

复方生脉成骨胶囊调控 miR-135b-5p 对小鼠激素性股骨头坏死及骨代谢的影响

何德利^{1△} 陈宏慈¹ 陈凯奇¹

[摘要] 目的:基于补肾活血理论研究复方生脉成骨胶囊对小鼠激素性股骨头坏死的改善作用及机制。方法:小鼠随机分为正常组和造模组,采用脂多糖联合甲强龙建立激素性股骨头坏死模型。造模完成后随机分为模型组、复方生脉成骨胶囊组、Agomir 组、复方生脉成骨胶囊+Agomir 组和阿仑膦酸钠组,12 只/组。复方生脉成骨胶囊组灌胃给予小鼠复方生脉成骨胶囊(5.46 g/kg),1 次/d;Agomir 组按照 200 μ L/只,尾静脉注射 miR-135b-5p Agomir (14 nmol/L),每 2 周 1 次;复方生脉成骨胶囊+Agomir 组灌胃给予复方生脉成骨胶囊(5.46 g/kg),1 次/d,同时尾静脉注射 miR-135b-5p Agomir (14 nmol/L),每 2 周 1 次;阿仑膦酸钠组灌胃给予阿仑膦酸钠(1.3 mg/kg),1 次/d;正常组和模型组灌胃给予等量蒸馏水,所有组别连续干预 8 周。实时定量聚合酶链式反应(PCR)测定 miR-135b-5p 水平,微型计算机断层扫描仪(Micro-CT)检查小鼠股骨头形态并计算骨小梁数量、骨小梁厚度和骨小梁分离度,酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒测定小鼠血清骨钙素、碱性磷酸酶(ALP)、I 型胶原氨基端前肽(PINP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)、甲状旁腺素(PTH)、骨碱性磷酸酶(BALP)水平,全自动生化分析仪测定小鼠血清肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6(IL-6)、超氧化物歧化酶(SOD)、丙二醛(MDA)和脂质过氧化物(LPO)水平,苏木精-伊红(HE)染色法检查小鼠股骨头组织病理改变,实时定量聚合酶链式反应和免疫印迹法分别测定小鼠股骨头 Runx2 相关转录因子 2(Runx2)、骨形态发生蛋白 2(BMP-2)、成骨相关转录因子抗体(Osterix)mRNA 和蛋白水平。结果:与正常组比较,模型组 miR-135b-5p 水平、骨小梁分离度、血清 ALP、TRAP、PTH、TNF- α 、IL-6、MDA 和 LPO 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);股骨头骨小梁数量、骨小梁厚度、血清骨钙素、PINP、BALP 和 SOD 水平,Runx2、BMP-2、Osterix mRNA 和蛋白水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与模型组比较,复方生脉成骨胶囊组和阿仑膦酸钠组 miR-135b-5p 水平、骨小梁分离度、血清 ALP、TRAP、PTH、TNF- α 、IL-6、MDA 和 LPO 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);股骨头骨小梁数量、骨小梁厚度、血清骨钙素、PINP、BALP 和 SOD 水平,Runx2、BMP-2、Osterix mRNA 和蛋白水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),股骨头组织病理结构显著改善。与正常组、模型组和复方生脉成骨胶囊组比较,Agomir 组 miR-135b-5p 水平、骨小梁分离度、血清 ALP、TRAP、PTH、TNF- α 、IL-6、MDA 和 LPO 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);股骨头骨小梁数量、骨小梁厚度、血清骨钙素、PINP、BALP 和 SOD 水平,Runx2、BMP-2、Osterix mRNA 和蛋白水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$)。与 Agomir 组比较,复方生脉成骨胶囊+Agomir 组 miR-135b-5p 水平、骨小梁分离度、血清 ALP、TRAP、PTH、TNF- α 、IL-6、MDA 和 LPO 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);股骨头骨小梁数量、骨小梁厚度、血清骨钙素、PINP、BALP 和 SOD 水平,Runx2、BMP-2、Osterix mRNA 和蛋白水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结论:复方生脉成骨胶囊能够显著抑制激素性股骨头坏死小鼠股骨头组织结构破坏,促进股骨头病理恢复,调节骨代谢,抑制小鼠全身炎症反应及氧化应激损伤,促进股骨头成骨细胞分化,其机制可能与调节 miR-135b-5p 有关。

[关键词] 补肾活血;激素性股骨头坏死;骨代谢;阿仑膦酸钠;复方生脉成骨胶囊

[中图分类号] R285.5 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1005-0205(2026)03-0043-08

DOI: 10.20085/j.cnki.issn1005-0205.260307

基金项目:广东省中医药局科研项目(20232127)

¹ 广州中医药大学番禺医院(广州,511400)

[△]通信作者 E-mail:jjebi7917@sina.com

The Effect of Compound Shengmai Chenggu Capsules on miR-135b-5p in the Regulating of Steroid-Induced Femoral Head Necrosis and Bone Metabolism in Mice

HE Deli^{1△} CHEN Hongci¹ CHEN Kaiqi¹

¹ Panyu Hospital, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 511400, China.

