DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20250918.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1089.R.20250918.1724.002

骨痹通消颗粒调控Wnt/β-catenin/PPARγ信号通路治疗激素性股骨头坏死的实验研究

薛 松[1],周正新[2]✉,朱 磊[2],方 祥[1],陈家康[1],韩士鼎[2],徐 寰[2]
(1.安徽中医药大学第一临床医学院,安徽 合肥 230038;2.安徽中医药大学第一附属医院,安徽 合肥 230031)

[摘要] **目的**:探究骨痹通消颗粒对地塞米松(dexamethasone,Dex)环境下人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells,hBMSCs)功能的影响。**方法**:获取激素性股骨头坏死(steroid-induced avascular necrosis of femoral head,SANFH)及股骨颈骨折(femoral neck fracture,FNF)患者的股骨头和骨髓组织,对骨组织进行H&E染色观察组织病理学情况,Western blot检测骨组织中Wnt3a、β-catenin、Runx2、PPARγ、C/EBPα蛋白表达水平;体外分离培养hBMSCs原代细胞,Dex诱导细胞损伤后使用骨痹通消颗粒含药血清干预培养,CCK-8检测含药血清对hBMSCs增殖的影响,油红O、茜素红染色,RT-qPCR和Western blot检测在含药血清干预后,hBMSCs骨脂分化情况及通路相关蛋白表达水平。**结果**:组织病理学染色可见SANFH组坏死区内骨小梁排列紊乱、狭窄及断裂情况明显,骨髓腔内细胞种类减少,出现脂肪浸润的趋势;Western blot结果显示PPARγ、C/EBPα蛋白在SANFH组中的表达较FNF组明显升高($P<0.01$),Wnt3a、β-catenin、Runx2等蛋白则出现相反的情况($P<0.05$);在激素环境下,hBMSCs活力受到影响,一定浓度范围内的骨痹通消颗粒含药血清可以逆转由Dex造成的增殖抑制,其中尤以5%组作用48 h时最为明显($P<0.01$);与模型组或抑制剂组比,5%含药血清作用后可明显增加胞质中钙盐沉积处的矿化结节进而减少脂滴着色,同时上调*Wnt3a*、*β-catenin*、*ALP*、*Runx2* mRNA和下调*PPARγ*、*C/EBPα* mRNA表达水平($P<0.05$)。此外,含药血清干预可明显提高通路蛋白Wnt3a、β-catenin和Runx2表达水平,降低PPARγ、C/EBPα、DKK1蛋白表达水平($P<0.05$)。**结论**:骨痹通消颗粒可通过调控Wnt/β-catenin/PPARγ信号通路有效改善在糖皮质激素环境下由PPARγ介导的间充质干细胞骨脂分化失衡现象,从而发挥治疗SANFH的作用。

[关键词] 骨痹通消颗粒;激素性股骨头坏死(SANFH);人骨髓间充质干细胞(hBMSCs);骨脂分化;Wnt/β-catenin/PPARγ信号通路
[中图分类号] R285.5 [文献标志码] A [文章编号] 2097-5953(2026)20-1541-12

Study on the therapeutic effects of Gubi Tongxiao Granules in steroid-induced avascular necrosis of femoral head *via* modulating the Wnt/β-catenin/PPARγ signaling pathway

XUE Song[1], ZHOU Zhengxin[2]✉, ZHU Lei[2], FANG Xiang[1], CHEN Jiakang[1], HAN Shiding[2], XU Huan[2]
(1. *The First Clinical Medical College of Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230038, *China*; 2. *The First Affiliated Hospital of Anhui University of Chinese Medicine*, *Hefei* 230031, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by the Ding E National Famous Traditional Chinese Medicine Inheritance Studio Construction Project* (*czbkjf*20200037); *Anhui Provincial Traditional Chinese Medicine Advantage Specialty Project* (*zyyfw*20220126); *Major Scientific Research Project of Anhui Province Universities* (2024*AH*040158, 2023*AH*040109)

[*Author*]: *XUE Song*, *E-mail*: 1470218213@*qq.com*.
[*Correspondence to*]: *ZHOU Zhengxin*, *Ph.D.*, *Chief Physician*, *Doctoral Supervisor*, *E-mail*: *zhouzhengxin*1968@*sina.com*.

Received: 2025-05-23 *Revised*: 2025-09-02 *JHMU*, 2026;32(20):1541-1552

[基金项目] 丁锷全国名中医传承工作室建设项目(czbkjf20200037);安徽省级中医优势专科项目(zyyfw20220126);安徽省高校自然科学研究重大项目(2024AH040158、2023AH040109)

[作者简介] 薛松,E-mail:1470218213@qq.com。
[通讯作者] 周正新,博士,主任医师,博士生导师,E-mail:zhouzhengxin1968@sina.com。

[收稿日期] 2025-05-23 [修回日期] 2025-09-02 网络出版时间:2025-09-19 10:57:25

View from specialist: It is creative, and of certain scientific and educational value.

[Abstract] Objective: To investigate the effects of Gubi Tongxiao Granules on the function of human bone marrow mesenchymal stem cells (hBMSCs) in a dexamethasone (Dex)-induced environment. Methods: Femoral heads and bone marrow tissues were obtained from patients with steroid-induced avascular necrosis of femoral head (SANFH) and femoral neck fracture (FNF). The bone tissues were stained with H&E staining for histopathological observation. The expression levels of Wnt3a, β-catenin, Runx2, PPARγ, and C/EBPα proteins in the bone tissues were detected by Western blot. For *in vitro* experiments, hBMSCs were isolated and cultured. After inducing cell injury with Dex, the cells were treated with Gubi Tongxiao Granules′ drug-containing serum. The proliferative effects of the drug-containing serum on hBMSCs were assessed using the CCK-8 assay. Oil Red O staining, Alizarin Red S staining, RT-qPCR, and Western blot were performed to measure the osteogenic and adipogenic differentiation and the expression levels of pathway-related proteins after Gubi Tongxiao Granules′ drug-containing serum intervention. Results: Histopathological staining revealed that in the SANFH group, the necrotic area exhibited significantly disordered, narrowed, and fractured trabeculae, along with reduced cellular diversity in the bone marrow cavity and a tendency for fat infiltration. Western blot results showed that the expression of PPARγ and C/EBPα proteins were significantly higher in the SANFH group compared to the FNF group ($P<0.01$). On the contrary, the expression levels of Wnt3a, β-catenin, and Runx2 proteins were significantly lower in the SANFH group ($P<0.05$). Under glucocorticoid conditions, the viability of hBMSCs was impaired. Gubi Tongxiao Granules′ drug-containing serum at a certain concentration reversed the Dex-induced proliferation inhibition, with the most pronounced effect observed in the 5% group at 48 hour ($P<0.01$). Compared to the model group or the inhibitor groups, treatment with 5% drug-containing serum significantly increased mineralized nodules and reduced lipid droplet staining. Meanwhile, it upregulated *Wnt3a*, *β-catenin*, *ALP*, and *Runx2* mRNA levels while downregulating *PPARγ* and *C/EBPα* mRNA expression ($P<0.05$). Furthermore, intervention with the drug-containing serum increased the expression levels of osteogenic pathway proteins Wnt3a, β-catenin, and Runx2, while decreasing PPARγ, C/EBPα and DKK1 protein expression levels ($P<0.05$). Conclusion: By modulating the Wnt/β-catenin/PPARγ signaling pathway, Gubi Tongxiao Granules can effectively correct the PPARγ-mediated imbalance in osteogenic and adipogenic differentiation of mesenchymal stem cells in the glucocorticoid environment, and exert its therapeutic effect against SANFH.

