

• XXXX •

## 补肾化痰方调控HIF-1信号通路对MC3T3-E1细胞 有氧糖酵解的影响

熊梦欣<sup>1,2,3</sup>, 陈颖庆<sup>1</sup>, 张昊雪<sup>1</sup>, 蒋泽宇<sup>1</sup>, 向楠<sup>1,2</sup>, 徐俊<sup>1,2\*</sup>, 邓阿黎<sup>1,2,3\*</sup>

(1. 湖北中医药大学, 武汉 430065; 2. 湖北时珍实验室, 武汉 430061;

3. 湖北省中医院, 武汉 430061)

**[摘要]** 目的: 基于缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路探讨补肾化痰方对小鼠胚胎成骨细胞MC3T3-E1有氧糖酵解的作用, 进一步探究补肾化痰方干预绝经后骨质疏松(PMOP)机制。方法: 将小鼠胚胎成骨细胞MC3T3-E1分为空白组, 补肾化痰方低、中、高质量浓度组(0.01、0.05、0.1 g·L<sup>-1</sup>), 淫羊藿苷组(0.1 g·L<sup>-1</sup>)。碱性磷酸酶染色法(ALP)、茜素红染色法(ARS)测定各组细胞成骨活性与矿化结节; 透射电镜观察成骨细胞线粒体、粗面内质网等超微结构变化; 免疫荧光法(IF)检测Runt相关转录因子2(Runx2)、成骨相关转录因子抗体(Osterix)的表达; 酶联免疫吸附测定法(ELISA)检测细胞上清液中丙酮酸(PA)、乳酸(LA)水平; Seahorse XF96细胞外流量分析仪测量细胞外酸化率(ECAR); 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测缺氧诱导因子-1α(HIF-1α)、HIF-1β、丙酮酸脱氢酶激酶同工酶1(PDK1)、己糖激酶2(HK2)、M2型丙酮酸激酶同工酶2(PKM2)蛋白的表达; 实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)检测HIF-1α、HIF-1β、PDK1、HK2、PKM2 mRNA表达。结果: 与空白组比较, 各给药组MC3T3-E1细胞ALP染色与ARS染色阳性表达面积明显增强(P<0.05, P<0.01); 胞内粗面内质网显著扩张, 数量增多, 溶酶体数量也有所增加; Runx2、Osterix荧光强度显著升高(P<0.01); 细胞上清PA、LA表达量显著升高(P<0.01); 细胞同时间段内ECAR明显上调(P<0.05); HIF-1α、HK2、PDK1、PKM2蛋白及mRNA表达水平明显上调(P<0.05, P<0.01)。结论: 补肾化痰方可以通过上调HIF-1信号通路调控MC3T3-E1成骨细胞有氧糖酵解, 促进骨形成。

**[关键词]** 补肾化痰方; 绝经后骨质疏松; 成骨细胞分化; 缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路; 有氧糖酵解

**[中图分类号]** R289; R259; R285 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(XXXX)XX-0001-10

**[doi]** 10.13422/j.cnki.syfjx.20252309

**[网络出版地址]**

**[网络出版日期]** XXXX-XX-XX



### Bushen Huatan Prescription Modulates Aerobic Glycolysis of MC3T3-E1 Cells by Regulating HIF-1 Signaling Pathway

XIONG Mengxin<sup>1,2,3</sup>, CHEN Yingqing<sup>1</sup>, ZHANG Haoxue<sup>1</sup>, JIANG Zeyu<sup>1</sup>,

XIANG Nan<sup>1,2</sup>, XU Jun<sup>1,2\*</sup>, DENG Ali<sup>1,2,3\*</sup>

(1. Hubei University of Chinese Medicine, Wuhan 430065, China; 2. Hubei Sizhen Laboratory, Wuhan 430061, China; 3. Hubei Provincial Hospital of Traditional Chinese Medicine, Wuhan 430061, China)

**[Abstract]** **Objective:** To explore the effect of Bushen Huatan prescription on aerobic glycolysis of MC3T3-E1 mouse embryonic osteoblasts based on the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway and further investigate the mechanism of Bushen Huatan decoction in the intervention of postmenopausal osteoporosis (PMOP). **Methods:** MC3T3-E1 cells were assigned into blank, low-dose (0.01 g·L<sup>-1</sup>) Bushen Huatan decoction, medium-dose (0.05 g·L<sup>-1</sup>) Bushen Huatan prescription, high-dose (0.1 g·L<sup>-1</sup>) Bushen Huatan prescription, and icaritin (0.1 g·L<sup>-1</sup>) groups. Alkaline phosphatase (ALP) staining and alizarin red S (ARS) staining were used to determine the osteogenic activity and mineralized nodules of cells in each group. Scanning electron

**[收稿日期]** 2025-09-27

**[基金项目]** 国家自然科学基金项目(82305350, 82074416); 湖北省自然科学基金项目(2022CFD153)

**[第一作者]** 熊梦欣, 博士, 主治医师, 从事中医药防治妇科内分泌疾病的研究, E-mail: Rimo.X@outlook.com

**[通信作者]** \* 徐俊, 博士, 讲师, 从事中医药防治骨病的研究, E-mail: 15623898756@163.com;

\* 邓阿黎, 博士, 教授, 主任医师, 从事中医药防治妇科内分泌疾病的研究, E-mail: 1556635835@qq.com

microscopy was employed to observe the ultrastructural changes of mitochondria and rough endoplasmic reticulum in osteoblasts. Immunofluorescence assay was adopted to detect the expression of Runt-related transcription factor 2 (Runx2) and osteogenic-specific transcription factor antibody (Osterix). Enzyme-linked immunosorbent assay was employed to measure the levels of pyruvic acid (PA) and lactic acid (LA) in cell supernatants. The Seahorse XF96 extracellular flow analyzer was used to measure the extracellular acidification rate (ECAR). Western blot and Real-time fluorescence quantitative polymerase chain reaction (Real-time PCR) were employed to determine the protein and mRNA levels, respectively of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ), HIF-1 $\beta$ , pyruvate dehydrogenase kinase isozyme 1 (PDK1), hexokinase 2 (HK2), and M2-type pyruvate kinase isozyme (PKM2). **Results:** Compared with the blank group, each treatment group showed increased positive areas of ALP and ARS staining in MC3T3-E1 cells ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ), significantly expanded and increased rough endoplasmic reticula, increased lysosomes, enhanced fluorescence intensities of Runx2 and Osterix ( $P<0.01$ ), elevated levels of PA and LA in the cell supernatants ( $P<0.01$ ), increased ECAR within the same time period ( $P<0.05$ ), and upregulated protein and mRNA levels of HIF-1 $\alpha$ , HK2, PDK1, and PKM2 ( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ). **Conclusion:** Bushen Huatan prescription can regulate aerobic glycolysis in MC3T3-E1 osteoblasts by upregulating the HIF-1 signaling pathway, thereby promoting bone formation.

