

网络药理学和斑马鱼模型在中药药效物质及作用机制研究中的应用进展

刘可春,王勇澄,臧晓涵,夏青,张云,张姗姗,孙晨

(齐鲁工业大学(山东省科学院)山东省科学院生物研究所 山东省人类疾病斑马鱼模型与药物筛选工程技术研究中心,山东 济南 250014)

摘要:网络药理学高度契合中药多成分、多靶点的整体观和系统论思想,在中药现代化过程中迅速发展。实验验证是网络药理学的关键研究内容之一。斑马鱼模型具有完整的药物代谢系统、复杂的体内环境和靶点、通路调控机制,且利用该模型开展实验具有用量少、高通量、周期短等优势。近年来,网络药理学预测结合斑马鱼模型实验验证的研究模式,在阐明中药药效物质及作用机制方面得到广泛应用。本文对网络药理学和斑马鱼模型综合应用的进展及发展趋势进行综述,以期该方法在阐明中药功效现代科学内涵中的应用提供参考。

关键词:网络药理学;斑马鱼;中药;药效物质;机制;质量标志物

中图分类号:R285.5 文献标志码:A 文章编号:1002-4026(2024)02-0029-07

开放科学(资源服务)标志码(OSID):



Advancements in network pharmacology and zebrafish modeling for studying traditional Chinese medicine's effective substances and mechanisms of action

LIU Kechun, WANG Yongcheng, ZANG Xiaohan, XIA Qing,
ZHANG Yun, ZHANG Shanshan, SUN Chen

(Engineering Research Center of Zebrafish Model for Human Diseases and Drug Screening of Shandong Province, Biology Institute,
Qilu University of Technology (Shandong Academy of Sciences), Jinan 250014, China)

Abstract: Network pharmacology, which is highly consistent with the holistic and systematic perspectives of traditional Chinese medicine (TCM) with its multiple components and targets, has rapidly developed in the modernization of TCM. Experimental verification is one of the key contents of network pharmacology research. The zebrafish model has a complete

收稿日期:2024-01-20

基金项目:山东省重点研发计划(重大科技创新工程)(2021CXGC10507,2022CXGC020515);山东省中央引导地方科技发展资金项目(YDZX2022164)

作者简介:刘可春(1964—),男,博士,研究员,研究方向为药物筛选、药物早期成药性评价及新产品研发。E-mail:liukechun2000@163.com,

Tel:15020009568

system of drug metabolism, as well as a complex in vivo environment and target and pathway regulation mechanisms. Experiments that utilize this model have the advantages of low drug dosage, high throughput, and short cycle time. In recent years, the research mode that combines network pharmacology prediction with experimental validation using the zebrafish model has been widely applied to elucidate the effective substances and mechanisms of action of TCM. This study reviews the progress and development trends in the comprehensive application of network pharmacology and zebrafish modeling, aiming to provide a reference for their application in elucidating the modern scientific implications of the efficacy of TCM.

Key words : network pharmacology; zebrafish; traditional Chinese medicine; effective substances; mechanism; quality markers

中医药是中华民族与疾病斗争的智慧结晶,具有一套独特的科学思想和理论体系。自中药现代化以来,我国中药产业快速发展,达到万亿规模,且仍具有巨大潜力^[1]。但是,大多数中药药效物质不清、作用机制不明,严重制约中药产业高质量发展^[2]。近二十年,针对这一瓶颈问题,我国学者引入多种现代先进技术,创新性地建立了一系列具有中医药特色的研究思路和方法^[3-6]。网络药理学(network pharmacology)是以系统生物学和多向药理学为理论基础的学科,通过构建网络分析中药-成分-靶点-病证之间的关系,解析疾病与中药相关的生物网络,发掘疾病复杂生物系统与中药复杂化学体系的内在网络关联,高度契合中药多成分、多靶点整体调节的作用特点^[7]。目前,网络药理学已广泛应用于发现中药关键靶点、挖掘中药功效物质、解析中药成分协同作用和方剂调节机制等。

