

## • 实验研究 •

## 补肾活血方调节自噬促进绝经后骨质疏松症骨组织 H 型血管及骨形成的实验研究

胡劲涛<sup>1△</sup> 阮立奇<sup>1</sup> 钱剑胜<sup>2</sup> 王振威<sup>2</sup> 倪月明<sup>2</sup> 胡淼锋<sup>3</sup>

**[摘要]** 目的:探索补肾活血方调节自噬对去势骨质疏松小鼠 H 型血管及骨形成的作用。方法:将 C57BL/6J 雌鼠随机分为假手术组、骨质疏松组和补肾活血方组,补肾活血方组在去势骨质疏松造模成功后以补肾活血方灌胃,假手术组及骨质疏松组以等量生理盐水灌胃,1 次/d,连续给药 8 周。采用 Micro-CT 检测骨组织形态,免疫荧光检测 EMCN、CD31 共表达情况,免疫组化检测骨组织 LC3 和 P62 表达水平,荧光定量 PCR 检测骨组织内 RUNX2、COL1A1、LC3 及 P62 基因表达水平,Western Blot 法检测骨组织内 RUNX2、COL1A1、LC3 及 P62 蛋白表达水平。结果:与假手术组相比,骨质疏松组骨组织 BV/TV、Tb. N、Tb. Th 明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.001$ );EMCN 和 CD31 共表达面积减少,差异有统计学意义( $P < 0.001$ );LC3 阳性表达减少,而 P62 阳性表达增加,RUNX2、COL1A1 和 LC3 基因及蛋白表达水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.001$ );而 P62 基因及蛋白表达水平增高,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。与骨质疏松组相比,补肾活血方组骨组织 BV/TV、Tb. N、Tb. Th 升高,差异有统计学意义( $P < 0.001$ );EMCN 和 CD31 共表达面积增加,差异有统计学意义( $P < 0.001$ );LC3 阳性表达增加,而 P62 阳性表达减少,RUNX2、COL1A1 和 LC3 基因及蛋白表达水平增高,差异有统计学意义( $P < 0.001$ );而 P62 基因及蛋白表达水平降低,差异有统计学意义( $P < 0.001$ )。结论:补肾活血方能够提高绝经后骨质疏松小鼠骨组织内自噬水平,增加骨组织内 H 型血管形成,促进骨组织的形成,起到治疗绝经后骨质疏松的作用。

**[关键词]** 绝经后骨质疏松;补肾活血方;自噬;H 型血管;骨形成

**[中图分类号]** R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2025)08-0018-06

**DOI:** 10.20085/j.cnki.issn1005-0205.250804

## Experimental Study on Bushen Huoxue Formula Modulating Autophagy to Regulate Type H Vessels and Bone Formation in Postmenopausal Osteoporosis

HU Jintao<sup>1△</sup> RUAN Liqi<sup>1</sup> QIAN Jiansheng<sup>2</sup> WANG Zhenwei<sup>2</sup> NI Yueming<sup>2</sup> HU Miaofeng<sup>3</sup>

<sup>1</sup> Hangzhou Traditional Chinese Medicine Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310007, China;

<sup>2</sup> Jiangnan Hospital Affiliated to Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 311201, China;

<sup>3</sup> Hangzhou Fuyang Hospital of Traditional Chinese Medicine Orthopedics and Traumatology, Hangzhou 311400, China.

**Abstract Objective:** To investigate the effects of Bushen Huoxue formula on type H vessels and bone formation through autophagy modulation in ovariectomized osteoporotic mice. **Methods:** C57BL/6J female mice were randomly divided into

sham operation group, osteoporosis group, and Bushen Huoxue formula group. After successful modeling of ovariectomy induced osteoporosis, the Bushen Huoxue formula group received oral gavage with Bushen Huoxue formula. The sham operation group and osteoporosis group received oral gavage with an equal volume of physiological saline. Administer once a day for 8 consecutive weeks. Micro-CT was used to detect bone tissue morphology. Immunofluorescence was used to detect the co-expression of EMCN and CD31. Immu-

基金项目:浙江省中医药科技计划项目(2022ZB232,2024ZR119)

杭州市医药卫生科技项目(A20220507,20220919Y045)

浙江省医药卫生科技计划项目(2023RC068)

<sup>1</sup> 浙江中医药大学附属杭州市中医院(杭州,310007)

