptosis by activating autophagy via suppressing the PI3K/Akt/mTOR pathway in osteocytes[J]. Eur J Pharmacol,2020,880:173212.

[22]WANG Y J,SHEN S P,LI Z,et al. MIR - 140 - 5p affects chondrocyte proliferation, apoptosis, and inflammation by targeting HMGB1 in osteoarthritis[J]. Inflamm Res,2020,69(1):63 - 73.

[23]LU G D,CHENG P,LIU T,et al. BMSC - derived exosomal miR - 29a promotes angiogenesis and osteogenesis[J]. Front Cell Dev Biol,2020,8:608521.

[24]ZHANG X,YOU J M,DONG X J,et al. Administration of mircoRNA - 135b - reinforced exosomes derived from MSCs ameliorates glucocorticoid - induced osteonecrosis of femoral head (ONFH) in rats[J]. J Cell Mol Med,2020,24(23):13973 - 13983.

[25]ROSTAMI Z,KHORASHADIZADEH M,NASERI M. Immunoregulatory properties of mesenchymal stem cells:micro - RNAs[J]. Immunol Lett,2020,219:34 - 45.

[26]YANG Z X,SONG C C,JIANG R,et al. Micro - ribonucleic acid - 216a regulates bovine primary muscle cells proliferation and differentiation via targeting SMAD nuclear interacting protein - 1 and Smad7[J]. Front Genet,2019,10:1112.

[27]KENYON J D,SERGEEVA O,SOMOZA R A,et al. Analysis of - 5p and - 3p strands of miR - 145 and miR - 140 during mesenchymal stem cell chondrogenic differentiation[J]. Tissue Eng Part A,2019,25(1/2):80 - 90.

[28]QI S S,HE J,ZHENG H X,et al. Icariin prevents diabetes - induced bone loss in rats by reducing blood glucose and suppressing bone turnover[J]. Molecules,2019,24(10):1871.

[29]WANG J Y,YUAN Y,CHEN X J,et al. Extract from Eucommia ulmoides Oliv. ameliorates arthritis via regulation of inflammation,synoviocyte proliferation and osteoclastogenesis in vitro and in vivo[J]. J Ethnopharmacol,2016,194:609 - 616.

[30]XIE X Y,LIU M,MENG Q. Angelica polysaccharide promotes proliferation and osteoblast differentiation of mesenchymal stem cells by regulation of long non - coding RNA H19:an animal study[J]. Bone Joint Res,2019,8(7):323 - 332.

收稿日期:2024 - 09 - 03

作者简介:曹洋(1999 -),女,河南新乡人,硕士研究生,主要从事骨与关节疾病的基础与临床研究。

通信作者:张宇航(1984 -),男,河南郑州人,讲师,主要从事骨与关节疾病的基础与临床研究。E - mail:zhangyuhang@hactcm.edu.cn

编辑:刘凯歌