利用网络药理学研究中药药效物质及作用机制的基本思路是首先构建中药成分及疾病靶点库,利用蛋白互作分析建立生物分子网络;再开展生物信息学分析,进行 GO 分类富集和 KEGG 通路富集;最后进行实验验证。虽然利用网络药理学方法能够从海量的数据中快速获取中药关键化学成分和靶点信息,但对关键信息的实验验证仍工作量巨大。近年来,网络药理学与斑马鱼等高通量评价模型的联合应用已成为热点研究内容之一。斑马鱼与人类基因的同源性高达 87%,利用该模型开展实验验证具有用量量少、准确率高、实验周期短、透明易观察、成本低、整体性等优势^[8]。本文综述了网络药理学预测联合斑马鱼实验验证在中药药效物质、作用机制、质量标志物、炮制机理等研究中的应用进展,旨在为阐明中药功效现代科学内涵提供技术参考。

1 网络药理学联合斑马鱼模型在中药药效物质研究中的应用

中药发挥药效必有其物质基础。但是,中药具有多成分、多靶点、多途径的特点,其化学成分体系极其复杂,为解析药效物质带来极大挑战^[9]。网络药理学的整体性、系统性和注重药物间相互作用的特点与中医药学的基本特点相吻合,符合中医药对疾病本质的认识^[10]。建立中药有效成分库是开展网络药理学研究的首要步骤,也是利用网络药理学方法解析中药药效物质直接作用和协同起效的关键。目前,通常采用数据库检索或液质联用技术鉴定两种方式建立中药有效成分库,根据网络药理学预测结果,利用斑马鱼模型进行活性验证(图 1)。

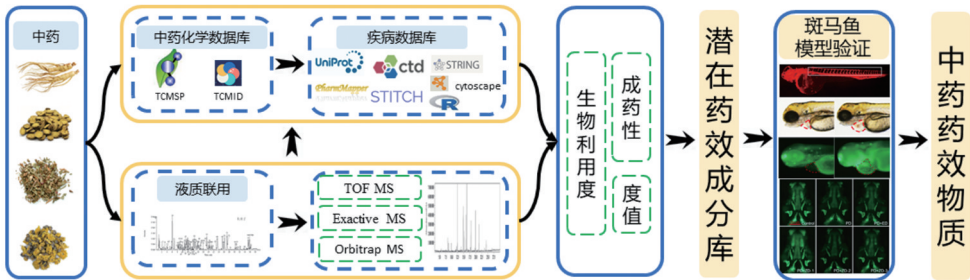


图 1 网络药理学联合斑马鱼模型在中药药效物质研究中的应用示例图

Fig.1 Application of network pharmacology combined with zebrafish model in the study of effective substances of traditional Chinese medicine

1.1 利用数据库检索建立中药有效成分库

随着研究数据的不断积累,中药数据库发挥着越来越重要的作用。多数常用中药均已采用传统分离或液质鉴定的方法从不同程度上解析了其化学成分组成,并收录在 TCMSP (traditional Chinese medicine systems pharmacology database)、TCMIP (中医药整合药理学研究平台, integrative pharmacology-based research platform of traditional Chinese medicine)、ETCM (the encyclopedia of traditional Chinese medicine)、TCMSID (traditional Chinese medicine simplified integrated database)、CHEM-TCM 等数据库中。除了化合物名称,上述数据库还提供了化合物的分子量 (MW)、口服生物利用度 (OB)、类药性 (DL)、血脑屏障渗透性 (BBB)、肠上皮渗透性 (Caco-2)、Alog *P*、负表面积 (FASA-) 和氢键供体/受体 (Hdon / Hacc) 等信息,为利用网络药理学研究中药及复方提供了重要的潜在有效成分信息。

