

淫羊藿治疗骨不连机制研究

黄川洪, 陈跃平, 吕挺

(广西中医药大学附属瑞康医院, 广西南宁 530011)

摘要:淫羊藿是我国传统中医药药材之一,一般指小檗科植物淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿或朝鲜淫羊藿的干燥叶,淫羊藿苷(icariin, ICA)是其主要成分,具有免疫调节、抗炎、抗衰老、抗肿瘤等活性,对骨不连、骨质疏松等多种骨科疾病具有治疗作用,而骨不连是目前骨科学界的难题之一,针对骨不连的病理因素,该文从炎症改善、促进血管生成、促进干细胞生成和信号级联改变几个方面对近年来淫羊藿治疗骨不连的研究进行了汇总,供广大学者参考。

关键词:淫羊藿;淫羊藿苷;骨不连

中图分类号:R274.3

文献标志码:A

文章编号:1673-842X(2024)12-0061-07

Study on Mechanism of Yinyanghuo (*Epimedii Wushanensis Folium*) Therapy for Bone Nonunion

HUANG Chuanhong, CHEN Yueping, LYU Ting

(Ruikang Hospital Affiliated to Guangxi University of Chinese Medicine, Nanning 530011, Guangxi, China)

Abstract: Yinyanghuo (*Epimedii Wushanensis Folium*) is one of the Chinese medicine herbs in China, which generally refers to the dry leaves of Berberis plant *Epimedium brevicornu* Maxim., *Epimedium sagittatum* Maxim., *Epimedium pubescens* Maxim. or *Epimedium koreanum* Nakai., and icariin (ICA) is its main component, which has immune regulation, anti-inflammatory, anti-aging, anti-tumor and other activities, and has therapeutic effects on bone nonunion, osteoporosis and other orthopedic diseases. Bone nonunion is one of the difficult problems in the orthopaedic field at present. In view of the pathological factors of bone nonunion, this article summarized the recent studies on the treatment of bone nonunion by Yinyanghuo (*Epimedii Wushanensis Folium*) from the aspects of improving inflammation, promoting angiogenesis, promoting stem cell generation and signaling concatenation, for the reference of the majority of scholars.

Keywords: Yinyanghuo (*Epimedii Wushanensis Folium*); icariin; bone nonunion

骨不连的发生在骨折患者中并不少见,成为了全球骨科医生共同面对的难题之一,骨不连的定义当前仍未统一,目前学界内主要遵循美国食品药品监督管理局(FDA)对骨不连的定义,即骨折发生至少已经9个月,并且连续3个月没有任何愈合迹象。骨不连的简化定义是如果不进一步干预,就不可能愈合的骨折^[1]。骨不连的成因是多因素的,包括原始损伤、治疗方案、患者的基础疾病和骨折后合并症,在病理学方面目前学界认为主要与以下几个方面相关:机械不稳定^[2]、炎症反应过程被干扰^[3-4]、血管形成功能受损^[5]、缺乏干细胞^[6]、信号级联改变^[7]、骨痂重塑受损^[8],并因此提出了骨折愈合的“钻石理论”。在世界范围内,发生骨不连的风险为1.9%~4.9%^[11],英国的一项统计显示急性骨折不愈合的几率可达到5%~10%^[9]。针对骨不连的成因,世界各地的学者都在积极地寻找适合的治疗方案,中国传统中药草本植物淫羊藿也是研究热点之一,淫羊藿具有“补肾壮阳、强筋骨、祛风湿”的作用,在近些年的研究中,发现淫羊藿具有改善生殖系统功能、保护神经、抗骨质疏松、保护心血管疾病、抗炎症、抗氧化应激、抗抑郁和抗肿瘤等作用^[10-14],淫羊藿最主要的活性成分淫羊藿苷(icariin, ICA)也被应用在骨折及骨不连的治疗中,作者对ICA用于治疗骨不连的机制进

行了总结,供各位学者参考。

1 草本淫羊藿的主要活性成分及作用

1.1 淫羊藿的有效成分

淫羊藿属(*Epimedium*)属于小檗科,全世界共有68种,其中58种(85.3%)分布在中国^[15]。中国是淫羊藿地理分布和品种中心。超过15种淫羊藿在中医中有悠久的历史,被认为具有滋肾补阳的特性^[16]。淫羊藿的记录最早出现在2000多年前的《神农本草经》中,南北朝时期著名医学家陶弘景认为这种植物可以增强肾阳,并将其命名为“阴阳火”,并记载在《本草经集注》中^[17]。草本淫羊藿中含有的成分众多, QIAN H Q等^[18]于2023年对淫羊藿草本植物的分离提取成分进行了统计分析,得到了共计379种化合物,包括黄酮类化合物、木脂素、有机酸、萜类化合物、二氢菲衍生物、生物碱和其他成分。在2020年版《中华人民共和国药典》中,淫羊藿叶是指4种淫羊藿植物的干叶,即短角淫羊藿、箭叶淫羊藿、柔毛淫羊藿和朝鲜淫羊藿^[18-19]。淫羊藿中主要含有53种黄酮类化合物,包括黄酮类、双黄酮类、黄酮类和黄酮类苷类^[10],如朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C、ICA、宝藿苷I(又称淫羊藿次苷II)、淫羊藿次苷I、淫羊藿素等,上述成分是公认的主要植物化学和药理活性成分^[17, 20]。这些化合物在淫羊藿素C-3和C-7上的

基金项目:国家自然科学基金(81960803);广西中医药大学“桂派中医药传承创新团队”(2022A004)

作者简介:黄川洪(1985-),男,广西南宁人,副主任医师,硕士在读,研究方向:脊柱与四肢退行性疾病的中医防治研究。

通讯作者:陈跃平(1970-),男,湖南益阳人,教授、主任医师,博士,研究方向:骨与关节疾病及运动损伤研究。

糖基化程度不同^[19-20]。不同种类的淫羊藿中黄酮类物质含量不尽相同^[21-22]。这些黄酮类物质主要为朝藿定A、朝藿定B、朝藿定C和ICA,占淫羊藿总黄酮含量的52%以上^[23]。淫羊藿中的主要黄酮类化合物表现出显著而多样的药理活性。在这些主要成分中,ICA的作用最为引人关注。

