

· 基础研究 ·

山柰酚对去势大鼠影响的 4D-DIA 蛋白质与代谢组学分析[△]

梁周^{1,2}, 张驰¹, 潘成镇², 杨博², 蒲张林¹, 刘桦¹, 彭金辉², 文立春², 凌观汉², 陈锋^{1*}

(1. 广西中医药大学, 广西南宁 530000; 2. 玉林市中西医结合骨科医院, 广西玉林 537599)

摘要: [目的] 通过蛋白和代谢组学研究去势大鼠山柰酚抗骨质疏松的作用机制。[方法] 18 只雌性 SD 大鼠随机分为 3 组, 每组 6 只。通过卵巢切除方法建立大鼠骨质疏松模型, 山柰酚组按 40 mg/kg 标准给予山柰酚灌胃, 模型组和假手术组给予蒸馏水灌胃, 连续干预 12 周后, 取大鼠股骨标本进行四维数据独立采集 (four-dimensional data-independent acquisition, 4D-DIA) 蛋白质组学及广泛靶向代谢组学, 结合生物信息学探究差异蛋白及代谢物、代谢通路之间的相关性。[结果] 4D-DIA 蛋白质组学结果显示, 3 组共鉴定出 A0A8I5Y0Y5、A0A8I5ZMX9、A0A8I6AI41、D3Z9R8、D4A7K7、F7FLE6、M0R6X7、M0R7Q2、P08494、Q62740、Q68FP3、Q6AY77 等 12 个共有差异蛋白。XDH、IBSP、MGP 和 F2RL3 等蛋白的表达在山柰酚组显著上调 ($P<0.05$)。广泛靶向代谢组学结果显示, 在 3 组中泛酸、L-精氨酸-L-丙氨酸等 25 种代谢物的表达存在差异。差异蛋白和代谢物表达相关性分析表明, 山柰酚组和模型组之间有 3 个差异蛋白和代谢物呈现强相关性, XDH 与 L-异亮氨酸-L-组氨酸、IBSP 与赖氨酸-缬氨酸、GPR183 与 L-组氨酸等代谢物呈显著负相关。差异蛋白和代谢物共同参与了维生素消化与吸收、代谢途径, 其中 10 种差异代谢物和 3 个差异蛋白与代谢途径密切相关。[结论] 山柰酚可能通过调节 XDH、IBSP、MGP 和 F2RL3 等蛋白的表达, 调控氨基酸及其代谢物的代谢、维生素消化与吸收, 起到防治骨质疏松的作用。

关键词: 山柰酚, 骨质疏松, 4D-DIA, 广泛靶向代谢组学, 大鼠

中图分类号: R318 **文献标志码:** A **文章编号:** 1005-8478 (2025) 21-1962-09

4D-DIA protein and metabolomic analysis of the effects of kaempferol on ovariectomized rats // LIANG Zhou^{1,2}, ZHANG Chi¹, PAN Cheng-zhen², YANG Bo², PU Zhang-lin¹, LIU Hua¹, PENG Jin-hui², WEN Li-chun², LING Guan-han², CHEN Feng^{1*}. 1. Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530000, Guangxi, China; 2. Yulin Integrated Traditional Chinese and Western Medicine Orthopedic Hospital, Yulin 537599, Guangxi, China

Abstract: [Objective] To study the mechanism of kaempferol against osteoporosis by protein and metabolomics. [Methods] Eighteen female SD rats were randomly divided into three groups with six animals in each group. After ovariectomy or sham operation performed correspondingly, 40 mg/kg of kaempferol was given intragastrically in the kaempferol group, while distilled water was given intragastrically in the model group and sham groups. After 12 consecutive weeks of intervention, the rat femur specimens were taken for four-dimensional data-independent acquisition (4D-DIA) proteomics and broadly targeted metabolomics analysis, combined with bioinformatics to explore the correlation between differential proteins and metabolites and metabolic pathways. [Results] As results of the 4D-DIA proteomics, a total of 12 shared differential proteins were identified among the three groups, and the expression of proteins such as XDH, IBSP, MGP, and F2RL3 was up-regulated in the kaempferol group ($P<0.05$). In term of extensively targeted metabolomics, differential expression of 25 metabolites, including pantothenic acid and L-arginine-L-alanine, were found among the three groups. The differential proteins and metabolites were jointly involved in vitamin digestion and absorption pathways and metabolic pathways. Specifically, 10 differential metabolites and 3 differential proteins are closely associated with metabolic pathways. [Conclusion] The kaempferol may exert its anti-osteoporotic effects by modulating the expression of proteins such as XDH, IBSP, MGP, and F2RL3, regulating the metabolism of amino acids and their metabolites, as well as

DOI:10.20184/j.cnki.issn1005-8478.110527

△基金项目: 广西壮族自治区中医药自筹经费科研课题项目 (编号: GXZYK20230695); 广西高校中青年教师科研基础能力提升项目 (编号: 2024KY0295); 广西研究生教育创新计划项目 (编号: YCBXJ2023034); 广西中医药大学引进博士科研启动基金项目 (编号: 2023BS043); 广西中医药防治骨伤疾病重点实验室 (培育) 项目 (编号: 桂中医药科教发[2023]9 号)

作者简介: 梁周, 副主任医师, 研究方向: 骨伤科疾病的中医药防治研究, (电子信箱) 5913682@qq.com

***通信作者:** 陈锋, (电子信箱) chenfeng2000@163.com

vitamin digestion and absorption pathways.

