

基于 PI3K/Akt 信号通路介导的细胞凋亡探讨健步汤抗骨质疏松症的作用

刘传龙^{1,2}, 李志恒^{1,2}, 叶子玉^{1,2}, 江鹏^{1,2}, 唐懿^{1,2}, 刘东浩^{1,2}, 王哲享^{1*}, 罗继^{1*}

(1. 湖南省中西医结合医院, 湖南长沙 410006; 2. 湖南中医药大学, 湖南长沙 410208)

摘要: 目的 探讨健步汤抗骨质疏松症 (OP) 的作用。方法 18只大鼠采取双侧卵巢摘除法构建OP模型, 造模成功后随机分为模型组、仙灵骨葆组 (0.27 g/kg)、健步汤组 (15.75 g/kg), 每组6只; 另设空白组和假手术组, 每组6只。连续给药90 d后, 采用Micro-CT检测骨微结构变化, ELISA法检测大鼠血清骨形成标志物PINP、骨吸收标志物CTX-1和炎症因子TNF- α 、IL-6水平, 流式细胞术检测大鼠股骨组织细胞凋亡率, RT-qPCR法检测大鼠股骨组织PI3K、Akt、PTEN mRNA表达。采取地塞米松诱导MC3T3-E1细胞建立OP体外模型, 分为空白组、模型组和健步汤含药血清低、中、高浓度 (健步汤-L、M、H) 组 (10%、15%、20%含药血清), 干预结束后, 采用CCK-8法检测细胞增殖活性, 流式细胞术检测细胞凋亡率, Western blot法检测细胞PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Bax、Bcl-2蛋白表达, RT-qPCR法检测细胞PI3K、Akt、BGP、Runx2、COL1a1 mRNA表达。结果 健步汤能增加OP大鼠骨密度、骨体积分数和骨小梁数量 ($P<0.05$), 升高PINP水平 ($P<0.05$), 降低CTX-1、TNF- α 、IL-6水平 ($P<0.05$), 降低股骨组织中细胞凋亡率 ($P<0.05$), 降低PTEN mRNA表达 ($P<0.05$), 升高PI3K、Akt mRNA表达 ($P<0.05$)。健步汤含药血清能增加MC3T3-E1细胞增殖活性 ($P<0.05$), 降低细胞凋亡率 ($P<0.05$), 升高p-PI3K、p-Akt、Bcl-2蛋白表达 ($P<0.05$), 降低Bax蛋白表达 ($P<0.05$), 升高PI3K、Akt、BGP、Runx2、COL1a1 mRNA表达 ($P<0.05$)。结论 健步汤可能通过激活PI3K/Akt信号通路, 促进MC3T3-E1细胞增殖和活性, 减少细胞凋亡, 同时增加骨密度并减轻机体炎症反应, 从而发挥抗骨质疏松症的作用。

关键词: 健步汤; 骨质疏松症; 骨密度; 细胞凋亡; 炎症反应; PI3K/Akt 信号通路

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1001-1528(2026)01-0057-08

doi: 10.3969/j.issn.1001-1528.2026.01.009

Effects of Jianbu Decoction on osteoporosis based on PI3K/Akt signaling pathway-mediated apoptosis

LIU Chuan-long^{1,2}, LI Zhi-heng^{1,2}, YE Zi-yu^{1,2}, JIANG Peng^{1,2}, TANG Yi^{1,2}, LIU Dong-hao^{1,2}, WANG Zhe-xiang^{1*}, LUO Ji^{1*}

(1. Hunan Hospital of Integrated Traditional Chinese and Western Medicine, Changsha 410006, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208, China)

ABSTRACT: AIM To investigate the anti-osteoporosis (OP) effects of Jianbu Decoction. **METHODS** Eighteen rats were selected to establish OP models by bilateral ovariectomy. After successful modeling, they were randomly divided into model group, Xianling Gubao group (0.27 g/kg) and Jianbu Decoction group (15.75 g/kg), with 6 rats in each group. The blank group and the sham operation group were also set up, with 6 rats in each group. After continuous administration for 90 days, Micro-CT was used to detect changes in bone microstructure. ELISA was employed to measure the serum levels of bone formation marker PINP, bone resorption marker CTX-1, and inflammatory factors TNF- α and IL-6 in rats. Flow cytometry was used to detect the apoptosis

收稿日期: 2025-03-20

基金项目: 湖南省自然科学基金 (2024JJ9464); 湖南省中医药管理局项目 (B2024027); 长沙市自然科学基金 (kq2403133)

