

基于 FGFR1 靶点分子虚拟对接筛选淫羊藿中抗骨质疏松的药效成分

许梦习¹, 耿诗涵¹, 张译丹¹, 陈卓², 杨珍¹, 张艳军¹, 庄朋伟^{1*}

1. 天津中医药大学 中药学院 天津市中药药理重点实验室, 天津 300193

2. 天津市药品检验研究院, 天津 300070

摘要: 目的 基于 FGFR1 蛋白靶点筛选淫羊藿中抗骨质疏松的药效成分。方法 采用维甲酸灌胃 14 d 复制大鼠骨质疏松模型, 给予淫羊藿提取物进行干预; 采用 Western blotting 法检测各组大鼠股骨 FGFR1 蛋白的表达, 用 UPLC-Q-TOF-MS 确认提取物中化学成分。基于 FGFR1 靶点进行分子虚拟对接筛选药效成分。结果 淫羊藿能够改善大鼠骨质疏松症状, 并提高 FGFR1 蛋白的表达。淫羊藿提取物中识别出 23 种化合物, 其中淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I、箭藿苷 C 可与 FGFR1 可以有效对接。结论 淫羊藿中淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I、箭藿苷 C 可能通过上调 FGFR1 发挥抗骨质疏松作用。

关键词: 淫羊藿; 骨质疏松; 骨形成; 淫羊藿苷; 淫羊藿次苷 I; 箭藿苷 C; 分子对接

中图分类号: R285.5; R965 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2017)08-1403-07

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2017.08.003

Screening medicinal components of anti-osteoporosis in *Epimedii Herba* based on FGFR1

XU Meng-xi¹, GENG Shi-han¹, ZHANG Yi-dan¹, CHEN Zhuo², YANG Zhen¹, ZHANG Yan-jun¹, ZHUANG Peng-wei¹

1. Key Laboratory of Pharmacology of Chinese Materia Medica, College of Traditional Chinese Medicine, Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300193, China

2. Tianjin Institute for Drug Control, Tianjin 300070, China

Abstract: Objective To Screen the medicinal components of anti-osteoporosis in *Epimedii Herba* based on FGFR1. **Methods** The osteoporosis of rats was induced by given retinoic acid intragastrically for 14 d, and were treated with *Epimedii Herba* extract. The expression of FGFR1 protein in the femur was detected by Western blotting, and the chemical constituents of the extract were confirmed by UPLC-Q-TOF-MS method. The effective components were screened based on the target of FGFR1 by molecular docking. **Results** *Epimedii Herba* had a significant function of anti-osteoporosis, and could increase the expression of FGFR1 protein in rats. Icaritin, icaridin I and sagittoside C were picked out among the 23 identified compounds in extract, and could be effectively docked with FGFR1. **Conclusion** Icaritin, icaridin I and sagittoside C may play an anti-osteoporotic effect by up-regulating FGFR1.

Key words: *Epimedii Herba*; osteoporosis; osteogenesis; bone remodeling; icaritin; icaridin I; sagittoside C; molecular docking

淫羊藿又名仙灵脾、刚前, 是一种传统的常用补肾中药, 始载于《神农本草经》, 被列为中品, 具有补肾阳、强筋骨、祛风湿的功效^[1-2], 用于治疗肾阳虚衰、阳痿遗精、风湿麻痹、骨质疏松等^[3]。淫羊藿中含黄酮、生物碱、木质素等多种化学成分。淫羊藿苷被广大学者认为是其主要成分, 并被《中国药典》作为淫羊藿药材品质评价的指标。近年研

究发现 FGFR 信号通路上碱性成纤维细胞生长因子受体 1 (basic fibroblast growth factor receptor 1, bFGFR1) 蛋白靶点与骨形成密切相关, 可以作为骨质疏松治疗过程中药理性调节的重要靶标^[4-5]。基于此, 本研究复制维甲酸诱导的骨质疏松模型, 首先考察淫羊藿的抗骨质疏松作用, 并在此基础上检测各组大鼠股骨 FGFR1 蛋白的表达情况, 最后运

收稿日期: 2017-06-13

基金项目: 国家科技支撑计划项目 (2011BAI07B08); 长江学者和创新团队发展计划资助项目 (IRT_14R41)

