

引用:吉富涛,卢钰,谢元洋,任思路,尹本敬.基于网络药理学、分子对接和动物实验探究骨松康复汤抗骨质疏松症的作用机制[J].中医导报,2026,32(4):5-12.

实验

基于网络药理学、分子对接和动物实验 探究骨松康复汤抗骨质疏松症的作用机制*

吉富涛¹, 卢钰², 谢元洋³, 任思路³, 尹本敬²

(1.郑州四六〇医院, 河南 郑州 450007;

2.云南省中医医院, 云南 昆明 650021;

3.云南中医药大学, 云南 昆明 650500)

[摘要] 目的:整合网络药理学、分子对接及动物实验揭示骨松康复汤抗骨质疏松症(OP)的分子机制。方法:通过TCMSP筛选骨松康复汤活性成分及靶点;从GeneCards、OMIM、TTD、DrugBank及DisGeNET数据库获取OP疾病靶点,取交集得潜在靶点。利用STRING构建蛋白质-蛋白质相互作用(PPI)网络筛选核心靶点,DAVID进行通路富集分析,AutoDock 4.2.6完成分子对接。采用双侧卵巢切除术建立OP小鼠模型,将24只小鼠随机分为假手术组、模型组、雌激素组和骨松康复汤组,治疗12周后取股骨验证靶点及通路。结果:鉴定骨松康复汤活性成分319个、靶点448个,与OP靶点交集得293个潜在靶点。KEGG分析显示靶点显著富集于磷脂酰肌醇3激酶(PI3K)-蛋白激酶B(Akt)等通路。PPI网络确定NF- κ B抑制蛋白 α (NFKB1 α)、Fos原癌基因(FOS)、缺氧诱导因子1 α (HIF-1 α)、连环蛋白 β 1(CTNNB1)和丝裂原活化蛋白激酶14(MAPK14)为核心靶点。分子对接证实槲皮素、汉黄芩素、木犀草素、豆甾醇、山柰酚与核心靶点结合能均 <-7.0 kcal/mol。动物实验显示:骨松康复汤能显著下调股骨NFKB1 mRNA、FOS mRNA、HIF-1 α mRNA和MAPK14 mRNA表达($P<0.05$),上调CTNNB1 mRNA及p-PI3K/p-Akt蛋白水平($P<0.05$)。结论:骨松康复汤可通过槲皮素等活性成分靶向调控NFKB1、FOS、HIF-1 α 、MAPK14和CTNNB1,激活PI3K-Akt信号通路发挥抗OP作用。

[关键词] 骨质疏松症;骨松康复汤;网络药理学;分子对接;实验验证;小鼠

[中图分类号] R285.5 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1672-951X(2026)04-0005-08

DOI: 10.13862/j.cn43-1446/r.2026.04.002

Mechanism of Gusong Kangfu Decoction (骨松康复汤) against Osteoporosis via Network Pharmacology, Molecular Docking, and Animal Experiments

Ji Futao¹, Lu Yu², Xie Yuanyang³, Ren Silu³, Yin Benjing²

(1.Zhengzhou 460 Hospital, Zhengzhou He'nan 450007 China; 2.Yunnan Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Kunming Yunnan 650021,China; 3.Yunnan University of Traditional Chinese Medicine, Kunming Yunnan 650500, China)

[Abstract] Objective: To elucidate the molecular mechanism of Gusong Kangfu decoction against osteoporosis (OP) by integrating network pharmacology, molecular docking, and animal experiments. Methods: Active ingredients and targets of Gusong Kangfu decoction were screened using the TCMSP database. OP-related targets were retrieved from GeneCards, OMIM, TTD, DrugBank, and DisGeNET databases. Potential targets were identified by intersecting drug and disease targets. A protein-protein interaction (PPI) network was constructed via STRING to identify core targets. Functional enrichment analysis was performed with DAVID, and molecular docking was conducted using AutoDock 4.2.6. An OP mouse model was established by bilateral ovariectomy. Totally 24 mice were randomly assigned to sham group, model group, estrogen group, and Gusong Kangfu decoction group. After 12 weeks of treatment, femurs were harvested for validation of key targets and pathways. Results: Totally 319 active ingredients and 448 targets of Gusong Kangfu decoction were identified, with 293 potential targets overlapping with OP-related targets. KEGG enrichment analysis revealed significant involvement of targets

*基金项目:云南省科技厅中医联合专项-面上项目(202101AZ070001-067)

通信作者:尹本敬,男,副主任医师,研究方向为中医骨伤科的临床工作与研究

in the phosphoinositide 3-kinase (PI3K)-protein kinase B (Akt) signaling pathway. PPI network analysis identified nuclear factor kappa B inhibitor alpha (NFKB1α), fos proto-oncogene (FOS), hypoxia inducible factor 1 subunit alpha (HIF-1α), catenin beta 1 (CTNNB1), and mitogen-activated protein kinase 14 (MAPK14) as core targets. Molecular docking confirmed strong binding affinities (binding energy<-7.0 kcal/mol) between five key components (quercetin, wogonin, luteolin, stigmaterol, kaempferol) and these core targets. Animal experiments demonstrated that Gusong Kangfu decoction significantly down-regulated expression of NFKB1α mRNA, FOS mRNA, HIF-1α mRNA, and MAPK14 mRNA ($P<0.05$), while upregulating CTNNB1 mRNA and p-PI3K/p-Akt protein levels ($P<0.05$) in femoral tissue. Conclusion: Gusong Kangfu decoction targets NFKB1α, FOS, HIF-1α, MAPK14 and CTNNB1 targets through quercetin and other ingredients to activate the PI3K-Akt signaling pathway, which then exerts anti-OP effects.