1.2 ICA的结构和功能

在淫羊藿的几种主要有效成分中,ICA是最主要生物活性成分(约占活性成分总量的1%),其代谢产物为淫羊藿素^[23]。根据2020年版《中华人民共和国药典》记载,ICA分子式为C₃₃H₄₀O₁₅,分子量为676.67 g/mol。ICA具有多种药理作用,包括改善生殖系统功能、保护神经、抗骨质疏松、保护心血管疾病、抗炎症、抗氧化应激、抗抑郁和抗肿瘤等作用。除上述作用外,ICA还有很强的促进成骨细胞分化、抑制破骨细胞功能,防止骨量丢失,在骨骼的生成和吸收过程中起到双重调节作用^[24-25]。血管生成在骨再生中同样具有重要作用,研究显示^[26],ICA可以通过刺激体内内皮细胞迁移、增殖和小管生成来增加血管生成,从而在心血管疾病中产生保护作用,同时也在骨组织修复中发挥积极作用。ICA丰富的功能特性表明淫羊藿在诸多骨科疾病(如绝经后骨质疏松症、骨关节炎、股骨头缺血坏死、骨缺损和骨不连)中有巨大的潜力和应用价值,值得深入研究。

2 淫羊藿苷治疗骨不连的相关机制

2.1 对炎症的改善和对免疫系统的调节作用

炎症过程是免疫反应的重要组成部分,骨愈合过程中发生的生理性炎症是需要精细调控的^[3],骨折炎症期的炎症细胞因子主要包括白细胞介素-1 β (interleukin-1 β , IL-1 β)、IL-6、IL-8、IL-10、单核细胞趋化蛋白-1 (monocyte chemo tactic protein 1, MCP-1)和肿瘤坏死因子(tumor necrosis factor, TNF)^[27],炎症延长和无法消除会导致早期骨折处构成骨痂的细胞组成和细胞因子谱发生改变。在严重创伤、败血症或一些具有促炎表型的疾病(包括肥胖和糖尿病、骨质疏松症、类风湿性关节炎或系统性红斑狼疮)诱导的全身炎症的情况下,免疫反应会受到影响,随之而来的是骨不连风险的增加^[28]。ICA可以减轻自身免疫性疾病中体液免疫和细胞免疫介导的免疫复合物沉积所造成的损伤,一方面ICA可显著降低类风湿关节炎(rheumatoid arthritis, RA)小鼠血清免疫球蛋白G2a (immunoglobulin G2a, IgG2a)水平,抑制STAT3激活介导的辅助T细胞17 (T helper cells, Th17)分泌IL-17细胞因子,减轻类风湿引发的炎症反应^[29]。另一方面ICA可以诱导CD4⁺淋巴细胞凋亡,对T淋巴细胞引起的免疫反应起到限制性调节作用^[30]。此外ICA既可以通过核因子 κ B/核苷酸结合寡聚化结构域样受体3 (nuclear factor- κ B/nucleotide-bound oligomerized domain-like receptors 3, NF- κ B/NALP3)途径减少痛风性关节炎大鼠滑膜组织中的炎症细胞浸润并下调IL-1 β 、IL-6、TNF- α 和前列腺素E₂ (prostaglandin E₂, PGE₂)的水平^[31],也可以通过限制Smad2/3的产生,减少NF- κ B、环加氧酶2 (cyclo-oxygenase-2, COX-2)、IL-1 β 和NADPH氧化酶-4 (NADPH oxidase-4, NOX-4)等促炎因

子^[32],还可以抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路,调节软骨细胞自噬,这在TANG Y H等^[33]研究的大鼠骨关节炎模型中得到了证实。进一步研究发现,ICA在抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路的同时,还可以减弱IL-1 β 诱导的基质金属蛋白酶-3 (matrix metalloproteinase-3, MMP-3)过量,增加II型胶原,诱导自噬相关蛋白的表达^[34]。ICA有着明确的抗炎和免疫调节作用,可以使骨折产生的生理性炎症得到有效控制,又可以削弱系统性疾病导致的病理性炎症,为骨折愈合创造良好的内环境基础,利于骨折愈合进程的顺利发展。见图1。

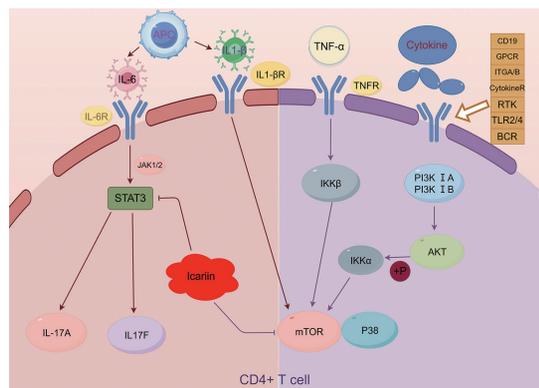


图1 淫羊藿苷对免疫系统的调节作用

2.2 促血管生成作用

骨微血管内皮细胞(bone microvascular endothelial cells, BMECs)在维持骨内正常微环境中有着重要的意义,BMECs为骨组织和骨细胞提供氧气和其他营养成分,还具有内分泌功能。张庆宇等^[35]从人股骨头分离提取BMECs,经过培养后,先使用氢化可的松进行干预,再使用ICA进行干预,发现ICA能改善低浓度激素诱导的BMECs自噬,对血管内皮细胞起到保护作用。在过氧化氢(H₂O₂)诱导的主动脉血管平滑肌细胞(vascular smooth muscle cells, VSMCs)钙化大鼠模型中,ICA可以下调VSMCs骨化标志因子,如骨钙素(osteocalcin, OC)、骨桥蛋白(osteopontin, OPN)、Runt相关转录因子2 (Runt-related transcription factor 2, Runx2)和I型胶原mRNA的表达,并减少碱性磷酸酶(alkaline phosphatase, ALP),最终可减少VSMCs钙化^[36-37]。而对于BMSCs,ICA同样以上述方式通过AKT信号通路增强血管内皮生长因子(vascular endothelial growth factor, VEGF)的表达^[38]。同时,ICA还可以通过调节B淋巴细胞瘤-2 (B-cell lymphoma-2, Bcl-2)和半胱天冬酶3 (caspase-3)的蛋白和mRNA表达水平,预防人血管内皮细胞(human umbilical vein endothelial cells, HUVECs)的损伤和凋亡^[39]。然而HUVECs通常是从脐静脉中提取,不具有特异性,为进一步明确ICA对骨内血管的作用,YU H C等^[40]使用从人股骨头软骨下骨获得的BMECs进行更特异的体内和体外分子研究,该研究发现,ICA增强了Bcl-2的表达,但减少了Bax的表达,可以显著促进BMECs迁移、血管生成相关细胞因子(如VEGF)的表达和AKT信号通路活化,对糖皮质激素引起的股骨头坏死中的血管生成起到显著的促进作用。VEGF是一种内皮细胞特异性有丝分裂原和

