DOI:10.13210/j.cnki.jhmu.20240425.001
网络出版地址:https://link.cnki.net/urlid/46.1049.R.20240425.1057.002

基于网络药理学和分子对接探究壮骨止痛方治疗绝经后骨质疏松症的作用机制

陈诗淇[1],王意坚[2],陈 瑶[1],蔡昕瑶[1],姚 海[1],雷晓明[2]✉
(1.湖南中医药大学中西医结合学院,湖南 长沙 410208;2.湖南中医药大学医学院,湖南 长沙 410208)

[摘要] **目的**:探究壮骨止痛方治疗绝经后骨质疏松症的潜在作用靶点与机制。**方法**:利用STRING数据库建立基于BATMAN-TCM数据库筛选出的药物作用靶点与GeneCards、TTD和OMIM数据库中PMOP疾病靶点交集的PPI网络,并借助Cytoscape软件,将该网络可视化处理,得到"药物-活性成分-靶点-疾病"网络,同时,分子对接验证核心活性成分与关键靶点间的结合能力。实验建立绝经后骨质疏松的动物模型,采用mirco-CT和HE染色技术研究壮骨止痛方对绝经后骨质疏松症的治疗作用,并通过RT-PCR技术评估关键靶点mRNA的表达情况。**结果**:获得壮骨止痛方活性成分与疾病共同靶点69个。其中关键靶点为PPARG、PTGS2、ESR1等。药物-活性成分-靶点-疾病网络揭示核心活性成分为豆甾醇、异补骨脂素、熊果酸、齐墩果酸等。分子对接结果显示两者有较强结合能力。GO功能分析得到主要生物功能为对激素的反应等。KEGG富集主要相关通路为癌症的发病途径、雌激素信号通路等。CT扫描、HE染色可得壮骨止痛方能有效缓解绝经后骨质疏松症,RT-PCR显示壮骨止痛方组PTGS2mRNA表达显著升高,PPARG表达明显降低($P<0.05$)。**结论**:壮骨止痛方通过多成分、多靶点、多通路治疗PMOP,其成分主要为豆甾醇、异补骨脂素、熊果酸、齐墩果酸,并通过代谢途径、雌激素信号通路等作用于人体INS、AKT1、PPARG、PTGS2、ESR1发挥疗效。

[关键词] 壮骨止痛方;绝经后骨质疏松症;网络药理学;分子对接
[中图分类号] R285 [文献标志码] A [文章编号] 1007-1237(2024)16-1246-13

Exploring the mechanism of Zhuanggu Zhitong Formula in treating postmenopausal osteoporosis based on network pharmacology and molecular docking

CHEN Shiqi[1], WANG Yijian[2], CHEN Yao[1], CAI Xinyao[1], YAO hai[1], LEI Xiaoming[2]✉
(1. *College of Integrative Medicine, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha* 410208, *China*; 2. *Medical College, Hunan University of Traditional Chinese Medicine, Changsha* 410208, *China*)

[*Foundation Project*]: *This study was supported by National Natural Science Foundation of China* (81973920); *Natural Science Foundation of Hunan Province* (2021JJ30494); *Health Commission of Hunan Province* (D202303107310); *Science Research Project of Hunan Provincial Department of Education* (20K092); *Hunan University of Chinese Medicine Graduate Student Innovation Project* (2023CX170)

[*Author*]: *CHEN Shiqi, E-mail*: 15575392042@163.com.
[*Correspondence to*]: *LEI Xiaoming, M.D., Associate Professor, E-mail*: 34506390@qq.com.

Received: 2024-01-22 *Revised*: 2024-04-17 *JHMU*, 2024;30(16):1246-1258

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

[Abstract] **Objective**: To explore the potential target and mechanism of Zhuanggu Zhitong formula in the treatment of postmenopausal osteoporosis. **Methods**: The PPI network of drug action targets was screened from the BATMAN-TCM database and PMOP disease targets were obtained from GeneCards, TTD, and OMIM databases. This network was then established using the STRING database and visualized with Cytoscape software to create a 'drug-active ingredient-target-disease' network. Additional-

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81973920);湖南省自然科学基金面上项目(2021JJ30494);湖南省卫生健康委项目(D202303107310);湖南省教育厅科学研究项目(20K092);湖南中医药大学校级研究生创新课题立项项目(2023CX170)
[作者简介] 陈诗淇,E-mail:15575392042@163.com。
[通讯作者] 雷晓明,医学博士,副教授,E-mail:34506390@qq.com。
[收稿日期] 2024-01-22 [修回日期] 2024-04-17 网络出版时间:2024-04-25 17:49:53

ly, molecular docking was employed to confirm the binding ability between core active components and key targets. Molecular docking technique was used to verify the binding ability of core active components to key targets. The animal model of postmenopausal osteoporosis was established. Mirco-CT and HE staining were used to explore the effect of Zhuanggu Zhitong formula in the treatment of postmenopausal osteoporosis. RT-PCR was used to evaluate the expression of mRNA. **Results**: 69 active ingredient targets and disease common targets of Zhuanggu Zhitong formula were obtained. The key targets of PPI analysis were PPARG, PTGS2, ESR1 and so on. Drug-active ingredient-target-disease network revealed that the core active components were stigmasterol, isopsoralen, ursolic acid, oleanolic acid and so on. The results of molecular docking showed that they had strong binding ability. GO function analysis showed that the main biological function was the response to hormones. The main pathways related to KEGG enrichment were the pathogenesis of cancer, estrogen signal pathway and so on. CT scanning and HE staining can effectively relieve postmenopausal osteoporosis. RT-PCR showed that the expression of PTGS2mRNA was significantly increased and the expression of PPARG was significantly decreased in Zhuanggu Zhitong group. **Conclusion**: Zhuanggu Zhitong formula can treat PMOP with multi-components, multi-targets and multi-pathways. The main components of Zhuanggu Zhitong formula are stigmasterol, Angelicin, ursolic acid and oleanolic acid. Zhuanggu Zhitong formula acts on human INS, AKT1, PPARG, PTGS2 and ESR1 through metabolic pathway and estrogen signal pathway.

[**Key words**] Zhuanggu Zhitong Formula; Postmenopausal osteoporosis; Network pharmacology; Molecular docking

骨质疏松症(osteoporosis,OP)是以骨密度下降、骨小梁结构退化、骨折风险上升为特征的代谢性骨病[1]。绝经后骨质疏松(postmenopausal osteoporosis, PMOP)特指女性在进入绝经期后,由于卵巢功能逐渐衰退,导致雌激素分泌大幅度减少,从而引发骨代谢失衡的病理现象[2]。根据一项全国性的调查研究估计,中国50岁以上男性和女性骨质疏松症的发病率分别为6.46%和29.13%[3-5]。雌激素替代疗法治疗PMOP可提高体内雌激素水平,减少骨吸收,但存在组织选择性差,需联合用药,副作用严重的问题,且存在增加心血管的风险[6],近年来,越来越多的研究致力于探讨利用中医药治疗绝经后骨质疏松症的新方法。

壮骨止痛方是湖南省名老中医谭日强教授的经验方,由莫新民教授开发为中药新药,由淫羊藿、补骨脂、狗脊、川牛膝、骨碎补、枸杞子、女贞子七味中药组成[7],具有补益肝肾,壮骨止痛的功效,通过长期的临床应用证实对PMOP有良好疗效[8]。但中药复方所含有效成分纷杂,多靶点联合治疗,利用网络药理学和分子对接技术,研究壮骨止痛方治疗骨质疏松症的有效成分和关键靶点,并通过动物实验验证,深入了解其作用机制,为扩大其临床应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 动物饲养

SPF级3月龄体质量220~280 g雌性SD大鼠40只,授权于湖南中医药大学动物实验中心,购于湖南斯莱克景达实验动物有限公司,于湖南中医药大学清洁级动物实验中心饲养,饲养中心许可证号:SCXK(湘)2019-0009,动物批号:SCXK(湘)2019-0004,本研究所有动物实验设计和操作流程符合动物伦理的要求,获动物实验伦理委员会批准,伦理编号:LL202205250[9]。

1.2 实验仪器

QuantumGX型小动物显微CT(珀金埃尔默股份有限公司);荧光定量PCR仪(北京龙跃生物科技发展有限公司,Light-Cycler96);高速低温组织研磨仪(Sericebio,KZ-Ⅲ-F)、低温高速离心机(ThermoFisher,HeraeusFresco21);电子精密天平(湘仪、TP-200D);低速小型离心机(Labnet,C1301R-230V)。

1.3 实验药品及试剂

壮骨止痛方由七味中药配伍而成,包括补骨脂、淫羊藿、骨碎补、女贞子、枸杞子、川牛膝以及狗脊[7],具体的药物配伍依据为国家新药证书[国药证字Z20050118],所需中药饮片均从湖南中医药大学第一附属医院中药房采购。1 mg/片戊酸雌二醇片(拜耳医药保健有限公司,批号:J20171038);戊巴比妥钠(美国默克公司,批号:20200422)。SYBR qPCR Super Mix Plus (novoprotein, E099-01A);gDNA Pure (novoprotein ,E047-01B);EDTA慢速脱钙液(Servicebio)。

