

衰老与骨质疏松靶基因及小分子筛选的基因组分析

马丹^{1,2)}, 张亚娟^{1,2)}, 马彬斌³⁾, 岳乔宁⁴⁾, 刘建平²⁾

(1)大理大学公共卫生学院, 云南大理 671000; 2)玉溪市人民医院科研管理部;

3)急诊外科; 4)骨外三科, 云南玉溪 653100)

[摘要] **目的** 利用公共数据库中的数据探索衰老与骨质疏松的共同靶基因, 筛选有潜在治疗作用的小分子化合物。**方法** 从公共基因表达数据库 (gene expression omnibus, GEO) 中下载骨质疏松数据集 GSE56814 和 GSE56815 并合并, 从 Genecard 数据库和 Cell age 数据库中选取衰老基因并合并, 使用 R 软件对数据进行清洗, 筛选出差异基因, 制作火山图, 进行加权基因共表达筛选出关键模块和基因以及使用机器学习方法筛选靶基因, 利用微生物平台绘制韦恩图, Cytoscape 软件进行蛋白互作结果可视化, 使用 STRING 数据库进行差异编码蛋白的相互作用分析, 利用 Cmap 数据库进行小分子化合物的预测。绘制受试者工作特征曲线, 找出最有意义的靶基因, 在此基础上建立逻辑回归模型并绘制列线图。**结果** 使用 limma 包共筛选出 127 个差异基因。对差异基因进行加权基因共表达网络分析, 筛选出 103 个高表达基因。采用拉索回归、支持向量机和随机森林模型 3 种机器学习方法, 最终获得 4 个靶基因: FOXO3、HIRA、CBX5、RAD1。列线图和校准曲线显示出良好的预测效果。使用 Cmap 数据库筛选出有潜在治疗作用的 5 种小分子化合物: 樱黄素 (O-甲基化异黄酮)、XMD-885、杠柳次苷、依维莫司和 XMD-1150。**结论** FOXO3、HIRA 基因目前已证实是衰老和骨质疏松共同的靶基因, 樱黄素对衰老和骨质疏松有潜在治疗作用。

[关键词] 衰老; 骨质疏松; 靶基因; 小分子化合物; 基因组分析

[中图分类号] R681 **[文献标志码]** A **[文章编号]** 2095 - 610X(2025)02 - 0141 - 10

Genomic Analysis of Cellular Senescence and Osteoporosis Target Genes and Small Molecule Screening

MA Dan^{1,2)}, ZHANG Yajuan^{1,2)}, MA Binbin³⁾, YUE Qiaoning⁴⁾, LIU Jianping²⁾

(1) School of Public Health, Dali University, Dali Yunnan 671000; 2) Research Management

Department; Yuxi People's Hospital; 3) Emergency Surgery; 4) Department of Orthopaedics

Surgery, Yuxi People's Hospital, Yuxi Yunnan 653100, China)

[Abstract] **Objective** To explore common target genes related to aging and osteoporosis using data from public databases and to screen for small molecule compounds with potential therapeutic effects. **Methods** Osteoporosis datasets GSE56814 and GSE56815 were downloaded and merged from the public gene expression database (Gene Expression Omnibus (GEO)). Senescent genes were selected and merged from the genecard database and the cell age database. Data cleaning and differential gene selection were performed using R software, and a volcano plot was created. Weighted gene co-expression network analysis was performed to screen out key modules and genes, and the machine learning methods were employed to screen target genes. A Venn diagram was drawn using the the Microbioinformatics platform, and cytoscape software was used to visualise protein interactions results. Interaction analysis of differentially encoded proteins was carried out using the STRING database, and prediction of small molecule compounds was carried out using Cmap database. Finally, Receiver operating characteristic (ROC) curves were plotted to find out the most meaningful target genes, followed by the establishment

[收稿日期] 2024 - 08 - 20

[基金项目] 云南省卫健委医学后备人才培养计划项目(H-2019049)

[作者简介] 马丹(2000~), 女, 云南宣威人, 在读硕士研究生, 主要从事骨质疏松的流行病与卫生统计学研究工作。

[通信作者] 刘建平, E-mail: liujianping789123@163.com

of a logistic regression model and the creation of a nomogram. **Results** A total of 127 differential genes were screened using the limma package. Weighted gene co-expression network analysis was performed on the differential genes and 103 highly expressed genes were screened. Three machine learning methods, lasso regression, support vector machine and random forest model, were used to finally obtain four target genes: FOXO3, HIRA, CBX5 and RAD1. The nomogram and calibration curves showed good predictive results. Five small molecule compounds with potential therapeutic effects were identified using the Cmap database: sakuraflavin (O-methylated isoflavone), XMD-885, kangaroo hyoscyamine, everolimus and XMD-1150. **Conclusion** FOXO3 and HIRA genes have now been confirmed to be the common target genes for aging and osteoporosis, and sakuraflavin has potential therapeutic effects on both conditions.

[**Key words**] Cellular senescence; Osteoporosis; Target genes; Small molecule compounds; Genomic analysis

衰老 (Cellular senescence) 是一个普遍且不可避免的生理衰退过程, 随着人口老龄化程度加剧, 衰老及相关疾病成为全球亟待解决的重大难题^[1]。中国在 20 世纪也进入老龄化社会, 根据 2020 年全国第七次人口普查和 2022 年国家统计局公布的数据, 我国 60 岁及以上人口占比分别为 18.70%、19.8%, 人口老龄化的后果是衰老相关疾病骤增^[2-3]。研究^[4-5]表明, 衰老与多种疾病的发生密切相关, 包括心血管疾病、神经退行性疾病、癌症、糖尿病和骨质疏松症等。这些疾病被称为年龄相关疾病, 其共同特点是随年龄增长发病率显著增加。在衰老过程中, 基因组稳定性、端粒长度、表观遗传状态和蛋白质稳态都会发生显著变化, 这些变化不仅影响细胞的正常功能, 还促进了多种疾病的发生和发展^[6]。慢性低度的系统性炎症 (即炎症性衰老) 与多种年龄相关疾病密切相关, 包括动脉粥样硬化、阿尔茨海默病和骨质疏松症等^[7]。此外, 细胞衰老、线粒体功能障碍和氧化应激等过程也在衰老中发挥关键作用^[8]。深入研究衰老的分子机制有助于开发新的治疗策略, 从而延缓衰老过程, 预防和治疗年龄相关疾病, 提高老年人的生活质量和寿命。

