

· 论 著 ·

基于网络药理学探讨柚皮苷治疗骨质疏松症的潜在机制

张鹏¹ 余翔^{2*} 陈卓峰³ 任辉² 沈耿杨² 张志达¹ 尚奇¹ 梁德² 江晓兵^{2,4*}

1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405

2. 广州中医药大学第一附属医院脊柱骨科, 广东 广州 510405

3. 广东医科大学, 广东 东莞 523808

4. 广州中医药大学岭南医学研究中心, 广东 广州 510405

中图分类号: R259 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 04-0533-09

摘要: **目的** 基于网络药理学探讨柚皮苷治疗骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 的潜在机制。 **方法** 根据 TCMSP 数据库、Swiss Target Prediction 数据库和 Uniprot 数据库得到柚皮苷的结构及其靶点, 利用 GeneCards、OMIM 数据库获取 OP 相关靶点, 将交集靶点输入到 STRING 数据库以获取蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 信息, 借助 Cytoscape 3.7.2 软件构建 PPI 网络、“柚皮苷-交集靶点-骨质疏松”网络, 并使用 Cytoscape 3.7.2 软件、R 软件进行 GO 功能富集分析及 KEGG 通路富集分析。 **结果** 筛选得到柚皮苷 105 个作用靶点, 其中与 OP 相关靶点 44 个, GO 功能富集分析获得 607 个结果 ($P < 0.05$), KEGG 通路富集分析获得 43 个结果, 其中相关信号通路有 11 条 ($P < 0.05$), 涉及 p53、IL-17、NF- κ B、Estrogen、Prolactin 等信号通路。 **结论** 柚皮苷可能通过多靶点、多通路调节炎症反应、细胞周期和激素代谢来治疗 OP。

关键词: 骨质疏松症; 柚皮苷; 网络药理学; 信号通路

To investigate the underlying mechanism of Naringin in the treatment of osteoporosis on the basis of network pharmacology

ZHANG Peng¹, YU Xiang^{2*}, CHEN Zhuofeng³, REN Hui², SHEN Gengyang², ZHANG Zhida¹, SHANG Qi¹, LIANG De², JIANG Xiaobing^{2,4*}

1. The First Clinical Medical College, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. Department of Spine Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

3. Guangdong Medical University, Dongguan 523808, China

4. Lingnan Medical Research Center, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China; YU Xiang, Email: 20172101019@stu.gzucm.edu.cn

* Corresponding author; JIANG Xiaobing, Email: spinedrjxb@sina.com; YU Xiang, Email: 20172101019@stu.gzucm.edu.cn

Abstract: **Objective** To investigate the underlying mechanism of naringin in the treatment of Osteoporosis (OP) on the basis of network pharmacology. **Methods** The structure of naringin and its targets were obtained through TCMSP database, Swiss Target Prediction database and Uniprot database. The OP-related targets were retrieved through GeneCards database and OMIM database. Protein-protein interaction (PPI) information were obtained with the intersection targets input into STRING database. Cytoscape3.7.2 software was used to construct PPI network and "naringin-intersection target-osteoporosis" network. Using Cytoscape3.7.2 software and R software, GO function enrichment analysis and KEGG pathway enrichment analysis were conducted.

基金项目: 国家自然科学基金项目 (81904225, 81774338, 81674000); 中华中医药学会 (2019-2021 年度) 青年人才托举工程项目 (CACM-2019-C08); 广东省自然科学基金项目 (2018A030310615); 广东省教育厅基础研究及应用基础研究项目 (2018KZDXM021, 2018KTSCX041); 广东省中医药局面上项目 (20191107); 广州中医药大学第一附属医院创新强院项目 (2017QN08, 2017TD08); 广州中医药大学青年科研培育项目 (2019QNPY04); 广州中医药大学学科研究重大项目, 广州中医药大学中医骨伤学科老年脊柱伤病方向学术带头人项目; 广东省医学科研基金项目 (A2021320); 广东省高等学校珠江学者岗位计划资助项目 (2018)

* 通信作者: 江晓兵, Email: spinedrjxb@sina.com; 余翔, Email: 20172101019@stu.gzucm.edu.cn

Results 105 targets of naringin were selected, including 44 targets correlated with OP. There were 607 result gained through GO function enrichment analysis ($P < 0.05$), and 43 result through KEGG pathway enrichment analysis, including 11 relevant signaling pathways ($P < 0.05$), which involved p53, IL-17, NF kappa B, Estrogen, Prolactin and other signaling pathways. **Conclusion** By regulating inflammatory response, cell cycle and hormone metabolism, naringin may treat OP through numerous targets and pathways.

Key words: osteoporosis; naringin; network pharmacology; signaling pathway

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种系统性骨病,常引起骨折等严重并发症^[1]。OP 在中医学里面属于“骨痿”等范畴,其主要病机为肾精不足,骨失滋养^[2]。以脊柱变形、全身骨骼疼痛、易出现骨折为主要临床表现^[3]。OP 与年龄密切相关^[4-5],据统计,2016 年我国 60 岁以上的老年人中超过三分之一患有 OP,其中男性约占 25%,女性接近 50%^[6],OP 危害老年人的生命健康,增添家庭、社会的负担。抑制骨吸收药物是临床治疗 OP 的主要药物^[7],但这些药物因使用过程中存在一些并发症从而限制了其临床运用^[8]。目前,中医药治疗 OP 的疗效逐渐被患者所认可,引起了当今国内外学者的关注^[9-10]。