Abstract Objective: To study the improvement effect and mechanism of compound Shengmai Chenggu capsules on steroid-induced femoral head necrosis in mice based on the Bushen Huoxue theory. **Methods:** Mice were randomly divided into the normal group and the model group. The steroid-induced femoral head necrosis model was established using lipopolysaccharide combined with methylprednisolone. After the modeling was completed, they were randomly divided into the model group, the compound Shengmai Chenggu capsules group, the Agomir group, the compound Shengmai Chenggu capsules+Agomir group, and the alendronate sodium group, with 12 rats in each group. In the compound Shengmai Chenggu capsules group, mice received compound Shengmai Chenggu capsules (5.46 g/kg) by gavage once a day. In the Agomir group, miR-135b-5p Agomir (14 nmol/L) was injected into the tail vein at a volume of 200 μ L per mouse once for 2 weeks. In the compound Shengmai Chenggu capsules+Agomir group, compound Shengmai Chenggu capsules (5.46 g/kg) were administered intragastrically once a day, and miR-135b-5p Agomir (14 nmol/L) was injected into the tail vein once for 2 weeks. In the alendronate sodium group, alendronate sodium (1.3 mg/kg) was administered intragastrically once a day. The normal group and the model group were administered an equivalent volume of distilled water by gavage, all groups were continuously treated for 8 weeks. The level of miR-135b-5p was determined by real-time quantitative polymerase chain reaction (qPCR), the morphology of the femoral head in mice was examined using a micro-computed tomography scanner (Micro-CT), and the number of trabeculae, the thickness of trabeculae and the separation of trabeculae were calculated. The levels of osteocalcin, alkaline phosphatase (ALP), type I collagen amino-terminal propeptide (PINP), tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP), parathyroid hormone (PTH), and bone alkaline phosphatase (BALP) in mouse serum were determined using enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) kits. The levels of tumor necrosis factor- α (TNF- α), interleukin-6 (IL-6), superoxide dismutase (SOD), malondialdehyde (MDA), and lipid peroxide (LPO) in mouse serum were determined using an automatic biochemical analyzer. The histopathological changes in the femoral head of mice were examined by hematoxylin-eosin (HE) staining. The mRNA and protein levels of Runt-related transcription factor 2 (Runx2), bone morphogenetic protein 2 (BMP-2), and osteogenic transcription factor antibody (Osterix) in the femoral head of mice were determined by real-time quantitative PCR and Western Blot, respectively. **Results:** Compared with the normal group, the levels of miR-135b-5p, trabecular bone separation, serum ALP, TRAP, PTH, TNF- α , IL-6, MDA and LPO in the model group were increased ($P < 0.05$); the number of trabeculae in the femoral head, trabecular thickness, the levels of serum osteocalcin, PINP, BALP and SOD, as well as the mRNA and protein levels of Runx2, BMP-2 and Osterix were decreased ($P < 0.05$). Compared with the model group, the levels of miR-135b-5p, trabecular bone separation, serum ALP, TRAP, PTH, TNF- α , IL-6, MDA, and LPO in both compound Shengmai Chenggu capsules group and the alendronate sodium group were decreased ($P < 0.05$), the number of trabeculae of the femoral head, the thickness of trabeculae, the levels of serum osteocalcin, PINP, BALP and SOD, the mRNA and protein levels of Runx2, BMP-2 and Osterix increased ($P < 0.05$), and the histopathological structure of the femoral head tissue was significantly improved. Compared with the normal group, the model group and compound Shengmai Chenggu capsules group, the levels of miR-135b-5p, trabecular bone separation, serum ALP, TRAP, PTH, TNF- α , IL-6, MDA and LPO in the Agomir group were increased ($P < 0.05$). The number of trabeculae of the femoral head, the thickness of trabeculae, the levels of serum osteocalcin, PINP, BALP and SOD, as well as the mRNA and protein levels of Runx2, BMP-2 and Osterix decreased ($P < 0.05$). Compared with the Agomir group, the levels of miR-135b-5p, trabecular bone separation, serum ALP, TRAP, PTH, TNF- α , IL-6, MDA and LPO in the compound Shengmai Chenggu capsules+Agomir group were decreased ($P < 0.05$), the number of trabeculae of the femoral head, the thickness of trabeculae, the levels of serum osteocalcin, PINP, BALP and SOD, as well as the mRNA and protein levels of Runx2, BMP-2 and Osterix increased ($P < 0.05$). **Conclusion:** The compound Shengmai Chenggu capsules can significantly inhibit the destruction of femoral head tissue structure in mice with steroid-induced femoral head necrosis, promote the pathological recovery of the femoral head, regulate bone metabolism, inhibit systemic inflammatory responses and oxidative stress injury in mice, and promote osteoblast differentiation in the femoral head. The mechanism may be related to the regulation of miR-135b-5p.

Keywords: Bushen Huoxue; steroid-induced femoral head necrosis; bone metabolism; alendronate sodium; compound

Shengmai Chenggu capsules

股骨头坏死是以髋关节疼痛及功能障碍为主要表现的临床常见骨关节病,其发生及发展与创伤、长期大量使用糖皮质激素、酒精、年龄、性别、吸烟等多种因素有关^[1-2]。复方生脉成骨胶囊是由广州中医药大学第一附属医院何伟教授以袁氏生脉成骨片为基础,以补肾活血理论为基础,由川芎、赤芍、当归、红花等药材组成的中药制剂,近年来研究发现^[3],其在股骨头坏死的治疗中发挥关键作用,本课题组在前期文献研究中发现其在股骨头坏死的治疗中具有较大潜力^[4]。本实验以激素性股骨头坏死模型小鼠为研究对象,以复方生脉成骨胶囊为研究药物,基于 miR-135b-5p 探讨其在小鼠激素性股骨头坏死治疗中的药理作用机制及其对骨代谢的调节作用,为股骨头坏死治疗药物的研发提供新的参考依据。

1 材料和方法

1.1 实验动物

75 只无特定病原体级 C57BL/6 小鼠,雄性,8 周龄,体重为 20~22 g,由广州中医药大学提供,实验动物生产许可证号为 SCXK(粤)2023-0068。小鼠饲养于动物房,温度为 20~25 ℃,每天光照/黑暗各 12 h,自由饮水摄食 1 周后进行后续实验。本研究动物实验经医院伦理委员会审核批准。

