

骨碎补治疗骨关节炎的网络药理学研究

骆 帝, 许 波, 李 刚*, 梁学振, 刘 杰, 李嘉程, 夏聪敏, 阎博昭, 盖帅帅

山东中医药大学, 山东 济南 250355

摘 要: **目的** 基于网络药理学和生物信息学研究骨碎补治疗骨关节炎(OA)可能的分子机制。**方法** 通过中药系统药理学数据库和分析平台(TCMSP)对骨碎补可能的生物活性成分和靶点进行筛选和预测,通过 TTD 等 5 个数据库挖掘骨关节炎相关的作用靶点,采用 ClueGo 分析骨碎补治疗 OA 可能的分子机制。**结果** 从 TCMSP 检索出 71 个骨碎补相关成分,根据口服生物利用度(OB)和药物相似性(DL)值筛选获得生物活性成分 18 个,同时预测出 92 个可能的作用靶点;通过相关数据库共检索到与 OA 密切相关的靶点 168 个;拓扑分析筛选出骨碎补治疗 OA 的 99 个关键靶点;ClueGO 分析显示,骨碎补治疗 OA 的关键靶点主要涉及细胞周期、炎症、感染、癌症相关等 31 条信号通路。**结论** 骨碎补治疗 OA 具有多系统、多成分、多靶点的特点;其可能的作用机制包括直接参与骨重建的细胞增殖、凋亡及分化,调节成骨、破骨代谢平衡,以及调节免疫、炎症反应等干预和影响骨微环境以达到控制疾病发生发展的目的,与目前治疗 OA 的作用机制相符合。

关键词: 骨碎补; 骨关节炎; 网络药理学; 生物信息学; 分子机制; 信号通路; 木犀草素; 儿茶素; 金鱼草素; 柚皮素

中图分类号: R285.5 **文献标志码:** A **文章编号:** 0253-2670(2018)15-3516-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2018.15.008

Network pharmacology study on *Drynariae Rhizoma* in treatment of osteoarthritis

LUO Di, XU Bo, LI Gang, LIANG Xue-zhen, LIU Jie, LI Jia-cheng, XIA Cong-min, YAN Bo-zhao,
GAI Shuai-shuai

Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China

Abstract: Objective To investigate the potential molecular mechanism of *Drynariae Rhizoma* in the treatment of osteoarthritis based on network pharmacology and bioinformatics. **Methods** The potential active constituents and targets of *Drynariae Rhizoma* were screened and predicted through the traditional Chinese medicine systems pharmacology database and analysis platform (TCMSP). Using TTD and four other osteoarthritis related disease databases, combining the topological analysis, the specific target of *Drynariae Rhizoma* in the treatment of osteoarthritis was filtered. And the further possible molecular mechanism of *Drynariae Rhizoma* was analyzed through ClueGo method. **Results** Seventy-one corresponding compounds of *Drynariae Rhizoma* were retrieved from TCMSP. According to the values of oral bioavailability (OB) and drug likeness (DL), 18 possible bioactive components were screened out, and 92 potential targets were obtained by using the related target prediction technique. A total of 168 known targets closely related to the development of osteoarthritis were retrieved from the disease-related databases. A total of 99 key genes were screened out through network topological analysis. The ClueGo analysis showed that the action mode of *Drynariae Rhizoma* in treating osteoarthritis was mainly working on 31 signaling pathways related to cell cycle, inflammation, infection and cancer etc. **Conclusion** *Drynariae Rhizoma* has the characteristics of multisystem, multiple targets, and multicomponent in the treatment of osteoarthritis. Through analysis, the possible mechanism includes not only directly acting on proliferation, apoptosis, differentiation of cells related to bone reconstruction and regulation of the balance of bone metabolism, but also affecting and interfering the bone and cartilage microenvironment through regulating immunity, inflammation, and other systems, which is consistent with the current mechanism of osteoarthritis treatment.

收稿日期: 2017-12-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(81774333); 山东省重点研发计划(2016GSF202022)

作者简介: 骆 帝(1989—), 男, 2017 级在读博士生, 研究方向为骨与关节疾病研究。Tel: 13884988867 E-mail: topld22@163.com

*通信作者 李 刚(1970—), 男, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向为骨与关节疾病研究。Tel: (0531)68617088 E-mail: doctorlee808@163.com

Key words: *Drynariae Rhizoma*; osteoarthritis; network pharmacology; bioinformatics; molecular mechanisms; signaling pathway; luteoin; catechin; aureusidin; (S)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one