**[Keywords]** Bushen Huatan prescription; postmenopausal osteoporosis; osteoblast differentiation; hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) signaling pathway; aerobic glycolysis

绝经后骨质疏松症(PMOP)是原发性骨质疏松(OP)最常见类型之一,是绝经后妇女随年龄增长雌激素骤降导致骨代谢失衡所引发的代谢性骨病<sup>[1]</sup>。其核心危害包括骨量流失与骨微结构破坏、高骨折风险及骨折后全身并发症<sup>[2]</sup>,严重降低生活质量,增加死亡风险。根据2018年国家卫生健康委员会开展涉及全国11个省的OP流行病学调查显示,50岁以上患病率为19.2%,其中男性为6.0%,女性为32.1%,女性患病率是男性的5倍;而65岁以上人群OP患病率达到32.0%,其中男性为10.7%,女性为51.6%<sup>[3]</sup>。OP已成为我国中老年人群的重要健康问题。骨矿化剂、骨形成促进剂和骨吸收抑制剂是PMOP临床常用药,随着用药疗程的延长,药效减弱、药物安全性及药物不良反应限制了其临床应用,基于天然植物的中药现备受青睐<sup>[4-7]</sup>。

中医学无“绝经后骨质疏松症”的病名,根据其临床症状可将其归于“骨痿”“骨枯”等范畴。虚为PMOP病机之根本,久虚及肾,肾虚,髓不满,骨不生<sup>[8]</sup>。湖北中医名师向楠以中医基础理论为基础,结合多年临证实践提出在补肾的基础上,还应从“痰”论治,融合《本草纲目》补骨脂丸与《丹溪心法》瓜蒌丸加减而成补肾化痰方用于PMOP的临床诊疗<sup>[9]</sup>。前期研究成果显示,补肾化痰方在缓解临床症状,提高生活质量,延缓骨丢失等方面有良好的疗效<sup>[10-11]</sup>。同时,前期通过转录组学、网络药理学联合分析,发现缺氧诱导因子-1(HIF-1)信号通路是补肾化痰方防治PMOP的核心通路之一<sup>[12]</sup>,但其具体作用环节尚待进一步明确。

有氧糖酵解通过调控成骨细胞的能量供给与功能活性,在OP骨形成过程中发挥关键调控作用<sup>[13]</sup>。成骨细胞增殖、分化及矿化需大量能量,而

有氧糖酵解相较于氧化磷酸化,能以更快速率生成三磷酸腺苷(ATP),快速满足骨形成关键阶段的能量需求<sup>[14]</sup>,缓解PMOP状态下成骨细胞能量代谢紊乱。研究表明,HIF-1信号通路可调控糖酵解相关酶表达,推动细胞供能方式从氧化磷酸化向有氧糖酵解转化,满足成骨细胞增殖、分化和矿化所需的高能量要求<sup>[15]</sup>,提示HIF-1信号通路是可能改善PMOP骨形成不足的关键调控通路。为明确补肾化痰方的作用机制,本研究拟以小鼠胚胎成骨细胞MC3T3-E1为研究对象,探讨补肾化痰方对HIF-1信号通路和其介导的成骨细胞有氧糖酵解的调控作用,为中医药防治PMOP提供参考。

## 1 材料

**1.1 细胞** 小鼠胚胎成骨细胞株MC3T3-E1,购自上海赛百慷公司,批号iCell-m031。

**1.2 药品** 补肾化痰方由淫羊藿10g、盐补骨脂15g、全瓜蒌15g、菟丝子30g、红曲12g、山楂20g组成。淫羊藿(批号202412021)、盐补骨脂(批号2524120103)、山楂(批号231002331),均由湖北辰美中药有限公司提供;全瓜蒌(批号230301),由四川国强中药饮片公司提供;菟丝子(批号1292420-1),由保和堂(亳州)制药有限公司提供;红曲(批号230801),由化州市华逸中药饮片有限公司提供。以上中药饮片均购自湖北中医药大学附属湖北省中医院中药房,经湖北省中医院陈树和教授鉴定,均符合2025年版《中华人民共和国药典》标准。补肾化痰方冻干粉制备:按处方标准比例混合后用中药粉碎机粉碎,过80目药筛(粒度控制在180 $\mu$ m以下),收集均匀粉末备用。加入10倍量纯化水,搅拌使粉末充分润湿,静置30min后加热至沸腾,保持微沸状态煎煮60min,用4层医用脱脂纱布初步滤

过,收集第1次滤液;药渣再加入8倍量纯化水,重复上述操作(微沸煎煮45 min),收集第2次滤液;药渣加入6倍量纯化水,微沸煎煮30 min,收集第3次滤液。合并3次滤液,先经100目不锈钢筛网滤除残留细小药渣,再采用板框压滤机(滤膜孔径 $0.45\ \mu\text{m}$ )进一步澄清滤过;将澄清滤液转移至旋转蒸发仪,在 $60\ ^\circ\text{C}$ 、真空度 $-0.08\ \text{MPa}$ 条件下减压浓缩至相对密度 $1.10\sim 1.15$ 的浸膏。将浓缩浸膏分装于冻干瓶中,置于冷冻干燥机内,先在 $-40\ ^\circ\text{C}$ 预冻4 h,再升温至 $-15\ ^\circ\text{C}$ ,升华干燥24 h,最后升温至 $25\ ^\circ\text{C}$ 解析干燥8 h,冻干完成后取出,收集粉末状冻干物,密封后置于 $4\ ^\circ\text{C}$ 冰箱保存。细胞给药前取上述冻干粉,加入适量纯水超声溶解,定容配置成质量浓度为 $50\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 储备液,经 $0.22\ \mu\text{m}$ 无菌微孔滤膜过滤后,分装于无菌离心管中,置于 $-20\ ^\circ\text{C}$ 备用。淫羊藿苷(成都普思生物科技有限公司,批号489-32-7,质量分数99.50%),采用纯水溶解粉末配置至 $0.1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

**1.3 试剂** MC3T3-E1细胞专用培养基(上海赛百慷生物技术公司,批号iCell-m031-001b);细胞增殖与活性检测(CCK-8)试剂盒(美仑生物科技有限公司,货号65162-13-2);茜素红法钙质染色(ARS)试剂盒(上海歌凡生物科技有限公司,批号M040);碱性磷酸酶染色(ALP)试剂盒、蛋白定量法(BCA)蛋白浓度测定试剂盒(北京索莱宝科技公司,批号分别为G1481、PC0020);聚偏二氟乙烯(PVDF)转移膜、化学发光试剂(德国Millipore公司,批号分别为IPVH00010、WBKLS0500);Runt相关转录因子2(Runx2)、M2型丙酮酸激酶同工酶(PKM2)、己糖激酶2(HK2)一抗(碧云天生物科技公司,批号分别为AF2593、AF7764、AG2142);成骨相关转录因子抗体(Osterix)、缺氧诱导因子-1 $\alpha$ (HIF-1 $\alpha$ )、丙酮酸脱氢酶激酶同工酶1(PDK1)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)一抗(美国Abcam公司,批号分别为ab209484、ab214821、ab308433、ab202468、ab8245);缺氧诱导因子-1 $\beta$ (HIF-1 $\beta$ )一抗(美国CST公司,批号5537);二抗(美国Jackson公司,批号JAC-111-035-003);丙酮酸(PA)、乳酸(LA)酶联免疫吸附测定法(ELISA)试剂盒(上海蕊试生物技术有限公司,货号分别为EY3734、EY2119);Seahorse XF糖酵解应力测试试剂盒(美国Agilent公司,批号103346-100)。

**1.4 仪器** DMILLED型倒置荧光显微镜(德国Leica公司);mini protean 3 cell型电泳仪、CFX-

Connect 96型实时荧光定量聚合酶链式反应(Real-time PCR)仪(美国Bio-Rad公司);DYCZ-40D型转膜仪(北京六一仪器厂);HT7700型透射电子显微镜(日本日立公司);MK3型酶标仪(芬兰Thermo LabSystems公司);K30型干式恒温器(杭州爽盛仪器有限公司);MTV-1型微型涡旋混合仪、Nano-300型超微量分光光度计、iCEN-24R型高速冷冻离心机(杭州奥盛仪器有限公司);Seahorse XF96型细胞外流量分析仪(美国Agilent公司)。