[Key words] Gubi Tongxiao Granules; Steroid-induced avascular necrosis of femoral head; Bone marrow mesenchymal stem cells; Osteogenic and adipogenic differentiation; Wnt/β-catenin/PPARγ signaling pathway

激素性股骨头坏死(steroid-induced avascular necrosis of femoral head,SANFH)是由长期使用糖皮质激素(glucocorticoids,GCs)所引发的一种病理状态,其特征表现为股骨头局部组织坏死或脂质在骨细胞中大量蓄积[1]。目前SANFH的临床干预策略涵盖非手术治疗、保髋手术以及髋关节置换术等多种方式,其中对于股骨头结构塌陷造成髋关节功能丧失的患者,全髋关节置换术常被视为最终解决方案[2]。然而随着SANFH发病年龄趋于年轻化,术后人工髋关节假体的使用寿命和翻修的风险,给医生和患者带来了极大的挑战[3,4]。因此,早期治疗旨在延缓疾病进程,预防塌陷,最大程度保留患者自身髋关节。

已有研究表明,髓系干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells,BMSCs)分化失衡是SANFH重要的发病机制之一[5,6]。Wnt/β-catenin是一条经典的调节干细胞多能性并抑制细胞凋亡的信号通路,通常在细胞分化中起决定性作用;而PPARγ则被认为是促进脂肪细胞分化的特异性因子,调节间充质干细胞的分化方向,并且有研究证实该过程受到Wnt/β-catenin信号的调控[7,8]。骨痹通消颗粒是本课题组治疗股骨头坏死的有效方剂[9-11]。前期研究[12,13]证实,骨痹通消颗粒含药血清在促进人骨髓间充质干细胞(human bone marrow mesenchymal stem cells,hBMSCs)向成骨细胞分化的同时,还可抑制脂肪细胞生成,但其具体的作用机制是否与Wnt信号相关仍有待进一步研究。因此本研究从获取患者股骨头及体外培养hBMSCs两个方面进行实验研究,探究骨痹通消颗粒是否通过Wnt/β-catenin/PPARγ信号通路逆转由GCs诱导的hBMSCs分化失衡,旨在为防治SANFH提供新的理论依据。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 全髋关节置换术 在全髋关节置换术中,选用摆据、骨刀等工具获取SANFH患者股骨头局部坏死最明显、大小约1.5 cm×1.5 cm的骨组织块,并从股骨颈骨折(femoral neck fracture,FNF)患者的相同位置取材做对比,同时收集3~5 mL股骨近端的血与骨髓混合液,用于后续体外实验操作。

1.1.2 纳入标准 SANFH组:(1)符合《非创伤性股骨头坏死中西医结合诊疗专家共识》[14]诊断标准;(2)有长期GCs类药物服用史;(3)达到手术指

征的患者。FNF组：(1)保守治疗失败的股骨颈骨折(尚未发生坏死)；(2)无激素服用史；(3)无吸烟、酗酒及其他基础疾病的患者。

所有入组患者签署知情同意书，各项材料符合本单位伦理审查制度要求(审批号：2025AH-25-01)。

1.1.3 实验药物 取处方量中药饮片(丹参、当归、淫羊藿、川续断、川芎、赤芍、土鳖虫、肉桂、甘草)于10倍清水中浸泡30 min，大火煮至沸腾后转文火煎煮40 min，将所得汤剂置于60 ℃水浴条件下浓缩药材至0.92 g/mL，浓缩液经密闭分装后冷藏备用。

1.1.4 含药血清制备 选用SPF级SD大鼠(合格证号：No.210726201100614582)，参照临床等效剂量换算方法[大鼠等效剂量=(人药物剂量)/70 kg×6.3]，每日给予8.01 g/kg骨痹通消颗粒药液灌胃1次，持续7 d。于末次灌胃结束后2 h麻醉大鼠并进行腹主动脉采血，将分离、灭活、除菌后所得的血清样本置于－20 ℃储存。

1.1.5 实验试剂及仪器 地塞米松磷酸钠(丰原制药有限公司，H20051748)；4%多聚甲醛(Biosharp生物，BL539A)；RIPA裂解液(碧云天生物，P0013B)；SDS-PAGE凝胶试剂盒(塞维尔生物，P1200-50T)；胎牛血清、DMEM培养基(Gibco公司，12484028、C12571500BT)；茜素红、油红O染色试剂盒(碧云天生物，C0148S、C00158S)；RT-qPCR试剂盒(新贝生物，Q204-01)；Wnt3a、DKK1、β-actnin、PPARγ、Runx2、C/EBPα一抗抗体(英国Abcam公司，ab219412、ab109416、ab224803、ab178860、ab76956、ab65081)；DKK1抑制剂(美国MCE公司，HY-P7155A)。

全自动包埋封片一体机(德国Microm公司，LEICAEG1150H)；光学显微镜(日本OLYMPUS公司，BX53)；实时荧光定量PCR仪(美国赛默飞公司，QS6 Pro)；Western blot成像系统(上海天能公司，VE-180)。

1.2 实验方法

1.2.1 H&E染色评估组织病理学变化 对患者股骨头组织进行脱钙处理，制备厚度为5 μm的连续切片，60 ℃烘片过夜；隔天经脱蜡和水化后，用苏木精染色5 min，盐酸乙醇分化数秒，PBS返蓝，流水冲洗后以伊红溶液复染2 min；染色完成的切片依次经梯度乙醇脱水、二甲苯透明、中性树脂封固，最后于光学显微镜下观察并采集图像。

1.2.2 Western blot检测骨组织内目标蛋白表达情况 取低温研磨后的骨组织或细胞样本，使用RIPA裂解以提取总蛋白。均一化后依次进行上样、凝胶电泳、转膜、封闭及孵育一抗过夜；TBST洗膜3次(10 min/次)后，室温摇床孵育对应种属HRP标记的二抗2 h，结束后再次经TBST充分洗涤，将PVDF膜置于Western blot成像系统中曝光，采用ImageJ 1.53软件对目标条带灰度值进行半定量分析，并以β-action作为内参校正。

1.2.3 细胞分离、培养及诱导损伤 参照文献[15]中所述的全骨髓贴壁法，将术中取得的骨髓样本使用完全培养基稀释后接种于6孔板中，2 d后收集上清液再次接种，等待原代细胞从骨髓碎片边缘迁出后进行常规培养、传代，鉴定及冻存备用。同时，根据课题组前期研究[16]基础采用10^{-5} mol/L地塞米松(dexamethasone，Dex)复制SANFH体外细胞模型。

1.2.4 含药血清浓度筛选及实验分组 将Dex诱导损伤后的细胞以每孔2×10^3个的密度铺板于96孔培养板中，待细胞贴壁后，加入2%、5%、8%、10%不同体积分数的骨痹通消颗粒(GBTX)含药血清继续培养(2%、5%、8%、10% GBTX含药血清组)，在不同检测时间点(24、48、72 h)每孔加入10 μL CCK-8工作液，37 ℃敷育1 h后测定各孔的吸光度(OD值)并据此计算各组细胞的相对活力。同时将后续实验分为空白对照(Control)组、Dex诱导损伤模型(Dex)组、含药血清干预实验(Dex+GBTX)组、Wnt信号通路抑制剂(DKK1)组以及含药血清联合抑制剂(GBTX+DKK1)组。

1.2.5 骨脂分化染色 使用4%多聚甲醛于室温条件下固定细胞30 min，经磷酸盐缓冲液漂洗后，按照说明书分别使用茜素红、油红O溶液对细胞进行髓系分化染色。染色步骤结束后，采用去离子水反复洗涤，以去除残留染料。随后将样本置于光学显微镜下采集图像并进行半定量分析。