骨关节炎 (osteoarthritis, OA) 是一种常见难治的骨与关节疾病, 主要以关节软骨细胞显著减少, 关节基质崩解、软骨下骨退变及继发性骨质增生为特征, 以关节逐渐加重的不可逆性疼痛、肿胀、运动障碍甚至畸形等为临床特征表现。有研究指出全球大约有 10% 的男性、18% 的女性以及 60%~65% 的 60 岁以上人群患有 OA^[1], 且在过去数十年中其发病率总体呈增长态势^[2]。但 OA 的发病机制仍不十分明确。目前, OA 的非手术手段治疗有很多^[3], 包括药物干预、饮食调控和运动疗法。化学药通常分为非特异性药物和特异性药物 2 类, 可显著缓解患者的临床症状, 但可能的不良反应和耐受性限制了其应用, 而且其靶向性过于单一。传统中医凭借其“简、便、廉、效”的优势在防治 OA 方面发挥着得天独厚的优势, 具有广阔的发展前景。

骨碎补 *Drynariae Rhizoma* 是水龙骨科 (Polypodiaceae) 植物槲蕨 *Drynaria fortunei* (Kunze) J. Smith 的干燥根茎, 始载于唐《本草拾遗》, 入肝、肾经, 其味甘、辛, 性温, 具有疗伤止痛、补肾强骨功效, 主治跌扑闪挫、筋骨折伤、肾虚腰痛、筋骨痿软、耳鸣耳聋、牙齿松动等症, 还具有促增殖分化、抗骨质疏松、肾保护、牙骨细胞保护、骨缺损修复、抗骨关节炎等作用, 是中医临床治疗 OA 常用药物之一^[4-5]。文献研究表明, 骨碎补在治疗 OA 方面可发挥显著作用^[5], 但其药效物质基础和分子机制依然不十分明确。所以, 深入分析探究骨碎补治疗 OA 的活性成分及其可能的作用机制, 从微观角度科学论证阐述, 对其临床应用与推广具有十分重要的意义。但现有的中药研究手段普遍存在成本高昂、检测灵敏度低、缺乏标准可靠的评价指标等问题, 难以全面、高效、清晰地揭示中药作用机制。得益于大数据时代网络药理学和生物信息学理论的建立与发展, 使中药潜在生物活性成分和作用靶点的研究不断深入。本研究筛选和预测了骨碎补治疗 OA 的相关靶点, 对其进行富集分析, 探讨骨碎补治疗 OA 可能的作用机制。

1 方法

1.1 骨碎补生物活性成分筛选

通过检索中药系统药理学数据库和分析平台^[6] (TCMSP) 挖掘骨碎补所有成分数据, 根据成分药

动力学吸收、分布、代谢、排泄 (ADME) 参数^[7-9]进行初步筛选, 筛选条件为药物口服生物利用度 (OB) $\geq 30\%$, 药物相似性 (DL) ≥ 0.18 ^[10-11]。在 TCMSP 中对筛选后获得的活性成分进行配对分析, 得到骨碎补最终的生物活性成分。同时, 结合前期研究结果及查阅文献对生物活性成分进行完善。

1.2 骨碎补作用靶点预测及生物活性成分-靶点网络构建

通过 TCMSP 靶点预测模型预测“1.1”项下骨碎补生物活性成分的作用靶点, 采用网络图像化软件 Cytoscape 3.2.1^[10]对生物活性成分及作用靶点进行相关网络构建, 其中用“节点 (node)”表示分子、靶蛋白, 用“边 (edge)”表示成分与靶点之间的关系。采用 network analyzer 插件进行网络特征分析, 以明确骨碎补中较为重要的成分和靶点, 结合文献分析其中的相互作用。

1.3 OA 相关疾病靶点检索

通过药物靶标数据库^[12] (TTD, <http://bidd.nus.edu.sg/BIDD-Databases/TTD/TTD.asp>)、药物银行 DrugBank^[13] (<https://www.drugbank.ca/>)、人类孟德尔遗传在线数据库^[14] (OMIM, <http://www.omim.org/>)、遗传关联数据库^[15] (GAD, <https://geneticassociationdb.nih.gov/>)、药物基因数据库 PharmGKB^[16] (<https://www.pharmgkb.org/>) 等与疾病靶点相关的数据库, 以“osteoarthritis”作为关键词对 OA 相关靶点进行检索及筛选, 获得 OA 发病过程中已知的靶点。

1.4 蛋白质-蛋白质相互关系 (PPI) 网络构建和关键靶点筛选

机体内的调控通常不是由单一的信号通路支配, 而是经过复杂的调控网络。不同的信号通路和靶点之间会存在一定程度的信号转导, 故药物的有效成分不仅体现在与靶点的直接结合, 而是更多通过直接、间接的方式与其他靶点相结合。所以, 通过 PPI 数据的构建与挖掘, 使靶点的直接、间接调控作用关系能清晰可靠地呈现。