在网络药理学实验中,通常以 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 1.8$ 为条件从上述数据库中筛选化合物建立潜在有效成分库,构建成分-靶点-疾病网络,根据成分与靶点的连接度值,筛选在网络中具有重要调节作用的化合物,进一步利用斑马鱼模型验证其活性。Zhong 等^[11]利用该方法从 TCMSP 中筛选了中药复方二至丸中的 162 个化合物,其中以 72 个成分构建了成分-靶点-疾病网络,发现槲皮苷、烟碱、苓黄素等度值排名前 15 的化合物在网络中具有重要调节作用,分别利用硬骨荧光标记的转基因斑马鱼和茜素红染色野生型斑马鱼两种方法验证了槲皮苷能够显著提升斑马鱼骨密度。Fu 等^[12]采用同样的方法,通过网络预测结合斑马鱼模型,验证了从巴戟天筛选出两种蒽醌、一种环烯醚萜和两种多糖具有抗骨质疏松活性。Liu 等^[13]首先利用斑马鱼模型证实了鱼腥草提取物的胚胎毒性,进而从 TCMSP 数据库中搜集到鱼腥草可能含有的 189 个成分,其中 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 1.8$ 的有 51 个化合物,网络分析显示毒性成分可能为齐墩果酸、木酚素和马兜铃内酰胺 AII。Xue 等^[14]以 $OB \geq 30\%$ 和 $DL \geq 1.8$ 为筛选条件,从 TCMSP 数据库中仅得到 7 种化合物,作者通过查阅文献补充了 12 种潜在的活性成分,共以 19 种成分建立了成分-靶点-疾病网络,根据度值发现油酸等 6 个化合物是活性最高的化合物,并用斑马鱼模型验证了二氢槲皮素、丁香酚、油酸和肉桂醛抗心肌缺血再灌注损伤活性。Li 等^[15]综合网络药理学和骨质疏松、阿尔茨海默病 2 种斑马鱼模型从肉苁蓉中筛选到 22 个治疗骨质疏松症和阿尔茨海默病的双药效成分,为筛选中药中的多效化合物提供了技术参考。

可以看出,TCMSP 是构建潜在有效成分库常用的数据库,该数据库包含 500 多种常用中药,3 万多种化学成分及其药物代谢动力学、药物化学、药物对应靶点信息,提供了化合物的 12 项性质参数,还包括其在各种数据中的 ID 号,以方便数据库间查找,同时还提供了对应的靶点、关联的疾病及中药来源。此外还有 TCMID 平台,提供了较为详细的化合物性质,特别是核磁参数,但对靶点信息及来源重要信息提供较少,该数据库主要针对分子化合物的对接及化学结构对蛋白结合的影响等^[16]。上述数据库为快速获取中药潜在药效成分提供了便利条件,但是数据库更新相对较滞后,对一些化学成分尚不十分明确的中药适用性较差^[17]。

1.2 利用液质联用技术建立中药有效成分库

液质联用技术已广泛应用于快速获取中药化学成分信息,并可通过多重反应监测技术、峰面积归一化法等实现快速定量分析。在开展网络药理学研究时,通常以中药全成分或含量排名靠前的化合物为基础,依据 OB 值和 DL 值筛选化合物建立成分-靶点-疾病网络,根据度值排序筛选潜在药效化合物,并进一步利用斑马鱼模型验证化合物活性。Zhou 等^[18]首先利用 2 种斑马鱼模型证实普尔纳具有明显的抗炎作用,然后采用液质联用 (LC-MS) 结合广泛靶向代谢组学方法,从普尔纳中鉴定了 185 个成分,以相对含量大约 1% 的 20 个化合物开展了网络药理学,根据网络分析获得了 3,7-di-O-methylquercetin 等排名前 10 的化合物,最后利用斑马鱼模型验证了其中 6 个化合物具有显著抗炎活性。Yang 等^[19]利用 HPLC-Q-TOF-MS (高效液相色谱-四级杆-反行时间高分辨质谱) 从茯神中鉴定了 36 个化合物,利用氯化钡诱导的斑马鱼心律失常发现茯神可以改善心脏充血、缩短 SV-BA (静脉窦与动脉球) 距离、缓解心肌细胞凋亡,结合网络药理学筛选出茯苓酸、齐墩果酸等 11 种抗心律失常活性成分。Zhang 等^[20]采用液质联用结合数据库检索,从当归-川芎药对中选取 24 个潜在活性成分建立了

