

· 基础研究 ·

基于网络药理学研究杜仲抗骨质疏松的分子机制[△]李嘉程¹, 许波², 李刚^{2*}, 阎博昭¹, 夏聪敏³, 梁学振¹, 骆帝¹

(1. 山东中医药大学 第一临床医学院, 山东 济南 250355;

2. 山东中医药大学 附属医院 显微骨科, 山东 济南 250355;

3. 山东中医药大学 中医学院, 山东 济南 250355)

[摘要] 目的: 基于网络药理学探究杜仲抗骨质疏松可能的分子机制。方法: 采用活性成分筛选、靶点预测技术, 结合生物信息学手段, 预测杜仲防治骨质疏松症的作用靶点, 并进行信号通路富集分析, 从而探讨其治疗骨质疏松症的分子机制。结果: 杜仲在 TCMSP 数据库中检索到 94 个相应成分, 根据口服生物利用度(oral bioavailability, OB)和药物相似性(drug-likeness, DL)参数共筛选到 25 个入血活性成分, 同时利用相关靶点预测技术, 共获得 101 个预测靶点。通过对 GEO 芯片数据库的基因芯片进行二次挖掘分析, 共获取 124 个明显的差异基因; 在疾病基因相关数据库共检索到 356 个与骨质疏松症发生、发展密切相关的已知靶点基因。利用 cytoscape 构建并合并活性成分及疾病的蛋白质相互作用关系网络, 通过网络拓扑分析共筛选出 232 个关键基因; ClueGO 富集分析显示, 杜仲除与直接作用于骨质疏松症关键节点涉及的信号通路, 如 Wnt 信号通路、NF-kappa B 信号通路、FoxO 信号通路等有关, 还对 PI3K-Akt 信号通路、GnRH 信号通路、甲状腺素信号通路、雌激素信号通路等同时进行调控。结论: 杜仲治疗骨质疏松症具有多成分、多靶点的特点; 其主要通路不仅可能直接参与骨重建的细胞分化, 调节成骨、破骨代谢平衡, 还可能通过全身其他系统, 如循环系统、神经系统等来干预和影响骨微环境, 与目前抗骨质疏松的作用机制相符合。

[关键词] 杜仲; 骨质疏松症; 网络药理学; 生物信息学; 分子机制; 信号通路

Study on Molecular Mechanism of Osteoporosis Treated by *Eucommia ulmoides* Based on Network PharmacologyLI Jia-cheng¹, XU Bo², LI Gang^{2*}, YAN Bo-zhao¹, XIA Cong-min³, LIANG Xue-zhen¹, LUO Di¹

(1. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, the First Clinical Medical College, Jinan 250355, China;

2. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China;

3. Shandong University of Traditional Chinese Medicine, the College of Traditional Chinese Medicine, Jinan 250355, China)

[Abstract] **Objective:** To clarify the molecular mechanism of *Eucommia ulmoides* in the treatment of osteoporosis. **Methods:** The method of network pharmacology was used to determine and screen the known compounds corresponding to *E. ulmoides*, and predict the drug-related gene/protein targets, and combined with bioinformatics, the specific target of osteoporosis prevention and treatment of *E. ulmoides* was determined, and then through the analysis of the signal pathway enrichment, the molecular mechanism of *E. ulmoides* in treatment of osteoporosis was further analyzed. **Results:** 94 corresponding compounds were retrieved in the TCMID database from *E. ulmoides*. According to the values of OB and DL, a total of 25 blood transfusion components were screened, which obtained 101 targets by using the related target prediction technique. Through the secondary mining of the genechip of GEO chip database, we obtained a total of 124 significantly different genes. And a total of 356 known target genes closely related to the development of osteoporosis were retrieved in the disease-related database. Using the cytoscape to construct and synthesize the protein-protein interaction network of active ingredients and diseases, 232 key genes were screened out by network topological analysis. Using ClueGO analysis, it is shown that *E. ulmoides* is directly involved in the signal pathways involved in the key nodes of osteoporosis, which are mainly related to the direct regulation of bone metabolism, such as Estrogen signaling pathway Wnt signaling pathway, HIF-1 signaling pathway,

[△] [基金项目] 山东省自然科学基金项目(ZR2017LH067)

* [通信作者] 李刚, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 骨与关节疾病; E-mail: doctorlee808@163.com

MAPK signaling pathway, PI3K-Akt signaling pathway, FoxO signaling pathway, NF-kappa B signaling pathway, neurotrophin signaling pathway, prolactin signaling pathway and neurotrophin signaling pathway. **Conclusion:** *E. ulmoides* has the character of multiple targets and multicomponent in the treatment of osteoporosis, which could involve not only directly in bone cell differentiation and regulation of the balance of ontogenesis and osteoclasts, but also affect and interfere with the bone micro environment through other systemic systems, such as circulatory system, nervous system, which is consistent with the current mechanism of treatment of osteoporosis.

