

## 基于 PPAR $\gamma$ /ERR $\alpha$ /PGC-1 $\beta$ 信号通路探究哈巴苷抑制动脉粥样硬化小鼠骨吸收的作用机制

梁瑞琼<sup>1</sup>, 徐天舒<sup>1</sup>, 郭昊辰<sup>1</sup>, 岳改月<sup>1</sup>, 戴璇<sup>1</sup>, 王丽丽<sup>2</sup>, 郭淑贞<sup>1</sup>, 张东伟<sup>1\*</sup>

1. 北京中医药大学中医院, 北京 102488

2. 北京中医药大学中药学院, 北京 102488

**摘要:** 目的 探索哈巴苷对高脂饲料诱导的动脉粥样硬化 (atherosclerosis, AS) 小鼠脂代谢和骨代谢的影响及其可能的作用机制。方法 高脂饲料喂养载脂蛋白 E 敲除 (apolipoprotein E knock-out, ApoE $^{-/-}$ ) 小鼠 8 周构建 AS 模型, 随机分为模型组、阿托伐他汀 (2.6 mg/kg) 组和哈巴苷 (20 mg/kg) 组, 每组 8 只。另取 8 只 C57BL/6N 野生型小鼠作为对照组, 给予普通饲料喂养。药物干预 9 周后, 利用 micro-CT 检测小鼠骨微结构的变化; 利用红外光谱检测骨材料构成; 利用苏木素-伊红 (hematoxylin-eosin, HE) 染色观察小鼠股骨骨小梁的形态, 抗酒石酸酸性磷酸酶 (tartrate resistant acid phosphatase, TRAP) 染色观察小鼠股骨破骨细胞的数量; 利用生化法检测小鼠血清总胆固醇 (total cholesterol, TC)、高密度脂蛋白胆固醇 (high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)、低密度脂蛋白胆固醇 (low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)、TRAP、1 型胶原交联 C 端末端肽 (C-terminal telopeptide of type I collagen, CTX-1) 水平; 利用 Western blotting 检测骨组织活化 T 细胞核因子 c1 (nuclear factor-activated T cell 1, NFATc1)、原癌基因 Fos (fos proto-oncogene, c-Fos)、组织蛋白酶 K (cathepsin K)、过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  共激活因子-1 $\beta$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\beta$ , PGC-1 $\beta$ )、雌激素相关受体  $\alpha$  (estrogen-related receptor  $\alpha$ , ERR $\alpha$ ) 和过氧化物酶体增殖物激活受体  $\gamma$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ ) 的蛋白表达。结果 哈巴苷显著改善 AS 小鼠骨微结构和骨材料构成 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 降低血清中脂代谢 TC、LDL-C 和 HDL-C 水平以及 AS 指数 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ ), 降低血清中骨吸收特异性指标 CTX-1 和 TRAP 的水平 ( $P < 0.01$ ), 降低骨组织中骨吸收相关蛋白 c-Fos、NFATc1 和 cathepsin K 的表达水平 ( $P < 0.01$ )。此外, 哈巴苷能抑制 AS 小鼠骨组织中 PGC-1 $\beta$ 、ERR $\alpha$  和 PPAR $\gamma$  蛋白的表达 ( $P < 0.05$ 、 $0.01$ )。结论 哈巴苷可以改善 AS 小鼠的血脂代谢, 抑制骨吸收, 从而发挥改善骨质量作用。其作用机制可能与抑制 PPAR $\gamma$ /ERR $\alpha$ /PGC-1 $\beta$  信号通路有关。

**关键词:** 哈巴苷; 动脉粥样硬化; 骨质疏松症; 骨代谢; 脂代谢; PPAR $\gamma$ /ERR $\alpha$ /PGC-1 $\beta$  信号通路

中图分类号: R285.5 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2026)03-0981-09

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2026.03.016

## Mechanism of harpagide in regulating bone resorption in atherosclerosis mice based on PPAR $\gamma$ /ERR $\alpha$ /PGC-1 $\beta$ signaling pathway

LIANG Ruiqiong<sup>1</sup>, XU Tianshu<sup>1</sup>, GUO Haochen<sup>1</sup>, YUE Gaiyue<sup>1</sup>, DAI Xuan<sup>1</sup>, WANG Lili<sup>2</sup>, GUO Shuzhen<sup>1</sup>, ZHANG Dongwei<sup>1</sup>

1. School of Traditional Chinese Medicine, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

2. School of Chinese Materia Medica, Beijing University of Chinese Medicine, Beijing 102488, China

**Abstract: Objective** To explore the effect and potential mechanism of harpagide on lipid metabolism and bone metabolism in atherosclerosis (AS) mice fed a high-fat diet. **Methods** AS model was constructed by feeding apolipoprotein E knock-out (ApoE $^{-/-}$ ) mice with high-fat diet for eight weeks, mice were randomly divided into model group, atorvastatin (2.6 mg/kg) group, and harpagide (20 mg/kg) group, with eight mice in each group. Additionally, eight C57BL/6N wild-type mice were included as control group and fed a standard diet. After nine weeks of drug intervention, micro-CT was used to analyze changes in bone microarchitecture. Infrared spectroscopy was employed to examine bone material composition. Hematoxylin-eosin (HE) staining was applied to observe the

收稿日期: 2025-09-04

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (82261138556); 2024 年国家中医药管理局中医药国际合作专项 (XDZYJZC-002)

作者简介: 梁瑞琼 (2000—), 女, 硕士研究生, 研究方向为中西医结合药理学。E-mail: 119800306030@163.com

\*通信作者: 张东伟 (1974—), 男, 研究员, 博士生导师, 研究方向为中药防治内分泌代谢性疾病。E-mail: zhangdw@bucm.edu.cn

morphology of femoral trabeculae, and tartrate resistant acid phosphatase (TRAP) staining was used to quantify osteoclast numbers in the femur. Levels of total cholesterol (TC), high-density lipoprotein cholesterol (HDL-C), low-density lipoprotein cholesterol (LDL-C), TRAP and C-terminal telopeptide of type I collagen (CTX-1) in serum were measured using biochemical assays. Western blotting was performed to detect protein expression levels of nuclear factor of activated T cells 1 (NFATc1), Fos proto-oncogene (c-Fos), cathepsin K, peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator-1 $\beta$  (PGC-1 $\beta$ ), estrogen-related receptor  $\alpha$  (ERR $\alpha$ ) and peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  (PPAR $\gamma$ ) in bone tissue. **Results** Harpagide significantly improved bone microarchitecture and bone material composition in AS mice ( $P < 0.05, 0.01$ ), reduced levels of TC, LDL-C, HDL-C in serum and AS index ( $P < 0.05, 0.01$ ), decreased levels of bone resorption markers CTX-1 and TRAP in serum ( $P < 0.01$ ), down-regulated the expressions of bone resorption-related proteins c-Fos, NFATc1 and cathepsin K in bone tissue ( $P < 0.01$ ). Additionally, harpagide suppressed the protein expression levels of PGC-1 $\beta$ , ERR $\alpha$  and PPAR $\gamma$  in bone tissue of AS mice ( $P < 0.05, 0.01$ ). **Conclusion** Harpagide ameliorates dyslipidemia and suppresses bone resorption in AS mice, thereby exerting anti-osteoporotic effects. The mechanism may involve the inhibition of PPAR $\gamma$ /ERR $\alpha$ /PGC-1 $\beta$  signaling pathway.

