

活骨方对酒精性骨质疏松大鼠骨髓微环境 相关炎症-氧化失衡及衰老信号的影响

徐西林¹ 王银仓² 任树军² 李小冬¹ 尚东雨³ 高宇鹤¹ 刘博¹ 姜益常^{2△}

[摘要] 目的:探讨活骨方对酒精性骨质疏松(AOP)大鼠骨髓微环境相关的炎症反应、股骨远端松质骨微结构、骨组织抗氧化防御及 p16/p21/p53 相关蛋白变化的影响,并结合骨代谢指标与骨髓脂肪沉积变化评价其干预作用。方法:选取 6~8 周龄,体重(200±20)g 的无特定病原体(SPF)级雄性 SD 大鼠 50 只,按随机数字表法分为正常组(N 组)、酒精性骨质疏松模型组(AOP 组)和活骨方低/中/高剂量组(L/M/H 组),每组 10 只。除 N 组外,其余各组采用 20%体积分数酒精 10 mL/kg 灌胃,每周 6 次,连续 20 周建立酒精性骨质疏松模型。于第 16 周采用股骨远端 Micro-CT 对模型进行阶段性验证;自第 16 周起,在持续酒精干预基础上,L/M/H 组分别给予活骨方 0.98,1.96,3.92 g/kg 灌胃,每周 6 次,连续 4 周。第 20 周末再次行股骨远端 Micro-CT 观察松质骨微结构,检测血清 IL-1 β 、IL-6、CXCL10、MCP-1 及 Ca、P、PINP、CTX-1 水平;检测骨组织总抗氧化能力(T-AOC)、超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)水平;采用 Western Blot 法检测股骨组织 p16、p21、p53 蛋白表达;采用茜素红染色和油红 O 染色观察骨矿化及骨髓脂肪沉积变化。结果:第 16 周 Micro-CT 结果显示,与 N 组比较,AOP 组股骨远端松质骨骨小梁明显稀疏、变细,骨小梁组织平均骨密度降低,差异有统计学意义($P<0.01$),骨小梁分离度(Tb. Sp)升高,差异有统计学意义($P<0.01$),骨小梁厚度(Tb. Th)降低,差异有统计学意义($P<0.01$),骨小梁数目(Tb. N)降低,差异有统计学意义($P<0.001$),骨体积分数(BV/TV)降低,差异有统计学意义($P<0.0001$),提示模型已成功建立。第 20 周末,与 N 组比较,AOP 组上述松质骨微结构异常仍然存在。与 AOP 组比较,活骨方干预后股骨远端松质骨微结构均有不同程度改善,其中高剂量组改善更为明显,表现为骨小梁组织平均骨密度、Tb. Th、Tb. N 及 BV/TV 升高,Tb. Sp 降低,差异有统计学意义($P<0.05$)。同时,与 N 组比较,AOP 组血清 IL-1 β 、IL-6、CXCL10、MC-1 水平升高,Ca、P 水平下降,骨组织 T-AOC、SOD、CAT 水平下降,股骨组织 p16、p21、p53 蛋白表达上调,差异均有统计学意义($P<0.05$),并伴骨髓脂肪沉积增加及骨代谢失衡;活骨方干预后上述异常均得到不同程度改善,其中高剂量组改善幅度相对较大,差异有统计学意义($P<0.05$)。结论:活骨方可改善酒精性骨质疏松大鼠股骨远端松质骨微结构损伤,减轻炎症因子异常升高、骨组织抗氧化能力下降、p16/p21/p53 相关蛋白异常表达、骨髓脂肪沉积增加及骨代谢紊乱,其保护作用可能与改善骨髓微环境相关的异常状态有关。

[关键词] 活骨方;酒精性骨质疏松;骨髓微环境;炎症;氧化应激;p16/p21/p53 蛋白

[中图分类号] R285.5;R274 **[文献标志码]** A **[文章编号]**1005-0205(2026)05-0001-09

DOI:10.20085/j.cnki.issn1005-0205.260501

Effects of Huogu Formula on Bone Marrow Microenvironment-Related Inflammatory-Oxidative Imbalance and Senescence-Related Signaling in Rats with Alcoholic Osteoporosis

基金项目:黑龙江省自然科学基金联合基金培育项目
(JJ2025PL0348)

黑龙江省卫生健康委科研课题(20252121010127)

国家自然科学基金项目(82374496)

¹ 黑龙江中医药大学附属第三医院(哈尔滨,150036)

² 黑龙江中医药大学附属第一医院

³ 黑龙江中医药大学附属第二医院

Δ 通信作者 E-mail:jiangyichang2008@126.com

XU Xilin¹ WANG Yincang² REN Shujun²

LI Xiaodong¹ SHANG Dongyu³ GAO Yuhe¹

LIU Bo¹ JIANG Yichang^{2△}

¹ The Third Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150036, China;

² The First Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China;

³ The Second Affiliated Hospital of Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150006, China.

Abstract Objective: To investigate the effects of Huogu formula on bone marrow microenvironment-related inflammatory response, distal femoral trabecular microarchitecture, bone antioxidant defense, and p16/p21/p53-related protein changes in rats with alcoholic osteoporosis (AOP), and to evaluate its intervention effects in combination with bone metabolism indices and bone marrow fat deposition. **Methods:** Fifty SPF male Sprague-Dawley rats aged 6–8 weeks and weighing (200±20) g were randomly divided into normal group (N group), AOP model group (AOP group), and low-, medium-, and high-dose Huogu formula groups (L, M, and H groups), with 10 rats in each group. Except for the N group, rats in all groups received intragastric administration of 20% (vol/vol) ethanol at 10 mL/kg, 6 times per week for 20 consecutive weeks to establish the AOP model. At week 16, distal femoral Micro-CT was performed for stage validation of the model. From week 16, on the basis of continued ethanol intervention, rats in the L, M, and H groups were given Huogu formula by gavage at doses of 0.98, 1.96, and 3.92 g/kg, respectively, 6 times per week for 4 consecutive weeks. At week 20, distal femoral trabecular microarchitecture was re-evaluated by Micro-CT. Serum levels of IL-1 β , IL-6, CXCL10, MCP-1, Ca, P, PINP, and CTX-1 were measured. Total antioxidant capacity (T-AOC), superoxide dismutase (SOD), and catalase (CAT) levels in bone tissue were determined. Protein expression of p16, p21, and p53 in femoral tissue was detected by Western Blot. Bone mineralization and bone marrow fat deposition were observed by Alizarin Red staining and Oil Red O staining, respectively. **Results:** At week 16, Micro-CT showed that, compared with the N group, rats in the AOP group exhibited markedly sparse and thinned trabeculae in the distal femur, accompanied by decreased trabecular tissue mean BMD ($P < 0.01$), reduced trabecular thickness (Tb. Th, $P < 0.01$), trabecular number (Tb. N, $P < 0.001$), and bone volume fraction (BV/TV, $P < 0.0001$), as well as increased trabecular separation (Tb. Sp, $P < 0.01$), indicating successful model establishment. At week 20, these trabecular microarchitectural abnormalities remained in the AOP group. Compared with the AOP group, Huogu formula improved distal femoral trabecular microarchitecture to varying degrees, with more marked improvement in the high-dose group, as evidenced by increased trabecular tissue mean BMD, Tb. Th, Tb. N, and BV/TV and decreased Tb. Sp (all $P < 0.05$). Meanwhile, compared with the N group, the AOP group showed increased serum IL-1 β , IL-6, CXCL10, and MCP-1 levels (all $P < 0.05$), accompanied by decreased serum Ca and P levels, decreased bone tissue T-AOC, SOD, and CAT levels (all $P < 0.05$), upregulated p16, p21, and p53 protein expression in femoral tissue (all $P < 0.05$), increased bone marrow fat deposition, and disordered bone metabolism. Huogu formula ameliorated these abnormalities to different extents, with relatively greater improvement in the high-dose group (all $P < 0.05$). **Conclusion:** Huogu formula can ameliorate distal femoral trabecular microarchitectural damage, abnormal elevation of inflammatory factors, decreased bone antioxidant capacity, abnormal expression of p16/p21/p53-related proteins, increased bone marrow fat deposition, and bone metabolic disorder in AOP rats. Its protective effect may be related to the improvement of abnormalities associated with the bone marrow microenvironment.