## 2 方法

**2.1 细胞培养及干预** 取出冻存MC3T3-E1细胞 $37\ ^\circ\text{C}$ 水浴融化,置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 的培养箱内培养。加入0.25%胰酶1 mL进行细胞消化1 min,显微镜下观察细胞收回突变圆且脱落时,加入完全培养基停止消化,完成细胞传代,存贮备用。分别采用质量浓度为 $0.1\ \text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 的淫羊藿苷及不同浓度补肾化痰方冻干粉溶液干预,同时设置不含药物培养基的空白组。

### 2.2 CCK-8法筛选补肾化痰方最佳浓度及时间

取对数生长期的MC3T3-E1细胞,以密度为 $5\times 10^5$ 个/孔接种于96孔板内并培养24 h。以空白组为对照,分别加入不同质量浓度的补肾化痰方(0、0.01、0.05、0.1、0.5、1、2  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),干预12 h、24 h、48 h和72 h后,加入CCK-8工作液10  $\mu\text{L}$ ,置于 $37\ ^\circ\text{C}$ 、5% $\text{CO}_2$ 培养箱中孵育2 h后,使用酶标仪测定吸光度 $A_{570}$ 值,筛选最佳浓度及作用时间,用于后续实验。

### 2.3 ALP及ARS染色检测MC3T3-E1细胞成骨活性

将MC3T3-E1细胞以 $4\times 10^5$ 个/孔接种于6孔板中,培养至细胞完全贴壁生长后,按照空白组,补肾化痰方低、中、高质量浓度组(0.01、0.05、0.1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ ),淫羊藿苷组(0.1  $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ )干预处理48 h,磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤1次,4%多聚甲醛固定15 min, PBS清洗,每孔加入2 mL ALP染色液或ARS染色液,室温染色30 min,蒸馏水速洗后显微镜下观察并拍照。使用Image J软件计算阳性细胞面积。

### 2.4 透射电镜检测MC3T3-E1细胞成骨超微结构

组织电镜固定液固定后PBS冲洗,1%锇酸固定,乙醇梯度脱水,树脂浸透,包埋后切片(70 nm),轴染、铅染,电镜下观察细胞微观结构。

### 2.5 蛋白免疫印迹法(Western blot)检测目的蛋白表达

将MC3T3-E1细胞以 $1\times 10^6$ 个/孔接种于6孔板中,予以对应浓度药物分别干预48 h后,收取细胞沉淀。不同药物分别干预48 h后,收取细胞沉

淀。依据放射免疫沉淀法(RIPA)蛋白抽提试剂盒抽提总蛋白,BCA蛋白质定量试剂盒说明书测定蛋白质浓度,配置12%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)胶,每孔加入蛋白20 μg,进行电泳并转膜,5%脱脂奶粉室温封闭1 h,4 °C过夜。TBST溶液洗涤3次,加HIF-1α(1:1 000)、HIF-1β(1:1 000)、HK2(1:1 000)、PKM2(1:2 000)、PDK1(1:2 000)、GAPDH(1:10 000)的一抗4 °C孵育过夜,TBST洗涤3次,用二抗(1:5 000)室温孵育60 min,TBST溶液洗涤后,将PVDF膜置于化学发光系统中检测,应用增强化学发光法(ECL)显色剂在暗室中曝光成像观察蛋白信号,结果用Image J软件量化处理。

### 2.6 Real-time PCR 检测目的 mRNA 表达

MC3T3-E1细胞以 $1 \times 10^6$ 个/孔的密度接种于6孔板中,不同药物干预48 h后,收取细胞沉淀,加入TRIzol液后提取总RNA。取RNA 1 μg按照逆转录试剂盒说明书逆转录成cDNA,加入特异引物进行Real-time PCR扩增。所得数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法计算mRNA相对表达量。反应条件:25 °C预反应5 min,51 °C反转录15 min,83 °C变性5 min,4 °C退火10 min。扩增过程中将5倍稀释的cDNA(4 μL)与上下游引物(各4 μL)混合。93 °C预变性10 min,95 °C变性10 s,60 °C退火延伸30 s,40个循环。引物由北京擎科生物科技有限公司合成,引物设计见表1。

表1 引物序列

Table 1 Primer sequences

引物	序列(5'-3')	长度/bp
HIF-1α	上游 GCTGATTTGTGAGCCTTCTATG	144
	下游 TCATCTGTAAGTGGGTCTCGT	
HIF-1β	上游 GCTGCTGGAGAAGATGACCT	144
	下游 CAGGAAGCGGTAGTCATGGT	
HK2	上游 GCTGCTGCTGAAGAAGATGG	132
	下游 CCAGAGGGAGTCGATGTTGA	
PKM2	上游 TGGACAAGAACGGCAAGATC	128
	下游 CAGAGGTGATGCCGATGTTG	
PDK1	上游 ATGGCGTCCGTGGAGAAGTA	120
	下游 TCAGTCTTGGCGTAGTCGTT	
GAPDH	上游 TGTGTCCGTCGTGGATCTGA	152
	下游 TTGCTGTTGAAGTCGCAGGAG	

2.7 免疫荧光染色 Runx2、Osterix 蛋白表达 取对数生长期细胞按 $2 \times 10^5$ /mL/孔的密度接种于6孔板,

待细胞融合到50%,按照不同的组别干预细胞,培养箱中孵育48 h。倒出培养基,4%多聚甲醛固定,0.1%聚乙二醇辛基苯基醚(Triton X 100)破膜,过氧化氢(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)室温孵育10 min,5%牛血清白蛋白溶液(BSA)37 °C孵育30 min,加一抗室温孵育2 h后移出,浓度Runx2(1:100)、Osterix(1:500),加二抗(1:500)避光孵育30 min,4',6-二脒基-2-苯基吡啶(DAPI)染核,PBS清洗3次,镜下观察,Image J进行分析。

2.8 ELISA 检测 PA、LA 浓度 取对数生长期细胞按 $2 \times 10^5$ 个/mL/孔的密度接种于6孔板,待细胞融合到50%,按照不同的组别干预细胞,培养箱中孵育48 h,取细胞培养液上清,按试剂盒说明书检测PA、LA浓度。

2.9 细胞外酸化速率(ECAR)测量 采用Seahorse XF糖酵解应力测试试剂盒和Seahorse XF96细胞外流量分析仪测量ECAR。在测量前1 d,将细胞以 $2 \times 10^4$ 个/孔的密度接种在XF96细胞培养微孔板中。细胞在基础条件下与非缓冲培养基孵育,然后在指定的时间点依次加入葡萄糖(10 mmol·L<sup>-1</sup>)、寡霉素(1 μmol·L<sup>-1</sup>)和2-脱氧-D-葡萄糖(50 mmol·L<sup>-1</sup>)。每个测试重复3次。

2.10 统计学方法 实验结果的数据采用SPSS 22.0统计软件分析,数据均以 $\bar{x} \pm s$ 表示,两组间比较采用t检验,多组间比较采用单因素方差分析加Tukey's事后检验,以P<0.05为差异有统计学意义。

## 3 结果

3.1 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞活性水平的影响 0.01、0.05、0.1 g·L<sup>-1</sup>的补肾化痰方在12、24、48、72 h对MC3T3-E1细胞生长具有促进作用,当药物质量浓度超过0.5 g·L<sup>-1</sup>后,细胞生长受到明显抑制;0.1 g·L<sup>-1</sup>的补肾化痰方在48 h对细胞活性的影响最为明显,当干预时间到72 h时,细胞活性反而下降。基于此,研究后续选择质量浓度为0.01、0.05、0.1 g·L<sup>-1</sup>的补肾化痰方干预MC3T3-E1细胞48 h来进行相关实验。见图1。