作者简介: 刘传龙 (2000—), 男, 硕士在读, 研究方向为中医药防治脊柱疾病。E-mail: 1910559878@qq.com

* 通信作者: 王哲享 (1969—), 男, 教授, 主任医师, 硕士生导师, 研究方向为中医药防治脊柱疾病。E-mail: 986248357@qq.com

罗继 (1980—), 男, 硕士, 主任医师, 研究方向为中医药防治脊柱疾病。E-mail: Luoji9000@163.com

rate of femoral tissue cells. RT-qPCR was applied to determine the mRNA expressions of *PI3K*, *Akt* and *PTEN* in rat femoral tissue. Dexamethasone-induced MC3T3-E1 cells were used to establish the *in vitro* OP model, which was divided into blank group, model group, and low, medium and high concentration groups of Jianbu Decoction-containing serum (Jianbu Decoction-L, M, H groups) (10%, 15%, 20% drug-containing serum). After intervention, CCK-8 assay was used to detect cell proliferation activity. Flow cytometry was used to measure cell apoptosis rate. Western blot was performed to detect the protein expressions of *PI3K*, p-*PI3K*, *Akt*, p-*Akt*, *Bax* and *Bcl-2*. RT-qPCR was used to determine the mRNA expressions of *PI3K*, *Akt*, *BGP*, *Runx2* and *COL1a1* in cells. **RESULTS** Jianbu Decoction could increase bone mineral density, bone volume fraction and trabecular number in OP rats ($P<0.05$), elevate PINP level ($P<0.05$), reduce the levels of CTX-1, TNF- α and IL-6 ($P<0.05$), decrease the apoptosis rate of cells in femoral tissue ($P<0.05$), downregulate *PTEN* mRNA expression ($P<0.05$), and upregulate *PI3K* and *Akt* mRNA expressions ($P<0.05$). Jianbu Decoction-containing serum could enhance the proliferation activity of MC3T3-E1 cells ($P<0.05$), reduce cell apoptosis rate ($P<0.05$), increase the protein expressions of p-*PI3K*, p-*Akt* and *Bcl-2* ($P<0.05$), decrease *Bax* protein expression ($P<0.05$), and upregulate the mRNA expressions of *PI3K*, *Akt*, *BGP*, *Runx2* and *COL1a1* ($P<0.05$). **CONCLUSION** Jianbu Decoction may exert an anti-osteoporosis effect by activating the *PI3K/Akt* signaling pathway, promoting the proliferation and activity of MC3T3-E1 cells, reducing cell apoptosis, increasing bone mineral density and alleviating the body's inflammatory response.

KEY WORDS: Jianbu Decoction; osteoporosis; bone mineral density; cell apoptosis; inflammatory reaction; *PI3K/Akt* signaling pathway

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种与年龄相关并涉及骨密度损失、骨骼结构恶化和骨折风险增加的全身性骨代谢疾病^[1-2]，临床症状主要表现为腰背部疼痛、脊柱变形、脆性骨折等^[3]。一项 Meta 分析显示，全球 OP 患病率约为 19.7%，50 岁以上人群约为 19.2%，其中女性高达 32.1%^[4]。随着全球人口持续老龄化，OP 已成为一个日益严重的公共卫生问题，本病发生机制主要涉及骨代谢失衡^[5-6]。甲状旁腺激素类似物已被证实可促进骨形成^[7]，但其存在不良反应，包括血钙异常、关节疼痛等，并且在临床预实验期间大鼠骨肉瘤发生率增加^[8]。

近年来研究发现，中医药在治疗 OP 方面具有独特优势。中医将 OP 归属于“骨痿”等范畴^[9]，认为其证候以肝肾亏虚为主，导致筋骨失养，故以滋补肝肾、强筋壮骨为治则。健步汤由《伤科补要》中的经典方剂健步虎潜丸化裁而来，具有补肝肾、强筋骨作用，以及抗炎、增加骨密度、延缓 OP 进程功效^[10]。研究表明，*PI3K/Akt* 通过抑制成骨细胞凋亡和促进骨形成参与抗 OP^[11]，因此，本研究探讨健步汤是否通过调控 *PI3K/Akt* 信号通路介导的细胞凋亡发挥抗 OP 的作用，以期为其临床应用提供更坚实的理论依据。

1 材料

1.1 动物与细胞 SPF 级健康雌性 SD 大鼠，8 周龄，体质量约 250 g，购自湖南斯莱克景达实验动物有限公司 [实验动物生产许可证号 SCXK (湘) 2021-0002，动物质量合格证号 430727241103168012]，饲养于湖南省中医药研究院医学实验动物中心 [实验动物使用许可证号 SYXK (湘) 2024-0015]，环境温度 20~23 °C，相对湿度 40%~60%，12 h 光照/12 h 黑暗周期，保持饲养室环境安静、通风良好，自由进食能水，给予标准饲料适应性喂养 7 d。实验方案经湖南省中医药研究院医学实验动物中心实验动物福利伦理委员会批准 (伦理号 SY2024-0005)。成骨细胞前体细胞 MC3T3-E1 细胞 (批号 C5734)，购自浙江百迪生物科技有限公司。

1.2 药物 健步汤组方由龟甲胶、鹿角胶、狗脊、何首乌、川牛膝、杜仲、锁阳、当归、熟地黄、威灵仙各 12 g，黄柏、人参、羌活、白术、白芍、附子各 9 g 组成，均购自湖南省中西医结合医院中药房，经湖南省中西医结合医院药学部田其学主任药师鉴定为正品，符合 2020 年版《中国药典》标准。将上述药材混合后加 10 倍量水浸泡 30 min，煎煮 2 次，每次 30 min，过滤煎液，去除药渣，合并后浓缩至生药量 1 g/mL，灭菌，置于 4 °C 冰箱

中保存。仙灵骨葆胶囊(贵州同济堂制药有限公司,国药准字Z20025337,0.5 g/粒);注射用青霉素钠(华北制药股份有限公司,国药准字H20013036,800 000 U/瓶)。

1.3 试剂 α -MEM 培养基、10% 胎牛血清 (FBS)、1% 双抗青链霉素、BCA 蛋白定量试剂盒、PI3K 抗体、p-PI3K 抗体、Akt 抗体、p-Akt 抗体(长沙艾碧维生物科技有限公司,批号 M003、C0227a、H0529a、AWB0104、AWA11331、AWA10142、AWA41499、AWA40438);CCK-8 试剂盒(广州华韵生物科技有限公司,批号 NU679);地塞米松(上海皓元生物医药科技有限公司,批号 HY-14648);Annexin V-APC/PI 双染细胞凋亡检测试剂盒(江苏凯基生物技术股份有限公司,批号 KGA1030-1007);TRIzol 试剂(美国 Thermo Fisher Scientific 公司,批号 15596026);mRNA 逆转录试剂盒(北京康为世纪生物科技有限公司,批号 CW2569);Bax 抗体、Bcl-2 抗体(上海碧云天生物技术股份有限公司,批号 AB026、AB112); β -actin 抗体(美国 Proteintech 公司,批号 66009-1-Ig)。