作为骨碎补中含量最丰富的一种黄酮类活性分子,柚皮苷 (naringin, NR) 具备补肾强骨等疗效^[11],在临床上有较好的实际运用和发展前景。目前研究显示 NR 能促进成骨细胞的增殖^[12],也可通过诱导骨形态发生蛋白-2 (BMP-2) 的表达,促进成骨分化^[13]。但是, NR 治疗 OP 涉及靶点通路众多,起效机制复杂,传统药理学难以进行系统的分析。随着系统生物学的新兴和发展,网络药理学作为研究潜在分子机制的新方法,更系统综合地分析活性分子对疾病治疗的起效机制,与活性分子多靶点、多途径干预疾病的治疗原理相契合^[14]。本文拟运用网络药理学技术探究 NR 治疗 OP 的潜在作用机制,为其提供科学的理论依据。

1 材料和方法

1.1 获取 NR 结构及靶点信息

利用 TCMSP 数据库 (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>) 获取 NR 结构及其靶点信息,同时通过 Pubchem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 获取 NR 的三维结构 (以 SDF 格式储存),并将所得到的 NR 三维结构导入 Swiss Target Prediction 数据库 (<http://new.swisstargetprediction.ch/>) 获得 NR 的相关靶点,然后将 TCMSP 数据库、Swiss Target Prediction 数据库得到的靶点去重合并

得到 NR 的靶点。利用 UniProt 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 将靶点转换为对应的人源基因名。

1.2 OP 靶点集的获取及 NR 治疗 OP 的潜在作用靶点预测

检索 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 和 OMIM (<https://www.omim.org>) 数据库获得 OP 对应靶点。利用 R 软件,将 OP 靶点与 1.1 中靶点进行映射,得到两者交集靶点。

1.3 建立 NR 治疗 OP 的靶点蛋白互作网络

在 STRING 数据库 (<https://string-db.org/>) 中导入交集靶点,隐藏孤立蛋白后得到蛋白互作 (protein-protein interaction, PPI) 信息,并将其输入到 Cytoscape 3.7.2 (<http://www.cytoscape.org/>) 软件建立 PPI 网络,同时进行网络拓扑学分析,将网络中高于度值 (degree) 平均值的靶点蛋白筛选出来作为核心靶点。

1.4 NR 治疗 OP 网络的构建

建立柚皮苷交集靶点与骨质疏松的对应关系,导入 Cytoscape 3.7.2 软件中绘制 NR 治疗 OP 网络图。

1.5 GO 功能富集分析

使用 R 软件及其程序包对交集靶点进行 GO 功能富集分析, pvalue Cutoff、qvalue Cutoff 均设为 0.05,将每类显著性排在前 20 的富集结果以点状图的形式进行展示。此外,将交集靶点输入至 Cytoscape 3.7.2 软件中进行 GO 功能富集分析,将主要与疾病相关的生物学过程或功能筛选出来 ($P < 0.05$),最后将交集靶点及上述生物学过程或功能进行可视化展示。

1.6 KEGG 通路富集分析

同样通过 R 软件及其程序包对交集靶点进行 KEGG 分析, pvalue Cutoff、qvalue Cutoff 均设为 0.05,按照显著性进行排序,将富集得到的信号通路 ($P < 0.05$) 进行展示,并运用 Cytoscape 3.7.2 软件绘制 NR 治疗 OP 的“通路-靶标”网络图。

2 结果

2.1 NR 结构及其靶点信息

通过 TC MSP 数据库和 Swiss Target Prediction 数据库检索去重后得到 105 个作用靶点。NR 结构相关信息详见表 1, 105 个作用靶点详见表 2。

表 1 柚皮苷的结构

Table 1 The structure of naringin

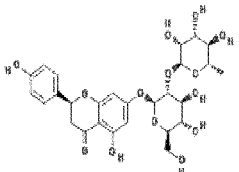
Molecule ID	Molecule name	Chemical formula	Structure	OB(%)	DL
MOL005812	naringin	C ₂₇ H ₃₂ O ₁₄		6.92	0.78

表 2 柚皮苷靶点

Table 2 Targets of naringin

序号	靶点	序号	靶点	序号	靶点
1	TOP2A	36	EIF4A1	71	GRM2
2	CDKN1A	37	PTPN2	72	LGALS7
3	TNF	38	CA3	73	FOLH1
4	RASGRF2	39	CA6	74	CES1
5	RAF1	40	CA13	75	PPARG
6	CYP19A1	41	CA5B	76	CES2
7	SLC5A1	42	ABCB1	77	MME
8	SLC5A4	43	CA5A	78	ECE1
9	SLC5A2	44	CA7	79	PLA2G1B
10	SRD5A1	45	CA4	80	IGFBP3
11	EPHX2	46	ESR1	81	CASP6
12	TYR	47	ESR2	82	CASP7
13	SLC28A3	48	LGALS1	83	CASP8
14	CA12	49	VAR5	84	CASP1
15	CA2	50	LARS	85	CASP2
16	CA1	51	CHIA	86	RXRA
17	MMP1	52	PARP1	87	IRAK4
18	MMP7	53	PTPN1	88	HRAS
19	MMP8	54	ADORA2B	89	CDK1
20	ADORA1	55	TDP1	90	NEU4
21	ADORA3	56	ALDH2	91	SLC28A2
22	TAS2R31	57	FHIT	92	HCAR2
23	CA14	58	CASP3	93	SERPINE1
24	MMP13	59	AKR1B1	94	DHFR
25	MMP12	60	ACE	95	MMP2
26	IMPDH1	61	SLC29A1	96	CHEK1
27	MAOB	62	GAA	97	GRM5
28	CYP1B1	63	ABL1	98	TACR2
29	ABCG2	64	AMY2A	99	PO1B
30	PTGS1	65	EPHA2	100	PDE5A
31	ADORA2A	66	PYGL	101	KLK1
32	ABCC1	67	LCK	102	KLK2
33	HSD17B1	68	MAP3K9	103	SLC10A2
34	SHBG	69	BTK	104	LGALS4
35	CBR1	70	EDNRA	105	TYMS