1.4 壮骨止痛方治疗绝经后骨质疏松症的网络药理学分析方法

1.4.1 活性成分和靶点获取 在BATMAN-TCM数据库(http://bionet.ncpsb.org.cn/batman-tcm/)[10]分别以七味中药为关键词进行检索,枸杞子设置Score cutoff=124, Adjusted P_value cutoff=0.05,其余六味中药设置Score cutoff:30,Adjusted P_value cutoff:0.05,筛选出活性成分并获取作用靶点。

1.4.2 疾病靶点获取 以“Postmenopausal Osteoporosis”为检索关键词在GeneCards数据库[11]

(https://www. genecards. org/)、TTD数据库(https://idrblab. org/ttd/)[12]和OMIM数据库(https://www.omim.org/)[13]检索获得结果后去除重复靶点得到PMOP靶点。

1.4.3 关键靶点获取 将壮骨止痛方活性成分靶点和PMOP靶点导入jvenn平台(http://www.bioinformatics.com.cn/static/others/jvenn/example.html)[14]绘制韦恩图并获得两者共同靶点(交集靶点),得到的共同靶点即为壮骨止痛方治疗PMOP的关键靶点。

1.4.4 PPI网络构建 把关键靶点导入STRING数据库(https://version-11-5.string-db.org/)[15],隐藏游离节点得到蛋白-蛋白相互作用(PPI)网络,导入Cytoscape3.7.2软件进行可视化[16]。

1.4.5 药物-活性成分-靶点-疾病网络构建 将壮骨止痛方的活性成分和关键靶点等信息输入Cytoscape3.7.2软件[16],构建药物-活性成分-靶点-疾病可视化网络,并通过Network Analyzer进行拓扑分析获取degree值。

1.4.6 GO生物功能和KEGG通路富集分析 将关键靶点导入metascape数据库(https://metascape.org/)进行GO生物功能和KEGG通路富集分析[17]。以q-value<0.01为筛选条件,得到的数据导入微生信在线平台[18](https://www.bioinformatics.com.cn/)制作气泡图。

1.4.7 核心药物活性成分与关键蛋白分子对接验证 选取药物-活性成分-靶点-疾病网络中degree值排名前四的核心活性成分,并与PPI网络中degree值最大的5个关键靶点进行对接,从PubChem数据库(https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)[19]下载核心活性成分的sdf格式文件,导入Chem3D 20.0软件中进行能量最小化处理并保存为mol2格式文件。从PDB数据库(http://www.rcsb.org/)获取关键靶点的PDB ID及其3D结构,保存为pdb格式文件[20]。使用PyMOL软件去除靶点结构中的配体和水分子,将处理后的蛋白质受体和对应的小分子配体导入AutodockTools 1.5.6软件中,进行加氢等必要的预处理,利用Autodock Vina进行分子对接,得到各个组合结合能[21],使用PyMOL软件对结合能力较强的组合进行可视化处理。

1.5 壮骨止痛方治疗绝经后骨质疏松症的关键靶点及通路的体内实验验证

1.5.1 动物分组及模型建立 根据完全随机原则将40只SD大鼠均等地划分为假手术组(SHAM)、模型组(OVX)、壮骨止痛方组(ZGZT)以及雌二醇组(EV),每组10只大鼠。各组均采用国内外常用造模方法建立绝经后骨质疏松症病理模型[22],假手术组仅摘除与卵巢体积相当的脂肪组织,造模完成后,所有大鼠在术后3 d接受4万单位青霉素注射,以防伤口感染。

1.5.2 药品制备 将七味中药的中药饮片蒸馏水浸泡1 h,中药饮片与浸泡蒸馏水倒入砂锅予以武火煮沸后改文火继续煎煮1 h,所得药液过滤倒出后加入同等体积蒸馏水继续煎煮1 h,混合两次所得药液浓缩至生药含量0.66 g/mL[23]。

1.5.3 给药方法 大鼠造模手术1周后,予以药物灌胃,每日1次,连续给药12周。壮骨止痛方组按照6.6g/kg生药量的中药药液进行灌胃[23],雌二醇组按照体表面积换算公式即绝经后女性体重水平来确定西药用药剂量(成人剂量×60 kg×0.018/0.2 kg),余下各组灌胃则给予相应体积的蒸馏水[9]。

1.5.4 大鼠骨微结构检测(mirco—CT) 选取大鼠右侧股骨,在剔除多余结缔组织后,使用显微CT扫描从生长板最高点向下1 mm位置开始,连续扫描40层骨小梁,扫描参数包括电压90 kV,电流80 μA,时间14 min,旋转360°,分辨率18 μm,扫描结束后研究骨微观结构[24]。

1.5.5 大鼠骨组织病理形态检测(HE染色) 取大鼠左侧胫骨,除去多余肌肉及结缔组织,浸泡于中性福尔马林溶液中1周、EDTA脱钙液浸泡2个月,每4~6 d更换脱钙液,确保骨组织充分脱钙。随后进行脱水、浸蜡、包埋、切片、展片、烤片等常规操作和染色步骤[9]。最后使用显微镜拍摄并观察骨小梁结构。

1.5.6 Real-time PCR检测 运用TRIzol方法对总RNA进行提取和纯化。反转录的条件为:50 ℃,15 min,85 ℃,5 s。在扩增过程中应用SYBR试剂盒,条件为:95 ℃,60 s,1个循环;95 ℃,20 s,60 ℃,20 s,72 ℃,30 s,40个循环,系统检测关键靶点PPARG、PTGS2的表达。使用的引物序列见表1。

1.6 统计学处理

采用SPSS 26.0软件,并将数据以均值和标准差($\bar{x} \pm s$)的形式表示。在比较多组数据时,选用单因素方差分析方法。$P<0.05$为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 壮骨止痛方活性成分及靶点获取结果

筛选出壮骨止痛方活性成分中活性成分见表2。共获得活性成分靶点262个。

表1　检测基因引物序列

Tab 1　Detection of gene primer sequence

基因	引物序列	产物大小(bp)
GADPH	上游：5′-CAAGTTCAACGGCACAGTCAAGG-3′ 下游：5′-ACATACTCAGCACCAGCATCACC-3′	123
PPARG	上游：5′-CTGTGGACCTCTCTGTGATGGATG-3′ 下游：5′-AACGGGATGTCTTCATAGTGTGGAG-3′	109
PTGS2	上游：5′-TTTGATTGACAGCCCACCAACTTAC-3′ 下游：5′-CAGTCATCAGCCACAGGAGGAAG-3′	111

2.2　PMOP靶点的获取结果

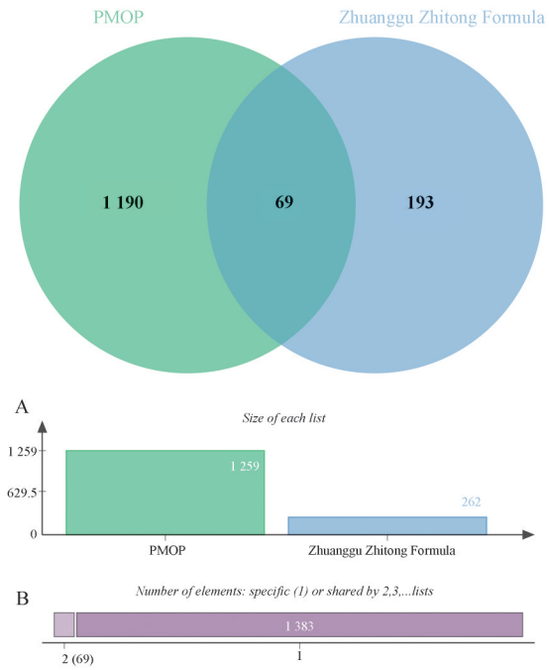
经GeneCards、OMIM和TTD数据库筛选，分别得到1 224个、45个和4个PMOP相关靶点。排除重复后共计1 259个。

2.3　PMOP靶点与壮骨止痛方共同靶点的获取结果

将获取的1 259个PMOP靶点和262个壮骨止痛方靶点通过jvenn平台转化为韦恩图(见图1)并获得69个关键靶点(共同靶点)。

2.4　PPI网络分析和关键靶点获取

选用STRING 11.5数据库作为数据源，得到涵盖69个节点和321条边的网络图，见图2。将STRING数据库数据导入Cytoscape3.7.2软件进行



两者交集靶点有69个，图A是对韦恩图的坐标数据统计，即1 259个PMOP靶点和262个壮骨止痛方靶点；图B中为POMP与壮骨止痛方的总计靶点1 383个，其中共同靶点69个