1.2.6 RT-qPCR检测目标mRNA表达情况 采用TRIzol法提取细胞总RNA并确保样本质量符合要求。随后严格按照试剂盒说明将总RNA反转录为cDNA，并以此cDNA为模板、以*GAPDH*为内参，配置反应体系。将配制好的反应体系置于qPCR仪中进行扩增反应，最后采用$2^{-\Delta\Delta Ct}$法对所得Ct值进行处理，见表1。

1.3 统计学处理

使用SPSS Statistics 25.0进行数据统计分析，计量资料以$\bar{x}\pm s$表示。2组间比较使用独立样本t检验，多组间比较采用单因素方差分析(One-way ANOVA)及LSD-t检验。计数资料组间分布差异

表1　各基因引物序列

Tab 1　Primer sequences for target genes

基因	正向引物（5′～3′）	反向引物（5′～3′）
Wnt3a	CACCACTGCAAGTCCTGT TC	GCTGGTTCTCGATGTAGTGC
β-catenin	GCTTTCAGTTGAGCTGACCA	TGGTCTTCCTCACCATACGG
ALP	GGA AGCAAGGCAGAAGC	CGGGGACCATAAGCGAGT
Runx2	CCTGAACTCTGCACCAAGTCCT	TCATCTGGCTCAGATAGGAGGG
PPARγ	ATGGCAATTGAATGTCGTGTC	TCCGCCCAAACCTGATG
C/EBPα	GGGTGAGTTCATGGAGAATCG	CAGTTTGGCAAGAATCAGAGCA
GAPDH	CATCAAGAAGGTGGTGAAGCAG	CGTCAAAGGTGGAGGAGTGG

使用卡方检验。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2　结果

2.1　患者基线资料

本研究共纳入29例患者，其中FNF患者13例、SANFH患者16例。基线特征分析显示2组患者在性别构成及年龄分布方面的差异均无统计学意义（$P>0.05$），具有可比性，见表2。

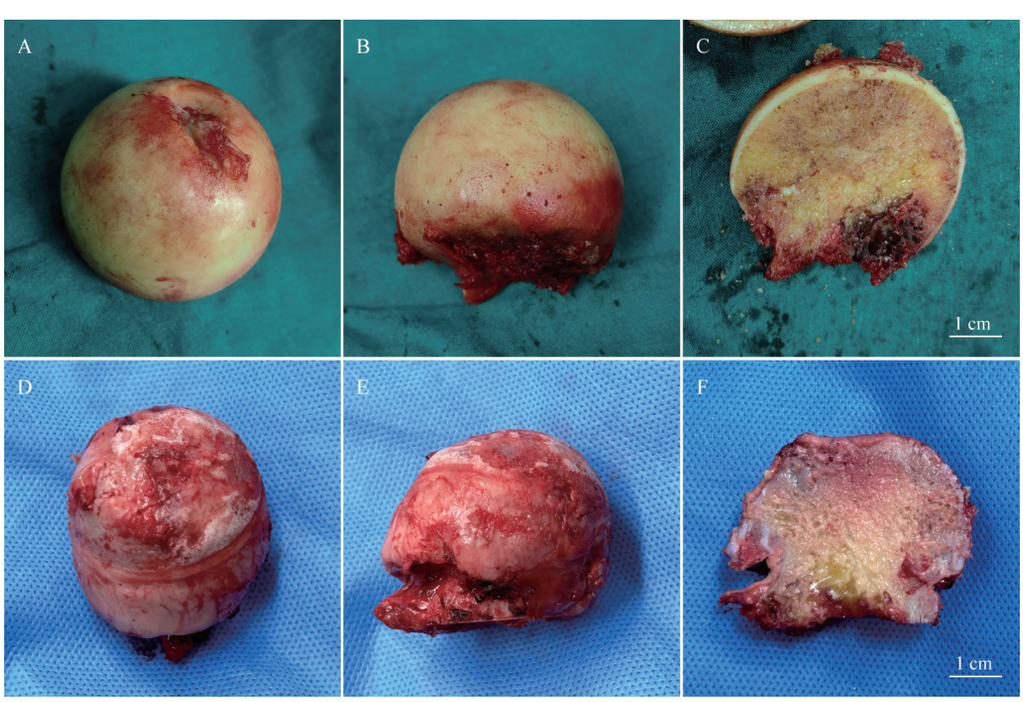
表2　2组患者性别、年龄比较

Tab 2　Comparison of gender and age between the two groups

项目	FNF组（n=13）	SANFH组（n=16）	χ^2/t	P
性别（n）			-	0.715
男	6	9	-	-
女	7	7	-	-
年龄（岁，$\bar{x}\pm s$）	64.812±5.337	62.572±3.740	1.643	0.112

2.2　股骨头大体形态学特征

对2组患者的股骨头标本进行形态学观察，可见FNF患者的股骨头呈现典型的半球状形态，其表面覆盖的关节软骨层结构连续且完整，松质骨小梁间隙内可见黄红骨髓混合分布。与之形成对比，SANFH患者的股骨头出现不同程度塌陷变形，关节面磨损导致软骨层连续性中断甚至缺失。此外，松质骨间隙内的红骨髓成分明显减少，被异常增生的脂肪组织所填充替代，见图1。



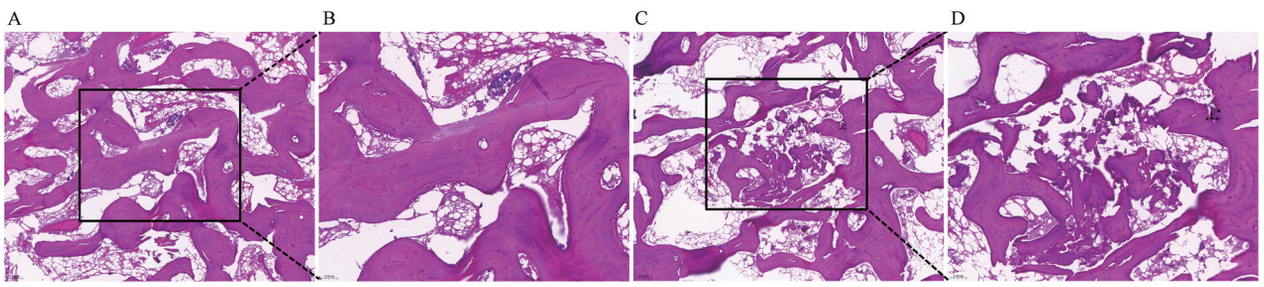
A～C：FNF患者股骨头表面与切面观；D～F：SANFH患者股骨头表面与切面观

图1　FNF和SANFH组患者股骨头大体观

Fig 1　Macroscopic view of patients´ femoral head between the FNF and SANFH groups

2.3 股骨头组织病理学情况

对2组患者的股骨头组织进行H&E染色，结果可见相较于FNF患者，SANFH患者出现明显的坏死区，且坏死区内骨小梁排列紊乱，甚至存在严重的狭窄及断裂情况；此外骨髓腔内细胞种类减少，脂肪细胞数量增多、体积较大，逐渐呈现融合的趋势，见图2。



