

· 论 著 ·

基于网络药理学和分子对接探讨补肾活血汤“从虚从瘀”治疗骨质疏松症的分子机制

岳志军¹ 姜自伟¹ 李紫阁¹ 李绍烁² 阮冠龙¹ 王睿¹ 赵京涛^{1*}

1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广东 广州 510405

2. 南京中医药大学无锡附属医院, 江苏 无锡 214071

中图分类号: R285.6; R589.5 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 04-0542-08

摘要: **目的** 采用网络药理学和分子对接技术探索补肾活血汤“从虚从瘀”治疗骨质疏松症(osteoporosis, OP)的内在分子机制。**方法** 将补肾活血汤中的药物在 TCMS、Batman-TCM、化学数据库、TCMID 数据库和知网上收集相关化学成分及作用靶点, 然后对靶点进行基因注释; 对 GeneCards 和 OMIM 数据库进行疾病相关靶点检索, 获取其对应靶点; 然后通过 Cytoscape 3.7.2 软件将药物成分、疾病及靶点的对应关系构建“中药-成分-靶点-疾病”网络可视化, 并从 String 数据库获取交集靶点数据, 构建蛋白互作网络; 利用 R 语言软件对基因进行 GO 和 KEGG 富集分析; 最后对核心化合物及靶点进行分子对接。**结果** 共获取补肾活血汤活性化合物 171 种, 共筛选出 11 个核心成分, 预测出对应靶点 166 个; OP 相关靶点 1335 个, 两者的交集基因共 54 个; 利用 PPI 蛋白网络共筛选到 13 个核心靶点蛋白; GO 和 KEGG 富集分析分别得到 279 个、63 个富集结果; 分子对接结果显示补肾活血汤治疗骨质疏松过程中, 其核心化合物豆甾醇与 MAPK1、PPARG 以及 β -谷甾醇与 PPARG 具有良好的结合性能。**结论** 补肾活血汤通过营养支持、免疫调节和抗炎、损伤修复等方面发挥其重要作用, 通过网络药理学和分子对接阐释了其“从虚从瘀”治疗骨质疏松的内在分子机制。

关键词: 骨质疏松; 从虚从瘀; 网络药理学; 分子对接

Based on network pharmacology and molecular docking to explore the molecular mechanism of Bushen Huoxue Decoction “from deficiency and stasis” in the treatment of osteoporosisYUE Zhijun¹, JIANG Ziwei¹, LI Zige¹, LI Shaosuo², RUAN Guanlong¹, WANG Rui¹, ZHAO Jingtao^{1*}

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

2. Wuxi Affiliated Hospital of Nanjing University of Traditional Chinese Medicine, Wuxi 214071, China

* Corresponding author; ZHAO Jingtao, Email: 13922182520@139.com

Abstract: **Objective** To explore the internal molecular mechanism of Bushen Huoxue Decoction “from deficiency to stasis” in the treatment of osteoporosis (OP) by network pharmacology and molecular docking technology. **Methods** The related chemical components and targets of Bushenhuoxue Decoction were collected from tcmsp, Batman TCM, chemical database, tcmid database and HowNet, and then the target was annotated with gene; the disease-related targets were retrieved from geencards and OMIM databases to obtain the corresponding targets; and then, used Cytoscape 3.7.2 software to visualize the corresponding relationship between drug components, diseases and targets to construct a “traditional Chinese medicine component target disease” network, and obtained the intersection target data from string database to construct protein interaction network; used R language software to analyze gene enrichment of go and KEGG; finally, molecular docking was carried out for core compounds and targets. **Results** A total of 171 active compounds of Bushen Huoxue Decoction were obtained, 11 core components were screened out, 166 corresponding targets were predicted; 1335 OP related targets, 54 genes were intersected; 13 core target proteins were screened by PPI protein network; 279 and 63 enrichment result were obtained by go and KEGG enrichment analysis; molecular docking result showed that the core compounds stigmasterol and mapk1, PPARG and β -sitosterol had good binding properties with PPARG in the treatment of osteoporosis. **Conclusion** Bushen Huoxue Decoction plays an important role in nutritional support, immune

* 通信作者: 赵京涛, Email: 13922182520@139.com

regulation, anti-inflammatory, damage repair and other aspects. Through network pharmacology and molecular docking, it explains the internal molecular mechanism of “from deficiency to blood stasis” in the treatment of osteoporosis.

Key words: osteoporosis; deficiency and stasis; network pharmacology; molecular docking

骨质疏松症是临床上的常见病,其特点以骨量降低、骨组织结构异常、导致骨脆性增加、继发骨折的危险性增加为特征的骨骼疾病^[1]。由于人口老龄化,骨质疏松症以及其导致的骨折发病率居高不下。西医治疗 OP 的药物常包括骨吸收抑制剂、骨形成促进剂、骨矿化药物以及新近报道的药物等^[2]。但是西药治疗 OP 仍然有很多缺陷,常会出现服药后不良反应,不少抗 OP 药会导致患者不耐受,此外还有一些药物对于治疗 OP 的疗效不明确^[3]。近年来,随着中医药自身的不断发展,保持自身内涵的同时结合现代科技,中医对骨质疏松症的研究日益增多,中医药理论治疗 OP 有效性的研究不断被挖掘,凸显中医治疗 OP 的优势,并取得了一定的成果^[4]。

