中国比较医学杂志
Chinese Journal of Comparative Medicine
ISSN 1671-7856,CN 11-4822/R

《中国比较医学杂志》网络首发论文

题目：　基于成分分析与实验验证探讨特制接骨丸治疗骨质疏松症的作用机制
作者：　刘娜，杨昭杰，吴莹，申瑞芳，吴丹，滕军燕
收稿日期：　2025-11-15
网络首发日期：　2026-09-03
引用格式：　刘娜，杨昭杰，吴莹，申瑞芳，吴丹，滕军燕．基于成分分析与实验验证探讨特制接骨丸治疗骨质疏松症的作用机制[J/OL]．中国比较医学杂志．https://link.cnki.net/urlid/11.4822.r.20260902.1234.004

网络首发：在编辑部工作流程中，稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定，且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式（包括网络呈现版式）排版后的稿件，可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定；学术研究成果具有创新性、科学性和先进性，符合编辑部对刊文的录用要求，不存在学术不端行为及其他侵权行为；稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准，正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性，录用定稿一经发布，不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容，只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认：纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊（光盘版）》电子杂志社有限公司签约，在《中国学术期刊（网络版）》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版，以单篇或整期出版形式，在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊（网络版）》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物（ISSN 2096-4188，CN 11-6037/Z），所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

基于成分分析与实验验证探讨特制接骨丸治疗骨质疏松症的作用机制

刘 娜[1,2]，杨昭杰[3]，吴 莹[3]，申瑞芳[3]，吴 丹[3]，滕军燕[1]✉

(1.河南省中西医结合医院，郑州 450004；2.湖南中医药大学，长沙 410208；3.河南省洛阳正骨医院（河南省骨科医院），郑州 450016)
*通信作者 滕军燕(1981—)，女，主任医师，研究方向：骨质疏松方向。E-mail：tengjy1981@163.com

摘要 目的 探究特制接骨丸抗骨质疏松症的作用机制，为其临床应用提供实验依据。方法 采用超高效液相色谱-高分辨质谱技术结合 TCMSP 数据库鉴定特制接骨丸的化学成分；利用网络药理学预测核心成分、作用靶点及关键通路；通过分子对接验证成分与靶点的结合能力；制备含药血清，采用 CCK-8 法、茜素红 S 染色、抗酒石酸酸性磷酸酶染色评估细胞增殖与分化，并通过 RT-qPCR 检测 *TP*53、*PIK*3*CA*、*STAT*3、*SRC*、*AKT*1 基因表达水平，采用 Western blot 检测 P-AKT、P-PI3K、PTEN、IL-6、TNF-α、IL-1β 蛋白表达水平，对预测结果进行验证。结果 特制接骨丸中共鉴定出 147 个化合物、1 215 个作用靶点；获得疾病相关靶点 2 284 个、交集靶点 346 个，筛选出 *TP*53、*PIK*3*CA*、*PIK*3*R*1、*STAT*3、*SRC*、*AKT*1 等核心靶点，核心成分为黄芩素（Baicalein）、异槲皮苷（Isoquercitrin）、人参皂苷 Rg1（Ginsenoside Rg1）、松柏醛（Coniferaldehyde）、芹菜素 5-O-葡萄糖苷（Apigenin 5-O-glucoside）和人参皂苷 Rh4（Ginsenoside Rh4）。KEGG 分析表明，特制接骨丸影响骨质疏松主要通过 PI3K/AKT 信号通路；分子对接结果显示核心成分与靶点结合稳定。体外实验结果显示，特制接骨丸含药血清促进 MC3T3 的增殖，抑制 RAW264.7 的活力；RT-qPCR 检测结果显示基因 *TP*53、*PIK*3*CA*、*STAT*3、*SRC* 和 *AKT*1 在破骨细胞中表达下调；Western blot 实验进一步表明，RAW264.7 细胞中 P-AKT、P-PI3K 及炎症因子 IL-6、TNF-α、IL-1β 的蛋白表达水平显著下调（$P<0.05$），同时上调抑癌基因 PTEN 的表达（$P<0.05$）。结论 特制接骨丸可能主要通过抑制磷酸化 AKT 和 PI3K 以及炎症因子，介导 PI3K/AKT 信号通路信号通路发挥对骨质疏松的治疗作用。

关键词 特制接骨丸；骨质疏松症；网络药理学；PI3K/AKT 信号通路；分子对接
中图分类号 R285.5；R681；R-33 文献标志码 A

Mechanisms of Tezhi Jiegu Pills against osteoporosis based on chemical profiling and experimental validation

LIU Na[1,2], YANG Zhaojie[3], WU Ying[3], SHEN Ruifang[3], WU Dan[3], TENG Junyan[1] ✉

(1. Henan Integrative Medicine Hospital, Zhengzhou 450004, China; 2. Hunan University of Chinese Medicine, Changsha 410208; 3. Henan Provincial Luoyang Orthopedic Hospital, Zhengzhou 450016)

Abstract Objective To investigate the mechanism by which Tezhi Jiegu Pills combat osteoporosis and to provide experimental evidence for their clinical application. Methods The chemical components of Tezhi Jiegu Pills were identified using UPLC-HRMS combined with database analysis. Network pharmacology was employed to predict the core components, potential targets, and key pathways. Molecular docking was performed to validate the binding affinity between the key components and hub targets. Drug-containing serum was prepared, and *in vitro* experiments, including cell counting kit-8 assay, alizarin red S staining, and tartrate-resistant acid phosphatase staining, were conducted to evaluate cell proliferation and differentiation. Reverse transcription quantitative PCR (RT-qPCR) was performed to measure the mRNA expression levels of TP53, PIK3CA, STAT3, SRC, and AKT1, while Western blot was utilized to evaluate the abundance of phosphorylated AKT (P-AKT), phosphorylated PI3K (P-PI3K), PTEN, interleukin (IL)-6, tumor necrosis factor-α, and IL-1β to verify the predicted

收稿日期：2025-11-15
基金项目：河南省重点研发计划项目（231111310500）；中华中医药学会 2024 年度中成药治疗骨质疏松症临床研究专项重点课题（GA_CACM_2024003）。
作者简介：刘娜(2000—)，女，在读硕士研究生，研究方向：骨质疏松方向。E-mail：13783134738@163.com
网络首发时间：2026-09-03 17:00:01 网络首发地址：https://link.cnki.net/urlid/11.4822.r.20260902.1234.004

mechanisms. Results A total of 147 compounds and 1,215 putative targets were identified in Tezhi Jiegu Pills; after merging with 2,284 osteoporosis-related targets, 346 overlapping targets were obtained. The core hubs (*TP*53, *PIK*3*CA*, *PIK*3*R*1, *STAT*3, *SRC*, and *AKT*1) were selected; the main active components were baicalein, isoquercitrin, ginsenoside Rg1, coniferaldehyde, apigenin 5-O-glucoside, and ginsenoside Rh4. Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes analysis revealed that the drug exerts its anti-osteoporotic effect principally through PI3K/AKT signaling, with molecular docking showing stable binding between the core compounds and hub targets. Drug-containing serum promoted MC3T3 proliferation while suppressing RAW264.7 viability. RT-qPCR confirmed that mRNA levels of *TP*53, *PIK*3*CA*, *STAT*3, *SRC*, and *AKT*1 were significantly reduced. Western blot further demonstrated that P-AKT, P-PI3K, and the inflammatory cytokines IL-6, TNF-α, and IL-1β were significantly down-regulated in RAW264.7 cells ($P<0.05$), whereas the tumor-suppressor PTEN was up-regulated ($P<0.05$). Conclusions Tezhi Jiegu Pills are likely to exert their therapeutic effect against osteoporosis mainly by inhibiting phosphorylated AKT and PI3K as well as pro-inflammatory cytokines, thereby modulating PI3K/AKT signaling.
Key words Tezhi Jiegu Pills; osteoporosis; network pharmacology; PI3K/AKT signaling; molecular docking

骨质疏松症是一种以骨量减少、骨微结构退化为特征的全身性骨代谢疾病，其导致的骨骼脆性增加和病理性骨折风险显著升高，严重威胁中老年人群的健康与生活质量[1,2]。随着全球人口老龄化进程加剧，骨质疏松症已成为继缺血性心脏病、阿尔茨海默病和肺癌之后的第四大致残性慢性病[3]。骨质疏松症的病理机制涉及成骨细胞与破骨细胞功能的失衡[4]，以及慢性炎症状态对骨代谢的持续影响[5,6]。目前，西医治疗以抗骨吸收药物和促骨形成剂为主，虽有一定疗效，但长期使用常伴随不良反应、耐药性及治疗成本较高等问题[7,8]。

中医药在防治骨质疏松症方面历史悠久，强调“肾主骨、生髓”与“肝肾同源”理论，注重整体调节与辨证施治[9,10]。特制接骨丸是在平乐郭氏正骨“筋骨并重、辨证施治”理论指导下的临床经验方，由红参、黄芪、烫骨碎补、麸炒白术、盐杜仲、枸杞子、麸炒山药、鹿茸片、茯苓、续断片、三七、煅自然铜、地龙和土鳖虫等 14 味中药组成。全方以红参、黄芪为君，大补元气、益气固表；以烫骨碎补、盐杜仲、续断片、鹿茸片为臣，补肝肾、强筋骨；佐以麸炒白术、枸杞子、麸炒山药、茯苓健脾益肾，三七活血化瘀；使以煅自然铜、地龙、土鳖虫通经活络、续筋接骨。诸药合用，共奏益肝肾、填精髓、强筋骨之效[11,12]。全方配伍体现“气血同治、筋骨并重、标本兼顾”的组方特色，既符合中医“肾主骨、肝主筋”理论，又兼顾骨质疏松症“虚、瘀、痛”的临床特点。临床研究证实，该方能有效提高患者腰椎骨密度，缓解骨痛及腰膝酸软等症状，在骨折愈合延迟及骨质疏松症的治疗中显示出良好的应用前景[13,14]。然而，目前关于特制接骨丸的研究主要集中于临床疗效观察，其药效物质基础及系统的作用机制尚未完全阐明，这在很大程度上制约了其临床应用与现代药学评价的深入发展。

