

中药单体调控成骨相关信号通路治疗激素性股骨头坏死的研究进展

尚征亚¹, 曹林忠^{1,2}, 张翼³, 马成祥¹, 胡康一¹, 杨浩东¹, 孙金宁¹, 张勇杰¹, 杨小瑞¹

(1. 甘肃中医药大学, 兰州 730000;

2. 甘肃中医药大学附属医院, 兰州 730000;

3. 解放军总医院第八医学中心, 北京 100080)

[摘要] 激素性股骨头坏死是一种主要由糖皮质激素诱导的多种因素共同作用而造成的骨科常见疾病,其具有治愈难度大、愈后效果差等特点。而且其具体发病机制至今仍未明确。成骨相关信号通路对骨形成的影响至关重要,糖皮质激素诱导的成骨相关信号通路异常激活及转运所导致的骨髓间充质干细胞分化异常、骨代谢功能紊乱、成骨形成障碍等因素或是造成激素性股骨头坏死发生和发展的主要原因。骨骼的形成、重塑能力都离不开骨髓间充质干细胞的参与,其是一种拥有不断自我更新和分化能力的干细胞,更好地强化骨骼重塑能力关键就在于提高其成骨分化能力,并且这是抑制骨吸收,阻止破骨细胞分化的重点。传统中药对骨坏死的治疗在古时已有应用,《本草汇言》记载:“凡下焦之虚,非杜仲不补……足胫之酸,非杜仲不去;腰膝之痛,非杜仲不除……补肝益肾,诚为要药。”这表明古代医家早已开始运用杜仲补益肝肾,强健筋骨的功效对骨坏死进行有效治疗。随着国家支持中医药发展的力度加大,传统中医药在防治激素性股骨头坏死方面的研究不断增加,多项研究都发现中药通过影响靶向信号分子可以对骨髓间充质干细胞的分化产生积极的作用,促进成骨及骨缺损修复,进而对抗激素性股骨头坏死的发生及发展。中药调控成骨相关信号通路防治激素性股骨头坏死已成为当今研究的热点。现就中药单体通过调控成骨相关信号通路防治激素性股骨头坏死的研究进展做一综述,挖掘探究促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化、抑制破骨细胞分化、促进骨形成的机制,以期对中药治疗激素性股骨头坏死的更深层次研究提供参考。

[关键词] 中药单体; 调控; 激素性股骨头坏死; 研究进展

[中图分类号] R22;R242;R285;R96;R274.9 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1005-9903(2023)18-0229-12

[doi] 10.13422/j.cnki.syfjx.20231491

[网络出版地址] <https://link.cnki.net/urlid/11.3495.R.20221208.2153.001>

[网络出版日期] 2022-12-09 17:03:39

Active Components in Chinese Medicinal Herbs Regulate Osteogenic Signaling Pathway in Treatment of Steroid-induced Osteonecrosis of Femoral Head: A Review

SHANG Zhengya¹, CAO Linzhong^{1,2}, ZHANG Yi³, MA Chengxiang¹, HU Kangyi¹, YANG Haodong¹,
SUN Jinning¹, ZHANG Yongjie¹, YANG Xiaorui¹

(1. Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

2. Affiliated Hospital of Gansu University of Chinese Medicine, Lanzhou 730000, China;

3. The Eighth Medical Center of PLA General Hospital, Beijing 100080, China)

[Abstract] As a threat to human health, steroid-induced osteonecrosis of femur head is a common refractory orthopedic disease mainly caused by glucocorticoids, with poor prognosis and unclear pathogenesis. Osteogenesis-associated signaling pathways play an important role in bone formation. Glucocorticoid-induced abnormal activation and transport of these signaling pathways lead to abnormal differentiation of bone marrow

[收稿日期] 2022-11-06

[基金项目] 国家自然科学基金项目(81860859,82160915)

[第一作者] 尚征亚,在读硕士,从事中医药治疗骨伤疾病研究,E-mail:1240920471@qq.com

[通信作者] *曹林忠,教授、主任医师,从事中医药防治骨关节疾病的临床与基础研究,E-mail:clzh1@163.com

mesenchymal stem cells, dysfunction of bone metabolism, and osteogenesis disorders, which may be the main reasons for the occurrence and development of steroid-induced osteonecrosis of femur head. Bone formation and remodeling need the participation of bone marrow mesenchymal stem cells, which are stem cells characterized by continuous self-renewal and differentiation. The key to strengthening bone remodeling is to improve the osteogenic differentiation capacity, which is the key point to inhibit bone resorption and prevent bone marrow mesenchymal stem cells from differentiating into osteoclasts. Traditional Chinese medicine (TCM) has been used in the treatment of osteonecrosis in ancient times. It is recorded in the *Treasury of Words on Materia Medica* (《本草汇编》) that "The deficiency in the lower energizer cannot be tonified without Eucommiae Cortex. The soreness in lower legs cannot be alleviated without Eucommiae Cortex...The pain in the waist and knee cannot be relieved without Eucommiae Cortex...Tonifying liver and invigorating kidney, Eucommiae Cortex is an essential medicine." This indicates that ancient physicians have already begun to use the liver-tonifying, kidney-invigorating, and sinew-bone-strengthening effects of Eucommiae Cortex for the treatment of osteonecrosis. As the national support for the development of TCM strengthens, increasing studies have been conducted on the TCM prevention and treatment of steroid-induced osteonecrosis of femur head. Studies have suggested that Chinese medicinal herbs can exert a positive effect on the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells by affecting targeted signaling molecules, and promote osteogenesis and bone defect repair, thus combating the occurrence and development of steroid-induced osteonecrosis of femur head. The regulation of osteogenic signaling pathway by Chinese medicines to prevent steroid-induced osteonecrosis of femoral head has become a hot research topic. This article reviews the studies about the prevention and treatment of steroid-induced osteonecrosis of femur head with the active components in Chinese medicinal herbs by regulating osteogenic signaling pathways. We then explore the mechanism of the active components in promoting the differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells into osteoblasts and inhibiting their differentiation into osteoclasts to facilitate bone formation, aiming to provide a reference for the further study of treating steroid-induced osteonecrosis of femoral head with Chinese medicinal herbs.

[Keywords] active components in Chinese medicinal herbs; regulation; steroid-induced osteonecrosis of femoral head necrosis; review

股骨头坏死(NOFH)是骨科较为常见的一类疾病,大多数都是由于乙醇、糖皮质激素(GC)的滥用、外伤等病因引起的局部骨组织缺血性坏死,进而导致严重的继发性髋关节病变,更严重的需要手术治疗,其好发于中年人群^[1]。在导致非创伤性NOFH原因中,激素类药物的过分使用为最常见和最主要因素,激素性股骨头坏死(SANFH)在近年新发股骨坏死的占比也日益增高^[2]。GC在临床的应用十分普遍,是治疗自身免疫性疾病的常用药物,虽然效果明显,但不良反应严重。SANFH是长期不规范使用或短期大量使用GC导致股骨头结构改变、塌陷、关节功能障碍的病理过程,会导致股骨头血供受损,骨细胞和骨髓成分死亡,发生率为9%~40%^[3]。双侧SANFH发病率较高,如果不及时治疗,70%的患者会发生股骨头塌陷,80%~90%的患者最终需要进行2次甚至多次髋关节置换,不仅增加了患者的身心痛苦,而且严重影响患者的生活质量,并造成

很大的经济压力^[4]。虽然通过分析研究中药的主要有效成分进而探索成骨相关信号通路的靶向药物的研究已经大量进行,但是仍有大部分中药对防治SANFH具有显著效果却不知其具体分子机制,故探索中药对成骨相关信号通路的具体调控作用已成为当前骨科研究工作的重中之重。将来防治SANFH的研究就可以从中药调控成骨相关信号通路的具体机制入手,这不仅能将中药独具的特色及优越性展现出来,也将促进中医药事业的长足发展。现就中药单体通过调控成骨相关信号通路防治SANFH的研究进展做一综述,以期为临床对SANFH的靶向治疗提供方向及参考。