中医理论中无骨质疏松的病名,按照其症状及相关临床特点可以将其归纳于“骨痿”、“虚劳”、“骨痹”等范畴^[5]。肝肾亏虚,筋脉不利是骨痿的基本病机^[6]。肝肾不足会导致气滞血瘀,并且气滞血瘀也会导致肝肾亏虚,因此老年骨质疏松症患者通常具有肝肾不足兼气滞血瘀的特征。“补肾强筋,活血化瘀”是中医药治疗骨痿病症的重要原则,目前多数实验及临床研究已经证实^[7-9],补肾活血汤在促进骨折愈合、提高骨密度及改善骨代谢水平等方面疗效显著,但其内在成分众多,分子间作用关系十分复杂,致使其微观作用机制缺乏全面、系统的阐述,需要进一步探讨。

本研究将《伤科大全》里面的经典名方补肾活血汤^[10-12]进行网络药理学和分子对接,挖掘补肾活血汤抗骨质疏松的关键靶点和通路,探索关键化合物与关键靶点的分子对接,揭示补肾活血汤“从虚从瘀”治疗 OP 的内在分子机理,为临床抗骨质疏松发挥中医药特色提供科学指导方案。

1 材料和方法

1.1 补肾活血汤化合物及靶点预测

通过 TCMSP 数据库分别对补肾活血汤中的中药“熟地”、“菟丝子”、“杜仲”、“枸杞”、“山萸肉”、“肉苁蓉”以及“当归”、“红花”、“没药”、“独活”进行检索,按 ADME 原则(口服利用度 $\geq 30\%$,类药性 ≥ 0.18)^[13-14]进行筛选,获得其化合物,并预测其对应

靶点;根据 Uniprot 数据库,进行基因注释,规范对应靶点信息。对未检索到的中药“补骨脂”,分别从 BATM-TCM 数据库、化学数据库、TCMID 数据库以及知网中查询相关化合物,然后通过 PubChem 数据库获取化合物的 2D 结构,导入 Swiss ADME 得到其 SMILES,同样根据 ADME 原则进行筛选,对筛选出的化合物通过 Swiss Target Prediction 数据库进行预测,获取其对应靶点。

1.2 骨质疏松症的疾病靶点收集

以“osteoporosis”为关键词,分别从 Gene Cards、OMIM 数据库搜索相关的作用靶点,对收集到的疾病靶点进行整合、去重,预测出疾病相关靶点,获取相应的基因标准名。利用韦恩图在线制作网站 Draw Venn Diagram,获取药物与靶点交集基因数目,绘制出韦恩图。

1.3 构建“中药-化合物-靶点-疾病”可视化网络

将中药、活性成分、靶点、疾病相关数据导入 Cytoscape 3.7.2 软件,使用“Network Analyzer”功能获得其拓扑学参数,构建“中药-化合物-靶点-疾病”网络,然后根据“Degree”值筛选出核心化合物。

1.4 蛋白互作网络(PPI)的构建

将 1.3 中获得的交集基因导入蛋白互作平台 String 数据库,导出其蛋白间相互作用数据至 Cytoscape 3.7.2 进行网络可视化分析,获得蛋白互作网络的拓扑学参数。

1.5 基因本体(GO)和京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析

使用 R 软件及其后台数据库“org.Hs.eg.db”获取潜在作用靶点的基因 ID;再利用“DOSE”、“cluster Profiler”、“path view”程序包对这些潜在作用靶点进行 GO 和 KEGG 富集分析;GO 功能富集分析包括三个方面的内容:生物学过程富集分析(biological process, BP)、细胞组成富集分析(cellular component, CC)、分子功能富集分析(molecular function, MF),设定 p value Cutoff = 0.05, q value Cutoff = 0.05;将每一类按照显著性进行排序,把排在 GO 功能富集分析前 10 和 KEGG 富集分析前 30 的富集条目通过柱状图和气泡图的形式进行可视化展示。

1.6 分子对接

为进一步明确补肾活血汤“从虚从瘀”治疗 OP 的内在分子机制,将 1.3 和 1.4 中筛选出的核心化合物和关键靶点进行分子对接。通过 pubchem 网站检索获取核心化合物的 3D 结构,下载 SDF 文件并利用 Open Babel 2.3.2 软件将 SDF 文件转化为 PDB 文件,从 Protein Data Bank 数据库中检索获得受体,利用 PYMOL 2.3.4 软件对受体进行去水、去配体等操作,采用 Autodock 4.2.6 软件对受体进行加氢以及计算电荷处理,设置受体对接格点参数将小分子配体可能结合的活性口袋位点进行包含,并将受体和配体分别转化为 pdbqt 格式,利用 Auto Dock Vina 1.1.2 对受体与配体分别进行分子对接,对接后获取其构象。