1.2 药物与试剂

复方生脉成骨胶囊购自广州中医药大学第一附属医院(批准文号为粤药制字 Z20071224,批号为 202210181);阿仑膦酸钠(标准品,纯度 $\geq 98\%$,货号为 YZ-100901)购自北京索莱宝科技有限公司;miR-135b-5p Agomir(货号为 HY-R00261A)购自美国 MedChemExpress 公司;实时定量聚合酶链式反应(PCR)试剂盒(货号为 PH0120)购自云科生物技术泰州有限公司;RNA 提取试剂盒(货号为 DP420)购自天根生化科技北京有限公司;逆转录试剂盒(货号为 abs60269)购自爱必信上海生物科技有限公司;蛋白测定试剂盒(货号为 T1949)购自西格玛奥德里奇上海贸易有限公司;苏木精-伊红(HE)试剂盒(货号为 WLA051)购自沈阳万类生物科技有限公司。酶联免疫吸附法(ELISA)试剂盒;骨钙素(货号为 D721126)购自生工生物工程上海股份有限公司;碱性磷酸酶(ALP,货号为 MU30029)、骨碱性磷酸酶(BALP,货号为 MU30270)购自武汉贝茵莱生物科技有限公司;Ⅰ型胶原氨基端前肽(PINP,货号为 AB-K1095702)购自艾比玛特医药科技上海有限公司;抗酒石酸酸性

磷酸酶(TRAP,货号为 m1598212)购自上海酶联生物科技有限公司;甲状旁腺素(PTH,货号为 CSB-E08690m)购自武汉华美生物工程有限公司。兔抗体 Runt 相关转录因子 2(Runx2,货号为 ab192256)、骨形态发生蛋白 2(BMP-2,货号为 ab284387)、成骨相关转录因子抗体(Osterix,货号为 ab209484)购自艾博抗(上海)贸易有限公司;聚合酶链式反应引物设计剂合成由百力格生物科技上海股份有限公司完成。

1.3 主要仪器

Skyscan1276 微型计算机断层扫描仪(Micro-CT)购自布鲁克北京科技有限公司;MTN-360 全自动生化分析仪购自曼特诺医疗器械有限公司;Infinite F50 Plus 酶标仪购自帝肯上海贸易有限公司;MF53-N 荧光倒置显微镜购自广州市明美光电技术有限公司;KETA GL 凝胶成像仪购自美国 Wealtec 公司。

1.4 方法

1.4.1 造模与分组 小鼠随机分为正常组(13 只)和造模组(62 只)。参照文献^[5]方法,造模组小鼠静脉注射脂多糖(10 $\mu\text{g}/\text{kg}$),1 次/d。干预 2 d 后,臀部肌肉注射甲强龙(20 mg/kg),1 次/d,干预 3 d。继续饲养 1 周后,造模组随机取 2 只小鼠,正常组随机取 1 只小鼠,颈椎脱臼法处死后分离股骨头,HE 染色观察小鼠股骨头病理变化,以小鼠股骨头组织空骨陷窝增多,骨小梁稀疏、排列紊乱视为造模成功。小鼠造模完成后随机分为模型组、复方生脉成骨胶囊组、Agomir 组、复方生脉成骨胶囊+Agomir 组和阿仑膦酸钠组,12 只/组。

1.4.2 给药 复方生脉成骨胶囊组按照临床给药剂量的 9.1 倍,灌胃给予小鼠复方生脉成骨胶囊(5.46 g/kg)^[6],1 次/d;Agomir 组按照 200 $\mu\text{L}/\text{只}$,尾静脉注射 miR-135b-5p Agomir(14 nmol/L)^[7],每 2 周 1 次;复方生脉成骨胶囊+Agomir 组灌胃给予复方生脉成骨胶囊(5.46 g/kg),1 次/d,同时尾静脉注射 miR-135b-5p Agomir(14 nmol/L),每 2 周 1 次;阿仑膦酸钠组灌胃给予阿仑膦酸钠(1.3 mg/kg)^[8],1 次/d;正常组和模型组灌胃给予等量蒸馏水,所有组别连续干预 8 周^[9]。

1.4.3 观察指标

1.4.3.1 实时定量聚合酶链式反应测定 miR-135b-5p 水平 小鼠颈椎脱臼法处死后分离股骨头,使用聚合酶链式反应试剂盒,以 U6 为内参,按照 $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$ 法计

算 miR-135b-5p 水平。引物序列为 U6: 正向引物为 5'-ATGACGTCTGCCTTGGAGAAC-3', 反向引物为 5'-TCAGTGTGCTACGGAGTTCAG-3'。miR-135b-5p: 正向引物为 5'-GGTATGGCTTTTCATTCCT-3', 反向引物为 5'-GCGAGCACAGAATTAATACGAC-3'。

1.4.3.2 Micro-CT 检查小鼠股骨头形态 小鼠颈椎脱臼法处死后分离股骨头, 用 Micro-CT 扫描分析骨小梁数量、骨小梁厚度和骨小梁分离度。

1.4.3.3 ELISA 试剂盒测定小鼠血清骨钙素、ALP、PINP、TRAP、PTH、BALP 水平 小鼠眼眶静脉取血至离心管中, 按照试剂盒说明书测定骨钙素、ALP、PINP、TRAP、PTH、BALP 水平。

1.4.3.4 全自动生化分析仪测定小鼠血清 TNF- α 、

IL-6、SOD、MDA 和 LPO 水平 小鼠眼眶静脉取血, 使用全自动生化分析仪测定肿瘤坏死因子- α (TNF- α)、白细胞介素-6 (IL-6)、超氧化物歧化酶 (SOD)、丙二醛 (MDA) 和脂质过氧化物 (LPO) 水平。

1.4.3.5 HE 染色法检查小鼠股骨头组织病理改变 取小鼠股骨头组织, 脱钙液脱钙后, 石蜡包埋并切片, 常规 HE 染色, 于显微镜下拍照检查病理改变。

1.4.3.6 实时定量聚合酶链式反应测定小鼠股骨头 Runx2、BMP-2、Osterix mRNA 水平 取小鼠股骨头组织, 按照聚合酶链式反应试剂盒方法测定 Runx2、BMP-2、Osterix mRNA 水平。引物序列见表 1, 以 GAPDH 为内参, 按照 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法计算 Runx2、BMP-2、Osterix mRNA 相对水平。