成骨和骨吸收作用是影响骨组织的主要活动,其决定了骨组织生命周期的长短。在骨形成的过程中起主要作用的便是成骨细胞(OB),骨基质的合成与质量便是由OB主导。另外,OB是由骨髓间充质干细胞(BMSCs)分化而来,其向OB分化的过程

是重塑骨骼的关键,而且这一过程被认为对保持人体体液中钙离子浓度及人体骨量十分重要;因此, BMSCs 可以视为是治疗骨科疾病关键的干细胞^[5-6]。GC 的过度使用会抑制 BMSCs 向 OB 分化,造成骨代谢紊乱并影响骨稳态,进而引发 SANFH^[7]。参与成骨过程中信号调控的信号通路众多且复杂。当前,对中药单体防治 SANFH 的研究主要围绕 Wnt/ β -连环蛋白(β -catenin)、磷脂肌醇 3-激酶(PI3K)/蛋白激酶 B(Akt)/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)、转化生长因子- β (TGF- β)/Sma 和 Mad 相关蛋白(Smad)、有丝分裂原活化蛋白激酶(MAPK)、Notch 信号通路而展开。探索出调控这些通路的药物,或可明确防治 SANFH 的有效途径。

1 中药单体调控 Wnt/ β -catenin 信号通路治疗 SANFH

1.1 Wnt/ β -catenin 信号通路 Wnt 信号通路是影响人体骨骼生长发育的一条重要的信号通路。在成骨过程中 Wnt/ β -catenin 信号通路起到了关键作用,促进 BMSCs 向 OB 分化并减少破骨细胞(OC)分化,很好地保持了骨代谢平衡。Wnt2、 β -catenin、核内转录因子 T 细胞因子/淋巴增强因子(TCF/LEF)、低密度脂蛋白相关蛋白 5(LRP5)、低密度脂蛋白相关蛋白 6(LRP6)、糖原合成酶激酶-3 β (GSK-3 β)共同组成了 Wnt/ β -catenin 信号通路。Wnt/ β -catenin 信号通路的异常激活是导致 SANFH 发生并改变其病理表现的关键因素^[8-9],所以调控 Wnt/ β -catenin 信号通路对 SANFH 的发生发展过程产生积极影响已是研究热点^[10]。Wnt/ β -catenin 信号通路对成骨的影响主要表现在促进 BMSCs 更新和向 OB 转化,阻止 OB 凋亡和 OC 的分化形成,提升骨量^[11]。

1.2 中药单体调控 Wnt/ β -catenin 信号通路

BMSCs 的正常分化被改变后会导致 SANFH 的发生并促进其发展。但是 Wnt/ β -catenin 信号通路的下游信号过氧化物酶体增殖物激活受体 γ (PPAR γ)却是抑制 BMSCs 分化的主要因素^[12]。人体脂肪的形成主要是通过 PPAR γ 的调节作用来影响的,GC 会诱导 PPAR γ 保持在一个高表达状态,这样就会造成 BMSCs 过度向脂肪细胞分化,导致成脂分化的异常,产生大量骨脂肪细胞,打破成骨和成脂分化之间的平衡状态;造成髓腔内大量脂肪堆积而使骨内压升高导致股骨头缺血引发坏死^[13-14]。有研究证实, β -catenin 会分散存在于细胞质中,对 OB 发育及骨代谢的平衡起到积极作用,但是 GSK-3 β 复合物会使其磷酸化,分解细胞质中的 β -catenin,减少其数

量并终止其作用^[15]。GC 使用的剂量与 Wnt/ β -catenin 信号通路的功能正常发挥呈负相关。大量 GC 进入人体后会将 β -catenin 进入细胞核的途径切断^[16],这将导致 β -catenin 的数量骤降引起 Wnt/ β -catenin 信号通路功能的丧失,继而加速了 SANFH 的发生及发展。中药淫羊藿最具代表性的成分淫羊藿苷属于黄酮苷类化合物,能上调 Wnt/ β -catenin 信号通路,对 BMSCs 向 OB 分化具有促进作用,同时还会阻止 OC 分化^[17-18]。有实验证实,大鼠在淫羊藿苷的干预作用下其成骨分化功能被增强,脂肪源性干细胞会大量增殖,并且在此作用干预下 BMSCs 的成脂分化功能被削弱,脂肪细胞数量明显下降^[19-20]。SHI 等^[21]在实验中证实兔早期 SANFH 在淫羊藿苷的干预下有明显改善迹象,主要表现在骨骼微结构的改善及骨细胞凋亡的降低。一项 ONFH 大鼠模型实验证实,在三七总皂苷的干预下,OC 活性及分化水平减弱,成骨作用及骨保护素水平增强,由此可见,三七总皂苷会使骨组织空腔骨陷窝发生率下降,起到抗 ONFH 的作用^[22]。陈杰等^[23]在实验中发现,三七总皂苷在激活 Wnt/ β -catenin 信号通路后使 SANFH 兔的血脂指标和炎症反应下降。表明了其对 SANFH 具有改善作用,对防治 SANFH 具有积极意义。一项 SANFH 兔模型实验证实,在经过骨碎补总黄酮干预下的模型兔血钙含量显著上升,血磷水平、空腔骨陷窝率有所下降,而且指标检测显示 OB 的增殖作用较之前明显提升,与之相反,OC 的活性被抑制,这些指标都表明骨碎补总黄酮对 SANFH 兔有一定的治疗效果^[24]。后来的一项体外研究实验得到了类似的结果,GSK-3 β 的表达经骨碎补总黄酮的干预作用后明显下降,而 Runt 相关转录因子 2(Runx2)、LRP5、 β -catenin 等表达都呈上升趋势^[25]。由此可见,Wnt/ β -catenin 信号通路在骨碎补总黄酮的作用下被激活并且提升了骨愈合的效率,延缓了 SANFH 的发展进程。具有抗炎和抗肿瘤作用的白藜芦醇葡萄糖苷是从传统中药虎杖根部提取的生物活性化合物^[26];而该化合物也被研究发现可以影响骨代谢过程^[27]。而经过另一项 BMSCs 的体外培养研究发现,在白藜芦醇葡萄糖苷的作用下,骨形态发生蛋白-2(BMP-2)-Wnt/ β -catenin 信号通路被激活,此时随着信号通路的激活成骨基因呈高表达状态,并促进 BMSCs 向 OB 分化,加速骨修复,以达到治疗 SANFH 的目的^[28]。有研究指出虫草素可以活化此前已经被抑制的 Wnt/ β -catenin 信号通路,使髓腔内

的 BMSCs 继续向 OB 分化, 促进骨修复及骨形成^[29]。由此可见, 虫草素可能是治疗 SANFH 的有效途径。促进骨形成, 提升骨密度, 改善骨骼微结构也是修复骨坏死的有效途径, 郑苏阳^[30]在其实验中发现, 随着蛇床子素干预剂量的增加, Wnt/ β -catenin 信号通路随之激活, Runx2、Wnt1 蛋白、 β -catenin 的表达也被上调, 并且促进成骨作用的增强, 起到了抗 SANFH 的效果。张贤等^[31]通过实验证实, 杜仲醇提取物能有效抑制 Wnt 抑制因子, 使其表达降低, 而上调 Wnt 受体 Frizzled(Fzd)2, Fzd3 和 β -catenin 的表达, 以此来促进 BMSCs 向 OB 转化。WENG 等^[32]的一项体外实验表明, 中药补骨脂的提取物补骨脂素, 能随剂量上升而抬高 LRP5、Wnt3a 及 β -catenin 的表达, 以此来激活 Wnt/ β -catenin 信号通路并促进人原代 OB 的分化, 增加成骨促进骨坏死的修复。李家等^[33]在实验中发现 Runx2、BMP-2、骨钙素、 β -catenin 等被 DKK 分泌蛋白 1(DDK1)抑制的成骨基因在经过续断皂苷 VI 的干预作用后, 其表达出现了明显上调, 并且 BMSCs 向 OB 分化及矿化作用也有显著提升, 这些结果可能是续断皂苷 VI 激活了 Wnt/ β -catenin 信号通路而造成的。在张占勇^[34]的观察实验中发现葛根的提取物葛根素降低了在 GC 诱导下的 BMSCs 的成脂分化, 这表明葛根素能通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路而抑制 BMSCs 的成脂分化达到抗 SANFH 的作用。大量的中药单体在实验中被发现可以通过激活 Wnt/ β -catenin 信号通路的方式, 来调控 BMSCs 的分化功能, 促进成骨, 维持骨代谢平衡, 保持骨稳态, 阻止或延缓 SANFH 的发生或发展进程。