本研究首先通过超高效液相色谱-高分辨质谱（ultra performance liquid chromatography- high resolution mass spectrometry，UPLC-HRMS）分析特制接骨丸的主要活性成分，进而整合网络药理学与分子对接，预测其关键靶点及信号通路，最后通过体外细胞实验进行验证，旨在从系统层面阐释特制接骨丸治疗骨质疏松症的科学内涵，为其临床应用提供实验依据。

1 材料和方法

1.1 实验材料

1.1.1 实验动物

实验选用 16 只 SPF 级雌性 Wistar 大鼠，8 周龄，体质量 220~240 g，购自辽宁长生生物公司[SCXK (辽) 2020-0001]。动物饲养在国家心血管病中心华中分中心实验动物中心[SYXK (豫) 2024-0002]，适应性喂养 7 d，温度 22~26 ℃，相对湿度 50%~60%，12 h/12 h 光/暗循环。本实验由国家心血管病中心华中分中心实验动物管理与使用委员会审核批准（IACUC-202404011），实验过程中遵循 3R 原则。

1.1.2 细胞

成骨前体细胞 MC3T3（武汉梓杉生物技术有限公司，货号：STCC20026P）；破骨前体细胞 RAW264.7（武汉赛维尔生物科技有限公司，货号：CL-0190）。

1.2 主要试剂与仪器

特制接骨丸（河南省洛阳正骨医院制剂室配制并无偿提供，批准文号：豫药制字 Z20120267）；DMEM 高糖培养基、胎牛血清、一步法 10%的 PAGE 彩色制胶试剂盒、RNA 提取试剂、Anti-IL-6 antibody（武汉赛维尔生物科技有限公司，货号：G4524、G8003、G2177-50T、CR2501053、AC241218200）；CCK-8 检测试剂盒（大连美仑生物技术有限公司，货号：MA0218）；茜素红 S 染色液和抗酒石酸酸性磷酸酶（tartrate-resistant acid phosphatase，TRAP）染色试剂盒（北京索莱宝科技有限公司，货号：G1450；G1492）；BCA 蛋白试剂盒（江苏康为世纪生物公司，货号：CW0014S）；Anti-PTEN antibody（成都正能生物技术有限公司，货号：R381415）；Anti-P-AKT antibody、Anti-P-PI3K antibody、Anti-TNF-α antibody、Anti-IL-1β antibody、β-actin antibody（武汉三鹰生物技术有限公司，货号：80455-1-RR；20584-1-AP；17590-1-AP；16806-1-AP；66009-1-IG）；cDNA 合成试剂盒、qPCR 试剂盒（苏州近岸蛋白质科技股份有限公司，货号：E047-0113、E096-01A）。高速冷冻离心机（上海卢湘仪离心机仪器，TGL-20M）；超声波清洗机（深圳福洋科技集团，F-060SD）；漩涡振荡器（上海汗诺仪器有限公司，TYXH-I）；全波长酶标仪（Thermo Fisher Scientific，美国，Multiskan GO）；蛋白垂直电泳仪（Bio-Rad Laboratories, Inc.，美国，164-5050）；CFX96 实时定量荧光 PCR 仪（Bio-Rad Laboratories, Inc.，美国，CFX96 Touch）。实验所用引物序列由上海生工生物工程股份有限公司合成，见表 1。

表1 RT-qPCR目的基因引物序列相关信息

Table 1 Primer sequence information for RT-qPCR target genes

基因名称 Gene name	序列(5’-3’) Sequence (5’-3’)	长度/bp Length /bp
TP53-F	TATCCTTACCATCATCACACT	21
TP53-R	CACAAACACGAACCTCAA	18
PIK3CA-F	TTGATTGTGATTAGTAAGG	19
PIK3CA-R	AAGGTTGATGAAGAGATT	18
PIK3R1-F	TGAGGTATATTAGGCAATCT	20
PIK3R1-R	TGAGGTATATTAGGCAATCT	20
STAT3-F	GTTGGTGTTTCATAATCTCTT	21
STAT3-R	GAAGGTTGTGCTGATAGA	18
SRC-F	AAGCTGAGGCATGAGAAG	18
SRC-R	TGTACTCCGTGACGATGT	18
AKT1-F	TATTGTGAAGGAGGGTTG	18
AKT1-R	ATTCTTGAGGAGGAAGTAG	19
GAPDH-F	GGGAAGAAGTGAATGAAA	18
GAPDH-R	TTAGTGTAAGAGTGTAATCG	20

1.3 实验方法

1.3.1 特制接骨丸的化学成分分析

采用 UPLC-HRMS 分析特制接骨丸的主要成分。样品经 40%甲醇提取，经 16 000 r/min 离心 15 min 后取上清液，4 ℃保存。采用 HSS-T3 色谱柱（100 mm×2.1 mm, 1.8 μm）进行分离，柱温控制在 35 ℃，以 0.1%甲酸水（A）和乙腈（B）为流动相，梯度洗脱。质谱使用 ESI 正负离子模式获取（90~1300 m/z），毛细管温度 320 ℃，加热器温度 370 ℃。最终进行 TCMSP 及自建数据库成分鉴定。

1.3.2 特制接骨丸药物靶点筛选

将质谱鉴定结果与 PubChem (https://www.pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/)，Swiss Target Prediction（http://www.swisstargetprediction.ch/）以及 TCMSP（https://old.tcmsp-e.com/ tcmsp.php）数据库联合，筛选该复方活性成分的潜在可能靶点。

1.3.3 骨质疏松症的靶点与特制接骨丸相关靶点交集

在 GeneCards（https://www.genecards.org/）、OMIM（https://omim.org/）、TTD（http://db.idrblab.net/ttd/）和 PharmGKB（https://www.pharmgkb.org/）数据库中搜索关键词“骨质疏松症”得到疾病相关的靶点。使用 Venny 2.1.0（https://bioinfogp.cnb.csic.es/ tools/venny/），筛选疾病与药物之间的交集靶点，即特制接骨丸治疗骨质疏松症的潜在靶点。

1.3.4 **构建靶蛋白相互作用（protein-protein interaction，PPI）网络及筛选核心靶点**

将交集靶点输入 STRING（https://string-db.org/）数据库中绘制 PPI 网络图，选择物种为“人类”，选择最小相互作用得分是 0.900，以保证较高的置信度；再将交集靶点导入 Cytoscape 3.10.0 软件中，筛选排除不相连接的点后，对各点进行连接度、紧密度和介度分析。利用 CytoNCA 插件，取连接度、紧密度和介度的中位数作为筛选标准，获得影响最大的核心靶点。

1.3.5 GO **与** KEGG **通路富集分析**

基于 bioinformatics.com.cn 平台，本研究对核心靶点进行了 GO 和 KEGG 富集分析，错误发现率 FDR<0.05 为显著条件进行筛选。选取了 GO 分析显著性排名前 10 的条目；KEGG 分析则筛选了排名前 20 的显著通路并进行可视化。

1.3.6 **多维互作网络构建与分析**

通过 Cytoscape 3.10.0 软件构建了“中药-成分-靶点-疾病-通路”多维网络模型，以系统阐释中药复方多成分协同作用的药理学基础。

1.3.7 **分子对接**

在 PubChem（https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/）数据库下载核心成分的 mol2 格式文件。在 PDB 数据库中下载蛋白的 pdb 文件，使用 PyMOL（v2.4.1；https://www.pymol.org/）打开去水，并保存为 pdb 格式。通过 AutoDockTools 1.5.7 软件进行分子对接并进行可视化。

1.3.8 **特制接骨丸含药血清的制备**

大鼠随机分为对照组和特制接骨丸组，每组 8 只，分别给予特制接骨丸（14.58 g/kg 和 0.9%氯化钠溶液（10 mL/kg）灌胃处理 7 d。于末次灌胃给药 1 h 后，腹腔注射 1%戊巴比妥钠（40 mg/kg）麻醉大鼠，再经腹主动脉采血，离心分离上清液，于 56 ℃灭活 30 min，并使用 0.22 μm 滤膜过滤除菌。将血清分为对照组、2.5%低剂量组、5%中剂量组和 10%高剂量组 4 组，保存于-20 ℃。

1.3.9 CCK-8 **法检测细胞** MC3T3 **和** RAW264.7 **的增殖活性**

细胞 MC3T3、RAW264.7 分别于 α-MEM、DMEM 高糖培养基中培养。以每孔 1×10^4 个细胞接种于 96 孔板中，并将细胞随机分为 5 组：空白组（10%胎牛血清高糖培养基）、对照组（正常血清组）、2.5%低剂量组、5%中剂量组和 10%高剂量组。使用酶标仪在 450 nm 波长下测量光密度，分别测定细胞 0 h、24 h、48 h、72 h 的活力。

