

· 基础研究 ·

基于网络药理学方法探讨二至丸 治疗骨质疏松症的有效成分、作用靶点及作用机制

谭雪¹, 许云腾¹, 王圣杰¹, 王丽丽¹, 付长龙², 叶锦霞¹, 郑春松¹, 叶蕪芝², 李西海²

(1. 福建中医药大学中西医结合研究院, 福建 福州 350122;

2. 福建省中西医结合老年性疾病重点实验室, 福建 福州 350122)

摘要 目的:探讨二至丸治疗骨质疏松症(osteoporosis, OP)的有效成分、作用靶点及作用机制。**方法:**在 GEO 数据库检索 OP 相关基因, 同时在中药系统药理学数据库及分析平台检索二至丸的组成中药(女贞子、墨旱莲)的有效成分和药物靶点。利用 PERL 软件将检索到的 OP 相关基因与二至丸的药物靶点取交集, 初步获得二至丸治疗 OP 的靶点。在此基础上利用 Cytoscape 软件建立二至丸治疗 OP 的有效成分-靶点网络进行分析, 并利用 R 软件进行靶点基因 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。最后使用 PERL 软件筛选出 KEGG 富集分析表达位于前 20 的信号通路和对应的靶点基因, 利用 Cytoscape 软件构建二至丸治疗 OP 的信号通路-靶点关系网络进行分析。**结果:**在 GEO 数据库中筛选出 2 个与 OP 相关的基因芯片, 分别为 GSE35956 和 GSE56116, 其共同的 OP 相关基因 102 个、共同上调基因 34 个、共同下调基因 17 个。利用 PERL 软件将 2 个芯片中的 OP 相关基因与二至丸的药物靶点取交集, 共筛选出二至丸治疗 OP 的 42 个靶点, 其中芯片 GSE35956 对应的靶点 28 个、芯片 GSE56116 对应的靶点 16 个。2 个芯片对应的有效成分-靶点网络中, 存在 7 个共同有效成分, 分别为紫柳素、槲皮素、山奈酚、 β -谷甾醇、木犀草素、花旗松素和 Lucidumoside D_{qt}; 存在 2 个共同靶点, 分别为谷胱甘肽 S-转移酶 mu1 (glutathione S-transferase mu1, GSTM1) 和 GSTM2。靶点基因 GO 功能分析显示, 靶点基因的分子功能主要包括谷胱甘肽结合、寡肽结合、谷胱甘肽转移酶活性、与修饰的氨基酸结合。靶点基因 KEGG 富集分析及信号通路-靶点关系网络显示, 二至丸治疗 OP 的主要靶点基因包括 CDKN1A、CHUK、MYC、RELA、GSTM1、GSTM2、FOS、IL4、CD40LG, 其中 CDKN1A、GSTM1、GSTM2、RELA、MYC、FOS 是上调基因, CHUK、CD40LG、IL4 是下调基因; 2 个芯片中共同的靶点基因为 GSTM1 和 GSTM2, 且在 2 个芯片中都属于上调基因; 二至丸治疗 OP 的主要信号通路为与感染、心血管疾病、癌症、代谢、免疫相关的信号通路。**结论:**二至丸治疗 OP 的有效成分主要为黄酮类化合物, 主要靶点为 GSTM1 和 GSTM2, 其作用机制可能是通过抑制或减轻氧化应激反应发挥治疗作用。

关键词 骨质疏松; 二至丸; 网络药理学

A study of effective components, action targets and mechanism of action of Erzhi Wan(二至丸) for treatment of osteoporosis using network pharmacology approach

TAN Xue¹, XU Yunteng¹, WANG Shengjie¹, WANG Lili¹, FU Changlong², YE Jinxia¹, ZHENG Chunsong¹, YE Hongzhi², LI Xihai²

1. Academy of Integrated Medicine affiliated to Fujian University of Traditional Chinese Medicine, Fuzhou 350122, Fujian, China

2. Fujian Key Laboratory of Integrated Medicine on Geriatrics, Fuzhou 350122, Fujian, China

ABSTRACT Objective: To explore the effective components, action targets and mechanism of action of Erzhi Wan(二至丸, EZW) for treatment of osteoporosis(OP). **Methods:** The OP-related genes were searched out from GEO databases, and the effective components and drug targets of EZW(Fructus Ligustri Lucidi and Ecliptae Herba) were screened out by retrieving Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform(TCMSP). The targets of EZW for treatment of OP were selected out through overlapping the retrieved OP-related genes with the drug targets of EZW using PERL software. The effective components-targets network of EZW for treatment of OP was built by using Cytoscape software, and GO function and KEGG pathway enrichment analysis were performed on target genes respectively by using R software. Finally, the top 20 signal pathways and their corresponding target genes obtained by KEGG enrichment

基金项目: 第四批全国中医优秀人才研修项目(国中医药人教发[2017]24号)

通讯作者: 李西海 E-mail: lixihai@163.com

analysis were screened out by using PERL software, and the signal pathway-target interaction network of EZW for treatment of OP was built by using Cytoscape software. **Results:** Two OP-related gene chips including GSE35956 and GSE56116 were searched out from GEO databases, and 102 common OP-related genes, 34 common up-regulated genes and 17 common down-regulated genes were found in the 2 chips. Forty-two targets of EZW for treatment of OP were selected out through overlapping the OP-related genes in 2 chips with the drug targets of EZW by using PERL software, in which GSE35956 corresponded to 28 targets and GSE56116 corresponded to 16 targets. Seven common effective components including butin, quercetin, kaempferol, beta-sitosterol, luteolin, taxifolin and Lucidumside D_{qt} and 2 common targets including glutathione S-transferase mu 1 (GSTM1) and GSTM2 were found in the effective components-targets network that corresponded to the 2 chips. The results of GO function enrichment analysis on target genes demonstrated that the main molecular functions of target genes included glutathione binding, oligopeptide binding, glutathione transferase activity and modified amino acid binding. The results of KEGG pathway enrichment analysis on target genes and the signal pathway-target interaction network demonstrated that the main target genes of EZW for treatment of OP included CDKN1A, CHUK, MYC, RELA, GSTM1, GSTM2, FOS, IL4 and CD40LG, in which CDKN1A, GSTM1, GSTM2, RELA, MYC and FOS were up-regulated genes, while CHUK, CD40LG and IL4 were down-regulated genes. The common target genes were up-regulated genes GSTM1 and GSTM2 in the 2 chips. The main signal pathways of EZW for treatment of OP were the signal pathways which related to infection, cardiovascular disease, cancer, metabolism and immunity. **Conclusion:** The effective components of EZW are mainly flavonoids, and the main targets are GSTM1 and GSTM2 in treatment of OP. Its mechanism of action may be that it produce the therapeutic effects through inhibiting or alleviating the oxidative stress response.

