

基于 PINK1/Parkin 信号通路探讨壮骨止痛方对绝经后骨质疏松大鼠线粒体自噬的影响

姚海¹, 陈诗淇¹, 戴醒¹, 雷晓明^{2*}

(1. 湖南中医药大学中西医结合学院, 湖南长沙 410208; 2. 湖南中医药大学医学院, 湖南长沙 410208)

摘要: 目的 探讨壮骨止痛方对绝经后骨质疏松 (PMOP) 大鼠线粒体自噬的影响。方法 50 只雌性 SD 大鼠分为假手术组、模型组、雌二醇组 (0.09 mg/kg) 和壮骨止痛方中、高剂量组 (6.6、13.2 g/kg), 假手术组仅在卵巢周围切除脂肪, 其余各组通过切除双侧卵巢建立 PMOP 大鼠模型。采用瑞氏染色监测大鼠动情周期; Micro-CT 检测大鼠股骨微结构; HE 染色观察胫骨组织形态变化; Western blot 法检测胫骨组织中线粒体自噬蛋白-微管相关蛋白轻链 3B (LC3B)、p62、Beclin1 蛋白表达; 免疫组化法检测胫骨组织 PINK1、Parkin 蛋白表达。结果 与假手术组比较, 模型组大鼠动情周期紊乱, 完全丧失周期性波动; 大鼠股骨骨密度 (BMD)、骨体积 (BV)、骨体积分数 (BV/TV)、骨表面积密度 (BS/TV)、骨小梁厚度 (Tb. Th) 降低 ($P<0.01$), 骨小梁分离度 (Tb. Sp) 升高 ($P<0.01$); 胫骨髓腔内可见大量脂肪空泡; 血清雌二醇 (E_2) 水平降低 ($P<0.01$), FSH 和 LH 水平升高 ($P<0.01$); 胫骨组织 PINK1、Parkin、Beclin1、LC3 II/I 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$), p62 蛋白表达升高 ($P<0.01$)。与模型组比较, 壮骨止痛方高剂量组和雌二醇组大鼠股骨 BMD、BV、BV/TV、BS/TV、Tb. Th 升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), Tb. Sp 降低 ($P<0.01$); 胫骨髓腔内脂肪空泡减少; 血清 E_2 水平升高 ($P<0.01$), FSH 和 LH 水平降低 ($P<0.01$); 胫骨组织 PINK1、Parkin、Beclin1、LC3 II/I 蛋白表达升高 ($P<0.05$, $P<0.01$), p62 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。结论 壮骨止痛方能够改善 PMOP 大鼠骨微结构, 并延缓骨量下降, 起到骨保护作用, 其机制可能与调控 PINK1/Parkin 信号通路、促进线粒体自噬有关。

关键词: 壮骨止痛方; 绝经后骨质疏松症; 线粒体自噬; 骨微结构; PINK1/Parkin 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)03-0781-09

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.03.010

Effects of Zhuanggu Zhitong Formula on mitochondrial mitophagy in postmenopausal osteoporotic rats based on the PINK1/Parkin signaling pathway

YAO Hai¹, CHEN Shi-qi¹, DAI Xing¹, LEI Xiao-ming^{2*}

(1. College of Integrative Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China; 2. School of Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the effects of the Zhuanggu Zhitong Formula on mitochondrial autophagy in postmenopausal osteoporosis (PMOP) rats. **METHODS** Fifty female SD rats were divided into sham operation group, model group, estradiol group (0.09 mg/kg), and middle and high dose groups of Zhuanggu Zhitong Formula (6.6, 13.2 g/kg). The sham operation group only removed fat around ovaries, and the other groups established PMOP rat models by removing bilateral ovaries. The estrous cycle of rats was monitored by Wright's staining. Micro-CT was used to detect the femur microstructure of rats. HE staining was used to observe the morphological changes of tibia. Western blot was used to detect the expressions of mitochondrial autophagy protein-microtubule associated protein light chain 3B (LC3B), p62 and Beclin1 in tibia. Immunohistochemical method

收稿日期: 2025-08-21

基金项目: 国家自然科学基金 (81973920); 湖南省自然科学基金 (2025JJ90072); 湖南省重点研发计划 2024 年度项目 (2024JK2131); 湖南省卫生健康委科研项目 (D202303107310); 长沙市自然科学基金 (kq2502220)

作者简介: 姚海 (1995—), 男, 硕士, 从事中西医结合防治骨与关节疾病的研究。E-mail: 24489362@qq.com

* 通信作者: 雷晓明 (1975—), 男, 博士, 教授, 从事中西医结合防治老年病的研究。E-mail: 34506390@qq.com

was used to detect the expressions of PINK1 and Parkin protein in tibia. **RESULTS** Compared with the sham operation group, the estrous cycle of the model group was disordered and the periodic fluctuation was completely lost. Bone mineral density (BMD), bone volume (BV), bone volume fraction (BV/TV), bone surface density (BS/TV) and trabecular thickness (Tb. Th) of femur decreased ($P < 0.01$), while trabecular separation (Tb. Sp) increased ($P < 0.01$). A large number of fat vacuoles could be seen in the tibial medullary cavity. Serum estradiol (E_2) level decreased ($P < 0.01$), while FSH and LH levels increased ($P < 0.01$). The protein expressions of PINK1, Parkin, Beclin1 and LC3 II/I in tibia decreased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), and the protein expression of p62 in tibia increased ($P < 0.01$). Compared with the model group, the BMD, BV, BV/TV, BS/TV, Tb. Th of femur in the high-dose group and estradiol group increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while Tb. Sp decreased ($P < 0.01$). Fat vacuoles in tibial marrow cavity decreased. Serum E_2 level increased ($P < 0.01$), while FSH and LH levels decreased ($P < 0.01$). The protein expressions of PINK1, Parkin, Beclin1 and LC3 II/I in tibia increased ($P < 0.05$, $P < 0.01$), while the protein expression of p62 in tibia decreased ($P < 0.01$). **CONCLUSION** Zhuanggu Zhitong Formula can improve bone microstructure and slow bone loss in PMOP rats, and play a role in bone protection. Its mechanism may be related to regulating PINK1/Parkin signaling pathway and promoting mitochondrial autophagy.

