

基于响应面法的加味塔布森-2 水提工艺优化及体外药效考察

况媛媛,宋清翔,郭 姝,付 瑶,田雨欣,孟 琪,薛培凤,董 馨
(内蒙古医科大学药学院,呼和浩特 010110)

[摘要] **目的:**采用 Box-Behnken 设计-响应面法优化加味塔布森-2 水提工艺,并对其体外药效进行考察。**方法:**采用响应面法,以咖啡酸、京尼平苷酸 2 种成分的质量分数为综合得分,优选出浸泡时间、料液比、提取时间和提取次数的最佳值。将最优工艺下提取物与核因子- κ B 受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- κ B ligand,RANKL)诱导的 RAW264.7 细胞共培养 5 d,随后以抗酒石酸酸性磷酸酶(TRAP)染色,显微镜下观察 TRAP($\text{mL}\cdot\text{g}^{-1}$)阳性细胞状态,评价提取物的体外药效。**结果:**选取提取时间、浸泡时间以及料液比为考察因素,以咖啡酸和京尼平苷酸含量的综合评分为评价指标,经响应面法优化,得到的最佳提取条件:浸泡时间为 540 min,料液比为 1:12($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$),提取时间为 44 min,提取次数为 2 次。此条件下所得的提取物对 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞有明显抑制作用,可减少 TRAP 阳性细胞,并抑制多核生成。**结论:**运用响应面分析法优选的加味塔布森-2 水提工艺重复性好、稳定可行,且具有良好的体外药效活性,为后期体内药效实验研究奠定可靠的基础。

[关键词] 加味塔布森-2;响应面法;咖啡酸;京尼平苷酸;破骨细胞

[中图分类号] R943 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 1003-3734(2023)20-2093-06

Optimization of water extraction process of modified Tabusen-2 based on response surface methodology and investigation of its *in vitro* efficacy

KUANG Yuan-yuan, SONG Qing-xiang, GUO Shu, FU Yao, TIAN Yu-xin, MENG Qi, XUE Pei-feng, DONG Xin
(School of Pharmacy, Inner Mongolia Medical University, Hohhot 010110, China)

[Abstract] **Objective:** To optimize the water extraction process of modified Tabusen-2 by response surface methodology (Box-Behnken) and investigate its *in vitro* efficacy. **Methods:** Taking the mass fractions of caffeic acid and geniposide as the comprehensive score, response surface methodology was used to optimize the soaking time, material-to-liquid ratio, extraction time and extraction times. The RAW 264.7 cells induced by nuclear factor- κ B receptor activator ligand (RANKL) were co-cultured with the optimal extracts for 5 d, and then treated with tartrate-resistant acid phosphatase (TRAP). The TRAP-positive cells were stained and observed under a microscope to evaluate the *in vitro* efficacy of the extract. **Results:** The extraction time, soaking time, and material-to-liquid ratio were selected as the inspection factors, and the comprehensive score of caffeic acid and geniposide content was used as the evaluation index. After optimization by response surface method, the optimal extraction condition was 540 min; the liquid ratio was 1:12 ($\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$); the extraction time was 44 min, and the extraction times were two times. The extract obtained under this condition had a significant inhibitory effect on RAW264.7

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(81960758);内蒙古医科大学青年培育项目(YKD2021QN007);国家大学生创新创业训练计划项目(202010132003)

[作者简介] 况媛媛,女,硕士,实验师,主要从事中蒙药物物质基础及质量控制研究。E-mail:yuanyuankuang8855@126.com。

[通讯作者] 董馨,女,硕士,高级实验师,硕士生导师,主要从事中蒙药物物质基础及质量控制研究。联系电话:(0471)6653162, E-mail:dongx1128@163.com。

cells induced by RANKL, could reduce TRAP-positive cells, and inhibited multinucleation. **Conclusion:** The water extraction process of modified Tabusen-2 optimized by response surface analysis method is reproducible, stable and feasible, and has good *in vitro* pharmacodynamic activity, laying a reliable foundation for future *in vivo* pharmacodynamic experimental research.