有效的血管生成因子,可以调节血管通透性和促进内皮细胞增殖,并诱导内皮细胞迁移和血管生成。LI X L等^[41]研究显示,ICA可以激活细胞自噬,并上调VEGF家族中最重要的成员——VEGFA以及VEGF受体-2的基因和蛋白质水平,从而促进血管生成。对于高血糖引起的血管内皮损伤,ICA则通过减少凋亡、氧化应激和炎症来保护血管内皮因子,减少由此引发的功能障碍^[42]。通过上述研究可以得知,ICA对于各种原因引起的血管损伤均有改善作用,对血管的生成具有显著的促进作用,推断ICA同样可以在骨折端发挥促血管生成的作用。

2.3 对骨髓间充质干细胞和骨形态发生蛋白2的促进作用

2.3.1 促进骨髓间充质干细胞成骨分化

骨髓间充质干细胞(bone marrow mesenchymal stem cells, BMSCs)作为组织工程中理想的种子细胞,在组织修复和再生中发挥着重要作用, BMSCs不仅具有广泛的增殖能力,而且还保留了多系间充质分化潜能^[43], BMSCs可以定向分化为成骨细胞,而成骨细胞可以产生细胞外基质蛋白和矿化调节剂,最终导致骨量增加^[44]。ICA对BMSCs成骨分化的促进作用已经得到证实,这一作用可以通过多种渠道实现。YAO X D等^[45]发现铁超载可以抑制PI3K/AKT/mTOR信号通路,引发成骨前细胞分化停滞和自噬,对BMSCs的增殖和成骨分化造成负面影响,而ICA则可以减弱铁超载诱导的PI3K/AKT/mTOR通路的失活,保护BMSCs免受铁超载的损伤。ZHANG S C等^[46]发现ICA可抑制BMSCs成脂分化,促进成骨细胞分化;在新西兰兔骨缺损模型中,ICA通过增加BMSC增殖和成骨细胞分化显著促进骨愈合^[47]。ICA的代谢产物淫羊藿素对骨髓间充质干细胞成骨分化具有正向作用,它通过灭活糖原合成酶激酶-3 β (glycogen synthase kinase-3 β , GSK-3 β)和限制过氧化物酶体增殖物激活受体(peroxisome proliferators-activated receptors γ , PPAR γ)表达来促进BMSCs的成骨分化,同时抑制成脂分化^[48]。大鼠的体内及体外实验证明,ICA可调节miR-23a-3p介导的BMSCs成骨分化^[49],这一调节作用是通过蛋白和骨形态发生蛋白2 (bone morphogenetic protein, BMP-2)/Smad5/Runx2和WNT/ β -catenin途径实现的^[50-51]。JIAO F等^[52]从3月龄的新西兰兔中分离出BMSCs并进行培养后,用浓度为1 μ mol/L的ICA进行干预,发现ICA可以激活MAPK信号通路从而促进骨髓间充质干细胞向软骨缺损区的募集,诱导肌动蛋白应力纤维形成,从而促进BMSC在体内和体外的迁移。ICA在促进骨髓间充质干细胞的软骨分化和细胞增殖的同时还促进了II型胶原、聚集BMP-2在骨髓间充质干细胞中的表达^[50]。这些都是骨修复所必须的基础环境和利好条件,在ICA促进BMSCs的几种途径中,对BMP-2的促进具有十分重要的意义。

2.3.2 对BMP-2的促进作用

BMP-2是一种骨诱导因子,可在体外诱导各种类型的干细胞向软骨分化, BMP-2也能诱导间充质干细胞(marrow mesenchymal stem cells, MSCs)的成骨分化和软骨内骨化促进骨再生,并作为骨诱导

佐剂被广泛用于骨再生^[53]。在体外实验中,ICA和BMP-2均能对骨缺损动物模型的成骨细胞产生促进增殖作用进而增加骨形成,ICA可上调BMP-2/Smad4/Runx2信号通路,通过诱导成骨相关转录因子抗体(osterix, OSX)、Runx2和ALP基因的表达,促进骨形成或增加Ca²⁺浓度,来促进成骨细胞增殖^[54]。ICA还可以通过激活cAMP/PKA/CREB信号通路刺激BMP-2介导的成骨细胞分化^[55]。ICA对BMSCs的增殖促进作用还可以通过上调脑和肌肉Arnt样蛋白1 (brain and muscle Arnt-like protein 1, BMAL-1)来实现, HUANG Z F等^[56]研究结果表明, BMAL-1可以调节BMSCs的成骨分化,ICA可以通过上调BMAL-1的表达,引起BMP-2、Runx2、ALP和肌钙蛋白的表达,继而促进BMSCs的增殖。这一研究结果说明,ICA不但可以直接激活BMP-2/Smad4/Runx2信号通路,也可以经由BMAL-1间接激活该通路。在以脂多糖(lipopolysaccharide, LPS)诱导的成骨细胞模型中,当ICA进入细胞后有较高的利用率,可以增加BMP-2/Runx2信号通路关键基因和蛋白的表达,增强成骨细胞增殖和骨矿化^[57]。在ZHANG X Y等^[58]研究使用SD大鼠进行骨折造模,并分为青年组和老年组,对两组使用ICA进行干预后发现,ICA可以刺激BMP-2/Smad5/Runx2通路,诱导BMSCs成骨增殖分化。在他们的进一步研究中还发现ICA可上调骨折模型大鼠Wnt1和 β -catenin mRNA/蛋白表达,激活Wnt1/ β -catenin成骨信号通路,以剂量依赖的方式增加ALP活性,诱导核心结合因子 α 1 (core binding factor α 1, Cbf α 1)、BMP-2和BMP-4的表达^[59]。由此可见,ICA既可以通过激活cAMP/PKA/CREB信号通路刺激体内BMP-2总量的增加,也可以激活WNT1/ β -catenin诱导的成骨信号通路,还可以直接刺激BMP-2/Runx2信号通路,通过多种途径和方式促进BMSCs的增殖和增加成骨细胞的分化,足以证明其具有强效且明确的促进成骨作用。见图2。