2 中药单体调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路治疗 SANFH

2.1 PI3K/Akt/mTOR 信号通路 PI3K/Akt/mTOR 是生物体内可以接受细胞外多种信号刺激并调节细胞生物学活动的关键信号转导通路^[35]。具有催化亚基 P110 和调节亚基 p85 功能的异源二聚体构成了脂质激酶 PI3K, 这种脂质激酶被激活后导致其分裂为 IA 和 IB 两个亚型。激活后的 PI3K I 同时具备了类脂激酶和蛋白激酶的活性, 这使其在骨代谢和细胞膜转运、信号转导等过程里起到了不可或缺或调节作用^[36-37]。调节域、催化域和 PH 域共同组成了 PI3K 下游至关重要的活性信号靶点——Akt 蛋白, 而调节域具有将 Akt 磷酸化的功能。磷脂酰肌醇(4,5)二磷酸[PI(4,5)P₂]肌醇环 3 被已激活的

PI3K 的催化亚基 P110 位磷酸化, 导致其生成磷脂酰肌醇(3,4,5)三磷酸[PI(3,4,5)P₃]^[38], 进而导致原本为三级结构的 Akt 发生改变。作为 Akt 两个重要的磷酸化残基, Thr308 及 Ser473, 在 Akt 被第二信使的 PIP3 转运到质膜上后而得到充分暴露, 随即 3-磷脂酰肌醇依赖性激酶 2(PDK2)及 3-磷脂酰肌醇依赖性激酶 1(PDK1)将其磷酸化^[39], 而 Akt 也因此被完全激活, 发挥调节下游信号分子的作用^[40]。PI3K/Akt/mTOR 信号通路的主要蛋白 mTOR 有 2 种复合体 mTORC1 及 mTORC2, 他们之间结构相似但功能却不同。mTORC1 被激活后的 Akt 蛋白磷酸化, 继而磷酸化通路下游的效应分子, 即调节转录因子 EB、真核起始因子 4E、p70 核糖体 S6 蛋白激酶及自噬激酶 1 等蛋白的表达或磷酸化, 而蛋白质及核苷酸等物质的合成也受到其干预; 另一方面, 血清/GC 调节激酶、蛋白激酶 C 及 Akt 等物质的活性表达或磷酸化要受到 mTORC2 的干预调节, 继而影响细胞代谢、增殖、生长及自噬^[41-42]。

2.2 中药单体调控 PI3K/Akt/mTOR 信号通路 骨量的失衡在骨代谢过程中是造成骨质破坏的重要原因, 而 OB 的成骨能力降低及 OC 骨吸收能力的同时下降致使骨的正常代谢紊乱, 导致骨量失衡的发生^[43], 所以防治 SANFH 关键在于促进 OB 增生分化并减少其凋亡。OB 的加速分化可通过增强 Wnt/ β -catenin 信号通路与激活后的 PI3K/Akt 信号通路的关联, 使磷酸化的 β -catenin 降解, 并使其在细胞核内与转录因子相结合来实现^[44]。生物组织生存起到关键作用的胰岛素样生长因子-1(IGF-1)能够对细胞发挥活性、稳定的调节作用并与相关蛋白胰岛素存在高度同源性^[45]。PI3K/Akt 信号通路下游效应蛋白 mTORC1/核糖体蛋白 S6 激酶 1(S6K1)等与 IGF-1 存在重要关联, 并可在其诱导作用下被激活^[46]。有实验表明血清生长激素(GH)可通过 IGF-1 对骨量产生影响, 提升成骨的生成活性, 而且 GH/IGF-1 轴在骨质疏松的发生过程中起到非常关键的作用。IGF-1 和 GH 等生长因子在 PI3K/Akt 信号通路的影响下可以与其受体相结合, 促成 OB 加速分化, 对骨质疏松的发生起到良好的影响, 不过, 其详细作用靶点还有待进一步研究发掘^[47]。除此之外, BMSCs 的结构受到 PI3K/Akt 信号通路的调控以进一步影响骨吸收能力及 OC 的活性^[48]。实验表明 PI3K/Akt 通路下游 Akt 蛋白表达过程中有成骨分化参与其中, 且在 BMSCs 培养液中混入 PI3K 抑制剂后, 可加速 OB 向成骨分化矿化, 但该细胞的

增生数量却明显降低^[49],由此可见,分化及增生在一定条件下是可以同时存在的。NOFH的防治可以通过PI3K/Akt信号通路调节破骨微结构和活化下游的叉头框蛋白O4(FoxO4)、GSK-3 β 等效应因子的形式实现。在氧化应激条件下,PI3K/Akt/mTOR信号通路可以调控GSK-3 β 和FoxO等介导物质以降低二者氧化受损程度,不仅如此,在正常生理状态下的OC和OB的分化功能也能被该通路影响和调控^[50]。这些结果证实或可以通过激活PI3K/Akt/mTOR信号通路来调控OB的分化增殖以达到抗SANFH的目的。胱天蛋白酶(Caspase)家族、B细胞淋巴瘤-2(Bcl-2家族)、肿瘤坏死因子等凋亡家族因子能够调控骨细胞凋亡^[51]。XUE等^[52]的实验表明,GC诱导的OB凋亡在红景天苷激活PI3K/Akt信号通路以减少OB中Caspase-3的表达而减少;在此之外,还有实验表明,大蒜素或可成为未来临床用于防治SANFH的有效物质,GC诱导的剪切的(c)-Caspase-9, c-Caspase-3, Bcl-2及Bcl-2相关X蛋白(Bax)的表达异常可以通过大蒜素激活PI3K/Akt信号通路的方式而降低,进而对SANFH的发展起到积极影响^[53]。在曾锁林等^[54]的SANFH大鼠模型试验中被证实,葛根素通过激活PI3K/Akt信号通路,使被抑制的血管新生重新激活,并且通过这一影响促进了骨组织的再生,使坏死区域的血液循环及骨微结构恢复活性,以此来改善SANFH的发展进程。

3 中药单体调控TGF- β /Smad信号通路治疗SANFH

3.1 TGF- β /Smad信号通路 在成骨相关信号传导通路中,TGF- β 信号传导通路是较为重要且热门的研究对象,靶向其信号传导在临床上治疗潜力巨大^[55]。TGF- β 超家族是一个复杂且庞大的家族,有多达33种结构相关细胞因子将其组成,其中激活素、抑制素、BMP、转化生长因子是主要组成部分,除此之外还有其他亚家族等^[56]。TGF- β 信号传导通路下游主要的信号分子即是Smad蛋白^[57]。典型的Smad依赖性途径和MAPK途径即非典型Smad独立信号通路共同组成了TGF- β 信号传导通路。Smad4是TGF- β 信号传导最常见的介质之一,在骨吸收的耦合及骨形成与保持出生后正常骨稳态中不可或缺,Smad4是在典型的Smad依赖的TGF- β 信号传导通路中,Smad2和Smad3与Smad7竞争而产生的复合物。靶基因表达的触发是活化性受体Smad4和受体调节型Smad(R-Smad)R-Smad组成