Keywords: Huogu formula; alcoholic osteoporosis; bone marrow microenvironment; inflammation; oxidative stress; p16/p21/p53 protein

酒精相关骨量下降和骨折风险增加已有较明确的流行病学证据。前瞻性队列研究的系统综述及剂量-反应 Meta 分析显示, 饮酒与骨折风险显著相关, 且饮酒水平越高, 骨健康受损风险越大^[1-2]。动物与基础研究进一步提示, 长期酒精暴露不仅可直接损伤成骨细胞并抑制骨形成, 还可通过诱导炎症反应、氧化应激及骨髓脂肪化等多重改变, 加速继发性骨质疏松的发生发展^[3-4]。因此, 酒精性骨质疏松 (Alcoholic Osteoporosis, AOP) 并非单纯骨量减少, 现有研究提示其可能伴随与骨髓微环境相关的炎症激活、氧化应激增强及脂肪化倾向等一系列异常变化。

近年来, 骨质疏松的研究视角已由单纯“成骨-破

骨失衡”逐步拓展至“骨免疫-氧化应激-衰老相关变化”耦联网络。炎症因子可促进破骨细胞分化并抑制成骨细胞功能, 是骨重建失衡的重要推动因素^[5-6]; 活性氧 (ROS) 过量累积及抗氧化系统受损不仅可直接损害骨细胞, 还可与炎症反应形成放大回路, 进一步加重骨组织损伤^[7-8]; 应激相关的 p53/p21 轴及 p16 信号异常则常与细胞周期阻滞、衰老相关变化及组织稳态失衡相关^[9-13]。这些证据表明, 炎症、氧化应激与衰老相关变化可能共同参与骨质疏松的持续进展。

除上述通路外, 骨髓微环境及骨髓脂肪组织在骨代谢调控中的作用也受到重视。骨髓基质干细胞向成骨或成脂分化的平衡直接影响骨稳态维持, 当骨髓微

环境偏向脂肪化时,常伴随成骨潜能下降及骨吸收增强^[14-16]。同时,CXCL10、MCP-1/CCL2 等趋化因子与免疫炎症放大、破骨相关调控密切相关,是连接炎症反应与骨重建异常的重要介质^[17-20]。然而,基于血清学、骨组织生化及组织学表型的结果,只能从相关层面提示骨髓微环境异常,尚不足以直接证明骨髓微环境本身已被重塑。

活骨方由丹参、川芎、骨碎补三味中药组成,具有补肾活血、强骨通络之功效。现代药理研究表明,丹参及其活性成分具有抗炎、抑制破骨细胞活化等作用^[21-22];川芎及其代表性成分四甲基吡嗪具备抗炎、抗氧化和多通路调控特性^[23-24];骨碎补总黄酮可改善骨代谢紊乱并修复骨微结构^[25]。目前,关于活骨方干预酒精性骨质疏松的研究仍相对有限,尤其缺乏基于与骨髓微环境相关表型的系统评价。基于此,本研究采用酒精性骨质疏松大鼠模型,结合骨代谢指标、骨髓脂肪沉积、炎症/趋化因子、骨组织抗氧化指标及 p16/p21/p53 相关蛋白表达,综合评价活骨方的干预效应,以期为阐明其对酒精性骨质疏松的保护作用提供实验依据。

1 材料与方法

1.1 实验动物

本研究选用 6~8 周龄、体重为(200±20)g 的无特定病原体(SPF)级雄性 SD 大鼠,由北京维通利华实验动物技术有限公司提供(许可证号为 SCXK(京)2021-0006)。实验大鼠饲养于河北以岭医药研究院实验动物中心 SPF 级屏障设施内,环境温度控制在(25±2)℃,相对湿度为 50%±5%,采用 12 h/12 h 昼夜交替照明。实验期间大鼠自由摄食饮水。垫料为高温灭菌后的干燥玉米芯,每周更换 2 次,并使用经高温消毒后的专用笼具饲养。本研究经河北以岭医药研究院实验动物伦理委员会批准(编号为 N2023142),动物处置符合相关实验动物伦理规范。

1.2 实验药物及试剂

活骨方药材购自黑龙江中医药大学附属第二医院,处方组成:丹参 24 g,川芎 16 g,骨碎补 16 g。活骨方水提物制备方法如下:按处方剂量称取药材,置于 5 L 圆底烧瓶中,加入 10 倍体积蒸馏水,加热回流提取 3 次,每次加热 2 h。合并滤液后继续加热浓缩至生药含量 1 g/mL,室温冷却后于 4℃下保存备用。油红 O 染液(Sigma, O0625),IL-1 β 、IL-6 酶联免疫试剂盒及钙、磷比色法检测试剂盒(伊莱瑞特生物,货号分别为 E-EL-R0012、E-EL-R0015、E-BC-K103-M、E-BC-K245-M),总抗氧化能力(T-AOC)检测试剂盒(南京建成生物工程研究所, A015-2-1),过氧化氢酶(CAT)检测试剂盒(索莱宝, G4307-96T),总超氧化物歧化酶(T-SOD)检测试剂盒(索莱宝, G4306-96T),兔源一抗