[Key words] modified tarbson-2; response surface methodology; caffeic acid; geniposide acid; osteoclast

随着我国人口老龄化进程加速,居世界多发病、常见病第 7 位^[1]的骨质疏松症正悄然而至。据推测,至 2050 年,我国骨质疏松症患者将达 2.12 亿例^[2]。加味塔布森-2 源于蒙古族骨科疾病的临床经验方,由蓝刺头、杜仲、红花、三七、珍珠 5 味药材组成^[3]。全方可活血散瘀、消肿止痛、续筋接骨,临床上在治疗骨质疏松、肢体骨折等症中效果显著^[4]。但该复方以药材打粉制成,患者服用依从性差,且未经提取直接服用,更不利于有效成分的吸收。因此,对加味塔布森-2 提取工艺优化研究有助于提升药物疗效并改善患者服用依从性。但因复方药物成分较多,提取时多种化学成分相互影响,难以准确判断各有效成分对总体提取效率的贡献率^[5];并且以往对提取工艺评价指标较为单一,仅限于浸膏得率或单一成分含量,且缺乏相关药效学验证,未能全面反映复方提取工艺的质量内涵^[6]。本研究采用 Box-Behnken 设计-响应面法,以咖啡酸、京尼平苷酸 2 种成分的质量分数为综合得分,优选最佳水提工艺。并以核因子- κ B 受体活化因子配体(receptor activator for nuclear factor- κ B ligand, RANKL)诱导的 RAW264.7 细胞形成破骨细胞分化为药效,评价最优工艺下提取物的体外药效。这样既能综合考虑各单一因素对提取工艺影响的交互作用,又能明确工艺的质量内涵,对加味塔布森-2 的提取工艺研发提供科学依据。

材料与方法

1 仪器

ThermoFisher UltiMate 3000 高效液相色谱仪(赛默飞世尔科技中国有限公司); AB135-S 型十万分之一分析天平(瑞士 Metter Toledo 公司); KQ-400E 型超声波清洗器(昆山超声仪器有限公司); DS-T 350 粉碎机(上海市顶帅工贸有限公司); KDM 型电热套(山东华鲁电热仪器有限公司)。

2 药材与试剂

蒙药蓝刺头药材于 2020 年 8 月采自内蒙古自治区呼和浩特市武川县,经内蒙古医科大学药学院

薛培凤教授鉴定为菊科植物驴欺口(*Echinops latifolius* Tausch)的干燥花序。杜仲、红花和三七粉均购自亳州中药材有限责任公司,珍珠粉购自北京同仁堂公司,经内蒙古医科大学药学院薛培凤教授鉴定以上药材均为正品药材;京尼平苷酸(批号:SH19011702,纯度 $\geq 98.0\%$)、咖啡酸(批号:SH17122804,纯度 $\geq 98.0\%$)均购自北京赛百草科技有限公司;甲醇(美国 Fisher Scientific 公司,色谱纯);无水乙醇(天津市津东天正精细化学试剂厂,分析纯);娃哈哈纯净水(杭州娃哈哈非常可乐饮料有限公司);甲酸(天津市津东天正精细化学试剂厂,分析纯);RANKL、巨噬细胞集落刺激因子(macrophage colony-stimulating factor, M-CSF)购自美国 R&D 公司;抗酒石酸酸性磷酸酶(tartrate resistant acid phosphatase, TRAP)染色试剂(美国 Sigma-Aldrich 公司);DMEM 培养基、 α -MEM 和胎牛血清(FBS)购自美国 GIBCO 公司。

3 实验动物

6 周龄雌性小鼠,20 只,体质量 20~23 g,购自内蒙古医科大学实验动物研究中心,许可证号:SCXK(蒙)2015-0001。动物饲养温度(20 ± 2) $^{\circ}\text{C}$,相对湿度(55 ± 5)%,环境保持 12 h 昼夜交替,保持进食饮水自由。动物实验经内蒙古医科大学医学伦理委员会批准(批准号:YKD2018056)。

4 色谱条件

采用 YMC-Pack ODS-A 柱(250 mm \times 4.6 mm, 5 μm);流动相为乙腈(A)-水(B);梯度洗脱(0~30 min:20%~38% A;30~31 min:38%~20% A;31~40 min:20% A);柱温 30 $^{\circ}\text{C}$;流速 1 mL \cdot min⁻¹,检测波长 203 nm;进样量 10 μL 。

