

补骨生髓方通过促进血管生成改善斑马鱼血管损伤的机制研究

李琰¹ 郝二伟² 刘宁¹ 夏中尚² 潘祥龙² 朱立国^{1△} 魏戌^{1△}

[摘要] 目的:评估补骨生髓方对正常斑马鱼和 VEGFR 抑制剂诱导下的斑马鱼血管损伤模型血管生成的影响,明确其作用机制是否与 HIF-1 α /VEGF 信号通路相关。方法:采用 *Tg(kdrl:EGFP)* 斑马鱼胚胎(12 hpf 起处理),E₂ 培养基条件下给予补骨生髓方(50,100,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$),分别于 48 hpf 观察节间血管(ISV)数量与管径,72 hpf 观察肠下血管(SIV)出芽数、交叉数与管径;以 PTK787 0.075~0.200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (12 hpf 起处理)培养斑马鱼胚胎至 48 hpf,通过评估完整节间血管与缺损节间血管数量,筛选血管损伤模型剂量。对斑马鱼节间血管损伤模型给予不同剂量的补骨生髓方水煎液(50,100,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$),观察节间血管生长情况,采用 qRT-PCR 检测血管生成相关基因(*kdrl*、*flt1*、*hif1aa*、*vegfaa*)表达。结果:补骨生髓方各剂量对正常斑马鱼节间血管数量、管径和肠下血管交叉数、出芽数及管径的影响,差异均无统计学意义($P>0.05$)。0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ PTK787 干预斑马鱼胚胎 36 h(12~48 hpf)显著降低节间血管指数,差异有统计学意义($P<0.05$),表明血管损伤模型成功建立。补骨生髓方 100 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组节间血管指数较模型组分别提升 184.63% 和 269.47%,差异有统计学意义($P<0.05$),且呈剂量依赖性;50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组无明显改善,差异无统计学意义($P>0.05$)。qRT-PCR 结果显示,模型组 *kdrl*、*flt1* mRNA 下调,*hif1aa*、*vegfaa* 上调,差异有统计学意义($P<0.05$);200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组补骨生髓方可逆转上述变化,使其趋于正常水平,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:补骨生髓方对正常斑马鱼血管生成无显著影响,但对 PTK787 诱导的血管损伤模型具有保护作用,促进血管生成,其机制可能与调控 HIF-1 α /VEGF 信号通路中 *hif1aa*、*vegfaa*、*kdrl*、*flt1* 基因的表达平衡有关。

[关键词] 补骨生髓方;斑马鱼;血管生成;骨质疏松;中医药;HIF-1 α /VEGF 信号通路;PTK787

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2026)01-0092-09

DOI: 10.20085/j.cnki.issn1005-0205.260113

Angiogenesis-Mediated Protective Mechanisms of Bugu Shengsui Decoction against Vascular Injury in Zebrafish

LI Yan¹ HAO Erwei² LIU Ning¹ XIA Zhongshang² PAN Xianglong² ZHU Liguo^{1△} WEI Xu^{1△}

¹ Wangjing Hospital of China Academy of Chinese Medical Sciences, Beijing 100102, China;

² Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530200, China.

Abstract Objective: This study aimed to investigate the effects of Bugu Shengsui decoction (BGSSD) on angiogenesis in normal zebrafish and in a VEGFR inhibitor-induced zebrafish model of vascular injury, and to elucidate whether its mechanism of action involves the HIF-1 α /VEGF signaling pathway. **Methods:** *Tg(kdrl:EGFP)* zebrafish embryos were treated

基金项目:国家自然科学基金区域创新发展联合基金重点支持项目(U23A20505)

国家自然科学基金面上项目(82374497)

¹ 中国中医科学院望京医院(北京,100102)

² 广西中医药大学

Δ 通信作者 E-mail:weixu.007@163.com(魏戌)

tcmspine@163.com(朱立国)

with BGSSD (50, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) in E₂ medium from 12 hours post-fertilization (hpf). Intersegmental vessels (ISVs) were assessed for number and diameter at 48 hpf, and subintestinal vessels (SIVs) were evaluated for sprout count, mean number of intersections, and diameter at 72 hpf. For modeling, embryos were treated with PTK787 at 0.075–0.200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ from 12 to 48 hpf; the vascular injury dose was selected by counting complete and defective ISVs. In the ISV injury model, embryos were administered BGSSD

(50, 100, and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$), ISV growth was examined, and the expression of vascular angiogenesis-related genes (*kdrl*, *flt1*, *hif1aa*, *vegfaa*) was measured by qRT-PCR. **Results:** In normal embryos, BGSSD did not significantly affect ISV number or diameter or SIV intersections, sprouts, or diameter ($P > 0.05$). PTK787 at 0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ for 36 h (12–48 hpf) significantly reduced the ISV vascular index ($P < 0.05$), confirming the establishment of the model. Compared with the model group, BGSSD at 100 and 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ increased the intersegmental vessel index by 184.63% and 269.47%, respectively ($P < 0.05$), in a dose-dependent manner, whereas 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ produced no significant improvement ($P > 0.05$). qRT-PCR showed down-regulation of *kdrl* and *flt1* and up-regulation of *hif1aa* and *vegfaa* in the model group ($P < 0.05$); BGSSD at 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ reversed these changes toward normal levels ($P < 0.05$). **Conclusion:** BGSSD had no significant effect on angiogenesis in normal zebrafish, but exerted a protective effect in the PTK787-induced vascular injury model by promoting angiogenesis. Its mechanism may be associated with maintaining the balanced expression of *hif1aa*, *vegfaa*, *kdrl* and *flt1* within the HIF-1 α /VEGF signaling pathway.

Keywords: Bugu Shengsui decoction; zebrafish; angiogenesis; osteoporosis; traditional Chinese medicine; HIF-1 α /VEGF signaling pathway; PTK787

