

基于网络药理学探讨骨碎补治疗骨质疏松症的作用机制[△]

林 适^{1*}, 吴潇烁¹, 陈柏行¹, 陈 超¹, 吴宇航¹, 周琦石², 何才勇^{1,2#} (1. 广州中医药大学第一临床医学院, 广州 510006; 2. 广州中医药大学第一附属医院一骨科, 广州 510405)

中图分类号 R285 文献标志码 A 文章编号 1001-0408(2019)10-1333-06
DOI 10.6039/j.issn.1001-0408.2019.10.08

摘要 目的: 探讨骨碎补治疗骨质疏松(OP)的作用机制。方法: 采用中药系统药理学成分分析平台(BATMAN-TCM)数据库获得骨碎补的活性化合物及其作用靶点, 再通过GeneCards数据库获得相关化合物靶点, 取两者交集得到骨碎补作用靶点。通过TTD、DrugBank、OMIM、GAD、PharmGKB、CTD数据库获得OP疾病相关靶点, 与骨碎补作用靶点取交集后获得骨碎补-OP疾病交集靶点。运用STRING在线数据库构建蛋白相互作用(PPI)网络, 再通过Cytoscape 3.6.1软件进行分析获得关键靶点, 并进行可视化展示。借助DAVID在线工具进行交集靶点的基因本体论(GO)分析。通过在线分析工具KOBAS进行KEGG通路富集分析, 筛选出显著富集的通路($P < 0.05$)。通过MCC算法进行关键基因的筛选。结果: 共获得骨碎补活性化合物7个, 骨碎补-OP疾病交集靶点136个。GO分析结果显示, 上述交集靶点的生物途径主要包括化学反应、类固醇代谢过程、细胞对化学刺激的应答等; 细胞组分主要包括细胞外间隙、胞外区部分、细胞质等; 分子功能主要有血红素结合、四吡咯结合、单氧酶活性等。KEGG通路富集结果显示, 上述靶点主要与骨代谢、内分泌、炎症、肿瘤、细胞凋亡等信号通路相关。通过MCC算法筛选得到关键基因30个, 包括ALB、AKT1、JUN等($P \leq 1.96 \times 10^{-9}$)。结论: 骨碎补治疗OP的作用机制呈多靶点、多系统的特性, 除了影响骨代谢相关途径还可影响体内多种代谢途径。

关键词 骨碎补; 骨质疏松症; 作用机制; 通路; 靶点; 网络药理学

Investigation of the Mechanism of Osteoporosis Treated by *Drynariae rhizoma* Based on Network Pharmacology

LIN Shi¹, WU Xiaoshuo¹, CHEN Baihang¹, CHEN Chao¹, WU Yuhang¹, ZHOU Qishi², HE Caiyong^{1,2} (1. First Clinical Medical College of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510006, China; 2. First Dept. of Orthopedics, the First Affiliated Hospital of Guangzhou University of TCM, Guangzhou 510405, China)

ABSTRACT OBJECTIVE: To investigate the mechanism of *Drynariae rhizoma* in the treatment of osteoporosis (OP). METHODS: The active compounds and targets of *D. rhizoma* were obtained by using Bioinformatics Analysis Tool for Molecular Mechanism of Traditional Chinese Medicine (BATMAN-TCM database). The targets of relevant compounds were also obtained by GeneCards database, and targets of *D. rhizoma* were obtained by the combination of the two. The disease targets corresponding to

- 房, 2018, 29(12):1600-1604.
- [14] 谢黎崖, 吴永良, 朱佩娟, 等. 载羟基喜树碱聚乳酸微球的制备与体外释药研究[J]. 中国新药杂志, 2012, 21(21): 2557-2561.
- [15] 王玉, 王东凯, 孙念. 聚丙烯酯乙交酯共聚物作为大分子药物载体的纳米及微米技术研究进展[J]. 中国药理学杂志(网络版), 2009, 7(3):205-211.
- [16] 孙美丽, 班俊峰, 黄思玉, 等. PLGA微球载药量和包封率的影响因素及控制[J]. 广东药学院学报, 2011, 27(6): 643-648.
- [17] 林红赛, 刘曦, 于少君, 等. 聚乙交酯丙交酯共聚物体外实时降解和加速降解的相关性研究[J]. 首都食品与医药, 2016, 23(12):26-28.
- [18] ANDHARIYA JV, CHOI S, WANG Y, et al. Accelerated in vitro release testing method for naltrexone loaded PLGA microspheres[J]. *Int J Pharm*, 2017, 520(1/2): 79-85.
- [19] ASO Y, YOSHIOKA S, LIWAN POA, et al. Effect of temperature on mechanisms of drug release and matrix degradation of poly(-lactide) microspheres[J]. *J Control Release*, 1994, 100(31):31-39.
- [20] ZOLNIK BS, LEARY PE, BURGESS DJ. Elevated temperature accelerated release testing of PLGA microspheres [J]. *J Control Release*, 2006, 112(3):293-300.