KEY WORDS: Zhuanggu Zhitong Formula; postmenopausal osteoporosis; mitochondrial autophagy; bone microstructure; PINK1/Parkin signaling pathway

绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 是一种以骨量低、骨微结构损坏导致脆性增加, 易发生骨折为特征的全身代谢性骨病, 好发于绝经后女性。调查显示, 我国 50 岁以上女性骨质疏松症患病率为 32.1%, 低骨量患病率为 45.9%^[1], 其高发病率、高致死致残率以及低生活质量严重危害中老年女性身心健康, 给家庭及社会带来巨大的医疗经济负担。因此, 早期干预和防治具有重要的临床意义。目前, 临床上治疗 PMOP 的主要药物包括骨吸收抑制剂 (如双磷酸盐类、降钙素类、雌激素与选择性雌激素受体调节剂) 和骨形成促进剂 (如甲状旁腺激素及其类似物), 此外还有活性维生素 D 及其类似物、锶盐等药物^[2]。但这些药物均存在诸多不良反应^[3-4], 故而寻找有效且不良反应小的治疗方法已成为目前亟待解决的问题。

PINK1/Parkin 通路是线粒体自噬的经典调控途径, 增强该通路的活性可能促进受损线粒体的清除, 改善骨细胞功能。近年来研究发现, 在骨质疏松症动物模型中, 上调 PINK1 的表达可促进线粒体自噬, 减少线粒体损伤, 进而改善骨密度和骨微结构^[5-6]。因此, 开发能够激活 PINK1/Parkin 通路的药物或生物制剂具有潜在的价值。

壮骨止痛方是湖南省名中医谭日强教授的经验方, 已获得国家新药证书 (国药准字 Z20050118), 全方由淫羊藿、补骨脂、枸杞子、

女贞子、狗脊、骨碎补、川牛膝 7 味中药组成, 具有补肾壮骨、活血化瘀、祛风除湿的功效, 课题组前期研究证实及长期临床用药观测, 该方对绝经后骨质疏松症具较好的防治作用^[7]。本研究旨在明确壮骨止痛方对 PMOP 大鼠骨密度和骨微结构的改善作用, 并进一步基于 PINK1/Parkin 信号通路探讨其可能机制, 以期为该方临床防治 PMOP 提供实验基础。

1 材料

1.1 药物与试剂 壮骨止痛方组方药材淫羊藿 (批号 2501182, 产地甘肃定西)、补骨脂 (批号 2412122, 产地广西玉林)、骨碎补 (批号 2502060372, 产地湖北宜昌)、川牛膝 (批号 2412020, 产地四川汉源)、女贞子 (批号 2411273, 产地江苏南京)、枸杞子 (批号 SX25030303, 产地宁夏中卫)、狗脊 (批号 2410060022, 产地广西玉林), 均购自湖南中医药大学第一附属医院。戊酸雌二醇 (德国拜耳公司, 批号 J20171038); 戊巴比妥 (德国 Merck 公司, 货号 P3761); 青霉素钠 (华北制药股份有限公司, 批号 F9102109); 大鼠雌二醇 (E_2)、促卵泡激素 (FSH)、促黄体生成激素 (LH) 酶联免疫吸附 (ELISA) 测定试剂盒、BCA 试剂盒、Goat Anti-Rabbit IgG (H&L) 抗体 (武汉伊莱瑞特生物科技股份有限公司, 货号 E-OSEL-R0001、E-EL-R0391、E-EL-R0026、E-BC-K318-M、E-AB-1003); 蛋白提

取试剂盒、瑞氏染色液（北京索莱宝科技有限公司，货号 BC3710、G1040）； β -actin、PINK1、Goat Anti-Mouse IgG (H&L) 抗体（武汉三鹰生物技术有限公司，货号 66009-1-Ig、23274-1-AP、RGAM001）；Parkin、LC3B 抗体（武汉爱博泰克生物技术有限公司，货号 A11172、A19665）；p62 抗体（杭州华安生物技术有限公司，货号 HA721171）。

1.2 动物 50 只 SPF 级健康雌性 SD 大鼠，3 月龄，体质量 220~250 g，购自湖南斯莱克实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2021-0002]，饲养于湖南中医药大学动物实验中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (湘) 2024-0014]，饲养环境温度 22~25 $^{\circ}\text{C}$ ，相对湿度 40%~60%，光照/黑暗周期 12 h/12 h，自由进食及饮水。所有动物实验规程已通过动物实验伦理委员会批准（伦理批准号 HNUCM21-2412-08）。

1.3 仪器 Hiscan HUM Micro-CT（苏州海斯菲德信息科技有限公司）；Bio-Rad Universal Hood II 化学发光显影仪、电泳转膜槽、转印槽、电泳转膜仪（美国 Bio-Rad 公司）；KZ-III F 高速低温组织研磨仪（武汉赛维尔生物科技有限公司）；BA410E 显微镜 [麦克奥迪（厦门）电气股份有限公司]；Axio Vert. A1 倒置荧光显微镜（德国 ZEISS 公司）；TP-200D 电子精密天平（湖南湘仪实验室仪器开发有限公司）；ICV-450 电热恒温培养箱（日本 ASONE 公司）；Multiskan MK3 全自动酶标仪（美国 Thermo Fisher Scientific 公司）。

2 方法

2.1 壮骨止痛方药液制备 所有药材浸泡 1 h，武火煮沸后转文火持续煎煮 1 h，过滤，收集滤液；药渣加入蒸馏水二次煎煮 1 h，过滤，合并 2 次滤液，浓缩至高剂量 13.2 g/mL，再以蒸馏水稀释得中剂量 6.6 g/mL^[8]，4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。预实验显示低剂量（3.3 g/kg）对主要指标无显著效果，且与中剂量无显著差异，以往研究亦支持此类剂量-效应关系^[9-10]，故本研究仅设置中、高剂量组。

2.2 分组及造模 大鼠适应性饲养 1 周后，按照随机数字法分为假手术组、模型组、雌二醇组和壮骨止痛方中、高剂量组，每组 10 只，采用双侧卵巢切除术（OVX）建立大鼠骨质疏松模型^[11]。大鼠腹腔注射 1% 戊巴比妥钠（0.5 mL/g）麻醉后，采取俯卧位，于脊柱中线两侧区域脱毛，在距脊柱约 1 cm 的肋下位置做约 0.5 cm 切口，暴露包裹卵巢的脂肪组织，用镊子将其牵出切口外。确认