使用 BisoGenet 软件对获得的生物活性成分及疾病靶点进行 PPI 网络绘制, 再采用 Cytoscape 对已绘制好的 2 个网络图融合并抽取交集网络, 即得到骨碎补治疗 OA 的直接和间接靶点调控网络图。

通过网络拓扑分析插件 CytoNCA^[17]并结合相关文献,借助度中心性 (degree centrality, DC)、介度中心性 (betweenness centrality, BC)、接近中心性 (closeness centrality, CC)、特征向量中心性 (eigenvector centrality, EC)、网络中心性 (network centrality, NC) 和局部边连通性 (local average connectivity, LAC) 等指标进行筛选,其中 DC 值大于所有节点 DC 值中位数 2 倍的节点为网络中的重要节点,即“Big hubs”。再筛选其他几个指标大于所有节点中位数的节点,即关键靶点,以尽可能在网络中获得更多节点的传递信息和更高的节点信息传递效率,充分发挥其在网络中的重要作用。

1.5 Pathway 富集分析

通过基因富集分析插件 ClueGO^[18]对“1.4”项下获得的关键靶点进行信号通路富集分析,将结果以节点图像化形式展现,同时根据重要程度绘制信号通路占比饼状图,以分析关键靶点参与的主要信号通路,研究骨碎补治疗 OA 可能的作用机制。其

中,同一种颜色的节点代表同一类型的信号通路,节点的大小代表信号通路的显著性,节点越大信号通路的显著性越高,说明该通路的重要性越高。

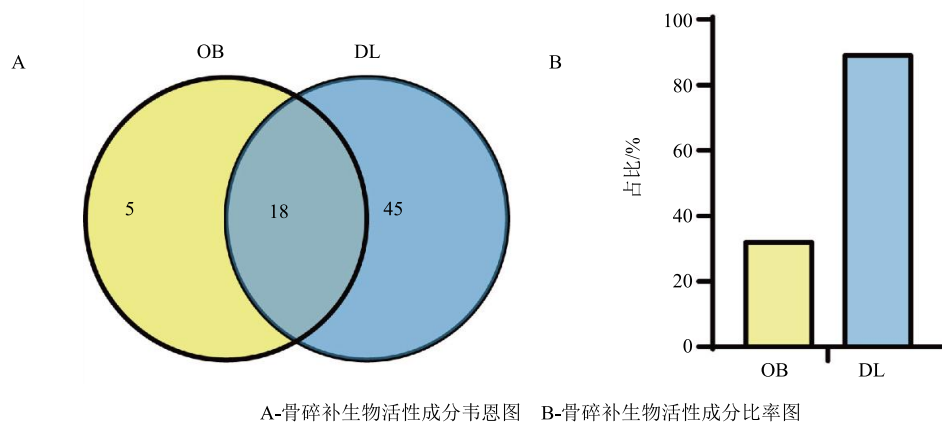
2 结果

2.1 骨碎补生物活性成分筛选与 ADME 分析

本研究通过 TCMSP 数据库共检索到已报道的骨碎补成分 71 个,根据 OB 和 DL 等 ADME 参数初步筛选到生物活性成分 18 个。其筛选的成分分布图见图 1。再经 TCMSP 配对分析后得到有对应靶点的活性成分共 8 个,见表 1。

2.2 骨碎补作用靶点预测及生物活性成分-靶点网络构建

本研究利用 TCMSP 靶点预测模型预测技术对上述生物活性成分进行作用靶点预测,排除重复靶点,共获得预测靶点 92 个。利用网络图形化工具 Cytoscape 3.2.1 对上述生物活性成分及预测的作用靶点进行关系网络绘制和分析,可知骨碎补发挥重要作用的生物活性成分与对应作用靶点的相互关系共 227 个,见图 2。



A-Venn diagram of bioactive components that meet criteria for screening in *Drynariae Rhizoma* B-bioactive components ratio in accordance with screening conditions in *Drynariae Rhizoma*

图 1 根据 ADME 参数筛选出的骨碎补生物活性成分分布

Fig. 1 ADME parameters distribution of bioactive components in *Drynariae Rhizoma*

表 1 骨碎补生物活性成分

Table 1 Bioactive components from *Drynariae Rhizoma*

编号	成分代码	化合物	OB/%	DL/%
1	MOL000006	木犀草素 (luteolin)	36.16	0.25
2	MOL000492	(+)-儿茶素 [(+)-catechin]	54.83	0.24
3	MOL001978	金鱼草素 (aureusidin)	53.42	0.24
4	MOL000422	山柰酚 (kaempferol)	41.88	0.24
5	MOL000449	豆甾醇 (stigmasterol)	43.83	0.76
6	MOL001040	柚皮素 [(S)-5,7-dihydroxy-2-(4-hydroxyphenyl) chroman-4-one]	42.36	0.21
7	MOL000358	β -谷甾醇 (β -sitosterol)	36.91	0.75
8	MOL000569	鞣酸 (digallic acid)	61.85	0.26