[**Keywords**] *Eucommia ulmoides*; osteoporosis; network pharmacology; bioinformatics; molecular mechanisms; signaling pathway

doi:10.13313/j.issn.1673-4890.20180227001

随着世界人口的老齡化,骨质疏松症(osteoporosis, OP)的发病率也逐年上升,现已成为世界普遍关注的公共卫生问题^[1]。骨质疏松症是骨量减少、骨内微细结构破坏导致的骨脆性增加、骨折风险增大的系统性骨代谢疾病,是老年人的常见病、多发病^[2-3]。目前,治疗OP的公认药物主要包括骨吸收抑制剂、骨形成促进剂、骨矿化物三大类。但从药物相关的治疗效果来看,如今仅仅局限于改善临床症状、延缓病情进展,且上述药物的靶向性均较单一,因此亟需寻找新的思路解决这一问题^[4]。而中药及其复方治疗OP以温补肾阳、强筋壮骨、填精生髓为主,兼以益气养血、祛风散寒除湿、通络止痛。现代药理学研

究发现^[5],中药及其复方在系统防治OP方面具有独特优势和广阔发展前景。

杜仲具有补肝肾、强筋骨的功能,用于肝肾不足、腰膝酸痛、筋骨无力^[6]。但其药效物质基础和分子机制至今尚不明确。因此,分析杜仲的有效活性成分和作用靶点,分析其可能的作用机制,有利于阐述杜仲的科学内涵,并促进其临床推广应用。目前,现有的研究中药及其复方的手段往往存在各种问题,以至于难以阐释其作用机制。本文通过网络药理学预测杜仲可能入血的有效活性成分,配合化合物相似性分析和蛋白质-蛋白质相互作用网络分析的手段,预测杜仲治疗OP的作用靶点,探讨其可能的作用机制。流程图见图1。

