

基于网络药理学、分子对接和斑马鱼实验探讨仙鹤草治疗糖皮质激素性骨质疏松症的作用机制

吴佩珊¹, 谢保城², 陈世春², 罗世英^{1*}

1. 广东医科大学 海洋与热带医学学院, 广东 湛江 524023

2. 东莞市人民医院 药学部, 广东 东莞 523059

摘要: 目的 通过网络药理学、分子对接技术和斑马鱼实验探究仙鹤草治疗糖皮质激素性骨质疏松症可能的作用机制。方法 通过中药系统药理学数据库与分析平台 (TCMSP) 和本草组鉴 (HERB) 数据库初步筛选出仙鹤草相关的活性成分; 利用 SEA 和 SwissTargetPrediction 平台预测活性成分的相关靶点; 利用 OMIM、GeneCards 数据库检索糖皮质激素性骨质疏松症相关的疾病靶点; 利用韦恩图绘制平台获取共有的关键作用靶点, 并将信息导入 Cytoscape 3.7.2 软件和 STRING 在线分析平台, 进行可视化分析; 使用 DAVID 数据库进行基因本体 (GO) 和京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析; 然后通过 Autodock Tools 1.5.6 软件对有效成分-核心作用靶点进行分子对接验证。通过斑马鱼幼鱼骨形成抑制模型探讨仙鹤草水提液对糖皮质激素所致的斑马鱼幼鱼骨形成抑制的影响及机制。**结果** 通过 TCMSP 和 HERB 数据库筛选出仙鹤草的 32 种潜在活性成分, 通过 SEA 和 SwissTargetPrediction 平台预测并筛选后得 277 个药物靶点; 通过 OMIM 和 GeneCards 数据库检索糖皮质激素性骨质疏松症相关的潜在疾病靶点共 654 个。将药物-疾病的 36 个交集靶点进行富集分析, GO 功能富集主要包括通过 RNA 聚合酶 II 的转录正调控、信号转导、DNA 模板的正向调控等; KEGG 富集通路主要富集在磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt) 信号通路等信号通路。将 degree 值前 5 个的有效成分 (槲皮素、木犀草素、鞣花酸、芹菜素和山柰酚) 与核心靶点 [丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶 1 (Akt1)、非受体酪氨酸激酶 (SRC)、雌激素受体 1 (ESR1)、基质金属蛋白酶-9 (MMP9)、核因子 κ B 亚基 1 (NF κ B1)、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)、前列腺素内过氧化物合酶 2 (PTGS2) 和 Jun 原癌基因] 进行分子对接, 结果显示仙鹤草的 5 种活性成分与糖皮质激素性骨质疏松症核心靶点的结合活性均较好。通过斑马鱼幼鱼骨形成抑制模型验证仙鹤草水提液可部分通过 PI3K/Akt 信号通路缓解糖皮质激素所致的斑马鱼幼鱼骨形成抑制的现象。**结论** 揭示了仙鹤草治疗糖皮质激素性骨质疏松症的有效成分和作用机制, 为仙鹤草治疗糖皮质激素性骨质疏松症的临床实践及后续研究提供参考。

关键词: 仙鹤草; 糖皮质激素性骨质疏松症; 斑马鱼; 网络药理学; 分子对接; 槲皮素; 木犀草素; 鞣花酸; 芹菜素; 山柰酚
中图分类号: R285 文献标志码: A 文章编号: 1674-5515(2025)02-0286-14

DOI: 10.7501/j.issn.1674-5515.2025.02.005

Mechanism of *Agrimoniae Herba* in treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis based on network pharmacology, molecular docking and zebrafish experiments

WU Peishan¹, XIE Baocheng², CHEN Shichun², LUO Shiying¹

1. School of Ocean and Tropical Medicine, Guangdong Medical University, Zhanjiang 524023, China

2. Department of Pharmacy, Dongguan People's Hospital, Dongguan 523059, China

Abstract: Objective To explore the mechanism of action of *Agrimoniae Herba* in treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis based on network pharmacology, molecular docking technology, and zebrafish experiments. **Methods** Preliminary screening of active ingredients related to *Agrimoniae Herba* was conducted through the TCMSP and the HERB database; Using SEA and SwissTarget Prediction platforms to predict the relevant targets of active ingredients. Retrieve disease targets related to glucocorticoid induced osteoporosis using OMIM and GeneCards databases. Using the Venn diagram drawing platform to obtain common key targets, and

收稿日期: 2024-12-30

基金项目: 广东省医学科学技术研究基金资助项目 (A2024138); 广东省药学会科学研究基金资助项目 (2023QNTJ39)

作者简介: 吴佩珊, 女, 硕士研究生, 研究方向为骨药理学。E-mail: 3468852650@qq.com

*通信作者: 罗世英, 女, 副教授, 博士, 研究方向为骨药理学。E-mail: luosy76@gdmu.edu.cn

importing the information into Cytoscope 3.7.2 software and STRING online analysis platform for visualization analysis. Perform GO and KEGG enrichment analysis using the DAVID database. Molecular docking validation was performed on the active ingredient core target using Autodock Tools 1.5.6 software. Through a zebrafish larval bone formation inhibition model, the effects and mechanisms of the water extract of *Agrimoniae Herba* on glucocorticoid-induced inhibition of bone formation in zebrafish larvae were explored. **Results** 32 Active ingredients of *Agrimoniae Herba* were screened through TCMSP and HERB databases, with the top 5 core active ingredients (quercetin, luteolin, ellagic acid, apigenin, and kaempferol). After prediction and screening using SEA and SwissTarget Prediction platforms, 277 drug targets were identified. A total of 654 potential disease targets related to glucocorticoid induced osteoporosis were retrieved through OMIM and GeneCards databases. Enrichment analysis of the 36 intersecting targets of drugs and diseases showed that GO functional enrichment mainly included positive regulation of transcription by RNA polymerase II, signal transduction, and positive regulation of DNA-templated processes. KEGG enrichment pathways were mainly focused on the PI3K/Akt signaling pathway. Molecular docking of the top 5 effective components (quercetin, luteolin, ellagic acid, apigenin, and kaempferol) with the core targets (Akt1, SRC, ESR1, MMP9, NFKB1, GSK-3 β , PTGS2, and JUN) showed had good binding activity. The zebrafish larval bone formation inhibition model verified that the water extract of *Agrimoniae Herba* could partially alleviate the glucocorticoid-induced inhibition of bone formation in zebrafish larvae through the PI3K/Akt signaling pathway. **Conclusion** This study preliminarily revealed the effective ingredients and mechanism of action of *Agrimoniae Herba* in treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis, providing reference for the clinical practice and subsequent research of *Agrimoniae Herba* in treatment of glucocorticoid-induced osteoporosis.

Key words: *Agrimoniae Herba*; glucocorticoid-induced osteoporosis; Zebrafish; network pharmacology; molecular docking technology; quercetin; luteolin; ellagic acid; apigenin; kaempferol

糖皮质激素性骨质疏松症是一种以骨丢失、骨量减少、骨组织微结构破坏为特点的继发性骨质疏松症，常见于长期或高剂量使用糖皮质激素的患者^[1-2]。长时间使用激素的患者，其骨质疏松发生的概率高达 1/3，其骨折发生率高达 30%~50%^[1, 3]。目前，临床上用于治疗骨质疏松的药物多以抑制骨吸收、促进骨形成的化学药物为主，包括双膦酸盐、甲状旁腺激素类药物等，但大多数药物具有靶点单一、不良反应大的缺点^[4]。而中医药在其辨证论治、整体治疗、兼顾他病、不良反应小等方面，较化学药有一定优势^[5-6]。近年来中药治疗糖皮质激素性骨质疏松症的相关研究越来越多，有研究表明中药单体淫羊藿苷、木犀草素和山柰酚等可通过保护成骨细胞增殖分化能力，纠正骨稳态失衡，最终达到治疗糖皮质激素性骨质疏松症的目的^[7]。

中医学上认为血瘀是骨质疏松症的重要促进因素。骨骼必须依靠经脉中的气血营养，如果气滞血瘀和脉络瘀阻，将会导致筋骨关节失养，最终出现疼痛以及痿废^[8]。而糖皮质激素为纯阳壮火药，当属“壮火”，长时间“壮火”灼烧机体，肾气血阴阳皆虚，定会致使机体内部血瘀的形成^[9]，瘀血会增加骨内压力，从而破坏骨内微结构。瘀血不去，新血则无生机，阻碍新血输布周身，使骨骼血供不足、失于滋养，骨细胞生成减少、破坏增加，最终导致骨质疏松^[10]。

仙鹤草又称龙牙草，属蔷薇科多年生草本植物，性微温，味苦、涩，归心、肝、脾经，具有补虚益气的功效，临床上常用于呼吸、血液、内分泌等系统疾病的治疗^[11]。有研究表明，仙鹤草能增加血钙含量和骨髓造血组织面积，促进骨髓巨核细胞的增殖^[12]；大剂量使用能扩张血管，改善毛细血管通透性^[13]；周郁鸿教授在临床治疗血液疾病时常以仙鹤草补虚摄血、化瘀通经^[14]。从现代医学来看，仙鹤草主要成分有黄酮及其苷类，如槲皮素、山柰酚、木犀草素、芹菜素等；香豆素类化合物，如仙鹤草内酯等，以及有机酸类化合物、间苯三酚衍生物类和鞣质类等其它化合物^[15]。在治疗骨质疏松方面，黄酮类化合物可通过调控成骨细胞磷脂酰肌醇 3-激酶 (PI3K)/蛋白激酶 B (Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白 (mTOR) 通路保持适当自噬水平，抑制成骨细胞凋亡；调控成骨细胞铁死亡相关因子谷胱甘肽过氧化酶 4 (GPX4) 和抑制铁转出蛋白铁转运蛋白 (FPN1) 的表达降低其铁死亡水平，最终提升骨重建能力，维持骨稳态，治疗骨质疏松^[16]。蛇床子总香豆素能够有效防止类固醇性骨质疏松，对新生大鼠成骨细胞的增殖、以及骨胶原合成具有显著的促进作用^[17-18]。核因子-E2 相关因子 2 (Nrf2) 通路在糖皮质激素处理的成骨细胞中显著下调，仙鹤草特有的香豆素化合物仙鹤草内酯和去甲基仙鹤草内酯可通过清除自由基的活性激活 Nrf2 通路保护成骨