Key words: kaempferol, osteoporosis, four-dimensional data-independent acquisition, comprehensive targeted metabolomics, rat

骨质疏松症 (osteoporosis, OP) 是一种影响全身骨骼的疾病, 其主要临床表现为骨密度降低及骨组织的微观结构受损, 最终导致骨骼脆性和骨折风险增加^[1]。既往研究表明, 个体骨密度低于-2.5 标准差, 即可诊断为骨质疏松^[2]。女性绝经后骨质流失会加速, 骨量会随年龄增长而减少, 进而增加骨质疏松性骨折的风险^[3, 4], 导致患者生活质量下降、健康支出增加^[5]。因此, 未来亟需更多关于预防和治疗骨质疏松的相关研究。

山柰酚是一种具有多酚结构的天然化合物, 可治疗动脉粥样硬化、癌症和阿尔茨海默病等多种疾病^[6]。本课题组前期研究发现, 山柰酚能通过靶向调控骨质疏松大鼠体内的 RPN1 蛋白, 逆转骨小梁的损伤, 提高骨密度。此外, Aa 等^[7]的研究表明, 山柰酚能通过调节小鼠体内色氨酸、脂肪酸和胆汁酸的代谢起到抗关节炎的作用。Yi 等^[8]的研究也表明, 山柰酚能参与氨基酸和花生四烯酸代谢, 进而缓解肺动脉高压的发展。这些研究皆表明, 山柰酚能通过调节蛋白、代谢物的表达, 起到防治相关疾病的作用, 但山柰酚是否能通过调节相关代谢物的代谢, 起到防治骨质疏松的作用, 目前尚缺乏相关的研究。

近年来, 多组学联合分析技术已被广泛用于研究各种疾病的机制^[9]。蛋白和代谢组学技术的联合应用具有不可否认的优势^[10]。代谢组学分析的数据可为蛋白组学的结果提供分子功能信息, 蛋白-代谢物相互作用网络能展示生物功能在疾病发展过程中的整体变化。鉴于目前关于山柰酚抗骨质疏松的靶点和代谢物的研究仍不全面, 本研究基于四维数据独立采集 (four-dimensional data-independent acquisition, 4D-DIA) 蛋白质组学和广泛靶向代谢组学, 进一步探索山柰酚抗骨质疏松的机制。

1 材料和方法

1.1 实验动物与材料

18 只 SPF 级 8 周龄雌性 Sprague-Dawley 大鼠, 体重 250~290 g, 购买于湖南斯莱克景达实验动物有限公司, 合格证号: SCXK2019-0004, 使用许可证号: SYXK 桂 2019-0001。山柰酚, CAS 编号为 520-18-3, 目录编号为 K107145, 纯度为 97%, 购于上

海阿拉丁生物化学技术有限公司。异氟烷购买于上海玉研科学仪器有限公司。

1.2 体内实验

1.2.1 动物分组与处理

本实验方案已通过广西中医药大学伦理委员会审批 (批准编号: DW20230302-006)。关于大鼠相关操作符合实验动物伦理要求。18 只大鼠随机分为假手术组、模型组及山柰酚组, 每组 6 只。

1.2.2 去势模型建立

实验过程中麻醉方法皆采用吸入 2% 异氟烷混合氧气麻醉。采用经典的双侧卵巢切除术进行造模, 假手术组仅切除卵巢周围少许脂肪^[7]。术后连续 3 d 给予各组大鼠肌肉注射青霉素 (80 000 U/d)。8 周后, 6 只接受假手术的大鼠为假手术组, 将 12 只去卵巢大鼠随机分为模型组和山柰酚组。

1.2.3 药物干预

连续 12 周, 山柰酚组按照 40 mg/kg 标准给予山柰酚灌胃, 模型组和假手术组予蒸馏水灌胃^[7]。

1.3 4D-DIA 检测

1.3.1 蛋白提取及肽段酶解

连续给药 12 周处死动物后取各组大鼠股骨样本, 各样本分别加入裂解缓冲液 (8 mmol/L 尿素), 在 4℃ 环境中, 15 000 g 离心 20 min, 收集上清。通过 BCA 蛋白定量分析测定总蛋白浓度。通过 8 mmol/L 尿素在 37℃ 下用 10 mmol/L MDTT 还原 45 min, 在室温的暗室中用 50 mmol/L 碘乙酰胺烷基化 15 min。加入 4 倍于蛋白液体积的预冷丙酮, 在 -20℃ 下沉淀 2 h。离心后, 加入胰蛋白酶, 37℃ 下消化过夜。消化后的肽通过 C18 柱料进行脱盐处理。