1.3.10 **茜素红 S 染色**

MC3T3 细胞接种于 6 孔培养板，接种密度为 2×10^5/孔，且每孔加完全培养基 2 mL。待细胞生长融合度至 80%~95%时，吸弃原有培养基，更换为 2 mL 成骨诱导分化完全培养基，每 48~72 h 更换 1 次预热的新鲜诱导培养基，诱导培养 7 d 后，按实验分组加入相应含药血清，继续干预 21 d 后进行茜素红 S 染色。染色前吸弃培养基，PBS 漂洗 2 次，4%多聚甲醛室温固定 30 min，再次 PBS 漂洗 2 次。随后每孔加入 1 mL 茜素红 S 染液，室温避光孵育 30 min，弃去染液后使用 PBS 反复洗涤，直至背景无色，在显微镜下观察并拍照。

1.3.11 TRAP **染色**

RAW264.7 细胞按 2×10^4/mL 的密度接种于 24 孔板，每孔加入 500 μL 培养基，隔夜培养使细胞贴壁。使用 100 ng/mL RANKL 因子以及 25 ng/mL M-CS 因子破骨诱导的完全培养基加入孔板中，2~3 d 换液 1 次，诱导第 3 天按分组开始加入含药血清，每隔 3 d 换液加药，继续培养至第 7 天。吸弃培养基后，以 PBS 缓冲液轻洗 2 次细胞，加入 4%多聚甲醛室温固定 15 min，弃去甲醛再次 PBS 洗 2 次。依据 TRAP 染色试剂盒操作指南配制反应工作液，每孔加入 500 μL，37 ℃避光孵育 30 min。反应完成后弃去染液，PBS 洗涤 2 次，显微镜下观察并拍照。TRAP 阳性细胞（紫红色、含 3 个以上细胞核）记为破骨细胞。

1.3.12 RT-qPCR **分析**

细胞总 RNA 经 TRIzon 溶液提取后，采用两步法实施 cDNA 逆转录及 qPCR 扩增。逆转录反应条件为：50 ℃孵育 15 min、85 ℃灭活逆转录酶 5 s，最后于 4 ℃暂存。qPCR 运行参数设置为：95 ℃预变性 1 min，随后 40 个循环的 95 ℃变性 20 s、60 ℃退火 20 s、72 ℃延伸 30 s。实验数据以 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法

进行相对定量分析。

1.3.13 Western blot 实验

使用 BCA 蛋白试剂盒测定 RAW264.7 细胞的蛋白含量。采用 10%浓度的 PAGE 分离蛋白后，电转移至 0.45 μm 孔径的 PVDF 膜。转膜完成后，以 5%脱脂奶粉于室温条件下封闭 1 h，随后加入一抗于 4 ℃孵育过夜。一抗稀释比例如下：P-AKT（1:5 000）、P-PI3K（1:1 000）、PTEN（1:1 000）、IL-6（1:2 000）、TNF-α（1:2 000）、IL-1β（1:10 000）、β-actin（1:5 000）。次日以 TBST 缓冲液洗涤 3 次，每次 10 min，加入相应二抗（山羊抗兔 IgG 1:5 000，山羊抗小鼠 IgG 1:5 000），室温孵育 1 h。再次 TBST 洗涤 3 次后，采用 ECL 化学发光试剂盒显色。使用 ImageJ 1.54 g 分析蛋白条带强度，目标蛋白的表达水平归一化为 β-actin。

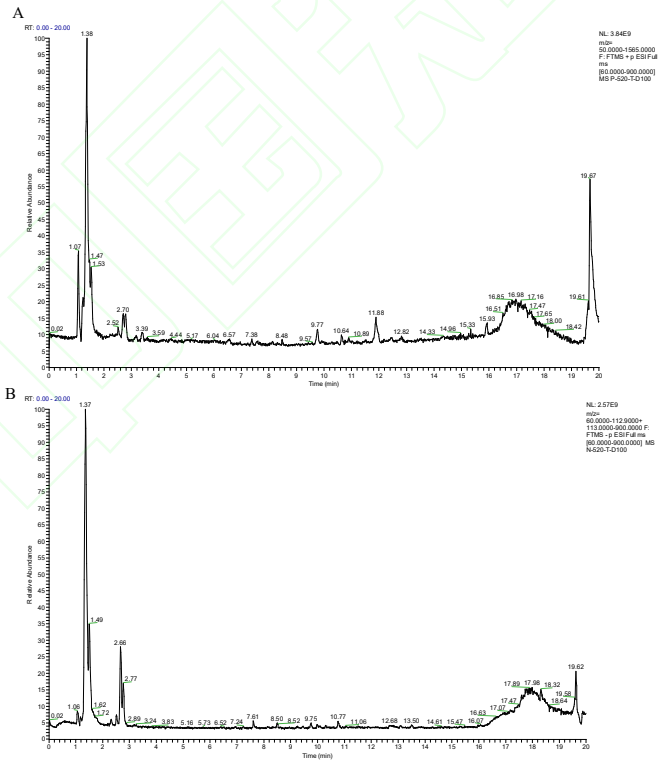
1.4 统计学方法

实验数据使用 GraphPad Prism 10.1.2 软件进行统计学分析，以平均数±标准差（$\bar{x} \pm s$）形式呈现。多组间差异比较采用单因素方差分析（One-way ANOVA），组间两两比较则采用 LSD-*t* 检验（方差齐）或 Games-Howell 检验（方差不齐）。$P<0.05$ 被认为差异具有统计学意义。

2 结果

2.1 特制接骨丸的化学成分分析

采用 UPLC-HRMS 技术对特制接骨丸进行正、负离子模式下全成分分析，在正、负离子模式下对特制接骨丸进行了全面的成分分析，并与相关数据库及文献进行比对分析，鉴定出黄酮类、皂苷类等 147 个化合物（图 1）。



注：A：正离子模式下基峰图；B：负离子模式下基峰图。

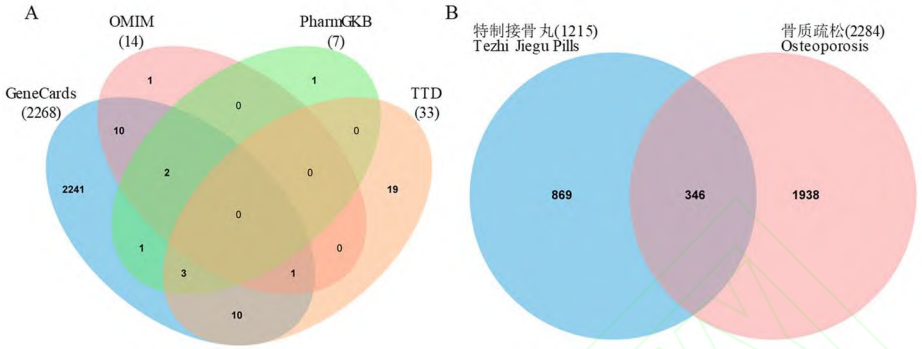
图 1 UPLC-HRMS 分析特制接骨丸的化学成分

Note. A, Base-peak chromatogram in positive-ion mode. B, Base-peak chromatogram in negative-ion mode.

Figure 1 Chemical profiling of Tezhi Jiegu Pills by UPLC-HRMS

2.2 特制接骨丸和疾病的作用靶点

通过合并 GeneCards、OMIM、TTD 和 PharmGKB 等数据库，系统地检索疾病相关靶点，去除冗余后产生 2 284 个骨质疏松症相关靶点（图 2A）。特制接骨丸经质谱鉴定的 147 个化合物在 TCMSP 数据库中进一步筛选，并导入 Swiss Target Prediction 和 PubChem 进行靶点预测，共得到 1 215 个潜在靶点（图 2B）。通过韦恩图分析取交集，共获得 346 个交集靶点。



注：A：骨质疏松症相关靶点；B：特制接骨丸有效活性成分和骨质疏松症相关靶点韦恩图。

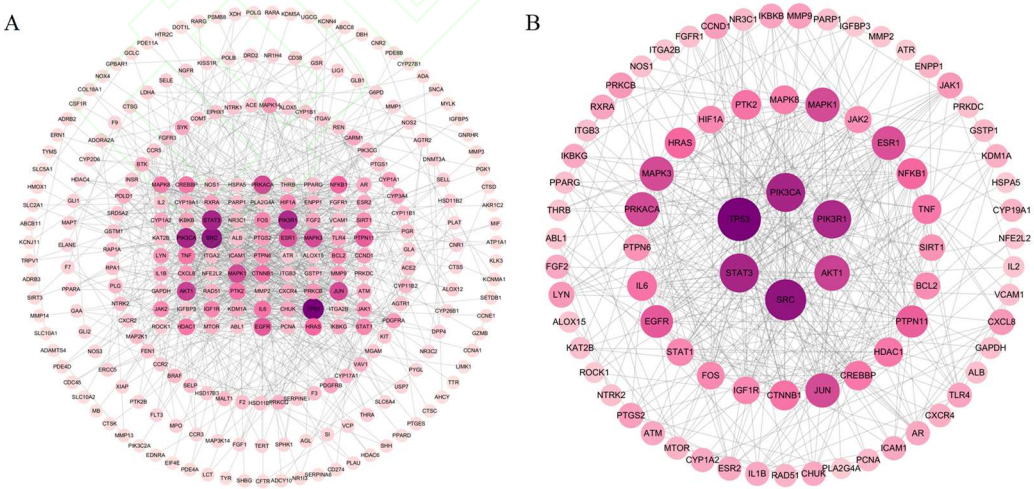
图 2 特制接骨丸活性成分和骨质疏松症相关靶点韦恩图

Note. A, Osteoporosis-related targets. B, Venn diagram of the active compounds of Tezhi Jiegu Pills and osteoporosis-related targets.

