

· 论 著 ·

生信分析肾虚型绝经后骨质疏松症分子机制及熟地黄靶向治疗

韩林静¹ 吴克亮¹ 王宏波² 肖庆华² 张震² 朱建宗² 林晓生^{2*}

1. 广州中医药大学, 广东 广州 510405

2. 深圳市中西医结合医院, 广东 深圳 518104

中图分类号: R274.9 文献标识码: A 文章编号: 1006-7108(2021) 04-0549-08

摘要: **目的** 基于生信数据挖掘探究肾虚型绝经后骨质疏松症的病理机制及熟地黄的治疗靶点。**方法** 通过 GEO 数据库挖掘阴虚型绝经后骨质疏松症患者差异表达基因, 运用 GeneCards 及 OMIM 数据库预测骨质疏松症相关基因, 采用 R 软件对阴虚靶点与骨质疏松靶点映射匹配。借助 String 数据库在线平台进行蛋白互作网络构建。分子对接预测熟地黄治疗阴虚型骨质疏松症的靶点。采用 DAVID 数据库进行生物过程及通路注释。**结果** 通过分析得到差异表达基因 1 272 个, 骨质疏松症靶点 662 个, 阴虚型骨质疏松症相关靶点 45 个, 主要涉及细胞凋亡调节、雌激素应答、骨骼肌系统发育等生物过程, 并由 PI3K-Akt、Wnt 信号通路、MAPK 信号通路、卵巢类固醇生成等信号通路调节。熟地 2 种有效成分能够作用于核心蛋白 IGF1、VEGFA 等。**结论** 熟地黄可能靶向 IGF1、VEGFA 等核心蛋白, 通过 PI3K-Akt、MAPK 等信号通路调节细胞凋亡及雌激素应答过程, 从而实现防治阴虚型骨质疏松症的疗效。

关键词: 骨质疏松症; 熟地黄; 肾虚; 绝经后; 通路; 病理机制

Bioinformatics analysis of molecular mechanism of postmenopausal osteoporosis with kidney-yin deficiency and targeting of Rehmanniae

HAN Linjing¹, WU Keliang¹, WANG Hongbo², XIAO Qinghua², ZHANG Zhen², ZHU Jianzong², LIN Xiaosheng^{2*}

1. Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510405, China

2. Shenzhen Integrative Medicine Hospital, Shenzhen 518104, China

* Corresponding author: LIN Xiaosheng, E-mail: Lxshengtc@126.com

Abstract: **Objective** To explore the pathological mechanism of postmenopausal osteoporosis of kidney-yin deficiency and the therapeutic target of Rehmanniae by bio-information data analysis. **Methods** The differentially expressed genes in postmenopausal osteoporosis patients with yin deficiency were analysed in GEO database. GeneCards and OMIM database were used to predict osteoporosis-related genes, and R software was used to map a Venn diagram of yin deficiency and osteoporosis matching. Use the String database online platform for protein interaction network construction. Molecular docking predicts the targets of Rehmanniae in the treatment of osteoporosis of yin deficiency. Use the DAVID database to annotate biological processes and pathways. **Results** Through analysis, 1272 differentially expressed genes, 662 osteoporosis related targets, and 45 yin deficiency osteoporosis related targets were obtained, mainly involving biological processes such as apoptosis regulation, estrogen response, and skeletal system development. It was regulated by PI3K-Akt, Wnt signaling pathway, MAPK signaling pathway, Ovarian steroidogenesis and some other signaling pathways. The two active ingredients of Rehmanniae could act on the hub proteins IGF1, VEGFA, etc. **Conclusion** Rehmanniae can target hub proteins such as IGF1 and VEGFA, regulate the apoptosis and estrogen response via PI3K-Akt, MAPK signaling pathway and some other signaling pathways, so as to achieve the effect of preventing and treating yin deficiency osteoporosis. **Key words:** osteoporosis; Rehmanniae; kidney-yin deficiency; postmenopausal; pathway; pathological mechanism

基金项目: 广东省中医药局面上科研项目 (20191292, 20201298); 深圳市科技创新委员会研究项目 (JCYJ20180302144355408, JCYJ20190808100818959)。

* 通信作者: 林晓生, Email: Lxshengtc@126.com。

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是以骨量减少、骨微结构退变、骨密度降低,引起骨脆性增加,易发骨折为特征的全身性代谢性骨病^[1]。其发病率与年龄呈正相关关系^[2],随着老龄化的加剧,OP 在世界范围内已经成为继心血管疾病、糖尿病之后第三大发病率的慢性疾病。据相关研究报道,我国 40 岁以上人群 OP 发病率约为 25 %^[3],并预计到 2050 年,我国 OP 患者将达到 2.12 亿^[4]。因此,骨质疏松症的有效预防与治疗已成为当务之急。

中医认为 OP 的发生主要与肾虚、脾虚、血瘀有关,其发生的根本病因是肾虚。2019 年骨痿指南推荐将绝经后骨质疏松症 (postmenopausal osteoporosis, PMOP) 分为脾肾阳虚、肝肾阴虚、肾虚血瘀 3 种证型,并认为肝肾阴虚型最为常见^[5]。根据相关统计^[6],在治疗阴虚型骨质疏松症的组方中,熟地黄的使用频次位列补肾阴药物的首位,是治疗肾阴虚型骨质疏松症的最基础药物。熟地黄性味甘、微温,归肝肾经,具有补血养阴,填精益髓的功效。《本经逢源》记载“熟地,藉酒蒸晒,转苦为甘,性凉变温,为阴中之阳,故能补肾中元气”。《本草纲目》有云:“填骨髓,长肌肉,生精血,补五脏”,治