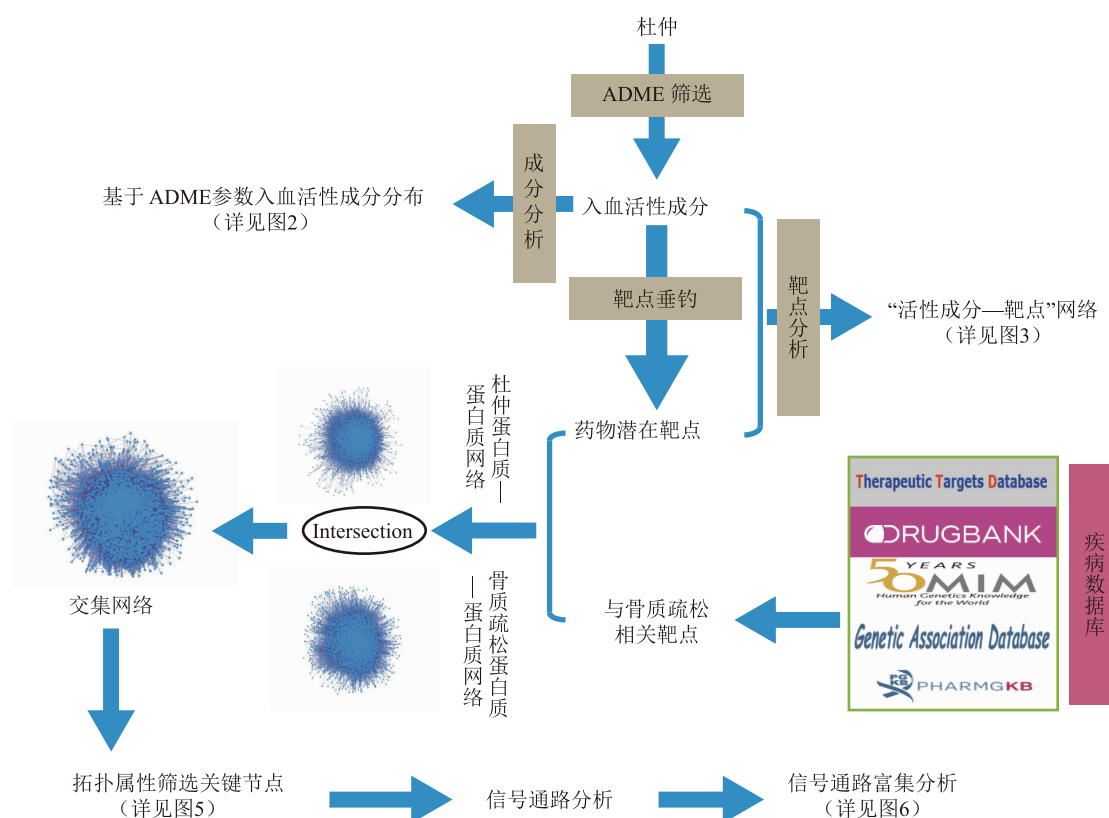


图1 杜仲治疗骨质疏松症的分子机制分析流程图

1 方法

1.1 杜仲中活性成分的筛选和靶点预测

本研究通过检索中药系统药理学数据库和分析平台^[7] (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP), 对杜仲所有成分数据库进行了筛选及构建, 其中筛选条件为口服生物利用度 (oral bioavailability, OB) $\geq 30\%$ 、药物相似性 (drug-likeness, DL) ≥ 0.18 ^[8]; 采用 TCMSP 靶点预测模型对相关活性成分作用靶点加以预测。

1.2 杜仲“活性成分-靶点网络”构建

杜仲“活性成分-靶点网络”主要通过网络图像化软件 Cytoscape3. 2. 1^[9] 进行构建和分析, 本研究将从上述获得的活性成分及靶点关系进行导入以完成相关网络构建, 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, 以明确杜仲中较为重要的成分和靶点, 结合文献以分析其中的相互作用。

1.3 已知的 OP 相关疾病靶点检索

利用“osteoporosis”作为关键词, 对五大常用数据库 (TTD、DrugBank 数据库、OMIM 数据库、GAD、PharmGKB 等) 进行已知疾病靶点的检索及筛选, 并删除检索结果中重复的靶点。

1.4 蛋白质相互关系网络构建和关键靶点筛选

蛋白质相互作用网络绘制主要借助于 BisoGenet 插件, 将杜仲上述的作用靶点和 OP 相关的疾病靶点分别映射到蛋白质相互作用关系网络中, 利用 BisoGenet 插件对 2 个蛋白质相互作用关系网络进行绘制, 同时利用 cytoscape 合并 2 个蛋白质相互作用关系网络, 抽取获得的交集网络。

基于交集网络, 采用网络拓扑分析插件 Cyto NCA^[10] 筛选出自由度大于所有节点自由度中位数 2 倍的节点, 即“Big hubs”; 筛选网络中的关键节点, 再筛选其他几个指标大于所有节点中位数的节点, 即关键基因。上述获得的相关活血成分及靶点则有可能是杜仲发挥抗骨质疏松直接或间接作用的环节。

1.5 Pathway 富集分析

本研究采用了 ClueGO 分析插件^[11], 对关键靶点进行富集分析, 并根据重要程度绘制信号通路占

比饼状图; 其中 ClueGO 插件在一定程度上可将富集分析的结果以节点的形式展现, 以充分发挥形象的图像化功能, 同一类型的信号通路采用同一种颜色的节点代表, 同时节点的大小代表了该信号通路的显著性, 信号通路的显著性越高, 节点越大, 说明该通路的重要性越高。

2 结果

2.1 杜仲活性成分筛选与 ADME 分析

本研究通过对 TCMSP 数据库杜仲中所有的已报道的成分及其成分药物动力学 (absorption and distribution and metabolism and excretion, ADME) 参数的相关检索, 共搜集到成分 94 个。根据 OB 和 DL 参数对杜仲中入血的活性成分进行筛选, 共搜集到入血活性成分 25 个, 见表 1、图 2。利用相关靶点预测技术对上述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 101 个。