Figure 2 Venn diagram showing the overlap between active ingredients of Tezhi Jiegu Pills and osteoporosis-related targets

2.3 核心靶点的 PPI 网络构建

将特制接骨丸抗骨质疏松症的 346 个潜在治疗靶点导入 STRING 平台进行分析，得到靶点的 PPI 互作网络图，导入 Cytoscape 3.10.0 软件，显示包括 266 个节点和 936 条边（图 3A）。通过 CytoNCA 插件计算出（degree centrality，DC）、（betweenness centrality，BC）和紧密度（closeness centrality，CC）的中位数分别为 4、147.126 和 0.265。根据 DC、BC 和 CC 值大于中位数的标准，并按度值排序，本研究确定了 81 个关键靶点（包括 81 个节点和 422 条边，图 3B）。其中排名靠前的蛋白依次为 *TP*53、*PIK*3*CA*、*STAT*3、*SRC*、*AKT*1。



注：A：特制接骨丸抗骨质疏松症相关靶点 PPI 网络图；B：特制接骨丸抗骨质疏松症筛选后的关键靶点。

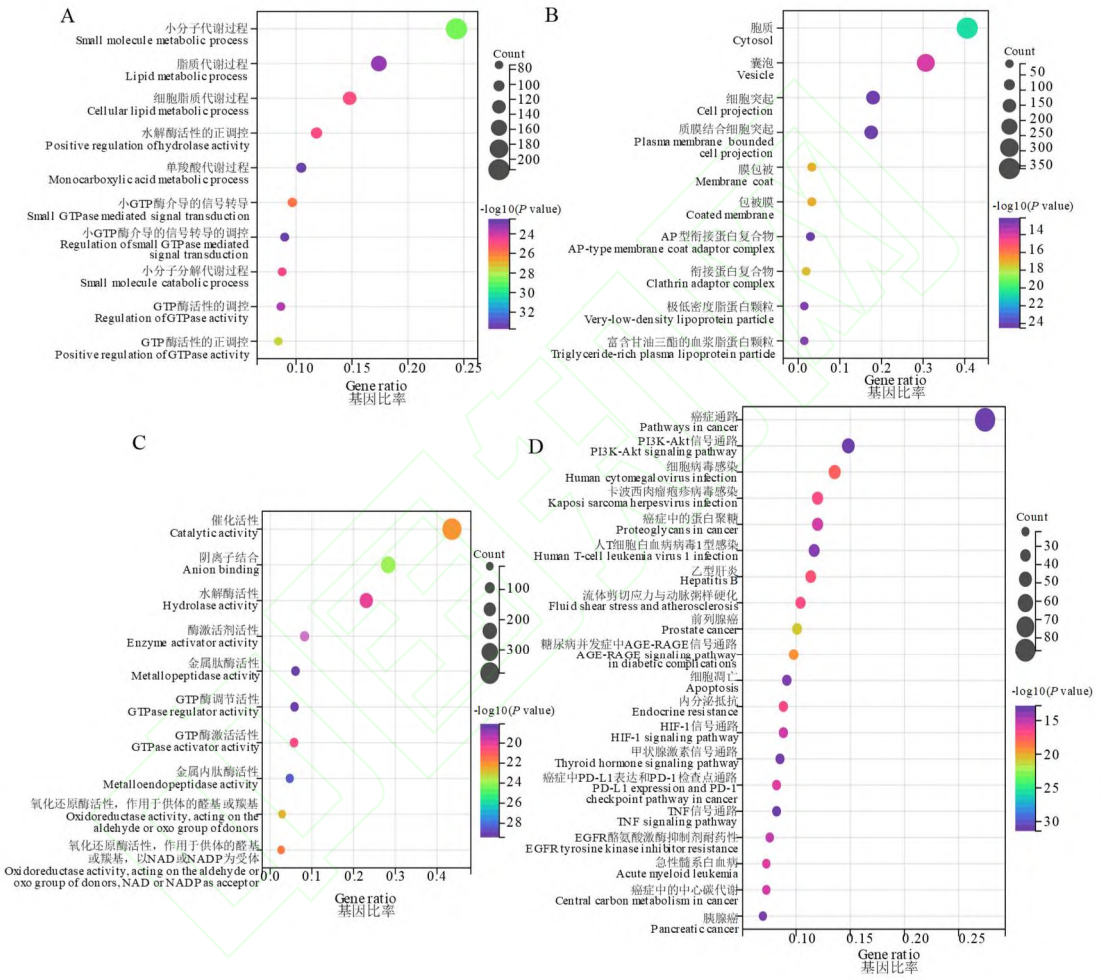
图 3 特制接骨丸抗骨质疏松症相关靶点 PPI 网络图

Note. A, PPI network of anti-osteoporotic targets associated with Tezhi Jiegu Pills. B, Key targets screened for anti-osteoporotic activity of Tezhi Jiegu Pills.

Figure 3 PPI network of targets related to Tezhi Jiegu Pills in the treatment of osteoporosis

2.4 GO 和 KEGG 通路富集分析

将 346 个交集靶点在 David 数据库进行 GO 富集分析。GO 富集分析包含 3 个部分，分别为生物过程（biological process, BP）、细胞组分（cellular component, CC）和分子功能（molecular function, MF）。BP 主要涉及小分子（含脂质与单羧酸）代谢、水解酶活性调控、小 GTPase 信号及其调控等（图 4A）。CC 主要富集在细胞质、囊泡、细胞表面特化结构、脂蛋白颗粒等空间（图 4B）。MF 主要集中在金属依赖的水解酶、醛/酮氧化还原酶等（图 4C）。同样，将 346 个交集靶点在 David 数据库进行 KEGG 富集分析（图 4D）。KEGG 富集显著性较高的通路主要有癌症通路、PI3K-AKT 信号通路、AGE-RAGE 信号通路，这些通路可能是特制接骨丸发挥抗骨质疏松症的关键通路。



注：A：GO 富集 BP 功能模块；B：GO 富集 CC 功能模块；C：GO 富集 MF 模块；D：交集靶点的 KEGG 富集图。纵坐标为通路名称，横坐标为基因参与比例；点越大，基因个数越多。

图 4 特制接骨丸抗骨质疏松症的 GO 和 KEGG 功能富集分析图

Note. A, GO enrichment–BP module. B, GO enrichment–CC module. C, GO enrichment–MF module. D, KEGG enrichment plot for the intersected targets. Y-axis: pathway name; X-axis: ratio of participating genes. Larger dots indicate more genes.

Figure 4 GO and KEGG functional enrichment analyses of Tezhi Jiegu Pills against osteoporosis

2.5 多维互作网络构建与分析

运用 Cytoscape 3.10.0 软件绘制“药物-成分-靶点-疾病-通路”多维互作网络（图 5）。在该网络中，红色方形代表药物，蓝色方形表示疾病，粉色圆形对应特制接骨丸的药物成分，绿色六边形代表特制接骨丸治疗骨质疏松症潜在关键靶点，浅蓝色箭头代表 20 个显著富集的通路。网络分析结果显示，核心成分、潜在靶点与信号通路间的关系十分紧密，这说明特制接骨丸可能通过“多成分-多靶

点-多通路”的作用模式调控骨质疏松症的发病机制。

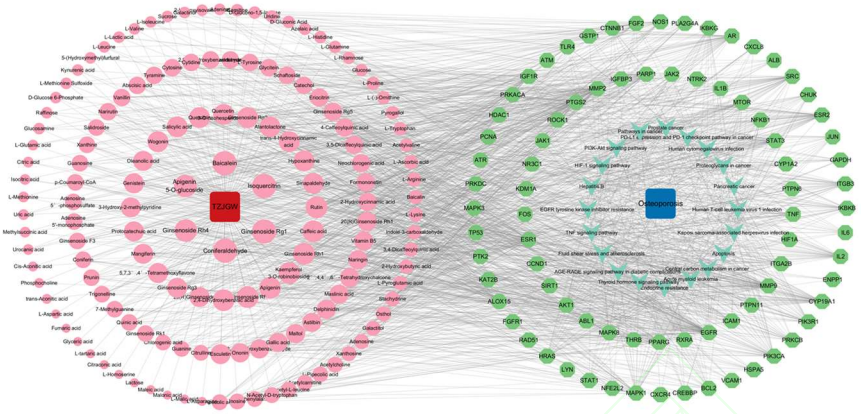
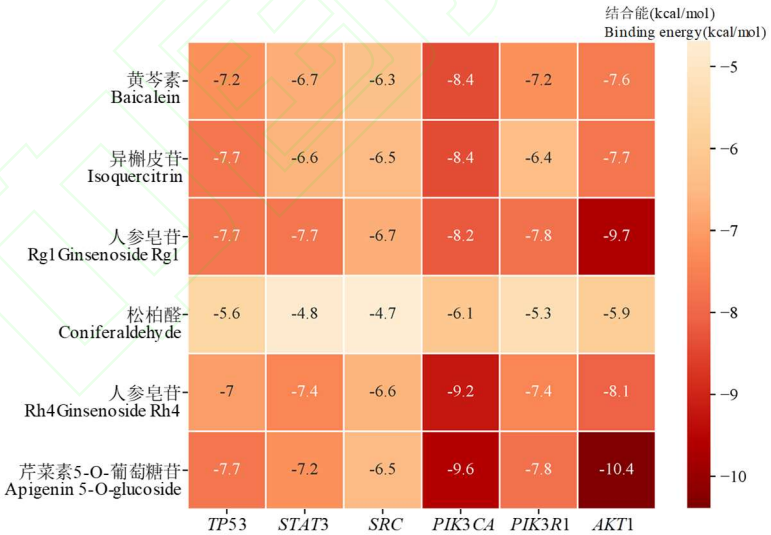