<sup>2</sup> 浙江中医药大学附属江南医院

<sup>3</sup> 杭州市富阳中医骨伤医院

△通信作者 E-mail:hujintao0714@163.com

nohistochemistry was used to detect the expression levels of LC3 and P62 in bone tissue. Fluorescence quantitative PCR was used to detect the expression levels of RUNX2, COL1A1, LC3 and P62 genes in bone tissue. Western Blot was used to detect the protein expression levels of RUNX2, COL1A1, LC3 and P62 in bone tissue. **Results:** Compared with sham operation group, the bone tissue BV/TV, Tb. N, Tb. Th in the osteoporosis group were significantly reduced ( $P < 0.001$ ), the number of osteoclasts was increased ( $P < 0.001$ ), the co-expression area of EMCN and CD31 was reduced ( $P < 0.001$ ), the positive expression of LC3 was reduced, and the positive expression of P62 was increased. The expression levels of RUNX2, COL1A1, LC3 genes and proteins were reduced ( $P < 0.001$ ), while the expression levels of P62 genes and proteins were increased ( $P < 0.001$ ). Compared with osteoporosis group, the bone tissue BV/TV, Tb. N, Tb. Th in the Bushen Huoxue formula group increased ( $P < 0.001$ ), the co-expression area of EMCN and CD31 increased ( $P < 0.001$ ), the positive expression of LC3 increased, while the positive expression of P62 decreased. The expression levels of RUNX2, COL1A1, LC3 genes and proteins increased ( $P < 0.001$ ), while the expression levels of P62 genes and proteins decreased ( $P < 0.001$ ). **Conclusion:** The Bushen Huoxue formula can ameliorate postmenopausal osteoporosis through upregulating autophagy activity in bone tissue, promoting angiogenesis of type H vessels, and enhancing osteogenic formation.

**Keywords:** postmenopausal osteoporosis; Bushen Huoxue formula; autophagy; type H vessels; bone formation

骨内血管的形成与骨形成密切相关, H 型血管是骨组织内一种特殊毛细血管, 对骨的形成具有重要意义, 而自噬是细胞维持稳态的重要过程, 在血管和骨的形成中具有重要作用<sup>[1-3]</sup>。五脏理论中肾主骨生髓, 中医认为肾与骨的关系最为密切, 肾虚则骨失所养, 而肾虚日久易致血瘀, 肾虚血瘀证是骨质疏松症患者中常见的中医证候, 补肾活血法是治疗骨质疏松症的重要治则之一<sup>[4]</sup>。在动物和临床研究中, 补肾活血中药均被证实能够促进骨形成、起到治疗骨质疏松的作用<sup>[5-6]</sup>, 且多项研究显示补肾活血中药可以增加自噬水平、起到治疗疾病的作用<sup>[7-8]</sup>, 但补肾活血中药是否能够调节绝经后骨质疏松 (PMOP) 骨组织内自噬水平, 起到促进 H 型血管及骨形成作用尚不明确。为此, 本研究通过建立绝经后骨质疏松小鼠模型, 应用补肾活血方干预, 以观察其对绝经后骨质疏松骨组织内自噬、H 型血管及骨形成的影响, 现报告如下。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验动物及分组

选取 27 只 6 周龄非特定病原体 (SPF) 级 C57BL/6J 雌鼠, 由上海 BK 公司提供, 体重为 20~25 g。饲养条件为室温 (24±2)℃、湿度 40%~60%、12 h 昼夜交替照明的环境下。适应性饲养 1 周后按随机数字表法分为假手术组 (8 只) 和去势组 (19 只)。去势组小鼠在接受卵巢去势手术后继续饲养 12 周 (期间无小鼠死亡), 抽取其中 3 只小鼠确认骨质疏松造模成功后, 剩余 16 只小鼠依据随机数字表法进一步分为骨质疏松组 (8 只) 和补肾活血方组 (8 只)。本研究得到浙江中医药大学动物实验研究中心伦理委员会批准 (202111-0754)。

### 1.2 实验试剂

抗石磷酸酸性磷酸酶 (TRAP) 染色液 (金克隆生

物, RS2890), 苏木精染液 (Servicebio, G1004), 兔抗 EMCN (proteintech, 11828-1-AP), 兔抗 CD31 (CST, 77699), 兔抗 RUNX2 (CST, 12556), 兔抗 COL1A1 (CST, 72026), 兔抗 c-Fos (CST, 2250), 兔抗 LC3 (CST, 12741), 兔抗 P62 (CST, 23214), DAPI 染色试剂 (CST, 4083S)。