“菜花状”卵巢后，连同其周围脂肪垫一并切除。结扎后将残存脂肪组织还纳腹腔，逐层缝合筋膜、肌肉及皮肤。假手术组大鼠仅切除卵巢周围同体积脂肪组织，不切除卵巢。术后予以青霉素肌注 3 d 预防感染。

2.3 给药 各组大鼠术后 1 周开始给药，假手术组和模型组灌胃蒸馏水；壮骨止痛方中、高剂量组分别灌胃 6.6、13.2 g/kg 壮骨止痛方药液^[12]；雌二醇组灌胃 0.09 mg/kg E_2 ，给药体积 10 mL/kg，每天 1 次，持续 12 周。

2.4 取材 末次给药结束后，大鼠禁食不禁水 12 h，腹腔注射 1% 戊巴比妥钠（0.5 mL/g）麻醉后，腹主动脉采血，室温静置 2 h 后 3 000 r/min 离心 15 min，分离得到血清，于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存备用。剖取左右后肢完整的股骨、胫骨，去除肌肉及结缔组织，保留骨膜，右侧股骨、胫骨置于 4% 多聚甲醛中保存，用于 Micro-CT 检测、苏木精-伊红（HE）染色及免疫组化检测；剩余骨组织均置于冻存管中，放于液氮罐中迅速冷冻，之后转移至 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱保存，用于后续蛋白免疫印迹法（Western blot）检测。

2.5 检测指标

2.5.1 大鼠一般状况和体质量 定期监测并记录各组大鼠一般状态，包括其饮食饮水情况、行为活动情况、精神行为与毛发变化等，定时称定体质量并记录。

2.5.2 动情周期 术后次日晨起开始监测假手术组及实验组大鼠动情周期，于固定时间窗采集大鼠阴道脱落细胞样本。经瑞氏染色后，在显微镜下观察阴道脱落上皮细胞形态（尤其是角化细胞特征），以此评估其动情周期所处阶段。

2.5.3 Micro-CT 检测 将股骨标本置于 4% 多聚甲醛中固定 24 h 后进行 Micro-CT 成像系统扫描。扫描时，将实验样本沿长轴固定于固定器内，设置扫描电压 60 kV，电流 134 μA ，功率 8 W，曝光时间 50 ms，旋转 1 周完成扫描。扫描完成后，进行三维重建及骨组织微结构分析，测定形态学参数骨密度（BMD）、相对骨体积（BV）、骨体积分数（BV/TV）、骨表面积密度（BS/TV）、骨小梁厚度（Tb. Th）、骨小梁分离度（Tb. Sp）。

2.5.4 HE 染色观察胫骨组织形态学变化 将大鼠胫骨组织用 4% 多聚甲醛固定，EDTA 慢脱钙至针刺可轻松刺入，经浸蜡、石蜡包埋、切片后，进行 HE 染色，于生物学显微镜下观察骨组织形态。

2.5.5 ELISA 法检测血清 E₂、FSH、LH 水平 将各组大鼠血清样本和 ELISA 试剂放置至室温，按照试剂盒说明书操作，经孵育、洗涤、显色并终止反应后，用酶标仪读取 450 nm 波长处光密度 (OD) 值，根据标准曲线计算 E₂、FSH、LH 水平。

2.5.6 免疫组化法检测胫骨组织 PINK1、Parkin 蛋白表达 胫骨组织石蜡切片经梯度脱蜡与水化处理后，进行抗原热修复，阻断内源性过氧化物酶，血清封闭后依次孵育一抗和二抗，DAB 显色后苏木素复染细胞核，中性树胶封片，于光学显微镜下观察并采集图像。采用 Image J 软件定量分析，以累积光密度值 (integrated optical density, IOD) 作为指标，计算阳性染色面积占比，公式为阳性率 = (IOD 值/目标区域总面积) × 100%。

2.5.7 Western blot 法检测胫骨组织 P62、LC3、Beclin1 蛋白表达 大鼠胫骨加入液氮，研磨至粉末状，每 100 mg 组织加入 700 μL RIPA 裂解液 (RIPA : 蛋白酶抑制剂 = 100 : 1)，4 °C、12 000 r/min 离心 15 min，吸取上清，采用 BCA 蛋白定量试剂盒测定蛋白浓度。经上样、电泳、转膜、封闭后，加一抗孵育过夜，TBST 漂洗 3 次，加二抗室温孵育 1 h，TBST 漂洗 3 次，通过化学发光成像系统显影，采用 Image Lab 软件分析条带灰度值，计算各蛋白相对表达量。

2.6 统计学分析 通过 SPSS 26.0 软件进行处理，结果以均值 ± 标准差 ($\bar{x} \pm s$) 表示，若数据符合正态分布且方差齐性，组间比较采用单因素方差分析。P < 0.05 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 壮骨止痛方对 PMOP 大鼠一般情况和体质量的影响 实验期间，各给药组大鼠毛发状态、自主活动及呼吸频率等生命体征均维持正常，与模型组比较未见显著异常。如图 1 所示，与假手术组比较，模型组大鼠体质量随着时间延长而升高，此变化与雌激素缺乏导致的代谢紊乱及脂肪蓄积一致，符合绝经后骨质疏松模型特征。与模型组比较，随着给药时间延长，各给药组大鼠体质量增长缓慢，且壮骨止痛方高剂量组和雌二醇组体质量增长接近，均低于模型组。