[Keywords] osteoporosis; Gusong Kangfu decoction; network pharmacology; molecular docking; experimental validation; mouse

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种以骨量减少和骨组织微结构破坏为特征,导致骨强度降低、骨骼脆性增加,进而易发生脆性骨折的全身性代谢性骨病^[1-2]。该病的病理本质在于骨代谢稳态失衡。在OP状态下,破骨细胞活性异常升高、成骨细胞功能减退或凋亡增加,导致骨吸收持续超过骨形成,进而引起骨小梁稀疏断裂、骨皮质变薄及孔隙率增加等结构性损害^[3]。从调控机制角度,OP的发生涉及激素调节、细胞因子信号通路及营养代谢等多个层面。雌激素缺乏通过上调核因子κB受体活化因子配体(Receptor Activator of Nuclear Factor-κB Ligand, RANKL)/骨保护素(osteoclastogenesis inhibitory factor, OPG)比值,解除对破骨细胞的抑制作用,是绝经后骨质疏松的核心发病机制^[4]。老年性骨质疏松症则主要与成骨前体细胞增殖分化能力下降、活性维生素D合成不足及继发性甲状旁腺功能亢进有关^[5]。OP的发病率随年龄增长显著升高。流行病学数据显示,全球≥65岁人群中OP患病率约为21.7%,其中亚洲≥65岁人群患病率最高(24.3%),且女性患病率远高于男性^[5-6]。更为严峻的是,>50岁的人群中,约50%的女性和20%的男性在其一生中经历至少一次与OP相关的骨折,显著增加致残率、死亡率及社会经济负担^[7]。因此,研发安全、有效且经济的OP防治药物具有重要的临床意义。

中医药在防治OP方面积累了丰富的经验。骨松康复汤是由云南省名老中医唐镇江教授基于清代《伤科补要》古方,结合三十余年临床实践创立的经验方。该方以补益肝肾、强筋壮骨、活血止痛为治法,由熟地黄、补骨脂、骨碎补、淫羊藿、丹参等多味中药组成。前期临床观察表明,骨松康复汤能显著改善OP患者的骨代谢水平,促进康复^[8],对OP治疗具有潜在价值和前景。然而,其确切的药效物质基础和作用机制尚不明确。本研究旨在综合运用网络药理学、分子对接技术和动物实验,解析骨松康复汤抗OP的分子机制,为临床上骨松康复汤治疗OP提供分子基础。

1 材料与方法

1.1 实验动物 24只SPF级雌性C57BL/6小鼠,8周龄,体质量18~20 g,由斯贝福(北京)生物技术有限公司提供,动物生产许可证号:SCXK(京)2019-0010;动物质量合格证号:SYXK(滇)K2024-0010。小鼠饲养于云南贝斯泰生物科技有限公司SPF级实验中心,温度23℃,湿度(60±10)%,12 h/12 h明暗交替照

明,自由饮食、饮水。本研究通过云南省中医医院实验动物伦理委员会审批(编号:DW-2024-067)。

1.2 药物与试剂 骨松康复汤由云南中医药大学第一附属医院提供;雌二醇(阿拉丁控股集团有限公司,批号:K1628077);RNA提取试剂盒(上海翌圣生物科技股份有限公司,批号:19225ES50);TIANScrip II cDNA第一链合成试剂盒(北京天根生化科技有限公司,批号:KR107);FastFire快速荧光定量预混试剂(北京天根生化科技有限公司,批号:FP207);RIPA裂解液(武汉三鹰生物技术有限公司,批号:PR20001);BCA蛋白浓度测定试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司,批号:P0012);磷脂酰肌醇3激酶(phosphoinositide 3-kinase,PI3K)抗体(Cell Signaling Technology, Inc.,批号:4292);p-PI3K抗体(批号:AF3242)、蛋白激酶B(protein kinase B,Akt)抗体(批号:AF0836)和p-Akt抗体(批号:AF0016)均购自江苏亲科生物研究中心有限公司;ECL化学发光试剂盒(上海碧云天生物科技股份有限公司,批号:P0018S)。

1.3 主要仪器 病理切片机(Leica Microsystems GmbH,型号:RM2016);组织脱水机(武汉俊杰电子有限公司,型号:JT-12S);正置显微镜(Nikon Corporation,型号:C-SHG1);荧光定量PCR仪器(Applied Biosystems, Inc.,型号:7500);电泳仪(Bio-Rad Laboratories, Inc.,型号:1658001);凝胶成像仪(Bio-Rad Laboratories, Inc.,型号:Gel Docxrs)。

1.4 网络药理学预测

1.4.1 骨松康复汤活性成分及其靶点的筛选与收集 利用中药系统药理学数据库与分析平台(TCMSP),检索复方骨松康复汤所含熟地黄、丹参、杜仲、骨碎补、淫羊藿、怀牛膝、肉苁蓉、山药、桃仁、续断、白芍、陈皮、川芎、甘草的化学成分。设定筛选条件为口服生物利用度(oral bioavailability, OB)≥30%且类药性(drug-like, DL)≥0.18,收集符合条件活性成分的潜在作用靶点。随后,借助UniProt数据库,以人源(Popular organisms: Human)且经过审阅(Status: Reviewed)为限定条件,检索上述靶点对应的蛋白名称及信息。

1.4.2 筛选骨松康复汤抗OP的潜在靶点 通过GeneCards、OMIM、TTD、DrugBank及DisGeNET数据库,以“Osteoporosis”为检索词,获取OP相关的疾病靶点。随后,采用Venny 2.1在线平台对获得的活性成分潜在作用靶点与OP疾病靶点取交集,

筛选得到骨松康复汤抗OP的潜在靶点。

1.4.3 “药物-成分-靶点-疾病”相互作用网络的构建 将复方药物、活性成分及其潜在靶点数据导入Cytoscape3.9.1,构建“疾病-药物-成分-潜在靶点”相互作用网络图。在该网络中,节点(Node)代表活性成分或潜在靶点,边(Edge)表示节点间存在的相互作用关系。

1.4.4 蛋白质-蛋白质相互作用(protein-protein interaction, PPI)网络构建与关键靶点鉴定 将筛选获得的潜在作用靶点导入STRING数据库,设置物种为“Homo sapiens”,最小相互作用置信度阈值为0.400,其余参数保持默认设置,构建PPI网络。随后,利用Cytoscape 3.9.1内置的分子复合物检测插件(MCODE),对上述PPI网络进行模块化分析,识别并筛选出关键靶点。

1.4.5 功能富集分析 将潜在靶点输入DAVID数据库,分别进行基因本体(gene Ontology, GO)功能富集分析和京都基因与基因组百科全书(kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG)通路富集分析,保留具有统计学意义的条目($P < 0.05$)。使用生物信息学云平台bioinformatic的可视化工具绘制GO和KEGG富集分析结果图。利用Cytoscape软件整合关键靶点及其显著富集的KEGG通路信息,构建“关键靶点-通路”相互作用网络图,直观阐释骨松康复汤抗OP的潜在分子作用途径。

1.5 分子对接验证 选取“疾病-药物-成分-靶点”网络中拓扑重要性排名前5的活性成分与关键靶点进行分子对接验证。首先,从PubChem数据库下载活性成分的2D结构,利用Chem3D软件进行3D结构构建、能量最小化及格式转换;从PDB数据库获取关键靶点的晶体结构,使用AutoDockTools软件去除水分子、加氢、分配电荷,并预测活性结合口袋;接着,采用AutoDock Vina软件,基于预设的活性口袋设置对接盒子参数,执行对接计算。最后,使用PyMOL软件对最优对接构象进行可视化呈现。