表 1 引物序列

基因	正向引物(5'-3')	反向引物(5'-3')
Runx2	GACTGTGGTTACCGTCATGGC	ACTTGGTTTTTTCATAACAGCGGA
BMP-2	GAACCCAGGTGTCTCCAAGA	GTCTCTTGCAGCTGGACTTG
Osterix	CGCATCTGAAAGCCCACTTG	CAGCTCGTCAGAGCGAGTGAA
GAPDH	AGGTCGGTGTGAACGGATTTG	GGGGTCGTTGATGGCAACA

1.4.3.7 Western Blot 法测定小鼠股骨头 Runx2、BMP-2、Osterix 蛋白水平 取小鼠股骨头组织, 脱钙液脱钙后, 研磨匀浆提取总蛋白, 上样量设置为 50 μ g, 依次经电泳分离、转膜、封闭后, 分别经 GAPDH、Runx2、BMP-2、Osterix 兔抗体(1:500 稀释)4 $^{\circ}$ C 下孵育过夜后, 再用山羊抗兔二抗(1:1 000 稀释)室温下孵育 1 h, 用化学发光液在凝胶成像系统显影并拍照, 以 GAPDH 为内参, 用 ImageJ 1. 8. 0 软件计算 Runx2、BMP-2、Osterix 蛋白相对水平。

1.5 统计学方法

用 SPSS 26.0 软件处理本实验所有数据, 计数资料用 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 采用卡方检验, 计量资料采用单因素方差分析进行多组间数据的比较, 两两比较采用 LSD 检验, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 复方生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死小鼠 miR-135b-5p 水平的影响

复方生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死小鼠 miR-135b-5p 水平的影响见表 2, 结果表明: 与正常组比较, 模型组 miR-135b-5p 水平升高 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 复方生脉成骨胶囊组和阿仑膦酸钠组 miR-135b-5p 水平降低 ($P < 0.05$); 与正常组、模型组和复方生脉成骨胶囊组比较, Agomir 组 miR-135b-5p 水平升高 ($P < 0.05$); 与 Agomir 组比较, 复方生脉成骨胶囊 + Agomir 组 miR-135b-5p 水平降低。

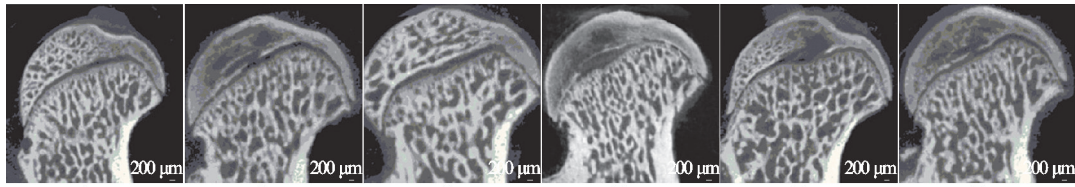
表 2 小鼠股骨头 miR-135b-5p 水平比较

组别	miR-135b-5p 水平
正常组	0.79 \pm 0.08
模型组	3.86 \pm 0.60 ¹⁾
复方生脉成骨胶囊组	0.88 \pm 0.04 ²⁾
Agomir 组	5.55 \pm 0.50 ¹⁾²⁾³⁾
复方生脉成骨胶囊 + Agomir 组	2.65 \pm 0.09 ⁴⁾
阿仑膦酸钠组	1.59 \pm 0.04 ²⁾

注: 1) 与正常组比, $P < 0.05$; 2) 与模型组比, $P < 0.05$; 3) 与复方生脉成骨胶囊组比, $P < 0.05$; 4) 与 Agomir 组比, $P < 0.05$ 。

2.2 复方生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死小鼠股骨头形态的影响

复方生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死小鼠股骨头形态的影响见图 1 和图 2, 结果表明: 与正常组比较, 模型组小鼠股骨头骨小梁数量、骨小梁厚度降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 骨小梁分离度升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 复方生脉成骨胶囊组和阿仑膦酸钠组骨小梁数量、骨小梁厚度升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 骨小梁分离度降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与正常组、模型组和复方生脉成骨胶囊组比较, Agomir 组骨小梁数量、骨小梁厚度降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 骨小梁分离度升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 Agomir 组比较, 复方生脉成骨胶囊 + Agomir 组骨小梁数量、骨小梁厚度升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 骨小梁分离度降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$)。



注: A-正常组; B-模型组; C-复方生脉成骨胶囊组; D-Agomir组; E-复方生脉成骨胶囊+Agomir组; F-阿仑膦酸钠组(下同)

图 1 小鼠股骨头 Micro-CT 检查结果

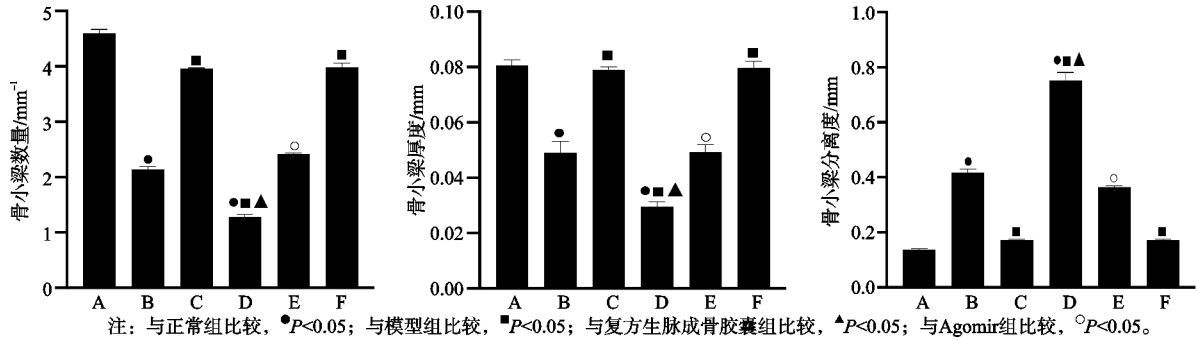


图 2 小鼠股骨头骨小梁数量、骨小梁厚度和骨小梁分离度比较

2.3 复方生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死小鼠血清骨钙素、ALP、PINP、TRAP、PTH、BALP 的影响