成分-靶点-疾病网络,利用斑马鱼证实当归-川芎药对具有抗血栓、抗炎、抗氧化和促血管生成作用,并进一步发现欧当归内酯 A 为主要抗血栓活性成分,咖啡酸和阿魏酸为主要抗炎活性成分,阿魏酸、*cis*-ligustilide 欧当归内酯 A 为主要抗氧化活性成分,阿魏酸是主要的促血管生成活性成分。相比于利用数据库检索建立潜在有效成分数据库,液质联用技术能够更真实地反映中药或复方中含有的化合物,从而能够更准确地开展网络药理学研究。入血成分是最直接的药效物质。但是,入血成分通常较难获得实体化合物。随着分离技术的进步,结合斑马鱼实验,未来有望从体内角度建立更真实体内调控网络,并实现体内直接药效物质的活性验证。

2 网络药理学联合斑马鱼模型在中药作用机制研究中的应用

阐明作用机制是理解中药药效现代科学内涵的关键内容。网络药理学结合斑马鱼模型研究中药作用机制的思路主要是通过网络药理学预测中药作用靶点及信号通路,利用斑马鱼模型结合实时荧光定量 PCR (RT-qPCR)、Western blot、组学等技术验证其作用机制(图 2)。Wang 等^[21]利用网络药理学预测出六味地黄丸抗白癜风的潜在作用靶点和信号通路之后,利用斑马鱼模型发现六味地黄丸升高过氧化氢酶(CAT)和超氧化物歧化酶(SOD)水平,降低活性氧自由基(ROS)和丙二醛(MDA)含量,结合 Western blot 技术发现六味地黄丸提高了黑色素生成相关蛋白质的表达水平,结合 RT-qPCR 技术发现六味地黄丸可以上调 *Nrf2* 和 *HO-1* 基因表达水平,认为六味地黄丸通过调节氧化应激因子和 *Nrf2*/*HO-1* 信号通路发挥抗白癜风作用。Liu 等^[22]通过网络药理学预测出清风藤及其生物碱可能通过靶向 MAPK14、CASP3、CXCL8、IL-1 β 、IL6、PTGS2、TNF- α 、ESR1 和 MMP9 等靶点,调节 TNF、PI3K-Akt、T 细胞受体、破骨细胞分化等信号通路发挥抗骨质疏松活性,进一步结合 qRT-PCR 技术检测斑马鱼中这些关键靶点的 mRNA 表达水平,验证了网络药理学推测出的作用机制。

另有学者通过网络药理学预测出中药作用靶点,并进一步利用抑制剂或激动剂等处理斑马鱼,从而验证中药作用机制。例如,Hu 等^[23]通过网络药理学发现复方丹参滴丸通过调节 VEGF/VEGFR 和 PI3K/AKT 通路治疗冠心病,利用斑马鱼模型验证了复方丹参滴丸的促血管生成活性,并发现复方丹参滴丸缓解了 VEGF 受体抑制剂造成的斑马鱼血管损伤,PI3K 和 AKT 抑制剂降低了复方丹参滴丸在斑马鱼中的促血管生成作用,认为复方丹参滴丸可能通过调节 VEGF/VEGFR 和 PI3K/AKT 信号通路发挥促血管生成作用。Chen 等^[24]利用网络药理学预测出真武汤对心肌的保护作用与 sGC-cGMP-PKG 信号通路的激活有关,利用斑马鱼模型发现能阻断该信号通路的 sGC 抑制剂可以使真武汤的心肌保护作用消失。斑马鱼体外发育,发育迅速,且斑马鱼基因编辑手段较成熟。今后有望通过斑马鱼靶基因敲除、敲降、过表达等手段更加深入地验证网络药理学预测的靶点及分子机制。