△ 基金项目: 国家自然科学基金资助项目(No.81674001)

* 硕士研究生。研究方向: 中医药治疗骨伤科疾病。电话: 020-36591317。E-mail: linshitongxue@163.com

通信作者: 副主任医师, 硕士生导师, 硕士。研究方向: 中医药治疗骨伤科疾病。电话: 020-36488481。E-mail: yuhuanpig@live.com

(收稿日期: 2018-12-18 修回日期: 2019-04-10)

(编辑: 陈 宏)

OP were obtained by using TTD, DrugBank, OMIM, GAD, PharmGKB and CTD database. The *D. rhizoma*-OP disease intersection targets were obtained after intersecting with the target of *D. rhizoma*. PPI network was constructed by STRING online database, analyzed by using Cytoscape 3.6.1 software to obtain key targets and showed by network visualization. Gene ontology (GO) analysis of drug-disease intersection target were conducted by DAVID online tools. KEGG pathway enrichment analysis was conducted by KOBAS online tools to screen the significant enrichment pathway ($P < 0.05$). The key genes were screened by MCC algorithm. RESULTS: There were 7 active compounds of *D. rhizoma* 136 intersection targets of *D. rhizoma*-OP disease. GO analysis results showed that the biological function of intersection target mainly included chemical reaction, steroid metabolic process as well as cellular response to chemical stimulus and so on; cell composition mainly included extracellular space, extracellular area and cytoplasm; molecular functions included heme binding, tetrapyrrole binding and monooxygenase activity, etc. KEGG pathway enrichment showed that above targets were mainly related to bone metabolism, endocrinology, inflammation, tumor, apoptosis, etc. Thirty key genes (such as *ALB*, *AKT1*, *JUN*, etc., $P \leq 1.96 \times 10^{-9}$) were screened by MCC algorithm. CONCLUSIONS: The mechanism of action of *D. rhizoma* in the treatment of OP is in multi-target and multi-system manner. In addition to influencing the related pathways of bone metabolism, it can also affect various metabolic pathways *in vivo*.

KEYWORDS *Drynariae rhizoma*; Osteoporosis; Mechanism; Pathway; Target; Network pharmacology

骨质疏松症(Osteoporosis, OP)是一种严重危害人类健康、以骨量及骨组织微结构异常为特征的代谢性骨疾病,其可引起骨脆性增加,增加患者骨折风险^[1-2]。随着社会人口老龄化,OP的发生率不断上升,严重影响了老年人的健康及生活质量^[3]。由于其高发病率、高致残率的特点,OP已经成为世界普遍关注的公共卫生问题^[4]。目前,针对OP的防治药物以骨吸收抑制剂、骨生成促进剂、骨矿化物质为主(包括降钙素、双膦酸盐、氟化物等),但这些药物只能改善患者临床症状、延缓病情,并不能从根本上改善骨代谢情况,亦不能恢复成骨与破骨进程的动态平衡,并且存在一定的副作用^[2]。

目前,中医药治疗OP已引起了国内外学者的关注^[4]。已有研究表明,骨碎补总黄酮能增强成骨细胞的活性,调节骨代谢过程中的细胞因子,降低破骨细胞活性,促进肠道对钙的吸收和钙在骨内的沉积^[5],有望用于OP的治疗。但中药具有多组分特性,其作用于机体的机制也相对复杂,通过动物实验或细胞试验的方法研究中药分子机制相对困难,而且会耗费大量人力物力。随着系统生物学的发展,越来越多的相关研究成果使明确中医药发挥疗效的分子机制成为可能^[6-8]。因此,本研究基于网络药理学的方法,分析骨碎补的有效活性成分、作用靶点及其可能的作用机制,同时通过网络分析的方法进一步预测骨碎补抗OP的靶点,并对相关靶点进行通路富集分析,探讨骨碎补治疗OP的潜在作用机制。