1.4 仪器 多功能酶标分析仪(深圳汇松科技发展有限公司);台式冷冻离心机(湖南湘仪实验室仪器开发有限公司);倒置生物显微镜(北京中显恒业仪器仪表有限公司);流式细胞仪(美国 Beckman 公司);荧光定量 PCR 仪(美国 ABI 公司);电泳仪、转膜仪(北京六一生物科技有限公司);化学发光成像系统(上海勤翔科学仪器有限公司);Micro-CT 扫描仪(德国 Bruker 公司)。

2 方法

2.1 动物实验

2.1.1 分组、造模与给药 大鼠随机分为空白组、假手术组、模型组、仙灵骨葆组和健步汤组,每组 6 只,空白组不作任何处理,模型组、仙灵骨葆组、健步汤组采取摘除双侧卵巢法构建 OP 模型,假手术组只摘除双侧卵巢周围少许脂肪组织,术后连续肌肉注射青霉素钠 3 d 预防感染。造模结束后 1 周,按照人与大鼠体表面积比计算等效给药剂量^[12],健步汤组灌胃给予 15.75 g/kg 健步汤,仙灵骨葆组灌胃给予 0.27 g/kg 仙灵骨葆溶液,空白组、假手术组和模型组均灌胃给予等体积生理盐水,给药体积 4 mL/只,每天 1 次,连续 90 d。

2.1.2 标本采集 给药结束后,大鼠禁食不禁水 12 h,腹腔注射 3% 戊巴比妥钠麻醉,腹主动脉取血,静置 1 h,3 500 r/min 离心 10 min,取上层血

清,处死大鼠,迅速分离右侧股骨,生理盐水冲洗干净,去除附着的肌肉和结缔组织,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 24 h。

2.1.3 Micro-CT 检测骨微结构变化 将保存于 4% 多聚甲醛溶液中的大鼠股骨组织取出, PBS 冲洗 2 次,晾干,置于特制的样本架上,进行 Micro-CT 扫描,设置参数为电压 80 kV; 电流 90 μ A; 分辨率 25 μ m; 扫描时间 10 min。扫描完成后,采用 NRecon 软件进行三维重建, CTAn 软件计算骨密度(BMD)、骨体积分数(BV/TV)、骨小梁数量(Tb. N)。

2.1.4 ELISA 法检测血清 PINP、CTX-1、TNF- α 、IL-6 水平 大鼠血清离心后取上清,与标准品一起加到包被好的微孔板中,温育一段时间,洗板去除未结合物质,加入酶标抗体,再次温育和洗板,最后加入底物溶液,在暗处反应一段时间,采用酶标仪在 450 nm 波长处测定吸光度,根据标准曲线计算 PINP、CTX-1、TNF- α 、IL-6 水平。

2.1.5 流式细胞术检测股骨组织细胞凋亡率 将大鼠股骨组织剪成碎块,37 $^{\circ}$ C 振荡消化 60 min,去除未消化的组织碎片及杂质,离心后弃上清,沉淀用 PBS 重悬,台盼蓝染色法检测细胞活性(确保活细胞占比>90%),100 μ L 结合缓冲液重悬,分别加入 5 μ L Annexin V、5 μ L PI 进行双染,室温下避光孵育 15 min,上机检测细胞凋亡率。

2.1.6 RT-qPCR 法检测股骨组织 PI3K、Akt、PTEN mRNA 表达 将大鼠股骨组织剪成碎块,加入液氮研磨至粉末,转移至含 TRIzol 的离心管中,涡旋裂解 5 min 后进行 RNA 分离,检测其浓度及纯度,通过电泳验证完整性。采用试剂盒将 RNA 逆转录为 cDNA,然后进行扩增反应,体系含 10 μ L Master Mix、0.8 μ L 引物、2 μ L cDNA 模板,ddH₂O 补足至总体积 20 μ L,反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s,95 $^{\circ}$ C 变性 5 s,60 $^{\circ}$ C 退火/延伸 30 s,共 40 个循环。以 β -actin 为内参,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 法计算 PI3K、Akt、PTEN mRNA 相对表达。引物由北京擎科生物科技股份有限公司合成,序列见表 1。

2.2 细胞实验

2.2.1 含药血清制备 大鼠随机分为空白组和健步汤给药组,每组 5 只,健步汤给药组灌胃给予 15.75 g/kg 健步汤,空白组灌胃给予等体积生理盐水,每天 1 次,连续 7 d。末次灌胃后 2 h,按“2.1.2”项下方法分别得到含药、空白血清,置于-80 $^{\circ}$ C 冰箱中保存。

表1 引物序列
Tab. 1 Primer sequences

基因	引物序列(5'→3')	产物长度/bp
PI3K	正向 AGCCACAGATCCACTTAACCC	128
	反向 CTTGCTGCCCCACTTTACTGA	
Akt	正向 CAGGTTCACCCAGTGACAAAC	143
	反向 CTCCTTCACCAGGATCACCT	
PTEN	正向 TGCCTTCTACCTGTCCTTCA	128
	反向 GCTGGTAGCTGGATGGTGT	
BGP	正向 CTAGCGGACCACATTGGCTT	167
	反向 AGCTGTGCCCTCATACTTT	
Runx2	正向 CCACCCAGTAGCAAACCGAA	173
	反向 GCATCAGACAAACACACGGAC	
COL1a1	正向 CTGGCTCTCCTGGTACCCCT	160
	反向 GGACCACGTTACCACCTGCT	
β -actin	正向 ACATCCGTAAAGACCTCTATGCC	223
	反向 TACTCCTGCTTGTGATCCAC	