**Key words:** harpagide; atherosclerosis; osteoporosis; bone metabolism; lipid metabolism; PPAR $\gamma$ /ERR $\alpha$ /PGC-1 $\beta$  signaling pathway

骨质疏松症(osteoporosis, OP)是一种全身性骨代谢疾病,其特征主要表现为骨量减少和骨微结构退化,进而导致骨脆性增加和骨折风险升高<sup>[1]</sup>。OP的发病率呈逐年增高趋势,目前全球OP患者约2亿人,预计到2050年每年的骨质疏松性骨折患者将达到599万<sup>[2]</sup>。该病的主要病理机制在于骨吸收与骨形成失衡。因此,维持骨稳态是预防和治疗OP的关键原则<sup>[3]</sup>。目前临床用于治疗OP的药物主要包括双膦酸盐、降钙素、维生素D、雌激素和甲状腺旁腺激素等。然而,长期使用上述药物可能伴随多种不良反应。如双膦酸盐可能导致胃肠道不耐受<sup>[3]</sup>,雌激素治疗可能增加血栓形成<sup>[4]</sup>和乳腺癌风险<sup>[5]</sup>。因此,临床亟需更优化的治疗方案。

动脉粥样硬化(atherosclerosis, AS)是心脑血管疾病的病理基础,其特征是动脉腔硬化和狭窄以及斑块的形成<sup>[6]</sup>。近年来,AS的发病率持续上升,已成为心血管相关疾病死亡的主要诱因<sup>[7]</sup>。研究表明,全球每年约有2000万人死于AS相关并发症,且患病群体呈现年轻化趋势,这对人类健康造成严重威胁。因此,AS的防治已成为医学研究的重点和难点<sup>[8-9]</sup>。近年来研究发现,AS与OP之间存在密切的联系。临床观察及流行病学数据显示,与骨量正常人群相比,低骨量及OP患者并发心血管疾病的风险显著升高,尤其是冠状动脉疾病和脑卒中的发生率明显上升<sup>[10]</sup>。这一现象提示OP与AS之间可能存在潜在的病理生理关联。研究也发现,血脂异常是OP与AS的共同危险因素<sup>[11]</sup>。脂代谢紊乱可通过干扰成骨细胞介导的骨形成与破骨细胞介导的骨吸收之间的平衡,破坏骨代谢稳态,进而引起骨密度下降与骨微结构损伤,最终促进骨质疏松

的发生与发展<sup>[12-13]</sup>。同时,脂质代谢紊乱也参与AS及脑血管疾病的发病过程,它促使脂质在动脉壁内异常积聚,是动脉斑块形成的核心始动环节<sup>[14]</sup>。因此,调节血脂、改善脂质沉积被视为防治OP合并AS的重要策略之一。值得关注的是,部分心血管药物对骨骼代谢亦表现出积极作用。如他汀类药物除具有调血脂作用外,还能促进骨形成。然而,目前在临床实践中,能够明确增加骨密度并降低骨质疏松性骨折风险的心血管药物仍主要局限于他汀类,其他类型药物尚缺乏足够的证据支持<sup>[15]</sup>。因此,进一步研发既能改善脂代谢又能抑制骨质疏松的药物,是提高老龄化社会健康水平的关键问题之一。

过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ , PPAR $\gamma$ )是一种配体激活的核转录因子,最初被证实是调控脂肪细胞分化的关键因子,后续研究发现其在葡萄糖稳态和脂质代谢等过程中也发挥重要调控作用<sup>[16]</sup>。研究表明,PPAR $\gamma$ 可直接调控原癌基因Fos(fos proto-oncogene, *c-Fos*)基因的表达,其配体激活后可显著促进破骨细胞分化和骨吸收功能。核受体家族成员雌激素相关受体 $\alpha$ (estrogen-related receptor  $\alpha$ , ERR $\alpha$ )作为PPAR $\gamma$ 的下游靶基因,与PPAR $\gamma$ 共同参与代谢调控。过氧化物酶体增殖物激活受体 $\gamma$ 共激活因子-1 $\beta$ (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$  coactivator-1 $\beta$ , PGC-1 $\beta$ )作为PPAR $\gamma$ 和ERR $\alpha$ 的共同转录激活因子,不仅能增强线粒体生物合成,还能显著提高破骨细胞活性。这提示PPAR $\gamma$ 、ERR $\alpha$ 和PGC-1 $\beta$ 通过形成复杂的转录调控网络,协同调节机体脂质代谢平衡和骨稳态<sup>[16]</sup>。

玄参 *Scrophulariae Radix* 为我国传统常用中药

材, 为玄参科植物玄参 *Scrophularia ningpoensis* Hemsl.的干燥根, 是著名中药材“浙八味”之一, 在浙江、四川、湖北等地广有栽培, 具有清热凉血等功效<sup>[17]</sup>。哈巴苷是玄参主要的环烯醚萜苷类成分之一, 具有重要的生物活性。研究表明, 哈巴苷具有神经保护、提高耐缺氧能力、保护血管内皮细胞和抑制血小板凝聚等作用<sup>[18-19]</sup>。哈巴苷通过下调骨髓细胞中抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)和c-Fos蛋白表达而抑制核因子- $\kappa$ B受体活化因子配体(receptor activator of nuclear factor- $\kappa$ B ligand, RANKL)诱导的破骨细胞分化<sup>[20]</sup>。然而, 哈巴苷对AS诱发的血脂代谢紊乱和骨吸收异常的作用以及其潜在的作用机制目前尚未见报道。因此, 本研究选用高脂饮食诱导的AS模型小鼠, 探讨哈巴苷对其血脂代谢和骨代谢的影响及其潜在的作用机制, 以期为哈巴苷在AS合并OP的临床应用提供理论依据。

## 1 材料

### 1.1 动物

SPF级雄性载脂蛋白E敲除(apolipoprotein E knock-out, ApoE<sup>-/-</sup>)小鼠(具有C57BL/6N遗传背景)24只, 雄性C57BL/6N小鼠8只, 7周龄, 体质量22~27 g, 购自江苏赛业生物公司, 生产许可证号SCXK(苏)2022-0016。小鼠饲养于北京中医药大学动物实验中心SPF级实验动物屏障环境, 室温(22±2)℃, 相对湿度40%~60%, 12 h/12 h光照循环, 自由进食饮水。动物实验经北京中医药大学动物实验伦理委员会批准(批准号BUCM-2023-052202-2094)。