1.3.2 液相色谱-串联质谱联用 (liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS/MS) 检测

使用 Pierce 肽定量试剂盒 (Thermo Fisher) 进行肽定量。将等量的多肽溶解在质谱上样缓冲液中, 用 EASY-nLC 1 200 色谱仪 (赛默飞世尔) 收集馏分。随后, 使用 timsTOF Pro2 质谱仪 (德国布鲁克公司) 进行 LC-MS/MS 分析。将建立的光谱库导入 Spectronaut 18, 并从 DIA 原始数据中提取产物离子峰。每个蛋白质选择了 6 个肽段, 每个肽段选择 3 个产物离子进行定量分析。

1.3.3 生物信息学分析

使用基因本体 (gene ontology, GO) 和京都基因

组百科全书 (kyoto encyclopedia of genes and genomes, KEGG) 数据库对从山柰酚组和模型组大鼠股骨组织中检测到的差异蛋白进行功能注释, 以更全面地判断差异蛋白所参与的生物学过程。

1.3.4 广泛靶向代谢组学分析

连续给药 12 周处死动物后取各组大鼠股骨样本, 将各组大鼠股骨组织液氮研磨至粉末状, 使用预冷的甲醇-水 (4:1, v/v) 溶液提取代谢物。提取液在 4℃ 下以 12 000 r/min 离心 10 min, 收集上清液并进行真空冷冻干燥。干燥后的样品用 80% 甲醇重溶, 经 0.22 μm 滤膜过滤, 确保样品纯净度。代谢物分析采用超高效液相色谱-三重四极杆质谱联用技术进行。质谱数据经过峰提取、对齐及标准化处理, 结合主成分分析 (principal component analysis, PCA) 和偏最小二乘判别分析 (partial least squares discriminant analysis, PLS-DA), 鉴定出各组间显著差异的代谢物。通过公共数据库比对并进行代谢通路分析, 揭示模型组、假手术组和山柰酚组之间的代谢差异及其潜在的生物学意义。

1.3.5 组学联合分析

使用 R3.5.0 中的 cor 函数计算山柰酚组和模型组股骨组织的差异蛋白和代谢物的定量值皮尔逊相关性系数, 进行相关性分析。利用 KEGG 数据库将山柰酚组和模型组股骨组织的共有差异蛋白和代谢物同时进行映射, 获取它们之间共同的通路关联信息。对关键的共有通路进行典型相关分析 (canonical correlation analysis, CCA), 进而更加系统直观地展现差异蛋

白和代谢物之间的相互作用。

1.4 统计学方法

采用 SPSS 26.0 软件对数据进行统计分析。计量数据以 $\bar{x} \pm s$ 表达, 两组数据采用独立样本 *t* 检验进行比较, 多组数据使用单因素方差分析。

2 结 果

2.1 大鼠股骨组织样本 4D-DIA 蛋白质组学分析

2.1.1 质谱鉴定结果

本实验质谱分析中采用两个标准计算蛋白的表达差异。若为重复项目, $FC > 1.5$ 或 $FC < 0.6667$, 合并 $P < 0.05$ 定义为差异蛋白质。若为非重复项目, $FC > 1.5$ 或 $FC < 0.6667$ 定义为差异蛋白。在山柰酚组与模型组之间检测到 71 个差异蛋白, 包括 57 个上调蛋白和 14 个下调蛋白。模型组与假手术组之间检测到 426 个差异蛋白, 其中 325 个上调, 101 个下调。见表 1。

2.1.2 差异蛋白 Venn 分析

结合山柰酚组、模型组和假手术组差异蛋白数据, 通过 Venn 分析筛选 3 组共有差异蛋白。结果显示 3 组间共有 12 个差异蛋白, 见图 1 和表 2。

表 1. 各组差异蛋白统计表			
Table 1. Statistical table of differential proteins in each group			
分组	上调	下调	差异蛋白
山柰酚组 vs 模型组	57	14	71
模型组 vs 假手术组	325	101	426

表 2. 共有差异蛋白信息表					
Table 2. Information table of common differential proteins					
蛋白编号	基因名称	FC 值		P 值	
		模型组 vs 假手术组	山柰酚组 vs 模型组	模型组 vs 假手术组	山柰酚组 vs 模型组
A0A8I5Y0Y5	XDH	0.229	3.132	0.003	0.004
A0A8I5ZMX9	-	0.365	2.502	0.005	0.011
A0A8I6AI41	-	0.617	1.504	0.049	0.036
D3Z9R8	ATP5MJ	0.499	1.936	0.009	0.013
D4A7K7	GPR183	0.419	1.669	<0.001	<0.001
F7FLE6	IBSP	0.359	1.875	0.009	0.038
M0R6X7	F2RL3	0.607	1.509	0.010	0.014
M0R7Q2	-	0.635	1.735	0.017	0.009
P08494	MGP	0.457	1.976	0.005	0.018
Q62740	SPP2	0.300	1.769	<0.001	0.014
Q68FP3	CCL6	0.565	1.885	0.009	0.005
Q6AY77	GEMIN8	0.655	1.712	0.036	0.024