“男子五劳七伤”。实验研究也证实,熟地黄能够调节糖尿病大鼠的碱性磷酸酶活性和骨钙素水平,增加骨矿物质密度,改善骨微结构^[7]。体外细胞实验提示,熟地黄提取物梓醇能够增加成骨细胞 MC3T3-E1 的增殖及分化能力^[8]。但是熟地黄调节骨代谢,改善骨密度,治疗 OP 的机制仍然不是十分明确。因此,研究熟地黄抗 OP 的机制,对其进一步开发及利用具有重要意义。

计算机虚拟分子对接技术就是模拟配体 (药物) 寻找与受体 (蛋白) 合适活性位点并结合的过程。分子对接技术为新药的研发及筛选带来了极大的便利,可以节约因合成化合物、进行生物活性测试等过程时间,提高效率。分子对接技术还可以代替大量的正交试验,对研究样本进行初步筛选,进行样本优化,减少人力、物力、时间的投入,且结果与正交试验基本一致^[9]。对中药及其处方研究具有重要意义,是阐述中药作用机制的重要工具。

1 材料和方法

1.1 设计方案

方案设计见图 1。

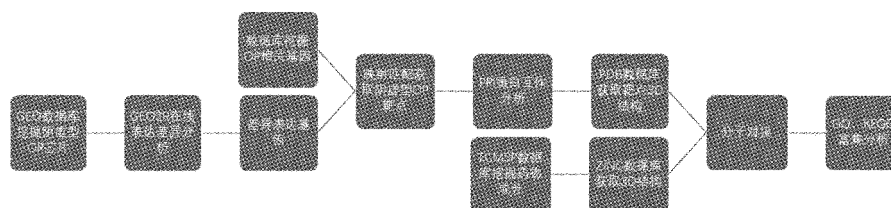


图 1 方案设计图

Fig.1 Scheme design drawing

1.2 芯片检索及差异表达分析

通过美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information, NCBI) 的 GEO 数据库,按照“osteoporosis”、“kidney yin deficiency”进行搜索,筛选物种为人的基因表达芯片,并使用在线分析软件 GEO2R 进行在线差异表达分析 (选择系统默认推荐设置),将分析结果保存为文本文件备用,运用 Origin2019b 64Bit 版绘制差异表达火山图。

1.3 获取阴虚型 OP 靶点

通过 GeneCards (<https://www.genecards.org>) 及 OMIM 在线数据库 (<https://www.omim.org>),输入“Osteoporosis”进行检索与骨质疏松症相关的基因,设置关联分数 (relevance score) ≥ 5 ,结果与 2.1 差异基因运用 R 软件进行映射匹配,得到肾阴虚型 OP 的靶点基因。

1.4 蛋白互作 (PPI) 网络建立

将 2.2 获得蛋白输入 STRING 数据库 (<http://string-db.org/cgi/input.pl>, Version11.0),设置物种为人类 (Homo sapiens) 进行构建,设置可信度为中等可信 (medium confidence),隐藏未连接的节点,其他参数保持数据库系统推荐设置,进行蛋白互作分析,获取蛋白互作关系网络,按照连接度值 (Degree) 确定前 10 位为核心蛋白。

1.5 熟地黄有效成分获取

中药药理学系统数据库 TCMSP (traditional Chinese medicine system pharmacology, <http://tcmispw.com/tcmisp.php>) 搜索熟地黄的化学成分,按口服利用度 (oral bioavailability, OB) ≥ 30 及类药性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 进行筛选^[10]。

1.6 蛋白及小分子结构文件获取

通过 PDB (protein data bank, <http://www.rcsb.org/>) 数据库获取核心靶点蛋白 3D 结构, 保存为 pdb 文件; ZINC (<http://zinc.docking.org/>) 数据库获取 2.4 药物小分子 3D 结构, 保存为 mol2 文件。

1.7 计算机分子对接

运用 AUTODOCK 4.2 及其工具 MGLTools-1.5.6 软件进行分子对接, 对所有对象先进行加氢, 计算电荷; 在 Docking 模块设置蛋白大分子对接方式为刚性 (Rigid), 将获取 3D 结构的蛋白逐一与药物小分子进行计算机分子对接, 并且以结合能 (binding energy) ≤ -5.0 kJ/mol^[11] 作为对接成功标准, 分析熟地有效成分发挥作用的靶点。

1.8 GO 生物过程及 KEGG 通路富集分析

将肾阴虚型绝经后骨质疏松症的靶点基因输入到数据库 DAVID (<https://david.ncifcrf.gov/home.jsp>, Version 6.8), 选择物种为人类 (Homo sapiens) 进行 GO 生物过程和 KEGG 信号通路富集, 分析阴虚型 PMOP 的生物过程及主要信号通路, 探讨阴虚型 PMOP 的病理机制。