血管生成(Angiogenesis)是指在已有血管基础上形成新血管的过程,由血管内皮细胞增殖、迁移、管腔形成等环节驱动,在组织供养、代谢稳态与损伤修复中具有关键作用^[1]。骨骼为高度血管化器官,骨内血管系统通过内皮源性信号与成骨破骨过程耦联,深度参与骨发育、骨稳态和骨重塑^[2]。研究显示衰老和雌激素缺乏导致的骨质疏松发病过程中血管生成受损,骨内血管尤其是具有促成骨潜能的H型血管显著减少,并伴随骨血流下降与骨髓炎性微环境改变,成骨能力下降,最终引起骨量丢失和力学性能衰退^[3]。可以说H型血管减少直接导致成骨细胞活性下降,是骨质疏松症的关键病理环节。因此,通过提升血管生成能力或有助于改善骨代谢,恢复骨微结构,这为骨质疏松症的治疗提供了新的干预靶点^[4]。补骨生髓方作为治疗骨质疏松症的经验处方,已在临床应用30余年,疗效确切^[5]。前期研究^[6-7]表明补骨生髓方能改善骨质疏松动物模型的骨微结构,缓解骨丢失,并提高小鼠骨组织中血管内皮生长因子(VEGF)蛋白表达,提示其可能具有促进血管生成的潜能,但未明确其对血管生成的直接作用及分子机制,且缺乏在体模型验证。为了进一步探究补骨生髓方是否具有促进血管生成的作用,本研究首次采用Tg(*kdrl*:EGFP)斑马鱼模型,系统评估补骨生髓方对正常及损伤血管生成的影响,揭示其通过HIF-1 α /VEGF信号通路调控血管生成的机制,现报告如下。

1 材料与方法

1.1 实验动物

6月龄雄雌斑马鱼Tg(*kdrl*:EGFP)由广西中医药大学中加斑马鱼中药筛选联合实验室提供。成鱼在标准实验室条件下饲养:14 h光照/10 h黑暗交替,养殖水温维持在26 $^{\circ}\text{C}$, pH 7.0~8.0,电导率500~800 $\mu\text{S}/\text{cm}$,盐度0.025%~0.050%溶解氧水平

6.0~7.8 mg/L。随机择配产卵,独立产卵批次 ≥ 3 。胚胎收集后于E₂培养液(15 mmol/L NaCl, 0.5 mmol/L KCl, 1 mmol/L MgSO₄, 0.15 mmol/L KH₂PO₄, 0.05 mmol/L Na₂HPO₄, 1 mmol/L CaCl₂, 0.7 mmol/L NaHCO₃)中,在28.5 $^{\circ}\text{C}$ 下培养。胚胎在受精后(post-fertilization, pf)24 h开始接受0.003%苯硫脲(PTU)处理以抑制色素沉着。本研究采用单因素方差分析设计,用G*Power 3.1.9.7软件进行事前效能分析,参数设定为效应量 $f = 0.40$, $\alpha = 0.05$,检验效能 $(1 - \beta) = 0.80$ 。计算结果显示每组至少需18尾斑马鱼,综合考虑实验损耗等因素,最终确定每组纳入20尾斑马鱼,并进行3次独立重复实验。实验结束后,冰浴法给予斑马鱼幼鱼安乐死。研究方案经广西中医药大学实验动物福利伦理委员会审核批准(DW20240805-01)。

1.2 实验药物

补骨生髓方中药饮片(骨碎补、补骨脂、三七、砂仁、人参等8味药)由中国中医科学院望京医院中药房提供并鉴定。将称好的药材(三七、砂仁除外)用10倍的纯水室温浸泡1 h,煎煮40 min,取一煎液。药渣再次加8倍量的纯水,二煎,合并滤液,水浴浓缩。另取锅加入砂仁10倍量的纯水煮沸后,加入砂仁煮5 min,过滤,收集滤液备用。待药液水浴浓缩至合适体积后加三七粉、砂仁滤液,边水浴边搅拌,搅拌均匀后转移至离心管中,4 500 r/min离心,每次30 min,离心2次,取上清,去离子水定容,配制成1 g/mL(按生药当量)的补骨生髓方(Bugu Shengsui Decoction, BGSSD)水煎液,4 $^{\circ}\text{C}$ 下短期保存,-80 $^{\circ}\text{C}$ 下长期保存。实验前涡旋混匀,以E₂培养基稀释至目标浓度(50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。

1.3 主要试剂

甲基纤维素(上海麦克林生化科技股份有限公司,

M813700), 氯化钾(天津博迪化工股份有限公司, XK13-011-00003), 无水氯化钙(成都市科隆化学品有限公司, 10043-52-4), 磷酸氢二钠(成都金山化学试剂, 20190522), 碳酸氢钠(广东省化学试剂工程技术研究中心, 144-55-8), PTK787 (MedChemExpress LLC, HY-12018), MS-222 (MedChemExpress LLC, HY-W011777), DMSO 二甲基亚砷(北京索莱宝科技有限公司, D8371), 总 RNA 提取试剂盒 (Promega, LS1040) Eastep[®] Super Total RNA Extraction Kit (Promega, LS1040), GoScript[™] Reverse Transcription System (Promega, A5001), GoTaq[®] qPCR Master Mix (Promega, A6002)。

1.4 实验仪器

斑马鱼养殖系统(上海海圣生物实验设备有限公司, Z-A-D5), 电子天平(METTLER TOLEDO, ME); 磁力搅拌器(江苏省金坛市中大仪器厂, T8-1), 体视显微镜(日本 OLYMPUS 株式会社, SZX16), 光照培养箱(上海博讯实业有限公司医疗设备厂, BSG-250), 荧光立体显微镜(LEICA, M165 FC), 超纯水器(四川优普超纯科技有限公司, UPK-I-10T), 全自动样品冷冻研磨仪(上海净信实业发展有限公司, JXFSTPRP-CL), NanoDrop One 分光光度计(Thermo Fisher Scientific, 美国), 梯度 PCR 仪(德国 Biometra, Tgradient), LightCycler[®] 96 qPCR 系统(Roche, 瑞士)。

1.5 方法

1.5.1 BGSSD 对正常斑马鱼节间血管 (Intersegmental Vessel, ISV) 生成的作用 选取发育良好的 12 hpf 胚胎, 随机分为对照组与 BGSSD 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组, 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 下培养, 每 24 h 换液补药。48 hpf 时观察节间血管数量、管径情况。每组 20 尾/批, 重复 3 次, 饲养于 6 孔板中(5 mL/孔, 20 尾/孔)。

1.5.2 BGSSD 对正常斑马鱼肠下血管 (Subintestinal Vessel, SIV) 生成的作用 选取发育良好的 12 hpf 胚胎, 随机分为对照组与 BGSSD 50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组, 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 下培养, 每 24 h 换液补药。72 hpf 时观察肠下血管出芽数、交叉数和管径。每组 20 尾/批, 重复 3 次, 饲养于 6 孔板中(5 mL/孔, 20 尾/孔)。

1.5.3 BGSSD 对 PTK787 诱导的斑马鱼节间血管损伤模型的作用 选取发育良好的 12 hpf 胚胎, 暴露于含有不同浓度 PTK787 (0.075, 0.100, 0.125, 0.150, 0.175, 0.200 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 的 E_2 培养基中, 48 hpf 时观察各组节间血管情况, 参照文献^[8] 计算血管指数, 血管指数 = 完整血管数 \times 1 + 缺陷血管数 \times 0.5。完整型血管定义为从脊椎主静脉或背主动脉发芽延伸并与背部脊索血管建立连接的节间血管; 已经发芽延伸, 但未与脊索血管相连的节间血管则定义为缺陷型血管。确定