图 5 “药物-成分-靶点-疾病-通路”关联网络图
Figure 5 Association network of drug, component, target, disease, pathway

2.6 分子对接

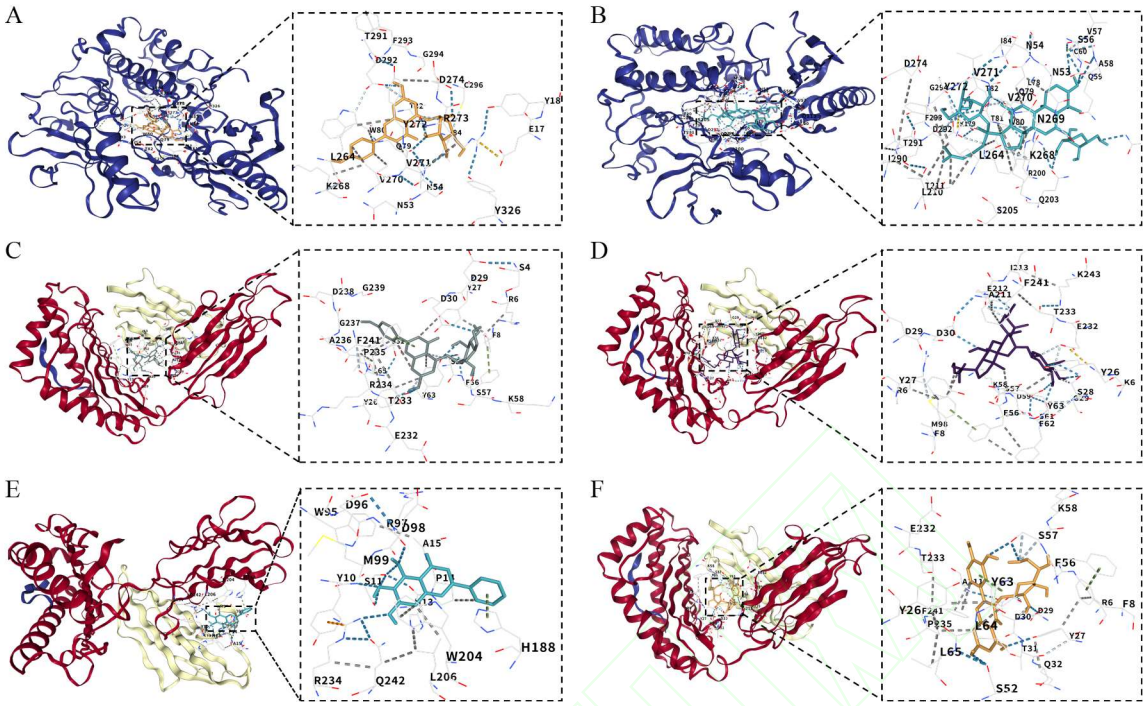
本研究通过分子对接评估配体与靶点蛋白的结合能力，其结合能是筛选潜在化合物的关键指标。结合能低于–5.0 kcal/mol 表明结合良好；若低于–7.0 kcal/mol，则认为具有强结合活性[15]。分子对接结果以结合能热图形式展示（图 6），并将核心靶点最优结合能构象进行可视化（图 7）。结果显示特制接骨丸核心成分与核心靶点 *TP*53、*PIK*3*CA*、*STAT*3、*SRC*、*AKT*1 和 *PIK*3*R*1 均能结合，其中 *AKT*1 与芹菜素-5-O-葡萄糖苷的结合能最低，为-10.4 kcal/mol，松柏醛与核心靶点的结合能较差。这进一步表明 *AKT*1 可能在特制接骨丸治疗骨质疏松症的过程中发挥重要作用。



注：热图单元格颜色越深，说明结合能越低。

图 6 特制接骨丸关键成分与骨质疏松症核心靶点的分子对接热图
Note. The darker the color of the heat-map cell, the lower (more favorable) the binding energy.

Figure 6 Heat-map of the molecular-docking results between the key components of Tezhi Jiegu Pills and the core osteoporotic targets



注：A：AKT1 与芹菜素-5-O-葡萄糖苷的对接构象（结合能为-10.4 kcal/mol）；B：AKT1 与人参皂苷 Rg1 的对接构象（结合能为-9.7 kcal/mol）；C：PIK3CA 与芹菜素-5-O-葡萄糖苷的对接构象（结合能为-9.6 kcal/mol）；D：PIK3CA 与人参皂苷 Rh4 的对接构象（结合能为-9.2 kcal/mol）；E：PIK3CA 与黄芩素的对接构象（结合能为-8.4 kcal/mol）；F：PIK3CA 与异槲皮苷的对接构象（结合能为-8.4 kcal/mol）。

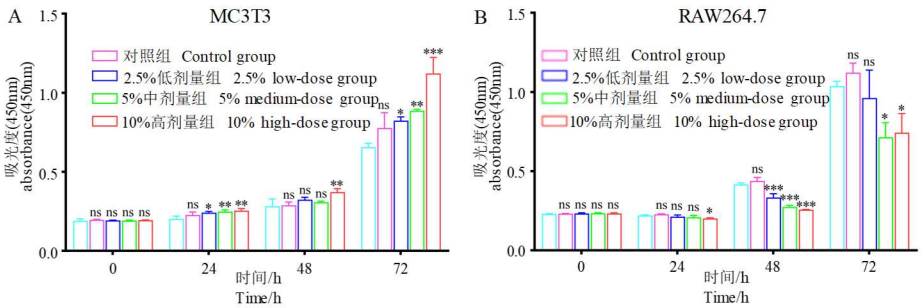
图 7 特制接骨丸关键成分与骨质疏松症核心靶点分子对接的最优构象

Note. A, Docking conformation of AKT1 with apigenin-5-O-glucoside (binding energy: -10.4 kcal/mol). B, Docking conformation of AKT1 with ginsenoside Rg1 (binding energy: -9.7 kcal/mol). C, Docking conformation of PIK3CA with apigenin-5-O-glucoside (binding energy: -9.6 kcal/mol). D, Docking conformation of PIK3CA with ginsenoside Rh4 (binding energy: -9.2 kcal/mol). E, Docking conformation of PIK3CA with baicalein (binding energy: -8.4 kcal/mol). F, Docking conformation of PIK3CA with isoquercitrin (binding energy: -8.4 kcal/mol).

Figure 7 Optimal docking poses of the key components in Tezhi Jiegu Pills with the core osteoporotic targets

2.7 特制接骨丸含药血清对细胞的增殖作用

采用 CCK-8 法检测细胞增殖活性，以评估不同浓度特制接骨丸含药血清对 MC3T3 和 RAW264.7 细胞在 0 h、24 h、48 h、72 h 的影响。结果显示，与对照组相比，特制接骨丸在 24 h、48 h、72 h 时均能促进 MC3T3 细胞的增殖，且该效应在 10%高剂量组更为显著（$P<0.01$，$P<0.001$），表明其具有促进成骨细胞增殖的作用（图 8A）。而在 RAW264.7 细胞中，10%高剂量组在 24 h、48 h、72 h 均显著抑制（$P<0.05$；$P<0.001$），5%中剂量组在 48 h 和 72 h 时显著抑制（$P<0.05$；$P<0.001$），而 2.5%低剂量组仅在 48 h 时受到抑制（$P<0.001$，图 8B）。



注：A：MC3T3 细胞在 0 h、24 h、48 h、72 h 时间间隔内的细胞增殖情况；B：RAW264.7 细胞在 0 h、24 h、48 h、72 h 时间间隔内的细胞增殖情况。与对照组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