复方生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死小鼠血清骨钙素、ALP、PINP、TRAP、PTH、BALP 的影响见表 3, 结果表明: 与正常组比较, 模型组血清骨钙素、PINP、BALP 水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), ALP、TRAP、PTH 水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 复方生脉成骨胶囊组和阿仑膦酸钠组血清骨钙素、PINP、BALP 水平升高, 差

异有统计学意义 ($P < 0.05$), ALP、TRAP、PTH 水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与正常组、模型组和复方生脉成骨胶囊组比较, Agomir 组血清骨钙素、PINP、BALP 水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), ALP、TRAP、PTH 水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 Agomir 组比较, 复方生脉成骨胶囊 + Agomir 组血清骨钙素、PINP、BALP 水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), ALP、TRAP、PTH 水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$).

表 3 小鼠血清骨钙素、ALP、PINP、TRAP、PTH、BALP 比较 ($\bar{x} \pm s$)

组别	骨钙素/ (ng · mL ⁻¹)	ALP/ (IU · L ⁻¹)	PINP/ (ng · mL ⁻¹)	TRAP/ (IU · L ⁻¹)	PTH/ (ng · mL ⁻¹)	BALP/ (IU · L ⁻¹)
正常组	18.70 ± 1.56	40.14 ± 1.94	11.62 ± 1.81	13.15 ± 0.99	51.62 ± 1.64	284.87 ± 2.63
模型组	6.62 ± 0.89 ¹⁾	100.01 ± 3.28 ¹⁾	6.84 ± 0.48 ¹⁾	27.96 ± 3.79 ¹⁾	100.06 ± 3.33 ¹⁾	197.12 ± 3.60 ¹⁾
复方生脉成骨 胶囊组	16.08 ± 1.72 ²⁾	48.77 ± 2.79 ²⁾	10.92 ± 1.25 ²⁾	14.72 ± 1.29 ²⁾	59.01 ± 3.12 ²⁾	255.72 ± 4.23 ²⁾
Agomir 组	2.92 ± 0.74 ¹⁾²⁾³⁾	128.40 ± 2.68 ¹⁾²⁾³⁾	3.99 ± 0.13 ¹⁾²⁾³⁾	34.25 ± 4.46 ¹⁾²⁾³⁾	123.36 ± 2.08 ¹⁾²⁾³⁾	154.99 ± 4.45 ¹⁾²⁾³⁾
复方生脉成骨胶 囊 + Agomir 组	9.72 ± 0.36 ¹⁾	82.13 ± 2.12 ¹⁾	8.30 ± 0.38 ¹⁾	21.75 ± 1.75 ¹⁾	94.04 ± 1.76 ¹⁾	221.83 ± 4.63 ¹⁾
阿仑膦酸钠组	15.55 ± 1.10 ²⁾	51.43 ± 0.85 ²⁾	10.69 ± 1.33 ²⁾	15.83 ± 2.00 ²⁾	56.54 ± 3.28 ²⁾	249.35 ± 5.03 ²⁾

注: 1)与正常组比, $P < 0.05$; 2)与模型组比, $P < 0.05$; 3)与复方生脉成骨胶囊组比, $P < 0.05$; 4)与 Agomir 组比, $P < 0.05$.

2.4 复方生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死小鼠血清 TNF- α 、IL-6、SOD、MDA 和 LPO 的影响

复方生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死小鼠血清 TNF- α 、IL-6、SOD、MDA 和 LPO 的影响见表 4, 结果表明: 与正常组比较, 模型组血清 TNF- α 、IL-6、MDA 和 LPO 水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 血清 SOD 降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与模型组比较, 复方生脉成骨胶囊组和阿仑膦酸钠组 TNF- α 、IL-6、MDA 和 LPO 水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 血清 SOD 升高, 差异有统计学意义 ($P <$

0.05); 与正常组、模型组和复方生脉成骨胶囊组比较, Agomir 组血清 TNF- α 、IL-6、MDA 和 LPO 水平升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 血清 SOD 降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$); 与 Agomir 组比较, 复方生脉成骨胶囊 + Agomir 组血清 TNF- α 、IL-6、MDA 和 LPO 水平降低, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$), 血清 SOD 升高, 差异有统计学意义 ($P < 0.05$).

2.5 复方生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死小鼠股骨头组织病理的影响

复方生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死小鼠股骨

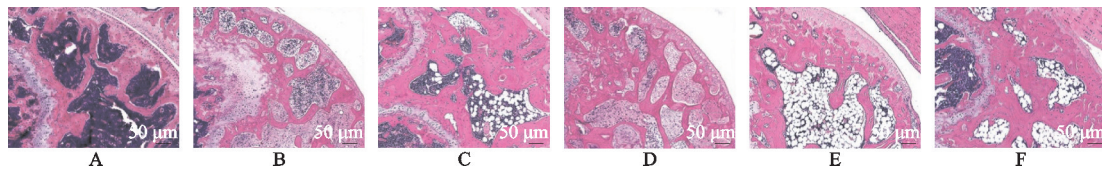
表4 小鼠血清 TNF- α 、IL-6、SOD、MDA 和 LPO 比较($\bar{x} \pm s$)