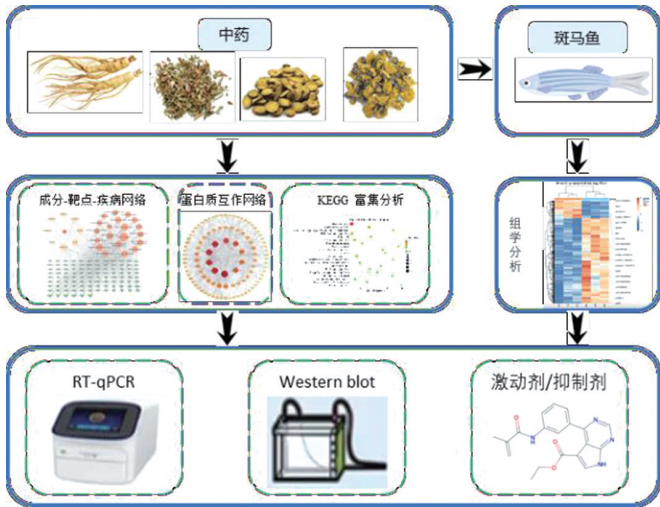


图 2 网络药理学联合斑马鱼模型在中药作用机制研究中的应用示例图

Fig.2 Application of network pharmacology combined with zebrafish model in the study of the mechanism of action of TCM

3 网络药理学联合斑马鱼模型在中药质量标志物研究中的应用

中药质量是中药临床疗效的保障,是中药产业发展的生命线^[25]。影响中药质量的因素极其复杂,品种、生长环境、采收运输、用药部位、炮制方式和配伍等因素会导致中药药效差异^[26]。刘昌孝院士提出“质量标志物”的概念,其核心理念是反映中药治疗疾病本质特征,建立中药专属的质量评价标准^[3]。中药质量标志物确认的核心原则为有效、特有、传递与溯源、可测和处方配伍“五要素”。基于网络药理学识别中药质量标志物的研究策略主要是构建可视化候选质量标志物网络,通过中药成分、靶点和通路之间的网络关系为中药质量标志物的挖掘和分析提供依据^[27]。罗林等^[28]通过 UPLC-Q-TOF-MS 和网络药理学技术确定了驱虫斑鸠菊注射液抗白癜风的药效物质,优选出芹菜素、金圣草黄素、丁香脂素和紫柳花素等质量标志物,利用斑马鱼模型发现驱虫斑鸠菊注射液毒性低,能增强酪氨酸酶活性,促进黑色素生成,从而发挥抗白癜风的作用。Wei 等^[29]建立了心可舒片 HPLC 指纹图谱与斑马鱼心率恢复率的谱效关系模型,确定了丹参素、丹酚酸 B、丹酚酸 A、葛根素和大豆苷元为心可舒片抗心律失常的质量标志物。Dong 等^[30]利用基于 UHPLC-QE-Orbitrap-MS(超高效液相色谱-四级杆-静电场轨道阱高分辨质谱法)的非靶向代谢组学筛选出西洋参抗心力衰竭的潜在药效物质,构建斑马鱼心力衰竭模型验证西洋参潜在药效物质的活性,通过网络药理学和分子对接技术预测了西洋参抗心力衰竭的作用机制,最后利用 RT-qPCR 技术在斑马鱼中验证西洋参潜在药效物质关键靶点的基因表达水平,发现苹果酸、奎宁酸、人参皂苷 Rg3、人参皂苷 Rg5、人参皂苷 Rg6 和拟人参皂苷 F11 是西洋参抗心力衰竭的质量标志物。Shi 等^[31]采用 HPLC-Q-TOF-MS 检测栀子中的化合物,通过代谢组学和灰色关联度分析鉴定了栀子抗血栓活性的关键化合物,然后利用斑马鱼对这些化合物进行了抗血栓活性评价,最后利用网络药理学探索这些化合物的靶点和信号通路,发现京尼平苷、柠檬酸和奎宁酸是栀子发挥抗血栓作用的质量标志物。在中药质量标志物研究中,可以利用网络药理学筛选中药潜在药效物质以及预测作用靶点与信号通路,并用斑马鱼模型验证。