表 1 通过 TCMSP 数据库中杜仲所有成分根据 OB 和 DL 参数进行筛选后结果

MOL ID	化合物	
	英文名称	中文名称
MOL002058	40957-99-1 (CAS 编号)	栲皮树脂醇
MOL000211	Mairin	丁子香菇
MOL000358	beta-sitosterol	白桦脂酸
MOL000422	kaempferol	Beta-谷甾醇
MOL004367	olivil	OLIVIL
MOL000443	Erythraline	刺桐灵碱
MOL005922	Acanthoside B	刺五加提取物
MOL006709	AIDS214634	8-羟基松脂醇
MOL007059	3-beta-Hydroxymethyllenetan-shiquinone	3-羟基亚甲基丹参醌
MOL000073	ent-Epicatechin	表儿茶酸
MOL007563	Yangambin	鹅掌楸树脂酚 B 二甲醚
MOL009009	(+)-medioresinol	杜仲脂素 A
MOL009015	(-)-Tabernemontanine	(-)-Tabernemontanine
MOL009027	Cyclopamine	环杷明
MOL009029	Dehydroniciferyl alcohol 4, gamma'-di-O-beta-D-glucopyranoside_qt	二氢去氢二愈创木基醇
MOL009031	Cinchonan-9-al, 6'-methoxy-, (9R)-	(9R)-6'-甲氧基奎宁-9-胺三盐酸盐
MOL009038	GBGB	京尼平龙胆双糖苷
MOL009042	Helenalin	心菊内脂
MOL009047	(+)-Eudesmin	胺脂素

表 1 续

MOL ID	化合物	
	英文名称	中文名称
MOL009053	4-[(2S, 3R)-5-[(E)-3-hydroxyprop-1-enyl]-7-methoxy-3-methylol-2, 3-dihydrobenzofuran-2-yl]-2-methoxy-phenol	去氢二松柏醇
MOL009055	hirsutin_qt	三甲花翠苷
MOL009057	liriodendrin_qt	鹅掌楸碱
MOL000098	quercetin	槲皮素
MOL008240	(E)-3-[4-[(1R, 2R)-2-hydroxy-2-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-methylol-ethoxy]-3-methoxy-phenyl]acrolein	丙烯醇
MOL011604	Syringetin	丁香亭

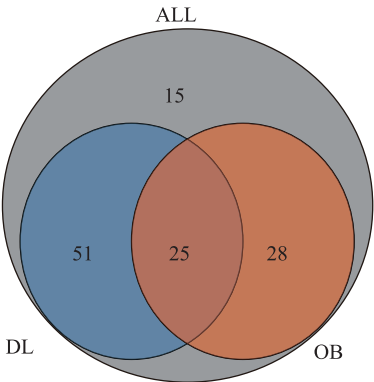


图 2 根据 ADME 参数筛选出的杜仲入血活性成分分布图

2.2 杜仲“活性成分-靶点网络”构建和分析

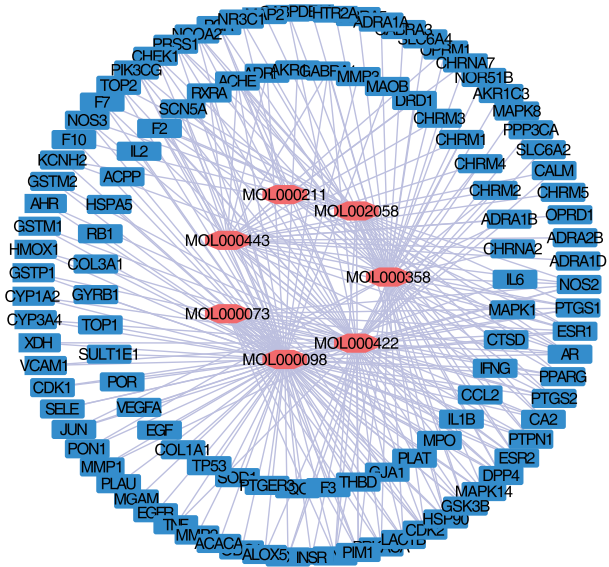
将上述活性成分及预测靶点采用 Cytoscape 对潜在活性成分和作用靶点的关系网络进行绘制和分析，并以关键节点确定杜仲中发挥重要作用的成分和靶点，根据不同靶点与成分对应关系数目，分别进行分类展示。靶点对应成分越多，说明该靶点相对重要性越高。如图 3 所示，通过 Cytoscape 网络构建共获得 123 个节点和 270 个关系。