### 1.2 药品与试剂

哈巴苷(批号A0335, 质量分数≥98%)购自成都曼斯特生物科技有限公司; 阿托伐他汀钙片(国药准字H20051407, 批号8249355)购自辉瑞制药有限公司; 小鼠高脂饲料(批号D12108C)购自美国Research Diet公司, 主要由40 kcal(1 kcal=4.182 kJ)脂肪和1.25%胆固醇组成; 羧甲基纤维素钠(批号C835846)购自上海麦克林生化科技股份有限公司; 总胆固醇(total cholesterol, TC)试剂盒(批号A111-1-1)、高密度脂蛋白胆固醇(high density lipoprotein cholesterol, HDL-C)试剂盒(批号A112-1-1)、低密度脂蛋白胆固醇(low density lipoprotein cholesterol, LDL-C)试剂盒(批号A113-1-1)购自南京建成生物工程研究所; TRAP试剂盒(批号MB-3144A)、1型胶原交联C端末端肽(C-terminal telopeptide of type I collagen, CTX-1)试剂盒(批号MB-6334A)试剂盒购自江苏酶标生物科技有限公司; PPAR $\gamma$ 抗体(批号00091738)、HRP标记的山羊抗兔IgG抗体(批号20000311)、HRP标记的山羊抗小鼠IgG抗体(批号20000261)、组织蛋白酶K(cathepsin K)抗体(批号ab19027)、 $\alpha$ -Tubulin抗体(批号66031-1-1g)购自美国Proteintech公司;  $\beta$ -actin抗体(批号AC240908001)购自武汉塞维尔生物科技有限公司; 活化T细胞核因子c1(nuclear factor-activated T cell 1, NFATc1)抗体(批号PA5-79730)购自美国Thermo Fisher Scientific公司; c-Fos抗体(批号66590-1-Ig)购自武汉三鹰生物科技有限公司; PGC-1 $\beta$ 抗体(批号F165201)、ERR $\alpha$ 抗体(批号F119001)购自美国Selleck公司。

3144A)、1型胶原交联C端末端肽(C-terminal telopeptide of type I collagen, CTX-1)试剂盒(批号MB-6334A)试剂盒购自江苏酶标生物科技有限公司; PPAR $\gamma$ 抗体(批号00091738)、HRP标记的山羊抗兔IgG抗体(批号20000311)、HRP标记的山羊抗小鼠IgG抗体(批号20000261)、组织蛋白酶K(cathepsin K)抗体(批号ab19027)、 $\alpha$ -Tubulin抗体(批号66031-1-1g)购自美国Proteintech公司;  $\beta$ -actin抗体(批号AC240908001)购自武汉塞维尔生物科技有限公司; 活化T细胞核因子c1(nuclear factor-activated T cell 1, NFATc1)抗体(批号PA5-79730)购自美国Thermo Fisher Scientific公司; c-Fos抗体(批号66590-1-Ig)购自武汉三鹰生物科技有限公司; PGC-1 $\beta$ 抗体(批号F165201)、ERR $\alpha$ 抗体(批号F119001)购自美国Selleck公司。

### 1.3 仪器

Centrifuge 5424 R型离心机(德国Eppendorf公司); A51119500C型Multiskan SkyHigh全波长酶标仪(美国Thermo Fisher Scientific公司); DYY-300型电泳、电转系统(美国Bio-Rad公司); Tanon 5200型凝胶成像仪(上海天能科技有限公司); Quantum GX2型小动物活体micro-CT影像系统(美国PerkinElmer公司); INVENIO RATR傅里叶变换红外光谱仪(德国Bruker公司)。

## 2 方法

### 2.1 动物分组、造模与给药

参考徐天舒等<sup>[21]</sup>的方法构建AS小鼠模型, 简述如下: ApoE<sup>-/-</sup>小鼠给予高脂饲料喂养8周后, 随机分成模型组、阿托伐他汀(2.6 mg/kg)<sup>[22]</sup>组和哈巴苷(20 mg/kg)<sup>[23]</sup>组, 每组8只。另取8只C57BL/6N野生型小鼠作为对照组, 全程给予普通饲料喂养。给药组ig以0.5%羧甲基纤维素钠溶液配制的相应药物(10 mL/kg), 对照组和模型组ig等体积的0.5%羧甲基纤维素钠溶液, 1次/d, 连续给药9周。给药过程中每周称量1次小鼠体质量。

### 2.2 取材

实验结束时, 小鼠禁食不禁水12 h后, ip 1%戊巴比妥钠麻醉, 进行腹主动脉取血, 血液静置后, 4℃、3 500 r/min离心15 min, 取上清, 保存于-80℃冰箱中备用。取两侧股骨和胫骨, 剔除肌肉组织, 将一侧股骨保存于70%乙醇中, 另一侧股骨固定于4%多聚甲醛溶液72 h后, 用10%乙二胺四乙酸二钠溶液(disodium edetate, EDTA)脱钙1.5

个月，每周更换1次。

### 2.3 股骨微结构分析

取小鼠股骨，将其放置于micro-CT仪器的成像床上。micro-CT的相关参数设置如下：电压90 kV，电流88 μA，成像视野36 mm×36 mm，14 min的高分辨率扫描模式，使用Analyze 2.0软件分析成像。将股骨生长板下0.1 mm的区域设置为分析区域，得到骨微结构参数：骨密度(bone mineral density, BMD)、骨表面积组织体积比(bone surface/tissue volume, BS/TV)、骨小梁厚度(trabecular thickness, Tb.Th)、皮质骨总面积(total cortical bone area, Tt.Ar)、骨体积分数(bone volume/tissue volume, BV/TV)、骨小梁数目(trabecular number, Tb.N)、皮质骨厚度(cortical bone thickness, Ct.Th)和各向异性程度(degree of anisotropy, DA)。

### 2.4 傅里叶变换红外光谱分析股骨材料特性

将股骨骨髓冲洗干净后，在研钵中加入液氮将其研磨呈细粉状，放入烘箱烘干。再将制备好的股骨样本放置在傅氏转换红外线光谱仪中，进行扫描分析。设置空间光谱分辨率为6.25 μm，扫描范围为4 000~400 cm<sup>-1</sup>。利用origin软件解谱分析，得到以下参数：(1)矿化程度(矿物质与基质峰面积比)：磷酸盐峰(波长900~1 200 cm<sup>-1</sup>)和酰胺I峰(波长1 592~1 712 cm<sup>-1</sup>)的面积比；(2)胶原蛋白交联比：波长1 660 cm<sup>-1</sup>和1 690 cm<sup>-1</sup>的强度比；(3)碳酸盐与磷酸盐比值：碳酸盐峰(波长850~890 cm<sup>-1</sup>)和磷酸盐峰(波长900~1 200 cm<sup>-1</sup>)的面积比。

### 2.5 股骨苏木素-伊红(hematoxylin-eosin, HE)染色

参考戴璇等<sup>[24]</sup>的方法，将脱钙后的股骨制成石蜡切片，置于60 °C烤箱中2 h，然后依次经二甲苯脱蜡、梯度乙醇复水，随后经苏木素染色3 min，再放入1%盐酸乙醇中进行分色，用伊红染色3 min，然后脱水透明、封片，于显微镜下观察股骨的病理变化并拍照记录。