2.2 NR 治疗 OP 的潜在作用靶点预测

共获得 OP 相关靶点 3 261 个,与 2.1 中得到的 105 个 NR 靶点进行映射,得到交集靶点 44 个,见图 1。NR 治疗 OP 的潜在作用靶点见表 3。

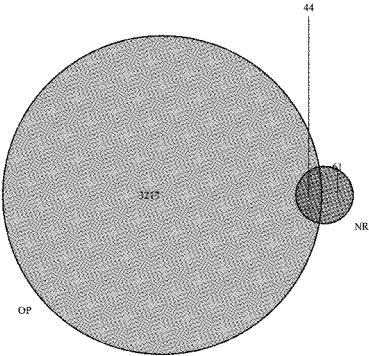


图 1 柚皮苷-骨质疏松症交集靶点韦恩图

Fig.1 Venn diagram of naringin-osteoporosis intersection targets

表 3 柚皮苷治疗骨质疏松潜在作用靶点基因

Table 3 Potential target genes of naringin in the treatment of osteoporosis

序号	基因	序号	基因
1	TNF	23	ALDH2
2	CDKN1A	24	CASP3
3	CYP19A1	25	ACE
4	SRD5A1	26	ABL1
5	TYR	27	PYGL
6	CA2	28	LCK
7	MMP1	29	BTK
8	MMP8	30	EDNRA
9	ADORA3	31	PPARG
10	MMP13	32	MME
11	CYP1B1	33	ECE1
12	ABCG2	34	IGFBP3
13	PTGS1	35	CASP7
14	ADORA2A	36	CASP1
15	ABCC1	37	RXRA
16	SHBG	38	HRAS
17	ABCB1	39	SERPINE1
18	ESR1	40	DHFR
19	ESR2	41	MMP2
20	LGALS1	42	POLB
21	PARP1	43	SLC10A2
22	PTPN1	44	TYMS

2.3 PPI 网络

将 STRING 数据库得到的 PPI 信息输入到 Cytoscape 3.7.2 软件制作 PPI 网络图,共涉及 41 个节点,161 条边,详见图 2。该网络中超过度值平均

值(7.85)的靶点蛋白有 18 个,视其为核心靶点,意味着它们很有可能是 NR 对 OP 起治疗作用的关键。核心靶点信息详见表 4。

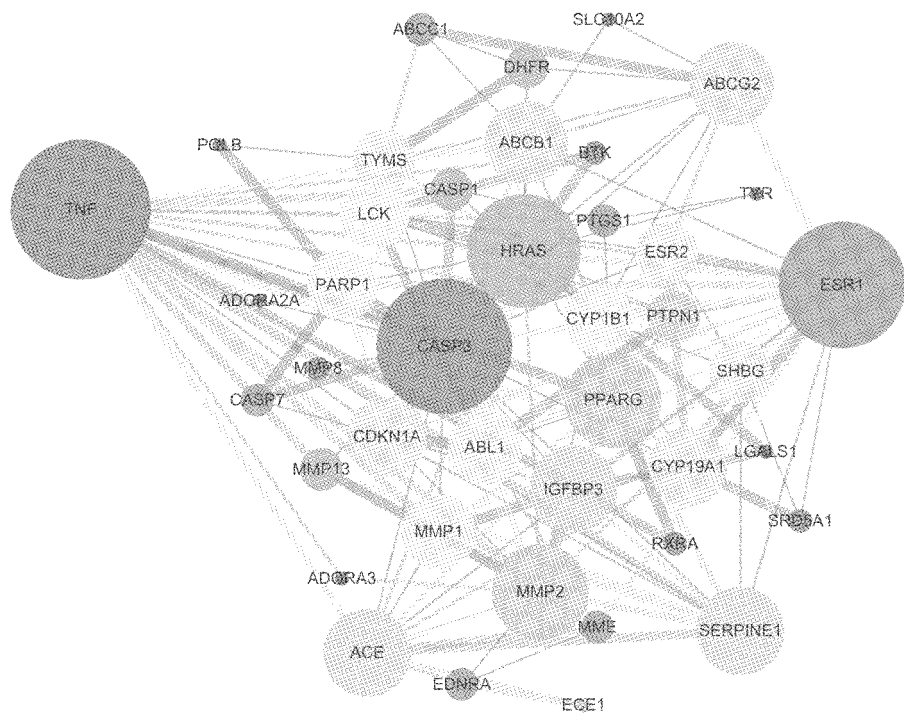


图 2 潜在作用靶点的 PPI 网络图

Fig.2 PPI network of potential targets

表 4 柚皮苷治疗骨质疏松网络核心靶点

Table 4 Core targets of naringin in the treatment of osteoporosis

序号	核心靶点	核心靶点蛋白名称	度值
1	TNF	肿瘤坏死因子	24
2	CASP3	半胱氨酸蛋白酶 3	23
3	ESR1	雌激素受体	21
4	HRAS	转化蛋白 p21 抗体 (H-ras 抗体)	18
5	PPARG	过氧化物酶体增殖激活受体	14
6	MMP2	细胞基质金属蛋白酶 2	14
7	IGFBP3	胰岛素样生长因子结合蛋白 3	12
8	SERPINE1	纤溶酶原激活物抑制剂 1	12
9	ACE	血管紧张素转换酶	12
10	ABCG2	ATP 结合盒转运蛋白 2	11
11	ABCB1	ATP 结合盒 B 亚家族成员 1 转运蛋白	11
12	CDKN1A	细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因子 1 A	10
13	CYP19A1	细胞色素酶 P450 19A1	10
14	ABL1	酪氨酸受体激酶 ABL1	9
15	MMP1	细胞基质金属蛋白酶 1	9
16	PARP1	多聚腺苷二磷酸核糖聚合酶 1	8
17	LCK	酪氨酸蛋白受体激酶 LCK	8
18	CYP1B1	细胞色素酶 P450 1B1	8