2.3 OP 相关基因分析和检索

本研究检索了 5 个国际公认的疾病基因相关数据库，搜集前期研究和报道的与 OP 发生、发展密切相关的已知靶点基因，去重后共检索到 356 个已知的靶点。

2.4 杜仲治疗 OP 的蛋白相互作用网络构建与关键靶点筛选

2.4.1 杜仲治疗 OP 的蛋白相互作用 网络构建机体的内在调控往往不是单一的信号通路支配的，而是复杂的调控网络。而蛋白质相互作用关系数据为寻



注：图中蓝色代表靶点基因名；红色代表杜仲 25 个成分中最终入血的白桦脂酸、槲皮素等 7 个化学成分。

图 3 杜仲活性成分-靶点网络图

找靶点的直接、间接调控作用关系提供了可能。通过蛋白质相互作用网络的构建，本研究发现杜仲可以与 6093 个靶点产生直接或间接作用，而这些靶点与靶点之间的相互联系多达 148 246 种。与此同时，对 OP 相关的靶点绘制蛋白质相互作用网络，也发现与 OP 直接或者间接相关的靶点也多达 4921 个。本研究利用蛋白质相互作用网络，进一步深入分析杜仲影响 OP 发生、发展中的靶点，绘制蛋白质相互作用靶点网络，为网络分析和机制的探讨提供了可能。交集网络图见图 4。

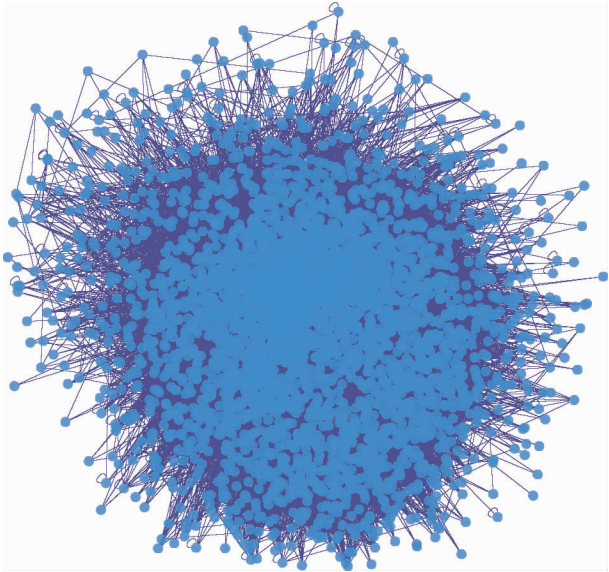


图 4 杜仲-OP 交集网络图

2.4.2 杜仲治疗 OP 的关键靶点 本研究通过对杜仲调控 OP 的蛋白质相互作用交集网络和网络节点的拓扑属性分析进行节点筛选,旨在寻找网络中关键靶点,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。通过网络拓扑分析,本研究共发现关键节点 232 个。筛选策略示意图见图 5。

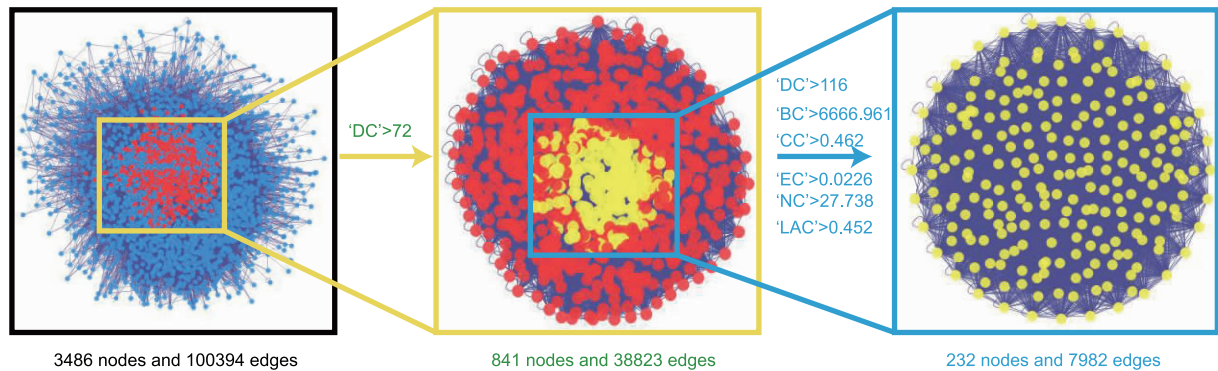
2.5 杜仲治疗 OP 可能的机制分析

本研究对上述 232 个关键节点利用 ClueGO 进行分析,分析其参与的主要信号通路,旨在研究杜仲治疗 OP 可能的作用机制。分析结果显示,杜仲除与直接作用于 OP 关键节点涉及的信号通路,如 Wnt 信号通路、NF-kappa B 信号通路、FoxO 信号通路等