4 网络药理学联合斑马鱼模型在中药炮制的应用

中药多源于自然界的植物、动物、矿物,药用部位含有一定的药用部分,但也常带有一些非药用部分影响疗效,并且不同药用部位药效有异。而原药材在发挥治疗作用的同时,也可能出现一些不良反应,这就需要通过炮制调整药性,增利除弊,减毒增效,以满足临床治疗要求^[32]。网络药理学结合斑马鱼模型的研究模式为解决中药炮制增效减毒机理提供了帮助。例如,肖建鹏^[33]通过不同批次的女贞子、酒女贞子的 HPLC 指纹图谱发现女贞子酒制后所含化学成分的种类和含量均发生了变化,采用 UPLC-Q-Orbitrap-MS 技术定性分析女贞子酒蒸前后含有的化学成分,发现红景天苷、羟基酪醇、酪醇和齐墩果酸等 20 个化合物与女贞子酒蒸相关,通过网络药理学和分子对接预测出酒女贞子主要通过调节 TGF-beta 信号通路治疗铁超载骨质疏松,并用斑马鱼模型发现酒女贞子治疗铁超载骨质疏松作用强于女贞子,证实了酒蒸炮制具有增效的作用。

5 讨论与展望

网络药理学从复杂生物网络的角度阐释中药-成分-靶点-病证之间的关系,与中医药整体观、系统论思想不谋而合^[34]。斑马鱼模型具有完整的药物代谢系统、复杂的体内环境和靶点、通路调控机制,且利用该模型开展实验具有用药量少、高通量、周期短等优势。近年来,网络药理学预测结合斑马鱼模型实验验证的研究模式,在阐明中药药效物质及作用机制方面得到广泛应用,高效地阐明了一系列中药、复方等的关键活性成分,以及其调控的作用靶点和信号通路,促进了中药的现代化发展。但是,在二者的联合应用中,斑马鱼实验通常仅用于潜在药效成分的活性评价,以及 PPI 网络分析或信号通路中关键靶点编码基因表达水平的检测。随着人工智能、多组学及基因编辑等技术的快速发展,网络药理学预测和斑马鱼模型实验验证有望进一步深度结合。

中药成分和疾病潜在靶点的准确性,是决定网络药理学实验结果可信性的关键内容。目前,网络药理学方法严重依赖数据库,通常采用 TC MSP 等数据库预测中药成分靶点,从 GeneCards 等数据库中搜寻疾病靶点。然而,不同数据库中的靶点信息存在较大的差别。转录组、代谢组、蛋白组等组学技术已成熟应用于斑马鱼模型。可以利用组学技术寻找中药干预斑马鱼疾病模型前后的差异基因、蛋白和代谢物,建立中药干预疾病过程中切实调控的靶点库,用于网络药理学研究。然而,如何建立中药成分与真实调控靶点之间的关联性,是该方法需要解决的关键问题。随着分子对接和人工智能的发展,通过大数据分析和深度学习,构建不同特征化学结构与疾病靶点相结合的预测模型,建立中药化学成分与体内真实调控靶点的相关性,能够大幅提升网络药理学预测结果的准确性。此外,斑马鱼体型小、胚胎发育快速,综合运用基因编辑、转基因、基因沉默、小 RNA 定向干扰等遗传学手段,建立与关键靶点基因相关的转基因、过表达、敲降等斑马鱼,深度验证作用机制,并结合表型组学-活体荧光表征-超微结构智能扫描等综合策略,验证关键药效成分对靶点及下游信号通路的调控作用。

总之,网络药理学和斑马鱼模型在中药药效物质及作用机制研究中已得到广泛应用,且具有进一步深度结合的潜力。通过与人工智能、多组学及基因编辑等技术的交叉融合,有望助力阐明中药功效现代科学内涵,促进产业高质量发展。

参考文献:

- [1]李天斯. 新医改背景下 YD 制药集团营销策略研究[D]. 北京:北京建筑大学, 2020.
- [2]马飞. 中药标准化融通国际资源链[N]. 医药经济报, 2023-07-24(1).
- [3]刘昌孝,陈士林,肖小河,等. 中药质量标志物(Q-Marker):中药产品质量控制的新概念[J]. 中草药, 2016, 47(9): 1443-1457. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2016.09.001.
- [4]蔡少青,王璇,尚明英,等. 中药“显效理论”或有助于阐释并弘扬中药特色优势[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(17): 3435-3443. DOI: 10.4268/cjcm20151720.
- [5]曾克武,姜勇,王晶,等. 中药化学生物学:“中药化学”与“生物学”交叉形成的新兴学科[J]. 中国中药杂志, 2019, 44(5): 849-860. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20190222.011.
- [6]王喜军. 中药药效物质基础研究的系统方法学:中医方证代谢组学[J]. 中国中药杂志, 2015, 40(1): 13-17. DOI: 10.4268/cjcm20150103.
- [7]肖沐紫,王思齐,贾壮壮,等. 基于网络药理学及实验验证探讨补肾定眩汤治疗高血压的作用机制[J]. 中国疗养医学, 2024, 33(2): 25-31. DOI:10.13517/j.cnki.ccm.2024.02.005.
- [8]王成金,吕琳,张玉琳,等. 斑马鱼中高通量毒性测试方法研究进展和应用现状[J]. 生态毒理学报, 2023, 18(6): 60-67.
- [9]李蕙质,周小玲,杨玉杰,等. 数据挖掘算法在中药方剂研究中的应用现状[J]. 中国药房, 2024, 35(1): 112-118.
- [10]刘志华,孙晓波.网络药理学:中医药现代化的新机遇[J].药学报,2017,47(6):696-703.DOI:10.16438/j.0513-4870.2012.06.001.
- [11]ZHONG Z G, LI Y Y, CHEN Y, et al. Predicting and exploring the mechanisms of erzhi pill in prevention and treatment of osteoporosis based on network pharmacology and zebrafish experiments[J]. Drug Design, Development and Therapy, 2021, 15: 817-827. DOI: 10.2147/DDDT.S293455.
- [12]FU S Q, WANG Z Y, JIANG Z M, et al. Integration of zebrafish model and network pharmacology to explore possible action mechanisms of *Morinda officinalis* for treating osteoporosis[J]. Chemistry & Biodiversity, 2020, 17(5): e2000056. DOI: 10.1002/cbdv.202000056.
- [13]LIU Y F, YANG G D, YANG C Q, et al. The mechanism of *Houttuynia cordata* embryotoxicity was explored in combination with an experimental model and network pharmacology[J]. Toxins, 2023, 15(1): 73. DOI: 10.3390/toxins15010073.
- [14]XUE T, XUE Y, FANG Y Y, et al. Exploring myocardial ischemia-reperfusion injury mechanism of cinnamon by network pharmacology, molecular docking, and experiment validation[J]. Computational and Mathematical Methods in Medicine, 2023, 2023: 1066057. DOI: 10.1155/2023/1066057.