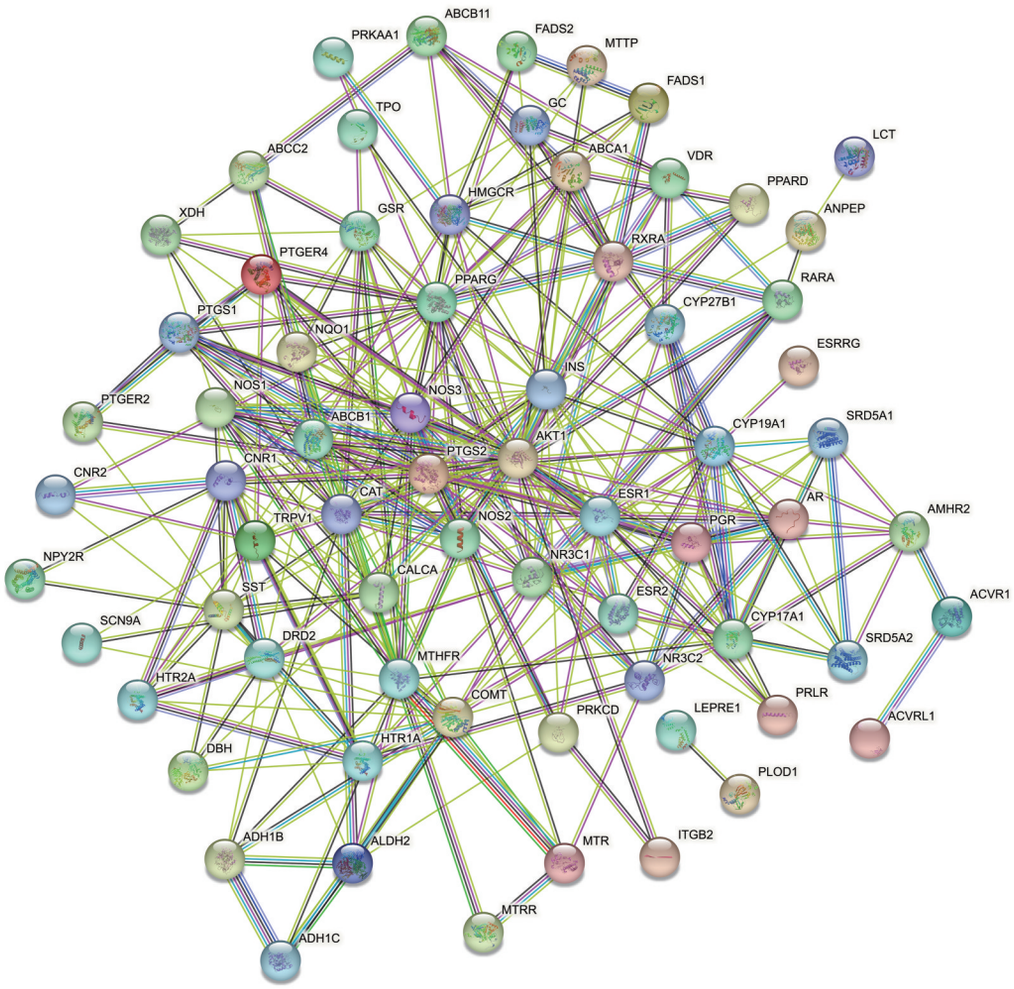
图1　壮骨止痛方活性成分靶点与POMP疾病靶点交集的韦恩图

Fig 1　Venn diagram of the intersection of active ingredient targets of Zhuanggu Zhitong formula prescription and POMP disease targets

表2　壮骨止痛方活性成分

Tab 2　Active components of Zhuanggu Zhitong formula

药物	活性成分
补骨脂	异补骨脂酮(Corylifolinin)；补骨脂甲素(Bavachin)；补骨脂酚(Bakuchiol)；异补骨脂二氢黄酮(Isobavachin)；补骨脂查耳酮(Bavachalcone)；豆甾醇(Stigmasterol)；花椒毒素(Xanthotoxin)；异补骨脂素(Angelicin)；补骨脂乙素(Isobavachalcone)
川牛膝	牛膝甾酮(Inokosterone)；蜕皮甾酮(Ecdysterone)；杯苋甾酮(Cyasterone)
狗脊	柘树酮D(Cudraphenone D)；佛手柑内酯(Bergapten)；柚皮素(Naringenin)；绵马酚(Aspidinol)；异补骨脂二氢黄酮(Isobavachin)；柘树酮B(Cudraphenone B)；柘树黄酮B(Cudraflavanone B)
枸杞子	瓜氨酸(Citrulline)；莨菪亭(Scopoletin)；维生素(B2Vitamin B2)；维生素(B12Vitamin B12)；甜菜碱(Betaine)；烟酸(Nicotinic Acid)；维生素C(Vitamin C)；胡萝卜素(Carotene)；核黄素(Riboflavine)
骨碎补	柚皮素(Naringenin)；油菜素甾醇(Campesterol)；豆甾醇(Stigmasterol)；柚皮苷(Naringin)；γ-谷甾醇(Gamma-Sitosterol)；芸香柚皮苷(Narirutin)；橙皮苷(Hesperidin)
女贞子	熊果酸(Ursolic Acid)；齐墩果酸(Oleanolic Acid)；熊果酸乙酸酯(Acetylursolic Acid)；圣草酚(Eriodictyol)
淫羊藿	木兰花碱(Magnoflorine)；淫羊藿苷(Yixinoside A)；三硬脂酸甘油酯(Stearin)；20-羟-二十烷四烯酸(20-Hexadecanoylingenol)；6-三十一烷醇(Hentriacontanol-6)；乙酸里哪酯(Linoleyl Acetate)



球体代表蛋白质编码基因产生的所有蛋白质，球内为蛋白质三维结构，节点间连接表示其功能相关性

图2 壮骨止痛方与PMOP交集靶点的蛋白互作图

Fig 2 Protein interaction between Zhuanggu Zhitong formula and PMOP intersection target

可视化获得核心靶点（图3），其中中包括69个节点，平均degree值9.3。degree值越大表示该靶点越重要，即与其相连的靶点越多，颜色更深，节点更大。PPI网络图中排名前10的的靶点见表3。

2.5 药物-活性成分-靶点-疾病网络构建

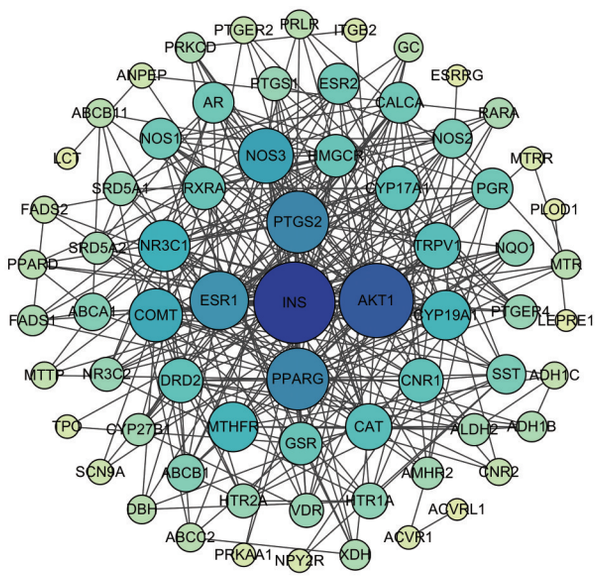
药物-活性成分-靶点-疾病网络涵盖105个节点（图4）。这些节点主要由34个核心活性成分及69个关键靶点组成，分别用红色和紫色标识加以区分。节点的大小根据degree值而定，degree值越大，节点越大，表示该节点处于越核心的位置。根据degree值进行排名，排名前11的核心活性成分见表4。

2.6 GO富集分析和KEGG通路富集分析结果

通过metascape数据库进行通路富集分析，并设定q-value＜0.01为筛选标准。经分析共获得433条生物学过程（BP）信息，主要涉及有机羟基化合物的代谢以及激素的反应等，细胞组分（CC）12条（涉及受体复合体、神经元胞体等），分子功能（MF）条目56条（以氧化还原酶活性为主）；利用KEGG数据库富集分析发现37条显著富集的信号传导途径。主要涵盖诸如酪氨酸代谢、雌激素信号通路以及神经活性配体-受体相互作用等关键生物过程。选取GO各组分条目前10个和KEGG通路前20进行可视化分析，见图5～8。

2.7 分子对接结果

通过筛选得到豆甾醇、异补骨脂素、熊果酸、齐墩果酸4个小分子配体，INS（PDB ID：1UZ9）、AKT1（PDB ID：1UNQ）、PPARG（PDB ID：1PRG）、PTGS2（PDB ID：5F19）、ESR1（PDB ID：1XPC）5个大分子受体。分子对接后结合能见表5，在对接结果分析中，当结合能低于－5 kcal/mol时，通常表明配体与受体之间具备显著的结合能力[25]。实验结果显示，所研究的4个核心活性成分与5个关键靶点之间的结合能数值均处于－6.1



圆圈节点为一个蛋白质，蛋白间的连线表示两者间的相互作用，如图，各靶点中INS、AKT1、PPARG、PTGS2、ESR1靶点相对连接度最高、节点最大

图3　壮骨止痛方与PMOP交集靶点的PPI网络图

Fig 3　PPI network diagram of the intersection target of Zhuanggu Zhitong prescription and PMOP