PTK787 工作剂量, 以含等量 DMSO (体积分数均为 0.1%) 的 E_2 培养基组作为对照组。每组 20 尾/批, 重复 3 次, 饲养于 6 孔板中(5 mL/孔, 20 尾/孔)。通过血管指数筛选最优损伤剂量, 为后续给药干预实验奠定基础。

选取发育良好的 12 hpf 胚胎, 随机分为 5 组, 对照组、模型组 (PTK787) 和 PTK787 + BGSSD 组 (50, 100, 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$)。模型组及 PTK787 + BGSSD 组均给予相同浓度的 PTK787, 以诱导建立斑马鱼血管损伤模型, 以含等量 DMSO 的 E_2 培养基组作为对照组, 28.5 $^{\circ}\text{C}$ 下培养, 每 24 h 换液补药。48 hpf 时观察节间血管情况, 计算血管指数。每组 20 尾/批, 重复 3 次, 饲养于 6 孔板中(5 mL/孔, 20 尾/孔)。

1.5.4 成像与显微镜观察 用 0.02% MS-222 对斑马鱼进行短暂麻醉, 摆放在 3% 甲基纤维素中固定。采用 LEICA M165FC 荧光立体显微镜成像, 并通过 MShot Image Analysis System 软件获取图像。所有图像随后均用 ImageJ 1.54p 软件进行处理与分析。

1.5.5 实时荧光定量逆转录 (qRT-PCR) 从每组 3 个批次中分别各取 20 尾斑马鱼幼鱼安乐死后匀浆, 用 Eastep[®] Super Total RNA Extraction Kit 按照制造商说明提取总 RNA。RNA 浓度与纯度通过 NanoDrop One 分光光度计测定, 并以 A_{260}/A_{280} 比值在 1.8 ~ 2.0 之间的样本用于后续实验。随后用 GoScript[™] Reverse Transcription System 进行反转录, 合成 cDNA。定量实时 PCR 在 LightCycler[®] 96 qPCR 系统上进行, 反应总体积为 20 μL , 反应体系按照 GoTaq[®] qPCR Master Mix 试剂盒说明书配制, 扩增程序设置为: 预变性 95 $^{\circ}\text{C}$ 下 2 min (1 个循环), 随后进行 45 个循环的两步法扩增: 95 $^{\circ}\text{C}$ 下 15 s (变性), 60 $^{\circ}\text{C}$ 下 30 s (退火/延伸)。扩增结束后进行熔解曲线分析: 95 $^{\circ}\text{C}$ 下 10 s, 65 $^{\circ}\text{C}$ 下 60 s, 97 $^{\circ}\text{C}$ 下 1 s (各 1 个循环), 以评价扩增产物的特异性。引物由广州睿博生物技术有限公司合成, 具体序列见表 1。相对 mRNA 表达量采用循环阈值 (Ct) 法计算, 目标基因的 Ct 值以 β -肌动蛋白 (*actb1*) 作为内参, 采用 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 方法进行归一化。对同一反应板上各实验组样本的 *actb1* Ct 值进行统计分析显示, 其在不同处理组间的平均 Ct 值范围约为 20.2 ~ 21.4, 最大差值约 1.2 个循环; 各组组长内标准差均小于 0.2, 变异系数均小于 1%, 上述结果提示 *actb1* 在本实验条件下表达相对稳定, 适合作为本研究的内参基因。

1.6 统计学方法

数据以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示。若符合正态分布及方差齐, 则采用单因素方差分析, 并以 Dunnett's 检验比较各实验组与对照组; 若不符合正态分布, 则用 Kruskal-

表 1 引物序列

基因名称	序列(5'-3')	长度/bp
actb1	正向引物 CCAGCCTTCCTTCCTGGG-TATG	22
	反向引物 GTGGAAGGAGCAAGAGA-GGTG	21
hif1aa	正向引物 TCCAAGACACAGGGAGTGG	20
	反向引物 GCCCTGAACATGGACTGG-AG	20
vegfaa	正向引物 TCCCGACAGAGACACGAA-AC	20
	反向引物 CATCTTGGCTTTTTCACAT-CTTTCTT	25
kdr1	正向引物 TCATGTCCCGAGCGATGA-AGA	21
	反向引物 CCAGCGCAGAGCATGTCA-GA	20
flt1	正向引物 ACTGGTGGTAAATGTGA-AGCCC	22
	反向引物 CTGCAGTCCAGGACGAA-GGA	20

Wallis 检验,必要时辅以 Dunn's 检验。对于不同剂量组之间的剂量-效应关系,进一步采用线性趋势检验计算趋势性 P 值,评价其是否存在显著剂量依赖性。统计分析用 GraphPad Prism10.1.2 软件,显著性水平设定为 $P < 0.05$ 。

2 结果

2.1 BGSSD 对正常斑马鱼节间血管生成的影响

与对照组相比,BGSSD 50,100,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组斑马鱼胚胎节间血管数量、管径与对照组差异均无统计学意义($P > 0.05$),见图 1。

2.2 BGSSD 对正常斑马鱼肠下血管生成的影响

与对照组相比,BGSSD 50,100,200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组斑马鱼胚胎肠下血管交叉数、出芽数和管径方面与对照组差异均无统计学意义($P > 0.05$),见图 2 及表 2。

2.3 斑马鱼节间血管损伤模型的建立

如图 3 和图 4 所示,与对照组相比,0.075 ~ 0.200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 PTK787 干预 12 hpf 斑马鱼胚胎至 48 hpf 就均能建立斑马鱼节间血管损伤模型,差异有统计学意义($P < 0.05$)。此外,随着 PTK787 剂量增