GAPDH、p16、p21、p53 及 HRP 标记二抗(武汉三鹰生物技术有限公司)。

1.3 实验仪器

超纯水系统(Heal),超净工作台(Airtech),-80℃超低温冰箱(Haier),Tissue-Tek 石蜡包埋机(Sakura,日本),RM2245 型石蜡切片机(Leica,德国),病理切片染色机(Sakura,日本),组织染色切片扫描仪(Sakura,日本),Tecan Infinite M200 PRO 酶标仪(Tecan,瑞士),EPS301 电泳仪(GE Healthcare Bio-Science AB),SE260-10A-75 垂直电泳槽(GE Healthcare UK Ltd),快速湿转仪(金斯瑞生物科技有限公司),WD-9405DW 数显水平摇床(北京六一生物科技有限公司),PerkinElmer Quantum GX2 Micro-CT(PerkinElmer, Waltham, MA, USA)。

1.4 方法

1.4.1 造模方法 大鼠检疫合格后适应性饲养 7 d。除正常组外,其余各组均采用酒精灌胃法建立酒精性骨质疏松大鼠模型,具体方法为:以 20%体积分数酒精按 10 mL/kg 剂量灌胃,每周 6 次,连续干预 20 周。正常组同期给予等量生理盐水灌胃。

1.4.2 分组方法 采用随机数字表法将 50 只 SPF 级雄性 SD 大鼠随机分为 5 组(每组 10 只):正常组(N 组)、酒精性骨质疏松模型组(AOP 组)、活骨方低剂量组(L 组)/中剂量组(M 组)/高剂量组(H 组)。其中, N 组不接受酒精造模处理;AOP 组、L 组、M 组和 H 组均接受酒精灌胃造模。各组大鼠于相同饲养条件下饲养,自由摄食和饮水。本研究每组初始纳入 10 只大鼠。预设剔除标准包括灌胃相关严重意外、非计划性死亡、标本处理失败或关键检测数据缺失。大鼠纳入、剔除及最终统计分析均按预设标准执行。

1.4.3 干预方法 各组大鼠均于常规 SPF 条件下饲养,自由摄食和饮水。N 组在整个实验期间给予等量生理盐水灌胃;AOP 组在酒精造模基础上不给予药物干预,仅继续按原方案给予酒精灌胃至第 20 周。L 组、M 组和 H 组在持续酒精造模基础上,自第 16 周起分别给予活骨方低/中/高剂量灌胃干预,剂量分别为 0.98, 1.96 和 3.92 g/kg,每周 6 次,连续干预 4 周,持续至第 20 周。活骨方剂量设定依据临床成人用量按人和动物体表面积折算的等效剂量比率表进行换算,其中中剂量为等效剂量,低剂量和高剂量分别为其中剂量的 1/2 和 2 倍。实验期间每周称量大鼠体重 1 次,并根据体重变化调整酒精及活骨方灌胃剂量。

1.4.4 标本制作方法 末次干预结束后,于第 20 周末对各组大鼠进行标本采集。大鼠经腹腔注射 2%戊巴比妥钠麻醉,充分麻醉后经腹主动脉取血,静置后离心分离血清,置于-80℃冰箱保存,用于后续血清骨

代谢指标及炎症/趋化因子检测。随后处死动物,迅速分离双侧股骨及胫骨,剔除周围软组织。左侧股骨用于 Micro-CT 检测,置于 4% 多聚甲醛溶液中固定 48 h;其中部分股骨标本经固定后用于茜素红染色观察骨矿化情况。胫骨远端标本置于 4% 多聚甲醛中固定,经常规脱钙、脱水、透明、石蜡包埋后制备切片,用于油红 O 染色观察骨髓脂肪沉积。另取部分股骨组织液氮速冻后置于 -80°C 冰箱保存,用于骨组织总蛋白提取及 Western Blot 法检测。另取部分骨组织制备组织匀浆,用于抗氧化指标检测。

1.5 实验指标测定

1.5.1 股骨远端 于第 16 周对正常组和酒精性骨质疏松模型组进行股骨远端 Micro-CT 阶段性验证,以评价酒精灌胃 16 周后模型是否成功建立;于第 20 周末对各组股骨标本再次行 Micro-CT 检测,以评价活骨方干预后股骨远端松质骨微结构变化。股骨标本经 4% 多聚甲醛固定 48 h 后取出,置于高分辨率 Micro-CT 成像系统进行扫描。扫描参数设定为: X 线电压 50 kV, 电流 $100\ \mu\text{A}$, 扫描时间 14 min, 视野 6 mm, 像素分辨率 $72.0\ \mu\text{m}$ 。扫描完成后,采用配套三维重建软件对图像进行重建,并在冠状位、矢状位和横断位三个平面上进行空间重定位,使各样本股骨长轴方向尽可能保持一致,以降低因摆位差异造成的测量偏倚。以股骨远端干骺端松质骨区为感兴趣区域,以生长板为统一解剖学标志,自生长板近侧 1 mm 处开始,连续选取相同层数/相同长度范围作为感兴趣区域,排除皮质骨后进行松质骨参数分析。所有标本均采用相同的重建参数、阈值及分析流程完成图像处理与定量测定。感兴趣区域的选取与分析由同一研究者在盲法条件下完成,主要分析指标包括骨小梁组织平均骨密度、骨小梁厚度(Tb. Th)、骨小梁数目(Tb. N)、骨小梁分离度(Tb. Sp)及骨体积分数(BV/TV)。

1.5.2 组织学观察 于第 20 周末取胫骨远端及股骨标本用于组织学观察。胫骨远端标本经 4% 多聚甲醛固定后,胫骨远端经脱钙处理后,采用冰冻切片进行油红 O 染色。股骨标本固定后不脱钙,经硬组织包埋后制备切片,进行茜素红染色,以观察骨组织矿化情况。所有切片均于光学显微镜下采集图像,并对骨组织形态学改变进行比较分析。

1.5.3 血清骨代谢指标及炎症/趋化因子检测 于第 20 周末取血后分离血清,采用商品化试剂盒检测钙(Ca)、磷(P)、I 型前胶原氨基端前肽(PINP)、I 型胶原交联 C 端肽(CTX-1)、白细胞介素- 1β (IL- 1β)、白细胞介素-6(IL-6)、C-X-C 基序趋化因子配体 10(CXCL10)和单核细胞趋化蛋白-1(MCP-1)水平。各项检测均严格按照试剂盒说明书操作,并采用酶标仪

读取吸光度值,根据标准曲线计算各指标浓度。

1.5.4 骨组织抗氧化指标检测 于第 20 周末取部分骨组织制备组织匀浆,采用商品化试剂盒检测骨组织总抗氧化能力(T-AOC)、总超氧化物歧化酶(SOD)活性及过氧化氢酶(CAT)活性。具体操作均按试剂盒说明书进行,并以单位蛋白含量进行结果归一化处理。

