

当归-骨碎补配伍治疗骨折三期辨证中期的网络药理学机制

李志鸿¹, 叶学劲², 刘经鹏², 陈文阳², 滕居赞³

(1. 广州市荔湾区中医医院, 广东广州 510000; 2. 广西中医药大学, 广西南宁 530011;

3. 广西中医药大学附属瑞康医院, 广西南宁 530000)

摘要:【目的】通过网络药理学探讨当归-骨碎补配伍治疗骨折三期辨证中期的作用机制。【方法】借助中药系统药理学分析平台(TCMSP)筛选出当归、骨碎补的有效化合物及其靶点,通过STRING、CTD及GeneCards数据库对当归-骨碎补治疗闭合骨折的靶点进行数据分析,利用Cytoscape 3.7.1开放源码的生物信息分析软件构建化合物-靶点网络、蛋白-蛋白互作网络、化合物-靶点-疾病网络。应用ClueGO插件对当归-骨碎补治疗闭合骨折的靶点进行基因本体论(GO)分析,并对核心靶点基因进行京都基因与基因组百科全书(KEGG)通路富集分析。【结果】共筛选出当归、骨碎补有效化合物20个,闭合骨折核心靶点25个,当归-骨碎补治疗闭合骨折的KEGG富集通路共51条,包括低氧诱导因子1(HIF-1)信号通路、肿瘤坏死因子(TNF)信号通路、磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B(PI3K/Akt)信号通路、血管内皮生长因子(VEGF)信号通路等。【结论】当归-骨碎补配伍可能通过主要活性成分β-谷甾醇、山柰酚、柚皮素、木犀草素、黄酮类、固醇类、海州骨碎补苷等,作用于HIF-1、TNF、PI3K/Akt、VEGF等信号通路促进骨折三期辨证中期的愈合。

关键词: 当归; 骨碎补; 配伍; 闭合骨折; 网络药理学

中图分类号: R285.5

文献标志码: A

文章编号: 1007-3213(2021)08-1693-07

DOI: 10.13359/j.cnki.gzxbcm.2021.08.028

Network Pharmacological Mechanism of Compatibility of Radix Angelicae Sinensis-Rhizoma Drynariae for Mid-Stage Fracture in Three Treatment Stages

LI Zhi-Hong¹, YE Xue-Jin², LIU Jing-Peng²,

CHEN Wen-Yang², TENG Ju-Zan³

(1. Guangzhou Liwan District Hospital of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou 510000 Guangdong, China;

2. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011 Guangxi, China; 3. Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000 Guangxi, China)

Abstract: Objective To explore the mechanism of compatibility of Radix Angelicae Sinensis-Rhizoma Drynariae for mid-stage fracture in the treatment three stages based on network pharmacology. **Methods** The effective constituents of Radix Angelicae Sinensis-Rhizoma Drynariae and their targets were screened from Traditional Chinese Medicines Systems Pharmacology Platform (TCMSP) database, and the targets of Radix Angelicae Sinensis-Rhizoma Drynariae for fracture were analyzed by STRING, CTD and GeneCards databases, and then a Cytoscape 3.7.1 open source bioinformatics analysis software was used to construct the constituent-target network, protein-protein interaction network and constituent-target-disease network. Finally, ontology (GO) analysis of the targets of Radix Angelicae Sinensis-Rhizoma Drynariae for closed fracture was carried out by ClueGO plug-in, and then Kyoto encyclopedia of genes and genomes (KEGG) enrich analysis of core target genes were performed. **Results** We screened out 20 effective constituents from Radix Angelicae Sinensis and Rhizoma Drynariae, 25 fracture core targets for closed fracture, and 51 KEGG enrichment pathways including hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1)

收稿日期: 2019-08-15

作者简介: 李志鸿(1993-),男,住院医师,硕士; E-mail: 347196727@qq.com

通讯作者: 滕居赞,男,主任医师,硕士; E-mail: 352980496@qq.com

基金项目: 崇左市科技计划项目(崇科FC2019011)

signaling pathway, tumor necrosis factor (TNF) signaling pathway, phosphatidyl inositol-3-kinase/protein kinase B (PI3K/Akt) signaling pathway and vascular endothelial growth factor (VEGF) signaling pathway, etc. on Radix Angelicae Sinensis-Rhizoma Drynariae for closed fracture. **Conclusion** Compatibility of Radix Angelicae Sinensis-Rhizoma Drynariae promotes healing of mid-stage fracture in the treatment three stages possible through HIF-1, TNF, PI3K/Akt, VEGF, etc. signaling pathways with main active constituent beta-sitosterol, kaempferol, naringenin, luteolin, flavanones, stigmasterols, marioside_{qt}, and so on.