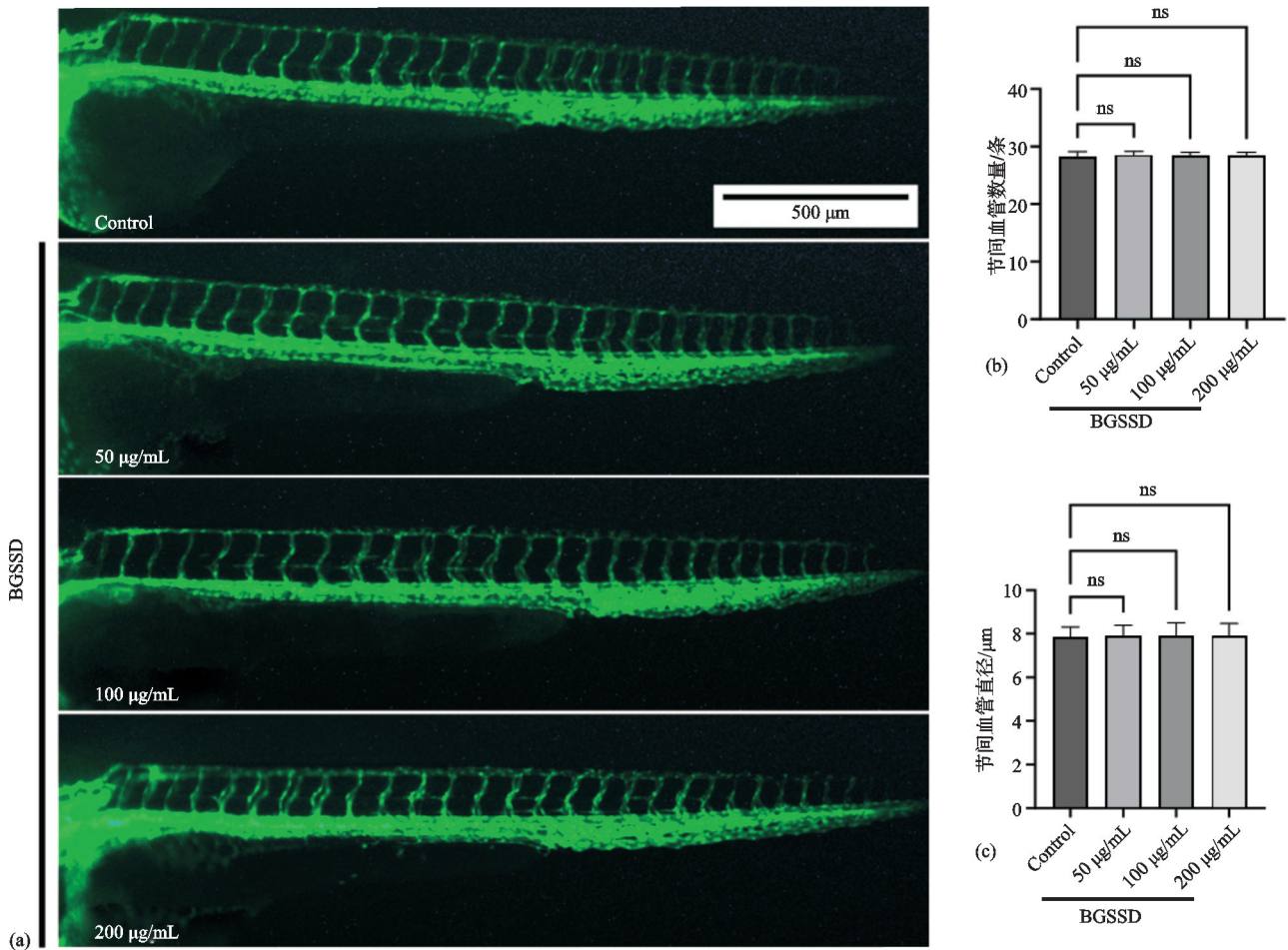


图 1 BGSSD 对斑马鱼节间血管生成的影响

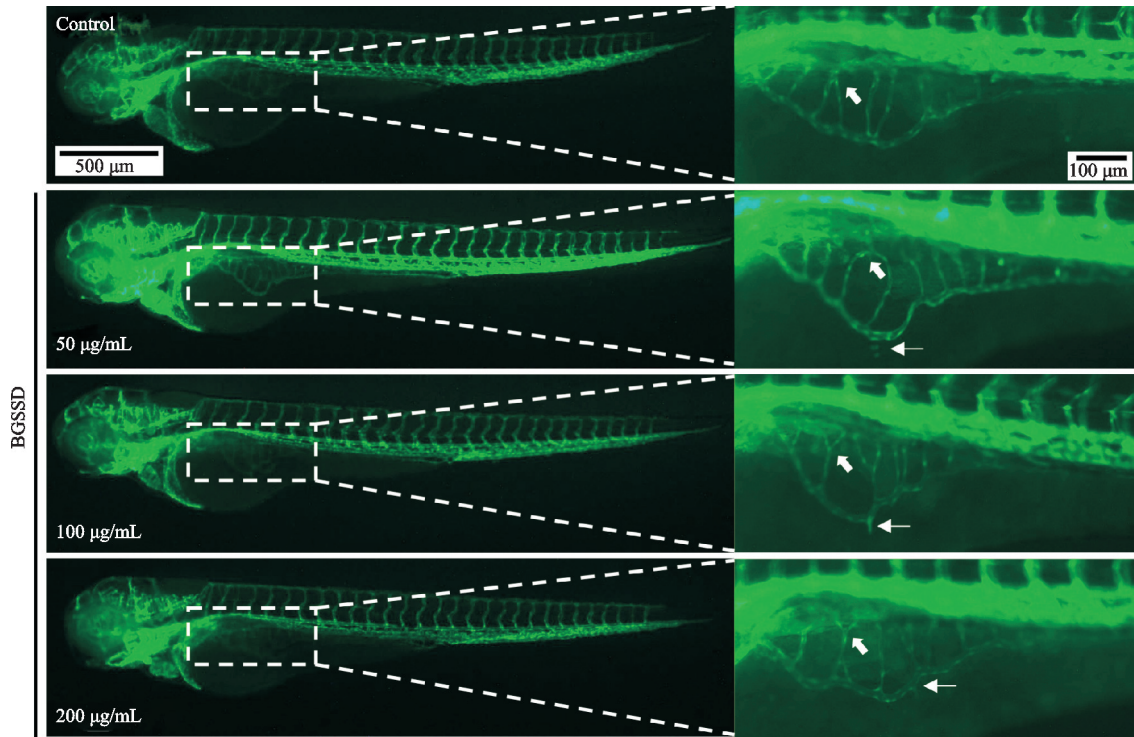
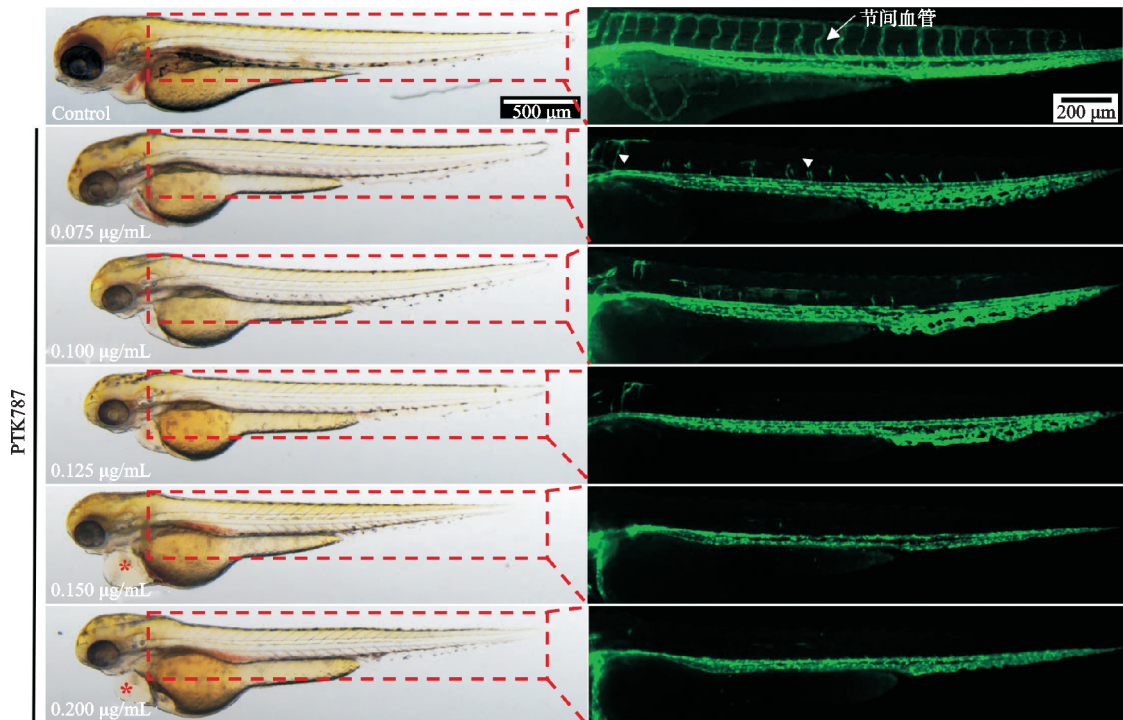