1.6 分组及造模 小鼠于动物房检疫饲养1周后,随机分为4组:假手术组、模型组、雌激素组和骨松康复汤组,每组6只。除假手术组外,其余各组小鼠行双侧卵巢摘除术。具体操作:腹腔注射1%异氟烷麻醉小鼠。术区(肋弓上下1 cm范围)剃毛,8%硫化钠脱毛,75%乙醇消毒。于背部肾区附近双侧分别作约1 cm纵行切口,逐层分离筋膜、肌肉及腹膜,定位并充分暴露附着于脂肪组织的粉红色卵巢,完整摘除。切口逐层缝合。假手术组仅切除双侧卵巢周围等量脂肪组织,保留卵巢,其余操作相同。术后各组小鼠创面均撒布青霉素粉剂预防感染,并连续3 d局部涂抹红霉素软膏及腹腔注射青霉素生理盐水(4万U/mL)抗炎。术后小鼠自由摄食饮水,饲喂标准饲料,持续12周以建立OP模型^[9]。

1.7 实验给药与取材 所有小鼠术后1周开始给药。按照人体与小鼠体表面积换算的等效剂量,骨松康复汤组灌胃骨松康复汤煎液[22 g(kg·d)]。雌激素组灌胃雌二醇(100 μg/kg)^[10]。假手术组和模型组以同体积生理盐水灌胃。1次/d,连续12周。

末次给药后禁食12 h,3%异氟烷麻醉小鼠后,取双侧股骨,剔去骨周围的肌肉,于-80℃冰箱冷冻备用。

1.8 观察指标

1.8.1 苏木精-伊红(HE)染色评估小鼠股骨病理变化 小鼠

股骨组织经4%多聚甲醛固定后,将组织移入10% EDTA脱钙液(pH 7.4)中,脱钙14 d。石蜡包埋并切片后,依次进行以下操作:64℃恒温箱烤片1 h;二甲苯 I (10 min)、二甲苯 II (10 min)脱蜡;依次经100%酒精 I (5 min)、100%酒精 II (5 min)、95%酒精(5 min)、80%酒精(3 min)、70%酒精(2 min)水化,PBS冲洗3次,每次5 min;苏木素染色5 min,蒸馏水冲洗后于酒精-盐酸溶液中分化10~15 s,再经自来水返蓝15 min;伊红染色5~10 s,蒸馏水清洗一次;95%酒精(5~10s)、100%酒精 I (5 min)、100%酒精 II (5 min)脱水;二甲苯 I (10 min)、二甲苯 II (10 min)透明;中性树胶封片并观察。

1.8.2 实时荧光定量PCR(RT-qPCR)检测关键靶点表达水平 采用RNA提取试剂盒分离各组小鼠股骨组织总RNA。取1 μg总RNA,使用TIANScrip II cDNA第一链合成试剂盒在PCR仪中合成cDNA第一链。随后,应用FastFire快速荧光定量预混试剂在荧光定量PCR仪上检测靶基因及内参基因(GAPDH)的Ct值。采用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算靶基因的相对表达量,以GAPDH作为内参基因进行标准化。引物序列详见表1。

表1 引物序列信息

目的基因	序列(5'→3')	扩增产物长度/bp
NFκB1α	上游引物:CCTGACCTGGTTTCGCTCTT	85
	下游引物:AGGTAAGCTGGTAGGGGAG	
FOS	上游引物:TGTTCTCGCAATAGCGTGT	170
	下游引物:TCAGACCACCTCGACAATGC	
HIF-1α	上游引物:CGTCGGCCGAGTGCTA	377
	下游引物:GTGGGAAGTGGCAACTGAT	
CTNNB1	上游引物:CACAAGCAGAGTGCTGAAGG	189
	下游引物:ACTCGGTCTGTCAGGTGAG	
MAPK14	上游引物:AAGACTCGTTGGAACCCAG	234
	下游引物:CGGTCGTGTTACTGAGCAAA	

1.8.3 免疫印迹法(Western blotting)检测PI3K/Akt的表达水平 取50 mg小鼠股骨组织,加入0.5 mL含1 mmol/L PMSF的RIPA裂解液,匀浆并裂解。裂解液于4℃,12 000×g离心20 min,收集上清液。采用BCA蛋白浓度检测试剂盒测定总蛋白浓度。取等量蛋白样品40 μg进行SDS-PAGE凝胶电泳,随后将蛋白转移至PVDF膜。用5%脱脂牛奶室温封闭1 h,随后与一抗:PI3K(1:2 000)、p-PI3K(1:2 000)、Akt(1:1 000)、p-Akt(1:1 000)及β-actin(1:3 000)于4℃孵育过夜。TBST漂洗3次后,与相应种属HRP标记二抗室温孵育2 h。经TBST充分洗涤,使用ECL化学发光试剂盒显影,化学发光成像系统采集图像。采用Image J软件分析目标条带与β-actin条带的灰度值,以目标蛋白与β-actin的灰度比值表示其相对表达水平。

1.9 统计学方法 采用SPSS 26.0进行数据处理,GraphPad Prism 9绘图。先行Shapiro-Wilk正态性检验及Levene方差齐性检验,满足参数检验前提后,组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)。计量资料以“均数±标准差”(x̄±s)表示。 $P < 0.05$ 为差异有统计学意义。

2 结 果

2.1 骨松康复汤抗OP潜在靶点的筛选与预测 在TCMSP平台检索骨松康复汤所含药物的活性成分,共获得319个。收集这些活性成分对应的靶点,经汇总并去重后,得到448个骨松

康复汤抗OP的潜在靶点。通过检索多个疾病靶点数据库获取OP相关靶点, GeneCards 4 959个、OMIM 85个、TTD 37个、DrugBank 342个、DisGeNET 1 098个, 合并上述数据库来源的靶点并去重, 最终获得5 349个OP相关靶点。使用Venny 2.1在线平台, 对骨松康复汤的448个潜在靶点与OP的5 349个相关靶点进行交集分析, 共获得293个交集靶点(见图1)。这些交集靶点被认定为骨松康复汤抗OP的潜在靶点。



图1 骨松康复汤抗OP的潜在靶点

2.2 骨松康复汤“成分-靶点-疾病”相互作用网络的构建与分析 使用Cytoscape 3.9.1软件构建了骨松康复汤抗OP的“疾病-药物-成分-潜在靶点”相互作用网络图(见图2)。该网络共包含542个节点和3 060条边。根据Degree值降序排列, 筛选出网络中连接度较高的关键成分。排名前10位的活性成分依次为: 槲皮素、汉黄芩素、木犀草素、豆甾醇、山柰酚、异补骨脂素、丹参酮II A、7-乙酰氧基-2-甲基异黄酮、柚皮素和维斯特素。(见表2)

表2 骨松康复汤中排名前10的活性成分

Table with 5 columns: 序号 (Serial Number), MOL ID, 名称 (Name), Degree. It lists the top 10 active ingredients of the Bone Density Recovery Decoction, such as Quercetin (槲皮素) with a degree of 120, and Wogonin (汉黄芩素) with a degree of 57.