2 结果

2.1 补肾活血汤活性成分筛选和对应靶点预测

在 TCMSP 数据库中共筛选出 162 种化合物,并预测出 2 568 个活性靶点,经整理去重获得 146 个对应靶点;补骨脂的化学成分共 148 个,得到 9 种活性化合物,预测出 56 个活性靶点,整理去重获得 29 个对应靶点。最终补肾活血汤共获得 171 种化合物,其中当归 2 个、熟地 2 个、独活 9 个、杜仲 24 个、枸杞 40 个、红花 17 个、没药 43 个、肉苁蓉 6 个、山茱萸 17 个、菟丝子 10 个、补骨脂 9 个,中药之间共有成分有 11 个,分别为 beta-sitosterol、quercetin、stigmasterol、kaempferol、CLR、yangambin、beta-carotene、Mandenol、Ethyl linolenate、poriferast-5-en-3beta-ol、sitosterol。将补骨脂与其余 10 种中药的对应的靶点合并去除重复,共收集到 166 种活性靶点。

2.2 疾病靶点的搜集

通过 Gene Cards、OMIM 数据库检索到与“osteoporosis”相关靶标 1 335 个。将补肾活血汤与 OP 中的靶标取交集共获得 54 个交集基因,见图 1。分别为 PON1、JUN、NOS2、ESR1、AR、PPARG、PTGS2、CA2、PGR、SLC6A4、ESR2、NR3C1、DPP4、RXRA、NR3C2、TNFSF15、MMP1、SELE、VCAM1、CYP3A4、HMOX1、GSTM1、DRD2、ODC1、MMP2、IL6、MAPK1、CTSD、CCL2、IL1B、MPO、F3、SOD1、TP63、COL1A1、EGF、VEGFA、POR、COL3A1、RB1、IL-2、MMP3、CASP7、MMP13、MMP8、APP、CYCS、G6PD、EHHADH、CYP19A1、AKT1、HTR2A、HTR2C、ESRRA。

2.3 “中药-成分-靶点-疾病”可视化网络分析

通过 Cytoscape 3.7.2 软件构建“中药-成分-靶

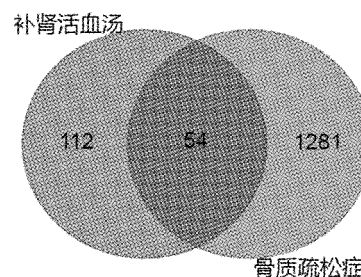


图 1 补肾活血汤与 OP 的交集基因

Fig. 1 The intersection gene of Bushen Huoxue decoction and osteoporosis

点-疾病”可视化网络,将网络中各个节点及边的数据进行网络拓扑分析,如图 2,其中红色代表疾病,蓝色代表中药,绿色代表靶点,紫色代表有效成分。共得到 207 个节点,其中包括疾病节点 1 个、中药节点 11 个、活性化合物节点 141 个、疾病与药物共有

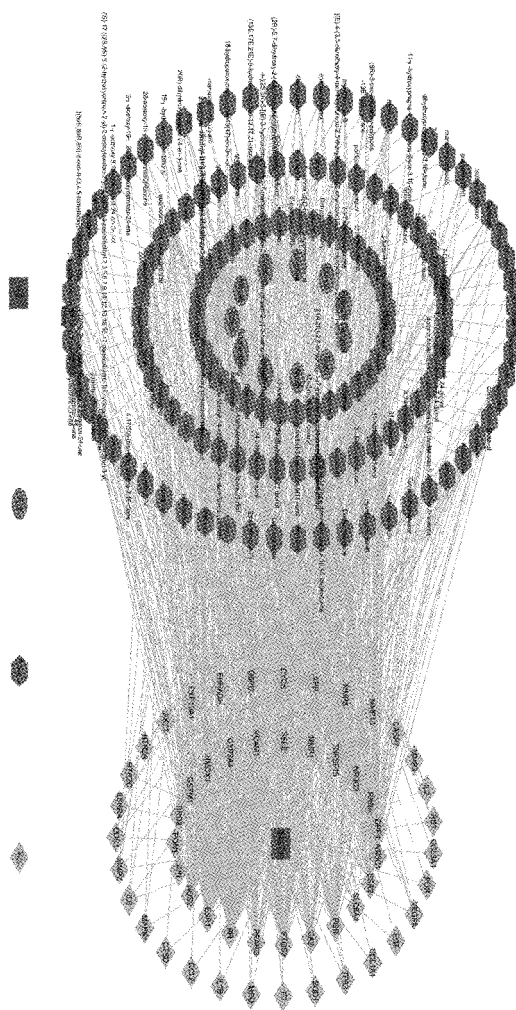


图 2 “中药-成分-靶点-疾病”可视化网络

Fig. 2 “Chinese medicine-component-target-disease” visualization network

靶点 54 个和 975 条边。其中“Degree”和“Closeness”是对网络中节点重要性的描述,两者值越大,表示该节点越重要。以“Degree”值的中位数进行筛选,筛选出大于平均数的化合物作为核心化合物。共筛选出 11 个核心成分,其中前 5 个分别为槲皮素、木犀草素、山奈酚、 β -谷甾醇、豆甾醇。表示以上成分可能为治疗 OP 的重要成分。