Keywords: Radix Angelicae Sinensis; Rhizoma Drynariae; compatibility; closed fracture; network pharmacology

骨折常导致骨折不愈合^[1-2]。中医学将骨折治则分为三期,骨折中期相当于原始骨痂形成期,此期的特点是肿痛较前期减轻,但瘀肿尚未消尽,筋骨虽连而未坚,故此期宜和营生新、接骨续损。骨折的愈合是从修复过程的起始直至骨折最终塑形完成为止的一个连续不断的过程。而骨折中期是连接初、后期的一个必不可少的“枢纽”。一旦骨折中期愈合欠佳,将会导致骨折初期治疗尽弃,而骨折后期过程停滞,最终导致骨折不愈合。骨折中期治疗常用的代表中药为当归、骨碎补^[3]。当归始载于《神农本草经》,为伞形科多年生草本植物当归 *Angelica sinensis* (Oliv.) Diels 的干燥根,有补血活血、调经止痛、润肠的作用。骨碎补始载于《药性本草》,为水龙骨科多年生附生蕨类植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Sm. 的干燥根茎,其功效主要为活血续伤、补肾强骨。当归、骨碎补对推进骨折愈合进程有明显的作^[4],骨折的愈合与血液供应、骨膜完整性破坏程度、断端的接触、周围肌群的影响相关。中药因其成分复杂,对其有效成分的研究开展受限,而中药网络药理学则可从中药的化合物-靶向-疾病关系反映、阐述其之间的相互作用。本研究系统性运用网络药理学方法综合探讨当归-骨碎补可能的化合物构成,并分析当归-骨碎补配伍治疗骨折三期辨证中期可能的药理学机制,以期为下一步的药物基础研究提供参考,现将研究结果报道如下。

1 资料与方法

1.1 当归-骨碎补的化学成分 借助中药系统药理学分析平台(TCMSP) (<http://lsp.nwu.edu.cn/tcmsp.php>)分别检索当归、骨碎补的所有化学成分,以口服生物利用度(OB)≥30%^[5],类药性(DL)≥

0.18^[6]为筛选标准,筛选当归、骨碎补中的活性成分,最后得到当归2个、骨碎补18个化合物。

1.2 当归-骨碎补化合物-靶点网络的构建 将通过TCMSP平台按照筛选标准所得的当归-骨碎补的20个化合物及其258个靶点,应用Cytoscape 3.7.1开放源码的生物信息分析软件构建化合物-靶点网络图。

1.3 当归-骨碎补靶蛋白相互作用网络的构建 应用STRING数据库10.5线上软件(<http://string-db.org>),将筛选所得的当归-骨碎补靶点上传,选择智人种(*homo sapiens*),应用Cytoscape 3.7.1软件构建当归-骨碎补靶蛋白互作网络图。

1.4 闭合骨折相关靶点数据库的构建 基于CTD (<https://ctdbase.org>)和GeneCards (<https://www.genecards.org>)数据库综合筛选挖掘闭合骨折相关靶点,构建闭合骨折相关靶点数据库,与当归-骨碎补化合物靶点进行对比分析,筛选出当归-骨碎补作用于闭合骨折的靶点,应用Venny 2.1在线工具(<http://bioinfogp.cnb.csic.es/>)绘制韦恩图。

1.5 当归-骨碎补化合物靶点与闭合骨折相关靶点网络图的构建 根据当归-骨碎补化学成分-靶点预测结果和靶点-疾病预测结果,应用Cytoscape 3.7.1软件中的“Merge”功能,将2个预测结果合并成“化学成分-靶点-疾病”网络图,进行全局化可视网络分析。通过Network Analysis功能计算网络的拓扑参数,分析其相互关系。

2 结果

2.1 有效化合物的筛选 本研究搜索到化合物共196个,其中,当归化合物125个,骨碎补71个。最后筛选得到当归2个、骨碎补18个化合物,主要活性成分的OB和DL值见表1。

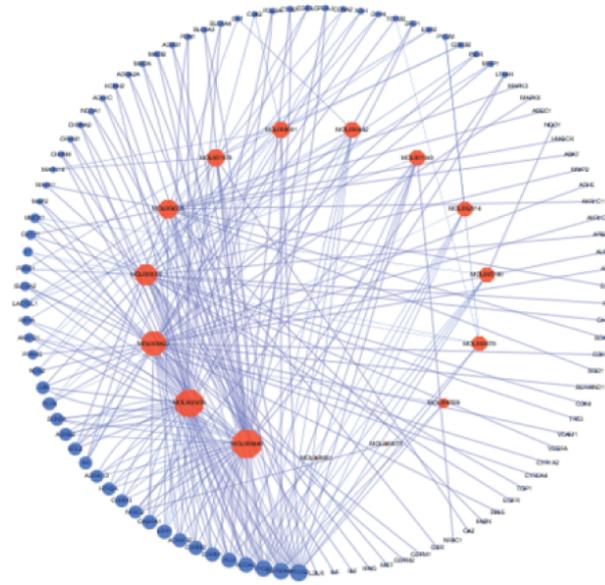
表1 当归、骨碎补主要有效化合物信息

Table 1 Data of main effective constituents from Radix Angelicae Sinensis and Rhizoma Drynariae