3.2 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞骨形成的影响 与空白组比较,补肾化痰方低、中、高剂量组及淫羊藿苷组ALP与ARS染色阳性表达面积明显升高(P<0.05);与补肾化痰方低剂量组比较,补肾化痰方中、高剂量组及淫羊藿苷组ALP与ARS染色阳性表达面积表达明显升高(P<0.05)。见表2、图2。

3.3 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞超微结构的影响 空白组细胞质内可见线粒体、溶酶体、粗面

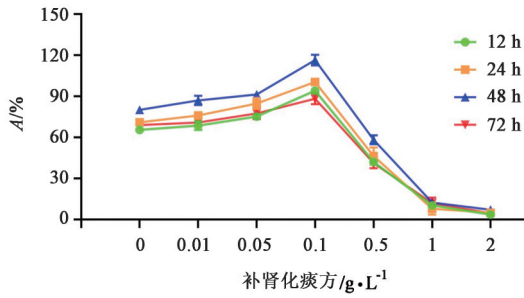


图1 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞活力的影响  
Fig. 1 Effect of Bushen Huatan prescription (BSBT) on viability of MC3T3-E1 cells

内质网等正常细胞器。与空白组比较,补肾化痰方低、中、高剂量组及淫羊藿苷组MC3T3-E1细胞内粗面内质网显著扩张,数量增多,且内质网膜上核糖体密集溶酶体数量增多;同时,溶酶体数

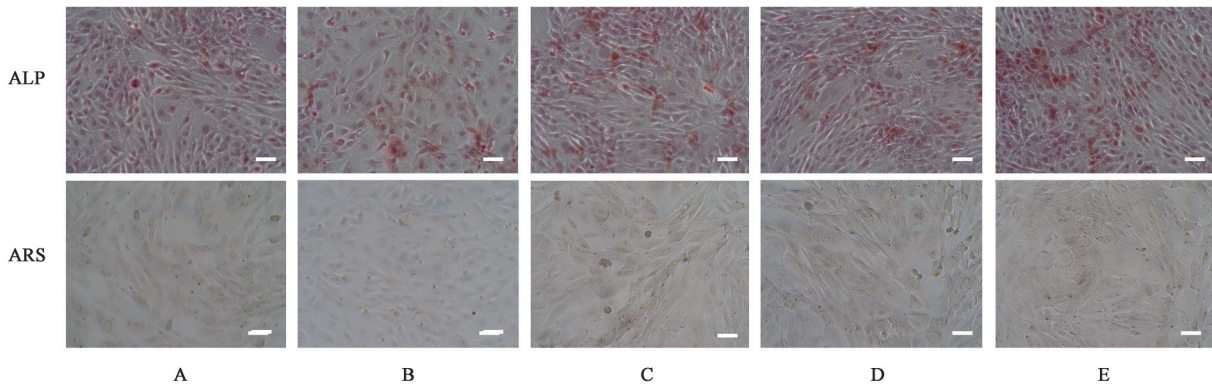
表2 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞ALP、ARS染色阳性表达面积的影响( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

Table 2 Effect of BSBT on positive expression area of ALP and ARS staining in MC3T3-E1 cells ( $\bar{x}\pm s, n=3$ )

组别	质量浓度 /g·L <sup>-1</sup>	ALP	ARS
空白组		3.58±0.46	4.11±0.58
补肾化痰方低剂量组	0.01	5.21±0.97 <sup>1)</sup>	6.31±0.71 <sup>1)</sup>
补肾化痰方中剂量组	0.05	11.91±1.34 <sup>2,3)</sup>	12.97±1.18 <sup>2,3)</sup>
补肾化痰方高剂量组	0.1	12.94±1.52 <sup>2,3)</sup>	14.45±1.26 <sup>2,3)</sup>
淫羊藿苷组	0.1	16.12±1.83 <sup>2,3)</sup>	13.54±1.62 <sup>2,3)</sup>

注:与空白组比较<sup>1)</sup>P<0.05,<sup>2)</sup>P<0.01;与补肾化痰方低剂量组比较<sup>3)</sup>P<0.05,<sup>4)</sup>P<0.01(表3-表6同)

量明显增多,分泌小泡数量也略有增多。见图3。



注:A.空白组;B.补肾化痰方低剂量组;C.补肾化痰方中剂量组;D.补肾化痰方高剂量组;E.淫羊藿苷组(图3-图6同)

图2 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞ALP、ARS染色的影响(×???)  
Fig. 2 Effect of BSBT on ALP and ARS staining of MC3T3-E1 cells(×???)

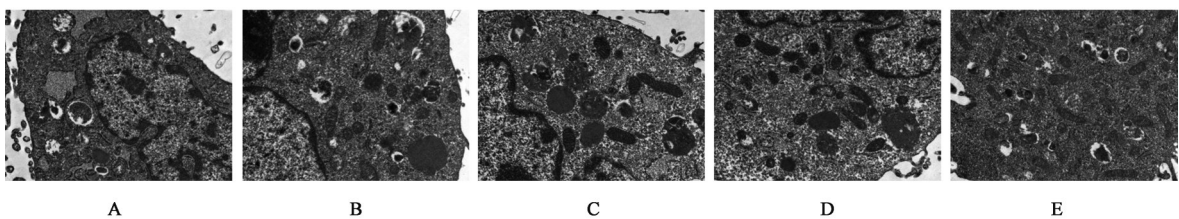


图3 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞超微结构的影响(扫描电镜,×???)

Fig. 3 Effect of BSHT on ultrastructure of MC3T3-E1 cells (TEM, ×???)

3.4 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞Runx2、Osterix蛋白表达的影响 免疫荧光结果显示,与空白组比较,补肾化痰方低、中、高剂量组及淫羊藿苷组Runx2、Osterix荧光强度显著上调( $P<0.01$ );与补肾化痰方低剂量组比较,补肾化痰方中、高剂量组及淫羊藿苷组Runx2荧光强度明显增强( $P<0.05$ ,  $P<0.01$ ),补肾化痰方高剂量组Osterix荧光强度明显增强( $P<0.05$ )。见图4、表3。

3.5 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞培养上清PA、

LA含量的影响 结果显示,与空白组比较,补肾化痰方低、中、高剂量组及淫羊藿苷组PA、LA表达显著升高( $P<0.01$ )。见表4。

3.6 补肾化痰方对ECAR的影响 ECAR结果显示,在相同时间段内,与空白组比较,补肾化痰方低、中、高剂量组及淫羊藿苷组细胞外酸化率明显升高( $P<0.05$ )。见图5。

3.7 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞HIF-1 $\alpha$ 、HIF-1 $\beta$ 、HK2、PKM2、PDK1 mRNA的影响 Real-time PCR