1 资料与方法

1.1 骨碎补中活性化合物及其作用靶点预测

通过中药系统药理学成分分析平台(BATMAN-TCM)数据库(<http://bionet.ncpsb.org/batman-tcm>)和GeneCards数据库(<https://www.genecards.org/>)来预测骨碎补作用靶点。BATMAN-TCM是一个在线中药分子机制的生物信息学分析工具,它的主要功能有中药成分靶点预测、靶点的功能分析、相关网络的可视化及中药的对比分析^[9],可通过“相似产物靶点相近”的原理进行

靶点预测,用“留一法”(Leave-one-drug-out)互作交叉验证进行预测的验证,用已验证过的化合物与蛋白的相互作用作为“金标准”来进行互作验证^[9]。GeneCards是一个综合数据库,参考了UniProt、AKS、PharmGKB等几大数据库对于基因的分析数据,可提供简明的基因组、蛋白质组、转录、遗传和功能上所有已知的和预测的人类基因^[10]。本研究首先以“GUSUIBU”为检索词在BATMAN-TCM数据库中检索获得骨碎补的化合物;同时,在BATMAN-TCM数据库中设置Cut-off值为20、 $P \leq 0.05$,来预测骨碎补作用靶点;然后在GeneCards数据库中设置候选靶点为“人类”,根据从BATMAN-TCM数据库得到的化合物进行靶点筛选;最后,取两个数据库获得靶点的交集,得到骨碎补相关作用靶点。

1.2 OP相关疾病靶点检索

检索TTD、DrugBank、OMIM、GAD、PharmGKB、CTD这6个公认的在线数据库,设置关键词为“Osteoporosis”,进行OP的已知相关疾病靶点检索。对从这6个数据库获得的检索结果进行汇总、对比分析并取交集,最终获得OP疾病相关靶点。

1.3 骨碎补-OP疾病交集靶点相互作用网络构建

对“1.1”“1.2”项下获得的骨碎补相关作用靶点和OP已知疾病靶点取交集,提取整理交集靶点基因,通过STRING在线数据库(<http://string-db.org/>)进行蛋白相互作用(Protein-protein interaction, PPI)网络的构建;同时,运用网络可视化软件Cytoscape 3.6.1对获得的PPI网络数据进行处理分析获得关键靶点,对生物分子的相互作用网络进行可视化展示,并通过力导向算法使网络节点分布合理^[11],获得清晰的可视化框架。

1.4 基因本体论分析

基因本体论(Gene ontology, GO)是用于描述基因产物功能并广泛应用于生物信息学领域的一个本体^[12]。作为一个广泛用于基因功能分类的系统,其涵盖生物学的3个方面:生物途径、细胞组分、分子功能^[12]。本研究采用在线分析工具DAVID(<https://david.ncifcrf.gov/>)对

骨碎补-OP疾病交集靶点进行GO富集分析,通过统计学超几何分布定量评估存在于各GO注释中的蛋白质群,以 P 值反映蛋白质生物功能的显著性($P < 0.05$ 表示有显著性)。DAVID是一个生物信息数据库,整合了生物学数据和分析工具,为大规模的基因或蛋白列表提供系统综合的生物功能注释信息,帮助用户从中提取生物学信息^[13]。笔者在输入目标基因列表后,目标基因会关联到生物学注释上,进而从无数个关联的注释中筛选出骨碎补-OP疾病交集靶点富集最具显著性($P < 0.05$ 为具有显著性)的生物学注释^[13]。

1.5 KEGG通路富集分析

本研究应用在线分析工具KOBAS(<http://kobas.cbi.pku.edu.cn/>)对骨碎补-OP疾病交集靶点进行KEGG富集分析^[14]。KEGG数据库可通过输入目标靶点,筛选出显著富集的通路^[15]。通路 P 值小于0.05时,则认为其是具有显著性的关键通路; P 值越小,则其显著性程度越高。