骨质疏松症是一种常见的代谢性骨病且与年龄相关, 其特征是骨量减少和骨微结构退化, 导致脆性增加和骨折风险升高^[9-10]。骨质疏松症的分子机制主要包括骨吸收与骨形成的不平衡, 即破骨细胞介导的骨吸收超过成骨细胞介导的骨形成。这种不平衡的主要原因包括雌激素缺乏、炎症、氧化应激、细胞衰老和表观遗传因素^[11]。这些因素共同促进了骨质疏松症的发生发展, 导致骨密度和骨质量的下降^[12]。研究表明, 微小 RNA (miRNA)、氧化应激和炎症在骨质疏松症的发展中发挥了关键作用, 通过调控基因表达和细胞信号传导途径影响骨代谢^[13]。此外, 肠道微生物

群和免疫系统的相互作用也被认为在骨质疏松症中具有重要作用, 通过调节骨代谢和免疫反应影响疾病进程^[14]。当前的治疗方法包括抗吸收药物和促成骨药物, 但这些药物的长期使用可能会导致严重的副作用, 因此需要新的治疗策略来更有效地管理这种疾病^[15]。深入研究骨质疏松症的分子机制有助于开发新的治疗策略, 提高患者的生活质量^[16]。

衰老与骨质疏松症密切相关, 二者共享许多分子机制, 包括炎症、氧化应激和细胞衰老。随着年龄的增长, 这些机制导致骨量减少和骨强度降低, 从而增加骨折风险。研究表明, 随着年龄增加, 衰老细胞会在骨组织中积累并表现出衰老相关分泌表型 (senescence-associated secretory phenotype, SASP), 导致骨稳态失衡、骨质减少、骨小梁结构改变、脆性增加, 从而引发骨质疏松症^[17]。其次, 随着年龄增长, 骨髓基质细胞 (bone marrow stromal cells, BMSCs) 大部分分化为脂肪细胞而不是成骨细胞, 并发生衰老, 从而导致骨形成减少, 导致老年性骨质疏松^[18]。此外, 衰老也能通过影响腔隙-骨管系统, 影响细胞间通讯以及对骨骼负荷和运动对骨形成的反应, 从而引起骨质退化^[19-20]; 衰老可直接影响成骨细胞的分化和功能^[21]等多种途径, 引发骨质疏松。本研究拟从分子角度出发, 寻找衰老和骨质疏松的共同候选基因, 揭示衰老致骨质疏松的潜在生物学过程, 为骨质疏松诊疗提供新理论及新靶点。

1 材料与方法

1.1 数据来源

以 “Osteoporosi” 为关键词在 GEO 数据库 (gene expression omnibus; <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>) 中找到了 GSE56814 和 GSE56815 两个数据集,

并将两个数据集进行合并。数据集 GSE56814 包括高 BMD(对照组)42 个和低 BMD(病例组)31 个, 数据集 GSE56815 包括高 BMD(对照组)40 个和低 BMD(病例组)40 个。笔者使用“cellular senescence”为关键词在 Genecard 数据库(GeneCards-HumanGenes|Gene Database|Gene Search; <https://www.genecards.org/>)中找到了衰老相关数据集, 选取“Relevance score”大于 7 分的基因, 共 537 个, 在 Cell age 数据库(CellAge: The cell senescencegenedatabase; <https://genomics.senescence.info/cells/>)中获得了另一个衰老基因的数据集, 共 605 个, 对两个数据集进行合并, 共收集到 952 个基因。

1.2 数据分析

1.2.1 差异基因分析 使用 R4.3.3 软件对骨质疏松症(OP)两个数据库的数据进行合并, 合并后的数据进行简单清洗和去重, 使用“limma”包进行批次矫正, 以 $P < 0.05$ 筛选出差异基因(differentially expressed genes, DEGs), 并设置 $\log FC > 0$ 为上调基因, $\log FC < 0$ 为下调基因。使用 R 软件中的“ggplot”包绘制火山图, 使用微生信平台(bioinformatics.com.cn)绘制韦恩图。

1.2.2 加权基因共表达网络 将得到的 DEGs, 进一步进行加权基因共表达网络分析(weighted correlation network analysis, WGCNA), 使用 R 软件中的 WGCNA 包, 设置软阈值为 6, 得到高表达的基因模块。

1.2.3 蛋白互作 再将 WGCNA 中得到的高表达基因放入 STRING 数据库(<https://string-db.org/>), 分析这些高表达基因编码蛋白的相互作用(protein-protein interaction, PPI)。再使用 Cytoscape 软件进行 PPI 结果的可视化分析, 选取关键基因。

1.2.4 GO-KEGG 富集分析 将 OP 的 DEGs 与衰老基因取交集, 得到在两个疾病中都表达的基因, 将这些基因上传至微生信平台进行 GO 和 KEGG 富集分析, 识别这些基因的通路和生物学过程。

1.2.5 机器学习方法 将上述交集基因采用机器学习方法进行降维, 筛选靶基因。分别采用拉索回归(least absolute shrinkage and selection operator, LASSO)、支持向量机(support vector machines, SVM)以及随机森林(random forest)进行筛选, 对 3 种机器学习方法的筛选结果取交集, 以选出靶基因。