2.2.2 细胞培养与传代 MC3T3-E1 细胞加到含 10% 胎牛血清及 1% 双抗的 α -MEM 培养基, 置于 37 ℃、5% CO_2 培养箱中培养, 每天观察生长状态。当细胞密度达到 80% ~ 90% 时, 用 37 ℃ 预热的 PBS 清洗, 加入 1 mL 0.25% 胰蛋白酶消化 2~3 min, 再加入 1 mL 完全培养基终止消化, 按 1:3 比例进行传代。

2.2.3 模型建立及分组给药 取对数生长期 MC3T3-E1 细胞, 以 5×10^6 /孔密度接种于 6 孔板中, 待细胞贴壁后除空白组(完全培养基+20% 空白血清)外, 其余各组均加入 1 $\mu\text{mol/L}$ 地塞米松培养 7 d 以建立 OP 体外模型^[13]。造模成功后, 分为模型组(完全培养基+20% 空白血清)、健步汤含药血清低浓度组(健步汤-L 组, 完全培养基+10% 健步汤含药血清+10% 空白血清)、健步汤含药血清中浓度组(健步汤-M 组, 完全培养基+15% 健步汤含药血清+5% 空白血清)、健步汤含药血清高浓度组(健步汤-H 组, 完全培养基+20% 健步汤含药血清)。

2.2.4 CCK-8 法检测细胞活性 取对数生长期 MC3T3-E1 细胞, 以 3×10^4 /孔密度接种于 24 孔板中, 按“2.2.3”项下方法分组处理 12、24、48 h, 去除含药培养基, 每孔加入 300 μL 含 10% CCK-8 溶液的混合培养基, 置于培养箱中继续孵育 4 h。再将每组含有 CCK-8 溶液的混合培养基上清转移至 96 孔板内, 每组 3 个复孔, 采用酶标仪测定 450 nm 波长处光密度(OD)值。

2.2.5 流式细胞术检测细胞凋亡率 取对数生长期 MC3T3-E1 细胞, 以 5×10^6 /孔密度接种于 6 孔板

中, 按“2.2.3”项下方法分组处理 48 h, 收集细胞并用 PBS 洗涤 2 次, 1000 r/min 离心 5 min, 弃去上清, 加入 500 μL 结合缓冲液重悬细胞, 分别加入 5 μL Annexin V、5 μL PI 进行双染, 室温下避光孵育 15 min, 采用流式细胞仪检测 MC3T3-E1 细胞凋亡率。

2.2.6 Western blot 法检测细胞 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Bax、Bcl-2 蛋白表达 取对数生长期 MC3T3-E1 细胞, 以 5×10^6 /孔密度接种于 6 孔板中, 按“2.2.3”项下方法分组处理 48 h, 预冷 PBS 洗涤, 加入 RIPA 裂解液, 冰上裂解 10 min, 4 ℃、12 000 r/min 离心 15 min, 取上清, 即为总蛋白, BCA 蛋白定量试剂盒测定浓度, 加入 5 \times Loading Buffer 混匀, 沸水煮 5 min 进行变性, 制备 SDS-PAGE 凝胶, 蛋白上样、电泳后转移至 PVDF 膜, 5% 脱脂奶粉溶液室温封闭 1.5 h, 加入稀释后的 PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Bax、Bcl-2 一抗, 4 ℃ 孵育过夜, 次日用 TBST 洗 3 次, 加入二抗, 室温孵育 1.5 h, TBST 洗 3 次, ECL 法显色后曝光, 凝胶成像系统成像。采用 ImageJ 软件对条带进行灰度值分析, 以 β -actin 为内参, 计算目标蛋白相对表达量。

2.2.7 RT-qPCR 法检测细胞 PI3K、Akt、BGP、Runx2、COL1a1 mRNA 表达 取对数生长期 MC3T3-E1 细胞, 以 5×10^6 /孔密度接种于 6 孔板中, 按“2.2.3”项下方法分组处理 48 h 后收集, 按“2.1.6”项下方法检测细胞 PI3K、Akt、BGP、Runx2、COL1a1 mRNA 表达。引物序列见表 1。

2.3 统计学分析 通过 SPSS 25.0 软件进行处理, 符合正态分布的计量资料以 $(\bar{x} \pm s)$ 表示, 符合方差齐性者多组间比较采用单因素方差分析, 组间两两比较采用 *t* 检验, 方差不齐时采用 Tamhane's T2 检验; 不符合正态分布者采用 Kruskal-Wallis 非参数检验。 $P < 0.05$ 表示差异具有统计学意义。

3 结果

3.1 动物实验

3.1.1 健步汤对 OP 大鼠右侧股骨微结构变化的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠右侧股骨 BMD、BV/TV、Tb. N 水平降低($P < 0.05$); 与模型组比较, 仙灵骨葆组和健步汤组大鼠右侧股骨 BMD、BV/TV、Tb. N 水平升高($P < 0.05$), 表明健步汤能增加大鼠骨密度、骨体积分数和骨小梁数量, 其效果与仙灵骨葆相当, 见图 1、表 2。

3.1.2 健步汤对 OP 大鼠血清 PINP、CTX-1、

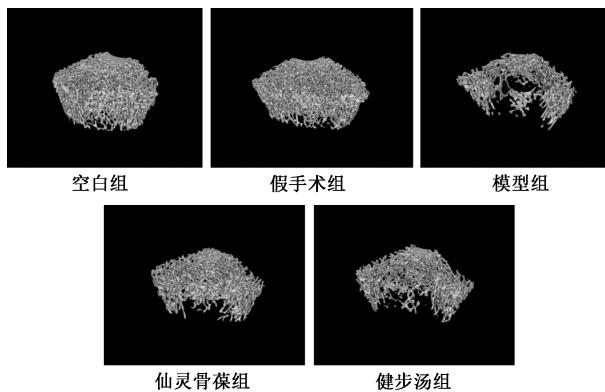


图1 各组大鼠右侧股骨微结构变化 (Micro-CT, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Fig. 1 Changes in right femur microstructures in rats in each group (Micro-CT, $\bar{x} \pm s$, $n=6$)