分子ID	化合物(中文名称)	OB (%)	DL	中药
MOL000358	beta-sitosterol(β-谷甾醇)	36.91	0.75	当归
MOL000449	stigmasterol(豆甾醇)	43.83	0.76	当归
MOL001040	(2R)-5, 7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one [(2R)-5, 7-二羟基-2-(4-羟苯基)苯并二氢吡喃-4-one]	42.36	0.21	骨碎补
MOL001978	aureusidin(金鱼草素)	53.42	0.24	骨碎补
MOL002914	eriodictiol (flavanone) (黄烷酮)	41.35	0.24	骨碎补
MOL000449	stigmasterol(豆甾醇)	43.83	0.76	骨碎补
MOL000358	beta-sitosterol(β-谷甾醇)	36.91	0.75	骨碎补
MOL000422	kaempferol(山柰酚)	41.88	0.24	骨碎补
MOL004328	naringenin(柚苷配基, 柚皮素)	59.29	0.21	骨碎补
MOL000492	(+)-catechin(儿茶素)	54.83	0.24	骨碎补
MOL005190	eriodictyol(圣草酚)	71.79	0.24	骨碎补
MOL000569	digallate	61.85	0.26	骨碎补
MOL000006	luteolin(木犀草素)	36.16	0.25	骨碎补
MOL009061	22-stigmasten-3-one(22-豆甾醇-3-one)	39.25	0.76	骨碎补
MOL009063	cyclolaudenol acetate(环劳顿醇醋酸盐)	41.66	0.79	骨碎补
MOL009075	cycloartenone(罗烯酮)	40.57	0.79	骨碎补
MOL009076	cyclolaudenol(环劳顿醇)	39.05	0.79	骨碎补
MOL009078	davallioside A _{qt} (大蒜素)	62.65	0.51	骨碎补
MOL009087	marioside _{qt} (海州骨碎补苷)	70.79	0.19	骨碎补
MOL009091	xanthogalenol	41.08	0.32	骨碎补

2.2 当归-骨碎补化学成分潜在靶点预测及相互作用 筛选当归、骨碎补化合物的有效靶点共258个, 构建“化合物成分-作用靶点”网络图, 见图1。当归-骨碎补化合物靶点蛋白互作网络见图2。

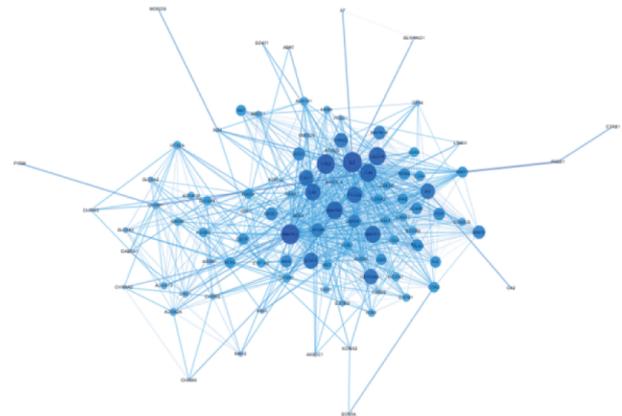
2.3 闭合骨折相关靶点数据库的构建 以“Closed Fracture”或“Fracture Closed”作为关键词在CTD、GeneCards数据库中查询, 初步筛选出CTD数据库72个, GeneCards数据库2950个, 共3022个候选基因。根据“Reference Count”值取GeneCards数据库中相关度最高的前200个结果, 其中与闭合骨折靶点有25个重合, 分别为VEGFA、RB1、PPARG、MET、ESR1、CA2、AR、MMP2、IL-6、TP53、VCAM1、PTGS2、NOS2、ABCC1、MAPK3、MAPK1等。当归-骨碎补靶点与闭合骨折靶点的韦恩图, 见图3。当归-骨碎补对闭合骨折作用靶点的蛋白互作网络, 见图4。当归-骨碎补化合物-靶



注: 红色为当归-骨碎补化合物, 蓝色为各个化合物对应靶点

图1 当归-骨碎补化合物-靶点网络图

Figure 1 Radix Angelicae Sinensis-Rhizoma Drynariae constituent-target network



注: 节点的大小和颜色表示 Degree 值的大小, 节点越大对应的 Degree 值越大, 蓝色由浅到深对应的 Degree 值越大; 用边的粗细表示 Combine Score 值的大小, Combine Score 值越大边越粗