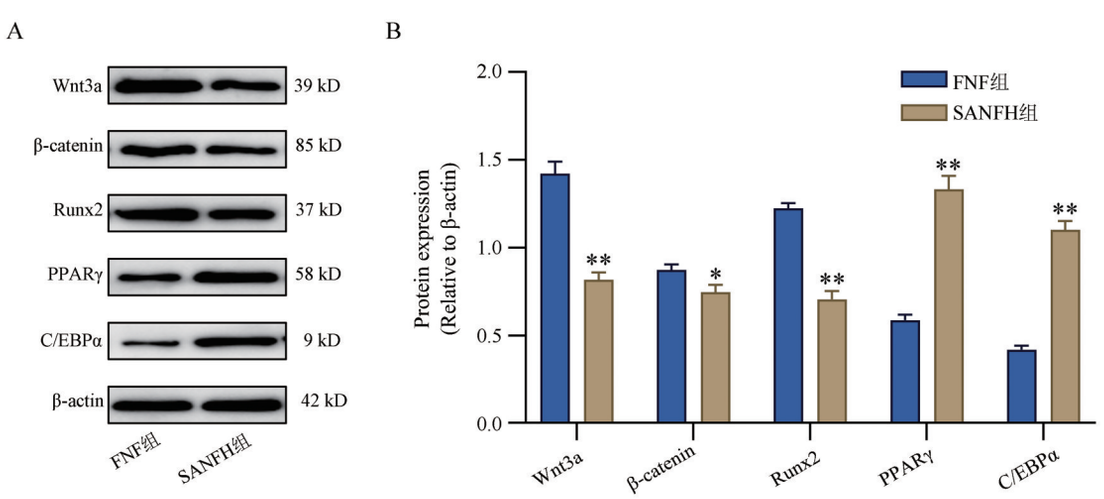
A、B：FNF组；C、D：SANFH组

图2 FNF和SANFH组患者骨组织病理学观察（20×，40×）

Fig 2 Microscopic features of patients´ bone pathology between the FNF and SANFH groups (20×, 40×)

2.4 骨组织中目标蛋白表达情况

Western blot检测结果显示，与FNF组相比，PPARγ、C/EBPα蛋白在SANFH组中的表达明显上调（$P<0.01$），而Wnt信号通路关键分子Wnt3a、β-catenin和Runx2蛋白表达明显下调（$P<0.05$），见图3。



A：骨组织中目标蛋白表达Western blot结果；B：骨组织中目标蛋白表达统计分析；与FNF组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$

图3 FNF和SANFH组患者骨组织中目标蛋白表达水平

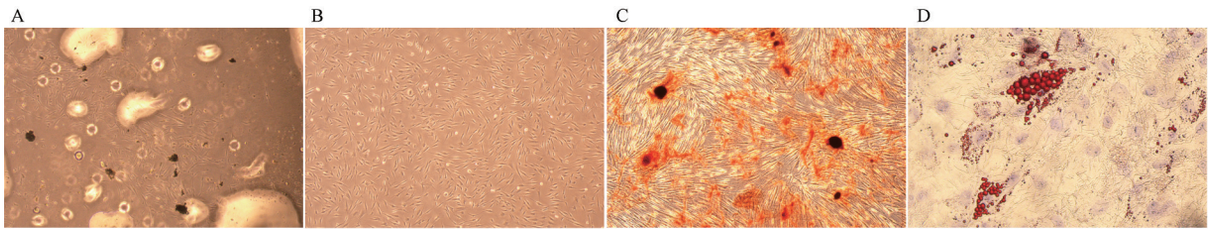
Fig 3 Expression levels of target proteins in patients´ bone tissue between the FNF and SANFH groups

2.5 原代细胞形态特征及多向分化能力鉴定

采用骨髓全贴壁法培养4 d后，显微镜下可观察到少量“纺锤状”原代细胞从贴壁的组织碎片边缘迁出，初期呈现聚集性生长趋势；经传代扩增后，细胞形态趋于均一，主要为长梭形或多角形。为鉴定其髓系分化潜能，取第3～5代细胞分别进行成骨和成脂诱导分化培养，镜下可见细胞外基质发生矿化形成结节以及胞质内脂滴蓄积。上述形态学表现及分化结果符合髓系干细胞的典型特征，因此分离培养的原代细胞即为hBMSCs，见图4。

2.6 含药血清对hBMSCs增殖活力的影响

在Dex环境中，细胞活力下降呈现时间依赖性（$P<0.01$）；在设定的浓度梯度以及干预时间内，骨痹通消颗粒含药血清能够有效拮抗由Dex造成的细胞增殖抑制效应。其中，含药血清体积分数为5%的处理组在干预48 h后，其促进细胞增殖的效果最为明显（$P<0.01$）。基于上述结果，后续实验选定体积分数为5%的含药血清进行干预并维持每48 h更换培养基的频率，见表3。



A：原代；B：第1代；C：成骨分化染色；D：成脂分化染色

图4　hBMSCs形态学观察及髓系分化染色（40×）

Fig 4　Morphological observation and adipogenic differentiation staining of hBMSCs（40×）

表3　不同体积分数GBTX含药血清干预后hBMSCs增殖活力比较（n=10，$\bar{x}\pm s$）

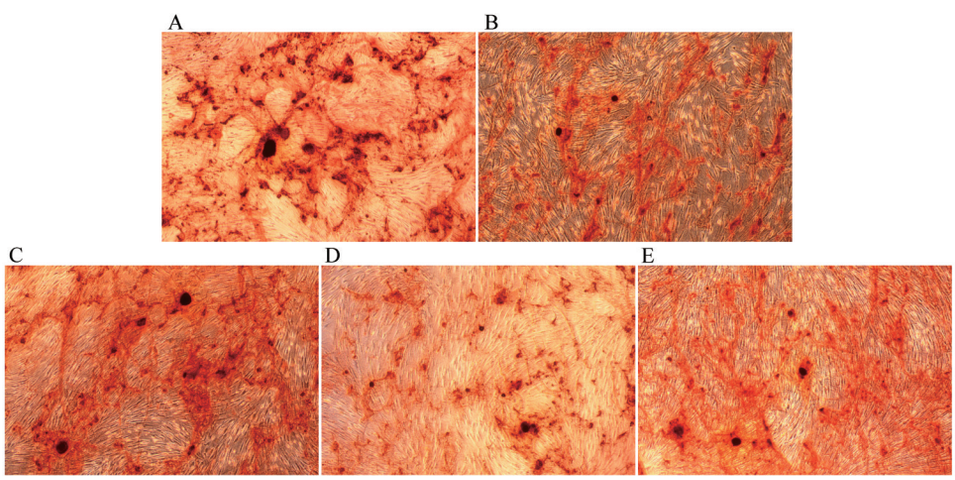
Tab 3　Comparison of hBMSC proliferation under different concentrations of GBTX drug-containing serum（n=10，$\bar{x}\pm s$）

组别	24 h	48 h	72 h
Control	1.000±0.000	1.000±0.000	1.000±0.000
Dex	0.912±0.012	0.824±0.033	$0.661\pm0.017^{\Delta\Delta}$
2% GBTX含药血清	0.925±0.018	$0.916\pm0.054^{**\#\#}$	0.884±0.022
5% GBTX含药血清	$0.933\pm0.024^{*}$	$0.962\pm0.038^{**}$	0.958±0.031
8% GBTX含药血清	$0.941\pm0.026^{**}$	$0.932\pm0.037^{**}$	0.918±0.045
10% GBTX含药血清	0.928±0.030	$0.873\pm0.040^{**\#\#}$	$0.806\pm0.015^{\Delta\Delta}$

注：与Dex组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；与5% GBTX含药血清组相比，$^{\#\#}P<0.01$；与48 h相比，$^{\Delta\Delta}P<0.01$。

2.7　含药血清对GCs环境下hBMSCs骨脂分化的调节作用

在Dex诱导下，hBMSCs表现出成骨分化抑制和成脂分化增强，显微镜下可见细胞外基质矿化结节减少和胞质内脂滴蓄积（$P<0.01$）。这种现象在使用Wnt信号通路抑制剂DKK1之后愈发明显；使用骨痹通消颗粒含药血清干预培养后，可逆转由Dex造成的hBMSCs骨脂分化失衡，见图5～7。