2.3 基于网络拓扑学的抗OP关键靶点筛选 运用STRING在线数据库, 对筛选出的293个骨松康复汤抗OP的潜在作用靶点进行PPI网络分析, 识别出高度互连的蛋白簇。最终筛选出77个靶点, 其中多个靶点在网络中表现出强相互作用, 包括B细胞淋巴瘤/白血病-2样蛋白1 (BCL2-like 1, BCL2L1)、NF-κB抑制蛋白α (nuclear factor kappa B inhibitor alpha, NFKB1α)、Fos原癌基因 (fos proto-oncogene, FOS)、缺氧诱导因子1α (hypoxia inducible factor 1 alpha, HIF-1α)、连环蛋白β1 (catenin beta 1, CTNNB1)和丝裂原活化蛋白激酶14 (mitogen-activated protein kinase 14, MAPK14)。这些关键靶点在蛋白相互作用网络中占据枢纽地位, 视为骨松康复汤抗OP的关键靶点。

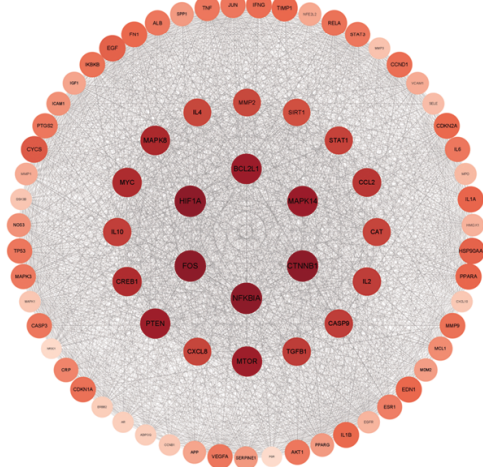
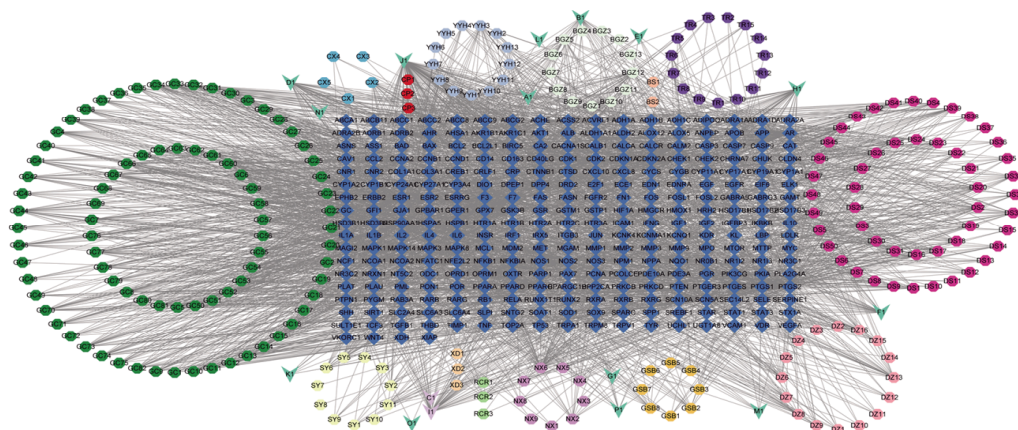


图3 骨松康复汤抗OP的关键靶点筛选

2.4 富集分析与“信号通路-关键靶点”网络的构建 GO富集分析结果显示: 生物过程(biological process, BP)共富集到722个显著条目, 主要富集于基因表达的正向调控、RNA聚合酶II启动子转录的正调控、细胞凋亡过程的负调控; 分子功能(molecular function, MF)共富集到95个显著条目, 主要富集于蛋白激酶结合、转录因子结合、相同蛋白结合; 细胞组成(cellular component, CC)共富集到57个显著条目, 主要富集于细胞核、细胞外间隙、细胞外基质组分(见图4A~C)。KEGG通路富集分析结果显示: 共富集到165条显著信号通路, 主要富集



注: 外围绿色六边形代表活性化合物, 中间蓝色棱形代表疾病靶点, 绿色倒三角型代表药物共同成分。

图2 骨松康复汤治疗OP的成分-潜在靶点网络图

通路包括癌症通路、AGE-RAGE信号通路、脂质与动脉粥样硬化信号通路、IL-17信号通路和PI3K-Akt信号通路等(见图4D)。构建的“信号通路-关键靶点”网络图显示,多个关键靶点同时映射到多条富集通路上。这提示骨松康复汤通过协同调控多条信号通路共同发挥抗OP的作用。(见图4E)

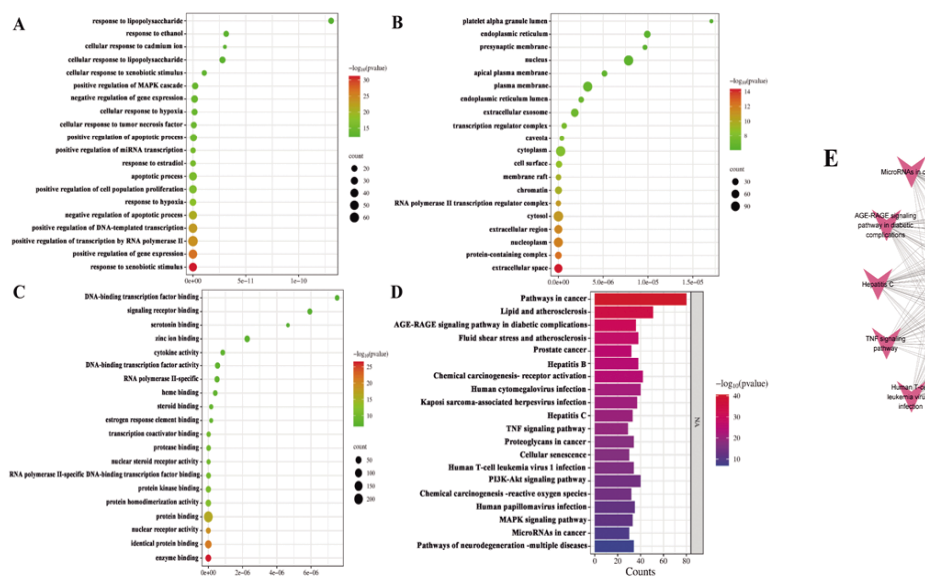
2.5 活性成分与关键靶点的分子对接验证 选取网络分析中排名前5的活性成分(槲皮素、汉黄芩素、木犀草素、豆甾醇和山柰酚)与关键靶点(NFKB1 α 、FOS、HIF-1 α 、CTNNB1和MAPK14),进行分子对接模拟以评估其结合潜力。对接结果显示,所有关键靶点与其对应的活性成分之间均表现出强烈的结合活性,结合能均低于-7.0 kcal/mol(见表3)。这表明