Keywords osteoporosis; Erzhi Pill; network pharmacology

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 属中医学“骨痿”“骨枯”“骨极”范畴^[1], 是最常见的全身性骨代谢疾病, 以单位体积内骨量减少、骨组织微结构破坏为特征, 从而增加了骨的脆性和骨折风险^[2-3]。据统计, 我国 50 岁以上人群 OP 患病率为 19.2%, 其中女性为 32.1%、男性为 6.0%, 而 65 岁以上女性 OP 患病率更是达到了 51.6%^[4]。目前临床治疗 OP 主要以缓解症状为主。

中医治疗 OP 从肝肾论治, 具有较为理想的治疗效果。二至丸出自明代吴旻所著《扶寿精方》, 药物组成包括女贞子和墨旱莲, 具有补益肝肾、滋阴止血之效^[5], 是治疗肾阴虚型 OP 的常用方剂之一, 临床疗效显著。《景岳全书·痿证》曰:“肾者, 水脏也, 今水不胜火, 则骨枯而髓虚, 故足不任身, 发为骨痿。”^[6]肾在体合骨, 主骨生髓。由此可见, 肾虚、水不胜火为骨痿的主要病机。二至丸的化学成分复杂, 具有多靶点效应, 但其治疗 OP 的具体作用机制仍不明确。

网络药理学研究是以系统生物学等交叉学科为基础, 基于“药物分子-基因靶点-信号通路-疾病”^[7]构建多层次网络结构, 强调网络靶标的研究模式, 可以从整体上分析药物与疾病之间的相关性^[8]。网络药理学研究还有助于对化合物的理解, 可从基因、蛋白的分子水平揭示药物的多途径、多靶点作用及相互之间的协同作用及可能的作用机理。因此, 本研究采用网络药理学的方法, 分析了二至丸治疗 OP

的有效成分、作用靶点及作用机制, 现总结报告如下。

1 材料与方法

1.1 OP 相关基因检索 通过 GEO 数据库, 以“osteoporosis”为检索词, 检索与 OP 相关的基因芯片, 按照 Entry type - Series、Study type - Expression profiling by array、Top Organisms - Homo sapiens 进行筛选, 选用分组为正常组和 OP 组的芯片。采用 PERL 软件和 R 软件 (Bioconductor 安装包) 进行差异分析, 得到 OP 相关基因, 并通过 Venny2.1 绘制韦恩图, 获得不同芯片中共同的 OP 相关基因。

1.2 药物有效成分-靶点网络构建及分析 分别以“女贞子”“墨旱莲”为检索词, 在中药系统药理学数据库及分析平台 (Traditional Chinese Medicine Systems Pharmacology Database and Analysis Platform, TCMSP) 检索其有效成分和药物靶点。在“Ingredients”中筛选出有效成分, 按照口服生物利用度 ≥ 30 、类药性 ≥ 0.18 筛选出具有较高活性的药物有效成分, 去除重复后初步得到二至丸的有效成分; 在“Related Targets”中检索 2 味中药的药物靶点, 利用 PERL 软件与 1.1 中得到的 OP 相关基因取交集, 获得二至丸治疗 OP 的靶点。利用 PERL 软件, 将筛选出来的有效成分、靶点及上一步得到的 OP 相关基因信息编辑成“成分-基因”“靶点-基因”“药物-成分”的网络准备文件, 导入 Cytoscape3.7.2 软件, 构建二至丸治疗 OP 的有效成分-靶点网络并进行分析。

1.3 靶点基因功能及信号通路富集分析 将 1.2 中得到的二至丸治疗 OP 的靶点进行 ID 转换,即将 Gene symbol 转换为 Gene ID。在 R 软件中安装 6 个 R 包 (Colorspace、Stringi、Ggplot2、DOSE、Clusterprofiler、Enrichplot) 并选择相应的镜像,导入 Gene ID 文件进行靶点基因 GO 功能富集分析和 KEGG 通路富集分析。

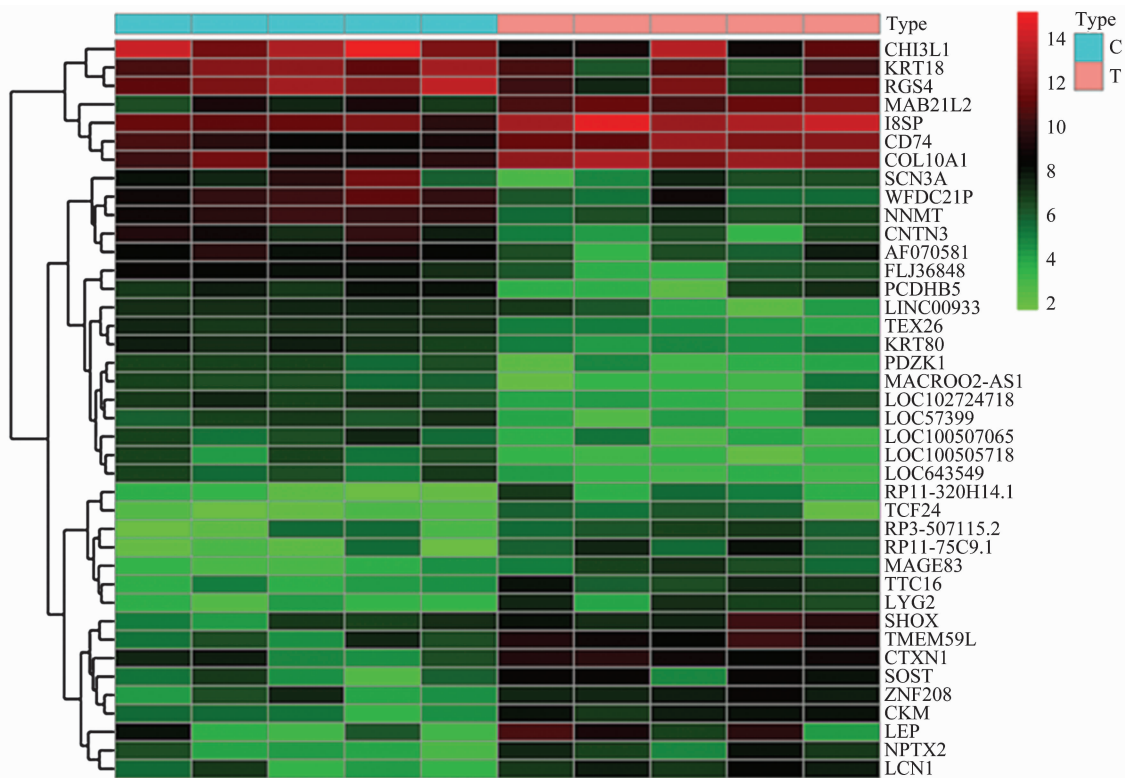
1.4 信号通路-靶点关系网络构建及分析 使用 PERL 软件筛选出 KEGG 富集分析表达位于前 20 的信号通路和对应的靶点基因,获取以上信息的输入准备文件并导入 Cytoscape3.7.2 软件,构建二至丸治疗 OP 的信号通路-靶点关系网络并进行分析。

2 结果

2.1 OP 相关基因检索结果 通过 GEO 数据库检索到 GSE35956 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE35956>) 和 GSE56116 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE56116>) 2 个与 OP 相关的基因芯片;通过 PERL 软件和 R 软件,按照 $P < 0.05$ 进行筛选分析,去除相同基因名后得到芯片 GSE35956 中 OP 相关基因 2789 个,其中上调基因 1465 个、下调基因 1324 个;芯片 GSE56116 中 OP 相关基因 971 个,其中上调基因