细胞免受糖皮质激素诱导的氧化应激和线粒体功能障碍的影响,缓解氧化应激,增加成骨细胞的分化,促进骨形成^[19-20]。

目前仙鹤草治疗糖皮质激素性骨质疏松症作用机制至今尚未明确,通过探索仙鹤草如何影响这一通路调控下游相关靶点治疗糖皮质激素性骨质疏松症仍具有较好的研究价值。故本研究拟通过网络药理学、分子对接技术和斑马鱼实验探究其可能的作用机制,旨在为仙鹤草治疗糖皮质激素性骨质疏松症的临床应用以及后续研究提供参考,为开发治疗糖皮质激素性骨质疏松症中药提供借鉴,更好地发挥中医药的优势作用。

1 资料与方法

1.1 筛选仙鹤草活性成分及药物靶点

以“仙鹤草”作为关键词输入 TCMSp 数据库 (<https://old.tcmsp-e.com/tcmsp.php>),以口服利用度 (OB) $\geq 30\%$ 和类药性 (DL) ≥ 0.18 为条件筛选其活性成分。在 TCMSp 中不能搜索到的仙鹤草相关信息另外借助本草组鉴 (HERB) 数据库 (<http://herb.ac.cn/>) 进行检索并以相对分子质量 ≤ 500 筛选为筛选条件,将所得的有效成分输入 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 中,再按脂水分配系数 ≤ 5 ,氢键供体 ≤ 5 ,氢键受体 ≤ 10 进行进一步筛选得出药物的有效成分。在 PubChem 数据库中检索出相应的 SMILES 和化学结构式,导入 SEA 数据库 (<https://sea.bkslab.org/>) 和 Swiss Target Prediction (<http://www.swisstargetprediction.ch/>) 物种选择“Homo sapiens”,预测得到靶点基因名称和 Uniprot ID,以 probability > 0.5 为条件筛选相关靶点,再通过 Uniprot 数据库 (<https://www.uniprot.org/>) 得到对应基因名称,构建仙鹤草药物靶点数据库。

1.2 获取糖皮质激素性骨质疏松症基因靶点

以“glucocorticoid-induced osteoporosis”和“GIOP”为关键词,分别在 OMIM (<https://www.omim.org/>) 和 GeneCards (<https://www.genecards.org/>) 数据库中筛选相关靶点,同时在 GeneCards 数据库中得到的糖皮质激素性骨质疏松症的候选靶点,选取评分 (表示糖皮质激素性骨质疏松症与靶点基因之间的关联程度) ≥ 1 的靶点为糖皮质激素性骨质疏松症的候选靶点。将 2 个数据库中的疾病靶点进行整合,删除重复靶点,构建糖皮质激素性骨质疏松症疾病靶点数据库。

1.3 仙鹤草治疗糖皮质激素性骨质疏松症有效靶点的筛选

通过 Jevnn 网站 (<http://jevnn.toulouse.inra.fr/app/example.html>),分别输入仙鹤草和糖皮质激素性骨质疏松症的有效靶点,绘制韦恩图,得到仙鹤草与糖皮质激素性骨质疏松症的交集靶点。

1.4 构建蛋白相互作用 (PPI) 网络

通过 STRING 数据库 (<https://cn.string-db.org/>),将仙鹤草和糖皮质激素性骨质疏松症交集靶点输入该数据库检索框中,种属设置为“Homo sapiens”,最低相互作用阈值设置为“medium confidence” (0.4),构建 PPI 网络图,并下载该 TSV 文件。利用 Cytoscape 3.7.2 软件对 TSV 文件进行可视化处理,再通过 Network Analyzer 功能,根据节点 degree 值筛选排名前 5 位的靶点。

1.5 基因本体 (GO) 及京都基因与基因组百科全书 (KEGG) 富集分析

运用 DAVID 数据库 (<https://david.ncifcrf.gov/>) 中的在线分析工具,对仙鹤草和糖皮质激素性骨质疏松症交集靶点进行 GO 功能和 KEGG 通路富集分析,并利用微生信平台 (<http://www.bioinformatics.com.cn/>) 进行可视化处理。

1.6 分子对接验证

选取分子对接的靶蛋白,借助 PDB 数据库 (<https://www.rcsb.org/>) 获取其 3D 结构;从 PubChem 数据库 (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>) 下载仙鹤草的活性成分的 3D 结构,对其最小结合能进行优化;用 AutodockTools 15.6 软件和 Pymol 2.6.0 软件进行分子对接和结果分析。

2 仙鹤草水提液对糖皮质激素所致的斑马鱼幼鱼骨形成抑制的影响

2.1 仪器

SHP-100 斑马鱼生化培养箱 (上海精其仪器有限公司);电子分析天平 (梅特勒托利多公司);荧光体式显微镜 [舜宇光学科技 (集团) 有限公司];Heidolph Hei-VAP Core 旋转蒸发仪 [海道尔夫仪器设备 (上海) 有限公司];SP Scientific BTP-8ZGE0X 冻干机 [德采实仪器设备 (北京) 有限公司]。

2.2 实验动物

AB 型斑马鱼幼鱼 (湖北创歆生物科技有限公司);转基因斑马鱼 Tg (ola.sp7: nlsGFP) 幼鱼 (湖北创歆生物科技有限公司)。

2.3 药品与试剂

仙鹤草（广东宝元堂药业有限公司，批号 20240630）经东莞市人民医院中药房李灿涛中药师鉴定确认为是仙鹤草，符合《中国药典》2020 年版中仙鹤草薄层色谱鉴别标准。MS-222 麻醉剂（湖北创歆生物科技有限公司，货号 MI-222）；地塞米松（美国 Sigma 公司，货号 D4902-25 mg）；茜素红（美国 Sigma 公司，货号 A5533-25 g）；3%过氧化氢（山东利尔康医疗科技有限公司，货号 D-S-3%）；甘油（北京索莱宝科技有限公司，货号 G8190-100 mL）；4%组织固定液（北京兰杰柯科技有限公司 bioship，货号 BL539A）；10×PBST 缓冲液（北京索莱宝科技有限公司，货号 P1033-500 mL）；NaCl（上海阿拉丁科技有限公司，货号 11533-500 g）；KCl（上海阿拉丁科技有限公司，货号 P670406-1 kg）；MgSO₄（上海阿拉丁科技有限公司，货号 M119381-500 g）；MgCl₂（上海阿拉丁科技有限公司，货号 M113689-1 kg）；KOH（上海阿拉丁科技有限公司，货号 P301749-500 g）；无水乙醇（上海阿拉丁科技有限公司，货号 A112717-500 mL）；PI3K 通路抑制剂 LY294002（质量分数 99.95%，美国 MedChemexpress 生物科技公司）；骨化三醇（质量分数 99.0%，美国 MedChemExpress 生物科技公司）。

斑马鱼幼鱼培养液：依次称取 2.922 g NaCl、126.735 mg KCl、366.234 mg CaCl₂ 和 397.221 mg MgSO₄ 溶于 10 L 超纯水中，即得。

茜素红染色液：称取 10 mg 茜素红粉末溶解于 2 mL 0.5% KOH 溶液中，再将其用 0.5% KOH 稀释 50 倍即得。

2.4 仙鹤草冻干粉的制备

称取仙鹤草 20 g，200 mL 水浸泡 30 min，加热煮沸，沸腾后微沸煎煮 1 h。放冷后，用双层纱布、滤纸滤过，药渣再加入 200 mL 水，按上述方法煎煮。将 2 次水煎液合并，旋蒸浓缩至约 50 mL，放入 -20 °C 冰箱中预冷冻 12 h 后，置于 -80 °C 预冷 2 h 的冷冻干燥机，冻干温度为 -80 °C，真空度为 (5±1) Pa，干燥 72 h，得仙鹤草冻干粉 14.4 g（按生药量算，得率为 72%，每克冻干粉含有 1.39 g 生药）。称取冻干粉约 10 mg，精密称定，溶于斑马鱼胚胎培养水中，得到浓度为 10 mg/mL 的样品母液。

2.5 收集斑马鱼胚胎

实验前 1 d 最后一次喂食 2 h 后，选取健康性

成熟的斑马鱼，并按照雌雄比例为 1:2 放于交配缸中，以透明挡板隔开，实验当日早上 8:00 抽离挡板，11:00 左右收集受精卵，挑除未受精胚胎及死亡胚胎，移入新鲜胚胎培养水清洗后备用。

2.6 仙鹤草水提液对地塞米松所致的斑马鱼幼鱼骨形成的影响

随机将 AB 型斑马鱼幼鱼分成 5 组，20 条/组，并置于 6 孔板中，以每孔 3 mL 培养液并作以下分组：对照组、模型组（地塞米松 25 μmol/L）、仙鹤草水提液 10 μg/mL 组、仙鹤草水提液 20 μg/mL 组、骨化三醇（100 nmol/L）组。按分组在斑马鱼幼鱼的受精后 3 d 给予相应处理，每天更换相应培养液，设置温度为 (28.0±0.5) °C，控制昼夜节律 14 h/10 h，在斑马鱼幼鱼的受精后 9 d 进行茜素红染色。

茜素红染色步骤：使用 MS-222 麻醉剂 100 mg/L 将受精后 9 d 的斑马鱼幼鱼麻醉致死；吸弃麻醉剂，将斑马鱼幼鱼置于 4%组织固定液中固定 2~4 h；去除组织固定液后，用 50%的乙醇脱水 10 min；去除脱水液，用 PBST 清洗 3 遍，每次 5 min，随后加入 1% KOH 和 1% H₂O₂ 混合液，漂白 25~30 min；吸弃漂液，用 PBST 洗 3 次，每次 5 min，后加入茜素红染液染色 2.5 h；去除染色液，用 PBST 洗去多余染色液；依次将斑马鱼幼鱼置于 0.5% KOH - 甘油（3:1）放置 6~8 h，0.5% KOH - 甘油（1:1）放置 6~8 h，0.5% KOH - 甘油（1:3）放置 12 h，最后保存在纯甘油中；使用显微镜观察并收集斑马鱼幼鱼头骨染色图像，使用 IPP 6.0 (Image-Pro Plus image analysis software version 6.0) 软件统计斑马鱼幼鱼头骨染色面积，单位像素 (pixel)。