图 2 BGSSD 对斑马鱼胚胎肠下血管的作用(粗箭头所指为血管交叉, 细箭头所指为血管出芽)

表 2 BGSSD 对正常斑马鱼胚胎肠下血管新生的影响 ($n=20, \bar{x} \pm s$)

组别	交叉数/个	出芽数/个	管径/ μm
对照组	0.70 ± 0.73	0.60 ± 0.60	13.34 ± 0.71
BGSSD 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	0.65 ± 0.81	0.55 ± 0.60	13.53 ± 0.52
BGSSD 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	0.90 ± 0.97	0.55 ± 0.83	13.58 ± 0.55
BGSSD 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 组	1.05 ± 0.69	0.70 ± 0.73	13.53 ± 0.63

加,对斑马鱼节间血管损伤的作用越发明显,当剂量增加至 1.250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时节间血管发育基本停滞,剂量超过 1.500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 时斑马鱼胚胎明显出现发育畸形、身体短缩和明显的心包水肿。通过分析镜下血管形态,结合血管指数的定量数据,最终研究选定用 0.100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的剂量进行斑马鱼血管损伤模型的诱导。



注:左侧为明场视野下各组斑马鱼外观照片;右侧为暗场视野下各组斑马鱼节间血管典型图片,箭头表示完整型节间血管,三角形表示缺损型节间血管

图 3 不同浓度的 PTK787 在建立斑马鱼血管损伤模型中的效果

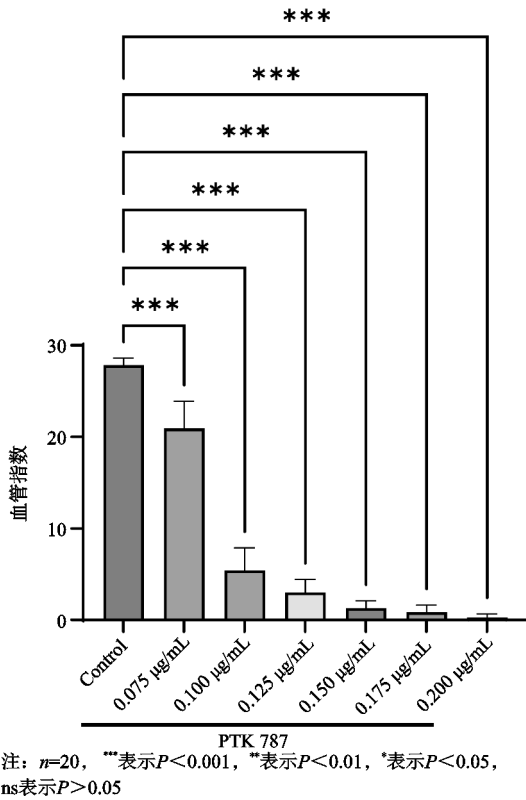


图 4 不同浓度的 PTK787 对斑马鱼节间血管指数的作用

2.4 BGSSD 通过促进血管生成发挥对斑马鱼血管损伤模型的保护作用

与对照组相比,0.100 μg/mL 的 PTK787 显著降低了斑马鱼节间血管指数,差异有统计学意义($P <$

0.05),说明血管损伤模型诱导成功。用 50 μg/mL BGSSD 干预后斑马鱼胚胎节间血管未见明显增加,血管指数与模型组差异无统计学意义($P > 0.05$)。100 和 200 μg/mL BGSSD 能够明显缓解 PTK787 对血管生成的抑制作用,血管指数与模型组差异有统计学意义($P < 0.05$),且随补骨生髓方剂量增加呈显著线性上升趋势($P < 0.001$),提示存在明显剂量依赖关系,见图 5 和图 6。