2.4 补肾活血汤治疗骨质疏松症的作用靶点蛋白互作网络

利用 String 数据库对药物与疾病共同作用的靶点进行分析,将分析结果导入 Cytoscape 3.7.2 进行

PPI 可视化网络构建,并对蛋白互作靶点前 30 的关键靶点展示,如图 3~图 4。其中节点表示蛋白质,边表示蛋白质之间的结合的关系。“Degree”值越大,表示该蛋白在网络中的重要性越大,图形越大,颜色越深;边越粗,颜色也越深,表示蛋白与蛋白相互作用关系越紧密。利用“Degree”值中位数逐步进行筛选,获取其核心靶点,共筛选到 13 个核心靶点蛋白,分别为 AKT1、IL6、VEGFA、JUN、EGF、PTGS2、CCL2、MAPK1、IL1B、CYCS、MMP2、ESR1、PPARG。表明补肾活血汤通过多靶点发挥抗炎、免疫调节、血管形成等达到抗 OP 的作用。

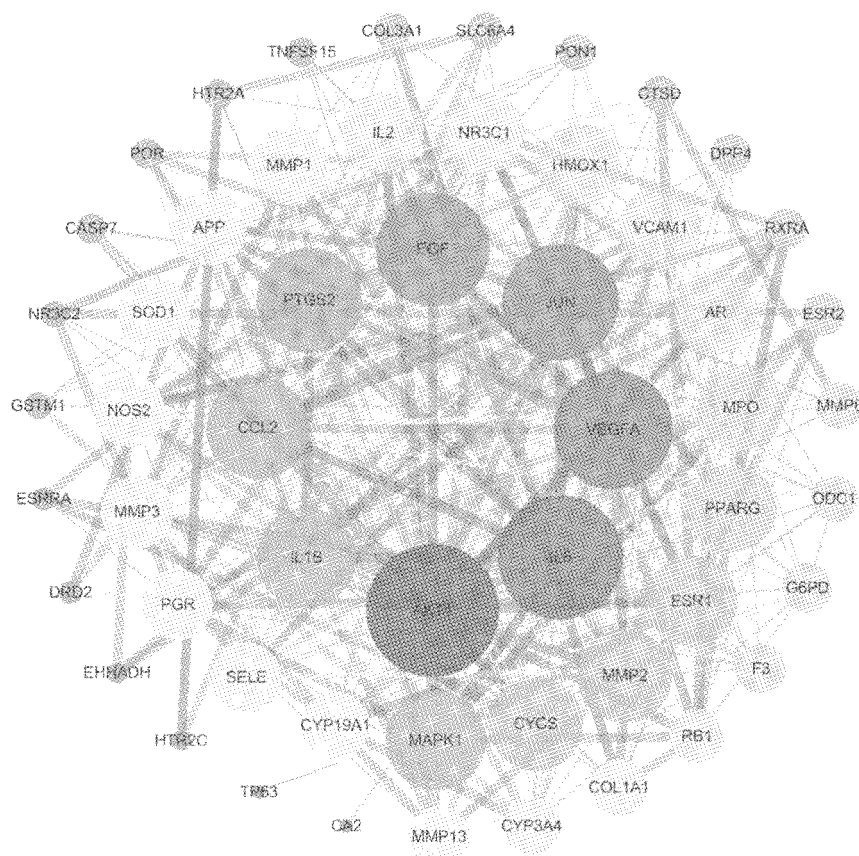


图 3 补肾活血汤治疗 OP 的蛋白互作网络

Fig.3 The protein interaction network of Bushen Huoxue Decoction in the treatment of OP

2.5 GO 和 KEGG 富集分析

利用 R 语言统计软件对富集结果使用柱状图和气泡图进行展示。GO 功能富集分析共得到 279 个富集结果,其中 BP、CC、MF 分别有 198、35、46 个富集结果。对排名前 10 的条目进行柱状图展示,如图 5。其中 BP 中涉及最高的是营养水平、类固醇激素、腺体发育等,CC 主要聚集于膜筏、膜微区、膜区等区域,MF 主要集中在类固醇激素受体活性、内肽

酶活性、核受体活性等,预测补肾活血汤主要通过以上生物学过程中发挥抗 OP 的作用。KEGG 通路富集分析共有 63 个富集结果,并对其中前 30 条信号通路进行富集展示,其中 AGE-RAGR、TNF、IL17、HIF-1 等信号通路可能与抗 OP 相关,表明补肾活血汤在抗炎、维持细胞内稳态和修复及再生损伤组织等方面发挥重要作用。如图 6。