5 对照品溶液的制备

精密称取京尼平苷酸 10.20 mg、咖啡酸 10.00 mg 分别置于 10 mL 容量瓶中,甲醇溶解并稀释至刻度,摇匀,即得。

6 供试品溶液的制备

将药材杜仲、蓝刺头和红花经粉碎机粉碎后过

40 目筛制备成实验用药材粉末,取杜仲 1.6 g、蓝刺头 1.2 g、红花 0.8 g、三七粉 0.4 g、珍珠粉 0.1 g,精密称定,置于 250 mL 的圆底烧瓶中,加入不同料液比、浸泡不同时间、进行不同次数及不同时间的回流提取,滤过。由于三七、珍珠为极细粉,因此只在最后一次回流加入。合并滤液并摇匀,经 0.45 μm 微孔滤膜滤过即得。

7 含量测定方法学考察

7.1 线性关系考察 精密量取各对照品溶液适量,置于 10 mL 容量瓶中,用甲醇定容至刻度,吸取以上混标对照品溶液 1, 2, 5, 10, 15, 20, 25 μL , 在“4”项色谱条件下进样测定,记录色谱图,计算线性方程。

7.2 精密度实验 按“6”项下方法制备供试品溶液,按“4”项下的色谱条件进样测定 6 次,记录色谱图,计算京尼平苷酸与咖啡酸浓度 RSD 值。

7.3 重复性实验 按“6”项下方法平行制备供试品溶液 6 份,按“4”项下色谱条件依次进样,记录色谱图,计算京尼平苷酸与咖啡酸浓度 RSD 值。

7.4 稳定性实验 按“6”项下的方法制备供试品溶液,按“4”项下色谱条件,分别在 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 24 h 注入液相色谱仪,记录色谱图,计算京尼平苷酸与咖啡酸浓度 RSD 值。

7.5 加样回收率实验 按方中比例精密称定样品 6 份,精密加入等同于样品含有量的各对照品溶液,按“6”项下方法制成供试液,按“4”项下的色谱条件进样,记录色谱图,计算京尼平苷酸与咖啡酸平均加样回收率。

8 单因素实验

主要考察浸泡时间(30, 45, 60, 90, 120, 180, 360, 540, 720 min)、料液比(1:8, 1:10, 1:12, 1:14, 1:16, 1:18, 1:20, 1:22, 1:30, w/v)、提取时间(30, 45, 60, 90, 120 min)和提取次数(1, 2, 3 次) 4 个因素对咖啡酸及京尼平苷酸的权重含量的影响程度。

9 Box-Behnken 设计-响应面因素与水平设计

9.1 实验设计 在单因素实验基础上,优选单因素最佳值,选取提取时间(A)、浸泡时间(B)以及料液比(C)为考察因素,以咖啡酸和京尼平苷酸含量的综合评分(Y)为评价指标,应用 Design Expert 8.0.6 软件进行设计,因素水平见表 1。

表 1 响应面法因素水平设计

水平	因素		
	A/min	B/min	C(m/v)
-1	30	360	1:10
0	45	540	1:12
1	60	720	1:14

9.2 模型拟合与方差分析 通过 Design Expert 8.0.6 软件(响应面分析软件)对数据进行拟合,分析各因素对综合评分的影响。

10 骨髓巨噬细胞的分离、培养及诱导形成破骨细胞

小鼠麻醉后清洗、脱颈处死,取其胫骨、股骨,并保持结构完整。将股骨或胫骨置于生物安全柜中,于 10 cm 培养皿中依次经酒精瞬时浸泡、PBS 洗涤后于空培养皿中晾干待用。剪开股骨或胫骨两端,注射器吸取适量含双抗的无血清 α -MEM,配上 27G 针头吹出股骨或胫骨髓腔中细胞。将上述细胞悬液收集至离心管,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 8 min。收集的细胞于 20 mL 红细胞裂解液裂解 2 min,再以 25 mL 10% FBS 的 α -MEM 中止裂解,1 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 8 min。收集到的细胞以含双抗和 10% FBS 的 α -MEM 重悬并转移至培养皿中,加入 5 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 M-CSF 培养 24 h 后,转移至新的培养皿,加入 10 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 M-CSF 培养,待细胞贴满培养皿后,将其以 5×10^3 个 \cdot 孔 $^{-1}$ 植入 96 孔板,加入含有 RANKL (100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$) 的培养液培养细胞 6 d。