作者简介: 许梦习 (1993—), 女, 安徽人, 在读药理学硕士研究生。Tel: 15822323821 E-mail: summermx@163.com

*通信作者 庄朋伟 (1982—), 男, 河北人, 博士, 副教授, 研究方向为中药药理。E-mail: zhuangpengwei@163.com

用分子虚拟对接的方法寻找淫羊藿提取物中抗骨质疏松的药效成分, 以期为建立淫羊藿的药效成分的研究提供新的研究思路与策略。

1 材料

1.1 药材

淫羊藿药材均购自北京华邈中药工程技术开发中心, 批号 SA1081, 经本校生药教研室李天翔教授鉴定为箭叶淫羊藿 *Epimedium sagittatum* (Sieb. et Zucc.) Maxim.。

1.2 试剂和仪器

维甲酸(RA)(货号 A9120)和羧甲基纤维素钠(货号 C8621)均购自北京索莱宝科技有限公司; 血清钙(Ca)(货号 150589)和血清无机磷(P)(货号 150591)试剂盒均购自中生北控生物科技股份有限公司; 血清碱性磷酸酶(ALP)(货号 A059-1)和血清抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)(货号 A058)试剂盒均购自南京建成生物科技有限公司。

Viva CT40 型小动物骨密度仪: SCANCO Medical AG(瑞士); Microlab 300 型半自动生化分析仪(荷兰 Vital Scientific 公司); ALLEGRA TM-64R 高速离心机(Beckman); Waters Xevo G2 型超高效液相色谱-四极杆-飞行时间串联质谱联用仪(美国 Waters 公司); HAC-I 自动浓缩氮吹仪(天津市恒奥科技发展有限公司)。

1.3 实验动物

SPF 级雄性 SD 大鼠, 体质量(200±10)g, 共 40 只, 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 生产许可证号 SCXK(京)2012-0001, 饲养于中国医学科学院放射医学研究所, 饲养室温度为(21±2)℃, 气压恒定, 昼夜 12 h 交替。

2 方法与结果

2.1 淫羊藿提取液的制备

称取淫羊藿药材 2 份, 每份均 500 g, 用 50% 乙醇加热回流提取两次, 第一次用 10 倍量溶剂提取 1 h, 将所得药液过滤收集, 然后向药材中添加 8 倍量 50% 乙醇加热回流提取 40 min, 再次将提取液滤过, 合并两次提取液, 浓缩, 得生药质量浓度 0.9 g/mL 的淫羊藿提取液。

2.2 淫羊藿对维甲酸诱导骨质疏松大鼠的影响

2.2.1 分组和造模 SD 大鼠随机分为对照组(10 只)、模型组(15 只)、淫羊藿组(15 只)。模型组和淫羊藿组上午 ig 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液配制的维甲酸溶液 70 mg/kg 造模^[6-7], 对照组 ig 相应体

积的 0.5% 羧甲基纤维素钠溶液, 同时下午对照组、模型组分别给予蒸馏水 0.1 mL/100 g。根据前期预实验结果以及参考文献报道^[8], 淫羊藿按照人与动物质量等效剂量比例公式计算出大鼠用药剂量为 9.0 g/kg, 相当于 10 倍 70 kg 体质量人的临床等效剂量(即 10 g/d), 进行预防治疗, 14 d 后终止维甲酸。淫羊藿组继续给予淫羊藿提取物 14 d, 其他两组继续给予相应体积的蒸馏水。

2.2.2 血清学指标的测定 实验结束时, 禁食 12 h 后腹主动脉取血并分离血清, 用 Microlab 300 型半自动生化分析仪检测血清中钙(Ca)、无机磷(IP)、碱性磷酸酶(ALP)、抗酒石酸酸性磷酸酶(TRACP)水平, 具体操作按试剂盒说明书进行。

2.2.3 股骨骨密度的测定 迅速取出双侧股骨, 剔除筋膜肌肉, 左侧股骨浸泡于 75% 乙醇消毒 3 d, 用小动物骨密度仪于大鼠左侧股骨骨髓线上 1 cm 处检测其骨密度, 并用仪器自带软件进行计算处理。

2.2.4 Western blotting 实验 将各组大鼠右侧股骨取出, 于研钵中加液氮进行研磨, 随后加入裂解液, 静置于冰上, 裂解 30 min, 4℃、12 000×g 离心 5 min, 取上清液, BCA 法对蛋白浓度进行定量。取各组蛋白经聚丙烯酰胺(SDS-PAGE)电泳后转移至 PVDF 膜上, 5% 脱脂奶粉室温下摇床震荡封闭 2 h, 加入相应一抗孵育过夜, 次日 TBST 漂洗 5 次, 加入辣根过氧化物酶标记的二抗, 37℃ 孵育 1 h, TBST 漂洗 5 次, 用化学发光法检测目的蛋白。