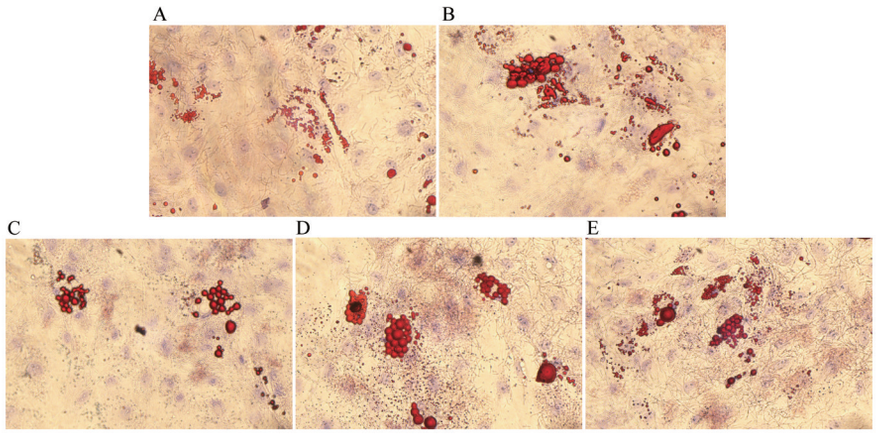
A：Control组；B：Dex组；C：Dex＋GBTX组；D：DKK1组；E：GBTX＋DKK1组

图5　hBMSCs成骨分化茜素红染色（40×）

Fig 5　Osteogenic differentiation of hBMSCs demonstrated by Alizarin Red S staining（40×）

2.8　含药血清对GCs环境下hBMSCs骨脂分化相关mRNA表达的调节作用

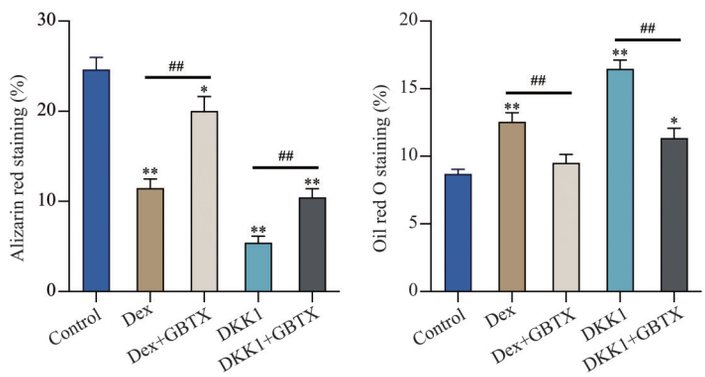
在Dex诱导下，通路关键分子mRNA表达异常，成骨标志物*ALP*、*Runx2* mRNA表达水平明显下调，而脂肪转录因子*PPARγ*、*C/EBPα* mRNA表达增多（$P<0.01$）；上述现象在使用DKK1阻断Wnt信号后表现得更为明显（$P<0.01$）。使用骨痹通消颗粒含药血清处理后能够部分逆转由Dex造成的相关mRNA表达失衡，但较正常对照组仍存在一定差异（$P<0.05$），见表4。



A:Control组;B:Dex组;C:Dex+GBTX组;D:DKK1组;E:GBTX+DKK1组

图6　hBMSCs成脂分化油红O染色(40×)

Fig 6　Adipogenic differentiation of hBMSCs demonstrated by Oil Red O staining (40×)



与Control组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$;$^{\#\#}P<0.01$

图7　hBMSCs骨脂分化半定量分析

Fig 7　Semi-quantitative analysis of osteogenic and adipogenic differentiation potential in hBMSCs

表4　骨痹通消颗粒含药血清对骨脂分化相关mRNA的影响(n=3,$\bar{x}\pm s$)

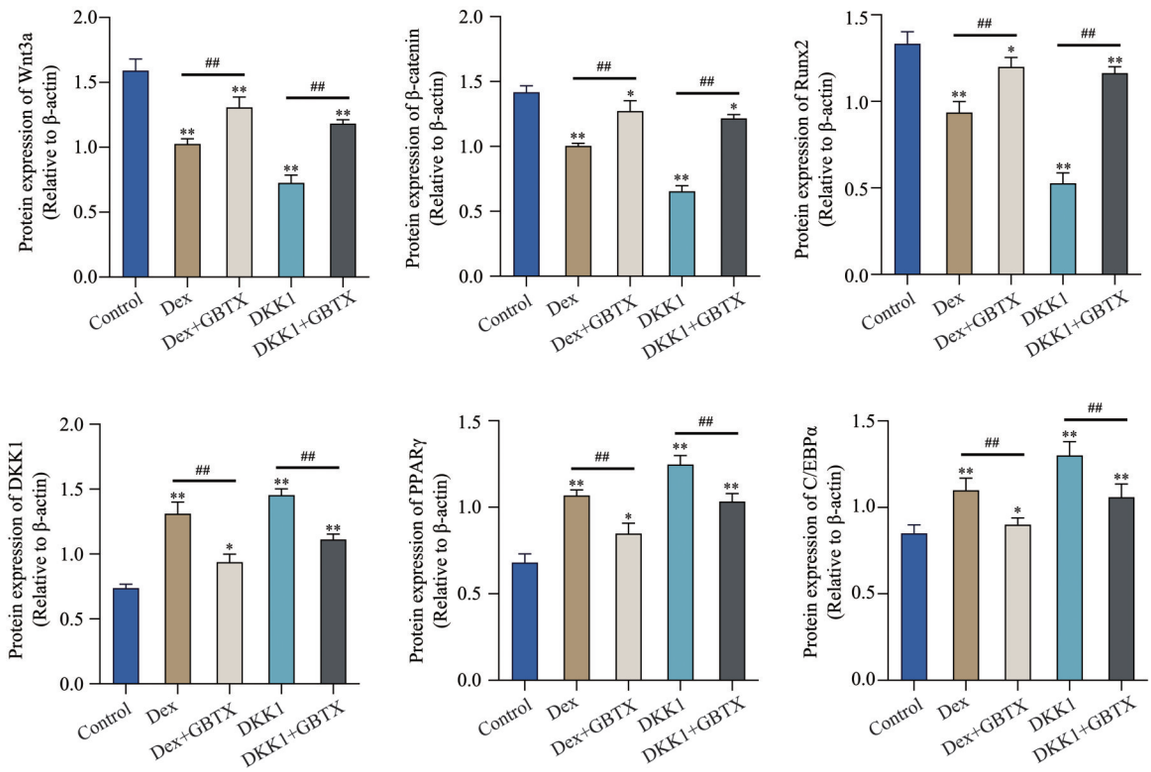
Tab 4　Effects of Gubi Tongxiao Granule-containing serum on osteogenic and adipogenic differentiation related mRNA expression levels (n=3,$\bar{x}\pm s$)

组别	*Wnt3a*	*β-catenin*	*ALP*	*Runx2*	*PPARγ*	*C/EBPα*
Control	1.003±0.022	1.000±0.054	1.000±0.054	1.000±0.014	1.001±0.039	1.000±0.041
Dex	0.750±0.042**	0.792±0.050**	0.687±0.021**	0.619±0.026**	1.548±0.046**	1.470±0.034**
Dex+GBTX	0.907±0.020$^{**\#\#}$	0.923±0.021$^{*\#\#}$	0.896±0.072$^{*\#\#}$	0.818±0.040$^{**\#\#}$	1.157±0.042$^{**\#\#}$	1.103±0.044$^{*\#\#}$
DKK1	0.515±0.025**	0.609±0.017**	0.467±0.040**	0.398±0.057**	2.171±0.066**	1.994±0.030**
DKK1+GBTX	0.803±0.035$^{**\Delta\Delta}$	0.877±0.030$^{**\Delta\Delta}$	0.788±0.048$^{**\Delta\Delta}$	0.722±0.041$^{**\Delta\Delta}$	1.311±0.025$^{**\Delta\Delta}$	1.202±0.038$^{**\Delta\Delta}$
F	115.552	68.582	53.147	103.880	303.854	336.590
P	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01	<0.01