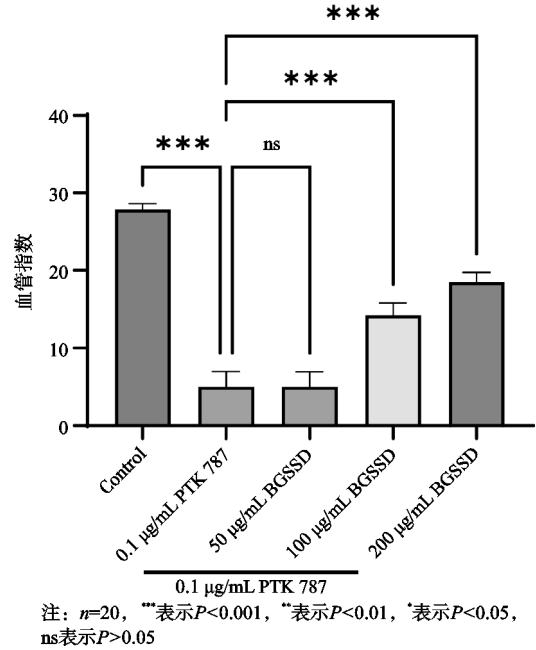


图 5 BGSSD 对斑马鱼血管损伤模型节间血管指数的影响

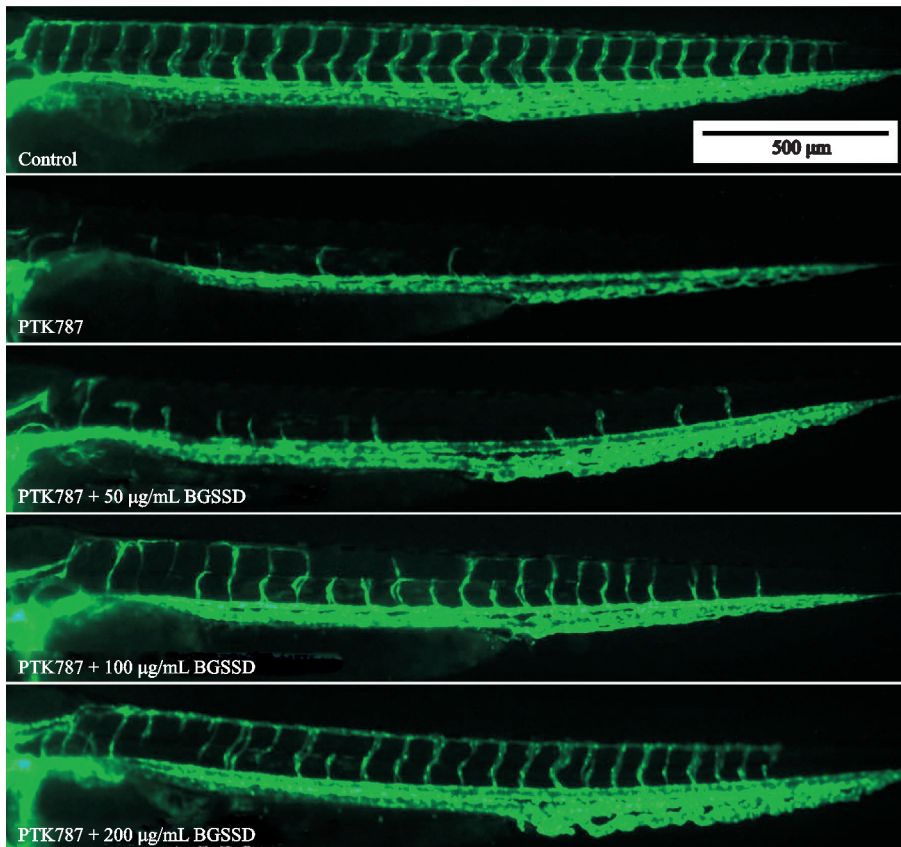


图 6 BGSSD 对斑马鱼节间血管损伤模型的保护作用

2.5 BGSSD对血管损伤斑马鱼模型血管生成相关基因的影响

为了检测BGSSD对血管生成相关基因的调控作用,实验进一步选取对照组、模型组及PTK787+200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BGSSD组进行qRT-PCR检测。图7结果显示,与对照组相比,模型组*kdrl*、*flt1* mRNA表达量明显下降,差异有统计学意义($P < 0.05$),*hif1aa*

及*vegfaa* mRNA表达升高。用200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ BGSSD干预后,*kdrl*、*flt1* mRNA表达较模型组显著升高,而*hif1aa*、*vegfaa* mRNA表达下降,差异有统计学意义($P < 0.05$)。恢复至正常水平,与对照组比较,差异无统计学意义($P > 0.05$)。上述基因表达变化与血管形态学改善趋势一致,提示BGSSD可能通过调控HIF-1 α /VEGF信号通路发挥血管保护作用。