2.2.5 统计学分析 实验数据均以 $\bar{x} \pm s$ 形式表示, 应用 SPSS 11.5 统计软件进行数据处理, 采用单因素方差分析法(one-way ANOVA)进行显著性检验。

2.2.6 淫羊藿对骨质疏松大鼠骨密度的影响 模型组大鼠骨密度显著性降低($P < 0.01$), 给予淫羊藿提取物后, 其骨密度与模型组相比显著升高($P < 0.01$), 表明维甲酸使得大鼠骨密度下降, 淫羊藿提取物可使骨质疏松大鼠的骨密度升高, 见表 1。

表 1 淫羊藿对骨质疏松大鼠骨密度的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)
Table 1 Effect of *Epimedium Herba* on bone mineral density in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 8$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	骨密度/(mg·cm ⁻²)
对照	—	797.11±33.80
模型	—	737.77±31.89 ^{##}
淫羊藿	9.0	831.19±35.96 ^{**}

与对照组比较: ^{##} $P < 0.01$; 与模型组比较: ^{**} $P < 0.01$

^{##} $P < 0.01$ vs control group; ^{**} $P < 0.01$ vs model group

2.2.7 淫羊藿对骨质疏松大鼠血清药效学指标的影响 维甲酸可降低大鼠血清 IP、ALP、TRACP 水平 ($P<0.05$ 、 0.01)；与模型组比较，

给予淫羊藿提取物后，其血清中 Ca、IP 和 TRACP 水平均有不同程度的升高 ($P<0.05$ 、 0.01)，见表 2。

表 2 淫羊藿对骨质疏松大鼠血清 Ca、P、ALP 和 TRACP 水平的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)
Table 2 Effect of *Epimedii Herba* on serum Ca, P, ALP, and TRACP in rats ($\bar{x} \pm s$, $n = 10$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	Ca/(mmol·L ⁻¹)	P/(mmol·dL ⁻¹)	ALP/(U·dL ⁻¹)	TRACP/(U·L ⁻¹)
对照	—	1.12±0.21	1.38±0.17	31.22±9.64	4.23±0.75
模型	—	0.97±0.08	0.92±0.15 ^{##}	19.75±5.87 [#]	2.98±0.60 ^{##}
淫羊藿	9.0	1.19±0.13 ^{**}	1.73±0.63 ^{**}	25.64±7.49	4.16±0.54 ^{**}

与对照组比较：[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较：^{**} $P<0.01$
[#] $P<0.05$ ^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{**} $P<0.01$ vs model group

2.2.8 淫羊藿对模型大鼠股骨 FGFR1 蛋白表达的影响 淫羊藿提取物可以提高骨质疏松大鼠股骨 FGFR1 的蛋白表达，见图 1、表 3。

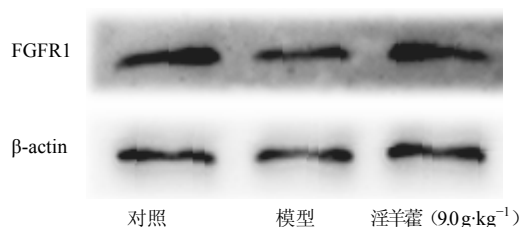


图 1 淫羊藿对大鼠股骨中的 FGFR1 蛋白表达的影响
Fig. 1 Effect of *Epimedii Herba* on FGFR1 expression in femur

表 3 淫羊藿对大鼠股骨中的 FGFR1 蛋白表达的影响 ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

Table 3 Effect of *Epimedii Herba* on expression of FGFR1 in femur ($\bar{x} \pm s$, $n = 3$)

组别	剂量/(g·kg ⁻¹)	FGFR1
对照	—	2.46±0.032
模型	—	1.38±0.043 ^{##}
淫羊藿	9.0	2.62±0.067 ^{**}

与对照组比较：^{##} $P<0.01$ ；与模型组比较：^{**} $P<0.01$
^{##} $P<0.01$ vs control group; ^{**} $P<0.01$ vs model group

2.3 淫羊藿提取物指纹图谱的建立

2.3.1 色谱条件 Agilent HSS T3 C₁₈ 色谱柱，流动相为 0.1%甲酸水溶液 (A) - 乙腈 (B)，梯度洗脱：0~2 min, 2% B；2~5 min, 5%~60% B；5~8 min, 60%~45% B；8~9 min, 45%~85% B；9~10 min, 85%~95% B；体积流量为 0.4 mL/min；柱温为 45 °C，进样量为 2 μL。