2.4 NR 治疗 OP 网络图

构建“柚皮苷-交集靶点-骨质疏松”的对应关系,将其输入 Cytoscape 3.7.2 软件中,得到 NR 治疗 OP 网络图。网络由 46 个节点(其中 1 个 NR 节点,44 个靶点,1 个 OP 节点)和 88 条边组成。网络图中蓝色菱形节点代表靶点,红色多边形节点代表“柚皮苷”,橙色椭圆形节点代表“骨质疏松症”,线条代表柚皮苷、骨质疏松症与靶点具有对应关系,见图 3。

2.5 GO 功能富集分析

使用 R 软件进行 GO 生物过程(GO BP)富集分析,共获得 533 个结果,主要涉及类固醇激素反应、固有凋亡信号通路、激素分解代谢过程、腺体发育、氧化应激反应、对活性氧的反应、炎症反应的调节等;GO 细胞组成(GO CC)富集分析共获得 3 个结果,涉及膜筏、膜微区、膜区;GO 分子功能(GO MF)富集分析共获得 71 个结果,主要涉及雌激素受体结合、肽链内切酶、跨膜转运蛋白、核受体、转录因子的活性等方面。GO BP、GO CC、GO MF 富集分析结果

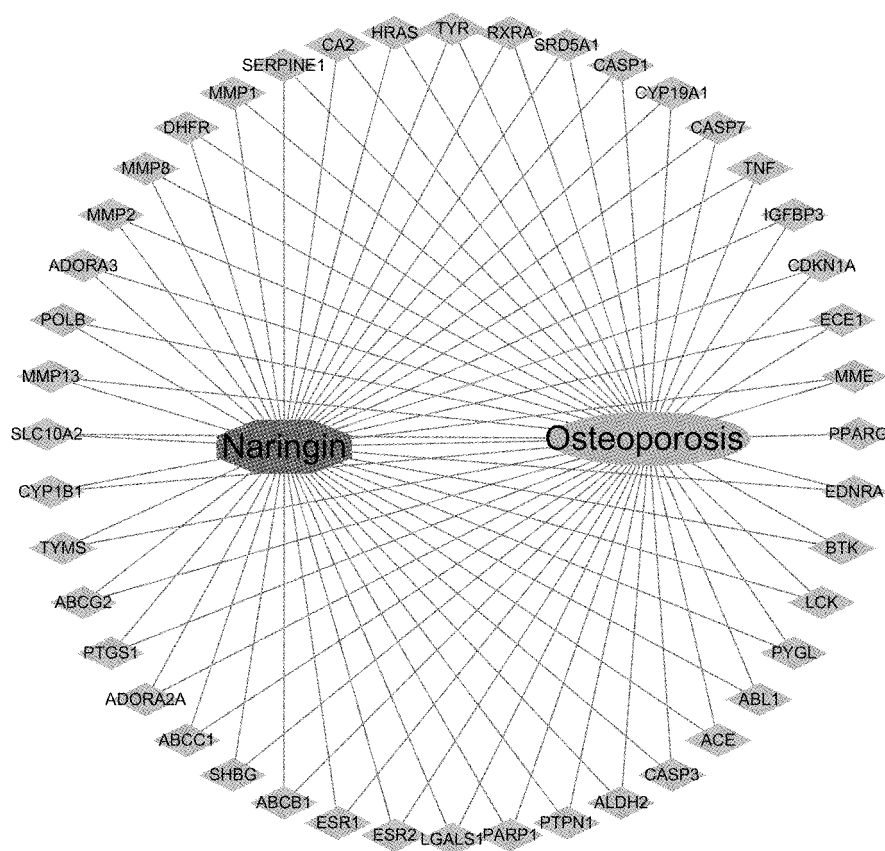


图 3 柚皮苷-交集靶标-骨质疏松网络图

Fig.3 Naringin-intersection target-osteoporosis network diagram

见图 4~图 6。此外,将 44 个靶点导入 Cytoscape 3.7.2 进行 GO 富集分析,结果主要涉及①炎症相关的,如调节炎症反应等;②细胞周期相关的,如调节