的复合物在细胞核中与其他转录因子发生反应而完成的^[58]。BMP-2在骨缺损修复方面得到了广泛的应用,因为在BMP亚型中其是成骨诱导最强的一个类型^[59]。Runx2与BMP-2相互作用后可达到刺激OB基因表达的效果^[60]。Smad蛋白被胞外的BMP以激活激酶与受体的方式诱导磷酸化,随后骨钙素与Runx2等成骨基因的转录在活化的Smad的核易位影响下升高^[61]。另外,BMP信号可以通过调节 β -catenin提升其核易位速度,并诱导OB分化也在最近的实验中被证实^[62]。BMP达到促进骨再生的目的主要是依靠降低GSK-3 β 和积累 β -catenin用于激活Wnt/ β -catenin信号通路以及激活Smad通路的方式来实现的^[63]。

3.2 中药单体调控TGF- β /Smad信号通路 有许多科研成果都表明了NOFH与TGF- β /Smad信号通路之间所存在的紧密的关系,刺激TGF- β /Smad通路的信号转导,在提升碱性磷酸酶的活性,阻碍OB凋亡,同时提升成骨分化效率,刺激NOFH的骨再生及自我修复方面成效显著。有实验结果显示,NOFH的早期发生与TGF- β /Smad信号通路的异常密不可分^[64]。BAI等^[65]的实验研究发现,微小RNA(miRNA)-27a对SANFH的影响或可通过激活TGF- β /Smad7信号通路的方式实现。因此,TGF- β /Smad信号通路在调节骨代谢及成骨分化过程中起到重要作用,这可能对SANFH的发生发展起到积极影响。TAO等^[66]的实验研究表明,在非创伤性原因导致的NOFH成人患者的股骨头标本内发生了TGF- β_1 表达显著减少的情况,这或许可以证实,在NOFH的发生及发展过程中,存在异常的TGF- β /Smads信号通路的参与,其并以此为依据提出了要达到非创伤性NOFH在一些特定阶段内促进骨自我修复及改善骨损伤的目的,或可通过靶向过表达外源性引入甚至是直接内注射TGF- β_1 的手段来实现。YANG等^[67]的动物实验研究证实了传统中药女贞子及淫羊藿内含有的主要活性成分在提升Smad2~Smad4及TGF- β_1 的表达方面效果明显,这能够成功激活TGF- β_1 /Smad信号通路,并提升骨钙素及骨形成标志物碱性磷酸酶的血清水平,而且减少了骨吸收标志物抗酒石酸酸性磷酸酶的血清表达。这些结果很好的改变了骨组织结构、维持了骨代谢平衡,并增强了骨密度、改善了骨强度,最终改善了由于GC所导致的OB抑制及骨吸收,并且加快了成骨分化。除此之外一项关于淫羊藿苷的实验也取得了相同的结果,在对SANFH大鼠模型

的研究中发现,淫羊藿苷阻止了GC诱导的骨丢失,淫羊藿苷能对PPAR γ 介导的GC诱导途径产生抑制作用并以此来阻止脂肪的产生,而且提升了BMP-2/Runx2信号通路中的成骨水平,并且以此来增强骨修复功能,这成功改善了SANFH的发生和发展进程。由此可见,淫羊藿苷对防治SANFH起到了积极作用^[68]。川续断的主要活性成分为木通皂苷D,在张志达等^[69]的研究中,发现GC抑制了小鼠BMSCs向OB分化,但是在加入了木通皂苷D的干预之后,这种抑制作用有了明显的减弱,这可能与木通皂苷D调控TGF- β /Smad信号通路有关,具体机制或是靶向调控了骨钙蛋白和Runx2的表达,这表明木通皂苷D通过促进成骨分化的途径而达到改善SANFH的目的。有研究发现柚皮苷能通过调控Runx2信号通路来提高兔BMSCs的成骨分化与增殖能力,有效的阻止了ONFH的发展进程,有望成为临床治疗骨坏死的理想药物^[70]。综上所述,在现有的试验研究中证实了不止一种中药的主要活性成分能对TGF- β /Smad信号通路起到调控作用,但其中详细的作用机制尚未明确。不过,通过此类研究也发现激活TGF- β /Smad信号通路或可成为防治SANFH发生的有效途径。

4 中药单体调控MAPK信号通路治疗SANFH

4.1 MAPK信号通路 作为一组丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,MAPK广泛存在于多种哺乳动物的细胞中,MAPK能够受到多数外环境的影响并被激活,并且经由三级酶促级联反应的方式完成信号的转导工作,由此积极参与到细胞的分化、凋亡及生长等各种生理过程中去。通过3种激酶依次激活后,MAPK信号通路的信号转导才能实现,即丝裂原活化蛋白激酶激酶激酶(MAPKKK)经过磷酸化的方式先激活丝裂原活化蛋白激酶激酶(MAPKK),随后MAPK也因此进入磷酸化的阶段,最后在此前被活化的MAPK磷酸化才能最终激活下游多种靶基因并促进其表达^[71]。c-Jun氨基末端激酶(JNK)通路、细胞外信号调节蛋白激酶(ERK)通路和p38 MAPK通路共同构成了MAPK信号通路^[72]。ERK作为MAPK信号通路中被发现最早的信号通路,其共由ERK1、ERK2两种亚型组成,这2种亚型在OB中都存在表达,并且他们都是能被MEK1(MAP2K1)和MEK2(MAP2K2)所激活的^[73]。Brewster在1993年首次发现了p38,其共由p38 α 、p38 β 、p38 γ 、p38 δ 4种亚型组成,他们的激活主要是靠上游的丝裂原活化蛋白激酶激酶3(MKK3)、

MKK6及MAPK激酶来完成的,但是MKK3只能将p38 α 、p38 γ 、p38 δ 这3种亚型磷酸化,而与此不同的是所有亚型均可被MKK6所磷酸化^[74]。与p38不同,JNK信号通路只有3种亚型,分别是JNK1、JNK2、JNK3,JNK3的表达十分有限,主要存在于神经元中,但是另外两种亚型却能普遍表达。当处于外界刺激状态下时,MAPK会被激活并发生级联磷酸化,随后转入细胞核,对基因的表达造成影响,对细胞各个阶段起到调控作用^[75]。

4.2 中药单体调控MAPK信号通路 作为维持骨代谢动态平衡和促进骨骼发育不可或缺的条件,ERK信号通路不但在炎症反应、骨代谢过程中扮演了重要角色,而且对OB的分化、凋亡及增殖也有重要影响^[76]。在一项成人OB的体外培养实验中证实,葛根素具有促进骨形成并加快体外培养的OB的分化和增殖的作用。将碱性磷酸酶的表达活化和激活ERK1/2信号通路以刺激OB的细胞周期并提升钙沉积的速度,以致OB成熟分化并促进成骨是葛根素具体的作用机制^[77]。可以说NOFH是一种与炎性有关的疾患,且在其发生发展的前期阶段有软骨下骨及软骨的破坏及降解的情况存在的。在一项从NOFH患者的股骨头中分离出原代软骨细胞的体外实验表明,ERK1和ERK2能够在颗粒蛋白前体的作用下加快活化速度,并对胶原蛋白II及聚集蛋白聚糖的生成起到促进作用,并最终对NOFH区域退化软骨的代谢与合成起到改善作用,这表明ERK信号通路在抗NOFH的中发挥了积极影响^[78]。此外一项SANFH模型兔的试验研究表明,在SANFH发生后,骨细胞中的p38及JNK表达明显提高,而其中的ERK1、ERK2的表达却明显下降,但p38及JNK的表达在经过羟基红花黄色素A的作用后在一定程度上下调,ERK1、ERK2的水平反而较之前明显提升。此结果或可说明,羟基红花黄色素A能增强OB的分化和增殖并提升坏死区骨修复速度,对SANFH的治疗起到积极作用。然而这些结果都是通过羟基红花黄色素A对MAPK相关信号通路的抑制或者激活即影响p38、JNK、ERK的磷酸化水平实现的^[79]。因此可知在SANFH的发生发展过程中有MAPK信号通路参与其中。而在另一项关于大鼠BMSCs体外培养的实验表明,增强后的细胞增殖、成骨分化及黏附能力在无定形碳薄膜涂层的纯钛金属植入物表面被发现,碱性磷酸酶活性、成骨基因表达、钙结节及胶原分泌形成也显著提升。在经过更深一步探究后证实,碳涂层增强