2.3.2 质谱条件 采用负离子模式；毛细管电压为 2.5 kV；锥孔电压为 30 V；离子源和脱溶剂气温为 400 °C；脱溶剂氮气和锥孔气体体积流量为 50 L/h；采样频率为 0.1 s，间隔 0.02 s；相对分子质量记录范围为 m/z 50~1 800，用亮氨酸-脑啡肽 ($[M-H]^- = 554.2615$) 对其进行实时校正。数据采集模式采用 MSE 模式，碰撞能量分别为 20、30、40、50 eV。

2.3.3 淫羊藿提取物中化学成分的确证 淫羊藿 50%乙醇提取物的色谱图见图 2。在该体系下色谱图基线平稳、色谱峰分离良好，各种成分能得到较好分离。采用 Masslynx v4.1 软件对测得的指纹图谱进行峰提取、峰对齐等处理分析，通过在负离子模式下测定到的精准相对分子质量、保留时间，并结合参考文献比对之后对离子峰进行指认，确认了淫羊藿提取物中 23 种成分，见表 4。

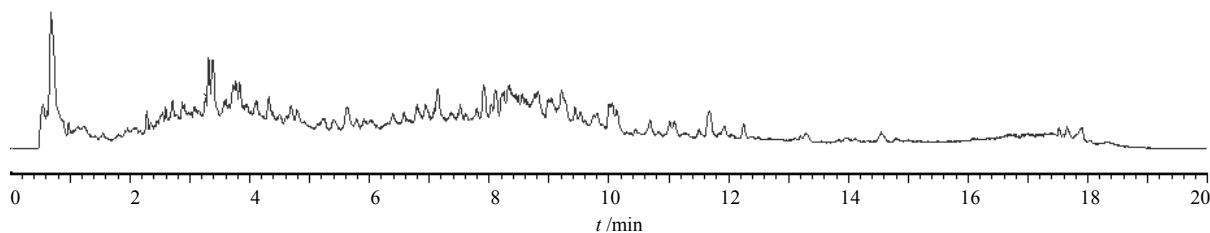


图 2 淫羊藿提取物色谱图
Fig. 2 HPLC chromatogram of *Epimedii Herba* extract

表 4 淫羊藿提取物 UPLC-Q-TOF/MS 离子峰分析结果

Table 4 Results of UPLC-Q-TOF / MS ion peak analysis of *Epimedium Herba* extract

编号	<i>t</i> /min	名称	离子	<i>m/z</i>	文献
1	3.120	山柰苷	[M-H] ⁻	577.136 5	9、10
2	3.287	3- <i>O-p</i> -coumaroylquinic acid	[M-H] ⁻	337.092 8	11
3	4.763	金丝桃苷	[M-H] ⁻	463.089 0	12~14
4	6.115	槲皮苷	[M-H] ⁻	447.092 4	14
5	6.399	hexandraside E	[M-H] ⁻	677.206 7	14、15
6	6.588	大花淫羊藿苷 B	[M-H] ⁻	677.208 6	16-18
7	7.075	二叶淫羊藿苷 A	[M-H] ⁻	807.273 1	16、19-20
8	7.168	淫羊藿属苷 A	[M-H] ⁻	661.215 2	21~24
9	7.374	anhydroicaritin-3,7-di- <i>O</i> -glucoside	[M-H] ⁻	691.226 0	25
10	8.036	demethylcaritin-3- <i>O</i> -(6"- <i>O</i> -acetyl)-glucosyl-1-3)- <i>O</i> -(4"- <i>O</i> -acetyl)-rhamnoside- 7- <i>O</i> -glucoside	[M-H] ⁻	907.287 3	11、26
11	8.099	朝藿定 A	[M-H] ⁻	837.280 3	21、26-28
12	8.227	朝藿定 B	[M-H] ⁻	807.271 5	16、21、27-28
13	8.541	淫羊藿苷	[M+COOH] ⁻	721.235 1	18~21
14	8.775	箭藿苷 C	[M-H] ⁻	717.238 8	14
15	9.728	淫羊藿苷 F	[M-H] ⁻	631.202 5	11、26
16	9.785	淫羊藿次苷 I	[M-H] ⁻	529.173 8	11、13、27、29~31
17	9.999	淫羊藿定 L	[M-H] ⁻	801.261 5	32
18	10.119	淫羊藿次苷 A	[M-H] ⁻	499.161 4	11、30-31
19	10.682	宝藿苷 VII	[M-H] ⁻	675.229 8	26
20	10.974	淫羊藿苷 I	[M-H] ⁻	529.170 5	21、22-24
21	11.010	箭藿苷 B	[M-H] ⁻	645.216 9	9、14、16、33
22	11.664	宝藿苷 I	[M-H] ⁻	513.177 0	19、27、11、30、23、34
23	14.561	淫羊藿 B	[M-H] ⁻	421.165 7	35