2.7 仙鹤草水提液通过 PI3K/Akt 信号通路对地塞米松导致的 Tg (ola.sp7: nlsGFP) 斑马鱼幼鱼骨形成的影响

Tag (ola.sp7: nlsGFP) 斑马鱼是一种成骨细胞自发绿色荧光的转基因斑马鱼，LY294002 是一种 PI3K 广谱通路抑制剂，为进一步探究仙鹤草水提液缓解斑马鱼幼鱼骨形成抑制的机制，将转基因斑马鱼幼鱼分组给药：对照组；模型组（地塞米松 25 μmol/L）组；仙鹤草水提液 10 μg/mL 组；仙鹤草水提液 20 μg/mL 组；仙鹤草水提液+LY294002 (20 μg/mL+10 μmol/L) 组，在斑马鱼幼鱼的受精后 9 d 进行拍照观察。拍照步骤：将给药处理受精后 9 d 的斑马鱼幼鱼置于 MS-222 麻醉剂 (100 mg/L) 中麻醉致死；吸弃麻醉剂，用 PBST 洗 3 次，每次 5 min；将斑马鱼幼鱼放

至载玻片上,滴加 3%甲基纤维素固定体位,荧光体式显微镜下观察、采集幼鱼腹正位、侧位的荧光显微图像,使用 IPP 6.0 软件对斑马鱼幼鱼头骨荧光面积进行统计。

2.8 统计学分析

所有实验数据均采用 $\bar{x} \pm s$ 表示,在 Graphpad Prism 8 软件对实验结果进行分析,多组样本采用 One-way ANOVA 进行统计分析,若差异有统计学意义,选择 Tukey's 多重比较检验进行两两比较。

3 结果

3.1 仙鹤草活性成分及药物靶点的筛选结果

通过 TCMSp 数据库共获得 41 个仙鹤草的化学成分,根据 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 0.18$,筛选出 5 种潜在的活性成分,见表 1。通过 Herb 数据库,初步检索出 75 种仙鹤草活性成分,经 Ingredient weight (相对分子质量) ≤ 500 ,脂水分配系数 ≤ 5 ,氢键供体 ≤ 5 和氢键受体 ≤ 10 进行进一步筛选得出仙鹤草活性成分 31 种,见表 2。2 个数据库合并整理去重得仙鹤草活性成分共 32 种。

将表 1、2 中的 32 种化合物的结构分别导入 SEA 和 SwissTargetPrediction 平台获取相关靶点信息进行整理去重,并以“probability > 0.5”为条件筛选相关靶点,获取仙鹤草的药物靶点有 277 个。

3.2 糖皮质激素性骨质疏松症靶点获取结果

在 OMIM 数据库中查到糖皮质激素性骨质疏松症的疾病靶点共 46 个,在 GeneCards 数据库中查到糖皮质激素性骨质疏松症的疾病靶点共 769 个,选择打分值 ≥ 1 的 608 个靶点作为糖皮质激素性骨质疏松症的候选靶点。将 2 个数据库中的靶点进行整理合并,去除相同靶点共得到 654 个疾病靶点。将该疾病靶点与仙鹤草的活性成分的 277 个药物靶点输入 Jevnn 网站,绘制成韦恩图,见图 1,得到仙鹤草-糖皮质激素性骨质疏松症的共同靶点 48 个,即仙鹤草对糖皮质激素性骨质疏松症主要是通过上述交集靶点起到治疗的作用。

表 1 TCMSp 数据库中检索仙鹤草的活性成分相关信息

Table 1 Retrieve information on active ingredients of *Agrimoniae Herba* from TCMSp database

MOL ID	中文名称	OB/%	DL
MOL001002	鞣花酸	43.06	0.43
MOL000098	槲皮素	46.43	0.28
MOL000006	木犀草素	36.16	0.25
MOL000422	山柰酚	41.88	0.24
MOL000492	儿茶素	54.83	0.24

表 2 HERB 数据库中检索仙鹤草的活性成分相关信息
Table 2 Retrieve information on active ingredients of *Agrimoniae Herba* from HERB databas

中文名称	相对分子质	脂水分配	氢键供	氢键受
	量 ≤ 500	系数 ≤ 5	体 ≤ 5	体 ≤ 10
麝香草酚	150.22	3.3	1	1
槲皮素	302.23	1.5	5	7
野靛黄素	282.25	2.6	1	5
百秋李醇	222.37	4.1	1	1
蛇床子素	244.28	3.8	0	3
木犀草素	286.24	1.4	4	6
芳樟醇	154.25	2.7	1	1
柠檬烯	136.23	3.4	0	0
没药醇	222.37	3.8	1	1
月桂酸	200.32	4.2	1	2
山柰酚	286.24	1.9	4	6
没食子酸	170.12	0.7	4	5
桉油精	374.90	3.2	3	6
玫瑰树碱	246.31	4.8	1	1
香豆素	146.14	1.4	0	2
儿茶素	290.27	0.4	5	6
乙酸柏木酯	264.40	4.5	0	2
樟脑(合成)	152.23	2.2	0	1
咖啡酸	180.16	1.2	3	4
乙酸龙脑酯	196.29	3.3	0	2
芹菜素	270.24	1.7	3	5
柏木烯	204.35	5.2	0	0
仙鹤草酚	474.50	4.6	4	8
仙鹤草内酯-6-O-葡萄糖苷	476.50	2.2	5	10
仙鹤草内酯	314.30	4.0	2	5
3,4-二甲氧基肉桂酸	208.21	1.8	1	4
(R)-3-羟基丁酸	104.10	-0.5	2	3
左旋-β-蒎烯	136.23	3.1	0	0
蒎烯	136.23	3.3	0	0
α-松油醇	154.25	1.8	1	1
蒎烯	136.23	2.8	0	0

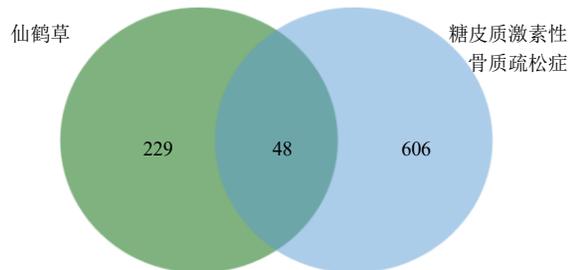


图 1 仙鹤草与糖皮质激素性骨质疏松症的交集靶点

Fig. 1 Intersection targets of *Agrimoniae Herba* and glucocorticoid-induced osteoporosis

3.3 构建仙鹤草“活性成分 - 潜在靶点”

在 Cytoscape 3.7.2 软件中导入仙鹤草的活性成分与潜在靶点，构建仙鹤草活性“活性成分 - 潜在靶点”网络图，如图 2 所示，此网络共涉及 16 个化合物，277 个靶点。六边形代表仙鹤草的活性成分，长方形表示潜在靶点（颜色越深，表示该 degree 值越大），边代表活性成分与潜在靶点之间的关联。

3.4 PPI 构建与分析

在 STRING 数据库中导入仙鹤草 - 糖皮质激素性骨质疏松症交集靶点，将物种选定为“Homo sapiens”，选取经过实验验证的 PPI 关系并设置最低交互分数为 0.4，基于“Evidence”线型，获取了包

含 48 个节点和 426 条边的 PPI 网络（见图 3A）。继而将该 PPI 网络导入 Cytoscape 3.7.2 软件中，利用软件中的插件对该网络进行分析，图 3B 中的节点表示节点蛋白，degree 值越大，则节点越大，颜色越深。边表示靶点之间的关系。并列前 5 位的核心靶点分别是 Akt1、非受体酪氨酸激酶（SRC）、雌激素受体 1（ESR1）、基质金属蛋白酶-9（MMP9）、核因子 κ B 亚基 1（NFKB1）、糖原合成酶激酶-3 β （GSK-3 β ）、前列腺素内过氧化物合酶 2（PTGS2）和 Jun 原癌基因。PPI 网络中 degree 值前 10 个靶点的 degree 值、中介中心性（BC）、接近中心性（CC）值见表 3。