### 1.3 主要药物

补肾活血方由熟地黄、炒山药、山茱萸、枸杞、制附子、肉桂、炙甘草、杜仲、桃仁、红花组成, 上述药物饮片按 4:2:1:2:3:1:1:2:2:1 的比例进行水煎提取并浓缩成含生药量为 1 g/mL, 中药饮片由浙江中医药大学附属杭州市中医院中药房提供。

### 1.4 动物造模

去势造模: 小鼠以舒泰 (盐酸替来他明盐酸唑拉西泮) 80 mg/kg 腹腔注射及阿托品 0.04 mg/kg 肌注, 麻醉完成后小鼠取仰卧位, 剪去腹部手术操作部位毛发, 以 75% 酒精消毒 3 遍, 铺无菌手术洞巾, 取腹部正中切口长约 1.5 cm, 依次切开皮肤及皮下组织, 沿腹直线切开暴露腹腔, 寻找到双侧卵巢后摘除, 冲洗伤口并缝合。假手术造模: 麻醉及进入腹腔操作同去势造模, 找到卵巢后仅去除卵巢周围的等量脂肪组织。

### 1.5 干预方式

补肾活血方组: 以补肾活血方水煎液灌胃, 小鼠的含生药剂量通过人和动物体表面积折算的等效剂量比率表中人-小鼠等效剂量比值进行计算, 算得小鼠含生药剂量为 8.03 g/kg, 每只小鼠灌胃量约为 0.16~0.20 mL, 1 次/d。假手术组及骨质疏松组: 以等量生理盐水灌胃, 1 次/d。所有小鼠在干预 8 周后以 CO<sub>2</sub> 安乐死方式处死, 收集骨组织标本。

### 1.6 指标检测

1.6.1 骨组织形态学检测 采用 Micro-CT 检测, 小

鼠处死后收集骨组织,去除周围软组织,应用 Bruker Skyscan1272 三维 X 线显微成像系统,按电流 140  $\mu$ A、电压 70 kV、扫描厚度 12  $\mu$ m 对胫骨近端进行扫描,分析胫骨骨体积百分比(BV/TV)、骨小梁数量(Tb. N)和骨小梁厚度(Tb. Th)等骨组织形态。

**1.6.2 免疫荧光检测** 骨组织石蜡切片脱蜡后进行抗原修复、封闭,然后以合适比例的一抗 EMCN (1:200)和 CD31(1:200)4  $^{\circ}$ C 下孵育过夜,次日切片清洗后应用相应二抗进行孵育,应用荧光显微镜采集图片,采用 Image J 软件对骨组织中 EMCN 及 CD31 共表达面积比例进行分析。

**1.6.3 免疫组化检测** 骨组织切片进行脱蜡、抗原修

复,然后采用 3% 双氧水阻断内源性过氧化物酶,以 3% BSA 封闭 30 min,加入一抗 LC3(1:200)及 P62 (1:200)4  $^{\circ}$ C 下孵育过夜,第 2 天加入 HRP 标记的二抗孵育,以 DAB 显色。显微镜下观察免疫组化阳性表达情况,采用 Image J 软件进行分析。

**1.6.4 荧光定量聚合酶链式反应(PCR)** 将骨组织以液氮研磨成粉末状后用 Trizol 法提取总 RNA,将 RNA 反转录为 cDNA 后采用 SYBR Green qPCR Master Mix 试剂盒根据说明书配制成相应比例反应液,采用 480 II 荧光定量 PCR 仪检测 RUNX2、COL1A1、LC3、P62 及 GAPDH,以 GAPDH 作为内参基因,根据  $2^{-\Delta\Delta Ct}$  值进行计算,引物序列见表 1。

表 1 引物序列

基因	正向(5'-3')	反向(5'-3')	长度/bp
LC3	CTCCACACCCATCGCTGACA	TCCTCTTGACTCAGAAGCCGAAG	104
P62	CCAGAATTCTCTGCTGACAACCC	TGCCACCTTTCACTCACTATGGAC	125
RUNX2	AACTTGCTAACGTGAATGGTC	AGCCCACTGAAGAACTTGGT	155
COL1A1	CCTTTGACCAACTGAACGTGA	CAGCATTAGGGTATCATAAGCCA	178
GAPDH	TGCGACTTCAACAGCAACTCC	CACCCTGTTGCTGTAGCCGTA	123