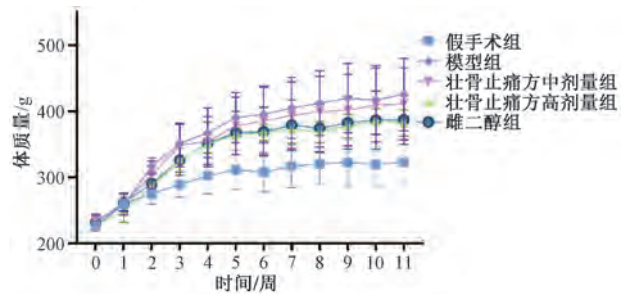
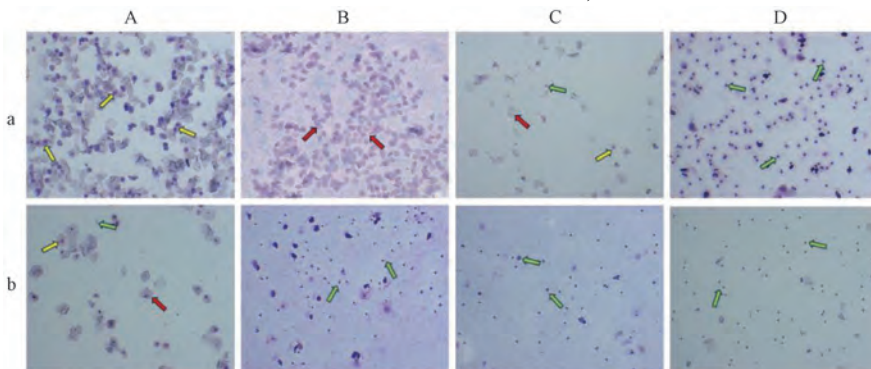


图 1 各组大鼠体质量增长曲线

Fig. 1 Body weight growth curves of rats in each group

3.2 壮骨止痛方对 PMOP 大鼠动情周期的影响 如图 2 所示，假手术组大鼠维持规律的动情周期 (< 6 d)：动情前期以有核上皮细胞居多，动情期可见大量无核角化细胞呈鳞片状聚集，动情后期可见有核上皮细胞、角化细胞与白细胞比例相近，动情间期则以密集白细胞浸润为标志。模型组大鼠持续处于动情后期或间期阶段，周期性波动完全消失，动情周期紊乱，证实了模型组具备绝经后骨质疏松的典型特征，提示造模成功。



注：a 为假手术组，aA 为动情前期，aB 为动情期，aC 为动情后期，aD 为动情间期；b 为模型组，bA 为动情后期，bB~bD 均为动情间期。黄色箭头指有核上皮细胞，红色箭头指角化细胞，绿色箭头指白细胞。

图 2 大鼠阴道脱落细胞涂片 (瑞氏染色, ×100)

Fig. 2 Smear of exfoliated cells in rat vagina (Wright's stain, ×100)

3.3 壮骨止痛方对 PMOP 大鼠股骨密度和骨微结

构的影响 如图 3~4 所示，与假手术组比较，模

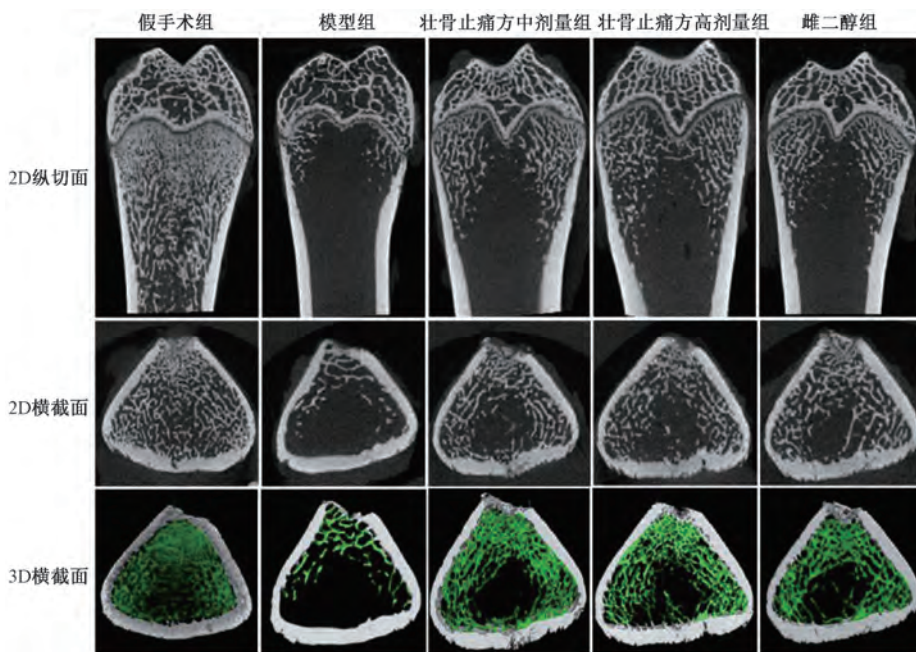
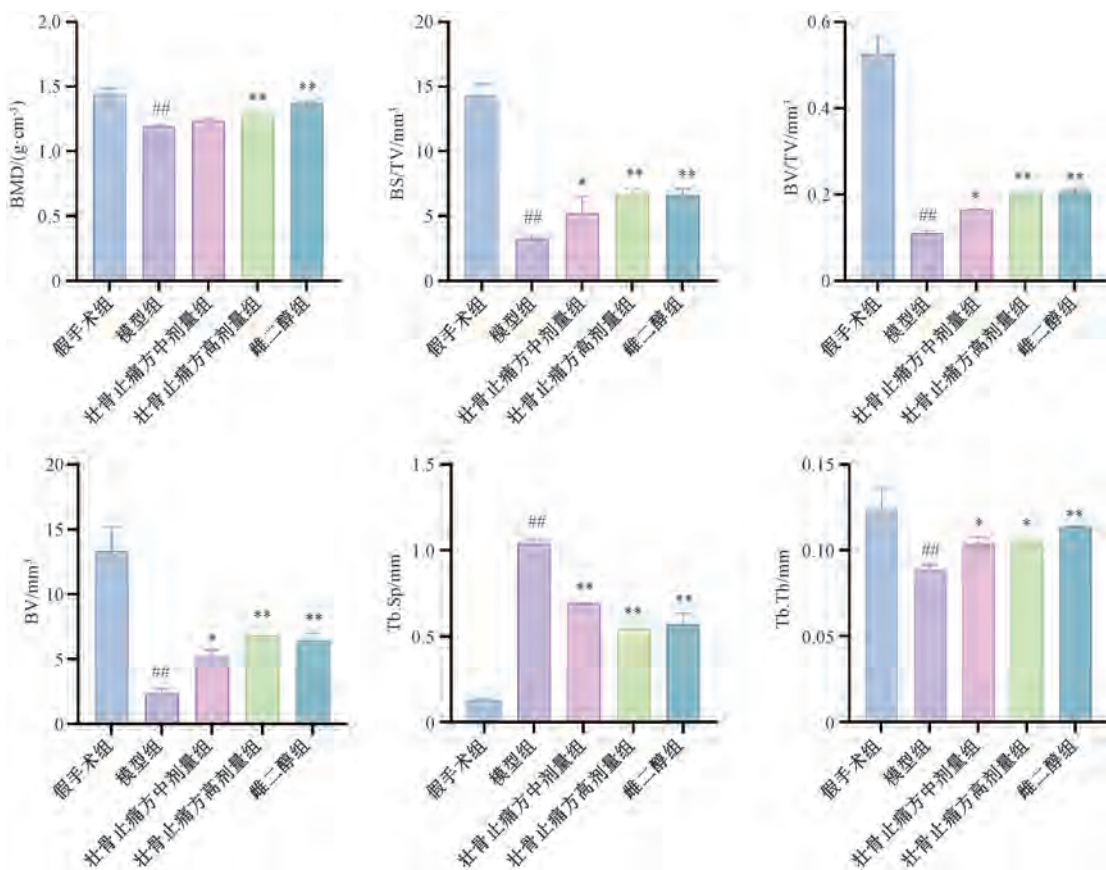