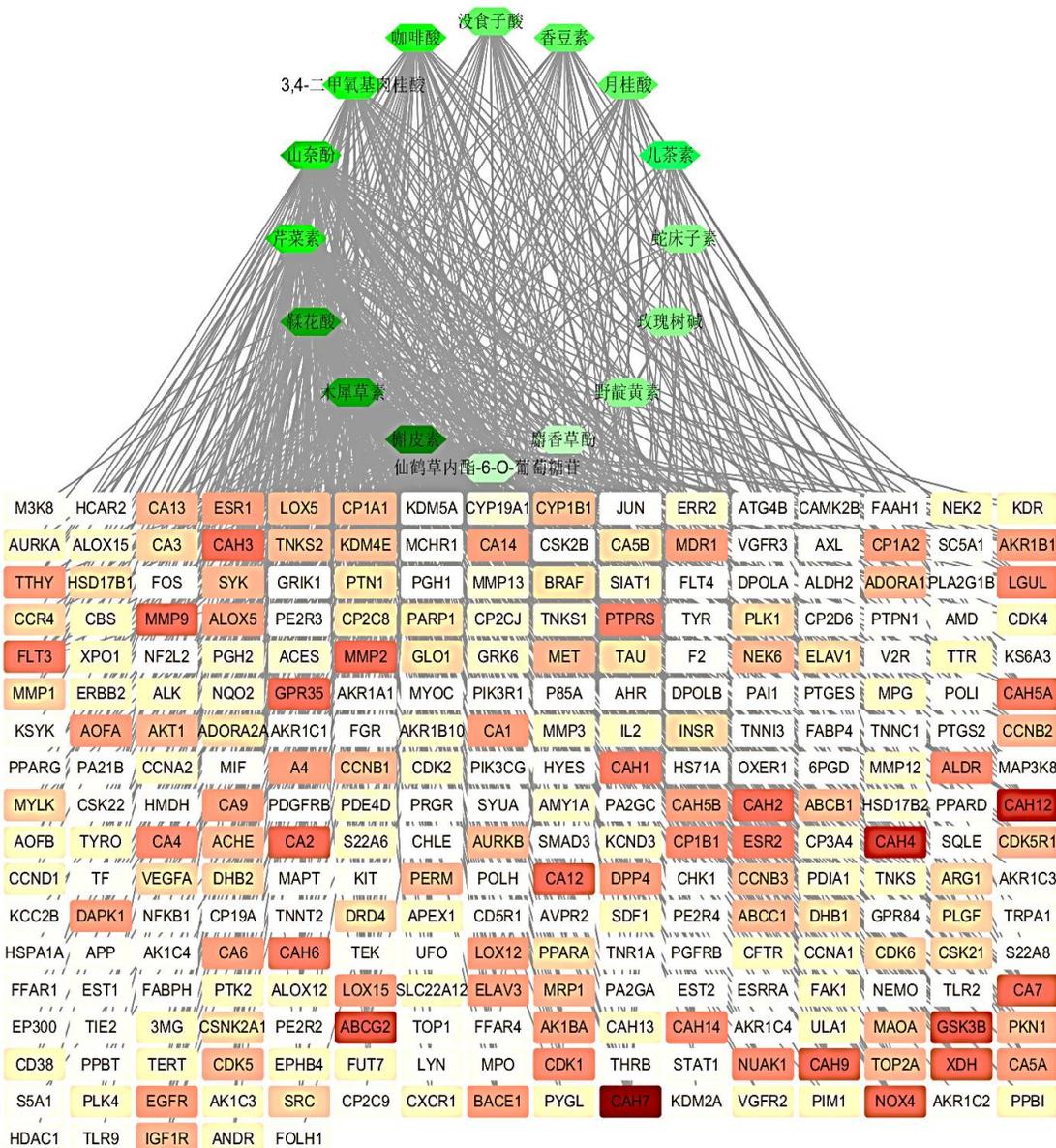


图 2 仙鹤草活性成分 - 潜在靶点网络图

Fig. 2 Network diagram of active ingredients in *Agrimoniae Herba* - potential targets

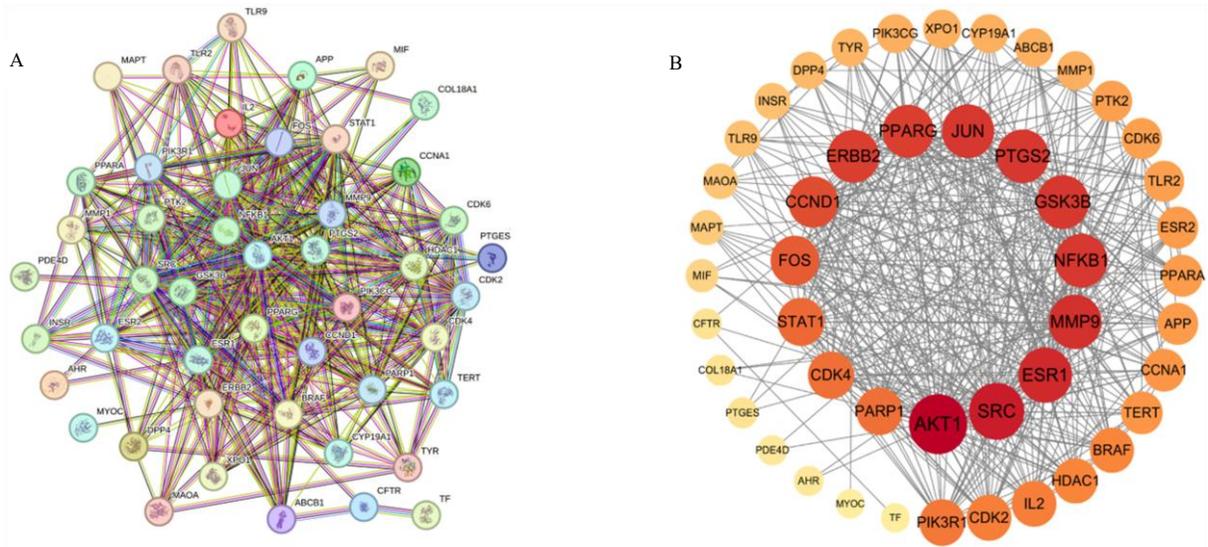


图 3 靶点蛋白 PPI 网络 (A) 和仙鹤草潜在靶点的 PPI 网络 (B)

Fig. 3 PPI network of target proteins (A) and PPI network of potential targets of *Agrimoniae Herba* (B)

表 3 核心靶点
Table 3 Key targets

靶点	degree 值	BC	CC
Akt1	40	0.077 361	0.867 924 53
SRC	36	0.115 650	0.821 428 57
ESR1	34	0.056 329	0.779 661 02
MMP9	33	0.055 271	0.766 666 67
JUN	32	0.023 832	0.754 098 36
PTGS2	32	0.040 672	0.754 098 36
GSK3B	32	0.040 747	0.754 098 36
NFKB1	32	0.021 118	0.754 098 36
PPARG	31	0.034 322	0.741 935 48
ERBB2	31	0.063 048	0.741 935 48

3.5 靶点 GO 及 KEGG 富集分析

利用 DAVID 数据库对上述 48 个仙鹤草和糖皮质激素性骨质疏松症的交集靶点进行 GO 分析与 KEGG 通路注释分析。GO 分析中,生物过程 (BP) 共得到 342 项,主要包括通过 RNA 聚合酶 II 启动子途径转录正调控 (positive regulation of transcription by RNA polymerase II)、信号传导 (signal transduction)、DNA 模板转录的正向调控 (positive regulation of DNA-templated transcription)、凋亡过程的负调控 (negative regulation of apoptotic process) 等; 细胞组分 (CC) 共得到 47 项,主要包括细胞质 (cytoplasm)、胞浆 (cytosol)、细胞核 (nucleus)、核质 (nucleoplasm) 等; 分子功能 (MF) 共得到 76

项,主要包括蛋白结合 (protein binding)、相同蛋白结合 (identical protein binding)、酶结合 (enzyme binding)、蛋白质同源二聚活性 (protein homodimerization activity) 等。按 *P* 值排序,将前 10 条结果在微生信数据可视化平台进行可视化分析,见图 4。

KEGG 通路注释分析共得到 121 条通路,按 *P* 值排序,将前 20 条结果在微生信数据可视化平台进行可视化分析,见图 4,主要包括癌症信号通路 (pathway in cancer)、PI3K/Akt 信号通路 (PI3K/Akt signaling pathway)、人乳头瘤病毒感染 (human papillomavirus infection) 等。其中 PI3K/Akt 信号通路可以刺激成骨细胞的分化和生长,同时抑制其凋亡^[21]; 还可以通过刺激破骨细胞肌动蛋白丝的形成,进而调节破骨细胞的趋化、附着和扩散等,抑制 PI3K 信号通路的表达能减少成熟破骨细胞的骨吸收^[22]。推测 PI3K/Akt 信号通路可能为仙鹤草治疗糖皮质激素性骨质疏松症的关键通路,见图 5,仙鹤草可能通过上调图中 PI3K/Akt 信号通路中标红的基因治疗糖皮质激素性骨质疏松症。

3.6 构建“活性成分-主要靶点-通路”网络

取 KEGG 富集分析获得的通路结果前 20 项,整理相关靶点,将药物-成分-靶点-通路-疾病导入 Cytoscape 3.7.2 软件,以六边形代表疾病,椭圆形代表药物,菱形代表活性成分,V 形代表信号通路,长方形代表靶点,边代表相互作用,制作“仙鹤草-活性成分-靶点-信号通路-糖皮质激素