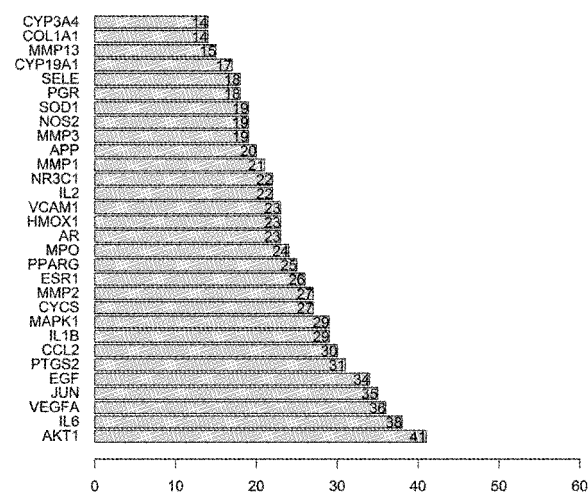


图 4 PPI 网络中前 30 关键靶点柱状图

Fig.4 Histogram of the top 30 key targets in the PPI network

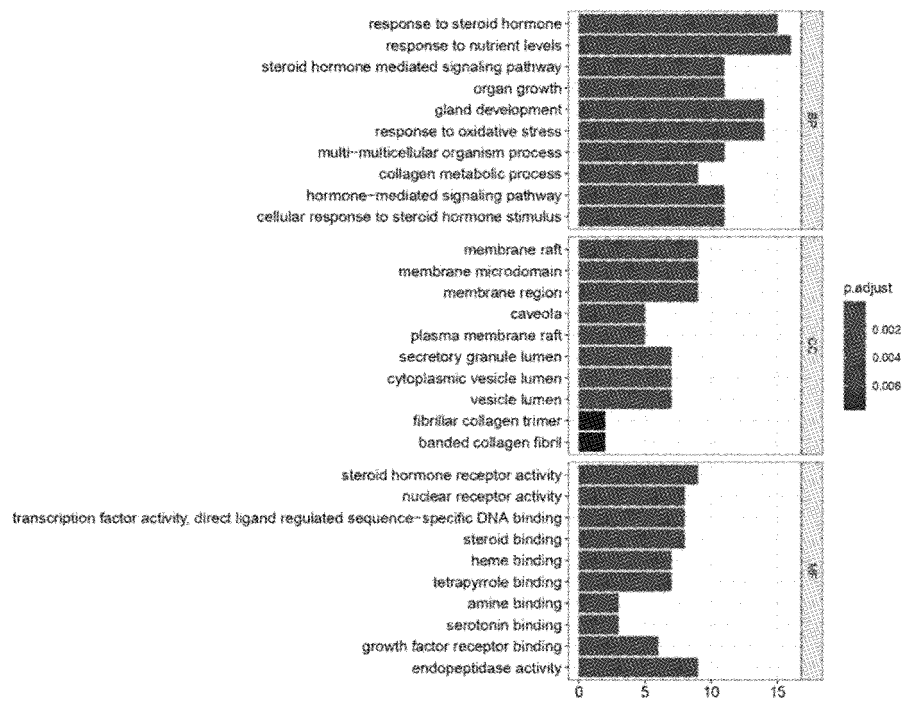


图 5 GO 功能富集分析

Fig.5 GO function enrichment analysis

2.6 分子对接

为进一步明确补肾活血汤治疗 OP 的关键靶标与活性成分之间的结合效能,本研究选取排名前 5 的活性化合物与核心靶标进行分子对接,分子对接结合能打分及对接参数如表 1 所示,结合能越低,说明分子与靶点蛋白结合越稳定,分别取 stigmasterol

和 MAPK1、stigmasterol 和 PPARG、beta-sitosterol 和 PPARG 对接构象进行作图分析,如图 7。表明补肾活血汤中的 β -谷甾醇、豆甾醇主要与 MAPK1 和 PPARG 具有良好的结合力,能够充分发挥抗 OP 的作用。

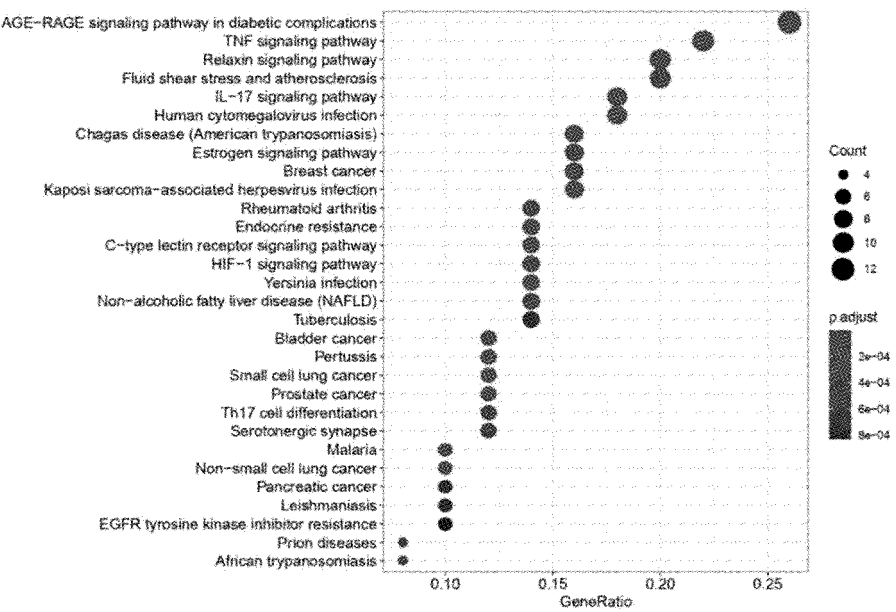


图 6 KEGG 通路富集分析
Fig.6 KEGG pathway enrichment analysis

表 1 关键化合物与关键靶点分子对接结合能打分及对接参数

Table 1 Docking and binding energy scores and docking parameters of key compounds and key target molecules