1.6 关键基因的筛选及其对OP治疗作用的预测

关键基因是指在生物学过程中发挥了举足轻重作用的基因,并可在相关通路中调控其他基因发挥作用的过程^[16]。关键基因是基于PPI网络拓扑结构筛选而得。但运用Cytoscape 3.6.1软件构建蛋白/基因的互作网络后,往往会因为基因/蛋白等分子节点之间的相互连线而掩盖关键基因^[17],因此需通过MCC、DMNC、Degree、EPC、BottleNeck等算法对网络结构和节点进行计算分析^[17],得到骨碎补治疗OP的关键基因。其中的MCC算法是一种较新的算法,在预测重要基因方面更有优势^[18],因此本研究采取MCC算法进行关键基因的筛选,所得基因的分值越高,则其显著性越高。

2 结果

2.1 骨碎补-OP疾病交集靶点的预测结果

通过BATMAN-TCM检索得到骨碎补化合物7个,分别为柚皮素(Naringenin)、菜油甾醇(Campesterol)、豆甾醇(Stigmasterol)、柚皮苷(Naringin)、 γ -谷固醇(Gamma-Sitosterol)、芸香柚皮苷(Narirutin)、桔皮苷(Hesperidin);同时获得其作用靶点共395个。通过GeneCards数据库筛选获得靶点234个。通过TTD等6个数据库共筛选获得OP的疾病靶点共761个。取上述三者的交集,最终获得骨碎补-OP疾病交集靶点共136个,其网络可视化图谱见图1(图中,矩形和三角菱形分别为骨碎补及其化合物,圆形为筛选获得的交集靶点)。

2.2 骨碎补-OP疾病交集靶点的GO分析结果

GO分析结果显示,136个骨碎补-OP疾病交集靶点的生物途径主要包括Response to chemical(化学反应)、Steroid metabolic process(类固醇代谢过程)、Cellular response to chemical stimulus(细胞对化学刺激的应答)等;基因所处细胞组分主要包括Extracellular space(细胞外间隙)、Extracellular region part(胞外区部分)、Cytoplas-

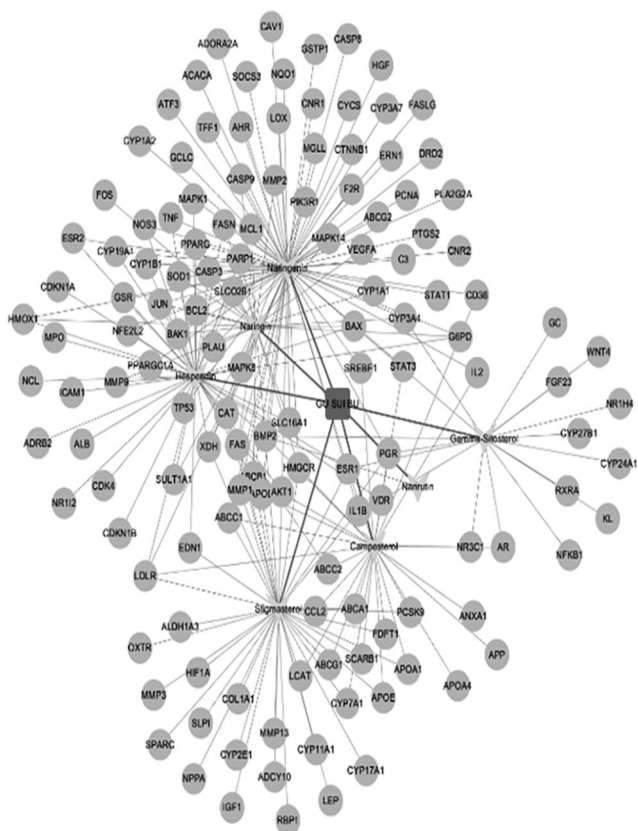


图1 骨碎补-OP疾病交集靶点DPI可视化图谱
Fig 1 PPI visualization map of *D. rhizoma*-OP disease intersection target

mic part(细胞质)等;分子功能主要包括Heme binding(血红素结合)、Tetrapyrrole binding(四吡咯结合)、Monoxygenase activity(单氧酶活性)等,详见表1。

2.3 KEGG通路富集分析结果

对136个骨碎补-OP疾病交集靶点的KEGG通路富集分析结果显示, P 值小于0.05的骨碎补治疗OP所涉及的信号通路有136个,主要与骨代谢、内分泌、炎症、肿瘤、细胞凋亡等相关。显著性程度排名前7位的信号通路见表2,排名前80位的信号通路结果见图2(图中,圆形节点为信号通路,其大小越大,则表示通路显著性程度越高)。