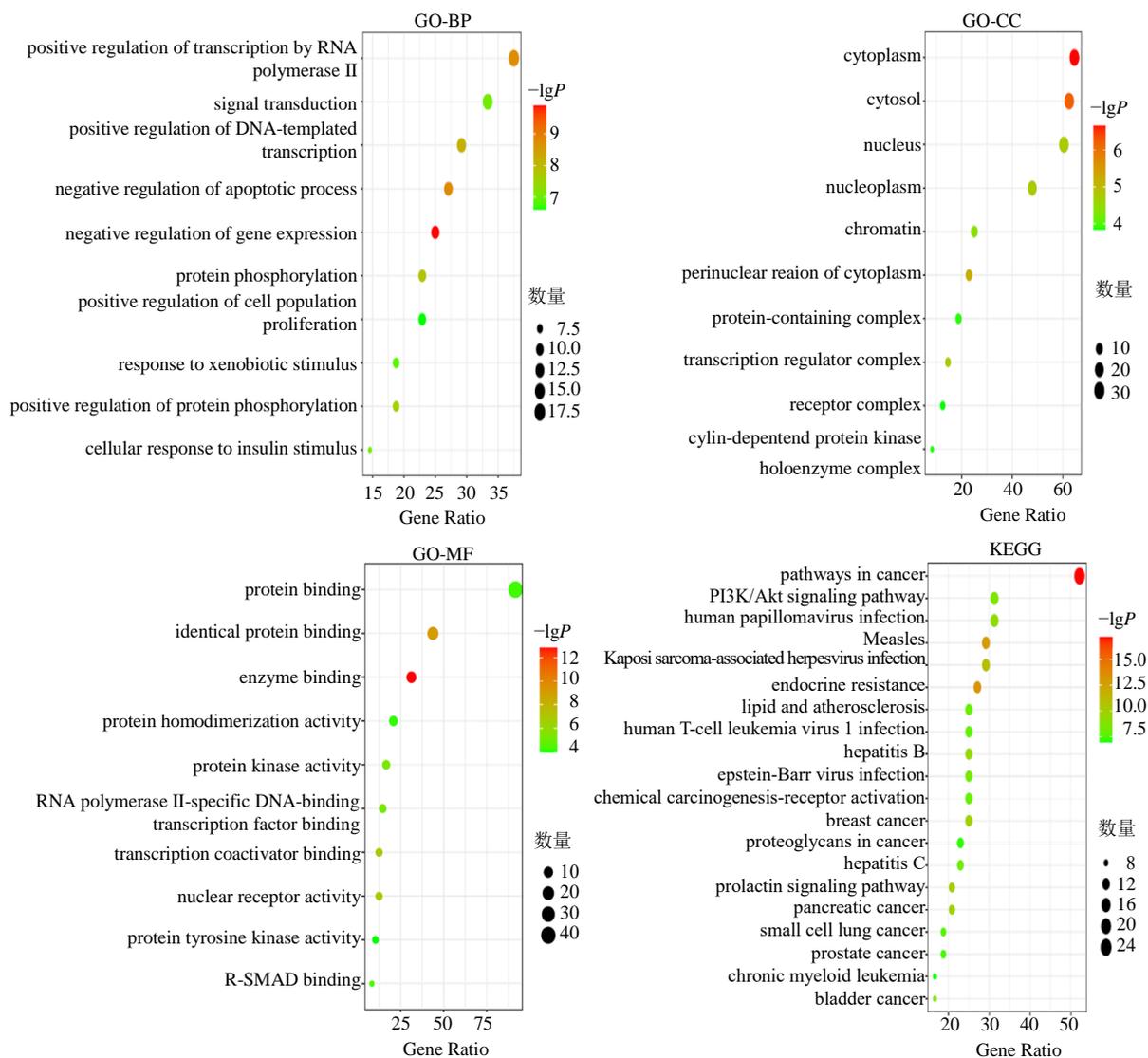


图 4 GO 和 KEGG 富集分析图

Fig. 4 GO and KEGG enrichment analysis chart

性骨质疏松症”网络，见图 6。图中共有 82 个节点（药物 1 个，活性成分 12 个，靶点 48 个，通路 20 个，疾病 1 个），390 条作用关系。

3.7 分子对接

选取 degree 值前 5 位的核心靶点 Akt1、SRC、ESR1、MMP9、NFKB1、GSK-3 β 、PTGS2、JUN 及 degree 值前 5 位的有效成分槲皮素、木犀草素、鞣花酸、芹菜素和山柰酚进行分子对接并计算结合能，以结合能参数等作为对接成功的参考值，其中结合能参数的绝对值越大说明配体与靶蛋白的结合度更高^[23]，结果见表 4，并将各蛋白中选择与其亲和力最好的成分进行构象作为最终的对接构象，并在 Pymol 2.6.0 中可视化，如图 7，小分子鞣花酸

与 Akt1 的氨基酸残基 THR-211、ILE-290、SER-205 和 ASP-292 形成 5 个氢键，与 ESR1 的氨基酸残基 THR-347、HIS524、LEU346 和 ARG-394 形成 4 个氢键，与 NFKB1 的氨基酸残基 GLU-120、LYS-95、TYR-166 和 GLY184 形成 5 个氢键，与 GSK-3 β 的氨基酸残基 ARG-394、LEU-346、THR-347 和 HIS-524 形成 4 个氢键，与 PTGS2 的氨基酸残基 GLY-45、TYR-130、HIS-39 和 CYS-36 形成 5 个氢键；小分子芹菜素与 SRC 的氨基酸残基 ASP-404 和 MET-341 形成 2 个氢键；小分子槲皮素与 MMP9 的氨基酸残基 LEU-397、PRO-421 和 PRO415 形成 3 个氢键；小分子木犀草素与 JUN 的氨基酸残基 ARG-272 形成 2 个氢键。

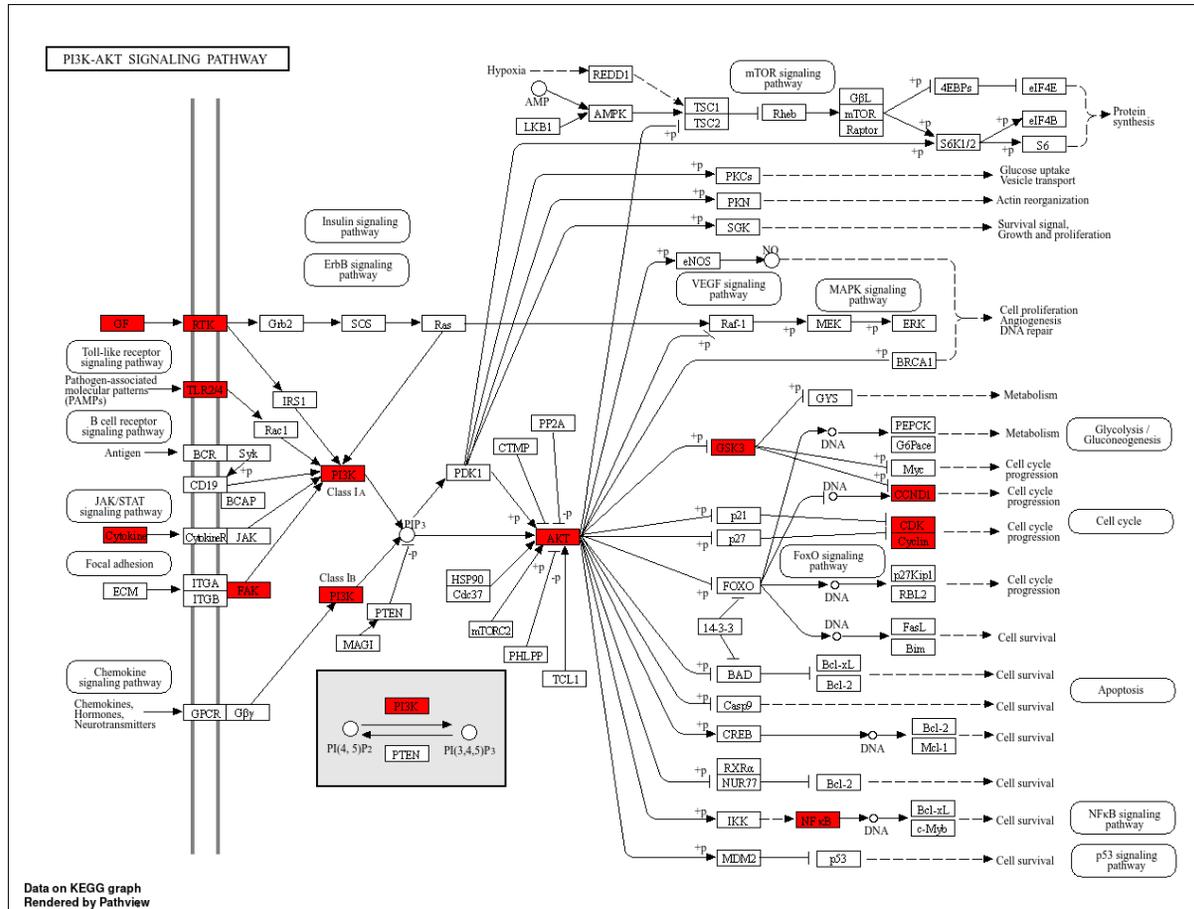


图 5 仙鹤草影响的 PI3K/Akt 信号通路

Fig. 5 PI3K/Akt signaling pathway affected by *Agrimoniae Herba*

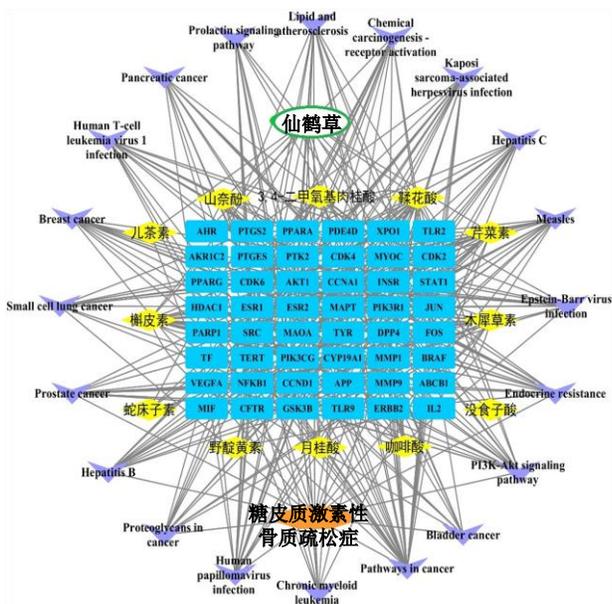


图 6 仙鹤草治疗糖皮质激素性骨质疏松症的药物 - 成分 - 靶点 - 通路 - 疾病网络图

Fig. 6 Drug-component-target-pathway-disease network diagram of *Agrimoniae Herba* in treating glucocorticoid-induced osteoporosis

表 4 分子对接结合能

Table 4 Molecular docking binding energy

蛋白名称	结合能/(kcal·mol ⁻¹)				
	槲皮素	木犀草素	鞣花酸	芹菜素	山奈酚
Akt1	-9.2	-9.8	-9.9	-9.5	-9.3
SRC	-8.5	-8.7	-8.6	-8.9	-8.4
ESR1	-8.4	-8.1	-9.3	-8.0	-8.5
MMP9	-9.6	-9.5	-7.3	-9.0	-9.3
NFkB1	-6.7	-6.7	-6.8	-6.7	-6.7
GSK3β	-7.9	-8.3	-8.7	-8.2	-7.7
PTGS2	-9.5	-9.1	-10.1	-9.2	-9.3
JUN	-5.3	-5.9	-5.5	-5.8	-5.8

3.8 斑马鱼实验

3.8.1 仙鹤草水提液对塞米松所致的斑马鱼幼鱼骨形成的影响 AB 型斑马鱼幼鱼茜素红染色结果显示, 与对照组相比, 腹正位和侧位图均显示模型组斑马鱼幼鱼头部茜素红染色面积明显减少 ($P < 0.01$), 经仙鹤草水提液 (10、20 $\mu\text{g}/\text{mL}$) 组治疗后头骨的茜素红染色面积增大 ($P < 0.01$), 提示仙鹤