1.2.6 ROC 曲线 使用 R 软件中的“pROC”包

对筛选出的靶基因绘制受试者工作特征曲线(receiver operating characteristic, ROC)曲线, 以曲线下面积(area under curve, AUC)值来判断靶基因的诊断能力, 设置 $AUC > 0.7$ 为有效。在此基础上构建逻辑回归模型并绘制列线图, 用 ROC 曲线来评价该模型的预测效果。

1.2.7 Cmap 小分子化合物预测 从 wgcna 的上调基因里挑出前 5 个基因, 与 17 个 DEGs 取交集, 共 21 个, 使用 Cmap 数据库(ConnectivityMap; <https://clue.io/>)预测有潜在治疗作用的小分子化合物, 鉴定标准为: 连通性评分为负。

2 结果

本研究从多个数据库获取骨质疏松和衰老数据集, 清洗后分析得 127 个差异表达基因, 与 942 个衰老相关基因取交集得 17 个共同基因。经 GO、KEGG 分析明确其生物通路, 再用 LASSO、SVM 和随机森林算法确定 4 个关键靶基因。通过 WGCNA 识别高表达模块并进行了 PPI 蛋白互作分析, 结合 Cmap 数据库预测出 5 种潜在治疗药物, 见图 1。

2.1 差异基因分析

GEO 数据集的 OP 基因共包含 73 个样本的 11 121 个基因, 有 127 个差异基因被鉴定为 OP 的 DEGs, 其中上调基因 44 个, 下调基因 83 个, 见图 2A。韦恩图显示了 OP 的 DEGs 与 Cellular senescence 共同的 17 个基因, 见图 2B。

2.2 加权基因共表达网络分析

使用 R 软件中的 WGCNA 包来识别 DEGs 中的高表达基因, 首先基于加权相关性, 进行层次聚类分析, 同一枝上的基因具有跟高的相似性, 见图 3A。其次, 选取最优软阈值为 6, 使构建的网络更符合无标度拓扑结构, 见图 3B。基于最优软阈值构建共表达网络, 将基因划分到不同模块后, 绘制基因聚类树, 见图 3C。通过基因树图的层次聚类分析和动态分支切割方法, OP 数据集中的 DEGs 被聚类为两个模块, 其中高表达模块为 MEturquoise, 103 个 DEGs 包含在其中, 见图 3D。

2.3 蛋白互作网络分析

将 WGCNA 中得到的高表达基因放入 STRING 数据库, 分析这些高表达基因编码蛋白的相互作用, 获得这些基因的相互作用数据, 将其导入 Cytoscape 进行 PPI 结果的可视化, 采用 Degree 无权重法, 计算结果取前 15 个基因作为