活性成分与靶点蛋白在分子水平上存在稳定且高效的相互作用。(见图5)

表3 骨松康复汤活性成分与关键靶点结合情况(kJ/mol)

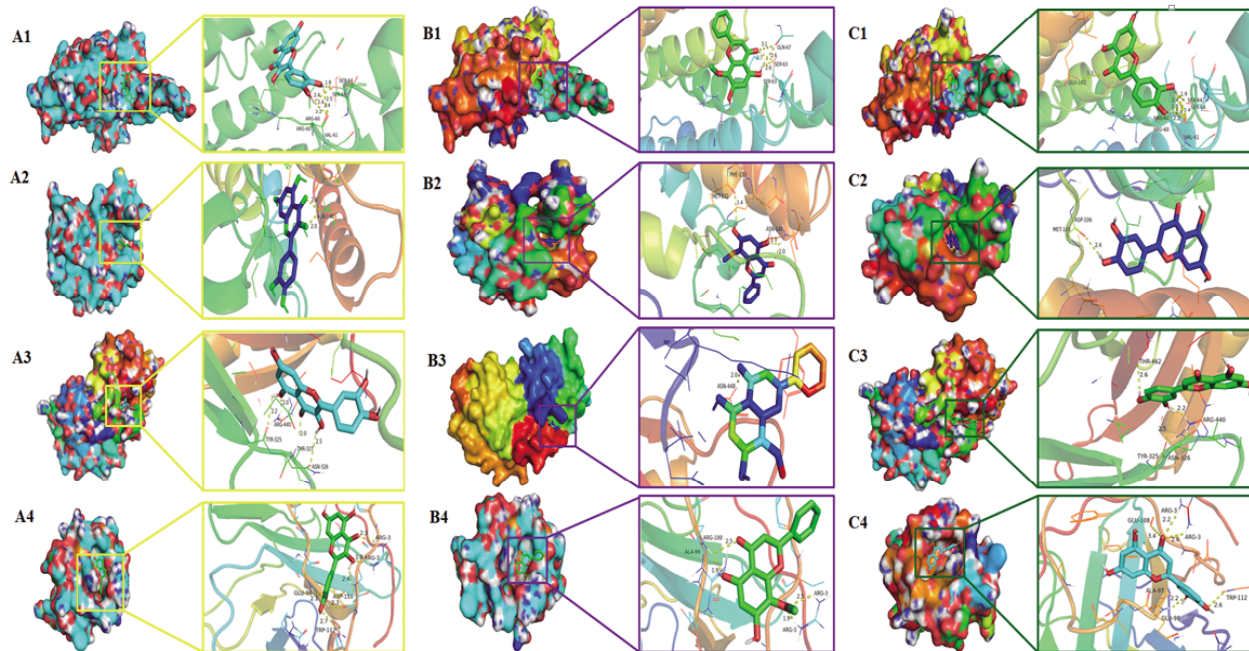
活性成分	NFKB1 α	FOS	HIF-1 α	CTNNB1	MAPK14
槲皮素	-7.809	-8.708	-8.038	-8.566	-7.878
汉黄芩素	-7.430	-8.788	-7.279	-7.959	-7.758
木犀草素	-7.788	-8.619	-7.694	-8.483	-8.104
豆甾醇	-8.089	-8.238	-7.723	-7.786	-8.357
山柰酚	-7.318	-8.406	-7.703	-8.147	-7.663

2.6 各组小鼠股骨组织病理学形态比较 假手术组小鼠骨小梁结构完整、排列致密且规则、骨小梁间隙内可见丰富的



注:A-C.GO富集分析;D.KEGG富集分析;E.信号通路-关键靶点图。

图4 富集分析和信号通路-关键靶点图



注:A1~A4代表槲皮素分别与NFKB1 α 、FOS、HIF-1 α 和CTNNB1的分子对接模拟图;B1~B4代表汉黄芩素分别与NFKB1 α 、FOS、HIF-1 α 和CTNNB1的分子对接模拟图;C1~C4代表木犀草素分别与NFKB1 α 、FOS、HIF-1 α 和CTNNB1的分子对接模拟图。

图5 分子对接结果

骨髓组织。模型组呈现典型的OP病理改变:骨小梁稀疏、断裂,连续性破坏;骨髓腔显著扩大,且骨髓组织被大量脂肪细胞浸润。与模型组比较,雌激素组与骨松康复汤组小鼠骨小梁数量增加、连续性改善、骨髓腔中脂肪细胞浸润减少。(见图6)

2.7 关键靶点在OP小鼠股骨中的表达验证 与假手术组比较,模型组小鼠股骨中NFKB1α mRNA、FOS mRNA、HIF-1α mRNA和MAPK14 mRNA的表达水平显著升高 ($P<0.05$),而CTNNB1 mRNA的表达水平显著降低 ($P<0.05$)。与模型组比较,雌激素组显著下调了NFKB1α mRNA和HIF-1α mRNA的表达,同时上调了CTNNB1 mRNA的表达 ($P<0.05$)。骨松康复汤组显著下调了NFKB1α mRNA、FOS mRNA、HIF-1α mRNA和MAPK14 mRNA的表达,并上调了CTNNB1 mRNA的表达 ($P<0.05$)。此外,与雌激素组比较,骨松康复汤组对FOS mRNA和MAPK14 mRNA的下调作用更为显著 ($P<0.05$)。(见表4)

以上结果表明,骨松康复汤能通过下调促骨吸收/炎症相关靶点(NFKB1α mRNA、FOS mRNA、HIF-1α mRNA和MAPK14 mRNA)并上调促骨形成关键靶点CTNNB1来发挥抗OP作用,且骨松康复汤对靶点的调节作用比雌激素更为广泛。