细胞增殖、分化、衰老、凋亡;③激素代谢相关的,如雄激素代谢过程,雌激素受体结合等。详见图 7。

2.6 KEGG 分析

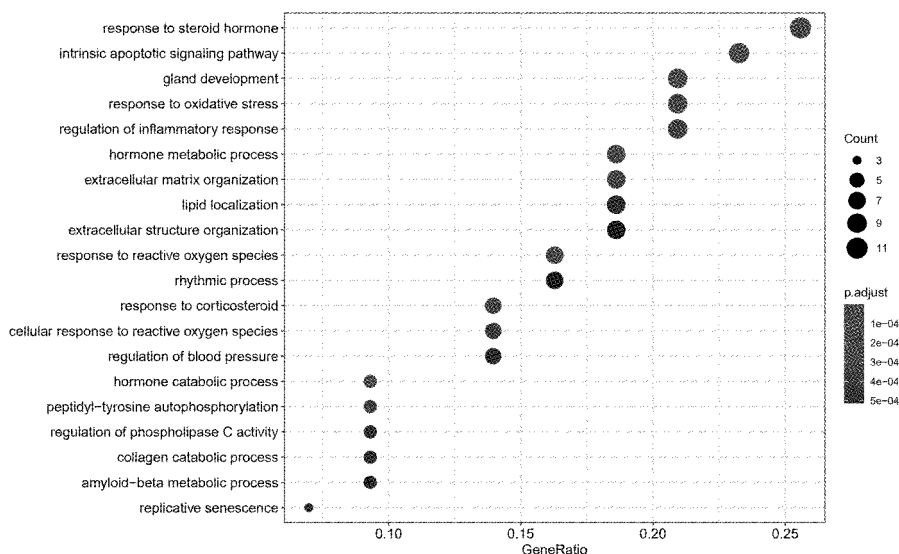


图 4 GO BP 富集分析结果

Fig.4 GO BP enrichment analysis results

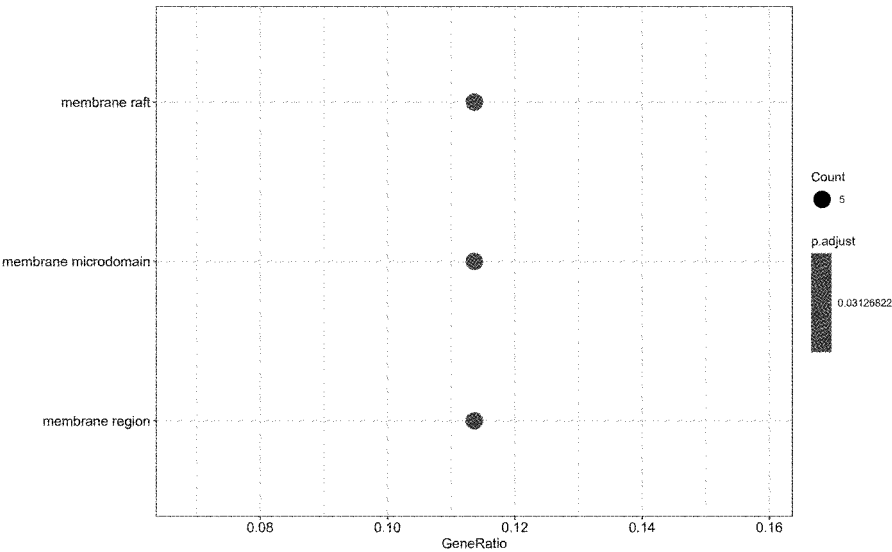


图 5 GO CC 富集分析结果
Fig.5 GO CC enrichment analysis results

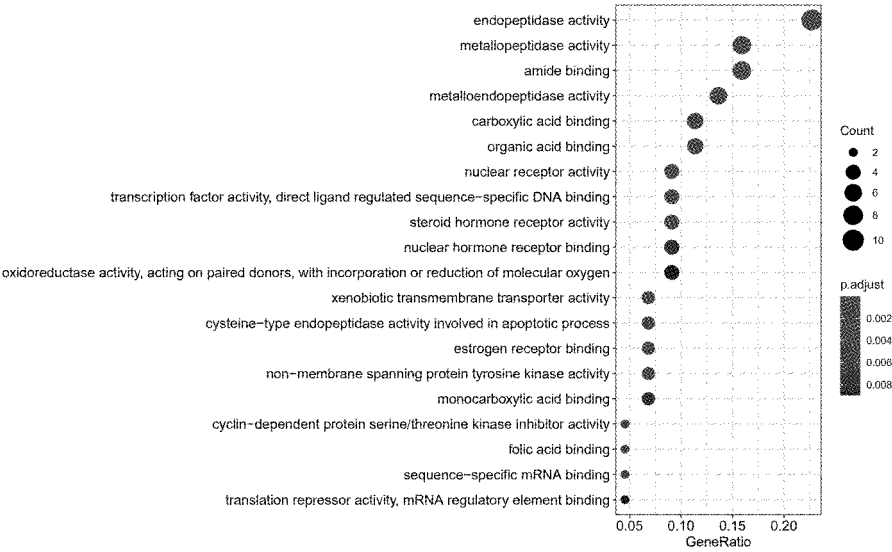


图 6 GO MF 富集分析结果
Fig.6 GO MF enrichment analysis results

使用 R 软件对 44 个靶点进行 KEGG 分析。共得到 43 个结果,相关信号通路共有 11 条,详见表 5,运用 Cytoscape 3.7.2 进行网络可视化,详见图 8,图中粉红色三角形节点代表信号通路,蓝色椭圆形节点代表基因,线条代表通路与基因之间的对应关系。

3 讨论

3.1 靶标与 PPI 网络分析

柚皮苷是中药骨碎补中活性成分含量最丰富的一类黄酮类化合物,同时也存在于柑橘类水果和许

表 5 KEGG 通路富集结果

Table 5 KEGG pathway enrichment analysis results			
ID	信号通路	富集基因数	P 值
hsa04664	AGE-RAGE 信号通路	5	0.002698
hsa04920	p53 信号通路	4	0.006173
hsa04622	IL-17 信号通路	4	0.010689
hsa04115	NF-kappa B 信号通路	4	0.013607
hsa04012	Sphingolipid 信号通路	4	0.019838
hsa04350	Relaxin 信号通路	4	0.020716
hsa04657	Fc epsilon RI 信号通路	3	0.020914
hsa04933	Estrogen 信号通路	4	0.020914
hsa04064	Prolactin 信号通路	3	0.021295
hsa04620	PPAR 信号通路	3	0.022326
hsa04630	ErbB 信号通路	3	0.027375