**1.6.5 Western Blot 法检测** 将骨组织以液氮研磨成粉末状后加入蛋白裂解液获取样品蛋白。将样品蛋白加入凝胶孔以 70 V 恒电压电泳,电泳完成后,将夹板海绵、滤纸、凝胶、PVDF 膜制作成三明治式夹层,以 210 mA 恒电流进行转膜。转膜完成后,取出 PVDF 膜以 5% 脱脂牛奶室温摇床封闭 2 h,然后以稀释的一抗(稀释比例为 RUNX2,1:1 000;COL1A1,1:1 000;LC3,1:1 000;P62,1:1 000),4  $^{\circ}$ C 下孵育过夜;次日上午去除一抗,以 PBST 清洗后加入含二抗孵育液,加入 ECL 显影液以 Tanon-5200 全自动化学发光图像分析系统显影。

**1.7 统计学方法**

采用 SPSS23.0 统计学软件进行数据分析,实验数据以  $\bar{x} \pm s$  形式表示,采用单因素方差分析,组间两两比较采用 LSD-*t* 检验, $P < 0.05$  差异有统计学意义。

## 2 结果

**2.1 补肾活血方对去势骨质疏松小鼠骨组织形态学的影响**

Micro-CT 图像表明,补肾活血方组小鼠胫骨干骺端骨量高于骨质疏松组(见图 1)。定量分析结果:与假手术组相比,骨质疏松组小鼠骨组织 BV/TV、Tb. N、Tb. Th 明显降低,差异有统计学意义( $P < 0.001$ );与骨质疏松组相比,补肾活血方组小鼠 BV/TV、Tb. N、Tb. Th 升高,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),见表 2。

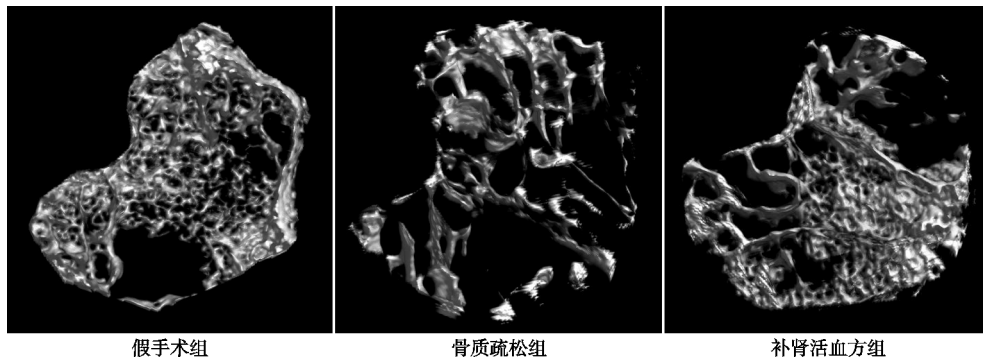


图 1 三组小鼠胫骨 Micro-CT 图像

**2.2 补肾活血方促进去势骨质疏松小鼠骨组织内 H 型血管的形成**

EMCN 和 CD31 为 H 型血管标志物,能够反映骨组织内 H 型血管的形成<sup>[9]</sup>。骨质疏松组小鼠骨组织

EMCN 和 CD31 共表达面积较假手术组明显减少,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),而补肾活血方组小鼠骨组织 EMCN 和 CD31 共表达面积比骨质疏松组有增加,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),见图 2 及表 3。

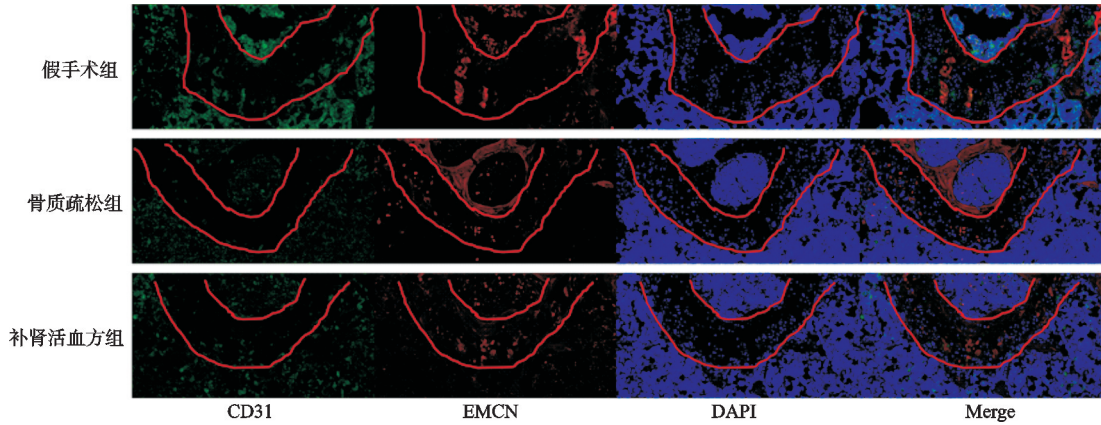


图 2 三组小鼠骨组织干骺端免疫荧光检测 EMCN 和 CD31 阳性表达情况(×200)