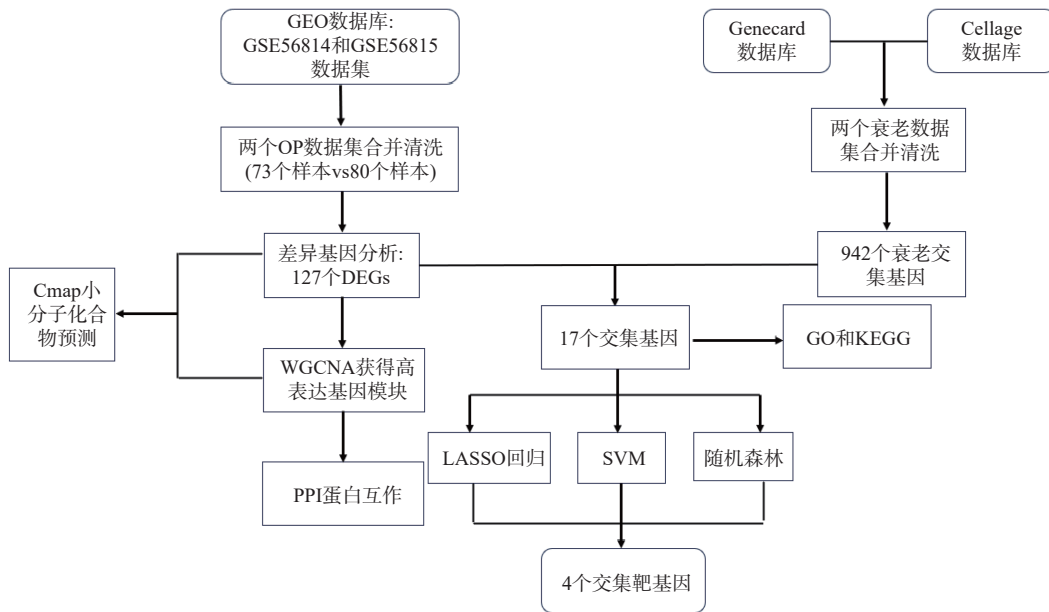


图 1 工作流程图

Fig. 1 Workflow diagram

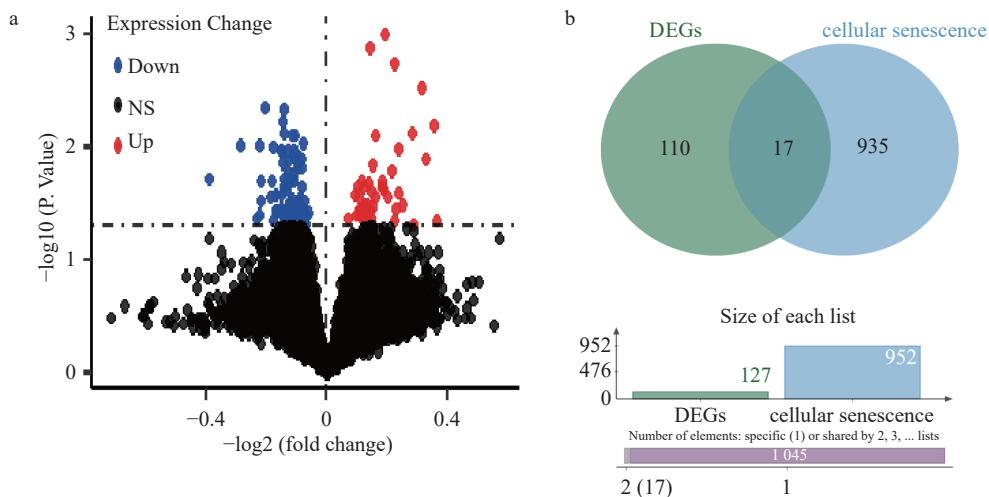


图 2 差异基因结果及交集

Fig. 2 Differential gene results and intersections

A: 差异基因火山图结果; B: 骨质疏松与衰老基因交集。

重要节点，见图 4。

2.4 GO 和 KEGG 富集分析

将 OP 的 DEGs 与 Cellular senescence 共同的 17 个基因上传至微生信平台进行 GO 和 KEGG 生物富集。共获得 57 个 GO 条目，其中 BP(生物过程) 30 个，CC(细胞成分) 12 个，MF(分子功能) 15 个。BP 方面，核心基因主要富集在转录的负调控 (GO:0045892)、对细胞凋亡过程的调控 (GO:0042981)、细胞对 DNA 损伤刺激的反应 (GO:0006974) 和对 RNA 聚合酶 II 启动子的转录进行正向调节 (GO:0045944) 上；CC 方面，核心基因主要富集于细胞核 (GO:0005654)；对于 MF，

核心基因主要富集于转录核心抑制因子活性 (GO:0003714) 和蛋白质结合 (GO:0005515)；KEGG 主要富集在五条通路上，分别是细胞衰老 (hsa04218)、细胞周期 (hsa04110)、帕金森病 (hsa05012)、铁中毒 (hsa04216) 和长寿调节途径 - 多物种 (hsa04213)，见图 5。

2.5 机器学习方法

基于上述 17 个基因，采用 LASSO 回归、SVM 以及 Random Forest 进行靶基因的筛选。LASSO 回归采用十折交叉验证，确定了 7 个靶基因，见图 6A、6B；SVM 采用五折交叉验证，确定了 15 个靶基因，见图 6C；Random Forest 选取

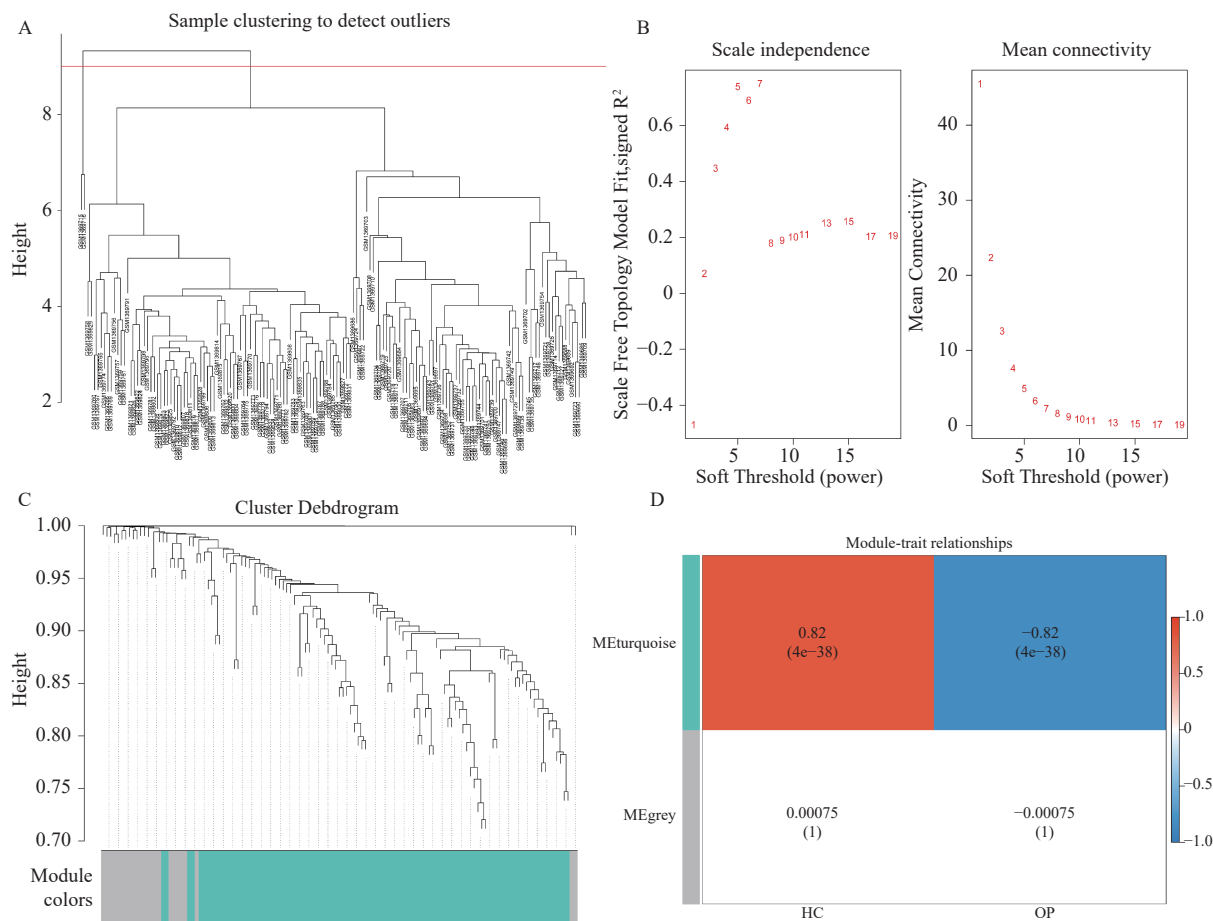


图3 加权基因共表达分析结果

Fig. 3 Weighted gene co-expression analysis results

A: 样本聚类图; B: 软阈值; C: 基因聚类树; D: 模块与临床相关性。

了 MeanDecreaseGini 值>5 的基因, 共 5 个, 见图 6D。上述三种机器学习方法取交集, 最终得出 4 个靶基因: FOXO3、HIRA、CBX5、RAD1, 见图 6E。