组别	TNF- α /(ng \cdot L $^{-1}$)	IL-6/(ng \cdot L $^{-1}$)	SOD/(IU \cdot L $^{-1}$)	MDA/(IU \cdot L $^{-1}$)	LPO/(μ g \cdot L $^{-1}$)
正常组	17.39 \pm 2.46	58.96 \pm 3.08	89.72 \pm 4.15	2.15 \pm 0.17	6.70 \pm 1.87
模型组	77.99 \pm 3.31 ¹⁾	100.82 \pm 1.15 ¹⁾	33.98 \pm 2.75 ¹⁾	5.74 \pm 0.61 ¹⁾	18.11 \pm 3.51 ¹⁾
复方生脉成骨胶囊组	21.92 \pm 2.93 ²⁾	66.51 \pm 3.25 ²⁾	85.28 \pm 1.39 ²⁾	2.53 \pm 0.16 ²⁾	8.60 \pm 1.68 ²⁾
Agomir 组	92.18 \pm 1.89 ¹⁾²⁾³⁾	127.74 \pm 4.72 ¹⁾²⁾³⁾	22.97 \pm 1.82 ¹⁾²⁾³⁾	6.92 \pm 0.85 ¹⁾²⁾³⁾	25.77 \pm 2.28 ¹⁾²⁾³⁾
复方生脉成骨胶囊+Agomir 组	67.00 \pm 1.15 ⁴⁾	90.62 \pm 2.78 ⁴⁾	48.76 \pm 0.89 ⁴⁾	4.75 \pm 0.25 ⁴⁾	15.83 \pm 0.87 ⁴⁾
阿仑膦酸钠组	27.47 \pm 2.19 ²⁾	72.87 \pm 1.67 ²⁾	74.33 \pm 3.62 ²⁾	3.25 \pm 0.39 ²⁾	12.31 \pm 1.73 ²⁾

注:1)与正常组比, $P < 0.05$;2)与模型组比, $P < 0.05$;3)与复方生脉成骨胶囊组比, $P < 0.05$;4)与 Agomir 组比, $P < 0.05$ 。

头组织病理的影响见图3,结果表明:正常组小鼠股骨头组织结构正常,无明显病理改变;与正常组比较,模型组股骨头组织骨小梁稀疏,排列紊乱,疏松,断裂,空骨陷窝增多;与模型组比较,复方生脉成骨胶囊组股骨

头组织病理显著改善;与复方生脉成骨胶囊组比较,Agomir 组骨小梁稀疏,变细,排列紊乱;与 Agomir 组比较,复方生脉成骨胶囊+Agomir 组股骨头组织显著恢复。

图3 小鼠股骨头组织病理检查结果(HE,200 \times)

2.6 复方生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死小鼠 Runx2、BMP-2、Osterix mRNA 的影响

复方生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死小鼠 Runx2、BMP-2、Osterix mRNA 的影响见表5,结果表明:与正常组比较,模型组小鼠 Runx2、BMP-2、Osterix mRNA 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,复方生脉成骨胶囊组和阿仑膦

酸钠组小鼠 Runx2、BMP-2、Osterix mRNA 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与正常组、模型组和复方生脉成骨胶囊组比较,Agomir 组 Runx2、BMP-2、Osterix mRNA 水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 Agomir 组比较,复方生脉成骨胶囊+Agomir 组 Runx2、BMP-2、Osterix mRNA 水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$)。

表5 小鼠 Runx2、BMP-2、Osterix mRNA 水平比较($\bar{x} \pm s$)

组别	Runx2	BMP-2	Osterix
正常组	5.55 \pm 0.08	4.95 \pm 0.33	6.67 \pm 0.14
模型组	1.04 \pm 0.07 ¹⁾	0.60 \pm 0.04 ¹⁾	1.13 \pm 0.08 ¹⁾
复方生脉成骨胶囊组	5.14 \pm 0.16 ²⁾	4.43 \pm 0.48 ²⁾	5.97 \pm 0.25 ²⁾
Agomir 组	0.46 \pm 0.06 ¹⁾²⁾³⁾	0.28 \pm 0.03 ¹⁾²⁾³⁾	0.68 \pm 0.08 ¹⁾²⁾³⁾
复方生脉成骨胶囊+Agomir 组	2.60 \pm 0.29 ⁴⁾	1.03 \pm 0.13 ⁴⁾	1.90 \pm 0.05 ⁴⁾
阿仑膦酸钠组	5.07 \pm 0.32 ²⁾	4.51 \pm 0.17 ²⁾	6.01 \pm 0.08 ²⁾

注:1)与正常组比, $P < 0.05$;2)与模型组比, $P < 0.05$;3)与复方生脉成骨胶囊组比, $P < 0.05$;4)与 Agomir 组比, $P < 0.05$ 。

2.7 复方生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死小鼠 Runx2、BMP-2、Osterix 蛋白的影响

复方生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死小鼠 Runx2、BMP-2、Osterix 蛋白的影响见图4,结果表明:与正常组比较,模型组小鼠 Runx2、BMP-2、Osterix 蛋白水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与模型组比较,复方生脉成骨胶囊组和阿仑膦酸钠组小鼠 Runx2、BMP-2、Osterix 蛋白水平升高,差异有统计学意义($P < 0.05$);与正常组、模型组和复方生脉成骨胶囊组比较,Agomir 组 Runx2、BMP-2、Osterix 蛋白水平降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);与 Agomir 组比较,复方生脉成骨胶囊+Agomir 组 Runx2、BMP-2、Osterix 蛋白水平升高,差异有统计学意义($P <$