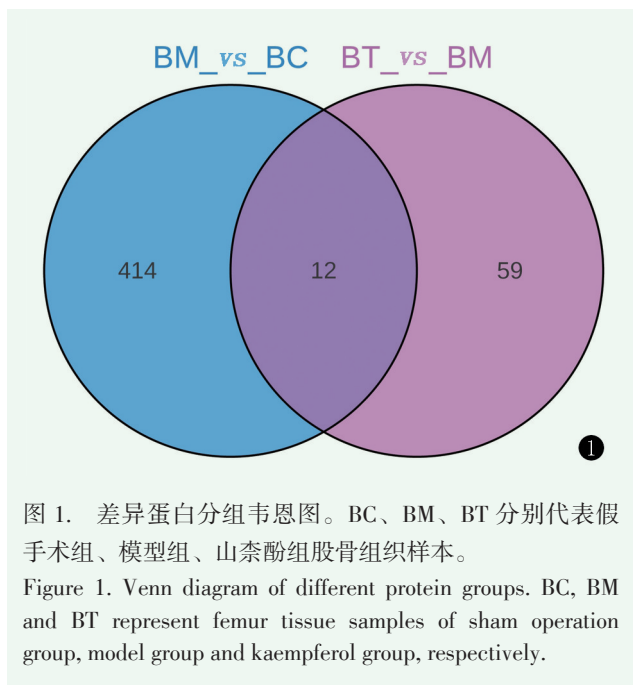


图 1. 差异蛋白分组韦恩图。BC、BM、BT 分别代表假手术组、模型组、山柰酚组股骨组织样本。
Figure 1. Venn diagram of different protein groups. BC, BM and BT represent femur tissue samples of sham operation group, model group and kaempferol group, respectively.

2.1.3 GO 和 KEGG 功能富集分析

对山柰酚组与模型组之间的差异蛋白进行 GO 富

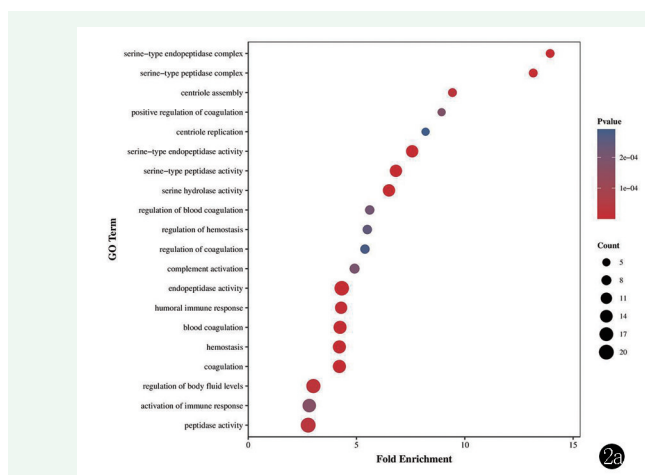


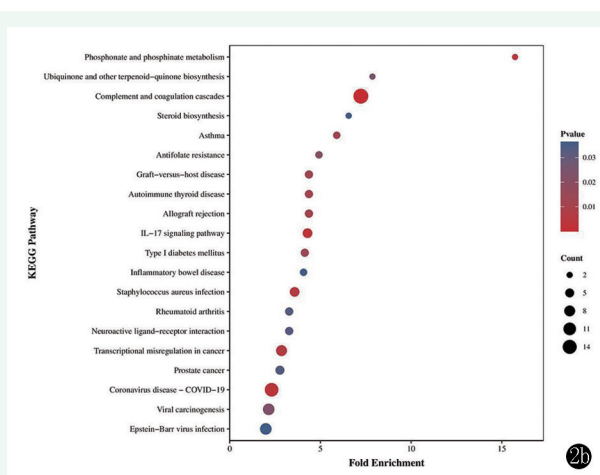
图 2. GO 和 KEGG 功能富集气泡图。
Figure 2. Bubble plot of GO and KEGG functional enrichment.