1.5.5 p16、p21、p53 相关蛋白检测 于第 20 周末取股骨组织液氮速冻保存,股骨组织样本加入裂解液提取总蛋白,采用 BCA 法测定蛋白浓度。蛋白样本与上样缓冲液混匀后,于 95°C 变性 5 min,经 SDS-PAGE 电泳分离后转膜,室温封闭 1.5 h,与 p16、p21、p53 及 GAPDH 一抗于 4°C 下孵育过夜。次日用 TBST 洗膜 3 次,每次 10 min,加入 HRP 标记二抗室温孵育 1.5 h,再次洗膜后进行化学发光显色。以 GAPDH 为内参,采用 ImageJ 软件对 Western Blot 条带灰度值进行定量分析,计算目标蛋白相对表达量。

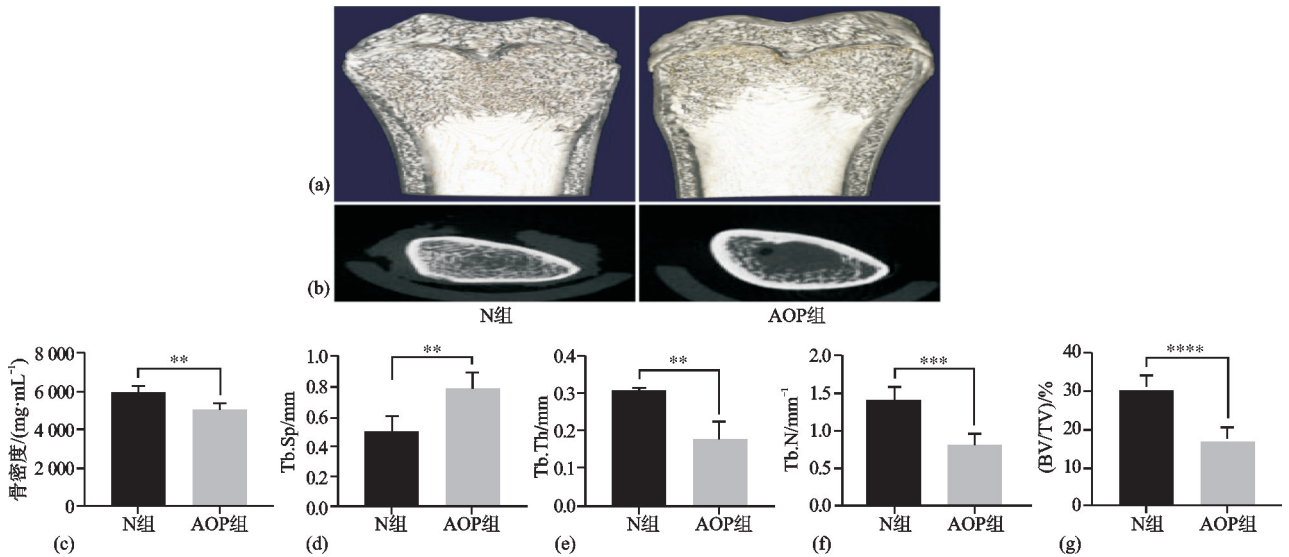
1.6 统计学方法

采用 SPSS 27.0 统计软件进行数据分析,计量资料以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示,对各组数据先行正态性检验和方差齐性检验。第 16 周阶段性 Micro-CT 检测中正常组与酒精性骨质疏松模型组之间的比较,符合正态分布且方差齐时采用独立样本 *t* 检验;不符合正态分布或方差不齐时采用非参数秩和检验。第 20 周末各项指标在 5 组间的比较,符合正态分布且方差齐时采用单因素方差分析,事后两两比较采用 LSD-*t* 检验;方差不齐时采用 Welch 校正方差分析,事后两两比较采用 Dunnett's T_3 检验。检验水准 $\alpha = 0.05$, $P < 0.05$ 差异有统计学意义。

2 结果

2.1 第 16 周股骨远端 Micro-CT 阶段性验证提示酒精性骨质疏松模型已成功建立

为明确第 16 周开始给药是否具备合理依据,于正式干预前对正常组与酒精灌胃 16 周模型组大鼠股骨远端进行 Micro-CT 阶段性评价。三维重建图及横断面图显示,与 N 组比较,酒精性骨质疏松组股骨远端松质骨骨小梁明显稀疏、变细,排列连续性减弱,局部骨小梁网络结构受损,提示酒精暴露已导致显著的松质骨微结构异常。定量分析结果显示,与 N 组比较,AOP 组骨小梁组织平均骨密度明显降低($P < 0.01$),Tb. Sp 明显升高($P < 0.01$),Tb. Th 明显降低($P < 0.01$),Tb. N 明显降低($P < 0.001$),BV/TV 明显降低($P < 0.0001$)。上述结果表明,持续酒精灌胃至第 16 周时,大鼠已出现明确的股骨远端松质骨微结构损伤,提示酒精性骨质疏松模型已成功建立,因此本研究选择自第 16 周开始给予活骨方干预,以评价其对已形成骨质疏松表型的治疗作用,见图 1。



注: ** $P < 0.01$, *** $P < 0.001$, **** $P < 0.0001$ 。

(a) N组与AOP组股骨远端三维重建图; (b) N组与AOP组股骨远端横断面代表图; (c) 骨小梁组织平均骨密度; (d) 骨小梁分离度; (e) 骨小梁厚度; (f) 骨小梁数目; (g) 骨体积分数