541 个、下调基因 430 个。2 个芯片中 OP 相关基因热图和火山图见图 1。通过绘制的韦恩图可见,芯片 GSE35956 和 GSE56116 中共同的 OP 相关基因 102 个、共同上调基因 34 个、共同下调基因 17 个 (图 2),其中谷胱甘肽 S-转移酶 mu1 (glutathione S-transferase mu 1, GSTM1) 和 GSTM2 为 2 个芯片共有的上调基因。

2.2 药物有效成分-靶点网络分析结果 通过 TC-MSP 检索到女贞子的有效成分 119 个、药物靶点 1026 个,墨旱莲的有效成分 48 个、药物靶点 561 个。按照口服生物利用度 ≥ 30 、类药性 ≥ 0.18 筛选后得到女贞子的有效成分 13 个、墨旱莲的有效成分 10 个,去除重复后共获得 2 种药物的共同有效成分 21 个。通过 PERL 软件共筛选出 42 个靶点,其中芯片 GSE35956 中对应的靶点 28 个、芯片 GSE56116 中对应的靶点 16 个。通过将 2 个芯片建立的二至丸治疗 OP 有效成分-靶点网络中有效成分和靶点分别取交集,共得到 7 个共同有效成分,分别为紫柳素 (butin)、槲皮素 (quercetin)、山奈酚 (kaempferol)、 β -谷甾醇 (beta-sitosterol)、木犀草素 (luteolin)、花旗松素 (taxifolin) 和 Lucidumoside D_{qt};得到 2 个共同靶点,分别为 GSTM1 和 GSTM2。见图 3、表 1。



(1) 芯片 GSE35956 中骨质疏松症相关基因热图

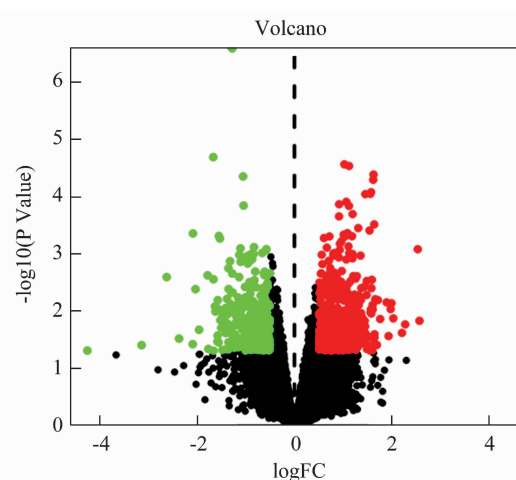
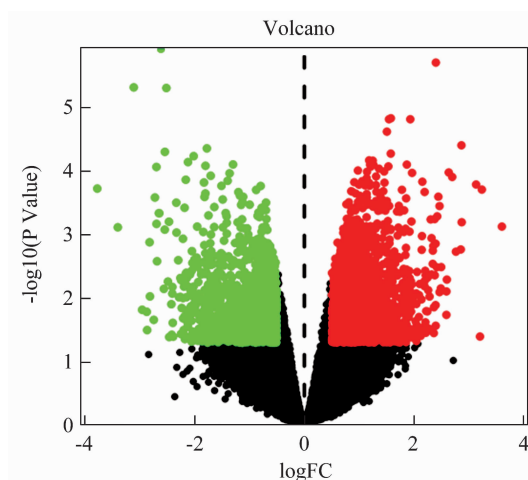
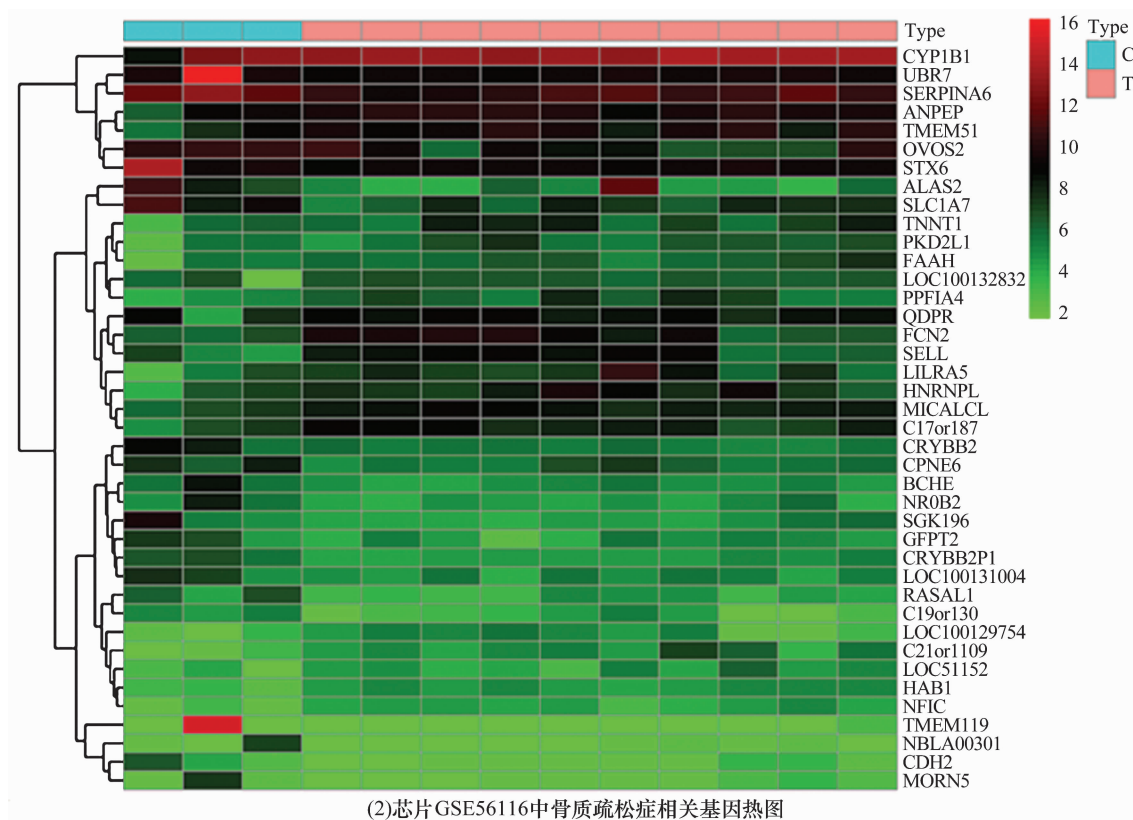