集分析，选取 P -value 排名前 5 的条目绘制柱形图。结果显示，在 BP 中，差异蛋白主要富集于细菌反应、免疫反应调节、伤口反应等功能；在 MF 中，主要集中于肽酶活性、内肽酶活性、钙离子结合；在 CC 中，则集中于细胞外基质、外部包膜结构和细胞核膜（图 2a）。

对山柰酚组与模型组之间的差异蛋白进行 KEGG 通路富集分析，发现集中在炎症性肠病、I 型糖尿病和 IL-17 信号通路等相关通路上（图 2b）。

2.2 大鼠股骨组织样本广泛靶向代谢组学分析

在正负离子模式下，共鉴定出 1 027 种代谢物，其中 549 种通过正离子模式检测，448 种通过负离子模式检测。PCA 结果显示，尽管样本间存在差异，但无法有效区分模型组、假手术组和山柰酚组（图 3a~3c）。分层聚类的热图进一步揭示了 3 组间的代谢物差异，但未能清晰区分这 3 组样本（图 3d）。



为区分组间代谢物差异，进行了多变量统计分析。通过 OPLS-DA 对代谢组学模式进行分析，并识别潜在的生物标志物变化。在 OPLS-DA 得分图中，模型组、假手术组和山柰酚组的特征被区分开来（图 4a, 4c）。假手术组与模型组之间的 OPLS-DA 模型的 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 分别为 0.5、0.999 和 0.745，模型组与山柰酚组之间的 R^2X 、 R^2Y 和 Q^2 分别为 0.275、0.975 和 0.325，表明了模型的拟合性能和预测能力。在共享与特有化合物结构分析图（S-plot）中，VIP 值 ≥ 1 的代谢物用红点表示（图 4b, 4d）。

最终，在假手术组与模型组、模型组与山柰酚组之间分别鉴定出 294 种和 48 种差异代谢物（表 3）。基于倍数变化值，模型组与假手术组之间差异倍数较高的上调代谢物包括 L-丙氨酰-L-谷氨酰胺、L-精氨酸-L-丙氨酸、赖氨酸-异亮氨酸等；下调代谢物为 3-脲基丙酸、乙基丙二酸、乙酰丙酸等（图 5a~5c）。在模型组与山柰酚组之间，上调的代谢物为己酰甘氨酸和正丁基甘氨酸；下调代谢物包括 L-精氨酸-L-丙氨酸、L-精氨酸-L-苏氨酸、L-天冬酰胺-L-精氨酸等（图 5d~5f）。

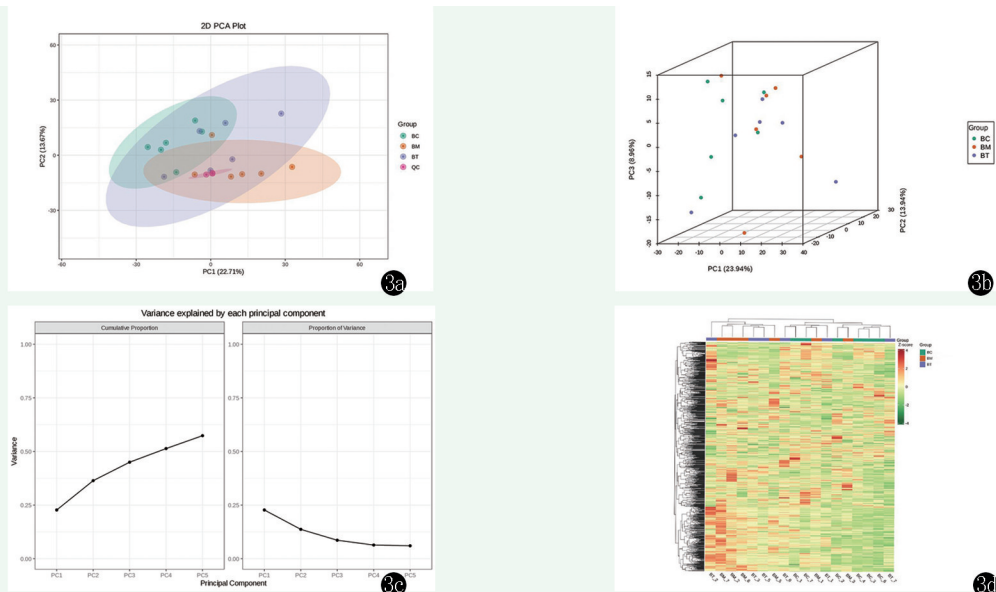


图 3. 基于主成分分析和分层聚类分析的股骨组织代谢物鉴定。3a: 基于 PCA 的骨代谢物二维图; 3b: 基于 PCA 的三维骨代谢物图; 3c: 具有多方差特征的 PCA; 3d: 分层聚类分析的骨代谢物热图。BC、BM、BT 分别代表假手术组、模型组、山柰酚组股骨组织样本, QC 代表质控样本。

Figure 3. Metabolite identification of femur tissue based on principal component analysis and hierarchical cluster analysis. 3a: PCA based two-dimensional map of bone metabolites; 3b: 3D bone metabolite map based on PCA; 3c: PCA with multi-difference characteristics; 3d: Heat maps of bone metabolites for hierarchical cluster analysis. BC, BM and BT represent femur tissue samples of the sham operation group, model group and kaempferol group respectively, and QC represents quality control samples.