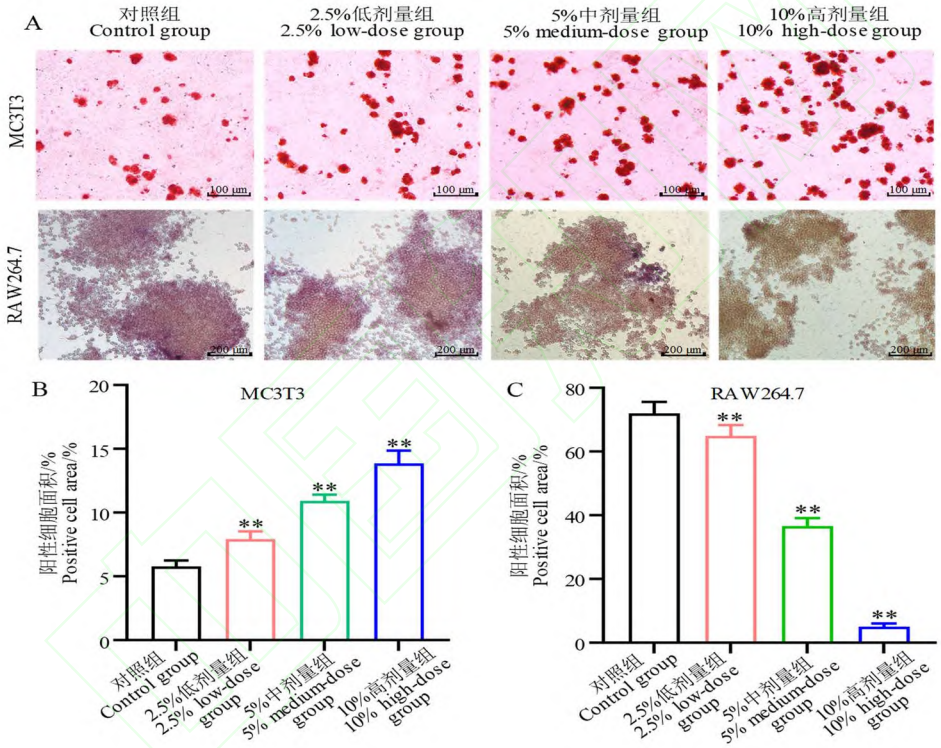
图 8 CCK-8 法检测不同时间段内细胞增殖情况

Note. A, Proliferation of MC3T3 cells at 0 h, 24 h, 48 h, and 72 h. B, Proliferation of RAW264.7 cells at 0 h, 24 h, 48 h, and 72 h. Compared with the control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

Figure 8 Cell proliferation at different time points assessed by CCK-8 assay

2.8 特制接骨丸含药血清对细胞作用的表型验证

为了进一步验证特制接骨丸对细胞影响的作用，本研究诱导 MC3T3 和 RAW264.7 细胞，并进行茜素红 S 染色和 TRAP 染色。MC3T3 细胞茜素红染色结果显示，对照组仅见散在的淡红色钙盐沉积点，而特制接骨丸含药血清各剂量组均可见明显的红色矿化结节，结节数量增多、体积增大，且呈剂量依赖性增加趋势，以 10%高剂量组效果最为显著（$P<0.01$，图 9）。RAW264.7 细胞 TRAP 染色显示，RANKL 诱导的对照组可见大量紫红色阳性多核细胞，特制接骨丸含药血清干预组 TRAP 阳性细胞数随剂量增加逐渐减少，染色强度减弱。10%高剂量组仅见散在的淡染小细胞，破骨细胞分化受到显著抑制（$P<0.01$）。因此，特制接骨丸含药血清对骨代谢具有双向调节作用，既能促进成骨细胞分化，又能抑制破骨细胞形成。



注：A：不同剂量药物对 MC3T3、RAW264.7 细胞作用的表型验证（10×）；B：MC3T3 阳性细胞面积占比的定量统计；C：RAW264.7 阳性细胞面积占比的定量统计。与对照组相比，$^{**}P<0.01$。

图 9 不同剂量的特制接骨丸含药血清对细胞作用的表型验证

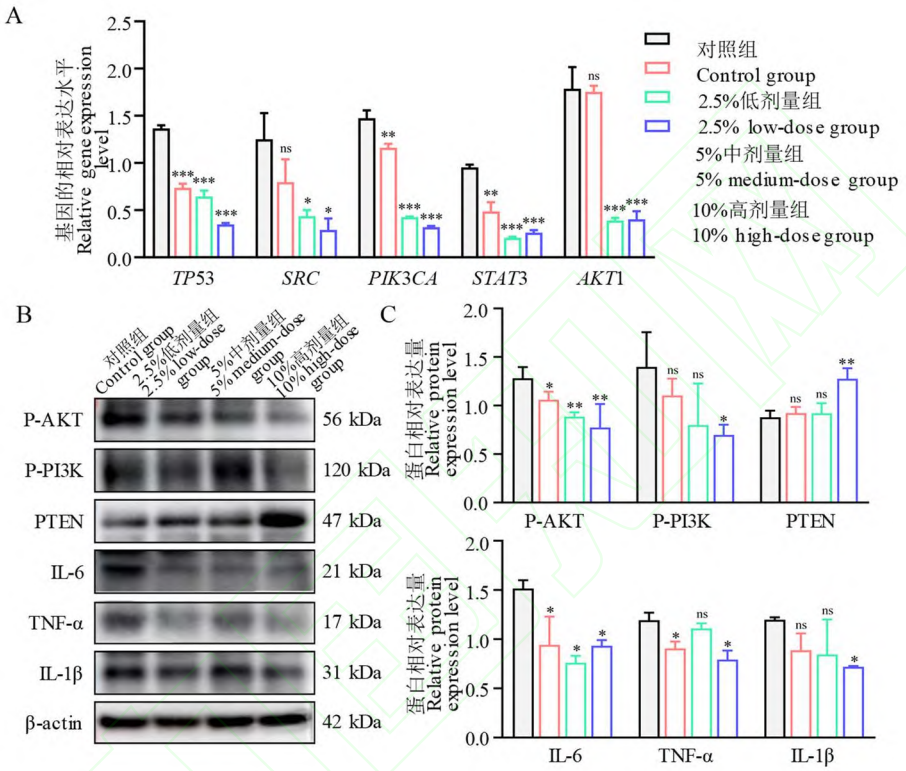
Note. A, Phenotypic validation of the effects of different drug doses on MC3T3 cells (10×). B, Quantitative statistics of the percentage of MC3T3 positive cell area. C, Phenotypic validation of the effects of different drug doses on RAW264.7 cells. D, Quantitative statistics of the percentage of RAW264.7 positive cell area. Compared with the control group, $^{**}P<0.01$.

Figure 9 Phenotypic validation of the effects of different doses of Tezhi Jiegu Pills drug-containing serum on cells

2.9 RT-qPCR 检测与 Western blot 实验

为评估 *TP*53、*PIK*3*CA*、*PIK*3*R*1、*STAT*3、*SRC* 和 *AKT*1 等目标基因在 RAW264.7 破骨细胞中的表达水平，本研究采用了 RT-qPCR 技术。结果显示，与对照组相比，*TP*53、*PIK*3*CA*、*STAT*3、*SRC* 和 *AKT*1 在含药血清处理组中的相对表达水平均显著下降，且 10%高剂量组中表达降低更为显著（$P<0.05$，$P<0.001$），而 *PIK*3*R*1 在所有样本中均未检出（Ct>40，图 10A）。因此，特制接骨丸能够

显著下调 RAW264.7 细胞中 *TP*53、*PIK*3*CA*、*STAT*3、*SRC* 和 *AKT*1 等多个关键基因的表达，并呈现剂量依赖性，提示其可能通过抑制这些基因的转录，调控破骨细胞活性，进而影响骨质疏松进程。同时，基于 PI3K/AKT 通路在特制接骨丸抗骨质疏松效应中的核心地位，本研究进一步利用 Western blot 技术对该通路关键节点蛋白的表达进行了验证（图 10B）。结果显示，10%高剂量组中 P-AKT、P-PI3K、IL-6、TNF-α 和 IL-1β 的表达水平较对照组均显著降低（$P<0.05$，$P<0.01$），而 PTEN 的表达则显著升高（$P<0.01$，图 10C）。特制接骨丸可能通过抑制 PI3K/AKT 通路的磷酸化过程与下调炎症因子表达，并同时促进负调控因子 PTEN 的表达，从而发挥改善骨质疏松的作用，进一步印证了 PI3K/AKT 通路在该药物机制中的关键地位。



注：A：目标基因（*TP*53、*PIK*3*CA*、*STAT*3、*SRC*、*AKT*1）的相对表达水平；B：Western blot 检测 P-AKT、P-PI3K、PTEN、IL-6、TNF-α、IL-1β 的蛋白表达水平；C：P-AKT、P-PI3K、PTEN、IL-6、TNF-α、IL-1β 蛋白表达的定量统计。与对照组相比，$^{*}P<0.05$，$^{**}P<0.01$，$^{***}P<0.001$。

图 10 不同剂量的特制接骨丸对 RAW264.7 细胞中 PI3K/AKT 信号通路及相关靶基因的影响

Note. A, qPCR analysis of the relative expression levels of target genes (*TP*53, *PIK*3*CA*, *STAT*3, *SRC*, and *AKT*1). B, Western blot analysis of the protein expression levels of P-AKT, P-PI3K, PTEN, IL-6, TNF-α, and IL-1β. C, Quantitative analysis of the protein expression of P-AKT, P-PI3K, PTEN, IL-6, TNF-α, and IL-1β. Compared with the control group, $^{*}P<0.05$, $^{**}P<0.01$, $^{***}P<0.001$.