2.6 ROC 曲线分析

笔者在 R 软件中绘制了上述 4 个靶基因的 ROC 曲线, 根据 AUC 值以确定其诊断价值。其中 CBX5 基因的 ROC 曲线最佳截断值为 7.961, 灵敏度为 91.5%, 特异度为 90.1%; FOXO3 基因的 ROC 曲线最佳截断值为 8.598, 灵敏度为 79.3%, 特异度为 100%; HIRA 基因的 ROC 曲线最佳截断值为 7.801, 灵敏度为 89%, 特异度为 100%; RAD1 基因的 ROC 曲线最佳截断值为 7.6, 灵敏度为 86.6%, 特异度为 100%。结果显示, 4 个靶基因的 AUC 值均大于 0.7, 对疾病的诊断有明显价值, 见图 7。

2.7 逻辑回归模型建立与列线图可视化

为了更直观地了解 4 个靶基因与衰老和骨质疏松发病的关系, 笔者基于逻辑回归模型绘制了

列线图, 构建的逻辑回归方程式为: $\log\left(\frac{p}{1-p}\right) = -12.18 - 4.34x_1 - 1.31x_2 + 2.80x_3 + 3.89x_4$ 。其中 P 值代表发生骨质疏松症的概率, x_1 代表 CBX5 的基因表达水平, x_2 代表 HIRA 的基因表达水平, x_3 代表 RAD1 的基因表达水平, x_4 代表 FOXO3 的基因表达水平。绘制了 ROC 曲线评价该模型的预测效果。结果显示, ROC 曲线下面积为 0.984, 证明了该模型在疾病诊断方面有良好的诊断效果, 从而验证了 4 个靶基因的诊断作用, 见图 8。

2.8 Cmap 筛选小分子化合物

将蛋白互作得到的 103 个高表达基因取前 5 个, 与 17 个基因取并集, 共 21 个基因, 将这些基因放入 Cmap 网站, 通过 Cmap 数据库分析可能缓解衰老和骨质疏松的小分子药物, 连通性评分为负表明该化合物对所研究疾病为保护因素, 反之则为危险因素, 且评分越高作用效果可能越大。结果表明, 最有希望对衰老和骨质疏松起作用的药物是樱黄素(O-甲基化异黄酮)、XMD-885、杠柳次苷、依维莫司和 XMD-1150, 见表 1。