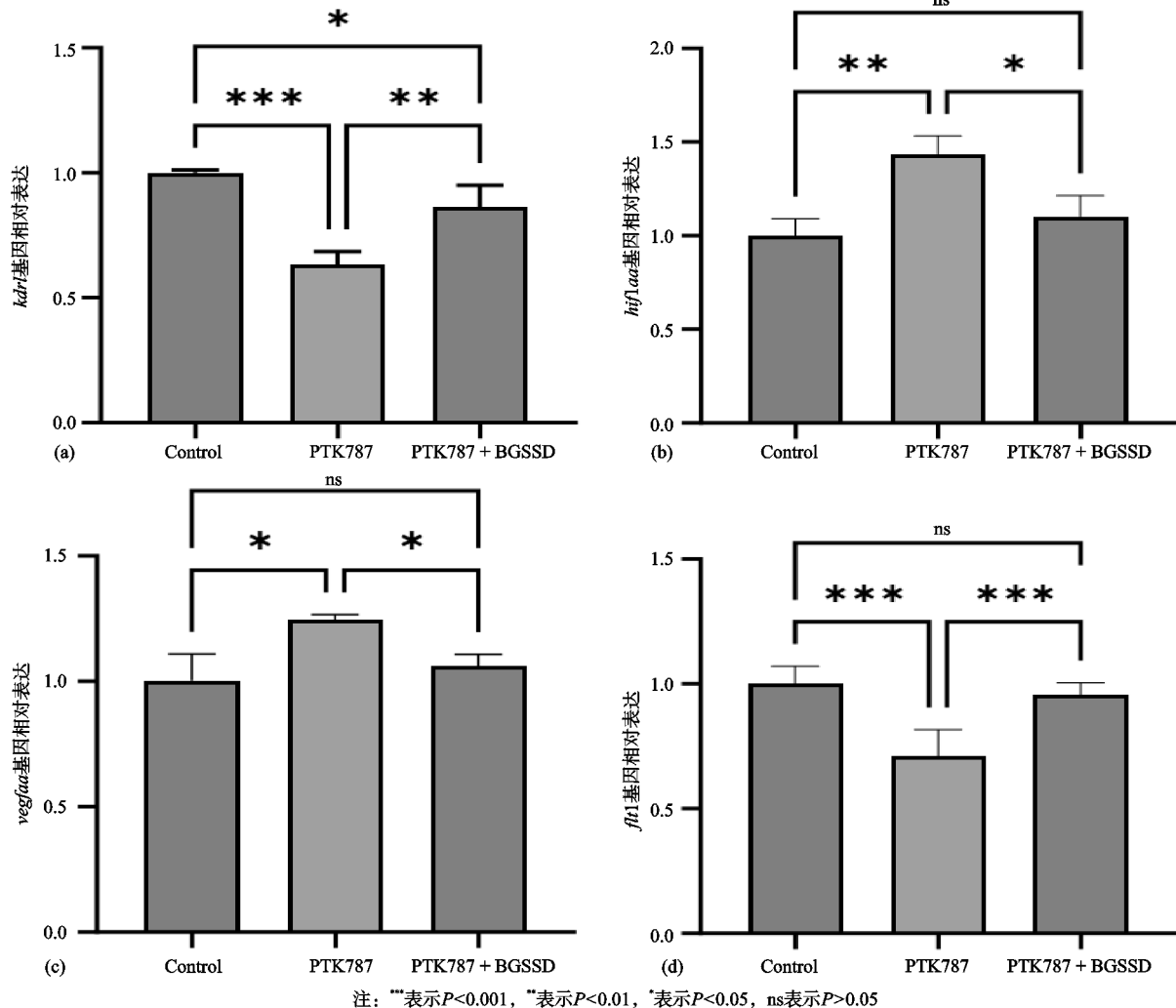


图7 BGSSD对斑马鱼血管损伤模型血管生成相关基因表达的影响

3 讨论

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是一种全身性的骨代谢疾病,以骨量低下、骨组织微结构损坏、骨脆性增加、易发生骨折为特征。据报道目前我国50岁以上人群骨质疏松症患病率为19.2%,65岁以上人群骨质疏松症患病率为32%,已成为人民健康的巨大威胁^[9]。近年来,骨血管生成-骨吸收-骨形成偶联的三元调控理论的提出^[10],丰富了骨质疏松症的发病机制,提出了骨质疏松症防治的新靶点——骨血管生成。血管生成属中医“血”“脉”理论范畴,血管涵于“脉”中,“脉者,资使之肾间动气”,提示血管生成与肾的关系密切。中医学中无骨质疏松的病名,属“骨痿”“骨枯”“骨痹”的范畴,病位在骨,首责于肾,与脾、肝、肺密切相

关^[11]。正如《黄帝内经》“肾气强则骨髓充满”,“血气在中,内著骨髓”等论述。补肾生髓、益气活血以壮骨是中医学防治骨质疏松症的核心治则。补肾生髓方治疗骨质疏松症在临床应用30余年,疗效确切,其药物组成为骨碎补、补骨脂、三七、砂仁、人参等。方中骨碎补、补骨脂补肾益髓;人参健脾益气,三七活血化瘀,共奏补肾健脾、活血生髓之功。中医“髓”含骨髓与血脉之意,“肾生髓,髓生血”,提示该方可能通过“补肾生髓”调控血管生成,与现代研究中“血管生成-骨形成耦联”机制相契合。为了探究补肾生髓方对血管生成的影响,选择了斑马鱼这一模式生物进行研究。

斑马鱼是一种源自于印度东部的淡水硬骨鱼,繁殖力高,传代时间短,基因序列具有高保守性、早期发

育的光学透明性,与人类具有相同的骨细胞类型和骨化机制,骨骼可以直接进行染色或 Micro-CT 扫描等,这些特点使其快速成为被广泛应用于人类骨骼相关疾病机制及药物筛选的模式生物^[12-13]。利用斑马鱼探究药物对血管生成作用的可行性也已被多项研究所证实^[14-16]。斑马鱼胚胎节间血管和肠下血管的发育生长情况是观察血管生成的重要指标,斑马鱼血管发育一般从 10~12 hpf 开始,节间血管在 20~24 hpf 自背主动脉逐节向背侧出芽,30~36 hpf 与背侧纵向血管完成吻合并逐步稳定,至约 48 hpf 形态与连通度基本固定;而肠下血管则在 48~55 hpf 由后主静脉腹向迁移装配形成肠下血管丛,约 72 hpf 形成稳定网格并随后重塑为主干肠下静脉^[17-18]。据此,本研究选取 48 hpf 量化分析节间血管,以在结构基本稳定的窗口评估 PTK787 抑制与药物“挽救”效应,降低发育进程带来的时序偏差与个体变异;同时于 72 hpf 评估肠下血管,处于生理装配完成的稳态时期,便于统计血管分支、交叉、管径等指标以判定是否存在“异常血管新生”。两者时间点与血管发育生理窗口高度契合,从方法学上增强了结果的可解释性与可信度。

本研究依托斑马鱼模式生物系统评估了 BGSSD 对血管生成的影响,主要发现包括:1)在生理发育条件下(节间血管,48 hpf;肠下血管,72 hpf),50~200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BGSSD 对节间血管数量、管径和肠下血管交叉数、出芽数和管径等均未造成显著改变,提示稳态条件下该剂量的 BGSSD 不会诱发异常血管新生;2)在 VEGFR 抑制剂 PTK787 (0.10 $\mu\text{g}/\text{mL}$)诱导的节间血管损伤模型(48 hpf)中,100 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 的 BGSSD 呈剂量依赖的“挽救样”促血管生成作用,而 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未见明显效应;3)在分子层面,PTK787 组 *kdrl*、*flt1* mRNA 显著下调而 *hif1aa*、*vegfaa* 上调,BGSSD 可使上述基因表达向对照水平回归。血管形态表现与基因表达读数的一致性提示,BGSSD 在 VEGFR 抑制剂 PTK787 诱导下的斑马鱼血管损伤背景下具有情境依赖的促血管生成的潜能,具有“稳态不扰动、失衡时矫正”的特征。BGSSD 基于“补肾生髓、健脾充血”治则,仅在血管损伤时发挥调控作用,体现中医“以平为期”的治疗理念。

既往促血管药物在稳态组织中易引起过度新生、异常分支甚至屏障功能受损,限制了安全窗。本研究结果显示,BGSSD 在生理发育期未显著增强血管网络复杂度或管径,降低了“非生理性促进”带来的潜在安全性担忧;相反,在节间血管被特异抑制的背景下,BGSSD 呈现阈值依赖性的挽救效应($\geq 100 \mu\text{g}/\text{mL}$),提示其作用更可能是恢复受损血管生成通路的功能活性而非无选择地推动血管生成。这一现象与结果中

“*kdrl*、*flt1* mRNA 上调,*hif1aa*、*vegfaa* mRNA 下调”的“向正常化”趋势相吻合。*kdrl*、*flt1* 为 VEGF 受体,其上调可增强 VEGF 信号传导,促进内皮细胞增殖迁移;*hif1aa* 下调可缓解缺氧应激,减少异常血管新生,共同维持血管稳态。当 VEGFR 通路被抑制、组织处于相对缺氧,*hif1aa*、*vegfaa* 代偿性上调状态时,BGSSD 能通过提升受体表达和敏感性,降低缺氧应答,重建有效的受体-配体信号耦联,从而实现损伤血管的形态学改善;而在生理稳态的条件下,通路本底活性较低,BGSSD 不显著放大终端效应,因而未造成过度的血管新生。