### 2.6 股骨TRAP染色

取骨组织石蜡切片，进行脱蜡和复水处理。然后滴加配制好的TRAP工作液覆盖组织，将其置于37 °C烘箱中避光孵育30 min。弃去孵育液，水洗，再将样品进行脱水和透明处理。最后，使用中性树胶封片，于显微镜下观察并拍照。

### 2.7 血清生化指标测定

按照试剂盒说明书检测血清中TRAP、CTX-1、TC、HDL-C和LDL-C水平，并计算AS指数。

$$\text{AS指数} = (\text{TC水平} - \text{HDL-C水平}) / \text{HDL-C水平}$$

### 2.8 Western blotting检测胫骨组织NFATc1、c-Fos、cathepsin K、PGC-1β、ERRα、PPARγ蛋白表达

称取100 mg胫骨组织，加入裂解液提取蛋白，BCA法测定蛋白浓度。分别取50 μg样品与上样缓冲液混合均匀，100 °C加热8 min使蛋白变性。蛋白样品经10%十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳，转移到PVDF膜，再置于5%脱脂牛奶中室温封闭1 h，分别加入NFATc1(1:1 000)、c-Fos(1:5 000)、cathepsin K(1:500)、PGC-1β(1:1 000)、ERRα(1:1 000)、PPARγ(1:1 000)、α-Tubulin(1:1 000)和β-actin(1:20 000)抗体，4 °C孵育过夜；次日，用TBST洗膜后，分别加入相应的二抗，室温孵育1 h，使用ECL发光液显色，采用凝胶成像仪拍照，利用Image J软件对条带进行半定量分析。

### 2.9 统计学分析

利用GraphPad prism 10软件对数据进行分析，结果以 $\bar{x} \pm s$ 表示。方差齐则采用单因素方差分析，方差不齐时采用Welch's t检验。

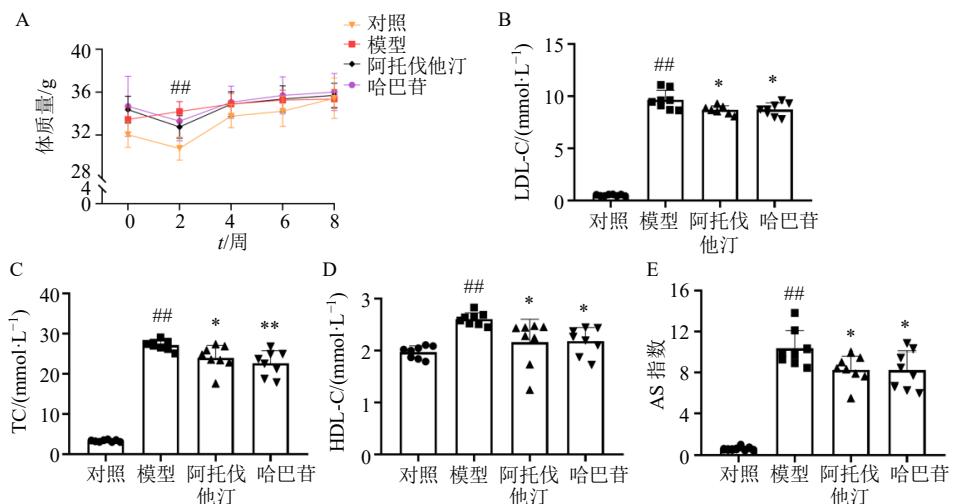
## 3 结果

### 3.1 哈巴苷改善AS小鼠的血脂代谢

如图1-A所示，与对照组比较，给药第2周时模型组小鼠的体质量显著升高( $P<0.01$ )；与模型组比较，各给药组小鼠的体质量无明显变化。如图1-B~E所示，与对照组比较，模型组小鼠血清中LDL-C、TC、HDL-C水平和AS指数显著升高( $P<0.01$ )；与模型组比较，各给药组小鼠血清中LDL-C、TC、HDL-C水平和AS指数均显著降低( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。这表明哈巴苷能改善AS小鼠的血脂代谢。

### 3.2 哈巴苷改善AS小鼠的骨微结构

如图2-A~I所示，与对照组比较，模型组小鼠表现出显著的骨微结构损伤和BMD下降，表现为骨小梁结构稀疏、变细、间距加宽、数目减少，其BMD、BS/TV、Tb.Th、Ct.Ar、BV/TV、Tb.N、Ct.Th均显著降低( $P<0.01$ )，DA显著升高( $P<0.05$ )。与模型组比较，各给药组小鼠的骨小梁丢失程度有所改善，其BMD、BS/TV、Tb.Th、Ct.Ar、BV/TV、