图3 各组大鼠股骨 Micro-CT 图像

Fig. 3 Micro-CT images of femur of rats in each group



注：与假手术组比较，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，* $P < 0.05$ ，** $P < 0.01$ 。

图4 各组大鼠股骨 BMD、BV、BV/TV、BS/TV、Tb. Th、Tb. Sp 值比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

Fig. 4 Comparison of BMD, BV, BV/TV, BS/TV, Tb. Th, Tb. Sp values in femur of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 5$)

型组大鼠骨小梁减少，髓腔出现空洞，内部结构破坏严重，呈现骨质疏松病理状态，BMD、BV、

BV/TV、BS/TV、Tb. Th 降低 ($P < 0.01$)，Tb. Sp 升高 ($P < 0.01$)；与模型组比较，各给药组骨小梁

交织程度改善，髓腔空洞面积减小，除壮骨止痛方中剂量组 BMD 无明显变化外 ($P>0.05$)，其余各给药组 BMD、BV、BV/TV、BS/TV、Tb. Th 升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)，Tb. Sp 降低 ($P<0.01$)。

3.4 壮骨止痛方对 PMOP 大鼠胫骨组织病理形态学的影响 如图 5 所示，与假手术组比较，模型组

大鼠胫骨骨小梁连续性中断、数目减少，结构完整性丧失并伴多发微断裂，骨髓腔内可见广泛脂肪细胞浸润；各给药组大鼠胫骨骨小梁数量均有不同程度增加，连续性改善、空间排列较整齐，同时骨髓腔内脂肪沉积量减少。

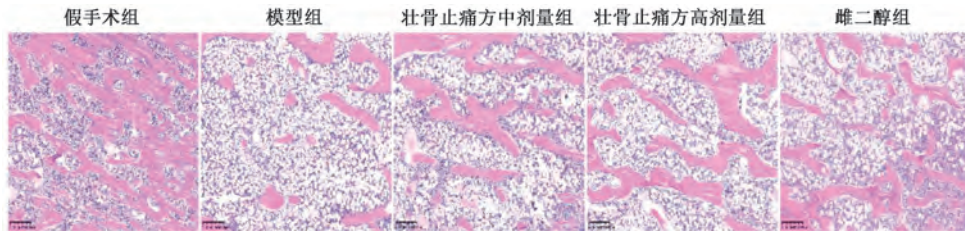
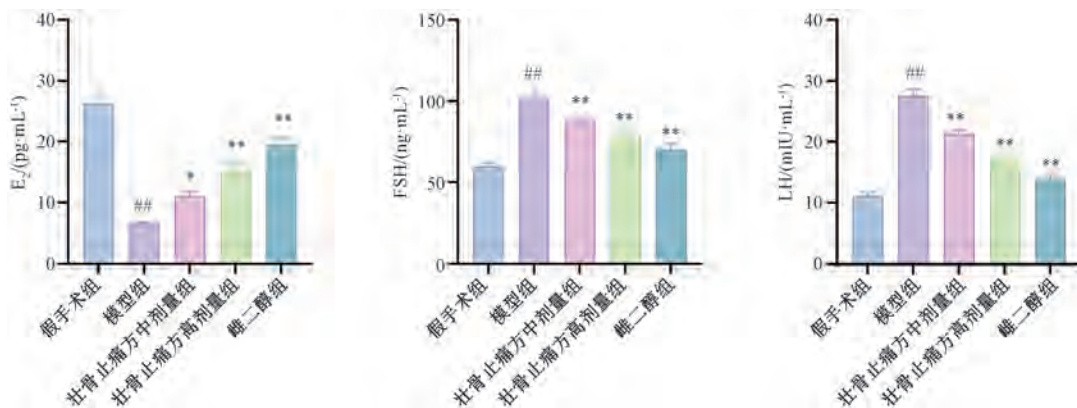


图 5 各组大鼠胫骨骨小梁病理形态 (HE 染色, $\times 100$)

Fig. 5 Pathological morphology of tibial trabecula in rats of each group (HE staining, $\times 100$)

3.5 壮骨止痛方对 PMOP 大鼠血清性激素水平的影响 如图 6 所示，与假手术组比较，模型组大鼠血清 FSH、LH 水平升高 ($P<0.01$)， E_2 水平降低

($P<0.01$)；与模型组比较，各给药组大鼠血清 FSH、LH 水平降低 ($P<0.01$)， E_2 水平升高 ($P<0.05$, $P<0.01$)。



注：与假手术组比较， $\#\# P<0.01$ ；与模型组比较， $* P<0.05$ ， $** P<0.01$ 。

图 6 各组大鼠血清 E_2 、FSH、LH 水平比较 ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

Fig. 6 Comparison of serum E_2 , FSH and LH levels in rats of each group ($\bar{x}\pm s$, $n=3$)