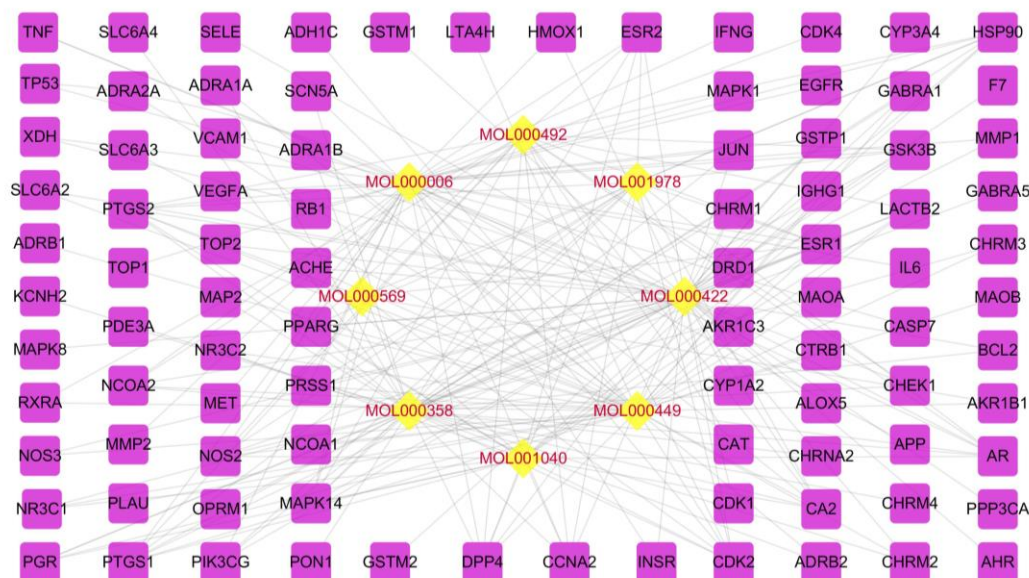


图 2 骨碎补生物活性成分-靶点网络

Fig. 2 Bioactive component-target network of *Drynariae Rhizoma*

2.3 OA 相关靶点检索分析

通过检索目前国际公认的 5 个疾病基因相关数据库,并搜集前期研究和报道,共获得与 OA 发生、发展密切相关的靶点基因 168 个,其中 TTD、DrugBank、OMIM、GAD、PharmGKB 数据库分别检索到 35、1、61、97、2 个靶点。

2.4 骨碎补治疗 OA 的 PPI 网络构建与关键靶点筛选

2.4.1 骨碎补治疗 OA 的 PPI 网络构建 通过 BisoGenet 对骨碎补生物活性成分的作用靶点进行 PPI 网络构建可知,与其产生直接或间接作用的靶点共 2 594 个,而这些靶点与靶点之间的相互关系多达 59 937 个。与此同时,对 OA 相关的靶点绘制 PPI 网络图发现与其直接或者间接相关的靶点多达 4 101 个,靶点与靶点相互关系 97 706 个。

2.4.2 骨碎补治疗 OA 的关键靶点筛选 通过 Cytoscape 对上述绘制的 2 个 PPI 网络图抽取交集网络,同时采用 CytoNCA 根据网络节点的拓扑属性筛选,共发现关键节点 99 个。筛选策略示意图见图 3。

2.5 骨碎补治疗 OA 的机制分析

利用 ClueGO 对上述 99 个关键节点进行富集分析,结果显示,骨碎补治疗 OA 的关键靶点主要与细胞周期、炎症、感染、癌症等 31 条信号通路相关(图 4、5)。

3 讨论

OA 是以关节软骨进行性退化伴随软骨下骨的硬化重塑为特征的关节疾病,发病人群广,致病因素多。根据临床表现,一般认为 OA 属于中医学“骨痹”范畴,因肾为先天之本,主骨生髓,肾精系一