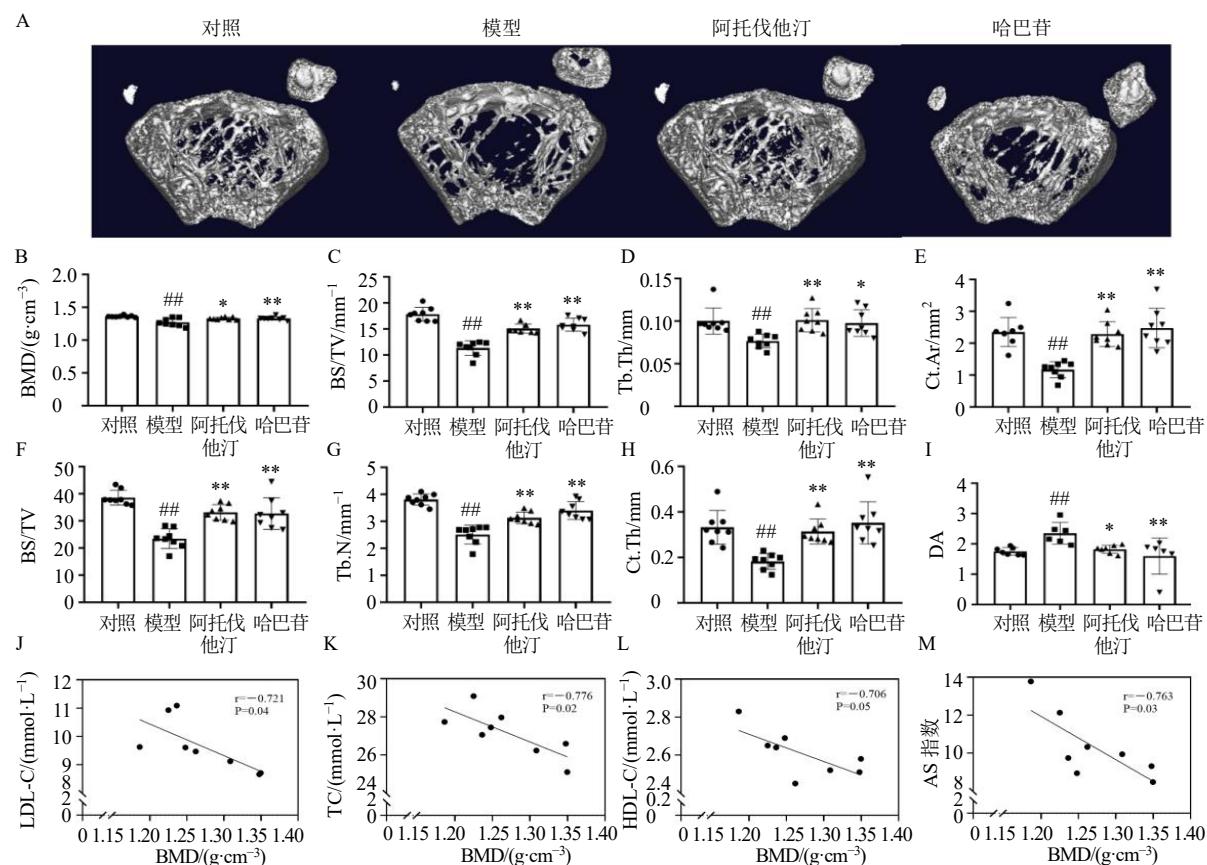


A-各组小鼠体质量; B-D-各组小鼠血清中 LDL-C、TC、HDL-C 水平; E-各组小鼠 AS 指数; 与对照组比较:  $^{\#}P < 0.05$   $^{\#\#}P < 0.01$ ; 与模型组比较:  $^{*}P < 0.05$   $^{**}P < 0.01$ , 下同。

A-body weight of mice in each group; B—D—levels of LDL-C, TC and HDL-C in serum of mice in each group; E-AS index of mice in each group;  $^{\#}P < 0.05$   $^{\#\#}P < 0.01$  vs control group;  $^{*}P < 0.05$   $^{**}P < 0.01$  vs model group, same as below figures.

图 1 哈巴昔改善 AS 小鼠的血脂代谢 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Fig. 1 Harpagide improves lipid metabolism in AS mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )



A-小鼠股骨 micro-CT 的 3D 重建代表图; B~I-小鼠的骨微结构参数; J~M-脂代谢各指标与 BMD 的相关图。

A—representative 3D reconstruction image of femur micro CT in mice; B—I—bone microstructure parameters of mice; J—M—correlation chart between lipid metabolism indicators and BMD.

图 2 哈巴昔对 AS 小鼠骨微结构的影响及脂代谢各指标与 BMD 的相关性分析 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Fig. 2 Effect of harpagide on bone microstructure in AS mice and correlation between lipid metabolism indices and BMD ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n = 8$ )

Tb.N、Ct/Th 均显著升高 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )，DA 显著降低 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。这表明哈巴苷可以抑制 AS 小鼠骨微结构的破坏，从而改善骨质量。

为了进一步探索 AS 与 OP 的关系，将模型组小鼠的脂代谢相关指标、AS 指数与 BMD 进行 Pearson 相关分析，结果如图 2-J~M 所示，LDL-C、TC、HDL-C、AS 指数与 BMD 呈负相关 ( $P<0.05$ )，这提示脂代谢紊乱能促进 AS 与 OP 的发生和发展。

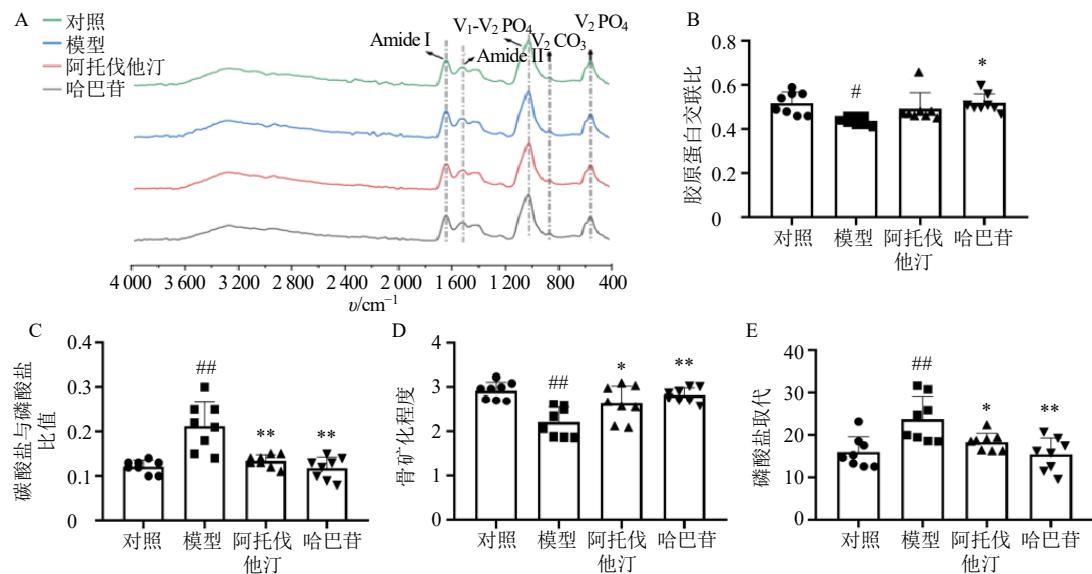
### 3.3 哈巴苷改善 AS 小鼠的骨材料特性

如图 3 所示，与对照组比较，模型组小鼠胶原蛋白交联比和骨矿化程度显著降低 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )，

0.01)，碳酸盐与磷酸盐比值以及磷酸盐取代显著升高 ( $P<0.01$ )。与模型组比较，哈巴苷组小鼠胶原蛋白交联比和骨矿化程度显著升高 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )，碳酸盐与磷酸盐比值以及磷酸盐取代显著降低 ( $P<0.01$ )；阿托伐他汀组小鼠骨矿化程度显著升高 ( $P<0.05$ )，碳酸盐与磷酸盐比值以及磷酸盐取代显著降低 ( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。这表明哈巴苷可以改善 AS 小鼠的骨材料特性。

### 3.4 哈巴苷改善 AS 小鼠骨病理学形态

各组小鼠股骨 HE 染色结果 (图 4-A) 所示，与对照组比较，模型组小鼠的骨小梁稀疏、不连续；

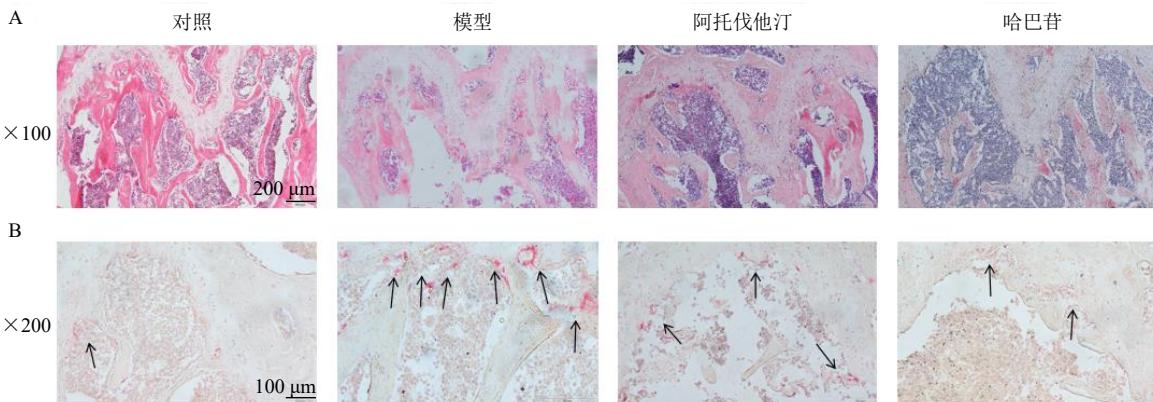


A-红外光谱图；B-胶原蛋白交联比；C-碳酸盐与磷酸盐比值；D-矿化程度；E-磷酸盐取代。

A-infrared spectrum; B-collagen cross-link ratio; C-carbonate/phosphate; D-mineralization degree; E-phosphate substitution.