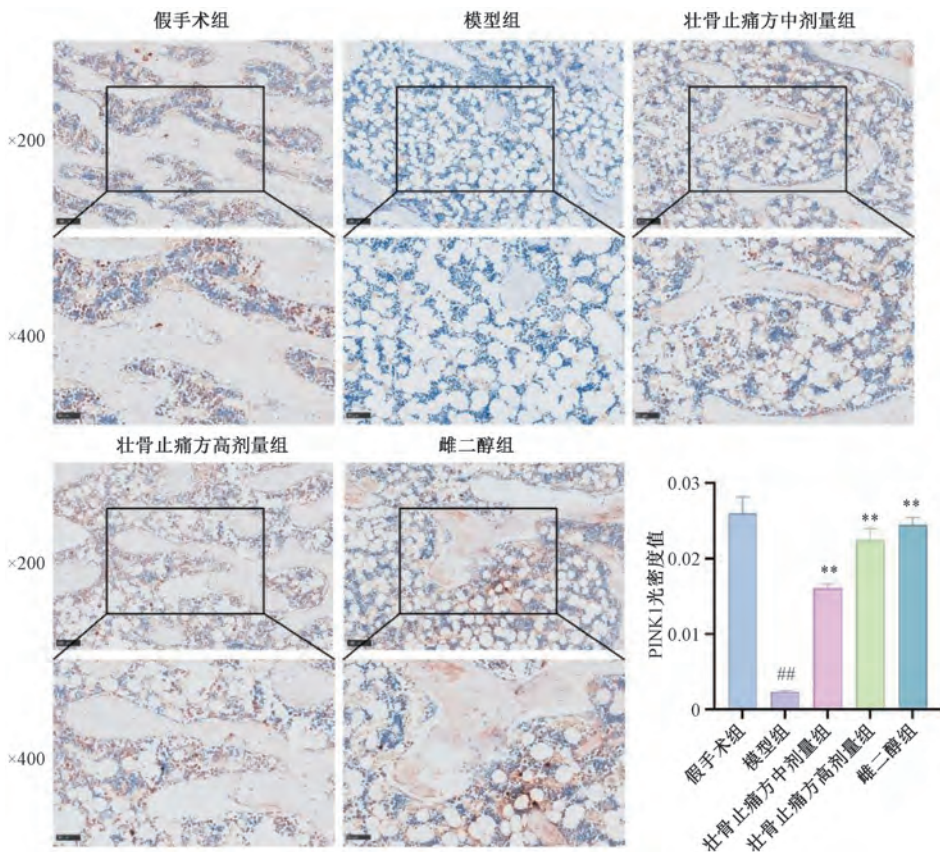
3.6 壮骨止痛方对 PMOP 大鼠胫骨组织 PINK1、Parkin 蛋白阳性表达的影响 如图 7~8 所示，与假手术组比较，模型组胫骨组织 PINK1、Parkin 蛋白阳性表达降低 ($P<0.01$)；与模型组比较，壮骨止痛方高剂量组和雌二醇组胫骨组织 PINK1、Parkin 蛋白阳性表达升高 ($P<0.01$)，壮骨止痛方中剂量组胫骨组织中 PINK1 阳性表达升高 ($P<0.01$)。

($P<0.05$)，各给药组大鼠胫骨组织 LC3 II / I 蛋白表达升高 ($P<0.01$)，p62 蛋白表达降低 ($P<0.01$)。

4 讨论

中医将骨质疏松症归为“骨痿”“骨枯”等范畴，其核心病机为肾虚骨枯、髓减骨弱。本研究所用壮骨止痛方由补骨脂丸加减而成，君以淫羊藿、女贞子补肾填髓，臣以补骨脂、枸杞加强补肾之力，佐以骨碎补、狗脊、川牛膝补肝肾、强筋骨，体现“补肾生髓、养骨壮骨”的治疗原则，对绝经后骨质疏松症有较好的疗效^[13]。既往研究证实，该方可改善 PMOP 患者骨密度并纠正骨代谢高转换状态^[14]。骨密度作为骨强度的间接指标之一，

3.7 壮骨止痛方对 PMOP 大鼠胫骨组织自噬相关蛋白表达的影响 如图 9 所示，与假手术组比较，模型组大鼠胫骨组织 Beclin1、LC3 II / I 蛋白表达降低 ($P<0.05$, $P<0.01$)，p62 蛋白表达升高 ($P<0.01$)；与模型组比较，壮骨止痛方高剂量组和雌二醇组大鼠胫骨组织 Beclin1 蛋白表达升高



注：与假手术组比较，## $P < 0.01$ ；与模型组比较，** $P < 0.01$ 。

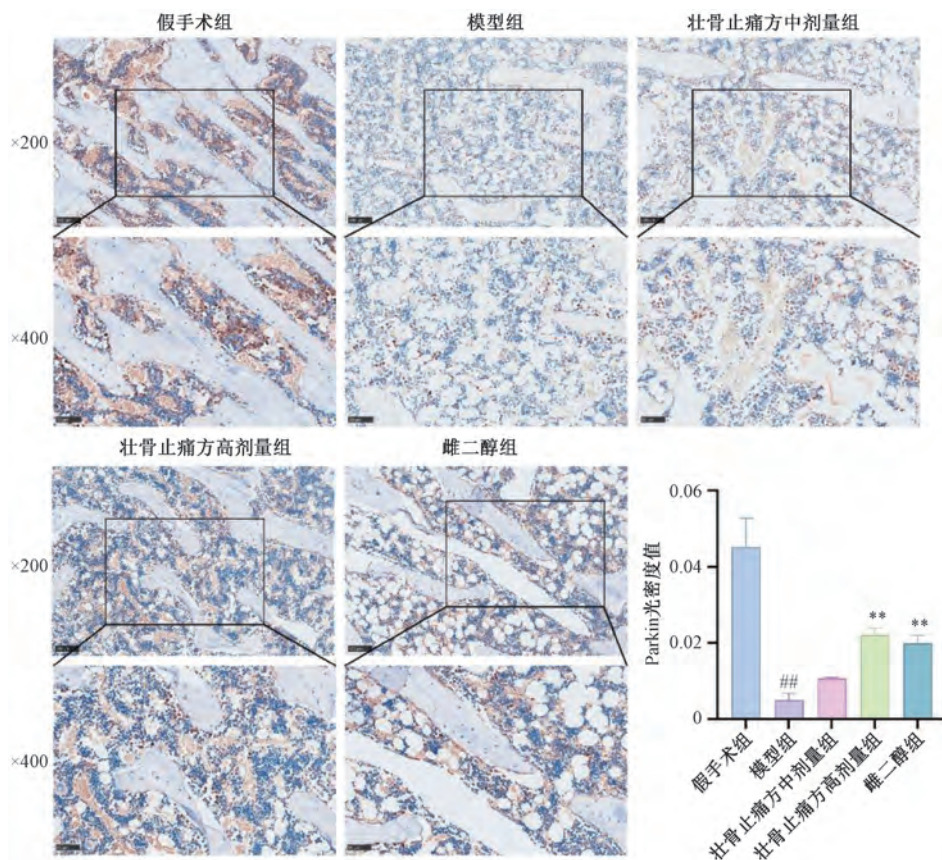
图7 各组大鼠胫骨组织 PINK1 蛋白阳性表达比较 (免疫组织化学染色, $\bar{x} \pm s, n = 3$)
Fig. 7 Comparison of positive expression of PINK1 protein in tibia tissue of rats in each group (immunohistochemical staining, $\bar{x} \pm s, n = 3$)