表3　壮骨止痛方治疗PMOP的关键靶点前10位

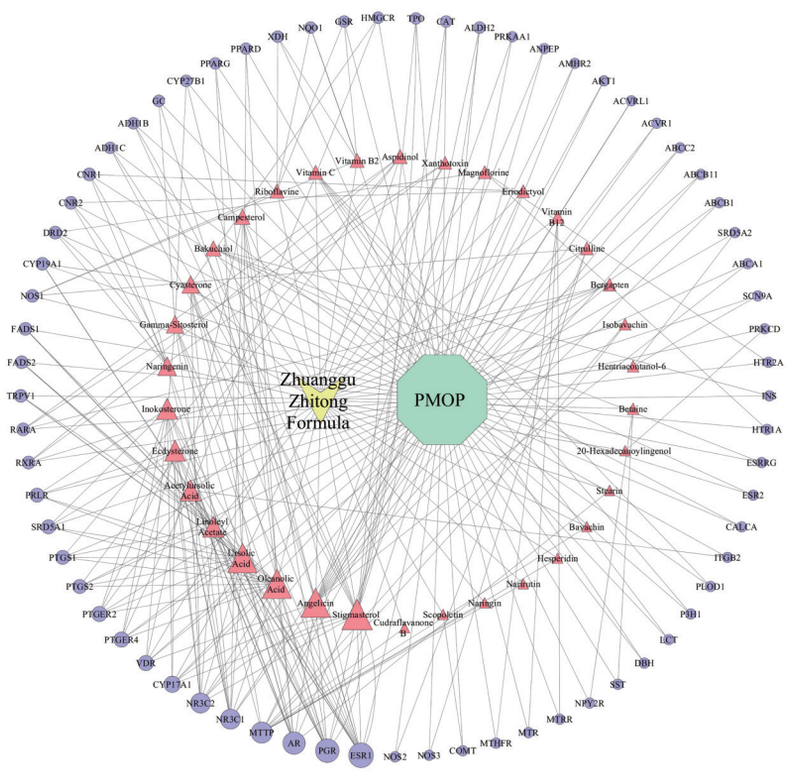
Tab 3　Top 10 key targets of Zhuanggu Zhitong formula in the treatment of PMOP

靶点	中文名	Uniprot ID	degree值
INS	胰岛素	P01308	35
AKT1	Rac－α丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶	P31749	31
PPARG	过氧化物酶体增殖物激活受体γ	P37231	24
PTGS2	前列腺素内过氧化物合酶2	P35354	24
ESR1	雌激素受体1	P03372	22
NOS3	内皮型一氧化氮合成酶	P29474	20
COMT	儿茶酚胺氧位甲基转移酶	P21964	19
NR3C1	糖皮质激素受体	P04150	18
MTHFR	亚甲基四氢叶酸还原酶	P42898	17
CYP19A1	细胞色素P450芳香化酶	P11511	17

kcal/mol至－10.2 kcal/mol范围内，这一数据证明两者间存在较强结合能力。具体得分见图9。选取结合能力较好的组合用PyMOL做可视化处理，结果显示受体和配体间均可形成稳定的氢键，见图10、11。

2.8　壮骨止痛方对去卵巢大鼠骨微结构的影响

SHAM组股骨组织骨小梁数目较多且分布疏密有致，与SHAM组相比，去势大鼠骨小梁显著匮



图中红色靶点为核心活性成分；紫色节点为69个关键靶点。由图可知核心成分：豆甾醇(Stigmasterol)、异补骨脂素(Angelicin)、熊果酸(Ursolic Acid)、齐墩果酸(Oleanolic Acid)在该网络图中关系最密切，degree值最高，且ESR1、PGR、AR、PTGS2、PPARG、AKT1等与活性成分关系较紧密

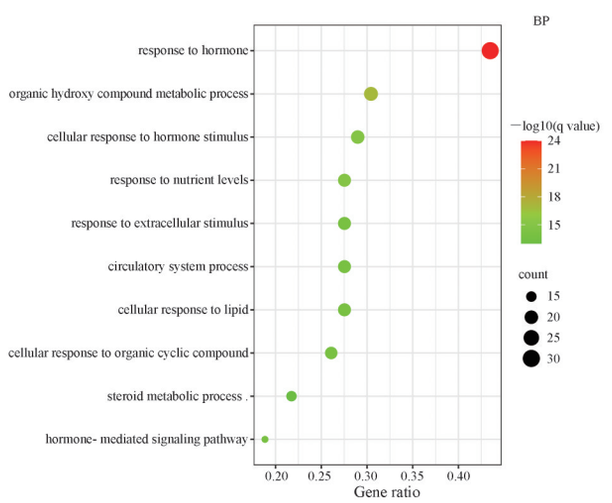
图4　药物-活性成分-靶点-疾病网络

Fig 4　Drug-active ingredient-target-disease network

表4　壮骨止痛方治疗PMOP的核心活性成分(前11)

Tab 4　Core active components of Zhuanggu Zhitong Formula in the treatment of PMOP(Top 11)

活性成分	中文名	来源	degree值
Stigmasterol	豆甾醇	骨碎补,补骨脂	19
Angelicin	异补骨脂素	补骨脂	18
Ursolic Acid	熊果酸	女贞子	18
Oleanolic Acid	齐墩果酸	女贞子	18
Inokosterone	牛膝甾酮	川牛膝	11
Ecdysterone	蜕皮甾酮	川牛膝	11
Acetylursolic Acid	乙酰熊果酸	女贞子	11
Linoleyl Acetate	乙酸亚油醇酯	淫羊藿	11
Naringenin	柚皮素	狗脊,骨碎补	9
Cyasterone	杯苋甾酮	川牛膝	8
Gamma-Sitosterol	γ-谷甾醇	骨碎补	8



以GeneRatio为横轴,表示在该基因清单中富集至目标路径的基因数目在该基因清单中所含基因集合的总数中所占的比率。气泡面积大小为富集基因的数量;气泡颜色为富集显著性,即q-value数值的大小

图5　壮骨止痛方治疗POMP的GO富集分析(BP)

Fig 5　GO enrichment analysis of Zhuanggu Zhitong formula in the treatment of POMP(BP)

乏,骨小梁数骤减,间隔加宽,出现骨小梁断裂;经壮骨止痛方干预后,骨组织小梁数量稍恢复,小梁间距离缩短,衔接度有所提升,网状结构得到明显改善。见图12。

2.9　壮骨止痛方对去卵巢大鼠骨组织病理形态的影响

SHAM组大鼠的胫骨结构完整,骨小梁密集且排列均匀,骨髓腔相对较小。相比之下,OVX组大鼠骨髓腔变大,骨小梁结构散乱且分布稀疏,大小不一,髓腔内存在大量空泡状脂肪细胞。ZGZT组骨组织形态得到明显改善,骨小梁排列相对整齐,

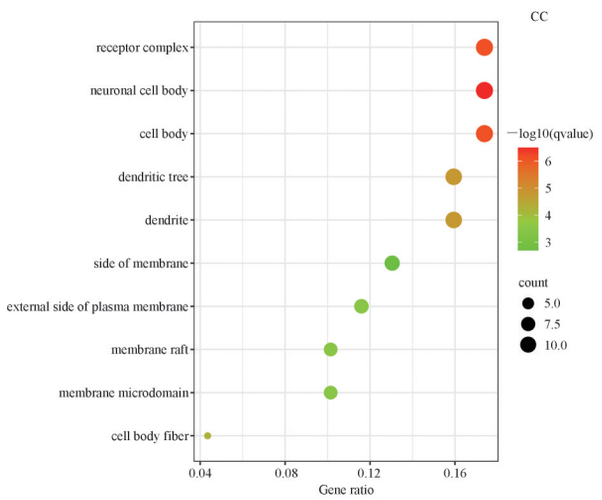


图6　壮骨止痛方治疗POMP的GO富集分析(CC)

Fig 6　GO enrichment analysis of Zhuanggu Zhitong formula in the treatment of POMP(CC)

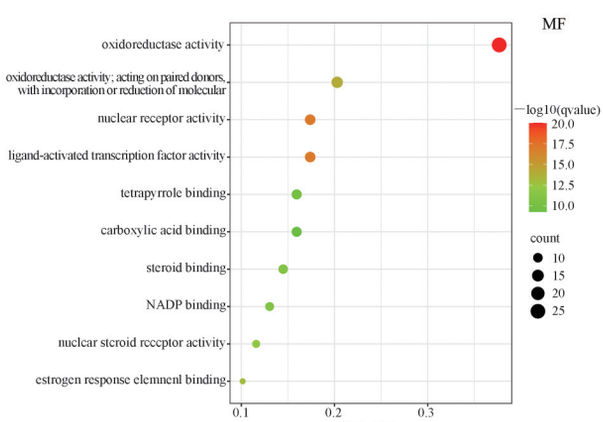


图7　壮骨止痛方治疗POMP的GO富集分析(MF)

Fig 7　GO enrichment analysis of Zhuanggu Zhitong formula in the treatment of POMP(MF)