成骨分化、BMSCs的黏附及增殖作用是通过时间依赖性提高表达谱ILK的表达且明显提升p38磷酸化的方式实现的。不过,加入p38抑制剂,BMSCs在纯钛金属植入物表面的成骨分化作用被明显降低,这更加能表明BMSCs在对纯钛金属植入物表面的成骨调节作用过程中ILK/p38信号传导发挥了显著影响^[80]。实验证实,在MAPK通路被miR-122-5p激活后,骨小梁体积及平均骨小梁板、股骨头密度都会有所增高,并能促进骨修复的发生,起到有效抵抗SANFH的作用^[81]。张亚军等^[82]的研究中发现葛根素通过激活ERK1/2和p38 MAPK信号通路,加快钙沉淀,增强碱性磷酸酶活性,并以此来促进骨形成。miRNA参与了BMSCs的特异性分化已经有研究可以证实,但其究竟如何通过调节信号通路来影响成骨的具体机制还有待进一步研究。

5 中药单体调控Notch信号通路治疗SANFH

5.1 Notch信号通路 1917年Morgan和其同事共同在突变的果蝇体内发现了Notch基因,由于Notch基因的缺失,会导致果蝇的翅膀边缘会发生损坏,所以这个基因便被命名为Notch。人体多个系统中均可以发现Notch基因的表达痕迹,并且Notch信号通路在心血管系统、中枢神经系统和骨骼系统中都存在显著的影响^[83]。在众多信号通路中,Notch信号通路算是十分保守的一条通路,共有4种Notch受体存在于哺乳动物中,即Notch1、Notch2、Notch3和Notch4。Hes1、Hes5及Hey等下游的靶基因在Notch受体与配体结合并经过水解酶切割裂解等化学修饰后便可被激活^[84]。可能受到不同分化阶段的影响,Notch信号通路可以双向调节OB的分化过程,这是影响骨代谢平衡的一条关键途径。成骨分化的能力在Notch1被激活,OC前体分化为OC的过程中受到抑制且骨保护素形成在这一整个过程完成后便会被增高^[85]。与此不同的是,Notch2与其配体的结合却会促进OC的生成^[86]。引起SANFH发生和发展的重要原因之一便是Notch信号通路所导致的骨重建失衡。有研究表明,Notch信号通路可能通过激活BMP/Smad信号通路,协调BMP而加快BMSCs向成骨分化^[87]。

5.2 中药单体调控Notch信号通路 有研究人员经过体外实验表明,淫羊藿苷激活Notch信号通路并加速BMSCs向OB分化的作用,是通过增强Jagged-1、CBF1、Noth1蛋白表达能力并提升Runx2mRNA和Hes1的表达来实现的^[88]。另外有实验证实,Notch信号通路或可通过激活调节

BMP/Smad信号通路增强BMSCs的成骨分化能力并在骨形态发生蛋白引起的BMSCs向OB分化过程中对骨重建和骨代谢发挥显著的影响^[89]。有实验表明,柚皮苷在体外BMSCs向成骨分化过程中起到了有效的刺激作用,而柚皮苷是传统中药骨碎补的一种活性化合物,具有增强成骨作用并降低骨吸收的作用^[90]。YU等^[91]的研究表明,柚皮苷能通过增强碱性磷酸化活性、提升矿化能力、降低PPAR γ 2基因转录水平及升高成骨基因mRNA和激活Notch信号通路的方式提升大鼠BMSCs的成骨分化能力。但是当加入 γ 分泌酶抑制剂(DAPT)后这种情况出现了改变,DAPT使此前柚皮苷诱导的结果发生了反向变化,不仅成骨基因转录、碱性磷酸酶活性、钙沉积的水平下降,还有PPAR γ 2基因的下调也被打断,而且Notch1的表达也出现了下调的情况。在此之外,Notch信号通路可能由于OB的分化阶段不同而对OB的分化存在着双向调节作用。经实验证实,Notch信号通路在成骨分化的晚期会阻止OB的成熟和进一步分化,但在其早期阶段却会加快成骨,可能正是通过此种方式Notch信号通路才会发挥出其提升BMSCs增殖能力,激发成骨分化潜能,并维持BMSCs的活性的作用^[92]。此前有研究人员在对SANFH家兔模型研究时发现,在Notch信号通路的组成基因Notch1~Notch4的共同影响下导致了SANFH的发生,但在这些基因中,Notch1和Notch3与SANFH的发生成负相关关系,表现在Notch1和Notch3的活性被抑制的同时BMSCs的成骨分化及增殖也会出现被抑制的现象,并由此最终引发了SANFH。综上所述,在SANFH的发生发展过程之中,Notch信号通路发挥了维持骨代谢平衡、影响OB分化等关键作用。可以说该信号通路是影响SANFH的至关重要的信号通路,其发挥的作用不容忽视,但目前无论国外还是国内对其研究都存在着严重不足的情况,且调节Notch信号通路的因素十分复杂,这也加大了对其研究的难度,而他们对成骨影响的具体作用机制尚未有明确定论,还需进一步研究探讨。中药单体抗SANFH的机制见表1。

6 小结与展望

除上述这些成骨相关通路以外,还有一些信号通路也对防治SANFH起到积极作用,如Kelch样ECH相关蛋白1(Keap1)/核因子E₂相关因子2(Nrf2)/抗氧化反应元件(ARE)信号通路,通过调节该通路可以发挥抗体氧化应激作用,减轻因氧化应激所引起的损伤^[93]。衡科^[94]在其研究中发现中药

表1 中药单体抗SANFH的机制

Table 1 Anti-SANFH mechanism of traditional Chinese medicine monomers

中药单体	主要成分	作用机制	参考文献
淫羊藿	淫羊藿苷	激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 促进 BMSCs 向 OB 分化	[16-20]
		激活 TGF- β_1 /Smad 信号通路, 提升 BMP-2/Runx2 信号通路中的成骨水平	[66-67]
		激活 Notch 信号通路, 加速 BMSCs 向 OB 分化	[87]
骨碎补	骨碎补总黄酮	激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 上调 LRP5、 β -catenin、Runx2 表达, 降低 GSK-3 β 表达	[23-24]
	柚皮苷	调控 Runx2 信号通路, 提高 BMSCs 成骨分化与增殖能力	[69]
		激活 Notch 信号通路, 增强碱性磷酸化活性、提升矿化能力、降低 PPAR γ 2 基因转录水平	[89-90]
续断	续断皂苷 VI	激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 上调 Runx2、BMP-2、骨钙素、 β -catenin 水平	[32]
川续断	木通皂苷 D	调控 TGF- β /Smad 信号通路, 上调骨钙蛋白、Runx2 表达	[68]
葛根	葛根素	激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 抑制 BMSCs 成脂分化	[33]
		激活 PI3K/Akt 信号通路, 复苏血管内皮生长因子(VEGF)	[53]
		激活 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路, 促进 OB 分化和增殖	[76, 81]
三七	三七总皂苷	激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 降低血脂指标和炎症反应	[21-22]
虎杖	白藜芦醇葡萄糖苷	激活 BMP-2-Wnt/ β -catenin 信号通路, 促进 BMSCs 向 OB 分化	[25-27]
虫草	虫草素	激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 促进 BMSCs 向 OB 分化	[28]
蛇床子	蛇床子素	激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 上调 Runx2、Wnt1、 β -catenin 表达	[29]
杜仲	杜仲醇提取物	激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 上调 Fzd2、Fzd3、 β -catenin 表达	[30]
补骨脂	补骨脂素	激活 Wnt/ β -catenin 信号通路, 上调 LRP5、Wnt3a、 β -catenin 表达	[31]
红景天	红景天苷	激活 PI3K/Akt 信号通路, 下调 OB 中 Caspase-3 表达	[51]
大蒜	大蒜素	激活 PI3K/Akt 信号通路, 下调 c-Caspase-9、c-Caspase-3、Bcl-2、Bax 表达	[52]