表4 关键靶点的 mRNA 表达量比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	NFKB1α mRNA	FOS mRNA	HIF-1α mRNA	CTNNB1 mRNA	MAPK14 mRNA
假手术组	6	1.01±0.12	1.06±0.42	1.02±0.23	1.02±0.25	1.02±0.20
模型组	6	5.31±1.91 ^a	11.12±2.51 ^a	3.65±0.53 ^a	0.40±0.10 ^a	3.69±1.00 ^a
雌激素组	6	2.01±0.56 ^b	10.17±2.35	1.02±0.33 ^b	0.80±0.08 ^b	3.18±0.82
骨松康复汤组	6	1.94±0.90 ^b	3.52±0.84 ^{b,c}	1.74±0.54 ^b	0.69±0.14 ^b	1.43±0.26 ^{b,c}
F		8.889	23.131	25.023	8.342	11.499
P		0.006	0.000	0.000	0.008	0.003

注:骨松康复汤组给药剂量:22 g生药/(kg·d)。

2.8 骨松康复汤对OP小鼠股骨PI3K/Akt信号通路的调控作用 各组间PI3K和Akt的总蛋白表达水平均未观察到显著变化 ($P>0.05$)。与假手术组比较,模型组小鼠股骨中p-PI3K和p-Akt的表达水显著降低 ($P<0.05$)。与模型组比较,雌激素组和骨松康复汤组均能显著上调p-PI3K和p-Akt的表达水平 ($P<0.05$)。与雌激素组比较,骨松康复汤组对p-PI3K和p-Akt表达的上调作用更为显著(见图7、表5)。以上结果表明,骨松康复汤抗OP的核心作用机制之一是恢复PI3K-Akt信号通路的活性,这与网络药理学的预测一致。

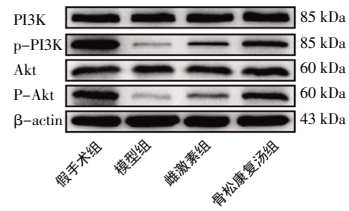


图7 PI3K/Akt 信号通路的表达水平 ($\bar{x}\pm s, n=6$)

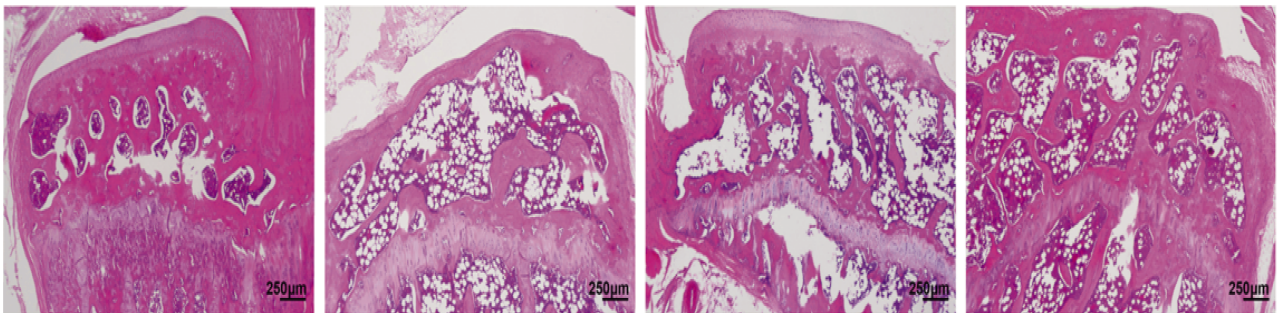
表5 各组小鼠股骨中PI3K/Akt 信号通路表达水平的比较 ($\bar{x}\pm s$)

组别	n	PI3K	p-PI3K	Akt	p-Akt
假手术组	6	0.87±0.03	0.87±0.05	0.81±0.08	0.81±0.04
模型组	6	0.89±0.07	0.15±0.01 ^a	0.79±0.07	0.14±0.01 ^a
雌激素组	6	0.90±0.05	0.38±0.02 ^b	0.80±0.04	0.29±0.03 ^b
骨松康复汤组	6	0.92±0.04	0.57±0.05 ^{b,c}	0.85±0.03	0.52±0.13 ^{b,c}
F		0.517	230.162	0.652	52.018
P		0.682	0.000	0.604	0.000

注:骨松康复汤组给药剂量:22 g生药/(kg·d)。

3 讨论

中医将OP归属于“骨痿”“骨枯”的范畴,其核心病机与肾、脾、肝三脏密切相关。《黄帝内经》提出“肾主骨”,奠定了本病的中医理论基础;《医经精义》进一步阐明“肾藏精,精生髓,髓养骨”,指出肾精可化生骨髓以充养骨骼;《素问·五脏生成篇》提出“肾之合骨也,其主脾也”,强调肾主骨的功能有赖于脾运化水谷精微的充养;《医宗必读》记载“阳虚则血气少……故足痿不用”,结合《张氏医通》“肝主筋,肾主骨,肝肾同源”之论,共同揭示了脾虚失运、肝血亏虚与骨骼失养的内在关联。因此,中医认为OP的主要病机在于肾精亏虚、脾失健运、肝血不足及气滞血瘀,治疗上秉承补肾填精、健脾益气、疏肝养血、活血通络的基本原则^[11-13]。现代研究同样支持中医“肾-骨”的理论,例如,补肾中药可通过调控Wnt/β-catenin、OPG/RANKL等信号通路,影响成骨细胞与破骨细胞活性,从而改善骨代谢平衡^[14];健脾类药材通过改善脾胃功能,调节能量代谢,可以为成骨细胞提供更充足的能量,从而促进骨形成^[15];活血化瘀类中药能够促进血液循环,清除血瘀,从而改善骨骼局部的微循环,为骨骼细胞提供充足的氧气和营养物质,并带走代谢废物,有助于骨修复^[16]。因此,以中医整体观念和辨证论治为指导,结合现代病理机制深入研究中药复方或



假手术组

模型组

雌激素组

骨松康复汤组

图6 HE染色观察股骨病理变化 (×40)