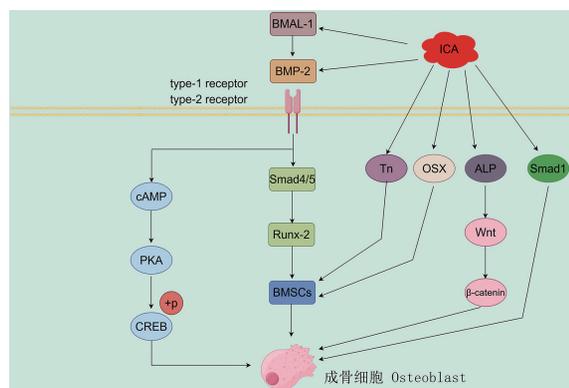


图2 淫羊藿素对BMSCs及BMP-2的促进作用机制

2.4 对信号级联的影响

2.4.1 通过RANKL/RANK/OPG对骨平衡造成影响

骨是一种矿化的结缔组织,具有4种类型的细胞,包括破骨细胞、成骨细胞、骨细胞和骨衬里细胞。在人体中,骨吸收活动和骨形成活动相互协调,形成一种循环的状态以维持骨组织的稳态,破骨细胞通过向成骨细胞传递一种耦合信号,驱动骨吸收到骨形成的转变^[44]。NF- κ B受体激活剂(receptor

activator of NF- κ B, RANK)、NF- κ B受体激活剂配体(receptor activator of NF- κ B ligand, RANK)和骨保护素(osteoprotegerin, OPG)是该信号系统的主要组成部分^[60]。RANK主要表达于破骨细胞前体细胞、成熟破骨细胞和免疫细胞,如树突状细胞(dendritic cell, DC)、巨噬细胞和小胶质细胞,RANKL通过与RANK结合刺激破骨前细胞的分化,使破骨细胞黏附于骨组织上,激活并维持破骨细胞的功能,而OPG则可以竞争性地与RANKL结合,从而对上述作用进行抑制^[61]。HSIEH T P等^[62]人取8月龄雌性小鼠骨髓细胞进行培养,并使用ICA对其进行干预后发现破骨细胞分化因子——抗酸性磷酸酶(tartrate-resistant acid phosphatase, TRAP)抗性活性显著降低,ICA(浓度为 10^{-8} mol/L)可降低脂多糖诱导的破骨细胞大小的形成,并降低其TRAP和酸性磷酸酶(acid phosphatase, ACP)活性,但不影响细胞活力;ICA能抑制脂多糖诱导的骨吸收和IL-6、TNF- α 的表达,OPG基因表达上调,RANKL基因表达下调;除此之外ICA还能阻止COX-2和PGE₂的合成。ICA对LPS诱导的破骨细胞缺氧诱导因子-1(hypoxia-inducible factor, HIF-1)表达具有显性抑制作用;在破骨细胞中,ICA抑制LPS介导的p38和JNK的激活;而在成骨细胞上,ICA降低了LPS诱导的ERK1/2和I- κ B- α (I κ B α)的激活,并增加了p38的激活。在经典的NF- κ B途径中,激活的I κ B激酶复合物诱导I κ B α 的磷酸化和降解,这导致NF- κ B成分蛋白的释放和磷酸化,随后NF- κ B的核易位并结合到DNA靶位点,以激活破骨细胞生成相关基因的表达^[63]。ZHANG S C等^[46]提取小鼠成骨细胞MC3T3-E1与小鼠破骨细胞RAW264.7在体外共同进行培养,并用ICA进行干预后发现,成骨细胞MC3T3-E1活性得到提高的同时破骨细胞RAW264.7受到了抑制,证实了ICA可以提高MC3T3-E1成骨分化活性,增强OPG和RANKL基因蛋白的表达,降低NF- κ B基因和蛋白的表达,增加ALP、转化生长因子- β_1 (transforming growth factor beta 1, TGF- β_1)和RANKL基因的表达水平,降低RANK基因的表达。RANKL可以诱导RAW264.7细胞中活性氧(reactive oxygen species, ROS)产生增加,这一作用可以被ICA减少,并因此降低了活化T细胞中核因子、细胞质和TRAP的表达,在RAW264.7细胞中,ICA还降低了RANKL诱导的烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化酶(nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidase, NOX)的表达,特别是NOX1和NOX4^[64]。然而KIM B等^[65]发现ICA可以抑制RANKL下游的TNF受体相关因子6(tumor necrosis factor receptor-associated factor, TRAF-6)表达,随后抑制ERK的磷酸化,从而减少破骨细胞前细胞向破骨细胞的分化,并下调破骨细胞形成和骨吸收相关基因的表达,但在他们的研究中ICA对p38、JNK和AKT的激活没有影响,这似乎与其他的研究结果相矛盾。更新的研究表明,使用ICA对硫代乙酰胺(thioacetamide, TAA)诱导的SD大鼠骨质疏松模型进行干预后,RANKL、RANK、p38、ERK、c-Fos和活化T细胞核因子1(nuclear factor of activated T cells 1, NFATc1)的蛋白表达均呈现下降的情况,破骨细胞分化减少,骨丢失和破骨细胞形成减少^[66]。

ICA可通过刺激OPG的表达来促进成骨细胞增殖,调节OPG/RANKL比率促进Runx2和COL1A2的表达,减少血清骨转换生物标志物的表达,促进去卵巢大鼠骨折的愈合^[67]。另外在模仿微重力造成的骨质疏松大鼠模型研究中,用ICA对试验对象进行治疗可恢复OPG/RANKL比率,显著改善骨密度丢失、骨小梁减少的现象^[54]。总体来说,ICA抑制RANKL、RANK,促进OPG表达的效果是明确的,这一效果不仅对下游的NF- κ B通路造成影响并抑制破骨细胞的形成,同样也会对MAPK通路产生影响,进而对破骨细胞的分化和破骨细胞的形成产生抑制作用。见图3。