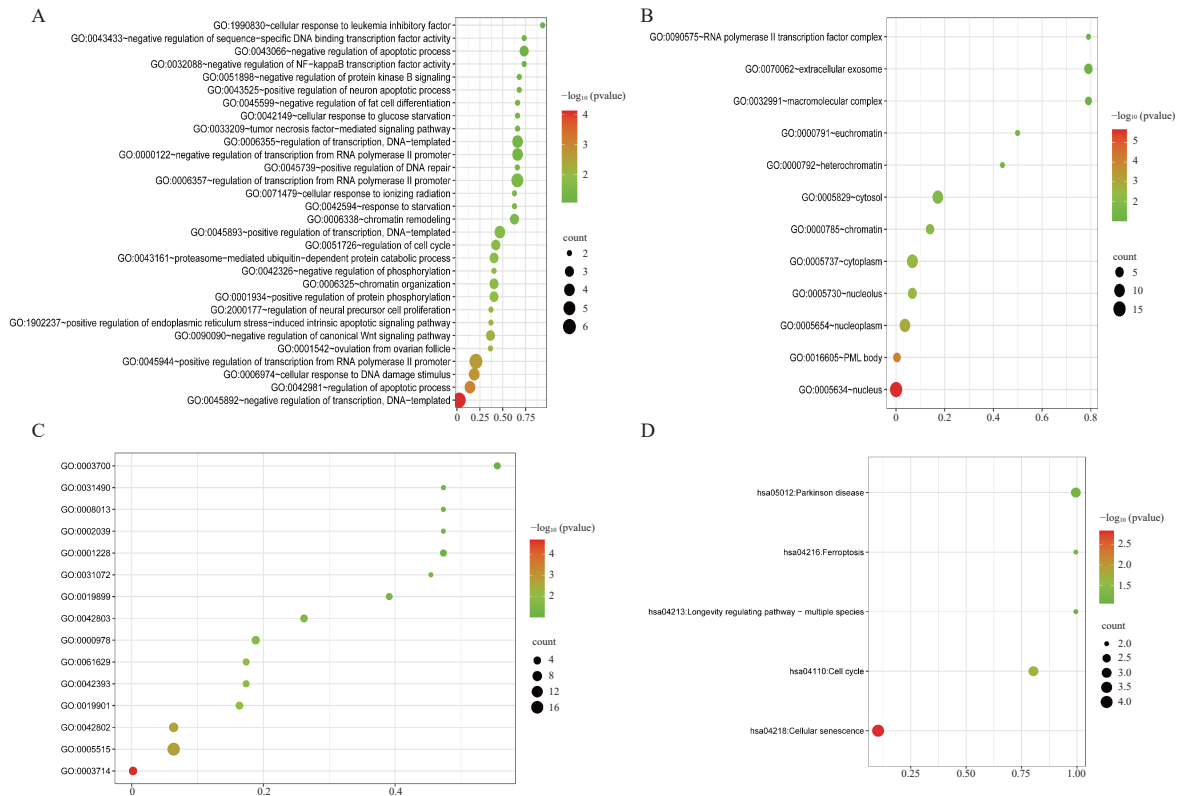


图 5 17 个交集基因的 GO-KEGG 富集分析

Fig. 5 GO-KEGG enrichment analysis of 17 intersecting genes

A: BP; B: CC; C: MF; D: KEGG。

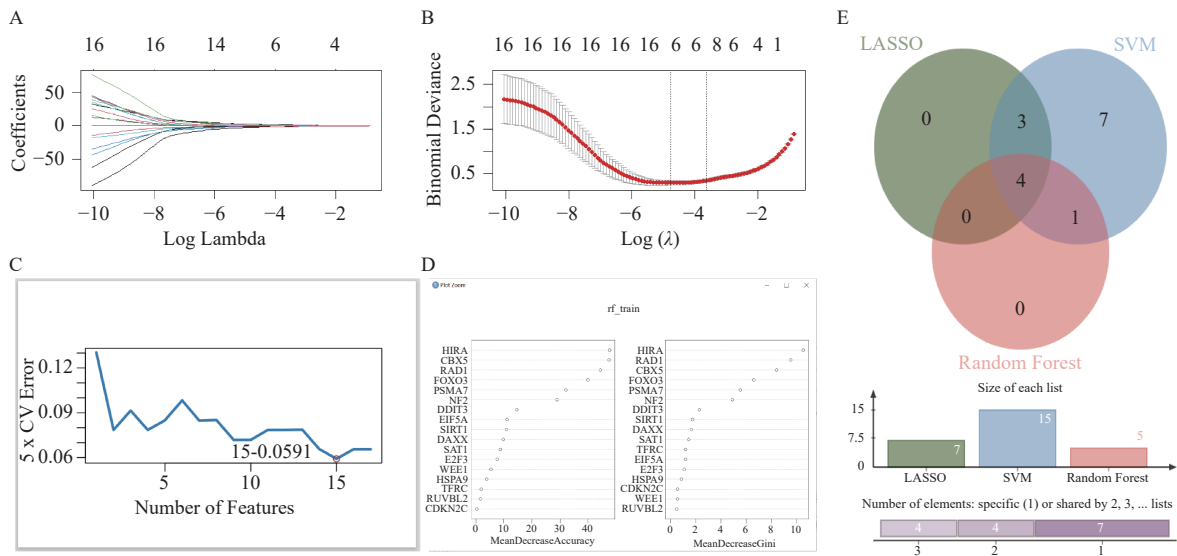


图 6 机器学习筛选靶基因

Fig. 6 Machine learning screening of target genes

A: 17 个基因的 LASSO 系数路径图; B: 交叉验证曲线; C: SVM-RFE; D: 随机森林 15 个基因重要性; E: 三种机器学习方法筛选基因的交集。

转录调控参与 DNA 损伤反应和氧化应激抵抗的基因来调节细胞衰老、凋亡和自噬, 从而决定细胞命运^[30], HIRA 基因对骨质疏松症的潜在诊断作用则在 2017 年一项对 GEO 数据库中 67 个骨质疏松症血样和 62 个对照血样的系列研究中得以验