TNF- α 、IL-6 水平的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠血清 PINP 水平降低 ($P<0.05$), CTX-1、TNF- α 、IL-6 水平升高 ($P<0.05$), 提示大鼠存在

表2 各组大鼠右侧股骨 BMD、BV/TV、Tb. N 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 2 Comparison of BMD, BV/TV and Tb. N levels in right femur of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	BMD/($g \cdot cm^{-3}$)	(BV/TV)/%	Tb.N/($1 \cdot mm^{-1}$)
空白组	0.59 \pm 0.04	44.20 \pm 3.17	3.89 \pm 0.16
假手术组	0.60 \pm 0.04	43.29 \pm 1.61	4.00 \pm 0.09
模型组	0.20 \pm 0.02 *	22.67 \pm 1.64 *	2.04 \pm 0.07 *
仙灵骨葆组	0.32 \pm 0.03 #	29.75 \pm 1.56 #	2.80 \pm 0.12 #
健步汤组	0.29 \pm 0.03 #	27.88 \pm 2.17 #	2.72 \pm 0.17 #

注: 与假手术组比较, * $P<0.05$; 与模型组比较, # $P<0.05$ 。
骨形成抑制、骨吸收亢进及炎症反应增强的病理状态; 与模型组比较, 仙灵骨葆组和健步汤组大鼠血清 PINP 水平升高 ($P<0.05$), CTX-1、TNF- α 、IL-6 水平降低 ($P<0.05$), 表明健步汤可有效调节大鼠骨代谢平衡 (促进骨形成、抑制骨吸收), 并减轻炎症反应, 见表 3。

表3 各组大鼠血清 PINP、CTX-1、TNF- α 、IL-6 水平比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 3 Comparison of serum levels of PINP, CTX-1, TNF- α and IL-6 in rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	PINP/($ng \cdot mL^{-1}$)	CTX-1/($ng \cdot mL^{-1}$)	TNF- α /($pg \cdot mL^{-1}$)	IL-6/($pg \cdot mL^{-1}$)
空白组	55.23 \pm 4.04	11.69 \pm 2.47	78.80 \pm 8.70	100.32 \pm 8.74
假手术组	57.28 \pm 5.80	10.06 \pm 3.21	84.00 \pm 9.26	105.31 \pm 7.44
模型组	16.13 \pm 4.53 *	26.37 \pm 1.19 *	139.67 \pm 8.91 *	150.57 \pm 8.57 *
仙灵骨葆组	42.91 \pm 3.81 #	17.89 \pm 2.64 #	99.44 \pm 5.49 #	121.33 \pm 7.37 #
健步汤组	40.68 \pm 3.53 #	18.53 \pm 2.30 #	102.92 \pm 6.20 #	130.46 \pm 8.48 #

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

3.1.3 健步汤对 OP 大鼠股骨组织中细胞凋亡率的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠股骨组织中细胞凋亡率升高 ($P<0.05$); 与模型组比较, 仙灵骨葆组和健步汤组大鼠股骨组织中细胞凋亡率降低 ($P<0.05$), 表明健步汤可通过抑制骨细胞凋亡来发挥抗骨质疏松的作用, 其效果与仙灵骨葆相当, 见表 4、图 2。

表4 各组大鼠股骨组织中细胞凋亡率比较 ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

Tab. 4 Comparison of apoptosis rate in femoral tissue of rats in each group ($\bar{x} \pm s$, $n=6$)

组别	凋亡率/%
空白组	1.06 \pm 0.02
假手术组	1.37 \pm 0.01
模型组	16.94 \pm 0.04 *
仙灵骨葆组	11.28 \pm 0.01 #
健步汤组	11.67 \pm 0.02 #

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

3.1.4 健步汤对 OP 大鼠股骨组织 PI3K、Akt、PTEN mRNA 表达的影响 与假手术组比较, 模型组大鼠股骨组织 PI3K、Akt mRNA 表达降低 ($P<0.05$), PTEN mRNA 表达升高 ($P<0.05$), 提示

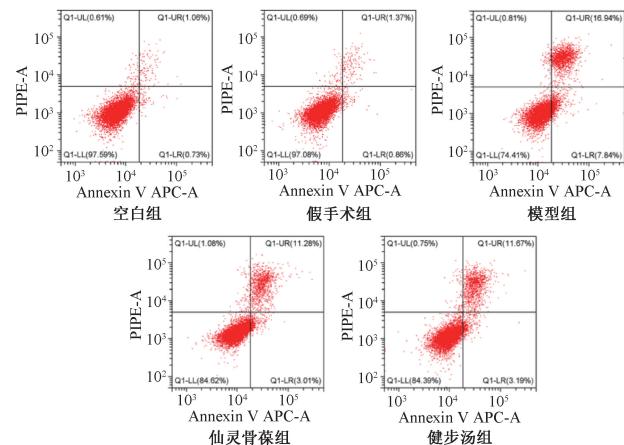


图2 各组大鼠股骨组织细胞凋亡流式图

Fig. 2 Flow charts of cell apoptosis in femoral tissue of rats in each group

大鼠股骨组织中 PI3K/Akt 通路受抑制, PTEN 作为通路负调控因子异常高表达; 与模型组比较, 仙灵骨葆组和健步汤组大鼠股骨组织 PI3K、Akt mRNA 表达升高 ($P<0.05$), PTEN mRNA 表达降低 ($P<0.05$), 表明健步汤可能通过下调 PTEN 表