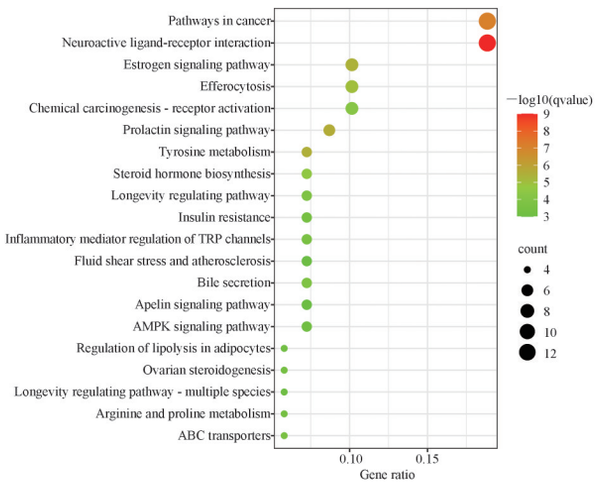
纹理清晰可见,脂肪空泡数量和面积相对减少。见图13。

2.10　壮骨止痛方对绝经后骨质疏松大鼠中PPARG、PTGS2基因转录的影响

与SHAM组比较,OVX组大鼠骨组织中PPARG的表达显著升高($P<0.05$),予以壮骨止痛方后,该表达量有所降低,雌二醇组较模型组表达量降低($P<0.05$)。相较于假手术组,模型组大鼠骨组织PTGS2的表达显著降低($P<0.05$);经壮骨止痛方治疗后,表达量明显增加($P<0.05$),见图14。

3　讨论

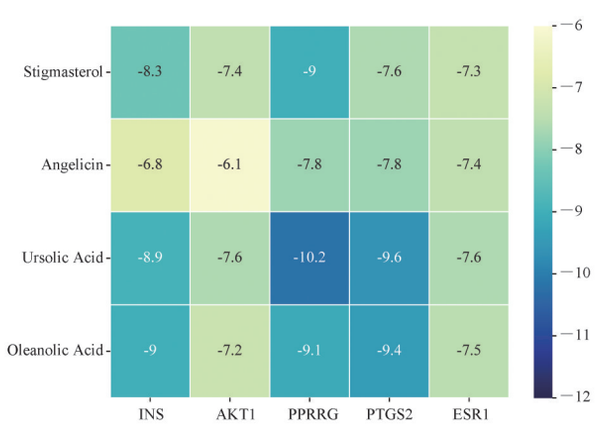
骨质疏松症作为全身性骨病的其中一种,表现为骨量的减少以及骨组织微结构的损伤,进而使得骨脆性增加,骨折风险加剧[26]。壮骨止痛方主要包



以 GeneRatio 为横轴，表示富集至目标路径的基因数目与所有输入的做富集分析的 gene 的数目的比值，数值越大表示富集程度越大，纵轴是富集程度较高的 pathway term，气泡的大小和颜色分别代表了富集基因的数量和显著性水平，显著性程度即 q-value 的大小。如图发现壮骨止痛方与 PMOP 的 KEGG 通路富集在癌症的发病途径、神经活性配体-受体相互作用通路中较明显

图 8　壮骨止痛方治疗 PMOP 的 KEGG 通路富集分析

Fig 8　Enrichment analysis of KEGG pathway of Zhuang-gu Zhitong formula in the treatment of PMOP



图中横坐标为关键靶点，纵坐标为有效活性成分，图中颜色深浅程度代表分子结合能大小，单位为 kcal/mol

图 9　分子对接最低结合能热图

Fig 9　Heat map of the lowest binding energy of molecular docking

表 5　壮骨止痛方治疗 PMOP 的核心活性成分与关键靶点分子对接结果

Tab 5　Docking results of core active components and key target molecules of Zhuanggu Zhitong formula in the treatment of PMOP

核心活性成分	结合能(kcal/mol)				
	INS	AKT1	PPARG	PTGS2	ESR1
豆甾醇(Stigmasterol)	−8.3	−7.4	−9.0	−7.6	−7.3
异补骨脂素(Angelicin)	−6.8	−6.1	−7.8	−7.8	−7.4
熊果酸(Ursolic Acid)	−8.9	−7.6	−10.2	−9.6	−7.6
齐墩果酸(Oleanolic Acid)	−9.0	−7.2	−9.1	−9.4	−7.5

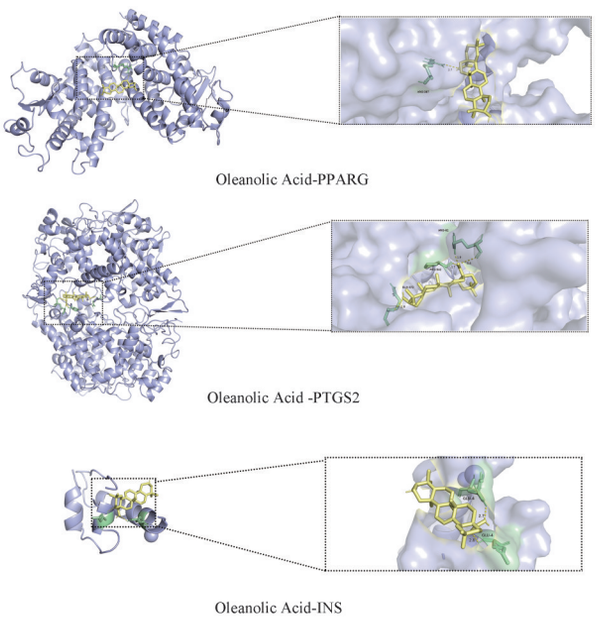
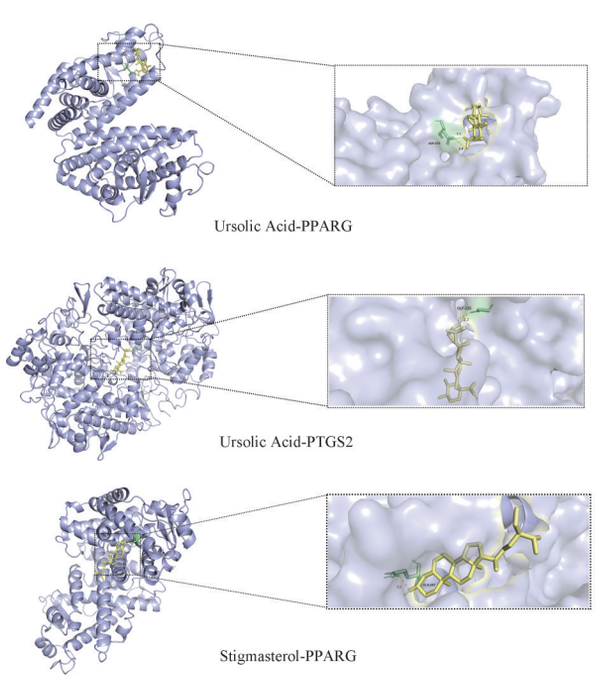


图 10　分子对接结果可视化(齐墩果酸-PPARG/PTGS2/INS)

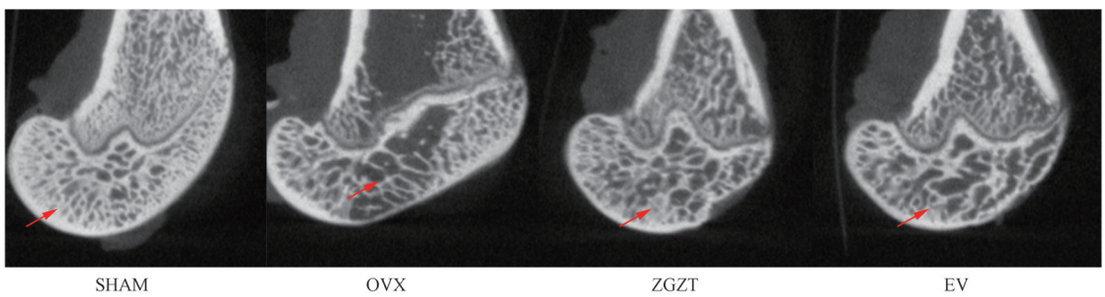
Fig 10　Visualization of molecular docking results(Oleanolic Acid-PPARG/PTGS2/INS)



全图左侧 3D 结构中紫色卷曲结构为受体蛋白，黄色棍棒结构为小分子配体，绿色部分为氨基酸残基；右侧为细节放大图，图中周围紫色膨胀分布为蛋白的表面结构，黄色棍棒结构为小分子配体，其中的数字代表氢键长度，绿色部分为氨基酸残基，如 GLN-283 等编号为氨基酸残基名称，黄色虚线连接部分为氢键

图 11　分子对接结果可视化(熊果酸-PPARG/PTGS2、豆甾醇-PPARG)