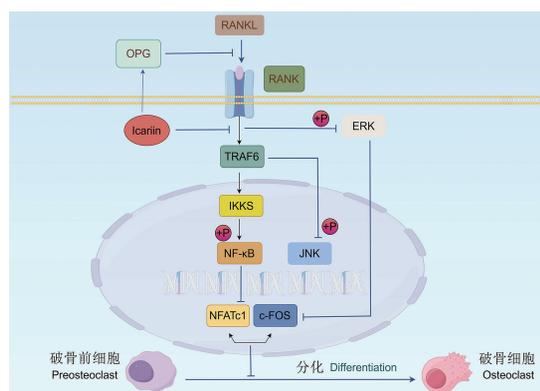


图3 淫羊藿苷对RANKL/RANK/OPG通路的影响

2.4.2 对MAPK信号通路的影响

MAPK信号通路在诱导和激活破骨细胞的形成和功能中起着至关重要的作用,主要通过3个主要的信号级联:ERK-MAPK、JNK-MAPK和p38-MAPK进行,是响应广泛刺激从细胞表面向细胞核传递信号的次级信使,然后调节成骨细胞的多种细胞活动^[63,68]。ICA通过阻止p38和JNK途径的激活,对MAPK通路产生下调作用,从而中断LPS诱导的破骨细胞生成程序^[62],RANKL与其受体RANK的结合导致后续衔接分子的募集,如TRAF-6,随后激活信号通路,包括MAPK和NF- κ B通路,ICA对MAPK信号通路的调控与对NF- κ B信号通路的调控相类似,都是对RANKL、RANK进行抑制,继而对下游的因子产生影响,进而对MAPK和NF- κ B信号通路产生抑制,降低破骨细胞的分化,同时还可以通过调节OPG/RANKL比率,增强成骨细胞的功能。ICA阻断了RANKL诱导的RAW264.7细胞中所有3种MAPK的磷酸化,这表明ICA对破骨细胞分化的抑制作用可能是通过调节成熟破骨细胞中MAPK的磷酸化来介导的^[63]。而其他实验与上述实验结果存在一定的差异,WANG Z M等^[69]在体外培养的SW1353软骨肉瘤中加入ICA后使用RT-qPCR法检测RANKL、RANK和OPG的mRNA和蛋白表达,ELISA法检测磷酸化p38(p-p38)和磷酸化细胞外信号调节激酶1/2(p-ERK 1/2)的表达后发现ICA可降低IL-1 β 刺激的SW1353细胞中p-p38的表达,增加p-ERK1/2的表达,ICA对OPG/RANKL比率的调节作用正是通过对p38表达的下调和对ERK1/2的上调来实现的,JNK通路也参与了这一过程。ICA对MAPK的调控还能促进BMSCs的分化。除此之外,ICA对MAPK的调控还能促进BMSCs的分化。

WU Y Q 等^[68]使用 ICA 对大鼠 BMSCs 进行干预后发现 ICA 对 BMSCs 的增殖虽然没有帮助,但可以通过激活 ERK-MAPK、JNK-MAPK 和 p38-MAPK 信号通路促进 BMSCs 成骨分化。虽然 ERK-MAPK、JNK-MAPK 和 p38-MAPK 通路之间的相互作用以及这些通路参与破骨细胞形成和促进成骨细胞的分化方面的确切机制尚不清楚,ICA 对这 3 条通路的作用到底是抑制还是激活尚且有争议,但是对上述的实验结果归纳总结后我们可以确定,ICA 对 MAPK 信号通路的调控是通过对 RANKL、RANK 进行抑制,继而对下游的因子产生影响,进而对 MAPK 和 NF- κ B 信号通路产生抑制,使破骨细胞的作用受到限制,同时还可以通过调节 OPG/RANKL 比率,增强成骨细胞功能。无论 ICA 是抑制 MAPK 信号通路减少破骨细胞分化起到保护作用,还是激活 MAPK 信号通路增强成骨细胞分化起到修复作用,其最终的结果对骨组织都有正面、良性的作用。

3 总结

淫羊藿的主要成分 ICA 一方面可以减轻炎症和调节免疫反应,减少诸如 IL-6、TNF- α 、IL-17 等炎症因子的产生,抑制 NF- κ B 及 PI3K/AKT/mTOR 通路,使骨折过程中的炎症得到控制,另一方面具有抗氧化、诱导 BMSCs 自噬及促进 VEGF 发生,从而发挥保护血管和促血管生成的作用;既能直接刺激 BMSCs 增加成骨细胞增殖,又能通过上调 BMP-2/Smad4/Runx2 信号通路提高 BMSCs 介导的成骨细胞分化;在信号级联反应中下调 RANKL/RANK/OPG 通路及 MAPK 通路抑制破骨细胞生成。综上所述,淫羊藿在骨折愈合中可以通过多种途径、多种机制对骨折愈合产生正面的效果,虽然其中的机制尚未完全阐明,但从各种实验结果来看,淫羊藿有明确的促进骨折愈合的作用。在骨折愈合的过程中(尤其是骨不连时)往往伴有局部的骨质疏松,因而 ICA 对骨质疏松的改善作用也同样可以改善骨折的愈合。无论是采取手术或非手术方式治疗骨不连,ICA 对骨组织的平衡、修复有着积极的作用。由于其同时具有抗骨质疏松的效果,推断 ICA 在治疗伴有骨质疏松症的骨不连时优势明显,前景广阔。虽然目前淫羊藿苷的使用还普遍局限于中药口服这一途径,然而随着研究的不断完善、剂型的改良和骨组织工程的发展,淫羊藿提取物有望在骨不连的治疗中发挥更广泛的作用,可以制成局部使用、缓慢释放的制剂配合自体骨或同种异体骨植入骨折端或骨坏死区域^[70],从而更高效、稳定地发挥作用,有助于更好地治疗缺损型骨不连。且生产成本和保存条件较目前常用的外源性细胞因子[如 BMPs、成纤维细胞生长因子(fibroblast growth factors, FGFs)、血小板生长因子(platelet-derived growth factor, PDGF)]更低,有望与目前临床上常用的外源性细胞因子产品并驾齐驱,但具体应用方法仍需要进一步研究。◆

参考文献

[1] WILDEMANN B, IGNATIUS A, LEUNG F, et al. Non-union bone fractures[J]. *Nature Reviews Disease Primers*, 2021, 7(1): 57.
[2] CLAES L. Improvement of clinical fracture healing—What can be learned from mechano-biological research?[J]. *Journal of Biomechanics*, 2021, 115: 110148.