2 结果

2.1 差异表达基因

按照检索词在 GEO 数据库进行检索, 最终得到福建省中医药研究院研究团队共享的肾阴虚型绝经后骨质疏松症的基因表达芯片 (GEO 编号: GSE56116)。对其在线分析结果以 $\log_2 FC = 1$ (差异 2 倍以上), $P < 0.05$ 为条件, 运用 Origin2019b 64Bit 版对差异表达结果进行火山图绘制, 结果显示与正常对照组相比, 肾阴虚型 OP 患者血液中低表达的基因有 725 个, 高表达的有 675 个 (见图 2)。

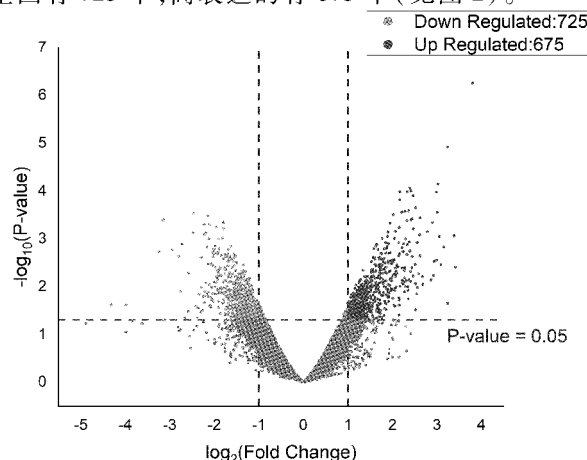


图 2 差异表达基因火山图

Fig.2 Volcano diagram of differentially expressed genes

2.2 阴虚型 OP 靶点

运用 R 软件中的韦恩图绘制包 (Venn Diagram) 对 2.1 差异表达基因与 GeneCards、OMIM 数据库获取的 OP 相关基因匹配映射, 去除重复, 共得到肾阴虚型 PMOP 靶点基因 45 个, 见图 3。

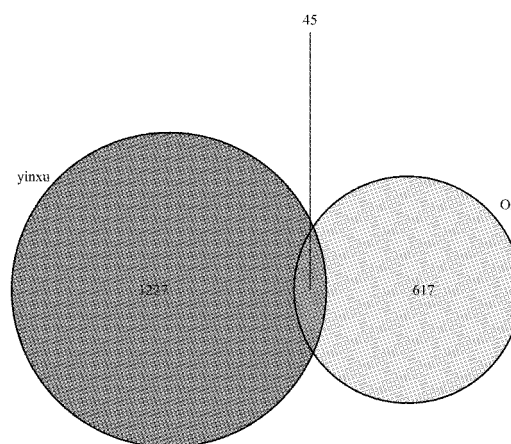


图 3 阴虚靶点与 OP 靶点匹配维恩图

Fig.3 Venn diagram of the targets of yin-deficiency and OP matching

2.3 PPI 蛋白互作

将 45 个阴虚型 OP 靶点基因导入 string 数据库, 在线绘制互作网络图, 隐藏未连接的靶点, 得到蛋白互作网络, 见图 4。通过 PDB 数据库获得连接度值前十的基因编码蛋白结构文件 (表 1)。

表 1 蛋白编码信息

Table 1 Protein coding information

编号	基因名	度值	PDB 编号
1	IGF1	19	6RVA
2	VEGFA	17	1MKG
3	ADIPOQ	11	6U66
4	APOB	11	3VM8
5	CCND1	11	2W9F
6	IL2	11	4NEJ
7	IL4	11	2B8Z
8	GPT	9	4TRC
9	ESR2	8	2FSZ
10	BMP15	7	6BTN

2.4 熟地黄活性成分及结构

按条件筛选获得熟地黄活性成分 2 种, 分别为谷甾醇 (sitosterol)、豆甾醇 (stigmasterol), ZINC 数据库获取两者的 3D 结构见图 5。

2.5 对接结果

将 PDB 数据库中获取的 10 个核心蛋白逐一与两个小分子进行对接, 按照标准 sitosterol、stigmasterol 对接成功的分别有 9 种、10 种, 结果见