图2 当归-骨碎补靶点蛋白互作网络图

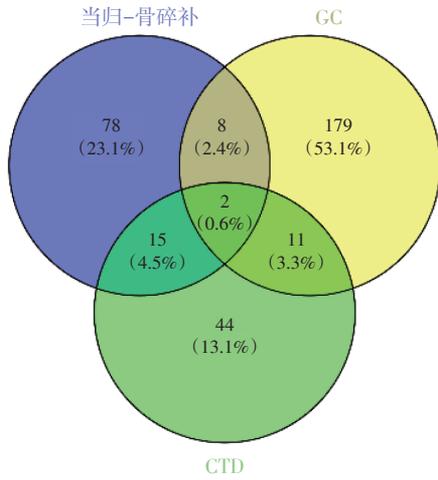
Figure 2 Target protein interaction network of Radix Angelicae Sinensis-Rhizoma Drynariae

点-闭合骨折的全局性网络, 见图5。

2.4 当归-骨碎补对闭合骨折作用靶点的京都基因与基因组百科全书(KEGG)分析和基因本体论(GO)分析 将当归-骨碎补对闭合骨折的25个作用靶点上传ClueGO插件中进行GO分析, GO分析注释图见图6~8。得出111个生物学过程 (biological

process, BP), 包括: 对雌激素的反应(response to estrogen), 对缺氧的反应(response to hypoxia), 转录的正调节, NDA 模板化(positive regulation of transcription, DNA-templated), 细胞对缺氧的反应(cellular response to hypoxia)等; 19 个细胞组

成(cellular component, CC), 包括细胞膜穴样内陷(caveola)、细胞外空隙(extracellular space)、细胞质(cytosol)等。24 个分子功能(molecular function, MF), 包括: 酶结合(enzyme binding)、血红素结合(heme binding)、转录因子逆结合(transcription factor binding)、相同的蛋白结合(identical protein



注: 紫色圆形, 当归-骨碎补化合物靶点集合; 绿色圆形, CTD中闭合骨折相关靶点集合; 黄色圆形, GeneCards 数据库闭合骨折靶点集合

图3 当归-骨碎补靶点与闭合骨折靶点的韦恩图
Figure 3 Venn diagram of targets related with Radix Angelicae Sinensis-Rhizoma Drynariae and closed fracture

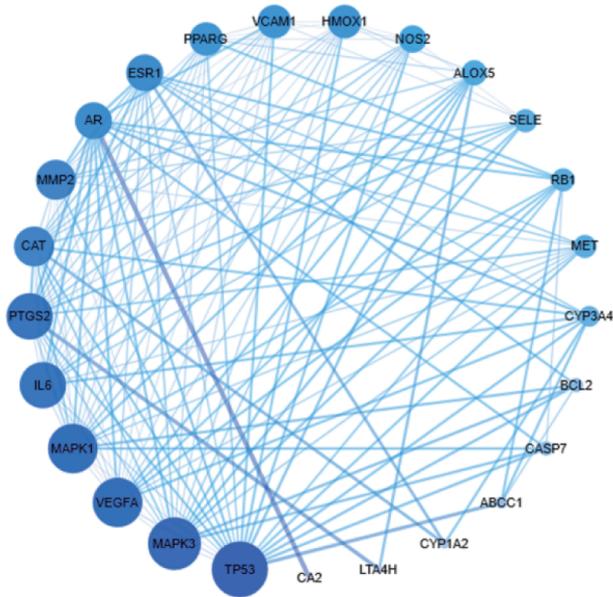
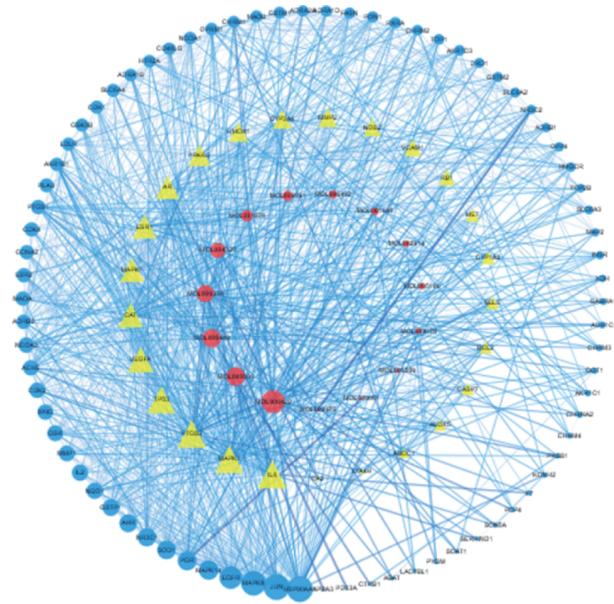


图4 当归-骨碎补对闭合骨折作用靶点蛋白的互作网络
Figure 4 Interaction network of target proteins of Radix Angelicae Sinensis-Rhizoma Drynariae for closed fracture



注: 红色六边形, 当归-骨碎补化合物; 浅蓝色圆形, 当归-骨碎补化合物靶点; 黄色三角形, 当归-骨碎补作用于闭合骨折靶点

图5 当归-骨碎补化合物-靶点-闭合骨折网络图
Figure 5 Radix Angelicae Sinensis-Rhizoma Drynariae constituent-target-closed fracture network