活性成分防治骨质疏松症的具体靶点与通路,不仅有助于丰富中西医结合防治OP的理论内涵,也可为新药研发提供重要方向。

骨松康复汤在《伤科补要》的基础上,结合OP“肾精亏虚、肝血不足、脾弱瘀滞”之病机化裁而成。熟地黄和当归为君药,具有滋肾填精、补血活血之功效;补骨脂、骨碎补、淫羊藿和肉苁蓉为臣药,具有温肾壮阳、强筋健骨的作用;丹参、桃仁和川芎为佐药活血组,具有活血祛瘀的作用;杜仲、续断和怀牛膝为佐药强筋组,具有补肝肾、强筋骨的作用;佐药调补组则以山药、白芍和陈皮配伍,兼具健脾益肾、养血柔肝、化痰散结之功效。骨松康复汤紧扣OP的病机,在临床上展现了有效性和安全性。网络药理学研究表明,该方抗OP的关键活性成分包括槲皮素、汉黄芩素、木犀草素、豆甾醇和山柰酚等。槲皮素是一种类黄酮素,具有广泛的生物活性,可通过促进成骨、血管生成、抗氧化表达和破骨细胞凋亡等方面对OP进行调节^[17]。动物实验证实其可改善卵巢切除大鼠骨标志物表达,调控自噬与凋亡基因,提升睾酮切除小鼠胰岛素样生长因子-1及高密度脂蛋白水平,增加骨密度并改善微结构^[18-19]。汉黄芩素是一种黄酮类化合物,可通过阻断前列腺素生成,上调骨保护素表达,抑制破骨细胞分化^[20-21]。木犀草素属于植物类黄酮,经细胞外信号调节激酶(extracellular signal-regulated kinase, ERK)/低密度脂蛋白受体相关蛋白5(low-density lipoprotein receptor-related protein 5, Lrp-5)/糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 beta, GSK-3 β)通路缓解糖皮质激素性OP,并激活Wnt信号通路促进成骨细胞分化^[22-23]。这些研究表明槲皮素、汉黄芩素、木犀草素可能是骨松康复汤抗OP的有效活性成分。然而,骨松康复汤中其他的药物活性成分对OP的作用还有待研究。

本研究筛选出骨松康复汤抗OP的77个关键靶点,其中NFKB1 α 、FOS、HIF-1 α 、CTNNB1和MAPK14可能发挥核心调控作用。分子对接显示上述5个靶点与方剂活性成分具有较强亲和力,提示其可能是药物干预OP的关键位点。动物实验证实,在OP小鼠股骨中,骨松康复汤能下调NFKB1 α 、FOS、HIF-1 α 及MAPK14表达,同时上调CTNNB1表达,表明该方通过抑制骨吸收/炎症并激活骨形成,发挥抗OP效应。NFKB1 α 作为转录调控因子参与骨形态发生蛋白(BMP)的表达调控。BMP可诱导间充质细胞向骨细胞分化,塑造骨微环境^[24-25]。研究表明,肉苁蓉活性成分毛蕊花糖苷可通过下调NFKB1 α 抑制破骨细胞形成,起到预防OP的作用^[26]。FOS是破骨细胞分化的必需转录因子,c-Fos缺失导致破骨细胞分化障碍^[27]。类黄酮化合物可降低c-Fos表达,抑制破骨细胞活性^[28]。骨松康复汤中槲皮素、木犀草素等核心成分均属类黄酮^[29]。MAPK14属p38 MAPK丝氨酸/苏氨酸激酶家族,参与骨代谢调控^[30]。p38 α 促进骨丢失,其抑制剂可预防骨质疏松性骨量减少^[31]。这些研究为我们的结果提供了支持。

KEGG富集分析揭示骨松康复汤抗OP的潜在作用通路涉及165条,其中核心通路包括AGE-RAGE信号通路、IL-17信号通路和PI3K-Akt信号通路。AGE-RAGE信号通路与糖尿病并发症相关,OP是糖尿病并发症之一^[32-33]。MONTAGNANI A

等^[34]研究发现AGE/RAGE轴失衡,将会直接影响成骨细胞的活性,从而导致骨质量下降。木犀草素可通过激活PI3K-Akt信号通路,降低ROS积累和线粒体功能障碍,缓解成骨细胞焦亡,治疗绝经后OP^[35]。柚皮苷可调节成骨细胞的增殖和分化能力、激活PI3K-Akt/mTOR信号通路、改善骨密度和骨形态,对糖皮质激素诱导的OP有保护作用^[36]。肉苁蓉提取物可能通过激活PI3K/Akt/mTOR信号通路来缓解OP,从而发挥保骨作用^[37]。这些研究表明中药活性成分激活PI3K-Akt信号通路来治疗OP。本研究表明骨松康复汤显著上调OP小鼠股骨中p-PI3K和p-Akt磷酸化水平,证实该通路为关键通路。

综上,本研究基于中医“肾精亏虚、肝血不足、脾弱瘀滞”的OP病机理论,结合网络药理学、分子对接及动物实验,阐释了经验方骨松康复汤的多维抗OP机制。核心结论为骨松康复汤中槲皮素、汉黄芩素、木犀草素、豆甾醇、山柰酚等活性成分通过靶向NFKB1 α 、FOS、HIF-1 α 、MAPK14、CTNNB1和PI3K-Akt信号通路发挥抗OP的作用。

参考文献

- [1] CHEN G M, ZHANG Z P, LIU Y Y, et al. Efficacy and safety of Zuogui Pill in treating osteoporosis: Study protocol of a systematic review[J]. *Medicine*, 2019, 98(8): e13936.
- [2] 李远志, 时宗庭, 迟敬轩, 等. 基于多组学探讨肾阳虚证绝经后骨质疏松症的生物标志物及潜在治疗中药[J]. *中医药导报*, 2025, 31(6): 115-123.
- [3] SONG S S, GUO Y Y, YANG Y H, et al. Advances in pathogenesis and therapeutic strategies for osteoporosis[J]. *Pharmacol Ther*, 2022, 237: 108168.
- [4] KOVÁCS B, VAJDA E, NAGY E E. Regulatory effects and interactions of the Wnt and OPG-RANKL-RANK signaling at the bone-cartilage interface in osteoarthritis[J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(18): 4653.
- [5] SALARI N, GHASEMI H, MOHAMMADI L, et al. The global prevalence of osteoporosis in the world: A comprehensive systematic review and meta-analysis[J]. *J Orthop Surg Res*, 2021, 16(1): 609.
- [6] 刘尚尚, 叶国庆, 耿燕慧, 等. 中医药介导相关信号通路治疗骨质疏松症研究进展[J]. *陕西中医*, 2025, 46(3): 428-432.
- [7] CIUBEAN A D, UNGUR R A, IRSAY L, et al. Polymorphisms of *FDPS*, *LRP5*, *SOST* and *VKORC1* genes and their relation with osteoporosis in postmenopausal Romanian women[J]. *PLoS One*, 2019, 14(11): e0225776.
- [8] 凌鑫国. 骨松康复汤治疗肾虚血瘀型原发性骨质疏松症的临床观察[D]. 昆明: 云南中医学院, 2017.
- [9] 张鹏, 高莎, 魏浩洋, 等. 煨肾汤调控TGF- β /Smad2与MAPK通路对骨质疏松骨保护的研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2025, 31(6): 806-811.
- [10] 毛佳乐, 林炳锋, 张晓芹, 等. 基于VDR/GPX4通路探讨小檗碱对去卵巢小鼠骨丢失的抑制作用[J]. *中国中医药科*