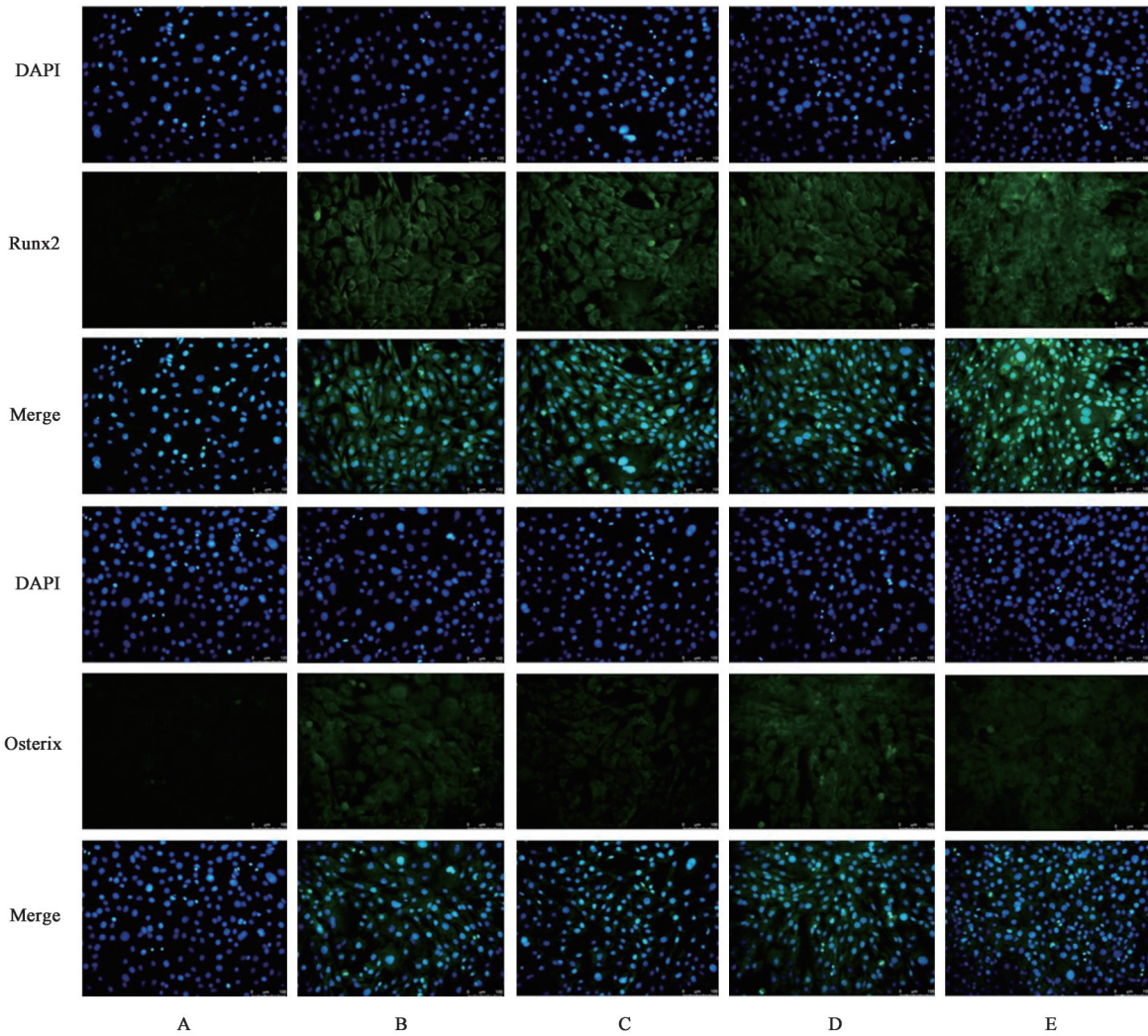


图4 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞Runx2、Osterix蛋白表达的影响(免疫荧光, ×200)

Fig. 4 Effect of BSHT on Runx2, Osterix expression in MC3T3-E1 cells (IF, ×200)

表3 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞Runx2、Osterix蛋白表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 3 Effect of BSHT on Runx2, Osterix expression in MC3T3-E1 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	Runx2	Osterix
空白组		6.50±0.92	2.24±0.41
补肾化痰方低剂量组	0.01	18.77±3.62 <sup>2)</sup>	12.66±1.27 <sup>2)</sup>
补肾化痰方中剂量组	0.05	23.29±3.81 <sup>2,3)</sup>	9.07±1.02 <sup>2)</sup>
补肾化痰方高剂量组	0.1	22.92±4.25 <sup>2,3)</sup>	17.54±2.04 <sup>2,3)</sup>
淫羊藿苷组	0.1	34.36±4.68 <sup>2,4)</sup>	11.14±1.52 <sup>2)</sup>

结果显示,与空白组比较,补肾化痰方低、中、高剂量组及淫羊藿苷组 HIF-1 $\alpha$ 、HK2、PKM2、PDK1 mRNA 表达明显上调 ( $P<0.05, P<0.01$ ), HIF-1 $\beta$  mRNA 表达差异无统计学意义。见表5。

3.8 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞HIF-1 $\alpha$ 、HIF-1 $\beta$ 、HK2、PKM2、PDK1蛋白表达水平的影响

表4 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞PA、LA表达的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 4 Effect of BSHT on PA, LA expression of MC3T3-E1 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	PA	LA
空白组		15.80±2.62	24.01±4.07
补肾化痰方低剂量组	0.01	24.21±4.27 <sup>2)</sup>	40.31±5.91 <sup>2)</sup>
补肾化痰方中剂量组	0.05	26.29±5.31 <sup>2)</sup>	41.67±6.77 <sup>2)</sup>
补肾化痰方高剂量组	0.1	27.92±5.25 <sup>2)</sup>	42.04±5.23 <sup>2)</sup>
淫羊藿苷组	0.1	32.02±4.33 <sup>2)</sup>	33.54±4.55 <sup>2)</sup>

Western blot结果显示,与空白组比较,补肾化痰方低、中、高剂量组及淫羊藿苷组 HIF-1 $\alpha$ 、HK2、PKM2、PDK1 表达显著上调 ( $P<0.01$ ), HIF-1 $\beta$  表达差异无统计学意义;与补肾化痰方低剂量组比较,补肾化痰方中、高剂量组及淫羊藿苷组 HIF-1 $\alpha$ 、PDK1 表达明显上调,差异具有统计学意义 ( $P<0.05$ )。见图6、表6。

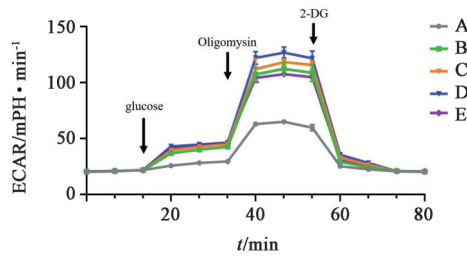


图5 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞ECAR的影响  
Fig. 5 Effect of BSHT on ECAR in MC3T3-E1 cells

表5 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞HIF-1通路mRNA相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 5 Effect of BSHT on HIF-1 pathway mRNAs expression of MC3T3-E1 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	HIF-1 $\alpha$	HIF-1 $\beta$	HK2	PKM2	PDK1
空白组		1.01±0.02	0.98±0.02	0.99±0.01	1.02±0.01	1.01±0.03
补肾化痰方低剂量组	0.01	1.33±0.18 <sup>2)</sup>	0.97±0.03	1.21±0.10 <sup>1)</sup>	1.52±0.08 <sup>2)</sup>	1.67±0.21 <sup>2)</sup>
补肾化痰方中剂量组	0.05	1.40±0.16 <sup>2)</sup>	0.98±0.02	1.26±0.12 <sup>1)</sup>	1.48±0.06 <sup>2)</sup>	1.81±0.19 <sup>2)</sup>
补肾化痰方高剂量组	0.1	1.42±0.13 <sup>2)</sup>	0.99±0.03	1.25±0.14 <sup>1)</sup>	1.44±0.05 <sup>2)</sup>	1.87±0.19 <sup>2)</sup>
淫羊藿苷组	0.1	1.29±0.11 <sup>2)</sup>	1.00±0.03	1.45±0.19 <sup>1)</sup>	1.27±0.04 <sup>2)</sup>	1.69±0.17 <sup>2)</sup>

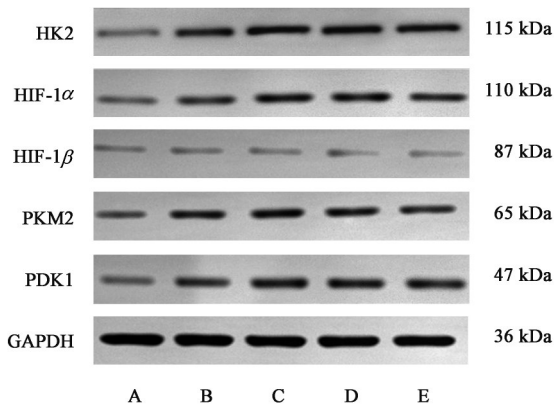


图6 MC3T3-E1细胞HIF-1通路蛋白相对表达电泳  
Fig. 6 Electrophoresis of HIF-1 pathway proteins expression of MC3T3-E1 cells