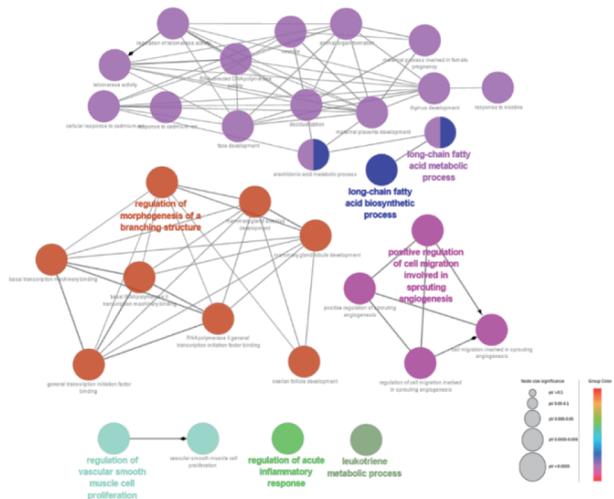


图6 当归-骨碎补对闭合骨折作用靶点的GO分析
Figure 6 GO analysis results for the targets of Radix Angelicae Sinensis-Rhizoma Drynariae for closed fracture

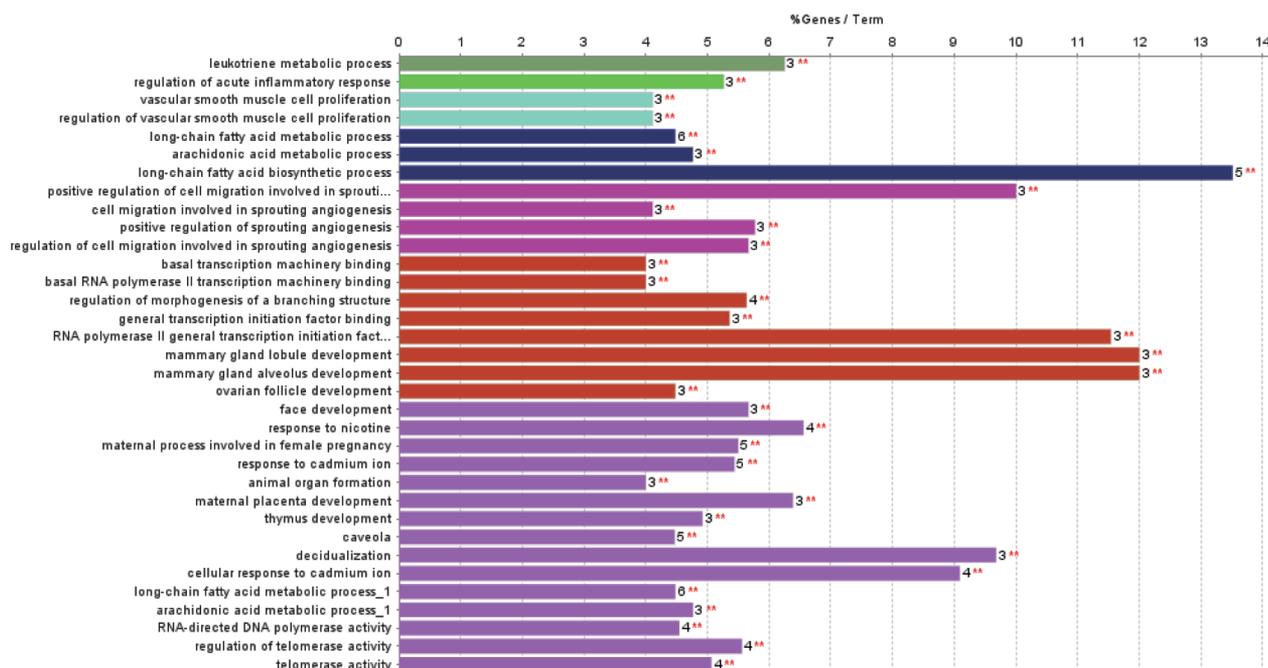


图7 当归-骨碎补对闭合骨折作用靶点的GO分析结果($P < 0.05$)

Figure 7 GO analysis results for the targets of Radix Angelicae Sinensis-Rhizoma Drynariae for closed fracture($P < 0.05$)

binding)等。KEGG通路富集分析发现, 当归-骨碎补作用于闭合骨折的靶点的通路有51条, 主要包括: 癌症通路 (pathways in cancer)、膀胱癌 (bladder cancer)、低氧诱导因子1信号通路 (HIF-1 signaling pathway)、肿瘤坏死因子信号通路 (TNF signaling pathway)、磷脂酰肌醇-3-激酶/蛋白激酶B信号通路 (PI3K/Akt signaling pathway)、