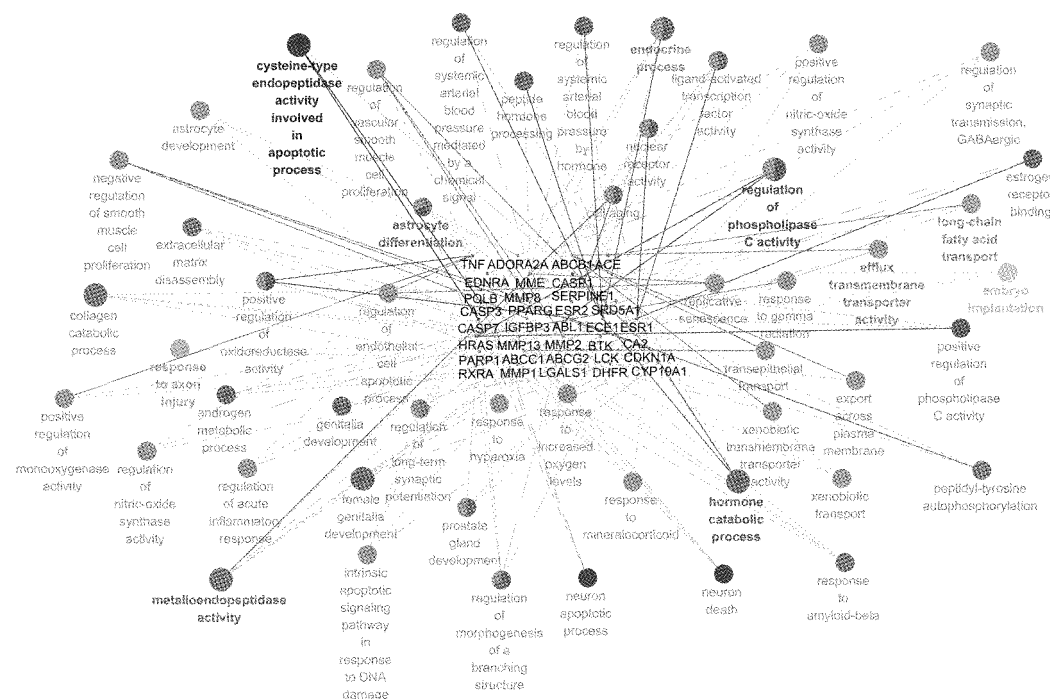


图 7 筛选后的 GO 富集分析图

Fig.7 GO enrichment analysis after screening

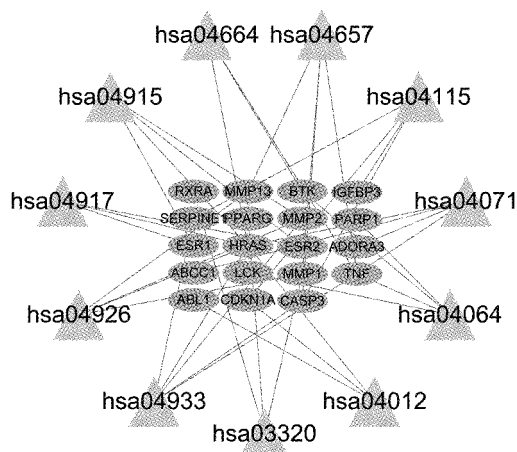


图 8 “通路-靶标”网络
Fig.8 Pathway-target network

多中药里面^[15]。现有研究表明黄酮类化合物可通过雌激素受体介导、OPG/RANK/RANKL、酶抑制作用、调节信号转导通路等机制预防 OP^[16]。

通过靶点预测得到柚皮苷作用于骨质疏松的靶点共 44 个,经 PPI 网络筛选后的核心靶标共有 18 个,主要有 TNF、CASP3、ESR1、CDKN1A 等,PPI 网络拓扑学特征以炎症反应、细胞周期调节以及激素代谢相关的蛋白居多,与 GO 富集分析结果相互印证。其中 TNF 的度值远高于其他核心靶点,推测

TNF 是柚皮苷治疗骨质疏松的关键靶点。TNF(肿瘤坏死因子),通称为 TNF- α ,是一种炎症反应相关的重要因子,可诱导巨细胞集落刺激因子(macrophagecolony-stimulating factor, M-CSF) 的表达,可通过激活 NF- κ B 启动 RANKL(NF- κ B 受体激活因子配体)诱导的破骨细胞生成,加速骨吸收发展进程,为骨质疏松症的上调基因^[17-18]。因此,笔者推测柚皮苷可以通过下调骨质疏松症患者体内 TNF- α 水平,下调 RANKL 的表达,减少破骨细胞的生成,起到防治 OP 的目的。CASP3(半胱氨酸蛋白酶 3)是度值排列第二的靶标,影响细胞凋亡过程^[19]。有研究通过实验证明 CASP3 mRNA 表达上调对治疗 OP 有促进作用^[20]。进一步的研究表明 CASP3 的上调可以激活 p53 信号通路破坏成骨细胞成熟并抑制软骨细胞分化^[21]。ESR1(雌激素受体)是度值排列第三的靶标,与骨形成代谢等具有密切关系,ESR1 与雌激素结合后,可通过调节细胞因子,影响相关信号通路,调控软骨内成骨的过程,对软骨厚度的维持、骨生长平衡有促进作用^[22]。绝经后妇女出现骨质疏松是由于体内缺乏雌激素,致使骨量丢失加速,甚至引发骨折,而 ESR1 是雌激素在细胞内发挥生理活性的作用靶点,主要表现在细胞的生长分化、衰老凋亡,由此可见 ESR1 与绝经后骨质疏松密切相关^[23]。CDKN1A(细胞周期蛋白依赖性激酶抑制因