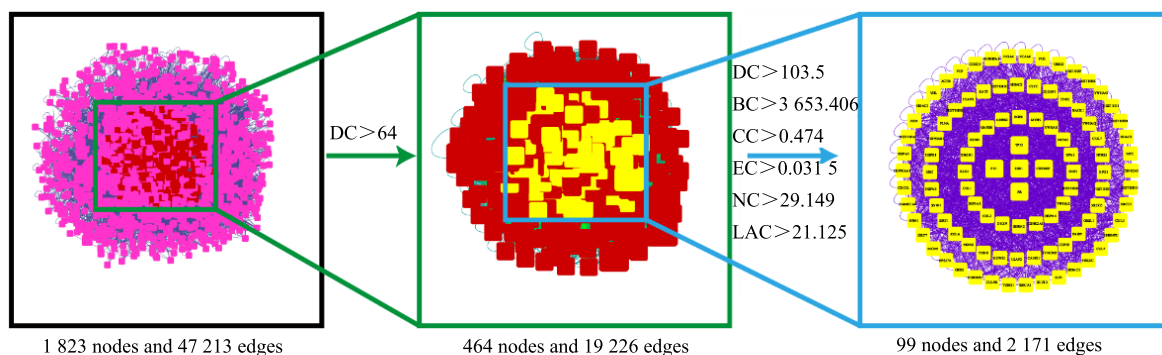


图 3 骨碎补关键节点的目标筛选策略

Fig. 3 Target screening strategy for key nodes in *Drynariae Rhizoma*

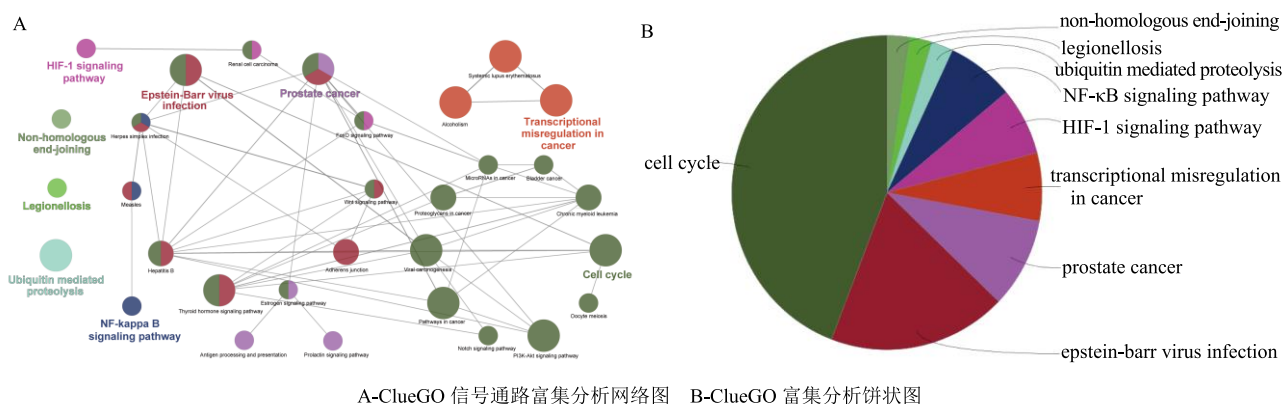


图 4 骨碎补治疗 OA 信号通路富集分析

Fig. 4 Enrichment analysis chart of signal pathway of treatment of OA by *Drynariae Rhizoma*