蛋白质	网格大小	对接分数/(kcal/mol)				
		beta-sitosterol	kaempferol	luteolin	quercetin	stigmasterol
AKT1	40×40×40	-9.1	-8.0	-8.0	-8.7	-9.5
CYCS	40×40×40	-6.7	-7.3	-7.5	-7.8	-6.3
ESR1	42×44×44	-7.9	-9.0	-9.0	-9.2	-8.0
IL1B	40×40×40	-7.4	-7.7	-7.7	-7.7	-7.6
IL6	42×42×42	-7.4	-7.4	-7.4	-7.3	-7.4
JUN	40×40×40	-5.2	-4.6	-4.7	-4.8	-5.5
MAPK1	40×40×40	-9.2	-8.1	-8.1	-8.0	-9.7
MMP2	40×40×40	-6.5	-8.5	-8.6	-8.7	-6.9
PPARG	40×40×40	-9.7	-8.3	-8.3	-8.3	-9.7

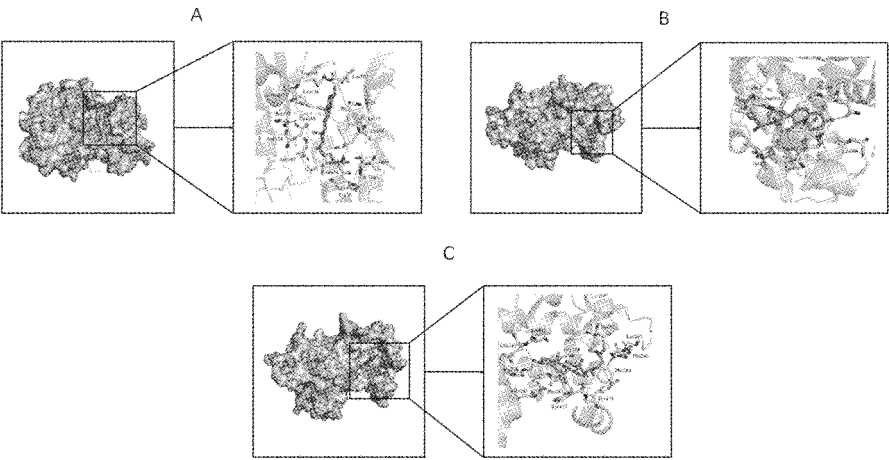


图 7 补肾活血汤核心化合物治疗 OP 的 3 个核心靶点的对接结果
Fig.7 Docking results of the three core targets of Bushen Huoxue Decoction in the treatment of OP

3 讨论

补肾活血汤具有补肾壮筋,活血止痛之功效,主治肝肾亏损,筋骨失养之骨痿。方中熟地、杜仲、菟丝子、补骨脂、枸杞子、山茱萸、肉苁蓉补益肝肾,填补精血,强壮筋骨;配以归尾、红花、独活、没药活血化瘀止痛,疏通筋脉,全方滋补肾精之中兼有化瘀之力。

本研究利用网络药理学和分子对接,探讨补肾活血汤治疗 OP 的分子机制。根据“中药-成分-靶点-疾病”网络显示的 11 个核心成分,大多具有抗炎、免疫调节、抗氧化等作用。 β -谷甾醇和豆甾醇在抗氧化、抗高血脂、抗炎、免疫调节、抗肿瘤等方面表现出良好的药理作用^[15-16]。槲皮素和山奈酚具有多种生物学活性,它具有抗氧化及清除自由基的作用,还具有抗炎、抗病毒、抗肿瘤、降糖等作用^[17-18]。

通过构建蛋白互作网络,共显示 13 种治疗 OP 的核心靶点,其中 VEGFA 对于 OP 的发生起着重要作用,其作用于内皮细胞,能够增加毛细血管的通透性,促进局部血管的生成^[19]。此外,VEGFA 还能通过调控骨髓间充质干细胞发挥抗 OP 的作用。研究表明,VEGFA 能够促进 BMSCs 的增殖和分化,同时还增加骨钙蛋白(BGP)和新生血管的数量^[20],预测 VEGFA 在骨骼血管化过程中与抗 OP 有关。而且在 OP 老鼠模型当中,补肾活血中药能够显著提高 mRNA 表达量,还能够显著提高 VEGF 蛋白表达水平,对肾虚血瘀骨代谢失常而导致的骨质疏松能够发挥抗 OP 的作用^[21]。这可能与补肾活血汤“从虚”治疗骨质疏松关系密切,客观上达到“补肾壮骨”的目的。IL-6 可以作用于成骨细胞,促使其分泌作用于机体,参与机体病理性骨量丢失的发生发展过程。研究发现,随着年龄的增长,骨质疏松的情况越突出,IL-6 的水平也相应的增加^[22],表明 IL-6 与骨质疏松的严重程度呈正相关。动物性研究也表明,去卵巢大鼠表现为 IL-6 水平与大鼠腰椎、关节骨密度均呈明显负相关^[23]。由此推论,补肾活血汤中活性成分通过调控 IL-6 发挥抗炎作用来改善骨质疏松的发生发展过程。

GO 和 KEGG 结果显示,补肾活血汤通过多种生物学过程以及多信号通路参与治疗 OP 的过程。晚期糖基化终产物受体(RAGE),是一种多配体受体,能够与多种配体相结合 RAGE 存在于许多类型细胞中,其参与了炎症消退、细胞内稳态的维持和损伤后的修复及再生等过程^[24]。在骨质疏松过程中,