0.05)。

3 讨论

股骨头坏死是由股骨头组织血供受损引发的骨髓成分和骨细胞死亡,进而导致患者关节活动受限^[9-10],目前股骨头坏死治疗药物的研发仍是亟需解决的问题^[11-12]。中医学认为^[13]肾为先天之本,主骨生髓;外邪入侵,痰湿瘀结,而致肾精亏虚,气血瘀滞,筋骨失养,日久所致髓海空虚,筋骨失养,最终导致股骨头坏死的发生。因此,中医理论认为补肾活血是股骨头坏死治疗的根本方法^[14]。复方生脉成骨胶囊以补肾活血理论为基础,方中川芎活血止痛、祛风燥湿,当归活血止痛、散瘀通结,赤芍活血凉血,红花活血散瘀,熟地黄益气补血、养阴生津,桃仁活血祛瘀,木豆叶解毒消

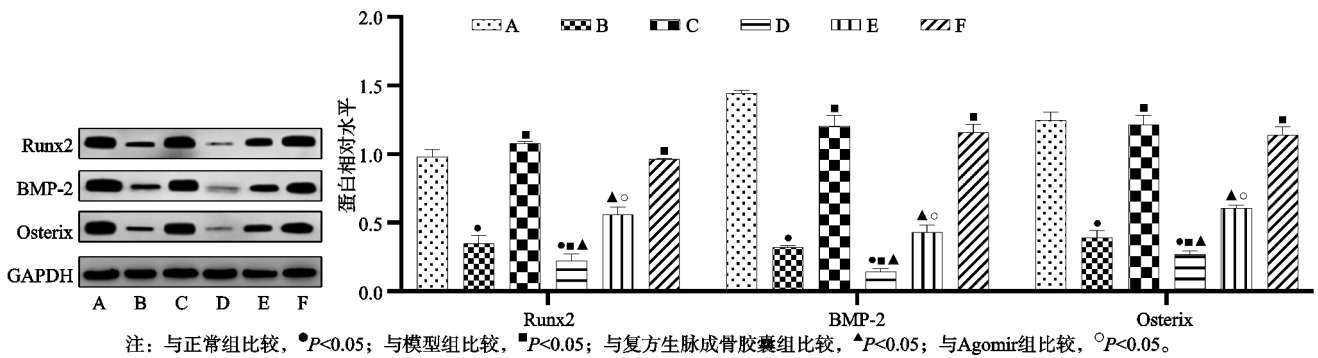


图 4 小鼠 Runx2、BMP-2、Osterix 蛋白比较

肿，全方共奏养阴补肾、活血散瘀、消肿止痛之功。近年来研究表明，复方生脉成骨胶囊在股骨头坏死治疗中发挥重要作用^[15-16]，能够促进股骨头组织的修复^[17]。由此可见复方生脉成骨胶囊在股骨头坏死的治疗中具有巨大潜力。

研究表明^[18] miR-135b-5p 与股骨头坏死的发生有关，调节 miR-135b-5p 可能是干预股骨头组织病理进展的关键途径。本实验结果表明，复方生脉成骨胶囊能够降低股骨头坏死小鼠 miR-135b-5p 水平，且同时给予小鼠复方生脉成骨胶囊和 miR-135b-5p 模拟物后，小鼠 miR-135b-5p 水平则明显下降，提示复方生脉成骨胶囊能够显著降低 miR-135b-5p 水平，这可能是复方生脉成骨胶囊在股骨头坏死治疗中的重要作用基础。

骨小梁数量和厚度降低，骨小梁分离度升高，是股骨头坏死的重要标志^[19-20]。本实验结果表明，miR-135b-5p 升高是导致小鼠激素性股骨头坏死的重要因素，且复方生脉成骨胶囊能够显著抑制 miR-135b-5p 升高导致的股骨头组织病理损害的加重。骨钙素、ALP、PINP、TRAP、PTH、BALP 水平是反映骨组织代谢的重要指标^[21-22]，降低 PTH 水平能够改善骨代谢，抑制小鼠股骨头病理性改变^[23]。本实验结果表明，复方生脉成骨胶囊能够抑制破骨细胞活性，抑制股骨头组织病理进展，并逆转 miR-135b-5p 水平升高导致的骨代谢异常。研究表明^[24-25] 调节 TNF- α 、IL-6、SOD、MDA 和 LPO 等炎症因子及氧化应激反应水平，能够抑制股骨头组织内质网应激，改善骨代谢及病理结构的改变。本实验结果表明，复方生脉成骨胶囊能够显著降低炎症因子水平并改善氧化应激反应，进而促进股骨头坏死的修复，抑制股骨头组织病理改变。

Runx2、BMP-2、Osterix 是与骨组织修复和成骨细胞分化相关的重要基因，Runx2 水平降低是导致激素性股骨头坏死的独立危险因素^[26]，升高 Runx2、Osterix 水平能够升高激素性股骨头坏死大鼠 H 型血管的生成，抑制激素性股骨头坏死的进展^[27]。本实验结果表明，复方生脉成骨胶囊能够显著升高股骨头坏

死小鼠 Runx2、BMP-2、Osterix 水平，同时复方生脉成骨胶囊能够显著逆转 miR-135b-5p 升高导致的 Runx2、BMP-2、Osterix 水平的降低。由此可见复方生脉成骨胶囊能够显著改善激素性股骨头坏死小鼠股骨头组织结构的变化，促进股骨头组织修复，其机制与调节 miR-135b-5p 有关。

综上所述，复方生脉成骨胶囊能够显著抑制激素性股骨头坏死小鼠股骨头组织结构破坏，调节骨代谢，抑制小鼠全身炎症反应及氧化应激损伤，促进股骨头成骨细胞分化，其机制可能与调节 miR-135b-5p 有关。