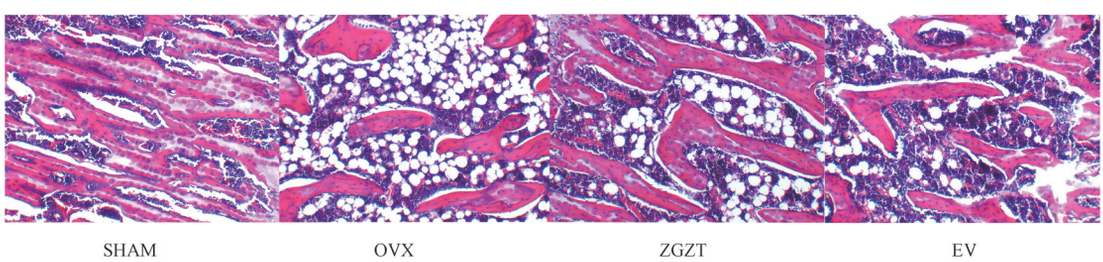
Fig 11　Visualization of molecular docking results(Ursolic Acid-PPARG/PTGS2、Stigmasterol-PPAGR)



SHAM：假手术组；OVX：模型组；ZGZT：壮骨止痛方组；EV：雌二醇组

图12　各组大鼠骨组织 Mirco-CT 图像（n=3）

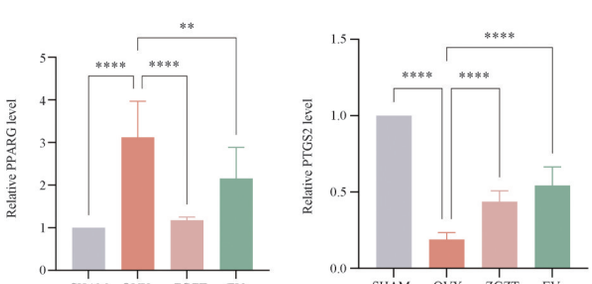
Fig 12　Mirco-CT image of bone tissue of rats in each group（n=3）



SHAM：假手术组；OVX：模型组；ZGZT：壮骨止痛方组；EV：雌二醇组

图13　各组大鼠骨组织病理形态学（HE，×100）

Fig 13　Comparison of pathomorphology of bone tissue in each group（HE，× 100）



SHAM：假手术组；OVX：模型组；ZGZT：壮骨止痛方组；EV：雌二醇组；与模型组比较，$^{****}P<0.0001$；$^{**}P<0.01$

图14　壮骨止痛方治疗绝经后骨质疏松大鼠后 PPARG、PTGS2 mRNA 的相对表达量

Fig 14　Relative expression of PPARG and PTGS2 mRNA in rats with postmenopausal osteoporosis treated with Zhuanggu Zhitong formula

括补骨脂、淫羊藿等药物，具有补肾助阳、振奋气化、益气以壮筋骨等功效。此外，配合骨碎补、狗脊、川牛膝等药物，可强筋骨、活血化瘀、祛风除湿、止痛，并对骨质疏松症有良好的防治作用[27]。本研究选择了壮骨止痛方作为研究对象，利用网络药理学方法，对该方防治骨质疏松的药效活性成分、作用靶点及作用机理进行了探索，并通过分子对接及在体动物实验加以验证。

利用 BATMAN-TCM 数据库，以七味中药为关键词进行深入检索，成功构建药物-活性成分-靶点-疾病可视化网络。经过网络拓扑分析发现壮骨止痛方的核心成分主要包括豆甾醇、异补骨脂素、熊果酸以及齐墩果酸等。而豆甾醇作为一种具有多种活性的植物甾醇，在抗癌、抗炎、抗氧化等方面展现出了显著的效果，据相关研究揭示，豆甾醇与骨髓间充质干细胞的联合应用，能够有效加速软骨修复进程[28]，并存在通过下调甾醇调节元件结合转录因子 2（SREBF2）调节铁死亡以此减轻白细胞介素（IL）-1β 诱导的软骨细胞的损伤[29]。有效缓解骨关节炎的发生。异补骨脂素已被确定为一种植物雌激素，可有效治疗绝经后骨质疏松，研究表明，异补骨脂素可以通过靶向 EGFR、AKT1、ESR1（ER-α）、PTGS2 和 IGF1R 来抵抗绝经后骨质疏松[30]。而 RANKL 对破骨细胞分化的抑制作用可能与其下调 NF-κB 通路有关[31]，通过抑制 Notch 信号传导诱导成骨分化[32]。有实验研究发现熊果酸在改善骨质疏松症方面展现出显著效果，它能够改善骨小梁微结构的恶化情况，有效减少椎骨中破骨细胞的数量，并抑制血清中破骨细胞特异性细胞因子的释放，熊果酸还能通过抑制自噬介导的破骨细胞分化，进一步改善骨质疏松症[33]。熊果酸可通过靶向下调核输出蛋白 exportin 5（XPO5）来抑制破骨细胞

分化[34]。齐墩果酸因其护肝降酶的特性,常被用作广谱抗菌药,研究表明,齐墩果酸不仅具备上述功效,还能有效抑制破骨细胞的生成与骨吸收过程,其作用机制在于上调ERα和miR-503的表达水平,同时抑制RANK的表达,从而实现对破骨细胞生成的抑制作用[35]。综上,壮骨止痛方通过发挥抗炎、抗氧化作用,抑制破骨细胞的形成与分化,同时促进成骨细胞的增值与分化,显示出对治疗骨质疏松症的潜在疗效。

PPI网络分析表明,INS、AKT1、PPARG、PTGS2、ESR1可能是壮骨止痛方治疗骨质疏松症的关键靶点。ESR1参与雌激素传导,与绝经后骨质疏松症关系密切[36],补阳草药可通过激活β-catenin信号通路上调ESR1,在体内上调骨矿物质含量,体外提高成骨细胞增殖能力[37]。近来,通过对ESR1 mRNA多重遗传性分析与绝经后骨质疏松相关联,使得筛查绝经后骨质疏松高风险人群成为可能[38]。作为蛋白激酶家族的关键成员,Akt1在多个生物过程中扮演着至关重要的角色,包括肿瘤细胞的增殖与代谢,以及成骨细胞与破骨细胞的分化过程[39],PI3K/AKt是细胞内的关键信号传导通路,而Akt1作为PI3K的下游效应分子,对细胞的增殖、生长与存活有重要调控作用,当PI3K/AKt信号通路被激活,它能够通过抑制炎性因子的表达、减少细胞凋亡等方式增强成骨细胞的分化能力[40]。研究表明,丹参酮可以提高AKT1基因表达,促进MSCs增殖,抑制其凋亡从而改善骨质疏松症[41]。PPARG与糖尿病、肥胖、癌症和动脉粥样硬化等多种疾病有关[42],在骨骼中,PPARG抑制骨髓基质细胞(BMSC)分化为成骨细胞[43,44],且促进破骨细胞的形成与骨吸收[45]。PPARG通过激活成骨细胞的代表性标志物ALPL和OPN来抑制BMSC的分化,PPARG的过表达缓解了FTO(m6A去甲基化酶)介导的BMSCs成骨分化[46]。最近研究表明,PPARG的转录活性在骨细胞中硬化蛋白的表达过程中发挥着核心作用,硬化蛋白是通过抑制WNT信号传导和RANKL的产生,来调节骨的形成和吸收[47,48],使用选择性调节剂靶向PPARG活性以期作为治疗骨质疏松症最新研究方向[49]。前列腺素内过氧化物酶(PTGS)作为前列腺素合成路径中的关键酶,不仅具备双加氧酶的功能,还展现出过氧化物酶的活性,其同分异构体PTGS1与诱导型PTGS2在细胞调控中发挥着不同的作用[50]。罗鸣然等人开展的研究表明,mmu-miR-107-3p具备靶向Ptgs2的能力,即敲减PTGS2的表达,达到对MC3T3-E1细胞增殖和成骨分化过程的抑制作用[51]。

GO富集分析结果显示壮骨止痛方的潜在作用靶点主要为对激素的反应、有机羟基化合物代谢过程、氧化还原酶活性等功能相关。KEGG富集到的通路有神经活性配体-受体相互作用、癌症的发病途径、雌激素信号通路、效应细胞增多症、催乳素信号通路、酪氨酸代谢等。雌激素作为一种重要的类固醇激素,其不足可引起绝经后骨质疏松[52]。胡红瑶等研究得知橙皮苷可能通过ESR1激活雌激素信号通路来缓解OP[53],而壮骨止痛方可发挥雌激素样作用,降低骨转换和骨流失,有效缓解绝经后骨质疏松[54]。5-HT可以通过在大脑中的作用以及对骨骼中细胞的作用对骨密度产生不同的影响。其中壮骨止痛方与pmop的共同基因HTR1A、HTR1B是编码5-羟色胺(血清素)的G蛋白偶联受体,属于5-羟色胺受体亚家族,5-HT1A受体结合位点主要位于边缘脑区域,特别是下丘脑和皮质区域,大脑中影响骨密度的神经通路是由脑干到下丘脑的5-羟色胺能投射启动的,它最终通过释放来自交感神经输入的抑制性影响来促进骨形成[55]。于潇等利用MCMC算法(吉布斯采样)计算高峰骨量(PBM)与低PBM健康中国女性循环单核细胞中的差异表达途径和枢纽基因,神经活性配体-受体相互作用途径可能与骨质疏松症的发展有关[56]。上原俊介等研究显示,Wnt5a-Ror2(酪氨酸激酶样孤儿受体2)信号转导通过激活Daam2-Rho-Pkn3-c-Src通路促进破骨细胞的骨吸收活性[57];谢刚等研究表明,高度特异性的脾酪氨酸激酶(SYK)抑制剂—PRT062607(PRT)对核因子κB配体受体激活剂(RANKL)诱导的破骨细胞特异性基因表达、体外抑制了骨吸收和破骨细胞生成的作用,可以预防卵巢切除术后(OVX)的骨丢失和乳腺癌诱导的体内骨破坏[58],酪氨酸激酶(Src)是骨质疏松症治疗的潜在靶点[59]。