11 破骨细胞生长情况及形态学变化观察

将骨髓巨噬细胞在含有 25 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 M-CSF 中培养 4 d 后,消化植于 96 孔板中,加入 18.6 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的加味塔布森-2 提取物溶液及 100 $\text{ng}\cdot\text{mL}^{-1}$ 的 RANKL 诱导培养 5 d 后,每孔采用 PBS 冲洗 3 次,多聚甲醛固定 30 min 后再用 PBS 冲洗 3 次。参照 TRAP 说明书配置染液并染色,光镜下观察。以 TRAP 染色阳性的多核细胞(≥ 3)为破骨细胞,观察不同组别(给药组、对照组、模型组)破骨细胞分化情况。

结 果

1 含量测定方法学考察

1.1 线性关系考察 分别以京尼平苷酸与咖啡酸的质量浓度为横坐标(X),峰面积为纵坐标(Y)进行回归,得线性方程,见表 2。

表 2 2 种成分的线性关系考察结果

成分	线性方程	<i>r</i>	线性范围/mg·mL ⁻¹
京尼平苷酸	$Y = 5.43 \times 10^7 + 11\ 032.23$	0.999 8	0.008 0 ~ 0.200 0
咖啡酸	$Y = 7.03 \times 10^7 + 9\ 263.13$	0.999 5	0.010 2 ~ 0.255 0

1.2 精密度、重复性、稳定性实验 京尼平苷酸与咖啡酸的精密度 RSD 分别为 0.33% , 0.46% ; 重复性 RSD 为 1.46% , 2.19% ; 稳定性 RSD 为 1.07% , 0.69% , 表明含量测定所建立方法仪器精密度良好、重复性良好且供试品在 24 h 内稳定。

1.3 加样回收率实验 京尼平苷酸与咖啡酸平均加样回收率分别为 95.43% , 96.77% , RSD 分别为 3.03% , 2.95% 。

2 建立指标权重

根据咖啡酸与京尼平苷酸在提取物中质量分配两物质权重,咖啡酸权重为 0.54、京尼平苷酸权重为 0.46。因此,权重含量 = $W_1 \times a + W_2 \times b$; 综合评分 = $(W_1 \times a/a_{\max} + W_2 \times b/b_{\max}) \times 100$ 。式中 *a*, *b* 分别为当前提取工艺咖啡酸与京尼平苷酸含量; a_{\max} , b_{\max} 分别为所有提取条件下咖啡酸与京尼平苷酸含量的最大值。

3 Box-Behnken 设计-响应面法

3.1 实验设计 实验设计及结果见表 3。

表 3 实验设计与结果

编号	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	含量/mg·g ⁻¹		综合评分	编号	<i>A</i>	<i>B</i>	<i>C</i>	含量/mg·g ⁻¹		综合评分
				咖啡酸	京尼平苷酸						咖啡酸	京尼平苷酸	
1	0	1	-1	0.342 0	0.630 0	61.73	10	0	0	0	0.741 1	0.746 5	96.89
2	-1	0	1	0.506 4	0.677 2	76.17	11	1	1	0	0.362 5	0.697 7	67.21
3	-1	-1	0	0.257 2	0.722 4	61.23	12	0	0	0	0.734 3	0.731 9	95.54
4	0	-1	1	0.219 7	0.722 2	58.57	13	1	0	1	0.419 6	0.653 6	68.62
5	1	0	-1	0.379 6	0.669 1	66.71	14	0	0	0	0.732 9	0.730 6	95.36
6	0	-1	-1	0.201 8	0.715 9	56.93	15	1	-1	0	0.264 7	0.774 4	64.87
7	0	1	1	0.317 8	0.680 1	63.00	16	-1	1	0	0.558 2	0.193 8	51.02
8	-1	0	-1	0.684 2	0.703 1	90.28	17	0	0	0	0.731 0	0.732 7	95.36
9	0	0	0	0.761 5	0.721 9	96.87							