图 1 芯片 GSE35956 和 GSE56116 中骨质疏松症相关基因热图及火山图

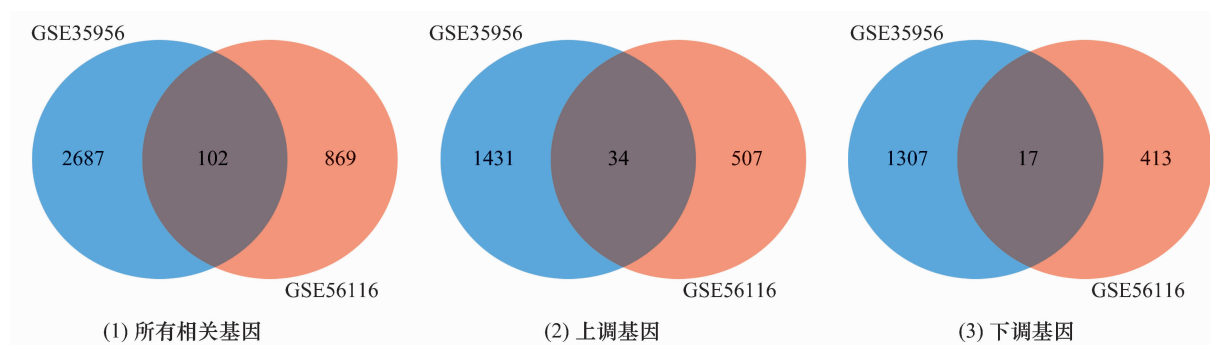
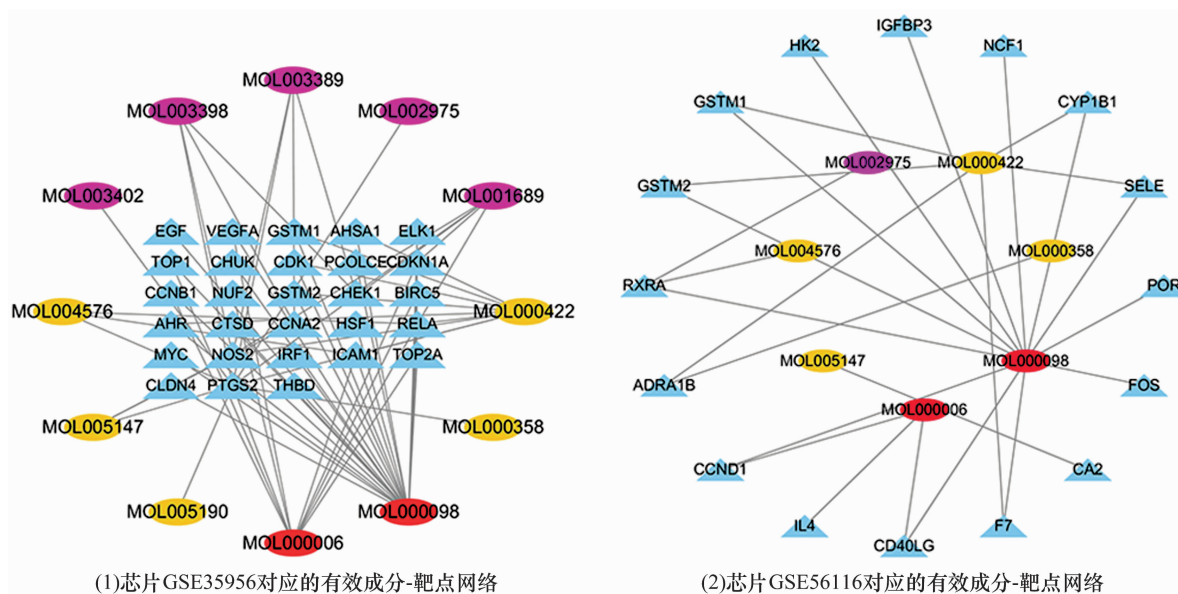


图 2 芯片 GSE35956 和 GSE56116 中骨质疏松症相关基因韦恩图



三角形为靶点基因,椭圆形为药物有效成分(紫色为墨旱莲的有效成分,黄色为女贞子的有效成分,红色为 2 种药物共同的有效成分)

图 3 二至丸治疗骨质疏松症有效成分-靶点网络

表 1 二至丸治疗骨质疏松症的主要有效成分

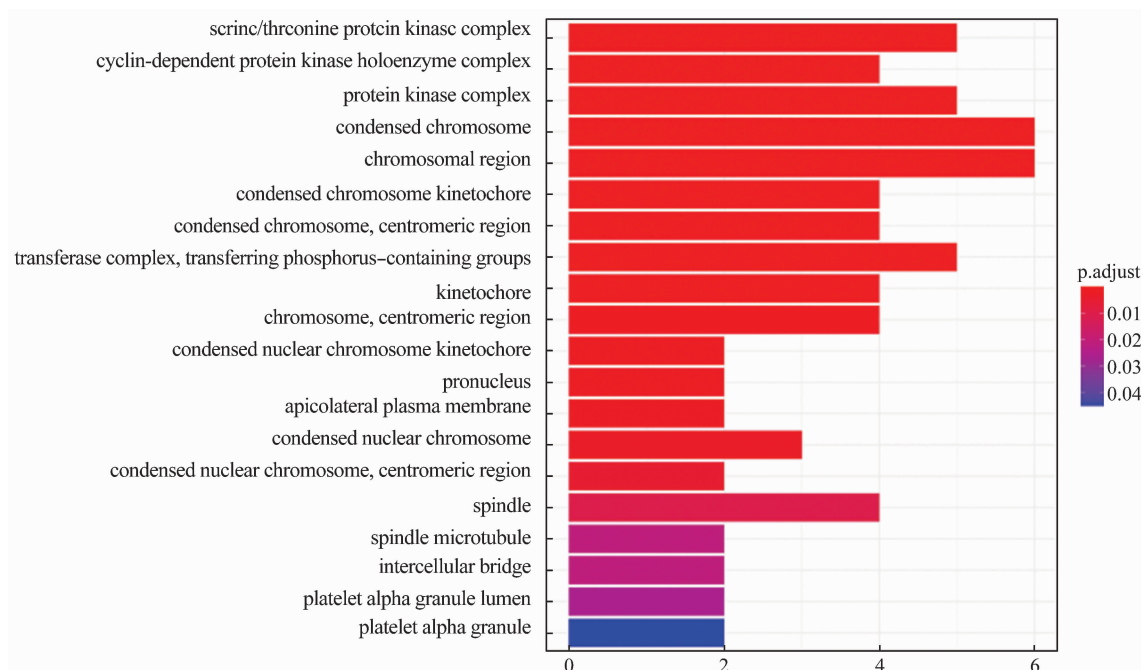
分子编号	分子名称		口服生物利用度	类药性
	英文名称	中文名称		
MOL002975	butin	紫柳素	69.94%	0.21%
MOL000098	quercetin	槲皮素	46.43%	0.28%
MOL000422	kaempferol	山奈酚	41.88%	0.24%
MOL000358	beta-sitosterol	β -甾甾醇	36.91%	0.75%
MOL000006	luteolin	木犀草素	36.16%	0.25%
MOL004576	taxifolin	花旗松素	57.84%	0.27%
MOL005147	Lucidumside D_qt		54.41%	0.47%

2.3 靶点基因功能及信号通路富集分析结果 芯片 GSE35956 中的靶点基因通过 GO 功能富集分析得到 494 个富集结果,其中生物学过程(biological process, BP)445 个、细胞成分(cellular component, CC)20 个、分子功能(molecular function, MF) 29 个; 芯片 GSE56116 中的靶点基因通过 GO 功能富集分析得到 82 个富集结果,其中 BP 71 个、CC 5 个、MF 6 个。芯片 GSE35956 中的靶点基因主要集中在细胞染色体区域,或者以复合物的形式存在;2 个芯片都有部分基因富集在细胞间桥,2 个芯片中靶点基因的分子功能都有谷胱甘肽结合、寡肽结合、谷胱甘肽转移酶活性、与修饰的氨基酸结合,其中谷胱甘肽转移酶活性与氧化应激有关,负责消除氧化应激产物(图 4)。