图 3 哈巴苷改善 AS 小鼠的骨材料构成 ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Fig. 3 Harpagide improves bone material composition in AS mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )



A-小鼠股骨干骺端 HE 染色图 ( $\times 100$ )；B-小鼠股骨干骺端 TRAP 染色图 ( $\times 200$ )，箭头表示破骨细胞 (紫红色)。

A-HE staining image of femoral epiphysis in mice ( $\times 100$ )；B-TRAP staining image of femoral epiphysis in mice ( $\times 200$ )，arrow indicates osteoclasts (purple-red).

图 4 哈巴苷改善 AS 小鼠的股骨病理学形态

Fig. 4 Harpagide improves pathological morphology of femur in AS mice

与模型组比较,给药组小鼠的骨小梁的形态有一定的改善。各组小鼠股骨TRAP染色结果(图4-B)显示,与对照组比较,模型组小鼠骨组织破骨细胞阳性紫红色区域明显增多;给予哈巴昔和阿托伐他汀干预后,可在一定程度上抑制这一改变。这表明哈巴昔可以改善AS小鼠骨组织病理形态学,减少破骨细胞的数量,抑制骨吸收。

### 3.5 哈巴昔降低AS小鼠血清中骨吸收水平

血清中TRAP和CTX-1的水平是反映小鼠骨吸收状态的特异性指标。如图5所示,与对照组比较,模型组小鼠血清中TRAP和CTX-1的水平显著升高( $P<0.05$ 、 $0.01$ );与模型组比较,各给药组小鼠血清中TRAP和CTX-1的水平显著降低( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。这表明哈巴昔可以抑制AS小鼠的骨吸收。

### 3.6 哈巴昔抑制AS小鼠骨组织中骨吸收相关蛋白的表达

本研究主要探究哈巴昔对AS小鼠骨吸收的影响。此外,已有研究表明阿托伐他汀通过调节NFATc1信号通路抗OP<sup>[25]</sup>,因此,以下研究重点探索哈巴昔对骨代谢和脂代谢相关因子的作用。采用Western blotting检测各组小鼠骨组织中骨吸收相关

蛋白c-Fos、NFATc1和cathepsin K的表达水平,结果如图6所示,与对照组比较,模型组小鼠骨组织中骨吸收相关蛋白c-Fos、NFATc1和cathepsin K的表达水平显著升高( $P<0.05$ 、 $0.01$ );与模型组比较,哈巴昔组小鼠骨组织中骨吸收相关蛋白c-Fos、NFATc1和cathepsin K的表达水平显著降低( $P<0.01$ )。这表明哈巴昔可以下调AS小鼠骨组织中骨吸收蛋白的表达水平,进而抑制骨吸收,改善骨质量。

### 3.7 哈巴昔抑制AS小鼠骨组织中PPAR $\gamma$ /ERR $\alpha$ /PGC-1 $\beta$ 信号通路相关蛋白表达

为了进一步研究哈巴昔对AS小鼠脂代谢及骨代谢的机制,采用Western blotting检测各组小鼠骨组织中PPAR $\gamma$ /ERR $\alpha$ /PGC-1 $\beta$ 信号通路相关蛋白的表达水平,结果如图7所示,与对照组比较,模型组小鼠骨组织中PPAR $\gamma$ 、ERR $\alpha$ 和PGC-1 $\beta$ 的蛋白表达水平显著升高( $P<0.01$ );与模型组比较,哈巴昔组小鼠骨组织中PPAR $\gamma$ 、ERR $\alpha$ 和PGC-1 $\beta$ 的蛋白表达水平显著降低( $P<0.05$ 、 $0.01$ )。这表明哈巴昔可能通过抑制AS小鼠骨组织中PPAR $\gamma$ /ERR $\alpha$ /PGC-1 $\beta$ 信号通路,从而改善脂质代谢和抑制骨吸收,进而改善骨质量。

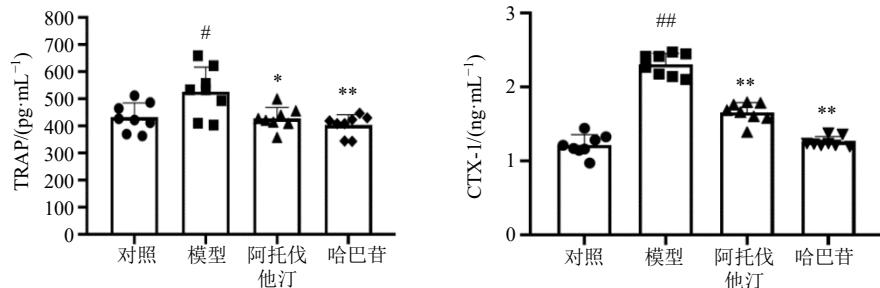


图5 哈巴昔改善AS小鼠血清中骨吸收水平( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

Fig. 5 Harpagide improves bone resorption levels in serum of AS mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=8$ )

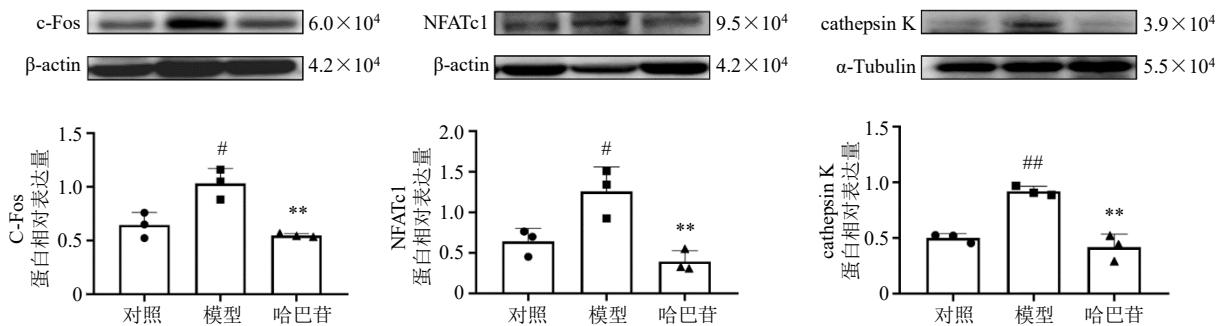


图6 哈巴昔抑制AS小鼠骨组织中c-Fos、NFATc1和cathepsin K蛋白的表达( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