2.4 分子对接虚拟筛选研究

选取蛋白靶点碱性成纤维细胞生长因子受体 1 (basic fibroblast growth factor receptor 1, bFGFR1), 并对其与淫羊藿提取物中 23 种成分进行分子对接研究: 利用 PharmMapper 数据库进行反向对接筛选, 分析其可能的作用靶点, 并将匹配度较高的靶点映射到 Reactome 数据库, 利用 Reactome 数据库和 KEGG 数据库进行通路注释和分析。

从蛋白质 PDB 数据库中选择 FGFR1 及其配体的复合物, (PDB: 5EW8), 晶体结构为 X-射线方法得到, 其分辨率为 16.3 nm, 该晶体结构为二聚体, 对其进行以下处理: 抽取出配体分子 5SF, 删除水分子、B 链及其他配体分子。并对蛋白及配体按上述方法分别进行前处理, 根据其中配体分子 5SF 定义活性口袋, 球半径设为 100.467 nm。采用高温动力学搜索配体分子的柔性空间, 利用模拟退

火的方法将各个构象在受体活性位点进行优化。

Pose cluster radius 设为 0.5, random conformations 设为 10, 在计算过程中考虑静电相互作用, 并利用格点技术计算非键作用。将抽取出的配体分子对接回原蛋白, 计算最佳对接构象与晶体中构象的 RMSD 为 3.623 nm。说明利用其进行分子对接研究接近实验结果, 因此选用其作为模板蛋白进行分子对接研究, 与筛选出的淫羊藿促进骨形成成分进行分子对接研究。

根据从淫羊藿提取物中辨认出的 23 种化合物, 其中苷类化合物成苷以后化合物结构相对较大, 在对接时容易出现与受体空间不能匹配的情况, 而很多苷类化合物进去体内后很容易丢失糖链与受体发生相互作用, 因此, 本研究对提取物中的苷类成分模拟体内代谢过程去除糖链后进行模拟筛选。同时为了提高结果的准确性, 选取了与骨形成相关的

FGFR 信号通路^[36]和 TGF- β 信号通路^[37]关键蛋白与淫羊藿进行分子对接研究。

结果显示淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和箭藿苷 C 在去除糖链后与多个蛋白靶点皆有较高的结合能，且可与 FGFR1 蛋白靶点有效对接，见图 3、表 5。

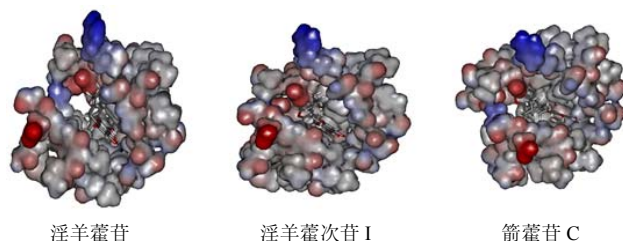


图 3 淫羊藿中各成分与 FGFR1 对接表面图

Fig. 3 Docking surface of FGFR1 and components from *Epimedium Herba*

表 5 目标成分去除糖链后的分子对接结果

Table 5 Results of molecular docking after removing the sugar chain of target component

化合物	-CDOCKER_INTERACTION ENERGY"
淫羊藿次苷 I	50.303 4
淫羊藿苷	50.717 7
箭藿苷 C	48.514 6

3 讨论

骨质疏松症是现代医学名词，是一种以低骨量和骨组织当中的微结构破坏为特征的全身性骨骼疾病，其临床症状与中医文献当中的“骨痿”、“骨枯”、“骨极”等症颇为类似。《素问·痿论》曰：“肾气热，则腰脊不举，骨枯而髓减，发为骨痿。”《灵枢·经脉》曰：“足少阴气绝，则骨枯。”《备急千金要方·骨极》也曾经指出：“骨极者，主肾也，肾应骨，骨与肾合……若肾病则骨极，牙齿苦痛，手足疼，不能久立，屈伸不利，身痹脑髓酸”。中医理论认为骨质疏松症的发病关键是“肾虚”，各种原因导致肾气/肾阴/肾阳的不足，都会影响骨髓，骨髓受损无力生骨，遂发生骨骼脆弱无力之证^[38]。临床上处方用药以及中成药研制多以补肾类中药为主进行治疗，并取得了较好的疗效，这也充分显示了中医在治疗骨质疏松症中独特的优势。