子1A),又称为p21,能够调控细胞的增值、分化和衰老^[24]。成骨细胞数量与细胞增殖密切相关^[25],而细胞增殖周期的进程主要受到G1期调节蛋白的调控^[26]。CDKN1A(p21),作为G1期调节蛋白,能结合细胞周期素与细胞周期蛋白依赖激酶形成的复合物,使其失活^[27],导致细胞周期停滞于G1期^[28]。吴银生等^[29]研究发现,第3腰椎成骨细胞p21蛋白含量在大鼠去卵巢4、8、12、18、24周显著升高($P < 0.01$)。易显富等^[30]研究发现p21蛋白表达的下调可促进成骨细胞增殖。刘明等^[31]研究发现,新仙灵骨葆胶囊可能通过作用于p21等G1期关键调节蛋白而影响成骨细胞增殖周期,可治疗大鼠去卵巢骨质疏松症。可见,CDKN1A在成骨细胞增殖过程中发挥着关键性的作用。

此外,表3中PTGS1(COX-1)是限制前列腺素生成的一类酶,而前列腺素可以诱导M-CSF以及RANKL的表达,促进破骨细胞分化,抑制成骨细胞功能^[18]。ESR2与ESR1同为雌激素的受体,与绝经后骨质疏松相关。

故柚皮苷-交集靶标-骨质疏松网络图关联复杂,可见柚皮苷治疗骨质疏松是通过多靶点多途径之间的相互作用实现的,并且蕴含着多种潜在的治疗作用。

3.2 GO分析和KEGG分析

GO富集分析结果所反映的内容与PPI网络规律相似,与炎症反应、细胞周期调节以及激素代谢相关。而KEGG通路富集分析结果显示相关靶点基因富集于p53、IL-17、NF- κ B、Estrogen、Prolactin等信号通路,可能是柚皮苷治疗骨质疏松症的关键信号通路,KEGG通路富集分析结果反映的内容也与PPI网络拓扑学分析及GO富集分析结果规律相似。相关研究表明,p53信号通路的激活能破坏成骨细胞成熟并抑制软骨细胞分化^[21]。IL-17信号通路能够通过IL-17刺激单核细胞分化形成破骨细胞,且IL-17可以促进TNF- α 的合成,上调IL-6、NF- κ B等细胞因子的表达,促进RANKL诱导的破骨细胞形成^[32]。破骨细胞的激活依赖于RANKL与RANK的结合,进而活化NF- κ B信号通路,促进破骨细胞的分化^[33],通过下调NF- κ B信号通路,能够抑制破骨细胞分化。由此可见IL-17信号通路、NF- κ B信号通路与OPG/RANKL/RANK系统调控成骨细胞和破骨细胞的机制密切相关。据此推测IL-17信号通路与NF- κ B信号通路可能是柚皮苷治疗骨质疏松症的重要信号通路。Estrogen(雌激素)信号通

路可以汇聚Wnt信号通路、蛋白激酶通路、BMP-2信号通路等共同调控成骨细胞和破骨细胞的增殖、分化和凋亡^[34]。此外Prolactin(泌乳素)信号通路同Estrogen(雌激素)信号通路均表明柚皮苷具有雌激素调节作用,是柚皮苷可运用于绝经后OP的证据。

综上所述,我们的研究结果提示柚皮苷可能通过多靶点、多通路调节炎症反应、细胞周期、激素代谢来治疗骨质疏松。本研究所得结果与现有的骨质疏松研究结果相吻合,为后续的柚皮苷药理机制分析和实验设计提供了数据支持。

【参考文献】

- [1] 夏维波,章振林,林华,等.原发性骨质疏松症诊疗指南(2017)[J].中国骨质疏松杂志,2019,25(3):281-309.
- [2] 葛继荣,郑洪新,万小明,等.中医药防治原发性骨质疏松症专家共识(2015)[J].中国骨质疏松杂志,2015,21(9):1023-1028.
- [3] Huang R, Xu S, Li D, et al. Acupoint injection treatment for primary osteoporosis: A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials protocol[J]. Medicine (Baltimore), 2019,98(32):e16735.
- [4] Gates BJ, Das S. Management of osteoporosis in elderly men[J]. Maturitas, 2011,69(2):113-119.
- [5] 张智海,刘忠厚,李娜,等.中国人骨质疏松症诊断标准专家共识(第三稿·2014版)[J].中国骨质疏松杂志,2014,20(9):1007-1010.
- [6] 贺丽英,孙蕴,要文娟,等.2010-2016年中国老年人骨质疏松症患病率Meta分析[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(12):1590-1596.
- [7] 陈国铭,汤顺莉,黄雁,等.基于网络药理学的骨碎补“疗伤止痛,补肾强骨”作用机制初探[J].中国中医基础医学杂志,2018,24(12):1781-1785.
- [8] 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治指南(2011年)[J].中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志,2011,4(1):2-17.
- [9] 郭鱼波,王丽丽,马如凤,等.骨质疏松的中医病因病机分析及其中医药治疗的前景探讨[J].世界科学技术-中医药现代化,2015,17(4):768-772.
- [10] Wang YC, Chiang JH, Hsu HC, et al. Decreased fracture incidence with traditional Chinese medicine therapy in patients with osteoporosis: a nationwide population-based cohort study[J]. BMC Complement Altern Med, 2019,19(1):42.
- [11] Pang WY, Wang XL, Mok SK, et al. Naringin improves bone properties in ovariectomized mice and exerts oestrogen-like activities in rat osteoblast-like (UMR-106) cells[J]. Br J Pharmacol, 2010,159(8):1693-1703.
- [12] Li N, Jiang Y, Wooley PH, et al. Naringin promotes osteoblast differentiation and effectively reverses ovariectomy-associated osteoporosis[J]. J Orthop Sci, 2013,18(3):478-485.