达、促进PI3K/Akt通路活化来发挥骨保护作用,见表5。

表5 各组大鼠股骨组织PI3K、Akt、PTEN mRNA表达比较($\bar{x}\pm s$, n=6)

Tab. 5 Comparison of mRNA expressions of PI3K, Akt and PTEN in femoral tissue of rats in each group ($\bar{x}\pm s$, n=6)

组别	PI3K	Akt	PTEN
空白组	3.261±0.025	2.691±0.057	1.029±0.218
假手术组	3.095±0.124	2.581±0.161	0.964±0.093
模型组	1.274±0.095 [*]	1.019±0.108 [*]	4.285±0.119 [*]
仙灵骨葆组	2.003±0.071 [#]	1.994±0.036 [#]	2.267±0.105 [#]
健步汤组	1.895±0.116 [#]	2.016±0.044 [#]	2.377±0.126 [#]

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

表6 不同作用时间各组OP模型MC3T3-E1细胞活性比较($\bar{x}\pm s$, n=3)

Tab. 6 Comparison of MC3T3-E1 cells viability in OP model of each group in different action time ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	0 h	12 h	24 h	48 h
空白组	1.50±0.05	1.67±0.05	1.95±0.01	2.33±0.02
模型组	0.89±0.03 [*]	0.90±0.01 [*]	1.03±0.04 [*]	1.11±0.04 [*]
健步汤-L组	0.88±0.06	1.20±0.04 [#]	1.26±0.03 [#]	1.43±0.03 [#]
健步汤-M组	0.90±0.02	1.27±0.02 [#]	1.40±0.01 [#]	1.53±0.05 [#]
健步汤-H组	0.88±0.03	1.58±0.04 ^{#△}	1.83±0.02 ^{#△}	1.98±0.03 ^{#△}

注:与空白组比较, ^{*}P<0.05;与模型组比较, [#]P<0.05;与健步汤-L组比较, [△]P<0.05。

表7 各组OP模型MC3T3-E1细胞凋亡率比较($\bar{x}\pm s$, n=3)

Tab. 7 Comparison of apoptosis rate of MC3T3-E1 cells in OP modes in each group ($\bar{x}\pm s$, n=3)

组别	凋亡率/%
空白组	1.15±0.04
模型组	18.55±0.02 [*]
健步汤-L组	15.48±0.01 [#]
健步汤-M组	15.24±0.01 [#]
健步汤-H组	11.28±0.02 ^{#△}

注:与空白组比较, ^{*}P<0.05;与模型组比较, [#]P<0.05;与健步汤-L组比较, [△]P<0.05。

3.2.3 健步汤含药血清对OP模型MC3T3-E1细胞PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Bax、Bcl-2蛋白表达的影响 与空白组比较,模型组PI3K、Akt、Bcl-2蛋白表达降低($P<0.05$),Bax蛋白表达升高($P<0.05$);与模型组比较,健步汤含药血清各浓度组PI3K、Akt、Bcl-2蛋白表达升高($P<0.05$),Bax蛋白表达降低($P<0.05$),以健步汤-H组更明显($P<0.05$),见表8、图4。

3.2.4 健步汤含药血清对OP模型MC3T3-E1细胞PI3K、Akt、BGP、Runx2、COL1a1 mRNA表达的影响 与空白组比较,模型组细胞PI3K、Akt、BGP、Runx2、COL1a1 mRNA表达降低($P<0.05$);与模型组比较,健步汤含药血清各浓度组细胞PI3K、Akt、BGP、Runx2、COL1a1 mRNA表

3.2 细胞实验

3.2.1 健步汤含药血清对OP模型MC3T3-E1细胞活性的影响 与空白组比较,模型组各时间点细胞活性降低($P<0.05$);与模型组比较,健步汤含药血清各浓度组在12、24、48 h时细胞活性升高($P<0.05$),以健步汤-H组更明显($P<0.05$),见表6。

3.2.2 健步汤含药血清对OP模型MC3T3-E1细胞凋亡的影响 与空白组比较,模型组细胞凋亡率升高($P<0.05$);与模型组比较,健步汤含药血清各浓度组细胞凋亡率降低($P<0.05$),以健步汤-H组更明显($P<0.05$),见表7、图3。

表6 不同作用时间各组OP模型MC3T3-E1细胞活性比较($\bar{x}\pm s$, n=3)

Tab. 6 Comparison of MC3T3-E1 cells viability in OP model of each group in different action time ($\bar{x}\pm s$, n=3)