2.4 关键基因分析结果

根据MCC算法获得显著性程度排名前30位的靶点作为骨碎补-OP疾病交集靶点中的关键基因,按显著性由高到低排序分别为ALB、AKT1、JUN、BCL2、CASP3、PTGS2、NFKB1、MAPK8、MAPK1、IGF1、FOS、MMP9、CYCS、CCL2、IL1B、PPARG、EDN1、LEP、CAT、APOE、ESR1、IL2、NOS3、ICAM1、CASP8、BAX、PARP1、PCNA、CDKN1A、CASP9,详见图3(图中,圆形节点为非关键基因,六边形为关键基因,关键基因节点颜色由浅至深以及节点大小由小至大均表示节点在网络中的重要性升高);富集关键基因数目 ≥ 5 个的通路见表3。

表3 富集关键基因数目≥5个的通路

Tab 3 Pathways with more than 5 key enrichment genes

通路	富集关键基因数	P
Pathways in cancer	16	8.14×10^{-25}
TNF signaling pathway	14	2.84×10^{-28}
Hepatitis B	14	1.19×10^{-28}
Apoptosis	13	1.54×10^{-24}
AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications	12	7.51×10^{-24}
Endocrine resistance	10	2.46×10^{-19}
Non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD)	10	1.66×10^{-17}
Platinum drug resistance	9	5.18×10^{-18}
Herpes simplex infection	9	1.25×10^{-14}
Toll-like receptor signaling pathway	8	1.44×10^{-14}
Osteoclast differentiation	8	7.74×10^{-14}
Viral carcinogenesis	8	2.30×10^{-12}
MAPK signaling pathway	8	1.25×10^{-11}
PI3K-Akt signaling pathway	8	1.21×10^{-10}
Apoptosis-multiple species	7	9.15×10^{-16}
p53 signaling pathway	7	1.05×10^{-13}
Estrogen signaling pathway	7	1.16×10^{-12}
HIF-1 signaling pathway	7	1.51×10^{-12}
Proteoglycans in cancer	7	1.56×10^{-10}
NOD-like receptor signaling pathway	6	5.70×10^{-12}
Prolactin signaling pathway	6	2.14×10^{-11}
Prostate cancer	6	7.17×10^{-11}
T cell receptor signaling pathway	6	1.85×10^{-10}
FoxO signaling pathway	6	7.57×10^{-10}
Oxytocin signaling pathway	6	1.96×10^{-9}
cAMP signaling pathway	6	7.48×10^{-9}

集靶点136个。由图1PPI网络分析结果显示,骨碎补的7个化合物可作用于多个靶点,而PPARG、ESR1、AR等靶点也可与多个骨碎补化合物产生相互作用。这提示骨碎补有效成分之间存在协同作用。

通过KEGG通路富集分析,由表2可见,Pathways in cancer(癌症信号通路)、AGE-RAGE signaling pathway in diabetic complications[晚期糖基化终末产物及其受体(AGE/RAGE)信号通路]、Hepatitis B(乙型肝炎信号通路)、TNF signaling pathway(肿瘤坏死因子信号通路)、Apoptosis(细胞凋亡信号通路)、Proteoglycans in cancer(癌症中的蛋白聚糖信号通路)和Endocrine resistance(雌激素信号通路)是骨碎补对OP发挥作用显著性程度最高的信号通路。这些通路都较为复杂,包括多个下游通路。例如癌症信号通路的下游通路包括Wnt信号通路、Hedgehog信号通路、Notch信号通路、低氧诱导因子1(HIF-1)信号通路、丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)信号通路、过氧化物酶体增殖物激活受体(PPAR)信号通路、血管内皮细胞生长因子(VEGF)信号通路等。又如AGE/RAGE信号通路可通过调控蛋白激酶C(PKC)、p38 MAPK、转化生长因子 β (TGF- β)、核因子 κ B(NF- κ B)以及细胞外信号调节激酶1/2(ERK1/2)信号通路从而调节细胞和系统反应,增加骨基质蛋白的表达^[22]。TNF信号通路包括细胞凋亡、细胞存活、炎症和免疫在内的