淫羊藿是传统补肾中药，骨质疏松是其临床上常用治疗病症之一，本实验参照有关文献报道^[6-7]给大鼠 ig 维甲酸 70 mg/kg，连续 14 d，14 d 后模型大鼠出现不同程度食少、拱背、反应迟钝、体毛枯疏毛躁、喜卧、体质量减轻等表征，选取血清 Ca、

P、ALP、TRACP 作为药效学评价指标，血清 Ca、P 水平可间接反映骨代谢情况^[39]；骨型碱性磷酸酶（BALP）由成骨细胞产生，其含量反映成骨细胞活性，成骨细胞活跃时 BALP 分泌增多，血清 ALP 水平升高^[40]；TRACP5b 是破骨细胞特异性标志酶，血清 TRACP 水平反映体内破骨细胞活性和骨吸收状态，其特异性高，不受昼夜变化、饮食、肝肾疾病影响^[41]。结果显示：模型组大鼠骨密度较对照组明显降低，血清 Ca、P 代谢异常，骨形成指标 ALP 和骨吸收指标 TRACP 均显著降低，刘康等^[42]的体外实验显示维甲酸降低成骨样细胞活性并抑制其增殖，表现为 ALP 活性下降，以及任心慈等^[43]的实验与本研究当中的模型趋势一致，因此可以认为骨质疏松模型建立成功，且骨吸收、骨形成都比较低缓，呈低转换型表现^[44]。给予淫羊藿提取物之后，模型大鼠的血清矿物质 Ca、P 以及 ALP、TRACP 水平均有所升高，且骨密度升高，说明淫羊藿提取物可通过促进骨质疏松大鼠骨矿代谢影响骨强度，并可调节骨形成和骨吸收的平衡，提高骨密度，发挥抗骨质疏松作用。

成纤维细胞生长因子受体（FGFRs）是一个多基因家族，属于免疫球蛋白基因家族成员。FGFs 属于分泌型蛋白，缺少跨膜结构，其生物学效应需通过 FGFRs 来实现。4 种 FGFR 中，骨骼细胞（成骨细胞、破骨细胞、软骨细胞）主要表达 1、2、3 型，即 FGFR1、FGFR2、FGFR3，FGFRs 通过不同的 FGF 配体结合参与调节骨骼的发育和成年期骨转换、骨骼矿化^[45-46]。FGFR1 属于酪氨酸激酶受体，研究表明 FGFR1 存在于胚胎骨骼发育期间、出生后骨重建、骨折愈合和骨再生。FGFR1 可通过调节软骨形成和骨生成促进骨骼发育，对骨骼生长起着至关重要的作用^[47]。且 FGFR1 是成骨细胞中主要的成纤维细胞生长因子 23（FGF23）受体，FGF23 对成骨细胞增殖、分化和细胞信号通路有着直接的影响^[48]。

本实验选取 FGFR1 靶点检测大鼠股骨 FGFR1 蛋白的表达^[49]，结果显示给予模型大鼠淫羊藿提取物后，其 FGFR1 蛋白的表达显著提高，通过 UPLC-Q-TOF-MS 法指出淫羊藿提取物中 23 种化合物，并对其进行分子对接虚拟筛选，结果显示淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I、箭藿苷 C 模拟体内代谢过程去除糖链后可与多个蛋白靶点进行有效对接，且与 FGFR1 有较高的结合能，说明淫羊藿抗骨质疏松的药效成

分可能是淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和箭藿苷 C。但淫羊藿苷、淫羊藿次苷 I 和箭藿苷 C 如何调节 FGFR1 蛋白的表达以及对 FGFR 信号通路^[36, 50]上其他蛋白靶点的调节还有待进一步的研究。