图1 第16周股骨远端 Micro-CT 阶段性验证结果

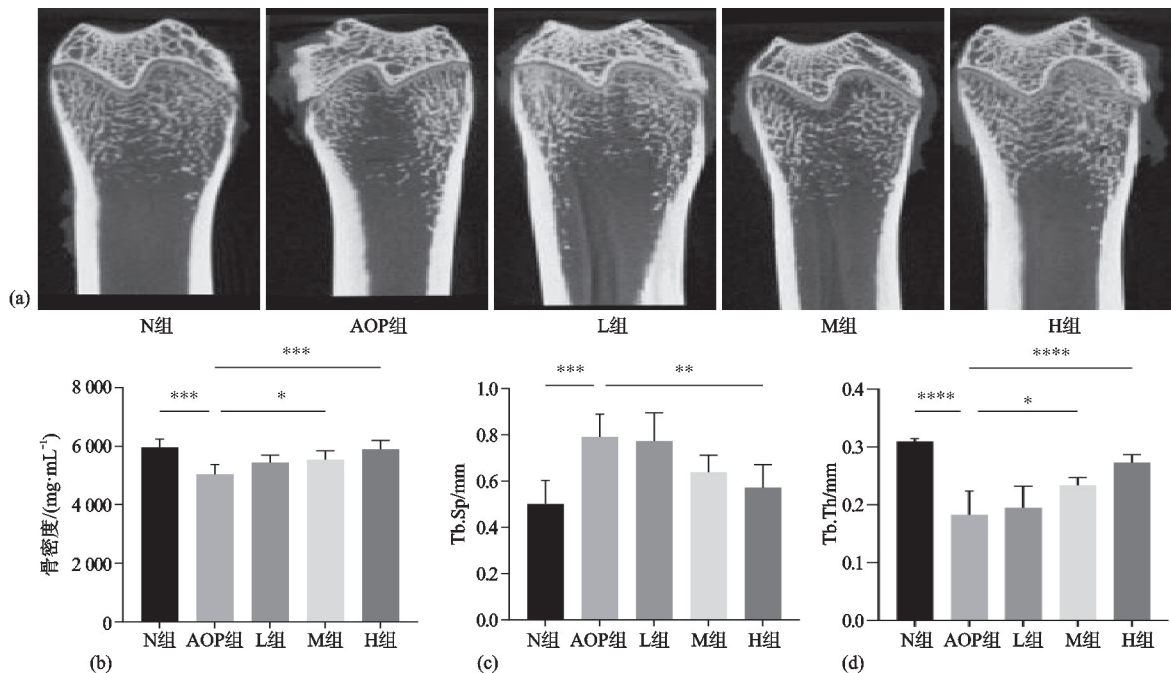
2.2 活骨方改善酒精性骨质疏松大鼠股骨远端松质骨微结构损伤

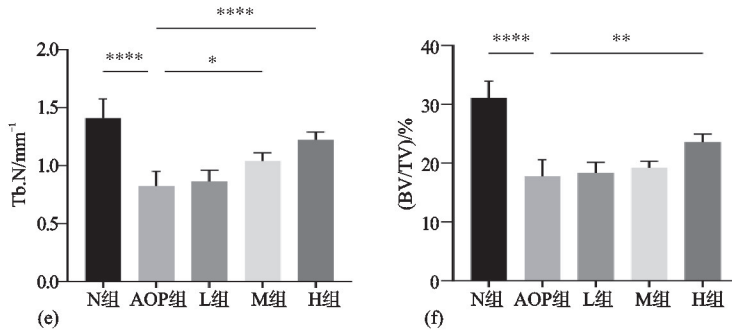
第20周末股骨远端 Micro-CT 结果显示,与 N 组比较,AOP 组松质骨骨小梁明显稀疏、变细,排列紊乱,连续性减弱,提示长期酒精暴露导致股骨远端松质骨微结构持续受损。定量分析进一步表明,AOP 组骨小梁组织平均骨密度、Tb. Th、Tb. N 及 BV/TV 均降低,Tb. Sp 升高,差异有统计学意义。与 AOP 组比较,活骨方干预后各剂量组股骨远端松质骨微结构均呈不同程度改善趋势,其中高剂量组改善最为明显,表现为骨小梁排列较致密、连续性较好,骨小梁组织平均骨密度、Tb. Th、Tb. N 及 BV/TV 升高,Tb. Sp 降低,差异有统计学意义($P < 0.05$);中剂量组部分指标也呈改善趋势。

结果表明活骨方可在一定程度上改善酒精性骨质疏松大鼠股骨远端松质骨微结构损伤,且高剂量组骨保护作用更为突出,见图2。

2.3 活骨方改善酒精性骨质疏松大鼠骨代谢异常并减轻骨髓脂肪沉积

与 N 组比较,AOP 组血清骨代谢指标出现明显异常,表现为 PINP 水平下降、CTX-1 水平升高,提示骨形成受抑、骨吸收增强;同时,茜素红染色显示矿化骨组织染色减弱,油红 O 染色显示骨髓脂肪沉积明显增加。上述结果提示,长期酒精暴露可导致酒精性骨质疏松大鼠骨代谢异常,并伴随骨髓脂肪沉积增加。与 AOP 组比较,活骨方干预后各剂量组骨代谢相关指标均呈不同程度改善,表现为 PINP 水平升高、CTX-1 水平下降,茜



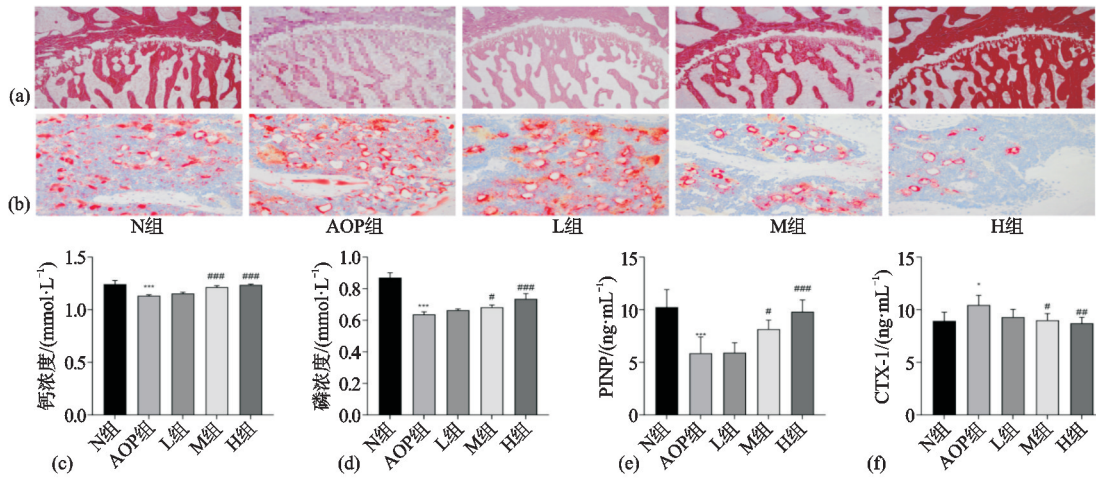


注：横线表示所比较的两组：* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ，**** $P<0.0001$ 。
(a) 各组股骨远端Micro-CT冠状位代表图；(b) 骨小梁组织平均骨密度；(c) 骨小梁分离度；(d) 骨小梁厚度；(e) 骨小梁数目；(f) 骨体积分数