#### 4 讨论

绝经后骨质疏松发病在七七之年,肾主骨生髓,肾虚是其基本病机。《仁斋直指方论·痿证方论》提出“人之气血弱虚,而痰火起于手足之内,则正不能胜邪,而痿痹作矣”,意味着气血虚弱可生痰,痰火滋生致骨痿,说明痰是导致“骨痿”的重要因素之

一。肾气既虚,则阴阳俱虚。肾阴不足,则骨髓生化乏源。肾阳不足,精血蒸化无力而痰浊内生,痰聚于内将进一步影响骨髓化生,可见“痰”既是肾虚的病理产物,亦是骨痿的致病因素。《医学入门》记载“痰聚于肾,多足膝酸软,腰背强痛,肢节冷痹骨痛”,详细描述了“肾痰”在骨的症状表现,与PMOP患者腰背或全身性疼痛、腰膝酸软、肢体乏力、步履艰难等的病理特征相符合。由此,肾虚生痰,痰浊

入骨,则筋骨不利,腰背强痛,足膝酸软,发生PMOP。基于“肾痰”在PMOP发病中的认识,湖北中医名师向楠教授认为勿见“痰”治“痰”,应辨证求根源,即“补肾化痰”,融合《本草纲目》补骨脂丸与《丹溪心法》瓜蒌丸加减而成补肾化痰方作为临床基础方<sup>[16]</sup>。方中以淫羊藿、补骨脂、菟丝子合用,凑补肾益精、强筋健骨之功;以全瓜蒌、山楂、红曲合用以消积痰,契合PMOP病机。

骨稳态维持与促进骨再生是骨代谢相关疾病的研究重点之一。绝经后雌激素下降,成骨细胞主导的骨形成不足且破骨细胞主导的骨吸收增强,是本病骨量丢失的主要因素<sup>[17]</sup>。成骨细胞负责骨基质的分泌和矿化,并严格调节破骨细胞的活化和分化,因此成骨细胞的活性与功能对骨形成和修复起决定性作用。MC3T3-E1细胞源自小鼠胚胎颅顶骨,具有定向分化为成骨细胞的特点,被认为与人类骨细胞衰老相似,使其适合作为体外骨骼研究的模型<sup>[18]</sup>。

成骨功能减弱是诱发OP的重要原因,成骨细胞参与骨形成和骨重塑,主要依赖于骨形态发生蛋

表6 补肾化痰方对MC3T3-E1细胞HIF-1通路蛋白相对表达量的影响 ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

Table 6 Effect of BSHT decoction on HIF-1 pathway proteins expression of MC3T3-E1 cells ( $\bar{x} \pm s, n=3$ )

组别	质量浓度/g·L <sup>-1</sup>	HIF-1 $\alpha$ /GAPDH	HIF-1 $\beta$ /GAPDH	HK2/GAPDH	PKM2/GAPDH	PDK1/GAPDH
空白组		0.32±0.04	0.18±0.02	0.42±0.06	0.36±0.07	0.34±0.04
补肾化痰方低剂量组	0.01	0.53±0.08 <sup>2)</sup>	0.17±0.02	0.81±0.09 <sup>2)</sup>	0.52±0.09 <sup>2)</sup>	0.64±0.09 <sup>2)</sup>
补肾化痰方中剂量组	0.05	0.70±0.12 <sup>2,3)</sup>	0.20±0.03	0.86±0.09 <sup>2)</sup>	0.58±0.10 <sup>2)</sup>	0.81±0.09 <sup>2,3)</sup>
补肾化痰方高剂量组	0.1	0.66±0.10 <sup>2,3)</sup>	0.18±0.02	0.89±0.11 <sup>2)</sup>	0.54±0.09 <sup>2)</sup>	0.76±0.10 <sup>2,3)</sup>
淫羊藿苷组	0.1	0.63±0.09 <sup>2,3)</sup>	0.17±0.03	0.85±0.08 <sup>2)</sup>	0.57±0.09 <sup>2)</sup>	0.83±0.07 <sup>2,3)</sup>

白(BMP)、骨特异性ALP、骨钙素(OCN) I型胶原蛋白(Col-1)、骨桥蛋白(OPN)等因子促进基质合成与矿化,增强成骨相关因子表达和成骨矿化结节形成是减缓骨质疏松的有效手段。Runx2和Osterix是骨形成的调控因子和转录因子,Runx2作用贯穿于胚胎发育至骨稳态维持的全过程,其相对高表达有利于促OCN、Col-1、OPN等其他成骨细胞增殖分化标志物的表达,与骨质疏松症高度相关<sup>[19]</sup>。Osterix核心功能为分泌骨基质和促进基质矿化,此外还可以与Runx2协同作用,平衡成骨细胞增殖与分化速率,维持骨量稳定<sup>[20-21]</sup>。ALP活性和矿化结节形成是细胞成骨分化早、晚期标志物<sup>[22]</sup>,ARS染色与ALP染色是观察细胞成骨分化的常用检测方式。粗面内质网是细胞内负责蛋白质的合成、初步加工和运输的核心细胞器,表面附着核糖体,发达的粗面内质网是细胞活性的重要体现,成骨细胞的基质合成能力与粗面内质网的丰富程度呈高度相关性。溶酶体是胞质内负责分解衰老物质并为新结构的合成提供原料的细胞器,其数量的改变可反映细胞更新代谢的活跃程度。本研究结果显示,经补肾化痰方干预后,MC3T3-E1细胞ALP、ARS阳性表达面积显著提高,Runx2、Osterix蛋白表达增加,细胞内粗面内质网扩张明显,数量明显增多,且内质网膜上核糖体密集溶酶体数量增多;同时,溶酶体与分泌小泡数量也有所增加。提示补肾化痰方可促进MC3T3-E1细胞活性与成骨分化能力,促进骨形成。

近年来,基于能量代谢探索PMOP的发病机制和挖掘新的治疗方法受到关注。成骨细胞沉积胶原、基质矿化过程的供给能量方式通过氧化磷酸化和糖酵解2种途径。进一步研究表明,即使在氧气充足的情况下,成骨细胞依然倾向于使用有氧糖酵解途径将葡萄糖代谢过程中产生的PA转化为LA,而非使用三羧酸循环代谢葡萄糖,有氧糖酵解代谢重编程是成骨细胞中葡萄糖利用的主要模式<sup>[23-24]</sup>。HIF-1信号通路是细胞应对缺氧微环境调控代谢适应与生存的核心信号通路。通路核心分子HIF-1为异源二聚体,包括HIF-1 $\alpha$ 与HIF-1 $\beta$ ,其中HIF-1 $\alpha$ 为敏感性亚基,是通路的核心调控靶点。HIF-1 $\alpha$ 与促进骨形成、改善骨折愈合关系密切。研究表明,通过激活成骨前细胞中的HIF-1 $\alpha$ 信号可启动成骨细胞有氧糖酵解代谢重编程,骨质疏松小鼠胫骨松质骨含量增加,为HIF-1 $\alpha$ 激活有氧糖酵解代谢重编程促进骨形成提供了直接证据<sup>[25-26]</sup>。进一步研究发