RAGE 的数量会明显上调,此外其还参与调节骨代谢过程^[25]。研究发现,AGEs 与 sRAGE 水平的升高与老年男性髋部骨折发生率的增加有关,并与骨质减少和骨质疏松的发生显著相关^[26]。在成骨细胞中,AGE 和 RAGE 的组合可激活 Raf/MEK/ERK 信号传导途径,降低成骨细胞活性并导致 veslin-1 和 LC3B 介导的自噬激活^[27]。可以推测出补肾活血汤“从瘀”治疗骨质疏松与调节 AGE-RAGE 通路的关系密切。

根据成分靶点网络筛选出的核心成分与蛋白互作网络筛选出的靶点进行分子对接,stigmasterol 和 MAPK1、PPARG, beta-sitosterol 和 PPARG 之间结合能分数最低,容易结合成稳定的构象。这表明这些成分与 OP 的治疗具有重要作用,可将这些成分用于探索治疗 OP 作为研究方向。本研究主要通过网络药理学和分子对接来阐述补肾活血汤抗 OP 的内在机制,未进行实验验证研究,需要进一步从实验角度探索本研究结果。

本研究利用网络药理学和分子对接技术,阐述补肾活血汤“从虚从瘀”治疗骨质疏松的活性成分、关键靶点和相互作用机制。补肾活血汤对骨质疏松的治疗体现了多靶点、多成分、多通路的作用特点,为阐述中医药理论提供了科学的解释,为进一步探讨补肾活血汤治疗 OP 奠定了基础。

【 参 考 文 献 】

- [1] Bijlsma AY, Meskers CG, Westendorp RG, et al. Chronology of age-related disease definitions: osteoporosis and sarcopenia[J]. Ageing Res Rev, 2012, 11(2):320-324.
- [2] 李章青, 向楠, 周广文, 等. 骨质疏松症的西医研究进展[J]. 湖北民族大学学报(医学版), 2020, 37(1):79-81.
- [3] Klop C, Welsing PM, Elders PJ, et al. Long-term persistence with anti-osteoporosis drugs after fracture[J]. Osteoporos Int, 2015, 26(6):1831-1840.
- [4] 梁伟乔, 钟诚, 李宇明. 骨质疏松症的中医病因病机认识与治疗进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(1):135-139.
- [5] 郑斌, 阮国辉, 嵇辉. 中医辨治骨质疏松症研究进展[J]. 江苏中医药, 2018, 50(7):78-81.
- [6] 史红霞, 卫荣. 补肾活血中药治疗绝经后妇女骨质疏松症的研究进展[J]. 新疆中医药, 2016, 34(5):106-109.
- [7] 胡流超, 罗毅文, 程英雄, 等. 补肾活血汤通过 Runx2/Osterix 促进骨质疏松模型大鼠的骨折愈合[J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(11):1717-1722.
- [8] 曾叶明. 补肾活血汤治疗肾虚血瘀型老年骨质疏松症临床观察[J]. 新中医, 2017, 49(2):84-86.

(下转第 584 页)

- [19] Clegg A, Young J, Iliffe S, et al. Frailty in elderly people[J]. *Lancet*, 2013, 381(9868): 752-762.
- [20] Brauer CA, Coca-Perrillon M, Cutler DM, et al. Incidence and mortality of hip fractures in the United States[J]. *JAMA*, 2009, 302(14): 1573-1579.
- [21] Arakaki H, Owan I, Kudoh H, et al. Epidemiology of hip fractures in Okinawa, Japan[J]. *J Bone Miner Metabol*, 2011, 29(3): 309-314.
- [22] Löfman O, Berglund K, Larsson L, et al. Changes in hip fracture epidemiology: redistribution between ages, genders and fracture types[J]. *Osteoporos Int*, 2002, 13(1): 18-25.
- [23] Zhu Y, Xing X, Liu S, et al. Epidemiology of low-energy wrist, hip, and spine fractures in Chinese populations 50 years or older: A national population-based survey[J]. *Medicine*, 2020, 99(5): e18531.
- [24] Shao CJ, Hsieh YH, Tsai CH, et al. A nationwide seven-year trend of hip fractures in the elderly population of Taiwan[J]. *Bone*, 2009, 44(1): 125-129.
- [25] Tian FM, Sun XX, Liu JY, et al. Unparallel gender-specific changes in the incidence of hip fractures in Tangshan, China[J]. *Arch Osteoporos*, 2017, 12(1): 18.
- [26] Imai N, Endo N, Shobugawa Y, et al. A decrease in the number and incidence of osteoporotic hip fractures among elderly individuals in Niigata, Japan, from 2010 to 2015[J]. *J Bone Miner Metab*, 2018, 36(5): 573-579.
- [27] Hansen L, Petersen KD, Eriksen SA, et al. Subsequent fracture rates in a nationwide population-based cohort study with a 10-year perspective[J]. *Osteoporos Int*, 2015, 26(2): 513-519.
- [28] Yan L, Zhou B, Prentice A, et al. Epidemiological study of hip fracture in Shenyang, People's Republic of China [J]. *Bone*, 1999, 24(2): 151-155.
- [29] Wang J, Wang Y, Liu WD, et al. Hip fractures in Hefei, China: the Hefei osteoporosis project[J]. *J Bone Miner Metabol*, 2014, 32(2): 206-214.
- [30] Chen M, Zhang Y, Du Y, et al. Epidemiological and clinical study of hip fracture in hospitalized elderly patients in Shanghai, China[J]. *Arch Osteoporos*, 2019, 14(1): 37.
- [31] 王培文, 李毅中, 林金矿, 等. 闽南地区部分脆性腕部骨折的发病特点及治疗现状[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(7): 888-893, 898.
- [32] Nancollas GH, Tang R, Phipps RJ, et al. Novel insights into actions of bisphosphonates on bone: Differences in interactions with hydroxyapatite[J]. *Bone*, 2006, 38(5): 617-627.
- [33] Grønskaag Anna Brenne, Forsmo Siri, Romundstad Pål, et al. Incidence and seasonal variation in hip fracture incidence among elderly women in Norway. The HUNT Study[J]. *Bone*, 2010, 46(5): 1294-1298.
- [34] 马仲峰, 冯国英, 齐明. 北京市东部地区髋部骨折发病特点及防治研究[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(4): 554-559.