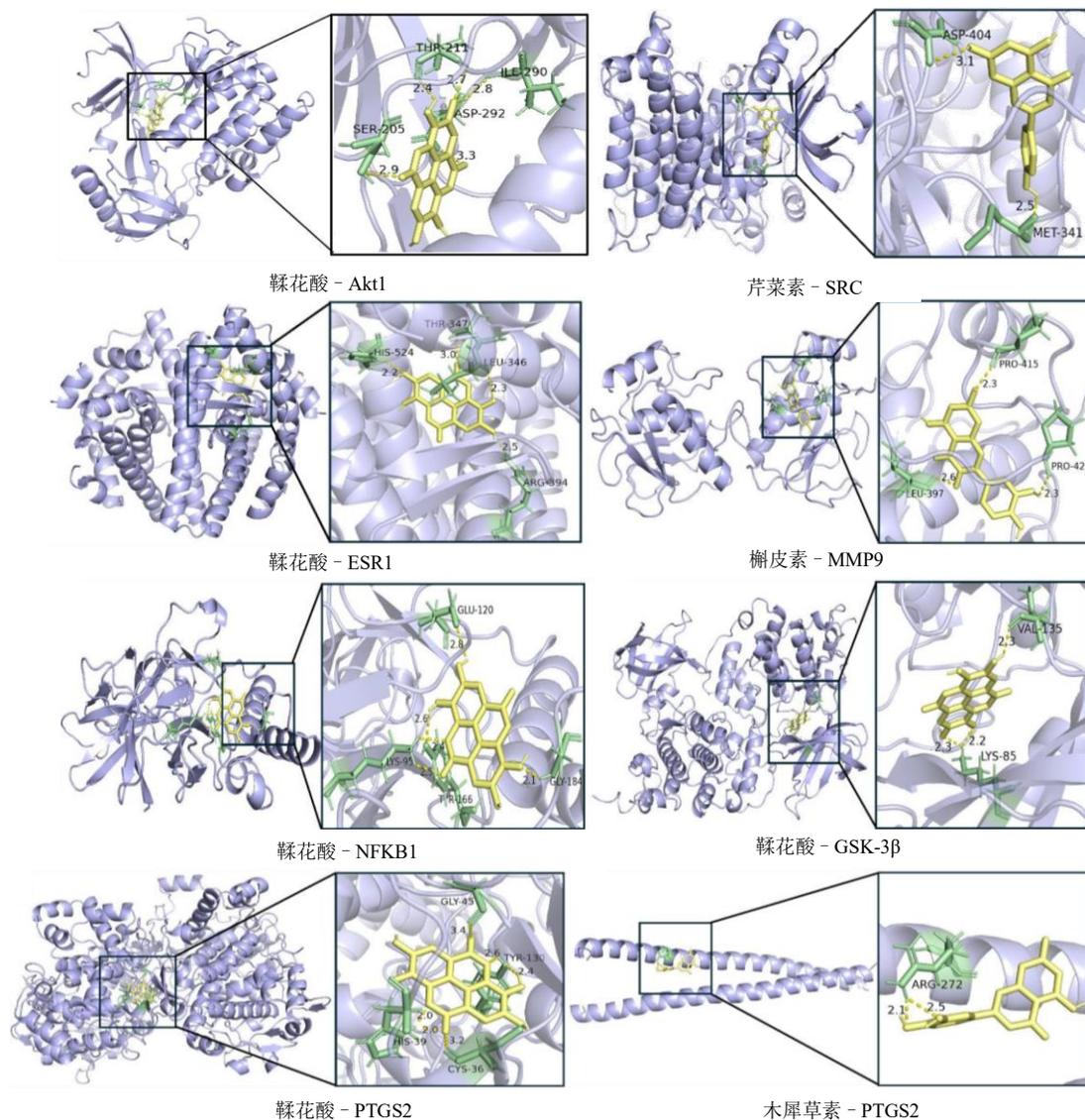


图 7 分子对接模式图

Fig. 7 Molecular docking mode diagram

草水提液能缓解地塞米松所致的斑马鱼幼鱼骨形成抑制作用，见图 8。

3.8.2 仙鹤草水提液通过 PI3K/Akt 信号通路对地塞米松导致的 Tg (ola.sp7: nlsGFP) 斑马鱼幼鱼骨形成抑制 Tg (ola.sp7: nlsGFP) 斑马鱼是一种成骨细胞自发绿色荧光的转基因斑马鱼，在荧光显微镜下拍照显示，模型组斑马鱼幼鱼头骨腹面和侧面的荧光面积均减少 ($P < 0.01$)，经仙鹤草水提液组斑马鱼幼鱼头骨腹面和侧面的荧光面积均增大 ($P < 0.01$)，提示仙鹤草水提液能缓解地塞米松所致骨形成抑制的作用。然而，加入了 PI3K 通路抑制剂 LY294002 后，斑马鱼幼鱼头骨腹面和侧面荧光面积减少 ($P < 0.05$)，阻断了仙鹤草水提液缓解

地塞米松对斑马鱼幼鱼的骨形成抑制的现象，提示仙鹤草水提液可能部分通过 PI3K/Akt 信号通路来缓解地塞米松所致的斑马鱼幼鱼骨形成抑制作用，见图 9。

4 讨论

本研究结合多种网络药理学在线分析平台和数据库筛选出仙鹤草的主要活性成分有儿茶素、鞣花酸、山柰酚、木犀草素和槲皮素，药物靶点共 277 个，疾病靶点 654 个靶点，药物 - 疾病共同靶点 48 个，进行 GO 和 KEGG 富集分析，并构建“药物有效成分 - 作用靶点”网络拓扑图，选取 degree 值排名前 7 位的靶点 (Akt1、SRC、ESR1、MMP9、NFKB1、GSK-3 β 、PTGS2 和 JUN) 与仙鹤草 degree

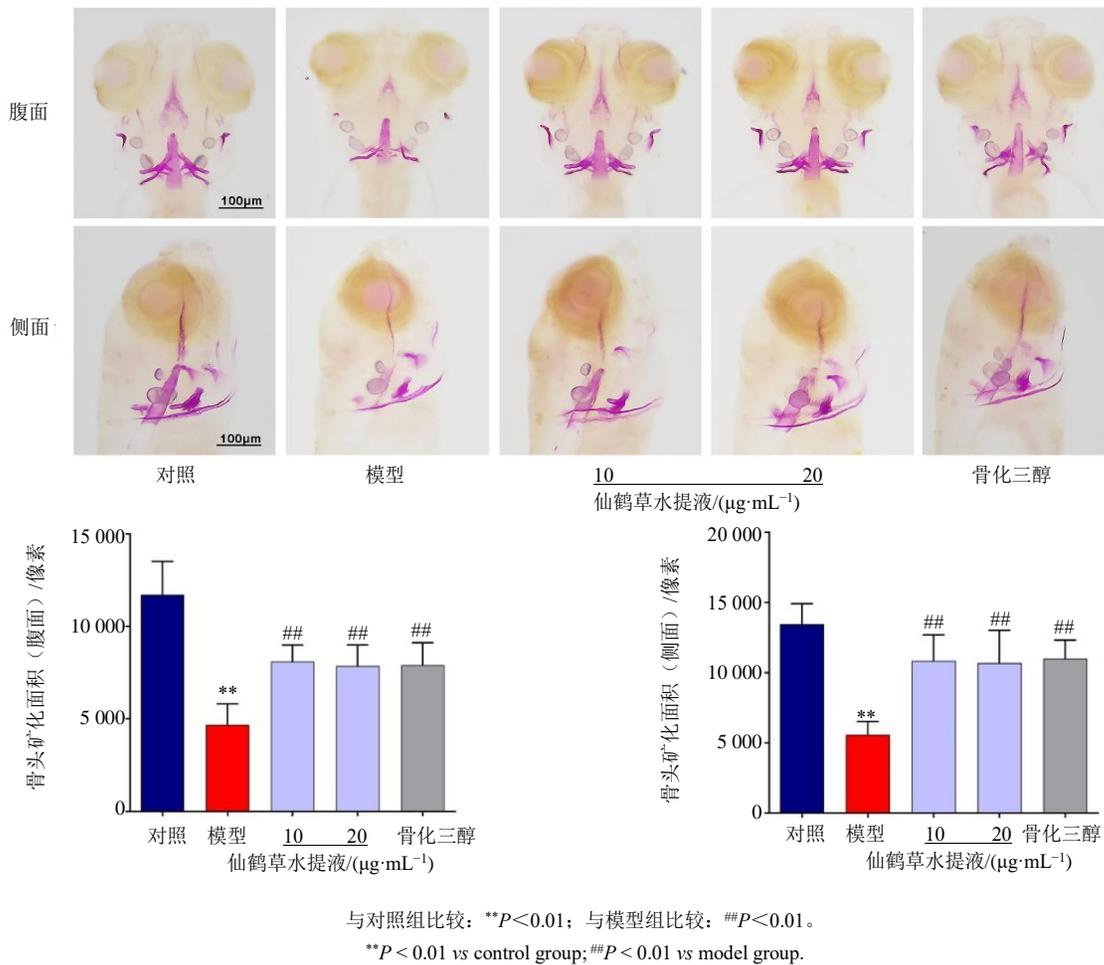


图 8 仙鹤草水提液对地塞米松所致斑马鱼幼鱼骨形成抑制的影响

Fig. 8 Effect of water extract of *Agrimoniae Herba* on dexamethasone induced bone formation inhibition in zebrafish larvae