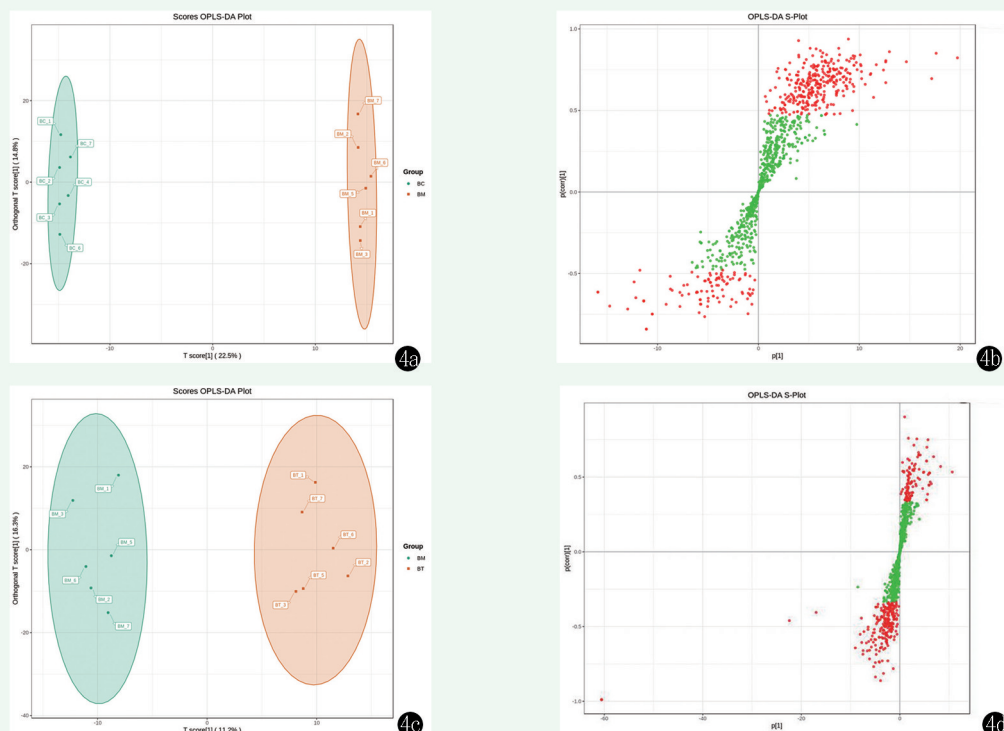


图 4. 基于 OPLS-DA 的股骨组织代谢物鉴定。4a: 假手术组和模型组之间 OPLS-DA 评分图; 4b: 假手术组和模型组之间的 S-plot 图; 4c: 模型组和山柰酚组之间 OPLS-DA 评分图; 4d: 模型组和山柰酚组之间的 S-plot 图。注: BC、BM、BT 分别代表假手术组、模型组、山柰酚组股骨组织样本。

Figure 4. Metabolite identification of femur tissue based on OPLS-DA. 4a: OPLS-DA score between sham operation group and model group; 4b: S-plot between the sham operation group and model group; 4c: OPLS-DA score between the model group and kaempferol group; 4d: S-plot between model group and kaempferol group. Note: BC, BM and BT represent femur tissue samples of sham operation group, model group and kaempferol group.

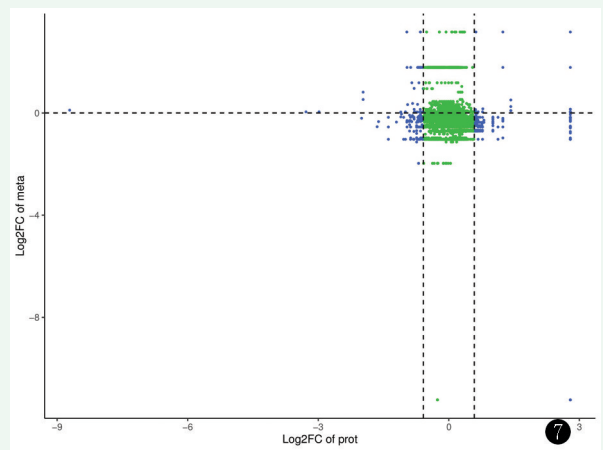


图 7. 相关性分析九象限图。注：横坐标表示蛋白质的 $\log_2 FC$ ，纵坐标表示代谢物的 $\log_2 FC$ 。
Figure 7. Correlation analysis nine quadrant plot. Note: the horizontal coordinate indicates the protein $\log_2 FC$, and the vertical coordinate indicates the metabolite $\log_2 FC$.