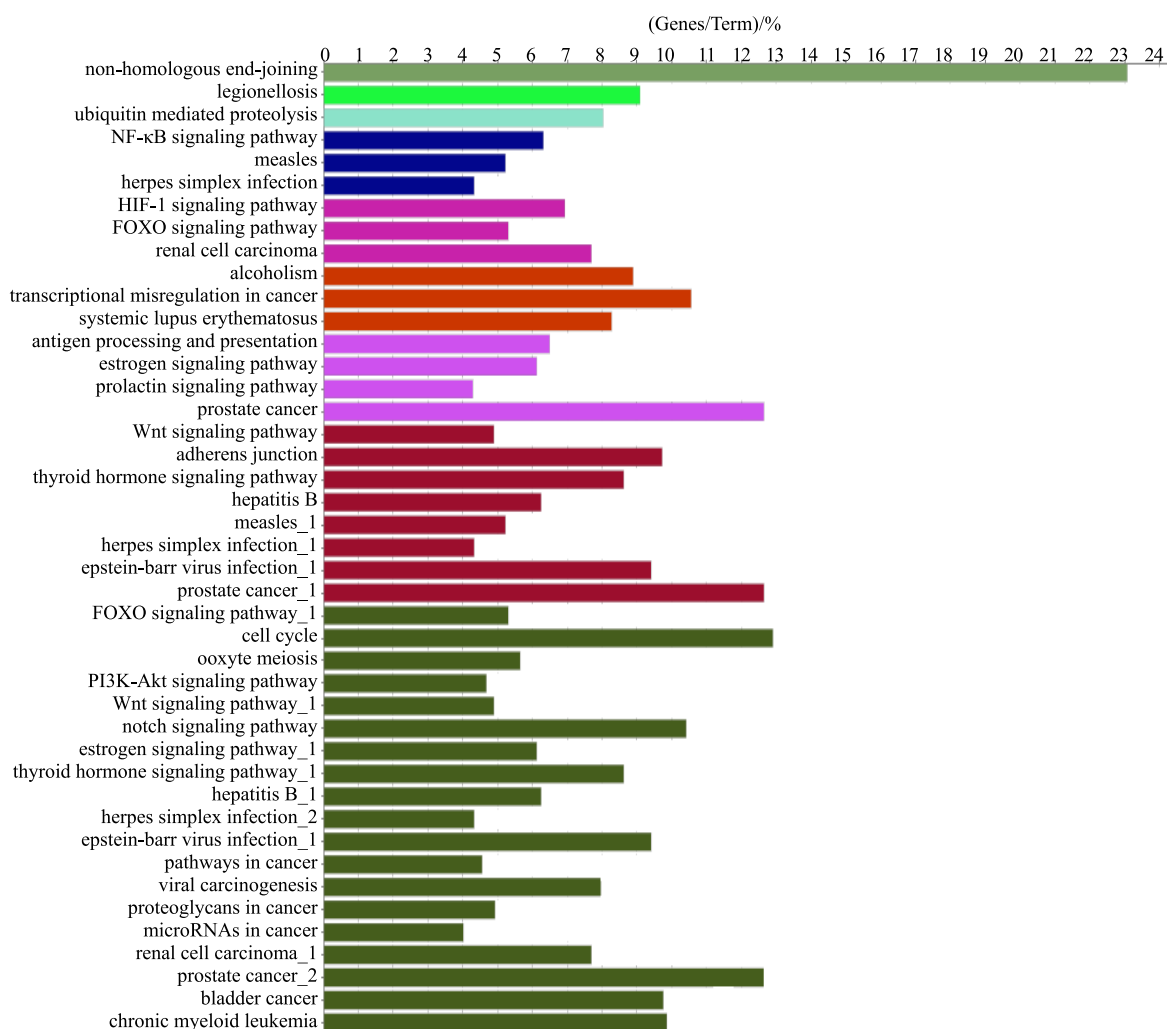


图 5 骨碎补治疗 OA 信号通路富集分析柱状图

Fig. 5 Enrichment analysis bar graph of signal pathway in treatment of OA by *Drynariae Rhizoma*

身生命的根本；肝主疏泄，藏血主筋。OA 乃本虚标实之证，系肝肾亏虚、精血不足、筋骨失养、易感风寒湿三邪而为痹，临床治法多以补肾活血为主。

中医药治疗 OA 具有价格低廉、剂型丰富、副作用小、依从性好等优势，在治疗早中期 OA 方面发挥着不可替代的作用^[19]。

骨碎补主要化学成分为黄酮、三萜、苯丙素以及挥发油类等^[20]。研究证实^[21]，骨碎补总黄酮可显著抑制骨关节炎兔膝关节中基质金属蛋白酶-1、3 的表达，有效降低肿瘤坏死因子- α (TNF- α) 在 OA 患者关节软骨中的含量，加速软骨表面的修复，显著改善病情。本研究通过初步筛选获得骨碎补中生物活性成分 18 个，并在此基础上利用最终得到的 8 个生物活性成分，挖掘出 92 个可能的靶点和 227 个相互关系。生物活性成分-靶点网络分析显示，木犀草素、(+)-儿茶素、金鱼草素、山柰酚、豆甾醇、柚皮素、 β -谷甾醇以及鞣酸等有效成分能作用于网络中的多个靶点，丝氨酸蛋白酶 1 (PRSS1)、雌激素受体 α (ESR1)、雄激素受体 (AR) 等靶点也能与多个成分形成作用关系。骨碎补的有效成分之间不仅存在紧密的协同关系，而且其作用的靶点也在整个疾病进程中发挥着重要作用。

从通路富集结果分析可知，骨碎补主要通过影响细胞周期、炎症、感染、癌症等相关通路而发挥治疗 OA 作用。通过排除广泛通路，筛选出信号转导通路有 Thyroid hormone 信号通路、PI3K-Akt 信号通路、低氧诱导因子-1 α (hypoxia inducible factor-1 α , HIF-1 α) 信号通路、Notch 信号通路、核转录因子- κ B (NF- κ B) 信号通路、FOXO 信号通路、Estrogen 信号通路、Wnt 信号通路、Prolactin 信号通路。①Thyroid hormone 通路：有研究^[22]指出甲状腺功能减退与骨密度及骨代谢之间关系密切，甲状腺激素缺乏造成了骨细胞成熟时间延后，骨密度降低，从而间接诱发 OA 且抑制了骨重建的进程。②PI3K-Akt 信号通路：P53 是比较公认的与细胞凋亡相关的蛋白质分子，具有诱导细胞凋亡的功能，其在 G₁ 期发挥检查点的功能以决定是否启动细胞凋亡程序^[23]。研究证实，p53 基因上调与阻止细胞凋亡的 Bcl-2 基因下调共同在 OA 发病过程中发挥重要调节作用^[24]。OA 患者的 p53 基因上调后，通过 PI3K/Akt 信号通路诱导细胞凋亡^[25]。③HIF-1 α 信号通路：HIF-1 α 是生物体内最具特征性的低氧反应信号通路。HIF-1 α 信号通路在体内缺血、缺氧环境下可改变一些列细胞功能，使其产生适应性反应，对骨形成和血管生成起着重要的调控作用^[26]。④Notch 信号通路：调节成骨细胞和破骨细胞分化和功能，从而控制骨的重建^[27]。⑤NF- κ B 信号通路：因 OA 病理机制具有炎症特性而富集，NF- κ B 受体活化因子配基 (receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL) 直