注:与Control组相比,$^{*}P<0.05$,$^{**}P<0.01$;与Dex组相比,$^{\#\#}P<0.01$;与DKK1组相比,$^{\Delta\Delta}P<0.01$。

2.9　含药血清对GCs环境下hBMSCs通路关键蛋白表达的调节作用

Dex诱导损伤后,通路蛋白Wnt3a、β-catenin、Runx2表达受到抑制($P<0.01$),而通路抑制因子DKK1、PPARγ与C/EBPα表达明显增多($P<0.01$)。当添加外源性的DKK1作用后,Wnt3a的表达受到更强烈的抑制,导致上述蛋白的表达趋势进一步强化($P<0.01$);经骨痹通消颗粒含药血清干预培养后,能够有效激活Wnt信号通路,提高β-catenin、Runx2蛋白水平的同时下调DKK1、PPARγ与C/EBPα蛋白表达水平($P<0.05$),见图8、9。



与Control组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$；$^{\#\#}P<0.01$

图8 hBMSCs中通路蛋白表达水平半定量分析

Fig 8 Semi-quantitative analysis of pathway protein expression levels in hBMSCs

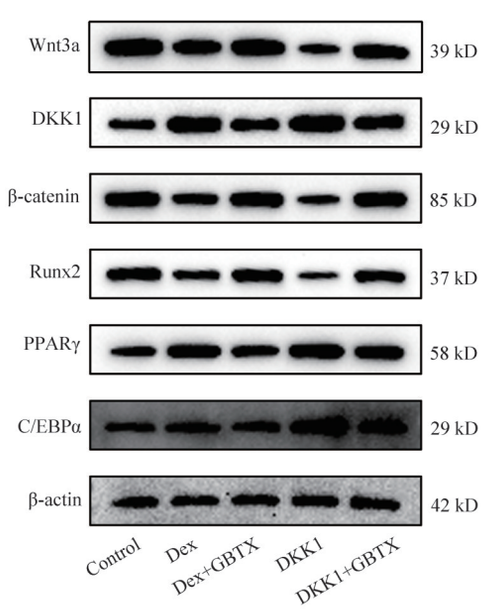


图9 hBMSCs中通路蛋白Western blot分析

Fig 9 Western blot analysis of pathway proteins in hBMSCs

3 讨论

根据股骨头坏死的临床表现及体征演变规律，中医学多将其归入“骨痹”、“骨蚀”等病证范畴，其病因常被认为与“肾阳虚”相关，尤其是SANFH[17]。中医学理论认为，内源性GCs功能特性类似于肾阳，是人体封藏和激发的原动力。而超生理剂量的外源性GCs犹如“壮火”，火旺伤阴，日久则阴阳两虚，必然损伤肾的生理功能[18]，最终导致骨坏死等疾病的发生。本课题组多年来从事中医药防治股骨头坏死的研究，并提出了“补肾活血通络”之治法。骨痹通消颗粒作为常用方剂，在临床与基础研究方面均收到了确切疗效[9-11,19,20]，该方以具有活血祛瘀，通经止痛功效的丹参、川芎、赤芍、当归为君药，以能够补益肝肾、强壮筋骨的淫羊藿、川续断为臣药，并配伍引火归元、破血逐瘀的肉桂、土鳖虫，最后以甘草补中益气，调和诸药之性[21-25]。

目前，SANFN的发病机制尚未被完全阐明，现代医学认为由GCs诱导的髓系干细胞分化异常与SANFH发病的病理过程密切相关。在这一过程中，BMSCs向成骨细胞分化减少，甘油三酯在非脂肪细胞中大量蓄积，进而导致骨量减少甚至骨坏死[7,26]。因此，减少髓系干细胞成脂分化是一种潜在的促进SANFH中骨修复的疗法，但成脂分化是多种转录因子相互协调的生物学过程，其中PPARγ作为调控脂肪细胞分化的关键转录因子，其在骨髓基质细胞中的表达水平直接影响干细胞分化的方

向和进程[27-29]。并且有研究表明,PPARγ既能促进BMSCs向脂肪细胞分化,同时也会抑制Runx2的表达,从而抑制BMSCs向成骨细胞分化,最终导致股骨头坏死[30,31]。在本研究中,SANFH患者股骨头坏死区内骨小梁排列紊乱,存在严重的狭窄及断裂情况;松质骨间隙内脂肪组织增多,甚至出现脂肪浸润。与此同时,PPARγ蛋白在骨组织中呈现高表达,而Runx2蛋白表达明显下降,骨修复受到了明显抑制。

此外,本研究还发现,Wn3a与β-catenin蛋白在SANFH患者股骨头组织中的表达较Control组明显降低。在Wnt信号转导通路中,β-catenin作为核心效应分子,其入核后可与TCF/LEF转录因子家族成员结合,通过招募共激活因子,诱导染色质结构变化,进而调节下游靶基因的转录活性,参与调控细胞增殖、分化等多种生命过程[32-34]。而Wnt3a作为该通路的经典配体,其分布广泛并参与调节细胞的多效性功能。其关键作用在于如果没有Wnt3a信号,胞质中的β-catenin将会被蛋白酶复合体识别并迅速降解,导致其无法入核启动下游靶基因的转录程序[35]。PPARs家族被称为脂质代谢的中心调节因子,Wnt和其中的PPARγ之间信号转导被认为在脂肪堆积正常化、减少肥胖和干细胞骨脂分化中起重要作用[36,37]。因此,为探究PPARγ介导的BMSCs分化过程是否受到Wnt信号的调控以及骨痹通消颗粒的干预作用,课题组进行了体外分离、培养hBMSCs的实验。结果发现,在GCs诱导下,骨脂分化染色可见胞质中大量脂滴着色,钙结节明显减少。成骨标志物*ALP*、*Runx2* mRNA表达水平明显下调,而脂肪转录因子*PPARγ*、*C/EBPα* mRNA表达增多。上述现象在使用DKK1阻断Wnt信号后表现得更为明显。DKK1作为一种分泌型蛋白,同时也是经典Wnt信号通路下游靶基因,可以通过抑制配体与受体结合的方式从而下调Wnt信号,使胞内β-catenin处在相对较低的水平[38,39]。此时Wnt信号抑制PPARγ的能力降低,PPARγ在激活C/EBPCα促进脂肪生成的同时,又抑制了通路蛋白Runx2的表达水平,使hBMSCs骨脂分化失衡进一步加剧。当给予骨痹通消颗粒干预后,PPARγ、C/EBPα的高表达被抑制,同时Wn3a、β-catenin以及Runx2表达上调,hBMSCs成骨与成脂分化趋于正常。