表 2 三组小鼠胫骨骨组织 BV/TV、Tb. N 及 Tb. Th 的比较 (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	(BV/TV)/%	Tb. N/mm <sup>-1</sup>	Tb. Th/mm
假手术组	17.0±1.0	4.0±0.2	0.043±0.004
骨质疏松组	8.4±1.0	2.1±0.4	0.021±0.005
补肾活血方组	13.7±1.2	3.2±0.3	0.035±0.004
F	128.208	61.895	53.592
P	<0.001	<0.001	<0.001

表 3 三组小鼠骨组织 EMCN 和 CD31 共表达面积比例的比较 (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	共表达面积/%
假手术组	9.1±1.7
骨质疏松组	2.5±1.1
补肾活血方组	7.7±0.8
F	62.189
P	<0.001

### 2.3 免疫组化检测补肾活血方对去势骨质疏松小鼠骨组织 LC3 及 P62 蛋白表达的影响

骨质疏松组小鼠胫骨骨组织 LC3 阳性表达少于假手术组, P62 阳性表达多于假手术组; 补肾活血方组小鼠 LC3 阳性表达多于骨质疏松组, P62 阳性表达少于骨质疏松组, 见图 3 和图 4。

### 2.4 补肾活血方对去势骨质疏松小鼠骨组织 RUNX2、COL1A1、LC3 及 P62 基因表达的影响

假手术组和补肾活血方组小鼠骨组织内 RUNX2、COL1A1 及 LC3 基因表达水平高于骨质疏松组, 差异有统计学意义 (P<0.001), 而假手术组和补肾活血方组小鼠 P62 基因表达水平低于骨质疏松组, 差异有统计学意义 (P<0.001), 见表 4。

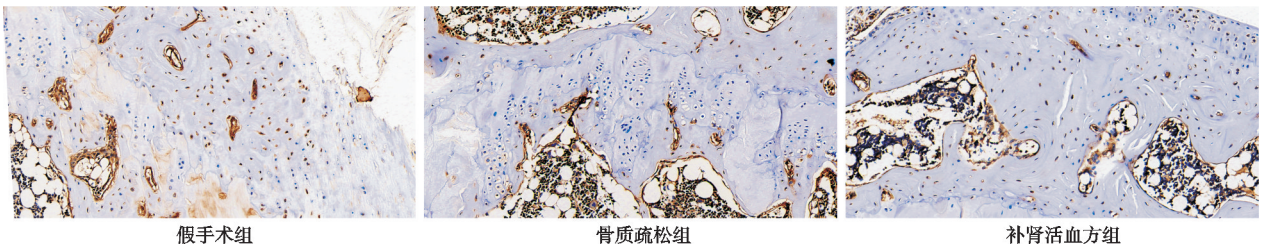


图 3 三组小鼠骨组织 LC3 免疫组化染色结果(×200)

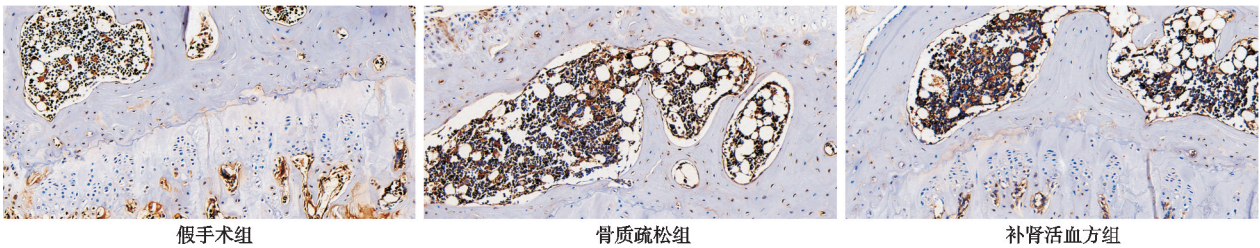


图 4 三组小鼠骨组织 P62 免疫组化染色结果(×200)

表 4 三组小鼠骨组织中 RUNX2、COL1A1、LC3 及 P62 基因表达水平 (n=8,  $\bar{x} \pm s$ )