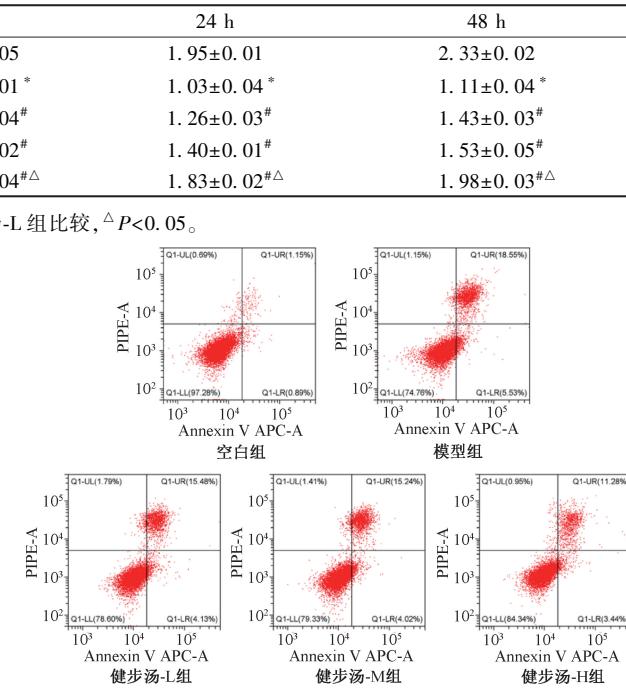


图3 各组OP模型MC3T3-E1细胞凋亡流式图

Fig. 3 Flow charts of cell apoptosis of MC3T3-E1 cells in OP model in each group

达升高($P<0.05$),以健步汤-H组更明显($P<0.05$),见表9。

4 讨论

骨质疏松症是人体衰老过程中常见的代谢性骨病,在全球范围内的患病率不断升高,致病因素主要涉及衰老、营养障碍、激素水平、药物等^[14-15]。骨骼重塑过程是为了给骨骼提供机械负荷强度,并维持骨稳态,但OP是由于重塑过程失衡而发生的^[16-17],其病理机制主要包括细胞凋亡、细胞自噬、氧化应激、炎症反应等,导致成骨细胞功能抑

表8 各组OP模型MC3T3-E1细胞p-PI3K、p-Akt、Bax、Bcl-2蛋白表达比较 ($\bar{x} \pm s$, n=3)Tab. 8 Comparison of protein expressions of p-PI3K, p-Akt, Bax and Bcl-2 in MC3T3-E1 cells in OP model in each group ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	p-Akt/Akt	p-PI3K/PI3K	Bax/β-actin	Bcl-2/β-actin
空白组	0.87±0.03	0.93±0.01	0.34±0.03	0.77±0.01
模型组	0.07±0.01*	0.11±0.02*	0.81±0.02*	0.23±0.03*
健步汤-L组	0.25±0.04#	0.34±0.02#	0.62±0.03#	0.44±0.01#
健步汤-M组	0.33±0.01#	0.44±0.03#	0.56±0.02#	0.48±0.01#
健步汤-H组	0.61±0.06#△	0.73±0.02#△	0.40±0.01#△	0.65±0.02#△

注: 与空白组比较, *P<0.05; 与模型组比较, #P<0.05; 与健步汤-L组比较, △P<0.05。

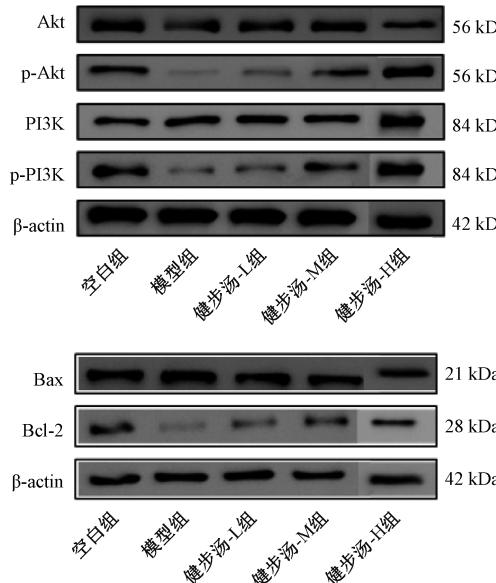


图4 各组OP模型MC3T3-E1细胞PI3K、p-PI3K、Akt、p-Akt、Bax、Bcl-2蛋白条带

Fig. 4 Protein bands of PI3K, p-PI3K, Akt, p-Akt, Bax and Bcl-2 of MC3T3-E1 cells in OP model in each group

表9 各组OP模型MC3T3-E1细胞PI3K、Akt、BGP、Runx2、COL1a1 mRNA表达比较 ($\bar{x} \pm s$, n=3)Tab. 9 Comparison of mRNA expressions of PI3K, Akt, BGP, Runx2 and COL1a1 in MC3T3-E1 cells in OP model in each group ($\bar{x} \pm s$, n=3)

组别	PI3K	Akt	BGP	Runx2	COL1a1
空白组	1.00±0.06	1.00±0.05	1.01±0.18	1.00±0.07	1.00±0.11
模型组	0.12±0.01*	0.12±0.01*	0.19±0.01*	0.12±0.02*	0.15±0.01*
健步汤-L组	0.32±0.01#	0.30±0.01#	0.45±0.02#	0.32±0.01#	0.33±0.01#
健步汤-M组	0.40±0.03#	0.41±0.02#	0.51±0.02#	0.38±0.03#	0.41±0.05#
健步汤-H组	0.57±0.02#△	0.59±0.04#△	0.76±0.03#△	0.59±0.04#△	0.63±0.04#△

注: 与空白组比较, *P<0.05; 与模型组比较, #P<0.05; 与健步汤-L组比较, △P<0.05。

制^[18], 骨形成不足。

PI3K/Akt是调节细胞周期的重要细胞内信号通路, 与骨质疏松症密切相关, 激活其通路可减轻骨微结构恶化, 促进成骨细胞分化并抑制其凋亡, 这与血管生成增加有关^[19]。细胞凋亡作为细胞程序性死亡的一种重要方式, 在维持机体正常生理功能和组织内环境稳定中起着关键作用^[20]。因此, 本研究通过体内外实验探讨健步汤是否通过调控PI3K/Akt信号通路抑制成骨细胞凋亡, 从而发挥改善OP的作用。