人参的提取物人参皂苷通过激活 Keap1/Nrf2/ARE 信号通路的方式能降低大鼠 SANFH 的氧化应激损伤, 进而对 SANFH 起到改善作用。Nrf2/血红素氧合酶-1(HO-1)信号通路对 SANFH 的影响也与之类似^[95], 单浩杰^[96]发现黄芪甲苷 IV 通过对 SANFH 模型兔的干预, 在激活 Akt 通路的同时, 对 Nrf2/HO-1 通路也起到了调节作用, 并由此来阻碍氧化应激反应, 达到预防大鼠 SANFH 的目的。除此之外, Nrf2/ARE 信号通路不但可以调节细胞抗氧化应激水平, 对细胞的炎症因子、增殖分化等也起到了显著作用^[97]。詹吉恒^[98]在其实验中证实虎杖苷在激活并上调 Nrf2/ARE 信号通路后促进了 BMSCs 分化, 这或可对抗 SANFH 的发生和发展产生积极影响。SANFH 发病机制本就复杂且尚未明确, 参与其中的信号通路及其之间的相互关联和作用机制也是复杂多变, 因此对中药单体调控一条甚至多条信号通路的深入探究是十分有必要的, 在今后的研究中, 还要从分子生物层面探讨中药在防治 SANFH 方面所发挥的机制, 为临床提供参考及依据。

当前 SANFH 的临床治疗主要以髋关节置换等手术方式为主, 这不仅给患者带来了巨大的生理痛

苦, 也造成了极大的心理压力及经济负担。成骨相关信号通路通过促进 BMSCs 更新、OB 增殖、诱导 OB 形成、抑制 OB 凋亡等途径能够对 SANFH 产生积极的影响。虽然现阶段的临床应用尚不广泛, 但随着对分子生物技术研究的不断深入, 成骨相关通路对 SANFH 的防治将会获得巨大研究进展, 希望在未来的实验研究中能找到更多有效的途径对临床治疗 SANFH 提供更多治疗手段。

[参考文献]

- [1] HUANG J M, BAO Y, XIANG W, et al. Icariin regulates the bidirectional differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells through canonical Wnt signaling pathway [J]. Evid Based Complement Alternat Med, 2017, 2017: 8085325.
- [2] 郭明峻, 曹林忠, 宋敏, 等. 干细胞治疗股骨头坏死 [J]. 中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志, 2019, 12(3): 303-310.
- [3] LUO P, GAO F, HAN J, et al. The role of autophagy in steroid necrosis of the femoral head: A comprehensive research review [J]. Int Orthop, 2018, 42(7): 1747-1753.
- [4] TANG C, CHEN L, GU W, et al. Cyclosporin A

- enhances the ability of trophoblasts to displace the activated human umbilical vein endothelial cell monolayers [J]. *Int J Clin Exp Pathol*, 2013, 6(11): 2441-2450.
- [5] DELANOIS R E, ETCHESON J I, SODHI N, et al. Biologic therapies for the treatment of knee osteoarthritis [J]. *J Arthroplasty*, 2019, 34(4): 801-813.
- [6] ZHOU W, LIN J, ZHAO K, et al. Single-cell profiles and clinically useful properties of human mesenchymal stem cells of adipose and bone marrow origin [J]. *Am J Sports Med*, 2019, 47(7): 1722-1733.
- [7] HAO C, YANG S, XU W, et al. MiR-708 promotes steroid-induced osteonecrosis of femoral head, suppresses osteogenic differentiation by targeting SMAD3 [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 22599.
- [8] LONG H, SUN B, CHENG L, et al. miR-139-5p Represses BMSC osteogenesis via targeting Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *DNA Cell Biol*, 2017, 36(8): 715-724.
- [9] SINDHAVAJIVA P R, SASTRAVAHA P, ARKSORNNUKIT M, et al. Purinergic 2X7 receptor activation regulates Wnt signaling in human mandibular-derived osteoblasts [J]. *Arch Oral Biol*, 2017, 81: 167-174.
- [10] LI T, ZHU J, WANG X, et al. Long non-coding RNA lncTCF7 activates the Wnt/ β -catenin pathway to promote metastasis and invasion in colorectal cancer [J]. *Oncol Lett*, 2017, 14(6): 7384-7390.
- [11] PEI J, FAN L, NAN K, et al. Excessive Activation of TLR4/NF- κ B interactively suppresses the canonical Wnt/ β -catenin pathway and induces SANFH in SD rats [J]. *Sci Rep*, 2017, 7(1): 11928.
- [12] WANG X L, WANG N, ZHENG L Z, et al. Phytoestrogenic molecule desmethylcaritin suppressed adipogenesis via Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Eur J Pharmacol*, 2013, 714(1/3): 254-260.
- [13] YUAN N, LI J, LI M, et al. BADGE, a synthetic antagonist for PPAR γ , prevents steroid-related osteonecrosis in a rabbit model [J]. *BMC Musculoskelet Disord*, 2018, 19(1): 129.
- [14] YU Z, FAN L, LI J, et al. Lithium prevents rat steroid-related osteonecrosis of the femoral head by β -catenin activation [J]. *Endocrine*, 2016, 52(2): 380-390.
- [15] WANG W J, CHEN K, WANG J, et al. Effects of ICAT silencing in Wnt signaling pathway and NSC67657 induced cell differentiation of HL-60 cells [J]. *Chin J Hematol*, 2017, 38(11): 972-976.
- [16] XIE D, ZHENG G Z, XIE P, et al. Antitumor activity of resveratrol against human osteosarcoma cells: A key role of Cx43 and Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Oncotarget*, 2017, 8(67): 111419-111432.
- [17] WANG Z, WANG D, YANG D, et al. The effect of icariin on bone metabolism and its potential clinical application [J]. *Osteoporos Int*, 2018, 29(3): 535-544.
- [18] YANG A, YU C, LU Q, et al. Mechanism of action of icariin in bone marrow mesenchymal stem cells [J]. *Stem Cells Int*, 2019, 2019: 5747298.
- [19] LIU H, XIONG Y, ZHU X, et al. Icariin improves osteoporosis, inhibits the expression of PPAR γ , C/EBP α , FABP4 mRNA, N1ICD and jagged1 proteins, and increases Notch2 mRNA in ovariectomized rats [J]. *Exp Ther Med*, 2017, 13(4): 1360-1368.
- [20] YE Y, JING X, LI N, et al. Icariin promotes proliferation and osteogenic differentiation of rat adipose-derived stem cells by activating the RhoA-TAZ signaling pathway [J]. *Biomed Pharmacother*, 2017, 88: 384-394.
- [21] SHI L, MAO T, LUO P, et al. Effect of icariin on early steroid-induced osteonecrosis of the femoral head in rabbits [J]. *CJRRS*, 2020, 34(2): 206-212.
- [22] 方妹晨, 邹季, 汪伟, 等. 三七总皂苷对股骨头坏死大鼠股骨头成骨作用影响的实验研究 [J]. *中国中医骨伤科杂志*, 2020, 28(6): 6-9, 15.
- [23] 陈杰, 张堃, 孔令俊, 等. 三七总皂苷通过调控 Wnt/ β -catenin 通路减轻家兔股骨头坏死 [J]. *中药药理与临床*, 2019, 35(4): 95-99.
- [24] 李慧英, 孟东方, 阮志磊. 骨碎补总黄酮对激素性股骨头坏死血钙、血磷及空骨陷窝率的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2016, 31(12): 5352-5354.
- [25] 李晋玉, 俞兴, 姜俊杰, 等. 骨碎补总黄酮联合纳米骨材料促进 MC3T3-E1 细胞的增殖分化 [J]. *中国组织工程研究*, 2020, 24(7): 1030-1036.
- [26] JIAO Y, WU Y, DU D. Polydatin inhibits cell proliferation, invasion and migration, and induces cell apoptosis in hepatocellular carcinoma [J]. *Braz J Med Biol Res*, 2018, 51(4): e6867.
- [27] SHEN Y S, CHEN X J, WURI S N, et al. Polydatin improves osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cells by stimulating TAZ expression via BMP2-Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Stem Cell Res Ther*, 2020, 11(1): 204.
- [28] CHEN X J, SHEN Y S, HE M C, et al. Polydatin promotes the osteogenic differentiation of human bone mesenchymal stem cells by activating the BMP2-Wnt/ β -catenin signaling pathway [J]. *Biomed*