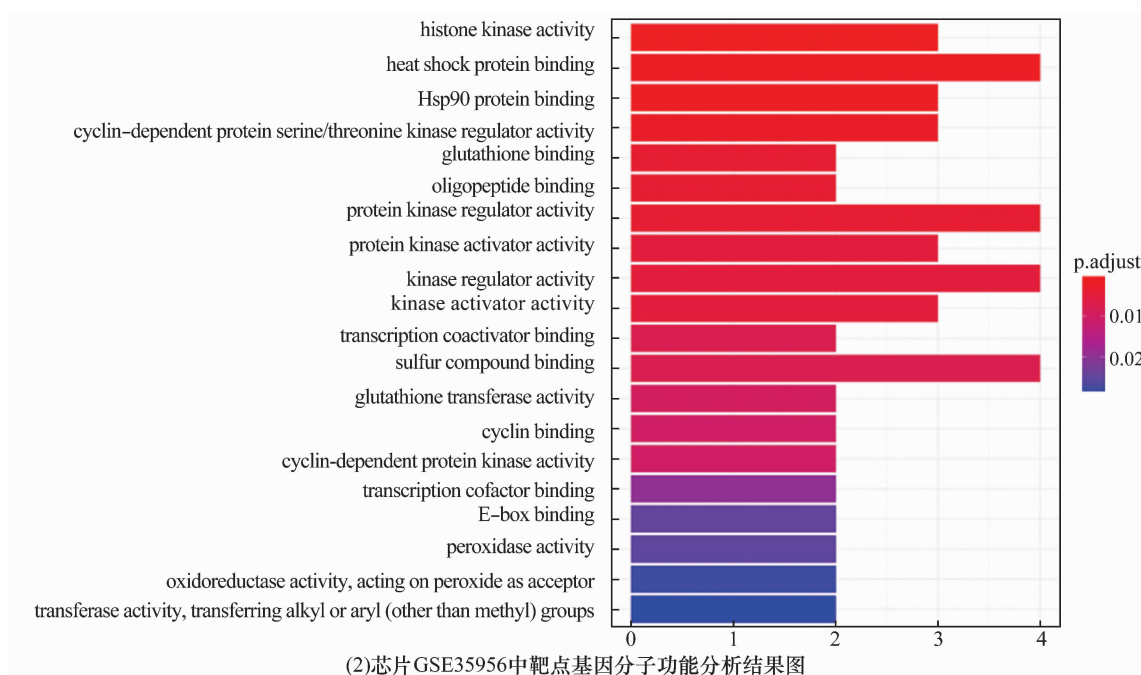
芯片 GSE35956 中的靶点基因通过 KEGG 富集分析得到了 76 条信号通路,除了与炎症、癌症、感染、代谢及与细胞周期、分化、衰老有关的信号通路,还包括 p53 信号通路、肿瘤坏死因子信号通路、缺氧诱导

因子 1 信号通路等[图 5(1)];芯片 GSE56116 中的靶点基因通过 KEGG 富集分析得到了 15 条信号通路,主要为与癌症、炎症、代谢、免疫及与细胞周期、分化、衰老有关的信号通路[图 5(2)]。2 个芯片中的靶点基因有 8 条共同信号通路,其共同的靶点基因为 GSTM1 和 GSTM2(表 2)。

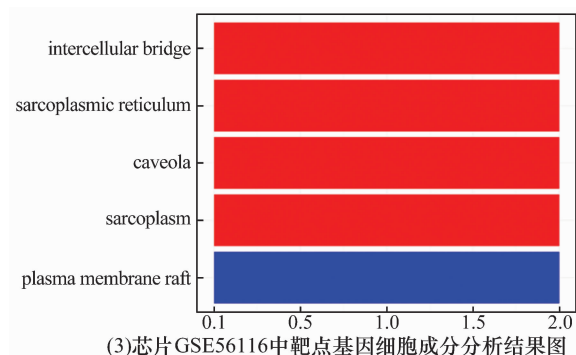
2.4 信号通路-靶点关系网络分析结果 构建的信号通路-靶点关系网络(图 6)显示,二至丸治疗 OP 的主要靶点基因包括细胞周期蛋白依赖性激酶抑制剂 1A (cyclin dependent kinase inhibitor 1A, CDKN1A)、CHUK、MYC、RELA、GSTM1、GSTM2、FOS、白细胞介素 4 (Interleukin 4, IL4)、CD40 配体(CD40 ligand, CD40LG),其中 CDKN1A、GSTM1、GSTM2、RELA、MYC、FOS 是上调基因,CHUK、CD40LG、IL4 是下调基因。2 个芯片中共同的靶点基因为 GSTM1 和 GSTM2,且在 2 个芯片中都属于上调基因;二至丸治疗 OP 的主要信号通路为与感染、心血管疾病、癌症、代谢、免疫相关的信号通路。