其变化与骨超微结构密切相关。本研究发现, PMOP 大鼠骨代谢失衡, 骨小梁稀疏、变薄、不连续, 连接性及骨体积分数降低, 而骨小梁分离度升高; 壮骨止痛方干预后, 骨密度显著提高, 骨小梁超微结构改善, 与前期研究结果一致。

PINK1/Parkin 信号通路介导的线粒体自噬是目前最经典的线粒体自噬途径^[15]。PINK1 作为线粒体损伤传感器^[16], 能够促进 Parkin 转位并导致线粒体泛素化, 经 p62、核点蛋白 52 (NDP52)、视神经蛋白 (OPTN) 等适配器蛋白招募至 LC3 组装自噬囊泡, 最终与溶酶体融合形成自噬溶酶体^[17-18]。作为贯穿自噬全程的关键蛋白, LC3 的胞浆型 LC3 I 经修饰后转变为脂化 LC3 II, 后者特异性整合至自噬体膜结构中, 因此, 其积累及 LC3 II/I 比值是衡量自噬水平 (包括线粒体自噬) 的重要指标^[19]。此外, p62 在自噬过程中被降解, 其蛋白丰度与自噬活性呈负相关^[20]。线粒体膜去极化时, PINK1/Parkin 通路被激活以清除损伤线粒体。PINK1 是线粒体自噬核心调节因子^[21], 其

被破坏会导致线粒体自噬受损^[22], 影响成骨细胞分化与矿化^[23], 而恢复线粒体自噬可缓解激素诱导的骨质丢失^[24]。研究发现, PINK1 在 OP 患者中表达降低, 且成骨分化过程中其表达升高^[25]。此外, 体外实验显示, 在小鼠 MC3T3-E1 成骨细胞系中发现 17 β -雌二醇诱导线粒体自噬, 并在体外促进细胞增殖, 表明雌激素对线粒体存在影响^[26]。

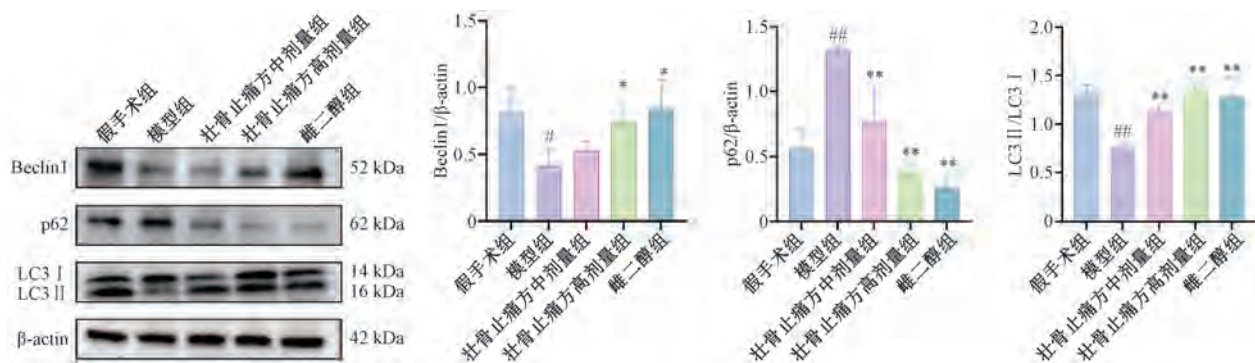
本研究结果显示, 模型组大鼠 PINK1、Parkin 蛋白阳性表达降低, 血清 E₂ 水平降低, 而 LH、FSH 水平升高, 提示 PMOP 大鼠 PINK1/Parkin 通路呈抑制状态。壮骨止痛方干预后 PINK1、Parkin 蛋白表达及 E₂ 水平升高, LH、FSH 水平降低, 提示该方可能通过调节激素水平激活 PINK1/Parkin 通路, 减轻雌激素缺乏导致的线粒体功能障碍, 促进骨形成。Beclin1 作为自噬启动关键蛋白, 其表达高低直接反映自噬水平^[27]。本研究结果显示, 模型组 Beclin1 蛋白表达和 LC3 II/I 比值降低, p62 蛋白表达升高, 提示线粒体自噬受损。壮骨止痛方干预后, 蛋白表达和 LC3 II/I 比值升高, p62



注：与假手术组比较，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{**} $P < 0.01$ 。

图8 各组大鼠胫骨组织 Parkin 蛋白阳性表达比较 (免疫组化, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 8 Comparison of positive expression of Parkin protein in tibia of rats in each group (immunohistochemistry, $\bar{x} \pm s$, $n = 3$)



注：与假手术组比较，[#] $P < 0.05$ ，^{##} $P < 0.01$ ；与模型组比较，^{*} $P < 0.05$ ，^{**} $P < 0.01$ 。

图9 各组大鼠胫骨组织 Beclin1、p62、LC3 蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Fig. 9 Comparison of protein expressions of Beclin1, p62 and LC3 in tibia of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

蛋白表达降低，说明其改善骨代谢可能与增强线粒体自噬有关。研究表明，线粒体自噬紊乱与骨代谢失衡密切相关，并参与多种骨疾病发生发展^[28]。因此，靶向调控线粒体自噬可能成为治疗骨相关疾病的新策略。

综上所述，壮骨止痛方能够改善 PMOP 大鼠

骨微结构，并延缓骨量下降，发挥骨保护作用，其机制可能与激活 PINK1/Parkin 信号通路，促进线粒体自噬有关。但本研究仍缺乏细胞水平验证及关键分子直接证据，后续计划基于成骨与破骨细胞开展体外实验，并利用基因干预或特异性抑制剂明确该通路关键作用，以期进一步揭示壮骨止痛方的分

子作用机制,为中药防治绝经后骨质疏松提供理论与实验依据。

参考文献:

[1] 乔林,熊英,徐克惠. 绝经后骨质疏松概述[J]. 实用妇产科杂志, 2020, 36(7): 481-484.