值排名前 5 位的成分进行分子对接。一般认为, 结合能 < -5.0 kcal/mol (1 cal = 4.2 J), 表明这种成分与核心靶点蛋白结合性较好^[24], 本研究中对接结果显示关键靶点与有效成分结合能均小于 -5.0 kcal/mol, 表明仙鹤草 degree 值前 5 个的成分和糖皮质激素性骨质疏松症的 7 个核心靶点均有较好的结合能, 提示这些靶点很可能在仙鹤草治疗糖皮质激素性骨质疏松症的过程中起到较为重要的作用, 并将其中与每个蛋白结合能最好的有效成分进行分子对接展示。有研究发现, 木犀草素可激活 PI3K/Akt 信号通路, 进而抑制 GSK-3 β 蛋白活性, 调节骨代谢并促成骨分化^[25]; SRC 的 c-Src 蛋白是破骨细胞活化所必需的物质, 可对成骨细胞活化进行负调控, 其高度活化或过量表达会导致骨质疏松症的发生^[26]; 山柰酚通过调节 ESR1、MAPK 等可以抑制破骨细胞自噬和成骨细胞凋亡, 激活成骨细胞自噬, 达到骨保护作用^[27]; MMP9 在破骨细胞中选择性表达

后, 通过影响破骨细胞基因活化而影响破骨细胞的骨吸收作用^[28]; JUN 具有促进成骨细胞增殖、分化的作用, 可以补偿骨缺损部位的骨量并促进其骨钙化组织形成^[29]; 抑制 PTGS2 表达水平, 可减轻骨质疏松患者骨破坏及机体炎症反应^[30]。

仙鹤草在治疗骨质疏松方面的药理作用报道较少, 但其有效成分在治疗骨质疏松方面有相关报道。木犀草素在糖皮质激素诱导的原发性骨质疏松细胞模型中具有促进成骨细胞增殖并抑制其凋亡的作用^[31], 可提高绝经后骨质疏松症大鼠模型股骨组织的骨密度及骨小梁数量, 参与骨合成代谢, 进而增加骨量及骨强度, 对于骨质疏松症有一定的疗效^[32]。槲皮素是具有多种生物活性的黄酮醇类化合物, 通过抑制破骨细胞、调控骨髓间充质干细胞的细胞机制, 促进骨形成、抑制骨吸收以改善骨质疏松^[33-34]。鞣花酸作为天然的多酚, 具有强抗氧化性, 鞣花酸能够通过抑制破骨代谢, 抑制骨吸收作用,

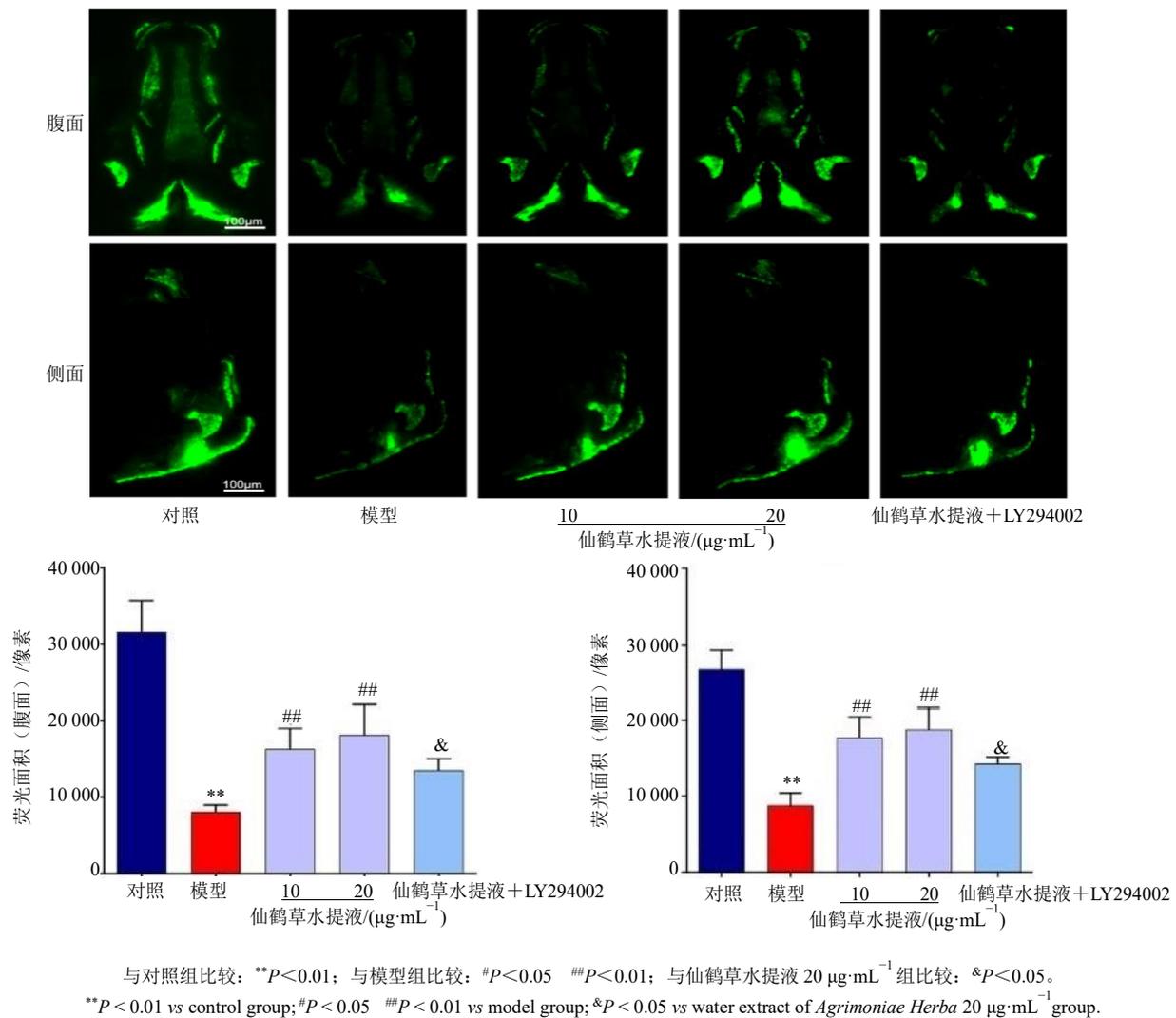


图 9 LY294002 对仙鹤草水提液缓解地塞米松所致 Tg(ola.sp7: nlsGFP)斑马鱼幼鱼骨形成抑制的影响
 Fig. 9 Effect of LY294002 on the mitigation of dexamethasone-induced inhibition of bone formation in Tg(ola.sp7: nlsGFP) zebrafish larvae by water extract of *Agrimoniae Herba*

从而有益于骨质疏松症的治疗^[35],有研究表明鞣花酸能够通过抑制 MAPK 信号通路,并且抑制 NFATc1 的表达,从而抑制破骨细胞的分化和骨吸收功能^[36]。

在本研究 KEGG 分析中,MAPK 信号通路也是仙鹤草治疗糖皮质激素性骨质疏松症的信号通路之一。山柰酚对成骨细胞的作用是促进其增殖、分化并抑制其凋亡而发挥抗骨质疏松的目的,通过对微小骨结构的修复,促进血管新生并调节脂质代谢发挥积极的抗骨质疏松作用^[37]。有研究表明,山柰酚可通过上调 PI3K、Akt 磷酸化水平,进而上调下游 GSK-3 β 磷酸化,GSK-3 β 氨基端的丝氨酸 9 (ser-9) 磷酸化后会抑制酶活性,提高细胞中 β -catenin 水平,进而促进骨形成^[38]。芹菜素可能通过激活 PI3K/

Akt 通路,促进 Runt 相关转录因子 2 (Runx2)、骨钙素 (OCN)、护骨素 (OPG) 表达,抑制核因子 κ B 受体活化因子配体 (RANKL) 表达,呈剂量相关性发挥抑制骨质疏松症骨吸收、促进骨形成作用^[39]。

过量的地塞米松会导致斑马鱼幼鱼成骨细胞活性减弱、破骨细胞的活性增强,从而造成斑马鱼幼鱼骨形成抑制^[40-41]。因此,本研究中采用 $25 \mu\text{mol/L}$ 的地塞米松来构建斑马鱼幼鱼骨形成抑制模型。Osterix 基因 (sp7) 是成骨细胞分化过程中关键且必要的调节因子。Tg (ola.sp7: nlsGFP) 是一种转基因系斑马鱼,其特征是其成骨细胞用 GFP 选择性标记,绿色荧光的面积可以直接反映成骨细胞的分化和数量^[40]。

通过对 AB 型野生型斑马鱼幼鱼和对转基因斑

马鱼 Tg (ola.sp7: nlsGFP) 幼鱼头骨进行茜素红染色和荧光拍照并进行分析, 可得出与对照组相比, 模型组头骨的茜素红染色面积和荧光面积下降, 说明糖皮质激素(地塞米松)显著阻碍斑马鱼幼鱼的骨形成发育。在接受仙鹤草水提液(10、20 μg/mL)治疗后, 斑马鱼幼鱼头骨的茜素红染色面积和荧光面积增加, 说明仙鹤草水提液能够缓解地塞米松所致的斑马鱼幼鱼骨形成抑制和骨量下降的现象, 揭示仙鹤草在治疗糖皮质激素性骨质疏松上具有一定的开发潜力。PI3K/Akt 通路在糖皮质激素诱导的成骨细胞增殖分化抑制中发挥重要作用^[42], 在本研究的 KEGG 分析中, PI3K/Akt 信号通路可能是仙鹤草治疗糖皮质激素性骨质疏松的信号通路, 故推测仙鹤草有可能通过 PI3K/Akt 信号通路治疗糖皮质激素性骨质疏松症。因此, 使用 PI3K 通路抑制剂 LY294002 来阻断 PI3K 通路的表达, 当使用 PI3K 通路抑制剂 LY294002 处理转基因斑马鱼 Tg (ola.sp7: nlsGFP) 幼鱼后, 发现斑马鱼幼鱼头骨腹面和侧面的荧光面积均下降, 逆转了仙鹤草水提液对地塞米松所致的斑马鱼幼鱼骨形成抑制的治疗作用, 推断仙鹤草至少是部分通过 PI3K/Akt 信号通路来缓解地塞米松所致的斑马鱼幼鱼骨形成抑制。

糖皮质激素性骨质疏松症病机以肾阳虚证、肾阴虚证、肝肾两虚证、血瘀证为主, 治疗糖皮质激素性骨质疏松症时使用的中药方剂以补肾方最多, 但因其属慢性病, 病程较长, 而补阳药多温燥, 若长期服用并不适宜; 应加强健脾益气及活血祛瘀等中药对糖皮质激素性骨质疏松症的研究^[11, 43]。本研究通过网络药理学和分子对接预测了仙鹤草的活性成分主要通过干扰 Akt1、SRC、ESR1、MMP9、NFKB1、GSK-3β、PTGS2 和 JUN 等靶点, 可能通过 PI3K/Akt 信号通路发挥治疗糖皮质激素性骨质疏松症并通过斑马鱼幼鱼成骨抑制模型验证仙鹤草水提液可部分通过 PI3K/Akt 信号通路缓解糖皮质激素所致的斑马鱼幼鱼骨形成抑制的现象, 为仙鹤草治疗糖皮质激素性骨质疏松的药效物质基础研究提供了理论依据。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

[1] Zavatta G, Clarke B L. Glucocorticoid-and transplantation-induced osteoporosis [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2021, 50(2): 251-273.