Fig. 6 Harpagide inhibits expressions of c-Fos, NFATc1 and cathepsin K proteins in bone tissue of AS mice ( $\bar{x} \pm s$ ,  $n=3$ )

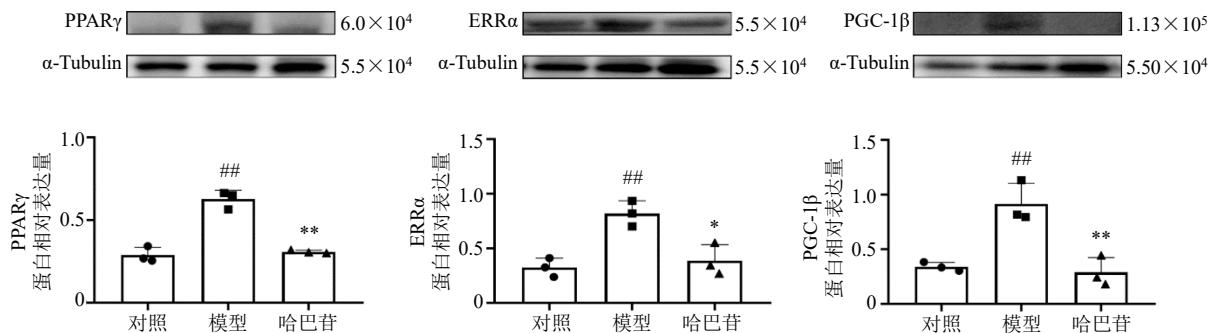


图 7 哈巴昔抑制 AS 小鼠骨组织中 PPAR $\gamma$ 、ERR $\alpha$  和 PGC-1 $\beta$  蛋白的表达 ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

Fig. 7 Harpagide inhibits expressions of PPAR $\gamma$ , ERR $\alpha$  and PGC-1 $\beta$  proteins in bone tissue of AS mice ( $\bar{x} \pm s, n = 3$ )

#### 4 讨论

OP 在中医理论中与“骨痿”“骨痹”或“骨枯”等病证相对应, 其发病原因主要归结为肾精亏虚、肝肾不足、气血两虚以及痰湿阻滞等<sup>[26]</sup>。AS 根据其临床表现可归属于“痰饮”“眩晕”及“脉痹”等范畴。其病因病机主要涉及先天禀赋不足、年老体衰、饮食不节等因素, 病理产物以热毒、痰浊、气滞、血瘀、寒凝等为主<sup>[27]</sup>。痰湿阻滞作为 AS 与 OP 的共同病理基础, 从中医理论角度揭示了两者在发病机制上的内在关联性。这一认识为“从痰论治”<sup>[28]</sup>防治 AS 相关性 OP 提供了理论依据。

ApoE 是一种具有多态性的蛋白质, ApoE 基因发生突变或缺失可引起人或动物出现脂代谢紊乱及血脂水平升高<sup>[29]</sup>。此外, ApoE 也参与骨代谢调节: 其通过与相应受体结合, 干扰维生素 K 依赖性骨钙素的羧化过程, 致使未羧化骨钙素浓度上升, 并进一步引起钙盐沉积异常与骨矿化障碍, 最终导致骨密度和骨强度下降<sup>[30]</sup>。本研究采用高脂饲料喂养雄性 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠, 建立 AS 模型。研究结果发现, 模型组小鼠的骨微结构和骨材料构成异常改变, 骨密度下降, 血清中 TC、LDL-C、HDL-C 水平和 AS 指数升高, 脂代谢与骨密度呈负相关。提示小鼠出现骨质疏松<sup>[31]</sup>和脂代谢紊乱的症状。哈巴昔干预后能够改善其骨微结构和降低血清中 TC、LDL-C 和 HDL-C 水平。以上结果表明, 哈巴昔可能具有改善 AS 小鼠骨质量并调节脂代谢的双重作用。

本研究结果显示, 哈巴昔能够降低 AS 小鼠血清中骨吸收特异性指标 CTX-1 和 TRAP 的水平, 降低骨组织中骨吸收相关蛋白 c-Fos、NFATc1 和 cathepsin K 的表达水平。其他团队研究也表明, 哈巴昔能够抑制 OVX 小鼠的骨量降低并显著改善其骨微结构。其还可以降低 OVX 小鼠血清中骨吸收

标志物 CTX-1 和 TRAP 的水平, 同时增加骨形成标志物 ALP 和 OCN 的水平<sup>[32]</sup>。哈巴昔可以通过下调 TRAP 和 c-Fos 蛋白的表达来抑制 RANKL 诱导的破骨细胞分化。NFATc1 作为调控破骨细胞分化的特异性基因<sup>[33]</sup>, 与 c-Fos (AP1 家族重要成员) 共同构成破骨细胞分化的核心调控网络<sup>[34]</sup>。这表明哈巴昔可以抑制 AS 小鼠的骨吸收, 从而发挥改善骨质量的作用。

PPAR $\gamma$  是一种配体激活的转录因子, 受 c-Fos 表达的直接调控, 在脂肪细胞分化和骨吸收方面发挥着重要作用<sup>[35]</sup>。ERR $\alpha$  也是一种转录因子, 是破骨细胞生成的特定背景下的直接 PPAR $\gamma$  靶基因, 能够促进破骨细胞的功能。作为 PPAR $\gamma$  和 ERR $\alpha$  的共激活因子, PGC-1 $\beta$  是一种重要的分子变阻器, 能够促进破骨细胞分化<sup>[16]</sup>。本研究发现, 哈巴昔能够降低 ApoE<sup>-/-</sup> 小鼠骨组织中 PPAR $\gamma$ 、ERR $\alpha$  和 PGC-1 $\beta$  蛋白的表达, 提示哈巴昔可能通过抑制 PPAR $\gamma$ /ERR $\alpha$ /PGC-1 $\beta$  信号通路, 从而发挥调节脂代谢和改善骨吸收的作用。本研究证明了哈巴昔可以调节 AS 小鼠的脂代谢和抑制骨吸收, 但并未确定其是否存在剂量相关性, 将在后续研究进一步探索。

综上, 哈巴昔可以调节高脂饲料喂养的 AS 小鼠脂代谢, 抑制其骨吸收, 其作用机制可能与抑制 PPAR $\gamma$ /ERR $\alpha$ /PGC-1 $\beta$  信号通路有关。本研究为哈巴昔防治 AS 合并 OP 的临床应用提供了一定的科学依据。

**利益冲突** 所有作者均声明不存在利益冲突

#### 参考文献

- [1] 彭玉龙, 黄晶, 郝庆飞, 等. 檬皮素防治骨质疏松症的作用机制研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2025, 40(3): 788-793.
- [2] Fan S J, Wu Y, Bloom M S, et al. Associations of per- and polyfluoroalkyl substances and their alternatives with bone

mineral density levels and osteoporosis prevalence: A community-based population study in Guangzhou, Southern China [J]. *Sci Total Environ*, 2023, 862: 160617.

[3] 黄杰, 曾浩, 王文驰, 等. 脂代谢影响骨质疏松症的文献可视化分析 [J]. 中国组织工程研究, 2026, 30(6): 1558-1568.