参考文献

- [1] 韩惠, 单淇, 周福军, 等. 淫羊藿中活性成分的代谢产物研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2013, 28(1): 78-82.
- [2] 中国药典 [S]. 一部. 2015: 327.
- [3] 李文魁, 张如意, 肖培根. 淫羊藿属药用植物研究进展 [J]. 现代药物与临床, 1993, 8(4): 147-154.
- [4] Yang L, Ge D, Cao X, *et al.* MiR-214 Attenuates osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells via targeting FGFR1 [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2016, 38(2): 809-820.
- [5] Guimarães, J M, Guimarães I C, Duarte M E, *et al.* Polymorphisms in BMP4 and FGFR1 genes are associated with fracture non-union [J]. *J Orthop. Res.*, 2013, 31(12): 1971-1979.
- [6] 彭璐, 赵云, 许旭东, 等. 玛咖对维甲酸诱导的骨质疏松症的抑制作用 [J]. 中药药理与临床, 2014, 30(3): 98-101.
- [7] 许鹏, 郭雄, 张银刚, 等. 维甲酸诱导骨质疏松模型大鼠的效果及机理 [J]. 四川大学学报: 医学版, 2005, 36(2): 229-232.
- [8] 李华珠, 黄文秀, 杜志斌, 等. 淫羊藿对骨质疏松大鼠骨代谢影响的实验研究 [J]. 口腔颌面外科杂志, 2010, 20(2): 136-140.
- [9] Mizuo M, Norio S, Sakura H, *et al.* Flavonal glycosides from *Epimedium sagittatum* [J]. *Phytochemistry*, 1987, 27(11): 3641-3643.
- [10] Hu B H, Zhou L D, Liu Y L. New tetrasaccharide flavonol glycoside from *Epimedium acuminatum* [J]. *J Nat Prod*, 1992, 55(5): 672-675.
- [11] Wang G J, Tsai T H, Lin L C. Prenylflavonol, acylated flavonol glycosides and related compounds from *Epimedium sagittatum* [J]. *Phytochemistry*, 2007, 68(19): 2455-2464.
- [12] 李遇伯, 孟繁浩, 鹿秀梅, 等. 淫羊藿化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 2005, 30(8): 586-588.
- [13] 韩冰, 沈彤, 刘东, 等. 黔岭淫羊藿化学成分的研究 II [J]. 中国药学杂志, 2002, 37(10): 740-742.
- [14] 胡碧煌, 周立东, 刘永澂. 粗毛淫羊藿甙的分离和结构 [J]. 药学学报, 1992, 27(5): 397-400.
- [15] 杨云, 张寒娟, 贺海花, 等. 心叶淫羊藿化学成分研究 [J]. 中草药, 2009, 40(7): 1026-1030.
- [16] 郑训海, 孔令义. 朝鲜淫羊藿化学成分研究 [J]. 中草药, 2002, 33(11): 964-967.
- [17] Li W K, Zhang R Y, Xiao P G. Flavonoids from *Epimedium wanshanense* [J]. *Phytochemistry*, 1996, 43(2): 527-530.
- [18] 贾宪生, 吴家其, 茅青. 粗毛淫羊藿根的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(3): 162-164.
- [19] 程岩, 王乃利, 王新宙, 等. 朝鲜淫羊藿的化学成分 [J]. 沈阳药科大学学报, 2006, 23(10): 644-647.
- [20] Li W K, Pan J Q, Lv M J, *et al.* A 9,10-Dihydrophenanthrene derivate from *Epimedium koreanum* [J]. *Phytochemistry*, 1995, 39(1): 231-233.
- [21] 贾宪生, 吴家其, 茅青. 粗毛淫羊藿根的化学成分研究 (II) [J]. 中国中药杂志, 1998, 23(12): 737-739.
- [22] 崔祥龙, 黄胜阳. 箭叶淫羊藿黄酮类化学成分研究 [J]. 哈尔滨商业大学学报: 自然科学版, 2011, 27(1): 17-20.
- [23] Zhang D W, Cheng Y, Zhang J C, *et al.* Cytotoxic effects of flavonol glycosides and nonflavonoid constituents of *Epimedium koreanum* primary osteoblasts [J]. *Pharm Biol*, 2008, 46(3): 185-190.
- [24] Li Y S, Liu Y L. Flavonol glycosides from *Epimedium wushanense* [J]. *Phytochemistry*, 1990, 29(10): 3311-3314.
- [25] 董晓萍, 肖崇厚, 张蓉, 等. 粗毛淫羊藿化学成分的研究 [J]. 中国中药杂志, 1994, 19(10): 614-615.
- [26] Tu F, Dai Y, Yao Z, *et al.* Flavonol glycosides from *Epimedium pubescens* [J]. *Chem Pharm Bull (Tokyo)*, 2011, 59(11): 1317-1321.
- [27] Li H F, Guan X Y, Yang W Z, *et al.* Antioxidant flavonoids from *Epimedium wushanense* [J]. *Fitoterapia*, 2012, 83(1): 44-48.
- [28] 王明权, 彭昕, 甘祺锋. 心叶淫羊藿的化学成分研究 [J]. 现代中药研究与实践, 2005, 19(2): 39-42.
- [29] Yuji I, Fusayoshi H, Keiichi S, *et al.* Three flavonol glycosides from *Epimedium koreanum* [J]. *Phytochemistry*, 1988, 27(3): 911-913.
- [30] 贾宪生, 吴家其, 茅青. 黔岭淫羊藿化学成分的研究 IV [J]. 中国药学杂志, 1999, 34(7): 442-444.
- [31] 梁海锐, 阎文玖, 李良, 等. 粗毛淫羊藿的化学成分研究 [J]. 中国中药杂志, 1993, 18(11): 677-679.
- [32] 周颖欣, 贾敏鸽, 涂光忠, 等. 巫山淫羊藿根的化学成分研究 [J]. 中草药, 2005, 36(6): 817-818.
- [33] Sun P Y, Chen Y J, Noriko S, *et al.* Studies on the constituents of *Epimedium koreanum* III [J]. *Chem Pharm Bull*, 1998, 46: 355-358.
- [34] 李文魁, 张如意, 肖培根. 朝鲜淫羊藿化学成分的研究 [J]. 中草药, 1995, 26(9): 453-455.
- [35] 张红飞, 闫利华, 张启伟, 等. 柔毛淫羊藿叶黄酮类成分研究 [J]. 中国中药杂志, 2013, 38(12): 1942-1946.
- [36] Chen C C, Huang Y L, Sun C M, *et al.* New prenylflavones