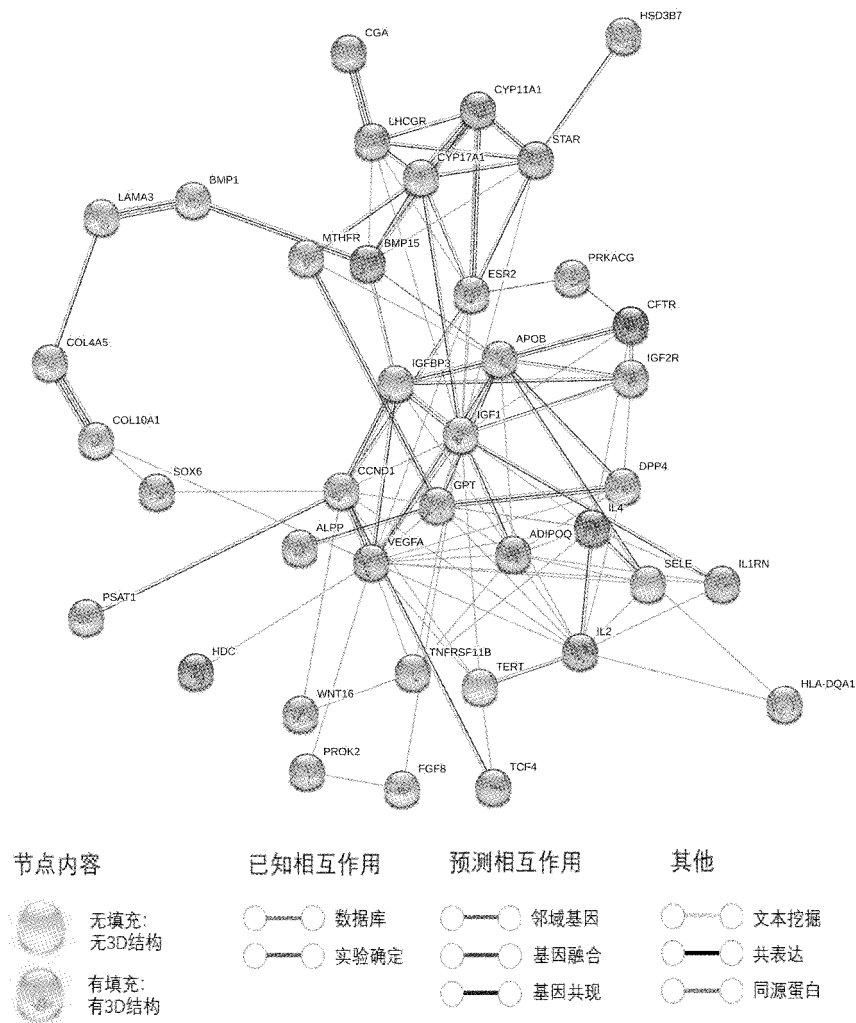
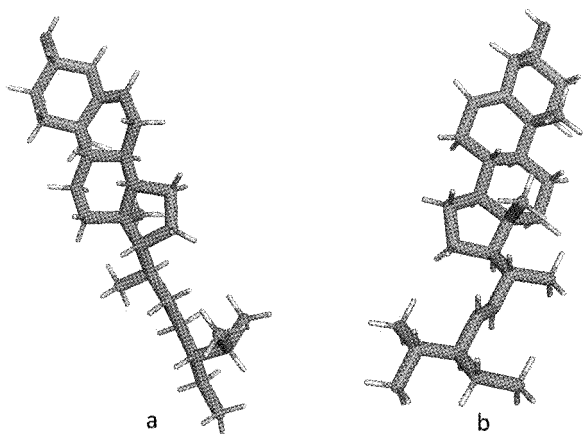


图 4 PPI 网络
Fig.4 Network of PPI



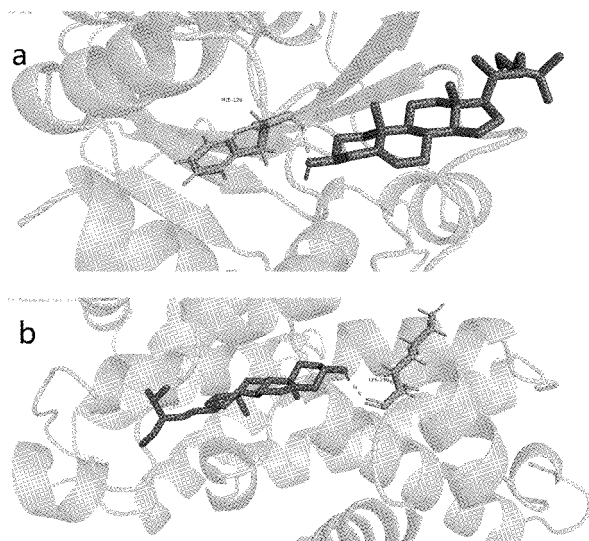
注: a 为 sitosterol(ZINC4095717); b 为 stigmasterol(ZINC4096712)。

图 5 药物的 3D 结构
Fig.5 3D structure of active ingredients

表 2; sitosterol 与 APOB 结合能最高为 - 7.53 kJ/mol,并能够形成氢键,见图 5a。stigmasterol 与 CCND1 结合能最高为-6.44 kJ/mol,形成共价氢键,见图 5b。

表 2 对接结果

基因名	对接结果 (kJ/mol)	
	sitosterol	stigmasterol
IGF1	-5.53	-5.19
VEGFA	-6.1	-5.42
ADIPOQ	-6.35	-5.93
APOB	-7.53	-5.78
CCND1	-5.95	-6.44
IL2	-5.11	-6.20
IL4	-5.82	-5.37
GPT	-6.51	-5.61
ESR2	-4.52	-5.88
BMP15	-5.17	-5.72



注:a:sitosterol 与 APOB 对接结果;b:stigmasterol 与 CCND1 对接结果。图中绿色表示蛋白结构,蓝色表示蛋白氨基酸残基,红色表示药物小分子,黄色表示形成的氢键,黑色数值表示形成氢键的氨基酸残基序号。

图 6 结合能最高的对接结果

Fig.6 Docking results with the highest binding energy of ingredients

2.6 富集结果

将肾阴虚型 PMOP 基因导入到 DAVID 数据库进行在线富集分析,GO 富集见图 6,结果显示 GO 生物学过程 (biological process, GO-BP) 参与骨骼肌