综上所述,在SANFH的病理进程中,髓系干细胞表现出成骨分化抑制和成脂分化增强,其直接后果是骨组织逐步被异常增生的脂肪组织所取代,进而引发骨量减少、骨坏死。本研究虽然严格筛选了无激素史、无代谢性疾病的FNF患者作为对照组,且观察到明显的组间差异与SANFH病理特征高度吻合,但是必须承认,骨折创伤及其修复过程本身可能对Wnt/β-catenin等骨代谢相关信号通路产生影响。有研究表明,老年人股骨颈骨折后保守治疗失败与Wnt信号通路活性下降有关[40,41],前期2组患者股骨头组织中通路蛋白表达结果显示SANFH组抑制更明显,这在一定程度上反而强化了研究结论。并且体外实验部分的结果独立于临床对照选择,直接证明了激素环境和药物对通路和细胞分化的影响,为临床结果提供了机制支持,即骨痹通消颗粒能够通过Wnt/β-catenin信号通路,调控由PPARγ介导的BMSCs骨脂分化失衡,有效改善GCs环境下甘油三脂在非脂肪细胞中的异常蓄积,从而促进坏死骨的修复和再生。未来研究将致力于纳入更接近生理状态的骨组织样本作为对照,以期获得更具说服力的数据支持。同时,针对骨痹通消颗粒的作用机制,本课题组将进一步开展研究,明确其在不同病理阶段的干预效果。

作者贡献度说明:

周正新:实验设计;朱磊:实验指导与评估;薛松、方祥、陈家康:实验实施;韩士鼎:资料收集与统计;薛松成文,徐寰审校。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Yang W, Pan Q, Peng Y, et al. Dual-target nanotherapy for vascular endothelium and bone mesenchymal stem cells halt steroid-induced osteonecrosis of the femoral head progression[J]. J Control Release, 2025, 380: 219-239.

2 Khanchandani P, Narayanan A, Naik AA, et al. Clinical characteristics, current treatment options, potential mechanisms, biomarkers, and therapeutic targets in avascular necrosis of femoral head[J]. Med Princ Pract, 2024, 33(6): 519-536.

3 Chou CM, Chuang TC, Chiang CH. Factors that increase the risk of prosthetic joint infection within 90 days after THA and TKA: A nationwide population-based study[J]. Clin Orthop Relat Res, 2025, 484(1): 109-116.

4 Buddhiraju A, Khanuja HS, Hegde V, et al. Epidemiology, management, and systematic review of surgical trends for patients who have osteonecrosis of the femoral head[J]. J Arthroplasty, 2025, 40(10): S112-S119.e1.

5 季伟，刘远航，张倩，等. 淫羊藿苷对激素性股骨头坏死人骨髓间充质干细胞成骨分化的影响[J]. 中国中医骨伤科杂志，2025，33(6)：14-20.
Ji W，Liu YH，Zhang Q，et al. Effect of icariin on osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells with hormone-induced femur head necrosis[J]. Chin J Tradit Med Traumatol Orthop，2025，33(6)：14-20.

6 吕子豪，周明旺，王晓萍，等. 中药干预骨髓间充质干细胞成骨分化治疗非创伤性股骨头坏死研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志，2023，29(5)：719-723.
Lv ZH，Zhou MW，Wang XP，et al. Research progress of intervention with traditional Chinese medicine in osteogenic differentiation by bone marrow mesenchymal stem cells in the treatment of non-traumatic femoral head necrosis[J]. Chin J Osteoporos，2023，29(5)：719-723.

7 Liu T，Liu Y，Shi H，et al. Sijunzi decoction improves lipid metabolism *via* regulation of Wnt/β-catenin signaling pathway in diabetic mice and 3T3-L1 cells[J]. J Ethnopharmacol，2025，346：119672.

8 Li H，Liao X，Lan M，et al. Arctigenin modulates adipogenic-osteogenic balance in the bone marrow microenvironment of ovariectomized rats *via* the MEK1/PPARγ/Wnt/β-catenin pathway[J]. Chem Biol Drug Des，2024，104(3)：e14625.

9 侯文渊，朱磊，顾一帆，等. 骨痹通消颗粒治疗早中期非创伤性股骨头坏死38例[J]. 中国中医骨伤科杂志，2023，31(1)：56-60.
Hou WY，Zhu L，Gu YY，et al. 38 cases of clinical study on Gubi Tongxiao Granules on the treatment of patients with non-traumatic femoral head necrosis in early and middle stages[J]. Chin J Tradit Med Traumatol Orthop，2023，31(1)：56-60.

10 朱彩玉，朱磊，顾一帆，等. 骨痹通消颗粒调控细胞凋亡干预激素性股骨头坏死的体内外研究[J]. 中医药学报，2023，51(6)：31-37.
Zhu CY，Zhu L，Gu YF，et al. *In vivo* and *in vitro* studies of Gubi Tongxiao Granule regulating apoptosis and intervening GCs-induced necrosis of femoral head[J]. Acta Chin Med Pharmacol，2023，51(6)：31-37.

11 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.
Fang X，Zhou ZX，Zhu L，et al. Effect of Gubi Tongxiao Granule in a mouse model of steroid-induced necrosis of the femoral head[J]. Chin J Tissue Eng Res，2024，28(16)：2599-2604.

12 王壮壮，周正新，朱磊，等. 骨痹通消颗粒对激素型股骨头坏死人骨髓间充质干细胞成骨与成脂分化的影响[J]. 中国医药导报，2024，21(3)：28-33，39.
Wang ZZ，Zhou ZX，Zhu L，et al. Effect of Gubi Tongxiao Granules on osteoblastic and lipogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head[J]. Chin Med Herald，2024，21(3)：28-33，39.

13 朱彩玉，李胜，王壮壮，等. 骨痹通消颗粒调控PI3K/AKT/FoxO1信号通路对人骨髓间充质干细胞骨脂分化的影响[J]. 世界科学技术-中医药现代化，2024，26(9)：2466-2475.
Zhu CY，Li S，Wang ZZ，et al. Effect of regulation of PI3K/AKT/FoxO1 signaling pathway by Gubi Tongxiao Granules on the differentiation of human bone mesenchymal stem cells[J]. Modern Tradit Chin Med Mater Med World Sci Technol，2024，26(9)：2466-2475.

14 中国中医药研究促进会中医骨伤临床循证医学分会. 非创伤性股骨头坏死中西医结合诊疗专家共识[J]. 中医正骨，2024，36(9)：1-11.
Clinical Evidence-based Medicine Branch of Chinese Orthopedics and Traumatology of Chinese Association for Research and Advancement of Chinese Medicine. Expert consensus on integrated TCM WM diagnosis and treatment of non-traumatic osteonecrosis of the femoral head[J]. J Tradit Chin Orthop Traumatol，2024，36(9)：1-11.

15 马华根，刘海琴，唐元瑜. 原代大鼠骨髓间充质干细胞的改良培养及鉴定[J]. 中国应用生理学杂志，2022，38(6)：735-738.
Ma HG，Liu HQ，Tang YY. An improved method about culture and identification of primary rat bone marrow derived mesenchymal stem cells[J]. Chin J App Physiol，2022，38(6)：735-738.

16 陈家康，周正新，朱磊，等. 骨痹通消颗粒对糖皮质激素致人骨髓间充质干细胞损伤的干预作用[J]. 中医药导报，2024，30(11)：48-52，81.
Chen JK，Zhou ZX，Zhu L，et al. The intervention effect of Gubi Tongxiao Granules on glucocorticoid-induced human bone marrow mesenchymal stem cell injury[J]. Guid J Tradit Chin Med Pharm，2024，30(11)：48-52，81.

17 徐仲翔，吴云刚，吴春雷. 从骨髓基质干细胞活性的改变探讨激素性股骨头坏死的肾阳虚本质[J]. 中医正骨，2013，25(3)：6-10.
Xu ZX，Wu YG，Wu CL. Study on the essence of kidney-yang deficiency of steroid-induced avascular necrosis of femoral head from the activity change of marrow stroma cells[J]. J Tradit Chin Orthop Traumatol，2013，25(3)：6-10.

18 刘芬芬，羊维，黄琳，等.中医学对糖皮质激素主治功效的药性认识[J].中华中医药杂志，2015，30(4)：1268-1270.
Liu FF，Yang W，Huang L，et al. Recognition of the medicine property of glucocorticoids in traditional Chinese medcine[J]. Chin J Tradit Chin Med Pharm，2015，30(4)：1268-1270.