[3] MARUYAMA M, RHEE C, UTSUNOMIYA T, et al. Modulation of the inflammatory response and bone healing[J]. *Frontiers in endocrinology (Lausanne)*, 2020, 11: 386.
[4] GEORGE M D, BAKER J F, LEONARD C E, et al. Risk of nonunion with nonselective NSAIDs, COX-2 inhibitors, and opioids[J]. *J Bone Joint Surg Am*, 2020, 102(14): 1230-1238.
[5] MICLAU K R, BRAZINA S A, BAHNEY C S, et al. Stimulating fracture healing in ischemic environments: does oxygen direct stem cell fate during fracture healing?[J]. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, 2017, 5(1): 45.
[6] EL-JAWHARI J J, KLEFTOURIS G, EL-SHERBINY Y, et al. Defective proliferation and osteogenic potential with altered immunoregulatory phenotype of native bone marrow-multipotential stromal cells in atrophic fracture non-union[J]. *Sci Rep*, 2019, 9(1): 17340.
[7] HELLWINKEL J E, MICLAU T, PROVENCHER M T, et al. The life of a fracture: Biologic progression, healing gone awry, and evaluation of union[J]. *J Bone Joint Surg Rev*, 2020, 8(8): e1900221.
[8] WAGNER J M, SHMITD S V, DADRAS M, et al. Inflammatory processes and elevated osteoclast activity chaperon atrophic non-union establishment in a murine model[J]. *J Transl Med*, 2019, 17(1): 416.
[9] PANTELI M, VUN J S H, POUNTOS I, et al. Biological and molecular profile of fracture non-union tissue: A systematic review and an update on current insights[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2022, 26(3): 601-623.
[10] WANG S Q, MA J R, ZENG Y Q, et al. Icariin, an up-and-coming bioactive compound against neurological diseases: Network pharmacology-based study and literature review[J]. *Drug Des Devel Ther*, 2021, 15(1): 3619-3641.
[11] HE C Y, ZE W, SHI J S. Pharmacological effects of icariin[J]. *Adv Pharmacol*, 2020, 87(1): 179-203.
[12] JIN J, HUA X, HUA X Y, et al. An outline for the pharmacological effect of icariin in the nervous system[J]. *European Journal of Pharmacology*, 2019, 842(1): 20-32.
[13] ZENG Y F, XIONG Y L, YANG T, et al. Icariin and its metabolites as potential protective phytochemicals against cardiovascular disease: From effects to molecular mechanisms[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 147(1): 112642.
[14] LI Z C, LI D D, CHEN R C, et al. Cell death regulation: A new way for natural products to treat osteoporosis[J]. *Pharmacological Research*, 2023, 187(1): 106635.
[15] 徐艳琴,蒋勇,黄华,等.淫羊藿属分类学研究:进展、问题与展望[J]. *广西植物*, 2020, 40(5): 601-617.
[16] ZHANG X L, TANG B L, WEN S J, et al. Advancements in the biotransformation and biosynthesis of the primary active flavonoids derived from Epimedium[J]. *Molecules*, 2023, 28(20): 7173.
[17] NIU Y J, LIN G T, PAN J C, et al. Deciphering the myth of icariin and synthetic derivatives in improving erectile function from a molecular biology perspective: A narrative review[J]. *Translational Andrology and Urology*, 2022, 11(7): 1007-1022.
[18] QIAN H Q, WU D C, LI C Y, et al. A systematic review of traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicity of Epimedium koreanum Nakai[J]. *J Ethnopharmacol*, 2024, 318(Pt B): 116957.
[19] 国家药典委员会. 中华人民共和国药典[S]. 2020版. 北京: 中国医药科技出版社, 2020: 340.
[20] LIN Y, CHEN W W, DING B, et al. Highly efficient bioconversion of icariin to icaritin by whole-cell catalysis[J]. *Microb Cell Fact*, 2023, 22(1): 64.
[21] CHEN X J, GUO B L, LI S P, et al. Simultaneous determination of 15 flavonoids in Epimedium using pressurized liquid extraction and high-performance liquid chromatography[J]. *Journal of Chromatography A*, 2007, 1163(1): 96-104.
[22] CHEN X J, JI H, ZHANG Q W, et al. A rapid method for simultaneous determination of 15 flavonoids in Epimedium using pressurized liquid extraction and ultra-performance liquid chromatography[J]. *J Pharm Biomed Anal*, 2008, 46(2): 226-