[4] 宋庆丽, 方天颖, 张琳. 雌激素与女性卒中血栓形成机制研究进展 [J]. 中国脑血管病杂志, 2022, 19(12): 861-866.

[5] 张彦收, 杨志芬, 郑丽华, 等. 雌激素代谢与绝经后乳腺癌的临床研究进展 [J]. 中国普通外科杂志, 2024, 33(11): 1897-1903.

[6] 张利刚. 血脂四项联合同型半胱氨酸检测在动脉粥样硬化性心血管疾病中的诊断价值分析 [C] // 爱关心生命大讲堂之生命关怀与智慧康养系列学术研讨会论文集(下)——临床心理关怀与医院人文建设的融合专题. 北京: 中国生命关怀协会, 2025: 497-499.

[7] 王莹, 邓双有, 刘燕娟, 等. 中医药调控 AMPK 信号通路防治动脉粥样硬化的研究进展 [J]. 中医学报, 2025, 40(9): 1901-1907.

[8] 张匣, 邵欣欣, 刘青芝, 等. 泽泻-白术药对及其活性成分防治动脉粥样硬化研究进展 [J]. 中草药, 2024, 55(16): 5735-5746.

[9] Song Y Q, Chen C, Li W. Ginsenoside Rb<sub>1</sub> in cardiovascular and cerebrovascular diseases: A review of therapeutic potentials and molecular mechanisms [J]. *Chin Herb Med*, 2024, 16(4): 489-504.

[10] 吕源, 龚沈初, 王林. 骨质疏松症与动脉粥样硬化相关性研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2025, 31(3): 457-462.

[11] 韩媛. 超声参数与颈动脉粥样硬化斑块形成脂代谢、易损性的关系分析 [J]. 罕少疾病杂志, 2025, 32(1): 44-46.

[12] Liu H H, Liu S B, Ji H Z, et al. An adiponectin receptor agonist promote osteogenesis via regulating bone-fat balance [J]. *Cell Prolif*, 2021, 54(6): e13035.

[13] Kang J, Zhao S L, Wu X Z, et al. The association of lipid metabolism with bone metabolism and the role of human traits: A Mendelian randomization study [J]. *Front Endocrinol*, 2023, 14: 1271942.

[14] 崔馨月, 贾连群, 杨关林, 等. 绞股蓝总苷对骨质疏松合并动脉粥样硬化小鼠的防治作用 [J]. 中华中医药学刊, 2022, 40(9): 193-196.

[15] 梅凡, 涂艳虹. 丹参注射液对骨质疏松合并动脉粥样硬化症小鼠的作用研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2021, 27(3): 348-352.

[16] Wang L, Yang M M, Jin H H. PI3K/AKT phosphorylation activates ERR $\alpha$  by upregulating PGC-1 $\alpha$  and PGC-1 $\beta$  in gallbladder cancer [J]. *Mol Med Rep*, 2021, 24(2): 613.

[17] 张哲娴, 覃章辉, 张乔会, 等. 不同种源玄参形态结构和有效成分的比较研究 [J]. 中国农学通报, 2025, 41(25): 49-53.

[18] 冷婧, 郭彦青, 杨鹏, 等. 哈巴苷对心梗后心力衰竭大鼠心肌细胞凋亡及心室重构的影响 [J]. 中药材, 2023, 46(12): 3127-3130.

[19] 刘锡禹, 高旭. 哈巴苷通过 Wnt/ $\beta$ -catenin 通路改善大鼠脑缺血再灌注损伤 [J]. 解剖科学进展, 2023, 29(4): 403-406.

[20] Chung H J, Kyung Kim W, Joo Park H, et al. Anti-osteoporotic activity of harpagide by regulation of bone formation in osteoblast cell culture and ovariectomy-induced bone loss mouse models [J]. *J Ethnopharmacol*, 2016, 179: 66-75.

[21] 徐天舒, 张芸阳, 柴王静, 等. 大蒜素调节 TLR4/ MyD88/NF- $\kappa$ B 通路改善 ApoE $^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化作用 [J]. 中草药, 2024, 55(19): 6636-6644.

[22] 张家瑞, 丁春晓, 管仲莹, 等. 藜本内酯减缓 ApoE $^{-/-}$ 小鼠动脉粥样硬化的机制研究 [J/OL]. 中国免疫学杂志, (2024-11-06) [2025-08-27]. <https://link.cnki.net/urlid/22.1126.R.20241104.1737.004>.

[23] 王成攀, 高峰, 吴敬欣, 等. 哈巴苷对病毒性心肌炎模型小鼠的影响 [J]. 中医学报, 2021, 36(4): 824-828.

[24] 戴璇, 叶紫梦玮, 刘亚鸽, 等. 马钱子与黄连素联合用药对糖尿病小鼠骨代谢的影响 [J]. 中国药理学通报, 2022, 38(2): 239-247.

[25] 王琼仁, 孔长庚, 郭祥, 等. 阿托伐他汀通过 NFATc1 信号通路促进大鼠骨质疏松性骨折愈合 [J]. 临床外科杂志, 2022, 30(6): 583-585.

[26] 韩礼军. 骨质疏松, 中医防治有良方 [J]. 家庭医药·就医选药, 2025(5): 52-53.

[27] 杨彤, 姚秋菊, 陈勇, 等. 基于“虚、痰、瘀、毒”理论探讨颈动脉粥样硬化 [J]. 亚太传统医药, 2024, 20(5): 215-218.

[28] 陈本坚, 徐丹萍, 吴焕林. 吴焕林从痰论治动脉粥样硬化经验介绍 [J]. 新中医, 2020, 52(19): 183-184.

[29] 丁振禹, 何耀华. 阿托伐他汀对 ApoE $^{-/-}$ 小鼠关节损伤的保护作用 [J]. 中国比较医学杂志, 2021, 31(1): 16-21.

[30] 马秋华, 周晓辉. 骨质疏松相关基因研究进展 [J]. 中国老年学杂志, 2014, 34(20): 5929-5931.

[31] Kanis J A. Diagnosis of osteoporosis and assessment of fracture risk [J]. *Lancet*, 2002, 359(9321): 1929-1936.

[32] Bahous A, Kalai E Y, Hadj Salah M, et al. Biochemical markers of bone remodeling: Recent data of their applications in managing postmenopausal osteoporosis [J]. *Tunis Med*, 2006, 84(11): 751-757.

[33] 杨文通, 赵继荣, 薛旭, 等. NFATc1 在绝经后骨质疏松症中的作用及中药干预进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2025, 31(5): 755-759.

[34] 侯成志, 韩佳童, 魏光成, 等. 骨疏康干预破骨细胞: 激活核因子E2相关因子2调控 c-Fos/NFATc1 通路 [J]. 中国组织工程研究, 2025, 29(2): 279-285.

[35] Qian X P, Wen T Y, Zi Y, et al. JIB-04 improves PPAR $\gamma$  expression and enhances adipogenic differentiation efficiency in human umbilical cord mesenchymal stem cells [J]. *Biochem Biophys Rep*, 2025, 43: 102142.