有关,还对 P13K-Akt 信号通路、GnRH 信号通路、甲状腺素信号通路、雌激素信号通路等同时进行调控(见图 6)。

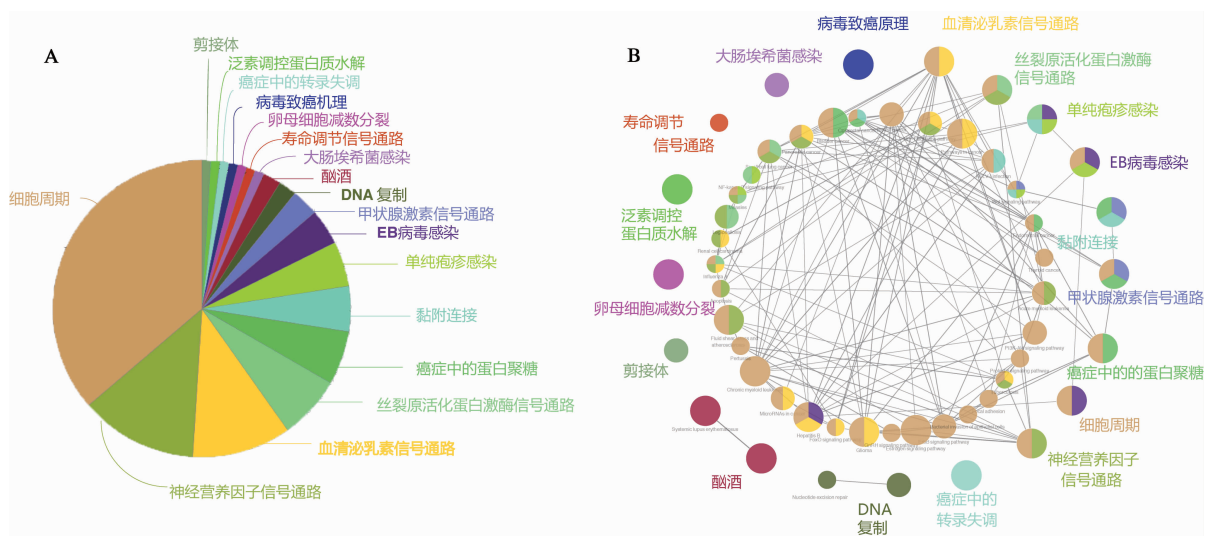
3 讨论

随着全球人口数量增加,伴随人口老龄化的加速发展,OP 患者人数逐年递增,长时间应用抗骨质疏松药物尤其是双膦酸盐的不良反应逐渐被重视^[12],抗骨质疏松新药的研发仍在不断探索^[13]。许多中药及复方在防治 OP 方面发挥着重要的作用。中医认为,肾乃先天之本,而骨的生长、发育及衰弱均与肾精盛衰关系紧密,OP 属肾虚,因此中医治疗以补肾为主。



注: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)。

图5 杜仲关键节点的目标筛选策略图



注: A. 富集分析饼状图; B. ClueGO 信号通路显著富集网络图。

图6 杜仲治疗骨质疏松症信号通路富集分析图

《神农本草经》将杜仲列为上品,在抗骨质疏松方面具有较好的临床疗效^[14-16]。本研究根据 OB 和 DL 参数,共筛选出杜仲中入血的活性成分 25 个,对上述活性成分进行潜在活性成分和作用靶点的关系网络绘制,共获得 123 个可能的靶点和 270 个相互关系。基于上述结果可知,杜仲的有效成分之间存在协同,而协同调控的靶点也在 OP 的发生、发展中发挥不同作用,具有治疗 OP 的潜力。