现,HIF-1 $\alpha$ 对有氧糖酵解代谢重编程的激活作用点可能在糖酵解关键酶,包括HK2、PDK1、PKM2等糖酵解关键酶<sup>[27-28]</sup>。研究表明,HIF-1 $\alpha$ 可直接结合HK2基因的启动子,激活其转录,促进HK2蛋白表达,继而增强细胞对葡萄糖的捕获和糖酵解起始效率<sup>[29]</sup>。有研究表明,HK2与成骨细胞线粒体功能和细胞代谢途径相关,通过影响成骨细胞HK2与电压依赖性阴离子通道1的相关作用,可以引起线粒体功能障碍和能量代谢异常,从而引起成骨细胞分化异常,导致骨稳态破坏<sup>[30]</sup>。HIF-1是PDK1的核心上游调控因子,可直接结合PDK1基因的高反应元件并激活其转录,促使PDK1表达升高。而高表达的PDK1能有效抑制线粒体中的PA脱氢酶复合物,阻断PA进入有氧呼吸,强制糖代谢流导向有氧糖酵解。研究表明,对MC3T3-E1细胞进行HIF-1 $\alpha$  RNAi后,有氧糖酵解关键酶PDK1表达及相应的底物PA、LA的含量均下降,同时成骨分化因子ALP水平和Runx2表达下降,成骨细胞分化能力下降<sup>[31]</sup>。PKM2是调控糖酵解终末阶段的关键限速酶。HIF-1可通过调控PKM基因的选择性剪接,抑制成熟PKM1(高活性亚型)的生成,促进PKM2(可调控活性亚型)的表达,以实现糖酵解终末步骤的灵活调控。研究表明,抑制PKM2介导的糖酵解代谢可以阻断细胞成骨分化<sup>[32]</sup>。在本次研究中,经补肾化痰方干预后,MC3T3-E1细胞上清PA、LA表达水平显著升高,提示葡萄糖向PA转化效率提升,乳酸也被大量生成,细胞有氧糖酵解速率加快。同时,细胞内HIF-1 $\alpha$ 、HK2、PKM2、PDK1的蛋白及mRNA表达量明显上调,提示补肾化痰方可以上调HIF-1信号通路及其介导的有氧糖酵解,也证实前期转录组学与网络药理学联合分析的准确性。

综上所述,补肾化痰方促进骨形成的机制可能与上调HIF-1信号通路,促进成骨细胞有氧糖酵解,促进成骨细胞分化,提升成骨细胞活性有关。本研究也存在一定的局限性,虽然通过多方面的证据确立了HIF-1通路激活与补肾化痰方促成骨作用之间的强相关性,然而,要最终确认其因果关系,仍有待于未来通过使用HIF-1 $\alpha$ 特异性抑制剂或基因敲低技术进行功能挽救实验来加以验证,后期将进行持续性研究。

[利益冲突] 本文不存在任何利益冲突。

#### [参考文献]

[1] 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.
- Osteoporosis and Bone Mineral Diseases Branch of the Chinese Medical Association. Diagnosis and treatment guidelines for primary osteoporosis (2022) [J]. Chin Gen Pract, 2023, 26(14): 1671-1691.
- [ 2 ] 陈春华, 孙贵新. 积雪草苷调节 HIF-1 $\alpha$ /VEGF 信号通路对绝经后骨质疏松大鼠血管生成的影响[J]. 中国老年学杂志, 2025, 45(16): 3990-3995.
- CHEN C H, SUN G X The effect of asiaticoside regulating the HIF-1 $\alpha$ /VEGF signaling pathway on angiogenesis in postmenopausal osteoporotic rats[J]. Chin J Gerontol, 2025, 45(16): 3990-3995.
- [ 3 ] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(4): 317-318.
- Osteoporosis and Bone Mineral Diseases Branch of the Chinese Medical Association. Epidemiological investigation of osteoporosis in China and release of results of the "healthy bones" special campaign [J]. Chin J Osteoporos Bone Miner Res, 2019, 12(4): 317-318.
- [ 4 ] 庄华烽, 李毅中, 王培文, 等. 唑来膦酸注射液治疗绝经后原发性骨质疏松的急性期药物不良反应研究[J]. 中国临床药理学杂志, 2019, 35(11): 1119-1121.
- ZHUANG H F, LI Y Z, WANG P W, et al. Study on acute adverse drug reactions of zoledronic acid injection in the treatment of postmenopausal primary osteoporosis [J]. Chin J Clin Pharmacol, 2019, 35(11): 1119-1121.
- [ 5 ] 卜建龙, 徐亮, 张品一, 等. 不同用药方案阿仑磷酸钠治疗老年性骨质疏松症的临床疗效分析[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(2): 181-184.
- BU J L, XU L, ZHANG P Y, et al. Analysis of the clinical efficacy of alenphosphate sodium with different medication regimens in the treatment of senile osteoporosis [J]. Chin J Osteoporos, 2014, 20(2): 181-184.
- [ 6 ] 刘勃, 文雪平, 闫志广. 强骨生血口服液联合利塞膦酸钠片治疗绝经后骨质疏松症的临床效果[J]. 临床合理用药, 2025, 18(24): 97-99.
- LIU B, WEN X P, YAN Z G. The clinical effect of Qianggu Shengxue oral liquid combined with risedronate Sodium Tablets in the treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. Clin Ration Drug Use, 2025, 18(24): 97-99.
- [ 7 ] 安玉兰, 曹昌霞, 田玉梅, 等. 金匮肾气丸合补中益气汤加减治疗绝经后骨质疏松症的疗效及对免疫炎症因子的调节作用[J]. 中国实验方剂学杂志, 2021, 27(6): 69-75.
- AN Y L, CAO C X, TIAN Y M, et al. The therapeutic effect of Jinkui Shenqi pills combined with modified Buzhong Yiqi decoction on postmenopausal osteoporosis and its regulatory effect on immune inflammatory factors [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2021, 27(6): 69-75.
- [ 8 ] 中华中医药学会. 绝经后骨质疏松症(骨痿)中医药诊疗指南(2019年版)[J]. 中医正骨, 2020, 32(2): 1-13.
- China Association of Chinese Medicine. Guidelines for the diagnosis and treatment of postmenopausal osteoporosis (bone atrophy) with traditional Chinese medicine (2019 edition) [J]. Trad Chin Orthop, 2020, 32(2): 1-13.
- [ 9 ] 熊梦欣, 向楠, 薛瑶珺, 等. 基于“肾痰”认识骨-脂代谢异常失衡在绝经后骨质疏松症发病中的作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(3): 455-459.
- XIONG M X, XIANG N, XUE Y J, et al. Understanding the role of abnormal imbalance in bone-lipid metabolism based on "kidney phlegm" in the pathogenesis of postmenopausal osteoporosis [J]. Chin J Osteoporos, 2022, 28(3): 455-459.
- [ 10 ] 谭张奎, 向楠, 张妍, 等. 基于 IL-6/JAK2/STAT3 通路探讨补肾化痰方改善去势大鼠骨丢失的作用机制[J]. 中草药, 2021, 52(16): 4904-4912.
- TAN Z K, XIANG N, ZHANG Y, et al. To explore the mechanism of the Bushen Huatan formula in improving bone loss in castrated rats based on the IL-6/JAK2/STAT3 pathway [J]. Chin Herb Med, 2021, 52(16): 4904-4912.
- [ 11 ] 张妍, 向楠, 周广文, 等. 补肾化痰方调控去势骨质疏松大鼠骨脂分化改善绝经后骨丢失的机制[J]. 中国实验方剂学杂志, 2022, 28(20): 53-60.
- ZHANG Y, XIANG N, ZHOU G W, et al. The mechanism by which the tonifying kidney and resolving phlegm formula regulates osteolipid differentiation in castrated osteoporotic rats and improves postmenopausal bone loss [J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2022, 28(20): 53-60.
- [ 12 ] 张郁, 张发雪, 张寒, 等. 基于多组学技术探讨补肾化痰方防止绝经后骨质疏松症的作用机制[J]. 湖北中医药大学学报, 2022, 24(5): 48-53.
- ZHANG Y, ZHANG F X, ZHANG H, et al. The mechanism of action of the Bushen Huatan formula in preventing postmenopausal osteoporosis was explored based on multi-omics technology [J]. J Hubei Univ Chin Med, 2022, 24(5): 48-53.
- [ 13 ] LIU C, FENG N, WWANG Z, et al. Foxk1 promotes bone formation through inducing aerobic glycolysis [J]. Cell Death Differ, 2024, 31(12): 1650-1663.
- [ 14 ] 刘小峰, 刘亚兰, 储旭东, 等. 线粒体相关功能障碍在骨代谢研究中的作用机制进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2025, 31(8): 1212-1217.
- LIU X F, LIU Y L, CHU X D, et al. Progress on the mechanism of mitochondrial-related dysfunction in bone metabolism research [J]. Chin J Osteoporos, 2025, 31(8): 1212-1217.
- [ 15 ] CHENG S C, QUINTIN J, CRAMER R A, et al. mTOR- and HIF-1 $\alpha$ -mediated aerobic glycolysis as metabolic basis for trained immunity [J]. Science, 2014, 345(6204): 1250684.
- [ 16 ] 鲁志林, 陈继东, 周广文, 等. 名中医向楠补肾化痰方治疗绝经后骨质疏松症经验[J]. 陕西中医, 2024, 45(5): 687-690.
- LU Z L, CHEN J D, ZHOU G W, et al. Experience of famous traditional Chinese medicine doctor XIANG Nan in treating postmenopausal osteoporosis with Bushen Huatan decoction