3.2 模型拟合与方差分析 通过 Design Expert 8.0.6 软件(响应面分析软件)对数据进行拟合,工艺得方程为 $Y = 96.00 - 1.41A + 0.17B - 1.16C +$

$3.14AB + 4.01AC - 0.092BC - 9.77A^2 - 25.15B^2 - 10.79C^2$, 方差分析见表 4。

表 4 方差分析结果

方差来源	平方和	自由度	均方	<i>F</i>	<i>P</i>
模型	4 000.66	9	444.52	7.93	0.006 2
<i>A</i>	15.93	1	15.93	0.28	0.610 3
<i>B</i>	0.23	1	0.23	0.01	0.950 6
<i>C</i>	10.79	1	10.79	0.19	0.674 0
<i>AB</i>	39.38	1	39.38	0.70	0.429 5
<i>AC</i>	64.16	1	64.16	1.15	0.320 1
<i>BC</i>	0.034	1	0.034	0.01	0.981 0
<i>A</i> ²	401.66	1	401.66	7.17	0.031 6
<i>B</i> ²	2 664.21	1	2 664.21	47.56	0.000 2
<i>C</i> ²	490.39	1	490.39	8.75	0.021 1
残差	392.16	7	56.02		
失拟项	389.58	3	129.86	201.35	0.000 1
误差项	2.58	4	0.64		
总和	4 392.82	16			

由表 4 可知,回归模型 F 为 7.93, $P < 0.01$, 表明模型具有极显著性,可用于响应值预测;各因素对提取的影响程度依次为 $A > C > B$;其中 A^2, B^2, C^2 具

有显著性差异 ($P < 0.05$)。各因素间的 3D 响应面图结果见图 1。

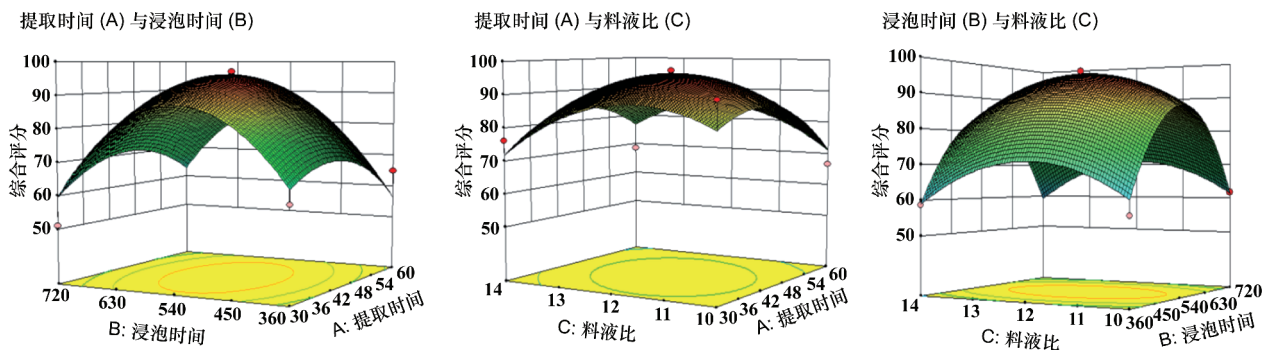


图 1 提取工艺中 A, B, C 各因素对综合评分的响应面图

3.3 验证实验 得到最优工艺为浸泡时间 539.75 min, 料液比 1: 11.86 (v/w), 提取时间 43.69 min。考虑到实验的实际可操作性,最终将结果调整为浸泡时间 540 min, 料液比 1: 12 (v/w), 提取时间 44 min。根据优化出的最佳条件,进行 3 次验证实验,结果见表 5,可知综合得分平均值为 96.65 与预测值 96.11 的相对误差为 0.57%,表明此方法重现性好、工艺稳定。

表 5 验证实验结果

编号	含量/ $\text{mg} \cdot \text{g}^{-1}$		综合评分
	咖啡酸	京尼平苷酸	
1	0.759 1	0.724 7	96.86
2	0.755 5	0.740 5	97.55
3	0.741 3	0.723 8	95.55
平均值	0.752 0	0.729 6	96.65
RSD/%	1.25	1.29	1.05