接影响破骨细胞的形成、分化和骨吸收的调节等^[28]。

⑥FOXO 信号通路：腺苷酸激活蛋白激酶 (5'-adenosine monophosphate-activated protein kinase, AMPK) 可通过上调 FOXO 转录因子 3a (forhead box O3a, FOXO3a) 的表达，进而抑制软骨细胞内氧化应激 (oxidative stress, OS) 速率，最终达到延缓 OA 病程的作用，尽管确切机制尚不明确^[29-30]。⑦Estrogen 信号通路：雌激素受体广泛存在于成骨、破骨及骨细胞中，可通过刺激成骨细胞表达骨保护素，干扰 NF- κ B 受体活化因子配体与 NF- κ B 受体活化因子结合来对抗骨吸收^[31]。此外，雌激素还可以对多种炎症因子、细胞因子及生长因子等产生直接或间接抑制效应，从而对关节软骨起到保护作用^[32]。⑧Wnt 信号通路：通过调控骨髓间充质干细胞的分化方向和早期的分化潜能以促进更新速度、成骨分化并抑制成脂^[33]。

作用靶点富集分析结果揭示骨碎补调控 OA 靶点富集通路存在复杂的相互作用关系，故在治疗时应根据患者和疾病的不同情况特点，针对局部关键通路，因人制宜的采用个性化的多靶点、多系统疗法，从侧面印证了中医主张的治病求本和标本兼治理论，且中医药疗法具有多靶点、多方面治疗疾病的优势。

综上，基于网络药理学和生物信息学分析能揭示出骨碎补治疗 OA 可能的作用机制，为后续研究及实验提供重要的理论依据。同时，也为今后药物作用机制研究和新药研发提供了新思路和新方法。

参考文献

- [1] Bijlsma J W, Berenbaum F, Lafeber F P. Osteoarthritis: An update with relevance for clinical practice [J]. *Lancet*, 2011, 377(9783): 2115-2126.
- [2] Nguyen U S, Zhang Y, Zhu Y, et al. Increasing prevalence of knee pain and symptomatic knee osteoarthritis: Survey and cohort data [J]. *Annal Inter Med*, 2011, 155(11): 725-732.
- [3] 郑晓芬. 骨关节炎发病机制和治疗的最新进展 [J]. *中国组织工程研究*, 2017, 21(20): 3255-3262.
- [4] 中国药典 [S]. 一部. 2015.
- [5] 龚晓健, 李运曼, 安佰平, 等. 骨碎补总黄酮的抗膝关节炎作用 [J]. *中国天然药物*, 2006, 4(3): 215-218.
- [6] Li Y, Zhang J X, Zhang L L, et al. Systems pharmacology to decipher the combinational anti-migraine effects of Tianshu formula [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 174(15): 45-56.
- [7] Liu H, Wang J, Zhou W, et al. Systems approaches and