从富集结果分析可知,杜仲主要从直接影响骨代谢和间接调节骨代谢两方面发挥抗骨质疏松的作用。1) 直接影响骨代谢。骨吸收和骨形成过程中的动态平衡异常是导致 OP 发生、发展过程中重要的发病机制,而影响骨代谢的相关信号通路也是调控过程中主要的信号通路。上述结果显示,主要富集在雌激素信号通路、Wnt 信号通路、HIF-1 信号通路、MAPK 信号通路等。研究表明,雌激素可以通过雌激素受体 α 或者激活 Wnt/ β -Catenin 信号通路改善人骨髓间充质干细胞成骨分化的能力^[17-19]; Wnt 信号通路具有调节成骨细胞和破骨细胞分化的双重作用^[20]。Notch 在成骨细胞分化过程的早期阶段表达时,通过诱导成骨细胞中骨保护素的表达,抑制成骨细胞向成熟成骨细胞表型和成骨细胞功能发展,从而抑制破骨细胞形成和骨吸收^[21]。低氧诱导因子-1 (Hypoxia-inducible factor, HIF-1) 信号通路对骨形成和骨吸收都有重要作用,该信号通路上调一方面可通过成血管成骨偶联促进骨形成和血管形成^[22];而另一方面又可增加破骨细胞的数量及破骨活性^[23]。MAPK 对细胞的增殖、分化进行调控,在维持骨代谢平衡方面具有重要作用^[24]。上述结果提示,杜仲抗 OP 的重要机制是调节 OP 发生、发展过程中骨代谢平衡异常的相关信号通路。2) 间接影响骨代谢。在明显富集的信号通路中仍存在部分调控其他系统的信号通路,如 PI3K-Akt 信号通路、FoxO 信号通路、NF- κ B 信号通路、神经营养因子 3 信号通路、泌乳素信号通路和甲状腺素信号通路等。PI3K/Akt 通路能促进间充质干细胞 (marrow mesenchymal stem cells, MSCs) 迁移。PI3K 通过激活 Akt,进而增加 Ras 同源基因家族 A 的表达量,从而改变细胞骨架^[25]。研究证实 FOXOs 因子可通过提高细胞的抗氧化能力从而减缓癌症、心血管疾病、骨质疏松等年龄相关疾病的发展^[26-29]。NF- κ B 信号通路是联系细胞因子、炎症反应的桥梁,多种炎症相关疾病与 NF- κ B 信号通路的过度激活有关, NF- κ B 信号通路

不仅在骨形成和骨吸收起着重要作用,而且通过与其他信号通路相互联系,彼此作用,影响骨质疏松的发生^[30]。神经营养因子 3 (Neurotrophin) 可以促进骨髓间充质干细胞体内的骨形态发生蛋白信号通路的表达,从而促进骨髓间充质干细胞向神经细胞分化^[31]。泌乳素可通过对骨转化的直接作用削弱骨的形成和矿化以及负反馈机制使 GnRH 的分泌失调而参与骨代谢的调节^[32]。

综上所述,体内代谢之间是相互作用、相互联系的,通过全身其他系统,如循环系统、神经系统等多种代谢可以间接影响或干预骨微环境,进而促进成骨细胞增殖或抑制破骨细胞生成以及双向调节,故杜仲治疗 OP 应在针对局部关键通路的基础上,仍应针对疾病病因、所处机体环境,进行多靶点、多系统干预,这与中医多靶点、多方面的综合干预理念相吻合。利用网络药理学分析手段为后续进一步探讨机制和实验设计的优化等提供了重要的基础,使实验研究更加合理、更加具有指导性。