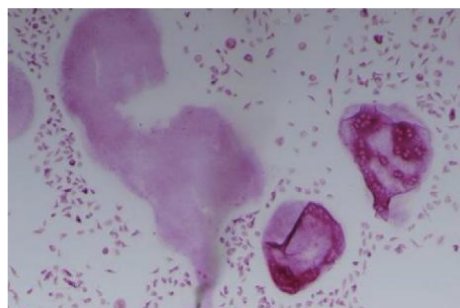
4 提取物破骨细胞抑制作用评价

由图 2 可知,对照组未见明显染色区域,细胞数量少;模型组细胞形态出现散在的大型细胞,且 TRAP 染色阳性,细胞质中可见多核,即破骨细胞分化;而给药 5 d 后,细胞中多为体积较小的单核圆形细胞且 TRAP 染色不明显,说明加味塔布森-2 提取物具有抑制破骨细胞分化的作用。

A 对照组



B 模型组



C 给药组

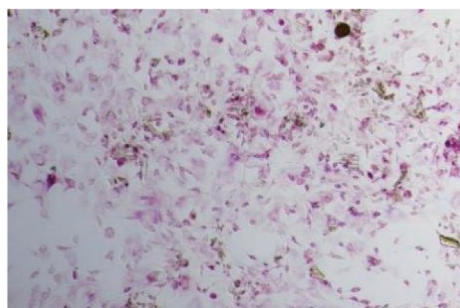


图 2 不同组别 TRAP 染色结果

讨 论

咖啡酸与京尼平苷酸是加味塔布森-2 中抗骨质疏松的主要活性成分,2 种成分均具有促进成骨细胞增殖与分化的功能。其中,咖啡酸不仅可加速骨矿化,上调骨桥蛋白、骨钙蛋白、骨形态发生蛋白,刺激细胞外钙浓度诱导成骨细胞成熟分化,还可以抑制破骨细胞中的骨吸收^[7-9]。可见,咖啡酸通过在成骨细胞和破骨细胞调节的多方面起效,发挥治疗骨质疏松的作用。京尼平苷酸能有效上调钙离子、碱性磷酸酶、巨噬细胞集落因子等水平,发挥促进成骨细胞增殖及成熟分化的作用^[10]。因此,本研究选取咖啡酸与京尼平苷酸作为该方提取工艺优化的指标,能有效体现“工艺-成分-药效”相互间的关联性。

研究中采用的 Box-Behnken 设计-响应面法是通过关键响应值受多个变量影响的问题进行建模和分析,得到最优化的响应值,该方法是数学方法和统计方法结合的产物。其优点在于几种因素间交互作用较为直观,得到的回归方程精度高,且不局限于点对点之间的优化方法,能够将优化过程延伸到面的程度,呈现三维立体效果。响应面法的结果简单明了、说服性强^[11-13]。因此,本研究中采用的工艺优化方法能够充分考虑实验的随机误差,克服单因素实验带来的缺陷,使优化结果更加准确。响应面立体图可直观地反映某一个影响因素固定在中心值的情况下其他任意 2 个因素对指标综合评分的影响。在响应面图中,若响应面坡度越陡峭,说明其响应值越敏感即影响越大。通过观察响应面图中 3 个因素间的交互作用对综合评分的影响,发现 A、B 和 C 的 3D 曲面陡峭,变化较明显,3 种因素对综合评分的影响均是先增后减,主要是由于提取次数的增加有利于物质浸出,进而提高成分含量;而随着料液比的增大,水体积增大的同时使物质更充分溶出,但发现浸泡时间达到一定程度后,并不会一直增加其溶出,还需要借助提取才能使成分更好的扩散浸出。

破骨细胞介导的骨吸收与成骨细胞介导的骨形成失衡是骨质疏松主要发病原因^[14-16]。其中 RANKL 介导的破骨细胞功能失调在绝经后骨质疏松中的关键作用已被证实^[17-19]。因此,抑制过度激活的破骨细胞分化是抗骨质疏松的重要途径,也是药物治疗骨质疏松体外药效评价的重要指标。本研究结果显示,采用 RANKL 诱导的 RAW264.7 细胞

出现大量的 TRAP 染色阳性细胞,即破骨细胞;而给予最佳工艺下制备的提取物后,破骨细胞数目明显减少,提示加味塔布森-2 提取物对 RAW264.7 细胞诱导的破骨细胞分化有一定抑制作用,不仅证实了该提取方法的有效性,同时为进一步研究加味塔布森-2 提取物对骨质疏松的防治作用奠定了基础。