- 技,2024,31(6):983-988.
- [11] 周大标,吴冰心,阳越,等.基于肝脾肾探讨绝经后骨质疏松症治疗机制[J].陕西中医,2022,43(6):752-754,766.
- [12] 陈广林,刘立俊,冯婷婷,等.温肾健脾方治疗绝经后骨质疏松性椎体骨折临床研究[J].陕西中医,2025,46(6):771-775.
- [13] 张子鸣,常裕绅,白林寒,等.匡建军基于“肾虚髓减”理论治疗骨质疏松症的经验[J].中医药导报,2023,29(11):196-199.
- [14] DUAN Y, SU Y T, REN J, et al. Kidney tonifying traditional Chinese medicine: Potential implications for the prevention and treatment of osteoporosis[J]. Front Pharmacol,2023,13:1063899.
- [15] 杨远超,王颖,方志远,等.抗炎产生抗骨质疏松作用的植物[J].中国组织工程研究,2018,22(4):638-643.
- [16] 吴俊,李欧叶,覃肖,等.补肾中药促进骨质疏松性骨折愈合机制的研究进展[J].中国中药杂志,2025,50(15):4166-4177.
- [17] WONG S K, CHIN K Y, IMA -NIRWANA S. Quercetin as an agent for protecting the bone: A review of the current evidence[J]. Int J Mol Sci,2020,21(17):6448.
- [18] VAKILI S, ZAL F, MOSTAFAVI-POUR Z, et al. Quercetin and vitamin E alleviate ovariectomy-induced osteoporosis by modulating autophagy and apoptosis in rat bone cells[J]. J Cell Physiol,2021,236(5):3495-3509.
- [19] SUN J, PAN Y L, LI X F, et al. Quercetin attenuates osteoporosis in orchietomy mice by regulating glucose and lipid metabolism via the GPRC6A/AMPK/mTOR signaling pathway[J]. Front Endocrinol,2022,13:849544.
- [20] SHARIFI-RAD J, HERRERA-BRAVO J, SALAZAR L A, et al. The therapeutic potential of wogonin observed in preclinical studies[J]. Evid Based Complement Alternat Med,2021,2021:9935451.
- [21] JANG S, BAK E J, KIM M, et al. Wogonin inhibits osteoclast formation induced by lipopolysaccharide [J]. Phytother Res,2010,24(7):964-968.
- [22] CALABRESE E J, AGATHOKLEOUS E, KAPOOR R, et al. Luteolin and hormesis[J]. Mech Ageing Dev,2021,199:111559.
- [23] JING Z, WANG C Y, YANG Q N, et al. Luteolin attenuates glucocorticoid-induced osteoporosis by regulating ERK/Lrp-5/GSK-3 β signaling pathway in vivo and in vitro[J]. J Cell Physiol,2019,234(4):4472-4490.
- [24] SIVERTSEN E A, HUSE K, HYSTAD M E, et al. Inhibitory effects and target genes of bone morphogenetic protein 6 in Jurkat TAg cells[J]. Eur J Immunol,2007,37(10):2937-2948.
- [25] 周悦,叶媚娜.骨微环境中细胞因子对乳腺癌骨转移的影响[J].南通大学学报(医学版),2014,34(3):207-211.
- [26] YANG L L, ZHANG B, LIU J J, et al. Protective effect of acteoside on ovariectomy-induced bone loss in mice[J]. Int J Mol Sci,2019,20(12):2974.
- [27] MATSUO K, GALSON D L, ZHAO C, et al. Nuclear factor of activated T-cells (NFAT) rescues osteoclastogenesis in precursors lacking c-Fos[J]. J Biol Chem,2004,279(25):26475-26480.
- [28] AL MAMUN M A, ASIM M M H, ALI ZABER SAHIN M, et al. Flavonoids compounds from *Tridax procumbens* inhibit osteoclast differentiation by down-regulating c-Fos activation[J]. J Cell Mol Med,2020,24(4):2542-2551.
- [29] MARTINIAKOVA M, BABIKOVA M, MONDOCKOVA V, et al. The role of macronutrients, micronutrients and flavonoid polyphenols in the prevention and treatment of osteoporosis[J]. Nutrients,2022,14(3):523.
- [30] CARGNELLO M, ROUX P P. Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases[J]. Microbiol Mol Biol Rev,2011,75(1):50-83.
- [31] WANG S, MI R J, CAI Z P, et al. DAPK1 interacts with the p38 isoform MAPK14, preventing its nuclear translocation and stimulation of bone marrow adipogenesis[J]. Stem Cells,2022,40(5):508-522.
- [32] BUETTSMANN E G, GOLDSCHNEIDER G M, HOPPOCK G A, et al. Similarities between disuse and age-induced bone loss[J]. J Bone Miner Res,2022,37(8):1417-1434.
- [33] CONTI F, WOLOSINSKA D T, PUGLIESE G. Diabetes and bone fragility: A dangerous liaison[J]. Aging Clin Exp Res,2013,25(Suppl 1):S39-S41.
- [34] MONTAGNANI A, GONNELLI S. Antidiabetic therapy effects on bone metabolism and fracture risk[J]. Diabetes Obes Metab,2013,15(9):784-791.
- [35] CHAI S, YANG Y B, WEI L W, et al. Luteolin rescues postmenopausal osteoporosis elicited by OVX through alleviating osteoblast pyroptosis via activating PI3K-AKT signaling[J]. Phytomedicine,2024,128:155516.
- [36] GE X T, ZHOU G. Protective effects of naringin on glucocorticoid-induced osteoporosis through regulating the PI3K/Akt/mTOR signaling pathway [J]. Am J Transl Res,2021,13(6):6330-6341.
- [37] LI S M, CUI Y J, LI M, et al. Acteoside derived from *Cistanche* improves glucocorticoid-induced osteoporosis by activating PI3K/AKT/mTOR pathway[J]. J Invest Surg,2023,36(1):2154578.

(收稿日期:2025-07-20 编辑:时格格)