参考文献

- [1] Zhang Z Q, Ho S C, Chen Z Q, et al. Reference values of bone mineral density and prevalence of osteoporosis in Chinese adults [J]. *Osteoporos Int*, 2014, 25 (2): 497-507.
- [2] Fini M, Giavaresi G, Torricelli P, et al. Osteoporosis and biomedicine: osteo integration [J]. *Biomedicine and Pharmacotherapy*, 2004, 58 (9): 487-493.
- [3] Sgaard C H, Mosekilde L, Schwartz W, et al. Effect of fluoride on rat vertebral body biomechanical competence and bone mass [J]. *Bone*, 1995, 16 (1): 163-169.
- [4] 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.
- [5] Huang J, Yuan L, Wang X, et al. Icaritin and its glycosides enhance osteoblastic, but suppress osteoclastic, differentiation and activity in vitro [J]. *Life Sci*, 2007, 81 (10): 832-840.
- [6] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典: 一部 [M]. 北京: 中国医药科技出版社, 2015: 165-166.
- [7] Li Y, Zhang J, Zhang L, et al. Systems pharmacology to decipher the combinational anti-migraine effects of Tianshu formula [J]. *J Ethnopharmacol*, 2015, 174 (15): 45-56.
- [8] 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, 5: 15290.
- [9] 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.
- [10] Tang Y, Li M, Wang J, et al. CytoNCA: a cytoscape plugin for centrality analysis and evaluation of protein interaction networks[J]. *Biosystems*, 2015, 127: 67-72.
- [11] 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.
- [12] Kanis J A, Svedbom A, Harvey N, et al. The osteoporosis treatment gap [J]. *J Bone Miner Res*, 2014, 29(9): 1926-1928.
- [13] 李近, 杨亚军, 刘钰瑜. FoxOs 与骨质疏松[J]. *中国药理学通报*, 2016, 32(2): 169-171.
- [14] 曾雪, 唐倩, 王丽娟, 等. 杜仲治疗骨质疏松症的临床疗效[J]. *临床合理用药杂志*, 2017, 10(3): 101-102.
- [15] 赵丽娜. 杜仲防治骨质疏松临床效果评价[J]. *现代中西医结合杂志*, 2003, 12(9): 922-923.
- [16] 林朝龙. 杜仲抗骨质疏松症临床研究[J]. *亚太传统医药*, 2014, 10(13): 123-124.
- [17] Hong L, Colpan A, Peptan I A. Modulations of 17-beta estradiol on osteogenic and adipogenic differentiations of human mesenchymal stem cells [J]. *Tissue Eng*, 2006, 12: 2747-2753.
- [18] Bhukhai K, Suksen K, Bhummaphan N, et al. A phytoestrogen diarylheptanoid mediates estrogen receptor/Akt/glycogen synthase kinase 3beta protein-dependent activation of the Wnt/beta-catenin signaling pathway [J]. *J Biol Chem*, 2012, 287: 36168-36178.
- [19] 范金柱, 杨柳, 罗卓荆, 等. 雌激素对绝经后骨质疏松患者骨髓间充质干细胞 Notch 信号通路的影响[J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2013, 6(3): 232-239.
- [20] 孙明宏, 卢丽霞, 赵刚. Notch 信号通路在骨与骨病中的研究进展[J]. *中国煤炭工业医学杂志*, 2014, 17(6): 1029-32.
- [21] Monroe D G, McGee-Lawrence M E, Oursler M J, et al. Update on Wnt signaling in bone cell biology and bone disease[J]. *Gene*, 2012, 492(1): 1-18.
- [22] Takahashi N, Maeda K, Ishihara A, et al. Regulatory mechanism of osteoclastogenesis by RANKL and Wnt signals[J]. *Front Biosci*, 2011, 16: 21-30.
- [23] Wang Y, Wan C, Deng L, et al. The hypoxia-inducible factor alpha pathway couples angiogenesis to orthogenesis during skeletal development [J]. *J Clin Invest*, 2007, 117(6): 1616-1626.
- [24] Knowles H J, Cleton-Jansen A M, Korsching E, et al. Hypoxia-inducible factor regulates osteoclast-mediated bone resorption: role of angiopoietin-like 4[J]. *FASEB J*, 2010, 24(12): 4648-4659.
- [25] McCubrey J A, Steelman L S, Chappell W H, et al. Ras/Raf/MEK/ERK and PI3K/PTEN/Akt/mTOR cascade inhibitors: how mutations can result in therapy resistance and how to overcome resistance [J]. *Oncotarget*, 2012, 3(10): 1068-1111.
- [26] 吴志方, 罗辉. 骨髓间充质干细胞迁移的信号通路的研究进展[J]. *医学综述*, 2016, 22(22): 4377-4380.
- [27] Kim J, Ishihara N, Lee T R. A DAF-16/FoxO3a-dependent longevity signal is initiated by antioxidants[J]. *Biofactors*, 2014, 40(2): 247-257.
- [28] Hou Y Q, Yao Y, Bao Y L, et al. Juglanthraquinone C Induces Intracellular ROS Increase and Apoptosis by Activating the Akt/Foxo Signal Pathway in HCC Cells [J/OL]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, [2017-10-30]. <http://dx.doi.org/10.1155/2016/4941623>.
- [29] Hou L, Chen J, Zheng Y, et al. Critical role of miR-155/FoxO1/ROS axis in the regulation of non-small cell lung carcinomas [J]. *Tumour Biol*, 2016, 37(4): 5185-5192.
- [30] 许建国. 基于 Wnt 及 NF- κ B 信号通路探讨补肾健脾活血汤对糖尿病骨质疏松大鼠作用机制的研究[D]. 济南: 山东中医药大学, 2015.
- [31] 姜红堃, 李云鹏, 李雷. 神经营养因子 3 促进骨髓间充质干细胞向类神经元分化的信号通路[J]. *中国组织工程研究*, 2015, 19(53): 8640.
- [32] Mazziotti G, Chiavistelli S, Giustina A. Pituitary diseases and bone [J]. *Endocrinol Metab Clin North Am*, 2015, 44(1): 171-180.

(收稿日期 2018-02-27)