系统发育、雌激素应答、细胞凋亡过程调节等;细胞组分 (cellular component, GO-CC) 有细胞外基质、内质网、胰岛素样生长因子复合体等;分子功能 (molecular function, GO-MF) 配受体活性、配受体结合、生长因子受体结合等。KEGG 通路富集见表 3,富集的通路有卵巢类固醇生成、Wnt 信号通路、PI3K-Akt、Jak-STAT 等信号通路。

3 讨论

基因表达谱芯片 (GSE56116) 原始资料共含有 10 个研究对象的血液样本,其中有 4 个为阴虚型绝经后骨质疏松症患者血液样本,3 个为阳虚型 (未纳入分析),3 个健康研究对象样本。以健康者基因表达为对照,分析阴虚型绝经后骨质疏松症患者血液样本差异表达基因,将过表达或者低表达的基因于骨质疏松相关基因进行映射匹配,结果可能就是阴虚型 PMOP 相关的靶基因,通过对靶基因分析,得出阴虚型 PMOP 的病理机制。

PPI 蛋白互作网络显示,IGF1、VEGFA 的连接度值最高,位于网络的中心位置,为阴虚型 OP 发生机制的关键基因。雌激素应答、细胞凋亡过程调节等是细胞的主要生物学过程,该过程主要由 PI3K/Akt 信号通路、MAPK 信号通路、Jak-STAT 信号通路等调节。IGF1 (胰岛素样生长因子 1) 是 PI3K/Akt

表 3 KEGG 通路富集结果

Table 3 Results of KEGG pathway enrichment

ID	通路	P 值	基因
hsa04913	Ovarian steroidogenesis	7.62E-09	BMP15, CYP11A1, CYP17A1, IGF1, LHCGR, PRKACG, STAR
hsa04151	PI3K-Akt signaling pathway	7.59E-05	CCND1, COL4A5, FGF8, IGF1, IL2, IL4, LAMA3, VEGFA
hsa04934	Cushing's syndrome	7.59E-05	CCND1, CYP11A1, CYP17A1, PRKACG, STAR, WNT16
hsa04927	Cortisol synthesis and secretion	0.00048	CYP11A1, CYP17A1, PRKACG, STAR
hsa01522	Endocrine resistance	0.0014	CCND1, ESR2, IGF1, PRKACG
hsa04933	AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	0.0014	CCND1, COL4A5, SELE, VEGFA
hsa04152	AMPK signaling pathway	0.002	ADIPOQ, CCND1, CFTR, IGF1
hsa04115	p53 signaling pathway	0.005	CCND1, IGF1, IGF1BP3
hsa04211	Longevity regulating pathway	0.0094	ADIPOQ, IGF1, PRKACG
hsa04658	Th1 and Th2 cell differentiation	0.0094	HLA-DQA1, IL2, IL4
hsa04974	Protein digestion and absorption	0.0094	COL10A1, COL4A5, DPP4
hsa04659	Th17 cell differentiation	0.0112	HLA-DQA1, IL2, IL4
hsa04014	Ras signaling pathway	0.0117	FGF8, IGF1, PRKACG, VEGFA
hsa04060	Cytokine-cytokine receptor interaction	0.017	IL2, IL4, TNFRSF11B, VEGFA
hsa04310	Wnt signaling pathway	0.0204	CCND1, PRKACG, WNT16
hsa04010	MAPK signaling pathway	0.0205	FGF8, IGF1, PRKACG, VEGFA
hsa04630	Jak-STAT signaling pathway	0.0245	CCND1, IL2, IL4
hsa04015	Rap1 signaling pathway	0.0392	FGF8, IGF1, VEGFA
hsa05323	Rheumatoid arthritis	0.0483	HLA-DQA1, VEGFA
hsa04917	Prolactin signaling pathway	0.00058	CCND1, CYP17A1, ESR2, LHCGR