多个细胞内信号通路。TNF主要有TNFR1和TNFR2两种受体,TNFR1信号通路可激活诱导许多基因的激活,主要受两种不同的途径控制:NF- κ B途径和MAPK级联途径;TNFR2信号通路可激活NF- κ B信号通路,包括磷酸肌醇3激酶(PI3K)依赖性NF- κ B信号通路和c-Jun氨基末端激酶(JNK)信号通路。结合图2可见,除了上述复杂的信号通路外,骨碎补活性成分还可直接调控这些通路包含的下游通路。

通过关键基因的筛选及分析,由表3可见,关键基因在以上这些通路中的富集数目有30个,其P值均不大于 1.96×10^{-9} ,进一步说明这些通路的重要性。

4 结语

骨碎补抗OP作用主要可归结为直接调控骨代谢和间接调节骨代谢两个方面,主要作用于成骨、破骨过程,使两个进程维持平衡。OP的发生与发展的病因主要是成骨和破骨的动态平衡被打破,因此与此相关的信号通路均可能作为抗OP治疗的主要通路。直接调节骨代谢通路包括Wnt信号通路、Notch信号通路、TGF- β 信号通路、破骨细胞分化信号通路、MAPK信号通路、Hedgehog信号通路等。其中,Wnt蛋白是一组分泌的糖蛋白,是促进成骨细胞分化和活性的重要调节因子^[23]。TGF- β 信号通路在骨形成过程中扮演着重要角色,能促进骨母细胞增殖和早期分化,抑制破骨细胞活性^[24-26]。Notch信号通路调节MSCs向成骨细胞分化,推动成骨进程,并具有抑制成骨细胞分化及降低骨量的作用^[27-29]。MAPKs在成骨细胞发育过程中起着重要作用,通过作用于成骨细胞调节骨形成^[30]。Hedgehog信号通路主要参与促进MSCs向成骨细胞及软骨细胞分化,而阻止其向脂肪细胞分化^[31-32]。其他显著性程度相对较高的通路如雌激素信号通路、PI3K-Akt信号通路、VEGF信号通路、甲状腺信号通路、HIF-1信号通路等可通过间接调节骨代谢发挥抗OP作用。

综上,骨碎补治疗OP的作用机制呈多靶点、多通路、多系统的特性,除了影响骨代谢相关途径,还可影响体内多种代谢途径。

参考文献

- [1] ZHANG ZQ, HO SC, CHEN ZQ, et al. Reference values of bone mineral density and prevalence of osteoporosis in Chinese adults[J]. *Osteoporos Int*, 2014, 25(2): 497-507.
- [2] 汪呈, 曹宇, 顾永清, 等. 骨质疏松治疗药物的研究进展[J]. *科学通报*, 2014, 59(13): 1209-1214.
- [3] 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.
- [4] 郭鱼波, 王丽丽, 马如风, 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.
- [5] 丁小刚, 覃勇, 鄂建设, 等. 骨碎补总黄酮对老年性骨质疏松