19 方祥，周正新，朱磊，等.基于RANKL/RANK/OPG信号轴探讨骨痹通消颗粒对激素性股骨头坏死模型小鼠的治疗作用[J].中国现代医学杂志，2024，34(7)：27-33.
Fang X，Zhou ZX，Zhu L，et al. Therapeutic effect of Gubi Tongxiao Granule on steroid-induced osteonecrosis of femoral head in mice based on RANKL/RANK/OPG signal axis[J]. Chin J Modern Med，2024，34(7)：27-33.

20 张宗逸，吴港归，朱守旭，等.骨痹通消颗粒调控TGF-β1/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.
Zhang ZY，Wu GG，Zhu SX，et al. Intervention effect of Gubi Tongxiao Granule on a rat model of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head by regulating the transforming growth factor-β1/Smads signaling pathway[J]. J Anhui Univ Chin Med，2025，44(2)：88-93.

21 黄克松，郑昊天，高向明，等.基于网络药理学和分子对接探析当归-川芎药对治疗股骨头坏死的作用机制[J].中医临床研究，2023，15(25)：15-20.
Huang KS，Zheng HT，Gao XM，et al. Study on the action mechanism of Danggui-Chuanxiong medicine pair in the treatment of femoral head necrosis based on network pharmacology and molecular docking[J]. Clin J Chin Med，2023，15(25)：15-20.

22 高彦淳，朱奕，张长青，等.淫羊藿苷治疗激素性股骨头坏死分子机制研究进展[J].国际骨科学杂志，2024，45(4)：257-260.
Gao YC，Zhu Y，Zhang CQ，et al. Progress on the molecular mechanism of icariin in the treatment of steroid-induced femoral head necrosis[J]. Internat J Orthop，2024，45(4)：257-260.

23 阮家坚，刘金城，蔡东岭，等.基于网络药理学和分子对接探讨续断治疗骨质疏松性骨折作用机制[J].新中医，2024，56(5)：200-206.
Ruan JJ，Liu JC，Cai DL，et al. Discussion on action mechanism of Dipsaci Radix for osteoporotic fracture based on network pharmacology and molecular docking[J]. New Chin Med，2024，56(5)：200-206.

24 樊燕鑫，权力，沈计荣.基于网络药理学探究肉桂治疗骨性关节炎的作用机制[J].延边大学医学学报，2023，46(2)：95-102.
Fan YX，Quan L，Shen JR. Research on the mechanism of *Cinnamomum cassia* Presl in the treatment of osteoarthritis based on network pharmacology[J]. J Med Sci Yanbian Univ，2023，46(2)：95-102.

25 倪林君，刘晓凤，胡筱，等.虫类药土鳖虫化学成分研究进展[J].中华中医药学刊，2024，42(11)：170-176.
Ni LJ，Liu XF，Hu X，et al. Research progress on chemical composition of Tubiechong (*Eupolyphaga steleophaga*)[J]. Chin Arch Tradit Chin Med，2024，42(11)：170-176.

26 朱彩玉，王壮壮，李胜，等.基于PI3K/AKT/mTORC信号通路探讨骨痹通消颗粒对人骨髓间充质干细胞成脂分化负性调节的机制研究[J].海南医学院学报，2024，30(21)：1634-1643.
Zhu CY，Wang ZZ，Li S，et al. The mechanism of Gubi Tongxiao Granules on the negative regulation of lipid differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells based on PI3K/AKT/mTORC signalling pathway[J]. J Hainan Med Univ，2024，30(21)：1634-1643.

27 Yu Y，Duan P，Zheng L，et al. Preliminary study of the role of histone deacetylase (HDAC) in steroid-induced avascular necrosis of the femoral head induced by BMSC adipogenic differentiation[J]. J Orthop Surg Res，2024，19(1)：645.

28 Huang G，Yin W，Zhao X，et al. Osteoking inhibits apoptosis of BMSCs in osteoporotic rats *via* PI3K/AKT signaling pathway[J]. J Ethnopharmacol，2025，340：118961.

29 Duan P，Wang H，Yi X，et al. C/EBPα regulates the fate of bone marrow mesenchymal stem cells and steroid-induced avascular necrosis of the femoral head by targeting the PPARγ signalling pathway[J]. Stem Cell Res Ther，2022，13(1)：342.

30 谭钢，罗磊，康鹏德，等.PPARγ-2和Runx-2与激素性股骨头坏死的发生[J].中国矫形外科杂志，2010，18(15)：1274-1277.
Tan G，Luo L，Kang PD，et al. PPARγ-2 and Runx-2 in the pathogenesis of steroid-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. Orthop J Chin，2010，18(15)：1274-1277.

31 Jiang M，Zhang K，Hu Y，et al. The IFT80/hedgehog pathway regulates the osteogenic-adipogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells[J]. Curr Med Chem，2024，DOI：10.2174/0109298673300113240418050128.

32 Voss JH，Koszegi Z，Yan Y，et al. WNT-induced association of Frizzled and LRP6 is not sufficient for the initiation of WNT/β-catenin signaling[J]. Nat Commun，2025，16(1)：4848.

33 Aljabri MY, Alhazmi YA, Elsayyad SA, et al. Gingival stem cell-conditioned media and low-level laser therapy enhance periodontal ligament stem cells function by up-regulating Wnt and TGF-β pathway components: An *in vitro* study[J]. Clin Exp Dent Res, 2025, 11(3): e70151.

34 Martinez-Marin D, Stroman GC, Fulton CJ, et al. Frizzled receptors: Gatekeepers of Wnt signaling in development and disease[J]. Front Cell Dev Biol, 2025, 13: 1599355.

35 Shima T, Onishi H, Terashima C. Improvement of spatial memory dysfunction in type 2 diabetic mice through a low-carbohydrate and high-protein diet: Potential role of LRP6/Wnt3a signaling in the hippocampus[J]. J Nutr Biochem, 2025, 143: 109937.

36 Xu C, Wang J, Zhu T, et al. Cross-talking between PPAR and WNT signaling and its regulation in mesenchymal stem cell differentiation[J]. Curr Stem Cell Res Ther, 2016, 11(3): 247-254.

37 Sardar A, Gautam S, Sinha S, et al. Nanoparticles of naturally occurring PPAR-γ inhibitor betulinic acid ameliorates bone marrow adiposity and pathological bone loss in ovariectomized rats *via* Wnt/β-catenin pathway[J]. Life Sci, 2022, 309: 121020.

38 Ren Z, Tang L, Ding Z, et al. Dried root of *Rehmannia glutinosa* extracts prevents steroid-induced avascular necrosis of femoral head by activating the wingless-type (Wnt)/β-catenin signal pathway[J]. Toxicon, 2023, 230: 107174.

39 Lin L, Qiu Q, Zhou N, et al. Dickkopf-1 is involved in BMP9-induced osteoblast differentiation of C3H10T1/2 mesenchymal stem cells[J]. BMB Rep, 2016, 49(3): 179-184.

40 Pham NT, Le HG, Peng BR, et al. Computational analysis of zoanthamine alkaloids from *Zoanthus* sp. as potential DKK1 and GSK-3β inhibitors for osteoporosis therapy *via* Wnt signaling[J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 14297.

41 Zhu B, Cai B, Xue K, et al. FKBP5 induces senescence in BMSCs and inhibits osteogenic differentiation through the canonical WNT/β-catenin signalling pathway in senile osteoporosisp[J]. J Cell Mol Med, 2025, 29(8): e70552.

[本文编辑] 陈思润