[参 考 文 献]

- [1] 张智海,刘忠厚,石少辉,等. 中国大陆地区以-2.5SD 为诊断的骨质疏松症发病率文献回顾性研究[J]. 中国骨质疏松杂志, 2015, 22(1):1-7.
- [2] LIN X, XIONG D, PENG YQ, et al. Epidemiology and management of osteoporosis in the People's Republic of China: current perspectives[J]. *Clin Interv Aging*, 2015, 25(10):1017-1033.
- [3] 赵军,谢静华. 蒙药塔布森-2 胶囊治疗 PMOP 骨痛临床研究[J]. 中国民族医药杂志, 2019, 25(7):1-3.
- [4] 谢金华,谭泽云,郭元满,等. 蓝红胶囊质量标准控制及含杜仲制剂的 TLC 鉴别方法[J]. 中成药, 2017, 39(3):194-198.
- [5] 刘洋,王子禹,徐文娟,等. 中药生物药剂学分类系统的研究和发展思路探讨[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(17):3637-3644.
- [6] 刘建勋,任建勋,林成仁. 中药复方功效的研究与发展[J]. 中国中药杂志, 2016, 41(6):971-975.
- [7] IBRAHIM HM, DARRAG HM, ALHAJHOJ MR, et al. Biomolecule from *Trigonella stellata* from Saudi Flora to Suppress Osteoporosis via Osteostromal Regulations[J]. *Plants (Basel)*, 2020, 9(11):1610-1612.
- [8] ZHENG J, LU B, XU B. An update on the health benefits promoted by edible flowers and involved mechanisms[J]. *Food Chem*, 2021, 15(340):127940-127946.
- [9] EKEUKU SO, PANG KL, CHIN KY. Effects of Caffeic Acid and Its Derivatives on Bone: A Systematic Review[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 22(15):259-275.
- [10] 兰波. 杜仲抗骨质疏松药效物质基础及机制研究[D]. 贵州:贵阳医学院, 2015.
- [11] 王仁广,贾艾玲,邱智东,等. 响应面法优化黄芩中黄芩苷的电磁裂解提取工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2019, 25(21):114-119.
- [12] 李潮,于欢,温柔,等. 基于 AHP-CRITIC 混合加权法和响应面法的盐车前子炮制工艺优选及其利尿作用考察[J]. 中国实验方剂学杂志, 2020, 26(20):131-138.
- [13] 臧琛,聂其霞,王国华,等. Box-Behnken 设计-响应面法优化铁皮石斛的真空冷冻干燥工艺[J]. 中国实验方剂学杂志, 2018(10):15-20.
- [14] CONG C, TIAN J, GAO T, et al. lncRNA GAS5 Is Upregulated in Osteoporosis and Downregulates miR-21 to Promote Apoptosis of Osteoclasts[J]. *Clin Interv Aging*, 2020, 16(15):1163-1169.
- [15] MATSUMOTO T, ENDO I. RANKL as a target for the treatment of osteoporosis[J]. *J Bone Miner Metab*, 2021, 39(1):91-105.
- [16] 张许,陈文文,刘燕琳,等. 特立帕肽和地舒单抗治疗骨质疏松的 Mini 卫生技术评估[J]. 今日药学, 2022, 32(8):611-617.
- [17] WANG L, HECKMANN BL, YANG X, et al. Osteoblast autophagy in glucocorticoid-induced osteoporosis[J]. *J Cell Physiol*, 2019, 234(4):3207-3215.
- [18] IMANGALI N, PHAN QT, MAHADY G, et al. The dietary anthocyanin delphinidin prevents bone resorption by inhibiting Rankl-induced differentiation of osteoclasts in a medaka (*Oryzias latipes*) model of osteoporosis[J]. *J Fish Biol*, 2020, 10(3):14317.
- [19] 王蔚陆,陈建新,朱姜,等. 补肾脂素治疗骨关节炎网络药理学预测及实验验证[J]. 世界中医药, 2023, 18(15):2103-2109, 2120.

编辑:刘卓越/接受日期:2023-06-27