- Pharmacother, 2019, 112: 108746.
- [29] CHEN Y X, ZHU D Y, XU Z L, et al. The protective effect of cordycepin on alcohol-induced osteonecrosis of the femoral head[J]. *Cell Physiol Biochem*, 2017, 42(6): 2391-2403.
- [30] 郑苏阳. 基于内质网应激与 Wnt/ β -catenin 信号通路研究蛇床子素对成骨细胞增殖与分化的影响及机制[D]. 南京: 南京中医药大学, 2017.
- [31] 张贤, 朱丽华, 钱晓伟, 等. 杜仲醇提取物诱导骨髓间充质干细胞成骨分化中的 Wnt 信号途径[J]. *中国组织工程研究*, 2012, 16(45): 8520-8523.
- [32] WENG Z B, GAO Q Q, WANG F, et al. Positive skeletal effect of two ingredients of *Psoralea corylifolia* L. on estrogen deficiency-induced osteoporosis and the possible mechanisms of action [J]. *Mol Cell Endocrinol*, 2015, 417: 103-113.
- [33] 李家, 林晓晟, 王雅冰, 等. 续断皂苷 VI 对小鼠骨髓基质干细胞成骨分化的影响[J]. *口腔颌面修复学杂志*, 2017, 18(1): 28-32.
- [34] 张占勇. 葛根提取物对激素诱导骨髓间充质干细胞 Wnt/ β -catenin 信号通路的调节作用[D]. 福州: 福建中医药大学, 2013.
- [35] CHIO C C, LIN M T, CHANG C P. Microglial activation as a compelling target for treating acute traumatic brain injury [J]. *Curr Med Chem*, 2015, 22(6): 759-770.
- [36] VANHAESEBROECK B, WHITEHEAD M A, PIÑEIRO R. Molecules in medicine mini-review: Isoforms of PI3K in biology and disease [J]. *J Mol Med (Berl)*, 2016, 94(1): 5-11.
- [37] RISSO G, BLAUSTEIN M, POZZI B, et al. Akt/PKB: One kinase, many modifications [J]. *Biochem J*, 2015, 468(2): 203-214.
- [38] CONCHE C, SAUER K. Uncovering the PI3Ksome: Phosphoinositide 3-kinases and counteracting PTEN form a signaling complex with intrinsic regulatory properties [J]. *Mol Cell Biol*, 2014, 34(18): 3356-3358.
- [39] HERSCHBEIN L, LIESVELD J L. Dueling for dual inhibition: Means to enhance effectiveness of PI3K/Akt/mTOR inhibitors in AML [J]. *Blood Rev*, 2018, 32(3): 235-248.
- [40] SIMPSON D R, MELL L K, COHEN E E. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck [J]. *Oral Oncol*, 2015, 51(4): 291-298.
- [41] HUANG S. mTOR signaling in metabolism and cancer [J]. *Cells*, 2020, 9(10): 2278.
- [42] DUAN Y, HAYBAECK J, YANG Z. Therapeutic potential of PI3K/Akt/mTOR pathway in gastrointestinal stromal tumors: Rationale and progress [J]. *Cancers (Basel)*, 2020, 12(10): 2972.
- [43] 王子江, 向川. 骨质疏松症与骨关节炎的相关性研究新进展 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2014, 20(3): 310-314.
- [44] SANTOS A, BAKKER A D, ZANDIEH-DOULABI B, et al. Early activation of the beta-catenin pathway in osteocytes is mediated by nitric oxide, phosphatidylinositol-3 kinase/Akt, and focal adhesion kinase [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2010, 391(1): 364-369.
- [45] VASSILAKOS G, BARTON E R. Insulin-like growth factor I regulation and its actions in skeletal muscle [J]. *Compr Physiol*, 2018, 9(1): 413-438.
- [46] GU Y X, DU J, SI M S, et al. The roles of PI3K/Akt signaling pathway in regulating MC3T3-E1 preosteoblast proliferation and differentiation on SLA and SLActive titanium surfaces [J]. *J Biomed Mater Res A*, 2013, 101(3): 748-754.
- [47] 陈小香, 邓伟民, 魏秋实, 等. 从 GH/IGF-1 轴与 PI3K/Akt 通路探讨老年骨质疏松症的发病机制 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(11): 1412-1415.
- [48] 王雪鹏, 李茂强, 边振宇, 等. PI3K/Akt 信号通路在骨髓间充质干细胞增殖及成骨分化调控中的作用 [J]. *中华骨质疏松和骨矿盐疾病杂志*, 2014(3): 250-257.
- [49] 陈亚辉, 龚忠勤, 崔燎. PI3K/Akt 信号通路在骨质疏松病理过程中的作用 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2015, 21(3): 356-360.
- [50] LIANG D, XIANG L, YANG M, et al. ZnT7 can protect MC3T3-E1 cells from oxidative stress-induced apoptosis via PI3K/Akt and MAPK/ERK signaling pathways [J]. *Cell Signal*, 2013, 25(5): 1126-1135.
- [51] 黎金焕, 陈跃平. 骨细胞凋亡在酒精性股骨头缺血性坏死中的作用 [J]. *中国组织工程研究*, 2016, 20(15): 2241-2247.
- [52] XUE X H, FENG Z H, LI Z X, et al. Salidroside inhibits steroid-induced avascular necrosis of the femoral head via the PI3K/Akt signaling pathway: *In vitro* and *in vivo* studies [J]. *Mol Med Rep*, 2018, 17(3): 3751-3757.
- [53] ZHAN J, YAN Z, ZHAO M, et al. Allicin inhibits osteoblast apoptosis and steroid-induced necrosis of femoral head progression by activating the PI3K/Akt pathway [J]. *Food Funct*, 2020, 11(9): 7830-7841.
- [54] 曾锁林, 施能兵, 刘昇. 葛根素对激素性股骨头坏死大鼠骨组织及 PI3K/Akt 信号转导通路的影响 [J]. *蚌*