组别	RUNX2	COL1A1	LC3	P62
假手术组	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00	1.00±0.00
骨质疏松组	0.64±0.11	0.59±0.06	0.64±0.08	1.42±0.19
补肾活血方组	0.84±0.09	0.80±0.04	1.33±0.16	0.91±0.04
F	38.041	168.726	60.667	47.072
P	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

## 2.5 Western Blot 法检测补肾活血方对去势骨质疏松小鼠骨组织 RUNX2、COL1A1、LC3 及 P62 蛋白表达的影响

假手术组和补肾活血方组小鼠骨组织内 RUNX2、COL1A1 及 LC3 蛋白表达水平高于骨质疏松组,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ),而假手术组及补肾活血方组小鼠 P62 蛋白表达水平低于骨质疏松组,差异有统计学意义( $P < 0.001$ ,见图 5 及表 5)。

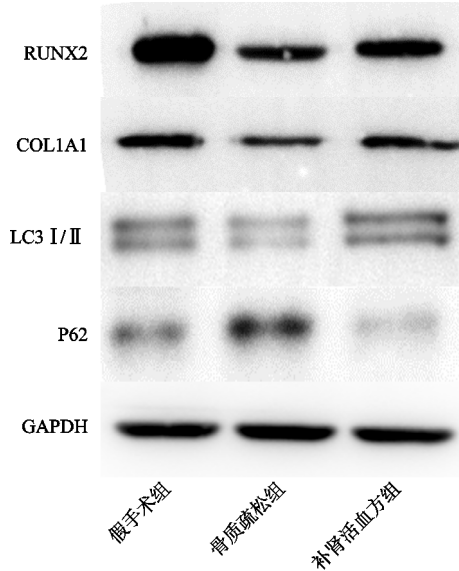


图 5 三组小鼠 RUNX2、COL1A1、LC3 及 P62 蛋白表达情况

表 5 三组小鼠骨组织中 RUNX2、COL1A1、LC3 及 P62 蛋白表达水平( $n=8, \bar{x} \pm s$ )

组别	RUNX2	COL1A1	LC3	P62
假手术组	1.84 ± 0.20	1.31 ± 0.20	0.63 ± 0.05	0.27 ± 0.04
骨质疏松组	0.81 ± 0.10	0.58 ± 0.11	0.27 ± 0.05	0.95 ± 0.11
补肾活血方组	1.38 ± 0.20	1.03 ± 0.17	0.79 ± 0.11	0.18 ± 0.03
<i>F</i>	71.119	41.881	101.160	302.756
<i>P</i>	<0.001	<0.001	<0.001	<0.001

用,共奏补肾健骨、活血祛瘀之功,切中本病之病机<sup>[14]</sup>。既往多项研究显示,补肾活血类中药能够促进骨髓间充质干细胞(BMSCs)的成骨分化,提高去势骨质疏松模型鼠骨密度和骨小梁数量,起到治疗绝经后骨质疏松的作用<sup>[15-16]</sup>。本研究结果与其相似,结果显示补肾活血方干预后的小鼠成骨指标增加,骨组织中骨量有明显提升,表明补肾活血方能促进去势骨质疏松小鼠骨形成。

近些年研究发现一种高表达 CD31 和 Endomucin (EMCN)的血管与骨形成之间存在密切联系,这种亚型的血管被命名为 H 型血管<sup>[17-18]</sup>。H 型血管主要位于骨的干骺端,为骨组织形成了一个特殊的微环境,有利于骨的形成,减少骨丢失<sup>[19-21]</sup>。研究发现骨质疏松患者骨组织中 H 型血管数量显著减少<sup>[22]</sup>。同样,本研究去势骨质疏松小鼠胫骨干骺端 H 型血管的数量较假手术组小鼠明显减少;而补肾活血方干预后的小鼠胫骨

## 3 讨论

骨质疏松症已成为仅次于心脑血管疾病的第二大慢性疾病,骨质疏松性骨折的发生是导致老年人残疾和死亡的临床常见骨科疾病,由于骨质疏松疾病静默性的特点,相当多的患者忽视了该疾病的危害<sup>[10]</sup>。目前西医对骨质疏松症的治疗主要是针对性地抑制破骨细胞或促进成骨细胞的单靶向性药物,尽管其能提高骨密度,降低骨折的发生率,但长期服用存在发生骨坏死、非特异性骨折、心脑血管疾病等副作用<sup>[11-13]</sup>。中药治疗具有多靶点、副作用小等优势,治疗绝经后骨质疏松也表现出可靠的疗效。