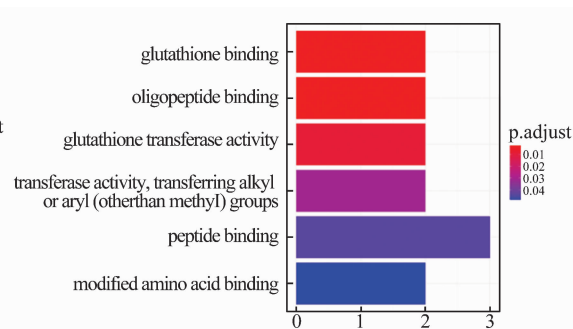
(1)芯片GSE35956中靶点基因细胞成分分析结果图



(2)芯片GSE35956中靶点基因分子功能分析结果图



(3)芯片GSE56116中靶点基因细胞成分分析结果图



(4)芯片GSE56116中靶点基因分子功能分析结果图

图 4 二至丸治疗骨质疏松症靶点基因 GO 功能富集分析结果图

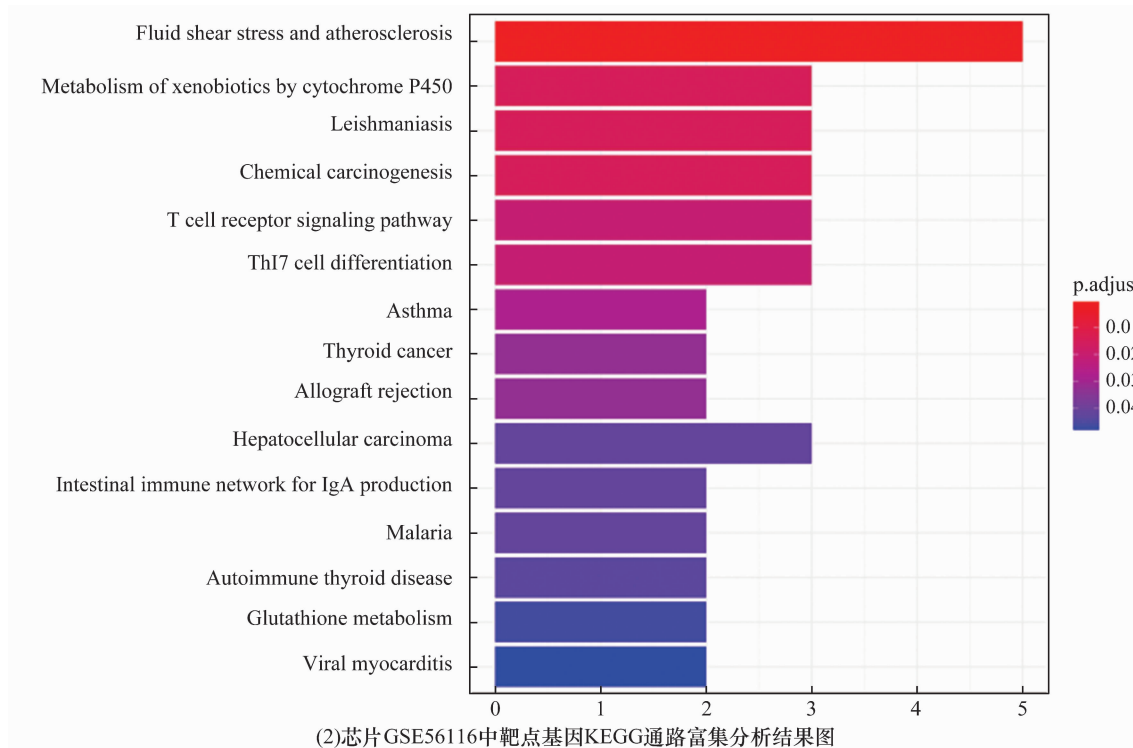
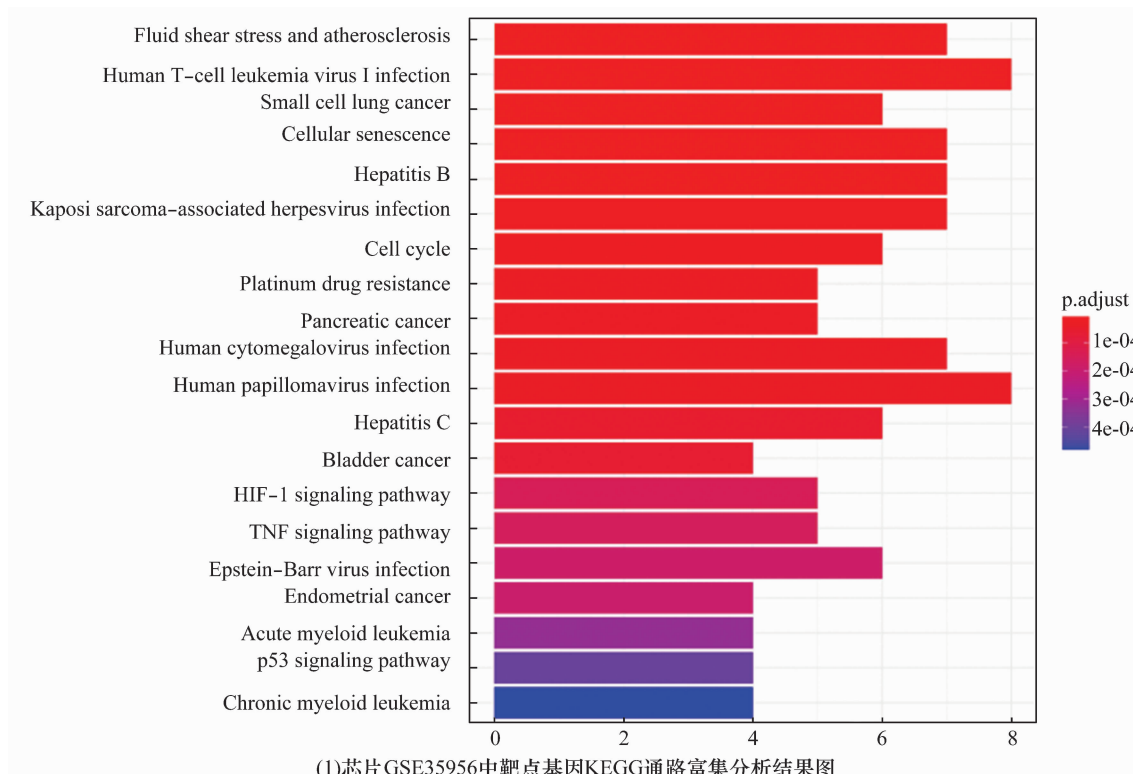


图5 二至丸治疗骨质疏松症靶点基因 KEGG 通路富集分析结果图

3 讨论

二至丸由女贞子、墨旱莲组成。方中女贞子甘苦性凉,可滋肾养血;墨旱莲甘酸性寒,可滋阴益精凉血;二者合用使得二至丸在补肾阴的同时兼有清而不腻不燥的特点^[9]。

从我们的研究结果来看,二至丸的主要有效成分

包括槲皮素、紫柳素、山奈酚、花旗松素、 β -谷甾醇、木犀草素和 Lucidumoside D_{qt},主要以黄酮类化合物为主,此类化合物控制着成骨细胞和破骨细胞的功能,能够改善骨代谢^[10]。槲皮素具有抗衰老作用,通过雌激素介导的信号通路促进骨髓间充质干细胞的增殖与成骨分化^[11],改善体内钙、磷水平,并可以增

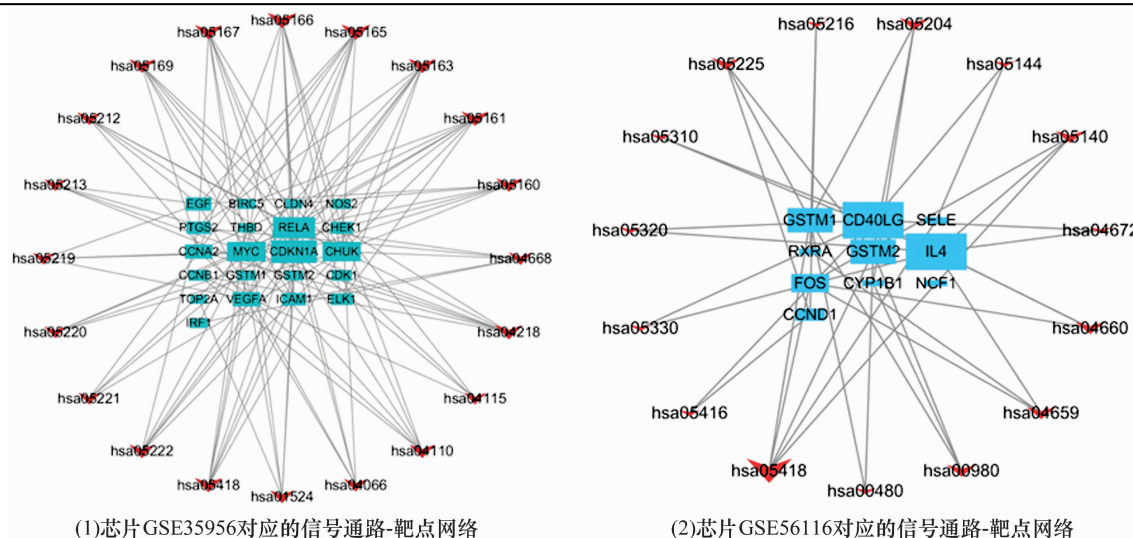
加成骨细胞活性^[12]。山奈酚具有抑制脂肪生成、炎症、氧化应激、破骨细胞自噬和成骨细胞凋亡的功能,可以通过调节雌激素受体、骨形态发生蛋白 2、核因子- κ B(nuclear factor- κ B, NF- κ B)、丝裂原活化蛋白激酶和哺乳动物雷帕霉素靶蛋白信号通路,发挥抗骨质疏松的作用^[13]。木犀草素可通过调节细胞外调节蛋白激酶/糖原合成酶 3 信号通路,减轻氧化应激,促进成骨细胞分化^[14]。紫铆素可以通过上调腺苷酸活化蛋白激酶/糖原合成酶 3 通路来抑制氧化应激反应导致的细胞凋亡^[15]。花旗松素是具有强抗氧化作用的黄酮类化合物,具有雌激素样作用,可以促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化^[16],抑制转染细胞