- 235.
- [23] GAO Y, SHI W, TU C, et al. Immunostimulatory activity and structure-activity relationship of epimedin B from *Epimedium brevicornu Maxim*[J]. *Front Pharmacol*, 2022, 13 (1): 1015846.
- [24] LIANG X X, HOU Z Q, XIE Y L, et al. Icarin promotes osteogenic differentiation of bone marrow stromal cells and prevents bone loss in OVX mice via activating autophagy[J]. *J Cell Biochem*, 2019, 120(8): 13121-13132.
- [25] ZHANG D W, ZHAO N, WAN C, et al. Icarin and icaraside II reciprocally stimulate osteogenesis and inhibit adipogenesis of multipotential stromal cells through ERK signaling[J]. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2021, 2021(1): 1-10.
- [26] 赵云鹏,刘培民,李东东. 淫羊藿苷对消化系统肿瘤作用及其机制研究进展[J]. *中华中医药学刊*, 2024, 42 (2): 98-102, 271..
- [27] KOVTUN A, BERGDOLT S, WIEGNER R, et al. The crucial role of neutrophil granulocytes in bone fracture healing[J]. *Eur Cell Mater*, 2016, 32(1): 152-162.
- [28] LOI F, CORDOVA LA, PAJARINEN J, et al. Inflammation, fracture and bone repair[J]. *Bone*, 2016, 86(1): 119-130.
- [29] BI Z Y, ZHANG W, YAN X Y. Anti-inflammatory and immunoregulatory effects of icaritin and icaritin[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2022, 151(1): 113180.
- [30] WANG H L, JIANG Q, FENG X H. Effect of Icarin on apoptosis and expression of Fas, Fas ligand, B cell lymphoma, and Bcl-2-associated X protein in CD4⁺ T lymphocytes from patients with ankylosing spondylitis[J]. *J Tradit Chin Med*, 2017, 37(2): 207-213.
- [31] CAO Y. Icarin alleviates MSU-induced rat GA models through NF-kappaB/NALP3 pathway[J]. *Cell Biochem Funct*, 2021, 39(3): 357-366.
- [32] CHEN H A, CHEN C M, GUAN S S, et al. The antifibrotic and anti-inflammatory effects of icaritin on the kidney in a unilateral ureteral obstruction mouse model[J]. *Phytomedicine*, 2019, 59(1): 152917.
- [33] TANG Y H, LI Y F, XIN D W, et al. Icarin alleviates osteoarthritis by regulating autophagy of chondrocytes by mediating PI3K/AKT/mTOR signaling[J]. *Bioengineered*, 2021, 12(1): 2984-2999.
- [34] CHEN Y, PAN X L, ZHAO J, et al. Icarin alleviates osteoarthritis through PI3K/Akt/mTOR/ULK1 signaling pathway[J]. *Eur J Med Res*, 2022, 27(1): 204.
- [35] 张庆宇,高福强,程立明,等. 淫羊藿苷对骨微血管内皮细胞自噬及外泌体产生的影响[J]. *中国修复重建外科杂志*, 2019, 33(5): 568-577.
- [36] 白晓君,刘艳,郝姗姗,等. 淫羊藿苷抑制氧化应激诱导主动脉血管平滑肌细胞钙化的机制研究[J]. *中国中药杂志*, 2021, 46(17): 4497-4503.
- [37] WANG F. Icarin protects vascular endothelial cells from oxidative stress through inhibiting endoplasmic reticulum stress[J]. *Journal of Integrative Medicine*, 2019, 17(3): 205-212.
- [38] WU F Y, JIA J, SONG H H, et al. Evaluation of osteogenesis and angiogenesis of icaritin loaded on micro/nano hybrid structured hydroxyapatite granules as a local drug delivery system for femoral defect repair[J]. *J Mater Chem B*, 2015, 3(24): 4871-4883.
- [39] HU Y W, LI H T, LIU K, et al. Protective effects of icaritin on human vascular endothelial cells induced by oxidized low-density lipoprotein via modulating caspase-3 and Bcl-2[J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(5): 6835-6839.
- [40] YU H C, YUE J A, WANG W G, et al. Icarin promotes angiogenesis in glucocorticoid-induced osteonecrosis of femoral heads : In vitro and in vivo studies[J]. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*, 2019, 23(11): 7320-7330.
- [41] LI X L, WEN Y J, SHENG L Y, et al. Icarin activates autophagy to trigger TGFβ1 upregulation and promote angiogenesis in EA. hy926 human vascular endothelial cells[J]. *Bioengineered*, 2022, 13(1): 164-177.
- [42] SUN S, TIAN X J, GUO Y H Y, et al. Icarin attenuates high glucose-induced apoptosis, oxidative stress, and inflammation in human umbilical venous endothelial cells[J]. *Planta Med*, 2019, 85(6): 473-482.
- [43] LEE C S, JEON O H, HAN S B, et al. Mesenchymal stem cells for enhanced healing of the medial collateral ligament of the knee joint[J]. *Medicina*, 2023, 59(4): 725.
- [44] YANG A F, YU C C, LU Q L, et al. Mechanism of action of icaritin in bone marrow mesenchymal stem cells[J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019(1): 5747298.
- [45] YAO X D, JING X Z, GUO J C, et al. Icarin protects bone marrow mesenchymal stem cells against iron overload induced dysfunction through mitochondrial fusion and fission, PI3K/AKT/mTOR and MAPK pathways[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2019, 10(1): 163.
- [46] ZHANG S C, FENG P B, MO G Y, et al. Icarin influences adipogenic differentiation of stem cells affected by osteoblast-osteoclast co-culture and clinical research adipogenic[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2017, 88(1): 436-442.
- [47] FAN J J, BI L, WU T, et al. A combined chitosan/nano-size hydroxyapatite system for the controlled release of icaritin[J]. *J Mater Sci Mater Med*, 2012, 23(2): 399-407.
- [48] LIU H R, XIONG Y Q, ZHU X F, et al. Icarin improves osteoporosis, inhibits the expression of PPARγ, C/EBPα, FABP4 mRNA, Nf-κB and jagged1 proteins, and increases Notch2 mRNA in ovariectomized rats[J]. *Experimental and Therapeutic Medicine*, 2017, 13(4): 1360-1368.
- [49] TENG J W, BIAN S S, KONG P, et al. Icarin triggers osteogenic differentiation of bone marrow stem cells by up-regulating miR-335-5p[J]. *Experimental Cell Research*, 2022, 414(2): 113085.
- [50] JIAO F, TANG W, WANG J, et al. Icarin promotes the repair of bone marrow mesenchymal stem cells in rabbit knee cartilage defects via the BMP/Smad pathway[J]. *Annals of Translational Medicine*, 2022, 10(12): 691.
- [51] GAO J L, XIANG S Y, WEI X, et al. Icarin promotes the osteogenesis of bone marrow mesenchymal stem cells through regulating sclerostin and activating the Wnt/beta-Catenin signaling pathway[J]. *Biomed Res Int*, 2021, 2021(1): 6666836.
- [52] JIAO F, TANG W, HUANG H, et al. Icarin promotes the migration of BMSCs in vitro and in vivo via the MAPK signaling pathway[J]. *Stem Cells International*, 2018, 2018(1): 2562105-2562109.
- [53] GARCIA-GARCIA P, RUIZ M, REYES R, et al. Smurf1 silencing using a LNA-ASOs/lipid nanoparticle system to promote bone regeneration[J]. *Stem Cells Transl Med*, 2019, 8(12): 1306-1317.
- [54] XIE L, LIU N, LIU Y H, et al. In vitro and in vivo osteogenesis induced by icaritin and bone morphogenetic protein-2 : A dynamic observation[J]. *Frontiers in Pharmacology*, 2020, 11(1): 1058.
- [55] CHEN M, CUI Y Z, LI H, et al. Icarin promotes the osteogenic action of BMP2 by activating the cAMP signaling pathway[J]. *Molecules*, 2019, 24(21): 3875.
- [56] HUANG Z F, WEI H, WANG X, et al. Icarin promotes osteogenic differentiation of BMSCs by upregulating BMAL1 expression via BMP signaling[J]. *Mol Med Rep*, 2020, 21(3): 1590-1596.
- [57] HUANG X W, WANG X P, ZHANG Y, et al. Absorption and utilisation of epimedin C and icaritin from *Epimedium herba*, and the regulatory mechanism via the BMP2/ Runx2 signalling pathway[J]. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 2019, 118(1): 109345.
- [58] ZHANG X Y, CHEN Y P, ZHANG C, et al. Effects of icaritin on the fracture healing in young and old rats and its mechanism[J]. *Pharmaceutical Biology*, 2021, 59(1): 1243-1253.
- [59] ZHANG X Y, CHEN Y P, ZHANG C, et al. Icarin accelerates fracture healing via activation of the WNT1/beta-catenin osteogenic signaling pathway[J]. *Curr Pharm Biotechnol*, 2020, 21(15): 1645-1653.