- [13] Zhou X, Zhang P, Zhang C, et al. Promotion of bone formation by naringin in a titanium particle-induced diabetic murine calvarial osteolysis model [J]. *J Orthop Res*, 2010, 28(4): 451-456.
- [14] 李玮婕, 毛霞, 郭秋岩, 等. 网络药理学研究策略在组合药物研究中的应用[J]. *转化医学电子杂志*, 2018, 5(3): 3-16.
- [15] Pang WY, Wang XL, Mok SK, et al. Naringin improves bone properties in ovariectomized mice and exerts oestrogen-like activities in rat osteoblast-like (UMR-106) cells [J]. *Br J Pharmacol*, 2010, 159(8): 1693-1703.
- [16] 付方胜, 丁伟昕, 邵思远, 等. 黄芩素抑制 RANKL 诱导的破骨细胞分化和功能[J]. *锦州医科大学学报*, 2019, 40(2): 18-20.
- [17] 陈鹏, 李杨, 胡伟文, 等. 绝经后骨质疏松症 TNF- α 通过激活 NF- κ B 促进 RANKL 诱导的破骨细胞形成[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(2): 960-965.
- [18] Schulman RC, Weiss AJ, Mechanick JL. Nutrition, bone, and aging: an integrative physiology approach [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2011, 9(4): 184-195.
- [19] Lakhani SA, Masud A, Kuida K, et al. Caspases 3 and 7: key mediators of mitochondrial events of apoptosis [J]. *Science*, 2006, 311(5762): 847-851.
- [20] Liu WJ, Jiang ZM, Chen Y, et al. Network pharmacology approach to elucidate possible action mechanisms of Sinomeni Caulis for treating osteoporosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257: 112871.
- [21] Wu J, Yang Y, He Y, et al. EFTUD2 gene deficiency disrupts osteoblast maturation and inhibits chondrocyte differentiation via activation of the p53 signaling pathway [J]. *Hum Genomics*, 2019, 13(1): 63.
- [22] 刘海, 李林福, 施伟梅, 等. 雌激素受体在骨形成代谢中的研究进展[J]. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(7): 1656-1661.
- [23] 林思文, 王丽丽, 施剑明, 等. 骨髓间充质干细胞成骨分化中信号转导途径与雌激素受体的关系[J]. *中国老年学杂志*, 2016, 36(5): 1267-1270.
- [24] 张明霞, 郑建清, 黄碧芬. CDKN1A 基因表达状态在卵巢癌中的预后价值[J]. *吉林医学*, 2019, 40(10): 2241-2243.
- [25] 陈珺, 林思慧, 钟佳贤, 等. 护骨胶囊含药血清对成骨细胞功能的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2017, 32(12): 5558-5562.
- [26] 桂建芳. RNA 加工与细胞周期调控[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [27] Matsushime H, Roussel MF, Ashmun RA, et al. Colony-stimulating factor 1 regulates novel cyclins during the G1 phase of the cell cycle [J]. *Cell*, 1991, 65(4): 701-713.
- [28] 宋其蔓, 孙洞箫. 细胞凋亡与 p21 关系的研究进展[J]. *医学综述*, 2008, 14(6): 816-818.
- [29] 吴银生, 林燕萍, 卢天祥, 等. 去卵巢骨质疏松大鼠成骨细胞 G₁ 期调节蛋白的改变[J]. *中国组织工程研究与临床康复*, 2010, 14(15): 2675-2679.
- [30] 易显富, 张泽月, 肖敏, 等. $1\alpha, 25-(OH)_2D_3$ 对大鼠成骨细胞周期及相关蛋白表达的影响[J]. *中国热带医学*, 2013, 13(12): 1443-1445.
- [31] 刘明, 张永萍, 徐剑, 等. 新仙灵骨葆胶囊调控成骨细胞 G₁ 期调节蛋白抗骨质疏松的实验研究[J]. *中华中医药学刊*, 2018, 36(10): 2411-2413.
- [32] 张国权, 范挽亭, 陈倩仪, 等. IL-17 抗体对大鼠破骨细胞功能影响的体外研究[J]. *全科口腔医学电子杂志*, 2018, 5(12): 7-10.
- [33] 李雪, 周延民, 马珊珊, 等. RANK-RANKL-OPG 信号通路在骨重建中的分子作用机制[J]. *口腔医学研究*, 2016, 32(6): 659-662.
- [34] 李传洁, 李亚男. 雌激素通过信号通路对成骨细胞分化、成熟与凋亡的调控[J]. *口腔颌面修复学杂志*, 2013, 14(6): 361-365.

(收稿日期: 2020-04-30; 修回日期: 2020-07-15)