表 4. 3 个差异蛋白和代谢物的相关性信息表
Table 4. Correlation information table of 3 differential proteins and metabolites

基因名称	代谢物	相关系数	P 值
XDH	Ile-His	-0.826	<0.001
IBSP	Lys-Val	-0.804	<0.001
GPR183	L-Histidine	-0.807	<0.001
GPR183	2'-Deoxyinosine-5'-monophosphate	-0.810	<0.001
GPR183	Glu-Ser	-0.811	<0.001
GPR183	3-Carboxypropyltrimethylammonium	-0.819	<0.001
GPR183	Thr-Glu	-0.823	<0.001
GPR183	SDMA	-0.836	<0.001
GPR183	Creatine phosphate	-0.848	<0.001
GPR183	D-Glucosamine 6-Phosphate	-0.883	<0.001

2.3.2 蛋白-代谢共有 KEGG 通路分析

利用差异蛋白和代谢物共同的 KEGG 通路绘制条形图，结果显示在模型组和山柰酚组之间，差异蛋白和代谢物共同参与了维生素消化与吸收途径及代谢途径（图 8a）。

对代谢途径中的差异蛋白及代谢物进行 CCA 分析，发现代谢途径与泛酸、XDH 蛋白存在显著相关性（图 8b）。

3 讨论

骨质疏松症在全球范围内普遍存在，尤其在老年人群中发病率较高，且以女性为主。据国际骨质疏松基金会数据显示，全球约有 2 亿人患有骨质疏松

症，其中绝经后女性占比高达 30%^[11]。山柰酚是一种存在于多种中草药中的黄酮类化合物，可通过多种机制调节骨代谢。包括调整破骨细胞与成骨细胞的活性、调节炎症反应、激活 Wnt/ β -catenin 信号通路、影响 RANKL/OPG 比例，以及调控氧化应激和细胞凋亡等^[12]。然而现阶段与山柰酚抗骨质疏松相关的动物骨组织蛋白质组学和骨代谢的学术报道尚不完整^[13]。因此，本研究联合 4D-DIA 蛋白质组学和广泛靶向代谢组学两种技术，进一步探索山柰酚治疗骨质疏松大鼠的机制。

4D-DIA 蛋白质组学结果显示，山柰酚可能通过上调 XDH、ATP5MJ、GPRL83、IBSP、F2RL3、MGP、SPP2、CCL6、GEMIN8 等蛋白的表达，起到抗骨质疏松的作用。既往研究表明，XDH 与嘌呤代谢密切相关，其具有将嘌呤转化为尿酸的作用。Li 等^[14]的研究表明，XDH 能通过抑制次黄嘌呤和黄嘌呤的表达来影响嘌呤代谢，降低机体的尿酸水平，进而抑制黄韧带的骨化。有研究指出，IBSP 的表达高低与骨质疏松症的发生与发展有直接联系，IBSP 高表达能促进人骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化^[15]。MGP 是一种抑制骨矿化的蛋白，MGP 缺乏或功能异常与过度矿化病变相关。Yuan 等^[16]的研究表明，机体的 APPL1 下调，会导致基质 MGP 蛋白高表达，进而阻断 BMP2 信号通路的传导，从而抑制间充质干细胞向成骨细胞分化。Su 等^[17]的研究也指出，F2RL3 与机体骨代谢密不可分，可能是诊断骨关节炎的潜在生物标志物。这些研究表明，XDH、IBSP、MGP、F2RL3 等蛋白可能与骨质疏松密切相关，这与本研究结果一致，进一步支持了山柰酚作为潜在治疗骨质疏松症的有效成分，其通过多重蛋白调控途径，展现出广泛的骨保护作用，为未来的临床应用提供了有力的科学依据。

基于广泛靶向代谢组学发现，本实验在假手术组与模型组、模型组与山柰酚组中分别鉴定出 294 和 48 种代谢物。通过韦恩图分析 3 组代谢物交集，得到以氨基酸及核苷酸代谢物为主的 25 个交集代谢物。结合 VIP 值分析，发现 L-精氨酸-L-丙氨酸与山柰酚抗骨质疏松的机制密切相关。既往研究表明，氨基酸作为蛋白质的基本单位，对人体正常代谢至关重要^[18, 19]，其中 L-精氨酸-L-丙氨酸在促进胶原蛋白合成和增强骨骼健康方面发挥重要作用，而胶原蛋白是维持骨密度和强度的关键成分^[20]。