(收稿日期: 2020-05-06; 修回日期: 2020-06-09)

(上接第 548 页)

- [9] 胡正刚, 山俊松. 补肾活血汤联合骨化三醇治疗骨质疏松性骨折的疗效及对患者骨密度、骨代谢的影响[J]. *四川中医*, 2020, 38(2): 151-154.
- [10] 焦可欣. 补肾活血汤加减治疗老年股骨转子间骨折临床研究[J]. *河南中医*, 2019, 39(1): 66-69.
- [11] 袁韩涛, 李四波. 补肾活血汤对骨质疏松性股骨颈骨折术后愈合的临床疗效观察[J]. *广州中医药大学学报*, 2020, 37(4): 612-616.
- [12] 黄俊才. 补肾活血汤治疗老年骨质疏松性桡骨远端骨折的临床疗效[J]. *内蒙古中医药*, 2017, 36(15): 14-15.
- [13] Paine MF, Shen DD, Kunze KL, et al. First-pass metabolism of midazolam by the human intestine[J]. *Clin Pharmacol Ther*, 1996, 60(1): 14-24.
- [14] Walters WP, Mureko MA. Prediction of 'drug-likeness'[J]. *Adv Drug Deliv Rev*, 2002, 54(3): 255-271.
- [15] 刘威良, 姬昱, 黄艾祥. β -谷甾醇的研究及开发进展[J]. *农产品加工*, 2019(01): 77-79, 82.
- [16] 汪帅, 孙宇, 李春梅, 等. 豆甾醇的研究进展概述[J]. *中国药业*, 2019, 28(23): 96-98.
- [17] 雷晓青, 陈鳌, 刘毅, 等. 山茶酚药理作用的研究进展[J]. *微量元素与健康研究*, 2017, 34(2): 61-62.
- [18] 刘晟文, 刘建英. 槲皮素药理学作用的研究进展[J]. *中华肺部疾病杂志(电子版)*, 2020, 13(1): 104-106.
- [19] Herzog DP, Dohle E, Bischoff I, et al. Cell communication in a coculture system consisting of outgrowth endothelial cells and primary osteoblasts[J]. *Biomed Res Int*, 2014, 2014: 320123.
- [20] Feng L, Wu H, Wang D, et al. Effects of vascular endothelial growth factor 165 on bone tissue engineering[J]. *PLoS One*, 2013, 8(12): e82945.
- [21] 孙宇, 邓洋洋, 孙鑫, 等. 补肾、活血复方对骨质疏松症模型大鼠 VEGF 表达的影响[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(9): 1096-1100.
- [22] 方秀统, 李洋, 于方, 等. 白细胞介素-6 在老年骨质疏松发病机制中的作用[J]. *中国老年学杂志*, 2014, 34(24): 6917-6919.
- [23] 邱奕雁, 朱峰, 蓝涛, 等. IL-6, IL-1 β 及 TNF- α 与大鼠骨质疏松形成的关系[J]. *现代生物医学进展*, 2016, 16(18): 3448-3451.
- [24] Sorci G, Riuzzi F, Giambanco I, et al. RAGE in tissue homeostasis, repair and regeneration[J]. *Biochim Biophys Acta*, 2013, 1833(1): 101-109.
- [25] Rojas A, Morales M, Gonzalez I, et al. Inhibition of RAGE axis signaling: a pharmacological challenge[J]. *Curr Drug Targets*, 2019, 20(3): 340-346.
- [26] Lamb LS, Alfonso H, Norman PE, et al. Advanced glycation end products and esRAGE are associated with bone turnover and incidence of hip fracture in older men[J]. *J Clin Endocrinol Metab*, 2018, 103(11): 4224-4231.
- [27] 许南, 杨鑫, 任莉荣, 等. RAGE 及相关信号通路在骨生物学中的研究进展[J]. *世界最新医学信息文摘*, 2019, 19(98): 38-40.

(收稿日期: 2020-05-23; 修回日期: 2020-07-27)