图2 活骨方对酒精性骨质疏松大鼠股骨远端松质骨微结构的影响

素红染色增强，油红O染色减弱，其中高剂量组改善幅度相对较大，差异有统计学意义($P<0.05$)。结果

提示活骨方可在一定程度上改善酒精性骨质疏松大鼠骨代谢异常，并减轻骨髓脂肪沉积，见图3。



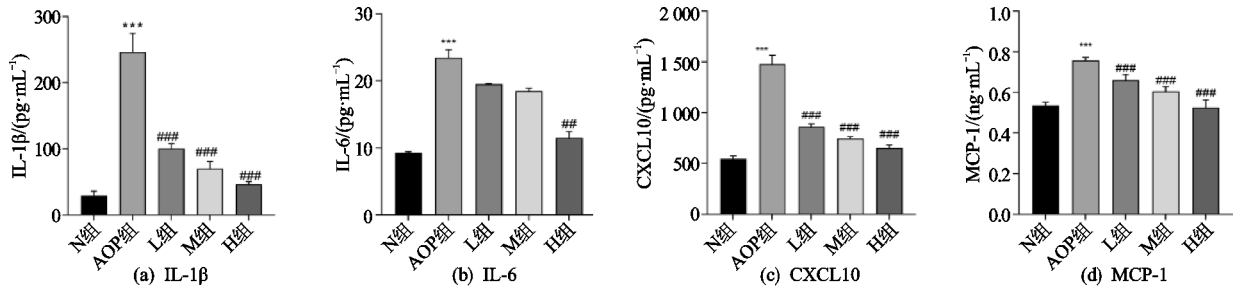
注：与N组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ；与AOP组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ，### $P<0.001$ 。
(a) 茜素红染色($\times 40$)；(b) 油红O染色($\times 200$)；(c)-(f) 骨代谢相关指标定量分析(钙浓度、磷浓度、PINP及CTX-1)

图3 活骨方对酒精性骨质疏松模型大鼠骨组织形态学及骨代谢相关指标的影响

2.4 活骨方改善酒精性骨质疏松大鼠血清炎症因子及趋化因子异常

与N组比较，AOP组血清IL-1 β 、IL-6、CXCL10和MCP-1水平均明显升高，差异有统计学意义($P<0.05$)，提示长期酒精暴露可诱导炎症因子及趋化因子

异常升高。与AOP组比较，活骨方干预后各剂量组上述指标均呈不同程度下降，其中高剂量组改善幅度相对较大，差异有统计学意义($P<0.05$)。结果表明活骨方可在一定程度上改善酒精性骨质疏松大鼠血清炎症因子及趋化因子异常，见图4。



注：与N组比较，* $P<0.05$ ，** $P<0.01$ ，*** $P<0.001$ ；与AOP组比较，# $P<0.05$ ，## $P<0.01$ ，### $P<0.001$ 。

图4 各组血清炎症因子及趋化因子水平的变化

2.5 活骨方改善酒精性骨质疏松大鼠骨组织抗氧化指标异常

与N组比较，AOP组骨组织T-AOC、SOD和CAT活性均明显下降，差异有统计学意义($P<0.05$)，提示酒精性骨质疏松大鼠骨组织抗氧化指标异

常。与AOP组比较，活骨方干预后各剂量组T-AOC、SOD和CAT水平均有所回升，其中高剂量组改善幅度相对较大，差异有统计学意义($P<0.05$)。结果提示活骨方可在一定程度上改善酒精性骨质疏松大鼠骨组织抗氧化指标异常，见图5。

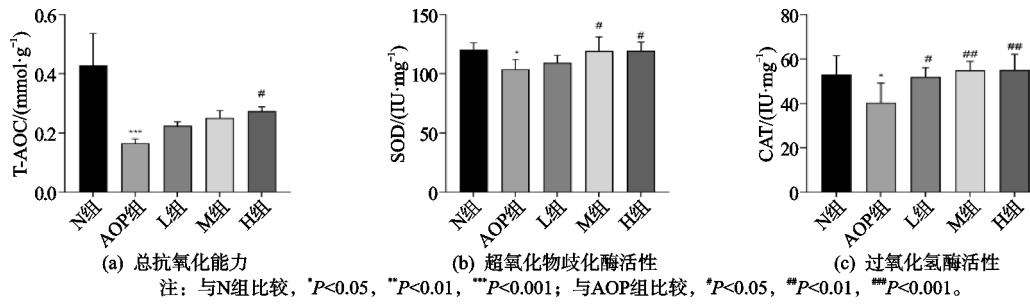


图 5 活骨方对酒精性骨质疏松模型大鼠骨组织抗氧化能力的影响

2.6 活骨方改善酒精性骨质疏松大鼠股骨 p16/p21/p53 相关蛋白异常表达

Western Blot 法结果显示,与 N 组比较,AOP 组股骨组织 p16、p21 和 p53 蛋白表达均明显升高,差异有统计学意义($P < 0.05$),提示长期酒精暴露可引起 p16/p21/p53 相关蛋白异常表达。与 AOP 组比较,活

骨方干预后各剂量组 p16、p21 和 p53 蛋白表达均呈不同程度下降,其中高剂量组改善幅度相对较大,差异有统计学意义($P < 0.05$)。结果提示活骨方可在一定程度上改善酒精性骨质疏松大鼠股骨 p16/p21/p53 相关蛋白异常表达,见图 6。

3 讨论

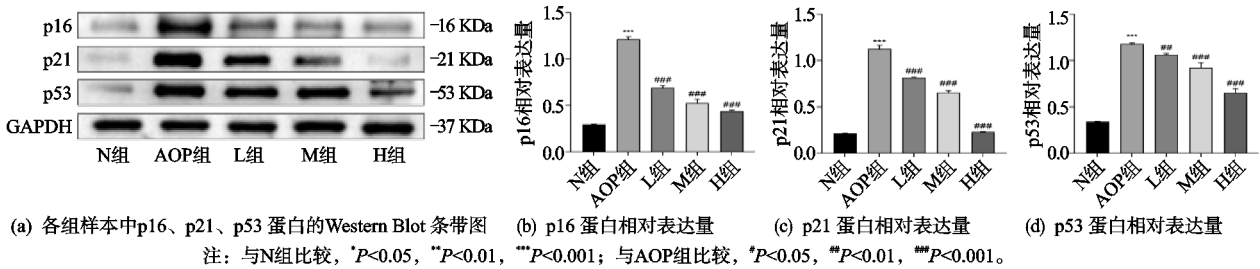


图 6 活骨方干预对酒精性骨质疏松模型大鼠衰老相关蛋白表达的影响

本研究围绕酒精性骨质疏松大鼠的骨结构改变、骨代谢异常、骨髓脂肪沉积、炎症/趋化因子变化、骨组织抗氧化指标及 p16/p21/p53 相关蛋白表达进行了系统观察,结果显示长期酒精暴露后,大鼠不仅出现股骨远端松质骨微结构损伤,还伴随骨代谢异常、骨髓脂肪沉积增加、血清炎症/趋化因子升高、骨组织抗氧化指标下降及 p16/p21/p53 相关蛋白表达上调。活骨方干预后,上述异常均得到不同程度改善,其中高剂量组改善幅度相对较大。整体来看,本研究结果提示酒精性骨质疏松并非单纯表现为骨量下降,而是伴随一系列与骨髓微环境相关的异常改变,活骨方可能通过多层面的协同调节发挥骨保护作用。

骨方干预后,上述异常均得到不同程度改善,其中高剂量组改善幅度相对较大。整体来看,本研究结果提示酒精性骨质疏松并非单纯表现为骨量下降,而是伴随一系列与骨髓微环境相关的异常改变,活骨方可能通过多层面的协同调节发挥骨保护作用。