本研究通过摘除雌性大鼠两侧卵巢造成绝经后骨质疏松症模型,并对其进行了壮骨止痛方的干预治疗。实验结果表明,与OVX组相比,给予壮骨止痛方后大鼠股骨骨量增加,骨微结构破坏得到改善,RT-PCR结果显示,相比于模型组,壮骨止痛方降低大鼠体内成脂关键因子PPARG的表达,抑制成脂分化的趋势,增加环氧合酶2(PTGS2)的表达,促进体内细胞成骨向。本研究利用网络药理学和分子对接技术并结合动物实验,对壮骨止痛方在治疗骨质疏松症时的作用靶点进行了详细分析和探

讨。研究发现，壮骨止痛方治疗绝经后骨质疏松症时采用了多靶点、多通路的协同治疗策略，这与中医的整体观念相契合，体现了人体是一个有机整体，代谢具有相互关联性。中医在治疗骨质疏松上多为补肾药物，而在KEGG通路筛选中有神经活性配体-受体相互作用这一途径对疾病靶点进行作用，根据肾脑相关理论，补肾中药在一定程度上也起到肾脑同治的作用，《素问·五藏生成》曰："诸髓者皆属于脑"[60]，中医药在肾脑相关方面的理论，对骨质疏松的治疗具有不可忽视的参考价值，同时也为未来的临床实践与实验研究提供了潜在的探索方向。然而，要深入揭示其确切的作用机制，还需通过更为细致和全面的实验验证来进行证实。

作者贡献度说明：

陈诗淇：设计实验方案、开展具体实验、整理数据、撰写论文；王意坚：收集数据，分析数据、绘制图表；陈瑶：协助实验；蔡昕瑶：指导论文；姚海：协助收集数据；雷晓明：提供研究经费支出、论文指导与修订。

所有作者声明不存在利益冲突关系。

参考文献

1 Deng YX, He WG, Cai HJ, et al. Analysis and validation of Hub genes in blood monocytes of postmenopausal osteoporosis patients[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2021, 12:815245.

2 Arceo-Mendoza RM, Camacho PM. Postmenopausal osteoporosis: Latest guidelines[J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2021, 50(2):167-178.

3 Walker MD, Shane E. Postmenopausal osteoporosis[J]. N Engl J Med, 2023, 389(21):1979-1991.

4 Luo MH, Zhao JL, Xu NJ, et al. Comparative efficacy of Xianling Gubao Capsules in improving bone mineral density in postmenopausal osteoporosis: A network meta-analysis[J]. Front Endocrinol (Lausanne), 2022, 13:839885.

5 Zeng Q, Li N, Wang Q, et al. The prevalence of osteoporosis in China, a nationwide, multicenter DXA survey [J]. J Bone Miner Res, 2019, 34(10):1789-1797.

6 Rozenberg S, Al-Daghri N, Aubertin-Leheudre M, et al. Is there a role for menopausal hormone therapy in the management of postmenopausal osteoporosis?[J]. Osteoporos Int, 2020, 31(12):2271-2286.

7 曾英，章文娟，李伟娟等. 基于雌激素信号通路的壮骨止痛胶囊治法组方机理探讨[J]. 时珍国医国药，2017，28(4):868-871.
Zeng Y, Zang WJ, Li WJ, et al. Exploration of the mechanism of the therapeutic formula of Strong Bone Pain Relief Capsules based on estrogen signaling pathway [J]. Lishizhen Med Mater Med Res, 2017, 28(4): 868-871.

8 李劲平，曾英，雷晓明等. 壮骨止痛胶囊抗实验性绝经后骨质疏松作用的三维组学分析[J]. 中国中药杂志，2014，39(16):3203-3207.
Li JP, Zeng Y, Lei XM, et al. Tri-dimensional omics analysis on effect of zhuanggu zhitong capsule against experimental postmenopausal osteoporosis [J]. Chin J Chin Materia Med, 2014, 39(16): 3203-3207.

9 蔡昕瑶，陈瑶，陈诗淇等. 壮骨止痛方通过RANKL/RANK信号通路抑制骨吸收的机制研究[J]. 中国骨质疏松杂志，2023，29(9):1333-1339.
Cai XY, Chen Y, Chen SQ, et al. Study of the mechanism of inhibition of bone resorption with the strong bone and analgesic prescription through RANKL/RANK signaling pathway [J]. Chin J Osteoporosis, 2023, 29(9): 1333-1339.

10 Liu Z, Guo F, Wang Y, et al. BATMAN-TCM: A bioinformatics analysis tool for molecular mechANism of traditional Chinese medicine[J]. Sci Rep, 2016, 6:21146.

11 Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, et al. The Genecards suite: From gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2016, 54:1.30.1-1.30.33.

12 Zhou Y, Zhang Y, Lian X, et al. Therapeutic target database update 2022: Facilitating drug discovery with enriched comparative data of targeted agents [J]. Nucleic Acids Res, 2022, 50(D1):D1398-D1407.

13 Amberger JS, Hamosh A. Searching online mendelian inheritance in man (OMIM): A knowledgebase of human genes and genetic phenotypes[J]. Curr Protoc Bioinformatics, 2017, 58:1.2.1-1.2.12.

14 Bardou P, Mariette J, Escudié F, et al. jvenn: an interactive Venn diagram viewer [J]. BMC Bioinformatics, 2014, 15(1):293.

15 Szklarczyk D, Kirsch R, Koutrouli M, et al. The STRING database in 2023: Protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest [J]. Nucleic Acids Res, 2023, 51(D1):D638-D646.

16 Shannon P, Markiel A, Ozier O, et al. Cytoscape: A software environment for integrated models of biomolecular interaction networks[J]. Genome Res, 2003, 13(11):2498-2504.

17 Zhou Y, Zhou B, Pache L, et al. Metascape provides a biologist-oriented resource for the analysis of systems-level datasets[J]. Nat Commun, 2019, 10(1):1523.

18 Tang D, Chen M, Huang X, et al. SRplot: A free online platform for data visualization and graphing [J].

PLoS One, 2023, 18(11):e0294236.

19 Kim S, Chen J, Cheng T, et al. PubChem in 2021: New data content and improved web interfaces[J]. Nucleic Acids Res, 2021, 49(D1):D1388-D1395.

20 Berman HM, Westbrook J, Feng Z, et al. The protein data bank[J]. Nucleic Acids Res, 2000, 28(1):235-242.

21 Trott O, Olson AJ. AutoDock Vina: Improving the speed and accuracy of docking with a new scoring function, efficient optimization, and multithreading [J]. J Comput Chem, 2010, 31(2):455-461.

22 陈沙, 王桂云, 李荣慧等. 雌性大鼠手术去势骨质疏松症模型建立及评价[J]. 湖南中医药大学学报, 2020, 40(11):1315-1319.
Chen S, Wang GY, Li RH, et al. Establishment of osteoporosis model by surgical castration in female rats and its evaluation[J]. J Hunan Univ Chin Med, 2020, 40(11): 1315-1319.

23 甘国兴, 刘毓, 李劲平等. 壮骨止痛方对去卵巢骨质疏松大鼠CGRP及β2-AR的影响[J]. 中国医药导报, 2018, 15(07):9-11,15,181.
Gan XG, Liu Y, Li JP, et al. Effect of Zhuanggu Zhitong prescription on CGRP and β2-AR in ovariectomized osteoporosis rats[J]. Chin Med Herald, 2018, 15(7): 9-11,15, 181.

24 杨珊珊, 陈红琼, 陈瑶等. 壮骨止痛胶囊对去卵巢大鼠体质量及脂/骨代谢的影响[J]. 湖南中医药大学学报, 2022, 42(1):18-24.
Yang SS, Chen HQ, Chen Y, et al.Effect of Zhuanggu Zhitong Capsule on body weight and lipid/bonemetabolism in ovariectomized rats [J]. J Hunan Univ ChinMed, 2022, 42(1): 18-24.

25 Ming Y, Jiachen L, Tao G, et al. Exploration of the mechanism of Tripterygium Wilfordii in the treatment of myocardial fibrosis based on network pharmacology and molecular docking[J]. Curr Comput Aided Drug Des, 2023, 19(1):68-79.

26 袁玲丹, 宋利格.《原发性骨质疏松症诊疗指南(2022版)》解读[J]. 同济大学学报(医学版), 2023, 44(6):777-784.
Yuan LD, Song LG. Interpretation of the Guidelines for the Diagnosis and Treatment of Primary Osteoporosis (2022) [J]. J Tongji Univ(Medical Science). 2023, 44(6):777-784.