- [15] LI Y Q, CHEN Y, FANG J Y, et al. Integrated network pharmacology and zebrafish model to investigate dual-effects components of *Cistanche tubulosa* for treating both Osteoporosis and Alzheimer's Disease[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 254: 112764. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112764.
- [16] ALEJANDRO P, CONSTANTINESCU F. A review of osteoporosis in the older adult: An update[J]. Rheumatic Diseases Clinics of North America, 2018, 44(3): 437-451. DOI: 10.1016/j.rdc.2018.03.004.
- [17] 宋阔魁, 毕天, 展晓日, 等. 网络药理学指导下的中药有效成分发现策略[J]. 世界科学技术-中医药现代化, 2014, 16(1): 27-31.
- [18] ZHOU C Y, CHEN J, ZHANG H Z, et al. Investigation of the chemical profile and anti-inflammatory mechanisms of flavonoids from *Artemisia vestita* Wall. ex Besser via targeted metabolomics, zebrafish model, and network pharmacology[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 302:115932. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115932.
- [19] YANG N J, LIU Y R, TANG Z S, et al. *Poria cum Radix pinirescues* Barium chloride-induced arrhythmia by regulating the cGMP-PKG signalling pathway involving ADORA1 in zebrafish[J]. Frontiers in Pharmacology, 2021, 12: 688746. DOI: 10.3389/fphar.2021.688746.
- [20] ZHANG M Q, LI P H, ZHANG S S, et al. Study on the mechanism of the Danggui-Chuanxiong herb pair on treating thrombus through network pharmacology and zebrafish models[J]. ACS Omega, 2021, 6(22): 14677-14691. DOI: 10.1021/acsomega.1c01847.
- [21] WANG D D, YANG Y, HENGERJIA G, et al. Exploring the mechanism of LiuweiDihuang formula for promoting melanin synthesis in juvenile zebrafish based on network pharmacology and molecular docking[J]. Heliyon, 2023, 9(11): e21744. DOI: 10.1016/j.heliyon.2023.e21744.
- [22] LIU W J, JIANG Z M, CHEN Y, et al. Network pharmacology approach to elucidate possible action mechanisms of *Sinomenii Caulis* for treating osteoporosis[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 257: 112871. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112871.
- [23] HU Y X, YOU H M, REN C Z, et al. Proangiogenesis effects of compound Danshendripping pills in zebrafish[J]. BMC Complementary Medicine and Therapies, 2022, 22(1): 112. DOI: 10.1186/s12906-022-03589-y.
- [24] CHEN L Q, ZHOU X H, DENG Y J, et al. Zhenwu decoction ameliorates cardiac hypertrophy through activating sGC (soluble guanylate cyclase)-cGMP (cyclic guanosine monophosphate)-PKG (protein kinase G) pathway[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2023, 300: 115705. DOI: 10.1016/j.jep.2022.115705.
- [25] 张铁军, 白钢, 刘昌孝. 中药质量标志物的概念、核心理论与研究方法[J]. 药学报, 2019, 54(2): 187-196. DOI: 10.16438/j.0513-4870.2018-0912.
- [26] 刘昌孝. 基于中药质量标志物的中药质量追溯系统建设[J]. 中草药, 2017, 48(18): 3669-3676. DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2017.18.001.
- [27] 唐加龙, 周莉, 孙祖越, 等. 网络药理学在中医药治疗自身免疫性疾病中的应用[J]. 中国药理学通报, 2021, 37(3): 323-327. DOI: 10.3969/j.issn.1001-1978.2021.03.006.
- [28] 罗林, 张晏源, 王程, 等. 基于 UPLC-Q-TOF-MS 联合网络药理学探讨驱虫斑鸠菊注射液诱导黑色素积累的作用机制[J]. 中国中药杂志, 2023, 48(6): 1606-1619. DOI: 10.19540/j.cnki.cjcm.20221201.703.
- [29] WEI Y H, NIE L, GAO L L, et al. An integrated strategy to identify and quantify the quality markers of Xinkeshu Tablets based on spectrum-effect relationship, network pharmacology, plasma pharmacochimistry, and pharmacodynamics of zebrafish[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 899038. DOI: 10.3389/fphar.2022.899038.
- [30] DONG R, ZHANG Y G, CHEN S J, et al. Identification of key pharmacodynamic markers of American ginseng against heart failure based on metabolomics and zebrafish model[J]. Frontiers in Pharmacology, 2022, 13: 909084. DOI: 10.3389/fphar.2022.909084.
- [31] SHI Y P, ZHANG Y G, LI H N, et al. Discovery and identification of antithrombotic chemical markers in *Gardenia Fructus* by herbal metabolomics and zebrafish model[J]. Journal of Ethnopharmacology, 2020, 253: 112679. DOI: 10.1016/j.jep.2020.112679.
- [32] 吕维红. 中药炮制与临床疗效的关系[J]. 中国城乡企业卫生, 2006, 21(1): 61-63. DOI: 10.3969/j.issn.1003-5052.2006.01.041.
- [33] 肖建鹏. 基于网络药理学和 PK-PD 结合模型阐释酒女贞子抗骨质疏松增效机理[D]. 镇江: 江苏大学, 2022.
- [34] 陈春妮. 基于代谢组学和网络药理学技术探讨黄芩总黄酮改善阿尔茨海默症的作用机制[D]. 太原: 山西大学, 2023.