动物实验显示, 健步汤能增加OP模型大鼠骨密度、骨体积分数和骨小梁数量, 升高骨形成标志物血清PINP水平, 降低骨吸收标志物CTX-1水平。炎症反应作为OP病理机制之一, 可通过多种途径影响骨代谢, 进而增加发病风险。TNF-α和IL-6能促进破骨细胞前体细胞分化为成熟的破骨细胞, 促进骨吸收^[21]。本研究发现, OP大鼠血清TNF-α、IL-6水平升高, 而健步汤能降低两者水平, 减轻炎症反应对骨组织的损害, 并能降低股骨组织细胞凋亡率。PTEN作为PI3K/Akt通路的负

调控因子, 其表达下调可激活该通路, 进而改善OP模型大鼠骨质疏松。

细胞实验显示, 模型组MC3T3-E1细胞增殖活性降低, 凋亡率升高, 而健步汤含药血清组增殖活性升高, 凋亡率降低, 表明地塞米松能抑制MC3T3-E1细胞增殖活性, 促进细胞凋亡, 减少骨形成。另外, 健步汤能激活PI3K/Akt信号通路, 增加PI3K、Akt蛋白磷酸化水平, 升高抗凋亡蛋白Bcl-2表达, 降低促凋亡蛋白Bax表达, 并且上调PI3K、Akt、BGP、Runx2、COL1a1 mRNA表达, 可能通过激活PI3K/Akt信号通路抑制成骨细胞凋亡, 并促进骨基质的合成, 调节骨代谢的平衡。

综上所述, 健步汤可能通过调控PI3K/Akt信号通路, 从而促进MC3T3-E1细胞增殖, 减少细胞凋亡, 加速骨基质合成和分泌, 增加骨骼强度和力学性能。本实验为健步汤临床应用提供了理论基础, 也为治疗OP提供了新靶点和新思路。

参考文献:

- [1] He Y, Liu T, Peng X, et al. Molecular mechanism of mitochondrial autophagy mediating impaired energy metabolism leading to osteoporosis [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2025, 1871(3): 167685.
- [2] Ensrud K E, Crandall C J. Osteoporosis [J]. *Ann Intern Med*, 2024, 177(1): ITC1-ITC16.
- [3] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 原发性骨质疏松症诊疗指南 (2022) [J]. 中国全科医学, 2023, 26(14): 1671-1691.
- [4] Hu Y, Xu H, Ji W, et al. Prevalence of frailty in senile osteoporosis: a systematic review and meta-analysis [J]. *Arch Gerontol Geriatr*, 2025, 130: 105718.
- [5] Zhang J Y, Zhong Y H, Chen L M, et al. Recent advance of small-molecule drugs for clinical treatment of osteoporosis: a review [J]. *Eur J Med Chem*, 2023, 259: 115654.
- [6] Zheng X Q, Huang J, Lin J L, et al. Pathophysiological mechanism of acute bone loss after fracture [J]. *J Adv Res*, 2023, 49: 63-80.
- [7] Yuan F, Peng W, Yang C, et al. Teriparatide versus bisphosphonates for treatment of postmenopausal osteoporosis: a meta-analysis [J]. *Int J Surg*, 2019, 66: 1-11.
- [8] Cappuzzo K A, Delafuente J C. Teriparatide for severe osteoporosis [J]. *Ann Pharmacother*, 2004, 38(2): 294-302.
- [9] 卜寒梅, 王世坤, 李远栋, 等. 补肾中药基于OPG/RANKL/RANK信号通路对原发性骨质疏松症作用机制的研究进展 [J]. 中草药, 2022, 53(10): 3209-3217.
- [10] 冯帅华, 肖文仲, 王国峰, 等. 健步汤对去势大鼠骨质疏松症模型骨密度及血清TNF- α 、IL-6、IL-1表达的影响 [J]. 中医药导报, 2021, 27(4): 23-26; 30.
- [11] Zhang Y, Cao X, Li P, et al. PSMC6 promotes osteoblast apoptosis through inhibiting PI3K/Akt signaling pathway activation in ovariectomy-induced osteoporosis mouse model [J]. *J Cell Physiol*, 2020, 235(7-8): 5511-5524.
- [12] 李仪奎. 中药药理实验方法学 [M]. 上海: 上海科学技术出版社, 2006.
- [13] Li S, Cui Y, 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.
- [14] Xiao P L, Cui A Y, Hsu C J, et al. Global, regional prevalence, and risk factors of osteoporosis according to the World Health Organization diagnostic criteria: a systematic review and meta-analysis [J]. *Osteoporos Int*, 2022, 33(10): 2137-2153.
- [15] Zhang L, Zheng Y L, Wang R, et al. Exercise for osteoporosis: a literature review of pathology and mechanism [J]. *Front Immunol*, 2022, 13: 1005665.
- [16] Noh J Y, Yang Y, Jung H. Molecular mechanisms and emerging therapeutics for osteoporosis [J]. *Int J Mol Sci*, 2020, 21(20): 7623.
- [17] Da W, Tao L, Zhu Y. The role of osteoclast energy metabolism in the occurrence and development of osteoporosis [J]. *Front Endocrinol (Lausanne)*, 2021, 12: 675385.
- [18] Iantomasi T, Romagnoli C, Palmi G, et al. Oxidative stress and inflammation in osteoporosis: molecular mechanisms involved and the relationship with microRNAs [J]. *Int J Mol Sci*, 2023, 24(4): 3772.
- [19] Abdurahman A, Li X, Li J, et al. Loading-driven PI3K/Akt signaling and erythropoiesis enhanced angiogenesis and osteogenesis in a postmenopausal osteoporosis mouse model [J]. *Bone*, 2022, 157: 116346.
- [20] Xia Y, Ge G, Xiao H, et al. REPIN1 regulates iron metabolism and osteoblast apoptosis in osteoporosis [J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(9): 631.
- [21] 姚娜, 李鹏程, 耿春梅, 等. TNF- α 介导绝经后骨质疏松症发病机制的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(3): 454-458.