27 雷晓明, 田松. 壮骨止痛胶囊含药血清对大鼠成骨样细胞增殖分化影响的实验研究[J]. 天津中医药, 2004, (3):237-239.
Lei XM, Tian S, et al. Effect of Zhuanggu Zhitong Capsule on the proliferation and differentiation in rat of osteoblast[J]. Tianjin J Tradit Chin Med, 2004, 2004(3): 237-239.

28 Sampath S, Kotikalapudi N, Venkatesan V. A novel therapeutic combination of mesenchymal stem cells and stigmasterol to attenuate osteoarthritis in rodent model system-a proof of concept study[J]. Stem Cell Investig, 2021, 8:5.

29 Mo Z, Xu P, Li H. Stigmasterol alleviates interleukin-1beta-induced chondrocyte injury by down-regulatingsterol regulatory element binding transcription factor 2 to regulateferroptosis[J]. Bioengineered, 2021, 12(2):9332-9340.

30 Li H, Wang C, Jin Y, et al. Anti-Postmenopausal osteoporosis effects of Isopsoralen: A bioinformatics-integrated experimental study[J]. Phytother Res, 2023, 37(1):231-251.

31 Zhan W, Ruan B, Dong H, et al. Isopsoralen suppresses receptor activator of nuclear factor kappa-β ligand-induced osteoclastogenesis by inhibiting the NF-κB signaling[J]. PeerJ, 2023, 11:e14560.

32 Zhu Z, Wang Z, Ma C, et al. Isopsoralen promotes osteogenic differentiation of human jawbone marrow mesenchymal cells through Notch signaling pathway [J]. Ann Anat, 2023, 250:152156.

33 Zheng H, Feng H, Zhang W, et al. Targeting autophagy by natural product Ursolic acid for prevention and treatment of osteoporosis[J]. Toxicol Appl Pharmacol, 2020, 409:115271.

34 Tan H, Zhao C, Zhu Q, et al. Ursolic acid isolated from the leaves of loquat (*Eriobotrya japonica*) inhibited osteoclast differentiation through targeting exportin 5[J]. J Agric Food Chem, 2019, 67(12):3333-3340.

35 Xie BP, Shi LY, Li JP, et al. Oleanolic acid inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis *via* ER alpha/miR-503/RANK signaling pathway in RAW264.7 cells[J]. Biomed Pharmacother, 2019, 117:109045.

36 柴爽, 马江涛, 杨岩冰等. 雌激素受体在骨疏康治疗绝经后骨质疏松症中的作用与机制[J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(16):2574-2578.
Chai S, Ma JT, Yang YB, 等.The role and mechanism of estrogen receptor in the treatment ofpostmenopausal osteoporosis by Gushukang[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2024, 28(16): 2574-2578.

37 Xia H, Liu J, Yang W, et al. Integrated strategy of network pharmacological prediction and experimental validation elucidate possible mechanism of Bu-Yang Herbs in treating postmenopausal osteoporosis *via* ESR1 [J]. Front Pharmacol, 2021, 12:654714.

38 Bajpai AK, Gu Q, Jiao Y, et al. Systems genetics and bioinformatics analyses using ESR1-correlated genes identify potential candidates underlying female bone development[J]. Genomics, 2024, 116(1):110769.

39 Mukherjee A, Rotwein P. Selective signaling by Akt1 controls osteoblast differentiation and osteoblast-mediated osteoclast development[J]. Mol Cell Biol, 2012, 32

(2):490-500.

40 Gao S, Chen B, Zhu Z, et al. PI3K-Akt signaling regulates BMP2-induced osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells (MSCs): A transcriptomic landscape analysis[J]. Stem Cell Res, 2023, 66:103010.

41 Wang Y, Liu L, Qu Z, et al. Tanshinone ameliorates glucocorticoid-induced bone loss *via* activation of AKT1 signaling pathway[J]. Front Cell Dev Biol, 2022, 10: 878433.

42 Kisfali P, Polgár N, Sáfrány E, et al. Triglyceride level affecting shared susceptibility genes in metabolic syndrome and coronary artery disease[J]. Curr Med Chem, 2010, 17(30):3533-3541.

43 Lecka-Czernik B, Gubrij I, Moerman EJ, et al. Inhibition of Osf2/Cbfa1 expression and terminal osteoblast differentiation by PPARgamma2[J]. J Cell Biochem, 1999, 74(3):357-371.

44 Shockley KR, Lazarenko OP, Czernik PJ, et al. PPARgamma2 nuclear receptor controls multiple regulatory pathways of osteoblast differentiation from marrow mesenchymal stem cells[J]. J Cell Biochem, 2009, 106(2): 232-246.

45 Wan Y, Chong LW, Evans RM. PPAR-gamma regulates osteoclastogenesis in mice[J]. Nat Med, 2007, 13 (12):1496-1503.

46 Chen LS, Zhang M, Chen P, et al. The m(6)A demethylase FTO promotes the osteogenesis of mesenchymal stem cells by downregulating PPARG[J]. Acta Pharmacol Sin, 2022, 43(5):1311-1323.

47 Marini F, Giusti F, Palmini G, et al. Role of Wnt signaling and sclerostin in bone and as therapeutic targets in skeletal disorders[J]. Osteoporos Int, 2023, 34(2): 213-238.

48 Delgado-Calle J, Sato AY, Bellido T. Role and mechanism of action of sclerostin in bone[J]. Bone, 2017, 96: 29-37.

49 Baroi S, Czernik PJ, Chougule A, et al. PPARG in osteocytes controls sclerostin expression, bone mass, marrow adiposity and mediates TZD-induced bone loss[J]. Bone, 2021, 147:115913.

50 Li S, Jiang M, Wang L, et al. Combined chemotherapy with cyclooxygenase-2 (COX-2) inhibitors in treating human cancers: Recent advancement[J]. Biomed Pharmacother, 2020, 129:110389.

51 罗鸣然, 范文豪, 李鑫等. 靶向调控前列腺素内过氧化物合成酶2基因抑制MC3T3-E1细胞的增殖和成骨分化[J]. 中国组织工程研究, 2022, 26(12):1888-1893.
Luo MR, Fan WH, Li X, et al. Inhibition of the proliferation and osteogenic differentiation of MC3T3-E1cells by targeting prostaglandin-endoperoxide synthase 2[J]. Chin J Tissue Eng Res, 2022, 26(12): 1888-1893.

52 Lu L, Tian L. Postmenopausal osteoporosis coexisting with sarcopenia: The role and mechanisms of estrogen [J]. J Endocrinol, 2023, 259(1):e230116 [pii].

53 Hu HY, Zhang ZZ, Jiang XY, et al. Hesperidin anti-osteoporosis by regulating estrogen signaling pathways[J]. Molecules, 2023, 28(19):6987.

54 甘国兴, 莫新民, 李劲平等. 壮骨止痛方石油醚提取A部位对去势雌鼠骨质疏松症的疗效及机理研究[J]. 中国中医基础医学杂志, 2010, 16(12):1169-1170,1185.
Gan XG, Mo XM, Li JP, et al. Study on the Therapeutic effect and Mechanism of part an extracted from Zhuanggu Zhitong Formula on osteoporosis in ovariectomized female rats[J]. Journal of Basic Chinese Medicine, 2010, 16(12): 1169-1170, 1185.

55 彭昕, 曾锦宁, 张叔琦等. 壮骨止痛方对体外培养成骨细胞Wnt/β-catenin信号通路的影响[J]. 中国中西医结合杂志, 2017, 37(9):1105-1108.
Peng X, Zeng JN, Zhang SQ, et al. Effect of Zhuanggu-Zhitong prescription on Wnt/β-catenin signaling pathway of ovariectomized rats with osteoporosis[J]. Chin J Int Tradit Chin Western Med, 2017, 37(9): 1105-1108.

56 Xiao Y, Zhao XP. Screening pathways and hub genes involved in osteoclastogenesis by gene expression analysis of circulating monocytes based on Gibbs sampling[J]. Exp Ther Med, 2019, 17(4):2529-2534.

57 Uehara S, Udagawa N, Kobayashi Y. Regulation of osteoclast function *via* Rho-Pkn3-c-Src pathways[J]. J Oral Biosci, 2019, 61(3):135-140.

58 Xie G, Liu W, Lian Z, et al. Spleen tyrosine kinase (SYK) inhibitor PRT062607 protects against ovariectomy-induced bone loss and breast cancer-induced bone destruction[J]. Biochem Pharmacol, 2021, 188:114579.

59 Matsubara T, Yasuda K, Mizuta K, et al. Tyrosine kinase src is a regulatory factor of bone homeostasis[J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10):5508.

60 张琦, 李丹, 杨芳等. "肾-精-髓-骨"系统的内涵与外延[J]. 中国中医基础医学杂志, 2023, 29(7):1055-1058.
Zhang Q, Li D, Yang F, et al. Connotation and Extension of "Kidney-Essence-Marrow-Bone" System [J]. J Basic Chin Med,2023,29(7):1055-1058.

[**本文编辑**] 邹 洲 宋睿璞 朱金月