- polypharmacology for drug discovery from herbal medicines: An example using licorice [J]. *J Ethnopharmacol*, 2013, 146(3): 773-793.
- [8] Xu X, Zhang W, Huang C, *et al.* A novel chemometric method for the prediction of human oral bioavailability [J]. *Inter J Mol Sci*, 2012, 13(6): 6964-6982.
- [9] Ma C, Wang L, Xie X Q. GPU Accelerated chemical similarity calculation for compound library comparison [J]. *J Chem Infor Model*, 2011, 51(7): 1521-1527.
- [10] 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.
- [11] Li J, Zhao P, Li Y, *et al.* Systems pharmacology-based dissection of mechanisms of Chinese medicinal formula Bufei Yishen as an effective treatment for chronic obstructive pulmonary disease [J]. *Sci Rep*, 2015, doi: 10.1038/srep1529.
- [12] Liu X, Zhu F, Ma X, *et al.* The therapeutic target database: An internet resource for the primary targets of approved, clinical trial and experimental drugs [J]. *Expert Opin Ther Tar*, 2011, 15(8): 903-912.
- [13] Wishart D S, Knox C, Guo A C, *et al.* DrugBank: A knowledgebase for drugs, drug actions and drug targets [J]. *Nucleic Acids Res*, 2008, doi: 10.1093/nar/gkm958.
- [14] Amberger J, Bocchini C A, Scott A F, *et al.* McKusick's online mendelian inheritance in man (OMIM®) [J]. *Nucleic Acids Res*, 2009, doi: 10.1093/nar/gkn665.
- [15] Becker K G, Barnes K C, Bright T J, *et al.* The genetic association database [J]. *Nat Gene*, 2004, 36(5): 431-432.
- [16] Ma Q, Lu A Y H. Pharmacogenetics, pharmacogenomics, and individualized medicine [J]. *Pharmacol Rev*, 2011, 63(2): 437-459.
- [17] Tang Y, Li M, Wang J, *et al.* CytoNCA: A cytoscape plugin for centrality analysis and evaluation of protein interaction networks [J]. *Bio Systems*, 2015, doi: 10.1016/j.biosystems.2014.11.005.
- [18] Bindea G, Mlecnik B, Hackl H, *et al.* ClueGO: A cytoscape plug-in to decipher functionally grouped gene ontology and pathway annotation networks. [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(8): 1091-1093.
- [19] 汪青春, 董蕙芳, 沈培芝, 等. 中药对膝关节炎黑鼠血清 SOD、HA、NO 水平的影响 [J]. 中医正骨, 1999, 11(5): 6-8.
- [20] 隋洪飞, 尹世强, 邹爱英, 等. 骨碎补化学成分研究 [J]. 中草药, 2015, 46(20): 2992-2995.
- [21] 金连峰. 单味中药骨碎补对兔膝关节炎软骨细胞凋亡作用的实验研究 [J]. 中华中医药学刊, 2013, 31(7): 1699-1703.
- [22] Yang W, Lu J, Weng J, *et al.* Prevalence of diabetes among men and women in China [J]. *New Engl J Med*, 2010, 362(12): 1090-1101.
- [23] Wang J L, Qie Y Q, Bing D Z, *et al.* Evaluation of a recombinant BCG expressing antigen Ag85B and PPE protein Rv3425 from DNA segment RD11 of mycobacterium tuberculosis in C57BL/6 mice [J]. *Med Microbiol Immun*, 2009, 198(1): 5-11.
- [24] 张立岩, 马恩元, 祖德玉, 等. 早期激素性股骨头坏死骨细胞凋亡与 bcl-2 和 p53 表达的实验研究 [J]. 中国现代医学杂志, 2009, 19(13): 1945-1947.
- [25] 余 华. p53 蛋白基因在酒精性股骨头缺血性坏死患者血液中表达及其致骨细胞凋亡机制研究 [J]. 解剖学研究, 2017(2): 136-139.
- [26] Maes C, Araldi E, Haigh K, *et al.* VEGF-independent cell-autonomous functions of HIF-1 α regulating oxygen consumption in fetal cartilage are critical for chondrocyte survival [J]. *J Bone Miner Res*, 2012, 27(3): 596-609.
- [27] Regan J, Long F. Notch signaling and bone remodeling [J]. *Cur Osteoporos Rep*, 2013, 11(2): 126-129.
- [28] 王建忠, 王坤正, 时志斌, 等. 激素性股骨头坏死患者股骨头骨组织骨保护素 NF- κ B 受体活化因子配基 mRNA 表达 [J]. 中国修复重建外科杂志, 2008, 22(10): 1161-1164.
- [29] Loeser R F, Collins J A, Diekman B O. Ageing and the pathogenesis of osteoarthritis [J]. *Nat Rev Rheumatol*, 2016, 12(7): 412-420.
- [30] Poulet B, Beier F. Targeting oxidative stress to reduce osteoarthritis [J]. *Arthritis Res Ther*, 2016, doi: 10.1186/s13075-015-0908-7.
- [31] Wang Q P, Yang L, Li X P, *et al.* Effects of 17 β -estradiol on adiponectin regulation of the expression of osteoprotegerin and receptor activator of nuclear factor- κ B ligand [J]. *Bone*, 2012, 51(3): 515-523.
- [32] 王 健, 陶海荣. 雌激素及相关化合物干预骨关节炎作用机制: 关节保护与骨软骨细胞的修复 [J]. 中国组织工程研究, 2014, 18(33): 5372-5376.
- [33] Dorman L J, Tucci M, Benghuzzi H. *In vitro* effects of bmp-2, bmp-7, and bmp-13 on proliferation and differentiation of mouse mesenchymal stem cells [J]. *Biomed Sci Instrum*, 2012, 48(9): 81-87.