[2] 易生辉,招文华,任辉,等. 中西医结合治疗绝经后骨质疏松症的研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(5): 274-282.

[3] 杨崇正,刘衡,吴志浩,等. 特立帕肽序贯地舒单抗或唑来膦酸治疗OVCF患者的疗效比较[J]. 中国骨质疏松杂志, 2024, 30(8): 1180-1185; 1192.

[4] Cheng C, Wentworth K, Shoback D M. New frontiers in osteoporosis therapy[J]. *Annu Rev Med*, 2020, 71: 277-288.

[5] Lee S Y, An H J, Kim J M, et al. PINK1 deficiency impairs osteoblast differentiation through aberrant mitochondrial homeostasis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 589.

[6] 章晓云,曾浩,黎征鹏,等. 骨质疏松症的发病机制及中医药治疗研究进展[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(1): 311-320.

[7] 蔡昕瑶,陈瑶,陈诗淇,等. 壮骨止痛方通过RANKL/RANK信号通路抑制骨吸收的机制研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(9): 1333-1339.

[8] 甘国兴,李劲平,刘毓,等. 壮骨止痛方调节OPG/RANKL平衡抗绝经后骨质疏松作用[J]. 中国现代应用药学, 2017, 34(7): 938-942.

[9] 张小莉,杨军. 壮骨止痛方对骨质疏松大鼠血清BGP、TRAP、SOD含量的影响[J]. 云南中医中药杂志, 2018, 39(9): 71-73.

[10] 王桂云,吴结枝,梁琼,等. 壮骨止痛胶囊对去卵巢大鼠股骨组织Runx2、Ox_s及DKK1蛋白表达的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2021, 23(10): 3621-3629.

[11] Yousefzadeh N, Kashfi K, Jeddi S, et al. Ovariectomized rat model of osteoporosis: a practical guide[J]. *EXCLI J*, 2020, 19: 89-107.

[12] 甘国兴,刘毓,李劲平,等. 壮骨止痛方对去卵巢骨质疏松大鼠CGRP及β₂-AR的影响[J]. 中国医药导报, 2018, 15(7): 9-11; 15.

[13] 陈诗淇,王意坚,陈瑶,等. 基于网络药理学和分子对接探究壮骨止痛方治疗绝经后骨质疏松症的作用机制[J]. 海南医学院学报, 2024, 30(16): 1246-1258.

[14] 彭琼辉,黄艳华,严超,等. 壮骨止痛方治疗绝经后骨质疏松症50例临床观察[J]. 湖南中医杂志, 2016, 32(8): 16-17; 47.

[15] Wang T, Zhu Q, Cao B, et al. Cadmium induces mitophagy via

AMP-activated protein kinases activation in a PINK1/Parkin-dependent manner in PC12 cells[J]. *Cell Prolif*, 2020, 53(6): e12817.

[16] Narendra D P, Youle R J. Targeting mitochondrial dysfunction: role for PINK1 and Parkin in mitochondrial quality control[J]. *Antioxid Redox Signal*, 2011, 14(10): 1929-1938.

[17] Sun K, Jing X, Guo J, et al. Mitophagy in degenerative joint diseases[J]. *Autophagy*, 2021, 17(9): 2082-2092.

[18] Bader V, Winklhofer K F. PINK1 and Parkin: team players in stress-induced mitophagy[J]. *Biol Chem*, 2020, 401(6-7): 891-899.

[19] Tan Z X, Dong F, Wu L Y, et al. Transcutaneous electrical nerve stimulation (TENS) alleviates brain ischemic injury by regulating neuronal oxidative stress, pyroptosis, and mitophagy[J]. *Mediators Inflamm*, 2023, 2023: 5677865.

[20] Kumar A V, Mills J, Lapierre L R. Selective autophagy receptor p62/SQSTM1, a pivotal player in stress and aging[J]. *Front Cell Dev Biol*, 2022, 10: 793328.

[21] Zachari M, Gudmundsson S R, Li Z, et al. Selective autophagy of mitochondria on a ubiquitin-endoplasmic-reticulum platform[J]. *Dev Cell*, 2020, 55(2): 251.

[22] Lazarou M, Sliter D A, Kane L A, et al. The ubiquitin kinase PINK1 recruits autophagy receptors to induce mitophagy[J]. *Nature*, 2015, 524(7565): 309-314.

[23] Jing X, Du T, Yang X, et al. Desferoxamine protects against glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head via activating HIF-1α expression[J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(12): 9864-9875.

[24] Zhang F, Peng W, Zhang J, et al. P53 and Parkin co-regulate mitophagy in bone marrow mesenchymal stem cells to promote the repair of early steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Cell Death Dis*, 2020, 11(1): 42.

[25] Lee S Y, An H J, Kim J M, et al. PINK1 deficiency impairs osteoblast differentiation through aberrant mitochondrial homeostasis[J]. *Stem Cell Res Ther*, 2021, 12(1): 589.

[26] Sun X, Yang X, Zhao Y, et al. Effects of 17β-estradiol on mitophagy in the murine MC3T3-E1 osteoblast cell line is mediated via G protein-coupled estrogen receptor and the ERK1/2 signaling pathway[J]. *Med Sci Monit*, 2018, 24: 903-911.

[27] 郭澜,李莉,葛继荣,等. 六味地黄丸含药血清通过诱导自噬对氧化应激状态下成骨细胞增殖的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(1): 11-16.

[28] Wang S, Deng Z, Ma Y, et al. The role of autophagy and mitophagy in bone metabolic disorders[J]. *Int J Biol Sci*, 2020, 16(14): 2675-2691.