Figure 10 Effects of different doses of Tezhi Jiegu Pills on the PI3K/AKT signaling pathway and related target genes in RAW264.7 cells

3 讨论

骨质疏松症作为一种与年龄密切相关的骨骼系统疾病，在全球老龄化加速的背景下，其防治已成为重大公共卫生问题。流行病学调查表明，我国 50 岁以上人群骨质疏松患病率达 19.2%，65 岁以上女性患病率甚至超过 32%，所造成的骨折风险严重影响着中老年人群的生活质量[16,17]。中医药在“肾主骨生髓”理论指导下，凭借多靶点、整体调节的特点，在骨质疏松的长期管理与症状缓解方面展现出独特优势[18]。本研究以临床经验方“特制接骨丸”为对象，整合 UPLC-HRMS 成分分析、网络药理学、分子对接及细胞实验，系统揭示了该复方通过调控 PI3K/AKT 信号通路与炎症因子网络，协同调节骨代谢的作用机制，为其临床合理应用提供了实验依据。

本研究利用 UPLC-HRMS 从特制接骨丸中鉴定出了 147 种化学成分，包括黄酮类、苯丙素类、皂苷类、萜类等，说明该方剂中有复杂多样的化学成分。网络药理学分析获得了 346 个药物-疾病的交集靶点，从中进一步鉴定出黄芩素、异槲皮苷、人参皂苷 Rg1、松柏醛、芹菜素-5-O-葡萄糖苷、人参皂苷 Rh4 等 6 种核心成分，已有研究证实这 6 种成分均具有调控骨代谢的相关生物活性。黄芩素是黄芩的主要黄酮类成分，通过抑制 RANKL 诱导的 NF-κB、MAPK 信号通路可显著抑制破骨细胞分化和骨吸收[19]；黄芩素还能抑制 Wnt/β-catenin 通路促进成骨细胞分化。异槲皮苷则通过调节 OPG/RANKL 比值发挥骨保护作用[20]。人参皂苷 Rg1 和 Rh4 作为红参的特征性成分，可通过雌激素受体信号通路促进成骨细胞增殖与分化，并抑制破骨细胞形成[21]。松柏醛是黄芪中的苯丙素类成分，具有抗氧化和抗炎活性。芹菜素-5-O-葡萄糖苷具有抗炎和抗氧化作用，可能通过抑制 NF-κB 通路减轻骨丢失[22]。这些核心成分的协同作用，构成了特制接骨丸“多成分-多靶点”治疗骨质疏松症的物质基础。

KEGG 通路富集分析显示，PI3K/AKT 信号通路是特制接骨丸调控骨质疏松症的关键通路之一。PI3K/AKT 信号通路在骨代谢调控中具有双重作用，既可以通过激活下游 mTOR、GSK-3β 等效应分子，促进成骨细胞的增殖、分化和存活[23]，同时也是 RANKL 诱导破骨细胞分化的重要信号节点，活化后的 AKT 可激活 NF-κB 和 NFATc1，进而上调破骨细胞特异性基因（如 TRAP、Cathepsin K、MMP-9）的表达[24,25]。本研究结果显示，特制接骨丸含药血清可显著抑制 RAW264.7 细胞中 P-PI3K 和 P-AKT 的蛋白表达水平，同时上调 PI3K/AKT 通路的负调控因子 PTEN。PTEN 是一种脂质磷酸酶，它通过将 PIP3 去磷酸化生成 PIP2，进而拮抗 PI3K/AKT 信号的转导[26]。既往研究表明，PTEN 在破骨细胞中表达下调与骨质疏松的发生发展密切相关，而 PTEN 过表达可抑制 RANKL 诱导的破骨细胞分化与骨吸收功能[27]。本研究首次在特制接骨丸抗骨质疏松机制中证实了 PTEN 的上调作用，提示该复方可能通过解除 PTEN 的抑制状态来负向调控 PI3K/AKT 信号通路。分子对接结果进一步支持了上述发现。AKT1 与芹菜素-5-O-葡萄糖苷的结合能达-10.4 kcal/mol，PIK3CA 与多个核心成分的结合能均低于-8.0 kcal/mol，表明这些成分与靶点蛋白之间具有强结合能力，结合能越低，配体与受体结合越稳定，形成活性构象的可能性越大。AKT1 作为 PI3K/AKT 通路的核心效应分子，与多种核心成分均存在优异的结合能力[28]，这进一步印证了 AKT1 在特制接骨丸抗骨质疏松作用中的枢纽地位。

近年来，“骨免疫学”研究表明慢性低度的炎症状态是造成骨质疏松症发病的重要原因之一。如 IL-6、TNF-α、IL-1β 等炎症因子本身能够直接诱导破骨细胞活性表达，甚至可诱导成骨细胞上 RANKL 表达，从而促使破骨细胞的生成[29]。流行病学观察发现，骨质疏松症患者血清中炎症因子 IL-6、TNF-α 等含量明显高于正常人群，且和骨密度呈负相关[30]，因而抑制炎症应答是骨质疏松的一种重要防治措施。本研究 Western blot 结果表明，特制接骨丸含药血清能够剂量依赖性地抑制 RAW264.7 细胞内 IL-6、TNF-α、IL-1β 的蛋白表达，这与特制接骨丸组方特点相符。该复方中红参、黄芪、鹿茸等补益药有免疫调节作用，能抑制 NF-κB 核因子移位和 MAPK 磷酸化，抑制炎症因子的释放；三七、地龙等活血化瘀药则改善骨组织微循环，抑制炎症反应[31]。在中医理论中，骨质疏松症多偏于“肾虚血瘀”，“虚”与“瘀”互为因果，共同促成病变发展[32]。特制接骨丸重在“气血同治、筋骨并重”，既能补益肝肾治病本，又能活血通络治标，这与现代医学上的“调节骨代谢、抑制炎症反应”共同防治骨质疏松的治疗理念是一致的。

本研究体外实验表明，特制接骨丸含药血清对骨代谢的调节呈双向性。CCK-8 试验结果显示，该方含药血清有显著促进成骨前体细胞 MC3T3 增殖的作用，且高剂型含药血清对破骨前体细胞 RAW264.7 的存活有抑制作用。含药血清能显著增加成骨诱导后矿化结节的个数及面积，呈现剂量依赖性增加的趋势，TRAP 染色显示含药血清可以抑制 RANKL 诱导后的 TRAP 阳性多核破骨细胞数目的降低。这些结果表明，特制接骨丸可通过诱导成骨细胞分化并阻遏破骨细胞形成，进而重建骨代谢稳态，最终产生骨保护效应。RT-qPCR 实验结果显示，特制接骨丸可剂量依赖性地下调破骨细胞中 *TP*53、*PIK*3*CA*、*STAT*3、*SRC* 和 *AKT*1 等基因的表达。其中，*STAT*3 是 RANKL 诱导破骨细胞分化的关键转录因子，可通过上调 NFATc1 和 c-Fos 促进破骨细胞生成[33]；*SRC* 是非受体型酪氨酸激酶，在

破骨细胞黏附、极化和骨吸收功能中发挥核心作用[34]；*TP*53 则通过调控细胞周期和凋亡影响破骨细胞寿命[35]。这些基因表达的下调从转录水平上解释了特制接骨丸抑制破骨细胞分化的分子机制。

本研究仍存在一定的局限性。首先，尽管网络药理学预测与分子对接结果提示 PI3K/AKT 通路可能在其中发挥关键作用，但尚未通过通路抑制剂或激动剂进行逆向药理学验证，未来可结合体外与体内干预实验，进一步明确该通路发挥的作用。其次，当前研究主要基于细胞实验，其结果虽能在分子层面揭示潜在机制，但尚不能完全反映机体整体生理病理环境下的复杂调控网络。因此，后续研究有必要构建骨质疏松动物模型（如去卵巢大鼠），系统评价特制接骨丸对骨密度、骨微结构及 PI3K/AKT 通路关键指标的影响，从而为临床疗效提供更充分的实验依据。

综上所述，本研究提示特制接骨丸可能通过黄芩素、人参皂苷 Rg1 等多种活性成分，协同作用于 *TP*53、*AKT*1 等关键靶点，调控 PI3K/AKT 信号通路，抑制炎症反应并促进 PTEN 表达，从而调节骨代谢平衡，发挥抗骨质疏松作用。这一发现不仅为特制接骨丸的临床应用提供了药理学依据，也体现了中药复方在多靶点、整体调节方面的独特优势，为中药治疗骨质疏松的系统研究提供新思路。

参考文献：

[1] Arceo-Mendoza R M, Camacho P M. Postmenopausal osteoporosis: latest guidelines [J]. Endocrinol Metab Clin North Am, 2021, 50(2): 167-178.

[2] Zhang L, Zheng Y L, Wang R, et al. Exercise for osteoporosis: a literature review of pathology and mechanism [J]. Front Immunol, 2022, 13: 1005665.

[3] Shen Y, Huang X, Wu J, et al. The global burden of osteoporosis, low bone mass, and its related fracture in 204 countries and territories, 1990-2019 [J]. Front Endocrinol, 2022, 13: 882241.

[4] Liang B, Burley G, Lin S, et al. Osteoporosis pathogenesis and treatment: existing and emerging avenues [J]. Cell Mol Biol Lett, 2022, 27(1): 72.

[5] Albogami M M, Jawad A S, Mageed R A. Bone loss in osteoporosis and arthritis. Pathogenesis and therapeutic strategies [J]. Saudi Med J, 2014, 35(3): 224-233.

[6] 程霜， 尹恒， 胡卓仪， 等． 瘦素抵抗与骨质疏松： 代谢失衡中的骨健康调控机制 [J]． 中国骨质疏松杂志， 2025， 31（7）： 1037-1042．
Cheng S, Yin H, Hu Z Y, et al. Leptin resistance and osteoporosis: mechanisms for regulating bone health in metabolic imbalances [J]. Chin J Osteoporos, 2025, 31(7): 1037-1042.

[7] Skjødt M K, Frost M, Abrahamsen B. Side effects of drugs for osteoporosis and metastatic bone disease [J]. Brit J Clinical Pharma, 2019, 85(6): 1063-1071.

[8] Adami G, Saag K G. Expert perspective: how, when, and why to potentially stop antiresorptive drugs in osteoporosis [J]. Arthritis Rheumatol, 2025, 77(10): 1294-1304.