中破骨细胞的生成^[17];另外,花旗松素还可通过抑制 NF- κ B 受体活化因子配体(receptor activator of NF- κ B ligand, RANKL)诱导抗酒石酸酸性磷酸酶、活化 T 细胞核因子 1 等因子的表达,通过 RANKL 通路的下游途径 NF- κ B 信号通路抑制 F-肌动蛋白的形成以及脂多糖诱导的破骨细胞的生成与活化,影响骨代谢^[18-19]。 β -谷甾醇具有抗炎作用,但具体作用机制不明。RANKL 与破骨细胞表达的 NF- κ B 受体活化因子受体结合,可引起促炎反应,因此 β -谷甾醇可能是通过使 RANKL 受体失活影响骨代谢^[20-21]。

从有效成分-靶点网络和 KEGG 通路分析结果来看, GSTM1 和 GSTM2 为 2 个 OP 相关基因芯片的

表 2 二至丸治疗骨质疏松症主要信号通路

编号	名称	分类	对应的靶点基因	
			芯片 GSE35956	芯片 GSE56116
hsa05418	Fluid shear stress and atherosclerosis	Human Diseases; Cardiovascular disease	RELA/VEGFA/ICAM1/THBD/CHUK/GSTM1/GSTM2	FOS/SELE/NCF1/GSTM1/GSTM2
hsa00980	Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450	Metabolism; Xenobiotics biodegradation and metabolism	GSTM1/GSTM2	CYP1B1/GSTM1/GSTM2
hsa05140	Leishmaniasis	Human Diseases; Infectious disease; parasitic	NOS2/PTGS2/RELA/ELK1	IL4/FOS/NCF1
hsa05204	Chemical carcinogenesis	Human Diseases; Cancer; overview	PTGS2/GSTM1/GSTM2	CYP1B1/GSTM1/GSTM2
hsa04659	Th17 cell differentiation	Organismal Systems; Immune system	RELA/AHR/CHUK	RXRA/IL4/FOS
hsa05216	Thyroid cancer	Human Diseases; Cancer; specific types	CDKN1A/MYC	RXRA/CCND1
hsa05225	Hepatocellular carcinoma	Human Diseases; Cancer; specific types	CDKN1A/ELK1/MYC/GSTM1/GSTM2	CCND1/GSTM1/GSTM2
hsa00480	Glutathione metabolism	Metabolism; Metabolism of other amino acids	GSTM1/GSTM2	GSTM1/GSTM2



方形为靶点基因,三角形为信号通路

图 6 二至丸治疗骨质疏松症的信号通路-靶点网络

共同靶点基因,且都参与 Fluid shear stress and atherosclerosis、Metabolism of xenobiotics by cytochrome P450、Chemical carcinogenesis、Hepatocellular carcinoma、Glutathione metabolism 信号通路。GSTM1 和 GSTM2 属于 GST 的同工酶,后者是参与氧化应激处理的酶。已有研究证实,GSTM1 在去除肾脏后的大鼠体内具有调节氧化应激、炎症和保护代谢产物的作用^[22],可以保护细胞免受有毒物质的损害^[23]。而 OP 的病因之一就是活性氧诱导的氧化应激反应,氧化应激反应会导致体内的氧化物水平升高,通过诱导成骨细胞分化和刺激骨吸收促进 OP 进展。基于抗氧化的作用,GSTM1 和 GSTM2 都可以保护细胞免受活性氧的损害。有研究显示,GSTM1 在成骨细胞中高表达,当 GSTM1 基因被删除时成骨细胞会受到不利影响,骨密度会下降^[24]。GSTM1 和 GSTM2 在 2 个芯片中都属于上调基因,表明其在 OP 中都有高表达。目前对这两个基因的研究很少,但可以明确 GST 是在 OP 进展中激活细胞保护基因的重要分子^[25]。所以笔者猜想,二至丸可以通过促进该基因的表达,保护氧化应激反应对机体的伤害而达到治疗 OP 的目的。

综上所述,二至丸治疗 OP 的有效成分主要为黄酮类化合物,主要靶点为 GSTM1 和 GSTM2,其作用机制可能是通过抑制或减轻氧化应激反应发挥治疗作用。

参考文献

- [1] 中华中医药学会. 绝经后骨质疏松症(骨痿)中医药诊疗指南(2019 年版)[J]. 中医正骨, 2020, 32(2): 1-13.
- [2] 王可可, 李思淼, 罗婕, 等. 骨质疏松症临床实践指南评价及药物综合价值研究[J]. 中国医院药学杂志, 2020, 40(1): 91-98.
- [3] 许一帆, 樊炳楷, 黄金山, 等. 肌少-骨质疏松症的研究进展[J]. 中医正骨, 2019, 31(5): 22-25.
- [4] 中华医学会骨质疏松和骨矿盐疾病分会. 中国骨质疏松症流行病学调查及“健康骨骼”专项行动结果发布[J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(4): 317-318.
- [5] 曾文泓, 王丽华, 梅鸥. 二至丸治疗绝经后肝肾阴虚型骨质疏松症的临床效果及对骨生化标志物的影响[J]. 中国医学创新, 2020, 17(11): 78-82.
- [6] 梁伟乔, 钟诚, 李宇明. 骨质疏松症的中医病因病机认识与治疗进展[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(1): 135-139.
- [7] 徐森楠, 庄莉, 翟园园, 等. 基于网络药理学研究二至丸