参考文献

- [1] GEORGE G, LANE J M. Osteonecrosis of the femoral head[J]. Journal of the American Academy of Orthopaedic Surgeons, 2022, 6(5): e21. 00176.
- [2] KARAMPINAS P, GALANIS A, PAPAGRIGORAKIS E, et al. Osteonecrosis of the femoral head. Optimizing the early-stage joint-preserving surgical treatment? [J]. Maedica, 2022, 17(4): 948-954.
- [3] 谢中胜, 陈志强, 李涌涛, 等. 复方生脉成骨胶囊防治激素性股骨头坏死的 MRI 评价[J]. 光明中医, 2019, 34(24): 3732-3736.
- [4] 何伟, 陈镇秋, 张庆文. 补肾活血中药治疗股骨头坏死临床研究[J]. 新中医, 2012, 44(4): 50-51.
- [5] 帅波, 马陈, 沈霖, 等. 补肾活血方对激素性股骨头缺血性坏死小鼠肾素-血管紧张素系统经典轴的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2022, 30(6): 1-5.
- [6] 林天烨, 吴智明, 张文胜, 等. 复方生脉成骨胶囊修复激素性股骨头坏死的作用机制[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(2): 200-207.
- [7] 艾力江·阿斯拉, 梁治权, 李雷疆, 等. 补肾生骨汤对股骨头无菌性坏死大鼠的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志, 2023, 31(1): 7-12.
- [8] 李杰, 范永升, 丁兴红. 基于“肾主骨”理论探讨解毒祛瘀滋阴方治疗糖皮质激素性骨质疏松的作用机制[J]. 中国中西医结合杂志, 2023, 43(7): 846-850.
- [9] LIU X Z, WANG C, MENG H Y, et al. Research progress on exosomes in osteonecrosis of the femoral head[J]. Orthopaedic Surgery, 2022, 14(9): 1951-1957.
- [10] MA M X, TAN Z, LI W Y, et al. Osteoimmunology and

- osteonecrosis of the femoral head[J]. *Bone & Joint Research*, 2022, 11(1): 26-28.
- [11] REZUS E, TAMBA B I, BADESCU M C, et al. Osteonecrosis of the femoral head in patients with hypercoagulability: from pathophysiology to therapeutic implications[J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2021, 22(13): 6801.
- [12] ZHANG J, CAO J Z, LIU Y F, et al. Advances in the pathogenesis of steroid-associated osteonecrosis of the femoral head[J]. *Biomolecules*, 2024, 14(6): 667.
- [13] 韦标方, 孙丙银. 活血补肾中药联合植骨支撑治疗非创伤性股骨头坏死[J]. *中国组织工程研究*, 2014, 18(29): 4706-4711.
- [14] 乌日莎娜, 沈莹珊, 袁颖嘉, 等. 基于“瘀去、新生、骨合”理论从细胞层面探讨祛瘀、活血及补肾中药治疗股骨头坏死的作用机制[J]. *中医正骨*, 2022, 34(4): 61-63.
- [15] 侯伟, 杜斌, 刘铎, 等. 股骨头坏死常用复方研究进展[J]. *国医论坛*, 2022, 37(2): 71-75.
- [16] 田媛媛, 张佳琦, 蓝若丹, 等. 复方生脉成骨胶囊对激素性股骨头坏死患者 VEGF、HIF-1 α 水平及股骨头微血流灌注超声造影指标的影响[J]. *临床和实验医学杂志*, 2022, 21(12): 1294-1299.
- [17] 周泽旺, 陈雷雷, 叶秋丰, 等. 磁共振功能成像对复方生脉成骨胶囊治疗肾虚血瘀型早期激素性股骨头坏死的评价分析[J]. *河北中医*, 2021, 43(5): 777-780.
- [18] ZHANG M, CHEN D L, ZHANG F, et al. Serum exosomal hsa-miR-135b-5p serves as a potential diagnostic biomarker in steroid-induced osteonecrosis of femoral head[J]. *American Journal of Translational Research*, 2020, 12(5): 2136-2154.
- [19] 杨祥军, 王丛悦, 徐西林, 等. 虎杖苷调节 JAK2/STAT3 信号通路治疗大鼠激素性股骨头坏死的实验研究[J]. *中国骨伤*, 2025, 38(2): 195-203.
- [20] 李文茜, 田亮玉, 张谨, 等. 基于 VEGF/PI3K/Akt 通路基因表达探讨骨坏死康复丸对激素性股骨头坏死大鼠血管新生的影响[J]. *广州中医药大学学报*, 2024, 41(8): 2127-2135.
- [21] 李皎, 许康, 周志能, 等. 益气续骨方调节 PI3K/Akt 信号通路对激素性股骨头坏死大鼠骨代谢的影响[J]. *现代中西医结合杂志*, 2024, 33(9): 1181-1187.
- [22] 张宗逸, 吴港归, 朱守旭, 等. 骨痹通消颗粒调控 TGF- β 1/Smads 信号通路干预激素性股骨头坏死大鼠模型[J]. *安徽中医药大学学报*, 2025, 44(2): 88-93.
- [23] 方祥, 周正新, 朱磊, 等. 骨痹通消颗粒干预激素性股骨头坏死小鼠模型的作用及机制[J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(16): 2599-2604.
- [24] 李鹏飞, 刘宏鹏, 李琳琳, 等. 黄芪甲苷通过 GATA4 途径调控内质网应激对激素性股骨头缺血坏死大鼠的作用机制[J]. *新疆医科大学学报*, 2024, 47(10): 1340-1347.
- [25] 马秉楠, 关玉波, 陈长锋, 等. 补肾生髓强骨方对酒精性股骨头坏死模型大鼠炎症因子、氧化应激及 TLR4、NF- κ B 和 VEGF 蛋白表达的影响[J]. *中国中医急症*, 2020, 29(12): 2125-2128.
- [26] 杨森林, 张国秋, 李超, 等. miR-133a 调控 RUNX2/BMP2 信号通路参与激素性股骨头坏死的机制[J]. *中国医科大学学报*, 2023, 52(11): 984-991.
- [27] 于海洋, 卢增鹏, 汪海燕, 等. 生骨再造丸对激素性股骨头坏死大鼠 H 型血管生成的影响[J]. *中国中医药信息杂志*, 2023, 30(5): 91-96.

(收稿日期: 2025-06-25)