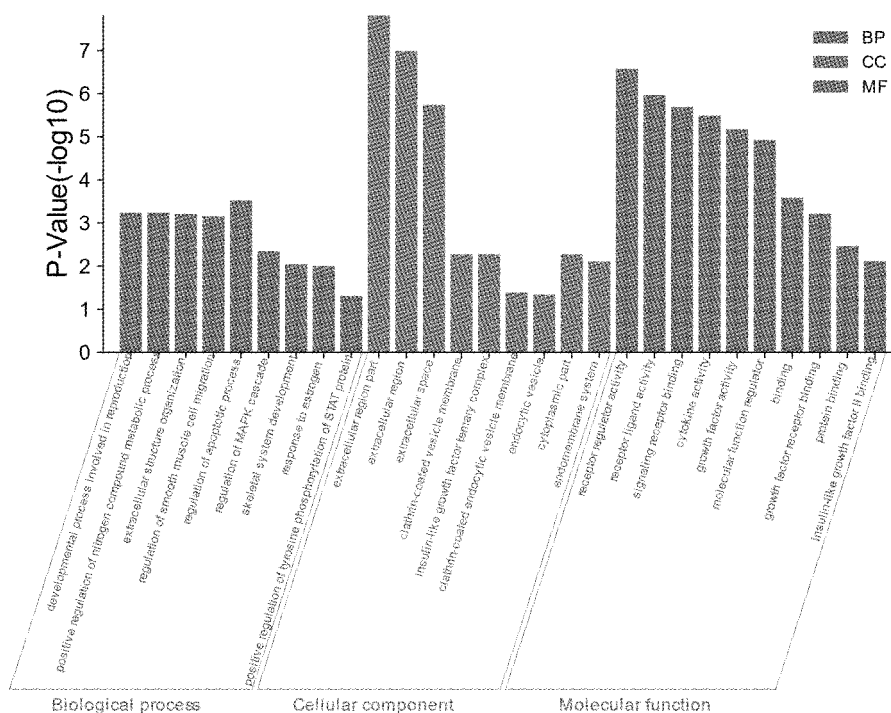


图 7 GO 富集结果

Fig.7 Results of GO enrichment

信号通路的激活剂, IGF1 可以激活 PI3K^[12]。PI3K 激活后并促进下游靶蛋白 Akt 的激活, Akt 是一种丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶, 活化的 Akt 可以继续作用于下游凋亡靶蛋白^[13], 影响细胞凋亡相关蛋白 (Bcl2、Bax) 活性, 调节细胞凋亡^[14]。雌激素的应答过程主要有 MAPK、Ras、Rap1 等信号通路调节。外界因素作用于鸟苷酸交换因子上 (SOS、C3G 等), 信号则转导至小分子 GTP 结合蛋白 (Ras, Rap1)^[15], 后者再激活级联中的核心单位, 包括一个 MAPKKK (Raf)、一个 MAPKK (MEK1/2) 和 MAPK (Erk)^[16]。激活的 Erk 二聚物可在胞质中调控靶蛋白, 也可转运入胞核, 在核内磷酸化多种调控基因表达的转录因子^[17]。而且不同生物过程中的调控通路是相互影响的^[18] (见图 8)。因此, 肾阴虚型骨质疏松症的病理机制可能是上述通路调节的细胞凋亡、雌激素应答等过程。

本研究共获得两种熟地黄的有效成分, sitosterol (谷甾醇)、stigmasterol (豆甾醇)。10 个分子对接成功结果中, 谷甾醇与 APOB (载脂蛋白 B) 形成氢键紧密结合。肿瘤骨转移患者血清 APOB 升高, APOA1 降低, APOA1/APOB 比值降低, 糖脂代谢紊乱^[19]。APOB 是低密度脂蛋白 (LDL) 及极低密度脂蛋白的转运载体, 能够促进细胞对胆固醇及 LDL

的吸收^[20], 成骨细胞中脂质的积累会抑制其骨形成的活性, 骨髓干细胞脂肪形成的增加, 还可诱导破骨细胞分化, 造成骨量流失^[21]。另外, 谷甾醇在肠道中的吸收与 APOB 水平相关, 这种关系是正向的^[22]。谷甾醇可以调节 IGF1 的表达, 动物实验^[23]中, 植物雌激素环境中 (sitosterol), 虹鳟肝脏内 IGF1 的 mRNA 的表达明显下调。豆甾醇与 CCND1 (细胞周期蛋白 D1) 编码的蛋白结合最为紧密, 且蛋白 A 链的 238 号氨基酸残基上与药物形成一个氢键。CCND1 是细胞周期的正调节蛋白, 参与了细胞增殖、分化和细胞凋亡等过程。阿吉木^[24]报道 Wnt/ β -catenin 信号通路能够靶向 CCND1, 促进 MG63 骨肉瘤细胞的增殖及分化, 此研究也应证了通路富集结果。豆甾醇可以调控大鼠 VEGFA 蛋白表达, $(4.34 \pm 1.64) \mu\text{g/mL}$ 牛蒡子^[25]的乙醇提取物 (主要成分为谷甾醇及豆甾醇) 可以降低大鼠 VEGFA (血管内皮生长因子 A) 的表达, 抗血管生成。普遍认为 VEGFA 能够促进新生血管形成, 促进骨修复^[26]。但近来也有研究表明, 过表达 VEGFA 对促进骨髓间充质干细胞成骨分化并无益处^[27]。因此, 有待进一步研究证实。