山柰酚抗乳腺癌作用机制研究进展

佟茜^{1,2,3}, 江晨^{1,2,3}, 马会园^{1,2,3}, 张莹^{1,2}

(1. 天津中医药大学第一附属医院, 天津 300381; 2. 国家中医针灸临床医学研究中心, 天津 300381;
3. 天津中医药大学, 天津 301617)

摘要: 国际癌症研究机构(IARC)统计显示,2020年全球乳腺癌新增病例超过230万例,已超过肺癌成为全球最常见的癌症,严重危害人类健康。山柰酚存在于许多蔬菜水果及中草药中,具有广泛的药理活性,包括抗肿瘤、抗炎、抗氧化、改善脑缺血、降糖、抗骨质疏松、抗菌、保护损伤组织、抗焦虑活性。越来越多的研究表明,山柰酚在抗乳腺癌方面表现出了巨大潜力,主要通过诱导乳腺癌细胞凋亡以及抑制乳腺癌细胞增殖、代谢及迁徙转移等途径来发挥抗乳腺癌作用。此外,还有研究表明山柰酚可通过逆转乳腺癌细胞耐药性来增强抗乳腺癌药物细胞毒性。山柰酚可通过多种途径来发挥抗乳腺癌作用,在临床抗乳腺癌治疗中具有广泛的应用前景。文章对近几年山柰酚抗乳腺癌作用机制的研究进展进行综述,以期期为研究开发山柰酚的抗乳腺癌作用和临床应用提供理论基础。

关键词: 山柰酚; 乳腺癌; 细胞增殖; 细胞凋亡; 作用机制

中图分类号: R285

文献标志码: A

文章编号: 1673-842X(2024)12-0067-05

Mechanism of Kaempferol Against Breast Cancer and Its Research Progress

TONG Qian^{1,2,3}, JIANG Chen^{1,2,3}, MA Huiyuan^{1,2,3}, ZHANG Ying^{1,2}

(1. First Teaching Hospital of Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 300381, China; 2. National Clinical Research Center for Chinese Medicine Acupuncture and Moxibustion, Tianjin 300381, China; 3. Tianjin University of Traditional Chinese Medicine, Tianjin 301617, China)

Abstract: According to the statistics of the International Agency for Research on Cancer (IARC), there are more than 2.3 million new cases of breast cancer in the world in 2020, which has surpassed lung cancer to become the most common cancer in the world, seriously endangering human health. Kaempferol exists in many vegetables, fruits and Chinese herbal medicine, and has a wide range of pharmacological activities, including anti-tumor, anti-inflammatory, anti-oxidation, improving cerebral ischemia, reducing blood sugar, anti-osteoporosis, antibacterial, protecting injured tissue, anti-anxiety activity. More and more studies have shown that Kaempferol shows great potential in anti-breast cancer, mainly by inducing breast cancer cell apoptosis and inhibiting breast cancer cell proliferation, metabolism and metastasis. In addition, studies have shown that Kaempferol can enhance the cytotoxicity of anti-breast cancer drugs by reversing the drug resistance of breast cancer cells. Kaempferol can exert its anti-breast cancer effect in many ways and has a

基金项目: 国家自然科学基金(82104553)

作者简介: 佟茜(2000-),女,河北承德人,硕士在读,研究方向:中医肿瘤学。

通讯作者: 张莹(1977-),女,天津人,主任医师,硕士研究生导师,研究方向:中西医结合肿瘤学。

- [60] TOBEIHA M, MOGHADASIAN H M, AMIN M, et al. RANKL/RANK/OPG pathway: A mechanism involved in exercise-induced bone remodeling[J]. *BioMed Research International*, 2020, 2020(1): 6910312.
- [61] YASUDA H. Discovery of the RANKL-RANK-OPG system[J]. *Journal of Bone and Mineral Metabolism*, 2021, 39(1): 2-11.
- [62] HSIEH T P, SHEU S Y, SUN J S, et al. Icaritin inhibits osteoclast differentiation and bone resorption by suppression of MAPKs/NF- κ B regulated HIF-1 α and PGE2 synthesis[J]. *Phytomedicine*, 2011, 18(2-3): 176-185.
- [63] XU Q. Icaritin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis via modulation of the NF- κ B and MAPK signaling pathways[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2019, 508(3): 902-906.
- [64] JI R F, WU D, LIU Q. Icaritin inhibits RANKL-induced osteoclastogenesis in RAW264.7 cells via inhibition of reactive oxygen species production by reducing the expression of NOX1 and NOX4[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2022, 600(1): 6-13.
- [65] KIM B, LEE K Y, PARK B. Icaritin abrogates osteoclast formation through the regulation of the RANKL-mediated TRAF6/NF- κ B/ERK signaling pathway in Raw264.7 cells[J]. *Phytomedicine*, 2018, 1(51): 181-190.
- [66] CHENG L Y, JIN X L, SHEN H, et al. Icaritin attenuates thioacetamide-induced bone loss via the RANKL-p38/ERK-NFAT signaling pathway[J]. *Mol Med Rep*, 2022, 25(4): 126.
- [67] ZHANG Y, HAN B, WEI Y, et al. Icaritin promotes fracture healing in ovariectomized rats[J]. *Medical Science Monitor*, 2020, 26(1): e924554.
- [68] WU Y Q, XIA L G, ZHOU Y N, et al. Icaritin induces osteogenic differentiation of bone mesenchymal stem cells in a MAPK-dependent manner[J]. *Cell Proliferation*, 2015, 48(3): 375-384.
- [69] WANG Z M, DING L, ZHANG S H, et al. Effects of icaritin on the regulation of the OPG-RANKL-RANK system are mediated through the MAPK pathways in IL-1 β -stimulated human SW1353 chondrosarcoma cells[J]. *Int J Mol Med*, 2014, 34(6): 1720-1726.
- [70] ZHANG W T, WANG N G, YANG M, et al. Periosteum and development of the tissue-engineered periosteum for guided bone regeneration[J]. *Journal of Orthopaedic Translation*, 2022, 33(1): 41-54.