- 埠医学院学报, 2019, 44(11): 1441-1444.
- [55] DAVID C J, MASSAGUÉ J. Contextual determinants of TGF- β action in development, immunity and cancer [J]. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 2018, 19(7): 419-435.
- [56] HINCK A P, MUELLER T D, SPRINGER T A. Structural biology and evolution of the TGF- β family [J]. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2016, 8(12): a022103.
- [57] ANTEBI Y E, LINTON J M, KLUMPE H, et al. Combinatorial signal perception in the BMP pathway [J]. *Cell*, 2017, 170(6): 1184-1196.
- [58] TAN X, WENG T, ZHANG J, et al. Smad4 is required for maintaining normal murine postnatal bone homeostasis [J]. *J Cell Sci*, 2007, 120(Pt 13): 2162-2170.
- [59] JAVED A, AFZAL F, BAE J S, et al. Specific residues of RUNX2 are obligatory for formation of BMP2-induced RUNX2-SMAD complex to promote osteoblast differentiation [J]. *Cells Tissues Organs*, 2009, 189(1/4): 133-137.
- [60] PHIMPHILAI M, ZHAO Z, BOULES H, et al. BMP signaling is required for RUNX2-dependent induction of the osteoblast phenotype [J]. *J Bone Miner Res*, 2006, 21(4): 637-646.
- [61] SALAZAR V S, OHTE S, CAPELO L P, et al. Specification of osteoblast cell fate by canonical Wnt signaling requires Bmp2 [J]. *Development*, 2016, 143(23): 4352-4367.
- [62] FUENTEALBA L C, EIVERS E, IKEDA A, et al. Integrating patterning signals: Wnt/GSK3 regulates the duration of the BMP/Smad1 signal [J]. *Cell*, 2007, 131(5): 980-993.
- [63] QIAN C, ZHU C, YU W, et al. Bone morphogenetic protein 2 promotes osteogenesis of bone marrow stromal cells in type 2 diabetic rats via the Wnt signaling pathway [J]. *Int J Biochem Cell Biol*, 2016, 80: 143-153.
- [64] FANG S H, CHEN L, CHEN H H, et al. MiR-15b ameliorates SONFH by targeting Smad7 and inhibiting osteogenic differentiation of BMSCs [J]. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*, 2019, 23(22): 9761-9771.
- [65] BAI Y, LIU Y, JIN S, et al. Expression of microRNA27a in a rat model of osteonecrosis of the femoral head and its association with TGF β /Smad7 signalling in osteoblasts [J]. *Int J Mol Med*, 2019, 43(2): 850-860.
- [66] TAO J, DONG B, YANG L X, et al. TGF- β_1 expression in adults with non-traumatic osteonecrosis of the femoral head [J]. *Mol Med Rep*, 2017, 16(6): 9539-9544.
- [67] YANG Y, NIAN H, TANG X, et al. Effects of the combined Herba Epimedii and *Fructus Ligustri Lucidi* on bone turnover and TGF- β_1 /Smads pathway in GIOP rats [J]. *J Ethnopharmacol*, 2017, 201: 91-99.
- [68] HUANG Z, CHENG C, CAO B, et al. Icaritin protects against glucocorticoid-induced osteonecrosis of the femoral head in rats [J]. *Cell Physiol Biochem*, 2018, 47(2): 694-706.
- [69] 张志达, 沈耿杨, 任辉, 等. 木通皂苷D促进糖皮质激素环境下小鼠骨髓间充质干细胞成骨分化 [J]. *中国骨质疏松杂志*, 2020, 26(4): 529-533.
- [70] 宁宇, 刘想忠, 汪伟, 等. 柚皮苷通过 Runx2 信号通路促进 MSCs 成骨分化的实验研究 [J]. *湖北中医药大学学报*, 2019, 21(1): 9-14.
- [71] ARTHUR J S, LEY S C. Mitogen-activated protein kinases in innate immunity [J]. *Nat Rev Immunol*, 2013, 13(9): 679-692.
- [72] SU B, KARIN M. Mitogen-activated protein kinase cascades and regulation of gene expression [J]. *Curr Opin Immunol*, 1996, 8(3): 402-411.
- [73] GREENBLATT M B, SHIM J H, GLIMCHER L H. Mitogen-activated protein kinase pathways in osteoblasts [J]. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2013, 29: 63-79.
- [74] THOUVEREY C, CAVERZASIO J. The p38 α MAPK positively regulates osteoblast function and postnatal bone acquisition [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2012, 69(18): 3115-3125.
- [75] BOUTROS T, CHEVET E, METRAKOS P. Mitogen-activated protein (MAP) kinase/MAP kinase phosphatase regulation: Roles in cell growth, death, and cancer [J]. *Pharmacol Rev*, 2008, 60(3): 261-310.
- [76] KIM J M, YANG Y S, PARK K H, et al. The ERK MAPK pathway is essential for skeletal development and homeostasis [J]. *Int J Mol Sci*, 2019, 20(8): 1803.
- [77] 钟海波, 郭祥, 黄琳惠. 葛根素通过 ERK1/2 和 p38 MAPK 信号通路刺激成骨分化和骨形成的机制 [J]. *中国比较医学杂志*, 2019, 29(2): 78-83.
- [78] HAN Y, SI M, ZHAO Y, et al. Progranulin protects against osteonecrosis of the femoral head by activating ERK1/2 pathway [J]. *Inflammation*, 2017, 40(3): 946-955.
- [79] 齐振熙, 万甜, 吴敏瑞, 等. 羟基红花黄色素A不同给药方式对激素性股骨头缺血坏死模兔 ERK1/2、JNK 和 p38 蛋白表达的影响 [J]. *中华中医药杂志*, 2014, 29(9): 2927-2930.
- [80] YUE G, SONG W, XU S, et al. Role of ILK/p38

- pathway in mediating the enhanced osteogenic differentiation of bone marrow mesenchymal stem cells on amorphous carbon coating[J]. *Biomater Sci*, 2019,7(3):975-984.
- [81] LIAO W, NING Y, XU H J, et al. BMSC-derived exosomes carrying microRNA-122-5p promote proliferation of osteoblasts in osteonecrosis of the femoral head[J]. *Clin Sci (Lond)*, 2019, 133(18): 1955-1975.
- [82] 张亚军,陈金洪,王勇,等. 葛根素通过细胞外信号调节激酶1/2和p38丝裂原活化蛋白激酶信号通路刺激成骨分化和骨形成的机制[J]. *中华实验外科杂志*, 2019,36(5):973.
- [83] PENTON A L, LEONARD L D, SPINNER N B. Notch signaling in human development and disease [J]. *Semin Cell Dev Biol*, 2012, 23(4):450-457.
- [84] ARTAVANIS-TSAKONAS S, RAND M D, LAKE R J. Notch signaling: Cell fate control and signal integration in development [J]. *Science*, 1999, 284(5415):770-776.
- [85] CARREIRA A C, LOJUDICE F H, HALCSIK E, et al. Bone morphogenetic proteins: Facts, challenges, and future perspectives [J]. *J Dent Res*, 2014, 93(4): 335-345.
- [86] FUKUSHIMA H, NAKAO A, OKAMOTO F, et al. The association of Notch2 and NF-kappaB accelerates RANKL-induced osteoclastogenesis [J]. *Mol Cell Biol*, 2008, 28(20):6402-6412.
- [87] VIALE-BOURONCLE S, GOSAU M, MORSCZECK C. NOTCH1 signaling regulates the BMP2/DLX-3 directed osteogenic differentiation of dental follicle cells [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2014, 443(2):500-504.
- [88] 邓宇,陈廖斌. 淫羊藿苷通过激活 Notch 信号通路促进骨髓间充质干细胞向成骨细胞分化的实验研究 [J]. *中医学报*, 2017, 32(12):2393-2398, 2403.
- [89] VIALE-BOURONCLE S, GOSAU M, MORSCZECK C. Laminin regulates the osteogenic differentiation of dental follicle cells via integrin- $\alpha 2/-\beta 1$ and the activation of the FAK/ERK signaling pathway [J]. *Cell Tissue Res*, 2014, 357(1):345-354.
- [90] LI N, JIANG Y, WOOLEY P H, et al. Naringin promotes osteoblast differentiation and effectively reverses ovariectomy-associated osteoporosis [J]. *J Orthop Sci*, 2013, 18(3):478-485.
- [91] YU G Y, ZHENG G Z, CHANG B, et al. Naringin stimulates osteogenic differentiation of rat bone marrow stromal cells via activation of the Notch signaling pathway [J]. *Stem Cells Int*, 2016, 2016: 7130653.
- [92] ZANOTTI S, CANALIS E. Notch signaling and the skeleton [J]. *Endocr Rev*, 2016, 37(3):223-253.
- [93] ZHANG J, WANG X, VIKASH V, et al. ROS and ROS-mediated cellular signaling [J]. *Oxid Med Cell Longev*, 2016, 2016:4350965.
- [94] 衡科. Rg₁抑制氧化应激预防激素性股骨头坏死的实验研究[D]. 南京:南京医科大学, 2018.
- [95] 吴克亮. 基于 Nrf2/HO-1/NF- κ B 信号通路探讨滋肾健骨方防治骨质疏松的作用机制[D]. 广州:广州中医药大学, 2021.
- [96] 单浩杰. 黄芪甲苷 IV 调控 Akt 通路预防激素性股骨头坏死[D]. 上海:上海交通大学, 2020.
- [97] BELLEZZA I, GIAMBANCO I, MINELLI A, et al. Nrf2-Keap1 signaling in oxidative and reductive stress [J]. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res*, 2018, 1865(5):721-733.
- [98] 詹吉恒. 虎杖苷上调 Nrf2/ARE 促进神经分化在骨髓干细胞移植治疗髓损伤中的应用[D]. 广州:广州中医药大学, 2020.

[责任编辑 王鑫]