综上所述, 肾阴虚型绝经后骨质疏松症的发生机制可能与 PI3K/Akt 信号通路、MAPK 信号通路、

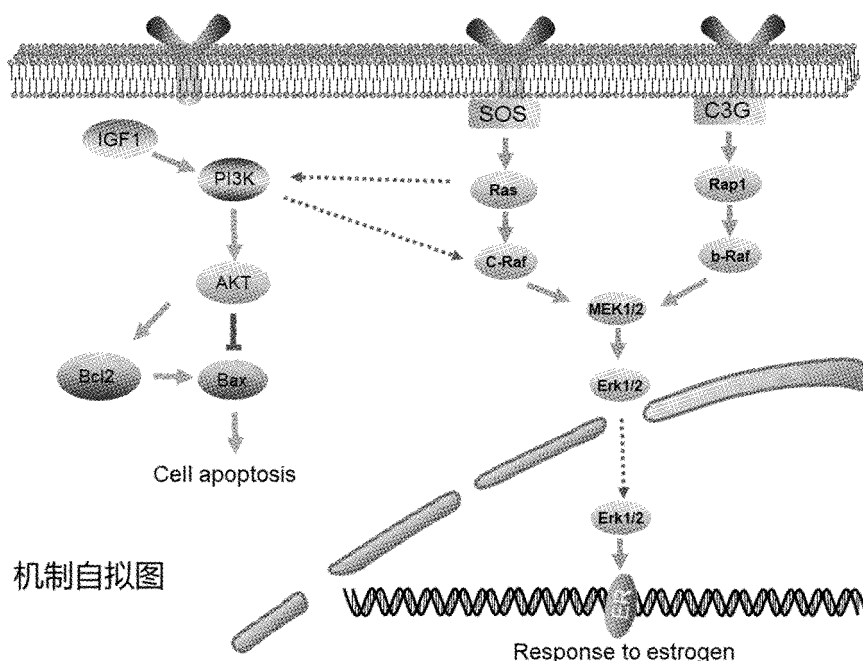


图 8 预测机制图

Fig.8 Potential mechanism diagram

Ras 信号通路、Rap1 信号通路调节的细胞凋亡及雌激素应答有关。熟地黄治疗肾阴虚型绝经后骨质疏松症的机制可能是其有效成分作用于 IGF1、VEGFA、APOB 等靶蛋白,而发挥药效作用。本研究不足之处在于,通过分子对接预测药物有效成分作用靶蛋白,尚缺乏在骨质疏松领域的直接证据,有待进一步验证。

【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] 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.
- [3] 张智海,张智若,刘忠厚,等.中国大陆地区以-2.0SD 为诊断标准的骨质疏松症发病率回顾性研究[J].中国骨质疏松杂志,2016,22(1):1-8.
- [4] Xiao L, Dan X, Yi-Qun P, et al. Epidemiology and management of osteoporosis in the People's Republic of China: current perspectives[J]. Clin Interv Aging, 2015,10:1017-1033.
- [5] 史晓林,王和鸣,高毅,等.绝经后骨质疏松症(骨痿)中医药诊疗指南(2019 年版)[J].中国骨质疏松杂志(网络首发),2019-11-26.
- [6] 宋敏,刘涛,巩彦龙,等.基于中医传承辅助平台系统的骨质疏松症组方用药规律分析[J].中国骨质疏松杂志,2017,23(4):519-523.
- [7] Gong W, Zhang N, Cheng G, et al. Rehmannia glutinosa libosch extracts prevent bone loss and architectural deterioration and enhance osteoblastic bone formation by regulating the IGF-1/PI3K/mTOR pathway in streptozotocin-induced diabetic rats[J]. Int J Mol Sci, 2019,20(16):3964.
- [8] 武密山,赵素芝,李恩,等.地黄活性成分梓醇对小鼠成骨细胞 MC3T3-E1 增殖、分化和矿化的影响[J].中国药理学通报,2010,26(4):509-513.
- [9] 涂瑶生,孙冬梅,陈玉兴,等.中药新药筛选新技术及实践[J].世界科学技术-中医药现代化,2014,16(8):1696-1702.
- [10] Xu X, Zhang W, Huang C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability[J]. Int J Mol Sci, 2012,13(6):6964-6982.
- [11] 曹灿,崔瑛,楚玉玺,等.基于网络药理学与分子对接方法的疏风解毒胶囊治疗新型冠状病毒肺炎(COVID-19)的作用机制与活性成分研究[J].中草药,2020,51(9):2283-2296.
- [12] Xie X, Xiong G, Chen W, et al. FOXD3 inhibits cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma through regulation of the PI3K/Akt pathway[J]. Biochem Cell Biol, 2020,98(6):653-660.
- [13] Hers I, Vincent EE, Tavaré JM. Akt signalling in health and disease[J]. Cell Signal, 2011,23(10):1515-1527.
- [14] Dong J, Xu X, Zhang Q, et al. The PI3K/AKT pathway promotes fracture healing through its crosstalk with Wnt/ β -catenin[J]. Exp Cell Res, 2020,394(1):112137.
- [15] Huang W, Alvarez S, Kondo Y, et al. A molecular assembly phase transition and kinetic proofreading modulate Ras activation by SOS[J]. Science, 2019,363(6431):1098-1103.

(下转第 604 页)