本实验通过蛋白-代谢联合分析，发现代谢途径、维生素消化与吸收途径是两者共有的生物途

- [10] Shimshoni E, Solomonov I, Sagi I, et al. Integrated metabolomics and proteomics of symptomatic and early presymptomatic states of colitis [J]. *J Proteome Res*, 2024, 23 (4) : 1420–1432. DOI: 10.1021/acs.jproteome.3c00860.
- [11] Onizuka N, Onizuka T. Disparities in osteoporosis prevention and care: Understanding gender, racial, and ethnic dynamics [J]. *Curr Rev Musculoskelet Med*, 2024, 17 (9) : 365–372. DOI: 10.1007/s12178-024-09909-8.
- [12] 杨启培, 陈锋, 崔伟, 等. 山奈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. DOI: 10.12307/2024.338.
- Yang QP, Chen F, Cui W, et al. Relevant signaling pathways of kaempferol monomer in the treatment of osteoporosis [J]. *Chinese Journal of Tissue Engineering Research*, 2024, 28 (26) : 4242–4249. DOI: 10.12307/2024.338.
- [13] 向晶晶, 王朝阳, 喻小明, 等. 四妙丸对 II 型环氧合酶与黄嘌呤脱氢酶抑制作用的虚拟筛选研究 [J]. *上海中医药大学学报*, 2022, 36 (2) : 59–67. DOI: 10.16306/j.1008-861x.2022.02.010.
- Xiang JJ, Wang CY, Yu XM, et al. Virtual screening study of simi-aopill on inhibition of COX-2 and xanthine oxidase [J]. *Journal of Shanghai University of Traditional Chinese Medicine*, 2022, 36 (2) : 59–67. DOI: 10.16306/j.1008-861x.2022.02.010.
- [14] Li J, Yu L, Guo S, et al. Identification of the molecular mechanism and diagnostic biomarkers in the thoracic ossification of the ligamentum flavum using metabolomics and transcriptomics [J]. *BMC Mol Cell Biol*, 2020, 21 (1) : 37. DOI: 10.1186/s12860-020-00280-3.
- [15] Liu F, Dong J, Zhang P, et al. Transcriptome sequencing reveals key genes in three early phases of osteogenic, adipogenic, and chondrogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells in rats [J]. *Front Mol Biosci*, 2022, 8: 782054. DOI: 10.3389/fmolb.2021.782054.
- [16] Yuan W, Liu W, Zhang Y, et al. Reduced APPL1 impairs osteogenic differentiation of mesenchymal stem cells by facilitating MGP expression to disrupt the BMP2 pathway in osteoporosis [J]. *J Biol Chem*, 2023, 299 (6) : 104823. DOI: 10.1016/j.jbc.2023.104823.
- [17] Su Q, Shen G, Xu G. Strong correlation between F2RL3 in the blood and osteoarthritis based on a retrospective cohort study [J]. *Medicine (Baltimore)*, 2023, 102 (21) : e33657. DOI: 10.1097/MD.00000000000033657.
- [18] Wu G. Amino acids: metabolism, functions, and nutrition [J]. *Amino Acids*, 2009, 37 (1) : 1–17. DOI: 10.1097/MD.00000000000033657.
- [19] Li H, Seugnet L. Decoding the nexus: branched-chain amino acids and their connection with sleep, circadian rhythms, and cardiometabolic health [J]. *Neural Regen Res*, 2025, 20 (5) : 1350–1363. DOI: 10.4103/NRR.NRR-D-23-02020.
- [20] 袁功武, 兰生辉, 曾文波, 等. 吉非替尼对骨折愈合中 I、II 及 X 型胶原基因表达的影响 [J]. *中国矫形外科杂志*, 2018, 26 (10) : 939–944. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2018.10.17.
- Yuan GW, Lan SH, Zeng WB, et al. Effect of gefitinib on the expression of type I, II, and X collagen genes during fracture healing [J]. *Orthopedic Journal of China*, 2018, 26 (10) : 939–944. DOI: 10.3977/j.issn.1005-8478.2018.10.17.
- [21] 张伟, 樊宇宇, 方秀统. 血清维生素 D 和骨转换标志物与老年女性骨质疏松性椎体单发骨折和多发骨折的关系 [J]. *中国老年学杂志*, 2023, 43 (24) : 5961–5964. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2023.24.021.
- Zhang W, Fan YY, Fang XT. Relationship between serum vitamin D, bone turnover markers, and single and multiple osteoporotic vertebral fractures in elderly women [J]. *Chinese Journal of Gerontology*, 2023, 43 (24) : 5961–5964. DOI: 10.3969/j.issn.1005-9202.2023.24.021.
- [22] 胥小琴, 张丹, 陶新城, 等. 维生素 K2 防治绝经后骨质疏松症作用的荟萃分析 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2021, 27 (12) : 1780–1787. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2021.12.011.
- Xu XQ, Zhang D, Tao XC, et al. Meta-analysis of the effect of vitamin K2 on postmenopausal osteoporosis [J]. *Chinese Journal of Osteoporosis*, 2021, 27 (12) : 1780–1787. DOI: 10.3969/j.issn.1006-7108.2021.12.011.
- [23] Grili PPDF, Vidigal CV, Cruz GFD, et al. Nutrient patterns and risk of osteopenia in postmenopausal women [J]. *Nutrients*, 2023, 15 (7) : 1670. DOI: 10.3390/nu15071670.

(收稿:2024-07-18 修回:2025-03-14)

(同行评议专家:袁普卫,李宏宇,刘汝专)

(本文编辑:宁桦)