中医理论认为“肾主骨,生髓”,肾精气的充沛是骨骼生长和功能正常发挥的关键。女性绝经后肾精日渐亏耗,髓无所生,骨失濡养而致痿;同时,肾精亏虚致使气血生化乏源,气血运行无力,日久瘀阻脉络,可以看出肾虚血瘀是绝经后骨质疏松发病的主要病因病机,故治疗原则应以补肾活血为核心。本研究所用补肾活血方主要由补肾类、活血类中药组成,其中熟地滋肾填精,重用为君;山药健脾固肾益精,山茱萸补肝肾、涩精气,协同熟地增强补肾填精的效果,桃仁、红花活血祛瘀、通经止痛,四药共为臣药;枸杞补肾益精,杜仲强肾壮骨,肉桂温肾助阳,使阴得阳升而泉源不绝,为使药;炙甘草益气健脾、调和诸药,功兼佐使。该方诸药合

干骺端 H 型血管形成的数量较去势骨质疏松小鼠有明显增加,与骨量的增加正相关,表明补肾活血方促进去势骨质疏松小鼠 H 型血管及骨的形成。

自噬是一个复杂且动态的降解过程,能清除细胞内受损或功能缺失的器官及蛋白,并将其转化为能量以供再利用,对于维持细胞的稳态具有重要的意义<sup>[23]</sup>。自噬在骨质疏松的发生发展过程中具有重要的作用,骨质疏松骨组织中自噬水平有不同程度的降低<sup>[24]</sup>。本研究结果显示去势骨质疏松小鼠骨组织内 LC3 蛋白及基因表达降低,而 P62 蛋白及基因表达增加,提示去势骨质疏松小鼠自噬水平减弱;补肾活血方干预小鼠的骨组织内 LC3 蛋白及基因的表达相比去势骨质疏松小鼠明显增加,而 P62 蛋白及基因水平低于去势骨质疏松小鼠,这提示补肾活血方能提高去势骨质疏松小鼠骨组织内自噬水平。既往研究发现自噬水平的增高能提高骨质疏松模型小鼠骨髓间充质干细

胞的成骨能力,抑制其成脂分化<sup>[25-26]</sup>,而 Li 等<sup>[27]</sup>研究显示自噬能够促进组织内血管的形成。本研究结果提示,补肾活血方不仅可以提高去势骨质疏松小鼠骨组织内的自噬水平,还能促进 H 型血管的形成,从而发挥治疗绝经后骨质疏松症的效果。