- elderly patients with distal radius fracture: a prospective double-blind, placebo-controlled randomised clinical trial [J]. *Benef Microbes*, 2016, 7(5): 631-637.
- [28] Novince CM, Whittow CR, Aartun JD, et al. Commensal gut microbiota immunomodulatory actions in bone marrow and liver have catabolic effects on skeletal homeostasis in health [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 5747.
- [29] Yan J, Charles JF. Gut microbiome and bone: to build, destroy, or both? [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2017, 15(4): 376-384.
- [30] Kareem KY, Loh TC, Foo HL, et al. Effects of dietary postbiotic and inulin on growth performance, IGF1 and GHR mRNA expression, faecal microbiota and volatile fatty acids in broilers [J]. *BMC Veterin Res*, 2016, 12(1): 163.
- [31] Schieber AMP, Lee YM, Chang MW, et al. Disease tolerance mediated by microbiome *E. coli* involves inflammasome and IGF-1 signaling [J]. *Science*, 2015, 350(6260): 558-563.
- [32] McCabe L, Britton RA, Parameswaran N. Prebiotic and probiotic regulation of bone health: role of the intestine and its microbiome [J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2015, 13(6): 363-371.
- [33] Sharon G, Garg N, Debelius J, et al. Specialized metabolites from the microbiome in health and disease [J]. *Cell Metab*, 2014, 20(5): 719-730.
- [34] Koh A, De Vadder F, Kovatcheva-Datchary P, et al. From dietary fiber to host physiology: short-chain fatty acids as key bacterial metabolites [J]. *Cell*, 2016, 165(6): 1332-1345.
- [35] Smith PM, Howitt MR, Panikov N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis [J]. *Science*, 2013, 341(6145): 569-573.
- [36] Yan J, Takakura A, Zandi-Nejad K, et al. Mechanisms of gut microbiota-mediated bone remodeling [J]. *Gut Microbes*, 2018, 9(1): 84-92.
- [37] Smith PM, Howitt MR, Panikov N, et al. The microbial metabolites, short-chain fatty acids, regulate colonic Treg cell homeostasis [J]. *Science*, 2013, 341(6145): 569-573.
- [38] Bancos I, Algeciras-Schimmich A, Woodmansee WW, et al. Determination of nadir growth hormone concentration cutoff in patients with acromegaly [J]. *Endocr Pract*, 2013, 19(6): 937-945.
- [39] Lindsey RC, Mohan S. Skeletal effects of growth hormone and insulin-like growth factor-I therapy [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2016, 432: 44-55.
- [40] 金昊, 金鑫, 王文波. GH/IGF-1 与骨质疏松的研究进展 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2015, 23(5): 431-433.
- [41] Schwarzer M. Gut microbiota: puppeteer of the host juvenile growth [J]. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, 2018, 21(3): 179-183.
- [42] Fazeli PK, Klibanski A. Determinants of GH resistance in malnutrition [J]. *J Endocrinol*, 2014, 220(3): R57-R65.
- [43] Du R, Jiao S, Dai Y, et al. Probiotic C-1 improves growth performance, stimulates GH/IGF-1, and regulates the gut microbiota of growth-retarded beef calves [J]. *Front Microbiol*, 2018, 9: 2006.
- [44] Yamamoto M, Iguchi G, Fukuoka H, et al. SIRT1 regulates adaptive response of the growth hormone--insulin-like growth factor-I axis under fasting conditions in liver [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2013, 110(37): 14948-14953.

(收稿日期: 2020-05-29;修回日期: 2020-06-22)

(上接第 555 页)

- [16] Kim EK, Choi EJ. Pathological roles of MAPK signaling pathways in human diseases [J]. *Biochim Biophys Acta*, 2010, 1802(4): 396-405.
- [17] Roskoski R Jr. MEK1/2 dual-specificity protein kinases: structure and regulation [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2012, 417(1): 5-10.
- [18] De Luca A, Maiello MR, D'Alessio A, et al. The RAS/RAF/MEK/ERK and the PI3K/AKT signalling pathways: role in cancer pathogenesis and implications for therapeutic approaches [J]. *Expert Opin Ther Targets*, 2012, 16 Suppl 2: S17-S27.
- [19] 成浩, 冯纲. (99m)Tc-MDP SPECT 全身骨显像与生物标志物水平检测鉴别良恶性疾病的临床价值 [J]. *中国卫生检验杂志*, 2019, 29(10): 1251-1253, 1258.
- [20] 刘晓媛. 载脂蛋白 B/载脂蛋白 A1 及相关血脂指标对冠心病经皮冠状动脉介入治疗术预后的预测价值 [J]. *中华老年病研究电子杂志*, 2019, 6(4): 13-17.
- [21] Parhami F. Possible role of oxidized lipids in osteoporosis: could hyperlipidemia be a risk factor? [J]. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids*, 2003, 68(6): 373-378.
- [22] Marek Vecka, Aleš Žák, Eva Tvrdická, et al. Associations of serum uric acid with endogenous cholesterol synthesis indices in men with high cardiometabolic risk [J]. *Metab Syndr Relat Disord*, 2020, 18(4): 212-218.
- [23] Hanson AM, Kittilson JD, Martin LE, et al. Environmental estrogens inhibit growth of rainbow trout (*Oncorhynchus mykiss*) by modulating the growth hormone-insulin-like growth factor system [J]. *Gen Comp Endocrinol*, 2014, 196: 130-138.
- [24] 阿吉木·克热木. NRSN2 对骨肉瘤细胞增殖、分化的作用及其分子机制研究 [D]. 乌鲁木齐: 新疆医科大学, 2017.
- [25] Taleb Agha M, Baharetha HM, Al-Mansoub MA, et al. Proapoptotic and antiangiogenic activities of arctium lappa L. on breast cancer cell lines [J]. *Scientifica (Cairo)*, 2020, 2020: 7286053.
- [26] 曹凯, 安洪, 蒋电明. 血管内皮生长因子及其对成骨的影响 [J]. *中国骨与关节损伤杂志*, 2005, 20(6): 427-429.
- [27] 黄佳梦. 不同比例的 BMP2 和 VEGFA 对骨髓间充质干细胞成骨分化的影响 [D]. 杭州: 浙江大学, 2019.

(收稿日期: 2020-06-18;修回日期: 2020-07-06)