[9] 杨荣禄， 程斌， 刘拥军， 等． “肾主骨生髓”理论下还少丹治疗原发性骨质疏松症与轻度认知损害共病的作用机制 [J]． 中医药临床杂志， 2025， 37（10）： 2062-2070．
Yang R L, Cheng B, Liu Y J, et al. Mechanisms of action for treating primary osteoporosis and mild cognitive impairment co-morbidities by Huanshaodan based on the theory of“the kidney governs bone and Pr oduces marrow”: a network pharmacology and molecular interfacing approach [J]. Clin J Tradit Chin Med, 2025, 37(10): 2062-2070.

[10] 张润云， 倪青， 张新菊， 等． 骨质疏松症中医药防治研究浅析 [J]． 中国临床保健杂志， 2022， 25（1）： 34-36．
Zhang R Y, Ni Q, Zhang X J, et al. Study on the prevention and treatment of osteoporosis with traditional Chinese medicine [J]. Chin J Clin Healthc, 2022, 25(1): 34-36.

[11] 杜贵强， 刘又文， 李建明． 特制接骨丸治疗骨折延迟愈合临床研究 [J]． 中国卫生产业， 2013， 10（7）： 171-171， 173．
Du G Q, Liu Y W, Li J M. Clinical study on the treatment of delayed fracture union with Special Jiegu Pills [J]. China Heal Ind, 2013, 10(7): 171-171, 173.

[12] 莫湘涛， 朱俊博， 董正． 特制接骨丸对骨质疏松性股骨转子间骨折的影响 [J]． 深圳中西医结合杂志， 2020， 30（5）： 47-49．
Mo X T, Zhu J B, Dong Z. Effects of Special Jiegu Pills on osteoporotic intertrochanteric fractures [J]. Shenzhen J Integr Tradit Chin West Med, 2020, 30(5): 47-49.

[13] 李培峰， 张颖， 范亚楠， 等． 特制接骨丸治疗股骨颈Ⅰ、Ⅱ型骨折的疗效及对髋关节功能、骨密度、骨痂生长、炎症因子水平的影响 [J]． 中医研究， 2023， 36（3）： 28-34．
Li P F, Zhang Y, Fan Y N, et al. Efficacy of Special Jiegu Pills in the treatment of type Ⅰ and Ⅱ femoral neck fractures and its effects on hip joint function, bone mineral density, callus growth and levels of inflammatory factors [J]. Tradit Chin Med Res, 2023, 36(3): 28-34.

[14] 张来福， 郭绍勇， 卢承印， 等． 特制接骨丸对 Masquelet 技术中诱导膜成骨因子表达的影响 [J]． 亚太传统医药， 2021， 17（2）： 10-13．
Zhang L F, Guo S Y, Lu C Y, et al. Effect of special-made jiegu pills on the expression of induced membranous osteogenic factors in masquelet technology [J]. Asia Pac Tradit Med, 2021, 17(2): 10-13.

[15] 苏安宇， 黄伟斌， 莫静媛， 等． 基于系统药理学结合 LC-MS/MS 技术探讨温性经筋通贴膏治疗类风湿性关节炎的药效物质基础与作用特点 [J]． 中药新药与临床药理， 2024， 35（5）： 706-718．
Su A Y, Huang W B, Mo J Y, et al. Exploration of the pharmacological substance basis and action characteristics of Wenxing Jingjintong Gel Patch in the treatment of rheumatoid arthritis based on system pharmacology and LC-MS/MS technology [J]. Tradit Chin Drug Res Clin Pharmacol, 2024, 35(5): 706-718.

[16] 李宁， 李新萍， 杨明辉， 等． 老年髋部骨折的骨质疏松症诊疗专家共识 [J]． 中华骨与关节外科杂志， 2021， 14（8）：

657-663.
Li N, Li X P, Yang M H, et al. Expert consensus on diagnosis and management of osteoporosis in geriatric hip fractures [J]. Chin J Bone Jt Surg, 2021, 14(8): 657-663.
[17] 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.
Chinese Society of Osteoporosis and Bone Mineral Research, Chinese Medical Association. Epidemiological investigation of osteoporosis in China and the release of the results of the special action of “healthy bones” [J]. Chin J Osteoporos Bone Miner Res, 2019, 12(4): 317-318.
[18] 李勇进, 章晓云, 曾浩. 骨质疏松症病证结合动物模型的研究进展 [J]. 中国实验动物学报, 2024, 32（6）: 772-785.
Li Y J, Zhang X Y, Zeng H. Progress in the establishment and evaluation of osteoporosis disease and syndrome combination animal models [J]. Acta Lab Anim Sci Sin, 2024, 32(6): 772-785.
[19] Zhao Z, He X, Han W, et al. Genus *Tetradium* L.: a comprehensive review on traditional uses, phytochemistry, and pharmacological activities [J]. J Ethnopharmacol, 2019, 231: 337-354.
[20] Tian X, Jiang H, Chen Y, et al. Baicalein accelerates tendon-bone healing *via* activation of Wnt/*β*-catenin signaling pathway in rats [J]. Biomed Res Int, 2018, 2018: 3849760.
[21] 李仰池, 王子正, 杨锋. 人参皂苷 Rg 家族抗骨质疏松症机制研究进展 [J]. 中国医药导报, 2025, 22（20）: 148-153.
Li Y C, Wang Z Z, Yang F. Research progress on the mechanism of ginsenoside Rg family in anti-osteoporosis [J]. China Med Her, 2025, 22(20): 148-153.
[22] Park J M, Park J E, Park J S, et al. Anti-inflammatory and antioxidant mechanisms of coniferaldehyde in lipopolysaccharide-induced neuroinflammation: Involvement of AMPK/Nrf2 and TAK1/MAPK/NF-κB signaling pathways [J]. Eur J Pharmacol, 2024, 979: 176850.
[23] Liu C, Zhang J, Ye Z, et al. Research on the role and mechanism of the PI3K/Akt/mTOR signalling pathway in osteoporosis [J]. Front Endocrinol, 2025, 16: 1541714.
[24] Wang W, Wang B. Isofraxidin inhibits receptor activator of nuclear factor-κB ligand-induced osteoclastogenesis in bone marrow-derived macrophages isolated from sprague-dawley rats by regulating NF-κB/NFATc1 and Akt/NFATc1 signaling pathways [J]. Cell Transplant, 2021, 30: 963689721990321.
[25] 谢淑敏, 金丽, 符金凤, 等. PTHrP 促进 RANKL 诱导巨噬细胞分化为破骨细胞参与中耳胆脂瘤骨破坏 [J]. 中南大学学报（医学版）, 2024, 49（5）: 655-666.
Xie S M, Jin L, Fu J F, et al. PTHrP participates in the bone destruction of middle ear cholesteatoma *via* promoting macrophage differentiation into osteoclasts induced by RANKL [J]. J Cent South Univ Med Sci, 2024, 49(5): 655-666.
[26] Nguyen Huu T, Duong Thanh H, Kim M K, et al. 1, 1-Diethoxyethane increases insulin sensitivity and ameliorates obesity and dyslipidemia in mice fed high-fat diet [J]. NPJ Metab Health Dis, 2026, 4(1): 2.
[27] Long G, Liu F, Cheng H, et al. miR-374-5p inhibits osteogenesis by targeting PTEN/PI3K/AKT signaling pathway [J]. J Orthop Surg Res, 2025, 20(1): 283.
[28] Kawamura N, Kugimiya F, Oshima Y, et al. Akt1 in osteoblasts and osteoclasts controls bone remodeling [J]. PLoS One, 2007, 2(10): e1058.
[29] Liu T, Hou X, Luo Y, et al. To explore the association between the neutrophil percentage to albumin ratio and low bone mineral density/osteoporosis based on NHANES 2011-2018 [J]. Sci Rep, 2025, 15(1): 29544.
[30] Liu B, Chang H, Li P, et al. The critical role of inflammation in osteoporosis prediction unveiled by a machine learning framework integrating multi-source data [J]. Front Physiol, 2025, 16: 1729997.
[31] Li J Y, Yi C, Zhu M Q, et al. Immunomodulatory actions of tonifying polysaccharides: pharmacological effects, mechanisms and therapeutic applications [J]. Front Immunol, 2025, 16: 1640679.
[32] 赵雪琛, 孙羽亭, 谢凡, 等. 补肾类方药治疗绝经后骨质疏松的药理机制研究进展 [J]. 药学前沿, 2026, 30（1）: 150-161.
Zhao X C, Sun Y T, Xie F, et al. Research progress on the pharmacological mechanism of kidney-tonifying formulas in the treatment of postmenopausal osteoporosis [J]. Front Pharm Sci, 2026, 30(1): 150-161.
[33] Yang Y, Chung M R, Zhou S, et al. STAT3 controls osteoclast differentiation and bone homeostasis by regulating NFATc1 transcription [J]. J Biol Chem, 2019, 294(42): 15395-15407.
[34] Matsubara T, Yasuda K, Mizuta K, et al. Tyrosine kinase src is a regulatory factor of bone homeostasis [J]. Int J Mol Sci, 2022, 23(10): 5508.
[35] Usategui-Martín R, Galindo-Cabello N, Pastor-Idoate S, et al. A missense variant in *TP53* could be a genetic biomarker associated with bone tissue alterations [J]. Int J Mol Sci, 2024, 25(3): 1395.