证^[31]。在本研究中笔者发现 CBX5、RAD1 两个基因在衰老和骨质疏松方面有相互作用且目前暂未发现研究报道。

3.3 小分子化合物 樱黄素对骨质疏松的治疗作用

相关小分子化合物研究结果揭示, 樱黄素

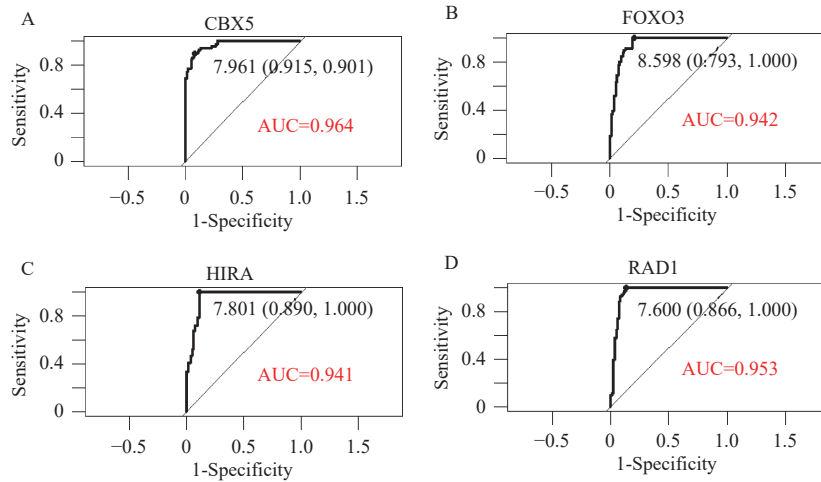


图 7 4 个靶基因的受试者工作曲线

Fig. 7 ROC curves for the four target genes

A: CBX5 基因的 ROC; B: FOXO3 基因的 ROC; C: HIRA 基因的 ROC; D: RAD1 基因的 ROC。

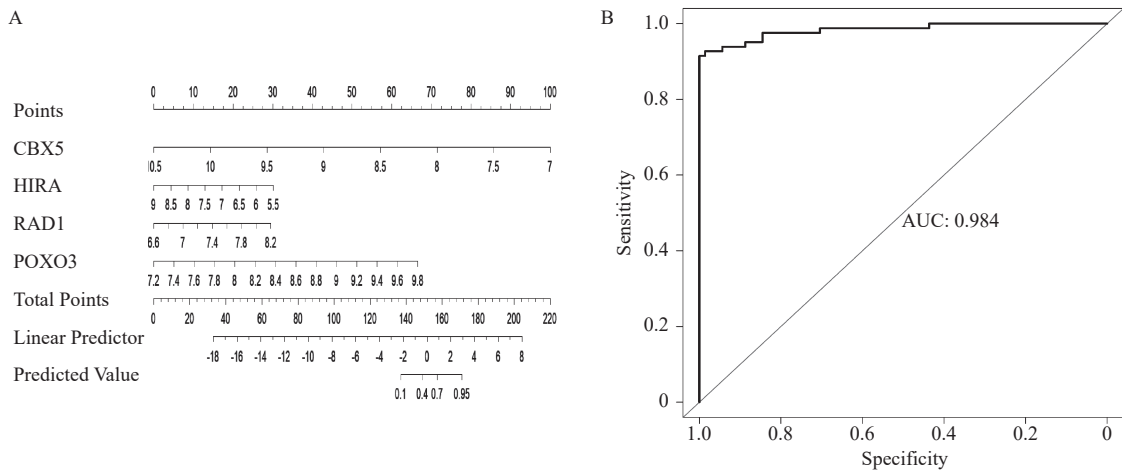


图 8 4 个靶基因的列线图与 ROC 曲线

Fig. 8 Nomogram and ROC curves for the four target genes

A: 4 个靶基因列线图; B: 逻辑回归模型的预测效果 ROC 曲线。

表 1 CMap 分析发现的潜在衰老和骨质疏松症药物小分子化合物

Tab. 1 Potential small molecular compounds for aging and osteoporosis found in CMap analysis

连通性评分	药物名称	说明
-98.39	prunetin	Breast cancer resistance protein inhibitor
-97.82	XMD-885	Leucine rich repeat kinase inhibitor
-97.64	periplocymarin	Apoptosis stimulant
-96.95	everolimus	MTOR inhibitor
-96.37	XMD-1150	Leucine rich repeat kinase inhibitor

(Prunetin)是一种 O-甲基化异黄酮，具有抗炎活性，已经有大量研究显示樱黄素对各种疾病存在治疗功能，如樱黄素可以通过 CASP3 和 TNF- α 基因抑制一氧化氮活性并诱导膀胱癌细胞凋亡^[32]、通过阻断钙通道降低大鼠血压^[33]、通过 G 蛋白偶联受体 GPR30 (GPER1) 诱导成骨细胞中的 Runx2 表达以促进骨再生^[34]。同时，它也是本研究预测

出最有可能对衰老和骨质疏松有治疗效果的小分子化合物，其对骨质疏松的治疗作用表现出多靶点，多途径相互作用的特点：樱黄素可能通过与 ESR1、PTGS2、FGFR1 和 ALB 蛋白相互作用，抑制破骨细胞的分化潜力，从而治疗骨质疏松症；樱黄素可以有效减轻地塞米松对 ALP(成骨分化的早期指标)活性的抑制作用，从而治疗骨质疏

松症^[35]。而其他几种小分子化合物对合并衰老和骨质疏松的治疗作用有待进一步研究。

3.4 衰老与骨质疏松未来研究展望

骨质疏松症已成为一个日益严重的公共健康问题。未来的研究应继续深入探讨衰老与骨质疏松症之间的复杂关系,特别是细胞衰老在骨质疏松症中的作用机制。现有研究表明,细胞衰老及其相关的分泌表型在骨质疏松症的发生和发展中起着关键作用,针对细胞衰老的治疗策略,如清除衰老细胞或抑制 SASP,可能成为未来治疗骨质疏松症的新方向^[36-37]。此外,氧化应激和炎症在骨质疏松症中的作用也值得进一步研究。氧化应激不仅影响骨细胞的生成和存活,还通过多种机制加速骨质流失^[38]。炎症与免疫系统的重塑同样在骨质疏松症中扮演重要角色,特别是在老年人群中^[39]。未来的研究应关注如何通过调节氧化应激和炎症反应来减缓骨质疏松症的进程。

[参考文献]

- [1] Calimport S R G, Bentley B L, Stewart C E, et al. To help aging populations, classify organismal senescence[J]. *Science*, 2019, 366(6465): 576-578.
- [2] 陈卫, 郭亚隆. 中国的人口负增长与人口老龄化[J]. *北京社会科学*, 2023(8): 101-112.
- [3] 杜鹏. 中国人口老龄化现状与社会保障体系发展[J]. *社会保障评论*, 2023, 7(2): 31-47.
- [4] Le Couteur D G, Thillainadesan J. What is an aging-related disease? An epidemiological perspective[J]. *The Journals of Gerontology Series A: Biological Sciences and Medical Sciences*, 2022, 77(11): 2168-2174.
- [5] Dönertaş H M, Fabian D K, Valenzuela M F, et al. Common genetic associations between age-related diseases[J]. *Nat Aging*, 2021, 1(4): 400-412.
- [6] Fougère B, Boulanger E, Nourhashemi F, et al. Chronic inflammation: Accelerator of biological aging[J]. *J Gerontol A Biol Sci Med Sci*, 2017, 72(9): 1218-1225.
- [7] Filippov M A, Tatarnikova O G, Pozdnyakova N V, et al. Inflammation/bioenergetics-associated neurodegenerative pathologies and concomitant diseases: A role of mitochondria targeted catalase and xanthophylls[J]. *Neural Regen Res*, 2021, 16(2): 223-233.
- [8] Wang Y, Shen J, Chen Y, et al. PINK1 protects against oxidative stress induced senescence of human nucleus pulposus cells via regulating mitophagy[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018, 504(2): 406-414.
- [9] Tian Y, Hu Y, Hou X, et al. Impacts and mechanisms of PM2.5 on bone[J]. *Rev Environ Health*, 2023, 39(4): 765-775.
- [10] 王永炫, 李梅, 章振林, 等. 《原发性骨质疏松症诊疗指南(2022)》要点解读[J]. *协和医学杂志*, 2023, 14(6): 1203-1207.
- [11] Almeida M, Laurent M R, Dubois V, et al. Estrogens and androgens in skeletal physiology and pathophysiology[J]. *Physiol Rev*, 2017, 97(1): 135-187.
- [12] Ahire JJ, Kumar V, Rohilla A. Understanding osteoporosis: Human bone density, genetic mechanisms, gut microbiota, and future prospects[J]. *Probiotics Antimicrob Proteins*, 2024, 16(3): 875-883.
- [13] Zhou Z, Lu Y, Wang Y, et al. Let-7c regulates proliferation and osteodifferentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells under oxidative stress by targeting SCD-1[J]. *Am J Physiol Cell Physiol*, 2019, 316(1): C57-C69.
- [14] Li H, Xiao Z, Quarles L D, et al. Osteoporosis: Mechanism, molecular target and current status on drug development[J]. *Curr Med Chem*, 2021, 28(8): 1489-1507.
- [15] Palacios S. Medical treatment of osteoporosis[J]. *Climacteric*, 2022, 25(1): 43-49.
- [16] Yang T L, Shen H, Liu A, et al. A road map for understanding molecular and genetic determinants of osteoporosis[J]. *Nat Rev Endocrinol*, 2020, 16(2): 91-103.
- [17] Farr J N, Rowsey J L, Eckhardt B A, et al. Independent roles of estrogen deficiency and cellular senescence in the pathogenesis of osteoporosis: Evidence in young adult mice and older humans[J]. *J Bone Miner Res*, 2019, 34(8): 1407-1418.
- [18] Shen G S, Zhou H B, Zhang H, et al. The GDF11-FTO-PPAR γ axis controls the shift of osteoporotic MSC fate to adipocyte and inhibits bone formation during osteoporosis[J]. *Biochim Biophys Acta Mol Basis Dis*, 2018, 1864(12): 3644-3654.
- [19] Busse B, Djonic D, Milovanovic P, et al. Decrease in the osteocytelacunar density accompanied by hypermineralized lacunar occlusion reveals failure and delay of remodeling in aged human bone[J]. *Aging Cell*, 2010, 9(6):