- 松症患者血清骨钙素水平及骨密度影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2013, 19(5): 519-521.
- [6] AGUAYO-OROZCO A, AUDOUZE K, BRUNAK S, et al. In silico systems pharmacology to assess drug's therapeutic and toxic effects[J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22 (46) : 6895-6902.
- [7] CHENG F, HONG H, YANG S, et al. Individualized network-based drug repositioning infrastructure for precision oncology in the panomics era[J]. *Brief Bioinform*, 2017, 18 (4) : 682-697.
- [8] ZHANG W, BAI Y, WANG Y, et al. Polypharmacology in drug discovery: a review from systems pharmacology perspective[J]. *Curr Pharm Des*, 2016, 22 (21) : 3171-3181.
- [9] 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. DOI: 10.1038/srep21146.
- [10] STELZER G, ROSEN N, PLASCHKES I, et al. The gene-cards suite: from gene data mining to disease genome sequence analyses[J]. *Curr Protoc Bioinformatics*, 2016, 54: 1-30.
- [11] 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.
- [12] MARTUCCI D, MASSEROLI M, PINCIROLI F. Gene ontology application to genomic functional annotation, statistical analysis and knowledge mining[J]. *Stud Health Technol Inform*, 2004, 102: 108-131.
- [13] DENNIS G JR, SHERMAN BT, HOSACK DA, et al. DAVID: database for annotation, visualization, and integrated discovery[J]. *Genome Biol*, 2003, 4(9): R60.
- [14] XIE C, MAO X, HUANG J, et al. KOBAS 2.0: a web server for annotation and identification of enriched pathways and diseases[J]. *Nucleic Acids Res*, 2011. DOI: 10.1093/nar/gkr483.
- [15] KANEHISA M, GOTO S. KEGG: kyoto encyclopedia of genes and genomes[J]. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28 (1) : 27-30.
- [16] KANEHISA M, FURUMICHI M, TANABE M, et al. KEGG: new perspectives on genomes, pathways, diseases and drugs[J]. *Nucleic Acids Res*, 2017, 45 (D1) : D353-D361.
- [17] 邱冬妮, 潘峰, 谭希, 等. 基于网络药理学探讨补肾强督治痿方治疗强直性脊柱炎的作用机理[J]. 中医杂志, 2018, 59(2): 151-155.
- [18] CHIN CH, CHEN SH, WU HH, et al. cytoHubba: identifying hub objects and sub-networks from complex interactome[J]. *BMC Syst Biol*, 2014, 8(Suppl 4): S11.
- [19] 李焯, 童杰, 周衍晶, 等. 补肾壮骨中药抗骨质疏松有效成分及其药理作用研究进展[J]. 中国中药杂志, 2015, 40 (6): 1038-1043.
- [20] 匡立华, 贾庆运, 谭国庆, 等. 骨碎补防治骨质疏松症的研究进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(8): 1000-1004.
- [21] 宋渊, 李盛华, 何志军. 骨碎补含药血清对成骨细胞增殖、成骨的影响[J]. 中国骨质疏松杂志, 2014, 20(2): 125-128.
- [22] KAY AM, SIMPSON CL, STEWART JJ. The role of AGE/RAGE signaling in diabetes-mediated vascular calcification[J]. *J Diabetes Res*, 2016. DOI: 10.1155/2016/6809703.
- [23] KARNER CM, LONG F. Wnt signaling and cellular metabolism in osteoblasts[J]. *Cell Mol Life Sci*, 2017, 74(9): 1649-1657.
- [24] ZENG HC, BAE Y, DAWSON BC, et al. MicroRNA miR-23a cluster promotes osteocyte differentiation by regulating TGF-beta signalling in osteoblasts[J]. *Nat Commun*, 2017. DOI: 10.1038/ncomms15000.
- [25] QUERQUES F, CANTILENA B, COZZOLINO C, et al. Angiotensin receptor I stimulates osteoprogenitor proliferation through TGFbeta-mediated signaling[J]. *J Cell Physiol*, 2015, 230(7): 1466-1474.
- [26] CHAKRAVORTY N, HAMLET S, JAIPRAKASH A, et al. Pro-osteogenic topographical cues promote early activation of osteoprogenitor differentiation via enhanced TGF-beta, Wnt, and Notch signaling[J]. *Clin Oral Implants Res*, 2014, 25(4): 475-486.
- [27] XU L, KONG Q. Research progress of key signaling pathways in osteoblast differentiation and bone formation regulation[J]. *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*, 2014, 28(12): 1484-1489.
- [28] DENG ZL, SHARFF KA, TANG N, et al. Regulation of osteogenic differentiation during skeletal development[J]. *Front Biosci*, 2008, 13: 2001-2021.
- [29] WANG C, INZANA JA, MIRANDO AJ, et al. NOTCH signaling in skeletal progenitors is critical for fracture repair[J]. *J Clin Invest*, 2016, 126(4): 1471-1481.
- [30] YU H, JIANG L, WAN B, et al. The role of aryl hydrocarbon receptor in bone remodeling[J]. *Prog Biophys Mol Biol*, 2018. DOI: 10.1016/j.pbiomolbio.2017.12.005.
- [31] KIM WK, MELITON V, BOURQUARD N, et al. Hedgehog signaling and osteogenic differentiation in multipotent bone marrow stromal cells are inhibited by oxidative stress[J]. *J Cell Biochem*, 2010, 111(5): 1199-1209.
- [32] CAI JQ, HUANG YZ, CHEN XH, et al. Sonic hedgehog enhances the proliferation and osteogenic differentiation of bone marrow-derived mesenchymal stem cells[J]. *Cell Biol Int*, 2012, 36(4): 349-355.

(收稿日期: 2018-07-28 修回日期: 2019-03-31)

(编辑: 段思怡)