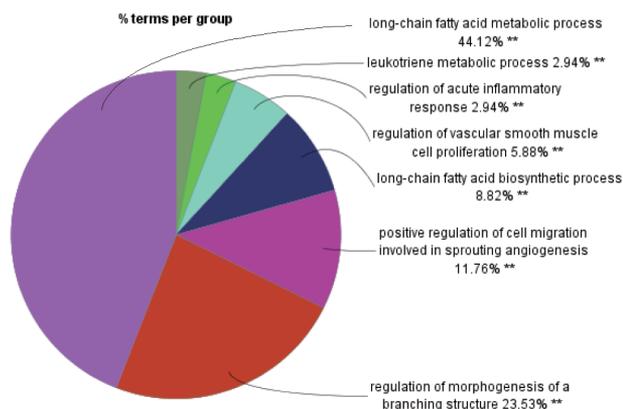


图8 当归-骨碎补治疗闭合骨折靶点的GO分析结果饼状图($P < 0.05$)

Figure 8 Pie chart of targets of Radix Angelicae Sinensis-Rhizoma Drynariae for closed fracture by GO analysis($P < 0.05$)

血管内皮生长因子 (VEGF) 信号通路 (VEGF signaling pathway)等等, 见图9。

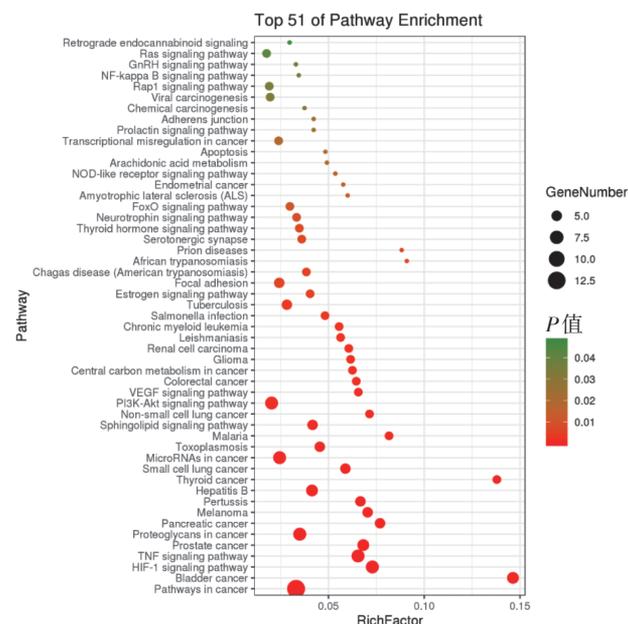


图9 当归-骨碎补对闭合骨折作用靶点的KEGG分析的气泡图

Figure 9 Bubble diagram for targets of Radix Angelicae Sinensis-Rhizoma Drynariae for closed fracture by KEGG analysis

3 讨论

骨折属于中医学“骨折病”的范畴。《正体类要》指出：“肢体损伤外，则气血伤于内，营卫有所不贯，脏腑由之不和。”开创了“气血学说”和“平补法”的理论基础，主张以补气血、活血、补肝肾为主的治法。当归-骨碎补作为骨折三期辨证中期治疗常用的药物配伍，其临床疗效肯定。现代药理学研究证实，当归具有抗凝血、止血^[7]，改善血液循环^[8]，促进造血^[9]的作用；骨碎补具有促进成骨细胞生成^[10]、矿化^[11]，促进骨折愈合^[12]的作用。但目前国内对当归、骨碎补促进骨折愈合机制的研究多局限在当归多糖、当归提取物，骨碎补总黄酮^[13-14]、骨碎补提取物这一类化合物，且对当归-骨碎补在骨折愈合的体内代谢作用机制研究鲜见。故本研究通过网络药理学对当归-骨碎补配伍治疗骨折三期辨证中期的机制进行可能性推断。

本研究筛选最后得到当归2个、骨碎补18个化合物。其中： β -谷甾醇(beta-sitosterol)可能通过改变体外成骨活性而改善骨脆性和骨折形态^[15]。山柰酚(kaempferol)能抑制破骨细胞分化并促进其凋亡，促进骨细胞样MG-63细胞系的分化，并减弱TNF在MC3T3-E1小鼠成骨细胞系中的信号传导^[16]，亦可通过促进成骨细胞功能和抑制骨髓中的脂肪细胞形成来预防去卵巢大鼠模型诱导的骨质流失^[17]。柚皮素(naringenin)可作为超氧化物清除剂，有助于内源性抗氧化防御系统保护骨骼免受骨质疏松症的侵害，而含有柚皮素的假蒟(Piper sarmentosum)的提取物则具有抑制脂肪组织和骨中11 β -羟基类固醇脱氢酶1(11 β -HSD1)表达和活性能力，从而恢复骨骼结构和强度^[18]。木犀草素(luteolin)可以通过促进糖皮质激素诱导的骨质疏松症中的成骨细胞分化、矿化和增殖来增加骨形成，其通过抑制活性氧(ROS)的过度生成来抑制成骨细胞增殖，增强成骨标志物的表达以促进成骨细胞分化和增加骨保护素(OPG)/核因子 κ B受体活化因子配体(RANKL)比率以维持骨量，从而减弱成骨细胞凋亡。此外，木犀草素可增强OPG/RANKL比率和成骨细胞分化减轻糖皮质激素诱导的骨质疏松症^[19]。本研究分析结果表明，当归-骨碎补化合物主要以甾醇类、黄酮类为主，且与目前现有研究结果一致。此外，还包括黄烷酮类(flavanones)、固醇类(stigmasterols)、海州骨碎补苷(marioside_qt)等。