Micro-CT 结果为本研究的模型建立和药效评价提供了较直接的结构学证据。第 16 周阶段性 Micro-CT 显示,酒精性骨质疏松模型组股骨远端松质骨骨小梁明显稀疏、变细,骨小梁组织平均骨密度、Tb. Th、Tb. N 及 BV/TV 降低,而 Tb. Sp 升高,提示在持续酒精暴露 16 周后,大鼠已形成较明确的骨小梁微结构损伤。第 20 周终点 Micro-CT 进一步显示,活骨方干预后股骨远端松质骨微结构较酒精性骨质疏松组有所改善,提示其不仅对生化和分子指标具有调节作用,也可在一定程度上减轻酒精所致骨结构损害。既往研究认为,长期饮酒可通过抑制骨形成、促进骨吸收及破坏骨小梁网络完整性而导致骨脆性增加^[4,14],本研究的结

构学结果与此基本一致,也从终点表型层面支持了活骨方的骨保护作用。骨代谢指标和组织学结果提示,酒精暴露导致酒精性骨质疏松大鼠处于“骨形成受抑、骨吸收增强”的异常状态,并伴随骨髓脂肪沉积增加。酒精性骨质疏松组 PINP 下降、CTX-1 升高,茜素红染色减弱而油红 O 染色增强,说明酒精暴露后骨矿化能力下降,同时髓腔脂肪化倾向增强。已有研究表明,长期饮酒可抑制成骨活性并增加骨髓脂肪沉积,进而形成骨量下降与髓腔脂肪化并存的病理表型^[4,14-16],本研究结果与这一认识一致。活骨方干预后,骨代谢相关指标向正常方向恢复,骨髓脂肪沉积减轻,提示其可能有助于改善酒精所致骨代谢异常及髓腔脂肪化改变。需要指出的是,本研究尚未开展原代成骨细胞、破骨细胞或骨髓间充质干细胞实验,因此现阶段仍不能明确活骨方主要作用于何种细胞群,也不能直接判断其是否通过调节成骨/成脂分化平衡而发挥作用。

血清 IL-1 β 、IL-6、CXCL10 和 MCP-1 的变化提示,酒精性骨质疏松状态下存在炎症及趋化相关分子异常。IL-1 β 和 IL-6 是骨重建失衡中较常见的促炎介质,可促进破骨相关信号并抑制成骨功能^[5-6],CXCL10 和 MCP-1 则被认为与炎症放大及骨相关细胞通信异常有关^[17,19-20]。本研究中 AOP 组这些指标均明显升高,且与骨代谢异常及骨结构损伤并行出现,

提示炎症/趋化异常可能参与了酒精性骨质疏松的发生发展。活骨方干预后,上述指标不同程度下降,说明其可能对酒精暴露引起的炎症状态具有一定缓解作用。需要强调的是,本研究仅检测了血清中相关因子水平,未进行细胞迁移实验、免疫细胞亚群分型或骨髓腔原位定位分析,因此尚不能据此直接证明 CXCL10、MCP-1 已参与免疫细胞募集或破骨调控过程,也不能将其上升为“骨免疫重塑”的确定性结论。活骨方可能改善了与骨髓微环境相关的炎症/趋化异常状态,而这一改善可能与其骨保护作用存在关联。

骨组织抗氧化指标结果进一步提示,氧化应激可能是酒精所致骨损伤的重要伴随过程。AOP 组 T-AOC、SOD 和 CAT 均明显下降,说明骨组织抗氧化防御能力减弱。既往研究指出,长期饮酒可通过增加活性氧负荷、损伤骨细胞及干扰骨重建平衡而加重骨丢失^[4,7-8]。本研究中骨组织抗氧化指标下降,与骨小梁微结构破坏、骨代谢异常和炎症因子升高相互印证,提示氧化应激可能是酒精性骨质疏松病理过程中不可忽视的组成部分。活骨方干预后,T-AOC、SOD 和 CAT 水平回升,说明其可能对骨组织氧化应激状态具有一定调节作用。需要指出的是,本研究检测的是骨组织抗氧化指标,而非骨髓腔内原位活性氧、线粒体功能或氧化损伤标志物,因此本研究结果表明活骨方改善骨组织抗氧化指标异常。

关于 p16/p21/p53 相关蛋白,本研究结果显示 AOP 组股骨组织中 p16、p21 和 p53 表达上调,活骨方干预后表达下降。p16/p21/p53 轴与应激反应、细胞周期阻滞及衰老相关变化密切相关,在骨衰老和骨质疏松研究中常被用作观察指标^[9-12]。本研究中这些蛋白的变化与炎症因子升高、抗氧化指标下降及骨结构损伤并行出现,提示长期酒精暴露可能诱发了与应激及衰老相关的分子改变;活骨方干预后其表达下调,则提示上述异常状态可能得到一定缓解。然而仅凭 p16、p21 和 p53 三项指标,尚不足以单独证明某一类细胞发生了真正意义上的衰老,也无法判断具体受影响的是成骨细胞、骨细胞、骨髓间充质干细胞还是其他细胞群。因此,本研究结果表明活骨方改善了 p16/p21/p53 相关蛋白异常表达。

从方药组成看,活骨方由丹参、川芎、骨碎补配伍组成,兼具活血化瘀、补肾强骨功效。现有研究显示,丹参、川芎及骨碎补相关成分在抗炎、抗氧化、调节骨代谢等方面具有一定药理活性^[21-25]。本研究中活骨方对骨结构、骨代谢、炎症/趋化因子、骨组织抗氧化指标以及 p16/p21/p53 相关蛋白表达均表现出一定改善作用,提示其可能对酒精性骨质疏松相关异常具有多层面的综合调节作用。但需要强调的是,本研究尚未开展成分鉴

定、网络药理学分析、血清药物化学或关键靶点验证。活骨方在多个指标层面均显示出改善效应,其具体药效物质基础及关键作用靶点仍有待进一步明确。

本研究仍存在以下局限性:第一,本研究采用第 16 周开始、连续 4 周的补救性干预设计,主要评价活骨方对已形成酒精性骨质疏松表型的治疗作用,未设置早期或中期干预组,因此尚不能评价其预防作用及全程干预效果;第二,尽管本研究剂量设置参考了人和动物体表面积折算方法,但仍缺乏系统的剂量探索、药代动力学及血清药物化学证据,因而不宜直接认定存在严格的剂量依赖关系,现有结果仅能说明不同剂量均有改善作用,其中高剂量组改善幅度相对较大;第三,本研究未开展原代细胞实验,尚不能明确活骨方的直接作用靶细胞;第四,关于“骨髓微环境”的证据仍主要来自骨结构、骨代谢、骨髓脂肪沉积、血清炎症/趋化因子及骨组织抗氧化/蛋白表达等间接指标,尚缺乏骨髓原位检测、免疫细胞谱分析及空间定位证据,因此不能直接证明骨髓微环境本身已被重塑;第五,趋化因子功能及 p16/p21/p53 相关变化目前均停留在相关性层面,尚缺乏更直接的功能学验证。后续研究可围绕三个方向进一步深入:一是补充原代细胞和共培养实验,明确活骨方的主要作用细胞;二是结合骨髓原位检测、免疫细胞分型及细胞迁移实验,进一步阐明炎症/趋化异常与骨损伤之间的关系;三是结合成分分析、网络药理学和关键通路干预实验,完善活骨方作用机制的证据链。