- 1065–1075.
- [20] Jilka R L, O'Brien C A. The role of osteocytes in age-related bone loss[J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2016, 14(1): 16–25.
- [21] Lv Y J, Yang Y, Sui B D, et al. Resveratrol counteracts bone loss via mitofilin-mediated osteogenic improvement of mesenchymal stem cells in senescence-accelerated mice[J]. *Theranostics*, 2018, 8(9): 2387–2406.
- [22] Tiede-Lewis L M, Dallas S L. Changes in the osteocyte lacunocanalicular network with aging[J]. *Bone*, 2019, 122: 101–113.
- [23] Aurora R, Veis D. Does aging activate T-cells to reduce bone mass and quality?[J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2022, 20(5): 326–333.
- [24] De Spiegeleer A, Beckw é e D, Bautmans I, et al. Pharmacological interventions to improve muscle mass, muscle strength and physical performance in older people: An umbrella review of systematic reviews and meta-analyses[J]. *Drugs Aging*, 2018, 35(8): 719–734.
- [25] Choi H S. Why do we need proactive management for fracture prevention in long-term glucocorticoid users?[J]. *Endocrinol Metab (Seoul)*, 2020, 35(3): 549–551.
- [26] Cortet B, Lucas S, Legroux-Gerot I, et al. Bone disorders associated with diabetes mellitus and its treatments[J]. *Joint Bone Spine*, 2019, 86(3): 315–320.
- [27] Ashamalla M, Malik, W. S, et al. Investigating the factors that affect osteoporosis in an aging population[J]. *The Health & Fitness Journal of Canada*, 2020, 13(2): 30–36.
- [28] Rubio-Gutierrez J C, Mendez-Hern á ndez P, Gu é guen Y, et al. Overview of traditional and environmental factors related to bone health[J]. *Environ Sci Pollut Res Int*, 2022, 29(21): 31042–31058.
- [29] Javaheri B, Pitsillides A A. Aging and mechanoadaptive responsiveness of bone[J]. *Curr Osteoporos Rep*, 2019, 17(6): 560–569.
- [30] Khor Y S, Wong P F. MicroRNAs-associated with FOXO3 in cellular senescence and other stress responses[J]. *Biogerontology*, 2024, 25(1): 23–51.
- [31] Xia B, Li Y, Zhou J, et al. Identification of potential pathogenic genes associated with osteoporosis[J]. *Bone Joint Res*, 2017, 6(12): 640–648.
- [32] Köksal Karayildirim Ç, Nalbantsoy A, Karabay Yavaşoğlu N Ü. Prunetin inhibits nitric oxide activity and induces apoptosis in urinary bladder cancer cells via CASP3 and TNF- α genes[J]. *Mol Biol Rep*, 2021, 48(11): 7251–7259.
- [33] Kim B, Jo C, Choi H Y, et al. Prunetin relaxed isolated rat aortic rings by blocking calcium channels[J]. *Molecules*, 2018, 23(9): 2372.
- [34] Khan K, Pal S, Yadav M, et al. Prunetin signals via G-protein-coupled receptor, GPR30(GPER1): Stimulation of adenylyl cyclase and cAMP-mediated activation of MAPK signaling induces Runx2 expression in osteoblasts to promote bone regeneration[J]. *J Nutr Biochem*, 2015, 26(12): 1491–501.
- [35] Wu J, Chen J, Yu X, et al. The potential pharmacological mechanism of prunetin against osteoporosis: transcriptome analysis, molecular docking, and experimental approaches[J]. *Toxicol Mech Methods*, 2024, 34(1): 46–56.
- [36] Chandra A, Rajawat J. Skeletal aging and osteoporosis: Mechanisms and therapeutics[J]. *Int J Mol Sci*, 2021, 22(7): 3553.
- [37] Pignolo R J, Law S F, Chandra A. Bone aging, cellular senescence, and osteoporosis[J]. *JBMR Plus*, 2021, 5(4): e10488.
- [38] Manolagas S C. From estrogen-centric to aging and oxidative stress: A revised perspective of the pathogenesis of osteoporosis[J]. *Endocr Rev*, 2010, 31(3): 266–300.
- [39] Pietschmann P, Mechtcheriakova D, Meshcheryakova A, et al. Immunology of osteoporosis: A mini-review[J]. *Gerontology*, 2016, 62(2): 128–137.