剂量阈值与平台效应亦值得关注。50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 未能产生显著改善,100 和 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 均有效,并可能呈递增趋势,这提示 BGSSD 内含活性成分(或多成分协同)对内皮细胞存活、迁移与管腔形成等环节的作用存在有效浓度窗口。血管生成与骨代谢之间存在耦联关系,骨内特异的促成骨微血管亚群(如 H 型血管)减少与骨量下降、骨形态及力学劣化同向改变。虽然本研究采用的是斑马鱼体轴节间血管/肠下血管模型而非骨内微血管,但“在损伤/抑制下恢复微血管结构完整性并矫正 HIF-1 α /VEGF 失衡”的证据链,为“改善微循环环境 \rightarrow 优化成骨微环境”的假说提供了在体药理学支撑。这为 BGSSD 在骨质疏松等微血管受损相关疾病中的潜在应用提供了理论依据,尤其是作为抗吸收或成骨促进药物的联合策略,有望实现对骨微环境的多向优化。

本研究亦存在若干局限性:1)PTK787 虽以抑制 VEGFR 为主,但兼及其他酪氨酸激酶靶点,BGSSD 的挽救效应可能不仅限于 VEGFR 通路“直接对抗”,亦可能涉及旁路通路(如 Ang-Tie、Notch、PDGF 等)的间接整合;未来可采用替代抑制剂或遗传学方式(如受体特异阻断/激活)进行药理学置换实验以增强因果推断。2)分子证据目前止于 mRNA 层面,尚缺乏蛋白水平与通路活性读数(如 VEGFA、Flt1/Kdrl 蛋白,及下游 p-ERK/p-AKT)。3)斑马鱼节间血管/肠下血管与哺乳动物骨内微血管在解剖与力学环境上存在差异,斑马鱼体轴血管为全身性血管,而骨质疏松症主要累及骨内 H 型血管,下一步应在骨质疏松大鼠模型中用 Microfill 灌注联合 MicroCT 扫描,免疫组化检测 H 型血管(CD31-high/EMCN-high)数量,结合骨密度测定,验证 BGSSD“促血管生成-改善骨代谢”的协同效应。4)尽管本研究在生理期未观察到异常促生,但安全性评估仍需扩展至肿瘤相关新生血管与眼底血管等敏感场景,以明确潜在风险边界。

综上所述,补骨生髓方在 VEGFR 抑制所致的斑马鱼血管损伤模型中表现出的促血管生成效应与调

控 HIF-1 α /VEGF 信号通路的分子向正常化转变的趋势,在生理稳态条件下不致血管异常新生。这种“稳态不扰动、失衡时矫正”作用特征为其在骨代谢相关疾病中的潜在应用和促血管生成的机制研究提供了依据。

参考文献

- [1] DUDLEY A C, GRIFFIOEN A W. Pathological angiogenesis: mechanisms and therapeutic strategies [J]. *Angiogenesis*, 2023, 26(3): 313-347.
- [2] WATANABE H, MAISHI N, HOSHI-NUMAHATA M, et al. Skeletal-vascular interactions in bone development, homeostasis, and pathological destruction [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(13): 10912.
- [3] TUCKERMANN J, ADAMS R H. The endothelium-bone axis in development, homeostasis and bone and joint disease [J]. *Nature Reviews Rheumatology*, 2021, 17(10): 608-620.
- [4] LEE E J, JAIN M, ALIMPERTI S. Bone microvasculature: stimulus for tissue function and regeneration [J]. *Tissue Engineering: Part B, Reviews*, 2021, 27(4): 313-329.
- [5] 谢雁鸣, 张方直, 周文泉, 等. 补骨生髓胶囊治疗肾阳虚证原发性骨质疏松症的临床研究 [J]. *中国中西医结合杂志*, 1997, 17(9): 526-530.
- [6] 孙凯, 魏戎, 谢雁鸣, 等. 补骨生髓方对去势骨质疏松大鼠 Smad/ERK 信号通路的影响 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2019, 25(11): 1556-1561.
- [7] 方圣杰, 李秋月, 刘宁, 等. 基于 RUNX2、VEGF 蛋白研究补骨生髓方治疗老年性骨质疏松症的作用机制 [J]. *中国中医基础医学杂志*, 2023, 29(4): 561-565.
- [8] 魏易洪, 周忠焱, 朱灵妍, 等. 人参水煎液对斑马鱼血管生长作用 [J]. *辽宁中医药大学学报*, 2017, 19(4): 8-10.
- [9] 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.
- [10] XIE H, CUI Z, WANG L, et al. PDGF-BB secreted by preosteoclasts induces angiogenesis during coupling with osteogenesis [J]. *Nature Medicine*, 2014, 20(11): 1270-1278.
- [11] 《老年性骨质疏松症中西医结合诊疗指南》工作组. 老年性骨质疏松症中西医结合诊疗指南 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2024, 30(7): 937-946.
- [12] 王恒鸿, 樊鑫宇, 高义涵, 等. 基于斑马鱼模型的中药抗骨质疏松的评价方法与疗效研究进展 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2025, 31(9): 323-330.
- [13] BEN-ZVI I, KARASIK D, ACKERT-BICKNELL C L. Zebrafish as a model for osteoporosis: functional validations of genome-wide association studies [J]. *Current Osteoporosis Reports*, 2023, 21(6): 650-659.
- [14] 邵娟, 徐梦丹, 张雪晶, 等. 冻干与生晒西洋参饮片差异皂苷含量及促斑马鱼血管生成活性比较 [J]. *中国实验方剂学杂志*, 2024, 30(17): 185-192.
- [15] 石秀娟, 魏易洪, 郑望, 等. 参蛤散对斑马鱼血管生长的干预作用 [J]. *中西医结合心脑血管病杂志*, 2023, 21(12): 2194-2197.
- [16] ZHONG X L, CHEN J Z, ZHANG Z Y, et al. Development of an automated morphometric approach to assess vascular outcomes following exposure to environmental chemicals in zebrafish [J]. *Environmental Health Perspectives*, 2024, 132(5): 057001.
- [17] NAKAJIMA H, CHIBA A, FUKUMOTO M, et al. Zebrafish vascular development: general and tissue-specific regulation [J]. *Journal of Lipid and Atherosclerosis*, 2021, 10(2): 145-159.
- [18] HUBERT M, HERZOG W. Analysis of vascular morphogenesis in zebrafish [J]. *Methods in Molecular Biology*, 2023, 2608: 425-450.

(收稿日期: 2025-11-06)