- from the leaves of *Epimedium sagittatum* [J]. *J Nat Prod*, 1996, 59(4): 412-414.
- [37] Stevens D A, Harvey C B, Scott A J, *et al*. Thyroid hormone activates fibroblast growth factor receptor-1 in bone [J]. *Mol Endocrinol*, 2003, 17(9): 1751-1766.
- [38] Mundy G, Garrett R, Harris S, *et al*. Stimulation of bone formation *in vitro* and in rodents by statins [J]. *Science*, 1999, 286(5446): 1946-1949.
- [39] 程 栋, 龙 攀, 周海艇, 等. 中医药治疗骨质疏松症研究近况 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2003, 9(1): 86-89.
- [40] Botolin S, Faugere M C, Malluche H, *et al*. Increased bone adiposity and peroxisomal proliferator-activated receptor- γ 2 expression in type 1 diabetic mice [J]. *Endocrinology*, 2005, 146(8): 3622-3631.
- [41] 许碧莲, 崔 燎, 陈文双, 等. 维甲酸致大鼠骨质疏松模型探讨及丹参骨宝的预防作用 [J]. 中国药理学通报, 2010, 26(4): 539-543.
- [42] 郭鱼波, 马如风, 王丽丽, 等. 骨质疏松动物模型及其评价方法的研究进展 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 21(9): 1149-1154.
- [43] 刘 康, 季 晖, 李绍平, 等. 三种大鼠骨质疏松模型比较研究 [J]. 中国骨质疏松杂志, 1998, 4(4): 13-18.
- [44] 任心慈, 徐先祥, 许杜娟, 等. 牛膝总皂苷对维甲酸致骨质疏松大鼠骨代谢的影响 [J]. 中国实验方剂学杂志, 2011, 17(4): 128-130.
- [45] 冯 坤, 刘月桂, 张灵菊, 等. 高转换型骨质疏松模型的生化特点 [J]. 中国骨质疏松杂志, 1997, 3(2): 25-27, 24.
- [46] Wilkie A O, Patey S J, Kan S H, *et al*. Fgfs, their receptors, and human limb malformations: clinical and molecular correlations [J]. *Am J Med Genet*, 2002, 112(3): 266-278.
- [47] Ornitz D M, Marie P J. FGF signaling pathways in endochondral and intramembranous bone development and human genetic disease [J]. *Genes Dev*, 2002, 16(12): 1446-1465.
- [48] Li J Y, Liu S G, Xiao G N, *et al*. Fibroblast growth factor receptor 1 propagates estrogen and fluid shear stress driven proliferation and differentiation response in MC3T3-E1 cells [J]. *Mol Bio (Mosk)*, 2017, 51(2), 342-355.
- [49] Shalhoub V, Ward S C, Sun B, *et al*. Fibroblast growth factor 23 (FGF23) and alpha-klotho stimulate osteoblastic MC3T3.E1 cell proliferation and inhibit mineralization. *Calcif Tissue Int*, 2011, 89(2): 140-150.
- [50] Al-Amer O. E-Cadherin and FGFR1 expression in mouse osteoblastogenesis in normoxic cultures [J]. *Int J Biomed Sci*, 2017, 13(1): 13-19.
- [51] Valverde-Franco G, Liu H, Davidson D, *et al*. Defective bone mineralization and osteopenia in young adult FGFR3^{-/-} mice [J]. *Hum Mol Genet*, 2004, 13(3): 271-284.