- 防治骨质疏松症的物质基础与作用机制[J]. 中国药理学杂志, 2018, 53(22): 1913-1920.
- [8] 梁文娜, 李冠慧, 林雪娟, 等. 二至丸调节 Sirt1/Runx2 信号通路抑制绝经后骨质疏松症肾阴虚证骨代谢失衡的机制探讨[J]. 中华中医药杂志, 2018, 33(7): 2767-2769.
- [9] 闵愈, 袁德培, 胡玉萍, 等. 二至丸干预去卵巢骨质疏松大鼠骨重建的效应及机制[J]. 南京中医药大学学报, 2020, 36(2): 215-220.
- [10] 顾艺婧, 傅稼耀, 武文婧, 等. 槲皮素通过抗骨相关细胞衰老作用治疗雌激素缺乏骨质疏松症的初步研究[J]. 同济大学学报(医学版), 2019, 40(3): 274-280.
- [11] 邓静, 张景岚, 周广朋, 等. 槲皮素对低钙高镁饮食大鼠血清钙量和骨代谢的改善作用[J]. 中国骨质疏松杂志, 2020, 26(7): 1039-1043.
- [12] WONG S K, CHIN K Y, IMA - NIRWANA S. The osteoprotective effects of kaempferol: the evidence from in vivo and in vitro studies[J]. Drug Des Devel Ther, 2019, 13(13): 3497-3514.
- [13] JING Z, WANG C, YANG Q, 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.
- [14] KWON E B, KANG M J, RYU H W, et al. Acacetin enhances glucose uptake through insulin - independent GLUT4 translocation in L6 myotubes[J/OL]. Phytomedicine, 2020[2020-05-01]. [https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711320300118? via%3Dihub](https://www.sciencedirect.com/science/article/abs/pii/S0944711320300118?via%3Dihub).
- [15] DUAN J, GUAN Y, MU F, et al. Protective effect of butin against ischemia/reperfusion - induced myocardial injury in diabetic mice: involvement of the AMPK/GSK - 3 β /Nrf2 signaling pathway[J/OL]. Sci Rep, 2017, 7[2020-05-01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5269748>.
- [16] WANG Y J, ZHANG H Q, HAN H L, et al. Taxifolin enhances osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells partially via NF - κ B pathway[J]. Biochem Biophys Res Commun, 2017, 490(1): 36-43.
- [17] SATUÉ M, ARRIERO M M, MONJO M, et al. Quercitrin and taxifolin stimulate osteoblast differentiation in MC3T3 - E1 cells and inhibit osteoclastogenesis in RAW 264.7 cells[J]. Biochem Pharmacol, 2013, 86(10): 1476-1486.
- [18] ZHANG H Q, WANG Y J, YANG G T, et al. Taxifolin inhibits receptor activator of NF - κ B ligand - induced osteoclastogenesis of human bone Marrow - Derived macro-

- phages in vitro and prevents Lipopolysaccharide - Induced bone loss in vivo [J]. Pharmacology, 2019, 103 (1/2): 101 - 109.
- [19] CAI C, LIU C, ZHAO L, et al. Effects of taxifolin on osteoclastogenesis in vitro and in vivo [J/OL]. Front Pharmacol, 2018, 9 [2020 - 05 - 01]. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC30483128>.
- [20] RUANGSURIYA J, CHARUMANEE S, JIRANUSORNKUL S, et al. Depletion of β - sitosterol and enrichment of quercetin and rutin in *Cissus quadrangularis* Linn fraction enhanced osteogenic but reduced osteoclastogenic marker expression [J]. BMC Complement Med Ther, 2020, 20 (1): 105.
- [21] 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.
- [22] GIGLIOTTI J C, TIN A, POURAFSHAR S, et al. GSTM1 deletion exaggerates kidney injury in experimental mouse models and confers the protective effect of cruciferous vegetables in mice and humans [J]. J Am Soc Nephrol, 2020, 31 (1): 102 - 116.
- [23] 郭书英, 吴传亮, 孙慧, 等. GSTP1、GSTM1 基因多态性与顺铂导致骨髓抑制的相关性研究 [J]. 现代药物与临床, 2018, 33 (9): 2165 - 2168.
- [24] MLAKAR S J, OSREDKAR J, PREZELJ J, et al. Opposite effects of GSTM1—and GSTT1: gene deletion variants on bone mineral density [J]. Dis Markers, 2011, 31 (5): 279 - 287.
- [25] MOURA K F, HAIDAR M, BONDUKI C, et al. Frequencies of interleukin - 6, GST and progesterone receptor gene polymorphisms in postmenopausal women with low bone mineral density [J]. Sao Paulo Med J, 2014, 132 (1): 36 - 40.
- (收稿日期: 2020-06-05 本文编辑: 李晓乐)

• 作者须知 •

论文中对数据进行统计学处理时需要注意的问题

1 对基线资料进行统计学分析 搜集资料应严格遵守随机抽样设计, 保证样本从同质的总体中随机抽取, 除了对比因素外, 其他可能影响结果的因素应尽可能齐同或基本接近, 以保证组间的齐同可比性。因此, 应对样本的基线资料进行统计学分析, 以证明组间的齐同可比性。

2 选择正确的统计检验方法 研究目的不同、设计方法不同、资料类型不同, 选用的统计检验方法则不同。例如: 2 组计量资料的比较应采用 t 检验; 而多组 (≥ 3 组) 计量资料的比较应采用方差分析 (即 F 检验), 如果组间差异有统计学意义, 想了解差异存在于哪两组之间, 再进一步做 q 检验或 LSD - t 检验。许多作者对多组计量资料进行比较时采用两两组间 t 检验的方法是错误的。又如: 等级资料的比较应采用 Ridit 分析或秩和检验或行平均得分差检验。许多作者对等级资料进行比较时采用卡方检验的方法是错误的。

3 假设检验的推断结论不能绝对化 假设检验的结论是一种概率性的推断, 无论是拒绝 H_0 还是不拒绝 H_0 , 都有可能发生错误 (I 型错误和 II 型错误)。因此, 假设检验的推断结论不能绝对化。

4 P 值的大小并不表示实际差别的大小 研究结论包括统计结论和专业结论两部分。统计结论只说明有无统计学意义, 而不能说明专业上的差异大小。 P 值的大小不能说明实际效果的“显著”或“不显著”。统计结果的解释和表达, 应说对比组之间的差异有 (或无) 统计学意义, 而不能说对比组之间有 (或无) 显著的差异。 $P \leq 0.01$ 比 $P \leq 0.05$ 更有理由拒绝 H_0 , 并不表示 $P \leq 0.01$ 时比 $P \leq 0.05$ 时实际差异更大。只有将统计结论和专业知识有机地结合起来, 才能得出恰如其分的研究结论。若统计结论与专业结论一致, 则最终结论也一致; 若统计结论与专业结论不一致, 则最终结论需根据专业知识而定。判断被试因素的有效性时, 要求在统计学上和专业上都有意义。

5 假设检验的结果表达 P 值传统采用 0.05 和 0.01 这 2 个界值, 现在提倡给出 P 的具体数值和检验统计量的具体数值 (小数点后保留 3 位有效数字), 主要理由是: ①以前未推广统计软件之前, 需要通过查表估计 P 值, 现在使用统计软件会自动给出具体的 P 值和检验统计量的具体值 (t 值、 F 值、 χ^2 值等)。②方便根据具体情况判断问题。例如 $P = 0.051$ 与 $P = 0.049$ 都是小概率, 不能简单地断定 $P = 0.051$ 无统计学意义而 $P = 0.049$ 有统计学意义。③便于对同类研究结果进行综合分析。

6 统计学符号的使用 统计学符号的使用应按照 GB3358—82《统计名词及符号》的规定, 具体可参阅本刊投稿须知中的有关要求。