对当归-骨碎补对闭合骨折的25个作用靶点进行GO分析，涉及111个生物学过程、19个细胞组成、24个分子功能。KEGG通路富集发现当归-骨碎补作用于闭合骨折的通路有51条，主要明确涉及HIF-1信号通路、TNF信号通路、PI3K/Akt信号通路、VEGF信号通路等。氧供是影响骨折愈合的重要因素，HIF-1在调节氧稳态中起关键作用，研究^[20]发现，缺氧条件下MC3T3-E1小鼠成骨细胞活力下降，HIF-1 α 蛋白表达增加，HIF-1 α 转染的MC3T3-E1细胞的存活率高于未强制表达HIF-1 α 的细胞，HIF-1 α 在MC3T3-E1细胞系中的强制表达通过抑制细胞凋亡减弱了缺氧诱导的成骨细胞活力下降。TNF- α 在干细胞向成骨分化过程中扮演着双重角色(促进或抑制成骨分化)，而TNF- α 的作用时间，作用浓度及作用的干细胞类型又可能是决定其促进或抑制干细胞成骨分化的主要因素^[21]。PI3K/Akt信号通路是调节细胞增殖、分化、存活、迁移和代谢过程的最为重要的一个信号通路。越来越多的证据表明，骨组织中的许多信号分子能够选择性激活PI3K/Akt信号通路的相关基因，通过调控成骨细胞和破骨细胞的活动，破坏骨重建过程中骨形成与骨吸收的动态平衡^[22]。miR-28-3p可以通过活化PI3K/Akt信号途径而加速骨折愈合过程^[23]。miR-181a/b-1通过调节第10号染色体缺失的磷酸酶及张力蛋白同源物基因(PTEN)/PI3K/Akt轴和线粒体代谢促进骨生成^[24]。VEGF是一种重要的信号蛋白，参与血管生成(胚胎循环系统的新生形成)和血管生成(从已存在的血管系统中生长血管)。研究^[25]表明，骨碎补可通过激活VEGF/VEGFRs的表达，促进骨折愈合。早期骨质疏松细胞(Osterix+)的VEGFA，但不是成熟的成骨细胞/骨细胞(Dmp1+)，对于快速骨膜血管生成和编织骨形成的骨损伤时至关重要。而在损伤时需要来自另一种细胞来源而非来自成骨细胞谱系的VEGFA，以获得最大的皮质缺损髓内血管生成和骨生成^[26]。因此，预测当归-骨碎补可能通过调控HIF-1、TNF、PI3K/Akt、VEGF等信号通路促进骨折三期辨证中期的愈合。

综上所述，本研究以当归-骨碎补主要活性成分为研究对象，借助网络药理学方法，通过分析其主要的活性成分，构建“化合物-靶向-疾病”的关系，初步在分子层面展示了当归-骨碎补作用于骨折三期辨证中期的机制，且大部分预测结果

与现代药理学研究相符, 为科学用药提供了指导; 然而, 本研究仅在分子水平初步预测当归-骨碎补的作用机制, 缺乏入血移行成分预测, 且缺乏药物相互作用机制研究, 具有一定的局限性, 因此, 有待进一步加以理论完善以及实验验证。

参考文献:

- [1] TZIOUPIS C, GIANNOUDIS P V. Prevalence of long-bone non-unions[J]. *Injury*, 2007, 38(2): S3-S9.
- [2] CALORI G M, MAZZA E, COLOMBO M, et al. Treatment of long bone non-unions with polytherapy: indications and clinical results[J]. *Injury*, 2011, 42(6): 587-590.
- [3] 詹红生. 中西医结合骨伤科学[M]. 2版. 中国中医药出版社, 2013.
- [4] 陈智能, 徐杰, 叶俊材, 等. 三期辨证中药复方对老年性骨质疏松髋部骨折患者骨代谢标志物的影响[J]. *中华中医药杂志*, 2018, 33(7): 3196-3199.
- [5] XUE X, WU X, ZHANG C, et al. A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability[J]. *Int J Mol Sci*, 2012, 13(6): 6964-6982.
- [6] TAO W, XU X, WANG X, et al. Network pharmacology-based prediction of the active ingredients and potential targets of Chinese herbal Radix Curcumae formula for application to cardiovascular disease[J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 145(1): 1-10.
- [7] 杨铁虹, 商澎, 梅其炳, 等. 当归多糖硫酸酯对凝血和血小板聚集的作用[J]. *中草药*, 2002, 33(11): 1010-1013.
- [8] 许珊珊, 朱顺娟, 张启立, 等. 模糊物元模型评价当归不同提取部位的活血作用[J]. *中国医院药学杂志*, 2018, 38(24): 13-16, 52.
- [9] 王彦超. 当归不同炮制品多糖含量的比较及其对血虚模型鸡造血机能的影响[D]. 保定: 河北农业大学, 2012.
- [10] JEONG J C, LEE J W, YOON C H, et al. Stimulative effects of *Drynariae Rhizoma* extracts on the proliferation and differentiation of osteoblastic MC3T3-E1 cells [J]. *J Ethnopharmacol*, 2005, 96(3): 489-495.
- [11] HUNG T Y, CHEN T L, LIAO M H, et al. *Drynaria fortunei* J. Sm. promotes osteoblast maturation by inducing differentiation-related gene expression and protecting against oxidative stress-induced apoptotic insults[J]. *J Ethnopharmacol*, 2010, 131(1): 70-77.
- [12] 贺旭峰, 祝涛. 骨碎补促进骨折愈合的机理[J]. *中医正骨*, 2013, 25(11): 67-69.
- [13] 史岩, 马秋野, 喻一东, 等. 骨碎补总黄酮促进骨质疏松性骨折愈合中参与Wnt/ β -catenin信号通路的初步研究[J]. *中药学报*, 2018, 238(2): 53-56.
- [14] 高颖, 房德敏. 骨碎补黄酮类化合物的研究进展与开发前景[J]. *中草药*, 2009, 40(2): 323-326.
- [15] CHAUHAN S, SHARMA A, UPADHYAY N K, et al. *In-vitro* osteoblast proliferation and in-vivo anti-osteoporotic activity of *Bombax ceiba* with quantification of Lupeol, gallic acid and β -sitosterol by HPTLC and HPLC [J]. *BMC Complement Altern Med*, 2018, 18(1): 233.
- [16] PANG J L, RICUPERO D A, HUANG S, et al. Differential activity of kaempferol and quercetin in attenuating tumor necrosis factor receptor family signaling in bone cells [J]. *Biochem Pharmacol*, 2006, 71(6): 818-826.
- [17] TRIVEDI R, KUMAR S, KUMAR A, et al. Kaempferol has osteogenic effect in ovariectomized adult Sprague-Dawley rats[J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2008, 289(1): 85-93.
- [18] RAMLI E S M, SUHAIMI F, AHMAD F, et al. Piper Sarmenosum: a new hope for the treatment of osteoporosis [J]. *Curr Drug Targets*, 2013, 14(14): 1675-1682.
- [19] JING Z, WANG C Y, YANG Q N, et al. Luteolin attenuates glucocorticoid-induced osteoporosis by regulating ERK/Lrp-5/GSK-3 β signaling pathway in vivo and in vitro[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4): 4472-4490.
- [20] XU G, XUE M, WANG H, et al. Hypoxia-inducible factor-1 α antagonizes the hypoxia-mediated osteoblast cell viability reduction by inhibiting apoptosis [J]. *Exp Ther Med*, 2015, 9(5): 1801-1806.
- [21] 陈林, 薛纯纯, 舒冰, 等. TNF- α 与干细胞成骨分化[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2016, 22(5): 619-623.
- [22] 陈亚辉, 龚忠勤, 崔燎. PI3K/Akt信号通路在骨质疏松病理过程中的作用[J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 33(7): 356-360.
- [23] 徐栋. microRNA-28-3p通过抑制Sox6并激活PI3K/AKT通路促进骨折愈合的研究[D]. 济南: 山东大学, 2017.
- [24] ZHENG H, LIU J, TYCKSEN E, et al. MicroRNA-181a/b-1 over-expression enhances osteogenesis by modulating PTEN/PI3K/AKT signaling and mitochondrial metabolism [J]. *Bone*, 2019, 123: 92-102.
- [25] HUANG S T, CHANG C C, PANG J H S, et al. *Drynaria fortunei* promoted angiogenesis associated with modified MMP-2/TIMP-2 balance and activation of VEGF ligand/receptors expression [J]. *Front Pharmacol*, 2018, 9. DOI: 10.3389/fphar.2018.00979.
- [26] BUETTMANN E G, MCKENZIE J A, MIGOTSKY N, et al. VEGFA from early osteoblast lineage cells (Osterix+) is required in mice for fracture healing [J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(1). DOI: 10.1002/jbmr.3755.

【责任编辑: 侯丽颖】