[2] Xing Q, Feng J Y, Zhang X L. Glucocorticoids suppressed osteoblast differentiation by decreasing Sema3A expression via the PIK3/Akt pathway [J]. *Exp Cell Res*, 403(1): 112595.

[3] Compston J. Glucocorticoid-induced osteoporosis: an update [J]. *Endocrine*, 2018, 61(1): 7-16.

[4] Chen Y J, Jia L H, Han T H, et al. Osteoporosis treatment: current drugs and future developments [J]. *Front Pharmacol*, 2024, 15: 1456796.

[5] 陈天鹏, 陈琪, 丰杰, 等. 中药复方治疗糖皮质激素性骨质疏松症用药规律分析 [J]. *山东中医药大学学报*, 2021, 45(6): 793-798.

[6] 廖韵诺, 赵凯丽, 郭宏伟. 中药网络药理学的应用与挑战 [J]. *中草药*, 2024, 55(12): 4204-4213.

[7] 侯博, 李东楠, 张永政, 等. 中药单体成分治疗糖皮质激素性骨质疏松症的机制及应用研究进展 [J]. *山东医药*, 2023, 63(32): 92-96.

[8] 王伟, 冯小波, 宋红, 等. 骨质疏松症的中医病因病机及其治疗进展 [J]. *中国社区医师*, 2018, 34(30): 19-20.

[9] 何才剑, 陈天鹏, 周航, 等. 从“壮火食气”探讨糖皮质激素性骨质疏松症的病机 [J]. *中医杂志*, 2021, 62(14): 1273-1275.

[10] 任之强, 赵志强, 晋大祥, 等. 骨质疏松症肾虚血瘀量化评分与性激素和血细胞参数关系研究 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(5): 560-563.

[11] 张慧兰, 郭文晖, 王旭, 等. 仙鹤草化学成分和药理作用的研究进展及其质量标志物(Q-Marker)预测分析 [J]. *中草药*, 2023, 54(16): 5399-5409.

[12] 孙静. 仙鹤草不同成分促进小鼠化疗后血小板减少作用研究 [J]. *中医药信息*, 2013, 30(2): 17-19.

[13] 张亚平, 马琼. 大剂量仙鹤草治疗梅尼埃病 100 例疗效观察 [J]. *西部医学*, 2007(4): 642.

[14] 宋岩松, 高雁婷, 许晓娜, 等. 周郁鸿辨治血液病常用药对拾珍 [J]. *上海中医药杂志*, 2019, 53(2): 20-22.

[15] 刘位杰, 梁敬钰, 孙建博, 等. 仙鹤草化学成分及药理作用研究进展 [J]. *海峡药学*, 2016, 28(2): 1-7.

[16] 周旋, 缪毛毛, 李孟颖, 等. 中药黄酮类化合物在细胞程序性死亡介导的骨关节疾病中的作用机制研究进展 [J]. *中国现代应用药学*, 2024, 41(15): 2126-2135.

[17] 代英宏, 赵艳敏, 张美媛, 等. 香豆素类化合物生理药理活性的研究 [J]. *山东化工*, 2021, 50(4): 30-31.

[18] 谢华, 李青南, 黄连芳, 等. 蛇床子总香豆素对类固醇性骨质疏松的作用 [J]. *Acta Pharmacol Sinica*, 1994(4): 85-88.

[19] Lei C, Hui T, Yanbo Z K, et al. Agrimonolide and desmethylagrimonolide induced HO-1 expression in Hep G2 cells through Nrf2-transduction and p38 inactivation [J]. *Front Pharmacol*, 2017, 7: 513.

- [20] Chen L, Hu S L, Xie J, *et al.* Proanthocyanidins-mediated Nrf2 activation ameliorates glucocorticoid-induced oxidative stress and mitochondrial dysfunction in osteoblasts [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2020, 2020: 9102012.
- [21] 李云隆, 赵振群, 刘万林. 激素性股骨头缺血坏死中 PI3K/Akt/mTOR 信号通路对自噬的调控 [J]. 中国组织工程研究, 2019, 23(12): 1921-1929.
- [22] 史东梅, 董明, 陆颖, 等. PI3K/Akt 信号通路骨破坏: 问题与机制 [J]. 中国组织工程研究, 2020, 24(23): 3716-3722.
- [23] 陈淑妮, 何海滨, 雷孝文, 等. 基于网络药理学及分子对接技术探讨丹参治疗缺血性肠病的作用机制 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(9): 2243-2253.
- [24] 杜欢, 徐鑫梅, 徐僮, 等. 基于网络药理学与分子对接技术探讨小檗皮治疗 2 型糖尿病的作用机制 [J]. 现代药物与临床, 2024, 39(10): 2493-2501.
- [25] 赵灿斌, 孙宏章, 闫小龙, 等. 木犀草素激活 PI3K/AKT 信号通路促进 MC3T3-E1 增殖及成骨分化的潜在机制 [J]. 世界中西医结合杂志, 2024, 19(11): 2177-2186.
- [26] 詹洁莹, 李国全, 滕希峰, 等. 基于网络药理学探讨盐酸雷洛昔芬治疗绝经后骨质疏松症的作用机制 [J]. 生物化工, 2023, 9(5): 13-18.
- [27] Wong S K, Chin K Y, Ima N. The osteoprotective effects of kaempferol: The evidence from *in vivo* and *in vitro* studies [J]. *Drug Des Devel Ther*, 2019(13): 3497-3514.
- [28] Zhu L X, Tang Y, Li X Y, *et al.* Osteoclast-mediated bone resorption is controlled by a compensatory network of secreted and membrane-tethered metalloproteinases [J]. *Sci Transl Med*, 2020, 12(529): eaaw6143.
- [29] 甄瑞峰, 卢文君, 刘树娇. 基于网络药理学分析绞股蓝治疗骨质疏松症的机制研究 [J]. 中国当代医药, 2022, 29(18): 11-17.
- [30] Liu W J, Jiang Z M, Chen Y, *et al.* Network pharmacology approach to elucidate possible action mechanisms of *Sinomenii Caulis* for treating osteoporosis [J]. *J Ethnopharmacol*, 2020, 257: 112871.
- [31] Zheng L. Luteolin stimulates proliferation and inhibits late differentiation of primary rat calvarial osteoblast induced by high-dose dexamethasone via Sema3A /NRP1/Plexin A1 [J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2021, 22(11): 1538-1545.
- [32] 马月超. 木犀草素抑制 PRMT5 的表达在骨质疏松症中的作用研究 [D]. 百色: 右江民族医学院, 2023.
- [33] 王龙飞, 高玉海, 谢高倩, 等. 槲皮素改善骨质疏松的作用机制研究进展 [J]. 现代药物与临床, 2023, 38(3): 714-718.
- [34] 刘昭明, 关智宇, 蒋太平, 等. 由“从瘀论治”理论探讨三七中槲皮素对破骨细胞分化的自噬调控机制 [J]. 中国骨质疏松杂志, 2022, 28(12): 1740-1744.
- [35] Rantlha M, Sagar T, Kruger M C, *et al.* Ellagic acid inhibits RANKL-induced osteoclast differentiation by suppressing the p38 MAP kinase pathway [J]. *Arch Pharm Res*, 2017, 40(1): 79-87.
- [36] 林茜茜. 鞣花酸保护去卵巢小鼠骨丢失的作用及其分子机制研究 [D]. 南宁: 广西医科大学, 2019.
- [37] 杨启培, 陈锋, 崔伟, 等. 山柰酚活性单体治疗骨质疏松症的相关信号通路 [J]. 中国组织工程研究, 2024, 28(26): 4242-4249.
- [38] 赵明智, 张磊, 周丹, 等. 山柰酚调控 PI3K/AKT/GSK-3 β 信号通路促进人炎性乳腺癌 SUM190 细胞株凋亡的研究 [J]. 广西医科大学学报, 2019, 36(6): 872-877.
- [39] 冯阳阳, 常宝生, 赵程锦, 等. 芹菜素调节绝经后骨质疏松症大鼠骨吸收与骨形成稳态的作用 [J]. 热带医学杂志, 2023, 23(9): 1203-1211.
- [40] Luo S Y, Yang Y J, Chen J F, *et al.* Tanshinol stimulates bone formation and attenuates dexamethasone-induced inhibition of osteogenesis in larval zebrafish [J]. *J Orthop Transl*, 2016, 4: 35-45.
- [41] Luo S Y, Chen J F, Zhong Z G, *et al.* Salvianolic acid B stimulates osteogenesis in dexamethasone-treated zebrafish larvae [J]. *Acta Pharmacol Sin*, 2016, 37(10): 1370-1380.
- [42] 王洋, 王飞, 张思萌, 等. 瑞香素通过 PI3K/AKT 和 BMP/Smad 信号通路保护糖皮质激素诱导的成骨细胞增殖和分化抑制研究 [J]. 河北医药, 2022, 44(7): 991-995.
- [43] 杨燕, 刘仁慧, 王秀娟. 中药治疗糖皮质激素性骨质疏松症的药理研究进展 [J]. 北京中医药, 2016, 35(3): 275-278.