综上所述,补肾活血方能够提高绝经后骨质疏松小鼠骨组织内自噬水平,增加骨组织内 H 型血管形成,促进骨组织的形成,起到治疗绝经后骨质疏松的作用。

### 参考文献

- [1] LIU Y, ZHU S, LIU J, et al. Vitexin regulates angiogenesis and osteogenesis in ovariectomy-induced osteoporosis of rats via the VDR/PI3K/AKT/eNOS signaling pathway [J]. *J Agric Food Chem*, 2023, 71(1): 546-556.
- [2] 刘康, 周航, 惠明大, 等. 酪蛋白激酶-2 相互作用蛋白-1 介导的自噬通路及骨质疏松症的关系探讨[J]. *中医正骨*, 2022, 34(6): 57-61.
- [3] SUN H, XU J, WANG Y, et al. Bone microenvironment regulative hydrogels with ROS scavenging and prolonged oxygen-generating for enhancing bone repair[J]. *Bioact Mater*, 2023, 24: 477-496.
- [4] 何才剑, 万全增, 陈天鹏, 等. 益气温经方在绝经后骨质疏松症肾虚血瘀证治疗中的应用[J]. *中医正骨*, 2021, 33(8): 7-11.
- [5] 熊浪, 唐芳, 马武开, 等. 补肾活血法治疗骨质疏松症对骨密度、骨代谢疗效的 Meta 分析[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2024, 30(7): 1013-1020.
- [6] 蒋佳豪, 彭兴宁, 吴官保, 等. 基于 Klotho、PI3K、Akt 蛋白表达水平探讨补肾活血汤对绝经后骨质疏松大鼠骨骼、血管及肾脏功能的影响[J]. *湖南中医药大学学报*, 2024, 44(1): 9-15.
- [7] 冯晓玲, 任佳杰, 赵小莹, 等. 不明原因复发性流产患者分泌晚期外周血中自噬水平对蜕膜化调控作用及补肾活血方干预机制[J]. *中华中医药学刊*, 2023, 41(2): 1-4.
- [8] 张梦娴, 周颖东, 王青玲, 等. 补肾活血方通过 PI3K/AKT/mTOR 信号通路对衰老小鼠听功能的保护作用[J]. *中国老年学杂志*, 2024, 44(24): 6008-6014.
- [9] WANG L, ZHOU F, ZHANG P, et al. Human type H vessels are a sensitive biomarker of bone mass[J]. *Cell Death Dis*, 2017, 8(5): e2760.
- [10] 沈腊梅, 韦晓淋, 徐又佳, 等. 苏州市 50 岁以上女性骨质疏松症流行现状及影响因素分析[J]. *中国慢性病预防与控制*, 2024, 32(4): 295-298.
- [11] BLACK D M, GEIGER E J, EASTELL R, et al. Atypical femur fracture risk versus fragility fracture prevention with bisphosphonates[J]. *The New England Journal of Medicine*, 2020, 383(8): 743-753.
- [12] BONE H G, WAGMAN R B, BRANDI M L, et al. 10 years of denosumab treatment in postmenopausal women with osteoporosis: results from the phase 3 randomised FREEDOM trial and open-label extension[J]. *The Lancet Diabetes & Endocrinology*, 2017, 5(7): 513-523.
- [13] FUGGLE N R, COOPER C, HARVEY N C, et al. Assessment of cardiovascular safety of anti-osteoporosis drugs[J]. *Drugs*, 2020, 80(15): 1537-1552.
- [14] 胡劲涛, 许超, 单乐天, 等. 补肾活血方对兔胫骨截骨延长骨组织形态及骨密度的影响[J]. *中国现代应用药学*, 2017, 34(3): 332-336.
- [15] 许旻鸣, 楼红侃, 高麟超, 等. 补肾活血方促进骨髓间充质干细胞的成骨及其防治大鼠骨质疏松症机制研究[J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42(9): 144-150.
- [16] 章胜权, 王煦程, 叶福生, 等. 从脂代谢角度探讨补肾活血方治疗绝经后骨质疏松症的作用机制[J]. *中医正骨*, 2022, 34(7): 1-5.
- [17] PENG Y, WU S, LI Y, CRANE J L. Type H blood vessels in bone modeling and remodeling[J]. *Theranostics*, 2020, 10(1): 426-436.
- [18] CHEN Y, YIN Y, LUO M, et al. Occlusal force maintains alveolar bone homeostasis via type H angiogenesis[J]. *J Dent Res*, 2023, 102(12): 1356-1365.
- [19] FU R, LV W C, XU Y, et al. Endothelial ZEB1 promotes angiogenesis-dependent bone formation and reverses osteoporosis[J]. *Nature Communications*, 2020, 11(1): 460.
- [20] RAMASAMY S K, KUSUMBE A P, SCHILLER M, et al. Blood flow controls bone vascular function and osteogenesis[J]. *Nature Communications*, 2016, 7: 13601.
- [21] HUANG J, YIN H, RAO S S, et al. Harmine enhances type H vessel formation and prevents bone loss in ovariectomized mice[J]. *Theranostics*, 2018, 8(9): 2435-2446.
- [22] 王亮, 张鹏, 姚喆, 等. 骨组织 H 亚型血管在骨质疏松与非骨质疏松骨折患者中的表现[J]. *中华骨科杂志*, 2016, 36(20): 1327-1334.
- [23] LIU S, YAO S, YANG H, et al. Autophagy: regulator of cell death[J]. *Cell Death Dis*, 2023, 14(10): 648.
- [24] YOSHIDA G, KAWABATA T, TAKAMATSU H, et al. Degradation of the NOTCH intracellular domain by elevated autophagy in osteoblasts promotes osteoblast differentiation and alleviates osteoporosis[J]. *Autophagy*, 2022, 18(10): 2323-2332.
- [25] GONG Y, LI Z, ZOU S, et al. Vangl2 limits chaperone-mediated autophagy to balance osteogenic differentiation in mesenchymal stem cells[J]. *Developmental Cell*, 2021, 56(14): 2103-2120.
- [26] LIANG B, CHEN X, LI M, et al. Liuwei Dihuang pills attenuate ovariectomy-induced bone loss by alleviating bone marrow mesenchymal stem cell (BMSC) senescence via the Yes-associated protein (YAP)-autophagy axis[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2024, 62(1): 42-52.
- [27] LI Z, WU M, LIU S, et al. Apoptotic vesicles activate autophagy in recipient cells to induce angiogenesis and dental pulp regeneration[J]. *Mol Ther*, 2022, 30(10): 3193-3208.

(收稿日期: 2025-03-09)