- [J]. Shaanxi J Tradit Chin Med, 2024, 45(5): 687-690.
- [17] 潘梅钦, 怀月琴. 评《骨质疏松症预防与治疗》——雌激素联合抗骨质疏松药物治疗绝经后妇女骨质疏松的疗效[J]. 中国实验方剂学杂志, 2025, 31(21): 89.
- PAN M Q, HUAI Y Q. Review of "prevention and treatment of osteoporosis" - the efficacy of estrogen combined with anti-osteoporosis drugs in treating osteoporosis in postmenopausal women[J]. Chin J Exp Tradit Med Form, 2025, 31(21): 89.
- [18] LI P X, FU Z Y, LI B, et al. A new flavanone and other constituents from the rhizomes of *Polygonum amplexicaule* var. *sinense* and their effect on osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. Rsc Adv, 2025, 15(47): 40021-40029.
- [19] XU H J, LIU X Z, YANG L, et al. Runx2 overexpression promotes bone repair of osteonecrosis of the femoral head (ONFH)[J]. Mol Biol Rep, 2023, 50(6): 4769-4779.
- [20] NAKAMURA E, HATA K, TAKAHATA Y, et al. Zfhx4 regulates endochondral ossification as the transcriptional platform of osterix in mice[J]. Commun Biol, 2021, 4(1): 1258-1263.
- [21] LIU Q, LI M, WANG S, et al. Recent advances of osterix transcription factor in osteoblast differentiation and bone formation[J]. Front Cell Dev Biol, 2020, 15(8): 1224-1229.
- [22] 《中国骨质疏松杂志》骨代谢专家组. 骨代谢生化指标临床应用专家共识(2023修订版)[J]. 中国骨质疏松杂志, 2023, 29(4): 469-476.
- Bone Metabolism Expert Group of Chinese Journal of Osteoporosis. Expert consensus on the clinical application of biochemical indicators of bone metabolism (revised edition 2023)[J]. Chin J Osteoporos, 2023, 29(4): 469-476.
- [23] SAUTCHUK R J, ELISEEV R A. Cell energy metabolism and bone formation[J]. Bone Rep, 2022, 16: 101594.
- [24] KARTHIK V, GUNTUR A R. Energy metabolism of osteocytes[J]. Curr Osteoporos Rep, 2021, 19(4): 444-451.
- [25] JIN Z, KHO J, DAWSON B, et al. Nitric oxide modulates bone anabolism through regulation of osteoblast glycolysis and differentiation[J]. J Clin Invest, 2021, 131(5): e138935.
- [26] DIRCKS N, TOWER R J, MERCKEN E M, et al. Vhl deletion in osteoblasts boosts cellular glycolysis and improves global glucose metabolism [J]. J Clin Invest, 2018, 128(3): 1087-1105.
- [27] SU P, YU L, Mao X, et al. Role of HIF-1 $\alpha$ /ERR $\alpha$  in enhancing cancer cell metabolism and promoting resistance of endometrial cancer cells to pyroptosis[J]. Front Oncol, 2022, 21(12): 881252.
- [28] ZOU C, YU S, XU Z, et al. ERR $\alpha$  augments HIF-1 signalling by directly interacting with HIF-1 $\alpha$  in normoxic and hypoxic prostate cancer cells[J]. J Pathol, 2014, 233(1): 61-73.
- [29] PEI X, LU L, HUANG Z, et al. Activation of M1 macrophages promotes diabetic kidney disease by modulating glycolysis via HIF-1 $\alpha$ -HK2 signaling pathway [J]. Diabetol Metab Syndr, 2025, 17(1): 362-362.
- [30] 陈亚妮, 蔡温晋, 王莹. STING 通过 Hk2-Vdac1 线粒体轴介导年龄相关性骨质疏松症[C]//中华口腔医学会口腔生物医学专业委员会, 中华口腔医学会口腔病理学专业委员会. 中华口腔医学会口腔生物医学专业委员会第14次口腔生物医学学术年会中华口腔医学会口腔病理学专业委员会第18次口腔病理学学术年会论文集. 浙江大学医学院附属口腔医院, 2024: 240.
- CHEN Y N, CAI W J, WANG Y. STING mediates age-related osteoporosis through the Hk2-Vdac1 mitochondrial axis [C]// Chinese Stomatological Association Oral Biomedical Professional Committee, Chinese Stomatological Association Oral Pathology Professional Committee. Proceedings of the 14th Academic Annual Conference on Oral Biomedical Sciences of the Oral Biomedical Professional Committee of the Chinese Stomatological Association and the 18th Academic Annual Conference on Oral Pathology of the Oral Pathology Professional Committee of the Chinese Stomatological Association. Affiliated Stomatological Hospital, School of Medicine, Zhejiang University, 2024: 240.
- [31] 尹煜辉, 李琰, 齐保玉, 等. 基于有氧糖酵解探究补骨生髓方含药血清通过介导 HIF-1 $\alpha$  促进 MC3T3-E1 细胞成骨分化的作用[J]. 湖南中医药大学学报, 2025, 45(5): 818-824.
- YIN Y H, LI Y, QI B Y, et al. Based on aerobic glycolysis, the role of drug-containing serum in the bone-supplementing and sum-growing formula in promoting osteogenic differentiation of MC3T3-E1 cells through mediating HIF-1 $\alpha$  was explored [J]. J Hunan Univ Chin Med, 2020, 45(5): 818-824.
- [32] 张雨, 杨力, 王春莉. 天麻素靶向 PKM2 抑制糖酵解依赖的组蛋白乳酸化减轻主动脉瓣钙化[J]. 医用生物力学, 2025, 40(S1): 101.
- ZHANG Y, YANG L, WANG C L. Gastrodin targets PKM2 to inhibit glycolysis-dependent histone lactation and alleviate aortic valve calcification [J]. Med Biomech, 2020, 40(S1): 101.

[责任编辑 周冰冰]