综上所述,本研究表明长期酒精暴露可导致大鼠股骨远端松质骨微结构损伤,并伴随骨代谢异常、骨髓脂肪沉积增加、炎症/趋化因子升高、骨组织抗氧化指标下降以及 p16/p21/p53 相关蛋白表达上调等一系列改变。活骨方干预后,上述异常均得到不同程度改善,其中高剂量组改善幅度相对较大。上述结果表明,活骨方可能通过改善与骨髓微环境相关的异常状态而发挥一定骨保护作用,但其具体作用细胞、关键靶点及分子机制仍需进一步研究证实。

参考文献

- [1] KE Y M, HU H F, ZHANG J L, et al. Alcohol consumption and risk of fractures: a systematic review and dose-response meta-analysis of prospective cohort studies[J]. *Advances in Nutrition*, 2023, 14(4): 599-611.
- [2] GODOS J, GIAMPIERI F, CHISARI E, et al. Alcohol consumption, bone mineral density, and risk of osteoporotic fractures: a dose-response meta-analysis[J]. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 2022, 19(3): 1515.
- [3] GUO M, HUANG Y L, WU Q, et al. Chronic ethanol consumption induces osteopenia via activation of osteo-

- blast necroptosis [J]. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2021;3027954.
- [4] SYED HASHIM S A, NAINA MOHAMED I, MOHAMED N. The effects of acute and chronic alcohol administration and withdrawal on bone microstructure, mechanical strength, and remodeling protein expression and their relation to an antioxidant and FGF23 in vivo [J]. *Biomedicines*, 2024, 12(7):1515.
- [5] LUO J, LI L, SHI W S, et al. Oxidative stress and inflammation: roles in osteoporosis [J]. *Frontiers in Immunology*, 2025, 16:1611932.
- [6] XU J, YU L X, LIU F, et al. The effect of cytokines on osteoblasts and osteoclasts in bone remodeling in osteoporosis: a review [J]. *Frontiers in Immunology*, 2023, 14:1222129.
- [7] IANTOMASI T, ROMAGNOLI C, PALMINI G, et al. Oxidative stress and inflammation in osteoporosis: molecular mechanisms involved and the relationship with microRNAs [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(4):3772.
- [8] MARCUCCI G, DOMAZETOVIC V, NEDIANI C, et al. Oxidative stress and natural antioxidants in osteoporosis: novel preventive and therapeutic approaches [J]. *Antioxidants*, 2023, 12(2):373.
- [9] LAWRENCE M, GOYAL A, PATHAK S, et al. Cellular senescence and inflammaging in the bone: pathways, genetics, anti-aging strategies and interventions [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(13):7411.
- [10] 杨超富, 谭国庆, 徐展望. 骨质疏松中衰老相关分泌型调控机制的研究进展 [J]. *中国全科医学*, 2024, 27(29):3685-3695.
- [11] 王薇, 杨钰婷, 白金霞, 等. 细胞衰老及其驱动基因与骨质疏松症研究进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2025, 31(2):215-221.
- [12] PIGNOLO R J, LAW S F, CHANDRA A. Bone aging, cellular senescence, and osteoporosis [J]. *JBMR Plus*, 2021, 5(4):e10488.
- [13] CHENG X Y, CHEN Y D, ZHOU X C, et al. Immunoporosis: the hidden link between aging immune cells and bone fragility [J]. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2025, 53:325-335.
- [14] GUO H Y, BI Y J, ZHANG G Z, et al. Alcohol-induced bone loss driven by dysregulated spatial distribution of gut microbiota and PGD2-IL17 pathway-mediated osteoclast activation [J]. *Frontiers in Microbiology*, 2025, 16:1551028.
- [15] PACCOU J, BADR S, LOMBARDO D, et al. Bone marrow adiposity and fragility fractures in postmenopausal women: the ADIMOS case-control study [J]. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, 2023, 108(10):2526-2536.
- [16] MARINELLI BUSILACCHI E, MORSIA E, POLONI A. Bone marrow adipose tissue [J]. *Cells*, 2024, 13(9):724.
- [17] MIURA M, KITaura H, OHORI F, et al. Role of CXCL10 released from osteocytes in response to TNF- α stimulation on osteoclasts [J]. *Scientific Reports*, 2025, 15:3040.
- [18] 郭曹培, 程飘涛, 杨成兵, 等. 骨免疫与骨代谢 [J]. *中国组织工程研究*, 2024, 28(14):2261-2266.
- [19] 王亮, 郭翔云, 秦金然, 等. 两样本孟德尔随机化研究炎症因子与骨质疏松症的因果关联 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2025, 31(1):62-69.
- [20] 匡昱林, 匡浩铭, 李洪芳, 等. 循环炎症细胞因子与骨质疏松症的双向孟德尔随机化研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2025, 31(1):70-77.
- [21] WANG L L, WANG S, DAI X, et al. *Salvia miltiorrhiza* in osteoporosis: a review of its phytochemistry, traditional clinical uses and preclinical studies (2014 - 2024) [J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2024, 15:1483431.
- [22] MA C, MO L, WANG Z Z, et al. Dihydroshinone I attenuates estrogen-deficiency bone loss through RANKL-stimulated NF- κ B, ERK and NFATc1 signaling pathways [J]. *International Immunopharmacology*, 2023, 123:110572.
- [23] LIN J G, WANG Q Q, ZHOU S M, et al. Tetramethylpyrazine: a review on its mechanisms and functions [J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 150:113005.
- [24] HUANG S W, CHEN J M, LIU X H, et al. Evaluation of the pharmaceutical activities of Chuanxiong, a key medicinal material in traditional Chinese medicine [J]. *Pharmaceuticals*, 2024, 17(9):1157.
- [25] ZHANG F Q, LI Q Y, WU J S, et al. Total flavonoids of *drynariae rhizoma* improve glucocorticoid-induced osteoporosis of rats: UHPLC-MS-based qualitative analysis, network pharmacology strategy and pharmacodynamic validation [J]. *Frontiers in Endocrinology*, 2022, 13:920931.

(收稿日期:2026-04-05)